

최 종  
연구보고서

CarMV 저항성 형질전환카네이션 품종개발

Development of CarMV Disease Resistance  
Carnation by Transgenic Technology

연구기관  
대구가톨릭대학교

농 립 부

# 최 종 보 고 서

190mm×268mm

2003년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 CarMV 저항성 형질전환  
카네이션 품종개발의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 7부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관 : 대구가톨릭대학교

총괄연구책임자 : 유 순 남 (인)

주관연구기관장 : 서 경 돈 직인

농 립 부 장 관 귀 하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “CarMV 저항성 형질전환카네이션 품종개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 대구가톨릭대학교

총괄연구책임자 유 순 남

협동연구기관명 : 영 남 대 학 교

협동연구책임자 장 무 응

# 요 약 문

## I. 제 목

CarMV 저항성 형질전환카네이션 품종개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 가. 연구개발의 목적

1. 형질전환에 의한 CarMV 저항성 카네이션 육성
2. Carnation Virus 검정

### 나. 연구개발의 필요성

- 1) 카네이션은 영양번식을 하는 식물이므로 바이러스에 감염되면 다음 세대에 계속 발생하게 되므로, 바이러스 저항성 형질전환 카네이션 품종개발이 필요하다.
- 2) 국내의 중요한 화훼작물중의 하나인 카네이션은 주로 CarMV등에 의한 바이러스 감염으로 그 생산이 크게 감소됨 (20~50%). 따라서 항바이러스성식물체 개발이 시급히 요구됨
- 3) 교잡육종에 의한 바이러스 내성도입은 multigene 도입에 의한 horizontal resistance 로 육종에 어려움이 있음
- 4) 최근 형질전환기술을 토대로, 항바이러스성 작물이 많이 연구되고 있으며, 특히 바이러스 유전자를 이용하여 작물에 바이러스 저항성을 도입하는 경우 이미 많은



작물에서 성공사례가 입증되었음. 따라서 이러한 방법의 적용으로 바이러스 저항성 카네이션의 개발이 필요함

- 5) 연구개발과정을 통하여 축적되는 형질전환체계 확립기술을 적용하여 새로운 형질을 가진 식물체를 개발하는데 기여할 것임
- 6) 식물 바이러스 병에 있어서 병원 바이러스의 신속하고 정확한 진단은 매우 중요하다. 따라서 카네이션 바이러스 진단체계확립이 필요하다.
- 7) 현재 전세계적으로 카네이션(*Dianthus caryophyllus*)에 발생하는 바이러스는 약 20여종이 보고되어 있다. 카네이션은 주로 영양번식에 의존하여 번식되어 왔으므로 이들 서로 다른 바이러스 속들이 세대를 거듭하여 복합감염과 축적이 되어있다. 이러한 카네이션 바이러스 축적으로 인해 현재 전세계에서 그 피해가 갈수록 심각한 실정이다. 카네이션 바이러스 피해를 줄이기 위하여 이들 바이러스의 특성에 관한 기초적인 연구가 반드시 필요하나, 한국에서는 카네이션에 발생하는 바이러스의 기초조사가 거의 없는 실정이다. 따라서 국내에 재배되고 있는 카네이션에 발생하는 바이러스의 분리 동정 및 피해양상의 조사가 필요하다.
- 8) 카네이션 바이러스 방제법이 확립되면 바이러스 피해를 줄여 농민의 소득원 확보와 자긍심이 향상된다. 바이러스병의 가장 효율적인 방제법은 바이러스저항성 형질전환카네이션 품종개발이 가장 안전한 예방법이므로 필요하다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. CarMV 저항성 형질전환카네이션 품종개발

##### 1) Kanamycin 선발 형질전환체 확충

- Carnation 품종에 CarMV CP gene 형질전환체 확충
- Carnation 품종에 CarRSV CP gene 형질전환체 확충
- Carnation 품종에 ToMV MP gene 형질전환체 확충

##### 2) 기내형질전환체 검정

- 형질전환체의 PCR 분석
- 형질전환체의 Southern blot 분석
- 형질전환체의 Western blot 분석 : CP 유전자 발현여부 조사

##### 3) 형질전환체 생장점배양 후 virus 검정

- 생장점 배양
- RIPA 검정
- RT-PCR 검정

##### 4) 조기강건형질전환체 생산을 위한 기내증식

##### 5) 발근배지개선, 형질전환식물체순화 및 온실재배

- 형질전환체의 발근배지의 조성을 달리하여 조건확립
- 포장검정을 위한 형질전환체 포트이식
- 포장검정을 위한 형질전환체 화분정식

##### 6) 형질전환체의 bioassay로 virus 저항성의 강도검정

##### 7) Bioassay 검정에 positive한 계통의 기내대량증식

##### 8) 교배육종

## 2. Carnation Virus 검정

### 1) 카네이션 품종에 감염되는 바이러스 분리·동정 및 특성연구

- 카네이션 바이러스의 피해 상황
- 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰
- 생물학적 검정

### 2) 바이러스 정제 및 항혈청 생산

#### (1) CarMV의 정제 및 항혈청 생산

- CarMV의 증식
- CarMV 정제
- CarMV 항혈청 제작
  - Agar double gel diffusion test
  - ELISA test

#### (2) CarRSV의 정제 및 항혈청 생산

- CarRSV의 증식
- 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰
- CarRSV 정제
- CarRSV 항혈청 제작
  - ELISA test
  - Rapid immunofilter paper assay(RIPA)

### 3) Virus 진단체계 확립

- RT-PCR 검정
- IC-RT-PCR 검정

### 4) Virus 염기서열분석

- 한국에서 재배되는 카네이션과 백합에서 분리된 CarMV CP gene 분석
- 한국, 일본, 중국에서 재배되는 카네이션에서 분리된 CarMV CP gene 분석
- CarRSV의 CP gene 분석

### 5) 카네이션 재배지역 감염률 조사

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 가. 연구개발 결과

#### 1. CarMV 저항성 형질전환카네이션 품종개발

##### 1) Kanamycin 선발 형질전환체 확충

- (1) Carnation 품종에 CarMV CP gene 형질전환체 확충 : 30계통
- (2) Carnation 품종에 CarRSV CP gene 형질전환체 확충 : 41계통
- (3) Carnation 품종에 ToMV MP gene 형질전환체 확충 : 40계통

##### 2) 기내형질전환체 검정

- (1) 형질전환체의 PCR 분석 : 153개체
  - ① CarMV CP gene의 PCR검정 : 56개체
  - ② CarRSV CP gene 형질전환체의 PCR 검정 : 45개체
  - ③ ToMV MP gene 형질전환체의 PCR 검정 : 52개체
- (2) 형질전환체의 Southern blot 분석 : 86개체(NTPII 56개체, CP 30개체)
- (3) 형질전환체의 Western blot 분석 : 80계통/124개체

##### 3) 형질전환체 생장점배양 후 virus 검정

- (1) 생장점 배양 : 58계통/194개체
- (2) RIPA 검정 : 113계통/276개체
  - ① CarMV 검정 : 47계통/172개체 → CarMV 무명주 : 62 개체
  - ② CarRSV 검정 : 66계통/104개체 → CarRSV 무명주 : 104 개체
- (3) RT-PCR 검정 : 306개체
  - ① CarMV 검정 : 195개체 → CarMV 무명주 : 82 개체
  - ② CarRSV 검정 : 111개체 → CarRSV 무명주 : 111 개체

- 4) 조기강건형질전환체 생산을 위한 기내증식 : 90계통/793개체  
(1)CarMV CP 형질전환체 기내증식 : 28계통 234개체  
(2)CarRSV CP 형질전환체 기내증식 : 30계통 295개체  
(3)ToMV MP (PT30) 형질전환체 기내증식 : 32계통 264개체
- 5) 발근배지개선, 형질전환식물체순화 및 온실재배 : 48계통/95개체  
(1)CarMV CP 형질전환체 : 16계통 33개체  
(2)CarRSV CP 형질전환체 : 16계통 28개체  
(3)ToMV MP 형질전환체 : 16계통 34개체
- 6) 형질전환체의 bioassay
- 7) 카네이션 품종간 교배육종  
93 교배조합 / 331 花 수정  
→ 12 교배조합 / 91 花 수정에서 → 492 종자 채취

## 2. Carnation Virus 검정

### 1) 카네이션 품종에 감염되는 바이러스 분리·동정 및 특성연구

- ① 카네이션 바이러스의 피해 상황
- ② 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰
- ③ 생물학적 검정

### 2) 바이러스 정제 및 항혈청 생산

#### (1) CarMV의 정제 및 항혈청 생산

- ④ CarMV의 증식
- ⑤ CarMV 정제
- ⑥ CarMV 항혈청 제작
  - Agar double gel diffusion test
  - ELISA test

#### (2) CarRSV의 정제 및 항혈청 생산

- ⑦ CarRSV의 증식
- ⑧ 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰
- ⑨ CarRSV 정제
- ⑩ CarRSV 항혈청 제작
  - ELISA test
  - Rapid immunofilter paper assay(RIPA)

### 3) virus 진단체계 확립

- ⑪ Primer 제작
- ⑫ RT-PCR
- ⑬ IC-RT-PCR 검정
- ⑭ Rapid immunofilter paper assay(RIPA)
- ⑮ Ds-RNA extraction and electrophoresis

#### 4) Virus 염기서열분석

- ⑩ 한국에서 재배되는 카네이션과 백합에서 분리된 CarMV CP gene 분석
- ⑪ 한국, 일본, 중국에서 재배되는 카네이션에서 분리된 CarMV CP gene 분석
  - 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰
  - 바이러스의 증식
  - 바이러스 부분 순화
  - 바이러스의 RNA 정제
  - RT-PCR에 의한 바이러스 CP gene의 증폭
  - CP gene 분석
- ⑫ CarRSV의 CP gene 분석

#### 5) 카네이션 재배지역 감염률 조사

#### 6) 대구가톨릭대학교와 협동연구 지원현황

- ⑬ RT-PCR에 의한 바이러스 검정
- ⑭ RIPA에 의한 바이러스 검정
- ⑮ 바이러스 증식된 잎을 제공

#### 7) 과제 수행 중 연구 활동

나. 연구성과활용에 대한 건의

- 1) 바이러스 유전자의 확보를 통하여 같은 바이러스가 감염하는 다른 작물에도 적용할 수 있을 것이며, 또 바이러스 유전자 조작기술 확립은 다른 바이러스 유전자의 분리 및 조작을 용이하게 할 수 있을 것으로 사료된다.
- 2) 카네이션의 각종조직배양기술 및 형질전환체계확립은 카네이션에 기타형질의 도입을 가능케 하는 파급효과를 주어 카네이션의 품질개량을 가속화 할 것이다.
- 3) 신규 바이러스 저항성유전자의 분리 및 기술확립은 유용작물의 복합 바이러스내성 개발에 적용할 수 있을 것이다.
- 4) 국내의 다른 연구팀들이 유사한 연구를 수행한다면 동일작물의 경우 직접 사용이 가능하며 타작물에서의 응용가능성도 높다고 판단된다.
- 5) 본 연구에서 개발된 항virus성 카네이션계통은 생물검정이 끝난 다음, 새로운 교잡육종의 재료로 이용이 가능하다.



# SUMMARY

## I. Title

1. Development for Viral Disease Resistance Carnation  
by Transgenic Technology

## II. Objective and Significance of Research

### A. Objective

1. To generate multi-viral disease resistant carnation
2. To test virus infections in carnation

### B. Significance

- 1) Since carnation is a plant by vegetative propagation, it is necessary to develop for viral disease resistance carnation in order to prevent further infection to the plant.
- 2) Viral disease causes a major damage in carnation, up to 30% decrease in productivity has been reported.
- 3) It is difficult to generate viral resistance by the classic plant breeding methodology because viral resistance is widely associated with undesirable characteristics as they can be polygenic in nature.

- 4) The approach to introduce viral gene in crop plants in order to Therefore, one believes that this approach can be successfully applied to develop viral resistance in carnation.
- 5) Accumulation of techniques for gene manipulation and transformation should help to yield new transgenic plants with agronomically important traits.
- 6) It is very important to diagnose accurate and fast to determine pathogenic viral infection in plant diseases. Thus, it is also necessary to establish a diagnosis system for carnation viral infection.
- 7) Recently, 20 species of carnation (*Dianthus caryophyllus*) viruses were reported in world-wide. Since the carnation is propagated vegetatively, many different carnation viruses were appeared because of multiple infection and successive generation by generation during cultivation. This kind of carnation virus accumulation usually gives bad effects on carnation business world-wide. It is also necessary to study on the characteristics of the viruses at the basic level in order to reduce economic loss by the carnation viruses. However, there is no basic viral research occurred in the carnation plant in Korea right now. Therefore, it is necessary to investigate the viruses of the cultivating carnation in aspects of virus isolation, characterization and damage from the viral infection.
- 8) As a result, to develop the viral disease resistance carnation will improve the farmer's income and self-fulfillment by reducing damage from viral infection of the carnation. The most effective method for preventing viral infection, is to develop the viral resistance carnation retrospectively and is known to be the most secured prevention method.

### III. The Scope and Content of the Research

#### 1. Development for viral disease carnation by transgenic technology

##### 1) To obtain Kanamycin selective transformant

- To obtain CarMV CP gene transgenic for carnation cultivar
- To obtain CarRSV CP gene transgenic for carnation cultivar
- To obtain ToMV MP gene transgenic for carnation cultivar

##### 2) Assays for in vitro transformant

- PCR analysis for transformant
- Southern blot analysis of the transformants : 86 plants(NPTII 56 plants and CP 30 plants)
- Western blot analysis of the transformants : 80 lines/124 plants

##### 3) Virus assays of the virus-free meristem culture for the transformants

- Meristem culture : 58 lines/194 plants
- RIPA(Rapid Immunofilter Paper Assay)
- RT-PCR Assay

##### 4) In vitro micro propagation for healthy transformant production

##### 5) Improvement of rooting media and growth in pot (total 48 lines/95 plants)

##### 6) Virus resistance bioassay

##### 7) Carnation cultivars micro propagative for crossing combination

## 2. Assays for Carnation virus

### 1) Virus isolation, identification and characteristic of carnation infected virus

(1) damage situation of carnation virus

(2) morphological observation of Transmission Electron Microscope

(3) Bioassay

### 2) Virus purification and antiserum production

(1) CarMV purification and antiserum production

• CarMV propagation

• CarMV purification

• CarMV antiserum production

-Agar double gel diffusion test

-ELISA test

(2) CarRSV purification and antiserum production

• CarRSV propagation

• morphological observation of Transmission Electron Microscope

• CarRSV purification

• CarRSV antiserum production

-ELISA test

-Rapid immunofilter paper assay(RIPA)

### 3. Virus diagnosis

• RT-PCR inspection

• IC-RT-PCR inspection

### 4. Virus sequence analysis

(1) CarMV CP gene analysis separated carnation and lily cultivated in the Korea

(2) CarMV CP gene analysis separated in carnation cultivated in Korea, Japan and China

(3) CarRSV CP gene analysis

### 5. infected rate of carnation cultivated region

## IV. Results and Application

### A. Results

#### 1. Development for viral disease carnation by transgenic technology

##### 1) To obtain Kanamycin selective transformant

- (1) To obtain CarMV CP gene transgenic for carnation cultivar (30 lines)
- (2) To obtain CarRSV CP gene transgenic for carnation cultivar (41 lines)
- (3) To obtain ToMV MP gene transgenic for carnation cultivar (40 lines)

##### 2) Assays for in vitro transformant

- (1) PCR analysis for transformant (153 plants)
  - ① PCR assay of CarMV CP gene transformants : 56 plants
  - ② PCR assay of CarRSV CP gene transformants : 45 plants
  - ③ PCR assay of ToMV MP gene transformants : 52 plants
- (2) Southern blot analysis of the transformants : 86 plants (NPTII 56 plants and CP 30 plants)
- (3) Western blot analysis of the transformants : 80 lines/124 plants

##### 3) Virus assays of the virus-free meristem culture for the transformants

- (1) Meristem culture : 58 lines/194 plants
- (2) RIPA (Rapid Immunofilter Paper Assay) : 113 lines/276 plants
  - ① CarMV test : 47 lines/172 plants → virus CarMV free : 62 plants
  - ② CarRSV test : 66 lines/104 plants → all CarRSV virus free : 104 plants
- (3) RT-PCR Assay : 306 plants
  - ① CarMV test : 195 plants → virus CarMV free : 82 plants
  - ② CarRSV test : 111 plants → all CarRSV virus free : 111 plants

4) In vitro micropropagation for healthy transformant production  
: 90 lines/793 plants

(1)CarMV CP : 28 lines/234 plants

(2)CarRSV CP : 30 lines/295 plants

(3)ToMV MP : 32 lines/264 plants

5) Improvement of rooting media and growth in pot : 48 lines/95 plants

(1)CarMV CP : 16 lines/33 plants

(2)CarRSV CP : 16 lines/28 plants

(3)ToMV MP : 16 lines/34 plants

6) Virus resistance bioassay

7) Carnation cultivars for crossing combination :

93 cross combination (331 flowers) tested,

→ 12 cross combination (91 flowers) succeeded,

→ 492 seeds were obtained.

## 2. Assays for Carnation virus

### 1) Virus isolation, identification and characteristic of carnation infected virus

- ① damage situation of carnation virus
- ② morphological observation of Transmission Electron Microscope
- ③ Bioassay

### 2) Virus purification and antiserum production

#### (1) CarMV purification and antiserum production

- ④ CarMV propagation
- ⑤ CarMV purification
- ⑥ CarMV antiserum production
  - Agar double gel diffusion test
  - ELISA test

#### (2) CarRSV purification and antiserum production

- ⑦ CarRSV propagation
- ⑧ morphological observation of Transmission Electron Microscope
- ⑨ CarRSV purification
- ⑩ CarRSV antiserum production
  - ELISA test
  - Rapid immunofilter paper assay(RIPA)

### 3) Virus diagnosis

#### (1) RT-PCR inspection

- ⑪ Primer design
- ⑫ RT-PCR
- ⑬ IC-RT-PCR inspection
- ⑭ Rapid immunofilter paper assay(RIPA)
- ⑮ Ds-RNA extraction and electrophoresis

4) Virus sequence analysis

⑩CarMV CP gene analysis separated carnation and lily cultivated in the Korea

⑪CarMV CP gene analysis separated in carnation cultivated in Korea, Japan and China

- morphological observation of Transmission Electron Microscope
- virus propagation
- virus purification
- virus RNA extraction
- virus CP gene amplification of RT-PCR
- CP gene analysis

⑫CarRSV CP gene analysis

5) infected rate of carnation cultivated region

6) the support present condition of Daegu catholic university joint research

⑬virus inspection of RT-PCR

⑭virus inspection of RIPA

⑮virus propagation offer

7) investigation activity during subject attendance



## B. Application and suggestion

- 1) The viral genes cloned into plant expression vector can be used to introduce viral resistance into other plants that are infected with the same virus. The establishment of technology necessary for genetic manipulation of virus genome will facilitate manipulation of other plant viral genome.
- 2) Through the establishment of regeneration and transformation system, it is now possible to introduce other useful agronomic traits into carnation.
- 3) The development of new technology to introduce viral disease resistance can be applied to provide broad spectrum virus resistance to other agronomically important crops.
- 4) The regeneration and transformation systems developed in this study are very useful ones enough for other researchers to apply in their studies.
- 5) Lines of cultivars developed for carnation anti-viral expression in this study can be applied as patents for cross-breeding.

# CONTENTS

Heading .....	1
Summary in Korean .....	2
Summary in English .....	11
Contents in English .....	20
Contents in Korean .....	21
Text .....	22
Chapter 1. Summary of research and development .....	22
Chapter 2. Current status of technical development in nation and foreign countries .....	25
Chapter 3. Contents and results of research and development achievement .....	26
I. Development for viral disease carnation by transgenic technology .....	26
1) To obtain Kanamycin selective transformant .....	29
2) Assays for in vitro transformant .....	32
3) Virus assays of the virus-free meristem culture for the transformants .....	48
4) In vitro micro propagation for healthy transformant production .....	59
5) Improvement of rooting media and growth in pot (total 48 lines/95 plants) .....	64
6) Virus resistance bioassay .....	68
7) Carnation cultivars micro propagative for crossing combination .....	71
II. Assays for Carnation virus .....	77
1) Virus isolation, identification and characteristic of carnation .....	79
infected virus	
2) Virus purification and antiserum production .....	84
3) Virus diagnosis .....	93
4) Virus sequence analysis .....	99
5) Infected rate of carnation cultivated region .....	110
Chapter 4. Achievement of objectives and contribution to associated area .....	126
Chapter 5. Plan of application of research and development results .....	128
Chapter 6. References .....	129

## 목 차

제출문 .....	1
요약문 .....	2
Summary .....	11
Contents .....	20
목차 .....	21
본문 .....	22
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	26
제1절 CarMV 저항성 형질전환카네이션 품종개발 .....	26
1. Kanamycin 선발 형질전환체 확충 .....	29
2. 기내형질전환체 검정 .....	32
3. 형질전환체 성장집배양 후 virus 검정 .....	48
4. 조기강건형질전환체 생산을 위한 기내증식 .....	59
5. 발근배지개선 및 포트재배 .....	64
6. 형질전환체의 bioassay로 virus 저항성의 검정 .....	68
7. 교배육종 .....	71
제2절 Carnation Virus 검정 .....	77
1. 카네이션 품종에 감염되는 바이러스 분리·동정 및 특성연구 .....	79
2. 바이러스 정제 및 항혈청 생산 .....	84
3. Virus 진단체계 확립 .....	93
4. Virus 염기서열분석 .....	99
5. 카네이션 재배지역 감염률 조사 .....	110
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	126
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	128
제 6 장 참고문헌 .....	129

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 가. 연구개발의 목적

형질전환에 의한 CarMV 저항성 카네이션 육성과 Carnation Virus 검정에 있다.

한국의 국내 화훼시장은 2000년 화훼재배현황 농림부자료에 따르면, 현재 총생산액이 6,649억원으로 절화류가 45.3%(3,012억원), 분화류가 43% (2,685억원), 관상수가 9%(585억원), 기타 약 2.8%(187억원)이다. 생산액 점유비율이 높은 절화의 종류로는 매년 차이는 있지만, 장미(1270억원), 국화(561억원), 백합(281억원), 안개초(196억원), 카네이션(162억원), 거베라(153억원) 순이며, 이러한 비율은 선진국도 비슷하여 앞으로도 이러한 추세가 계속 될 것으로 추측된다. 총 수입현황은 253억원에서 난류가 152억원, 글라디올러스가 5억원, 카네이션 4억원, 장미 5천만원, 그 외 기타 88억원이다. 수출은 총376억원, 장미가 134억원, 국화 61억원, 백합 56억원, 난 42억원, 선인장 36억원으로써, 장미, 국화 백합은 수출이 수입보다 높으며, 카네이션은 주로 묘주를 수입에만 의존하고, 거의 수출되지 않는 상태이므로, 수입묘의 자급자족과 수출을 위한 국제 경쟁력을 확보하는 것이 절실히 요구된다.

외국에서 묘주를 수입할 경우 두 가지 큰 문제가 있는데, 첫째는 삼수묘로 삼수할 동안 바이러스에 감염되기 쉽다는 것. 이럴 경우 수출용상품으로서의 가치가 상실된다. 둘째는 화란이나 오스트레일리아, 미국 등에 식물특허제도가 있어 신품종이 국내에 반입될 경우 로열티를 지급해야 된다는 것 등이다. 두 경우 모두 국내외의 경쟁력약화를 가져온다.

카네이션(*Dianthus caryophyllus* L.)은 국내외적으로 중요한 절화로서(Zucker, et al, 1999) 국내의 연간농가생산액이 162억원에 이르는 주요 작물로(농림부자료, 2000), 절화농가의 주요 수입원이나, 카네이션의 경우 묘주를 수입하고, 원래 삼수묘로 수입한 묘주를 재삼수 함에 따라, 현재 재배되는 품종은 거의 전부 virus에 감염되어 있다(Cheon et al., 1992). 국내 카네이션생산시 가장 큰 장애요인으로, 바이러스감염

에 의한 감수가 연간 20-30%에 달한다. 바이러스병방제는 곤충이나 선충의 부분적인 전이를 막는 이외에 특별한 화학적 방제법이 없어, 육종학자들에 의해 야생종으로부터 바이러스 저항성인자를 도입하기 위한 육종이 시도되고 있으나, 교배육종에 의한 바이러스내성유전자의 유전은, 대부분의 내성계통들이 multigene에 의한 horizontal resistance로 어려움이 있고 (Zuker et al, 2001), 품종의 유용형질의 변화 없이, 바이러스저항성만을 도입시키기가 어려운 점이 있어, 교배육종에 의한 바이러스저항성 카네이션품종의 개발은 국제적으로도 아직 뚜렷한 품종을 개발하지 못하고 있다. 이 때문에 분자생물학적으로 병원체의 항바이러스성 유전자를 분리하여 식물체에 도입시킴으로써, 형질전환을 이용한, 바이러스 저항성 품종의 개발이 요청된다.

본 연구는 카네이션에 주로 알려진 9종의 바이러스 중, 주요 피해 바이러스인 CarMV와 CarRSV에 대한, 복합바이러스내성 카네이션품종육성을 위한 기초연구로서, CarMV Cp 와 CarRSV Cp 유전자를 카네이션에 도입하여, CarMV와 CarRSV에 저항성을 나타내는 품종육성을 하고자 수행하였다.

#### 나. 연구개발의 필요성

- 카네이션은 영양번식을 하는 식물이므로 바이러스에 감염되면 다음 세대에 계속 발생하게 되므로, 바이러스 저항성 형질전환 카네이션 품종개발이 필요하다.
- 국내의 중요한 화훼작물중의 하나인 카네이션은 주로 CarMV등에 의한 바이러스 감염으로 그 생산이 크게 감수됨 (20~50%). 따라서 항바이러스성식물체 개발이 시급히 요구됨
- 식물 바이러스 병에 있어서 병원 바이러스의 신속하고 정확한 진단은 매우 중요하다. 따라서 카네이션 바이러스 진단체계확립이 필요하다.
- 현재 전세계적으로 카네이션(*Dianthus caryophyllus*)에 발생하는 바이러스는 약 20여종이 보고되어 있다. 카네이션은 주로 영양번식에 의존하여 번식되어 왔으므로

이들 서로 다른 바이러스 속들이 세대를 거듭하여 복합감염과 축적이 되어있다. 이러한 카네이션 바이러스 축적으로 인해 현재 전세계에서 그 피해가 갈수록 심각한 실정이다. 카네이션 바이러스 피해를 줄이기 위하여 이들 바이러스의 특성에 관한 기초적인 연구가 반드시 필요하나, 한국에서는 카네이션에 발생하는 바이러스의 기초조사가 거의 없는 실정이다. 따라서 국내에 재배되고 있는 카네이션에 발생하는 바이러스의 분리 동정 및 피해양상의 조사가 필요하다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 교배육종에 의한 바이러스 내성도입은 multigene 도입에 의한 horizontal resistance 로 육종에 어려움이 있음
- 최근 형질전환기술을 토대로, 항바이러스성 작물이 많이 연구되고 있으며, 특히 바이러스 유전자를 이용하여 작물에 바이러스 저항성을 도입하는 경우 이미 많은 작물에서 성공사례가 입증되었음. 따라서 이러한 방법의 적용으로 바이러스 저항성 카네이션의 개발이 필요했음
- 카네이션 바이러스 방제법이 확립되면 바이러스 피해를 줄여 농민의 소득원 확보와 자긍심이 향상된다. 바이러스병의 가장 효율적인 방제법은 바이러스저항성 형질전환카네이션 품종개발이 가장 안전한 예방법 이므로 필요한 상황이다.



## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 바이러스저항성 형질전환카네이션 품종개발

#### 가. 연구개발 수행 내용

##### 1. Kanamycin 선발 형질전환체 확충

- Carnation 품종에 CarMV CP gene 형질전환체 확충
- Carnation 품종에 CarRSV CP gene 형질전환체 확충
- Carnation 품종에 ToMV MP gene 형질전환체 확충

##### 2. 기내형질전환체 검정

- 형질전환체의 PCR 분석
- 형질전환체의 Southern blot 분석
- 형질전환체의 Western blot 분석 : CP 유전자 발현여부 조사

##### 3. 형질전환체 생장점배양 후 virus 검정

- 생장점 배양
- RIPA 검정
- RT-PCR 검정

##### 4. 조기강건형질전환체 생산을 위한 기내증식

##### 5. 형질전환식물체순화 및 은실재배

- 형질전환체의 발근배지의 조성을 달리하여 조건확립
- 포장검정을 위한 형질전환체 포트이식
- 포장검정을 위한 형질전환체 화분정식

##### 6. 형질전환체의 bioassay로 virus 저항성의 강도검정

##### 7. Bioassay 검정에 positive한 계통의 기내대량증식

##### 8. 교배육종



## 나. 연구개발 수행 결과

### (연구결과요약)

#### 1. Kanamycin 선발 형질전환체 확충

- 1) Carnation 품종에 CarMV CP gene 형질전환체 확충 : 30개체
- 2) Carnation 품종에 CarRSV CP gene 형질전환체 확충 : 41개체
- 3) Carnation 품종에 ToMV MP gene 형질전환체 확충 : 40개체

#### 2. 기내형질전환체 검정

- 1) 형질전환체의 PCR 분석 : 153개체
  - ①CarMV CP gene의 PCR검정 : 56개체
  - ②CarRSV CP gene 형질전환체의 PCR 검정 : 45개체
  - ③ToMV MP gene 형질전환체의 PCR 검정 : 52개체
- 2) 형질전환체의 Southern blot 분석 : 86개체(NTPII 56개체, CP 30개체)
- 3) 형질전환체의 Western blot 분석 : 80계통/124개체

#### 3. 형질전환체 생장점배양 후 virus 검정

- 1) 생장점 배양 : 58계통/194개체
- 2) RIPA 검정 : 113계통/276개체
  - ①CarMV 검정 : 47계통/172개체 → CarMV 무명주 : 62 개체
  - ②CarRSV 검정 : 66계통/104개체 → CarRSV 무명주 : 104 개체
- 3) RT-PCR 검정 : 306개체
  - ①CarMV 검정 : 195개체 → CarMV 무명주 : 82 개체
  - ②CarRSV 검정 : 111개체 → CarRSV 무명주 : 111 개체

#### 4. 조기강건형질전환체 생산을 위한 기내증식 : 90계통/793개체

- 1) CarMV CP 형질전환체 기내증식 : 28계통 234개체
- 2) CarRSV CP 형질전환체 기내증식 : 30계통 295개체
- 3) ToMV MP (PT30) 형질전환체 기내증식 : 32계통 264개체

5. 형질전환식물체순화 및 온실재배 : 48계통/95개체

1) CarMV CP 형질전환체 : 16계통 33개체

2) CarRSV CP 형질전환체 : 16계통 28개체

3) ToMV MP 형질전환체 : 16계통 34개체

6. 형질전환체의 bioassay

7. 카네이션 품종간 교배육종

93 교배조합 / 331 花 수정

→ 12 교배조합 / 91 花 수정에서 → 492 종자 채취

## 1. Kanamycin 선발 형질전환체 확충

카네이션 형질전환에 사용된 plant expression vector는 다음과 같다.

- Construction of pCarMV Cp (그림1-1)
- Construction of pCarRSV Cp (그림1-2)
- Construction of pSLN/ToMV-MP (그림1-3)

### 1) Carnation 품종에 CarMV Cp gene 형질전환체 확충 : 30개체

Carnation 품종에 CarMV Cp gene 형질전환체는 'KM' 'HD' 두 품 종에서 총 2200절편체를 접종하여(표1-1), kanamycin선발 8주후에는 90절편체에서 shoot가 형성되었고, 30개체로 확충되었다. 'KM' 2002절편을 접종하여 8주에는 83개체에서 shoot가 형성되었고 현재 25개체 생존하고 있으며, 'HD'는 198절편을 접종하여 8주에는 7개체에서 shoot가 형성되었고 현재 5개체가 생존하고 있다.

### 2) Carnation 품종에 CarRSV Cp gene 형질전환체 확충 : 41개체

Carnation 품종에 CarRSV Cp gene 형질전환 결과 'SL'품종 종에서 968절편체를 접종하여, 8주 후에는 75절편체에서 shoot가 형성되었고, 현재 33개체가 기내생존하고 있고, 'KM'품종에서 268절편체를 접종하여, 8주후에는 18절편체에서 shoot가 형성되었고, 현재 8개체가 기내생존하고 있다( 표1-2).

### 3) Carnation 품종에 ToMV MP gene 형질전환체 확충 : 40개체

표1-3에서와 같이, pSLN/ToMV-MP 형질전환체선발은 'KM'품종은 3881절편체를 접종하여 kanamycin 배지에 8주 동안 선발하여 42개체를 얻었고, 'SL'품종은 2227절편체를 접종하여 21개체를 HD품종은 198개체를 접종하여 7개체를 얻었다. 총 6306절편체를 접종하여 Kanamycin 선발 1주째는 1601개체가 생존하였으며, 4-5주째는 92%가량 백화고사하였고, 8주후에는 70개체에서 shoot가 형성되었으며, 6개월 이상 기내생존개체는 'KM'품종에서 25개체, 'SL'품종에서 8개체, HD품 7개체를 얻었다. 선발된 개체는 MS기본배지로 옮겨 각 10개체씩 4주마다 계대배양하며 증식유지하여 기내형 질전환체 검정재료로 사용하며, bioassay 검정에서 positive한 계통의 기내대량증식하여 포장검정의 재료로 확보하고자한다.

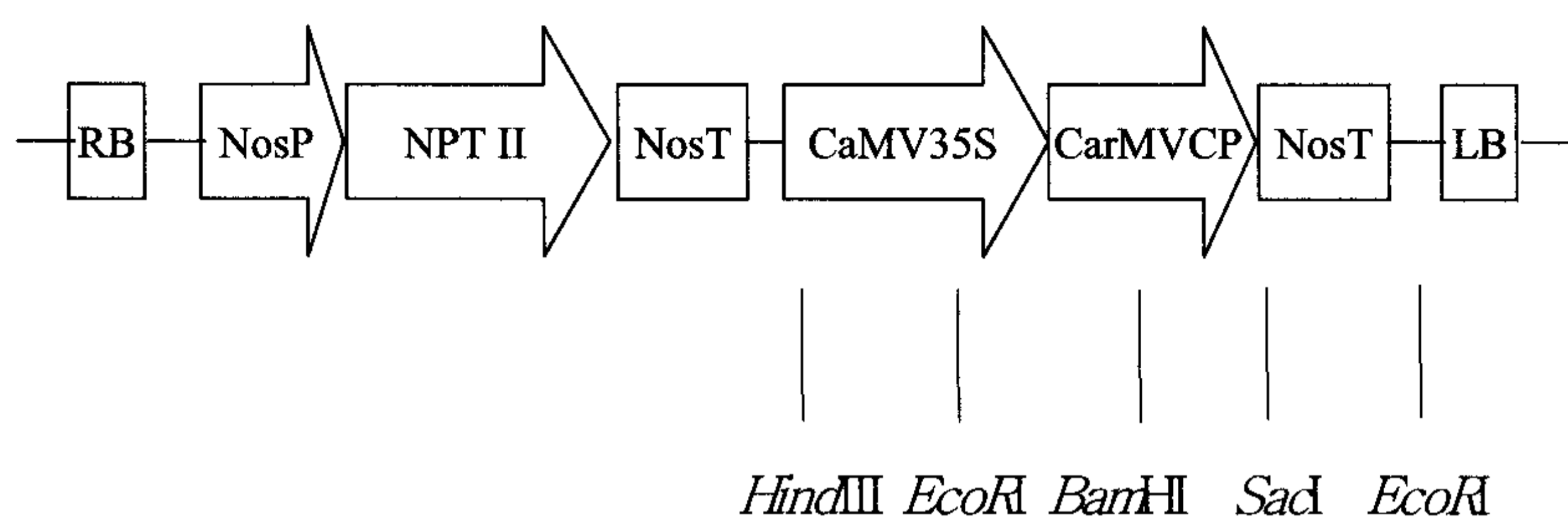


Fig. 1-1. Construction of pCarMV CP

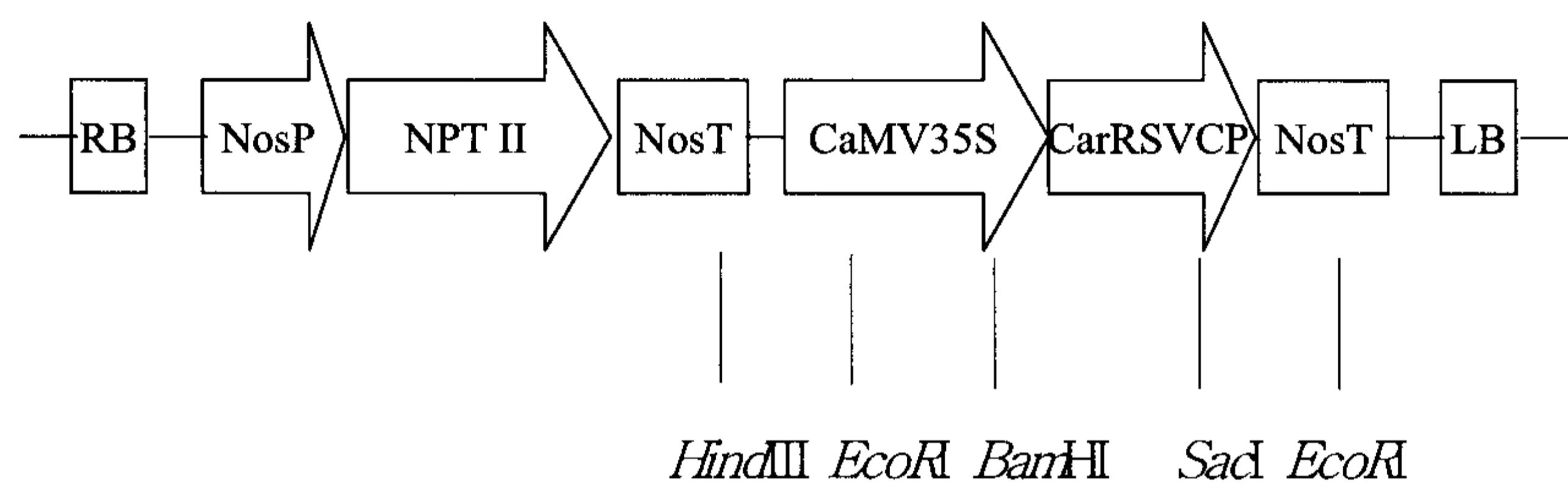


Fig. 1-2. Construction of pCarRSV CP

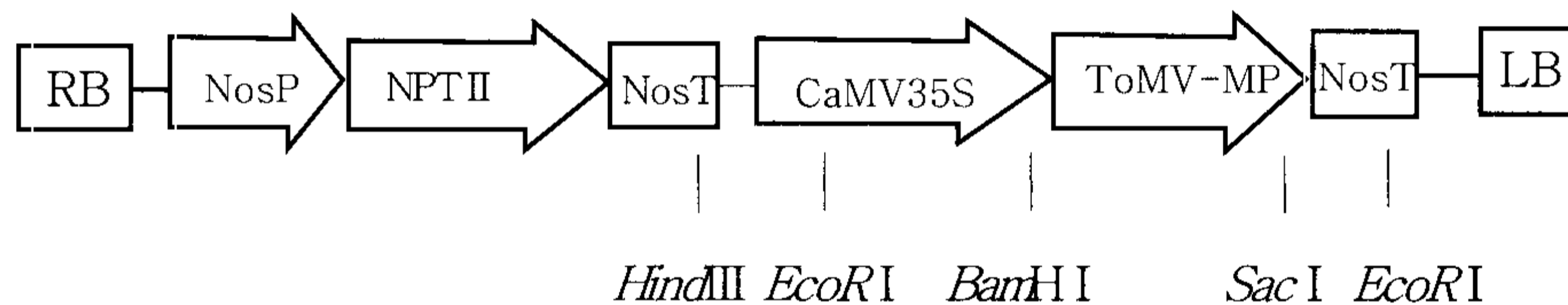


Fig. 1-3. Construction of pSLN/ToMV-MP

- NosP: nopaline synthase promoter,
- NPTII: neomycin phosphotransferase gene II,
- NosT: polyadenylation signal of the nopaline synthase gene,
- CaMV35S: 35S promoter of cauliflower mosaic virus,
- CarMV Cp: Carnation Mottle Virus Coat Protein gene,
- CarRSV Cp: Carnation Ringspot Virus Coat Protein gene,
- ToMV MP: Tomato Mosaic Virus Movement Virus,
- RB: T-DNA right border,
- LB: T-DNA left border

Table 1-1. Extent of the transformation ratio of *Dianthus caryophyllus* L. cocultivated with pCarMV CP.

	No.of explant coculti -vated(a)	Kanamycin weeks									Transformant plant (month)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	b/a	1	4	12
										(b)			
'KM'	2002	1010	912	741	554	305	152	89	83	4.1	63	53	25
'HD'	198	55	53	39	33	17	11	9	7	3.5	7	7	5
Σ	2200	1065	965	780	587	322	163	98	90	4.1	70	60	30

Table 1-2. Transformation in *Dianthus caryophyllis* cocultivated with pCarRSV CP.

	No.of explant coculti -vated(a)	Kanamycin weeks									Transformant plant (month)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	b/a	1	3	6
										(b)			
'SL'	1107	913	837	580	409	206	184	102	75	6.8	75	50	33
'KM'	268	221	203	141	99	64	45	25	18	6.7	18	12	8
Σ	1375	1134	1040	721	508	270	229	127	93	6.8	93	62	41

Table 1-3. Extent of the transformation ratio of *Dianthus caryophyllus* L. cocultivated with pSLN/ToMV MP.

cv.	No of explant coculti -vate(a)	Kanamycin weeks									Transformant plant(month)		
		1	2	3	4	5	6	7	8(b)	b/a	1	3	6
										(%)			
'KM'	3881	1038	1032	868	568	321	147	72	42	1.1	32	30	25
'SL'	2227	510	508	368	251	132	39	27	21	0.9	11	9	8
'HD'	198	53	53	39	33	17	11	9	7	3.5	7	7	7
Σ	6306	1601	1593	1275	852	470	197	108	70	1.1	50	46	40

## 2. 기내 형질전환체 검정

### 1) 형질전환체의 PCR 분석 : 153개체

#### (1) CarMV CP gene의 PCR검정 : 56개체

8주동안 kanamycin선발배지에서 선발된 56형질전환개체에서 CarMV CP gene이 발현되었는지를 PCR로 확인한 결과, 약 1.1 kbp 위치에서 47개체가 강한 band로 관찰되었다(그림2-1). 이로써 CP gene이 식물체 내에 도입되었음을 확인할 수 있었다.

#### (2) CarRSV CP gene 형질전환체의 PCR 검정 : 45개체

8주동안 kanamycin 선발배지에서 선발된 형질전환식물체내에 CarRSV CP gene이 삽입되었는지를 확인하기 위해, 45개체의 잎조직으로부터 분리한 genomic DNA를 template로 하여 PCR분석을 실시하였다. 그 결과, CarRSV CP gene의 경우 형질전환된 44개체에서 약 1.0 kbp 크기의 DNA 단편이 증폭된 것이 확인되어, 바이러스 저항성 CarRSV CP gene이 식물 체내에 도입되었음을 확인하였다(그림2-2).

#### (3) ToMV MP gene 형질전환체의 PCR 검정 : 52개체

8주동안 Kanamycin 100mg/L이 첨가된 배지에서 선발된 형질전환식물체내에 NPTII 유전자가 게놈상에 삽입되어 있는지를 확인하기 위하여 52개체의 잎조직으로부터 분리한 genomic DNA를 추출하여 PCR을 실시한 결과, 33개체에서 0.7kbp 크기의 DNA단편이 증폭되어 selection maker인 NPTII유전자가 발현됨을 확인할 수 있었다(그림2-3).



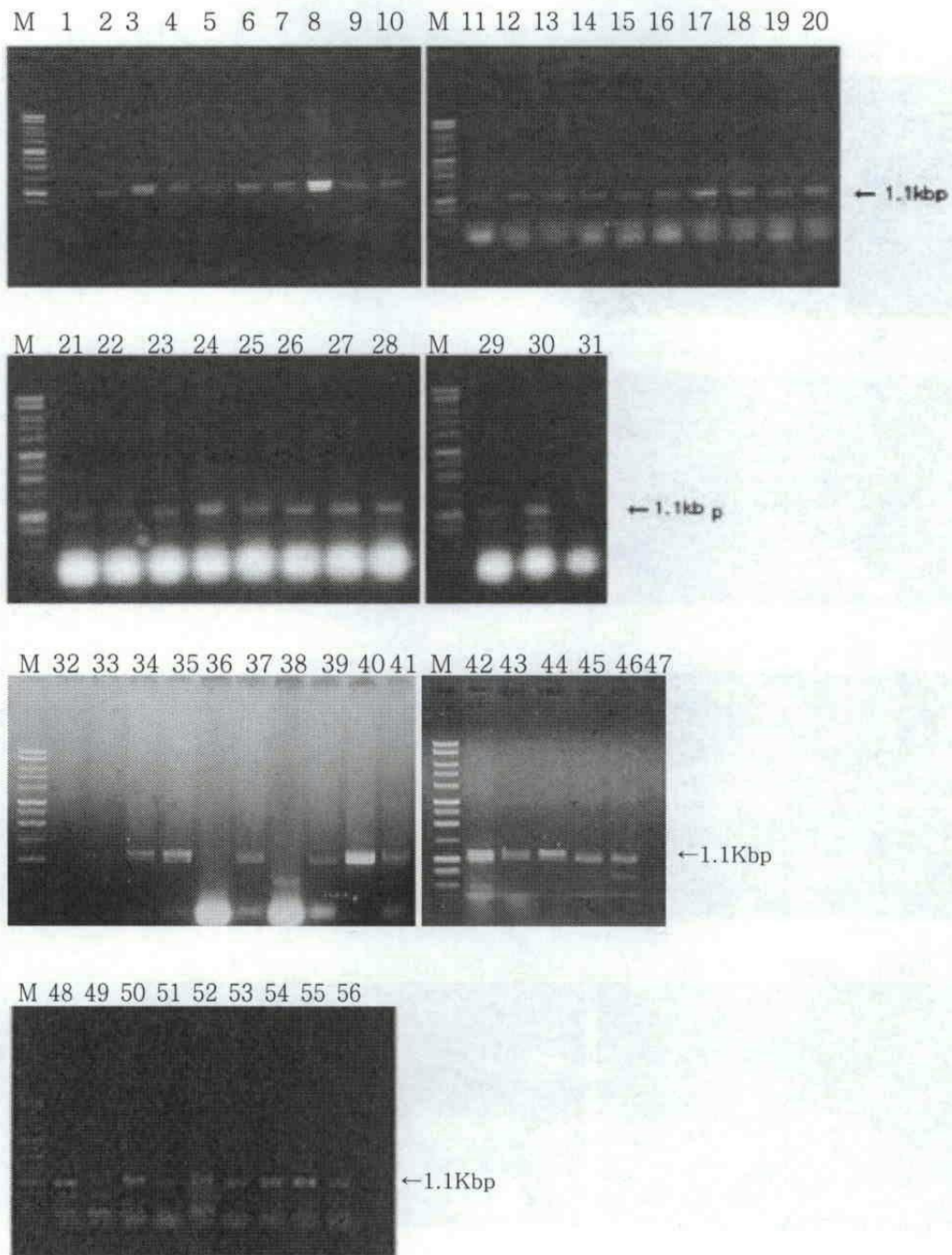


Fig. 2-1. PCR results of CarMV CP gene from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*. Marker (M), Transgenic plants (lanes 2-56)

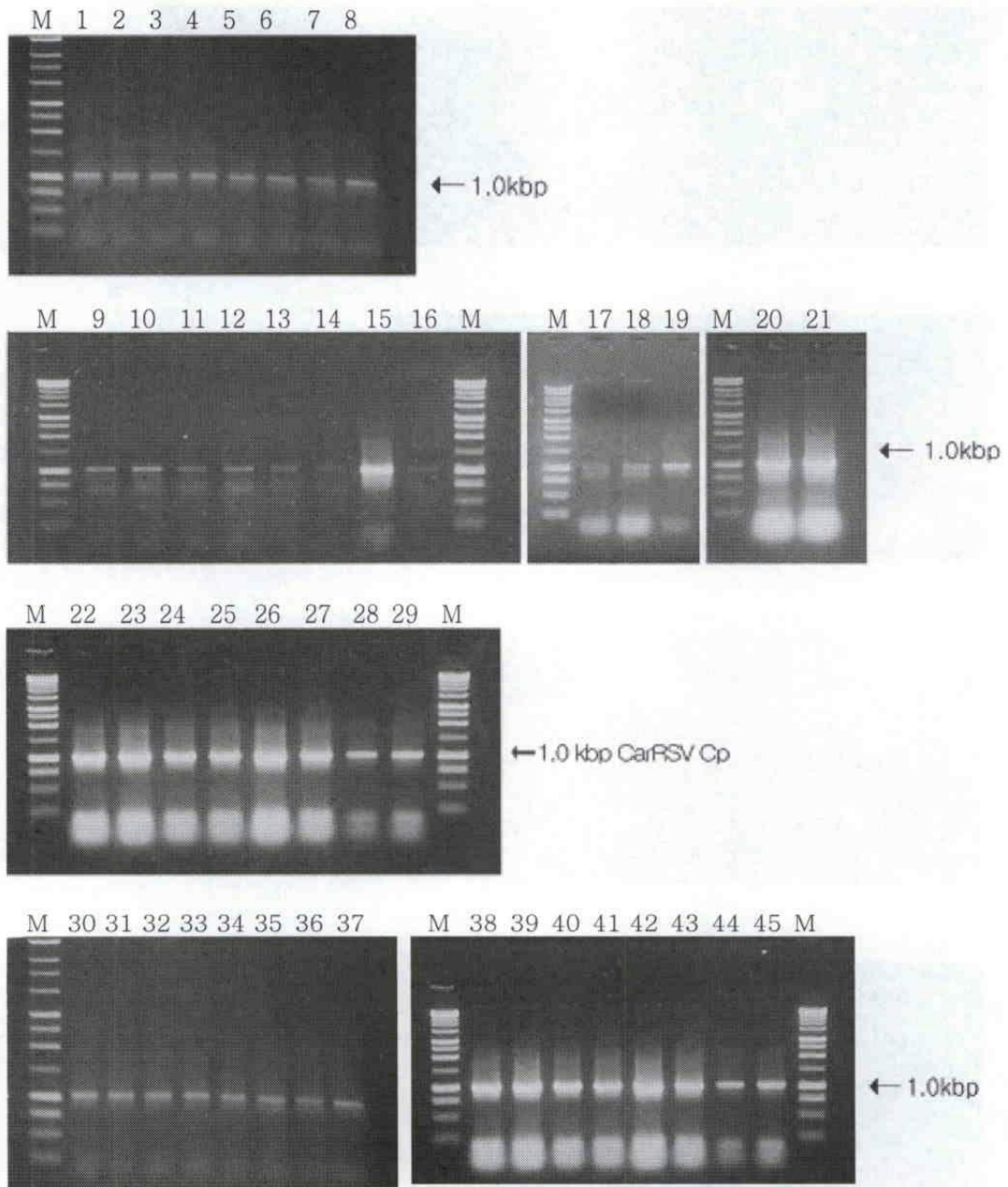


Fig. 2-2. PCR results of CarRSV CP gene from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*. Marker (M), Transgenic plants (lanes 1-45).



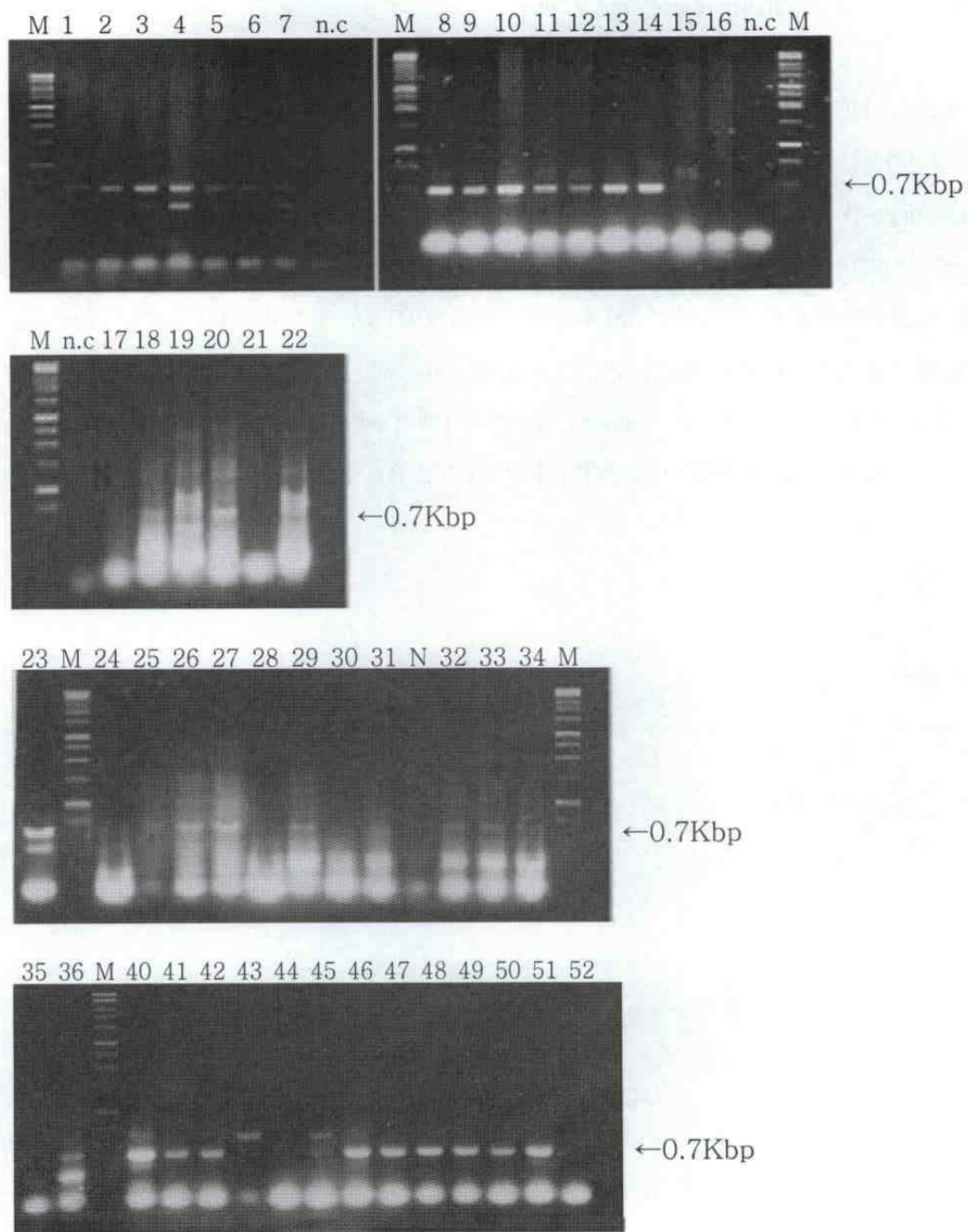


Fig. 2-3. PCR results of ToMV NPTII gene from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*. Marker (M), Transgenic plants (lanes 1-52).

## 2) 형질전환체의 Southern blot 분석 : 27개체

Southern blot 분석은 PCR 분석을 통해 NPT II gene과 CarMV CP gene의 삽입이 확인된 형질전환식물체에서의 genomic DNA를 분리하여, *EcoRI*, *BamHI*/*SacI* 등으로 digestion 한 후, 전기영동하여, nylon membrane.으로 transfer시킨 다음, X-ray film에 노출시켜 확인하였다. 그 결과, NPT II gene의 경우, CarMV CP 형질전환체는 28개체에서, CarRSV Cp 형질전환체는 16개체에서, ToMV(PT30) 형질전환체는 14개체에서, 0.7 kbp의 위치에서 band를 확인할수있었다(그림3-1-1, 3-2-1, 3-3-1). CarMV CP gene의 경우 16개체에서, CarRSV CP gene의 경우 9개체에서 약 1.1 kbp의 위치에서 band를 확인할 수 있어 형질전환체임이 확인되었다(그림3-1-2, 3-2-2).

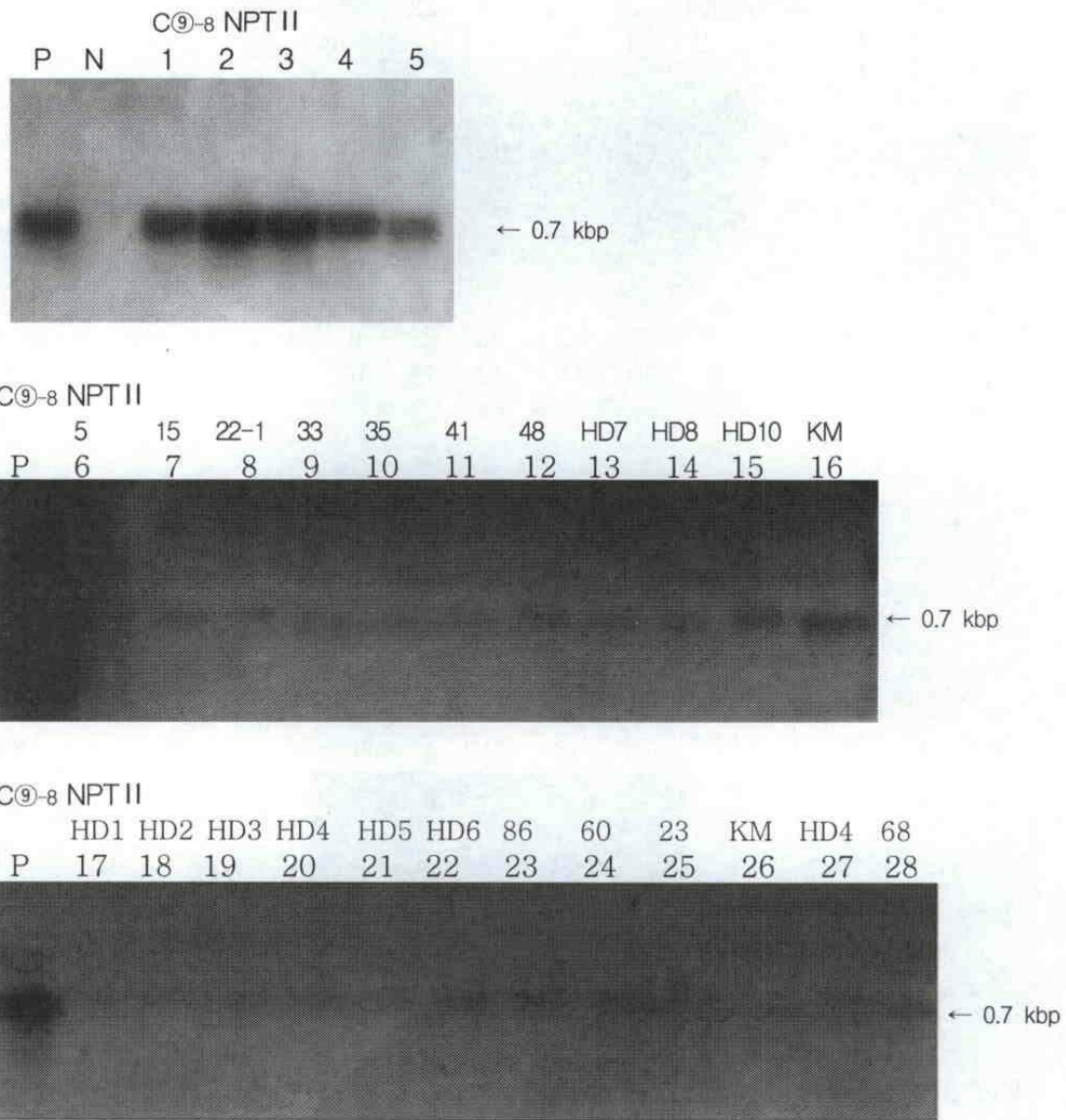


Fig. 3-1-1. Results of Southern blot analysis of CarMV NPT II gene from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*. Positive control (P), nontransgenic control (N), and transgenic plants (lanes 1-28). Genomic DNA was digested with *EcoRI*. Molecular probes used were *Bam*II/*Hind*III digested DNA fragment of pBINCarmV CP.

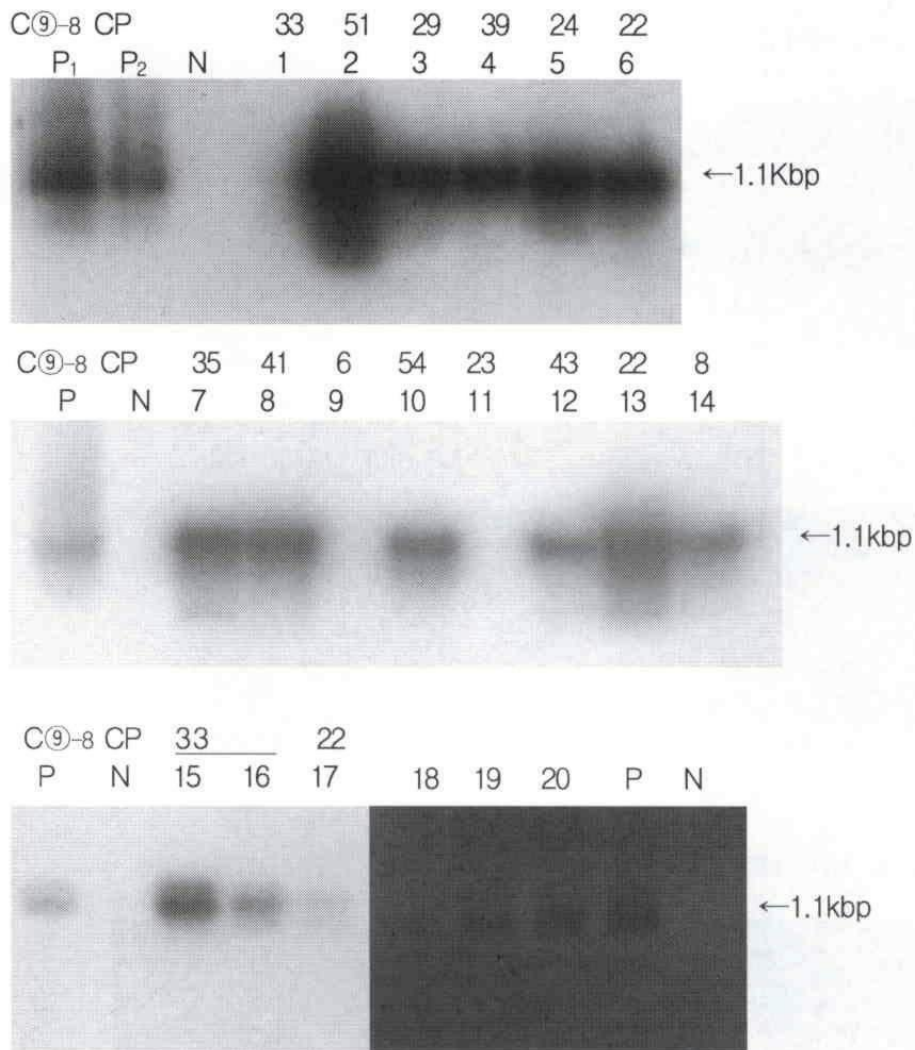


Fig. 3-1-2. Results of Southern blot analysis of CarMV CP gene from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*. Positive control (P), nontransgenic control (N), and transgenic plants (lanes 1-20). Genomic DNA was digested with *EcoRI*. Molecular probes used were *Bam*HI/*Hind*III digested DNA fragment of pBINCarMV CP.



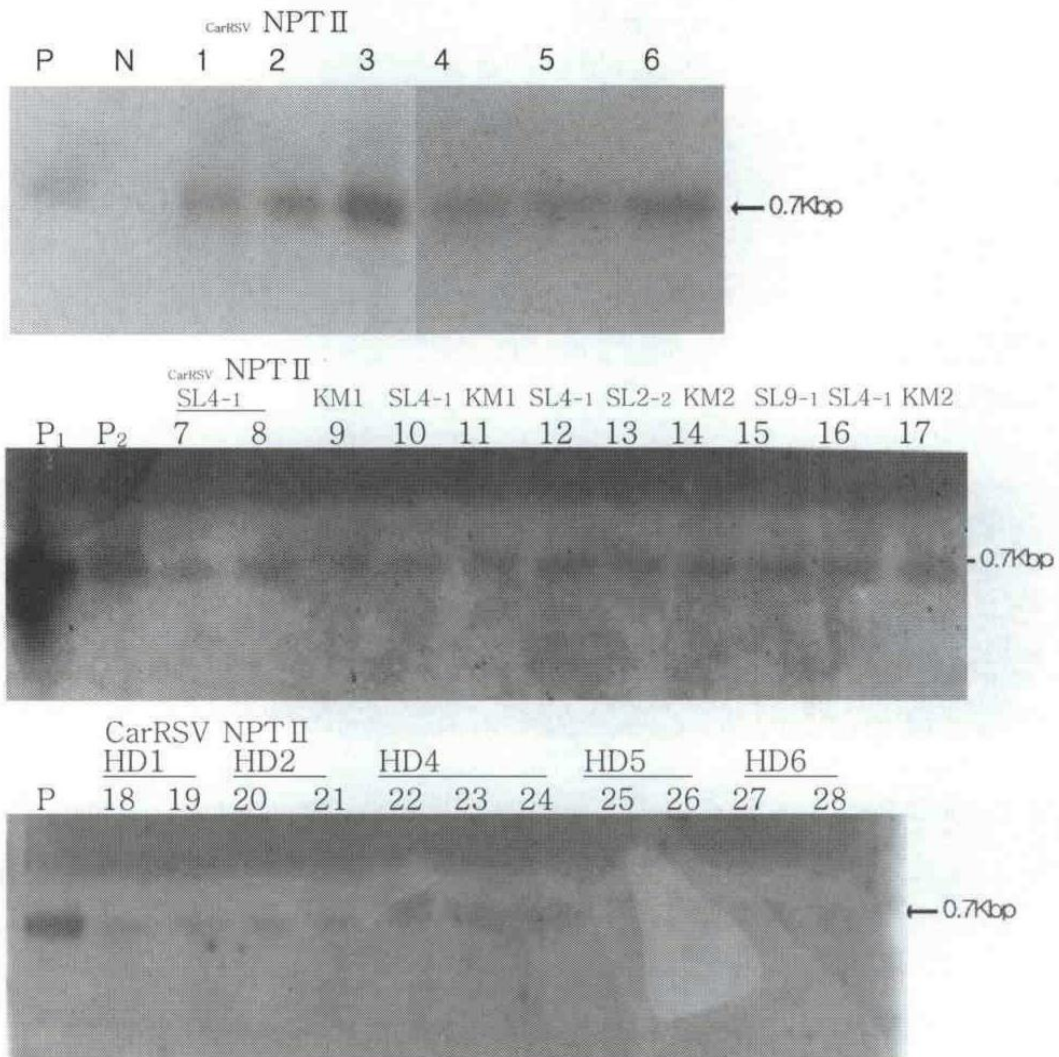


Fig. 3-2-1. Results of Southern blot analysis of CarRSV NPT II gene from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*. Positive control (P), nontransgenic control (N), and transgenic plants (lanes 1-28). Genomic DNA was digested with *EcoRI*. Molecular probes used were *Bam*HI/*Hind*III digested DNA fragment of pBINCarMV CP.

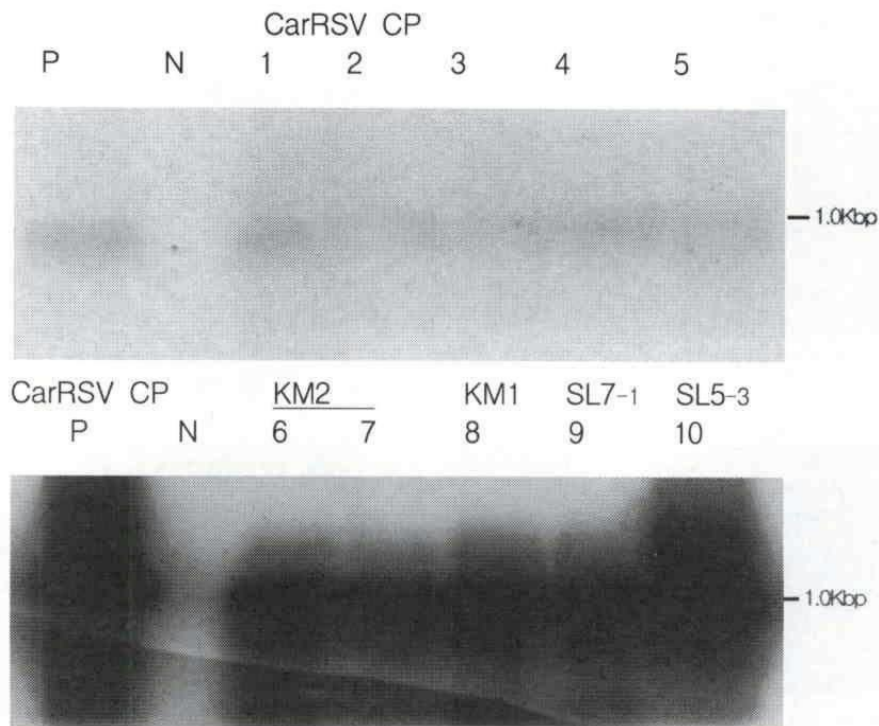


Fig. 3-2-2. Results of Southern blot analysis of CarRSV CP gene from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*. Positive control (P), nontransgenic control (N), and transgenic plants (lanes 1-10). Genomic DNA was digested with *EcoRI*. Molecular probes used were *Bam*HI/*Hind*III digested DNA fragment of pBIN-CarMV CP.

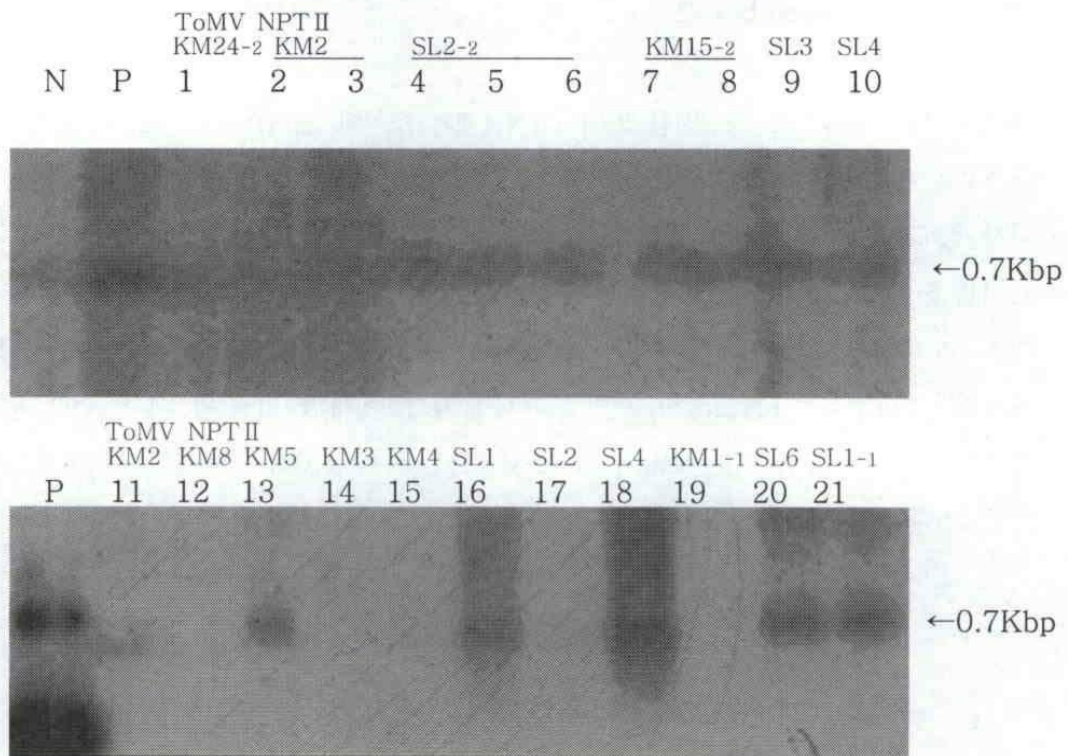


Fig. 3-3-1. Results of Southern blot analysis of ToMV NPTII gene from putative transgenic *Dianthus caryophyllus*. Positive control (P), nontransgenic control (N), and transgenic plants (lanes 1-21). Genomic DNA was digested with *EcoRI*. Molecular probes used were *Bam*HI/*Hind*III digested DNA fragment of pBIN-CarMV CP.

### 3) 형질전환체의 Western blot 분석 : 27개체

Western blot 검정으로 형질전환 카네이션식물체의 조직에 CarMV CP gene이 전사 및 단백질로 번역되었는지 여부를 조사하기 위하여, 형질전환된 카네이션을 바이러스에 노출되지 않도록 유지재배하여, 형질전환개체의 앞에서 단백질을 추출하였고, 'SDS-PAGE Mighty Small II' gel(Pharmacia)을 사용하여 전기영동하고, western blot을 실시한 결과, 대조구인 CarMV 접종후 이병된 *Chenopodium quinoa*와 kanamycin 선발 12개체 중 10개체에서, CarRSV는 Kanamycin 선발 15개체 중 7개체에서 35 kDa 위치에 band가 확인되었다. 이로써 CarMV CP gene과 CarRSV CP gene이 35kDa 단백질로 발현되었음이 확인되었다(그림 4-1-1, 4-1-2, 4-2-1, 4-2-2, 4-3-1).



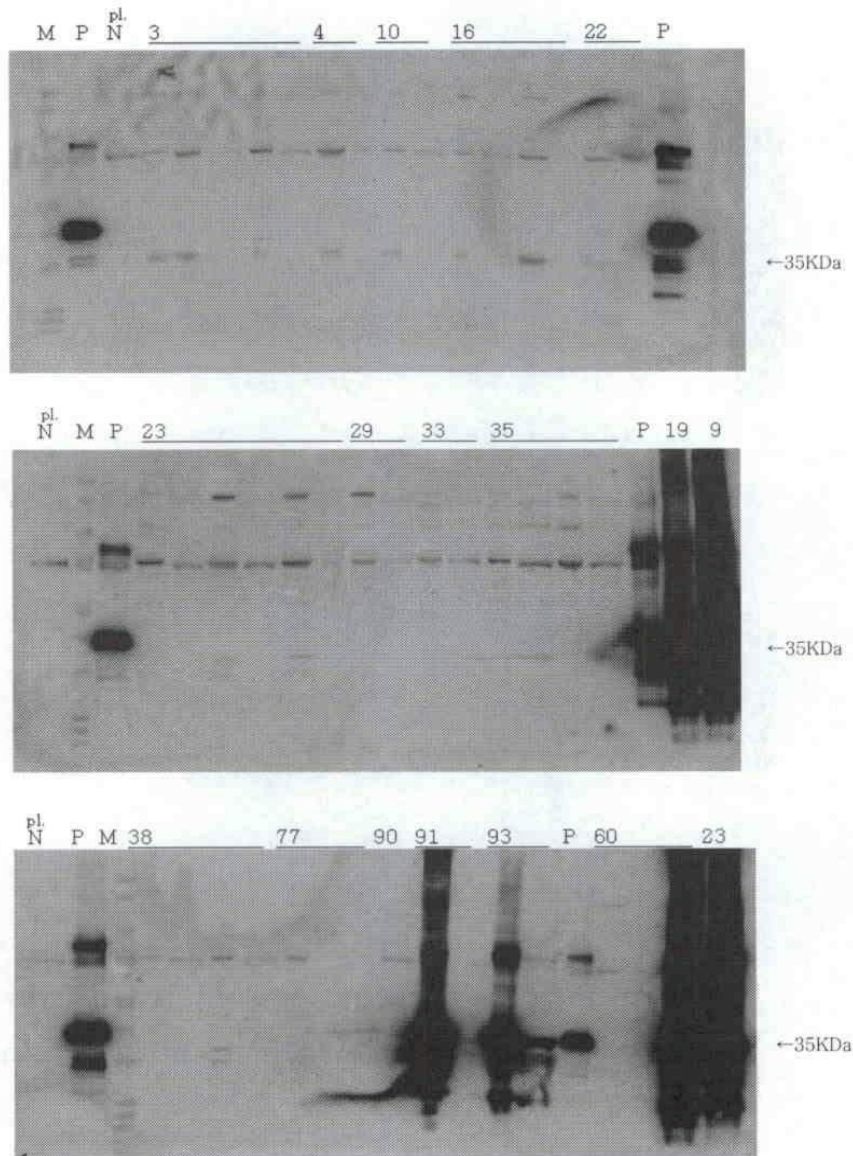


Fig. 4-1-1. Results of Western blot analysis of leaf tissue transgenic *Dianthus caryophyllus* expressing CarMV CP protein. Positive control (P), nontransgenic control (N) and transgenic plants (lanes 3, 4, 10, 16, 22, 33, 38, 93)

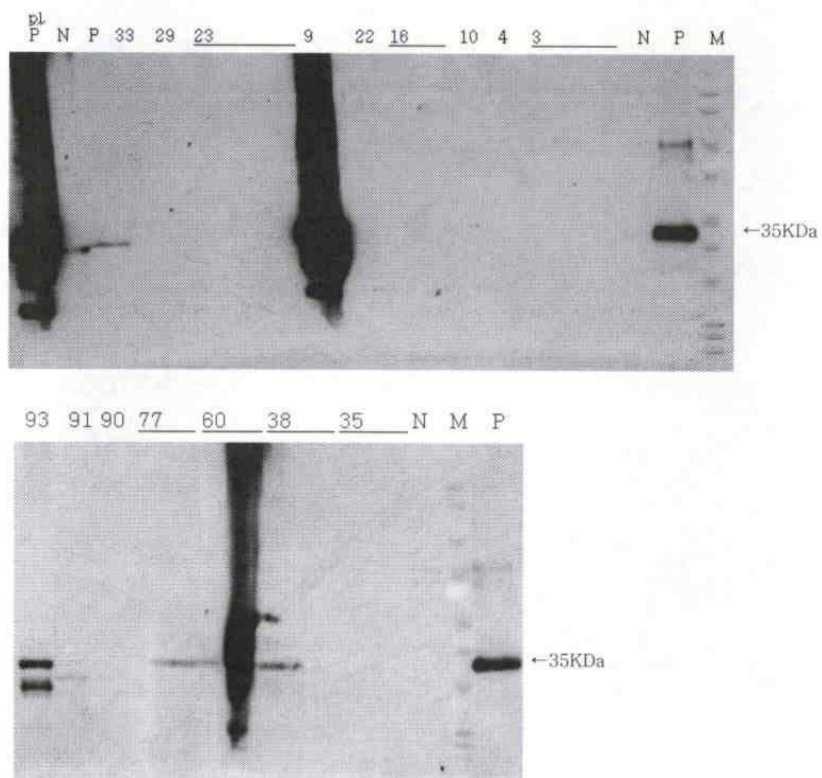


Fig. 4-1-2. Results of Western blot analysis of leaf tissue transgenic *Dianthus caryophyllus* expressing CarMV CP protein. Positive control (P), nontransgenic control (N) and transgenic plants (lanes 93, 77, 60, 38).

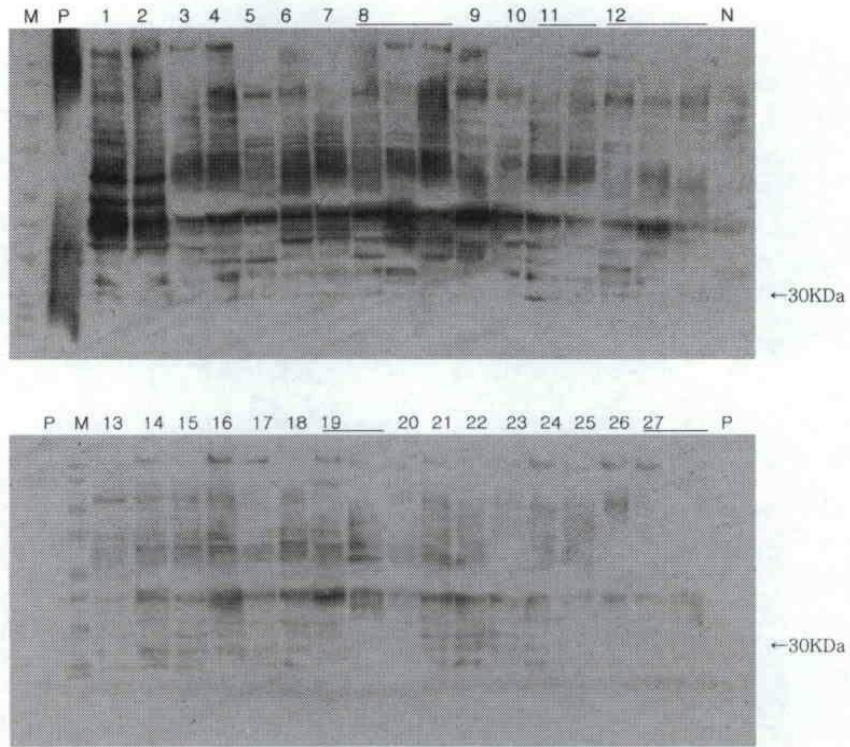


Fig. 4-2-1. Results of Western blot analysis of leaf tissue transgenic *Dianthus caryophyllus* expressing CarRSV CP protein. Positive control (P), nontransgenic control (N.) and transgenic plants (lanes 1, 2, 5, 6, 8, 12, 14, 15, 17-22, 25-27).

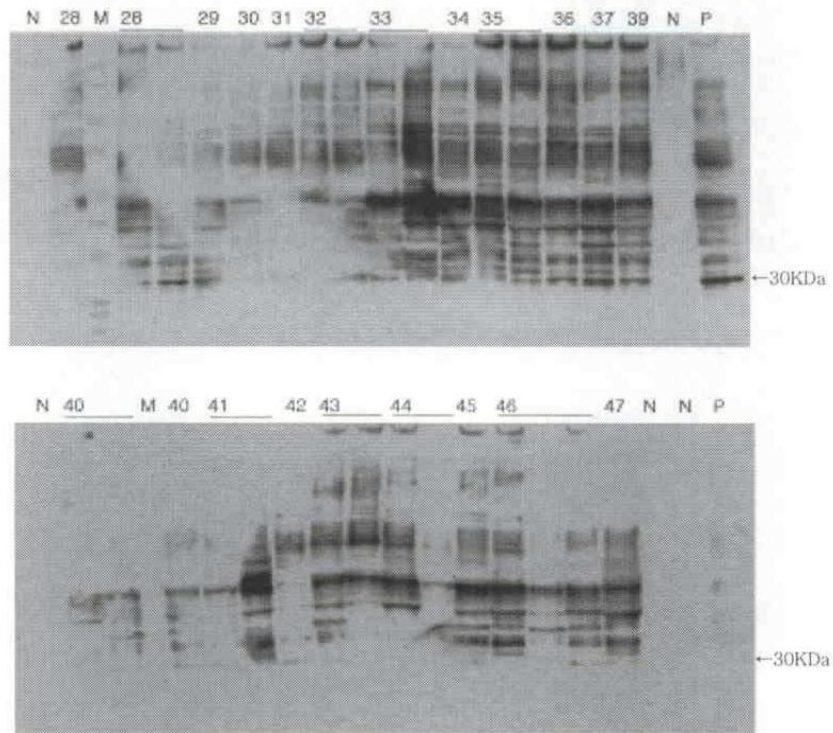


Fig. 4-2-2. Results of Western blot analysis of leaf tissue transgenic *Dianthus caryophyllus* expressing CarRSV CP protein. Positive control(P), nontransgenic control(N.)and transgenic plants (lanes 28, 29, 31-35, 37, 39-43, 46).



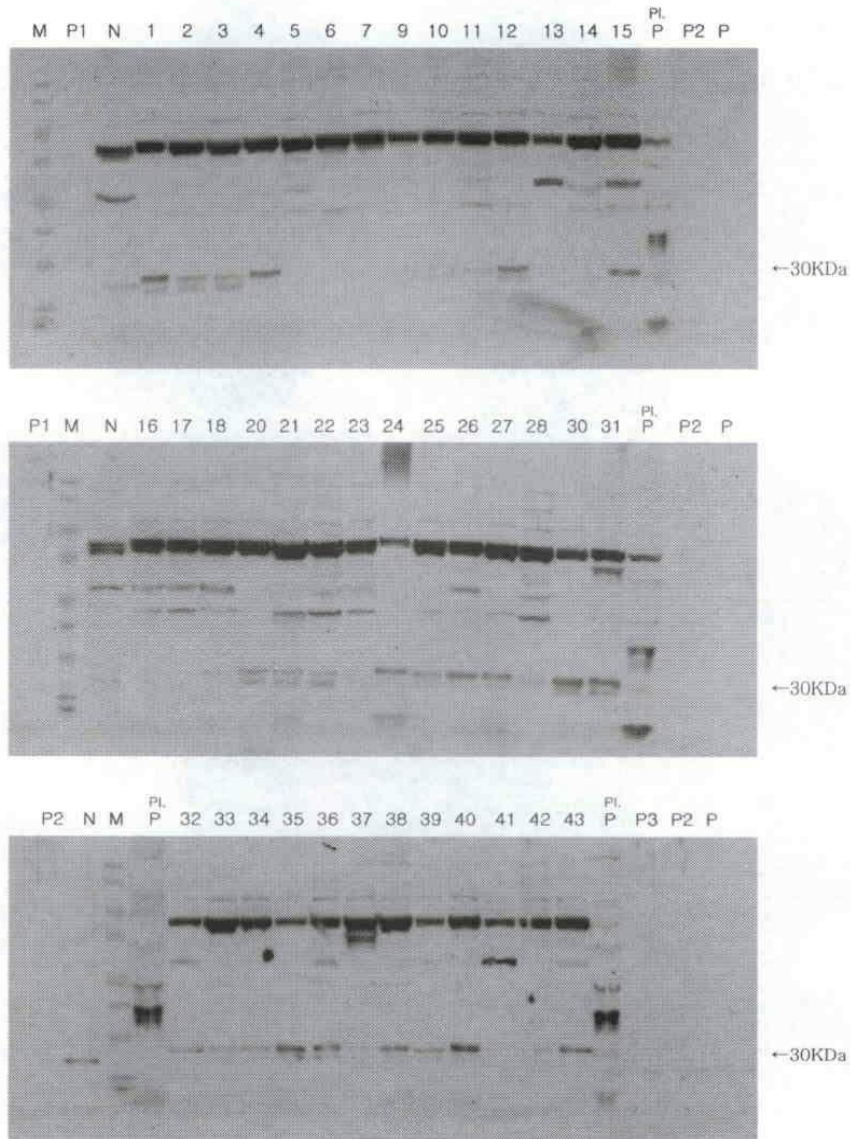


Fig. 4-3. Results of Western blot analysis of leaf tissue transgenic *Dianthus caryophyllus* expressing ToMV MP protein. Positive control (P), nontransgenic control (N.) and transgenic plants (lanes 1-4, 10-12, 15, 18-22, 24-31, 32-36, 38-40, 43).

3. 형질전환체 성장점배양 후 virus 검정 : 58계통 194개체

1) 성장점배양

①CarMV CP (C9)-8) : 27계통에 149개체를 성장점배양하였다(그림5-1-1, 5-1-2).

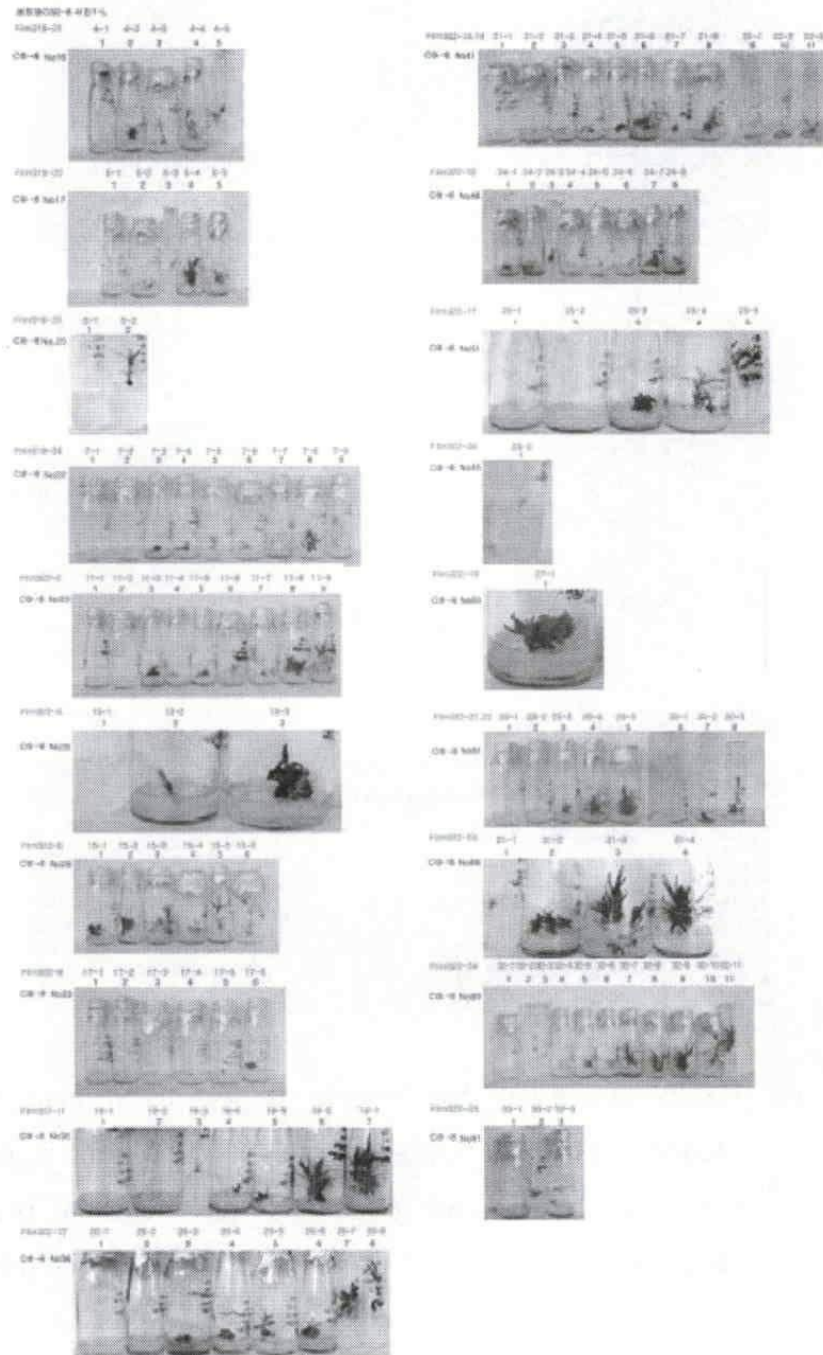


Fig. 5-1-1. Apical meristem culture of kanamycin resistant plants for CarMV CP.

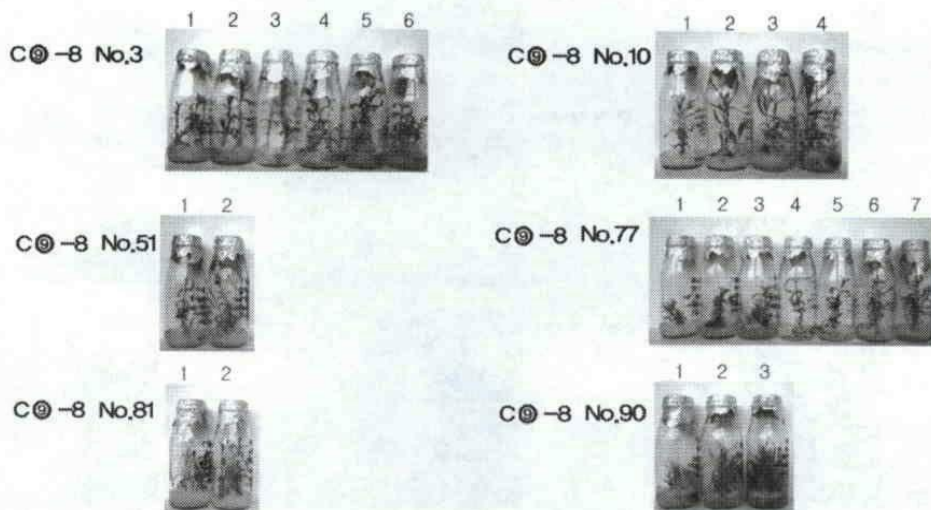


Fig. 5-1-2. Apical meristem culture of kanamycin resistant plants for CarMV CP.

②생장점배양 CarRSV CP : 17계통에 26개체를 성장점배양하였다(그림5-2).

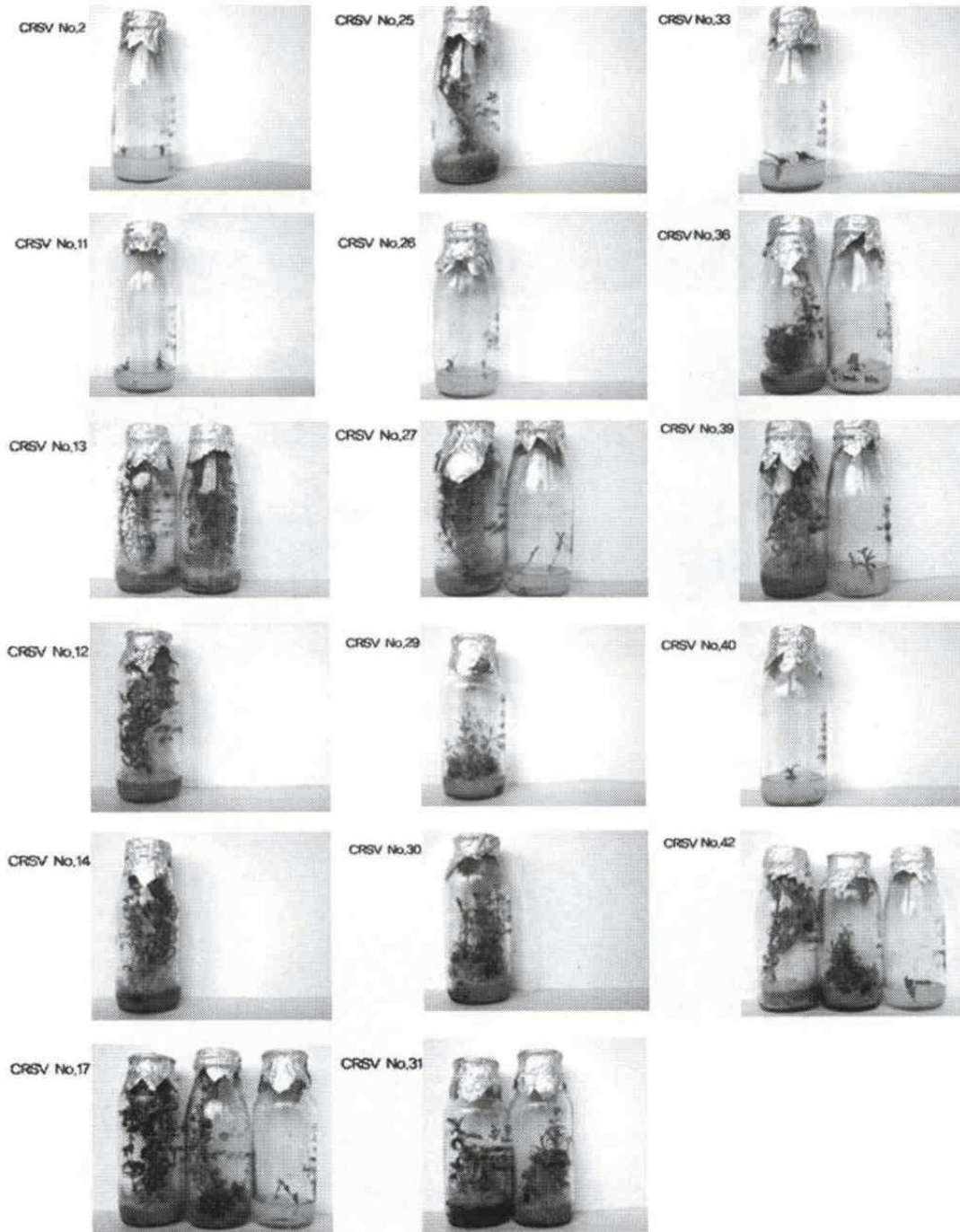


Fig. 5-2. Apical meristem culture of kanamycin resistant plants for CarRSV CP.



③생장점배양 ToMV MP : 14계통에 19개체를 생장점배양하였다(그림5-3).

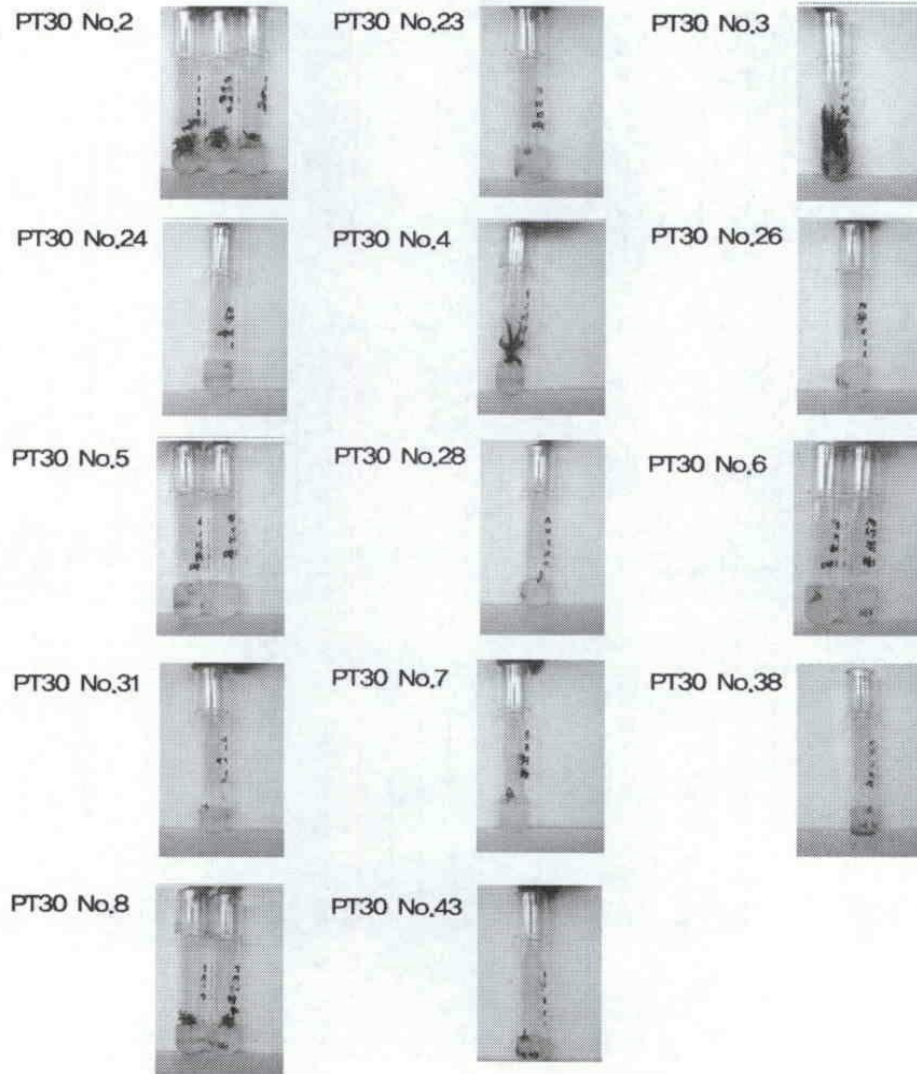


Fig. 5-3. Apical meristem culture of kanamycin resistant plants for ToMV MP.

2) RIPA (Rapid immunofilter paper assay) 검정

①CarMV CP 형질전환개체 성장점배양 37계통 125개체의 CarMV RIPA 검정에서 무병주 50개체를 얻었다(그림6-1-1, 6-1-2)

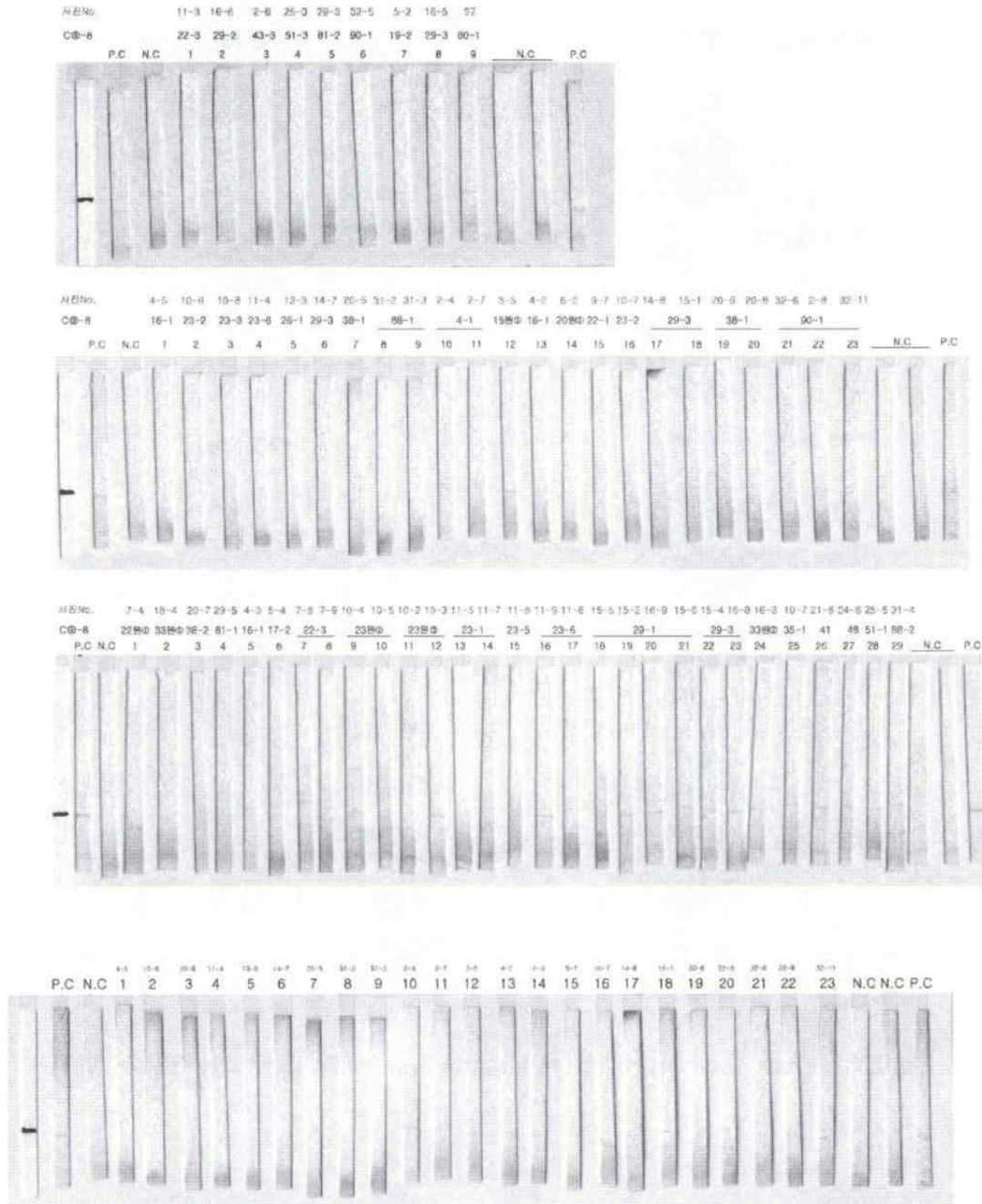


Fig. 6-1-1. RIPA CarMV CP test of the precipitation bands were formed with 1/800 dilution ratio of the IgG.

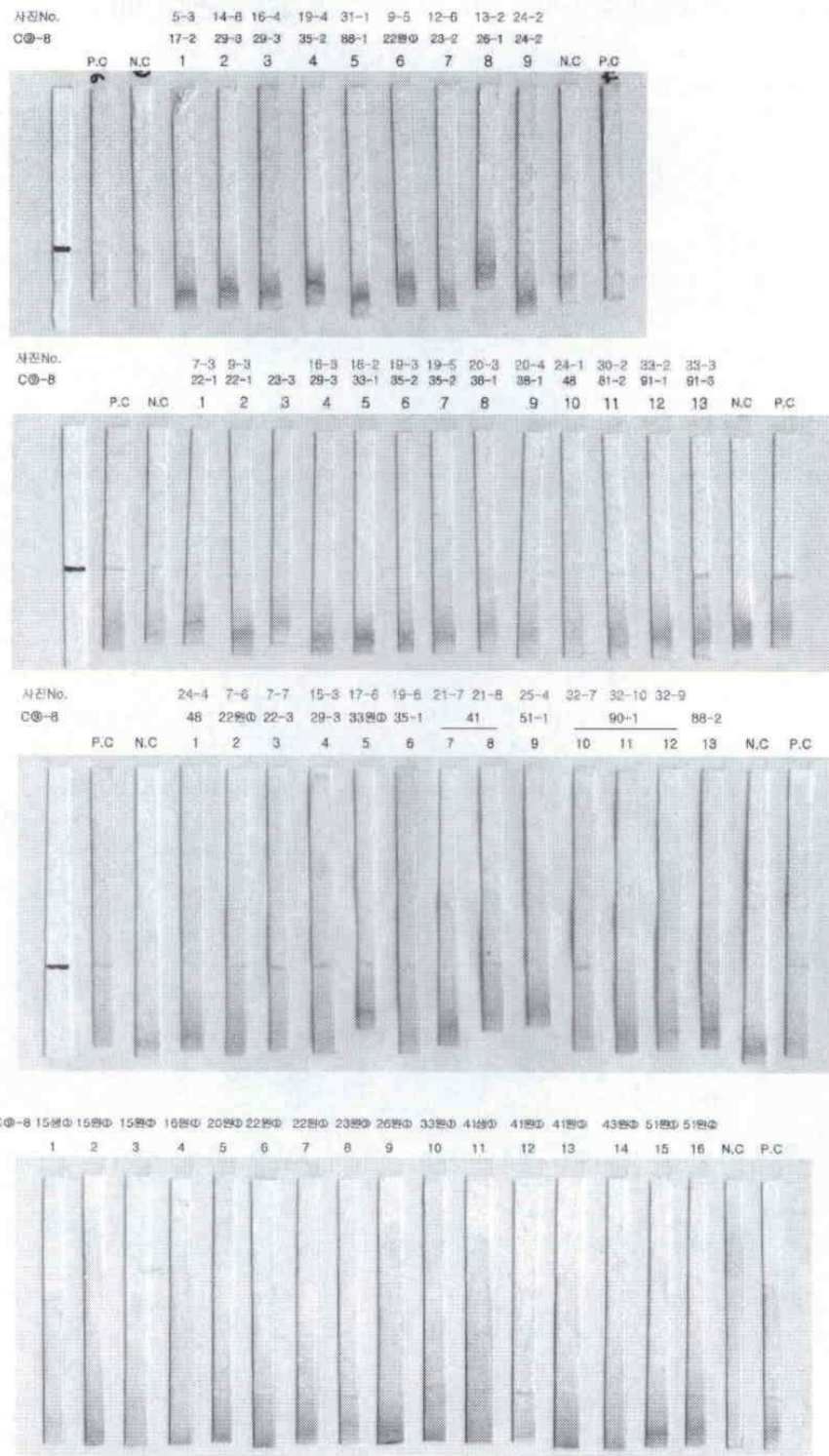


Fig. 6-1-2. CarMV test of the precipitation bands were formed with 1/800 dilution ratio of the IgG.



②CarRSV CP 형질전환개체 성장점배양 10계통 47개체의 CarMV RIPA 검정에서 무병주 26개체를 얻었다(그림6-2).

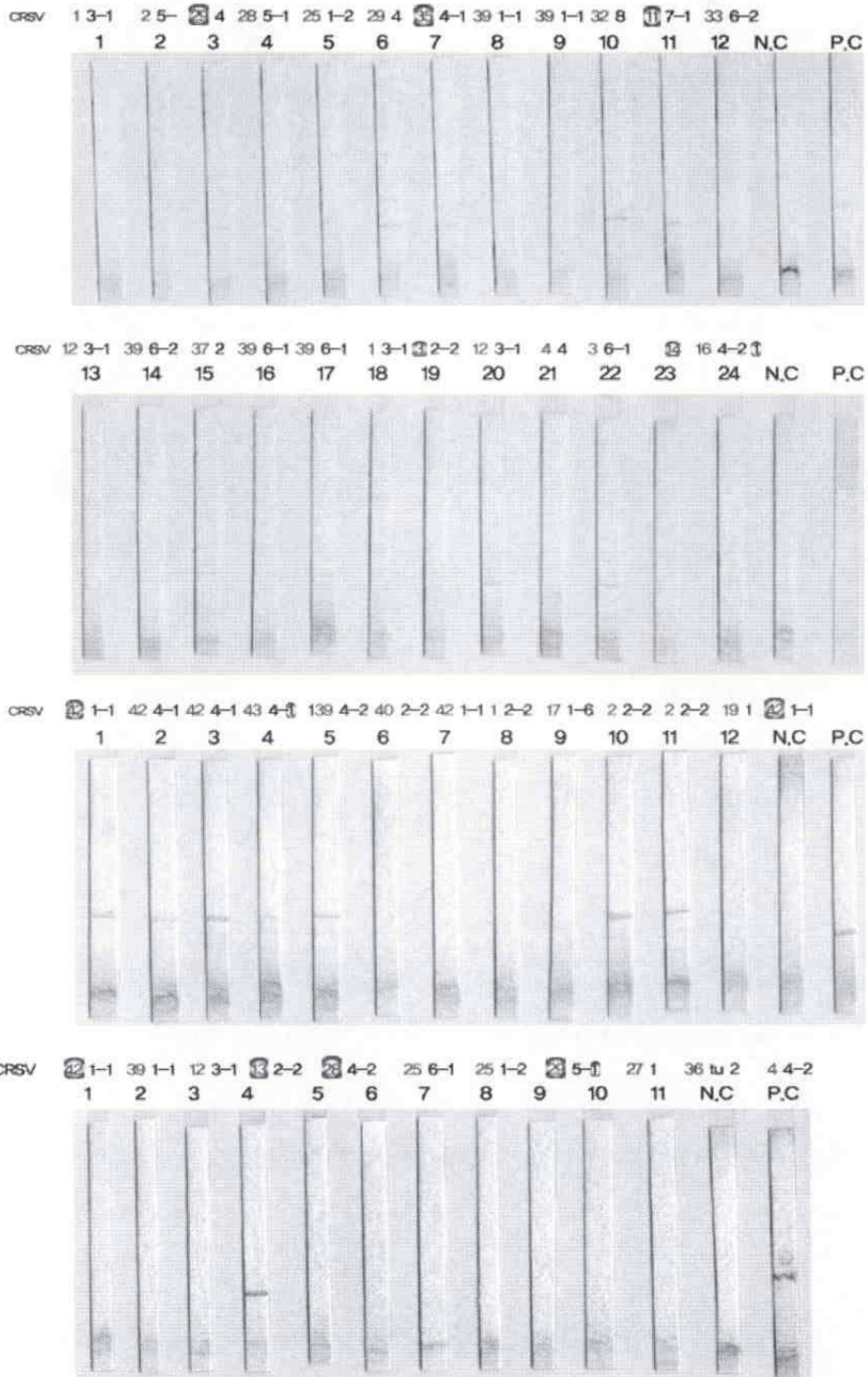


Fig. 6-2. CarRSV CP test of the precipitation bands were formed with 1/800 dilution ratio of the IgG.

③CarMV, CarRSV, ToMV 형질전환체 생장점배양 66계통 104개체의 CarRSV RIPA 검정  
에서 전체 104개체가 무병주였다.

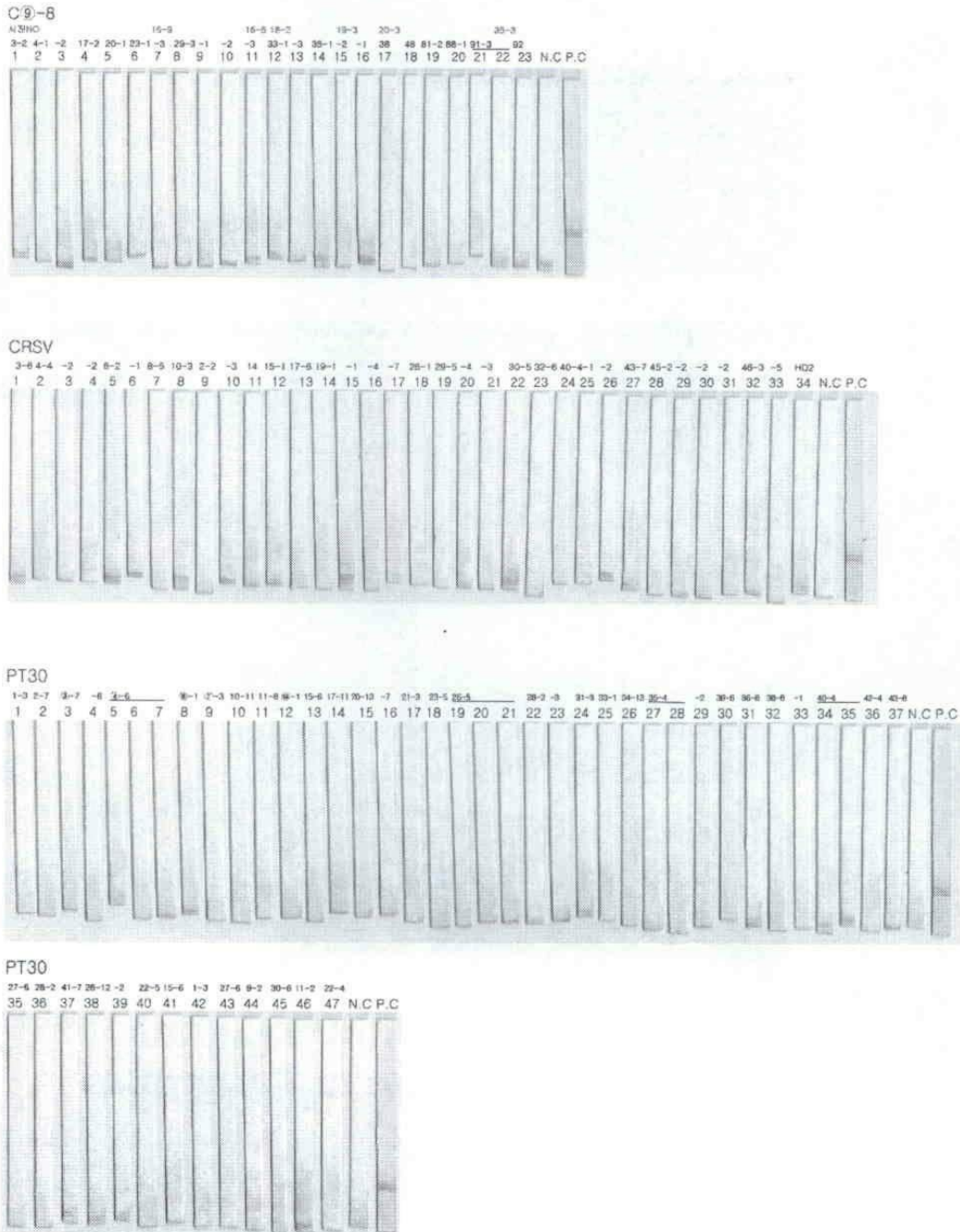


Fig. 6-3. Transgenic (CarMV, CarRSV, ToMV) CarRSV infection test of the precipitation bands were formed with 1/800 dilution ratio of the IgG.

3) RT-PCR 검정

①형질전환체 성장점배양 195개체 CarMV RT-PCR 검정에서 21계통 82개체가 무병주였다(그림7-1-1, 7-1-2)

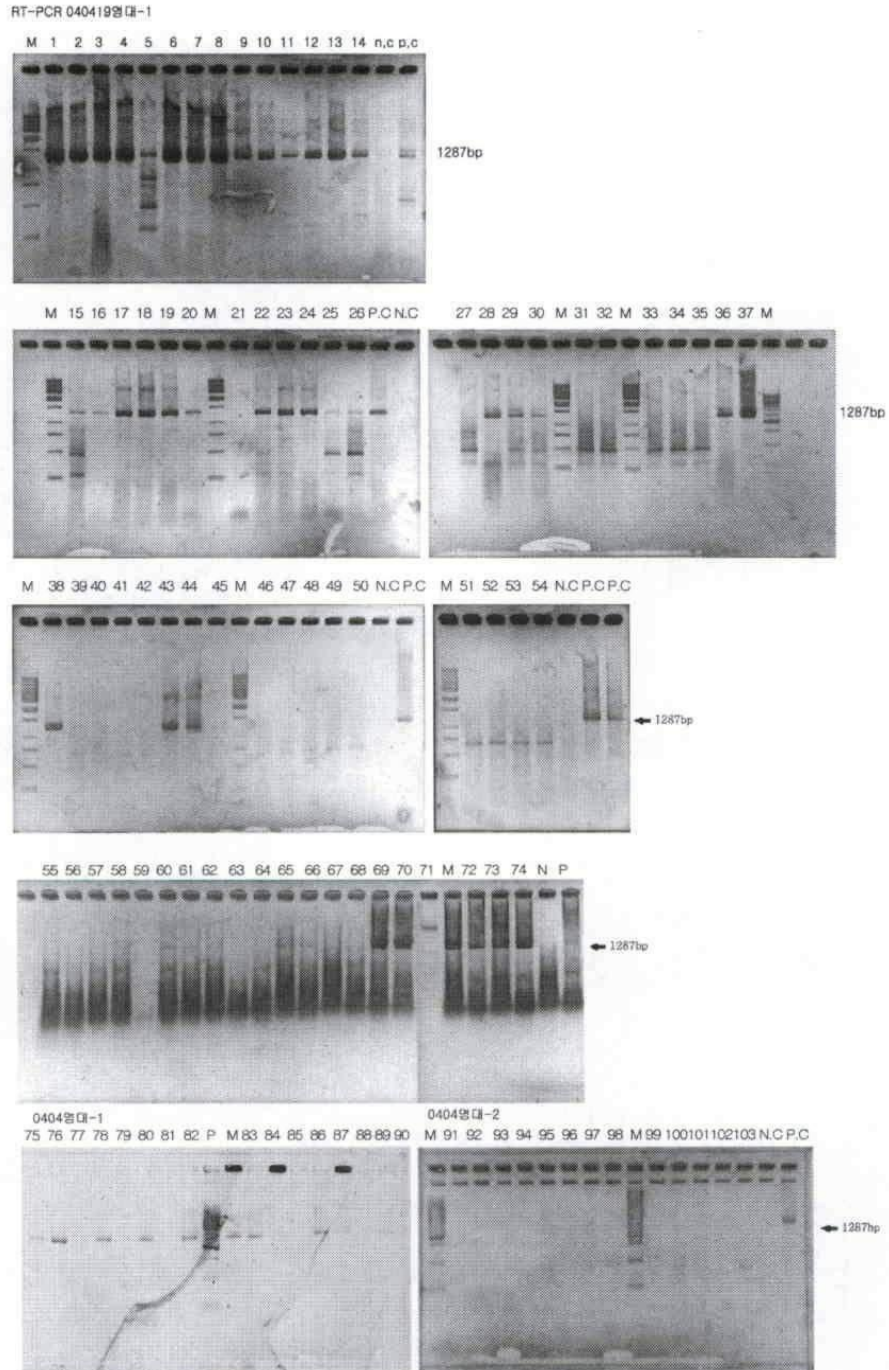


Fig. 7-1-1. Results of RT-PCR of CarMV from meristem culture of transgenic carnation. 250bp Marker (M), positive control (P), negative control (N).



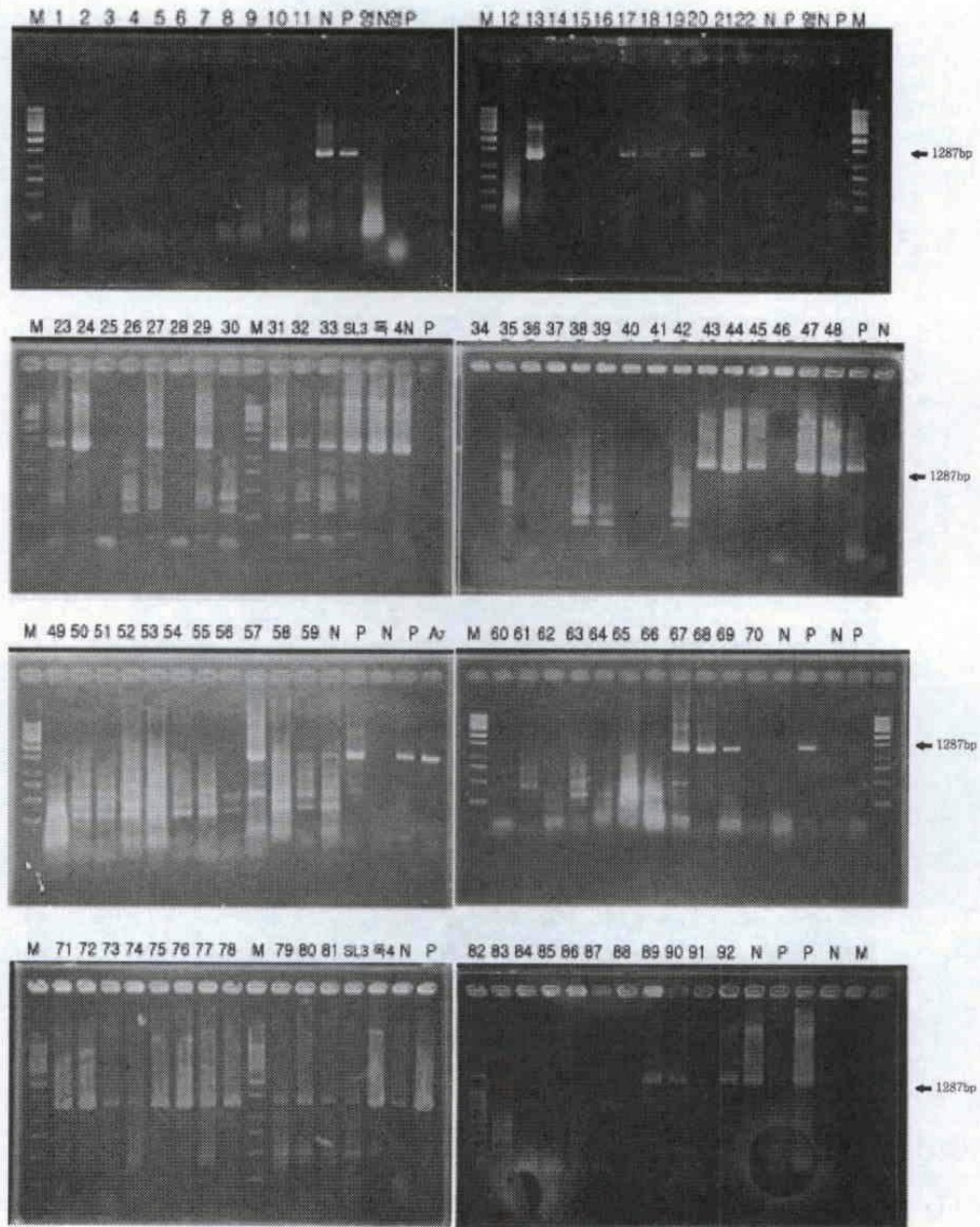


Fig. 7-1-2. Results of RT-PCR of CarMV from meristem culture of transgenic carnation. 250bp Marker (M), positive control (P), negative control (N).

②형질전환체 생장점배양 111개체 CarRSV RT-PCR검정에서 전체 111개체가 무병주였다.(그림7-2)

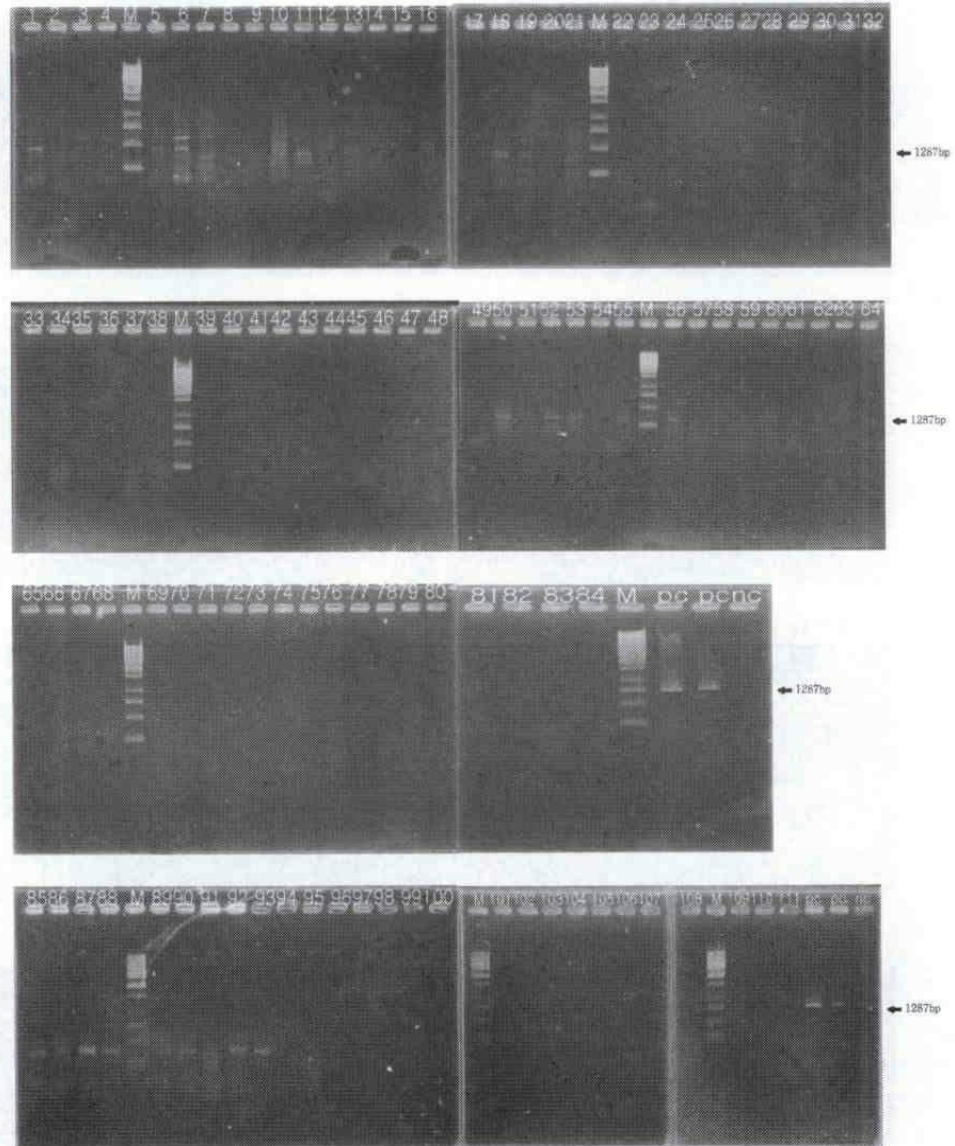


Fig. 7-2. Results of RT-PCR of CarRSV from meristem culture of transgenic carnation. 250bp Marker (M), positive control (P), negative control (N).



4. 조기강건형질전환체 생산을 위한 기내증식 : 90계통 793개체

1) CarMV CP 형질전환체 기내증식 : 28계통 234개체(그림8-1)

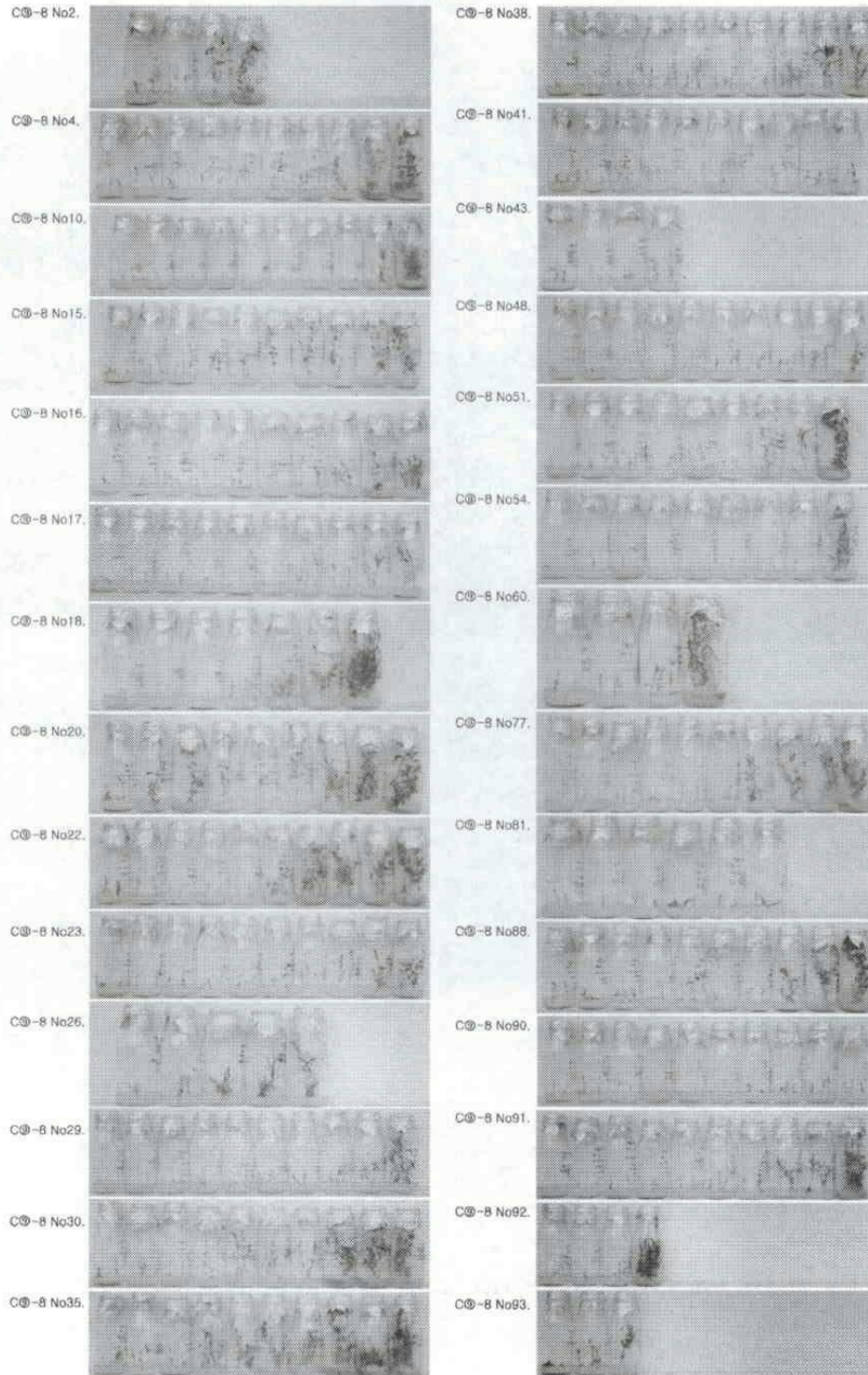


Fig. 8-1. CarMV CP transgenic plant subcultures and propagation.

2) CarRSV CP 형질전환체 기내증식 : 30계통 295개체(그림. 8-2-1, 8-2-2)

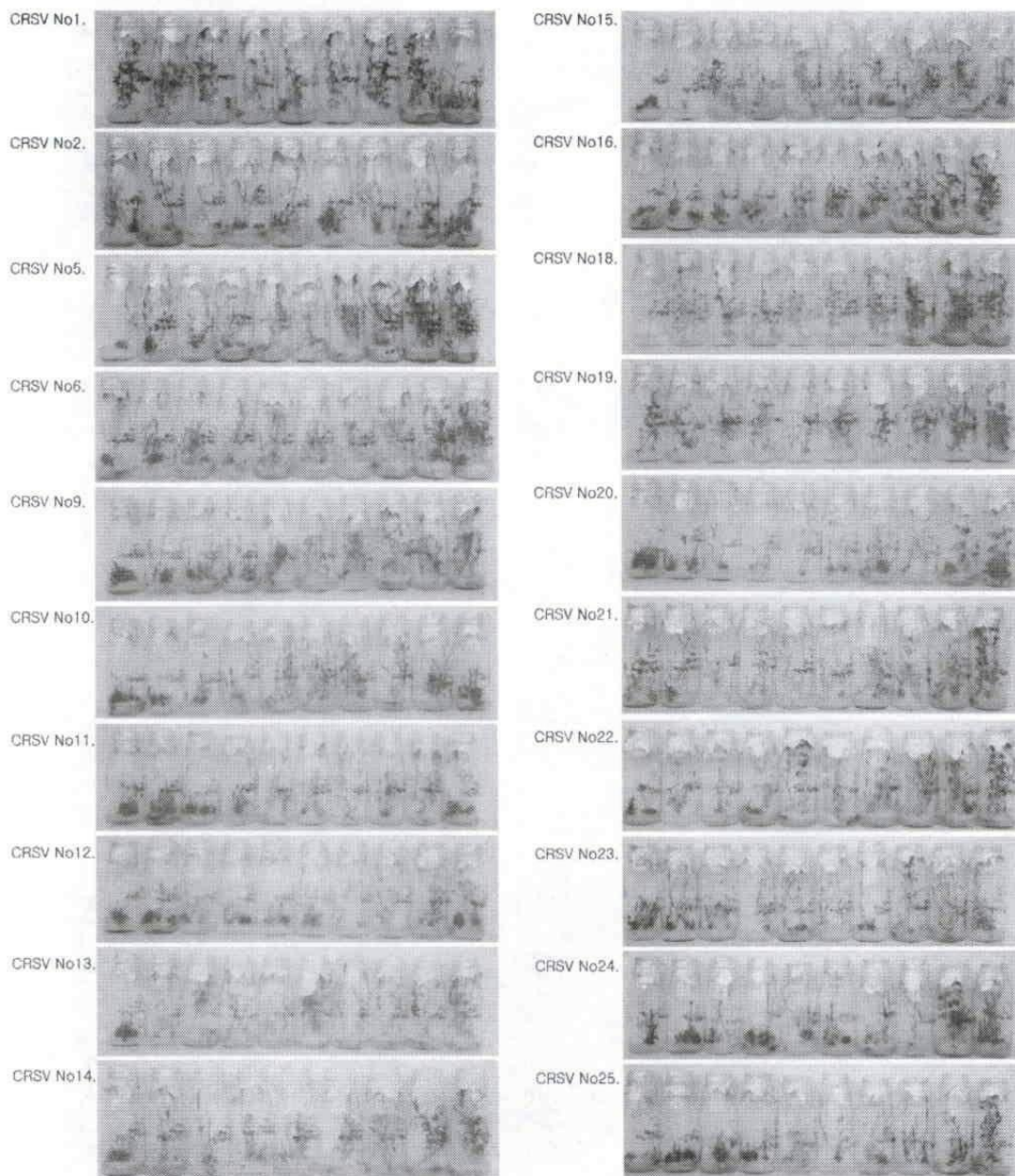


Fig. 8-2-1. CarRSV CP transgenic plant subcultures and propagation.



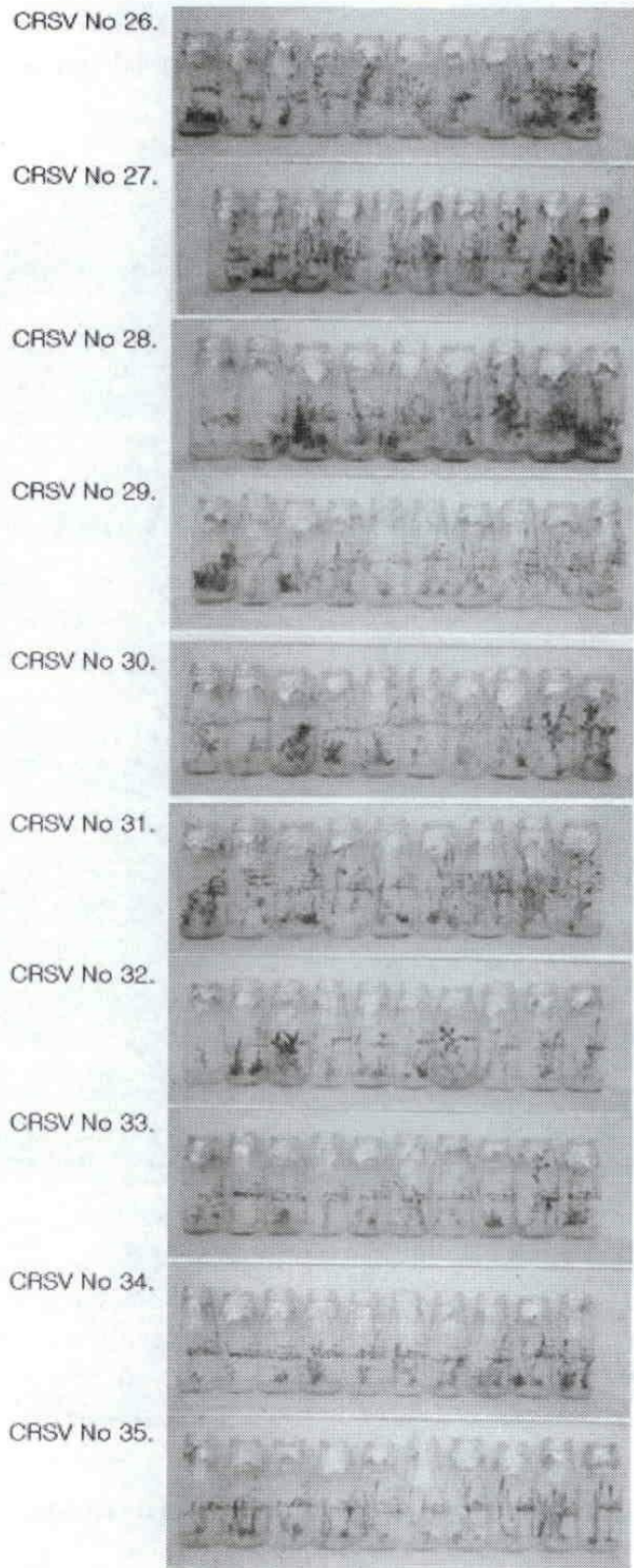


Fig. 8-2-2. CarRSV transgenic plant subcultures and propagation.

3) ToMV MP (PT30) 형질전환체 기내증식 : 43계통 339개체(그림. 8-3-1, 8-3-2)

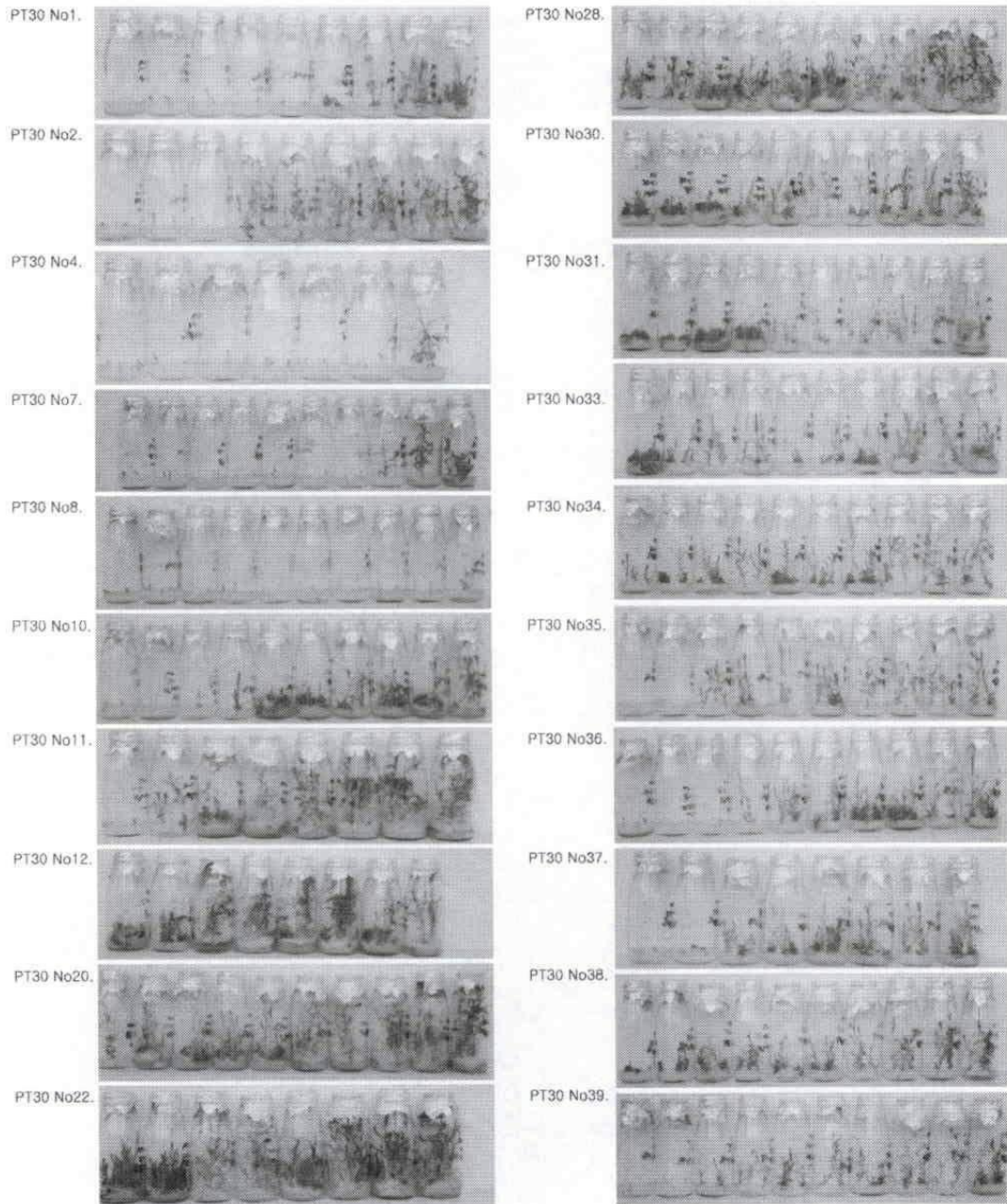


Fig. 8-3-1. ToMV MP transgenic plant subcultures and propagation.



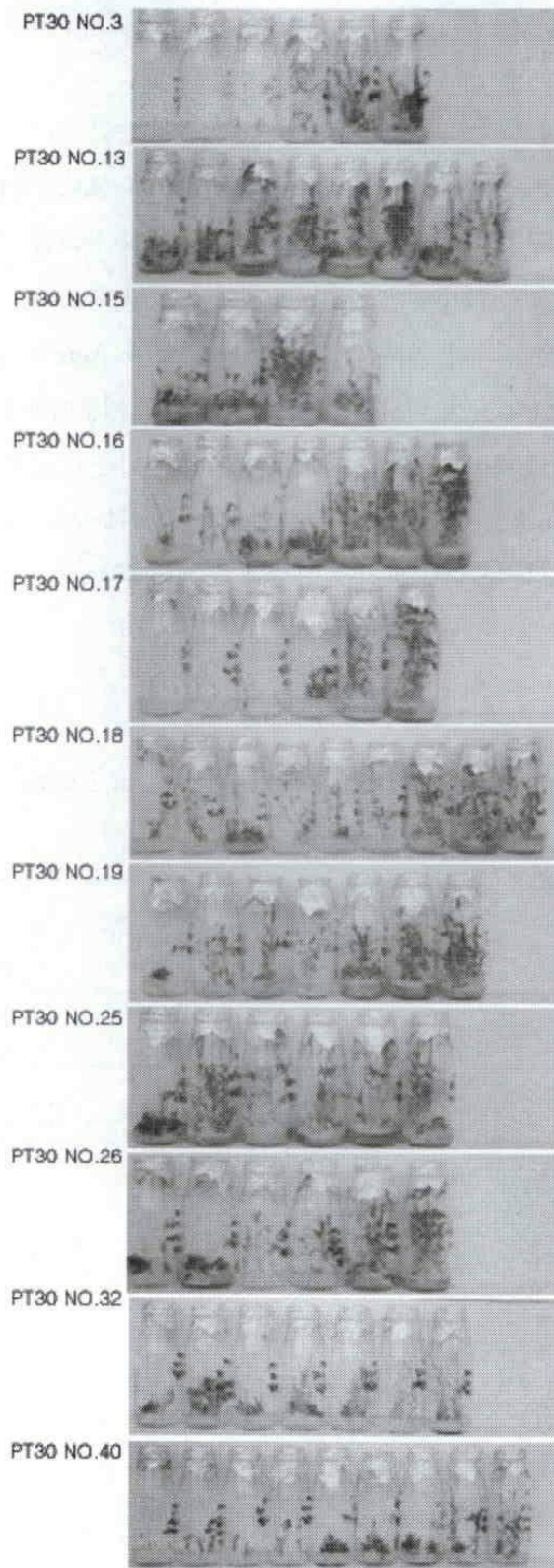


Fig. 8-3-2. Transgenic plant subcultures and propagation of ToMV MP.

## 5. 발근배지개선 및 포트재배

### 1) 강건묘 생산을 위한 발근배지개선 및 형질전환식물체 순화

형질전환체의 kanamycin 선발후의 생존율과, 발근후의 포트생존율을 높이기 위하여, MS기 본배지에서 무기염류, vitamin, sucrose와 agar의 농도를 달리하여 기내강건묘 육성을 위한 실험결과, sucrose는 3%가 5%보다 생육이 좋으며, 무기염류는 1 이 ½보다 좋았고, 비타민은 전체와 일부간에는 차이가 없었다. Agar의 농도는 1.2%가 0.8%보다 묘가 강건 하였다(표2). 이로써 Agar 1.2%의 MS 기본배지에 묘를 4주 계대배양한후 포트에 이식하였다. 강건묘배지와 발근배지에서 발근이 잘된 형질전환체는 지피 포트에 이식한 후, 4주 가량 성장상에서 순화시킨 후, 화분으로 이식하여 재배하였다. 이로써 Agar 1.2%의 MS 기본배지에 묘를 4주 계대배양한후 포트에 이식하였다. 강건묘지와 발근배지에서 발근이 잘된 형질전환체는 지피포트에 이식한 후, 4주 가량 성장상에서 순화시킨후, 화분으로 이식하여 재배하였다.

Table 2. Effects of varied MS-media on the growth of *Dianthus caryophyllus* 'Splash' shoot tip culture.

	No. of leaves <sup>z)</sup>	Plant length(cm) <sup>y)</sup>	(a/b)
	(a)	(b)	
Vitamin 일부	94	51.5	1.83
Vitamin 전체	96	50.0	1.92
Agar 0.8%	80	42.5	1.88
Agar 1.2%	110	59.0	1.86
Macro solution ½	86	46.5	2.12
Macro solution 1	104	61.0	1.71
Sucrose 3%	90	36.0	2.50
Sucrose 5%	100	65.5	1.53

z), y): after 4 weeks in culture

### 2) 형질전환식물체 온실재배 : 48계통/95개체

(1)CarMV CP 형질전환체 : 16계통 33개체(그림9-1)

(2)CarRSV CP 형질전환체 : 16계통 28개체(그림9-2)

(3)ToMV MP 형질전환체 : 16계통 34개체(그림9-3)

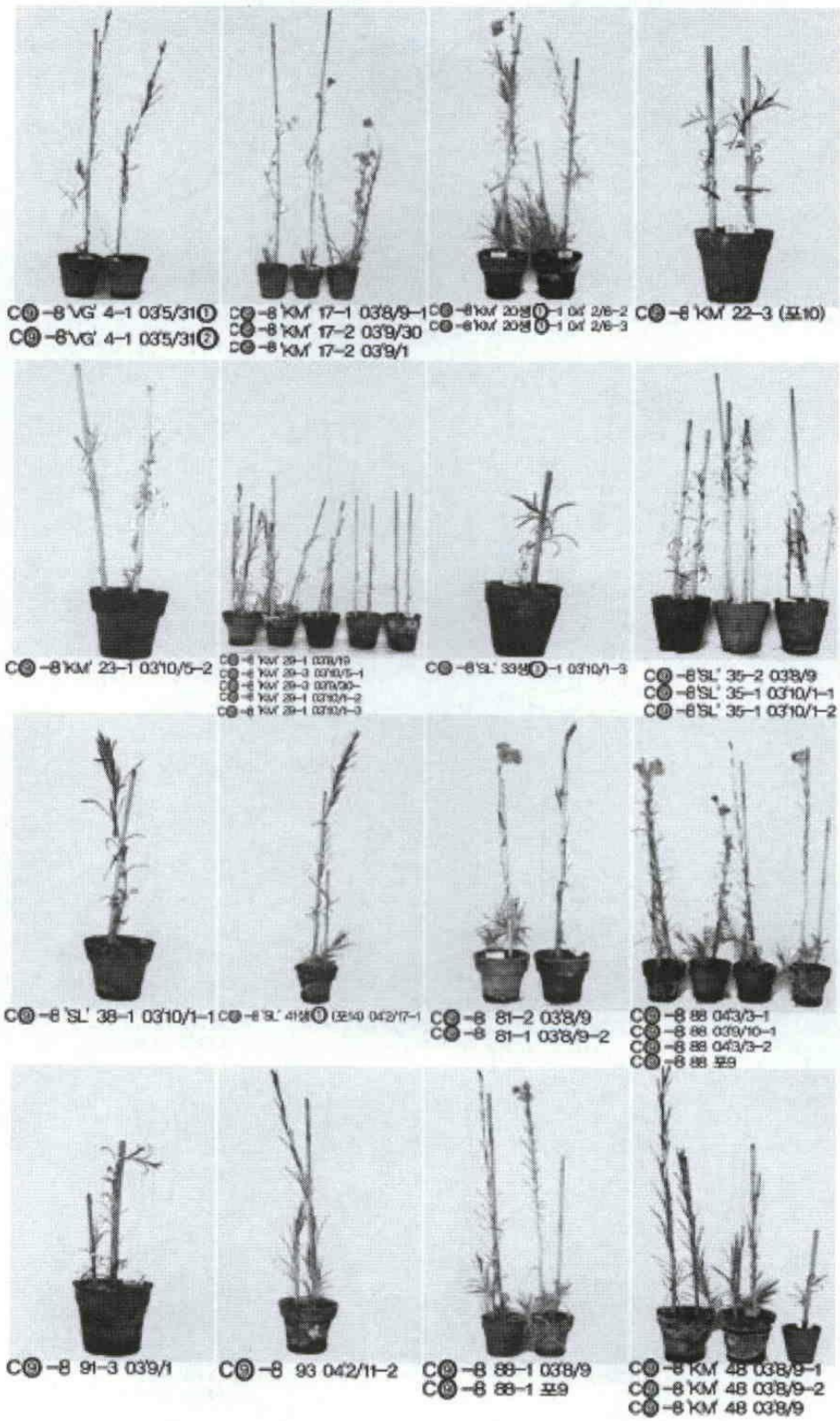


Fig. 9-1. Transgenic plants of CarMV CP gene (C⑨-8) in pot



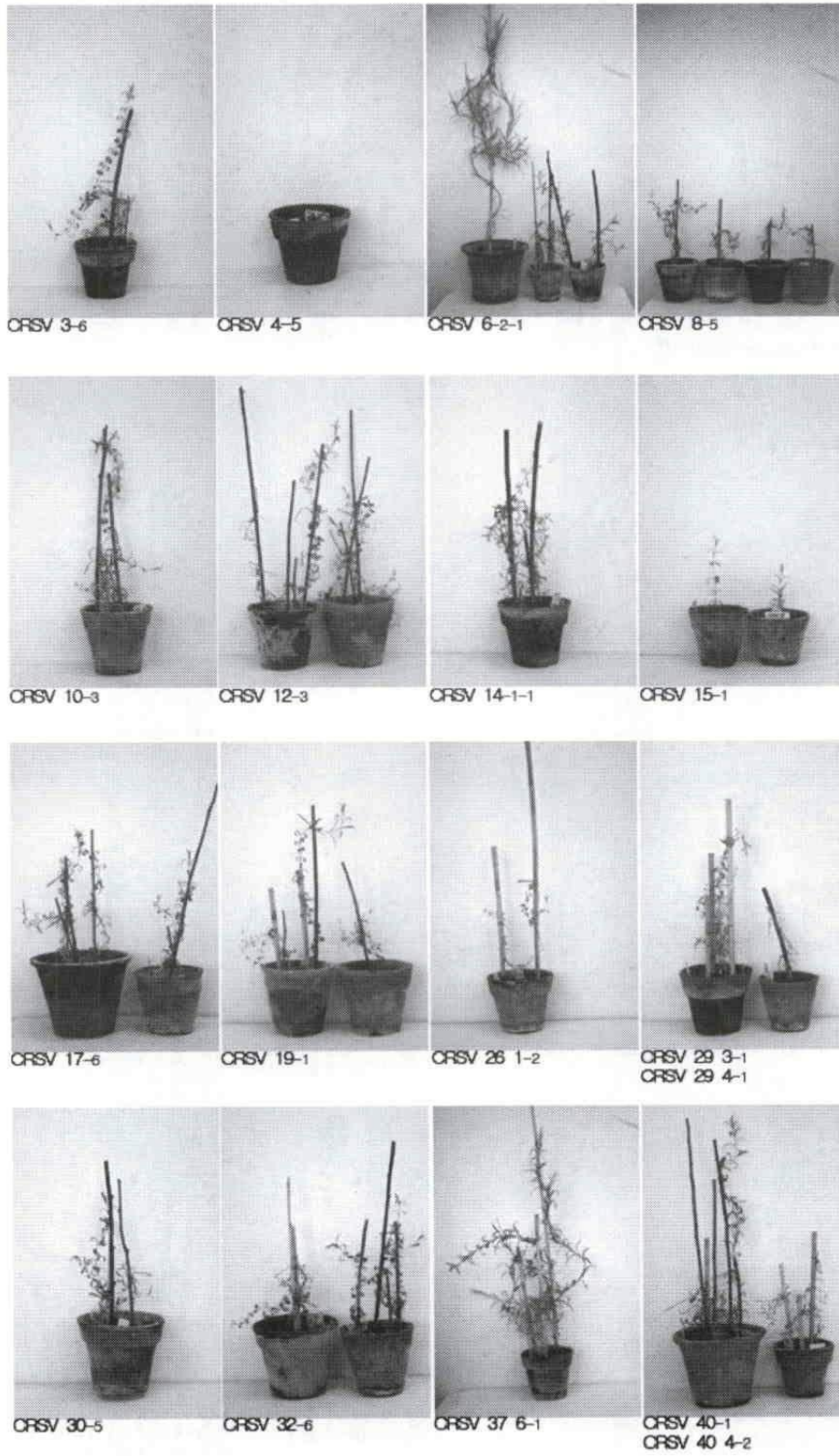


Fig. 9-2. Transgenic plants of CarRSV CP gene in pot.



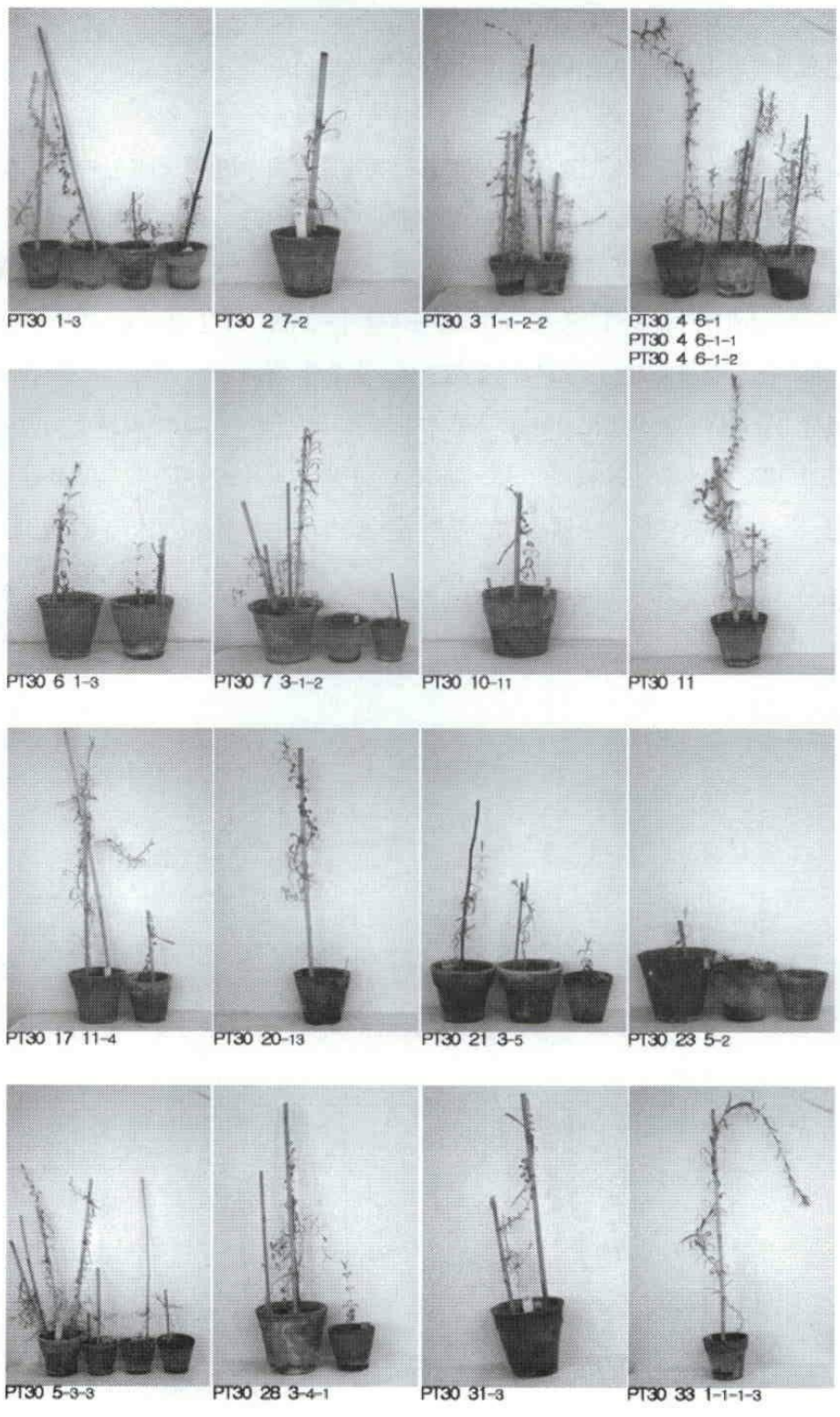


Fig. 9-3. Transgenic plants of ToMV MP (PT30) gene in pot.

## 6. 형질전환개체의 bioassay로 virus 저항성 검정

Virus 저항성검정으로 생물검정을 실시하였다. CarRSV에 이병된 시료잎의 즙액을 형질 전환체와 대조구인 'Blackeye'와 생장점배양에서 나온 무병주 카네이션에 즙액접종을 하였다. 접종은 0.01M(pH 7.0) 인산완충용액으로 시료를 마쇄하여 carborandum을 접종하고자 하는 잎에 뿌려 즙액접종을 한후 온실에서 1~2주일 동안 병징을 조사하였다. 그 결과 대조구인 실생묘 'Blackeye'에 CarRSV를 접종한 것은 1주 경과 후 갈색국부병반 증상에서 2주 경과 후 퇴록모자이크 증상까지 진행되면서 수일 뒤 백화고사 되었고(그림 10), 또한 대조구인 무병주 카네이션도 CarRSV 증상인 퇴록모자이크와 잎비틀림 증상이 나타난 후 고사하고, 형질전환체는 접종 2주 후 계속 왕성한 생육을 보였다(그림11, 12).

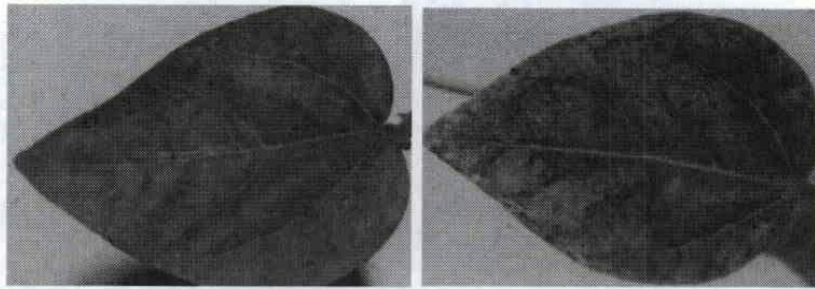


Fig. 10. Symptoms of local brown lesions (left) and chlorotic mosaic (right) *Vigna unguiculata* 'Blackeye' leaves infected with CarRSV.

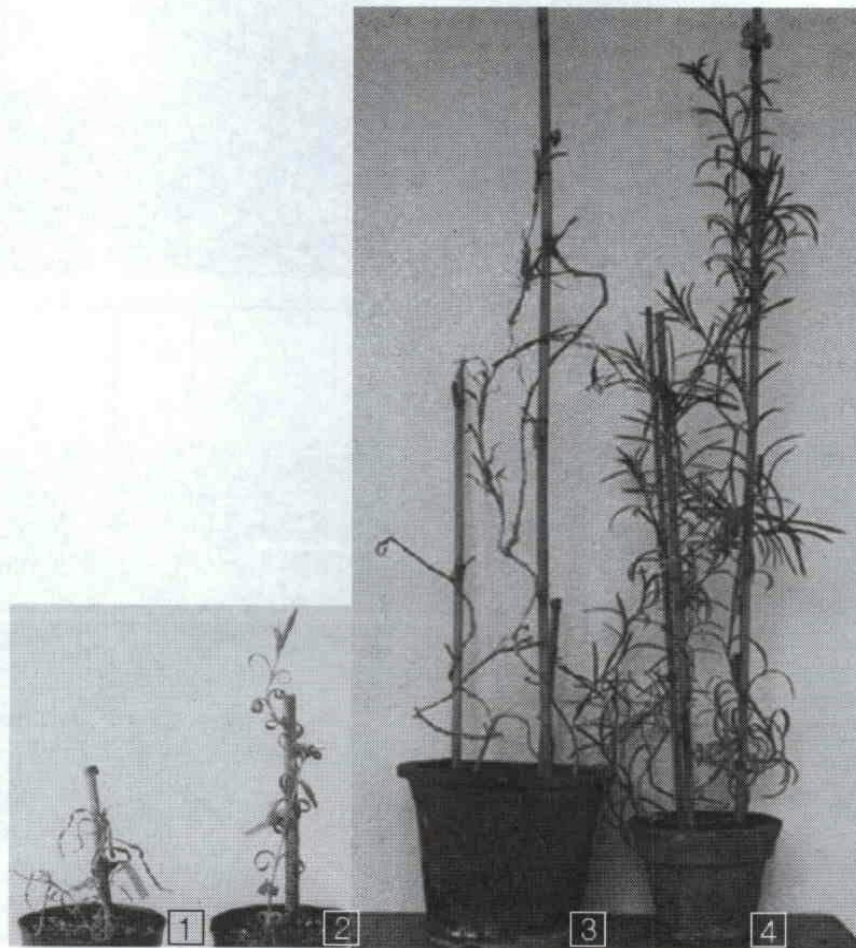


Fig. 11. Bioassay of non-transgenic (1, 3) and transgenic (2, 4) carnation plant inoculated with CarRSV (left) and CarMV (right).



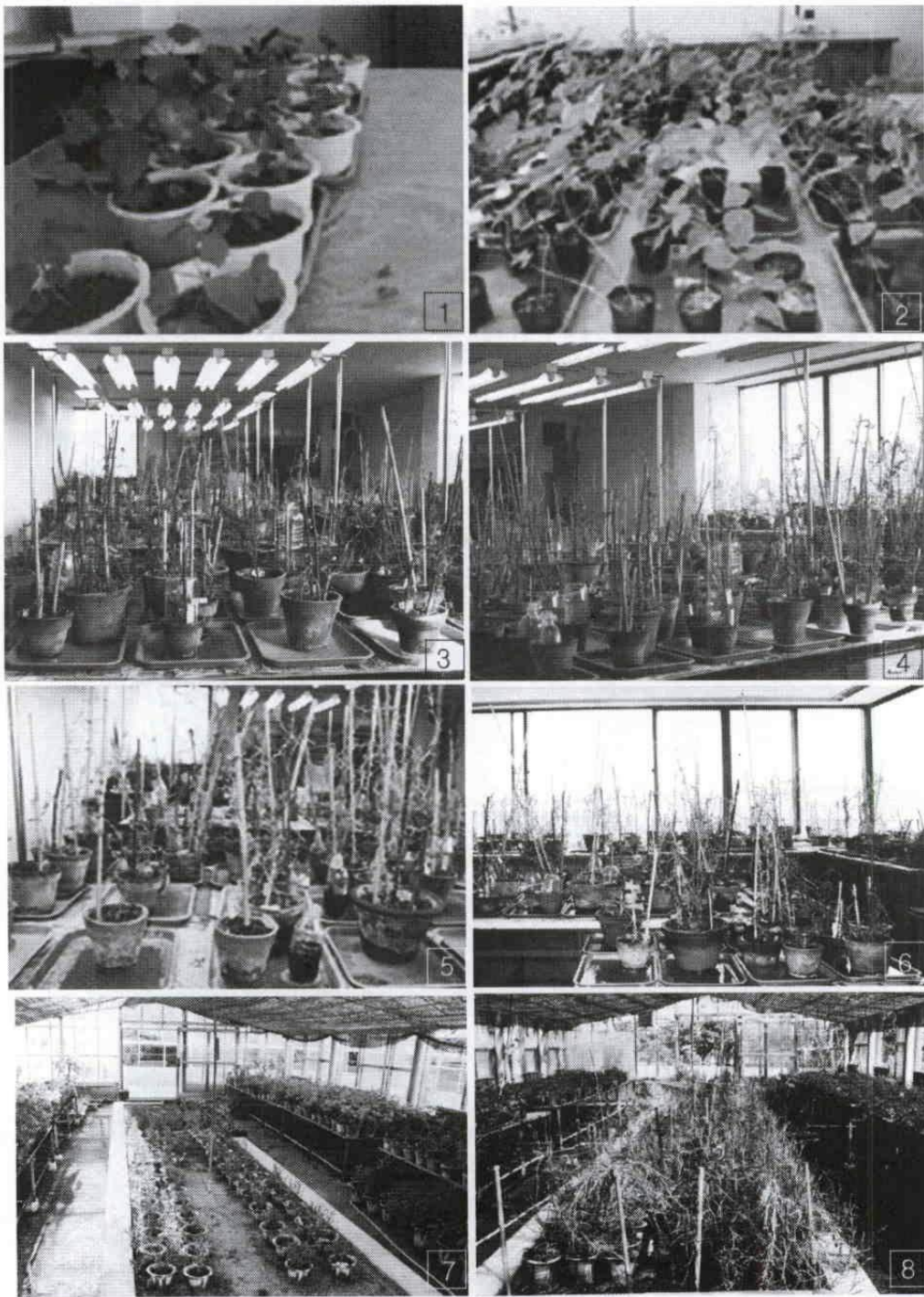


Fig. 12. Bioassay of non-transgenic and transgenic carnation plant inoculated with CarMV(2) and CarRSV(1), photography of cultured transgenic plant in growth-room (3, 4, 5, 6) and greenhouse (7, 8). [1]. *Chenopodium quinco* , [2]. *Vicia fava*, [3], [4]. CarRSV , [5]. PT30, [6]. C9-8, [7], [8]. Greenhouse

## 7. 교배육종

가톨릭대학교에서 교배모본 카네이션을 기내배양 14품종(그림13-1)과 온실재배 24품종(그림13-1, 12-7, -8)에서 형질전환개체와 품종간 13교배조합 15개체에서, 품종간 29교배조합 57개체에서 종자가 생기지 않았다(표 3-1, 3-3). 남원농장에서의 수집품종간의 교잡친화성 검정을 위하여 98교배 조합간 331꽃에 교배하여(표 3-2, 3-4, 그림 13-2, 13-3), 12교배조합에서 492종자를 채취하였다(표3-2).

Table 3-1. Results of cross combination for carnation plants (between trans-genic and cultivars) in 'Catholic Uni. of Daegu'.

Cross combination(♀x♂)	No. of crossing flowers	No. of seeds
C9-8 17-1 x '로렌스'	1	0
C9-8 17-2 x '로렌스'	1	0
'로렌스' x C9-8 17-2	1	0
C9-8 17-2 X '볼레로'	1	0
'볼레로' x C9-8 17-2	1	0
C9-8 17-2 x '케샤'	1	0
'케샤' x C9-8 17-2	1	0
C9-8 17-2 x '이븐드'	1	0
C9-8 17-2 x 'Mercury'	3	0
CarRSV 15-1 x 'Dona'	1	0
'Dona' x CarRSV 15-1	1	0
CarRSV 15-1 x '로렌스'	1	0
PT30 21-3-4 x 'Maestro'	1	0
Total	13	0

Table 3-2. Results of successfully cross combination for carnation plants (between cultivars) in 'Namwon'. Flowers produced seeds.

Cross combination(♀x♂)	No. of crossing flowers	No. of seeds
'Dona' x '볼레로'	7	26
'Super Green' x '다이아몬드'	5	2
'Degio' x '볼레로'	5	11
'루비' x '가아넷'	12	46
'페가수스' x '가아넷'	44	146
'Rossnii' x 'Crown'	2	40
'로렌스' x '볼레로'	9	1
'Rossnii' x 'Eugnia'	4	41
'Imp white' x '가아넷'	2	21
'White libeaty' x 'Rupic'	4	37
'산 호' x '가아넷'	10	61
'다홍별' x '가아넷'	18	60
Total	12	492



Table 3-3. Results of unsuccessfully cross combination for carnation plants  
(between cultivar) in 'Catholic Uni. of Daegu'.

Cross combination(♀x♂)	No. of crossing flowers	No. of seeds
'Lip Barber' x S	1	0
'Melosa' x S	1	0
'Mercury' x S	2	0
'Red Bardara' x S	1	0
'Nelsonst' x S	2	0
'Green' x S	1	0
'Framingo' x S	1	0
'핑크베걸' x S	1	0
'볼레로' x 'SL'	3	0
'핑크베걸' x 'SL'	3	0
'West Hipne' x 'SL'	3	0
'로렌스' x '이본느'	3	0
'Melosa' x 'Rossini'	1	0
'핑크로렌스' x 'West Hipne'	1	0
'Maestro' x 'Rossini'	1	0
'West Hipne' x 'Framingo'	1	0
'West Hipne' x 'Maestro'	1	0
'Super Green' x '다이아몬드'	1	0
'다이아몬드' x 'Super Green'	1	0
'Maestro' x 'Framingo'	2	0
'Virgine' x 'Nelsonst'	1	0
'Astraco' x 'Melosa'	3	0
'Lip Barber' x 'Green'	3	0
'Green' x 'Lip Barber'	1	0
'Rossini' x 'Green'	3	0
'Framingo' x 'Melosa'	3	0
'Rossini' x 'Red Badara'	3	0
'Mercury' x 'Red Badara'	3	0
'Framingo' x 'Red Badara'	6	0
Total	29	0

Table 3-4. Results of unsuccessfully cross combination for carnation plants  
(between cultivar) in 'Namwon'.

Cross combination(♀x♂)	No. of crossing flowers	No. of seeds
'Degio' x '다이아몬드'	4	0
'Super Green' x '블레로'	2	0
'로렌스' x '다이아몬드'	1	0
'Barados' x 'Terra'	4	0
'Terra' x '가아넷'	4	0
'Gold star' x '가아넷'	6	0
'Tasman' x '가아넷'	2	0
'Virgo' x '가아넷'	4	0
'피닉스' x '가아넷'	6	0
'피닉스' x 'West mint'	2	0
'West mint' x '가아넷'	4	0
'West mint' x 'Eugnia'	2	0
'West mint' x '사랑별'	2	0
'Sun ray' x '가아넷'	4	0
'Sun ray' x 'Eugnia'	4	0
'Tasman' x '가아넷'	4	0
'Tasman' x 'Scarlet queen'	2	0
'Tasman' x 'West mint'	2	0
'Teresa' x '가아넷'	8	0
'랑데뷰' x 'Crown'	2	0
'Easter' x 'West pearl'	2	0
'Easter' x 'Terra'	2	0
'다홍별' x 'Tropical butterfly'	2	0
'페가수스' x 'West mint'	4	0
'페가수스' x '사랑별'	4	0
'Koreno' x 'Tasman'	2	0
'드림별' x 'Eugnia'	6	0
'Tusarom' x '가아넷'	2	0
'Inter mezzo' x '가아넷'	4	0
'lury' x '가아넷'	6	0
'White libeaty' x 'West pearl'	6	0
'Gold star' x '가아넷'	6	0
'Rupic' x '가아넷'	8	0
'Scarlet queen' x '가아넷'	12	0
'White charlotte' x '가아넷'	2	0
Total      35	137	0

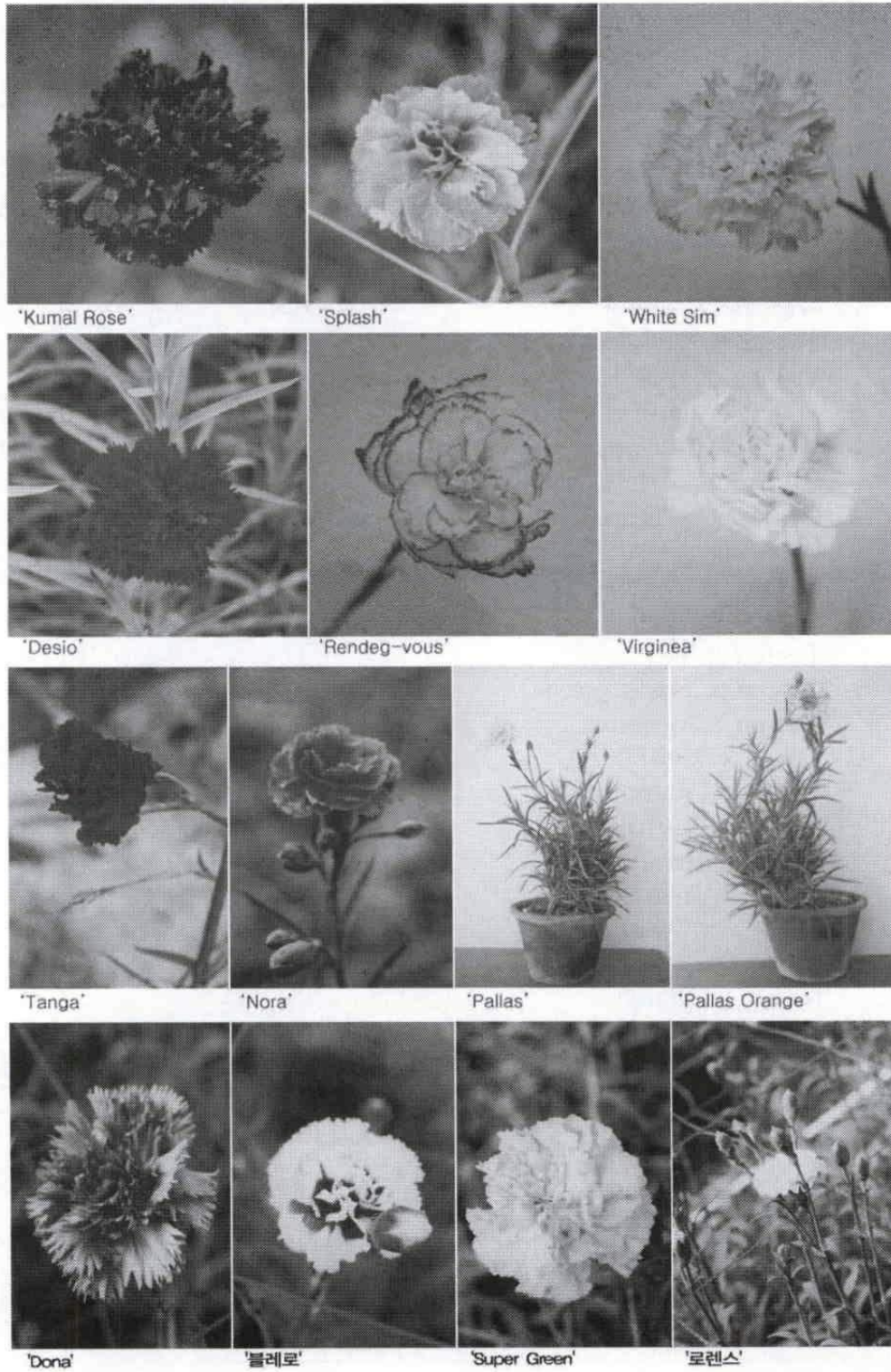


Fig. 13-1. Photography of used carnation cultivar collected in 'Catholic Uni. of Daegu'.





Fig. 13-2. Photography of used carnation cultivar collected in 'Namwon'.

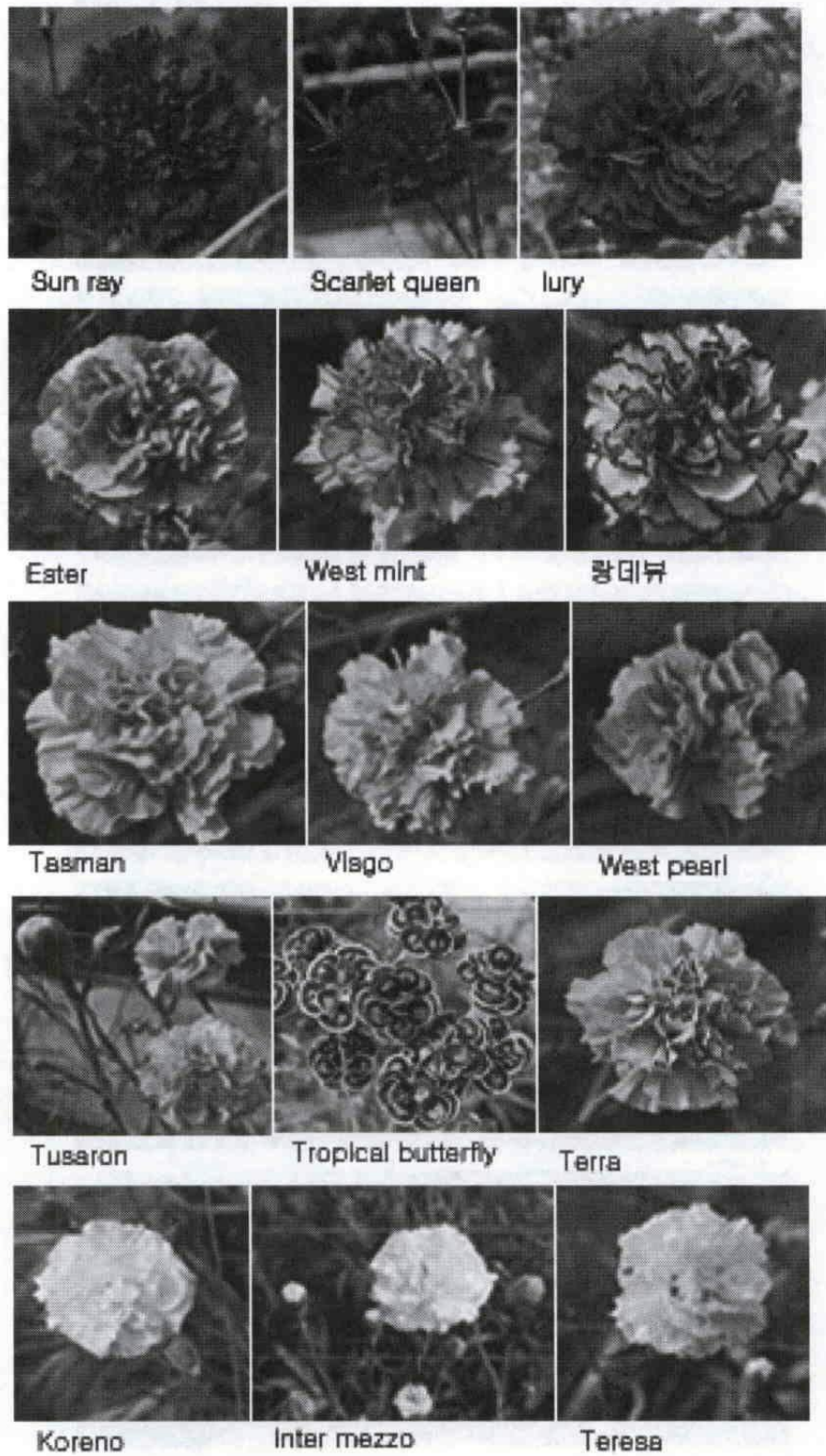


Fig. 13-3. Photography of used carnation cultivar collected in 'Namwon'.



## 제 2 절. Carnation Virus 검정; 협동연구기관

### 가. 연구개발 수행 내용

#### 1. 카네이션 품종에 감염되는 바이러스 분리·동정 및 특성연구

- 1) 카네이션 바이러스의 피해 상황
- 2) 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰
- 3) 생물학적 검정

#### 2. 바이러스 정제 및 항혈청 생산

##### 1) CarMV의 정제 및 항혈청 생산

- (1) CarMV의 증식
- (2) CarMV 정제
- (3) CarMV 항혈청 제작
  - ① Agar double gel diffusion test
  - ② ELISA test

##### 2) CarRSV의 정제 및 항혈청 생산

- (1) CarRSV의 증식
- (2) 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰
- (3) CarRSV 정제
- (4) CarRSV 항혈청 제작
  - ① ELISA test
  - ② Rapid immunofilter paper assay(RIPA)

#### 3. Virus 진단체계 확립

##### 1) RT-PCR 검정

- (1) Primer 제작
- (2) RT-PCR 검정
  - ① CarMV
  - ② CVMV

③CLV

- 2) IC-RT-PCR 검정
- 3) Rapid immunofilter paper assay (RIPA)
- 4) Ds-RNA extraction and electrophoresis

4. Virus 염기서열분석

- 1) 한국에서 재배되는 카네이션과 백합에서 분리된 CarMV CP gene 분석
- 2) 한국, 일본, 중국에서 재배되는 카네이션에서 분리된 CarMV CP gene 분석
  - (1)투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰
  - (2)바이러스의 증식
  - (3)바이러스 부분 순화
  - (4)바이러스의 RNA 정제
  - (5)RT-PCR에 의한 바이러스 CP gene의 증폭
  - (6)CP gene의 염기서열 분석
    - ①한국재배 카네이션
    - ②일본재배 카네이션
    - ③중국재배 카네이션
- 3) CarRSV의 CP gene분석

5. 카네이션 재배지역 감염률 조사

- 1) 광학현미경 검정
  - ①1차년도
  - ②2차년도
  - ③3차년도
- 2) RT-PCR 검정
  - (1)CarMV
  - (2)CarRSV
  - (3)CLV

6. 대구가톨릭대학교와 협동연구 지원현황

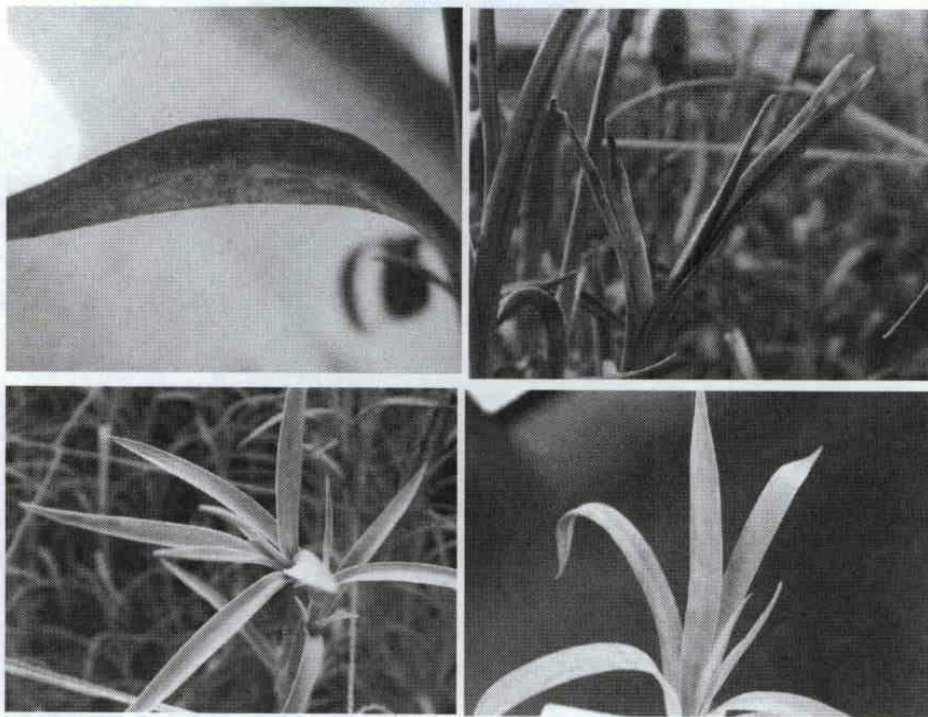
- 1) RT-PCR에 의한 바이러스 검정
- 2) RIPA에 의한 바이러스 검정
- 3) 바이러스 증식된 잎을 제공

## 나. 연구개발 수행 결과

### 1. 카네이션 품종에 감염되는 바이러스 분리·동정 및 특성연구

#### 1) 카네이션 바이러스의 피해 상황

카네이션 주 재배지인 남부지방을 중심으로 경상남도 김해 재배 농가, 전라북도 재배 농가, 전라북도 농업기술원, 대구 인근 꽃 판매상 등에서 바이러스 감염으로 사료되는 얼룩무늬(mottle), 줄무늬(stripe), 기형(malformation) 증상을 보이는 카네이션 채집하여 피해상황을 조사하였다.

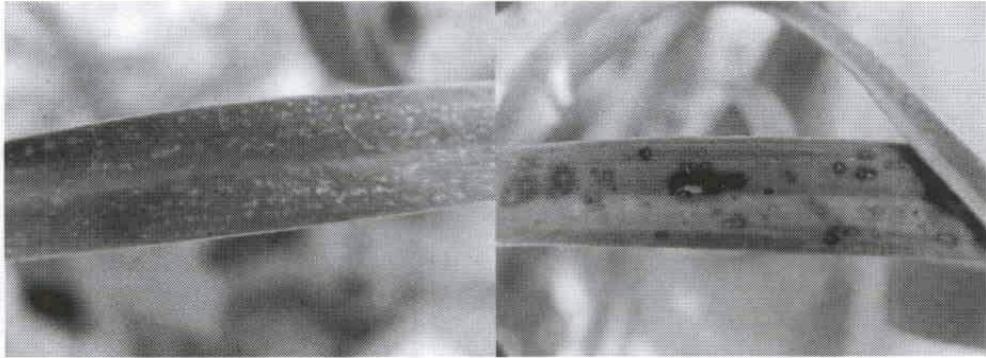


CarMV

Fig. 14-1. Symptom of CarMV infection (single infection)



CarMV + CLV



CarMV + CNFV



CarMV+CLV+CNFV

Fig. 14-2. Symptom of multiple infection



2) 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰

채집한 시료의 바이러스 감염이 확인되는 이병잎 조직을 멸균된 면도칼(razorblade)로 작게 잘라 소독된 슬라이드글라스 위에 올려놓은 다음, 2% phosphotungstic acid(PTA, pH 7.0)를 한두 방울 떨어뜨린 후, 면도칼로 잘게 잘라 충분히 마쇄(磨碎)한 조즙액에 탄소막을 입힌 그리드(grid)를 살짝 적셔서 약 30초간 역염색을 하고 다시 여과지에서 여액을 제거하고 건조시켜서 투과전자현미경(Hitachi H-7600)하에서 바이러스입자를 관찰하였다(Direct negative staining method; DN법, Doi 등, 1969). 그 결과 직경 30~34 nm의 구형 입자인 CarMV, 길이 600~700 nm의 사상형 입자인 CLV(Carnation latent virus) 그리고 길이 1400~1600nm인 CNFV(Carnation necrotic fleck virus)가 관찰되었다.

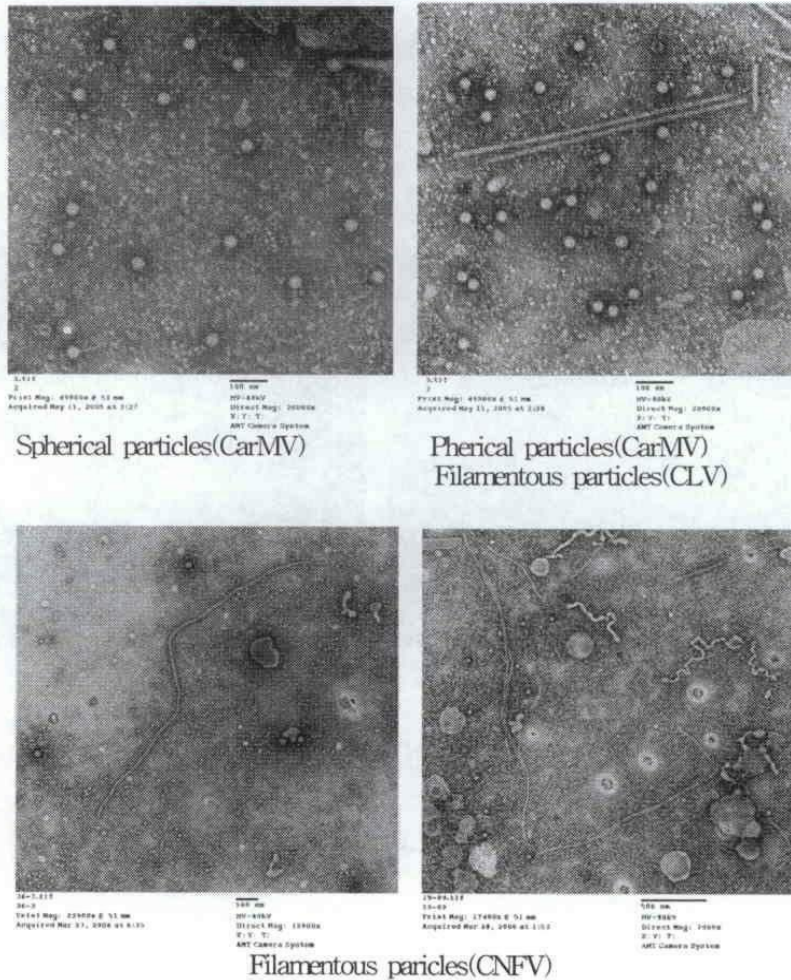
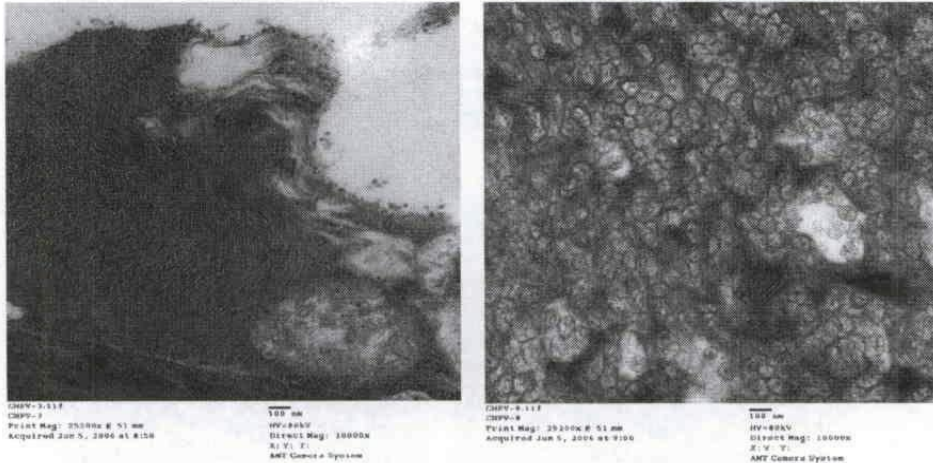


Fig. 15-1. Morphological observation of Carnation virus by TEM.



투과전자현미경으로 형태적인 관찰시, 우리나라에서 보고되지 않았던 CNFV (Carnation necrotic fleck virus)로 보이는 virus particle(약1400-1600nm)이 관찰되어 초박절편시료를 제작하여 관찰 하였다. 우선, CNFV는 감염된 잎의 표피세포와 사부 세포에서 관찰되므로 감염된 잎의 잎맥을 중심으로 10×2mm 크기로 자른다. Vial에 2.5% glutaraldehyde 2ml을 넣고 세절한 시료를 90-120분 동안 넣어둔다. 그 후 0.1M phosphate buffer(pH7.2) 2ml을 넣고 15분간 2회 washing 한다. 1% OsO<sub>4</sub>에 담귀 4℃에서 90분 동안 고정한 후 0.1M phosphate buffer(pH7.2) 2ml을 넣고 15분간 2회 washing 한다. stepwise EtOH로 시료에 따라 탈수시간을 적당히 조절하면서 흔들어 주면서 탈수한다. propylene oxide 2ml에서 20분간 1회 치환하고 Epoxy : propylene oxide = 1 : 1 혼합수지에서 1시간 30분 동안 vacuum에서 pumping 한다. Epoxy : propylene oxide = 2 : 1 혼합수지에서 1시간 30분 동안 vacuum에서 pumping 한다. 익일 epoxy를 다시 배합하여 pure epoxy에서 vacuum안에 넣어 overnight pumping 한다. Embedding한 후에 ultramicrotome을 이용하여 ultrathin section한다. Watson법 인 이중염색을 하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

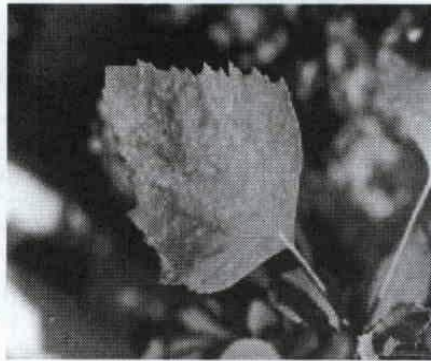


Filamentous particles(CNFV)

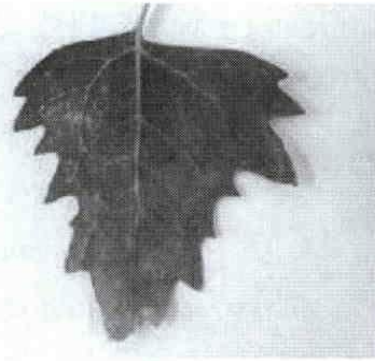
Fig. 15-2. Morphological observation of CNFV by TEM

3) 생물학적 검정

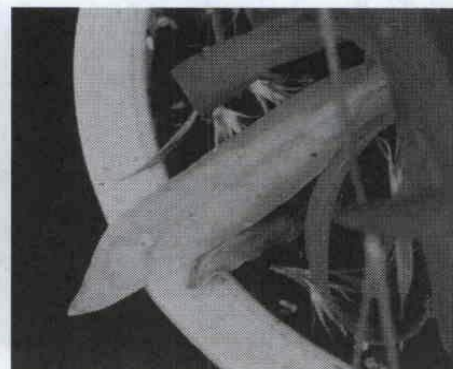
CarMV(Carnation mottle *carmovirus*)를 *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* 그리고 수염패랭이(*Dianthus barbatus*)에 접종한 결과 chlorotic spot과 yellowing 병징이 나타났다.



*Chenopodium amaranticolor*



*Chenopodium quinoa*



*Dianthus barbatus*

Fig. 16. Symptom of CarMV infection on various plants.

## 2. 바이러스 정제 및 항혈청 생산

### 1) CarMV의 정제 및 항혈청 생산

#### (1) CarMV의 증식

CarMV에 감염된 카네이션 이병엽에 0.01M PB(pH7.2)를 넣어 마쇄, 착즙한 다음, carborundum을 이용한 상법에 따라 *Chenopodium amaranticolor*에 적당량의 carborundum을 부린 다음, 상기 시료를 멸균된 탈지면에 적셔서 조심스럽게 고루 문지른 다음, 물로 씻어내고 고온과 직사광선을 피하여 그늘에 두었다. 그 결과, 접종 7일 후에 접종엽에서 chlorotic spot 병징이 나타났다. CarMV에 단독감염이 확인된 *Chenopodium amaranticolor* 이병엽을 접종원으로 하여 동일한 방법으로 *Chenopodium amaranticolor*에 접종하였다. 접종 7일 후 병징이 나타난 잎을 수거하여 바이러스 정제 시료로 하였다.

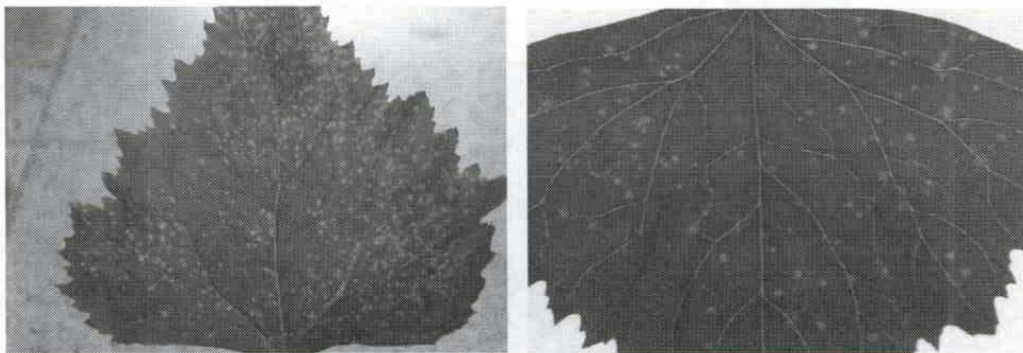


Fig. 17. Chlorotic spot on a leaf of *Chenopodium amaranticolor*.

#### (2) CarMV 정제

CarMV에 감염된 *Chenopodium amaranticolor* 이병엽 100g에 300ml의 추출 완충액을 첨가하여 분쇄기로 곱게 마쇄하여 이중거즈로 거른 다음 10,000rpm에 10분 원심분리를 실시한다. 2% Triton X-100을 첨가하여 4°C에서 15분간 교반시킨 다음 28,000rpm에 2시간 동안 초원심 분리를 실시한다. 침전물을 추출 완충액에 녹인후 6000rpm에 5분간 원심분리 시킨 후, 상층액을 32,000rpm에 1시간 30분 동안 초원심분리를 실시한다. 침전물을 10mM sodium borate buffer에 녹여서 바이



러스 시료를 준비한다. 이 바이러스 시료 2 $\mu$ l를 2% PTA에 염색하여 전자현미경으로 관찰한 결과 약 30~35nm 크기의 구형 바이러스 입자가 관찰되었다.

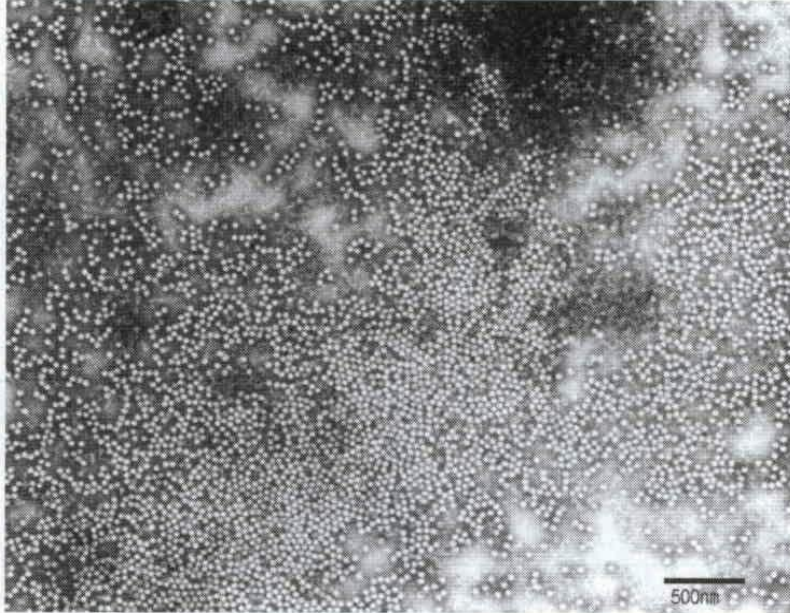


Fig. 18. Particle of purified CarMV.

### (3) CarMV 항혈청 제작

1차 년도에서는 백합에서 분리된 항혈청을 이용하여 바이러스 검정을 수행하였으며, 2차 년도에서는 카네이션에 분리한 CarMV 로부터 항혈청을 제작하였다.

항혈청 제작은 통상적인방법으로 실시하였다. 정제한 CarMV를 0.5mg/ml이 되도록 0.01M PB(pH 7.2)에 희석하여 동량의 Freund's complete adjuvant와 완전히 혼합한 다음 토끼에게 3군데에 나누어 피하주사를 1차, 2차 수행하였다. 2주 후에 위와 동일한 농도의 바이러스와 동량의 Freund's incomplete adjuvant와 섞어서 동일한 방법으로 피하주사를 3차, 4차 수행하였다. 다시 2주 후 동일 농도의 바이러스 항원을 ajuvant와 섞지 않고 토끼에게 피하 주사를 5차, 6차 수행하였다. 토끼의 정맥으로부터 채혈 후, 채혈한 전혈을 실온에서 overnight하여 응고시킨 후, 4°C에서 overnight하여 응고시킨 후, 4000rpm 30분간 원심분리하여 상층액을 항혈청으로 이용하였다. 얻어진 항혈청을 ImmunoPure IgG Purification kit(Pierce)로 정제 희석하여 Rapid immuofilter paper assay(RIPA)검정에 이용하였다.

Table 4. Method of CarMV antiserum Production

Date(days)	항혈청 제작 과정
	* 1.5kg female 토끼 구입, 적응- 7일간 일주일 간격으로 주사예정
1 ~ 7	* 1차 주사 (피하 주사), 2차 주사 (피하 주사) Antigen(CarMV) : 700 $\mu$ l(0.5mg/ml) Freund's complete adjuvant : 700 $\mu$ l total : 1.4ml 주사
8 ~ 15	* 3차 주사 (피하 주사), 4차 주사 (피하 주사) Antigen(CarMV) : 700 $\mu$ l Freund's incomplete adjuvant : 700 $\mu$ l total : 1.4ml 주사
22 ~ 29	* 5차 주사 (피하 주사), 6차 주사(피하 주사) Antigen(CarMV) : 원액 주사
36 ~ 43	* 채혈 후 ELISA로 역가 테스트
~ 현재	* -70 $^{\circ}$ C보관 CarMV RIPA Kit 제작

①Agar double gel diffusion test

증류수에 녹인 0.5% agarose 2.5ml을 페트리디쉬 위에 올려놓아 하루동안 말려서 표면에 납작하게 달라 붙도록 한다. PBS에 녹인 1% agarose 3ml을 coating된 페트리디쉬 위에 얹어 1시간 정도 굳힌다. 직경이 2~3mm 되는 관으로 well을 만든 다음, 가운데 well에 antigen용액 15 $\mu$ l를 넣고 둘레 well에는 antiserum을 PBS로 희석 (원액, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/2000)하여 15 $\mu$ l씩 넣는다. 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한 결과, 1, 5번 sample에서 precipitin line이 강하게 형성되었고, 4, 6번 sample에서는 precipitin line이 형성되지 않았다. 또한 2, 3번 sample에서는 precipitin line의 형성 유무를 확실히 알 수 없었다.

Ag	Purified CarMV
CaMV Ab 1	1/10 dilution
2	1/100 dilution
3	1/1000 dilution
4	1/2000 dilution
5	crude liquid
JYMV Ab 6	1/100 dilution

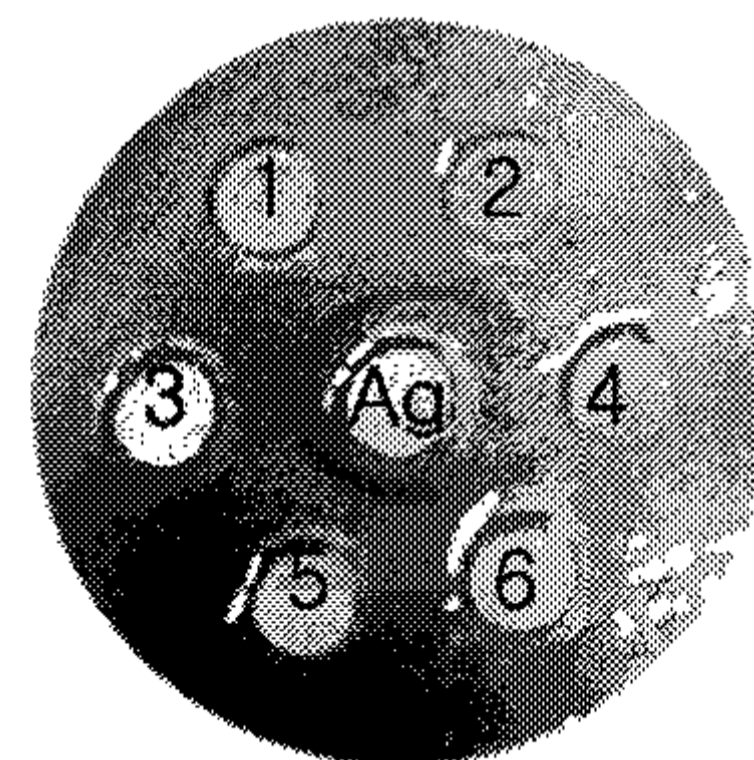


Fig. 19. Agar double gel diffusion test



②ELISA test

Clark와 Adams(1977)의 마이크로플레이트법에 의한 indirect DAS-ELISA를 수행하였다. 부분 정제한 바이러스 시료를 결합 완충액( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93 g,  $\text{NaN}_3$  0.29 g, pH9.6)으로 1:1의 농도로 희석하여 항원(Ag)으로 사용하였다. 이것을 96구멍 마이크로플레이트에 각각 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 wrap으로 밀봉하여 37°C에서 4시간동안 반응 시킨 후, 반응액을 털어서 버리고, 동량의 PBST로 각 구멍을 3~4회 세척하여 여분의 항원을 제거한 다음, PBST로 희석한 적당한 농도의 항혈청(primary antibody)을 각 구멍에 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시켰다. 동일한 방법으로 세척한 다음, PBST로 2,000 희석한 효소가 부착된 conjugate(secondary antibody; alkaline phosphatase -labelled goat anti-rabbit IgG)를 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C에서 90분동안 반응시켰다. 그리고, 동일한 방법으로 세척한 다음, 기질로 p-nitrophenylphosphate를 diethanolamine substrate buffer (diethanolamine 97 ml,  $\text{NaN}_3$  0.29 g, pH9.8, made to 1,000 ml)에 0.67 mg/ml의 농도로 녹여 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 양성조절의 발색이 선명한 황색이 되도록 실온에서 20분간 반응시킨 후, 3 M NaOH를 50 $\mu\text{l}$ 씩 각각 분주하여 반응을 정지시켰다. 그 결과, 1/2000배까지 희석된 항혈청으로 CarMV를 확인 할 수 있었다.

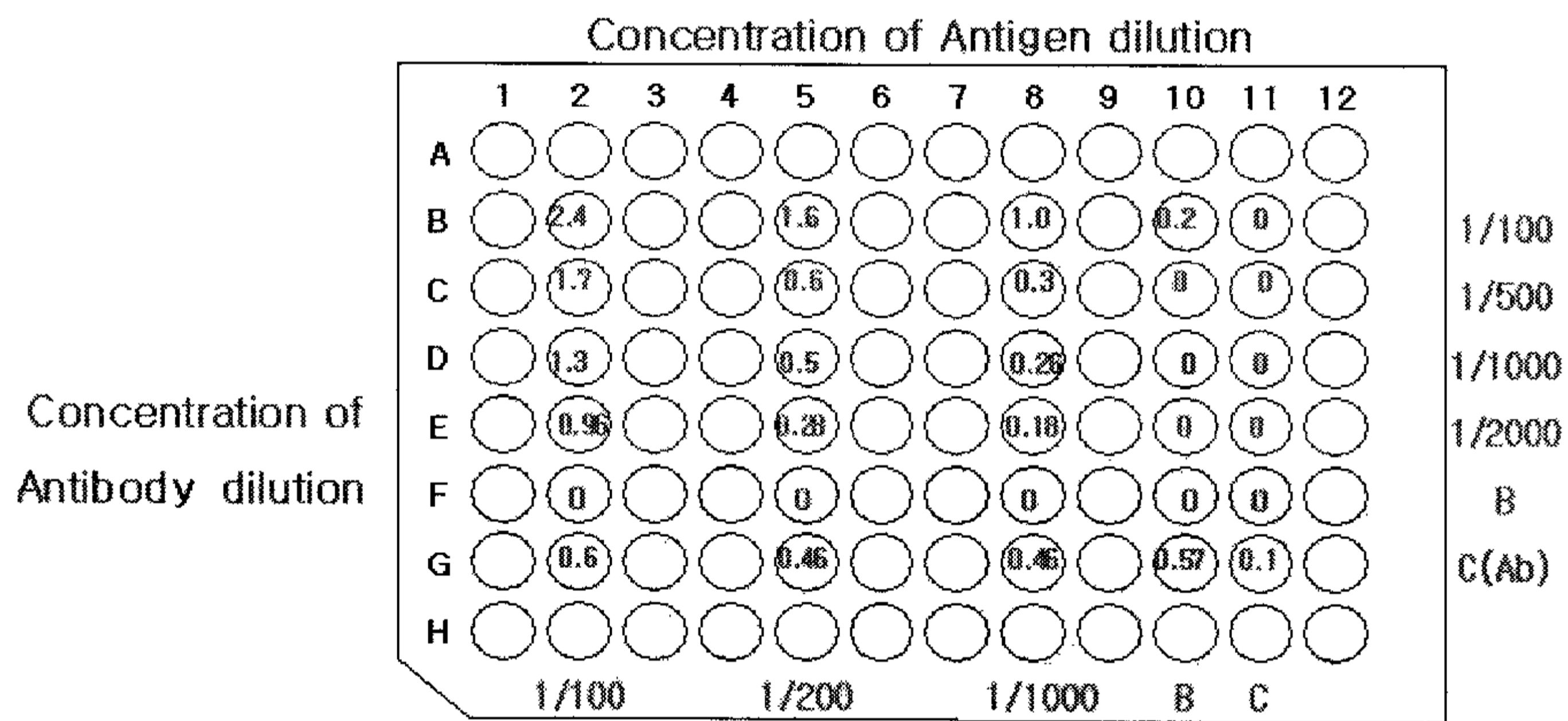
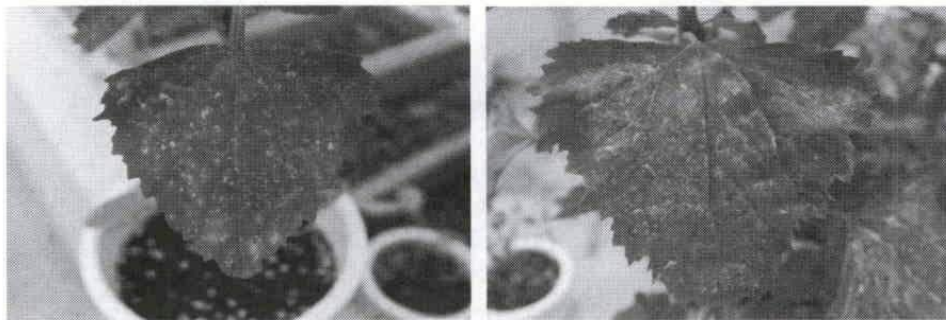


Fig. 20. ELISA test. B ; buffer, C (Ab) ; 1/100 dilution of JYMV, C ; Noninfected leaf of *Chenopodium amaranticolor*, Concentration of enzyme conjugate ; 1, 4, 7 lane : 1/1000, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 lane ; 1/2000, Measurement ; 405nm Optical density.

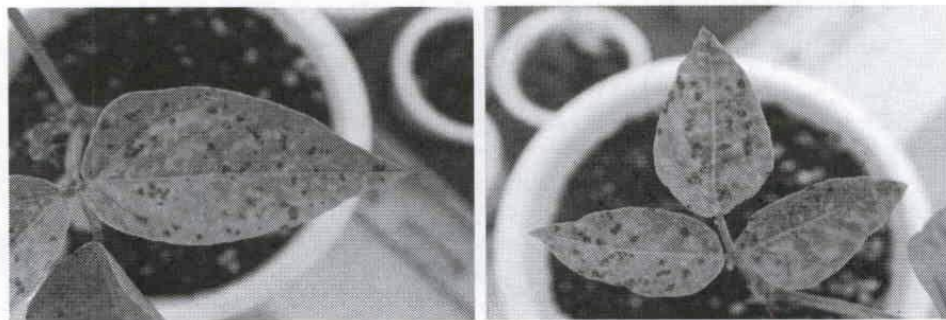
## 2) CarRSV의 정제 및 항혈청 생산

### (1) CarRSV의 증식

대구가톨릭대학교에서 동결건조된 CarRSV 시료를 제공받아 0.01M PB(pH7.2)에 녹여 carborundum을 이용한 상법에 따라 *Chenopodium amaranticolor*에 적당량의 carborundum을 부린 다음, 상기 시료를 멸균된 탈지면에 적셔서 조심스럽게 고루 문지른 다음, 물로 씻어내고 고온과 직사광선을 피하여 그늘에 두었다. 그 결과, 접종 7일 후에 접종엽에서 chlorotic spot 병징이 나타났다. CarRSV에 단독 감염이 확인된 *Chenopodium amaranticolor* 이병엽을 접종원으로 하여 동일한 방법으로 *Chenopodium amaranticolor* 에 접종하였다. 접종 7일 후 병징이 나타난 잎을 수거하여 바이러스 정제 시료로 하였다. 또한 CarRSV 시료를 미안마동부에 접종하여 10일 후 병징이 나타난 잎을 다시 동부에 동일한 방법으로 접종하여 병징이 나타난 잎을 수거하였다.



*C. amaranticolor*



*Vicia faba*

Fig. 21. Symptom of CarMV infection on *C. amaranticolor* and *Vicia faba*

(2) 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰

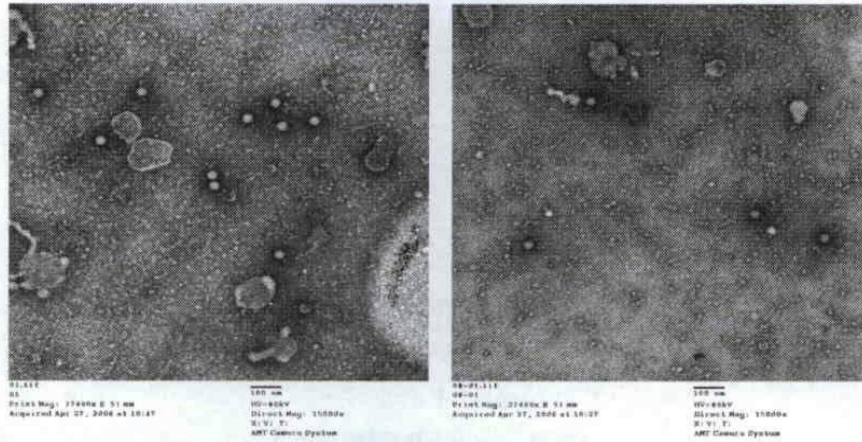


Fig. 22. Morphological observation of CarMV by TEM

(3) CarRSV 정제

CarRSV에 감염된 *Chenopodium amaranticolor* 이병엽 100g에 200ml의 추출 완충액을 첨가하여 분쇄기로 곱게 마쇄하여 이중거즈로 거른 다음 4°C에서 15,000rpm으로 10분간 원심분리를 실시한다. 상등액의 1/10 Vol의 chloroform을 첨가하여 1M HCl로 pH를 5.3으로 산성화 시켜 4°C에서 10분간 교반 시킨 다음 15,000rpm에 10분간 원심분리를 실시한다. 상등액을 4°C에서 105,000g로 2시간 동안 초원심분리를 실시한다. 침전물을 10mM sodium phosphate buffer에 녹여서 초원심분리 과정을 3회 반복한다. 10-40% sucrose density gradient ultracentrifuge 과정을 4°C에서 58,000g로 2시간 30분간 실시한다. 바이러스 밴드를 회수하여 10mM sodium phosphate buffer에 완전히 녹인다. 이 바이러스 시료 5 $\mu$ l를 2% PTA에 염색하여 전자현미경으로 관찰한 결과 약 30nm 크기의 구형 바이러스 입자가 관찰되었다.

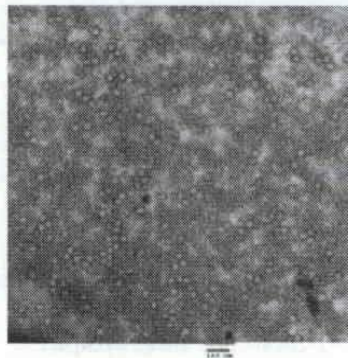



Fig. 23. Particle of purified CarRSV.



(4) CarRSV 항혈청 제작

Table 5. Method of CarRSV antiserum production

Date(days)	항혈청 제작 과정
	* 1.5kg female 토끼 구입, 적응- 7일간 일주일 간격으로 주사예정
1 ~ 7	* 1차 주사 (근육 주사), 2차 주사 (근육 주사) Antigen(CarRSV) : 700 $\mu$ l(0.5mg/ml) Freund's complete adjuvant : 700 $\mu$ l total : 1.4ml 주사 
8 ~ 15	* 3차 주사 (피하 주사), 4차 주사 (피하 주사) Antigen(CarRSV) : 700 $\mu$ l Freund's incomplete adjuvant : 700 $\mu$ l total : 1.4ml 주사
22 ~ 29	* 5차 주사 (피하 주사), 6차 주사(피하 주사) Antigen(CarMV) : 원액 주사
36 ~ 43	* 채혈 후 ELISA로 역가 테스트 CarRSV RIPA Kit 제작

①ELISA test

Clark와 Adams(1977)의 마이크로프레이트법에 의한 indirect DAS-ELISA를 수행하였다. 부분 정제한 바이러스 시료를 결합 완충액(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.93 g, NaN<sub>3</sub> 0.29 g, pH9.6)으로 1:1의 농도로 희석하여 항원(Ag)으로 사용하였다. 이것을 96구멍 마이크로프레이트에 각각 90  $\mu$ l씩 분주하고 wrap으로 밀봉하여 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 반응 시킨 후, 반응액을 털어서 버리고, 동량의 PBST로 각 구멍을 5회 세척하여 여분의 항원을 제거한 다음, PBS로 각 단계별로 희석한 항혈청



(primary antibody)을 각 구멍에 90  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시켰다. 동일한 방법으로 세척한 다음, PBS로 20,000 희석한 효소가 부착된 conjugate(secondary antibody; alkaline phosphatase -labelled goat anti-rabbit IgG)를 90  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C에서 90분동안 반응시켰다. 그리고 동일한 방법으로 세척한 다음, 기질로 alkaline phosphatase substrate를 diethanolamine substrate buffer (diethanolamine 97 ml, Na<sub>3</sub>N 0.29 g, pH9.8, made to 1,000 ml)에 0.67 mg/ml의 농도로 녹여 70  $\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 실온에서 20분간 반응시킨 후, 3 M NaOH를 50 $\mu\text{l}$ 씩 각각 분주하여 반응을 정지시켰다. 그 결과, 1/70000배까지 희석된 항혈청으로 CarMV를 확인할 수 있었다.

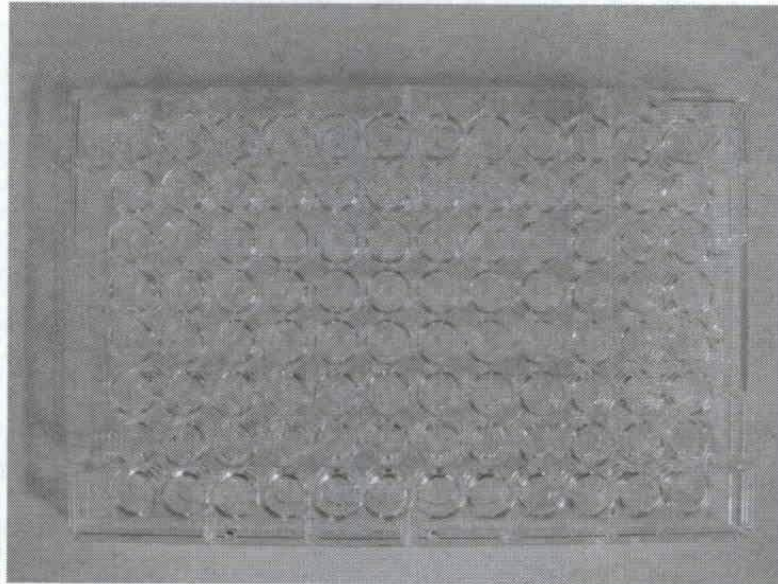


Fig. 24. ELISA test results of CarMV.

②Rapid immunofilter paper assay(RIPA)

카네이션에서 분리된 CarRSV로부터 항혈청을 제작하여 ImmunoPure (A/G) IgG Purification kit(QIAGEN)로 RIPA 용 IgG를 분리하였다.

항체결합 라텍스를 만들기 위하여 흰색라텍스 (10.3%, 0.45 $\mu$ m, Takara) 25 $\mu$ l, 항혈청 50 $\mu$ l, 결합완충액 925 $\mu$ l을 혼합하여 흰색 항체결합라텍스용액을 준비하였고, 핑크라텍스 50 $\mu$ l, 항혈청 50 $\mu$ l, 결합 완충액 950 $\mu$ l을 혼합하여 핑크색 항체결합 라텍스 용액을 준비하였다. 준비된 용액을 교반기로 실온에서 3시간 혼합하였다. 항체와 결합된 라텍스를 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 1ml의 세척 완충액(0.45% NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1% protein, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2)에 완전히 녹이는 과정을 3회 반복한 후, 마지막 3번 짜 침전물에 세척 완충액을 현탁하여 4°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

Filter paper GF/A를 O.H.P 필름에 부착시켜 폭 0.5cm, 길이 11cm 정도 되도록 절단하여 긴 조각을 만들었다. 이 긴 조각의 선단에서 2cm 위에 한 줄로 10 $\mu$ l의 흰색 라텍스를 흡착시켜 응집반응 부위를 만들었다 이병 잎과 20배의 추출 완충액(PBST, 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% polyvinyl pyrororidond)으로 함께 마쇄한 액을 흰색 라텍스가 흡착된 긴 조각의 선단에서부터 약 3분 정도 전개시킨 다음 각 단계별로 희석한 핑크색 라텍스를 다시 5분간 선단에서부터 전개시켜 흰색 라텍스가 흡착된 부위에서의 핑크색 침전 유무를 확인하였다.⇒ CarRSV 에 감염된 *C. amaranticolor*를 RIPA를 한 결과 IgG의 희석배율 1/600까지 밴드가 확인되었으며, 대조구로 사용한 무병주 *C. amaranticolor*에서는 어떠한 밴드도 나타나지 않은 것을 확인함으로써 진단 Kit로 사용하고 있으며, 주관연구기관에 지속적인 제공을 하고 있다.

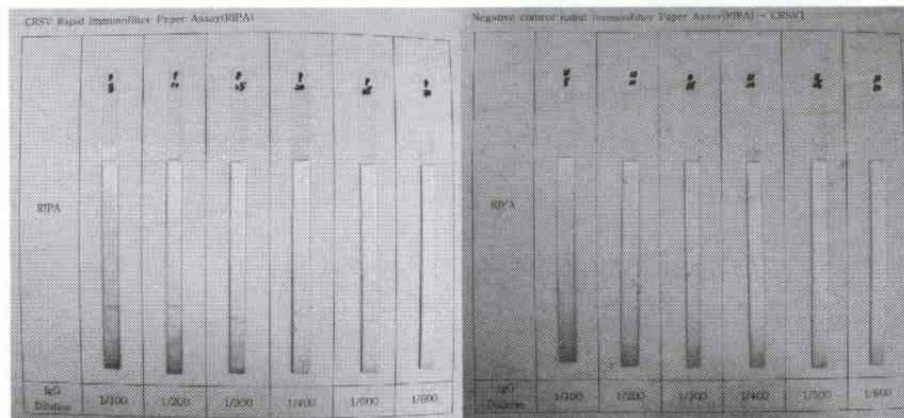


Fig. 25. Results of RIPA test for CarRSV.

### 3. virus 진단체계 확립

#### 1) RT-PCR 검정

##### (1) Primer 제작

RT-PCR을 실시하기 위하여 NCBI에 등록되어 있는 sequence를 토대로 DNASIS v2.5 프로그램을 사용하여 primer를 제작하였다.

Table 6. Nucleotide sequence of primers.

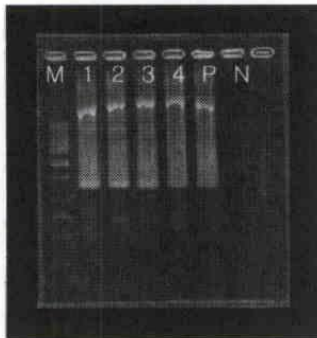
Virus	Oligonucleotide primers	Sequence
CarMV	Forward	GTGGTCTTCTATTAACAGC
	Reverse	GCAGAGAACAGGTTACAGTC
CLV	Forward	CCAACAATCCACCACAACAA
	Reverse	TGTCACGAGGCTATCAGTGC
CVMV	Forward	GTTGATGCACTACATGCAGCAT
	Reverse	GTGATGACATCCGAACGCGC
CarRSV	Forward	GCCTAAACAGCGTCAGAACC
	Reverse	ACATTGAATATGCCCGACA

##### (2) RT-PCR

RT-PCR은 먼저 역전사 효소에 의한 cDNA 합성반응과 이 반응산물인 cDNA를 주형으로 하는 PCR 반응을 수행하였다. RAN 시료 5 $\mu$ l에 reverse primer 1 $\mu$ l와 RNase free water 8 $\mu$ l를 넣어 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 둔다. 5 $\times$ reaction buffer 4 $\mu$ l, dNTP 1 $\mu$ l와 MMLV Rtase 0.5 $\mu$ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에 1시간 둔다. 합성된 cDNA 5 $\mu$ l에 RNase free water 34 $\mu$ l, forward primer 1 $\mu$ l, reverse primer 1 $\mu$ l, dNTP 1 $\mu$ l, 5 $\times$ reaction buffer 5 $\mu$ l, 25mM MgSO<sub>4</sub> 2 $\mu$ l, Tfl polymerase 0.5 $\mu$ l를 넣은 후, denaturation 94 $^{\circ}$ C/ 30sec, annealing 48 $^{\circ}$ C/1min, extension 68 $^{\circ}$ C/2min의 과정을 40cycle을 실시하였다. 각 primer 마다 annealing 온도를 달리하여 검정하였다.



①CarMV 감염확인 결과



M : 250bp Marker  
 N : 건전한 명아주 잎  
 P : CarMV 감염 명아주 잎  
 product size : 1287bp  
 1~4: CarMV증상으로 보이는 카네이션잎

Fig. 26. Results of RT-PCR for CarMV infection.

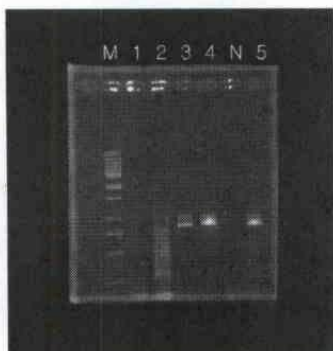
②CVMV 감염여부 확인 결과



M : 250bp Marker  
 N : 건전한 명아주 잎  
 5 : CarMV 감염 명아주 잎  
 1~4 : CVMV에 감염되었는 카네이션은  
 없었음

Fig. 27. Results of RT-PCR for CVMV(Carnation vein mottle virus).

③CLV 감염여부 확인 결과



M : 250bp Marker  
 N : 건전한 명아주 잎  
 product size : 809  
 1~5 : CLV 증상으로 보이는 카네이션 이병잎  
 3~5 : CLV에 감염되었는 것이 확인됨

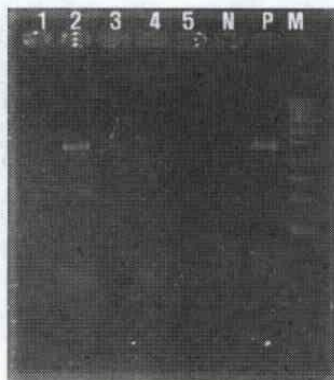
Fig. 28. Results of RT-PCR for CLV.

위와 같은 방법으로 RT-PCR을 하여 바이러스 의심으로 보이는 카네이션 잎을 동정 하였다.



## 2) IC-RT-PCR 검정

Sodium carbonate buffer(1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93g NaHCO<sub>3</sub>, 1.2g NaN<sub>3</sub>/l, pH 9.6)로 희석한 항혈청을 시험관에 넣고 37 ° °C에 2시간 정치한 후, PBST (0.02 M PB, 0.15 M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 로 3번 세척하였다. 식물조직과 시료량의 20배량(v/w)의 추출완충액 (PBST, 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% polyvinyl pyrrolidone)을 막자사발에 넣고 마쇄한 것을 15,000rpm에서 15분 원심분리한 다음, 항체가 코팅된 시험관에 상층액 50 $\mu$ l을 넣었다. 4°C에서 overnight 한 다음 시험관 당 500  $\mu$ l PBST로 3회 세정하고 60 $\mu$ l의 멸균수를 넣어 80°C에서 5분간 열처리 후에 바로 냉각시켜서 바이러스 RNA를 확보하였다. RT-PCR은 RNA 용액 25 $\mu$ l와 ONE Step RNA PCR Kit (Takara)으로 제공되는 반응액 23 $\mu$ l에 Forward primer 20 pmole, Reverse primers 20 pmole을 더하여 전체 50 $\mu$ l가 되도록 PCR 시험관에 넣고 50°C에서 30분간 역전사 반응 후, 94°C에서 2분간 역전사 효소를 실활시킨 다음, 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 35회 반복 수행 후, 72°C에서 5분간 반응시켜 완결하였다. RT-PCR 산물에 Loading 완충액 (0.25% bromophenol -blue, 50% glycerol)을 첨가하고 1.2% agarose gel 상에서 전기영동한 후 0.1% EtBr 용액에 15분간 염색하여 DNA 밴드를 확인하였다.



M : 250bp Marker  
 N : 건전한 명아주 잎  
 P : CarMV 감염 명아주 잎  
 1~5 : CarMV 확인을 위한 카네이션 잎  
 2 : CarMV에 감염되었음을 확인

Fig. 29. Results of IC-RT-PCR for CarMV infectionp

위와 같은 방법으로 상기의 방법으로 바이러스를 동정하였다.

### 3) Rapid immunofilter paper assay (RIPA)

카네이션에서 분리된 CarMV로부터 항혈청을 제작하여 ImmunoPure (A/G) IgG Purification kit(QIAGEN)로 RIPA 용 IgG를 분리하였다.

항체결합라텍스를 만들기 위하여 흰색라텍스 (10.3%, 0.45 $\mu$ m, Takara) 25 $\mu$ l, 항혈청 100 $\mu$ l, 결합완충액 925 $\mu$ l을 혼합하여 흰색 항체결합라텍스용액을 준비하였고, 핑크라텍스 50 $\mu$ l, 항혈청 100 $\mu$ l, 결합 완충액 850 $\mu$ l을 혼합하여 핑크색 항체결합 라텍스용액을 준비하였다. 준비된 용액을 교반기로 실온에서 3시간 혼합하였다. 항체와 결합된 라텍스를 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 1ml의 세척 완충액(0.45% NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1% protein, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2)에 완전히 녹이는 과정을 3회 반복한 후, 마지막 3번 짜 침전물에 세척 완충액을 현탁하여 4°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

Filter paper GF/A를 O.H.P 필름에 부착시켜 폭 0.5cm, 길이 11cm 정도 되도록 절단하여 긴 조각을 만들었다. 이 긴 조각의 선단에서 2cm 위에 한 줄로 10 $\mu$ l의 흰색라텍스를 흡착시켜 응집반응 부위를 만들었다 이병잎과 20배의 추출 완충액 (PBST, 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% polyvinyl pyroridond)으로 함께 마쇄한 액을 흰색라텍스가 흡착된 긴 조각의 선단에서부터 약 3분 정도 전개시킨 다음 5배 희석한 핑크색라텍스를 다시 5분간 선단에서부터 전개시켜 흰색라텍스가 흡착된 부위에서의 핑크색 침전 유무를 확인하였다.⇒ CarMV 에 감염된 카네이션을 RIPA를 한 결과 IgG의 희석배율 1/800까지 밴드가 확인되었으며, 대조구로 사용한 무병주 *C. amaranticolor*에서는 어떠한 밴드도 나타나지 않은 것을 확인함으로써 진단 Kit로 사용하여 바이러스 감염여부를 확인하였다.

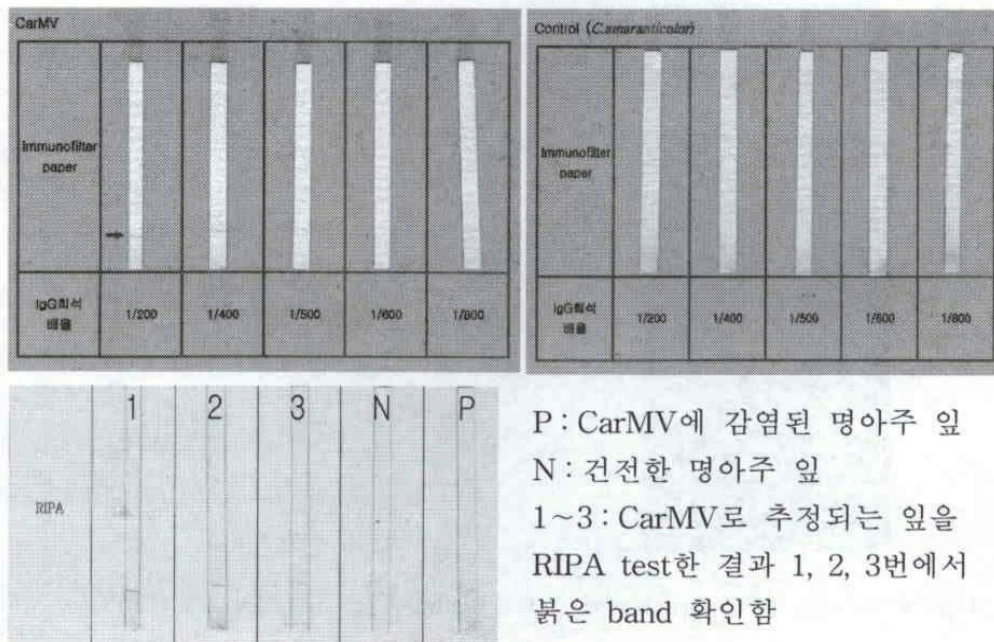


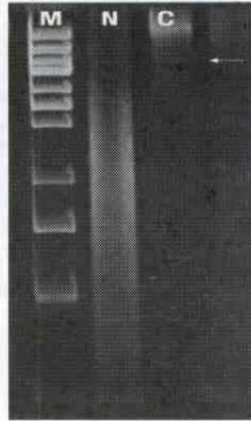
Fig. 30. Results of RIPA test for CarMV

#### 4) Ds-RNA extraction and electrophoresis

바이러스에 감염된 식물체로부터 dsRNA를 추출하여 분석하는 것은 간단하게 바이러스를 진단할 수 있는 분자 생물학적 기법의 하나이다. 식물바이러스의 대부분은 ssRNA를 게놈으로 가지고 있기 때문에 in vitro에서 쉽게 분해되어 취급하기가 어렵다. 그러나 식물체에 감염된 바이러스가 복제과정에서 일시적으로 형성하는 복제형 RNA는 겹가닥 구조를 취하고 있어 이를 검출하면 안정된 형태로 실험에 이용할 수 있는 장점을 가지고 있다.

0.1 g의 감염잎을 extraction buffer[5×EXB(0.5 M Glycin, 0.5M NaCl, 5 mM EDTA[pH9.0/NaOH] in DW)- 20 ml / DW(distilled water, sterilized)-50 ml / 10% SDS-20ml] 1 ml에 마쇄한 후 400  $\mu$ l phenol : chloroform : isoamylalcohol(25:24:1)을 첨가하여 3분간 교반한 다음, 1,400 rpm, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 있는 RNA를 침전시키기 위해 등량의 isopropanol을 첨가하여 충분히 섞어 -70°C에서 30분간 둔 후, 1,400 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 회수하였다. 침전물에 염(salt)와 같은 저분자의 불순물을 제거하기 위해 70% ethanol을 첨가하여 1,400 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하고 상

등을 제거하여 침전물을 건조시켰다. 여기에 적당량의 dye-buffer를 넣고 160V에서 4시간 동안 전기영동 하였다.



M : 1kb DNA ladder

N : 건전한 명아주 잎

C : CarMV에 감염된 명아주 잎

-4.5kb에서 CarMV RNA 확인

Fig. 31. Results of electrophoresis for detecting CarMV RNA.



#### 4. Virus 염기서열분석

##### 1) 한국에서 재배되는 카네이션과 백합에서 분리된 CarMV CP gene 분석

CarMV-RT-PCR의 반응산물을 QIAquick PCR Purification kit(QIAGEN)로 정제하였으며, cloning을 하기 위해 pGEM-T easy vector systemII(Promega)를 이용하여 4°C에서 밤새 ligation시켰다. 형질전환을 위하여 Heat shock법으로 JM109 competent cells에 ligation 반응액을 넣어 42°C에서 1분간 반응시킨 후 즉시 얼음에 박아 2분간 방치하고, SOC 배지에서 1시간 진탕 배양시켜 4,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 LB(Ampecillin, X-gal, IPTG) 고체배지에 50  $\mu$ l씩 도말하고, 37°C에서 12hr~18hr 배양 후, 흰 집락만을 선별하여 LB(Ampecillin) 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕하면서 완전 성장시켰다. Insert가 삽입된 플라스미드(plasmid)는 plasmid purification kit(Cherry innovation)를 이용하여 순화한 후, ABI Prism TM Big Dye terminator cyclic sequencing reaction kit와 ABI Prism 377 Genetic analyzer(PE applied biosystems)를 이용하여 cyclic sequencing하였다. Scale down 한 방법으로 주형 2.5  $\mu$ l에 BigDye terminator 2  $\mu$ l, 1.5 pmole primer 1  $\mu$ l를 넣은 후, PE thermocycler 9600기기를 이용하여 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분으로 cyclic sequencing하였다. PCR 반응산물을 정제하기 위하여 3 M sodium acetate(pH4.6) 0.5  $\mu$ l, 95% ethanol 12.5  $\mu$ l를 넣고 1.5 ml tube에 옮긴 다음 실온에서 15분간 놓아둔 후, 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 70% ethanol로 수세한 다음 건조시켰다. 4  $\mu$ l loading buffer(5:1 deionized formamide to 25 mM EDTA, 50 mg/ml blue dextran)에 녹인 다음 95°C에서 2분간 가열하여 변성 시킨 후 얼음에 냉각시켜 ABI PRISM 377에 well당 1.5  $\mu$ l씩 loading하였다.

① 카네이션에서 분리한 CarMV CP gene

Nucleotide

ATGGAAAATAAAGGAGAAAAGATCGCGATGAATCCCCTGTGCAAACATTGGCGC  
AGAAGGGGGACAAGTTAGCCGTGAAGTTGGTGACAAGAGGGTGGGCCTCTCTGAG  
TACGAACCAGAAGAGGAGAGCTGAAATGCTTGCTGGATACACTCCAGCGATCCTA  
GCCTTTACACCCAGACGACCACGGATGACAAACCCTCCTCCAAGGACCAGTAGGAA  
TTCACCAGGACAAGCTGGAAAGTCCATGACGATGAGTAAGACCGAACTATTATGC  
ACCGTCAAAGGTACCACAGGTGTTATCCCAAGCTTTGAAGACTGGGTCGTTTCCC  
CCCGAAACGTAGCCGTTTTCCCTCAACTCTCGCTGCTGGCGACCAACTTCAATAAG  
TACCGCATCACTGCGCTCACTGTGAAGTACTCACCAGCATGTAGCTTCGAGACCA  
ATGGGAGAGTGGCTCTGGGATTCAACGATGATGCTTCGGACACACCACCAACCAC  
CAAGGTTGGGTTTTACGATCTGGGCAAACATGTGGAAACTGCTGCACAGACAGCT  
AAAGATCTAGTGATACCAGTAGACGGCAAAACCCGGTTCATCAGGGACTCGGCTA  
GTGATGATGCCAAACTAGTCGATTTTGGACGAATAGTCTTGTCAACATACGGGTT  
TGACAAGGCAAACACTGTGGTGGGCGAATTGTTTATACAGTACACGATCGTACTG  
AGTGACCCAACCAAGACGGCCAAAATTTACAGGCAAGCAACGATAAGGTGTCGG  
ATGGACCAACGTATGTGGTCCCTTCGGTTAATGGCAACGAGCTACA ACTAAGGGT  
GGTAGCCGCTGGGAAATGGTGCATTATAGTGCGGGGTACGGTTGAAGGTGGCTTC  
ACCAAACCCACACTTATTGGACCAGGAATCAGCGGTGATGTGGACTATGAAAGTG  
CCAGACCTATCGCCATTTGTGAGTTGGTGACACAGATGGAGGGCCAGATATTGAA  
AATCACCAAGACCTCGGCAGAACAACCACTCCAATGGGTTGTTTATAGGATGTGA

Amino acid

MENKGEKIAMNPTVQTLAQKGDKLAVKLVTRGWASLSTNQKRRAEMLAGYTPAIL  
AFTPRRPRMTNPPRRTSRNSPGQAGKSMTMSKTELLCTVKGTTGVIPSFEDWVVS  
NVAVFPQLSLLATNFKYRITALTVKYSPACSFETNGRVALGFNDDASDTPPTTKVG  
FYDLGKHVETAAQTAKDLVIPVDGKTRFIRDSASDDAKLVDFGRIVLSTYGFDKANT  
VVGELFIQYTIVLSDPKTAKISQASNDKVSDGPTYVVPVSVNGNELQLRVVAAGKWC  
IVRGTVEGGFTKPTLIGPGISGDVDYESARPIAICELVTQMEGQILKITKTSAEQPLQWV  
VYRM

Fig. 32. Sequence data of CarMV CP gene from carnation.

② 백합에서 분리한 CarMV CP gene

Nucleotide

ATGGAAAATAAAGGAGAGAAGATCGCGATGAATCCCCTGTGCAAACGTTGGCGCAGAAGGGGG  
ACAAGTTAGCTGTGAAGTTGGTGACAAGAGGTTGGGCCCTCTCTGAGTACGAACCAGAAGAGGAG  
AGCTGAAATGCTTGCTGGATACACCCAGCGATCCTAGCCTTCACACCCCGACGACCACGGATGAC  
AAATCCTCCTCCAAGAACCAGTAGGAATTCACCAGGACAAGCTGGAAAGTCCATGACGATGAGT  
AAGACCGAACTACTATGCACCGTCAAAGGTACCACGGGTGTTATCCCAAGCTTTGAAGACTGGGT  
CGTTTCCCCCGAAACGTAGCCGTCTTCCCTCAACTCTCGCTACTGGCGACTAACTTCAACAAGTA  
CCGCATCACTGCGCTCACTGTGAAGTACTCGCCGGCGTGTAGCTTCGAGACAATGGGGAGGGTGG  
CTCTGGGATTC AACGATGACGCTTCGGATACACCACCAACCACAAAGGTTGGATTCTACGACCTA  
GGCAAACAATGTGGAAACTGCTGCACAAACAGCTAAGGATCTCGTGATACCAGTAGACGGCAAAA  
CCCGGTTTCATCAGGGACTCGGCTAGTGATGATGCCAAACTAGTCGATTTTGGACGAATAGICTTG  
TCAACATACGGGTTTGACAAGGCTGACACTGTGGTGGGCGAATTGTTTCATACAGTACACGATTG  
TGCTGAGTGACCCAACCAAGACGGCCAAAATTTACAGGCAAGCAACGATAAGGTGTCGGATGGA  
CCAACGTATGTGGTCCCTTCGGTTAATGGCAACGAGCTACAATAAGAGTGGTGGCCGCTGGGAA  
ATGGTGCATTATAGTGCGGGGTACGGTAGAAGGTGGCTTCACCAAACCCACACTTATTGGGCCAG  
GAATCAGCGGTTATGTAGACTATGAAAGTGCCAGACCTATCGCCATTTGTGAGTTGGTAACACA  
AATGGAGGGCCAAATATTGAAGATTACCAAGACCTCAGCAGAACAACCACTCCAATGGGTTGTT  
TATAGGATGTGA

Amino acid

MENKGEKIAMNPTVQTLAQKGDKLAVKLVTRGWASLSTNQKRRRAEMLAGYTPAILAFTPRRPRMTN  
PPRRTSRNSPGQAGKSMITMSKTELLCTVKGTIGVIPSFEDWVVS PRNVAVFPQLSLLATNFNKYRITA  
LTVKYSPACSFETMGRVALGFNDDASDTPPTTKVGFYDLGKHVETAAQTAKDLVIPVDGKTRFIRDS  
ASDDAKLVDFGRIVLSTYGFDKADTVVGELFIQYTI VLSDPTKTAKISQASNDKVS DGPTYVVPVSVNG  
NELQLRVVAAGKWCIIVRGTVVEGGFTKPTLIGPGISGYVDYESARPIAICELVTQMEGQILKITKTSABEQ  
PLQWVVYRM

⇒ CarMV(카네이션 분리) / CarMV (백합에서 분리)

nucleotide homology : 95%

Fig. 33. Sequence data of CarMV CP gene from lily.

## 2) 한국, 일본, 중국에서 재배되는 카네이션에서 분리된 CarMV CP gene 분석

### (1) 투과전자현미경에 의한 형태학적 관찰

한국에서 가장 많이 재배되고 있는 스탠다드계의 'Desio' 품종, 일본에서는 스프레이계 품종을, 중국에서는 스탠다드계의 품종을 채집한 시료에서 바이러스 감염이 확인되는 이병잎 조직을 멸균된 면도칼로 작게 잘라 소독된 슬라이드 글라스 위에 올려놓은 다음 0.01M phosphate buffer(PB, pH 7.0)를 한 방울 떨어뜨린 후 이병잎 조직을 면도칼로 마쇄하였다. 이 즙액에 그리드(grid)를 올려 약 1분간 바이러스를 흡착시킨 다음, 여과지에 여액을 제거한 후 2% phosphotungstic acid(PTA, pH7.0)에 약 1분간 역염색을 하고 다시 여과지에서 여액을 제거하고 건조시켜서 투과전자현미경(Hitachi H-7600)으로 바이러스 입자를 관찰하였다(Direct negative staining method; DN법, Doi et al. 1969).

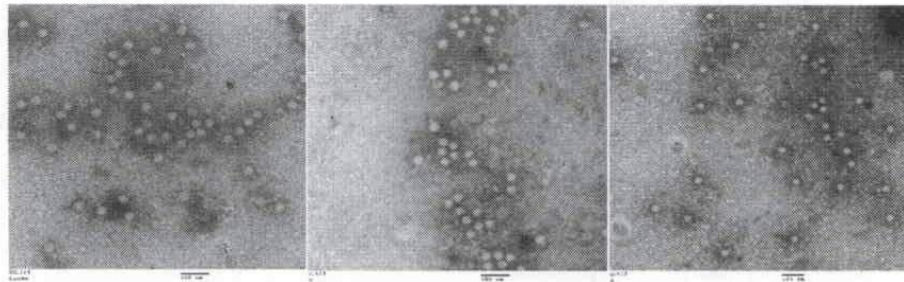


Fig. 34. Morphological observation of CarMV from various carnation by TEM.

### (2) 바이러스의 증식

바이러스에 감염된 카네이션 이병잎의 즙액을 *Chenopodium amaranticolor*의 잎에 접종 하여 바이러스를 증식하였다. CarMV는 재배된 나라에 따라 한국에서 재배된 카네이션에서 CarMV-K(Korea), 일본에서 재배된 카네이션에서 CarMV-J(Japan), 그리고 중국에서 재배된 카네이션에서는 CarMV-C(China)라고 본 실험에서 명명하여 사용하였다.

### (3) 바이러스 부분 순화

바이러스 정제는 Termine 등(1970)의 순화방법을 변형하여 실시하였고, CarMV에 감염된 *Chenopodium amaranticolor* 이병잎 100g에 0.1% thioglycolic acid와 0.1



M 인산완충액(pH 7.2)을 1:4(w/v)의 비율로 혼합하여 곱게 마쇄한 다음, 살균된 거즈로 여과하였다. 거른 여과액에 n-butanol을 첨가하여 1시간 30분간 교반시켜 준 다음, 5,500 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하고 8% PEG(polyethylene glycol) 6,000을 첨가하여 1시간동안 교반한 다음, 7,000 g에서 30분간 원심 분리하였다. 이 때의 침전물을 0.01 M 인산완충액(pH 7.2) 40 ml로 완전히 재현탁하고, 11,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음, 78,000 g에서 120분간 초 원심분리를 실시하였다. 이 침전물을 0.01 M 인산완충액 (pH 7.2)으로 재현탁한 다음, 7,000 g에서 원심분리하여 상등액을 추출하여 바이러스를 부분 순화하였다.

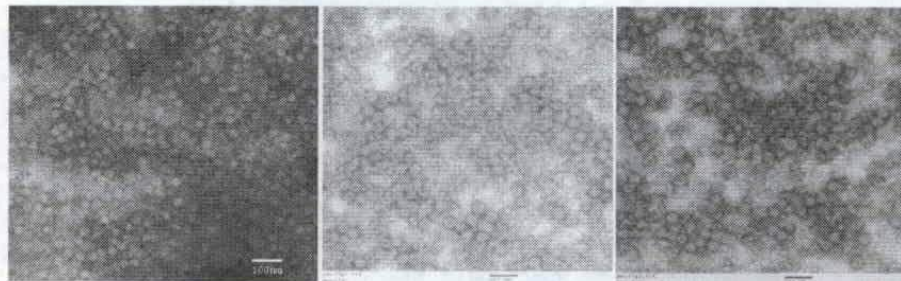


Fig. 35. Morphological observation of CarMV from *C. amaranticolor*.

#### (4) 바이러스의 RNA 정제

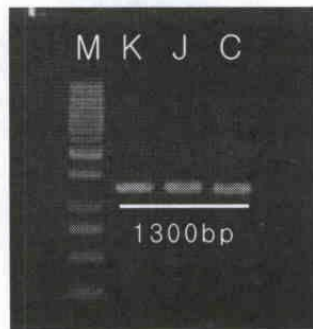
부분 순화된 바이러스입자를 전자현미경으로부터 확인하고 계면활성제 sodium dodecyl sulfate(SDS)와 단백질 분해효소 proteinase K를 이용하여 단백질을 분해하고 phenol과 chloroform을 사용하여 부분 순화된 바이러스 시료로부터 total RNA를 추출하였다.

즉, 부분 순화된 바이러스 입자를 isolation buffer의 1/10volume이 되도록 넣어서 잘 섞은 다음 단백질을 분해하기 위하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 동일 volume의 phenol을 첨가하여 12,000 rpm, 4°C의 조건에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 남아있는 phenol을 제거하기 위하여 동일 부피의 chloroform을 넣어 잘 교반한 다음 12,000 rpm, 4°C의 조건에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하여 70% ethanol를 1 ml 첨가한 후, 충분히 섞어주고 -70°C에서 30분간 놓아두었다. 다시 15,000 rpm, 4°C의 조건에서 30분간 원심분리하여 상등

액을 제거하고, 회수한 침전물에 염(salt)과 같은 저분자의 불순물을 제거하기 위해 70% ethanol로 세척한 후, 원심분리하여 침전물을 진공 중에서 건조시켰다. 여기에 적당량(20~50  $\mu$ l)의 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 3차 멸균 증류수로 녹인 total RNA를 RT-PCR을 위한 template로 사용하였다.

(5) RT-PCR에 의한 바이러스 CP gene의 증폭

부분 순화된 virus 시료로부터 viral RNA를 분리한 다음, 앞에서 언급한 바와 같이 CarMV의 외피단백질 유전자가 포함되는, 특이적으로 반응하는 Primer를 사용하여 외피단백질 유전자를 증폭하였다. RT-PCR은 two step RT-PCR로서 first strand cDNA 합성과 PCR의 2단계로 나누어 실시하였다.



M : 250bp DNA ladder Marker,  
 K : 한국카네이션에서 분리된 CarMV  
 J : 일본카네이션에서 분리된 CarMV  
 C : 중국카네이션에서 분리된 CarMV

Fig. 36. Results of RT-PCR for CarMV CP gene

(6) CP gene 분석

①한국에서 재배되는 카네이션에서 분리한 CarMV CP gene

Nucleotide

ATGGAAAATAAAGGAGAAAAGATCGCGATGAATCCCCTGTGCAAACATTGGCGC  
AGAAGGGGGACAAGTTAGCCGTGAAGTTGGTGACAAGAGGGTGGGCCTCTCTGAG  
TACGAACCAGAAGAGGAGAGCTGAAATGCTTGCTGGATACACTCAGCGATCCTAG  
CCTTTACACCCAGACGACCACGGATGACAAACCCTCCTCCAAGGACCAGTAGGAAT  
TCACCAGGACAAGCTGGAAAGTCCATGACGATGAGTAAGACCGAACTATTATGCA  
CCGTCAAAGGTACCACAGGTGTTATCCCAAGCTTTGAAGACTGGGTCGTTTCCCCC  
CGAAACGTAGCCGTTTTCCCTCAACTCTCGCTGCTGGCGACCAACTTCAATAAGT  
ACCGCATCACTGCGCTCACTGTGAAGTACTCACCAGCATGTAGCTTCGAGACCAA  
TGGGAGAGTGGCTCTGGGATTCAACGATGATGCTTCGGACACACCACCAACCACC  
AAGGTTGGGTTTTACGATCTGGGCAAACATGTGGAAACTGCTGCACAGACAGCTA  
AAGATCTAGTGATACCAGTAGACGGCAAACCCGGTTCATCAGGGACTCGGCTAG  
TGATGATGCCAAACTAGTCGATTTTTGGACGAATAGTCTTGTCAACATACGGGTTT  
ACAAGGCAAACACTGTGGTGGGCGAATTGTTTATACAGTACACGATCGTACTGAG  
TGACCCAACCAAGACGGCCAAAATTTACAGGCAAGCAACGATAAAGGTGTCGGAT  
GGACCAACGTATGTGGTCCCTTCGGTTAATGGCAACGAGCTACAACCTAAGGGTGG  
TAGCCGCTGGGAAATGGTGCATTATAGTGCGGGGTACGGTTGAAGGTGGCTTCAC  
CAAACCCACACTTATTGGACCAGGAATCAGCGGTGATGTGGACTATGAAAGTGCC  
AGACCTATCGCCATTTGTGAGTTGGTGACACAGATGGAGGGCCAGATATTGAAAA  
TCACCAAGACCTCGGCAGAACAACCACTCCAATGGGTTGTTTATAGGATGTGA

Amino acid

MENKGEKIAMNPTVQTLAQKGDKLAVKLVTRGWASLSTNQKRRRAEMLAGYTPAILA  
FTPRRPRMTNPPRRTSRNSPGQAGKSMTMSKTELLCTVKGTTGVIPSFEDWVVS  
PRN  
VAVFPQLSLLATNFNKYRITALTVKYSPACSFETNGRVALGFNDASDTPPTTKVGF  
YDLGKHVETAQAQAKDLVIPVDGKTRFIRDSASDDAKLVDFGRIVLSTYGFDKANTV  
VGELFIQYTIVLSDPTKTAKISQASNDKVSDGPTYVVPVNGNELQLRVVAAGKWCIIV  
RGTVEGGFTKPTLIGPGISGDVDYESARPIAICELVTQMEGQILKITKTSAEQPLQWVVY  
RM\*

Fig. 37. Sequence data of CarMV CP gene from carnation cultivated in Korea

②일본에서 재배되는 카네이션에서 분리한 CarMV CP gene

Nucleotide

ATGGAAAATAAAGGAGAAAAGATCGCGATGAATCCCCTGTGCAAACATTGCGC  
AGAAGGGGGACAAGTTAGCCGTGAAGTTGGTGACAAGGGGTTGGGCCTCTCTGAG  
TACGAACCAGAAGAGGAGAGCTGAAATGCTTGCTGGATACACTCCAGCGATCCTA  
GCCTTCACACCCCGACGACCACGGATGACGAACCCTCCTCCAAGAACCAGTAGGAA  
TTCACCAGGACAAGCTGGAAAGTCCATGACGATGAGTAAGACCGAACTATTAAGC  
ACCGTCAAAGGTACCACCGGTGTTATCCCAAGCTTTGAAGACTGGGTTCGTTTCCCC  
CCGAAACGTAGCCGTCTTCCCTCAACTCTCGCTGCTGGCGACGAACTTCAACAAGT  
ACCGCATTACTGCGCTCACTGTGAAGTACTCACCCGCGTGCAGCTTCGAGACTAAT  
GGGAGGGTGGCTCTGGGATTCAACGATGACGCTTCGGATACACCACCAACCACCA  
AGGTTGGATTTTACGATCTGGGCAAACATGTGGAAACTGCTGCACAGACAGCCAA  
GGATCTATGATACCAGTAGACGGCAAACCCGGTTCATCAGGGACTCGGCTAGTG  
ATGATGCCAAACTAGTCGATTTTGGACGGATAGTCTTGTCAACATACGGGTTTGA  
CAAGGCTGACACTGTGGTGGGCGAATTATTCATACAGTACACGATTGTGCTGAGT  
GACCCAACCAAGACGGCCAAAATTTACAGGCAAGCAACGATAAGGTGTCGGACG  
GACCAACGTATGTGGTCCCTTCGGTTAATGGCAACGAGCTACAACCTAAGAGTGGT  
AGCCGCTGGGAAATGGTGCATTATAGTGCGGGGTACGGTTGAGGGAGGCTTCACC  
AAACCCACACTTATTGGGCCGGGAATCAGCGGTGATGTGGACTATGAAAGTGCCA  
GACCTATCGCCATTTGTGAGTTGGTGACACAAATGGAGGGCCAGATATTGAAAAT  
CACCAAGACCTCAGCAGAACAACCACTCCAATGGGTTGTTTATAGGATGTGA

Amino acid

MENKGEKIAMNPTVQTLAQKGDKLAVKLVTRGWASLSTNQKRRAEMLAGYTPAILA  
FTPRRPRMTNPPPRTSRNSPGQAGKSMTMSKTELLCTVKGTTGVIPSFEDWVVSPRN  
VAVFPQLSLLATNFNKYRITALTVKYSPACSFETNGRVALGFNDDASDTPPTTKVGF  
YDLGKHVETAAQTAKDLVIPVDGKTRFIRDSASDDAKLVDFGRIVLSTYGFDKADTV  
VGELFIQYTIVLSDPTKTAKISQASNDKVS DGPTYVVPSVNGNELQLRVVAAGKWCIV  
RGTVEGGFTKPTLIGPGISGDVDYESARPIAICELVTQMEGQILKITKTSAEQPLQWVVY  
RM\*

Fig. 38. Sequence data of CarMV CP gene from carnation cultivated in Japan.



③중국에서 재배되는 카네이션에서 분리한 CarMV CP gene

Nucleotide

ATGGAAAATAAAGGAGAAAAGATCGCGATGAATCCCCTGTGCAAACGTTGGCGC  
AGAAGGGGGACAAGTTAGCCGTAAAGTTGGTGACAAGAGGGTGGGCCTCTCTGAG  
TACGAACCAGAAGAGGAGAGCTGAAATGCTTGCTGGATACACTCCAGCGATCCTA  
GCCTTCACACCCCGACGACCACGGATGACGAACCCTCCTCCAAGAACCAGTAGGAA  
TTCACCAGGACAAGCTGGAAAGTCCATGACGATGAGTAAGACCGAACTACTAAGC  
ACCGTCAAAGGTACCACGGGTGTTATCCCAAGCTTTGAAGACTGGGTCGTTTCCC  
CCCGAAACGTAGCCGTCTTCCCTCAACTCTCGCTGCTGGCGACGAACTTCAACAAG  
TACCGCATTACTGCGCTCACTGTGAAGTATTCACCCGCGTGCAGCTTCGAGACCAA  
TGGGAGGGTGGCTCTGGGATTCAACGATGACGCTTCGGACACACCACCAACCACT  
AAGGTTGGGTTTACGATCTGGGCAAACATGTGGAAACTGCTGCACAGACAGCTAA  
GGATCTAGTGATACCAGTAGACGGCAAAACCCGGTTCATCAGGGACTCGGCTAGT  
GATGATGCCAAACTAGTCGATTTTGGACGAATAGTCTTGTC AACATACGGGTTTG  
ACAAGGCTGACACTGTGGTGGGCGAATTGTTTATACAGTACACGATCGTGCTGAG  
TGACCCAACCAAGACGGCCAAAATTTACAGGCAAGCAACGATAAGGTGTCGGAC  
GGACCAACGTATGTGGTCCCTTCGGTTAATGGCAACGAGCTACA ACTAAGAGTGG  
TAGCCGCTGGGAAGTGGTGCATTATAGTGCGGGGTACGGTAGAAGGAGGCTTCAC  
CAAACCCACACTTATTGGGCCCGGAATCAGCGGTGATGTGGACTATGAAAGTGCC  
AGACCTATCGCCGTTTGTGAATTGGTGACACAAATGGAGGGCCAGATATTGAAAA  
TCACCAAGACCTCAGCAGAACAACCACTCCAATGGGTTGTTTATAGGATGTGA

Amino acid

MENKGEKIAMNPTVQTLAQKGDKLAVKLVTRGWASLSTNQKRRAEMLAGYTPAILA  
FTPRRPRMTNPPPRTSRNSPGQAGKSMTMSKTELLCTVKGTTGVIPSFEDWVVS  
PRN  
VAVFPQLSLLATNFNKYRITALTVKYSPACSFETNGRVALGFNDDASDTPPTTKVGF  
YDLGKHAVETAQAQKDLVIPVDGKTRFIRDSASDDAKLVDFGRIVLSTYGFDKADTV  
VGELFIQYTIVLSDPTKTAKISQASNDKVSDGPTYVVPVSVNGNELQLRVVAAGKWCIV  
RGTVEGGFTKPTLIGPGISGDVDYESARPIAICELVTQMEGQILKITKTSAEQPLQWVY  
RM\*

Fig. 39. Sequence data of CarMV CP gene from carnation cultivated in China.

ABI Prism™ BigDye terminator cyclic sequencing reaction kit와 ABI Prism

377 Genetic analyzer(PE applied biosystems)를 이용하여 cyclic sequencing하여 CarMV-K, CarMV-J, CarMV-C에서 각각 1047개의 nucleotides와 348개의 amino acids로 이루어져 있음을 확인하였다. NCBI에 align two sequences(bl2seq) program을 이용하여 query한 결과, CarMV-K, CarMV-J, CarMV-C에서 분석된 각각의 염기서열을 비교한 결과, 각 97%의 상동성을 나타내었으며, 염기서열을 amino acid sequence로 바꾸어서 alignments를 실시한 결과, CarMV-K, CarMV-J는 99.7%, CarMV-K, CarMV-C는 99.4%, 그리고 CarMV-J, CarMV-C는 99.7%의 상동성을 나타내었다.

### 3) CarRSV의 CP gene분석

CarMV-RT-PCR의 반응산물을 QIAquick PCR Purification kit(QIAGEN)로 정제하였으며, cloning을 하기 위해 pGEM-T easy vector systemII(Promega)를 이용하여 4°C에서 밤새 ligation시켰다. 형질전환을 위하여 Heat shock법으로 JM109 competent cells에 ligation 반응액을 넣어 42°C에서 1분간 반응시킨 후 즉시 얼음에 박아 2분간 방치하고, SOC 배지에서 1시간 진탕 배양시켜 4000 rpm, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 LB(Ampicillin, X-gal, IPTG) 고체배지에 50  $\mu$ l씩 도말하고, 37°C에서 12hr~18hr 배양 후, 흰 집락만을 선별하여 LB(Ampicillin) 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕하면서 완전 성장시켰다. Insert가 삽입된 플라스미드(plasmid)는 plasmid purification kit(Cherry innovation)를 이용하여 순화한 후, ABI Prism TM Big Dye terminator cyclic sequencing reaction kit와 ABI Prism 377 Genetic analyzer(PE applied biosystems)를 이용하여 cyclic sequencing하였다. Scale down 한 방법으로 주형 2.5  $\mu$ l에 BigDye terminator 2  $\mu$ l, 1.5 pmole primer 1  $\mu$ l를 넣은 후, PE thermocycler 9600기기를 이용하여 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분으로 cyclic sequencing하였다. PCR 반응산물을 정제하기 위하여 3 M sodium acetate(pH4.6) 0.5  $\mu$ l, 95% ethanol 12.5  $\mu$ l를 넣고 1.5 ml tube에 옮긴 다음 실온에서 15분간 놓아둔 후, 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 70% ethanol로 수세한 다음 건조시켰다. 4  $\mu$ l loading buffer(5:1 deionized formamide to 25 mM EDTA, 50 mg/ml blue dextran)에 녹인 다음 95°C에서 2분간 가열하여 변성 시킨 후 얼음에 냉각시켜 ABI PRISM 377에 well당 1.5  $\mu$ l씩 loading하였다.

## Nucleotide

ATGACGTCTAAACGATCCCGAAAATCCAAAATGACGCTGGTGCCTAAACAGCGTC  
AGAACCTGGCTCGGACGGTGAAAAGTGTCAAATACCTTTCGCAACCACCCAGAT  
AGTCACCACGAGTAACCCACCGAAAAAGGGACAAACCAGAGTCAGCGGCAGACAA  
CTGTTTATGTCGCTGATTAACCTCGTCCAGCTTCGTGGTCAACAATGGCCTGCCGA  
CTCCCAGTCTGCTCAGTCTAAATCCTAGTAACCAGTATCTATTCCCCTCTCTAGCT  
TACGAGGCGGCGAACTACGATCTGTATCGATTACCAAGTTACGACTTTATATGT  
ACACGACACAAACGCCACCGTGAGCGGTTCGCGTTTCACTGATGTGGGATAGAGAC  
TCCCAAGATGTACCACCCAACAGTCGGGTTTCAATACCCCAGTACACCAAATCGG  
TGTCCACGGCTGTGTATGAGAGTTGTGCCATCGACCTCCCATTGACGATGTCTGG  
ANGTTTGTGAGGNTACAGACGTGNGGACCGCAAGCTCNNGATNTGGACNGATCTT  
CACGCTGTCNCAGTGNTCACACTGTCGAGNNGGNCGTATACTNNCTANACTATAG  
AGTAAAGACAGCANCCNCTGCATCTANGNGCANNANNCATNTGGNTGCTATCAGTG  
AACATGGTGACGTCCTTGAGACCGGCATCCGCCATTATGTAGCCACTAGCCACGGT  
ACATAAGGGTCAAGTGTTGGGGTTCCATAAAACGTGTCCGTCACAACCTGGACATG  
ACCACAGGAATTACCGTGAGGAAGACAGTTGTACTGGCCAAAGCGGCCCTAGTGC  
GCATAGTGAGAACACTAGTGGGCACGAAGGCGGCCTTTGCGCAACGGCATTGACA  
GTCAAATTGCATCGGCGGTTGTTTCAACGTTCTCGCCCGCAANNNTCGGANANAG  
CTNGGACGAAGGACCTCGTCGNTTAGGTCTCTTTTTGTCTCNAATCCTNAANNNN  
NNCGTCAGTTCCCGTAG

Fig. 40. Sequence data of CarRSV CP gene.

## 5. 카네이션 재배지역 감염률 조사

### 1) 현미경관찰

#### (1) 1차년도

##### ①2004년 1월 14일

불로동에서 채집한 종의 카네이션 체리핑크와 스칼렛 두 종의 투과전자현미경으로 관찰결과 체리핑크 8개체 중 모든 개체에서 구형의 바이러스 확인했으며, 또 다른 품종 스칼렛에 대해서 8개체 모두에서 구형의 바이러스를 확인하였다.

Table 7. Results of TEM on the 2 cultivar 16 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무
체리핑크 ①	+	스칼렛 ①	+
체리핑크 ②	+	스칼렛 ②	+
체리핑크 ③	+	스칼렛 ③	+
체리핑크 ④	+	스칼렛 ④	+
체리핑크 ⑤	+	스칼렛 ⑤	+
체리핑크 ⑥	+	스칼렛 ⑥	+
체리핑크 ⑦	+	스칼렛 ⑦	+
체리핑크 ⑧	+	스칼렛 ⑧	+

##### ②2004년 1월 15일

서울에서 재배된 카네이션 3품종을 채집하여 투과전자현미경으로 관찰결과 한 품종의 11개체를 조사한 결과 5개체에서 구형의 바이러스를 확인 하였으며, 두 번째 품종 9개체에서는 모두 바이러스의 형태를 확인할 수 없었으며, 세 번째 품종 5개체에 대해서도 바이러스의 형태를 확인할 수 없었다.



Table 8. Results of TEM on the 3 cultivar 25 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무		바이러스유무
무명1-①	+	무명2-①	-	무명3-①	-
무명1-②	-	무명2-②	-	무명3-②	-
무명1-③	-	무명2-③	-	무명3-③	-
무명1-④	-	무명2-④	-	무명3-④	-
무명1-⑤	+	무명2-⑤	-	무명3-⑤	-
무명1-⑥	-	무명2-⑥	-		
무명1-⑦	+	무명2-⑦	-		
무명1-⑧	+	무명2-⑧	-		
무명1-⑨	-	무명2-⑨	-		
무명1-⑩	-				
무명1-⑪	+				

③2004년 2월 4일

김해농장을 방문하여 채집한 첫 번째 농장의 3품종에 대하여 체리에베타 품종 14개체 중 모두 구형의 바이러스를 확인할 수 있었으며, 파소아의 품종 14개체에서는 모두 바이러스의 형태가 관찰되지 않았으며, 이비자의 품종 15개체를 확인한 결과 7개체에서 구형의 바이러스를 확인하였다.

Table 9. Results of TEM on the 3 cultivar 44 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무		바이러스유무
체리에베타①	+	파소아①	-	이비자①	-
체리에베타②	+	파소아②	-	이비자②	+
체리에베타③	+	파소아③	-	이비자③	+
체리에베타④	+	파소아④	-	이비자④	+
체리에베타⑤	+	파소아⑤	-	이비자⑤	+
체리에베타⑥	+	파소아⑥	-	이비자⑥	-
체리에베타⑦	+	파소아⑦	-	이비자⑦	-
체리에베타⑧	+	파소아⑧	-	이비자⑧	-
체리에베타⑨	+	파소아⑨	-	이비자⑨	+
체리에베타⑩	+	파소아⑩	-	이비자⑩	-
체리에베타⑪	+	파소아⑪	-	이비자⑪	-
체리에베타⑫	+	파소아⑫	-	이비자⑫	+
체리에베타⑬	+	파소아⑬	-	이비자⑬	-
체리에베타⑭	+	파소아⑭	-	이비자⑭	-
		파소아⑮	-	이비자⑮	+

④2004년 2월 4일

두 번째 농장의 3품종에 대하여, 체리테시노 품종은 3개체중 한 개체에서 구형의 바이러스를 확인할 수 있었으며, 스칼렛플러스의 품종 4개체 모두에서 바이러스를 확인

할 수 없었으며, 트랜지테시노의 품종에서 4개체 중 3개체에서 구형의 바이러스를 확인할 수 있었다.

Table 10. Results of TEM on the 3 cultivar 11 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무		바이러스유무
체리테시노①	-	스칼렛플러스①	-	트랜지테시노①	+
체리테시노②	+	스칼렛플러스②	-	트랜지테시노②	+
체리테시노③	-	스칼렛플러스③	-	트랜지테시노③	+
		스칼렛플러스④	-	트랜지테시노⑤	-

⑤2004년 2월 20일

2품종을 채집하여 확인 결과 체리에베타의 품종의 3개체 중 한 개체가 구형의 바이러스를 확인하였다. 이비자의 품종 한 개체에서 구형의 바이러스를 확인 하였다.

Table 11. Results of TEM on the 2 cultivar 4 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무
체리에베타①	-	이비자①	+
체리에베타②	-		
체리에베타③	+		

⑥2004년 2월 21일

2품종을 채집하여 투과전자현미경으로 확인한 결과 첫 번째 품종의 4개체에서 3개체에서 구형의 바이러스를 확인하였다.

두 번째 품종의 4개체에서 확인결과 3개체에서 구형의 바이러스를 확인하였다.

Table 12. Results of TEM on the 2 cultivar 8 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무
무명 1-①	+	무명 2-①	+
무명 1-②	-	무명 2-②	+
무명 1-③	+	무명 2-③	+
무명 1-④	+	무명 2-④	-

⑦2004년 3월 5일

2품종을 채집하여 투과전자현미경으로 확인한 결과 첫 번째 품종의 3개체에서 모두 바이러스가 확인되지 않았다. 또한 두번째 품종의 2개체에서도 바이러스가 확인되지 않았다.

Table 13. Results of TEM on the 2 cultivar 6 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무
무명 1-①	-	무명 2-①	-
무명 1-②	-	무명 2-②	-
무명 1-③	-	무명 2-③	-

⑧2004년 3월 15일

서울에서 재배된 카네이션을 채집하여 투과전자현미경으로 확인한 결과 8개체에서 모두 구형의 바이러스가 확인되었다.

Table 14. Results of TEM on the 1 cultivar 8 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무
무명 1-①	+	무명 1-⑤	+
무명 1-②	+	무명 1-⑥	+
무명 1-③	+	무명 1-⑦	+
무명 1-④	+	무명 1-⑧	+

㉠2004년 3월 29일

Table 15. Results of TEM on the 8 cultivar 60 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무
무명 1-①	+	무명 2-①	+
무명 1-②	+	무명 2-②	+
무명 1-③	+	무명 2-③	+
무명 3-①	+	무명 4-①	-
무명 3-②	+	무명 4-②	+
무명 3-③	+	무명 4-③	-
무명 5-①	-	무명 6-①	-
무명 5-②	-	무명 6-②	+
무명 5-③	-	무명 6-③	+
무명 5-④	-	무명 6-④	-
무명 5-⑤	-	무명 6-⑤	-
무명 5-⑥	-	무명 6-⑥	-
무명 5-⑦	-	무명 6-⑦	-
무명 5-⑧	+	무명 6-⑧	+
무명 5-⑨	+	무명 6-⑨	+
무명 5-⑩	+	무명 6-⑩	-
무명 5-⑪	-	무명 6-⑪	-
무명 5-⑫	-		
무명 5-⑬	+		
무명 5-⑭	+		
무명 5-⑮	-		
무명 7-①	+	무명 8-①	+
무명 7-②	+	무명 8-②	+
무명 7-③	+	무명 8-③	-
무명 7-④	+	무명 8-④	-
무명 7-⑤	+	무명 8-⑤	+
무명 7-⑥	+	무명 8-⑥	+
무명 7-⑦	+	무명 8-⑦	+
무명 7-⑧	+	무명 8-⑧	-
무명 7-⑨	+	무명 8-⑨	-
무명 7-⑩	+	무명 8-⑩	-
무명 7-⑪	+	무명 8-⑪	+



⑩2004년 4월 12일

일본에서 채집한 두 품종의 투과전자현미경 확인 결과. 첫번째 품종의 두개체에 서 바이러스가 확인되지 않았으며, 두번째 품종의 두개체 모두에서 구형의 바이러스가 확인되었다.

Table 16. Results of TEM on the 2 cultivar 4 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무
무명 1-①	+	무명 2-①	-
무명 1-②	+	무명 2-②	-

⑪2004년 5월 3일

중국에서 채집한 카네이션 4품종을 투과전자현미경으로 확인결과. 채집한 카네이션의 159개체 중 98개체가 바이러스에 감염되었는 것이 확인되었다. 지금까지 조사 결과로 바이러스의 감염률은 61.6%로 확인된다.

Table 17. Results of TEM on the 4 cultivar 6 samples of carnation.

	바이러스유무		바이러스유무
무명 1-①	+	무명 3-①	+
무명 1-②	+	무명 3-②	+
무명 2	+	무명 4	+

(2) 2차년도

◆ 전라북도 카네이션채집 ◆

⑫전라북도 농업기술원

Table 18. Results of TEM on the 8 cultivar 53 samples of carnation.

품종	채집 개체 수	CarMV에 감염된개체수
스칼렛 퀸	10	-
바바라	9	3
몬테리	8	-
카타고	5	-
아이보리	5	2
피키후로레	5	-
안달루즈	6	2
마야미	5	1

⑬전라북도 농가의 카네이션 채집

Table 19. Results of TEM on the 14 cultivar 138 samples of carnation.

품종	채집개체수	CarMV에 감염된개체수	CLV에 감염된개체수
타우로	10	6	-
레이디 스프링	10	3	-
카잔	10	-	-
뉴 피가로	10	3	-
벨벳	10	9	-
마야미	5	-	-
데지오	10	10	-
Dona	10	9	-
로렌스	11	11	11
슈퍼그린	11	10	-
볼레로	10	3	-
그린매직	10	10	-
다이아몬드	11	11	7
케샤	10	10	4

◆ 대구 인근 꽃 판매상 ◆

⑭대구 인근 꽃판매상 카네이션 채집

지금까지 채집한 카네이션의 306개체 중 194개체가 CarMV 감염되었는 것이 확인되었으며, 22개체가 CLV에 감염되었는 것이 확인되었다. 조사결과로 바이러스의 감염률은 63.40%로 확인되었다.

Table 20. Results of TEM on the 9 cultivar 115 samples of carnation.

품종	채집 개체 수	CarMV에 감염된개체수
데지오	15	14
마리아	15	13
스칼렛	10	8
오팔	13	9
나나엘	10	7
체리스칼렛	13	10
로렌스	15	10
크리스탈	10	11
다이아몬드	14	9

(3) 3차년도

⑮2006. 04. 21 남원

투과전자현미경을 이용한 형태학적인 관찰 결과

Table 21. Results of morphological observation by TEM.

	구형 (약30nm)	사상형 (600-800nm)	긴사상형 (1400-1600nm)
Imp white①	+	+	+
Imp white②	+	+	+
Imp white③	+	+	+
Imp white④	+	+	+
west pretty①	+	+	+
west pretty②	+	-	-
west pretty③	+	+	-
Koreno①	+	+	+
Koreno②	+	+	+
sun ray①	+	+	+
sun ray②	+	+	+
Teresa①	+	+	+
Teresa②	+	+	-
Tropic butter fly 1-①	+	-	-
Tropic butter fly 1-②	+	+	+
Tropic butter fly 2-①	+	-	-
Tropic butter fly 2-②	+	+	+
Tropic butter fly 2-③	+	-	-
Tropic butter fly 2-④	+	-	-
Tropic butter fly 3-①	+	+	-
Tropic butter fly 3-②	+	-	-
Terra	+	+	+
Eugenia	+	+	+
Pink barasa	+	+	+
Tosman	+	-	+
Target	+	-	-
크라운	+	+	-
사랑별	+	+	+
Indios	+	-	+
Tusaron	+	+	+
산호	+	-	+
green magic	+	-	+
barados	+	-	+
scalet	+	-	+
spirit	+	-	+
Virgo	+	+	+
Jaco bine	+	+	+
yellow dusty	+	+	+
자수정	+	+	+
페가수스	+	-	+

## 2) RT-PCR 결과

### (1) CarMV 검정

남원농장에서 채집한 sample 39개체 중에 CarMV에 감염된 카네이션은 33개체로 85%의 감염률을 가진다.

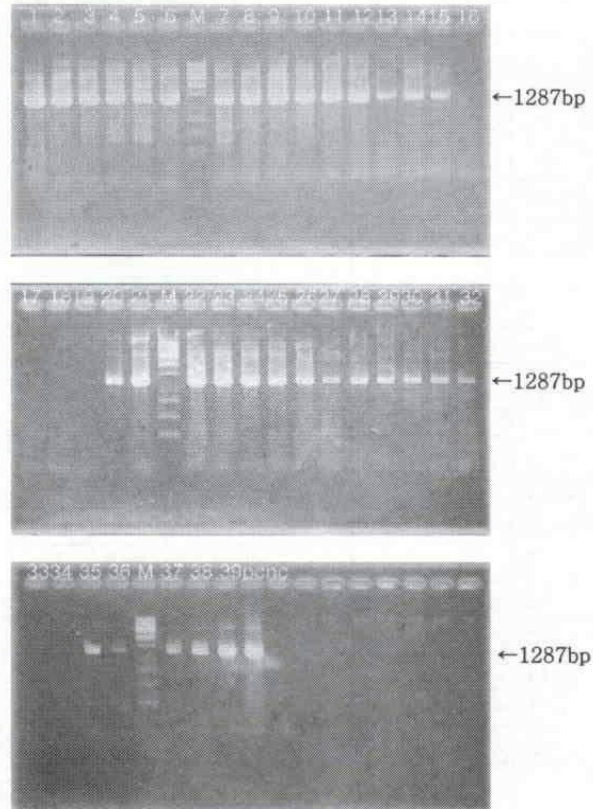


Fig. 41. Results of RT-PCR on CarMV infected carnations.

1~39: 남원농장에서 채집한 sample, pc: positive control,  
nc: negative control, product size: 1287bp

### (2) CarRSV 검정

남원농장에서 채집한 sample 39개체 중에 CarRSV에 감염된 카네이션은 0개체로 0%의 감염률을 가진다.



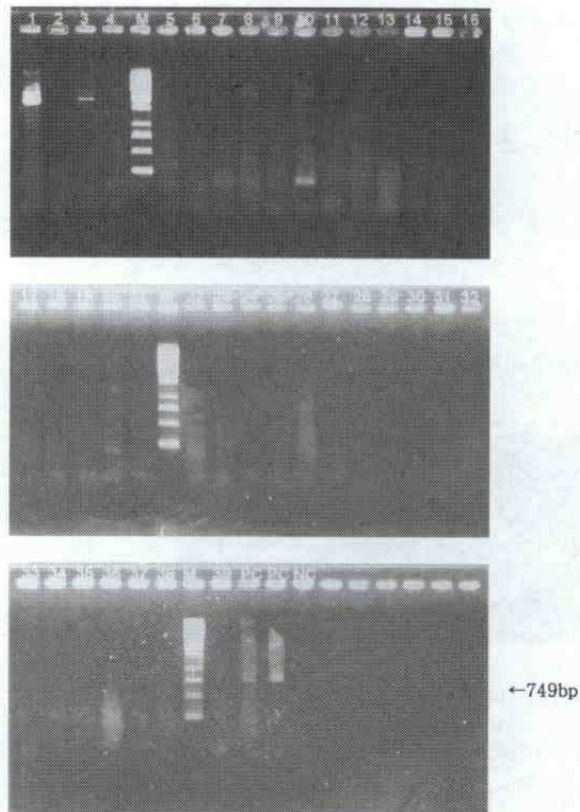


Fig. 42. Results of RT-PCR on CarRSV infected carnations.

1~39 : 남원농장에서 채집한 sample, PC : positive control,  
 NC : negative control product size (749bp)

### (3) CLV 검정

남원농장에서 채집한 sample 39개체 중에 CLV에 감염된 카네이션은 4개체로 약 10%의 감염률을 가진다.

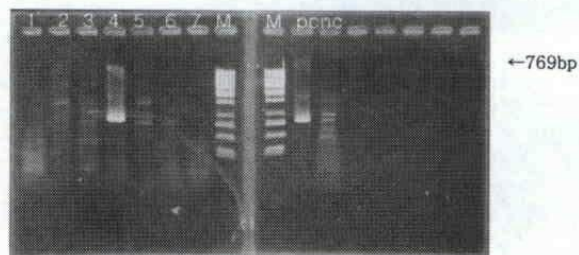


Fig. 43. Results of RT-PCR on CLV infected carnations.

1~7 : 남원농장에서 채집한 sample, PC : positive control,  
 NC : negative control product size : 769bp

6. 대구가톨릭대학교와 협동연구 지원현황

1) RT-PCR에 의한 바이러스 검정

(1) CarMV 검정

①2004년 3월 23일

21개체중에서 11개체에서 CarMV 감염 확인

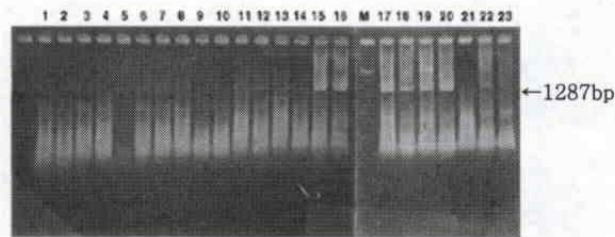


Fig. 44. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

M : 250bp Marker, Product size : 1287bp,

22 : CarMV 감염 패랭이잎, 23 : CarMV 감염 명아주잎

②2004년 4월 5일

카네이션 15개체 중 12개체에서 CarMV 감염 확인, CarMV에 감염된 개체 확인되지 않음

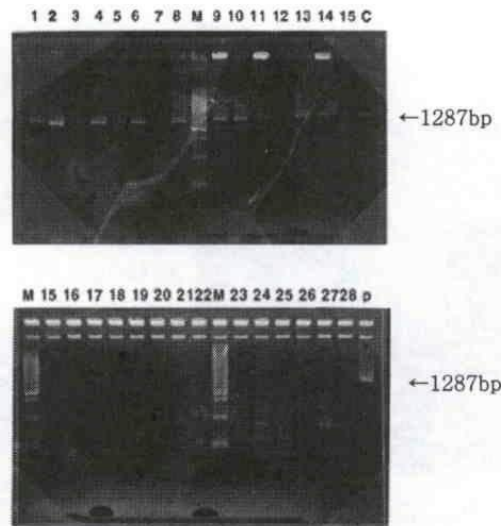


Fig. 45. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

M : 250bp Marker, Product size : 1287bp

C : CarMV에 감염된 패랭이잎, P : CarMV에 감염된 패랭이잎

③ 2004년 4월 17일

카네이션 23개체 중 15개체에서 CarMV 감염 확인.



Fig. 46. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

M : 250bp Marker, Product size : 1287bp,

P, 23 : CarMV에 감염된 명아주잎,

④ 2004년 4월 20일

카네이션 14개체 CarMV 감염 확인

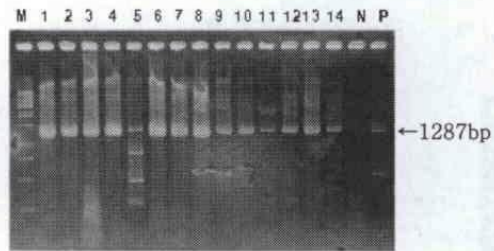


Fig. 47. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

M : 250bp Marker, Product size : 1287bp

N : 건전잎, P : CarMV에 감염된 명아주잎

⑤2004년 4월 27일

카네이션 14개체중 3개체에서 CarMV 감염 확인(그림 48-1), 카네이션 5개체에서의 CarMV의 감염이 확인되지 않음(그림 48-2), CarMV를 독말풀(datura)과 콩(black eye) 잎에 접종하여 증식 유무 확인 결과 2, 3번에서 CarMV 감염이 확인(그림 48-3)되었다.

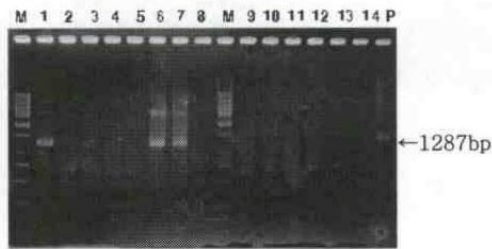


Fig. 48-1. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

M : 250bp Marker, Product size : 1287bp  
14 : 건전잎, P : CarM 에 감염된 명아주잎

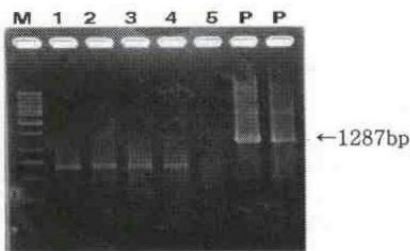


Fig. 48-2. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

M : 250bp Marker, Product size : 1287bp  
P : CarMV에 감염된 명아주잎

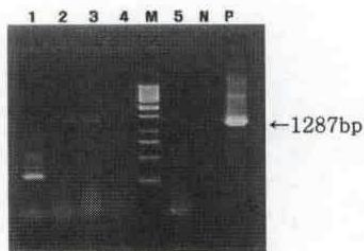


Fig. 48-3. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

M : 250bp Marker, Product size : 1287bp  
P : CarMV에 감염된 명아주잎, 1~3 : 독말풀  
4~5 : 콩



⑥2006. 02. 07

CarMV검정 결과 12개의 sample중 12개의 sample(그림 49-1)이, 8개의 sample중 7개의 sample(그림 49-2)이 CarMV에 감염된 것을 확인하였다.



Fig. 49-1. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

1~12 : sample, 13 : negative control  
14 : positive control

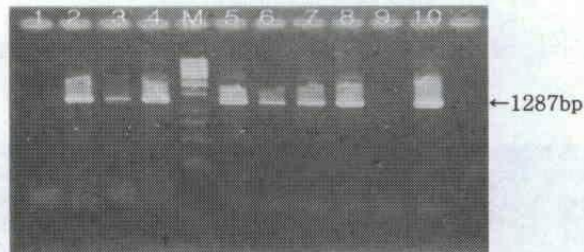


Fig. 49-2. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus.

1~8 : sample, 9 : negative control  
10 : positive control

⑦2006. 05. 15

CarMV검정 결과 23개의 sample중 20개의 sample이 CarMV에 감염된 것을 확인하였다.

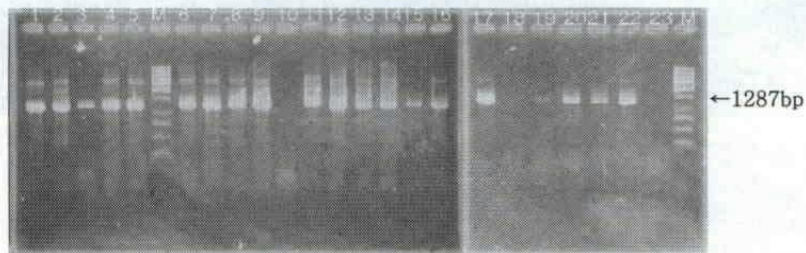


Fig. 50. Results of RT-PCR for detecting CarMV virus. 1~23 : sample

(2) CarRSV 검정

①2006. 03. 03

CarRSV검정 결과 7개의 sample중 2개의 sample이 CarRSV에 감염된 것을 확인하였다.

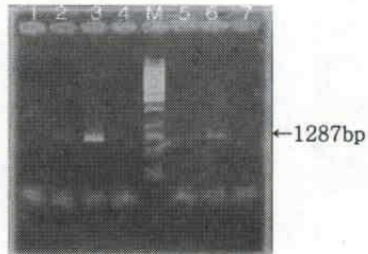
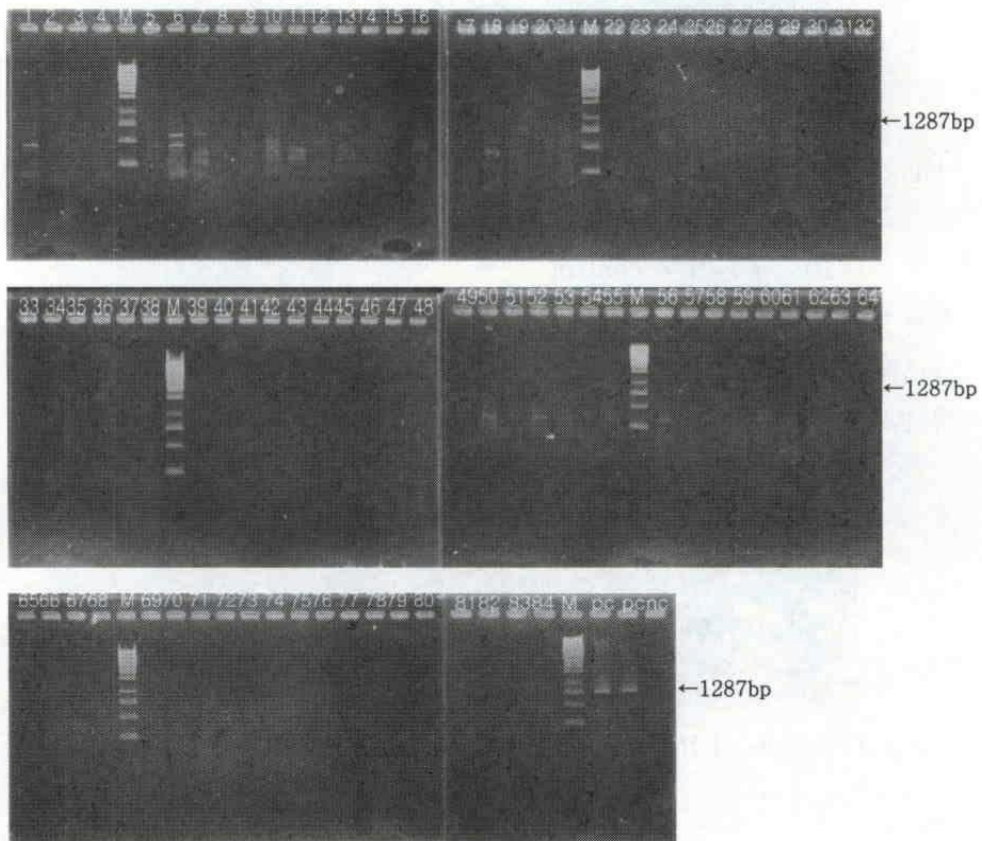


Fig. 51. Results of RT-PCR for detecting CarRSV virus. 1~7 : sample

②2005. 05. 15

CarRSV검정 결과 108개의 sample중 0개의 sample이 CarRSV에 감염된 것을 확인하였다.



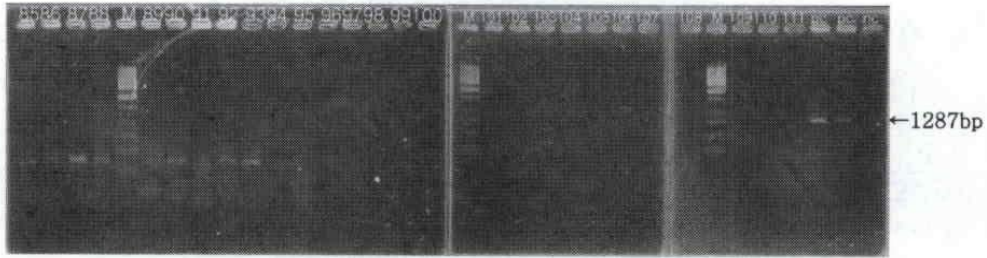


Fig. 52. Results of RT-PCR for detecting CarRSV virus.

1~94, 98~111 : sample, 95, 96, 97 : negative control,

PC : positive control, NC : negative control

## 2) RIPA에 의한 바이러스 검정

항혈청의 IgG를 분리하여 바이러스 대량 검정에 이용되는 RIPA(Rapid immunofilter paper assay)실험에 필요한 재료(Filter paper, 항체결합라텍스, 식물추출원충액)를 계속적으로 공급해 주고 있다.

## 3) 바이러스 증식된 잎을 제공

CarMV에 감염된 카네이션을 *Chenopodium amaranticolor* 접종하여 증식시킨 잎을 제공하여서, 실험에 Positive control로 실험할 수 있도록 제공하였으며, 주관연구기관에서 직접 증식할 수 있도록 하였다. 또한 CarRSV를 *Chenopodium amaranticolor*와 미안마 동부에 접종하여 증식시킨 잎을 제공하여 실험에 positive control로 실험할 수 있도록 제공하였으며 증식하기 위한 재료로도 제공하였다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1-1. 연차별 연구개발 목표와 내용(주관연구과제+협동연구과제)

구 분	연구개발목표	연구 개발 내용 및 범위
3차년도(최종) 제 1세부과제 (주관연구기관)	○ 바이러스저항성 품종개발을 위한 형질전환개체확충, 검정 및 기내증식	1) 형질전환체(Kanamycin 선발) 확충 ; · CarMV Cp (40개체) · CaRSV Cp (40개체) · ToMV MP (40개체) 2) 형질전환체 검정 ; · PCR 분석(120개체) · Southern Blot 분석(40개체) · Northern Blot / Western Blot 분석(40개체) 3) 생장점배양 후 virus 검정(형질전환 40계통 200개체) 4) 조기강건형질전환체 생산을 위한 발근배지개선 및 기내증식 5) 형질전환체 순화 및 온실재배 · 항virus성계통 포장재배(10계통 40개체) · 항virus성계통 증식재배(10계통 40개체) 6) 형질전환체의 Bioassay ; · CarMV 검정(4계통 20개체) · CarRSV 검정(4계통 20개체) 7) Bioassay 검정에 positive한 계통의 기내대량증식 8) 카네이션품종 수집재배(10품종) 9) 항virus성계통과 수집품종간 교배육종(1품종)
제 2세부과제 (협동연구기관)	○ 카네이션품종의 수집, 증식 및 교배육종  ○ 재배 Carnation Virus 검정 및 형질전환개체 저항성 검정	1) Virus 정제 및 항혈청생산(CarMV, CarRSV) ; · CarMV / CarRSV 증식 · CarMV RNA / CarRSV 정제 · 항혈청 제작 2) Virus 진단체계확립(CarMV, CarRSV) ; · RT-PCR / IC-RT-PCR 검정 · RIPA · ds-RNA 3) Virus 염기서열분석(CarMV, CarRSV) ; · CarMV Cp gene 염기서열분석 · CarMV등의 Strain RNA 전염기서열분석 4) 확립된 바이러스 진단체계를 이용한 형질전환개체 저항성 검정



2-1. 연구평가의 착안점(주관연구기관+협동연구기관)

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도 (점수)
3차년도 (최종)	○ CarMV pGS Op 형질전환체가 형성되었는가?	10
	○ CarRSV-pGS Op 형질전환체계가 확립되었는가?	10
	○ ToMV-pGA MP 형질전환체계가 확립되었는가?	10
	○ CarRSV pGA Op 형질전환체가 PCR분석이 되었는가?	5
	○ ToMV pGS MP 유전자가 PCR로 분석이 되었는가?	5
	○ ToMV pGS MP 유전자가 Southern blot 분석이 되었는가?	5
	○ 국내 CarRSV strain Op gene 형질전환체가 northern blot, western blot test로 분석이 되었는가?	10
	○ CarMV형질전환체가 순화되어 온실에 재식되었는가?	5
	○ 형질전환체에 CarMV의 bioassay 되었는가?	5
	○ 항바이러스성 카네이션계통이 증식되었는가?	5
	○ CarMV 항혈청 제조되었는가?	5
	○ ISEM을 이용한 CarRSV검정체계가 확립되었는가?	5
	○ CarRSV의 ELISA 분석체계가 확립되었는가?	5
	○ CarRSV의 RT-PCR 검정체계가 확립되었는가?	5
	○ CarMV Op gene 염기서열분석이 되었는가?	5
	○ CarMV Op gene cloning되었는가?	5
		100%

## 제 5 장 연구성과 및 활용계획

앞으로 생물검정으로 CarMV에 대한 내병성이 있는 형질전환계통을 특허권을 신청할 계획이며, 그 후 Virus 내병성 품종육성을 위하여, 교배육종의 모본재료식물로써 사용할 예정이다.

카네이션바이러스 검정법이 확립되어, 조기에 카네이션바이러스 병원주를 제거하면, 바이러스 피해를 줄여 농민의 소득원 증대에 기여 할 수 있다.

## 제 6 장 참고문헌

Bae K.M. and Yu S.N. 2002. Development of viral disease resistance in *Dianthus caryophyllus* by transformation of CarMV CP gene. I. Development of CarMV CP gene expression system for transformation. J.Kor. Soc. Hort. Sci. 43(4): 466-470.

Brierley P. & Smith. F. F. 1957. Carnation viruses in the United States. *Phytopathology* 47: 714-721.

Brierley P. & F. F. Smith. 1955. Two sap-transmissible viruses from carnation. (Abstr.) *Phytopathology* 45: 464.

Calderon, O. L., Arbelaez, G. 1999. Effect of the Carnation Mottle Virus on the rooting of the cuttings and on flower production. *Acta hortic*, 482: 179-186.

Carrington J.C. and Morris T.J 1984. Complementary DNA cloning and analysis of carnation mottle virus RNA. *Virology* 139: 22-31

Carrington J.C. and Morris T.J 1985. Characterization of the cell-free translation products of carnation mottle virus genomic and sg RNAs. *Virology* 144: 1-10

Carpenter C.D. and Simon A.E 1998. Analysis of sequences and predicted structures required for viral satellite RNA accumulation by in vivo genetic selection. *Nucleic Acids Res* 26: 2426-2432

Cheon J. U., E. J. Lee 1992. Studies on carnation mottle virus in Korea: 2.

Light microscopic approach to *Chenopodium amaranticolor* leaves infected with carnation mottle virus. Research reports of the rural development administration(Suweon) 34: 28-32.

Cheon J.U, Lee J.S, Ryu H.Y, Lee E.J 1992. Studies on carnation mottle virus in Korea. I. Isolation and identification of carnation mottle virus. Korean J Plant Pathol 8: 144-148.

Ciuffreda P, Rubino L, Russo M 1998. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of Galinsoga mosaic virus genomic RNA. Arch Virol 143: 173-180

Cohen Y, Qu F, Gisel A, Morris T.J, Zambryski PC 2000. Nuclear localization of Turnip Crinkle Virus movement protein p8. Virology 273: 276-285

Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V., Tagliatalata-Scafati O. 2001. Kaempferide triglycoside: a possible factor of resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus*) to *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 126(1): 13-18.

Diez J, Mimos J F, Pallas V 1998. Carnalovirus isolation and RNA extraction. In: Foster Dodds JA, Tremaine JH, Ronald WP. 1977. Some properties of carnation ringspot virus single- and double-stranded ribonucleic acid. Virology. 83(2):322-8.

Estopa M, Marfa, V, Mele, E, Messeguer, J. 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. Plant cell, tissue organ cult;65(3)211-220.



Felsenstein J 1989. Phylip-Phylogeny inference Package (Version 3.2). Cladisc 5:164-166

Fichot O, Girard M 1990. An improved method for sequencing of RNA templates. Nucleic Acids Res 18: 6162

Fraile A, Escrill F, Aranda MA, Malpica J.M, Gibbs A.J, Garcia-Arenal F 1997 A century of Tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. J Virol 71: 8316-8320

Garcia-Arenal F, Fraile A, Malpica J.M 1999. Genetic variability and evolution. In: Mandahar G.L (ed) Molecular biology of plant viruses. Kluwer, London, pp 143-159

Garcis-Castillo S, Marcos JF, Pallas V, Sanchez-Pina MA. 2001. Influence of the plant growing conditions on the translocation routes and systemic infection of carnation mottle virus in *Chenopodium quinoa* plants. Physiol. mol. plant pathol. 58(5): 229-238.

Glliney H, Canington JC, Balazs E, Jonard G, Richards K, Morris T.J 1995. Nucleotide sequence and genome organization of carnation mottle virus RNA. Nucleic Acids Res 13: 6663-6677

Gonzalez M, L. Di Feo. S. F. Nome 1990. Identification of carnation (*Dianthus caryophyllus*) viruses in Argentina. Fitopatologia Brasileira 15(4): 291-293.

Hacker D.L, Petty I, Wei N, Morris T.J 1992. Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. Virology 186: 1-8

Hegedus, K., Palkovics, L., Toth, E. K., Dallmann, G., Balazs, E. 2001. The DNA form of a retroviroid-like element characterized in cultivated carnation species. *J. gen. virol*, 82(3):687-691.

Hiruki C. The Dianthoviruses: A Distinct group of isometric plant viruses with bipartite genome. *Advances in virus research* 33:257-300.

Hull, R. 1993. Nucleic acid hybridization procedures. In: *Diagnosis of Plant Virus Diseases* (Matthews, R.E.F. ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 253-271.

Jesús A. Sánchez-Navarro, M. Carmen Cañizares, Emilio A. Cano and Vicente Pallás 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotype nucleic acid hybridization. *Journal of Virological Methods* 82 1999 167-175

Kalmakoff J and Tremaine JH. 1967. Some Physical and Chemical Properties of Carnation Ringspot Virus. *Virology* 33:10-16.

Kassanis B. 1955. Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. Appl. Biol.* 43: 103-113.

Kemp W. G. 1964. The identity of two sap transmissible viruses in carnation in Ontario. *Can. J. Bot.* 42: 45-55.

Kendall T.L. and Lommel. S. A. 1992. Nucleotide sequence of carnation ringspot dianthovirus RNA-2. *J. General virol.* 73, 2479-2482.

Koo B.J., Kang S.G. and Chang M.U. 2002. Survey of Garlic Virus Disease and Phylogenetic Characterization of Garlic Viruses of the Genus *Allexivirus* isolates in Korea. *Plant Pathol. J.* 18(5): 237-243.

Koo B.J., Kang S.G. Shin J.H, Kang D.K and Chang M.U. 2002. Bean common mosaic virus and Peanut mottle virus isolated from Peanut in Korea. Res. Plant Dis. 8(2): 92-100.

Kowalska A. 1973. Investigations into the occurrence of carnation mottle virus and the carnation ringspot virus on the glasshouse carnation cultures in central Poland(*Dianthus caryophyllus*). Hodowla. Roslin. Aklimatyzacja. Nasiennictwo 17(13): 53-63.

Kowalska A. 1972. Studies on the properties of carnation mottle virus and carnation ringspot virus isolated in Poland. Phytopathol. Z. 74(4): 329-341.

Li W, Qu F, Morris T.J 1998. Cell-to-cell movement of turnip crinkle virus is controlled by two small open reading frames that function in trans. Virology 244: 405-416

Lommel S. A., A. H. McCain, T. J. Morris 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses carnation mottle virus, carnation ringspot virus. Phytopathology. St. Paul, Minn. 72(8): 1018-1022.

Lommel SA, Weston-Fina M, Xing Z and Lomonosoff GP. 1988. The nucleotide sequence and gene organization of red clover necrotic mosaic virus RNA-2. Nucleic Acids Research 16(7): 8587-8602.

Lu C.Y., Nugent G., Wardley-Richardson, T., Chandler S.F., Young, R. and Dalling M.J. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Biotechnology. 9: 864-868.

Marcos J.F, Vilar M, perez-Pay& E, Pallas V 1999. In vivo detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle virus (CarMV). *Virology* 255: 354-365

Mayo M.A, Pingle C.R 1998. Virus taxonomy: 1997. *J Gen Virol* 79: 649-657

Miroshnichenko, D. N., Dolgov, S. V. 2000. Production of transgenic hygromycin resistant carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants after cocultivation with *A. tumefaciens*. *Acta hort.* 508: 255-258.

Morgunova E.Y, Dauter Z, Fry E, Stuart D.I, Sternlashchuk V.Y, Mikhailov A.M, Wilson K.S, Vainshteyl B.K 1994. The atomic structure of carnation mottle virus capsid protein. *FEBS Lett* 338: 267-271

Morris T.J, Canington J.C 1988. Carnation rome virus and viruses with similar properties-11: Koenig R (ed) *The plant viruses, non-polyhedral viruses with monopartite RNA genome*. Plenum Press, New York, pp 73-112

Morris-Krsinich B.A.M, Forster R.L.S, Mossop D.W. 1983. Translation of red clover necrotic mosaic virus RNA in rabbit reticulocyte lysate: identification of the virus coat protein cistron on the larger RNA strand of the bipartite genome. *Virology* 124: 349-356.

Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D., 1995. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag, Vienna, pp 586.

Richard H. Guentherm, Tim L. Sit, Hanna S. Gracz, Michael A. Dolan, Hannah L. Townsend, Guihua Liu, Winnell H. Newman,



Paul F., Agris and Steben A. Lommel 2004. Structural characterization of intermolecular RNA-RNA interaction involved in the transcription regulation element of a bipartite plant virus. *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, No.9 2819-2828

Rubino, L.; Weber-Lotfi, F.; Dietrich, A.; Stussi-Garaud, C.; Russo, M. 2001. The open reading frame 1-encoded ('36K') protein of Carnation Italian ringspot virus localizes to mitochondria. *J. gen. virol.*, 82(1):29-34.

Ryabov, E. V., Generozov, E. V., Kendall, T.L., Lommel S. A. and Zavirev S. K. 1994. Nucleotide Sequence of carnation ringspot dianthovirus RNA-1. *J. General viral.* 75: 243-247

Salomon R., M. Bar-Joseph, H. Soreq, I. Gozes, and U. Z. Littauer. 1978. Translation in vitro of carnation mottle virus RNA. Regulatory function of the 3'-region. 90: 288-298.

Sanchez-Navarro JA, Canizares MC, Cano EA, Pallas V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *J Virol Methods.* 82(2):167-75.

Sanchez-Navarro, J. A., Cano, E. A., Pallas, V. 1996. Non-radioactive molecular hybridization detection of carnation mottle virus in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques. *Plant pathol.*, 45(2): 375.

Sanchez-Navarro, J.A., Canizares, M.C., Cano, E.A., Pallas, V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *J. virol. methods*, 82(2): 167-175.

Shin. H. Y., Koo B.G., Kang S.G., Jang M. U and Ryu K. H. 2002. Characterization Tobacco rattle virus(TRV-K) isolated in Korea. Res. Plant Dis. 8(3): 207-214.

Sit TL, Haikal PR, Callaway AS, Lommel SA. 2001. A single amino acid mutation in the carnation ringspot virus capsid protein allows virion formation but prevents systemic infection. J Virol. 75(19):9538-42.

Taylor S.G, (eds) Plant virus promics Rom virus is ol ation to transgenis resistance.Hulnana Press, Totowa, pp 211-217

Tim L. Sit, Patriock R. Haikal, Anton S. Callaway and Steven A, Lomme l2001. A Single Amino Acid Mutation in Carnation Ringspot Virus Capsid Protein Allows Virion Firmation but Prevents Systemic Infection Journal of Viroligy, Oct 2001, p. 9538-9542 Vol.75, No. 19

Tremaine J. H and Ronald W. P. 1976. Differtial effects of sodium dodecyl sulfate on strains of carnation ringspot virus. J. Gen. Virol. 30: 299-308.

Tremaine J. H. and W. P. Ronald. 1985. The effect of pH and some selected chemicals on the temperature-reversible aggregation of carnation ringspot virus. Physiology and Biochemistry. 75(4): 467-471.

Tremaine J. H, Ronald W. P. and McGauley E. M. 1984. Temperature-reversible aggregation of two strains carnation ringspot virus. Phytopathology 74: 161-165.

Tremaine J. H. 1970. Physical, chemical, and serological studies on carnation mottle virus. Virology 42: 611-620.

Tremaine J. H., Ronald W. P. and Valcic A. 1976. Aggregation properties of carnation ringspot virus. *Phytopathology* 66: 34-39.

Tsay, H.-S. 1998. Effects of Medium Composition At Different Recultures on Vitrification of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) In Vitro Shoot Proliferation. *Acta hortic*, 461: 243-249.

Valenzuela M, M. Pizano 1992. Distribution of carnation mottle virus and carnation ringspot virus in the Bogota Sabana. *Acta Hortic. Wageningen : international Society for Horticultural Science. Aug. (307): 221-224.*

Van Altvorst, A. C., Riksen, T., Koehorst, H., Dons, H. J. M. 1995. Transgenic carnations obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-13.

Van Altvorst, A.-C., Riksen, T., Koehorst, H., Dons, H., 1995. Shoot Regeneration and *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Carnation. *Acta hortic*, 420: 92

Van Altvorst, A.-C.; Koehorst, H.; De Jong, J.; Dons, H. J. M. 1996. Transgenic carnation plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of petal explants. *Plant cell, tissue organ cult*, 45(2): 169-173.

Vilar, M., Esteve, V., Pallas, V., Marcos, J. F., Perez-Paya, E. 2001. Structural properties of carnation mottle virus p7 movement protein and its RNA-binding domain. *J. biol. chem*, 276(21)18122-18129.

Waterworth H. E. and J. M. Kaper. 1972. Purification and properties of carnation mottle virus and its ribonucleic acid. *Phytopathology* 62: 959-964.

Weerts J, M. Goethals, M. Verhoyen 1974. Influence of carnation mottle virus and carnation ringspot virus on the productivity of carnations (*Dianthus caryophyllus*). Rev. Agric. Brux., May/June(3): 517-528.

Weinthaub M. & W. G. Kemp. 1961. Protection with carnation mosaic virus in *Dianthus barbatus*. Virology 13:256-257.

Yu, Sun-Nam and Bae, Kyung Mi, 1996, Introduction of CarMV Coat Protein Gene into Carnation by *Agrobacterium tumefaciens*, Korean J. Plant Tissue Culture, 23(1):1-7.

Yu, Sun-Nam and Bae, Kyung Mi, 2000, Development of Viral Diseases Resistance in *Dianthus caryophyllus* by Transformation (I. Transformation of CarMV Coat Protein Gene), KOR. J. Hort. Sci. & Technol., 18(5):665

Yu, Sun-Nam and Bae, Kyung Mi, 2000, Development of Viral Diseases Resistance in *Dianthus caryophyllus* by Transformation (II. Development of CaRSV Cp Gene expression System for Transformation), KOR. J. Hort. Sci. & Technol, 18(5):665

Yu S.N. and Bae K.M. 2002. Development of viral disease resistance in *Dianthus caryophyllus* by transformation of CarMV CP gene. II. Plant Transformation and expression of CarMV CP gene. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 43(4): 471-475.

Yu, Sun-Nam, Bae, Kyung-Mi, Lim, Pyung-Ok, 1996, Transformation of TMV-OM Strain Coat Protein Gene in *Capsicum annuum* L. for Viral Disease Resistance, Korean J. Breed, 28(1):85-91.

Zuker, A, Ahroni, A, Tzfira, T., Ben-Meir, H, Vainstein, A. 1999.



Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Molecular breeding : new strategies in plant improvement*, 5(4): 367-375.

Zuker, A., Ahroni, A., Vainstein, A. 1997. A Highly Efficient Method for Carnation Transformation. *Acta hortic*, 447:373.

Zuker, A., Chang, P.-F. L., Ahroni, A., Cheah, K. 1995. Transformation of carnation by microprojectile bombardment. *Sci. hortic*, 64(3): 177-185.

Zuker, A., Tzfira, T., Ahroni, A., Shklarman, E., Ovadis, M., Itzhaki, H., Ben-Meir, H.; Vainstein, A. 2001. Transgenic *Dianthus* spp. (Carnation). *Biotechnol. agricult. for*, 48:70-83