

최 종
연구보고서

효율적인 무병씨감자 생산을 위한 바이러스
신속 무독화 및 유전적 안정성 검정
A research on fast-elimination of viruses
and maintenance of genetic stability for the
efficient production of seed-potatoes

강원대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “효율적인 무병씨감자 생산을 위한 바이러스 신속무독화 및 유전적 안정성 검정에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 임학태

연 구 원 : 방일란

연 구 원 : 강창원

연 구 원 : 박응준

연 구 원 : 황원남

연 구 원 : 윤정하

요 약 문

I. 제 목

효율적인 무병씨감자 생산을 위한 바이러스 신속무독화 및 유전적 안정성 검정

II. 연구개발의 목적 및 필요성

감자는 세계적인 주요 식량작물로 전 세계적으로 매년 약 4%정도의 꾸준한 생산량 증가를 보이고 있는 4대 주요 작물중의 하나이며, 특히 우리나라에서는 최근의 식생활이 변화하면서 점차적으로 중요한 위치를 차지하게 되었다. 우리나라의 전통적인 식단에 따른 여러 가지 감자 음식들과 더불어 감자를 이용한 인스턴트식품들의 증가와 다양한 음식개발 등은 시장성 증대가 기대되는 작물이다.

국내의 감자 재배는 주로 대관령, 평안지, 제주도의 가을재배, 남해안의 무가온 재배 등 재배 면적이 급속하게 증가하고 있으며 북한에서도 대표적인 식량자원으로 재배하던 옥수수 재배 지역을 감자로 바꾸는 작업과 씨감자 생산을 위한 유리온실, 망실 및 저장고 제작 등에 지원함으로써 감자의 생산력을 증대시키는 데 전력을 기울이고 있다..

경제 산업적 측면에서 감자는 우리 국민의 식생활에서는 식량자원의 역할과 또 최근의 식생활 구조의 다양화로 인하여 점차 중요한 위치를 차지해 가고 있다. 이와 같은 소비구조의 변화에 따라 감자는 농가의 주요 소득 작물로 변화하고 있으나 최근에는 수입 개방에 따라 값싼 외국산 감자가 수입되어 국내 감자시장에서 경쟁해야하는 어려움에 직면하고 있다.

국내 감자산업은 거의 1조억원의 시장을 가지고 있지만, 국내에서 재배되는 식용 및 가공용 감자 품종들은 대부분 외국에서 도입된 외래종들이다. 특히,

감자칩, 프렌치프라이 전분 등 가공용 감자 시장이 날로 커지고 있지만 현재는 생감자 및 냉동감자(100%) 수입에 크게 의존하고 있을 뿐만 아니라 외국 품종을 대체할 만한 좋은 품종이 국내에 없었다. 미국을 비롯한 선진국이 가공용 감자의 비율이 65%까지 올라간 반면 한국은 9%정도다. 포테이토칩, 프렌치프라이, 감자구이용 등 다양한 가공용 “밸리감자”들은 국내 시장은 물론 가까운 중국(세계 최대 감자생산국, 35%), 일본을 비롯한 UPOY에 가입한 나라들에게 품종을 수출을 할 것이다. 감자 품종의 용도는 크게 식용과 가공용으로 구분할 수 있는데, 우리나라 장려품종은 대부분이 식용이고 칩가공용으로 ‘대서’와 후렌치 후라이용으로 ‘세풍’ 품종이 있다. 현재 우리나라의 가공산업은 주로 칩 생산에 국한되어 있으며, 그나마도 원료용 감자품종은 외국 품종인 ‘Atlantic (대서)’에 의존해 왔다. 이 품종의 가공품질은 비교적 좋은 편이나 육성모지와 다른 기후환경 조건의 차이에 따라 괴경의 내부생리장해 현상이 크게 나타나는 단점이 있다.

감자는 지역 특성에 맞게 작형이 다양하게 분포되어 있으며 품종 또한 가공용과 식용 등 재배 방식과 용도에 따라 다양하게 육성 및 이용되고 있다. 하지만, 우리나라의 기후적 특성인 봄철 가뭄과 여름의 장마 등으로 많은 병충해를 야기 시킴으로 인하여 수확량의 극심한 감소로 이어지고 있다.

감자의 생산량 증대에 영향을 미치는 여러 가지 원인 중 가장 큰 원인은 바이러스 감염에 의한 씨감자의 품질 퇴화로 가장 심각한 문제로 대두 되고 있으며, 수량감소와 저품질 씨감자, 번식세대에 이병정도의 누적 등으로 식물체 또는 종서의 유지마저 어렵게 되어 감자 농사의 성공과 실패가 좌우 될 정도이다.

현재 감자 병해에서 발생이 가장 심하고 문제되는 PLRV, PVY 등 의 감자 바이러스 감염을 제거하기 위하여 식물체가 받는 영향을 최소화 하고 동시에 **신속하고 간편하게** 바이러스 감염을 제거하는 방법을 모색하여 농가에 보급할 필요성이 있다. 현재 농가에서 사용하는 씨감자는 바이러스 감염율이 높고 크기가 작을뿐만 아니라 수량성이 떨어지는 단점을 갖고 있어 **급속하고 대량적으로** 크기가 크고 수량성이 많은 우량 무병씨감자를 보급할 필요성이 있다.

감자를 기내에 도입하거나 혹은 매년 감자 품종을 교체할 때 즉 감자 조직 배양시 무병주의 감자를 도입하기 위하여 주요하게 성장점을 채취하는 방법이 시행되고 있는데 성장점 배양은 조작이 번거롭고 성공률이 매우 낮으며, 고도의 테크닉을 필요로 하고 효율이 떨어지며 재분화 되기까지 오랜 시간이 걸리는 단점이 있어 성장점 채취보다 조작이 간단하고 생존율을 증가할 수 있는 **더욱 효율적인 방법**이 시급하다.

현재까지 고온 열처리에 의한 바이러스 불활성화 방법이나 감자 성장점 조직배양을 통한 바이러스 무 감염 식물체의 육성 등 조직배양법(meristem culture) 기술을 이용해 왔으며, 최근에는 항바이러스제인 ribavirin이나 virazol 등의 화학제제를 배지에 사용하여 조직배양을 함으로 바이러스의 활성을 현저히 감소시키고 억제시킬 수 있는 연구가 이루어지고 있으나 항바이러스제는 식물체에 영향을 주지 않는 적정 농도의 선택이 어려워 좀 더 많은 연구가 이루어져야 한다고 봅니다. 기존에 여러 가지 처리를 통하여 얻어지는 식물체는 처리 과정에서 변이를 일으킬 수 있어 포장에 나갔을 때 형태적, 분자학적(RAPD)으로 **그 유전적인 안정성**을 검정할 필요성이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

실험에 필요한 식물체의 **바이러스 감염 여부 검정을 위해** 한국감자육종소 재은행에서 보유하고 있는 유전자원 및 본 연구실에서 육성한 새로운 벨리 감자품종들의 바이러스 유무를 ELISA TEST 및 RT-PCR로 검정하는 연구를 수행하였다.

효율적인 무병씨감자 생산을 위한 바이러스 신속 무독화기술을 위하여 바이러스 검정 결과 PLRV 와 PVY 에 감염된 감자 품종(Early)을 마디(성장점 포함) 배양을 통한 조직 배양을 시작으로 유전자원 보존을 위한 기내 유전자원 식물체 갱신 및 바이러스 처리를 위해 식물체를 기내 도입할 때 마디(성장점 포함)를 0.5-1cm 정도로 잘라서 이용하고 계대배양 해 주면서 실험 자료로 사용하였다.

얼리벨리는 1996년 Suncrisp를 모본으로 하고 미국 아이다오 대학교에서 육성된 계통인 A87109-10을 부분으로 하여 1996년 인공교배를 실시하여 진정종자를 획득하여 1997년 봄, 가을 두 번에 걸쳐 실생 양성 과정을 실시하고, 1998년에 본 검정 및 1999-2001년까지 생산력검정시험과 지역적응성시험(춘천 서면, 김제, 대관령, 김해 등)을 거쳐 육성된 품종이다.

식물체의 주요 형태적 특성 지상부 식물체형태는 반 줄기형이며 직립형으로서 숙기는 극조생이다. 지하부 줄기의 모양은 짧은 계란형이며 황색표피로서 과육색은 유백색이다. 덩이줄기의 과육색은 유백색이고 휴면은 짧아서 이기작용으로 재배가 가능하다. 본 품종은 특히 겨울하우스 재배시 조기재배용으로 매우 적합하다. 기존의 겨울하우스 조기재배용 품종이 지니고 있는 결점인 내부갈색반점과 성숙된 감자괴경 표피의 결점이 없다. 극조생종으로 괴경비대가 빠르기 때문에 상대적으로 비중이 높지 못하다. 겨울하우스 재배시 환원당함량이 상대적으로 적어서 칩색도가 매우 양호하였다. 2. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성(대조품종 : 수미) 모양은 수미보다 둥글다. 대서와 수미의 중간형태의 괴경 모양이다. 더덩이병에 대한 저항성은 기존의 수미 품종보다 낮다. 비중은 여름재배시 수미(1.066)에 비해 낮았다. 봄재배에서도 1.042로 수미(1.055)보다 낮았다. 겨울하우스와 가을재배도 수미(1.071/1.054)에 비해서 하우스에서는 1.058로 낮았지만 가을재배는 1.055로 유사했다. 환원당함량은 glucose 0.317, fructose 0.124로 수미(glucose 0.316, fructose 0.296)보다 낮았다. 극조생품종으로서 매우 낮은 환원당함량을 지닌 품종이며 겨울하우스재배시 칩가용으로 사용이 될 정도의 칩색도를 지닌다.

바이러스 감염 식물체 기내도입 후 열처리, 화학적 처리, 전기 충격 처리 및 초저온 처리를 통한 바이러스 제거 즉 변온 열처리, Ribavirin, ASA 단독처리 및 혼합처리를 통한 화학적 처리, 부동한 전류를 통한 전기 충격 처리, Cryopreservation등의 단독처리 및 혼합처리 등 다양한 조건하에서의 실험을 통해 바이러스 제거에 가장 효율적인 최적 조건을 통하여 보다 신속적이고 간편한 감자바이러스 제거 체계를 확립한 후 위의 처리를 통한 식물체를 순화한 후 형태적, 및 유전적 안정성 검정을 하였다.

형태적 특성표(UPOV)와 RAPD방법을 통하여 유전적으로 변이가 일어나지 않은 식물체임을 확인 한 후에 이러한 기술을 농업기술원, 농업기술관리센터 및 농협의 감자 관련 사업 팀 등과 협력하여 무병씨감자 대량 생산기술 인재를 양성한 후 그들이 직접 농가에 기술을 보급하는 시스템을 구축하는데 있다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 실험에 이용된 마디 배양을 이용하여 기존에 자주 이용되는 생장점 배양의 번거로움과 재분화 율의 저하를 향상시켜 기내에 식물체를 도입하거나 유전자원을 보존하거나 갱신하는데 도움이 되며, 또한 바이러스 제거에 가장 효율적인 최적조건을 이용하여 무병한 식물체를 보존할 필요성이 있을 때 또는 무병씨감자를 농가에 보급하여 대량증식을 용이하게 할 수 있고, 위의 바이러스 제거 기술을 기초로 하여 농가 포장에서도 활용될 수 있는 기술을 개발하여 바이러스에 의한 포장에서의 손해를 줄이는데 이용할 수 있다. 이러한 무병씨감자 기술로 농가의 씨감자 교체 비용을 줄이고 높은 수확량을 얻는데 효과가 대체 방안이며, 농업기술원, 농업기술관리센터 및 농협의 감자 관련 사업 팀 등과 협력하여 무병씨감자 대량생산 기술 인재를 양성한 후 그들이 직접 농가에 기술을 보급하는 시스템을 구축하는데 이바지 할 수 있을 것이다.

SUMMARY

'Early valley' genotype infected with both potato viruses (PLRV and PVY) was evaluated for the establishment of *in vitro* virus eradication using heat, chemical, electroporation, Cryopreservation treatments and combinations of heat & chemical methods. The effect of explant size on virus eradication after treatments was also evaluated. Infected plantlets were cultured in the media added with Acetylsalicylic acid (ASA) (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) and Ribavirin (10, 15, 20mg/ml) alone and combination of ASA+Ribavirin. The plantlets grown in each medium was kept at 25C, and heat treatment (35C/30C 1-hr, 4-hr, 8-hr) or 42C/25C 4-hr of nodal segments (0.5-1.0cm). Following these treatments, plantlets were tested quantitatively (OD at A₄₀₅) for virus detection based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). After 4-8 weeks, the potato genotype 'Early valley' showed 56%, 50%, 80%, 82%, and 0% survival rates when cultured on MS media at 25C ASA + Ribavirin (25C), MS (35C/30C) and ASA + Ribavirin (35C/30C), all (42C/25C), respectively. Among the tested treatments, the heat treatment (35C/30C) showed 92% or more PVY eradication, In other cases, the combined treatments eliminated PLRV sporadically.

In morphological and ultrastructural points of view, cryopreserved and non-cryopreserved (control) potato plants had no visual differences. Based on the cytometric analysis, there was no significant difference in the ploidy levels of both cryopreserved and control plants. Cryopreserved plants showed statically higher amounts (17.81%) of palmitic acid than those of control plant (14.07%) at 0.05 level. When test genetic stability of potato after virus elimination, that no genetic variation in the virus elimination and no different in the phenotype.

From this study, it was concluded that heat treatment was the most effective method for PVY elimination, and both heat and chemical treatments (ASA+Ribavirin) at the same time were effective for PLRV elimination when nodal segments were used instead of meristem culture and stability in the genotype and phenotype.

CONTENT

Chapter 1. Introduction of research development	11
Section 1. Objective and necessity of the research development.....	11
1. Aspect of technology.....	11
2. Aspect of economics · industry.....	12
3. Aspect of society · culture.....	13
Section 2. Scope of the research development.....	15
Chapter 2. Status of the current research development	17
Chapter 3. Contents and results of the research	19
Section 1. Contents of the research.....	19
Section 2. Contents of the results.....	26
Chapter 4. Achievement and contribution of the research	46
Section 1. Achievement of the research.....	46
Section 2. Contribution of the research.....	48
Chapter 5. Future applications	49
Chapter 6. Science and technology information obtained from overseas during the process of research development	50
Chapter 7. References	51
Chapter 8. Workshop	

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성	11
1. 기술적 측면	11
2. 경제·산업적 측면	12
3. 사회·문화적 측면	13
제 2 절 연구 개발의 목표와 범위	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	19
제 1 절 연구개발 수행 내용	19
제 2 절 연구 수행 결과	26
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	46
제 1 절 연구개발 목표의 달성도	46
제 2 절 관련분야에의 기여도	48
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	49
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	50
제 7 장 참고문헌	51
제 8 장 Workshop	

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

감자 병해에서 발생이 가장 심하고 문제되는 PLRV, PVY 등의 감자바이러스감염을 제거하기 위하여 식물체가 받는 영향을 최소화 하고, 현재 농가에서 사용하는 씨감자는 바이러스 감염률이 높고 크기가 작을 뿐만 아니라 수량성이 떨어지는 단점을 갖고 있어 **급속하고 대량적으로** 크기가 크고 수량성이 많은 우량 무병씨감자를 보급함과 동시에 **신속하고 간편하게** 바이러스 감염을 제거하는 방법을 모색하여 농가에 보급 할 필요성이 있다.

감자를 기내에 도입하거나 혹은 매년 감자 품종을 교체할 때 즉 감자 조직 배양시 무병주의감자를 도입하기 위하여 주요하게 생장점을 채취하는 방법이 시행되고 있는데 이런 방법은 성공률이 매우 낮고 또 재분화 되기까지 오랜 시간이 걸리는 단점을 갖고 있으므로 생장점 채취보다 **더욱 효율적인 방법**이 시급하다.

감자 바이러스 병을 직접 방제할 약제는 아직 발견되지 않고 있으며 이렇다 할 방제 대책이 없는 한 무병주를 만들어 유지하고 무병상태로 유지하는 것이 가장 바람직한 방제 방법이다. 그러기 위해서는 여러 가지 처리 방법을 통하여 바이러스 무병주를 만드는 것이 시급하다. 기존에 여러 가지 처리를 통하여 얻어지는 식물체는 처리 과정에서 변이를 일으킬 수 있어 포장에 나갔을 때 형태적, 분자학적(RAPD)으로 **그 유전적인 안정성**을 검정할 필요성이 있다.

2. 경제·산업적 측면

국내의 감자 재배는 주로 대관령 고랭지, 평안지, 제주도의 가을재배, 남해안의 무가온 재배 등 재배 면적이 급속하게 증가하고 있으며 북한에서도 대표적인 식량자원으로 재배하던 옥수수 재배 지역을 감자로 바꾸는 작업과 씨감자 생산을 위한 유리온실, 망실 및 저장고 제작 등에 지원함으로써 감자의 생산력을 증대시키는데 전력을 기울이고 있다.

경제 산업적 측면에서 감자는 우리 국민의 식생활에서는 식량자원의 역할과 또 최근의 식생활 구조의 다양화로 인하여 점차 중요한 위치를 차지해 가고 있다. 이와 같은 소비구조의 변화에 따라 감자는 농가의 주요 소득 작물로 변화하고 있으나 최근에는 수입 개방에 따라 값싼 외국산 감자가 수입되어 국내 감자시장에서 경쟁해야하는 어려움에 직면하고 있다.

감자 품종의 용도는 크게 식용과 가공용으로 구분할 수 있는데, 우리나라 장려품종은 대부분이 식용이고 칩가공용으로 '대서'와 후렌치 후라이용으로 '세풍' 품종이 있다. 현재 우리나라의 가공산업은 주로 칩 생산에 국한되어 있으며, 그나마도 원료용 감자품종은 외국 품종인 'Atlantic(대서)'에 의존해 왔다. 이 품종의 가공품질은 비교적 좋은 편이나 육성모지와 다른 기후환경 조건의 차이에 따라 괴경의 내부생리장해 현상이 크게 나타나는 단점이 있다.

국내 감자산업은 거의 1조억원의 시장을 가지고 있지만, 국내에서 재배되는 식용 및 가공용 감자 품종들은 대부분 외국에서 도입된 외래종들이다. 특히, 감자칩, 프렌치프라이 전분 등 가공용 감자 시장이 날로 커지고 있지만 현재는 생감자 및 냉동감자(100%) 수입에 크게 의존하고 있을 뿐만 아니라 외국 품종을 대체할 만한 좋은 품종이 국내에 없었다. 미국을 비롯한 선진국이 가공용 감자의 비율이 65%까지 올라간 반면 한국은 9%정도다. 포테이토칩, 프렌치프라이, 감자구이용 등 다양한 가공용 “밸리감자”들은 국내 시장은 물론 가까운 중국(세계 최대 감자생산국, 35%), 일본을 비롯한 UPOV에 가입한 나라들에게 품종을 수출할 것이다.

우리나라의 기후적 특성인 봄철 가뭄과 여름의 장마 등으로 많은 병충해를 야기시킴으로 인하여 수확량의 극심한 감소로 이어지고 있는데, 현재 한국에서

가장 문제가 되는 바이러스는 PLRV 와 PVY이다. 특히 PLRV 와 PVY 두 바이러스에 복합 감염되었을 경우에는 그 수확량이 훨씬 줄어들어 농가의 손해가 크다. 이 병에 걸린 감자를 씨감자로 이용하면 수량감소 뿐만 아니라 다른 감자에도 병을 옮기므로 절대 씨감자로 사용해서는 안 된다. 더구나 바이러스 병은 접촉에 의하여 또 곤충에 의하여 전염되기 때문에 그 전파는 기하급수적이다. 따라서 신속하고 편리하게 감자바이러스를 제거할 수 있는 방법이 시급한 실정이다..

영양번식 작물인 감자는 씨감자가 여러 가지 바이러스들에 의해 감염되었을 경우 수확량에 치명적인 영향을 미치므로 감자를 재배하고 있는 모든 국가들은 씨감자의 생산이나 수출입시 바이러스 검정을 필수적으로 실시하고 있다. 감자 소비 특히 가공제품의 소비가 증가하는 지금 씨감자 갱신율이 25% 내외로 무병 씨감자를 매년 사용해야 하나 씨감자의 크기가 작고 수량성이 떨어지는 단점으로 위의 바이러스 제거 방법을 기초로 하여 크기가 크고 수량성이 뛰어난 무병 씨감자의 보급이 시급하다. 그리고, 처리를 통하여 포장에 나간 감자가 변이를 일으켰을 때 r그에 대한 보급 부문 및 농가의 손실은 엄청나므로 식물체의 유전적인 안정성 검정은 여러 가지 경제적인 손실을 줄일 수 있다.

3. 사회·문화적 측면

감자는 세계적인 주요 식량작물로 전 세계적으로 매년 약 4%정도의 꾸준한 생산량 증가를 보이고 있는 4대 주요 작물중의 하나이며, 특히 우리나라에서는 최근의 식생활이 변화하면서 점차적으로 중요한 위치를 차지하게 되었다. 우리나라의 전통적인 식단에 따른 여러 가지 감자 음식들과 더불어 감자를 이용한 인스턴트 식품들의 증가와 다양한 음식개발 등은 시장성 증대가 기대되는 작물이다.

감자는 저 칼로리이고 알칼리성 식량으로 기호도가 높은 작물로 후진국에서는 식량제 해결의 전략적인 작물로, 선진국에서는 다이어트 식품으로 중요성이 강조되고 있다. 최근 북한도 옥수수를 감자로 대체하는 작업이 진행 중이라 감

자 소비량이 대량 증가할 것으로 추정된다. 최근 우리나라에서도 소비량이 증가 추세로 특히 가공 산업의 발달은 눈부시다. 가공제품의 소비량 증가를 보면 90년도 3만 톤에서 현재 9만 톤 정도로 급증하고 있는 실정이며 이 분야의 발달만 보아도 감자 산업의 전망은 밝다고 하겠다.

우리나라는 씨감자 갱신 측면에서 보면 씨감자 갱신율이 25% 내외로 무병 씨감자를 매년 사용 재배하여야 하나 우량 씨감자의 부족과 병해충 특히 바이러스 감염률이 높은 씨감자의 보급 미비로 농가에서 씨감자 구입에 많이 비용을 투자하고 있어 무 병 우량 씨감자를 재배하는 것이 가장 중요한 요인이라고 생각된다. 감자 소비 특히 가공제품의 소비가 증가하는 지금 씨감자 갱신율이 25% 내외로 무병 씨감자를 매년 사용해야 하나 씨감자의 크기가 작고 수량성이 떨어지는 단점으로 위의 바이러스 제거 방법을 기초로 하여 크기가 크고 수량성이 뛰어난 무병씨감자의 보급이 시급하다고 할 수 있다.

씨감자 증식 과정에서 영양번식 재료의 이병정도를 극소화시켜 재배자에게 급속하고 대량적으로 품종이 확실하고 무병한 다양한 고품질의 씨감자를 제공하여 농가의 선택의 폭을 넓히는 것이 목적이다.

현재 WTO 체제 출범으로 농산물 시장이 본격적인 개방화를 필요로 하는 시점에서 국내 품종을 이용하여 국외에 의존하지 않고 우리만이 소유한 테크닉으로 국내에서 신속한 무병주 기술이 개발되어 그 기술을 이용하여 급속하고 대량으로 수량성이 뛰어난 무병 씨감자를 생산하고 안정성 검정을 통하여 농업기술원, 농업기술관리센터 및 농협의 감자 관련 사업 팀 등과 협력하여 무병씨감자 대량 생산기술 인재를 양성한 후 그들이 직접 농가에 기술을 보급하는 시스템을 구축함으로써 농민들의 부담을 줄일 수 있고 나아가서 북한의 감자 생산에도 크게 기여할 것으로 사료되어 무병 씨감자 생산의 중요성을 인식하고, 확실한 무병씨감자를 보급함으로써 국내 뿐 아니라 앞으로 남북통일에 대비하여 북한의 감자 생산 기술을 향상시킬 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

제 2 절 연구개발의 목표와 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	감자 품종에 대한 바이러스 유무 검정을 통하여 바이러스에 감염된 품종을 마디배양, 열처리, 화학적 처리, 전기영동 처리, 초 저온 처리 등을 통하여 바이러스 제거	<p>1) 바이러스 감염 여부 검정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 한국감자육종소재은행에서 보유하고 있는 유전자원 및 본 연구실에서 육성한 새로운 벨리 감자들 바이러스 유무 검정 <p>2) 바이러스에 감염된 감자 기내 도입</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 검정 결과 PLRV 와 PVY 에 감염된 감자 품종의 마디를 따서 기내에 도입하여 계대배양 해 주면서 실험 자료로 사용 <p>3) 여러 가지 처리를 통한 바이러스 제거</p> <ul style="list-style-type: none"> - 마디배양(0.5-1cm), 열처리, 화학적 처리, 전기 충격 처리 및 초저온 처리 등 다양한 처리의 단독처리와 복합 처리를 통하여 바이러스 제거
2차 년도 (2005)	위의 처리를 통한 식물체를 순화한 후 형태적, 및 유전적 안정성 검정 안정성이 검정된 확실한 식물체로 무병씨감자를 대량 생산 및 농가 보급	<p>형태적 관찰 및 RAPD 기술을 이용하여 식물체 안정성 검정</p> <p>농업기술원, 농업기술관리센터 및 농협의 감자 관련 사업 팀 등과 협력하여 무병씨감자 대량 생산기술 인재를 양성한 후 그들이 직접 농가에 기술을 보급하는 시스템을 구축</p>

1. 감자 품종에 대한 바이러스 감염 여부 검정

- 한국감자육종소재은행에서 보유하고 있는 유전자원 및 본 연구실에서 육성한 새로운 벨리 감자들의 바이러스 유무 검정

2. 바이러스에 감염된 감자 기내 도입

- 바이러스 검정 결과 PLRV 와 PVY 에 감염된 감자 품종(Early)의 마디를 따서 기내에 도입하여 계대배양 해 주면서 실험 자료로 사용
- 마디(생장점 포함) 배양을 통한 조직 배양 -> 유전자원 보존을 위한 기내 유전자원 식물체 갱신 및 바이러스 처리를 위해 식물체를 기내 도입할 때 마디(생장점 포함)를 0.5-1cm 정도로 잘라서 이용

3. 여러 가지 처리를 통한 바이러스 제거

- 열처리, 화학적 처리, 전기 충격 처리 및 초 저온 처리를 통한 바이러스 제거-> 변온 열처리, Ribavirin, ASA 단독처리 및 혼합처리를 통한 화학적 처리, 부동한 전류를 통한 전기 충격 처리, Cryopresevation등의 단독처리 및 혼합처리를 통하여 보다 신속적이고 간편한 감자 바이러스 제거 체계 확립.

4. 위의 처리를 통한 식물체를 순화한 후 형태적, 및 유전적 안정성 검정

- 형태적 관찰 및 RAPD 기술을 이용하여 식물체 안정성 검정

5. 무병씨감자 대량 생산기술 인재 양성

- 농업기술원, 농업기술관리센터 및 농협의 감자 관련 사업 팀 등과 협력하여 한 후 그들이 직접 농가에 기술을 보급하는 시스템을 구축

제2장 국내외 기술개발 현황

외국의 경우에는 Limasset가 1949년에 처음으로 담배에서 Virus-free 한 식물을 생산하는 방법을 이끌어 내었고, Morel와 Martin이 1952년에 dahila의 감염된 신초에서 바이러스 무병주 식물을 얻기 위해 생장점 배양을 이용하였다. 하지만 생장점 조직의 미세한 양(<0.05mm)과 배양하기까지 조작이 번거롭고 배양 후 낮은 생존율을 보일뿐만 아니라 식물 재분화 기간이 길어지는 단점을 가지고 있다. 이런 단점을 보완하고자 Thomson(1959)에 처음으로 열처리와 경정배양을 혼합하여 여러 감자 품종에서 PVY를 퇴치하는데 성공하였다. 이런 방법 이외에 Norris(1954)는 경정에 malachite green을 처리하여 Green Mountain 품종의 바이러스 번식이 억제되었다고 보고하였다. 그 후 항바이러스제인 Ribavirin이 대부분의 바이러스에 대해서 비교적 광범위한 작용을 나타낸다는 것이 밝혀졌다. 최근에는 전기영동을 이용하면 기내에서 식물분화가 자극되며 식물조직의 전기적 특성이 식물생리학상의 연구에도 광범위하게 고려되고 있어 Lozoya-Saldona(1996)이 줄기를 10-15mA의 전류에 노출시켰을 때 비교적 강한 줄기와 높은 생존을 나타냈다고 보도하였다.

기준에 PLRV(1949), PVY(1956,2001), PVX (1958, 1968, 1982, 1983, 1985, 1991, 1996), PVS (1968,1982,1991,1994,1996) 등 단독 감염 바이러스에 대한 연구는 많이 진행되어 왔지만 감자가 PLRV 와 PVY에 복합 감염되었을 때 그 제거가 단독감염보다 훨씬 어렵고 이에 대한 연구가 너무나 미흡한 실정이다.

1992년 Cutt 등이 salicylic acid가 병원체 관련 단백질을 합성하여 저항성을 유도한다는 기사를 밝혔으며 1998년에 Humberto 등이 Acetylsalicylic acid 와 H₂O₂를 이용한 미세 식물의 내병성 유도 실험을 하여 두 물질이 내병성 유도에 효과가 있다고 보도하였다.

농가에 씨감자 보급은 많이 진행되어 왔지만 보급되는 씨감자 크기가 작고 또 수확량이 적어 농가에서 씨감자 구입에 많은 비용을 투자하고 있는 실정이다.

국내에서는 1994년에 Park 등에 의한 감자 조직배양시 배지 내에 항바이러스제(Ribavirin, ACV, AZT 등) 첨가에 의한 PVS 퇴치 효과에 관하여 알아본 연구에서 Ribavirin 이 가장 효과적인 것으로 나타났고, 이후 1996년 김 등은 Ribavirin 과 열처리 모두 대조구에 비해서 바이러스 퇴치 효과가 있었다고 보도하였다.

2001년 김 등은 Ribavirin과 열처리를 통하여 PVY를 퇴치하는데 5-7mA의 전기처리 후 Ribavirin을 첨가하지 않은 배지에 사용하는 것이 효과적이라고 보도하였다.

2002년 김 등이 Methyl Salicylate을 이용하여 딸기에서 Gray Mold Rot 저항성을 유도하는데 성공을 하였다.

2000년 이 등이 RAPD방법을 이용하여 재분화체의 유전적 안정성 검정을 하였다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발 수행 내용

1. ELISA TEST 및 RT-PCR을 통한 바이러스 유무 검정

한국감자육종소재은행에서 보유하고 있는 유전자원 및 본 연구실에서 육성한 새로운 벨리 감자 품종들의 바이러스 감염 여부 검정을 위해 ELISA 및 RT-PCR 로 검정하는 연구를 수행하였다.

ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) method

가. 샘플링(Sampling)

감자 잎에서 샘플을 얻는 과정으로 여러 부위의 감자 잎을 1.5ml 튜브에 100mg을 넣고 액체질소를 부어 Tissue Striker를 이용하여 감자 잎을 잘게 Grinding 한 후 파쇄한 후에 튜브 안에 Extraction buffer를 샘플의 10배인 1000 μ l를 주입하였다. 이후 거즈를 이용하여 덜 파쇄 된 감자 잎을 제거하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. (비율 - 조직무게 : buffer 양)

나. Plate Coating(1차 항체 코팅)

1차 항체를 플레이트에 고착시키는 과정으로 코팅버퍼에 항체를 200배 희석시켜 각 플레이트에 100 μ l를 주입 시킨 후, 상온에서는 습도가 높은 상자에 4시간 후에, 4 $^{\circ}$ C에서는 overnight시킨 후 충분히 플레이트에 흡착이 된 다음 실험에 사용할 수 있으므로 항체 희석 시 잘 섞이도록 주의해야 한다. 1x coating buffer 만들기 - 10x 코팅버퍼 : 증류수 (1ml : 9ml).

다. 워싱(Washing)

이 과정은 플레이트에 흡착되지 않은 나머지를 제거하는 과정으로, 워싱버퍼(PBST buffer)를 코팅된 플레이트의 각 well(플레이트에 패인 홈) 안에 200 μ l를 넣고 흔들어 씻어준 다음 플레이트를 뒤집어 well 안을 비워준 뒤

종이타월을 바닥에 깔고 가볍게 두들겨 제거하는 과정을 기본적으로 7~8회 반복 실시하였다.

Washing buffer 만들기 - 워싱버퍼 파우더 : 증류수 (1g : 100ml)

라. 항원 주입

워싱된 플레이트에 감자 잎에서 샘플링하여 얻은 것을 각 well에 100 μ l를 주입하고, 습도가 높은 상자에 넣어준 뒤 실온에서 2시간 기다립니다. 이때 샘플 이외에 바이러스positive control과 negative control을 샘플과 비교할 수 있게 함께 주입하였다.

마. 워싱(Washing)

위의 워싱 과정과 동일합니다.

바. 2차 항체 주입(enzyme conjugate)

워싱된 플레이트에 1x ECI buffer에 항체를 200배 희석하여 섞어준 뒤 각 well에 100 μ l씩 주입하고 다시 습한 상자에 넣어주고 2시간을 기다린다. ECI 버퍼는 코팅버퍼와 같은 기능으로 2차 항체 · 항원 반응을 흡착시키는 역할을 하므로 항체 희석시 잘 섞이도록 주의해서 실험을 하였다.

ECI buffer 만들기 - ECI 파우더 : 증류수 (1g : 30ml)

사. 워싱(Washing)

위의 워싱 과정과 동일합니다.

아. PNP 솔루션 주입 후 발색 반응 측정

워싱된 플레이트에 PNP 버퍼와 PNP 타블렛을 넣어주고 타블렛이 분해된 후 각 well에 100 μ l씩 주입한 후 일정 시간(평균적으로 15분 후)이 지난 후 바이러스가 존재하는 샘플에서 발색반응이 나타나고 눈으로 식별 또는 ELISA용 READER를 이용하여 발색 반응을 수치로 얻었다.

PNP솔루션 만들기 - PNP버퍼 : PNP타블렛 (5ml : 1정)

ELISA용 READER를 이용하는 경우 빛의 파장을 405nm ~ 450nm를 설정하여 수치를 컨트롤과 비교하였다.

2. RNA추출과 RT-PCR

가. 바이러스 감염 식물의 잎 100mg를 1.5ml tube에 뚜껑을 이용하여 절단 한 뒤 삽입한다.

나. 샘플에 액체질소를 넣어 잘게 갈아준 후 TRI Reagent 1ml를 넣고 실온에서 5분간 homognate.

다. chloroform 200 μ l 첨가 후 vortexing 하고 실온에서 15분 store 후 4 $^{\circ}$ C,14,000rpm에서 15 분간 centrifuge.

라. 상층액을 뽑아 isopropanol 500 μ l 첨가 후 실온에서 10분간 store 후 4 $^{\circ}$ C,14,000rpm에서 8 분간 centrifuge.

마. RNA pellet 에 75% ethanol 1ml을 섞어준 후 4 $^{\circ}$ C, 7500g에서 5분간 centrifuge.

바. ethanol을 완전 제거 후 실온에서 10분간 dry.

사. HO 100 μ l 첨가 후 58 $^{\circ}$ C waterbath에서 10분간 Dissolve.

아. 위 과정을 거친 후 얻은 RNA를 냉동고에 보관하면서 시료로 사용한다.

자. 추출한 RNA를 Reverse-iTTM One-step RT-PCR kit(ABgene Limited, Epsom, UK)을 사용하여 RT-PCR을 실행하였다.

RT-PCR조건: 47 $^{\circ}$ C/30min94 $^{\circ}$ C/5min

94 $^{\circ}$ C/30s 57 $^{\circ}$ C/30s 72 $^{\circ}$ C/45s -> 30cycle

72 $^{\circ}$ C/5min

사용한 primer는 아래와 같다(Table 1).

Table 1. Specific primers used in RT-PCR analysis.

Virus	Sequence(5'-3')	Polarity	Fragment(bp)
PLRV	CGCGCTAACAGAGTTCAGCC	Sense	336
	GCAATGGGGGTCCAACACTCAT	Antisense	336
PVY	GTGATGAATGGGCTTATGGTT TGG)	Sense	429
	ATCCTCGGTGGTGTGCCTCT	Antisense	429

* Primer were purchased from Bioneer

3. RAPD 방법

가. DNA 추출:

Total DNA 분리는 Doyle 등(1989)의 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 약 0.1g의 어린 감자 잎 조직을 600ul의 DNA추출용 완충용액[2% CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH8.0, 0.2% β -mercaptoethanol(freshly add 2mL)]을 가하여 잘 섞은 다음 60°C 수조에서 30분간 반응시켰다. 이 후 600ul의 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1)을 첨가하여 Vortex 한 다음 10k로 3분간 원심분리 하여 상층액의 투명한 부분을 분리하여 회수한 후 동일 볼륨(상층액)의 phenol : chloroform=1:1을 첨가한 후 다시 원심분리 하여 상층액을 회수하였다. 거기에 동일볼륨의 chloroform을 첨가한 후 다시 원심분리 하여 상층액을 회수하고 2/3의 isopropanol을 가하여 침전된 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA는 알콜로 살짝 씻어준 후 실온에서 말린 후 PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

나. Genomic DNA 증폭

bioneer의 'GTTGCCAGCC' random oligonucleotide primer를 사용하여 감자 약 10ng genomic DNA를 다음의 PCR조건으로 증폭시켰다.
94도 3분, <94도 1분, 36도 1분, 72도 2분>40 cycle 72도 10분

다. 증폭단편 분석

결과는 1.0%(w/v) agarose gel에서 전기영동하고 사진으로 기록하였다.

4. Virus 제거를 위한 최적 조건 찾기

ELISA 및 RT-PCR방법으로 바이러스 유무를 확인한 다음 바이러스에 감염된 식물체를 이용하여 열처리, 화학적 처리, 전기충격처리, 초저온 처리 등 단독처리 및 혼합처리를 통하여 바이러스를 제거하였다.

가. 열처리

바이러스 감염 식물체의 마디(0.5-1cm)를 절단하여 배지에 치상한 후 35℃ -4h/30℃-4h 교대로 배양실에서 4-8주 배양한다. 기본 배지는 MS 3% 고체 배지를 사용하였다.

나. 화학적 처리

Ribavirin(20mg/l), Acetylsalicylic(10^{-5} M) 각각 첨가한 MS 기본 배지에 치상하고 4-8주 배양한다.

다. 전기 충격 처리

감자 식물체의 줄기를 절단하여 양끝을 은박지로 싸서 전극을 연결한 후 전기영동용 power supply 로 전압(5mA)를 걸어준다.

라. 초저온 처리

식물체의 마디(0.5-1cm)를 절단하여 액체질소에 1시간동안 담근 후 꺼내어 다시 기본 배지에 치상한다.

마. 열처리. 화학적 처리 혼합 처리

바이러스 감염 식물체의 마디(0.5-1cm)를 절단하여 Ribavirin(20mg/l), Acetylsalicylic(10^{-5} M) 첨가한 배지에 치상한 후 35℃-4h/30℃-4h 교대로 배양실에서 4-8주 배양한다.

바. 열처리. 화학적 처리 및 전기 충격 처리 혼합 처리

감자 식물체의 줄기를 절단하여 양끝을 은박지로 싸서 전극을 연결한 후 전기영동용 power supply로 전압(5mA)를 걸어준다. 마디(0.5-1cm)를 절단하여 Ribavirin (20mg/l), Acetylsalicylic(10^{-5} M)첨가한 배지에 치상한 후 35℃ -4h/30℃ -4h 교대로 배양실에서 4-8주 배양한다.

5. 식물체의 형태적·유전적 안정성 검정

열처리, 화학적 처리, 전기충격처리, 초저온 처리 등 단독처리 및 혼합처리를 통하여 바이러스를 제거하였다. 위에서 처리한 식물체를 다시 ELISA 및 RT-PCR 방법으로 바이러스 퇴치 유무를 확인했다.

바이러스 제거 실험 후 검정을 통하여 바이러스가 제거된 개체들을 온실에 순화하여 유전적 안정성을 검정하기 위하여 형태적 특성을 분석(UPOV)하여 phenotype을 관찰하였다.

가. 형태적 특성표(UPOV)에 특성 분석

다음과 같은 50가지의 특성표로 실험 전·후의 차이를 비교 하였다. 감자씩 크기. 감자씩 모양. 감자씩 기부의 안토시아닌 색깔. 감자씩 기부의 안토시아닌 착색정도. 감자씩 기부의 털. 감자씩 정단부 크기. 감자씩 정단부 습성. 감자씩 정단부의 안토시아닌 착색정도. 감자씩 정단부의 털. 감자씩 뿌리원기의 수. 감자씩 숨구멍의 돌출성. 감자씩 측지길이. 식물체 키. 식물체 형태. 식물체 생장 습성. 줄기 주지의 굵기. 줄기 날개. 줄기 날개주름의 물결모양. 줄기 안토시아닌 색소의 착색정도. 잎 크기. 잎 겹침정도. 잎 녹색의 정도. 잎 안토시아닌 정도. 소엽 크기. 소엽너비. 소엽 병합의 빈도. 소엽 가장자리 물결모양. 소엽 엽맥의 깊이. 소엽 안토시아닌의 착색유무. 소엽 윗 부분의 광택의 정도. 잎(중륵, 주맥) 2차 소엽의 발생빈도. 정단 소엽 발생빈도. 측소엽 발생 빈도. 측소엽 크기. 화서 크기. 화서 안토시아닌 착색정도. 식물체 꽃의 수. 꽃눈의 안토시아닌. 화관 크기. 화관 안쪽부분 색깔. 화관 꽃 안쪽부분의 색깔 정도. 화관 흰 꽃 바깥부분의 안토시아닌. 화관 흰색 끝부분의 크기. 식물체 열매의 수. 식물체 성숙시기. 괴경 모양. 괴경 눈의 깊이. 괴경 표피의 매끄러운 정도. 괴경 표피의 색깔. 괴경 눈 기부 색깔. 괴경 육색. 노란색 표피 괴경 : 괴경표피 안토시아닌 색소 등

나. 유전적 안정성 검정

RAPD PCR 방법을 이용해 실험 전·후에 Early벨리의 유전적인 안정성을 검정하였다.

RAPD (random amplified polymorphic DNA) PCR은 일반적으로 두 생명체가 계통 유전학적으로 얼마나 유사성이 있는가를 판별할 때 사용하는 실험으로 PCR할 때 primer가 짧을 경우 genome 상에 여러 군데 달라붙어서 여러 fragment를 만든다. 이렇게 해서 생겨난 여러 fragment를 전기영동을 사용해서 확인하면 생명체마다 각각 독특한 band를 형성하는데 이것을 가지고 생명체간의 유사성을 판별할 수 있다. 만약 두 생명체가 비슷한 종일 경우에는 band의 모양이 비슷할 것이며, 그렇지 않을 경우에는 서로 많은 차이를 나타낼 것이다. 이 RAPD PCR은 방법이 비교적 간단하고 쉬워 genome sequencing을 하기 전에 대략적인 유전적 변이 분석을 나타내기 위해서 많이 사용된다.

제2절 연구 수행 결과

1. ELISA 및 PR-PCR을 통한 바이러스 유무 검정

한국감자육종소재은행(KPGR)에서 보유하고 있는 유전자들을 ELISA(Fig. 1) 및 RT-PCR(Fig.2)방법을 통하여 바이러스 감염 유무를 검정한 결과 Early 벨리(한국감자육종소재은행 개발 품종)가 PLRV 및 PVY에 복합감염 되었음을 확인하고, 바이러스 제거 실험 재료로 Early 벨리를 사용하였다.

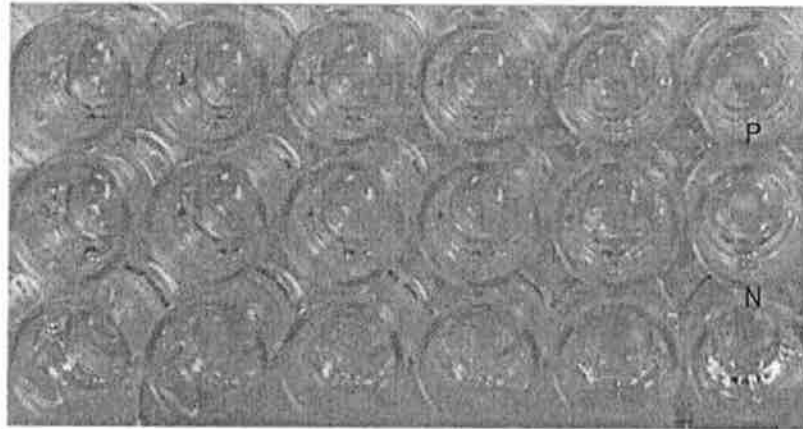
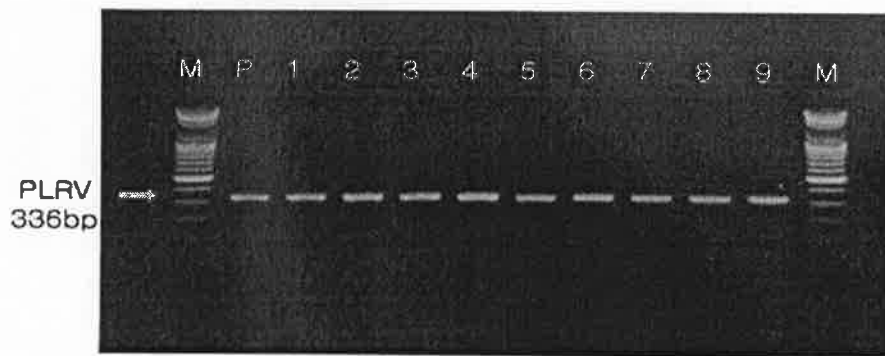


Fig 1. Elisa Test for leaf disc of virus infected potato(cv Early). N, negative control; P, positive control.

(A)



(B)

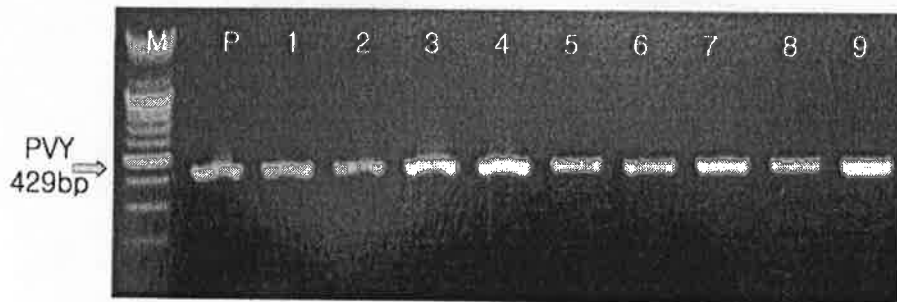


Fig 2. RT-PCR analysis of PLRV & PVY primer in virus infected potato plant (A) PLRV, (B) PVY M: molecular DNA weight marker(Invitrogen) Lane P: positive control; Lane 1-9: virus infected potato(cv Early)

2. 열처리

생장점이 포함된 마디를 큰 사이즈(0.5-1cm)로 절단하여 배지에 치상한 후 25℃, 35℃-4h/30℃-4h, 42℃/25℃-4h 교대로 배양실에서 4-8주 배양하였다. 결과 각 처리구에서 각각 83%, 83%, 0%의 생존율(Table 2)을 보였으며 25℃에서 각각 0%, 0%; 35℃-4h/30℃-4h에서는 각각 0%, 100%의 PLRV, PVY의 제거율을 보였다

3. 화학적 처리

식물체 재료를 Acetylsalicylic(10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M), Ribavirin(20, 40, 60mg/l) 각각 첨가한 배지에 치상하고 4-8주 배양하였다. 25℃에서 83%의 재분화율(Table 3)을 보였고 ASA 10^{-6} 에서는 100%의 재분화율을 보인 반면 Ribavirin 40과 60mg/l에서는 식물체 전체가 고사하는 경향을 보였다. 전체 처리구에서 모두 현저한 바이러스 감소율을 보이지 않았다(Table 4).

Table 2. Effect of treatments on and explant survival of platelets

Treatment	Explant Survival(%)
Control(25°C)	83
ASA 10 ⁻⁶	100
ASA 10 ⁻⁵	86
ASA 10 ⁻⁴	57
Ribavirin 20	86
Ribavirin 40	0
Ribavirin 60	0

Table 3. Effect of Heat+Ribavirin+ASA on the rate of platelets Survival (%) after 7 weeks of treatment applied.

Treatment	C	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10	15	20	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3	Mean
C	40	100	75	75	100	83	75	45	56	45	22	45	67	56	67	56	63
1hr	45	67	33	45	45	67	56	19	30	9	36	36	27	25	36	45	39
4hr	24	65	100	47	94	76	82	0	13	25	22	45	22	25	0	22	41
8hr	54	54	38	69	77	46	85	64	55	36	27	36	55	38	45	45	52
Mean	41	74	62	59	79	68	75	32	39	29	27	41	43	36	37	42	49

Cont.: 25C and non-treated platelets; 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ = ASA concentrations (M) 10, 15, 20 =ribavirin concentrations (mgL⁻¹). 1-1: ribavirin 10 mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁶M, 1-2: ribavirin 10mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁵M, 1-3: ribavirin 10 mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁴M, 2-1: ribavirin 15 mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁶M, 2-2: ribavirin 15 mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁵M, 2-3: ribavirin 10 mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁴M, 3-1: ribavirin 20 mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁶M, 3-2: ribavirin 20 mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁵M, 3-3: ribavirin 20 mg.L⁻¹ plus ASA 10⁻⁴M); °35C/30C 4 h alternating temperature

Table 4. Number of PLRV-free plantlets obtained Heat+Chemical treatment by nodal cutting.

Treatment	MS ^c		MSA		MSR		MSAR	
	No. ^b	%	No.	%	No.	%	No.	%
C ^d	0/7	0	0/10	0	0/12	0	0/41	0
1-hr ^e	0/4	0	0/13	0	0/15	0	5/30	17
4-hr	0/4	0	10/29	34	0/43	0	0/15	0
8-hr	0/7	0	0/21	0	7/27	26	26/43	60

^dControl plantlets were incubated at 25C and other treatments at 35C/30C alternating temperature for 1 h, 4 h, and 8h.; ^cMS = MS medium; MSA = MS medium contained ASA (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M), MSR = MS medium contained ribavirin (10 mgL⁻¹, 15 mgL⁻¹, 20mgL⁻¹); SAR = MS medium contained ASA and ribavirin ^bVirus free plantlets/plantlets tested.

4. 전기 충격 처리

감자 식물체의 줄기를 절단하여 양끝을 은박지로 싸서 전극을 연결한 후 전기영동용 power supply 로 전압(5, 7, 10mA)에서 10분씩 전기처리를 한 다음 경단을 채취하여 배양하였다. 결과 식물체의 재분화 정도는 전기처리 5, 7mA 충격 후 약 1/2 정도로 급격히 감소하였고 10mA 충격시에 약 1/4 이하로 감소하였다. 바이러스 농도 역시 5, 7mA 충격 후 약 1/2 정도로 감소하였고 10mA 충격시에 약 1/4 이하로 감소하였다.

Table 3. Effect of electrotherapy on the elimination of PLRV and PVY from the *in vitro* plantlets of potato genotype ‘Early Valley’ after three months of regeneration.

Treatm No. of ent(mA plantlet /min) tested	Titer group of treated plantlets (%) ^z						
	PLRV			PVY			
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	
5/5	21	9.5	23.8	66.7	9.6	33.3	57.1
5/7.5	20	20.0	25.0	55.0	15.0	25.0	60.0
5/10	14	28.6	35.7	35.7	7.2	42.8	50.0
10/5	30	46.7	33.3	20.0	40.0	36.7	23.3
10/7.5	13	30.7	46.2	23.1	30.8	38.4	30.8
10/10	10	30.0	50.0	20.0	30.0	40.0	30.0
15/5	11	27.3	36.4	36.3	27.3	27.3	45.4
15/7.5	10	30.0	40.0	30.0	20.0	50.0	30.0
15/10	7	42.9	42.9	14.2	28.6	57.1	14.3
0/0	36	0.0	11.1	88.9	0.0	2.8	97.2

^z Titer group was based on DAS-ELISA at A₄₀₅ nm low virus (virus-free): <0.076 OD, medium virus: > 0.076 - < 1 OD, and high virus: 1.0 OD.

5. 초저온 처리

생장점(1-1.5mm)를 채취하여 MS, 0.3M sucrose, 0.8%agar가 포함된 전처리 배지에 24h 배양한 뒤 상온에서 2M glycerol, 0.4M sucrose가 포함된 MS 배지에 30분동안 배양한다. 30분 뒤 0°C, 10°C, 25°C에서 MS, 3.26M glycerol, 2.42M ethylene glycol, 1.9M dimethylsulfoxide(DMSO), 0.4M sucrose가 포함된 Plant vitrification solution-2 배지에 30분동안 침지한다. 2ml의 cryovials를 따서 액체질소에 최소 1h 이상 침지한 뒤 신속히 90초동안 38-40°C 수조에 담근다. 다시 1.2M sucrose가 포함된 MS 배지에 30분동안 보관한다. 재분화 된 식물체로 바이러스 검정을 실행하였다. 결과 대조구인 Shoot tip(Control), Cold hardening (10C), Preculture, Vitrification에서는 모두 85%이상의 생존율을 보였지만 Vitrification-cryopreservation에서는 36.7%의 생존율을 보였다 그러나 바이러스 제거에서는 대조구인 Shoot tip(Control), Cold hardening (10C), Preculture, Vitrification에서 Virus-free 한 개체를 얻지 못하였으나 Vitrification-cryopreservation에서는 PLRV, PVT에서 각각 31.8%, 40.9%의 바이러스 제거율을 보였다(Table 5).

Table 5. Effect of different steps during cryopreservation of shoot tips by vitrification on the survival rate and potato leaf roll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) elimination from potato genotype 'Early Valley' by DAS-ELISA test.

Treatment ^z	Survival		Virus free plantlets by ELISA ^y (%)			
	No.	%	PLRV		PVY	
			No.	%	No.	%
Shoot tip(Control)	56/60 ¹	93.3 a ^x	0/56 ²	0	0/56	0
Cold hardening (10C)	54/60	90.0 a	0/54	0	0/54	0
Preculture	55/60	91.7 a	0/55	0	0/55	0
Vitrification	51/60	85.0 a	0/51	0	0/51	0
Vitrification-cryopreservation	22/60	36.7 b	7/22	31.8± 3.4	9/22	40.9± 3.8

^zTwenty shoot tips were used in each of three replicates. Shoot tips for vitrification and vitrification-cryopreservation were 1-1.5 mm in size.

^yDAS-ELISA (A405nm) values: virus free=up to the double of negative OD (Sutula *et al.*, 1986).

^xMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

¹No. of plantlets regenerated/no. of treated shoot tips.

²No. of virus-free plantlets/no. of plantlets regenerated.

6. 열처리. 화학적 처리 혼합 처리

Nodal cutting (0.5-1cm)를 하여 Ribavirin(10, 15, 20mg/l), Acetylsalicylic (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M)이 단독으로 포함된 배지 및 Ribavirin(R)과 ASA 이 결합된 배지 10 mgL⁻¹ R and 10^{-6} M ASA (1-1), 10 mgL⁻¹ R and 10^{-5} M ASA (1-2), 10 mgL⁻¹ R and 10^{-4} M ASA (1-3), 15 mgL⁻¹ R and 10^{-6} M ASA (2-1), 15 mgL⁻¹ R and 10^{-5} M ASA (2-2), 15 mgL⁻¹ R and 10^{-4} M ASA (2-3), 20 mgL⁻¹ R and 10^{-6} M ASA (3-1), 20 mgL⁻¹ R and 10^{-5} M ASA (3-2), and 20 mgL⁻¹ R and 10^{-4} M ASA에 식물체를 치상한 후 35°C-4h/30°C -1h, -4h, -8h 교대로 배양실에서 4-8주 배양했다. 결과 Ribavirin 및 Acetylsalicylic의 단독 처리가 혼합배지처리보다 생존율이 높은 것을 보였다. 열처리 병행처리구에서 각각 평균 39%, 41%, 52%의 생존율을 보였다. ribavirin 20 mg.L⁻¹ plus ASA 10^{-6} M, ribavirin 20 mg.L⁻¹ plus ASA 10^{-4} M 에서 가장 높은 생존율을 보였다(Table 4).

PLRV 제거에서 대조구에서는 0%의 바이러스 제거율을 보인 반면 ASA+Ribavirin 화학적 복합처리와 35C/30C 8h의 열처리 혼합처리에서 최고 60%의 바이러스 제거율을 보였다(Table 4).

PVY 제거에서는 대조구는 0%의 바이러스 제거율을 보인 반면 열처리 및 화학적 처리 단독처리 및 혼합처리 등 모든 처리구에서 최소 73%이상의 바이러스 제거율을 보였으며 최고로 100%의 바이러스 제거율을 보였다(Table 6, Fig. 3).

Table 6. -Number of PVY-free plantlets obtained Heat+Chemical treatment by nodal cutting.

Treatment	MS ^c		MSA		MSR		MSAR	
	No ^b .	%	No.	%	No.	%	No.	%
C ^d	0 ^a /7	0	0/10	0	0/12	0	0/41	0
1-hr ^e	4/4	100	13/13	100	14/15	93	30/30	100
4-hr	4/4	100	29/29	100	34/43	79	11/15	73
8-hr	7/7	100	21/21	100	27/27	100	42/43	98

^aVirus detected by DAS-ELISA; ^bNegative(-) / Survivols; ^cMS=MS medium; MSA=MS medium contained ASA (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M), MSR=MS medium contained Ribavirin (10,15,20mg/ml); MSAR=MS medium contained ASA+Ribavirin ; ^dControl plantlets at 25C; ^eTreated at 35C/30C alternating temperature 1-hr, 4-hr, 8-hr.

7. 열처리, 화학적 처리 및 전기 충격 처리 혼합 처리

감자 식물체의 줄기를 절단하여 양끝을 은박지로 싸서 전극을 연결한 후 전기영동용 power supply 로 전압(5mA)를 걸어준다. 마디(0.5-1cm)를 절단하여 Ribavirin (20mg/l), Acetylsalicylic(10^{-5} M)첨가한 배지에 치상한 후 35°C -4h/30°C-4h 교대로 배양실에서 4-8주 배양한다. 결과 처리구에서 10%이하의 낮은 생존율을 보여 더 이상 실험을 진행할 수가 없었다. 원인은 식물체가 많은 스트레스를 받아 생존율에 많은 영향을 미친 것으로 사료된다(Table 6).

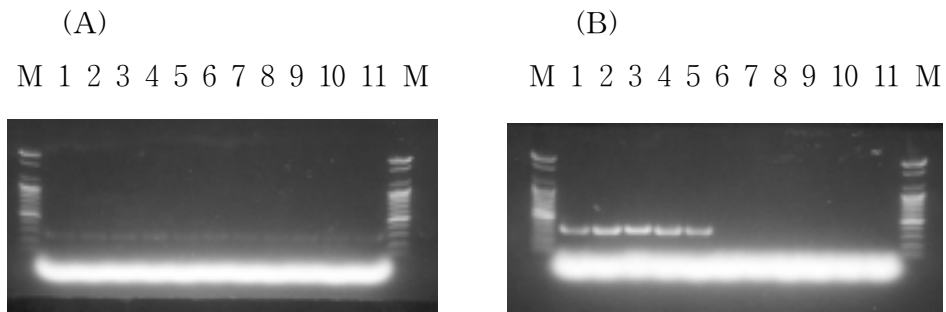


Fig. 3 Detection of PLRV(A) and PVY (B) strain agarose gel electrophoresis for products of RT-PCR. Lane M- molecular marker, Lane 1-control, Lane 2-ASA 10^{-6} M, Lane 3-ASA 10^{-5} M, Lane 4-ASA 10^{-4} M, Lane 5-ribavirin 20 mg.L-1 Lane 6-control, Lane 7-ASA 10^{-6} M, Lane 8-ASA 10^{-5} M, Lane 9-ASA 10^{-4} M, Lane 10-ribavirin 20 mg.L-1, Lane 11-Ribavirin 40 mg.L-1.

8. 바이러스 제거 한 후 표현형의 형태와 안정성 검정을 위하여 포트에 순화한 후 포장에 순화하여 식물체 형태적 특성(UPOV) 및 유전적 안정성 검정을 진행하였다(Fig.4)

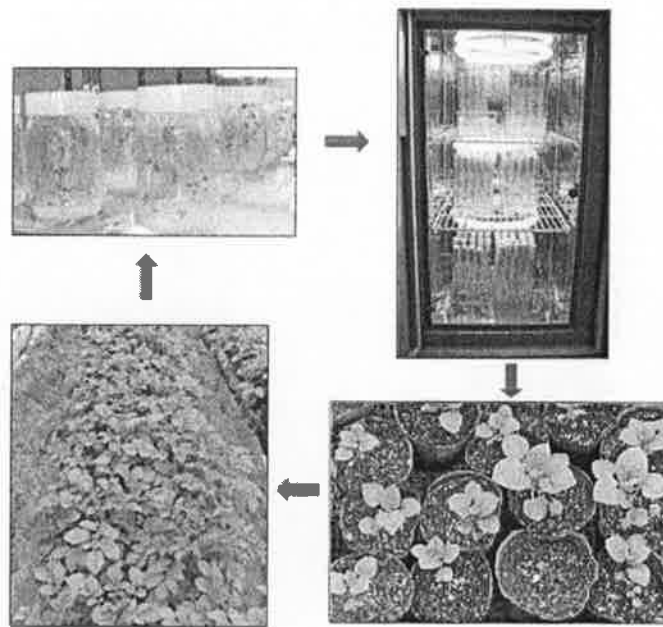
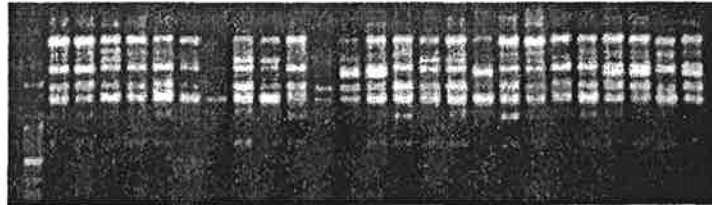


Fig 4. Whole cycle of virus eradication of potato(cv Early).

9. 유전적 안정성 검정을 위하여 RAPD 방법을 이용하여 바이러스 제거 전, 후 특이밴드의 유무를 확인하였다. 결과 바이러스 제거 전(Fig 5A) 와 바이러스 제거 후(Fig 5B)에서 특이 밴드를 찾아 볼 수가 없어 처리 전과 후 변이가 나타나지 않은 것으로 사료된다.

(A)



(B)

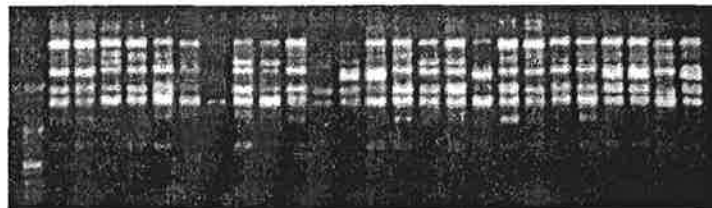


Fig 5. RAPD analysis of the potato(cv Early). (A). Before virus eradication. (B) After virus eradication.

10. 형태적 특성조사표(UPOV)에 의해 바이러스 제거 실험 전·후에 형태적 특성(Fig 6)을 비교한 결과 Early밸리는 실험 전·후에 차이를 볼 수 없었다 (Table 7).



Fig 6. Early Valley Morphological Characteristics.

Table 7. 형태적 특성조사표(UPOV)

No	형 질	표 현 형 태								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	감자싹 : 크기			작다		중간		크다		
2	감자싹 : 모양	등근형	계란형	원추형	넓은원통	좁은원통				
3	감자싹 : 기부 안토시아닌 색깔	적보라	청보라							
4	감자싹 : 기부 안토시아닌 착색정도	매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다
5	감자싹 : 기부의 털	매우적다		적다		중간		많다		매우많다
6	감자싹 : 정단부크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다
7	감자싹 : 정단부습성			달려있다		중간		얼려있다		
8	감자싹 : 정단부 안토시아닌 착색정도	매우연하다		연하다		중간		진하다		
9	감자싹 : 정단부의 털	없거나 매우적다		적다		중간		많다		매우많다
10	감자싹 : 뿌리원기의 수			적다		중간		많다		
11	감자싹 : 숨구멍의 돌출성			약하다		중간		심하다		
12	감자싹 : 측지 길이			짧다		중간		길다		

No	형 질	표 현 형 태								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
13	식물체 : 키	매우작다		작다		중간		크다		매우크다
14	식물체 : 형태	열려있다	중간	닫혀있다						
15	식물체 : 성장습성			직립		반직립		개장		
16	줄기 : 주지의 굵기			가늘다		중간		굵다		
16.1	줄기 : 날개	없다								있다
16.2	줄기 : 날개주름의 물결모양	없다								있다
17	줄기 : 안토시아닌 착색정도	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다
18	잎 : 크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다
19	잎 : 겹침정도			겹쳐있다		중간		열려있다		
20	잎 : 녹색의 정도			연하다		중간		진하다		
21	잎 : 주맥의 안토시아닌 퍼진정도	없거나 매우연하다		연하다		중간		심하다		매우심하다

No	형 질	표 현 형 태								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
22	소엽: 크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다
23	소엽: 너비			좁다		중간		넓다		
24	소엽: 병합의 빈도			낮다		중간		높다		
25	소엽 : 가장자리 물결 모양	없거나 매우약하다		약하다		중간		심하다		매우심하다
26	소엽 : 엽맥의 깊이			얕다		중간		깊다		
27	소엽 : 정부에 있는 어린엽신의 안토시아닌 의 착색유무	없다								있다
28	소엽 : 윗부분의 광택 의 정도			적다		중간		많다		
29	잎 : 2차소엽의 발생빈 도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다
30	정단소엽 : 발생빈도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다
31	측소엽 : 발생빈도	없거나 매우낮다		낮다		중간		높다		매우높다
32	측소엽 : 2차소엽의 크 기			작다		중간		크다		
33	화서 : 크기			작다		중간		크다		

No	형 질	표 현 형 태								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
34	화서 : 안토시아닌 착색정도	없거나 매우연함		연하다		중간		진하다		매우진하다
35	식물체 : 꽃의 수	없거나 매우적다		적다		중간		많다		매우많다
36	꽃 : 꽃눈의 안토시아닌	없거나 매우연함		연하다		중간		진하다		매우진하다
37	화관 : 크기	매우작다		작다		중간		크다		매우크다
38	화관 : 안쪽부분의 색깔	백색	적보라	청보라						
39	화관 : 꽃 안쪽부분의 색깔정도	매우연함		연하다		중간		진하다		매우진함
40	화관 : 흰꽃 바깥 부분의 안토시아닌	없다								있다
41	화관 : 흰색 끝부분의 크기			작다		중간		크다		
42	식물체 : 열매의 수	없거나 매우적다		적다		중간		많다		매우많다

No	형 질	표 현 형 태								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
43	식물체 : 성숙시기	매우빠름		빠르다		중간		늦다		매우늦다
44	피경 : 모양	등근형	짧은계란	계란형	긴계란	긴형	매우긴형			
45	피경 : 눈의 깊이	매우얕다		얕다		중간		깊다		매우깊다
46	피경 : 표피의 매끄러운 정도			매끄럽다		중간		거칠다		
47	피경 : 표피의 색깔	황색	적색	자색	부분적색	부분자색				
48	피경 : 눈 기부의 색깔	황색	적색	자색						
49	피경 : 육색	백색	유백색	담황색	노랑	농황색	적색	자주색		
50	노란색 표피 피경 : 안토시아닌 색소	없거나 매우연하다		연하다		중간		진하다		매우진하다

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발목표의 달성도

ELISA 및 PR-PCR을 통한 바이러스 유무 검정을 통해 PLRV 및 PVY에 복합 감염되어 있는 식물체를 확인하여 바이러스 제거 실험에 사용하였다.

Virus에 감염된 식물체를 이용해 Virus를 제거하기 위한 여러 조건하에서의 연구를 수행한 결과 Virus 제거에 가장 효과적인 최적 조건으로 열처리 조건하에서는 35°C-4h/30°C-4h 배양조건일 때, 화학적 처리 조건하에서는 Ribavirin(20mg/l), Acetylsalicylic (10^{-5} M)의 농도일 때, 전기충격처리 조건하에서는 5mA, 초저온처리 조건하에서는 액체질소에 1h 담근 후 10°C에서 3주 동안 배양한 후, 그리고 열처리, 화학적 처리의 혼합 처리 조건하에서는 Ribavirin(20mg/l), Acetylsalicylic(10^{-5} M)배제에 치상한 후 35°C-4h/30°C-4h 배양할 때 바이러스 제거의 최적 조건임을 알 수 있었다.

열처리·화학적 처리의 단독처리 및 열처리·화학적처리 혼합처리후 RT-PCR로 바이러스 유무를 확인한 결과 PLRV(A)는 모든 처리에서 적은 농도의 band를 확인할 수 있는 반면 PVY(B)는 열처리 단독처리 및 열처리 화학적처리 혼합처리에서 band를 확인할 수 없었다. 즉 PLRV는 모든 처리구에서 완전히 제거가 되지 않았지만 PVY는 열처리 및 열처리 화학적처리 혼합처리에서 완전한 바이러스 제거율을 보였다. 본 실험 결과는 많은 인용문헌에서 PLRV가 PVY보다 제거가 어렵다는 결론과 일치한 것으로 나타나 앞으로 PLRV를 확실히 제거할 수 있는 방법의 모색이 필요할 것으로 사료된다.

열처리, 화학적 처리 및 전기 충격 처리는 결과 처리구에서 10%이하의 낮은 생존율을 보여 더 이상 실험을 진행할 수가 없었으며, 식물체 재분화율이 많이 떨어지므로 바이러스 제거율을 측정할 수 없었다. 구체적으로 PLRV는 열처리와 화학적 처리 혼합 처리에서 최고 60%의 바이러스 제거율을 보였으며, PVY는 열처리만으로도 최고 100%의 바이러스 제거율을 보였다. 또한 PLRV

가 PVY 복합감염된 식물체는 단독 감염된 식물체보다 바이러스 제거가 더 어렵고 PLRV가 PVY보다 제거가 더 어렵다는 것을 확인할 수 있었다. 바이러스에 복합감염된 식물체의 효율적인 바이러스 제거 방법이 모색되어야 될 것으로 사료된다. 바이러스 제거 최적 조건 찾는 실험을 완료하였다.

위의 실험을 수행한 후 식물체의 형태적·유전적 안정성 검정을 통해 여러 가지 처리를 통한 바이러스 제거 실험 전·후에 유전적 변이가 발견되지 않아 안정적으로 유전된 것으로 사료된다. 유전적 안정적 실험을 완료하였다.

복합 감염된 식물체에서 PVY가 100% 제거율을 보인 것은 매우 좋은 결과라고 사료되어 무병 씨감자 생산 시 이 과제에서 연구된 기술이 많이 적용이 되어 농민들에게 수확량이 확대되고 안전한 씨감자를 보급할 수 있을 것이며 생산성이 높은 씨감자를 생산하고 안정성 검정을 거쳐 농업기술원, 농업기술관리센터 및 농협의 감자 관련 사업 팀 등과 협력하여 무병씨감자 대량 생산기술 인재를 양성한 후 그들이 직접 농가에 기술을 보급하는 시스템을 구축함으로써 농민들의 부담을 줄일 수 있고 나아가서 북한의 감자 생산에도 크게 기여할 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 개발된 기술을 농가에 보급시킬 수 있는 인재 양성의 한 방편으로 2006년 5월 12일-13일 강원대학교 내에서 '감자와 바이러스'란 제목으로 워크숍을 개최하였다. 대관령원예농협, 울산농업기술센터, 전북농업기술원, 해태제과 등 부문에서 참여하였고 감자 바이러스 제거 기술 및 바이러스 진단 기술을 보급하였으며 나아가서 농민들한테 보급될 것으로 사료된다. 농업기술원, 농업기술관리센터 및 농협의 감자 관련 사업 팀 등과 협력하여 무병씨감자 대량 생산기술 인재를 양성하는 절차를 완료하였다.

제2절 관련 분야 기술 발전에의 기여도

1. 논문 발표

가. Mei Ai Zhao, Shambbu Prasad Dhital, Yi Lan Fang, Dong Man Khu, Ye Su Song, Eung Jun Park, Chang Won Kang Hak Tae Lim. Application of slow-freezing Cryopreservation method for the conservation of diverse potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. Journal of plant biotechnology Vol.7 No.3 183-186 (2005)

나. Yi Lan Fang, Shambbu Prasad Dhital, Kui Hua Li, Dong Man Khu, Hae Young Kim, Ye Su Song, and Hak Tae Lim. Utilization of single nodalcuttings and therapies for eradicating double-infected potato virus(PLRV, PVY) form in vitro plantlets of potato(*Solanum tuberosum* L.). 한국원예학회지 Vol.46 No.2 (2005)

다. Mei Ai Zhao, Shambbu Prasad Dhital, Dong Man Khu, Ye Su Song, Myeong Hyeon Wang, Hak Tae Lim. An efficient cryopreservation procedure for potato(*Solanum tuberosum* L.) utilizing the new ice blocking agent, Supercool X1000. Plant cell Rep 24: 477-481 (2006)

2. WORKSHOP개최

본 연구를 통해 얻은 바이러스 제거 최적 기술과 바이러스 진단 기술을 보급하고자 농업기술원, 농업기술관리 센터 및 농협의 감자 관련 사업팀을 초청해 워크숍을 개최하였고, 무병 바이러스 씨감자 공급체계 및 안정생산 기술, 종자 산업법, 씨감자 산업의 민영화 방안과 바이러스 무독화 및 진단방법 등 실습을 진행하여 농업기술원, 농업기술관리 센터 및 농협의 감자 관련 사업팀에 기술을 보급하여 농민들의 부담을 줄이고 나아가서 북한의 감자 생산에도 크게 기여할 것으로 사료된다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

유전자원 보존 시 및 무병 씨감자 생산과정에 본 실험방법을 적용하여 신속하고 효율적으로 바이러스를 제거하여 최종적으로 효율적인 무병 씨감자를 생산하는 기술을 보급하여 이러한 무병씨감자 기술로 농가의 씨감자 교체 비용을 줄이고 높은 수확량을 얻는데 효과적인 대체 방안이며, 농업기술원, 농업기술관리센터 및 농협의 감자 관련 사업 팀 등과 협력하여 무병씨감자 대량생산 기술 인재를 양성한 후 그들이 직접 농가에 기술을 보급하는 시스템을 구축하는데 이바지 할 수 있을 것이다.

따라서 본 실험실에서는 비록 과제가 완료되었다 할지라도 PLRV 및 PVY 등 여러 감자 바이러스의 제거에 더욱 더 효과적인 방법에 대한 연구를 진행하고 있으며 차후 결과에 따라 여러 논문 투고나 발표 등을 통해 연구적 가치를 높이고자 한다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Idaho university
University of Idaho Nuclear Seed Potato Program

과제 보완사항

1. 최종보고서에는 다양한 품종에서의 결과를 기술하고 이미 보고된 논문을 정리하여 첨부하며 slide 자료는 빼는 것이 좋음.
 - 다양한 품종로즈(Rose Valley)로 실험한 결과 기존의 Early valley 의 결과와 같은 양상을 보였다(Data not shown).
2. 바이러스 제거 후 포장에서도 병증상이 나타나지 않은지에 대한 결과를 표기하고 또한 보고서에 table이 없는 것이 있음.
 - 현재까지는 증상이 거의 없는 것으로 나타났으며 추후 결과적으로 어떻게 되는지는 좀 더 지켜봐야 될 것 같다..
 - 漏落된 Table 추가했다.

제7장 참고문헌

1. **Antoniw, J. F., and White, R. F. 1980.** The effect of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf protein and resistance to virus infection in five cultivars of Tobacco. *Phytopathol Z* 98, 331-341
2. **Brown C. R., S. Kwiatkowski, M. W. Maetin and P. E. Thomas. 1988.** Eradication of PVS from potato clones through excision of meristem from in vitro, heat-treated shoot tips. *Am Potato J* 65, 633-638.
3. **Campbell, R. N. 1980.** Effects of benomyl and ribavirin on the lettuce big vein agent and its transmission. *Phytopath* 70, 1190-1192.
4. **Casper R. 1977.** Detection Of Potato Leaf roll Virus In Potato And In *Physalis floridana* By Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA). *Phytopathologische Zeitschrift* 90, 364-368
5. **Cassels, A. C. and R. D. Long. 1982.** The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of virazole. *Potato Research* 25, 165-173
6. **Clark, M. F. & A. N. Adams, 1977.** Characteristics Of The Microplate method Of The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For The Detection Of Plant Viruses. *J Gen Virol* 34, 475-483.
7. **Dawson, W. O. 1978.** Recovery of tobacco mosaic virus RNA replication after incubation at 40C. *Intervirology* 9, 295-303.
8. **De Bokx and Huntinga, 1981.** *CMI/AAB descriptions of plant viruses*, 242
9. **Ehlers U.; H. H.J. Vetten, and H. L. Paul. 1983.** Detection of potato leafroll virus in primarily infected tubers by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathol Z* 107, 37-46.

10. **Ehlers U;** **H. H.J. Vetten.** 1984. Detection of PLRV, PVA and PVY in potato tubers by ELISA. *Potato Research* 27, 101-102.
11. **Enyedi A J, Yalpani N, Silverman P, Raskin I.** 1992. Localization conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89. 2480-2484.
12. **Fazio, G. de, J. Caner, and M. Vincente.** 1978. Inhibitory effect of Virazole Ribavirin on the replication of tomato white necrosis virus: a brief report. *Arch Virol* 58, 153-156.
13. **Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, d., Nye, G, Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J.** 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756.
14. **G. E. Sanchez, S. A. Slack, and J. H. Dodds.** 1991. Response Of Selected *Solanum species* To Virus Eradication Therapy. *Am Potato J* 68, 299-315.
15. **Gugerli P.** 1978. The Detection Of Two Potato Viruses By Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) To Detected Potato Leaf roll Virus. *Phytopathologische Zeitschrift* 92, 51-56
16. **H. lozpya-Saladana and A. Madrigal-Vargas.** 1985. Kinetin, Thermotherapy, and tissue Culture To Eliminate potato Virus(PVX) In Potato. *Am Potato J* 62, 339-345.
17. **H. Lozoya-Saldana and W. O. Dawson.** 1982. The Use Of Constant and Alternating Temperature Regimes and Tissue Culture To Obtain PVS-Free Potato Plants. *Am Potato J* 59, 221-230.
18. **Hooft van Huijsduijnen, R. A. M.** 1986. Characterization of mRNAs

for Pathogenesis- Related proteins Induced by TMV-infection to patented chemical hybridizing agents. *Weed Sci* 38, 315-323.

19. **Hull, R., 1984.** Rapid diagnosis of plant virus infections by spot hybridisations. *Trends in biotechnology* 2, 2

20. **Humberto Lopez-Delgado, James F. Dat, Christine H. Foyer and Ian M. Scott. 1998.** Induction of thermotolerance in potato microplant by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J Exp Botany* 49, 713-720.

21. **Kassanis, B., and Posnette, A. F. 1961.** *Resent Advan. Botany*, 557

22. **Y. C. Kim, S. B. Kim and B. H. Hahn. 1983.** Eradication of potato virus S and X by repeated *in vitro* heat treatment combined with meristem apex culture. *Kor J Plant Tissue Cult* 10(1), 1-4.

23. **Kluge, S. and C. Oertel. 1978.** Testing of virazole on multiplication of cucumber mosaic and carnation mottle virus. Prufung von Virazol auf die Vermehrung des Gurkenmosaic-virus and des Nelkenschekungs-virus. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* 14, 219-225.

24. **Klein, R. E. and C.H. Livingston. 1982.** Eradication of potato virus X from potato by ribavirin treatment of culture potato shoot tips. *Am Potato J* 59, 359-365.

25. **Kojima, M. and H. Lapierre. 1988.** Potato leafroll virus(PLRV). In: Smith I. M., Dunez J, Philips D. H., Ielliot, R.A. and Archer S. A(eds.) *European handbook of plant Diseases.* 23-24. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

26. **Lerch, B. 1977.** Inhibition of the biosynthesis of potato virus X by ribavirin. *Phytopath Z* 89, 44-49

27. **Macdonald, D. M. 1973.** Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varieties from virus X and S. *Potato research* 16, 263-269.
28. **Mellor, F. C. and R, Stace-Smith. 1977.** Virus free potatoes by tissue culture. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Edited by L. Reinert and Y. P. S. Bajaj. *Springer-Verlag, New York.* 616-635.
29. **Mellor, F. C. and R, Stace-Smith. 1970.** Virus strain difference in eradication of potato virus X and S. *Phytopath* 60, 1587-1590.
30. **Mi-Ae kim and seong-jin Choi. 2002.** Induction of Gray Mold Rot Resistance by Methyl Norris, D. O. 1954. Development of virus-free stock of Green Mountain potato by treatment with malachite green. *Aust J Agric Res* 5, 658-663.
31. **Mori. K. 1971.** Production of virus free plants by means of meristem culture. *Japan Agr Res Quart* 6, 1-7.
32. **Morel, G. 1964.** *Revue hort.(paris)* 261, 733-740.
33. **Norris, D. O. 1954.** Development of virus-free stock of Green Mountain potato by treatment with malachite green. *Aust J Agric Res* 5, 658-663.
34. **Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15, 473-479
35. **Oshima, N. and C. H. Livingston. 1961.** The effects of antiviral chemicals on potato virus X-1. *Am Potato J* 38, 294-299.

36. **Park, Se Won. Jeon, Jae Heung. Kim, Hyun Soon. Joung, Hyouk. 1994.** Effect of antiviral chemical eradication of potato virus S in potato(*Solanum tuberosum* L.) shoot-tip culture. *J Kor Soc Hort Sci* 35(1), 32-35.
37. **Pennazio, S., Colaracio, D., Roggero, P., and Lenzi, R. 1987.** Effect of salicylate stress on the hypersensitive reaction of asparagus bean to tobacco necrosis virus. *Physiol Mol Plant Pathol* 30, 347-357.
38. **Peter L. Conrad. 1991.** Potato Virus S-Free Plants Obtained Using Antiviral Compounds And Nodal Segment Culture Of Potato. *Am Potato J* 68, 507-513.
39. **Quak. F. 1971.** Meristem culture and virus free plants. *In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.* Edited by J. Reinert and Y. P. S. Bajaj. *Springer-Verlag, New York.* 616-635
40. **Rowhani A & Stace-Smith R. 1979.** Purification And Characterisation Of Potato Leaf roll Virus. *Virol.* 98, 45-54
41. **Rasmussen JB, hammerschmidt R, Zook MN. 1991.** Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas-syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* 97, 1342-1347.
42. **R. E. Klein and C. H. Livingston. 1983.** Eradication Of Potato Viruses X and S From Potato Shoot-Tip Cultures with Ribavirin. *Physiology* 73, 1049-1050.
43. **Robert E. Klein and Clark H. Livingston. 1982.** Eradication Of Potato Virus X From Potato By Ribavirin Treatment Of Cultured Potato Shoot Tips. *Am Potato J* 59, 359-365.
44. **Russo, P., Miller. L., Singh, R. P., Slack, S. A., 1999.** Comparison of PLRV and PVY detection in potato seed samples tested by Florida

winter field inspection and RT-PCR. *Am J Potato Res* 76, 313-316.

45. **S. A. Hill and Elizabeth A. Jackson. 1984.** An investigation Of The Reliability Of ELISA As a Practical Test For Detecting Potato Leafroll Virus and Potato Virus Y In Tubers. *Plant Pathol* 33, 21-26.

46. **Schuster, G. 1976.** Effect of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide(virazole) on the multiplication of systemic viruse in *Nicotiana tabacum* 'Samaun.' Wirkung von 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide(virazole) auf die Vermehrung systemischer Viren in *Nicotiana tabacum* 'Samaun.'. *Ber Inst Tabakforschung* 23, 21-36.

47. **Schuster, G. 1979.** On some interaction of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide(virazole) and plant hormones in virus-infected plants. *Phytopath Z* 94, 72-79.

48. **Secor, G. A. and G. Nyland. 1978.** Rose ring pattern: A component of the rose-mosaic complex. *Phytopath* 68, 1005-1010.

49. **Shepard, J. F. 1977.** Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X-infected tobacco leaves. II. Influence of Virazole on the frequency of infection. *Virology* 78, 261-266.

50. **Slack, S. A. 1980.** Pathogen free plants by meristem culture. *Plant Disease* 64, 15-17.

51. **Singh, M., Singh, R. P., 1996.** Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. *J Virol Methods* 60, 47-57.

52. **Singh, M., Singh, R. P., 1997.** Potato virus Y detection: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. *Can. J Plant pathol* 19, 149-155.

53. **Singh, M., Singh, R. P., 1998.** Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Dis* 82, 230-234.
54. **Singh, R. P., Kurz, J., Boiteau, G., 1996a.** Detection of styletborne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 59, 189-196.
55. **Slack, S. A. 1995.** Potato viruses with some implication for production and processing in the United States: a history of problems and solutions. *Summa Phytopathologica* 21(3-4), 273-275.
56. **Stace-Smith, R.. and F. C. Mellor. 1968.** Eradication of potato virus X and S by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopathol* 53, 199-203.
57. **Summermatter K, Sticher L, Metraux JP. 1995.** Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* 108, 1379-1385.
58. **Tamada T. & Harrison B. D. 1980a.** Factors Affecting The Detection Of Potato leaf roll Virus In Potato Foliage By Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Ann Appl Biol* 95, 209-219.
59. **Thomas. 1988.** Eradication of PVS from potato clones through excision of meristem from in vitro, heat-treated shoot tips. *Am Potato J* 65, 633-638.
60. **Thomson, A. D. 1956.** Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potato from virus Y. *Nature* 177, 709.
61. **van Loon, L. C., and Antoniw, J. F. 1982.** Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-infected hypersensitivity and

acquired resistance in tobacco. *Neth. J Plant Pathol* 88, 237-256.

62. **Walkey, G. D. A. and G. H. Freeman. 1977.** Inactivation of cucumber mosaic virus in cultured tissue of *Nicotiana rustica* by diurnal periods of high and low temperature. *Ann Appl Biol* 87, 375-382.

63. **Ward E.R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Metraux, J. P., and Ryals, J. A. 1991.** Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.

64. **White R, 1979.** Acetyl salicylic acid (ASA) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99, 410-412.

65. **Wolfgang Molders, Antony Buchala, and jean-pierre Metraux. 1996.** Transport of Salicylic Acid in tobacco Necrosis Virus-Infected Cucumber Plants. *Plant Physiol* 112, 787-792.

66. **X. Nie, R. P. Singh. 2001.** A Novel Usage Of Random Primers For Multiplex RT-PCR Detection Of Virus And Viroid in Aphids, leaves, and Tubers. *J Virol Meth* 91, 37-49

67. **Yalpani N, Silverman P, Wilson TMA, Kleier DA, Raskin I. 1991.** Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3, 809-818.