

Digoxigenin으로 표지된 cRNA 프로브를 이용한 감자잎말림바이러스(PLRV)의 진단

서효원* · 함영일 · 오승은¹ · 신관용 · 최장경²

고령지농업시험장 감자과, ¹건국대학교 생물학과, ²강원대학교 농생물학과

Diagnosis of Potato Leafroll Virus with Digoxigenin-labeled cRNA Probes

Hyo Won Seo, Young Il Hahm, Seung Eun Oh¹, Kwan Yong Shin
and Jang Kyung Choi²

National Alpine Agricultural Experiment Station, RDA, Pyongchang 232-950, Korea

¹Department of Biology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

²Dept. of Agricultural Biology, Kangwon Nat'l University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT : Digoxigenin (DIG) was used to prepare nucleic acid probe for the detection of RNA of potato leafroll virus (PLRV) in the potato leaf extracts. The 0.6 kb coat protein (CP) gene cDNA of PLRV in plasmid pSPT18 vector was labeled with digoxigenin by *in vitro* run-off transcription and then used for cRNA probe. In the several buffers tested for increase the total RNA extraction efficiency AMES buffer was the most suitable for this detection method. The RNA extracts from potato leaves shown symptoms of PLRV were dot blotted onto nylon membrane and hybridized with labeled RNA probes. After hybridization, labeled RNA bound to PLRV RNA on membrane was detected with anti-digoxigenin alkaline phosphatase. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium (NBT) salt and CSPD were used as substrate for colorimetric and film exposure detection, respectively. These detection methods were very sensitive allowing for detection of 1/32 diluted total RNA extract from 100 mg leaf tissue.

Key words : diagnosis, digoxigenin, PLRV, potato, virus.

감자잎말림바이러스(PLRV)는 현재 감자잎에 모자이크 증상을 유발하는 감자바이러스 Y(PVY)와 더불어 국내(9) 뿐만 아니라 세계적으로 감자에 심각한 피해를 입히는 바이러스의 일종이며(4, 15, 20), 이 바이러스는 단일가닥의 (+)RNA를 핵산으로 가진 luteovirus 屬의 구형 바이러스(2, 16)로 직경 25 nm의 비교적 작은 식물 바이러스에 해당한다(16)(Fig. 1). 이 바이러스의 전염은 보독된 진딧물, 특히 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)에 의해 영속적인 방법으로 이루어지며 감염된 식물세포의 도관에만 분포하는 특성을 가지고 있다(19, 21, 22). 감자잎 말림바이러스에 의한 경제적 손실은 이병된 씨감자를 파종했을 경우 나타나는 2차 감염증상을 통해 발생되므로 씨감자 생산 프로그램에서 바이러스에 감염된 이병감자의 효율적인 제거와 진딧물의 방제는 매우 중요한 과정이라 할 수 있다. 현재 국내 씨감자 생산과정에서 바이러스에 이병된 감자의 제거는 상위단계 씨감자의 경우는 주로

효소결합항체법(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay)에 의해, 하위단계에서는 주로 육안에 의한 진단으로 행해지고 있다. ELISA에 의한 진단은 항체반응 후 전 전주와의 흡광도 수치 비교를 통해 이병여부를 판단하므로 이병주의 정확한 판단이 곤란한 경우가 많다. 따라서 식물 바이러스의 보다 민감하고 정확한 진단 방법을 모색하기 위해 reverse transcriptase를 이용한 RT-PCR (8, 11)과 방사능물질(3, 30) 등으로 표지된 핵산 probe를 이용한 여러 가지 정밀진단이 성공적으로 이루어지고 있으나 다량의 재료를 진단하기에는 경제성과 프로브의 안정성 등에서 불리한 점을 가지고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 최근 들어 핵산의 표지에 이용할 수 있는 비방사능 물질들이 많이 개발되고 있고, 안정성과 경제성에서 RT-PCR이나 방사능 표지유전자를 이용한 방법보다 유리한 진단법을 이용하여 바이러스를 진단하기 위한 많은 연구가 성공적으로 이루어지고 있다(5-7, 10, 13, 15).

본 연구는 현재 국내 씨감자 생산과정과 감자 생산량

*Corresponding author.

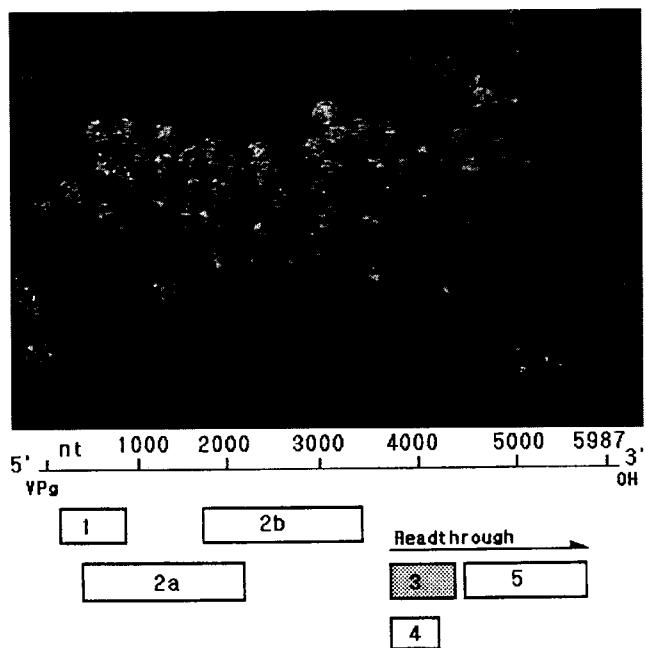


Fig. 1. Shape of PLRV particles (bar = 100 nm) and genomic diagram of PLRV.

에 막대한 피해를 주고 있는 감자잎말림바이러스에 대한 효과적인 진단과 현재 국내 씨감자 생산 프로그램에서 바이러스에 이병된 감자의 screening에 이용되고 있는 ELISA법보다 민감하고 효율적인 진단방법을 개발하기 위해 비방사능물질인 Digoxigenin(DIG)을 핵산표지인자로 사용하여 PLRV의 진단에 응용하고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료. 감자잎말림바이러스의 진단에 이용한 감자 (*Solanum tuberosum L.*)는 농촌진흥청 고령지농업시험장에서 시험 재배중인 장려품종 수미(cv. Superior)를 사용하였다. 진단에 이용한 이병된 감자는 1차감염된 감자를 과종하여 2차감염이 확인된 식물체를 이용하였으며, 전전 대조구로는 바이러스에 감염되지 않은 기본 식물급 씨감자를 사용하였다. 생육초기 단계의 감자 상위 어린잎에서 취한 직경 0.8 cm의 leaf discs를 total RNA 추출과 진단에 사용하였다.

cRNA probe의 합성. *In vitro* transcription-용 vector인 pSPT18의 *Xba*I/*Sac*I 제한효소 인식부위에 sub cloning된 약 0.6 kb 크기의 PLRV coat protein(CP) 유전자의 cDNA를 주형으로 digoxigenin(DIG)이 표지된 cRNA를 합성하였다(Fig. 2). 합성방법은 제한효소 *Sac*I으로 절단 후 SP6 RNA polymerase를 이용한 run-off transcription으로 DIG RNA labeling kits(Boehringer Mannheim,

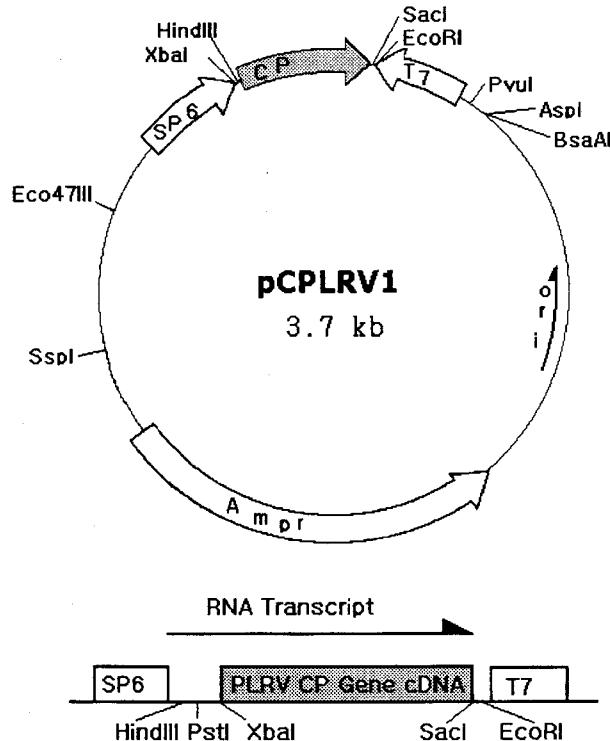


Fig. 2. Construction of PLRV CP cRNA transcription vector pCPLRV1 and transcription strategy.

Germany cat. No. 1093 657)에 제공된 방법에 따라 실시하였다. 합성이 완료된 반응액은 에탄올 침전 후 0.1% DEPC로 처리한 멸균수에 녹인 다음 -20°C 냉동고에 분리 보관하면서 사용하였다.

잎 추출물 제조. 진단에 사용될 감자잎 추출액 생육 초기단계의 상위 어린잎 양쪽에서 직경 0.8 cm의 leaf discs를 1.5 mL microcentrifuge tube에 취한 다음 사용하였다. 조성이 서로 다른 여러 종류의 RNA 추출용액 AMES buffer[0.5 M sodium acetate, 10 mM MgCl₂, 3.0%(w/v) SDS, 20% ethanol, pH 6.0], TS buffer[50 mM Tris-HCl, 2%(w/v), pH 7.4], TLE buffer[50 mM Tris-HCl, 150 mM LiCl, 5 mM EDTA, pH 8.0]와 TSMT buffer[100 mM Tris-HCl, 1.0 M NaCl, 2.0 mM MgCl₂, 0.05%(v/v) Triton X-100, pH 7.5] 50 μL를 각각 50 μL의 포화된 phenol을 가하여 조직마쇄기를 이용하여 균질화시키고, 12,000×g로 10분간 원심분리한 다음 상동액을 취하여 50 μL의 chloroform : isoamyl alcohol(24:1)로 단백질을 추출하고, 동일한 조건으로 원심분리하여 상동액을 진단용 추출원액으로 사용하였으며, 추출원액은 -20°C에 보관하면서 진단에 이용하였다.

바이러스 진단. 추출원액에서의 검출 한계를 확인하기 위해 진단효율이 가장 높게 나타난 AMES buffer(pH 6.0)를 이용해 추출한 추출원액을 순차적으로 희석하거나 원액을 vacuum dot-blotter(Bio-Rad)를 이용하

여 $10 \mu\text{L}$ 씩 진공 하에서 nylon membrane(Amersham, Hybond N⁺)에 점적하고, UV cross-linker(Spectro-linker, XL-1000)를 이용하여 파장 254 nm에서 3분간 막에 고착화시켰다. Prehybridization은 68°C에서 1시간 동안 hybridization buffer[50%(v/v)]로 실시하였으며, PLRV CP 유전자 프로브와의 혼성화는 2.5 mL hybridization buffer에서 3시간 이상 실시하였다. 혼성화가 끝난 membrane은 실온에서 약 5분간 washing buffer[2× SSC, 0.1%(w/v) SDS]로 2회 세척한 다음 68°C에서 15분간 0.2×SSC, 0.1% SDS에서 세척하였다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 실온에서 1시간 동안 blocking solution[1%(w/v); 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl(pH 7.5)]에서 반응시켰다. 다음 membrane을 30분간 anti-digoxigenin IgG APase conjugate(1:5000 dilution)와 반응시키고 15분간 2회 maleic acid buffer[0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl(pH 7.5)]로 세척한 다음 detection buffer(0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5)로 평형화시켰다. 이후 막에 고착화시킨 바이러스 유전자의 최종 진단방법으로는 digoxigenin(DIG)에 반응하는 기질의 종류에 따라 형광물질인 CSPD를 이용한 광화학적 반응과 NBT(nitroblue tetrazolium)와 X-phosphate(5-bromo-4-chloro-3-indoly-phosphate)를 이용한 발색반응을 이용하였다. 이를 위해 평형화시킨 막을 detection buffer로 1/100로 희석시킨 10 mL의 CSPD 용액에서 5분간 반응시킨 후 3 MM filter paper로 수분을 제거하고 형광반응을 촉진시키기 위해 37°C 배양기 내에서 15분간 반응시켰다. 이후 막을 X-ray 필름에 30분간 노출, 감광시켜 최종진단을 하였다. 또한 발색반응으로 진단하기 위해 10 mL의 color substrate sol.(45 μL NBT, 35 μL x-phosphate in detection buffer)에서 3시간 동안 발색시켜 최종진단하였다.

결 과

cRNA Probe제작. PLRV의 진단을 위해 coat protein(CP) 유전자를 RT-PCR로 증폭하여 transcription 전용 vector인 pSPT18에 subcloning(Fig. 2)하고, SP6 RNA polymerase를 이용하여 run-off transcription 방법으로 probe를 합성하여 labeling 효율을 확인하였다. 합성된 프로브의 양을 확인하기 위해 1% agarose gel에 전기영동한 다음 nyline membrane에 전이시켜 NBT와 CSPD를 반응기질로 사용하여 확인한 결과 진단에 이용할 수 있을 정도의 충분한 양의 프로브가 합성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

바이러스 RNA 추출 최적 완충용액 조성. 이병된 감자 잎에서 감자잎말림바이러스 RNA가 포함된 식물체

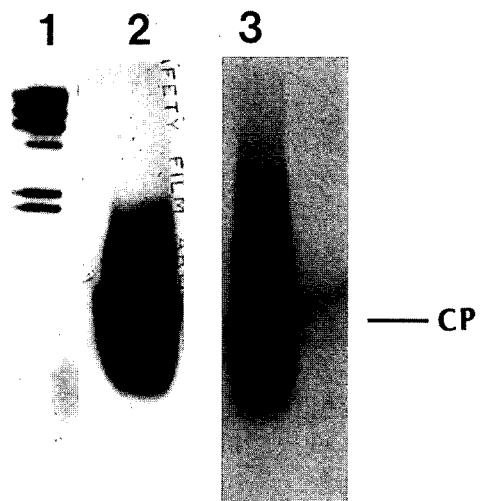


Fig. 3. The DIG-labeled PLRV CP cRNA was electrophoresed on 1.0% agarose gel and transferred to positive charged nylon membrane. The DIG-labeled probes were detected substrate CSPD and NBT/x-phosphate. lane 1: λ/HindIII, lane 2: used CSPD as detection substrate, lane 3: NBT/X-phosphate as detection substrate.

total RNA의 조추출물 제조시 실험조건에 가장 적합한 완충용액을 확인하기 위해 기존의 보고(14, 17)에서 제시한 추출 완충용액들의 조성을 각각 사용하여 동일 조건에서 진단을 실시하였다(Fig. 4). TSM buffer를 제외한 대부분의 완충용액의 경우 진단시 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 NBT를 기질로 이용한 발색반응 결과에서는 AMES buffer가 가장 진단효율이 높았으며, 이러한 결과는 Habil 등(1987)의 보고와 일치하였다.

감자잎말림바이러스 유전자와의 반응 효율. *In vitro*에서 합성한 digoxigenin-labeled PLRV CP cRNA probe

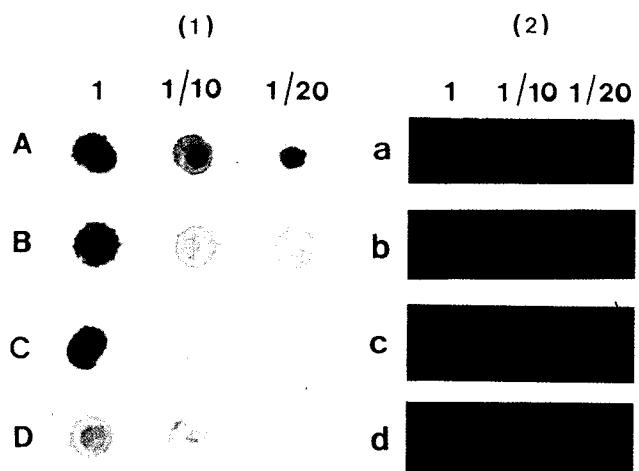


Fig. 4. Influence of extraction buffer on the detection of PLRV from infected potato leaves. (A, a) AMES buffer, (B, b) TS buffer, (C, c) TLE buffer, (D, d) TSMT buffer.

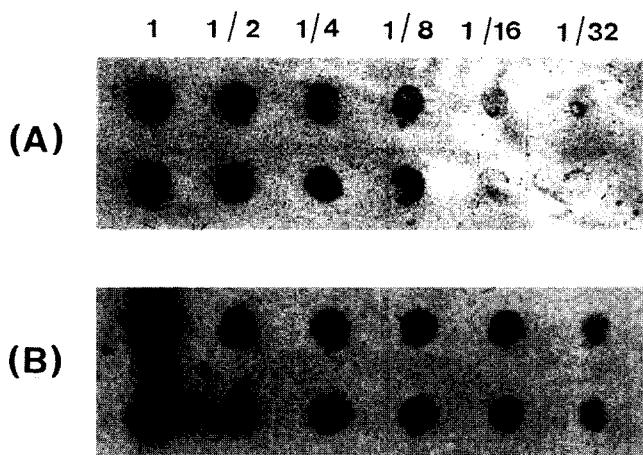


Fig. 5. Detection of PLRV by dot-blot hybridization. two-fold dilution series of symptomized potato leaf extracts were blot and hybridized with DIG-labeled cRNA probes and detected by colormetric substrate NBT/x-phosphate (A) and chemiluminescent CSPD (B).

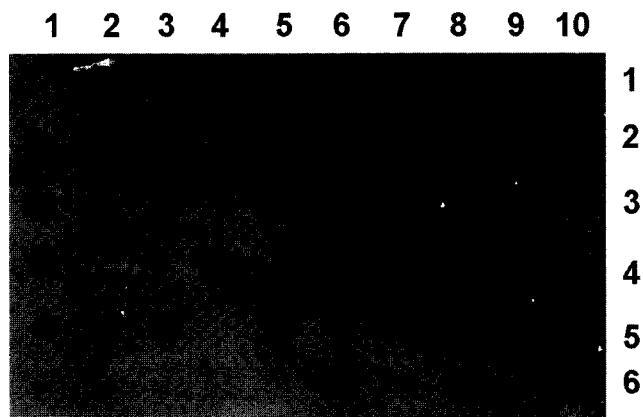


Fig. 6. Colormetric detection of PLRV in symptomized potato leaves by dot-blot hybridization using DIG-labeled cRNA probes. Used substrate was anti-DIG-AP/NBT/X-phosphate.

를 이용하여 진단해 본 결과 이병된 감자 잎에서 채취한 두장의 직경 8 mm의 감자 leaf disc에서 추출한 추출원액의 1/32 희석액에서도 바이러스 핵산의 검출이 가능하였다(Fig. 5). 또한 최종 반응 기질의 종류에 따른 진단 효율을 확인하기 위해 NBT와 CSPD를 최종반응기질로 하여 진단을 실시한 결과 이용한 반응 기질에 따른 진단 능력에는 뚜렷한 차이를 볼 수 없었으나 정확한 이병여부의 판단을 위해서는 CSPD를 이용하여 X-ray film을 감광시켜 확인하는 것이 보다 유리한 것으로 판단되었다. 시험재배를 위한 포장에서 재배중인 감자의 상위 어린잎에서 동일한 과정으로 추출시료를 제작하고 원액 10 µL를 진단에 이용한 결과 최종 반응기질의 종류와는 상관없이 이병여부를 판단하기에는 충분한 것으로 확인되었다(Fig. 6, Fig. 7).

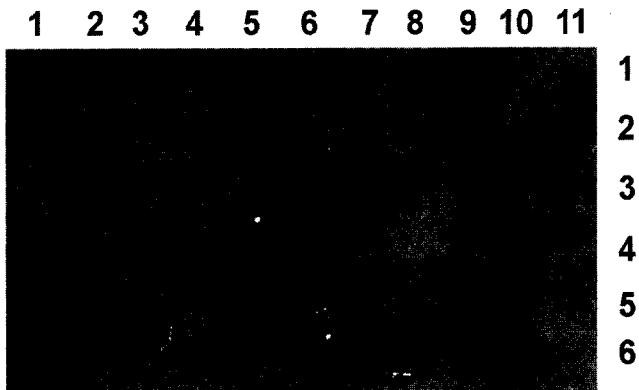


Fig. 7. Chemiluminescent detection of PLRV in symptomized potato leaves by dot-blot hybridization using DIG-labeled cRNA probes. Used substrate was anti-DIG-AP/CSPD.

고 찰

핵산을 이용한 바이러스의 진단에 있어서 cRNA를 이용하는 것이 cDNA를 이용한 방법보다 효율이나 민감도가 우수한 것으로 보고되었으며(18), 기존의 보고(12)에서 ELISA, RT-PCR 및 핵산진단법 등의 검정능력을 비교한 경우가 있었지만 이들 방법은 진단에 이용하는 기술과 검출하고자 하는 물질의 종류에 차이가 있으므로 진단효율을 수치화하는 것은 적절하지 못한 것으로 판단된다. 그러나 다량의 검정시료를 검정해야 하는 현행 씨감자 생산체계에 보다 효율적이고 경제적인 방법을 모색하기 위해 여러 가지 진단법을 시도해 본 결과 cRNA probe를 이용하는 것이 기존 ELISA보다 민감한 것으로 판단되었으며, RT-PCR(1, 17)에 비해서는 훨씬 경제적인 것으로 확인되었다(23). ELISA법의 단점을 개선하기 위해 dot-ELISA(20) 등을 이용하거나 방사능이나 여러 비방사능 표지인자를 이용하여 바이러스를 진단 할 수 있는 방법(7)이 최근 많이 개발되고 있지만 실제 대량의 검정과정에 이용된 보고는 드물다. Digoxigenin-labeled probe를 이용한 바이러스의 진단법은 이미 기존의 보고에서도 안정성과 효율성이 확인된 바 있으며(5, 6, 9), 실용화에 큰 어려움이 없을 것으로 판단된다. 그러나 PLRV를 비롯한 많은 식물 바이러스의 유전자는 단일가닥의 (+)RNA이므로 검정용 추출물의 준비과정에서 RNase에 의한 파괴 등의 불리한 점이 있으므로 진단에 필요한 추출물의 제조시 특별한 주의가 필요하다는 단점이 있다. 이러한 점을 보완하기 위해서는 추출원액 제조시 RNase 억제제를 첨가하는 방법도 있으나 경제적인 측면을 고려한다면 진단과정에서 주의를 하는 것이 보다 바람직한 것으로 판단된다.

PLRV의 검정방법 확립을 위한 기존 여러 보고에서 이병되었을 경우 감자 잎보다 바이러스의 농도가 높은 지

표식물로부터의 추출원액은 보다 높은 희석배수에서도 진단이 가능하다는 보고(15)도 있으나 이번에 사용한 방법은 감자식물체 잎에서 직접 추출하는 것으로 다소 효율은 낮았지만 진단에 필요한 충분한 양의 바이러스 핵산이 추출된다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6, Fig. 7).

최종진단을 위해 digoxigenin에 반응하는 기질의 종류에 따라 막에 직접 발색하는 NBT나 X-ray film을 감광시킬 수 있는 형광물질인 CSPD를 이용할 수 있으나 NBT/X-phosphate를 최종기질로 이용하는 발색반응의 경우 발색 정도가 낮을 경우 추출물에 오염된 phenolic compounds 등에 의한 발색의 경우와 구분이 곤란할 가능성이 있으므로(17) 최종 기질로는 NBT 보다는 형광물질인 CSPD를 이용하여 X-ray film을 감광시켜 진단하는 것이 이러한 가능성을 배제하는데 유리할 것으로 판단되었다. 본 연구결과를 기초로 실제 씨감자 생산과정에 혼란을 주고 있는 감자잎말림바이러스(PLRV)의 정밀진단을 위해 digoxigenin(DIG)으로 표지된 cRNA 프로브를 이용하여 진단을 실시하였다. Transcription 전용 vector인 pSPT18에 sub cloning된 0.6 kb 크기의 PLRV coat protein 유전자를 주형으로 DIG가 표지된 프로브를 합성하였다. 프로브를 표지한 DIG에 반응하는 최종 기질의 종류에 따라 막에서 직접 발색시키거나 X-ray film을 감광시켜 진단하는 방법을 사용하였다. 막에 직접 발색시키기 위해 NBT를 반응기질로 사용하였으며, X-ray 필름을 감광시키기 위해서는 CSPD를 각각 사용하였다. 또한 잎에서 바이러스 핵산이 포함된 total RNA의 수율을 높이기 위한 최적 완충용액의 조성을 확인하기 위해 기존 보고된 여러 문헌들을 참고하여 조성된 추출완충용액을 사용하여 추출물의 진단 효율을 확인한 결과 AMES buffer가 본 실험 조건에 가장 유리한 것으로 확인되었다. 이러한 방법을 이용해 100 mg의 감자 잎조직에서 total RNA를 추출하여 진단에 이용해본 결과 반응기질의 종류와 상관없이 1/32배의 희석배수에서 RNase 제거를 위한 특별한 처리 없이도 PLRV의 진단이 가능하였다.

요 약

현재 국내 감자재배 및 씨감자 생산과정에 심각한 피해를 주고 있는 감자잎말림바이러스(PLRV)의 정밀진단을 위해 digoxigenin(DIG)으로 표지된 cRNA 프로브를 이용하여 진단을 실시하였다. Transcription 전용 vector인 pSPT18에 sub cloning된 0.6 kb 크기의 PLRV coat protein 유전자를 주형으로 DIG가 표지된 프로브를 합성하였다. 프로브를 표지한 DIG에 반응하는 최종 기질의 종류에 따라 막에서 직접 발색시키거나 X-ray film을 감광시켜 진단하는 방법을 사용하였다. 막에 직접 발색시키기 위해 NBT를 반응기질로 사용하였으며, X-ray 필름을 감광시키기 위해서는 CSPD를 각각 사용하였다. 또한 잎에서 바이러스 핵산이 포함된 total RNA의 수율을 높이기 위한 최적 완충용액의 조성을 확인하기 위해 기존 보고된 여러 문헌들을 참고하여 조성된 추출완충용액을 사용하여 추출물의 진단 효율을 확인한 결과 AMES buffer가 본 실험 조건에 가장 유리한 것으로 확인되었다. 이러한 방법을 이용해 100 mg의 감자 잎조직에서 total RNA를 추출하여 진단에 이용해본 결과 반응기질의 종류와 상관없이 1/32배의 희석배수에서 RNase 제거를 위한 특별한 처리 없이도 PLRV의 진단이 가능하였다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도부터 지원된 농림수산특정연구과제의 연구비지원으로 수행된 연구 결과의 일부입니다.

연구 수행에 도움을 주신 포항공대 최관용 교수님과 실험에 많은 조언을 해주신 원예연구소 최국선 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

- Abad, J. A. and Moyer, W. 1992. Detection and Distribution of Sweet Potato Feathery Mottle Virus in Sweet Potato by *in vitro* Transcribed RNA Probes (Riboprobes), Membrane Immunobinding, and Direct Blotting. *Phytopathology* 82: 300-305.
- Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M. A. and Hay, R. T. 1990. Expression of the Genome of Potato Leafroll Virus; Read-through of the Coat Protein Termination Codon *in vivo*. *J. Gen. Virol.* 71: 2251-2256.
- Baulcombe, D. and Fernandez-Northcote, E. N. 1988. Detection of Strains of Potato Virus X and of a Broad Spectrum of Potato Virus Y isolates by Nucleic Acid Spot Hybridization (NASH). *Plant Dis.* 72: 307-309.
- Boulton, R. E., Jellis, D. C., Baulcombe, D. C. and Squire, A. M. 1984. The Practical Application of Complementary DNA Probes to Detection in a Potato Breeding Programme. Proceedings. 1989. British Crop Protection Conference. 3A-2.
- Dietzgen, R. G., Xu, Z. and Teycheney, P. Y. 1994. Digoxigenin-labeled cRNA Probes for the Detection of Two Potyviruses Infecting Peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Dis.* 78: 708-711.
- Haber, S., Wakarchuk, D. A., Cvitkovich, S. E. and Murray, G. 1992. Diagnosis of Flame Chlorosis, a Virus-like Disease of Cereals, by Detection of Disease-Specific RNA with Digoxigenin-labeled RNA Probes. *Plant Dis.* 76: 590-594.
- Habili, N., McInnes, J. L. and Symons, R. H. 1987. Non-radioactive, Photobiotin-labeled DNA Probes for the Routine Diagnosis of Barley Yellow Dwarf Virus. *J. Virol. Meth.* 16: 225-237.
- Hadidi, A., Montasser, M. S. and Levy, L. 1993. Detection of Potato Leafroll and Strawberry Mild Yellow-edge Luteoviruses by Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction Amplification. *Plant Dis.* 77: 595-601.
- Hahn, Y. I., Choi, J. K., Bae, S. W., Choi, K. S., Kim, Y. S. and Hwang, Y. S. 1993. Hybridization Detection of Potato Viruses Using Digoxigenin-labeled RNA Probe. *RDA. J. Agri. Sci.* 35(2): 239-244.
- Harper, K. and Creamer, R. 1995. Hybridization Detection of Insect-transmitted Plant Viruses with Digoxigenin-labeled Probes. *Plant Dis.* 79: 563-567.
- Henry, C. M., Barker, I., Morris, J. and Hugo, S. A. 1995. Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Using Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction. *J. Virol. Meth.* 54: 15-28.
- Hu, J. S., Li, H. P., Barry, K., and Wang, M. 1995. Comparison of Dot Blot, ELISA, and RT-PCR Assays for Detection of Two Cucumber Mosaic Virus Isolates Infecting Banana in Hawaii. *Plant Dis.* 79: 902-906.

13. Lemaire, O., Herrbach, E., Stevens, M., Bouchery, Y. and Smith, H. G. 1995. Detection of Sugar Beet-infesting Beet Mild Yellowing Luteovirus Isolates with a Specific RNA Probe. *Phytopathology*. 85 : 1513-1518.
14. Lauhere, J. P. and Rozier, C. 1976. One-step Extraction of Plant nucleic Acids. *Plant Sci. Lett.*, 6 : 237-242.
15. Loebenstein, G. and Akad, F. 1997. Improved Detection of Potato Leafroll Luteovirus in Leaves and Tubers with a Digoxigenin-labeled cRNA Probe. *Plant Dis.* 81 : 489-491.
16. Mayo, M. A., Robinson, D. J., Jolly, C. A. and Hyman. 1989. Nucleotide Sequence of Potato Leafroll Luteovirus RNA. *J. Gen. Virol.* 70 : 1037-1051.
17. Neubery, H. J. and Possingham, J. V. 1977. Factor Affecting the Extraction of Intact Ribonucleic Acid from Plant Tissues Containing Interfering Phenolic Compounds. *Plant Physiol.* 60 : 543-547
18. Robinson, D. J. and Romero, J. 1991. Sensitivity and Specificity of Nucleic Acid Probes for Potato Leafroll Luteovirus Detection. *J. Virol. Methods*. 34 : 209-219.
19. Rowhant, A. and Smith, R. S. 1979. Purification and Characterization of Potato Leafroll Virus. *Virology*. 98 : 45-54.
20. Smith, F. D. and Bantari, E. E. 1987. Dot-ELISA on Nitrocellulose Membranes for Detection of Potato Leafroll Virus. *Plant Dis.* 971(9) : 975-799.
21. Smith, O. P., Harris, K. F., Toler R. W., and Summers, M. D. 1988. Molecular Cloning of Potato Leaf Roll Virus Complementary DNA. *Phytopathology* 78 : 1060-1066.
22. Van Den Heuvel, J. F. J. M, de Blank, C. M. Goldbach, R. W. and Peters, D. 1990. A Characterization of Epitopes on Potato Leafroll Virus Coat Protein. *Arch. Virol.* 115 : 185-197.
23. 서효원, 함영일, 최장경. 1997. 바이러스 진단 및 검정 실용화 연구. 시험연구보고서 pp.301-308. 고령지농업시험장.

(Received December 6, 1998)