

나리 LSV 제거를 위한 약제 및 열처리 효과

서상영* · 안민실 · 최소라 · 임희춘 · 류 정
전북농업기술원

Effect of Chemo- and Thermo-therapy on LSV elimination in *Lilium Oriental Hybrid*

SEO, Sang Young* · ANN, Min Sil · CHOI, So Ra · LIM, Hoi Chun · RYU, Jeong
Chollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan, 570-140, Korea

ABSTRACT Effect of chemo- and thermo-therapy on LSV elimination was investigated in *Lilium Oriental Hybrid* cv. Casa Blanca which was infected by LSV. Either 20 mg/L ribavirin or the treatment of 35°C/25°C (day/night) thermo-therapy resulted in the desired growth rate and high percentage (86%, 80% respectively) of LSV elimination. When we combined those application, the rate of LSV elimination was increased with the time of heat treatment, and was 100% by all heat treatment of 16 weeks. After all of the LSV-free plants transferred into the soil, the number of LSV-free plants was 8 plants out of 12 plants and the efficiency of LSV elimination was best in the combination of 20 mg/L ribavirin and 8 weeks of heat treatment. About 21% of plants kept LSV-free after transferred all of the LSV-free plants into the soil, the others became LSV-infected again.

Key words; Ribavirin, LSV-free plant, ELISA, PCR

서 론

나리에 발생하는 주요 바이러스는 LSV (Lily symptomless virus), CMV (Cucumber mosaic virus), ToRV (Tomato ringspot virus) 등 약 20여종이 보고되고 있으며 본원 조사에 의하면 이들 바이러스 중 LSV 감염율이 높은 것으로 조사되었다.

LSV는 single strand RNA와 외피 단백질로 구성된 Carlavirus group에 속하고 640 nm 크기의 사상형이며 진딧물, 즙액에 의해 주로 전염되고 식물체에 잠재성 병징을 나타내므로 농가 재배에 따른 큰 피해는 없으나, CMV 등 다른 바이러스의 복합 감염시 병징의 상승효과로 품질 및 수량 저하의 요인이 되고 있다. 기존의 무병종구 생산의 한 방법인 생장점 배양 (Slack 1980)은 배양 초기에 많은 노력과 식물체 분화

에 많은 시간이 소요되며, 생장점 이외의 엽원기나 생장점 아래의 정상세포가 포함되어 바이러스 감염 가능성을 내포하고 있다.

따라서, 바이러스에 감염된 식물체를 대상으로 하여 바이러스 퇴치에 관한 연구가 보고되었다 (McDonald 1973; Kim et al. 1996; Iwanami et al. 1994). 본 실험에서는 바이러스 복제를 저해하는 화학약제 및 열처리 효과를 이용하여 나리의 LSV 제거를 위한 기내 배양조건을 구명하고 여기서 얻어진 식물체를 토양에 정식한 후 바이러스 무병화 정도를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배지

*Corresponding author. Tel 0653-833-3506
E-mail vvcoct05@chollian.com

포장에서 재배중인 *Lilium Oriental Hybrid* 계통의 “Casa Blanca” 중 LSV에 이미 감염된 구근의 인편을 흐르는 수돗

물에 깨끗이 씻은 후 0.5% sodium hypochloride에 20분간 소독하고 멸균수로 수세 후 무균상에서 인편 기저부의 0.7×0.7 cm² 절편체를 배지에 치상하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본 배지에 NAA 0.1 mg/L, sucrose 60 g/L, 한천 8 g/L를 첨가하여 pH 5.7로 조정 후 121°C에서 15 분 고압멸균하였다.

화학약제 처리

항바이러스 약제인 ribavirin (화학명 : Viramid)과 amantadine을 각각 증류수에 녹여 0.2 μm membrane filter로 여과 후 멸균된 배지가 60°C 정도로 식었을 때 ribavirin : 20, 40, 80 mg/L와 amantadine : 20, 40, 80, 150 mg/L 농도가 되게 100 mL 삼각 플라스크에 30 mL씩분주하였다. 배지에 치상한 절편체는 20 μmol · m⁻² · s⁻¹의 형광하에서 1일 16시간의 조명하에 두었고 배양 온도는 24±1°C 로 유지하였다. 배양 5개월 후 식물체 잎을 이용해 농업 과학 기술원 병리과에서 분양받은 LSV 항혈청을 이용해 ELISA (Clark 1986) 방법으로 LSV 제거율을 조사하였다.

열처리

약제가 함유되지 않은 배지에 절편체를 치상하여 24±1°C 배양온도에서 4주 전처리 배양 후 열처리하였다.

열처리는 ① 35°C/25°C (주간/야간), ② 30°C (3주) → 25°C (1주배양), ③ 30°C (2주) → 35°C (1주) → 25°C (1주배양)로 배양온도와 기간을 16주 동안 반복 배양 후 ELISA 방법으로 LSV 제거율을 조사하였다.

화학약제 및 열처리 병행

시험관 (직경:25mm, 길이:15mm)에 ribavirin 5, 10, 15, 20

mg/L 함유 배지를 각각 분주하여 식물체를 치상하고 24±1°C에서 4주 전처리 배양 후 열처리 35°C/25°C (주간/야간)를 4, 8, 12, 16주 동안 병행처리 하였다. 열처리 기간이 16주 전에 끝난 식물체는 16주가 될 때까지 대조구와 동일 환경 (ribavirin 무처리, 24±1°C 배양온도)에서 배양 후 ELISA 방법으로 LSV 제거율을 조사하였다.

토양 정식 후 LSV 무병화 조사

화학약제 및 열처리 병행에서 얻어진 바이러스 음성으로 판별된 나리 구근을 4°C에서 6주간 휴면을 타파시킨 후 원예용 상토에 정식하고 3개월 후에 ELISA 방법으로 LSV 무병화 정도를 조사하였다.

RT-PCR에 의한 LSV 검정

토양에 정식 후 ELISA에 의해 LSV 음성, 양성으로 판독

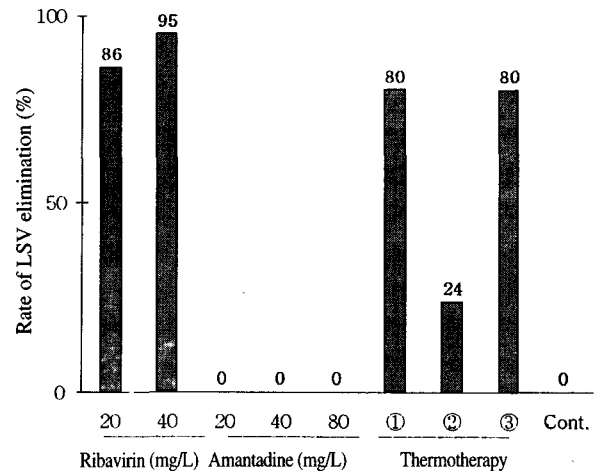


Figure 1. Effects of chemo- and thermotherapy on LSV elimination.

Table 1. Mortality and growth in chemo- and thermotherapy.

Treatment	Conc. (mg/L)	Mortality (%)	Rate of callus formation (%)	Rate of bulblets regeneration (%)	No. of bulblets regenerated	Fresh weight of bulblets regenerated (g)
Ribavirin	20	9.3	8.6	82.1	1.8	1.1
	40	24.8	38.2	37.0	1.5	0.8
	80	65.0	35.0	-	-	-
Amantadine	20	8.9	10.7	80.4	1.7	0.9
	40	12.7	32.6	54.7	1.4	0.7
	80	19.1	45.2	35.7	1.3	0.5
	150	20.0	75.7	4.3	0.3	0.5
Thermotherapy	① ^a	54.5	13.6	31.9	1.5	0.8
	② ^b	10.5	13.7	75.8	1.7	1.0
	③ ^c	73.7	20.6	5.7	0.9	0.2
Control		6.7	8.5	84.8	1.8	1.6

^a35°C/25°C (day/night), ^b30°C (3 wk.)→25°C (1 wk.), ^c30°C (2 wk.)→35°C (1 wk.)→25°C (1 wk.).

된 식물체의 잎에서 RNeasy Plant Total RNA Kit (Qiagen)를 이용하여 total RNA를 분리하였고 RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer)를 이용하여 RT-PCR (Takamatsu et al. 1994; Joung 1996; Shinya et al. 1994) 및 PCR (Gelfand 1989; Rotbart 1990; Griesbach 1995)을 수행하였다. 농업 과학 기술원 생화학 실험실에서 분양 받은 antisense primer와 sense primer를 이용해 RT-PCR을 42°C 15분, 99°C 5분, 5°C 5분간 1 cycle 수행 후, PCR을 95°C 105초 (hold), 95°C 15초, 60°C 30초, 72°C 90초 (35 cycle), 72°C 7분 (hold) 수행하였다. PCR산물의 확인은 반응액 15µL를 1% agarose gel에 전기영동 후 UV하에서 DNA band를 조사하였다.

결과 및 고찰

화학약제 처리효과

배지내 화학약제를 처리했을 때 식물의 생육정도는 table 1과 같다. Ribavirin과 amantadine 농도가 증가할수록 식물의 고사율 및 캘러스 발생률이 증가하는 경향이었으며, 고사율 정도는 ribavirin 약제에서 높았다. 식물체의 재분화를 역시 ribavirin 처리에서 낮은 경향이었으며 80 mg/L 농도에서는 전혀 재분화가 되지 않았다.

화학약제 처리에 따른 LSV 제거율은 (Figure 1) ribavirin 20 mg/L에서 86%, 40 mg/L에서 95%로 높게 나타났으며, amantadine 처리에서는 전혀 제거 되지 않았다. 이런 결과는 Kim (1997)이 난 바이러스 (ORSV, CyMV) 제거에는

amantadine이 ribavirin보다 우수하다고 한 보고와는 다른 결과였으며 이로써 바이러스 종류에 따라 적용 가능한 약제가 다름을 알 수 있었다.

따라서 ribavirin 처리가 식물의 생육은 다소 낮지만 LSV 제거에 보다 더 효과적인 것으로 사료되었다.

열처리 효과

열처리에 따른 식물의 생육은 (Table 1) 처리②에서 고사율 및 캘러스 발생률이 낮았으며, 자구 분화율이 75.8%로 다른 처리보다 높았다. 그러나 LSV 제거율은 (Figure 1) 24%로 처리①과 처리③의 80%보다 낮았다. 그러므로 식물의 생육 및 LSV 제거율을 고려할 때 처리①이 효과적인 처리로 사료된다.

화학약제 및 열처리 병행 효과

화학약제 및 열처리 병행에 따른 식물의 생육은 table 2와 같다. 열처리 기간이 4주에서 16주로 길어질수록 식물의 고사율은 다소 증가하는 경향이었고 캘러스 발생은 적었으며 상대적으로 자구 분화율은 증가하였는데, 이는 열처리 초기에 발생한 캘러스에서 열처리 기간이 길어지면서 자구 분화가 이루어졌기 때문인 것으로 생각된다. 자구수는 열처리 16주에서 대조구 6.3개보다 적었으며 12주 이하의 열처리에서 자구수가 많았다. 자구의 무게는 ribavirin 20 mg/L 농도에서 다른 농도보다 다소 적었고 열처리 기간이 길어질수록 감소하였으며 16주 열처리에서 현저하게 낮았다. 이는 식물의 생육이

Table 2. Mortality and growth in chemo- and thermotherapy combination.

Ribavirin (mg/L)	Thermo-therapy (wk.)	Mortality (%)	Rate of callus formation (%)	Rate of bulblets regeneration (%)	No. of bulblets regenerated ^a	Fresh weight of bulblets regenerated (g) ^a
5	4	4.0	16.0	72.0	7.0	5.3
	8	13.0	8.7	74.0	8.8	-4.2
	12	4.5	13.6	77.3	11.4	3.1
	16	8.7	-	82.6	4.2	1.3
10	4	4.0	32.0	60.0	8.1	6.9
	8	8.0	16.0	68.0	10.1	4.5
	12	8.3	4.2	83.3	7.7	1.8
	16	12.0	-	88.0	5.2	1.3
15	4	4.0	16.0	80.0	8.9	5.9
	8	-	4.0	92.0	9.3	4.1
	12	4.0	12.0	80.0	8.9	3.0
	16	12.0	-	84.0	6.1	1.3
20	4	-	44.0	56.0	7.4	3.6
	8	8.0	20.0	72.0	10.6	4.0
	12	8.0	8.0	76.0	9.2	2.3
	16	12.0	-	84.0	7.1	1.3
Control		5.0	-	90.0	6.3	3.2

^a Measurement after 16 weeks.

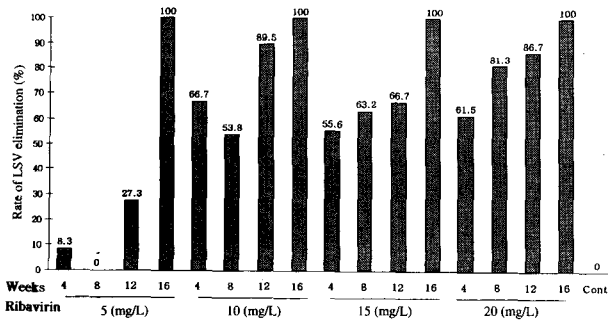


Figure 2. Effects of chemo- and thermotherapy combination on LSV elimination.

ribavirin 농도보다는 열처리에 의해 많은 영향을 받는 것으로 생각되며 table 1의 생육정도와 차이를 나타내는 것은, 초기 생육이 시험관에서 이루어지고 열처리가 끝난 후에는 삼각 플라스크로 옮겨져 대조구 환경 즉 배지내 ribavirin이 없고 24±1°C의 환경에서 생육이 이루어졌기 때문에 사료된다.

바이러스 제거율 (Figure 2)은 ribavirin 10 mg/L 이상의 농도에서 열처리 기간과 관계없이 50% 이상이었으며 열처리 기간이 길수록 LSV 제거율은 증가하였고, 특히 열처리 16주에서는 ribavirin처리 농도와 관계없이 100%의 제거율을 보였다. 이는 화학약제와 열처리를 병행하였을 경우 LSV 제거는 약제 ribavirin 보다 열처리 35°C/25°C (주간/야간)에서 보다 많은 영향을 받는 것으로 생각된다.

토양 정식 후 LSV 무병화 조사

토양 정식 후 식물의 엽 출현은 (Table 3) 열처리 16주 처리에서 낮았으며 다른 처리에서는 양호하였다. 이는 열처리 16주 처리의 자구 한 개의 평균 무게가 0.5 g 정도로 생육이 미진하였기 때문으로 보인다.

LSV 무병화 정도 (Table 3)는 각 처리당 0 ~ 6개로 검정수에 비하여 낮았으며, ribavirin 20 mg/L 농도와 열처리 8주 병행처리에서 12개체 중 8개체가 무병화를 보여 가장 효과적 이었고, 전체 검정수를 기준으로 하면 바이러스 검정수 108개에서 무병화 수 23개로 약 21%의 제거율을 보였다. 이런 결과는 약제 ribavirin 과 열처리에 의해 바이러스가 기내에서 증식이 억제되고 잠복상태로 유지되다가 토양의 자연 환경에서 다시 복제, 증식되기 때문인 것으로 보이며 Blom-Barnhoorn과 Van Aartrijk (1985)이 보고한 토양 정식 후 바이러스 이병율이 기내배양 조사보다 약간 더 높았다는 내용과는 차이가 있었다.

RT-PCR에 의한 LSV 검정

RT-PCR에 의한 LSV 검정 결과 (Figure 3), positive

Table 3. Number of LSV-free plants 12 weeks after planting into the soil.

Ribavirin (mg/L)	Thermo-therapy (wk.)	No. of leaf emergency / No. of planting	No. of LSV-free plants / No. of LSV detection
5	4	1 / 1	0 / 1
	12	2 / 3	2 / 2
	16	7 / 14	1 / 7
10	4	9 / 10	3 / 7
	8	7 / 7	2 / 7
	12	10 / 14	2 / 10
	16	6 / 15	0 / 6
15	4	9 / 10	0 / 8
	8	12 / 12	3 / 12
	12	10 / 10	2 / 9
	16	6 / 17	0 / 5
20	4	8 / 8	0 / 8
	8	12 / 13	6 / 12
	12	8 / 9	1 / 7
	16	5 / 11	1 / 7
Control		8 / 8	0 / 8

control (lane 1)과 토양 정식 후 LSV 양성 반응을 보인 식물체 (lane 2)에서 DNA밴드를 확인할 수 있었고 토양 정식 후 LSV 음성 반응을 보인 식물체 (lane 4, 5)에서는 lane 4에서만 DNA밴드를 볼 수 없었다. 즉 ELISA 검정법에서 음성이었던 식물체가 PCR 검정에서는 바이러스 양성으로 검정 (lane 5)되기도 하였다. 이런 사실은 Hu 등 (1995)이 보고한 PCR에 의한 검정 방법, ELISA 방법이나 dot blot 방법보다 더 민감하다는 내용과 일치하는 것으로 보여진다.

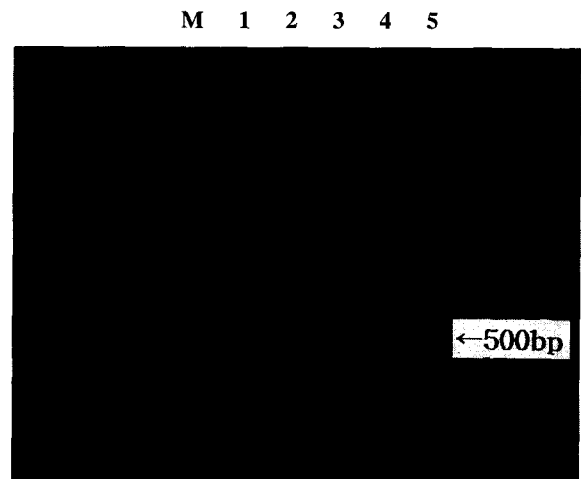


Figure 3. RT-PCR amplification of lily symptomless virus RNA in total RNA extracted from lily. Lane M : Size marker (EcoRI + Hind III) ; 1 : Positive control ; 2 : Virus-nonfree plant ; 3 : Negative control ; 4~5 : Virus-free plants.

적 요

LSV 제거 효과를 조사하기 위하여 LSV에 감염된 나리 Casa Blanca를 재료로 기내 배양 중에 화학약제 및 열처리를 단독 또는 병행처리하였다.

단독처리시 ribavirin 20 mg/L과 열처리 35°C/25°C (주간 야간)에서 식물의 생육 및 LSV 제거율 (각각 86%, 80%)이 다른 처리보다 좋았다. 이 두 처리를 병행하였을 경우, 열처리 기간이 길수록 LSV 제거율은 증가하는 경향이었으며 열처리 16주의 모든 처리에서 ribavirin 농도와 관계없이 100%의 LSV 제거 효과를 보였다.

토양 정식 후 LSV 무병화 정도는 ribavirin 20 mg/L 농도와 열처리 8주 병행처리에서 12개체 중 8개체가 무병화를 보여 가장 효과적이었으며, 전체 조사 수를 기준으로 했을 때 약 21% 정도의 무병화가 유지되었고, 나머지는 토양의 자연 조건에서 다시 바이러스의 복제, 증식이 되는 것으로 보인다.

인용문헌

- Blom-Barnhoorn GT, Van Aartrijk J (1985) The regeneration of plants free of LSV and TBV from infected liliium bulb-scale explants in the presence of virazole. *Acta Hort* **164**:163-168
- Clark MF, Lister RM, Bar Joseph M (1986) ELISA Techniques. *Methods in Enzymology* **118**:742-780
- Gelfand DH (1989) Principles and applications for DNA amplification. In : PCR Technology, Erlich AH (ed). pp17-22. Stokton Press, New York
- Griesbach JA (1995) Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. *Plant Dis* **79**:1054-1056
- Hu JS, Li HP (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
- Iwanami T, Ieki H (1994) Elimination of citrus tatter leaf virus from shoots of potted citrus plants by ribavirin. *Ann Phytopath Soc Jap* **60**:595-599
- Joung YH, Jeon JH, Choi KH, Kim HS (1996) Detection of lily symptomless virus using RT-PCR technique. *Kor J Plant Pathol* **12**:187-190
- Kim HS, Jeon JH, Choi KH (1996) Eradication of PVS (Potato Virus S) by thermo- and chemotherapy in potato tissue culture. *J Kor Soc Hort Sci* **37**:533-536
- Kim JY, Choi ST (1996) Production and detection of virus-free lily plants by shoot tip culture and virazole treatment of bulbils. *J Kor Soc Hort Sci* **37**:64-69
- Kim MS (1997) Elimination of Odontoglossum ringspot virus from orchid by chemotherapy and thermotherapy. *The Research and Extention, RDA* **38**:22-24
- McDonald DM (1973) Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varieties from viruses X and S. *Potato Res* **16**:263-269
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Rotbart HA (1990) A guide to methods and applications. In : PCR protocols, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). pp 3-12. Academic Press, San Diego, CA
- Shinya T, Ichiro F (1994) Detection of tomato spotted wilt virus S RNA in individual thrips by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Ann Phytopath Soc Jap* **60**:99-103
- Slack SA (1980) Pathogen-free plants by meristem-tip culture. *Plant Dis* **64**:14-17
- Takamatsu S, Lin BN, Furuta H, Makara K (1994) RT-PCR mediated cloning and sequence analysis of lily symptomless virus. *Ann Phytopath Soc Jap* **60**:487-490

(접수일자 1999년 1월 13일)