J Plant Biotechnol (2019) 46:228–235
DOI:https://doi.org/10.5010/JPB.2019.46.3.228

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

사과 왜성대목 M.9 및 M.26의 고온, ribavirin, 생장점 배양을 통한 바이러스 제거

권영희 · 이정관 · 김희규 · 김경옥 · 박재성 · 허윤선 · 박의광 · 윤여중

Efficient virus elimination for apple dwarfing rootstock M.9 and M.26 via thermotherapy, ribavirin and apical meristem culture

Young Hee Kwon · Joung Kwan Lee · Hee Kyu Kim · Kyung Ok Kim · Jae Seong Park · Yoon Sun Huh · Eui Kwang Park · Yeo Joong Yoon

Received: 8 July 2019 / Revised: 30 August 2019 / Accepted: 4 September 2019
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Apple (*Malus pumila*) is one of the most economically important fruits in Korea. but virus infection has decreased the sustainable production of apples and caused serious problems such as yield loss and poor fruit quality. Virus or viroid infection including *apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *apple stem pitting virus* (ASPV), *apple stem grooving virus* (ASGV), *apple mosaic virus* (ApMV) and *apple scar skin viroid* (ASSVd) have been also reported in Korea. In many cases, as apple gets infected with virus and viroid with no specific symptoms, the damage and symptoms caused by the viruses are not detected. In our research, viruses in the rootstock were eliminated for a virus-free apple dwarfing rootstock of M.9 and M.26. The virus elimination methods were apical meristem culture, thermotherapy (37°C, 6 weeks) and chemotherapy(Ribavirin®). The detection of apple viruses was accomplished by Enzyme-linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). RT- PCR method was 10 ~ 30% more sensitive than the ELISA method. The efficiency of virus elimination was enhanced in apical meristem culture method. The acquisition rate of virus-free apple dwarfing rootstocks was 30 ~ 40% higher in apical meristem culture. After the meristem culturing of M.9, the infection ratio of ACLSV, ASPV and ASGV was 45%, 60% and 50%, respectively. In the apple dwarfing rootstock of M.26, the infection ratio of ACLSV, ASPV and ASGV was 40%, 55% and 55%, respectively. Based on this study, the best method for the production of virus-free apple dwarfing rootstocks was the apical meristem culture.

Keywords Apple rootstocks, Virus elimination, Apical meristem, RT- PCR, ELISA

Y.-H. Kwon (✉) · J. K. Lee · H. K Kim · K. O. Kim · J. S. Park · Y. S. Huh · E.-K. Park
충청북도농업기술원
(Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Republic of Korea)
e-mail: tomato94@korea.kr

Y.-J. Yoon
(주)유니플랜텍
(Uniplantech, 498, Samyang-ro, Daeso-myeon, Eumseong-gun, Chungcheongbuk-do, 27659, Republic of Korea)

서 언

사과(*Malus pumila*)는 국내 과수 농업생산액 중 23% 정도인 1.1조원을 차지할 정도로 가장 중요한 과수이다(KOSIS, 2018). 과수에 있어 바이러스는 접목 감염을 통해 과실 품질 저하 및 수량 감소 등 생산성 저하를 야기한다(Smith and Challen 1972; Wood 1979). 사과는 주로 접목에 의해 증식하는 영양체 번식 작물로, 바이러스에 감염되면 각종 병해나 환경에 대한 저항력이 약화되고, 과실이 작아지는 등 피해를 입게 되어 대략 20 ~ 40% 정도 생산량이 감소된다(Kim et al. 2011; Kim et al. 2017; Kinard et al. 1996; Liu et al. 2013; Menzel et al. 2002).

사과에 주로 발생하는 바이러스는 Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV), Apple Mosaic Virus (ApMV), Apple Stem Pitting Virus (ASPV), Apple Stem Grooving Virus (ASGV) 등이며, Viroid는 Apple Scar Skin Viroid (ASSVd) 등이 보고되었다(Hu et al. 2015; Paprstein et al. 2008). 사과 '홍로'품종의 바이러스 검정 결과, 전국의 16개 농원 중 13개 농원의 사과 묘목

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에서 ACLSV, ASPV 및 ASGV가 복합 감염되어 있었고, 3개 농원 묘목에는 ACLSV와 ASGV가 복합 감염되어 있었다고 발표한 바 있다(Lee et al. 2017).

사과나무의 경우 바이러스에 감염이 되면 소각이나 매몰 외에는 다른 방제 대책이 없기 때문에 바이러스 무병묘 생산 시스템의 개발이 필요한 실정이다(Lee et al. 2013). 사과 바이러스 무병주 생산 방법으로는 기내 또는 기외에서 식물체를 열처리한 다음 경정배양을 병행하는 방법(Lee et al. 2013; Paprstein et al. 2008), 4°C로 일정기간 처리하는 한냉요법(El-Dougdoug et al. 2010; Paprstein et al. 2008; Wang et al. 2006), Ribavirin과 같은 항바이러스제를 처리하는 화학적 방법 등이 보고되었다(Hansen and Lane 1985; Hu et al. 2015).

Tan 등(2010)은 ACLSV, ASGV, ASPV가 감염된 배 'Fengshui'의 식물체를 주간 42°C, 야간 34°C에서 55일 이상 열처리하고 경정배양을 하여 바이러스를 제거하였다고 보고하였다. *Malus pumila Mill* 사과 품종에 Ribavirin을 10, 20, 40 및 80 μM 농도로 처리하여 온실과 농장 모두 사과 신초에서 ACLSV의 제거 효과를 확인하였다(Hansen and Lane 1985).

본 연구는 국내 사과 주요 왜성대목 M.9 및 M.26의 바이러스 무병묘 생산을 위하여 고온처리(37°C), ribavirin, 생장점 배양 처리를 한 후 바이러스 제거 효과를 비교하였고, 식물체 생존율을 분석하였으며, RT-PCR 및 ELISA 방법을 이용하여 바이러스 감염 진단 효율 및 정확도를 비교하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 시험에서는 충청북도농업기술원 시험포장에 재식된 사과 왜성대목 5년생 M.9 및 M.26을 재료로 사용하였다. 고온처리, 화학처리 및 생장점 배양의 바이러스 제거효과를 구명하기 위하여 바이러스(ACLSV, ASPV, ASGV) 감염이 확인된 왜성대목을 각각 20개체씩 선발하였다. 최종적으로 생산된 식물체에 대하여 바이러스 3종(ACLSV, ASPV, ASGV)의 제거 여부를 RT-PCR 및 ELISA로 진단하여 무병묘 생산 효율을 확인하였다.

바이러스 제거 처리

사과 왜성대목 M.9 및 M.26의 식물체를 이용하여 고온처리, 화학처리, 생장점 배양을 통하여 바이러스 제거 시험을 수행하였다. 고온처리는 각 처리별 20개 식물체를 37°C, 습도 65%로 유지되는 항온항습기(WGC-450, Daihan scientific, Korea)에서 6주간 처리하였으며, 화학처리는 Ribavirin (1-B-D-ribofuransyl-1,2,4-triazole caboxamide, MBcell, USA) 40 mg/L이 첨가될 배지에서 25°C로 4주간 신초를 배양하였다. 생장점 배양은 신초가 신장한 마디를 잘라 흐르는 물에 약 30분간 깨끗하게 세척한 후 70% 에탄올에 침지하여 약 30초간 표면 살균한 다음 멸균수로 1회 세척하였다. 이후, 클린벤치 안에서 2% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)에 20분간 침지하여 2차 표면살균 후, 멸균수로 3회 세척하고 실체 현미경 하에서 0.1±0.2 mm 크기로 생장점(Meristem)을 채취하여 기내배지에 치상하여 6주간 배양하였다. 배지의 조성은 MS (Murashige & Skoog, 1962) 배지에 30 g/ℓ sucrose (Junsei, Tokyo, Japan), agar (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)를 8 g/ℓ 첨가한 다음, 250 ㎖ 배양병에 50 ㎖씩 분주하였고 고압멸균기(AC-60, Daihan scientific, Korea)를 이용해 121°C, 1.2기압 하에서 20분간 멸균하여 사용하였다. 배양 조건은 23±1°C 온도가 유지되는 배양실에서 명배양(광주기 16D : 8H, cool white 형광등 30 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) 하였다. 배양 과정 중 신초의 발생 양상을 관찰하였고 배양 6주 후에 형성된 신초 잎을 이용하여 바이러스 검정을 하였다.

바이러스 검정

ELISA 검정

사과 왜성대목의 신초잎은 0.5 g씩 채취한 후 시료 무게의 10배가 되게 완충액(Extraction buffer 5 ml)을 첨가하였고, Sample bag mesh에 마쇄한 후 원심분리한 상층액을 사용하였다. 바이러스 검정은 Standard Double Antibody Sandwich ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 방법으로 Agdia (DAS ELISA, USA)로부터 구입한 ACLSV (Apple chlorotic leaf spot virus), ASPV (Apple stem pitting virus), ASGV (Apple stem grooving virus) 항혈청과 Conjugate enzyme은 Alkaline phosphatase를 이용하였다. 바이러스 측정은 ELISA Microplate Reader (VERSAmax, Molecular Devices, USA)를 사용하였고, 이병주 판정은 건전주의 평균 O.D (optical density)값의 2배 이상인 개체로 하였다.

RNA 추출 및 RT-PCR 검정

분석에 사용할 식물 시료 50 mg을 CTAB 방법(Gambino et al. 2008)을 변형하여 total RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA는 M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA 합성에 사용하였다. cDNA를 주형으로 각 바이러스 특이 primer sets를 PCR 반응에 사용하였다(Table 1). PCR에 사용한 총 20 μL의 반응액은 0.2 μM primer 1 μL, 2.5 mM dNTPs l.6 μL, 5 U Takara Ex. Taq polymerase (Takara Bio Inc., Japan) 0.1 μL, 10X Taq Buffer 2 μL, cDNA 1 μL, RNAase-free water 13.3 μL를 혼합하여 사용하였다.

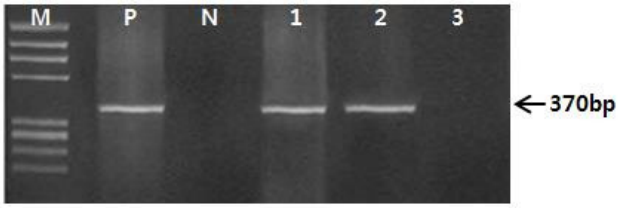
PCR 조건은 초기변성을 위해 94°C에서 2분간 반응시킨 뒤, DNA 증폭을 위한 반응(95°C에서 40초간 DNA 변성, 60°C에서 30초간 primer 접합, 72°C에서 30초간 DNA 신장)을 35

Table 1 Primer pairs and expected size of RT- PCR products for the detection of primers for apple dwarfing rootstock viruses

List of PCR primers		Product size	References
Primers[a]	Sequence		
ACLSV-F[b]	5'-TTCATGGAAAGACAGGGGCAA-3'	677 bp	Menzel et al. 2002
ACLSV-R	5'-AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA-3'		
ASPV-F[c]	5'-ATGTGTGGAACCTCATGCTGCAA-3'	370 bp	Menzel et al. 2002
ASPV-R	5'-TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA-3'		
ASGV-F[d]	5'-GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA-3'	273 bp	Menzel et al. 2002
ASGV-R	5'-AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA-3'		
ApMV-F[e]	5'-CGTAGAGGAGGACAGCTTGG	450 bp	Menzel et al. 2002
ApMV-R	5'-CCGGTGGTAACTCACTCGTT		
nad5-F[f]	5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3'	181 bp	Menzel et al. 2002
nad5-R	5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3'		

[a]The primers for each virus were designed as species-specific
[b]ACLSV: Apple chlorotic leaf spot virus
[c]ASPV: Apple stem pitting virus
[d]ASGV: Apple stem grooving virus
[e]ApMV: Apple mosaic virus
[f]NADH: Dehydrogenase subunit 5

회 반복하였다. 최종 신장을 위해 72°C에서 5분간 반응시킨 후 종료하였으며, NADH를 내부 대조구(internal control)로 사용하여 합성된 cDNA가 RT-PCR 반응에 제대로 사용되었는지 확인하였다. 반응이 증폭된 DNA는 2% agarose gel상에서 100 V로 30분간 전기영동한 후, Ethidium bromide로 염색하여 UV상에서 관찰하였다.



ASPV[a] virus detection

Fig. 1 Detection of apple viruses were detected by RT-PCR method in apple dwarfing rootstock

M: marker, P: Positive control, N: Negative control, 1; Infected samples, 2; Infected samples, 3; Uninfected samples
[a]ASPV : Apple stem pitting virus

결과 및 고찰

사과 왜성대목의 바이러스 진단

사과 왜성대목 무독묘 생산을 위하여 바이러스가 감염된 사과 묘목을 확보하였다. 충청북도농업기술원에 재식된 사과 왜성대목을 RT-PCR 진단 방법을 통해 바이러스 검정을 실시한 결과, ACLSV, ASPV, ASGV의 경우 대부분 복합 감염되어 있었다. 따라서 고온처리, 화학처리 및 생장점 배양을 통한 무병화가 가능한 시료를 채취하기 위하여 복합 감염된 개체를 선별하여 M.9 및 M.26의 묘목을 확보하였다(Fig. 1).

사과 왜성대목의 무병묘 생산을 위한 고온처리, ribavirin 처리 및 생장점 배양

사과 바이러스 무병묘를 생산하는 방법(Fig. 2)은 37°C로 일정기간 열처리하는 방법(Thermotherapy)과, 4°C로 일정기간 저온처리하는 한냉요법(Coldtherapy) 및 항바이러스 약품을 이용한 화학처리법(Chemotherapy) 등이 보고되었다(Feng et al. 2013; Hollings 1965; Paduch-Cichal and Kryczynski 1987; Savitri 2013). 사과에서도 열처리 수행 시 바이러스 활성보다 식물의 생장속도가 더 왕성한 점을 이용하여 무병주 생산이 가능하였다(Hollings 1965).

Campbell (1962)은 지표식물(Indicator plant)인 Virginia Crab, Spy227, Malus platycarpa 등이 열처리와 생장점 배양에 의해 사과 바이러스가 활성화되지 않는 현상에 대하여 보고하였다. 생장점 배양은 여러 식물 종에서 바이러스 제거를 위해 사용하는 방법 중의 하나로, 일반적으로 0.2 ~ 0.4 mm 크기의 생장점 분열조직을 분리해서 배양할 때 바이러스 제거에 효과적이었다(Faccioli and Marani 1998).

Plopa와 Preda (2013)는 Apple mosaic virus에 감염된 세가지 품종에서 0.3 mm와 1.0 mm 길이의 생장점을 분리하여 배양한 결과, 0.3 mm 생장점에서 분화되는 식물체의 감염률이 50 ~ 58%였고, 1.0 mm은 77 ~ 85%의 감염률을 보였다고 하였다. 열처리와 달리 항바이러스제 처리를 이용한 바이러스 제거 기작은 명확히 알려져 있지 않지만, 핵산과 RNA polymerase

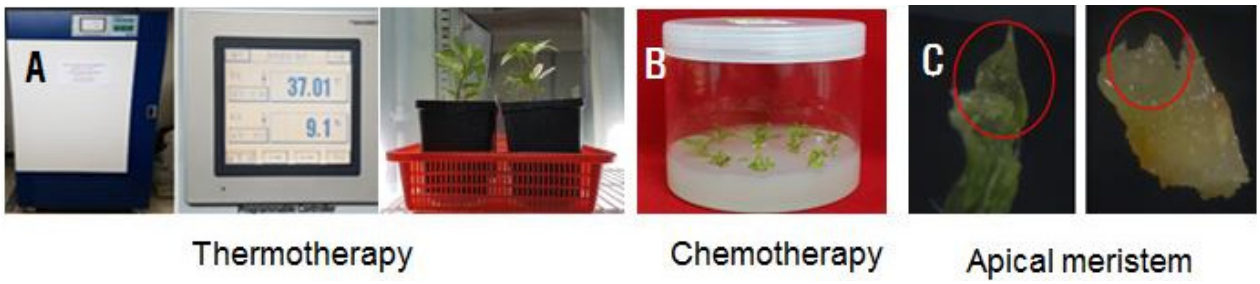


Fig. 2 Production process of virus-free apple dwarfing rootstock plants using thermotherapy, chemotherapy, and apical meristem culturing. A: Thermotherapy (37°C, 6 weeks), B: Chemotherapy (Ribavirin, 40 mg/L), C: Apical meristem culturing

Table 2 Comparisons of survival rate and ratio of virus free plant as affected by virus elimination method of M. 9 dwarfing rootstock measured by RT-PCR

Treatment	Number of tested	Survival Rate (%)	Rate of virus free plant (%)				
			ACLSV[a]	ApMV	ASPV	ASGV	Mean
Thermotherapy	20	65	20	nt[b]	35	25	26.7
Chemotherapy	20	50	10	nt	15	10	11.7
Apical meristem	20	60	45	nt	60	50	51.7

[a]ACLSV : Apple chlorotic leaf spot virus, ApMV : Apple mosaic virus, ASPV : Apple stem pitting virus, ASGV : Apple stem grooving virus
[b]Not tested

의 합성을 저해하여 바이러스 복제를 억제하는 것으로 보고되었다(Hansen 1989; Verma et al. 2005). Cho 등 (2016)은 Ribavirin을 20 mg/L와 40 mg/L으로 2주간 처리하였을 때 바이러스 제거율은 각각 80% 및 100%였고, 4주 및 8주간 처리에서는 모두 100%의 바이러스 제거율을 나타내었다.

항바이러스제는 바이러스 제거에 효과적이지만 고농도에서는 식물체에 식물 독성과 약해를 줄 수 있다. 식물 독성의 증상으로는 식물체의 엽록소 분해, 선단 괴사 및 재생이 저해되는 것으로 알려져 있으나, 배양 후 15일부터는 그 영향이 없어지는 것으로 보고되었다(El-Dougdoug et al. 2010).

사과 왜성대목 M.9 및 M.26 처리별 바이러스 제거효율 (RT-PCR)

RT-PCR 방법에 의한 M.9 대목의 바이러스 불활성화 처리 방법별 생존율 및 무병묘 생산 비율은 Table 2와 같다. 생존율은 50 ~ 65%의 범위로, 고온처리에서 65%로 가장 높았다. 바이러스 제거 방법별 무병묘 비율은 고온처리는 26.7%, 화학처리는 11.7%, 생장점 배양은 51.7%로, 바이러스 무병묘를 생산하기 위해서는 생장점 배양 방법을 이용하는 것이 가장 효과적이었다. 각 바이러스별 무병묘 비율은 ACLSV는 10 ~ 45%, ASPV는 15 ~ 60%, ASGV는 10 ~ 50%였고, ApMV는 검정되지 않았으며, ASPV에 대한 제거효율이 가장 높은 것으로 나타났다.

이 결과는 열처리와 경정배양 후 생존한 신품종들의 바이러스 제거 효율을 확인하였을 때 ACLSV은 총 31개체 중 26개체로 84%가 제거되었고, ASGV는 31개체 중 21개체로 68%, ASSVd는 24개체 중 20개체로 83% 정도 바이러스가 제거되었다는 연구 결과(Lee et al. 2013)와 비슷한 경향이었다.

Cho 등 (2016)은 바이러스 감염 정도는 줄기 횡단면 내에서의 바이러스의 분포뿐만 아니라 생장점으로 바이러스가 확산되는 것에 영향을 주었으며, 바이러스 무병화에는 열처리 등 다양한 기술이 이용되지만 단독처리로는 감염된 바이러스를 완전히 불활성화시킬 수 없기 때문에 경정배양과 함께 병행하고 있다고 보고하였다.

바이러스 무병묘를 생산하기 위해 항바이러스제인 Ribavirin를 사용하는 경우, 사과의 *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) 제거에도 효과적이었다(Hansen and Lane 1985). 하지만 Ribavirin 처리기간에 따라 Ribavirin 20 mg/L를 2주 및 4주간 처리한 그룹에서는 100%의 생존율을 보였지만, 8주간 처리한 그룹에서는 30.0%로 급격히 낮아졌다. 또한 Ribavirin을 40 mg/L 처리시 신초 생존율은 처리기간에 따라 100%, 96.7% 및 20.0%로 점차 낮아져, 항바이러스제 처리 기간은 4주까지가 적당한 것으로 판단되었다(Cho et al. 2016).

바이러스 불활성화 처리 방법별 M.26 대목의 생존율 및 무병묘 비율은 Table 3과 같다. 바이러스 제거 처리별 생존율은 60 ~ 70%로 M.9 대목보다 조금 높았으며, 생장점 배양이 가장 좋았다. Lee 등(2013)은 열처리 과정과 경정배양을 통한 기내 도입 과정 중 생장점 배양의 생존율은 단홍 41.7%, 홍안 28%, 새나라 25% 등 생존율이 낮았고, 생존 개체에서도 잎의 대부분이 소실되었다고 하였다. 열처리 후 생존한 개체에서는 바이러스 제거 효율이 높았지만 접목, 열처리

Table 3 Comparisons of survival rate and ratio of virus free plant as affected by virus elimination method of M.26 dwarfing rootstock measured by RT-PCR

Treatment	Number of tested	Survival Rate (%)	Rate of virus free plant (%)				
			ACLSV[a]	ApMV	ASPV	ASGV	Mean
Thermotherapy	20	65	30	nt[b]	35	30	31.7
Chemotherapy	20	60	20	nt	20	15	21.7
Apical meristem	20	70	40	nt	55	55	50.0

[a]ACLSV : Apple chlorotic leaf spot virus, ApMV : Apple mosaic virus, ASPV : Apple stem pitting virus, ASGV : Apple stem grooving virus
[b]Not tested

Table 4 Comparisons of virus detected plant as affected by the virus elimination methods of M.9 and M.26 dwarfing rootstock

Rootstock	Treatment	Tested method	Number of tested	Virus detected[a]			
				ACLSV[b]	ApMV[c]	ASPV[d]	ASGV[e]
M.9	Thermotherapy	RT-PCR	20	16	nt[f]	13	15
		ELISA	20	14	nt	9	9
	Chemotherapy	RT-PCR	20	18	nt	17	18
		ELISA	20	15	nt	12	14
	Apical meristem	RT-PCR	20	11	nt	8	10
		ELISA	20	8	nt	6	6
M.26	Thermotherapy	RT-PCR	20	14	nt[y]	13	14
		ELISA	20	13	nt	8	10
	Chemotherapy	RT-PCR	20	16	nt	16	17
		ELISA	20	12	nt	11	14
	Apical meristem	RT-PCR	20	12	nt	9	9
		ELISA	20	10	nt	7	7

[a]The numbers in parentheses refers to numbers of virus detected plants
[b]ACLSV : Apple chlorotic leaf spot virus
[c]ApMV : Apple mosaic virus
[d]ASPV : Apple stem pitting virus
[e]ASGV : Apple stem grooving virus
[f]Not tested

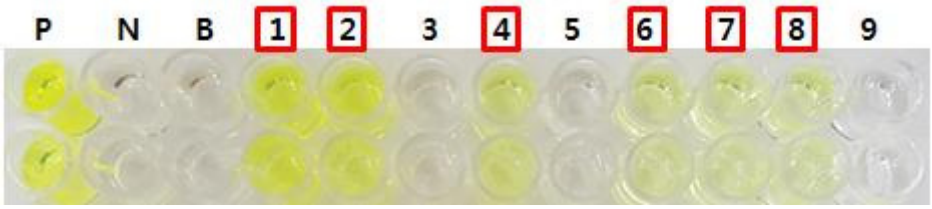
및 생장점 배양 과정에서 생존율이 많이 낮아졌고, 최종적으로는 12~28%의 무병묘를 획득할 수 있었다고 보고하였다.

바이러스 제거 방법별 무병묘 획득 비율은 고온처리 31.7%, 화학처리 21.7%, 생장점 배양 50.0%로, M.26 대목의 바이러스 무병묘를 생산하기 위해서는 생장점 배양을 이용하는 것이 가장 효과적이였다. Kim 등 (2017)은 사과 '홍로'의 동절기 가지 휴면아(측아)의 분열조직 절편체로부터 0.4 mm~1.2 mm의 다양한 캘러스를 배양하였을 때, ACLSV 바이러스는 100% 제거되었다고 하였다. 또한 ASSVd는 생장점 분열조직과 측부 분열조직만을 각각 단독으로 1개 배양하였을 때를 제외하곤, 대부분 93.5% 정도 바이러스가 제거되었다.

ASPV는 생장점과 측부 분열조직에 포엽(Bracts)을 포함하였을 때 제거율이 저하되었는데, 이 경우를 제외하면 ASPV도 모든 크기의 분열조직에서 대부분의 바이러스가 93.5% 제거되었다고 하였다. 이는 감염되었던 4종의 모든 바이러스가 제거된 캘러스, 총 31 계통 캘러스 중 7 계통을 생산한 분열조직 절편체의 발달단계를 확인한 결과, 휴면아에서만 절취된 것으로 나타났는데, 이는 ASGV가 이 단계에서만 주로 제거되었기 때문이었다. 많은 종류의 바이러스를 효과적으로 제거하기 위해서는 발달단계가 어린 분열조직을 사용하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

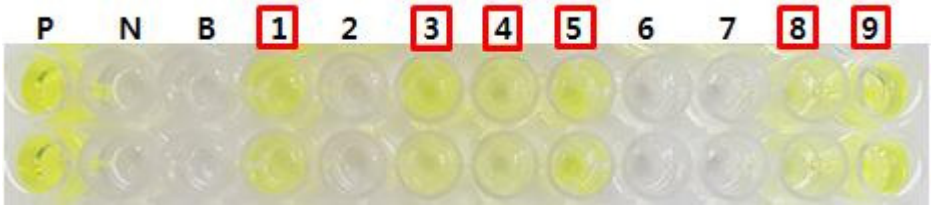
사과 왜성대목 M.9 및 M.26 처리별 바이러스 검정방법 비교 (RT-PCR, ELISA)

바이러스 불활성화 처리에서 사과 M.9 및 M.26 왜성대목의 바이러스 검정 방법을 각각 비교한 결과는 Table 4와 같다. 바이러스 감염률은 생장점 배양에서 화학처리 및 고온처리보다 낮고, M.9 대목은 20개 중 8~11개로 M.26 대목과 거의



P; Positive control, N; Negative control, B; Buffer
1, 2, 4, 6, 7, 8; Infected samples, 3, 5, 9; Uninfected samples

ASPV[a] detection



P; Positive control, N; Negative control, B; Buffer
1, 3, 4, 5, 8, 9; Infected samples, 2, 6, 7; Uninfected samples

ACLSV[b] detection

Fig. 3 Comparisons of the ASPV and ACLSV virus test of M. 9 dwarfing rootstock measured by ELISA
[a]ASPV : Apple stem pitting virus
[b]ACLSV : Apple chlorotic leaf spot virus

비슷한 경향이었다. 사과 왜성대목의 열처리에 의해 생장점 조직에서 바이러스가 제거되는 기작은, 고온에서 바이러스의 복제 또는 이동이 저해되고 식물체의 생장속도가 빨라 그 결과 생장점 부위로부터 바이러스가 제거되는 것으로 알려져 있다(Cooper and Walkey 1978).

고온처리에 의한 바이러스 제거율은 Ribavirin을 처리한 것보다 높았는데, 이는 식물세포가 바이러스에 의해 공격받을 때 고온처리에 의해 RNA silencing이 증가되었고 생장점 조직에서 바이러스 RNA가 분해되기 때문이다(Chellappan et al. 2005; Wang et al. 2008). 바이러스 제거 효율은 바이러스와 기주 식물체의 종류 및 복합 감염된 바이러스의 조합에 따라 달라지는 경향이었다(Knapp et al. 1995). 열처리에 의한 바이러스 제거 효율은 감염된 식물체의 바이러스 농도와 관련이 있었고, 바이러스 제거가 어려운 품종도 있었으며, 단독 감염보다 여러 종류의 바이러스가 복합 감염된 경우에 바이러스 제거가 더 어려운 것으로 조사되었다(Knapp et al. 1995; Paprstein et al. 2008).

본 연구에서 바이러스 검정 방법 비교시, ELISA 방법에 비해 RT-PCR 방법을 이용해서 바이러스를 검정하는 경우의 검출율이 약 30% 정도 높은 경향이었다(Fig. 3). ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)는 매우 민감한 검출법으로서 재현성 및 특이성이 매우 높으며, 무엇보다도 다량의 시료를 동시에 처리할 수 있다는 장점을 가지고 있다(Dixon-Holland and Katz 1991). 하지만 이 방법은 바이러스의 유전 물질을 직접적으로 증폭시켜 검출하는 RT-PCR 방법보다 실험조건이나 시료 상태 등 외부 환경에 의해 감도가 떨어질 수 있다. Joung 등(1997)은 감자바이러스(PVY)에 감염된 싹에서 바이러스 검정의 민감도를 비교하기 위해 RT-PCR 및 ELISA 검정 결과, RT-PCR 검정에서는 괴경에서 발아한 싹 조직을 1/100000 비율로 시료를 희석한 처리까지 희미한 band를 보여 검정의 민감도가 매우 높았다. ELISA 방법으로는 시료를 1/100 비율로 희석하였을 경우 감염여부를 판정할 수 있었고, RT-PCR이 ELISA보다 1000배 정도 높았다. 따라서 사과 왜성대목의 바이러스 검출을 위한 검정 방법은 RT-PCR 방법을 사용하는 것이 효율적이라고 판단되었다.

적 요

사과(*Malus pumila*)는 국내에서 가장 경제적으로 중요한 과수 중의 하나이다. 하지만 사과 바이러스 감염은 생산량을 감소시키고 수확량 손실과 과일 품질 저하와 같은 심각한 문제를 야기한다. 국내에 감염된 사과 바이러스 및 비로이드 종류는 *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple mosaic virus* (ApMV)와 *Apple scar skin viroid* (ASSVd) 등이 알려져 있다. 사과는 바이러스나 비로이드에 감염되어 있어도 대체로 이상한 징후가 발견되지 않아 바이러스로 인해 피해가 많았다. 본 연구는 사과 왜성대목 M.9 및 M.26의 무독묘 생산을 위하여 고온처리(37°C, 6주), 화학처리(Ribavirin) 및 생장점 배양하여 바이러스 제거 처리를 하였다.

바이러스 검출에 일반적으로 사용되는 방법은 효소면역

측정법(ELISA)과 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용하였는데, RT-PCR은 ELISA방법보다 10 ~ 30% 더 민감하였다. 사과 왜성대목 바이러스 검정 결과, 바이러스 제거 효율은 생장점 배양이 가장 높았다. 생장점 배양 후 바이러스 무병묘의 획득율은 30 ~ 40%로 높게 나타났다. 생장점 배양에서 사과 왜성대목 M.9은 ACLSV, ASPV 및 ASGV의 비율이 각각 45%, 60%, 50%로 높았고, 사과 왜성대목 M.26에서는 ACLSV, ASPV 및 ASGV의 감염율은 각각 40%, 55%, 55%였다. 이상의 결과, 사과 왜성대목에서 무독묘를 생산할 수 있는 가장 효과적인 방법은 생장점 배양에 의한 것으로 판단되었다.

사 사

본 연구는 농림식품기술기획평가원(IPET) 연구과제(세부과제번호 : 817023-03-3-HD020)의 지원으로 수행되었다.

References

Campbell AI (1962) Apple virus inactivation by heat therapy and tip propagation. Nature 195: 520

Chellappan P, Vanitharani R, Ogbe F, Fauquet CM (2005) Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. Plant Physiology 138:1828-1841

Cho KH, Shin JH, Kim DH, Park SJ, Kim SH, Chun JA, Kim MY, Han JH, Lee HC (2016) Elimination of Apple stem grooving virus from 'Mansoo' pear (Pyrus pyrifolia L.) by an antiviral agent combined with shoot tip culture. Journal of Plant Biotechnology 43:391-396

Cooper VC, Walkey DGA (1978) Thermal inactivation of Cherry leaf roll virus in tissue cultures of Nicotiana rustica raised from seeds and meristem tips. Annals of Applied Biology 88:273-278

Dixon-Holland DE and Katz SE (1991) Competitive direct enzyme-linked immunosorbent screening assay for the detection of sulfamethazine contamination of animal feeds. Journal Association of Analysis Chemistry International 74: 784-789

El-Dougdoug KA, Osman ME, Abdelkader HS, Dawoud RA, Elbaz RM (2010) Elimination of Hop stunt viroid (HSVd) from infected peach and pear plants. Australian Journal of Basic and Applied Science 4:54-60

Faccioli VC, Marani F (1998) Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In plant virus disease control. Hadidi A et al. (eds). American Phytopathological Society. 346-380

Feng C, Wang R, Li J, Wang B, Yin Z, Cui Z, Li B, Bi W, Zhang Z, Li M, Wang Q (2013) Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of in vitro-Grown shoot tips. Methods in Molecular Biology. 994: 463-482

Gambino G, Perrone I , Gribaudo I (2008) A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. Phytochemical Analysis. 19:520-525

Hansen A, Lane W (1985) Elimination of apple chlorotic leaf spot virus from apple shoot cultures by ribavirin. Plant Disease 69:134-135

Hansen AJ (1989) Antiviral chemicals for plant disease control. Critical Reviews in Plant Science 8:45-88

Hollings M (1965) Disease control through virus-free stock. Annual Review of Phytopathology. 3: 367-396

Hu G, Dong Y, Zhang Z, Fan X, Ren F, Zhou J (2015) Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. Plant Cell Tissue Culture 121:435-443

Joung YH, Jeon JH, Choi KH, Kim HS, Yi YS, Joung H (1997) An Effective Detection of Potato Virus Y Using RT-PCR Technique. Korean Journal Plant Pathology. 13: 219-224

Kim JS, Lee SH, Choi HS, Kim MK, Kwak HR, Nam M, Kim JS, Choi GS, Cho JD, Cho IS, Chung BN (2011) Occurrence of virus diseases on major crops in 2010. Research in Plant Disease. 17: 334-341

Kim MY, Chun JA, Cho KH, Park SJ, Kim SH, Lee HC (2017) Efficiency of virus elimination in apple callus (cv. Hongro) derived from meristem culture of dormant buds. Journal Plant Biotechnology 44:379-387

Kinard, G, Scott S, Barnett O (1996) Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses using RT-PCR. Plant Disease. 80: 616-621

Knapp E, Hanzer V, Weiss H, da Câmara Machado A, Wang Q, Weiss B, Katinger H, Laimer da Câmara Machado M (1995) Distribution of *Apple chlorotic leaf spot* virus in apple shoots cultivated in vitro. Acta Horticuture 386:187-194

KOSIS(Korea statistical Information Service), 2018

Lee G, Kim JH, Kim HR, Shin IS, Cho KH, Kim SH, Shin J, Kim DH (2013) Production system of virus-free apple plants using heat treatment and shoot tip culture. Research in Plant Disease 19: 288-293

Lee SH, Kwon YS, Shin HM, Nam SY, Hong EY, Kim BK, Kim DE, Cha , and Jae-Soon Cha (2017) Survey on Virus Infection for Commercial Nursery Trees of Major Apple Cultivars in Korea. Research in Plant Disease. 23(4): 355-362

Liu P, Zhang L, Zhang H, Jiao H, Wu Y (2013) Detection and molecular variability of Apple stem grooving virus in Shaanxi, China. Journal Phytopathology. 161: 445-449

Menzel W, Jelkmann W, Maiss E (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with complification of plant mRNA as internal control. Journal Virological Methods 99: 81-92

Murashige & Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology plant 15: 473-497

Paduch-Cichal E, Kryczynski S (1987) A low temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected plants. Journal Phytopathology 118: 341-346

Paprstein F, Sedlak J, Polak J, Svobodova L, Hanssan M, Bryxiova M (2008) Results of in vitro thermotherapy of apple cultivars.

Plant Cell Tissue Culture 94:347-352

Plopa C, Preda S (2013) Elimination of Apple mosaic virus by tissue culture of some infected apple cultivars. Acta Horticulture 981:517-522

Savitri WD, Park KI, Jeon SM, Chung MY, Han JS, Kim CK (2013) Elimination of Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) from meristem tip culture combined with prolonged cold treatment. Horticulture Environment Biotechnology. 54: 177-182

Smith PR, Challen D I (1972) Aetiology of the rosette and decline diseases of peach and interactions between *Prunus* necrotic ringspot, Prune dwarf, and dark green sunken mottle viruses. Australian Journal of Agriculture Research. 23:1027-1034

Tan R, Wang L, Hong N, Wang G (2010) Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. Plant Cell Tissue and Organ Culture 101: 229-235

Verma N, Ram R, Zaidi AA (2005) In vitro production of Prunus necrotic ringspot virus-free begonias through chemo-and thermotherapy. Science Horticulture 103:239-247

Wang L, Wang G, Hong N, Tang R, Deng X (2006) Effect of thermotherapy on elimination of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus for in vitro-cultured pear shoot tips. Horticulture Science 41:729-732

Wang QC, Cuellar WJ, Rajamäki ML, Hirata Y, Valkonen JPT (2008) Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Molecular Plant Pathology 9:237-250

Wood GA (1979) Virus and Virus-Like Diseases of Pome Fruits And Stone Fruits in New Zealand. No. 226. Bulletin, Department of Scientific and Industrial Research, Wellington. 87