

풋고추 수경재배에서 발생하는 tobamovirus의 특성

최국선* · 김재현 · 김정수 · 김현란
원예연구소 원예환경과

Tobamoviruses of Green Peppers Growing on Hydroponic Systems

Gug-Seoun Choi*, Jae-Hyun, Kim, Jeong-Soo, Kim and Hyun-Ran, Kim

Dept. of Horticultural Environment, National Horticultural Research Institute,
Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

(Received on June 2, 2004)

Incidence of tobamovirus diseases was 100% at late growth stage of green pepper on hydroponic systems in plastic house. Infection frequency of the diseases showed 34% of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), 41.5% of *Tobacco mild green mottle virus* (TMGMV), and 24.5% of the co-infected viruses. The two viruses specifically reacted in DAS-ELISA prepared with each polyclonal antibody. A total of 77 pure tobamovirus isolates obtained from the crops was tested for pathotype determination. The isolation frequency of tobamovirus pathotype P₀ and P_{1,2} was 61% and 39%, respectively. All TMGMV isolates belonged to the pathotype P₀. In restriction enzyme analysis of the cDNAs synthesized with coat protein gene of PMMoV pathotype P₀ and P_{1,2}, the former had two *TaqI* sites but the later had one.

Keywords ; hydroponic system, pathotype, pepper, PMMoV, TMGMV, tobamovirus

고추(*Capsicum* spp.)는 비타민 A와 C가 풍부한 주요 영양원이며, 세계적으로 1,596,219 ha에서 널리 재배되고 있다(FAOSTATE DATABASE, 2002). 우리나라의 고추재배 면적은 2003년 57,502 ha이며, 이 중 풋고추의 재배면적은 4,620 ha이다(www.nags.go.kr). 그러나 최근 시설재배 면적의 증가로 염류장해 및 토양 병해에 따른 연작장해의 피해가 증가되고 있다. 연작장해 방지 및 고품질 안전 생산의 일환으로 채소 작물의 수경재배면적은 점차 증가하고 있으며, 농촌진흥청 집계자료에 의하면 2003년 풋고추 수경재배 면적은 76농가 26 ha로 점차 증가 추세이며, 이에 따른 병해 종류 및 발생양상의 변화가 예상되고 있다.

세계적으로 고추에 발생하는 바이러스는 *Cucumber mosaic virus*(CMV) 등 50여 종이 보고되었다(Green과 Kim, 1991), 국내 고추에서 발생하는 바이러스는 *Alfalfa mosaic virus*(AIMV), CMV, *Potato virus Y*(PVY), *Tobacco mosaic*

virus(TMV), *Broad bean wilt virus*(BBWV), *Pepper vein chlorosis virus*(PVCV)가 보고되었다(한국식물병리학회, 1998). 최근 고추 바이러스 병의 종류를 재조사한 결과 국내에 발생하는 주요 바이러스는 *Pepper mottle virus*(PepMoV), CMV, *Broad bean wilt virus II*(BBWV II), *Pepper mild mottle virus*(PMMoV), *Tobacco mild green mottle virus*(TMGMV) 등이 확인되었다(원예연구소, 2002). 이들 바이러스 중 PMMoV와 TMGMV는 *Tobamovirus*에 속하는 바이러스로써 병원성이 강하고 물리적으로 안정화되어 있어 종자·토양·접촉 전염되는 바이러스이다(Gibbs, 1988; Wetter, 1987). 1993년 미국에서는 수경재배 고추에서 *Tomato mosaic virus*(ToMV)가 발생되어 심한 피해를 주었고, 특히 이 바이러스가 오염된 양액을 통하여 고추 뿌리로부터 감염시 더 심한 손실을 받는다고 하였다(Schuerger, 1995).

따라서 본 연구에서는 국내 고추 수경재배에서 tobamovirus의 발생 양상, 분리 빈도, 혈청학적 유연관계 및 pathotype 구분 등 특성을 구명하여 풋고추 수경재배에서 발생하는 이들 바이러스 종에 대한 저항성 품종 육성 등 예방대책을 위한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

*Corresponding author
Phone)+82-31-290-6237, Fax) +82-31-295-9548
E-mail)choigs@rda.go.kr

재료 및 방법

바이러스병 조사. 2002년 10월부터 2003년 3월까지 우리나라 주요 풋고추 재배지역인 경남지역의 수경재배 농가에서 바이러스병 발생양상을 시기별로 발병율을 조사하였다. 조사된 고추 품종은 생식용으로 많이 이용되고 있는 녹광이었다.

바이러스 분리. 고추 수경재배 포장에서 모자이크 등을 나타내는 증상 주를 상기 조사 기간 중 채집하여 이들 각각의 시료를 2% phosphotungstic acid로 염색하여 dipping 방법으로 전자현미경(Carl Zeiss LEO 906)에서 tobamovirus 입자를 확인하였다. Tobamovirus 입자가 확인된 시료는 *Nicotiana glutinosa* 또는 *N. tabacum* cv. Ky 57에서 단일국부병반으로 바이러스를 순수 분리하였다. 순수 분리된 바이러스는 *N. occidentalis*에 증식한 후 바이러스 동정 및 tobamovirus의 pathotype 구분에 이용되었다.

항혈청 검정. TMGMV-KP, PMMoV, TMV-U1 및 ToMV의 항혈청을 이용하여(Choi 등, 2002) 이들 바이러스에 대한 DAS-ELISA 방법(Clark와 Adams, 1977)으로 항원항체의 유연관계를 검정하였다.

RT-PCR. 채집한 고추 잎 또는 담배에서 증식된 시료의 전체 핵산은 Choi 등의 방법(1998)으로 추출하여 RT-PCR을 실시하였다. 이 때 사용된 primer의 종류는 Table 1과 같다. 역전사 효소 반응은 42°C에서 40분한 후, DNA 합성기(GeneAmp PCR System)에서 다음과 같은 과정으로 DNA를 증폭하였다. Denaturation(95°C, 45초), annealing(50°C, 1분), extension(72°C, 1분)의 과정으로 35회 반복하여 증폭된 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 특이적 PCR 산물의 존재 유무를 확인하였다.

Pathotype 구분. 단일국부병반 분리에 의하여 확인된 PMMoV의 48분리 주와 TMGMV 29분리 주에 대한 tobamovirus의 pathotype은 Boukema(1984) 방법에 따라 *C. annuum* Early Calwonder, *C. annuum* Bruinsma Wonder, *C. frutescens* Tobasco, *C. chinese* PI 159236 and *C. chacoense* PI 260429에 접종하여 이들 검정식물의 병징 반응으로 구분하였고 분리빈도를 산출하였다. PMMoV에서 구분한 2종의 pathotype으로부터 외피단백질유전자에 상응하는 cDNA 부위를 합성하여 *TaqI* 등 제한효소를 처리하여 physical map을 작성하여 비교하였다.

결과 및 고찰

바이러스병 발생. 국내 고추 주요 재배지역인 경남의 령 수경재배 농가에서 전 작기 100% tobamovirus병이 발

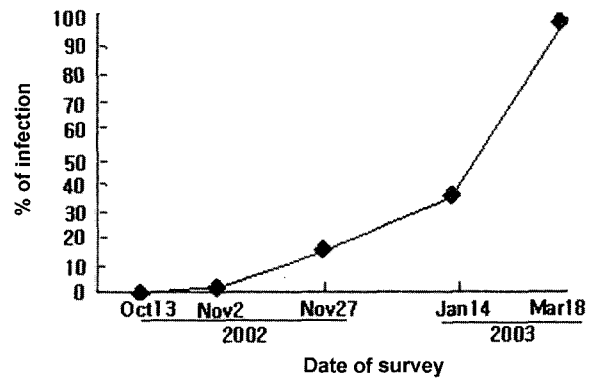


Fig. 1. Incidence of tobamoviral diseases, *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) and *Tobacco mild green mottle virus* (TMGMV), in pepper cv. 'Nokgaung' growing on hydroponic system during middle October 2002 to early March 2003.

생된 포장을 선정하여 시기적 재발생 양상을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 2002년 10월 중순 녹광 고추 묘를 정식시 바이러스 증상은 관찰할 수가 없었으나, 11월 초순에는 1%, 11월 하순에는 15%, 2003년 1월 중순에는 37%가 발생되었고, 3월 중순에는 100% 발생되는 경향을 보였다. 동일 고추 종자 및 펠라이트 베드에서 전 작기 잔재물을 수거하여 *N. glutinosa*에 접종한 결과, 잔재물 시료에서는 담배 접종 엽에 국부병반을 형성하여 바이러스의 생물 활성은 손실하지 않은 상태였으나 동일 고추 종자에서는 바이러스의 활성은 없었다(자료 생략). 따라서 물리적으로 안정화 되어 있고 토양 및 접촉전염이 되는 tobamovirus 전염 특성(Gibbs, 1988; Wetter, 1987)으로 미루어 볼 때, 전작기 이 바이러스의 발병이 확인되었던 이 포장에서 바이러스 병의 1차 전염원은 tobamovirus에 감염된 고추 뿌리 등 잔재 또는 펠라이트 등 수경재배 용기에 오염된 tobamovirus가 재 발생된 것으로 판단된다.

이 수경재배 포장에서 바이러스병 발생양상은 베드를 따라 일렬로 발생하는 경향을 보였으므로 2차 전염은 고추 순 유인 등 작업과정에서 접촉전염과 또한 바이러스에 오염된 양액으로부터 바이러스 병이 확산된 것으로 여겨진다.

바이러스 종류 및 감염빈도. 고추 수경재배 포장에서 바이러스 증상을 보이는 94시료를 채집하여 전자현미경으로 검정한 결과 100% tobamovirus 입자가 확인되었다. 이들 각각의 시료를 tobamovirus의 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, TMGMV 41.4%, PMMoV 34%, 이들 2종 바이러스의 복합감염이 24.5%였으나, TMV와 ToMV는 검출되지 않았다. 또한 조사 포장에서는 진딧물 전염성 바이러스인 CMV, PepMoV 및

BBWVII는 확인되지 않았다. 고추에서 병징별 특성은 TMGMV에 감염된 고추 잎은 황화, PMMoV는 모틀 증상을 나타내는 경향을 보였다. 이들 2종의 바이러스가 복

Table 1. Sequence of upstream and downstream primers for detection of tobamoviruses in the experiment

Primer	Sequence (5'-3')
TMGMV	(+)TCGAGTACGTTTTAATCAAT, (-)ATTTTAGGAAATCTCACAAAC
TMV	(+)GTTTTAATTATGTCTTACAG, (-)TGAGGTAGTCAAGATGCATA
PMMoV	(+)CTACTTATGTAGTAGCTGC, (-)ATGACTAATGCAAGTCTTG
ToMV	(+)AATATGTCCTACTCAATCAC, (-)GTGTGTTTTAGAAACACAAA

Table 2. Infection frequency of tobamoviruses, *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) and *Tobacco mild green mottle virus* (TMGMV), in the peppers growing on hydroponics

Tobamovirus	No. of plants infected ^a	% of plants infected
PMMoV	32	34.0
TMGMV	39	41.5
TMGMV + PMMoV	23	24.5
Total	94	100

^aIdentification of the viruses on the collected samples was conducted by RT-PCR.

Table 3. Comparative absorbances of 4 tobamoviruses in double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbant assay prepared with each polyclonal antibody^a

Virus ^b concentration	Absorbance value ^d at OD _{405 nm}				
	TMGMV	PMMoV	TMV	ToMV	
TMGMV	10 ug	1.1	0.0	0.2	0.7
	1	0.3	0.0	0.0	0.1
	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
PMMoV	10 ug	0.0	0.8	0.4	0.0
	1	0.0	0.2	0.1	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
TMV-U1	10 ug	0.2	0.2	0.8	0.0
	1	0.0	0.0	0.2	0.0
	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
ToMV	10 ug	1.2	0.0	0.4	1.0
	1	0.5	0.0	0.2	0.3
	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1
Control ^c		0.0	0.0	0.0	0.0

^aand ^bAfter Choi *et al.* (2002).

^cControl was the healthy sap of tobacco.

^dThe each value represents an average mark on three replicated times of the absorbances in ELISA reader (Tecan Spectra).

합 감염시 병징의 상승효과는 없었으며, 또한 바이러스의 종류와 상관없이 고추 선단 부위가 고사되는 식물체도 관찰되었다.

혈청학적 유연관계. TMGMV-KP, PMMoV, TMV-U1 및 ToMV의 항혈청을 이용하여(Choi 등, 2002) 제작된 DAS-ELISA로 항원항체의 유연관계의 비교는 Table 3과 같다. 이들 바이러스에 대한 ELISA 반응에서 동일한 항원에 대해서는 상대적으로 높은 흡광도를 나타냈고, 타 항원의 종류 및 농도 차이에 따라 흡광도의 정도는 달리 하였다. TMGMV 항체를 이용한 ELISA 반응에서 ToMV 항원과는 높은 흡광도를 나타낸 반면, 10 ug의 PMMoV 항원에서도 반응을 나타내지 않아 이들 2종류의 바이러스에 대한 공통 항원기는 적은 것으로 유추될 수가 있다. 이들 tobamovirus에 대한 항체들 중, 특히 PMMoV의 항체는 타 종의 tobamovirus에 대하여 가장 약한 항원항체 반응을 나타냈고 TMV-U1의 항체가 타 항원에 대하여 비교적 강한 항원항체반응을 보였다. 이것은 Wetter 등(1987)이 보고와 일치한 tobamovirus에 존재하는 공통항원기의 차이로 보인다. 이들의 결과로 고추에 발생하는 tobamovirus의 종 구분은 항원의 종류 및 농도 차이에 따른 항원항체 반응에서 나타나는 ELISA의 흡광도로 바이러스 종류를 식별이 가능하였다.

Pathotype 구분. 순수 분리한 PMMoV의 48분리 주와 TMGMV의 29분리 주에 대한 Boukema(1984)의 tobamovirus pathotype 구별 방법에 따라 L-저항성 유전자형이 다른 *C. annum* Early Calwonder를 포함한 5종의 *Capsicum* spp.에서 병징 발현에 따라 pathotype을 구분하였다(Table 4). 그 결과 PMMoV의 48분리주 중 P₀은 18(37.5%), P_{1,2}는 30(62.5%)의 빈도로 pathotype이 분리되었으며, TMGMV의 29분리 주 모두 P₀으로 확인되었다. PMMoV에서 구분한 pathotype P₀ 및 P_{1,2}로부터 외피단백질유전자에 상

Table 4. Isolation frequency of tobamovirus pathotypes occurred in pepper growing on hydroponics

Pathotype ^a	Total	No (%) of tobamovirus isolates ^b	
		PMMoV	TMGMV
P ₀	47 (61.0)	18 (37.5)	29 (100)
P ₁	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
P _{1,2}	30 (39.0)	30 (62.5)	0 (0.0)
P _{1,2,3}	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

^aAfter Boukema (1984).

^bThe biologically pure isolates were identified with RT-PCR and then were inoculated on *Capsicum annum* Early calwonder, *C. annum* Bruinsma Wonder, *C. frutescens* Tobacco, *C. chinese* PI 159236 and *C. chacoense* PI 260429.

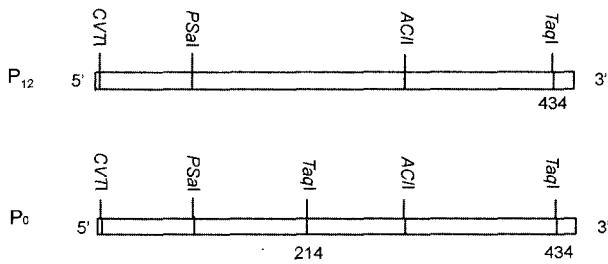


Fig. 2. Analysis of restriction enzymes map of RT-PCR amplified cDNAs using PMMoV primers. The cDNAs were synthesized to coat protein genes of PMMoV pathotype P₀ and P₁₂, respectively.

응하는 cDNA 부위를 합성하여 제한효소를 처리하여 physical map을 작성하여 비교한 결과(Fig. 2), *TaqI*의 인식부위가 P₀에서는 두 위치에 존재하였으나 P₁₂에는 단지 한 위치에만 존재하였다. 이와 같은 결과는 pathotype 1,2인 PMMV-S에 대한 제한효소 분석과 일치하였다(Tenllado 등, 1994).

이 실험에서는 P₁와 P_{1,2,3}의 pathotype은 지금까지는 확인되지 않았으므로 국내에 이들 2종 이외의 pathotype 발생 유무에 대해서는 계속 조사를 하고 있으며, tobamovirus pathotype들과 기주식물간의 상호작용에 대한 저항성 관련 기작구명의 연구가 급후 수행되어야 할 것이다.

요 약

풋고추 수경재배에서 tobamovirus 병의 발병률은 생육 후기 단계에서 100%였다. 바이러스 종류별 감염 빈도는 PMMoV 34%, TMGMV 41.5% 및 이들 2종의 바이러스 복합감염이 24.5%로 나타났다. 다클론 항체로 제작된 DAS-ELISA에서 각각의 항체에 대하여 특이적인 반응을 보였다. 수경재배하는 풋고추에서 77개의 tobamovirus를 순수 분리하여 tobamovirus의 pathotype을 구분한 결과, P₀은 61% 및 P_{1,2}는 39% 빈도로 분리되었다. 모든 TMGMV 분리주는 pathotype P₀에 속하였다. PMMoV에서 구분된

pathotype P₀ 및 P_{1,2}의 외피단백질유전자에 상응하는 cDNA를 합성하여 제한효소에 대한 분석을 실시한 결과, P_{1,2}는 *TaqI* 위치가 두 곳에 존재하였으나 P₀은 단지 한 곳에만 존재하였다.

참고문헌

Boukema, I. W. 1984. Allelism of gene controlling resistance to TMV in *Capsicum L.* *Euphytica* 29: 433-439.

Choi, G. S., Kim, J. H., Ryu, K. H., Choi, J. K., Kim, J. S., Chung, B. N., Kim, H. R. and Choi, Y. M. 2002. First report of *Tobacco mild green mottle virus* infecting pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 18: 323-327.

Choi, J. K., Kim, H. J., Hong, J. S. Kim, D. W. and Lee, S. Y. 1998. Identification and differentiation of cucumber mosaic virus isolates in Korea. *Korean J. Plant Pathol., J.* 14: 7-12.

Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

Gibbs, A. J. 1988. Tobacco mild green mosaic virus. *Plant Virus Database VIDEdb* no 71010011.

Green, S. K. and Kim, J. S. 1991. Characterization and control of viruses infecting peppers: a literature review. *AVRDC Technical Bull.* No.18: p60.

한국식물병리학회. 1998. *한국식물병목록*. 제3판. 436pp.

Schuerger, A. C. 1995. Effects of temperature on disease development of tomato mosaic virus in *Capsicum annum* in Hydroponic Systems. *Plant Dis.* 79: 880-885.

Tenllado, F., Garcia-Luque, I., Serra, M. T. and Diaz-Ruiz, J. R. 1994. Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistance genotype of pepper by RT-PCR and restriction analysis. *J. of Vir. Methods* 47: 165-174.

Wetter, C. 1987. Pepper mild mottle virus. *Plant Virus Database VIDEdb* no 71010007.

Wetter, C., Dore, I. and Bernard, M. 1987. Bell peper mottle virus, a distinct tobamovirus infecting pepper. *J. Phytopathol.* 119: 333-344.

원예연구소. 2002. 시험연구보고서. 1477pp.