

석량풋콩재배지에서의 동부모자이크바이러스병의 발생도 및 풋콩병해모니터링과 동부모자이크 바이러스의 순화

조 의 규*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부

Severity of Cowpea mosaic virus and Putkong Disease Monitoring and Purification of Cowpea mosaic virus

Cho, Eui-kyoo*

Major in Agricultural Biology, School of Bioresource Science, Andong National University,
Andong, Gyeongbuk 760-749, Korea

(Received on December 4, 2006)

One hundred and eighty-six leaves of soybean cv. Seokryangputkong that showed mild mosaic symptoms were collected randomly and ELISA tests were conducted with those leaf samples to screen the presence of Cowpea mosaic virus (CPMV). Ninety-three out of 186 samples reacted positively to CPMV, but those samples did negatively to Soybean mosaic virus (SMV). At least, 55 leaf samples revealed higher values than that of positive control. The results strongly confirmed that CPMV occurred severely in soybean cv. Seokryangputkong. However, a question is raised on the primary reservoir and vector for transmission of this virus. Since the farmer changes seeds every year, seed transmission is excluded. The virus was also purified, the analysis of coat protein conformed the virus of cowpea mosaic virus and UV absorption pattern confirmed that the causal virus of mosaic disease in soybean putkong was cowpea mosaic virus.

Keywords : Soybean cv. 'Seokryangputkong', ELISA, Cowpea mosaic virus (CPMV), Soybean mosaic virus (SMV)

경북 청송군 현서면에서는 1996년부터 풋콩 가공공장 콩나라를 설립하여 풋콩을 1년 2모작으로 재배하고 있다. 재배되고 있는 풋콩 품종은 모두 일본에서 매년 수입하고 있는 석량과 미원이며, 한국에서 육성된 품종은 2006년 현재 보급되지 못하고 있다. 한국에서 콩에 발생하고 있는 바이러스병은 Alfalfa mosaic virus에 의한 모자이크병과 Soybean mosaic virus(SMV)에 의한 괴저모자이크병, Soybean stunt virus 의한 오갈병이 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004). 이 중 가장 대표적인 바이러스병은 SMV에 의한 모자이크병이며, 2003년에 Cowpea mosaic comovirus에 의한 풋콩의 감염이 추가로 보고되었다(Cho와 Lee, 2003; 이, 2001). 이 조사에서는 경북 청송지방의 대단위 풋콩재배단지의 석량 품종에서 Cowpea mosaic virus(CPMV) 감염이 확인되었기에, 그 방제대책

수립을 위한 자료로 제공할한 목적에서 보고한다.

재료 및 방법

시료의 채집. 청송군 현서면 김규수씨의 밭에서 모자이크 증상을 나타내고 있는 석량풋콩의 이병잎 중에서 임의로 186점의 잎을 채집하여 사용하였다. 콩모자이크병의 감염을 피하기 위하여 콩모자이크바이러스(SMV)의 병징을 나타내는 유묘는 밭으로 이식하지 않도록 하였다.

ELISA 검정 방법. CPMV의 감마글로불린을 구입하여 ELISA plate에 처리하여 사용하였다. ELISA 검정방법은 다음과 같았다.

1. 감마글로불린을 coating buffer에 2 µg/ml 농도가 되게 희석하였다. 혹은 kit manual에 있는 희석배수로 희석하였다.
2. 희석된 감마글로불린을 각 well에 200 µl씩 분주한 다음 plate를 랩으로 싸거나 물에 적신 화장지를 바닥

*Corresponding author

Phone) +82-54-820-5507, Fax) +82-54-823-1628

E-mail) ekcho@andong.ac.kr

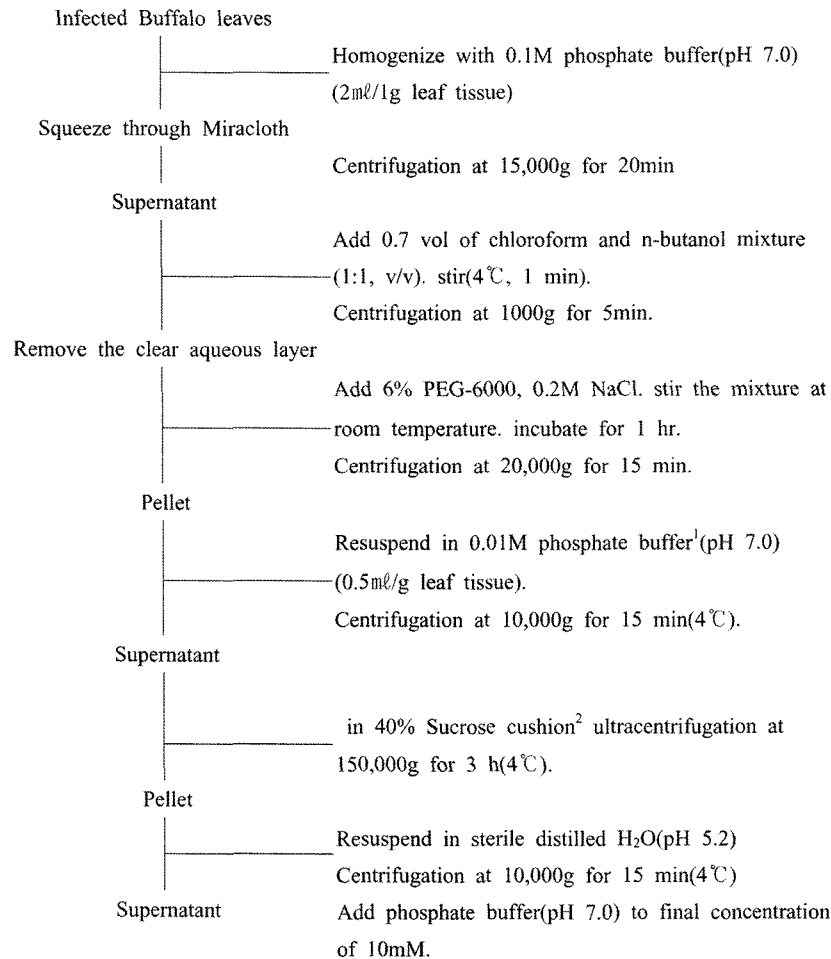
- 에 간 플라스틱통에 넣어 뚜껑 닫고 37°C에서 3시간 감작시켰다.
3. 싱크대에서 plate를 잡고 뒤집어서 well을 비운 다음 PBST를 채웠다. 3분 정도 가만히 놔두었다가 plate를 뒤집어 well을 비웠다. 실험대 위에 키친 타올을 두겹게 깔아놓고 plate를 뒤집어 잡은 상태에서 키친 타올 위에 힘껏 내리쳐서 well에 남아있는 물기를 최대한 제거하고 well을 뒤집어놓고 4번 정도 씻어내었다.
 4. 꽃콩 잎 1 g을 extraction buffer 10 ml에 넣고 마쇄하였다. 또는 1.5 ml tube 뚜껑 닫히는 부분에 잎을 올려놓고 뚜껑을 닫으면 잎에 구멍 뚫리면서 tube안으로 원반모양의 잎 조각(잎 disc)이 들어가도록 하였다. 한 tube에 3~4개의 잎 disc를 넣고 extraction buffer 600 µl 넣은 다음, 200 µl짜리 yellow tip 끝을 불로 녹여 뭉뚝하게 하여 tube에 넣고 잎을 갈아 즙액을

만들었다. 1,200 rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액을 well에 200 µl씩 넣었다. Extraction buffer와 바이러스에 감염되지 않은 잎 즙액을 negative 대조구로, mosaic virus 현탁액을 positive control로 사용하였다. Sample을 넣은 ELISA plate를 37°C에서 3시간, 냉장실에서 하룻밤 동안 보존한 후 반응을 조사하였다.

CPMV의 순화는 CPMV isolate B를 콩품종 ‘버펄로’에 증식하고(Steere, 1956; Halbert, 1963) 방법을 가감하여 순화하였다(Fig. 2).

결과 및 고찰

청송군 현서면에서 석량 품종의 꽃콩을 재배하는 포장에서 모자이크 증상을 약하게 보이는 콩 잎을 채집하여



1. 0.01M phosphate buffer containing 2mM EDTA and 2mM-mercaptoethanol and centrifuge at 10,00g for 15 min
2. 40% Sucrose .in 0.1M phosphate buffer, pH 7.0

Fig. 1. Procedure for the purification of B-1 isolate.

Table 1. Reaction value of 93 leaf samples collected from soybean cv. Seokryangputkong plants grown at Cheongsong-gun to *Cowpea mosaic virus* tested by ELISA

Samples ^a	Extraction buffer	Healthy plants	<i>Cowpea mosaic virus</i>
0.666~1.606	0.172	0.169	1.270

^aLeaves of soybean plants showed mild mosaic symptom.

CPMV에 대한 ELISA 검정을 한 결과, 186개의 시료 중 절반에 해당하는 93개의 콩잎이 양성반응을 나타내었다 (Table 1). 특히 약 30%에 해당하는 55개의 콩잎에서는 CPMV 현탁액보다도 높은 반응값을 나타내었다.

CPMV 순화는 이미 보고된 방법을 가감하여 다음과 같이 바이러스를 순화하였다(이, 2001).

전기영동(SDS-PAGE)에 의한 순화된 B-1 isolate의 외피 단백질 분석

4% SDS(sodium dodecyl sulfate) 및 2% β -mercaptoethanol을 포함하는 0.01M 인산완충액(pH 7.0)과 순화된 바이러스액을 1:1(v/v)의 비율로 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후 10% glycerol과 0.02% bromophenol blue를 첨가하여

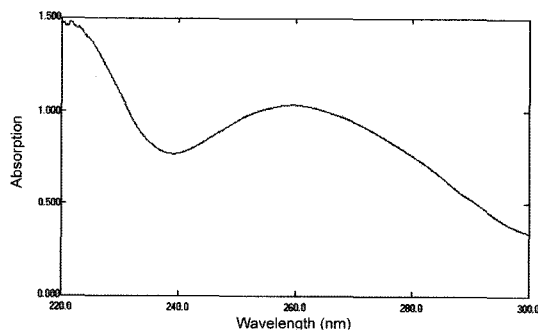


Fig. 2. Ultra-violet absorption spectra of purified virus from B-1 isolate.

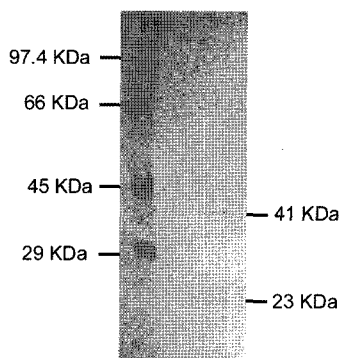


Fig. 3. Coat protein pattern of purified virus on 12% SDS-PAGE. Lane A: molecular weight marker proteins B: purified virus from isolate B.

전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동겔은 12% SDS-discontinuous polyacrylamide 겔을 사용하였고, 0.3% tris, 1.44% glycine, 0.1% SDS를 증류수에 녹여 전기영동용 완충액으로 사용하였다. 전기영동은 각 Well당 시료를 40 μ l 씩 넣고 200V, constant voltage로 3시간 동안 전기영동하였다(Fig. 3).

전기영동이 끝난 겔을 20 ml의 염색용액(1% Coomassie blue R 250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid in dH₂O)에 넣고 3시간동안 염색한 후, 50 ml의 탈색용액(10% methanol, 10% glacial acetic acid in dH₂O)에 넣어서 수 시간 탈색시켜 단백질 밴드를 발색시켰다. 겔을 image analyzer로 분석하여 단백질 밴드의 분자량을 측정하였다.

순화된 바이러스의 자외선 흡수패턴을 spectrophotometer로 측정한 결과 전형적인 바이러스 흡광도를 나타내었다 (Fig. 2). 대부분의 식물 바이러스가 260~265 nm에서 최대치, 240 nm에서 최소치를 나타내기 때문에 순화 액의 자외선 흡수패턴으로 바이러스의 존재를 확인하였고, 순화된 바이러스를 역염색하여 전자현미경으로 검정한 결과 약 24 nm의 구형 바이러스 입자를 확인할 수 있었다(이, 2001).

SDS-PAGE로 바이러스의 외피단백질을 분석한 결과 약 41 KDa과 23 KDa 분자량의 단백질 밴드가 확인되었다. 이는 Wu 등(1971)이 보고한 CPMV의 B 성분과 M 성분의 외피단백질로 판명되며, T 성분은 발견되지 않았다.

이상과 같은 결과를 종합하여 볼 때 B-1 isolate는 Comovirus 그룹의 CPMV로 동정되었다. 그러므로 국내 콩 포장에 발생하는 바이러스 병에 *cowpea mosaic virus*에 의한 모자이크병도 추가되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

석랑꽃콩 품종의 콩밭에서 모자이크 증상이 약하게 나타난 186개의 잎을 채집하여, *Cowpea mosaic virus*(CPMV)에 대한 ELISA 검정을 하였다. 그 결과 93개의 시료가 양성반응을 보였으며, 이 가운데 55개의 시료는 매우 높은 바이러스 밀도를 나타내고 있었다. 이러한 결과는 석랑꽃콩 품종의 동부모자이크병은 ELISA 검정, 바이러스 순화, 전자현미경검정 결과와 바이러스 표피 단백질분석 결과 *Cowpea mosaic virus*에 의한 병해로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2004학년도 안동대학교 학술연구지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Cho, E. K. and Goodman, R. M. 1979. Strains of *soybean mosaic virus*: Classification based on virulence in resistant soybean cultivars. *Phytopathology* 69: 467-470.
- Cho, E. K. and Goodman, R. M. 1982. Evaluation of resistance in soybeans to *soybean mosaic virus* strains. *Crop science* 22: 1133-1136.
- Cho, E. K. and Lee, S. H. 2003. *Cowpea mosaic virus* in vegetable soybean in Korea. *Plant pathol. J.* 19: 166-170.
- 조점덕, 김정수, 김현란, 정봉남, 류기현. 2006. Tomato spotted wilt virus를 위한 간편한 식물바이러스 핵산진단법: Virion captured/PT-PCR (VC/RT-PCR). *식물병연구* 12: 139-143.
- Halberdt, T. T. 1963. Precipitation of plant viruses by polyethyleneglycol. *Phytopathology*. 53: 362.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명목록. 제4판. 779 pp.
- Kamen, A. and Jagger, C. P. 1978. *Cowpea mosaic virus*. CMI/AAB. Descriptions of Plant viruses. No. 197.
- 이기운, 최장경, 장무웅, 조의규, 최창원. 2001. 한국식물병원체 3 식물바이러스. 농업과학기술원, 서울, 157 pp.
- 이신호. 2001. 콩에서의 cowpea mosaic comovirus 동정, 안동대학교 대학원 석사학위논문 37 pp.
- Steere, R. L. 1956. Purification of tobacco ringspot virus *Virology* 25: 487-494.
- Sinclair, J. B. 1982. *Compendium of soybean diseases*. American plant pathological Society. 104 pp.