

## 박과 작물 종자전염 바이러스 3종(CGMMV, ZGMMV, KGMMV)의 간편한 동시진단 VC/RT-PCR 유전자 진단

조점덕 · 김정수\* · 이신호 · 정봉남

원예연구소 원예환경과

### Triplex Virion Capture (VC)/RT-PCR for Three Seed Transmissible Tobamoviruses of CGMMV, ZGMMV and KGMMV Occurring on Cucurbitaceae

Jeom Deog Cho, Jeong Soo Kim\*, Sin Ho Lee and Bong Nam Chung

Horticultural Environment Division, National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 441-440, Korea

(Received on May 26, 2007)

The genetic diagnostic method of virion capture (VC)/RT-PCR was developed for the simultaneous detection of three rod shaped viruses of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV) and *Zucchini green mottle mosaic virus* (ZGMMV) transmitted by seed in Cucurbit. Out of 12 primer combinations for the three tobamoviruses, a primer set of CGMMV-C724, KGMMV-K513 and ZGMMV-Z407A was useful for mono and triplex VC/RT-PCR. The triplex VC/RT-PCR for the three tobamovirus in Cucurbit could detect specifically without interference among primers and/or plant species of watermelon, gourd, cucumber, melon, pumpkin, squash and *Nicotiana benthamiana*.

**Keywords :** CGMMV, KGMMV, Triplex, VC/RT-PCR, ZGMMV

우리나라 주요 재배 박과 작물은 수박, 오이, 멜론, 호박 등이며 이외에 수박 대목으로 사용하는 박이 있다. 박과 작물에 발생하여 피해를 입히는 바이러스는 오이녹반모자이크바이러스(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) 등 종자전염하는 막대형 바이러스 3종, 수박모자이크바이러스(*Watermelon mosaic virus 2*, WMV2) 등 진딧물 전염하는 사상형 바이러스 3종 그리고 오이모자이크바이러스(*Cucumber mosaic virus*, CMV), 멜론괴저반점바이러스(*Melon necrotic spot virus*, MNSV) 등 구형 바이러스를 포함하여 모두 8종이다(한국식물병리학회, 2004). 이 중에서 종자전염하는 바이러스인 CGMMV, 쥬키니녹반모자이크바이러스(*Zucchini green mottle mosaic virus*, ZGMMV) 그리고 큐리녹반모자이크바이러스(*Kyuri green mottle mosaic virus*, KGMMV) 3종은 외국에서 유입되는 종자에 대해 검역대상 바이러스로 취급되고 있으며, 특히 CGMMV는 수박 연작 포장에서 토양전염에 의하여 지속적으로 발생하고 있다(Choi, 2001).

수박에 발생하는 바이러스는 주로 CGMMV인데, 이 바이러스는 수박 대목으로 사용하는 박 종자의 종자전염에 기인하는 경우가 대부분이다. 1997년에 수박에 CGMMV가 전국적으로 463 ha 발생하여 막대한 경제적 손실이 발생하였으며 이때 발생한 바이러스 전염원은 중국에서 생산하여 수입한 수박 대목용 박이었다. 그 후 2002년 논산과 창원지역에서 재배한 수박 21 ha에 CGMMV가 발생하였으며 이때 사용한 수박 종자는 바이러스에 감염되지 않았으나 대목용 박 종자의 CGMMV 감염률이 약 83%로 병 발생의 중요한 역할을 하였다. 또한 2004년과 2005년에 걸쳐 서천, 논산, 전주지역 15 ha의 수박에 CGMMV가 발생하였으며 발생한 바이러스는 CGMMV 뿐만 아니라 진딧물 전염 바이러스인 WMV2 복합감염되어 피해가 더욱 컸었다(미발표 자료). 이와 같이 CGMMV의 종자전염에 의한 바이러스 발생은 1997년 이 후에도 지속적으로 발생하고 있음을 알 수 있다. 수박, 박 이외의 주요 박과 작물인 오이에서도 CGMMV와 KGMMV가 발생하고 있으며(Ko 등, 2006), 멜론에서는 2006년에 진주지역에서 국내 처음으로 CGMMV 발생이 확인되었다(Cho 등, 2006).

\*Corresponding author

Phone) +82-31-290-6234, Fax) +82-31-290-0406

E-mail) kimjsoo@rda.go.kr

일반적으로 RT-PCR 유전자 진단기술은 식물체로부터 전체 핵산을 추출한 다음 핵산 증폭과정을 거치게 되는데 진단감도는 매우 높으나 시간, 노동력 및 비용이 많이 드는 진단법이다(Zeng 등, 2002; Li 등, 2005). 따라서 이와 같은 단점을 극복하기 위하여 SDT/RT-PCR(Suehiro 등, 2005)이 개발되었으나 식물체 종류 및 프라이머간의 간섭현상이 발생하는 문제점이 있었다. 면역학적 방법을 결합한 IC/RT-PCR(Nolasko 등, 1993; Sharman 등, 2000; Kim 등, 2006)은 진단효율이 높고 간섭작용이 거의 없어 매우 개선된 방법이라고 할 수 있으나 특이성을 갖는 항체가 필요하고 항체 처리시간이 3-4시간 소요되어 사용상 다소 번거로움이 있다. 핵산추출이나 항체가 필요치 않는 VC/RT-PCR 유전자 진단법은 *Tomato spotted wilt virus*(TSWV)를 대상으로 국내 최초로 개발하였는데 감염 식물체 즙액을 10만 배까지 희석하였을 때에도 진단이 가능하여 진단 감도에도 사용상 문제점이 없어 사용 확대의 필요성이 높았다(조 등, 2006). 우리나라에서 재배되는 수박, 오이, 호박 등 박과 작물의 대부분이 종자전염성 바이러스인 CGMMV, ZGMMV, KGMMV 3종에 의하여 지속적으로 피해가 발생하고 바이러스의 특성상 집단민원이 자주 발생하므로 전국적으로 임상진단 요청이 꾸준히 요구되는 실정에 있다. 따라서 박과 작물의 종자전염성 바이러스의 효과적 진단법 개발이 요구되며 이에 따라 중앙 연구기관 뿐만 아니라 농업현장의 지도 연구기관에서도 누구나 이용할 수 있는 간편하고 정밀하며 빠른 시간 내에 감염여부를 알 수 있는 유전자 진단기술의 필요성이 매우 크므로 박과작물의 종자전염바이러스 3종을 동시에 간편하게 진단할 수 있는 새로운 기술을 국내최초로 개발하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**바이러스 분리주.** CGMMV 수박 분리주와 ZGMMV는 죽키니호박 분리주(Ryu 등, 2000) 그리고 서울여대에 서 분양받은 KGMMV를 이용하였다. CGMMV 등 3종의 바이러스는 담배(*Nicotiana benthamiana*)를 공통 기주로 이용하여 바이러스 분리주를 보관 및 사용하였으며, 기주 식물인 박과 작물에서의 활용성을 확보하기 위하여, 수박(*Citrullus vulgaris*), 박(*Lagenaria leucantha*), 오이(*Cucumis sativus*), 멜론(*C. melo*), 애호박(*Cucurbita moschata* 'Aihobag'), 죽키니 호박(*Cucurbita pepo* 'Zucchini')을 감염주로 사용하여 진단에 이용하였다.

**바이러스 진단 프라이머.** 박과 작물에 발생하는 종자전염 바이러스 3종에 대하여 각각 4개의 프라이머를 제작하였다(Table 1). 프라이머 제작에 이용한 프로그램은 DNASTAR Lasergene 7.1이었다. 각각의 프라이머는 CGMMV 등 3종 바이러스의 동시진단을 할 경우에 프라이머간의 간섭현상이 없는 조합을 선별하기 위하여 이용하였다.

**즙액 추출 완충액 및 RT-PCR.** 유전자 진단을 위한 즙액처리는 0.5% sodium sulfite를 첨가한 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)을 이병일 중량의 1:1로 하여 마쇄한 후 PCR 튜브에 50  $\mu$ l를 넣고 실온에서 10분간 둔다. 그 후 0.05%의 Tween-20를 넣은 인산완충액(PBST)으로 튜브를 두 번 세척하고 난 후에 50  $\mu$ l Nuclease-free water를 넣고 즉시 95°C에서 3분 동안 처리하고 바로 얼음에서 식혔다. 유전자 진단을 위한 열처리 조건은 48°C에서 45분, 94°C에서 2분 처리한 후 94°C에서 30초, Tm에서 30초, 72°C에서 90초 처리를 35회 하였으며 최종적으로 72°C에서 7분 처

**Table 1.** Sequences of primers for the three tobamoviruses infecting Cucurbits

Virus <sup>a</sup>	Primer name	Sequence	Size (bp)
KGMMV	K513	5'-cacaaccgcagggacttttagagc-3', 5'-ccgggtatttaggtggcagacg-3'	513
	K688	5'-tgtcggcgccttaccactt-3', 5'-ggcagcggactcctaccag-3'	688
	K737	5'-tcgggcggacgccctatt-3', 5'-gtaacccccacgcctcactttg-3'	737
	K721	5'-ggatcgcgaaagtaaggctcat-3', 5'-gtcgcacgttgcattgggt-3'	721
ZGMMV	Z407A	5'-ggcccaatcccgtaagacaa-3', 5'-ccgggaacgccatcaataagagta-3'	407
	Z407B	5'-agcgtattcgggtattgattcg-3', 5'-ttgcccttcgctatccattggtt-3'	407
	Z615	5'-cccgtcagctcaagaaaataat-3', 5'-ttttatgatgctgtttgcctgg-3'	615
	Z821	5'-aatgcgtttggccgataatgagtt-3', 5'-ccgcttggagtcgtaattggag-3'	821
CGMMV	C634	5'-aatggcggagatgggctgatgta-3', 5'-ccggggcgcactattgcttct-3'	634
	C415	5'-caagacagacccccgaaatgaac-3', 5'-tgaccgcacaggagaactatcg-3'	415
	C724	5'-cgcgatccttgctctttattgtg-3', 5'-ggcggtagacgcgtcatagta-3'	724
	C1250	5'-tttctcggaggcattgcttttagg-3', 5'-atctgccatttcaggggacat-3'	1250

<sup>a</sup>KGMMV, *Kyuri green mottle mosaic virus*; ZGMMV, *Zucchini yellow mosaic virus*; CGMMV, *Cucumber green mottle mosaic virus*.

리하였다. Tm 온도는 55°C, 58°C 및 60°C, 3 처리로 실험하였다. 전기영동은 1.2% Agarose 젤을 이용하여 100 V에서 30분 동안 전기영동하였으며, EtBr로 염색하여 사진 촬영하였다.

### 결과 및 고찰

박과작물에 증자전염하는 3종 바이러스에 이병된 담배 (*N. benthamiana*)에서 Qiagen 키트를 이용하여 전체 핵산을 분리하였으며 이 핵산을 RT-PCR 유전자 진단의 표준으로 이용하였다. 증자전염 바이러스 각각 3종류의 프라이머를 이용하였으며 동시진단을 할 경우 세가지 바이러스를 구별할 수 있도록 증폭산물의 크기를 고려하여 임의로 조합(Table 2)을 만들어 Tm 온도를 55°C, 58°C 및 60°C에서 처리하여 진단한 결과 55°C와 58°C에서 T7과 T8의 조합에서 CGMMV와 KGMMV가 동시에 진단이 되었다(Fig. 2).

Fig. 1의 결과로부터 세바이러스를 동시에 진단할 수 있는 조합을 찾지 못하였다. 그러나 각 바이러스에 대해 매우 안정적으로 진단이 되는 몇 개 프라이머를 찾을 수 있었다. 즉, CGMMV 프라이머는 T7에 사용된 C724,

KGMMV 프라이머는 T1의 K688, T2, T7 및 T8에 사용된 K513 프라이머, ZGMMV는 T3과 T4에 사용한 Z407A와 T5와 T6의 Z407B 프라이머이다. 이들을 이용하여 새로운 T10, T11 및 T12 조합(Table 3)을 설정하였으며 동시진단 결과 3종 바이러스가 모두 잘 진단이 된 T11 조합(Fig. 2의 사각형)을 선발하였다(Fig. 2). 이와 같이 만든 조합의 경우에는 Tm 55°C, 58°C 및 60°C 모두에서 프라이머간에 간섭작용이 발생하지 않고 동시진단이 가능하였다.

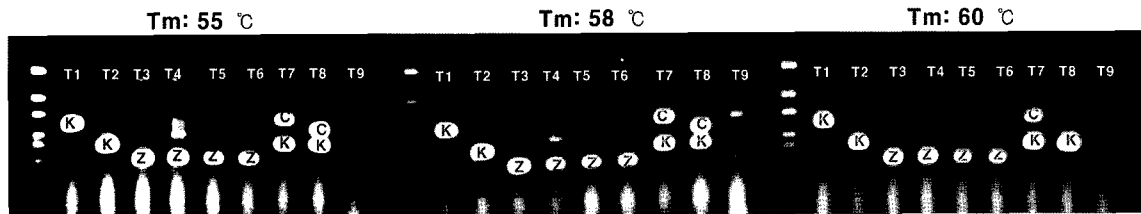
담배(*N. benthamiana*)로부터 분리한 total RNA를 이용한 실험결과 CGMMV-C724, KGMMV-K513, ZGMMV-Z407A의 T11조합이 최적의 결과를 보였으므로 이 조합을 이용하여 박과 작물 종류별 동시진단 VC/RT-PCR 유전자 진단을 하였다. VC/RT-PCR 동시진단법을 개발하기

**Table 3.** Primer combinations from the results of table 2 for triplex RT-PCR

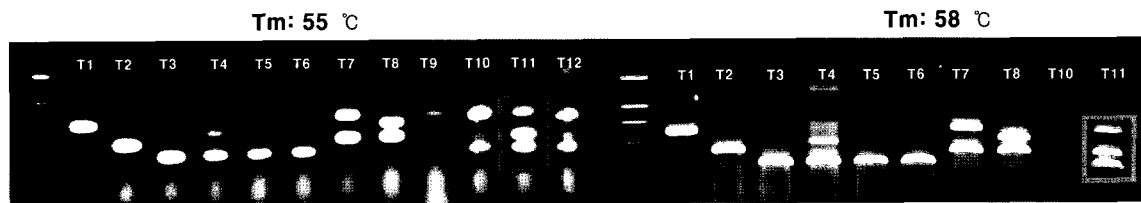
Viruses		Primers	
CGMMV	C724	C724	C1250
ZGMMV	Z407A	Z407B	Z407A
KGMMV	K688	K513	K688
Combinations	T10	T11	T12

**Table 2.** Combinations of three Tobamoviruses primers for triplex RT-PCR

Viruses		Primers							
CGMMV	C1250	C1250	C1250	C1250	C1250	C1250	C724	C634	C415
ZGMMV	Z821	Z821	Z407A	Z407A	Z407B	Z407B	Z615	Z821	Z615
KGMMV	K688	K513	K737	K721	K737	K721	K513	K513	K721
Combinations	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9



**Fig. 1.** Triplex RT-PCR for total RNA by Qiagen Kit from *N. benthamiana* infected with Cucurbit tobamovirus of CGMMV (C), KGMMV (K) and ZGMMV (Z).



**Fig. 2.** Triplex RT-PCR of the newly organized primer combinations of T10 to T11 for the three tobamoviruses of CGMMV, KGMMV and ZGMMV.

위하여 6종의 박과작물에 세가지 바이러스를 각각 접종하여 감염주를 유지하였다. 감염된 박과작물을 즙액추출 완충액을 넣어 갈아 즙액을 1.5 ml 튜브에 넣어 준비한 후 진단용 프라이머 혼합 조합액(T11)에 각각의 단독 바이러스를 진단하고 또한 각 작물에 대해 각각의 세가지 바이러스 즙액을 동량섞어 임의의 3종 바이러스 감염즙액을 만들어 triplex 진단을 하였다. VC/RT-PCR 유전자 진단을 한 결과 박과 작물 종자전염 바이러스 3종류는 감염 식물체로부터 전체 핵산을 분리할 필요없이 식물체 즙액을 직접 PCR 튜브에 직접 처리하여 유전자 진단을 할 경우에도 모두 특이 밴드가 형성되어 진단이 잘 되었다. CGMMV-C724 프라이머를 이용한 단독 진단의 경우

키니 호박(6번)은 CGMMV가 비 기주이므로 감염되지 않아 밴드가 형성되지 않았다(Fig. 3). KGMMV-K513 프라이머로 단독 진단한 경우에는 KGMMV 특이 밴드가 형성되었으며(Fig. 4) ZGMMV-Z407A 프라이머를 이용한 단독 진단의 경우에는 ZGMMV와 KGMMV가 동시에 진단되어 KGMMV 바이러스 접종원으로 사용한 분리주가 오염되어 있었으나 각각의 바이러스 특이 밴드가 형성되어 특이성이 인정되었고 프라이머 간의 간섭작용이 나타나지 않았다(Fig. 5). 박과 작물 종자전염 막대형 바이러스의 프라이머들은 단독 진단에서 특이성을 나타내었고 박과 작물 종류에 따라 어떠한 간섭작용도 나타나지 않아 VC/RT-PCR 유전자 진단에 이용하는데 적합하였다.

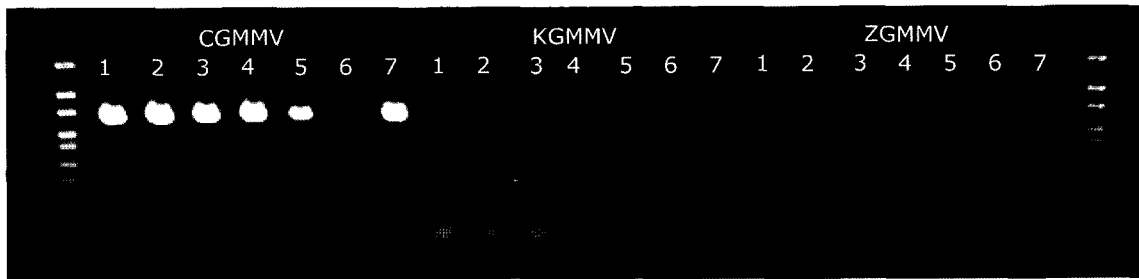


Fig. 3. VC/RT-PCR using CGMMV-C724 primer for the plants infected singly with CGMMV, KGMMV and ZGMMV. 1; *Lagenaria leucantha*, 2; *Citrullus vulgaris*, 3; *Cucumis sativus*, 4; *C. melo*, 5; *Cucurbita moschata* 'Aihobag', 6; *Cucurbita pepo* 'Zucchini'. 7; *Nicotiana benthamiana*.

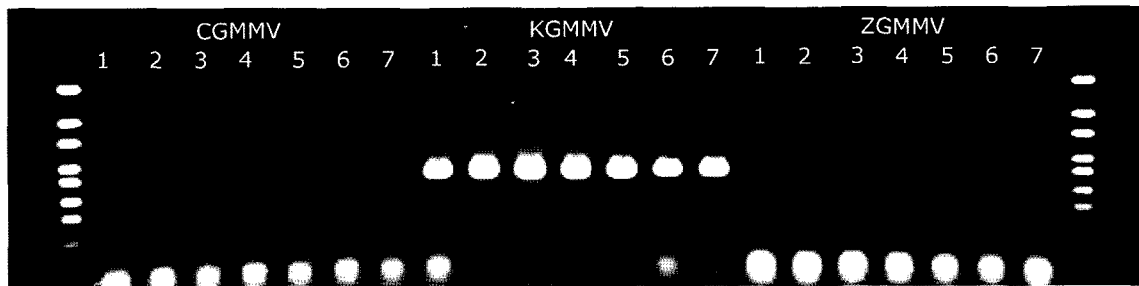


Fig. 4. VC/RT-PCR using KGMMV-K513 primer for the plants infected singly with CGMMV, KGMMV and ZGMMV. 1; *Lagenaria leucantha*, 2; *Citrullus vulgaris*, 3; *Cucumis sativus*, 4; *C. melo*, 5; *Cucurbita moschata* 'Aihobag', 6; *Cucurbita pepo* 'Zucchini'. 7; *Nicotiana benthamiana*.

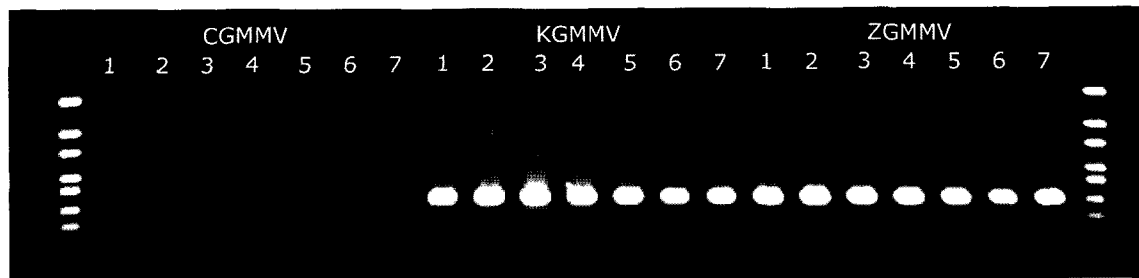
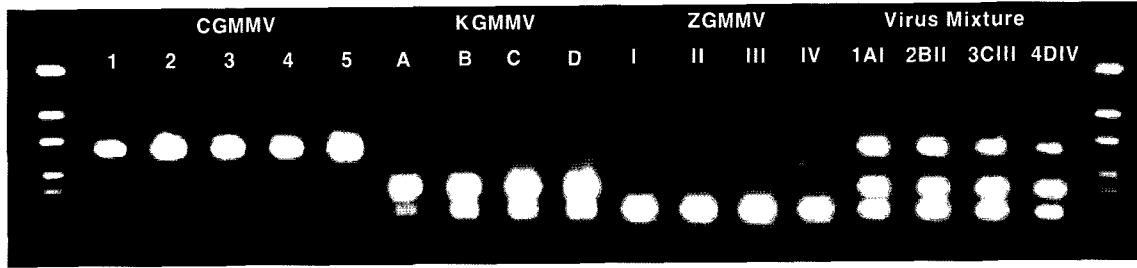


Fig. 5. VC/RT-PCR using ZGMMV-Z407A primer for the plants infected singly with CGMMV, KGMMV and ZGMMV. The KGMMV isolate was presented doubly with ZGMMV. 1; *Lagenaria leucantha*, 2; *Citrullus vulgaris*, 3; *Cucumis sativus*, 4; *C. melo*, 5; *Cucurbita moschata* 'Aihobag', 6; *Cucurbita pepo* 'Zucchini'. 7; *Nicotiana benthamiana*.



**Fig. 6.** VC/RT-PCR using T11 (C724+K513+Z407A) primer combination for the plant infected singly with CGMMV, KGMMV and ZGMMV, and the mixture sap for the infected plants of *N. benthamiana* (1, A and I), cucumber (2, B and II), melon (3, C and III), zucchini (4, D and IV) and watermelon (5).

세가지 바이러스를 동시에 진단할 수 있는 triplex 프라이머 조합 T11을 이용하여 단독감염 진단과 세 종류의 바이러스 감염 식물체를 동시에 진단하는 VC/RT-PCR을 수행하였다. Fig. 6은 바이러스에 감염된 담배, 오이, 멜론, 호박, 수박의 모든 식물체를 이용한 동시 진단할 결과는 단독 진단 결과와 같이 담배(1A), 오이(2B), 멜론(3C) 그리고 추키니호박(4D) 모두 프라이머 특이성이 나타났으며 식물체 종류에 의한 간섭작용이 일어나지 않았다. 다만 추키니 호박의 경우 CGMMV에 대해 비기주로 알려져 있으나 감염이 오래 지속되자 CGMMV가 전신감염 되어 이에 대한 보다 정확한 연구가 필요하겠다.

식물 바이러스의 유전자 진단을 위한 RT-PCR은 감염 식물에서 전체 핵산을 분리하기 위하여 전통적인 핵산분리 방법을 사용하거나 필요에 따라 간이 분리키트를 이용하여야 하는데 보통 1일-2일 이상 소요된다. 그러나 핵산 분리 과정이 필요없는 VC/RT-PCR 유전자 진단기술을 이용하여 식물체 즙액을 직접 PCR 튜브에 처리하므로 3-4시간 내에 바이러스 진단이 가능하고 박과 작물에 피해를 일으키는 종자전염 바이러스 CGMMV, KGMMV, ZGMMV를 매우 간편하고 빠르게 동시에 진단할 수 있으며 진단 비용도 절감할 수 있다.

## 적 요

박과 작물에 발생하는 종자전염성 막대형 바이러스인 CGMMV, KGMMV, ZGMMV 3종의 단독 및 동시 VC/RT-PCR 유전자 진단법을 개발하였다. CGMMV 등 3종의 바이러스에 대한 동시진단용 조합선발을 위하여 12 조합 중에서 동시 진단용 프라이머 조합 CGMMV-C724, KGMMV-K513, ZGMMV-Z407A를 선발하였다. CGMMV 등 3종에 대한 triplex VC/RT-PCR 유전자 진단법은 박, 수박, 오이, 멜론, 추키니 호박, 애호박, 담배(*N. benthamiana*) 작물의 식물체 즙액과 프라이머 간에 간섭현상 없이 특이적으로 진단되었다.

## 참고문헌

- Cho, J. D., Lee, S. J., Chung, B. N., Kim, J. S. and Kim, T. S. 2006. Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) reported newly on melon in Korea. *Plant Pathol. J.* 22(4): 426 (Abstract).
- Choi, G. S. 2001. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea. *Plant Pathol. J.* 17(5): 243-248.
- 조점덕, 김정수, 김현란, 정봉남, 류기현. 2006. *Tomato spotted wilt virus*를 위한 간편한 식물 바이러스 핵산 진단법: Virion capture/RT-PCR (VC/RT-PCR). *식물병연구* 12(2): 139-143.
- 한국식물병리학회. 2004. *한국식물병목록*.
- James, D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *J. Virol. Meth.* 83: 1-9.
- Kim, J. H., Choi, G. S., Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, J. K. and Ryu, K. H. 2006. Development of single-tube multiplex immunocapture RT-PCR Assay for simultaneous detection of two pepper Tobamoviruses. *Plant Pathol. J.* 22(2): 164-167.
- Ko, S. J., Lee, Y. H., Cha, K. H., Lee, S. H., Choi, H. S., Choi, Y. S., Lim, G. C. and Kim, K. H. 2006. Incidence and distribution of virus diseases on cucumber in Jeonnam province during 1999-2002. *Plant Pathol. J.* 2(2): 147-151.
- Li, R. and Mock, R. 2005. An improved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of two cherry flexiviruses in *Prunus* spp. *J. Virol. Meth.* 129: 162-169.
- Nolasco, G. deBlas, C., Torres, V. and Ponz, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods* 45: 201-218.
- Ryu, K. H., Min, B. E., Choi, G. S., Choi, S. H., Kwon, S. B., Noh, G. M., Yoon, J. Y., Choi, Y. M., Jang, S. H., Lee, G. P., Cho, K. H. and Park, W. M. 2000. *Zucchini green mottle mosaic virus* is a new tobamovirus; comparison of its coat protein gene with that of *Kyuri green mottle mosaic virus*. *Arch. Virol.* 145: 2325-2333.
- Sharman, M., Thomas, J. E. and Dietzgen, R. G. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric

- detection for viruses of banana. *J. Virol. Methods* 89: 75-88.
- Suehiro, N., Matsuda, K., Okuda, S. and Natsuaki, T. 2005. A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *J. Virol. Methods* 125: 67-73.
- Zeng, Y. and Yang, T. 2002. RNA Isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 417a-417e.