

멜론괴저반점바이러스-Me의 몇 가지 특성과 멜론 품종의 저항성 선발

최국선* · 조점덕 · 정봉남 · 조인숙 · 권순배¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과, ¹강원도농업기술원 연구개발부Some Characteristics of *Melon necrotic spot virus-Me* and Resistance Screen to the Virus in Melon CultivarsGug-Seoun Choi*, Jeom-Deog Cho, Bong-Nam Chung, In-Sook Cho and Soon-Bae Kwon¹

Horticulture & Herbal Environmental Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-440, Korea

¹Gangwon Agricultural Research and Extension Services, Chunchon 200-939, Korea

(Received on August 12, 2010; Accepted on October 4, 2010)

Melon necrotic spot virus (MNSV) is a very destructive disease to melon (*Cucumis melo*) plants. A MNSV was isolated from melon leaf showing necrotic spot symptoms at the plastic house in Naju, Korea in 2009. The isolate, designated as MNSV-Me, was identified and characterized by biological responses on several host plants, immuno captured RT-PCR and partial nucleotide sequencings of the genome. To evaluate MNSV-Me resistance in melon, thirty-five melon cultivars were mechanically inoculated on the cotyledon of the seedlings with the virus. MNSV-Me produced necrotic spots on the inoculated leaves of the all melon cultivars tested. Twenty-five cultivars were susceptible to the virus and they showed systemic necrotic spots on the leaves and/or necrosis longer than 3 cm in length on the stems within about forty days after inoculation. Five cultivars gave moderate resistance, no symptoms on the upper leaves but necrosis on the stem shorter than 3 cm in length. In an evaluation of MNSV-Me resistance in melon cultivars, 'Elstitan', 'Elsluxery', 'Betelichihage', 'Betelichi' and 'Womderfulhagae 1st' were found to have resistance by showing only faint necrosis on their stems.

Keywords : Melon, *Melon necrotic spot virus*, MNSV, Resistance

멜론(*Cucumis melo*)은 특유의 향기와 맛으로 세계적으로 널리 재배되고 있는 박과작물이다. 우리나라에서는 주로 비닐하우스 등 시설에서 전국적으로 재배되고 있으며, 2007년 재배면적 1,735 ha에서 생산액은 517억원으로 재배면적과 생산량은 지속적으로 증가추세에 있다(농촌진흥청, 2009). 국내 멜론에는 30여종의 각 종 병해와 뿌리혹선충이 발생하고 있다(한국식물병리학회, 2009). 특히 멜론괴저반점바이러스(*Melon necrotic spot virus*, MNSV) 병으로 심각한 경제적 피해를 초래하고 있는 실정이다. 이 바이러스의 입자는 직경이 30 nm이고 4.3 kb +ssRNA로 구성되어 있는 *Tombusviridae*과 *Cucumovirus*속으로 분류

되어 있으며, 토양균류인 *Oplidium bornovanus*에 의하여 매개된다(Campbell 등, 1994; Campbell 등, 1996). 일본 분리주 MNSV-NH와 -NK의 게놈 분석에서 5종류의 open reading frame이 존재하고 있는 것으로 밝혀졌으며(Ohshima 등, 2000), 이 바이러스의 외피단백질을 구성하는 300번째 아미노산 중 Ile를 Phe로 대체할 경우 특이적 부착 부위가 손실되어 곰팡이에 의하여 매개될 수 없지만, 바이러스 입자의 재구성이나 생물적 특성에는 영향을 주지 않는다고 보고하였다(Mochizuki 등, 2008). Gonzalez-Garza 등(1979)은 MNSV에 대하여 저항성을 표현하는 단일 열성 저항성 유전자인 *nsv*를 몇몇 멜론 품종에서 밝혀냈다. 최근 스페인에서는 *nsv* 유전자가 있는 멜론에서 이 유전자의 저항성을 극복하는 새로운 계통의 MNSV가 발생하였다고 보고하였다(Diaz 등, 2002).

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-6234, Fax) +82-31-290-6259

Email) choigs@korea.kr

국내에서 Choi 등(2003)은 전남 나주에서 재배되고 있는 네트 멜론에서 MNSV를 처음 분리 동정하여 보고하였다. 최근 국내에서는 다양한 품종의 멜론이 재배되고 있으며, 이 바이러스병의 피해는 점점 확산 추세에 있다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 분리한 MNSV-Me에 대한 특성과 멜론 재배 품종에 대하여 저항성 선발을 하였다. 또한 이 바이러스에 대한 저항성 품종 육성을 위한 저항성 검정법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

멜론 MNSV 발생 조사. 2009년 국내 멜론 주산지인 전남 나주와 담양지역을 중심으로 *Melon necrotic spot virus*(MNSV)의 발병률을 조사하였다. 조사방법은 멜론 잎 또는 줄기에 괴저 증상을 나타내는 식물체를 이병주로 선정하였고, 이 바이러스의 전형적인 증상이 모호한 식물체는 immuno capture(IC)/RT-PCR(Kim 등, 2006)로 검정하였다. 진단용으로 684 bp의 DNA를 증폭할 수 있는 MNSP 7AB F&R 프라이머(F: 5'-CTCACTGGTGAATA/TCCTTG-3', R: GCGTTTAACCATCGCCAT-3')를 사용하였다. 진단 조건은 42°C 60분 → 70°C 10분 → 35회(94°C 1분 → 51°C 1분 → 72°C 2분) → 72°C 10분이었다. IC를 위하여 사용된 MNSV의 항혈청은 국립원예특작과학원에서 생산하여 보존한 것을 이용하였다.

바이러스 접종원. 나주시 세지면에서 얼스 계통 멜론의 잎에 작은 갈색 반점과 줄기에 괴사 증상을 나타낸 식물체의 잎을 오이의 자엽에 접종하였다. 접종엽에 나타난 작은 흰색 반점을 3회 걸쳐 국부 병반을 분리하여 멜론 얼스파티 품종에 증식하여 접종원으로 사용하였다. 또한 분리한 바이러스는 지표식물 검정, IC/RT-PCR 및 외피단백질 유전자 영역의 상동성을 기준에 보고한 GeneBank database를 이용하여 비교하였다. 이와 같이 동정한 바이러스 분리주를 MNSV-Me로 명명하였고, 이 분리주를 멜론 시판품종에 대한 저항성 검정에 사용하였다. MNSV-Me의 일부 유전자 특성을 알아보기 위하여 외피단백질 유전자 영역을 포함한 3'말단의 1237 bp를 합성할 수 있는 M4051R(5'-AGATCTGGCTGAG AAC-3') 및 M2814S(5'-GCGATGGTTAAACGCA-3') 프라이머를 제작하였다. 합성조건은 42°C 60분 → 70°C 10분 → 35회(94°C 1분 → 51°C 1분 → 72°C 2분) → 72°C 10분이었다. 합성된 염기서열의 비교 분석은 NCBI BLAST를 이용하였다.

저항성 검정. MNSV-Me를 이용하여 시판용 멜론 35 품종에 대하여 저항성 검정을 3회에 걸쳐 실시하였다. 32공 플러그 육묘판에 검정 횟수마다 품종별 각각 8립을

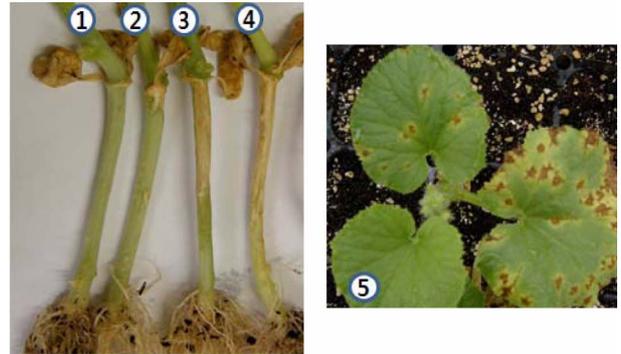


Fig. 1. Grade of resistance expression to *Melon necrotic spot virus-Me* on melon cultivars. No symptom (1st grade), < 3 cm in length of stem necrosis (2nd grade), 3 cm ≤ (3rd grade) < 5 cm, 5 cm ≤ (4th grade), and systemic infection (5th grade).

파종하여 전개된 자엽에 바이러스를 1회 즙액 접종하였고, 1주일 후에 새로 형성된 본엽에 2차 접종을 실시하였다. 접종 방법은 국부병반이 형성된 멜론의 자엽을 0.01 M phosphate buffer(pH 7.2)로 1:5(w/v) 비율로 마쇄한 후, 저항성 검정 대상 멜론 품종에 즙액 접종을 하였다. 2차 접종 7일 후 상엽으로 이행되지 않은 식물체는 1/ 포트에 정식하여 저항성 검정을 하였다.

저항성 평가. 바이러스를 자엽에 접종한 후, 상엽으로 바이러스 증상의 발현 이행여부에 따라 우선 감수성과 저항성으로 구분하였다. 또한 1/ 포트에 정식한 식물체는 접종엽인 자엽을 중심으로 줄기에 나타나는 괴저 증상의 확산 정도에 따라 접종 40~45일 후, 저항성 정도를 다음과 같이 판정하였다. 접종엽 이외 무증상 1점, 떡잎 중심 3 cm 미만의 줄기 괴저 증상 2점, 떡잎 중심 3~5 cm의 줄기 괴저 증상 3점, 떡잎 중심 5 cm 이상의 줄기 괴저 증상 4점, 상엽으로 이행하는 괴저증상은 5점으로 부여하였다(Fig. 1). 각 품종별 개체에 대한 이들 점수를 합산한 후, 평균치에 따라 저항성(R) ≤ 2, 2 < 중간 저항성(MR) ≤ 3, 3 < 감수성(S)으로 판정하였다. 이와 같은 방법으로 3회에 걸쳐 저항성 검정을 실시하여 종합적으로 분석하였다.

결과 및 고찰

MNSV 증상 및 발병율. MNSV에 자연 발병된 멜론 잎의 초기 증상은 작은 퇴록 반점이 형성되고 이 부위가 갈색으로 변색하였다. 대부분 잎 전체에 괴사 반점이 형성되지만 잎의 일부분에만 괴사반점과 엽맥을 따라 괴저 증상이 관찰되었다. 괴저 증상이 형성된 잎 뒷면에는 부정형의 흰색 딱지를 형성하는 것이 MNSV에 감염된 멜론의 전형적이 증상이었다. 줄기, 엽병 및 지체부위에서

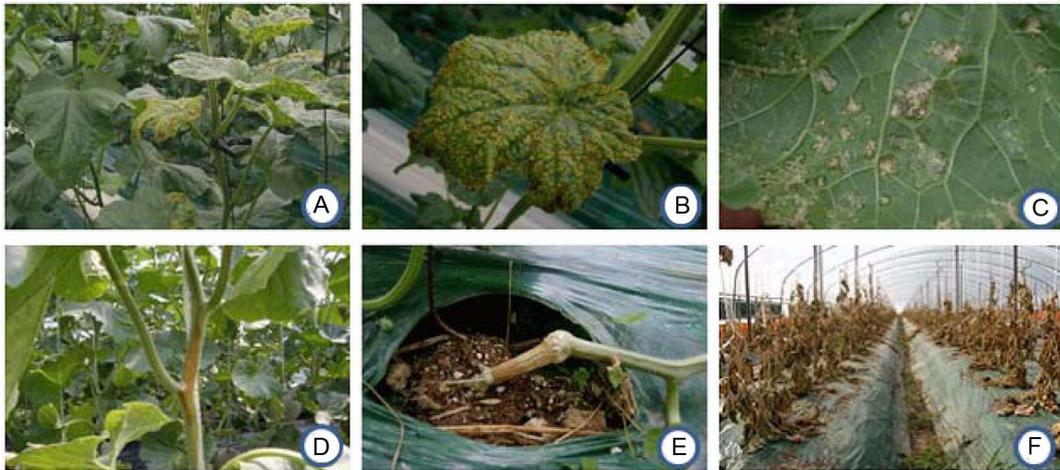


Fig. 2. Various symptoms on melon plants naturally infected with *Melon necrotic spot virus*. (A) stunt symptom, (B) necrotic spots on the upper surface of leaf, (C) scab on the lower surface of leaf, (D) necrosis on the stem, (E) necrosis on the basal stem, (F) a derelict melon field by MNSV.

Table 1. *Melon necrotic spot virus* disease incidence on melon plants growing in the plastic houses, 2009

Area investigated	Date of survey	Farm of survey ^a	No. of plants		% infection
			Investigated	Diseased	
Naju	Feb. 10	A	300	5	1.7
		B	450	53	11.8
		C	300	82	27.3
		D	250	66	26.4
Damyang	May 6	E	300	211	70.3
		F	200	7	3.5
		G	300	125	41.7
		H	250	250	100

^aThe melon growing in the fields treated with solar heat disinfection (A, B, D and F) and not treated (C, E, G and H).

도 괴저증상이 형성되었다(Fig. 2). 2009년 2월 중순 및 5월 초순 전남 나주시 세지면과 담양군 수북면 멜론재배 단지에서 MNSV의 이병율은 1.7~100%로 다양하였으며, 평균 이병율은 약 35%였다. 또한 일부 재배 농가에서는 멜론 생육 중기에 이 바이러스병으로 멜론재배를 포기하였다. 발병 농가 중 전년도 태양열 소독 처리를 실시한 농가(A, B, D, F)는 무처리 농가(C, E, G, H) 보다 멜론 MNSV의 발병율이 비교적 낮은 경향을 보였다(Table 1). 이 바이러스는 토양 서식균류인 *Olpidium borovanus*에 의하여 토양전염이 된다고 보고되었다(Campbell, 1996). 태양열로 토양 소독한 포장에서 MNSV의 발병율이 비교적 낮은 원인은 멜론에 발생하는 덩굴마름병 등 토양전염성 병원균을 소독할 목적으로 태양열을 처리한 포장에서 MNSV 매개 병원균인 *Olpidium*의 밀도 저하가 주요 원인이라고 판단되지만, 근본적으로 이 바이러스병을 방제

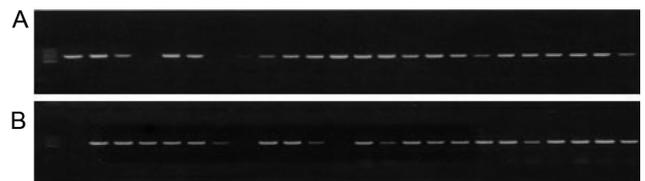


Fig. 3. IC/RT-PCR assay for detection of *Melon necrotic spot virus* from the samples collected in melon growing fields in Naju (A) and Damyang (B). The amplified DNA bands produced from the leaves and the stems showing necrosis symptom but not from the leaves showing chlorosis spots. Size of the synthesized DNA products was about 680 bp.

하기 위해서는 저항성 품종 선발 및 육성이 필요하다. 농가에서 채집한 다양한 시료에 대한 684 bp의 DNA를 증폭할 수 있는 MNSP 7AB F&R 프라이머를 이용한 IC/RT-PCR을 실시한 결과, 엽 및 줄기 등에 괴저 증상의 시

료에서는 모두 양성반응을 보였으나, 단지 황화 반점 증상 주에서는 음성 반응을 보였다(Fig. 3). 이 음성 반응의 시료는 오이모자이크바이러스에 감염된 것으로 확인되었다(자료 생략). IC/RT-PCR은 핵산 추출의 복잡한 단계없이 이 MNSV의 다량진단에 효율적인 것으로 판단되었다.

MNSV-Me 특성. 멜론 잎에서 괴저반점 증상을 나타내는 식물체의 즙액을 담배 및 박과작물에 즙액접종을 한 후, 담배에서 모자이크 증상이 나타나지 않으면서 오이 자엽에 괴저 반점을 형성하는 분리주를 MNSV-Me로 명명하였다. MNSV-Me는 오이와 수박의 접종엽에서만 괴저 반점이 나타났으며 상업으로 이행되지는 않았다. ‘얼스파티’ 멜론의 20주 중 13주에서 접종엽과 상업에 괴저 반점을 형성하였고 7주에서는 접종엽에만 괴저반점을 형성하였다. 명아주, 독말풀, 천일홍, 담배에 감염이 되지 않았다(Table 2). 국내 멜론에서 분리한 MNSV-Me의 3' 말단 부위 1237 bp 염기서열을 Genbank Database를 이용하여 분석하였다. p7K는 198nt 및 65aa, p9K는 186nt 및 61aa, 외피단백질유전자 38k는 1173nt 및 390aa로 구성되

Table 2. Biological reactions of *Melon necrotic spot virus-Me* isolated from melon leaf showing necrotic spots

Test plants	Host reactions
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-/- ^a
<i>C. quinoa</i>	-/-
<i>Datura stramonium</i>	-/-
<i>Gomphorena globosa</i>	-/-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-/-
<i>N. tabacum</i> cv. Xanti NC	-/-
<i>Cucurmis sativas</i> cv. Backbong	NL/-
<i>C. melo</i> cv. Elsparty	NL/NS
<i>Citrullus lanatus</i> cv. Olympus	NL/-

^aInoculated leaf/upper leaf, NL: necrotic spot, NS: necrotic spot, -: no infection.

The test plants mechanically inoculated with the virus were detected by IC/RT-PCR.

어 있었다. MNSV-Me와 기존에 보고된 MNSV 분리주들에 대한 아미노산의 상동성을 비교한 결과, p7K 93~100%, p9K 93~100%, CP 38K 93~97%였다. 이들 유전자 중 CP 38K 부위가 비교적 변이성이 높은 것으로 나타났다(Table 3).

저항성 선발. 시판용 멜론 35품종에 대하여 MNSV-Me를 인위적인 중복 즙액접종 방법으로 저항성 검정을 실시하였다. 접종한 모든 품종의 자엽을 포함한 접종엽에서는 100% 괴저 반점이 확인되었다. 그러나 상업으로 증상의 이행 여부는 동일 품종일지라도 개체간 일정하지는 않았다. 일반적으로 바이러스병 저항성 품종 또는 계통

Table 4. Response of commercial melon cultivars to *Melon necrotic spot virus-Me*

Melon cultivar	Resistance reaction ^a	Melon cultivar	Resistance reaction
Elstaitan	R	Elsparty	S
Elsluxury	R	Numberone	S
Betalichihagae	R	Homerunstar	S
Betalichi	R	Elsmounthagae	S
Wonderfulhagae 1st	R	Aaiahanguem	S
Sonata	MR	Supersaegi	S
Emeraldhagae 1st	MR	Asiachochunmanchun	S
Giant	MR	Beauty	S
Alskigstar	MR	SuperVIP	S
Nice	MR	Elsfriend	S
Elselize	S	Superstar	S
Elselite	S	Aisgold	S
Elsalan	S	Queen	S
Elshappy	S	Elsnighthagae 2nd	S
Elsgold	S	Elsnightsosunbansu	S
King	S	Romance	S
Elskingstar	S	08M309	S
Summercool	S		

^aR = resistance ≤ 2, MR = 2 < moderate resistance ≤ 3, S = 3 < susceptible.

Table 3. Percentage sequence identities between 3' region genes of *Melon necrotic spot virus-Me* and other MNSV isolates reported previously

Accession no.	p7K		p9K		CP 38K	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa
AB250686.1	100	100	100	100	94	97
AB044291.2	100	100	100	100	94	97
AB044292.2	98	98	99	100	95	97
AY330700.1	96	98	97	98	89	95
AY122286.1	92	93	93	93	89	94
DQ339157.1	97	98	95	96	89	95
DQ922807.1	96	98	96	100	89	93

선발은 잎의 증상 발현정도에 따라 실시하고 있으나, 멜론에 대한 MNSV의 저항성 선발은 개체간 전신감염 여부의 변이가 크므로 잎에서 나타나는 증상 발현만으로 선발하는데 한계가 있었다. 따라서 집중 상업에 나타나는 증상과 병행하여 집중업인 자엽을 중심으로 줄기에서 나타나는 괴저 증상의 확산 정도에 따라 1차 집중 40~45일 후 저항성 정도를 판정하였다. 이 시험에서 제시한 기준으로 선발된 저항성 5품종은 얼스타이탄, 얼스럭서리, 베타리치하계, 베타리치, 윈더플하계1호였다. 중간 저항성은 소나타 등 5품종, 감수성은 얼스엘리제 등 25품종이었다 (Table 4). 멜론에서 MNSV에 대한 저항성은 *nsv*라 일컫는 단일 열성 유전자에 의하여 지배되고(Coudriet 등, 1981), 2종의 우성 유전자인 *Mnr1*과 *Mnr2*에 의하여 조절된다고 하였다(Mallor 등, 2003). 하지만 국내에 재배되고 있는 대부분 멜론에서 동일 품종 간에 전신감염 또는 집중업에 국부병반을 형성하고 상업으로 이행되지 않는 차이를 나타냈다. 이것은 MNSV에 대한 저항성 발현 유전자의 존재 유무가 품종내에서 균등하지 않는 종자 순도(seed purity)의 차이로 추론될 수 있었다.

요 약

Melon necrotic spot virus (MNSV)는 국내에서 재배되고 있는 멜론(*Cucumis melo*)에 심각한 피해를 주고 있다. 2009년 전남 나주 멜론재배단지에서 괴저반점을 나타내는 멜론 잎에서 MNSV를 분리 동정하였다. 지표식물 반응, immuno captured(IC) RT-PCR 및 염기서열 상동성 비교 등 몇몇 분석으로 이 분리주를 MNSV-Me로 명명하였다. 멜론 시판 35품종에 대한 MNSV-Me의 저항성 선발을 위하여 유묘의 자엽에 인위적 즙액 집중 방법을 이용하였다. 집중된 모든 품종의 자엽에서는 괴저반점을 형성하였다. 이들 중 25품종은 상업으로 괴저 증상의 이행 또는 일부 개체에서는 집중 약 40일 후 줄기에 3 cm 이상의 괴저를 나타내는 감수성 반응을 나타냈다. 5품종은 상업으로 잘 이행이 되지 않지만 줄기에 3 cm 미만의 괴저 증상을 형성하는 중간 저항성을 발현하였다. 집중한 상업으로는 바이러스 증상이 발현되지 않고, 단지 줄기에 희미한 괴저가 형성되는 얼스타이탄, 얼스럭서리, 베타리치하계, 베타리치 및 윈더플하계1호가 저항성을 나타냈다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업단 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Campbell, R. N. 1996. Fungal transmission of plant virus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 87-108.
- Campbell, R. N. and Sim, S. T. 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radiale*) and comparison to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* 72: 1136-1143.
- Campbell, R. N., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H. 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* 86: 1294-1298.
- Choi, G. S., Kim, J. H. and Kim, J. S. 2003. Characterization of *Melon necrotic spot virus* isolated from muskmelon. *Plant Pathol.* 19: 123-127.
- Coudriet, D. L., Kishaba, A. N. and Bohn, G. W. 1981. Inheritance of resistance to muskmelon necrotic spot virus in a melon aphid-resistance breeding line of muskmelon. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 106: 781-791.
- Diaz, J. A., Nieto, C., Moriones, E. and Aranda, M. A. 2002. Spanish *Melon necrotic spot virus* isolate overcomes the resistance conferred by the recessive *nsv* gene of melon. *Plant Disease* 86: 694.
- Furuki, I. 1981. Epidemiological studies on *Melon necrotic spot virus*. Shizuoka Agriculture Experiment Station Technical Bulletin No. 14.
- Gonzalez-Garza, R., Gumpf, D. J., Kishaba, A. N. and Bohn, G. W. 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. *Phytopathology* 69: 340-345.
- 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 immuno capture RT-PCR assay for simultaneous detection of two pepper tobamoviruses. *Plant Pathol. J.* 22: 164-167.
- 한국식물병리학회. 2009. 한국식물병명명목록 5판. pp. 144-148.
- Mallor, C., Alvarez, J. M. and Luis-Arteaga, M. 2003. A resistance to systemic symptom to symptom expression of *Melon necrotic spot virus*(MNSV) in *Cucumis melo* L. 'Doublon'. *Euphytica* 134: 319-324.
- Mochizuki, T., Ohnishi, J., Ohki, T., Kanda, A. and Tsuda, S. 2008. Amino acid substitution in the coat protein of *Melon necrotic spot virus* causes loss of binding to the surface of *Olpidium bornovanus* zoospore. *J. Gen. Plant. Pathol.* 74: 176-181.
- 농촌진흥청. 2009. 주요 품목별 산업 및 연구현황. 멜론. pp. 148-149.
- Ohshima, K., Ando, T., Motomura, N., Matsuo, K. and Sako, N. 2000. Comparative study on genomes of two Japanese *Melon necrotic spot virus* isolates. *Acta Virologica* 44: 309-314.