

RT-PCR에 의한 과채류 열매 및 종자의 바이러스 검정

최장경* · 김혜자 · 윤주연 · 박선정¹ · 김두욱² · 이상용¹
강원대학교 농생물학과, ¹삼림자원보호학과, ²중앙종묘 육종연구소

Detection of Virus in Fruit and Seed of Vegetables Using RT-PCR

Jang Kyung Choi*, Hye Ja Kim, Ju Yeon Yoon, Sun Jung Park¹,
Doo Wook Kim² and Sang Yong Lee¹

Department Agricultural Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Forest Resources Protection, Kangwon National University,
Chuncheon 200-701, Korea

²Osan Breeding Institute, Choong-Ang Seed Co., Hwasung 445-810, Korea

ABSTRACT: Tobacco mosaic tobamovirus (TMV), cucumber mosaic cucumovirus (CMV), cucumber green mottle mosaic tobamovirus (CGMMV) and zucchini yellow mosaic potyvirus (ZYMV) from individual fruits and seeds of hot pepper and cucumber were detected by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The dilution end-points for RT-PCR in crude sap from TMV- and CMV- infected hot pepper leaves and CMV- and CGMMV-infected cucumber leaves were 10^{-5} . However, the amount of PCR product obtained from preparation of ZYMV-infected cucumber leaf was 10-fold lower than those of CMV or CGMMV-infected cucumber leaves. In hot pepper, both TMV and CMV were detected in all parts of the fruit wall tissue, but the yields of PCR products in the fruit stalk and its surrounding tissues were higher than those of the end parts of the fruit. On the other hand, in cucumber fruit infected with CMV, CGMMV or ZYMV, the fruit wall tissue and seed located in both stalk and end parts showed higher yields of PCR products than those of intermediate parts. Of five viruses that were analysed, only TMV in hot pepper seed, and CGMMV and CMV in cucumber seed were detected in testa parts.

Key words: CGMMV, CMV, cucumber, fruit and seed, hot pepper, RT-PCR detection, TMV, ZYMV.

식물바이러스병의 진단은 주로 생물학적 또는 혈청학적 기법을 통하여 이루어지고 있다. 그러나 이들 방법은 많은 노력과 시간을 요하며, 바이러스병의 조기 정밀진단이라는 측면에서는 쉽게 이용하기 어려운 문제점들을 가지고 있다. 특히 바이러스의 종자전염과 관계가 있는 과채류의 과실이나 종자로부터 바이러스의 감염을 검정하기 위해서는 기존 방법들의 검출한계성 때문에 직접 적용시키지 못하는 경우가 많다.

최근 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)기법의 발전은 RNA를 계놈으로 가지고 있는 대부분의 식물바이러스에 있어서 이병식물체로부터 바이러스를 민감하고 정확하게 검출할 수 있는 수단으로 많이 활용되고 있다(9, 11, 13, 16). 특히 종자나 매개생물로부터 직접 바이러스를 검출하기 위하여 RT-PCR이 이용된 실험들은, 이 방법이 미세한 시료로부터

바이러스를 민감하고 정확하게 검정할 수 있는 수단이 될 수 있다는 사실을 시사해 주고 있다(3, 17, 20, 21, 23).

이 논문에서는 우리나라의 주요 과채류인 고추와 오이를 공시하여, 이들의 과실 및 종자로부터 담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic tobamovirus, TMV), 오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic cucumovirus, CMV), 오이 녹반 모자이크 바이러스(cucumber green mottle mosaic tobamovirus, CGMMV) 및 쥬키니 황화 모자이크 바이러스(zucchini yellow mosaic potyvirus, ZYMV)의 RT-PCR을 이용한 검출특성을 분석하였다.

재료 및 방법

공시 식물 및 바이러스. RT-PCR을 이용한 바이러스의 검출을 위하여 고추(*Capsicum annuum* cv. Kumtap)와 오이(*Cucumis sativus* cv. Backbongdadagi)를 공시하고, 우리나라에서 이들 과채류의 주요 병원성 바이러스

*Corresponding author.

로 인정되고 있는 바이러스중, 고추에서는 TMV(P계통)(5)와 CMV(Mf계통)(4), 오이에서는 CMV, CGMMV(Cu계통)(6) 및 ZYMV(Cu계통)(24) 등, 본 실험실에서 분리 동정하여 증식시킨 것을 검정대상 바이러스로 공시하였다.

바이러스의 접종과 식물의 육성. 공시한 바이러스들은 기주식물(P-TMV: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, Mf-CMV: *N. tabacum* cv. Xanthi nc, Cu-CGMMV: *Cucurbita pepo* cv. Black Beauty, Cu-ZYMV: *C. sativus* cv. Backbongdadagi)에서 각각 증식시킨 다음, 이들을 접종원으로 0.01 M Na-phosphate buffer(pH 7.0)와 Carbonrundum(400 mesh)을 이용한 접액접종의 상법으로 접종하였다. 즉 고추의 경우, 파종 후 본엽이 5~6엽기 되었을 때 P-TMV와 Mf-CMV를 각각 접종하고, 바이러스의 병징이 발현된 식물체들을 대형 포트에 이식하여 열매가 성숙될 때까지 온실에서 육성하였다. 오이는 파종 후 전개된 자엽에 Mf-CMV, Cu-CGMMV 및 Cu-ZYMV를 각각 접종하고, 병징이 발현된 개체들을 온실내의 흙에 직접 이식한 다음 식물체가 성장함에 따라 유인선에 유인하였고, 하위 4~7마디째의 암꽃들을 인공 수분시켜 종자가 성숙되도록 유도하였다. 이와 같이 온실에서 관리한 고추와 오이로부터 과실 및 종자를 채취하여 RT-PCR 검정을 실시하기까지, 고추는 바이러스 접종 후 85~95일, 오이는 65~70일이 소요되었다.

바이러스의 검출 부위. 각 바이러스에 이병된 고추와 오이의 열매 및 종자로부터 바이러스를 검정하기 위하여, 과실은 외파피의 각 부위별로, 종자는 착생위치별로 종자를 채취하여(Fig. 1) RT-PCR을 실시하였다. 이때 각 식물체에서 모자이크 증상이 새롭게 발현된 어린 잎을 대조로 사용하였으며, 각 실험은 공히 3반복 실시하였다.

과실 및 종자로부터 RT-PCR용 조즙액의 추출. 고추

Hot pepper

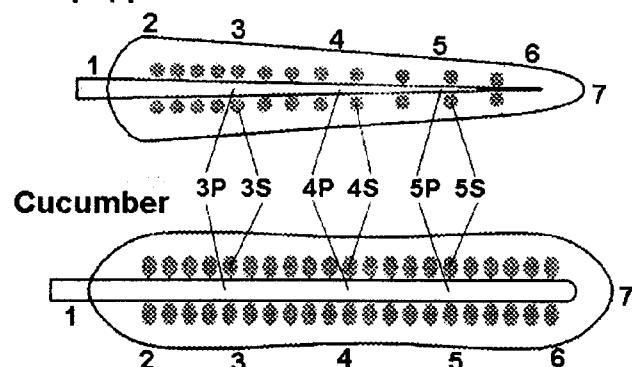


Fig. 1. Schematic representation of the sampling parts used to detect TMV, CMV, CGMMV and ZYMV using RT-PCR in fruit, seed(S) and placenta(P) collected from each virus-infected hot pepper and cucumber plant.

및 오이의 과실과 종자로부터 바이러스를 검정하기 위하여 조즙액을 추출하였다. RT-PCR용 조즙액의 추출은 기본적으로 Wylie 등(23)의 방법을 따랐다. 즉 과실의 부위별 외파피 조직(각 20~25 mg) 또는 과실 속의 착생 위치별로 종자 1개씩(15~25 mg)을 채취하여, 1.5 ml 마이크로튜브에서 액체질소를 넣고 마쇄한 후, 추출용완충액(200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% SDS)과 phenol/chloroform(1:1)을 시료의 무게에 따라 각각 300~500 μl씩 첨가하고 1분간 강하게 vortex시킨 다음, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 여기에서 얻어진 수층을 RT-PCR 검정용 조즙액으로 공시하였다. 이때 각 바이러스 검출한계를 측정하기 위하여, 잎으로부터 추출된 조즙액을 단계별 희석배수로 만들어 RT-PCR을 실시하였다.

RT-PCR 검정. 과실과 종자로부터 바이러스를 검출하기 위한 RT-PCR은 다음과 같은 방법을 이용하였다. 우선 공시 바이러스들의 primer는 모두 외파단백질유전자(coat protein gene, CP gene) 중에서 각 바이러스의 계통간 공통 염기서열 부분(4, 14, 19, 24)으로부터 올리고뉴클레오티드를 합성하였다(Table 1). 이들 primer를 이용하였을 때 합성된 PCR산물의 분자크기는 TMV 531 bp, CMV 487 bp, CGMMV 419 bp 및 ZYMV 300 bp로 예상되었다. 고추와 오이의 과실 및 종자로부터 추출한 조즙액은 80°C에서 5분간 변성시킨 다음, 10 X Taq polymerase buffer, 10 mM dNTP, 1 M MgCl₂, 5 units/μl Taq polymerase, 8 unit/μl M-MLV reverse transcriptase(Promega), 100 ng 각 primer 및 dH₂O를

Table 1. Sequences and expected sizes of PCR products for each primer set used to amplify the appropriate virus template

Virus	Primer ^a	Sequence	Expected size (bp)	Ref.
TMV	Up	5'-CTACTGTGCGCG-AATTGATTCG-3'	531	14
	Down	5'-TTTAGAATTCAT-CTTGACTACC-3'		
CMV	Up	5'-TGATAAGAACGCT-TGTTCCGC-3'	487	4
	Down	5'-TTAGCCGTAAGCTGGTTGTTCCGC-3'		
CGMMV	Up	5'-CACAAGGTACCG-CTTTCCAGA-3'	419	19
	Down	5'-CACCAACCATCAG-AAGACCCTCG-3'		
ZYMV	Up	5'-GCTCCATACATA-GCTGAGACAGC-3'	300	24
	Down	5'-CACAAATTTCAGC-ATGAGAACGAGC-3'		

^aUp and down indicate upstream and downstream primers, respectively.

포함하는 100 µl의 반응액을 만들었다. 이 반응액은 42 °C에서 45분간 RT반응 후, 변성 94 °C-30초, annealing 50~65 °C(TMV, CMV, CGMMV; 50 °C, ZYMV; 65 °C)-1분, 중합 72 °C-1분을 1 cycle로, 총 30 cycle 증폭을 실시한 다음 72 °C에서 7분간 중합시켰다. RT-PCR에 의한 반응 산물은 1.2% agarose gel에서의 전기영동 및 ethidium bromide에 의한 염색에 의하여 분석하였으며, 그 때의 반응산물의 유무 및 상대적인 농도에 의하여 바이러스 검출 정도를 결정하였다.

한편 ZYMV의 검출효율을 높이기 위하여 면역 RT-PCR(immunocapture RT-PCR; IC-RT-PCR)도 함께 실시하였다. IC-RT-PCR은 Wetzel 등(22)의 방법을 따랐으며, 항혈청은 ZYMV의 폴리클론 항체(ATCC PVAS 405)를 이용하였다.

결 과

고추와 오이의 공시 바이러스에 대한 반응. 고추의 유묘 및 오이의 자엽에 공시한 바이러스들을 접종한 결과, 두 식물 모두 모자이크를 발현하면서 전신감염되었다. 이때 접종 후 약 1개월 동안은 바이러스의 종류와 식물의 조합에 따라서 병징의 강약에 뚜렷한 차이를 보였으며, 특히 고추의 CMV와 오이의 ZYMV가 감염된 식물들에서 심한 모자이크 증상과 함께 잎의 기형을 나타내는 특성을 보였다(자료 생략). 그러나 열매와 종자를 채취하기 위하여 장기간 온실에서 육성시키는 과정에서 이들 식물의 병징은 신엽을 제외하고는 점차로 마스킹되었으며, 과실에서 모자이크병징이 발현되거나 기형을 초래하는 경우는 오이의 CGMMV에서만 일부 인정되었을 뿐, 다른 바이러스와 고추에서는 인정되지 않았다.

잎과 과실의 RT-PCR 검정. 공시 바이러스를 접종하고 온실에서 육성시킨 고추와 오이가 열매를 맺고 종자가 성숙된 단계에 각 식물체의 신엽으로부터 추출한 조즙액을 이용하여 각 바이러스에 대한 RT-PCR 검정을 실시하였다. 그 결과 모든 바이러스의 PCR산물이 인정되었으며, 그 반응의 한계는 고추의 TMV와 CMV, 오이의 CGMMV와 CMV에서는 각각 10^{-5} 의 희석한계를 나타냈으나, 오이의 ZYMV에서는 10^{-4} 에서 검출한계를 보였으며, 또한 ZYMV는 원액(10^0)에서도 검출되지 않았다 (Fig. 2). 한편 대조군으로 사용한 건전 고추와 오이의 잎과 열매의 조즙액을 공시한 모든 바이러스의 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하고 agarose gel에서 분석한 결과, 어떤 반응산물도 확인할 수 없었다(자료 생략).

과실의 부위별 및 종자의 착생위치별 RT-PCR 검정.

바이러스에 감염된 고추와 오이의 과실과 종자로부터 부위별 조직 및 착생위치별 종자에 있어서 바이러스의 농도를 RT-PCR로 검정하였다. 고추의 경우, TMV와 CMV

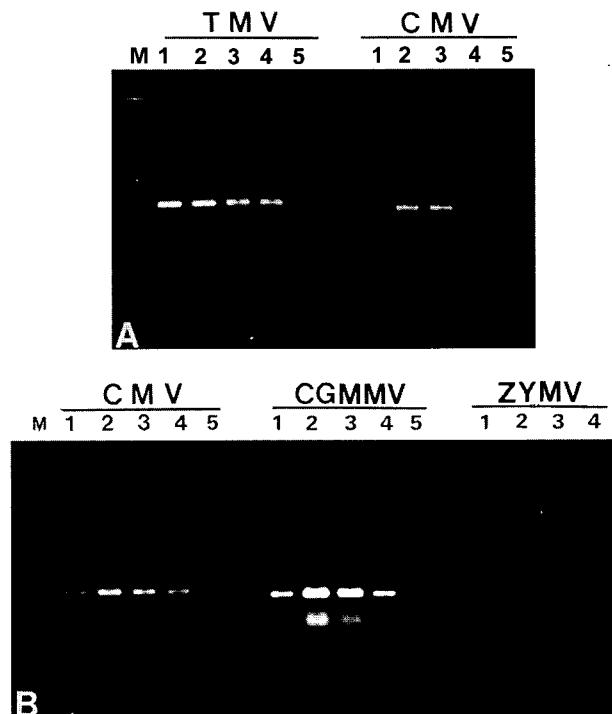


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products amplified using specific primers of TMV, CMV, CGMMV and ZYMV in crude sap from each virus-infected hot pepper (A) and cucumber (B) leaf. Lanes 1-5 are a dilution series of crude sap ($1=10^{-2}$, $2=10^{-3}$, $3=10^{-4}$, $4=10^{-5}$ and $5=10^{-6}$). Lanes M: 1 Kb DNA ladder (Promega) as size marker.

모두 과병과 그 주위의 조직에서 PCR산물의 농도가 높았고, 과육의 끝 부분으로 갈수록 농도가 낮아지는 경향을 보였다(Table 2). 이때 특히 TMV의 경우는 종자나 태좌에서의 검출도 과병부위의 종자나 태좌에서 PCR 산물의 농도가 높았으며, 과육의 끝 부분에 위치한 종자나 태좌에서는 낮았다(Table 3). 그러나 오이의 경우, CMV, CGMMV 및 ZYMV 모두 과병과 과실의 끝 부분에서 PCR 산물의 농도가 높았으며(Table 2), 종자나 태좌에

Table 2. RT-PCR detection of TMV, CMV, CGMMV and ZYMV in crude sap from different parts of fruit wall tissue of each virus-infected hot pepper and cucumber

Host	Virus	Detection part of fruit wall tissue ^a						
		1	2	3	4	5	6	7
Pepper	TMV	++ ^b	++	+	++	+	+	+
	CMV	++	++	+	+	+	+	+
Cucumber	CMV	++	+	+	(+)	+	+	++
	CGMMV	++	++	+	+	+	+	++
	ZYMV	++	+	+	-	-	+	++

^aDetection parts designated in numbers are presented in Fig. 1. ^b-not detected, + = low and ++ = high yield of PCR products by agarose gel electrophoresis.

Table 3. RT-PCR detection of TMV, CMV, CGMMV and ZYMV in crude sap from different parts of seed and placenta of each virus-infected hot pepper and cucumber fruit

Host	Virus	Detection part of seed and placenta ^a					
		3s	3p	4s	4p	5s	5p
Pepper	TMV	++ ^b	++	+	++	+	+
	CMV	-	+	-	+	-	+
Cucumber	CMV	+	++	-	+	-(+)	+
	CGMMV	++	++	+	+	+	++
	ZYMV	-	+	-	-	-	+

^aDetection parts are presented in Fig. 1. ^b-=not detected, + = low and ++=high yield of PCR products by agarose gel electrophoresis.

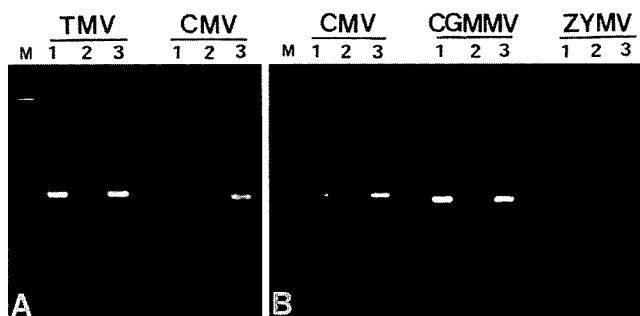


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products amplified using specific primers of TMV, CMV, CGMMV and ZYMV in crude sap of testa (lanes 1) and endosperm (containing embryo or cotyledon; lanes 2) of seeds collected from each virus-infected hot pepper (A) and cucumber (B) plant. Lanes 3 are RT-PCR products from each virus-infected leaf. Lanes M: 1 Kb DNA ladder (Promega) as size marker.

서도 일반적으로 과병과 과실의 끝 부분에 위치한 종자 또는 태좌에서 PCR산물의 농도가 높게 나타났고, 중간 부위에서 낮게 나타나는 경향을 보였다(Table 3).

종피와 배유의 RT-PCR 검정. 각 바이러스에 감염된 고추와 오이의 종자를 채취하여 종피 및 배유(배 또는 자엽을 포함)를 분리한 다음 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 고추종자에서는 종피에서 TMV가 검출되었고, 오이에서는 CGMMV와 CMV가 종피로부터 검출되었다(Fig. 3). 그러나 모든 종자의 배유로부터는 바이러스가 검출되지 않았다.

고 찰

일반적으로 바이러스에 감염된 식물체의 과실이나 종자내의 바이러스 분포 및 농도는 일정하지 않다(23). 따라서 식물체의 잎으로부터 바이러스를 검출하는 일반적인 방법으로는 바이러스의 존재를 정확하게 검정하기 어렵고, 특히 과실이나 종자의 부위별 작은 조직으로부터 바이러스를 검출하는 것은, 널리 이용되고 있는 효소결합

항체법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 등에서도 한계성을 갖는다(17).

RT-PCR은 식물 RNA 바이러스의 검출을 위한 가장 민감한 방법중의 하나로 많은 활용성이 기대되고 있다. Hu 등(10)은 바나나로부터 CMV를 검정하기 위하여 기존에 바이러스 검정에 있어서 민감한 방법으로 많이 활용되고 있는 ELISA 및 dot blot법과 RT-PCR 검출법을 비교한 결과, RT-PCR에 의한 검출율이 ELISA나 dot blot보다 최소한 100배 이상의 민감도를 나타냈다. 또한 RT-PCR의 민감성을 이용하여 루핀 종자로부터 CMV(23)나, 진딧물로부터 barley yellow dwarf virus(BYDV)(3), potato virus Y(PVY), potato leafroll virus(PLRV)(17), 선충으로부터 grapevine fanleaf virus(GFV)(8), 감자의 괴경으로부터 tobacco rattle virus(TRV)(21) 등을 검출할 수 있게 되었고, 이와 같은 결과들은 지금까지 바이러스의 검정이나 진단에 어려움이 있었던 미세 조직이나 개체로부터 바이러스의 검출을 가능하게 만들었다. 이 실험을 통해서도 고추와 오이의 과실이나 종자로부터 RT-PCR을 이용한 몇몇 바이러스의 검출을 시도한 결과, 이들 미세 조직으로부터 충분히 바이러스들을 검출할 수 있다는 사실이 확인되었다. 더욱이 단순한 바이러스의 검출이나 진단기법으로서의 활용성이 외에, 기주식물의 과실이나 종자에 있어서 바이러스의 분포특성도 파악할 수 있는 기법으로의 이용 가능성을 보였기 때문에 바이러스가 식물체로부터 종자에 이동하는 과정 등을 추적할 수 있는 생리학적 연구에도 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 한편 과실로부터 바이러스를 검정하는 과정에서 고추와 오이의 과실이 서로 다른 바이러스의 분포양상을 나타내는 특성을 보였는데(Table 2 및 3), 이것은 바이러스 보다는 기주식물인 고추와 오이의 과실이 착생되고 성장하는 특성에 따른 것으로 추정되었다. 즉 고추는 과병쪽에 태좌가 두껍게 풍쳐 있고 종자도 이곳을 중심으로 많이 붙어 있으며 과실의 선단부로 갈수록 태좌도 가늘고 종자도 적어지는 형태적 특성을 가지고 있는 반면, 오이는 과병부위나 과실의 선단부 모두 종자가 고르게 분포하는 성질을 가지고 있어 이러한 형태적 특성이 바이러스의 분포양상에 영향을 미친 것으로 생각되었다. 그러나 고추와 오이가 착과되고 성장하는 과정은 기본적으로 같은 양식을 취하고 있기 때문에 (15), 바이러스의 이동과정이나 분포가 두 과실의 형태적 특성과 관련이 있는지에 대한 해답은 얻을 수 없었다.

고추와 오이에서는 종자를 통하여 전염될 수 있는 바이러스로 TMV 및 CGMMV가 알려져 있다(1, 7). 이러한 사실은 이들 바이러스가 각각 고추와 오이 종자의 배와 배유에서는 검출되지 않았으나, 종피로부터 검출되었다는 점에서 표피에 오염된 이들 바이러스의 종자전염에 관련된 지금까지의 보고들(1, 7, 18)과 일치하였다. 다만

오이 종자의 종피에서 CMV도 검출된 점은, 고추와는 다르게 오이가 액과성으로 과육과 종자 사이가 액체로 채워진 구조로 되어 있기 때문에 바이러스의 농도가 높은 CMV의 경우, 과육에 분포하는 바이러스가 종피에 오염되었을 가능성을 암시해 주었다. 이러한 사실은 토마토의 TMV에 있어서도 바이러스의 농도에 따라 종피에의 오염율이 달라지고 농도가 매우 높을 경우에는 배유에서도 검출된다는 보고(2)에서와 같이 식물체내에 증식된 바이러스 농도는 바이러스의 종자전염에 영향을 미치는 하나의 요인이 될 수 있을 것으로 추정되었다. 한편 고추의 경우, 종자의 종피로부터 검출되는 TMV나 종자에서는 검출되지 않은 CMV 모두, 과실과 종자를 연결하는 태좌에서는 검출되었다. 이러한 결과는 바이러스가 태좌로부터 종자의 종피로 이동하는 이동기구와 관련해서 검토될 수 있는 흥미있는 과제로 생각된다.

RT-PCR기법의 발달은 대부분 RNA를 계단으로 가지고 있는 식물바이러스의 정밀한 검정이나 진단을 위한 수단으로 널리 활용되고 있다(9, 11, 13). 이 실험을 통해서도 고추나 오이의 과실 또는 종자의 바이러스를 검출하는 방법으로 RT-PCR은 매우 유용하였다. 다만 오이의 ZYMV와 같은 경우 바이러스의 검출한계가 다른 바이러스들에 비하여 낮았고, 이러한 결과는 ZYMV와 같은 potyvirus의 세포내 분포양식(13) 또는 바이러스의 증식농도와 관련이 있을 것으로 추정되었다. IC-RT-PCR기법은 세포내에 축적이 낮은 바이러스를 RT-PCR로 검출하는데 있어서 그 효율을 높일 수 있는 방법으로 고안되었다(12). 그러나 ZYMV의 검출효율을 높이기 위하여 IC-RT-PCR을 실시하였을 경우에도 RT-PCR과 유사한 검출한계를 보였다(자료 생략). 이러한 결과는 이 실험에서의 바이러스 검출시기가 열매와 종자로부터 바이러스를 검정하기 위하여 접종 후 2개월이 경과한 식물을 공시함으로서, 초기에 증식된 바이러스의 소실에 의한 결과일 가능성도 배제할 수 없었다.

요 약

고추와 오이의 과실 및 종자로부터 TMV, CMV, CGMMV 및 ZYMV 감염을 RT-PCR에 의하여 검정하였다. 이병된 식물체의 잎을 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, 고추의 TMV와 CMV, 오이의 CMV와 CGMMV에서 10^{-5} , 오이의 ZYMV에서 10^{-4} 의 검출한계를 보였다. 바이러스에 감염된 고추와 오이의 과실과 종자로부터, 과실의 부위별 및 종자의 착생위치별 바이러스를 RT-PCR로 검정한 결과, 고추의 경우, TMV와 CMV 모두 과병과 그 주위의 조직에서 검출농도가 높았고, 과육의 끝 부분에서 낮았다. 또한 종자나 태좌에서도 과병부위에서 검출농도가 높았으며, 과육의 끝 부분에 위치한 종자 또는 태

좌에서 낮았다. 한편 오이의 경우, CGMMV, CMV 및 ZYMV 모두 과병과 과실의 끝 부분에서 바이러스의 검출이 잘 되었으며, 종자와 태좌에서도 과병과 과실의 끝 부분에 위치한 것에서 RT-PCR반응이 강하게 나타났다. 각 바이러스에 감염된 고추와 오이의 종자를 채취하여 종피 및 배유를 분리한 다음 RT-PCR을 실시한 결과, 고추종자에서는 종피에서 TMV가 검출되었고, 오이에서는 CGMMV와 CMV가 종피로부터 검출되었다. 그러나 모든 종자의 배유(배, 자엽을 포함)로부터는 바이러스가 검출되지 않았다.

감사의 말씀

이 논문은 1997년도 학술진흥재단의 지방대학육성연구비에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Broadbent, L. 1965. The epidemiology of tomato mosaic. 11. Seed-transmission of TMV. *Ann. Appl. Biol.* 56:177-205.
- Broadbent, L. 1976. Epidemiology and control of tomato mosaic virus. *Ann. Rev. Phytopath.* 14: 75-96.
- Canning, E. S. G., Penrose, M. J., Barker, I. and Coates, D. 1996. Improved detection of barley yellow dwarf virus in single aphids using RT-PCR. *J. Virol. Methods* 56:191-197.
- 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.* 14: 7-12.
- 최장경, 박영섭, 김정옥, 박은경. 1989. 고추에서 분리한 담배 모자이크 바이러스의 생물적 특성. *한국식물병리학회지* 5: 331-336.
- 최충원. 1995. 오이(*Cucumis sativus L.*)에서 분리한 *To-bamo* 및 *Potyvirus*의 생물적특성에 관한 연구. 강원대 석사논문 46 pp.
- Crowley, N. C. 1957. The effect of developing embryos on plant viruses. *Aust. J. Biol. Sci.* 10: 443-448.
- Esmenjaud, D. and Abad, P. 1994. Detection of grapevine fanleaf virus by RT-PCR in the nematode vector. *Plant Dis.* 78: 1087-1090.
- Hadidi, M., Moutasser, M. S. and Levy, L. 1993. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Plant Dis.* 77: 595-601.
- Hu, J. S., Li, H. P., Barry, K. and Wang, M. 1995. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Dis.* 79: 902-906.
- Jones, T. D., Buck, K. W. and Plumb, R. T. 1991. The detection of beet western yellow virus and beet mild yellowing virus in crop plants using the polymerase chain

- reaction. *J. Virol. Methods* 35: 287-296.
12. Kokko, H. I., Kivineva, M. and Karenlampi, S. O. 1996. Single-step immunocapture RT-PCR in the detection of raspberry bushy dwarf virus. *BioTechniques* 20: 842-846.
 13. Langeveld, S. A., Dore, J., Memelink, J., Derkx, A. F. L. M., Van der Vlugt, C. I. M., Asjes, C. J. and Bol, J. F. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.* 72: 1531-1541.
 14. Lee, J. Y., Jung, D. S., Chang, M. U. and Choi, J. K. 1993. Effective cloning of coat protein gene isolated from tobacco mosaic virus pepper (TMV-P) strain. *Korean J. Plant Pathol.* 9: 136-138.
 15. Mauseth, J. D. 1988. Fruit. In: *Plant Anatomy* (Mauseth, J. D. ed.). The Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park. pp. 439-451.
 16. Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73: 2099-2103.
 17. Singh, R. P., Kurz, J. and Boiteau, G. 1996. Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 59: 189-196.
 18. Taylor, R. H., Grogan, R. G. and Kimble, K. A. 1961. Transmission of tobacco mosaic virus in tomato seed. *Phytopathology* 51: 837-842.
 19. Ugaki, M., Tomiyama, M., Kakutani, T., Hidaka, S., Kiguchi, T., Nagata, R., Sato, T., Motoyoshi, F. and Nishiguchi, M. 1991. The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 72: 1487-1495.
 20. Wang, H., Qi, M. and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.
 21. Weidemann, H.L. 1995. Detection of tobacco rattle virus in potato tubers and roots by polymerase chain reaction (PCR). *J. Phytopath.* 143: 455-458.
 22. Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. and Dunez, J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* 33: 355-365.
 23. Wyllie, S., Wilson, C. R., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. 1993. A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. *Aust. J. Agric. Res.* 44: 41-51.
 24. 윤주연, 최장경. 1998. 오이에서 분리한 쥐카니 황화모자이크 바이러스(ZYMV) RNA 3말단영역의 염기서열. *한국식물병리학회지* 14: 23-27.

(Received December 9, 1998)