

고추에 엽맥퇴색병을 일으키는 오이 모자이크 바이러스(CMV-VCH)의 특징

조점덕 · 이신호 · 김정수* · 최국선 · 김현란 · 정봉남 · 류기현¹
 농촌진흥청 원예연구소 원예환경과, ¹서울여자대학교 환경생명과학대학

Characteristics of *Cucumber mosaic virus-VCH* Causing Vein Chlorosis on Red Pepper in Korea

Jeom-Deog Cho, Sin-Ho Lee, Jeong-Soo Kim*, Gug-Seoun Choi, Hyun-Ran Kim,
 Bong-Nam Chung and Ki-Hyun Ryu¹

National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

¹Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

(Received on June 21, 2006)

Cucumber mosaic virus (CMV) was occurred on red pepper showing vein chlorosis or vein necrosis with the incidence rate of 52% from 62 specimens collected in natural fields. Among 32 samples infected with CMV, the specimens of 22 red pepper leaves showing vein chlorosis were infected singly with CMV-VCH. CMV-VCH induced vein chlorosis on the inoculated leaves, and vein banding and vein necrosis on the upper leaves of *Nicotiana glutinosa*, and then killed after showing bud necrosis. The typical symptoms of vein banding, malformation and blister were produced on the upper leaves of *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum* 'Ky-57' without symptoms on the inoculated leaves. The commercial cultivars of 'Bugang', 'Manitta' and 'Gwariput' were shown the typical symptom of vein chlorosis by the mechanical inoculation of CMV-VCH. CMV-VCH was detected specifically by RT-PCR. Virus particles of CMV-VCH were isometric shape having 30 nm diameter. Ultraviolet absorption of purified CMV-VCH was maximum at 260 nm and minimum at 242 nm. The ratio of A260/A280 was 1.71. CMV-VCH had the single nucleo-protein having the molecular weight of 24.5 kDa.

Keywords : *Cucumber mosaic virus* (CMV-VCH), red pepper, vein chlorosis

고추에 발생하는 바이러스 종류는 세계적으로 약 60여 종이 보고되어 있으며(Kim과 Choi, 2002), 우리나라에서는 오이 모자이크 바이러스(*Cucumber mosaic virus*; CMV) 등 10종이 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004; Kim 등 1990A; Choi 등, 2005). 국내에서 보고된 10종의 바이러스 중에서 담배 연녹 모자이크 바이러스(*Tobacco mild green mosaic virus*; TMGMV)와 토마토 반점 위조 바이러스(*Tomato spotted wilt virus*; TSWV)는 지역적으로 발생하고 있고, 알팔파 모자이크 바이러스(*Alfalfa mosaic virus*; AMV), 감자Y 바이러스(*Potato virus Y*; PVY), 담배 모자이크 바이러스(*Tobacco mosaic virus*; TMV)와 고추 엽맥

퇴색 바이러스(*Pepper vein chlorosis virus*; PVChV; Kim 등, 1990B)들은 최근에는 발생되지 않는 바이러스이며, 그 외 4종류 바이러스인 CMV, 잠두 위조 바이러스(BBWV 2), 고추 연한 모틀 바이러스(PMMoV), 고추 모틀 바이러스(PepMoV)가 전국적으로 발생하여 피해를 주고 있다(Choi 등, 2005).

CMV는 전 세계적으로 발생하며 9과 100여종의 식물에 감염을 일으키는데(DPV No. 400), 고추에서는 1980년대 TMV와 함께 주요 바이러스로 보고된 이후(Kim 등, 1990, 1991) 현재까지 지속적으로 발생하여 피해를 주고 있다. 최근에 CMV는 고추에서 BBWV2와 함께 가장 중요한 바이러스이며(Choi 등, 2005; Cho, 등 2006), CMV의 대표적인 병징은 모자이크이고 병징이 심해지면 세입화하고 식물체가 위축된다. 고추가 원예작물 중에서 가장 중요한 작물임에도 불구하고 고추에서 발생한 CMV 분

*Corresponding author

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

E-mail) kimjsoo@rda.go.kr

리주가 바이러스 저항성 검정 등에 범용화되어 있지 않고 다른 작물이나 중간기주에 발생한 CMV 분리주를 일반적으로 사용하고 있다. 본 논문에서는 고추잎에 발생하는 바이러스 병징으로 보고되지 않았던 새로운 엽맥퇴록 및 엽맥괴저 병징을 일으키는 CMV 분리주에 대한 생물적 특성 등을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

생물검정. 고추 잎에 엽맥퇴록 병징을 보이는 시료를 채집하여 명아주 등 지표식물에 접종하였다. 명아주 접종 잎에 나타난 단일 국부병반을 3회 생물순화를 한 후 증식하였으며 분리주는 CMV-VCH로 하였다. 인공접종은 0.01 M 인산완충액, pH 7.0을 사용하여 마쇄한 후 2-3엽기 건전 지표식물에 카보렌덤을 뿌리고 종이 타월을 이용하여 접종하고 수도물로 세척하였다. 지표식물에 나타난 병징은 2~3주간 조사하였다.

유전자 진단. 이병잎에서 전체 핵산을 분리하여 Duplex RT-PCR 검정을 하였다. 핵산 분리는 RNeasy Plant Mini Kit를 이용하였으며, Duplex RT-PCR은 CMV와 BBWV2를 동시에 진단하였다. RT-PCR 조건은 48°C 45 min; 94°C 2min; <94°C, 30 sec; 50°C 30 sec; 72°C 1 min > 35 cycles; 72°C 7 min.이었다. CMV 프라이머는 CTPALL-F: 5'-YAS YTT TDR GGT TCA ATT CC-3'와 CTPALL-R: 5'-GACTGACCATTTTAGCCG-3'(Choi 등, 1999)를 이용하였다.

바이러스 순화. CMV-VCH는 담배 'KY57' 등에 증식하여 순수분리하였다. 순화방법은 Lot 등(1972)의 방법을 이용하였다. 이병잎과 0.5 M sodium citrate, pH 6.5 (0.5% thioglycolic acid 포함)에 1:1(V/W)로 섞어서 믹서기로 마

쇄한 후 4겹의 거즈로 거른 후 동일량의 클로로포름을 첨가하여 10분 동안 교반하였다. 균질된 혼합물을 12,000 g로 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 10% PEG(분자량 8,000)를 넣고 45분 동안 천천히 교반한 후 7,000 g에서 20분 동안 원심분리하여 침전물을 취하고 여기에 0.05 M sodium citrate, pH 7.0 완충액으로 바이러스를 부유시키고 5~25%의 설탕밀도구배 상층에 바이러스를 치상하여 22,000 rpm으로 2.5시간 원심분리하였다(Beckman SW28). 원심분리 후 만들어진 우유 빛 밴드를 취하고 0.05 M sodium citrate, pH 7.0 완충액에 희석하여 37,000 rpm으로 2시간 원심분리(Beckman Ti50.2)하였다. 침전물을 취하여 순화된 바이러스는 0.01 M 인산완충액에 현탁하였다.

전자현미경 검정. 순화된 바이러스 입자는 Uranyl acetate로 염색하여 Dip 방법으로 검정하였다. 바이러스 입자 사진은 LEO 906E, 80 KV에서 디지털 영상화하였다.

결과 및 고찰

발생조사. 노지 재배 고추에 바이러스 병징을 나타내는 시료를 채집하여 바이러스를 검정한 결과 총 62개 중 52%인 32개가 CMV에 감염되었다. CMV에 감염된 32개 시료중 68.8%인 22개 시료가 CMV에 단독감염 되었으며, 고추 잎의 병징은 모두 엽맥퇴록(Fig. 1A) 및 엽맥괴저(Fig. 1B)이었다. 엽맥퇴록 병징을 나타낸 시료에서 순수분리한 바이러스 분리주는 CMV-VCH로 명명하였다. 생육초기에 엽맥퇴록 병징을 보였던 고추들은 3개월 후에 재조사한 결과 모두 상업이 모두 심한 모자이크와 기형의 전형적인 CMV 병징을 보였다.

생물적 특성. 고추에 전형적인 엽맥퇴록 및 괴저병징

Table 1. Comparison of biological characteristics for CMV-VCH and other major CMV isolates

Indicator plant	Reactions ^a for the isolate ^b of					
	CMV-VCH1	CMV-VCH3	CMV-Sa	CMV-Mf	CMV-PaFM	CMV-CARNA5
<i>Chenopodium quinoa</i>	LNS/-	LNS/-	NL/-	NL/-	NL/-	NL/-
<i>C. amaranticolor</i>	NS/-	NS/-	NL/-	NL/-	NL/-	NL/-
<i>Vicia faba</i>	-/-	-/-	*	*	*	-/-
<i>Vigna unguiculata</i>	NS/-	NS/-	*	*	*	-/-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	VCh/VN, Ma, BN	VCh/VB, Ma, BN	*	*	*	NS/SM
<i>N. benthamiana</i>	-/M, VB, MAL	-/M, VB, MAL	NS/M, D	-/M	-/M	NS/SM
<i>N. tabacum</i> 'KY57'	-/M, B, MAL	-/M, B, MAL	RS/RS, M	-/M	-/M	NS/SM
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-/M	-/M	*	*	*	-/BN
<i>Capsicum annum</i>	-/VCh, MAL	-/VCh, MAL	-/M	-/M	-/M	-/M

^aB, Blister; BN, Bud necrosis; LNS, large necrotic spot; M, mosaic; MAL, malformation; NL, necrotic local; NS, necrotic spot; SM, severe mosaic; VB, vein banding; VCh, vein chlorosis; VN, vein necrosis; *, not tested.

^bCMV-Sa isolated from *Stellaria aquatica* in subgroup I (Choi et al., 2004); CMV-Mf from *Melandryum firmum* (Choi et al., 1998); CMV-PaFM from paprika (Kim et al., 2002); CMV-CARNA5 from table tomato (Choi et al., 2001).

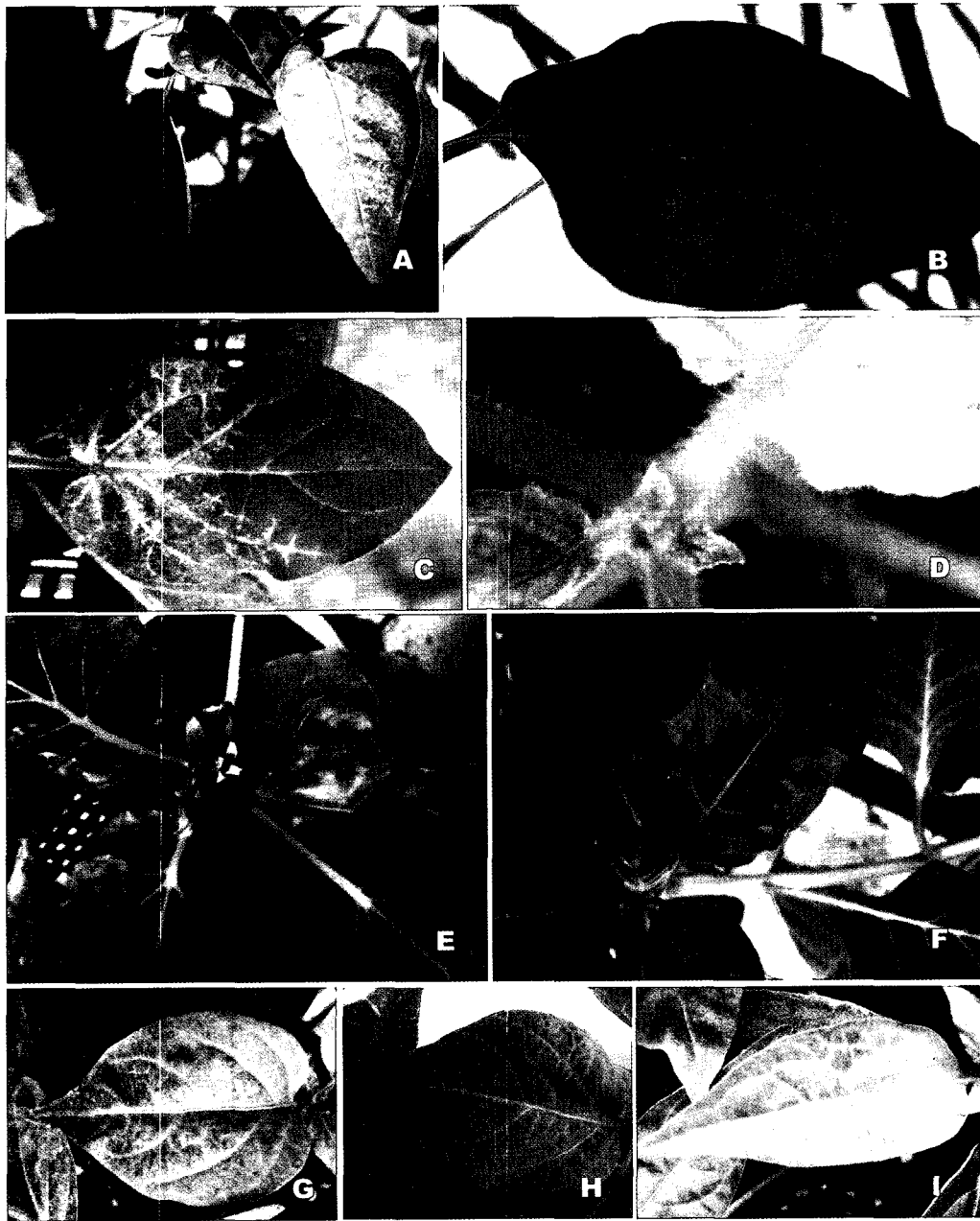


Fig. 1. Symptomatology by CMV-VCH. **A**, Typical vein chlorosis on leaf of red pepper in field; **B**, Vein necrosis on red pepper; **C**, Systemic vein chlorosis on *Nicotiana glutinosa*; **D**, Bud necrosis of *N. glutinosa*; **E**, Typical mosaic, vein banding and leaf malformation on *N. benthamiana*; **F**, Mosaic and malformation on *N. tabacum* 'Ky-57'; **G**, Vein chlorosis on 'Bugang' and 'Manitta' (H) those known as resistant cultivars against CMV; **I**, Vein chlorosis and yellow on 'Gwariput' that known as a sensitive cultivar to CMV.

을 일으키는 CMV-VCH의 병원성은 Table 1에서 보는 바와 같다. CMV-VCH 분리주는 CMV-VCH1과 -VCH3 두 종류를 사용하였는데 이들은 병원성이 동일하였다. 두 분리주는 명아주(*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*)에서는 국부감염을 일으켰으며, 잠두에는 무병징, 동부에는 점종엽에 괴저반점을 나타내었다. *Nicotiana glutinosa* 등 담배 종류와 토마토에 전신감염을 일으켰는데, 특히 *N.*

*glutinosa*는 점종엽에 엽맥이 매우 심하게 퇴색되었고(Fig. 1C) 상엽에서는 순 괴저 병징이(Fig. 1D) 나타나 괴사하였다. 담배 *N. benthamiana*(Fig. 1E)와 *N. tabacum* 'Ky-57'에서는 상엽에 CMV의 전형적인 모자이크 병징이(Fig. 1F) 나타났다. CMV-VCH를 시판 고추 품종 중 저항성으로 알려진 '부강'(Fig. 1G)과 '마니따'(Fig. 1H) 그리고 이 병성인 '파리 풋고추'(Fig. 1I)에 인공접종한 결과 3품종

모두에 전형적인 엽맥퇴색 병징을 일으켰으며, 이병성 품종인 파리 풋고추에서 병원성이 다소 강하였다. CMV 저항성 고추 품종은 감염초기부터 포장에서와 같이 엽맥퇴색 병징이 나타났으며 감염된 2주 후 식물체 상엽이 기형이 되며 위축되고 한달 이상 오랜 기간이 지나면 식물체 전체가 기형이 되었다.

고추 분리주인 CMV-VCH와 쇠별꽃 분리주(CMV-Sa) 등 4개의 분리주와 병원성을 비교한 결과(Table 1) 가지과 지표식물인 담배 종류와 토마토, 고추에서 병원성이 상이 하였다. CMV-VCH는 *N. glutinosa* 담배에서 병원성이 매우 강하여 접종잎에 엽맥퇴색을 일으킨 후 상엽에 엽맥괴저, 기형 및 순 괴저 병징을 일으켜 식물체가 고사하였다. 담배 지표식물 중 가장 감수성인 *N. benthamiana*에서는 CMV-VCH는 엽맥녹대와 기형병징을 일으킨 반면에 CMV-Sa는 식물체가 고사하였으며 다른 분리주는 모자이크 병징으로 CMV 분리주들 간에 병원성 차이가 매우 컸다. 토마토 분리주인 CMV-CARNAS는 토마토에 순 괴저병징을 일으키나 고추 분리주인 CMV-VCH는 모자이크 병징을 일으켜 분리주간의 생물적 특성이 다르므로 저항성 검정을 위한 시험은 해당 작물에 적합한 CMV 분리주를 선택하여야 할 것이다.

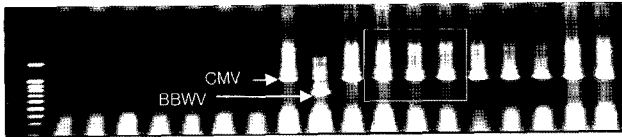


Fig. 2. Duplex RT-PCR of CMV (940 bp) and BBWV 2 (654 bp) for red pepper showing vein chlorosis. The open box represents the CMV isolates of VCH1, VCH2 and VCH3 from the left.

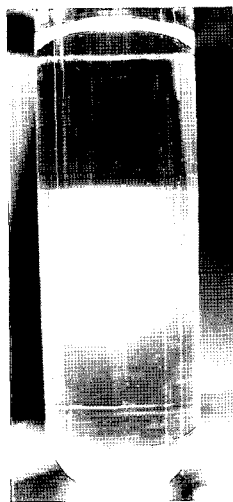


Fig. 3. Thick milkish virus band was formed after 5-25% sucrose density centrifugation.

유전자 진단. 고추 잎에 엽맥퇴색 병징을 나타낸 시료를 채집하여 전체 RNA를 추출한 후 바이러스 감염여부를 조사한 결과 11개 시료 중 10개의 시료가 CMV에 감염되어 있었다(Fig. 2).

설탕 밀도 구배 원심분리. CMV-VCH를 부분 순화한 후 5-25%의 설탕밀도 구배 원심분리 결과 우유 빛 바이러스 층이 형성되었다(Fig. 3).

순화 바이러스의 자외선 흡광도. CMV-VCH를 순화하여 자외선 흡광도 조사 결과 전형적인 핵단백질의 흡광곡선을 나타내었다. 최고점은 260 nm이었으며 최저점은 242 nm이었다(Fig. 4). 바이러스 핵산과 단백질 비율은 1.71로서 CMV의 전형적인 물리적 조성 특성을 갖고 있었다. 바이러스 순화 농도는 10.1 mg/ml이었다.

바이러스 입자 형태. 순화한 바이러스를 Uranyl acetate로 염색하여 DIP 방법으로 검정한 결과 직경이 30 nm의 구형 입자가 관찰되었다(Fig. 5).

바이러스 단백질 분자량. 순화된 CMV-VCH 바이러스를 SDS로 처리하여 단백질 분자량을 측정된 결과 약 24.5 kDa이었다. Habili and Francki(1974)에 의하면 CMV의 단백질은 분자량이 24,500인 단일 단백질이라고 보고

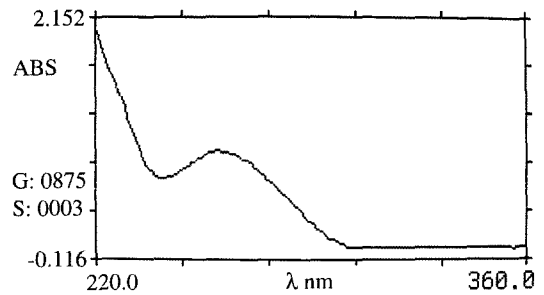


Fig. 4. Ultraviolet absorption spectrum for the purified virus of CMV-VCH from red pepper showing vein chlorosis.

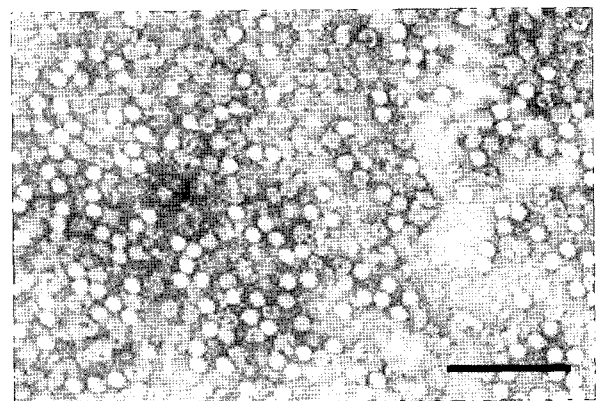


Fig. 5. The purified virus particles of CMV-VCH. The virus particles were isometric having the diameter of 30 nm. Bar represents 200 nm.

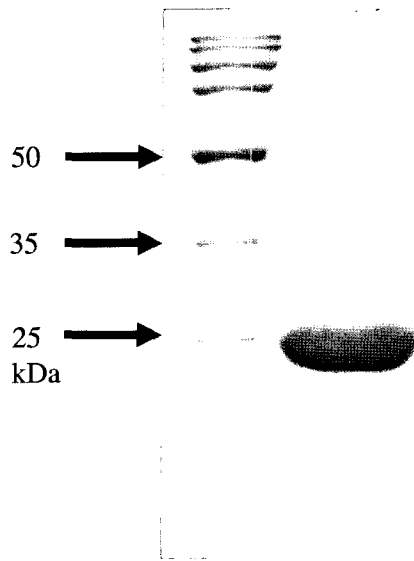


Fig. 6. Molecular weight of nucleo-protein for CMV-VCH released by the 12% SDS in the poly-acryl amide gel on the electric field at 23 mA for 3 hrs.

하여 CMV-VCH도 동일하였다(Fig. 6).

요 약

노지 포장에서 채집한 고추 잎에 바이러스 병징을 나타내는 총 62개 시료 중 32개(52%) 시료가 CMV에 감염되었다. CMV에 감염된 32개체 중 22개(68.8%) 시료는 엽맥퇴락 및 엽맥괴저 병징을 나타냈으며 모두 CMV(CMV-VCH)에 단독감염되어 있었다. 생물검정결과 *Nicotiana glutinosa*에서 집중엽에 엽맥퇴락, 상업에 엽맥늑대, 엽맥괴저, 순괴저에 이르는 심한 병징을 보였고 *N. benthamiana*와 *N. tabacum* cv. 'Ky-57'에서 집중엽에 무병징, 상업에 엽맥늑대, 기형 및 물집 병징을 일으켰다. 고추 시판품종인 '부강', '마니파' 그리고 '파리꽃고추' 모두 엽맥퇴락 병징이 나타났으며 후기에는 기형이 되었다. RT-PCR 유전자 진단결과 엽맥퇴락 병징의 시료는 모두 CMV에 감염되었으며, CMV-VCH 바이러스 입자는 약 30 nm의 구형이었다. 자외선 흡광도는 260 nm에서 최고, 242 nm에서 최저였으며 핵산과 단백질 비율은 1.71이었다. CMV-VCH의 핵 단백질은 단일 단백질이며 분자량은 24.5 kDa이었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21과제로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Cho, J. D., Kim, J. S., Choi, G. S., Kim, H. R., Chung, B. N. and Ryu, K. H. 2005. Characteristics of *Cucumber mosaic virus* causing vein chlorosis on red pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 21: 426 C-73(Abstract).
- Cho, J. D., Lee, S. H., Choi, G. S., Lim, T. J., Chung, B. N., Ryu, K. H. and Kim, J. S. 2006. Viruses and their mixed infections on red peppers at Jeolla-do Province in 2005. *Plant Pathol.*, April 21: 124-125(Abstract).
- Choi, G. S., Kim, J. H., Kim, J. S. and Choi, J. K. 2004. Characterization of cucumber mosaic virus isolated from water chickweed. *Plant Pathol. J.* 20: 131-134.
- Choi, G. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Kim, J. S. and Ryu, K. H. 2005. Occurrence and distribution of viruses infecting pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 21: 258-261.
- Choi, H. S., Ryu, J. K., Ahn, K. K., Cho, J. D. and Kim, J. S. 2001. *Cucumber mosaic cucumovirus-CARNA5* causing bud necrosis on table tomato. *Plant Pathol. J.* 17: 169-173.
- 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. *Plant Pathol. J.* 14: 7-12.
- Choi, S. K., Choi, J. K., Park, W. M. and Ryu, K. H. 1999. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *J. Virol Methods.* 83: 67-73.
- Habili, N. and Francki, R. I. 1974. Comparative studies on tomato aspermy and *Cucumber mosaic viruses*. III. Further studies on relationship and construction of a virus from parts of the two viral genomes. *Virology* 61: 443-9.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병목록. 제4판. 한국식물병리학회 779 pp.
- Kim, J. H., Choi, G. S. and Choi, J. K. 2002. Characterization of *Cucumber mosaic virus* subgroup II isolated from paprika in Korea. *Plant Pathol. J.* 18: 6-11.
- Kim, J. S. and Choi, G. S. 2002. Viruses infecting pepper and their characteristics. *J. Kor. Capsicum Res. Coop.* 7: 23-47.
- Kim, J. S. and Lee, K. H. 1991. Virus disease incidence and symptom expression of peppers cultivated in vinyl house, and serological relation ship of CMV isolates from peppers. *Res. Rept. RDA (C.P)* 33: 8-14.
- Kim, J. S., Kim, S. K., Choi, G. S. and Lee, M. W. 1990A. Virus disease incidence and symptom appearance in red pepper. *Korean J. Plant Pathol.* 6: 125-132.
- Kim, J. S., Kim, S. K., Lee, S. Y. and Lee, M. W. 1990B. A pepper vein chlorosis virus causing stem necrosis and vein chlorosis on red pepper in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 6: 376-381.
- Lot, H., Marrou, J., Quiot, J. B. and Esvan, C. 1972. Contribution à l'étude de virus de la mosaïque du concombre (CMV) II: methode de purification rapide du virus. *Annales dePhytopathologie* 4: 25-38.