

파프리카 과실에 괴사반점을 일으키는 *Pepper mild mottle virus*의 병원형

최국선* · 최승국 · 조점덕 · 조인숙

국립원예특작과학원 원예특작환경과

A Pathotype of *Pepper mild mottle virus* Causing Necrotic Spot Symptoms in Paprika Fruit

Gug-Seoun Choi*, Sung-Kook Choi, Jeom-Deog Cho and In-Sook Cho

Horticulture and Herbal Environmental Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science,
Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

(Received on February 19, 2013; Revised on April 1, 2013; Accepted on June 9, 2013)

Black necrotic spots were observed from the fruits of paprika that were cultivating in a vinylhouse. The casual agents of the symptom were identified as several isolates of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) by responses of indicator plants, electron microscopy, and RT-PCR analysis. Symptoms of the viral disease were mild mottle in the young leaves, necrotic spots on the fruits and the fruit apex of paprika, but the symptoms were not shown on the mature leaves. All of the PMMoV isolates were determined as P_{1,2,3} pathotypes from the biological responses on the chilli pepper lines used for discrimination of tobamovirus pathotypes. Pathogenicity of the PMMoV isolates was also confirmed using mechanical inoculation method to paprika seedlings. The coat protein (CP) genes of the PMMoV isolates were compared at the nucleotide and amino acid levels with the previously published PMMoV isolate. The isolates share 96 to 99% CP nucleotide identity among the isolates. The CP of P_{1,2} pathotype PMMoV-P2 presented Met at position 139, But the CPs of P_{1,2,3} pathotype PMMoVs from paprika showed Met to Asn substitution at the same position. This is the first report of identification of P_{1,2,3} pathotype PMMoV isolates from paprika in Korea.

Keywords : Coat protein, Identification, Paprika, Pathotype, *Pepper mild mottle virus*, PMMoV

파프리카(*Capsicum annuum* var. *angulosum*)는 매운 맛이 있는 피망과 달리 단맛이 많아 단고추라고도 한다. 아삭아삭하게 씹혀 샐러드용으로 많이 소비되고 있으며, 2011년 생산액은 1,745억 원으로 국내 농산물 중 주요 수출 품목이다. 파프리카 재배면적은 증가 추세이지만, 각종 병해충의 발생으로 수량 감소와 품질 저하로 경제적 손실이 발생하고 있다. 우리나라에서 파프리카를 포함한 고추에 발생하는 바이러스들은 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 등 16종이 보고되었다(한국식물병리학회, 2009). 특히 시설재배를 위주로 하는 파프리카에서 발생하는 주요 바이러스들의 종류는 CMV, *Pepper mottle virus*

(PepMoV), *Broad beam wilt virus 2* (BBWV2), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) 등이 있으며 이들 바이러스들은 주로 진딧물 또는 총채벌레가 매개하는 총채전염에 의하여 피해가 확산된다(Cho 등, 2007; Choi 등, 2005).

최근 제주도와 경상남도 함안군 파프리카 재배단지에서 파프리카 과실에 검은 괴저 반점 증상이 관찰되었고 이런 증상이 나타나는 파프리카 식물체는 괴사하여, 결국 재배를 포기하게 되어 농가에 막대한 경제적 피해를 초래하고 있다. 따라서 본 연구에서는 파프리카의 과실에 검은 반점을 나타내는 원인 바이러스들을 동정하고, tobamovirus 병원형(pathotype)의 검정 결과를 보고하고자 한다.

병징과 발생현황. 파프리카의 성숙한 잎에는 무증상이었고, 단지 신엽에 약한 얼룩 증상이 관찰되었다(Fig. 1A). 하지만 과실에는 검은색의 불규칙한 원형 반점(Fig. 1B),

*Corresponding author

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

Email) choigs@korea.kr



Fig. 1. Symptoms occurred in paprika plants infected with *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) isolates. **A:** Mild mottle symptoms on young leaf, **B:** Necrotic spots on the fruit apex of paprika, **C:** Necrotic spots on the fruit apex of paprika, **D:** Paprika plants were died by cutting artificially the bottom parts of the plants infected.

과경과 꼭지 부위에 괴사반점(Fig. 1C)을 형성하였다. 이 병이 발생한 파프리카는 새로 착과되는 과실에도 동일한 병징이 발현되었다. 발병 식물체는 지속적으로 비상품과(非商品果)를 형성하기 때문에 지체부위를 절단하여 식물체 전체를 완전하게 고사시키는 재배 하우스도 있었다(Fig. 1D). 제주도 제주시에서 조사주수 280주 중 16주가 감염이 확인되어 감염율 5.7%, 경상남도 함안군에서는 조사주수 750주 중 188주가 감염되어 25.1%의 감염율을 나타냈다. 발생 양상은 접촉전염이 되는 Tobamovirus의 전염 특성(Van Regenmortel과 Fraenkel-Conrat, 1986)과 동일하게 파프리카의 재식 열 방향으로 일정하게 확산되는 경향을 보였다.

바이러스 동정. 파프리카 과실 및 꼭지에 괴사 증상을 전자현미경으로 검정한 결과, 길이가 300 nm인 전형적인 tobamovirus 입자가 관찰되었다. 바이러스 입자가 검출된 파프리카의 과육을 *Nicotiana glutinosa*에 접종한 후, 국부병반을 분리하여 고추 대목 ‘PR 파워’에 바이러스를 증식하였다. 포장에서 채집한 파프리카와 증식한 시료를 *Pepper mild mottle virus*(PMMoV)의 외피단백질유전자 영역을 포함하는 특이적 프라이머들을 이용하여 RT-



Fig. 2. Analysis of RT-PCR products amplified from *Pepper mild mottle virus* isolates collected from paprika using a set of primers (Choi *et al.*, 2011). 580 bp RT-PCR products are indicated by an black arrow. M; 1 kb DNA ladder, H; healthy paprika leaf.

PCR를 실시하였다(Choi 등, 2011). RT-PCR 결과 580 bp 크기의 PCR 산물을 얻었다(Fig. 2). 이들 합성된 cDNA 들을 이용하여 염기서열을 결정한 결과, 기존에 보고된 PMMoV-P2(Choi 등, 2011)와 파프리카에서 분리한 7개 PMMoV 분리주들 사이의 외피단백질 유전자의 염기서열 상동성은 96–99%로 나타났다. 파프리카 분리주들인 HA-1-3, HA-1-4 및 JE-3-2를 파프리카에 재접종한 결과, 앞에는 약한 모틀 증상과 과실에는 괴사 반점을 형성하였다. 이러한 결과들에 의거하여 파프리카의 과실에 검은

PMMoV isolates	1	11	21	31	41	51	61	71	
P-2	MAYTVSSANQ	LVYFGSVWAD	PLELQNLCTS	ALGNQFQTQQ	ARTKVQQQFS	GVWKTIPAT	VRFPATGFKV	FRYNAVLDL	
HA-1-4	-----T-----	-----L-----	-----	-----T-----	-----T-----	-----D-----	-----	-----	
HA-1-3, HA-2-1, HA-2-2, HA-2-3, JE-3-2, JE-3-3	-----T-----	-----L-----	-----	-----A-----	-----T-----	-----D-----	-----	-----	
	81	91	101	111	121	131	141	151	157
P-2	VSALLGAFDT	RNRIIEVENP	QNPTTAETLD	ATRRVDDATV	AIRASISNLM	NELVRGTGMY	NQALFESASG	LTWATTP	
HA-1-4	-----	-----	-----	-----	-----	-----N-----	-----	-----	
HA-1-3, HA-2-1, HA-2-2, HA-2-3 JE-3-2, JE-3-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----N-----	-----V-----	-----	

Fig. 3. Comparison of coat protein sequences between *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) P-2 isolate (pathotype_{1,2}) (Choi *et al.*, 2011) and 7 isolates of PMMoV (pathotype_{1,2,3}) collected from paprika in this study.

반점을 나타내는 원인 바이러스는 *Tobamovirus*속 PMMoV로 동정되었다.

PMMoV 병원형(pathotype) 판별. *Tobamovirus*에 대한 고추의 저항성 발현에 따라서 고추 유전자 유전형을 L¹, L², L³, L⁴로 구분하였고, 이들 대립유전자에 대한 *Tobamovirus* 병원형(pathotype, P)으로 P₀, P₁, P_{1,2}, P_{1,2,3}으로 구분하고 있다(Rast, 1979, 1988). 최근에는 L⁴ 유전자를 가지고 있는 고추 계통의 저항성을 무너뜨려 침입하는 새로운 병원형으로 *Tobamovirus* P_{1,2,3,4}가 보고되었다(Antignus 등, 2008). 파프리카에서 분리한 PMMoV의 함안(HA라 표기함) 5개 분리주들과 제주(JE라 표기함) 2개 분리주에 대한 PMMoV의 *Tobamovirus* 병원형을 식별하기 위하여, 각각 다양한 L 유전자들을 가지고 있는 다양한 고추 계통들에 집중한 결과, *Capsicum annuum* Tisana, *C. frutescens* Tabasco, *C. baccatum* PI 260549 및 *C. chinense* PI 159236은 전신감염을 보였으나, L⁴ 유전자를 가지고 있는 *C. chacoense* PI260429은 접종엽에서만 국부 병반을 형성하였다. 따라서 Gilardi 등(1999)과 Rast (1979)의 PMMoV 병원형 분류체계에 따라 파프리카에서 분리한 PMMoV 7개 분리주들 모두 P_{1,2,3}으로 판별되었다.

7개 PMMoV 분리주들의 외피단백질은 157개의 아미노산들로 구성되어 있었다(Fig. 3). 이들 중, HA 분리주 4개와 JE 분리주 2개는 서로간 100% 아미노산 서열의 상동성을 보였다. 하지만 동일한 아미노산 배열을 하고 있는 6개 분리주들과 HA-1-4를 비교한 결과, 2개의 아미노산(31번째 Ala → Thr, 148번째 Val → Ala)에서 차이가 있었다. 고추에서 분리한 PMMoV-P2(최 등, 2011)의 외피단백질 아미노산 서열과 파프리카 분리주 HA-1-4는 6개, 다른 6개 분리주들에서 7개의 아미노산들이 차이를 나타냈다. PMMoV-P2 분리주의 외피단백질의 아미노산 서열 139번째가 Met인 반면, 파프리카 7개 분리주들 모두 이 위치의 아미노산이 Asn으로 확인되었다. 이것은 PMMoV 외피단백질 아미노산 139번째 Asn이 L³ 유전자를 함유하고 있는 *Capsicum* spp.에 전신감염을 유도하는 병원형 결

정인자로 작용한다는 보고와 일치하였다(Tsuda 등, 1998).

PMMoV의 외피단백질은 고추의 저항성 발현의 전형적 병원인 국부 과민감 반응을 유도하고 외피단백질의 몇몇 아미노산의 변화가 PMMoV 병원형을 결정하고 있다(Gilardi 등, 1999). 특히 82번째의 Ser이 Ala로 치환되었을 경우에는 전신 괴사반응을 일으킨다고 보고되었는데(Handa 등, 2002), 파프리카에서 분리한 모든 PMMoV 분리주들의 외피단백질 82번째 아미노산은 Ser으로 확인되었다. 또한 pathotype P_{1,2}인 PMMoV-P2 분리주의 외피단백질 아미노산 배열 139번째가 Met인 반면, 파프리카 7개 분리주들 모두 이 위치가 Asn으로 확인되어, 이탈리아 분리주 PMMoV P_{1,2,3}(Tsuda 등, 1998)과 일치하였다. PMMoV P_{1,2,3,4}와 P_{1,2}의 외피단백질 아미노산을 비교분석에서 47번째 Gly이 Arg, 86번째 Gln이 Lys으로 치환되어서 L⁴ 유전자를 함유한 *C. annuum* cv. Miogi의 저항성을 무너뜨린다고 보고되었다(Genda 등, 2007). 이 연구에서 분리한 파프리카 PMMoV 분리주들의 아미노산은 이들 각각 위치에 Gln 및 Gly로 구성되어 있어 *Tobamovirus*의 P_{1,2,3,4}와 차이를 보였다.

따라서 파프리카 과실에 검은 반점 및 꼭지 부위에 괴사를 일으키는 바이러스는 고추계통을 이용한 생물검정과 외피단백질 아미노산 분석으로 *Tobamovirus*의 P_{1,2,3}으로 모두 확인되었다. 금후에는 P_{1,2,3,4}의 존재유무도 조사되어 PMMoV에 대한 파프리카의 저항성 품종 육성에 함께 이용되어야 할 것이다.

요 약

시설재배단지에서 파프리카의 열매에 검은 괴저 반점 증상이 발생하였다. 이 증상주를 전자현미경, 지표식물 검정 및 RT-PCR 분석 결과, 원인 바이러스로 PMMoV로 동정되었다. 신엽에서 병징은 약한 모틀 증상, 과경과 과일에 검은 반점이 보였지만, 성숙한 잎에서는 증상이 나타나지 않았다. PMMoV의 분리주들에 대한 *Tobamovirus*

pathotype(P)의 판별 고추계통에 접종한 결과, 모두 P_{1,2,3}으로 확인되었다. 분리한 PMMoV를 건전 파프리카 유묘에 기계적 접종을 통하여 이 바이러스의 병원성을 증명하였다. PMMoV 분리주들의 외피단백질 유전자의 상동성은 96–99%였다. P_{1,2}인 PMMoV-P2 분리주의 외피단백질 아미노산 배열 139번째가 Met인 반면, 파프리카 분리주 모두 이 위치가 Asn으로 확인되었다. 본 논문은 파프리카에서 PMMoV pathotype P_{1,2,3}의 동정에 관한 우리나라 최초 보고이다.

Acknowledgement

This research was supported by National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Research Fund, 2012.

References

- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Maslenin, L. and Rosner, A. 2008. A new pathotype of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) overcomes the L⁴ resistance genotype of pepper cultivars. *Plant Dis.* 92: 1033–1037.
- Cho, J. D., Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, G. S. and Chung, B. N. 2007. Viruses and symptoms on peppers, and Their infection types in Korea. *Res. Plant Dis.* 13: 75–81. (In Korean)
- Choi, G. S., Cho, J. D., Chung, B. N., Cho, I. S. and Choi, S. K. 2011. Cause of the scion death in green pepper grafting system by a tobamovirus. *Res. Plant Dis.* 17: 191–195. (In Korean)
- 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 Pathology J.* 2: 258–261.
- Genda, Y., Kanda, A., Hamada, H., Sato, K., Ohnishi, J. and Tsuda, S. 2007. Two amino acid substitutions in the coat protein of *Pepper mild mottle virus* are responsible for overcoming the L⁴ gene-mediated resistance in *Capsicum* spp. *Virology* 97: 787–793.
- Gilardi, P., Wicke, B., Castillo, S., de la Cruz, A., Serra, M. T. and Garcia-Luque, I. 1999. Resistance in *Capsicum* spp. against the tobamoviruses. In : *Recent Research Developments in Virology*, ed. by S. G. Pandalai, vol. 1, pp. 547–558. India: Transworld Research Network.
- Hamada, H., Takeuchi, S., Kiba, A., Tsuda, S., Hikichi, Y. and Okuno, T. 2002. Amino acid changes in *Pepper mild mosaic virus* coat protein that affect L³ gene-mediated resistance in pepper. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 155–162.
- Rast, A. T. B. 1979. Pepper strains of TMV in the Netherlands. *Meded Fac Lan* 44: 617–622.
- Rast, A. T. B. 1988. Pepper tobamoviruses and pathotypes used in resistance breeding. *Capsicum Newsletter* 7: 20–23.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea. 5th ed., Suwon, Korea. 853 pp. (In Korean)
- Tsuda, S., Kirita, M. and Watanabe, Y. 1998. Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the L³ gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *MPMI* 11: 327–331.
- Van Regenmortel, M. H. V. and Fraenkel-Conrat, H. 1986. Tobacco mosaic virus. In: *The Plant Viruses*, ed. R. Koenig, pp. 79–100. Plenum Press, New York, USA.