

과제구분	기관프로젝트	Code:LS0205	수행시기	전반기	연구기간	'00 ~ 2001(완결)
연구과제명	수출유망 신작목 개발연구				과제책임자	정병찬
세부과제명	고추냉이 바이러스병의 조기정밀진단법 개발					
연구실별임무						
구분	소속	성명	전화번호	담당임무		
세부과제 책임자	특화작목개발시험장	권순배	033-243-1823	설계 및 시험총괄		
공동 연구자	"	허수정	033-243-1823	바이러스진단		
	"	장진선	033-243-1823	데이터정리		
	"	정정수	033-243-1823	데이터정리		
	작물경영연구과	변학수	033-258-5725	시료수집		
색인용어	고추냉이, 바이러스, 바이러스진단법					

1. 연구배경

고추냉이(*Wasabia japonica* Matsum)는 일본이 원산지인 속근성 다년생 반음지 식물로써 일본명으로는 와사비라고 하며 풍미, 향미, 신미를 가지고 있는 고급향신료 작물이다.

일본의 고추냉이 재배지에서 문제가 되는 주요 병해로는 연부병(*Erwinia aroideae*), 목입병(*Phoma wasabiae*)과 바이러스병이 보고되고 있다. 고추냉이에 발생하는 바이러스병은 위축증상 등 품질저하의 주요인이기 때문에 일본에서는 조직배양묘 생산에 있어서 바이러스검정을 실시하여 무병·우량묘를 보급하고 있는 실정이다. 최근 국내에서도 재배면적이 확대됨에 따라 바이러스 피해의 예방을 위하여 국내 재배지에서 발생하는 바이러스 종류와 그 진단방법 개발 등 대책마련이 필요한 실정이다. 본 시험에서는 국내 물고추냉이 재배지에서 발생하고 있는 바이러스의 발생양상 및 종류조사, 그리고 바이러스 종류별 생물적, 혈청학적 특성, 진단기술 확립 및 진단키트를 개발하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 발생 바이러스 조사

2000 ~ 2001년에 걸쳐서 철원, 평창의 고추냉이 재배지에서 고추냉이에 감염하는 주요바이러스로 밝혀져 있는 Cucumber Mosaic Virus, Tobacco Mosaic Virus, Turnip Mosaic Virus의 발생유무를 확인하기 위해 잎에 위축증상 혹은 생육 불량주를 채집, 항체검정법으로 검정하여 양성 반응주를 각 바이러스의 분리원으로 하였다.

나. 바이러스 순수분리 및 지표식물을 이용한 기주범위 조사

항혈청 검정법으로 바이러스감염이 확인된 각각의 이병시료에 0.01M 인산완충액(pH7.0)을 넣고 멸균 막자사발에서 마쇄한 다음, carborundum (600mesh)을 이용하여 공시 지표식물에 즙액 접종하였다. 바이러스의 순수분리는 단일병반분리법을 이용하였다. 순수 분리된 바이러스는 *N. glutinosa*를 비롯한 수종의 판별식물에 즙액 접종한 후 25℃ 온실에 유지하면서 발현되는 병징을 조사하였다.

다. 바이러스의 정제 및 입자 형태 관찰

바이러스의 순화는 기존의 문헌에 보고된 순화법을 참조하여 수행하였다 (표1). 바이러스 입자는 전자현미경(Carl Zeiss, Leo906)을 이용하여 Dip법으로 관찰하였다.

표 1. 본 시험에 이용된 바이러스 순화방법

바이러스명	증식기주	순화법
Tobacco Mosaic Virus	담배 (cv. Samsun)	Kwon <i>et al</i> (1994)
Cucumber Mosaic Virus	담배 (cv. Burley 21)	Kwon (1990)
Turnip Mosaic Virus	순무	Moghal and Francki(1976)

라. 바이러스 항체 생산 및 면역글로블린 정제

각 바이러스의 항체제조는 Kwon and Sako(1994)의 방법을 사용하였다. 순화바이러스(1mg/ml)를 항원에 Freund's complete adjuvant를 동량으로 하여 주사기(3ml) 2개와 연결 어댑터(Syringe adaptor)를 이용하여 혼합한 후, New Zealand White 토끼 뒷다리에 1차 근육주사하였으며, 10일 간격으로 incomplete adjuvant를 혼합한 항원을 1차주사와 동일한 방법으로 2차와 3차 근육주사를 하였다. 마지막 booster injection은 순화바이러스(1mg/ml)를 직접혈관 주사하였다. 항혈청의 채혈은 마지막 혈관주사 일주일 후 채혈전 24시간 동안 절식 시킨 토끼의 귀정맥을 살균한 면도칼로 부분절단하여 원심분리용 튜브에 20ml씩 받은 후 37℃에서 1시간-냉장고에서 12시간정도 정치시킨 후 원심분리하여 맑은 상등액을 항혈청으로 취하였다. 분리한 항혈청에 0.02%NaN₃를 첨가하여 50% glycerol 첨가 후 -20℃보관 혹은 동결건조시켜 보관하였다. 제조된 항혈청은 순화 바이러스액 및 이병즙액을 사용하여 한천 겔내 이중 확산법(S. Wakimoto,1993) 및 미침강 반응법(Ouchterlony,1968)을 이용하여 역가를 조사하였다. 각 바이러스의 항혈청으로부터 면역글로블린의 정제는 Immunopure(A/G) IgG purification 키트(PIERCE Co.)를 사용하여 정제하였다.

마. 바이러스별 진단방법 및 키트 개발

1) DAS-ELISA법

각 바이러스 (CMV, TMV, TuMV)에 대한 DAS-ELISA진단키트는 그림1의 모식도의 방법으로 조제하였다.

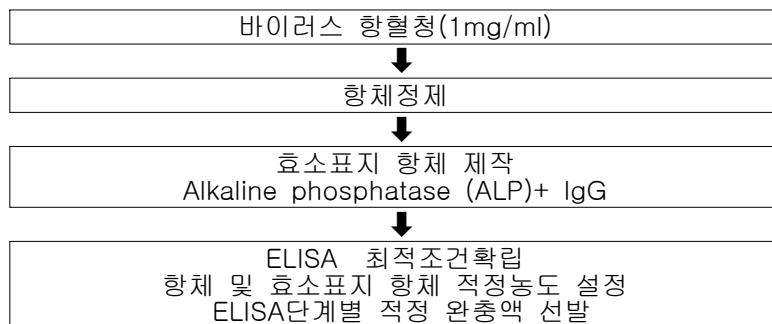


그림 1. DAS-ELISA 검정 키트 개발 모식도.

2) Immunostrips진단법

각 바이러스 (CMV, TMV, TuMV)에 대한 Immunostrips진단키트는 그림2의 모식도의 방법으로 조제하였다.

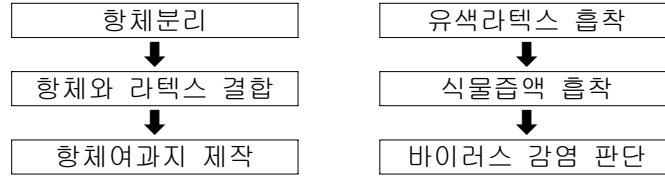


그림 2. Immunostrips 검정 키트 개발 모식도

3) 유전자진단(RT-PCR)법

식물바이러스분류학상 Potyviridae에 속하는 TuMV의 진단용 프라이머는 표2 처럼 7종 potyvirus의 coat protein 유전자의 보존배열을 참고한 Degenerated primer를 개발하였다. 또한 개발한 프라이머를 이용하여 RT-PCR진단은 그림3의 방법으로 수행하였다.

표2. 고추냉이에 감염하는 TuMV등 다수의 potyvirus를 동시에 진단할 수 있는 RT-PCR용 Primer 디자인 전략

TBV	5'-ATGGTTTGGTGCATAGA	TATTTGGGCTGGATGG-3'
TuMV	5'-ATGGTCTGGTGCATAGA	TGTTCCGGCCTGGATGG-3'
WMV	5'-ATGGTTTGGTGTATAGA	TATTTGGACTTGATGG-3'
ZYMV	5'-ATGGTTTGGTGCATTGA	TGTTTGGACTGGATGG-3'
BYMV	5'-ATGGTGTGGTGCATAGA	TATTTGGACTTGATGG-3'
PVY	5'-ATGGTTTGGTGCATAGA	TATTTGGGCTGGACGG-3'
Primer name	5'-ATGGTBTGGTGYATHGA	CCATCCAGSCCRAAYA-3'
	<i>POTY-P</i>		<i>POTY-M</i>

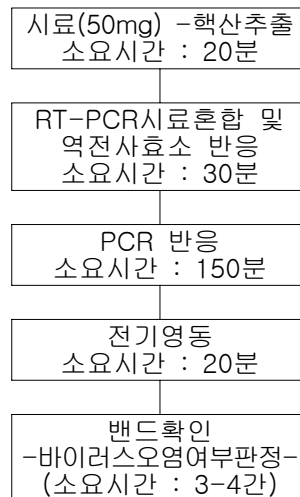


그림 3. RT-PCR기법을 활용한 RNA바이러스 진단 모식도

3. 결과 및 고찰

가. 바이러스병 발생양상조사

'00 ~ 2001년에 걸쳐 철원과 평창의 고추냉이 재배포장에서의 바이러스 이병여부를 조사한 결과 TuMV, TMV, CMV의 발생이 확인 되었고 이병율은 10.0 - 11.4%로 조사되었다.(표 3)

표3. 국내 고추냉이에 발생하는 바이러스 종류 및 이병정도 조사

조사 연도	조사 지역	조사주의 외관상 병징	조사 주수	이병주수				이병율 (%)
				TuMV	TMV	CMV	복합감염	
2000	철원	잎의 기형,모자이크	50	1	2	2	0	10.0
2001	철원	"	60	2	3	2	1	10.0
"	평창	"	35	2	1	1	0	11.4

♪ Agdia사 바이러스 진단키트 SRA44501, 18700, 57400 사용

나. 바이러스 분리 및 지표식물 검정

TuMV : 이병주를 *C. amaranticola*에 접종하여 나타난 국부병반을 3회 계대접종하여 분리하였다. *N. glutinosa*, *C. amaranticolor*의 접종엽에 국부병반, 순무의 상엽에 모자이크를 보였으며, 잠두에는 감염하지 않았다.

TMV : 잎에 퇴록반문 및 위축증상을 보이는 이병엽을 *N. glutinosa*에 접종하여 나타난 국부병반을 다시 *N. glutinosa*에 3회 계대접종하여 순수 분리하였다. 이를 담배 cv. Samsun에 접종, 증식하였다. *C. amaranticolor* 및 순무에의 병징은 각각 국부병반 및 모자이크증상을 나타냈다.

CMV : 위축증상을 이병엽을 *Vicia. faba*에 즙액접종하여 나타난 국부병반을 *N. glutinosa*에 접종하여 상엽으로부터 바이러스를 분리하였다. *C. amaranticolor*의 접종엽에 국부병반 및 순무에 전신감염하였다.

표4. 고추냉이에서 분리한 3종 바이러스의 지표식물 반응

바이러스	<i>N. glutinosa</i>		<i>C. amaranticola</i>		순 무		잠 두	
	접종엽	상엽	접종엽	상엽	접종엽	상엽	접종엽	상엽
TuMV	-	M	L	-	-	M	-	-
TMV	L	-	L	M	-	M	-	-
CMV	-	M	L	-	-	M	L	-

L: 국부병반, M : 모자이크, - : 비감염, 무병징

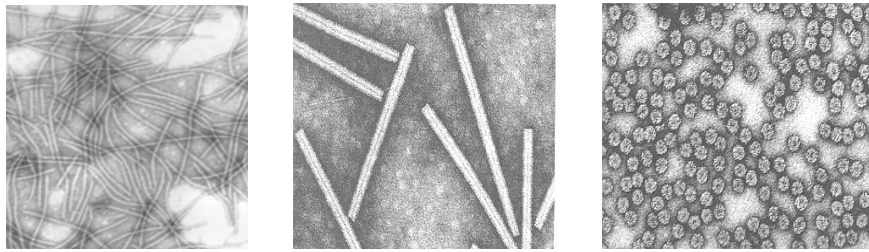
다. 바이러스의 정제 및 입자 형태 관찰

TuMV : 순수분리한 TuMV는 순무에서 증식한 후 Moghal and Francki (1976)의 방법으로 순화하였다. 순화액을 전자현미경으로 관찰한 결과 직경이 약 750nm×13nm의 사상형 입자가 균일하게 관찰되었다.(그림4)

TMV : 담배 cv. Samsun에 접종, 증식한 후 Kwon 등 (1994)의 방법으로 순화하였다. 순화액을 전자현미경으로 관찰한 결과 직경이 약 300×18nm의 막대형 입자가 균일하게 관찰되었다.(그림4)

CMV : 담배 cv. Burley 21에 접종, 증식한 후 Kwon (1990)의 방법으로 순화하였다. 순화액을

전자현미경으로 관찰한 결과 직경이 약 30nm의 구형 입자가 균일하게 관찰되었다.(그림4)



TuMV(750×13nm)

TMV(300×18nm)

CMV(30nm)

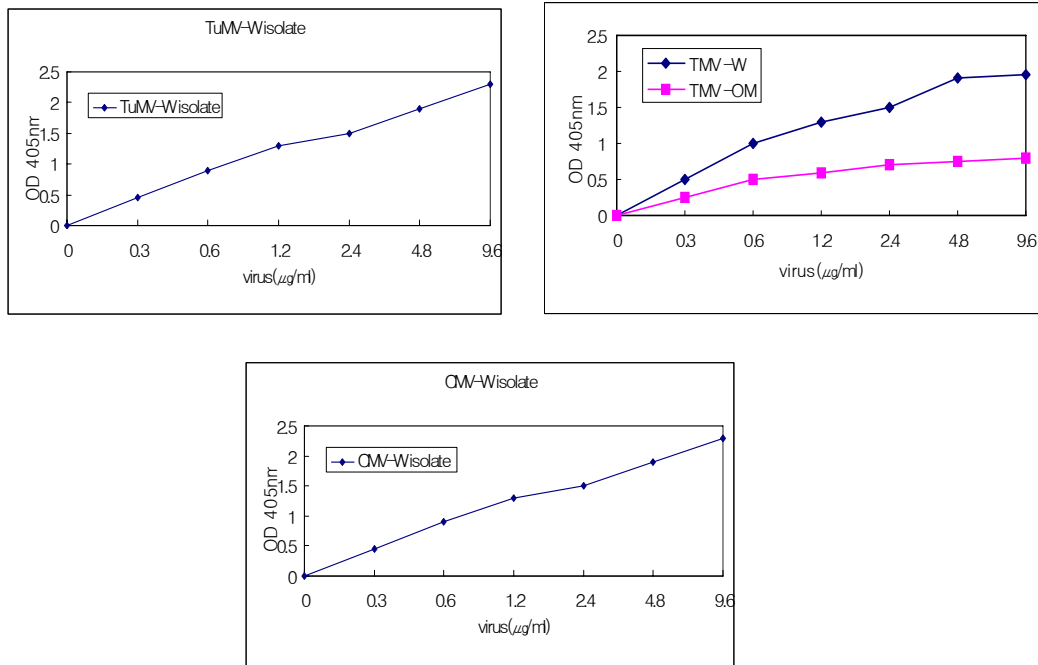
그림4. 고추냉이에서 분리한 3종 바이러스 입자의 전자현미경 사진.

라. 혈청학적 성질

TuMV-고추냉이 분리주 : 혈청학적 유연관계를 DAS-ELISA법으로 TuMV-보통계와 비교한 결과 높은 반응 특이성을 나타내 TuMV-고추냉이 분리주는 보통계- TuMV와 혈청학적 유연관계가 높은 것으로 보였다(그림5-A).

TMV-고추냉이 분리주 : 혈청학적 유연관계를 DAS-ELISA법으로 TMV-OM과 비교한 결과 1/2 정도의 OD값을 보여 TMV-W는 TMV-OM과 혈청학적 유연관계는 있으나 동일한 계통은 아닌 것으로 밝혀졌다(그림5-B).

CMV-고추냉이 분리주 : 혈청학적 유연관계를 DAS-ELISA법으로 Serotype I CMV와 비교한 결과 높은 반응 특이성을 나타내 CMV-고추냉이 분리주는 Serotype I 에 속하는 바이러스로 확인되었다(그림5-C).



A : TuMV-wasabi분리주의 DAS-ELISA반응, TuMV(보통계) IgG 및 Conjugate 이용

B : TMV-wasabi 계통과 TMV-CMV의 DAS-ELISA에서 반응 TMV-W IgG 및 Conjugate 이용

C : CMV-wasabi분리주의 DAS-ELISA반응, CMV-serotype I IgG 및 Conjugate 이용

그림5. 고추냉이에서 분리한 3종 바이러스의 혈청학적 특성 비교.

5. 바이러스별 진단방법 및 키트 개발

1) DAS-ELISA법

각 바이러스 (CMV, TMV, TuMV)를 진단할 수 있는 ELISA진단키트를 제작하여 최적반응 조건 구명시험을 수행한 결과, 표5와 같은 조건을 확립하였다. 개발된 ELISA키트는 저농도로 존재하는 바이러스의 정밀진단에 활용이 가능하기 때문에 성장점 배양한 고추냉이 조직배양묘의 바이러스 검정에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

표5. 개발된 고추냉이 바이러스 다량, 정밀 종합검정용 ELISA 진단키트의 적정사용조건 설정

검 사 바이러스	최 적 조 건			평균 OD ₄₀₅ 치	비 고 (진단기작)
	항체농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	이병즙액 희석(배)	효소표지 항체희석(배)		
TMV-W	2	$10^{-1} \sim 10^{-2}$	1×10^{-3}	2.0 ± 0.5	
TuMV	"	"	1×10^{-3}	2.0 ± 0.5	효소반응
CMV	"	"	1×10^{-3}	2.0 ± 0.5	

- 반응조건 : 항체(2hrs)→시료(2hrs)→효소결합항체(2hrs) →기질(30min)

2) Immunostrips 진단법

각 바이러스 (CMV, TMV, TuMV)를 진단할 수 있는 Immunostrips진단키트를 제작하여 최적반응조건 구명시험을 수행한 결과, 표6과 같은 조건을 확립하였다. 개발된 키트는 바이러스의 신속 검정이 가능하기 때문에 종묘 증식포 등 포장에서 바이러스 이병주 조기 제거에 효과적으로 이용이 가능한 것으로 판단된다.

표6. 개발된 고추냉이 바이러스의 신속, 간이 종합 검정용 Immunostrips 진단키트의 검출한계 및 최적사용조건 설정

검 사 바이러스	검출한계 (바이러스정제액)	최적조건				비 고 (진단기작)
		이병엽		항체 감작 착색 라텍스		
		희석 (배)	침지 시간	희석 (배)	침지 시간	
TMV-W	50ng	10^{-2}	2분	20^{-1}	5분	Latex
TuMV	"	10^{-1}	"	40^{-1}	"	응집반응
CMV	"	50^{-1}	"	30^{-1}	"	

- 진단방법 : 즙액 추출(5min) → 항체여과지 흡착(3min) → 착색라텍스결합(5min) → 바이러스진단

3) 유전자진단(RT-PCR)법

제작한 Degenerated primer를 이용하여 TuMV 감염 고추냉이를 시료로 RT-PCR를 수행한 결과 TuMV의 염기서열로부터 예상되는 약 360bp의 PCR 산물이 전기영동에서 확인되었다. 또한 건전식물에서의 비특이반응은 확인되지 않았다. (그림 6)

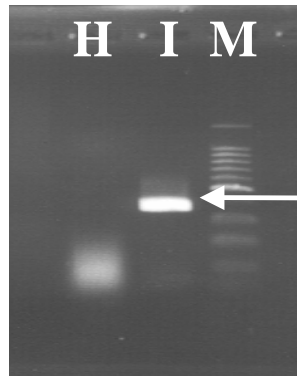


그림 6 . 개발된 수종의 Potyvirus진단용 Primer를 이용한 TuMV진단 결과
H : 건전주, I : TuMV 이병주, M : 100bp marker(Promega)

4. 적 요

본 연구는 국내 고추냉이 재배지에서 발생하는 바이러스의 발생양상을 조사하고 그들의 진단법과 검정키트를 개발하고자 수행하였다.

가. '00 과 '01년에 철원 및 평창의 고추냉이 포장에 발생하는 바이러스병의 종류를 조사한 결과 Turnip mosaic virus(TuMV), Cucumber mosaic virus(CMV), Tobacco mosaic virus(TMV)의 발생이 확인되었으며, ELISA 검정에서 각 바이러스의 이병정도는 TuMV(3.5%), CMV(3.5%), TMV-W(4.0%) 이었다.

나. 고추냉이에 발생하는 주요 바이러스에 대한 진단법으로 CMV, TuMV, TMV-W을 진단할 수 있는 항체진단법과 TuMV를 진단할 수 있는 유전자진단법을 확립하였다.

다. 그리고 각 바이러스에 대한 폴리크로날 항체를 제작하여 3종바이러스(TuMV, TMV-W, CMV)에 대한 국산항체진단키트 2종(DAS-ELISA, Immunostrips키트)을 개발하였으며, 개발된 시제품의 성능검정 결과, 고추냉이의 주요바이러스에 대한 실용적인 검정에 활용이 가능하였다 (표5, 6)

5, 인용문헌

Clark, M and Adams, A. N.(1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol 34: 475 -483

Koenig, R. (1981). Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55 : 53-62

Kwon Soon-Bae and Nobumichi Sako (1994). A new strain of tobacco mosaic virus infecting Rakkyo(*Allium chinense* G. Don). Annals of the phytopathological society of Japan vol.60(1) 36 - 44.

권 순배 (1989) Some properties of cucumber mosaic virus isolated from *Aster yomena* Makino and *Commelina communis* L. 강원대학교 석사학위논문

Mogal, S. M and Francki, R.I.B(1976). Towards a system for the identification and

classification of potyviruses. 1. Serology and aminoacid composition of six distinct viruses. Virology 73, 350-362

Ohki, S.T and Kameya-Iwaki,M(1996). Simplifying the rapid immunofilter paper assay for faster detection of plant viruses simplified RIPA. Ann. Phytopath. Soc. Jpn.62:240-242

Ouchterlony (1968). Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Prog. Allergy. Ann. Arbor Sci. Publ. pp135

Wakimoto S. (1993). 식물병원성 미생물연구법. Soft science publications. Tokyo Japan

6. 연구결과 활용제목

- 1) 고추병의 주요 3종 바이러스 정밀 종합검정용 ELISA 키트 개발 및 분양 (2002 영농활용)
- 2) 고추병의 주요 3종 바이러스 신속, 간이 검정용 Immunostrips 개발 및 분양 (2002 영농활용)