

## 高比重라텍스凝集反應法에 의한 고추의 Pepper Mild Mottle Virus 檢出

한 정 헌

서울대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부  
 현주소: 서울대학교 농업생명과학대학 식물분자유전육종연구센터  
 E-mail : hhhjjj@daum.net

### 緒 言

우리나라의 고추에서 발생하는 바이러스는 10여종이 알려져 있는데(김정수 등, 1989), 이 중에서 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 고추재배에서 가장 문제가 되는 바이러스는 pepper mild mottle virus (PMMV, TMV-P1.2, TMV-I19)이다 (Demski, 1981). PMMV는 고추의 종자를 통해서 전염되기 때문에 감염종자는 PMMV의 제 1차 傳染源으로서 매우 중요하다(Kim 등, 1989). 따라서 PMMV를 방제하기 위해서는 PMMV에 감염되어 있지 않은 健全種子의 생산이 필수적이다 (Boukema, 1977). 바이러스 무감염 고추종자의 생산 및 바이러스 抵抗性 育種을 효율적으로 수행하기 위해서는 PMMV를 정확하게 검정할 수 있는 간편하고 경제적인 진단방법이 절실히 요구된다. 오늘날 식물바이러스의 檢定에는 주로 酵素標識抗體法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)이 많이 이용되고 있는데 (Falk와 Purcifull, 1983; Lommel 등, 1982) 이 方法은 바이러스 檢出感度和 반응의 特異度가 높다는 장점이 있지만, 반면에 技法이 복잡하고 비용이 많이 들며, 무엇보다도 검정에 많은 시간(12-16시간)이 걸린다는 단점이 있다(나 와 한, 1997). 따라서 ELISA를 代身하여 고추의 PMMV를 신속·간편하게 검출할 수 있는 실용적인 방법을 개발하고자, PMMV의 전반적인 특성을 조사하고 免疫診斷用人工擔體의 한 종류인 高比重라텍스를 이용한 PMMV 검출 조건을 구명하였다.

### Pepper mild mottle virus

고추에서 보고된 tobamovirus는 Bell pepper mottle virus, tobacco mild green mosaic virus, solanum dulcamara yellow fleck-ob virus, mild dark-green tobacco mosaic virus, para-tobacco mosaic virus, tomato mosaic virus(ToMV), tobacco mosaic virus(TMV), Pepper mild mottle virus(PMMV) 등이 있다(Brunt, 1986). PepMMoV로도 불리는 PMMV는 灌水, 토양, 종자 등을 통하여 쉽게 傳染되며, 고추에서 가장 문제시되는 바이러스 중의 하나이다. PMMV는 형태적으로는

담배모자이크바이러스(TMV)와 유사하나 크기(320x18nm)가 약간 크며, Capsicum mosaic virus(호주), TMV samsun latent strain(미국), TMV-p8(화란), TMV-p14(화란), TMV-Adam과 TMV-Eve(프랑스), PMMV-S(스페인), TMV-P(일본), PMMV-W(이탈리아), TMV-고추系統(한국) 등에서 다양한 계통이 보고되었다(최 등, 1989; Gebre-Selassie and Marchoux, 1991; Greenleaf *et. al.*, 1964; Nagai *et. al.*, 1981; Pares, 1985; Wetter *et. al.*, 1984). 또한 최근에는 L<sub>1</sub>L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>L<sub>4</sub> 遺傳子를 갖는 4종류의 tobamovirus 병원형 판별고추품종에서의 반응에 따라 P1.2, P1,2,3 類型으로도 불린다(Rast, 1988).

우리나라의 경우 1994년부터 1997년까지 수행한 국내시판 고추종자의 PMMV 오염율은 Table 1에서처럼 공시한 30개 품종의 종자에서 PMMV에 오염된 품종은 23개였고, 고추품종 당 PMMV의 평균 汚染率은 78.5%였다.

Table 1. Contamination of pepper seeds by pepper mild mottle virus as determined by gelatin particle agglutination test

Cultivar <sup>a</sup>	Seed production area	Harvest time	% detection <sup>b</sup>
Seoulshilkkwari	Buan	1995	90
Jorimkkwari	Cheonwon	1994	100
Mannyang	Chungyang	1996	60
Nokkwang	Chungyang	1994	75
Kumjige	Dangjin	1996	95
Hansemkkwari	Dongwon	1995	100
Joyang	Hadong	1995	95
Kalakgimjang	Hadong	1995	90
Kwangbok	Hadong	1996	100
Nongwookkwari	Hadong	1996	45
Sinbaram	Hadong	1996	85
Cheonghong	Haenam	1996	100
Daehonggun	Haenam	1994	75
Dabok	Icheon	1995	55
Dongbang	Icheon	1995	70
Keosung	Icheon	1995	90
Kumbong	Icheon	1995	90
Kumjang-samho	Icheon	1995	55

Table 1. (continued)

Cultivar <sup>a</sup>	Seed production area	Harvest time	% detection <sup>b</sup>
Oryun	Icheon	1995	85
Daemyeong	Kongju	1996	55
Sinjokwang	Kongju	1995	10
Cheongok	Seocheon	1995	100
Daejanggyeong	Seocheon	1996	55
Daewang	Seocheon	1996	60
Hyangchon	Seocheon	1995	75
Jangwon	Seocheon	1995	95
Jeoncheonhoo	Seocheon	1994	95
Johong	Seocheon	1996	100
Jonggajib	Seocheon	1995	65
Taeyanggun	Seocheon	1995	90

<sup>a</sup> Seed samples were obtained from the following five seed companies: Joongang, Seed, Co. Ltd., Hannong, Seed, Co. Ltd., Hungnong, Seed, Co. Ltd., Nongwoo, Seed, Co. Ltd., and Seoul, Seed, Co. Ltd.

<sup>b</sup> Twenty seeds per cultivar was used for detection of tobamovirus by gelatin particle agglutination test.

### 高比重라텍스凝集反應法

라텍스(latex)는 초창기 합성고무(synthetic rubber)를 연구하는 과정에서 유래된 용어로 오늘날에는 폴리스티렌(polystyrene) 粒子的 同名으로 사용되고 있다. 라텍스의 표면은 疏水性을 띠며 소수성인 Immunoglobulin G(IgG)의 Fc chain과 강하게 결합한다. 초기의 라텍스응집반응법(latex agglutination test, LAT)은 바이러스 검정의 신속성, 간편성, 경제성 등과 같은 장점으로 인해 몇몇 식물바이러스의 검정에 사용되어왔으나, 바이러스檢出의 정확도와 感도가 낮고, 대량검정에 부적합하다는 이유로 널리 이용되지 못했다(나 와 정, 1995; Demski *et. al*, 1986). 그러나 최근의 연구결과에 의하면 완충용액의 이온농도와 酸度, Tween-20, Tween-80, Triton X-100과 같은 界面活性劑의 농도가 라텍스와 단백질의 결합에 많은 영향을 준다는 사실이 밝혀졌으며(Griffin, *et. al*, 1994; Martin-Rodriguez and Cabrerizo-Vilchez, 1997), 기존 latex보다 비중이 높고 입자가 큰 고비중라텍스를 담체

(carrier)로 이용할 경우 항원 및 항체 검정을 위한 특이도를 증가시킬 수 있고 그림 1처럼 육안으로 대량의 시료를 간편하게 검사할 수 있다는 보고가 있었다 (Fujikawa and Igarashi, 1988; Kawano and Takahashi, 1997).

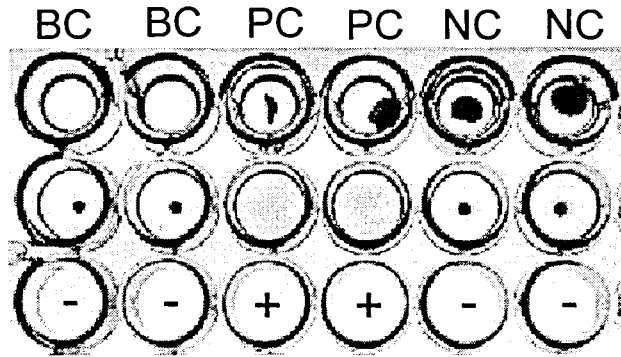


Figure 1. Agglutination pattern of high-density latex agglutination test (HDLAT): BC; buffer control, PC; positive control(PMMV infected pepper seed), and NC; negative control(Healthy pepper seed).

따라서 본연구에서는 고비중라텍스입자(high density latex particles, HDLP, 比重  $1.5\text{g/cm}^3$ , 粒徑  $1.41\ \mu\text{m}$ , 赤色)의 감작과 감작HDLP의 보존과정에서 안정제(stabilizer)로 주로 사용되는 Tween-80과 bovine serum albumin(BSA), 고비중라텍스응집반응법(high-density latex agglutination test, HDLAT)를 위한 완충액 및 IgG 농도가 바이러스 檢出感度に 미치는 영향을 조사한 결과, 순수한 증류수를 사용해서 感作할 경우 바이러스 檢出感度が 증가하였고, 感作HDLP의 보존을 위해서는 0.05% BSA를 녹인 증류수가 효과적임을 확인하였다. 또한 HDLAT에 적합한 완충액은 0.05% BSA를 녹인 증류수와 borate 및 carbonate 완충액이 효과적이었으며, HDLP에 결합시킬 최적의 IgG 농도는  $50\ \mu\text{g/ml}$ 이었다(자료 미제출).

### HDLAT를 이용한 pepper mild mottle virus 검출

HDLAT에 의한 고추종자의 PMMV검출에 효과적인 시료의 조제방법을 결정하기 위해 PMMV에 100% 감염되어 있는 고추종자(品種: 녹광)를 재료로 시료조제방법의 效用性を 비교하였다. Table 2에서처럼 종자 침지액의 경우 5배 희석까지, 마쇄액의 경우 10배 희석까지 100%의 PMMV검출율을 보였다.

Table 2. Percent detection of PMMV at each dilution of infected pepper seed washing and seed extract as determined by high-density latex agglutination test

Antigen dilution <sup>a</sup>	Percent of samples with positive reaction (n=150) <sup>b</sup>	
	Seed washing	Seed extract
1	100	100
5 <sup>-1</sup>	100	100
2×5 <sup>-1</sup>	90	100
5 <sup>-2</sup>	66	79
5 <sup>-3</sup>	45	71
5 <sup>-4</sup>	9	60
5 <sup>-5</sup>	0	40
5 <sup>-6</sup>	0	20
5 <sup>-7</sup>	0	8
5 <sup>-8</sup>	0	0

<sup>a</sup> The original seed washing was prepared by soaking one seed in 0.5ml of distilled water containing 0.05% BSA and 0.06% sodium azide for 1 hr at room temperature. A hundred  $\mu\ell$  aliquot of seed washings was used as original antigenic solution, and then the remnant was homogenized and centrifuged at 8,000 rpm for 5 min. The supernatant was used as original solution of seed extract.

<sup>b</sup> A total of 150 seeds contaminated with pepper mild mottle virus were tested.

한편, 침지처리구에서 음성반응을 보이는 고추종자를 마쇄하여 검사했을 때에도 침지액과 마찬가지로 음성반응을 보였다(자료 미제출). 이처럼 종자의 마쇄액에서 침지액의 625배나 되는 많은 양의 PMMV가 검출된 것은 침지처리만으로는 고추종자에 있는 PMMV의 극히 일부분만이 유출된다는 것을 의미한다. 그러나 고추종자의 PMMV는 종자침지액의 원액이나 5배 희석액에서도 HDLAT에 의해 100%의 검출이 가능하기 때문에, 고추종자를 個別檢定할 때는 종자를 일일이 마쇄할 필요 없이 1시간동안 침지한 침지액을 사용하는 것이 시간과 노력을 크게 절약할 수 있어 보다 有利하며, 감염종자의 混入率이 낮은 많은 양의 고추종자에서 PMMV를 검정하기 위해서는 100~200粒 單位로 마쇄하여 검정하는 것이 보다 능률적이라고 할 수 있다.

고추 잎의 경우, HDLAT에 의한 PMMV검출에 적합한 고추잎汁液의 희석범위를 결정하기 위해 PMMV에 자연감염된 고추幼苗(플러그묘)의 잎과 발에서 채취

한 고추의 感染葉을 供試하여 이들 잎즙액에서의 PMMV 검출한계를 조사하였다. Table 3에서처럼 幼苗와 成體葉汁液에서의 PMMV를 검출한계희석배수는 78,125 배로 나타났고, 원액의 5-10배 희석액에서는 100%의 검출율을 보였다. 잎즙액의 경우, 원액에서 偽陽性反應이 일어났으나, 2% sodium sulfite를 함유한 시료조제액을 사용하면 원액과 같은 高濃度液에서도 PMMV의 정확한 검출이 가능하였다(자료 미제출). 따라서 HDLAT에 사용할 고추잎 汁液을 調製할때는 반드시 2% sodium sulfite를 함유한 시료조제액을 사용하는 것이 바람직하다.

Table 3. Percent detection of PMMV at each dilution of infected pepper leaf extract as determined by high-density latex agglutination test

Antigen dilution <sup>a</sup>	Percent of samples with positive reaction (n=100) <sup>b</sup>	
	Leaf extract of seedling(n=30)	Leaf extract of adult pepper(n=70)
5 <sup>-1</sup>	100	100
2×5 <sup>-1</sup>	100	100
5 <sup>-2</sup>	96	82
5 <sup>-3</sup>	66	81
5 <sup>-4</sup>	30	57
5 <sup>-5</sup>	22	51
5 <sup>-6</sup>	11	29
5 <sup>-7</sup>	11	14
5 <sup>-8</sup>	0	0

<sup>a</sup> The original leaf extract was prepared by homogenizing 1 g fresh leaf in 1ml of distilled water containing 0.05% BSA, 0.06% sodium azide, 2% sodium sulfite, and centrifuging at 8,000 rpm for 5 min. The supernatant was used as stock solution of original extract.

<sup>b</sup> A total of 100 pepper leaves infected with pepper mild mottle virus were tested.

## 結 論

HDLAT는 PMMV의 검출감도가 높을 뿐 아니라 조작이 간편하고, 단시간에 많은 시료의 바이러스 검정이 가능하기 때문에, 바이러스 無感染고추종자 및 幼苗의 생산과정을 비롯하여, PMMV저항성고추품종의 육종, 식물검역 등에서 요구되는 소량 혹은 대량의 시료 검정에 매우 효과적이고 경제적인 진단방법이라고 생각된다.

### 參考文獻

- 김정수, 이순형, 이민웅. 1989. 고추 TMV의 종자傳染에 관한 연구. 농사시험연구 논문집(작물보호편). 31(1):10-13.
- 나용준, 정효원. 1995. Latex 凝集反應法을 이용한 백합바이러스의 간이檢定기술 개발. 대산농총. 3:124-131.
- 최장경, 박영섭, 김정옥, 박은경. 1989. 고추에서 분리한 담배 모자이크 바이러스의 生物的특성. 한국식물병리학회지. 5(4):331-336.
- 나용준, 한정현. 1997. 고비중라텍스응집반응법에 의한 고추종자로부터의 TMV의 신속검출. 한국식물병리학회발표요지 p.105-106.
- Boukema, I. W. 1977. Resistance in Capsicum to a pepper strain of TMV [tobacco mosaic virus]. Capsicum 77:85-88.
- Brunt, A. A. Miscellaneous tobamoviruses. The Plant viruses edited by M. H. V. Van Regemortl and Heinz Fraenkel-Conrat. New York : Plenum Press, c1986. V. 2 P. 283-302.
- Demski, J. W., Bays, D. C., and Khan, M. A. 1986. Simple latex agglutination test for detecting flexuous rod-shaped viruses in forage legumes. Plant Dis. 70:777-779.
- Falk. B. W., and Purcifull, D. E. 1983. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) test to index lettuce seed for lettuce mosaic virus in Florida. Plant Disease 67:413-416.
- Fujikawa, H. and Igarashi, H. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. Applied and Environmental Microbiology 54(10):2345-2348.
- Gebre-Selassie, K., and Marchoux, G. 1991. Identification and characterization of tobamoviruses strains infecting L-resistant genotypes of peppers in France. J. Phytopathology 131:275-289.
- Greenleaf, W. H., Cook, A. A., and Heyn, A. N. J. 1964. Resistance to tobacco mosaic virus in Capsicum, with reference to the samsun latent strain. Phytopathology 54: 1367-1371.
- Griffin, G., Sutor, J., and Bruce, S. Microparticle reagent optimization. c1994. Seradyn, Inc. Indiana. P1-47.
- Kawano, T., and Takahashi, Y. 1997. Simplified detection of plant viruses using high-density latex. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63:03-405.
- Lommel, S. A., McCain, A. H., and Morris, T. J. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology 72:1018-1022.

- Martin-Rodriguez, A. and Cabrerizo-Vilchez, M. A. 1997. Comparative study on the adsorption of triton-100 and tween 20 onto latexes with different interfacial properties. 187(1):139-147.
- Nagai, Y., Takeuchi, T. and Tochihara, H. 1981. A new mosaic disease of sweet pepper caused by pepper strain of tobacco mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 47:541-546.
- Pares, R. D. 1985. A tobamovirus infecting capsicum in Australia. Ann. appl. Biol.106:459-474.
- Rast, A. Th. B. 1988. Pepper tobamoviruses and pathotypes used in resistance breeding. Capsicum Newsletter 7:20-23.
- Wetter, C., Conti, M., Altschuh, D., Tabillion, R., and van Regenmortel, M. H. V. 1984. Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. Phytopathology 74: 405-410.