

배나무잎 검은점병(구: 이상반점증상)에 관한 연구 7. 병원 바이러스의 동정

남기웅* · 김충희 · 김경수¹

농업과학기술원 작물보호부 병리과, ¹미국 Arkansas대학 식물병리과

Studies on the Pear Black Necrotic Leaf Spot (Former: Abnormal Leaf Spot) Disease 7. Identification of Causal Virus

Ki Woong Nam*, Choong Hoe Kim and Kyung Soo Kim¹

Plant Pathology Division, Department of Crop Protection,

National Institute of Agricultural Science & Technology, Suwon 441-707, Korea

¹Department of Plant Pathology, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA.

ABSTRACT : An ultrastructural study of black necrotic leaf spot diseased pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) revealed the consistent presence of flexuous rod-shaped viruslike particles (VLP) in the symptomatic leaves of both Niitaka cultivar and indicator pear, PS-95. The particles, approximately 12 nm in diameter with undetermined length occurred in the cytoplasm of mesophyll parenchyma cells. Cells with VLPs also contained fibril-containing vesicles which are common in cells infected with plant viruses with ssRNA genome. The vesicles were formed at the tonoplast. Attempts to transmit the agent causing the symptoms by sap-inoculation to other plants failed. However, typical symptoms were always developed in the leaves of grafted pear trees and these leaves contained VLPs. Based on the symptomatology, the presence of fibril-containing vesicles, and graft-transmissibility, it is believed that the VLPs associated with pear black necrotic leaf spot disease are viral in nature, possibly those of a closterovirus.

배잎에 발생하는 검은점병(가칭, 구: 배나무이상반점증상)은 70년대 후반 일부지역에서 검은무늬병에 저항성으로 알려진 신고 등의 품종에 반점이 발생하였으나(10), 최근에는 전국적으로 만연되어 배 재배농가에 가장 큰 피해를 주고 있는 병이다(17). 발생이 심한 나무는 수량이 약 50%정도 감소하고 고품질의 과실생산이 곤란하다. 본 병의 원인에 대해 기 등(11)은 검은무늬병균의 병원성 분화에 의한 저항성품종의 이병화 현상이라고 보고하였으나 박 등(22)은 신고, 만삼길, 장십랑은 여전히 배검은무늬병에 저항성 품종임을 재확인하였다. 또한 Chung 등(5)은 이 검은점병이 *Enterobacter pyrinus*에 의해 일어나는 신종 갈색점무늬병이라고 보고하였다. 그러나 본 병에 대해서 남 등(17-20)은 병반으로부터 병원 곰팡이나 세균이 분리되지 않고 약해, 산성비 등 환경공해의 피해와도 관

련이 없음을 보고하였다. 또한 본 병이 접목에 의해서 전염된다는 것을 증명하여 간접적으로 바이러스에 의한 병으로 추정하였으며(19), 본 병의 이병유무의 조기검정에 이용코저 병징이 전형적으로 조기에 잘 발현하고 본 병과 유사한 검은무늬병에 저항성인 지표 식물 PS-95를 배 교배실생으로부터 선발한 바 있다(21).

일본에서는 본 병과 유사한 병해가 1957년에 최초로 발생하여 큰 피해를 주었고 점목전염성 바이러스에 의한 병으로 간주된다고 보고한 바 있다(13). 병원 바이러스는 사상형인 pear vein yellows와 apple stem pitting 바이러스의 한 strain일 것이라고 보고되었다(25).

배나무잎 검은점병은 그동안 병원이 확실히 구명되지 않아 배나무잎 이상반점증상으로 불려져 왔고 일부 농가에서는 유사 흑반병으로 알려져 있었다. 저자들은 본 병의 병원체를 구명하기 위하여 지표식물 PS-

*Corresponding author.

95에 접촉증하여 나타난 증상으로부터 시료를 채취, 전자현미경을 사용하여 세포병리학적으로 면밀히 관찰한 결과 전형적인 검은점병 증상을 보이는 배나무 잎 이병세포내에서 closterovirus-like 입자와 바이러스 전염에 의해서 형성되는 세포병리학적 구조물의 존재를 확인하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료. 본 병이 매년 심하게 발생하고 있는 신고(*Pyrus pyrifolia* Nakai) 20년생과 건전한 신고 20년생, 그리고 지표식물(21)인 PS-95로부터 휴면가지를 채취 8°C 저온실에 보관하여 접수로 이용하였다. 미리 준비한 배 싹생대목에 이병된 신고 및 건전신고 접수를 절첩하여 이병묘목을 양성하였다. 신고 이병 및 건전 묘목에 지표식물 PS-95를 접촉하여 만든 묘목을 주간 23°C, 야간 18°C로 조정된 식물생육상에서 병징 발현을 유도하여 실험재료로 사용하였다(20). 상기 묘목이 식물생육상에서 검은점의 증상이 나타나는 병징을 다음과 같이 3단계로 구분하여 시료를 채취하였다. 1) 초기병징으로 잎의 가장자리부터 황색의 반점이 발생하여 흑색으로 변하기 전 상태의 시료, 2) 중기의 병징으로 잎표면에 발생한 황색의 반점이 흑색으로 변하나 반점의 크기가 작고 흑색의 반점발생수가 많지 않은 상태의 시료, 3) 전형적인 최성기의 병징으로 흑색의 반점이 무수히 발생하고 작은 반점이 합쳐져 큰 반점이 되며 잎전체가 흑색의 반점으로 덮여 있는 상태의 시료를 구분하여 채취하였다. 대조시료는 건전주의 건전잎을 공시하였다.

전자현미경 시료조제. 전형적인 이상반점증상을 나타내는 잎과 비슷한 크기의 건전한 잎을 채취 1~2 mm² 크기로 시료를 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액(pH 7.0, phosphate buffer)으로 상온에서 2시간 동안 고정하였다. 그후 buffer로 3회 수세하고, 2% osmium tetroxide용액(pH 7.0, phosphate buffer)에 2시간 고정한 후 0.5% aqueous uranyl acetate로 over night *en bloc* staining 하였다. 다음날 시료를 ethanol로 탈수하고 propylene oxide로 2회 씻어내었으며 Epon 812로 포매한 후 diamond knife로 박절하였다. 잘라진 시료들을 2% uranyl acetate와 lead citrate로 2중 전자염색하여 투과전자현미경(Zeiss EM 902A)으로 검경하였다.

결과 및 고찰

바이러스 동정에는 즙액 또는 감염식물의 조직내

바이러스의 성상을 기초로 하는 경우와 정제 바이러스의 성상을 기초로 하는 경우로 크게 두단계로 구분하는데 본 연구에서는 전자에 의해 동정하였다. 본 병에 이병된 신고와 지표식물 PS-95(포장 및 식물생육상에서 자란주)의 잎을 전자현미경으로 세포내 미세구조를 검경한 결과 엽육세포질 안에서 긴 굴곡성 사상형 유사바이러스 입자가 집단으로 축적하여 존재하고 있는 현상을 관찰하였다(Figs. 1, 2). 이들 바이러스 입자들은 핵 가까이에서 크고 작은 집단으로 정렬하고 있었다(Figs. 1, 3, 5). 입자집단을 횡으로 잘라(cross section) 보면 이 입자들은 작은 원형입자의 밀집군으로 관찰되었다. 이 입자들을 측정된 결과 직경이 12 nm 정도였으나(Figs. 3, 4) 이 입자들의 길이는 순화하지 못하여 측정하지 못하였다. 이 유사바이러스를 면밀히 관찰한 결과 일반적으로 알려진 네 그룹의 사상형 바이러스 형상과는 차이가 있었다.

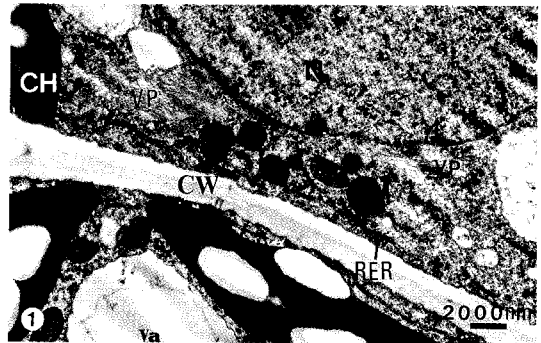


Fig. 1. Longitudinally sectioned viruslike particles (VP) near the nucleus (N), the particles appear as bundles. CW=Cell wall; REP = Rough endoplasmic reticulum; M = Mitochondria; Va = Vacuole.

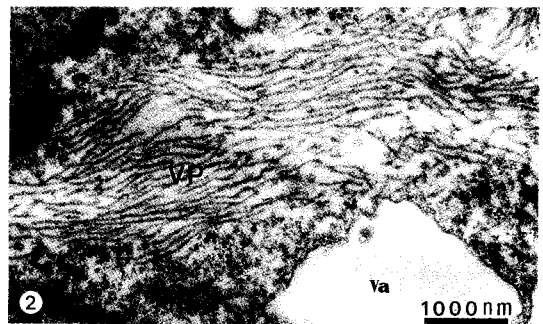


Fig. 2. Higher magnification of viruslike particles (VP) in Fig. 1 showing the details of the particle structure. Va = Vacuole.

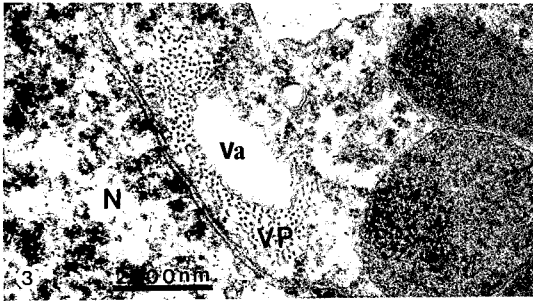


Fig. 3. Transversely sectioned viruslike particles (VP) which appeared as densely packed electron-dense spherical particles. N = Nucleus; Va = Vacuole.

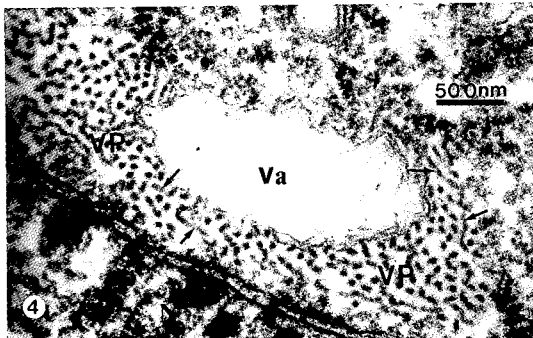


Fig. 4. Higher magnification of viruslike particles (VP) in Fig. 3 showing the details. Va = Vacuole. Some particles were obliquely sectioned (see arrows).

사상형바이러스의 대표적이고 전 식물바이러스의 30%를 차지하고 있는 potyviruses에 감염된 모든 기주들은 바이러스 입자외에 풍차봉입체의 구조물을 갖고 있는 것이 이 바이러스들의 세포병리학적 특징이다 (7). 다른 식물바이러스에도 봉입체는 생성되는데 이와 같은 관상의 풍차형봉입체는 potyviruses의 감염세포에만 있는 것이 특징이다. 다른 사상형 바이러스인 tobamoviruses들의 세포병리학적 특징은 X-bodies의 형성을 유도하는 것이며, potexviruses들은 세포질내에 방울이 달려 있는 것과 같은 얇은 층의 봉입체 형성을 유도하는 것이 이 바이러스들의 세포병리학적 특성이기도 하다. 그러나 본 연구에서 관찰된 감염된 배일의 엽육세포내에 존재하고 있는 유사바이러스 입자의 형상은 위에 열거한 사상형바이러스 입자와는 확연히 구분되었다. 따라서 배일의 엽육세포질내에 존재하고 있는 유사바이러스 입자의 분포상황과 이병세포가 나타내는 일반적인 특성으로 판단하여 볼 때 위에 열거한 바이러스들과는 다른 사상형바이러스로

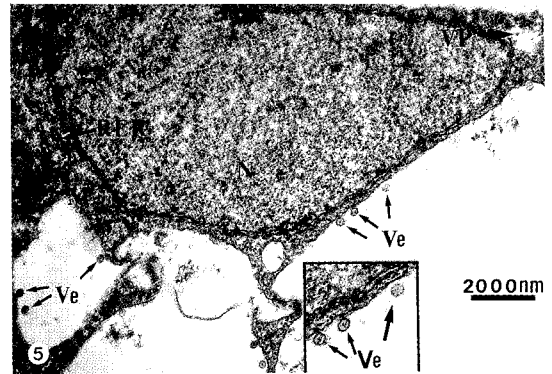


Fig. 5. Membraneous vesicles (Ve) containing electron-dense fibrils formed at the tonoplast of a mesophyll cell are shown. Upper viruslike particles (VP) near the nucleus at the right corner is also shown. Insert shows higher magnification of three vesicles in Fig. 5. N = Nucleus; RER = Rough endoplasmic reticulum.

생각된다. 또다른 굴곡성 사상형바이러스들인 carlaviruses(2, 3)는 본 연구에서 관찰된 배일 엽육세포내에 존재하고 있는 유사바이러스 입자와는 그 형태가 상이하였다. 이와같이 배 이병일 세포내에 존재하고 있는 굴곡성 사상형유사바이러스 입자 및 이병세포를 형태학적으로 관찰하여 볼 때 이 바이러스는 굴곡성 사상형바이러스 그룹중에서도 closteroviruses와 아주 비슷하여 이 그룹에 속하는 바이러스로 생각되어진다(15, 16, 26). Closteroviruses의 입자는 직경 12 nm, 길이 600~2,000 nm로 ssRNA genome구조를 갖는 다른 사상형바이러스에 비하여 외피단백질의 선상에서 완만하게 말리는 구조를 갖고 있어 입자의 형상이 대단히 구불구불한 모양을 하고 있는 것이 특징이다. 또한 이 그룹에 속하는 대부분의 바이러스들은 사부조직에 국한되어 있다(8). 그러나 본 연구에서 확인된 유사바이러스 입자는 주로 배 이병일의 엽육세포에서 존재하고 있는 것이 특징이다.

배나무잎 이병세포내에는 유사바이러스 입자외에 직경이 50~100 nm 크기의 원형의 소포(vesicles)가 관찰되었으며 소포중앙에는 밀집된 섬유사를 함유하고 있었다(Fig. 5). 이들 섬유사를 함유하고 있는 소포는 그동안 병원에 대하여 논란이 되어온 배나무잎 검은 점병(구: 배나무잎 이상반점증상)이 바이러스에 의한 것임을 병리학적으로 증명하기 위한 아주 중요한 증거로 생각된다. 왜냐하면, 이들 소포는 일반적으로 대부분의 ssRNA genome을 갖는 식물바이러스에 의해 이병된 세포의 세포병리학적 특징으로 알려져 있기

때문이다(7). 이러한 사실 때문에 소포의 존재유무는 이병식물의 초미세포구조의 특징을 면밀히 관찰하여 바이러스를 진단하는데 있어서 중요한 단서가 되고 있다(7, 8, 12). 많은 경우에 있어서 이 바이러스들에 의해서 생성된 소포는 바이러스를 복제할 때 생기는 dsRNA를 포함하고 있는 것으로 증명되었으며, 따라서 소포는 세포 내에서의 바이러스를 복제 하는 장소인 것으로 알려져 있다(1, 14, 24).

Closteroviruses를 진단하는데 있어서 섬유사를 함유하고 있는 소포와 굴곡성 사상형유사바이러스 입자의 존재, 그리고 사부국재성은 중요한 역할을 해 왔다(8). 그 이유는 이 closteroviruses는 원 기주에서 즙액전염이 잘 되지 않고, 이병잎에 나타나는 병징과 기주범위가 항상 일정하지 않아서 이들만으로 진단에 이용하기에는 한계가 있기 때문이다(8, 15, 16).

본 배나무잎 검은점병 병원 동정방법의 하나로 기주범위, 병징, 전염방법 등을 연구한 결과 기주범위는 현재까지 배나무속 이외에는 밝혀져 있지 않고, 기주 식물로부터 쉽게 즙액전염이 되지 않았다(19). 또한 병징도 일정하지 않고 불규칙적이었다(17, 18). 이러한 현상은 closteroviruses의 특성과 유사한 것으로 생각된다. 대부분 closteroviruses 감염에 의해서 생기는 소포는 특징적인 현상을 갖고 있으며, 이러한 현상은 "BYV type"로 불려졌다(6, 8). 왜냐하면 이 소포들은 "BYV type"에 의해서 생기는 것과 비슷하기 때문이었다. 그러나 "BYV type"의 소포는 현재까지 어느 특정한 세포기관(organelle)과의 연관성이 확인되지 않았기 때문에 그 근원은 확실치 않다(6). 이 "BYV type" 이외의 closteroviruses들에 의해서 생기는 소포는 mi-

tochondria, endoplasmic reticulum 혹은 tonoplast에 생성된다고 보고되었다. 대표적인 예로 dendrobium vein necrosis virus와 grapevine leafroll virus는 소포가 mitochondria에서 생성되고(12), lilac chlorotic leaf spot virus는 endoplasmic reticulum에서 생긴다고 보고되었다(4). 한편 diodia vein chlorosis virus는 tonoplast에서 소포가 형성된다는 사실 최근 보고되었다(15).

본 연구에서 배나무잎 검은점병의 검은조직에서 관찰된 굴곡성 사상형유사바이러스 입자와 이와 관련된 소포는 대부분의 closterovirus와는 달리 사부조직에 국한되어 있지 않고 많은 엽육세포에서도 발견되었다(Fig. 6). 현재까지 알려져 있는 closteroviruses 그룹중에서 dendrobium vein necrosis virus와 lilac chlorotic leaf spot virus만이 사부조직 국재성이 아니다(4). 이들 바이러스 입자들과 소포들은 본 배나무잎 검은점병에서와 같이 엽육세포에서도 생성되었다. 하나의 흥미로운 점은 그 소포들이 사부국재성 바이러스들에 있어서는 전부 BYV type이며, 그 외의 바이러스들에 의해서 생기는 소포들은 위에서 지적한 것과 같이 특정한 세포기관에서 생성된다. 이와 같이 바이러스 복제부위, 소포의 존재 등 closteroviruses는 다양한 성질을 갖고 있는 바이러스 집합군이다.

현재까지 배나무잎 검은점병에 대한 연구결과를 정리하여 보면, 잎의 병징(17), 접목전염성(19), 섬유사를 갖고 있는 소포(ssRNA 감염의 세포병리학적 특징) 그리고 굴곡성 사상형유사바이러스 입자의 존재를 기초로 하여 볼 때에 이병은 ssRNA 바이러스 감염에 의해서 생긴 것으로 생각된다. 더 나아가 다른 굴곡성 사상형 바이러스들인 potyviruses, potexviruses 그리고 carlaviruses의 세포병리학적 특징의 부재로 보아 이 바이러스는 closteroviruses의 하나로 간주된다.

배나무에 발생하는 바이러스병은 세계적으로 약 10여종이 보고되고 있다(23). 일본에서는 본 병과 유사한 병해로 1957년에 배 괴저반점병이 보고되었고, 1970년대에 이르러 접목전염성 바이러스병으로 밝혀졌으나 병원은 동정되지 않았다(13). 그러나 일본의 한 연구자(25)는 병원이 사상형바이러스로 pear vein yellow virus와 apple stem pitting virus와 strain이 다른 바이러스라고 하였다. pear vein yellow virus는 혈청학적 및 입자의 형태학적 특징으로 보아 closterovirus-like virus라고 보고된 바 있다(9).

이상의 연구결과 배나무잎 검은점병을 일으키는 병원바이러스는 병태학적, 형태학적 면에서 closteroviruses와 여러 가지 공통적인 특성을 가지고 있으므로 closteroviruses에 의한 병해로 생각되며 앞으로

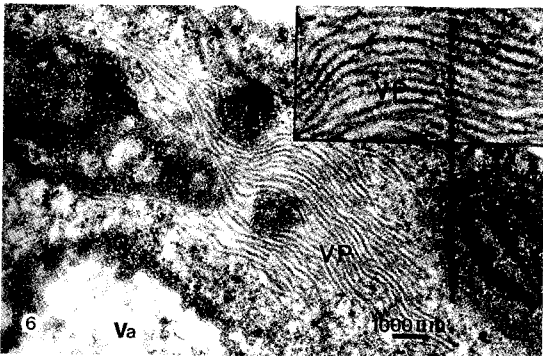


Fig. 6. Highly flexuous rod-shaped viruslike particles (VP) in another mesophyll cells. Insert shows higher magnification of viruslike particles showing the detail. CH = Chloroplast; Va = Vacuole.

이 병을 “배나무잎 검은점병”으로 제안하고자 한다.

요 약

배나무잎 검은점병에 이병된 신고와 지표식물 PS-95의 잎을 전자현미경으로 세포내 미세구조를 검정한 결과 굴곡성 사상형 유사바이러스 입자가 집단으로 존재하고 있는 것을 확인하였다. 염육유세포질에 있는 유사바이러스 입자들의 직경은 12 nm였으나 입자들의 길이는 측정하지 못하였다. 섬유사를 함유하고 있는 소포는 일반적으로 ssRNA genome을 갖는 식물 바이러스에 의해 이병된 세포에서 생성된다. 본 연구에서 이 소포들은 tonoplast에 형성되었다. 배나무잎 검은점병의 이병잎을 초본 지표식물에 즙액접종하였으나 어떠한 병징도 나타나지 않았다. 또한 점목접종 전염에 의하여 전염되어 전형적인 검은점이 발병하였다. 발병된 잎에는 유사바이러스 입자가 존재하고 있었다. 이상의 결과 병징, 섬유사를 함유한 소포의 존재, 그리고 점목전염을 기초로 하여 볼 때 배나무 검은점병을 일으키는 유사바이러스 입자는 closteroviruses의 하나로 생각된다.

참고문헌

1. Assink, A. M., Swaans, H. and Van Kammen, A. 1973. The localization of virus-specific double-stranded RNA of cowpea mosaic virus in subcellular fractions in infected *Vigna* leaves. *Virology* 53 : 384-391.
2. Atkinson, M. A. and Cooper, J. I. 1976. Ultrastructural changes in leaf cells of poplar naturally infected with poplar mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 83 : 395.
3. Brunt, A. A., Stace-smith, R. and Leung, E. 1976. Cytological evidence supporting the inclusions of poplar mosaic virus in the carlavirus group of plant viruses. *Intervirology* 7 : 303.
4. Brunt, A. A. and Stace-smith, R. 1978. The intracellular location of lilac chlorotic leafspot virus. *J. Gen. Virol.* 39 : 63.
5. Chung, Y. R., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Kim, B. S., Kim, H. T. and Cho, K. Y. 1993. *Enterobacter pyrinus* sp. nov, an organism associated with brown leaf spot disease of pear trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 : 157-161.
6. Esau, K. and Hoefert, L. L. 1981. Beet yellows stunt virus in the phloem of *Aonchus oleraceus* L. *J. Ultrastruct. Res.* 75 : 326-338.
7. Francki, R. I. B. 1987. Responses of plant cells to virus infection with special reference to the sites of RNA replication. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser.* 54 : 423-436.
8. Francki, R. I. B., Milne, R. G. and Hatta, T. 1985. Closterovirus group. Pages 219-234 in: *Atlas of Plant Viruses*. Vol. II. CRC Press. Boca Raton, FL.
9. Giunchedi, L. and Pollini, C. P. 1992. Cytopathological, negative staining and serological electron microscopy of a clostero-like virus associated with pear vein yellow disease. *J. Phytopathology* 134 : 329-335.
10. 홍경희, 김용석, 김휘천, 김정배, 이운직, 이은중, 조원대, 조의규. 1985. 배잎의 이상반점증상에 관한 연구. *농시논문집(원예)* 27(2) : 46-55.
11. 기운계, 박서기, 조백호, 김기청. 1984. 배나무 검은 무늬병균(*Alternaria kikuchiana* Tanaka)의 병원성 분화와 저항성품종의 이병화. *한식보호지* 23 : 7-14.
12. Kim, K. G., Ronsalves, D., Teliz, D. and Lee, K. W. 1989. Ultrastructure and mitochondrial vesiculation associated with closteroviruslike particles in leafroll-diseased grapevines. *Phytopathology* 79 : 357-360.
13. Kishi, K., Takanashi, K. and Abiko, K. 1976. Pear necrotic spot, a new virus disease in Japan. *Acta Horticulture* 67 : 269-273.
14. Lafleche, D., Bove, C., Dupant, G., Mouches, C., Astiev, T., Garnier, M. and Bove, J. M. 1972. Site of viral RNA replication in the cells of higher plants. TYMV (turnip yellow mosaic virus)-RNA synthesis on the chloroplast outer membrane system. *Proc. FEBS Meet* 72 : 43.
15. Larsen, R. C., Kim, K. S. and Scott, H. A. 1991. Properties and cytopathology of Diodia vein chlorosis virus-a new whitefly-transmitted virus. *Phytopathology* 81 : 227-232.
16. Lister, R. M. and Bar-Joseph, M. 1981. Closteroviruses. Pages 809-844 in: *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. E. Kurstak, ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York.
17. 남기웅, 김충희. 1994. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 1. 발생상황과 피해. *한식병지*. 10(3) : 169-174.
18. 남기웅, 김충희. 1995. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 2. 원인구명. *한식병지*. 11(3) : 210-216.
19. 남기웅, 김충희. 1995. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 3. 병원의 점목 전염. *한식병지*. 11(3) : 217-223.
20. 남기웅, 김충희. 1996. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 4. 온도 및 토양 수분의 영향. *한식병지*. 12(2) : 209-213.
21. 남기웅, 김충희, 황해성. 1996. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 5. 목본 지표식물 선발. *한식병지*. 12(2) : 214-218.

22. 박종성, 유승현. 1988. 배 검은무늬병균(*Alternaria kikuchiana*)이 생성하는 AK 독소에 대한 배 품종의 감수성 진단. 충남대 농업기술연구보고 15 : 1-8.
23. Posnette, A. E. 1963. Virus diseases of apples and pears. Commonwealth Agricultural Bureaux. 141pp.
24. Van Kammen, A. 1984. Expression of functions encoded on genomic RNAs of multiparticulate plant viruses. Pages 301 in: Control of Virus Diseases. E. Kurstak, ed. Marcel Dekker Press, New York.
25. Yanase, H., Koganezawa, H. and Fridlund, P. R. 1988. Correlation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting, and a flexuous filamentous associated with them. *Acta Horticulture* 235 : 157.
26. Zee, F., Gonsalves, D., Goheen, A., Kim, K. S., Pool, R. and Lee, R. F. 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closterovirus-like particles. *Phytopathology* 77 : 1427-1434.