Res. Plant Dis. 23(1): 60-64 (2017)
https://doi.org/10.5423/RPD.2017.23.1.60

순무모자이크바이러스에 대한 무 육종 계통 저항성 평가

Resistance Evaluation of Radish (*Raphanus sativus* L.) Inbred Lines against *Turnip mosaic virus*

윤주연[1] · 최국선[1] · 김 수[2] · 최승국[2]*

농촌진흥청 국립원예특작과학원 [1]원예특작환경과, [2]채소과

Ju-Yeon Yoon[1], Gug-Seoun Choi[1], Su Kim[2], and Seung-Kook Choi[2]*

[1]*Department of Horticultural and Herbal Environment, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea*
[2]*Department of Vegetables, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea*

***Corresponding author**
Tel: +82-63-238-6322
Fax: +82-63-238-6305
E-mail: viroid73@gmail.com

Received September 12, 2016
Revised February 15, 2017
Accepted February 15, 2017

Leaves of twenties radish (*Raphanus sativus* L.) inbred lines were mechanically inoculated with *Turnip mosaic virus* (TuMV) strain HY to evaluate TuMV resistance of the radish inbred lines. The inoculated radish plants were incubated at 22°C±3°C and resistance assessment was examined using symptom development for 4 weeks. Based on the reactions of differential radish inbred lines, 16 radish lines were produced mild mosaic, mottling, mosaic and severe mosaic symptoms by TuMV infection. These results were confirmed by RT-PCR analysis of TuMV coat protein gene, suggesting that TuMV is responsible for the disease symptoms. Four resistant radish lines did not induce systemic mosaic symptoms on upper leaves and chlorosis in stem tissues for 4 weeks, showing they were symptomless by 8 weeks. Further examination of TuMV infection in the 4 radish lines showed no TuMV infection in all systemic leaves. These results suggest that the 4 radish lines are highly resistant to TuMV.

Keywords: Breeding, Radish, Resistance, RT-PCR, *Turnip mosaic virus*

배추과(*Cruciferae* family)에 속하는 무(*Raphanus sativus*)는 아시아 및 지중해 연안이 원산지로 알려진 한해살이 또는 두해살이 식물이다. 우리나라의 5대 채소 가운데 하나이며 우리나라 전체 채소 생산량 대비 무는 10%–15%로, 배추와 더불어 우리의 주요 부식인 김치, 단무지, 외식업체의 식재료로 사용되는 중요 작물 중 하나이다(Ku 등, 2006; Lee 등, 2008). 영양가치측면에서 무는 필수무기질들과 칼슘, 비타민 등이 풍부하여, 특히 겨울철에 무청을 말린 재료를 활용한 다양한 음식으로 섭취함으로써 한국인들에게는 중요 무기영양 공급원 작물이다. 최근 많은 양의 화학비료를 사용하는 무의 연작재배지에서 각종 생리적 장해와 바이러스병이 점차 증가하고 있다. 특히 무 및 배추 등에서 순무모자이크바이러스(*Turnip mosaic virus*, TuMV)를 비롯한 5종 바이러스들이 보고되었으나(Choi와 Choi, 1992; Chung 등, 2015; Ham, 1995; Kim 등, 2012), 순무모자이크바이러스에 의한 피해가 우리나라뿐만 아니라 세계적으로도 무 재배 지역에서 가장 크며 지속적으로 발생하고 있다.

순무모자이크바이러스는 *Potyviridae*과(科, family) *Potyvirus*속(屬, genus)으로 분류되며, 전 세계적으로 넓게 퍼져 있으며 경제적 피해를 지속적으로 끼치는 중요 바이러스 중 하나이다(Provvidenti, 1996). 순무모자이크바이러스는 주

Research in Plant Disease
pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191
www.online-rpd.org

요 배추과 등 작물들을 비롯한 잡초들을 포함한 300여 종 이상의 식물들을 감염시킬 수 있으며 약 90여 종의 진딧물을 통한 비영속적 전반으로 포장에서 퍼져나가는 것으로 알려져 있다(Choi와 Choi, 1992; Raybould 등, 1999; Shukla 등, 1994). 순무모자이크바이러스는 병리학적으로 4개 그룹으로 분류되는데, 첫 번째로 배추과 작물을 감염하지만 병징을 발현하지 않으며 무는 감염하지 못하는 TuMV (B)계통, 두 번째로 배추과 작물을 감염하며 모자이크 등 병징을 발현하나 무는 감염하지 못하는 TuMV B계통, 세 번째로 배추과 작물을 감염하며 모자이크 등 병징을 발현하며 무 역시 감염시키나 병징을 발현시키지 않는 TuMV B(R)계통, 네 번째로 배추과 작물 및 무를 감염시키며 모자이크 등 병징을 발현시키는 TuMV BR계통으로 구분할 수 있다(Ohshima 등, 2002, 2007). 또한 분자 계통학적 연구에 의해 순무모자이크바이러스는 4개 계통, 즉 basal-B (*Brassica*), basal-BR (*Brassica*/*Raphanus*), Asian-BR 및 World-B 그룹으로 구별할 수 있음이 보고되었다(Ohshima 등, 2007).

순무모자이크바이러스병을 예방하기 위한 가장 효율적이며 현실적인 방법들로는 진딧물의 철저한 포장에서의 구제, 저항성 배추 및 무 품종을 재배하는 것이다. 최근에는 많은 나라들이 농약을 가급적 사용하거나 무농약으로 재배하는 친환경 농업 정책을 펼치고 있어, 채소 작물들에 대한 저항성 품종을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 순무모자이크바이러스에 대한 새로운 저항성 유전자원 선발 및 저항성 품종의 육종이 필요하며, 이를 위해 순무모자이크바이러스에 극도로 저항성을 가지는 무 육종 계통들에 대한 저항성 조사를 이번 연구에서 수행하였다.

식물 재배 및 접종. 저항성 평가용 순무모자이크바이러스 계통으로서 병원성과 유전적 특성을 분석하기 위하여 2014년도 1월 제주도 무에서 분리하여 국립원예특작과학원에서 보존하고 있는 순무모자이크바이러스 HY계통(TuMV-HY)을 공시바이러스로 사용하였다. 순무모자이크바이러스 HY계통의 생물학적 기주 범위 조사 결과 배추에서 모자이크, 황화 병징 및 무에서 모자이크 및 위축 등 전신감염을 시킬 수 있는 계통으로 조사되었다(Table 1). 기존 순무모자이크바이러스 계통들에서 연구되어 발표된 방법들인 RT-PCR법, 클로닝 및 생물정보학(Tomimura 등, 2003)을 이용하여 순무모자이크바이러스 HY 전체 염기서열을 결정하였다. 염기서열 분석 결과 순무모자이크바이러스 HY는 9,798개 염기들로 구성되어 있었으며(accession no. LC215859), 외피단백질 상동성 분석 결과 기존의 BR 계통으로 알려진 TuMV FD27J 계통(accession no. AB093618)과 아미노산 서열이 100% 일치하였다. 또한 FD27J 계통과 polyprotein 상동성도 가장 높은 것으로 분석되었다.

무에 대한 저항성 평가를 위해 순무모자이크바이러스 HY 계통을 무 품종(보석알타리; Dongbu Farm Hannong, Seoul, Korea)에서 10 mM 인산완충액(pH 7.0)을 이용하여 즙액 접종으로 증식시켜서 모자이크 등 병징이 발현된 잎을 이후 저항성 평가 조사에 사용하였다. 다양한 상업용 F1 품종을 육성하는 데 사용되는 무 육종 계통은 포장에서 순무모자이크바이러스에 대하여 저항성을 가질 것으로 예측된 20개 무 육성 계통들(radish inbred lines)을 선택하였다. 위에서 기술된 순무모자이크바이러스 HY 계통이 전신 감염된 무 잎을 10 mM 인산완충액(pH 7.0)을 3 대 1 비율(1 g 감염 잎/3 ml 인산완충액)로 첨가 후 막자사발에서 갈아 즙액을 추출하였다. 20개 무 육종 계통들의 종자를 상토(바로커; Seoul Bio, Eumseong, Korea)에 파종 후 본 잎이 4장이 나온 잎들을 대상으로 각 계통당 6개 개체를 선택하여 mesh 600크기 연마제(Carborundum®; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 뿌린 후, 순무모자이크바이러스 HY 계통이 감염된 즙액으로 면봉을 사용하여 접종하였다. 저항성 비교 평가를 위하여 바이러스가 없는 10 mM 인산완충액(pH 7.0)을 연마제가 뿌

Table 1. Symptoms of plant species inoculated with *Turnip mosaic virus* (TuMV)-HY

Plant species	Reactions*
Brassica campestris subsp. *pekinensis*	Y & mM†/Ch & M‡
Brassica juncea	-/-
Brassica rapa	M/M
Capsicum annuuum cv. 'Cheong-Yang'	-/-
Chenopodium quinoa	NLL/NLL
Cucurbita pepo	-/-
Datura stramonium	-/-
Nicotiana tabacum cv. Samsun	-/NLL
Physalis floridana	-/SM & St.
Raphanus sativus cv. Bosuk-Altari	-/SM & St.
R. sativus cv. Cheongun-mu	-/SM & St.
R. sativus cv. Seoho-mu	-/SM & St.
R. sativus cv. Matdong-mu	-/SM & St.

*Symptoms are briefly shown as symbols: Y, yellowing; mM, mild mosaic; Ch, chlorosis; M, mosaic; -, no infection confirmed using RT-PCR analysis; NLL, necrotic local lesion; SM, severe mosaic; St., stunnting.
†Inoculated leaves.
‡Upper leaves.

려진 각 계통당 본 잎 4장이 나온 3개 무 식물들에 위에서 기술한 방법과 동일하게 면봉으로 문질러 접종하였다. 접종 후 전신 감염 병징을 관찰하기 위하여 22°C±3°C, 주간 16시간 야간 8시간으로 조절되는 식물 생장상에서 28일간 재배하였다. 순무모자이크바이러스를 접종한 후 28일에 접종하지 않은 무 유묘 상엽의 병징을 육안으로 조사하였으며, 정확한 순무모자이크바이러스를 무 상엽에서 조사하기 위하여 전체 RNA를 식물 RNA 추출 kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여, 제조회사에서 제공된 방법을 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 TuMV-CP-For (5′-gcaggtgaaacgcttgatg-caggtttg-3′), TuMV-CP-Rev (5′-taaccccttaacgccaagtaagttatg-3′)라 명명된 프라이머들과 함께 One-Step SuperScriptIII® 역전사중합효소 kit (Thermo Scientific)를 이용하여 65°C, 10분(1회), 얼음에 5분간 방치 후, PCR 기계를 이용하여 55°C, 30분 및 95°C, 2분(각 1회), 94°C, 20초, 55°C, 30초, 72°C, 60초(35회 반복), 72°C, 10분(1회) 증폭 반응을 시켰다. 반응 후 1.2% 아가로스겔 전기영동(agarose gel electrophoresis)으로 산물을 확인하였다.

Table 2. Resistance of radish inbred lines against *Turnip mosaic virus* (TuMV)

Name	Score*	TuMV-inoculated radish		Mock-inoculated radish	
		Symptom	RT-PCR	Symptom	RT-PCR
Rad-V1	S	mM† (6/6‡)	O§	- (0/3)	X
Rad-V2	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V3	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V4	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V5	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V6	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V7	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V8	S	SM (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V9	S	SM (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V10	R	- (0/6)	X	- (0/3)	X
Rad-V11	R	- (0/6)	X	- (0/3)	X
Rad-V12	R	- (0/6)	X	- (0/3)	X
Rad-V13	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V14	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V15	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V16	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V17	S	mM (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V18	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V19	S	M (6/6)	O	- (0/3)	X
Rad-V20	R	- (0/6)	X	- (0/3)	X

*S, susceptible; R, resistant.
†mM, mild mosaic; M, mosaic; SM, severe mosaic; -, no symptom.
‡Number of plants developed systemic symptoms/number of plants inoculated with TuMV.
§O, detection of RT-PCR product for TuMV; X, no detection of RT-PCR product for TuMV.

무 육종 계통들의 저항성 평가. 무 저항성 판정을 위한 지표로서 강한 저항성 계통을 선발하기 위하여, 순무모자이크바이러스의 병징이 나타나지 않으며 순무모자이크바이러스를 접종하지 않은 상엽에서 역전사중합효소연쇄반응으로 검출되지 않는 상태를 기준으로 정했다. 접종 후 28일 후 병징을 조사한 결과, 16개 무 육종 계통들에서 순무모자이크바이러스에 대한 약한 모자이크에서부터 심한 모자이크 병징을 나타내었으며 생육이 불량해지고 위축이 되는 병징이 관찰되고 무 기형이 관찰되었으나, 대조구로 사용된 완충액이 접종된 무 계통들에서는 순무모자이크바이러스에 의한 병징이 관찰되지 않았다(Table 2). 4개 무 육성 계통들에서 순무모자이크바이러스가 접종되었으나, 접종되지 않은 상엽에서 완충액이 접종된 대조구와 동일하게 모자이크 등 순무모자이크바이러스 병징이 나타나지 않았다(Fig. 1). 순무모자이크바이러스를 접종하거나 완충액을 접종한 20개 무 육종 계통들에서 순무모자이크바이러스의 외피단백질 유전자를 검출할 수 있는 특이적 프라이머들을 이용한 역전사중합효소연쇄반응으로 조사한 결과, 병징이 관찰된 16개 계통들(Rad-V1–Rad-V9, Rad-V13–Rad-V19)에서 모두 순무모자이크바이러스 외피단백질 유전자에 대한 증폭 산물이 검출이 되었으나, 대조구로 사용된 16개 계통들의 각 3개체들에서는 증폭 산물이 검출되지 않았다. 또한 순무모자이크바이러스가 접종되었으나 전신 감염 병징이 관찰되지 않은 4계통(Rad-V10–Rad-V12, Rad-V20)들에서 모두 순무모자이크바이러스 외피단백질 유전자에 대한 증폭 산물이 검출이 되지 않았다. 이 4계통들의 대조구로 사용된 각 3개체들에서는 증폭 산물이 검출되지 않아 4계통은 순무모자이크바이러스에 대한 전신 감염을 억제하는 강한 저항성을 가지고 있는 것으로 판단된다. 일부 순무모자이크바이러스 계통들(예를 들면, TuMV UK1 계통; Tomimura 등, 2003; Walsh, 1989)에서 보고된 것처럼, 배추들은 매우 잘 감염되지만 무는 드물게 TuMV에 의해서 감염이 되며 바이러스는 분명히 상엽에 존재하며 감염이 되더라도 무에서 아무런 병징을 나타내지 못하는 순무모자이크바이러스 계통 그 자체의 특이적 현상 때문이 아닌 것으로 차별성이 있다. 또한 위의 결과는 Tan 등 (2005)이 순무모자이크

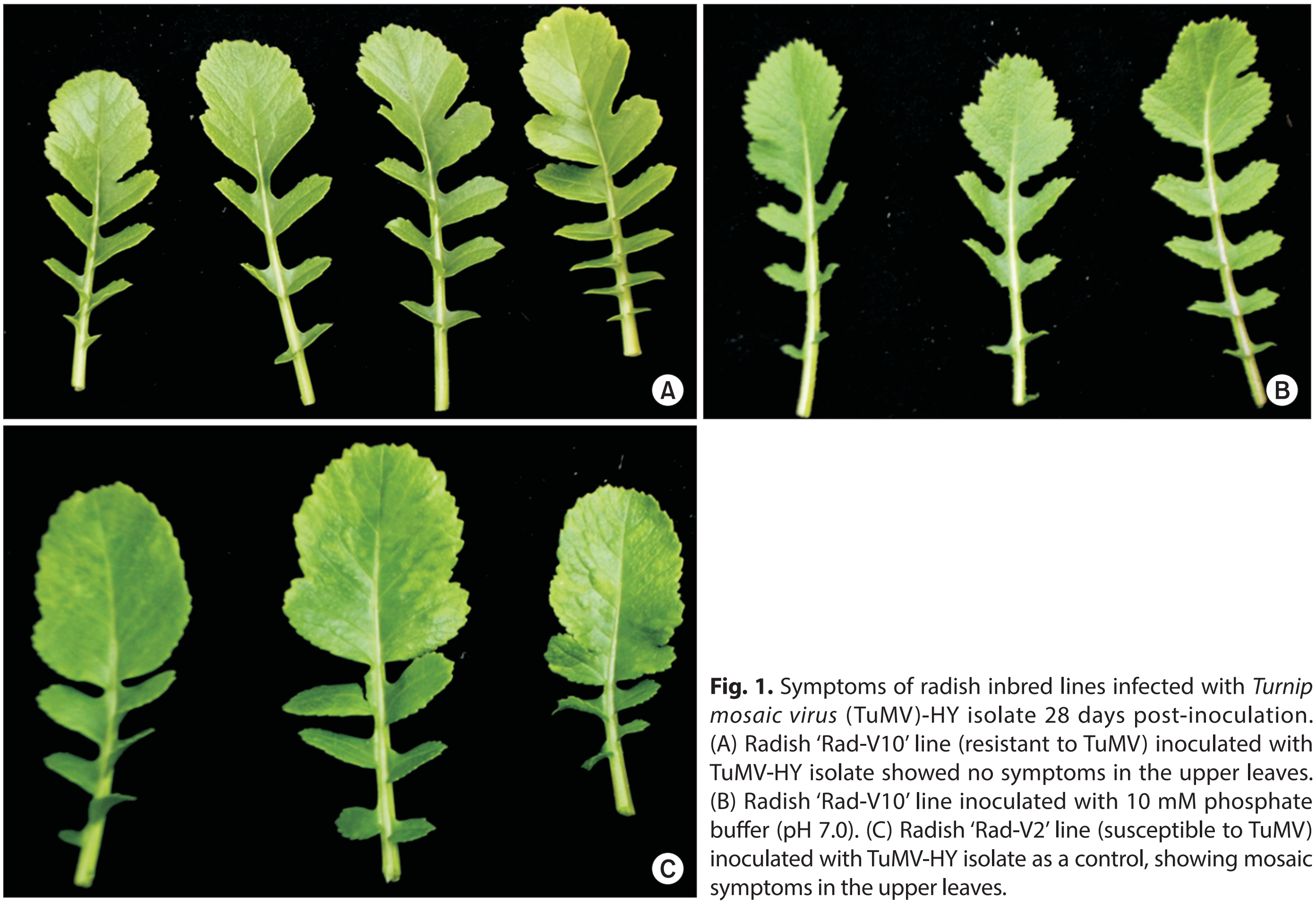

Fig. 1. Symptoms of radish inbred lines infected with *Turnip mosaic virus* (TuMV)-HY isolate 28 days post-inoculation. (A) Radish 'Rad-V10' line (resistant to TuMV) inoculated with TuMV-HY isolate showed no symptoms in the upper leaves. (B) Radish 'Rad-V10' line inoculated with 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). (C) Radish 'Rad-V2' line (susceptible to TuMV) inoculated with TuMV-HY isolate as a control, showing mosaic symptoms in the upper leaves.

바이러스 BR계통(배추와 무를 모두 감염시킬 수 있는 계통)을 사용하여 무를 감염시켰을 때 100% 감염률이 조사되었는데, 이번 연구에 사용된 순무모자이크바이러스 HY계통이 BR계통 그룹에 속하는 결과와 일치하였으며, 공시된 순무모자이크바이러스 계통 특이적 병원성 결여에 의하여 저항성이 발현되는 것은 아님을 시사해준다.

요 약

무(*Raphanus sativus* L.) 육종 계통들에 대한 순무모자이크바이러스(*Turnip mosaic virus*, TuMV) 저항성을 평가하기 위하여, 20개 무 육종계통들의 잎에 순무모자이크바이러스 BR 병원성을 가지는 국내 분리 계통을 즙액 접종하였다. 순무모자이크바이러스를 접종한 무 개체들은 22°C±3°C에서 재배하였으며 4주 동안 바이러스 병징 발현을 육안으로 조사하여 저항성을 평가하였다. 순무모자이크바이러스 감염에 의해서 무 육종계통들의 다른 병징 발현에 의해 분석한 결과, 16개 무 계통은 약한 모자이크, 모틀링에서 심한 모자이크 전신 병징을 보였으며 감수성으로 판별되었다. 이러한 결과는 순무모자이크바이러스 외피단백질 유전자에 대한 특이적 역전사중합효소연쇄반응에 의하여 확인되어, 순무모자이크바이러스가 병징을 발현시킨 원인이었다. 이와는 다르게 4개 무 육종계통들에서는 모자이크 등 전신 감염 병징이 발현되지 않았으며, 동일한 무 육종 계통들의 개체들에서 8주 동안 병징이 관찰되지 않았다. 역전사중합효소연쇄반응으로 조사한 결과 4개 무 육종 계통들의 상엽들에서 순무모자이크바이러스가 검출되지 않았다. 이런 결과는 4개 무 육종계통들이 순무모자이크바이러스에 대한 강한 저항성을 가지고 있음을 예시해준다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

We thank Dr. Han-Yong Park (Sejong University, Seoul, Korea) for his helpful comments. This work was financially supported by a grant of Basic Research Projects of NIHHS (Project No. PJ010247) funded by Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

Choi, G. S. and Choi, J. K. 1992. Biological properties of two isolates of turnip mosaic virus isolated from Chinese cabbage and radish in Korea. *Korean J. Plant Pathol*. 8: 276-280. (In Korean)

Chung, J., Han, J. Y., Kim, J., Ju, H., Gong, J., Seo, E. Y., Hammond, J. and Lim, H. S. 2015. Survey of viruses present in radish fields in 2014. *Res. Plant Dis*. 21: 235-242. (In Korean)

Ham, Y. I. 1995. Recent occurrence of TuMV disease on radish and Chinese cabbage in alpine region, Kangwon province. *Plant Dis. Agric*. 1: 45-46. (In Korean)

Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, H. S., Kim, M. K., Kwak, H. R., Kim, J. S., Nam, M., Cho, J. D., Cho, I. S. and Choi, G. S. 2012. 2007-2011 characteristics of plant virus infections on crop samples submitted from agricultural places. *Res. Plant Dis*. 18: 277-289. (In Korean)

Ku, K. H., Lee, K. A., Kim, Y. L. and Lee, M. G. 2006. Effects of pretreatment method on the surface microbes of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 3: 649-654. (In Korean)

Lee, H. C., Lee, Y. J. and Yang, D. C. 2008. Genetic characterization of mitochondrial DNA in novel CMS radish line. *Bull. Nat. Sci*. 22: 107-118.

Ohshima, K., Tomitaka, Y., Wood, J. T., Minematsu, Y., Kajiyama, H., Tomimura, K. and Gibbs, A. J. 2007. Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *J. Gen. Virol*. 88: 298-315.

Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., Walsh, J. A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A. and Gibbs, A. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol*. 83: 1511-1521.

Provvidenti, R. 1996. *Turnip mosaic potyvirus*. In: Viruses of Plants, eds. by A. A. Brunt, K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson, pp. 1340-1343. CAB International, Wallingford, UK.

Raybould, A. F., Maskell, L. C., Edwards, M. L., Copper, J. I. and Gray, A. J. 1999. The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea*. *New Phytol*. 141: 265-275.

Shukla, D. D., Ward, C. W. and Brunt, A. A. 1994. *The Potyviridae*. CAB International, Wallingford, UK.

Tan, Z., Gibbs, A. J., Tomitaka, Y., Sánchez, F., Ponz, F. and Ohshima, K. 2005. Mutations in *Turnip mosaic virus* genomes that have adapted to *Raphanus sativus*. *J. Gen. Virol*. 86: 501-510.

Tomimura, K., Gibbs, A. J., Jenner, C. E., Walsh, J. A. and Ohshima, K. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparison of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia. *Mol. Ecol*. 12: 2099-2111.

Walsh, J. A. 1989. Genetic control of immunity to turnip mosaic virus in winter oilseed rape (*Brassica napus* spp. *oleifera*) and the effect of foreign isolates of the virus. *Ann. Appl. Biol*. 115: 89-99.