

한국산 접목 선인장에서 분리한 괴사 반점 원인 바이러스의 생물리화학적 특성

이철호* · 나용준¹ · 한정현¹

서경대학교 이공대학 생물공학과, ¹서울대학교 농업생명과학대학 농생물학과

Purification and Biophysicochemical Properties of the Virus Causing Necrotic Spot Symptom on Korean Cactus

Cheol Ho Lee*, Yong Joon La¹ and Jung Heon Han¹

Department of Biological Engineering, College of Natural Sciences and Technology,
Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea

¹Department of Agricultural biology, College of Agriculture and Life Sciences,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT: A virus was purified from Korean cactus (*Chamaeaereus silverstrii* f. *Variegata* Hort) showing necrotic spots and its biophysicochemical properties were examined. The typical necrotic spots were observed on healthy looking cactus inoculated with the purified virus and the various symptoms from necrotic spots to systemic were observed on 17 species of test plants used, which suggests that the purified virus has the normal infectivity and wide host range. Ultraviolet absorption scanning analysis revealed that the viral preparation had the typical curve with shoulder at 290 nm and its ratio of absorbances at 260 nm to 280 nm and extinction coefficient was 1.156 and 2.86, respectively. The virus represented one distinct and homogeneous band and molecular weight of viral coat protein was determined to 17,000 Dalton by SDS-PAGE. The virus revealed rod-shaped virion (325×20 nm) by electron microscopy. Based on these results, it has been thought that the virus purified in this study is the pathogenic agents causing necrotic spot symptom on Korean cactus and one of the member of tobamovirus family.

Key words: *Chamaeaereus silverstrii* f. *variegata* hort, necrotic spots, biophysicochemical properties, SDS-PAGE, spectrophotometry, electron microscopy.

안데스 산맥을 중심으로 한 남미와 아리조나, 멕시코 일대의 북미를 원산지로 하는 선인장은 척박한 기후와 토양에서도 잘 자라는 강한 생명력으로 인하여 120여속 3천 여종의 원종과 3만여종 이상의 원예종이 세계 곳곳에 보급되어 있으며 우리나라에는 약 200여종이 보급되어 있다. 선인장은 형태에 따라 기둥선인장, 구형선인장 및 오픈티아(*Opuntia*) 선인장, 접목선인장 등으로, 크기에 따라 소형, 중형 및 대형 등으로 구분된다. 특히, 접목선인장은 여러 가지 색상을 가진 구형선인장을 일정 크기의 대목에 접목시킨 비모란(비목단)과 균생하는 노란색의 선인장을 대목에 접목한 산취로 크게 구분된다. 국산 접목선인장의 경우 전세계

시장의 약 60~70%를 점유할 정도의 중요한 화훼 자원으로 농가의 소득 증대에 크게 기여하고 있다. 일반적으로 식물은 바이러스 병원체에 의하여 생산성의 감소, 화훼 품질의 저하 등으로 야기되는 경제적 손실을 입게 되는 데, 화훼류인 선인장의 경우도 예외는 아니다. 특히, 국산 접목선인장의 경우 산취에 나타나는 괴사반점병이 가장 폐해가 커 국산 접목선인장의 경제적 가치를 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다. 그러나, 선인장 바이러스에 대한 연구는 극히 부진하여 세계적으로 약 5종의 바이러스가 분리, 보고되어 그 생물리화학적 특성이 밝혀져 있을 뿐이며(1, 3, 4, 7, 9-12), 우리나라의 경우 1990년 최 등(6)이 처음으로 cactus virus X(CVX)를 분리하여 기본적 특성에 대한 연구결과를 보고한 이후로 더 이상의 연구를 찾아보기 힘든 실정이다.

*Corresponding author.

본 실험에서는 접목선인장 재배시 가장 큰 품질저하를 일으키는 것으로 알려진 피사반점병의 원인을 규명하고자 피사반점 병징을 보이는 접목선인장 산취 (*Chamaeaereus silverstrii* f. *Variegata* Hort)를 실험포장에서 수집하여 이로부터 바이러스 병원체를 분리하였다. 또한, 분리한 병원성 바이러스의 기초적인 생물리화학적 특성을 규명하여 접목선인장 재배시 가장 큰 품질저하를 일으키는 피사반점 병의 방제 및 치료대책 수립에 필요한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스 정제원 및 공식 지표식물. 농촌진흥청 원예시험장 선인장 포장에서 피사병징을 보이는 접목선인장을 수집, 병징 부위를 절개하여 마쇄한 후, *Chenopodium amaranticola* 잎에 접종하여 바이러스를 1차 분리하고, *Nicotiana glutinosa* 잎에 접종하여 단일 병반으로 2차 분리하였다. 단일 병반으로 분리된 바이러스를 *Chenopodium amaranticola*에서 증식시킨 후, 잎을 수확하여 초저온 냉동고에 보관하면서 추후의 실험재료로 사용하였다. 선인장 바이러스의 기주범위 검정용 지표식물의 종자 및 종묘는 농촌진흥청 원예시험장 및 연암축산원에 전문대학으로부터 분양받았다. 한편, 건전한 접목선인장 산취는 농촌진흥청 원예시험장으로부터 분양받았다.

바이러스 정제. 바이러스에 감염된 붉은 명아주 잎 35 g과 1%(w/v)의 sodium sulfite를 첨가한 0.1 M의 Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액을 동량으로 첨가하여 녹즙기(그린파워)와 믹서로 곱게 마쇄한 후 세척의 거머즈로 여과하였다. 이 여과액에 2% Triton X-100(alkyl-phenoxypolyethoxyethanol)을 첨가하여 40분간 실온에서 교반하고 4°C에서 30분간 정치한 후, 1,600×g에서 10분간 원심분리하였다. 상정액을 회수하여 polyethylene glycol(PEG) 8000과 sodium chloride를 각각 8%와 1% 농도로 처리하고 실온에서 30분간 교반한 후 700×g에서 20분간 원심분리하여 바이러스를 침전시키고 40 ml의 완충용액으로 용출하였다. 용출된 용액을 다시 400×g(6,000 rpm)에서 20분간 원심분리하여 용해되지 않은 침전물을 제거한 후, PEG 침전법으로 바이러스를 침전시키고 4 ml의 0.01 M Tris-HCl(pH 8.0)으로 용출시켰다. 이 용출액을 30% sucrose cushion 법으로 35,000 rpm에서 1시간 30분간 초고속 원심분리하여 部分 純化하였다.

部分 純化된 바이러스 용액을 Sephacryl-HR 500 column 크로마토그래피법을 이용하여 아래와 같이 최

종적으로 정제하였다. Sephacryl S-500 HR(Pharmacia Ltd.)을 0.01 M 인산완충용액(pH 7.4)로 잘 세척하여 30×1 cm column(Bio-rad)에 채운 후, 다시 10배의 동일한 완충용액으로 Sephacryl S-500 HR column을 세척하였다. 이 column을 4°C 냉장고에서 24시간 안정화시킨 후 부분 순화된 시료 0.5 ml을 column의 상부에 적재하여 정량 pump(MP-3, Eyla)를 이용, 인산완충용액을 40 ml/hr의 속도로 공급하면서 1.7 ml씩 분획하였다. 각 분획구의 흡광도를 조사하여 일정 수준 이상의 분획을 선별, 선인장 바이러스로 확인된 각각의 분획을 취합하였다. 선인장 바이러스로 확인된 분획구의 취합 용액을 137,000×g, 4°C에서 60분간 원심분리하여 농축한 후, 침전물을 0.01 M 인산완충용액에 녹여 초저온 냉동고에 보관하면서 추후 실험재료로 사용하였다.

최종 정제한 선인장 바이러스의 생물활성 및 기주범위 검정. 최종 분리, 정제된 선인장 바이러스를 100 µg/ml의 농도로 주사기를 이용하여 건전한 접목선인장 산취에 내부 접종하여 선인장 바이러스의 감염력을 조사하였다. 최종 정제된 선인장 바이러스를 100 µg/ml의 농도로 *Chenopodium amaranticola* 잎에 접종하여 7일 경과후 노란색 점무늬(yellow spot)를 나타내는 *Chenopodium amaranticola* 잎을 수확하였다. 1 g의 *Chenopodium amaranticola* 잎에 5 ml의 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)을 첨가하고 유발로 곱게 마쇄, 400×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상정액을 정제원으로 기주범위 검정용 지표식물에 5일 간격으로 1개월 동안 접종하여 병징 발현 유무를 관찰하였다. 또한, 병징을 나타내지 않은 식물과 국부병반을 보이는 식물의 비접종엽에서 바이러스 감염유무를 조사하기 위하여 *Nicotiana glutinosa* 잎에 접종하여 피사 반점 형성 여부를 관찰하였다.

Spectrophotometry. 최종 분리, 정제한 선인장 바이러스를 적절한 농도로 희석한 후 spectrophotometer (Shimadzu UV 160A)를 이용하여 $A_{260/280}$ 의 비와 220~340 nm까지의 흡광 곡선을 조사하여 흡광계수($E_{1cm}^{0.1\%}$ 260 nm)를 결정하였다.

SDS-PAGE. 최종 분리, 정제한 선인장 바이러스 시료를 Bradford(2)의 단백질 정량법에 따라 정량하여 Lammli 등(8)의 방법에 따라 전기영동하였다. 선인장 바이러스 외피 단백질의 분자량은 반복된 전기영동 실험 결과를 토대로 Weber와 Osborn(16)의 방법에 따라 회귀분석하여 결정하였다.

Electron microscopy. 전자현미경 관찰용 시료는 Sap-dip method를 다소 변형하여 아래와 같은 방법으

로 준비하였다. Plastic films(Formvar 또는 collodion)으로 300 mesh grid에 막을 씌운 후, high vacuum evaporator로 다시 탄소막을 입혔다. 이 grid위에 0.01 M Na-K 인산 완충액(pH 7.4)으로 희석한 선인장 바이러스 용액을 한방울 떨어뜨리고 10분간 정착한 후 여액을 여과지로 제거하고 30방울의 증류수로 세척하였다. 이 grid를 2% phosphotungstic acid로 15분간 염색한 후 여액을 여과지로 제거하고 40방울의 증류수로 씻은 후 15분간 건조시켰다. 이렇게 준비된 시료를 전자현미경(Hitachi H-800)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

바이러스의 정제. 식물체 조즙액으로부터 선인장 바이러스 입자를 분리하기 위해 원심분리한 결과, 11,000×g에서부터 바이러스 입자의 농도가 급격히 떨어지지만 조즙액에 포함되어 있는 식물체 구성분들은 16,000×g에서 대부분 제거되었다. 부분 정제를 위해 30% Sucrose cushion을 이용하여 초고속 원심 분리한 결과, 우유빛을 띠는 선인장 바이러스 입자괴를 얻을 수 있었다. 우유빛 침전 상태의 부분 정제된 바이러스를 현탁하여 Sephacryl S-500 HR column으로 gel filtration한 결과, 바이러스 입자들이 먼저 분획된 후, 수

종의 식물체 단백질이 분획되어 선인장 바이러스만을 순수하게 분리할 수 있었다. 결과적으로 단일 병반의 형태로 접종한 *C. amaranticola* 잎 35 g으로부터 12 mg 정도의 선인장 바이러스를 순수 분리, 정제할 수 있었다.

이상의 결과를 비교·분석해 볼 때, 본 실험에서 공시한 선인장 바이러스의 분리, 정제 방법은 이와 유사한 특성을 지니는 바이러스의 정제에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

생물학적 활성 및 기주범위. 최종적으로 분리, 정제된 선인장 바이러스를 100 µg/ml의 농도로 건전한 접목 선인장 산취에 접종하여 선인장 바이러스의 감염력을 조사한 결과, 약 6개월이 경과한 시점에서 Fig. 1과 같은 괴사 반점을 나타내는 감염력, 즉, 생물 활성을 확인할 수 있었다. 또한, 최종적으로 분리, 정제된 선인장 바이러스를 100 µg/ml의 농도로 5과 10속 17종의 검정식물에 접종하여 4일 후부터 수시로 병징 발현 유무를 관찰한 결과, 부분적인 괴사 병징으로부터 전신 감염 증상에 이르기까지 다양한 병징을 나타내는 것으로 확인되었다. Table 1에서 볼 수 있는 것처럼, 접종 4~7일 후부터 부분적인 괴사 병징을 나타내

Table 1. The reaction of the different test plants to the finally purified cactus virus

Test plant	Reaction ^a
Amarantaceae	
<i>Celosia cristata</i> L.	SS
<i>Gomphrena globosa</i> L.	LL
Chenopodiaceae	
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL
<i>Chenopodium quinoa</i>	YS
Cucurbitaceae	
<i>Cucurbita pepo</i>	SS
Leguminosae	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	SS
<i>Vicia faba</i>	SS
Solanaceae	
<i>Datura stramonium</i>	LL
<i>Nicotiana benthamiana</i>	WS, SM
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	LL
<i>Nicotiana rustica</i> L.	LL, SS
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. KY-57	LL
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi-nc	LL
<i>Nicotiana occidentalis</i>	SN
<i>Nicotiana edwardsonii</i>	LL
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Blight yellow	SN
<i>Tetragonia expansa</i>	LL

^a LL = local lesion, SM = systemic mosaic, SN = systemic necrosis, SS = symptomless systemic, WS = white spot, YS = yellow spot.

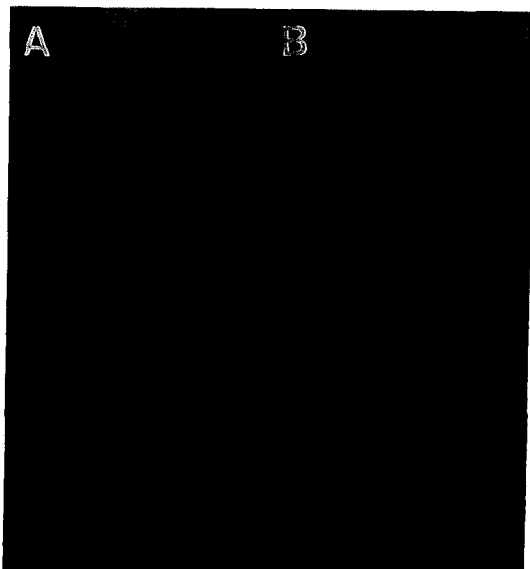


Fig. 1. Necrotic spot symptoms of *Chamaeaereus silvestrii* f. *Variegata* Hort 6 months after the inoculation. A) Naturally infected, B) Inoculated with the purified virus.

는 것으로는 *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum* Xanthic-nc, *Nicotiana tabacum* KY-57, *Nicotiana edwardsonii*, 그리고 *Tetragonia expansa* 등이었으며, *Chenopodium quinoa*의 경우, 점종엽에서는 노란색 점무늬가 형성되었고 비점종엽에서는 엽맥을 따라 노란색 줄무늬가 형성되었다. *Nicotiana rustica*의 경우, 점종 5일 후 괴사국부병반이 형성되었으며 14일 후 비점종 상엽에 무병징으로 전신감염 되었다. *Nicotiana benthamiana*에서는 점종엽에 흰색 국부병반이 형성된 후 상엽에서는 퇴록증상을 보였다. 전신감염을 보이는 검정식물 중 *Celosia cristata*, *Phaseolus vulgaris*에서는 바이러스가 아주 낮은 농도로 존재하였다. 한 편, *Nicotiana occidentalis*와 *Nicotiana tabacum* Blight Yellow의 경우, 심한 rugose 증상을 보였다.

선인장 바이러스의 물리화학적 특성. 선인장 괴사반점 원인 바이러스의 흡광 분석 결과, 선인장 바이러스의 흡광계수는 2.86이었으며 A260/280의 비는 1.156으로 나타나 전형적인 핵산단백질의 특성을 보이는 것으로 확인되었다. 또한, 220~350 nm에서의 자외선 흡광곡선을 조사한 결과, Fig. 2에서 보는 것처럼 전형적인 바이러스의 흡광 곡선 형태를 보였다. 선인장 바이러스를 전기영동한 결과, 균일한 단일 밴드를 나타냈다(Fig. 3). 전기영동 결과를 Weber와 Osborn의 방법에 따라 회귀분석하여 선인장 바이러스 외피 단백질의 분자량을 결정하였는 바, 17,000 Dalton으로 확인되었다(Fig. 4). 선인장 괴사 반점 원인 바이러스의 형태를 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, 최대 길이가 325 nm, 폭 20 nm 정도인 막대 모양의 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

이상의 결과로 볼 때, 본실험에서 최종 분리, 정제된 선인장 바이러스는 점목선인장 산취에 괴사반점을 일으키는 원인 바이러스로 판단되며 기주범위 또한 비교적 넓은 것으로 추정된다. 또한, 바이러스 외피 단백

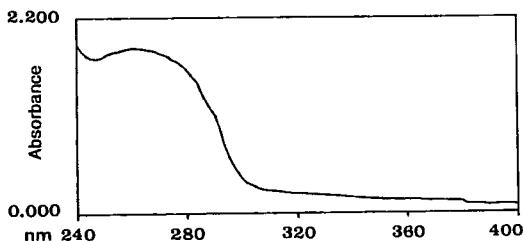


Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of the purified virus.

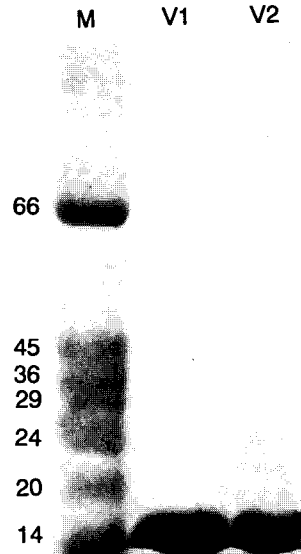


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the purified virus. M, molecular weight marker; V1, V2, viral preparations.

질의 분자량 및 입자의 모양과 크기 등 물리화학적 특성은 본실험에서 최종적으로 분리. 정제된 선인장 바이러스가 기존에 분리. 보고된 他 선인장 바이러스중 Sammons' opuntia virus를 제외한 여타의 선인장 바이러스가 tobamovirus群에 속하지 아니하며(1, 4, 7, 9-12) Sammons' opuntia virus의 경우 입자 크기가 320 nm 정도로 tobamovirus群에 속하지만 *Nicotiana glutinosa*를 이용한 생물검정에서 병징이 나타나지 아니

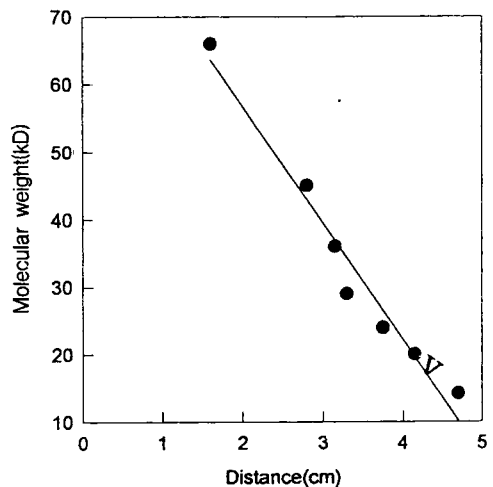


Fig. 4. Molecular weight determination of the coat protein of the purified virus from relative mobility on 12.5% polyacrylamide gel. V, viral coat protein.

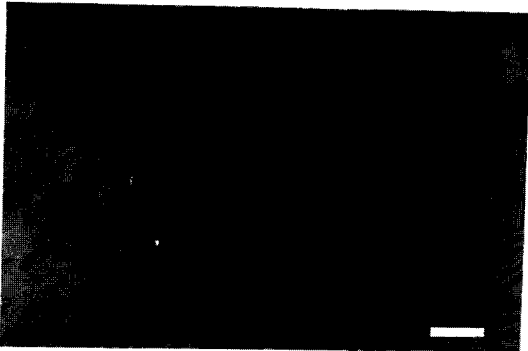


Fig. 5. Electron micrograph of the purified virus. Viral preparations were stained with 2% phosphotungstic acid. The bar represents 100 nm.

함을 감안 할 때(3, 9), tobamovirus群에 속하는 새로운 선인장 바이러스로 추정된다.

앞으로 새로운 병원 바이러스 여부의 판단에는 기 보고된 선인장 바이러스들과의 혈청학적 및 생물학적 특성에 대한 비교, 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히, Sammons' opuntia virus와의 생물리화학적 특성 비교가 좀 더 보완되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 보다 더 정확한 바이러스의 분류학적 위치를 결정하기 위해서는 tobamovirus군에 속하는 他 바이러스와의 바이러스 genome의 염기서열 비교, 분석 등 분자생물학적 관점에서의 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

괴사 반점 병징을 보이는 한국산 접목선인장 산취 (*Chamaeaereus silverstriif. variegata hort*)로부터 바이러스 병원체를 분리하여 생물리화학적 특성을 조사하였다. 생물학적 활성 검정 결과, 최종적으로 분리. 정제된 선인장 바이러스는 건전한 접목 선인장 산취에서 정상적인 감염력을 지니는 것으로 판명되었으며, 5과 10속 17종의 검정 식물에서도 부분적인 괴사 병징으로부터 전신 감염 증상에 이르기까지 다양한 병징을 나타내는 것으로 확인되어 상당히 넓은 기주 범위를 지니는 것으로 생각된다. 흡광분석 결과, 바이러스의 흡광계수는 2.86이었으며 A260/280의 비는 1.156으로 확인되었고 220~350 nm에서의 자외선 흡광곡선 역시 전형적인 바이러스의 흡광 곡선 형태를 보였다. 전기영동 결과, 균일한 단일 밴드를 나타내었으며 외피 단백질의 분자량은 17,000 Dalton으로 확인되었다. 전자현미경 관찰 결과, 길이 325 nm, 폭 20 nm 정도의 막

대 형태의 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다. 상기한 바이러스의 생물리화학적 특징으로부터 본 실험에서 분리한 바이러스는 한국산 접목선인장 산취에서 괴사 반점을 일으키는 원인 바이러스로 tobamovirus의 한 구성원일 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Attathom, S., Weathers, L. F. and Gumpf, D. J. 1978. Identification and characterization of a potex virus from California barrel cactus. *Phytopathology* 68: 1401-1406.
2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
3. Brandes, J. and Chessin, M. 1965. An electron microscope study on the size of Sammons' opuntia virus. *Virology* 25: 673-674.
4. Chessin, M. and Lesemann, D. 1972. Distribution of cactus viruses in wild plants. *Phytopathology* 62: 97-99.
5. Chessin, M., Solberg, R. A. and Fischer, P. C. 1963. External symptoms and Giemsa-stainable cell inclusions associated with virus infection in cacti. *Phytopathology* 53: 988-989.
6. Choi, G. S., Kim, J. S., Choi, Y. M. and Lee, S. H. 1990. Identification and characterization of cactus virus X from cacti in Korea. *Res. Rept. RDA(C. P)* 32: 7-13.
7. Giri, L. and Chessin, M. 1975. Zygocactus virus X. *Phytopathol. Z.* 83: 40-48.
8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
9. Mayhew, D. E. and Wiens, A. L. 1994. Viruses in cacti and other succulents. *Cactus and Succulents J.* 66: 117-121.
10. Milbrath, G. M., Nelson, M. R. and Wheeler, R. E. 1973. The distribution and electronmicroscopy of virus of cacti in southern Arizona. *Phytopathology* 63: 1133-1139.
11. Milbrath, G. M. and Nelson, M. R. 1972. Isolation and characterization of a virus from Saguaro cactus. *Phytopathology* 62: 732-739.
12. Nelson, M. R. and Tremaine, J. H. 1975. Physicochemical and serological properties of a virus from Saguaro cactus. *Virology* 65: 309-319.
13. Ready, K. F. M. and Bancroft, J. B. 1985. The assembly of barrel cactus virus protein. *Virology* 141: 302-305.

14. Russo, M. and Martelli, G. P. 1982. Ultrastructure of turnip crinkle and Saguaro cactus virus infected tissues. *Virology* 118 : 109-116.
15. Sammons, I. M. and Chessin, M. 1961. Cactus virus in the United States. *Nature* 191 : 517-518.
16. Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244 : 4406-4412.

(Received Feb. 20, 1997)