

땅콩(*Arachis hypogaea*)에서 분리한 *Bean common mosaic virus*와 *Peanut mottle virus*

구봉진 · 신혜영 · 성정현 · 강동균¹ · 장무웅*
영남대학교 이과대학 생물학과, ¹경북농업기술원 생물자원연구소

Bean common mosaic virus and *Peanut mottle virus* isolated from Peanut in Korea

Bong Jin Koo, Hye Young Shin, Jung Hyun Sung, Dong Kyon Kang¹ and Moo Ung Chang*

Department of Biology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

¹Experiment Station of Bioresources, Gyeongbuk Agri. Tech. Admin., Andong 760-891, Korea

(Received on June 5, 2002)

For the survey of viruses infected in peanut cultivated in Korea, peanut seeds and leaves showing viral symptoms were collected from their growing areas. Typical symptoms on virus infected peanut leaves including mosaic, mottle with necrosis, yellowing, stripe or vein banding and stunts were observed. Two viruses isolated from the naturally infected peanuts were identified as *Bean common mosaic virus*(BCMVP-St) and *Peanut mottle virus*(PeMoV) by their host range, immunosorbent electron microscopy(ISEM), direct immuno staining assay(DISA), RT-PCR, and intracellular symptoms. Direct negative staining method by electron microscope showed filamentous particles of about 780 nm in length as well as inclusion bodies. In ultrathin sections of BCMVP-St and PeMoV infected tissues, cytoplasmic cylindrical inclusions as well as filamentous virus particles were observed in the cytoplasm of parenchyma cells. ISEM revealed filamentous particles strongly decorated with antisera of BCMVP-St and PeMoV. Peanut seeds were stained with BCMVP-St and PeMoV antisera indicating the possibility of seed transmission for these viruses. Seedlings germinated from peanut seeds which reacted with antisera of BCMVP-St by DISA showed mild mottle or stripe symptoms while mosaic and necrotic mottle symptoms were observed for PeMoV-positive seedlings. Filamentous particles were strongly decorated with each antiserum under ISEM observation. BCMVP-St coat protein gene of about 1.2 Kbp was amplified by RT-PCR. Altogether, these results indicate that BCMVP-St is the most prevalent virus infecting peanut in Korea.

Keywords : *Arachis hypogaea*, *Bean common mosaic virus*, *Peanut mottle virus*, RT-PCR

땅콩(*Arachis hypogaea*)은 열량원, 단백질, 유지의 원료로 대두 다음으로 중요한 콩과 작물로 특히 미국에서는 고부가가치 작물로 땅콩버터와 스낵의 가공식품으로 생산되고 있다. 땅콩의 세계 총 생산면적은 대략 2천만 ha가 넘으며 생산량도 2,500만 톤에 이르고 있어 생산량이 증가하는 추세에 있다. 아시아는 이 중 70% 이상을 차지하고 있고 우리나라에서는 1만 ha 정도 재배하여 총수요량의 40%를 자급하고 나머지는 수입하여 충당하고 있다.

땅콩 바이러스의 기록은 1965년 Kuhn에 의해 처음으로 mottle 및 mosaic 병징으로 기재된 *Peanut mottle virus*(PeMoV)와 1966년 Miller & Troutman에 의해 왜소화 병징으로 기재된 *Peanut stunt virus*(PSV)가 보고되었다(Reddy, 1998, Sutic 등, 1998). 현재까지 알려진 땅콩의 바이러스는 Potyvirus 그룹의 *Bean common mosaic virus*(=*Peanut stripe virus* : PStV, BCMVP-St; Pappu 등, 1998), *Peanut top paralysis virus*(Sutic 등, 1998), PeMoV(Bock & Kuhn, 1975, Anjos 등, 1998) *Peanut green mosaic virus*(PgMV; (Sutic 등, 1998))가 있고, Umbravirus 그룹의 *Groundnut rosette virus*(GRV; Ryabov 등, 1998), Furovirus 그룹의 *Indian peanut clump virus*(IPCV; Konate

*Corresponding author
Phone)+82-53-810-2374, Fax)+82-53-515-3061
E-mail)muchang@yu.ac.kr

& Barro, 1993), Tospovirus 그룹의 *Peanut bud necrosis virus*(PBNV; Sutic 등, 1998), *Tomato spotted wilt virus*(TSWV; Hoffmann 등, 1988), Cucumovirus 그룹의 *Cucumber mosaic virus*(CMV; Sutic 등, 1998), *Peanut stunt virus*(PSV; Xu 등, 1998, Zeyong 등, 1988), 등이 있으며 이외에도 *Peanut veinal chlorosis virus*(Sutic 등, 1998), *Peanut chlorotic streak virus*(Sutic 등, 1998)가 있다. 이중 아시아-태평양지역에서 분포하는 주요한 바이러스는 PBNV, IPCV, BCMV-PSI, PeMoV, PSV 등이 있다 (Reddy, 1991). 특히, 종자전염에 의해 전파되는 BCMV-PSI와 PeMoV가 중국 등의 땅콩 재배지역에서 가장 광범위하게 감염되어 땅콩의 수확량을 떨어뜨리는 바이러스로 보고되어 있다(Demski 등, 1984; Chang 등, 1990; Matsumoto 등, 1991; Reddy, 1998). 그리고, 국내 땅콩의 약 60% 이상을 중국 및 동남아시아에서 수입하여 재배하므로 이들 바이러스 피해가 심각하다고 볼 수 있다. 땅콩은 종자의 불량, 파종 후 토양 병해충의 피해 등이 다른 작물에 비해 큰 편이고 대부분의 바이러스가 종자전염 또는 토양전염에 의해 쉽게 전파되며 진딧물, 토양 곰팡이(*Polymyxa* sp.) 등의 매개에 의한다.

현재까지 전 세계적으로 보고된 땅콩 바이러스는 약 16 여종정도가 되지만, 그 분류체계가 불분명한 상황이다. 예를 들어, PeMoV의 보고가 있는 후에도 *Peanut green mosaic virus*, *Peanut chlorotic blotch virus*, *Peanut chlorotic mottle virus* 등의 *Potyvirus*가 보고되었으나, 이들은 모두 PeMoV로 확인되었다(Demski 등, 1984). 그러므로, 땅콩에 보고되어 있는 바이러스에 대한 분자생물학적 특징 등에 의한 정확한 분류체계가 시급하며, 종자로부터 바이러스 감염을 수월하고 정확하게 검출할 수 있는 진단법의 개발이 절실히 요구되고 있는 상황이다.

그러나, 지금까지 한국에서 재배되고 있는 땅콩에는 PSV(김 등, 1988) 외에 다른 바이러스에 대한 보고가 없어, 1999-2000년도에 걸쳐 대구 근교의 2개 지역, 경북 안동, 영주, 예천 등의 5개 지역, 전북 고창, 부안, 정읍 3개 지역에서 재배되고 있는 땅콩에 대한 바이러스 병을 조사한 결과, 모자이크, 황화, 줄무늬, 기형 등의 증상을 나타내는 땅콩을 채집하였다. 이들 바이러스 증상의 잎을 Direct negative staining method(DN법, Doi 등, 1969)로 염색하여 투과전자현미경으로 바이러스 입자의 검출을 시도한 결과, 길이 780 nm의 사상형 바이러스의 입자들과 *Potyvirus*의 감염조직에서 특이하게 관찰되는 세포질 봉입체를 확인하였다. 또한, 이들 지역에서 바이러스의 감염이 확인된 땅콩에서 수확한 종자에 대하여 바이러스 검출을 시도한 결과, 상당수의 종자로부터 바이러스가 검출

되어 바이러스가 종자 전염됨을 확인하였다. 따라서 한국에서 재배되고 있는 대부분의 땅콩이 종자전염에 의한 바이러스에 감염되어 있음을 추측하였다.

이 연구에서는 이들 땅콩에 종자전염으로 복합 감염의 증상을 일으키는 바이러스에 대하여 생물검정, 전자현미경에 의한 입자관찰 및 혈청학적 반응 등의 방법으로 각각의 바이러스를 분리 및 동정하였다. 또한, 분리·동정된 바이러스의 RNA를 추출하여 각각의 바이러스에 대한 primer를 제작한 후, RT-PCR하여 현재 한국산 땅콩에 감염되어 있는 바이러스에 대한 정확한 동정을 하여 땅콩 바이러스의 진단체계를 확립하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시식물. 1999-2000년도에 걸쳐 대구 근교의 2개 지역, 경북 안동, 영주, 예천 등의 5개 지역, 전북 고창, 부안, 정읍 3개 지역에서 재배되고 있는 땅콩 밭에서 모자이크, 괴저를 동반한 얼룩무늬, 황화, 줄무늬, 엽맥녹대, 위축 등의 증상을 나타내는 땅콩을 채집하여 병원 바이러스를 조사하였다(Fig. 1A, B). 이들 바이러스 증상의 잎 조직을 시료로 하여 DN법 및 immunosorbent electron microscopy(ISEM)법에 의해 투과전자현미경으로 병원 바이러스의 입자를 관찰하였다. 본 연구에서는 바이러스 감염이 확인된 땅콩으로부터 바이러스를 분리 동정하기 위하여 아래와 같은 방법을 수행하였고, 이어서 땅콩 바이러스의 진단체계를 확립하고자 한다.

바이러스 입자의 확인. 바이러스 입자의 확인은 모자이크, 줄무늬, 엽맥녹대 등의 증상을 나타내는 땅콩 잎 및 땅콩, 그리고 direct immuno staining assay(DIS)를 실시하여 발아시킨 땅콩 잎을 소량 잘라 슬라이드 글라스에 둔 후, 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.4)을 넣어 마쇄한 조즙액을 시료로 하여 DN법으로 2% uranyl acetate 혹은 phosphotungstic acid (PTA)로 염색하여 투과전자현미경(Hitachi H-600)으로 검경하였다. 감염 잎 조직내의 바이러스 입자의 존재양식을 관찰하기 위하여 이병식물의 잎 조직을 2.5% glutaraldehyde에 3시간 전고정하고, 1% osmium tetroxide에 1시간 후고정한 다음 ethanol로 탈수하였다. 이것을 수지에 포매한 다음, 초박절편하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

면역전자현미경법(ISEM법). Immunosorbent electron microscopy(ISEM)법은 Miline & Luisoni(1977)의 방법에 의해 실시하였다. 땅콩 바이러스에 대한 항혈청을 미국의 ATCC(PVAS: 607-PgMV, 413-PMV)사 및 日本 大阪府立大學 Ohki 박사(BCMV-PSI) 등으로부터 구입 및 분양 받

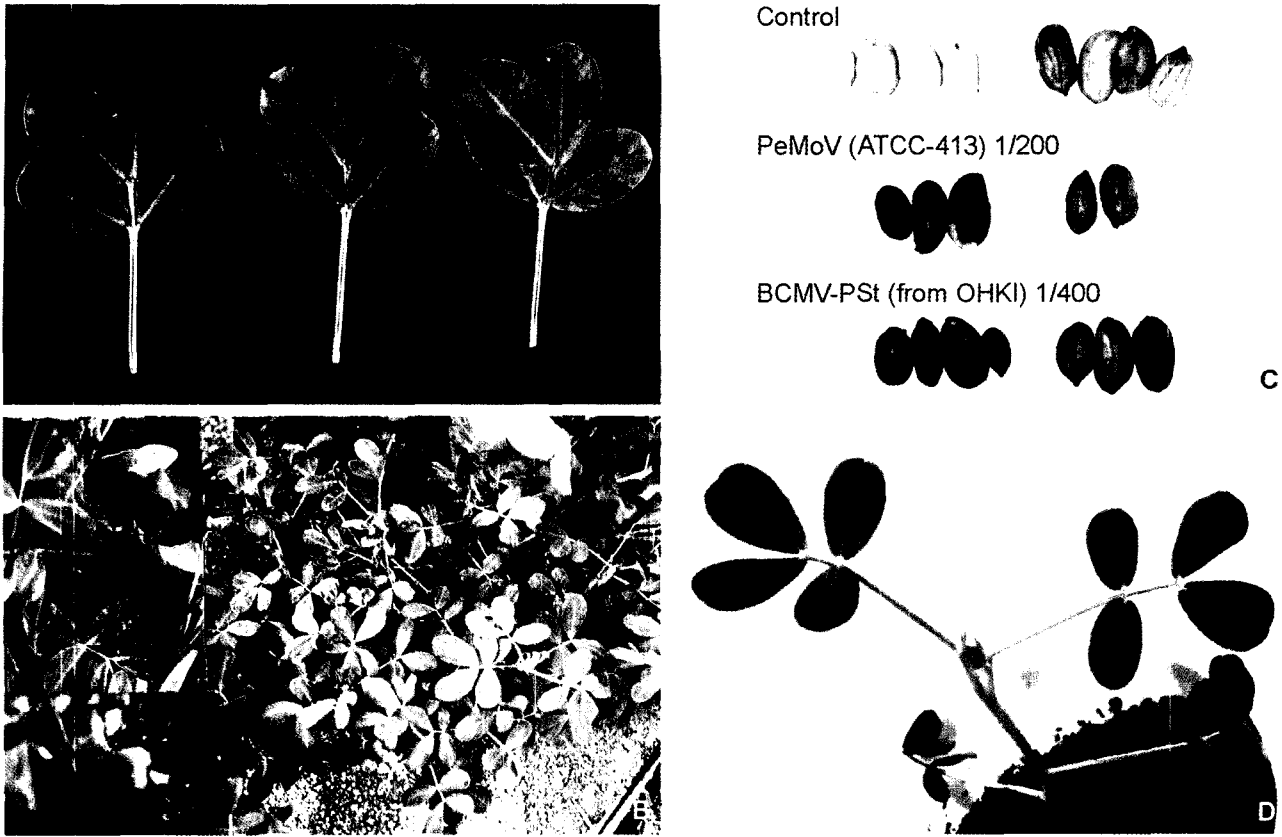


Fig. 1. A: Dark-green islands and mild mottle on peanut leaves infected by PeMoV(left), tip yellowing, mottle or mosaic of irregular, dark-green islands on peanut leaves infected by BCMV-PSt and PeMoV(center), dark-green stripes and vein banding on peanut leaves infected by BCMV-PSt(right), B: Major symptoms of mottle with necrosis on peanut leaves infected by PeMoV. High magnification of necrosis symptoms(left upper coner), C: The seeds harvested form BCMV-PSt and PeMoV- inoculated plants were stained dark purple with antisera of BCMV-PSt and PeMoV, D: Seedlings germinated from peanut seeds which reacted with antisera of BCMV-PSt and PeMoV by DISA were showed mottle and mosaic symptoms on the leaves, and also were detected viral particles, which decorated with antisera of BCMV-PSt and PeMoV.

아 각각을 적당하게 희석한 다음 실험을 실시하였다. 먼저 바이러스에 감염된 땅콩 잎을 0.1 M 인산 완충용액으로 마쇄한 다음 즙액을 추출하여 이를 항혈청과 반응시킨 후 염색하여 전자현미경으로 관찰하는 면역전자현미경법의 혈청학적 반응 결과에 의거하여 한국산 땅콩에서 발생하는 바이러스를 동정하였다.

생물학적 검정 및 바이러스 증식. 바이러스 감염이 확인된 땅콩의 이병엽 및 DISA 테스트후 발아시킨 유묘 식물을 이용하여 PBNV, BCMV-PSt, PeMoV, PSV 등에서 바이러스의 검정식물로 알려진 *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana benthamiana*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisium sativus*, *Vicia faba* 등에 즙액 접종하여 땅콩에 감염된 바이러스에 대한 생물검정을 실시하였다(Table 2). 퇴북얼룩무늬의 국부병

징을 나타내는 *C. amaranticolor*로부터 오려낸 단일병반을 접종원으로 각각의 바이러스에 전신감염이고 바이러스 농도가 높은 *P. vulgaris*, *V. faba* 등의 검정식물에서 대량적으로 증식시킨 후, 단독감염이 확인된 이병주를 수거하여 -70°C 에 동결 보관하여 실험 재료로 사용한다.

Direct immuno staining assay(DISA). 종자감염이 보고되어 있는 BCMV-PSt, PeMoV 등의 바이러스를 검출하기 위하여 땅콩을 직접 항혈청과 반응, 발색시켜 관찰하는 DISA를 실시하였다. DISA법은 Lin 등(1990)의 방법을 수정하여 Fig. 2와 같은 순서로 수행하였다. 미국 ATCC 사에서 구입한 BCMV-PSt, PeMoV의 항혈청을 PBS로 각각 1/400, 1/200배 희석한 용액 5 ml에 땅콩을 침지하여 실험을 실시하였다. 이후, PBST로 10분간 2회 수세한 후, 2차 항체인 anti-rabbit IgG goat antibody alkaline

Table 1. Oligonucleotide used for RT-PCR

Name	Sequence
BCMVII-F	5'-GAATTGCTCCAGGAGATTA-3'
BCMVII-R	5'-CAATGGTTCCTCCGGCTTAC-3'
PMV-F	5'-CAGGTGAAAATAAGAGTAAAGT-3'
PMV-R	5'-ACAATGTGTATCTTTGGTGT-3'
PSV-F	5'-CACCAAAAAGGTACTGGTAA-3'
PSV-R	5'-GCTTGATGTGTACGTTGTA-3'

Table 2. Experimental host range of BCMV-PSt and PeMoV isolated from peanuts in Korea ^{a),b)}

Test plant	BCMV-PSt	PeMoV
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLc/-	-/-
<i>C. quinoa</i>	LLc/-	-/-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	LLc/-	LLc/Mo
<i>N. benthamiana</i>	-/S	-/S
<i>Cucumis sativus</i>	-/-	-/-
<i>Glycine max</i>	-/M	LLc/Mo
<i>Phaseolus vulgaris</i>	LLc/V	LLc/M
<i>Pisium sativum</i>	-/-	LLc/M
<i>Vicia faba</i>	-/-	LLn/S
<i>Vigna sinensis</i>	LLc/-	-/-

^{a)}Infection was confirmed by observing virus particles in tested plants by electron microscopy.

^{b)}- : no symptom, LLc : chlorotic local lesions, LLn : necrotic local lesions, Mosaic : M, Mottle : Mo, S : latent systemic, V: vein banding.

phosphatase conjugate를 1/2,000배 희석한 후, 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 다시, 2회간 PBST로 수세한 후, 시료를 NBT와 BCIP를 혼합한 용액으로 발색시켰다. 약 30분간 반응 후, dark purple로 염색되면 수도물로 수세한 후 발색정도로써 바이러스 감염을 판별하였다. 2회의 실험을 실시하였고, 이후에 발색된 땅콩 씨앗은 파종하여 받아시켰다(Fig. 2).

바이러스의 RNA 정제. 바이러스 감염이 확인된 이병 땅콩 잎과 생물검정을 실시한 후, 단리된 시료를 extraction buffer에 마쇄하여 vortexing한 다음 상층액을 수거하여 proteinase K(100 µg/ml), SDS(25%)를 처리하여 42°C에서 15분간 정치하였다. 이후, phenol:chloroform을 수회 처리하여 바이러스의 coat protein을 제거하고 상층액을 수거하여 에탄올 침전으로 viral RNA를 정제 및 농축하여 RT-PCR을 위한 재료로 준비하였다(Fig. 3).

CP gene의 primer 제작 및 RT-PCR. 정제된 RNA

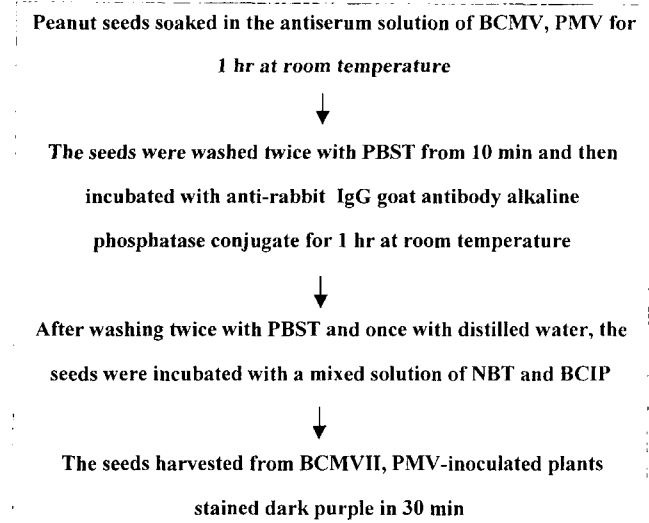


Fig. 2. Brief experimental method for direct immunostaining assay(DISA).

를 RT-PCR을 실시하기 위하여 NCBI/DDBJ 등에 등록되어 있는 sequence를 토대로 하여 각 바이러스의 외피 단백질유전자 부위에 대한 primer를 제작하였다(Higgins 등, 1998, Pappu 등, 1998). 각 primer는 BCMV-PSt, PeMoV, PSV의 forward와 reverse로 구성된 것으로 약 1.2 kb 크기의 DNA를 증폭되도록 제작하였다(Table 1). RT-PCR은 먼저 역전사 효소에 의한 cDNA 합성반응과 이 반응산물인 cDNA를 다시 주형으로 하는 PCR 반응으로 실시하였다. 먼저 RNA 시료 5 µl에 reverse primer와 멸균증류수를 넣고 98°C에서 1분간 denaturation을 실시하였다. 즉시 얼음에 두고 renaturation을 방지한 다음, 5Xreaction buffer, dNTP와 역전사 효소인 MMLV를 넣어 37°C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하였다. 이후, 에탄올을 이용하여 정제 과정을 거친후, 정제된 cDNA와 forward, reverse primer를 넣고, dNTP, reaction buffer, 25 mM MgSO₄, 중합효소인 *T7*을 넣은후, denaturation을 94°C/30 sec, annealing을 60°C/1 min, extension을 68°C/2 min의 과정을 40cycles를 실시하였다. 이후, 반응산물은 1.2% agarose gel상에서 밴드의 유무를 확인하였다.

결 과

바이러스 입자의 확인. 바이러스 입자의 확인은 모자이크, 줄무늬, 엽맥녹대 등의 증상을 나타내는 땅콩 잎 및 땅콩(Fig. 1), 그리고 DISA를 실시하여 받아시킨 땅콩 잎(Fig. 1D)을 DN법에 의해 투과전자현미경(Hitachi H-600)으로 검경하였다. 바이러스 입자는 약 780 nm의 크기로

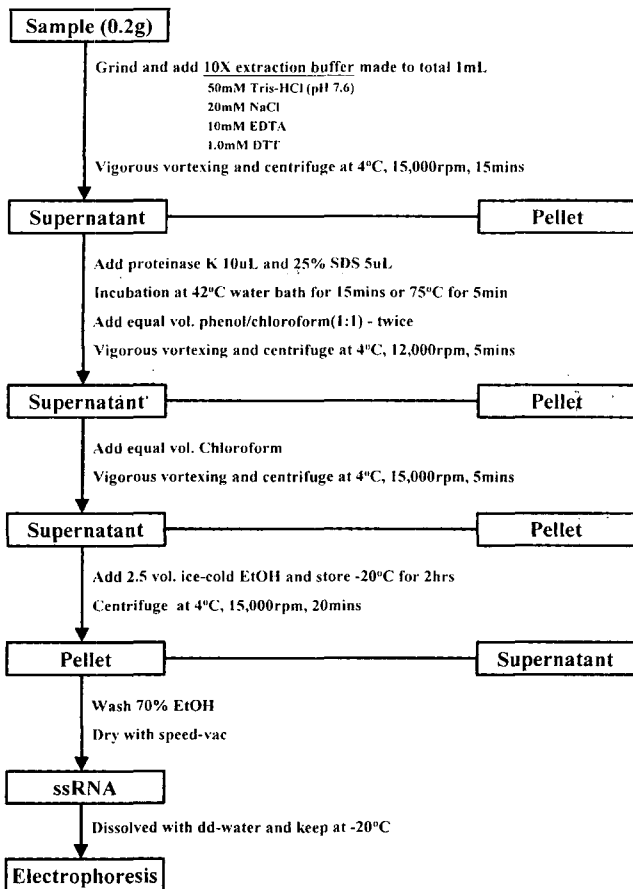


Fig. 3. Viral RNA purification method of peanut leaves.

굴곡성이 있는 사상형의 입자와 세포질 봉입체의 단편이 확인되었다(Fig. 4A).

감염 조직내의 바이러스 존재양식. 자연적으로 복합 및 단독감염이 확인된 땅콩 및 좁쌀접종에 의하여 BCMV-PSt 및 PeMoV에 각각 단독감염이 확인된 *C. quinoa*, *V. fava*의 이병엽을 초박절편하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 어느 시료에서도 길이 약 700 nm의 사상입자가 엽육세포 등의 세포질과 액포에 산재 혹은 병행배열로 존재해 있는 영상이 확인되었다(Fig. 5B). *Potyvirus*의 감염 세포에 특이적으로 생성되는 세포질내의 봉입체(cytoplasmic cylindrical inclusions)가 반드시 확인되었는데, BCMV-PSt에 단독감염이 확인된 *C. quinoa*의 세포에서는 pinwheel, short curved laminated aggregates, scrolls가 확인되었고(Fig. 5A), PeMoV에 단독감염이 확인된 *V. fava*의 세포에서는 laminated aggregates, scrolls가 확인되었다(Fig. 5B).

면역전자현미경법(ISEM). 면역전자현미경법은 Miline & Luisoni(1977)의 방법에 의해 미국의 ATCC(PVAS-607, 413)사 및 일본 등으로부터 구입한 항혈청을 이용하여 바이러스를 동정하였다. Ohki 박사로부터 분양받은 BCMV-PSt항혈청을 이용하여 ISEM 한 결과, 항원과 항체의 특이적인 반응으로 바이러스 입자의 주위가 검게 염색(decoration)되어 보이는 입자가 관찰되었다(Fig. 4B). 따라서, 이병된 땅콩 잎에는 BCMV-PSt 바이러스가 감염되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, ATCC사의 PeMoV

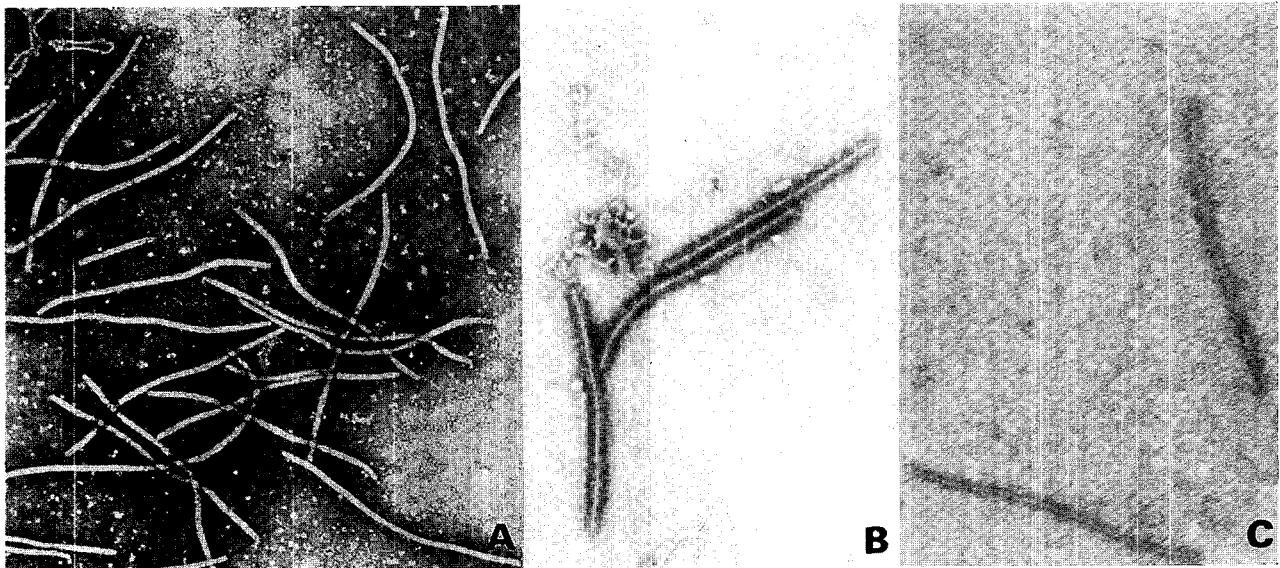


Fig. 4. Electron micrograph of virus particles in negatively stained preparations from peanut leaves infected by BCMV-PSt and PeMoV. A: Filamentous particles of BCMV-PSt and PeMoV($\times 46,000$). B: BCMV-PSt filamentous particles strongly decorated with BCMV-PSt antiserum($\times 39,100$). C: PeMoV filamentous particles decorated with PeMoV antiserum($\times 46,000$).

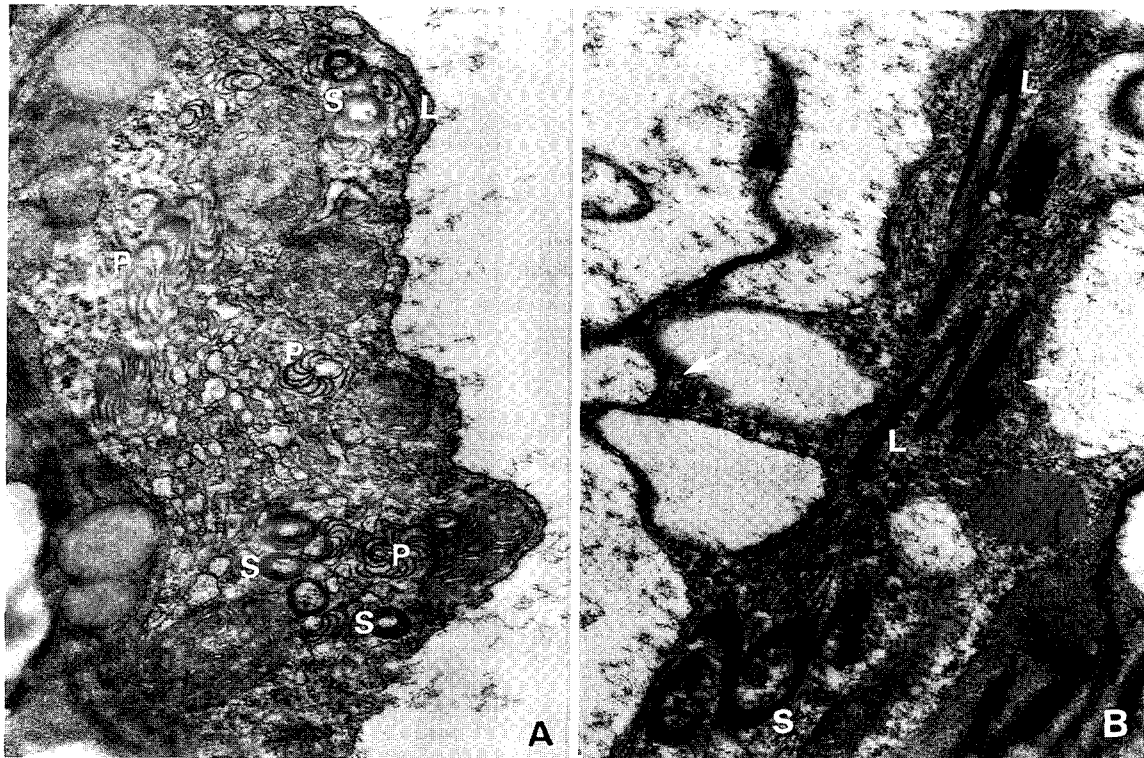


Fig. 5. A: A parenchyma cell of BCMV-PSst infected *Cenopodium amalanticolor* leaf. Cytoplasmic cylindrical inclusions ; pinwheel(P), short curved laminated aggregates(L), scrolls(S) in the cytoplasm (×23,000). **B:** A parenchyma cell of PeMoV infected *Pisium sativum* leaf. Cytoplasmic cylindrical inclusions ; laminated aggregates(L) and scrolls(S) in the cytoplasm, one end of the virus particles aggregate adjacent to the tonoplast(arrows) (×23,000).

(ATCC-413)항혈청 및 PgMV로 ISEM을 실시한 결과, PeMoV 항혈청에 의해 PeMoV가 decoration되어 검게 관찰되었다(Fig. 4C). 따라서, 한국산 땅콩에는 최소 BCMV-PSst, PeMoV의 2종의 바이러스가 단독 및 복합 감염되어 있음을 DN법 및 항혈청반응을 통하여 확인하였다. 또한 땅콩 잎의 즙액으로 위에 항혈청뿐 아니라, CMV, PSV, CaMV의 항혈청으로 ISEM을 실시하였으나, decoration된 바이러스를 관찰할 수는 없었다.

Direct immuno staining assay(DISA). 종자감염이 보고되어 있는 BCMV-PSst, PeMoV 등의 바이러스를 검출하기 위하여 땅콩을 직접 항혈청과 반응하여 발색시켜 관찰하였고, 발색된 땅콩 씨앗은 파종하여 발아시켰다. BCMV-PSst 및 PeMoV는 종자 전염되는 바이러스로 알려져 있는데, 한국산 땅콩에 직접 DISA를 실시하여 실제로 땅콩이 종자감염이 되어 바이러스의 전파가 계속되는지를 확인하기 위하여 본 실험을 실시하였다. Fig. 1C의 위의 것은 대조구로 항혈청을 처리하지 않은 것이고, 가운데 것은 PeMoV의 항혈청으로 반응한 것으로 껍질을 깬 것과, 까지 않은 것 모두가 염색이 되었다. 가장 아래의 것은 400

배 희석한 BCMV-PSst 항혈청으로 반응시킨 것이다. 그 결과, 한국산 땅콩에는 50% 이상이 BCMV-PSst 및 PeMoV가 단독 혹은 복합적으로 감염되어 있음을 확인하였다. 이후, DISA를 실시한 땅콩은 발아시켜 유묘에서도 바이러스가 나타나는지를 확인하였다. Fig. 1D는 DISA에 의하여 BCMV-PSst에 감염이 확인된 땅콩 20개의 종자를 파종하여 발아된 유식물체는 2개 정도였다. 여기에서 수확된 땅콩을 DISA로 종자전염율을 조사한 결과, 약 40%의 종자전염이 확인되었다. 2년 차에 다시 파종하여 병징을 관찰한 결과, 얼룩무늬의 바이러스증상을 관찰하였고, 잎을 DN법 및 ISEM법에 의거 전자현미경으로 관찰한 결과, 길이가 약 780 nm의 사상입자가 BCMV-PSst의 항혈청에 decoration이 되었음을 관찰하였다.

생물학적 검정(biological assay) 및 바이러스 증식. 한국산 땅콩의 정확한 동정을 위하여 생물학적 검정을 실시하였다. 시료는 첫째, 바이러스 감염을 전자현미경으로 확인한 땅콩의 이병엽, 둘째는 DISA 테스트 후 BCMV-PSst 및 PeMoV에 단독 감염이 확인된 종자를 파종하여 발아된 유묘식물, 마지막으로 발아된 유묘식물에

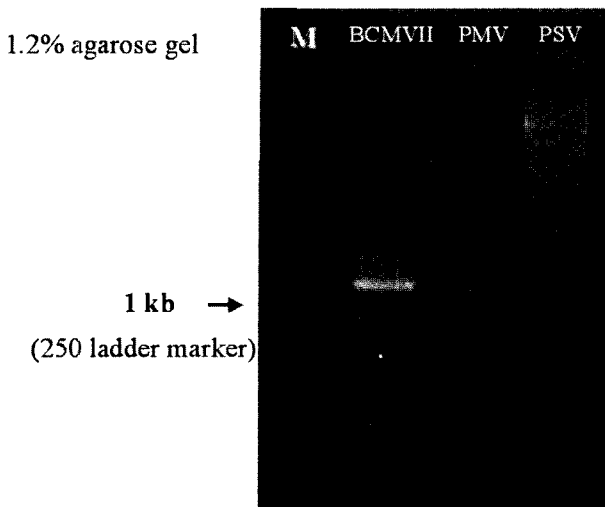


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplified DNA. Each amplified DNA was separated on 1.2% agarose gel and stained with ethidium bromide. Arrow indicates the position of 1 kb maker DNA. DMA band of about 1.2 kb in size was observed from BCMVII primer-amplified sample.

서 수거한 땅콩씨앗을 2년 차에 받아시켜 얻은 유식물체(Fig. 1D)를 이용하여 PBNV, BCMV-PSt, PeMoV, PSV 등에서 바이러스의 검정식물로 잘 알려진 *P. vulgaris*, *C. amanticolor*, *N. benthamiana*, *V. faba*, *C. sativus*, *P. sativus* 등에 즙액 접종하여 땅콩에 감염된 바이러스에 대한 생물검정을 실시하였다. 그 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 BCMV-PSt는 *C. amanticolor*에서는 접종 후에 chlorotic local lesion이 형성되었고, *V. sinensis*에서는 접종 후에 necrotic local lesion이 형성된 후에 전신 감염이 확인되었다. PeMoV는 *V. faba*의 접종 후에 necrotic local lesion이 형성된 후에 전신 감염이 확인되었다. 이들 국부병반을 오려서 전자현미경으로 관찰한 결과, 사상형의 바이러스 입자 및 봉입체를 관찰하였고, 이 시료를 각각 BCMV-PSt와 PeMoV의 항혈청으로 ISEM한 결과, 두 종의 항혈청에 각각 decoration되었다. 단독 감염 및 전신감염이 확인된 이병주를 수거하여 -70°C 에 동결 보관 및 바이러스 표본을 제작하였다.

바이러스의 RNA 정제 및 coat protein gene의 RT-PCR. 바이러스 감염이 확인된 이병 땅콩 잎 및 생물검정을 한 후, 단리된 시료를 마쇄하여, proteinase K 및 SDS/phenol/chloroform 추출법에 의거하여 바이러스 ss-RNA를 정제하여 에탄올 침전으로 RNA를 농축하여, RT-PCR을 위한 시료로 준비하였다. 정제된 RNA를 RT-PCR 및 염기서열을 분석을 하기 위하여 NCBI/DDBJ 등에 등록되어 있는 sequence를 토대로 하여 BCMV-PSt, PeMoV, PSV

의 각 바이러스의 외피 단백질유전자 부위에 대한 primer를 제작하였다(Table 1). 제작된 primer 및 oligo d(T)를 이용하여 coat protein gene을 RT-PCR하여 바이러스의 동정을 실시하였다. 그 결과, BCMV-PSt의 primer를 사용한 반응산물에서 약 1.2 kb 부근에서 증폭이 예상되는 밴드를 확인하였다(Fig. 6). 그러나, PeMoV, PSV의 primer를 사용한 시료는 비특이적 밴드나 증폭예상부위에서의 밴드는 관찰되지 않았다. 따라서, 이 결과로 생물검정실험과 DISA 실험과의 일치성을 확인할 수 있었다.

고 찰

과거부터 현재까지 연구되어온 전통적이고 실용적인 식물 바이러스의 방제법은 가장 중요한 것이 정확한 바이러스의 진단의 실시이다. 정확한 진단을 실시하여 바이러스 감염식물을 검정하여 이병식물을 초기에 제거하고, 바이러스 주요 매개원인 다년생 식물인 잡초류 및 구근, 숙근의 초화류의 제거, 진딧물등의 바이러스 매개동물의 구제, 바이러스 전염경로 차단 등의 물리적 방제법을 실시한다. 이 외에도 열처리와 화학적 처리를 하여 바이러스를 불활성화시키거나 조직배양을 통한 무독화 묘목을 선별하는 방법과 유전적 저항성과 유도적 저항성을 이용한 육종방법도 식물 바이러스 방제에 연구 및 이용되고 있다. 현재, 한국에서 재배되고 있는 대부분의 땅콩은 중국에서 수입하여 재배 및 판매되고 있다. 외래로부터의 종묘의 수입은 외래 바이러스 유전자의 수입도 동시에 이루어지고 있는 상황이므로 땅콩뿐만 아니라, 다른 수입 작물에서도 가장 중요한 것이 바이러스 무감염 종묘 및 모주를 선택하는 일이고, 다음으로 바이러스 무병독 식물의 진단법이다. 이들 모두 가장 중요한 것이 정확 신속함은 물론 저렴하고 간편한 바이러스 검정법이 절실하다는 사실이다. 이를 충족시키기 위해서는 각종 농작물에 정확한 바이러스 병의 발생사상과 이들 바이러스의 특성의 규명과 항혈청의 제작이다.

이 실험에서 얻어진 땅콩에 발생하는 바이러스 병의 발생사상과 이들 바이러스의 특성의 결과는 땅콩의 바이러스 병의 방제는 물론 이들 바이러스의 감염성 기주인 다른 농작물의 바이러스병 방제에도 매우 중요한 기초적인 자료가 될 것으로 기대된다. 땅콩은 종자감염에 의해 몇몇 바이러스가 전파됨으로 한번 바이러스에 감염된 땅콩은 생산성에 있어 상당한 영향을 끼친다. 특히 종자감염에 의해 쉽게 전파되는 BCMV-PSt, PeMoV, PGMV, PCV, PSV 등의 바이러스는 전세계적으로 발생이 보고되어 있고, 동남 아시아의 콩과 작물에 많이 발생하여 피해가 큰

바이러스로 알려져 있다. 특히, 사상형의 바이러스 중 BCMV-PSt 및 PeMoV의 경우는 이 연구 결과에서도 나타났듯이 종자전염이 되는 바이러스이다. 즉, 한번 모주가 BCMV-PSt 및 PeMoV에 감염이 되면 지하경에 있는 땅콩에도 모두 이 바이러스가 감염되어 영속적으로 감염이 된다는 사실이다. 따라서, BCMV-PSt 및 PeMoV의 간편하고 대량적으로 신속·정확하게 바이러스를 검정하는 방법은 Lin 등(1990)이 개발한 항체반응의 일종인 direct tissue blotting immunological assay 방법의 응용법인 DISA 방법이 적당한 진단법이라는 사실이 이번 연구한 결과에서 확인되었다. 그러나, 땅콩의 경우, 종자가 크기 때문에 DISA를 실시할 때 고추와 같은 시료에 비하여 상대적으로 항혈청이 많이 소모되는 단점도 있다. 이 연구에서는 생물검정법, 전자현미경법, RT-PCR 등을 이용하여 복합 감염되어 있는 땅콩 바이러스들의 동정을 시도하였다. 그 결과, 전자현미경 관찰을 통하여 사상형 바이러스 입자를 관찰하였고, 이들 바이러스를 땅콩 시료를 DISA를 실시한 결과, BCMV-PSt와 PeMoV에 발색이 나타났으며, 종자 감염을 확인하기 위하여 테스트한 시료를 받아시켰다. 그러나, PeMoV처리한 땅콩은 발아가 되지 않았고, BCMV-PSt로 발색된 시료의 2개만이 발아되었다. 또한, 바이러스 감염 이병엽과 DISA 테스트 시료를 생물검정한 결과, BCMV-PSt의 바이러스가 단리되었다. 이로써, 한국에서 재배되고 있는 땅콩에 BCMV-PSt가 감염되어 종자전염이 되는 것을 할 수 있었다.

요 약

한국산 땅콩에 감염되어 있는 바이러스를 동정하기 위하여 땅콩 재배지에서 모자이크, 괴저를 동반한 얼룩무늬, 황화, 줄무늬, 엽맥녹대, 위축 등의 바이러스 감염 증상을 나타내는 땅콩잎 및 땅콩을 채집하였다. 이들 시료로부터 기주범위, 면역전자현미경(ISEM), 감염 세포내의 바이러스의 존재양식, direct immuno staining assay(DISA), RT-PCR 등에 의하여 *Bean common mosaic virus*(BCMV-PSt)와 *Peanut mottle virus*(PeMoV)를 분리하였다. 이들 시료를 DN법에 의거하여 전자현미경으로 관찰한 바 길이가 약 780 nm의 사상형 입자와 세포질 봉입체를 관찰하였다. 초박절편의 시료 관찰에서도 길이 약 700 nm의 사상 입자가 엽육세포 등의 세포질과 액포에 산재 혹은 병행 배열로 존재해 있는 영상 및 세포질 봉입체가 반드시 확인되었다. 또한, 이들 시료를 BCMV-PSt와 PeMoV의 항혈청으로 ISEM을 실시한 결과, 두 항체에 모두 decoration 되었음을 확인하였다. 두 바이러스가 종자전염이 되는 지

를 확인하기 위하여 땅콩을 직접 BCMV-PSt와 PeMoV의 항혈청으로 DISA를 실시하였다. 그 결과, BCMV-PSt 및 PeMoV 항혈청에 발색이 되었으며, 이들을 받아시켜 유식물체를 획득하였다. 이들 유식물체에서도 바이러스 감염 증상인 얼룩무늬 증상이 관찰되었고, 이들을 BCMV-PSt와 PeMoV의 항혈청으로 ISEM방법으로 검정한 결과, 두 항체에 모두 decoration 되었다. 또한, 자연감염 식물체 및 DISA에 의해 바이러스 감염이 확인된 종자를 받아시킨 2년생 식물체로부터 생물검정법 및 ISEM에 의해 두 종의 바이러스가 검출되었다. RT-PCR을 실시한 결과, 약 1.2 Kb 크기의 BCMV-PSt coat protein 유전자가 증폭되었다. 이 연구결과, 한국산 땅콩에 BCMV-PSt가 가장 많이 감염되어 있음을 확인하였다.

감사의 말씀

이 연구는 영남대학교 교비연구비로 수행되었습니다.

참고문헌

- Anjos, J. T. N. Dos, Kitajima, E. W., Charchar, M. J. A. and Marinho, V. L. A. 1998. Natural infection of *Arachis pintoi* by peanut mottle virus in central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 23(1): 71-74.
- Bock, K. R. and Kuhn, C. W. 1975. Peanut mottle virus. No. 141. In: *Descriptions of Plant Viruses*. CMI/AAB. England.
- Chang, C. A., Purcifull, D. E. and Zettler, F. W. 1990. Comparison of two strains of peanut stripe virus in Taiwan. *Plant Dis.* 74: 593-596.
- Demski, J. W., Reddy, D. V., Sowell, G. and Bays, D. 1984. Peanut stripe virus-a new seed-borne potyvirus from China infecting groundnut(*Arachis hypogaea*). *Ann. Appl. Biol.* 105: 495-501.
- Doi, Y., Toriyama, S., Yora, K. and Auyama, H. 1969. Direct negative staining methods for detection for virus particles in fresh preparations from infected plant tissue. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 35: 180-187.
- Higgins, C. M., Cassidy, B. G., Teycheney, P. Y., Wongkaew, S. and Dietzgen, R. G. 1998. Sequence of the coat protein gene of five peanut stripe virus(PSTV) strains from Thailand and their evolutionary relationship with other bean common mosaic virus sequences. *Archives of Virology* 143(9): 1655-1667.
- Hoffmann, K., Geske, S. M. and Moyer, J. W. 1998. Pathogenesis of tomato spotted wilt virus in peanut plants dually infected with peanut mottle virus. *Plant Dis.* 82: 610-614.
- 김정수, 이순형, 이민웅. 1988. 땅콩에 모자이크 및 위축병징을 일으키는 peanut stunt virus. *한국식물병리학회지* 4: 88-94.
- Konate, G. and Barro, N. 1993. Dissemination and detection of

- peanut clump virus in groundnut seed. *Ann. Appl. Biol.* 123: 623-627.
- Kuhn, C. W. 1965. Symptomatology, host range, and effect on yield of a seed-transmitted peanut virus. *Phytopathology* 55: 880-884.
- Lin, N. S., Hsu, Y. H. and Hsu, H. T. 1990. Immunological detection of plant virus and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80: 824-828.
- Mastumoto, J. I., Ohki, S. T. and Inouye, T. 1991. Incidence of peanut stripe virus in seeds and field plants of peanut in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 57: 587-590.
- Milne, R. G. and Loisoni, N. 1977. Rapid immune electron microscopy. In: *Method in Virology*, pp. 265-281, Academic Press, New York.
- Pappu, S. S., Pappu, H. R., Chang, C. A., Culbeath, A. K. and Todd, J. W. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. *Plant Dis.* 82: 1121-1125.
- Prasada Rao, R. D. V. J., Chakrabarty, S. K. and Reddy, A. S. 1997. Interception of peanut stripe virus in soybean seeds imported from China. *Indian J. of Plant Protection* 25(1): 81.
- Recheigl, N. A., Tolin, S. A., Grayson, R. L. and Hooper, G. R. 1989. Ultrastructural comparison of peanut infected with stripe and blotch variants of peanut stripe virus. *Phytopathology* 79: 156-161.
- Reddy, D. V. R. 1991. Groundnut viruses and virus diseases: distribution, identification and control. *Review of Plant Pathology* 70: 665-678.
- Reddy, D. V. R. 1998. Control measures for the economically important peanut viruses. In: *Plant Virus Disease Control*. by A. Hadidi, R. K. Khetarpal, and H. Koganezawa, eds. pp. 541-546, APS Press.
- Reddy, A. S., Hobbs, H. A., Delfose, P., Murthy, A. K. and Reddy, D. V. R. 1998. Seed transmission of Idian peanut clump virus (IPCV) in peanut and millets. *Plant Dis.* 82: 343-346.
- Ryabov, E. V., Oparka, K. J., Cruz, S. S., Robinson, D. J. and Taliasky, M. E. 1998. Intracellular location of two groundnut rosette umbravirus protein delivered by PVX and TMV vectors. *Virology* 242(2): 303-313.
- Sutic, D. D., Ford, R. E. and Tomic, M. T. 1998. Virus diseases of peanut (*Arachis hypogaea*). In: *Plant Virus Diseases*. by Sutic, D. D., Ford, R. E. and Tomic, M. T. pp.229-240. CRC Press. London.
- Wongkaew, S. and Dollet, M. 1990. Comparison of peanut stripe virus isolates using symptomatology on particular hosts and serology. *Oleagineux* 45: 267-278.
- Xu, Z., Banett, O. W. and Gilson, P. B. 1986. Characterization of peanut stunt virus strains by host reactions, serology, and RNA patterns. *Phytopathology* 76: 390-395.
- Zeyong, X., Higgins, C. M., Kunrong, C., Dietzgen, R. G., Zhongyi, Z., Liying, Y. and Xiaoping, F. 1998. Evidence for a third taxonomic subgroup of peanut stunt virus from China. *Plant Dis.* 82: 992-998.