

감자 '추백'에 발생한 *Tobacco mosaic virus*의 특성

김정수* · 김재현 · 최국선 · 채수영 · 김현란 · 정봉남 · 최용문
농촌진흥청 원예연구소 원예환경과

Characterization of *Tobacco mosaic virus* Isolated from *Solanum tuberosum* 'Chubak' in Korea

Joung-Soo Kim*, Jae-Hyun Kim, Gug-Seoun Choi, Soo-Young Chae, Hyun-Ran Kim,
Bong-Nam Joung and Yong-Mun Choi

Dept. of Horticultural Environment, National Horticultural Research Institute,
Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

(Received on April 11, 2003)

An isolate of *Tobacco mosaic virus* (TMV) was isolated from potato cultivar 'Chubak' showing vein clearing and mild mosaic at Namhae in Korea. This isolate, TMV-St, was differentiated from other tobamoviruses based on biological properties, serological relationships and nucleotide sequence analyses of coat protein genes. TMV-St caused typical symptoms on four indicator plants as compared to the tobamovirus of TMV-U1, *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), and *Tomato mosaic virus* (ToMV), which caused economic losses in Solanaceous vegetables, tomato, pepper, and eggplant. Remarkably, the TMV-St induced distinctly different symptom of systemic chlorotic spots on *Chenopodium murale*. On *C. murale*, *Gomphorena globosa*, and *Nicotiana rustica*, the four viruses were classed by the virulence of systemic or local infections. In serological test TMV-St antiserum showed a precipitation line with each other tobamovirus. The CP gene of TMV-St contain 477 nucleotides, and the nucleotides sequence was the most similar to that of TMV-U1.

Keywords : *Solanum tuberosum* 'Chubak', *Tobacco mosaic virus*

Tobacco mosaic virus(TMV)는 세계적으로 많은 작물을 대상으로 널리 분포하고 있지만 감자에서는 흔히 발생되는 바이러스가 아니며 경제적으로도 커다란 피해를 주지 않고 있다(Blodgett, 1927; Juretic 등, 1977; Salazar 1996). 그러나 TMV는 가지과 작물에 매우 중요한 바이러스이며, 감자에 인위적 접촉을 통해서 병징을 유도시킬 수 있으며, Blodgett(1927)은 TMV가 각기 다른 재배종 마다 서로 다른 병징을 나타내며, 또한 TMV의 종서전염이 다음 세대에 극도의 위축이나 낙엽을 일으킬 수 있다고 하였다. 감자에 TMV 감염은 중국, 인도, 헝가리(Horvath, 1977; Juretic 등, 1977), 안데스(Phatak과 Verma, 1967) 그리고 사우디아라비아(Al-Shahwan 등, 1997) 등에서 보고되었으

며, 이들은 bright mosaic, interveinal yellowing, rigid leaves, mild mottle 그리고 severe stunt 등의 병징을 나타낸다. TMV는 우리나라에서도 토마토, 고추 그리고 가지 등을 포함하는 가지과 작물에서 매우 중요한 바이러스이며, 최근 감자에서 tobamovirus에 의한 위축증상이 보고된 바 있다(Jung 등, 2002).

본 연구에서는 남해지역에서 원원종 망실재배지의 감자 '추백' 품종에 대한 생육조사하는 과정에서 엽맥투명 및 매우 약한 모자이크 증상을 나타내는 바이러스를 분리하여 지표식물 반응 및 분자생물적 특성을 다른 종의 tobamovirus와 비교한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

바이러스 분리. 2002년 남해지역 감자 원원종 생산포장에서 '추백' 품종에 대한 생육조사과정에서 엽맥투명

*Corresponding author
Phone)+82-31-290-6220, Fax)+82-31-295-9548
E-mail)Kimjsoo@rda.go.kr

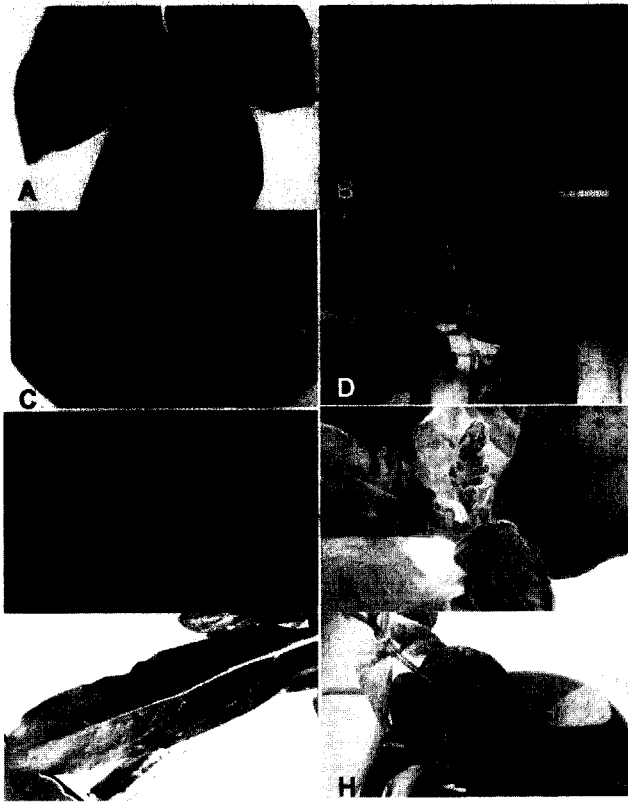


Fig. 1. Symptoms of vein clearing (arrow) on the leaf of potato 'Chu-bak' infected naturally with TMV-St (A) and electron micrograph of the purified particles showing rigid rod having 300 nm length (B). The bar represents 100 nm. The virus, TMV-St, induced necrotic locals on the inoculated leaved of *Chenopodium amaranticolor* (C) and *Nicotiana rustica* (D). The virus infected systemically on *C. murale* (E), *Nicotiana tabacum* 'Samsun' (F) and *Gomphrena globosa* (G). The virus induced large necrotic spots on the inoculated leaves and yellowing on the upper leaves of potato 'Superior' by mechanical inoculation (H).

및 매우 약한 모자이크 증상을 나타내는 감자잎들을 채집하여 실험재료로 사용하였다(Fig. 1-A). 감자로부터 바이러스의 순수 분리는 이병엽 즙액을 *Chenopodium amaranticolor*에 접종하여 단일 국부병반을 3회에 걸쳐 순수 분리하였다. 최종 단일국부병반을 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun에 접종하여 증식시켰으며, 접종 7~10일 후 전신감염된 잎을 실험재료로 사용하였다. 이 과정에서 전자현미경 및 혈청반응 등의 예비실험을 통하여 이 순수바이러스 분리주를 Tobamovirus-St라 명명하였고, TMV-U1 (Tobacco mosaic virus strain U1), PMMoV (Pepper mild mottle virus) 및 ToMV (Tomato mosaic virus)는 서울여대 류기현 교수(<http://www.virusbank.org>, Plant Virus Genbank)로부터 분양 받아 대조 Tobamovirus로써 실험에 사용하였다.

전자현미경 검정. 이병된 감자에서 바이러스 입자를

확인하기 위하여 이병엽의 조직을 dip 방법을 이용하여 2% phosphotungstic acid (PTA, pH 6.0)로 염색한 다음, 투과전자현미경(Carl Zeiss, LEO 906)으로 관찰하였다.

지표식물 검정. Tobamovirus-St가 증식된 *N. tabacum* cv. Samsun의 잎을 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)에 마쇄(w/v = 1:10)한 후 이 즙액을 carborundum(600 mesh)을 사용하여 *C. amaranticolor*를 포함한 5종의 지표식물에 즙액접종을 실시하였다. TMV-U1, PMMoV 그리고 ToMV를 대조 바이러스로 사용하여 병징발현을 비교하였다.

바이러스의 정제. Tobamovirus-St, TMV-U1, PMMoV 및 ToMV는 Gooding과 Herbert(1967)의 방법을 수정하여 정제하였다. 이들 각각의 바이러스를 *N. tabacum* cv. Samsun에 증식시킨 잎으로부터 바이러스를 정제하였다. 부분 정제 바이러스는 10~40% 설탕밀도구배 위에 치상하여 25,000 rpm에서 2시간동안 초원심분리 하였다. 유백색의 바이러스 층을 주사기로 수거하여 35,000 rpm에서 1시간 30분간 초원심분리로 바이러스를 정제하였다.

항혈청 제조 및 혈청학적 유연관계. 정제한 Tobamovirus-St(1 mg/ml)와 freund's complete adjuvant를 1:1(v:v)로 혼합하였다. 이 혼합액을 토끼에 1주 간격으로 3회 근육에 각각 2 ml(1 mg/ml)를 주사하였고, 이어서 채혈 1주일 전에 바이러스액(1 mg/ml)을 1회 정맥에 주사한 후 전량을 채혈하였다. 항혈청 분리는 상온에서 4시간 정치 후 10,000 g로 5분간 원심 후 상등액을 얻었다. 이 항혈청은 동결건조하여 -20°C 에서 보존하면서 사용하였다.

0.7% 한천겔, 0.01 M 인산완충액(pH 7.0), 0.85% NaCl 및 NaN_3 조성의 겔을 제작하여 한천겔이중확산법(Ouchterlony, 1962)에 따라 사용하였다. Tobamovirus 항혈청의 유연관계 실험은 위와 같은 방법으로 제조된 Tobamovirus-St 항혈청을 사용하였다.

외피단백질 전기영동. 바이러스의 외피단백질분자량은 Laemmli의 방법(1973)에 따라 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)으로 수행하였다. 전기영동을 위한 gel은 5% polyacrylamide(75 mM Tris-HCl, pH 6.7, 0.1% SDS)의 stacking gel과 12% polyacrylamide(0.25 M Tris-HCl, pH 8.9, 0.1% SDS)의 separation gel로 제작하였다. 전기영동은 20 mM Tris base, 0.2 M glycine 및 0.1% SDS의 완충액에서 20 mA에서 5시간 실시하였다. 분자량 표준 단백질은 rainbow marker(Amersham)를 이용하여 외피단백질의 분자량을 측정하였다.

바이러스 RNA의 추출. 바이러스 RNA의 추출은 정제된 바이러스에 0.5% SDS 및 proteinase K(1 mg/ml)를 첨가하여 37°C 에서 20분간 반응시킨 후, phenol/chloroform을 처리하여 바이러스 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA

를 1.75% agarose gel에서 50 V로 70분간 전기영동하여 Tobamovirus들의 RNA 크기를 비교하였다.

Primer 제작 및 RT-PCR. 자연 발생된 감자의 이병엽 또는 Tobamovirus-St가 감염된 이병지표식물로부터 바이러스를 검출하기 위하여 RT-PCR를 수행하였다. 이때 사용된 primer는 기존에 보고된 TMV의 염기서열(Palukaitis 등, 1981)을 참조하여 제작하였다. TMV의 외피단백질 영역 Upstream primer는 5'-GTTTTAAAT-ATGCTTACAG-3', Downstream Primer는 5'-TGAGGTAGTCAAGATGCAT-A-3'로 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. RT-PCR의 조건은 42°C에서 60분간 역전사 반응을 실시한 다음, 이 반응액을 94°C에서 2분간 가열한 후, 1 cycle을 94°C 30초/54°C 30초/72°C 1분으로 하여 총 35 cycle의 PCR을 실시하였으며, 마지막에 72°C에서 10분간 반응시켰다. 이렇게 증폭된 PCR 산물은 0.5×TBE 완충액을 이용한 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 바이러스 유전자의 증폭여부 확인하였다.

클로닝 및 염기서열분석. 감자에서 확인된 Tobamovirus-St의 RT-PCR 산물을 이용하여 클로닝 및 염기서열 분석을 실시하였다. 증폭된 cDNA를 pGEM-T easy vector (Promega)에 삽입하여 *Escherichia coli* JM 109에 형질전환 하였다. 형질전환된 클론들로부터 Tobamovirus-St cDNA의 삽입유무는 alkaline lysis 방법(Sambrook 등, 1989)을 이용해 플라스미드를 추출한 후, 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 확인하였다. 정제된 플라스미드는 ABI PrismTM BigDye Terminator Cyclic Sequencing Reaction Kit와 ABI prismTM 377 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)를 이용하여 cyclic sequencing을 실시하였으며, DNASTAR (Madison, WI) 프로그램을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

지표식물검정. 우리나라 남해지역 감자 원원종 생산포장에서 '추백'품종에 대한 생육조사 과정에서 엽맥투명 및 매우 약한 모자이크 증상을 나타내는 감자 잎들을 채집하여 전자현미경으로 관찰한 결과 폭 18 nm, 길이 300 nm의 전형적인 Tobamovirus 입자(Fig. 1-B)가 확인되었다. 순수 분리한 Tobamovirus-St는 *Chenopodium amaranticolor* (Fig. 1-C)과 *N. rustica*(Fig. 1-D)에서는 점종잎에 괴저 국부병반이 나타났으며, *C. murale*에서는 점종엽과 상업 모두에서 퇴색반점(Fig. 1-E), *N. tabacum* cv. Samsun에서는 점종엽에 괴사반점, 상업에서는 모자이크증상을 일으켰으며(Fig. 1-F), *Gomphrena globosa*에서는 점종엽과 상업 모두에서 괴저반점을 일으켰다(Fig. 1-G). 감자 '수미' 품종

에서는 점종잎에 큰 괴저반점이 나타났으며 상업에 황화 증상이 나타났다(Fig. 1-C). Tobamovirus-St와 TMV-U1, PMMoV 및 ToMV를 30종의 지표식물에 인공접종하여 나타난 병징을 비교한 결과 *C. murale*, *G. globosa*, *N. rustica* 및 *N. tabacum* cv. Samsun은 가지과 작물에 중요한 tobamovirus들을 효과적으로 구분할 수 있는 지표식물로 선발되었다(Table 1). 그러나 Jung 등(2002)이 대관령 지역에서 분리한 4개의 tobamovirus 분리주와 병원성을 비교할 때 본 실험에서 선발된 지표식물에서의 병징과 일치하는 분리주는 없었다.

혈청학적 특성. 감자에서 분리한 Tobamovirus-St의 혈청학적 유연관계를 구명하기 위하여 항혈청을 생산한 후, TMV-U1, PMMoV 및 ToMV의 항원을 대조로 하여 한천 겔이중확산법을 실시하였다. 그 결과, Tobamovirus-St 항혈청에 대한 TMV-St, TMV-U1, PMMoV 및 ToMV의 항

Table 1. Biological reactions induced by TMV-St, TMV-U1, PMMoV and ToMV on indicator plants

Indicator plants	Host reactions of virus strains			
	TMV-St	TMV-U1	PMMoV	ToMV
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	NL ^a	NL/-	NL/-	NL/-
<i>C. murale</i>	CS/CS	NL/-	NL/-	NS/NS
<i>Gomphrena globosa</i>	NS/NS	NS/NS	NL/-	NS/M
<i>Nicotiana rustica</i>	NL/-	NS/NS,D	NL/-	NL/-
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun nn	NS/M	NS/M	NS/MM	NS/M

^aInoculation leaf/upper leaves induced by tobamovirus strains. -, no infection; NL, necrotic local lesions; NS, necrotic spots; CS, chlorotic spot; M, mosaic; MM, mild mosaic; D, Death, Cur, leaf curling; Dist, leaf distortion; VN, vein necrosis; NRL, necrotic ring local lesions; SL, symptomless.

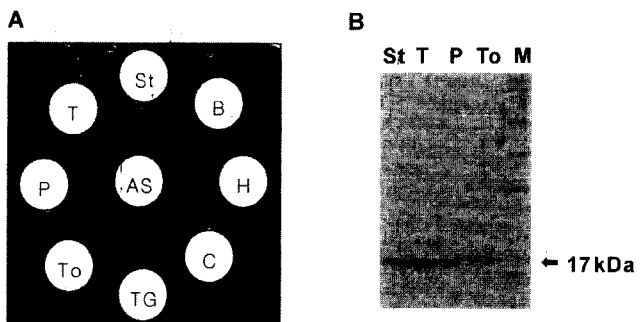


Fig. 2. A: Serological relationships of the TMV-St antiserum (AS) with antigens of TMV-St (St), TMV-U1 (T), PMMoV (P), ToMV (To), TMGMV (TG), CMV (C) and the crude sap of healthy *N. occidentalis* (H). B: Molecular weight of the coat protein of TMV-St (St), TMV-U1 (T), PMMoV (P) and ToMV (To) on SDS-PAGE electrophoresis at 30 mA for 4 hr. Lane M: Marker (Amersham, Rainbow).

원들이 모두 뚜렷한 침강선을 형성하였다. Tobamovirus-St는 TMV-U1과 PMMoV는 단일 침강선을 형성하였으나, ToMV와는 spur를 형성하여 유연관계가 다른 특성을 보였다(Fig. 2-A). 이는 Wetter 등(1987)이 보고한 바와 일치하는 결과로 Tobamovirus 계통간의 존재하는 공통항원기(common epitope)에 의한 것으로 보인다.

바이러스 RNA 및 단백질 전기영동. 정제한 Tobamovirus-St, TMV-U1, PMMoV 및 ToMV로부터 추출된 RNA를 전기영동한 결과(Fig. 3-A), 이들 바이러스의 RNA 크기는 약 6.4 kb로 Meshi 등(1982)과 Palukaitis 등(1981)이 보고한 것과 일치하였다.

정제된 이들 바이러스의 외피단백질 단백질은 모두 1개의 단일 band가 확인되었고, 외피단백질의 분자량은 약 17KD이었다(Fig. 2-B).

RT-PCR 및 염기서열 분석. Tobamovirus-St, TMV-U1, PMMoV 및 ToMV에 감염된 식물체로부터 RNA를 추출한 다음 TMV의 외피단백질 영역을 증폭할 수 있는 특이적인 primer로 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 약 500 bp

로 예상되는 PCR 산물을 확인할 수 있었고, 이는 대조구인 TMV-U1과 같은 band가 증폭됨을 알 수 있었다(Fig. 3-B). 증폭된 cDNA를 이용하여 염기서열을 결정된 결과 primer를 제작할 때 예상되었던 총 497개의 염기를 읽을 수 있었다. 외피단백질 유전자는 477 뉴클레오타이드로 구성되어있으며, 이 염기서열로부터 158잔기의 아미노산 서열이 분석되었다.

Genbank database를 활용하여 Tobamovirus-St와 타종의 tobamovirus간의 외피단백질 영역의 상동성을 비교한 결과, TMV-U1(AX040187)와 염기에서는 99.5%로 가장 높은 상동성을 나타냈고 번역된 아미노산에서는 100% 동일 하여 Jung 등(2002)의 보고와 유사하였으나 이들 2종의 바이러스는 *C. murale*와 *N. rustica*에서 반응차이가 있는 것은 또한 병징 발현에 관련되는 replicase gene과 movement gene(Chen 등, 1996; Ishikawa 등, 1991; Shintaku 등, 1996)에서 차이가 있는 것으로 생각된다.

따라서 감자 추백에서 분리한 Tobamovirus-St는 지표식물 반응, 혈청학적 유연관계 및 외피단백질의 상동성을 비교 결과 Tobamovirus 속인 TMV로 확인되었고, 지표식물의 병원성의 차이로 이 바이러스를 TMV-St 계통으로 제안하고자 하며, 앞으로 유전자 재조합이나 전장 RNA 염기서열 등을 결정하여 병징발현에 관여하는 것에 대하여 연구가 이루어져야 한다고 생각되어진다.

요 약

남해지역의 원원종 종서 생산 포장에서 '추백'품종에 나타난 엽맥투명 및 매우 약한 모자이크 증상을 나타내는 감자 앞에서 담배 모자이크 바이러스(TMV)를 분리하였다. 이 바이러스(TMV-St)는 생물학적, 혈청학적 유연관계 및 외피단백질의 염기서열 등을 통해 기존에 보고된 다른 tobamovirus와 비교하였다. TMV-St는 5개의 지표식물 반응에서 토마토, 고추, 가지 등과 같은 가지과 작물에 경제적 피해를 주고있는 TMV-U1, *Pepper mild mottle virus*(PMMoV) 및 *Tomato mosaic virus*(ToMV)와는 다른 기주 반응을 보였다. 특히 즙액접종에 의한 기주의 반응은 *C. murale* 접종엽과 상업 모두에서 퇴록반점을 보였으며, *C. murale*, *G. globosa*, *N. rustica* 그리고 *N. tabacum* cv. Samsun nn 등 4가지 지표식물로 이들 바이러스계통을 구분할 수 있었다. 혈청학적 검정에서 TMV-St는 TMV-U1, PMMoV 그리고 ToMV와의 반응에서 모두 뚜렷한 침강선을 형성하였다. TMV-St의 외피단백질은 477개의 염기서열로 되어있으며, 이는 TMV-U1의 염기서열과 매우 유사하였다.

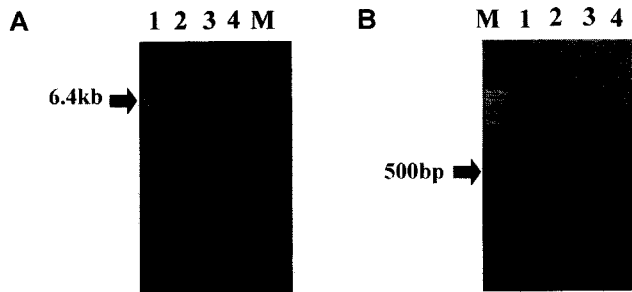


Fig. 3. Electrophoretic pattern of tobamovirus genomic RNAs (A) and RT-PCR assay with specific primer TMV-U1 (B). Lane M: RNA ladder in A and DNA ladder in B, 1: TMV-St, 2: TMV-U1, 3: PMMoV and 4: ToMV.

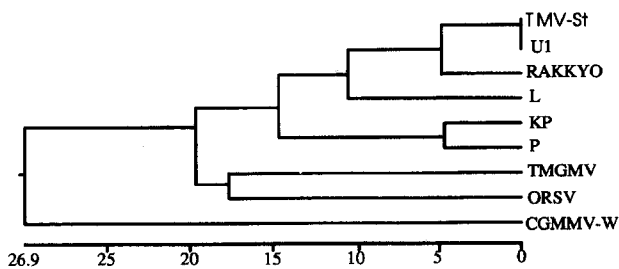


Fig. 4. Phylogenetic tree constructed from predicted amino acid sequence alignment of CP genes of TMV-St isolate and other tobamovirus isolates TMV strains. The sources of sequence data were from the following Genbank database accession number: U1 (AX040187), RAKKYO (D63809), L (X02144), KP (L35073), P (D13367), TMGMV (AF132908) and CGMMV-W (V01151).

참고문헌

- Al-Shahwan, I. M., Abdalla, O. A. and Al-Saleh, M. A. 1997. Viruses in the northern potato-producing regions of Saudi Arabia. *Plant Pathol.* 46: 91-94.
- Blodgett, E. M. 1927. Tobacco mosaic on potatoes. *Phytopathology* 17: 727-734.
- Chen, J., Watanabe, Y., Sako, N., Ohshima, K. and Okada, Y. 1996. Mapping of host range restriction of the Rakkyo strain of Tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum* cv. Bright yellow. *Virology* 226: 198-204.
- de Bokx, J. A. 1972. Viruses and seed-potato production. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Netherlands.
- Gooding, G. V. and Hervert, T. T. 1967. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathology* 57: 1285.
- Hinf, M. E. and Dawson, W. O. 1993. The tobamovirus capsid protein functions as a host-specific determinant of long-distance movement. *Virology* 193: 106-114.
- Horvath, J. 1977. Natural occurrence of a strain of Tomato mosaic virus on potato as in Hungary. *Potato Res.* 20: 347.
- Ishikawa, M., Kroner, P., Ahlquist, P. and Meshi, T. 1991. Biological activities of hybrid RNAs generated by 3'-end exchanges between tobacco mosaic virus and brome mosaic viruses. *J. Virol.* 65: 3451-3459.
- Ishikawa, M., Meshi, T., Watanabe, Y. and Okada, Y. 1988. Replication of chimeric tobacco mosaic viruses which carry heterologous combinations of replicase genes and 3' noncoding regions. *Virology* 164: 290-293.
- Jung, H. W., Yun, W. S., Ham, Y. I. and Kim, K. H. 2002. Characterization of Tobacco mosaic virus isolated from potato showing yellow leaf mosaic and stunting symptoms in Korea. *Plant Dis.* 86(2): 112-117.
- Juretic, N., Horvath, W., Besada, W. H., Horvath, A. and Lonhard, M. 1977. Serological relationships of Tomato mosaic virus isolated from potato to members of tobamovirus. *J. Indian Potato Assoc.* 4: 46-65.
- Laemmli, U. K. and Favre, M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging event. *J. Mol. Biol.* 80: 575-599.
- Lee, J. W., Kim, H. J. and Lee, E. S. 1999. The Potato in Korea. National Alpine Agriculture Experiment Station, Pyungchang, Kangwon, Korea.
- Ouchterlony, O. 1968. Handbook of immunodiffusion immunoelectrophoresis. Prog. Allergy. Ann. Arbor Sci. Publ. 135 p.
- Phatak, H. C. and Verma, V. S. 1967. A strain of tobacco mosaic from potato. *Phytopathol.* 59: 141-146.
- Salazar, L. F. 1996. Potato Viruses and Their Control. International Potato Center (CIP), Lima, Peru.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Eds. New York, Cold Spring Harbor.
- Takeshi, O., Midori, A., Yuji, Y., Hiraku, S., Shuntaro, L., Tetsuo, M. and Yoshimi, O. 1984. Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (Tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. *J. Biochem.* 96: 1915-1923.
- Wetter, C. 1984. Serological identification of four tobamoviruses infecting pepper. *Plant Dis.* 68: 597-599.