

동부(*Vigna sinensis*)의 국부병반을 이용한 *Cucumber mosaic virus*와 *Broad bean wilt virus 2*의 구별

배선화 · 김미순 · 정민영 · 권순배¹ · 류기현² · 김국형³ · 최장경*
강원대학교 응용생물학과, ¹강원도농업기술원, ²서울여자대학교 환경생명과학부
³서울대학교 농생명공학부

Discrimination of *Cucumber mosaic virus* and *Broad bean wilt virus 2* Using Local Lesions on *Vigna sinensis*

Sun Hwa Bae, Mi Soon Kim, Min Young Jung, Soon Bae Kwon¹, Ki Hyun Ryu²,
Kook Hyung Kim³ and Jang Kyung Choi*

Department of Applied Biology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

¹Gangwondo Agricultural Research and Extension Services, Chunchon 200-110, Korea

²Division of Environment & Life Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

³School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

(Received on June 14, 2006)

Cucumber mosaic virus (CMV) and *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2) were isolated from *Gentiana scabra* plants showing typical mosaic and yellowing symptoms. When the inoculum of mosaic symptom propagated in *Nicotiana benthamiana* was inoculated to primary leaves of *Vigna sinensis*, the local lesions of different types was developed. Type one produced a small necrotic spot (SNS) of pinpoint type, while the other one showed a large necrotic spot (LNS) of halo type. LNS on primary leaves of *V. sinensis* was also induced by inoculum from yellowing symptom on *G. scabra*. Single lesion from SNS induced a typical mosaic symptom on *N. Benthamiana*. On the other hand, LNS produced a chlorotic ring symptom on inoculated leaves and mosaic plus necrotic ringspot on upper leaves of *N. benthamiana*. An isolate of CMV from SNS and BBWV2 from LNS were detected by using dsRNA analysis, RT-PCR and agar gel double-diffusion test. Thus, our results should provide a tool of a simple method for discrimination from mixed infected plants by CMV and BBWV2.

Keywords : *Cucumber mosaic virus*, *Broad bean wilt virus 2*, Local lesions, *Vigna sinensis*

*Bromoviridae*의 *Cucumovirus*에 속하는 *Cucumber mosaic virus* (CMV)는 직경 30 nm의 크기를 가지고 있으며, 같은과의 *Fabavirus*에 속하는 *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2)는 직경 25 nm의 크기를 갖는 구형 바이러스이다. 이들 두 바이러스는 모두 진딧물에 의해서 비영속적으로 전염되고, 기주범위가 매우 넓기 때문에, 서로 같은 기주에서 유사한 병징을 나타냄으로서 생물학적 특성만으로는 쉽게 구별되지 않는 경우가 많이 있다. 이러한 현

상은 특히 가지과, 십자화과, 콩과 등의 식물에서 흔히 볼 수 있다(Taylor와 Stubbs, 1972; Francki 등, 1979). 2005년 봄 강원도 춘천시 소재 강원대학교 농장의 포장에서 용담(*Gentiana scabra* var. *buergeri*)의 잎에 선명한 모자이크 증상과 황화 증상을 나타내는 2종의 바이러스병징 이 병엽을 채집하여 검정한 결과, CMV와 BBWV2가 분리되었다. 이 논문에서는 용담에서 분리한 이들 바이러스가 자연 발병된 이병주의 증상과 분리되는 바이러스의 종류에 따라 특이성이 있고, 또한 두 바이러스는 국부병반 기주인 동부(*Vigna sinensis*)에 접종하였을 때 쉽게 구분할 수 있는 특성이 발견되어 그 결과를 보고한다.

*Corresponding author

Phone) +82-33-250-6432, Fax) +82-33-241-1721

E-mail) jkchoi@kangwon.ac.kr

재료 및 방법

공시 바이러스 및 기주. 실험에 이용한 바이러스원은 병징을 달리하는 2 종류의 용담에서 분리한 CMV 및 BBWV2를 공시바이러스로 이용하였으며, 대조 바이러스로서는 CMV-Mf(Choi 등, 1998), BBWV2-K(Lee 등, 2000)를 공시하였다. 이들 바이러스는 모두 *N. benthamiana*에 접종하고 7일 후 전신감염된 잎을 접종원으로 사용하였다. 한편 바이러스를 구분하기 위한 국부병반 기주는 동부(*V. sinensis*, 품종; Kurotane-sanzaku)를 이용하였다.

접종실험. 바이러스 병징이 발현된 용담으로부터 바이러스를 분리하기 위하여 즙액접종실험을 하였다. 즉 자연 발병된 용담의 잎을 채집하여 4-5엽기의 *N. benthamiana*에 접종하고 7일 후 전신감염된 잎을 채취하여 10배량(w/v)의 20 mM EDTA를 포함하는 0.1 M 인산완충액(pH 7.0)을 넣고 막자사발에서 파쇄한 후, 동부의 초생엽에 접종하고 생성된 병반을 병반의 형태별로 각각 단일 병반 분리하여 다시 *N. benthamiana*에 접종하여 증식시켰다. 이렇게 전신 감염된 *N. benthamiana*를 재료로 바이러스를 동정하였다.

바이러스의 동정. 동부의 단일병반으로부터 분리하여 *N. benthamiana*에서 증식시킨 바이러스는, dsRNA(double stranded RNA) 검출 및 RT-PCR 분석을 통하여 동정하였다. DsRNA는 자연 감염된 용담 및 단일병반으로부터 증식된 *N. benthamiana*의 잎을 이용하여, Morris와 Dodds (1979)의 방법으로 추출하였으며, TAE 완충액(40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 2 mM EDTA, pH 7.8)을 이용한 6% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV에서 확인하였다. 한편 dsRNA 분석 결과, 검출된 바이러스가 CMV 및 BBWV2가 감염된 것으로 추정되었기 때문에, CMV 및 BBWV2의 게놈 RNA 중, 기존에 보고된 외피단백질(coat protein; CP) 유전자의 primer(Choi 등, 1998, 2005)를 이용한 RT-PCR 방법을 이용하여 바이러스를 검정하였다. RT-PCR 반응 및 PCR 산물의 전기영동은 Choi 등(1998)의 방법을 따랐다. 한편 국부병반 기주에 나타난 병반의 특성과 분리되는 바이러스가 일치하는지의 여부를 검정하기 위하여 CMV, BBWV2 및 Tobacco rattle virus (TRV)의 항혈청을 이용한 Ouchterlony double-diffusion test를 실시하였다. 즉 항혈청은 CMV-D (ATCC PVAS-260, serotype I), BBWV2 (ATCC PVAS-207) 및 TRV (ATCC PVAS-360)를 사용하였으며, 0.01 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.0)을 포함하는 1% agarose gel을 이용하였다. 항원은 동부의 초생엽에 발현된 병반의 형태별 단일병반으로부터 증식

된 바이러스 및 각 대조 바이러스에 감염된 *N. benthamiana* 잎을 PBS에 착즙하여 사용하였다. 혈청반응의 결과는 24시간 동안 실온에서 반응한 다음 형성된 침강선을 관찰하였다.

결과 및 고찰

병징 및 병반의 특징. 자연 발병된 용담의 병징은 전형적인 모자이크 증상을 나타낸 경우와 잎 전체가 황화 증상을 보이는 경우로 구분되었다(Fig. 1). 이들 이병엽을 채집하여 4-5엽기의 *N. benthamiana*에 접종한 결과, 두 접종원 모두 접종 후 5일 경부터 접종 상엽에 모자이크 증상을 발현하였으며, 용담의 모자이크 이병주를 접종한 식물체에서 모자이크 증상이 더 강하게 발현되었다.

이들 전신감염된 *N. benthamiana*의 잎을 접종원으로, 동부의 바로 전개된 직후의 초생엽에 접종하였다. 접종 후 3일째부터 생성된 국부병반을 관찰한 결과, 용담의 모자이크 발병주로부터의 접종원을 접종한 동부의 초생엽에는 2가지 형태의 국부 괴사병반이 형성되었다(Fig. 2A). 즉 하나는 작은 크기로 짙은 갈색의 pinpoint 형 국부 괴사병반(small necrotic spot; SNS)이며, 다른 하나는 SNS 보다 직경이 약간 크며 가장자리는 짙고 안쪽은 옅은 갈색의 국부 괴사병반(large necrotic spot; LNS)으로 뚜렷하게 구분되었다. 한편 황화 병징의 접종원을 접종한 동부의 초생엽에는 LNS만 형성되어 접종원간에 특성을 나타냈다. 이상과 같은 결과를 검토해 볼 때, 용담에 발현된 모자이크 증상은 적어도 2종 이상의 바이러스가 관여한다는 것을 암시하고 있으며, 황화증상의 경우 1종의 바이러스가 관여할 가능성을 나타냈다. 지금까지 용담에 전신 병을 일으키는 병원 바이러스는 CMV, BBWV2 및 TRV가 알려져 있으며(Kameya, 1993), 국내에서도 CMV, BBWV2 및 미동정의 Potyvirus가 보고되었다(장 등, 1994). 이들 바이러스의 생물학적 성질을 검토해 보면, CMV, BBWV2 및 TRV는 동부에 국부병반을 형성할 수 있기 때문에, 동부에 병반을 형성한 바이러스는 이들 중, 복수 또는 단독 감염에 의해서 일어났을 가능성을 나타내고 있다. 그러나 이들 3종의 바이러스를 접종한 동부는 국부병반을 형성한다는 기술 이외에는 각 바이러스의 감염에 따른 병반의 형태적 특성을 비교한 기록은 없다. 지금까지 CMV에 감염된 동부의 병반 표면구조를 전자현미경(SEM)으로 관찰하였을 때, 1차로 감염된 세포의 주변으로 20~30개의 표피세포가 위축되면서 요철형의 병반이 형성된다는 특성이 보고되었으나(Kato, 1978), 이 병반의 형태가 SNS 또는 LNS형의 특징을 갖는지에 대한 언급은 없

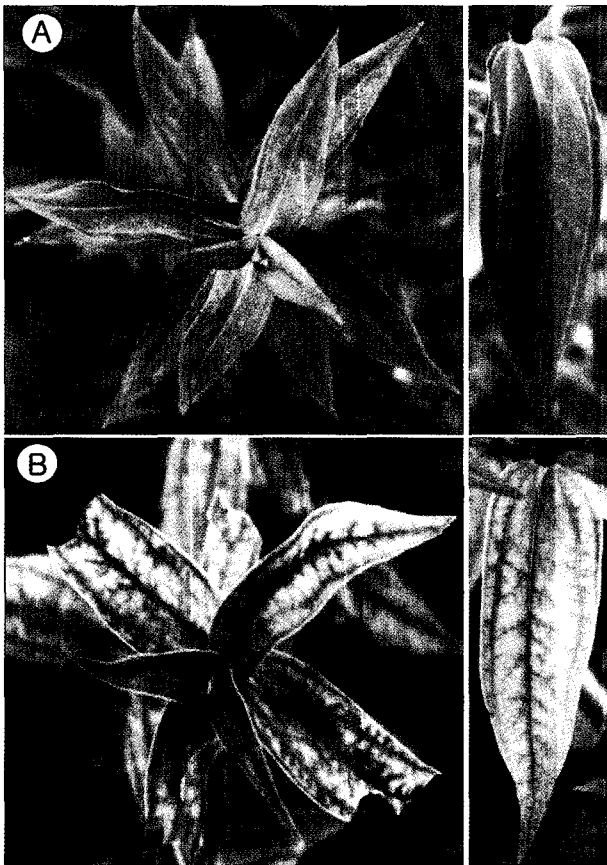


Fig. 1. Field-infected gentian plants with a mosaic (A) and a yellowing symptoms (B).

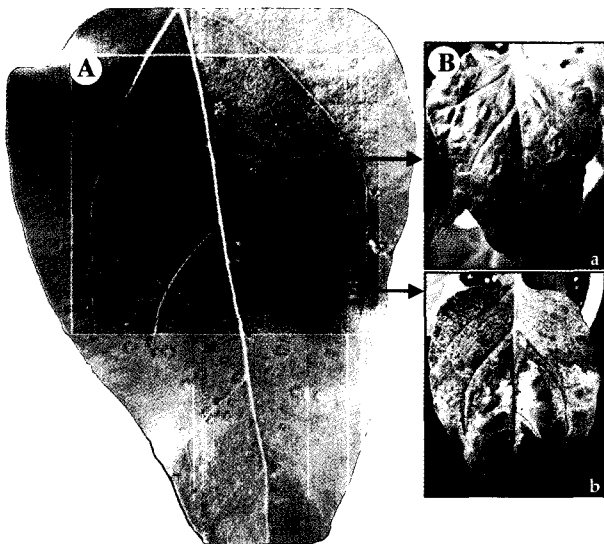


Fig. 2. (A) Small necrotic spots (SNS) and large necrotic spots (LNS) on primary leaf of *Vigna sinensis* induced by inoculum from *Nicotiana benthamiana* infected with the gentian plant showing mosaic symptom. (B) Systemic symptoms of *N. benthamiana* leaves infected with single-lesions of SNS (a) and LNS (b), respectively.

다. 따라서 이 연구에서는 동부에 형성된 병반의 특성이 바이러스의 종류를 구분하고 동정할 수 있는 기준이 될 수 있는가에 대해서 검토하였다.

바이러스의 검출 및 동정. 동부에 형성된 병반으로부터 SNS 및 LNS형 병반을 각 10개씩 단일병반 분리하여 각각 *N. benthamiana*에 접종하였다. 단일 병반을 접종한 식물체에 발현된 병징은 병반의 형태에 따라 서로 다른 특징이 나타났다(Fig. 2B). 즉 접종 7~10일 후 SNS를 접종한 *N. benthamiana*에서는 접종엽에 무병징, 상위엽에는 전형적인 모자이크 증상이 발현되었다. 이에 반하여 LNS를 접종한 식물체에서는 접종 후 10일경 접종엽에 선명한 퇴록 윤문(chlorotic ring)이 형성되었으며, 상위엽에는 괴저를 동반한 모자이크 증상이 발현되는 특징을 나타냈다.

이들 두 종류의 단일 병반을 접종하여 전신감염된 *N. benthamiana*를 이용하여 dsRNA 분석을 실시하였다. 그 결과 SNS를 접종하여 증식된 *N. benthamiana*로부터 추출한 dsRNA의 패턴은 4종의 밴드가 검출되었고, 이들의 분자의 크기는 약 3,300, 3,200, 22,00 및 1,000염기쌍으로 나타났다(Fig. 3). 한편 LNS를 접종한 식물체에서 분리한 dsRNA는 2종의 밴드로 검출되었고, 각 dsRNA의 크기는 약 6,000 및 3,400염기쌍으로 분석되었다. 이와 같은 결과를 검토해 보았을 때, SNS로부터 검출된 바이러스의 dsRNA는 CMV의 게놈 RNA와 유사하였고, LNS로부터 추출된 dsRNA는 BBWV2의 게놈 크기로 추정되었다. 한편 자연 발병된 용담의 시료를 이용하여 dsRNA 분석을 실시하였다. 그 결과 모자이크가 발현된 용담으로부터는 6,000~1,000염기쌍 크기의 dsRNA가 적어도 5-6종

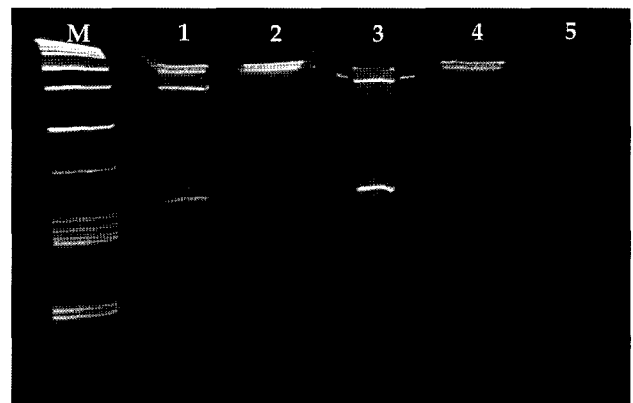


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA isolated from *Nicotiana benthamiana* infected with the gentian plant showing mosaic (lane 1) and yellowing symptoms (lane 2), and infected with single-lesions of SNS (lane 3) and LNS (lane 4), and healthy plant (lane 5), respectively. Aliquot of dsRNA purified by CF-11 cellulose was electrophoresed in 6% polyacrylamide gel. Molecular size of the dsRNA was estimated by dsDNA markers (M).

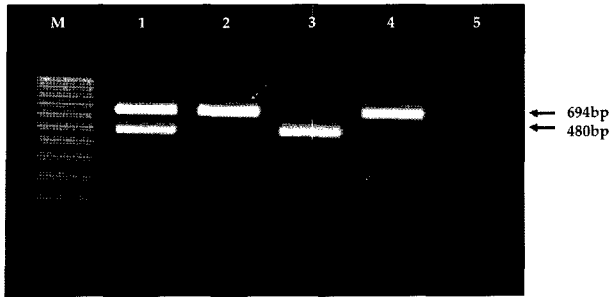


Fig. 4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays of *Nicotiana benthamiana* infected with the gentian plant showing mosaic (lane 1) and yellowing symptoms (lane 2), and infected with single-lesions of SNS (lane 3) and LNS (lane 4), and healthy plant (lane 5), respectively. The cDNAs were amplified from the 3' half regions of coat protein gene of *Cucumber mosaic virus* (480 bp) and *Broad bean wilt virus 2* (694 bp). Electrophoresis was carried out on 1.2% agarose gel and the gel was stained with ethidium bromide.

이 검출되었으며, 황화증상을 보인 용담으로부터는 LNS에서와 마찬가지로 유사한 크기의 2종의 dsRNA가 검출되었다(Fig. 3). 이와 같은 dsRNA 분석결과는 SNS 병반을 유도한 바이러스는 CMV로 추정되었으며, LNS 병반 및 용담의 황화증상주로부터 검출된 바이러스는 BBWV2일 가능성을 나타냈다. 따라서 이와 같은 결과는 용담의 모자이크 증상주는 CMV와 BBWV2가 복합감염된 것으로 판단되었다.

CMV와 BBWV2의 CP 영역 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, SNS를 접종하여 전신감염된 *N. benthamiana*로부터 추출한 total RNA에서는 CMV의 primer에 의한 약 490염기의 PCR 산물이 확인되었으며, LNS로부터는 약 650염기의 BBWV2 cDNA의 증폭이 확인되었다(Fig. 4). 한편 모자이크 증상의 용담잎의 즙액을 접종하여 전신병징이 발현된 *N. benthamiana*로부터는 CMV 및 BBWV2의 cDNA, 황화증상의 용담잎을 접종한 *N. benthamiana*로부터는 BBWV2의 PCR 산물이 검출되었다. 이와 같은 결과는 dsRNA 분석과 일치하였다. 따라서 이 실험에서 이용한 각 바이러스의 CP primer는 CMV와 BBWV2가 복합감염된 용담 등 여러 식물로부터 2종의 바이러스를 쉽게 구분할 수 있는 수단으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

한편 동부에 특징적인 병반을 형성하는 바이러스에 대한 정확한 동정을 위하여 agar gel diffusion법을 이용한 혈청실험을 실시하였다. 그 결과 SNS를 접종하여 전신감염된 *N. benthamiana*의 즙액은 CMV의 항혈청과 침강선을 형성하였으며, LNS를 접종한 식물의 즙액은 BBWV의 항혈청과 반응하였다(Fig. 5). 또한 모자이크 증상의

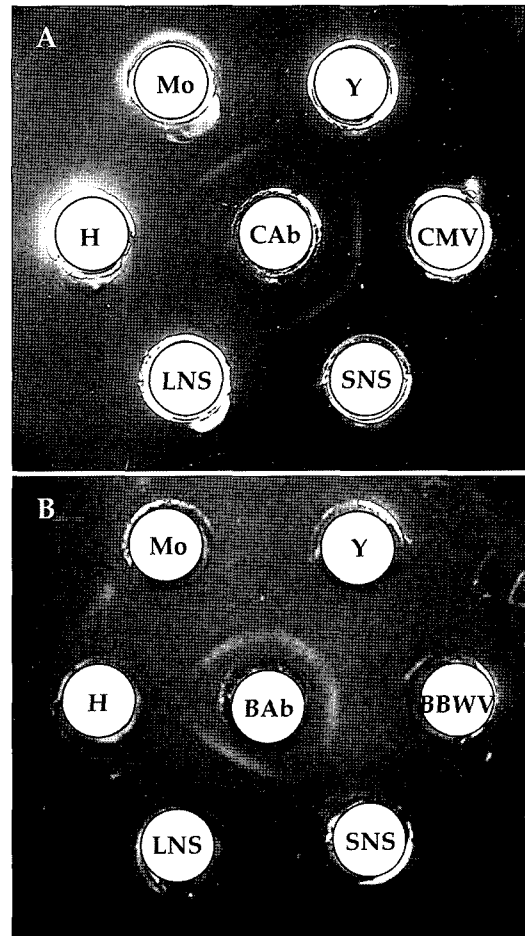


Fig. 5. Ouchterlony double-diffusion test of crude sap of *Nicotiana benthamiana* infected with single-lesions of SNS and LNS with antisera to *Cucumber mosaic virus* (CAB), *Broad bean wilt virus 2* (BAB), respectively. Peripheral wells: crude antigens from *N. benthamiana* infected with the gentian plant showing mosaic (Mo) and yellowing symptoms (Y), CMV-Mf, BBWV2-K, SNS, LNS, (H) sap of healthy *N. benthamiana*.

용담을 접종하여 전신감염된 *N. benthamiana*의 항원은 부터는 CMV 및 BBWV2의 항혈청과 모두 반응하였으며, 황화증상의 용담을 접종한 *N. benthamiana*의 즙액은 BBWV2의 항혈청과 침강선을 형성하였다. 한편 TRV의 항혈청을 이용하여 검정한 모든 항원은 TRV 항혈청과 반응하지 않았기 때문에, 이 실험에서 공시한 시료로부터 TRV는 검출되지 않았다.

최근 국내의 고추에서 괴저증상을 나타낸 바이러스병의 이병주에 대한 관찰이 빈번하게 보고되고 있다. 이 괴저 증상의 원인으로부터 분리되는 바이러스는 대부분 CMV의 계통이거나 BBWV2의 감염에 의한 경우가 많다(Lee 등, 2000; Choi 등, 2005). 이 연구의 결과는 이와 같이 자연계에서 CMV와 BBWV2가 복합감염되어 병징

의 구분이 어려운 경우, 동부에 접종하여 유도된 병반을 이용하여 두 바이러스의 감염을 쉽게 구분할 수 있는 방법으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 실제로 이 실험에서 대조바이러스로 공시한 CMV-Mf와 BBWV2-K 계통을 동부에 접종하였을 때에도 두 종류의 바이러스가 확실하게 구별되는 SNS와 LNS형 병반을 형성하였다(테이 터는 제시하지 않음). 따라서 기주범위가 매우 넓은 이들 2종의 바이러스가, 흔히 복합감염되어 있는 가지과, 십자 화과 및 콩과 등의 작물에서 CMV와 BBWV2를 구분하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

용담에서 전형적인 모자이크 증상을 나타낸 바이러스 이병주 및 황화증상을 보이는 식물체를 채집하였다. 이들 중, 모자이크 증상의 잎을 접종하여 전신감염된 *Nicotiana benthamiana*로부터의 접종원을 동부의 초생엽에 접종하였을 때, 2가지 형태의 괴사 국부병반이 형성되었다. 즉 하나는 작은 크기 pinpoint 형태의 국부 괴사병반(SNS)이며, 다른 하나는 SNS보다 약간 큰 halo 형의 국부 괴사병반(LNS)으로 뚜렷하게 구분되었다. 한편 황화 병징의 용담으로부터 증식된 접종원은 동부의 초생엽에 LNS만 형성하였다. 동부에 형성된 SNS 및 LNS형 병반을 각각 단일병반 분리하여 *N. benthamiana*에 접종하였다. 그 결과 SNS를 접종한 *N. benthamiana*에서는 접종엽에 무병징, 상위엽에는 전형적인 모자이크 증상이 발현되었다. 반면 LNS를 접종한 식물체에서는 접종엽에 퇴록 운문이 형성되었으며, 상위엽에는 괴사를 동반한 모자이크 증상이 발현되었다. 이들 SNS 및 LNS 병반으로부터 분리한 바이러스를 dsRNA, RT-PCR 및 혈청학적 유연관계 분석을 통하여 SNS 병반은 CMV에 의해서, LNS는 BBWV2에 의해서 유도된다는 것을 확인하였다. 이 연구의 결과로부터 자연계에서 CMV와 BBWV2가 복합감염되어 병징의

구분이 어려운 경우, 동부에 접종하여 유도된 병반을 이용하여 두 바이러스의 감염을 쉽게 구분할 수 있는 방법으로 활용할 수 있을 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 바이오그린21사업의 지원으로 수행된 결과의 일부입니다.

참고문헌

장무웅, 김종두, 권유경, 배소현. 1994. 용담(*Gentiana scabra*)에서 분리한 3종의 바이러스. *한국식물병리학회지* 10: 363.

Choi, G. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Kim, J. S. and Ryu, K. H. 2005. Occurrence and distribution of viruses infecting pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 21: 258-261.

Choi, J. K., Kim, H. J., Hong, J. S., Kim, D. W. and Lee, S. Y. 1998. Identification and differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates in Korea. *Korean J. plant Pathol.* 14: 7-12.

Francki, R. I. B., Mossop, D. W. and Hatta, T. 1979. *Cucumber mosaic virus*. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 213.

Kameya, M. 1993. *Gentian*; *Gentiana scabra* var. *buergeri*. In: *Plant Virus Diseases In Japan*. ed. by Tsuchizaki, T. et al. pp. 520-522. Agricultural Education Society of Japan.

Kato, M. 1978. External structure of local lesion induced on CMV-infected cowpea leaves. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 396.

Lee, U., Hong, J. S., Choi, J. K., Kim, K. C., Kim, Y. S., Curtis, I. S., Nam, H. G. and Lim, P. O. 2000. *Broad bean wilt virus* causes necrotic symptoms and generates defective RNA in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 90: 1390-1395.

Morris, T. J. and Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69: 854-858.

Taylor, R. H. and Stubbs, L. L. 1972. *Broad bean wilt virus*. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 81.