

## 칸나에서 분리한 *Cucumber mosaic virus*의 특성

전용운 · 홍진성<sup>1</sup> · 이상용<sup>2</sup> · 류기현<sup>1</sup> · 최장경\*

강원대학교 응용생물학과, <sup>1</sup>서울여자대학교 환경생명과학부, <sup>2</sup>강원대학교 산림자원보호학과

### Characterization of an Isolate of *Cucumber mosaic virus* Isolated from *Canna generalis* Bailey

Yong Woon Jeon, Jin Sung Hong<sup>1</sup>, Sang Yong Lee<sup>2</sup>, Ki Hyun Ryu<sup>1</sup> and Jang Kyung Choi\*

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

<sup>1</sup>Division of Environment & Life Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

<sup>2</sup>Department of Forest Resources Protection, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received on October 31, 2006)

An isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV), called as Can-CMV, was originally isolated from *Canna generalis* showing typical streak mosaic foliar symptoms, and its properties were investigated in this study. Whereas all known isolates of CMV could induce symptoms on their systemic hosts (four kinds of *Nicotiana* spp and a zucchini squash), Can-CMV induced no symptoms on its systemic hosts tested. Replication and movement of the virus on upper leaves as well as inoculated leaves were confirmed by RT-PCR suggesting that Can-CMV could only infect systemically on *N. benthamiana* and *N. glutinosa*. Size of local lesions on the Can-CMV-inoculated leaves of *Chenopodium amaranticolor* was much smaller than that of Fny-CMV. Whereas Fny-CMV and LS-CMV could induce distinct necrotic local lesions on *Vigna unguiculata* 2 to 3 days postinoculation (dpi), chlorotic spots symptom was expressed by Can-CMV 4 to 5 dpi. Virus-specific 4 kinds of dsRNAs were isolated from leaves of *N. benthamiana* infected with Can-CMV, and these dsRNAs corresponded to the viral genomic RNAs and subgenomic RNAs and their patterns were indistinguishable to those of Fny-CMV and LS-CMV. By restriction mapping analysis of 950 bp of RT-PCR amplified products of coat protein gene of the virus as well as by serological analysis of gel diffusion test, Can-CMV belongs to a typical member of CMV subgroup IA. These results suggest that the Can-CMV isolated from *C. generalis* possesses unique pathological properties to understand further insight into the various interactions between virus and host.

**Keywords :** *Cucumber mosaic virus*, *Canna generalis*, Host reaction, Subgroup IA

*Cucumber mosaic virus* (CMV)는 *Bromoviridae-Cucumovirus*에 속한다. CMV는 분자의 크기에 따라 RNA1, RNA2 및 RNA3으로 불리는 3종의 (+)외가닥 RNA(ssRNA)를 계놈으로, 또한 RNA3의 3' 영역에 해당하는 서브계놈 RNA(RNA4)를 포함하고 있다(Palukaitis 등, 1992). 이 바이러스는 전 세계적으로 널리 분포하고, 많은 종류의 작물에 피해를 주고 있으며, 특히 채소나 화훼에서는 가장 중요한 바이러스병의 병원이다(Tomlinson, 1987). 지금까지 많은 CMV의 계통들이 보고 되었는데, 이들 CMV의 계통

을 분류하기 위한 방법들 중에는 기주반응과 혈청학적 관계(Kaper와 Waterworth, 1981), 외피단백질에 대한 펩티드지도 작성과 ELISA 분석(enzyme-linked immunosorbent assay)(Edwards와 Gonsalves, 1983), RNase protection을 이용한 heterogeneity 분석(Owen과 Palukaitis, 1988) 및 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용한 외피단백질 유전자의 제한효소지도 분석(Rizos 등, 1992) 등이 주로 활용되었다. 이와 같은 결과들을 기초로 CMV의 계통은 크게 서브그룹 I과 II로 구분되고 있으며(Owen과 Palukaitis, 1988), 최근에는 계놈 RNA3의 5' 말단영역에 대한 염기서열 분석을 통하여, 서브그룹 I을 다시 서브그룹 IA 및 IB로 구분하고 있다(Roossinck 등, 1999).

\*Corresponding author

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

E-mail) jkchoi@kangwon.ac.kr

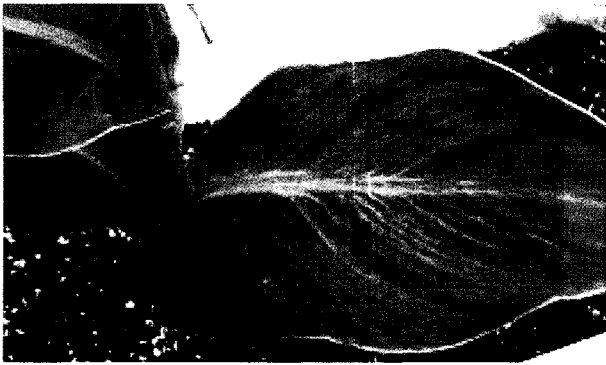


Fig. 1. Streak mosaic symptom in naturally infected canna plant (*Canna generalis* Bailey).

칸나(*Canna generalis* Bailey)의 모자이크병에 대한 기록은 1920년대로 매우 오래 되었으나, CMV가 분리된 것은 1955년 小室와 明日山에 의한 보고가 처음이다. 우리나라에서는 1976년에 칸나에서 CMV가 분리된 것으로 기재되어 있으나(한국식물병리학회, 2004), 실제로 이 논문에서는 칸나 모자이크병의 X체에 관한 연구로, 이 X체가 CMV의 감염에 따른 개연성에 대해서는 전혀 언급되지 않았다(이, 1976). 2006년 봄, 강원도 춘천시 소재 강원대학교 캠퍼스의 화단에 식재되어 있는 칸나에서 선명한 줄무늬 모자이크 증상이 나타난 이병주를 발견하고 바이러스를 분리한 결과, CMV의 한 계통으로 판명되었다. 칸나에서 분리된 이 CMV 계통은 지금까지 알려진 대표적인 CMV 계통들과 비교해 보았을 때, 매우 특징적인 생물학적 성질을 나타냈다.

**바이러스의 분리.** 전형적인 줄무늬 모자이크 증상을 나타낸 칸나의 이병주(Fig. 1)를 채집하여 CMV-specific 프라이머(Choi 등, 1999)를 이용한 RT-PCR을 실시한 결과, 예상된 분자크기의 cDNA가 검출되었다. 따라서 칸나에 모자이크 병징을 일으킨 병원이 CMV의 한 계통일 것으로 예측하고 CMV의 분리실험을 실시하였다. 즉 채취한 칸나의 이병엽 시료를 0.01M 인산완충액(pH 7.0)으로 마쇄한 후, 5-6엽기의 *Nicotiana benthamiana*에 접종하여 증식시켰다. 전신감염된 *N. benthamiana*의 이병엽 즙액을 *Chenopodium amaranticolor*의 전개엽에 접종하여 형성된 국부병반으로부터 단일병반분리를 2회 실시한 다음, 형성된 단일병반을 다시 5-6엽기의 *N. benthamiana*에 접종하여 전신감염된 잎을 공시 바이러스원으로 사용하였으며, 이렇게 분리된 칸나 CMV의 분리주를 Can-CMV로 명명하였다. 한편 *N. benthamiana*에 증식시킨 Fny-CMV(subgroup I) 및 LS-CMV(subgroup II)를 이 실험의 대조 바이러스로 이용하였다.

Table 1. Comparison of reactions of Can-CMV on indicator plants induced by Fny-CMV and LS-CMV used as control CMV

Indicator plants	Symptoms		
	Can (RT-PCR)	Fny	LS
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/mM <sup>a</sup> (++) <sup>b</sup>	-/M	-/M
<i>N. glutinosa</i>	-/- (++)	-/M	-/M
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	-/- (-/-)	-/M	RS/M
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	-/- (-/-)	-/M	-/M
<i>Cucubita pepo</i> cv. Black beauty	-/- (-/-)	-/M	CS/M
<i>Zea mays</i>	-/- (-/-)	-/M	-/-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	sNS/-	NS/-	NS/-
<i>Vigna unguiculata</i>	CS/-	NS/-	NS/-

<sup>a</sup>Inoculated leaves/upper leaves, M: mosaic, mM: mild mosaic, RS: ring spot, NS: necrotic spot, sNS: small necrotic spot, CS: chlorotic spot. -; symptomless or not infected.

<sup>b</sup>RT-PCR was performed from total RNAs extracted from the indicator plants 10 days after inoculation using a method previously described by Choi et al.(1998). +: positive assay, -: negative assay.

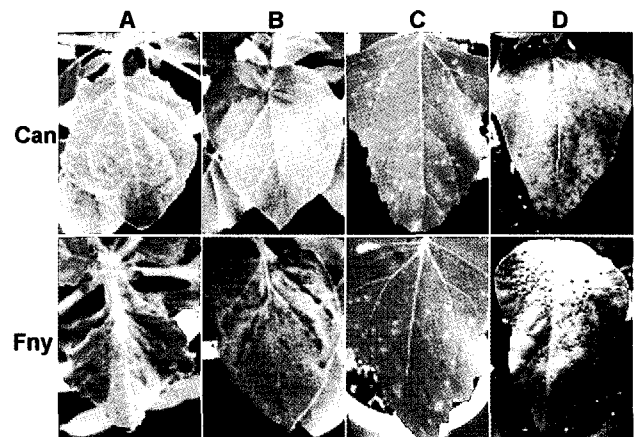


Fig. 2. Symptoms on indicator plants by mechanical inoculation of Can-CMV isolated from canna plant. Fny-CMV was inoculated as a control CMV. Photographs are presented symptoms on leaves of *Nicotiana benthamiana* (A), *N. glutinosa* (B), *Chenopodium amaranticolor* (C), and *Vigna unguiculata* (D), respectively.

**기주범위 및 병징특성.** 일반적으로 CMV의 계통분류에 자주 사용되고 있는 주요 지표식물 중, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi nc, *N. tabacum* cv. Samsun, *Cucubita pepo* cv. Black beauty, *Zea mays*, *C. amaranticolor* 및 *Vigna unguiculata* cv. Kurotanesanzaku를 공시하여 Can-CMV의 기주범위와 병징 특성을 조사하였다. 접종은 0.01M 인산완충액과 카보런덤을 이용한 즙액접종법으로 실시하였다. Can-CMV 및 대조 CMV를 접종한 이들 지표식물은 25-30°C의 온실에 3주 이상 두

고 접종엽 및 상엽에 발현되는 병징을 관찰하였다. 이때 무병징으로 감염된 경우를 검정하기 위하여 병징이 발현되지 않는 식물에 대해서는 접종엽과 상엽에 대해서 CMV-specific 프라이머를 이용한 RT-PCR을 실시하여 감염유무를 판정하였다.

Can-CMV의 기주범위 및 병징 특성에 관한 실험결과를 Table 1에 정리하였다. 이 결과를 보면 칸나에서 분리한 CMV는 *N. benthamiana*에서만 매우 얇은 모자이크증상을 보일 뿐, 다른 전신감염 기주에서는 병징이 발현되지 않았다(Fig. 2). 또한 이들 기주에서 RT-PCR로 바이러스를 검출한 결과, *N. benthamiana*와 *N. glutinosa*에서만 접종엽 및 상엽에서 바이러스의 감염이 확인되었고, 다른 기주에서는 바이러스가 검출되지 않았다. 한편 *C. amaranticolor*의 접종엽에 발현된 국부 괴사병반은 대조로 접종한 Fny-CMV와 LS-CMV에 의해서 형성된 병반보다 매우 작은 크기의 반점을 형성하였으며, *V. unguiculata*의 접종엽에는 Fny-CMV나 LS-CMV가 접종 2-3일 후에 뚜렷한 괴사병반을 형성하는데 반해서, Can-CMV는 접종 4-5일 후에 윤곽이 확실치 않은 퇴색병반을 형성하는 특징을 보였다. 이와 같은 Can-CMV의 기주반응 특성은 칸나가 영양번식을 통하여 증식되는 식물이기 때문에, 일단 칸나에 감염된 바이러스는 계속적으로 후대에 전파되는 환경을 갖게 됨으로서 기주범위가 좁고, 또한 병징이 약하게 발현되는 것으로 생각되었다. 실제로 유사한 환경에서 적응한 것으로 추측되는 백합의 Ly2-CMV, Li-CMV, HL-CMV 등이 기주범위 및 병징 발현이 매우 제한되어 있다는 사실에 비추어 볼 때(Jung 등, 2000; Ryu 등, 2002;

Masuta 등, 2002), 칸나에서 분리한 CMV도 기주적응성이 매우 제한적인 특성으로 진화되었을 가능성을 배제할 수 없다. 이와 같은 Can-CMV의 기주반응 특성은 앞으로 바이러스와 기주의 다양한 상호관계를 이해하는데 있어서 중요한 병원학적 성질을 가지고 있는 것으로 생각되었다.

**DsRNA 분석.** Can-CMV에 감염된 *N. benthamiana* 잎으로부터 dsRNA를 추출하여 전기영동으로 패턴을 비교 분석하였다. DsRNA의 추출은 Morris와 Dodds(1979)의 방법을 이용하였으며, 추출한 dsRNA는 6% polyacrylamide gel에서 1×TAE 완충액(40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 2 mM EDTA, pH 7.8)으로 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator로 밴드를 관찰하였다. 그 결과 Can-CMV에 감염된 *N. benthamiana*로부터 추출한 4종의 dsRNA가 확인되었으며, 이들의 분자 크기는 약 3.4, 3.2, 2.2 및 1.0 kbp로, 크기 및 중수에 있어서 대조로 이용한 Fny-CMV나 LS-CMV와 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3). 일반적으로 dsRNA 분석은 CMV와 같이 분절계놈을 가지고 있는 바이러스의 경우에 게놈 RNA 또는 satellite RNA를 검출하는 방법으로 매우 효과적이다(Dodds, 1993). 한편 지금까지 보고된 CMV의 계통들 중에는 satellite RNA의 존재가 약독병징의 발현과 관련되는 경우가 많이 있다. 예를 들면 고추의 약독계 Paf-CMV는 이 바이러스에 포함되어 있는 satellite RNA가 약독병징 발현에 직접적으로 영향을 주는 것으로 보고되었다(성 등, 2004). 그러나 이 실험의 dsRNA 분석을 통하여, Can-CMV의 감염 식물로부터 satellite RNA가 검출되지 않은 것은 적어도 Can-CMV의 약독병징은 satellite RNA의 관련은 없는 것으로 판단되었다.

**혈청학적 성질.** Fny-CMV의 항혈청을 이용한 한천젤 2중확산법으로 Can-CMV의 혈청학적 성질을 조사하였

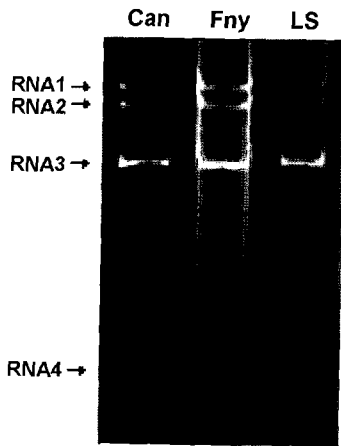


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA isolated from *N. benthamiana* infected with Can-CMV (lane 1), Fny-CMV (lane 2), LS-CMV (lane 3), and healthy plant (lane 4), respectively. Aliquot of dsRNA purified by CF-11 cellulose was electrophoresed in 6% polyacrylamide gel. Molecular size of the dsRNA was estimated by dsDNA markers (M).

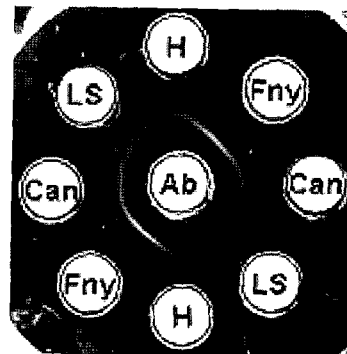
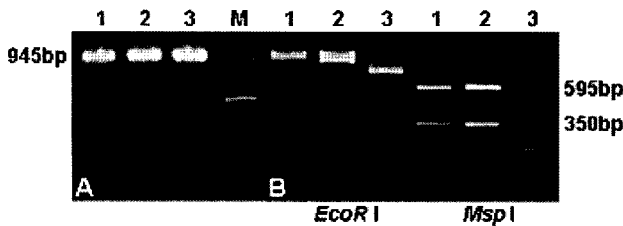


Fig. 4. Ouchterlony double-diffusion test of crude sap of *N. benthamiana* infected with Can-CMV, Fny-CMV and LS-CMV against to antiserum of Fny-CMV. H: crude sap from healthy *N. benthamiana*.



**Fig. 5.** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay (A) and restriction analysis of the product (B) for the half region of RNA3 covering full-length coat protein gene from Can-CMV (lane 1), Fny-CMV (lane 2), and LS-CMV (lane 3), respectively. Electrophoresis was carried out on 1.2% agarose gel and the gel was stained with ethidium bromide. M: 100 bp DNA ladder as a size marker.

다. 한천겔은 1%의 agarose를 0.15M NaCl을 포함하는 0.01M 인산완충액(PBS)에 녹여 제조하였으며, Can-CMV 및 대조 CMV에 감염된 *N. benthamiana*의 잎을 PBS에서 마쇄한 즙액을 마이크로튜브에 넣고 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상청액을 항원으로 사용하였다. 침강반응의 결과는 실온에서 12시간 정치 후 나타난 침강대를 관찰하였다. 그 결과 Can-CMV의 항원은 Fny-CMV의 항혈청에 대해서 한 종의 뚜렷한 침강대를 형성하였으며, 대조로 이용한 Fny-CMV의 항원에 의해서 형성된 침강선과 융합하였다(Fig. 4). 또한 서브그룹 II에 속하는 LS-CMV의 침강선과는 분지선(spur)을 형성함으로써, Can-CMV가 혈청학적으로 서브그룹 I에 속하는 CMV계통이라는 것을 시사하였다.

**RT-PCR 및 제한효소지도.** Can-CMV에 전신감염된 *N. benthamiana*의 잎을 채취하여 total RNA를 추출하고, 이를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. Total RNA의 추출은 Choi 등(1998)의 방법을 이용하였으며, RT-PCR은 CMV-specific 프라이머를 이용한 CMV RNA3의 외피단백질 유전자를 포함하는 3' 영역, 945 bp에 대해서 실시하였다(Choi 등, 1999). PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 1×TAE 완충액으로 전기영동하여 검출하였다. 한편 Can-CMV의 subgroup을 검정하기 위하여, 이들 PCR산물을 제한효소 *MspI*과 *EcoRI*으로 처리한 후, agarose gel에서 전기영동하여 제한효소 절단 패턴을 분석하였다(Singh 등, 1995). 그 결과 Can-CMV는 대조의 Fny-CMV나 LS-CMV와 마찬가지로 예상되었던 약 950 bp 크기의 cDNA가 증폭되었다(Fig. 5A). 또한 칸나에서 분리한 Can-CMV의 cDNA를 *EcoRI*으로 처리하였을 때에는 절단되지 않았으며, *MspI*에서는 595 bp 및 350 bp의 절편으로 절단되었다(Fig. 5B). 이와 같은 결과는 Fny-CMV의 패턴과 완전히 일치하였으며, 각 제한효소에 의해서 2개 및 4개의 절편

으로 절단된 LS-CMV의 패턴과는 차이를 보였다. 따라서 이러한 결과로부터 Can-CMV는 서브그룹 IA에 속하는 계통으로 확인되었다.

## 요 약

전형적인 줄무늬 모자이크 증상을 나타낸 칸나로부터 *Cucumber mosaic virus*(CMV)의 한 계통(Can-CMV)을 분리하고, 특성을 조사하였다. Can-CMV는 대부분의 전신 감염 기주에서 병징이 발현되지 않았고, 이들 기주의 접종엽 및 상엽에서 RT-PCR로 바이러스의 감염여부를 조사한 결과, *N. benthamiana*와 *N. glutinosa*에서만 바이러스가 검출되었으며, 다른 기주로부터는 확인되지 않았다. 한편 *Chenopodium amaranticolor*의 접종엽에 발현된 국부 괴사병반은 대조로 접종한 Fny-CMV나 LS-CMV에 의해서 형성된 병반보다 매우 작은 크기의 반점을 형성하는 특성을 보였다. 또한 *Vigna unguiculata*의 접종엽에는 Fny-CMV나 LS-CMV가 접종 2-3일 후에 뚜렷한 괴사병반을 형성하는데 반해서, Can-CMV는 접종 4-5일 후에 윤곽이 확실치 않은 퇴색병반을 형성하였다. Can-CMV에 감염된 *N. benthamiana*로부터 추출한 dsRNA는 4종의 밴드가 검출되었으며, 이들 분자의 크기 및 중수는 Fny-CMV나 LS-CMV와 차이를 나타내지 않았다. Can-CMV의 항원은 Fny-CMV의 항혈청에 대해서 한 종의 뚜렷한 침강선을 형성하였으며, Fny-CMV의 항원에 의해서 형성된 침강선과 융합하였고, LS-CMV의 침강선과는 분지선을 형성함으로써, 혈청학적으로 서브그룹 I에 속하는 계통으로 판단되었다. 또한 Can-CMV에 감염된 *N. benthamiana*로부터 RNA를 추출하여 CMV-specific 프라이머를 이용한 CMV-RNA3의 외피단백질 유전자를 포함하는 3'영역에 대해서 RT-PCR을 실시하였다. Can-CMV는 Fny-CMV나 LS-CMV와 마찬가지로 예상되었던 약 950 bp 크기의 cDNA가 증폭되었으며, 이 cDNA를 *EcoRI*으로 처리하였을 때에는 절단되지 않았고, *MspI*에서는 595 bp 및 350 bp의 절편으로 절단되었다. 이와 같은 결과는 Fny-CMV의 패턴과 일치하였으며, 이러한 결과로부터 Can-CMV가 서브그룹 IA에 속하는 계통으로 확인되었다. 이상과 같은 결과들로부터, Can-CMV는 앞으로 바이러스와 기주의 다양한 상호관계를 이해하는데 있어서 중요한 병원학적 성질을 가지고 있는 것으로 생각되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2006년도 농촌진흥청 바이오그린21사업의

지원으로 수행된 결과의 일부입니다.

## 참고문헌

- 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.
- Choi, S. K., Choi, J. K., Park, W. M. and Ryu, K. H. 1999. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single-pair of primers. *J. Virol. Methods* 83: 67-73.
- Dodds, J. A. 1993. DsRNA in diagnosis. In : *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, ed. by R.E.F. Matthews. pp. 273-295. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Edwards, M. C. and Gonsalves, D. 1983. Grouping of seven biologically defined isolates of *Cucumber mosaic virus* by peptide mapping. *Phytopathology* 73: 1117-1120.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명록(제4판). 한국식물병리학회 319 pp.
- Jung, H. J., Ueda, S., Ryu, K. H., Lee, S. Y. and Choi, J. K. 2000. A novel strain of *Cucumber mosaic virus* isolated from *Lilium longiflorum*. *Plant Pathol. J.* 16: 306-311.
- Kaper, J. M. and Waterworth, H. E. 1981. Cucumoviruses. In : *Handbook of Plant Virus Infections*, ed. by E. Kurstak, pp. 257-332. Elsevier/Holland Biomedical, New York, USA.
- 小室康雄, 明日山秀文. 1955. キュウリモザイク病ウイルスに関する研究. (II) 東京付近における各種モザイク症状株からの分離. *日植病報* 20: 77-82.
- 이창은. 1976. 칸나 모자이크병의 X체에 관한 연구. *한국식물보호학회지* 15: 199-204.
- Masuta, C., Seshimo, Y., Mukohara, M., Jung, H. J., Ueda, S., Ryu, K. H. and Choi, J. K. 2002. Evolutionary characterization of two lily isolates of *Cucumber mosaic virus* isolated in Japan and Korea. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 163-168.
- 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.
- Owen, J. and Palukaitis, P. 1988. Characterization of *Cucumber mosaic virus*. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 496-502.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francki, R. I. B. 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus. Res.* 41: 281-348.
- Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73: 2009-2103.
- Roossinck, M. J., Zhang, L. and Hellwald, K. H. 1999. Rearrangement in the 5' nontranslated region and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* RNA3 indicated radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* 73: 6752-6758.
- Ryu, K. H., Park, H. W. and Choi, J. K. 2002. Characterization and sequence analysis of a lily isolate of *Cucumber mosaic virus* from *Lilium tsingtauense*. *Plant Pathol. J.* 18: 85-92.
- Singh, Z., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. 1995. Identification of *Cucumber mosaic virus* subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Dis.* 79: 713-716.
- 성미영, 정민영, 이상용, 류기현, 최장경. 2004. *Cucumber mosaic virus* Paf계통의 약독병 징과 관련된 satellite RNA의 유전자 해석. *식물병연구* 10: 241-247.
- Tomlinson, J. A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110: 661-681.