

과꽃에서 분리한 *Cucumber mosaic virus*의 성질오선미 · 김성률 · 홍진성<sup>1</sup> · 류기현<sup>1</sup> · 이공표<sup>2</sup> · 최장경\*강원대학교 생물자원공학부, <sup>1</sup>서울여자대학교 환경생명과학부, <sup>2</sup>중앙대학교 응용식물과학부Characterization of an Isolate of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Chinese aster (*Callistephus chinensis*)Sun Mi Oh, Sung Ryul Kim, Jin Sung Hong<sup>1</sup>, Ki Hyun Ryu<sup>1</sup>,  
Gung Pyo Lee<sup>2</sup> and Jang Kyung Choi\*

Division of Bio-Resources, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>1</sup>Division of Environmental & Life Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-744, Korea<sup>2</sup>Division of Applied Plant Sciences, Chungang University, Ansung 456-756, Korea

(Received on November 21, 2008)

An isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV), designated as Cas-CMV, was isolated from Chinese aster (*Callistephus chinensis*) showing severe mosaic symptom, and its properties was compared to the well-characterized Fny-CMV (subgroup IA) and As-CMV (subgroup IB) by host reaction in several indicator plants, dsRNA analysis, RT-PCR analysis, and restriction enzyme profile of the PCR products. Cas-CMV differed markedly in their host reaction to Fny-CMV or As-CMV in *Cucurbita pepo* cv. Black beauty. In the zucchini squash, all strains induced chlorotic spot on inoculated leaves and mosaic symptoms on upper leaves. However, symptoms induced by Cas-CMV were developed lethal necrosis on the young plants 15 to 20 days after inoculation. In experiments of dsRNA analysis and RT-PCR analysis, properties of Cas-CMV was come within subgroup I CMV. Moreover, restriction enzyme analysis using *Hind*III of the RT-PCR products showed that Cas-CMV belong to a member of CMV subgroup IA.

**Keywords :** *Callistephus chinensis*, *Cucumber mosaic virus*, *Cucurbita pepo*, Lethal necrosis, Subgroup IA

Bromoviridae의 Cucumovirus에 속하는 *Cucumber mosaic virus*(CMV)는 전 세계적으로 널리 분포하며 많은 종류의 작물에 피해를 주고 있는데, 그중에서도 특히 채소나 화훼식물에서는 가장 중요한 바이러스병의 병원체 중 하나이다(Tomlinson, 1987). CMV는 분자 크기에 따라 RNA1, RNA2, RNA3으로 분절된 계통 RNA와 RNA3의 3' 영역에 해당하는 서브계통 RNA (RNA4)로 구성되어 있다(Palukaitis 등, 1992). 지금까지 보고된 많은 계통의 CMV는 서브그룹 I과 II로 구분되고 있는데(Owen과 Palukaitis, 1988), 이들은 주로 기주반응, 혈청학적 유연관계와 ELISA 분석(enzyme-linked immunosorbent assay) (Kaper와 Waterworth, 1981), 외피단백질의 펩티드지도(Edwards와

Gonsalves, 1983), RNase protection에 의한 heterogeneity분석(Owen과 Palukaitis, 1988) 및 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용한 외피단백질 유전자의 제한효소지도 분석(Rizos 등, 1992) 등의 방법들이 주로 활용되었다. 또한 최근에는 계통 RNA3의 5' 말단영역에 대한 염기서열 분석을 통하여 서브그룹 I을 다시 서브그룹 IA 및 IB로 구분하고 있다(Roossinck 등, 1999).

과꽃(*Callistephus chinensis*)은 국화과 일년생식물로 화단 또는 꽃꽂이 용도로 재배되고 있다. 지금까지 과꽃으로부터 분리된 바이러스병의 기록은 없으나, CMV의 기주범위 실험에서 CMV 보통계에 감염된다는 보고가 있다(小室, 1958). 이 연구는 2007년 여름, 경기도 가평의 가정집 화단에서 채집한 전형적인 모자이크 증상의 과꽃으로부터 바이러스를 분리하고, 이 바이러스에 대한 몇 가지 성질을 조사한 결과, CMV의 한 계통으로 동정되어 그 특성을 기술한다.

\*Corresponding author

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

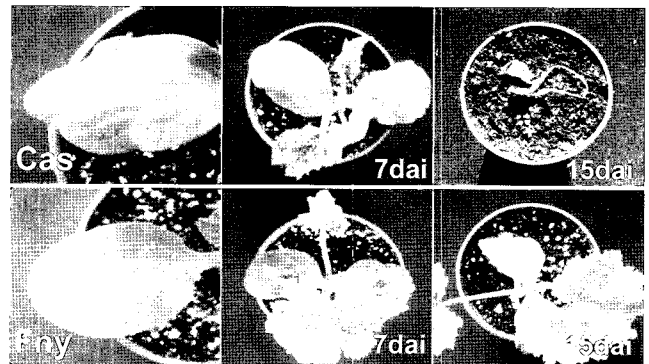
E-mail) jkchoi@kangwon.ac.kr

**바이러스의 분리.** 모자이크 증상의 과꽃의 잎을 채집하여 RNA를 추출하고, *Cucumovirus* specific 프라이머 (Choi 등, 1999)를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, 예상된 약 950 bp 크기의 cDNA가 검출되었기 때문에 과꽃의 모자이크 증상을 일으킨 병원체는 *Cucumovirus*의 한 종으로 판단되었다. 따라서 *Cucumovirus*속의 CMV, *Peanut stunt virus*(PSV) 및 *Tomato aspermy virus*(TAV) 중에서 어느 바이러스인지를 구분하기 위하여, 이 cDNA로부터 *SalI*과 *HindIII*를 이용한 RFLP분석(Choi 등, 1999)을 실시한 결과, CMV 서브그룹 I의 한 계통으로 판명되었다. 이 CMV를 분리 동정하기 위하여 다음의 실험을 실시하였다. 즉 채취한 과꽃의 이병엽을 0.01M 인산완충액 (pH 7.0)으로 마쇄한 후, 5-6엽기의 *Nicotiana benthamiana*에 접종하여 증식을 확인하였다. 접종 10일 후 전신 감염된 *N. benthamiana* 이병엽의 즙액을 *Chenopodium amaranticolor*의 전개엽에 접종한 결과, 접종 3일 후에 선명한 괴사병반이 형성되었다. 이들 병반으로부터 단일병반을 분리하여 *N. benthamiana*에 접종하는 방법을 2회 실시한 다음, 전신 감염된 *N. benthamiana*를 공시 바이러스원으로 사용하였다. 이렇게 분리된 과꽃 CMV의 분리주를 Cas-CMV로 명명하였다. 한편 *N. benthamiana*에 증식시킨 Fny-CMV(서브그룹 IA)와 As-CMV(서브그룹 IB)를 대조 바이러스로 공시하였다.

**기주반응 및 병징 특성.** Cas-CMV의 기주범위와 병징 특성을 조사하기 위하여 CMV의 계통분류에 주로 사용되는 지표식물 중에서 *N. benthamiana*, *N. tabacum* cv. 'Xanthi nc', *N. glutinosa* 등 3종의 담배속 식물, *Cucubita pepo* cv. 'Black beauty', *C. moschata* cv. 'Chungang-aihobak' 및 *Cucumis sativus* cv. 'Suyo' 등 3종의 박과식물 및 *C. amaranticolor*를 국부병반기주로 공시하여, Fny-CMV 및 As-CMV와 비교하였다. 접종은 0.01 M 인산완

충액과 카보런덤을 이용한 즙액접종법으로 실시하였으며, 접종한 지표식물을 25°C-30°C의 온실에 3주 이상 두면서 접종엽과 상엽에서 발현되는 병징을 관찰하였다.

Cas-CMV, Fny-CMV 및 As-CMV의 기주범위 및 접종엽과 상엽에서의 병징 특성에 관한 결과를 Table 1에 정리하였다. 이 결과를 보면 Cas-CMV의 감염으로 발현된 병징은 전반적으로 Fny-CMV와 유사한 패턴을 나타냈다. 특히 *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *N. glutinosa* 등 담배에서의 전신 병징은 매우 유사한 특징을 보였으며, As-CMV의 감염식물에서 나타난 얼룩무늬를 동반하는 모자이크 증상과 구별되었다. 그러나 박과식물에 있어서는 Cas-CMV에 감염되었을 때 대조의 Fny-CMV나 As-CMV 보다 강한 모자이크 증상이 발현되었다. 특히 쥬키니호박과 애호박에서는 접종한 자엽에 퇴록반문을 형성하고, 잎에 심한 모자이크 증상이 나타나면서 접종 2-3주 후에 상엽에 괴저 증상이 나타났으며, 쥬키니호박의 경우 30°C 이상이 1주일 정도 지속된 고온조건에서는 정단부 또는 식물체 전체가 고사되는 특징을 보였다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Symptoms induced on *Cucurbita pepo* cv. 'Black beauty' by inoculation of Cas-, Fny- and As-CMV. (A) Chlorotic spots on inoculated cotyledons, (B) Mosaic symptom (7dai) and lethal necrosis or severe mosaic (15dai) on plants.

**Table 1.** Reaction of indicator plants by mechanical inoculation of Cas-CMV

Host plant	Symptom <sup>a</sup>		
	Cas-CMV	Fny-CMV	As-CMV
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. glutinosa</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. tabacum</i> cv. 'Xanthi nc'	-/M	-/M	-/M
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L/-	L/-	L/-
<i>Cucubita pepo</i> cv. 'Black beauty'	CS/M,N,LN	CS/M	-/M
<i>C. Moschata</i> cv. 'Chungang-aihobak'	CS/M,N	CS/M	-/M
<i>Cucumis sativus</i> cv. 'Suyo'	-/M	-/M	-/M
<i>C. melo</i> cv. 'Earl's primo'	-/M	-/M	-/M

<sup>a</sup>Inoculated leaves/upper leaves, M: mosaic, CS: chlorotic spot, N: necrosis, LN: lethal necrosis, L: necrotic local lesion, -: symptom less or not infected.

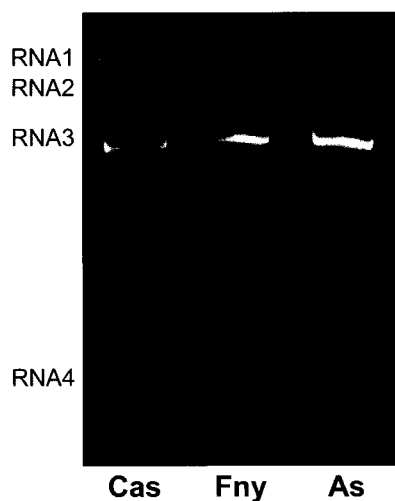
쥬키니호박('Black beauty')에서 심한 모자이크 증상을 일으키는 Fny-CMV의 병징 발현속도와 강도는 RNA1에 의해서 지배된다는 것이 pseudorecombinant 실험을 통하여 확인되었다(Roossinck와 Palukaitis, 1990). 한편 Choi 등 (2004)은 쥬키니에 전신 감염을 일으키지 못하는 백합계 CMV와 Fny-CMV의 키메라 cDNA제작 및 transcript접종 실험을 통하여, RNA3의 3a 유전자에서 3개의 아미노산 치환이 전신감염과 관련된다는 사실을 보고하였다. 이와 같은 결과들로부터 추측해 볼 때, 박과식물에서 Fny-CMV에 감염된 경우 보다 더욱 강한 모자이크병징과 함께 괴저를 일으키는 Cas-CMV의 특성이 이들 유전자의 변이와 관련이 있는지에 대해서는 금후 검토해야 할 흥미 있는 과제로 생각되었다.

**DsRNA 분석.** Cas-CMV의 게놈RNA에 대한 분자 크기 및 종류를 알아보기 위하여 Cas-CMV, Fny-CMV 및 As-CMV에 감염된 *N. benthamiana*의 잎으로부터 Morris와 Dodds(1979)의 방법으로 겹가닥 RNA(double stranded RNA: dsRNA)를 추출하였다. 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 dsRNA 밴드를 관찰하였다. 그 결과 Cas-CMV에 감염된 *N. benthamiana* 잎으로부터 추출한 dsRNA의 전기영동 패턴은 대조로 이용한 Fny-CMV 또는 As-CMV의 dsRNA의 종류 및 분자 크기에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

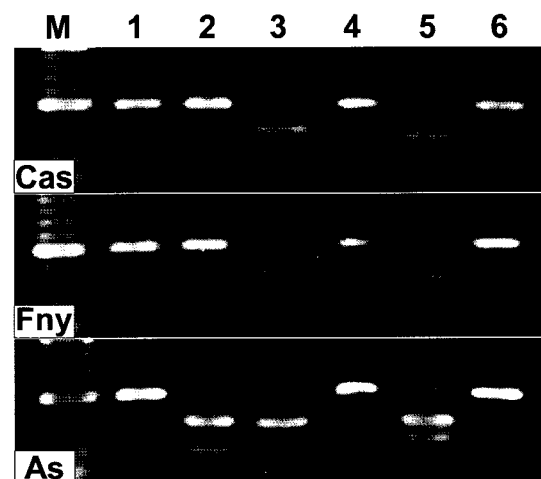
일반적으로 dsRNA 분석법의 장점 중 하나는 CMV와

같이 분절게놈을 가지고 있는 경우 게놈 RNA 또는 satellite RNA를 분석하는데 매우 유용한 것으로 알려져 있다(Dodds, 1993). 또한 CMV가 lethal necrosis를 일으키는 원인 중 하나로 satellite RNA의 간섭에 의한 것이 알려져 있기 때문에(White 등, 1995), Cas-CMV의 dsRNA로부터 satellite RNA의 검출이 기대 되었으나, satellite RNA의 존재는 인정되지 않았다. 한편 Wang 등(1988)은 여러 종의 CMV로부터 dsRNA를 추출하여 전기영동하였을 때, 각 게놈 RNA의 이동도는 각 계통의 혈청형(serotype)과 일치한다고 보고하였다. 이러한 고찰로부터 추정하였을 때, Cas-CMV의 dsRNA는 Fny-CMV 또는 As-CMV와 같은 이동도의 게놈 분자를 갖는 것으로 미루어 이들과 같은 혈청형으로 판단되었다.

**RT-PCR 및 제한효소지도 분석.** Cas-CMV에 전신 감염된 *N. benthamiana*의 잎을 채취하여 total RNA를 각각 추출하고, 이를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. Total RNA의 추출은 Choi 등(1998)의 방법을 이용하였으며, RT-PCR은 외피단백질 유전자의 일부와 3' 비번역 영역을 포함하는 약 490 bp의 cDNA합성을 위한 프라이머(Singh 등, 1995)를 이용하였다. 여기에서 얻어진 PCR산물을 1.2% agarose gel에서 1×TAE 완충액으로 전기영동한 결과, 3종의 CMV로부터는 모두 약 490 bp의 cDNA가 검출되었다. 이 cDNA를 *EcoRI*, *HindIII*, *MspI*, *SalI*, *PstI* 및 *XhoI*으로 처리한 후, 제한효소절단 패턴(RFLP)을 분석하여 Cas-CMV의 서브그룹을 검정하였다. 그 결과 Cas-CMV의 RFLP패턴은 공시한 6종의 모든 제한효소에서 Fny-CMV와 일치하



**Fig. 2.** Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA isolated from *Nicotiana benthamiana* infected with Cas-CMV (lane 1), Fny-CMV (lane 2) and As-CMV (lane 3), respectively. DsRNA purified using CF-11 cellulose column were electrophoresed in 6% polyacrylamide gel.



**Fig. 3.** RFLP analysis of the RT-PCR products obtained from 3' region of coat protein gene. Digested fragments by several restriction enzymes were separated on 1.2% agarose gel and stained with EtBr. Lane M: 100kb DNA ladder marker, Lanes 1-6: digested cDNAs by *EcoRI*, *HindIII*, *MspI*, *SalI*, *PstI* and *XhoI*, respectively.

였다(Fig. 3). 한편 *Hind*III의 처리에서는 2종의 절편으로 절단되는 As-CMV의 절단패턴과 구별되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, Cas-CMV는 Fny-CMV와 같은 서브그룹 IA로 판단되었다. Singh 등(1995)은 CMV계통의 구분을 위하여 490 bp의 cDNA를 *Eco*RI과 *Msp*I으로 처리하였을 때, 서브그룹 I과 II를 구분하는데 유용하다고 보고하였다. 그러나 이 실험을 통하여 이들 두 효소의 처리가 서브그룹 IA와 IB는 구분하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 이 실험에서 사용한 *Hind*III의 처리는 서브그룹 IA와 서브그룹 IB를 구별하는데 유용할 것으로 생각되었다.

## 요 약

모자이크 증상의 과꽃(*Callistephus chinensis* L.)으로부터 *Cucumber mosaic virus* (CMV)의 한 계통(Cas-CMV)를 분리하고, Fny-CMV와 As-CMV를 대조로 기주반응, dsRNA, RT-PCR 및 RFLP분석을 통하여 바이러스를 동정하였다. Cas-CMV의 특징적인 기주반응의 차이는 박과 식물에서 발현되는 강한 병징이었으며, 특히 추키니호박에 접종하였을 때에는 접종 15-20일 후에 심한 모자이크 증상과 함께 어린 식물이 고사되는 괴저현상을 나타냈다. DsRNA분석과 RT-PCR실험의 결과는 Cas-CMV가 서브그룹 I의 CMV에 속하는 것으로 나타났으며, 더욱이 *Hind*III를 이용한 RFLP 분석은 Cas-CMV가 서브그룹 IA로 구분되었다.

## 감사의 글

이 연구는 2008년도 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20080401034055)의 지원으로 수행된 결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

## 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.

Choi, S. K., Ahn, H. I., Kim, S. J., Choi, J. K. and Ryu, K. H. 2004. Symptom determinant as RNA3 of lily isolates of *Cucumber mosaic virus* on zucchini squash. *Plant Pathol. J.* 20: 212-219.  
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.  
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.  
小峯康雄, 明日山秀文. 1958. キュウリモザイク病ウイルスに関する研究. (III) 寄主範囲. 日植病報 23: 235-239.  
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. and Palukaitis, P. 1990. Rapid induction and severity of symptoms in zucchini squash(*Cucurbita pepo*) map to RNA1 of cucumber mosaic virus. *MPMI* 3: 188-192.  
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.  
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.  
Tomlinson, J. A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110: 661-681.  
Wang, W. Q., Natsuaki, T., Okuda, S. and Teranaka, M. 1988. Comparison of Cucumber mosaic virus isolates by double-strand RNA analysis. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 536-539.  
White, J. L., Tousignant, M. E., Geletka, L. M. and Kaper, J. M. 1995. The replication of a necrogenic cucumber mosaic virus satellite is temperature-sensitive in tomato. *Arch. Virol.* 140: 53-63.