

## 열무에서 분리한 오이모자이크바이러스 분리주의 특성

이선주 · 홍진성<sup>1</sup> · 최장경<sup>2</sup> · 김은지 · 이금표\*

중앙대학교 식물시스템과학과, <sup>1</sup>서울여자대학교 자연과학연구소, <sup>2</sup>강원대학교 응용생물학과

### Characterization of an Isolate of *Cucumber mosaic virus* from *Raphanus sativus* L.

Sun Ju Rhee, Jin Sung Hong<sup>1</sup>, Jang Kyung Choi<sup>2</sup>, Eun Ji Kim and Gung Pyo Lee\*

Department of Integrative Plant Sciences, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea

<sup>1</sup>Institute of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

<sup>2</sup>Department of Applied Biology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

(Received on June 22, 2011; Revised on July 12, 2011; Accepted on July 12, 2011)

*Cucumber mosaic virus* (CMV)-like isolate was collected from *Raphanus sativus* (cv. Choon-hyang), which showed mosaic symptoms. The isolate was confirmed to a strain of CMV by host responses in *Vigna unguiculata*, *Chenopodium amaranticolor* and *Gomphrena globosa*, by viral genome composition with RT-PCR and PCR-RFLP, and by serological analysis. Symptom developed by the strain of CMV was severe in *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* (cv. Samsun, cv. Xanthi), *Cucumis melo* (cv. Early hanover), *Cucumis sativus* (cv. White wonder), *Capsicum annuum* (cv. Chung-yang and cv. Geum-top), but mild symptom was developed in *Raphanus sativus* (cv. Choon-hyang), *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (cv. Bul-Am No. 3), and *B. juncea* (cv. Daenong Jukgot). Newly isolated strain of CMV could infect diverse crops including *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* and *Brassicaceae*. We designated the new strain of CMV as Gn-CMV based on the novel infectivity of *Brassicaceae*. In double-stranded (ds) RNA analysis, Gn-CMV consisted of 3.3, 3.0, and 2.2 kb genomes likewise other strains of CMV. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed 28 kDa of the CMV coat protein. By restriction enzyme mapping using *Cac8I*, *ClaI* and *MspI* of RT-PCR products indicated that Gn-CMV belongs to CMV subgroup I.

**Keywords :** dsRNA, Host range analysis, PCR-RFLP, RT-PCR, SDS-PAGE

*Cucumber mosaic virus*(CMV)는 *Bromoviridae Cucumovirus*에 속하며, 직경 29 nm의 구형으로 되어 있고, 박과, 가지과 등 85개과의 1000종 이상의 넓은 기주범위를 갖는다(Palukaitis 등, 1992). 전 세계적으로 널리 분포하고 많은 종류의 작물에 피해를 주고 있는 CMV는 채소나 화훼에서는 가장 중요한 바이러스병의 병원이다(Tomlinson, 1987). CMV는 계놈 분자의 크기에 따라 RNA1, 2, 3의 분절된 genome을 가지며(Palukaitis 등, 1992), 서브계놈 RNA(RNA 4)를 포함하고 있다. CMV는 계통에 따라서는 satellite RNA를 함께 갖고 있는 CMV도 있다(Gould 등, 1978). 세계적으로 많은 계통과 분리주가 보고되어 있

는 CMV는 기주 반응의 특성과 혈청학적 성질, 외피단백질의 peptide 서열과 ELISA 분석, RT-PCR을 이용한 외피단백질 유전자의 제한효소 절단패턴 분석 등에 따라 subgroup I과 II로 구분된다(Choi 등, 1998; Owen과 Palukaitis, 1988). 또한 RNA3의 외피단백질 유전자와 5' 비번역 부위를 통하여 subgroup IA와 IB로 구분하고 있다(Roossinck 등, 1999).

무, 배추 등 십자화과 식물에 감염하고 있는 바이러스로는 대표적으로 Potyvirus 속의 *Turnip mosaic virus*(TuMV)가 보고되어 있으며(Tomlinson 등, 1970), Tobamovirus속의 *Ribgrass mosaic virus*(RMV; Wang 등, 1997), *Turnip vein clearing virus*(TVCV; Lartey 등, 1993), Cr-TMV (Dorokhov 등, 1994), *Chinese rape mosaic virus*(CRMV; Aguilar 등, 1996), TMV-Cg(Yamanaka 등, 1998) 등이 보

\*Corresponding author

Phone) +82-31-670-3039, Fax) +82-31-676-6714

Email) gplee@cau.ac.kr

고되어 있다. 본 연구는 2008년 강원도 강릉시 외곽지역의 텃밭에 재식되어 있는 열무(*Raphanus sativus* L.)에서 모자이크 병징을 나타내는 잎을 채집하여 단일 바이러스를 분리하고, 이를 여러 가지 검정 실험을 통하여 새로운 계통의 CMV로 동정하였고, 그 특성을 보고하고자 한다.

**바이러스의 분리.** 모자이크 증상을 보이는 열무의 잎을 채취하여 0.01 M의 인산완충액(pH 7.0)으로 마쇄하여 *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*와 *Nicotiana benthamiana*에 접종하였다. 접종 7일 후 전신 감염된 *N. benthamiana*를 *C. amaranticolor*에 접종한 후, 단일국부병반을 2회 분리하여 *N. benthamiana*에 접종하여 증식하여 공시 바이러스원으로 사용하였다. 이병엽에서 다음과 같은 방법으로 total RNA를 추출하였다. 약 0.4 g의 감염 잎을 액체질소로 동결시켜 마쇄한 후 RNA 추출 buffer(10% sodium dodecylsulfate(SDS), 0.5 M EDTA, 1 M Tris (pH8.0),  $\beta$ -mercaptoethanol) 800  $\mu$ l와 phenol 800  $\mu$ l를 첨가하고 상온에서 5분간 정치시켰다. 반응액은 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 상등액 700  $\mu$ l를 취하였다. 여기에 동량의 PCI(phenol: chloroform: isoamyl alcohol = 10: 49: 1, v/v/v) 분주 후 vortexing하였고 5분간 상온에서 정치시켰다. 이를 12,000 rpm, 4°C, 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였고 이 과정을 2회 반복했다. 이 상등액에 동량의 chloroform을 첨가한 후 15초 교반하여 원심 분리한 후 상등액을 취하고, 동량의 isopropanol 을 첨가하여 15분간 상온에서 반응시켰다. 이를 원심분리 한 후 75% ethanol 1 ml 첨가하여 수세한 뒤 0.1% DEPC water 30  $\mu$ l에 녹여서 바이러스 검정에 사용하였다. 바이러스의 검정은 Chen 등(2007)이 제시한 CMV-specific primer set을 이용한 RT-PCR을 통하여 CMV임을 확인하였으며, CMV의 대표적인 검정식물인 *Vigna unguiculata*, *C. amaranticolor*와 *G. globosa*에의 반응, 혈청학적 분석 등을 통하여 분리한 바이러스가 CMV의 한 계통임을 판단할 수 있었다. 이 논문에서는 열무에서 분리한 CMV 분리주를 Gn-CMV로 명명하여 이하 실험에 사용하였다. 또한 *N. benthamiana*에 증식시켜 보관중인 Y-CMV와 Pf-CMV를 대조바이러스로 공시하였다.

**기주식물 반응 및 병징특성.** Gn-CMV에 대한 기주범위 및 접종엽과 상엽의 병징에 관한 실험결과를 Table 1에 정리하였다. 채집한 열무의 잎을 마쇄하여 접종하였을 때, *C. amaranticolor*에서 국부병반을 확인하였으며, 접종 5일 쯤부터 *N. benthamiana*에서 전형적인 모자이크 병징이 나타났다. 분리된 Gn-CMV를 증식시킨 *N. benthamiana*의 감염잎을 다양한 지표식물에 즙액 접종하였다. 그 결과 *N. benthamiana*와 *N. glutinosa*, *N. tabacum*의 접종 상

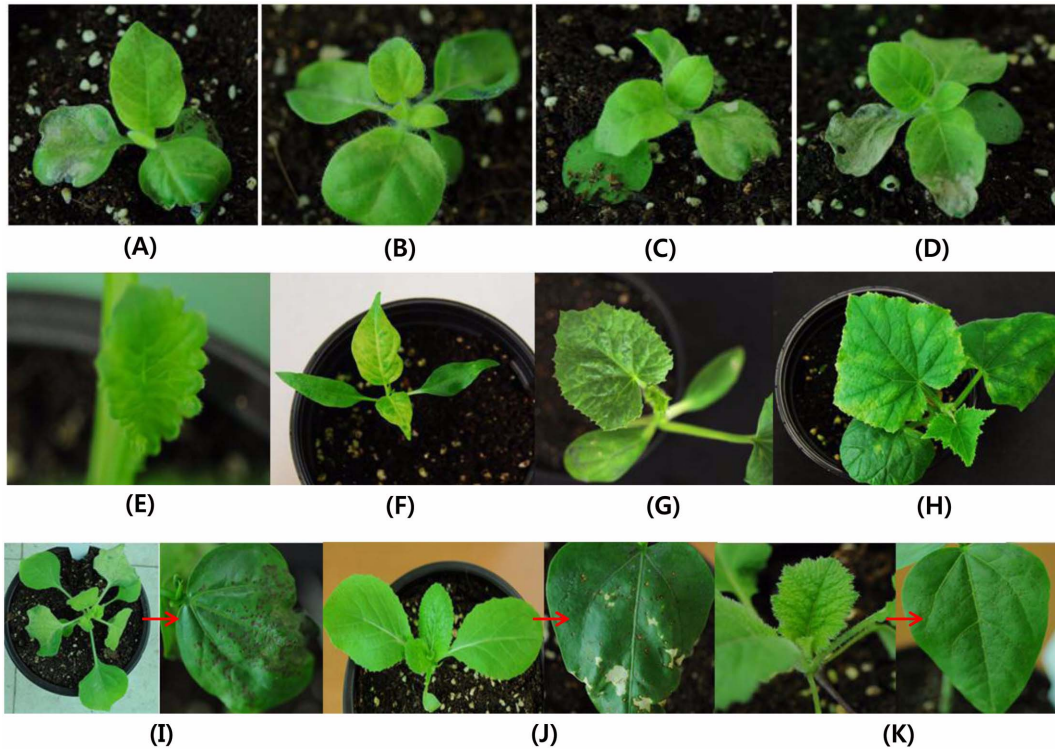
**Table 1.** Reaction of indicator plants by mechanical inoculation of the Gn-CMV

Host plants	Symptoms <sup>a</sup>		
	Gn-CMV	Y-CMV	Pf-CMV
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/M(yM)	-/yM	-/M
<i>N. tabacum</i> 'Xanthi-nc'	-/yM	-/yM	-/M
<i>N. glutinosa</i>	-/yM	-/yM	-/M
<i>Capsicum annuum</i> 'Geum-top'	-/M	-/M	-/M
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L/-	L/-	L/-
<i>Vigna unguiculata</i>	L/-	L/-	L/-
<i>Gomphrena globosa</i>	L/M	L/M	L/M
<i>Raphanus sativus</i> 'Choon-hyang'	-/mM	-/-	-/-
<i>Brassica juncea</i> 'Daenong Jukgot'	-/mM	-/-	-/-
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> 'Bul-Am No. 3'	-/mM	-/-	-/-
<i>Cucumis sativus</i> 'White wonder'	-/M	-/M	-/M
<i>Cucumis melo</i> 'Early hanover'	-/M	-/M	-/M

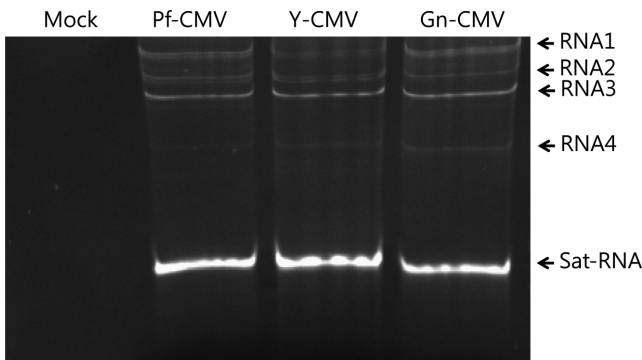
<sup>a</sup>Inoculated leaf/upper leaf, M: mosaic, mM: mild mosaic, yM: yellow mosaic, L: local lesion, -: symptomless or not infected.

위엽에서 약간의 황백화 현상과 함께 전형적인 모자이크 병징이 나타났으며, 고추, 오이, 멜론에서 역시 접종 후 7일 이내에 상위엽에서 강한 모자이크의 병징을 확인할 수 있었다. 열무에서는 약한 모자이크 병징을 보였고, 배추와 적갓에서는 뚜렷한 병징을 나타내지는 않았으나, 상엽의 즙액을 국부병반 기주인 동부에 접종하였을 때, 접종 후 1일째 국부병반이 나타남으로서 Gn-CMV의 배추와 적갓에 무병징 감염되고 있음을 판별할 수 있었다 (Fig. 1). 또한 CMV 특이 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 병징 발현을 확인하기 어려운 기주에 대한 Gn-CMV의 감염성을 확인하였다. Gn-CMV의 경우 기주 식물 반응 및 병징특성을 보았을 때 일반적인 CMV의 기주범위를 갖고 있으면서 동시에 십자화과 식물에서는 병징이 거의 없이 바이러스의 증식이 이루어지고 있는 특성을 보였다.

**Ds-RNA 및 외피단백질 분석.** 열무에서 분리한 Gn-CMV의 계통 및 계놈 RNA에 대한 분자크기 및 종류를 알아보기 위하여 Y-CMV 및 Pf-CMV에 감염된 *N. benthamiana*의 잎으로부터 Morris와 Dodds(1979)의 방법으로 이중가닥 RNA(double stranded RNA: dsRNA)를 추출하였다. 추출된 dsRNA를 native polyacrylamide gel에서 전기영동하여 확인한 결과 대조구인 Y-CMV, Pf-CMV와 마찬가지로 3종류의 계놈 RNA와 satellite RNA를 확인할 수 있었다 (Fig. 2). DsRNA의 패턴으로 보아 Gn-CMV가 대조 CMV와 마찬가지로 satellite RNA를 포함하는 CMV의 한 계



**Fig. 1.** Symptoms on host plants by mechanical inoculation of Gn-CMV isolated from *Raphanus sativus*. (A) *N. tabacum* (cv. Samsun), (B) *N. glutinosa*, (C) *N. tabacum* (cv. Xanthi), (D) *N. tabacum* (cv. Xanthi-nc), (E) *Raphanus sativus* (cv. Choon-hyang), (F) *Capsicum annuum* (cv. Geum-top), (G) *Cucumis melo* (cv. Early hanover), (H) *Cucumis sativus* (cv. White wonder), and (I) to (K) local lesions on *V. unguiculata* inoculated with the sap of Gn-CMV inoculated *N. benthamiana*, *B. rapa* ssp. *pekinensis* (cv. Bul-Am No. 3), and *B. juncea* (cv. Daenong Jeokgot), respectively. Arrow indicates sap inoculation.

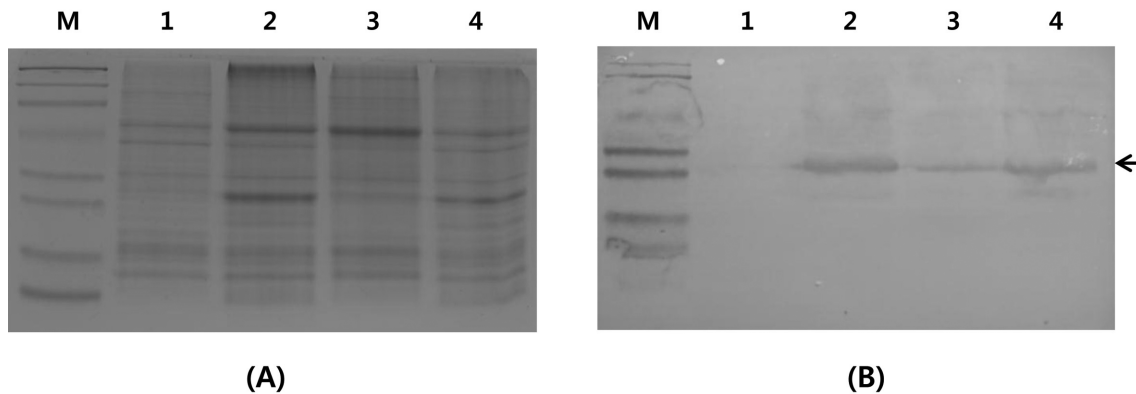


**Fig. 2.** Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA isolated from *N. benthamiana* infected with Gn-CMV, Y-CMV and Pf-CMV, respectively. Mock: inoculation with 0.05 M phosphate buffer. Aliquot of dsRNA purified by CF-11 cellulose is electrophoresed in 6% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide.

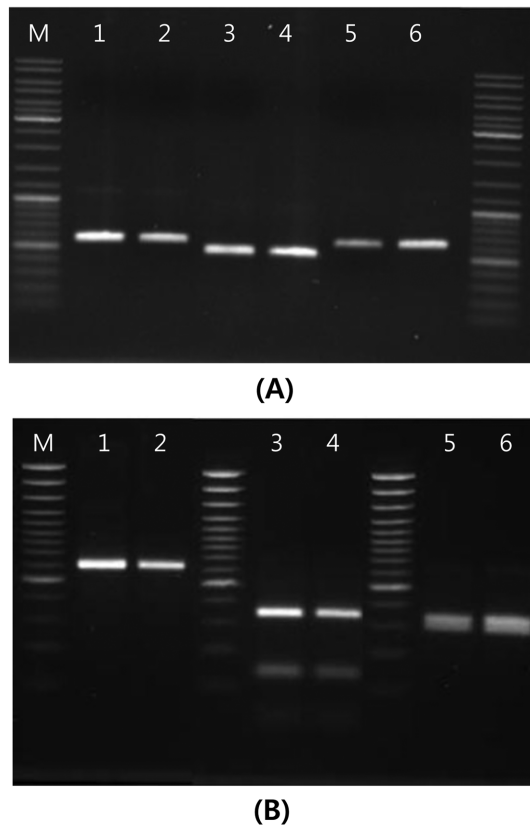
통임을 확인할 수 있었으며, 이는 바이러스의 감염여부와 분절계놈을 갖고 있는 바이러스를 간편하게 확인할 수 있는 유용한 수단으로써 이용될 수 있다는 보고(Dodds, 1993)와 일치하며, satellite RNA 존재 여부를 쉽게 판단할 수 있을 것으로 판단되었다. 특히 기주식물 반응에서 황화증

상을 보이는 기주의 경우 직접적인 관련성은 확인되지 않았으나 satellite RNA가 기주의 병징변화에 영향을 미친다는 기존의 보고(Choi 등, 2001)를 통하여 satellite RNA에 의한 병징의 변화로 예상되었다. 한편 Gn-CMV의 외피단백질의 특성을 확인하기 위해 바이러스가 감염된 *N. benthamiana*로부터 단백질을 추출한 후 CMV 항혈청(anti-CMV)를 사용하여 Western blot 분석을 실시하였다. 그 결과 Gn-CMV, Y-CMV 및 Pf-CMV 모두 CMV의 외피단백질 크기인 약 28 kDa 분자량을 갖는 밴드가 확인되었다(Fig. 3). 이들 결과를 통하여 열무로부터 분리된 바이러스는 CMV의 한 계통으로 동정되었다.

**RT-PCR 및 제한효소지도분석.** Gn-CMV의 감염 여부와 특성을 확인하기 위하여 RT-PCR과 제한효소절단 패턴(RFLP) 분석을 실시하였다. 우선 RT-PCR에 사용된 primer는 Chen 등(2007)의 논문을 참고하여 제작하였고, 수행조건은 다음과 같다. cDNA 2 µl, rTaq buffer(10x) 5 µl, dNTP(2.5 mM) 2 µl, primer(10 pmol) 1 µl, rTaq 1 µl 첨가한 뒤 멸균된 증류수로 최종반응액 50 µl로 하였다. PCR 반응은 94°C 5분, 94°C 30초, 56°C 40초, 72°C 50초, 72°C 10분 35 cycles 반응조건으로 증폭하였다. 증폭시킨 PCR



**Fig. 3.** SDS-PAGE and Western blot of *N. benthamiana* inoculated with Gn-CMV, Y-CMV, and Pf-CMV. (A) Total proteins were analyzed by electrophoresis on a 12% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue, (B) Western blotting using an antiserum to Fny-CMV. Lane 1: mock-inoculated, lane 2: Gn-CMV, lane 3: Y-CMV, lane 4: Pf-CMV, and lane M: molecular weight marker. Arrow indicates 28 kDa of coat protein.



**Fig. 4.** CMV detection and PCR-RFLP analysis from the RT-PCR products of CMV-infected *N. benthamiana*. (A) RT-PCR detection using CMV RNA1, 2, and 3 specific primers. Lane 1 and 2: 600 bp fragment of RNA1, lane 3 and 4: 510 bp fragment of RNA2, and lane 5 and 6: 625 fragment of RNA3. (B) Restriction pattern of three strains of CMV on 3% agarose gel. Each RT-PCR product of RNA 1, 2, and 3 of CMV was digested by *Cac8I*, *Clal*, and *MspI*, respectively. Lane 1, 3, and 5: RNA1, 2, and 3 of Gn-CMV, lane 2, 4, and 6: RNA1, 2, and 3 of Y-CMV, respectively.

반응산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였고 RNA1, RNA2와 RNA3는 각각 *CaC8I*, *Clal* 그리고 *MspI*를 이용하여 Gn-CMV의 subgroup을 확인하였다. Chen 등(2007)이 제시한 CMV 검정 프라이머와 서브그룹을 확인할 수 있는 제한효소절단패턴 분석을 통하여 Gn-CMV를 동정하고자 하였다. RT-PCR 결과 Gn-CMV RNA1은 600 bp, RNA2는 510 bp, RNA3는 625 bp의 밴드가 각각 증폭되었으며, 이를 각각 *CaC8I*, *Clal*, *MspI*으로 절단하여 분석한 결과 RNA1은 600 bp, RNA2는 40, 130, 430 bp, RNA3는 290, 335 bp의 절단 패턴을 나타내었다(Fig. 4). 분절계놈을 갖고 있는 Gn-CMV의 RNA1, RNA2, RNA3 모두 subgroup I으로 분류됨을 확인하였다. 특히 분절계놈을 갖는 바이러스는 조건에 따라 서로 재조합하는 경우가 있어 이를 구분하기 위해서는 각각의 RNA에 대한 염기서열을 결정하여 분석해야 하는 번거로움이 있는데 이들 각 계놈 영역에 대한 PCR-RFLP 분석은 CMV의 각 계놈이 재조합 형태인지를 구분하고 CMV의 서브그룹을 결정하는데 있어 간편하게 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

## 요 약

모자이크증상을 나타내는 열무로부터 *Cucumber mosaic virus*의 한 계통을 분리하고 특성을 조사하였다. *Vigna unguiculata*, *Chenopodium amaranticolor* and *Gomphrena globosa*에서 분리 바이러스의 기주반응과 dsRNA 분석, RT-PCR 검정, PCR-RFLP, 혈청학적 분석을 통하여 CMV의 한 계통임을 확인하였다. 이 CMV 계통을 다양한 지표식물에 접종하였을 때, *Nicotiana benthamiana*와 *N. glutinosa*, *N. tabacum*, 고추, 오이 그리고 멜론에서는 전

형적인 강한 모자이크 병징이 나타났으나, 열무, 배추, 적갓은 매우 약한 병징을 나타내는 특징을 보였다. 새롭게 분리된 CMV 계통은 가지과, 박과 및 배추과 등 광범위한 작물에 감염성을 나타내었으며, 배추과에서의 감염성 차이를 근거로 Gn-CMV로 명명하였다. Double-stranded (ds) RNA를 분리한 분석에서 Gn-CMV는 기 보고된 CMV 계통과 마찬가지로 3.3, 3.0, 그리고 2.2 kb의 독립된 계놈으로 구성되어 있었으며, SDS-PAGE와 Western blotting 분석으로 통하여 28 kDa의 외피단백질을 확인할 수 있었다. RT-PCR로 얻어진 증폭산물을 *Cac8I*, *ClaI* and *MspI*을 이용한 PCR-RFLP를 통하여 CMV subgroup I임을 확인할 수 있었다.

### Acknowledgement

This work was supported by a grant from the BioGreen 21 Program (No. PJ006996), Rural Development Administration, Republic of Korea.

### 참고문헌

- Aguilar, I., Sanchez, F., Martin-Martin, A., Martinez-Herrera, D. and Ponz, F. 1996. Nucleotide sequence of *Chinese rape mosaic virus* (oilseed rape mosaic virus), a crucifer tobamovirus infectious on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 30: 191–197.
- Chen, Y., Chen, J., Zhang, H., Tang, X. and Du, Z. 2007. Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between *Cucumber mosaic virus* subgroup IA and II strains. *Virus Genes* 35: 405–413.
- 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, J. K., Sung, M. Y., Jung, H. J., Hong, J. S. and Lee, S. Y. 2001. Cross protection effectiveness of *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates associated with satellite RNA for prevention of CMV disease in pepper plants. *Res. Plant Dis.* 7: 155–163.
- 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.
- Dorokhov, Y. L., Ivanov, P. A., Novikov, V. K., Agranovsky, A. A., Morozov, S. Y., Efimov, V. A., Casper, R. and Atabekov, J. G. 1994. Complete nucleotide sequence and genome organization of a tobamovirus infecting cruciferae plants. *FEBS Lett.* 350: 5–8.
- Gould, A. R. and Symons, R. H. 1978. *Alfalfa mosaic virus* RNA. Determination of the sequence homology between the four RNA species and a comparison with the four RNA species of *Cucumber mosaic virus*. *Eur. J. Biochem.* 4: 3787–3802.
- Lartey, R. T., Hartson, S. D., Pennington, R. E., Sherwood, J. L. and Melcher, U. 1993. Occurrence of a vein-clearing tobamovirus in turnip. *Plant Dis.* 77: 21–24.
- 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.
- 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 radialevolution of three subgroups. *J. Virol.* 73: 6752–6758.
- Tomlinson, J. A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110: 661–681.
- Tomlinson, J. A., Carter, A. L., Dale, W. T. and Simpsons, C. J. 1970. Weed plants as sources of cucumber mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 66: 11–16.
- Wang, H., Culver, J. N. and Stubbs, G. R. T. 1997. Structure of *Ribgrass mosaic virus* at 2.9 Å resolution.: evolution and taxonomy of tobamoviruses. *J. Mol. Biol.* 269: 769–779.
- Yamanaka, T., Komatan, H., Meshi, T., Naito, S., Ishikawa, M. and Ohno, T. 1998. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of *Tobacco mosaic virus* strain Cg. *Virus Genes* 16: 173–176.