

## 국내 토끼풀에서 분리한 *Cucumber mosaic virus*의 특성

# Characterization of *Cucumber mosaic virus* Isolated from *Trifolium repens* in Korea

박태선<sup>1</sup> · 최국선<sup>2</sup> · 홍진성<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 생물자원과학부, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과

### \*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6437  
Fax: +82-33-259-5558  
E-mail: jinsunghong@kangwon.ac.kr

Tae Seon Park<sup>1</sup>, Gug Seoun Choi<sup>2</sup>, and Jin Sung Hong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Bioresource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

<sup>2</sup>Department of Horticultural Environment, National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

A *Cucumber mosaic virus* (named CMV-Tr1) isolated from the white clover (*Trifolium repens*) showing mosaic and malformation that found in a pepper field. *Cucumber mosaic virus* was identified through confirmation with PT-PCR, PCR-restriction fragment length polymorphism, and sequence analysis of coat protein (CP) gene. CMV-Tr1 mosaic symptom on the upper leaves of five tobacco species including *Nicotiana benthamiana*, *Cucumis sativus*, *Physalis angulata*, and *Solanum lycopersicon*. In *Chenopodium quinoa* and *Vigna unguiculata* the isolate showed local lesions in inoculated leaves. CMV-Tr1 compared with CMV-As in the sequence identity of CP gene. CMV-Tr1 showed 98.9% and 99.5% homologies at nucleotide and amino acid levels, respectively. Phylogenetic analysis of the CP gene indicated that CMV-Tr1 belongs to the CMV subgroup IB base on the CP. To our knowledge, this is the first report of CMV in *T. repens* in Korea.

**Keywords:** *Cucumber mosaic virus*, RT-PCR, Subgroup, *Trifolium repens*

Received October 12, 2015  
Revised November 8, 2015  
Accepted January 7, 2016

*Cucumber mosaic virus* (CMV)는 오이에서 최초로 보고되었으며(Doolittle, 1916; Jagger, 1916), 85개 과(family) 1,000여 종(species)의 매우 넓은 기주 범위를 가지고 있는 바이러스이다(Choi 등, 1990; Flasiniski 등, 1995; Kim 등, 1981; Palukaitis 등, 1992). CMV는 3개의 계통과 2개의 서브계통을 가지며(Palukaitis 등, 1992), 다양한 식물에서 발견되는 만큼 계통 또는 분리주(isolate) 간에도 유전적 다양성이 크다(Owen과 Palukaitis, 1988). CMV는 혈청학적 유연관계 및 염기서열의 차이에 따라 subgroup I과 subgroup II로 구분되며(Owen과 Palukaitis, 1988), subgroup I 계통의 CMV의 경우 그룹 내부에

서도 염기서열의 차이에 따라 subgroup IA와 subgroup IB로 세분화하기도 한다(Roossinck 등, 1999). 국내의 경우 2007년부터 2011년까지 5년간 주요작물 바이러스병 검정 비율을 분석한 결과 CMV가 가장 높은 검정률을 나타내어 농가에 피해를 끼치는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2012).

토끼풀(*Trifolium repens*)은 우리나라 전체에 걸쳐 자생하는 여러해살이 콩과 식물로 한약재로 쓰이기도 한다. 토끼풀에는 CMV를 포함한 다양한 바이러스가 감염하는 것으로 보고되어(Flasiniski 등, 1995), 우리나라에는 *Bean yellow mosaic virus*, *Peanut stunt virus* (PSV), *Alfalfa mosaic virus*, *White clover mosaic virus*, *Red clover vein mosaic virus*, *Red clover mosaic virus* 및 *Clover yellow vein virus*가 보고되어있다(Jung 등, 2008; Park 등, 2014; Ryu 등, 1986). 본 연구에서는 최근 춘천 근교에 위치한 고추

### Research in Plant Disease

©The Korean Society of Plant Pathology  
pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

포장 주변에서 모자이크 병징을 보이는 토끼풀로부터 바이러스를 분리하여 검정한 결과 CMV로 동정되어 국내 토끼풀 CMV의 발병을 보고함과 동시에 토끼풀에서 분리된 CMV의 특성을 파악하고자 한다.

**기주식물 반응.** 바이러스에 감염된 것으로 추정되는 토끼풀의 이병주를 채집하여 *Nicotiana benthamiana*와 *N. tabacum* cv. Xanthi nc에 접종하였다. 접종 후 육안관찰을 통해 전신감염한 것으로 판단되는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc의 상엽을 채취하여 동부(*Vigna unguiculata*)에서 단일병반을 분리하였다. *N. benthamiana* 외 3종의 담배(*N. tabacum* cv. Xanthi nc, *N. glutinosa* 및 *N. rustica*)와 오이(*Cucumis sativus* cv. Baekdadagi), 토마토(*Solanum lycopersicum* cv. Prime Alexander) 및 동부 등에 접종한 결과 오이의 상엽에 모자이크 병징을 나타내었고, 동부의 접종엽에서 CMV의 특징적인 병징인 괴사 반점이 관찰되었다(Table 1). 이것은 기존에 토끼풀에서 보고되었던 다른 바이러스종에서는 나타나지 않는 병징으로 *Cucumovirus*속의 다른 바이러스인 PSV의 특성과도 구분되는 CMV의 한 계통으로 추정되었다.

**RT-PCR 및 제한효소지도.** 기주식물 반응을 통해 토끼풀에 감염한 바이러스가 CMV의 계통으로 추정되어 CMV의 외피단백질을 검정하는 특이 프라이머(CMV CP-5: 5'-ATGGACAAATCTGAATCAACC-3', CMV CP-3: 5'-TCA-GACTGGGAGCACTCCAGA-3')를 이용하여 대조구로 서울여대 바이러스은행에서 분양받은 CMV subgroup IA (CMV-Fny)와

subgroup IB (CMV-As)와 함께 RT-PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 전기영동으로 확인한 결과, 대조구로 사용된 CMV-Fny 및 CMV-As의 증폭산물과 크기가 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이를 통해 토끼풀로부터 분리한 바이러스가 CMV의 한 계통으로 확인되어 CMV-Tr1으로 명명하여 이하 실험을 수행하였다. CMV-Tr1의 특성과 계통 분석 위해 *EcoRI*, *HindIII*, *SacI* 등 3가지 제한효소를 사용하여 제한효소지도 분석을 실시하였다(Fig. 2). 그 결과 CMV-Tr1은 *EcoRI*에서만 PCR 산물이 절단되는 것을 확인하였으며, 이것은 CMV subgroup IB 계통의 바이러스들이 갖는 특성과 일치하는 것으로 대조구인 CMV-Fny와 CMV-As를 통해 확인할 수 있었다.

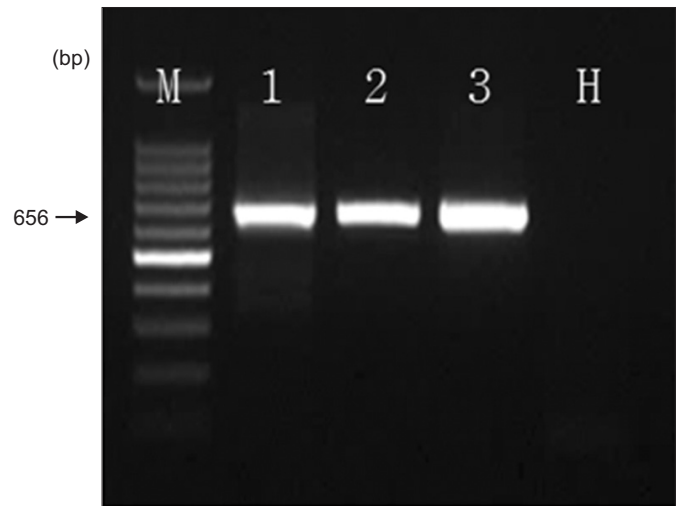
**염기서열 및 계통 분석.** CMV-Tr1의 RNA3에 존재하는 외피단백질(coat protein)의 염기서열을 결정하여 계통분석(MEGA6; Arizona State University, Tempe, AZ, USA)을 실시한 결과 subgroup IB 계통의 바이러스와 가장 유사한 특성을 나타

**Table 1.** Symptomatic reactions of indicator plants to CMV-Tr1

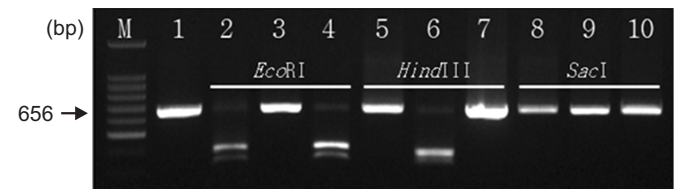
Indicator plant	Symptom*		
	Tr-CMV	Fny-CMV	As-CMV
<i>Chenopodium quinoa</i>	L/-	L/-	L/-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. glutinosa</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. rustica</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	-/M	-/M	-/mM
<i>Cucumis sativus</i> cv. Baekdadagi	-/M	-/M	-/M
<i>Physalis angulata</i>	-/sM	-/M	-/sM
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Prime Alexander	-/M	-/M	-/M
<i>Vigna unguiculata</i>	L/-	L/-	L/-

CMV, *Cucumber mosaic virus*.

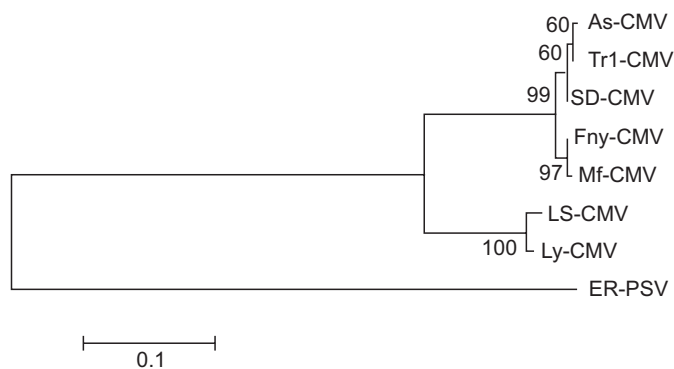
\*Inoculated leaves/upper leaves; L, necrotic local lesion; -, symptomless or not infected; M, mosaic; mM, mild mosaic; sM, severe mosaic.



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR products of CMV-Tr1. M, 100 bp size marker; lane 1, CMV-Tr1; lane 2, CMV-Fny; lane 3, CMV-As; H, healthy control. CMV, *Cucumber mosaic virus*.



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis analysis of and RT-PCR-restriction fragment length polymorphism of CMV-Tr1. M, 100 bp DNA ladder as a size marker; lane 1, uncut; lane 2, 5, and 8, CMV-Tr1; lane 3, 6, and 9, CMV-Fny; lane 4, 7, and 10, CMV-As; lane 2-4, *EcoRI*; lane 5-7, *HindIII*; lane 8-10, *SacI*. CMV, *Cucumber mosaic virus*.



**Fig. 3.** Phylogenetic trees for amino acid sequences of coat protein of many *Cucumber mosaic virus* (CMV) strains. *Peanut stunt virus* (PSV-ER) was used as an outgroup. Sequence sources are as follows: CMV-Fny (D10538), CMV-Mf (AJ276481), CMV-As (AF013291), CMV-SD (AB008777), CMV-Ly (AF198103), CMV-LS (AF127976), and PSV-ER (U15730.1). Phylogenetic trees were bootstrapped using 1,000 replications. Also they were performed employing the maximum likelihood method packaged in the MEGA6 software.

냈다(Fig. 3).

토끼풀에 감염하는 바이러스로 아직까지 국내에서는 보고되지 않았던 CMV-Tr1의 분리를 통해 국내에도 토끼풀에 CMV가 감염하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 여러해살이 풀인 토끼풀에서 CMV와 함께 같은 *Cucumovirus*속의 PSV가 자연 감염으로 인한 월동기주 역할을 할 것으로 예상되었다(Jung 등, 2008; Mink 등, 1969). 따라서 토끼풀에서 분리된 CMV-Tr1을 다른 여러 식물에 대한 기주 실험을 실시하여 다양한 과의 작물에서의 특성을 분석할 필요가 있다.

## 요 약

고추포장 주변의 모자이크 및 기형의 병징을 보이는 토끼풀에서 CMV를 분리하여 CMV-Tr1으로 명명하였다. 토끼풀로부터 RT-PCR, PCR-restriction fragment length polymorphism 및 외피단백질 유전자의 염기서열 분석을 통해 CMV를 동정하였다. 기주식물 반응결과 *N. benthamiana*를 포함한 5종의 담배와 오이, 파리와 토마토의 상업에서 모자이크 병징을 나타내었고, 명아주와 동부에서는 접종염에 국부괴사 병반을 나타냈다. CMV-Tr1의 외피단백질을 CMV-As와 비교한 결과 99.5%의 상동성을 보였으며, 계통분석 결과 CMV subgroup IB에 속하는 CMV의 한 계통으로 확인되었다.

## Acknowledgement

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ01087804)" in Rural Development Administration, Republic of Korea, Basic Science Research Program through the NRF funded by the Ministry of Education (NRF-2014R1A1A2059836) and 2014 Research Grant from Kangwon National University.

## References

- Choi, J. K., Kwon, S. B., Lee, S. Y. and Park, W. M. 1990. Some properties of two isolates of *Cucumber mosaic virus* isolated from *Aster yomena* Makino and *Commelina communis* L. *Korean J. Plant Pathol.* 6: 138-143. (In Korean)
- Doolittle, S. P. 1916. A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology* 6: 145-147.
- Flasinski, S., Scott, S. W., Barnett, O. W. and Sun, C. 1995. Diseases of Peperomia, Impatiens, and Hibbertia caused by *Cucumber mosaic virus*. *Plant Dis.* 79: 843-848.
- Jagger, I. C. 1916. Experiments with cucumber mosaic disease. *Phytopathology* 6: 148-151.
- Jung, G. H., Jeon, Y. W., Choi, J. K., Hong, J. S., Ryu, K. H. and Lee, S. Y. 2008. Some properties of an isolate of *Peanut stunt virus* isolated from white clover (*Trifolium repens* L.). *Res. Plant Dis.* 14: 71-75. (In Korean)
- Kim, J. S., Kim, H. B. and Lee, S. H. 1981. Isolation and properties of *Cucumber mosaic virus* including mosaic symptoms in *Hippeastrum hybridum* hort. *Korean J. Plant Prot.* 20: 76-82. (In Korean)
- Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, H. S., Kim, M. K., Kwak, H. R., Kim, J. S., Nam, M., Cho, J. D., Cho, I. S. and Choi, G. S. 2012. 2007-2011 Characteristic of plant virus infections on crop samples submitted from agricultural places. *Res. Plant Dis.* 18: 277-289. (In Korean)
- Mink, G. I., Silbernagel, M. J. and Saksena, K. N. 1969. Host range, purification, and properties of the western strain of *Peanut stunt virus*. *Phytopathology* 59: 1625-1631.
- Owen, J. and Palukaitis, P. 1988. Characterization of *Cucumber mosaic virus*. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francki, R. I. 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.* 41: 281-348.
- Park, C. Y., Lee, M. A., Baek, D. S., Moon, N., Bae, Y. S., Park, E. H., Won, D. Y. and Lee, S. H. 2014. Characterization of *Clover yellow vein virus* (CIYVV) isolated from white clover in Korea. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium & The 2014 KSPP Fall Meeting on Plant Pathology, Busan, Korea. 198 pp.
- 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.  
Ryu, G. H., Lee, S. H. and La, Y. J. 1986. Identification of *Bean yellow*

*mosaic virus* from *Trifolium repens*. *Korean J. Plant Pathol.* 2: 48-52. (In Korean)