식물병연구

Res. Plant Dis. 24(2): 170-173 (2018)

Note | Open Access

https://doi.org/10.5423/RPD.2018.24.2.170

국내 닭의장풀에서 분리된 오이모자이크바이러스 분리주들의 외피단백질 유전자와 병징 다양성 비교

Comparative Analysis of Genetic Variation of *Cucumber Mosaic Virus* from *Commelina communis* in Korea

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

박태선 · 홍진성*

강원대학교 생물자원과학부

Tae-Seon Park and Jin-Sung Hong*

Department of Applied Biology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Received June 18, 2018
Revised June 25, 2018
Accepted June 25, 2018

Three isolates of *Cucumber mosaic virus* isolated from *Commelina communis* plants showing chlorosis and mosaic were collected in Chungju and Chuncheon, Korea. To confirm genetic variation of these three isolates (CMV-Co, CMV-Co2, and CMV-Co3), we performed PCR-RFLP and sequence analysis. Sequences of coat protein genes of CMV-C0, -Co2 and -Co3 were compared with CMV-Fny and showed 96.3%, 96.3%, and 95.9% similarities, respectively. In host reactions, three CMV-Co isolates induced systemic necrosis in *Cucurbita pepo* unlike CMV-Fny and CMV-Co, CMV-Co2 and CMV-Co3 observed differential symptoms responses in *Physalis angulata* and *Nicotiana rustica*. These results indicated that three isolates of CMV isolated from *C. communis* have genetic and biological variation.

Keywords: Coat protein gene, *Commelina communis*, *Cucumber mosaic virus*, Genetic variation

국내에서 약용식물로 이용되고 있는 닭의장풀은 닭의장풀과에 속하는 식물로 닭의장풀에 감염하는 바이러스로는 *Cucumber mosaic virus* (CMV)와 *Brome mosaic virus* (BMV)가 알려져 있지만, 국내의 경우 CMV의 감염만 보고되었다(Choi 등, 1990; Valverde, 1983).

CMV는 Bromoviridae의 Cucumovirus genus에 속하는 바이러스로 85과 1,000종 이상의 매우 넓은 기주범위를 가지는 식물병원성 바이러스이다(Palukaitis 등, 1992). CMV는 광범위한 기주범위를 바탕으로 종 내의 유전적 다양성이 크기 때문에 혈청학적 유연관계 및 외피단백질의 염기서열을 바탕으로 한 RT-PCR 및 제한효소 절단패턴 분석 등에 따라 subgroup I과 II로 구분된다(Choi 등, 1999; Owen과 Palukaitis, 1988; Wahyuni 등, 1992). 또한 CMV subgroup I은 RNA3의 5' 비번역 영역과 외피단백질 유전자를 바탕으로 subroup IA와 IB 그룹으로 세분화하였다(Roossinck 등, 1999). CMV는 3개의 분절 게놈(RNA1, 2, 3)과 2개의 서브게놈(RNA 4A와 RNA4)을 가지고 있다. RNA1과 RNA2는 바이러스의 복제효소복합체인 1a와 2a 단백질을 암호화하고 있으며, RNA3는 이동단백질(MP)과 외피단백질(CP)을 암호화하고 있다(Palukaitis와 Garcia-Arenal, 2003; Suzuki 등, 1991).

몇몇 연구결과에 따르면, 동일한 종으로부터 분리된 CMV의 계통간에도 유전적 다양성이 나타날 수 있다고 보고하였다(Kim 등, 2014; Hong 등, 2009). 과거 국내의 춘천에서 닭의장풀에 감염하는 CMV의 보고(Choi 등, 1990) 이후에 추가적으로

Research in Plant Disease
pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191
www.online-rpd.org

ⓒ The Korean Society of Plant Pathology
ⓒ This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Reaction on indicator plants by mechanical inoculation of CMV-Co, CMV-Co2, and CMV-Co3

Indicator plants	Symptoms*			
	Co-CMV	Co2-CMV	Co3-CMV	Fny-CMV
Capsicum annuum cv. Cheongyang	-/sM	-/M	-/M	-/M
Chenopodium amaranticolor	L/-	L/-	L/-	L/-
Cucumis sativus	-/M	-/M	-/M	-/M
Cucurbita pepo	L/N	L/N	L/N, sM	CS/M
Nicotiana benthamiana	-/sM	-/M	-/mM	-/M
Nicotiana glutinosa	-/M	-/M	-/mM	-/M
Nicotiana rustica	WRS/M	WRS/M	L/sM	-/M
Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc	-/M	-/mM	WRS/mM	-/M
Perilla frutescens	-/M	-/M	-/M	-/M
Physalis angulata	L/M	-/M	-/mM	-/M

*Inoculated leaves/upper leaves; M, Mosaic; mM, mild Mosaic; sM, severe Mosaic; N, Necrosis; WRS, White ring spot; L, Necrotic local lesion; -, Symptomless or not infected. Fny-CMV as control

2017년 충청북도 충주와 강원도 춘천에서 바이러스 병징으로 보이는 닭의장풀을 발견하여 원인 병원체를 분리 및 동정하였다. 본 연구는 닭의장풀로부터 분리된 CMV 간의 유전적 및 병원학적 다양성을 확인하고자 하였다.

기주식물 반응. 닭의장풀에서 분리한 CMV 분리주(CMV-Co, CMV-Co2, CMV-Co3)의 생물학적 특성 분석을 위하여 기존에 알려진 CMV-Fny를 대조군으로 하여 기주식물에 접종 후 그 반응을 관찰하였다. 그 결과 *Cucumis sativus, Perilla frutescens, Capsicum annuum, Nicotiana benthamiana* 및 *N. glutinosa*에서 대조바이러스인 CMV-Fny와 유사한 반응을 나타냈다(Table 1).

CMV-Fny와 달리 닭의장풀 분리주들의 경우 *Cucurbita pepo*에서 특이적으로 전신 괴사병징 유도하였다(Table 1). 특히 CMV-Co는 특징적으로 *Physalis angulata*에서 접종엽에 괴사반응의 병징을 나타냈다(Table 1). CMV-Co와 CMV-Co2 분리주는 *N. rustica*에서 접종엽에 흰색원형괴사 병징과 함께 전신에서 모자이크 병징이 나타난 반면, CMV-Co3는 접종엽에 사반응과 전신에서 더욱 심한 모자이크 병징의 특성을 보였다(Table 1).

RT-PCR 및 제한효소지도. 바이러스의 검정과 유전적 특성을 파악하기위해 CMV의 외피단백질 영역을 포함하는 cucumovirus genus-specific 프라이머를 이용하여 RT-PCR 검정을 수행하였다(Choi 등, 1999). 두 지역의 *C. communis*로부터 분리된 바이러스는 CMV의 예상된 950 bp의 밴드를 나타내었다. 바이러스의 유전적 특성을 조사하기 위해 증폭된 RT-PCR 산물에 대해 *Eco*RI과 *Hind*III를 통한 restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 분석을 실시하였다. 그 결과 닭의장풀에서 분리한 바이러스는 CMV의 계통들로 확인되었다(Fig. 1). 또한 CMV-Co와 CMV-Co2는 CMV내의 subgroup IA와 유사하였으며, CMV-Co3는 subgroup IB와 같은 그룹에 속하는 것을 나타내었다. 이 결과로 볼 때 닭의장풀에 감염하는 CMV 분리주간에는 유전적 다양성이 존재하고 있다는 것을 추정 할 수 있었다(Fig. 1).

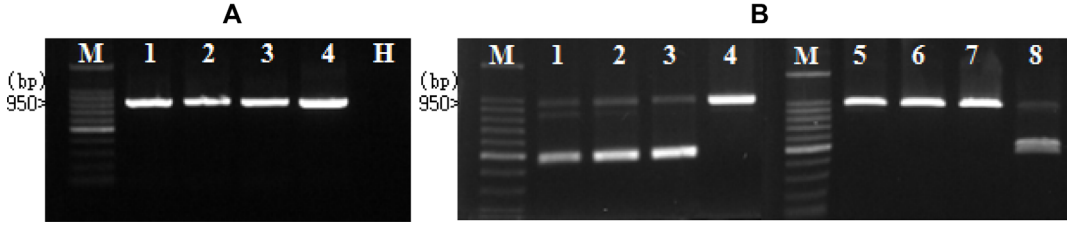

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR (A) and PCR-RFLP analysis (B) of CMV isolates from *Commelina communis*. Lane 1, CMV-Fny; lane 2, CMV-Co; lane 3, CMV-CO2; lane 4, CMV-CO3; H, Healthy control; M, size marker (100bp DNA ladder). Restriction pattern of three CMV on 1.2% Agrarose gel. Lanes 1 and 5, CMV-Fny; lanes 2 and 6, CMV-Co; lanes 3 and 7, CMV-Co2; lanes 4 and 8, CMV-Co3; Lanes 1-4, *Hind*III; Lane 5-8 *Eco*RI.

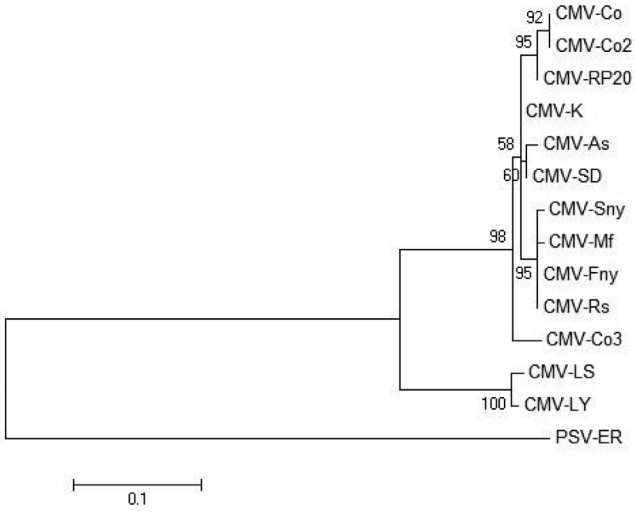

Fig. 2. Phylogenetic analysis of coat protein of three CMV isolates from *C. communis* and used strains of 10 Cucumber mosaic virus. The abbreviations of virus names and GenBank accession numbers used in the phylogenetic tree analysis: CMV-Fny (D10538.1), CMV-Sny (U66094.1), CMV-Mf (AJ276481.1), CMV-Rs (AJ517802.1), CMV-As (AF013291.1), CMV-K (AF127977.1), CMV-SD (AB008777.1), CMV-RP20 (KC527749.1), CMV-LY (AF189130.1), CMV-LS (AF127976.1), PSV-ER (U15730.1). Phylogenetic trees were bootstrapped using 1,000 replications. Also, they were performed employing the maximum likehood method packaged in the MEGA6 software.

염기서열 및 계통 분석. RT-PCR로 증폭된 cDNA들을 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. *C. communis*에서 분리한 CMV들의 외피단백질의 염기서열을 대조군인 CMV-Fny와 비교하였다. 그 결과 CMV-Co, CMV-Co2와 CMV-Co3는 외피단백질의 아미노산 수준에서 각각 96.3%, 96.3%, 95.9%의 상동성을 보였다. 또한 기존에 알려진 CMV의 계통을 이용하여 분자계통분석(MEGA6 software)을 실시한 결과 닭의 장풀의 CMV 분리주간에 다소의 유전적 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

이들 결과로 볼 때, 한 종의 *C. commnuis*에서 분리된 CMV들이 다른 계통의 CMV와 구분되는 공통적인 특성이 존재하는 동시에 CMV 분리주 간에 유전적 변이와 생물학적 특성의 차이가 있는 것으로 판단되었다.

요 약

춘천과 충주에서 퇴록현상과 모자이크 병징이 뚜렷한 닭의장풀을 채집하여 바이러스 분리 동정하였다. 해당 바이러스는 RT-PCR과 RFLP 분석결과 CMV로 동정되었으며, 닭의장풀 CMV 분리주들은 서로 다른 서브그룹으로 존재하고 있는 것이 확인되었다. 외피단백질유전자의 염기서열을 분석한 결과, 각 CMV 분리주들은 CMV-Fny와 비교 하였을 때 CMV-Co와 96.3%, CMV-Co2는 96.3%, CMV-Co3는 95.9%의 유사성을 나타내었다. 또한 기주 반응 분석 결과 닭의장풀 분리주들은 대조바이러스(CMV-Fny)와 달리 *C. pepo*에서 전신 괴사병징이 특징적으로 나타났으며 *Physalis angulata*과 *N.rustica*의 경우 닭의장풀 분리주 간에 병징의 차이를 보였다. 이들 결과를 통해, 국내 닭의장풀에서 분리된 CMV들에서 유전적, 생물학적 다양성이 있는 것으로 확인되었다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

This work were carried out with the support of Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ012266012018) in Rural Development Administration, Republic of Korea and basic science Research Program through the NRF funded by the Ministry of Education (NRF-2017R1D1A1B03036553).

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.

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-specifics single pair of primers. *J. Virol. Methods* 83: 67-73.

Hong, J. S., Park, H. S., Ryu, K. H. and Choi, J. K. 2009. Comparative anaylysis of coat protein gene of isolates of cucumber mosaic virus isolated from pepper plants in two GMO environmental risk assessment fields. *Res. Plant Dis.* 15: 165-169.

Kim, M. K., Seo, J. K., Kwak, H. R., Kim, J. S., Kim, K. H., Cha, B. J. and Choi, H. S. 2014. Molecular genetic analysis of cucumber mosaic virus populations infecting pepper suggests unique patterns of evolution in Korea. *Phytopathology* 104: 993-1000.

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. and Garcia-Arenal, F. 2003. Cucumoviruses. *Adv. Virus Res.* 62: 241-323.

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. Rearrangements in the 5'nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* 73: 6752-6758.

Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N. and Takanami, Y. 1991. Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an *in vitro* transcription system. *Virology* 183: 106-113.

Valverde, R. A. 1983. Brome mosaic virus isolates naturally infecting *Commelina diffusa* and *C. communis*. *Plant Dis.* 67: 1194-1196.

Wahyuni, W. S., Dietzgen, R. G., Hanada, K. and Francki, R. I. B. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathol.* 41: 282-297.