

## Cymbidium mild mosaic virus의 分離同定

張茂雄\* 土居養二\*\* 與良清\*\*

### Isolation of Cymbidium mild mosaic virus

Chang M.U., Y.DoI, K. Yora

#### Abstract

A virus, named Cymbidium mild mosaic virus(CyMMV), was mechanically transmitted to *Chenopodium amaranticolor* from the leaves of *Cymbidium* with mild mosaic symptoms. The virus was cultured in *C. amaranticolor*, in which it produced local chlorotic and ring spots, followed by systemic vein clearing with distortion. CyMMV infected 7 out of 35 species of plants. In *C. amaranticolor* juice infectivity was lost by heating at 90°C for 10 minutes, and by aging at 20°C for 60 days, and by diluting at  $10^{-6}$  when bioassayed on *C. amaranticolor*. CyMMV was not transmitted by *Myzus persicae*. The virus was purified after clarification of homogenized *C. amaranticolor* leaf tissues with chloroform, by differential centrifugation followed by sucrose density gradient centrifugation. Electron microscopic examination of purified preparation showed spherical particles of 28nm in diameter. The UV absorption spectrum of purified preparation was typical of a nucleoprotein (max. at 261nm. min. at 243nm), and showed  $260/280=1.72$  and  $max/min=1.26$ . The value of the sedimentation coefficient of the virus was  $S_{20,w}=126$ . In gel-diffusion tests, CyMMV anti-serum reacted with CarMV, but not with any of four other viruses (BBWV, CRSV, CMV, TBRV) having similar particles and properties in vitro. In ultra-thin sections of CyMMV infected tissues, a large number of virus particles were found in the cytoplasm of mesophyll cells and in xylem vessels.

#### 緒 論

1970~1972년 사이에 日本九州의 일부와 東京近郊의 蘭栽培地域의 東洋蘭(*Cymbidium* spp.)에서 mild mosaic 症狀를 나타낸 병이 발생하여 栽培者들에게 문제가 되었다. 이 병에 걸린 *Cymbidium*은 생장이 불량할 뿐만 아니라 꽃이 피지 않거나 또는 꽃이 피어도 꽃송이 수가 적고 작아서 상품 가치가 크게 떨어지며 栽培者들에게 막대한 피해를 갖다준다. 필자는 이 지역의 蘭栽培者로부터 의뢰받은 *Cymbidium* mild mosaic 病株에 대해서 病原體를 조사한 바, 直徑約

28nm인 小球形 바이러스 粒子가 검출되었다.

지금까지 *Cymbidium*의 病原 바이러스는 Cymbidium mosaic virus (Corbett, 1960), Cymbidium ringspot virus (Hollings and Stone, 1963), Odontoglossum ringspot virus (Jensen, 1951), Orchid fleck virus (Chang et al, 1976), Bacilliform virus (Lesemann and Doraiswamy, 1975) 등이 보고되어 있으나, 本研究에서 分離된 바이러스는 上記한 바이러스와 다른 새로운 바이러스로 생각되어서 그 결과를 보고한다.

이 논문의 일부는 1975년 日本植物病理學會大會에서 발표되었고, 日本植物病理學會報(1975년 41卷 p.286)에 abstract로 보고된 것이다.

\* 嶺南大學校 文理科大學 生物學科(Degt. of Biology, College of Liberal arts and Science, Yeungnam University, Kyungsan, Korea 632.)

\*\* 日本 東京大學 農學部 農生物學科(Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 113.)

## 材料 및 方法

본 실험에 사용된 *Cymbidium* 病株는 日本 長崎와 東京 近郊의 蘭 栽培者로부터 분양받은 것으로 온실에 보존하여 接種源으로 사용하였다(fig. 1-A).

汁液接種은 接種源에 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.0)을 加하여 磨碎, 搾汁한 다음, carborandum을 사용하여 常法으로 行하였다.

실험에 사용한 식물은 20°C로 조절된 온실에서 키웠다.

抗血清은 純化한 바이러스를 토끼에 1주일 간격으로 接種주사하여 만들었다.

血清學的 關係를 試驗하기 위하여 사용된 바이러스는 Broad bean wilt virus (BBWV), Carnation mottle virus (CarMV), Carnation ringspot virus (CRSV), Cucumber mosaic virus (CMV), Tomato black ring virus (TBRV)이다.

電子顯微鏡의 試料는 *Cymbidium* 病葉과 뿌리, 및 汁液接種에 의하여 感染된 *Chenopodium amaranticolor*의 接種葉의 組織細片을 1% OsO<sub>4</sub>에 固定하고 ethanol로 탈수한 후 Epon 812 樹脂에 embedding 하였다. 이것을 ultramicrotome으로 超薄切片을 만든 다음 uranyl acetate 및 lead citrate의 二重染色을 해서 電子顯微鏡(Hitachi model HU-12)으로 관찰하였다.

## 結 果

### 1. 汁液接種

本 바이러스의 病原性을 조사할 目的으로 蘭 以外의 數種植物에 粗汁液을 이용하여 汁液接種을 시도해 보았으나, 어떠한 植物에도 感染되지 않았다. 그러나 *Cymbidium* 病葉을 凍結, 磨碎하여 0.1% thioglycollic acid-0.005M 磷酸緩衝液(pH7.0)으로 抽出하고 chloroform으로 淸澄, 分割遠心한 部分純化試料를 接種源으로 汁液接種한 結果, *Chenopodium amaranticolor*에 局部病斑이 形成되었다. 病原株와 *C. amaranticolor*의 局部病斑을 direct negative method (Doi et al, 1969)에 依하여 電子顯微鏡으로 관찰한 바 두 試料에서 모두 直徑 約 28nm의 小球形 바이러스가 檢出되어, 本 바이러스가 小球形 바이러스로 汁液接種이 가능하다는 것이 확인되었다.

따라서 *Cymbidium* 病葉에 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.1% sodiumdiethylthiocarbamate를 加해서 만든 粗汁液과 이들 試料를 처리하지 않은 *Cymbidium*의 粗汁液을 열처리(50°C, 10分間), 또는 회석(1,000, 5,000, 10,000倍)하여 다시 한번 汁液接種을 시도하였다. 그

결과 10,000倍 회석구에서는 낮은 비율이지만 感染性이 확인되었다.

이로부터 *Cymbidium*葉의 磨碎液中에는 本 바이러스를 不活性化하는 어떤 물질이 함유되어있는 것으로 추정되었다.

### 2. 寄主範圍 및 感染植物의 病徵

汁液接種에 依하여 局部病斑을 나타낸 *C. amaranticolor*의 病葉을 接種源으로 하여 12科 27種의 植物에 數回에 걸쳐 汁液接種하였다. 接種葉의 感染有無는 接種後 5~7日에 上葉은 22日後에 나타난 病徵과 電子顯微鏡 관찰에 依한 小球形 바이러스의 存否로써 判定하였다. 그 결과 table 1에서와 같이 4科 7種의 植物에서 感染이 확인되었다.

Table 1. Experimental host range of *Cymbidium mild mosaic virus*

#### Plants infected systemically:

*Cymbidium* spp., *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Dianthus caryophyllus*.

#### Plants infected locally:

*Gomphrena globosa*, *Chenopodium folium*, *Dianthus chinensis*.

#### Plants not infected:

*Petunia hybrida*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* var. *Xanthi nc*, *N. tabacum* var. *White Burley*, *N. tabacum* var. *Bright Yellow*, *Datura stramonium*, *Physalis floridana*, *Vigna sinensis*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Zinia elegans*, *Helianthus annuus*, *Beta vulgaris*, *Vinca rosea*, *Tetragonia expansa*, *Brassica campestris*, *Cucumis sativus*, *Zea mays*, *Rumex japonicus*.

*C. amaranticolor*와 *C. quinoa*에서는 接種 4~5日 後에 接種葉에 chlorotic spots 症狀을, 2週 後에는 全身의 mottling 혹은 vein clearing 症狀을 나타냈다.

*Gomphrena globosa*에서는 接種 5~6日 後에 接種葉에 chlorotic spots 症狀을 보이다가 10日 경에는 necrotic spots로 變하였다(Fig. 1-B).

*Dianthus caryophyllus*에서는 接種 4~6日 後에 接種葉에 不明瞭한 chlorotic spots 症狀을 나타냈다. 上葉에서는 2週 後에도 病徵이 나타나지 않았으나, direct negative法에 依하여 바이러스 粒子(約 28nm)가 檢出되었기 때문에 無病徵의 全身感染이 확인되었다.

以上の 結果로 보아 이 바이러스는 寄主範圍가 좁은 것으로 생각된다.

### 2. 진딧물에 依한 傳搬試驗 및 粗汁液中의 不活性化 限界

本 바이러스에 感染된 *C. quinoa*를 接種源으로 2時

間 絶食시킨 *Myzus persicae*를 20分間 獲得吸汁시킨 後 건전한 *C. quinoa*와 *C. amaranticolor*에 옮겨서 각각 48時間 接種吸汁시킨 後에 發病을 조사하였다. 그 結果 어느 植物에서도 傳搬은 인정되지 않았다.

*C. amaranticolor* 病葉에 5倍容의 0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.0)을 加하여 磨碎한 다음 꺼즈로 걸른 粗汁液을 原液으로 하여 *C. amaranticolor*에 汁液接種하였다.

그 結果 耐熱性은 90°C (10分), 保存限界는 60日(20°C)이고 稀釋限界는 10<sup>-6</sup>이었다.

이로부터 本 바이러스는 매우 安定된 物理的 性質을 갖고 있고, 寄主植物內에서 바이러스 粒子 生産量이 매우 많은 것 임이 확인되었다.

#### 4. 바이러스 純化

本 바이러스를 接種한 *C. amaranticolor* 接種葉을 凍結後, 1.5倍量의 0.1% thioglycolic acid-0.5M 磷酸緩衝液을 加하고 磨碎하여 꺼-즈로 걸른 汁液에 8.5% chloroform을 加해서 2시간동안 攪拌한 後에 5000 rpm에서 20分間, 2800 rpm에서 180分間 分割遠心分離하였다. 그 沈澱을 0.05M 磷酸緩衝液으로 녹여 10,000 rpm에서 10分間 遠心, 그 상등액을 40,000rpm에서 90分間 遠心分離하였다. 이러한 分割遠心を 3회 반복하여 最終의 沈澱을 0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0)에 녹인 다음, 10~40%의 sucrose density gradient에 의해 遠心分離(25000 rpm, 90分)하였다. 遠心分離後, 원심분리관의 中央보다 좀 上部에 생긴 乳白色帶를 주사기로 모아서 여기에 0.001M EDTA-0.001M 磷酸緩衝液을 加한후 다시 40,000 rpm에서 90分間 遠心分離하여 純化試料을 얻었다.

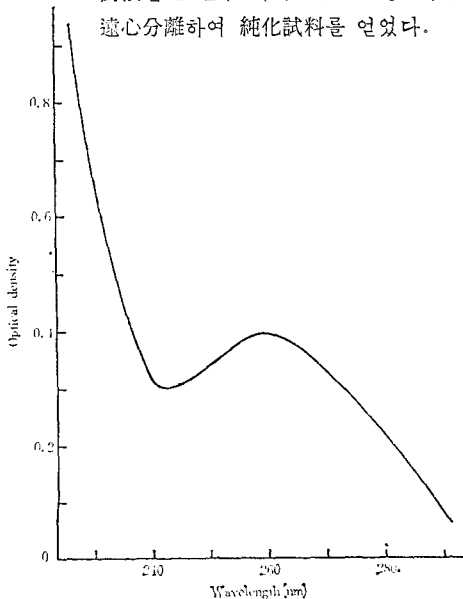


Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of purified virus preparation of CyMMV.

이 純化試料은 汁液接種에서 높은 感染性을 나타내 고, 또 紫外線吸收曲線은 最高 261nm, 最低 243nm이고, 260/280=1.72, 最高/最低=1.26의 수치를 나타내었다. (Fig. 2).

다음에 이 純化試料을 0.1M NaCl, 0.01M 磷酸緩衝液(pH 7.0)에 溶解한 後 分析用超遠心機 (Hitachi UCA-1)를 사용하여 Schlienen pattern의 이동에 의한 沈降速度法으로 沈降係數를 측정하였다. 그 結果 단일 頂點(peak)이 형성되었고, 이동속도로부터  $S_{0,w}=126$ 의 수치를 얻었다 (Fig. 3-A,B).

#### 5. 바이러스 粒子의 形態

本 바이러스에 感染된 *C. amaranticolor*, *Cymbidium*, *Gomphrena globosa* 등의 病葉에서 direct negative method에 의해 바이러스 粒子의 檢出을 시도하여 本 結果 直徑 約 28nm의 小球形 바이러스가 多數 관찰되었다(Fig. 4-B). 또 純化試料을 negative staining method에 의하여 電子顯微鏡으로 관찰한 結果, 直徑 約 28nm의 小球形(多面體) 粒子中에는 core가 결여되어서 染色液(Phosphotungstic acid)이 浸透된 ghost particles (empty particles)이 少數 混在되어 관찰되었다(Fig. 4-A).

#### 6. 血清試驗

前述한 純化바이러스 試料을 1週 간격으로 4회 토끼의 귀 정맥에 주사하였다. 최종 주사후 12일째에 全採血해서 抗血清을 얻었다. 이 抗血清은 沈降反應混合法에서 2,025倍의 力價를 나타냈고, 寒天內擴散法에서는 *C. amaranticolor* 病葉의 粗汁液과 純化試料에 대해서 100倍 희석까지 反應을 나타냈다. 이 抗血清을 사용하여, 本 바이러스와 다른 小球形 바이러스(BBWW, CarMV, CRSV, CMV, TBRV)와의 血清學的關係를 寒天內擴散法으로 조사한 結果, CarMV와의 사이에만 反應帶가 形成되었다. 따라서 本 바이러스는 CarMV에 近緣의 바이러스라고 판단된다.

#### 7. 病葉의 超薄切片에 의한 電子顯微鏡의 관찰

CyMMV 感染組織內의 病原 바이러스의 存在 및 所在樣式을 알기 위하여 感染葉切片을 만들어 電子顯微鏡으로 觀察하였다. 供試材料의 各種 細胞의 細胞質, 液脂 및 導管內에는 直徑 約 24nm의 小球形 粒子가 多數 觀察되었다(Fig. 5,7). 바이러스 粒子는 非局在性으로 各種 細胞內에 散在 또는 集塊로 觀察된 例가 많았다(Fig. 7). 導管壁에 따라서 나란히 있는 粒子像, 厚膜細胞內에 散在해 있는 粒子像(Fig. 6), 그리고 *C. ficifolium*의 壞死細胞에서는 結晶配列의 粒子像(Fig. 8)이 觀察되었다. 따라서 本 바이러스 粒子의 生産量이 많고, 安定된 바이러스라고 생각된다.

## 考 察

本 研究에서 *Cymbidium*으로부터 分離된 小球形 바이러스는 지금까지 보고되지 않은 바이러스라고 생각할 수 있다.

*Cymbidium*에 발생하고 있는 바이러스로는 *Cymbidium mosaic virus* (CyMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Cymbidium ringspot virus* (CyRSV), *Cymbidium necrotic ringspot virus* (CyNRSV), *Orchid fleck virus* (OFV) 등이 報告되어 있다.

이들 바이러스중 小球形의 바이러스는 CyRSV와 CyNRSV이지만, 本 研究에서 분리된 바이러스는 *Cymbidium*에 necrosis를 일으키지 않은 점으로 보아 위의 어느것과도 일치하지 않는다. 특히 Hollings가 분리한 CyRSV는 直徑 28nm의 小球形 바이러스로 粒子形態는 一致하나, 寄主範圍와 物理的 性質이 다르고, CarMV와 血清學的 關係가 없는 점으로 보아 CyMMV와는 다른 것으로 생각된다. 그러므로 本 바이러스는 *Cymbidium*에 발생하는 새로운 바이러스라고 생각되어서 *Cymbidium mild mosaic virus* (CyMMV)로 명명함과 동시에 이 바이러스에 의한 병을 *Cymbidium mild mosaic virus disease*로 명명하고 싶다.

이 CyMMV는 direct negative 法에 의해서 쉽게 검출되고 粒子量도 많으며 感染葉에서는 導管에서도 자주 관찰되었다. 이와같은 성질은 CarMV와 *Sowban mosaic virus* (土居 1969)등에서도 알려져 있고, 더욱이 이들 바이러스는 耐熱性도 높고 安定된 바이러스이며 특히 CarMV는 本 바이러스와 血清學的 關係가 있는 것이 확인되었다. 이와같은 사실들로 미루어 보아 CyMMV는 CarMV와 같은 group에 속하는 바이러스라고 생각된다.

## 摘 要

*Cymbidium*의 mild mosaic 病株로부터 各種 草本植物에 汁液接種되는 小球形 바이러스를 분리하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 本 바이러스를 汁液接種하였을 때 *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cymbidium* spp., *Dianthus caryophyllus*는 全身感染, *C. ficiifolium*, *Gomphrena globosa*는 局部感染되었다.
2. 本 바이러스는 *Myzus persicae*로 傳搬되지 않고, 영양번식기관에 의하여 傳搬되었다.
3. 粗汁液中의 不活性化限界는 耐熱性이 90°C (10分)이고 耐稀釋性이 10<sup>-6</sup>, 耐保存性이 60日 (20°C)이

였다.

4. 本 바이러스는 *C. amaranticolor*病葉을 凍結後, chlorform으로 澄清하여 分割遠心分離와 sucrose density gradient 遠心分離法으로 純化하였다.

5. 純化試料의 紫外線吸收曲線은 最高 261nm, 最低 243nm이고 260/280=1.72, 最高/最低=1.26의 핵단백에 의한 吸收曲線을 나타냈다. 沈降係數는 S<sub>20,w</sub>=126의 수치가 얻어졌다.

6. 本 바이러스의 抗血清은 沈降反應混合法에 의해 2,025倍의 力價를 나타냈고, 寒天內擴散法에 의한 試驗에서 CarMV와 血清學的 關係가 있는 것으로 나타났다.

7. 本 바이러스의 形態는 直徑 約 28nm의 小球形 (多面體) 粒子이고, empty particles도 소수 관찰되었다.

8. 本 바이러스에 感染된 *C. amaranticolor*, *C. ficiifolium*, *Cymbidium* spp.의 病葉超薄切片을 電子顯微鏡으로 관찰하였든나, 各種 細胞의 細胞質, 液胞 및 導管內에 小球形 粒子가 散在 또는 集塊의 所在樣式으로 확인되었다.

9. 以上の 結果를 종합해서 本 바이러스를 *Cymbidium mild mosaic virus*로 命名한다.

## 引用文獻

1. 張茂雄, 土居養二, 與良清, 1975. シンビジウム微斑モイクウイルス *Cymbidium mild mosaic virus*: CyMMV)について. 日本植物病理學會報 41: 286 (講要).
2. 張茂雄, 荒井啓, 土居養二, 與良清, 1973. テソにえそ斑紋さ生ずる短桿形ウイルス, ラソえそ斑紋ウイルス (*Orchid flecken virus* 假稱) について. 日本植物病理學會報 39: 176 (講要).
3. Chang, M. U., Arai, K., Doi, Y., and Yora, K., 1976. Morphology and intracellular appearance of orchid fleck virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42: 156-167.
4. Corbett, M. K., 1960. Purification by density-gradient centrifugation, electron microscopy and properties of cymbidium mosaic virus. Phytopathology 50: 346-351.
5. 土居養二, 烏山重光, 與良清, 明日山秀文, 1969. ダイレクトネガティブ染色法によるウイルス粒子の簡易觀察. 日本植物病理學會報 35: 180-187.
6. 土居養二, 與良清, 明日山秀文, 1969. 所在様式によるウイルスの分類: BBWVグループとその他の比較. 日本植物病理學會報 35: 123 (講要).

7. Hollings, M. and Stone, M., 1963. Cymbidium ringspot (a previously undescribed virus). Rep. Glasshouse Crops Res. Stat. S. : 90.
8. Jensen, D. D., 1953, Virus disease of Cymbidium Amer. Orchid Soc. Bull. 22 : 800-804.
9. Jensen, D. D. and, Gold, A. H., 1951. A virus ringspot of Odontolossium orchid: Symptoms, transmission, and electron microscopy. Phytopathology 41 : 648-653.
10. Lesemann, D. and Doraiswamy, S., 1975. Bullet-shaped virus-like particles in chlorotic and necrotic leaf lesions of orchids. Phytopath. Z. 83 : 27-39.



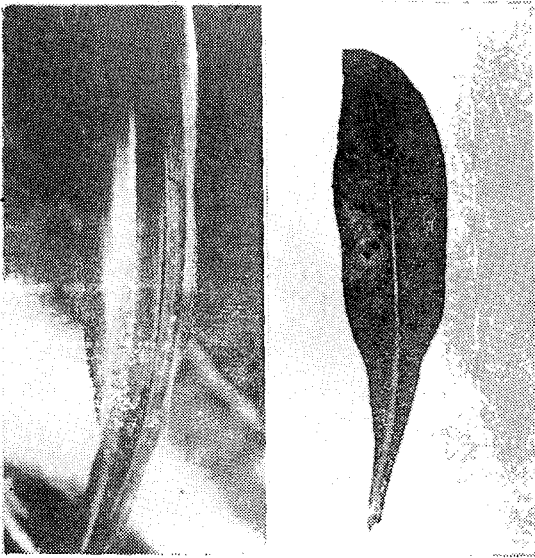


Fig. 1. (A) Systemic mild mosaic on *Cymbidium* leaf infected with CyMMV (B) Local necrotic spots on leaf of *Gomphrena globosa* caused by CyMMV.

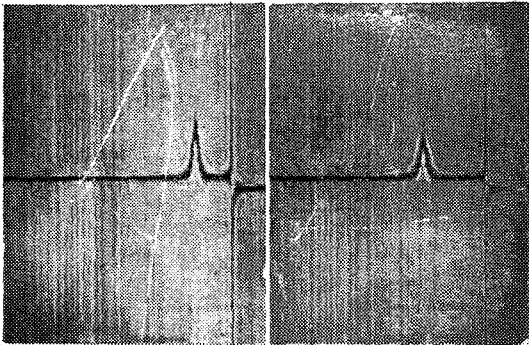


Fig. 3. (A) and (B) Schlieren diagram obtained by analytical ultracentrifugation of a purified virus preparation.

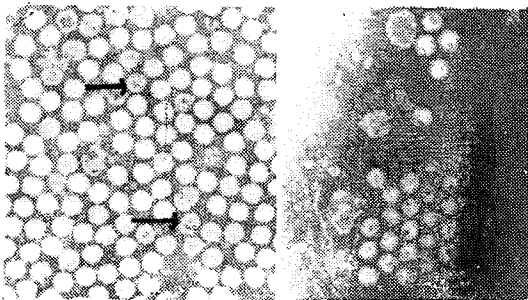


Fig. 4. (A) Virus particles in purified preparation of CyMMV. Empty particles (arrows). ( $\times 70,000$ ) (B) Virus particles in negatively stained preparation from CyMMV-infected *Cymbidium*. ( $\times 100,000$ )

Fig. 5. Large aggregates of CyMMV particles in vacuole of a mesophyll cell of CyMMV-infected *Cymbidium*. cw, cell wall; v, virus ( $\times 20,400$ )



Fig. 6. Virus particles (arrows) in a sclerenchyma cell of CyMMV-infected *Cymbidium*. cw, cell wall. ( $\times 34,000$ )

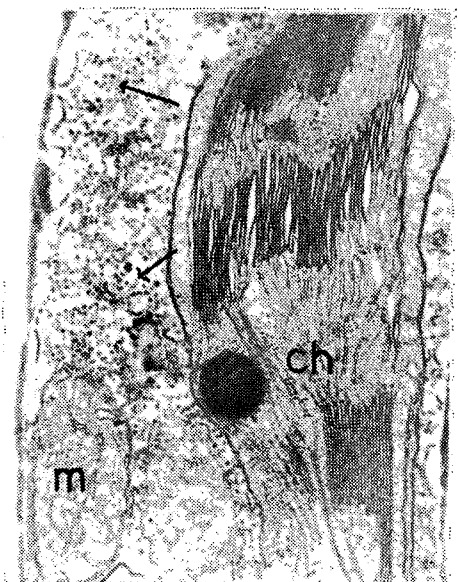
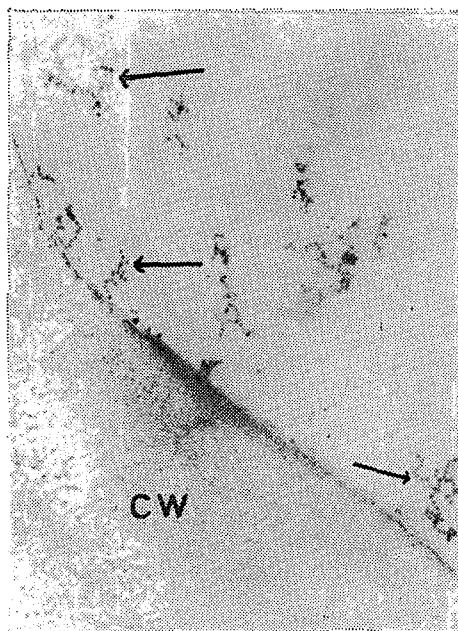


Fig. 7. Virus particles (arrows) in cytoplasm of a mesophyll cell of CyMMV-infected *C. amaranticolor*. m, mitochondria; ch, chlorophyll ( $\times 34,000$ )

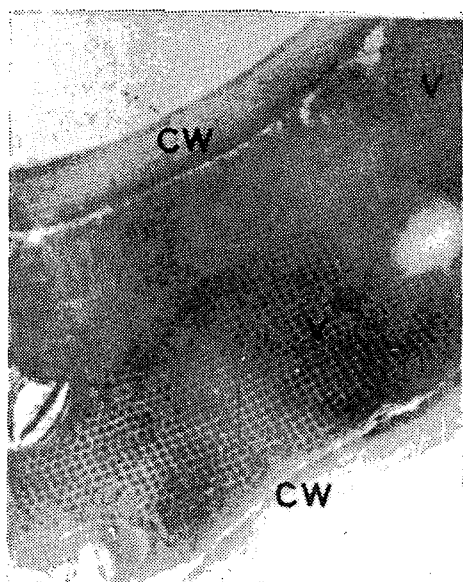


Fig. 8. Large crystalline aggregate of virus particles in a mesophyll cell of CyMMV-infected *C. ficifolium* cw, cell wall; v, virus ( $\times 51,000$ )