

# 동부 (*Vigna sesquipedalis*) 에 發生하는 Blackeye Cowpea Mosaic Virus와 Cucumber Mosaic Virus에 관한 研究

尹 泰 圭

慶南大學校 理科大學 環境保護學科

## Blackeye Cowpea Mosaic Virus and Cucumber Mosaic Virus Causing Mosaic Disease on Asparagus Bean (*Vigna sesquipedalis*) in Korea

Tae Kyu Yoon

Department of Environmental Protection, College of Natural Sciences,  
Kyungnam University, Masan 610, Korea

### 要 約

모자이크, 葉脈綠帶, 退綠斑點 등의 病徵을 나타내고 있는 동부 (*Vigna sesquipedalis*)를 晉州에서 採集하였다. 電子현미경에 의해 2種의 바이러스가 分離되어 이들의 寄主範圍, 粗汁液中の 不活性化限界, 感染集細胞에 있어서 粒子的 所在樣式에 의하여 2種의 바이러스를 同定하였다. Blackeye cowpea mosaic virus (BICMV). 이 바이러스는 汁液接種에 의해 2科 7種의 檢定植物에 感染이 확인되었다. 그러나 全身感染은 豆科植物에 限했다. 耐熱性은 50-60°C, 耐稀釋性은  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ , 耐保存性은 1-6日이 었다. 바이러스 粒子的 形態는 길이 約 750nm의 絲狀形이다. 病葉 切片의 電子현미경적 관찰에서는 葉肉細胞의 細胞質에서 絲狀 粒子和 風車狀 및 環狀의 封入體가 確認되었다.

Cucumber mosaic virus(CMV). 이 바이러스는 汁液接種에 의해 3科 9種의 檢定植物에 感染이 확인되었다. 다른 CMV系와 달리 豆科植物에도 全身感染을 했다. 이 바이러스 粒子的 形態는 直徑約 30nm의 粒子的이다. 感染葉의 電子현미경적 관찰에서는 葉肉細胞의 細胞質 및 液胞內에서 바이러스 粒子的 凝集像이 확인되었다.

### ABSTRACT

Samples showing mosaic symptom of cowpea (*Vigna sesquipedalis*) with vein banding, chlorotic spot, vein yellow were collected from Chinju areas in Korea. Two viruses were distinguishable by stability in sap, host range, and relations with cells and tissues were examined under an electron microscope. Blackeye cowpea mosaic (BICMV) was sap-transmissible to 7 plant species in 2 families. Of the plants, only leguminous species were systemically infected. This virus was inactivated by heating at 50-65°C for 10 min, by diluting at  $10^{-4}$ -

$10^{-5}$ , and aging at room temperature for 1–6 days. Preparations examined under the electron microscope by direct negative staining method(DN-method) always showed particles of flexuous filament about 750nm in length and cytoplasmic inclusions. Cytoplasmic inclusions and virus particles were also confirmed to present in the cytoplasm of a mesophyll cell by ultrathin sections of BICMV infected cowpea leaves. Cucumber mosaic virus(CMV) was transmitted by sap-inoculation on inoculated leaves of *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* producing local lesions, but non-inoculated upper leaves of *Nicotiana glutinosa*, *Cucurbita pepo* and *Vigna sesquipedalis* producing systemic mosaic symptoms. Electron microscopic examination of virus preparation by direct negative staining showed spherical particles of about 30nm in diameter. In ultrathin sections of CMV infected tissues, virus particles of crystalline array were found in the vacuole and a large number of virus particles were found in the cytoplasm and the plasmodesmata of mesophyll cells.

*Key words* : cowpea, BICMV-Pinwheel inclusion, CMV-Systemic infection on Cowpea.

## 緒 論

동부의 바이러스病은 世界 各地에서 發生하여 그 病原으로서 數種의 바이러스가 報告되었다. 한국에서 發生하는 동부바이러스病에 대한 報告는 Lee (14)의 Cowpea mosaic virus (CPMV)에 대한 最初의 기록이다. 外國에서 지금까지 동부類에 發生하는 바이러스는 Cowpea aphid-borne mosaic virus(CAMV), (11) Black-eye cowpea mosaic virus(BICMV) (1), Cowpea mosaic virus, (16) Cowpea chlorotic mottle virus (10), 土崎 등(17)이 Cucumber mosaic virus, subclover mottle virus를 分離했고 다시 Tsuchizaki 등(18)에 의하여 從來 日本産 CAMV와 Thailand, Malaysia의 동부(*Vigna sesquipedalis*) 바이러스 症狀에서 分離한 바이러스와의 關係를 再檢討한 結果 日本産 CAMV가 BICMV임이 밝혀져서 모두 BICMV라 했다.

필자는 晋州에 재배한 동부 採種圃에서 모자이크 症狀株를 採集하여 寄主範圍, 粗汁液中的 不活性化限界, 電子顯微鏡 등으로 동부에 感染된 Blackeye cowpea mosaic virus와 Cucumber mosaic virus를 分類 同定하였다.

本研究에서 有益한 助言과 電子顯微鏡의 調査援助를 받은 嶺南大學校 張茂雄교수에 대하여 眞心으로 謝意를 表한다.

## 材料 및 方法

供試바이러스, 晋州地域의 동부 採種圃에서 發病한 모자이크 症狀의 病葉의 搾汁을 供試바이러스로 사용하였다.

寄主範圍調査, 바이러스의 기주범위를 조사하기 위하여 사용한 檢定植物은 진부 網室에서 키웠고 살충제를 사용하여 진딧물 등의 發生을 방제했다. 接種은 檢定植物의 幼苗잎에 600mesh의 carborundum를 뿌리고 병징이 뚜렷한 罹病葉의 上葉을 採取하여 여기에 3배의 0.05M의 sodium thioglycollate (pH7.0)을 加한후 마쇄 착즙하여 얻은 汁液으로 接種하였다. 粗汁液中的 바이러스 不活性化條件을 조사하는데 있어 病葉에 上記의 sodium thioglycollate액을 10倍量加하여 마쇄하여 얻은 病汁을 原液으로 했다.

바이러스粒子的 電子顯微鏡的 관찰은 2% phosphotungstic acid(PTA, pH7.0), 또는 罹病葉의 조직을 2%  $O_3O_4$ 에 固定한 후 2% PTA용액을 이용한 DN法에 의하여 관찰했다(4) 感染葉조직의 전자현미경적 관찰 試料는 罹病葉의 組織切片을 1%  $O_3O_4$ 에 固定하여 ethanol로 탈수한 후 Epon 81樹脂에 embedding하였다. 이것을 ultramicrotome으로 超薄切片을 만든다음 uranyl acetate 및 lead citrate에 二重染色하여 Hitachi H-600 電子顯微鏡으로 관찰하였다.

## 結 果

**Blackeye cowpea mosaic virus(BICMV)**. 自然 감염된 동부(黑種十六, 黑種三尺)의 病徵. 本試驗에 供試한 바이러스는 동부 發病株의 上葉에 모자이크, 葉脈綠帶, 葉脈黃化 등 病徵이 認定되었다.(그림 1)

汁液接種에 의한 寄主範圍. 葉脈綠帶의 모자이크 症狀葉에서 分離한 바이러스를 數種檢定植物에 汁液接種한 結果. 동부(黑種十六, 黑種三尺, 黑芽) 강남콩(金時) 赤小豆 등에만 全身感染을 나타냈고 *Chemopodium amaranticolor*, *C. quinoa*의 接種葉에는 局部病斑을 나타냈다. 特히 *C. amaranticolor*의 局部病斑은 red ring 현상(그림 2)이었다. 其他 供試한 數種植物中 *Nicotiana glutinosa*, *Petunia hybrida*, 강남콩(Top crop) *Cucurbita pepo* 등은 感染하지 않았다(표 1).

粗汁液中の 不活性化限界. 試驗結果는 耐熱성이 50-60°C(10分), 稀釋限度가  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  保存限度가 1-6日(室温)이었다.

바이러스 粒子 및 電子현미경적 所見. DN法에 의한 바이러스 粒子는 絲狀型750nm의 粒子와 Cytoplasmic inclusion이 認定되었다(그림 5, 6).

感染조직의 電子현미경적 관찰. 葉脈綠帶를 한

罹病葉을 超薄切片하여 電子현미경으로 관찰하였다. 바이러스 粒子는 供試材料의 各種세포의 細胞質內에 약 700nm의 絲狀粒子가 小集團 또는 散在하고있는 像이 확인되었다. (그림 7) 細胞質內에는 絲狀粒子와 함께 本 바이러스 感染에 의하여 생긴 細胞質 封入體가 반드시 관찰되었다(그림 7, 8, 9). 이들 세포질 封入體의 다른 角度의 斷面像인 pinwheel, laminated aggregate 등으로 부터 potyviruses group의 感染細胞에서 特異적으로 관찰되는 cylindrical inclusion으로 判定되었다(그림 8, 9). 이 細胞質 封入體는 前述의 DN法에 의한 長方形(rectangular form)의 構造物(그림 6)과 같은 것으로 생각된다. 以上の 結果는 Anderson(1,2) Lima(13), 土崎 등(18)의 報告와 거의 一致한다.

**Cucumber mosaic virus(CMV)**. CMV가 分離된 동부의 罹病葉은 모자이크 退綠斑點 등을 同伴한 것이다. BICMV의 感染症狀와 같은 葉脈綠帶 현상을 관찰하지 못했다(그림 3).

汁液接種에 의한 寄主範圍. 接種의 檢定植物에 대한 接種試驗 結果 동부, 완두, 감두 등의 科種植物에 全身感染하는 外 *N. glutinosa*, *Petunia hybrida*, *Cucurbita pepo*(그림 4) 등이 全身感染하였고 *C. amaranticolor*, *C. quinoa*만이 局部病斑이 생겼다(Table 1).

바이러스 粒子의 形態. *N. glutinosa*의 罹病葉을

Table 1. Reaction of indicator plants to mechanical inoculation of BICMV and CMV isolated from asparagus bean (*Vigna sesquipedalis*)

Host species	Symptoms produced by*	
	BICMV	CMV
CHENOPODIACEA		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn.	L <sup>-1</sup> /-	L/-
<i>C. quinoa</i> Willd.	L/-	L/-
SOLANACEAE		
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	-/-	-/M
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	-/-	-/M
CUCURBITACEAE		
<i>Cucurbita pepo</i> Mill	-/-	-/M
FABACEAE		
<i>Vigna sesquipedalis</i> 'Kurodanesanjaku'	-/M	-/M
'kurodane juroku'	-/M	-/M
<i>Vigna sinensis</i> 'Blackeye'	-/M	-
<i>Phaseolus angularis</i> 'Akadane'	-/M	-
<i>P. vulgaris</i> 'Kintoki'	-/M	-
<i>P. vulgaris</i> 'Top crop'	-	-
<i>Pisum sativum</i>	-	-/M
<i>Vicia faba</i> L.	-	-/M

\* L : local lesion, L<sup>-1</sup> : red(ring) lesion, M : mosaic symptoms, N : necrosis, - : no infection(no reaction)

DN法에 의한 전자현미경 관찰에서 직경 30nm의球形粒子가多數檢出되었다(그림 10).

感染조직의電子현미경적 관찰. 汁液接種에 의해感染된 *N. glutinosa*의罹病葉을超薄切片하여 전자현미경으로 관찰하였다. 바이러스粒子는供試材料의各種세포의細胞質에散在 혹은凝集해있고液胞에서는粒子가多數모여凝集像으로 관찰되었다(그림 11).

이상의寄主範圍(1, 2, 17) 및感染葉의電子현미경의 관찰結果는 CMV 感染葉의電子현미경 관찰결과와 거의一致하였다(5, 6, 9, 12) 다만 Anderson이報告한 CMV의種子傳染性, CMV系의血清學적反應에 대하여서는本試驗에서 확인못했다.

## 考 察

동부類의 모자이크, 葉脈綠帶, 退綠斑點등의 症狀株에서分離한絲狀形의 750nm와 30nm의 小球形바이러스를 粒子의 形態, 寄主範圍, 感染細胞內에 있어서 바이러스 粒子의 所在樣式등의 結果로 보아 blackeye cowpea mosaic virus 와 cucumber mosaic virus의 1系統으로 同定했다.

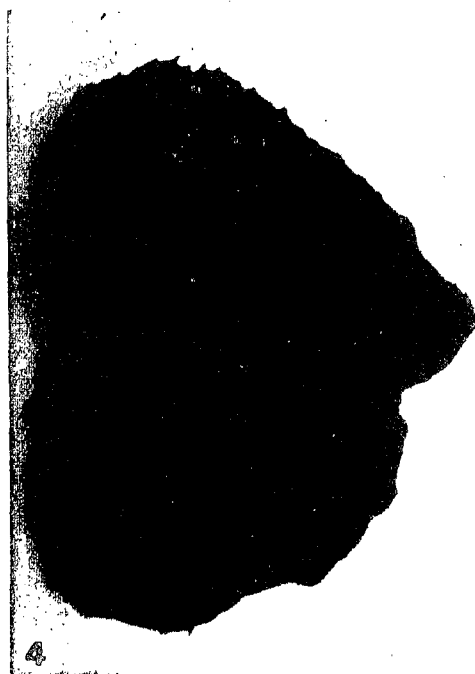
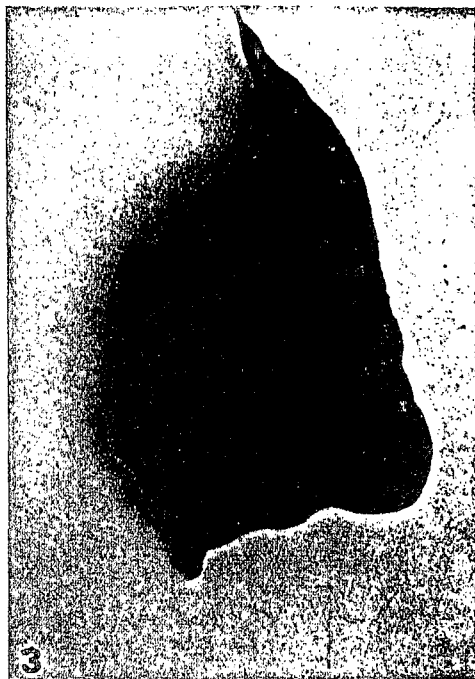
BICMV. 本 바이러스는 주로 葉脈綠帶를 하는 모자이크 病葉에서分離된 바이러스로서寄主範圍가 2科植物에만感染되며 특히 豆科植物에限해서 全身感染이 나타낸다는 사실이報告되어 있다(1, 8, 13, 17). 필자의試驗調查와 거의一致한다. BICMV 感染葉에 있어서 바이러스 粒子의 所在樣式에 대해서도 관찰例가 있다(13, 18). 本 바이러스의 電子현미경 관찰에도細胞質內에絲狀粒子和細胞質封入體가 반드시 관찰되었다(그림 7, 8, 9). 本 바이러스의 名稱에 대하여 한때 議論이 있어 土崎 등(17)이 *Lovisolo* and *Conti*(11)가命名한 cowpea aphid-borne mosaic virus가適當하다하여報告했으나 다시 Tsuchizaki 등(18)에의하여 CAMV와 BICMV를比較再檢討한 結果從來日本産 CAMV가 BICMV임을 밝히報告하였다. 필자의試驗조사에도 本 바이러스가 Anderson(1)의 第2群에 속하는 바이러스 뿐 아니라 Lima 등(13) Tsuchizaki 등(18)의細胞質內의絲狀粒子和細胞質封入體가 관찰되었다는報告와 거의一致함으로 本研究의 바이러스도 Anderson

(1), Lima 등(13) Tsuchizaki 등(18)에 따라 blackeye cowpea mosaic virus라 했다. 그러나最近報告(13, 18)된血清學的관계는 확인못했다.

CMV는 주로 退綠斑點 症狀을 하는 病葉에서檢出되나 동부의 CMV는 동부類에 局部病斑을 만들지 않은 系統이라報告(17)하고 있다. Anderson(1, 2) Hino(8)도 동부에서 모자이크가 생기는 CMV의 1系統을 보고 하고 있다. 이것과 本試驗에서分離한 CMV와比較하면寄主範圍가 거의一致한다. 다만 Anderson(1, 2)이報告한 CMV는種子傳染性이라 하나 本試驗에서는 확인 못했다. 以上の BICMV와 CMV 1系統이 동부類의 自然感染葉에서分離된것은 한국에서 本研究가 처음이라 생각된다.

## 參 考 文 獻

1. ANDERSON, C. W. (1955). Vigna and Crotalaria Viruses in Florida. I. Preliminary report on a strain of cucumber mosaic virus obtained from cowpea plants. *Plant Dis. Rep.* 39: 346-348.
2. ANDERSON, C. W. (1955). Vigna and Crotalaria Viruses in Florida. II. Notations concerning cowpea mosaic virus (*Marmor vignae*). *Plant Dis. Rep.* 39: 349-352.
3. BOCK, K. R. (1973). East African strains of cowpea aphid-borne mosaic virus *Ann. Appl. Biol.* 74: 75-83.
4. CHANG, M. U., ARAI, K., DOI, Y. & YORA, K. (1976). Morphology and intracellular appearance of orchid fleck virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42: 156-167.
5. CHANG, M. U., DOI, Y. & YORA, K. (1979). Some properties of viruses isolated from gerbera. *Thesis Collection of Yeungnam University* 13: 77-93.
6. 孫茂雄·鄭載東(1987). 韓國産 나리類에서分離한 바이러스에 관한 研究. 1. Broad Bean Wilt Virus 및 Cucumber Mosaic Virus. *한식병지* 3(3): 223-235.
7. 韓國植物保護學會.(1986). 韓國植物病害蟲雜草名鑑 改訂版 韓國植物保護學會 19p.



## PLATE I.

- Fig. 1. Symptoms in *Vigna sesquipedalis* naturally infected with blackeye cowpea mosaic virus(BICMV)  
 Fig. 2. Local lesions(red ring) induced by BICMV in *Chenopodium amaranticolor*.  
 Fig. 3. Symptoms in *Vigna sesquipedalis* naturally infected with cucumber mosaic virus(CMV).  
 Fig. 4. Chlorotic spots induced by CMV in *Cucurbita pepo*.

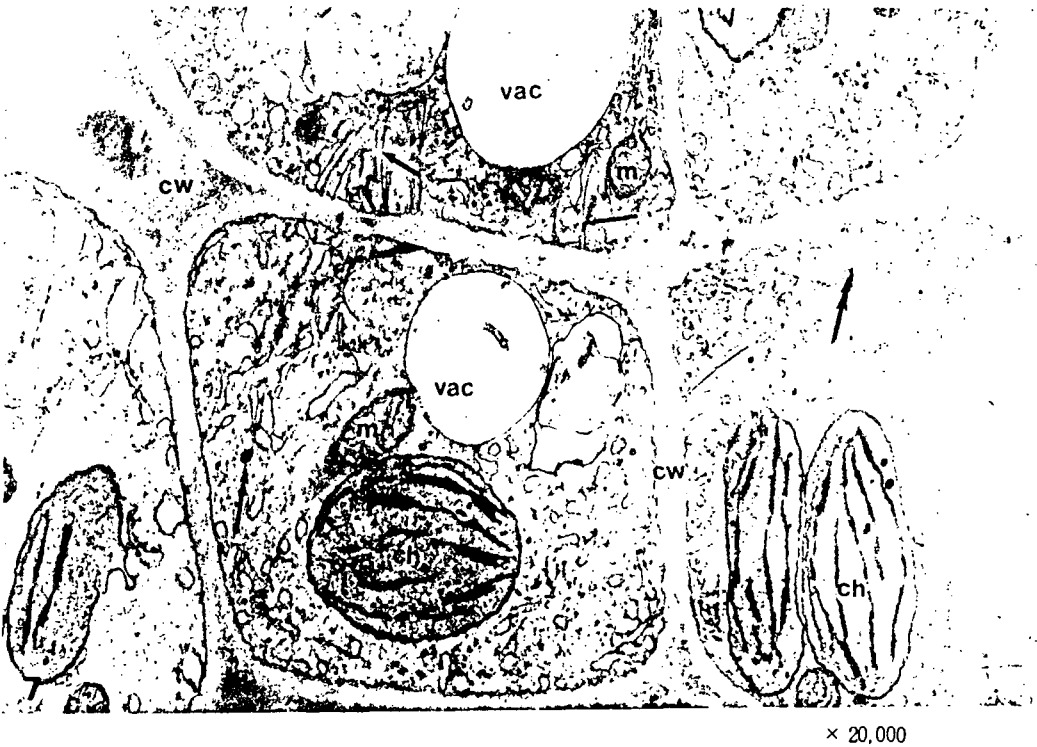
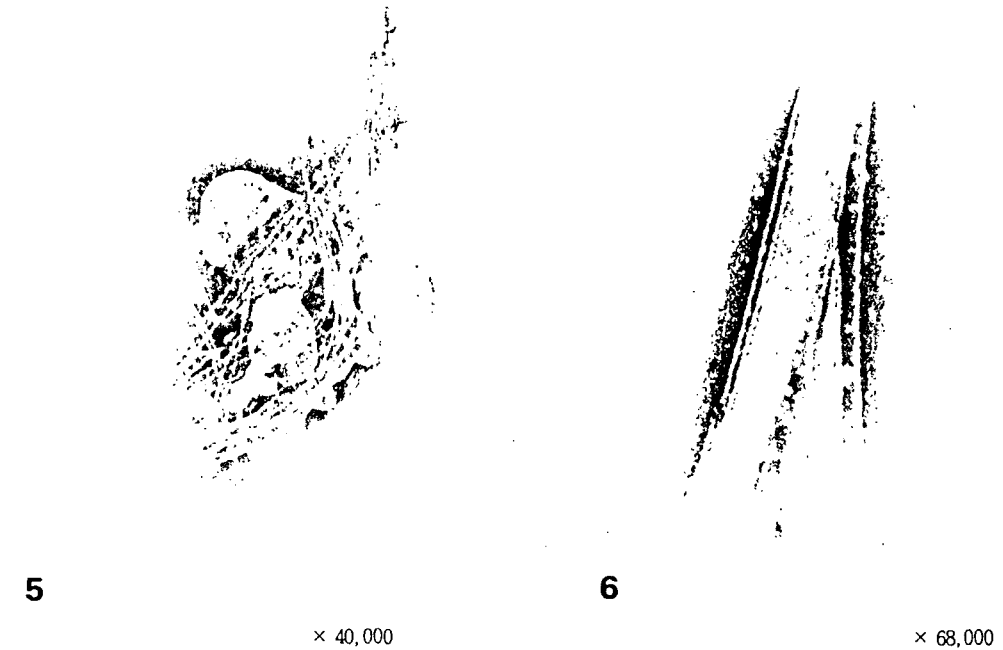
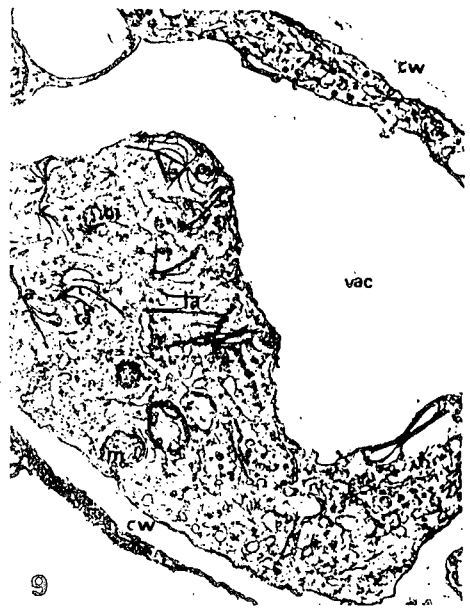


PLATE II.

Fig. 5. BICMV—particles in direct negative staining preparations( $\times 40,000$ ).  
 Fig. 6. Pieces of cytoplasmic inclusion by direct negative staining( $\times 68,000$ ).  
 Fig. 7. Virus particles(arrow) and cytoplasmic inclusion(double arrows) in cytoplasm of mesophyll cells of BICMV infected cowpea( $\times 20,000$ ).



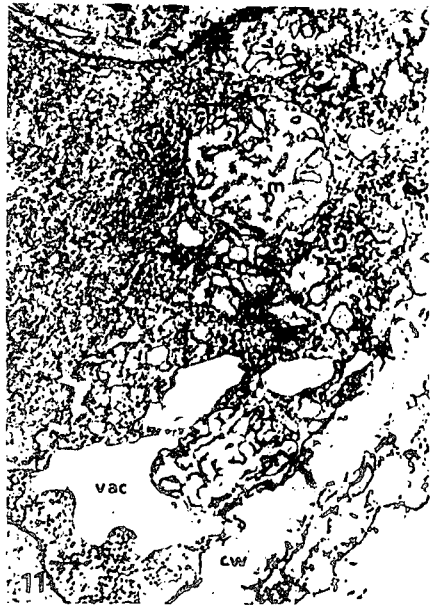
x 20,000



x 20,000



x 80,000



x 34,000

PLATE III.

Fig. 8. Cytoplasmic inclusion (pw : pinwheel, la : laminated aggregate) in cytoplasm of a mesophyll of BICMV infected cowpea (x 20,000).

Fig. 9. Virus particles and cytoplasmic inclusion (pw : pinwheel, la : laminated aggregate, ci : circular) in cytoplasm of a mesophyll cell BICMV infected cowpea. Note the transverse section of particles (x 20,000).

Fig. 10. CMV-particles in direct negative staining (x 80,000).

Fig. 11. Virus particles (arrows) in cytoplasm of a mesophyll cell of CMV-infected *Nicotiana glutinosa* (x 34,000).

Key for labelling : c : cytoplasm, ch : chloroplast, cw : cell wall, m : mitochondria, n : nucleus, t : tonoplast, vac : vacuole.

8. HINO, T. (1960). Studies on the asparagus-bean mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 25 : 178-186.
9. HONDA, Y. & MATSUI, C. (1974). Electron microscopy of cucumber mosaic virus-infected tobacco leaves showing mosaic symptoms. *Phytopathology* 64 : 534-539.
10. KUHN, C. W. (1964). Separation of cowpea virus mixtures. *Phytopathology* 54 : 853-857.
11. LOVISOLO, O. & CONTI, M. (1966). Identification of an aphid-transmitted cowpea mosaic virus. *Neth. J. Plant Pathol.* 72 : 265-269.
12. LOEBENSTEIN, G., COHEN, M., SHABTAI, S., COUTTS, R.H. A. & WOOD, K. R. (1977). Distribution of cucumber mosaic virus in systemically infected tobacco leaves. *Virology* 81 : 117-125.
13. LIMA, J. A., PURCIFULL, D.E. & HIEBERT, E. (1979). Purification, partial characterization, and serology of blackeye cowpea mosaic virus. *Phytopathology* 69 : 420-430.
14. LEE, S. H. (1981). Studies on virus disease occurring in various crops in Korea. Annual Report of the Institute of Agricultural Sciences, ORD, Suwon, Korea. 23 : 62-74.
15. McLEAN, D. M. (1941). Studies on mosaic of cowpea, *Vigna sinensis*. *Phytopathology* 31 : 420-430.
16. MATTHEWS, R. E. F. (1970). *Plant Virology*. Academic Press. New York. 237p.
17. 土崎常男・與良清・明日山 秀文. (1970). ササゲおよび アズキにモザイク病をおこす ウィルスとその種子伝染性. 日植病報 36 : 112-120.
18. TSUCHIZAKI, T., SENBOKU, T., IWAKI, M., PHOLAUPORN, S., SRITHONGCHI, W., DEEMA, N. & ONG, C. A. (1984). Blackeye cowpea mosaic virus from asparagus bean (*Vigna sesquipedalis*) in Thailand and Malaysia and their relationships to a Japanese isolate. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 50 : 461-468.