

팥에 發生하는 바이러스 分離 同定

許南基* · 康文碩* · 河建秀* · 金惠子** · 崔章京**

Identification of Virus from Azuki Bean Plant

Nam Kee Heo*, Moon Seok Kang*, Keon Soo Ha*,
Hye Ja Kim** and Jang Kyung Choi**

ABSTRACT: Three types of virus disease symptoms were observed in azuki bean plants : yellow mosaic; mosaic; severe mosaic with dwarf. The symptoms developed in the indicator plant inoculated with a virus- infected leaf of azuki bean showed similar host range with those of AMV, CMV and AzMV. In antiserum response, yellow mosaic symptom formed sediments with AMV antiserum, mosaic type with CMV antiserum, respectively. From the electron microscope observation, ecliptic particle(18~58×18nm), isometric particle(30nm), and filamentous(730×12nm) combined with inclusion body were observed in yellow mosaic, mosaic, and severe mosaic with leaf curling symptoms, respectively. The results demonstrate that yellow mosaic, mosaic, and severe mosaic with dwarf are caused by AMV, CMV and AzMV.

Key words : Azuki bean, AMV, CMV, AzMV, Antiserum, Diagnosis

팥 栽培 圃場을 관찰하여 보면 팥 식물체에 바이러스병이 感染되어 있는 것을 흔히 볼 수 있으며 그 피해 또한 상당함을 알 수 있다. 그러한 팥에 發生되는 바이러스병에 대하여 日本에서는 Azuki bean mosaic virus(AzMV), Cucumber mosaic virus(CMV), Cowpea mosaic virus(Co-MV), Bean common mosaic virus(BC-MV), Bean yellow mosaic virus(BYMV), Alfalfa mosaic virus(AMV)가 발견되었다는 보고^{9,11)}가 있고, 우리나라에서는 CMV, AzMV가 分離 同定되었다고 보고¹⁾된 바 있다. 또한 既 보고³⁾된 春川 地方에서 蔓延하는 바이러스병 發生 調査 結果 罹病株에서 收穫 팥 種子가 後代에 직접 感染시키기 보다는 當年의 生育기간중의 媒介蟲에 의한 感染이 더 큰 原因인 것으로 판단되었다.

本 試驗은 春川 地方의 팥 재배 圃場에서 發生되는 바이러스를 分離코자 指標植物 反應, 電子顯微鏡 觀察 및 抗血清檢定을 이용하여 試驗한 結果 몇가지 바이러스가 分離 同定되었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

本 實驗은 江原道 春川市에 所在한 江原道 農村 振興院의 팥 재배포장에서 採取한 3가지 特徵的인 病徵을 나타내는 각각의 바이러스 罹病株를 本 實驗의 供試材料로 이용하였다.

* 江原道 農村振興院(Kangwon Provincial RDA, Chunchon 200-150, Korea)

**江原大學校(Coll. of Agric., Kangwon Univ., Chunchon 200-701, Korea)

〈'96. 10. 22 接受〉

1. 感染率 및 收量性 調査

生育 段階別 感染率을 조사하기 위하여 播種直後 32mesh 網絲를 이용하여 放任區를 對比로 幼苗期, 開花前(本葉 7~8엽), 開花期, 成熟期등 生育 段階別로 網室을 除去하여 自然 感染시켜 個體別로 바이러스 症狀을 조사하였고, 10a當 收量은 區當 2.4m²을 수확하여 換算하였다.

2. 指標植物 檢定

팔에 발생되는 바이러스병의 奇主範圍는 豆科 作物을 포함한 3科 8種의 식물에 各 病徵別 試料를 汁液 接種한 後 나타나는 病徵으로 조사하였다. 이때 바이러스의 接種은 carborandum(600 mesh)을 이용하는 일반적인 방법으로 하였다. 奇主植物들은 溫室에서 5~6葉期時 第 3~4葉에 接種한 다음 發現되는 病徵을 매일 觀察하여 各 病徵別 特性을 調査하였다.

3. 바이러스 粒子的 電子顯微鏡 觀察

팔 植物體에서 採取한 바이러스 病徵別 試料를 이용한 電子顯微鏡 觀察은 罹病葉의 切片을 2% phosphotungstic acid(pH 5.0)로 染色하는 dip 法⁴⁾을 이용하였다. 이때 바이러스의 物理的 性質이 不安定하여 分離가 어려운 바이러스를 檢出하기 위하여 試料의 切片(2×2mm)을 7% formaldehyde 또는 8% glutaraldehyde 로 1시간 이상 固定시킨 試料를 이용하였다.

4. 抗血清 檢定

팔에서 分離한 바이러스의 正確한 同定을 위하여 抗血清 實驗을 통한 한천겔 二重擴散法(agar gel double diffusion test)⁷⁾을 이용하였는데 이때 겔은 0.8% agarose, 0.02% sodium azide, 0.85% sodium chloride 및 0.01M phosphate

buffer(pH 7.0)로 製作하였다. 다만 絲狀形 바이러스의 抗血清 反應은 2% sodium dodecyl sulfate(SDS)를 添加하였다. 供試한 바이러스의 抗血清은 AMV(ATCC PVAS-921), CMV(ATCC PVAS-299) 및 AzMV(日本 東京大 分讓)를 이용하였다.

結果 및 考察

1. 바이러스 病徵別 類型

팔 재배 포장에서 自然 發生되는 바이러스 病徵은 크게 3가지 類型으로 區分되었다. 즉 잎에 황화 모자이크(yellow mosaic)를 형성하는 것과 잎에 모자이크(mosaic)를 형성하는 것, 그리고 잎에 심한 모자이크(severe mosaic)를 형성하고 식물체가 萎縮(dwarf)되는 것으로 나눌 수 있었다. 이들 病徵의 分布는 mosaic 病徵이 전 조사 개체 중 13.3%의 比率을 보여 가장 많이 分布하였으며 그 다음으로는 severe mosaic 病徵이 6.9%, yellow mosaic 病徵이 1.9%의 分布를 보였다. 또한 경우에 따라서는 이들 病徵의 구분이 어려운 複合的인 症狀이 나타나는 경우도 있었다(표 1).

2. 生育 段階別 感染率 및 收量性

播種 直後 網室을 설치한 후 幼苗期, 開花前, 開花期 및 成熟期로 구분하여 生育 段階別 網室을 除去하여 自然 感染에 의한 感染率 및 收量性을 조사한 結果(표 2), 放任區가 20.7%인 반면 生育後期인 成熟期까지 媒介蟲을 遮斷한 網室 재배시 感染率은 1.5%로서 生育 後期까지 網室격리 재배시 感染率이 낮은 傾向이었고, 10a當 收量도 放任區 119kg에 비하여 成熟期까지 網室재배시 171kg으로서 45%가 增收되었다. 日野⁵⁾는 팔이 바이러스

Table 1. Distribution of virus-disease symptom naturally occurred in azuki bean

Observed plants	Mosaic	Yellow mosaic	Severe mosaic	Multiple symptom
216	29	15	4	11
(27.2)	(13.3)	(6.9)	(1.9)	(5.1)

() percentage of virus infected plants.

Table 2. Effect of net-covering at various stages on virus infection and yield in azuki bean

	Net-covering stage*				
	Uncovered (control)	Seedling stage	Vegetative stage	Flowering stage	Pre-mature stage
Infection rate(%)±SE	20.7±0.6	16.9±0.7	8.5±0.5	4.0±0.2	1.5±0.2
Yield (kg /10a)±SE	119±6.2	124±7.6	136±10.6	145±12.3	171±12.5

* Net-coverings were maintained up to mature stage.

Table 3. Response of indicator plants inoculated with virus-infected azuki bean leaves

Indicator plant	Developed in indicator plants		
	Yellow mosaic	Mosaic	Severe mosaic
<i>C. quinoa</i>	CS / -	CS / -	- / -
<i>Nicotiana tabcum</i> cv. Samsun	- / Mo	- / M	- / -
<i>N. glutinosa</i>	- / VC, M	- / M	- / -
<i>Vigna unguiculata</i> cv. White eye	- / -	NS / -	- / -
<i>Glycine max</i>	- / YM	- / M	- / VB
<i>Vigna angularis</i>	- / YM	- / M	- / M
<i>Cassia tora</i>	- / -	- / -	- / -

Note) /:inoculated leaf /upper leaf, NS:necrotic spot, CS:chlorotic spot, M:mosaic, Mo:mottle, VC:vein clearing, VB:vein banding, -:no symptom

에罹病되던生育이 나빠지고開花, 結實이 充分치 못하여被害가 크다고 하였는데 本試驗에서도 같은 경향을 보였고 生育 段階別 진딧물에 의한 바이러스罹病率이 收量性에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

2. 指標植物反應

팔에 발생된 3種의 病徵別로 採取한 罹病葉의 汁液을 豆科 作物을 중심으로 3과 8種의 指標植物에 接種시켜 나타난 反應 結果(표 3), yellow mosaic 症狀의 바이러스罹病 植物體로부터 2種의 명아주 接種葉에서 퇴록반점 症狀이, 2種의 담배 接種葉의 上葉에서 각각 얼룩반점 및 葉脈 透明과 mosaic 症狀, 그리고 콩과 팔의 上葉에서 yellow mosaic 症狀이 나타났으나 동부와 결명자에서는 어떠한 病徵도 나타나지 않았다. 따라서 yellow mosaic의 病徵으로부터 分離된 바이러스는 alfalfa mosaic virus (AMV)의 寄株範圍⁶⁾와 類似한 결과를 보였고 팔 식물체에 나타나는 mosaic型의 病徵으로부터는 2種의 명아주 接種葉에

서 壞死斑點과 퇴록반점 症狀을, 동부에서도 괴사 반점 症狀이 나타났고 담배, 콩 및 팔의 接種 上葉에서 mosaic증상이 나타남으로서 cucumber mosaic virus(CMV)의 寄主範圍²⁾와 一致하였다. 그러나 severe mosaic 症狀의 팔에서 分離된 바이러스의 寄主反應은 콩에서 葉脈綠帶 病徵과 팔에서 mosaic 病徵을 보였을 뿐 다른 寄株에서는 接種되지 않아 바이러스 分離에 失敗하였고 결명자에서도 反應이 나타나지 않아 확실하게 同定되지 않았다. 그러나 콩과 팔에서의 病徵으로 보아 azuki bean mosaic virus(AzMV)¹⁰⁾인 것으로 推定되어 이하 實驗에 供試하였다.

4. 電子顯微鏡 觀察

바이러스 粒子 形態에 관하여 金 等⁷⁾은 CMV는 球形의 30nm, AzMV는 絲狀形의 750nm 크기였다고 하였으며 Tamada⁸⁾는 AMV는 稈狀 粒子로서 19~58 × 18nm, AzMV는 750nm의 絲狀形 粒子로 potyvirus group에 속한다고 하였으며 崔 等¹¹⁾도 팔 罹病株로부터 AzMV를 分離同

Table 4. Virus particle observation by electron microscope

Symptom	Classification	Shape	Size
Yellow mosaic	Amvg	Elliptic	18~58 × 18nm
Mosaic	Cucumovirus	Isometric	30nm
Severe mosaic	Potyvirus	Filamentous, Rod-shape	730 × 12nm

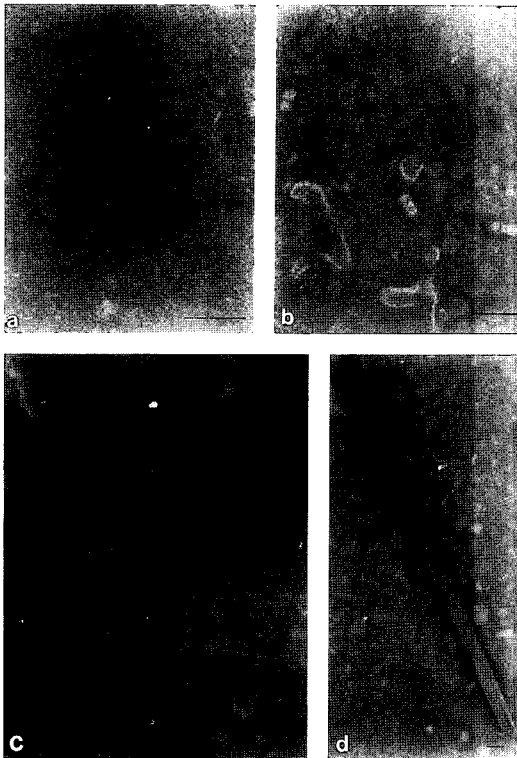


Fig. 1. The virus particle observed from virus infected Azuki bean in electron microscope(Bar=100nm).
a) elliptic b) isometric c) filamentous
d) rod-shape

정한 결과 750nm 크기의 絲狀形이었으며罹病細胞內에서 pinwheel形의 棒立體가 발견되었다고 보고한 바 있는데 本試驗에서도 病徵類型別各罹病葉으로 부터 dip法으로 試料를 調製한 後電子顯微鏡으로 觀察한 結果(표 4, 그림 1) yellow mosaic 病徵의 試料에서 18~58×18nm의 橢圓形 粒子가 多數 觀察되었고 mosaic 症狀의 試料에서는 直徑 30nm의 球形 粒子, severe mosaic 病徵의 試料에서는 730×12nm의 絲狀形 바이러스 粒子의 棒立體가 多數 觀察되었다. 그러나 試料에 따라서는 이들 바이러스 粒子가 混合되어 存在하는 경우도 있었다. 이와 같은 결과는 寄主反應에서 判定된 病徵類型別 바이러스의 同定結果와 類似하였다. 즉 yellow mosaic에서는 AMV, mosaic에서는 CMV, 그리고 severe mosaic에서는 AzMV가 分離되는 것으로 判定되었다.

5. 抗血清 檢定

Agar gel double diffusion法으로 檢定한 結果(표 5), yellow mosaic型의 試料는 AMV 抗血清과 mosaic型의 試料는 CMV의 抗血清과 沈降線이 形成되어 각각 AMV 및 CMV의 同系統으로 判明되었으며(그림 2) severe mosaic型의 試料를 이용한 AzMV 抗體와의 血清反應에서는 血清의 疫價에 問題가 있었는지 어떠한 沈降帶도 形成되지 않아 팔에 존재하는 絲狀形 바이러스의 同定

Table 5. Serological reaction of virus to antiserum in agar gel diffusion test

Symptom	Antiserum	Reaction		
		AMV	CMV	AzMV
Yellow mosaic	Alfalfa mosaic virus(ATCC)	+	-	-
Mosaic	Cucumber mosaic virus(ATCC)	-	+	-
Severe mosaic	Azukibean mosaic virus(Japan)	-	-	-

Note) + : Precipitation, - : No precipitation

ATCC : American type culture collection, Japan : Tokyo Univ.

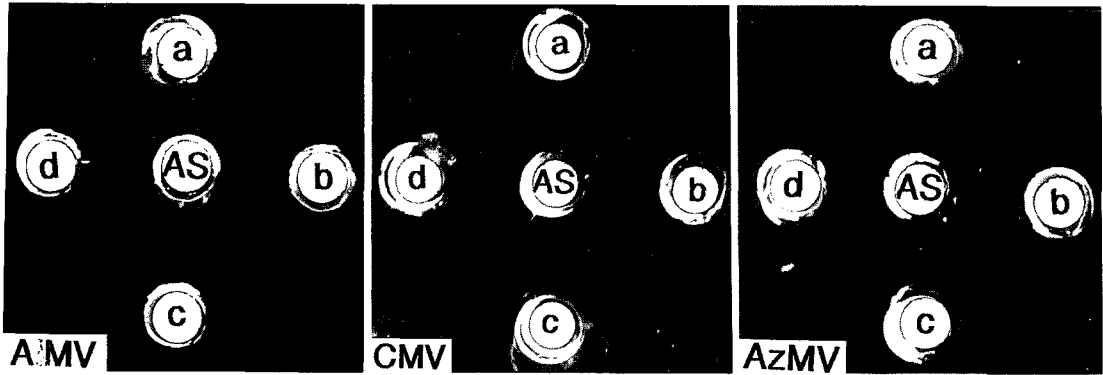


Fig. 2. Serological reaction in agar gel double diffusion test. The central wells contain each antisera of AMV, CMV, and AzMV, and peripheral wells contain crude sap extracted from Azuki bean infected with viruses.

은 되지 않았다. 이 바이러스에 대하여는今後 좀더 구체적으로 檢定이 필요할 것으로 생각되어진다.

摘 要

팥 바이러스병에 대한 基礎資料를 얻고자 病徵의 類型과 生育 段階別 感染정도 및 收量에 미치는 影響을 調査하고 病徵 類型別 바이러스를 分離 同定한 결과는 다음과 같다.

1. 팥에 발생되는 바이러스병의 病徵은 크게 mosaic, yellow mosaic 및 severe mosaic의 3가지 群으로 分類되었으며 病徵別 分布는 mosaic > severe mosaic > yellow mosaic 順이었다.
2. 成熟期까지 媒介蟲 遮斷 재배시의 罹病率은 1.5%(放任區 20.7%)로서 生育 後期에 感染될 수록 罹病率이 낮았으며 10a當 收量도 171kg 으로서 放任區에 비하여 45% 增收되었다.
3. 指標植物 檢定 결과 mosaic 類型은 CMV, yellow mosaic 類型은 AMV, severe mosaic 類型은 AzMV의 奇主範圍와 類似하였다.
4. 抗血清에 의한 各 病徵別 反應結果 yellow mosaic 類型的 試料은 AMV 抗血清과 mosaic

類型的 試料은 CMV의 抗血清과 沈降線이 形成되어 각각 AMV 및 CMV의 한 系統으로 判定되었다.

5. 病徵 類型別 電子顯微鏡 觀察結果 yellow mosaic 類型은 $18 \sim 58 \times 18 \text{nm}$ 의 橢圓形 粒子가 다수 觀察되었고 mosaic 症狀의 試料에서는 直徑 30nm의 球形 粒子, severe mosaic 病徵의 試料에서는 $730 \times 12 \text{nm}$ 의 絲狀形 粒子와 棒粒子가 觀察되었다.

LITERATURE CITED

1. Choi Y.M and Lee S.H. 1989. Identification of Azuki bean mosaic virus on *Phaseolus angularis*. Korean J. Plant Pathol. 5(1):49-53.
2. Francki R.I.B. 1985. The plant viruses, Vol 1, Polyhedral Virions with Tripartite Genome. NY : Plenum press
3. Heo N.K, Kim K.S, Byun H.S, Ha K.S and Choi J.K. 1995. Growth and yield of Azuki bean seed from virus-infected plant. Korean J. Crop Sci. 40(5):569-573.
4. Horne R.W & Wildy P. 1963. Virus struc-

- ture revealed by negative staining. *Advan. Virus Res.* 10:101-170.
5. 日野稔彦. 1962. アズキモザイク病に関する研究. *日植病報*, 27(3) : 138-142.
 6. Jarpar E.M.J and Bos L. 1980. Alfalfa Mosaic virus. *CMI / AAB Description of plant Viruses*, No. 229.
 7. Ouchterlony O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Prog. Allergy* 6:30-154.
 8. Tetsuo Tamada. 1988. 日本の大豆ウイルス病害. *Hokkaido 中央農業 試験場*. pp.93-107.
 9. Tsuchizaki Tsuneo & Toshihiro O. 1987. Relationship among bean mosaic virus, black eye cowpea virus, Azuki bean mosaic virus and soybean mosaic virus, *Ann, Phytophath. Soc. Japan*.
 10. 土崎常男. 1993. 作物ウイルス病 辞典. 全国農村教育協会.
 11. 吉田幸二, 土崎常男. 1978. 北海道のアズキから分離されたウイルス. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*.