

## 한국산 글라디올러스에 발생하는 바이러스 2. Broad Bean Wilt Virus, Cucumber Mosaic Virus 및 Tobacco Rattle Virus

박인숙 · 김규원 · 권현정<sup>1</sup> · 장무웅<sup>1\*</sup>  
영남대학교 원예학과, <sup>1</sup>생물학과

### The Viruses in *Gladiolus hybridus* cultivated in Korea 2. Broad Bean Wilt Virus, Cucumber Mosaic Virus and Tobacco Rattle Virus

In Sook Park, Kiu Weon Kim, Hyun Jung Kyun<sup>1</sup> and Moo Ung Chang<sup>1\*</sup>

Dept. of Horticulture, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Biology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**ABSTRACT:** Gladioli (*Gladiolus hybridus*) showing flower colour breaking leaf mosaics, notched leaf, and dwarfing or lack of visible symptoms were collected from gladioli growing areas in Taegu and Kyungpook province, Korea. The three viruses isolated from the naturally infected gladioli were identified as broad bean wilt virus (BBWV), cucumber mosaic virus (CMV), and tobacco rattle virus (TRV) by their host range, immunosorbent electron microscopy (ISEM), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), direct tissue blotting immunoassay (DTBIA), and intracellular symptoms. By DTBIA and ISEM, TRV was detected in gladioli showing notched leaf, while CMV was frequently detected in gladioli with dwarfing, color breaking and malformation of flowers. BBWV was also often detected in many symptomless gladioli plants, but TRV was detected in notched-leaf of gladioli. Electron microscopic examination of negatively stained preparations showed that BBWV and CMV are spherical particles of 28 nm and 30 nm in diameter, and TRV is rigid rod-shaped particles of 40~200 nm in length. The rigid rod-shaped virus particles reacted positively with TRV antiserum in ISEM and DTBIA, respectively.

**Key words:** gladiolus virus, BBWV, CMV, TRV

이 연구에서는 대구 및 경북지역의 꽃판매점에서 수거한 글라디올러스와 영남대학교 농장에 재배중인 글라디올러스에서 모자이크, 꽃잎 얼룩무늬 및 기형, 잎의 가장자리가 일정한 간격으로 찢겨진(notched leaf) 증상을 나타내는 식물체로부터 DN법(11)에 의하여 전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 28 nm와 30 nm의 구형입자, 80~100 nm의 구형입자, 40~200 nm의 여러 종류의 막대입자, 780 nm의 사상입자, 5 종류의 바이러스 입자가 검출되었다. 이들 바이러스 중에서 potyvirus에 속하는 bean yellow mosaic virus(BYMV)와 clover yellow vein virus(CIYVV)는 이 논문 시리즈의 제1보에서 보고하였고, 나머지 바이러스의 동정을 하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

#### 재료 및 방법

1994년부터 1996년까지 대구 및 경북지역의 꽃판매점에서 채집한 글라디올러스와 영남대학교 농장에 재배중인 글라디올러스에서 모자이크, 생육불량, 꽃잎 얼룩무늬 및 기형(Fig. 1-A), 잎의 가장자리가 일정한 간격으로 찢겨진(notched leaf)(Fig. 1-B) 등의 증상을 나타내는 식물체로부터 DN법(11)에 의하여 투과전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 28 nm 및 30 nm의 작은 구형입자, 40~200 nm의 여러 종류의 막대입자를 확인하였다. 이들 3 종류의 바이러스 입자가 검출된 글라디올러스 식물체를 바이러스의 시료원으로 하였다.

Cucumber mosaic virus(CMV; ATCC PVAS-30), tobacco rattle virus(TRV; ATCC PVAS-820)의 항혈청은 American Type Culture Collection(ATCC)에서, 한국산 CMV의 보통계의 항혈청은 담배인삼연초연구소 박은경 박사로부터, 일본산 CMV의 보통계와 broad bean wilt virus(BBWV)의 항혈청은 日本 東京大學 農學部 植物病理學 研究室 日比教授로부터 각각 분양 받아 본 실험의 면역학적 반응실험

\*Corresponding author.

에 사용하였다.

바이러스에 감염된 글라디올러스 이병엽에 0.01 M 인산 완충액(pH 7.0)을 넣어 막자사발에서 잘게 갈아서 이중거즈로 착즙하여 바이러스의 즙액접종 시료로 carborandum 을 이용한 방법에 의하여 접종하였다. 즙액접종 시험에 사용된 검정식물은 Table 1에 나타난바와 같이 전 세계적으로 글라디올러스에 발생하는 14 종류의 바이러스 중에 즙액접종이 가능한 13 종류의 바이러스에 대한 가장 대표적인 판별 및 증식 기주식물 22 종류이다. 이들 식물체는 전 부 온실에 키웠고, 주기적으로 살충제를 뿌리며 진딧물 등 바이러스 매개곤충의 발생을 방제했다.

바이러스 입자의 검출은 처음에 2% phosphotungstic acid(PTA, pH 7.0)나 2% uranyl acetate를 이용한 DN법으로 제작된 시료에 대하여 바이러스의 형태를 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다. 감염잎 조직내의 바이러스 입자의 존재양식을 관찰하기 위하여 이병식물의 잎조직을 2.5% glutaraldehyde에 3시간 전고정하고, 1% osmium tetroxide에 1시간 후고정한 다음 ethanol로 탈수하였다. 이것을 Epoxy 수지에 포매하였다. 초박절편된 시료는 uranyl acetate와 lead citrate에 2중 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. Immunosorbent electron microscopy (ISEM)은 Miline and Loisoni의 방법(25)에 따르거나, 최근에 수정법으로 사용되고있는 trap and decoration method로 수행하였다. ELISA법은 Clark and Adams의 microplate method(10)에 의거 실험을 실시하였다. Direct Tissue Blotting Immunoassay(DTBIA)법은 Lin 등의 방법(21)을 약간 수정한 박 등의 방법으로 수행하였다(28).

## 결 과

**병원 바이러스의 동정.** 1994~1996년 사이 대구 및 경북지역의 꽃판매점에서 채집한 글라디올러스와 영남대학교 농장에 재배중인 글라디올러스에서 모자이크, 괴저반점, 꽃잎 얼룩무늬(Fig. 1-A), 생육불량, 잎의 가장 자리가 일정한 간격으로 찢겨진(notched leaf) 등의 증상(Fig. 1-B)을 나타내는 식물체로부터 5 종류의 바이러스를 분리하였다. 즉 DN법(11)에 의하여 투과전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 28 nm 및 30 nm의 작은 구형입자, 80~100 nm의 대형 구형입자, 40~200 nm의 여러 종류의 막대입자, 780 nm의 사상입자와 세포질 봉입체를 확인하였다. 이중 28 nm, 30 nm의 구형입자와 40~200 nm의 막대입자에 대하여 기주범위, 입자의 형태, 혈청학적 반응, 감염세포 내의 바이러스 입자의 소재양식 및 병변 등을 조사한 결과, broad bean wilt virus(BBWV), cucumber mosaic virus(CMV), tobacco rattle virus(TRV)로 동정하였다.

### Tobacco rattle virus(TRV).

#### ① 글라디올러스의 병징

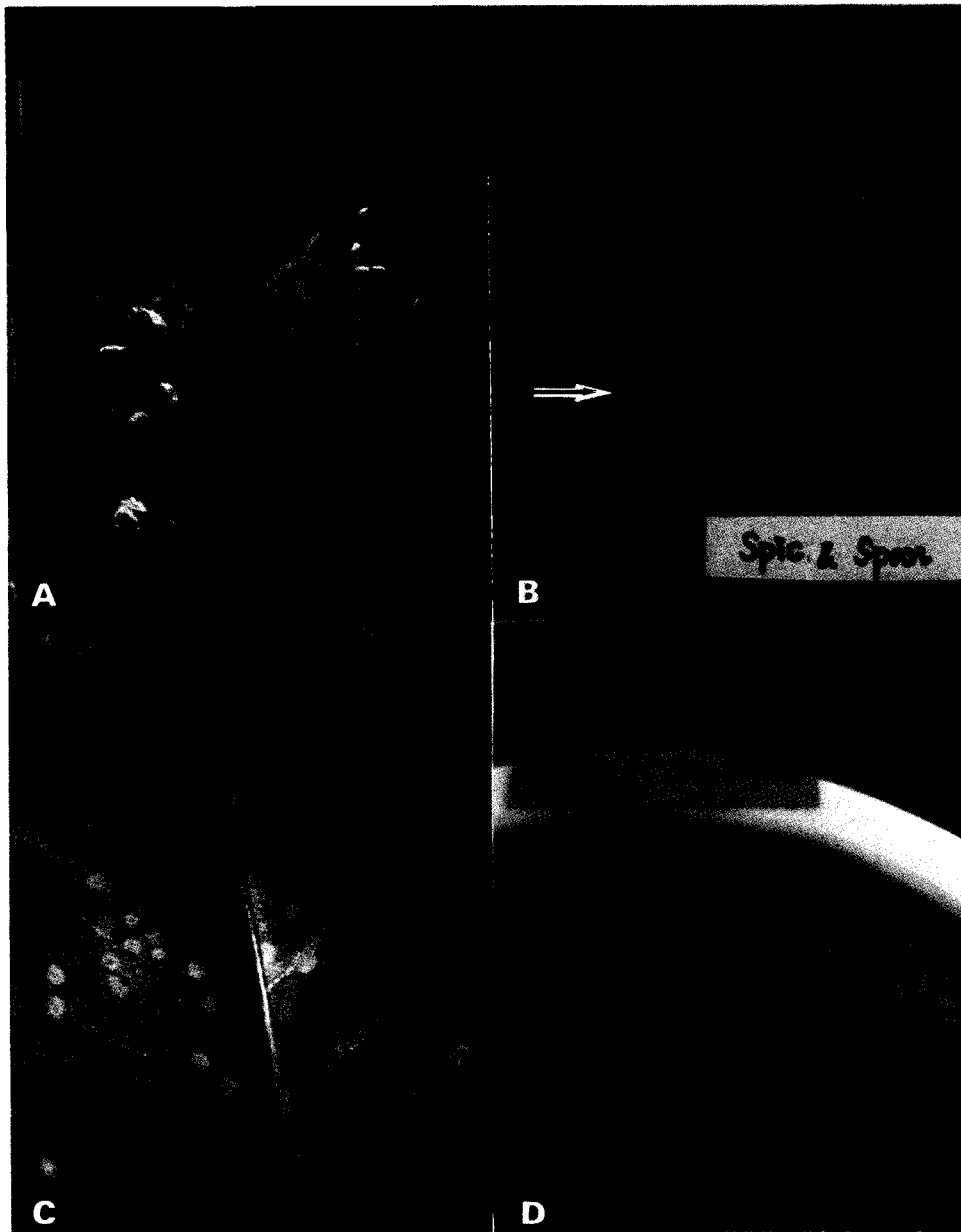
시료로 제공된 글라디올러스로부터 5 종류의 입자가 검출되었는데, 이들 바이러스는 단일 입자로 관찰되는 일은 거의 없었고, 2 종류 이상의 입자가 혼합적으로 검출되었기 때문에 시료로 제공된 글라디올러스는 2 종류의 바이러스에 복합감염되어 있음을 확인하였다(8, 28). 더우기 이들 바이러스 각각의 단독감염에 의한 글라디올러스에 대한 병징은 확인되지 않았다. 그러나 이 실험에서는 잎의 가장 자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상(notched leaf)(Fig. 1-B)의 글라디올러스에서는 40~200 nm 정도에 이르는 다양한 길이의 막대입자(Fig. 2-A)만을 관찰할 수 있었다. 다음의 여러 가지 실험 결과에서도 잎의 가장 자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상은 40~200 nm의 입자, 즉 TRV 단독감염에 의한 증상임이 확인되었다.

#### ② 바이러스 입자의 형태

잎의 가장 자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상을 나타내는 글라디올러스 잎, 즙액접종에 의하여 감염된 *Nicotiana benthamiana*의 잎국부병반 부분을 DN법(11)에 의하여 전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰하였다. 그 결과, 비교적 길이가 긴 입자(150~200 nm)와 다소 길이가 짧은 막대 모양의 입자(40~90 nm)만을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-A). 잎의 가장 자리가 일정한 간격으로 갈라진 모양을 나타내는 글라디올러스를 접종원으로 하여 수십 종의 지표 식물에 즙액접종한 결과 *N. benthamiana* 등의 국부감염 잎에서도 동일한 입자(40~200 nm)만이 관찰되었으므로 바이러스 접종원도 40~200 nm의 입자에 단독감염 되었다. 따라서 글라디올러스의 잎의 가장 자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상을 나타내는 병원 바이러스의 입자는 40~200 nm의 막대 모양임이 확인되었다.

#### ③ 기주범위

40~200 nm의 막대모양의 입자에 단독감염이 확인된 *N. benthamiana* 등의 지표식물의 국부병반을 접종원으로 하여 수종의 지표 식물에 즙액접종한 결과, *N. benthamiana*에 전신감염이 확인되었다. 기주범위를 조사하기 위하여 전신감염된 *N. benthamiana*를 접종원으로하여 22 종류의 지표 식물에 즙액접종한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. *Cucumis sativus*에서는 접종 후 3일에 접종 잎에 국부병반을 형성하였으나, 전신감염은 관찰되지 않았다. *Phaseolus vulgaris*는 접종 후 4~6일에 접종 잎에 괴저반점을 형성하였으나, 전신감염은 관찰되지 않았다. *N. tabacum* Samsun의 접종잎에서는 퇴록의 둥근무늬가 나타나고(Fig. 1-C), *Xanthi*의 접종잎에서는 괴저 둥근무늬가 나타났다. *N. clevelandii*의 접종잎에 접종 후 3일에 퇴록의 둥근무늬와 괴저 둥근무늬를 형성하고, 약 7일 후에 접종하지 않은 잎에서도 퇴록 및 괴저 둥근무늬를 생성하여, *N. tabacum*과는 다른 전신감염을 나타내었다. *N. benthamiana*에 접종하고 이 주일 이상 지난 후에 접종잎에 퇴록반점을 나타내기 시작하여 시간이 경과함에 따라 반점은 점점 확대되었



**Fig. 1.** A: Symptoms (yellow mosaic, colour breaking and stunting) in *Gladiolus hybridus* naturally infected with bean yellow mosaic virus, BBWV, CMV, B: Notched-leaf (arrow) in *G. hybridus* infected with TRV. C: Leaf of *N. tabacum* (Samsun) inoculated with sap extract of notched-leaf of *G. hybridus*. Note the chlorotic ringspots on inoculated leaf. D: Systemical symptoms in *N. benthamiana*. Note the chlorotic and necrotic ringspots on non-inoculated leaf.

고, 때로는 엽맥을 따라 퇴록부분이 확대되는 경우도 관찰되었다. 접종한지 10일 정도 지나자 접종하지 않은 잎에서 퇴록 및 괴저 둥근무늬를 형성하거나 심한 뒤틀림과 황화 증상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1-D). 이 식물체에서는 잎뿐 아니라 화탁에서까지 병징을 볼 수 있었다. *N. benthamiana*는 생장조건이 까다롭지 않고, 비교적 생장률이 높고, 전신감염이 되며, 전자현미경으로 확인한 결과에 의하면 바이러스 입자의 생성량도 다른 지표식물보다 월등히

많았기에 TRV의 증식식물로 적합하였다.

#### ④ 면역전자현미경적 관찰(ISEM)

즙액접종에 의하여 단독감염이 확인된 *N. benthamiana*의 국부병반의 조즙액에 희석한 TRV 항혈청을 반응시켜 전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 2-B의 전자현미경 사진에서 볼 수 있듯이 바이러스 입자의 외피단백질과 TRV 항혈청과의 항원-항체반응으로 인해 decoration이 일어났음을 관찰할 수 있었다. 따라서 글라디올러스의 잎 가장 자

**Table 1.** Experimental host range of broad bean wilt virus, cucumber mosaic virus, tobacco rattle virus, isolated from *Gladiolus* in Korea<sup>a)</sup>

Test plant	CMV	TRV	BBWV
<i>Achyranthes japonica</i>	-/-	-/-	+/Mo,D
<i>Brassica rapa</i>	-/-	-/-	-/+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	N. Sp/- <sup>#</sup>	N. Sp/- <sup>#</sup>	N. Sp/L,W <sup>#</sup>
<i>C. quinoa</i>	N. Sp/- <sup>#</sup>	N. Sp/- <sup>#</sup>	N. Sp/L,W <sup>#</sup>
<i>Cucumis sativus</i>	W/Mo	N. Sp/- <sup>#</sup>	-/-
<i>Cucurbita pepo</i>	W/Mo*	-/-	-/-
<i>C. moschata</i>	W/Mo	-/-	-/-
<i>Datura stramonium</i>	N. Sp/-	-/-	NR/NR,L
<i>Gomphrena globosa</i>	N. Sp/Mo	-/-	S/-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	N.Sp/-	N. Sp/- <sup>#</sup>	+/-
<i>Pisum sativum</i>	-/-	-/-	-/+
<i>Raphanus sativus</i>	-/-	-/-	-/+
<i>Vicia faba</i>	N. Sp/-	-/-	N.Sp/W*
<i>Vigna sesquipedalis</i>	N. Sp/- <sup>#</sup>	-/-	N.Sp/- <sup>#</sup>
<i>Nicotiana glutinosa</i>	CR.Sp/Mo*	N. Sp/- <sup>#</sup>	C.R.Sp/Mo,Vc
<i>N. tabacum</i>	C.Sp/Mo*	CR.Sp/-	CR/-
<i>N. clevelandii</i>	CR Sp/Mo*	N.Sp/N.Sp,D*	Sp/+
<i>N. benthamiana</i>	CR.Sp/Mo*	N.So/Vc,D*	-/-
<i>Petunia hybrida</i>	+/Mo	-/-	-/M
<i>Plantago asiatica</i>	-/+	-/+	+/R.Sp
<i>Spinacia oleracea</i>	-/-	+/-	C.Sp/Mo <sup>#</sup>
<i>Tetragonia expansa</i>	C. Sp/N. Sp	N. Sp/-	C. Sp/-

<sup>a)</sup> Symptom abbreviation: C=chlorosis, D=distortion, G=green island, L=Line pattern, Mo=mosaic, Mt=mottle, Na=narrowing, N=necrosis, R=ring, S=symptomless, Sp=spot, St=stunt, Vc=vein clearing, W=wilt, +=uncertain, and -=no infection detected based on back-inoculation. Symptoms on inoculated leaves to the left of the slash and symptoms in systemically infected leaves to the right of the slash. \* and #: These plants were available for propagation (\*) and assay (#) of BYMV and CIYVV.

리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상에서 분리된 40~200 nm 막대모양의 바이러스 입자는 TRV임을 확인하였다.

#### ⑤ 감염 조직내 바이러스의 존재양식

즙액접종에 의하여 감염된 *N. benthamiana*의 국부병반을 초박절편하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 감염조직의 각종 세포의 세포질이나 액포 내에 18×40~180 nm의 막대모양의 입자가 집단 혹은 산재해 있었다(Fig. 3-A, B). 150~180 nm의 긴 입자는 세포질내 혹은 액포내에서 다발상으로 배열된 양상으로 관찰되었다(Fig. 3-B). 세포소기관인 핵이나 엽록체 내에서는 바이러스 입자를 확인할 수 없었다. 40~80 nm의 짧은 입자는 세포질 내에서 산재하고 있는 상은 확인되었으나(Fig. 3-B), 긴 입자와 같이 집단으로 존재하는 예는 확인되지 않았다. 막대모양의 입자가 전신감염된 잎의 도관내에 산재하고 있는 상도 가끔 확인되어, 바이러스 입자상태로 도관을 통하여 식물전체로 이동함을 확인할 수 있었다. 또한 특이할만한 사실은 바이

러스 입자들이 미토콘드리아와 엽록체에 인접해 있는 상도 확인되었다(Fig. 3-A). 엽록체는 비정상적으로 팽대해 있고, 내부에는 작은 낭(sac)들이 형성되어 있음을 볼 수 있었으며, 액포(vacuole)들이 발달해 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-C).

#### ⑥ DTBIA(Direct Tissue Blotting Immunoassay)

Tsuneyoshi와 Sumi의 DTBIA법을 적절하게 변형시켜 글라디올러스에서 TRV의 존재 유무를 판정하였다(28). 그 결과는 TRV 항혈청으로 처리한 nitrocellulose membrane에서 잎의 가장자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상의 글라디올러스 처리구는 항원 항체반응에 의해 자주색으로 발색되었으나(Fig. 3-D, No. 4, 5, 7), 조직배양에서 얻어진 바이러스 무독인 대조구(Fig. 3-D, No. 1, 2)에서는 무반응이었다. 따라서 이 실험은 유효한 것으로 판단하여 잎 가장자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상의 글라디올러스는 TRV에 감염되었으므로 바이러스 시료로 이용하였다.

#### Broad bean wilt virus(BBWV).

##### ① 글라디올러스의 병징

BBWV는 가벼운 모자이크, 꽃잎얼룩무늬 등의 증상 및 무병징을 나타내는 글라디올러스에서 주로 분리되었다.

##### ② 바이러스 입자의 형태

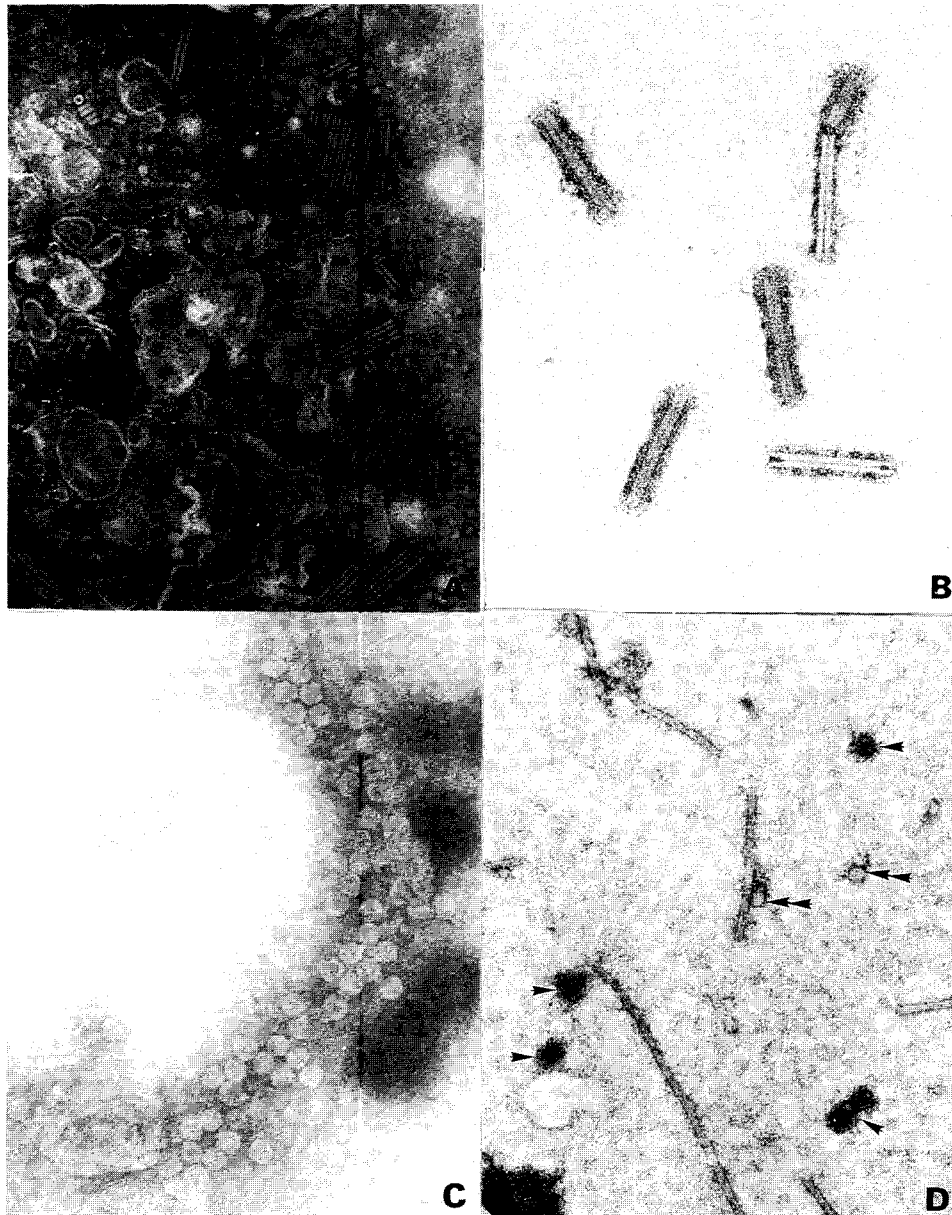
BBWV 입자가 확인된 글라디올러스의 즙액을 접종한 *N. glutinosa*와 *Chenopodium amaranticolor*의 이병엽을 사용하여 DN법에 의해 투과전자현미경으로 관찰하였던 바, 직경 약 28 nm의 작은 공모양의 캡시드 구조를 가진 입자가 많이 검출되었다(Fig. 2-D).

##### ③ 기주범위

즙액접종에 의하여 접종 잎에 황색 또는 괴저성의 점무늬를 형성하고, 접종 후 1주일째는 새로운 잎에 모자이크가 형성되면서 위축과 기형을 동반한 *C. amaranticolor*, *C. quinoa*의 상엽을 ISEM으로 조사한 결과, BBWV의 단독 감염이 확인되었다. 단독감염이 확인된 *C. amaranticolor* 상엽을 사용하여 22 종류의 지표식물에 즙액 접종한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 이 두 검정식물은 CMV, CIYVV, BBWV, BYMV 4종의 바이러스 중에 1종 이상의 혼합 감염된 글라디올러스로부터 BBWV를 분리하는데 이용하였다. *N. glutinosa*에서는 접종후 6일째 접종잎에 퇴록색의 둥근무늬를 형성하였다. 그후 환경에 따라 새로운 잎에 둥근무늬를 형성하기도 하였다. 질경이(*Plantago asiatica*)에서는 접종잎에 황색 점무늬가 형성되고, 새로운 잎에는 퇴록색의 둥근무늬를 나타내었다. 쇠무릅(*Achyranthes japonica*)에서는 접종잎에 병징이 없었으나, 새로운 잎에는 모자이크와 황화를 동반한 위축증상을 나타내었다.

##### ④ 혈청반응시험

이 바이러스의 기주범위, 입자의 형태 등의 결과가 BBWV와 유사하여 BBWV의 항혈청을 이용하여 한천겔 확산법과 ISEM에 의하여 혈청학적 유연관계를 조사하였



**Fig. 2.** A: Rod-shaped particles in negatively stained preparations from notched-leaf of gladiolus ( $\times 60,000$ ). B: Rod-shaped particles decorated with TRV antiserum in ISEM preparations from *N. benthamiana* (Fig. 1-D) infected with TRV ( $\times 80,000$ ). C: Spherical particles of CMV in negatively stained preparations from infected gladiolus ( $\times 110,000$ ). D: Spherical particles (arrows) decorated with CMV antiserum, non-decorated filamentous particles (BYMV, CYVV) and spherical particles (BBWV; double arrows) in ISEM preparations from gladiolus (Fig. 1-A)( $\times 100,000$ ).

다. 그 결과 글라디올러스에서 분리한 28 nm의 바이러스는 BBWV의 항혈청과 특이적으로 반응하였다.

#### ⑤ 감염 조직내 바이러스의 존재양식

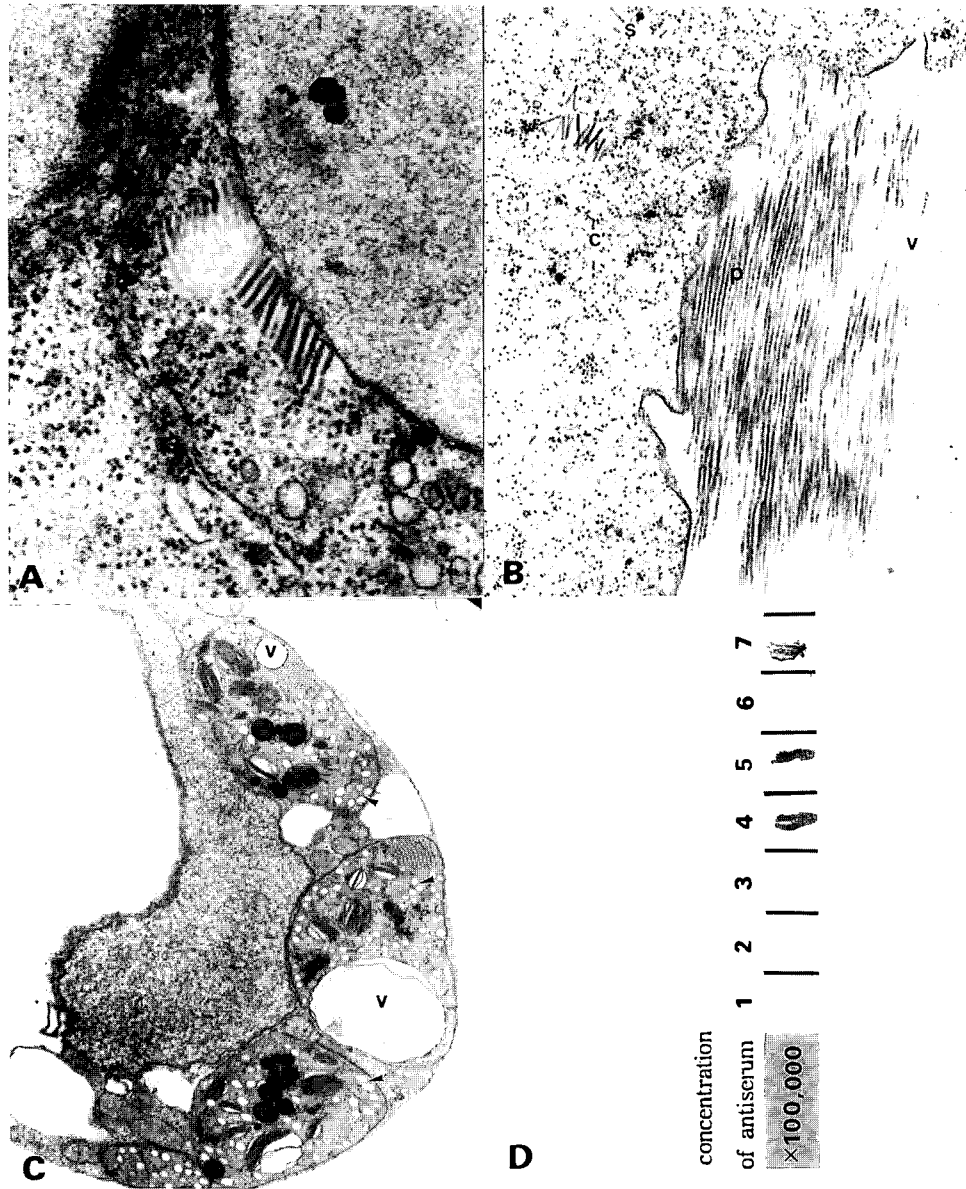
즙액접종에 의하여 감염된 *C. amaranticolor*의 이병엽을 초박절편하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 어느 시료에서도 작은 공모양의 입자가 표피세포, 엽육세포, 통도조직의 유세포 등의 세포질과 액포 및 사관 내에 산재 혹은 결정배열로서 존재하였다. 특히 BBWV의 감염 세포 내에

특이적으로 생성되는 막상 구조물이 모여서 된 봉입체 (vesicular body)가 반드시 관찰되었고, 가끔 이들 봉입체 내에 혹은 주위에 바이러스 입자의 집단 또는 결정 배열상을 확인하였다.

#### Cucumber mosaic virus(CMV).

##### ① 글라디올러스의 병징

CMV는 주로 심한 꽃잎얼룩무늬 및 기형 등의 증상을 나타내는 꽃잎(Fig. 1-A)으로부터 분리되었기 때문에 CMV



**Fig. 3.** Spongy parenchyma cells of TRV inoculated-leaf of *Nicotiana benthamiana*. A: Side by side array of long particles associated organelle membrane in the cytoplasm ( $\times 51,000$ ). B: Long (l) and short (s) particles in cytoplasm (c) and particle aggregate (p) in vacuole (v) ( $\times 25,000$ ). C: Abnormally enlarged chloroplasts with vacuoles (v) and membranous sacs (arrows) in the cytoplasm ( $\times 9,000$ ). D: DTBIA for TRV-infected gladiolus leaves infected to TRV antiserum. No. 1 and No. 2 from virus-free gladiolus. No. 4, No. 5 and No. 7 from cultivated gladiolus infected with TRV.

의 감염에 관련된 가장 일반적인 글라디올러스 병징으로 알려진 여러가지 꽃잎에 나타난 증상(10)과 잘 일치하였다. 투과전자현미경과 즙액접종에서 *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*의 모자이크 상엽이 단독감염이 되었음이 확인되었다.

② 기주범위

심한 꽃잎얼룩무늬 및 기형 등의 증상을 나타내는 글라디올러스의 꽃잎을 즙액접종원으로 하였다. 단독감염이 확인된 *C. sativus*의 모자이크 상엽을 사용하여 22 종류의

지표식물에 즙액 접종한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. *P. vulgaris*, *Vigna sesquipedalis*에서는 접종 일에 괴사 반점만 형성하였다. *N. tabacum*에서는 접종 일에 황화반 점을, 상엽에는 전형적인 모자이크 증상을 나타냈다. *N. glutinosa*에서는 접종 일에 황화 등근 무늬를, 상엽에는 모자이크 증상을 나타냈다. 이들 검정식물은 CMV, CIYVV, BBWV, BYMV, TRV, 5 종류의 바이러스 중에 1종의 바이러스에 혼합감염된 글라디올러스로부터 CMV를 분리하는데 유용하였다.

### ③ 바이러스 입자의 형태

*N. tabacum*의 이병엽을 사용하여 DN법에 의해 투과전 자현미경으로 관찰하였던 바, 바이러스 입자를 확인할 수 없어서 osmium tetroxide로 고정한 후, DN법으로 만든 시료에서는 약 30 nm의 hollow center를 가진 공모양 입자가 많이 검출되었다(Fig. 2-C).

### ④ 혈청반응시험

이 바이러스의 기주범위, 입자의 형태 등의 결과가 CMV와 유사하여 CMV의 항혈청을 이용하여 한천겔 확산법과 ISEM법에 의하여 혈청학적 유연관계를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 2-D의 전자현미경 사진에서 볼 수 있듯이 30 nm의 바이러스 입자의 외피단백질과 CMV 항혈청과의 항원-항체반응으로 인해 decoration이 일어났음을 관찰할 수 있었다. 글라디올러스의 조증액을 이용한 ISEM법에 의한 CMV의 검출이 한천겔 확산법보다 훨씬 민감도가 높고, 간편하며, 시간도 1/4 정도 단축되었다.

## 고 찰

글라디올러스 잎에 모자이크 및 괴사반점과, 꽃잎 얼룩 무늬 등의 단독증상 또는 복합증상을 나타내는 식물체로부터 분리한 28 nm, 30 nm의 구형입자와 40~200 nm의 막대 입자에 대하여 기주범위, 입자의 형태, 혈청학적 반응, 감염 세포 내의 바이러스 입자의 소재양식 및 병변 등을 조사한 결과, broad bean wilt virus(BBWV), cucumber mosaic virus (CMV), tobacco rattle virus(TRV)로 동정하였다. 특히 한국산 글라디올러스의 잎 가장자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상을 나타내는 병원 바이러스인 40~200 nm 막대모양 입자를 TRV의 한 계통으로 동정하였는데, 이것은 한국산 식물 중에서 TRV의 자연감염이 확인된 최초의 보고이다.

TRV는 Tobravirus에 속하는 바이러스로 기주범위가 초본성의 일년생 및 다년생과 목본성 다년생의 재배식물과 야생식물에서 100여종 이상임이 알려져 있다(13). 재배가 전세계적이고, 광범위한 생산면적을 가지고 있는 구근의 화훼류인 튜울립, 글라디올러스, 히야신스, 백합, 수선화, 크로커스 등은 TRV의 자연감염 기주로 알려져 있다(23). 이들 구근류에 TRV 감염에 의한 병징은 일반적으로 잎에서 반점무늬 증상을 나타내고, 본 실험에서 확인된 바와 같이 TRV에 단독감염된 글라디올러스 잎의 가장자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상(notched leaf)은 Harrison와 Robinson 및 Loebenstein 등이 보고한 TRV에 감염된 글라디올러스의 증상과 잘 일치하였다(13, 23). 또한 이미 보고된 TRV의 기주범위(13, 16, 27), 입자형태(13, 22), 감염 세포내 바이러스의 존재양식(13, 27) 등의 결과는 약간의 차이는 있으나, 거의 동일하였다.

BBWV는 기주범위가 넓어 14과 50여종의 식물에 감염된다(6, 12, 24, 26, 29, 30, 35). 한국에서는 시금치, 백합, 고

추, 질경이, 쇠무릎, 수선에서 BBWV의 자연감염이 확인되었다(5, 6, 9, 20). BBWV에 대한 종합적인 결과와 고찰은 장과 정의 보고(6)에 상세하게 논의되었으며, 이번 실험에서 수종의 지표식물에 특징적인 병징이 보였다. *N. glutinosa*의 접종잎에 황화 둥근무늬와 상엽의 모자이크 증상이 나타났고, *Vicia fava*의 접종 잎에 갈색 반점이 나타났고, 상엽에 괴사증상(dark brown wilt symptom)이 나타났다. 이들은 BBWV의 감염에 의한 전형적인 증상으로 BBWV의 지표식물의 한 진단에 기준이 될 수 있다. 종자 파종에서 얻은 질경이와 쇠무릎의 유묘에 BBWV를 즙액 접종한 결과, BBWV의 자연감염에 의한 병징과 동일하게 질경이는 퇴록색의 둥근 무늬가, 쇠무릎은 모자이크와 위축 증상이 확인되었다. 이와 같은 증상의 질경이와 쇠무릎이 농경지 주위에서 확인되었을 때는 BBWV의 감염 위험이 있으므로 이들을 제거함이 좋겠다.

BBWV가 글라디올러스에서 자연감염이 처음으로 확인되었다. 글라디올러스는 구근류로 영양번식을 하고, 봄에서 가을까지 생육기간이 길다. 따라서 진딧물 전파에 의한 타 식물에 중요한 전염원이 될 가능성이 크기 때문에 주의가 필요하다. 장과 정의 보고에 의하면 질경이, 쇠무릎, 나리류 등에서도 BBWV가 자연 감염되어 있음이 확인되었다(6). 이들 식물도 다년생이고, 경작지 주위에서 주로 자생하고 있기 때문에 글라디올러스와 함께 한국에서 재배되고 있는 농작물에 있어서 BBWV의 중요한 전염원으로서 가장 유력하다고 생각된다.

CMV는 현재로 세계 각국에서 보고된 자연감염의 기주는 67과 470여종에 이른다. 한국에서는 20여종의 자연감염의 기주에서 CMV가 분리되었는데(5, 6, 9), 글라디올러스에서의 CMV의 분리는 본 연구가 처음이다. CMV와 BYMV는 재배되고 있는 글라디올러스의 모든 품종에 가장 만연되어 있고, 피해도 가장 심한 바이러스로 알려져 있다(1, 3, 23). 글라디올러스의 꽃잎은 CMV의 농도가 높고, 진딧물이 쉽게 접근하는 부위로 알려져 있으므로(1, 23, 31, 32) CMV의 전염원으로 매우 중요하다. CMV는 많은 종류의 진딧물의 매개에 의해 쉽게 전파되므로 CMV에 감염된 글라디올러스는 주변의 바이러스 무병독 글라디올러스는 물론, 다른 농작물의 CMV의 중요한 전염원으로 유력하다.

사상형 바이러스에 감염된 식물에 있어서 바이러스의 검정이 ISEM이 ELISA보다 훨씬 예민하다는 결과(15, 28)가 본 실험에서도 확인되었다. 본 실험에서는 사상형뿐만 아니라 공모양의 BBWV와 CMV에도 ISEM이 매우 유효하다는 결과가 얻어졌다.

## 요 약

대구 및 경북지역의 꽃판매점에서 수거한 글라디올러스와 영남대학교 농장에 재배중인 글라디올러스에서 모자이크

크, 괴저반점, 꽃잎 얼룩무늬, 생육불량, 잎의 가장 자리가 일정한 간격으로 찢겨진 증상을 나타내는 식물체로부터 3 종류의 바이러스를 분리하였다. 이들 바이러스는 전자현미경, 기주범위, ISEM, ELISA, DTBIA, 병엽 조직내의 바이러스의 존재양식 등에 의하여 broad bean wilt virus (BBWV), cucumber mosaic virus(CMV), tobacco rattle virus (TRV)로 동정하였다. DTBIA와 ISEM에 의하여 TRV는 잎의 가장 자리가 일정한 간격으로 찢겨진 식물체에서 검정되었고, CMV는 꽃잎얼룩무늬 및 왜화증상의 글라디올러스에서 자주 검정되었다. DN법에 의한 전자현미경 관찰에 의하여 BBWV는 직경 28 nm, CMV는 직경 30 nm의 공모양 입자와 TRV는 40~200 nm의 막대형입자가 확인되었다. 이 막대형 입자는 ISEM과 DTBIA에서 TRV 항혈청에 특이적으로 반응하였다.

### 감사말씀

이 논문은 1995년도 농림수산특정연구과제 연구비에 의해 수행된 연구결과임.

### 참고문헌

- Aly, R., Stein, A., Levy, S., Raccah, B. and Loebenstein, G. 1986. Spread and control of cucumber mosaic virus in gladiolus. *Phytoparasitica* 14: 205-217.
- Bertaccini, A. and Marani, F. 1980. Mycoplasma-like organisms in Gladiolus sp. with malformed and virescent flowers. *Phytopathol. Mediterr.* 19: 121-128.
- Bing, A. 1972. Virus. In: The World of the Gladiolus, N. Koenig and W. Crowley (eds) Edgewood Press, Edgewood, MD. pp.182-191.
- Bridgman, G. H. and Walker, J. C. 1952. Gladiolus as a virus reservoir. *Phytopathology* 42: 65-70.
- 장무웅, 백대현, 이재열. 1993. Ds-RNA를 이용한 식물바이러스의 검출. *한국식물병리학회지* 9: 191-199.
- 장무웅, 정재동. 1987. 韓國産 나리類에서 分離한 바이러스에 관한 연구. 1. Broad bean wilt virus 및 cucumber mosaic virus. *한국식물병리학회지* 3: 223-235.
- 장무웅, 김규원. 1996. 관상용 구근류의 바이러스병. *한국화훼연구지* 5: 21-32.
- 장무웅, 김규원, 최정두, 박인숙. 1996. 글라디올러스에서 분리한 4 종의 바이러스. *한국식물병리학회지* 12(4): 503-504.
- 장무웅, 윤태규. 1987. 다알리아에서 분리한 3종의 바이러스. *영남대학 기초과학 연구* 7: 151-167.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Doi, Y., Toriyama, S., Yora, K., and Auyama, H. 1969. Direct negative staining methods for detection for virus particles in fresh preparations from infected plant tissue. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 35: 180-187.
- Frowd, J. A. and Tomlinson, A. 1970. Relationships between a parsley virus, nasturtium rinspot virus and broad bean wilt virus. *Ann. App. Biol.* 72: 189-195.
- Harrison, B. D. and Robinson, D. J. 1981. Handbook of plant virus of infection and comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 516-540.
- Hsu, H. T. and Lawson, R. H. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in impatiens. *Plant Dis.* 75: 292-295.
- Hsu, H. T., Vongsasitorn, D., and Lawson, R. H. 1992. An improved method for serological detection of cymbidium mosaic potexvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82: 491-495.
- Iwaki, M. and Komuro, Y. 1972. Cucumber mosaic virus, Tobacco rattle virus, Broad bean wilt virus について. *Ann. of Phytopath. Soc. Japan* 38: 137-145.
- Kim, J. S., Choi, G. S., and Lee, K. H. 1991. A new potyvirus Isolated from imported gladiolus showing yellow and white stripe symptoms in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 7: 42-47.
- Lawson, R. H. 1990. Production and maintenance of virus-free bulbs. *Acta Hort.* 266: 25-34.
- Lee, S. H., Kim, J. S., and Choi, Y. M. 1983. Bean yellow mosaic virus and cucumber mosaic virus causing mosaic disease on gladiolus in Korea. *Korean J. Plant Prot.* 22: 198-202.
- 이순형, 이기운, 정봉조. 1979. 시금치 바이러스병에 관한 연구 II. 시금치에 발생하는 broad bean wilt virus 분리동정. *한국식물보호학회*. 18: 337-342.
- Lin, N. S., Hsu, Y.H., Hsu, Y.T. 1990. Immunological detection of viruses and mycoplasma-like organisms by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80: 824-828.
- Lister, R. M. 1968. Functional relationships between virus-specific products of infection by viruses of the tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.* 2: 43-58
- Loebenstein, G., Lawson, R. H., and Brunt, A. A. 1995. In *Virus and Virus-like diseases of Bulb and Flower Crops*. 543pp. John Wiley & Sons.
- Lokhart, B. E. L. and Betzold, J. A. 1982. Broad bean wilt virus in begonia in Minesota. *Plant Disease* 66: 72-73.
- Milne, R. G. & Loisoni, N. 1977. Rapid immune electron microscopy. In *methods in Virology*, pp. 265-281, Academic Press, New York.
- 森田健二, 荒井啓, 土居養二, 與良清. 1984. Broad bean wilt virusによるナスの病害. *日植病報*. 40: 288-294.
- Natsuaki, K. T., Yamashita, S., Doi, Y. and Yora, K. 1980. Soybean Fleck, a newly recognized disease caused by Tobacco rattle virus. *Ann. of Phytopath. Soc. Japan* 46: 357-360
- 박인숙, 김규원, 권현정, 장무웅. 1998. 한국산 글라디올러스에 발생하는 바이러스. 1. Bean yellow mosaic virus. clover yellow vein virus. *한국식물병리학회지* 14(1): (인쇄중).
- Scott, S. W. and Barnett, O. W. 1984. Some properties of an isolate of broad bean wilt virus from dogweed. *Plant*



- Disease* 68:983-985.
30. Shukla, D. D., Teakle, D. S., and Gough, K. H. 1980. Periwinkle, a latent host for broad bean wilt virus and cucumber mosaic virus in Australia. *Plant Disease* 64:802-803.
  31. Smith, F. F. 1961. Insect vectors of cucumber mosaic virus in gladiolus. *Gladiolus Gram* 48:10-13.
  32. Stein, A., Loebenstein, G. and Koenig, R. 1979. Detection of cucumber mosaic virus and bean yellow mosaic virus in gladioli by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Dis. Rep.* 63:185-188.
  33. Sushak, P. M. 1977. Seed transmission of tobacco ringspot and tomato ringspot viruses in gladioli and inoculations of tissue-cultured virus-free gladiolus plants and calli with bean yellow mosaic virus and with cucumber mosaic virus. *Gladiolus Gram* 26:2-7.
  34. Swenson, K.G. and Nelson R.L. 1959. Relation of aphids to the spread of cucumber mosaic virus in Gladiolus. *J. Econ. Entomol.* 52:421-424.
  35. Taylor, R. H. and Stubbs, L. L. 1972. Broad bean wilt virus. CMI/AAB. Descr. Plant viruses. No. 81.
  36. Tsuneyoshi, T. and Sumi, S. 1996. Differentiation among garlic tissue blotting immunoassays. *The American Phytopathological Society.* 86(3):253-259.

(Received January 14, 1998)