

## 수국에서 분리한 *Cucumber mosaic virus*의 특성

방주희 · 박선정 · 이금희<sup>1</sup> · 최장경<sup>2</sup> · 이상용\*

강원대학교 삼림자원보호학과, <sup>1</sup>국립식물검역소, <sup>2</sup>강원대학교 자원생물환경학부

### Characterization of *Cucumber mosaic virus* Isolated from *Hydrangea macrophylla* for. *otaksa* (Sieb. et Zucc.) Wils.

Ju Hee Bang, Sun Jung Park, Keum Hee Lee<sup>1</sup>, Jang Kyung Choi<sup>2</sup> and Sang Yong Lee\*

Department of Forest Resources Protection, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>1</sup>Institute of National Plant Quarantine Service, Anyang 430-012, Korea

<sup>2</sup>Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received on November 20, 2000)

An isolate of *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) was isolated from *Hydrangea macrophylla* for. *otaksa* (Sieb. et Zucc.) Wils. showing mosaic symptoms, and designated as Hm-CMV. Hm-CMV was characterized by the tests of host range, physical properties, serological properties, RNA and coat protein compositions, and reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Twelve species in 4 families were used in the host range test of Hm-CMV and could be differentiated from Y-CMV used as a control CMV by the ringspot and line pattern on inoculated leaves of several tobacco plants. The virus produced local lesions on inoculated leaves of *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* and *Vigna unguiculata*. The physical properties of the virus were as follows; thermal inactivation point (TIP) was 60°C, dilution end point (DEP) was 10<sup>-3</sup>, and longevity *in vitro* (LIP) was 3-4 days. Hm-CMV was serologically identical to Y-CMV. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed one major protein band of about 28 kDa. In RNA or dsRNA analysis, Hm-CMV consisted of four RNA or dsRNA species, but satellite RNA was not detected. In RT-PCR using CMV-common primer and CMV subgroup I-specific primer, both amplified expected size of about 490 bp and 200 bp DNA fragments from Hm-CMV, respectively. Restriction enzyme analysis of the 490 bp RT-PCR products using *EcoR* I and *Msp* I showed that Hm-CMV belonged to CMV subgroup I. However, Hm-CMV could be differentiated from other CMV subgroup I isolates by RNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction (RAP-PCR).

**Keywords :** *Cucumber mosaic cucumovirus*, *Hydrangea macrophylla*, RT-PCR, RAP-PCR

## 서 론

*Cucumber mosaic cucumovirus*(CMV)는 3종의 계놈 RNA(RNA1, 2 및 3)와 1종의 서브계놈 RNA(RNA4)로 구성된 직경 30 nm의 구형 바이러스이며 *Cucumovirus*속의 대표 바이러스이다(Francki, 1985; Peden과 Symon, 1973). CMV의 계통에 따라서는 계놈 RNA 이외에 위성 RNA (satellite RNA; satRNA)를 갖고 있는 것도 있다(Gould 등, 1978; Takanami, 1981). CMV는 기주범위가 매우 넓은 바이러스로 세계적으로 많은 계통과 분리주들이 보고

되어 있는데(Bos와 Maat, 1974; Francki 등 1979; Normand 와 Pirone, 1968), 혈청학적 성질, 외피단백질의 1차구조 및 유전자 교잡의 특성에 따라서 subgroup I과 II로 구분되고 있다(Hayakawa 등, 1980; Owen 등, 1990). 지금까지 식물 바이러스의 동정과 구분을 위하여 많은 방법들이 이용되어 왔으나, RT-PCR(reverse transcription and polymerase chain reaction)을 이용한 바이러스의 검정법은 혈청반응 등의 기존 방법 보다 실험과정이 단순하고 정확성이 뛰어나기 때문에 최근 바이러스의 분류 동정 뿐만 아니라 바이러스의 특성을 규명하는데 있어서도 많이 활용되고 있으며, CMV의 검정과 동정에도 응용된 예들이 있다. 특히 Rizos 등(1992)과 Singh 등(1995)은 RT-PCR 및 제한효소를 이용하여 CMV의 subgroup을 분류하

\*Corresponding author  
Tel) +82-33-250-8362, Fax) +82-33-257-8361  
E-mail) sangyong@cc.kangwon.ac.kr

였으며, 이 방법은 국내의 CMV 관련 연구에도 응용된 바 있다(이 등, 1996).

수국(*Hydrangea macrophylla* for. *otaksa*)은 전국에서 관상용으로 널리 재배되고 있는 낙엽관목이다. 지금까지 수국의 바이러스에 대한 보고는 이 등(1982)에 의한 모자이크병의 발생에 관한 보고가 있을 뿐, 구체적인 바이러스의 동정이나 생물학적 특성에 대한 보고는 없다. 이 연구는 1998년 수원근교에서 채집한 전형적인 모자이크 병징의 수국으로부터 CMV를 분리하고, 이 바이러스에 대한 생물학적 및 생화학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

공시식물 및 바이러스. 수원시 근교에서 모자이크병징을 나타낸 수국의 잎을 채집하여 실험재료로 공시하였다(Fig. 1). 수국으로부터 바이러스의 순수분리는 이병엽즙액을 *Chenopodium amaranticolor*의 전개엽에 접종하여 형성된 병반으로부터 단일국부병반을 분리하고 이를 *Nicotiana glutinosa*에 접종하여 증식시켰으며, 접종 7~10일 후 전신감염된 잎을 실험에 공시하였다. 이 과정에서 double strand RNA(dsRNA) 분석 및 혈청반응 등의 예비 실험을 통하여 이 바이러스가 CMV로 판단되어 이를 Hm-CMV라 명명하고, 대조 CMV로서 Y. Takanami교수(일본 Kyushu 대학)로부터 제공받은 subgroup I의 Y-CMV

및 P. Palukaitis교수(미국 Cornell대학)로부터 분양받은 subgroup II의 LS-CMV를 공시하였다.

지표식물 검정. 바이러스를 접종하여 증식시킨 *N. glutinosa*의 잎을 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)에서 마쇄(w/v = 1:10)한 후, 이 즙액을 carborundum(600 mesh)을 사용하여 12종의 CMV기주식물을 공시하여 즙액접종을 실시하였다. 이 때 Y-CMV를 대조바이러스로 사용하여 병징 발현의 특성을 비교하였다.

물리적 성질. 바이러스 이병즙액의 물리적 성질은 Noordam(1973)의 방법에 따라서 내열성, 내회석성 및 내보존성을 조사하였다. Hm-CMV를 접종하고 7~10일 후의 *N. glutinosa* 이병엽조직을 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)에서 마쇄한 즙액(w/v = 1:10)을 이용하여 *C. amaranticolor*에 반엽법으로 3회 반복 조사하였다.

바이러스 정제. CMV정제는 Takanami의 방법(1981)을 변형하여 사용하였다. 즉, 즙액접종한 *N. glutinosa*를 10일 후에 채취하여 0.1% thioglycolic acid 및 10 mM EDTA를 포함하는 0.5 M sodium citrate buffer(pH 6.5)와 chloroform을 1:1.5:1(w/v/v) 비율로 넣고 마쇄한 후, 9,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 이 상층액을 28,000 rpm에서 150분간 원심분리하였다. 여기에서 얻은 침전을 1% Triton X-100 및 2 mM EDTA가 포함된 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)에 현탁하여 4°C에서 8시간 교반한 후, 9,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였



Fig. 1. Mosaic symptoms on leaves of *Hydrangea macrophylla* for. *otaksa* naturally infected with *Cucumer mosaic cucumovirus* (Hm-CMV).

다. 이 상층액을 38,000 rpm에서 90분간 원심분리한 후, 침전물을 인산완충액에서 현탁하여 9,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였으며, 같은 조건의 고속 및 저속원심분리를 1회 반복하여 바이러스를 정제하였다. 정제바이러스는 2% phosphotungstic acid(PTA, pH 7.2)로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였고, 흡광계수를 이용하여 정량하였다.

**항혈청 검정.** 바이러스의 혈청학적 성질은 한천겔이 중화산법(Ouchterlony, 1962)에 준하였으며, 겔은 0.75% agarose, 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.85% NaCl 및 0.02%  $\text{NaN}_3$ 의 조성으로 제작하였다. CMV의 항혈청은 Y-CMV의 항혈청을 사용하였다.

**단백질의 분리.** 바이러스 외피단백질의 분석은 Maizel의 방법(1971)에 따라 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)으로 수행하였다. 외피단백질은 정제바이러스 5  $\mu\text{l}$ (50 ng)를 Laemmli sample buffer(62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol) 10  $\mu\text{l}$ 에 혼합하여 100°C에서 10분간 처리하여 제작하였으며, 전기영동을 위한 gel은 3% polyacrylamide(75 mM Tris-HCl, pH 6.7, 0.1% SDS)의 stacking gel과 7.5% polyacrylamide(0.25 M Tris-HCl, pH 8.9, 0.1% SDS)의 separation gel로 제작하였다. 전기영동은 25 mM Tris base, 0.2 M glycine 및 0.1% SDS의 완충액에서 125 V로 4시간 실시하였으며, 이때 단백질 분자량 marker는 SDS-PAGE Standard(BIO-RAD)를 사용하였고, 염색은 Silver Stain Plus Kit(BIO-RAD)를 이용하였다.

**바이러스 RNA의 추출.** 바이러스 RNA의 추출은 Phenol/SDS 법(Peden 등, 1973)을 이용, 정제 바이러스로부터 RNA를 추출하였다. RNA의 전기영동은 1.75% agarose gel에서 50 V로 70분간 실시하였으며, ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

**DsRNA의 추출.** 식물조직으로부터 바이러스의 dsRNA의 추출은 Morris 등(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 수국의 엽조직 7g을 액체질소로 마쇄한 다음, 2×STE(0.2 M NaCl, 0.1 M Tris base, 2 mM EDTA), 10% SDS 및 phenol을 첨가하여 실온에서 30분동안 교반한 후, 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 이 상층액으로부터 16.5% ethanol/1×STE로 CF-11 cellulose column(Whatman)에 흡착시킨 다음, 1×STE를 이용하여 dsRNA를 추출하였다. 정제 dsRNA의 전기영동은 6% polyacrylamide gel에서 120 V로 2시간 30분간 실시하였으며, 염색은 Silver Stain Plus Kit(BIO-RAD)를 이용하였다.

**RT-PCR 분석.** PCR 검정용 CMV subgroup I과 subgroup II의 공통 primer는 Lee 등(1996)이 보고한 바와 같이 CMV-RNA3의 외피단백질유전자와 3' 말단의 비번역영역에 존재하는 공통염기서열을 이용하여 제작하였다(P1 및 P2 Primer). 한편, CMV subgroup I만을 특이적으로 검출하기 위하여 Y-CMV RNA3의 외피단백질유전자의 1635-1654번째 염기서열 5'-CGTAAAGTTTCTGCCTCCTC-3'(SP1)와 1814-1835번째 염기서열 5'-CGTCTTTTGAATACACGAGG-3'(SP2)를 primer로 합성하였다. RT-PCR의 조건은 Lee 등(1996)의 방법을 따랐다. PCR산물은 2% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다.

Hm-CMV의 subgroup을 결정하기 위하여 RT-PCR증폭산물은 제한효소 *EcoR* I 및 *Msp* I(Promega)을 이용하여 분석하였다(Rizos 등, 1992; Singh 등, 1995). 또한, subgroup 내의 계통간 구분을 위한 RAP-PCR(RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR)은 Michael 등(1995)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, CMV 감염 담배로부터 추출한 total RNA에 2×1st-strand 반응완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100 mM KCl, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM DTT, 0.2 mM dNTPs) 및 20 units AMV reverse transcriptase (Promega)와 P2 primer 100 pM을 첨가한 20  $\mu\text{l}$  반응액을 37°C에서 15분동안 역전사 반응을 실시한 다음, 94°C에서 2분 30초간 처리한 후, 4°C로 냉각시켰다. 이 반응액에 20  $\mu\text{l}$ 의 2×2nd-strand 반응완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 25 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 100 pM P2 primer, 10 M random hexamer(Promega) 및 2 units *Taq* DNA polymerase (Promega)를 첨가하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분동안 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 42°C에서 5분 및 72°C에서 5분간 1회 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 및 72°C에서 1분간 35회 실시하였다. 반응 산물은 2% agarose gel에서 분석하였다.

## 결 과

**기주반응의 특성.** 공시한 12종의 지표식물에 대한 Hm-CMV의 병징발현 특성을 Y-CMV와 비교하였다(Table 1). Hm-CMV는 *Vigna unguiculata*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*에서는 국부괴사병반을 형성하여 Y-CMV와 같은 반응을 나타냈다. 한편, *N. rustica*, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* 및 *N. tabacum* cv. Burley 21에서는 모자이크 증상을 나타냈으며 특히, *N. tabacum* Xanthi-nc, *N. tabacum* Samsun에서는 약한 모자이크 증상과 점종엽에서는 line pattern을, *Petunia hybrida*에서는 모자이크 증상과 점종엽에서 ringspot병징이 발현되어, 황화모자이크 증

**Table 1.** Symptoms on indicator plants of *Cucumber mosaic cucumovirus* isolated from *Hydrangea macrophylla* for. otaksa (Hm-CMV)

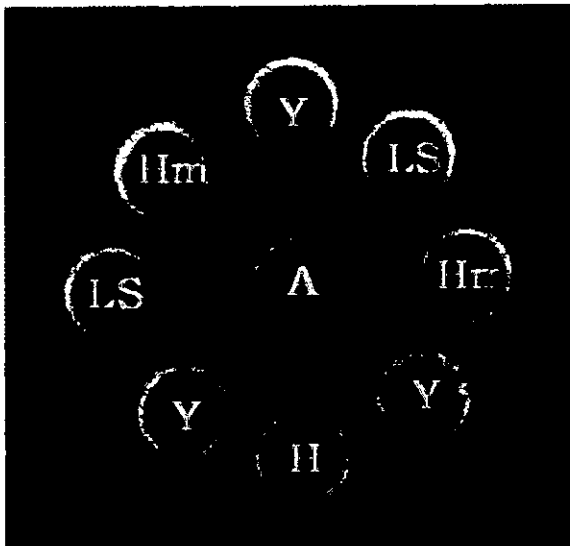
Host	Symptom <sup>a</sup>	
	Hm-CMV	Y-CMV
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L/-	L/-
<i>C. quinoa</i>	L/-	L/-
<i>Vigna unguiculata</i>	L/-	L/-
<i>Cucumis sativus</i>	-/M	-/M
<i>Petunia hybrida</i>	-/M,R	-/YM
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-/M	-/YM
<i>N. clevelandii</i>	-/M	-/YM
<i>N. rustica</i>	-/M	-/YM
<i>N. benthamiana</i>	-/M	-/YM
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi-nc	LP/M	-/YM
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	LP/M	-/YM
<i>N. tabacum</i> cv. Burley 21	-/M	-/YM

<sup>a</sup> inoculated leaf/upper leaf: M; mosaic, L; local lesion, YM; yellowing mosaic, R; ringspot, LP; line pattern.

상을 나타내는 Y-CMV와는 구별되었다.

이병즙액의 물리적 성질. Hm-CMV에 감염된 *N. glutinosa* 즙액의 물리적성질을 *C. amaranticolor*에서 조사하였다(Table 2). 그 결과 Hm-CMV는 내열성이 60°C, 내희석성이 10<sup>-4</sup>, 내본존성이 3~4일로 나타나, Y-CMV에 비하여 내열성이 낮은 특성을 보였다.

혈청학적 성질. 한천겔이중확산법으로 분석한 Hm-CMV의 항원은 Y-CMV 항혈청에 대하여 뚜렷한 1종의 침강대를 형성하였으며, Y-CMV 항원의 침강대와 서로



**Fig. 2.** Serological reaction of *Cucumber mosaic cucumovirus* in agar gel double diffusion test. The center well contains Y-CMV antiserum (A). The peripheral wells contain crude sap from *N. glutinosa* leaves infected with Y-CMV (Y), Hm-CMV (Hm) and LS-CMV (LS), and healthy leaf sap (H), respectively.

**Table 2.** Crude sap properties of *Cucumber mosaic cucumovirus* isolated from *Hydrangea macrophylla* for. otaksa (Hm-CMV)<sup>a</sup>

Property	Hm-CMV	Y-CMV
Thermal inactivation point (°C)	60	70
Dilution end point (w/v)	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Longevity <i>in vitro</i> (days)	3-4	3-4

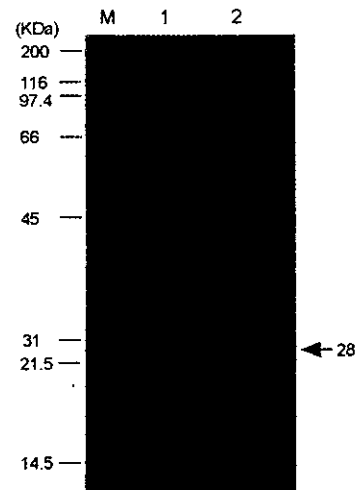
<sup>a</sup> assay host: *Chenopodium amaranticolor*.

융합되었다. 한편, LS-CMV의 항원과는 spur를 형성했다 (Fig. 2).

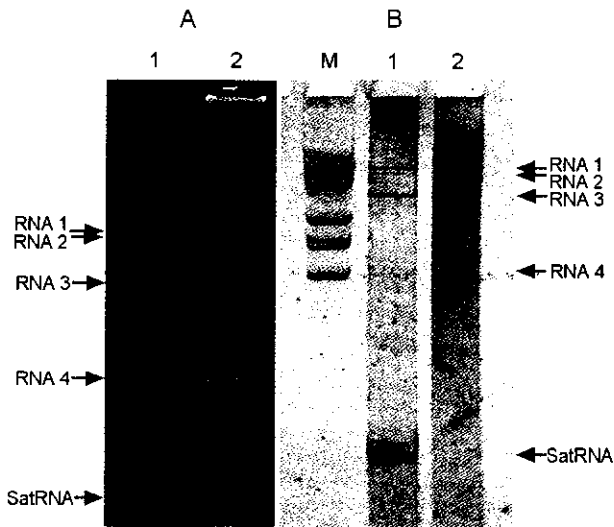
외피단백질의 분석. 정제바이러스로부터 추출한 Hm-CMV의 외피단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, Y-CMV와 같은 위치에 약 28 kDa의 분자량을 갖는 1종의 밴드로 검출되었다(Fig. 3).

계놈 RNA 및 dsRNA의 분석. 정제바이러스로부터 SDS 및 phenol 처리에 의해 Hm-CMV의 RNA를 추출하여 1.75% agarose gel에서 전기영동한 결과, Y-CMV와 마찬가지로 같은 위치에서 3종의 계놈 RNA(RNA1, 2 및 3)와 1종의 서브계놈 RNA(RNA4)가 확인되었다(Fig. 4-A). Y-CMV에서만 관찰된 위성 RNA의 밴드는 검출되지 않았다. 한편 수국의 이병조직으로부터 추출한 dsRNA를 6% polyacrylamide gel 전기영동으로 분석한 결과, 계놈 RNA의 경우와 마찬가지로 Y-CMV와 동일한 위치에서 4종의 dsRNA가 확인되었다(Fig. 4-B).

RT-PCR에 의한 Hm-CMV의 동정. Hm-CMV에 감염된 *N. glutinosa*에서 추출한 total RNA로부터 CMV-RNA3의 공통 primer 및 subgroup I의 특이적 primer를 이용하

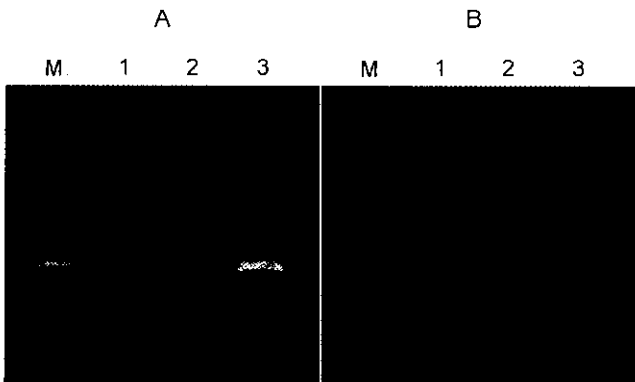


**Fig. 3.** SDS-PAGE analysis of viral coat protein isolated from Hm-CMV. Lane 1, marker protein; lane 2, coat protein of Y-CMV; lane 3, coat protein of Hm-CMV.

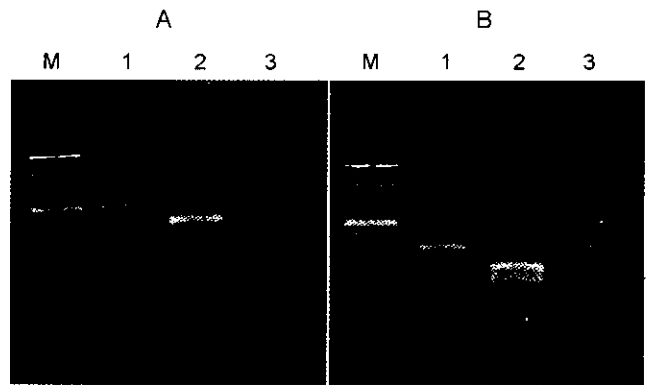


**Fig. 4.** Electrophoretic profiles of the genomic RNA and dsRNA. A : 1.75% agarose gel electrophoresis of viral RNA. Lane 1, Y-CMV; lane 2, Hm-CMV. B : 6% PAGE of dsRNA extracted from *Nicotiana glutinosa* infected with Y-CMV (lane 2), *Hydrangea macrophylla* for. *otaksa* with Hm-CMV (lane 3), respectively. M, dsRNA of rice dwarf virus (RDV) as a size marker.

여 각각 RT-PCR을 실시하였다. CMV subgroup I 및 II의 공통 primer인 P1과 P2를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, Hm-CMV 뿐만 아니라 Y-CMV 및 LS-CMV 모두 증폭 DNA 산물이 검출되었다(Fig. 5-A). 증폭된 DNA 단편의 크기는 Hm-CMV가 약 490 bp로 Y-CMV의 경우와 같았으나, LS-CMV는 약간 큰 분자로 나타났다. 한편, CMV subgroup I에 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였을 경우, Hm-CMV로부터는 Y-CMV와 마찬가지로 약 200 bp의 DNA 단편이 증폭되었으나, LS-CMV에서는 증폭산물이 검출되지 않았다(Fig. 5-B).



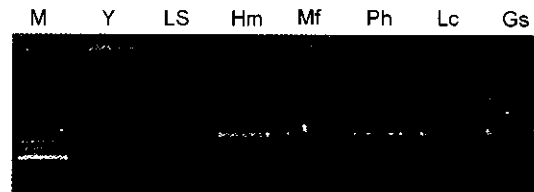
**Fig. 5.** RT-PCR assay of coat protein genes of CMV-RNA3. (A) RT-PCR using a pair of CMV-common primer. (B) RT-PCR assay by subgroup CMV-specific primer. Amplified DNA fragment of Y-CMV (lane 1), Ls-CMV (lane 2) and Hm-CMV (lane 3). M, 100 bp DNA ladder.



**Fig. 6.** Restriction enzyme maps of RT-PCR products of CMV isolates. (A) *EcoR* restriction analysis of RT-PCR products. (B) *MspI* restriction analysis of RT-PCR products. DNA fragments of Y-CMV (lane 1), LS-CMV (lane 2) and Hm-CMV (lane 3). M, 100 bp DNA ladder.

제한효소 처리에 의한 Hm-CMV의 동정. RT-PCR로 증폭된 490-500 bp의 DNA 산물을 제한효소 *EcoR* I으로 처리한 결과, Hm-CMV는 Y-CMV와 마찬가지로 절단되지 않아, *EcoR* I의 인식부위가 존재하지 않음이 확인되었으나, LS-CMV는 329 bp와 173 bp의 두 종류의 DNA 단편이 검출되어, 한 곳의 *EcoR* I 인식부위가 존재함을 알 수 있었다(Fig. 6-A). *MspI*의 처리 결과, Hm-CMV는 Y-CMV와 동일하게 342 bp와 148 bp에 해당하는 두 종류의 DNA 단편이 검출되어, 3곳의 *MspI* 인식부위가 존재하는 LS-CMV와 구별되었다(Fig. 6-B).

RAP-PCR에 의한 Hm-CMV의 유연관계 분석. RT-PCR 산물의 제한효소 map에 의해서 Hm-CMV는 Y-CMV와 같이 subgroup I에 속하는 것으로 확인되었으나, 이들 계통 RNA간의 상동성은 확인할 수 없었다. 따라서 Hm-CMV와 공시바이러스간 유연관계를 분석하기 위하여 RNA3을 대상으로 RAP-PCR을 실시하였다. 그 결과, Hm-CMV는 800 bp 및 600 bp의 2종의 major band가 검출된 반면에 Y-CMV는 이들 2종 이외에 320 bp의 DNA도 증폭되었으며, 그 외의 공시한 CMV 계통들(Choi 등, 1998)과도



**Fig. 7.** RAP-PCR of CMV RNA3 using random hexamer primer. Lanes 1 to 7, amplified DNA fragments from RNA3 Y-, LS-, Hm- and other Korean isolates (Mf, Ph, Lc, Gs), respectively. M, 100 bp DNA ladder.

구별되었다(Fig. 7).

## 고 찰

모자이크병징의 수국으로부터 분리한 Hm-CMV의 기주 반응 특성은 *C. amaranticolor* 등 국부감염 식물에서는 대조 바이러스인 Y-CMV와 차이가 없었으나, 전신감염 식물의 경우 Hm-CMV는 대부분 엷은 모자이크증상을 발현하는 성질을 보였으며, 특히 *N. tabacum* Xanthi-nc, *N. tabacum* Samsun에서 점종엽에 line pattern과 *P. hybrida*에서 ringspot을 형성하여, 이들 식물에서 황화모자이크 증상만을 나타내는 Y-CMV와 차이가 인정되었다. 그러나 이와 같은 기주반응실험의 결과는 기존에 보고된 CMV의 계통들과 특징적으로 구분되는 Hm-CMV 특이적기주는 발견되지 않았다. 한편, 이병식물 즙액의 물리적 성질에서 Hm-CMV의 내열성은 60°C로 나타나, 지금까지 밝혀진 CMV 분리주들의 내열성 70~75°C와는 큰 차이를 보여주었다. 이와 관련된 Hm-CMV의 생물적 성질은 금후 검토대상으로 생각되었다.

Habili와 Francki(1974)는 Y-CMV 외피단백질의 분자량을 아미노산 서열로부터 26,000 dalton, SDS-PAGE에 의해서는 24,500 dalton으로 보고하였으며, Nitta 등(1988)은 Y-CMV-RNA3의 염기서열분석으로부터 외피단백질의 분자량을 24,004 dalton으로 보고하였다. 또한, 박 등(1990)은 SDS-PAGE에 의하여 Y-CMV 외피단백질의 분자량을 약 25,000 dalton으로 보고하였다. 한편 이 연구에서 SDS-PAGE에 의하여 Hm-CMV의 외피단백질을 분석한 결과 Y-CMV의 외피단백질과 같은 위치에서 1종의 단백질이 검출되었으나, 이 때의 분자량은 약 28,000 dalton으로 계산되어, 분자량의 값은 분석방법과 실험조건에 따라 차이를 나타낼 수 있는 것으로 생각되었다.

RT-PCR은 바이러스의 검정에 민감하고 특이적으로 이용할 수 있기 때문에 지금까지 CMV의 계통간 유연관계 분석 등에 많이 이용되고 있다(Nishiguchi 등, 1995; Rizos 등, 1992; Roberson 등, 1991). 또한 Rizos 등(1989)과 Singh 등(1991)은 CMV subgroup I과 II간의 RNA3의 외피단백질 유전자영역 염기서열의 특징을 이용하여 PCR 증폭산물을 제한효소 *EcoR* I과 *Msp* I으로 처리하여, 절단 특성에 따라 subgroup을 분류하였으며, 이 결과는 혈청학적 subgroup과 일치하고 있다. 이와 같은 결과는 이 등(1996) 및 최 등(1998)도 우리나라에서 분리한 CMV 분리주들의 동정과 구분에 이용하였다. 이 실험에서의 Hm-CMV는 subgroup I인 Y-CMV와 마찬가지로 *EcoR* I에 대한 인식부위를 가지고 있지 않았으나, *Msp* I에 대해서는

한 곳의 인식부위를 가지고 있는 subgroup I의 특성을 보였고, 이 방법은 CMV의 계통구분에 유효함을 확인할 수 있었다. 한편, 외피단백질유전자의 염기서열중 CMV subgroup I의 특징적인 염기서열을 primer로 제작하여 RT-PCR을 실시한 결과, Hm-CMV와 Y-CMV는 같은 크기의 DNA 단편이 증폭되었으나, subgroup II인 LS-CMV에서는 증폭산물이 검출되지 않았다. 따라서 제한효소를 이용하지 않고 CMV subgroup I 특이적 primer를 이용할 경우 간단하게 subgroup을 구분하는 방법으로 이용할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한, 이 실험에서 응용한 RAP-PCR은 subgroup I CMV 계통들을 세분할 수 있는 방법으로 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

## 요 약

1998년 수원 근교에서 채집한 전형적인 모자이크 병징을 나타내는 수국(*Hydrangea macrophylla* for. otaksa)으로부터 CMV를 분리하고, Hm-CMV라 명명하였다. 기주 실험, 물리적 성질, 혈청학적 성질, RNA와 coat protein의 성질, RT-PCR 및 RAP-PCR 분석을 통하여 Hm-CMV의 특성을 분석하였다. 12종의 CMV 지표식물에서 실시한 기주반응실험의 결과, 지금까지 보고된 CMV계통들의 반응과 특징적인 차이는 인정되지 않았다. Hm-CMV의 물리적 성질은 내열성에서 60°C를 보여 기존 CMV들 보다 낮았다. 혈청학적으로 Hm-CMV는 Y-CMV와 융합하는 subgroup I CMV로 분석되었다. SDS-PAGE로부터 Hm-CMV의 외피단백질은 28 kDa의 band가 확인되었으며, 4종의 계놈 RNA는 Y-CMV와 같은 분자량을 나타냈으나, 위성 RNA는 존재하지 않았다. 수국의 이병엽에서 분리한 dsRNA의 분석 결과도 Y-CMV와 같은 패턴을 보였다. Hm-CMV의 외피단백질유전자에 대한 RT-PCR 분석 결과, 예상된 분자크기의 DNA증폭이 인정되었으며, PCR 산물을 이용한 *EcoR* I 및 *Msp* I을 처리한 결과는 subgroup I CMV의 특성을 나타냈다. 그러나, RAP-PCR의 결과, Hm-CMV는 subgroup I내의 다른 계통들과 구분되었다.

## 참고문헌

- Bos, L. and Maat, D. Z. 1974. A strain of cucumber mosaic virus seed-transmitted in beans. *Neth. J. Plant Pathol.* 80: 113.
- Choi, J. K., Kim, H. J., Hong, J. S., Kim, D. W. and Lee, S. Y. 1998. Identification and differentiation of cucumber mosaic virus isolates in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 14: 7-12.
- Francki, R. I. B. 1985. *The Plant Viruses*, Vol. 1, *Polyhedral Virions with Tripartite Genomes*. Plenum, New York and London.

- Francki, R. I. B., Mossop D. W. and Hatta, T. 1979. Cucumber mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No 213. Kew Surrey, England.
- Gould, A. R., Palukaitis, P., Symons, R. H. and Mossop, D. W. 1978. Characterization of a satellite RNA associated with cucumber mosaic virus. *Virology* 84: 443-455.
- Habili, N. and Francki, R. I. B. 1974. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. Physical and chemical properties. *Virology* 57: 392-401.
- Hayakawa, T., Mizukami, Nakajima, M. and Suzuki, M. 1980. Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain Q : Comparative study of nucleotide sequence and amino acid sequences among CMV strain O, Q, D and Y. *J. Gen. Virol.* 70: 499-504.
- Lee, J. T., Lee, K. W., Park, J. E., Park, K. S. 1982. *Studies on Virus Diseases of Medicinal Plants in Korea*. Research Review of Kyungpook National Univ. 34: 505-515.
- Lee, S. Y., Hong, J. S., Lee, J. S. and Choi, J. K. 1996. Detection of CMV by RT-PCR using a simple and rapid crude sap extraction method. *Korean J. Plant Pathol.* 12: 432-436.
- Maizel, J. V. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral protein. In: *Methods in Virology* V, pp.179-246.
- Michael, A. L., David, H. G. and Jhon, J. S. 1995. RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. In: *PCR Strategies*, pp. 259-267. Academic Press, Inc., New York.
- Morris, T. J., Dodds, J. A., Hillman, B., Jorden, R. L., Lommel, S. A., and Tamaki, S. J. 1983. Viral specific dsRNA: Diagnostic value for plant virus disease identification. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 27-30.
- Nitta, M., Masuta, C., Kuwata, S. and Takanami, Y. 1988. Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA3 between Y strain and Q strain. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 54: 516-522.
- Nishiguchi, M., Mori, M., Suzuki, F., Nagata, R., Morishita, T., Sakai, J., Hanada, K. and Usugi, T. 1995. Specific detection of a severe strain of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV-S) by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 54: 516-522.
- Noordam, D. 1973. *Identification of Plant Viruses. Methods and Experiments*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc) Wageningen.
- Normand, R. A. and Pirone, T. P. 1968. Differential transmission of strains of cucumber mosaic virus by aphids. *Virology* 36: 538.
- Ouchterlony, O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis in: *Allergy*, Vol. VI, ed. by P. Kallos and B. H. Waksman, pp. 30-154. Kaser. Basel.
- Owen, J., Shintaku, M., Aeschleman, P., Tahar, S. B. and Palukaitis, P. 1990. Nucleotide sequence and evolutionships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA3. *J. Gen. Virol.* 71: 2243-2249.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francki, R. I. B. 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.* 41: 281-348.
- Park, W. M., Ryu, K. H. and Choi, J. K. 1990. Properties and purification of cucumber mosaic virus As strain. *Korean J. Plant Pathol.* 6: 393-401.
- Peden, K. W. C. and Symon, R. H. 1973. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology* 53: 487-492.
- Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73: 2099-2103.
- Roberson, N. L., French, R. and Gray, S. M. 1991. Use of group specific primers and polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J. Gen. Virol.* 72: 1473-1477.
- Singh, Z., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Dis.* 79: 713-716.
- Takanami, Y. 1981. Striking change in symptoms on cucumber mosaic virus infected plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109: 120-126.