

한국에서 분리한 *Tobacco rattle virus*(TRV-K)의 특성

신혜영 · 구봉진 · 강상구¹ · 장무웅* · 류기현²

영남대학교 이과대학 생물학과, ¹영남대학교 생명공학연구소

²서울여자대학교 환경생명과학부 원예학과

Characterization of *Tobacco rattle virus*(TRV-K) isolated in Korea

Hye Young Shin, Bong Jin Koo, Sang Gu Kang¹, Moo Ung Chang* and Ki Hyun Ryu²

Department of Biology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

¹Institute of Biotechnology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

²Plant Virus Genbank, Department of Horticultural Science, Seoul Womens University, Seoul 139-774, Korea

(Received on December 4, 2002)

Tobacco rattle virus(TRV) was detected from *Gladiolus hybridus*, *Crocus* spp. and *Narcissus* spp. leaves showing notched or stripe on the leaf and malformation symptoms collected from Daegu and Kyungbuk province by electron microscopy (EM), immunosorbent electron microscopy (ISEM) and host range study. Direct negative staining method by EM showed rigid rod long particles 170~200 × 22 nm and rigid rod short particles 40~114 × 22 nm. TRV-K isolated from *G. hybridus* propagated with *Nicotiana tabacum*. TRV coat protein(CP) gene was amplified using specific oligonucleotide primer by RT-PCR. Sequence analysis of amplified CP gene showed 99.5% nucleotide similarity to TRV-ORY.

Keywords : CP-gene sequence, RT-PCR, *Tobravirus*, *Tobacco rattle virus*

화훼식물의 구근류가 여러 종류의 바이러스에 복합 감염된 경우 그 피해가 매우 큰데, 실제로 한국에서 재배되고 있는 다년생 구근류가 바이러스에 의해 피해가 심각하다. 바이러스에 감염된 구근류는 생산량이 감소하고 질적인 면에서도 저하된다(Loebenstein *et al.*, 1995). *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Bean yellow mosaic virus*(BYMV) 등의 바이러스에 감염되면 생장불량은 물론, 관상용 구근류는 꽃 색이 변하고, 잎에 기형이 나타나고, 그리고 종구의 생산성이 감소되는 등과 같은 막대한 지장을 초래한다. 관상용 구근류는 영양번식을 하기 때문에 바이러스에 감염된 구근류는 바이러스를 수직 및 수평으로 전파시킨다. 즉 바이러스에 감염된 식물체에서 수확한 모 구근은 다음 세대로 바이러스를 전파시키고, 이들 구근에서 생산한 식물체는 다른 농작물의 바이러스 전염원이 된다(Lawson 1990; Loebenstein *et al.*, 1995). 한국에서는 현재 네덜란

드 등에서 수입되고 있는 구근류는 백합(*Lilium* spp.)이 가장 많으며 이외에도 글라디올러스(*Gladiolus hybridus*), 크로커스(*Crocus* spp.), 수선화(*Narcissus* spp.) 등이 있으며 이들 구근류의 재배면적이 크게 증가하고 있는 추세이다. 그러나 지금까지 한국에서 재배되고 있는 이들 관상용 구근류에 발생하는 바이러스에 대한 체계적인 연구가 없는 실정이다. 1998년 박 등은 한국산 글라디올러스에서 발생하는 5종의 바이러스를 분리 동정하였는데, 이 중에 *Tobacco rattle virus*(TRV)가 포함되어 있다. TRV는 글라디올러스에 단독 감염되었을 경우에 잎의 가장자리가 일정한 간격으로 찢겨지는 증상(notched leaf; 박 등, 1998; Cremer and Schenk, 1967)을 나타내어 생장은 물론 상품성을 저하시킬 수 있다(Loebenstein *et al.*, 1995).

TRV는 *Tobravirus*속의 type species로서 이 입자성 바이러스, 즉 긴 입자는 180~215×21~23 nm, 짧은 입자는 46~114×21~23 nm의 크기를 가지며, 매우 많은 식물 종들을 감염시킬 수 있고, 경제적으로 중요한 작물인 감자와 담배 그리고 구근류에 광범위하게 분포하고 있다(MacFarlane, 1999). *Tobravirus*는 토양 서식 선충류에 의

*Corresponding author

Phone)+82-53-810-2374, FAX)+82-53-515-3061

E-mail)muchang@yu.ac.kr

해서 식물에서 식물로 전파되는 바이러스의 단2가지 타입들 중의 하나이다(Taylor & Brown, 1997). 그리고 *Tobravirus*는 긴 입자의 RNA-1은 감염성이 있지만, 짧은 입자의 RNA-2는 계통에 따라 차이가 있다. 그러나, 일반적으로 감염성이 없고 외피단백질(coat protein)의 합성 또는 병징 유발에 관여하는 유전자를 가지고 있다. 기주범위는 단자엽식물 및 쌍자엽식물을 포함하여 50여과에 달하고, 즙액, 접촉, 선충, 접목, 새삼 등에 의하여 전염되며, 어떤 식물에서는 종자에 의하여 전염되는 것도 있다. 따라서, 본 연구에서는 한국으로 수입되어 재배되고 있는 화훼식물의 구근류에 감염되어 있는 TRV를 분리 동정하고 진단용 항혈청을 제작하고, RNA-2의 coat protein gene의 염기서열을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료. 대구시와 경상북도 지역 및 기타 수 개 지역의 꽃 판매점에서 *Tobacco rattle virus*(TRV) 등의 바이러스의 감염에 의한 특이적인 증상 또는 무병징으로 보이는 글라디올러스(*Gladiolus hybridus*), 크로커스(*Crocus* spp.), 수선화(*Narcissus* spp.)를 채집하였다. 특이적인 증상으로는 잎에서 톱니모양(notch), 줄무늬(stripe), 변형(malformation) 등을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이들 바이러스 증상의 잎 조직을 시료로 하여 direct negative staining method(DN) 및 면역전자현미경법에 의해 투과전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰하였다.

바이러스 입자의 확인. 바이러스 입자의 확인은 톱니모양, 줄무늬, 변형 등의 증상 또는 무병징을 나타내는 글라디올러스, 크로커스, 수선화의 잎을 소량 잘라 direct negative staining method(DN)로 phosphotungstic acid (PTA)로 염색하여 투과전자현미경(Hitachi H-600)으로 관

찰하였다. 감염 잎 조직내의 바이러스 입자의 존재양식을 관찰하기 위하여 즙액접종에 의하여 감염된 담배(*N. tabaccum*)의 국부병반을 2.5% glutaraldehyde에 3시간 전 고정하고, 1% osmium tetroxide에 1시간 후 고정한 다음 ethanol로 탈수하였다. 이것을 수지에 포매한 다음 초박절편하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

지표식물을 이용한 기주범위. 바이러스에 감염된 글라디올러스, 크로커스, 수선화의 이병엽을 접종원으로 담배(*N. tabaccum*) 등 11여종의 지표식물에 즙액 접종하여 기주범위를 조사하였다. 지표식물은 온실에서 재배하였고, 살충제를 사용하여 진딧물 등의 바이러스 매개곤충의 발생을 방제하였다.

면역전자현미경법(ISEM). Immunosorbent electron microscopy(ISEM)법은 Miline & Luisoni(1977)의 decoration method로 반응시킨 후 phosphotungstic acid(PTA)로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. TRV 항혈청을 미국 ATCC(PVAS-820)사로부터 구입하여 1/100배 희석하여 사용하였다.

바이러스 증식. 바이러스에 감염된 글라디올러스 이병엽에 0.01M PB(pH 7.2)를 넣어 막자사발에서 잘게 갈아 탈지면에 즙액을 묻혀 carborundum powder를 뿌린 담배(*Nicotiana tabacum*)에 접종하였다. 접종 3-5일 후 접종엽에서 국부병반이 나타났다. 단일 국부병반을 이용하여 TRV에 단독감염이 확인된 담배 이병엽을 접종원으로 하여 동일한 방법으로 담배에 일주일간격으로 접종하였다. 접종 7일 후에 접종 잎을 수거하여 바이러스 정제 시료로 하였다.

바이러스 정제. 바이러스의 정제는 Lister(1967)의 TRV 정제법을 아래와 같이 수정하여 실시하였다. TRV에 감염된 담배 이병엽 100 g에 100 ml의 extraction buffer를 첨가하여 분쇄기로 곱게 마쇄하여 이중거즈로 거른다. 걸러



Fig. 1. A. Notched-leaf in *Gladiolus hybridus* infected with tobacco rattle virus, B. Stripe on the leaf of *Crocus* sp. infected with tobacco rattle virus and other viruses. C. Mosaic on the leaf of *Narcissus* sp. infected with tobacco rattle virus and other viruses.

진 조증액을 8,000 g에 15분간 원심분리를 실시하였다. 상층액에 8% PEG 6000과 0.2M NaCl을 첨가하여 실온에서 1시간 교반시킨 다음, 8,000 g에 15분간 원심분리를 실시하였다. 침전물을 1/10배의 extraction buffer에 녹여 30분간 교반시킨 후, 8,000 g에 10분간 원심분리를 실시하였다. 이후, 상층액에 8% PEG 6000과 0.2M NaCl을 첨가하여 실온에서 1시간 교반시킨 다음, 8,000 g에 10분간 원심분리를 실시하였다. 침전물을 extraction buffer에 녹여 30분간 교반시킨 후, 8,000 g에 10분간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 38,000 rpm에 90분간 초원심분리를 실시하였다. 이 침전물을 extraction buffer에 녹여 바이러스 시료를 준비하였다.

항혈청 제작. 항혈청 제작은 통상적인 방법으로 실시하였다. 정제된 바이러스를 0.01M PB(pH 7.2)에 희석하여 0.5 mg/ml이 되도록 하여 Freund's complete adjuvant 또는 Freund's incomplete adjuvant와의 현탁액을 만들어 체중 2 kg의 토끼에 피하주사를 실시하였다. 항혈청은 처음 주사한 날로부터 36일째 되는 날 토끼의 정맥으로부터 채혈하여 실온에서 1시간 응고시킨 후, 4000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 항혈청으로 이용하였다.

바이러스의 RNA 정제. 정제된 바이러스에 proteinase K(10 µg/ml), SDS(2%), bentonite(2%)를 처리하여 37°C에서 30분간 둔 후 phenol:chloroform(1:1)을 수회 처리하여 바이러스의 coat protein을 제거하고, 상층액을 수거하여 100% 에탄올을 넣어서 70°C에 30분 둔다. 이후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 70% 에탄올로 수세하고 RNase free water에 녹여 실험에 사용하였다.

RNA 전기영동(electrophoresis). agarose 1.4 g, 10XMOPS buffer 10 ml, formaldehyde 17 ml, ddi water 76 ml를 넣어서 1.4% agarose gel 100 ml을 준비하였다. Formaldehyde는 agarose를 MOPS buffer와 water에 녹여서 끓인 후 식혀서 50°C가 되었을 때 첨가하였다. 20분 후 gel이 굳으면 tank에 1XMOPS buffer를 채운 다음, TRV-RNA sample을 준비하고 RNA loading buffer를 섞은 후 60V에서 3시간동안 전기영동을 실시하였다.

CP 유전자의 primer 제작 및 RT-PCR. 정제된 TRV-RNA를 RT-PCR을 실시하기 위하여 NCBI에 등록되어 있는 TRV-sequence를 토대로 하여 바이러스 coat protein gene 부위에 대한 primer를 제작하였다. Forward primer 5'-CATTGACCCGGAAGGTCTAA-3'와 reverse primer 5'-CCCAATTAACCGAACGAGAA-3'를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.

RT-PCR은 먼저 역전사 효소에 의한 cDNA 합성반응과 이 반응산물인 cDNA를 주형으로 하는 PCR 반응으로 수

행하였다. RNA 시료 5 µl에 reverse primer 1 µl와 RNase free water 8 µl를 넣어 97°C에서 2분간 둔다. 5Xreaction buffer 4 µl, dNTP 1 µl와 MMLV Rtase 0.5 µl를 넣어 37°C에 1시간 둔다. 합성된 cDNA 5 µl에 RNase free water 34 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, dNTP 1 µl, 10Xreaction buffer 5 µl, 25 mM MgSO₄ 2 µl와 Tfl polymerase 0.5 µl를 넣은 후, denaturation 94°C/30 sec, annealing 50°C/1 min, extension 68°C/2 min의 과정을 40 cycle을 실시하였다.

염기서열의 분석(Automatic sequencing). ABI Prism TM BigDye Terminator Cyclic Sequencing Reaction Kit와 ABI Prism 377 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)를 이용하여 cyclic sequencing하였다. Template는 약 250 ng에 1 µl의 terminator ready reaction mix, 1.6pmole primer 1 µl, 5xseq buffer 2 µl를 넣은 다음, 증류수로 총 10 µl로 맞추고 PE thermocycler 9600기기를 이용하여 denaturation 96°C/10 sec, annealing 50°C/5 sec, extension 60°C/4 min의 과정을 25 cycle을 실시하였다. Gel은 UREA 18.0 g, Ac STOCK 6.0 ml, dH₂O 50.0 ml, 10XTBE 5.0 ml, 10% APS 300 µl, TEMED 30 µl를 넣어 만든다. PCR product를 정제한 후 로딩하여 ABI PRISM 377로 염기서열을 분석하였다.

결 과

바이러스 입자의 확인. 바이러스 입자의 확인은 톱니 모양(notch), 줄무늬(stripe), 변형(malformation) 증상 또는 무병징을 나타내는 글라디올러스(*Gladiolus hybridus*), 크로커스(*Crocus* spp.), 수선화(*Narcissus* spp.)의 잎을 소량 잘라 direct negative staining method(DN)법으로 phosphotungstic acid(PTA)에 염색하여 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 각각의 시료에서 긴 막대입자는 170~200×22 nm, 짧은 막대입자는 40~114×22 nm 크기의 막대모양 입자가 다수 확인되었다(Fig. 2). 조사 시료 중에 막대입자 외에 750 nm의 사상입자, 세포질 봉입체, 30 nm 구형입자도 확인되었다. 또한 담배의 국부병반을 초박절편하여 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 감염조직의 각종 세포의 세포질이나 액포 내에 막대모양의 입자가 집단 혹은 산재해 있었다(Fig. 2).

지표식물을 이용한 기주범위. 바이러스에 감염된 글라디올러스, 크로커스, 수선화를 약 11종의 지표식물에즙액 접종하여 기주범위를 조사하였다. 그 결과 chlorosis, distortion, mosaic, necrosis, ring, spot 등의 증상이 나타났다. *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Capsicum*

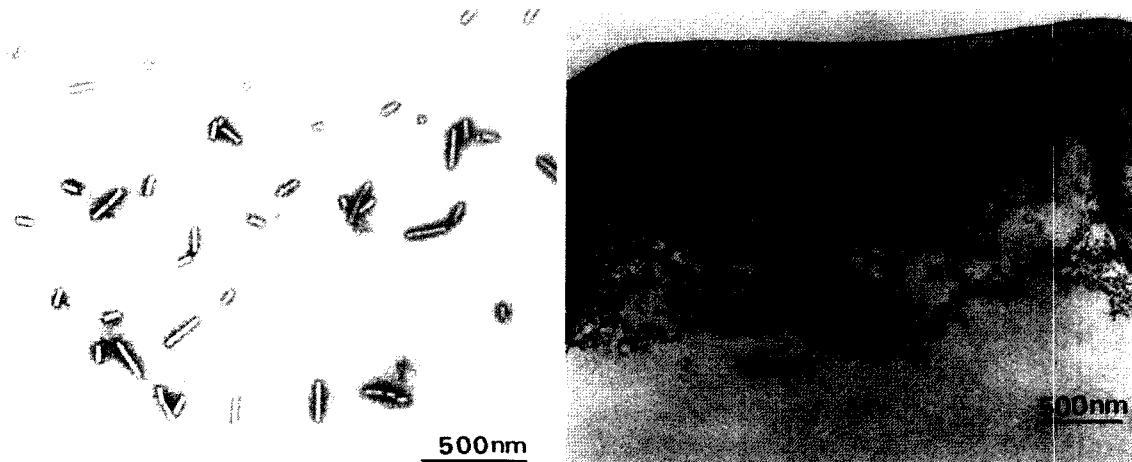


Fig. 2. Rod-shaped virus particles in negatively stained preparations from *Gladiolus hybridus*(left). A mesophyll cell of the leaf of *Nicotiana tabacum* infected with TRV-K. Note appearance of virus particles(arrow) in the cytoplasm(right).

annuum, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana tabacum* 등에 국부감염이, *N. benthamiana*와 *N. clevelandii*에서는 전신감염이 확인되었다. *N. benthamiana*는 접종 후 이주일 이상 지난 후에 병징이 나타났고, *N. clevelandii*는 접종 3일 후 접종엽에서 병징이 나타났고, 7일 후 비접종엽에서도 병징이 나타났다. *N. tabacum*은 접종 후 3-5일 후 병징이 나타났다. *N. tabacum*은 전신감염되지는 않지만 성장조건이 까다롭지 않고, 생장률이 높고, 바이러스 입자의 생성량도 많아 TRV의 증식 식물로 확인되었다.

면역전자현미경(ISEM). TRV 항혈청을 미국 ATCC (PVAS-820)사로부터 구입하여 1/100배 희석하여 사용하였다. 먼저 바이러스에 감염된 잎을 0.1 M 인산 완충용액으로 마쇄한 다음, TRV 항혈청을 이용하여 ISEM한 결과, 바이러스 입자의 coat protein에 TRV의 항혈청이 반응하여 입자 주위가 진하게 염색(decoration)되었다. 이와 같은 혈청학적 반응의 결과로 글라디올러스, 크로커스, 수선화 잎에서 분리한 40~200 nm 막대모양의 입자는 TRV로 확인할 수 있었다(Fig. 3).

바이러스 증식과 정제. 즙액접종에 의해 담배(*Nicotiana tabacum*)에 형성된 단일 국부병반(Fig. 4)을 접종원으로 하여 담배에 2~3 즙액접종을 반복하면서 TRV 단독감염을 확인하였다. 단독감염이 확인된 담배의 국부병반을 접종원으로 하여 동일한 방법으로 담배에 일주일간격으로 즙액접종하여 바이러스를 증식시켰다. 담배 이병엽에 extraction buffer를 첨가하여 분쇄기로 곱게 마쇄하여 수정된 TRV 정제법에 의거 실시하였다. 정제된 바이러스 시료를 buffer에 녹여 10,000 rpm에 15분간 원심분리하여 상등액 얻었다. 이 상등액 2 μ l를 2%PTA에 염색하여 전

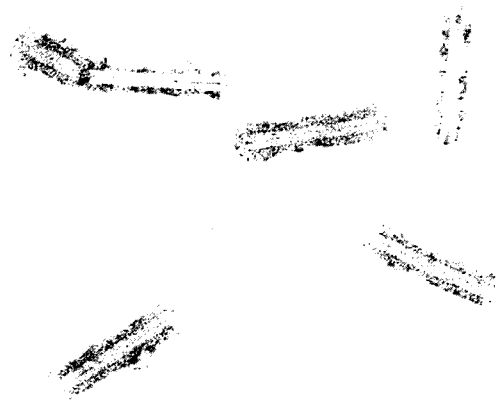


Fig. 3. Virus particles decorated with TRV antiserum by immunosorbent electron microscopy (ISEM).

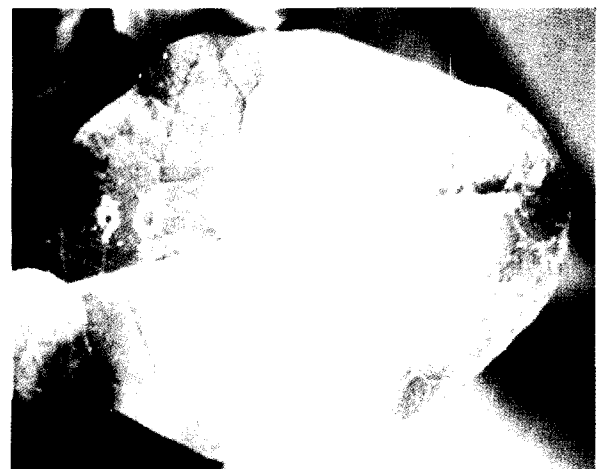


Fig. 4. Concentrated ring on the leaf of *Nicotiana tabacum* inoculated with TRV-K isolated from *Gladiolus hybridus*.

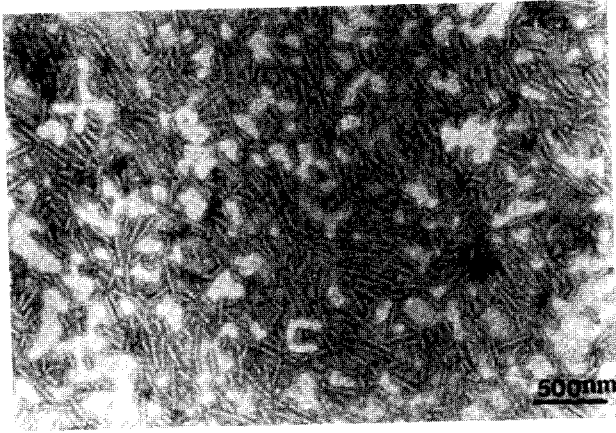


Fig. 5. Electron micrograph of purified virus particles of TRV-K.

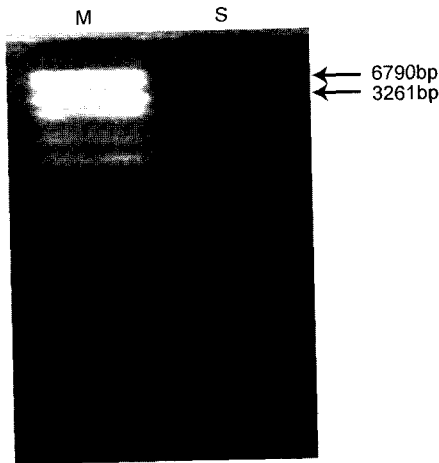


Fig. 6. Agarose gel denaturated electrophoresis of RNA from purified TRV-K. M: RNA marker, S: TRV-K, RNA-1 size is 6790bp and RNA-2 size is 3261bp.

자현미경으로 관찰한 결과, 불순물이 거의 없는 긴 막대 입자는 170~200×22 nm, 짧은 막대입자는 40~114×22 nm 크기의 막대모양 입자만을 확인했다(Fig. 5).

RNA electrophoresis. Agarose 1.4 g, 10XMOPS buffer 10 ml, formaldehyde 17 ml, ddi water 76 ml를 넣어서 1.4% agarose gel 100 ml을 준비하였다. Formaldehyde는 agarose를 MOPS buffer와 water에 녹여서 끓인 후 식혀서 50°C가 되었을 때 첨가하였다. 20분 후 gel이 굳으면 tank에 1XMOPS buffer를 채운 다음 RNA sample을 준비하고 RNA loading buffer를 섞은 후 60V에서 3시간동안 전기영동을 실시하였다. 그 결과 6790 bp의 RNA1과 3261 bp의 RNA2 2개의 밴드가 나타났다(Fig. 6).

CP gene의 primer 제작 및 RT-PCR. RT-PCR은 먼저 역전사 효소에 의한 cDNA 합성반응과 이 반응산물인 cDNA를 주형으로 하는 PCR 반응으로 수행하였다. RNA

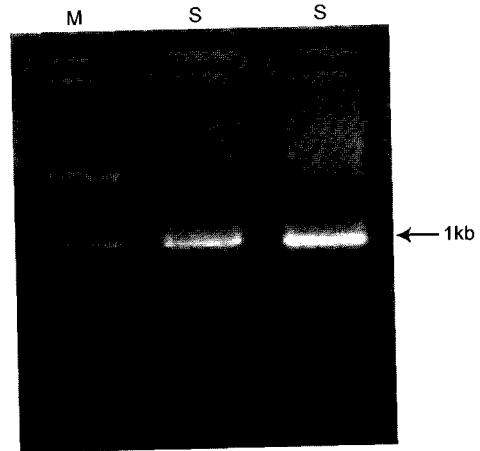


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR. Electrophoresis was performed in 1.2% agarose. Lane M: 250bp ladder marker S: using of TRV-377F and TRV-1375R primer.

시료 5 µl에 reverse primer 1 µl와 RNase free water 8 µl를 넣어 97°C에서 2분간 둔다. 5Xreaction buffer 4 µl, dNTP 1 µl와 MMLV Rtase 0.5 µl를 넣어 37°C에 1시간 둔다. 합성된 cDNA 5 µl에 RNase free water 34 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, dNTP 1 µl, 10Xreaction buffer 5 µl, 25 mM MgSO₄ 2 µl와 *Tfl* polymerase 0.5 µl를 넣은 후, denaturation 94°C/30 sec, annealing 60°C/1 min, extension 68°C/2 min의 과정을 40 cycle을 실시하였다. 그 결과 1 kb크기의 밴드가 나타났다(Fig. 7).

염기서열분석. ABI Prism™ BigDye Terminator Cyclic Sequencing Reaction Kit와 ABI Prism 377 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 cyclic sequencing하였다. Template는 약 250 ng에 1 µl의 terminator ready reaction mix, 1.6pmole primer 1 µl, 5xseq buffer 2 µl를 넣은 다음, 증류수로 총 10 µl로 맞추고, PE thermocycler 9600기기를 이용하여 denaturation 96°C/10 sec, annealing 50°C/5 sec, extension 60°C/4 min의 과정을 25 cycle을 실시하였다. Gel은 UREA, Ac STOCK, dH₂O, 10XTBE, 10%APS, TEMED를 넣어 만든다. PCR product를 정제한 후 로딩하여 ABI PRISM 377로 염기서열을 분석하였다. 글라디올러스에서 분리한 TRV의 coat protein cDNA는 TAA를 stop codon으로 하는 200개의 아미노산으로 구성되어 있다(Fig. 8). TRV 아미노산염기서열의 상동성을 비교한 결과 본 연구에서 분리된 TRV-K는 기존에 보고된 TRV(AAC02063)와 완전히 일치하였으며, Pepper ringsopt virus(PRV; NP_620037)과 69%, 그리고 Pea early browning virus(PEBV; S07552)와 57%의 상동성을 보였다(Fig. 9). 그러나 GenBank에 보고된 TRV들과의 상동성

러스를 비롯한 많은 다년생 구근류에서는 바이러스병의 발생이 빈번히 일어나고 그 피해가 매우 크다는 것은 이미 알려진 사실이다. 세 식물 중에 대구시 꽃집에서 채집한 애기 수선화의 TRV 감염율이 약 70%였고, 다음으로 크로커스의 TRV 감염율이 약 40%이었으나, 글라디올러스의 TRV 감염율은 1% 미만이었다. 이 연구에서도 확인된 바와 같이 외국에서 수입된 수선화와 크로커스도 바이러스 감염율이 매우 높았고, 대부분이 복합감염 되어 있음이 확인되었다. 글라디올러스 등 구근류에서 한 종 이상의 바이러스를 제거하게 되면 그 상품가치와 수량이 크게 향상될 것이라 보고가 있다(Lawson, 1990; Loebenstein *et al.*, 1995).

과거부터 현재까지 연구되어온 전통적이고 실용적인 식물 바이러스의 방제법은 가장 중요한 것이 정확한 바이러스 진단의 실시이다. 정확한 진단을 실시하여 바이러스 감염식물을 검정하여 이병식물을 초기에 제거함은 물론 바이러스 주요 전염원인 다년생 식물의 잡초류 및 구근, 숙근의 초화류 제거, 진딧물 등의 바이러스 매개동물을 구제하여 바이러스 전염경로 차단 등의 물리적 방제법을 실시한다. 이 외에도 열처리와 화학적 처리를 하여 바이러스를 불활성화시키거나 조직배양을 통한 무독화 묘목을 선발하는 방법과 유전적 저항성과 유도적 저항성을 이용한 육종방법도 식물 바이러스 방제에 이용되고 있다(구 등, 2002). 한국에서 처음으로 이 연구에서 제작된 TRV-K 항혈청은 Direct tissue blotting immunoassay(DTBIA)법, Enzyme linked immunosorbent electron microscopy(ELISA)법, Rapid immunofilter paper assay(RIPA)법과 같은 항체반응을 통한 바이러스 동정에 사용될 것이므로 중요한 의의가 있다.

바이러스병은 세균병이나 곰팡이병과는 달리, 현재까지도 그 구제방법이 없기 때문에 바이러스가 일단 감염되면 영양번식에 의해 지속적으로 후대에 전해지게 된다. 특히, 기호성이 높은 유명 품종의 경우는 장기간 계속적으로 재배되고 있는 실정이므로 품종에 따라서는 거의 전부가 바이러스에 감염되어 있는 것으로 알려져 있다. 이들 구근 화훼류에서 분리, 동정된 바이러스 중 구근 화훼류에서만 발생하는 바이러스도 있으나, 대부분은 다른 농작물에서도 발생하는 바이러스이기 때문에 이들 작물들은 농작물 바이러스의 전염원으로서 매우 중요하다는 사실이 보고되어 있다(Lawson, 1981). 특히 최근에는 집약 재배의 경향이 높기 때문에 바이러스의 증식과 확산이 더욱 문제가 되고 있다. 일정 면적 내에 소량의 바이러스 감염주만 있어도 생장 및 꽃의 크기, 수, 색깔 등 최종 산물의 품질에 크게 영향을 미친다. 게다가 구근 화훼류는

다년생 식물이기 때문에 바이러스 확산 측면에서도 생태적으로 매우 중요한 역할을 하여, 이들 영양번식성 화훼 식물은 바이러스 생존 장소도 되지만 이들을 전파하는 매개곤충의 서식 장소도 된다. 영양번식성 화훼 식물이 바이러스에 감염되어 있고 매개충도 같이 서식하고 있는 경우에는 바이러스병이 대대적으로 발생할 가능성이 높다(최 등, 1996; Hadidi *et al.*, 1998; Lawson, 1981; Loebenstein *et al.*, 1995; Matthews, 1991). 따라서 바이러스 무감염의 구근류를 재배한다는 것은 매우 큰 의의가 있다. 바이러스 무감염 종묘 및 모주를 선택하기 위해서는 정확 신속함은 물론 저렴하고 간편한 바이러스 검정법이 절실하다. 이 외에 아직까지 한국에서 보고되지 않은 TRV-K RNA-1의 염기서열을 분석할 필요가 있으며 항혈청을 이용한 바이러스 검정 kit를 제작할 필요가 있다.

요 약

대구시와 경상북도 지역에서 *Tobacco rattle virus*(TRV) 감염에 의한 증상으로 보이는 글라디올러스(*Gladiolus hybridus*), 크로커스(*Crocus* spp.), 수선화(*Narcissus* spp.)를 채집하였다. 톱니무늬(notch), 줄무늬(stripe), 변형(malformation) 등의 증상의 잎 조직을 시료로 하여 direct negative staining method(DN) 및 immunosorbent electron microscopy(ISEM)법에 의해 투과전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 각각의 시료에서 긴 입자는 170~200×22 nm, 짧은 입자는 40~114×22 nm 크기의 막대모양 입자가 다수 확인되었다. 글라디올러스에서 분리한 *tobacco rattle virus*(TRV-K)를 담배(*Nicotiana tabacum*)에 즙액접종, 증식시킨 후, 정제하여 항혈청을 제작하였다. TRV-K의 coat protein(CP) 유전자를 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)으로 증폭시킨 후에 염기서열분석법으로 확인하였다. 그 결과 TRV-ORY의 CP와 99.5%의 상동성을 나타냈다.

감사의 말씀

이 연구는 농촌진흥청 대형공동연구사업 연구비로 수행되었습니다.

참고문헌

- Angenent, G. C., Van Den Ouweland, J. M. W. and Bol, J. F. 1989. Biological activity of transcripts synthesized in vitro from full-length and mutated DNA copies of *tobacco rattle virus* RNA 2. *Virology* 173: 68-76.

- Angenent, G. C., Van Den Ouweland, J. M. W. and Bol, J. F. 1990. Susceptibility to virus infection of transgenic tobacco plants expressing structural and nonstructural genes of *tobacco rattle virus*. *Virology* 175: 191-198.
- Dolja, V. V., Boyko, V. P., Gronovsky, A. A. and Koonin, E. V. 1991. Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology* 184: 79-86.
- Goulden, M. G., Lomonosoff, G. P., Wood, K. R. and Davies, J. W. 1991. A model for the generation of *tobacco rattle virus* (Trv) anomalous isolates-pea early browning virus RNA-s acquires Trv sequences from both RNA-1 and RNA-2. *Journal of General Virology* 72: 1751-1754.
- Goulden, M. G., Davies, J. W., Lomonosoff, G. P., Wood, K. R. and Davies, J. W. 1992. Structure of tobnaviral particles: A model suggested from sequence conservation in tobnaviral and tobamoviral coat proteins. *J. Mol. Biol.* 227: 1-8.
- Hernandez, C., Carette, J. E., Brown, D. J. F. and Bol, J. F. 1996. Serial passage of *tobacco rattle virus* under different selection conditions results in deletion of structural and nonstructural genes in RNA 2. *Journal of General Virology* 4933-4940.
- Heinae, C., Vonbargen, S., Sadowskarybak, M., Willingmann P. and Adam, G. 2000. Sequences of *tobacco rattle viruses* from potato. *Journal of Phytopathology -PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT* 148: 547-554.
- Lawson, R. H. 1981. Controlling virus diseases in major international flower and bulb crops. *Plant Diseases* 65: 780-786.
- Lawson, R. H. 1990. Production and maintenance of virus-free bulbs. *Acta Hort.* 266: 25-34.
- Lister, R. M. 1968. Functional relationships between virus-specific products of infection by viruses of the tobacco rattle type. *Journal of General Virology*. 2: 43-58.
- Lister, R. M. and Bracker, C. E. 1969. Defectiveness and dependence in three related strains of *tobacco rattle virus*. *Virology* 37: 262-275.
- Loebenstein, G., Lawson, R. H. and Brunt, A. A. 1995. Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops. pp.543. Willey.
- MacFarlane, S. A. 1995. Rapid cloning of uncharacterized *tobacco rattle virus* isolates using long template (LT) PCR. *Journal of Virological Methods* 56: 91-98.
- MacFarlane, S. A. 1997. Natural recombination among plant virus genomes: Evidence from tobnaviruses. *Seminars in Virology* 8: 25-31.
- MacFarlane, S. A.. 1999. Molecular biology of the tobnaviruses. *Journal of General Virology* 80: 2799-2807.
- Milne, R. G. and Luisoni, E. 1977. Rapid immuno electron microscope of virus preparations. *Methods of Virology* 6: 265-281. Academic Press, New York.
- Ploeg, A. T., Brown, D. J. F. and Robinson, D. J. 1992. The association between species of trichodorus and paratrichodorus vector nematodes and serotypes of tobacco rattle tobnavirus. *Annals of applied Biology* 121: 619-630.
- Ploeg, A. T., Brown, D. J. F. and Robinson, D. J. 1992. Acquisition and subsequent transmission of *tobacco rattle virus* isolates by paratrichodorus and trichodorus nematode species. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98: 91-300.
- Ploeg, A. T., Brown, D. J. F. and Robinson, D. J. 1993. RNA-2 of *tobacco rattle virus* encodes the determinants of transmissibility by trichodorus vector nematodes. *Journal of General Virology* 74: 1463-1466.
- Robinson, D. J. and Harrison, B. D. 1985. Unequal variation in the two genome parts of tobnaviruses and evidence for the existence of three separate viruses. *Journal of General Virology* 66: 171-176.
- Schmidt, K. and Koenig, R. 1999. Genetic-analysis of large sized RNA 2 species of a TCM-like *tobacco rattle virus* source from spinach. *Archives of Virology* 144: 503-511.
- Sudarshana, M. R. and Berger, P. H. 1998. Nucleotide-sequence of both genomic RNAs of a north-american *tobacco rattle virus* isolate. *Archives of Virology* 143: 1535-1544.
- Taylor, C. E. and Brown, D. J. F. 1997. Nematode vectors of plant viruses. New York: CAM international.
- Uhde, K., Koenig, R. and Lesemann, D. E. 1998. An onion isolate of *tobacco rattle virus*: reactivity with an antiserum to Hypochoeris mosaic virus, a putative furovirus, and molecular analysis of its RNA 2. *Archives of Virology*. 143: 1041-1053.
- Van Dun, C. M. P. and Bol, J. F. 1988. Transgenic tobacco plants accumulating *tobacco rattle virus* coat protein resist infection with *tobacco rattle virus* and pea early browning virus. *Virology* 67: 649-652.
- Visser, P. B. and Bol, J. F. 1999. Nonstructural proteins of *tobacco rattle virus* which have a role in nematode-transmission: expression pattern and interaction with viral coat protein. *Journal of General Virology* 80: 3273-3280.
- Visser, P. B., Brown, D. J. F., Brederode, F. T. and Bol, J. F. 1999. Nematode transmission of *tobacco rattle virus* serves as a bottleneck to clear the virus population from defective interfering RNAs. *Virology* 263: 155-165.
- Ziegler-Graff, V., Guilford, P. J. and Baulcombe. D. C. 1991. *Tobacco rattle virus* RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology* 182: 145-155.
- 박인숙, 김규원, 권현정, 장무웅. 1998. 한국산 글라디올러스에 발생하는 바이러스. 1. Bean yellow mosaic virus, clover yellow vein virus. *한국식물병리학회지* 14(1): 74-82.
- 박인숙, 김규원, 권현정, 장무웅. 1998. 한국산 글라디올러스에 발생하는 바이러스. 2. Broad bean wilt virus, cucumber mosaic virus, *tobacco rattle virus* *한국식물병리학회지* 14(1): 83-91.
- 장무웅, 김규원. 1996. 관상용 구근류의 바이러스병. *J. Kor. Flower Res. Soc.* 5(1): 21-32.