

표주박 (*Lagenaria leucantha* var. *gourda*)에서 분리한 서브그룹 IB계통의 *Cucumber mosaic virus*

오선미 · 홍진성¹ · 류기현¹ · 이금표² · 최장경*

강원대학교 응용생물학과, ¹서울여자대학교 환경생명과학부, ²중앙대학교 응용식물과학부

A Subgroup IB Isolate of *Cucumber mosaic virus* Isolated from *Lagenaria leucantha* var. *gourda*

Sun Mi Oh, Jin Sung Hong¹, Ki Hyun Ryu¹, Gung Pyo Lee² and Jang Kyung Choi*

Department of Applied Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Division of Environment & Life Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

²Division of Applied Plant Sciences, Chungang University, Ansong 456-756, Korea

(Received on November 17, 2009; Accepted on December 7, 2009)

An isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV), called as Lag-CMV, was identified from *Lagenaria leucantha* var. *gourda* showing mosaic symptom, and its properties was compared to Fny-CMV (subgroup IA) and As-CMV (subgroup IB) by host reaction in several indicator plants, dsRNA analysis, RT-PCR analysis, restriction enzyme profile of the PCR products and nucleotide sequence of coat protein gene. Lag-CMV was similar to As-CMV used as a control CMV by the induced chlorotic spot on inoculated leaves and mosaic symptoms on upper leaves of *N. tabacum*. cv. Xanthi nc. In the cucumber and zucchini squash, Lag-CMV and As-CMV induced a mild mosaic symptoms than that of Fny-CMV. Size and shapes of local lesions on *Chenopodium amaranticolor* and *Vigna unguiculata* induced by Lag-CMV was similar those by Fny-CMV or As-CMV. In experiments of dsRNA profiles and RT-PCR analysis of coat protein gene, Lag-CMV was come within subgroup I CMV. Moreover, restriction enzyme analysis using *EcoRI*, *SalI*, *MspI*, *XhoI*, and *HindIII* of the RT-PCR products and nucleotide sequence analysis of the coat protein gene showed that Lag-CMV belong to a member of CMV subgroup IB of the same to As-CMV.

Keywords : *Cucumber mosaic virus*, *Lagenaria leucantha* var. *gourda*., Host reaction, Restriction enzyme profile, Subgroup IB

*Bromoviridae*의 *Cucumovirus*에 속하는 *Cucumber mosaic virus*(CMV)는, 전 세계적으로 널리 분포하고 기주범위가 매우 넓어 많은 종류의 작물에 피해를 주고 있으며, 그 중에서도 채소나 화훼류에서는 가장 중요한 바이러스병의 원인이 되고 있다(Tomlinson, 1987). CMV는 RNA1, RNA2 및 RNA3으로 분절된 3종의 (+)외가닥 게놈RNA와 RNA3의 3' 영역에 해당하는 서브게놈 RNA(RNA4)를 포함하고 있다(Palukaitis 등, 1992). 지금까지 보고된 많은 계통의 CMV는 크게 서브그룹 I과 II로 구분되고 있는데(Owen과 Palukaitis, 1988), 이들은 주로 기주반응의

특징과 혈청학적 관계(Kaper와 Waterworth, 1981), 외피 단백질의 웨티드지도와 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)분석(Edwards와 Gonsalves, 1983), RNase protection에 의한 heterogeneity 분석(Owen과 Palukaitis, 1988) 및 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용한 외피단백질 유전자의 제한효소지도 분석(Rizos 등, 1992) 등에 의해서 구분되고 있다. 또 서브그룹 I에 대해서는 게놈 RNA3의 5' 말단영역 염기서열의 특징을 바탕으로 다시 서브그룹 IA 및 IB로 세분하고 있다(Roossinck 등, 1999).

표주박(*Lagenaria leucantha* var. *gourda*)은 박(*Lagenaria leucantha*)의 변종으로 박과 유사한 잎과 단성화를 갖는 덩굴성 자용동주 식물이다. 열매는 소형으로 모양은 다양

*Corresponding author

Phone) +82-33-250-6432, Fax) +82-33-241-1721

Email) jkchoi@kangwon.ac.kr



Fig. 1. Mosaic symptoms in naturally infected *Lagenaria leucantha* var. *gourda*.

하고 많은 과실을 생산하며 관상용으로 재배되고 있다. 지금까지 표주박에서 보고된 바이러스는 없으나, 다른 박과식물로부터는 *Cucumber mosaic virus*(CMV) (Choi 등, 1999), *Cucumber green mottle mosaic virus*(CGMMV) (Lee 등, 1990; Kim과 Lee, 2000; Antignus 등, 2001), *Zucchini yellow mosaic virus*(ZYMV) (Lisa 등, 1981), *Zucchini green mottle mosaic virus*(ZGMMV) (Ryu 등, 2000; Lee 등, 2003) 등의 감염이 확인되었다. 이 연구에서는 1999년 8월, 강원도 춘천시 강원대학교 농장의 식물자원 포장에서 전형적인 모자이크 증상의 표주박 잎 (Fig. 1)을 채집하여 동결 건조시켜 보존 중인 시료로부터 CMV의 한 계통을 분리하고, 지금까지 잘 알려진 대표적인 CMV계통들과 비교하여 그 특성을 동정하였다.

바이러스의 분리. 동결 건조된 모자이크 병징의 표주박 잎을 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)으로 마쇄한 후, 5-6엽기의 *Nicotiana benthamiana*에 접종하였다. 접종 10일 후 전신 감염된 *N. benthamiana*의 이병엽 및 동결 건조하여 보존되었던 자연 감염의 표주박 잎을 *Cucumovirus* 특이적 프라이머(CPT-all primer) (Choi 등, 1999)를 사용하여 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 실시한 결과, 두 이병엽 모두에서 예상된 약 950 bp 크기의 cDNA가 검출되었다. 따라서 표주박의 모자이크 병징 원인이 CMV의 한 계통일 것으로 예상하고 *Chenopodium amaranticolor*를 이용한 단일병반 분리를 실시하였다. 즉 즙액접종을 통해 전신감염된 *N. benthamiana*의 이병엽을 *C. amaranticolor*의 전개엽에 즙액 접종하여 형성된 국부병반에서 단일병반분리를 2회 실시한 다음, 형성된 단일병반을 다시 5-6엽기의 *N. benthamiana*에 접종하여 전신 감염된 잎을 바이러스원으로 공시하였고, 표주박에서 분리한 CMV 분리주를 Lag-CMV로 명명하였다. 한편 대조의 CMV로는 지금까지 잘 알려진 Fny-CMV(서브그룹 IA)와 As-CMV(서브그룹 IB)를 공시하였다.

지표식물 검정. Lag-CMV의 기주범위와 병징 특성을 조사하기 위하여 CMV의 특성 구분에 일반적으로 이용되고 있는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc, *N. glutinosa*, *Cucubita pepo* cv. Black beauty, *Cucumis sativus* cv. Suyo, *Vigna unguiculata* cv. Kurotanesanzaku 및 *Capsicum annuum* cv. Cheongyang을 공시하였다. 접종은 카보린덤과 0.01 M 인산완충액을 이용한 즙액접종법으로 실시하였으며, 접종한 지표식물은 25°C-30°C의 온실에 2주 이상 두고 접종엽과 상엽에 나타나는 병징을 Fny-CMV 및 As-CMV를 접종한 지표식물과 함께 비교 관찰하였다.

Lag-CMV와 Fny-CMV 및 As-CMV의 기주범위 및 접종엽과 상엽에 나타난 병징 특성의 결과를 Table 1에 정

Table 1. Reaction of indicator plants by mechanical inoculation of Lag-CMV, Fny-CMV and As-CMV

Host plant	Symptoms ^a		
	Lag-CMV	Fny-CMV	As-CMV
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. glutinosa</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	CS/M	-/M	CS/M
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L/-	L/-	L/-
<i>Capsicum annuum</i> cv. Cheongyang	-/-	-/M	-/mM
<i>Cucubita pepo</i> cv. Black beauty	-/M	CS/M	-/M
<i>Cucumis sativus</i> cv. Suyo	-/M	-/M	-/M
<i>Vigna unguiculata</i>	L/-	L/-	L/-

^aInoculated leaves/upper leaves, M: mosaic, mM: mild mosaic, CS: chlorotic spot, L: necrotic local lesion, -: symptom less or not infected.

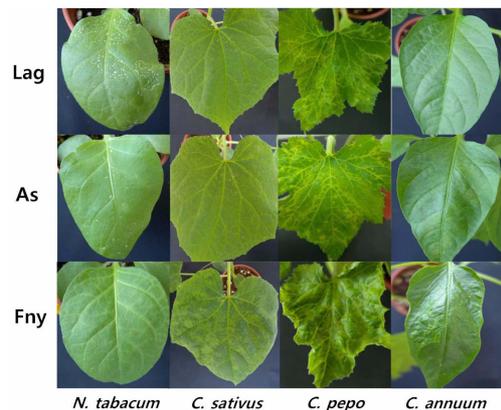


Fig. 2. Symptoms on indicator plants by mechanical inoculation of Lag-CMV isolated from *Lagenaria leucantha* var. *gourda*. Fny-CMV and As-CMV were inoculated as a control CMVs. Photographs are presented on inoculated leaves of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc, and on upper leaves of *Cucumis sativus* cv. Suyo, *Cucurbita pepo* cv. Black beauty and *Capsicum annuum* cv. Cheongyang, respectively.

리하였다. 표주박에서 분리한 Lag-CMV는 *N. benthamiana*에서 전신감염되어 전형적인 모자이크 증상을 나타내 대조로 공시한 CMV들과 유사하였다. 그러나 *N. tabacum* cv. Xanthi nc에서 집중엽에 퇴록반점이 형성되는 점이 As-CMV와 유사하였으며, 집중엽에 무병징을 나타낸 Fny-CMV와 구분되었다(Fig. 2). 한편 Fny-CMV에 감염된 오이와 주키니 호박은 매우 심한 모자이크 증상을 나타낸 반면, Lag-CMV와 As-CMV에 감염된 식물은 비교적 얇은 모자이크 병징이 발현되었다. 고추에서는 Fny-CMV와 As-CMV가 집중 7~10일 후 상엽에 모자이크 증상이 발현되으나, Lag-CMV는 병징이 확인되지 않았다. 그러나 Lag-CMV를 집중한 고추에 대해서 *Cucumovirus* 특이적 프라이머를 이용한 RT-PCR을 실시한 결과, 바이러스의 cDNA가 검출됨으로서 Lag-CMV는 고추에 무병징으로 감염되는 성질을 갖는 것으로 생각되었다. 한편 *C. amaranticolor*와 *V. unguiculata*에서는 집중 2-3일 후에 국부 괴사병반이 발현되어 대조의 CMV들과 차이를 보이지 않았다.

DsRNA 분석. Lag-CMV 게놈RNA의 분자 크기 및 종류를 알아보기 위하여 Lag-CMV, Fny-CMV 및 As-CMV에 감염된 *N. benthamiana* 잎으로부터 Morris와 Dodds (1979)의 방법으로 겹가닥 RNA(double stranded RNA; dsRNA)를 추출하였다. 추출한 dsRNA는 6% polyacrylamide gel에서 1×TAE 완충액(40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 2 mM EDTA, pH 7.8)으로 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 밴드를 관찰하였다. 그 결과 Lag-CMV에 감염된 *N. benthamiana*로부터 추출한 dsRNA의 전기영동 패턴은 대조의 Fny-CMV나 As-CMV의 dsRNA와 종류 및 분자 크기에서 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3). 일반적으로 dsRNA 분석법의 장점 중 하나는 CMV와 같이 분절계놈을 가지고 있는 경우, 게놈RNA 또는 satellite RNA를 분석하는데 매우 유용한 것으로 알려져 있다(Dodds, 1993). 또한 Wang 등(1988)은 여러 계통의 CMV로부터 추출한 dsRNA의 전기영동 결과, dsRNA의 이동도는 각 계통의 혈청형(serotype)과 일치한다고 보고하였다. 이러한 고찰들로부터 추정하였을 때, Lag-CMV의 dsRNA는 Fny-CMV나 As-CMV와 같은 이동도의 게놈 분자를 갖는 것으로 미루어 이들과 같은 혈청형으로 판단되었다.

RT-PCR 및 제한효소지도 분석. Lag-CMV에 감염된 *N. benthamiana*의 잎을 채취하여 total RNA를 추출하고, 이를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. Total RNA의 추출은 Choi 등(1998)의 방법을 이용하였으며, RT-PCR은 외피단백질 유전자와 IR 및 3' 비번역영역 일부를 포함하는 *Cucumovirus* 특이적 프라이머(Choi 등, 1999)를 이용하였

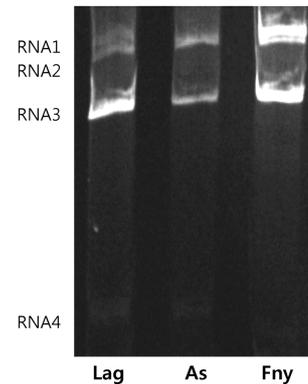


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA isolated from *Nicotiana benthamiana* infected with Lag-CMV, As-CMV and Fny-CMV, respectively. Aliquot of dsRNA purified by CF-11 cellulose was electrophoresed in 6% polyacrylamide gel.

다. 여기에서 얻어진 PCR산물은 1.2% agarose gel에서 1×TAE 완충액으로 전기영동 한 결과, 3종의 CMV로부터 모두 약 950 bp의 cDNA가 검출되었다(Fig. 4A). 이 cDNA를 제한효소 *EcoRI*, *HindIII*, *MspI*, *SalI* 및 *XhoI*으로 처리한 후, 제한효소의 절단패턴(RFLP)을 분석하여 Lag-CMV의 서브그룹을 검정하였다. 그 결과 Lag-CMV의 RFLP패턴은 공시한 5종의 모든 제한효소에서 As-CMV와 일치함으로써 Lag-CMV가 서브그룹 IB일 것으로 추정되었다(Fig. 4B). Singh 등(1995)은 CMV의 계통 구분을 위하여 외피단백질 유전자의 cDNA를 이용하여 *EcoRI*과 *MspI*으로 절단하였을 때, 서브그룹 I과 II를 구별하는데 유용하다고 하였다. 그러나 이들 두 효소의 처리에 의한 서브그룹 IA와 IB의 구분은 할 수 없었다. 따라서 이 실험 결과에서 얻어진 *HindIII*의 처리에 따른 IA와 IB의 구분은 CMV의 서브그룹을 구분하기 위한 제한효소로 이용될 수 있을 것으로 생각되었다.

외피단백질의 특성. Lag-CMV의 외피단백질에 대한 염기 및 아미노산 서열을 분석하기 위하여, CMV RNA3의 외피단백질영역을 포함하는 약 950 bp의 cDNA를 이용하였다. 즉 Lag-CMV와 대조 CMV에 감염된 *N. benthamiana*로부터 추출한 total RNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하고, 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시한 다음, 각 CMV의 cDNA를 선발하였다. 선발한 각 cDNA는 pGEM-T easy vector (Promega)에 ligation시킨 후 *E. coli* JM109에 클로닝하였으며, GFX Micro Plasmid Prep kit (Amersham Pharmacia)을 이용해 재조합 플라스미드를 정제하였다. 정제된 재조합 플라스미드는 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 확인하였으며, 확인된 플라스미드를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 외피단백질 유전자의 염기서열은 MacAlign(DNAstar 3.30C)을 사용하여 아

감사의 글

이 연구는 2009년도 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20080401034055)의 지원으로 수행된 결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Antignus, Y., Wang, Y., Perlman, M., Lachman, O., Lavi, N. and Gal-On, A. 2001. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting Tobamovirus. *Phytopathology* 91: 565-571.
- 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.
- Choi, S. K., Choi, J. K., Park, W. M. and Ryu, K. H. 1999. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *J. Virol. Methods* 83: 67-73.
- Dodds, J. A. 1993. DsRNA in diagnosis. In : *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, ed. by R.E.F. Matthews. pp. 273-295. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Edwards, M. C. and Gonsalves, D. 1983. Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. *Phytopathology* 73: 1117-1120.
- Kim, D. H. and Lee, J. M. 2000. Seed treatment for Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) in gourd (*Lagenaria siceraria*) seeds and its detection. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44: 1-6.
- Kaper, J. M. and Waterworth, H. E. 1981. Cucumoviruses. In : *Handbook of Plant Virus Infections*, ed. by E. Kurstak, pp. 257-332. Elsevier/Holland Biomedical, New York, USA.
- Lee, G. P., Min, B. E., Kim, C. S., Choi, S. H., Ham, C. H., Kim, S. U. and Ryu, K. H. 2003. Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting tobamovirus. *J. Virol. Methods* 110: 19-24.
- Lee, K. W., Lee, B. C., Park, H. C. and Lee, Y. S. 1990. Occurrence of cucumber green mottle mosaic virus disease of watermelon in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 6: 250-255.
- Lisa, V., Boccardo, G., Dgostino, G. and Dellaville, G. 1981. Characterization of a potyvirus causing zucchini yeiiow mosaic virus. *Phytopathology* 71: 667-672.
- Morris, T. J. and Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69: 854-858.
- Owen, J. and Palukaitis, P. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 496-502.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francki, R. I. B. 1992. Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus. Res.* 41: 281-348.
- Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73: 2009-2103.
- Roossinck, M. J., Zhang, L. and Hellwald, K. H. 1999. Rearrangement in the 5' nontranslated region and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus RNA3 indicated radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* 73: 6752-6758.
- Ryu, K. H., Min, B. E., Choi, G. S., Choi, S. H., Kwon, S. B., Noh, G. M., Yoon, J. Y., Choi, Y. M., Jang, S. H., Lee, G. P., Cho, K. H. and Park, W. M. 2000. *Zucchini green mottle mosaic virus* is a new Tabamovirus; Comparison of its coat protein gene with that of *Kyuri green mottle mosaic virus*. *Arch. Virol.* 145: 2325-2333.
- Singh, Z., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. 1995. Identification of *Cucumber mosaic virus* subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Dis.* 79: 713-716.
- Tomlinson, J. A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110: 661-681.
- Wang, W. Q., Natsuaki, T., Okuda, S. and Teranaka, M. 1988. Comparison of cucumber mosaic virus isolate by double-strand RNA analysis. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 536-539.