

## 감자바이러스 Y 계통간의 혈청학적 관계

박 은 경

한국인삼연초연구소 경작시험장

### SEROLOGICAL RELATIONSHIPS BETWEEN POTATO VIRUS Y STRAINS

Eun Kyung Park

*Suweon Experiment Station*

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Suweon, Korea*

*(Received for Publication, September 10, 1984)*

#### Abstract

Two PVY strains (PVY-VB and PVY-VN) isolated from tobacco in Korea were compared for their serological relationship with other 8 strains which were obtained from tobacco or potato in different countries.

One of these strains, PVY-Argentina showed the spur reaction to PVY-VB and PVY-VN antisera in SDS-agar gel double diffusion plates. The two Korean PVY strains were closely related to other strains except for one, PVY-Argentina when antigen-antibody reciprocal absorption tests were conducted.

It is suggested that the strain, PVY-Argentina, is a new serotype containing a specific antigenic site different from other 9 strains tested.

#### 서 론

식물 바이러스의 혈청학적 성질은 바이러스의 특이성이 높기 때문에 바이러스를 동정하거나 분류하는데 널리 이용되고 있다.<sup>6) 19) 21)</sup> 또한 항혈청반응과 항원의 화학적 특성은 서로 밀접한 관계를 이루고 있어 바이러스의 화학적 특성을 이해하는데 큰 도움을 주고있다.

Knight 등<sup>14)</sup>은 병징을 달리하는 TMV 계통의 바이러스 단백질 구조 및 핵산의 구성성분을 조사한 결과, 항혈청반응을 달리하는 이 2 가지 계통의 바이러스에서 아미노산과 핵산에서 많은

차이점을 발견하였다. 그 후 항혈청반응에 영향을 주는 것은 단백질의 4 차구조라는 것이 알려졌다.<sup>20)</sup> 그러나 지금까지 PVY 계통들은 기주반응, 총매전염, 물리적성질 등에 따라 여러가지로 분류되어 왔으나<sup>1) 4) 5) 12) 13)</sup> 이 계통들의 혈청학적 관계에 대해서는 충분히 조사되어 있지 않다.

본 연구에서는 우리나라에서 새로히 분리된 PVY의 2 가지 계통을 포함하여 잎담배 및 감자에서 분리된 다른 계통들 사이에 혈청학적 유연관계를 분석하고 이에 따른 계통의 특성을 비교 검토코져 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스의 순화

바이러스를 즙액접종 후 2~3주 지난 담배품종 Burley 21 이병엽을 수확하여 주맥을 제거한 엽육조직을 재료로 하여 Dougherty 방법<sup>10)</sup>을 다음과 같이 수정, 바이러스를 순화하였다.

이병조직(100g)을 0.1% sodium sulfite 및 8%의 n-butanol이 함유된 150ml의 0.02M HEPES(N-2-hydroxy ethylpiperazine-N-2-ethansulfonic acid) buffer(pH 7.5)를 첨가하여 고기분쇄기로 1차 마쇄한 다음, mixer(sorval omni-mixer)로 2분간 갈아 3중 거르기로 걸러냈다. 이 즙액을 3,300g에서 10분간 원심분리한 상청액에 1% Triton X-100, 4% PEG 6000 및 0.01M NaCl을 첨가, 4℃에서 2시간 저어주었다. 이후 원심분리(10,000g, 10분)하여 침전된 것을 500ml의 HEPES buffer에 현탁시켜 10,400g에서 10분간 재원심분리하였다. 여기에서 얻어진 상청액에 8% PEG와 0.01M NaCl을 다시 넣고 4℃에서 한시간 용해시켜 10,400g에서 15분간 원심분리한 후, 침전물을 5~10ml의 0.02M HEPES buffer로 현탁시켜 10,400g에서 15분간 원심분리하였고 여기에서 얻어진 상청액을 2회 분획원심분리(78,000g, 120분)하여 순화 바이러스를 얻었다.

### 2. 항혈청 조제

순화된 바이러스는 체중 2kg 이상되는 토끼(Newzealand white)에 3ml씩 순화 바이러스액(1mg/ml)을 동량의 Adjuvant(incomplete)와 섞어 일주일 간격으로 2회 근육주사후, 1~1.5ml의 바이러스 액을 7일 간격으로 3회 정맥주사 하였다. 최종 주사 7일후 부터 5일 간격으로 30ml씩 채혈, 항혈청을 분리하였다. 분리된 항혈청은 0.02%의 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>를 넣어 진공냉동건조 또는 -20℃에 냉동보존 하면서 필요시 이를 사용하였다.

### 3. 항원-항체반응

항원으로 사용된 PVY의 계통은 PVY-VB 및 PVY-VN 이외에 Table 1과 같다. 이들 각 계통의 바이러스는 Burley 21에 접종, 2주후의 병든잎을 착즙하여 그 즙액을 항원으로 사용하였다. 항혈청반응은 SDS-agar gel double diffusion 법에 따라 실시하였는데 이때 agar gel의 주변혈에는 항원을, 중앙혈에는 항혈청을 넣어 23℃에서 24시간 반응시켰다.

상호흡수반응(Reciprocal absorption test)은 0.2g의 건조된 각 계통의 병든 잎조직을 4ml의 Tris-HCl buffer(0.01M, pH 7.5)에 갈아 10,000g에서 20분간 원심분리하였다. 그 상청액에서 2ml를 항혈청 1ml와 혼합시켜 37℃에서 4시간, 4℃에서 12~16시간 보존 후 다시 10,000g에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상청액을 흡수항혈청으로 사용하였다.

흡수항혈청과 이병즙액(homologous antigen) 사이에 침강반응이 일어나면 이병즙액으로 다시 흡수시켜 사용하였다. 상호흡수반응 조사는 SDS-agar gel double diffusion 법 또는 가는 유리관을 이용한 침강반응법<sup>16)</sup>에 의해 실시하였다.

## 결 과

### 1. 바이러스의 순화

바이러스의 순화는 항혈청생산 및 바이러스의 이화학적인 특성을 연구하는데 가장 중요한 과정이다. HEPES buffer를 이용하여 순화한 결과 이병엽 1kg당 약 30~40mg의 바이러스를 얻을 수 있었으며 순화된 바이러스는 spectrophotometer를 이용한 흡광도 조사결과 260nm에서 최대흡수치를, 247nm에서 최소흡수치를 나타냈다.

### 2. PVY계통간의 혈청학적 관계

시험된 모든 계통의 이병즙액은 PVY-VB 항혈청과 양성반응을 나타냈다(Fig 1). 또한 각 계통의 침강대는 서로 융합하여 혈청학적으로 밀접

한 관련이 있는 것으로 보였으나, PVY-Argentina 계통만은 다른 계통의 침강대와 "Spur" 를 나타냈다. 따라서 이 계통은 항원의 성질이 다른 계통들과는 서로 다른 것으로 판단된다.

항원과 항혈청의 흡수반응을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 한국에서 분리된 PVY-VB 및 PVY-VN 계통의 항혈청을 서로 다른 계통의 항원 (heterologous antigen) 과 흡수반응시켜 조사

Table 1. Description of PVY strains used in the present study.

	Host origin	Symptom criteria on differential hosts	Geographic origin	Sources
MSMR	<i>N. tabacum</i>	Mottling symptom in tobacco var. NC2326 and NC95, which are susceptible and resistant to the root knot nematode, respectively	U.S.A	G.V. Gooding Jr.
MSNR	<i>N. tabacum</i>	Mottling in NC2326, and necrosis in NC95.	U.S.A	G.V. Gooding Jr.
NSNR	<i>N. tabacum</i>	Necrotic symptom in both of NC2326 and NC95.	U.S.A	G.V. Gooding Jr.
Chile	<i>N. tabacum</i>	Dark green bands along the veins with vein necrosis in both of NC2326 and NC95.	Chile	G.V. Gooding Jr.
Argentina	<i>N. tabacum</i>	Severe necrosis of all veins including the midrib in most tobacco species and cultivars. Small plants are killed.	Argentina	G.V. Gooding Jr.
N	<i>S. tuberosum</i>	Severe systemic veinal necrosis in tobacco, mottling in <i>P. floridana</i> , and mild mottling most potato cultivars including "Eersteling"	Netherlands	J.A. De Bokx
O	<i>S. tuberosum</i>	Severe systemic crinkle, rugosity or leaf drop, especially rugose mosaic in potato "Eersteling"	Netherlands	J.A. De Bokx
C	<i>S. tuberosum</i>	Many potato cultivars are hypersensitive to this strain. Systemic stipple streak in potato "Eersteling". Systemic necrosis and leaf dropping in <i>P. floridana</i> .	Netherlands	J.A. De Bokx

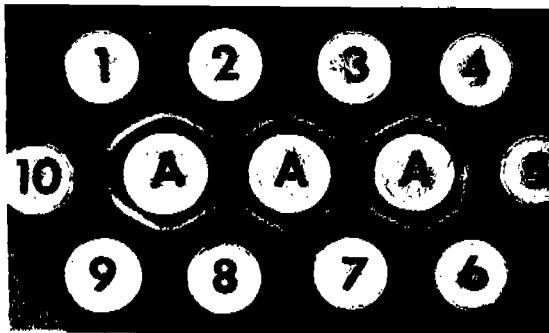


Fig. 1. SDS-immunodiffusion plate to investigate serological relations of various potato virus Y strains. The center well ( $\lambda$ ) contained antiserum (PVY-VB), and peripheral wells with PVY-infected tobacco saps: 1: PVY-BV, 2: PVY-VN, 3: PVY-MSMR, 4: PVY-, 5: PVY-M, 6: PVY-C, 7: PVY-MSNR, 8: PVY-NSNR, 9: PVY-Chile, 10: PVY-Argentina.

Table 2. Reciprocal-absorption test<sup>1</sup> with antigen<sup>2</sup> of potato virus Y strains.

Antiserum	Absorbing antigen	PVY antigens					0
		VB	MSMR	VN	Chile	Argentina	
Anti-VB	MSMR	-	-	-	-	-	-
	VN	-	-	-	-	-	-
	Chile	-	-	-	-	-	-
	Argentina	+	+	+	+	-	+
	O	-	-	-	-	-	-
	None	+	+	+	+	+	+
Anti-VN	MSMR	-	-	-	-	-	-
	VB	-	-	-	-	-	-
	Chile	-	-	-	-	-	-
	Argentina	+	+	+	+	-	+
	O	-	-	-	-	-	-
	None	+	+	+	+	+	+

1 Test conducted using the capillary tube precipitating technique.

+ : Positive reaction, - ; negative reaction.

2 See the table 1.

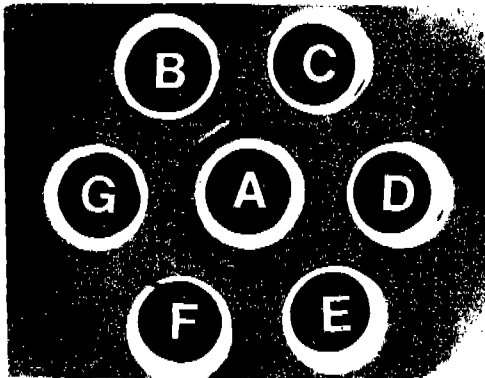


Fig. 2. Interaction of potato virus Y straining using absorbed antiserum. Center well (A) contained PVY-VB antigen, and peripheral wells contained antiserum absorbed with; B: PVY-Argentina, C: PVY-VN, D:PVY-MSMR, E:PVY-Chile, F:PVY-O, G:PVY-N.

한 결과 Argentina 계통을 제외한 모든 계통들은 PVY-VB 및 PVY-VN 항혈청을 흡수하여 음성반응을 나타냈다. 이 같은 반응은 SDS-agar gel double diffusion 법에 의해서도 같은 결과를 나타냈다.

### 고 찰

Delgado-Sanchez 와 Grogan<sup>9)</sup> 은 PVY를 담배에 접종한 결과 접종 10일 후부터 가장 높은 바이러스 농도를 나타내며 전신감염보다 접종일 이 바이러스 농도가 높은 것으로 보고하였다. 본 실험에서도 바이러스 농도를 조사한 결과 접종 후 2~3 주에 가장높은 농도를 보여, 순화제로서 사용하기에 적당한 시기로 생각되었다. 한편 순화된 바이러스의 농도도 일반적으로 국부반점 산정법을 이용하고 있으나 PVY의 경우는 바이러

스 농도를 비교하기 위한 국부반점을 나타내는 기주를 선택하기가 어렵다. *C. amaranticolor*<sup>3)</sup>, *C. quinoa*<sup>9)</sup> 또는 감자 “A6”<sup>2)</sup> 등이 많이 이용되고 있으나 이들은 바이러스 계통에 따라 국부반점이 나타나지 않거나, 다른 바이러스 오염에 대한 위험성 및 5일 이상의 시일이 필요한 등의 불편한 점들이 많다. 또 이들 기주들은 접종전 재배조건, 접종엽의 위치, 식물체의 크기 등에 따라 감수성의 차가 나타나기도 한다. 따라서 PVY의 경우 이병즙액과 동일한 계통의 항혈청반응에 의해 이병즙액의 내회석성을 조사하는 것이 관정이 빠르고 정확할 것으로 생각된다.

PVY는 비교적 기주식물내 바이러스 농도가 적고 순화도중 바이러스가 응집되어 손실되는 경우가 많아 순화에 어려움이 있는 바이러스로 알려져 있다.<sup>5)</sup> 이같이 순화도중 응집에 의한 바이러스 손실을 막기 위해 mol 농도가 높은 beffer를 많이 이용하고 있다.<sup>8) 18)</sup> 그러나 Dougherty<sup>10)</sup> 순화시 착즙용 또는 재현탁용 buffer로 HEPES buffer를 이용하였으며 PEG에 의한 바이러스 침전을 4%와 8%로 각각 농도를 단계적으로 높여 순화한 결과, 식물체로부터의 핵산 및 단백질 오염을 막을 수 있었다고 하였다. 또 바이러스의 수량도 이병엽 1kg당 50~100 mg으로 많은 양을 얻고 있다.

본 실험에서도 HEPES buffer를 이용한 순화가 Phosphate buffer를 사용한 Purcifull과 Gooding의 방법<sup>17)</sup>에 의한 것보다 많은 양의 바이러스를 얻을 수 있었다. 또 부분순화하여 전자현미경에 의한 바이러스 입자 관찰의 결과도 Dougherty 방법으로 순화한 것은 응집이 거의 없었다.

PVY의 계통들 사이에는 혈청학적으로 매우 밀접하게 관련되어 있는 경우가 대부분이다. 그러나 계통에 따라서는 예외적인 경우가 있다. Bokx<sup>3)</sup>는 감자 Gladblaadje 품종에서 분리된 PVY-GL 계통은 다른 계통들과 서로 다른 혈청반응을 나타냈다고 하였으며 Calvert 등<sup>7)</sup>도 계통간에 혈청학적 성질이 다른 PVY<sup>C</sup>-AB 계통을 보고한 바 있다. 본 실험에서도 PVY-Argentina 계통은

다른 9종의 계통들과 혈청반응에서 구분되는 새로운 계통으로 생각된다. 또 이 계통은 기주에서도 매우 심한 괴저병징을 나타내 대부분의 잎담배 품종들은 감염 후 2주 이상되면 고사되지만 다른 계통들은 고사되지 않았다.

Lin 등<sup>15)</sup>은 cowpea severe mosaic virus의 분리주종 항혈청과의 “Spur” 반응에 따라 두 가지의 혈청형 (serotype)으로 구분하고, 서로 다른 혈청형 사이에는 병징도 차이가 있다고 하였다. 그러나 항혈청 반응에 의해 분류되는 계통들과 이들간의 병징차이는 항상 일치하지는 않는 것으로 생각된다.<sup>11)</sup>

## 결 론

우리나라 잎담배에서 분리된 감자바이러스 Y (PVY)의 2가지 계통 (PVY-VB, PVY-VN)과 외국의 잎담배 또는 감자에서 분리된 8가지의 PVY 계통들 간의 혈청학적 관계를 조사하였다.

이 계통들중 PVY-Argentina 계통은 SDS가 함유된 한천확산배지 내에서 반응시킨 결과, PVY-VB 및 PVY-VN 항혈청과 “Spur” 반응을 나타냈다. 또, 한국에서 분리된 2가지 계통은 항원-항체 상호흡수반응 조사에 의해 PVY-Argentina 계통을 제외한 다른 계통들과는 혈청학적으로 밀접하게 관련되어 있어 반응의 차가 없었다.

이같은 결과로 미루어 조사된 계통들중 PVY-Argentina 계통은 다른 9가지의 계통들과는 서로 구분되는 새로운 혈청형으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. Bawden, F.C., Ann. Appl. Biol., 23:487-496 (1936).
2. Bokx, J.A. de, “viruses of potatoes and seed-production”, 233 pp., Pudoc, Wageningen, The Netherlands (1972).
3. Bokx, J.A. de, Potato Res., 18:38-51 (1975).

4. Bokx, J.A. de, EAPR, Abstr. Conf. papers, Warsaw (1978).
5. Bokx, J.A. de, and H. Huttinga, CMI/AAB, Descriptions of plant viruses, No. 242, Potato virus Y (1981).
6. Brandes, J. and R. Bercks, Adv. Virus Res., 11:1-24 (1965).
7. Calvert, E.L., P. Cooper and J. McClure, Record of Agricultural Res., N. Ireland, 28:63-74 (1980).
8. Choi, J.K., Thesis Ph.D. 109pp. Kushu Univ., Japan, (1980).
9. Delgado-Sanchez, S. and R.G. Grogan, Phytopathology, 56:1397-1404 (1966).
10. Dougherty, W.G., Virology, 101:466-474 (1980).
11. Gooding, G.V., Jr. and H. Ross, Tob. Sci., 14:55-57 (1970).
12. Gooding, G.V., Jr. and S.A. Tolin, Plant Dis. Repr., 57:200-204 (1973).
13. Klinkowski, M. and K. Schmelzer, Am. Potato J., 37:221-228 (1959).
14. Knight, C.A., D.M. Silva, D. Dahl, and A. Tsugita, Virology, 16:236-243 (1962).
15. Lin, M.T., J.R.N. Anjos, and G.P. Rios, Phytopathology, 71:435-438 (1981).
16. Marcussen, O.F. and T. Lundsgaard, Z. Pflkrankh. Pflschutz, 82:547-548 (1975).
17. Purcifull, D.E. and G.V. Gooding, Jr., Phytopathology, 60:1036-1039 (1970).
18. Shepherd, R.J. and G.S. Pond, Phytopathology, 50:797-803 (1960).
19. Van Regenmortel, M.H.V., Adv. Virus Res., 12:207-271 (1966).
20. Van Regenmortel, M.H.V., Virology, 31:467-480 (1967).
21. Wetter, C., Ann. Rev. Phytopathology, 3:19-42 (1965).