

## 大豆에서 發生한 알파파 모자이크 바이러스의 分類同定에 關한 研究

李淳炯 · 崔容文 · 金政洙 · 鄭鳳朝  
農村振興廳 農業技術研究所 病理科

## Identification of Alfalfa Mosaic Virus from Soybean

S. H. Lee, Y. M. Choi, J. S. Kim and B. J. Chung

*Institute of Agricultural Sciences, Department of Plant Pathology,  
Office of Rural Development, Suweon 170, Korea*

### 要 約

黃綠色줄무늬모자이크과 줄기 頂端部가 구부러지는 증상을 보이는 大豆 罹病株를 採集하여 指標植物檢定, 蟲媒傳染, 物理的 性質 調査, 抗血清檢定 및 電子顯微鏡檢鏡을 하였다. 指標植物檢定結果 *T. expansa*와 *Scotia*에 局部病斑反應, 동부, 완두, 명아주 등에 全身感染 증상을 일으켰다. 복숭아혹진딧물에 의한 傳染率은 90%였다. 物理的 性質은 耐熱성이 60°C, 耐稀釋성이 1,000 배였고 耐保存성이 2日이었다. 바이러스를 純化하여 抗血清製造結果 1:1024의 力價를 보였으며 日本 바이러스研究所에서 분양 받은 AMV 抗血清과 陽性反應을 보였다. 電子顯微鏡檢鏡 結果 大部分 길이가 60nm인 박테리아 모양의 바이러스 입자가 檢鏡되었다.

### ABSTRACT

A yellow stripe and bud bending disease of soybean was commonly observed on the field at Suweon area. The causal agent was identified as alfalfa mosaic virus (AMV) by indicator plant reactions, physical properties, serological test and electron microscopy. AMV produced vein clearing, top necrosis, top bent and mottling on the parts of soybean plants. Local lesions were produced on the inoculated leaves of *Vigna sesquipedialis*, *Vicia faba* and *Tetragonia expansa*, while *Chenopodium am. anticolor*, *C. quinoa*, *Pisum sativum*, *Petunia hybrida* and *Nicotiana tabacum* 'Bright yellow' were systemically infected. The thermal inactivation point was 60°C, dilution end point was 10<sup>-3</sup>, and longevity *in vitro* was 2 days at room temperature. AMV from soybean was reacted with AMV - antiserum in agar gel diffusion test. Electron microscopy of AMV from soybean exhibited bacilliform particles of 60 nm in length.

**Key words:** alfalfa mosaic virus, diagnosis.

### 緒 論

Alfalfa Mosaic Virus(AMV)는 1931년 Weimer에 의하여 처음 報告된 以後 現在 全世界的으로 分布, 發

生하고 있다. Hull(6)은 AMV가 12科 47種의 植物에 自然的으로 發生하며 人工接種했을 경우 47科 305種의 植物이 罹病된다고 하였다.

AMV의 病徵은 Alfalfa의 境遇 바이러스의 Strain 과 寄主의 生育時期에 따라 다양하며 一般的으로 初

期에는 길은 녹반증상이 보이다가 後期에 病徵이 은폐된다. 도마도에서는 萎縮되고 黃化現象이 일어나며 줄기가 壞死되어 결국에는 죽어 버린다. 大豆에서는 대체로 2가지 경우가 있는데 壞死型 局部病斑을 일으키는 것과 처음에는 녹반모자익병징에서 후기에 줄기가 壞死되고 잎이 뒤틀리는 病徵을 일으키는 全身모자익 증상이 있다.

本 試驗에서는 水原地方에서 大豆에 黃綠色 줄무늬 모자익병을 일으키고 頂端部가 아래로 굽어지는 病徵의 罹病株를 採集하여 바이러스를 分離, 指標植物檢定, 蟲媒傳染, 抗血清檢定, 物理的 性質을 調査하고 電子顯微鏡에 의한 바이러스粒子를 檢鏡하여 檢討하였다.

### 材料 및 方法

指標植物檢定: 水原地方 大豆 栽培圃場에서 自然發病된 罹病植物體를 採集, 乳鉢을 利用하여 干培의 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)과 함께 마쇄하였다. 溫室에서 育苗한 指標植物에 Carborundum(600 mesh)을 均一하게 뿌리고 마쇄한 罹病汁液을 달지면 接種 후 수도물로 接種葉을 씻었다.

蟲媒傳染: 網室內에서 育苗한 健全大豆에 無毒 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)을 飼育하였다. 바이러스接種은 罹病大豆에서 24時間 진딧물에 바이러스를 吸汁獲得시킨 후, 健全大豆(東北太)에 옮겨 24時間 바이러스를 接種하였다.

物理的 性質 調査: 耐熱性 調査는 罹病 *Tetragonia expansa*의 汁液을 試驗管에 1ml씩 넣고 恒溫수조를 利用하여 45°C에서 65°C까지 5°C간격으로 各各 10分間 處理한 후, 수도물로 冷却시킨 다음 健全 *T. expansa*에 接種하였다. 耐稀釋性은 罹病汁液을 10<sup>-1</sup>부터 10<sup>-5</sup>까지 10進法으로 稀釋하여 健全 *T. expansa*에 接種하였다. 耐保存性은 罹病汁液을 10ml 씩 試驗管에 넣고 室溫에 보관, 1日 간격으로 *T. expansa*에 接種하였다. 各處理別 病斑數는 接種 10日後 接種葉 5枚에서의 局部病斑數를 調査하였다.

바이러스의 純化: 大豆에서 分離한 바이러스를 接種後 1주일된 담배(*N. tabacum* 'ky-57')잎에 0.005 M ascorbic acid를 넣은 0.1 M 인산완충액(pH 7.0)과 10%의 butanol과 chloroform(1:4)를 넣고 Waring Blendor로 90秒 동안 마쇄하였다. 이 粗汁液을 9,000g로 15分間 遠心分離한 후 上溶液을 75,000g에서 120分間 遠心分離하여 바이러스를 沈澱시켰다.

이 沈澱物을 0.001 M Na-EDTA를 含有한 0.01 M 인산완충액(pH 7.6)으로 溶解하여 9,000g로 15分間 遠心分離하였다. 部分純化된 바이러스液을 10~40% 蔗糖밀도층(Sucrose density gradient) 遠心分離하였다(RPS 25-2). 이 때의 遠心分離는 90,000g로 90分間하였으며 우유빛 바이러스층을 주사기로 採取, 75,000g로 120分間 遠心分離하여 純化된 바이러스를 얻었다.

抗血清製造 및 檢定: 抗血清製造는 純化된 바이러스를 Freund complete adjuvant와 1:1로 잘 섞어 2주일 간격으로 2회 토끼에 근육 주사한 다음 최종 주사 2주 후에 全採血을 하였다. 이와 같이 製造된 抗血清과 純化한 바이러스를 使用하여 微量沈降法으로 力價檢定하였다. 血清檢定은 大豆에서 分離한 바이러스를 담배(*N. tabacum* 'ky-57')에 接種, 罹病葉을 部分純化하여 얻은 바이러스를 抗原으로 하였으며 AMV-抗血清은 日本 바이러스研究所에서 분양 받은 것을 1/16로 稀釋 使用하였다. 檢定方法은 寒天內 擴散法을 利用하였다.

電子顯微鏡檢鏡: 大豆에서 分離한 바이러스를 *Phy-saris floridana*에 人工接種하여 病徵이 심한 잎을 1×3mm 크기로 잘라 10%포르마린溶液으로 固定시킨 후 Phosphotungstic acid로 염색하여 試料를 製作하였다. 電子顯微鏡은 Hitachi Hu-11E型을 使用하였고 바이러스粒子 測定은 77개의 바이러스粒子 길이를 측정하여 그 分布를 調査하였다.

### 結果 및 考察

寄主植物反應: *Chenopodium amaranticolor* 등 15種의 植物을 供試하여 指標植物 檢定 結果 *Vigna sesquipedalis* 등 8種의 植物에서 全身 感染되었고 *Phaseolus vulgaris* 'Scotia'와 *T. expansa*에서는 接種葉에만 反應이 나타났고 *Physaris floridana*, *Petunia hybrida*, *Glycine max* 'Bonguei'에서는 上葉에만 反應이 나타났으며 *Datura metel*과 *Nicotiana rustica*에서는 反應이 나타나지 않았다(表 1). *C. amaranticolor* 上葉에는 葉脈을 따라 황색줄무늬가 불규칙하게 나타나는 모자익으로 잎이 오그라졌으며 接種葉에서는 黃色 局部病斑이 나타났다. *Vigna sesquipedalis*는 接種葉에 局部病斑이 나타난 후 시일이 경과함에 따라 갈색으로 변하면서 커지고 葉脈을 따라 壞疽現象이 일어나 심하게 萎縮된다. *Vicia faba*는 接種葉에 갈색국부병반이 나타났고 上葉에는 壞疽斑點이 생기며

**Table 1.** Reactions of indicator host plants to mechanical inoculation of AMV from soybean

Host species	Reaction <sup>a</sup>	
	inoculated leaves	upper leaves
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L	M
<i>C. quinoa</i>	L	M
<i>Vigna sesquipedalis</i>	L	VN
<i>Phaseolus vulgaris</i> 'Scotia'	L	-
<i>Physalis floridana</i>	-	M
<i>Pisum sativum</i>	L	M
<i>Tetragonia expansa</i>	L	-
<i>Gomphrena globosa</i>	L	M
<i>Petunia hybrida</i>	-	M
<i>Datura metel</i>	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Bright yellow'	L	M
<i>N. rustica</i>	-	-
<i>Glycine max</i> 'Gwanggyo'	L	M
<i>G. max</i> 'Bongeu'	-	St, M

<sup>a</sup> L : local lesion, VN : veinal necrosis, St : stunting, M : mosaic, NS : necrotic spot, - : no symptom.

모자이크를 동반한다. *P. vulgaris* 'Scotia'에서는接種葉에 갈색의 病斑이 생기며 上葉에서는反應이 없었다. *Petunia hybrida*와 *N. tabacum* 'Bright yellow'의接種葉에는黃色局部病斑이 上葉에는모자이크가 나타났다. *P. floridana*는接種葉에서는反應이 없었고 上葉에서만反應이 나타났다. *G. max* 'Gwanggyo'에서는接種葉에褐色의局部病斑, 上葉에서는심한모자이크증상과작은갈색반점이 나타났고 *G. max* 'Bongeu'에서는接種葉에反應이 없었으나 上葉에서는葉脈透明모자이크가 나타났으며感染後期에植物體가萎縮되었다.

一般的으로 AMV의 Strain은 *P. vulgaris*, *V. sesquipedalis*에서의病徵에依하여分類된다(8). 본 시험에서, 大豆에서分離한 AMV는 *V. sesquipedalis*接種葉에局部病斑이 나타난후 갈색으로變하고 커지면서葉脈壞疽가 일어나 잎이 떨어진다. 上葉에서는壞疽斑點이 생기면서 잎이 심하게 오그려진다. Scotia에서는接種葉에褐色의局部病斑이 생기며 上葉에서는反應이 없었다. Zaumeyer(8, 9)가報告한 강남콩에서分離한 4種의 Strain 중 Alfalfa yellow mosaic virus는 강남콩과 동부에서 병징이 大豆에서分離한 AMV와 同一히 있으나 *P. hybrida*에서는病徵이 달라 AMV를分類하는데 주요 寄主上에서는同一한 바이

러스로 생각되나 *P. hybrida*에서 다르기 때문에 大豆와 강남콩에서分離한 AMV는 서로 다른 것으로 생각된다. 또한 Clover의 一種인 *Pachysandra terminalis*에서分離한 AMV는(2) 동부에서 全身感染되지 않았고 강남콩에서 全身感染되었다. 도마도에壞疽病을 일으키는 AMV는(5) 동부와 강남콩에서壞疽型局部病斑을 일으켰으나 동부에서 全身感染되지 않아 大豆에서分離한 본 바이러스와는 상이한 Strain으로 사료된다.

蟲媒傳染 : 罹病植物에 복숭아혹진딧물을 24時間獲得吸汁시킨 후 24時間 大豆(東北太) 幼苗에接種한 結果 90%의 높은 傳染率을 보였다(表 2).

**Table 2.** Transmission of AMV from soybean by *Myzus persicae*

Cultivar	No. of plants		Percentage of infection
	Inoculated	Infected	
Dongbugtae	10	9	90

物理的性質 調査 : 大豆에서分離한 바이러스를 *T. expansa*에接種하여粗汁液을 얻어物理的性質을 調査한 結果 耐熱性은 60°C였고 耐稀釋性은 1,000배였으며 耐保存性은 2日이었다(表 3).

Clover에서分離한 AMV는(4) 耐熱성이 55~60°C, 耐稀釋성이 1,000배, 耐保存성이 3~4일이었으며, 강남콩에서分離한 AMV는(8) 耐熱성이 65~70°C, 耐稀釋성이 4,000배 耐保存성이 3일이며, Idaho strain은(8) 耐保存성이 2日, 耐熱성이 58~60°C, 耐稀釋성이 4,000배이었다. 그러나 Yellow strain은(8)

**Table 3.** Physical properties of AMV from soybean

Thermal inactivation point		Dilution end point		Longevity <i>in vitro</i>	
Temperature (°C)	No. of local lesions <sup>a</sup>	No. of Dilution local lesions	No. of local lesions	Day	No. of local lesions
Control	403	Control	450	Control	395
50	383	10 <sup>-1</sup>	257	1	301
55	92	10 <sup>-2</sup>	152	2	205
60	5	10 <sup>-3</sup>	3	3	0
65	0	10 <sup>-4</sup>	0	4	0
70	0	10 <sup>-5</sup>	0	5	0

<sup>a</sup> Total number of lesions on 5 inoculated leaves.

耐稀釋性이 500 배, 耐保存性이 12時間이었다. 이와 같이 AMV의 物理的 性質은 바이러스의 Strain에 따라 다양하며 一般적으로 AMV의 物理的 性質은 모두 이에 포함되나 그 差異는 바이러스의 Strain과 조즙액의 인산농도, pH 등의 關係에 기인된 것으로 생각된다.

抗血清檢定: 純化한 바이러스를 토끼에 주사하여 한마리당 32ml의 抗血清을 얻었으며 이 抗血清과 純化바이러스를 抗原으로하여 微量沈降法으로 力價를 測定한 結果 1/10<sup>24</sup>이었다. 또한 大豆에서 分離한 바이러스와 日本 바이러스研究所에서 분양받은 AMV 抗血清을 寒天內 擴散法으로 血清檢定한 結果 뚜렷한 양성 반응을 나타내었다.

電子顯微鏡檢鏡: 罹病葉에서 얻어진 바이러스의

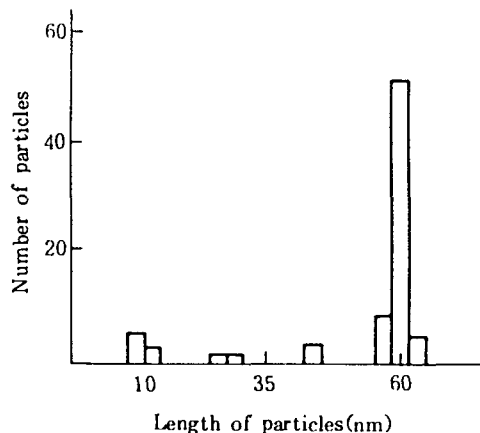


Fig. 1. Histogram of particle length distribution of AMV from soybean.

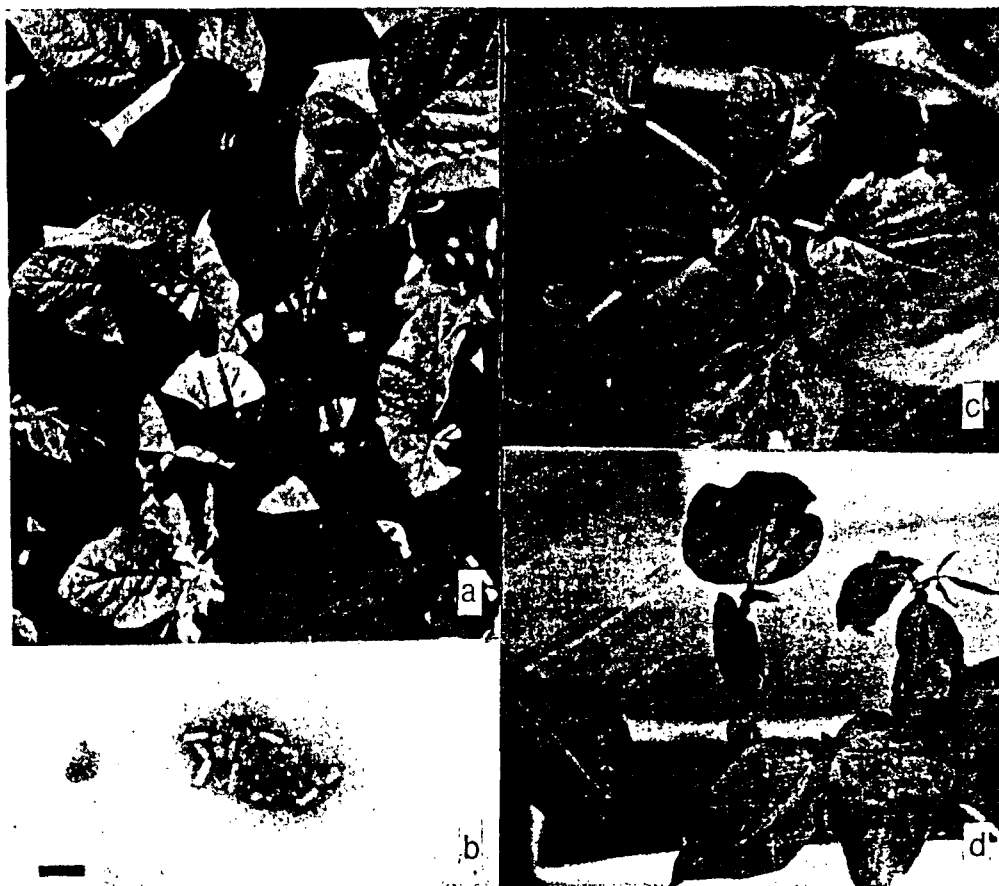


Fig. 2. (a) Yellow mosaic symptoms on naturally infected soybean leaves with AMV. (b) Purified virus particles fixed in 10% formalin and stained with 2% phosphotungstate (bar 100 nm). (c) Mosaic symptoms on *Physalis floridana*. (d) Necrotic local lesions on *Vigna sesquipedalis*.

電子顯微鏡檢鏡 結果 길이가 大部分 60 nm의 박테리아 모양의 바이러스粒子가 觀察되었다. 총 77個 粒子를 測定한 結果 바이러스粒子 길이 分布는 11nm~62.5nm였으며 가장 많은 것이 60nm였고, 다음이 57nm이었다(그림 1, 그림 2).

#### 參 考 文 獻

1. ALLINGTON, W. B., MOORHEAD, ELLEN L. & STAPLES, R. (1960). Alfalfa mosaic virus in soybean. *Phytopathology* 50:627 (Abstract)
2. BYRIN, R. H. & OSWALD, J. W. (1953). The mosaic virus disease complex of Ladino clover. *Phytopathology* 43:271-276.
3. JASPER, E. M. & BOS, L. (1980). Alfalfa mosaic virus. CMI/AAB Description of plant viruses. No. 229.
4. HERSHMAN, D. E. & VARNEY, E. H. (1982). Alfalfa mosaic virus in *Pachysandria terminalis*.

*Plant Disease* 66: 1195-1196.

5. KNORR, D. A., LAEMMLEN, F. F. & DAWSON, W. O. (1983). Effect of a necrosis inducing isolate of alfalfa mosaic virus on stand loss in tomatoes. *Phytopathology* 73:1554-1558.
6. ROGER, H. (1969). Alfalfa mosaic virus. *Advances in virus research* Vol. 15: 365-433.
7. SHUKLA, D. D. & GOUGH, K. H. (1983). Tobacco streak, broadbean wilt, cucumber mosaic and alfalfa mosaic viruses associated with ringspot of a *Ajuga reptans* in Australia. *Plant Disease* 67: 221-224.
8. Zaumeyer, W. J. (1953). Alfalfa mosaic virus systemically infectious to bean. *Phytopathology* 43: 38-42.
9. Zaumeyer, W. J. (1963). Two new strains of alfalfa mosaic virus systemically infectious to bean. *Phytopathology* 53: 444-449.