

Satellite RNA 보유 *Cucumber mosaic virus*(CMV)의 고추 CMV병에 대한 교차방어 효과

최장경* · 성미영 · 정혜진 · 홍진성 · 이상용¹

강원대학교 자원생물환경학부, ¹강원대학교 산림자원보호학과

Cross-Protection Effectiveness of *Cucumber mosaic virus* (CMV) Isolates Associated with Satellite RNA for Prevention of CMV Disease in Pepper Plants

Jang Kyung Choi*, Mi Young Sung, Hye Jin Jung, Jin Sung Hong and Sang Yong Lee¹

Division of Biological Environment, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Forest Resources Protection, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received on October 29, 2001)

Two attenuated *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates, Paf-CMV and Rs2-CMV, that had been selected from CMV isolates associated with satellite RNA (satRNA) were tested for cross-protection effect in pepper plants. The viruses selected as attenuated strains appeared to be identical serologically and physically to the challenge virus (Mf-CMV), but they were lower in the dilution end-point of infectivity of crude sap than Mf-CMV. When symptoms were observed in several indicator plants after inoculation, Paf-CMV and Rs2-CMV were symptomless or showed mild mosaic symptoms while another satRNA isolate Ap-CMV developed severe mosaic symptoms on the leaves as Mf-CMV. The nucleotide sequences of the satRNAs were determined by sequencing full-length cDNA clones. Paf-, Rs2- and Ap-satRNAs were 386, 335, and 347 nucleotides long, respectively. The sequences were then compared with the other known Y-satRNA, revealing that nucleotide sequences of the satRNAs consisted of 5'- and 3'-terminal conserved regions. However, variations occurred on the middle regions of the sequences, especially those related to symptom interference, showing significant differences between Paf-satRNA and other isolates. Infectious transcripts of Paf-satRNA and Rs2-satRNA induced mild mosaic symptoms in pepper plants when supported by genomic RNAs of Mf-CMV. Under greenhouse conditions, Paf-CMV and Rs2-CMV were tested for cross-protection effect in pepper and tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) plants against Mf-CMV. No symptoms were developed on the plants vaccinated with Paf-CMV until 3 weeks after inoculation with the virulent strain; however, another attenuated isolate, Rs2-CMV, showed less effectiveness in cross-protection. Depending on the concentration of the challenged virus, symptoms sometimes appeared later in the upper leaves. However, in plants challenged with low concentrations (below 0.2 mg/ml) of the challenge inoculum, symptoms caused by the virulent strain did not develop on the plants vaccinated with Paf-CMV. In the field experiments, the number of pepper plants with severe mosaic symptoms in the control plots was progressively increased after transplanting and reached approximately 50% after 50 days. On the other hand, the incidence of mosaic disease appeared very low on the plants that had received the protective inoculation with Paf-CMV.

Keywords : *Cucumber mosaic virus*, satellite RNA, cross-protection, pepper plant

오이 모자이크 바이러스(*Cucumber mosaic virus*; CMV)는 넓은 기주범위를 가지고 있으며, 진딧물에 의한 비영속전염 바이러스로 전세계적으로 분포한다(Francki 등,

1979). 이 바이러스는 *Cucumovirus* 그룹의 대표바이러스로서, 85과 365속 775종의 기주로부터 분리된다는 기록(Palukaitis 등, 1992)으로 보아, 적어도 1,000종 이상의 식물들을 기주로 가지고 있다고 생각된다. 이와 같이 자연계에 널리 분포하는 CMV는 많은 계통 또는 분리주가 보고되었으며, 이들은 주로 병징이나 기주범위의 차이에 의

*Corresponding author

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

E-mail) jkchoi@kangwon.ac.kr

해서 구분되고 있다. 그러나 일반적으로 CMV는 혈청학적 유연관계, 외피단백질(coat protein; CP)의 펩티드 map 또는 게놈RNA의 hybridization 분석 등에 의해서 서브그룹 I과 II로 구분하고 있으며(Devergne과 Cardin, 1973; Gonda와 Symons, 1978; Piazzola 등, 1979; Owen과 Palukaitis, 1988), 최근에는 서브그룹 I을 RNA3의 5'말단 및 CP영역의 염기서열 특성에 따라 서브그룹 IA 및 IB로 세분하고 있다(Roossinck 등, 1999).

현재 직접적으로 바이러스병에 효과적인 방제방법은 없으나, 식물바이러스병의 방제를 위하여 그 동안 시도되어 온 여러 가지 방법들 중에는 유용하게 활용될 수 있는 것들이 있으며, 약독바이러스를 이용한 교차방어효과(cross-protection effect)의 활용도 그 중의 하나이다. 지금까지 실용적으로 약독바이러스를 이용하여 바이러스병을 방제한 예로서는 유럽과 일본에서 성공한 토마토의 *Tobacco mosaic virus*(TMV)병, 브라질의 감귤 *Citrus tristeza virus*(CTV)병, 대만과 하와이에서 실시한 파파야의 *Papaya ringspot virus*(PaRSV)병의 방제 등이 있다(Oshima, 1975; Muller와 Costa, 1987; Wang 등, 1987; Gonsalves와 Garnsey, 1989).

CMV는 계통에 따라 게놈 RNA 이외에 저분자의 satellite RNA(satRNA)를 보유하고 있는 경우가 자주 발견된다. 아직까지 이 satRNA의 유래나 기능에 관한 확실한 해석은 이루어져 있지 않으나, 대부분의 satRNA가 helper CMV의 병징을 간접하는 것으로 보고되어 있다(Palukaitis 등, 1992). 특히 satRNA의 종류에 따라서는 helper CMV의 병징을 약화시키는 경우가 있는데, 이러한 satRNA-CMV는 약독바이러스로서 이용하거나 또는 satRNA를 발현하는 형질전환식물체를 만들어 CMV병에 대한 저항성식물로 이용하는 연구들이 수행되기도 하였다(Yoshida 등, 1985; Baulcombe 등, 1986; 이 등, 1995; Montasser 등, 1998).

CMV는 우리 나라에서도 각종 작물에 큰 피해를 주고 있으며, 고추에서도 높은 수준으로 검출되고 있어(Park 등, 1995), 이에 따른 피해는 심각할 것으로 생각된다. 이 연구는 우리 나라의 고추재배에서 발생하고 있는 CMV병의 효과적인 방제법을 모색하기 위한 방안의 하나로, satRNA를 보유하고 있는 CMV계통들 중에서 고추의 약독바이러스로 이용할 수 있는 계통을 선발하는 것을 목적으로 강독계 CMV에 대한 교차방어효과를 검정하였다.

재료 및 방법

공시 바이러스. 이 실험에서는 satRNA를 보유하고 있는 CMV계통으로 무, 썩, 및 파리에서 분리한 Rs2-CMV,

Ap-CMV 및 Paf-CMV(Hong 등, 1999)를 공시하였으며, 대조 또는 교차방어효과의 검정을 위한 강독계 바이러스로 Mf-CMV(Choi 등, 1998)를 사용하였다. 공시한 각 CMV계통은 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc에 접종하였고, 10일 후 병징이 발현된 상엽의 즙액을 *Chenopodium amaranticolor*의 전개엽에 접종하였다. 접종 4-5일 후 접종엽에 형성된 병반을 단일병반분리법으로 분리하여 *N. tabacum* cv. Xanthi nc의 유묘에 재접종하고 증식된 바이러스를 접종원으로 사용하였다. 이 실험에서의 접종원은 특별히 언급하는 경우를 제외하고 0.01 M 인산완충액(0.01 M EDTA포함, pH 7.0) 20배 액(w/v)으로 마쇄한 즙액을 사용하였다.

약독 satRNA-CMV의 선발. SatRNA를 보유한 CMV계통 중에서 약독바이러스로 이용할 수 있는 계통을 선발하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 즉 공시한 satRNA 보유 CMV계통들에 대하여 기주반응실험, 혈청학적성질 및 물리적성질을 강독계 Mf-CMV와 비교하여, 약독계로 이용 가능한 satRNA-CMV를 선발하였다. 기주반응실험은 CMV의 특성을 잘 발현하는 *N. glutinosa* 등 9종의 지표식물을 대상으로 실시하였다. 약독바이러스의 혈청학적성질은 Mf-CMV의 항혈청(Choi 등, 1998)을 사용하여 agar gel diffusion 방법으로 조사하였다. 한편 약독바이러스의 물리적성질은 각 바이러스에 감염된 *N. glutinosa* 잎의 즙액을 이용하여 상법에 따른 내열성, 내회색성 및 내보존성을 각 처리구 별로 *Vigna unguiculata*의 초생엽 4매씩을 사용하여 검정하였다.

바이러스의 정제. 공시한 satRNA-CMV는 5-6엽기의 *N. tabacum* cv. Xanthi nc에 접종하고 7-10일 후, 전신감염된 잎을 채취하여 바이러스의 정제재료로 사용하였다. 이때 Mf-CMV도 같은 방법으로 증식하여 대조바이러스로 이용하였다. 정제는 Takanami(1981)의 방법을 사용하였고, 정제바이러스는 220-320 nm에서의 자외선(UV)흡수 곡선을 조사하여 농도를 산출하였으며, negative direct staining법에 의한 전자현미경 관찰을 실시하였다.

SatRNA의 cDNA클로닝 및 염기서열 분석. SatRNA에 대한 염기서열을 결정하고 약독현상과 관련된 satRNA의 domain을 분석하기 위하여 3종의 satRNA에 대한 전장 cDNA를 구축하였다. 각 RNA에 대한 cDNA의 합성은 Ix-CMV의 satRNA에 대한 cDNA합성방법(Bernal과 Garcia-Arenal, 1994)을 따랐다. 이때 polymerase chain reaction(PCR)에 의한 satRNA-cDNA합성의 primer는 5'-GGAATTCCTGGGTCCTG-3'(3'end-primer: *Eco*RI 및 *Sma*I site를 삽입하였고, 밑줄부분은 CMV satRNA 3'말단 영역의 공통 염기서열에 대한 상보적 염기) 및 5'-

GGAATTCTAATACGACTCACTATAGGTTTTGTTTG-3' (5'end-primer: *Eco*RI site와 T7 promoter sequence를 포함하며, 밑줄부분은 CMV satRNA 5'영역의 공통 염기서열)의 sequence를 합성하여 사용하였다. 각 satRNA에 대한 cDNA는 이들 primer pair를 이용하여 정제바이러스로부터 추출한 total RNA를 주형으로 RT(reverse transcription)-PCR을 Bernal과 Garcia-Arenal(1994)의 조건에 따라 수행하고, 1.2% agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하여, 각 satRNA의 전장 cDNA를 선별하였다. 선별된 각 바이러스의 satRNA-cDNA는 pUC18의 *Eco*RI-*Sma*I site에 삽입하고 *Escherichia coli* DH5 α 에 형질전환하였으며, 이들 클론으로부터 추출한 재조합플라스미드는 Sequenase kit (United States Biochemical)를 이용하여 dideoxy nucleotide chain termination 방법으로 염기서열을 결정하였다.

감염성 cDNA transcript의 구축. SatRNA의 helper CMV에 대한 병징간섭작용을 검정하기 위하여 Bernal과 Garcia-Arenal의 방법(1994)으로 감염성 cDNA transcript system을 구축하였다. 즉 각 satRNA의 cDNA 클론으로부터 플라스미드를 정제하고 *Sma*I로 처리하여 선상구조로 만든 후, T7 RNA polymerase(Promega)와 cap analog (BRL)를 이용하여 *in vitro* satRNA transcript를 제작하였다. 전사된 satRNA transcript(20-25 μ g/ml)는 정제 Mf-CMV로부터 추출한 게놈RNA(200-300 μ g/ml)과 혼합한 후 5-6엽기의 *N. benthamiana*에 접종하였다. 전사RNA를 접종하고 1주일 후, 전신감염된 *N. benthamiana*의 잎을 접종원으로 고추에 재접종하여 발현되는 병징을 관찰하였다.

교차방어 효과검정. 선별된 약독CMV(Paf-CMV 및 Rs2-CMV)의 강독계 바이러스에 대한 교차방어효과를 검정하기 위하여, 약독바이러스를 접종한 고추 및 담배에 강독바이러스를 challenge한 후 나타나는 교차방어의 지속효과 및 강독계 바이러스의 challenge 농도별 접종에 따른 교차방어효과를 검정하였다. 우선 약독바이러스를 접종한 고추에 강독계 바이러스를 challenge한 후 나타나는 교차방어의 지속효과를 검정하기 위하여, 고추(품종; 대한) 및 담배(품종; Xanthi nc)의 유묘(고추는 본엽 3-4매, 담배는 본엽 5-6매)에 약독계 satRNA-CMV를 접종하고 7일 후에 Mf-CMV를 challenge 접종하였다. 이후 이들 식물은 온실에서 생육시키면서 Mf-CMV의 병징이 발현되는 개체를 3주 동안 조사하여 강독바이러스의 challenge 감염에 대한 약독바이러스의 교차방어 지속효과를 조사하였다. 이때 약독바이러스 및 강독바이러스의 접종원은 *N. tabacum* cv. Xanthi nc에 접종하고 7-10일 후 감염된 잎을 10배(w/v)의 인산완충액으로 마쇄한 즙액을 이용하였다. 한편 강독계 바이러스의 challenge 농도별 교차방어

효과의 검정은 위와 같은 방법으로 약독CMV를 접종한 고추와 담배에, 7일 후 정제한 Mf-CMV의 농도를 20, 2, 0.2 및 0.02 mg/ml로 조정된 다음, 각각 challenge 접종하고 Mf-CMV의 병징이 발현되는 시기를 5일 간격으로 30일간 조사하였다.

포장실험. 약독Paf-CMV 및 Rs2-CMV를 접종한 고추의 강독바이러스에 대한 교차방어 효과를 포장에서 검정하였다. 육묘용 포트에 파종하여 자란 고추의 유묘(품종; 대한, 본엽 3-4엽기)에 두 종의 약독 satRNA-CMV를 각각 100-110개체씩 접종한 다음, 10일간 온실에서 관리하였다. 이 후 약독바이러스를 접종한 고추의 묘는 바이러스별로 30-40개체씩 3시험구로 나눠서 관행재배 방법에 따라 2000년 6월 19일 임의배치법으로 시험포장에 정식하였다. 바이러스병의 발생은 정식 20일 후부터 10일 간격으로 각 개체에 나타난 모자이크, 기형, 위축 등의 병징을 육안 조사하여 검정하였다.

결과 및 고찰

약독 satRNA-CMV의 성질. 공시한 3종의 CMV로부터 satRNA 보유여부를 확인하기 위하여 이들 바이러스에 전신감염된 *N. tabacum* cv. Xanthi nc의 잎으로부터



Fig. 1. Double stranded RNA (dsRNA) profiles of the *Cucurber mosaic virus* (CMV) isolates extracted from infected *Nicotiana tabacum* plants. Electrophoresis was performed in 6% polyacrylamide gel and the gel was stained with ethidium bromide. Lane 1: dsRNA of Rs2-CMV, lane 2: dsRNA of Ap-CMV, lane 3: dsRNA of Paf-CMV.

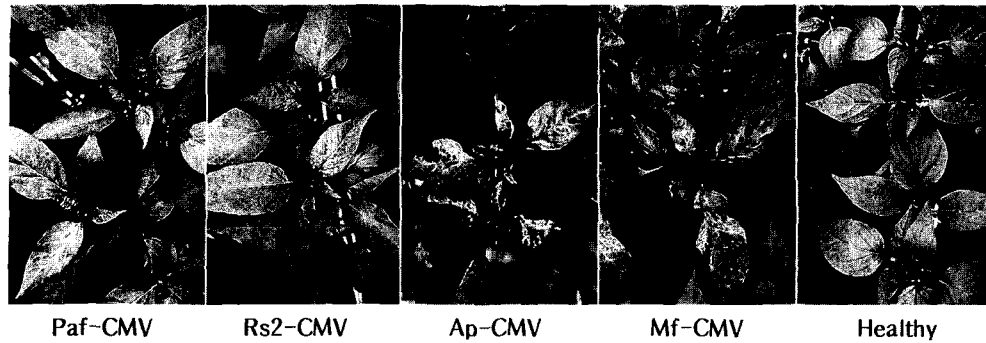


Fig. 2. Symptoms on *Capsicum annuum* (cv. Daehan) caused by inoculation of three *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates associated with satRNA and Mf-CMV used as a virulent CMV.

복제형인 겹가닥 RNA(double-stranded RNA; dsRNA)를 Morris와 Dodds의 방법(1979)으로 추출하여 전기영동하였다. 그 결과 3종의 CMV는 모두 게놈RNA 이외에 satRNA를 보유하였으며, 이들의 분자크기는 Paf-satRNA가 약 390염기, Ap-satRNA 약 350염기, 그리고 Rs2-satRNA가 약 330염기로 확인되었다(Fig. 1).

약독계 CMV를 선발하기 위하여 공시한 3종의 satRNA 보유 CMV를 3-4엽기의 고추 유묘에 접종하고, 온실에서 1개월간 발현되는 병징의 강도 및 변화를 관찰하였다. 그 결과 Paf-CMV 및 Rs2-CMV를 접종한 고추에서는 매우 얇은 전신병징이 발현되었으며, 감염된 고추의 생육은 건전 고추와 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 따라서 고추에서 약독반응을 나타낸 2계통의 바이러스를 약독계 CMV로 1차 선발하였다. 한편 Ap-CMV를 접종한 고추는 강독계 Mf-CMV에 의한 병징과 마찬가지로 심한 모자이크 증상이 발현되었으며, 그 결과 식물체는 현저하게 위축되었다. 이러한 결과로부터 Ap-CMV는 약독병징을 발현하는 계통이 아닌 것으로 판단되었다.

SatRNA 보유 CMV의 기주반응을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 이 결과에서 약독계로 선발된 Paf-CMV 및 Rs2-CMV의 기주반응은 공시한 모든 식물에서 다른 계통의 바이러스에 의한 병징 보다 전체적으로 약하게 발현되는 특성을 보였다. 특히 Paf-CMV를 접종한 식물체의 약독병징은 균일하고 안정되게 발현되었다. 한편 Rs2-CMV를 접종한 식물체의 경우도 대부분의 식물에서 약한 병징이 발현되기는 하였으나, 접종한 식물의 개체에 따라서는 모자이크 증상이 나타나고 잎의 기형을 초래하는 개체들이 발생하였다. 따라서 Rs2-CMV의 경우, 그 satRNA가 환경의 영향 또는 식물의 개체에 따라서는 helper 바이러스에 의한 병징을 일정하게 간섭하지 못한다는 것을 시사하였다. 한편 Ap-CMV의 기주반응은 고추에서 발현되었던 병

징 특성과 마찬가지로, 다른 기주식물의 반응에서도 뚜렷한 모자이크 병징이 발현되고 식물체가 위축되는 성질을 나타냈다.

약독바이러스의 혈청학적성질을 검정하기 위하여 Mf-CMV의 항혈청에 대한 agar gel diffusion test를 실시한 결과는, 공시한 모든 satRNA-CMV의 항원이 Mf-CMV의 항원과 융합하는 한 종의 침강선을 나타냈다(데이터 생략). 이는 Mf-CMV가 혈청학적으로 subgroup I에 속하기 때문에(Choi 등, 1998), 공시한 CMV의 혈청형은 모두 subgroup I에 속하는 것으로 판단되었다. 한편 약독바이러스로 판단된 Paf-CMV 및 Rs2-CMV의 물리적성질은 내회석성이 10^4 으로, Mf-CMV나 Ap-CMV 보다 낮게 나타났다. 그러나 이들의 내열성 및 내보존성은 바이러스간 차이를 보이지 않았다(데이터 생략).

바이러스를 정제하고 전자현미경으로 관찰한 각 satRNA-CMV의 입자는 모두 직경 약 30 nm의 구형입자로 Mf-CMV와 차이를 보이지 않았다. 그러나 정제바이러스액의 자외선흡수곡선으로부터 산출한 바이러스의 농도는 Paf-CMV 및 Rs2-CMV가 감염 잎 조직 100 g으로부터 36-40 mg으로, Mf-CMV 및 Ap-CMV의 정제농도 70-90 mg 보다 낮게 나타났다.

이상과 같은 약독Paf-CMV 및 Rs2-CMV의 성질, 특히 기주반응 실험에서 전반적으로 병징이 약하게 발현되는 특성, 물리적성질 중 내회석성이 낮고 바이러스의 정제수량이 낮은 성질 등으로부터, 이 실험에서 선발된 satRNA의 약독작용은 바이러스의 증식농도 또는 증식속도에 영향을 미친 결과와 관련이 있을 가능성을 시사해주었다. 실제로 최와 손(1985)은 약독 담배 모자이크 바이러스(*Tobacco mosaic virus*: TMV), Tw 333의 증식농도는 강독계 TMV의 약 1/2에 불과하다는 사실을 보고하였고, 바이러스의 약독은 증식속도 또는 증식농도와 관련되는 계

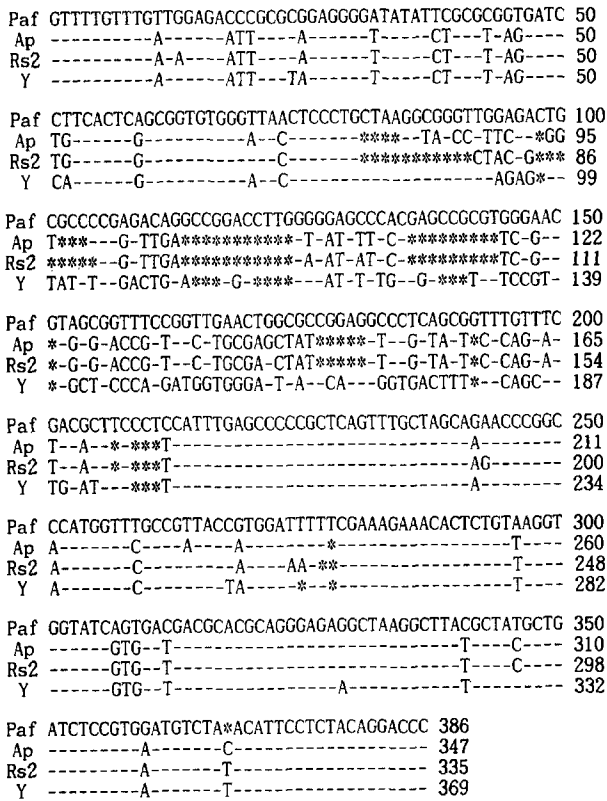


Fig. 3. Alignment of the nucleotide sequences of the satRNAs isolated from *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates, Paf-CMV, Ap-CMV, and Rs2-CMV. The differences between the nucleotide sequences of the three satRNAs and Y-satRNA (Kuwata *et al.*, 1991) are indicated; dashed lines indicate an identical sequence. Deletions are presented as asterisks.

놈RNA의 변이에 기인한다는 것을 지적하였다. 한편 Cassells와 Herrick(1977)은 식물체내에 증식된 약독바이러스의 농도가 강독계의 1/10 이상으로 축적되면 교차방어의 효과

가 인정된다는 것을 토마토의 약독TMV에서 보고하였다. 따라서 약독바이러스의 증식이 늦거나 증식농도가 낮아 하어도 일정 수준이상으로 증식된 식물에서는 강독계 바이러스의 challenge에 대한 교차방어효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되었다.

SatRNA의 염기서열. 공시한 3계통 CMV의 satRNA에 대한 염기서열을 결정한 결과, Rs2-satRNA는 335염기, Ap-satRNA 347염기, Paf-satRNA 386염기로 분석되었다(Fig. 3). 이들 염기서열을 이미 보고된 Y-CMV satRNA의 염기서열(Kuwata 등, 1991)과 비교한 결과, 분자 크기가 큰 Paf-satRNA에서 약간의 염기치환이 발견되기는 하였지만, 전반적으로 양 말단영역, 특히 5'말단으로부터 80염기 그리고 3'말단으로부터 174염기는 매우 안정된 conserved sequence를 보였다. 그러나 이들 satRNA의 중간영역에 존재하는 sequence, 즉 5'말단의 81번째 염기로부터 162번째(Rs2-satRNA), 173번째(Ap-CMV), 또는 212번째(Paf-satRNA) 염기까지의 영역에서는 많은 변화를 나타냈다. 이러한 결과는 지금까지 보고된 CMV satRNA 염기서열의 구조적특성(Kurath와 Palukaitis, 1989; Masuta와 Takanami, 1989; Jaegle 등, 1990; Kuwata 등, 1991; Bernal과 Garcia-Arenal, 1994)과 일치하였다. 한편 Y-CMV의 satRNA에서 병징과 관련된 domain으로 164-197번째 sequence가 보고되었는데(Kuwata 등, 1991), 이 domain과 대응하는 영역에서의 sequence 변이도 확실하게 인정되었다. 특히 이 영역에서 Paf-satRNA의 염기서열은 다른 계통의 satRNA에 비하여 뚜렷한 차이를 보였기 때문에, 이 영역의 염기서열 변이가 약독과 관련이 있을 지에 관해서는 금후 흥미 있는 연구과제가 될 것으로 생각된다.

SatRNA-cDNA transcript의 감염성. 공시한 satRNA가 helper CMV의 병징에 대해서 간섭하는 성질을 검정

Table 1. Reaction of indicator plants by mechanical inoculation of the *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates (Ap-CMV, Rs2-CMV and Paf-CMV) associated with satRNA and Mf-CMV used as a challenge virus

Indicator plants	Symptoms			
	Ap-CMV	Rs2-CMV	Paf-CMV	Mf-CMV
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/M ^a	-/M	-/m	-/M
<i>N. glutinosa</i>	-/M	-/m(M)	-/m	-/M
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	-/M	-/m(M)	-/m	-/M
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-/M	-/m	-/m	-/M
<i>Capsicum annuum</i>	-/M	-/m(M)	-/m	-/M
<i>Cucurbita pepo</i>	-/M	-/m	-/m(-)	-/M
<i>Cucumis sativus</i>	-/m	-/-	-/-	-/M
<i>Zea mays</i>	-/-	-/-	-/-	-/M
<i>Vigna unguiculata</i>	L/-	L/-	L/-	L/-

^aInoculated leaves/upper leaves, M: mosaic, m: mild mosaic, L: necrotic local lesion, -: symptomless infection or not infected, (): sometimes symptoms expressed.

하기 위하여, 구축한 각 클론의 cDNA로부터 transcript RNA를 전사시켰다. 전사된 각 바이러스의 satRNA transcript는 정제된 Mf-CMV의 RNA와 혼합한 후 5-6엽기의 *N. benthamiana*에 접종하였다. 전사 RNA를 접종하고 1주일 경과하여 전신감염된 *N. benthamiana*의 잎을 접종원으로 고추에 재접종하였다. 이렇게 접종된 고추에서 발현되는 병징을 1개월간 검정한 결과, 본래의 각 satRNA-CMV를 접종한 결과와 유사하게, Paf-satRNA 및 Rs2-satRNA의 transcript와 혼합한 Mf-CMV를 접종한 식물에서 약한 병징이 발현되었고, Ap-satRNA와 Mf-CMV RNA를 혼합하여 접종한 고추는 Mf-CMV 단독접종과 마찬가지로 접종 1주일 후에 뚜렷한 모자이크 병징이 발현되었다.

약독 satRNA바이러스의 교차방어효과. 고추 및 담배

Table 2. Cross-protection effectiveness of *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates associated with satRNA against Mf-CMV in pepper and tobacco plants under greenhouse conditions

Host	Days after challenge inoculation	Number of plants with severe symptoms		
		Control ^a	Paf-CMV ^b	Rs2-CMV ^b
Pepper	7	2/10 ^c	0/10	0/10
	14	9/10	0/10	4/10
	21	10/10	1/10	5/10
Tobacco	7	3/10	0/10	1/10
	14	10/10	0/10	3/10
	21	10/10	0/10	4/10

^aInoculated with challenge virus only.

^bSeedlings were inoculated with the satRNA-CMVs and challenge-inoculated with Mf-CMV after 7 days.

^cNumber of mosaic symptom expressed plants/Number of inoculated plants.

의 유묘에 두 종의 약독계 satRNA-CMV를 접종하고 1주일 후에 Mf-CMV를 challenge 접종한 다음, 3주 동안 Mf-CMV의 병징이 발현되는 개체를 조사하여 강독바이러스의 challenge에 따른 약독바이러스의 교차방어 지속 효과를 조사하였다. 그 결과 Paf-CMV를 접종한 고추와 담배는 모두 Mf-CMV를 접종한 후 21일까지 병징이 발현되지 않았으나, Rs2-CMV의 경우 challenge 14일 후에 약 반수의 개체에서 모자이크 병징이 발현되었다(Table 2). 이러한 현상은 Rs2-CMV의 기주반응 실험의 결과(Table 1)와 마찬가지로, Rs2-CMV에 감염된 식물의 일부 개체에서 뚜렷하게 모자이크가 발현되었던 성질과 일치하였다. 한편 약독 satRNA-CMV를 접종한 고추와 담배에, 접종 7일 후 Mf-CMV의 농도를 달리하여 challenge 접종하고 Mf-CMV의 병징이 발현되는 시기를 조사함으로써, challenge 농도에 따른 교차방어효과를 검정하였다. 그 결과 Paf-CMV를 면역시킨 고추의 경우, Mf-CMV를 0.2 mg/ml 이하의 농도로 challenge하였을 때, 30일 경과 후까지 병징이 발현되지 않았다(Table 3). 그러나 Rs2-CMV에서는 대부분의 식물체가 0.2 mg/ml 이하의 농도에서 병징발현이 억제되었으나, 일부의 개체(접종 후 25일 및 30일에서 접종한 10개체 중 2개체)에서는 병징이 발현되어 강독계에 대한 교차방어의 효과가 일정하게 나타나지 않았다.

포장실험. 포장에서 약독CMV의 강독바이러스에 대한 교차방어효과를 검정하기 위하여 고추의 유묘에 Paf-CMV 및 Rs2-CMV를 접종한 다음, 포장에 재배하면서 바이러스병징이 발현되는 개체를 조사하였다. 그 결과 Paf-CMV를 접종한 고추에서는 약독바이러스 접종 30일 후(7월 9

Table 3. Cross-protection effectiveness of the attenuated *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates, Paf-CMV and Rs2-CMV against inoculum concentration of virulent Mf-CMV challenged in pepper plants under greenhouse conditions

Concentration of challenged inoculum (mg/ml)	Severe strain symptoms appearance (days after challenge)					
	5	10	15	20	25	30
Cross-protected plants by Paf-CMV ^a						
20	-	+	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
0.2	-	-	-	-	-	-
0.02	-	-	-	-	-	-
Cross-protected plants by Rs2-CMV ^a						
20	-	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+
0.2	-	-	-	-	+	+
0.02	-	-	-	-	-	-

^aSeedlings were inoculated with the satRNA-CMVs and challenge-inoculated with Mf-CMV inoculum after 7 days at 20 mg/ml, 2 mg/ml, 0.2 mg/ml, and 0.02 mg/ml, respectively.

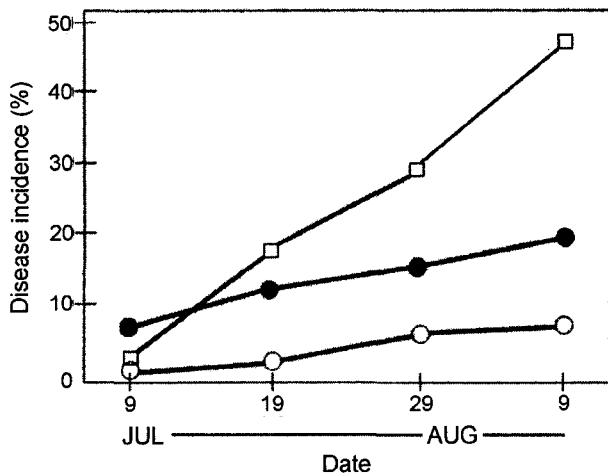


Fig. 4. The incidence of severe mosaic and stunting symptoms by virulent *Cucumber mosaic virus* (CMV) and/or other viruses in the experimental fields in 2000. At 10 days after inoculation with attenuated isolates, the seedlings of pepper plants were transplanted in the field at Jun 19, 2000. ○ = Paf-CMV inoculated plot; ● = Rs2-CMV inoculated plot; □ = noninoculated plot.

일), 바이러스 병징이 발현된 개체가 1.8%(110개체 중 2개체)로 나타났으며, Rs2-CMV의 접종구에서는 8.2%(98 식물 중 8개체)의 식물에서 병징이 발현되었다. 이때 약독바이러스를 접종하지 않고 대조로 재배한 고추에서의 병징 발현율은 2.7%(1/36)로 나타났다(Fig. 4). 그러나 약독바이러스 접종 40일 후에는 Paf-CMV 접종구에서 4.5%(5/110), Rs2-CMV에서 13.3%(13/98), 대조구 19.4%(7/36)로 모자이크 병징의 식물체가 증가하였으며, 50일 후에는 각각 5.5%(6/110), 14.3%(14/98) 및 30.6%(11/36)의 개체에서, 그리고 접종 60일 후에는 6.4%(7/109), 18.3%(18/98) 및 47.2%(17/36)의 개체에서 병징이 발현되었다.

한편 포장에서 모자이크 병징이 발현된 고추가 모두 CMV의 감염에 의한 결과인지 또는 다른 바이러스의 감염에 의한 병징인지를 검정하기 위하여, 모자이크 병징이 발현된 개체에 대해서 CMV RNA3의 CP영역에 대응하는 primer를 이용한 RT-PCR법(Choi 등, 1998)으로 CMV의 감염여부를 조사하였다. 그 결과 Paf-CMV의 접종구에서는 접종 30일 후 모자이크가 발현된 2식물 중 0개체, 40일 후 2개체(2/5), 50일 및 60일 후 2개체(2/6)에서 각각 CMV가 검출되었으며, Rs2-CMV에서는 각각 3/8, 7/13, 9/14, 10/18개체에서, 대조구는 각각 0/1, 4/7, 8/11, 13/17개체로부터 CMV가 검출되었다. 이러한 결과로부터 Paf-CMV의 면역접종은 Rs2-CMV의 접종보다 강독계 CMV의 감염에 대한 교차방어효과가 안정적으로 유지된 결과로 해석되었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, 약독병징과 관련된 satRNA-CMV, 특히 Paf-CMV를 이용한 강독계 CMV병에 대한 교차방어효과가 인정되었으며, 이는 약독satRNA-CMV가 고추의 CMV병 방제에 이용가능성이 있다는 것을 시사하였다. 다만 약독계 바이러스 자체에 의한 고추의 감수율에 대한 평가나, 다른 작물에 미치는 영향 등에 대해서는 구체적인 조사가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

기주반응 실험을 통하여 무병징 또는 옅은 병징을 발현하는 satRNA 보유 Paf-CMV 및 Rs2-CMV를 고추 CMV병의 방제를 위한 약독바이러스로 공시하여 교차방어효과를 검정하였다. 공시한 satRNA-CMV는 모두 agar gel diffusion test에서 강독계로 공시한 Mf-CMV의 항원과 융합하는 침강선을 나타내 subgroup I의 혈청형으로 판단되었다. 이들 약독계 satRNA-CMV의 물리적성질은 내회색성이 10^4 으로, 강독계 Mf-CMV나 satRNA를 보유하고 있는 Ap-CMV 보다 낮게 나타났으나, 내열성 및 내보존성은 차이를 보이지 않았다. 공시한 satRNA의 염기서열을 결정된 결과, Rs2-satRNA는 335염기, Ap-satRNA 347염기, Paf-satRNA 386염기로 구성되어 있었다. 이들 염기서열을 이미 보고된 Y-CMV의 satRNA와 비교한 결과, 양말단 영역 특히 5'말단으로부터 80염기 및 3'말단으로부터 174염기는 안정된 conserved sequence를 나타냈다. 그러나 중간영역의 염기서열에서는 많은 변이를 나타냈고, 특히 병징과 관련된 domain으로 보고된 영역에서 Paf-satRNA의 염기서열은 다른 계통의 satRNA에 비하여 많은 차이를 보였다. 각 satRNA의 cDNA로부터 전사시킨 transcript RNA를 Mf-CMV의 계놈RNA와 혼합하여 고추에 접종한 결과, 본래의 각 satRNA-CMV를 접종하였을 때와 마찬가지로 Paf-satRNA 및 Rs2-satRNA의 transcript와 혼합한 Mf-CMV에 감염된 고추의 병징이 약하게 발현되었다. 선발된 약독CMV의 강독계 바이러스에 대한 교차방어효과를 검정하기 위하여 Paf-CMV 및 Rs2-CMV를 접종한 고추와 담배에 강독 Mf-CMV를 challenge한 후 교차방어 지속효과를 검정한 결과, Paf-CMV를 접종한 고추와 담배는 모두 Mf-CMV를 challenge 접종한 3주 후까지 병징이 발현되지 않았으나, Rs2-CMV를 접종한 식물은 challenge 2주 후에 약 반수의 개체에서 강독계 병징이 발현되었다. 또한 challenge 바이러스의 농도별 교차방어효과에서도 Paf-CMV를 접종한 고추에 정제된 Mf-CMV를 0.2 mg/ml 이하의 농도로 challenge한 경우, 접종 30일이 되었을 때까지 병징이 발현되지 않았으나, Rs2-

CMV에서는 일부의 개체에서 병징이 발현되어 강독계에 대한 교차방어의 효과가 일정하게 나타나지 않았다. 한편 고추의 유묘에 약독CMV를 접종한 다음, 포장에 재배하면서 바이러스병징이 발현되는 개체를 조사한 결과, 약독CMV접종 30-60일 후에 Paf-CMV 접종구에서 1.8-6.4%, Rs2-CMV 접종구에서 8.2-18.3% 그리고 무접종구에서 2.7-47.2%의 바이러스병징이 발현됨으로서 Paf-CMV의 강독계 CMV의 감염에 대한 교차방어효과가 안정되고 높게 나타났다.

감사의 말씀

이 논문은 1999-2001년도 농촌진흥청에서 지원한 농업 특정연구비에 의해서 이루어진 연구결과의 일부입니다.

참고문헌

- Baulcombe, D. C., Saunders, G. R., Bevan, M. W., Mayo, M. A. and Harrison, B. D. 1986. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321: 446-449.
- Bernal, J. J. and Garcia-Arenal, F. 1994. Analysis of the determinants of the satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus for high accumulation in squash. *Virology* 205: 262-268.
- Cassells, A. C. and Herrick, C. C. 1977. Cross-protection between mild and severe strains of tobacco mosaic virus in doubly inoculated tomato plants. *Virology* 78: 253-260.
- 최장경, 손경옥. 1985. 약독 담배모자이크 바이러스. 1. 약독바이러스의 유기 및 특성. *한식병지* 1: 3-11.
- 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.
- Devergne, J. C. and Cardin, L. 1973. Contribution for cucumber mosaic virus. IV. Classification of the isolates. *Ann. Phytopathol.* 5: 409-430.
- Francki, R. I. B., Mossop, D. W. and Hatta, T. 1979. Cucumber mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 213.
- Gonda, T. J. and Symons, R. H. 1978. The use of hybridization analysis with cDNA to determine the RNA sequence homology between strains of plant viruses; Its application to several strains of cucumoviruses. *Virology* 88: 361-370.
- Gonsalves, D. and Garnsey, S. M. 1989. Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. *Plant Dis.* 73: 592-596.
- Hong, J. S., Park, J. C., Kim, J. E. and Choi, J. K. 1999. Comparison of nucleotide sequences and biological properties of three satellite RNAs associated with cucumber mosaic viruses. *Plant Pathol. J.* 15: 374(abstract).
- Jaegle, M., Devic, M., Longstaff, M. and Baulcombe, D. 1990. Cucumber mosaic virus satellite RNA (Y strain): analysis of sequences which affect yellow mosaic symptoms on tobacco. *J. Gen. Virol.* 71: 1905-1912.
- Kurath, G. and Palukaitis, P. 1989. Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: recombinants constructed in vitro reveal independent functional domains for chlorosis and necrosis in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 91-96.
- Kuwata, S., Masuta, C. and Takanami, Y. 1991. Reciprocal phenotype alterations between two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 72: 2385-2389.
- 이상용, 홍은주, 최장경. 1995. 오이 모자이크 바이러스 위성RNA의 cDNA가 도입된 형질전환 담배의 육성. *한식병지* 11: 80-86.
- Masuta, C. and Takanami, Y. 1989. Determination of sequence and structural requirements for pathogenicity of a cucumber mosaic virus satellite RNA (Y strain). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 332-336.
- Montasser, M. S., Tousignant, M. E. and Kaper, J. M. 1998. Viral satellite RNAs for prevention of cucumber mosaic virus (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. *Plant Dis.* 82: 1298-1303.
- 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.
- Muller, G. W. and Costa, A. S. 1987. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proc. Int. Soc. Citric.* 3: 868-872.
- Oshima, N. 1975. The control of tomato mosaic disease with attenuated virus of a tomato strain of TMV. *Rev. Plant Prot. Res.* 8: 126-135.
- Owen, J. and Palukaitis, P. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francki, R. I. B. 1992. Cucumovirus. *Adv. Virus Res.* 41: 281-348.
- Park, W. M., Ryu, K. H., Kim, S. J. and Choi, J. K. 1995. Rapid detection and identification of cucumber mosaic virus by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction analysis. *J. Plant Biol.* 38: 267-274.
- Piazzolla, P., Diaz-Ruiz, J. R. and Kaper, J. M. 1979. Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic virus isolates determined by competition hybridization. *J. Gen. Virol.* 45: 361-369.
- Roossinck, M. J., Zhang, L. and Hellward, K. H. 1999. Rearrangements in the 5' non-translated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* 73: 6752-6758.
- Takanami, Y. 1981. A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite

- RNA. *Virology* 109: 120-126.
- Wang, H. L., Yeh, S. D., Chiu, R. J. and Gonsalves, D. 1987. Effectiveness of cross protection by mild mutants of papaya ringspot virus for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. *Plant Dis.* 71: 491-497.
- Yoshida, K., Goto, T. and Iizuka, M. 1985. Attenuated isolates of cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross-protection between attenuated isolates and virulent ones. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51: 238-242.