

토끼풀에서 분리한 *Peanut stunt virus*의 성질

정구호 · 전용운 · 최장경 · 흥진성¹ · 류기현¹ · 이상용^{2*}

강원대학교 생물자원공학부, ¹서울여자대학교 환경생명과학부, ²강원대학교 산림자원보호학과

Some Properties of an Isolate of *Peanut stunt virus* Isolated from White Clover (*Trifolium repens* L.)

Goo Ho Jung, Yong Woon Jeon, Jang Kyung Choi, Jin Sung Hong¹,
Ki Hyun Ryu¹ and Sang Yong Lee^{2*}

Division of Bio-resources Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Division of Environmental and Life Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

²Department of Forest Resources Protection, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received on February 4, 2008)

An isolate of *Peanut stunt virus* (PSV), named as Tr-PSV, was isolated from white clover (*Trifolium repens* L.) showing mosaic symptom. Tr-PSV systemically infected all plants tested in the *Nicotiana* spp. and induced local lesions on inoculated leaves of *Chenopodium amaranticolor*. However, Tr-PSV induced typical mosaic symptoms as ER-PSV on *Vigna unguiculata* 5 to 6 days after inoculation, while Fny-CMV used as a control virus of *Cucumovirus* produced local lesions on inoculated leaves. In dsRNA analysis, Tr-PSV consisted of four dsRNAs, but satellite RNA was not detected. The cDNA of coat protein gene of Tr-PSV was amplified by RT-PCR using a *Cucumovirus*-specific single pair primers that designed to amplify a DNA fragment of approximately 950 bp. By restriction mapping analysis using RFLP of the RT-PCR products and by serological properties of gel diffusion test, Tr-PSV belongs to a typical member of PSV subgroup I. This is the first report on the occurrence of PSV in white clover in Korea.

Keywords : Host reaction, *Peanut stunt virus* subgroup I, RFLP, White clover

전 세계적으로 널리 분포하는 *Peanut stunt virus*(PSV)는 땅콩(*Arachis hypogaea* L.)에서 처음 보고 되었는데 (Miller와 Troutman, 1966), 비교적 기주범위가 넓어 115종의 식물에 감염되며, 이들 중 63종이 콩과식물로, 특히 콩과 작물에서 많은 피해를 주는 주요 병원 바이러스의 하나이다(Mink 등, 1969; Echandi와 Hebert, 1971; Barnett와 Gibson, 1975; Milbrath와 Tolin, 1977; Brunt 등, 1996). PSV는 *Bromoviridae*의 *Cucumovirus*에 속하며, 계놈은 분자의 크기에 따라 RNA1, RNA2 및 RNA3으로 지칭되는 3종의 (+)외가닥 RNA(ssRNA)로 구성되어 있다 (Fauquet와 Mayo, 2001). 또한 RNA3의 3' 영역에 해당하는 서브계놈 RNA(RNA4)가 포함되어 있다(Kaper와

Waterworth, 1981). 지금까지 많은 PSV의 계통들이 보고 되었는데, 주로 기주반응의 특성과 혈청학적 성질에 의해서 구분되었다(Xu 등, 1986). 한편 이들 PSV의 계통들은 RNA3의 염기서열에 따라 ER-PSV를 대표로 하는 서브그룹 I과 W-PSV를 포함하는 서브그룹 II(Hu 등, 1997)로 나뉘며, 최근에는 Mi-PSV(Yan 등, 2005)나 Rp-PSV(Bang 등, 2006)와 같은 새로운 계통이 발견됨으로서 서브그룹 III의 설정이 제기되고 있다.

토끼풀(*Trifolium repens* L.)은 오래전부터 자연 감염된 PSV의 월동기주로서 보고 되었으나(Mink 등, 1969), 이 계통의 구체적인 성상에 대한 연구가 없으며, 또한 국내에서는 아직까지 토끼풀로부터 PSV의 보고가 없는 상황이다. 2007년 여름, 강원도 춘천시 소재 농업과학기술원의 포장 주변에서 선명한 모자이크 병징의 토끼풀을 채집하여 바이러스를 분리한 결과, PSV로 동정되어 이 바이러스의 몇몇 성질을 여기에 보고한다.

*Corresponding author

Phone) +82-33-250-8362, Fax) +82-33-257-8361

E-mail) sangyong@kangwon.ac.kr

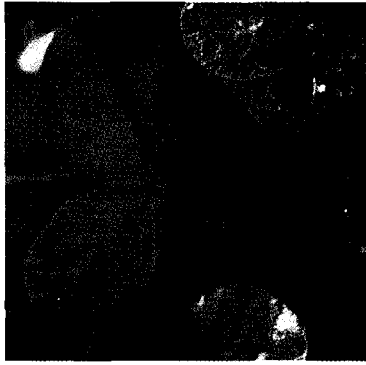


Fig. 1. Mosaic symptom in naturally infected on white clover (*Trifolium repens* L.).

바이러스의 분리. 모자이크 증상의 토끼풀 이병주(Fig. 1)를 채집하여 total RNA를 추출하고, *Cucumovirus* 특이적 프라이머(Choi 등, 1999)를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, 예상된 약 950 bp 크기의 cDNA가 검출되었다. 따라서 클로버의 모자이크 증상을 일으킨 병원을 *Cucumovirus*의 한 종으로 예측하고, 바이러스의 분리 동정실험을 실시하였다. 즉 채취한 토끼풀의 이병엽을 0.01M 인산완충액(pH 7.0)으로 마쇄한 후, 5-6엽기의 *Nicotiana benthamiana*에 접종하여 증식시켰다. 접종 10일 후 전신 감염된 *N. benthamiana*의 이병엽 즙액을 *Chenopodium amaranticolor*의 전개엽에 접종한 결과 접종 3일 후에 선명한 퇴록병반이 형성되었다. 이들 병반으로부터 단일병반을 분리하여 *N. benthamiana*에 접종하는 방법을 2회 실시한 다음, 전신 감염된 *N. benthamiana*를 공시 바이러스 원으로 사용하였다. 한편 *N. benthamiana*에 증식시킨 ER-PSV와 Fny-CMV(*Cucumber mosaic virus*)를 이 실험의 대조바이러스로 이용하였다. *Cucumovirus* 중 *Tomato aspermy virus* (TAV)는 콩과식물에서 보고된 예가 없기 때문에 대조 바이러스로 공시하지 않았다.

기주범위 및 병징 특성. 토끼풀에서 분리한 바이러스의 동정을 위하여, *Cucumovirus*의 기주반응 실험에 자주 사용되는 지표식물 중, *N. benthamiana*, *N. tabacum* cv. Xanthi nc, *N. glutinosa*, *C. amaranticolor*, *Vigna unguiculata* cv. Kurotanesanzaku를 공시하여 기주범위와 병징 특성을 조사하였다. 접종은 0.01M 인산완충액과 카보린덱을 이용한 즙액접종법으로 실시하였다. 바이러스를 접종한 지표식물은 25-30°C의 온실에 3주 이상 관리하면서 접종엽 및 상엽에 발현되는 병징을 관찰하였다. 이때 무병징으로 감염된 경우를 검정하기 위하여 병징이 발현되지 않은 식물에 대해서는 RT-PCR검정을 통하여 감염유무를 판정하였다.

토끼풀에서 분리한 *Cucumovirus*의 기주반응 특성을 Table

Table 1. Reaction on indicator plants by mechanical inoculation of Tr-PSV

Indicator plants	Symptoms ^a		
	Tr-PSV	ER-PSV	Fny-CMV
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. glutinosa</i>	-/M	-/M	-/M
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	-/M	-/M	-/M
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CS/-	CS/-	L/-
<i>Vigna unguiculata</i>	-/M	-/M	L/-

^aInoculated leaves/upper leaves; M, mosaic; CS, chlorotic spot; L, necrotic local lesion; -, symptomless or not infected.

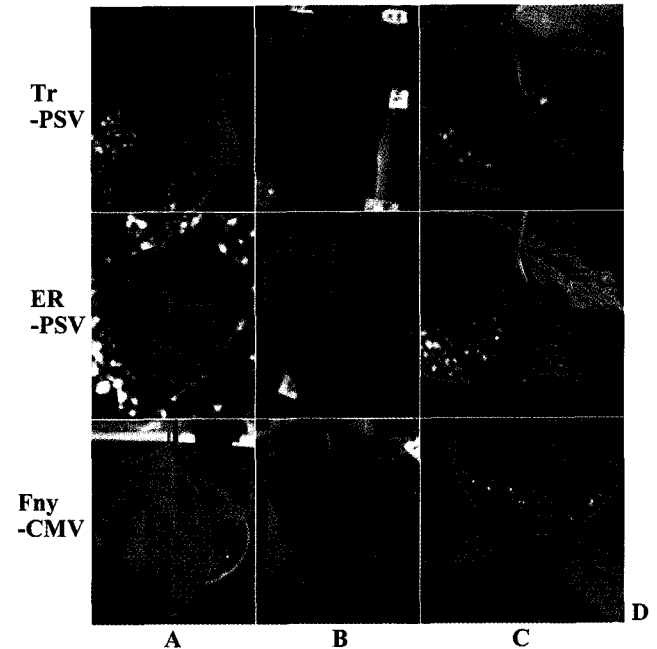


Fig. 2. Symptoms on indicator plants by mechanical inoculation of Tr-PSV isolated from white clover. ER-PSV and Fny-CMV were inoculated as control viruses. Photographs are presented symptoms on inoculated leaves of *Chenopodium amaranticolor* (A) and *Vigna unguiculata* (B), and on non-inoculated leaves of *V. unguiculata* (C), respectively.

1에 정리하였다. 이 결과로부터 토끼풀에서 분리한 바이러스의 기주반응은, 대조로 이용한 Fny-CMV 보다는 ER-PSV에 의해서 발현된 병징과 매우 유사하게 나타났다. 특징적인 것은 동부에서 접종엽에 전형적인 괴사반점을 형성하는 CMV와 다르게, 접종엽에서는 퇴록반점이 나타나면서 상엽에 모자이크 증상을 발현하는 특성을 보였다(Fig. 2). 또한 *C. amaranticolor*의 접종엽에 형성된 병반도 퇴록반점으로 발현되어 괴사반점을 형성하는 CMV와 확실하게 구별되었다. 그러나 *Nicotiana*속의 식물에서는 모자이크 증상이 전반적으로 약하게 발현되는 성질을 나타냈으나, 대조로 이용한 ER-PSV나 Fny-CMV의 감염과

마찬가지로 전신 감염되었다. 따라서 이와 같은 기주반응의 결과를 검토해 보았을 때, 토끼풀에서 분리한 바이러스는 PSV의 한 계통인 것으로 판단되었다. 특히 PSV는 동부(*V. unguiculata*)에 전신감염 되는데 반해서 CMV는 점종엽에 국부병반을, 그리고 TAV는 감염되지 않기 때문에 *Cucumovirus*속의 3종 바이러스를 구별할 수 있는 기주로 활용할 수 있다는 보고(Kaper와 Waterworth, 1981)와도 일치하였다. 이상의 결과로부터 토끼풀에서 분리한 바이러스를 Tr-PSV로 명명하고 이하의 실험을 실시하였다.

DsRNA 분석. Tr-PSV에 감염된 *N. benthamiana* 잎으로부터 dsRNA를 추출하여 전기영동으로 패턴을 비교 분석하였다. DsRNA의 추출은 Morris와 Dodds(1979)의 방법을 이용하였으며, 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 UV illuminator로 밴드를 관찰하였다. 그 결과 Tr-PSV에 감염된 *N. glutinosa*로부터 추출한 4종의 dsRNA가 확인되었으며, 분자의 크기 및 종수에 있어서 대조로 이용한 ER-PSV나 Fny-CMV와 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3). 일반적으로 분절 계층을 갖는 RNA 바이러스의 경우, dsRNA검출법은 바이러스의 특성을 파악하는데 매우 효과적이다(Dodds, 1993). 아울러 CMV나 PSV의 일부 계통에서 발견되는 satellite RNA와 같이 카피수가 많은 저분자의 RNA를 검출하는데 있어서도 효과적으로 이용되고 있으나, Tr-PSV로부터 satellite RNA는 검출되지 않았다.

혈청학적 성질. ER-PSV의 항혈청을 이용하여 Ouchterlony 방법으로 Tr-PSV의 혈청학적 성질을 조사하였다. 한천젤은 1%의 agarose를 0.15M NaCl을 포함하는 0.01M 인산완

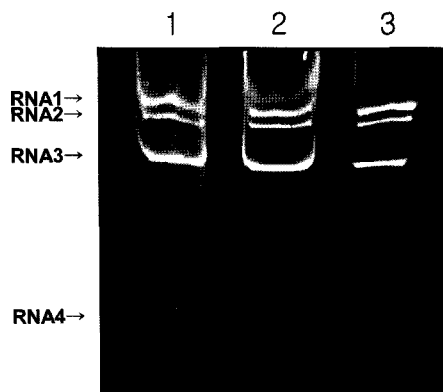


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA isolated from *Nicotiana benthamiana* infected with Tr-PSV (lane 1), ER-PSV (lane 2) and Fny-CMV (lane 3), respectively. Aliquot of dsRNA purified by CF-11 cellulose column was electrophoresed in 6% polyacrylamide gel.

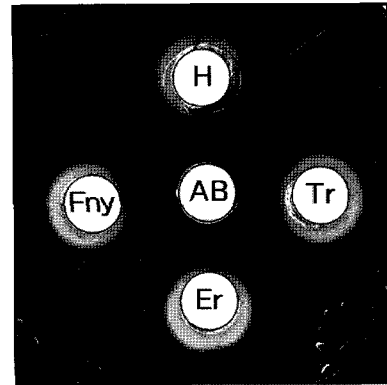


Fig. 4. Ouchterlony double-diffusion test of crude sap of *Nicotiana benthamiana* infected with Tr-PSV (Tr), ER-PSV (ER) and Fny-CMV (Fny) against to antiserum of ER-PSV. H: crude sap from healthy leaves of *N. benthamiana*.

충액(PBS)에 녹여 제조하였으며, Tr-PSV, ER-PSV 및 Fny-CMV에 감염된 *N. benthamiana*의 잎을 PBS에서 마쇄한 즙액을 마이크로튜브에 넣고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상청액을 항원으로 사용하였다. 침강반응은 실온에서 14시간 정치 후 나타난 침강대를 관찰하였다. 그 결과 Tr-PSV의 항원은 ER-PSV 항혈청에 대해서 한 종의 침강대를 형성하였으며, 대조로 이용한 ER-PSV의 항원에 의해서 형성된 침강선과 융합하였다(Fig. 4). 그러나 대조로 이용한 Fny-CMV의 항원은 PSV항체에 대해서 침강선을 형성하지 않았다. PSV의 계통들은 혈청학적으로 serotype I, II, III 및 IV로 구분되고 있다(Xu 등, 1986). 이들 혈청형 간 반응의 특징은 Ouchterlony test에서 각각의 항체에 대해서 서로 분지선을 갖는 침강대가 형성된다. 따라서 이 실험에서 분리한 Tr-PSV의 혈청형은 대조로 공시한 ER-PSV(serotype I)와 융합하는 침강대를 형성한 것으로 보아 serotype I에 속하는 PSV의 계통이라는 것을 시사하였다.

RT-PCR 및 제한효소지도. Tr-PSV에 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 *Cucumovirus* 특이적 프라이머(CPTALL-5: 5' T/CAG/CT/CTTTG/TAA/GGGTTC AATTCC3', CPTALL-3: 3'GCCGATTTTACCA GTCAG5')를 이용하여 실시하였다(Choi 등, 1999). PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 1×TBE 완충액으로 전기영동하여 검출하였다. 한편 Tr-PSV의 서브그룹을 동정하기 위하여, 이들 PCR산물을 제한효소 *EcoRI*, *MspI*, *SalI* 및 *XhoI*으로 처리한 후, agarose gel에서 전기영동하여 제한효소 절단 패턴을 분석하였다(Singh 등, 1995; Choi 등, 1999). 이때 Tr-PSV RNA3의 3' 영역에 대한 염기서열의

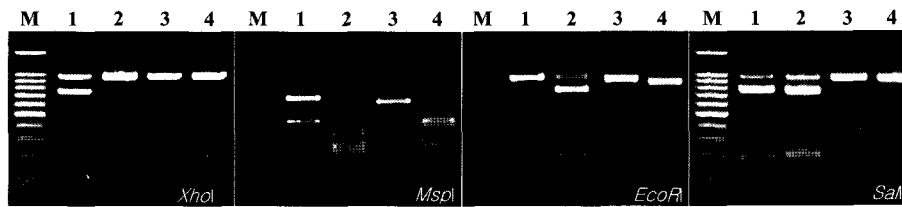


Fig. 5. RFLP analysis of the product for the half region of RNA3 covering full-length coat protein gene of Fny-CMV (lane 1), LS-CMV (lane 2), ER-PSV (lane 3) and Tr-PSV (lane 4), respectively. Electrophoresis was carried out on 1.2% agarose gel and the gel was stained with ethidium bromide. M: 100 bp DNA ladder as a size marker.

특성을 비교하기 위하여, 앞에서 공시한 ER-PSV와 Fny-CMV의 RT-PCR산물 이외에 CMV의 서브그룹 II에 속하는 LS-CMV의 cDNA에 대한 RFLP패턴도 함께 비교하였다. 그 결과 Tr-PSV로부터 대조바이러스로 이용한 PSV나 CMV계통들과 유사한 분자 크기의 cDNA가 증폭되었다(데이터는 제시하지 않음). 한편 Tr-PSV의 cDNA를 이용하여 4종의 제한효소처리에 따른 RFLP패턴을 조사한 결과, 모두 ER-PSV의 절단패턴과 같게 나타났으며, 대조로 이용한 CMV의 계통들과는 차이를 보였다(Fig. 5). 이와 같은 Tr-PSV의 RFLP패턴으로부터 Tr-PSV는 서브그룹 I에 속하는 PSV의 계통으로 판단되었다. 이와 같은 결과는 RNA3의 3' 영역에 대한 이들 제한효소의 처리가 *Cucumovirus*에 속하는 CMV, PSV 및 TAV를 구분하는데 유용하게 활용될 수 있다는 보고(Choi 등, 1999)와 일치하였다.

토끼풀에서 분리한 PSV에 대한 고찰. 토끼풀로부터 PSV가 분리 보고된 것은 오래 전의 일로 자연 감염된 토끼풀이 PSV의 월동기주로서 중요한 역할을 할 것이라는 것을 기술하고 있다(Mink 등, 1969). 그러나 이 바이러스의 계통에 대한 구체적인 특성은 보고되지 않았다. 한편 국내에서는 황색모자이크 병징의 토끼풀로부터 *Bean yellow mosaic virus*(BYMV)가 분리 동정되었을 뿐(류 등, 1986), 아직까지 PSV의 자연 감염에 관한 연구는 없는 상황이다. 따라서 이 논문은 토끼풀에서 분리한 PSV에 관한 국내의 첫 보고이며, 금후 PSV의 자연 감염기주로서 토끼풀의 역할 등에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

전형적인 모자이크 증상을 나타낸 토끼풀로부터 *Peanut stunt virus*(PSV)를 분리하여 Tr-PSV로 명명하였다. 이 연구에서는 Tr-PSV의 특성을 기주반응, 혈청학적 성질, dsRNA 분석, RT-PCR 및 RFLP 분석 등을 통하여 지금까지 잘 알려진 ER-PSV, Fny-CMV 및 LS-CMV와 비교하였다. Tr-PSV는 접종한 *Nicotiana*속 식물에서는 모두 전신감염되

었으며, *C. amaranticolor*에서는 접종엽에 국부병반을 형성하였다. 그러나 동부에서는 대조로 이용한 ER-PSV와 마찬가지로 전신감염되어, 접종엽에 국부병반을 형성하는 대조의 CMV계통과는 구분되었다. Tr-PSV에 감염된 *N. benthamiana* 잎으로부터 추출한 dsRNA는 대조의 PSV나 CMV와 유사한 분자 크기의 4종의 dsRNA가 확인되었고, satellite RNA의 존재는 인정되지 않았다. *Cucumovirus* 특이적 프라이머를 이용하여 증폭시킨 PCR산물은 약 950 bp의 cDNA가 얻어졌고, 이를 이용하여 조사한 RFLP패턴은 ER-PSV와 같았다. 이와 같은 RFLP 분석과 Er-PSV의 항혈청을 이용한 혈청학적 성질의 결과로부터 Tr-PSV는 ER-PSV와 같은 서브그룹 I에 속하는 PSV의 한 계통으로 판단되었다. 국내에서 토끼풀로부터 PSV가 분리 동정된 것은 이 논문이 처음이다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원으로 수행된 결과의 일부입니다.

참고문헌

- Bang, J. H., Choi, J. K. and Lee, S. Y. 2006. Characterization of *Peanut stunt virus* isolated from black locust tree (*Robinia pseudo-acacia* L.). *Plant Pathol. J.* 2: 125-130.
- Barnett, O. W. and Gibson, P. B. 1975. Identification and prevalence of white clover viruses and the resistance of *Trifolium* species to these viruses. *Crop Sci.* 15: 32-37.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. and Zurcher, E. J. 1996. Plant Virus Online: *Descriptions and Lists from VIDE Database* (Version 20th). Aug. 1966.
- 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.*

- Viol. 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.
- Echandi, E. and Hebert, T. T. 1971. Stunt of beans incited by peanut stunt virus. *Phytopathology* 61: 328-330.
- Fauquet, C. M. and Mayo, M. A. 2001. The *Bromoviridae*. In: *Virus taxonomy* (7th Report of ICTV). *Arch. Virol.* 146: 189-194.
- Hu, C. C., Aboul-Ata, A. E., Naidu, R. A. and Ghabrial, S. A. 1997. Evidence for the occurrence of two distinct subgroups of peanut stunt cucumovirus strains: Molecular characterization of RNA3. *J. Gen. Virol.* 78: 929-939.
- Kaper, J. M. and Waterworth, H. E. 1981. *Cucumoviruses*, In: *Handbook of Plant Virus Infections-Comparative Diagnosis* (Kurstak, E. Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 257-332.
- Milbrath, G. M. and Tolin, S. A. 1977. Identification, host range and serology of peanut stunt virus isolated from soybean. *Plant Dis. Rep.* 61: 637-640.
- Miller, L. I. and Troutman, J. L. 1966. Stunt disease of peanuts in Virginia. *Plant Dis.* 50: 139-143.
- Mink, G. I., Silbernagel, M. J. and Saksena, K. N. 1969. Host range, purification and properties of the western strain of peanut stunt virus. *Phytopathology* 59: 1625-1631.
- 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.
- 류갑희, 이순형, 라용준. 1986. 흰 토끼풀에서 분리한 강낭콩황반모자이크 바이러스의 동정. *한국식물병리학회지* 2: 48-52.
- 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.
- Xu, Z., Garnet, O. W. and Gibson, P. B. 1986. Characterization of peanut stunt virus strains by host reactions, serology, and RNA patterns. *Phytopathology* 76: 390-395.
- Yan, L., Zu, Z. Y., Goldbach, R., Kunrong, C. and Prins, M. 2005. Nucleotide sequence analyses of genomic RNAs of peanut stunt virus Mi, the type strain representative of a novel PSV subgroup from China. *Arch. Virol.* 150: 1203-1211.