

## Molecular and biological characterization of 2.8 kb dsRNA in *Chalara elegans (Thielaviopsis basicolar)*

박 윤 정

부경대학교

다양한 식물에 검은뿌리썩음병 (black root rot)을 일으키는 곰팡이, *Chalara elegans (Thielaviopsis basicolar)* 안에 존재하는 2.8 kb double-stranded (ds) RNA에 관한 분자생물학적 연구를 수행하였다. *C. elegans* BK18 strain 은 California 의 목화밭에서 최초로 분리되었으며, dsRNA의 full-length cDNA sequence의 총 길이는 2,896 nucleotides로 확인되어졌다. 염기서열 분석결과 mitochondrial genetic code를 사용해서 하나의 큰 open reading frame (ORF I)을 발견할 수 있었고, 이 ORF I의 아미노산 서열은 이미 알려진 다른 곰팡이의 mitochondrial RNA virus의 아미노산의 서열과 20-34%의 identity를 보였다. ORF I은 705개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 암호화 하고 있으며, 다른 RNA의 바이러스들에서 나타내어지는 RNA-dependent RNA polymerases (RdRps)의 conserved motif가 존재한다. 곰팡이 숙주인 BK18의 mitochondria와 함께 이 dsRNA가 분리되어짐으로써, 바이러스가 mitochondria와 함께 존재함을 알 수 있었으며, strand-specific probe를 이용한 Northern blot을 통해서, 이 dsRNA는 (+) single-stranded 특징을 가지는 것을 알 수 있었다. 이 2.8 kb dsRNA를 *Chalara elegans mitovirus (CeMV)*라 명명 지었으며, Narnaviridae family 안의 Mitovirus genus의 새로운 바이러스로 분류하였다.

*C. elegans* 안에 존재하는 2.8 kb dsRNA의 sequence의 diversity를 조사하기 위하여, 네덜란드에서 당근으로부터 처음 분리되어진 또 다른 strain 인 HA2의 2.8 kb dsRNA cDNA clone을 *CeMV*의 dsRNA specific primer를 이용하여 제작하였다. 두개의 dsRNA의 ORF의 염기서열 분석결과 98%의 homology를 나타내었다. ORF I 안의 conserved motif의 300 bp 부분을 RT-PCR를 통해 증폭 시킬 수 있는 dsRNA-specific primer를 이용하여 다른 5개의 *C. elegans* strain의 2.8 kb dsRNA의 염기 서열 조사 결과 모두 97-100%의 identity를 보였다. *CeMV*와 곰팡이 숙주에와의 생물학적인 관계를 알아보기 위하여 dsRNA 제거를 위한 여러 가지 방법이 시도되었으며, 높은 incubation temperature (36-37C)에서 연속적인 균사의 transfer를 통해서 2.8 kb dsRNA가 제거됨을 gel analysis 와 Northern blot hybridization에 의하여 확인하였다. 그러나 dsRNA-specific primer를 이용한 RT-PCR에서 300 bp 길이의 amplicon이 보여짐으로써, 높은 온도의 incubation을 통해서, dsRNA가 완전히 제거되어지기 보다는 replication이 잠재적으로 억제 (latent infection) 되어지는 것을 알 수 있었다. 2.8 kb latent infection 된 culture와 wild-type의 culture를 배지에서의 culture 형태, growth rate, melanin production, enzyme assays (laccase, polyphenoloxidase, tyrosinase and esterase), virulence on carrot roots 를 이용하여 비교하였다. V8 agar에서의 colony의 형태는 비슷하

였으며, growth rate, melanin production 과 virulence 는 latently-infected strain이 더 증가했음을 보였다. 다양한 enzymatic assay에서도 큰 차이점을 나타내지 않았다. Transmission electron microscopy를 이용하여 이 두 strains의 균사 안의 mitochondria를 비교한 결과, latently-infected strain에서 mitochondria의 수와 크기가 증가했음을 알 수 있었다.