

한국산 장마(*Dioscorea opposita* cv. Jang-Ma)에서 분리한 *Chinese yam necrotic mosaic virus*

강동균* · 곤도 토루¹ · 신종희 · 신혜영² · 성정현² · 강상구³ · 장무웅²

경상북도농업기술원 생물자원연구소, ¹아오모리 그린바이오센터,

²영남대학교 이과대학 생물학과, ³영남대학교 생명공학연구소

Chinese yam necrotic mosaic virus Isolated from Chinese Yam in Korea

Dong Kyoon Kang*, Toru Kondo¹, Jong Hee Shin, Hye Young Shin², Jung Hyun Sung²,
Sang Gu Kang³ and Moo Ung Chang²

Experiment Station of Bioresources, Gyeongbuk Provincial ATA, Andong 760-891, Korea

¹Aomori Green Biocenter, 211-10, Yamaguchi, Nogi, Aomori 030-0142, Japan

²Dept. Biology, Yeungnam University, 214-1 Dae Dong, Kyungsan 702-320, Korea

³Institute of Biotechnology, Yeungnam University, 214-1 Dae Dong, Kyungsan 702-320, Korea

(Received on August 30, 2003)

Chinese yam (*Dioscorea opposita* cv. Jang-Ma) plants showing necrotic mosaic symptom were collected from their growing fields in Andong, Euisong, Gunwi and Daegu, Korea. Direct negative staining method by electron microscope showed filamentous particles of about 660 nm in length. Immunosorbent electron microscopy (ISEM) revealed filamentous particles of 660 nm decorated with antiserum of *Chinese yam necrotic mosaic virus* (ChYNMV). The viruses purified partially were used to isolate viral RNA as template for RT-PCR to amplify about 1.2 kbp of 3'-terminal region (coat protein, 3'-UTR) with ChYNMV specific and oligo-dT primers. Amino acids sequences of amplified CP genes revealed that the viruses shared 97.9% similarity with ChYNMV (AB044386) which was known as the member of *Macluravirus*. So the viruses from Chinese yam (*D. opposita* cv. Jang-Ma) plants were identified as ChYNMV. Comparing the CP amino acid sequences of ChYNMV strains with other *macluraviruses* such as *Cardamon mosaic virus* (CdMV), *Narcissus latent virus* (NLV) and *Maclura mosaic virus* (MacMV) revealed that N-terminal was the most variable region and conserved regions were present within the genus *Macluravirus*.

Keywords : *Chinese yam necrotic mosaic virus*, coat protein gene, *Dioscorea opposita*, *Macluravirus*

마(Chinese yam, *Dioscorea opposita*)는 식물학적으로 백합목 마과 마속에 속하는 덩굴성·다년생·단자엽 초본 식물로 전 세계적으로 600종이 분포하고, 이 중에 약 50여 종이 이용되고 있다.

우리나라에 분포되어 있는 마는 열대지방의 마에 비해 저온에 잘 견디는 자생된 것들로 괴경의 모양에 따라 장마, 단마, 참마, 둥근마로 나뉘며 예로부터 한방에서는 마와 참마를 산약이라 부르고 신체허약, 정력부족, 야뇨증,

당뇨병, 폐결핵 설사, 대하증, 빈뇨증에 효력이 인정되어 한약재로 널리 애용되어 왔다.

그러나 국내에서 재배되고 있는 장마는 영양번식을 하는 작물로서 마 바이러스에 감염되면 계속 유전되는 특성이 있어 약 30-40%의 감수를 초래한다. 현재 재배중인 장마의 80%, 단마의 60%, 둥근마 100%가 바이러스에 감염되어 있으나(미발표), 이들의 영양체인 괴경이나 영영자를 매년 번식수단으로 사용하고 있어 바이러스 감염율이 계속 증가하는 추세이다.

장마(*Dioscorea opposita* cv. Jang-Ma)에 발생하는 바이러스는 *Broad bean wilt virus*(BBWV)와 *Chinese yam necrotic mosaic virus*(ChYNMV)가 알려져 있다.

*Corresponding author

Phone)+82-54-859-5123, Fax)+82-54-859-7212

E-mail)kyoon2848@hanmail.net

잎과 줄기에 기형을 유발시키는 BBWV는 石川 등(1985)이 처음으로 마에서 분리하였다고 보고하였으며 Kondo 등(2002)이 장마에서 분리한 BBWV의 외피단백질 아미노산서열을 분석한 결과, BBWV2의 Long coat protein (LCP)과는 91.0~97.3%, Short coat protein(SCP)과는 84.8~93.4%의 상동성을 보였다고 보고하였다.

장마잎에 모자이크 증상과 함께 괴저반점을 유발하나 기형을 일으키지 않는 바이러스를 Fukumoto 등(1978)이 확인하고 ChYNMV로 명명하였으며, 입자는 660 nm의 사상형으로 진딧물에 의해 비영속적으로 전파되는 특징에 기인하여 *Carlavirus*로 분류하였다.

ChYNMV는 마속에 속하는 식물 중에 장마에서만 감염성이 확인되고 있어, 아직까지 적절한 증식 체계가 확립되지 않아서 순수분리가 매우 어려운 바이러스로 알려져 있다. ChYNMV에 감염된 장마 잎의 조직 내에서의 바이러스 입자 확인이 어려울 뿐만 아니라, 정제가 어려워 분자생물학적인 연구가 거의 이루어지지 않고 있다. Kodo(2001)가 장마의 신선한 잎을 열 및 *Driselase* 등을 처리하여 ChYNMV를 분리, 정제하였고, 이 바이러스 시료로부터 외피단백질 유전자의 아미노산 서열을 분석하여 ChYNMV가 *Maluravirus*에 소속시켜야 한다고 제안하였다.

국내에서 재배되고 있는 대부분의 장마가 잎에 모자이크와 괴저반점 증상을 보이고 있어 ChYNMV에 광범위하게 감염되어 있는 것으로 판단되어 면역전자현미경법(ISEM), 바이러스 부분정제, 외피단백질 및 3'-UTR 분석을 수행하여 바이러스를 정확하게 동정하고자 이 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시식물. 2001~2002년도에 걸쳐 경상북도 안동시를 중심으로 의성, 군위, 대구의 장마(*D. opposita* cv. Jangma) 재배지역에서 모자이크 등의 바이러스 증상을 나타내는 장마를 채집하여 병원 바이러스를 조사하였다. 바이러스 감염이 확인된 식물체로부터 괴경을 최아시켜 본포에 4월 초순 정식하여 네트망 지주로 줄기를 유인하였으며 재배포장에서 모자이크와 괴저반점을 보이는 장마 잎을 채집하여 순화재료로 이용하였다(Fig. 1). 이들 바이러스 증상의 잎 조직을 시료로 하여 direct negative staining method(DN법) 및 면역전자현미경법에 의해 투과전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰하였다.

면역전자현미경법(ISEM). Immunosorbent electron microscopy(ISEM)법은 Miline & Luisoni(1977)의 decoration

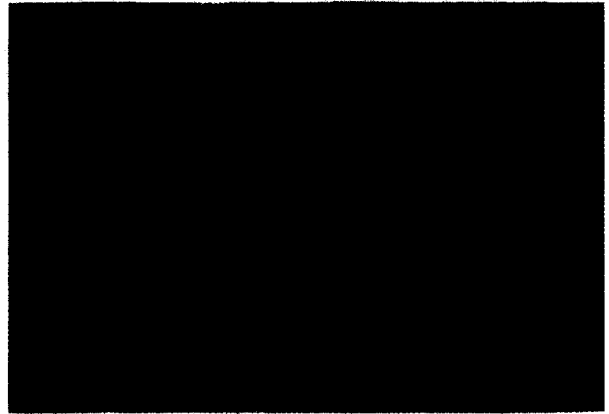


Fig. 1. Symptom of *Diosorea opposita* cv. Jang-Ma infected ChYNMV.

method로 반응시킨 후, phosphotungstic acid(PTA)로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. ChYNMV 항혈청은 Kondo(일본 Green Biocenter)로부터 분양 받았으며 1/500배로 희석하여 사용하였다.

바이러스 부분정제. 부분정제는 Kondo(2001)의 ChYNMV 정제법을 이용하였으며 아래와 같이 수행하였다. ChYNMV에 감염된 잎에 8배 분량의 0.2 M citrate buffer(10 mM sodium diethyldithio-carbomate, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid, 0.4% ascorbic acid, 0.5% sodium thioglycolate, 2% polyvinylpyrrolidone, pH 5.8)를 넣고 마쇄한 다음, 50°C에서 8분간 열처리한 것을 두 겹의 거름으로 거른다. 걸러진 조즙액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 상층액량의 1/100 부피의 1 M CaCl₂와 1/20 부피의 0.2 M Na₂HPO₄를 넣고, 20분간 교반한 다음, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후에 5% Triton-X 100을 교반하면서 첨가하였다. 위 용액을 35,000 rpm에서 90분간 초원심분리하여 침전시킨 바이러스 입자를 증류수에 녹여 바이러스 시료로 준비하였다.

Viral RNA 정제. 부분 정제한 바이러스 시료의 현탁 용액에 1/100 부피의 10% SDS와 동량의 TE-Phenol을 잘 혼합한 다음, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 상층액과 동량의 TE-Phenol : Chloroform-isocamylalcohol(1:1)을 혼합하여 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하는 과정을 3회 반복 수행하였다. 상층액에 1/10 부피의 3 M Sodium acetate와 2.5 부피의 에탄올을 첨가하여 -80°C에서 30분간 방치한 후에 4°C에서 15,000 rpm, 20분의 조건으로 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 추출된 RNA를 70% 에탄올로 세척하고 에탄올을 제거한 후 증류수에 녹여 사용하였다.

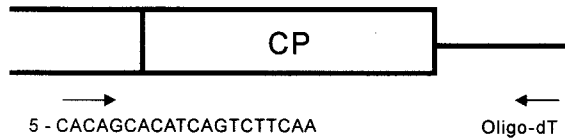


Fig. 2. Primer set to amplify 3'-terminal region of ChYNMV.

CP 유전자 증폭, 클로닝 및 염기서열 분석. ChYNMV RNA를 주형으로 ChYNMV specific primer와 oligo-dT primer를 제작하여 3'말단을 증폭을 위하여 사용하였다 (Fig. 2; Kondo, 2000). One step RT-PCR kit(Takara)을 사용하여 제작사의 지시에 따라 반응액을 혼합한 후에 50°C에서 30분간 역전사 반응 후, 94°C에서 2분간 열처리 후, 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분의 조건으로 35회 반복 수행 후에 72°C에서 5분간 반응시켰다. 약 1.2 kb의 증폭산물을 GFX PCR DNA and Gel Band Purificatin kit(Amersham Pharmacia)으로 정제하였다. 클로닝은 pGEM-T easy vector kit(Promega)을 이용하여 2× ligation buffer 2.5 μl, T4 ligase 0.5 μl, pGEM-T easy vector 0.5 μl, 정제한 RT-PCR 산물 1.5 μl을 혼합 후에 실온에서 1시간 ligation시켰다. 형질전환법으로 통상의 heat shock법으로 JM109 competent cells에 ligation 반응액을 넣어 42°C에서 1분간 처리한 다음, SOC 배지에서 1시간 배양시킨 후에 LB(Ampecillin, X-gal, IPTG 포함) 고체배지에 도말하여 37°C에서 overnight시켜, 흰색 콜로니만 선별하여 LB(Ampecillin 포함) 액체배지에 접종하여 37°C에서 진탕하면서 full growth시켰다. 플라스미드 정제는 GFX Micro Plasmid Prep kit(Amersham Pharmacia)를 이용하였으며 제한효소 EcoRI으로 절단하여 Insert를 확인하였다. 확인된 플라스미드는 ABI Prism™ BigDye Terminator Cyclic Sequencing Reaction kit와 ABI Prism 377 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)를 이용하여 cycling sequencing 하였다. 염기서열 반응액 및 기기분석 조건은 제작사의 지시에 따라 수행하였다.

결과 및 고찰

조사 지역의 장마에서 바이러스병 발생과 병징. 한국에서 재배중인 장마의 80%, 단마의 60%, 둥근마 100%가 바이러스에 감염되어 있음이 알려져 있다(미발표). 이번 조사지역에서 장마의 80% 이상이 모자이크 또는 괴저성 반점을 나타내었고, 봄에는 연한 황색 모자이크 증상을 나타내었고, 잎이 성숙되면서 짙은 황색 모자이크 또는 둥근 무늬로 되고, 시간이 경과되면서 괴저성 반점 또는 망상으로 되었다(Fig. 1). 일반적으로 잎은 요철이나

기형으로는 되지 않고, 길모양은 정상적인 잎과 별 차이가 없었다. 그러나 온도가 상승되면서 대부분의 모자이크 증상은 엷게 되거나, 은폐되어 무병징으로 되는 경우가 많았다. 이들의 잎을 DN법에 의한 전자현미경으로 관찰한 결과, 바이러스 입자의 검출율이 90% 이상이었다. 영양번식 식물인 마는 지상부의 영여자나 지하부의 괴경으로 증식함으로 바이러스에 감염된 개체는 계속하여 후대에 바이러스를 유전시키는 결과를 초래하여, 기호성이 높은 유명 품종의 경우는 장기간 계속적으로 재배되고 있는 실정이므로 거의 전부가 바이러스에 감염되어 있는 것으로 알려져 있다(Tochihara, 1993). 또한 유명 품종이라도 ChYNMV에 감염될 경우에 수량이 30~45% 감소되고 품질도 저하되는 것으로 알려져 있다. 이번 조사 지역에서 재배되고 있는 장마의 90% 이상이 ChYNMV에 감염되어 있음이 확인되었고, 유묘기의 병징이 심하여 생장이 불량하였고, 이들 식물체로부터 수확된 괴경은 비정상적인 크기가 대부분이었다. 즉 일본의 장마에 대한 Tochihara (1993)의 보고와 매우 유사하였다. 이와 같은 유사 결과는 한국에서 재배되고 있는 대부분의 장마 품종이 일본에서 수입되고 있기 때문이라고 판단된다.

Chenopodium amaranticolor 등 수종의 지표식물에 카보란덤을 이용한 일상적인 즙액접종법을 이용하여 기계적인 감염을 시도하였으나, 즙액접종에 의한 전염성이 확인되지 않았다. 즉 Fukumoto 등(1978)의 연구결과와 잘 일치하고 있다.

ChYNMV에 대한 연구는 1978에 Fukumoto 등이 처음으로 보고한 이래로 활발한 연구가 이루어지지 않고 있는데, 이유는 장마 잎에 존재하는 점액성물질(glycoproteins) 등으로 인하여 즙액접종이 불가능하여 장마 이외의 식물에서 ChYNMV의 증식체계가 확립되지 못하였고, 또한 순수 정제가 어려워 충분한 양과 질의 항원(virion antigen)을 얻기가 매우 곤란하기 때문으로 사료된다.

ChYNMV 입자 확인. 모자이크와 괴저성 반점을 보이는 장마(*D. opposita* cv. Jangm-MA)의 잎을 소량 잘라 DN법으로 PTA에 염색하여 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 길이 660 nm의 사상형 입자가 확인되었으나, 봉입체는 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 앞에서 병징의 변화과정을 언급하였는데, 병징과 바이러스 입자의 검출과는 매우 관련성이 크다는 사실이 이번 실험에서 확인되었다. 즉 연한 황색의 모자이크 증상의 부드러운 잎에서는 DN법으로 바이러스 입자를 쉽게 검출이 가능하였으나, 온도가 상승하고, 짙은 모자이크 증상의 굳어진 잎에서는 바이러스 입자의 검출이 매우 어려웠다. 이유는 위에서 언급한 점액성물질이 완전히 성숙된 잎에서는 매우 많아져서, 시

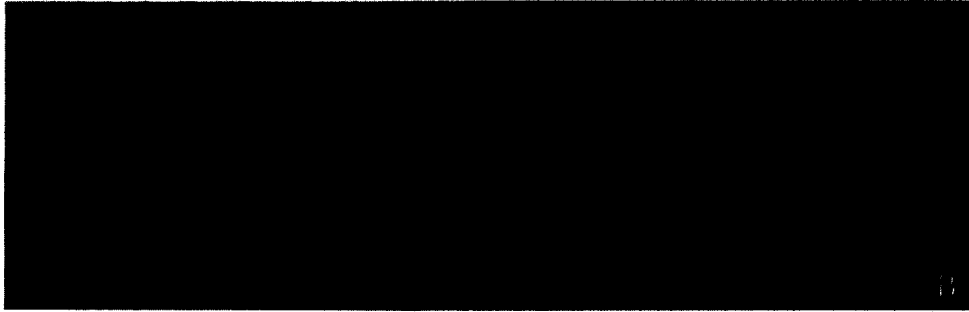


Fig. 3. A :Virus particle decorated with ChYNMV antiserum by immunosorbent electron microscopy, B : Virus particles purified partially from leaves of *Dioscorea opposita* cv. Jang-Ma.

료를 제작하는데 어려움이 있었다. 이와 같은 사실은 다음의 바이러스 정제에서도 확인되었다.

면역전자현미경 (ISEM). 일본에서 분양 받은 ChYNMV 항혈청을 1/500배로 희석하여 사용하였다. 먼저 바이러스에 감염된 모자이크 잎을 0.1 M 인산완충액으로 마쇄한 다음, ChYNMV 항혈청액을 혼합하여 면역반응을 시켰다. 반응액을 PTA로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 660 nm의 사상형 바이러스 입자의 coat protein에 ChYNMV 항혈청이 반응하여 바이러스 입자 주위가 진하게 염색(decoration)되었다(Fig. 3). 이와 같은 혈청학적 반응의 결과로 장마의 모자이크 잎에서 검출된 660 nm의 사상형 바이러스 입자는 ChYNMV로 확인되었다.

바이러스 부분정제. Kondo(2001)의 ChYNMV 정제법을 이용하여 바이러스를 부분정제 하였다. 즉 정제법은 위에서 언급한 바와 같이 일반적인 바이러스 추출법과는 다르게 열처리를 하였고, 통상 처리하는 유기용매는 첨가하지 않았고, 초원심분리법으로 바이러스를 부분 정제하였다. 전자현미경을 이용한 바이러스 입자의 검출에서 연한 황색의 모자이크 증상의 부드러운 잎에서 바이러스 입자가 쉽게 검출되었고, 짙은 모자이크의 성숙된 잎에서

바이러스 입자의 검출이 어렵다는 결과를 얻었기 때문에 이 두 종류의 잎을 순화시료로 이용하였다. 부드러운 잎에서는 바이러스 입자가 확인되었으나, 성숙 잎에서는 바이러스 입자가 확인되지 않아서, 전자현미경 결과와 같았다. ChYNMV를 일반적인 전자현미경법이나 혈청학적 방법으로 진단하기 어려움이 있어 이를 극복하기 위하여 Electro-Blot Immunoassay법을 Yukio 등(1986)이 개발하였다. 따라서 한국에서도 장마 무병종서를 농가에 보급하기 위해선 항혈청 제작하여 정확하고 간편하며 저렴한 진단법에 대한 연구는 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

외피단백질 아미노산서열 분석. ChYNMV에 감염된 장마 잎에서 viral RNA를 추출하기 위하여 ChYNMV의 부분 정제 시료를 이용하였다. 부분 정제한 바이러스 시료로부터 RNA를 추출하여 One step RT-PCR을 수행하여 약 1.2 kbp의 증폭산물을 획득하였다.

증폭산물을 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하여 염기서열을 결정하였으며 염기서열을 기초로하여 외피단백질 아미노산서열을 결정하였다. 국내에서 분리한 ChYNMV strains(이후 ChYNMV-K strains로 표시)는 일본에서 보고한 ChYNMV와 평균 97.9%의 상동성을 보여 매우 유사

Table 1. Identity and divergence of the amino acid sequences of ChYNMV (AB044386), ChYNMV Korean strains, cardamon mosaic virus (CdMV : AF189125), narcissus latent virus (NLV : U58770) and maclura mosaic virus (MacMV : U58771)

		Identity (%)						
		ChYNMV	ChYNMV-K1	ChYNMV-K2	ChYNMV-K3	CdMV	NLV	MacMV
Divergence	ChYNMV		98.3	97.6	97.9	55.2	47.9	40.3
	ChYNMV-K1	1.8		97.9	98.3	54.9	47.2	39.6
	ChYNMV-K2	2.5	2.1		96.9	55.2	46.5	39.9
	ChYNMV-K3	2.1	1.8	3.2		54.9	48.3	40.3
	CdMV	60.0	60.8	60.0	60.8		44.8	37.6
	NLV	78.0	77.1	78.9	78.0	90.9		48.5
	MacMV	106.1	108.6	107.4	106.1	11.5	79.0	

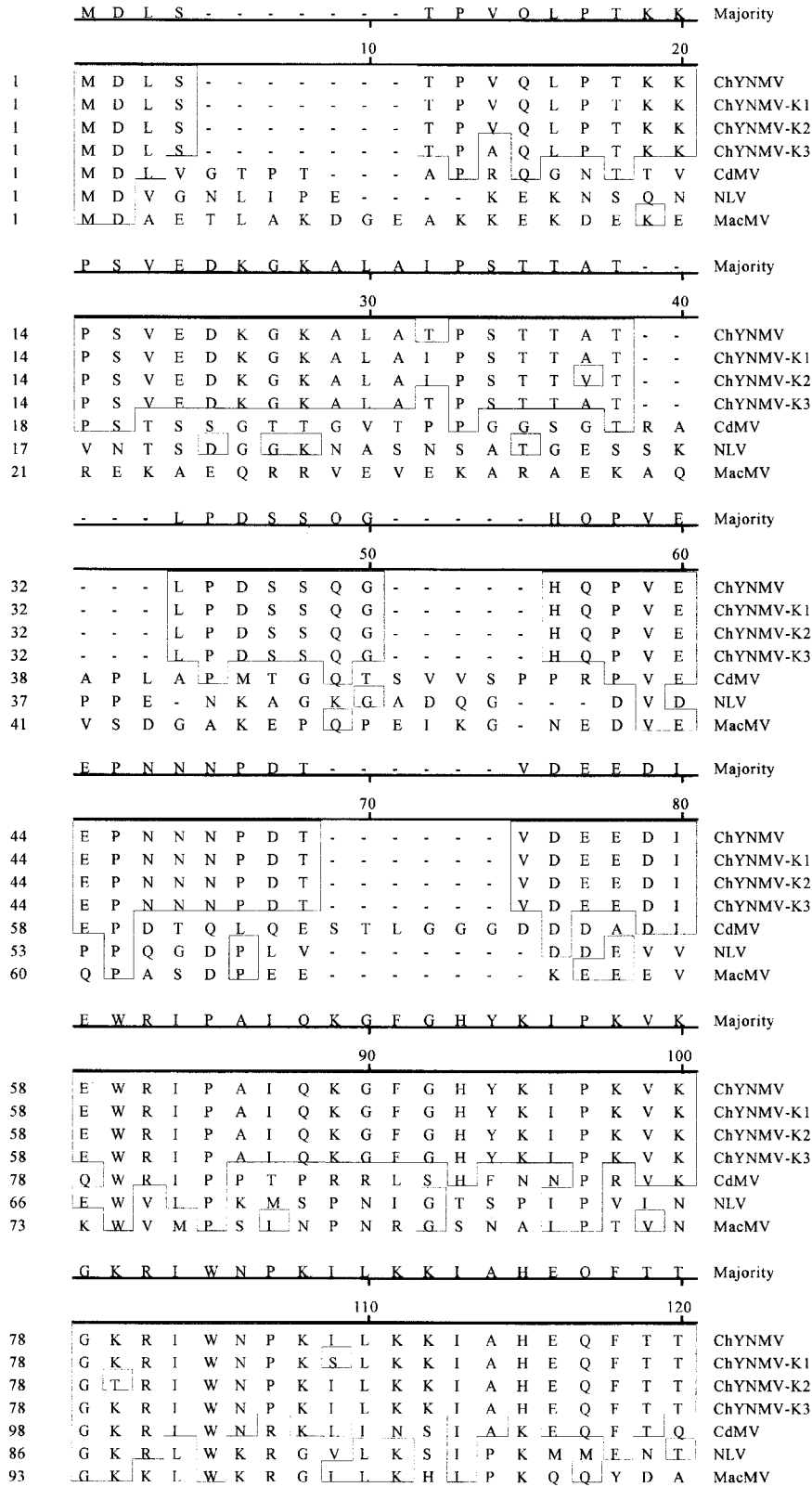


Fig. 4. Multiple alignments of the amino acid sequences of ChYNMV (AB044386), ChYNMV Korean strains, cardamon mosaic virus (CdMV : AF189125), narcissus latent virus (NLV : U58770) and maclura mosaic virus (MacMV : U58771). Residues conserved in above three viruses are boxed. N-terminal was the most variable region and conserved regions were present within the genus *Macluravirus*.

	<u>T S O M V T T D K L E K W I E E V K R D</u>																				Majority	
		130																		140		
98	T	S	Q	M	V	T	T	D	K	L	E	K	W	T	E	E	V	K	R	D	ChYNMV	
98	T	S	Q	M	V	T	T	D	K	L	E	K	W	I	E	E	V	K	R	D	ChYNMV-K1	
98	T	S	Q	M	V	T	T	D	K	L	E	K	W	I	E	E	V	K	R	D	ChYNMV-K2	
98	T	S	Q	M	V	T	T	D	K	L	E	K	W	I	E	E	V	K	R	D	ChYNMV-K3	
118	S	S	Q	L	A	T	T	L	Q	F	E	K	W	A	E	D	V	R	K	S	CdMV	
106	T	S	T	M	A	T	Q	A	Q	L	T	S	W	V	E	E	V	K	Q	A	NLV	
113	S	T	T	K	A	T	S	A	Q	L	A	A	W	V	E	A	V	K	K	D	MacMV	
	<u>L V V T N E T D F Q I C L T S W C L W C</u>																				Majority	
		150																		160		
118	L	V	V	T	N	E	T	D	F	Q	I	C	L	T	S	W	C	L	W	C	ChYNMV	
118	L	V	V	T	N	E	T	D	F	Q	I	C	L	T	S	W	C	L	W	C	ChYNMV-K1	
118	L	V	V	T	N	E	T	D	F	Q	I	C	L	T	S	W	C	L	W	C	ChYNMV-K2	
118	L	V	I	T	N	E	T	D	F	Q	I	C	L	T	S	W	C	L	W	C	ChYNMV-K3	
	L	G	T	P	N	E	E	D	F	Q	I	Y	L	T	S	W	C	L	W	C	CdMV	
138	L	A	L	K	T	D	D	A	W	T	Y	V	I	T	N	W	C	I	W	C	NLV	
126	L	A	L	K	T	D	D	A	W	T	Y	V	I	T	N	W	C	I	W	C	NLV	
133	L	K	I	R	N	D	D	A	W	S	I	V	L	T	A	W	C	I	W	C	MacMV	
	<u>A N N G T S S E L D A S O F M E V - H A</u>																				Majority	
		170																		180		
138	A	N	N	G	T	S	S	E	L	D	A	S	Q	F	M	E	V	-	H	A	ChYNMV	
138	A	N	N	G	T	S	S	E	L	D	A	S	Q	F	M	E	V	-	H	A	ChYNMV-K1	
138	A	N	N	G	T	S	S	E	L	D	A	S	Q	F	M	E	V	-	H	A	ChYNMV-K2	
138	A	N	N	G	T	S	S	E	L	D	A	S	Q	F	M	E	V	-	H	A	ChYNMV-K3	
158	A	N	N	G	T	S	S	E	V	D	V	N	Q	N	M	E	I	-	H	S	CdMV	
146	A	N	N	G	T	S	S	E	V	D	T	S	Q	T	M	E	I	R	D	G	NLV	
153	A	N	N	G	T	S	S	E	V	D	T	N	Q	D	M	E	S	-	D	S	MacMV	
	<u>N G Q I M G I P I Q I F V E P A I Q H G</u>																				Majority	
		190																		200		
157	N	G	Q	I	M	G	I	P	I	Q	I	F	V	E	P	A	I	Q	H	G	ChYNMV	
157	N	G	Q	I	M	G	I	P	I	Q	I	F	V	N	P	A	I	Q	H	G	ChYNMV-K1	
157	N	G	Q	I	M	G	I	P	I	Q	I	F	V	E	P	A	I	Q	H	G	ChYNMV-K2	
157	N	G	Q	I	M	G	I	P	I	Q	I	F	V	N	P	A	I	Q	H	G	ChYNMV-K3	
177	G	G	K	Y	S	T	I	P	I	A	L	F	V	E	P	A	V	Q	N	G	CdMV	
166	F	G	K	V	Q	A	L	P	I	E	V	F	V	N	P	A	V	E	N	G	NLV	
172	L	G	K	V	Q	T	V	R	L	D	S	F	V	E	P	A	I	E	N	G	MacMV	
	<u>G L R K V M R H F S G I T S K M L S E G</u>																				Majority	
		210																		220		
177	G	L	R	K	V	M	R	H	F	S	G	I	T	S	K	M	L	S	E	G	ChYNMV	
177	G	L	R	K	V	M	R	H	F	S	G	I	T	S	K	M	L	S	E	G	ChYNMV-K1	
177	G	L	R	K	V	M	R	H	F	S	G	I	T	S	K	M	L	S	E	G	ChYNMV-K2	
177	G	L	R	K	V	M	R	H	F	S	G	I	T	S	K	M	L	S	E	G	ChYNMV-K3	
197	G	L	R	K	I	M	R	H	L	S	D	I	T	S	Q	I	L	A	K	G	CdMV	
186	G	L	R	K	I	M	R	H	F	S	G	I	T	H	E	I	L	K	A	G	NLV	
192	G	L	R	K	I	M	R	L	L	F	R	Y	H	S	G	N	L	G	Q	R	MacMV	
	<u>G K M T A W G R K R G F T O R S M I P Y</u>																				Majority	
		230																		240		
197	G	K	M	T	A	W	G	R	K	R	G	F	T	Q	R	S	M	I	P	Y	ChYNMV	
197	G	K	M	T	A	W	G	R	K	R	G	F	T	Q	R	S	M	I	P	Y	ChYNMV-K1	
197	G	K	M	T	A	W	G	R	K	R	G	F	T	Q	R	S	M	I	P	Y	ChYNMV-K2	
197	G	K	M	T	A	W	G	R	K	R	G	F	T	Q	R	S	M	I	P	Y	ChYNMV-K3	
217	G	K	M	T	A	W	G	T	K	R	G	Y	T	Q	L	A	M	I	P	Y	CdMV	
206	K	R	M	T	A	W	G	N	K	R	G	F	T	E	K	S	M	I	P	Y	NLV	
212	G	K	N	D	S	L	W	N	Q	A	G	F	T	E	K	A	M	T	T	L	MacMV	

Fig. 4. Continued.

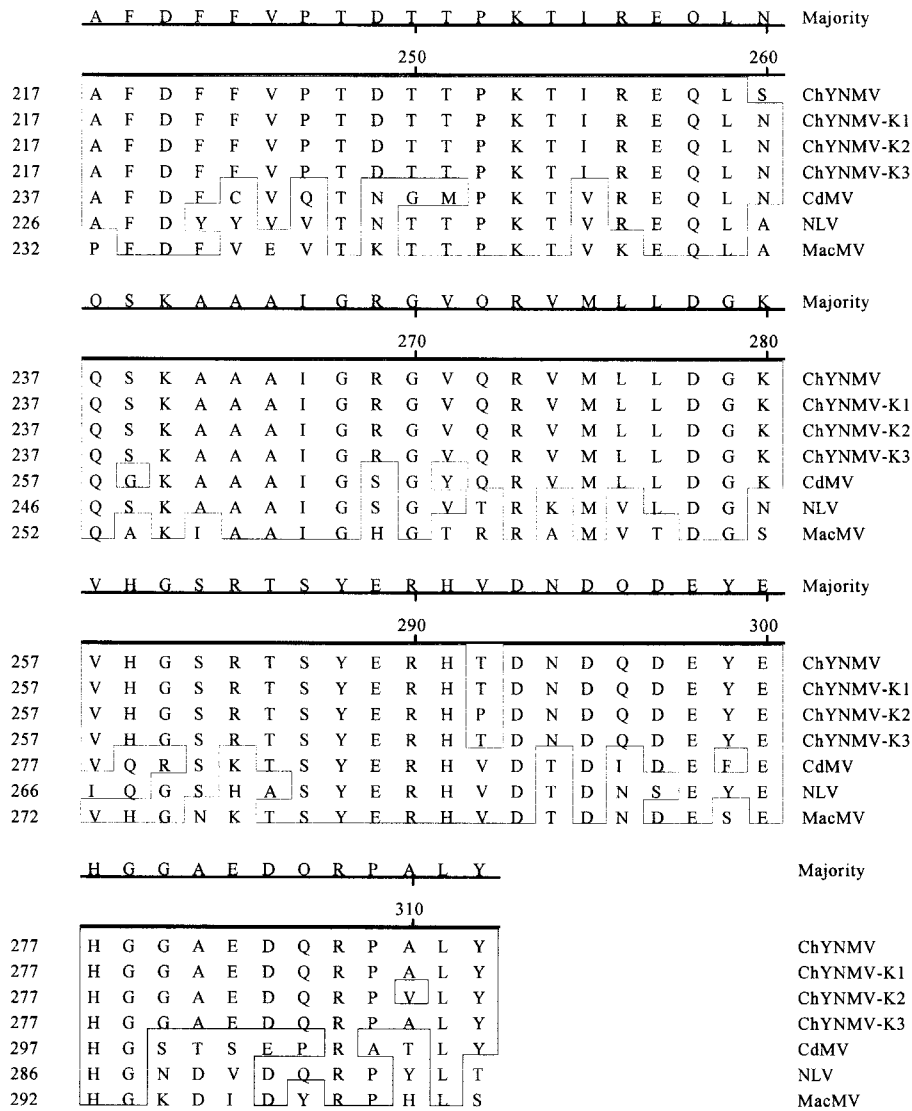


Fig. 4. Continued.

함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 국내에서 재배되고 있는 장마의 종서를 일본에서 수입하는 과정에서 이미 이 병된 장마를 국내에 들어와 재배하고 있기 때문으로 생각된다. 장마를 대규모로 재배하는 농장에서는 3년 주기로 일본에서 장마 종묘를 개인적으로 수입하고 있어 이 병된 장마의 무분별한 국내 유입이 가능하였으며 특히 국내에선 아직 ChYNMV에 대한 연구가 이루어지지 않아서 본 바이러스에 대한 진단은 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

ChYNMV는 처음에는 형태적 특징과 진딧물 전염성을 기준으로 *Carlavirus*로 분류되었으나 Kondo(2001)가 ChYNMV를 정제하여 외피단백질의 아미노산서열을 분석한 결과, *Carlavirus*와는 유의성 있는 상동성을 확인할

수 없었으며, *Macluravirus*와는 41.3~47.2%의 상동성을 보였음을 보고하였다. 본 연구에서 분리한 ChYNMV-K strains간의 상동성도 평균 97.7%로 매우 높아, ChYNMV의 유전적 변이는 크지 않은 것으로 사료되었다.

*Macluravirus*로 보고된 *Cardamon mosaic virus*(CdMV: AF189125), *Narcissus latent virus*(NLV : U58770), *Maclura mosaic virus*(MacMV : U58771)와 ChYNMV strains의 외피단백질 아미노산서열을 비교한 결과(Badge 등, 1997; Jacob 등, 2001), CdMV와 가장 높은 상동성을 보였으며, 잘 보존된 부위가 *Macluravirus*간에 존재하였고 C-말단 보다는 N-말단에서의 변이가 많이 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). *Macluravirus* 속은 분자수준에서의 식물바이러스 연구가 활발히 이루어짐으로 해서 최근에 분리된 것으로

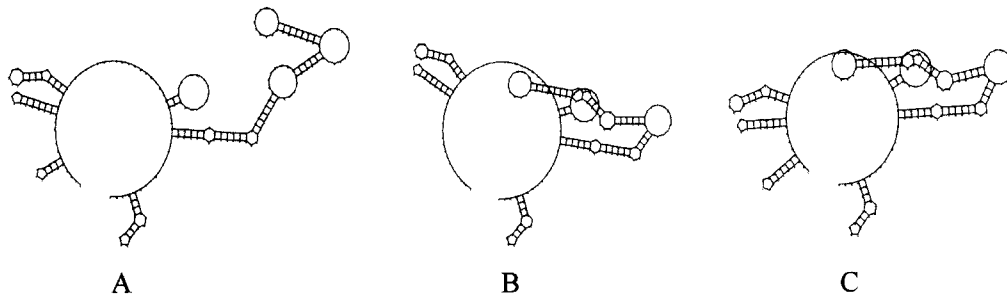


Fig. 5. Diagram illustrating the sequences and structures of the 3'-UTR in ChYNMV Korean strains. A, B, C : ChYNMV-K1, 2, 3.

Potyviridae에 속하는 다른 속과는 Nib와 외피단백질 아미노산서열이 상당히 다름을 확인되어 새로운 속으로 분리되었고(Badge 등, 1997), 국내에선 아직 *Macluravirus*에 대한 보고는 없었다.

3'-UTR의 2차 구조. ChYNMV의 3'-UTR은 231nt로 구성되어 165nt의 3'-UTR를 가진 YMV(*yam mosaic virus* : U42596)보다는 길었으며(Aleman 등, 1996), ChYNMV strains간의 상동성은 97% 이상으로 매우 높게 나타났다. 3'-UTR의 2차 구조에서 5~6개의 stem and loops 구조(Fig. 5)를 가질 것으로 예상되며, 이러한 현상은 YMV 및 다른 *Potyvirus*에서도 확인된 것으로(Domier 등, 1986; Turpen 등, 1989), stem and loops 구조는 바이러스의 복제 및 전사와 병징 발현의 조절에 관계하는 것으로 보고되었다(Matthews REF, 1991; Rodriguez-Cerezo 등, 1991).

적 요

경상북도 안동, 의성, 군위, 대구의 장마 재배포장에서 모자이크와 괴저반점을 보이는 장마잎을 채집하였다. 이들 이병 잎 조직을 시료로 하여 DN법 및 ISEM법에 의해 투과전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 각각의 시료에서 ChYNMV 항혈청에 반응한 660 nm의 사상형 입자가 확인되었다. 장마 잎에서 부분 정제한 바이러스에서 RNA를 추출하여 이것을 주형으로 ChYNMV 특이적 프라이머와 oligo-dT 프라이머를 이용하여 외피단백질 유전자와 3'-말단 비전사부위를 포함하는 약 1.2 kbp의 3'-말단을 증폭하였다. 외피단백질 아미노산서열은 *Macluravirus*로 알려진 ChYNMV(AB044386)와 97.9%의 상동성을 보여 장마에서 분리한 바이러스를 ChYNMV로 동정하였다. ChYNMV와 다른 *Macluravirus*의 외피단백질 아미노산서열을 비교한 결과, M말단 영역에서 가장 많은 변이를 확인하였고 *Macluravirus* 속에는 잘 보존된 영역이 존재하였다.

참고문헌

- Aleman, M. E., Marcos, J. F., Brugidou, C., Beachy, R. N. and Fauquet, C. 1996. The complete nucleotide sequence of *yam mosaic virus* (Ivory Coast isolate) genomic RNA. *Archives of virology* 141: 1259-1278.
- Badge, J., Robinson, D. J., Brunt, A. A. and Foster, G. D. 1997. 3'-Terminal sequences of the RNA genomes of narcissus latent and *Maclura mosaic viruses* suggest that they represent a new genus of the Potyviridae. *J. Gen. Virol.* 78: 253-257.
- Domier, L. L., Franklin, K. M., Shahabuddin, M., Hellmann, G. M., Overmeyer, J. H., Hiremath, S. T., Siaw, M. F. E., Lomonosoff, G. P., Shaw, J. G. and Rhoads, R. E. 1986. The nucleotide sequence of *tobacco vein mottling virus* RNA. *Nucleic Acid Res.* 13: 5417-5430.
- Fukamoto, F. and Tochiara, H. 1978. Chinese yam necrotic mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 1-5.
- Jacob, T. and Usha, R. 2001. 3'-Terminal sequence analysis of the RNA genome of the Indian isolate of cardamom mosaic virus: a new member of genus *Macluravirus* of Potyviridae. *Virus Genes* 23: 81-88.
- 石川 亮, 難波成任, 山下修一, 土居養二. 1985. Broad bean wilt virus (BBWV)의純化および理化學的性狀について. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 51(3): 352-353.
- Kondo, T. 2000. Detection of Chinese yam necrotic mosaic virus by RT-PCR. *Jpn. J. Phytopathol.* 66: 263.
- Kondo, T. 2001. The 3'-terminal sequence of Chinese yam necrotic mosaic virus genomic RNA: a close relationship with *Macluravirus*. *Arch. Virol.* 146: 1527-1535.
- Kondo, T., Sasaki, Y., Fuji, S., Kang, D.-K. and Chang, M.-U. (2002). Occurrence of *Broad bean wilt virus 2* in Yams. *Jpn. J. Phytopath.* 68: 239 (Abstr. in Japanese).
- Matthews, R.E.F. 1991. Plant virology. 3rd ed. *Academic Press. San Diego.*
- Rodriguez-Cerezo, E., Gamble-Klein, P. and Shaw, J. G. 1991. A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9863-9867.

- Shirako, Y. and Ehara, Y. 1986. Rapid diagnosis of Chinese yam necrotic mosaic virus infection by electro-blot immunoassay. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52: 453-459.
- Tochihara, H. 1993. Yams. In: Tsuchizaki, T., Tochihara, H., Kameya, M., Yanase, H. (eds) Plant virus diseases in Japan. *Zenkoku Noson Kyokai, Tokyo* pp. 431-435.
- Turpen, T. 1989. Molecular cloning of a *Potato virus Y* genome: nucleotide sequence homology in non-coding region of *Potyviruses*. *J. Gen. Virol.* 70: 1951-1960.