

우리나라 감자에 발생하는 PVY의 병원학적 특성 및 외피단백질 유전자 분석

고령지농업시험장 정 승 룡

Etiological Properties and Coat Protein Gene Analysis of Potato Virus Y Occuring in Potatoes of Korea

Cheong Seung Ryong

Alpine Agricultural Experiment Station

Abstract

To obtain basic informations for the improvement of seed potato production in Korea, some etiological properties of potato virus Y(PVY) distributed in the major seed potato production area(Daekwanryeong) were characterized, and the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein gene of the PVY strain isolated were analyzed.

PVY strains in Daekwanryeong, an alpine area, were identified to be two strains, PVY^O and PVY^N by symptoms of indicator plants, and their distribution in potato fields was similar. Major symptom on potato varieties by PVY was grouped as either mosaic alone or mosaic accompanied with veinal necrosis in the lower leaves. The symptom occurrence of the two symptoms was similar with Irish Cobbler, but Superior showed a higher rate of mosaic symptom than the other.

The PVY strain which was isolated from potato cv. Superior showing typical mosaic symptoms produced symptoms of PVY-O on the indicator plants of *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc and *Physalis floridana*, but no symptom on *Capsicum annum* cv. Ace. Moreover, results from the enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies showed that the isolated PVY reacts strongly with PVY-O antibodies but does not react specifically with PVY-T antibodies. The purified virus particles were flexious with a size of 730x11nm. On the basis of the above characteristics, the strain was identified to be a PVY-O and named as of PVY-K strain.

The flight of vector aphids was observed in late May, however, the first occurrence of infected plants was in mid June with the bait plants surrounded with PVY-infected potato plants and early July with the bait plants surrounded with PVY-free potato plants. PVY infection rates by counting symptoms on bait plants

(White Burley) were 1.1% with the field surrounded with PVY-free potato plants and 13.7% the fields surrounded with PVY-infected potato plants, showing the effect of infection pressure.

The propagated PVY-K strain on tobacco(*N. sylvestris*) was purified, and the RNA of the virus was extracted by the method of phenol extraction. The size of PVY-K RNA was measured to be 9,500 nucleotides on agarose gel electrophoresis. The double-stranded cDNAs of PVY-K coat protein(CP) gene derived by the method of polymerase chain reaction were transformed into the competent cells of *E. coli* JM109, and 2 clones(pYK6 and pYK17) among 11 clones were confirmed to contain the full-length cDNA. Purified plasmids from pYK17 were cut with *Sph* I and *Xba* I were deleted with exonuclease III and were used for sequencing analysis. The PVY-K CP gene was comprised of 801 nucleotides when counted from the cleavage site of CAG(Gln)-GCA(Ala) to the stop codon of TGA and encoded 267 amino acids. The molecular weight of the encoded polypeptides was calculated to be 34,630 daltons. The base composition of the CP gene was 33.3% of adenine, 25.2% of guanine, 20.1% of cytosine and 21.4% of uracil. The polypeptide encoded by PVY-K CP gene was comprised of 22 alanines, 20 threonines, 19 glutamic acids and 18 glycines in order. The homology of nucleotide sequence of PVY-K CP gene with those of PVY-O(Japan), PVY-T(Japan), PVY-T_H(Japan), PVY^N(the Netherlands), and PVY^N(France) was represented as 97.3%, 88.9%, 89y.3%, 89.6%, and 98.5%, respectively. The amino acid sequence homology of the polypeptide encoded by PVY-K CP gene with those encoded by viruses was represented as 97.4%, 92.5%, 92.9%, 92.9%, and 98.5%, respectively.

감자(*Solanum tuberosum* L.)는 전세계 130여개국에서 재배되어 연간 2억 6천만톤 정도가 생산되며, 생산량에서는 옥수수, 벼, 밀 다음으로 4위, 재배면적으로는 8위를 차지하고 있는 주요 작물이다. 감자의 주요 생산국은 러시아, 폴란드, 중국, 미국, 인도 등으로 전세계 생산량의 약 60%를 차지하고 있으며, 우리나라의 생산량은 0.17%를 차지하고 있다(6). 1988년부터 1992년까지 5개년간 우리나라의 연평균 감자 생산량은 약 64만톤이며, 재배 면적은 25,000ha로 해에 따라 약간의 차이가 있다(13). 우리나라의 감자수량은 10a당 2,000kg 정도로 주요 감자 재배국의 절반 수준에 머물고 있다.

감자는 영양번식 작물로서 씨감자 퇴화가 재배에 있어서 가장 중요한 문제점이 되고 있다. 감자의 퇴화원인은 여러가지 요인이 있으나, 특히 바이러스병에 의한 퇴화(2)가 가장 심각하여 피해가 크다.

감자에 발생하는 바이러스병의 종류는 세계적으로 24종이 알려져 있으나(10), 우리나라에는 PLRV, PVY, PVA, PVX, PVM, PVS, AIMV, PSTV 등이 보고되어 있다(1).

이들 바이러스중에서 PVY는 우리나라 뿐만 아니라 전세계적으로 가장 널리 분포하며, 매우 다양한 계통들이 보고되어 있고(3, 10, 11, 18), 이 바이러스의 이병에 따른 피해도 매우 커서 10-80%의 수량 감수를 초래하는 것으로 알려져 있다(5). 한편 우리나라의 주요 감자재배지인 대관령지역의 보급종 단계 씨감자의 PVY의 이병율을 살펴보면, 1984년부터 1991년까지 평균 3.7%의 이병율을 보였으며, 1987년 대지품종의 경우 12.7%가 발병되어 씨감자 생산에 문제를 일으킨 일도 있다.

본 연구는 감자 무병종서 생산을 위한 기초연구의 일환으로 PVY의 발생조사, 계통분리, 전염시기구명, 접종시기에 따른 병징발현의 양상, 감자 체내에서의 PVX와의 상호작용 등 PVY의 병원학적 특성을 구명하였으며, 분리한 PVY를 공시하여 바이러스의 게놈 RNA를 클로닝하고 외피단백질 유전자(coat protein gene, CP)에 대한 유전자분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. PVY의 발생조사

1986년부터 1989년까지 3년동안 대관령지역에서 감자 생육기인 6월부터 8월 사이에 감자의 지상부에 나타난 병징을 관찰하여 모자이크, 엽맥괴저 증상 등 PVY에 의한 것이라고 여겨지는 식물체를 고령지농업시험장 재배포장과 품종보존 포장에서 채집하였다. 채집된 이들 감자의 시료는 *Nicotiana tabacum* cv. White Burley 등 12종의 지표식물에 접종하여 반응을 조사하였고, PVY 항혈청을 이용한 ELISA법으로 검정하여 PVY의 이병 여부를 조사하였다. 이 때 바이러스의 접종은 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)을 10배량(W/V)첨가하여 마쇄한 즙액을 Carborundum(500 mesh)을 이용한 방법으로 실시하였다. 또한 네덜란드 식물보호연구소(Plant Protection Institute:IPO)의 De Bokx박사로부터 분양받은 PVY^N, PVY^O, PVY^C의 3계통을 표준계통으로 사용하여 분리된 PVY의 계통분류를 실시하였다.

2. PVY의 분리동정

대관령지역에서 기본식물을 망실 재배한 후, 동계에 온실에서 후대검정을 실시 하던 중, 수미에서 모자이크 증상을 나타내는 개체들을 발견하였다. 이들 모자이크 병징을 나타낸 이병주의 잎을 채취하여 10배액(W/V)의 0.01 M 인산완충액 (pH 7.0)을 넣고 마쇄한 즙액을 접종원으로 사용하여 *Chenopodium amaranticolor*에 접종하였다. 접종 후 나타나는 국부병반을 단일분리하여 *C. amaranticolor*에 3회에 걸쳐 single isolation 한 후 *N. tabacum* cv. White Burley에 접종하여 이병된 담배잎을 0.01 M 인산완충액(pH 7.0) 10배액(W/V)을 넣고 마쇄한 즙액을 접종원으로 사용하였다. 이 때 이 바

이러스의 지표식물 검정을 위하여 명아주(*C. amaranticolor*), 고추(*Capsicum annuum* cv. Ace), 천일홍(*Gomphrena globosa*), 담배(*N. tabacum* cv. Xanthi nc), 땅파리(*Physalis floridana*), 감자(*Solanum tuberosum* cv. Irish Cobbler, cv. May Queen, cv. Konkei 59)를 공시하여 즙액접종하였다. 접종 2일 후부터 각 지표식물의 접종엽 및 상위엽에 나타나는 병징을 일본 북해도농업시험장에서 분양받은 PVY-O계통 및 PVY-T계통을 공시하여 비교검정하였다. 또한 분리한 바이러스의 혈청학적 성질을 검정하기 위하여 일본 북해도대학에서 분양받은 PVY-T와 PVY-O계통의 단크론 및 다크론항체를 5 μ g/ml씩 코팅한 후 enzyme-conjugate농도 800배에서 ELISA방법으로 각 계통의 항원과 반응시킨 다음 405nm에서의 흡광도를 조사하였다.

3. 진딧물에 의한 대관령지역의 PVY 전염시기 조사

PVY의 진딧물에 의한 전염시기를 조사하기 위하여 포장의 중앙에 담배(*N. tabacum* cv. White Burley)를 유인식물(bait plant)로 심고, 그 주위에 PVY에 이병된 감자 (품종:남작)를 심은 오염포장과, 유인식물 주위에 건전감자를 심은 건전 포장을 설치하여 조사하였다. 즉 이들 두 포장은 서로 1km 정도 격리시켜서 18.25 \times 15m로 포장을 조성하여 주위에 감자를 휴간 75cm \times 주간 25cm 간격으로 이병괴경과 건전괴경을 각각 5월 상순에 파종한 후, 그 중앙에 50 \times 50cm 간격으로 직경 20cm, 높이 19cm되는 50개의 포트에 잎이 3-4매되는 유인용 담배를 심고, 이들 포트는 지표면보다 약간 높게 묻었다. 유인식물은 4월 하순부터 8월 하순까지 약 10일 간격으로 포장에 노출시킨 후, 온실로 옮기고 약제를 살포하여 진딧물을 방제한 다음 약 1개월간 키우면서 담배에 나타나는 병징으로 PVY의 이병 여부를 판단하였고, 판단이 곤란한 경우에는 ELISA를 이용하여 검정하였다. 또한 같은 기간동안 두 곳의 포장에서 비래진딧물을 채집하기 위하여 지상 60cm에 황색수반(50 \times 30 \times 10cm)을 설치하고 매일 오전에 진딧물을 채집하여 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*), 목화진딧물(*Aphis gossypii*), 감자수염진딧물(*Macrosiphum euphorbiae*), 싸리수염진딧물(*Aulacorthum solani*), 무테두리진딧물(*Lipaphis erysimi*) 등 5종의 PVY 매개진딧물을 분리하였으며, 1986-1987년까지 2년동안 실시 하였다.

4. PVY-K 계놈 RNA의 정제

감자로부터 분리한 바이러스를 지표식물 *N. sylvestris*에 증식시킨 후 순화하였다. 순화된 바이러스로부터 계놈 RNA를 추출하기 위하여 2% SDS와 proteinase K로 처리한 후 phenol/chloroform으로 추출하고 ethanol침전과정을 거쳐 RNA를 정제하였다(7).

5. PVY-K 외피단백질 유전자의 cDNA 합성 및 클로닝

PVY-K 계통의 외피단백질 유전자(coat protein gene: CP gene)에 대한 cDNA합성

및 클로닝을 실시하였다. 우선 계놈 RNA에서 CP gene에 대응하는 cDNA를 합성하기 위하여 polymerase chain reaction(PCR)법(16)을 이용하였다. 이 때 PCR에 활용할 primer는 van der Vlugt 등(19)에 의해서 보고된 PVY^N계통의 염기서열을 참조하여 CP gene의 5' 및 3' 말단부위에 대응하는 oligodeoxynucleotide를 20mer씩 합성하여 primer로 사용하였다.

PVY-K RNA의 CP gene cDNA의 합성은 정제된 PVY-K RNA에 3' 말단부 primer (CP3M) 1 μ l, M-MLV reverse transcriptase(1U) 1 μ l를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 45분동안 반응시켜 1st strand cDNA를 합성한 다음, PCR 반응의 과정을 거쳐 2nd strand cDNA를 합성하였다. PCR 반응은 reverse transcriptase 반응시료(1st strand cDNA) 20 μ l, primer CP3P(1 μ g/ μ ml) 2 μ l, primer 3P3M(1 μ g/ml) 2 μ l, 증류수 49.5 μ l, 10 \times buffer 10 μ l, 1.25mM dNTPs 16 μ l 및 Taq polymerase 0.5 μ l를 혼합하여 100 μ l의 반응계로 만든 다음, denaturation 94 $^{\circ}$ C 1분, annealing 51 $^{\circ}$ C 2분, extension 72 $^{\circ}$ C 3분을 1cycle로 하여 총 25cycle 반응시켰다.

PCR에 의해서 증폭된 PVY-K CP gene의 cDNA는 1% agarose gel 전기영동으로 분자의 크기를 결정하였고, 이들 cDNA는 T4 DNA polymerase를 이용하여 양말단을 blunt end시켰다. Blunt end된 CP gene cDNA는 플라스미드 벡터 pUC119의 Sma I site에 ligation 시켰다. 이 때 ligation 반응은 pUC119(Sma I cut) 1 μ l에 blunt cDNA 1 μ l를 첨가하고 1U의 T4 DNA ligase를 넣고 16 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. Ligation시킬 pUC119는 RbCl법(12)에 의해서 미리 competent cell로 제작한 *E. coli* JM109에 형질전환 시켰다. 형질전환 시킨 *E. coli*는 X-gal, IPTG 및 25 μ g/ml의 ampicilline을 포함하는 LB배지에서 37 $^{\circ}$ C로 16시간 동안 배양시킨 다음 형성된 colony 중 white colony를 형질전환된 클론으로 판정하여 선발하였다. 클로닝된 CP cDNA를 확인하기 위하여 선발된 클론들을 2 \times YT 액체배지에서 37 $^{\circ}$ C로 16시간동안 진탕배양 후 boiling법(9)으로 recombinant plasmid를 추출하고 1% agarose gel에서 전기영동하여 cDNA의 삽입여부를 확인하였다. 또한 2 \times YT배지에서 배양한 클론들을 alkaline lysis법으로 플라스미드를 정제하여 제한효소 Sac I 및 Xba I으로 처리한 다음 전기영동하여 삽입된 CP cDNA의 분자크기를 검정하였다.

6. 외피단백질 유전자의 염기서열 분석

PVY-K 계놈 RNA의 CP gene에 대한 염기서열을 결정할 목적으로 pUC119에 삽입된 CP cDNA의 클론중 pYK17을 선발하여 Sma I site에 삽입된 약 840bp의 cDNA를 deletion시켜서 서브클로닝 하였다. pYK17을 형질전환된 *E. coli*로부터 alkaline lysis법으로 재조합 플라스미드를 추출하여 플라스미드의 폴리클로닝 site에 존재하는 Xba I site를 절단하여 cDNA의 3' 말단을 돌출(producing)시켰고, 이어서 5' 말단 부위는 Sph I으로 처리하여 플라스미드 부위를 절단하였다. 이렇게 제작된 cDNA절편은 exonuclease III(Boehringer Mannheim)로 37 $^{\circ}$ C에서 30초, 1분, 1분 30초 및 2분동안

처리하여 cDNA를 deletion시켰다. Deletion된 cDNA는 S1 nuclease와 Klenow enzyme을 처리하여 5' overhang과 3' overhang을 제거한 다음 0.7% agarose gel에 전기영동하였다. 이어서 전기영동에서 나타난 각 cDNA band를 절취하여 phenol 추출법으로 cDNA 절편들을 정제한 후 DNA polymerase I, dNTPs, T4 DNA ligase를 이용하여 pUC119에 ligation 시킨 후, *E. coli* JM109 competent cell에 서브클로닝 하였다. 서브클로닝된 각 클론으로부터 추출한 cDNA는 dATP를 이용하여 dideoxy chain termination방법(17)에 의하여 5'→3' 및 3'→5' 방향으로 염기서열을 결정하였다. DNA 시료는 alkali로 변성시킨 후 사용하였으며, primer는 (M13/pUC sequencing Kit, Amersham)를 사용하여 annealing반응을 시켰다. 이 반응액을 dCTP, dGTP, dTTP 및 ³⁵S-dATP와 ddATP, ddGTP 및 ddTTP의 혼합액(dddNTP mix)에 첨가하고 Klenow fragment(1U)를 넣어 45℃ 수조에서 20분 동안 sequencing 반응을 시킨 후 formamide stop solution을 넣어 반응을 중지시킨 다음, 95℃에서 3분간 열변성하여 미리 준비된 겔에 loading하였다. 전기영동을 위한 겔은 8 M urea가 포함된 5% acrylamide gel (60×20cm)을 이용하였으며, 영동 buffer 1×TBE(10.8g Tris base, 5.5g boric acid, 0.98g Na₂-EDTA, pH8.3)를 사용하여 1,500V에서 1시간 pre-run시킨 다음, 2,000V에서 2-3 시간동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 겔 plate는 고정액(5% methanol, 5% acetic acid)에 20분간 침지하여 고정 및 urea를 제거하였다. 이어서 60-80℃에서 1시간 동안 건조시키고 X-ray 필름에 2일 동안 감광시켜 autoradiograph를 얻었다.

결정된 PVY-K CP gene의 염기서열로부터 아미노산 배열을 추정하였고, 폴리단백질의 cleavage site인 Gln-Ala dipeptide 위치를 확인하여 CP 단백질의 N말단부위를 판단하였다. 또한 기 보고된 PVY 각 계통의 CP gene 염기서열(8, 14, 15)과 비교 분석하고 상동성을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 감자에 있어서 PVY의 발생 및 분포

대관령지역의 감자에서 PVY의 발생과 분포를 조사하기 위하여 분양받은 PVY의 표준계통 PVY^N, PVY^O, PVY^C 등 3계통을 지표식물 담배 White Burley품종의 병징으로 3계통을 뚜렷이 구분할 수 있어 이를 이용 하였다.

149주를 채집후 128 분리주가 PVY에 단독감염된 것을 확인하였다. 또한 분리된 PVY를 연도 및 시기별로 각 계통의 발생분포를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 즉 포장에서 PVY에 자연 감염되어 나타나는 감자의 병징은 크게 모자이크 증상과 모자이크와 엽맥괴저가 혼재하는 증상으로 나타났으며, 이들 병징은 감자 생육기간인 6월에서 8월까지 발현되었지만, 특히 6, 7월에 많았다. 연도에 따른 PVY의 계통분포는 PVY^O계통이 PVY^N계통보다 약간 많이 분포하였으나 큰 차이는 보이지 않았으며, PVY^C

계통은 발견되지 않았다. 이는 De Bokx와 Piron(4)이 감자 품종중 상당수가 PVY^c계통에 대해서는 포장저항성을 갖고 있다고 보고한 점을 고려하여 볼때, 우리나라 품종들도 PVY^c계통에 저항성을 갖고있기 때문에 PVY^c에 이병된 개체는 발견되지 않은 것으로 추정된다. 한편 감자에 자연 발생된 병징에 따라 PVY를 감자의 품종별로 분포를 조사하였다(Table 2). 그 결과 남작의 경우 PVY^N과 PVY^O계통이 유사한 비율로 발견되었으나, 수미에서는 PVY^O계통이 월등히 많은 특성을 나타냈다. 감자에 나타난 병징은 두 품종 모두 모자이크 증상이 많았으나, 남작에서는 모자이크 증상과 모자이크 + 엽맥괴저 혼재 증상이 26주 : 18주의 비율로 발현되는데 반해서, 수미에서는 23주 : 8주로 모자이크 증상이 월등히 많았다.

Table 1. Distribution of PVY strains during the potato growing seasons from 1986 to 1988

Symptom of isolates		PVY strain ^a)								Total
		PVY ^N				PVY ^O				
		'86	'87	'88	total	'86	'87	'88	total	
Mosaic	June	5	5	15	25	1	2	10	13	38
	July	6	9	0	15	5	12	10	27	42
Mosaic + Veinal necrosis	July	4	5	2	11	18	6	6	30	41
	August	0	2	0	2	5	0	1	6	8
Total		15	21	17	53	29	20	27	76	129

^a) PVY strains were identified by reaction on indicator plant(White Burley).

Table 2. Distribution of PVY strains on major potato varieties

Symptom of isolates	PVY strain								Total
	PVY ^N				PVY ^O				
	Irish	Cobbler	Superior	total	Irish	Cobbler	Superior	total	
Mosaic	21	2	23	5	21	26	49		
Mosaic + Veinal necrosis	2	1	3	16	7	23	26		
Total	23	3	26	21	28	49	75		

2. 분리동정된 PVY-K

후대검정용 감자로부터 분리한 PVY의 계통을 동정하기 위하여 지표식물 반응을 조사하였다. 그 결과 *C. amaranticolor*, 담배(*Xanthi nc*), *P. floridana* 및 감자 에서 PVY-O계통과 같은 반응을 나타냈으나, 고추에서는 무병징 감염으로 병징이 나타나지 않아 PVY-O계통의 모자이크 병징과는 다르게 반응하였다(Table 3). 이러한 결과로부터

이 PVY를 PVY-K계통으로 명명하였다. PVY-K를 접종하여 증식시킨 담배로부터 바이러스를 순화한 후 자외선 흡수패턴을 조사한 결과 260 nm에서 최고, 242 nm에서 최저치를 나타내는 전형적인 핵단백질의 자외선 흡수 곡선을 나타냈고, 290 nm 부근에 shoulder를 보였다. 이 자외선 흡수 곡선으로부터 max/min의 비는 1.23, OD 260/280의 비는 1.24를 나타냈다.

Table 3. Reactions on indicator plants mechanically-inoculated with PVY-K and other strains PVY strain

Indicator plant	PVY strain		
	PVY-K	PVY-O	PVY-T
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L ^a	L	-
<i>Capsicum annuum</i> cv. Ace	-	VC,M	-
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi nc	VC,VB,M	VC,VB,M	VC,VN
<i>Physalis floridana</i>	L,VC,M,VN	L,VC,M,VN	VC,M
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Irish Cobbler	L,VC,M	L,VC,M	L,VC,M
cv. May Queen	VC,M	VC,M	VC,M
cv. Konkei 59	L	L	L

^a L : Local lesions. VC : Vein clearing. M : Mosaic.

VB : Vein banding. VN : Veinal necrosis. CS : Chlorotic spots.

한편 PVY-K를 순화하였을 때 바이러스의 수율은 1.13 mg/100g이었으며, 전자 현미경 관찰 결과 약 730×11 nm의 사상형 바이러스 입자가 관찰되었다.

감자에서 분리한 PVY-K는 단크론 PVY-O항체와 특이적으로 반응하여 평균 흡광도 1.00(×5)을 나타낸 반면, 다크론 PVY^o항체와는 평균 0.21(×5)을 나타내는 특성을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과는 일본의 PVY-T 및 PVY-O 항원의 경우도 각각 계통별 단크론 항체와는 반응하였지만, 다크론 항체를 이용하였을 경우에는 특이적으로 광범위하게 반응하는 것으로 나타났다.

한편 코팅 항체로서 다크론 PVY-O와 PVY-T를 혼합 사용하여 바이러스 계통별 흡광도 수치를 비교하였다. 그 결과 PVY-K의 경우에는 enzyme-conjugate로서 PVY-T와 PVY-O를 처리한 것에서는 뚜렷한 흡광도의 차이를 나타내지 않았으나, PVY-O처리에서 비교적 높았다. 한편 PVY-T항원과 PVY-O항원에서는 두 계통의 enzyme-conjugate 처리에 의하여 흡광도 수치에 상당한 차이를 보였다(Fig. 2).

이와 같은 몇가지 성질을 검토해 볼 때 감자에서 분리한 PVY-K는 PVY^o계통과 유사한 특성을 나타내고 있으나, 고추에서의 병징이나 혈청반응의 성질에서 약간의 차이

를 보였다. 따라서 이 계통의 바이러스는 우리나라 감자에 널리 분포하는 우리나라 고유의 PVY^o형으로 추정되기 때문에 PVY-K로 불리는 것이 좋을 것으로 생각된다.

		Exp. I				Exp. II			
		Monoclonal PVY-T		Monoclonal PVY-O		Polyclonal PVY-T		Polyclonal PVY-O	
Antigen dilution									
PVY-K	×5	0.00	0.00	0.86	1.13	0.04	0.03	0.20	0.21
	×10	0.02	0.04	0.63	0.76	0.03	0.05	0.19	0.17
	×20	0.00	0.02	0.51	0.47	0.03	0.05	0.16	0.19
	×40	0.00	0.02	0.43	0.32	0.03	0.06	0.14	0.16
	×80	0.00	0.04	0.24	0.23	0.03	0.04	0.08	0.12
	×160	0.01	0.03	0.19	0.20	0.04	0.05	0.11	0.10
PVY-T	×5	0.48	1.48	0.08	0.10	0.95	1.32	0.17	0.22
	×5	0.25	1.78	0.06	0.07	0.89	0.96	0.26	0.23
PVY-O	×5	0.08	0.09	1.28	1.56	0.21	0.25	0.38	0.40
	×5	0.10	0.07	1.28	1.77	0.31	0.30	0.34	0.03
PBS-T	×5	0.01	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.02	0.02
Control	×5	0.02	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.02	0.03

Fig. 1. ELISA results of PVY-K reacted with several PVY antibodies. Concentration of coating γ -globulin was $5\mu\text{g/ml}$. Concentration of enzyme conjugate was $\times 800$. Used buffer was phosphate-buffered saline(PBS).

Enzyme Antigen conjugate		Antigen dilution				
		×5	×10	×20	×40	×80
PVY-K	PVY-T	0.42	0.43	0.21	0.13	0.26
	PVY-O	0.60	0.46	0.63	-	0.36
PVY-T	PVY-T	Over	Over	Over	1.78	Over
	PVY-O	0.45	0.29	0.22	0.29	0.29
PVY-O	PVY-T	1.38	1.13	0.54	0.61	0.16
	PVY-O	1.61	Over	1.97	1.41	1.14
Buffer	PVY-T	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01
	PVY-O	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Control	PVY-T	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02
	PVY-O	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01

Fig. 2. ELISA results of PVY-K reacted with mixed antibodies(PVY-T+PVY-O). Concentration of mixed coating γ -globulin was $7\mu\text{g/ml}$ (PVY-T:PVY-O=1:1). Concentration of enzyme conjugate was $\times 800$.

3. 주위 환경에 따른 PVY의 전염양상

PVY의 진딧물에 의한 전염시기를 조사한 결과 건전포장 및 오염포장에 비래한 바이러스 매개진딧물의 총수는 각각 117 마리와 101마리로서 큰 차이를 나타내지 않았으며, 비래된 매개 진딧물의 종류로는 복숭아혹진딧물과 목화진딧물의 비래율이 80% 이상을 차지하였다.

한편 건전포장과 오염포장내에 4월하순부터 8월하순까지 10일 간격으로 50주의 담배를 각각의 포장에 노출시킨 후, 온실내로 옮겨 PVY의 감염을 조사하였을 때, PVY에 이병된 담배는 온실에 옮기고 약 1주후부터 엽맥괴사, 황화, 왜화, 엽맥녹대 등의 병징이 나타났으며, ELISA검정에 의해 PVY를 확인하였다. 이 실험의 결과 건전포장

및 오염포장에서 2년간 유인식물에 나타난 PVY의 평균 이병율은 각각 1.1% 및 13.7%로 나타나, 주위환경에 따라 현저한 이병율의 차이를 보였다. 또한 PVY의 전염시기를 보면 건전포장과 오염포장 모두 최초 매개진딧물 비래가 5월 하순이었으나, 최초 이병시기는 건전포장에서는 7월 상순(1987년)과 8월 상순(1986년)이었고, 오염포장에서는 6월 중순(1986년)과 6월 하순(1987년)으로 나타나 해에 따라 10일-50일의 큰 차이를 보였다. 또한 바이러스의 이병율도 건전포장에서는 감자의 생육후기인 8월에 가서야 2-6%로 낮게 나타난 반면, 오염포장에서는 6월 하순부터 8월 중순까지 20-30%의 높은 이병율을 보였다.

대관령지역에서 포장주위의 환경 및 비래되는 진딧물의 밀도와 연관시켜 PVY가 최초로 이병되는 시기는 비래되는 진딧물 밀도보다는 감자포장 주위의 환경에 따라 크게 좌우되는 것으로 나타났다. 즉 포장 주위가 건전한 식물체로 둘러싸여 있는 경우에는 7월 상순에서 8월 상순에 처음 발생되었으나, 주위에 PVY의 이병식물체가 존재할 때에는 6월 중순에서 6월 하순에 나타남으로써 PVY의 이병시기가 20일에서 50일 정도 빨라지는 것으로 확인되었다.

4. PVY-K 게놈RNA의 정제 및 외피단백질 유전자의 cDNA 클로닝

순화 PVY-K로부터 게놈 RNA를 정제한 후 자외선 흡광도를 측정하였다. 그 결과 260 nm에서 최고, 232 nm에서 최저치를 나타냈다. 정제된 RNA를 *Hind* III로 절단한 λ DNA를 size marker로 사용하여 1% agarose gel에서 전기영동하여 비교한 PVY-K RNA의 분자크기는 약 9,500뉴클리오티드로 나타났다.

PVY-K RNA의 CP gene에 대한 cDNA를 PCR 반응으로 합성한 결과 약 840bp의 cDNA가 검출되었다. 이 cDNA를 blunt end 시킨 다음 pUC119의 *Sma* I site에 annealing 시킨 후, *E. coli* JM109에 형질전환시킨 결과 11개의 클론이 선발되었고, 이들 각 클론으로부터 alkline lysis법으로 플라스미드를 추출하여 전기영동하였을 때, 2개의 클론(pYK6, pYK17)에서 full length의 cDNA가 삽입된 것을 확인할 수 있었다. 이들 재조합 플라스미드는 *Sac* I과 *Xba* I으로 cDNA를 절단하고 pBR322를 *Alu* I 및 *Hpa* II로 절단한 2종의 size marker를 사용하여 전기영동을 실시하였다. 그 결과 클론 pYK6 및 pYK17에 삽입된 cDNA의 분자크기는 모두 약 840bp로 나타나 full length에 해당하는 PVY-K CP gene의 cDNA가 클로닝된 것이 확인되었다(Fig. 3).

PVY-K RNA의 외피단백질 유전자에 대응하는 cDNA를 합성하는데 있어서 van der Vlugt 등(19)이 보고한 PVY^N의 염기서열 중 외피단백질 유전자의 양 말단 상 하류 부분의 각 20뉴클리오티드에 해당하는 sequence를 primer로 합성하여 PCR 반응을 실시하였다. 그 결과 PVY-K CP gene 부분의 PCR증폭이 성공적으로 수행되었는데 이 primer 부분의 염기서열은 Hataya 등(8)이 PVY-T_{II}계통에 적용하여 cDNA클론을 제조하였으며, Oshima 등(14)도 PVY-O와 PVY-T계통에서 CP gene의 cDNA를 합성하는데 이용하여 모두 만족할 만한 결과를 얻고 있기 때문에, 금후 여러 계통의 PVY CP

gene을 분석하는데 유용하게 활용될 수 있는 sequence로 판단된다.

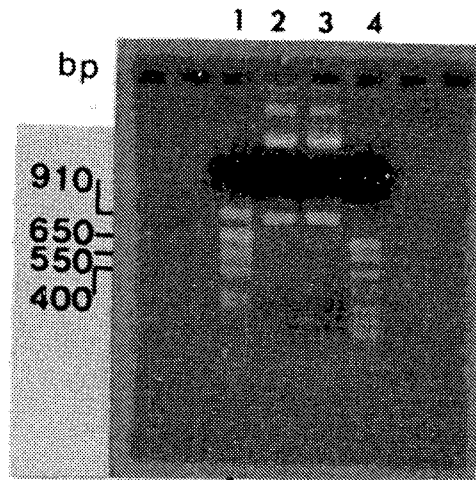


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmids digested with *Xba* I and *Sac* I.

Lanes 1 and 4 : Molecular size marker, pBR 322 digested with *Alu* I and *Hap* II, respectively.

Lanes 2 and 3 : Recombinant plasmid containing cDNAs isolated from pYK6 and pYK17, respectively.

5. PVY-K CP gene의 염기서열

PVY-K CP gene의 염기서열을 분석하기 위하여 클론 pYK17을 이용하였다. pYK17로부터 정제한 플라스미드를 *Sph* I과 *Xba* I으로 절단한 후 exonuclease III로 deletion시켜서 서브클로닝한 결과, 3915bp, 3790bp, 3665bp 및 3540bp의 cDNA로 deletion되어 클로닝된 것이 확인되었다.

이들 deletion된 cDNA의 클론들로부터 플라스미드를 추출하여 CP gene의 염기서열을 결정하였다. 그 결과 결정된 PVY-K CP gene은 CAG(Gln)-GCA(Ala)의 cleavage site에서 시작하여 정지코돈 TGA까지 801뉴클레오티드로 구성되어 있었다(Fig. 4). 이 유전자로부터 산출된 아미노산은 267잔기로 나타났고(Fig. 5), 단백질의 분자량은 34,630 daltons였다. 한편 PVY-K CP gene을 구성하는 각 염기는 A:G:C:U = 267(33.3%):202(25.2%):161(20.1%):171(21.4%)의 비율로 구성되어 있었다. 또한 이들 CP gene이 encode하는 아미노산의 분포는 Ala 22, Thr 20, Glu 19, Gly 18의 순으로 높게 나타났다.

한편 PVY-K CP gene의 염기서열을 기 보고된 PVY 계통들의 CP gene과 비교한 결과 일본에서 보고된 PVY-O, PVY-T 및 PVY-T_{II}계통과 각각 97.3, 88.9 및 89.3%의 상동성을 나타냈고, 네덜란드의 PVY^a과는 89.6%, 그리고 프랑스의 PVY^a과는 98.5%의

	1							21											
PVY-K	GCA	AAT	GAC	ACA	ATT	GAT	GCA	GGA	GGA	AGC	AAC	AAG	AAA						
PVY-O(J)T.	.A.	.T.						
PVY-T(J)	.G.CCT						
PVY-T _H (J)	.G.CT	..CT						
PVY ^N (N)	.G.CCT						
PVY ^N (F)						
	41					61								81					
GAT	GCA	AGA	CCA	GAG	CAA	GGT	AGC	ATC	CAG	TCA	AAC	CCG	AAC	AAA	GGA	AAA	GAT	AAG	GAT
..A	T.	.A.C
...A.	.A.T	..A	..C.	..T	..TCG	.A.	..G	..AC
...A.	.A.T	..A	..C.	..GT	..TCG	.A.	..G	..AC
...A.	.A.T	..ATCG	.A.	..G	..TAC
...A.G	..CC.G
	101					121								141					
GTT	AAT	GCT	GGC	ACA	TCT	GGG	ACA	CAT	ACT	GTG	CCG	AGA	ATC	AAG	GCT	ATT	ACG	TCC	AAA
..GTCC
..GT	..AA	..T	..CA	..C.	..T	..AG.
..GT	..AA	..T	..CA	..A	..C.	..T	..AC
..GT	..AA	..T	..CA	..C.	..T	..AC
...AC
	161					181								201					
ATG	AGA	ATG	CCC	AAA	AGC	AAG	GGA	GCA	ACC	GTG	CTA	AAC	TTA	GAA	CAT	TTG	CTT	GAG	TAT
...TCC
...G	..TTT	..AT	..GC	..A	..C
...G	..TTT	..AT	..GC	..A	..C
...G	..TTT	..AT	..GC	..A	..C
...G	..TTT	..AT	..GC	..A	..C
...C

Fig. 4. Nucleotide sequence of PVY-K coat protein(CP) gene. Different nucleotide sequences of CP of PVY-K gene compare to those of Japan(J), Netherland(N) and France(F) isolates are describe by bold characters.

221	241	261
GCT CCA CAA CAA ATC GAT ATT TCA AAT ACT CGG GCA ACT CAA TCA CAG TTT GAT ACG TGG		
...	...T...	...
... ..G... ..T..C..C... ..A... ..A...		
... ..G... ..T..C..C... ..A... ..A...		
... ..G... ..T..A..C... ..A... ..A...		
... ..T...		
281	301	321
TAT GAG GCA GTG CGG ATG GCA TAC GAC ATA GGA GAA ACT GAG ATG CCA ACT GTG ATG AAT		
...		
... ..A... ..A..AA C.T... ..A... ..A...		
... A.A... ..A..AA C.T... ..A... ..A...		
... ..A... ..A..AA C.T... ..A... ..A...		
...		
341	361	381
GGG CTT ATG GTT TGG TGC ATT GAA AAT GGA ACC TCG CCA AAT GTC AAC GGA GTT TGG GTT		
...		
...		...A...T...
...		...A...T...
...		...A...T...
...		
401	421	441
ATG ATG GAT GGG AAT GAA CAA GTT GAG TAC CCG CTG AAA CCA ATC GTT GAG AAT GCA AAA		
...		...T...
... ..A G... ..C..A... ..A...		
... ..A G... ..C..A... ..A...		
... ..A... ..C..A... ..A...		
... ..T...		
461	481	501
CCA ACT CTT AGG CAA ATC ATG GCA CAT TTC TCA GAT GTT GCA GAA GCG TAT ATA GAA ATG		
... ..C...		
... ..A...		
... ..A...		
... ..A...		
... ..C...		

Fig. 4. Continued

201	211	221	231
G L A R Y A F D F Y E V T S R T P V R R A R E A H I Q M K A A A L K S A Q P R L F			
.....		
S			S
S			S
S			S
.....		

241	251	261
G L D G G I S T Q E E N T E R H T T E D V S P S M H T L L G V K N M		
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		

Fig. 5. Continued

상동성을 보였다(Fig. 8). 또한 이들 각 계통과의 아미노산 배열에 있어서의 상동성은 각각 97.4, 92.5, 92.9, 92.9 및 98.5%를 나타냈다(Fig. 9). 여기에서 특이한 점은 PVY^N계통으로 보고된 프랑스 계통과의 높은 상동성인데, 이는 프랑스 계통의 계통분류에 문제가 있는 것으로 생각된다. 이와 같은 근거는 PVY^N계통에 속하는 PVY-T(일본계)(73), PVY-T₁(일본계)(45) 및 PVY^N(네덜란드)(105) 등의 염기서열과 PVY-K 사이에는 모두 89% 정도의 상동성을 나타내는 특성을 보였기 때문이다. 한편 아미노산의 배열에 있어서도 이들 계통들과의 상동성이 염기서열에서 보인 상동성과 일치하였다.

적 요

이 연구는 우리나라의 감자 무병종서 생산 기술의 개선을 위하여 수행한 기초 연구로서, 씨감자의 주산지인 대관령지역에 있어 감자 Y 바이러스(PVY)의 발생 및 분포를 조사하였으며, 계통분리 및 전염시기 구명 등으로 PVY의 병원학적 특성을 구명하였고, 분리된 PVY계통을 공시하여 PVY의 외피단백질 유전자에 대한 유전자 분석을 실시하였다.

대관령지역에서 발생하고 있는 PVY의 계통은 PVY^O 및 PVY^N계통에 속하는 바이러스로 검정되었으며, 이들 계통의 분포비는 유사하였다. 감자에서의 PVY병징은 주로 모자이크 또는 모자이크와 엽맥괴저가 혼재하는 병징으로 나타났으며, 납작의 경우는 이들 두가지 병징이 비슷하게 분포했으나, 수미는 모자이크 병징이 많았다.

감자에 전형적인 모자이크 병징을 나타낸 수미 품종의 감염주로부터 분리한 PVY는 지표식물 검정 결과, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc, *Physalis floridana*에서는 일본의 PVY-O계통과 유사한 병징을 나타내었으나, *Capsicum annum* cv. Ace에서는 병징을 볼 수 없었다. 또한 단크론 및 다크론 항체를 이용하여 분리된 PVY에 대한 ELISA 검정을 실시한 결과, PVY-O계통의 항체와는 매우 민감하게 반응하였으나, PVY-T계통의 항체와는 반응하지 않았다. 전자현미경에서 관찰된 바이러스 입자는 730×11 nm의 크기로서 사상바이러스였다. 따라서 본 PVY의 계통은 PVY-O계통에 유사한 것으로 판단되었고, PVY-K로 명명하였다.

대관령지역의 PVY 이병시기를 조사한 결과, 매개진딧물의 최초 비래시기는 5월 하순이었으나, 유인식물(담배)의 최초 이병시기는 오염포장에서는 6월 중순이었고 건전포장에서는 7월 상순이었다. 유인식물로 건전포장과 오염포장의 이병율을 조사한 결과 각각 1.1%와 13.7%로 주위환경에 따른 이병율의 차이가 매우 컸다.

담배(*N. sylvestris*)에 증식하여 순화된 PVY-K로부터 게놈 RNA를 정제한 후 agarose gel에서 전기영동하여 측정된 PVY-K RNA의 분자크기는 약 9,500뉴클레오티드로 나타났다. PVY-K RNA의 CP gene에 대한 cDNA를 *E. coli* JM109에 형질전환시킨 결과 2개의 클론(pYK6, pYK17)에서 full length의 cDNA가 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

PVY-K 외피단백질 유전자(CP gene)의 염기서열을 분석하기 위하여 pYK17로부터 정제한 플라스미드를 *Sph* I과 *Xba* I으로 절단한 후 exonuclease III로 deletion시켜서 서브클로닝하였고, 이들 deletion된 cDNA의 클론들로부터 플라스미드를 추출하여 CP gene의 염기서열을 결정하였다. 그 결과 PVY-K CP gene은 CAG(Gln)-GCA(Ala)의 cleavage site에서 시작하여 정지코돈 TGA 전까지 801뉴클레오티드로 구성되어 있었다. 이 유전자로부터 산출된 폴리펩티드의 아미노산 서열은 267잔기로 나타났고, 단백질의 분자량은 34,630 daltons로 산출되었다. 한편 PVY-K CP gene의 염기구성 비는 A:G:C:U=33.3:25.2:20.1:21.4였다. 또한 이들 CP gene이 encode하는 폴리펩티드의 아미노산 분포는 Ala 22, Thr 20, Glu 19, Gly 18잔기 등의 순으로 높게 나타났다. PVY-K CP gene의 염기서열을 기 보고된 PVY계통들의 CP gene과 비교한 결과, 일본에서 보고된 PVY-O, PVY-T 및 PVY-T_H계통과 각각 97.3, 88.9 및 89.3%의 상동성을 나타냈고, 네덜란드의 PVY^N과는 89.6%, 그리고 프랑스의 PVY^N과는 98.5%의 상동성을 보였다. 한편 이들 각 계통과 PVY-K의 아미노산 배열의 상동성은 각각 97.4, 92.5, 92.9, 92.9 및 98.5%였다.

참 고 문 헌

1. 한국 식물보호학회. 1986. 한국 식물병. 해충. 잡초명감(개정판). 한식보학회간.
2. 정승룡, 함영일, 박영섭. 1983. 감자의 년차별 퇴화와 각종 바이러스병의 수량감수

- 에 관한 연구. 고시연보:105-111.
3. Darby, J. F. and Larson R. H. 1951 Variation in virulence of naturally occurring strain of potato virus Y. Amer. Potato J. 28:561-562.
 4. De Bokx, J. A. and Piron, P. G. M. 1978. Transmission of potato virus YC by aphids. Proceedings 7th Triennial Conference of the European Association for Potato Research (Warsaw). pp. 244-245.
 5. De Bokx, J. A. and Huttinga, H. 1981. Potato virus Y. CMI/AAB description of plant viruses. No. 242(No. 37 revised).
 6. FAO. Production year book. 1991.
 7. Gubler, U. and Hoffman, B. J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25:263-269.
 8. Hataya, T., Sano, T., Ohima, K. and Shikata, E. 1990. Polymerase chain-reaction-mediated cloning and expression of the coat protein gene of potato virus Y in *Escherichia coli*. Virus Genes 4(4):339-350.
 9. Holmes, D. S. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114:193-197.
 10. Hooker, W. J. 1981. Compendium of potato diseases. The American Phytopathology Society.
 11. Klinkowski, M. and Schmelzer, K. 1959. A necrotic type of potato virus Y. Amer. Potato J. 37:221-228.
 12. Kushner, S. R. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with *ColE1* derived plasmids. In Genetic Engineering. (eds.)Boyer, H. W. and Nicosia, S. pp. 17-23. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
 13. 농림수산부, 작물통계. 1992.
 14. Oshima, K., Hataya, T., Sano, T., Inoue, A. and Shikata, E. 1991. Comparison of biological properties, serological characteristics and amino acid sequence of coat protein between potato virus Y ordinary strain and necrotic strain. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57:615-622.
 15. Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudadizin, G., Astier-Manificier, S. and Casse-Dilbart, F. 1989. Nucleotide sequence of Potato Virus Y(N strain) genomic RNA. J. Gen. Virol. 70:935-947.
 16. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.
 17. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5643-5647.
 18. 宇田川晃. 都丸敬一. 1972. 香川縣のタバコに發生したジャガイモYウイルスの新 系

統. 日植病報 38(3):210(講要).

19. van der Vlugt, Allefs, R., S., de Haan, P. and Goldbach, R. 1989. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of Potato Virus Y^N RNA. J. Gen. Virol. 70:229-233.