

제 2 강연장

1. 벼오갈병 바이러스 게놈의 cDNA 크로닝, 분리주간의 게놈비교 및 비구조단백질에 관한 연구

이 봉 춘

원예연구소 원예환경과

한국 및 외국의 벼오갈병 (Rice Dwarf Virus, RDV) 분리주에 대한 게놈 RNA의 상동성을 조사하기 위해 polyacrylamide gel 전기영동 (PAGE)과 dot blot hybridization을 실시하였다. 우선 RDV 전 게놈 segment에 대한 full-length cDNA 크론을 제작하였다. S2, S3, S5~S12는 RDV-AN1을 S1, S4는 RDV-H를 이용하여 full-length cDNA 크로닝을 실시하였다. S3~S12까지의 cDNA합성은 게놈 dsRNA의 역전사-PCR법 (RT-PCR)에 의해 실시하였다. RDV-H의 염기배열을 기초로하여 제작한 3'말단 primer를 사용하여 역전사 반응에 의해 cDNA을 합성하고, 5'와 3'말단 primer를 사용하여 PCR에 의해 cDNA를 증폭하였다. Agarose gel 전기영동에 의해 확인한 결과, S3~S12 segment의 full-length에 대응하는 band가 확인되었다. S4, S6~S12의 cDNA 크로닝은 RT-PCR산물을 PCR 반응에 사용한 primer에 부착한 제한효소로 절단하여, 같은 제한효소로 처리한 plasmid vector pUC119에 삽입하였다. S3과 S5의 cDNA 크로닝은 RT-PCR에 의해 얻어진 cDNA에 poly dC쇄를 부가하여, 이것을 Pst I 부위에 poly dG쇄를 부가한 plasmid vector pUC9에 anneal시켜 full-length cDNA을 삽입하였다. S2는 3,512 염기로 매우 길어서 RT-PCR에 의해 full-length의 증폭이 불가능하였기 때문에, cDNA합성은 RDV-H의 염기배열에 의해 예상되는 5'말단으로부터 약 1,800 염기에 있는 제한효소부위 *Hin* dIII를 이용하여 *Hin* dIII의 상류와 하류부분으로 나누어서 RT-PCR을 행하였다. cDNA 크로닝은 *Hin* dIII의 상류와 하류부분의 RT-PCR산물을 plasmid vector Bluescript II SK-와 pUC119에 삽입하였다. *Hin* dIII 하류부분을 Bluescript II SK-에 삽입하는것에 의해 full-length cDNA을 크로닝하였다. S1은 Gubular & Hoffman에 의해 얻어진 5'말단이 부족한 cDNA를 가진 plasmid pRDT19에 RT-PCR에 의해 증폭한 5'말단의 800 염기를 삽입하는것에 의해 full-length cDNA를 크로닝하였다.

S1~S12의 full-length 크론으로부터 비구조단백질을 코드하는 S4, S6, S10, S11, S12에 대한 크론을 이용하여 full-length cDNA probe와 S12의 변이영역의 probe를 제작하였다. 그리고 각각의 분리주로부터 추출한 게놈 RNA와 hybridization을 실시하였다. 또한 S12의 probe를 사용하였을 경우 분리주간에 차를 나타낸 몇개의 분리주에 관해서는 S12의 해석을 실시하여 염기배열 수준에서의 변이를 조사하였다. 그리고 S12의 염기배열로부터 예측되는 아미노산배열에 의해 계통주를 작성하였다. 일본과 외국(필리핀, 네팔, 중국, 한국)의 분리주를 이용하여, 게놈 RNA의 PAGE에 있어서 이동도에 의한 분리주의 식별을 실시하였다. 그결과, 전부 같은 영동패턴을 나타내는 분리주는 존재하지 않

고, 같은 채집지에 있어서도 분리주의 계놈 영동패턴은 달랐다. 국별로 비교한 결과 한국의 분리주는 중국, 네팔, 필리핀주에 비교하여 일본의 분리주에 닮은 영동패턴을 나타내었다. 비구조단백질을 코드하는 S4, S6, S9, S10, S11, S12의 full-length cDNA 크론을 사용하여, full-length cDNA probe를 제작하였다. 제작한 cDNA probe를 사용하여, 각 분리주로부터 추출한 계놈 RNA와 dot blot hybridization을 실시하였다. 그결과 S12의 probe를 사용한 결과 일본의 분리주가 외국의 분리주보다 시그날이 상대적으로 강하게 검출되어, 일본과 외국의 분리주간의 식별이 가능하였다. 수 분리주의 S12의 염기배열의 비교로부터 변이가 많은 영역(283~381염기)에 관하여 분리주 AN1에 의해 probe를 제작하여 각분리주로부터 추출한 계놈 RNA와 dot blot hybridization을 실시한 결과, 일본, 한국의 분리주와 필리핀, 네팔, 중국의 분리주 사이에 식별이 가능하였다. 한국과 네팔의 분리주 (RDV-KOR1, RDV-NEL19) S12를 크로닝하여, 전염기배열의 해석을 실시하였다. 전염기수는 둘다 1,066으로서 P12, P12OPa 및 P12OPb 세개의 단백질을 코드하는 ORF의 개시코돈 및 정지코돈이 보존되어 있었다. RDV-H와 염기배열의 상동성을 비교한 결과, RDV-KOR1에서 96.1%, RDV-NEL19에서는 95.4%의 상동성을 나타내었다. RDV-KOR1과 RDV-NEL19의 S12의 염기배열로부터 예상되는 아미노산배열은 P12, P12OPa, P12OPb의 3개의 ORF가 보존되어 있었다. RDV-H와 비교한 결과, P12에서 RDV-KOR1은 94.2%, RDV-NEL19는 91.1%를 나타내고 OPa에서는 RDV-KOR1, NEL19 모두 96.8%를 나타내었다. RDV-KOR1은 18군데, RDV-NEL19에서는 25군데 변이가 있었다. 각분리주의 염기배열과 아미노산배열을 각각 상대적으로 비교한 결과, 일본과 한국분리주간의 상동성이 일본과 네팔, 중국, 필리핀주간의 상동성보다 높게 나타났다. S12의 부분적인 probe제작에 사용한 영역(283~381염기)의 염기배열을 RDV-H와 비교한 결과, AN1은 5군데, KOR1은 4군데, CK18은 9군데, NEL19는 12군데, P는 9군데의 변이가 있었다. 수분리주의 P12를 사용하여 계통수를 제작하여, 유연관계를 분석한 결과, 한국분리주는 일본분리주와 같은그룹을 형성하고, 다른 외국의 분리주보다 일본분리주와 가깝게 나타났다.

S12가 코드하는 단백질 P12에 대한 항체를 사용하여 감염세포중에서 P12의 발현을 조사하였다. S6에 관해서 발현 plasmid vector 내에서 S6이 코드하는 단백질 P6을 발현시켜 항체를 제작하여 감염세포내에서 P6의 발현을 조사하였다. 본연구에서 제작한 RDV-AN1의 S6의 full-length cDNA 크론을 주형으로하여, P6 ORF의 개시코돈으로부터 계놈 3'말단까지의 cDNA를 제작하여, pMAL-c2의 EcoR I, Pst I 부위에 삽입하였다. pMAL-c2에 크로닝한 S6의 ORF로부터 P6을 MBP와 P6의 융합단백질로서 발현시켰다. MBP-P6에 대한 항혈청을 제작하여 western blot 로서 발현단백질의 반응을 조사한 결과, P6의 발현단백질 및 pMAL-c2에 유래하는 MBP- β -gal- α 융합단백질에 반응하였다. 그것으로부터 항 MBP-P6 혈청에서 MBP에 대한 항체와 P6에 대한 항체의 존재를 확인하였다. P6과 P12의 항체를 사용하여 금입자에 의한 immunolabeling을 실시하여, 면역전자현미경법에 의해 감염세포로부터 P6 및 P12의 발현을 조사하였다. 그결과 금입자가 세포소기관 또는 바이러스입자에 특이적으로 반응하지 않고, 세포질전체에서 관찰되었다. 이것으로부터 P6 및 P12는 세포질전체에 산재하여 있는것으로 결론하였다.

2. 배나무잎 검은점병(구:이상반점증상)의 병원 및 발생생태

남 기 응

농업과학기술원 작물보호부 식물병리과

한국에서 배는 국제 경쟁력 있고 수출도 유망한 중요한 과수중의 하나다. 그런데 1970년대 후기부터 일부 농가에서 배나무 잎에 원인불명의 흑색반점이 발생하여 문제가 되어 왔다. 최근에는 전국의 과수원에 만연하여 재배농가에 큰 피해를 주고 있다. 따라서 본 연구에서는 본 병의 원인구명과 방제대책을 개발하기 위해 발생상황과 피해, 발생요인을 다각적으로 검토하였고, 실용적인 방제대책 기술을 확립하였다.

본 병은 5월 중순경부터 단과지에는 어린잎을 제외하고 성엽의 경화한 잎에, 도장지에는 기부의 경화된 잎에 한하여 발생이 시작된다. 6월 중순경이면 발생 최성기에 도달한다. 증상은 초기에 잎전체에 황색반점이 다수 발생한 후 적자색으로 변하고 급속히 흑갈색으로 변한다. 최후에는 회백화하여 엽육조직이 붕괴되고 함몰하여 구멍이 나기도 한다. 피해는 재배면적이 가장 많은 신고에서 가장 크다. 전국 발생주율은 평균 23%에 달하며, 발생주는 건전주에 비하여 수량이 약 49% 감소하고, 과실의 품질에서도 당함량이 낮고 산함량이 높다.

본 병과 검은무늬병과의 관계를 구명하기 위하여 검은점병 병반으로부터 균을 분리한 결과 주로 *Alternaria* spp.가 분리되었다. 그러나 신고에서 분리한 균에는 신고와 이십세기에서 병원성이 없었고 이십세기에서 분리한 균은 신고에는 병원성이 없었으나 이십세기에는 강한 병원성을 나타내었다. 따라서 신고에서 분리한 균은 부생균으로 판단되고 이십세기에서 분리한 균은 *A. Kikuchiana*로 동정되었다.

검은점병을 일으키는 요인을 조사하기 위해서 토양수분을 건조 및 과다상태에 재배하고, 발생주의 토양과 건전주의 토양의 이화학성을 분석한 결과 토양요인과 발생과는 관계가 없었다. 발생주의 발병엽과 건전주의 건전엽을 무기분석한 결과에서도 양자간에 차이가 없었다. 또한 pH 3.0~6.0의 인공산성비를 살포하였어도 피해가 발생하지 않았다.

본 병은 6월이 발생최성기로 7월 중순부터 고온기에는 발생이 대체로 중단된다. 또한 비닐로 비가림 재배를 하면 발생율이 14~36%까지 저하된다. 가지를 유산봉지로 피복하여도 발생이 저하되었다. 또 봉지 종류별로 피복해도 같은 결과였다. 이때 봉지내의 온도는 노지보다 43.3℃~47.9℃까지 상승하였다. 본 병의 병징이 발현하는 가장 좋은 온도는 주간 23℃/야간 18℃였다. 또한 발생주의 도장지를 채취하여 수습한 후 잎이 완전히 전개한 후 주간 23℃/야간 18℃의 인공 기상실에 배양하면 병징이 발현하였다. 그러나 건전지의 수습에서는 발현하지 않았다.

본 병의 전염방법을 밝히기 위해서 배 실생대목에 발생지 및 건전지를 2중접목한 결과 발생지는 물론 건전지에도 검은 반점이 발생하였다. 또한 발생주와 건전주를 기부에 설접을 하였어도 양방 공히 발병하였다.

검은점병의 지표식물을 선발하기 위하여 본 병에 이병성 품종을 양친으로 교배를 하였다. 실생계통 중에서 본 병에 아주 민감하게 반응하고 또 본 병과 비슷한 검은무늬병에 대해서는 저항성 계통 선발시험을 하였다. 그 결과 신고×조생적 조합인 86-2-2 계통을 지표식물로 선발하여 PS-95로 명명하였다. PS-95를 이용하여 본 병의 보독의 유무를 판별할 수 있는 검정방법을 개발하였다. 즉, 3월 하순에 2중삭아접목방법으로 적어도 1일 이상의 접촉시간이 경과해야 병징이 발현하였다.

병원바이러스를 동정하기 위해 초본식물인 *Chenopodium quinoa* 등 21종에 즙액접종한 결과 병징은 나타나지 않았다. 본 병을 접목접종한 PS-95의 잎을 전자현미경으로 세포를 검정한 결과 긴 굴곡성의 유사 바이러스 입자가 집단으로 존재하고 있는 것을 확인하였다. 이 입자의 직경은 12nm 였다. 이병세포내에는 바이러스 입자외에 섬유사를 함유한 소포가 tonoplast에 형성하고 있었다. 이 바이러스는 세포병리학적 특징으로 볼 때 capillovirus의 하나로 생각되어 진다.

본 병에 대한 방제대책으로 본 병에 저항성이고 품질이 우수한 수황배와 감천배를 선발하였다. 신고 이병주에는 이들의 품종으로 고접갱신하면 방제가 가능하다. 또한 PS-95를 이용해서 현지 농가의 과수원에 본 병의 무병주를 선발하였다. 또한 열처리에 의하여 본 바이러스병의 무독개체를 얻었다. 묘목생산에 있어서 무병묘의 생산 시스템이 확립할 필요가 있다고 생각되어 진다.

3. Identification of Host Range Determinant for Infection of Maize and 3a Movement Protein Sequences Affecting Host Range and Virus Movement of Cucumber Mosaic Virus

Ki Hyun Ryu

Graduate School of Biotechnology
Korea University, Seoul 136-701, Korea

Cucumber mosaic virus (CMV), a type species of the Cucumovirus genus, is a positive-sense, RNA virus with a divided genome, expressing five proteins from the three genomic and two subgenomic RNAs. RNAs 1 and 2 are required for replication while RNA3 encodes two proteins, the 30kDa 3a protein (movement protein) and 25kDa 3b protein (coat protein), both of which are involved in virus movement. The numerous strains of CMV have a collective host range of over 885 species in 65 families, including monocotyledonous as well as dicotyledonous plants. Some strains of CMV are able to infect maize. We focused to identify the viral sequences involved in resistance in maize to the M-strain of CMV and analyzed the nature of the mechanism of this resistance. The movement of most plant viruses within their hosts involves several distinct stages. Depending on the virus system, plant viruses encode one to five proteins involved in virus movement. For some viruses, the coat protein of the virus as well as movement protein (MP) is involved in the virus movement. In spite of the seeming multiplicity of forms of movement, MPs show similar characteristics whether or not they share the same requirements for cell-to-cell and long-distance movements. Models for the movement of viral genomes from site of replication (or assembly) to adjacent cells have been proposed, but there are still many unanswered questions, including why some viruses seem to have elements of different mechanisms of movement. CMV requires the coat protein along with the 3a protein for viral cell-to-cell movement, in contrast to tobacco mosaic virus (TMV), where only 30K protein is needed for the movement. On the other hand, in contrast to some other viruses that require the coat protein for movement, CMV does not induce tubular structures protruding from the cell membrane during infection. Here, we mapped 3a MP sequences affecting pathogenicity and virus movement by alanine-scanning mutagenesis.

I. The coat protein gene is a host range determinant for infection of maize in cucumber mosaic virus

Resistance to plant viruses occurs at several levels : activation of a hypersensitive response, inhibition of virus replication, and inhibition of cell-to-cell (local) and long

distance (systemic) movements. Infection of maize by the Fny strain of CMV and resistance against infection by the M strain of CMV were mapped to the coat protein gene on RNA3 of CMV, using biologically active cDNA clones for the both strains by the pseudorecombination, chimeras and site-directed mutations. Changes in the coat protein gene of M-CMV RNA3 at both positions 129 (Leu to Pro) and 162 (Thr to Ala) were required to overcome the resistance against M-CMV in maize plant. Resistance to M-CMV in maize was correlated with an inability to detect virus accumulation in the inoculated leaves. Since the coat protein of CMV is involved in virus movement, but not virus replication, the data suggest that the resistance in maize to M-CMV is due to the inability of the M-CMV coat protein to promote the cell-to-cell movement of CMV in maize.

II. Identification of 3a movement protein sequences affecting host range and virus movement of cucumber mosaic virus

To ascribe particular functions to specific sequences of the CMV 3a MP, we have constructed a series of alanine-scanning mutants in the 3a gene of the Fny-strain of CMV. Nine alanine-scanning mutants of the CMV MP, M1-M9, were assessed for their effects on the properties of the mutated virus or the altered MP *in vivo*. Mutants M4, M5, M6 and M7 were unable to promote movement in any of 8 host species tested ; however, mutants M4, M5 and M6 could be complemented for movement in transgenic tobacco expressing the CMV MP. None of the four movement-defective mutants could be complemented for cell-to-cell movement in TMV MP-transgenic tobacco. Mutant M7 could replicate and accumulate in tobacco protoplasts, indicating that this mutant was *cis* dominant for inhibition of virus movement. Mutant M8 affected movement and activation of a hypersensitive response in two plant species, but did not affect movement in 6 other hosts. Mutant M9 was temperature-sensitive for long-distance movement in tobacco, but not for cell-to-cell movement. This confirms previous experiments indicating a role for the CMV MP in long-distance as well as cell-to-cell movement.