

마(*Dioscorea opposita*)에 발생한 *Japanese yam mosaic virus* 진단 및 염기서열 분석

Diagnosis and Sequence Analysis of *Japanese yam mosaic virus* from Yam (*Dioscorea opposita*)

이중환^{1*} · 손창기¹ · 권중배¹ · 남효훈¹ · 김영태¹ · 김미경² · 이수현³

¹경상북도농업기술원 생물자원연구소, ²농촌진흥청 국립농업과학원, ³경북대학교 응용생명과학부

Joong-Hwan Lee^{1*}, Chang-Gi Son¹, Joong-Bae Kwon¹, Hyo-Hun Nam¹,
Yeong-Tae Kim¹, Mi Kyeong Kim², and Su-Heon Lee³

¹Institute for Bioresources Research, Gyeongsangbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Andong 36614, Korea

²National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

³School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

*Corresponding author

Tel: +82-54-859-5123

Fax: +82-54-859-7212

E-mail: ljh8888@korea.kr

We surveyed the occurrence of *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) on Yam in Gyeongsangbuk-do province from 2013 to 2015. The symptoms of JYMV were yellow stripes and chlorosis in yam leaves and the infection rate was ranged from 33.6% to 40.8%. We determined nucleotide sequence encoding the polyprotein of JYMV isolate BRI from yam leaves using next-generation sequencing (NGS) method. The partial nucleotide portion (7,736 nucleotides) of the genomic RNA of the JYMV isolate BRI has been sequenced (accession No. KU309315). The region sequenced includes a single open reading frame (ORF) encoding a polyprotein composed of 2,497 amino acids containing the coat protein (CP) and 3' untranslated region (UTR). The genomic organization of this isolate shows almost the same to that of other members of JYMV. The JYMV isolate BRI showed 77% to 79% nucleotide identity with the Japanese and Chinese strains and isolates. This is the first report of the genome nucleotide sequence of JYMV from *Dioscorea opposita* in Korea.

Keywords: *Dioscorea opposita*, *Japanese yam mosaic virus*, Sequence analysis

Received August 26, 2016

Revised October 26, 2016

Accepted November 7, 2016

마(Yam)는 다년생 덩굴식물로 괴경을 식용으로 하거나 한약재로 이용되어 왔으며 최근에는 기능식품으로서의 효용이 높고 경제적 가치 또한 높다. 마의 경제적 가치를 저하시키는 요인으로 바이러스 감염이 큰 비중을 차지하는데 바이러스 감염으로 인해 30%~40%의 감수와 국내 재배마의 60%~100%가 바이러스에 감염되어 있는 것으로 보고하고

있다(Kang 등, 2003). 바이러스 감염 증상으로는 모자이크나 괴저병징을 나타내고 잎의 변형이 일어난다. 마에 발생하는 바이러스는 *Broad bean wilt virus* (BBWV) (Kobayashi 등, 1999; Kwon 등, 2016), *Chinese yam necrotic mosaic virus* (ChYNMV) (Fukumoto와 Tochiara, 1978), 그리고 *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) (Kondo 등, 2002; Lan 등, 2015)가 보고되고 있으며 단일 및 복합감염 형태로 나타난다. JYMV는 *Potyvirus*속(Kenyon 등, 2001)에 속하며, 1999년 Fuji와 Nakamae (1999)가 일본 마에서 최초로 분리하여 완전한 게놈 염기서열을 결정하고 명

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

©The Korean Society of Plant Pathology

©This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

명하였다. 게놈 구조는 *Potyvirus*속의 다른 종과 유사하고 9개의 바이러스 단백질분해효소 절단 부위를 나타내며 1개의 open reading frame (ORF)을 지니고 *Yam mosaic virus* 및 14종의 *Potyvirus*와 44%–59%의 낮은 아미노산 상동성을 나타낸다(Fuji와 Nakamae, 1999). 최근 중국의 JYMV-CN 분리주는 기존 일본 분리주와는 게놈의 상동성이 74% 정도로 나타나는데, 이는 분화과정 중 나타나는 변이주라는 것을 제시한다(Lan 등, 2015). 본 연구는 PCR에 의한 마 바이러스 진단으로 JYMV의 감염 여부를 파악하여 마 재배지에 광범위하게 감염되어 지속적으로 피해를 나타낼 수 있을 것으로 판단되는 JYMV의 마 재배지에서의 발생 실태를 조사하였으며, 마에서 JYMV 게놈의 부분 염기서열을 결정하여 동정하고 그 특성을 밝힌 결과를 최초로 보고하는 것이다.

병징 및 발생현황. JYMV의 전형적인 병징은 잎과 엽맥에 부정형의 황화증상이 나타나는 것으로 정식 50일 후부터 나타났다(Fig. 1). 2013년부터 2015년까지 3년간 경북 안동 지역에서 JYMV 발생현황을 종 특이적인 primer로(forward: 5'-TTGGCTAACACAAGGGCTAC-3', reverse: 5'-AAATCAAACGCATAGCGAGC-3') 제작하여 진단한 결과 33.6%–40.8% 정도의 감염률을 보였다(Table 1, Fig. 2).

염기서열 분석. JYMV의 유전체 정보를 확보하기 위해 차세대염기서열 분석법(next-generation sequencing, NGS)으로 transcriptome 데이터를 확보하고 분석하였다. 이를 위해 경북 안동의 마 재배지에서 바이러스 이병된 마 잎을 무작위로 채취하여 TRI reagent (Molecular Research Center)로 total RNA를 분리하고 Ribo-Zero rRNA removal kit (Epicentre,

Madison, WI, USA)로 rRNA를 제거한 후 TruSeq RNA sample prep kit (Illumina, San Diego, CA, USA)로 cDNA library를 구축했다. 구축된 library의 크기와 순도는 BluePippin 2% agarose gel cassettes (Sage Science, Beverly, MA, USA)와 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 측정했다. Illumina HiSeq 2500으로 raw 데이터를 생산하고 read들을 contig로 어셈블리하는 과정을 진행하고 염기서열 유사도 검색을 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 데이터베이스를 이용하여 contig들을 annotation하였다.

NGS를 실시하여 어셈블리된 염기서열을 동정하기 위해 NCBI 데이터베이스를 검색한 결과, 게놈이 완전 해독된 JYMV 분리주들과 77%–79%의 염기서열 유사도와 100% query coverage를 나타내어 이 연구에서 염기서열을 결정된 분리주가 JYMV임을 확인하였다. 염기서열이 결정된 영역은 완전하게 해독된 JYMV 분리주 WX3 (accession No. KJ78919), SG1 (accession No. KJ789140), WX1 (accession No. KJ789138)의 genome과 비교했을 때 5' 말단으로부터 약 2 kb 위치에서 3' 말단까지 matching되며 7,736개의 nucleotide로 기 발표된 genome 길이 약 9.7 kb (Fuji와 Nakamae, 1999; Lan 등, 2015)보다 2 kb 단축된 것으로 5' 영역을 완전하게 해독하지 못하였으나 이 염기서열을 JYMV isolate BRI로 명명하고 GenBank에 등록하였다(accession No. KU309315). 염기서열 구조는 2,497개의 아미노산으로 구성된 1개의 긴 ORF를 이루며 3' 말단 영역에 외피단백질 도메인과 207개의 nucleotide로 구성된 3' UTR, 5' 말단 영역에 helper component proteinase 도메인

Table 1. Detection rate of JYMV on Yam in Gyeongbuk province from 2013 to 2015

Year	No. of samples	Detection rate of JYMV (%)
2013	30	40.0
2014	250	33.6
2015	250	40.8

JYMV, Japanese yam mosaic virus.

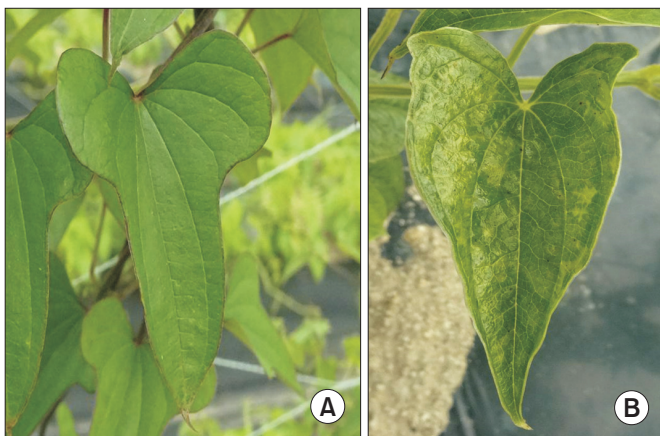


Fig. 1. Symptoms of virus disease in yam leaves. (A) Healthy. (B) Yellow stripes and chlorosis.



Fig. 2. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-PCR. M, molecular weight marker 100 bp ladder; 1–11, sample; P, positive control; N, negative control.

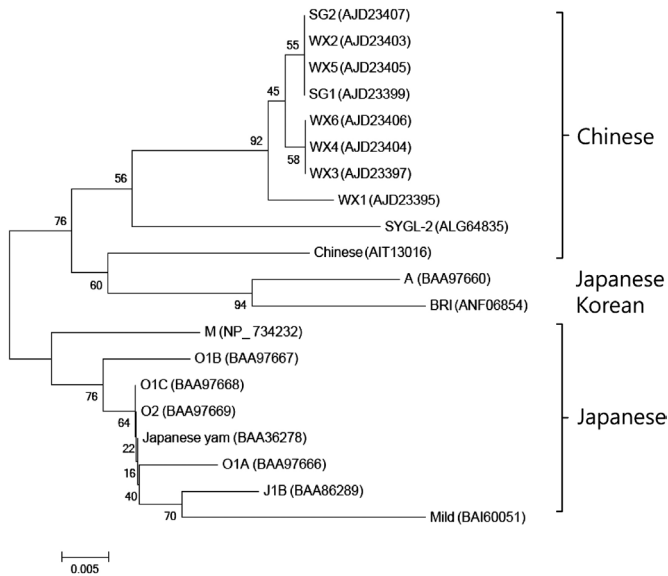


Fig. 3. Phylogenetic relationship among the coat protein amino acid sequences of various *Japanese yam mosaic virus* strains and isolates. The sequences was analysed using the neighbor-joining method and the numbers on the nodes represent the percentage of 1,000 bootstrap replications. The GenBank accession numbers are given in parentheses.

이 존재하며 기 보고된 JYMV의 isolate (Fuji와 Nakamae, 1999) 계통의 단백질 도메인 배열 구조와 일치하였다.

유연관계 분석. 유연관계 분석을 위해 NCBI의 GenBank 에 등록된 JYMV 19개 분리주와 BRI 분리주의 외피단백질 (ANF06854) 영역의 아미노산 서열을 MEGA 6 프로그램을 이용하여 Clustal W로 서열정렬을 하고 계통분류 작성을 위해 neighbor-joining method, 정확성은 bootstraps 값을 1,000으로 설정하여 phylogenetic tree를 작성하였다. 분석결과, 일본 분리주 JYMV strain A (BAA97660)를 제외한 중국과 일본 계통 간에는 뚜렷하게 구분되는 2개의 cluster를 형성하였으며, 분리주 BRI는 이들 두 계통과 달리 일본 분리주 JYMV strain A와 BRI의 계통적 유연관계가 가장 높게 나타났다(Fig. 3). Polyprotein 전체 염기서열 유사도는 77%–79%로 나타났는데 이는 중국과 일본 계통과 다른 한국 계통(isolate BRI)이 존재할 가능성이 있으나 5' 말단부에 대한 완전해독과 더불어 정밀한 분석이 필요하다. 외피단백질 영역의 아미노산 서열은 90%–96%의 유사도를 보였고 염기서열은 85%–89%의 유사도를 나타냈다.

추후 BRI 분리주의 5' 말단에 대한 완전한 염기서열 해독으로 확보되는 유전체 정보는 다기능 진단 프라이머 제작과 정밀 진단에 의한 정확한 발생실태 조사 및 무병주 검증에

유용하게 활용될 것으로 판단한다.

요약

JYMV에 감염된 마는 잎과 엽맥에 부정형의 황화증상을 나타내었고, 마 주산단지인 경북 안동지역에서 조사한 결과 33.6%–40.8%의 감염률을 나타냈다. 마에 발생하는 JYMV 분리주 BRI 계통의 polyprotein을 코딩하는 영역에 대한 염기서열을 결정하고 이를 JYMV isolate BRI로 명명하고 GenBank에 KU309315로 유전자 등록을 하였으며, 외피단백질 영역에 대한 유연관계 분석에서 대부분의 일본이나 중국과 분리주와는 다른 유연관계를 보이는데 이것은 분화 과정 중에 나타나는 변이주 가능성이 제시되나 추후 광범위한 조사를 통한 정밀한 분석이 필요하다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ01011310)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

Fuji, S. and Nakamae, H. 1999. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a *Japanese yam mosaic virus*, a new potyvirus in Japan. *Arch. Virol.* 144: 231-240.

Fukumoto, F. and Tochihara, H. 1978. *Chinese yam necrotic mosaic virus*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 44: 1-5. (In Japanese)

Kang, D. K., Kondo, T., Shin, J. H., Shin, H. Y., Sung, J. H., Kang, S. G. and Chang, M. U. 2003. *Chinese yam necrotic mosaic virus* isolated from Chinese yam in Korea. *Res. Plant Dis.* 9: 107-115. (In Korean)

Kenyon, L., Shoyinka, S. A., Hughes, J. D. A. and Odu, B. O. 2001. An overview of viruses infecting *Dioscorea* yams in sub-Saharan Africa. *Plant Virol. Sub-Saharan Afr.* 432-439.

Kobayashi, Y. O., Nakano, M., Kashiwazaki, S., Naito, T., Mikoshiba, Y., Shiota, A., Kameya-Iwaki, M. and Honda, Y. 1999. Sequence analysis of RNA-2 of different isolates of *Broad bean wilt virus* confirms the existence of two distinct species. *Arch. Virol.* 144: 1429-1438.

- 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. Phytopathol.* 68: 239. (In Japanese)
- Kwon, S. J., Cho, I. S., Yoon, J. Y., Choi, S. K. and Choi, G. S. 2016. First report of *Broad bean wilt virus 2* in *Dioscorea opposita* Thunb. in Korea. *Plant Dis.* 100: 538.
- Lan, P., Li, F., Wang, M. and Li, R. 2015. Complete genome sequence of a divergent strain of *Japanese yam mosaic virus* from China. *Arch. Virol.* 160: 573-576.