최 종
연구보고서

T00007666

G0VP1200628665

과수바이러스 (ASGV-K) 매개 및 전이기작 구명에 의한 방제기술 개발에 관한 연구

Development of fruit virus protection approaches by investigation of fruit virus (ASGV-K) mediation and transmission mechanism

성 균 관 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “과수바이러스 (ASGV-K) 매개 및 전이기작 구명에 의한 방제기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 12 일

주관연구 기관명 : 성 균 관 대 학 교
총괄연구 책임자 : 이 석 찬
세부연구 책임자 : 이 석 찬
연 구 원 : 심 혜 경
연 구 원 : 황 현 식
연 구 원 : 최 승 호
협동연구 기관명 : 농 촌 진 흥 청
협동연구 책임자 : 지 형 진
연 구 원 : 이 수 헌
연 구 원 : 심 창 기
연 구 원 : 한 지 선

요 약 문

Ⅰ. 제 목

과수바이러스(ASGV-K) 매개 및 전이기작 구명에 의한 방제기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

이제까지 국내에서 수행되거나 현재 진행 중인 식물바이러스에 관련된 연구는 대부분이 특정 바이러스의 분리 동정과 일부 바이러스의 유전자 특성 연구 및 바이러스 저항성 유도와 관련된 연구에 맞춰져 있다. 본 과제에서는 이러한 흐름에서 탈피하여 **과수 바이러스를 전파하는 매개체와 중간기주를 밝히고 전염기작에 관한 분자생물학적/생태학적 연구를 수행하여 식물 바이러스 연구의 새로운 방향을 제시**하고자 한다. 이에 기초하여 새로운 개념의 바이러스 방제기법을 제시하고 이 기술을 실용화 할 수 있는 방안을 마련함으로서 농가의 소득증대에 기여하고자 한다.

과수 바이러스는 기주의 특성 상 연구에 많은 제약이 따르기 때문에 분자 수준에서의 바이러스 특성 분석과 효과적인 바이러스 진단 기술에 관련된 내

용이 연구의 주를 이루고 있다. 바이러스의 전이에 관련한 연구는 더욱 적어 접목에 의한 사례는 일부 문헌으로 보고 되어 있으나 매개체에 의한 전이 사례는 많지 않다. 과수 바이러스는 감염 후 병징의 발현까지 상당한 시간이 소요되기 때문에 감염 여부를 확인하는 것이 쉽지 않고, 한 번 발병하면 회복이 되지 않아 기타 어떠한 작물보다 방제라는 측면이 더욱 중요하다. 무병주를 선별하였다 하더라도 바이러스 매개체를 통한 포장에서의 감염 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 이 분야의 연구는 전 세계적으로도 아직 체계적인 연구 보고가 없으므로 바이러스 전이 과정 분석 뿐 아니라 방제대책 수립을 위해서도 매개체에 대한 연구가 필요하다.

원예 초본성 바이러스와 달리 과수 바이러스에 관한 연구는 기본적으로 바이러스 저항성 및 방제 법에 대한 접근법이 상이하므로 과수 바이러스에 적절한 체계적 연구가 필요하다. 과수 바이러스의 경우 초본 기주식물과 달리 유전공학적 기법 도입이 어려워 육종과 약독바이러스를 활용하는 방법으로 저항성 품종을 개발하고 있는 실정이다. 근본적으로는 바이러스의 전염을 차단하는 것이 가장 중요하다고 할 수 있다. 따라서 바이러스 전이 매개체에 대한 이해는 효과적인 바이러스 방제대책의 근본적 제안으로 실용적 방안의 도출이 가능하다.

해외에서 새롭게 개발된 과수 품종이 정상적인 유통 경로를 거치지 않고 국내 농가에 보급되는 경우가 있다. 이 때 묘목과 함께 해외 과수 바이러스가 함께 유입될 우려가 높으며 실제로 국내에서 분리된 대부분의 과수 바이러스는 이러한 경로로 유입된 것으로 추정된다. 국내 과수 농가를 보호하기 위해서는 주요 바이러스의 정밀진단 기술개발 뿐 만 아니라 해외에서 보고가 되었거나 피해를 주고 있는 바이러스의 진단 기술을 확보하는 것이 매우 중요하다. 지금까지는

주로 과수에서만 바이러스의 감염여부를 분석을 하였으나 앞으로는 과수와 함께 유입되는 토양이나 토양 내 곰팡이 및 미소 곤충에 대해서도 바이러스를 진단할 필요성이 있다.

과수는 일반적으로 형질전환이 어려워 유전공학적인 방법으로는 바이러스 저항성 과수를 개발하는 것이 현실적으로 매우 어렵다. 과수는 바이러스에 일단 감염되면 실용적인 치료방법이 없으므로 약독 바이러스를 이용한 교차저항성(cross protection) 방법이나 무독묘의 생산이 바이러스 방제 수단으로써 가장 보편화되어 있다. 하지만 바이러스를 옮기는 매개체에 대한 대책방안이 없다면 근본적인 방제효과를 기대하기 어렵기 때문에 바이러스 매개체를 밝히고 이들의 감염생태 및 기주와의 상호작용에 대한 연구가 매우 절실하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 과수 바이러스의 특성 분석 및 기주식물 분석

최근까지 문헌에 보고 되지 않은 내용이므로 *Apple stem grooving virus* (ASGV)의 어떠한 특성이 매개체에 의해 기주 식물로 전달될 수 있도록 하는지 알 수 없다. 이를 분석하기 위해 곰팡이에 의해 전달되는 바이러스를 대량 증식하여 유지하고자 하였다. 이렇게 확보한 바이러스에서 전체 유전자의 염기서열을 획득하였고, 기능성이 있는 유전자 부위를 분석하였다. 또한 각 유전자의 보존 부위와 변이 부분을 결정하였다. 바이러스 감염 곰팡이를 다양한 초본식물에 접종하여 기주 범위를 결정하였고, 이것이 알려진 ASGV의 기주와 유사

함을 확인하였다. 과수와 초본성 기주 식물에서 증식된 바이러스와 이를 매개한 곰팡이에서 분리한 바이러스의 염기 서열 변화를 분석하였다. 기존에 알려진 ASGV의 중요 부위는 상당 부분 보존되고 있었으나 곰팡이에서 분리한 바이러스는 많은 변이 부위가 존재하였다. 나아가 각 기주에서 다르게 나타난 변이의 폭과 병징의 발현이 연관되었는지를 확인하였다.

2. 과수 바이러스 감염 곰팡이의 분리 수집 및 바이러스 확인

수원과 안성에 위치한 과수원에서 장소와 계절에 따라 곰팡이를 수집하여 ASGV 매개 곰팡이의 분포를 확인하였다. 곰팡이는 꽃, 잎 표면, 잎 내부, 토양에서 분리하였으며 분리된 전체 곰팡이의 수는 지역이나 계절 변화에 큰 차이를 보이지 않았다. ASGV가 확인되는 곰팡이 역시 지역과 계절에 영향을 받지 않고 일정하게 분리되었다. 바이러스의 확인은 주로 RT-PCR 방법을 통해 이루어졌으며 최종 확인을 위해 northern hybridization이나 dot-blot hybridization 방법을 수행하였다. 이에서 분리한 곰팡이를 동정하여 ASGV를 매개하는 곰팡이가 *Talaromyces flavus* 임을 확인하였다.

3. 과수 바이러스 감염 곰팡이에 의한 바이러스 전이기작 분석

매개체에 의해 전이되는 ASGV와 매개체의 특성, 기주 식물로의 전이 방법을 구명하기 위해 정확한 진단법의 확립을 연구 내용에 포함하였다. ASGV는 기주 내에 극히 미량으로 존재하는 바이러스이기 때문에 감염 여부를 확인하는 것이 쉽지 않다. 또한 포장의 식물은 기내에서 자라는 것보다 복합 감염의 기회가 상대적으로 많이 주어지므로 매개체를 이용한 기주 식물 검정과 전이 기작

구명을 위해서는 대상이 되는 바이러스를 정확히 선별할 수 있어야 한다. 과수와 곰팡이라는 시료는 상이한 것이지만 어느 경우에서도 검정될 수 있도록 조건을 수립하는 것 역시 필요하였다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하여 정확히 진단할 수 있는 방법을 개발하였고 이를 특허 출원하였다.

많은 경우 과수 바이러스는 초본 기주 식물에서 증식되지 않는다. 초본 기주식물의 이용은 바이러스 특성 연구에 가장 기초적이고 중요한 부분을 차지하고 있으므로 적절한 기주 식물의 선발에 연구의 비중을 두었다. 초본 기주 식물을 이용할 수 없는 과수 바이러스는 적절한 연구의 방법을 적용할 수 없어 다양한 분석을 할 수 없다. 본 연구는 바이러스의 특성 뿐 만이 아니라 곰팡이 매개체에 의한 바이러스의 전이 기작을 구명해야 하므로 이러한 목적에 부합되는 기주 식물의 선발이 필수적이었다. 따라서 바이러스와 곰팡이 모두를 접종하여 병징의 발현을 유도하는 식물체를 선발할 수 있도록 하였다.

여러 문헌에서 바이러스의 유전자가 기주의 염색체에 삽입되어 긴 시간 동안 유지될 수 있고, 이것이 후에 발병하는 요인이 될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 본 연구에서 재료로 선택한 곰팡이 매개체와 ASGV 사이에도 이러한 가능성이 존재하는 것으로 보고 이를 증명하고자 하였다. 바이러스의 매개체 역할을 하는 곰팡이가 식물 바이러스의 기주가 되는 경우는 매우 드물다. 그러나 ASGV는 매개체에서 낮은 수준이기는 하지만 복제할 수 있는 것으로 보이며 이를 증명하고자 하였다. 이 두 가지 현상은 증명이 어려우나 방제 기술 개발에 있어 고려되어야 할 부분이므로 다양한 방법으로 연구를 지속하였다. 과수는 바이러스의 감염을 쉽게 알 수 없고, 특정 시기에 갑작스럽게 병징이 발현되어 피해를 주는 경우가 많기 때문에 바이러스가 감염될 수 있는 모든 가능성을 고려하

여 감염을 최소화하는 것이 가장 중요하다고 할 수 있다.

4. 과수 바이러스 감염 곰팡이의 형질전환 및 매개 양식 구명

바이러스의 전이 기작 구명을 보다 정밀하면서 용이한 방법으로 접근하기 위해 매개 곰팡이 내로 항생제 저항성 유전자를 삽입하여 이를 활용하고자 하였다. 형질 전환된 곰팡이를 활용할 경우 매개체가 어떻게 바이러스를 얻어 기주 식물로 옮겨줄 수 있는지를 밝힐 수 있는 것은 물론, 실제로 포장에서 병 발생에 어떻게 관여하는지 알 수 있게 된다.

매개체에 의한 과수 바이러스의 전이와 병 발생에 관련하여 거의 연구가 이루어져 있지 않으므로 이와 관련한 모든 기초적인 분석이 중요한 의미를 갖는다.

5. 과수 바이러스 매개 곰팡이를 이용한 바이러스 방제대책 개발

본 연구에서 제시하는 바이러스 방제 접근법은 매개체에 중심을 두고 있다. 이는 바이러스 방제를 위한 새로운 대안으로 이미 포장에서 자라고 있는 식물을 바이러스로부터 효과적으로 보호할 수 있는 차별화된 개념을 제시한다. 무독묘를 식재하였어도 이 후 바이러스에 감염될 가능성은 항상 열려있다. 본 연구에서는 매개체의 형태적, 배양적, 균학적 특성을 밝히고 바이러스 매개체로서의 가능성을 확인한 뒤 이것의 생태학적 특성을 분석하고자 하였다. 곰팡이 매개체의 분포와 바이러스의 분포, 이에 따른 병 발생이 어떤 관계에 있는지 분석하여 방제 기술 개발에 도움이 되도록 하고자 하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 과제에서 연구 중인 ASGV는 곰팡이 매개체와 연관성이 있는 것으로 기존의 ASGV와는 여러 가지 면에서 차별화된 바이러스이다. 바이러스의 특성 분석, 매개체에 의한 전이 기작 분석, 매개체의 특성 분석에 관한 연구 내용을 논문 발표하였다. 그러나 연구의 내용과 재료의 특성을 고려할 때 방제 기술 개발에는 어려움이 따른다. 소량 존재하여 진단에 어려움이 있는 바이러스를 식물과 매개체 내에서 정확하게 진단할 수 있는 진단 방법을 특허 출원하였다.

SUMMARY

(영문요약문)

Development of control and monitoring system of ASGV-K by understanding the transmission mechanism

Most reports about plant viruses in Korea have been focused on the virus isolation/identification, functional analysis of viral ORFs as well as the induced resistance to virus infection. In this project we tried to show new research trends about plant virology by investigating the virus transmission mechanism, identifying intermediate plants between infected plants and studying molecular/ecopathological analysis.

Specially the research about fruit viruses has some trouble to analyze the life cycle because of limitation of host plants. So most works about viruses deal with virus identification and detection tools. There was few report about fruit transmission studies or natural vectors except some examples of grafting. It takes relatively long time to see the symptoms on plant by fruit virus infection. If trees were infected viruses, those trees can be recovered. Therefore the preventive approach against virus infection in fruit trees is more important to the any crops. Even though virus-free fruit

trees were planted in fields, these plants can be infected by virus in fields via natural vectors. However, there were little reports about fruit virus transmission in trees so that it is necessary to study the virus transmission mechanism between plant and plants to develop the bio-control strategy of virus infection.

The basic studies and approaches for virus protection in the herbaceous plants were quite different from in the wooden fruit trees. In case of wooden fruit trees, it is hard to applying genetic engineering to give a resistance to plants compared to herbaceous crop plants. So many approaches have been developed to applying the cross-protection by using mild strains of target viruses. Basically preventive protection is more important than therapeutics.

Many new fruit trees which were developed in other countries were imported from outside by non-regulated distribution. By importing fruit trees without quarantine inspection, fruit virus may also enter and distribute to orchards. Practically most fruit viruses which were identified in Korea were imported by this routes. Therefore we need to develop the precise and rapid virus detection methods in Korea as well as other countries which has been reported virus outbreaks in order to protect farmers fruit trees in Korea. In this reason, now we have to investigate and inspect not only fruit trees, but also soil itself, fungi in soils as well as insects to detect viruses.

Practically it is hard to develop the trees by genetic engineering

approaches because of low efficiency of transformation. So some examples of virus protection has been applied by cross-protection. But without any alternative strategy about the transmission of virus via natural vectors, we can not say that we have a virus protection tools. Therefore we have to study and understand the virus transmission mechanism by natural vectors, ecopathological analysis, and the interactions among host trees, viruses and vectors.

In this project, we tried to do develop the precise and rapid detection method of ASGV to understand the transmission mechanism as well as the characteristics of natural vectors. Naturally the titer of ASGV in plants were pretty low and there is a chance to be infected with other viruses in same plants in fields. So the detection methods is important to go to the first step of this project. To better develop the virus detection methods, we currently applied the patent for rapid and precise detection method of virus from plants and fungi.

In any previous reports, there was no publication about ASGV transmission between plant to plant. To better characterize the biological properties about ASGV, each ORFs of ASGV and specific motifs of proteins were investigated. For this purpose, viral genome of ASGV from plants and fungi were cloned and sequenced. Also we have tried to identify the sequences and motifs of specific regions of each ASGV genome isolated from plants and fungi in order to apply for understanding transmission mechanism.

In addition, we tried to investigate the relationship between sequence differences and symptom severity.

There were reports about the possibility of viral genome integration into host chromosome which caused pathogenesis. With this rational, we also tried to see the possibility of ASGV genome integration into fungal chromosome. There was few reports about the cases of viruses which could be infectious both plants and fungus as viral vector for transmission. However, ASGV can also replicate in both host plant and fungus even though the replication efficiency was low. Practically these two events were not easy to be proved in the lab but these were significantly considered by applying with various approaches in order to develop the bio-control of virus protection. In case of plant virus disease, fruit viruses were not detected in early stage and then virus infected plants suddenly showed symptoms. So it is important to minimize any possibility of virus infection.

Many fruit virus can not infect and multiplicate in herbaceous host. So if we can use herbaceous host plant in this study, we can do study basic and principle analysis. So we tried to select herbaceous host plant which can be infected by fruit virus. If herbaceous host was not available for specific fruit virus, the basic study has to be limited. In this study, it is necessary to select herbaceous host plants to understand the interactions between plant, fungus and virus. Therefore we develop the host system which can be infected by fungus and virus respectively.

In this study, we focused on the fungus as a natural vector system to protect virus infection. It is an alternative approach to protect virus infection in fields. It is open to virus in field even though virus-free plants were planted. With this research purpose, we investigated the ecopathological characteristics of fungus as a viral vector after we analyzed the morphological, cultural and mycological properties as a viral vector system. We intended to develop the bio-control technology by analyzing the pathogenesis relationship between the distribution of fungus and virus.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction 16

Purpose of R&D / Necessity of R&D

Chapter 2 Status of the technology 24

Chapter 3 Contents and Results of R&D 26

Part 1 Characteristics of fruit viruses and host plants 26

Part 2 Collection of virus infected fungus and identification of virus 50

Part 3 Mechanism study of virus transmission mediated by fungus 58

Part 4 Fungus transformation and transmission study 75

Part 5 Development of virus protection by using virus infected fungus 86

Chapter 4 Achievement and contribution of the R&D 101

Chapter 5 Plan to apply the results of the R&D 102

Chapter 6 R&D information collected from foreign country 103

Chapter 7 Reference 106

목 차

제 1 장 연구 개발 과제의 개요 16

제 2 장 국내외 기술개발 현황 24

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 26

제 1절 과수 바이러스의 특성 분석 및 기주식물 분석 26

제 2절 과수 바이러스 감염 곰팡이의 분리 수집 및 바이러스 확인 50

제 3절 과수 바이러스 감염 곰팡이에 의한 바이러스 전이기작 분석 58

제 4절 과수 바이러스 감염 곰팡이의 형질전환 및 매개 양식 구명 75

제 5절 과수 바이러스 매개 곰팡이를 이용한 바이러스 방제대책 개발 86

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 101

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 102

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 103

제 7 장 참고문헌 106

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

이제까지 국내에서 수행되거나 현재 진행 중인 식물바이러스에 관련된 연구는 대부분이 특정 바이러스의 분리 동정과 일부 바이러스의 유전자 특성 연구 및 바이러스 저항성 유도와 관련된 연구에 맞춰져 있다. 본 과제에서는 이러한 흐름에서 탈피하여 과수 바이러스를 전파하는 매개체와 중간기주를 밝히고 전염기작에 관한 분자생물학적/생태학적 연구를 수행하여 식물 바이러스 연구의 새로운 방향을 제시하고자 한다. 이에 기초하여 새로운 개념의 바이러스 방제기법을 제시하고 이 기술을 실용화

■ 기주식물과 곰팡이 내에 존재하는 바이러스 진단법 개발

■ 과수바이러스 감염 곰팡이의 분리 동정 및 분포

■ 바이러스 전이 과정에 있어서 운반체로서의 곰팡이 기능 분석

■ 과수바이러스 감염 곰팡이와 기주 과수와의 상호작용 연구

■ 곰팡이에 의해 매개되는 과수바이러스에 대한 새로운 연구체계 확립

■ 새로운 과수바이러스 방제대할 수 있는 방안을 마련함으로서 농가의 소득증대에 기여하고자 한다. 책 수립

1 차년도 : 과수 바이러스 감염곰팡이 분리 및 바이러스 유전자 분석

2 차년도 : 과수 바이러스 감염곰팡이의 동정 및 바이러스 전이기작 분석

3 차년도 : 과수 바이러스 매개 곰팡이의 감염생태 해석 및 바이러스 방제대책 개발

제 2절 연구개발의 필요성

1. 과학 기술적 측면

가. 바이러스 매개체 연구의 필요성

과수 바이러스는 기주의 특성 상 연구에 많은 제약이 따르기 때문에 분자 수준에서의 바이러스 특성 분석과 효과적인 바이러스 진단 기술에 관련된 내용이 연구의 주를 이루고 있다. 바이러스의 전이에 관련한 연구는 더욱 적어 접목에 의한 사례는 일부 문헌으로 보고 되어 있으나 매개체에 의한 전이 사례는 많지 않다. 과수 바이러스는 감염 후 병징의 발현까지 상당한 시간이 소요되기 때문에 감염 여부를 확인하는 것이 쉽지 않고, 한 번 발병하면 회복이 되지 않아 기타 어떠한 작물보다 방제라는 측면이 더욱 중요하다. 무병주를 선별하였다 하더라도 바이러스 매개체를 통한 포장에서의 감염 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 이 분야의 연구는 전 세계적으로도 아직 체계적인 연구 보고가 없으므로 바이러스 전이 과정 분석 뿐 아니라 방제대책 수립을 위해서도 매개체에 대한 연구가 필요하다.

- 바이러스 전파 매개체를 모르는 관계로 대부분 접목의 문제점만 강조됨
- 바이러스 전파 매개체의 경우 곤충 이외의 경우에 대해서는 거의 논의되고 있지 않음
- 최근에 접목이 아닌 경우에도 자연적으로 바이러스에 감염되는 경우가 보고 됨
- 바이러스 매개체와 전파 양식에 관한 연구가 없는 방제 방법은 근본적으로 무의미함

- 목본성 과수의 특성상 유전공학적인 접근이 불가능하여 저항성 품종의 개발이 어려움

나. 원예초본성 바이러스와 차별화된 연구법 및 바이러스 방제법 개발의 필요성

원예 초본성 바이러스와 달리 과수 바이러스에 관한 연구는 기본적으로 바이러스 저항성 및 방제 법에 대한 접근법이 상이하므로 과수 바이러스에 적절한 체계적 연구가 필요하다. 과수 바이러스의 경우 초본 기주식물과 달리 유전공학적 기법 도입이 어려워 육종과 약독바이러스를 활용하는 방법으로 저항성 품종을 개발하고 있는 실정이다. 근본적으로는 바이러스의 전염을 차단하는 것이 가장 중요하다고 할 수 있다. 따라서 바이러스 전이 매개체에 대한 이해는 효과적인 바이러스 방제대책의 근본적 제안으로 실용적 방안의 도출이 가능하다.

다. 해외 과수 바이러스의 유입 경로 분석의 필요성

해외에서 새롭게 개발된 과수 품종이 정상적인 유통 경로를 거치지 않고 국내 농가에 보급되는 경우가 있다. 이 때 묘목과 함께 해외 과수 바이러스가 함께 유입될 우려가 높으며 실제로 국내에서 분리된 대부분의 과수 바이러스는 이러한 경로로 유입된 것으로 추정된다. 국내 과수 농가를 보호하기 위해서는 주요 바이러스의 정밀진단 기술개발 뿐 만 아니라 해외에서 보고가 되었거나 피해를 주고 있는 바이러스의 진단 기술을 확보하는 것이 매우 중요하다. 지금까지는 주로 과수에서만 바이러스의 감염여부를 분석을 하였으나 앞으로는 과수와 함께 유입되는 토양이나 토양 내 곰팡이 및 미소 곤충에 대해서도 바이러스를 진단할 필요성이 있다.

라. 약독 바이러스의 분리 및 무독묘 보급을 위해서는 바이러스 매개체에 대한 분석 필요

과수는 일반적으로 형질전환이 어려워 유전공학적인 방법으로는 바이러스 저항성 과수를 개발하는 것이 현실적으로 매우 어렵다. 과수는 바이러스에 일단 감염되면 실용적인 치료방법이 없으므로 약독 바이러스를 이용한 교차저항성(cross protection) 방법이나 무독묘의 생산이 바이러스 방제 수단으로써 가장 보편화되어 있다. 하지만 바이러스를 옮기는 매개체에 대한 대책방안이 없다면 근본적인 방제효과를 기대하기 어렵기 때문에 바이러스 매개체를 밝히고 이들의 감염생태 및 기주와의 상호작용에 대한 연구가 매우 절실하다.

마. 곰팡이 매개 바이러스 전염사례

Plasmodiophoromycota (*Polymyxa graminis, P. betae* and *Spongospora subterranean*)와 Chytridiomycota (*Olpidium brassicae* and *O. bornovanus*)와 같은 토양 곰팡이는 경제적으로 중요한 작물을 감염하는 바이러스를 매개한다. 이들은 절대적인 기생곰팡이이며 기주식물 내에서만 살수 있고, 휴면포자와 같은 형태로 토양 내에서 생존을 한다. 이들의 감염은 이동성이 있는 zoospore를 통해 이루어진다. 대표적인 감염 사례는 다음과 같다.

Indian Peanut Clump Virus (IPCV)는 *Polymyxa graminis*에 의해 쉽게 전이된다. 이를 방제하기 위해 곰팡이를 제거하거나 억제하려는 노력이 집중적으로 있었지만 성공하지 못했다. *Polymyxa graminis*가 저항성을 가지고 있는데다 복잡하였기 때문이다. 그래서 바이러스 유전자를 활용한 저항성 작물의 개발이 시도되었다.

*Polymyxa graminis*는 보리의 뿌리를 감염하고 바이러스를 전달하여 보리호위축병이라는 병을 일으키기도 한다. 포장이 일단 오염되면 병원 바이러스는 매개균의 휴면포자중에 간직되어 10년 이상 병원력을 유지하기 때문에 매년 발병하며 여러 작물을 돌아가면서 심어도 완전히 오염원을 제거하기는 어렵다.

사탕수수를 감염하는 *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV)는 *Polymyxa betae*라는 사탕수수의 근권에 서식하는 절대기생균에 의해 전반된다. *Polymyxa betae*는 휴면체(resting cystosori) 형태로 토양 내에서 다년간 생존할 수 있기 때문에, 윤작이나 일정기간 사탕수수를 심지 않는다 해도 병을 방제하는 것은 매우 힘들다. 현재 이 병에 의한 피해를 줄이기 위해 사용되는 방법은 식물 혹은 토양에 존재하는 BNYVV를 정확하게 검출하여 바이러스 무감염 식물을 오염되지 않은 토양에 심는 것과 BNYVV에 저항성인 식물을 심는 것이다. 그러나 BNYVV에 감수성인 식물의 사탕수수의 수확량은 저항성 식물보다 월등히 높기 때문에 후자의 방법은 실용적이지 못하다고 알려져 있다. BNYVV는 시금치와 같은 채소에도 전염이 된다.

완두 줄기괴저 바이러스는 뿌리에 기생하는 Olpidium균의 유주자에 의해 전파된다. 바이러스에 감염된 식물은 엽맥과 줄기의 유관속에 괴저가 생겨 갈변하면서 생장점 부근부터 시든다. 병세가 진전되면 포기 전체가 갈변하여 고사한다. 토양 소독을 하거나 저항성인 품종을 심는 방법으로 방제를 하나 단기적인 효과 밖에 볼 수 없다.

상추 큰 엽맥 바이러스 (*Lettuce big vein virus*)는 *Olpidium brassicae* 균에 의해 매개되는 토양전염에 의해서만 발병한다. 포장의 오염정도가 심해지면 거의 전부가 감염, 발병하여 마치 품종 특유의 형태로 착각할 정도가 된다.

LBVV는 *O. brassicae*의 휴면포자 속에서 장기간 (8년 이상) 생존하기 때문에 한 번 발병한 후 근절시키려면 장기간 휴작해야 한다. 토양소독이 효과적이기는 하지만 오염원의 유입경로가 매우 다양하기 때문에 모든 가능한 경로를 상정하여 빠짐없이 점검해야 한다. 또한 토양에 오염원이 유입되었을 경우에도 오염정도가 증폭되지 않도록 상추의 연작을 피해야 한다.

이 외에도 감자, 토마토, 강낭콩, 멜론, 수박 등의 작물을 감염하는 바이러스 역시 이러한 곰팡이 매개자에 의해 감염이 된다. 토양 전염에 의한 바이러스 병은 모두 그러한 것은 아니지만 많은 경우 즙액 접종으로도 전이가 가능하기 때문에 이중의 피해가 있다.

2. 경제·산업적 측면

○ 90년대 접어들어 과수산업은 연평균 7.1%씩 성장하였고 90년 이후 재배면적 증가와 단수가 늘어 생산량은 90년 대비 3배 이상 증가하였다. 가격은 공급증대에도 불구하고 수요가 증가하여 높은 수준을 유지해 농가소득증대에 기여하고 있다.

○ 한국 농업에서 과수의 비중은 벼와 기타 원예작물보다도 높아 농가소득 기여 수준이 약 19,600 천원에 이르고 있다. 소득 수준은 특작과 과수, 화훼농가가 높고 전작과 논벼 농가가 낮다. 그러나 화훼와 특작은 소비 감소와 유류비 인상 등에 따른 생산비 증가로 소득이 감소하는 추세에 있다.

	전 국	논벼 농가	과수 농가	채소 농가	특작 농가	축산 농가	전작 농가	화훼 농가
농가소득	**23,072**	19,598	**28,609**	19,950	32,572	29,816	18,920	19,588
농업소득	**10,897**	10,448	**19,876**	12,741	25,916	19,986	10,018	15,038

(2001년 기준)

○ 국내 과수바이러스를 정확하게 동정·진단하고 무독묘를 생산하며 바이러스 전염에 관한 이해를 토대로 과수 바이러스병의 새로운 방제대책을 수립하여 고품질 과실 생산으로 농가소득에 기여할 필요가 있다.

3. 사회·문화적 측면

○ 현재 우리나라 국민들의 소득증대와 기호의 다양화로 인해 외국으로부터 많은 농산물이 수입되고 있다.

표 4. 과실 수입동향 (단위 : M/T, 천$)

구분	'95		'98		'99		'2000	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액	물량	금액
계	**331,900**	**299,822**	**211,944**	**174,309**	**327,396**	**260,380**	**431,687**	**319,635**
사 과	-	-	256	251	975	936	920	908
배	-	-	3,593	2,580	383	243	1,006	574
복숭아	-	-	5,046	5,148	6,611	6,583	8,622	8,577
포 도	-	-	12,790	21,377	20,070	35,080	20,285	31,104
살 구	-	-	123	264	397	676	275	415
감	-	-	4	7	1,090	982	1,529	1,473
오렌지	15,402	13,389	68,362	68,605	70,016	83,390	139,603	116,013
바나나	121,538	49,513	85,939	37,801	167,783	73,098	184,212	75,250
파인애플	23,644	9,042	16,517	11,117	30,198	19,650	32,240	19,382
그레이프	7,735	6,279	1,192	1,468	2,518	2,740	2,042	2,522
레몬	3,014	3,622	2,648	3,367	3,322	4,464	3,958	4,960
키위	5,112	9,653	3,471	5,192	4,383	7,521	5,228	8,647
기타과실	7,062	12,686	12,003	17,132	19,650	25,017	31,767	49,810

농림부 농산물 수출입통계수치임

○ 이러한 상황에서 바이러스 전염경로 및 전파에 관한 이해와 기술 개발의 미흡으로 무독묘를 사용한다고 하더라도 바이러스 감염주로부터 새로운 과수가 바이러스에 감염되는 악순환이 계속되고 있다.

○ 기주식물 뿐만이 아니라 외국으로부터 바이러스 유입 경로를 추적하는데 있어 토양서식 곰팡이나 곤충을 함께 포함하여야 한다. 이로써 궁극적으로는 국내 미발생 바이러스병의 유입 경로를 차단하여야 한다.

○ 본연구가 성공적으로 수행된다면 과수바이러스에 대한 진정한 의미에서의 'virus-free' 개념이 완성된다.

제 2 장　국내외 기술개발 현황

제 1절. 국외의 기술 동향 및 수준

외국에서는 생물 관련 회사에서 진단시약을 제품화하여 세계 각지로 판매하고 있으며 우리나라도 다수를 주문하여 사용하고 있다. 과수묘목은 바이러스 검정 후 무독묘를 생산·유통하는 것이 원칙이다. 바이러스의 치료는 불가능하기 때문에 사전 진단으로 감염을 예방하고자 하는 것이다. 사과의 경우 무병대목인 EMLA에서 바이러스 이병대목보다 수량이 40% 이상 증수되는 것이 보고 되었다 (영국 East Malling 연구소). 양앵두 나무에 바이러스가 이병되면 40%의 생육저하와 60%의 수량감소가 보고 되었다 (영국East Malling 연구소). 동양배 바이러스성 병인 괴저반점병에 이병된 나무는 대개 3종의 바이러스 복합감염이 보고되었다 (日本). 영국, 미국, 일본 등지에서는 과수 바이러스 무독묘 보증제 실시로 농가 피해를 최소화하고 있다. 그러나 무독묘 보급에도 불구하고 포장에서의 감염 가능성은 얼마든지 있기 때문에 스페인을 중심으로 약독바이러스를 이용한 과수 바이러스 방제에 관한 연구가 진행되고 있으나 근본적은 해결 방법은 될 수 없다. 전 세계적으로 바이러스 매개체에 관한 연구는 기초단계에 머물고 있으므로 본 연구가 성공적으로 수행될 경우 농가에 직접적으로 도움을 줄 뿐 아니라 바이러스와 매개체 연구 분야에 있어서도 국가적 위상을 높일 수 있을 것으로 예상된다.

제 2절. 국내의 기술 동향 및 수준

지금까지 국내 과수바이러스에 관한 연구는 농촌진흥청 농업과학기술원

식물병리과와 원예연구소 원예환경과를 중심으로 과수 바이러스병의 발생 실태와 바이러스의 분류동정 및 진단기술 개발 등이 수행되어 왔다. 과수바이러스 진단을 위한 항체의 생산과 바이러스의 분리 동정 및 진단에 관한 연구보고는 일부 있으나 바이러스의 전파와 매개체에 대한 연구보고는 없었다. 본 연구진은 선행 연구에서 배나무 검은 점병을 일으키는 ASGV-K가 과원에 분포하는 일반 곰팡이와 간작물 및 잡초에도 감염되어 있는 새로운 사실을 발견하였다. 본 발견은 일반 곰팡이가 과수바이러스의 매개체일 가능성과 과원의 간작물 및 잡초가 과수바이러스의 중간기주일 가능성을 시사하는 매우 중대한 연구적 사건이다. 이는 전 세계적으로 최초의 발견이며 본 제안 과제가 성공적으로 수행될 경우 과수바이러스의 매개체와 중간기주가 밝혀져 과수 바이러스병 연구의 새로운 방향을 제시하고 새로운 방제대책을 수립할 수 있는 실용화 가치가 매우 높은 연구가 될 것이다.

앞으로는 국제간에 교류가 활성화되어 물류의 이동이 활발할 것이므로 과수의 이동 뿐 아니라 바이러스 매개체의 이동 및 유입에 관한 통관이나 조사의 기준이 마련되어야 한다. 그러나 아직까지 바이러스 매개체에 대한 연구가 체계화 되어 있지 않아 이에 대한 평가기준은 마련되어 있지 않다. 우수한 품종을 유지하고 바이러스 감염 피해를 최소화할 수 있는 근본적인 기준 마련에도 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 과수 바이러스의 특성 분석 및 기주식물 분석

1. ASGV 정밀 진단 체계 확립

ELISA는 간단하면서도 쉽게 바이러스의 감염을 확인할 수 있기 때문에 가장 많이 사용되어 오는 방법 중의 하나이다. 그러나 이 방법은 계절적인 제약을 받는데, 봄에 채집한 식물 조직을 사용해야 하는 단점이 있다 (Mink, 1980; Varveri et al., 1997; Bertozzi et al., 2002). 바이러스의 농도가 어느 수준 이상이 되었을 때 감지할 수 있는 방법이기 때문에 37℃ 이하 온도에서 바이러스의 축적이 많이 진행된 시기의 조직을 취해야 하는 것이다 (Heleguera et al., 2001). 그러나 RT-PCR 방법은 적은 양의 바이러스로도 확인이 가능하기 때문에 계절이나 식물의 조직, 병징의 정도에 관계없이 검출이 가능하다. 특별히, multiplex RT-PCR 방법은 많은 양의 식물 조직을 다루면서도 정확성을 보장할 수 있으므로 비용 절감의 효과도 기대할 수 있다.

ASGV는 신고 배 검은 점병의 원인이 되는 바이러스로 보고가 되어 있다 (Nam et al., 1996; Shim, 2000). 신고 배 검은 점병 (pear black necrotic leaf spot)의 발병은 생산량 저하와 직접적으로 연결되는데 이의 원인이 되는 ASGV는 감염 후 병징을 발현하지 않는 특성을 갖고 있어 사전 예방이 어렵다.

전이에 관여하는 매개체가 없다는 기존의 보고와 달리 본 연구진에서는 ASGV가 곰팡이에 의해 매개되는 것을 확인하였다. 이에 ASGV에 대한 정밀 진

단 체계를 확립하였다. 보고된 ASGV의 RdRp, helicase, CP 부분의 염기서열에 기초하여 진단용 프라이머를 제작하였다 (Table 1).

Table 1. 바이러스 진단을 위해 사용한 프라이머의 염기서열

대상 유전자	진단용 프라이머의 염기서열		크기 (bp)
RdRp (D14995)	F	(4058) ACTTCTTCTGCCTGGATAGCT (4078)	529
	R	(4587) CTGTCTTTCACTCATCATCTTG (4566)	
Helicase (D14995)	F	(2293) TTCGACCTAGAATTCTGCAAGA (2314)	718
	R	(3011) GTCGCCACAGGTATTCTG (2994)	
CP (AF465354)	F	(5641) CATATGGATTTGGAAGACGTGCTTC (5665)	714
	R	(6368) CTCGAGACCCTCCAGTTCCAAGTTA (6354)	

신고 배 검은 점병이 발생한 이병 조직을 이용해 multiplex RT-PCR의 조건을 확립하였다. 자연 상태에서 물리적인 방법에 의하지 않고 ASGV에 감염되어 검은 점병이 발생한 것으로 보이는 과원을 선정하였다. 병징의 발현은 과제의 시작 전부터 3년 동안 예비 실험에서 관찰하였다. 협동연구기관에서 이병 식물의 뿌리, 잎과 주변의 흙으로부터 곰팡이를 분리 및 배양하였다. 이 가운데 ASGV를 갖고 있는 곰팡이를 선별하기 위해 검은 점병을 보인 이병 조직에서 확립된 multiplex RT-PCR 방법을 적용하여 검정하였다 (그림 1). 검정은 3회 실시하였다. 검정을 위해 곰팡이는 potato dextrose broth에서 최소 2주를 배양하였고, Trizol reagent를 사용하여 total RNA를 추출하였다.

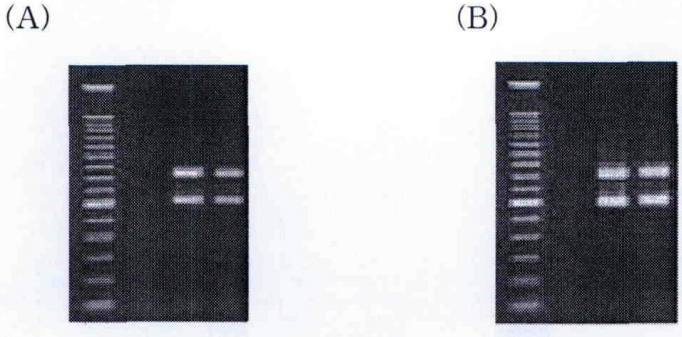


그림 1. 곰팡이에서 total RNA를 추출하여 multiplex RT-PCR 방법을 적용한 후 전기영동 사진. (A) RdRP + helicase; (B) RdRP + CP

2. ASGV 전체 유전자 분리 및 확보

가. ASGV의 증식, 순수분리 및 total genome 확보

곰팡이에서 ASGV의 genome을 분리하였다. 곰팡이를 potato dextrose broth에서 20일 동안 배양하였고, filtration 과정을 거쳐 100 g (dry weight) 의 균사를 확보하였다. Kim et al. (2003) 이 Penicillium stoloniferum virus S 를 순화할 때 사용했던 방법에 기초하였다. 분리한 viral nucleic acids 는 1% agarose gel 에서 전기영동하여 약 6.5 kb 크기의 single-band를 확인하였다 (그림 2).

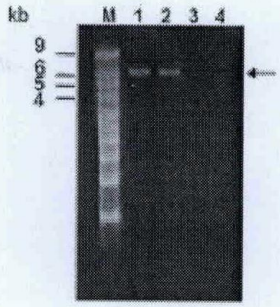


그림 2. Ionic strength-dependent sensitivity of purified viral nucleic acids to hydrolysis by RNase A. The viral nucleic acids were incubated for 30 min at 37℃ without nuclease (lane 1), with DNase 1 (5 u/㎖; lane 2), with RNase A (10 ㎍/㎖) in 0.5 M NaCl (lane 3) and 0.05 M NaCl (lane 4). M, perfect RNA marker (0.5-9 kb) (TaKaRa).

곰팡이에서 발견되는 많은 바이러스가 dsRNA genome을 갖는 것으로 보고 되어 있지만 (Koonin et al., 1991; Nogawa et al., 1993; Castillo and Cifuentes, 1994; Hillman et al., 1994; Ghabrial, 1998; Preisig et al., 1998; Chu et al., 2002), ssRNA 를 갖는 strains (Hollings and Stone, 1971; Hollings, 1978; van Zaayen, 1979; Coley-Smith et al., 1980; Tavantzis et al., 1980; Honkura et al., 1983; Shirako and Ehara, 1985; Revill et al., 1999; Yokoi et al., 1999; Robyn et al., 2001; Yu et al., 2003)에 대한 보고도 있다. 분리한 곰팡이가 ASGV를 매개하는 것이라면 ssRNA가 분리되었을 가능성이 높기 때문에 이를 확인하였다. 분리한 RNA에 DNase I을 처리했을 때는 분리한 것과 같은 크기의 single-band를 확인할 수 있었다. 0.05 M (low salt)과 0.5 M NaCl (high-salt)에서 RNase A (10 ㎍/㎖)를 처리했을 때는 어떤 조건에서도 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 곰팡이에서 분리한 RNA는 ASGV와 같은 ssRNA라는 것을 알 수 있었다 (그림 2).

나. Infectious clone의 확보 및 유전자 분석

곰팡이에서 확인되는 바이러스는 ASGV와 매우 유사하지만 기존에 알려진 ASGV와 달리 곰팡이에서 발견되므로 infectious cone을 제작해 특성 분석을 하고자 하였다. 감염성을 갖는 infectious clone을 제작하기 위해 full-length cDNA를 한 번의 반응으로 확보하고자 하였다 (그림 3). poly A를 포함한 3′ region의 염기 서열에 특이적인 primer를 제작하였고, 5′ region의 증폭을 위한 primer에는 T7 promoter를 포함하여 in vitro transcription이 가능하도록 하였다.

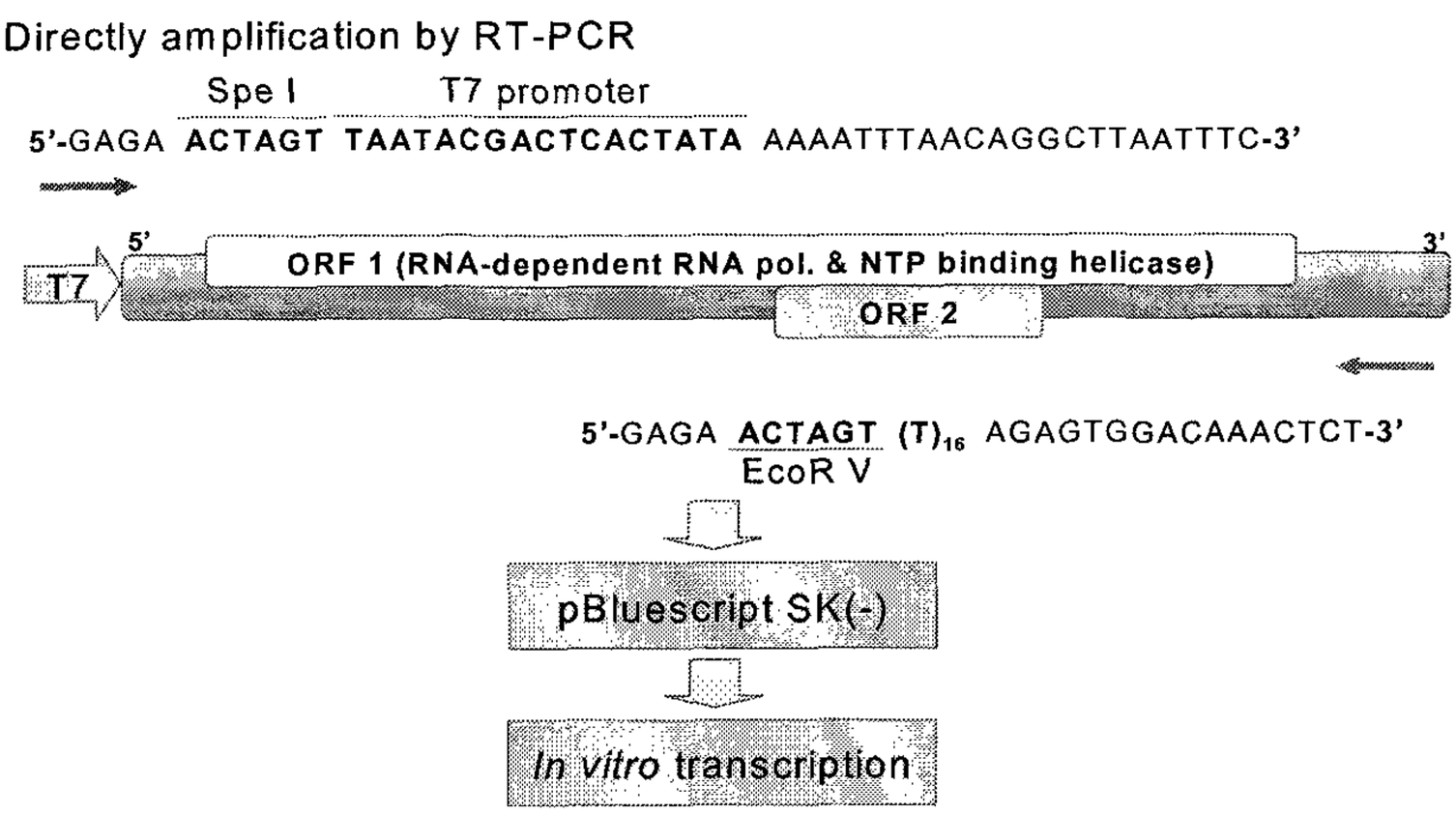


그림 3. 감염성 바이러스 클론을 얻기 위해 앞부분에는 T7 promoter sequence를 포함시켰고, 뒷부분에는 poly(A) tail을 삽입하여 프라이머를 제작하였다.

RT-PCR 결과 약 6 Kb이상의 PCR product를 cloning 하였고, 이것의 염기서열을 분석하였다. 전체 서열, 5′ region 및 3′region의 서열이 보고된 ASGV의 infectious clone과 유사한 것을 선택하여 RNA transcript를 확보하였다. 이것을 미리 준비한 명아주와 콩에 접종하여 병징의 유도와 바이러스의 증식을 확인해 보았다. 그러나 바이러스의 증식과 병징을 확인할 수 없었다. 염기서열 분석 결과로는 보고된 바이러스의 염기서열과 같았으나 infectious clone으로서의 활성을 가지지는 않았다. 이는 RNA virus의 경우 infectious clone 제작 시 나타나는 현상으로 그 원인은 명확하지 않으나 infectious clone을 반복적으로 제작하면 이 과정 중에 infectious clone을 확보할 수 있을 것으로 생각된다.

다. Putative ORF의 분석 및 염기서열 분석

알려진 ASGV의 ORF에 근거하여 곰팡이에서 확보한 것과 비교하였다. 곰팡이에서 확인되는 바이러스와 이를 식물에 접종하였을 때 기주 식물에서 생성된 바이러스, 검은 점병과 관련하여 분리되는 ASGV를 함께 비교하였다.

곰팡이에서 확인되는 helicase 예상 부위는 D14995와 AY596172 모두에 대하여 97%의 높은 상동성을 나타내었다. 또한 ASGV의 helicase에서 보존되는 motif 부위인 GFAGSGKT를 확인할 수 있었다 (그림 25). 곰팡이에서 확인되는 바이러스와 이를 식물에 접종하여 기주 식물에 축적된 바이러스, 검은 점병과 관련하여 분리되는 ASGV의 helicase 예상 부위는 서로 97% 이상의 상동성을 보였다. 곰팡이를 통해 매개되어 각각 다른 기주 식물에서 복제하였으나 큰 변이는 없었던 것으로 보인다.

곰팡이에서 확인되는 CP 예상 부위는 D14995와 AY596172 모두에 대하여 98%의 높은 상동성을 보였다. 곰팡이에서 분리한 ASGV의 CP는 곰팡이를 강낭콩 (*Phaseolus vulgaris*)에 접종하여 병징이 나타난 후 분리한 바이러스의 CP와 가장 가까운 유연 관계에 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 4). 이들의 염기서열이 일본에서 보고된 ASGV 보다는 PBNLS를 보이는 배나무에서 분리한 것과 더 가까운 유연 관계에 있는 것도 확인할 수 있었다. 각각 다른 기주에서 분리하였지만 모든 ASGV의 CP에는 flexuous rod-shaped plant virus에서 보존되는 salt bridge motif가 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 4). Salt bridge motif는 positively charged residue (Arg)와 negatively charged residue (Asp)로 구성된 것이다 (Koonin and Dolja, 1993).

ASGV-BEAN	(155)	CTF**R**KLCEPFAD	(24)	AFEKSPWVAF**D**FAT	(32)
ASGV-FUNGI	(155)	CTF**R**KLCEPFAD	(24)	AFEKSPWVAF**D**FAT	(32)
ASGV-CP	(2012)	CTF**R**KLCEPFAD	(24)	AFEKSPWVAF**D**FAT	(32)
ASGV-PEAR	(2012)	CTF**R**KLCEPFAD	(24)	AFEKSPWVAF**D**FAT	(32)
CYA	(2250)	LTF**R**QLCEPFAE	(22)	AYFNCPAVVF**D**FNK	(45)
PVT	(119)	KTL**R**QMCMPFAK	(21)	LCRKAKWVAF**D**FAS	(48)
ACLSV	(156)	MTF**R**QVCEAFAP	(24)	VGSKYPELMF**D**FNK	(45)
ASPV	(320)	CTLRQYCAFYAK	(24)	TRYAAFDFFFGVES	(52)
BVF	(116)	QTL**R**QFARPYAP	(24)	SVDAPPHVCI**D**FND	(139)
MBV	(156)	NCLGANSVKVFA	(24)	VVPANKQLSSPPSS	(40)
SmVB	(285)	NIVDQTSVSFVA	(24)	VGVLEYELVYHLEG	(48)

그림 4. Amino acid alignment of the coat proteins of ASGV and flexuous rod-shaped plant viruses potentially involved in salt-bridge formation. The conserved positively and negatively charged residues (Arg and Asp, respectively), proposed to form a salt bridge crucial for protein structure, are shown in bold (modified from Dolja et al., 1991). Identical residues are indicated by asterisks and similar residues by colons.

Potex-like plant viruses와의 유연 관계를 살펴보면, ASGV와 함께 *Capillovirus*에 속하는 Cherry virus A (CVA)와 가장 근접하고, 혈청학적으로 유연 관계에 있는 것으로 알려진 Potato virus T (PVT) (Ohira et al., 1995)와도 가까운 거리에 위치하는 것을 볼 수 있다 (그림 5). ssRNA genome mycovirus 와 비교한 결과를 보면 BVF (*Botrytis* virus F)와 가장 근접한 것을 확인할 수 있는데 BVF는 flexuous rod-shape을 취하고 있는 것으로 보고 되어 있다 (Robyn et al., 2001). 따라서 곰팡이에 존재하는 바이러스가 ASGV와 같은 형태의 바이러스일 것을 짐작할 수 있다.

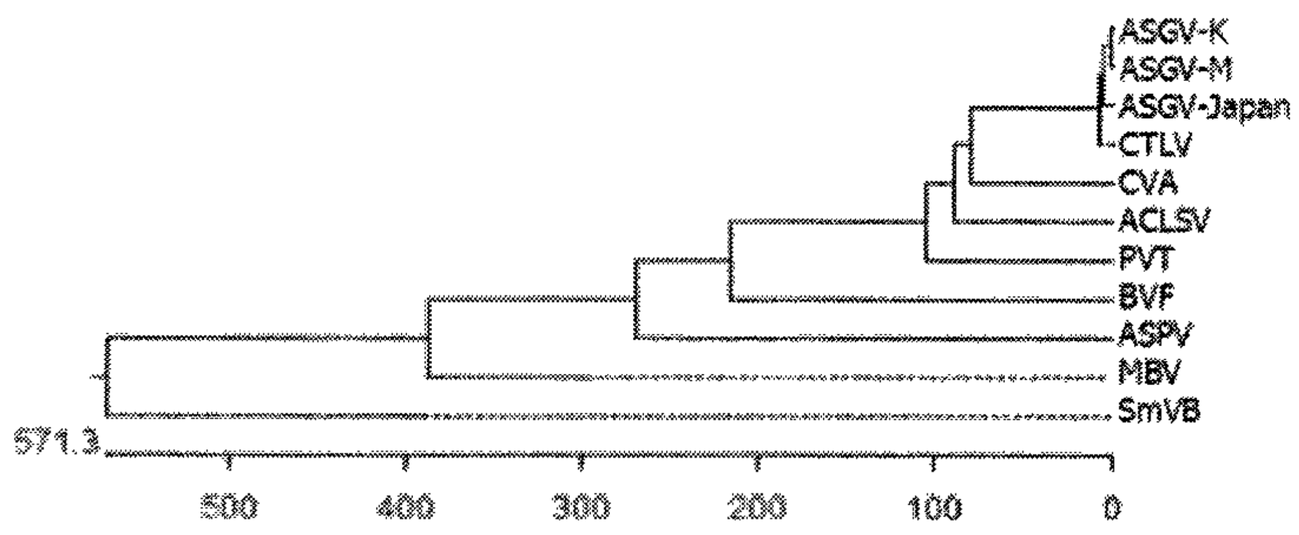


그림 5. Phylogram of the putative salt bridge region corresponding to amino acids of the ASGV coat protein.

3. ASGV 변이 분석 체계 확립

가. SSCP를 이용한 바이러스 유전자의 변이 분석

ASGV의 SSCP를 이용한 변이 분석은 본 연구진이 Citrus tristeza virus (CTV)의 분석에 사용했던 방법을 적용하여 수행하였다. CTV strain은 서로 90% 이상의 상동성을 보이지만 변이는 일정한 형식 없이 비특이적으로 일어나기 때문에 염기 서열 분석으로는 구분하기 힘든 바이러스의 특성을 SSCP 방법을 통해 병징과 연관하여 분류한다 (Gago-Zachert et al., 1999). 이 결과에 근거하여 mild strain과 severe strain을 찾고, cross-protection 결과 분석에 적용한다. 그러나 ASGV에서는 SSCP pattern으로 변이를 짐작할 수 없었다. 곰팡이에서 분리한 것이나 이병 식물에서 분리한 것이 위치 상 변화는 조금 있었지만 그 외에는 차이를 볼 수 없었다. 곰팡이에 의해 매개되어 기주 식물로 전이되는 바이러스는 약간의 변이는 일어나지만 바이러스의 특성에 변화를 가져오지는 않는 것으로 보여진다.

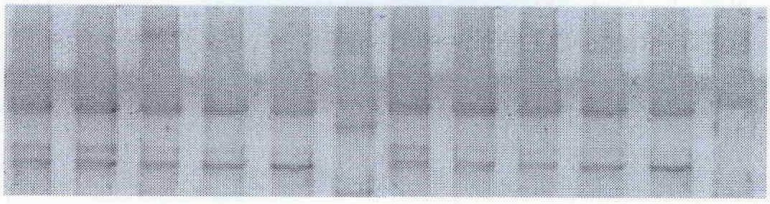


그림 6. 곰팡이에 의해 매개되는 ASGV의 SSCP를 이용한 변이 분석

나. 병징에 따른 바이러스 유전자의 변이 분석

검은 점병이 발현한 정도에 따라 ASGV의 변이 정도를 분석하였다. 그림 7에서 보는 것처럼 병징의 정도와 바이러스의 변이 정도는 큰 관계가 없는 것으로 보인다.

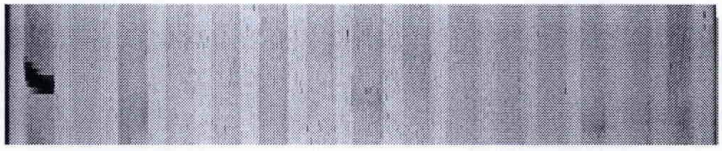


그림 7. 기주 식물에 감염한 ASGV의 변이 분석

4. 기주 식물과 곰팡이 염색체 내 ASGV 유전자 분석

가. 기주식물 내에서의 ASGV 유전자 분리 및 탐색

앞선 결과에서 ASGV가 곰팡이 매개체를 통해 기주 식물에 전달이 되고 감염 후 복제 하는 것을 간접적으로 제시하였다. 그러나 이러한 현상이 매개체를 통한 전달에 의한 것이 아니라 기주 염색체에 존재하는 유사 염기서열의 증폭이 아닌지를 의심하고 확인하였다. 기주 식물에서 genomic DNA를 추출하여 확인한 결과 이에서는 증폭되지 않는 것을 확인하였다.

나. 곰팡이 내에서의 ASGV 유전자 분리 및 탐색

곰팡이가 바이러스를 획득한 것이 아니라 곰팡이 염색체 내 ASGV 염기서열과 유사한 부분이 존재하여 증폭이 일어나는 것이 아닌지를 확인하였다 곰팡이에서 genomic DNA를 추출하여 확인한 결과 이에서는 증폭되지 않는 것을 확인하였다.

다. 곰팡이 내에서 바이러스의 증식 여부 확인

ASGV 감염 곰팡이 내에서 복제가 이루어지는지를 확인하고자 하였다. ASGV 감염 곰팡이를 100 ㎖ PDB에 접종하여 실온에서 20일 동안 배양하였고 이를 20일 간격으로 계대 배양하였다. 각 단계의 접종원은 바로 전 단계의 배양액에서 취하였다. 계대 배양을 마친 후 첫 번째부터 네 번째 배양까지 각각의 단계에서 회수한 균사로부터 total RNA 를 추출하여 template으로 사용하였고, ASGV의 CP gene에 대한 specific primers를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 각각의 반응에서 expected size인 714 bp 크기의 PCR products를 확인하였다 (그림 8A).

계대 배양 과정 중 네 번째 배양액의 균사에서 추출한 total RNA를 template으로 사용하여 ASGV의 serine proteinase, RdRp, helicase와 같은 주요 ORF를 증폭하고 이에 대한 염기서열 분석을 수행하였다. RT-PCR 결과 각각의 부위에 대해 예상되는 크기의 bands를 확인할 수 있었고 (그림 8B), 증폭된 유전자의 염기서열을 분석한 결과 검은 점병에서 분리한 ASGV의 serine proteinase, RdRp, helicase와 각각 82%, 83%, 96%의 상동성을 보였다.

바이러스는 기주에 의존하여 복제하는 유전 물질이다. 따라서 간접적이지만 위와 같은 결과로 곰팡이에서 ASGV의 증식이 이루어지는 것을 예상할 수 있었다.

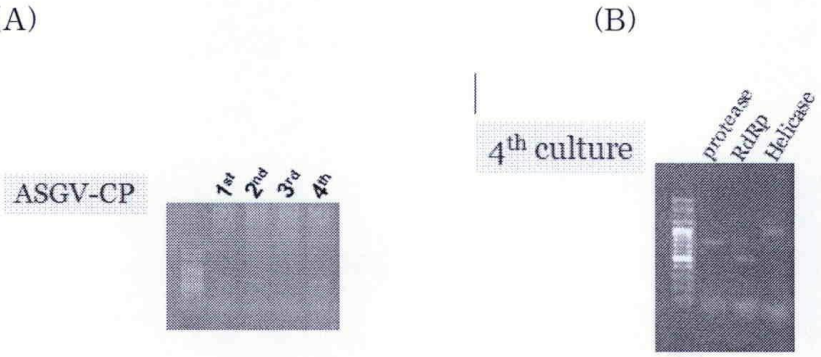


그림 8. Gel electrophoresis of RT-PCR products. (A) PCR products amplified by primer set CP-specific P1 and P2. Lane 1, ASGV-infected fungi before suspension culture; Lane 2, suspension cultural mycelia of ASGV-infected T. flavus 20 days post-inoculation (p.i.); Lane 3, suspension cultural mycelia collected on days 20 after the introduction of suspension mycelia of lane 2; Lane 4, suspension cultural mycelia were collected in the same manner. (B) Lane 1, serin protease; Lane 2, RNA dependent RNA polymerase; Lane 3, helicase. Electrophoresis was performed in 1% agarose gel and 100 bp DNA ladder (Bioneer) was used as a DNA standard.

5. ASGV 감염 곰팡이의 기주 식물 screening 및 선발

가. 곰팡이 접종을 통한 초본성 기주식물 선발

ASGV의 초본성 기주 식물로는 *Chenopodium quinoa, Phaseolus vulgaris, Nicotiana glutinosa*등이 알려져 있다. 그러나 ASGV 감염 곰팡이와 기주 식물 사이에 특이적인 반응이 있을 것을 고려하여 연구 목적에 적합한 새로운 초본성 기주식물을 선발하고자 하였다. 접종은 곰팡이를 직접 기주식물의 잎에 물리적으로 접종하거나 (Table 2-A) 흙에 곰팡이 배양액을 관주하였다 (Table 2-B).

경기도 농촌지도소에서 육종중인 강낭콩 10 품종을 공시 식물로 선발하여 감염도를 측정하였다. 잎에 직접 접종하였을 때의 감염도는 약 35% - 90%, 흙에 관주하였을 때는 0%-70%의 감염도를 보였다. 아래 표에서 보는 것처럼 품종과 접종 방법에 따라 감염도에 많은 차이를 보여주는 것은 기주 식물과 ASGV 그리고 ASGV를 매개하는 곰팡이 사이의 매우 특이적인 상호작용의 결과로 보여진다. 본 실험에서는 경기 5호에서 상대적으로 빠른 시간 안에 뚜렷한 병징을 관찰할 수 있었다 (그림 9). 또 다른 초본성 식물인 명아주와 담배의 경우는 강낭콩에 비해 감염도가 현저히 낮았다. 전체적으로 뿌리에 곰팡이 배양액을 관주하는 것보다는 잎에 접종하였을 때 보다 빨리 병징을 확인할 수 있었다. 강낭콩 경기 5호를 model host로 선발하였다.

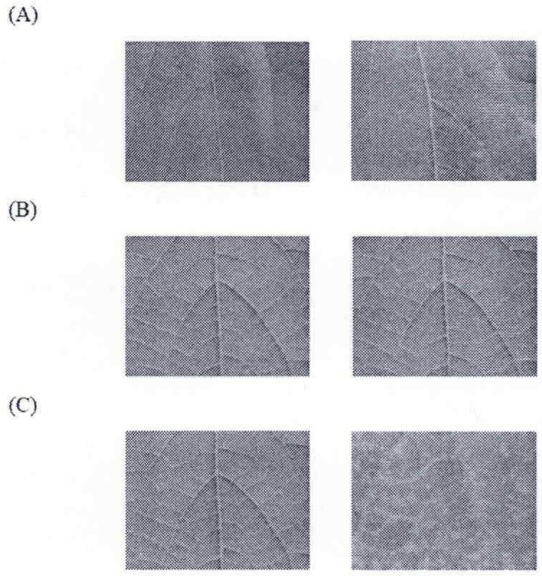


그림 9. Comparison of symptoms on leaves of *Phaseolus vulgaris* at 25 DPI. The leaves on the left are buffer-inoculated leaves, which served as the negative controls, and the leaves on the right were inoculated with (A) infectious ASGV plant sap, (B) ASGV-infected *T. flavus*, and (C) plant sap from ASGV-infected *T. flavus* infected leaves.

Table 2. Infection rates of various *P. vulgaris* cultivars inoculated with ASGV-infected fungal isolate.

(A) Inoculation of fungus onto the leaves.

Plant	N[a]	% infected[b]	severity[c]	DPI[d]	RT-PCR
P.vulgaris					
Kyunggi 1	20	85	4	10	+
Kyunggi 2	20	85	3	17	+
Kyunggi 4	20	85	4	12	+
Kyunggi 5	20	90	5	10	+
Kangnangkong 1	20	50	2	17	+
KGP 6029	20	75	3	11	+
KGP 7059	20	75	3	14	+
Chungkye 20	20	50	2	20	+
Chungkye 23	20	50	2	20	+
Sansung	20	35	1	23	+
C.quinoa	14	0	0	ND[e]	ND
Nicotiana tabacum	14	0	0	ND	ND

a; number of plants treated
b; (number of plants showing symptoms/total number of plants treated) x 100
c; degree of symptom development (0; no symptoms, 1; mild symptoms, 2; moderate symptoms,and 3; severe symptoms)
d; DPI (days post-inoculation)
e; Not determined

(B) drenching

Plant	N[a]	% infected[b]	severity[c]	DPI[d]	RT-PCR
P.vulgaris					
Kyunggi 1	10	50	2	14	+
Kyunggi 2	10	50	1	20	+
Kyunggi 4	10	50	2	16	+
Kyunggi 5	10	70	3	14	+
Kangnangkong 1	10	20	1	19	+
KGP 6029	10	40	2	16	+
KGP 7059	10	40	1	19	+
Chungkye 20	10	ND[e]	0	ND	+
Chungkye 23	10	ND	0	ND	+
Sansung	10	0	0	ND	ND
C.quinoa	14	21	1	20	+
Nicotiana tabacum	14	0	0	ND	ND

a; number of plants treated
b; (number of plants showing symptoms/total number of plants treated) x 100
c; degree of symptom development (0; no symptoms, 1; mild symptoms, 2; moderate symptoms,and 3; severe symptoms)
d; DPI (days post-inoculation)
e; Not determined

나. 기주식물에서의 바이러스의 증식 양상 및 병징 분석

곰팡이를 통해 기주 식물인 강낭콩으로 옮겨진 ASGV의 감염과 복제 양상을 northern hybridization으로 확인하였다 (그림 10). ASGV CP를 probe로 사용하여 검정하였다. 곰팡이를 접종한 후 10-15일 경과하면 병징을 관찰할 수 있었고, 이 시점의 조직을 취해 total RNA를 추출하였다. ASGV 감염 곰팡이를 경기 5호에 접종한 후 병징이 나타난 잎에서 sap을 취해 새로운 경기 5호에 접종하였다. 이러한 방법으로 접종한 경기 5호에서 발현하는 병징은 ASGV sap을 접종한 것과 ASGV 감염 곰팡이를 접종하였을 때 관찰할 수 있는 병징과 유사하였다. ASGV 감염 곰팡이를 기주 식물에 접종한 것이나 이로부터 얻은 sap을 접종한 것, ASGV를 감염한 것 모두에서 바이러스의 accumulation이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 축적되는 양의 차이가 있었는데 곰팡이를 통해 기주 식물로 옮겨진 것은 식물에서 식물로 옮겨진 것에 비해 상대적으로 적은 양이 축적되는 것을 확인할 수 있었다.

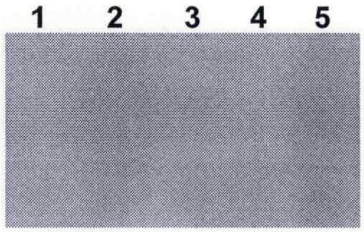


그림 10. 감염 방법에 따른 바이러스의 accumulation 정도 비교. 기주 식물로는 경기 5호를 사용하였고 total RNA를 추출하여 각 10 μg을 전기영동하였다. Lane 1, Mock (water-inoculation); lane 2, ASGV를 감염시킨 명아주에서 병징을 확인한 후 이병 잎으로부터 취한 sap을 접종; lane 3, ASGV 감염 곰팡이를 경기 5호에 접종한 뒤 신초에서 병징의 발현을 확인하고 이병 잎으로부터 sap을 취해 새로운 경기 5호에 접종; lane 4, virus-free isolate를 잎에 직접 접종; lane 5, ASGV 감염 곰팡이를 잎에 직접 접종

ASGV 감염 곰팡이를 접종하여 병징을 관찰할 수 있었던 경기 5호에서 잎이 발생한 위치 별로 조직을 취해 각각에서 total RNA를 추출하고 위와 동일한 방법으로 northern hybridization을 수행하였다. 곰팡이의 접종은 잎이 2장 이었을 때 1회 실시하였으며 이후는 병징의 발현 시기까지 식물을 배양하였다. Probe는 ASGV CP를 사용하였고 잎이 자란 위치에 따라 조직을 취하여 추출한 RNA 각 20 ㎍을 membrane에 transfer 하였다. Hybridization 결과 가장 늦게 발생한 잎에서 바이러스가 가장 많이 축적된 것을 확인하였다 (그림 11).

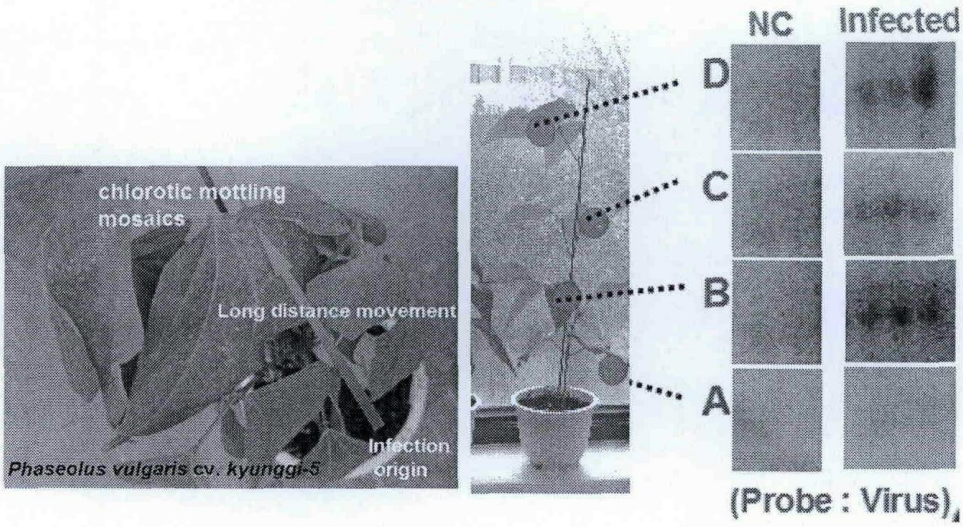


그림 11. Virus accumulation on different leaves of different developmental stages. A, foliage leaf; B, 1st trifoliolate leaves; C, 2nd trifoliolate leaves; D, latest leaves.

다. 곰팡이 접종을 통한 과수바이러스 기주식물 선발

곰팡이에 의해 배나무로 ASGV가 전이되는 것을 확인하기 위해 무독묘에 곰팡이를 두 가지 방법으로 접종하였다. 초본 기주 식물에서 수행했던 것과 동일하게 일부는 잎에 물리적인 방법으로 접종하였고 일부는 흙에 관주하였다. 배나무 무독묘 20 개체는 무독묘에서 취한 접수를 virus-free root stock에 접을 붙여 만들었다. 이 중 10 개체는 mock inoculation 용으로 사용하였고, 다른 10개체에는 바이러스에 감염된 곰팡이를 접종하였다. 배의 잎은 조직이 두텁기 때문에 6개 개체에는 주사기를 이용하여 leaf surface에 물리적인 상처를 준 뒤 infiltration 하였고, 4개 개체는 PDB에서 배양한 액을 흙에 직접 처리하였다. 병징의 발현과 바이러스의 감염 양상에 대한 대조구로 사용하기 위해 ASGV에 감염된 배나무 가지를 접수로 취해 virus-free root stock에 접목하고 배양하였다. 6개월이 경과한 후 ASGV에 감염된 가지를 접붙인 배나무에서 전형적인 pear black necrotic leaf spot을 관찰할 수 있었다 (그림 12). 바이러스 감염 곰팡이를 접종한 개체에서는 두 가지 방법 당 한 개씩의 이병 식물을 얻을 수 있었다. 이들의 증상은 indicator에서 보인 병징과 유사했고 비슷한 시기에 보이기 시작했으나 상대적으로 증상의 정도가 약하였다 (그림 12). Indicator plants에서는 검은 반점이 보이고 난 후 반점의 형성과 반점사이의 융합이 빠르게 번져 잎 전체에 분포하였으나 바이러스 감염 곰팡이를 감염시킨 배나무에서 나타난 반점은 병반의 진전이 거의 없었다 (그림 12). 이 시기까지 건전주에서는 병징이 발현되지 않았다 (그림 12).

Table 3. Infection rates of pear trees inoculated with ASGV-infected fungal isolates and top-grafting.

Methods	N[a]	% infected[b]	severity[c]	DPI[d]	RT-PCR
Top grafting (Healthy plants)	10	0	0	-	-
Top grafting (Indicator plants)	10	70	3-5	6 months	+
Virus-infected fungus Inoculation	10	20	2	6 months	+

a; number of plants treated

b; (number of plants showing symptoms/total number of plants treated) x 100

c; degree of symptom development (0; no symptoms, 1; mild symptoms, 2; moderate symptoms, and 3; severe symptoms)

d; DPI (days post-inoculation)

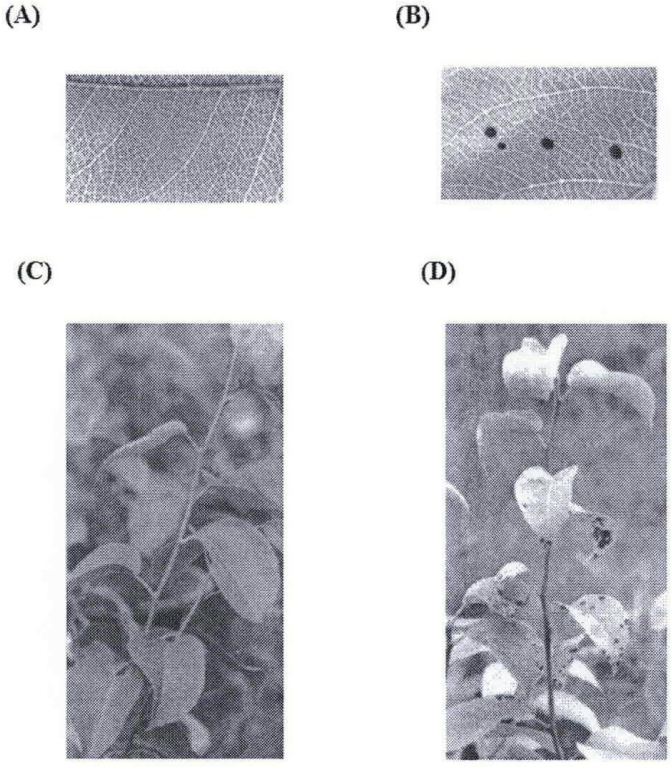


그림 12. Symptoms caused by virus-infected fungi and grafting. (A) Virus-free *T. flavus*-infected pear, (B) virus-infected *T. flavus*-inoculated pear, (C) Virus-free pear tree, (D) Virus-infected indicator plants.

병징을 보이지 않은 건전주, 전형적인 병징을 보인 indicator plants, 두 가지 방법으로 접종하여 병징을 관찰할 수 있었던 각각의 개체에서 이병 잎을 취해 total RNA를 추출하고 ASGV CP primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 건전주에서는 PCR product를 확인할 수 없었고, 병징이 발현된 indicator에서는 product를 확인할 수 있었다 (그림 13). 배 잎에 적접 접종한 잎에서 병징이 관찰된 잎과 흙에 직접 곰팡이 배양액을 처리한 잎에서 반점을 보였던 개체에서 얻은 잎에서도 PCR product를 확인할 수 있었으며 염기서열을 확인한 결과 모두 ASGV (AF465354)와 98% 이상의 염기서열의 상동성을 보여주었다.

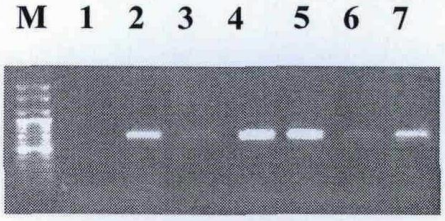


그림 13. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR using ASGV CP specific primer. M, 100 bp DNA size ladder; Lane 1, healthy pear leaves; Lane 2, ASGV infected pear leaves; Lane 3 and 4, ASGV-infected *T. flavus* inoculated onto upper leaves far grafting point; Lane 5 and 6, ASGV-infected *T. flavus* inoculated onto lower leaves near grafting point; Lane 7, conidia suspension of ASGV-infected *T. flavus* drenching roots. Odd number lanes (3, 5 and 7) are new developed young leaves and even number lanes (4 and 6) are fungi inoculated origins.

제 2절 과수 바이러스 감염 곰팡이의 분리 수집 및 바이러스 확인

1. ASGV 감염 곰팡이의 분리 및 분포조사

ASGV에 감염된 곰팡이가 자연 상태에 분포하는 정도와 그 밀도를 분석하기 위해 수원과 안성 두 지역에서 각각 한 곳의 배나무 과수원을 선정하여 배나무의 발생과 온도 변화에 따른 전체 곰팡이의 밀도 변화를 조사하였다. 배나무 건전주와 이병주의 꽃, 잎의 표면과 내부 그리고 주변 흙을 취해 곰팡이의 분리에 사용하였다. 분리된 전체 곰팡이 중 ASGV에 감염된 곰팡이는 RT-PCR 방법으로 선발하였다. ASGV 감염 곰팡이의 분포와 밀도 변화는 전체 곰팡이의 분석 결과와 비교하여 측정하였다. 조사 시기는 배나무의 ASGV에 의한 병징이 초기 발생하여 최고조에 이르는 4-6월로 정하였다. 전체 곰팡이 밀도의 변화는 각각의 곰팡이를 동정하여 이들 각각에 대한 변화를 조사한 것이 아니라 채취한 조직이나 토양으로부터 분리 및 배양된 모든 곰팡이의 수를 종합한 것이다.

수원과 안성 지역의 배나무 꽃이 피는 시기는 4월 중순에서 5월 초로 꽃잎과 꽃받침 부분을 포함하여 채집한 후 곰팡이를 분리하였으나 수원에서 89 isolates와 안성 지역에서 16 isolates에서 ASGV에 감염된 곰팡이는 분리되지 않았다 (Table 4).

잎 표면에서 배양된 전체 곰팡이의 밀도는 4월에서 6월로 진행되면서 약 50% 감소하였다 (Table 5). ASGV에 감염된 곰팡이는 온도나 병징과 뚜렷한 상관 관계 없이 비슷한 수로 분리되었다. 또한 전체 곰팡이 밀도의 변화와도 밀접한 관계는 없었으며 지역적인 차이도 관찰되지 않았다.

Table 4. Population density of fungi on *Pyrus* flowers.

Location	Plant Condition	Total (A)	ASGV-infected* (B)	Ratio (B/A)
Suwon	Healthy	64	0	0
	Infected	24	0	0
Anseong	Healthy	2	0	0
	Infected	14	0	0

*ASGV infection was determined by RT-PCR.

Table 5. Seasonal changes of fungal populations on leaf surface of *Pyrus*

		virus-infected fungi[a]/total fungi[b]			
Location	**Plant Condition**	**April**	**May**	**June**	**Total**
Suwon	Healthy	0/11	0/9	0/6	0/26
	Infected	0/10	0/6	1/5	1/21
Anseong	Healthy	1/12	0/4	0/7	1/23
	Infected	1/11	0/5	0/4	1/20

The a/b ratio represents the ratio of virus-infected fungi (a) to the total number of fungi detected (b). ASGV infection was determined by RT-PCR or dot-blot hybridization.

잎 내부에서 배양된 곰팡이는 잎 표면에서 가장 많은 곰팡이가 분리되었던 4월에는 전혀 분리되지 않았다 (Table 6). 4월에 비해 5월에 상대적으로 많은 수의 곰팡이가 잎 내부에서 분리되었다가 6월에는 다시 감소하였다. 잎 표면에서 보았던 결과와 다르게 ASGV 감염 곰팡이의 수가 전체 곰팡이 밀도의 변화와 유사하게 유지되는 것을 알 수 있다 (Table 6). 잎 표면에서와 마찬가지로 분리되는 곰팡이의 밀도 변화는 지역 간의 차이나 기주 식물의 감염에 따른 차이는 없었다.

과수원의 토양에서는 잎이나 꽃과는 다른 양상을 보여주었다. 토양에서는 비교적 일정한 수의 곰팡이가 분리되었다. 토양에서 분리된 전체 곰팡이의 밀도 변화는 온도 변화에 큰 영향을 받지 않았으며 평균 13 isolates가 분리 되었다 (Table 7). ASGV 감염 곰팡이의 밀도도 전체 곰팡이 밀도의 변화와 유사하였으며 (Table 7), 토양에서는 꽃이나 잎에서 분리된 결과와 비교하여 상대적으로 많은 5 isolates 의 ASGV 감염 곰팡이가 분리되었다.

Table 6. Seasonal changes in fungal populations in the interior of *Pyrus* leaves.

Location	Plant Condition	virus-infected fungi[a]/total fungi[b]			
		April	May	June	Total
Suwon	Healthy	0/0	0/7	0/7	0/14
	Infected	0/0	1/11	0/2	1/13
Anseong	Healthy	0/0	0/4	1/1	1/5
	Infected	0/0	0/6	0/1	0/7

The a/b ratio represents the ratio of virus-infected fungi (a) to the total number of fungi detected (b). ASGV infection was determined by RT-PCR or dot-blot hybridization.

Table 7. Seasonal changes in fungal populations in rhizosphere soil.

Location	Plant Condition	virus-infected fungi[a]/total fungi[b]			
		April	May	June	Total
Suwon	Healthy	0/14	1/9	0/10	1/33
	Infected	0/12	1/9	2/10	3/31
Anseong	Healthy	3/12	0/15	0/10	3/37
	Infected	1/16	1/15	0/9	2/40

The a/b ratio represents the ratio of virus-infected fungi (a) to the total number of fungi detected (b). ASGV infection was determined by RT-PCR or dot-blot hybridization.

위의 결과를 도식화하여 보면 다음과 같다.

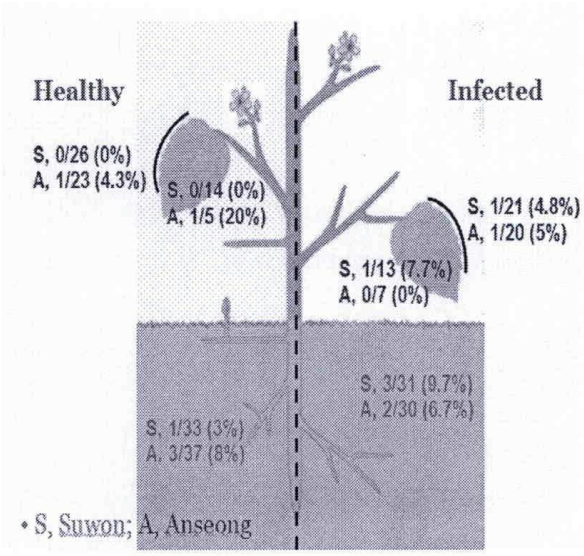


그림 14. ASGV 감염 곰팡이의 지역에 따른 부위별 분포조사

2. 분리된 곰팡이의 ASGV 감염 확인 및 벡터 기능 분석

가. RT-PCR 및 dot-blot hybridization을 이용한 바이러스 확인

수원과 안성 두 지역의 다양한 분리원에서 배양한 ASGV 감염 곰팡이로부터 단포자를 분리하였고, 여러 번의 배양 과정을 거쳐 순수 분리하였다. 이들 각각을 RT-PCR과 dot-blot hybridization으로 검정하여 ASGV에 감염된 곰팡이를 최종적으로 선발하였고, 이들을 형태별로 분류하였다. ASGV에 감염된 곰팡이와 유사한 형태의 곰팡이를 선별하여 대조구를 삼았다. 단포자 분리 후 3회의 dot-blot hybridization 과정을 거쳐 동일한 강도의 signal을 확인할 수 있는 균주를 최종 선발하였다. 이들에 대해 RT-PCR을 수행하여 ASGV CP가 확인되는 것을 알 수 있었다.

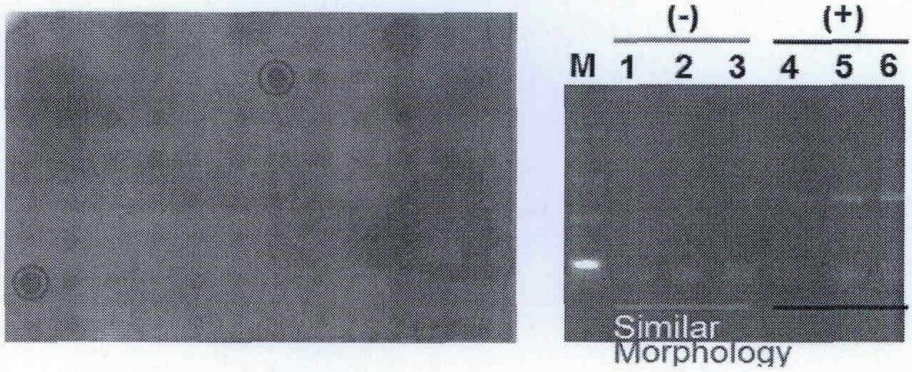


그림 15. ASGV 감염 곰팡이를 선별하기 위해 포장에서 수집한 곰팡이에서 단포자를 분리한 후 total RNA를 추출하고 dot-blot hybridization을 통해 확인. 3회의 반복 과정을 통해 동일한 강도를 보이는 균주를 선택하여 RT-PCR을 수행하고 바이러스에 감염되어 있음을 결정. 유사한 형태이지만 두 가지의 반복 실험을 통해 바이러스에 감염되지 않은 곰팡이를 함께 선별.

나. 초본성 지표식물을 이용한 바이러스 확인

바이러스에 감염된 곰팡이와 바이러스에 감염되지 않은 곰팡이를 각각 경기 5호의 잎에 물리적인 방법으로 접종하였다. 바이러스에 감염된 곰팡이를 접종한 개체에서는 접종 후 20일이 경과하자 병징이 발현하였고, RT-PCR로 ASGV의 유전자를 확인할 수 있었다. 유사한 형태로 자라지만 바이러스에 감염되지 않은 곰팡이를 접종한 경기 5호에서는 병징의 발현을 관찰할 수 없었고, RT-PCR 결과에서도 ASGV의 유전자를 확인할 수 없었다. 이러한 결과에 기초하여 볼 때 식물에 곰팡이를 접종한 후 나타나는 병징은 곰팡이 자체에 의한 것이 아니라 곰팡이를 통해 옮겨진 바이러스에 의한 것으로 볼 수 있다.

Table 8. Infectivity of mechanical inoculation assay on *P. vulgaris* with ASGV-free and ASGV-infected fungus

	Infectivity (%)[a]	severity[b]	RT-PCR
virus-infected 1	70	3	+
virus-infected 2	80	2	+
virus-infected 3	60	3	+
virus-free 1	0	0	-
virus-free 2	0	0	-
virus-free 3	0	0	-

a ; number of plants showing symptoms / number of total plants applied X 100

b; degree of symptom development (0; no symptom, 1; mild symptom, 2; moderate symptom and 3; severe symptom)

제 3절 과수 바이러스 감염 곰팡이에 의한 바이러스 전이기작 분석

1. ASGV 매개 곰팡이 내의 바이러스 관찰

가. ASGV 감염 곰팡이 내 바이러스의 순수 분리 및 입자의 형태 관찰

곰팡이에서 순수 분리한 바이러스의 형태와 조직 내에서의 형태를 관찰하기 위해 *Talaromyces flavus* 균체 내 바이러스의 밀도를 높이는 과정을 수행하였다. ASGV의 감염이 확인되는 균주를 지름 5cm 크기의 petri-dish에서 7일 동안 배양한 뒤 급속히 건조시켜 starvation condition이 되도록 하였다. 이것을 접종원으로 사용하여 조직 내부 관찰을 위한 것은 새로운 PDA 배지로 옮겨주었고, 순수 분리를 위한 것은 PDB 배지에 접종하여 각각을 14일 동안 배양하였다. 바이러스의 titer가 높지 않기 때문에 PDB 배지에서 대량으로 배양하여 균사를 회수하였다. 균체 내 존재하는 바이러스를 관찰하기 위한 시료는 접종원을 중심으로 구획을 나누었고, 바이러스의 농도가 높은 부위를 northern hybridization을 통해 선정하였다. 감염되지 않은 균주 역시 동일한 조건에서 배양한 뒤 같은 방법으로 시료를 준비하였다.

ASGV는 titer가 높지 않고, 순화가 쉽지 않은 대표적인 과수 바이러스 중 하나이다. 이러한 문제 때문에 균체 내에서 바이러스의 농도를 높이는 방법을 고안하여 수행하였고, 다량의 균사를 회수하였으나 방법적인 어려움으로 입자의 형태를 관찰하지는 못하였다. 현재는 순화의 방법에 다양한 변화를 주어 시도하

고 있는 중이다. 균체 내에서의 바이러스 위치와 형태 관찰 역시 계속적으로 수행할 예정이다. 가능한 많은 종류의 시료를 준비하였고, 다양한 각도에서 관찰을 시도하고 있다.

곰팡이에서 분리한 바이러스에서 ASGV의 coat protein과 같은 크기의 단백질을 확인할 수 있었다 (그림 16).

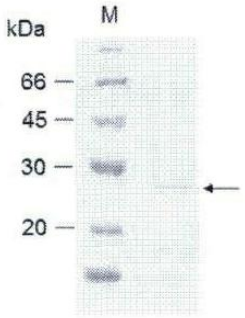


그림 16. 곰팡이에서 분리한 바이러스에서 확인한 단백질.

나. ASGV 감염 및 건전 곰팡이 조직의 세포학적 비교

ASGV의 감염에 의한 *Talaromyces flavus* 균체 내부 미세조직의 변화를 살펴보기 위해 투과전자현미경 (TEM)으로 관찰하였다. 균체 내 바이러스의 밀도를 높여 TEM을 이용한 직접적인 관찰이 용이하도록 ASGV의 안정적인 증식을 유도하였다. 이를 위해 ASGV의 감염이 확인되는 균주를 지름 5cm 크기의 petri-dish에서 7일 동안 배양한 뒤 급속히 건조시켜 starvation condition이 되도록 하였다. 이것을 접종원으로 사용하여 새로운 PDA 배지로 옮겨주고 14일 동안 배양하였다. 접종원을 중심으로 5 X 5 mm 크기의 24개 block으로 구획을 나누고, 바이러스의 농도가 높은 부위를 northern hybridization을 통해 선정하였다. 감염되지 않은 균주 역시 동일한 조건에서 배양한 뒤 같은 방법으로 시료를 준비하였다.

감염주의 내부 구조는 감염되지 않은 균주와 다르지 않은 것으로 보인다. 바이러스의 증식이 이루어진 시료에서 관찰하였으나 세포 내부 기관의 비정상적인 변형은 관찰되지 않는다. 바이러스 titer가 높지 않아 기주인 곰팡이의 내부 미세구조에 변화를 주지 않은 것으로 보여 지나 시료의 특성을 고려하여 보다 많은 시료를 확보하고 다양한 각도에서 관찰하여 바이러스에 의한 영향을 살펴보아야 할 것으로 사료된다.

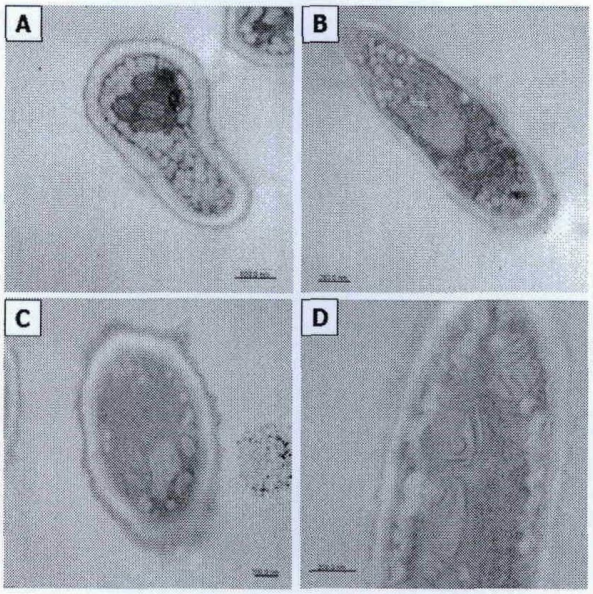


그림 17. *Talaromyces flavus*의 전자현미경 사진. A와 B는 virus-free isolate (T16-6), C와 D는 virus-infected isolate (T2-3).

2. ASGV 전체 유전자 분리 및 확보 II

가. ASGV의 증식, 순수분리 및 total genome 확보

곰팡이를 기주로 이용하여 ASGV의 증식이 안정적으로 이루어질 수 있는 유도 조건을 확립하기 위해 다양한 종류의 스트레스 조건을 만들어 처리하였다. 지름 5 cm plate에서 키운 *T. flavus*를 5 X 5 mm 크기로 잘라 접종원으로 준비하였다. 이것을 PDA 배지의 중심에 옮겨주고 7일을 배양한 뒤 16시간 간격으로 50℃에서 1시간 동안 배양하는 것을 3회 반복하였다. 일부는 PDA powder에 agar의 양을 2배로 넣어 배지를 만들었다. 다른 것은 배지를 얇게 부어 같은 기간을 배양하면 배지가 먼저 마르도록 하여 starvation 조건에 놓이도록 하였다. 모두 28℃ 배양기에서 자라도록 하였고, 처리한 조건에 상관없이 총 배양 기간은 접종 후 14일이 되도록 하였다. 이렇게 배양한 곰팡이 각각을 접종원으로 하여 PDB 배지에 접종하였고, 14일을 키운 뒤 filter paper를 이용하여 균사를 회수하였다. 3회의 반복 실험을 수행한 결과 starvation 조건이 되도록 스트레스를 처리한 균주에서 가장 높은 양의 바이러스가 확인됨을 알 수 있었다. 계대 배양 시 전달된 바이러스는 dot-blot hybridization 방법을 통해 확인하였다. 계대 배양 시 바이러스의 전달이 균일하게 이루어지지 않는 문제점이 있었으나 starvation을 거친 뒤에 바이러스가 확인되는 균주가 있는 것으로 보아 적은 양의 바이러스가 남아 있으면 복제를 유도하는 것으로 보여 진다.

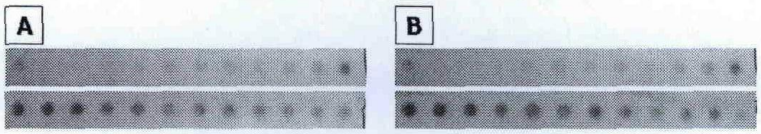


그림 18. PDA powder에 agar를 2배로 넣은 배지에서 배양한 균주 내에서의 바이러스 양의 변화. A는 ASGV의 CP gene을 probe로 사용. B는 ASGV의 ORF1 중 N-termini 일부를 cloning 하여 probe로 사용. A와 B의 각 3개 blot 중 가장 위에 있는 것은 계대 배양 후 바이러스가 확인되는 않는 균주의 RNA. 아래 2개 blot은 바이러스가 확인되지 않는 균주를 agar 과량 첨가된 배지에서 배양한 것.

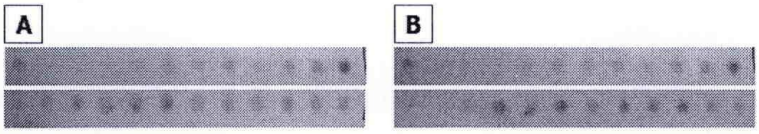


그림 19. 열처리를 한 균주 내에서의 바이러스 양의 변화. A는 ASGV의 CP gene을 probe로 사용. B는 ASGV의 ORF1 중 N-termini 일부를 cloning 하여 probe로 사용. A와 B의 각 3개 blot 중 가장 위에 있는 것은 계대 배양 후 바이러스가 확인되는 않는 균주의 RNA. 아래 2개 blot은 바이러스가 확인되지 않는 균주를계대 배양 후 7일을 키운 뒤 16시간 간격으로 50℃에서 1시간 배양.

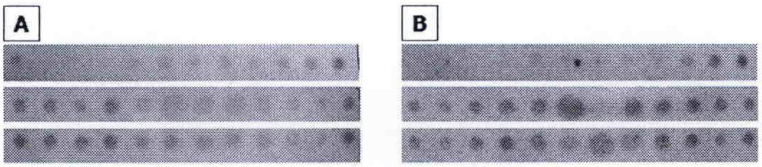


그림 20. starvation 후 균주 내에서의 바이러스 양의 변화. A는 ASGV의 CP gene을 probe로 사용. B는 ASGV의 ORF1 중 N-termini 일부를 cloning 하여 probe로 사용. A와 B의 각 3개 blot 중 가장 위에 있는 것은 계대 배양 후 바이러스가 확인되는 않는 균주의 RNA. 아래 2개 blot은 바이러스가 확인되지 않는 균주를 starvation 시킨 뒤 배양한 것.

ASGV는 기주 식물에서의 복제가 활발하지 않은 바이러스 중 하나이다. 또 다른 기주로 여겨지는 곰팡이에서 역시 비슷한 양상을 보여 바이러스 genome의 확보가 어렵다. 이를 극복하기 위해 다양한 스트레스 조건을 부여하고, 각각에 대한 바이러스의 양을 확인하였다. 본 연구에서는 starvation 후 바이러스의 복제가 유도되는 것으로 판단하고 이를 활용하여 바이러스를 증식 및 확보하고 있다. 곰팡이에서 복제한 ASGV의 전체 염기서열이 어떻게 구성되었는지 알아보기 위해 total RNA와 dsRNA의 추출을 병행하여 주형으로 사용하였다.

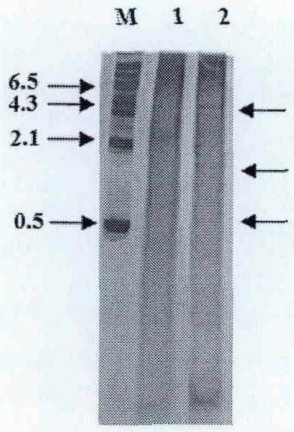


그림 21. virus-free isolate와 virus-infected isolate에서 추출한 dsRNA. M, DNA/Hind III fragments; Lane 1, dsRNA from virus-free *T. flavus* Lane 2, dsRNA from virus-infected *T. flavus*.

식물에서 나타나는 병징이 곰팡이 자체가 갖는 병원성에 의한 것이 아니라 곰팡이에 의해 옮겨진 ASGV에 의한 것임을 증명하기 위해 다음과 같은 실험을 계획하였다. *Talaromyces flavus*의 병원성에 대해 잘 알려진 바가 없기 때문에 바이러스가 없는 균주와 바이러스가 있는 균주를 같은 시기에 동일한 방법으로 잎에 접종하여 비교하였다.

ASGV의 기주 식물인 명아주 (*C. quinoa*), 강낭콩 (*P. vulgaris*), 담배 (*N. benthamiana*)를 대상으로 바이러스 감염주를 접종하여 바이러스의 복제 여부와 병징의 발현 정도를 비교하였다. 본 실험을 수행할 때에는, *N. benthamiana*에서의 감염률이 가장 높았고, ASGV의 전형적인 병징을 확인할 수 있었다. 대조구인 바이러스에 감염되지 않은 *T. flavus*를 접종한 식물에서는 병징이 발현되지 않았다. ASGV는 즙액 접종으로 전이되므로 발현한 병징이 바이러스에 의한 것인지를 확인하기 위해 sap을 취하여 새로운 *N. benthamiana*에 접종하였고, 접종 14일 후 동일한 병징이 발현되는 것을 확인하였다. 발현한 병징이 ASGV에 의한 것인지를 확실히 하기 위해 ASGV를 증식시킨 명아주에서 추출한 sap을 *N. benthamiana*에 접종하여 비교하였다. 잎을 취해 total RNA를 추출하여 만든 동일한 두 개의 blot을 만들어 ASGV의 CP 유전자와 ORF 1의 일부를 probe로 사용하여 바이러스의 증식을 비교하였다.

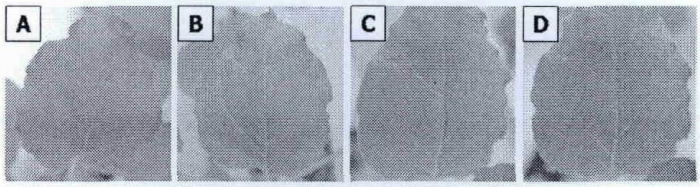


그림 22. A, virus-free *T. flavus*를 접종한 담배; B, ASGV를 증식한 명아주의 sap을 접종한 담배; C, virus-infected *T. flavus*를 접종한 담배; D, virus-infected *T. flavus*를 접종한 담배에서 병징 발현한 잎의 sap을 취해 재접종한 담배

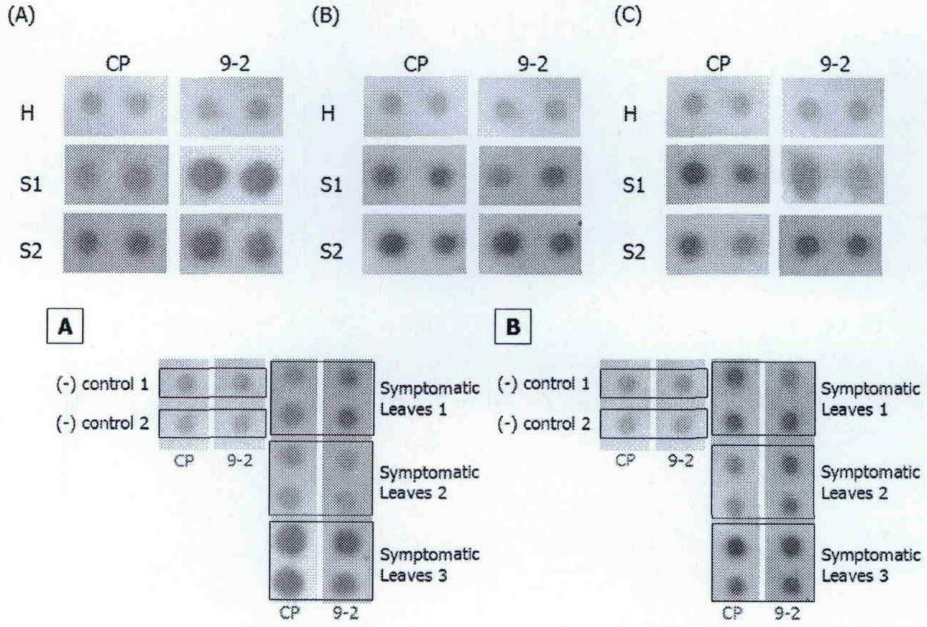


그림 23. virus-free & virus-infected *T. flavus*를 *N. benthamiana*에 접종하였을 때 바이러스의 감염 확인. A, ASGV를 증식한 명아주의 sap을 접종한 담배; B, virus-infected *T. flavus*를 접종한 담배

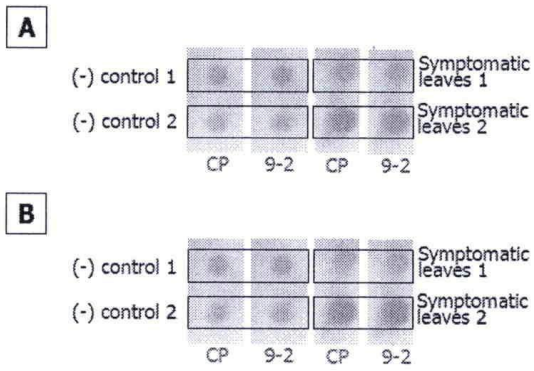


그림 24. 바이러스에 의한 병징의 확인. A, ASGV를 증식한 명아주의 sap을 접종한 담배; B, virus-infected *T. flavus*를 접종한 담배의 병징이 발현한 잎에서 취한 sap을 재접종한 담배

virus-infected *T. flavus*를 접종하여 기주 식물에서 바이러스를 증식시킨 뒤 염기 서열을 결정하기 위한 재료로 사용하였다. 이를 이용하여 곰팡이 기주에서 증식한 바이러스의 염기 서열과 비교하였다.

나. Infectious clone의 확보 및 유전자 분석, putative ORF의 분석

전체 염기서열이 분석된 ASGV는 사과에서 분리된 2종류의 strain과 배에서 분리한 한 종류의 strain이 GenBank에 등록되어 있다. 이 외에는 사과, 배, 키위, 감귤 등에서 분리되어 부분적으로 분석된 ASGV의 염기 서열이 보고 되어 있다. ASGV의 증식이 이루어진 기주 식물이 다르더라도 80% 이상의 상동성이 검색된다. amino acid 서열의 비교에서도 75% 이상의 높은 상동성을 갖는다. 기주 식물에 따른 특정 변이 부위는 전체 6495 nt 중 1364-3605 (nt) 사이에 존재하는 것으로 추정된다. 실제로 곰팡이에서 분리한 바이러스에서도 이 부위의 변이가 심하게 나타났다. 즉, 변이가 1364-3605 (nt) 사이에 집중되어 있다고 분석할 수 있다. 이는 helicase, methyltransferase, RNA dependent RNA polymerase 등의 주요 기능 단백질 포함되어 있는 ORF1에 해당하는 부위이다.

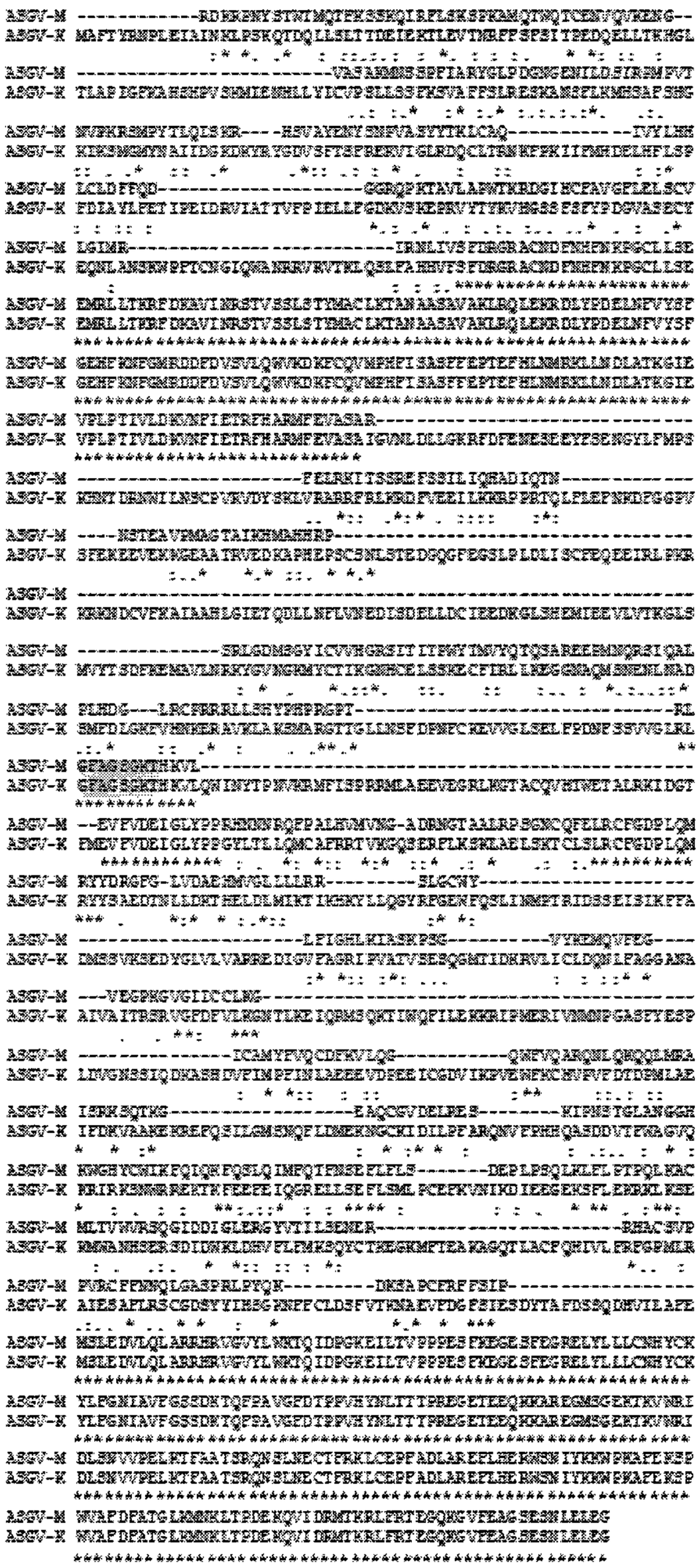


그림 25. Comparison of amino acid sequences of ORF 1 between ASGV fungal strain and ASGV-K (AY596172). Identical residues are indicated by asterisks and similar residues are indicated by colons. The conserved helicase motif is shown in the shaded box. The alignment was generated using CLUSTAL W.

3. ASGV 변이 분석 system 확립 II

가. 곰팡이와 과수로부터 분리한 바이러스의 유전자 증폭

ASGV의 전체 genome을 11개 부위로 나누어 각 부위를 효율적으로 증폭할 수 있는 primer를 새롭게 제작하였다 (표 9). 기주 식물에서 분리한 것과는 달리 곰팡이에서 분리한 바이러스에서는 다양한 변이의 양상을 보였다. 이들 변이의 발현 경향과 영향을 알아보기 위해 가능한 많은 수의 clone을 확보하여 염기서열을 해독하고 분석에 활용하였다. 전체 6.5 kb를 세 개의 균일한 크기로 나누었을 때 N-termini와 C-termini 부분은 거의 다르지 않은 서열들로 보존되고 있었다. 그러나 중심 부위는 다양한 염기 서열들이 분포하고 있었다. 식물의 ASGV를 직접 기주 식물에 접종하였을 때는 변이의 발현 정도가 매우 낮았던 것과 비교하여 특이적인 현상이라 할 수 있다.

표 9. ASGV의 전체 genome의 변이 분석을 위하여 제작한 primers

Name	Position	Sequences (5′-3′)	Size (bp)
P1-P2	5641-6351	catatgagtttggaagacgtgcttc ctcgagaccctccagttccaagtta	710
SGV1	5161-5855	gctcctacctattcacatttg gatgacccgaaaacagcaata	694
SGV2	4494-5323	cctatgttctgtggatggtac atgtcaagagcaaacaactcag	829
SGV3	4058-4587	acttttctgcctggatagct ctgtctttcactcatcatcttg	529
SGV4	3607-4148	gatgatgttactttctgggca gatgaatcaaaagaagtgtag	541
SGV5	3227-3662	tggagaggatagtcaacatgt ctccagtttgactttctaattctt	435
SGV6	2293-3287	ttcgacctagaattctgcaaga ccaacgtcaagtggactctc	994
SGV7	1316-2378	tcctggacaaagtcaacttca ccaagtctcaaaccaacaaca	1062
SGV9	796-1381	agcggcatacaatgggctaa tggcactggcaacctcaaa	585
SGV10	502-888	agagatcaatgccttacacgt agccctgcctctatcaaatga	386
SGV11	124-525	gacgagattgaaaaagaccttaga gttacgtgtaaggcattgatctc	401

나. PCR로 증폭한 바이러스 유전자의 염기서열 분석 및 비교

곰팡이에서 분리한 바이러스는 전체 6.5 kb를 세 개의 균일한 크기로 나누었을 때 중간 부위에서 변이의 폭이 넓었다. 과수에서 분리한 ASGV의 전체 염기서열에 근거하여 제작한 primer를 이용해 증폭을 반복하고 다양한 clone을 확보하여 염기 서열을 분석하였다.

특정 부위를 증폭한 후 염기 서열을 분석하여 분류를 하였다. 다음과 같이 부위마다 몇 개의 대표적인 서열들이 존재함을 알 수 있었다.

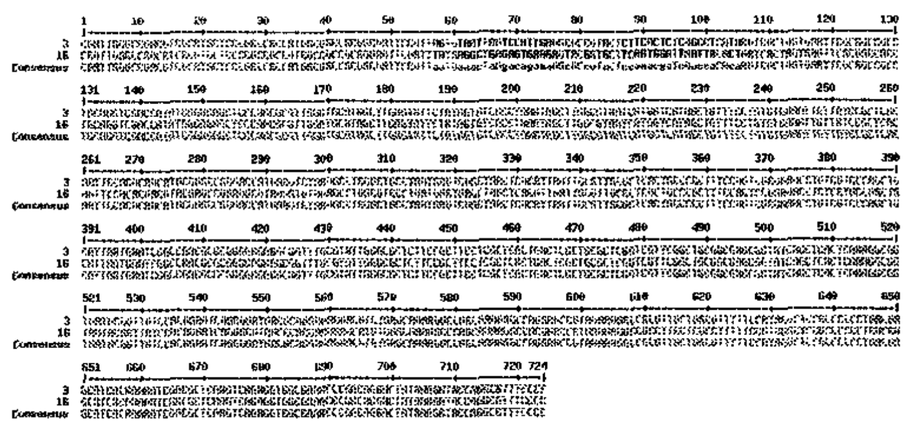


그림 26. 곰팡이에서 분리한 바이러스의 염기서열 분석. ASGV의 2200-2924 nt 에 해당.

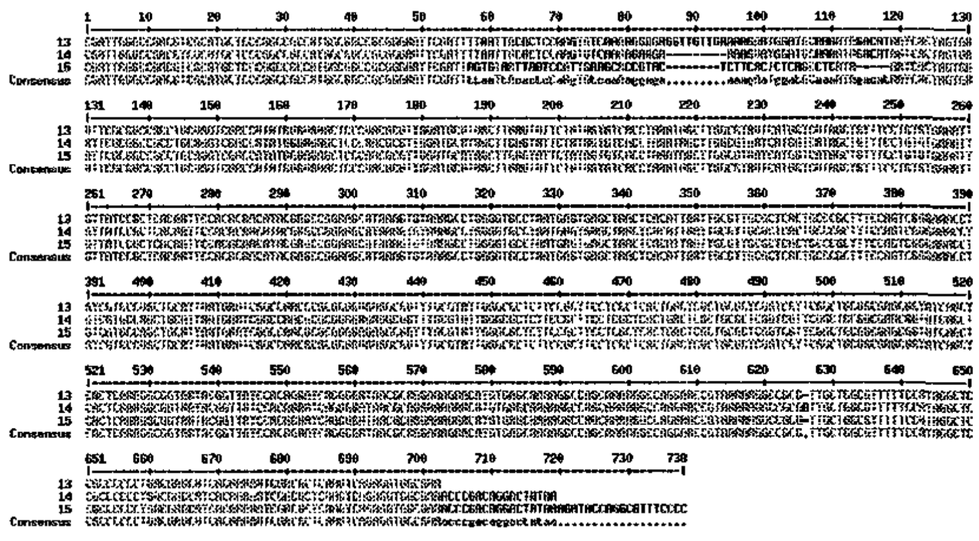


그림 27. 곰팡이에서 분리한 바이러스의 염기서열 분석. ASGV의 2924-3662 nt 에 해당.

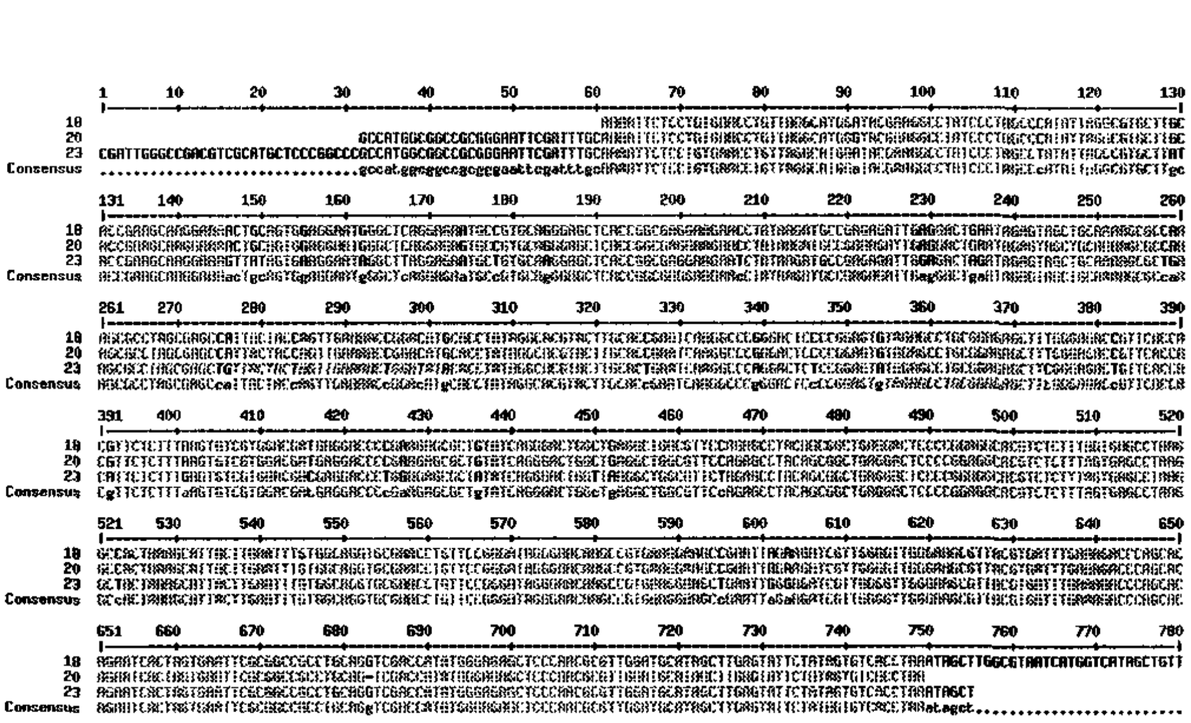


그림 28. 곰팡이에서 분리한 바이러스의 염기서열 분석. ASGV의 3807-4587 nt에 해당.

제 4절 과수 바이러스 감염 곰팡이의 형질전환 및 매개 양식 구명

1. ASGV 감염 곰팡이의 특성 조사

가. 형태적/배양적 특성에 따른 분류학적 분류

선별된 균주는 모두 agar 배지 상에서 자낭과를 쉽게 형성하는 자낭균이었다 (그림 29). 이 균주는 구형의 자낭을 다수 형성하였고 자낭 안에는 돌기를 가진 8개의 자낭 포자 (spiny ascospore) 가 들어 있었다. 자낭과 자낭 포자의 크기는 각각 7-9 7-9 ㎛, 4.4-5.6 2.4-3.6 ㎛ 로서 *Talaromyces flavus* 의 원기재와 일치하였다. 특히 곤봉형의 조난기와 이를 감싸고 있는 조정기는 *Talaromyces flavus* 의 고유한 특징인데 그림 30-C 에서와 같이 관찰되었다. 이 균주는 4℃에서는 생장하지 않았고 25℃와 37℃에서는 생장이 활발하였으며 이 종의 불완전세대는biverticillate *Penicillium* sp. 으로 확인 되었다.

Phenicillium 을 동정하는 분자생물학적 지표인 5.8S ribosomal DNA ITS 영역의 염기서열 분석 결과 GenBank 에 보고된 *Talaromyces flavus* (U18354) 와 98%의 염기서열 상동성을 보였다 (그림 31). 따라서 이 종은 *Talaromyces flavus* 의 종 범주에 속하는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 fungi의 분리 동정을 의뢰한 Netherland CBS와 농진청의 두 기관에서 같은 결과를 얻어 배나무와 강낭콩에서 분리한 fungi 중에 ASGV 에 감염된 fungi는 *Talaromyces flavus* 의 종 범주에 속하는 fungi로 확인 되었다.

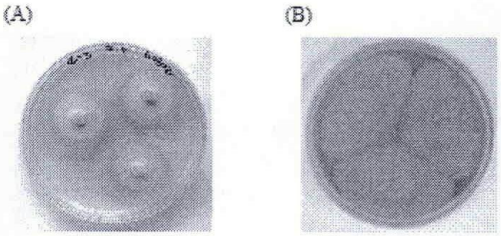


그림 29. Cultural morphology and mycological characteristics of *Talaromyces flavus*. *T. flavus* grows rapidly on MEA, with dense arial mycelia and pigmentation ranging from yellow to yellowish-green in the center and white at the margins.

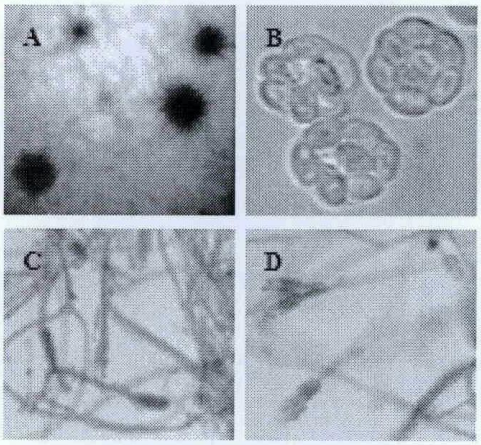


그림 30. Characteristic features of Ascomycota. A, ascomata; B, ascospore; C, antheridia and ascogonia; D, biverticillate *Penicillium* sp.

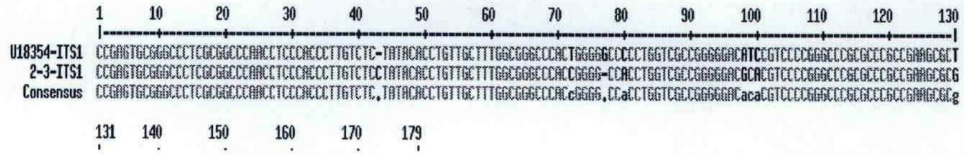


그림 31. Sequence analysis of ribosomal ITS gene amplified from *T. falvus*. (A) ITS 1; (B) ITS 2

나. ASGV 감염 및 비감염 곰팡이의 균학적 특성 비교

바이러스 감염이 확인된 *T. flavus* 곰팡이 균주 (2-3 IO-A) 를 유지하기 위해 계대 배양하는 과정에서 원래의 균주 형태와 다른 isolate (16-6 VF) 를 얻게 되었다. 새로 얻은 균주에 바이러스가 없는 것을 RT-PCR 로 확인하였다. 연속적인 단포자 배양과 이들로부터 유도된 isolates들의 배양 형태를 관찰하였고 이 과정 중에 곰팡이 내에 virus가 존재하지 않은 isolates를 선발하여 바이러스 감염에 따른 *T. flavus*의 생장과 발생을 비교하였다. ASGV-free & ASGV-infected *T. flavus*는 PDA에서 배양 시 colony morphology가 다른 것을 알 수 있었다. 16-6 VF는 2-3 IO-A와 다르게 포자낭을 형성하지 않았고, 본 연구에서 분리한 *T. flavus*의 특징인 yellow-green color의 pigmentation을 나타내지 않았다. 포자형성과는 달리 곰팡이의 균사의 생장 속도는 크게 차이가 없었다. 단포자 분리 과정 중에 계대 배양 시 단계별로 바이러스 감염 여부를 ASGV CP 유전자의 증폭으로 확인하였으며 ASGV-free isolate와 ASGV-infected isolate의 곰팡이 동정은 ITS region을 증폭하여 확인하였다. ITS region의 염기서열을 비교했을 때 ASGV-free isolate 역시 *T. flavus* 의 종 범주에 속하는 것을 확인할 수 있었다.

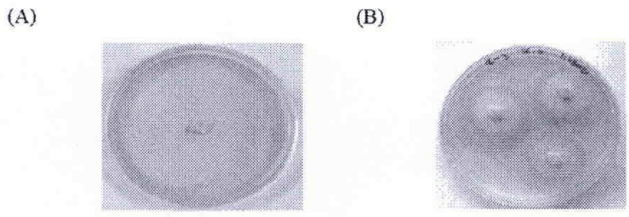


그림 32. Colony morphology of *T. flavus* with and without ASGV. (A) ASGV-free fungus isolate 16-6 VF. (B) ASGV-infected fungus isolate 2-3 IO-A.

바이러스의 감염이 곰팡이 기주에 미치는 영향을 확인하기 위해 laccase activity를 측정하였다. 바이러스에 감염된 균주는 비감염 균주에 비하여 extracellular 및 intracellular laccase 활성이 증가하는 양상을 보였다. 감염주에서는 두 종류의 laccase 모두 배양 4 일째부터 활성이 증가하기 시작하여 배양 8일과 10 일경에는 모두 정점을 이루었고, 배양 10일을 전후로 laccase 활성이 감소하였다. 감염주에서는 비감염 균주에 비하여 최고 4배까지 laccase의 활성이 증가함을 관찰하였다. 비감염주에서는 감염주와 달리 extracellular 및 intracellular laccase 활성이 배양 과정 동안 변화하지 않았다. 절대적인 laccase 활성 정도를 비교하면 감염주의 경우 intracellular laccase activity가 extracellular laccase 에 비하여 약 25배 많이 발현함을 확인하였다. 이는 virus 감염에 따라 세포 내에서 보다 많은 산화반응이 일어남을 알 수 있다.

virus-infected isolate의 경우 배양 시간이 길어짐에 따라서 laccase 활성이 감소되었을 뿐 아니라 sporulation ability까지 사라진 것을 알 수 있었다. 비감염주인 16-6 VF에서는 감염주인 2-3 IO-A와 같은 배양 조건 하에서 포자를 전혀 형성하지 않았다.

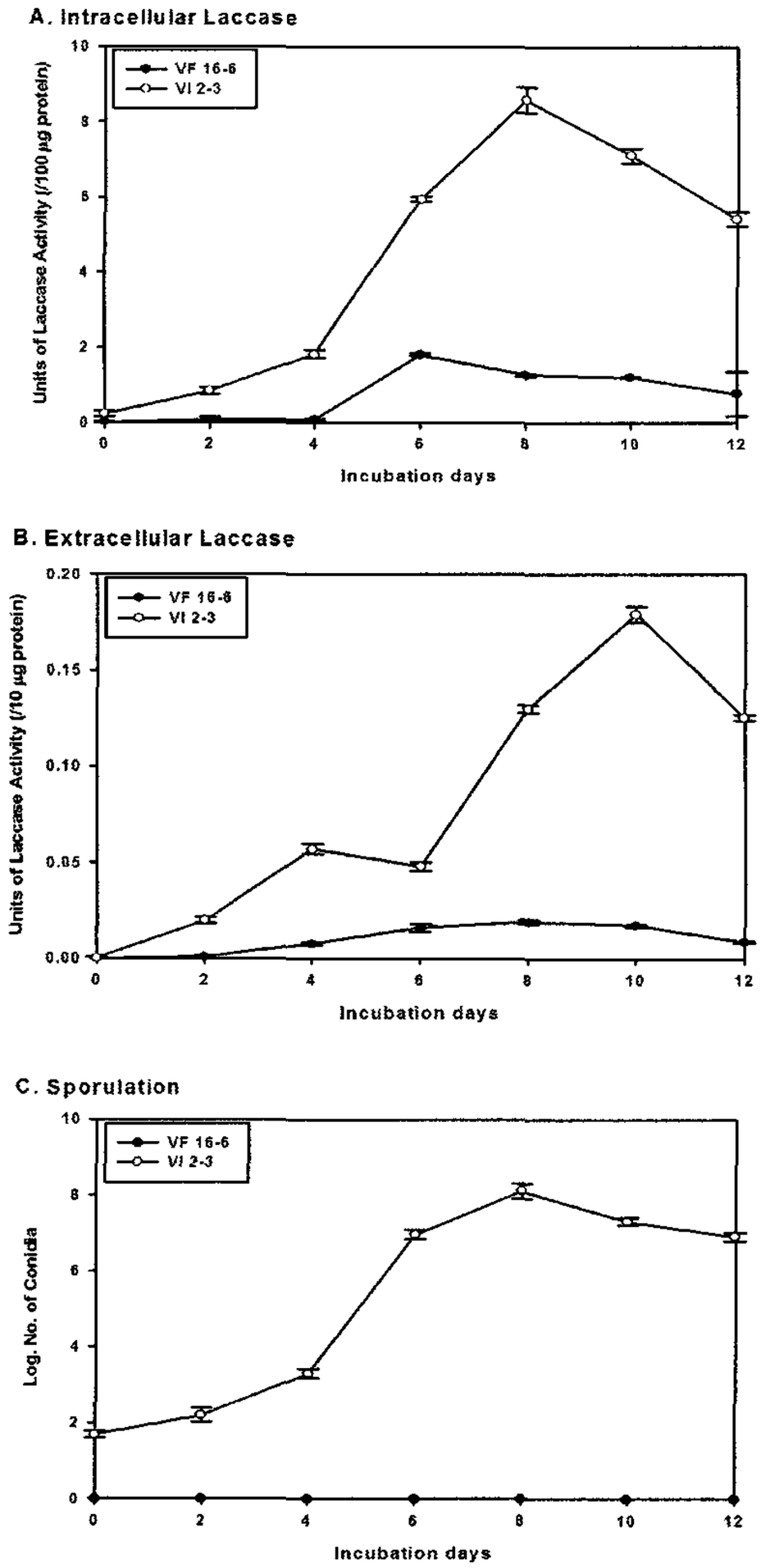


그림 33. Comparison of laccase activities and sporulation abilities in 16-6 VF and 2-3 IO-A. Proteins from mycelia and culture filtrates were used for measuring intracellular and extracellular laccase activities, respectively. Laccase activity was determined with 2,6-dimethoxyphenol as the substrate. One unit was defined as an increase of absorbance of 1.0 per min at 468 nm and at 25℃. All measurements were conducted with three replications. A, Intracellular laccase activities; 100 ㎍ of total protein was used for each analysis. B, Extracellular laccase activities; 10 ㎍ of total protein was used for each analysis. C, Sporulation was examined in 5 ㎖ of V8 juice broth at 8 days after inoculation with approximately 1,000 conidia.

2. ASGV 매개 곰팡이의 형질전환

가. 곰팡이 내로 selectable marker 유전자 도입

전이 기작 분석을 효과적이고 명확하게 수행하기 위해 *T. flavus* 내에 selectable marker를 삽입하고자 vector를 construction 하였다. marker로는 Hygromycine 유전자(hph)를 사용하였다. 이것은 1992년 Punt와 van del Hondel 에 의해서 개발된 PAN7-1에서 얻을 수 있었다. *Aspergillus nidulans*의 *trp*C gene의 promotor와 terminator(Mullanet et al., 1985)를 포함하는 3601bp의 Hygromycine 내성유전자(hph)를 획득하였다. Agrobacterium-mediated transformation을 수행할 계획이므로 분리한 단편은 PSB11(6329bp) plsmid DNA 에 삽입하였다.

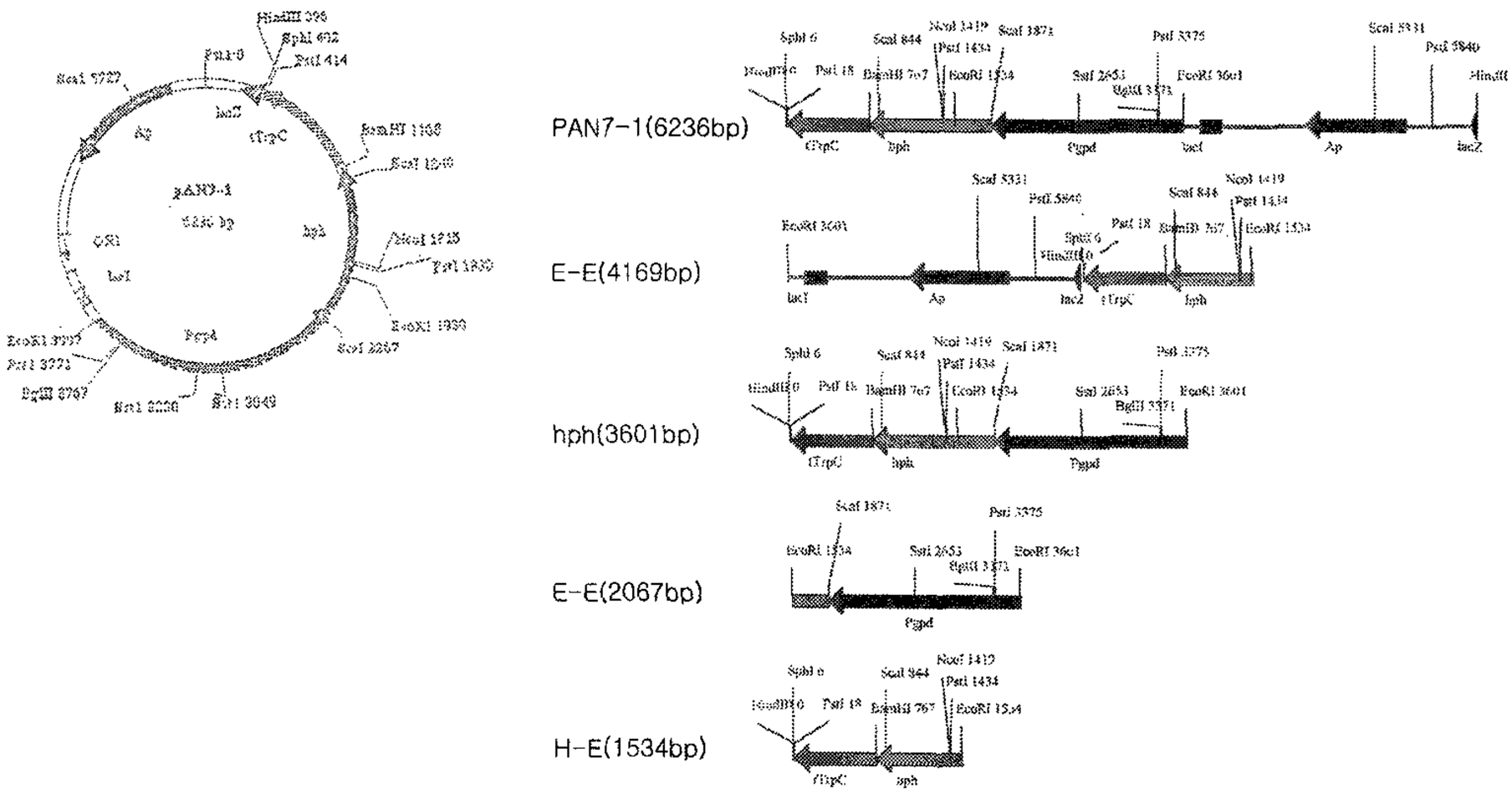


그림 34. pAN7-1(6236bp) plasmid로부터 제한효소(*Hind*III/*Eco*RI)처리에 의한 Hygromycine 내성유전자(hph) 추출을 위한 partial digestion 모식도.
A:pAN7-1 plasmid,6236bp; B:시간별 제한효소(*Hind*III/*Eco*RI)처리에 의한 Hygromycine 내성 유전자(hph) 추출 모식도.

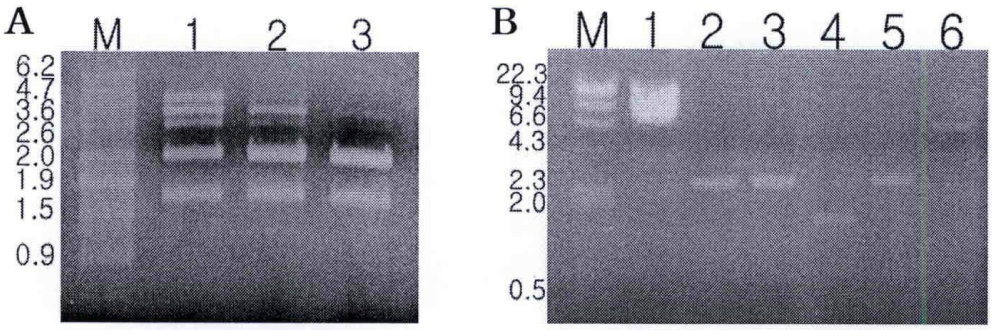


그림 35. pAN7-1(6236bp) plasmid로부터 Hygromycine 내성유전자(hph)의 추출 및 정제

A:partial digestion of pAN7-1 with restriction enzymes (*Hind*III/*EcoR*I), M,molecular marker(λ/*Pst*I); lane1,partial digestion of pAN7-1 for 5min.;lane2,15min;lane1,30min.

B:Purification of digested DNA fragements with restriction enzymes (*Hind*III/*EcoR*I) by Gene Clean II Kit, M,molecular marker(λ/*Hind*III); lane1,pAN7-1(digested with *Hind*III)lane2, for 5min.;lane2,15min;lane1,30min.

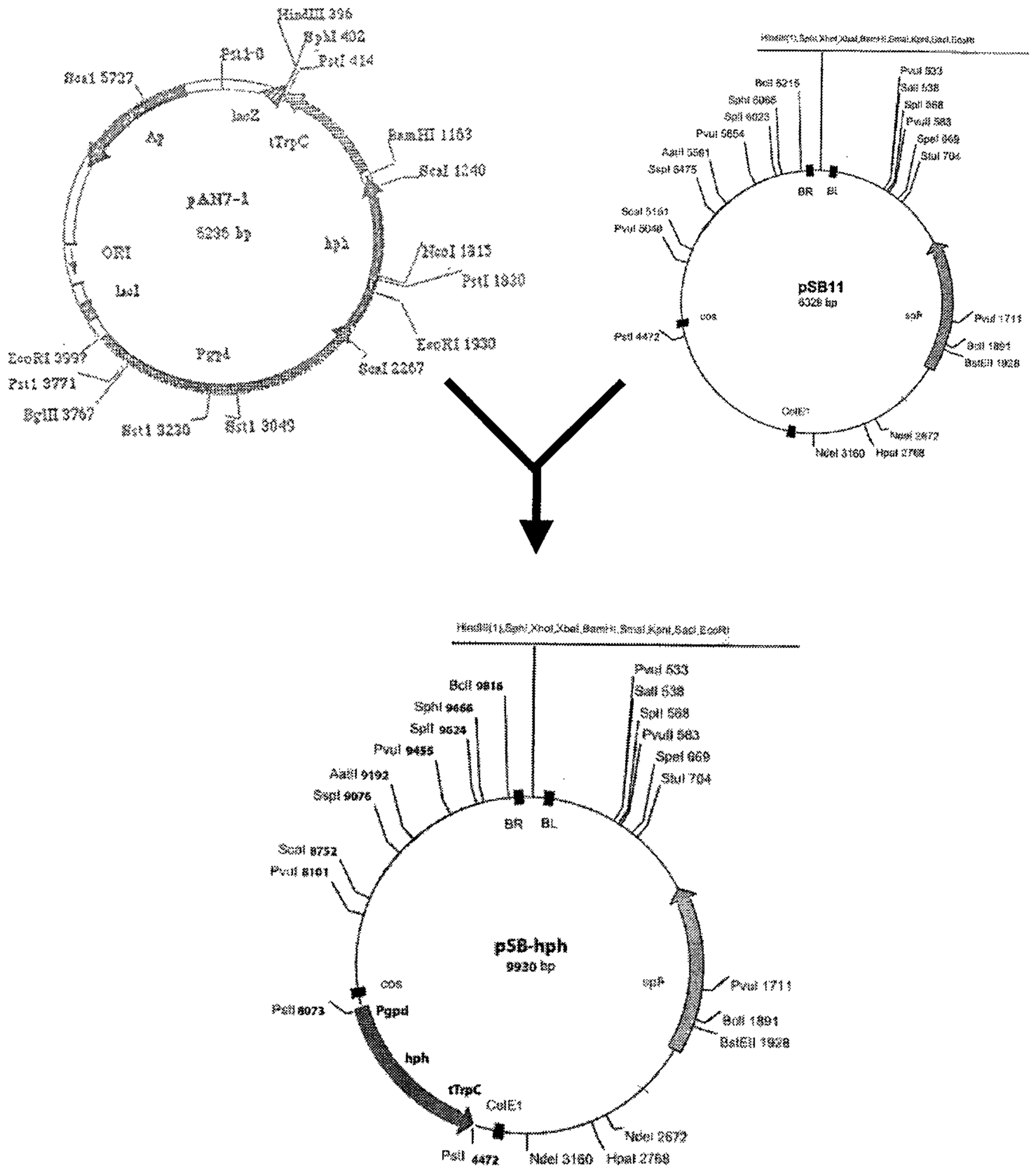


그림 36. ASGV 매개곰팡이(*Talaromyces flavus*) 감염생태 분석을 위한 genetic marker(Hygromycine 내성유전자) 형질전환을 위한 vector의 작성.

P*gpd*,5′expression signals of the *Aspergillus nidulans* gpd gene; t*Trp*C, termination region of the *A. nidulans* trpC gene; *gpd*, 5′part of the coding region of the *A. nidulans* gpd gene; hph, part of the *E. coli* hph gene(hygromycine tolence).

3. ASGV의 곰팡이체내 전이 기작 분석 I

균주에서 균주로의 바이러스 전이가 일어나는지를 확인하기 위하여 아래와 같은 기초적인 실험을 수행하였다. 동일한 plate 내에 virus-infected isolate (donor isolate) 와 virus-free isolate (recipient isolate)를 배양하면 두 isolates가 만나는 경계면에 red pigment가 생긴다. 이것을 고정하여 10일 배양한 후 두 균주의 경계면으로부터 안쪽으로 virus-free isolate가 자란 면에서 colony를 채취하였다. 이것을 접종원으로 사용하여 PDA plate에서 재배양 하였다. 배양한 20개의 plates 중 3개의 plates에서 colony의 형태 변화를 관찰할 수 있었다. 이들 중 일부는 red pigment가 증가한 것이 있고, virus-free isolate의 형태와 다르게 균사의 정단 부위에서 노란 포자낭을 형성한 것이 있었다. 그러나 이 실험에서는 다른 유사 곰팡이의 오염도 배제할 수 없기 때문에 항생제 저항성 유전자가 안정적으로 삽입된 형질전환 균주를 획득하여 동일한 실험을 반복하고자 한다.

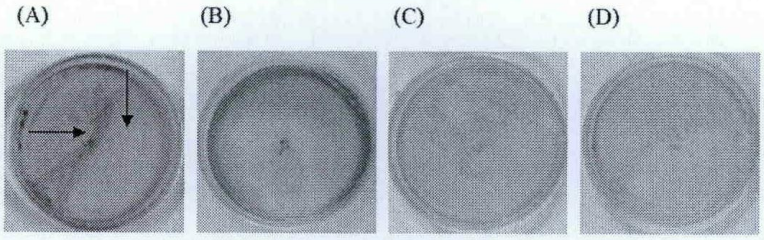


그림 37. A, 동일한 plate 내에 virus-infected isolate (donor isolate) 와 virus-free isolate (recipient isolate) 배양. 고정하여 10일 배양한 후 두 균주의 경계면으로부터 안쪽으로 virus-free isolate가 자란 면에서 colony를 채취; B, red pigment 증가; C, virus-free isolate의 형태와 다르게 포자낭 형성

제 5절 과수 바이러스 매개 곰팡이를 이용한 바이러스 방제대책 개발

1. ASGV 감염 여부에 따른 곰팡이 유전자 발현 양상 분석

ASGV의 감염이 곰팡이 유전자 발현에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 또한 바이러스 감염 곰팡이에서만 독특하게 발현하는 유전자를 분리하기 위하여 differential expressed gene (DEG) isolation 방법을 이용하였다. 바이러스 감염 여부에 따른 곰팡이의 특이 유전자를 분리/분석하는 것은 토양 내 존재하는 곰팡이의 유전자를 분석하므로써 곰팡이 내 바이러스의 존재여부를 직간접적으로 확인할 수 있으며 이는 궁극적으로 곰팡이에 의한 바이러스 감염의 잠재요인이 되므로 이는 새로운 개념의 바이러스 방제 대책이고 예방책이기도 하다. 지금까지의 바이러스의 진단은 기주식물의 병증 관찰과 유사 병증을 나타내는 식물로부터 바이러스의 존재여부를 PCR과 혈청학적인 방법으로 분석하는 방법을 사용하고 있는데, 바이러스를 매개하는 것으로 보이는 곰팡이로부터 바이러스를 분석하는 것과 함께 바이러스 감염에 따른 곰팡이 특이 유전자를 확인하는 것은 예방차원에서 매우 의미 있다 하겠다.

DEG 분석법은 비교대상 시료 간에 mRNA의 발현차이를 보이는 모든 유전자들을 일컫는 것으로 바이러스 감염 곰팡이와 건전 곰팡이 사이에서 특이하게 발현하는 유유전자를 특이하게 제작된 primer set를 사용하여 PCR로 분리하는 방법이다.

이 실험의 개략적인 방법과 원리는 아래 그림 38과 같으며 DEG 분석법으로 약 60여개의 유전자를 분리하였고 그중에 특이하게 발현 양에서 차이가 나

는 10개의 염기서열을 분석하였다.

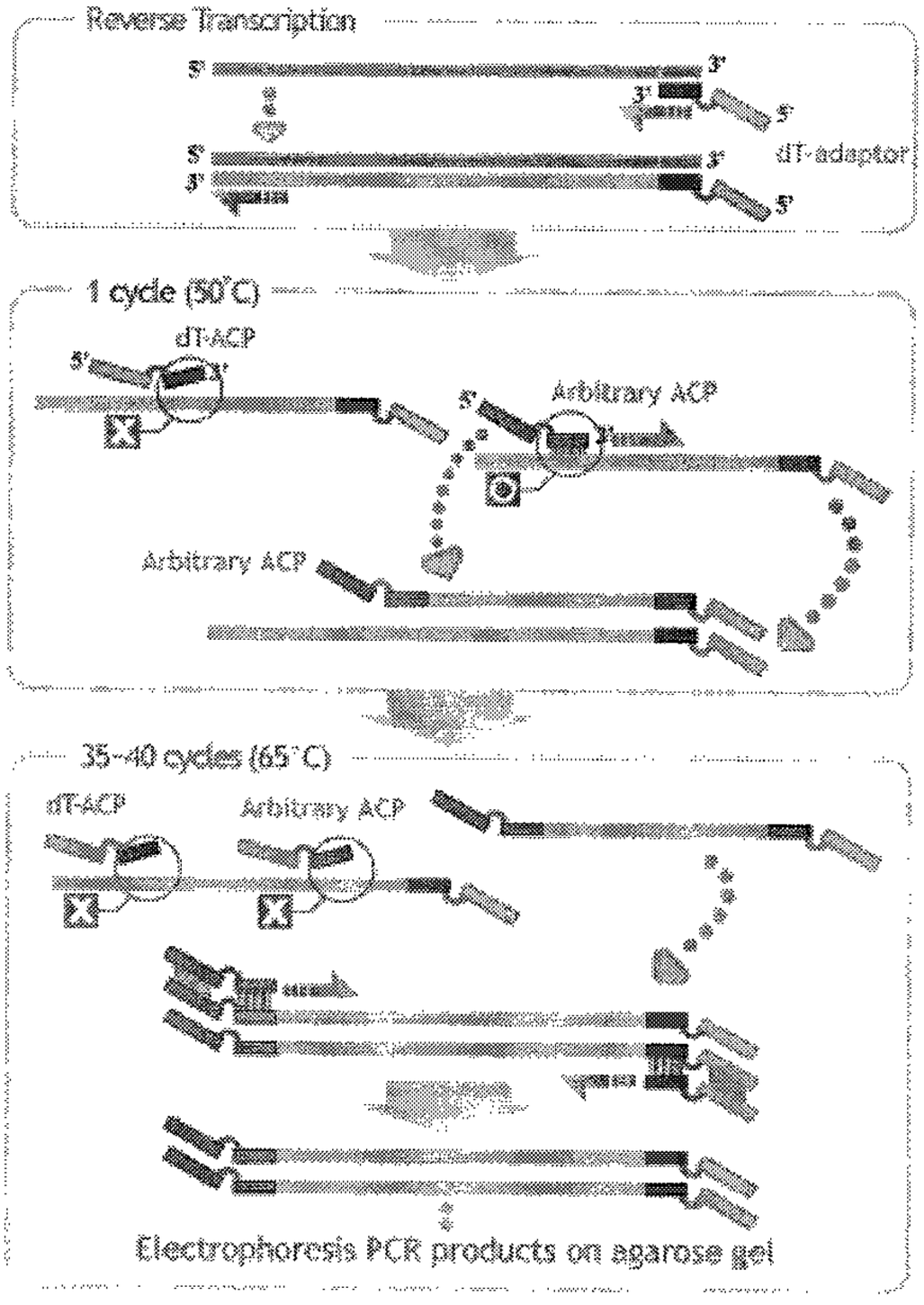
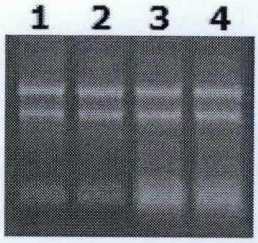


그림 38. DEG 분석법의 원리. mRNA의 Poly A부위에 특이적으로 결합하는 dT-ACP를 이용하여 42℃에서 Reverse transcription 반응을 통해 first strand cDNA를 합성. 이를 주형으로 Second strand cDNA합성. 이때 Annealing 온도는 RT 때 보다 높아진 50℃로 이 온도에서는 dT ACP가 template에 결합할 수 없고, arbitrary ACP의 core 부분만 특이적으로 주형가닥에 결합. 최종적으로 Annealing 온도를 65℃로 높여 줌으로써, Arbitrary primer와 100% 일치하는, 일차 PCR 과정을 통해 합성된 product만 특이적으로 증폭.

바이러스 감염주와 건전주에서 순도 높은 곰팡이 total RNA를 분리하였고 (그림 39), 이를 GeneFishing DEG Premix Kit (Seegene Co, Korea)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 그림 40과 같이 primer mix 의 종류에 따라서 바이러스 유무에 따른 다양한 발현 양상을 보여주었다. 이렇게 곰팡이의 유무에 따라서 다르게 발현하는 곰팡이 유전자를 agarose gel로부터 분리한 다음 다시 재 증폭하는 과정을 거쳐서 그림 41과 그림 42와 같은 유전자를 확보하였다. 이 유전자의 잠재 기능과 바이러스 감염과정동안의 역할을 확인하기 위하여 먼저 염기서열을 분석하였으나 다른 미생물이나 동식물종에 비하여 곰팡이 유전자가 GenBank에 많이 등록이 되어 있지 않아 염기서열 분석방법만으로는 유전자의 기능을 확인할 수 없었다 (그림 43 및 표 10).



- Total RNA extraction
- OD determination
- Electrophoresis of 3 ug total RNA

Sample	A260	A260/A280	Conc. (ng/ul)	Total (ug)
V+fungi 11	43.179	2.17	1727.17	120.9
V+fungi 16	51.141	2.15	2045.65	143.2
Virus free-1	11.364	2.1	454.55	68.2
Virus free-2	9.583	2.12	383.34	57.5

그림 39. DEG를 이용한 ASGV 감염 전후 곰팡이 total RNA 분리

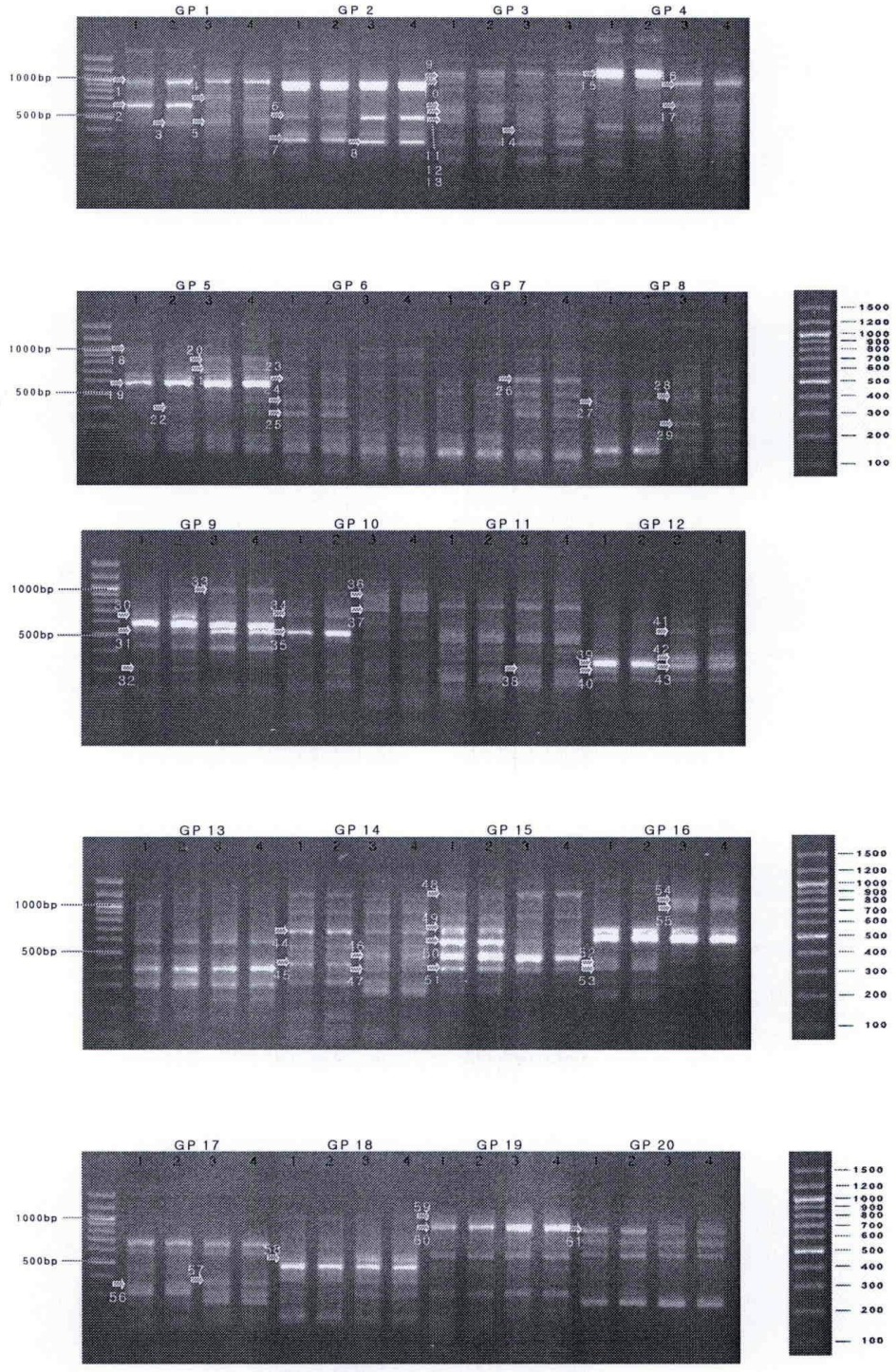


그림 40. DEG를 이용한 곰팡이 유전자 분리, 염기서열 분석 및 발현양상 분석

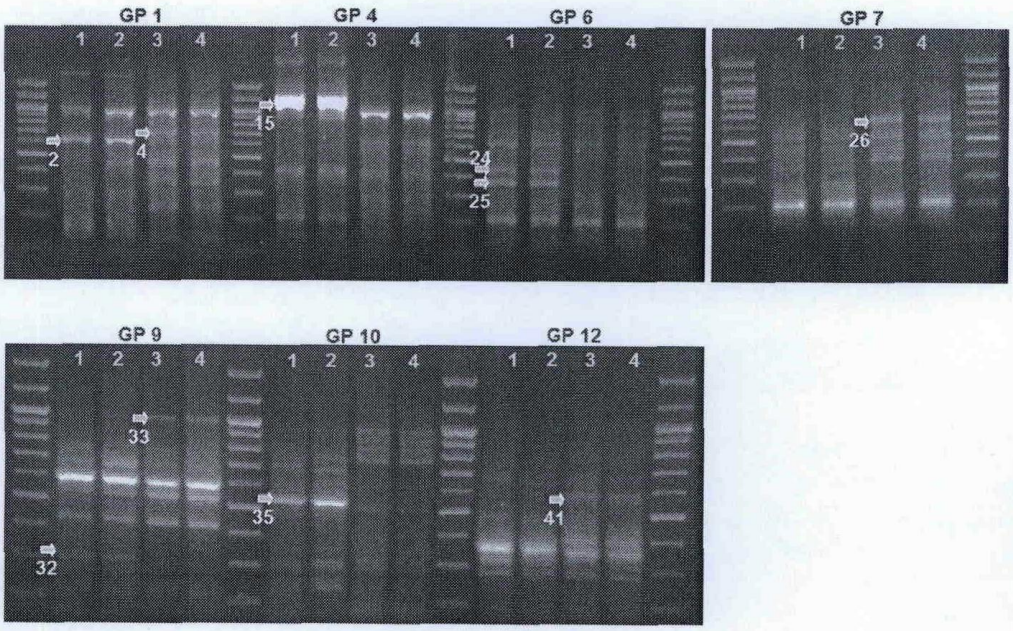


그림 41. 바이러스 감염 유무에 따라 발현의 차이를 보인 유전자들의 염기 서열 분석을 위한 재증폭

그림 42. 바이러스 감염 유무에 따라 발현의 차이를 보인 유전자들의 염기 서열 분석을 위한 재증폭 및 gel extraction

DEG2

(direct seq.)
TTGCGGCAGTATACATCATGACCCCWTGGTCTTATGACCAAYTTCTGACTGGATATCGMCCACTATGTTCCGATTT
CAATAACACATGGTCTGTCTCCTTTACCTTCGGCACTGACRACACCCATAAAACTTTCACGGTTACCGGTGATCAA
TTGGCGACACCTGGATATGTGGACGACGATCACTGCTTCCCACCATTCAACCCAKGGGGTAGCAACAATMCCWTTC
TCGGAGCGCGATGGATGAGCAATTTTTATTCCGTCTTCGATTTTGGATCGTTTGASCCGTCAGGATATGATCTTCG
CWTTGGYTTTGCGCCWTTGAARAAGGAATMCCGGCCCATAGTCTAAAAATGGAGGCTAACTTAGCACTATCTATAG
GCATTAGGATTATCGTGTGTCGAGWAAGGCTGCACATGTGTGTTTTCAAGCGAAAGATTCTTTGATTACTCTGTAC
GTTATATGTTGGAGCATTGCCCACTCCCTCGCTCTACATTCAACGTAATCCTCGTTGCTAGCTATATCTTACCATA
CTAGATCATCTAGAATGCGAAAAAAAAAAAAAACCCCCATCGTAGTCSCAGCATTCMCAGAAGGGCGAATTCTGCA
RAWWTCCATCACRCKGGCGGCCSCTSGAGCATGCATCTARRGGG

DEG4

(direct seq.)
NGGCGGGTNNGGGCTNGGCATCTACGGGGGGCATCAACTCTTCCGAGTCGGCCGATTTGGGAACAAACGACTTACT
CAAAGCCAGCGTGATCTGCTTTCTAGCTGCATACGTTGCGTTTTTGGGTTTGTTCCTGCTTTTCTTGACCGGGTTG
AGCCGGATCCCCCCCAACNAACGCCCGTTGCTTTATGGCTTTGCCGTCTGCATTCCCTTCATGGTCGTTCGATTCA
TGTACAGCGTTCTGCCGACGTTTATACCGAGCATCAGGGACAACTACAATGCTCTCTTTGGTAATGTCACAATATA
TTTGTTCATGGCTGTCCTGGAANAGATTGTCATTGTCGCCTGCTACGTCTACATCGGCATGAGGTTAGACNAGCTC
CCGCCCGAATTGAAGGCCCCGCCTTTGAGTTTCAAGAAGAAGGACAAGAAGAAGAAGAGAAAGCACTCGTCACAGG
ATAGCGGTGAGCATATGTTGAAATGATTGTCAGTTGTGCGTGAGCAAGGGGAGCAAATATTGCTGCTTATATTTGT
TTGTTTATTCTTGGGCCNAGACATGATTTCTTTTGTTCNAAGCGATTAGCCAGTGTGTGAGTCCGTTGTTAGCTAC
GTGGAGATAGGAACCTATCAAAATCCTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG15

(direct seq.)
GGGGTGCAAGGAGTATTCTGAGTGCTGGAATGATCGGATCTCCTCAGCTTCTACTTGCCTCCGGAGTTGGCCCTGC
ACGATCACTAAAGTCACTGAATATTCCCGTTGTAGCTGACAGACCGGGTGTTGGCCAAGGCTTGCAAGACCACGCT
TGGATGCATATCACATATCGTGTGAACGGACAGACCATTTCATCTCTCAACAACCCCGAATTTGCTGCGGAGCAAG
CANAACTCTTCATCGACCATGCTGAAGGCATGTACACTAGCCCAAATACCGACGTGTTGGCATGGGAGAAGATCCC
TCAACCGTTCCGGGCACACTGGAGTAACGACACGAAGCGCGCTCTCGATGCCTACCCCGCCGATTGGCCCGAGGTT
GAGTACATCACTGTCCCTTCGTACTTGGGTGACCAAGAAAACTCAAGATCGCTGGGTCCCAATGATGGCTATGACT
ACGCCTCACTGGCTATTGTCTTGATCGCGCCGCGATCCCGAGGATCTGTAACCATTACATCGCCTGACACGAAGGT
CGCTCCGCTGATCAACCCTAATTACTTGACTGTGCAGTCCGACATTGACATTTTGATCGGAGCATTCAAGCGCATT
CGTCAGTTTTGGGGCACTCCAGTCATGCANAGTTTCGCTATTGGTGACNAGTACTGGCCCGGCAAAAACGTGACAA
CCGATGCTGATATTGAGCATTTTATCCGCCAAAACTTCAATACCATTTGGCATGGAACTTCTACTTGCGCAATGGG
TCGTGCTAACGACAAGAATGCCGTTGTGGACTCAAAGACCAAGGTCATTGGTGTCCAAGGCTTGAGGGTTGTANAC
NCAAGTGCTTTCCCATTTCTCCCTCCGGGACATCCCATGTNAACNTTTATGCTCTTG

DEG24

(direct seq.)
CTGMGGYGGGGACTCATGACCCCMCAGACCTCGAGAAGASYCAACCACTATATTCCTTCCAACTCAGCCCGCAGCA
CAGCACGGGAAGGATAGAGTTCCATCTTCCGTACAAACTTGAYTTTGGAGTCTCCGAGTCTGGGATTGKGGGGAGA
CAGGCAAYTTTACTYTTGTCAAGTCRAGATGTGAGTGAGATGAGTATTCTGGGGAAGGGGGTTATKGGGKGGAATT
GATCAGTAGTTACCAGGAGGGACGCAGTTGAYTTTGCGTCGGTAGATATCGTTCTTACAATTCCAGTCTTGTTCCT
TTTTCTGAAARAARMTWGAATCTCGAAGTTACTTGACAGATTCTGGAGGGAATAACATAAAACAAGATAATTAAAA
ATGCGTA

DEG25

(direct seq.)
NTGGGNCGACCACGACCTCGAGAGAGTCAACCACTATATTCCTTCCAACTCAGCCCGCAGCACAGCACGGGAAGGA
TAGAGTTCCATCTTCCGTACAAACTTGACTTTGGAGTCTCCGAGTCTGGGATTGTGGGGAGACAGGCAACTTTACT
CTTGTCAAGTCNAGATGTGAGTGAGATGAGTATTCTGGGGAAGGGGGTTATTGGGTGGAATTGATCAGTAGTTACC
AGGAGGGACGCAGTTGACTTTGCGTCGGTAGATATCGTTCTTACAATTCCAGTCTTGTTCCTTTTTCTGAAAAAAA
AAAAAAAAAA

DEG26

(direct seq.)
TGNGGGGAGAGTGCTCCAAGCTCCATTGATGTCATTTTGACCTTTGATGAGTACGGCGTTAGTAACCATCCGAACC
ATCGATCTCTATACCACGGCGCGGTCGCATTTTTGAAGGCATTGATGGATGGCAAGAGCGGATATTCATGTCCTGT
AACGTTATTCACGTTGACAACGACAAACATTGTCCGGAAGTACTCCGGTATTCTCGATTCATTTTTGACGATGGTC
CTGGGCGCATTCACAAATCTTGGAGACTCGATGGCTTCGGCAGGCAAGAAGGGCGCTGCAAAAAATAATGGTTGCG
CCAGTCGTCTTTTGTATATCAGCTCGTTTCAGGATTGGGTACAGGCTCGCACTGCGATGACGGATGGACACAAGAG
TCAGATGTTGTGGTTTCGATGGGGCTGGATTACTATCGGGCGATATATGTTTGTCAATGATTTGAAGAGGGAGAAG
ATTTGACTATGTCTCGCTCCGAACTGGAGAGATATCGTACAGATATGGGCAGGCAGACGATACTCACAATACTGTA
TTATATGTATCTTAGGACTGTAATAGTAACTAACTTACGCTAAATGAACATATACTCTTTATGAAAAAAAAAAAAA
AAA

DEG32

(direct seq.)
NTGGGNCNTTCCTNTTNTNAGAANGGGAACAGAAAGAATTACCGNAGGTTTGNTCGGGTGTTGAACCCNCCGTGCC
TTTTGGGAGGCNTGCTTATCAAGAACAACAAATAANCGTGCCACCNCCNCNTGCCACTAANAGGGGGGATGTTTGT
TGATCTCTCTGATTAANAGAGAGATTTGTATTGTTTGTATGTTACANATNCCACGACTACNGTAGTCNGGTCTGAA
TTGAAATGATTGCCNTTNCAAAAAAAAAAAAAAA

DEG33

(direct seq.)
TGGGTGGGGCCTAMTTCTTCGTGGTTGATTTCCCCAGTCCGCCTCTTGGKWRACACCCGAAGAAWAWKCCTTTGTC
ACGGAAAAGACTCGCAGTGATGAGTCGCACGTTGCTCCCGTTACTGCGAAAGACGTGCTGCACTATCTCGGTGATC
TCAAATCTCATCTCGGTGCCATTATGTATTTCACCATTGTCGTCCCCATCTATGMCTTTTCCTACTTTGCCGCGAC
CATCATCAGGGCATTGGGATATTCGACCGTGGAGACCCAATTGCATACCGTGCCACCTTTCGCCGCGGCCTTTGCC
TACGCTCTTATCGTTGCTATCTGGTCTGACCGAGCCAAAATCCGGTTCCCATTCATCTTGGCGTCTGATGCACTGA
TTATCGTCGGCGTCGCCTTGATGCTGCATTACCACGGAAAGAGCCACTTTTCTGCARAAATATTGCGGWATCGTYC
TTCATCAMCCATGGGTGCCTTTTGGCGGSGGGGCTATTATCGTTTGCTGGGATTTTGATGGAATCTCCGGG

DEG35

(direct seq.)
GNGGNNCCCCACGNGCGAGANGGCCGAGCAGAATATGTTGGGTCGTTTGTCGCGTCCTGAGGAATACCGTGGCGCT
GCTGTTTTCTTGATCAGTGATGCTAGTAGCTTTATGACTGGAAGCGATTTGAGGATGGATGGTGGGCATGCTGCGT
GGTAGTTGGCAACTACCAAGCCGACAATGATGACNACNAAAATAGAGCACACGACTATTCTAATACTTTTCGCCAC
GCATATACAATTGTTTGTTTTTCGGGTGCCTACCTAGGTATGATTGTTCAGTGATATGAGATTGCTGGAAAGGCGT
TTCTTTTTTTTNCNCTGCAAAGNCANGGGNGTTTACATGCCNCGGCGTTTATTTTTGTTTCANCGGNCANGCNCNC
AAGCGTCANGTTTCNCTNAANTCCGGTTTACGGNGACNGCNCATACTACAANACACTAATCTAANGGATCGATTTT
CANANCAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG41

(direct seq.)
GCGGNGNNGANNTCTCTTCACCCAGTTTTCTTCCGATGATGAAGACGATGTTTTCGATCACCAAGATGAGGAATTC
GCTCGTTGACTTGTCTCCGGACTGGCCAGAGGATGTTTTCAAGGACCGAATGACNAATGACGATATTTTTCAGGAA
TGGCGCGAAAATGTCCCGAGGATAATCGATGAAGAGAATCGACTTCGGACTTGGCTTCAGGAATGGCCGGAAGGCA
TACACAGCATCTTTGAGGATGATATGGCCATACTTTCCTGGTTGCAGGCCTGGCCCGAANAAGTAACACAACTGTT
TTCCAGGGACGAGGAANAAATTGAAAATGCAAATGAGTGGCCGGAGAGTTCATCGAACGATCAAACCAGCCGACCG
GATGTTGGGGTTTCTTTTGTCATACGGGCCGCTCAAGTTCTCATTCCTGCTGCAATAACATTATTTTTCTAGACNA
CAATANCCTTACACCCTGGCAAGAATAATACTAACATTTGAAGGTTCTCTTGAAAAAAAAAAAAAA

그림 43. 바이러스 감염 유무에 따라 발현의 차이를 보인 유전자들의 염기 서열

Table 10. 바이러스 감염 유무에 따른 DEG 결과

DEG No.	GeneBank Accession No.	Sequence homology search
DEG2	No EST	•New gene
DEG4	No EST	•New gene
DEG15	No EST	•New gene
DEG24	No EST	•New gene
DEG25	No EST	•New gene
DEG26	No EST	•New gene
DEG32	No EST	•New gene
DEG33	No EST	•New gene
DEG35	No EST	•New gene
DEG41	No EST	•New gene

결과와 같이 virus-infected fungi와 virus-free fungi에서의 유전자 발현 양상이 다르게 나왔으나 염기서열 분석만으로는 그 기능을 유추할 수 없어 이들 유전자의 발현 양상을 염기서열 분석 결과를 토대로 gene specific primer를 이용하여 real-time RT-PCR로 발현 양상을 비교 분석하였다 (그림 44). 지금까지의 분석 결과로는 유전자들의 기능이 밝혀지지 않은 유전자여서 바이러스 감염 여부에 따른 특별한 의미를 부여할 수는 없지만 real-time RT-PCR 결과에 의해서도 바이러스에 감염이 되어 있는 곰팡이와 그렇지 않은 곰팡이 사이에서 일부 유전자가 특이하게 발현을 하고 있었다 (그림 44). 특히 DEG25 primer 를 사용하였을 때는 이 유전자가 Virus-free strain에서 많이 발현하였고, 이는 이 유전자가 바이러스의 감염에 따라 억제가 되는 것으로 보여진다. 반면 DEG26 및 DEG35의 경우는 바이러스 감염주에서 이 유전자가 많이 발현하는 것으로 보여, 이들 두 유전자의 분석을 위해 genome walking을 수행하여 full length cDNA를 분리하고 amino acid 염기서열을 분석함으로써 부분적인 기능을 유추하고자 한다.

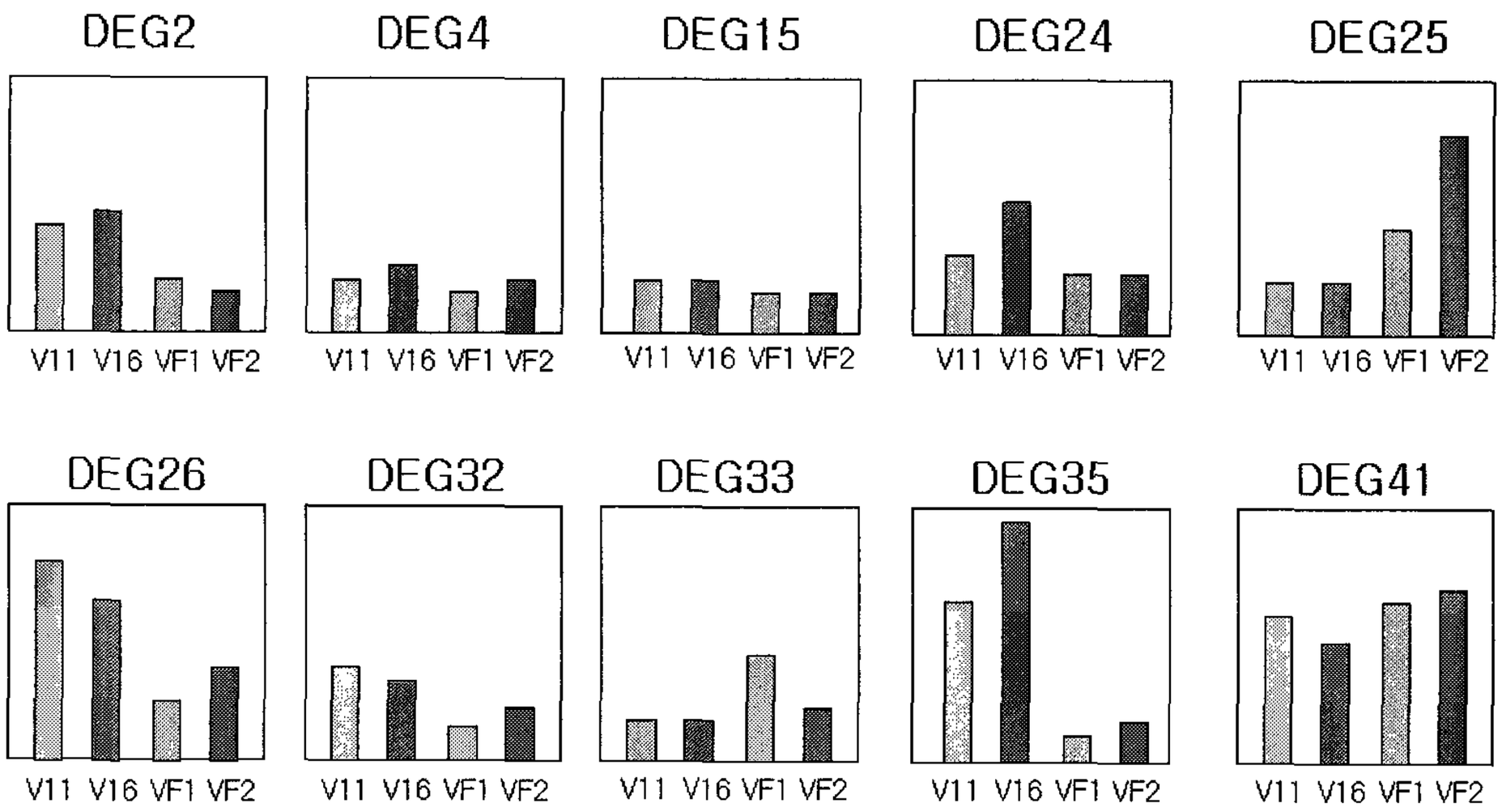


그림 44. DEG 유전자의 real-time RT-PCR 결과. V 는 바이러스 감염주를 의미하며 VF는 virus-free를 의미함. 각각의 번호는 본 실험에 사용하기 위하여 분리한 곰팡이의 strain 번호임.

위 실험에서 보여진 바와 같이 DEG 분석결과 바이러스 감염에 따라서 곰팡이 내 유전자중 증가하는 pattern을 보인 것과 감소 양상을 보인 것의 유전자 발현 양상이 분명하여 향후 이들 유전자의 분석은 곰팡이 내에서 바이러스 감염 후 바이러스 life cycle과 연관이 있을 것으로 보여진다.

2. 곰팡이를 이용한 과수 바이러스병 monitoring system 확립 및 ASGV 매개 곰팡이 분석을 통한 과수원의 바이러스 생태 분석

ASGV 매개 곰팡이를 이용한 과수 바이러스의 생태 분석을 위하여 selectable marker gene을 도입한 형질전환 곰팡이 제작을 시도하였으나 결과적으로 곰팡이 형질전환체를 확보하는데 어려움이 많아 monitoring system 구축 및 이를 활용하는 실험은 과제 기간동안 성공적으로 수행하지 못하였다. 곰팡이 형질전환을 위하여 여러 다양한 형질전환 방법 (bombardment, agrobacteria mediated transformation, protoplast transformation 등)을 시도하였으나 곰팡이의 특성상 일반 동식물 보다는 형질전환에 어려움이 있었으며 유전자 삽입 여부를 확인하는 과정 중에 형질전환 곰팡이의 제작에는 성공하지 못하였다. 최근 연구보고에 의하면 agrobacteria (Park and Kim, 2004)를 이용한 곰팡이 형질전환시 agrobacteria의 growth curve와 온도 그리고 strain의 선택이 중요하다고 보고되어 본 과제에서도 *T. flavus*의 형질조건을 확립하기 위하여 다양한 요인을 고려하여 실험을 시도하였으나 결과적으로 좋은 결과를 얻지 못하였다.

3. 본 과제 결과를 활용 계획

바이러스의 진단은 기주식물에서 바이러스의 병증이 관찰되는 경우에 어떤 바이러스에 의한 병인지를 확인하기 위해서 또는 예방적인 차원에서 특정 지역의 작물을 random하게 선택하여 monitoring을 하는 바이러스의 진단을 한다. 하지만 특정 시기에 특정 기주식물에 바이러스의 병증이 나타나지 않는다고 하더라도 최근에는 기후의 변화와 온실재배 등과 같은 재배환경이 바뀌어 특정 지역에서 특정 바이러스병이 갑자기 나타날 수 있는 개연성이 높아지고 있다. 따라서 본 과제에서와 같이 바이러스를 매개하는 vector에 대한 연구와 이들 vector 내에 바이러스의 존재 여부를 빠르게 진단할 수 있는 방법이 필요하다. 하지만 특정 바이러스의 경우는 vector 내에 바이러스의 titer가 낮아 일반적인 PCR이나 ELISA와 같은 방법으로는 분석이 불가능하기도 하다. 이런 이유로 바이러스에 의한 vector의 유전자 발현 양상의 분석은 vector 내에 바이러스의 존재 여부를 확인하기 위한 매우 중요한 요인이 된다. 또한 특정 바이러스에 대한 vector의 동정 역시 그 바이러스의 존재 가능성를 확인할 수 있는 또 하나의 지표가 되기에 바이러스 매개에 관여하는 vector 연구는 필요하다.

결과적으로 본 과제에서 제시한 것처럼 (1) ASGV의 발현 가능성을 이 ASGV의 매개에 관여하는 *T. flavus*의 밀도와 분포를 과수원 포장에서 조사하는 것과 (2) 바이러스의 조기정밀 진단 기술의 확립 그리고 (3) 바이러스에 의해 특이하게 발현하는 유전자를 vector로부터 확인하는 방법이 새로운 개념의 바이러스 방제 및 예방대책이 될 수 있을 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구목표	평가의 착안점	목표 달성도 (%)	및 기술발전 기여도
1차년도 (2003-2004)	○ ASGV 정밀 진단 system 확립	○ 과수 바이러스 진단 system 확립	100	곰팡이에 의해 매개되는 ASGV를 진단할 수 있는 방법을 특허 출원하였다.
	○ ASGV 변이 분석 system 확립	○ 바이러스 감염 곰팡이 분리 및 확인	100	
	○ASGV감염 곰팡이의 기주식물 선발	○곰팡이에 대한 기주식물의 선발	100	
2차년도 (2004-2005)	○ ASGV 매개곰팡이 내의 virus 관찰	○ 곰팡이 내 바이러스의 입자의 확인	100	GenBank에 보고된 ASGV와 비교하여 유전적 변이가 다양한 strain을 확인하였으며 전이 양상을 분석에 활용하였다.
	○ ASGV 유전자(ORF)의 기능분석	○ 바이러스 변이 분석 및 ORF 기능 분석	100	
	○ ASGV 매개 곰팡이의 형질전환	○ 과수 바이러스의 전이 양상 분석	100	
3차년도 (2005-2006)	○ ASGV의 주요 단백질 발현, 순수 분리 및 기능 분석	○곰팡이 ORF의 세포내 유전자 변이 분석	80	ASGV의 protease를 분리 및 정제하여 활성이 있는 것을 확인하였다. ASGV 매개 곰팡이의 분포를 조사하여 병 발생을 조절할 수 있는 기술에 활용하고자 하였다.
	○ ASGV 기주 염색체내 바이러스 유전자 분리	○기주 염색체내 바이러스 유전자 분리 및 분석	100	
	○ ASGV 감염 여부에 따른 곰팡이 유전자 발현 양상 분석 (DEG를 이용한 분석)	○바이러스 감염에 따른 곰팡이 내 유전자 발현 양상 분석	100	
	○ ASGV 매개 곰팡이의 형질전환	○곰팡이를 이용한 바이러스 monitoring system 확립 및 발생생태 분석	80	
	○ ASGV 감염 곰팡이의 분리 및 수집			
	○ ASGV 감염 곰팡이의 분포 조사			
	○ ASGV 매개곰팡이의 발생생태 구명			

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 과제의 최종 목표인 바이러스에 감염된 곰팡이의 monitoring을 통하여 과수원 토양 내 과수 바이러스의 존재여부를 조기에 검사하므로써 토양내 잠재적인 바이러스 감염을 막는 새로운 개념의 바이러스 방제법을 개발하고, 곰팡이와 식물에 모두 감염이 되는 infectious clone을 제작하여 ASGV-host plant-fungus 사이의 상호 작용을 이해하는 내용은 학술적인 면에서 또는 실용화 측면에서 연구 가치가 있다고 사료된다. 다만 과제 기간동안 농진청과 공동연구를 추진하면서 생태학적인, 기초적인 분자생물학적인 연구 그리고 병리학적인 분석은 목표에 도달하였으나 궁극적인 과제 목표중의 하나인 monitoring system과 infectious clone을 확보하지 못하여 최종 목표에 도달하지 못한 면이 있다. 현재까지 정리한 연구 성과를 특허 (1편 출원)와 논문 (3편 투고 준비 중)을 통하여 보고하였으며, 이 연구로 심혜경 박사가 박사학위를 받아서 학술적인 부분에서 또 인력양성 부분에서는 소기의 목표를 달성하였다. 향후 본 연구진이나 또는 곰팡이 형질전환에 대한 새로운 기술을 가지고 있는 다른 연구진을 통하여 본 과제의 최종 목표를 위해 지속적인 연구가 이루어졌으면 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

각 종 과수에 발생하는 바이러스병은 과수의 생육과 수량 및 품질을 현저히 저하시키는 치료가 불가능한 병해로 바이러스 무병묘 생산보급과 저항성품종 재배가 유일한 방제대책이며 치료보다 방제가 우선이 되어야 한다. 과수바이러스의 진단에는 생물학적 검정법, 혈청학적 검정법, RT-PCR법 등이 이용되고 있으며 **국내에서는 주로 생물검정과 혈청검정**이 이용되고 있으나 **대부분 해외에서 구입한 항체로** 국내바이러스를 검정하므로 **strain 차이에 의한 비특이적 반응이 많아 조기 정밀진단이 어려움이 많다.** 국내에는 **약 1억 5천만주의 각종 과수가 재배**되고 있으나 주요 과수바이러스에 대한 검정체계가 확립되지 못하여 ASGV 등 일부 과수 바이러스에 대해서만 항체검정을 실시하고 있다. 과수바이러스의 진단체계 확립으로 무병묘 생산체제를 갖추어도 이들 **바이러스의 전염양식에 관한 이해가 있어야 바이러스병의 발생과 확산을 미연에 방지 할 수 있으며 따라서 바이러스 매개체와 전이기작에 대한 연구가 동시에 수행**되어야 한다. 과수 바이러스는 주로 접목에 의한 전이만이 강조되어 **바이러스를 기주로 전이시키는 매개체, 이동경로 및 전염양식에 대한 연구는 전 세계적으로 거의 없는 실정이다.**

지난 3년 동안 ASGV와 관련된 새로운 내용의 연구 보고는 없으며, ASGV의 진단 및 병증의 유도와 관련된 아래의 3편의 논문이 해외 연구진에 의해서 보고 되었고, 본 연구진에 의해 국내에서 분리한 ASGV 논문이 1편 발표되

었다. 하지만 본 연구의 목적인 ASGV의 전이와 매개와 관련된 곰팡이 관련 특허나, 논문 그리고 학술대회의 보고는 본 연구진에 의해 보고고거나 준비된 것 이외에는 국내외에서 발표된 것이 없다.

Kundu JK. (2003). A. rapid and effective RNA release procedure for virus detection in woody plants by reverse transcription-polymerase chain reaction. Acta Virol. 47(3):147-51.

Hirata H, Lu X, Yamaji Y, Kagiwada S, Ugaki M, Namba S. (2003). A single silent substitution in the genome of Apple stem grooving virus causes symptom attenuation. J Gen Virol. 84(Pt 9):2579-83.

Ito T, Ieki H, Ozaki K.(2003). Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. J Virol Methods. 106(2):235-9.

Shim H, Min Y, Hong S, Kwon M, Kim D, Kim H, Choi Y, Lee S, Yang J. (2004). Nucleotide sequences of a Korean isolate of apple stem grooving virus associated with black necrotic leaf spot disease on pear (Pyrus pyrifolia). Mol. Cells. 31;18(2):192-9.

본 연구가 2003년 8월 연구를 시작했을 때와 비교하여 본 연구진이 새롭게 발견한 아래의 연구 결과는 아직 국내외 전문학술지에 보고하지는 않았지만, 현재 투고한 3편의 논문에는 본 과제를 수행하면서 ASGV 뿐만이 아니라 과수 바이러스분야, 그리고 *Penicillium* 및 새로운 형태의 ssRNA mycovirus 연구분야에 있어서 아래에 정리한 바와 같이 매우 새로운 내용을 포함하고 있다. ASGV가 아직 구명되지 않은 기작에 의하여 곰팡이-곰팡이, 곰팡이-식물, 식물-곰팡이로의 전이가 된다는 사실을 관찰하였고 본 과제에서는 이 기작을 연구하는데 주력하였다.

1. ASGV는 기주식물로 배와 명아주 그리고 강낭콩을 기주 식물 이용함.
2. ASGV는 식물 이외에 기주로 곰팡이를 이용함.
3. ASGV는 곰팡이에서 곰팡이로의 전이가 가능함.
4. ASGV는 기주식물에서 곰팡이로의 전이가 가능함.
5. Virus-infected 및 virus-free 곰팡이의 분리

본 과제에 관련하여 투고한 연구논문은 보고서에 별첨하였다.

제 7 장 참고문헌

German S, Candresse T, Lanneau M, Huet JC, Pernollet JC, Dunez J, 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. Virology **179**, 104-12.

Inouye N, Maeda T, Mitsuhata K, 1979. Citrus tatter leaf virus isolated from lily. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn .**45**, 712-20.

Kishi K, Takanashi K, Ahiko K, 1976. Pear necrotic spot, new virus disease in Japan. Acta Horiculture **67**, 260-273.

Magome H, Yoshikawa N, Takahashi T, Ito T, Miyakawa T, 1997. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. Phytopathology **87**, 389-96.

Malnoy M, Reynoird JP, Mourgues F, Chevreau E, Simoneau P, 2001. A method for isolating total RNA from pear leaves. Plant Molecular Biology Reporter **19**, 69a-f.

Nam KW, Kim CH, 1995. Research of the unidentified spots on the pear leaf; Causal agents of graft-transmission. Korean Journal of Plant Pathology **11**, 217-23.

Nam KW, Kim CH, 1996. Research on the Black Necrotic Leaf Spot on pear leaves; Identification of the causal agent virus. Korean Journal of Plant Pathology **12**, 368-73.

Ohira K, Ito T, Kawai A, Namba S, Kusumi T, Tsuchizaki T, 1994. Nucleotide sequence of the 3′-terminal region of citrus tatter leaf virus RNA. Virus Genes **8**, 169-72.

Ohira K, Namba S, Rozanov M, Kusumi T, Tsuchizaki T, 1995. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capilllovirus: Comparative sequence analysis of capillovirus genomes. Journal of General Virology **76**, 2305-9.

Ohki ST, Yoshikawa N, Inouye N, Inouye T, 1989. Comparative electron microscopy of Chenopodium quinoa leaves infected with apple chlorotic leaf spot, apple stem grooving, or citrus tatter leaf virus. Ann Phytopath Soc Japan **55**, 1354-8.

Park SM and Kim DH, 2004. Transformation of a filamentous fungus *Cryphonectria parasitica* using Agarobacterium tumefaciens. Biotechnology and Bioprocess Engineering **9**, 217-222.

Saldarelli P, Minafra A, Martelli GP, 1996. The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B. Journal of General Virology **77**, 2645-52.

Sato K, Yoshikawa N, Takahashi T, 1993. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of apple chlorotic leaf spot virus. Journal of General Virology **74**, 1927-31.

Yoshikawa N, Magome H, Takahashi T, Ito T, Miyakawa, 1997. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear,

European pear, and citrus trees. Phytopathology **87**, 389-396.

Yoshikawa N, Imaizumi M, Takahashi T, Inouye N, 1993. Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organization of citrus tatter leaf and apple stem grooving capilloviruses. Journal of General Virology **74**, 2743-7.

Yoshikawa N, Sasaki E, Kato M, Takahashi T, 1992. The nucleotide sequences of apple stem grooving capillovirus genome. Virology **191**, 98-105.

Yoshikawa N, Sasamoto K, Sakurada M, Takahashi T, Yanase H, 1996. Apple stem grooving and citrus tatter leaf capilloviruses obtained from a single shoot of Japanese Pear (*Pyrus serotina*). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **62**, 119-24.

Yoshikawa N, Takahashi T, 1988. Properties of RNAs and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot viruses. Journal of General Virology **69**, 241-5.

Zee F, Gonsalves D, Goheen A, Kim KS, Pool R, Lee RF, 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closteroviruslike particles. Phytopathology **77**, 1427-34.

Plant Pathol. J. 22(3) : 248-254 (2006)

The Plant Pathology Journal
©The Korean Society of Plant Pathology

Ecopathological Analysis of *Apple stem grooving virus*-K Harboring *Talaromyces flavus*

Hye-Kyung Shim[1], Kyu-Hyon Hwang[1], Chang-Ki Shim[2], Seung-Beom Hong[3], Su-Wan Son[1], Donggiun Kim[4], Yong-Mun Choi[5], Youngjae Chung[6], Dae-Hyun Kim[7], Hyeong-Jin Jee[2] and Suk-Chan Lee[1]*

[1]*Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea*
[2]*Organic Farming Technology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea*
[3]*Microbial Genetics Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea*
[4]*Environmental Biotechnology National Core Research Center and Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*
[5]*Pear Experiment Station, National Horticultural Research Institute, RDA, Naju 520-820, Korea*
[6]*Department of Biology, Seonam University, Chunbuk, Namwon 590-711, Korea*
[7]*Evaluation Coordination Officer, Planning and Management Officer, RDA, Suwon 441-707, Korea*

(Received on August 1, 2006; Accepted on August 15, 2006)

Pear black necrotic leaf spot (PBNLS) on pear trees (*Pyrus pyrifolia*) is caused by a Korean isolate of *Apple stem grooving virus* (ASGV-K). Yellow spots were detected in *Phaseolus vulgaris* (kidney bean) and *Chenopodium quinoa* which were grown near the diseased pears in year 2000 through 2003. The ASGV-K, the causative agent of PBNLS, was detected from the symptoms of the diseased kidney bean plant and *C. quinoa*. ASGV-harboring fungi were also isolated from symptomatic plants and from soils surrounding the infected plants. The ASGV-harboring fungus was identified and characterized as *Talaromyces flavus*. Ecopathological studies showed that the number of ASGV-harboring fungi on the pear leaves was not correlated with differences in temperature or severity of symptoms. Additionally, there was no difference in fungus frequency among the orchard locations or different host plants. Although the frequency of fungi isolated from the soil was not affected by changes in temperature or location, the fungi occurred at higher densities in the rhizosphere than in the plants themselves.

Keywords **:** *Apple stem grooving virus*, fungal population, pear black necrotic leaf spot, *Pyrus pyrifolia*, vector transmission

Pear black necrotic leaf spot (PBNLS) was first reported in Korea in 1979, and this severe disease has since spread sporadically through orchards, causing losses of up to 50% in crop yield (Nam and Kim, 1994). PBNLS first appears as small, defined, black spots on mature leaves. The spots, which may have a circular or irregular shape and are approximately 1-4 mm in diameter, are reddish brown during the early stages of the infection and later turn black. These lesions grow larger over time and fuse with neighboring spots until the whole leaf becomes black (Nam and Kim, 1994). PBNLS develops on the basal portion of early emerging leaves and on hardening leaves appearing from leaf buds in late May (Nam and Kim, 1994). The most typical symptom of PBNLS is the appearance of necrotic spotting on mature leaves.

The suggestion by Nam and Kim (2002) that PBNLS was caused by a virus has been investigated experimentally by ultrastructural observations and grafting assays. Shim et al. (2004) reported that the causative agent of PBNLS is a Korean isolate of *Apple stem grooving virus* (ASGV-K), which they detected by electron microscopy and serological analysis, and they reported the full length sequence of the putative pear virus genome as well.

ASGV was identified in diseased *Phaseolus vulgaris* and *Chenopodium quinoa* which had no physical connections to the roots of virus-infected *P. pyrifolia*. Transmission of ASGV from fruit trees to herbaceous plants in nature has not been previously reported, but recently we observed that ASGV could transmit from virus infected pear tree to virus-free pear tree (Shim, 2004). However, the vector mediating this ASGV transmission has not been reported (Lister, 1970).

We hypothesized that ASGV transmission might be vector mediated because ASGV caused epidemics in the field, passing from ASGV-infected pears to virus-free pears, as well as from ASGV-infected pears to herbaceous plants located close to ASGV-infected pears. In this study,

*Corresponding author.
Phone) +82-31-290-7866, FAX) +82-31-290-7870
E-mail) sukchan@skku.ac.kr

we isolated an ASGV-harboring fungus from ASGV-infected plants and from soil within the rhizosphere, characterized the fungus, and surveyed the pathoecological distribution of this fungus.

Materials and Methods

Fungal isolates. Samples were recovered from plants showing typical symptoms caused by ASGV from two provinces (Suwon and Anseong) in the Republic of Korea. Leaves, bark, and roots were rinsed with running tap water to remove soil and plant debris. The tissues were then cut using a sterilized scalpel. Small pieces of tissue (1 cm^2) were surface-sterilized in 70% ethanol for 10 s, followed by 1 min in 1% sodium hypochlorite (NaOCl), and were then placed on 2% water agar. Plates were incubated at 28°C and/or 37°C for 2-3 days, after which fungal colonies were transferred to potato dextrose agar (PDA). Ninety milliliter of sterile distilled water was thoroughly mixed with the ten grams of soil and final density of fungus was adjusted to 10^3-10^5/100 µl. This fungus was incubated at 37°C for 1 h. After brief centrifugation, the supernatant was spread onto PDA plates and cultured at 28°C and/or 37°C for 2-3 days. In order to count the frequency of fungus on external and internal leaf tissues, one or two leaves were rinsed with 10 ml of distilled water for the isolation of fungus from external leaf tissues. The frequency of fungi for internal tissues were analyzed by cultures from one or two surface sterilized leaves on PDA plates.

Identification of fungal isolates. The fungal identifications were based on the methods of Samson (1990). The ASGV-harboring fungi were 3-point inoculated on malt extract agar (MEA) and PDA, and incubated in the dark for 7 days at 25°C. After incubation, the diameters of the macroscopic colonies (in millimeters) were measured from the reverse side of the plate, and the range observed on each medium from the three inoculation points was recorded. Colony appearance was judged by eye or with a hand lens or stereomicroscope. To determine colony colors, colonies were examined by daylight or using a daylight-type fluorescent light. To determine whether selected isolates were *Talaromyces flavus*, the ITS-1 and ITS-2 regions were amplified by PCR using gene-specific primers based on the *T. flavus* (U18354) sequence. PCR was also carried out to determine how different the sequences were between different isolates.

RNA extraction. Total RNA was prepared essentially as described by Davis and Ausubel (1989) using the Trizol method (Gibco BRL). Freeze-dried leaves and mycelia were collected in 2 ml tubes, which were quick frozen in liquid nitrogen. The tissue was ground to a fine powder using a mortar cooled in liquid nitrogen. After grinding, the fine powder was added to a 1.5 ml microfuge tube containing 0.55 ml of RNA extraction buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 9, 0.4 M LiCl, 25 mM EDTA, and 1% SDS) and 0.55 ml water-saturated phenol. RNA was precipitated by adding a one-third volume of DEPC-treated 8 M LiCl and incubating on ice for 3 h. The RNA pellet was precipitated by centrifugation, dissolved in 0.3 ml DEPC-treated H_2O, and ethanol-precipitated in the presence of 0.3 M sodium acetate, pH 5.2. RNA was collected by centrifugation, dried under vacuum pressure, dissolved in 50 µl DEPC-treated H_2O, and quantified by measuring the absorbance at 260 nm.

RT-PCR. Primers were designed to amplify the coat protein genes of plant viruses known to infect both trees and herbaceous plants (Table 1) (http://www.virusbank.org). The specific primers for *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) and *Apple stem pitting virus* (ASPV) were designed based on the recommendations of Menzel et al. (2002).

RT-PCR was carried out using samples of symptomatic plants and isolated fungi. The cDNA synthesis reaction was performed as follows: A single cycle (consisting of 10 min at 70°C, 50 min at 42°C, 5 min at 95°C) was used to reverse transcribe 5 µg of RNA treated with RQ-1 DNase (Promega Madison, WI, USA) in a reaction volume of 30 µl (final concentrations of 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 5.5 mM $MgCl_2$, 500 µM each dNTP, 0.4 units RNase inhibitor/µl, 1.25 units reverse transcriptase/µl). Samples of the resultant cDNA (5 µl) was then subjected to PCR amplification (5 min at 93°C, followed by 30 cycles of 20 s at 94°C, 40 s at 57°C, 40 s at 72°C) using Hi-Fidelity PCR amplification reagents (Super-bio). For coat protein (CP) gene amplification, the primer pairs used were: ASGV-P1, 5'-CAT ATG AGT TTG GAA GAC GTG CTT C-3'; and ASGV-P2, 5'-CTC GAG ACC CTC CAG TTC CAA GTT A-3'. The PCR product was sub-cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega), according to the manufacturer's instructions.

Results and Discussion

Symptoms of ASGV were observed in *C. quinoa* and *P. vulgaris* plants which were grown within around 160 m^2 of pear orchard that exhibited signs of PBNLS. But no symptoms were observed on *C. quinoa* and *P. vulgaris* or other plants cultivated in fields more distantly located from pear trees exhibiting PBNLS (Fig. 1).

RT-PCR was performed to determine whether a virus was causing the disease. The PCR primers for the amplification

Table 1. Primers used for amplification and detection of various plant viruses

Viruses	Primer sequences (5'-3')	Size (bp)	RT-PCR
ACLSV (Apple chlorotic leaf spot virus)	atggcagcagttctgaatttgcagc ctaaatgcaaagatcagtcgacaca	581	–
ASPV (Apple stem pitting virus)	atggcttccgacggatcccagcctc tgtagacttgtctgaggcgccaaca	720	–
ASGV (Apple stem grooving virus)	atgagtttggaagacgtgcttcaa ctaaccctccagttccaagttact	699	+
BGMV (Bean golden mosaic virus)	atgcctaagcgtgatgctcaatg ttaattggtgatcgaatcataaa	755	–
BYMV (Bean yellow mosaic virus)	caatgcaggtggggtgaaggat cgtggcatatacctctctgttg	552	–
CarMV (Carnation mottle virus)	atggaaaataaaggagaaaaa agcagcgagagttgagggaa	368	–
CMV (Cucumber mosaic virus)	atggacaaatctgaatcaac tcagactgggagcaccccag	657	–
CPMV (Cowpea mosaic virus)	tcaggaactgggcagccgcaac ctgcggggaacccatgccaaga	860	–
LSV (Lily symptomless virus)	atgcaatcaagaccagctca aggttgatttctcacgagca	600	–
PLRV (Potato leaf roll virus)	atgagtacggtcgtggttag tgcaaagccaccctgatggt	614	–
PVY (Potato virus Y)	atggtttggtgcattaaaaa catcctcggtggtgtgcctc	419	–
SMV (Soybean mosaic virus)	ccaggcaaggagaaggaaggag ttactgcggtgggcccatgccc	795	–
TMV (Tobacco mosaic virus)	agttaattaatttatgtact atttaagtggagggaaaaac	503	–
ToMV (Tomato mosaic virus)	ctttccctcagagcaccgtc caacccagacatactttcaa	290	–
WMV (Watermelon mosaic virus)	atggtttggtgtatcgagaa gctgcggccttcatttgtgc	326	–
ZyMV (Zucchini yellow mosaic virus)	tggtgtatagaaaacggcac ctgcattgtattcacaccta	453	–

of virus coat proteins were designed by sequence analysis of viruses reported in the Republic of Korea (Choi, 1999; Ryu, 2002) (Table 1). The PCR conditions and specificity were determined using viruses supplied by the Rural Development Administration (RDA) and the Plant Virus GenBank.

RT-PCR was performed with total RNA extracted from the symptomatic leaves of pears, kidney beans, and *C. quinoa*. The ASGV CP gene was amplified from all tissues (Fig. 1D), and sequence analysis demonstrated that the sequence was identical to the ASGV CP gene sequence in GenBank (Fig. 1E). Additionally, the CP genes of bean golden mosaic virus (BGMV), bean yellow mosaic virus (BYMV) and soybean mosaic virus (SMV) were not amplified from kidney bean plants that showed virus-like symptoms. No product was detected from any of the other PCR primer sets shown in Table 1 (data not shown).

It is possible that the causative agent of the disease might be associated with a soil microorganism because: (1) viral disease symptoms occurring from year 2000 to 2003 were observed in kidney beans located near ASGV-infected pears, but peppers, sesames, and cabbages did not show any symptoms; (2) new kidney beans grown in furrows developed the same disease symptoms detected in kidney

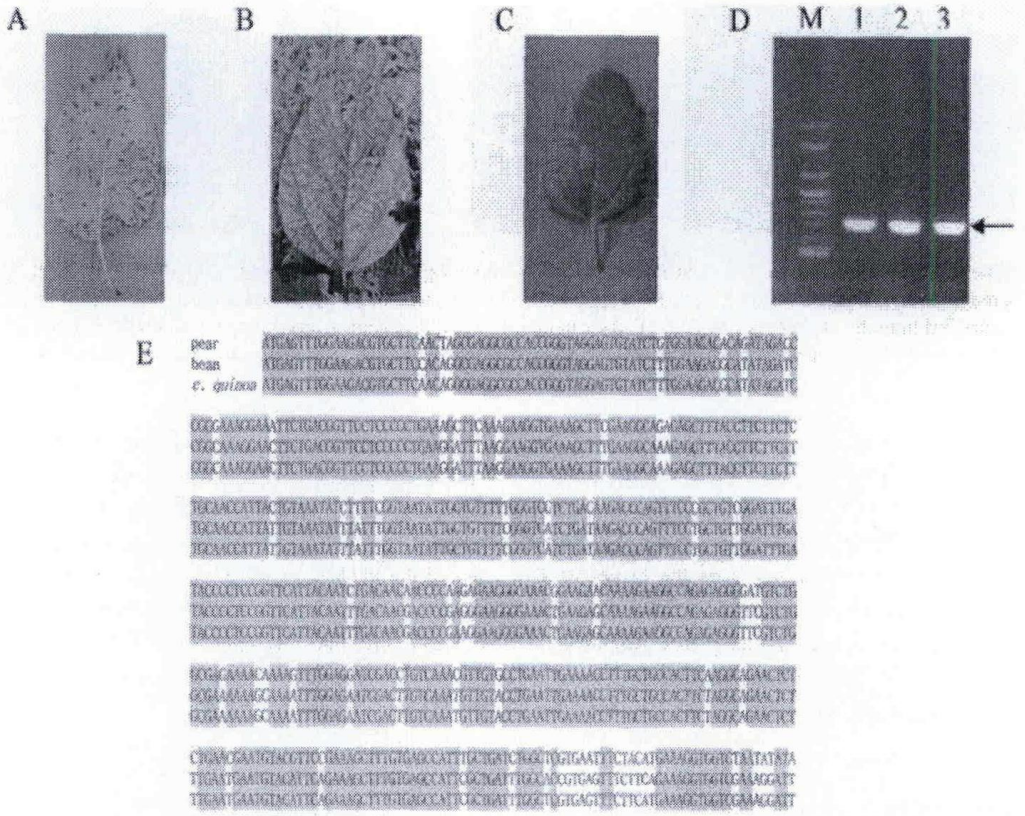


Fig. 1. Typical pear black necrotic leaf spot disease symptoms as they appear in *Pyrus pyrifolia* (A), *Phaseolus vulgaris* (B), and *Chenopodium quinoa* (C). Leaves were taken from plants infected in the field. (D) RT-PCR and sequence analysis of ASGV CP gene from plants showing ASGV-like symptoms. RT-PCR was performed with specific primers (ASGV-P1 and ASGV-P2) for the ASGV CP gene. M, 100 bp DNA molecular weight marker (Bioneer); Lane 1, *P. pyrifolia*; Lane 2, *P. vulgaris*; Lane 3, *C. quinoa*. (E) Nucleotide sequence alignment of amplified products and the previously reported ASGV CP gene sequence (GenBank AF465354). Sequence analysis was carried out with the program provided at http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html.

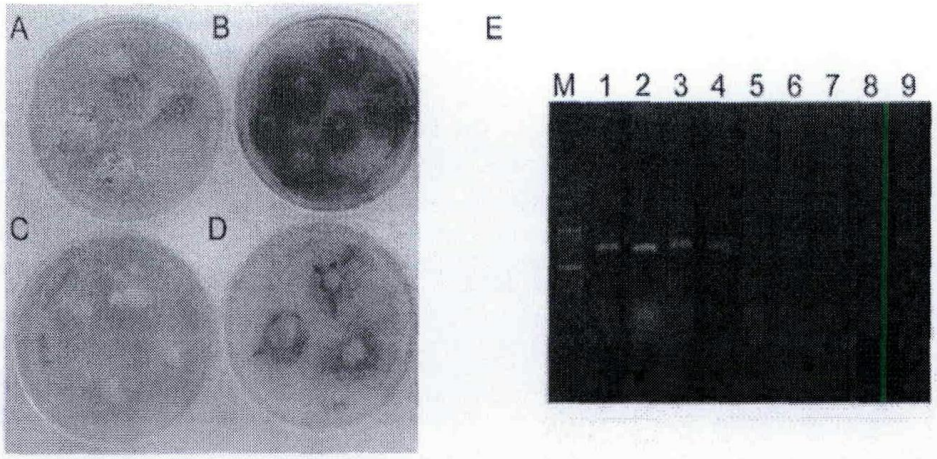


Fig. 2. Morphology of fungi isolated from soil or virus-infected plant tissues. (A) fungi isolated from roots of a virus-infected pear (B) fungi isolated from rhizosphere soil of a virus-infected pear (C) fungi isolated from roots of a virus-infected kidney bean (D) fungi isolated from rhizosphere soil of a virus-infected kidney bean. (E) RT-PCR for virus detection of in samples of fungi isolated from pear and kidney bean plants and surrounding soils. M, 100 bp DNA size marker; Lane 1, fungi cultured from diseased pear root; Lane 2, fungi cultured from soil (pear); Lane 3, fungi cultured from diseased bean root; Lane 4, fungi cultured from soil (bean); Lane 5, ACLSV; Lane 6, ASPV; Lane 7, BGMV; Lane 8, BYMV; Lane 9, SMV. The ASGV CP-specific primers were used in lanes 1-4.

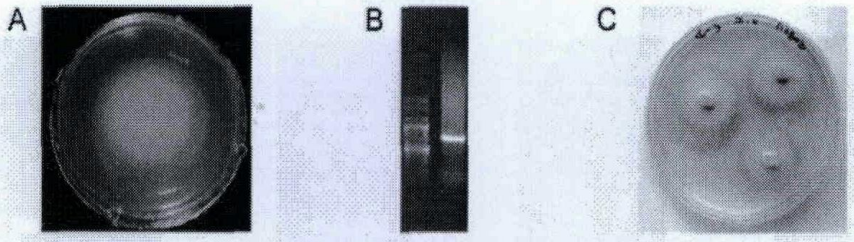


Fig. 3. Virus-infected strain isolation. (A) Culture morphology and mycological characteristics of ASGV-harboring fungi. This strain showed dense mycelia and pigmentation ranging from yellow to yellowish-green in the center and white at the margins. (B) ASGV CP gene was amplified from this strain by RT-PCR. (C) Culture morphology and mycological characteristics of ASGV-infected *Talaromyces flavus*. *T. flavus* grew rapidly on MEA, with dense mycelia and pigmentation ranging from yellow to yellowish-green in the center and white at the margins.

beans during the previous year; and (3) the soil of the orchard was not exchanged or covered with soils from other areas. We were indeed able to isolate and identify the soil microorganism that transmitted and carried the plant virus.

After CP genes were identified from the leaves of *P. pyrifolia* and *P. vulgaris*, fungi were cultured from the infected plants and the soil around the plants. Among soil-borne microorganisms, fungi and nematodes are known to transmit viruses. Nematodes were not isolated from the tissues or soils, but many fungi were isolated from different plant tissues and from the soil (Fig. 2).

Total RNA was extracted from fungi isolated from soils and root tissues, and RT-PCR was then performed using ASGV CP-specific primers. RT-PCR for three bean viruses (BGMV, BYMV, and SMV) and two pear viruses (ACLSV and ASPV) was also performed, but only the ASGV CP gene was amplified by RT-PCR, which was confirmed by sequence analysis (Fig. 2E).

Single conidia were isolated from fungi pools with ASGV and grown on PDA plates for 14 days at 28 ℃. Total RNA was extracted for RT-PCR with ASGV CP-specific primers. The ASGV CP gene product was amplified from one of the PDA plates (Fig. 3B). After culturing for seven days, a pale green circle had formed around the tips of the mycelia (Fig. 3A). Another RT-PCR amplification using ASGV CP-specific primers was performed to confirm that the fungus contained ASGV.

Two orchards, one near Suwon and one near Anseong, were used to study the distribution, frequency, and ecology of the fungus. Two experimental sites were selected for each orchard. Kidney bean was used as the indicator plant at one site, and sesame was used at the other site. To analyze the pathoecological distribution of fungi infected with ASGV, diseased plants with typical symptoms and rhizosphere soil were used for isolation of fungi (Table 2). Control fungus was prepared and isolated from asympto-

Table 2. Isolation of suspected fungal vectors of ASGV from the rhizoplane of pear and kidney bean growing under and near pear trees exhibiting PBNLS

(A) List of soil samples

Sample no.	Host	Condition	Collection area
R-1	Pear	ASGV-infected plants	Suwon (NIAB[1])
R-2	Bean	Virus-like symptoms	Suwon (NIAB)
R-3	Bean	Virus-like symptoms	Suwon (NIAST[2])
R-4	Pear	Healthy plants (no visible symptoms)	Suwon (NIAST)

[1]National Institute of Agricultural Biotechnology
[2]National Institute of Agricultural Science and Technology

(B) Fungal population densities in the rhizoplane of pear and kidney bean growing under and near pear trees exhibiting PBNLS

Sample no.	No. of cfu/g root ($\times 10^3$)			Average ($\times 10^3$)	No. of isolates selected for further testing
	I	II	III		
R-1	0.83	1.49	0.99	1.1	9
R-2	8.33	13.33	6.66	9.4	7
R-3	6.66	14.99	6.66	9.4	9
R-4	2.02	1.06	1.49	1.52	10

Table 3. Isolation of suspected fungal vectors from rhizosphere soils of pear trees exhibiting PBNLS

(A) List of soil samples

Sample no.	Host	Condition	Collection area
S-1	Pear	ASGV-infected plants	Suwon (NIAST[1])
S-2	Pear	ASGV-infected plants	Suwon (NIAB[2])
S-3	Pear	Healthy plants (no visible symptoms)	Suwon (NIAB)
S-4	Sesame	Negative control for this study	Suwon (NIAST)

[1]National Institute of Agricultural Science and Technology
[2]National Institute of Agricultural Biotechnology

(B) Fungal population densities in the rhizosphere of pear trees exhibiting PBNLS

Sample no.	No. of cfu/g root ($\times 10^3$)			Average ($\times 10^3$)	No. of isolates selected for further testing
	1st Exp	2nd Exp	3rd Exp		
S-1	1.75	2.25	0.50	1.50	8
S-2	3.75	4.25	3.25	3.75	9
S-3	1.00	1.50	1.17	1.17	10
S-4	7.25	6.00	7.00	6.75	7

matic pear leaves, sesame leaves, and soils surrounding these plants (Table 3). A total of 69 fungi were selected for further analysis. Three ASGV positives were sent to independent laboratories [Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in the Netherlands and Korean agricultural culture collections (KACC) in the Republic of Korea] for identification of each isolate.

A selected ASGV carrying fungus grew well on PDA plate and formed ascomata (Fig. 3C). This isolate formed many circular asci bearing eight spiny ascospores (Fig. 4B). The sizes of the asci and ascospores were 7-9 × 7-9 μm and 4.4-5.6 × 2.4-3.6 μm, respectively, and these characteristics were similar to the original description of *T. flavus*. Lobe-shaped ascogonia and antheridia surrounding the ascogonia showed typical characteristics of *T. flavus*, and these structures were observed in the fungus described here. This fungus isolate did not grow at 4°C, but grew actively at temperatures from 25 to 37°C. The anamorphic name of this fungus was biverticillate *Penicillium* sp. (Fig. 4D). Also, ITS-1 and ITS-2 regions of ASGV-harboring fungus were amplified and compared with sequences of *T. flavus* (U18354). The sequences of *T. flavus* (U18354) and ASGV-harboring fungus were identical each other (data not shown). Our results were verified by two independent laboratories, CBS and KACC, confirming that the fungus isolated from pear and kidney bean was *T. flavus*.

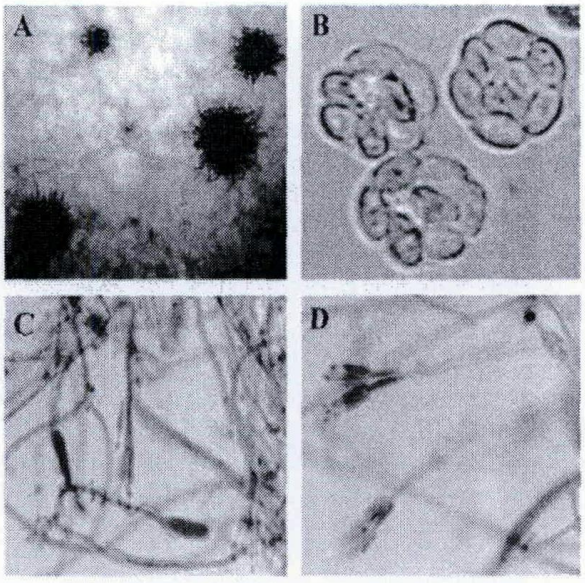


Fig. 4. Characteristic features of *T. flavus*. The conidiophore was branched in a brush-like manner, with phialides at the branch tips. (A) ascomata (B) ascospore (C) antheridia and ascogonia (D) biverticillate *Penicillium* sp.

The frequency and distribution of fungi were surveyed from different developmental stages of *Pyrus* trees and under different temperature conditions. Fungi were isolated from flowers, internal and external tissues of leaves of ASGV-infected pears, and healthy pears, as well as from soil around the pear plants. ASGV-harboring fungi were identified in the surveyed fungal isolates by RT-PCR analysis. The changes in frequency and distribution of ASGV-harboring fungi were analyzed by comparison to the total population of fungi surveyed in this study. The survey was conducted for three months in different orchards because pear plants infected with ASGV first show symptoms during this season. Information regarding the frequency and distribution of fungi came from total numbers of fungi isolated from soils and pears, not from

individual plants. from pears flower for three months. A total of 89 and 16 isolates were isolated from the two separate orchards, respectively, during this period, but ASGV-harboring fungi were not detected (data not shown).

The frequency of fungi isolated from leaf surfaces decreased by 50% for three months. The number of ASGV-harboring fungi was not affected by temperature changes or severity of symptoms, and there were no differences between the two locations (data not shown).

No ASGV-harboring fungi were isolated from the interior of the leaves during the month of April, although many fungi were isolated from leaf surfaces during this period. Relatively more fungi were isolated from the interior of the leaves in May, and the numbers then decreased in June. Additionally, no difference in fungal frequency was observed among the different orchard locations and host plants.

Data regarding soil was quite different from those of leaves and flowers. Relatively constant numbers of fungi were isolated from the soil (data not shown). The frequency of fungi isolated from the soil was not affected by changes in temperature. The average frequency of fungal isolation was 13 isolates per gram of soil. The frequency of ASGV-harboring fungi was similar to the pattern of total fungal frequency. Soil contained relatively more ASGV-harboring fungi than did flowers and leaves.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Agricultural Research Promotion Center (203051-3), Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

References

Adams, M. J. 1991. Transmission of plant viruses by fungi. *Ann. Appl. Biol.* 118:479-492.

Ahmed, N. A., Christie, S. R. and Zettler, F. W. 1983. Identification and partial characterization of a closterovirus infecting *Nandina domestica*. *Phytopathology* 73:470-475.

Caston, J. R., Ghabrial, S. A., Jiang, D., Rivas, G, Alfonso, C., Roca, R., Luque, D. and Carrascosa, J. L. 2003. Three-dimensional structure of *Penicillium chrysogenum* virus: A double-stranded RNA virus with a genuine T=1 capsid. *J. Mol. Biol.* 331:417-431.

Choi, J. K. 1999. http://bric.postech.ac.kr/biowave/review

Chu, Y. M., Jeon, J. J., Yea, S. J., Kim, Y. H., Yun, S. H., Lee, Y. W. and Kim, K. H. 2002. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2529-2534.

Chu, Y. M., Lim, W. S., Yea, S. J., Cho, J. D., Lee, Y. W. and Kim, K. H. 2004. Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes* 28:135-143.

Davis, K. R. and Ausubel, F. M. 1989. Characterization of elicitor induced defense responses in suspension-cultured cells of Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 2:363-368.

Lister, R. M. 1970. *Apple stem grooving virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 31.

Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* 99:81-92.

Nam, K. W. and Kim, C. H. 1994. Studies on the pear abnormal leaf spot disease. 1. Occurrence and damage. *Korean J. Plant Pathol.* 10:169-174.

Nam, K. W. and Kim, C. H. 2002. Graft transmission and cytopathology of pear black necrotic leaf spot (PBNLS) disease. *Plant Pathol. J.* 18:301-307.

Ryu, K. H. 2002. http://www.virusbank.org

Samson, R. A. and Pitt, J. I. 1990. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Plenum Press, New York.

Shim, H. K. 2004. Molecular characteristics and pathological interactions of *Talaromyces flavus* and *Apple stem grooving virus-M*. Ph.D. Dissertation of Sungkyungkwan University, Korea.

Shim, H. K., Min, Y. J., Hong, S. Y., Kwon, M. S., Kim, D. H., Kim, H. R., Choi, Y. M., Lee, S. C. and Yang, J. M. 2004. Nucleotide Sequences of Korean Isolate of Apple Stem Grooving Virus Associated with Black Necrotic Leaf Spot Disease on Pear (*Pyrus pyrifolia*). *Mol. Cells* 18:192-199.

von Wechmar, M. B. 1980. Transmission of brome mosaic virus by *Puccinia graminis tritici*. *Phytopathology* 5:239-250.

von Wechmar, M. B., Chauhan, R. and Knox, E. 1992. Fungal transmission of a potyvirus: uredospores of *Puccinia sorghi* transmit *Maize dwarf mosaic virus*. *Arch. Virol. Suppl.* 5:239-250.

Plant Pathol. J. 22(3) : 255-259 (2006)

The Plant Pathology Journal
©The Korean Society of Plant Pathology

The Pear Black Necrotic Leaf Spot Disease Virus Transmitted by *Talaromyces flavus* Displays Pathogenicity Similar to *Apple stem grooving virus* Strains

Hye-Kyung Shim[1], Kyu-Hyon Hwang[1], Chang-Ki Shim[2], Su-Wan Son[1], Donggiun Kim[3], Yong-Mun Choi[4], Youngjae Chung[5], Dae-Hyun Kim[6], Hyeong-Jin Jee[2] and Suk-Chan Lee[1]*

[1]*Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea*
[2]*Organic Farming Technology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea*
[3]*Environmental Biotechnology National Core Research Center and Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*
[4]*Pear Experiment Station, National Horticultural Research Institute, RDA, Naju 520-820, Korea*
[5]*Department of Biology, Seonam University, Namwon 590-711, Korea*
[6]*Evaluation Coordination Officer, Planning and Management Officer, RDA, Suwon 441-707, Korea*

(Received on August 1, 2006; Accepted on August 16, 2006)

The pathogenicity to pear trees and other experimental hosts of the *Apple stem grooving virus* Korean isolate (ASGV-K) carried by a fungal vector, *Talaromyces flavus* was examined. ASGV-harboring *T. flavus* induced mild symptoms on virus-free pears. Symptom severity was intermediate between pears showing typical PBNLS and virus-free pears. Ten cultivars of *Phaseolus vulgaris* showed 35%-90% infectivity by direct infiltration into leaves and roots by ASGV-harboring *T. flavus*. Application of fungal cultures to soils showed 0%-70% infectivity depending on the *P. vulgaris* cultivar. Sap extracted from ASGV-infected *Chenopodium quinoa* induced similar symptoms on *P. vulgaris* at 25 days after inoculation. Similar symptoms were also detected on *P. vulgaris* which were inoculated with ASGV-harboring *T. flavus*. When healthy *P. vulgaris* leaves were challenged with sap extracted from *P. vulgaris* leaves infected with ASGV-harboring *T. flavus*, typical symptoms were observed. These data suggest that *T. flavus* mediates the transfer of ASGV to host plants.

Keywords **:** *Apple stem grooving virus*, pear black necrotic leaf spot, *Phaseolus vulgaris*, *Talaromyces flavus*

Recently, we reported that pear black necrotic leaf spot (PBNLS) could be caused by *Apple stem grooving virus* (ASGV) (Shim et al., 2004). However, there was no information about the viral vectors and transmission manner of ASGV on pears.

Twenty plant viruses are currently known to be transmitted by fungal zoospores, and, in many cases, this is their primary or only means of transmission (Adams, 1991). This is a testament to the efficiency of zoospores in locating a host. However, the vectors belong to just three genera, *Olpidium* (Chytridiomycota), and *Polymyxa* and *Spongospora* (plasmodiophorids). These fungi are common and usually symptomless parasites of roots, and their significant feature as viral vectors is that the encysted zoospores germinate to release a naked protoplast into the plant (Alexopoulos et al., 1996). Fungi (Oomycota) that produce walled hyphae from zoospore cysts appear to be incapable of acting as viral vectors.

Contrary to these studies, von Wechmar et al. (1992) have claimed that three viruses are transmitted by higher fungi (Erasnus et al., 1983). They observed that uredospores of *P. graminis tritici* (stemrust of wheat) transmitted *Brome mosaic virus* (BMV) when uredospores developed on plants that were simultaneously infected with stemrust and BMV (von Wechmar, 1980; Erasmus and von Wechmar, 1983). Additionally, they showed that transmission of *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) to new maize seedlings by uredospores was maintained for three successive years (1988-1991) in a plant growth room.

Talaromyces flavus is considered a member of the higher fungi. *T. flavus* (anamorph: *Penicillium vermiculatum*) is an ascomycetous fungus, and is the most common species of *Talaromyces*, which is found throughout the world in soils of warmer climates (Murray et al., 1997). It first attracted attention as a parasite of *Rhizoctonia solani* because it was found to coil around the hyphae on agar plates, penetrating them and causing localized disruption. However, recent interest has focused on its potential to control the vascular wilt pathogen, *Verticillium dahliae* (Marois et al., 1982). *T. flavus* invades the melanized microsclerotia of *V. dahliae* on diseased roots and sporulates on the surfaces of these structures. *T. flavus* has often been found in soil, but the

*Corresponding author.
Phone) +82-31-290-7866, FAX) +82-31-290-7870
E-mail) sukchan@skku.ac.kr

pathogenicity of *T. flavus* and its ability to act as a virus transmitting vector have not been reported previously. A few studies have suggested that higher fungi such as *T. flavus* deliver plant viruses, but more definitive studies have not appeared.

Here, in order to investigate why and how the number of PBNLS disease was increased in field we show that ASGV could be transmitted by *T. flavus* as a putative vector. We also developed an experimental host system to induce symptoms and investigated the transmissibility of ASGV by inoculating host plants with ASGV-harboring fungi.

Materials and Methods

Seeds. *C. quinoa* seeds were obtained from the National Horticultural Research Institute. *P. vulgaris* seeds were obtained from the National Seed Management Office. The ten cultivars of *Phaseolus vulgaris* used in this study were Kyunggi 1, Kyunggi 2, Kyunggi 3, Kyunggi 4, Kyunggi 5, Kangnangkong 1, KGP 6029, KGP 7059, Chungye 20, Chyungye 23, and Sansung.

Fungal transmission tests. Isolates of virus-free and virus-infected *T. flavus* were grown on potato dextrose agar (PDA) for 14 days. Conidial suspensions were prepared in distilled water containing 0.01% Tween-20. *P. vulgaris*, *C. quinoa*, and *N. tabacum* seedlings were used as test plants for viral transmission. Soils were autoclaved at 121°C for 15 min and dried at 65°C. The seedlings were supplied with modified Hoagland and Arnon solution (pH 7.0) daily, and were cultured in a growth chamber at 25°C under a 16 h light/8 h dark cycle (Tamada et al., 1989). When seedlings reached the 4-6 leaf stage, plant leaves were inoculated with fungus, or liquid fungal cultures were applied to the soil. Leaves were given a wound of approximately 1 mm in length with a sterilized scalpel and were inoculated with 10 µL of conidial suspension (1×10^6 conidia/mL) or a 0.5×0.5 mm mycelial block. Inoculations were performed with 3 replicates per leaf. Inoculated plants were kept in a plant growth room with high relative humidity (approx. 70%) maintained by an automatic humidifier. To prepare an inoculum for soil applications, 10 µL of conidial suspension (1×10^6 conidia/mL) was introduced into 250 mL of PDB and incubated for 14 days.

RT-PCR. To determine the possible transmission of ASGV by *T. flavus*, RT-PCR was carried out on fungi and inoculated plants. A single cycle (consisting of 10 min at 70°C, 50 min at 42°C, 5 min at 95°C) was used to reverse transcribe 5 µg of RNA treated with RQ-1 DNase (Promega) in a reaction volume of 30 µL (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 5.5 mM $MgCl_2$, 500 µM each dNTP, 0.4 units RNase inhibitor/µL, 1.25 units reverse transcriptase/µL). The resulting cDNA (5 µL) was then subjected to PCR amplification (5 min at 93°C, followed by 30 cycles of 20 s at 94°C, 40 s at 57°C, 40 s at 72°C) using Hi-Fidelity PCR amplification reagents (Roche). Primers for amplification of ASGV were designed based on the nucleotide sequence of the reported ASGV (AF465354). The primer pairs used for the amplification of the coat protein (CP) were: ASGV-P1, 5'-CAT ATG AGT TTG GAA GAC GTG CTT C-3' and ASGV-P2, 5'-CTC GAG ACC CTC CAG TTC CAA GTT A-3'. The resulting PCR product was subcloned into the pGEM-T Easy vector (Promega), according to the manufacturer's instructions.

Dot-blot hybridization. Dot-blot hybridization was used to detect ASGV in plants and fungi. The quality of the RNA was checked on a 1% agarose gel after denaturation for 10 min at 70°C in 5 M urea. The RNA concentration and purity were determined by UV absorbance. RNA samples (100 ng) from soil samples and from pure fungal cultures were denatured in three volumes of 2% gluteraldehyde in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and applied in duplicate to Hybond-N+ positively-charged membranes (Amersham Pharmacia Biotech) using a 96-well Miniford I dot-blot system (Midwest Scientific) under vacuum pressure. The membranes were air-dried prior to hybridization. A [^{32}P]dCTP-labeled pASCP clone was used as the probe. Unincorporated nucleotides were removed with a nucleic acid removal kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Membranes were pre-hybridized in Perfect Hyb Plus hybridization buffer (Amersham Pharmacia Biotech) for 15 min at 42°C before adding the labeled probe. After overnight hybridization, membranes were washed twice in 100 mL of a wash solution consisting of 1x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate) and 1% sodium dodecyl sulfate at 42°C. Each membrane was then washed for 30 min in 200 mL of the wash solution at the specified wash temperature for each probe. After washing, the membranes were air-dried and exposed to film for 2 days at -70°C.

Results and Discussion

To compare PBNLS symptoms with those of pears infected with ASGV-harboring *T. flavus*, three pear tree treatments were used. Ten scions from healthy plants were top-grafted onto healthy rootstocks as controls in this study. Two experimental groups consisted of ten healthy scions top-grafted onto plants that had shown signs of PBNLS, and ten healthy plants that were inoculated with ASGV-harboring *T. flavus*.

PBNLS-like symptoms developed in the experimental plants in six months after grafting (Table 1). Necrotic spots

Table 1. Infection rates of pear trees inoculated with ASGV-harboring fungal isolates and top-grafting

Methods	N[a]	% infected[b]	severity[c]	DPI[d]	RT-PCR
Top grafting (Healthy plants)	10	0	0	-	-
Top grafting (Indicator plants)	10	70	3-5	6 months	+
Virus-infected fungus Inoculation	10	20	2	6 months	+

[a]number of plants treated
[b](number of plants showing symptoms/total number of plants treated) × 100
[c]degree of symptom development (0; no symptoms, 1; mild symptoms, 2; moderate symptoms, and 3; severe symptoms)
[d]DPI (days post-inoculation)

were produced on the leaves of seven out of ten scions grafted onto PBNLS infected plants. Typical symptoms were observed on leaves of the top-grafted scions and were used as positive controls (Fig. 1D). PBNLS-like symptoms also developed in plants infiltrated with ASGV-harboring *T. flavus*. The symptoms were similar to those of the grafted plants, but were relatively mild overall (Fig. 1B). In the case of the PBNLS infected plants, necrotic spots became much larger due to fusion of the lesions (Fig. 1D). None of virus-free fungi infected pears or virus-free scions of pears developed symptoms (Fig. 1A, 1C). These data indicated that ASGV can be transmitted both by grafting and ASGV-harboring *T. flavus*. This was the first report about the ASGV transmission by fungus, not by grafting.

RT-PCR was used to detect the ASGV CP gene and confirmed the presence of the virus. RT-PCR using CP gene specific primers was performed on total RNA extracts and a PCR product of the expected size (714 bp) was amplified from plants grafted onto PBNLS infected plants, but not from healthy plants (data not shown). Symptomatic leaves of plants inoculated with ASGV-harboring *T. flavus* also produced a 714 bp PCR product. The PCR products were sequenced and compared with ASGV (AF465354). These sequences showed extremely high homology (98%) to the ASGV CP sequence in the database (data not shown).

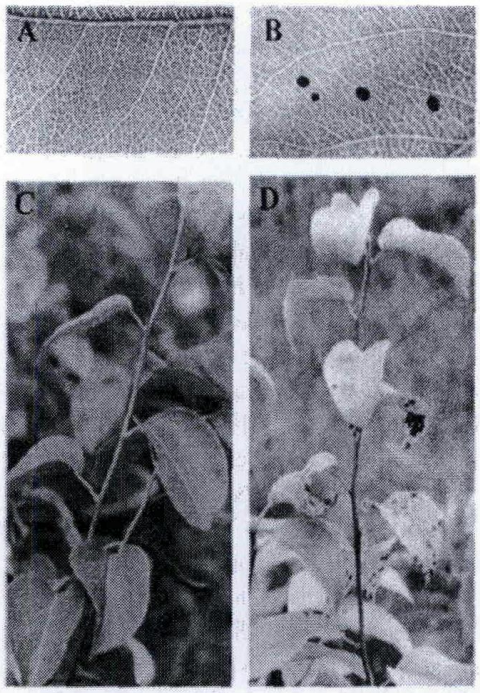


Fig. 1. Symptoms caused by virus-infected fungi and grafting. (A) Virus-free *T. flavus*-infected pear, (B) virus-infected *T. flavus*-inoculated pear, (C) Virus-free pear tree, (D) Virus-infected indicator plants.

To study the complex interactions among host plant, fungus, and virus, we used the experimental hosts *P. vulgaris* and *C. quinoa* which are susceptible to ASGV as well as to virus-infected fungi. *N. tabacum* was also tested to determine whether it could be used as another experimental host (Table 2). *N. tobacum* was asymptomatic to ASGV-harboring *T. flavus*. In this study, two inoculation methods were applied for investigating which organs could be the possible route for infection by ASGV-harboring *T. flavus*: (A) mechanical inoculation of fungi onto the leaves and (B) direct application of suspension-cultured mycelia to the soil. Ten cultivars of *P. vulgaris* showed 35%-90% infectivity when they were inoculated by direct inoculation into wounds on the leaves (Table 2A). Direct application of fungal cultures to the soil produced infection rates of 0%-70% among the different *P. vulgaris* cultivars (Table 2B). Infectivity varied depending on the method of inoculation and the *P. vulgaris* cultivar, due to specific interactions between *P. vulgaris*, ASGV, and the ASGV-harboring fungus. The Kyunggi 5 cultivar showed the highest rates of infection under either method of inoculation and, thus, should be a suitable experimental host for future analyses. When leaves of two other herbaceous hosts, *C. quinoa* and *N. tabacum*, were inoculated, or when liquid cultures of fungus were applied to the soil surrounding the plants, the plants were not infected to the same degree as *P. vulgaris* (Table 2). *C. quinoa* showed 21% infectivity when fungal cultures were applied to the soil surrounding the roots, but the disease symptoms were not clear and a relatively long amount of time was needed for symptoms to appear. *N. tabacum* was not infected by ASGV regardless of inoculation method. In all cases, inoculation of leaves induced disease symptoms faster than inoculation of roots by application of fungal cultures to the soil.

Table 2. Infection rates of various *P. vulgaris* cultivars inoculated with ASGV-harboring fungal isolate

(A) Inoculation of fungus onto the leaves

Plants	N[a]	% infected[b]	severity[c]	DPI[d]	RT-PCR
Phaseolus vulgaris					
Kyunggi 1	20	85	4	10	+
Kyunggi 2	20	85	3	17	+
Kyunggi 4	20	85	4	12	+
Kyunggi 5	20	90	5	10	+
Kangnangkong 1	20	50	2	17	+
KGP 6029	20	75	3	11	+
KGP 7059	20	75	3	14	+
Chungkye 20	20	50	2	20	+
Chungkye 23	20	50	2	20	+
Sansung	20	35	1	23	+
Chenopodium quinoa	14	0	0	ND[e]	ND
Nicotiana tabacum	14	0	0	ND	ND

[a]number of plants treated
[b](number of plants showing symptoms/total number of plants treated) × 100
[c]degree of symptom development (0; no symptoms, 1; mild symptoms, 2; moderate symptoms, and 3; severe symptoms)
[d]DPI (days post-inoculation)
[e]Not determined

(B) Application of fungal culture to the soil.

Plants	N[a]	% infected[b]	severity[c]	DPI[d]	RT-PCR
Phaseolus vulgaris					
Kyunggi 1	10	50	2	14	+
Kyunggi 2	10	50	1	20	+
Kyunggi 4	10	50	2	16	+
Kyunggi 5	10	70	3	14	+
Kangnangkong 1	10	20	1	19	+
KGP 6029	10	40	2	16	+
KGP 7059	10	40	1	19	+
Chungkye 20	10	ND[e]	0	ND	+
Chungkye 23	10	ND	0	ND	+
Sansung	10	0	0	ND	ND
Chenopodium quinoa	14	21	1	20	+
Nicotiana tabacum	14	0	0	ND	ND

[a]number of plants treated
[b](number of plants showing symptoms/total number of plants treated) × 100
[c]degree of symptom development (0; no symptoms, 1; mild symptoms, 2; moderate symptoms, and 3; severe symptoms)
[d]DPI (days post-inoculation)
[e]Not determined

Sap extracted from ASGV-infected *C. quinoa* induced similar symptoms on *P. vulgaris* at 25 days after inoculation (Fig. 2B). Symptoms were also detected in *P. vulgaris* treated with ASGV-harboring *T. flavus* (Fig. 2D). When sap extracted from *P. vulgaris* leaves infected with ASGV-harboring *T. flavus* was used to inoculate new healthy *P. vulgaris* leaves, similar symptoms were observed (Fig. 2F). However, *P. vulgaris* inoculated with mock treatment (Fig. 2A), ASGV-free *T. flavus* (Fig. 2C), or saps from ASGV-free *T. flavus* infected *P. vulgaris* (Fig. 2E) did not show any disease symptoms. Collectively, with the data of Fig. 2, we concluded that (1) ASGV can be transmitted by *T. flavus* and (2) the symptoms shown on *P. vulgaris*, pear, and *C. quinoa* (data not shown) were induced by ASGV-harboring *T. flavus*, not by *T. flavus* only.

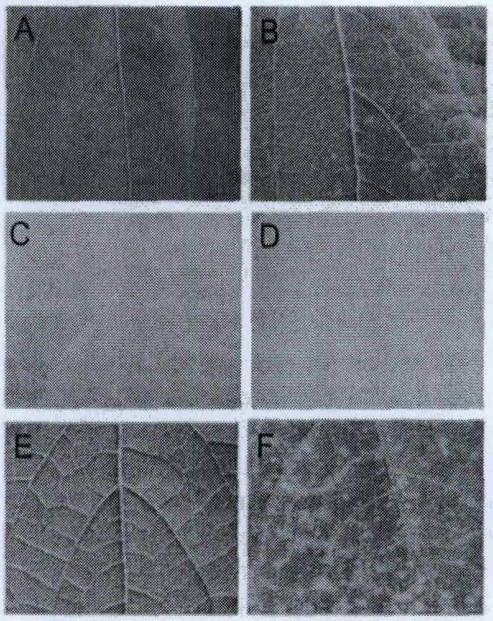


Fig. 2. Comparison of symptoms on leaves of *Phaseolus vulgaris* at 25 dpi. The leaves on the left are buffer-inoculated leaves (A), (C) and (E) which served as the negative controls, and the leaves on the right were inoculated with (B) infectious ASGV plant sap, (D) ASGV-harboring *T. flavus*, and (F) plant sap from ASGV-harboring *T. flavus* infected leaves.

The plant samples shown in Fig. 2 were used for RNA isolation, and 5 μg RNA was used for dot-blot hybridization to detect the presence of the virus (Fig. 3). ASGV was not detected in plants treated with the virus-free fungal isolate or mock-inoculated (Fig. 3). However, ASGV was detected in all symptomatic leaves (Fig. 3). Taken together, these data indicated that *T. flavus* mediates the transfer of ASGV into host plants by ASGV harboring *T. flavus* infiltration. With limited information and data about virus transmission by fungus such as *T. flavus*, we could not explain the mechanism of ASGV transmission 'from plant to plant' and 'from fungus to plant'. But the challenging of saps from ASGV infected *C. quinoa* on *P. vulgaris*, infiltration of ASGV harboring *T. flavus* on *P. vulgaris* and re-inoculation of saps from ASGV harboring *T. flavus* infiltrated leaves showed the symptom induction and

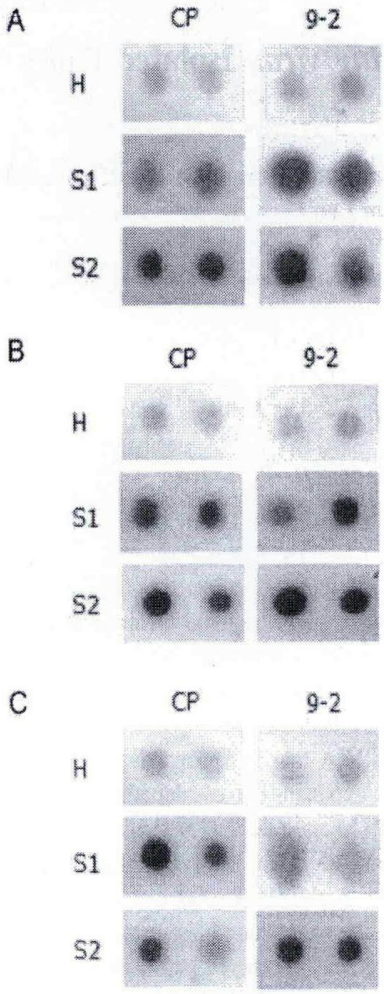


Fig. 3. Dot-blot hybridization of total RNA extracted from *Phaseolus vulgaris*. (A) Total RNA extracted from symptomatic leaves treated with plant sap from ASGV infected plants; (B) total RNA extracted from *P. vulgaris* inoculated with ASGV-harboring *T. flavus*; (C) total RNA extracted from *P. vulgaris* inoculated with plant sap from leaves inoculated with ASGV-harboring *T. flavus*. Duplicate membranes were hybridized with specific probes for the coat protein (CP) region and the N-terminal (9-2) region of the viral genome. H indicates a healthy plant. S1 and S2 are two independent symptomatic plants.

ASGV accumulation in all three trials, demonstrating that somehow ASGV could be transmitted by ASGV harboring *T. flavus*.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Agricultural Research Promotion Center (203051-3), Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

References

Adams, M. J. 1991. Transmission of plant viruses by fungi. *Ann. Appl. Biol.* 118:479-492.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. In: Chapter 2. Characteristics of Fungi. John Wiley & Sons, Canada.

Cortesi, P., McCulloch, C. E., Song, H., Lin, H. and Milgroom, M. G. 2001. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut bight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 159:107-118.

Erasmus, D. S., Rybicki, E. P. and von Wechmar, M. B. 1983. The association of *Brome mosaic virus* and wheat rust: Detection of virus in/on uredospores. *J. Phytopathol.* 108:34-40.

Erasmus, D. S. and von Wechmar, M. B. 1983. *Brome mosaic virus* (BMV) reduces susceptibility of wheat to stem rust (*Puccinia graminis tritici*). *Plant Dis.* 67:1196-1198.

Marois, J. J., Dunn, M. T. and Papavizas, G. C. 1982. Biological control of Verticillium wilt of eggplant in the field. *Plant Dis.* 66:1166-1168.

Murray, F. R., Llewellyn, D. J., Peacock, W. J. and Dennis, E. S. 1997. Isolation of the glucose oxidase gene from *Talaromyces flavus* and characterization of its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Curr. Genetics* 32:367-375.

Nam, K. W. and Kim, C. H. 2002. Graft transmission and cytopathology of pear black necrotic leaf spot (PBNLS) disease. *Plant Pathol. J.* 18:301-307.

Shim, H. K., Min, Y. J., Hong, S. Y., Kwon, M. S., Kim, H. R., Choi, Y. M., Lee, S. C. and Yang, J. M. 2004. Nucleotide sequences of Korean isolate of *Apple stem grooving virus* associated with black necrotic leaf spot disease on pear (*Pyrus pyrifolia*). *Mol. Cells* 18:192-199.

Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T. and Harada, T. 1989. Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.* 70:3399-3409.

von Wechmar, M. B. 1980. Transmission of *Brome mosaic virus* by *Puccinia graminis tritici*. Phytopahtololy 5:239-250.

von Wechmar, M. B., Chauhan, R. and Knox, E. 1992. Fungal transmission of a potyvirus: uredospores of *Puccinia sorghi* transmit *Maize dwarf mosaic virus*. *Arch. Virol. Suppl.* 5:239-250.

Yu, H. J., Lim, D. B. and Lee, H. S. 2003. Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. *Virology* 314:9-15.

Plant Pathol. J. 22(3) : 260-264 (2006)

The Plant Pathology Journal
©The Korean Society of Plant Pathology

Molecular Characterization of *Apple stem grooving virus* Isolated from *Talaromyces flavus*

Hye-Kyung Shim[1], Kyu-Hyon Hwang[1], Chang-Ki Shim[2], Su-Wan Son[1], Donggiun Kim[3], Yong-Mun Choi[4], Youngjae Chung[5], Dae-Hyun Kim[6], Hyeong-Jin Jee[2] and Suk-Chan Lee[1]*

[1]*Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea*
[2]*Organic Farming Technology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea*
[3]*Environmental Biotechnology National Core Research Center and Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*
[4]*Pear Experiment Station, National Horticultural Research Institute, RDA, Naju 520-820, Korea*
[5]*Department of Biology, Seonam University, Namwon 590-711, Korea*
[6]*Evaluation Coordination Officer, Planning and Management Officer, RDA, Suwon 441-707, Korea*

(Received on August 1, 2006; Accepted on August 16, 2006)

***Talaromyces flavus* mediates the transmission of *Apple stem grooving virus* (ASGV) to several host plants. The ASGV-F carried by *T. flavus* was partially purified from the fungus. Based on sequence analysis and homology searches, this is closely related to other ASGV strains isolated from host plants. The partially purified viral coat protein (CP) was separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel and analyzed by Western blotting with an ASGV anti-serum. A single band at 28 kDa reacted with the ASGV anti-serum. The deduced amino acid sequence of the ORF-1 showed conserved domains, including an NTP-binding helicase motif, GFAGSGKT. The amino acid sequences of the helicase and CP showed strong homology to other ASGV strains (98%). All ASGV isolated from plants and fungi had salt bridges composed of the CP and the GFAGSGKT motif of the helicase, which are commonly conserved in plant viruses. These results suggest that ASGV-F is one of ASGV strains isolated from *T. flavus* based on sequence similarity as well as the serological analysis of CP.**

Keywords : *Apple stem grooving virus*, coat protein, helicase, *Talaromyces flavus*

In the previous studies, we reported that *Talaromyces flavus* served as a vector of *Apple stem grooving virus* (ASGV), and transmitted virus was also infectious to the host plants. ASGV usually latently infects Rosaceae fruit trees such as apple, pear, apricot and cherry (Yoshikawa et al., 1996). ASGV caused apple top working disease in Japan and induced decline syndrome in Mitsuba Kaido (*Malus sieboldii*), a rootstock of apple trees (Lister, 1970). ASGV is transmitted by grafting and mechanical inoculation into susceptible hosts such as *Phaseolus vulgaris*, *Chenopodium quinoa* and *Nicotiana glutinosa* (Lister, 1970). ASGV has a monopartite genome consisting of a 6.5 kb, single stranded, plus-sense RNA that is 5' capped and 3' polyadenylated. ASGV RNA contains two overlapping open reading frames: ORF1 (6.3 kb) and ORF2 (1.0 kb), which encode proteins of 241 and 36 kDa in molecular mass, respectively (Yoshikawa et al., 1992; Ohira et al., 1995). The larger ORF1 encodes an apparently chimeric polyprotein containing at least two conserved regions: the replicase (Rep) region contains several domains (methyltransferase, papain-like protease, NTP-binding helicase and RNA-dependent RNA polymerase domains), which was characteristics of viral Rep. The coat protein (CP) region is located at the C-terminal end and contains typical motifs of CP (Yoshikawa et al., 1992; Ohira et al., 1995). ORF2 encodes a protein with conserved motifs for both movement proteins (MP) and viral proteases (Yoshikawa et al., 1992; Ohira et al., 1995). The expression strategies of these ORFs are not yet well understood.

Most mycoviruses have dsRNA genomes, either encapsidated in particles (Buck, 1986), present as unencapsidated forms in the cytoplasm (Ahn and Lee, 2001), or found in the mitochondrial fraction (Hong et al., 1998; Lakshman et al., 1998). Rarely, single-stranded RNA (ssRNA) genomes have been reported in mycoviruses: only four ssRNA mycoviruses have been identified to date. The *Mushroom bacilliform virus* (MBV) was found in *Agaricus bisporus* (Tavantzis et al., 1980; Revill et al., 1994), and the *Scelerophthora macrospora Virus B* (SmVB) was isolated from *S. macrospora*, the pathogenic fungus responsible for downy mildew in gramineous plants (Yokoi et al., 1999). *Botrytis virus F* (BVF) infects *Botrytis cinerea*, an impor-

*Corresponding author.
Phone) +82-31-290-7866, FAX) +82-31-290-7870
E-mail) sukchan@skku.ac.kr

tant pathogen affecting a large number of economically important vegetables, flowers, and fruit crops (Robyn et al., 2001). *Oyster mushroom spherical virus* (OMSV) was isolated from a cultivated oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. This virus was associated with the recent epidemic of oyster mushroom die-back disease in Korea (Yu et al., 2003).

Here, an ASGV-F was purified from *T. flavus*. We confirmed that this strain possesses the highly conserved helicase, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and coat protein (CP) domains found in other strains of ASGV. Phylogenetic analysis showed that this ASGV-F was indeed a strain of ASGV. This strain also showed relatively high sequence homology to the filamentous form of BVF when the coat protein sequences were aligned with those of the ssRNA mycoviruses.

The strains of *T. flavus* used in this study were 2-3 IO-A as an ASGV harboring fungus strain and 16-6 VF as a virus-free *T. flavus*. Both ASGV-F harboring *T. flavus* and virus-free strains were maintained on a solid medium [3.9% w/v potato dextrose agar (PDA), Difco, USA]. Preparative cultures for RNA analysis were grown for 20 days at room temperature under a 16 h light/8 h dark cycle, with cellophane on the agar surface to permit mycelial harvesting. The virus was purified based on the method of Kim et al. (2003) with some modifications. For purification of the virus, the mycelia grown in 250 mL of potato dextrose broth (PDB) at room temperature for 20 days were collected on 0.45 μm filter paper (Whatman) via vacuum filtration, followed by two washes with distilled water. Using a mortar and pestle containing liquid nitrogen, 100 g of the fungal mycelia were finely ground, and was transferred to a centrifuge tube, and added with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0). Cell debris was removed by centrifugation at 12,000 rpm for 30 min in a Sorvall GSA rotor. The virus was precipitated with 6% polyethylene glycol (MW, 8000) and 0.15 M sodium chloride on ice for 12 h, and then centrifuged at 10,000 g for 20 min. The pellet was resuspended in the same buffer. Following another low-speed centrifugation, the supernatant was centrifuged in a Beckman 70 Ti rotor at 30,000 rpm for 3 h. The pellet was resuspended in the same buffer, and then subjected to 20% sucrose density gradient centrifugation using a SW-27 rotor at 24,000 rpm for 3 h. The virus band was collected and concentrated by centrifugation at 30,000 rpm for 3 h in a Beckman 70 Ti rotor. The virus preparation was stored at -70°C until use.

For viral coat protein analysis, the purified virus was mixed with an equal volume of 1x sample buffer (50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue) and heated for 5 min at 100°C. Further analysis followed previously published methods (Shim et al., 2004). In order to characterize the viral cDNA, RNA was extracted from cultures of virus-infected *T. flavus* strain 2-3 IO-A grown in PDB. Primer pairs for the amplification of ASGV cDNA were designed based on the nucleotide sequence of the reported ASGV strain (D14995). The following primer pairs were used for the amplification of helicase (5'-AGC GGC ATA CAA TGG GCT AA-3' & 5'-TGG CAC TGG CAA CCT CAA A-3'), RdRp (5'-ACT TTT TCT GCC TGG ATA GCT-3' & 5'-CTG TCT TTC ACT CAT CAT CTT G-3'), and CP (5'-CAT ATG AGT TTG GAA GAC GTG CTT C-3', and 5'-CTC GAG ACC CTC CAG TTC CAA GTT A-3'). The single PCR products from each amplification were subcloned into the pGEM-T Easy vector (Promega), according to the manufacturer's instructions. cDNA clones were sequenced in both forward and reverse directions. Sequence alignment was performed using the CLUSTAL W program (version 1.8) (Thompson et al., 1994). Helicase, RdRp, and CP regions were aligned independently of the entire replicase alignment. Unrooted neighbor-joining distance trees were constructed using the NEIGHBOR program. Sequence identity and similarity analyses were carried out using BLAST 2 and CLUSTAL W. The 'tymo-like' virus group, composed of isometric particles, included genera *Tymovirus* and *Marafivirus*. The 'potex-like' virus group, composed of flexuous rod-shaped particles, included genera *Capillovirus*, *Foveavirus*, and *Trichovirus*. The ssRNA genome mycovirus group includes Mushroom bacilliform virus, *Botrytis* virus F, and *Sclerophthora macrospora* virus B.

In previous studies, we found that *Talaromyces flavus* could transmit ASGV to uninfected host plants. This study represents the first molecular characterization of the ASGV-F harbored by *T. flavus*. The virion, which was present at very low titers in the fungus, was isolated and partially purified. The results of the cDNA sequence analysis and homology searches indicate that the ASGV -F is closely related to other ASGV strains.

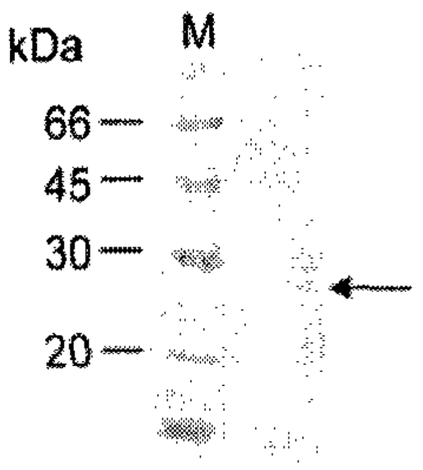


Fig. 1. Western blot of viral proteins separated by a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. M, low range standard markers (Gibco). The viral CP recognized by the anti-ASGV serum is noted by the arrow.

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of ORF 1 between ASGV-F and ASGV-K (AY596172). Identical residues are indicated by asterisks and similar residues are indicated by colons. The conserved helicase motif is shown in the shaded box. The alignment was generated using CLUSTAL W.

The partially purified viral particles were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel and analyzed by Western blotting using an ASGV anti-serum provided the by National Horticultural Research Institute and National Cheju Agricultural Experiment Station (Fig. 1). One band at 28 kDa reacted with the ASGV anti-serum, consistent with the mobility of the viral CP from purified ASGV isolated from pears.

The ASGV ORF1 encodes a 241 kDa polyprotein containing a replicase region, in which all of the characteristic motifs for methyltransferase (Rozanov et al., 1992), papain-like proteinase (Rozanov et al., 1992), NTP-binding helicase (Gorbalenya and Koonin, 1989), RdRp (Koonin, 1991), and CP (Yoshikawa et al., 1992; Ohira et al., 1995) are located. Specific primers for helicase, RdRp, and CP were designed according to the genome sequences and organization of ASGV strains previously isolated from plants (Shim et al., 2004). The deduced amino acid sequence of ASGV-F showed conserved domains, which contain an NTP-binding helicase motif, GFAGSGKT (Fig. 2). But a complete comparison of the RdRp amino acid sequence has not been conducted since a full length cDNA of RdRp was not amplified. However, when partial sequences of ASGV-F were analyzed, these sequences were similar to those of ASGV-K (AY596172), which is associated with PBNLS. The predicted amino acid sequences of ASGV-F showed 83% similarity to ASGV-K (AY596172) and 72% similarity to the ASGV-Japan strain (D14995). A BLAST search revealed that the ASGV-F CP has a relatively high homology to all ASGV strains (98%) (Fig. 2 and Fig. 4).

We were not able to detect virus particles in the fungus, but we assume that ASGV-F has a structure similar to ASGV-K because the ASGV-F CP has a high degree of amino acid homology to the CP of other strains, as well as conserved residues that have been associated with the putative salt bridge and corresponding hydrophobic core found in flexuous rod-shaped ssRNA plant viruses (Fig. 3) (Dolja et al., 1991).

To compare the phylogeny and genetic characteristics of

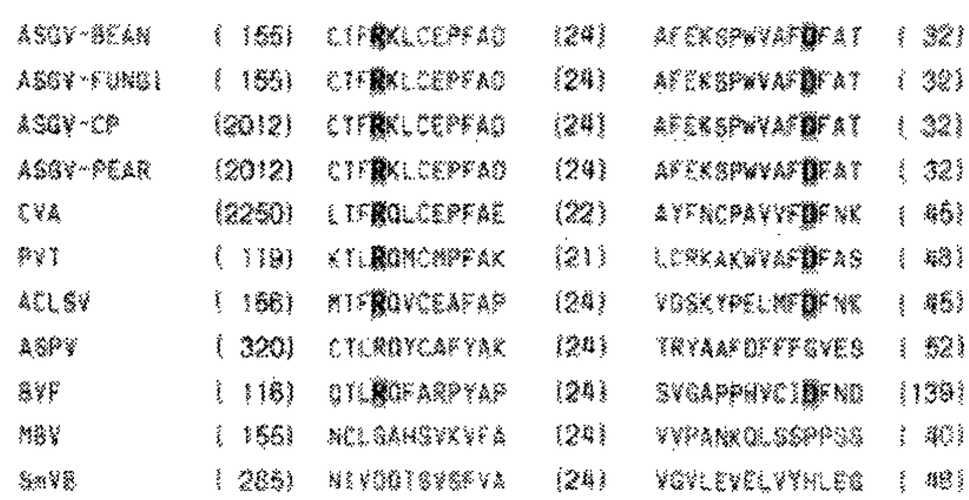


Fig. 3. Amino acid sequence alignments of coat proteins from ASGV-F, flexuous rod-shaped plant viruses and ssRNA mycoviruses. The conserved positively- and negatively-charged residues (Arg and Asp, respectively), which are proposed to form a salt bridge crucial to the tertiary structure of the protein, are shown in bold (modified from Dolja et al., 1991).

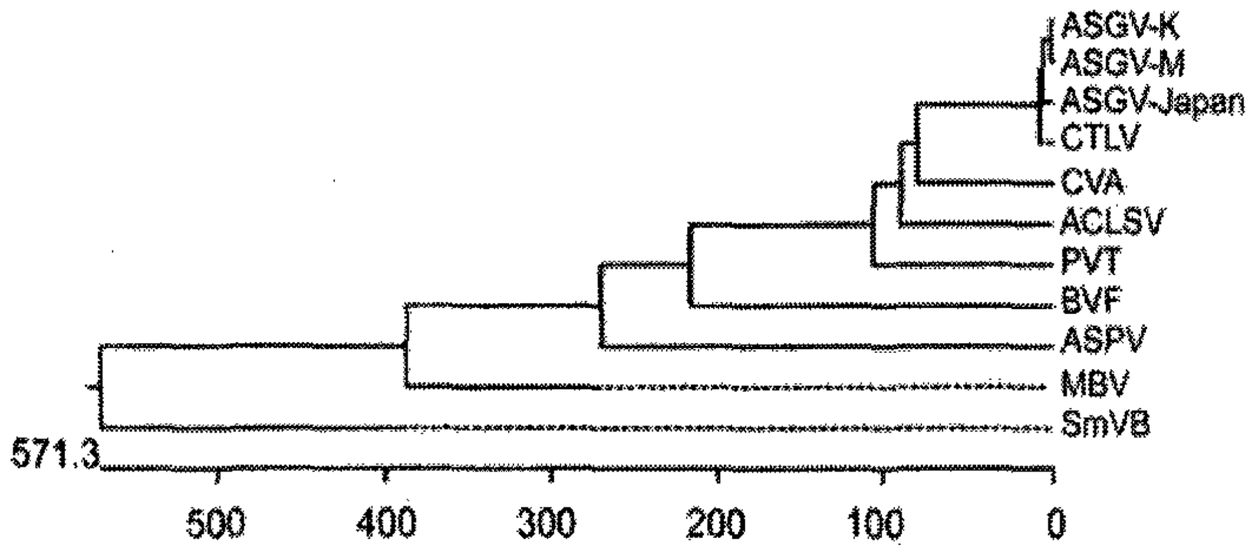


Fig. 4. Phylogenetic tree constructed from alignment of the putative salt bridge region of the ASGV-F coat protein. Numbers indicate the percentage of bootstrap replicates (N=100) that support each branch node (only values >50% are shown). A bar represents 10 substitutions per 100 amino acids. Viruses used in the analysis and their NCBI GenBank accession numbers are: ASGV-K (AY596172), ASGV-Japan (D14995), CTLV (D14455), CVA (X82547), ACLSV (P27737), PVT (D10172), BVF (NP068550), ASPV (D21829), MBV (NP042511), and SmVB (NP821131).

ASGV-F, the amino acids of the 3' terminus were aligned with other RNA viruses of the Flexiviridae, the family to which ASGV belongs. Flexiviridae comprises *Capillovirus*, *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, and *Vitivirus*. *Cherry virus A* (CVA, belonging to the same genus as ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV, which is infectious to a number of fruit trees) and *Potato virus T* (PVT, which is serologically similar to ASGV) were chosen for comparison. ASGV-F was most closely related to the ASGV-Korea strain (ASGV-K) which appears to cause PBNLS disease, and less closely related to the ASGV-Japan strain which does not cause PBLNS (Fig. 4). ASGV-F showed a high degree of homology to ACLSV, which is capable of infecting the same host plants, including apples. Serologically, PVT showed a similarity to ASGV. Interestingly, ASGV-F was more similar to BVF, a flexuous rod-shaped ssRNA mycovirus, than to ASPV.

To clarify the characteristics and biology of ASGV-F, electron microscopy (EM) and a complete genome sequence analysis are needed. Additionally, it will be important to isolate an infectious clone in future studies, so that the mechanisms of virus replication in both fungi and plants, and virus transmission from plant to fungus, fungus to plant, and fungus to fungus can be better understood.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Agricultural Research Promotion Center (203051-3), Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

References

Ahn, I. P. and Lee, Y. H. 2001. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:496-507.

Buck, K. W. 1986. Fungal Virology-An overview. In: *Fungal virology* ed. by Buck KW, pp. 1-84. CRC press, Boca Raton.

Choi, K. H. and Nuss, D. L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257:800-803.

Dolja, V. V., Boyko, V. P., Agranovsky, A. A. and Koonin, E. V. 1991. Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology* 184:79-86.

Erasmus, D. S., Rybicki, E. P. and von Wechmar, M. B. 1983. The association of brome mosaic virus and wheat rust: Detection of virus in/on uredospores. *J. Phytopathol.* 108:34-40.

Erasmus, D. S. and von Wechmar, M. B. 1983. *Brome mosaic virus* (BMV) reduces susceptibility of wheat to stem rust (*Puccinia graminis tritici*). *Plant Dis.* 67:1196-1198.

Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V. 1989. Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucl Acids Res.* 17:8413-8440.

Hong, Y., Cole, T. E., Brasier, C. M. and Buck, K. W. 1998. Novel structures of two virus-like RNA elements from a diseased isolate of the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. *Virology* 242:80-89.

Kim, J. W., Kim, S. Y. and Kim, K. M. 2003. Genome organization and expression of the *Penicillium Stoloniferum* virus S. *Virus Genes* 27:249-256.

Koonin, E. V. 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 72:2197-2206.

Lakshman, D. K., Jian, J. and Tavantzis, S. M. 1998. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6425-6429.

Lister, R. M. 1970. *Apple stem grooving virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 31.

Ohira, K., Namba, S., Rozanov, M., Kusumi, T. and Tsuchizaki, T. 1995. Complete sequence of an infectious full-length cDNA

clone of *Citrus tatter leaf capillovirus* comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *J. Gen. Virol.* 76:2305-2309.

Revill, P. A., Davidson, A. D. and Wright, P. J. 1994. The nucleotide sequence and genome organization of mushroom bacilliform virus: a single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Virology* 202:904-911.

Robyn, L. J. H., Beever, R. E., Pearson, M. N. and Foster, R. L. S. 2001. Genomic characterization of *Botrytis* virus F, a flexous rod-shaped mycovirus resembling plant "potex-like" viruses. *J. Gen. Virol.* 82:67-78.

Rozanov, M. N., Koonin, E. V. and Gorbalenya, A. E. 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 73:2129-2134.

Shim, H. K., Min, Y. J., Hong, S. Y., Kwon, M. S., Kim, H. R., Choi, Y. M., Lee, S. C. and Yang, J. M. 2004. Nucleotide Sequences of Korean Isolate of *Apple Stem Grooving Virus* Associated with Black Necrotic Leaf Spot Disease on Pear (*Pyrus pyrifolia*). *Mol. cells* 18:192-199.

Tavantzis, S. M., Romaine, C. P. and Smith, S. H. 1980. Purification and partial characterization of a bacilliform virus from *Agaricus bisporus*. *Virology* 105:94-102.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.* 22:4673-4680.

von Wechmar, M. B., Chauhan, R. and Knox, E. 1992. Fungal transmission of a potyvirus: uredospores of *Puccinia sorghi* transmit *Maize dwarf mosaic virus*. *Arch. Virol. Suppl.* 5:239-250.

Yokoi, T., Takemoto, Y., Suzuki, M., Yamashita, S. and Hibi, T. 1999. The nucleotide sequence and genome orgnization of *Sclerophthora macrospora* virus B. *Virology* 264: 344-349.

Yoshikawa, N., Sasaki, E., Kato, M. and Takahashi, T. 1992. The nucleotide sequence of *Apple stem grooving capillovirus* genome. *Virology* 191:98-105.

Yoshikawa, N., Sasamoto, K., Sakurada, M., Takahashi, T. and Yanase, H. 1996. *Apple stem grooving* and *citrus tatter leaf capilloviruses* obtained from a single shoot of Japanese Pear (*Pyrus serotina*). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62:119-124.

Yu, H. J., Lim, D. B. and Lee, H. S. 2003. Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. *Virology* 314:9-15.