

최종  
연구보고서

# 신고 배나무잎 검은 점병 바이러스의 분리 동정 및 진단 기술 개발

Characterization of Pear Necrotic-spot Virus and Development of Diagnostic Devices to Identify the Pathogen in Sin-Go (*Pyrus pyrifolia* Nitaka, cultivar Sin-Go).

성균관대학교 생명공학부

농 립 부

633.139  
L293 人

## 제 출 문

19

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "신고 배나무잎 검은 점병 바이러스의 분리 동정 및 진단 기술 개발에 관한 연구" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 15일

주관연구기관명 : 성균관대학교  
총괄연구책임자 : 권 무 식  
세부연구책임자 : 권 무 식  
세부연구책임자 : 이 석 찬  
연 구 원 : 홍 성 렬  
연 구 원 : 이 정 민  
협동연구기관명 : 원예 연구소  
협동연구책임자 : 최 용 문

# 요 약 문

## I. 제 목

신고 배나무잎 검은 점병 바이러스의 분리 동정 및 진단 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 우리 나라의 연구는 과수 바이러스에 대한 활발한 연구와 실용화가 이루어진 외국과 비교하여 국내에서는 식물바이러스의 단클론 항체 및 PCR 진단용 primers가 여러 기관에서 산발적으로 연구되었으나, 이러한 단클론 항체 및 PCR 진단용 primers의 실용화된 kit가 생산된 바는 없다. 배 바이러스 검정체계 기술이 전무한 상태이다. 배 바이러스를 진단할 수 있는 조기 진단 kit의 개발이 시급하다. 현재까지 개발된 바이러스 진단 방법으로는 항체를 이용한 진단 방법과 PCR을 이용한 진단방법이 많이 사용되고 있으며, 이 두 방법 모두 특정 바이러스의 단백질이나 바이러스 특정 염기서열과 특이적으로 반응함으로써 매우 간편하고 정확한 진단을 할 수 있다. 항체를 이용한 방법은 다클론 항체와 단클론 항체를 이용하는 방법으로 나누어지는데 단클론 항체를 이용한 방법은 그 제작은 힘들지만 특이성이 높으며 대량생산이 가능하여 실용성이 있으며, PCR을 이용한 바이러스의 진단 및 동정은 바이러스 염기서열 분석이 선행되어야 하지만 바이러스 특이적인 primers 제작이 되면 RT-PCR에 의하여 극소량의 바이러스도 진단할 수 있는 장점이 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구를 통하여 신고배에 나타나는 검은 점병의 원인이 바이러스임을 확인하였다. 이 바이러스 genome의 염기서열을 최초로 규명하였고, 이 염기서열을 토대로 신고배에 검은 점병을 일으키는 바이러스를 정확하게 진단할 수 있는 PCR primer set를 결정, 제작하였다. 아울러, 이 바이러스의 coat protein 부위에 특이적으로 반응하여 면역화학적 방법으로 진단할 수 있는 항체를 제작하였다. 본 연구에서 제작한 항체와 진단 primer를 이용하여

시기와 증상에 따른 분석을 수행한 결과, 가장 효과적인 바이러스의 진단 방법을 결정하였다. 배나무 검은 점병은 점목을 통한 바이러스의 전이 때문이라고 알려져 있었으나, 본 연구를 수행하면서 점목이 아닌 다른 생물학적인 방법에 의해 바이러스가 전이될 가능성을 찾게 되었다. 마지막으로 바이러스가 곰팡이에 의해서 전이된다면 효과적인 진단을 개발하여 부속묘를 보급하여도 포장에서 다시 바이러스에 감염될 수 있기 때문에 방제의 또 다른 측면을 제시하였다.

#### IV. 연구개발 성과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 축적한 지식과 기술을 기반으로 다른 과수의 바이러스 병에 대해서도 체계적인 연구가 수행할 수 있을 뿐 아니라 정확한 진단 기술을 개발하여 건전 모수 선발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 주요한 과수 바이러스에 속하나 아직까지 연구가 미흡한 capillovirus의 ORF들의 규명과 효소 기능 분석은 물론 이것을 매개하는 곰팡이 운반체에 대한 연구를 수행하여 국내 과수 바이러스 연구에 새로운 지평을 열 것으로 기대된다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

**Title:** Characterization of Pear Necrotic-spot Virus and Development of Diagnostic Devices to Identify the Pathogen in Sin-Go (*Pyrus pyrifolia* Nitaka, cultivar Sin-Go).

There are several diseases prevailing at pear orchard in Korea. They are pear ring disease, mosaic (ring pattern) disease, and pear necrotic-spot disease. The first two are caused by apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus (ASGV), respectively. However, the causal agent of the last has not been cleared out. It has been argued that the pear necrotic-spot disease is caused by a bacterium and/or virus in a Korean cv. Sin-Go (*Pyrus pyrifolia* Nitaka, cultivar Sin-Go). The major symptoms of the disease are accompanied by spots appearing reddish brown to black in color, circular or irregular in shape with the diameter of 2-4 mm. It has been known that transmission of the causal agent is dependent on grafting, so it has been considered viral. The purposes of this research have been focused on the elucidation of the nature of the disease, and the development of an easy-to-use device to detect the pathogen with three subjects. First, identification and characterization of the prospective causal agent at the gene (molecular) level. Second, development of diagnostic kit of the disease. Finally, ultrastructural identification of the causal agent. The three topics have been successfully accomplished as below.

To characterize the genome of the prospective pathogen, cDNAs were generated by RT-PCR using poly (A) RNAs fractionated from infected pear leaves. Some eleven sets of PCR primers whose nucleotide sequences deduced from various sources were employed for the gene amplification. All the PCR products were individually ligated into the vector (pGEM-T) and transformed to *Echerichia coli* DH5 $\alpha$ . Recombinant plasmids were isolated from the hosts and their DNA sequences were determined by the Sanger. Sum total of 6,496 base pairs (bp) were determined. Sequence alignment revealed that its DNA sequence composition is very much similar to those of ASGV

and citrus tatter leaf virus (CTLV). It is, therefore, safe to say that the pear necrotic-spot disease is caused by virus. The complete DNA sequence of the viral genome has been determined and shown in this text. This is the world's first report on the pathogen of the pear necrotic-spot disease. The virus is tentatively nominated as Pear Necrotic-spot Virus (PNsV). The genome is 6,496 bp in length excluding a 3'-terminal poly(A) tail and contains two overlapping open reading frames (ORF). ORF1 begins at the 36th nucleotide and is terminated at the 6,350th nucleotide encoding a protein with a molecular weight of 241 kDa, whose amino acid sequences contain two consensus regions associated with RNA-dependent RNA polymerase and NTP-binding helicase. The viral coat protein appears in the C-terminal region of the 241 kDa. ORF2 presiding within the ORF1, begins at the 4,787th nucleotide and stops at the 5,747th nucleotide. It can encode  $\alpha$ . 36 kDa protein.

In order to develop easy-to-use devices for the detection of PNsV in Sin-Go, two methods have been created here. One is employing DNA-primers to identify the PNsV in the infected pears, but not in a normal. All the eleven primer sets mentioned above were tested to obtain the best results. The primer set number five (5) having the DNA sequences shown here gave an excellent outcome: The amplified product (714 bp long DNA fragment) can only be generated in the Sin-Go infected by PNsV.

Forward: 5'-CTGCAAGAGCATGGTCACTCTCTC-3'

Reverse: 5'-GTCCGCAAAGAACTTTCTTGAGAAC-3'

The other one is an immunochemical way to detect the PNsV in Sin-Go. For this, polyclonal anti coatprotein antibody has been raised in a mouse as below. The cDNA encoding PNsV coat protein was cloned into the plasmid, pET-22b(+), and transformed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. The recombinant protein was run through Ni-NTA Superflow™ affinity column chromatography to purify the coat protein, which was then used as an immunogen. The immunization was performed four times every week in 6 week-old Balb/c mouse. The immunoselectivity of the serum with the selected antigen was examined by ELISA, protein gel blot analysis. This antibody was also used to identify PNsV-infected Sin-Go.

Ultrastructural studies of black necrotic leaf spot diseased pears revealed the consistent presence of flexuous rod-shaped virus-like particles from the virus infected leaves of both pear and goosefoot (*Chenopodium quinoa*). The particles approximately 12 nm in diameter occurred from the partially purified virions. With the based on the diameter and morphology of virus particles, this seems to be belonging to Capillovirus group.

The CTLV causes necrotic local lesions and variable systemic necrosis in cowpea and bean. There has been little evidence of natural spread of CTLV from introduced CTLV-infected plants of their graft-propagated progeny. However, there is a possibility of being natural vector may be involved in the viral transmission. Because, PCR and sequence analysis of amplified fungal DNA products from cultured fungi from infected bean and pear tree revealed that putative fungus vector is existent.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1. introduction -----	9
Purpose and area of study -----	9
History -----	13
 Chapter 2. Virus diagnostic kit development	
using Molecular Biological Techniques -----	15
Introduction -----	15
Materials and methods -----	16
Results and discussion -----	21
Summary -----	35
References -----	36
 Chapter 3. Virus diagnostic kit development using immunological techniques	
Introduction -----	38
Materials and methods -----	39
Results and discussion -----	50
Summary -----	87
References -----	89
 Chapter 4. Virus identification by electron microscopy	
Introduction -----	94
Materials and methods -----	95
Results and discussion -----	99
Summary -----	105
References -----	106



## 목 차

제 1 장. 서 분	9
제 1 절. 연구개발의 목적 및 범위	9
제 2 절. 연구사	13
제 2 장. 분자생물학을 이용한 바이러스 진단 kit의 개발 (제 1 세부과제) -	15
제 1 절. 서 설	15
제 2 절. 연구 재료 및 방법	16
제 3 절. 결과 및 고찰	21
제 4 절. 적 요	35
제 5 절. 참고 문헌	36
제 3 장. 세포면역학을 이용한 바이러스 진단법 개발 (제 2 세부과제) ----	38
제 1 절. 서 설	38
제 2 절. 연구 재료 및 방법	39
제 3 절. 결과 및 고찰	50
제 4 절. 적 요	87
제 5 절. 참고 문헌	89
제 4 장. 전지현미경을 이용한 바이러스의 동정 (협동과제) -----	94
제 1 절. 서 설	94
제 2 절. 연구 재료 및 방법	95
제 3 절. 결과 및 고찰	99
제 4 절. 적 요.	105
제 5 절. 참고 문헌	106

# 제 1 장. 서 론

## 제 1 절. 연구개발의 목적 및 범위

식물병은 사람들이 식량과 의복, 기구, 환경, 그리고 많은 경우에 있어서 주거까지 의존하고 있는 식물과 식물의 생산물에 피해를 주기 때문에 인간에게 있어서도 중요한 것이다. 식물병은 그 지역의 식물상과 산업상을 제한하는 요인으로 작용하기도 하고, 식물 생산물의 질과 양을 떨어뜨리며 나아가 커다란 경제적 손실을 초래하기도 한다. 뿐만 아니라 식물병 방제비용 또한 병으로 인한 직접적 손실이라 하겠다. 이렇듯 경제적인 부분과 맞물려 식물병의 존재를 깨닫기 시작하고 중요성이 부각되면서 새로운 병과 병원균이 끊임없이 밝혀지고 특정 식물병의 원인을 밝히기 위한 실험이 수행되었으며 나아가서는 식물병의 방제법을 개발하고자 하는 노력이 병행되었다. 이러한 역사적, 과학적 배경 속에서 지난 50년 동안 바이러스는 주요 곡류와 과수의 질병을 일으키는 감염원으로 그 중요성이 새롭게 인식되어져 왔다. 특별히 과수 바이러스는 그 증상이 미미하고 잠재적 감염을 하며 감염된 식물체에 심각한 영향을 초래하지 않는 특성 때문에 바이러스에 감염되었다 할지라도 그대로 재배되어져 전세계적으로 바이러스가 확산되는 결과를 가져왔다. 또한 접목을 하는 경우가 대부분이어서 더 많은 바이러스를 축적하는 원인이 되었고 새로운 품종에도 감염되는 문제를 불러일으키게 되었다. 이렇게 확산된 바이러스는 현재 심각한 병을 일으키는 감염원도 있어 이에 대한 진단과 방제법의 개발을 필요로 하게 되었다. 따라서 경제적이면서도 쉬운 방법의 개발은 필수적이라 할 수 있겠는데 특별히 진단은 실험실내에서 수행 가능하면서도 빠르고 확실하며 경제적인 방법을 필요로 한다. 무독묘를 판단할 수 있는 지표 식물의 이용은 너무나 긴 시간과 많은 비용을 필요로 하기 때문이다. 분자생물학적인 진단은 병징, transmission의 방법, particle morphology, serological relationships와 같은 중요 특성에 의하는데 woody perennials은 보통 바이러스 함량이 낮고 virus distribution이 일정하지 않을뿐더러 sensitivity도 낮아 진단이 쉽지 않다. 진단보다 중요한 것은 바이러스를 방제하는 것일텐데 가장 확실한 방법은 바이러스에 감염된 식물체를 제거하는 것이지만 모든 경우에 적용할 수 없기 때문에 효과적인 새로운 방법의 개발이 요구되어져 왔다. 식물은 동물이나 사람처럼 면역체계가 없어 vaccination이나

chemotherapy 같은 방법으로는 식물을 보호할 수 없어 그 어려움은 더 크다고 할 수 있겠다. 현재 방제의 일환으로 선진국에서는 무병묘를 공급하는 방법을 개발하여 실용화하고 있다.

우리나라의 경우에 있어서도 일반작물에 발생하는 바이러스병에 비하여 과수에 발생하는 바이러스병의 연구는 상당히 미진한 편이다. 본 연구에서 다루고 있는 배나무 검은 점병은 바이러스에 이병된 묘목의 생산 유통으로 인해 바이러스에 의한 피해가 확산된 것으로 보여지는데 이는 과수 바이러스에 대한 연구 부진으로 이를 검정할 수 있는 체계가 마련되어 있지 않은 결과라 할 수 있겠다. 한국에 있어 배는 상업적으로 매우 중요한 과수의 하나로 전국에 걸쳐 대략 11,500 ha 에 이르는 면적에서 연간 약 140만 개체가 생산되어 사고 있다. 신고배는 그중 대표적인 품종으로 이 중 2/3의 생산량을 차지한다. 최근의 통계에 따르면 약 1/3의 신고배 가수가 검은 점병 증상을 나타내며 그 손실은 확대되고 있다. 검은점병은 성숙한 잎에서 그 증상을 보이며, 병반은 처음에는 적갈색에서 검은색의 직경 2-4mm의 원형 또는 불규칙한 형상으로 나타나며 이러한 병반은 서로 합쳐져 더욱 커다란 병반으로 발전한다. 본 병은 5월 중, 하순부터 과충엽과 신초의 기부 잎이 성엽이 되면 갈색반점이 하엽부터 상엽으로 올라가면서 발생한다. 6월이 되면 최성기이며 심하면 소기낙엽되고 수세가 쇠약해진다. 병반은 직경 0.9-2.5 mm의 타원형 또는 부정다각형의 흑갈색 반점으로 시간이 지나면서 색택이 열어져 후기에는 회백색으로 변하여 천공이 되기도한다. 배나무 검은점병은 한나무에 전체적으로 발생하기도 하지만 가지에 부분적으로 발생하기도 한다. 또한 이병주의 발병가지와 건진주의 가지가 서로 인접하고 있거나 혼재하고 있어도 이웃 건진한 가지로 전염되지 않으며, 고점한 과수원에서 특히 심하게 발생하고 있는 것이 특징이다. 한번 발병한 나무는 매년 병이 발생하게 되는데 해를 거듭할수록 그 증세는 점점 심해지면서 빈번한 농약 살포에도 불구하고 약방제 효과는 거의 없다. 배나무 검은 점병이 심하게 걸리면 품질이 떨어지고 수량이 약 50% 정도 감소된다.

이 검은 점병이 바이러스에 의한 것이라는 것은 농업과학기술원 연구진이 배나무 잎 검은 점병 증상을 보인 잎을 전자현미경으로 관찰한 결과 직경 12 nm의 굴곡성 사상형 유사 바이러스 입자를 확인한 결과이다. 일본에서는 본 병과 유사한 병해가 1957년에 최초로 발생하여 배나무에 큰 피해를 주었고 접목 전염성 바이러스에 의한 병으로 간주되었다. 국내에서 유행하는 검은 점병 역시 접목에 의해서만 질병이 전파되는 것으로 미루

어 이와 같은 접목 전염성 바이러스에 의한 것으로 추정하고 있다. 전자현미경 관찰 결과 capillovirus group으로 여겨지는 배나무 검은 점병 바이러스는 대부분 과수에 질병을 일으키는 원인이 되는데 간혹 이들 바이러스는 잠재적으로 식물에 존재하다가 특정 시기에 병을 유발시키기 때문에 무병묘를 선발하는데 어려움을 준다. 고온 처리로 일시적인 방제 효과는 얻을 수 있지만 근본적인 방법은 아니기 때문에 무병묘 확보를 위해서도 바이러스를 진단할 수 있는 방법의 개발은 필수적이다.

국내에서는 식물바이러스의 단클론 항체 및 PCR 진단용 primers가 여러 기관에서 연구되었으나 과수 바이러스에 대한 활발한 연구와 실용화가 이루어진 외국과 비교할 때 미흡한 바가 많다. 특별히 배 바이러스에 대한 검정체계 기술은 전무한 상태라고 할 수 있다. 현재까지 개발된 바이러스 진단 방법으로는 항체를 이용한 진단 방법과 PCR을 이용한 진단방법이 많이 사용되고 있으며, 이 두 방법 모두 특정 바이러스의 단백질이나 바이러스 특정 염기서열과 특이적으로 반응함으로써 매우 신속, 정확한 진단을 할 수 있다. 항체를 이용한 방법은 특이성이 높으며 대량생산이 가능하며 실용성이 있고 PCR을 이용한 바이러스의 진단 및 동정은 바이러스 염기서열 분석이 선행되어야 하지만 바이러스 특이적인 primers가 제작이 되면 RT-PCR에 의하여 극소량의 바이러스도 진단할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 이러한 방법에 기초하여,

첫째, 검은 점병의 원인이 되는 바이러스의 coat protein 부위에 특이적으로 반응하여 진단할 수 있는 항체를 제작하였다.

둘째, 배 바이러스-신고배에 검은 점병을 일으키는 바이러스-의 염기서열을 결정하고, 이를 정확하게 진단할 수 있는 primer set를 제작하였다.

셋째, 본 연구에서 제작한 항체와 진단 primer를 이용하여 시기와 증상에 따른 분석을 수행한 결과 가장 효과적인 바이러스의 진단 방법을 결정하였다.

넷째, 배나무 검은 점병은 접목을 통한 바이러스의 전이 때문이라고 알려져 있었으나 본 연구를 수행하면서 접목이 아닌 다른 생물학적인 방법에 의해 바이러스가 전이될 가능성을 찾게 되었다.

다섯째, 바이러스가 곰팡이에 의해서 전이된다면 효과적인 진단을 개발하여 무병묘를 보급하여도 포장에서 다시 바이러스에 감염될 수 있기 때문에 방제의 또다른 측면을 제시하였다.

본 연구에서 축적한 지식과 기술을 기반으로 다른 과수의 바이러스 병에 대해서도 체계적인 연구를 수행할 수 있을 뿐 아니라 정확한 진단 기술을 개발하여 건전 모수 선발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 주요한 과수 바이러스에 속하나 아직까지 연구가 미흡한 capillovirus의 ORF의 규명과 효소 기능 분석은 물론 이것을 매개하는 곰팡이 운반체에 대한 연구를 수행하여 국내 과수 바이러스 연구에 새로운 지평을 열 것으로 기대된다.

## 제 2 절. 연구 사

배 잎에 발생하는 검은 점병은 1970년대 후반 일부지역에서 검은무늬병에 저항성으로 알려진 신고 등의 품종에 반점이 발생하였으나 (홍경희 등, 1985), 최근에는 전국적으로 만연되어 배 재배농가에 가장 큰 피해를 주고 있는 병이다 (남기웅과 김충희, 1994). 발생이 심한 나무는 수량이 약 50% 정도 감소하고 고품질의 과실 생산이 곤란하다. 본 병의 원인에 대해 검은무늬병균의 병원성 분화에 의한 저항성 품종의 이병화 현상이라는 보고 (기운계 등, 1984)와 함께 신고, 만삼길, 장십랑은 여전히 배 검은무늬병에 저항성 품종임을 재확인하는 연구에 대해서 보고하였다 (박종성과 유승헌, 1988). 또한 배 검은점병이 *Enterobacter pyrinus*에 의해 일어나는 신종 갈색점 무늬병이라는 보고도 있어 (Chung 등, 1993) 이 병에 대한 원인균의 분리 및 동정은 매우 중요하다.

이러한 병원성 미생물에 의한 병증이 유발이라는 보고와 함께 배검은 점병이 약해, 산성비 등과 같은 환경공해의 피해와도 관련이 있음이 보고되기도 하여 이에 대한 체계적인 검증 실험도 수행되었고 이 병이 접목에 의해서만 전염된다는 것을 증명하여 간접적으로 바이러스에 의한 병으로 추정하고 있다 (남기웅과 김충희, 1995).

일본에서는 본 병과 유사한 병해가 1957년에 최초로 발생하여 큰 피해를 주었고 접목전염성 바이러스에 의한 병으로 간주된다고 보고한 바 있다 (Kishi 등, 1976). 병원 바이러스는 사상형인 pear vein yellow와 apple stem pitting 바이러스의 한 strain일 것이라고 보고되었다 (Yanase 등, 1988). 배나무 검은 점병은 그 동안 병원이 확실히 구명되지 않아 배나무 이상반점이라고도 불려져 왔고 일부 농가에서는 유사 흑반병으로 알려져 있었다.

### 1. 배나무잎 검은 점병의 병징

이 병은 도장지 기부의 잎과 과총의 잎이 점차 자라나 성엽이 강화되면서 병징이 나타난다. 초기에는 잎 표면에 투명하게 보이는 황색반점이 나타나기 시작하다가 점차 적자색으로 변하면서 흑갈색이 된다. 흑갈색 반점은 시일이 지나면서 갈색으로 색택이 열어지며 후기에는 점차 희백화되어 조직이 고사하고 구멍이 생기기도 한다. 발생초기에는 주로 타원형 또는 부정다각형의 반점이 잎의 가장자리나 소엽맥 주위에서 발생하며 시간이 지나면서 그 증세가 심해져 잎 전체로 번진다. 반점의 크기는 초기에 직경이 0.9-2.5 mm

의 범위로 일단 발생하면 대부분 더 이상 커지지는 않는다. 발병이 심해질수록 작은 반점이 합쳐져 큰 반점이 되고 점차 불규칙한 병무늬로 확대되며 초기에 발생한 잎은 반점부위가 찢어지고 지지분해된다. 가을에 발생하는 잎은 주로 여름에 자란 잎에서 발생하는데 황색반점이 적사색에서 흑갈색으로 변하는 과정에서 기온이 15℃ 이하로 떨어지는 시기에 도달하면 흑갈색으로 변하지 못하고 잎에 그대로 황색과 적자색으로 남아있다.

## 2. 전염

이 병은 접목전염에 의해서 발생한다. 배 실생대목에 이병주를 접목하고 그 위에 건전주를 2중으로 접목하면 건전주에 전염되어 발생하며, 반대로 배 실생대목에 건전주를 접목하고 그 위에 이병주를 접목하여도 건전주에 전염되어 발생한다. 중요한 것은 이병된 모수로부터 접수를 채취하여 인위적으로 접목하면 전염에 의해서 병해가 전파된다.

## 3. *Capillovirus*

*Capillovirus* group에 속하는 바이러스는 single stranded positive-sense RNA genome을 갖고 그 크기는 평균적으로 6,500-7,570 bp 정도이다. 전자 현미경으로 관찰하였을 때 바이러스의 형태는 긴 사상형의 굴곡 입자형으로 보이며 길이는 600-700 nm, 직경은 12-19nm로 3.4-3.9 nm의 helical pitch를 갖는다. 이에 속하는 바이러스에 의해 발생하는 병은 잠복 감염된 형태로 존재하다가 일정 시기에 발병하는 경우가 대부분이다. 현재까지 이들 바이러스에 대한 운반체는 알려져 있지 않으며 접목에 의한 감염이 주를 이룬다. Apple stem grooving virus (ASGV)는 사과, 배, 살구, 체리 등의 과수에 Citrus tatter leaf virus (CTLV)는 감귤류에 병을 일으키는데 genome의 구조가 매우 유사하지만 일정 부분이 다른 많은 변이들이 존재한다. 현재는 CTLV가 ASGV에서 유래한 유연 관계에 있는 바이러스일 것으로 간주한다. 배나무에는 주로 ASGV가 병을 일으키는 것으로 보이지만 이들 두 바이러스가 한 나무에 복합적으로 감염되어 있는 경우도 있다. 따라서 이들 바이러스를 구분짓게 하는 부위를 증폭할 수 있는 primer를 사용하여 진단하는 경우가 많다.

## 제 2 장. 분자생물학을 이용한 바이러스 진단 kit의 개발 (제 1 세부과제)

### 제 1 절. 시 설

국내에서는 식물바이러스의 단클론 항체 및 PCR 진단용 primers가 여러 기관에서 연구되었으나 과수 바이러스에 대한 활발한 연구와 실용화가 이루어진 외국과 비교할 때 미흡한 바가 많다. 특별히 배 바이러스에 대한 검정체계 기술은 전무한 상태라고 할 수 있다. 현재까지 개발된 바이러스 진단 방법으로는 항체를 이용한 진단 방법과 PCR을 이용한 진단방법이 많이 사용되고 있으며, 이 두 방법 모두 특정 바이러스의 단백질이나 바이러스 특정 염기서열과 특이적으로 반응함으로써 매우 신속, 정확한 진단을 할 수 있다. 항체를 이용한 방법은 특이성이 높으며 대량생산이 가능하여 실용성이 있고 PCR을 이용한 바이러스의 진단 및 동정은 바이러스 염기서열 분석이 선행되어야 하지만 바이러스 특이적인 primers가 제작이 되면 RT-PCR에 의하여 극소량의 바이러스도 진단할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 이러한 방법에 기초하여, 신고배에 검은 점병을 일으키는 바이러스를 정확하게 진단할 수 있는 PCR primer set를 제작하고 이를 이용하여 시기와 증상에 따른 분석을 수행한 결과 가장 효과적인 바이러스의 진단 방법을 결정하고자 하였다.



## 제 2 절. 연구 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 가. 시약

세균 배양을 위한 Bacto-tryptone, yeast extract, Bacto-agar 등은 Difco (미국)에서, agarose와, phenol, ammonium persulfate, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium phosphate (monobasic, dibasic), sodiumchloride 등은 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하였다. 바이러스의 RT-PCR에 사용한 RTase는 iNtRon Biotech(한국)에서, Taq polymerase는 Super-Bio (한국)에서 각각 구입하여 사용하였으며, PCR 산물의 클로닝에 사용된 pGEM-T Easy vector는 Promega (미국)에서 구입하였다. 그 외에 본 연구에 사용된 모든 시약은 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하여 사용하였으며, 국내 시약은 모두 특등품을 사용하였다.

#### 나. 공시재료

실험에 사용된 배양액은 바이러스 감염증상이 나타나기 시작하는 시점인 6월 전후로 농업진흥청 원예기술연구소와 잠사곤충연구소의 포장에 식수된 10본의 신고배나무로부터 채집하였다. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 는 Takara (일본)에서 각각 구입하였다. 사용된 유전자형은 다음과 같다.

DH5 $\alpha$  : *supE44*,  $\Delta$ *lacU169*( $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*

### 2. 기기

Incubator 및 shaking incubator, clean bench는 Vision 제품, chemical balancer는 Sartorius 제품을 사용하였다. 원심분리기는 Hanil 제품, spectrophotometer는 Pharmacia 제품, water bath는 Vision 제품을 사용하였다. DNA 증폭을 위한 thermocycler는 MJ Research Inc. 제품을 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가. Viral total RNA의 분리

바이러스 유전자를 분리하기 위한 RNA 분리 및 분석법은 아래와 같다. 바이러스에 감염된 신고배나무로부터 잎을 채취하고 냉동 보관하여 RNA 분리에 사용하였다. 매 잎을 액체질소에 급속 냉동시켜 아주 미세하게 파쇄하여 분말화한 후, 이 분말을 7 ml의 RNA extraction buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 9, 0.4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1% SDS)와 7 ml의 phenol이 들어 있는 50 ml centrifuge tube에 넣고 잘 섞어주었다. 이 sample을 얼음에 보관한 뒤 모든 sample이 준비되면 10,000 rpm에서 2분동안 원심분리하여 얻어진 수층 액층을 7 ml의 phenol과 chloroform상등액을 넣고 잘 섞어 주었다. RNA를 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리된 8 M LiCl와 섞은 뒤 얼음에서 3시간 이상 처리한다음, 침전된 RNA를 DEPC 처리된 물로 녹인 후 pH 5.2인 0.3 M sodium acetate와 ethanol을 사용하여 제침전시켰다. 원심분리 후 건조시킨 total RNA를 DEPC 처리한 10mM HEPES buffer로 다시 녹여 spectrophotometer를 사용하여 RNA 농도와 순도를 측정하여 80 A<sub>260</sub> unit/ml의 농도로 맞추었다. 이 total RNA를 60-65°C에서 2분간 열처리한후 전체의 1/7 부피에 해당하는 4M NaCl을 첨가하였다. Ice-chilled water bath에서 냉각한 후 High salt buffer를 이용하여 sample을 40 A<sub>260</sub> unit/ml 이하로 희석하였다. 이를 oligo-dT affinity column에 건 후 High salt buffer로 elute의 농도가 0.01 A<sub>260</sub> unit/ml 이하가 될 때까지 씻어 준 다음, Low salt buffer로 씻어 Poly (A) RNA를 얻었다.

#### 나. RT-PCR을 이용한 바이러스 유전자의 증폭

준비된 Poly (A) RNA를 10  $\mu$ l의 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리된 DIW (deionized water) 에 녹인 후 RT-PCR을 수행하였다. 검은 점병의 원인이 되는 capillovirus group 중에서 Apple stem grooving virus (ASGV)와 Citrus tatter leaf virus (CTLV)의 genome structure는 상당 부분이 유사하며, 이들 바이러스의 isolates 염기서열을 토대로 상동성을 조사하고 이를 바탕으로 전체 배바이러스의 coding 부위를 클로닝 할 수 있는 11개의 primer set를 제작하였다 (표 1). AMV RT 5X 완충용액 (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT (dithiothreitol), 2.5 mM spermidine) 2  $\mu$ l, 0.125 mM dNTP 혼합액, RNasin 20 U, AMV RT (iNtRon Biotech)

25 U를 넣고 DEPC-DIW로 전체 부피를 20  $\mu$ l로 만들고 42°C에서 1 시간 반응시켰다. 이렇게 cDNA를 합성하고, PCR은 이 용액에 시발체 쌍을 20 pmol씩 첨가하고, 10× Taq 중합효소 완충 용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin) 5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP 혼합액 4  $\mu$ l, Taq 중합효소 (AmpliTaq<sup>®</sup>.gold, Perkin Elmer) 5 U를 첨가 후 DIW로 전체 부피를 50  $\mu$ l로 만들었다. PCR 반응은 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer)으로 94°C에서 1 분 간 denaturation, 55°C에서 1 분 간 annealing, 72°C에서 1 분 간 extension을 40 회 실시하였다.

다. 배 바이러스 cDNA의 클로닝 및 염기서열 결정

RNA 증폭효소 PCR 산물의 ligation은 pGEM-T-vector kit (Amersham Life Science)를 사용하여 제조사의 실험 방법에 따라 수행하였다. Ligation은 66 mM Tris-HCl, pH 7.6, 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP를 포함한 반응용액에 50 ng pMOSBlue-T vector, 100 ng PCR 산물을 가하고, 150 U T<sub>4</sub> DNA ligase (TaKaRa)를 첨가한 후 최종부피가 15  $\mu$ l가 되도록 DIW를 첨가하여, 16°C에서 10 시간 정도 반응시켰다. Ligation 반응물을 Hanahan 방법에 따라 만들어진 competent cell에 형질전환 시키기 위하여, ligation이 완료된 용액을 200  $\mu$ l의 competent cell (DH5a)에 첨가하여, 얼음에 40 분 방치 후 42°C에서 45 초 간 중탕하였다. 다시 얼음에 3 분 간 방치 후 800  $\mu$ l의 LB 배지 (1% Bacto trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)를 첨가한 후 37°C에서 200rpm으로 진탕하여 1 시간 동안 배양하였다. 배양의 50  $\mu$ l를 50  $\mu$ g/ml의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase (X-gal)이 포함된 LB/Ampicillin 평판 배지에 도말하여 흰색 콜로니를 확인하였다. 이를 subculture하고 이를 LB/Ampicillin배지에 접종하여 37°C에서 200rpm으로 shaking 하면서 12시간 배양한 후 plasmid를 분리하였다.

바이러스 유전자의 염기서열 분석은 double stranded DNA를 이용하여 Sanger등의 방법을 이용하였다. DNA 염기서열 및 단백질의 분석은 DNASTAR computer program을 이용하였다. DNA의 open reading frame 분석은 Editseq의 ORF finder를, multiple sequence alignment는 Megalign program을 사용하였다. 또한 Blast search를 통해 Genbank집에 보고된 다른 바이러스 genome과의 상동성을 분석하였다.

라. 접목에 의한 감염 실험 및 검정 대상 확보

접목에 의한 바이러스의 감염 여부 확인 및 본 연구 성과로 얻어지는 배나무잎 검은 점병 바이러스에 특이적인 RT-PCR primers와 바이러스에 특이적인 항체를 검정하기 위한 대상 식물체로 활용하기 위하여 접목 실험을 수행하였다. 대목은 바이러스에 감염되지 않은 돌배 품종을 사용하였으며 접목 일주일 전 화분에 대목들을 미리 심어 뿌리를 활착 시킨 후, 대목을 지상으로부터 5 cm 부근을 자른 뒤 접수와 깎기접을 시행하였다. 바이러스의 감염 경로를 알기 위해 5분류로 나누어서 각각 10개체씩 실험 접목하였다. 실험군 1은 Control용으로 바이러스에 감염되지 않은 신고배 접수를 돌배 대목에 접목하였다. 실험군 2는 돌배 대목에 바이러스에 감염된 신고배 접수를 접목하였다. 실험군 3은 바이러스의 감염 경로가 접목에 의한 부주의에서 올 수도 있다는 가정하에 병에 걸리지 않은 신고배 접수를 접목하기 전, 접도를 병에 걸린 신고배에 문질러 바이러스가 감염될 수 있도록 한 뒤 접목하였다. 실험군 4는 바이러스가 토양에 기생하는 Fungi에서 올 수도 있다는 가정하에 바이러스가 들어간 Fungi를 병에 걸리지 않은 신고배를 접목한 접수에 잎이 나오기 전 자란 뒤 잎과 줄기에 주입하였다. 실험군 5는 병에 걸리지 않은 신고배 접수와 병에 걸린 신고배 접수를 한 대목에 동시에 접목하여(이중접목) 바이러스가 한 개체의 나무 안에서 감염되는 경로를 알고자 하였다.

### 제 3 절. 결과 및 고찰

#### 1. 배나무 잎으로부터 RNA의 추출, 분리 정제

배나무에 감염된 바이러스의 genome을 분리하기 위하여 본 연구실에서 반복하여 확립한 방법을 이용하여 이병주와 건전주의 배나무 잎으로부터 total RNA를 추출하였다 (Figure 2-1).

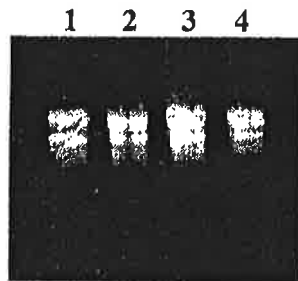


Figure 2-1. 배나무 잎으로부터 분리한 total RNA. lane 1 : 배의 건전주에서 추출한 total RNA, lane 2 : 배의 이병주에서 추출한 total RNA, lane 3 : 명아주의 건전주에서 추출한 total RNA, lane 4 : 명아주의 이병주에서 추출한 total RNA.

2. 배나무 잎으로부터 바이러스 genome을 분석하기 위한 primer 제작

기존에 보고되었던 Apple stem grooving virus (GenBank Acces number AB004063) 와 Citrus tatter leaf virus의 genome 염기서열 (Genbank Access number D16681)을 바탕으로 하여, 바이러스 genome 클로닝을 위한 primers를 제작하였다(Table2-1).

Table 2-1. 배나무 잎 검은 점병 바이러스의 genome을 클로닝하기 위한 RT-PCR Primers

Name	Sequence	Position in CTLV	nts	AT:GC	amplified length (expected)
F1	AAT TTA ACA GCG CTT AAT TTC CGC G	1-25	25	15:10	678 nts
R1	CCT TAG AGA CCT TGT CCC CAA ATA	678-655	24	13:11	
F2	GAC GAA TTG CAC TTT CTT AGC CCC	552-575	24	12:12	675 nts
R2	GAA ACP AGC AGC AAT GAA GTG AGG C	1226-1202	25	13:12	
F3	GGG ATG AGA GAT GAC TTT GAC GTG	1137-1160	24	12:12	682 nts
R3	CTT CTT CCG GTT CAA AGC AAT TGA	1818-1795	24	14:10	
F4	GGA GGC AAC TCT TCT TAG AAT CAA CC	1609-1634	26	14:12	721 nts
R4	GAA AGA GTG ACC ATG CTC TTG CAG	2329-2306	24	12:12	
F5	GAC CTT GGG AAA TTT GTG CAT AAC AG	2205-2230	26	15:11	714 nts
R5	GTC GGC AAA GAA CTT TCT TGA GAA C	2918-2894	25	14:11	
F6	GGG GTA CAG ATT TGG CCA ATG GTT	2828-2851	24	12:12	819 nts
R6	CTT ATC CTC TTT TGA ACA CCT GCC C	3646-3622	25	13:12	
F7	CGG GTG CAA AAT TGA CAT ACT TCC	3542-3565	24	13:11	749 nts
R7	CCC-CGG TGA ATC TCA TTA TTG CTA	4290-4267	24	13:11	
F8	AGG ACC ACG TCA TTT TGG CCT TCG	4150-4173	24	11:13	690 nts
R8	AGG TTT GTT GAC TCG ACC TCC TTG	4839-4816	24	11:13	
F9	GGT GAG AGG CTG TAC ACA ATT TTG	4644-4667	24	13:11	697 nts
R9	CAT CTG TAG GCC ACA CCA ATG TCA	5340-5317	24	12:12	
F10	GAG TCT GAC TGC TGT TAC TTC GGT	5180-5203	24	12:12	691 nts
R10	GAA CTG GGT CTT ATC AGA TGA CCC	5870-5847	24	12:12	
F11	CTG AAG GGT TTA AGG AAG GTG AAA G	5746-5770	25	14:11	751 nts
R11	TAG AGT GGA CAA ACT CTA GAC TCT AG	6496-6471	26	15:11	

### 3. RT-PCR

이병주 배나무 잎에서 추출한 RNA를 주형으로 하고, 위의 primers를 이용하여 배나무잎에서 바이러스 genome을 클로닝 하기 위한 RT-PCR을 수행하였다. cDNA의 합성은 total RNA 500ng에 10 pmol 3'-primer를 넣고 70℃에서 10분간 annealing, 4℃에서 15분간 처리한 후, 5mM dNTP, 100mM Tris-HCl (pH 8.3), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 50mM KCl을 첨가한 다음 5 Unit의 AMV Reverse Transcriptase (iNtRON Biotech)를 넣고 37℃에서 60분간 반응시킨다. 반응의 전체 volume은 20ul이 되도록 하였고, 70℃에서 10분간 반응시킨 후 4℃에서 종료하였다.

이렇게 만들어진 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였으며, 4ul의 RT-산물에 각각 10 pmol의 primers와 2.5 unit의 Taq DNA polymerase (SUPER-Bio Co.)를 사용하여 95℃에서 30초, 54℃에서 40초, 72℃에서 1분 씩 30회 수행하여 대략 700 bp 정도 크기의 PCR산물들을 얻었다 (Figure 2-2).

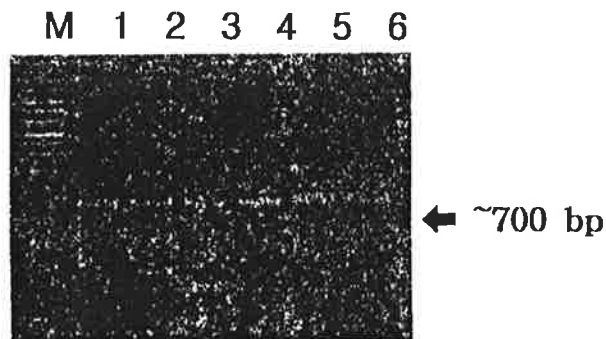


Figure 2-2. 배나무잎으로부터 추출한 RNA를 주형으로 한 RT-PCR의 전기영동 결과.  
Marker: , Lane 1-6: RT-PCR products.



#### 4. cDNA 클로닝

PCR 산물은 dsDNA이며 Taq DNA polymerase를 이용하여 증폭한 DNA fragment의 경우 말단에 노출된 Adenine을 이용하여 T-vector에 바로 클로닝할 수 있다. PCR 산물, T-돌출 말단을 가지고 있는 pGEM-T vector (Promega, USA), 2×Rapid ligation buffer for T4 ligase, 그리고 T4 DNA ligase (1 weiss unit)를 섞은 후, 상온에서 30분 또는 4℃에서 12시간 동안 반응시켜 클로닝하였다 (Figure 2-3).

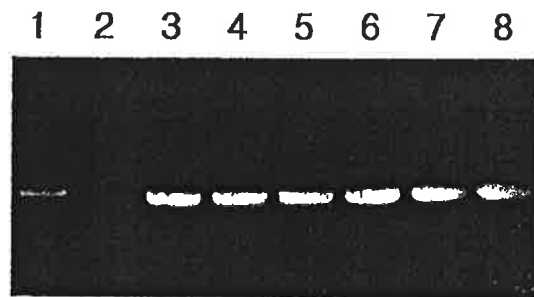


Figure 2-3. RT-PCR의 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝한 후 전기영동 결과.

## 5. 염기서열 결정

PE 310 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer, USA)를 사용하여 각각의 클론의 염기서열을 결정하였다. 모두 11개의 클론을 위의 방법으로 클로닝 및 염기서열 분석을 완료하였다. 염기서열의 분석으로는 CTLV (Citrus tatter leaf virus) 와 ASGV (Apple stem grooving virus) 모두와 유사성이 있는 것으로 사료된다. 이 염기서열을 translation 한 아미노산 서열 분석에서는 DNA 서열 보다 높은 상동성이 나타났다. 배 바이러스의 전체 염기서열 및 아미노산 서열 분석 결과는 다음과 같다 (Figure 2-4).

### Pear Necrotic-Spot Virus

AATTTAACAGCGCTTAATTTCCGCGCTTTACGTCAATGGCTTTCACCTACAGAAATCCGCTAGAA	65
M A F T Y R N P L E	10
ATTGCAATCAACAACTTCCAAGCAAGCAGTCTGATCAATTGCTTTCCTTGACCACAGACGAGATT	131
I A I N K L P S K Q S D Q L L S L T T D E I	32
GAAAAGACCTTAcAAGTGACAAATCGCTTCTTCTCTTTTTCAATCACCCAGAAGATCAAGAATTG	197
E K T L Q V T N R F F S F S I T P E D Q E L	54
TTGACCAAACATGGCCTAACACTTGCACCCATTGGATTTAAGTCACATCCCATCCAATATCCAAA	263
L T K H G L T L <u>A P I G F K S H S H P I S K</u>	76
<i>putative methyltransferase domain</i>	
ATGATAGAAAATCACCTCTTGTACATATGTATCCCCAGTCTTCTATCTTCTTTTAGGTCAGTTGCC	329
<u>M I E N H L L Y</u> I C I P S L L S S F R S V A	98
TTCTTTCCCTTAGAGAAAACAAGGTTGATAATTTCCCTCAAATGCATTCTGTGTTTTACACGGG	395
F F S L R E N K V D N F L K M H S V F S H G	120
AAGATCAAATCTTTAGGAATGTACAATGCAATAATTGACGGGAAGGACAAGTATAGGTATGGTGAG	461
K I K S L G M Y N A I <u>I D G K D K Y R Y G E</u>	142
<i>putative methyltransferase domain</i>	
GTTTCTTTCACCTCCTTCAGAGATAGAGTGATAGGTCCTTAGAGATCAATGCCTCACGCGTAACAAA	527
V S F T S F R D R V I G L R D Q C L T R N K	164
TTTCCAAAGGTGTIATTCCTTCATGATGAATTGCACTTCTCAGCCCTTTGATGTGGCCTTCTG	593
F P K V L F L H D E L H F L S P F D V A F L	186

TTTGAACAATTCCAGAGATAGACAGGGTTGTTGCAACCACCATATTTCCGATTGAGTTGTTATTT	659
F E T I P E I D R V V A T T I F P I E L L F	208
GGGGACAAGGTCTCTAAGGAGCCTAGAGTTTATACCTATAAGGTTTCATGGATCTTCCTTTTCATTT	725
G D K V S K E P R V Y T Y K V H G S S F S F	230
TACCCTGACGGTGTAGCCTCTGAATGTTATGAACAAAATTTGGCGAATTCGAAATGGCCTTTCCACC	791
Y P D G V A S E C Y E Q N L A N S K W P F T	252
TGTAGTGGCATTCAATGGGCCAATAGGAAGATAAGGGTGACCAAGTTGCAGAGCTTGTTTGCTCAC	857
C S G I Q W A N R K I R V T K L Q S L F A H	274
CATGTTTTTTTCATTTGACAGAGGCAGGGCCTGCAATGAATTCAACCATTTCATAAGCCAAGCTGC	923
H V F S F D R G R A C N E F N H F N K P S C	296
CTGCTCGCAGATGAAATGCGTCTTTTGACAAAAAGGTTTCGATTCTGCAGTCATCAATCGGAGTACA	989
L L A D E M R L L T K R F D S A V I N R S T	318
GTTTCCTCTCTCAGCACTTACATGGCTTGCCCTCAAACGCGAGCTTCAGCAGTTGCTAAA	1055
V S S L S T Y M A C L K T A N A A S A V A K	340
TTGAGACAGTTGGAGAAGAGAGACCTCTATCCAGATGAGCTGAACTTTGTTACTCTTTCCGGGGAA	1121
L R Q L E K R D L Y P D E L N F V Y S F G E	362
GATTTCAAGAATTTTGGGATGAGAGATGACTTTGACGTGTCAATTCTACAATGGGTAAAGACAAA	1187
D F K N F G M R D D D V S I L Q W V K D K F	384
TTTTGCCAAGTAATGCCCACTTCATTTGCCGCCAGTTTCTTTGAGCCAACAGAATTTCAATTTAAAC	1253
F C Q V M P H F I A A S F F E P T E F H L N	406
ATGCGCAAATAATGAGTGATTTGGCTACCAAAGGAATAGAGGTCCTCTTTCTGTGATCATTTTG	1319
M R K L L S D L A T K G I E V P L S V I I L	428
GACAAAGTCAACTTCATAGAGACCAGATTTTCATGCCAGAATGTTGACATAGCACAGGCAATTTGGG	1385
D K V N F I E T R F H A R M F D I A Q A I G	450
GTGAATCTAGATTTACTGGGAAAAAGATTTGATTATGAGGCTGAAAGTGAAGAATACTTTTCAGAA	1451
V N L D L L G K R F D Y E A E S E E Y F S E	472
AACGGTTACGTCTTTATGCCCTCTAAATCAAATCCAGATAGAAATTTGGATTCTAAATTTCTGGTTCCG	1517
N G Y V F M P S K S N P D R N W I L N S G S	494
CTGAAAATGACTATTCAGGGTTGGTGAGAGCCAGAAGATTTAGATTGAGAAGAGATTTTTTGGAC	1583
L K I D Y S G L V R A R R F R L R R D F L D	516

CCCATATCTAAAGGGAAATCTCCTAGGAAACAGCTTTTCTTGGAGTCAATGGGAAACATTGAACCA	1649
P I S K G K S P R K Q L F L E S M G N I E P	538
GATTCCAATGCTGGAAAAAGTGGTGAGAACAACGAGATAAAGATTGAAGGTAGTGCCAAAAATGAC	1715
D S N A G K S G E N N E I K I E G S A K N D	560
CAGCCACATGAGGCACCACACACTTCAATGGAAACCGAGGATGGACAGGGTTTTGAAGTTCTATA	1781
Q P H E A P H T S M E T E D G Q G F E G S I	582
CCAATTGATTTGATCAATTGCTTTGAACCGGAAGAAGTTAAATGCCCAAGAAGGAAGGAAGAAT	1847
P I D L I N C F E P E E V K C P R R K R K N	604
GATTGCGTTTTTAGGGCTATTTCTGCACACTTGGGAATTGAAACCCAAGACTTGTGAATTTCTCTC	1913
D C V F R A I S A H L G I E T Q D L L N F L	626
GTTAATGAGGACATATCTGAAGAACTATTGGACTGCATTGATGAAGACAAAGGGCTCTCACATGAA	1979
V N E D I S E E L L D C I D E D K G L S H E	648
ATGATTGAAGAAGTATTAATCACGAAAGGTCTTTCAATGGTTTATACTTCAGACTTTAAAGAGATG	2045
M I E E V L I T K G L S M V Y T S D F K E M	670
GCAGTCCTTAACAGAAAATATGGTGTGAATGGTAAAATGTACTGCACCATTAAAGGCAACCACTGT	2111
A V L N R K Y G V N G K M Y C T I K G N H C	692
GAATTGAGCTCAAAGAATGTTTTGTGACACTGTAAAGGAAGGTGGTGAAGCTCAAATGTCAAAT	2177
E L S S K E C F V R L L K E G G E A Q M S N	714
GAGAACTGAATGCCGACTCCATGTTTGACCTTGGGAAATTTGTGCATAACAGGGAGAGAGCAGTT	2243
E N L N A D S M F D L G K F V H N R E R A V	736
AAATTGGCAAAGTCAATGGCAAGAGGCACACTACAGGTCTCTTGAATGAATTTGATCCAGTCTTCTGC	2309
K L A K S M A R G T T G L L N E F D P V F C	758
AAGAGCATGGTCACTCTCTCAGAATTATTTCTGAGAACFTTTCATCTGTTATTGGGCTAAGACTG	2375
K S M V T L S E L F P E N F S S V I G L R L	780
GGATTTGCTGGCTCAGGGAAGACTCACAAAGTGCTCCAATGGATCAACTACACCCGAGTGTCAAG	2441
<u>G F A G S G K T H K V L Q W I N Y T P S V K</u>	802
<i>putative NTP-binding helicase domain</i>	
AGAATGTTTCATAAGCCCAAGAAGGATGCTAGCTGATGAAGTTGAGGTTCAACTTAAAGGGACAGCC	2507
R M F I S P R R M L A D E V E V Q L K G T A	824

TGTCAGGTGCACACTTGGGAAGTCGCCTTGAAGAAGATCGATGGAACCTTCATGGAGGTTTTTCATT C Q V H T W E V A L K K I D G T F M E V F I	2573 846
GATGAAATAGGTCTATAACCCACCTGGGTTTCTCACATTGTTGCAAATGTGTGCTTTCAGGAAGATC D E I G L Y P P G F L T L L Q M C A F R K I	2679 868
GTCAAAGGACAGAGTGAAGTTCTTGAAGGGTAAACTCAGTGAAGTGTCAAAAACCTGTCTGAAC V K G Q S E K F L K G K L S E L S K T C L N	2705 890
ATGAGGTGTTTTGGAGATCCATTACAATTGAGGTACTACTCTGCTGAGGATACAAATCTTCTGGAT M R C F G D P L Q L R Y Y S A E D T N L L D	2771 912
AAAACACATGAACCTGACCTTCTGACTAAGACAATCAAGCATAAATACCTTCTTCAGGGGTACAGA K T H E L D L L T K T I K H K Y L L Q G Y R	2837 934
TTCGGCCAATGGTTCCAAGAGCTCATAAATATGCCGACCAGGGTGGATGACTCAAAGTTCTCAAGA F G Q W F Q E L I N M P T R V D D S K F S R	2903 956
AAGTTCTTTGCGGACATCTCCAGTGTCAAGACTGAAGATTACGGGCTCATTCTTGTGCCAAAAGG K F F A D I S S V K T E D Y G L I L V A K R	2969 978
GAGGACAAAGGCGTTTTTGGCTGGGAGGATCCCAGTGGCCACAGTTAGCGAGTCTCAAGGGATGACA E D K G V F A G R I P V A T V S E S Q G M T	3035 1000
ATAAGCAAAGAGTATTGATATGTCTGGATCAAACCTCTTTGCTGGAGGGGCCAATGCTGCCATT I S K R V L I C L D Q N L F A G G A N A A I	3101 1022
GTTGCAATCACAAGGTGCAAAGTTGGGTTTGACTTTATCCTCAAGGGGAACCTCACTGAAGGAAGTG V A I T R S K V G F D F I L K G N S L K E V	3167 1044
CAGAAGATGGCCAAAAAACCATTTGGCAATTCGTCATTGAGGGCAAATCTATCCAATGGAGAGA Q K M A Q K T I W Q F V I E G K S I P M E R	3233 1066
ATAGTCAACATGAATCCTGGAGCCAGCTTCTATGAAAGCCCTTAGACGTTGGAAATTCGTCTATT I V N M N P G A S F Y E S P L D V G N S S I	3299 1088
CAAGACAAAGCTTCTCATGATTTGTTTATAATGCCTTTTATAAATTTGGCTGAGGAAGAGGTTGAC Q D K A S H D L F I M P F I N L A E E E V D	3365 1110
CCAGAGGAAGTTCTTGGGGACGTGATACAGCCTGTTGAATGGTTTAAATGCCACATACCTGTCTTT P E E V L G D V I Q P V E W F K C H I P V F	3431 1132
GATAGAGATCCAAATGCTAGCAGAGATATTCGATAAAGTAGCCGAAAAGAAAAGAGAGGTTTCA D R D P M L A E I F D K V A A K E K R E V S	3497 1154

TCTATATTGGGTCCTCAAAATCAATTTTGGACATGGAAAAAACGGGTGCAAAATTGACATACTT	3563
S I L G L S N Q F L D M E K N G C K I D I L	1176
CCTTTTGCTAGGCAAAATGTTTTCCACATCATCAGTCCTCAGATGATGTTACTTTCTGGCCGGA	3629
P F A R Q N V F P H H Q S S D D V T F W A G	1198
GTGCAAAGAGGATTAGAAAGTCAAACCTGGAGCGGAGAGAAGACAAAGTTGAAGAGTTGAGATT	3695
V Q K R I R K S N W R R E K T K F E E F E I	1220
CAAGGAAGAGAACTTTTGTCTGAATTCCTATCCATGCTGCCATGTGAATCAAAGTCAACATTA	3761
Q G R E L L S E F L S M L P C E F K V N I K	1242
GACATAGAAGAAGGGGAAAAAGCTTTCTGGAAAAGAGAAAGCTAAAGTCTGAAAAATGTGGGCA	3827
D I E E G E K S F L E K R K L K S E K M W A	1264
AATCATTGCGAAAGGTCTGATATTGACTGGAAACTCGACCATGTTTTCTCTTCATGAAGTCACAA	3893
N H S E R S D I D W K L D H V F L F M K S Q	1286
TACTGTACAAAAGAGGGGAAAATGTTTCACAGAGGCCAAGGCTGGACAAACTCTAGCTTGCTTCCAG	3959
Y C T K E G K M F T E A K A G Q T L A C F Q	1308
CACATTGTTCTGTTCGGTTTGGACCGATGCTCAGAGCCATTGAGAGTGCCTTTTTAAGGAGCTGT	4025
H I V L F R F G P M L R A I E S A F L R S C	1330
GGGACTCATACTATATACTCAGGAAAGAACTTCTTCTGTCTGGACAGTTTTGTAACGAAGAAC	4091
G D S Y Y I H S G K N F F C L D S F V T K N	1352
GCCGAGGTATTTGACGGTCTCTATAGAGTCAGACTACACGGCTTTTGATTCATCCCAGGACCAC	4157
A E V F D G F S I E S D Y T A F D S S Q D H	1374
GTCATTCTGGCCTTCGAGATGGCGCTATTGCAATATTTGGGTGTGTCCAAAGAATTCAGCTTGAC	4223
V I L A F E M A L L Q Y L G V S K E F Q L D	1396
TATCTGAGGTTAAAGTTGACTCTTGTTGTAGGCTGGGTCATTGGCAATAATGAGATTTACTGGA	4287
Y L R L K L T L G C R L G S L A I M R F T G	1418
GAATTTGACCTTTCTGTTAATACATTTGCTAACATGCTTTTCACTCAGCTGAAGTACAAAATA	4355
<u>E F C T F L E N T F A N M L F T Q L K Y K I</u>	1440
<i>RNA-dependent RNA polymerase domain</i>	
GACCCACGAAAACATAGAATCTTATTCGCAGGGGATGACATGTGTTCCCTTGAGCTCTCTCAAGAGG	4421
D P R K H R I L F A <u>G D D</u> M C S L S S L K R	1462

AGAAGAGGAGAGAGCAACAAGGTTGATGAAGAGCTTTTCTTAACTGCCGGTGGAGGAAGTAAGG	4487
R R G E R A T R L M K S F S L T A V E E V R	1484
AAATTCCTATGTTCTGTGGATGGTACTTAAGCCCATATGGAATTATCAAATCACCGAAGCTTTTG	4553
K F P M F C G W Y L S P Y G I I K S P K L L	1506
TGGGCGAGGATCAAATGATGAGTGAAAGGCCAAGCTTCTGAAAGAGTGTGTGGACAACCTATTTGTTT	4619
W A R I K M M S E R Q L L K E C V D N Y L F	1528
GAGGCAATATTCGCCTACAGATTAGGTGAGAGGCTCTACACAATCTTGAAAGAAGAAGATTTTGAA	4685
E A I F A Y R L G E R L Y T I L K E E D F E	1550
TATCACTACTAGTGATAAGGTTTTTCGTCAAAAATTCAAAAGCTGCTGACTGGATTAAGCAAAAGC	4751
Y H Y L V I R F F V K N S K L L T G L S K S	1572
TTAATATTTGAAATGGAGAAGGAATAGGGTCAGAAATGGCAATTGTCAATGTCAACCACTTCCTCA	4817
L I F E I G E G I G S E W Q L S M S T T S S	1594
M A I V N V N H F L K	11
AAGAGGTTGAATCAACAGATCTCAAGATTGATGCCATCGCGTCATCTGAACTTTATAAAGATGCAA	4883
K R L N Q Q I S R L M P S R H L N F I K M Q	1616
E V E S T D L K I D A I A S S E L Y K D A T	33
CCTTTTTCAAGCCAGATGTTCTCAATTGCATCAAACGATTTGAATCAAATGTCAAAGTGTCTCAA	4949
P F S S Q M F S I A S N D L N Q M S K C P Q	1638
F F K P D V L N C I K R F E S N V K V S S R	55
GGTCAGGGGATGGACTCGTGTGTCCGACTTCAAGCTGCTTGATGACACAGAAATTGACTCCATTA	5015
G Q G M D S C C P T S S C L M T Q K L T P L	1660
S G D G L V L S D F K L L D D T E I D S I R	77
GAAAGAAGAGCAACAAGTACAAATACTTACATTATGGAGTTATTCTTGTGGCATCAAAGCAATGC	5081
E R R A T S T N T Y I M E L F L L A S K Q C	1682
K K S N K Y K Y L H Y G V I L V G I K A M L	99
TGCCCAACTTCAGGGGAATGGAAGGGAGGGTCATTGTATATGACGGTGCCTGTTTGGACCCAGAAA	5147
C P T S G E W K G G S L Y M T V P V W T Q K	1704
P N F R G M E G R V I V Y D G A C L D P E R	121
GAGGTCATATATGTTCTACCTATTCAGATTTGAGTCTGACTGCTGTTACTTCGGTCTCAGGCCAG	5213
E V I Y V P T Y S D L S L T A V T S V S G Q	1726
G H I C S Y L F R F E S D C C Y F G L R P E	143

AGCACTGTTTGTCTACCCACAGACGCAAATTTGGCAAAAAGGTTTAGATTCCGTGTGGACTTTGATT	5279
S T V C L P Q T Q I W Q K G L D S V W T L I	1748
H C L S T T D A N L A K R F R F R V D F D C	165
GCCCAATATGAACAGGATACCGAGTTGTTTGTCTCTGATATCGGAGTTGCATACAGATGCGTCA	5345
A H N M N R I P S C L L L I S E L H T D A S	1770
P Q Y E Q D T E L F A L D I G V A Y R C V N	187
ATTCTGCAAGGTTCTGGAAACCACTACTGGTGATTCAGGGTGGGCTTCACAGGCAATCAGCGGCT	5411
I L Q G F W K P V L V I Q G G L H R Q S A A	1792
S A R F L E T S T <u>G D S G</u> W A S Q A I S G C	209
<i>serine protease domain</i>	
GTGAGGCACTTAAATTCATGAAGAGATTAAAATGGCCATCCTGGATCACAATCCCCGCTGTTTC	5477
V R H L N S M K R L K W P S W I T N P R C F	1814
E A L K F N E E I K M A I L D H K S P L F L	231
TGGAGGAAGGTGCACCAAACGTGCACATTGAAAAAAGACTGTTTCAGAGGCGACAAAATTAGAAGGT	5543
W R K V H Q T C T L K K D C S E A T K L E G	1836
E E G A P N V H I E K R L F R G D K I R R S	253
CGCGTTCTATTTCTGCCAAAAGGGGGCCAAACTCAAATCGCAGGAAAAGAGAGGATTTAGGTCCC	5609
R V L F L P K G G Q T Q N R R K R E D L G P	1858
R S I S A K R G P N S K S Q E K R G F R S L	275
TCTCAGCTAGAATTGAAAGATTTGGAAAAAATGAGTTTGGAGACGTGCTTCAACAAGCGAGACGC	5675
S Q L E L K D L E K M S L E D V L Q Q A R R	1880
S A R I E R F G K N E F G R R A S T S E T P	297
CACCGGGTAGGAGTATATCTATGGAAGACCCATATAGACCCGGCAAAGGAAGCTTCTGATGGTTCCCT	5741
H R V G V Y L W K T H I D P A K E L L M V P	1902
P G R S I S M E D P Y R P G K G T S D G S S	319
CCCCCTGAAGGgTTTAAgGAAGGTGAAAGCTTTGAAGGTAGaGAGCTCTACCTTCTCTATGTAAT	5807
P P E G F K E G E S F E G R E L Y L L L C N	1924
P	321
CACTACTGTAATAATTTATTTGGTAATATTGCTGTTTTCGGGTCATCTGATAAGACCCAGTTTCCC	5873
H Y C K Y L F G N I A V F G S S D K T Q F P	1946
GCTGTTGGATTTGATACCCCTCCGGTTCATTTTAATTTGACAACGACCCGAAAGAAGGGGAGACT	5939
A V G F D T P P V H F N L T T T P K E G E T	1968
GAAGAGCAAAGAAGGCCAGAGAGGGATCGTCTGGTGAAAAAACAAAGATTTGGAGGATCGACTTG	6005
E E Q K K A R E G S S G E K T K I W R I D L	1990



TCAAATGTTGTACCTGAACTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAAACGAATGT	6071
S N V V P E L K T F A A T S R Q N S L N E C	2012
ACGTTTCAGGAAGCITTTGTGAACCATTTGCTGATCTAGCACGTGAATTTCTACATGAAAGGTGGTCC	6137
T F R K L C E P F A D L A R E F L H E R W S	2034
M K G G P	5
AAAGGACTGGCCACCAACATTTACAAGAAATGGCCCAAAGCTTTTGAAAAAGTCCATGGGTGGCA	6203
K G L A T N I Y K K W P K A F E K S P W V A	2056
K D W P P T F T R N G P K L L K K V H G W H	27
TTTGACTTtGCCACTGGTCTAAAAATGAATCGTTTAACACCTGATGAGAAGCAGGTGATCGATAGA	6269
F D F A T G L K M N R L T P D E K Q V I D R	2078
L T L P L V .	33
AtGACAAAGAGGGCTTTTTTCGTACTGAAGGTCAAAAAGGGGTTTTTCGAGGCAGGTTCCGAGAGTAAC	6335
M T K R L F R T E G Q K G V F E A G S E S N	2100
CTCGAACTGGAGGTTTAGGAGTCGTGTGAAATCCGCAAACCTTGGTCGGGTCTTGCAGGTTGACA	6401
L E L E G .	2116
<i>coat protein</i>	
TGCCTGCCTTTA'ACTTAATTAAGGGTTCACCCGGTTTTCTGTGCATTCCGGGTTAGTGTGGTT	6467
TTTCTAGAGTCTAGAGTTTGTCCACTCTA	6496

Figure 2-4. 배 바이러스 염기서열 분석결과. ORF1, ORF2의 시작부위.(ATG)와 coat protein 시작 부위에는 밑줄로 표시하였다.

배바이러스의 총 6496 염기쌍의 염기서열을 결정하였으며 2개의 ORF에 예상되어지는 아미노산 서열을 작성하였다. 전체 염기서열은 ASGV, CTLV와 높은 상동성을 보였으며, 아미노산 서열은 더욱 높은 상동성을 나타내었다.

7. 배 바이러스 감염여부를 검사하기 위한 PCR 진단 Kit의 개발.

신고배의 배 바이러스 감염여부를 PCR에 의해 진단하기 위해 본 연구에서 결정된 배 바이러스의 전체 염기서열을 바탕으로 11개의 PCR primer sets를 제작하였다. 이들을 이병주와 건전주에서 반복하여 시험한 결과 가장 확실한 결과를 나타내는 primer set은 5번으로 그 염기서열은 다음과 같다.

Forward: 5'-CTTGCAAGAGCATGGTCACTCTCTC-3'

Reverse: 5'-GTTCCGCAAAGAACTTTCCTGAGAAC-3'

PCR에 의해 이 primer set을 사용하여 증폭된 714bp의 증폭산물은 배 바이러스에 감염된 배엽에서만 나타났다.

## 8. 접목에 의한 감염 실험 및 검정 대상 확보

접목에 의한 바이러스의 감염 여부 확인 및 본 연구 성과로 얻어지는 배나무잎 검은 점병 바이러스에 특이적인 RT-PCR primers와 바이러스에 특이적인 항체를 검정하기 위한 대상 식물체로 활용하기 위한 접목 실험에서 실험군 1은 바이러스 감염증상을 나타내지 않았다. 물배 대목에 바이러스에 감염된 신고배 접수틀 접목한 실험군 2와, 접도를 병에 걸린 신고배에 문질러 바이러스가 감염될 수 있도록 한 실험군 3, 그리고 바이러스가 들어간 Fungi를 병에 걸리지 않은 신고배를 접목한 접수에 잎이 나오고 자란 뒤 잎과 줄기에 주입한 실험군 4는 바이러스 감염증상을 보였다. 실험군 5의 이중접목의 결과, 병에 걸려 있던 접수에서는 감염증상이 나타났으나, 바이러스가 감염된 접수로부터 건전주로 이동하는 현상은 관찰되지 않았다 (Figure2-5).

(A)



(B)

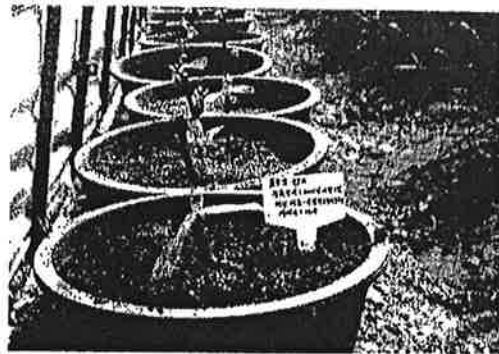


Figure 2-5. 감염 검정을 위한 배나무 접목 실험. (A) 무병주와 이병주의 이중접목. (B) 실험군 1, 2, 3, 4.

## 제 4 절. 적 요

본 연구에서는 신코베의 검은점병에 감염된 잎으로부터 분리한 RNA에서 RT-PCR에 의해 증폭한 cDNA를 cloning하고 그 염기서열을 분석함으로써 PCR에 의한 베 바이러스 진단의 기반을 마련 하고자 하였다. 이를 요약하면 다음과 같다.

1. 신코베에 검은 점병을 일으키는 바이러스를 정확하게 진단할 수 있는 primer set를 제작하기 위하여, ASGV와 CTLV간에 보존된 염기서열을 바탕으로 primer set을 제작하였다.
2. RT-PCR을 통해 증폭된 이들 각각의 cDNA를 vector에 cloning하여 contigs를 제작하였다.
3. 이들 각각의 클론들에 대한 염기서열을 결정하고 이를 기존에 알려진 capillovirus group과 비교하였다.
4. 베 바이러스의 전체 염기서열을 결정하고 그 ORF를 분석하였다.
5. PCR방법에 의해 베 바이러스의 감염 여부를 진단할 수 있는 primer set을 제작하였다.

## 제 5 절. 참 고 문 헌

- Bar-Joseph, M. and Murant, A. F. 1982. Closterovirus group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, no. 260.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M. and Gonsalves, D. 1979. The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Advances in Virus Research* 25, 93-168.
- Chung, Y. R., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Kim, B.S., Kim, H. T., and Cho, K. Y. 1993. *Enterobacterpyrinus* sp. nov. an organism associated with brown leaf spot disease of pear trees. *Int J Svst Bacteriol.* 43 : 157-161.
- Coffins, N. R. and Couttis, R. H. A. 1993. The closteroviruses, capilloviruses and other similar viruses: a short review. *J. Gen. Virol.* 74: 1475-1483.
- Dunez, J., Delbos, R., and Bertranet, P. 1973. Le rôle de différents facteurs de stabilisation appliqués à la purification du virus du Chlorotic Leaf spot. *Ann. Phytopathol.* 5, 255-265
- German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J. C., Pernollet, J. C. and Dunez, J. 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology* 179: 104-112.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 166: 557
- Kishi, K., Takanashi, K. and Ahiko, K 1976. Pear necrotic spot, a new virus diseases in Japan. *Acta Horticulure* 67: 260- 273.
- Lister, R. M. 1970. Apple chlorotic leaf spot virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses, no. 30
- Murant, A. F., Raccach, B. and Pirone, T. P. 1988. Transmission by Vectors. In *The Plant Viruses*, vol. 4, The filamentous plant viruses, pp. 237-274. Edited by R. G. Milne. New York: Plenum Press.

Sanger, F. and A. R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 13: 373

Wood, G. A. 1972. Further virus diseases of pear (*Pyrus communis* L.) in New Zealand *J. Agr. Res.* 15 : 160-171.

Yanase, H., Koganezawa, H. and Fridlund, P. R. 1988. Correlation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting, and a flexuous filamentous associated with them. *Acta Horticulure* 235: 157.

Yoshikawa, N., Sasaki, E., Kato, M., and Takahashi, T. 1992. *Virology* 191: 98-105.

Yoshikawa, N. and Takahashi, T. 1988. Properties of RNAs and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot viruses. *J. Gen. Virol.* 69: 241-245.

Zacommer, B., Haenni, A. L. and Macaya, G. 1995. *J. Gen. Virol.* 76: 231-247.

남기웅, 김충희, 김경수. 1996. 배나무 잎 검은 점병(구 이상반점증상)에 관한 연구, 병원 바이러스의 동정. *한국식물병리학회지* 12: 368-373.

## 제 3 장. 세포면역학을 이용한 바이러스 진단법 개발 (제 2 세부과제)

### 제 1 절 서 설

배에는 동양배, 서양배를 합쳐서 감염이 알려진 바이러스병은 전세계적으로 약 23종이 알려져 있다. 우리나라에서는 배나무에 발생하는 바이러스병으로 배나무 검은점병 (배나무괴저반점증상)과 apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), apple stem grooving virus (ASGV)에 의한 병이 알려져 있다. 이 가운데 검은점병은 배나무 잎에 발생하는 병해로써 신고, 만삼길, 신흥 등에 부정형 또는 원형의 병반을 나타내는 것이 특징이다.

배나무잎 검은점병은 1970년대 후반부터 배나무에 검은무늬병과 유사한 이상반점증상이 발생하기 시작하여 최근에는 전국적으로 만연되어 배나무 재배에 있어서 가장 큰 문제의 병해로 내두되고 있다. 이 병은 신고품종에서 발생이 심하여 전국평균 약 23%의 발병주율을 나타내고 있다. 이 병에 감염되면 당함량이 낮고 산 함량이 높아 품질이 저하됨은 물론 발병이 심한 나무에서는 수량이 약 50% 정도 감소한다.

병의 원인은 접목에 의해 전이되는 것으로 미루어 바이러스에 의한 것으로 보이며, 이 바이러스는 전자현미경 관찰 결과 capillovirus group으로 여겨진다. 과수는 특성상 연구 기간이 장시간 소요되며 한 번 바이러스에 감염되면 이것을 완전히 제거하는 것이 불가능하기 때문에 사전에 진단하는 것이 최선이다.

본 연구에서는 현재까지 확립되어 있지 않은 배 바이러스에 대한 효과적인 진단 체계를 갖출 수 있도록 항체를 제작하고자 한다. 또한 이들 바이러스를 매개하는 운반체에 대한 역학 조사를 통해 근본적인 방제체계를 확립할 수 있도록 기여하고자 한다.

## 제 2 절. 연구 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 가. 시약

세균 배양을 위한 Bacto-tryptone, yeast extract, Bacto-agar 등은 Difco (미국)에서, agarose와 polyacrylamide, phenol, 분자량 마커, ammonium persulfate, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium phosphate (monobasic, dibasic), sodium chloride 등은 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하였다. 바이러스의 coat protein gene의 클로닝에 사용한 제한 효소들은 Takara (일본)에서 구입하여 사용하였으며, pGEM-T Easy vector는 Promega (미국), expression vector를 통한 바이러스 coat protein의 발현과 정제에 사용된 isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG), sodium bicarbonate과 실험 동물의 면역에 사용된 Freund's complete adjuvant (FCA)와 Freund's incomplete adjuvant (FIA)는 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하였다. 항체 생성 여부를 확인하기 위하여 사용된 2차 항체와 2차 항체의 substrate로 사용한 NBT/BCIP tablet는 Sigma Chemical Co. (미국)에서 protein gel blot analysis에 사용한 membrane은 Amersham Pharmacia (영국)에서 구입하였다. MMLV는 Promega (미국)에서 DNA를 elution 하기 위해 Q-Biogen (네덜란드)의 GeneClean<sup>®</sup> Kit를 사용하였다. 곰팡이를 배양하기 위해 사용한 PDA와 PDB는 Duchefa Biochemi BV (네덜란드)에서, sucrose는 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하였다. Southern과 Northern blot용 Hybond N+ membrane (20 cm x 3 m)과 방사성 동위원소 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP은 Amersham (영국)에서, dNTP는 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하였다. X-ray film과 현상액, 인화지는 Kodak (미국)에서 구입하였다. 그 외에 본 연구에 사용된 모든 시약은 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하여 사용하였으며, 국내 시약은 모두 특등품을 사용하였다.



## 나. 공시재료

면역화에 사용된 실험 동물은 실험 동물 전문 사육 회사인 제일 상사(평택, 경기도)에서, 곰팡이의 감염실험을 위해 심은 강낭콩(kidney bean)은 한농종묘(수원, 경기도)에서, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 와 BL21(DE3) pLysS는 Takara (일본)과 Novagen (미국)에서 각각 구입하였다. 사용된 유전자형은 다음과 같다.

DH5 $\alpha$  : *sup104*,  $\Delta lacU169(\emptyset 80 lacZ \Delta M15)$ , *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*

BL21(DE3)pLysS : F<sup>+</sup> *ompThsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-)gal dcm* (DE3) pLysS(Cm<sup>R</sup>)

## 2. 기기

Incubator 및 shaking incubator는 Johnsam 제품, clean bench는 Vision 제품, chemical balancer는 Sartorius 제품을 사용하였다. 원심분리기는 Hanil 제품, spectrophotometer는 Pharmacia 제품, water bath는 Vision 제품을 사용하였다. DNA 증폭을 위한 thermocycler는 MJ Research Inc. 제품, 초음파 파쇄기는 Ultrasonics 제품을 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가. Viral coat protein 의 확보

##### (1) Viral coat protein 유전자의 클로닝

###### (가) 과수 조직에서 total RNA의 분리

보통 과수의 잎은 다량의 phenolic compounds 및 여러 2차 대사 산물이 축적되어 있기 때문에 이를 제거하는 과정이 필수적이다. 본 연구에서는 Cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB)를 이용한 방법을 사용하였다. 노지에서 취한 조직은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며 이 중에서 1g을 취해 차갑게 식힌 막자사발에 담아 액체 질소를 부어 주면서 고운 가루가 될 때까지 갈아주었다. 조직을 마쇄할 때 PVPP와 bentonite를 첨가하였고 여기에 RNA extraction buffer (2% CTAB, 1.4M NaCl, 1% PVP, 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0)를 혼합하였다. 이것을  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 처리한 후 동일 부피의 chloroform: isoamylalcohol (24:1)을 첨가하고 잘 섞어주었다. 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액에 phenol:chloroform: isoamylalcohol (25:24:1)을 동일부피로 첨가하여 다시 잘 섞어주고 원심분리하여 상층액을 취하였다. 여기에 isopropyl alcohol을 첨가하여 얼음에 10분 정도 두었다. 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 pellet을 70% ethanol로 washing한 후 0.1%의 DEPC로 처리된 물 300  $\mu\text{l}$ 에 용해시키고 여기에 8M LiCl을 300  $\mu\text{l}$  첨가하여 잘 섞어주었다. 이것을  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 두어 RNA가 침전되도록 한 뒤 원심분리하고 70% ethanol로 washing 해주었다. EtOH를 제거하고 0.1% DEPC 처리된 물로 용해시켜 농도와 순도를 측정하였다.

###### (나) RT-PCR을 이용한 바이러스 유전자의 증폭

바이러스의 증식을 위해 검은 점병 증상을 보이는 배 잎의 즙액을 명아주에 접종하였고, 배나무와 명아주의 이병식물체 잎 조직에서 total RNA를 추출하여 바이러스의 coat protein gene을 클로닝하기 위한 주형으로 사용하였다. 검은 점병의 원인이 되는 capillovirus group에는 현재까지 4가지 strain이 보고되었으며 이 중 Apple stem grooving virus와 Citrus tatter leaf virus의 genome structure는 상당 부분 유사하다. 현

재까지 이들의 coat protein 유전자의 위치는 확실하게 결정되어 있지 않기 때문에 이들 바이러스의 isolates 염기서열을 토대로 상동성을 조사하고 이를 바탕으로 coat protein gene을 클로닝 할 수 있는 primer를 제작하였다. forward primer는 ASCT-I (5' - CATATGAGTTTGGGAAGACGTGCTTC-3')으로, reverse primer는 ASCT-II (5' - CTCGAGACCTCCAGTTCCAAGTTA-3')으로 명명하였다. 배와 땅아주에서 추출한 total RNA를 주형으로 하였고 cDNA 합성을 위해 reverse primer로 10 pmol oligo(dT)<sub>20</sub>을 1  $\mu$ l 첨가하였다. Primer를 첨가하고 70°C에서 10분 반응시킨 뒤 얼음에 5분 동안 방치하고 이 동안 reverse transcriptase buffer, dNTP, 그리고 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase mixture를 만든 뒤 이를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 reverse transcription (RT)을 수행하였다. 여기에서 합성된 first strand cDNA를 주형으로 95°C에서 5분 동안 DNA-RNA hybrid를 변성화 한 뒤 95°C 30초, 57°C 40초, 72°C 40초의 조건으로 30회 반복하여 DNA를 증폭한 후 72°C에서 5분간 DNA를 합성하였다.

### (2) Viral coat protein 의 발현

RT-PCR 방법을 수행하여 확보한 바이러스의 coat protein gene을 expression vector 인 pET-22b(+)에 ligation 하였다. 이것을 BL21(DE3) pLysS에 transformation 시킨 뒤 subculture하고 이를 LB/Ampicillin 배지에 1/100 접종하여 Absorbance(A) 600 nm 값이 0.4가 될 때까지 배양하였다. 이 때 IPTG를 1mM이 되도록 첨가하여 induction을 유도하였는데 IPTG를 첨가한 후에는 28°C에서 150rpm으로 shaking 하면서 4시간 배양하였다.

### (3) Viral coat protein 의 정제

발현을 유도하여 키운 배양액을 원심분리하여 세포들을 모으고 10 ml의 lysis buffer로 다시 현탁한 후 lysozyme (1 mg/ml)을 첨가하여 4°C에 20분 정도 두었다. 4°C를 유지하면서 초음파를 가해 분쇄한 뒤 원심분리하여 상층액을 얻고 이것을 Ni<sup>2+</sup> 으로 precharged 된 resin이 충전되어 있는 column에 loading 하였다. 가해준 sample이 resin을 완전히 통과한 후 1X binding buffer (5mM imidazole, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 흘려주어 washing 하여주고, 1X washing buffer (60mM imidazole, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 흘려주었다. 정제 과정에서 detector를 사용하였기 때문에 읽혀지는 peak에 따라 첨가하는 buffer의 양을 조절하여 주었다. 발현된 단백질의 elution을 위해

1X elution buffer (1M imidazole, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 첨가하였고, 이 과정을 통해 얻은 단백질은 0.9% NaCl 용액에 녹여 주었다.

## 나. 면역 혈청 생산

### (1) 면역 혈청 생산

면역 혈청 생산을 위해 6주된 Balb/C mouse를 사용하였다. 4차에 걸쳐 면역을 실시하였는데 각 단계마다 0.9%의 NaCl에 녹인 바이러스의 coat protein을 25  $\mu\text{g}$  사용하였다. 1차 면역 시에는 단백질과 동량의 complete adjuvant를 사용하였고 이로부터 1주일 이 지난후 2차 면역을 실시하였다. 역시 2차 면역 후 1주 경과하여 3차 면역을 실시하였는데 이렇게 4차까지 단백질과 동량의 incomplete adjuvant를 혼합하여 사용하였다. 4차 면역 후 14일 경과하여 복강 내에 sarcoma cell을 주입하였는데 이로부터 2주 후 복부가 불렀을 때 복수를 세취하였고 동시에 혈액을 채취하여 항혈청을 분리하였다.

### (2) ELISA

96 well plate의 각 well에 최종농도가 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 PBS로 희석한 antigen을 90  $\mu\text{l}$ 씩 넣은 뒤 Filter paper 위에 plate를 올려놓고 wrap으로 싸서 37°C incubator에 넣어 2시간 동안 incubation 하였다. 털어서 antigen 용액을 제거한 뒤에 Tween-20을 0.05% 포함하는 PBS를 200  $\mu\text{l}$ 씩 떨어뜨려 washing 하고, PBS에 녹인 1% BSA를 90  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 떨어뜨려 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Washing 과정을 2번 정도 반복한 뒤 primary antibody solution을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 3번 정도 washing 하여 준 뒤 secondary antibody solution을 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 다시 washing을 3회 해주었다. Substrate인 pNPP를 첨가하여 발색을 확인하고 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (3) Protein gel blot analysis

동일한 양의 protein을 SDS-PAGE를 통해 분리한 후 이것을 30V에서 12시간 이상 transfer 시켜 nitrocellulose membrane으로 옮겨주었다. PBS buffer에 1% BSA를 첨가하여 blocking 해주었다. Primary antibody를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 PBS로 2번 정도 씻어 주고 1/1000로 희석한 secondary antibody를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 정도 washing하여 준 뒤 멸균수에 NBT/BCIP tablet을 넣어 발색반응을 유도하였다.

다. 배나무 검은 점병에 대한 분자생물학적인 분석

(1) 병징의 진행정도에 따른 분석

(가) Southern hybridization analysis

분리한 DNA를 Et-Br이 포함된 agarose gel에서 분획하였다. Alkaline transfer solution과 모세관법을 사용하여 DNA를 nylon membrane으로 전이시키고, 전이된 DNA는 UV-crosslinker (Stratagene)를 사용하여 nylon filter에 고정시켰다. Membrane을 prehybridization solution이 들어있는 bottle에 넣어 hybridization oven에서 60°C, 4시간 이상 반응시킨 후 prehybridization solution에 <sup>32</sup>P로 labeling 시킨 probes를 넣고 65°C, 20시간 이상 반응시켰다. Probe는 바이러스 coat protein 유전자가 클로닝 되어있는 pGEM-T Easy vector에서 유전자 부위를 제한효소 처리하여 얻고 kit로 표지하였다.

(나) Northern hybridization analysis

10 µg RNA를 formaldehyde agarose gel에서 분획한 후 nylon filter (Duralon UV, Stratagene)로 10X SSC (1X SSC에는 0.15 M NaCl과 0.015 M sodium citrate로 제조)를 이용하여 모세관법으로 전이시켰다. 전이된 RNA는 UV-crosslinker (Stratagene)를 사용하여 nylon filter에 covalent 결합을 시켰다. Nylon filter는 42°C prehybridization 용액에서 (1 M NaCl, 1% SDS, 10% dextran sulfate, 50% formamide, 100 ug/ml salmon sperm DNA) 2시간 이상 처리하였고 여기에 <sup>32</sup>P로 labeling 시킨 probe를 넣었다. Hybridization은 42°C에서 20시간 이상 수행하였고 50°C에서 1% SDS가 포함된 2X SSC를 사용하여 washing 해주었다. Probe는 열로 변성된 insert DNA를 kit를 이용하여 제작하였다. Nylon filter는 공기 중에서 건조한 후 plastic wrap으로 싸서 X-ray film에 노출시켰다.

## (2) 항체를 이용한 진단

### (가) DAS-ELISA

정제된 항체를 coating solution (50mM sodium carbonate, pH 9.6, 10mM PBS, pH 7.2)에 적정 농도로 희석한 후 각각의 well에 100  $\mu$ l씩 첨가하여 plate에 코팅한 후 밀봉하여 30°C에서 1시간 동안 배양하였다. 항체를 비우고 3-4회 washing solution (0.1M Phosphate-buffered saline with a 0.05% Tween 20) 300  $\mu$ l로 조심스럽게 씻은 후 100  $\mu$ l로 dilution 시킨 antigen을 각 well에 넣고 room temperature에서 12시간 동안 반응시킨 후 washing 하여 주었다. 여기에 secondary antibody를 100  $\mu$ l씩 첨가하여 30°C에서 2시간 동안 배양한 뒤 substrate를 첨가하여 발색반응을 확인하고 ELISA reader 이용하여 405 nm에서 발색 정도를 측정하였다.

### (나) Dot immunoblotting assay

바이러스 감염 시료를 protein extraction buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 5% SDS, 20% sucrose, 5% 2-mercaptoethanol)를 첨가하여 마쇄한 후 얼음에 20분 정도 두었다가 15,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 취하였다. 즙액을 blotter에 장착되어 있는 PVDF (Polyvinylidene difluoride) membrane에 loading하고 진공 펌프를 이용하여 옮겨주었다. 시료가 전이된 PVDF membrane을 2회 washing하여 주고 primary antibody solution을 첨가한 후 1시간, washing 과정을 거친 후 secondary antibody를 첨가한 후 1시간을 반응하여 substrate를 첨가하고 30분 정도 발색반응을 지켜본 뒤 PVDF membrane을 washing하여 발색 반응을 중지시켰다.

## 라. 배 바이러스와 Capillovirus genus간의 유연관계 분석

### (1) 유연관계 분석을 위한 primer의 제작

배 바이러스의 coat protein과 ASGV, CTLV의 coat protein 간의 phylogenetic relationships를 알아보기 위해서 이들의 amino acid 서열을 multiple alignments를 통해 분석하였다. ASGV와 CTLV는 다른 바이러스이지만 기존의 보고에 따르면 CTLV는 ASGV의 isolate인 것으로 생각되고 있다. 두 바이러스의 genome sequences 중 차이를 부여하는 부위인 5' 방향 1634-1765의 염기서열 바깥 부위 중 상동성이 매우 높은 부분의 염기서열에 근거를 두고 primer를 제작하였다. Forward primer는 5' -GCCAGGAGATTTAGATTGAGAAGAG-3' (AC-II) reverse primer는 5' -GAAGTATAAACCATTTGAAAGACC-3' (AC-III) 로 AC-III를 첨가하여 합성된 first strand cDNA를 주형으로 AC-II와 AC-III를 첨가하여 95°C에서 5분 동안 DNA-RNA hybrid를 변성화 한 뒤 95°C 30초, 57°C 40초, 72°C 40초의 조건으로 30회 반복하여 DNA를 증폭한 후 72°C에서 5분간 DNA를 합성하였다. 이것에 기초하여 차이를 보였던 염기서열 중 CTLV의 염기서열 일부를 선택하여 forward primer (5' -TGAGGTCCCCGAGAGTGATGCA-3')를 새롭게 제작하였다. 동일한 조건에서 RT-PCR을 수행하였다.

## 마. Virus를 옮기는 운반체에 대한 역학 조사

### (1) 배 바이러스를 옮겨주는 곰팡이 운반체의 분리 및 유지

#### (가) 곰팡이의 배양

식물의 뿌리 조직을 tap water에 씻어 흙을 제거한 뒤 clean bench 안에서 멸균한 blade로 0.5 mm 크기가 되도록 잘라 PDA 배지 위에 올려두었다. PDA 배지는 2%로 만들어 곰팡이가 표면에서 자라도록 하였다. 각 plate를 공기가 통할 수 있는 tape으로 sealing 하여 25°C incubator에서 균사체가 충분히 자랄 때까지 배양하였다.



## (2) Pathogenicity and transmission tests

### (가) 식물의 배양과 곰팡이의 감염

10품종의 콩을 germination test를 거쳐 선별하여 흙 표면에서 1 cm 깊이에 심어 주고 물을 충분히 주었다. 28°C에서 배양하였으며 true leaf이 적당한 크기로 자랐을 때 cornidia culture 했던 곰팡이를 감염시켰다. 잎맥으로 둘러싸인 부분을 택하고 주사 바늘로 잎 표면에 살짝 흠집을 낸 뒤 주사기에 포자 현탁액을 담고 주사 바늘을 뺀 상태에서 눌러 압력을 가하면서 포자 현탁액을 밀어 넣었다. 포자 현탁액을 넣으면 잎이 젖으면서 퍼지는 것을 관찰할 수 있는데 이러한 방법으로 petiole에 가까운 부분에 여러 군데 접종하여 주었다.

### (나) 단포자체의 분리

PDA 배지에서 배양한 곰팡이의 균사체 일부를 살짝 긁어 이것을 멸균수에 풀어준 뒤 hemacytometer를 이용하여 포자 수를 측정하고 포자 농도별로 PDA 배지 위에 spreading하여 주었다. 농도별로 spreading한 plate를 duplicate로 만들어 25°C와 37°C에서 각각 배양하면서 spreading하고 나서 10시간 후부터 계속적으로 포자의 자라는 모습을 관찰하였다. 12시간 후부터는 발아하는 포자의 모습을 관찰할 수가 있는데 현미경 하에서 멸균한 핀을 이용하여 이것을 살짝 긁어낸다. 조그만 agar 조각을 새로운 PDA 배지 위에 올려 25°C incubator에서 배양함으로 균사체가 충분히 자라도록 하였다.

### (다) 배양한 곰팡이로부터 total RNA의 분리

PDA 배지 위에서 충분히 배양한 곰팡이를 멸균한 핀으로 전부 긁어내어 차갑게 식힌 막자사발에 담아 액체 질소를 부어 주면서 고운 가루가 될 때까지 갈아주었다. 고운 가루 상태가 되면 RNA extraction buffer (0.2M Tris-HCl, pH9.0, 0.4M LiCl, 25mM EDTA, 1% SDS) 550  $\mu$ l와 phenol 550  $\mu$ l에 혼합하였다. 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액에 phenol과 chloroform을 동일부피로 첨가하여 다시 잘 섞어주고 원심분리하여 상층액을 취하였다. 여기에 8M LiCl을 1/3 volume 되도록 첨가한 뒤 4°C에 2시간 동안 두었다. 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 pellet을 0.1%의 DEPC로 처리된 물 300  $\mu$ l에 용해시키고 여기에 3M sodium acetate 30  $\mu$ l, absolute ethanol 600  $\mu$ l를 첨가하여 잘 섞어주고 -20°C에서 1시간 동안 두어 RNA가 침전되도록 한 뒤 원심분리하

고 70% ethanol로 washing 해주었다. EtOH를 제거하고 0.1% DEPC 처리된 물로 용해시켜 농도와 순도를 측정하였다.

### (3) Characterization of the fungal vector

#### (가) 곰팡이의 배양

PDA 배지에서 배양한 곰팡이 조각을 잘라 새로운 PDA 배지 위에 올려 25℃와 37℃ incubator에서 균사체가 충분히 자랄 때까지 배양하였다. 배양한 곰팡이는 농업과학기술원 분자유전과 농용미생물 보존센터에 동정을 의뢰하였다.

### 제 3 절. 결과 및 고찰

#### 1. Viral coat protein의 확보

배와 명아주의 이병 식물체 잎에서 추출한 total RNA를 주형으로 하고, 바이러스의 coat protein gene을 증폭할 수 있도록 제작된 primer인 ASCT-I, ASCT-II를 첨가하여 RT-PCR을 수행한 결과 714 bp 크기의 product를 얻었다 (Figure 3-1).

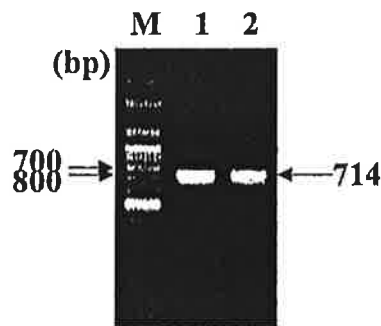
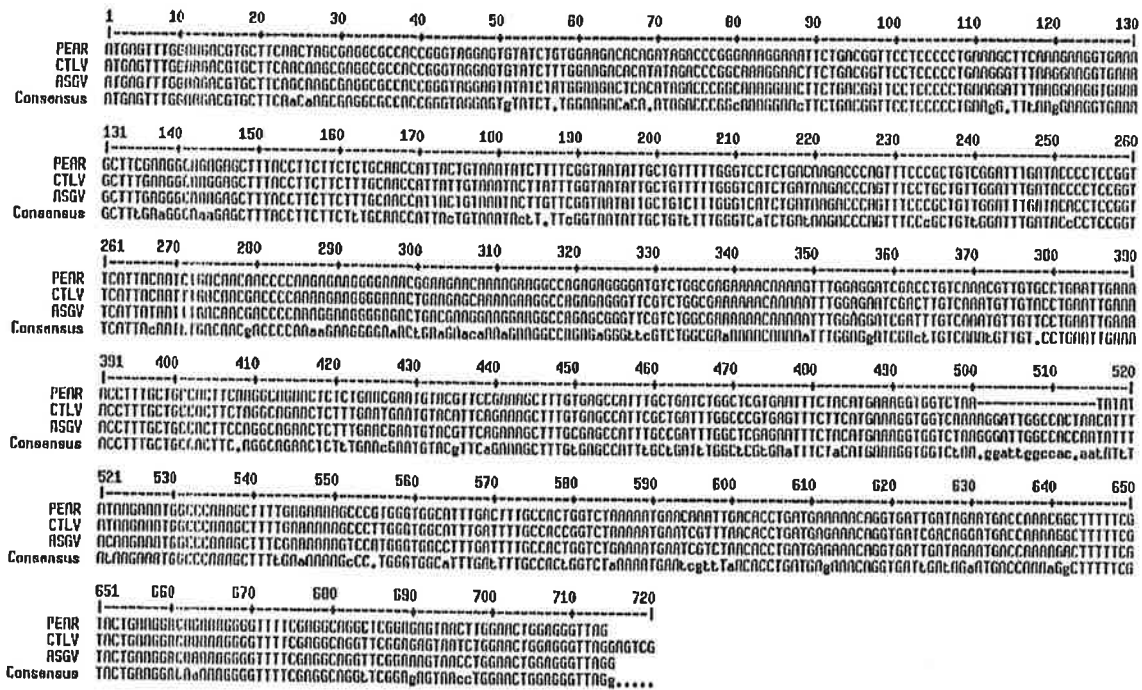


Figure 3-1. Amplification of viral coat protein gene. Lane M, 100 bp ladder DNA size marker ; Lane 1, symptomatic pear leaves ; Lane 2, symptomatic *C. quinoa* leaves. PCR products were amplified by using the primer pair [ASCT-I and ASCT-II], respectively.

RT-PCR을 통해 얻은 product의 염기서열을 결정하여 상동성을 조사한 결과 기존에 보고된 ASGV, CTLV coat protein gene의 염기서열과 90%의 유사성을 보이는 것을 알 수 있었다 (Figure 3-2A). 이것의 amino acid 서열의 상동성 역시 동일한 결과를 보이는지 비교하기 위해 translation을 하였다. 현재까지 ASGV와 CTLV의 coat protein region은 정확하게 결정되어 있지 않지만 genome의 전체 염기서열이 결정되어 있기 때문에 coat protein region으로 예상되어지는 부분을 기존의 여러 보고들을 토대로 하여 정할 수 있었다. C-terminal 부위의 5640-6353을 open reading frame을 맞추어 translation하여 분석한 결과 역시 매우 높은 유사성을 보이는 것을 알 수 있었다 (Figure 3-2B).

(A)



(B)

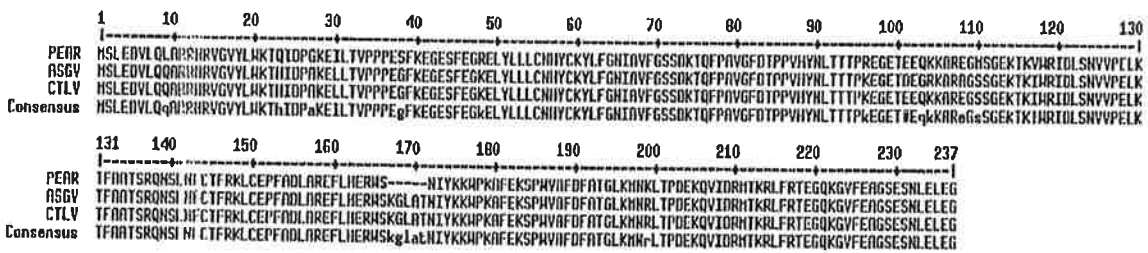


Figure 3-2. Multiple alignments of the coat protein genes. The cloning coat protein gene from pear diseased leaf is in perfect agreement with that of the ASGV (accession code; D14995) and CTLV (accession code; D14455). The nucleotide sequences (A) and amino acid sequences (B), excluding poly(A) tail, of the cloning coat protein gene shown 90% identity to that of the ASGV and CTLV.

예상되는 deduced amino acid sequence 역시 높은 상동성을 나타내었기 때문에 이것을 발현시켜 얻은 단백질을 항원으로 이에 반응하는 특이적인 항체를 만들 수 있을 것으로 예상하고 이것을 단백질 발현 vector인 pET-22b(+)에 삽입하였다 (Figure 3-3A). 클로닝한 coat protein gene을 vector에 ligation 하기 위해 Nde I 과 Xho I site를 ASCT-I 과 ASCT-II 각각에 삽입하여 새롭게 primer를 제작하고 이것을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 여기서 얻은 product를 pGEM-T Easy vector에 삽입하고 Nde I 과 Xho I 으로 절단하여 이것을 동일한 제한효소로 절단한 vector에 ligation 시켰다. 이것을 BL21(DE3)pLysS에 transformation 하기 전 DH5 $\alpha$ 에 transformation 하였는데 ligation 여부를 쉽게 확인함은 물론, BL21(DE3)pLysS의 특성상 plasmid가 잘 소실되기 때문에 이를 방지하기 위해 이 과정을 거쳤다. 여기서 확실하게 확인된 것을 다시 BL21(DE3)pLysS에 transformation하고 1mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였다. 발현시킨 단백질의 크기는 32kDa 정도로 계산되어지는데 *E. Coli*에서 발현시킨 단백질을 SDS-PAGE 분석한 결과 동일한 크기의 단백질을 확인할 수 있었다. 발현된 단백질을 정제하기 위해 Ni<sup>2+</sup>으로 precharged 되어 있는 agarose resin을 사용하였고, imidazole 농도를 조절하여 발현시킨 단백질을 elution 하였다 (Figure 3-3B).

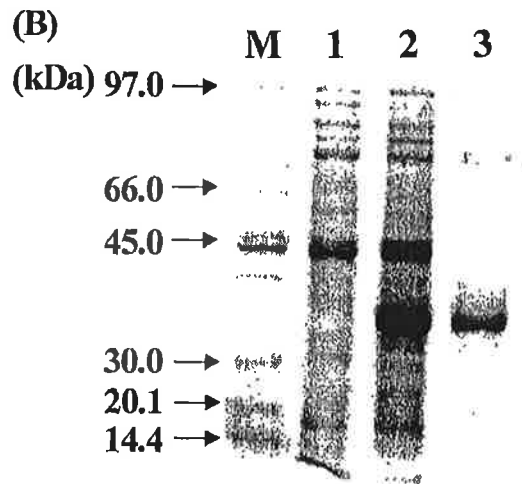
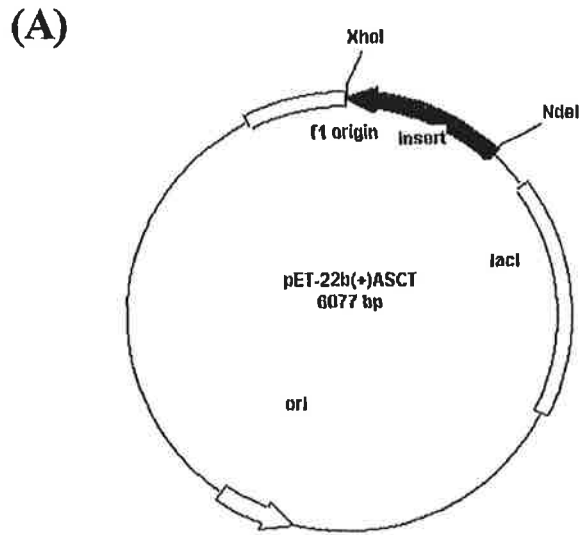


Figure 3-3. SDS-PAGE of the proteins expressed in *E. Coli* containing pET 22b(+).  
 (A) The pET-22b(+)-ASCT (B) Lane M, low molecular weight marker ; Lane 1, proteins from *E. Coli* cells grown without IPTG ; Lane 2, proteins from *E. Coli* cells induced by IPTG ; Lane 3, purified coat protein.

## 2. 면역 혈청 생산

검은 점병의 원인이 되는 바이러스의 coat protein에 대한 항체를 생산하기 위하여, 정제한 단백질을 0.9% NaCl에 녹이고 이를 adjuvant와 혼합한 후 4차에 걸쳐 mouse에 생체 면역을 실시한 후 14일이 지난 후 복수를 취하여 이로부터 항혈청을 분리하였다. 실험 동물로부터 얻어진 항혈청에 대하여 viral coat protein에 대한 특이적인 항체의 존재 여부 및 역가를 측정하기 위하여 ELISA와 protein gel blot analysis를 수행하였다. 발현 시킨 coat protein은 ASGV와 CTLV의 coat protein과 amino acid 수준에서 매우 높은 유사성을 보였기 때문에 이들 각각의 바이러스에 대한 Anti-coat protein antibody에 대해서도 반응할 것으로 생각하고 이것을 확인해 보았다. 결과 정제한 coat protein을 immunogen으로 사용하여 생산한 항혈청은 물론 ASGV와 CTLV의 항혈청 역시 immunogen에 특이적으로 반응함을 확인하였다 (Figure 3-4).

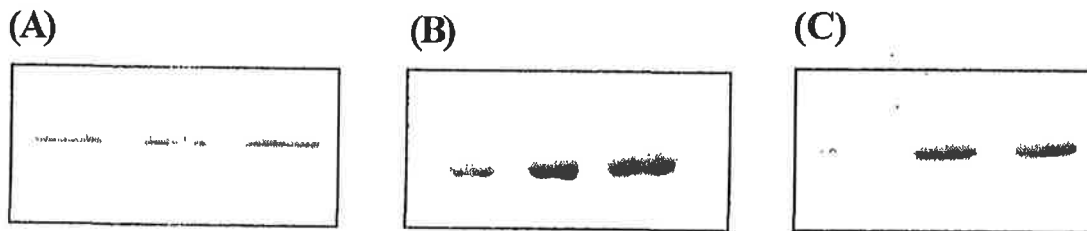


Figure 3-4. Protein gel blot analysis showing each differential binding of the antibodies with the purified coat protein. 50 ng or 100 ng of protein was separated by SDS-PAGE, and protein gel blot analysis was performed with the polyclonal antibody. (A) Anti-pear virus coat protein antibody (B) CTLV antibody (C) ASGV antibody

감염원이 되는 바이러스의 여러 isolates 가운데 mild strain과 severe strain이 존재하면 이들 각각에 반응하는 항혈청은 달라진다. 과수 바이러스 가운데 이러한 대표적인 경우로 closterovirus group의 citrus tristeza virus가 있다. mild strain과 severe strain에 반응하는 항혈청이 다른 이유는 보통 critical epitope으로 작용하는 하나 또는 몇 개의 amino acid가 있기 때문인데, 현재까지 보고된 바를 살펴보면 ASGV와 CTLV는 이러한 경우에 해당되지 않는 것으로 여겨진다. 물론, 이들 사이에는 많은 isolates가 보고되었고 coat protein 부위의 변이가 관찰되지만 이 중 antigenicity에 영향을 끼치는 요인은 없는 것으로 보인다. 따라서 ASGV와 CTLV에 유연한 배 바이러스의 경우나 다른 유사한 isolates를 검정하는데 있어 어떤 것에 대한 항혈청으로도 진단이 가능할 것으로 보인다.



### 3. 배나무 검은 점병에 대한 분자생물학적인 분석

#### 가. 병징의 진행 정도에 따른 분석

효과적으로 바이러스를 검정하기 위하여 병징의 진행정도에 따라 RT-PCR을 이용하여 분석을 실시하였다. 이를 위해 시기적으로 병증이 처음 나오기 시작했을 때부터 병증이 충분히 나타났을 때까지 증상별로 조직을 취하였다. 바이러스의 coat protein gene을 클로닝 할 때 사용한 primer는 다른 어떤 바이러스 gene의 염기서열과 상동성 없이 ASGV와 CTIV의 coat protein gene 염기서열에만 특이적이기 때문에 분석에 이를 사용하였다. RT-PCR을 수행하여 분석한 결과 검은 점병의 원인이 되는 바이러스는 증상의 정도에 크게 좌우되지 않고 확인되었는데 분석이 PCR 방법을 통해 이루어졌기 때문에 바이러스가 소량만 있어도 검정된 것으로 여겨진다. 그러나 이 결과에서 주목할만한 것은 건전주에서도 바이러스가 확인된 것이다 (Figure 3-5). 이것을 다시 확인하기 위해 다른 두 장소에서 채취한 건전주의 잎에서 total RNA를 추출하여 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하였다 (Figure 3-6). 두 번째 결과에서도 마찬가지로 건전주 식물에 바이러스가 감염되어 있음을 알 수 있었고 이것은 southern analysis를 통해서 확증할 수 있었다 (Figure 3-7).

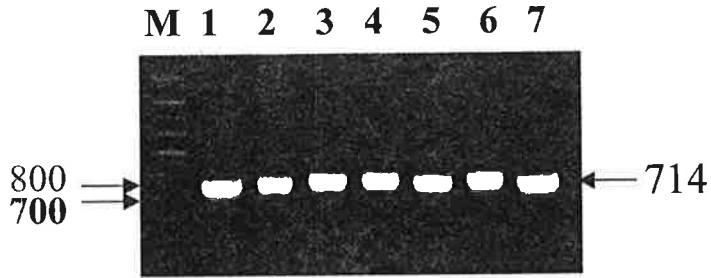


Figure 3-5. 병증의 진행 정도에 따른 (5월26일 sampling) 1차 RT-PCR 분석. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, symptomatic *Chenopodium quinoa* ; Lane 2, virus-free plant (N) ; Lane 3, severe symptom ; Lane 4, mosaic pattern ; Lane 5, mild symptom ; Lane 6, very severe symptom ; Lane 7, no symptomatic young leaf from diseased plant.

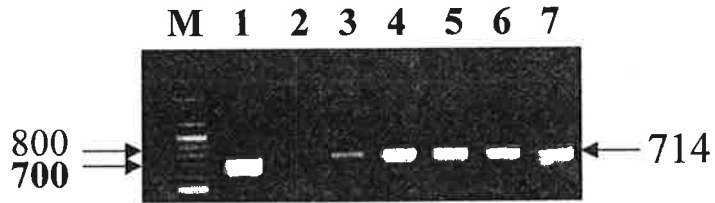


Figure 3-6. 병증의 진행 정도에 따른 (6월 2일 sampling) 2차 RT-PCR 분석. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, virus-free plant (N) ; Lane 2, virus-free plant (Z) ; Lane 3, severe symptom ; Lane 4, mosaic pattern ; Lane 5, mild symptom ; Lane 6, very severe symptom ; Lane 7, no symptomatic young leaf from diseased plant

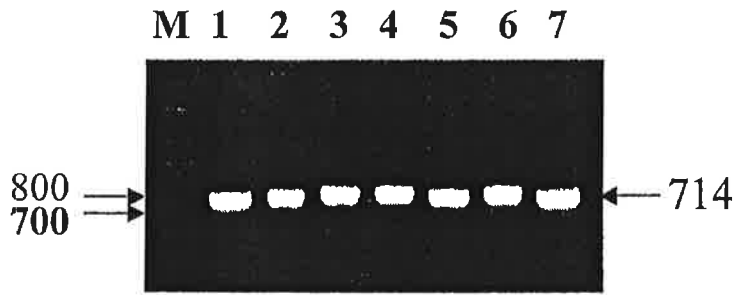


Figure 3-5. 병증의 진행 정도에 따른 (5월26일 sampling) 1차 RT-PCR 분석. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, symptomatic *Chenopodium quinoa* ; Lane 2, virus-free plant (N) ; Lane 3, severe symptom ; Lane 4, mosaic pattern ; Lane 5, mild symptom ; Lane 6, very severe symptom ; Lane 7, no symptomatic young leaf from diseased plant.

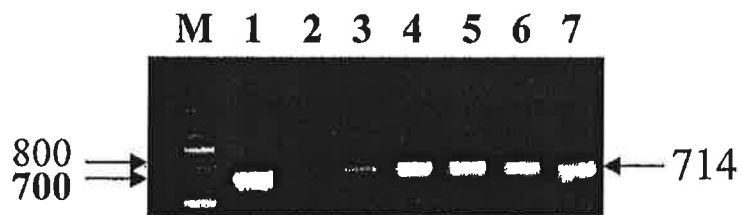
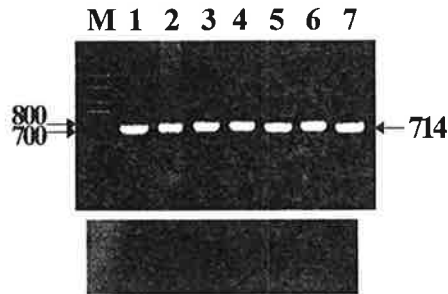


Figure 3-6. 병증의 진행 정도에 따른 (6월 2일 sampling) 2차 RT-PCR 분석. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, virus-free plant (N) ; Lane 2, virus-free plant (Z) ; Lane 3, severe symptom ; Lane 4, mosaic pattern ; Lane 5, mild symptom ; Lane 6, very severe symptom ; Lane 7, no symptomatic young leaf from diseased plant

(A)

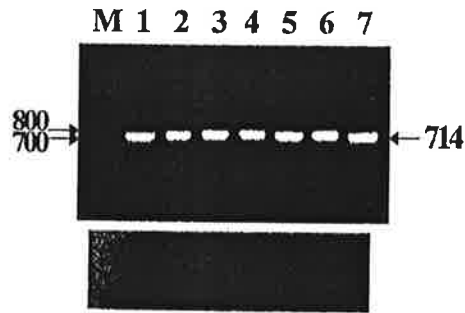


(B)

Figure 3-7. RT-PCR (A) and southern blot hybridization (B) of total RNA from pear leaves infected with virus. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, symptomatic *Chenopodium quinoa* ; Lane 2, virus-free plant (N) ; Lane 3, no symptomatic young leaf from diseased plant ; Lane 4, mild symptom ; Lane 5, severe symptom ; Lane 6, very severe symptom ; Lane 7, mosaic pattern.

RT-PCR 결과 얻은 product가 바이러스의 것인지를 확인하기 위해 이것을 클로닝하고 염기서열을 결정하였는데 상동성을 조사한 결과 ASGV와 CTLV의 coat protein gene 염기서열과 동일한 것으로 나타났다. 여기서의 문제점은 건전주에서도 바이러스가 존재함에도 불구하고 이병식물과 같이 병징이 나타나지 않느냐는 것이다. 여러 가지 요인을 생각해 볼 수 있겠지만 가장 주요한 원인이 될 수 있는 것으로는 기존의 보고에서 언급하는 것처럼 ASGV와 CTLV가 많은 경우 잠재적으로 감염되어 존재한다는 것이다. ASGV와 CTLV의 isolates 가운데 상당수는 이렇게 latent infection 되어 있는 상태로 존재하는 것으로 여겨진다. 다른 가능성 있는 요인으로는 품종에 따른 저항성, 바이러스의 양 또는 외부 환경요인이 작용하는 것 등이다. 이 가운데 바이러스의 양과 병징의 관계를 살펴보기 위해 병징의 진행도와 조직에 따라 sampling을 하여 northern analysis를 수행하였다 (Figure 3-8). 분석에는 배 바이러스의 coat protein gene을 probe로 사용하였고, 다양하게 취한 각각의 조직에서 total RNA를 추출하여 동일하게 10  $\mu$ g을 사용하였다.

(A)



(B)

Figure 3-7. RT-PCR (A) and southern blot hybridization (B) of total RNA from pear leaves infected with virus. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, symptomatic *Chenopodium quinoa* ; Lane 2, virus-free plant (N) ; Lane 3, no symptomatic young leaf from diseased plant ; Lane 4, mild symptom ; Lane 5, severe symptom ; Lane 6, very severe symptom ; Lane 7, mosaic pattern.

RT-PCR 결과 얻은 product가 바이러스의 것인지를 확인하기 위해 이것을 클로닝하고 염기서열을 결정하였는데 상동성을 조사한 결과 ASGV와 CTLV의 coat protein gene 염기서열과 동일한 것으로 나타났다. 여기서의 문제점은 건전주에서도 바이러스가 존재함에도 불구하고 이병식물과 같이 병징이 나타나지 않는다는 것이다. 여러 가지 요인을 생각해 볼 수 있겠지만 가장 주요한 원인이 될 수 있는 것으로는 기존의 보고에서 언급하는 것처럼 ASGV와 CTLV가 많은 경우 잠재적으로 감염되어 존재한다는 것이다. ASGV와 CTLV의 isolates 가운데 상당수는 이렇게 latent infection 되어 있는 상태로 존재하는 것으로 여겨진다. 다른 가능성 있는 요인으로는 품종에 따른 저항성, 바이러스의 양 또는 외부 환경요인이 작용하는 것 등이다. 이 가운데 바이러스의 양과 병징의 관계를 살펴보기 위해 병징의 진행도와 조직에 따라 sampling을 하여 northern analysis를 수행하였다 (Figure 3-8). 분석에는 배 바이러스의 coat protein gene을 probe로 사용하였고, 다양하게 취한 각각의 조직에서 total RNA를 추출하여 동일하게 10  $\mu$ g을 사용하였다.

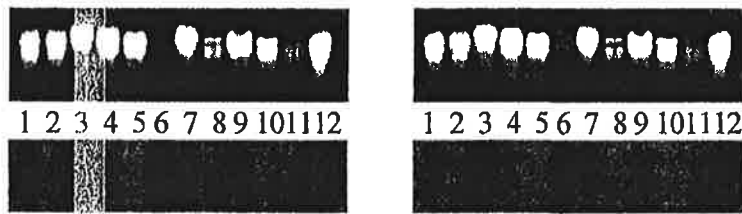


Figure 3-8. Analysis of northern blot hybridization. Probe was labeled [ $^{32}$ P]. (A) using cloning CP from pear and (B) using cloning CP from *chenopodium quinoa*. The orders of the lanes of the autoradiographs are the same. Lane 1, infected pear ; Lane 2, healthy *chenopodium quinoa* ; Lane 3, infected *chenopodium quinoa* ; Lane 4, healthy pear (N) ; Lane 5, healthy pear (Z) ; Lane 6, petal from infected pear tree ; Lane 7, no symptomatic young leaf ; Lane 8, mild symptom ; Lane 9, severe symptom ; Lane 10, very severe symptom Lane 11, mosaic pattern ; Lane 12, 2nd infected *chenopodium quinoa*.

먼저, 건전주와 이병주의 경우를 비교해 보면 건전주에서 이병주보다 바이러스의 양이 훨씬 적은 것을 알 수 있다. 병징의 진행 정도에 따른 바이러스의 양을 살펴보면 배나무의 가장 상단 이새 막 나오기 시작한 앞에서 많은 양의 바이러스를 측정할 수 있고, 다음으로 가는 검은 점이 작고 또렷하게 보이면서 잎 전체에 고르게 퍼졌을 때 비교적 많은 양의 바이러스를 검출할 수 있다. 병징이 심하게 나타난 경우에는 오히려 바이러스가 거의 존재하지 않음을 알 수 있는데 이는 조직이 거의 죽은 상태가 되기 전에 바이러스가 다른 조직으로 이동하였기 때문이 아닌가 생각되어진다. 또한 바이러스를 가장 많이 검출할 수 있는 조직은 꽃잎이었다. 한 식물체에서 초기에 감염된 바이러스의 복제와 증식, 이동이 얼마나 효과적으로 이루어지는가와 기주 식물의 반응에 따라 병징의 진행 양상은 다르게 나타나는데 일부 건전주에서 detection되는 바이러스의 경우 그 양이 적을 뿐 아니라 어떤 요인에 의해 바이러스의 증식이 억제되었을 것으로 생각된다. 바이러스의 복제양상과 기주 식물을 관련된 정확한 결과를 얻기 위해 protoplast system을 이용한 transient assay가 필요하지만, 과수 바이러스의 특성상 이것이 어렵다. 병징이 나타나는 정도는 다른 바이러스가 복합 감염되었을 경우 다르게 나타날 수 있는데 배나무의 경우 TMV 같은 바이

러스가 복합 감염된다는 기존의 보고가 있다. 이에 근거하여 우리나라에서 현재 보고된 RNA 바이러스의 coat protein gene을 증폭할 수 있는 primer를 제작하고 이를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

나. 병의 원인이 될 수 있는 다른 생물학적 요인 조사

배나무에 복합감염 되는 것으로 기존에 보고된 바이러스는 물론, 다른 바이러스의 감염 가능성을 확인하기 위해 우리나라에서 현재 보고된 RNA 바이러스의 coat protein gene을 증폭할 수 있는 primer를 제작하고 이를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다 (Table 3-1). 여러 가지 바이러스 가운데 PLRV, PVS, TMV에서 증폭된 product가 있었으나 (Figure 3-9), 염기서열을 분석한 결과 바이러스의 gene은 아니었다. 따라서 배나무 검은 점병은 capillovirus에 의한 것이라고 할 수 있겠다.

Table 3-1. Amplification with coat protein region primers of other viruses.

Name of virus	1st screening	2nd screening	3rd screening
CMV	-	-	-
CGMMV	-	-	-
TMV	-	-	-
LMV	-	-	-
LSV	-	-	-
PVY	-	-	-
ZyMV	-	-	-
WMV	-	-	-
ApMV	-	-	-
SqMV	-	-	-
ORSV	-	-	-
ToMV	-	-	-
CarMV	-	-	-





그림 3-9. 복합 감염여부를 확인하기 위한 RT-PCR. Lane M, 100 bp ladder ; Lane 1, TMV ; Lane 2, PLRV ; Lane 3, PVS

다. 향체를 이용한 진단

건전주와 이병주에서 RT-PCR 분석을 통해 얻은 결과에 근거하여 보다 정확한 결과를 얻기 위해 각각 10그루의 식물을 심어 실험을 수행하였다 (Figure 3-10).



Figure 3-10. 향체를 이용한 진단을 하기 위해 점목하여 키운 배나무의 건전주와 이병주

건전주와 이병주 각각 10그루에서 취한 잎에서 total protein을 추출하고 바이러스의 coat protein에 대한 항혈청을 사용하여 DAS-ELISA를 수행하였다 (Table 3-2A). 이와 동시에 southern analysis와 northern analysis를 수행할 때 사용했던 조직에서 total protein을 추출하여 DAS-ELISA를 수행하였는데 화분에 심은 10그로의 배나무에서는 이병주에서만 virus titer가 높게 나타났지만 포장에서 취한 조직에서는 건전주에서도 비교적 높은 virus titier를 나타냈다 (Table 3-2B).

Table 3-2. Virus titer in leaves of healthy and infected pear trees.

(A)

Plant no.	Virus titer in leaves (O.D values)	
	Mock	Infected
1	0.026	1.290
2	0.019	1.095
3	0.032	1.070
4	0.025	1.225
5	0.085	1.150
6	0.090	1.278
7	0.079	1.474
8	0.013	1.095
9	0.074	0.721
10	0.082	1.368

(B)

	Symptom	Virus titer (O.D Values)
건전주	field 건전주 1 (농진청)	0.926
	field 건전주 2 (잡사연)	0.058
이병주	증상없는 어린 잎	1.386
	+	0.072
	++	1.252
	++++	0.085
	검은점병과 다른 증상	0.043

증상에 따른 분석에서는 northern analysis를 수행하였을 때와 유사한 양상으로 virus titer를 측정할 수 있었다. 건전주에서 바이러스가 detection 되는 이유는 포장에서의 어떤 원인에 의해 나타나는 것으로 생각된다. 병징의 진행도와 조직에 따른 바이러스의 detection 양상을 항체를 이용하여 살펴보기 위해 각각의 조직에서 total protein을 추출하여 protein gel blot analysis와 dot immunoblotting assay를 수행하였다 (Figure 3-11).

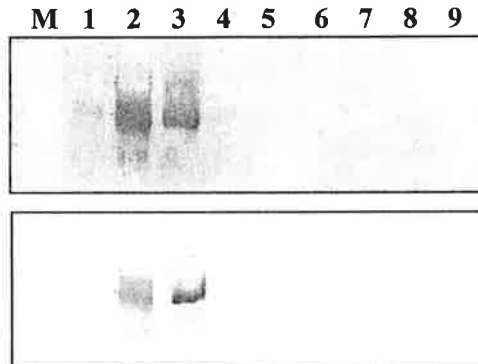


Figure 3-11. Protein gel blot analysis showing each differential binding of the antibodies with the purified coat protein. 50 ng or 100 ng of protein was separated by SDS-PAGE, and protein gel blot analysis was performed with the polyclonal antibody.

인위적으로 발원시켜 정제한 coat protein의 경우에는 50 ng의 단백질에도 항혈청이 반응하였지만 식물에서 추출한 total protein의 경우에는 많은 양의 단백질을 사용하였음에도 불구하고 반응하는 것을 관찰하지 못하였다. 과수의 조직 내에서는 바이러스의 titer가 높지 않은데 보통 이러한 문제점 때문에 과수 바이러스를 적절히 증식시킨 후 protein gel blot analysis를 수행한다. 그러나 이렇게 하면 다양한 조직, 병징에 따른 분석은 어렵기 때문에 이를 위한 분석은 본 연구에서 수행한 것처럼 DAS-ELISA 방법을 이용하는 것이 가장 효과적이라 여겨진다 (Figure 3-12). DAS-ELISA에 의한 결과의 다음과 같다 (Table 3-3).

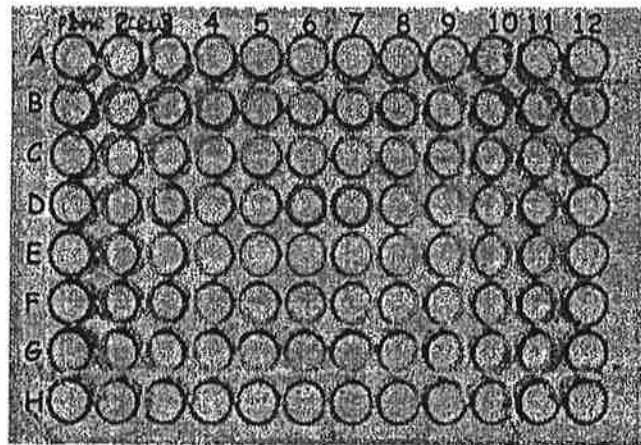


Figure 3-12. 배 바이러스에 특이적인 항체를 이용한 분석.

Table 3-3. 형체를 이용하여 진단한 결과.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	온실 건전주 1	온실 건전주 2	온실 건전주 3	온실 건전주 4	온실 건전주 5	온실 건전주 6	온실 건전주 7	온실 건전주 8	온실 건전주 9	온실 건전주 10
	0.026	0.019	0.032	0.025	0.085	0.090	0.079	0.013	0.074	0.082
B	온실 이병주 1	온실 이병주 2	온실 이병주 3	온실 이병주 4	온실 이병주 5	온실 이병주 6	온실 이병주 7	온실 이병주 8	온실 이병주 9	온실 이병주 10
	1.290	1.095	1.070	1.225	1.150	1.278	1.474	1.095	0.721	1.368
C	포장 건전주 1	포장 건전주 2	포장 건전주 3	포장 건전주 4	포장 건전주 5	포장 이병주 1	포장 이병주 2	포장 이병주 3	포장 이병주 4	포장 이병주 5
	0.926	0.058	0.019	0.875	0.072	1.879	1.724	1.683	1.752	1.691
D	증상없는 어린잎	증상 +	증상 ++	증상 ++++	mosaic	이병주 꽃잎	줄액접종 명아주			
	1.386	0.072	1.252	0.085	0.043	2.261	3.826			
E	extract 접종구 1	extract 접종구 2	extract 접종구 3	extract 접종구 4	extract 접종구 5	extract 접종구 6	extract 접종구 7	extract 접종구 8	extract 접종구 9	extract 접종구 10
	0.026	0.072	0.054	0.082	0.027	0.038	0.058	0.061	0.043	0.078
F	온실 건전주 (control)	곰팡이 윗가지 감염있	곰팡이 윗가지 감염외있	곰팡이 아래가지 감염있	곰팡이 아래가지 감염외있	곰팡이 뿌리감염				
	0.342	1.225	1.290	0.721	1.062	1.457				
G	이중접목 1	이중접목 2	이중접목 3	이중접목 4	이중접목 5	이중접목 6	이중접목 7	이중접목 8	이중접목 9	이중접목 10
	0.076	0.924	0.243	0.341	0.014	0.527	0.326	0.091	0.583	0.149

4. 배 바이러스와 *Capillivirus* genus 간의 유연관계 분석

배 바이러스의 coat protein과 ASGV, CTLV의 coat protein 간의 phylogenetic relationships를 알아보기 위해서 이들의 amino acid 서열을 multiple alignments를 통해 분석하였다. amino acid 서열의 분석 결과 배 바이러스는 CTLV와 가까운 유연 관계에 있는 것으로 보이고, 이들은 ASGV에서 유래한 것으로 여겨진다 (Figure 12).

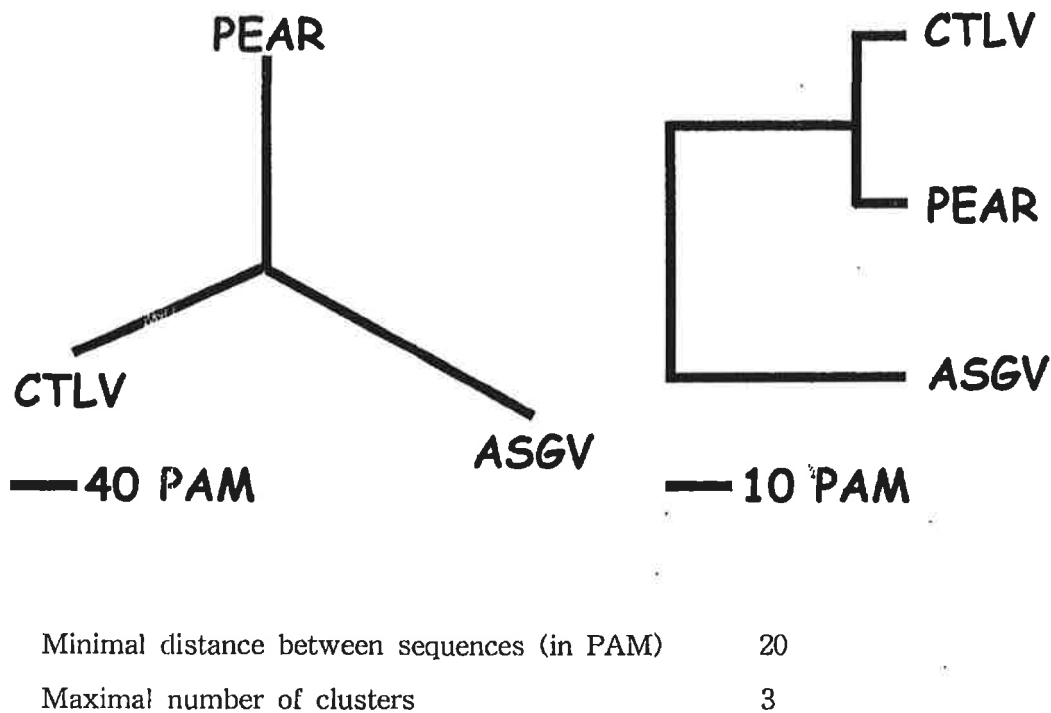


Figure 3-12. Phylogenetic tree for the coat protein region (233 [aa]) among 3 isolates and sequence variants.

ASGV와 CTLV는 다른 바이러스이지만 기존의 보고에 따르면 CTLV는 ASGV의 isolate 인 것으로 생각되고 있다. 배 바이러스의 phylogenetic relationships를 확실하게 하기 위해 coat protein 외 다른 부위 즉, ORF 1의 일부를 지정하여 이를 증폭하였다. 이들 두 바이러스의 genomic sequence를 비교하여 보면 ASGV와 CTLV의 염기서열은 89%의 상동성을 보이는데, 이것은 5' 부위 1634-1765의 염기서열에 차이를 나타내기 때문이다. 이 염기서열이 배 바이러스에서는 어떻게 나타나는지 확인하기 위해 primer를 제작하였는데 이것은 ASGV와 CTLV를 구분하게 되는 부위의 염기서열 바깥 부위 중 상동성이 매우 높은 부분의 염기서열에 근거하였다 (Figure 3-13A). 제작한 primer를 첨가하고 이병 식물의 앞에서 추출한 RNA를 주형으로 RT-PCR을 수행한 결과 이 과정에서 482 bp 크기의 product를 얻을 수 있었다 (Figure 3-13B).

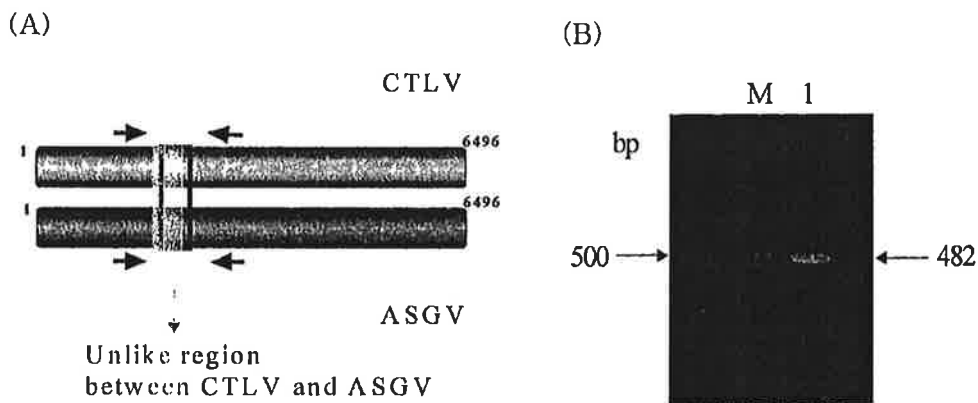


Figure 3-13. RT-PCR analysis for making a distinction causal agent. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, Amplified product of different region between ASGV and CTLV.



이것의 염기서열을 결정하여 N-terminal 1634-1765 부위 서열을 BLAST 2 Sequences results에서 분석한 결과 ASGV와는 상동성이 없으며 CTLV와 81% 유사한 것으로 나타났다. 결과 사진에서 보여주는 것은 phylogenetic relationships를 보여주기 위하여 multiple alignments를 수행한 것으로 역시 동일한 결과를 살펴볼 수 있다 (Figure 3-14A). 이 부위를 각각 translation 하여 amid acid 서열의 상동성을 분석하면 ASGV와 CTLV의 동일한 부위는 다른 것을 알 수 있고 배 바이러스의 amino acid 서열은 CTLV와 71% 유사한 것을 알 수 있다 (Figure 3-14B).

(A)

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ASGV  GGGAAACATTAATCAATCCCAATCTGAAAHAAATGCGAGAGCGGCCAATTAAGATTGAGCCAGTCCGAAATGATCAGCCACATGAGGTATCACAATCTCAATGGAATCCGAGGATGGACAG
CTLV  CAGTGACCCCAAGTCAAATCCCTGAGGTCCCGAGAGTGTGCACTGGAGAGCAGGATTAATCAGTGAATGACGAGAGCTGCGAGTCCCAAGGAGATTTGTGCGCCAAATGTCACAGAGGATGGCCAA
PEAR  CAGTGAGCCTAAGTCAAACTCTGAGGTCCCGAGAGTGTGAGATTAGAAAGGCGAACCATTGGTCAATGACGAGGCTGCGAGCCGTCANAGAGCTTTGTGAAACCAATGTCCACAGAGGATGGCCAA
Consensus  caGt.gfAcccT.AAgTC.AAACTCTgAgGt.ccccgAgAgTAgT.Gaaa.,tgGagAggcagaa,t.at.,nGt.cAaTGaCGAgagct.gCfAGcCgccaAgGagT.t.t.gTgc.cCaAAGtccACaGAGGAtGGcCAa
  
```

(B)

```

1      10     20     30     40
|-----|-----|-----|-----|
PEAR  EVPESDAVRKAEPLVNDGCGPSKELCEPHSTEDGQI
CTLV  SDPKSNPEVPESDATGEAGLSVNDESCQSPKEFCAPHSTEDGQ
ASGV  GNIKSNPNAEKNSESGEIKIEGSAENDQPHEVSHTSMETEDGQ
Consensus  ...k.np#vpesda.gea...vndE.cQp.ke.c.phsTEDGQ
  
```

Figure 3-14. Multiple alignments of making a distinction causal agent. It was shown that 131 bp nucleotide regions are most closely related to CTLV. (A) The nucleotide sequences (B) Deduced amino acid sequences.

이것에 기초하여 차이를 보였던 염기 서열 중 CTLV의 염기 서열 일부를 선택하여 forward primer를 새롭게 제작하였다 (Figure 3-15A). 새로 제작한 forward primer는 ASGV보다 CTLV의 특이적인 부분에 binding하도록 제작하였기 때문에 배 바이러스의 염기 서열이 CTLV와 유사하다면 RT-PCR에 의한 증폭이 가능할 것으로 예상하였다. 동일한 조건에서 RT-PCR을 수행하여 product를 얻을 수 있었다 (Figure 3-15B).

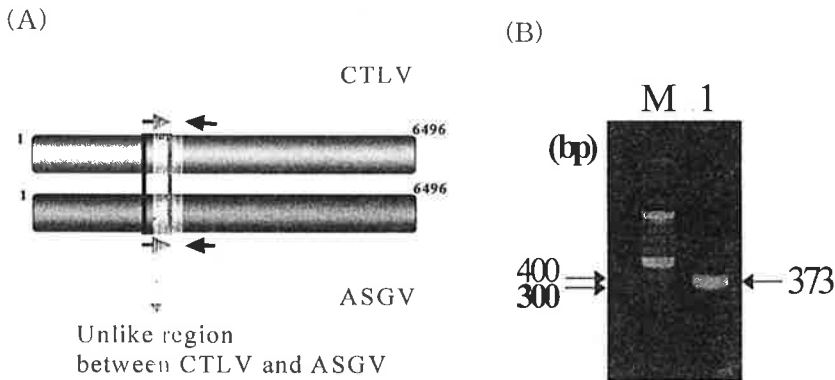


Figure 3-15. RT-PCR analysis for making a distinction causal agent. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, Amplified product of different region between ASGV and CTLV.

이것의 염기 서열을 분석한 결과 역시 ASGV와는 상동성이 없으며, CTLV와 매우 높은 유사성을 나타내는 것을 알 수 있었다 (Figure 3-16).

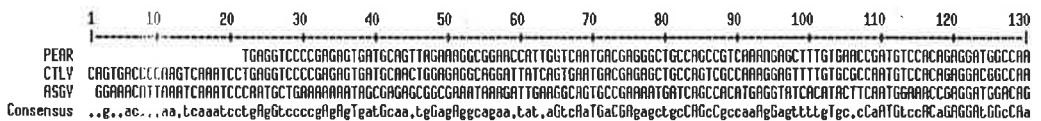


Figure 3-16. Multiple alignments shown that N-terminal sequences of pear virus are most closely related to CTLV.

이것에 기초하여 차이를 보였던 염기 서열 중 CTLV의 염기 서열 일부를 선택하여 forward primer를 새롭게 제작하였다 (Figure 3-15A). 새로 제작한 forward primer는 ASGV보다 CTLV의 특이적인 부분에 binding하도록 제작하였기 때문에 배 바이러스의 염기 서열이 CTLV와 유사하다면 RT-PCR에 의한 증폭이 가능할 것으로 예상하였다. 동일한 조건에서 RT-PCR을 수행하여 product를 얻을 수 있었다 (Figure 3-15B).

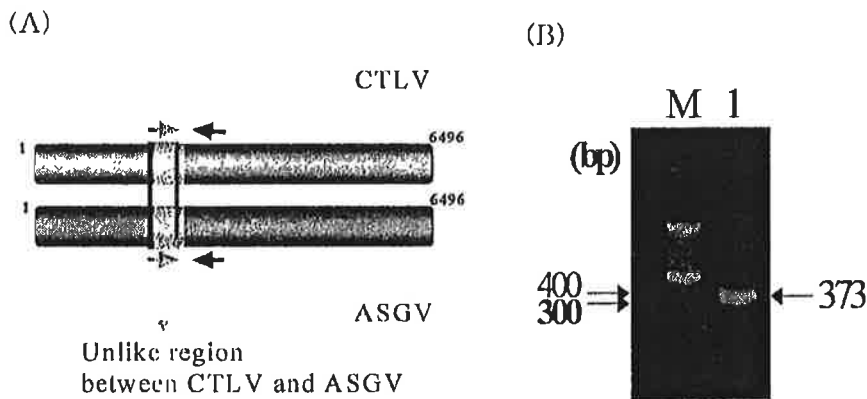


Figure 3-15. RT-PCR analysis for making a distinction causal agent. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, Amplified product of different region between ASGV and CTLV.

이것의 염기 서열을 분석한 결과 역시 ASGV와는 상동성이 없으며, CTLV와 매우 높은 유사성을 나타내는 것을 알 수 있었다 (Figure 3-16).



Figure 3-16. Multiple alignments shown that N-terminal sequences of pear virus are most closely related to CTLV.

기존의 많은 보고에서 사과와 배나무에 감염된 바이러스는 ASGV인 것으로 되어 있는데 일부 보고에서는 배나무에 감염된 바이러스가 CTLV의 isolate 일 가능성을 제시하고 있다. 드문 경우이기는 하지만 배나무 한 그루에 동시에 감염된 바이러스가 하나는 ASGV의 isolate이고 다른 하나는 CTLV의 isolate인 경우도 보고된 바가 있다. 배 바이러스 역시 유사한 CTLV의 한 isolate일 것으로 여겨진다.

## 5. Virus를 옮기는 운반체에 대한 역학 조사

### 가. 배 바이러스를 옮겨주는 곰팡이 운반체의 분리 및 유지

#### (1) 배 바이러스의 운반체 조사

검은 점병을 일으키는 바이러스에 대한 연구를 수행하기 위해 여러 지표 식물을 심었는데 주변에는 많은 작물들이 심어져 있었다. 그 중 명아주와 콩에서 바이러스에 의한 것으로 여겨지는 증상을 관찰할 수 있었다 (Figure 3-17A). 명아주에서는 주변과 확실히 구분되는 노란 점을, 콩에서는 vein을 중심으로 노랗게 퍼져있는 반점을 관찰할 수 있었다. 이것을 분자생물학적인 방법으로 확인하기 위해 sampling 하였는데, 건전주와 이병주가 심어져 있는 근처 모두에서 각각 명아주와 콩의 잎을 취하였다. 바이러스에 의한 병징으로 보이는 이병잎에서 각각의 total RNA를 추출하고 배 바이러스의 coat protein gene을 증폭할 때 사용한 primer를 첨가해 동일한 조건에서 RT-PCR을 수행하였는데, 배 바이러스의 coat protein gene과 동일한 크기의 PCR 산물을 얻을 수 있었다 (Figure 3-17B).

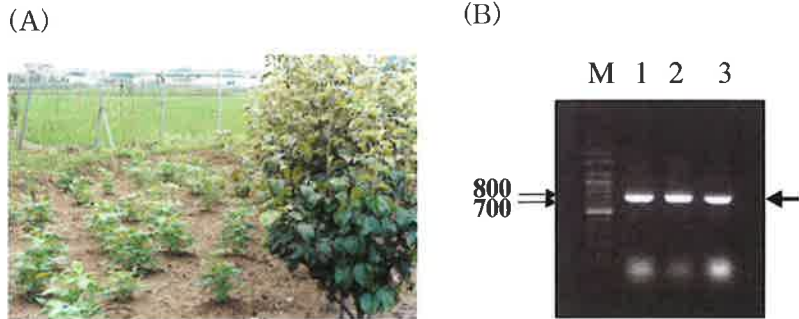


Figure 3-17. Tests for natural vector of *Capillovirus*. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, symptomatic bean ; Lane 2, symptomatic *chenopodium quinoa* near healthy plant ; Lane 3, symptomatic *chenopodium quinoa* near indicator plant.

## 5. Virus를 옮기는 운반체에 대한 역학 조사

### 가. 배 바이러스를 옮겨주는 곰팡이 운반체의 분리 및 유지

#### (1) 배 바이러스의 운반체 조사

검은 점병을 일으키는 바이러스에 대한 연구를 수행하기 위해 여러 지표 식물을 심었는데 주변에는 많은 작물들이 심어져 있었다. 그 중 명아주와 콩에서 바이러스에 의한 것으로 여겨지는 증상을 관찰할 수 있었다 (Figure 3-17A). 명아주에서는 주변과 확실히 구분되는 노란 점을, 콩에서는 vein을 중심으로 노랗게 퍼져있는 반점을 관찰할 수 있었다. 이것을 분자생물학적인 방법으로 확인하기 위해 sampling 하였는데, 건전주와 이병주가 심어져 있는 근처 모두에서 각각 명아주와 콩의 잎을 취하였다. 바이러스에 의한 병징으로 보이는 이병잎에서 각각의 total RNA를 추출하고 배 바이러스의 coat protein gene을 증폭할 때 사용한 primer를 첨가해 동일한 조건에서 RT-PCR을 수행하였는데, 배 바이러스의 coat protein gene과 동일한 크기의 PCR 산물을 얻을 수 있었다 (Figure 3-17B).

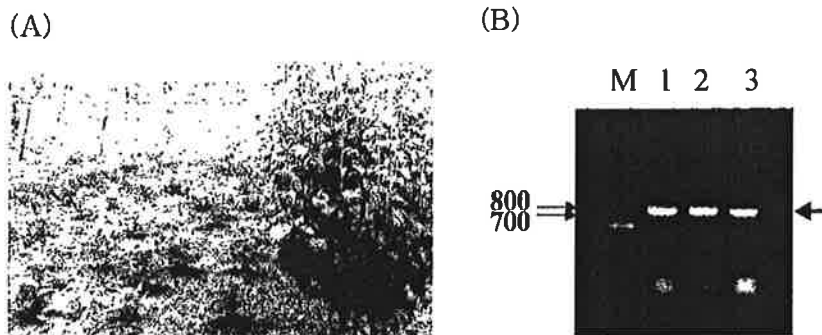


Figure 3-17. Tests for natural vector of *Capillovirus*. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, symptomatic bean ; Lane 2, symptomatic *chenopodium quinoa* near healthy plant ; Lane 3, symptomatic *chenopodium quinoa* near indicator plant.

이들 각각의 염기서열을 결정하여 상동성을 조사한 결과 베 바이러스의 coat protein gene의 염기서열과 일치함을 알 수 있었다. 주변의 식물 중 명아주와 콩만이 capillovirus의 기주 식물이 될 수 있는 것으로 실험 결과 보고된 것이었지만 명아주와 콩 외 많은 식물이 심어져 있었기 때문에 모든 식물에서 total RNA를 추출하고 RT-PCR을 수행하여 바이러스의 존재 여부를 확인하였다. 결과 바이러스가 검정된 식물은 없었다. 베 바이러스를 비롯한 capillovirus group의 바이러스는 접목에 의해, 초본식물에는 mechanical inoculation에 의해 전염되며 특별한 vector는 없는 것으로 보고되어 있다. 그러나 건진주에서도 바이러스가 detection 된다는 점, 지표 식물을 심어놓은 주변 식물에서 역시 동일한 바이러스가 detection 된다는 점을 미루어 바이러스를 매개하는 vector가 존재할 가능성을 생각하게 되었다. 바이러스를 매개하는 것으로는 여러 가지 생물체가 있지만 기존의 보고 중 몇 가지 실험에 근거하여 곰팡이에 의한 것으로 가정하고 몇 가지 실험을 계획하고 수행하였다.

(2) 곰팡이의 배양과 분리

배 바이러스의 운반체가 될 수 있는 곰팡이를 배양하기 위하여 식물체의 조직을 취하였다. 곰팡이에 의한 감염이라면 포자에 의해 멀리 있는 식물체 - 기주 식물이기만 한다면 - 에도 감염될 가능성이 있을 것으로 보고 바이러스에 의한 증상을 보이는 4가지 식물체의 조직을 취하였다. 검은 점병의 증상을 보이는 이병 지표 식물로부터 멀리 떨어진 곳에 있는 콩의 뿌리, 지표 식물 사이에 심어져 있는 콩의 뿌리, 이병 배나무의 뿌리와 bark 조직을 취하여 0.5 mm 크기로 잘라 PDA 배지 위에 놓아 25 °C에서 배양하였다 (Figure 3-18).



Figure 3-18. Cultured morphology of fungi from roots of symptomatic bean and pear. Strains were inoculated on potato-dextrose agar medium. It was cultured for 3 weeks.



## (2) 곰팡이의 배양과 분리

배 바이러스의 운반체가 될 수 있는 곰팡이를 배양하기 위하여 식물체의 조직을 취하였다. 곰팡이에 의한 감염이라면 포자에 의해 멀리 있는 식물체 - 기주 식물이기만 한다면 - 에도 감염될 가능성이 있을 것으로 보고 바이러스에 의한 증상을 보이는 4가지 식물체의 조직을 취하였다. 검은 점병의 증상을 보이는 이병 지표 식물로부터 멀리 떨어진 곳에 있는 콩의 뿌리, 지표 식물 사이에 심어져 있는 콩의 뿌리, 이병 배나무의 뿌리와 bark 조직을 취하여 0.5 mm 크기로 잘라 PDA 배지 위에 놓아 25 °C에서 배양하였다 (Figure 3-18).

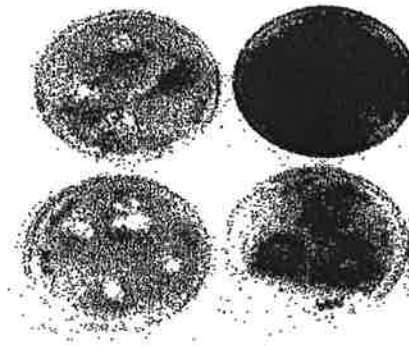


Figure 3-18. Cultured morphology of fungi from roots of symptomatic bean and pear. Strains were inoculated on potato-dextrose agar medium. It was cultured for 3 weeks.

배양 후 5일 정도 경과하자 곰팡이가 자라기 시작한 것을 관찰할 수 있었고, 4주일 정도 경과했을 때는 배지 위를 하얗게 덮으며 충분히 자라는 것을 볼 수 있었다. 4주 정도 지났을 때 각각에서 total RNA를 추출하여 주형으로 하고 배 바이러스의 coat protein gene을 클로닝할 때 사용했던 primer를 첨가하여 RT-PCR을 수행한 결과 714 bp 크기의 product를 얻을 수 있었다 (Figure 3-19).



Figure 3-19. Amplification of fungal virus genome. Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, Cultured fungi from roots of bean shown necrotic lesions on leaves ; Lane 2, Cultured fungi from roots of bean near symptomatic pear ; Lane 3, Cultured fungi from barks of symptomatic pear ; Lane 4, Cultured fungi from roots of symptomatic pear

각각의 염기 서열을 결정하고 이들의 상동성을 조사한 결과 각각 배 바이러스의 coat protein gene 염기 서열과 동일하다는 것을 알 수 있었다 (Figure 3-20).

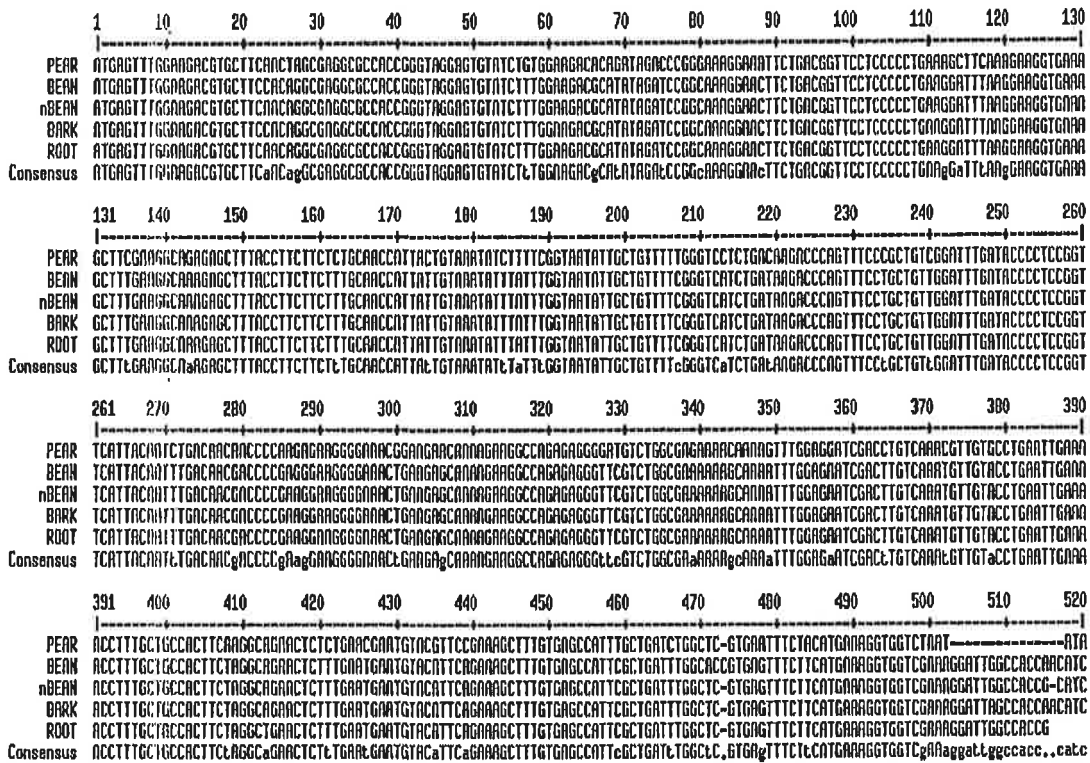


Figure 3-20. An alignment of nucleotide sequences of the partial genes.

따라서 배양한 곰팡이 중 특정한 균주가 배 바이러스의 운반체일 것으로 생각하고 건전주의 뿌리를 잘라 동일한 실험을 수행하여 결과를 보완하였다. 임의로 3그룹의 건전주를 선택하여 뿌리조직을 취하여 0.5 mm 크기로 잘라 곰팡이를 배양한 후 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하고 분석하였는데 역시 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 3-21).

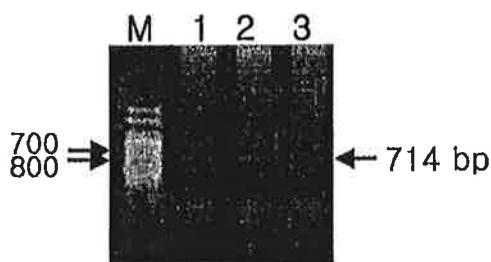


Figure 3-21. RT-PCR analysis of cultured fungi from root of different healthy plants. Each fungi are cultured from root of different individual healthy plants.

이렇게 곰팡이가 배 바이러스의 운반체라는 가능성을 보여주는 결과에 기초하여 가정을 보완하기 위한 몇 가지 실험을 수행하였다.

나. Pathogenicity and transmission tests

곰팡이를 식물체에 감염 시켰을 때 배 바이러스에 의한 검은 점병과 유사한 병징을 나타내는지, 병징이 나타나는 식물체에서 배 바이러스가 detection 되는지 여부를 확인하기 위해 배양한 곰팡이를 experimental host인 콩에 인위적으로 감염을 시켰다. 감염은 포자를 배양한 액을 잎에 주사하는 형식으로 이루어 졌는데 감염 후 8주 후부터 주변과 구분되는 노란 작은 점을 관찰할 수 있었다 (Figure 3-22). 이 후 시간이 경과하면서 vein을 중심으로 노란 점들이 증가하며 서로 fusion 되는데 포장에서 취한 콩의 이병주 잎과 거의 비슷한 양상으로 병징이 유도되는 것을 알 수 있었다 (Figure 3-23).

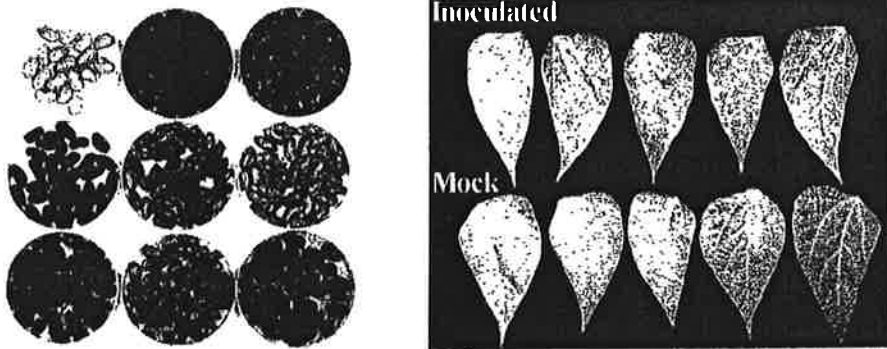


Figure 3-22. 곰팡이를 감염시키기 위해 10품종의 콩을 발아시키고 각각에 배양한 곰팡이를 감염. 오른쪽 사진에서와 같이 감염시킨 잎에서는 뚜렷한 병징을 관찰할 수 있다.

#### 나. Pathogenicity and transmission tests

곰팡이를 식물체에 감염 시켰을 때 배 바이러스에 의한 검은 점병과 유사한 병징을 나타내는지, 병징이 나타나는 식물체에서 배 바이러스가 detection 되는지 여부를 확인하기 위해 배양한 곰팡이를 experimental host인 콩에 인위적으로 감염을 시켰다. 감염은 포자를 배양한 액을 잎에 주사하는 형식으로 이루어 졌는데 감염 후 8주 후부터 주변과 구분되는 노란 작은 점을 관찰할 수 있었다 (Figure 3-22). 이 후 시간이 경과하면서 vein을 중심으로 노란 점들이 증가하며 서로 fusion 되는데 포장에서 취한 콩의 이병주 잎과 거의 비슷한 양상으로 병징이 유도되는 것을 알 수 있었다 (Figure 3-23).



Figure 3-22. 곰팡이를 감염시키기 위해 10품종의 콩을 발아시키고 각각에 배양한 곰팡이를 감염. 오른쪽 사진에서와 같이 감염시킨 잎에서는 뚜렷한 병징을 관찰할 수 있다.

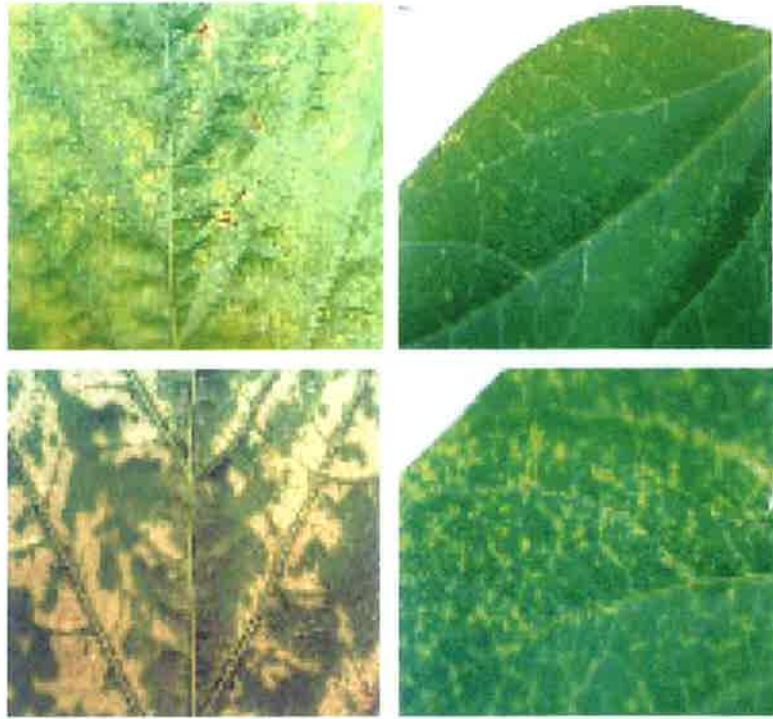


Figure 3-23. 곰팡이를 감염시킨 콩잎에서 관찰할 수 있는 병징. 감염시킨 8주 후부터 작은 노란 반점을 관찰할 수 있으며 이 반점은 시간이 경과할수록 서로 합쳐져 잎 전체를 덮는다.

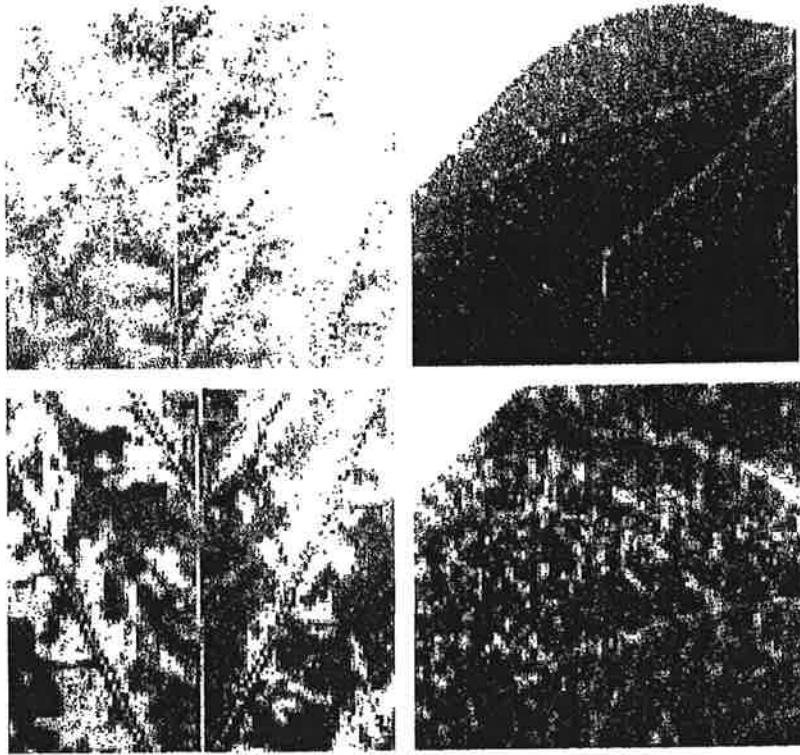


Figure 3-23. 곰팡이를 감염시킨 콩잎에서 관찰할 수 있는 병징. 감염시킨 8주 후부터 작은 노란 반점을 관찰할 수 있으며 이 반점은 시간이 경과할수록 서로 합쳐져 잎 전체를 덮는다.



병징이 유도된 잎에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하고 염기 서열을 분석한 결과 마찬가지로 배 바이러스의 coat protein gene을 detection 할 수 있었다 (Figure 3-24).

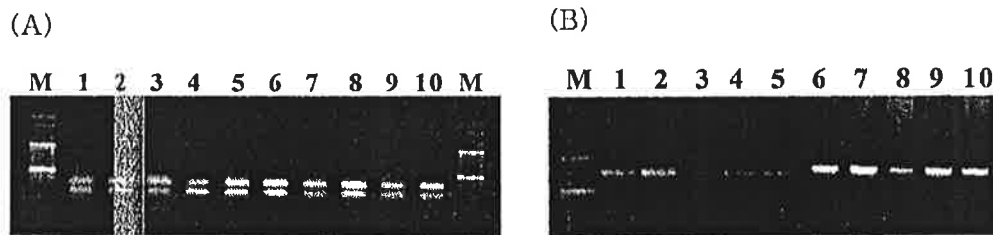


Figure 3-24. 10품종의 콩에 곰팡이를 감염시킨 후 병징이 나타난 잎에서 RT-PCR을 통해 바이러스를 검정. (A) 배 바이러스의 coat protein gene을 검정할 수 있는 primer로 증폭. (B) ASGV와 CTLV를 구분짓는 N-terminal 부분을 검정할 수 있는 primer로 증폭.

배나무에 감염을 시킬 때에는 곰팡이의 단포자체를 분리하고 (Figure 3-25), 배양하여 잎에 주사하는 방법과 흙에 배양액을 주어 뿌리로 감염되도록 하였다. 감염의 기주 식물로 사용한 배나무는 모수에 가지를 이중 접목한 것으로 감염을 3가지 방법으로 나누어 수행하였다. 일부 개체는 아래 가지의 잎에 일부는 위 가지의 잎에 곰팡이를 감염시켜 병징과 바이러스의 이동 양상을 관찰할 수 있도록 하였고, 일부는 잎이 아닌 뿌리에 포자를 배양한 액을 물과 섞어 부어줌으로써 감염이 되도록 하였다.



Cultured single spore      Detection for pear virus

Figure 25. 식물의 조직으로부터 배양한 여러 곰팡이 중에서 분리한 단포자체의 자라는 모습과 RT-PCR을 수행하여 단포자체 내에 바이러스가 존재하는 것을 검정.

감염 후 네 달 정도 경과하면서부터 작은 검은 반점이 나타나기 시작하였다 (Figure 3-26A). 비록 모수에 이병가지를 접목하였을 때처럼 심한 증상이 나타나지는 않았지만 시간이 경과할수록 병징이 조금씩 심해지는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 따라 증상과 부위 별로 나누어 각각의 조직을 취하고 RT-PCR을 수행하여 분석하였는데 실험에 사용한 배나무는 감염시키기 전 RT-PCR 방법으로 바이러스가 없는 것을 확인하였다. 결과를 보면 아래 가지 옆에 감염시킨 개체에는 바이러스가 없는 반면 위 가지 옆에 감염시킨 경우는 바이러스가 존재하는 것을 알 수 있다 (Figure 3-26B).

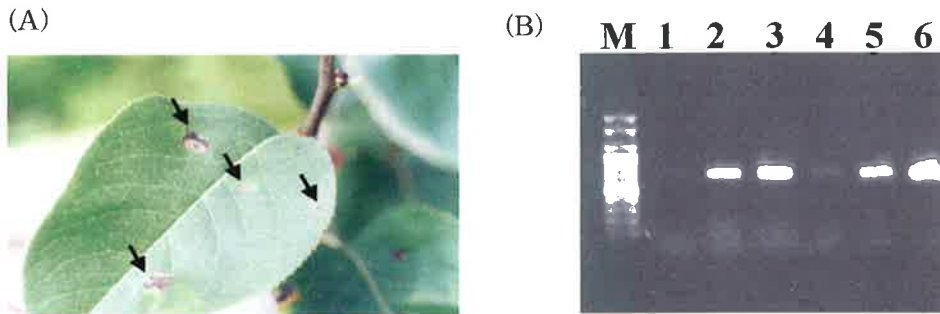


Figure 3-26. (A) 단포자체를 감염시킨 후 나타나는 병징 (B) Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, 배나무의 건전주 ; Lane 2, 감염시킨 위 가지의 잎 ; Lane 3, 감염시킨 위 가지의 잎 근처에서 병징이 나타난 잎 ; Lane 4, 감염시킨 아래 가지의 잎 ; Lane 5, 감염시킨 아래 가지의 잎 근처에서 병징이 나타난 잎 ; Lane 6, 흙을 통해 뿌리에 감염시킨 후 병징이 나타난 잎.

어느 경우에도 감염시킨 부위에서 떨어진 잎 중 병징을 보인 잎에서는 바이러스를 검정할 수 있었고, 흙을 통해 뿌리에 곰팡이를 감염시킨 경우에도 잎에서 병징을 보이며 바이러스를 검정할 수 있었다. 접목에 의한 감염보다는 병징이 심하게 나타나지 않고, 증상을 보이는 잎의 수도 많지는 않지만 곰팡이를 감염시켰을 때 역시 검은 점병과 같은 병징을 관찰할 수 있고 동일한 방법으로 바이러스를 검정할 수 있는 것으로 미루어 분리한 단포자체가 배 바이러스의 운반체일 것으로 생각된다.

감염 후 네 달 정도 경과하면서부터 작은 검은 반점이 나타나기 시작하였다 (Figure 3-26A). 비록 모수에 이병가지를 접목하였을 때처럼 심한 증상이 나타나지는 않았지만 시간이 경과할수록 병징이 조금씩 심해지는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 따라 증상과 부위 별로 나누어 각각의 조직을 취하고 RT-PCR을 수행하여 분석하였는데 실험에 사용한 배나무는 감염시키기 전 RT-PCR 방법으로 바이러스가 없는 것을 확인하였다. 결과를 보면 아래 가지 옆에 감염시킨 개체에는 바이러스가 없는 반면 위 가지 옆에 감염시킨 경우는 바이러스가 존재하는 것을 알 수 있다 (Figure 3-26B).

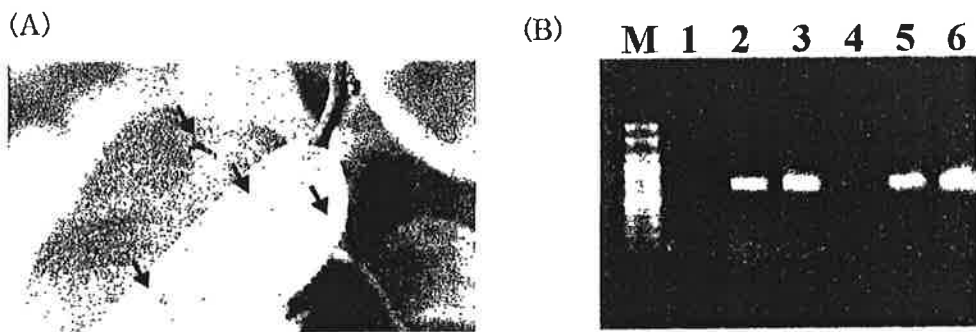


Figure 3-26. (A) 단포자체를 감염시킨 후 나타나는 병징 (B) Lane M, 100 bp DNA ladder ; Lane 1, 배나무의 건전주 ; Lane 2, 감염시킨 위 가지의 잎 ; Lane 3, 감염시킨 위 가지의 잎 근처에서 병징이 나타난 잎 ; Lane 4, 감염시킨 아래 가지의 잎 ; Lane 5, 감염시킨 아래 가지의 잎 근처에서 병징이 나타난 잎 ; Lane 6, 흙을 통해 뿌리에 감염시킨 후 병징이 나타난 잎.

어느 경우에도 감염시킨 부위에서 떨어진 잎 중 병징을 보인 잎에서는 바이러스를 검정할 수 있었고, 흙을 통해 뿌리에 곰팡이를 감염시킨 경우에도 잎에서 병징을 보이며 바이러스를 검정할 수 있었다. 접목에 의한 감염보다는 병징이 심하게 나타나지 않고, 증상을 보이는 잎의 수도 많지는 않지만 곰팡이를 감염시켰을 때 역시 검은 점병과 같은 병징을 관찰할 수 있고 동일한 방법으로 바이러스를 검정할 수 있는 것으로 미루어 분리한 단포자체가 배 바이러스의 운반체일 것으로 생각된다.

#### 다. Characterization of the fungal vector

포장에서 취한 조직을 잘라 PDA 배지 위에서 배양하였기 때문에 다양한 종류의 곰팡이가 배양되었는데 가장 많이 보이는 형태는 하얀 균사체와 노란 균사 덩어리였다 (Figure 3-27).

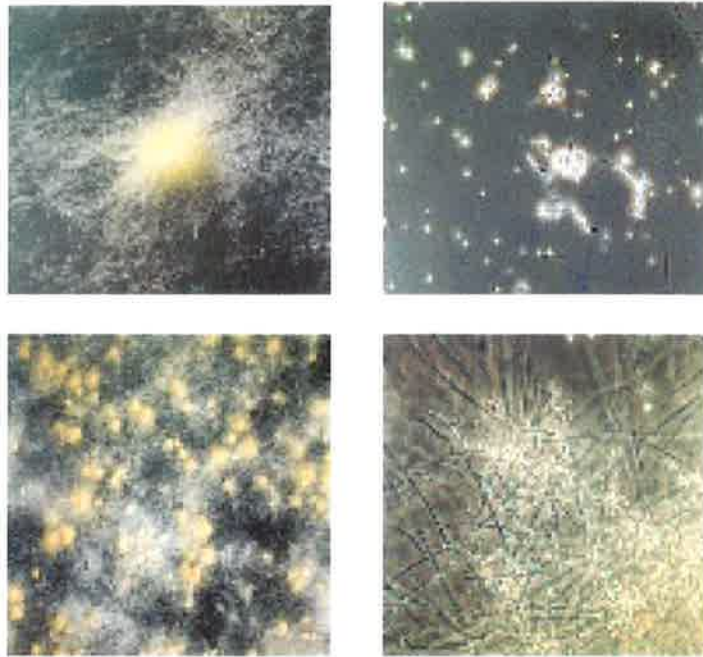


Figure 3-27. Morphological shapes of cultured fungi from plant tissues.

이렇게 배양한 다양한 곰팡이 중에서 배 바이러스를 옮겨주는 운반체를 찾기 위해 가장 많이 보이는 형태의 곰팡이로부터 단포자체를 분리하여 배양하였다. 4주 정도 경과하자 노란 색소를 나타내는 곰팡이가 충분히 자랐고 여기서 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다 (Figure 3-25).

#### 다. Characterization of the fungal vector

포장에서 취한 조직을 잘라 PDA 배지 위에서 배양하였기 때문에 다양한 종류의 곰팡이가 배양되었는데 가장 많이 보이는 형태는 하얀 균사체와 노란 균사 덩어리였다 (Figure 3-27).

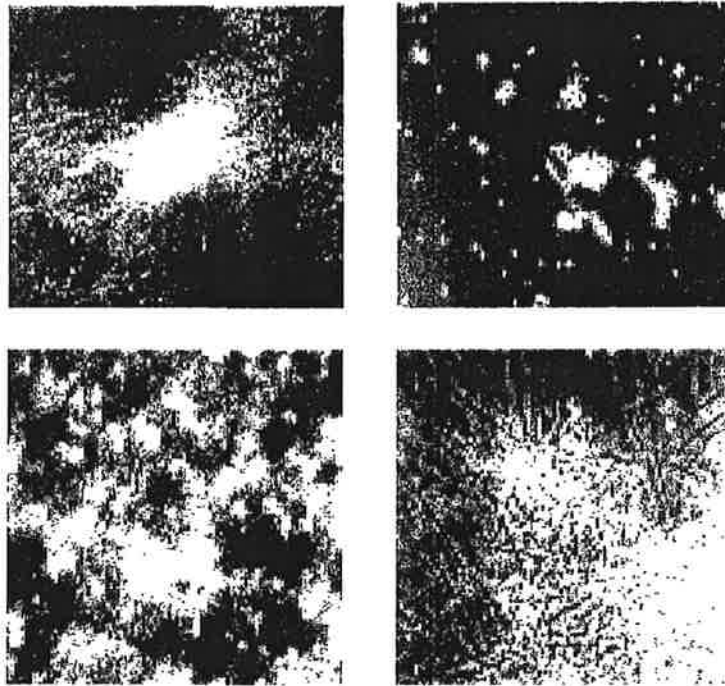


Figure 3-27. Morphological shapes of cultured fungi from plant tissues.

이렇게 배양한 다양한 곰팡이 중에서 배 바이러스를 옮겨주는 운반체를 찾기 위해 가장 많이 보이는 형태의 곰팡이로부터 단포자체를 분리하여 배양하였다. 4주 정도 경과하자 노란 색소를 나타내는 곰팡이가 충분히 자랐고 여기서 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다 (Figure 3-25).

결과 배 바이러스의 coat protein gene을 detection 할 수 있었고 이 곰팡이 안에는 배 바이러스가 포함되어 있는 것으로 생각되어진다. 단포자체로 분리한 곰팡이가 어떤 종류의 균주인지를 확인하기 위해 동정을 의뢰하였는데 agar 배지상에서 자낭과를 쉽게 형성하는 자낭균이며 구형의 자낭을 다수 형성하고 자낭안에는 돌기를 가진 8개의 자낭포자(spiny ascospore)가 들어 있는 *Talaromyces* 부류의 것으로 확인되었다 (Figure 3-28).

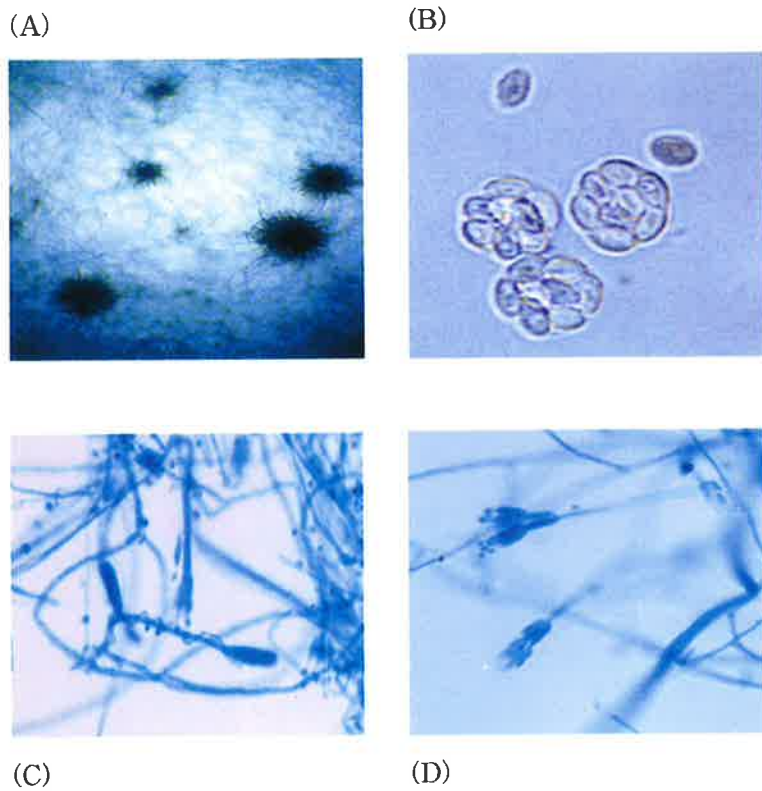


Figure 3-28. 동정균주의 형태적 특징. (A) Agar에서 자낭과(ascmata) (B) 8개의 자낭포자를 가지고 있는 자낭(asci)과 돌기를 가진 자낭포자(ascospore) (C) 자낭과의 형성을 위한 조정기(antheridia)와 조난기(ascogonia)의 발생 (D) 불완전세대 : biverticillate *Penicillium* sp.

결과 배 바이러스의 coat protein gene을 detection 할 수 있었고 이 곰팡이 안에는 배 바이러스가 포함되어 있는 것으로 생각되어진다. 단포자체로 분리한 곰팡이가 어떤 종류의 균주인지를 확인하기 위해 동정을 의뢰하였는데 agar 배지상에서 자낭과를 쉽게 형성하는 자낭균이며 구형의 자낭을 다수 형성하고 자낭안에는 돌기를 가진 8개의 자낭포자(spiny ascospore)가 들어 있는 *Talaromyces* 부류의 것으로 확인되었다 (Figure 3-28).

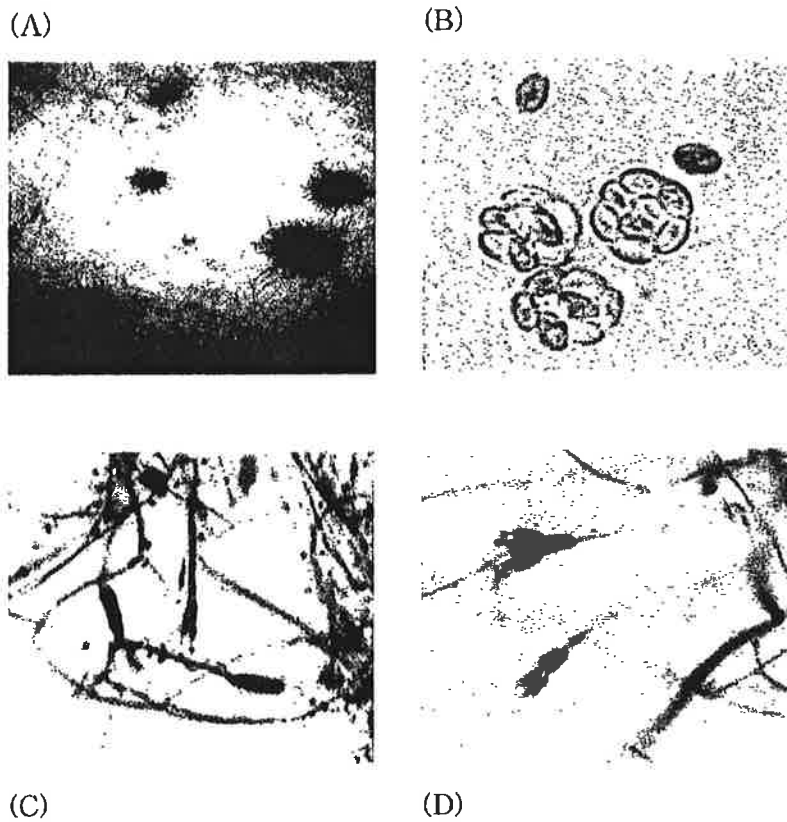


Figure 3-28. 동정균주의 형태적 특징. (A) Agar에서 자낭과(ascomata) (B) 8개의 자낭포자를 가지고 있는 자낭(asci)과 돌기를 가진 자낭포자(ascospore) (C) 자낭과의 형성을 위한 조정기(antheridia)와 조난기(ascogonia)의 발생 (D) 불완전세대 : biverticillate *Penicillium* sp.



자낭과 자낭포자의 크기는 각각  $7-9 \times 7-9 \mu\text{m}$ ,  $4.4-5.6 \times 2.4-3.6 \mu\text{m}$ 로써 *Talaromyces flavus*의 original description과 일치하였다. 특히 곤봉형의 조난기와 이를 감싸고 있는 조정기는 *Talaromyces flavus*의 고유한 특징인데 그림 27-C에서와 같이 자주 관찰되었다. 이 균주는  $4^\circ\text{C}$ 에서는 성장하지 않았고  $25, 37^\circ\text{C}$ 에서는 생장이 활발하였다. 그리고 이 종의 불완전 세대는 biverticillate *Penicillium* sp. (그림 3-28D)였다. 또한 ribosomal DNA ITS 영역의 염기서열 분석 결과 기보고된 *Talaromyces flavus* (GenBank U18354)와 98%의 염기서열 상동성을 보였다. 따라서 이 종은 *Talaromyces flavus*의 종범주에 속한다. 현재 배양한 단포자체와 같은 group에 속하는 몇 가지 다른 균주를 분양 받아 비교 분석하는 연구를 수행 중이다.

## 제 4 절. 직 요

본 연구에서는 매나무 검은 점병의 원인이 되는 바이러스에 대한 연구를 통해 이를 효과적으로 진단할 수 있는 체계를 갖추도록 하였다. 면역학적인 방법으로는 바이러스의 coat protein에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하여 진단이 가능하도록 하였다. 배 바이러스는 이와 매우 유사한 엽기서열 구조를 갖는 다양한 strain이 같은 group 내에 존재하기 때문에 정확한 진단을 위해서는 일부 특정 부위를 증폭하여 분석할 필요가 있다. 따라서 이를 위한 primer sets를 준비하였다. 이러한 진단 체계를 이용하여 시기와 증상에 따라 다르게 나타나는 병징을 분석하였다. 현재까지 배 바이러스를 포함한 capillovirus group은 접목과 즙액접종을 통해서만 전이되는 것으로 알려져 있었으나 본 연구를 수행하는 과정에서 배 바이러스를 매개하는 운반체가 존재할 가능성을 찾게 되었다. 바이러스에 의한 식물병은 근본적인 치료가 불가능하여 진단보다 방제가 중요하기 때문에 바이러스를 매개하는 운반체의 발견은 방제를 위한 새로운 대안이 될 수 있다. 이들을 요약하면 다음과 같다.

1. 매나무 검은 점병의 원인이 되는 바이러스를 진단할 수 있는 항체를 제작하기 위해 바이러스의 coat protein gene을 클로닝하고, 이를 *E. coli*에서 대량 발현시킨 후 정제 과정을 거쳐 항원으로 준비하였다.
2. 항원으로 준비한 바이러스의 coat protein을 실험 동물 면역 실험을 실시하여 특이적인 항체를 생산하였다.
3. 배 바이러스를 진단할 수 있도록 제작한 특이적인 항체를 기존에 제작된 ASGV, CTLV에 대한 항체와 비교하기 위해 protein gel blot analysis를 수행하였다. 배 바이러스가 속한 capillovirus group의 strains는 모두 coat protein이 매우 유사한데 protein gel blot analysis 결과 제작한 항체와 기존의 항체 모두에 반응하는 것을 알 수 있었다.

4. 항체를 이용한 진단 결과 병징이 나타나지 않은 어린 잎에 보다 많은 바이러스가 존재함을 알 수 있었고 꽃잎에서는 적은 양의 조직을 이용하여 진단이 가능하였다. 또한 건전 주 식물에서도 바이러스가 검정되었는데 많은 경우 잠재적으로 바이러스가 존재함을 알 수 있었다.
5. 번역학적인 방법에 의한 진단 방법을 보완하기 위해 다양한 primer sets를 제작하였다. 배 바이러스를 비롯한 capillovirus group의 strains는 genome 전체 구조가 매우 유사하지만 일정하게 변이가 있는 부위가 있다 (aa positions 516-680 and 1585-1868). 제작한 primer sets는 이들 변이 부위를 증폭하여 분석이 가능하다.
6. 제작한 primer를 이용하여 변이 부위를 증폭하고 염기서열과 amino acid 서열을 분석한 결과 배 바이러스는 같은 capillovirus group에 속하는 ASGV보다 CTLV와 유사한 것으로 나타났다.
7. 접목이나 수액접종 외에 배 바이러스를 매개하는 곰팡이 운반체가 존재하는 것을 알 수 있었다. 배나무 조직으로부터 배양한 곰팡이에서 배 바이러스의 coat protein gene을 클로닝하였고 염기서열을 분석하여 동일한 바이러스임을 밝혔다.
8. 분리한 곰팡이를 초본식물과 이중접목을 시킨 배나무에 각각 인위적으로 감염시킨 결과 검은 점병과 유사한 병징을 관찰할 수 있었고, 식물 조직과 여기에서 배양한 곰팡이 각각에서 제작한 primer를 이용하여 배 바이러스를 검정할 수 있었다.
9. 배양한 곰팡이 가운데 단일포자를 분리하여 배양한 후 제작한 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 배 바이러스의 coat protein gene을 클로닝하였다.
10. 배 바이러스의 운반체로 보여지는 곰팡이를 동정한 결과 *Talaromyces flavus*의 original description과 일치하였다 (농업과학기술원 분자유전과 농용미생물 보존센터에 동정을 의뢰하였다).

## 제 5 절. 참 고 문 헌

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

Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Moscovitez, M., Purcifull, D. E., Clark, M. F., and Loebenstein, D. (1979) The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-194

Brlansky, R. H., Lee, R. F., and Garnsey, S. M. (1988) In situ immunofluorescence for the detection of citrus tristeza virus inclusion bodies. *Plant Dis.* 72:1039-1041

Campbell, R. N. (1996) Fungal transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:87-108

Clffin, R. S. and Coutts, R. H. A. (1993) The closteroviruses, capilloviruses and other similar viruses : a short review. *J. Gen. Virol.* 74:1475-1483

Davis, J. W. and Hull, R. (1982) Genome expression of plant positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol.* 61:1-14

Dragoljub D. Sutic, Richard E. Ford and Malisa T. Tomic (1999) Hand book of plant virus diseases. CRC press.

German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J. C., Pernollet, J. C. and Dunez, J. (1990) Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology* 179:104-112

Guerri, J., Moreno, P., and Lee, R. F. (1990) Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology* 80:692-698

Hideki Osaki, Yoshihiko Sato and Akira Kudo. (1998) Seed- and pollen-transmitted double-stranded RNAs detected from Japanese pear. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64:110-115

Hollings, M. (1962) Viruses associated with a die back diseases of cultivated mushrooms. *Nature* 196:962-965

Hollings, M. (1982) Mycoviruses and plant pathology. *Plant Dis.* 66(12):1106-1112.

Jelkmann, W. (1995) Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *J. Gen. Virol.* 76:2015-2024

Jesus Navas-Castillo, Maria R. Albiach-Marti, Siddarama Gowda, Mark E. Hilf (1997) Kinetics of accumulation of Citrus tristeza virus RNAs. *Virology* 228:92-97

Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S. (1997) *Compendium of Apple and Pear Diseases.* APS press

Kim, K. H. (1999) Recent development in detection and identification of fruit tree viruses. *Plant Pathol. J.* 15(4):199-209.

Kishi, K., Takanashi, K. and Ahiko, K. (1976) Pear necrotic spot, new virus diseases in Japan. *Acta Horticulure* 67: 260- 273

Koonin, E. V., Choi, G. H., Nuss, D. L., Shapira, R., and Carrington, J. C. (1991)

Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-strand RNA plant viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:10647-10651

Lee, R. F., Calver, L. A., Nagel, J., and Hubbard, J. D. (1988) Citrus tristeza virus: Characterization of coat proteins. Phytopathology 78:1221-1226

Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., and Miyakawa, T. (1997) Molecular variability of the genome of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. Phytopathology 87:389-396

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis A. W. Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D., eds. (1995) Virus taxonomy: 6th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. Suppl. 10

Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Gumpf, D. J., Lee, R. F., and Garnsey, S. M. (1995) Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli*: Application for immunodiagnosis. Phytopathology 85:691-694

Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Lee, R. F., and Garnsey, S. M. (1998) Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. Plant Dis. 82:1276-1280

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

Pappu, H. R., Pappu, S. S., Manjunath, K. L., Lee, R. F. and Niblett, C. L. (1993) Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3641-3644

Pormar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J., and Lee, R. F. (1990) A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80:2224-228

Rosner, A., Lee, R. F., and Bar-Joseph, M. (1986) Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 76:820-824

Semancik, J. S. and Weather, L. G. (1965) Partial purification of a mechanically transmissible virus associated with tatter leaf of citrus. *Phytopathology* 55:1354-1358

Timmer, L. W., Garnsey, S. M. and Graham, J. H. (2000) *Compendium of Citrus Diseases*. APS press. 2nd edition.

Wallace, J. M. and Drake, R. J. (1962) Tatter leaf, a previously undescribed virus effect on citrus. *Plant Dis. Rep.* 46:211-212

Yoshikawa, N. and Takahashi, T. (1988) Properties of RNAs and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot viruses. *J. Gen. Virol.* 69:241-245

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. and Takahashi, T. (1992) Evidence for translation of apple stem grooving capillovirus genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 73:1313-1315

Yoshikawa, N., Imaizumi, M., Takahashi, T. and Inouye, N (1993) Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organizing of citrus tatter leaf and apple stem grooving capilloviruses. *J. Gen. Virol.* 74:2743-2747

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

Yoshikawa N, Iida H, Goto S, Magome H, Takahashi T. and Terai Y. (1997) Grapevine berry inner necrosis, a new trichovirus: comparative studies with several known trichoviruses. Arch Virol. 142:1351-1363

Yoshikawa, N., and Takahashi, T. (1998) Properties of RNAs and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot viruses. J. Gen. Virol. 69:241-245.

Youjian Lin, Phyllis A. Rundell, Lianhui Xie, and Charles A. Powell (2000) In situ immunoassay for detection of citrus tristeza virus. Plant Disease 84:937-940

남기웅 (1996) II. 배의 병과 방제 배나무잎 검은점병 (구:이상반점증상)

최용문 (1998) 과수의 바이러스병. 植物바이러스學論考. 147-163.



## 제 4 장. 전자현미경을 이용한 바이러스의 동정 (협동 과제)

### 제 1 절 시 설

바이러스의 검정은 최근 분자생물학적인 방법이 도입되어 PCR, RT-PCR 및 항체를 이용한 ELISA 방법 등이 많이 사용되고는 있으나 바이러스의 동정을 위해서는 전자현미경을 이용한 형태학적인 분석이 아직도 많이 사용되고 있다. 바이러스의 입자를 확인하기 위해 개발된 즙액검정법은 식물 바이러스를 전자현미경으로 진단, 신속하게 직접 관찰하는 방법이다. 감염된 식물에서 추출한 즙액에 섞여 있는 바이러스를 지지막을 입힌 그리드에 흡착시켜 negative staining 한 후 바로 관찰하는 방법이다. 따라서 숙련된 기술과 고가의 장비 및 복잡한 시료제작이 필요한 ultrathin section에 의한 관찰보다는 많은 시료를 신속하게 관찰 할 수 있는 장점이 있다. Negative staining 법은 보고자 하는 시료를 직접 염색하는 대신 시료의 주변을 염색하여 나타나는 형태를 관찰하는 방법이다. Leaf dip 방법에 비하여 복잡한 과정이 필요하나 바이러스 추출에 매우 효과적인 homogenization 방법은 식물 조직을 완충용액과 함께 적절히 갈아서 다양한 centrifugation 방법으로 바이러스를 추출하는 방법이다. 과수의 경우는 특히 세포내에 고농도의 당류가 포함되어 있고 polyphenolic compounds가 함유되어 있어 바이러스의 추출 및 순화가 어렵다. 이러한 이유에서 과수 바이러스의 순화 및 동정에 관한 연구는 대부분 바이러스를 과수 조직에서 직접 분리하지 않고 다른 지표식물 및 초본성 식물에 이병하여 바이러스를 증식한 다음 순화하는 과정을 거친다.

본 과제에서는 바이러스 증식을 효율적으로 하기 위해 개발한 배나무 지표식물 PS-95와 바이러스의 순화를 용이하게 하기 위하여 새로운 초본성 지표식물을 선발하였다. PS-95와 명아주에 접목접종 및 즙액접종하여 나타난 증상으로부터 시료를 채취, 전자현미경을 사용하여 세포병리학적으로 면밀히 관찰한 결과 이 배나무 검은점병은 capillovirus group에 속하는 것으로 확인되었다.

## 제 2 절. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

바이러스의 증식과 검정을 위하여 신고 배와 indicator plant로는 신고와 조생적 16-2-2를 교배한 배를 사용한다. 또한 바이러스에 감염된 지표식물 주위에 식재한 배 품종의 바이러스 감염도 여부를 조사하기 위하여 16 품종의 배를 사용하였다.

### 2. 바이러스의 채집 및 생물검정

배나무잎 검은점병 유도 바이러스는 바이러스 감염증상이 나타나기 시작하는 시점인 5월 말부터 6월 전후로 경기지역의 배 과수원과 원예연구소에서 각각의 시료를 채취하고 품종, 병중 및 부위별로 격리하여 저온 저장하였다. 생물검정에 사용하는 배 바이러스는 교배에 의하여 새롭게 육종한 지표식물과 신고를 이용하여 바이러스의 증식 및 검증에 이용하였다.

### 3. 바이러스 분리 및 증식

#### 가. 바이러스의 채집 및 생물검정

배나무잎 검은점병 유도 바이러스는 바이러스 감염증상이 나타나기 시작하는 시점인 6월 선후로 경기지역과 충청 및 남도의 배 과수원과 원예연구소에서 각각의 시료를 채취하고 품종, 병중 및 부위별로 격리하여 저온 저장하며, 이를 접종, 검정 및 분리 등 세반 실험에 사용하였다. 생물검정에 사용하는 배 바이러스는 교배에 의하여 새롭게 육종한 지표식물과 신고를 이용하여 바이러스의 증식 및 검증에 이용하였다.

#### 나. 바이러스 분리 및 증식

바이러스의 분리는 지표식물에 나타난 국부병반을 3차 단일 국부병반 분리법에 의해 수행한다. 바이러스 병증의 유도 및 증식은 바이러스의 특성상 물리적인 방법으로는 전이가 없으므로 지표식물에 접촉 방법을 이용하여 접종한다.

#### 다. 바이러스 순화

앞서 재취한 재료에서 다음과 같은 방법을 사용하여 바이러스를 순화하였다 (Figure 4-1). 바이러스를 순화하기 위한 원심분리 속도와 시간은 바이러스 분리 과정에 따라 약간의 변화를 주었다.

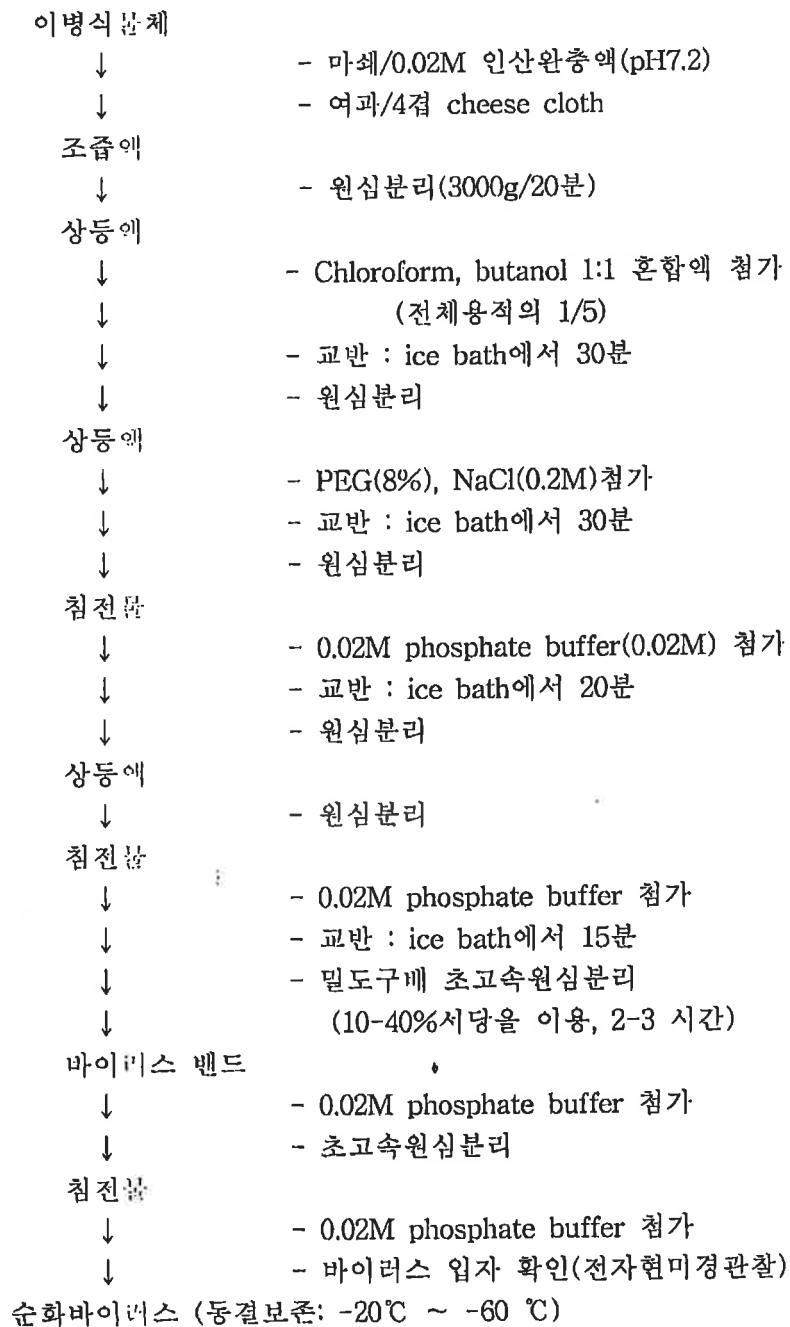


Figure 4-1. 바이러스의 순화과정

#### 4. 바이러스 관찰

부분적으로 순화한 바이러스 입자의 관찰은 homogenization 방법을 사용하였고, 2% PTA (phosphotungstic acid, pH 7.0)로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

### 제 3 절. 결과 및 고찰

#### 1. 바이러스의 증식을 위한 기주식물의 개발 및 품종별 바이러스 감염도 선발

수원 일대 농가와 농진청 소재 배 과수원 포장에서 잎에 반점증상과 과일의 유과에 검은 반점이 나타났다가 수확기에는 흔적만 남은 이병주에서 분리된 바이러스를 공시하였다. 배는 신고 15-16년생 나무에 병징이 나타나지 않은 균청조생을 수분수로 고접한 결과 병징이 나타난 이병주며 대부분의 품종에 잠복감염되는 것으로 알려져 왔다. 배 잎으로부터 바이러스를 분리하기가 어려워 아직까지 시도되지 않은 방법으로 바이러스에 감염된 배 잎을 즙액접종에 사용하였다. 기주식물은 이제까지 바이러스 연구에 많이 사용된 식물을 사용하였다. 즙액접종은 어린잎을 채집하여 0.01M pH7.2 인산 완충액에 2% Nicotine을 첨가한 포함된 완충액에 마쇄하여 12종의 지표식물에 600mesh Carborundum을 뿌린 후 솥으로 즙액을 흡수하여 분질러 주어서 접종하였다. 접종결과 *Chenopodium quinoa*에 접종엽에 황색 국부병반이 접종후 약 일주일후에 나타났으며 상엽에 노란반점이 나타났다 (그림 1). 그밖에 바이러스의 즙액접종을 시도한 독말풀, *Nicotiana xhathi*, *N. occidentalis*, 땅파리, 시금치, 오이, 완두, 콩, 동부, 토마토, *Cucurbita moschata*에서는 병징이 나타나지 않았다 (Table 1).

Table 1. 배나무잎 검은 점병 바이러스에 대한 새로운 기주식물의 개발을 위한 병증 및 바이러스 입자 분리

기주식물	병증	바이러스 입자 확인
<i>Chenopodium quinoa</i>	O	O
독말풀	X	X
<i>Nicotiana tobacum</i> Xanthi	X	X
<i>N. occidentalis</i>	X	X
땅파리	X	X
시금치	X	X
오이	X	X
완두	X	X
콩	X	X
동부	X	X
토마토	X	X
<i>Cucurbita moschata</i>	X	X

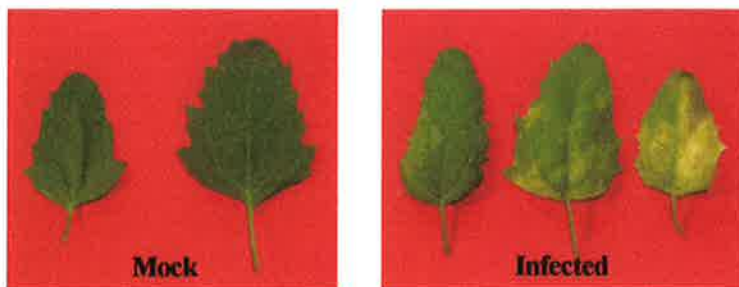


Figure 4-2. 명아주에서 나타난 바이러스 감염증상. 정상 명아주 (좌), 신고 배 검은점병에 감염된 배 잎의 즙액을 이용하여 접종한 명아주에서 노란 반점과 잎이 뒤틀리는 증상이 나타남을 보인다 (우).

Table 1. 배나무잎 검은 점병 바이러스에 대한 새로운 기주식물의 개발을 위한 병증 및 바이러스 입자 분리

기주식물	병증	바이러스 입자 확인
<i>Chenopodium quinoa</i>	O	O
독말풀	X	X
<i>Nicotiana tobacum</i> Xanthi	X	X
<i>N. occidentalis</i>	X	X
땅파리	X	X
시금치	X	X
오이	X	X
완두	X	X
콩	X	X
동부	X	X
토마토	X	X
<i>Cucurbita moschata</i>	X	X

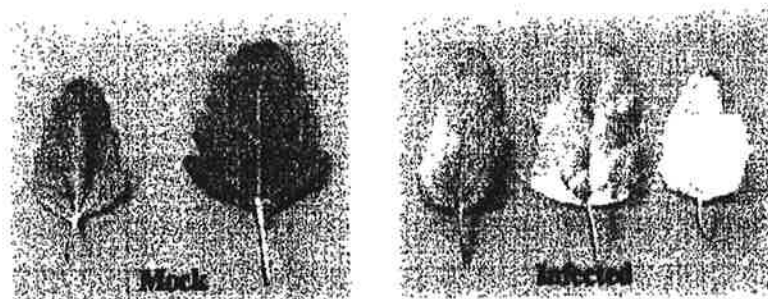


Figure 4-2. 명아주에서 나타난 바이러스 감염증상. 정상 명아주 (좌), 신고 배 검은점병에 감염된 배 잎의 즙액을 이용하여 접종한 명아주에서 노란 반점과 잎이 뒤틀리는 증상이 나타남을 보인다 (우).



## 2. 바이러스의 순화

*C. quinoa*에서 병징이 나타난 것을 *C. quinoa*에 다시 재접종하여 감염여부를 재 확인하였다. 바이러스를 순화하기 위하여 *C. quinoa* 병징이 뚜렷한 상위엽을 채집하여 2배의 0.01M Tris/HCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.001M pH7.6 완충액에 마쇄하여 Bentonite와 PEG 처리 및 고속과 초고속의 원심분리를 반복하여 바이러스를 정제한 후 10-40% Sucrose gradient에 22,500rpm에 120분간 원심하여 ISCO density gradient fractionater에 의하여 분획하여 흡광도를 조사하여 바이러스의 침강대를 분리하였다 (Figure 4-3). 분리결과 meniscus로부터 부분에 band가 형성되었으며 band를 투석하여 전자현미경에 의한 입자를 관찰하기 위하여 uranyl acetate에 의하여 염색하여 조사하였다. 바이러스의 물리성을 조사하기 위하여 인산완충액 0.01M pH 7.2에 Nicotine 2%를 첨가한 완충액에 *C. quinoa* 상위엽을 20배(w/v)로 희석 마쇄하여 조사하였다. 내희석성은 10,000배이었으며 내열성은 60~65℃이었고 내보존성은 20℃에서 2일, 4℃에서 9일이었다.

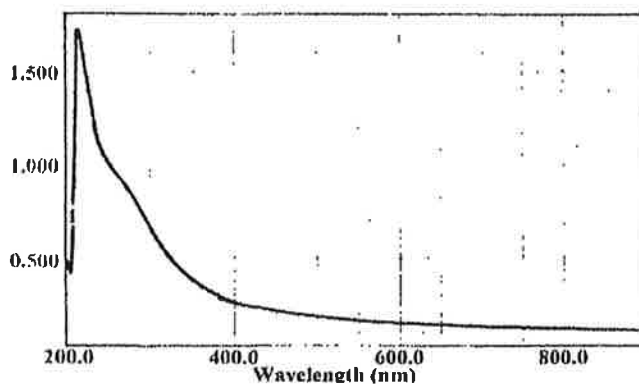


Figure 4-3. 바이러스 정성 분석을 위한 흡광도 측정

### 3. 바이러스의 분리 및 동정

바이러스 입자의 관찰은 homogenization 방법을 사용하였고, 2% PTA (phosphotungstic acid, pH 7.0)로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다. 바이러스의 순화여부 및 입자 모양을 확인하기 위해 실시한 실험에 의하면 배 잎에 내재한 이차대사산물이 많아 바이러스를 순화하기가 어려웠고, capillovirus의 특성상 완전한 형태를 보여주는 바이러스를 관찰할 수 없었다. 배 잎에는 다른 식물조직과 비교하였을 때 polyphenolic compounds, tanic acid 및 여러종류의 polysaccharide가 많아 바이러스 분리용 완충용액을 사용하여 원심분리하면 상층액이 흑갈변하며 점성이 매우 강해, 이들 점성물질들로부터 바이러스를 분리시키기가 어려웠다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 바이러스에 감염된 지표식물의 잎과 꽃 잎에서 바이러스를 분리하여 전자현미경으로 관찰하였을 때 일부 굴곡성 사상형 capillovirus의 형태를 보여주는 virus particle이 관찰되었다 (Figure 4-4). 이는 전년도에 부분적으로 분리된 바이러스의 외부 형태에 의해 clesterovirus라고 분류되었지만 완전한 바이러스의 형태를 보여주지 못하여 clesterovirus라고 단정하지 못했던 것을 올해는 완전한 형태의 바이러스를 분리할 수 있어서 이 바이러스가 clesterovirus group에 속한다기 보다는 capillovirus group에 속한다는 것을 알 수 있었다. 또한 25만배로 확대하여 관찰한 바이러스의 형태를 보면 capillovirus의 전형적인 나선형의 capsid의 외부형태를 보여주며 대부분 길이가 550-650nm이며 폭이 13nm인 사상의 바이러스 입자가 관찰되었고 입자의 표피 단백질 subunit가 capillovirus형의 나선형으로 배열되어 있는 것으로 보아 이 바이러스가 일반적으로 과수 바이러스에 많은 문제를 일으키는 대표적인 바이러스 group인 capillovirus임을 입증하여 주었다 (Figure 4-4, Figure 4-5).

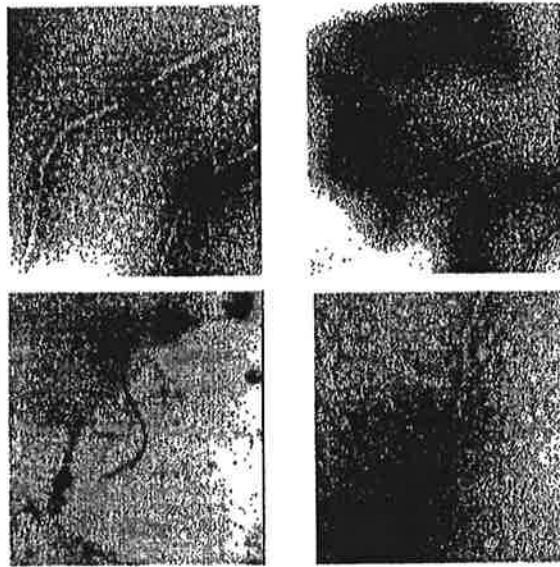


Figure 4-4. ㄷ 꽃잎에서 분리한 바이러스 입자.

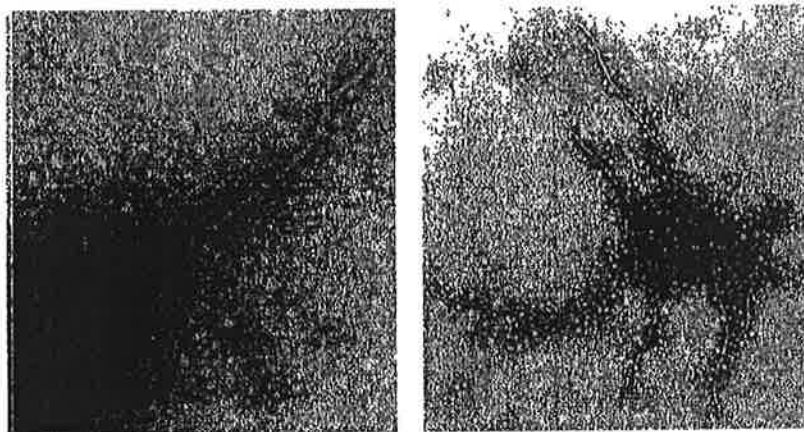


Figure 4-5. ㄷ아주에 즙액을 접종하여 증식한 바이러스 입자. 전형적인 굴곡형의 사상 바이러스의 특징으로 보여주며 특징적인 나선형 사슬이 관찰.

배 조직내에서 바이러스 입자 관찰은 남 (1996)등의 연구에 의해서 보고되었다. 이 보고에 의하면 굴곡형 사상형의 바이러스 입자가 핵 가까이에 크고 작은 집단으로 정렬하고 있고 입자집단을 횡으로 잘라보면 원형의 작은 입자의 밀집군으로 관찰되었다. 남 등은 이 입자의 직경이 약 12 nm 임을 확인하였으나 길이는 확인하지 못하였다. 이러한 굴곡형이며 사상형 바이러스는 일반적으로 4개의 그룹에 속하는데 형태학적인 측면에서 closterovirus group에 속한다고 보고하였으나 본 과제에서 순화한 바이러스의 전자 형태학적인 결과에 의하면 이는 capillovirus 속하는 것으로 보여진다. 이러한 연구 결과는 이들 바이러스의 유전자 분석 결과에서도 배 검은점병 바이러스의 coat protein 및 viral genome 분석에서도 capillovirus group에 속하는 것으로 조사되었다.

## 제 4 절. 적 요

본 연구에서는 배 검은점병 바이러스의 증식, 순화 및 동정을 하여 배 검은 점병의 원인 균을 확인하고 제 1, 2 세부과제의 연구 결과를 토대로 진단법을 개발하고자 하였다. 3차 년도에 걸쳐 수행한 연구 결과는 다음과 같다.

1. 12종의 지표식물에 배 검은점병에 이병된 지표식물의 즙액을 접종한 결과 바이러스가 효과적으로 이병되고 병증이 나타나면 순화가 가능한 *Chenopodium quinoa*를 선발하였다.
2. 선발한 *Chenopodium quinoa*로부터 배 검은점병 바이러스를 분리·정제하였다.
3. 분리·정제한 바이러스 입자를 전자현미경을 통하여 검경하였으며 그 결과 굴곡형이며 사상형인 바이러스 입자를 관찰하였다.
4. 전자현미경 관찰 결과 이 바이러스는 *Capillovirus group*에 속하는 바이러스임을 확인하였다.

## 제 5 절. 참 고 문 헌

Chung, YR., Brenner, DJ. Steigerwalt, AG., Kim, BS., Kim, HT and Cho, KY. 1993. *Enterobacter pyrinus* sp. nov, an organism associated with brown leaf spot disease of pear trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 157-161.

Yanase, H., Koganezawa, H. and Fridlund, P.R. 1988. Corelation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting, and a flexible filamentous associated with tehm. *Acta Horticulture* 235: 157-163.

기운계, 박서기, 조백호, 김기청. 1984. 배나무 검은 무늬병균의 병원성 분화와 저항성품종의 이병화. *한식보호지* 23: 7-14.

남기웅, 김충희. 1994. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 1. 발생상황과 피해. *한식병지*.10(3): 169-174.

남기웅, 김충희. 1995. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 3. 방원의 접목 전염. *한식병지*. 11(3): 217-223.

남기웅, 김충희, 황해성. 1996. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 5. 목본 지표식물 선발. *한식병지*. 12(2): 214-218.

박종성, 유승현. 1988. 배 검은무늬병균이 생성하는 AK 독소에 대한 배 품종의 감수성 진단. *충남대 농업기술연구보고*. 15: 1-8.

홍경희, 김용석, 김희선, 김정배, 이운직, 이은중, 조원대, 조의규, 1985. 배잎의 이상반점증상에 관한 연구. *농시논문집 (원예)* 27(2):46-55.