

주요 박과작물에서 오이 녹반 모자이크 바이러스의 유전자 검정 및 방제법 개발

류기현 · 장매희 · 박혜원 · 민병은 · 정소영 · 최선희

(서울여자대학교 원예학과 식물바이러스유전자은행)

Molecular detection and control of cucumber green mottle mosaic virus in Cucurbitaceae crop plants

Ki-Hyun Ryu · Mae-Hee Chiang · Hye-Won Park · Byung-Eun Min · So-Young Chung · Sun-Hee Choi

Plant Virus GenBank, Dept. of Horticultural Science, Seoul Women's University

적 요

오이 녹반 모자이크 바이러스(cucumber green mottle mosaic virus; CGMMV)의 신속하고 정확한 유전자 검정법을 개발하기 위하여 CGMMV 두 계통(CGMMV-Y, CGMMV-NS1)을 이병식물체로부터 생물학적으로 순수 분리하였으며, 이를 기주식물에 접종하여 바이러스를 증식하였다. 증식시킨 감염식물체로부터 원심분리법과 PEG 침전법을 사용하여 바이러스 particle을 순수 정제하였으며, 이를 유전자 진단 및 유전자 분석, 그리고 전자전염시험의 재료로 이용하였다. RT-PCR법을 사용하여 바이러스의 유전자 진단을 개발하였다. 유전자 진단은 CGMMV 염기서열을 결정하여 CGMMV 외피단백질(coat protein; CP)과 이동단백질(movement protein; MP) 부분을 사용하여 각각 한 쌍의 primer를 제작하였으며, 제작된 primer를 사용하여 CGMMV를 유전자 진단한 결과, 10fg까지 바이러스를 검정 가능하였다. 이는 기존의 혈청학적 방법과 비교시 10³배 이상 민감하고 정확하게 CGMMV를 진단할 수 있는 방법임이 확인되었다. CGMMV의 분자생물학적 계통다양성 분석을 위하여 CGMMV-Y 및 CGMMV-NS1 두 계통 바이러스의 유전자 염기서열을 사용하여 실시하였다. 이들 두 국내에서 분리된 CGMMV 계통들과 외국에서 보고된 다른 두 계통들과 상동성을 비교한 결과 CP 및 MP 유전자 부위는 98.2%~100.0%의 높은 염기서열 상동성을 보여 주었다. 본 결과는 다른 tobamovirus에서의 각 계통비교와 유사한 경향을 보이고 있으며, 병리학적 성질과 함께 국내 분리계통인 이들 두 계통은 유전적 특성이 기존의 CGMMV와 유사하게 조사되었다.

1. 서론

오이 녹반 모자이크 바이러스(Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)는 cucumber virus 4(CV4)로 처음 보고 되었으며(Ainsworth, 1935), 그 후 독일, 오스트레일리아, 덴마크, 인도에서 발생하였

고 일본에서는 1971년 발병이 확인된 병이다(Hollings et al., 1975). 우리나라에서는 1989년 함안, 진주지역에서 발생이 확인되었고, 수박에서 처음으로 보고된 병으로(Lee et al., 1990), 1998년에는 전국적으로 5개도, 25개 시군, 949농가, 408ha에서 발병되어 피해가 매우 심했다. 이 바이러스는 불활성화 온도가 90°C 매우 안전성이 높으며, 종자, 토양 및 즙액전염을 하는데

그 중에서 농업적 측면에서 경제적으로 가장 큰 비중을 차지하는 것은 종자전염으로 수박종자 및 대목의 박 종자이다. 수박에서 피해증상 앞에서 선명한 담황색의 모자이크 병반을 나타내고 과실에는 꼭지 부분이 검게 변하여 탄저 증상을 나타내며 종자주변이 적자색 수침상으로 되고 과육내에 황색섬유가 많이 나타나는 'konnyaku' 증상을 나타낸다(Hollings et al., 1975).

CGMMV는 (+) 단일가닥의 RNA를 게놈으로 하는 tobamovirus 그룹의 한 종으로서 CGMMV-SH 계통의 경우 6421nucleotides로 이루어져 있으며, 유전자는 129kD/186kDa은 복제와 관계되는 단백질이며, 30kDa은 이동단백질, 그리고 17.3kDa은 외피단백질로서 이동단백질 유전자는 17.3kDa과 186kDa 단백질 유전자와 일부 overlapping되어 있다(Hollings et al., 1975; Ugaki et al., 1991).

일본에서는 CGMMV-SH 계통외에 오이로부터 CGMMV-C가 분리되었고, 수박에서는 CGMMV-W와 CGMMV-Y가 각각 다른 계통으로 분류되었다(Hollings et al., 1975; Ugaki et al., 1991).

본 연구의 목적은 수박, 메론 및 호박 등 우리나라 주요 박과작물에서 큰 경제적 피해를 주는 오이 녹반 모자이크 바이러스의 신속하고 정확한 유전자 검정법과 방제법 개발에 있다. 수박 및 메론은 우리나라 농가의 주요 소득원이 되는 특화작물로서 과채류 중에서 생산량이 가장 많으며, 특히 국민의 소득증가와 생활수준이 향상되면서 계절에 관계없이 수요가 증가하여 연중 시설재배가 되고 있다. 그러나, 이들 박과작물을 연작 재배하게 되면서부터 이에 따른 생리적 장애나 각종 병해충에 의한 피해가 점차 증가 추세에 있는 실정이다. 최근 WTO 출범과 더불어 자유무역주의에 입각하여 각종 농산물들이 수입개방정책에 따라 외국으로부터 국내로 대량 수입되고 있다. 특히 원예작물의 수입량이 빠른 속도로 증가추세에 있으며, 내수뿐만 아니라 수출유망작물들을 막대한 외화를 들여 구근과 유묘를 수입하지만 국내 유입후 재배시기가 2~3년이 경과한 후부터는 각종 바이러스로 인하여 재차 수입이 불가피하므로 막대한 외화를 낭비하는 악순환이 거듭되고 있다.

이러한 문제의 해결은 실로 국가적인 문제이다. 그러나 대부분의 식물에 피해를 주는 바이러스는 국내의 토착 병원체보다는 외국에서 도래되는 것이 많기 때문에 국내에서는 이들 바이러스의 종류나 특성이 미처 파악되지 못한 경우가 있으며, 더욱이 새로운 외래병원 바이러스의 유입은 국내 자생 식물자원에도 치명적인 영향을 초래할 잠재적인 위험성 또한 크다고 할 수 있다. 현재 식물병원균 중 바이러스는 화훼류와 채소류에서 심각한 피해를 주고 있으며, 특히 곱팡이나 세균 등의 병원균과는 달리 식물체가 일단 바이러스에 감염되면 방제나 치료할 농약이 개발되지 않은 현실에서는 농약을 사용하는 화학적인 방제가 불가능하다. 더욱이 영양번식을 하는 식물체들에서는 바이러스의 피해가 당대는 물론 후대에게까지 증폭되어 품종의 퇴화 등 지속적인 악영향을 끼친다. 전세계적으로 주요 바이러스에 대한 진단시약의 개발은 이들 바이러스의 조기진단을 통한 무병주의 선발에 필수요건이기 때문에 본 연구과제를 통해 창출되는 바이러스 진단법 개발은 국내외 종자회사 등과 협력시 상용화 가능성이 크다고 할 수 있다. 실제로 최근 미국과 네덜란드에서는 식물바이러스의 진단시약회사가 설립되어 각종 연구기관과 외국검역기관에서의 이에 대한 수요가 점차 증가추세에 있다.

특히 최근에는 오이 녹반 모자이크 바이러스의 발생이 증가하여 수박 등에 큰 경제적 손실을 야기하고 있다. 박과작물은 국내의 경우 재배품종 육종의 일련과정뿐만 아니라 종자 채종용 모본, 그리고 농민들이 직접 사용하는 재배종자의 각 단계별로 대부분이 바이러스 감염성 여부를 육안검정이나 일부 시료를 사용하여 민감도가 상대적으로 떨어지는 혈청학적 검정을 사용하여 왔으며, 그 결과 최근 3년간 박과작물에서 가장 큰 문제로 알려진 오이 녹반 모자이크 바이러스가 대발생되어 막대한 경제적 손실뿐만 아니라 사회적 문제로 대두된 바 있다.

오이 녹반 모자이크 바이러스는 식물바이러스 중에서 담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus: TMV)와 함께 Tobamovirus group에 속하는 식물병원 바이러스로서, 토양이나 종자전염이 가능하며 물리적

성질이 매우 안정하여 토양이나 이병잔재물에서 수 년이상 병원성을 유지하므로 대상 식물에는 매우 치명적인 바이러스이다(Hollings et al., 1975; Matthews, 1993).

본 연구에서는 오이 녹반 모자이크 바이러스의 진단법으로 효소항체결합법(ELISA)등 면역학적 방법과 함께 유전자 검정법으로 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction: PCR)을 개발하여 초미량의 바이러스까지 정확하게 진단코자 한다(De Blas et al., 1994; Park et al., 1995; Ryu et al., 1995; Ryu & Park, 1995). 바이러스를 진단하기 위한 방법으로는 주로 생물학적, 전자현미경적, 혈청학적 및 분자생물학적 진단 방법이 있다. 이러한 많은 방법들 중 검역과 종자 채종용 모본에서 바이러스를 검정하기 위해서는 신속하고 정확하며 민감한 방법을 이용하여야 한다. 유전자원의 확보측면에서는 진단시 증폭되는 바이러스의 유전자 산물을 클로닝하여 염기서열을 결정하며 향후 바이러스 저항성 분자유종의 소재로 활용한다.

본 연구의 대상 바이러스인 CGMMV는 세계적으로 바이러스의 기본적인 병리학적 연구와 함께 혈청학적 진단법이 일부 개발되어 있고, 일본의 두 계통에 대한 전체 계놈 및 외피단백질 3' 말단의 염기서열이 밝혀져 있다.

국내에서 재배되고 있는 주요 작물인 박과류에서 문제시되고 있는 주요 바이러스를 동정 분리하고, 이들의 진단방법을 개발하며, 이러한 기초적인 바이러스 유전자원과 항혈청의 확보 그리고 지속적인 개발과 대량확보를 통한 바이러스 진단 및 분류를 발전시킴으로서 국내의 잠재적인 수요의 충당과 연구의 활성화를 도모하여, 향후에 이들 바이러스의 방제를 위하여 분자생물학적 방법인 형질전환식물(transgenic plant)을 개발하여 바이러스 저항성식물을 육성하고자 하였다. 본 연구의 목적은 수박, 메론 및 호박등 우리나라 주요 박과작물에서 큰 경제적 피해를 주는 오이 녹반 모자이크 바이러스의 신속하고 정확한 유전자 검정법 개발을 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 바이러스 분리 및 순화

가. Virus의 순수분리 및 동정

CGMMV가 감염된 수박잎(Fig. 1 b, d)을 사용하여 국부병반 형성 기주인 붉은 명아주(*Chenopodium amaranticolor*)에 접종하였다. 붉은 명아주에서 발현된 황반의 chlorotic spot을 다시 명아주에 계대배양을 3회 반복처리하여 재접종을 생물학적으로 virus를 순수 분리하였다. 분리된 바이러스는 CGMMV의 전신 감염 기주인 박(Fig. 1 e, f)에서 대량 증식시켜 바이러스 순화의 재료로 이용하였다. 접종방법은 감염 잎에 대해 10배량(w/v)의 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)를 넣고 마쇄한 이병즙액을 Carborundum(400 mesh)을 사용하여 오이 떡잎에 상처를 낸 후 접종하였으며, 바이러스 접종 후 10일경에 모자이크 병반이 뚜렷한 잎을 취하여 실험의 재료로 사용하였다. 순화된 바이러스를 관찰하기 위하여 순화액 10μl에 탄소막을 씌운 grid(300mesh)를 15분간 방치한 다음 grid의 물기를 제거하고 멸균수로 세척하고 여과지로 수분을 제거한 뒤 2% uranyl acetate로 10분간 negative staining시켜 여분의 염색액을 제거한 후 실온에서 grid를 건조시킨 후 투과전자현미경(HITACHI-800 TEM SYSTEM, 150kv, magnification 20×1000)으로 바이러스의 형태 및 크기를 관찰하였다.

나. Virus의 순화

CGMMV를 대량 증식시킨 박 잎을 사용하여 바이러스 입자를 정제하였다. 바이러스의 정제는 감염잎 50g을 사용하여 0.5M 인산완충액(pH 7.0)으로 마쇄하여 조즙액을 butanol로 청정화 시킨 다음 6,000g에서 원심분리를 실시하였다. 맑은 상등액을 채집하여, 0.1 M NaCl과 4%의 polyethylene glycol 6,000을 첨가하면서 교반을 실시한 다음, 원심분리를 실시하여 바이러스를 농축하였고, 이를 3회 반복처리 하였다. 원심분리후 얻어진 백색의 침전물을 1ml의 0.02M 인산완충액(pH 7.0)으로 녹인 다음 5,000g에서 3분간 원심분리를 실시하여 맑은 상등액을 채취하였으며, 이를 바이

러스원으로 사용하였다. 상등액은 20%의 sucrose cushion을 이용하여 Beckman SW40Ti roter로 100,000×g로 2시간 동안 초고속원심분리를 하였으며, 침전물의 1ml의 0.01M phosphate buffer(pH7.4, 0.2mM EDTA)에 녹인 후 8,500×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 획득하여 바이러스를 순화하였다.

다. Virus 항혈청 제조

순수 분리된 바이러스액 1ml(1.5mg)를 New Zealand white 토끼에 근육주사하여 바이러스의 항혈청을 제조하였다. 1차 면역은 항원과 Freund's complete adjuvant를 1:1(v/v)로 섞은 용액을 토끼의 뒷다리 근육에 2회 주사를 실시하였고, 10일 간격으

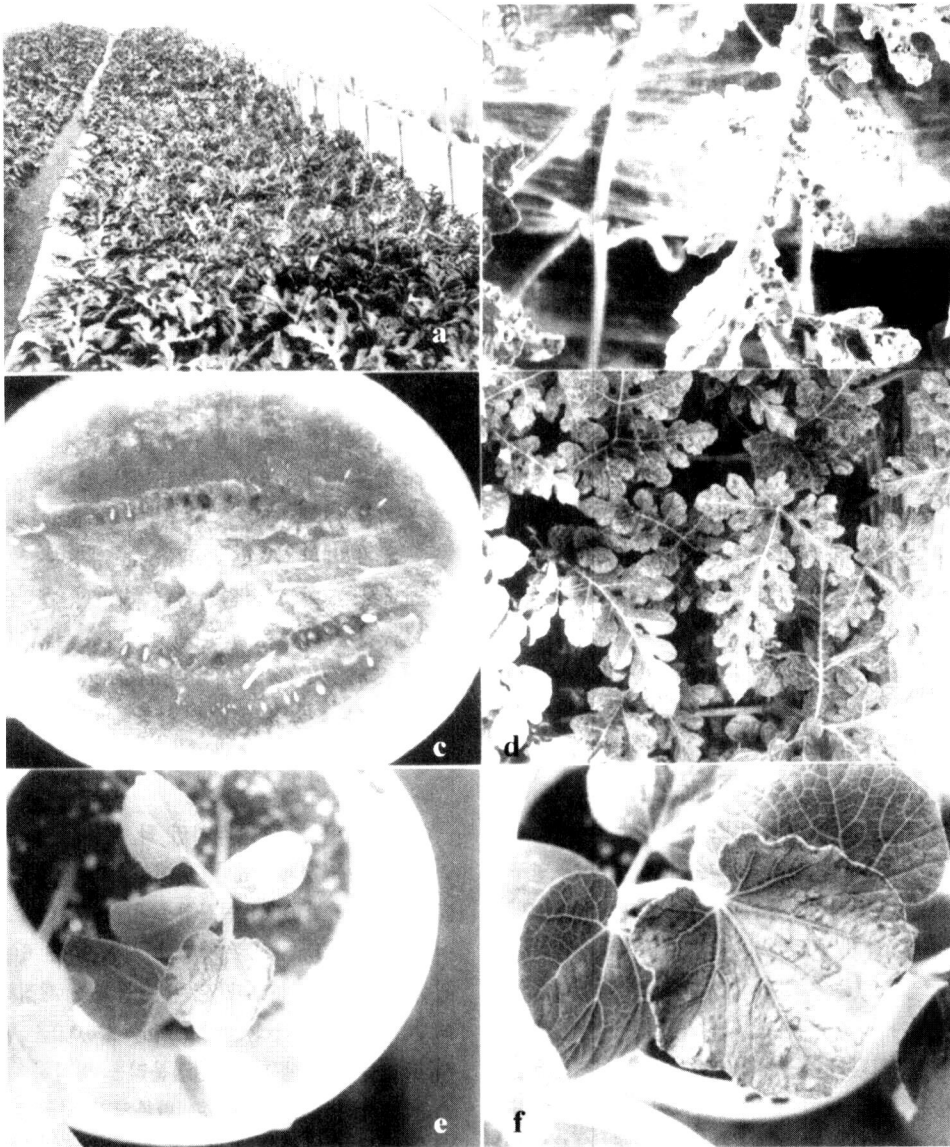


Fig. 1. CGMMV-infected watermelons (a), leaf systemic symptoms on watermelons (b, d), fruit symptom (c), leaf systemic symptoms on gourds (e, f).

로 incomplete adjuvant와 항원을 사용하여 2차 및 3차 접종을 실시하였다. 최종 접종 일주일 후 10일 간격으로 토끼 귀 정맥에서 채혈을 실시하고 이로부터 CGMMV 항혈청을 분리하고 -80°C에서 보관 사용하였다.

2. 유전자 진단법 개발

가. RT-PCR

바이러스 특이적 primer를 사용하는 역전사 중합효소 연쇄반응법(RT-PCR)을 개발하여 CGMMV에 적용한다. 본 연구의 대상 바이러스인 CGMMV 특이적 primer를 제작하고 이를 이용하여 바이러스를 RT-PCR 방법으로 진단하였다.

1) 바이러스 특이적 개시절편의 제작

CGMMV의 핵산 염기서열을 토대로 바이러스 특

이적 primer(개시절편)를 제작하였다(Fig. 2 및 Table 1 참조).

2) RT-PCR 최적 조건 조사

CGMMV에 감염된 오이 잎 0.2g을 RNA 추출용액 600µl (0.5M Tris-HCl(pH 8.0) 20µl, 0.1M EDTA(pH 8.0) 10µl, 10% SDS 100µl, 5M NaCl 60µl, distilled water 810µl/total 1ml)와 혼합하고 액체질소를 첨가하여 마쇄한 다음 protenase K(10mg/ml) 10µl를 넣고 37°C에서 30분간 방치하였다. 이 혼합액에 P.C.I (Phenol:chloroform:isoamyl alcohol=25:24:1)를 1:1로 첨가하여 2회 반복하여 원심분리한 다음 상등액에 7.5M ammonium acetate 0.5배와 100% ethanol을 2.5배 첨가하고 -70°C에서 20분간 방치하였다. 이 혼합액을 15,000×g로 15분간 원심분리한 다음 상등액은 버리고 pellet을 vacuum dryer에서 1시간 동안 건조시킨 후 3차 멸균수에 녹여 시료로 사용하였다. 순화된

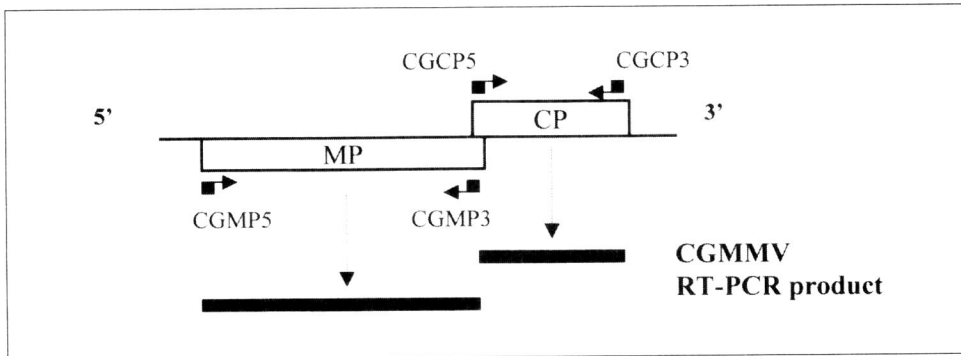


Fig. 2. Design of CGMMV-specific two sets of primes for detection of CGMMV by RT-PCR. Abbreviations used ; MP: movement protein, CP: coat protein.

Table 1. Nucleotide sequences of CGMMV-specific primers

Primer name	Nucleotide sequence (5' -3')	GenBank Accession
CGMP5	TAAGTTTGCTAGGTGTGATC	AJ250104
CGMP3	ACATAGATGTCTCTAAGTAAG	AJ250105
CGCP3	ACCCTCGAAACTAAGCTTTC	AJ243351
CGCP5	GAAGAGTCCAGTTCTGTTTC	AJ243352

바이러스의 RNA를 시료로 이용하여 RT-PCR 반응에서 마그네슘 이온의 농도, annealing 온도 및 cycle 시간 등에 변화를 주어 최적의 조건을 조사하였다.

3) 식물에서 전체핵산의 추출

바이러스에 감염된 식물의 마쇄액이나 순화된 바이러스에 proteinase K와 SDS를 각각 최종농도 5 g/ml, 0.1%로 첨가하여 37°C에서 30분간 반응을 실시하였다. 시료와 동일 양의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(PCI, 25:24:1)로 단백질을 제거하고 1/2 vol.의 7.5M ammonium acetate와 2.5 vol.의 absolute ethanol로 핵산을 침강시켜 이를 RT-PCR을 위한 재료로 사용하였다.

4) RT-PCR

RT-PCR은 DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus, Model 480)을 이용하여 실시하였다. RT(reverse transcription) 반응은 RNA 시료 100ng, MuLV reverse transcriptase 50unit, RNase inhibitor 20unit, MgCl₂ 2.5mM, down stream primer 100pM, dCTP, dGTP, dTTP, dATP 각 1mM, KCl 50mM, Tris-HCl(pH 8.3) 10mM 농도로 42°C에서 30분, 99°C에서 5분간 반응시키고 4°C로 냉각하였다. PCR 반응은 RT 반응이 끝난 후 DNA Thermal Cycler에서 전처리를 94°C 5분간 처리하고, 94°C 30초, 46°C에서 60초, 그리고 72°C에서 60초의 cycle을 총 40회 실시하였다. 반응 후 72°C에서 5분간 실시한 후 agarose gel에 전기영동으로 RT-PCR product를 확인하였다.

3. 바이러스의 분자생물학적 계통다양성 분석

가. 바이러스 유전자 증폭

분리된 바이러스 RNA와 CGMMV 특이적으로 제작한 primer를 이용하여 바이러스의 유전자를 증폭하였다. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)는 증폭된 유전자를 각종 제한효소로 절단 후 전기영동 패턴을 비교하므로써 바이러스간의 변형을 검출하여 다양성을 분석하였다. RT-PCR을 통해 증폭된 cDNA를 agarose gel 전기 영동을 실시하였다.

TAE buffer로 만든 1% agarose gel을 100V에서 30분간 전기영동을 실시하고 ethidium bromide(EtBr)로 염색하여 UV transilluminator에서 관찰한 다음 사진을 촬영하였다(Sambrook et al., 1989).

나. RFLP 분석

증폭된 CGMMV 유전자를 각종 제한효소로 절단 후 agarose gel 상에서 전기영동 패턴을 비교하여 바이러스간의 변형을 검출하여 다양성을 분석 비교하였다. E. coli에서 alkaline lysis 방법을 이용하여 얻은 클론을 EcoR I, Hinc II, Nci I, Taq I 등의 제한효소를 이용하여 지도를 작성하였다.

4. CGMMV CP 및 MP 유전자의 염기서열 결정

CGMMV의 coat protein(CP) 및 movement protein(MP) 유전자 부위를 클로닝하기 위하여 CGMMV-SH 염기서열을 토대로 primer를 제작하고(Fig. 2), CP 및 MP 유전자를 RT-PCR로 증폭시켰다. RT-PCR을 이용하여 합성된 cDNA를 1% agarose gel 전기영동 후 절편을 확인한 후 pGEM-T Easy vector(Promega)를 사용하여 클로닝을 실시하였다. RT-PCR 반응이 끝난 반응액 2 μ l에 3차 멸균수 5.5 μ l로 희석한 다음 10 \times Buffer (300 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM APT) 1 μ l, pGEM-T Easy vector 1 μ l (50 ng), T4 DNA ligase 0.5 μ l를 첨가하고 17°C에서 36시간 동안 방치하였다. 반응이 끝난 후 E. coli competent cell(NM522)에 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 방치한 다음, 42°C에서 50초간 heat shock 처리 후 얼음 속에서 2분간 정지하여 transformation하였다. 상온에서 1시간 방치 후 LB배지 1ml을 첨가한 다음 37°C에서 1시간 배양하고 MacConkey agar(ampicilline 100 μ g/ml) 배지 위에 plating하고 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 클로닝된 plasmid는 대장균에 형질전환시킨 후 selection marker와 제한효소처리에 의해서 삽입되어진 유전자를 확인하고, 이를 사용하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열 및 아미노산서열은 DNASTAR program을 이용하여 기존에 발표되었던

CGMMV-SH, CGMMV-W의 염기서열 및 아미노산 서열과 비교하였고, 다른 tobamovirus와의 연관성을 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1999년 논산과 전주일원에서 수집한 CGMMV 감염 수박 잎을 오이에 접종시켜 순화시켰으며, 순화된 바이러스 입자를 전자현미경으로 관찰한 결과, $300 \times 18\text{nm}$ 크기의 전형적인 tobamovirus 입자를 관찰할 수 있었다(Fig. 3). CGMMV의 신속한 검정을 위하여

항체여과지 진단으로 바이러스 검정한계를 조사하였다. 항체 여과지를 이용하여, 검정한계를 조사한 결과, CGMMV 감염 식물체 추출액의 $2^{-4} \sim 2^{-12}$ 까지 진단이 가능했으며, $2^{-9} \sim 2^{-7}$ 까지 범위에서 반응성이 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. 4). CGMMV에 대한 진단은 바이러스 감염주를 조기에 제거하여 전체적인 확산을 막는데 의미가 있으므로 CGMMV에 대해 민감하게 검정할 수 있는 방법과 특히, 포장에서 신속하고 간단하게 진단할 수 있는 방법이 필수적 요건이다. 이런 측면에서 볼 때 항체 여과지 진단은 이 두 가지의 가장 근접한 방법이라고 생각된다. 진단에

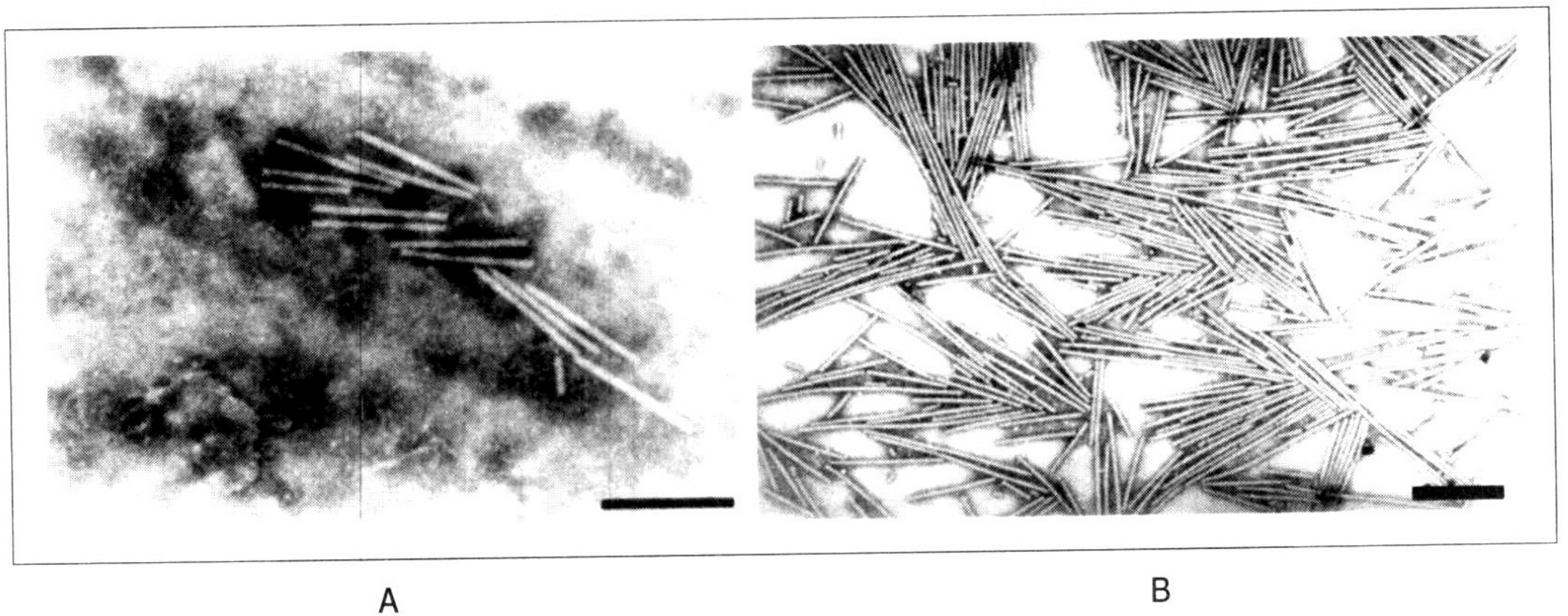


Fig. 3. Electron micrographs of CGMMV particles. A: dip method from infected leaf (bar represents 300 nm), B: purified virions of CGMMV (bar represents 150 nm)

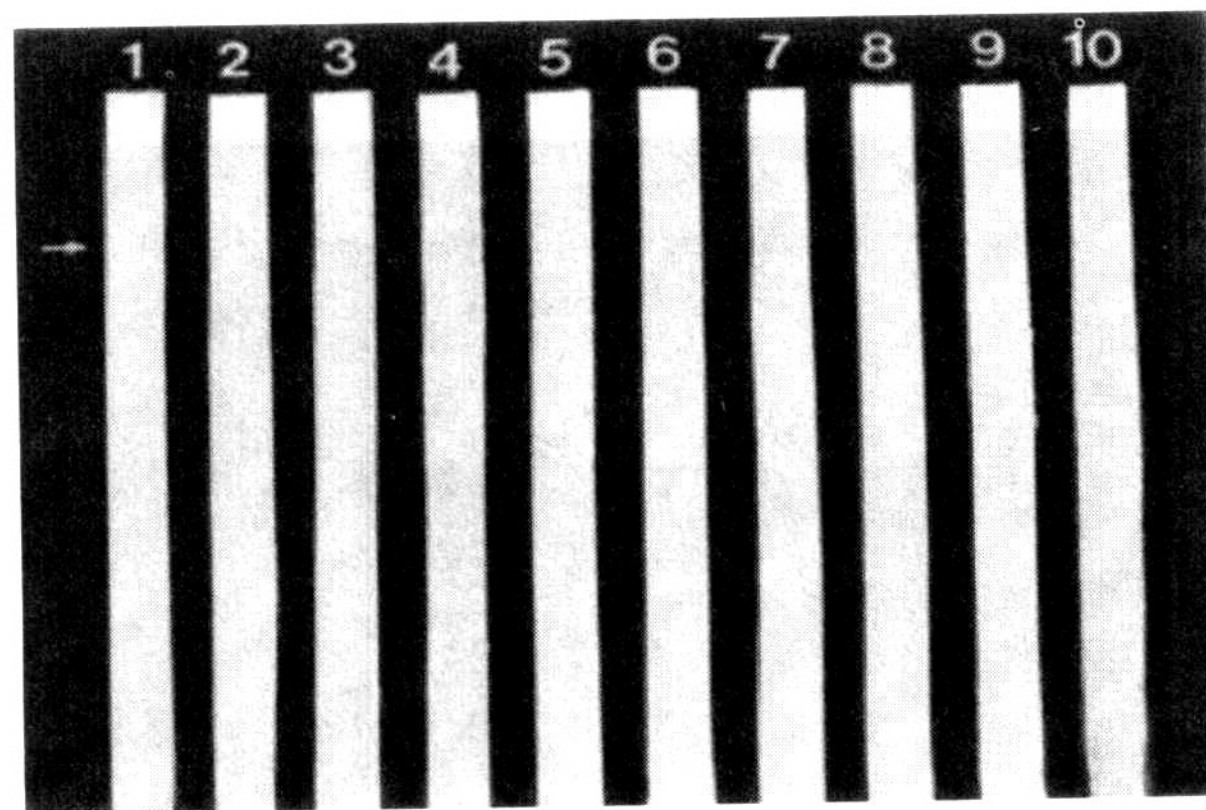


Fig. 4. Application of rapid immunopaper assay to detect CGMMV from infected leaf sample. Lane 1: (-) control, healthy, 2: 2-4, 3: 2-5, 4: 2-6, 5: 2-7, 6: 2-8, 7: 2-9, 8: 2-10. 9: 2-11, 10: 2-12 (w/v).

소요되는 시간이 5분 이내이고 진단기계나 기구가 필요 없으며 진단비용도 한 시료당 이백원 이하로서 매우 경제적이라고 사료된다.

Virus 감염 유포로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR 방법으로 cDNA를 합성하였다. pGEM-T Easy vector를 이용하여 CGMMV 유전자중에서 CP와 MP를 클로닝하였고, 제한효소 지도작성 및 분석을 통하여 기존에 발표된 바이러스와의 차이를 비교하였다. 또한 CGMMV-NS1과 CGMMV-Y의 30kDa 이동단백질 유전자의 염기서열과 아미노산 서열을 분석하여 계통별로 비교하였고, 다른 tobamovirus와의 연관성을 분석하였다.

RT-PCR 결과 product의 크기는 CGMMV-NS1과

CGMMV-Y에서 모두 0.8kb의 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 5). MgCl₂ 농도 결정에서는 2.0mM, 2.5 mM, 5.0mM, 7.5mM, 10.0mM에서 product의 양에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). 또한 바이러스를 희석하여 검정한계를 조사해 본 결과 10⁻⁴까지 희석하여도 바이러스의 검정이 가능한 것으로 나타났다(Fig. 6). cDNA가 삽입된 vector를 4종의 제한효소 EcoR I, Hinc II, Nci I, Taq I으로 절단한 결과 EcoR I, Hinc II 그리고 Nci I은 2cut 절편으로 절단되었으며 Taq I은 2cut 절편과 100bp 이하의 작은 절편으로 분리되었다(Fig. 7). 이것으로 CGMMV-NS1과 CGMMV-Y의 제한효소 지도를 작성한 결과, 국내에서 분리된 두 CGMMV 계통은 동일한 지도를 나타내었다.

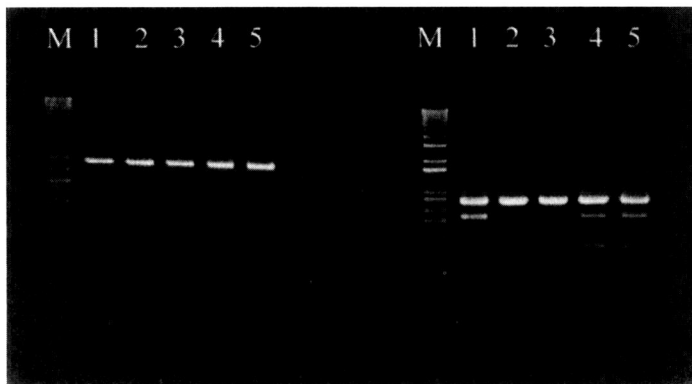


Fig. 5. Electrophoretic pattern of RT-PCR products in different MgCl₂ concentrations. Lane M : size marker DNA, 1: 2.0 mM, 2: 2.5 mM, 3: 5.0 mM, 4: 7.5 mM, 5: 10.0 mM.

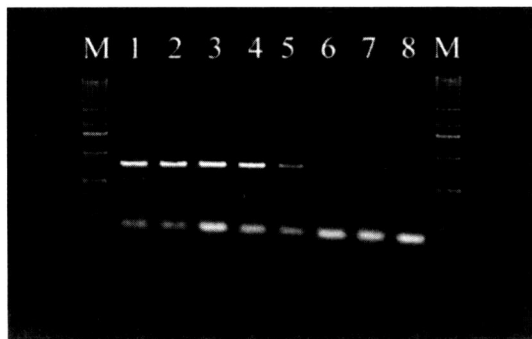


Fig. 6. Detection limit of CGMMV by RT-PCR. Lane M: size marker DNA, 1:1, 2:10-1, 3: 10-2, 4: 10-3, 5: 10-4, 6: 10-5, 7: 10-6, 8: 10-7.

CGMMV-NS1과 CGMMV-Y의 염기서열 및 아미노산 서열을 결정하여 CGMMV-SH와 CGMMV-W의 30kDa 이동단백질 유전자의 염기서열과 아미노산 서열을 비교한 결과, 염기서열은 각각 99.8%와 98.4%의 homology를 보였으며, 아미노산 서열은 99.6%와 98.2%의 매우 높은 homology를 나타내었다(Fig. 9). 이들 두 국내계통들은 외국에서 보고된 다른 계통들과 비교한 결과 CP와 MP 유전자 모두 98.2% ~ 100.0%의 높은 염기서열 상동성을 보여 주었다(Fig. 8, Table 2). 본 결과는 다른 tobamovirus에서의 각 계통비교와 유사한 경향을 보이고 있으며, 병리학적 성질과 함께 국내 분리계통인 이들 두 계통은 유전적 특성이 기존의 CGMMV와 유사하게 조사되었다.

IV. 결론

본 연구의 목적은 수박, 배론 및 호박등 우리나라

주요 박과작물에서 큰 경제적 피해를 주는 오이 녹반 모자이크 바이러스(cucumber green mottle mosaic virus: CGMMV)의 신속하고 정확한 유전자 검정법과 방제법 개발에 있다. CGMMV 두 계통(CGMMV-Y, CGMMV-NS1)을 이병식물체로부터 생물학적으로 순수분리하였으며, 이를 기주식물에 접종하여 바이러스를 증식하였다. 증식시킨 감염식물체로부터 원심분리법과 PEG 침전법을 사용하여 바이러스 particle를 순수 정제하였으며, 이를 유전자 진단 및 유전자 분석, 그리고 종자전염시험의 재료로 이용하였다. 주요 박과식물로부터 CGMMV를 신속 정확하게 진단하기 위하여 본 연구에서는 RT-PCR법을 사용하여 바이러스의 유전자 진단을 개발하였다. 유전자 진단은 CGMMV 염기서열을 결정하여 CGMMV 외피단백질(coat protein: CP)과 이동단백질(movement protein: MP) 부분을 사용하여 각각 한 쌍의 primer를 제작하였으며, 제작된 primer의 정보는 미국과 영

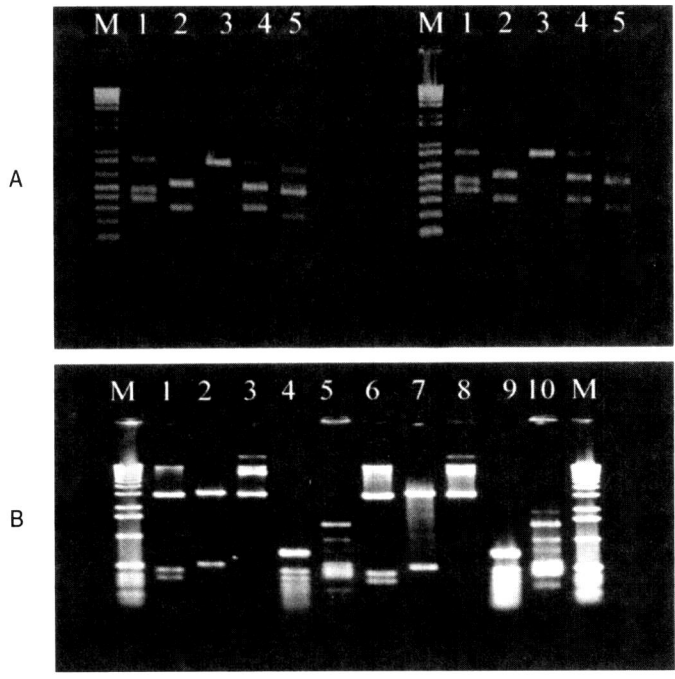


Fig. 7. Restriction mapping analysis of RT-PCR products of CGMMV isolates (photo A), recombinants molecules after cloned into plasmids (photo B). Photo A; Lane M: size marker DNA, 1: EcoRI, 2: HinCII, 3: uncut, 4: NciI, 5: TaqI. Photo B; Lane M: size marker DNA, 1, 6: EcoRI, 2, 7: HinCII, 3, 8: HindIII, 4, 9: HpaI, 5, 10: TaqI.

국의 database에 등록을 실시하였다(Table 1 참조). 제작된 primer를 사용하여 CGMMV를 유전자 진단한 결과, 10fg 농도까지도 바이러스의 검정이 가능하였으며 이는 기존의 혈청학적 방법과 비교시 10배 이상 민감하고 정확하게 CGMMV를 진단할 수 있는 방법임이 확인되었다. CGMMV의 분자생물학적 계통

다양성 분석은 CGMMV-Y 및 CGMMV-NS1 두 계통 바이러스의 유전자 염기서열을 사용하여 실시하였다. 이들 두 국내계통들은 외국에서 보고된 다른 계통들과 비교한 결과 CP와 MP 유전자 모두 98.2% ~ 100.0%의 높은 염기서열 상동성을 보여 주었다. 본 결과는 다른 tobamovirus에서의 각 계통비교와 유사

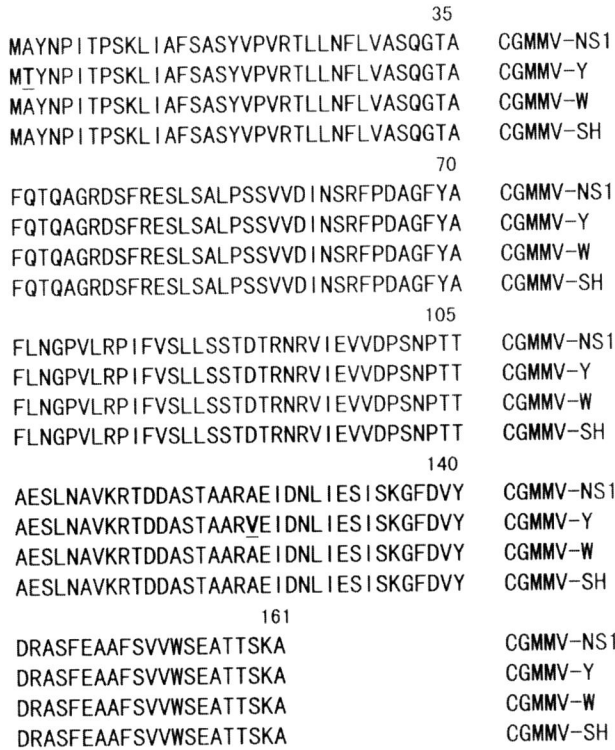


Fig. 8. Multiple alignment of amino acid sequence of CP gene of CGMMV. NS1 and Y was determined in this study.

Table 2. Percentage of sequence homologies of CP and MP genes between CGMMV-NS1 and other CGMMV strains at the nucleotide and amino acid level

Virus	MP		CP	
	nucleotide	amino acid	nucleotide	amino acid
CGMMV-Y	100	100	99.6	98.9
CGMMV-SH	99.8	99.6	99.6	100
CGMMV-W	98.4	98.2	98.9	100

한 경향을 보이고 있으며, 병리학적 성질과 함께 국내 분리계통인 이들 두 계통은 유전적 특성이 기존의 CGMMV와 유사하게 조사되었다. CGMMV의 경우 1998년에 전국적으로 5개 도, 25개 시군, 949수박 재배농가, 408ha에서 발병되어 피해규모가 매우 컸다. 발병원인에 대해서는 외국으로부터 들어온 대목의 박 종자(FR킹 II)에 의한 감염으로 판명되었는데, 종묘회사에서는 열처리에 의하여 바이러스가 불활성화시킨 후 바이러스의 존재여부를 검정하여 무병종자를 반드시 확인한 후 판매해야 할 것이다. 우리나라에서는 1998년 이전까지 CGMMV에 대한 연구가 미진한 상태였는데, 그 이후로 연구소, 대학, 종묘회사에서 CGMMV에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 수박 농가에서는 흔히 ‘피수박’ 또는 ‘꼭지 탄저병’이라고 불리고 있으며, 감염된 포장은 수확이 거의 불가능할 정도로 피해가 심하며 과실은 상품성이 거

의 없어 경제적인 손실이 막대하므로 무병종자 선택 및 조기 진단에 의한 전염원 제거가 그 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다.

참고문헌

1. Ainsworth, G.C.(1935), Mosaic diseases of the cucumber. *Annals of Applied Biology* 22:55-67.
2. De Blas, C., Borja, M. J., Saiz, M. and Romero, J.(1994), Broad spectrum detection of cucumber mosaic virus(CMV) using the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 141:323-329.
3. Hollings, M., Komuro, Y. and Tochiyama, H. (1975), Cucumber green mottle mosaic virus, In: CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 154., Kew Surrey, England.



Fig. 9. Multiple alignment of amino acid sequence of MP gene of CGMMV. NS1 and Y was determined in this study.

4. Lee, K.W., Lee, B.C., Park, H.C. and Lee, Y.S. (1990), Occurrence of cucumber green mottle mosaic virus disease of watermelon in Korea, *Korean Journal of Plant Pathology* 6:250-255.
5. Matthews, R.E.F.(1993), *Diagnosis of plant virus diseases*, CRC press, Florida.
6. Park, W.M., Ryu, K.H., Kim, S.J. and Choi, J.K. (1995), Rapid detection and identification of cucumber mosaic virus by reverse transcription and polymerase chain reaction(RT-PCR) and restriction analysis, *Journal of Plant Biology* 38:267-274.
7. Ryu, K.H., Yoon, K.E. and Park, W.M.(1995), Detection by RT-PCR of cymbidium mosaic virus in orchids, *Journal of Phytopathology* 143:643-646.
8. Ryu, K.H. and Park, W.M.(1995), Rapid detection and identification of odontoglossum ringspot virus by polymerase chain reaction amplification, *FEMS Microbiology Letters* 133:265-269.
9. Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A labortary mannual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
10. Ugaki, M., Tomiyama, M., Kakutani, T., Hidaka, S., Kiguchi, T., Nagata, R., Sato, T., Motoyoshi, F. and Nishiguchi, M.(1991), The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA, *Journal of General Virology* 72:1487-1495.