

벼 흑조위축병 바이러스의 분자생물학적 연구

박종석 · 배신철¹ · 김영민^{**} · 백용기^{**} · 김주곤 · 황영수^{*}

농촌진흥청 농업유전공학연구소 생화학과, ¹분자유전과

^{**}연세대학교 이과대학 생화학과

초록 : 우리나라에서 발생하는 주요 벼 바이러스로써 저항성 유전자원이 없어 현재까지 저항성 품종이 육성되지 못하고 있는 흑조위축병(Rice Black-Streaked Dwarf Virus, RBSDV)에 대한 유전정보에 대하여 연구하였다. 매개충인 보독 애벌거리를 이용하여 이병주를 생산한후 바이러스 입자를 순수분리하여 전기영동한 결과 10개의 band를 확인하였다. RBSDV RNA로부터 역전사 효소를 이용 cDNA를 합성한 후 λ gt11에 삽입하여 cDNA library를 만들었다. 이 library에서 6개의 단편을 선별하였으며 그중 한개의 clone(pRV3)은 hybridization을 통해 RBSDV 게놈 조각 3번 유래인 것을 확인하였다. pRV3의 염기서열을 결정한 결과 2개의 ORF의 일부분들을 갖고 있었으며 이것은 바이러스 저항성 작물개발에 이용될 수 있을 것으로 생각된다(1994년 5월 30일 접수, 1994년 6월 1일 수리).

현재 세계적으로 알려져있는 바이러스병은 약 600여 종에 이르고 있으며 바이러스병에 대한 피해는 작물이나 바이러스종류에 따라 차이가 있으나 바이러스에 감염된 식물은 심한 경우에는 고사하거나 생육불량으로 피해가 심하다.¹⁾ 우리나라에서 발생하는 주요 벼 바이러스는 흑조위축병(Rice Black-Streaked Dwarf Virus: RBSDV), 오갈병(Rice Dwarf Virus) 및 줄무늬 잎마름병(Rice Stripe Virus) 등 3종이 있으며 오갈병과 줄무늬 잎마름병은 이미 육종학적인 방법으로 저항성 품종이 육성되었으나 흑조위축병만은 저항성 유전자 자원이 없어 현재까지 저항성 품종이 육성되지 못하고 있다.²⁾ 1973년 경북 선산에서 최초로 보고된 흑조위축병바이러스는 1984년에 전국적으로 발생하여 큰 피해를 주었고 특히 사료용 옥수수 재배면적이 증가함에 따라 남부지방에서의 옥수수 확대재배의 큰 제약요인이 되고있다.³⁾

식물 바이러스 Reoviridae과 Fijivirus속 groupII로 분류되는 RBSDV⁴⁾는 밀구류(*Laodelphax striatellus* F.)에 의해 매개 전염되어 벼를 비롯한 화본과 작물에 큰 피해를 주고 있다.⁵⁻⁷⁾ 흑조위축병 바이러스는 바이러스 게놈이 10개의 dsRNA 단편으로 되어있고⁸⁾ 특이한 2차, 3차의 복잡한 구조를 형성하고 있으며 외피단백질이 이들 dsRNAs 단편들을 싸고있는 정이십면체를 이루고 있다. 특히, 각 RNA단편 끝에 poly(A)가 없어서⁹⁾ cDNA 합성이 어려운 것으로 알려져 있다.

최근까지 식물 Reovirus 중 Phytoreovirus에 속하는 식물 바이러스의 게놈 연구는 상당히 진척이 되었지만¹⁰⁻¹⁴⁾ RBSDV가 속하는 Fijivirus속에 대해서는 FDV(Fiji Disease Virus), MRDV(Maize Rough Dwarf Virus) 게놈의 염기서열이 부분적으로 밝혀져있고¹⁵⁾ 특히 RBSDV의 경우는 게놈 단편 중에 크기가 작은 7, 8, 10번째 게놈 단편의 염기서열과 각 단편의 양쪽 끝에 공통적으로 나타나는 염기서열(5'AAGUUUUU----GUC3')이 보고되어있을 뿐이다.^{9,16)}

본 연구에서는 RBSDV를 순수분리한 후, 바이러스 RNA로부터 cDNA library를 만들고 선별된 cDNA의 염기서열을 결정하여 흑조위축병 바이러스 게놈의 부분적인 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

흑조위축병 바이러스 보독충 및 이병주 생산

흑조위축병 바이러스(RBSDV)를 유지하기 위하여 3월 하순 흑조위축병 발생이 심한 경남 밀양, 진주, 함양 및 전남 순천, 나주 등지에서 채집한 애벌거리를 사용하였다. 애벌거리 (*Laodelphax striatellus* F.)는 성충에서 산란 후 2령의 약충이 되었을 때 벼 이병주에 2일간 흡즙시킨 후 회수하여 1.5엽기 벼 유묘에 접종하여 2~3주간 잠복기를 거쳐 보독충을 준비하였다. 바이러스 보독충을 감수성 옥

Key words : Rice Black-Streaked Dwarf Virus (RBSDV) purification, cDNA, sequencing.

*Corresponding author : Y.-S. Hwang

수수 품종인 수원 19호가 1엽기일 때 1주당 5마리씩 접종하여 30~40일 경과 후 병징이 나타나는 이병 옥수수만 선별하여 뿌리를 수확한 후 -70°C 에 보관하여 시료로 사용하였다.

바이러스 입자 순수 분리

옥수수 이병주 뿌리 1kg을 액체질소로 마쇄한 후 2리터의 0.01 M MgCl_2 , 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)를 넣고 Waring blender로 섞은 후 gauze로 고형물을 제거하고 최종농도가 20% 되도록 CCl_4 를 첨가하여 2분간 섞었다. 이 혼합액을 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 그 상등액을 취하여 용액 중의 최종 농도가 각각 6% polyethylene glycol, 3 M NaCl, 1% Triton X-100이 되도록 한 후 2시간 동안 4°C 에서 잘 섞고 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 취하였다. 이 침전액을 0.01 M MgCl_2 , 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0) 50 ml에 현탁시킨 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 현탁액내의 고형물을 다시 제거하였다. 상등액에 CF_4 를 20% 되도록 첨가하여 섞은 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 다시 22,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 침전물을 0.01 M MgCl_2 , 0.1 M Histidine buffer (pH 7.0) 1 ml에 재현탁한 후 tissue grinder로 완전히 분쇄하여 녹이고 10~40% sucrose 밀도구배 원심분리를 26,000 rpm에서 1시간 동안 실시하였다. 원심분리 후 생성된 virus band를 회수하여 0.01 M MgCl_2 , 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)로 회석한후 37,500 rpm에서 1시간 동안 원심분리하였다. 침전물을 200 μl 의 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA buffer(pH 8.0)에 녹인 후 260 nm 파장에서의 흡광도로서 바이러스 농도를 측정 하였다.

cDNA library 제작

바이러스의 유전자를 분리하기 위하여 벼 흑조위축병 바이러스의 double-stranded RNA로부터 cDNA library를 제작 하였다. RBSDV RNA 5 μg 을 100°C 에서 5분간 열처리한 후 0°C 에서 10분간 방치하고 0.5 μg 의 random hexamer와 1 mM CH_3HgOH 를 잘 혼합한 후 최종 농도가 각각 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 1.25 mM dATP, 1.25 mM dGTP, 1.25 mM dTTP, 20 μCi [α - ^{32}P -dCTP], 40 u/ μl RNasin가 되게 섞은 다음 reverse transcriptase(Perkin-Elmer)를 넣어서 전체용량이 50 μl 가 되게하여 잘 섞고 37°C 에서 15분, 42°C 에서 1시간 반응시키고 EtOH로 침전시키고 침전물을 증류수 20 μl 에 용해시켰다. Second strand 합성은 5 μl buffer(100 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM

MgCl_2 , 0.5 u RNaseH, 12.5 u DNA polymerase D)를 첨가하여 15°C 에서 1시간, 22°C 에서 1시간 반응시킨 후 phenol로 추출하고 합성된 cDNA를 EtOH로 침전시켰다. cDNA의 양쪽 말단을 blunt end로 만들어 EcoRI Linker를 부착하기 위하여 합성된 cDNA와 10 u T_4 DNA polymerase, 1 mM dNTPs(최종농도), 10X T_4 DNA polymerase buffer(250 mM KCl, 500 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 10 mg/ml BSA)등을 첨가하여 전체 반응액이 50 μl 되게한 후 37°C 에서 30분간 반응시켰다. EcoRI methylation은 1.5 u EcoRI methylase, 100 uM(최종농도) S-adenosylmethionine, 100 mM(최종농도) Tris-HCl, 10 mM(최종농도) EDTA 등을 첨가하여 전체용액을 100 μl 가 되게하여 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 이와 같이 만들어진 cDNA에 EcoRI linker를 연결시키는 반응은 40 ng EcoRI linker, 1 mM(최종농도) ATP, 20 mM(최종농도) DTT, 10 mM(최종농도) MgCl_2 , 100 mM(최종농도) Tris-HCl 등을 첨가하여 최종반응액이 20 μl 가 되게하여 15°C 에서 12시간 반응시켰다. cDNA에 접합된 EcoRI linker를 절단하기 위해서 최종농도가 각각 100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0.5 u/ μl EcoRI 제한효소 등을 첨가한 후 37°C 에서 2시간 반응시키고 sepharose CL-4B column를 통하여 cDNA만 정제하였다. EcoRI-digested cDNA와 lambda gt11 vector와 ligation을 시킨 후 *in vitro* packaging은 Packagene(Promega)를 사용하였다.

RNA gel-blotting

바이러스 RNA 10 μg 를 10% formamide, 10% formaldehyde가 함유된 1.4% agarose gel에서 전기영동을 행하였다. 이때 바이러스 RNA를 50% formamide, 10% formaldehyde의 sample buffer에 넣어서 65°C 에서 5분간 열처리한 후 agarose gel에 loading하였고 30 volt에서 24시간 전기영동하였다. 사용된 전기영동 완충액은 200 mM sodium MOPS, 50 mM sodium-acetate, 1 mM EDTA(pH 7.0)이었다. 전기영동이 끝난 후 nitrocellulose filter로 RNA를 전이시키고 2시간 동안 80°C 에서 진공 건조시킨 다음 hybridization에 사용하였다. Hybridization에 사용된 probe는 cDNA를 함유한 운반체를 직접 nick translation kit(Pharmacia 27-9250)을 이용하여 제작하였다.

DNA 염기서열 결정 및 유전정보 검색

DNA 염기서열 결정은 Sequenase 2.0 Kit(USB)를 사용하였고 Kit 제작자가 권유하는 방법으로 행하였다. 먼저 pUC19 plasmid에 삽입된 RBSDV cDNA 5 μg 을 2 M NaOH로 5분간 실온에서 단산화하여 에탄올로 침전시킨

후 증류수에 녹여서 Sequenase, DTT, universal primer, dNTPs 및 [α - 32 P]dATP 등을 넣어 반응시킨 후 8% sequencing gel에서 3000V로 6시간 전기영동 하였다. 전기영동 후 젖어있는 gel을 rap으로 쓴 다음 직접 X-ray 필름에 감광시키고 12시간 후에 필름을 현상하여 염기서열을 결정하였다.

결과 및 고찰

흑조위축병 바이러스(RBSDV) 보독충 및 이병주 생산

흑조위축병 바이러스(RBSDV) 발생이 심한 경남 밀양, 진주, 함양 및 전남 순천, 나주 등지에서 채취한 보독애벌거를 감수성 벼 품종인 추청벼에 2~3주 흡즙시켜 보독충을 생산하였다. 그리고 흑조위축병 바이러스를 순수분리하기에는 벼 뿌리량이 극히 부족하므로 기주식물로서 감수성 품종으로 알려진 옥수수 수원 19호에 보독충을 흡즙시켜 이병주를 생산하였다. 옥수수는 파종 후 1엽의 유묘가 되었을 때 주당 5마리씩 접종하였으며 30~40일 경과 후 병증이 나타나는 것을 이병주로 하였다(Fig. 1). 흑조위축병 바이러스의 발병은 육안으로도 관찰할 수 있었으며 보다 확실한 확인을 위하여 전자현미경으로 균일한 정이십면체 RBSDV입자를 관찰하였다(Data not shown).

흑조위축병 바이러스 입자의 정제

순수한 흑조위축병 바이러스를 정제하기 위하여 이병된 옥수수 뿌리 1kg으로부터 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 분리하고 sucrose 밀도구배로 원심분리한 결과 Fig. 2.과 같이 두개의 바이러스 band를 얻을 수 있는데 아랫부분에서 순수한 바이러스 입자를 얻을 수

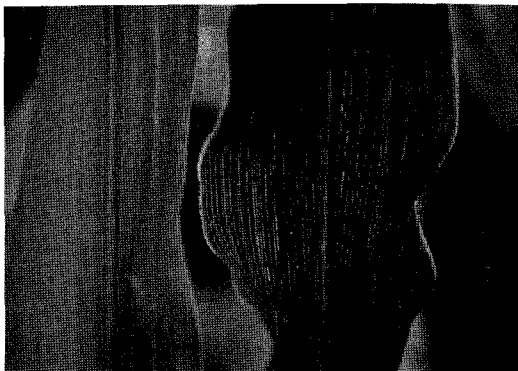


Fig. 1. Symptoms caused by Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV) on maize.

있었다. 윗 band는 아마도 바이러스 핵산이 없거나 바이러스 핵산을 부분적으로 함유하고있는 바이러스 입자로 구성되어있을 것으로 추정된다. 왜냐하면 윗 band로부터 바이러스 핵산을 분리했을 때는 agarose 전기영동상에서 뚜렷한 바이러스 핵산 band를 확인할 수 없었기 때문이다.

이와 같이 sucrose 밀도구배 원심분리로 얻어진 바이러스를 10% SDS로 상온에서 10분간 처리하여 바이러스 외피막을 파괴한 후 phenol 처리하여 이들 단백질을 제거하고 agarose gel에서 전기영동한 결과 Fig. 3과 같이 뚜렷한 8개의 RNA band를 관찰할 수 있었다. 한편 Omura¹⁷⁾는 분리능이 높은 polyacrylamide gel에서 RBSDV RNA를 전기영동했을 때 10개의 band를 확인하였다고 보고하였는데 본 실험에서 사용한 agarose gel은 polyacrylamide gel에 비해 분리능이 떨어지고 또한 Fig. 3에서 관찰되는 바와 같이 위에서부터 3번째와 7번째 band가 다른 band들에 비해서 밝기가 차이가 나기 때문에 각각 크기가 유사한 두개의 band가 중첩되었을 것으로 생각된다. 이와 같은 결과를 종합해보면 본 실험에서 RBSDV가 순수분리 되었고 계층조성도 보고된 바와 같이 10개의 계층 단편으로 구성되어 있음을 확인하였다. 따라서 순수 분리된 바이러스로부터 cDNA

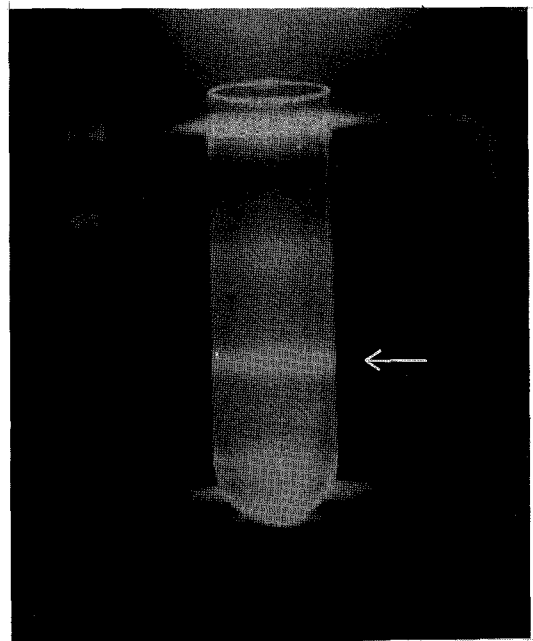


Fig. 2. Sedimentation pattern of RBSDV after centrifugation on 10~40% sucrose density gradient. Arrow indicates a band containing RBSDV particles.

library를 제작 하고 바이러스 유전자를 분리하는 실험에 착수할 수 있게 되었다.

RBSDV cDNA library 제작 및 cDNA 클론 분리

바이러스에 내재하는 유전자를 분리하여 저항성 유전자로 이용하기 위해서 흑조위축병 바이러스 RNA에 대한 cDNA library를 제작하였는데 흑조위축병 바이러스는 double stranded RNA로 구성된 바이러스 이므로 cDNA를 만들기위해 단선회가 필요하다. 흑조위축병 바이러스 RNA단편은 크기가 클 뿐만 아니라(1.7~4.3 kb) 구조도 단순한 형태가 아니라 2차, 3차 등 복합할 것으로 추정되고 있으므로 단선회 반응이 가장 중요할것으로 생각되었다. 따라서 본 실험에서는 RBSDV RNA를 100 °C 에서 5분간 열처리한 후 1mM CH₃HgOH 용액을 첨가하여 단선회 반응을 촉진시켰다. 또한 RBSDV RNA 단편들은 진핵세포 mRNA와는 다르게 poly(A)가 없는 것으로 알려져 있어서 단선회된 바이러스 RNA에 random primer를 먼저 부착시킨 후 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 최종적으로 얻은 cDNA library의 phage수는 1×10⁴ pfu/ml 이었고 약 60%정도가 흰색의 plaque를 형성하였으며 그중에서 무작위로 10개의 흰색 plaque를 선발하여 phage DNA를 분리하고 EcoRI으로 절단해본 결과 0.5~1.0 kb 크기의 cDNA 단편들을 함유하고 있었다. 이어서 RBSDV cDNA 단편이 삽입된

phage를 선발하기위해 바이러스 게놈 dsRNA로부터 random primer 방법에 의하여 합성된 probe를 이용, 위에서 만들어진 cDNA library에 hybridization한 결과 대부분의 흰색 plaque들이 RBSDV cDNA를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 삽입된 cDNA 단편들을 pUC 19 plasmid vector에 재삽입하여 8개의 clone을 얻었으며 이들 clone 중 가장 큰 것이 1.0 kb 정도로 흑조위축병 바이러스 게놈 단편 크기에 비해 작아서 RBSDV 게놈 전체를 포함하는 full-length cDNA가 만들어지지 않은 것으로 추정되었다. 이는 RNA로부터 cDNA를 만드는 과정에서 cDNA 합성이 충분히 이루어지지 않은 것으로 생각되고 이것은 다시 바이러스 게놈 특유의 구조적 형태에 기인한 것으로 생각된다. 그러나 본 실험에서 만들어진 cDNA library는 RBSDV 게놈 단편들을 부분적으로 포함하고 있는 것은 확실하고 따라서 무작위로 선발한 clone들 중에서 비교적 크기가 큰 한개의 clone (pRV3)을 선택하여 염기서열 결정 실험을 시작하였다.

RBSDV 게놈 단편별 cDNA 위치 확인 및 염기 서열 결정

분리된 cDNA 클론이 흑조위축병 바이러스의 어떤 게놈단편으로부터 유래된것인지를 확인하기 위해서 RBSDV 게놈 RNA와 cDNA를 probe로 사용하여 RNA gel-blot 실험을 실시하였다(Fig. 4). 실험결과 Fig. 4에서 보

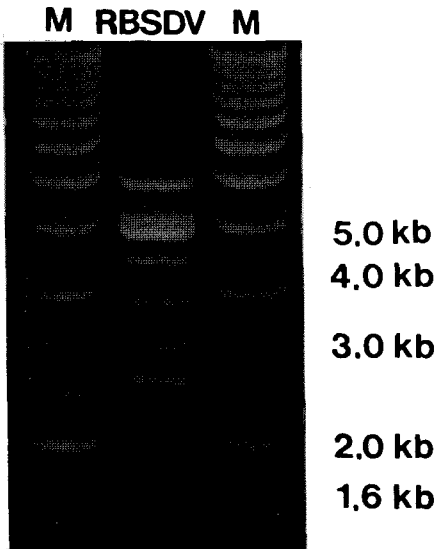


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of purified total RBSDV genomic RNAs. M, 1 kb ladder marker; RBSDV, RBSDV genomic RNAs. 3rd and 7th band from the top are double bands.

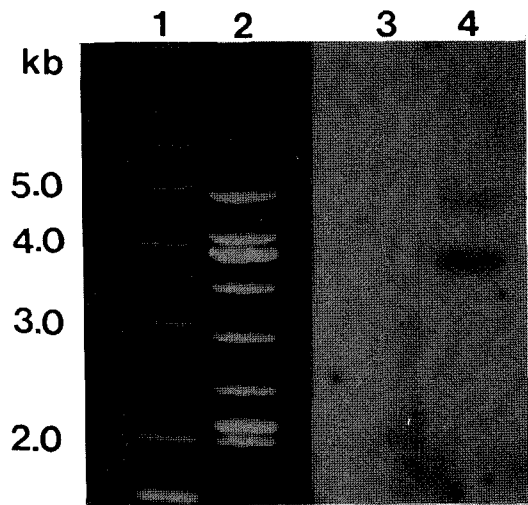


Fig. 4. RNA gel-blot analysis of RBSDV genomic RNAs with the pRV3 as a probe. Left and right panels are agarose gel and RNA gel-blot hybridization, respectively. Lanes 1 and 3, 1 kb ladder; lanes 2 and 4, RBSDV genomic RNAs.

여주고 있는 바와 같이 흑조위축병 바이러스 RNA 게놈 단편들을 가장 큰것을 1번으로해서 차례로 번호를 붙였을 때 pRV3은 3번 게놈 단편에 강하게 hybridization되는 것을 알았으며 1번 게놈 단편에도 약하게 반응하는 것으로 나타났다. 이 결과로 pRV3은 3번 게놈단편 유래의 cDNA임을 알게 되었고 1번 게놈 단편에도 약하게 반응하는 것은 homology가 낮은 유사한 염기서열이 1번 단편에 존재하거나, 동일한 sequence가 두 게놈 단편 사이에 부분적으로 중복 존재하는데 기인한 것으로 추정되었다.

현재까지 RBSDV게놈 중 7, 8, 10번 RNA를 제외하고는 유전 정보가 전혀 알려지지 않다. 따라서 RBSDV cDNA library에서 임의로 선택되었고 또한 RNA gel-blot으로 3번 게놈 단편에서 유래된 것으로 확인된 pRV3의 염기서열을 결정하였다(Fig. 5). 결정된 염기서열을 DNAsis program을 이용하여 open reading frame (ORF)

을 찾아본 결과 pRV3은 완전한 ORF는 아니지만 Fig. 5에서 보여주는 바와 같이 두개의 ORF를 부분적으로 갖고있으며 두 ORF 아미노산 서열간에는 유사성이 없는 것으로 확인되었다. 이는 Asamizu¹³⁾ 등이 식물 Reovirus에 속하는 Wound Tumor Virus(WTV)에서 12번째 게놈 단편의 terminal inverted repeats(IR)내에 2개의 ORF가 존재한다는 보고하였고, Marzachi¹⁵⁾ 등도 Maize Rough Dwarf Virus(MRDV)에서 6번째 게놈 단편에 거의 같은 크기의 2개의 ORF가 겹치지 않고 존재하며 이들 2개의 ORF의 아미노산 서열 간에는 유사성이 없다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다. 또한 pRV3 염기서열은 RBSDV 게놈 RNA 끝부분에 공통으로 나타나는 terminal sequence(5' AAGUUUUU---GUC3')와 inverted repeat(5' AUAAUGGCUGA---UCAGCUAU-UGU3')를 함유하고있지 않았는데 이것으로부터 pRV3가 3번 게놈의 양쪽 끝이 아닌 가운데 부분에 해당하는 clone임을 간접적으로 알수 있었다.

pRV3의 전체 염기서열을 GenBank Database에 수록이 되어있는 기존의 바이러스 유전자 염기서열들을 대상으로 homology search를 해본 결과 ORF1 부분이 동물세포에 감염하는 Equine influenza virus A의 hemagglutinin유전자와 50% 수준의 부분적인 homology를 보였다. 그러나 염기서열 homology 수준이 낮은데 아미노산 서열 상동성이 높지 않기 때문에 pRV3가 hemagglutinin 유사 유전자라고 판단하기 까지는 더 많은 유전정보가 확보돼야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Martyn, E. B. (1968) Plant virus names, CMI, 204
2. 이석순, 이진모 (1989) 흑조위축병이 심한 남부지방에서 옥수수를 중심으로한 사료작물 작부체계, 한국작물학회지, 34(1), 30-39
3. 이석순, 이진모 (1987) 흑조위축병 다발 지역에서 사일리지 옥수수 품종의 생산성, 한국초지학회지, 7(3), 140-145
4. Nuss, D. L., and Dall, D. J. (1991) Structural and functional properties of plant reovirus genomes, Advances in virus research, 38, 249-306
5. Granados, R. R. (1970) Maize and vectors, In K. Maramorosch [ed] Viruses, vectors and vegetation. Interscience Publishers, New York, London, Sydney, Toronto, 327
6. 이순형, 이기운, 이민효, 최용문, 유갑희, 김정수 (1981) 주요 작물 바이러스병의 분류 동정에 관한 시험, 농시연보, 372-381

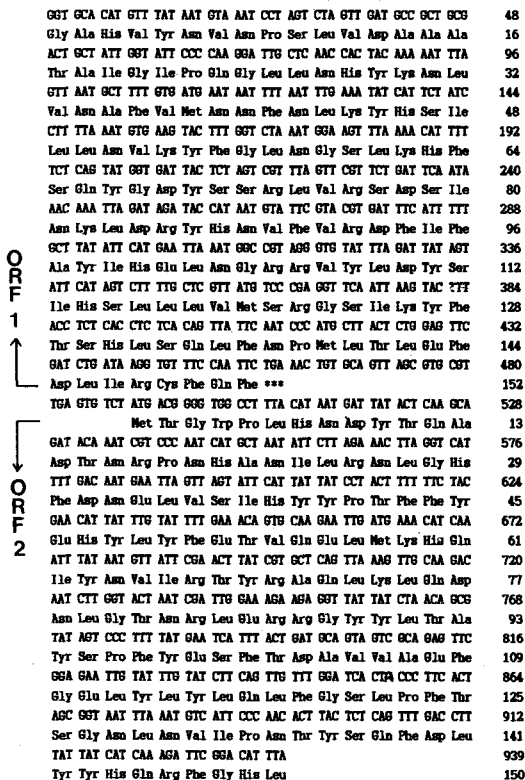


Fig. 5. Nucleotide and predicted amino acid sequences of pRV3. The coding, untranslated regions (upper), and protein (lower) sequences are shown. The triple-letter amino acid code is used. Arrows followed by ORF1 and ORF2 indicate the end of ORF1 and the start of ORF2, respectively.

7. Tyler, K. L. and Fields, B. N. (1990) *Virology*, second Edition. Raven Press, Ltd., NewYork, 45, 1271
8. Kawano, S. et al. (1984) *J. Jac. Agr. Hokkaido Univ.*, 61, 408
9. Azuhata, F., Uyeda, I. and Shikata, E. (1992) Conserved terminal nucleotide sequences in the genome of rice black streaked dwarf virus, *J. Gen. Virol.*, 73, 1593-1595
10. Anzola, J. V., Xu, Z., Asamizu, T and Nuss, D. L. (1987) Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interferin RNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 8301-8305
11. Asamizu, T., Summers, D., Motika, M. B., Anzola, J. V., and Nuss, D. L. (1985) Molecular cloning and characterization of the genome of wound tumor virus: A tumor-inducing plant reovirus, *Virology*, 144, 398-409
12. Dall, D. J., Anzola, J. V., Xu, Z., and Nuss, D. L. (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17, 3599
13. Omura, T., Y. Minobe, I. Kimura, H. Hibino, T. Tsuchizaki and Y. Saito (1985) *J. Gen. Virol.*, 66, 811
14. Uyeda, I., Kudo, H., Takahashi, T., Sano, T., Ohshima, K., Matsumura, T., and Shikata, E. (1989) Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 9, *J. Gen. Virol.*, 70, 1297-1300
15. Marzachi, C., G. Boccardo, and Nuss D. L. (1991) *Virology* 180, 518
16. Uyeda, I., Azuhata, F., and Shikata, E. (1990) *J. Faculty of Agriculture, Hokkaido University*, 64, 183
17. Omura, T., Y. Minobe, I. Kimura, and T. Tsuchizaki (1988) *J. Gen. Virol.*, 69, 227

A Molecular Study of Rice Black-Streaked Dwarf Virus

Jong-Sug Park, Shin-Chyul Bae¹, Young-Min Kim**, Young-Ki Paik**, Ju-Kon Kim and Young-Soo Hwang* (Department of Biochemistry, ¹Molecular Genetics, Agricultural Biotechnology Institute, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea. **Department of Biochemistry, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea)

Abstract: Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV), a member of the plant reoviridae fijivirus group, causes a serious damage for rice production in Korea. To characterize the RBSDV genome, virus particles were produced by feeding of planthopper (*Laodelphax striatellus* F.) carrying RBSDV to maize plants for 2 days. In 30~40 days after feeding, the viral particles were purified from the infected maize roots by using 10~40% sucrose gradient centrifugation. After treatment of 10% SDS to remove the viral coat proteins, ten viral double-stranded RNAs were resolved in agrose gel electrophoresis. Total dsRNA was then used to synthesize cDNA by reverse transcriptase and a cDNA library was constructed in the λ gt11 vector. The phages that contain RBSDV cDNA fragments were selected by hybridizing with the random-primed probe prepared from RBSDV dsRNAs. After subcloning of several cDNA fragments into the pUC19 plasmid vector, one clone (pRV3) was chosen for sequencing. The pRV3 clone was shown to be located on the RBSDV genome fragment No.3 by RNA gel-blot analysis. Sequence analysis of the clone revealed that the pRV3 contains two partial open reading frames.