

## RT-PCR을 이용한 보리누른모자이크바이러스(BaYMV)와 보리마일드모자이크바이러스(BaMMV)의 외피단백질 유전자 검정 및 해석

이 귀 재  
전북대학교 농과대학 농생물학과

### Analysis and Detection of Coat Protein Gene of Barley Yellow Mosaic Virus and Barley Mild Mosaic Virus by RT-PCR

Kui Jae Lee

Dept. of Agricultural Biology, College of Agriculture, Chonbuk Nat'l Univ. Chonju 561-756

**ABSTRACT:** Using the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), a rapid and sensitive assay method for the detection and identification of barley yellow mosaic virus (BaYMV) and barley mild mosaic virus (BaMMV) was adapted. Two units of primers from each virus were selected and used for the determination of two different viruses. PCR fragments of BaYMV (ca. 0.9kb) and BaMMV (ca. 0.8kb) were obtained from the desinged method for the assay of BaYMV and BaMMV coat protein. PT-PCR fragments were cloned using vector pT7 Blue and the sequences of the selected clones were analyzed. Coat protein of BaYMV and that of BaMMV consisted of 297 amino acids (891 nucleotides) and 251 amino acids (753 nucleotides), respectively. The analysis of coat protein genes from these two viruses showed that 45.6% of nucleotides sequence and 34.9% of amino acid in BaYMV were homologous to those in BaMMV.

**Key words:** BaYMV, BaMMV, RT-PCR, coat protein, sequence.

추파보리 재배포장에 발생하는 토양전염성 바이러스에 의한 황화현상은 유럽과 아시아의 맥류재배포장에 발생하여 많은 피해를 주고 있다(1, 25). 보리에 황화현상을 일으키는 보리누른모자이크바이러스병(縞萎縮病, barley yellow mosaic virus, BaYMV)은 일본에서 최초로 보고되었으며(10), 최근에는 독일의 Huth 등(8)이 보고한 보리마일드모자이크바이러스(barley mild mosaic virus, BaMMV)와 BaYMV가 혼합 감염되어 심한 피해를 주고 있다. BaYMV와 BaMMV의 특징은 폭 13 nm, 길이 500~600 nm 및 250~300 nm의 크기를 가지는 사상형 바이러스이며, 약 7.6 kb의 RNA 1과 3.5 kb의 RNA 2로 구성된 ssRNA 바이러스로서 구조가 서로 비슷하다(8, 9, 14, 24). 최근 들어 이들 바이러스에 대한 혈청학적 반응, 생물학적인 성질 및 바이러스의 여러 가지 특성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1, 14, 15, 24). 이들 바이러스는 토양균류인 *Polymyxa graminis*에 의해 매개되며 분류학적 위치로는 *Potyviridae*의 bymovirus로 분류되고 있다(11, 12, 18, 19, 27). Bymovirus의 진단에 이용되는 것은 주로 혈청학적인 방법인 ELISA법과 금입자를 이용한 면역전자현미경법을 이용하고 있다(5, 7, 15,

16, 20, 26). 최근 들어 바이러스의 유전자 구조가 밝혀지면서 분자 수준의 분류가 이루어지고 있다(2, 3, 19). Polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 BaYMV(17, 22, 23)의 유전자 해석 및 RACE(rapid amplification of cDNA ends) PCR법을 이용하여 BaMMV(13, 15, 21)의 유전자 해석이 있었지만, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 BaYMV 및 BaMMV의 외피단백질의 증폭 및 유연관계를 비교한 보고는 없다. 본 실험은 ELISA법에 의하여 보리재배포장에 발생한 BaYMV 및 BaMMV를 확인하고, RT-PCR을 이용하여 BaYMV와 BaMMV 외피단백질 유전자를 해석하여, 보리바이러스병의 신속한 진단체계를 확립하고자 실시하였다.

#### 재료 및 방법

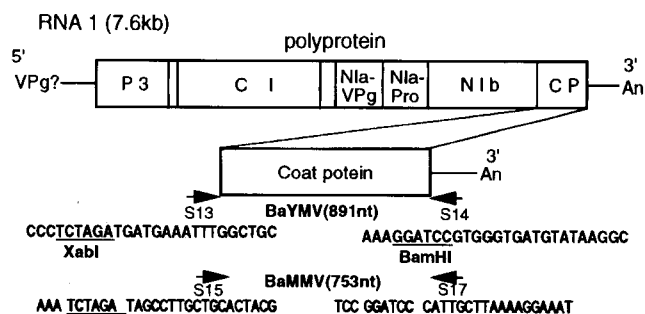
**공시재료.** 재료는 전라북도 익산시 및 전라남도 해남군소재 보리 포장에서 바이러스병 증상으로 보이는 황화현상의 보리를 채취하여 ELISA 재료로 이용하였다. 항혈청은 BaMMV-Kor(15), BaYMV-III 및 soil-borne

wheat mosaic virus(SBWMV) 항혈청과 대조바이러스는 BaMMV-Ka1 및 BaYMV-III를 일본농업연구센타에서 분양 받아 이용하였다. ELISA은 Clark and Adams (4)의 방법을 따랐으며, 이를 통해 BaYMV 및 BaMMV의 감염 여부를 확인하였다. RT-PCR 재료로는 ELISA 검정에서 단독 및 혼합 감염된 재료중 전복 익산시 및 전남 해남군 보리재배포장에서 채취한 감염엽을 이용하였다.

**전체 RNA분리.** BaYMV와 BaMMV에 단독 및 혼합 감염된 보리잎(cv. Baegdong)을 재료로 핵산 추출 시약인 Sepa Gene Kit(Sanko Junyaku Co.)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 감염잎 10 mg과 tris-buffer(sol. I, 100 µl)를 넣고 power homogenizer로 마쇄한 후 guanidine thiocyanate가 함유된 단백질 변성제(sol. II, 100 µl) 및 acetate buffer(sol. V, 50 µl)를 첨가하여 잘 혼합하였다. 그리고 클로르포름(sol. III, 700 µl) 및 추출제인 sodium acetate(sol. IV, 400 µl)를 넣고 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상등액에 glycogen 2 µl 및 iso-propanol 500 µl를 혼합하고 -80°C에 20분간 정지 후 15,000 rpm으로 10분간 원심분리 시켜 핵산을 침전시켰다. 핵산은 70% 에탄올로 수세 후 진공건조시켜 멸균증류수에 재회석하여 RT-PCR 시료로 사용하였다.

**RT-PCR반응.** RT-PCR반응은 RT-PCR high kit (Toyobo Co.)의 사용 설명서에 따랐다. 분리된 total RNA 1 µl에 혼합액 [5×RNase buffer, 0.1 M DTT, 5 mM dNTPs dH<sub>2</sub>O, Super Script RT(10 U/µl)와 RNase inhibitor(10 U/µl)] 8 µl를 넣고 42°C/30분간 역전사반응을 시켜 first strand cDNA를 합성시킨 다음 99°C/5분간 열처리하여 PCR반응에 이용하였다. First strand cDNA를 주형으로 해서 Ampli. Tag DNA polymerase(2.5 U/µl)를 이용하여 PCR반응에 따라 증폭시켰다. Primer는 柏崎 등(11, 12, 13)과 이 등(15)이 보고한 염기서열에 준하여 외피단백질 부분을 증폭 및 cloning할 수 있도록 제작된 특이 primer를 이용하였다. BaYMV 및 BaMMV의 primer는 공히 *BamH I* 및 *Xba I* cutting site가 있게 고안하였으며(Fig. 1), BaYMV는 S14와 S13, BaMMV는 S17과 S15 primer를 이용하였다(Fig. 1). PCR반응은 94°C에서 1분, 55°C에서 2분 및 72°C에서 3분간 30 cycle의 조건으로 수행하고 72°C에서 7분간 신장반응을 시켰다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide(1 mg/ml)에 염색후 전기영동대를 확인하였다.

**Sequencing 및 유전자분석.** Cloning은 RT-PCR 결과 얻어진 합성물을 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Co.)를 이용하여 정제하고 에탄올 침전법에 따라 침전 시켜 사용하였다. Ligation반응은 합성물(90 ng)과 pT7 Blue(Novagen Co., 60 ng) 벡터를 이용했고,



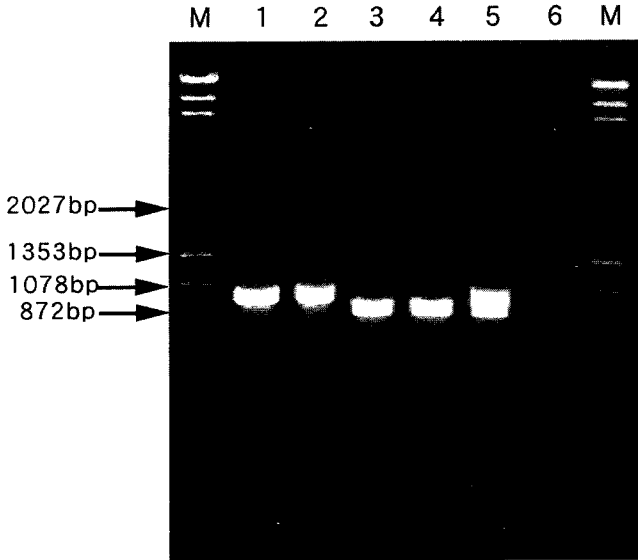
**Fig. 1.** The genetic map of the RNA 1 (upper) and the oligonucleotide primers used to amplify of the BaYMV and BaMMV coat protein gene (down).

*Escherichia coli* JM109 competent cell에 transformation시켰다. BaYMV는 HNF1, 9, 13과 BaMMV는 KorF3, 4, 5의 clone을 선별하여 sequencing을 하였다. Sequencing은 ABI PRISM dye primer cycle sequencing core kit(Perkin elmer Co.) -21M13 forward 및 -21M13 reverse primer를 이용하여 반응시키고, ABI PRISM 377 DNA sequencing system을 이용하여 sequencing하였다. Sequence data는 DNASIS system (Hitachi Software Engineering)을 이용하여 분석하였다.

## 결 과

**RT-PCR 반응.** 전남 해남군 포장에서 채취한 BaYMV 감염주 및 전북 익산시 포장에서 채취한 BaMMV 감염주와 분양받은 일본산 계통 BaYMV-III 및 BaMMV-Ka1 등을 재료로 하여 RT-PCR을 수행한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 해남군(lane 1) 및 일본산(lane 2) BaYMV 계통은 약 0.9 kb, 익산시(lane 3) 및 일본산(lane 4) BaMMV 계통은 약 0.8 kb 부위에 단일 PCR 증폭산물 반응대를 얻었다. Fig. 2의 5번은 익산시 포장의 BaYMV와 BaMMV에 혼합감염된 보리(cv. Baegdong)로 RT-PCR한 결과 BaYMV 및 BaMMV로 추정되는 약 0.9 kb 및 약 0.8 kb 부위에 2개의 PCR 증폭산물 반응대를 얻었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 증폭산물의 크기가 달랐기 때문에 BaYMV 및 BaMMV가 혼합감염된 재료에서도 구별이 가능하였다. 진전주를 넣은 6번에서는 RT-PCR 반응이 전혀 일어나지 않았다.

**외피단백질 sequencing 및 상동성.** RT-PCR 증폭산물을 pT7Blue 벡터에 cloning하여 선별된 clone HNF1, 9, 13과 KorF 3, 4, 5으로 염기서열을 결정하였다(Fig. 3, 4). BaYMV의 외피단백질은 297개 아미노산(891개 염기)으로(Fig. 3), BaMMV는 251개 아미노산(753개 염기)으로 각각 구성되어 있었다(Fig. 4). BaYMV 및 BaMMV에서 3개 clone간의 차이는 없었다. BaYMV 및



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplified products of BaYMV and BaMMV in total RNA extracted from infected barley leaves. M: Size marker (DRigest III, Toyobo Co.); 1: BaYMV-Haenam, 2: BaYMV-III, 3: BaMMV-Iksan, 4: BaMMV-Ka1, 5: BaYMV+BaMMV mixed infection (Haenam field), 6: healthy barley.

BaMMV의 외피단백질의 sequence data는 DNASIS system으로 분석하여 본 결과 아미노산의 상동성은 34.9%, 염기의 상동성은 45.6%였다.

**고 찰**

보리에 황화현상을 일으키는 바이러스인 BaYMV-HN(전남해남에서 분리)와 BaMMV-Kor(전북익산에서 분리)을 검정하고자 특이 primer를 이용하여 RT-PCR을 전개한 결과 바이러스 유전자 증폭에 성공했다. BaYMV에서는 약 0.9 kb, BaMMV에서는 약 0.8 kb의

PCR 증폭산물을 얻었다. 과거에는 BaYMV 및 BaMMV를 따로 따로 RT-PCR 반응을 시켰으나 본 실험에서는 BaYMV와 BaMMV에 혼합감염된 재료를 한번에 RT-PCR 한 결과 BaYMV는 약 900 bp, BaMMV는 약 800 bp의 크기별로 증폭되어 BaYMV 및 BaMMV를 동시에 식별할 수 있었다. 따라서 차후에 BaYMV 및 BaMMV가 혼합감염되어 있다 하더라도 빠른 시간내에 동시에 두 개의 바이러스를 진단할 수 있을 것이다.

RT-PCR 산물을 pT7Blue 벡터에 cloning하여 선발된 clone 3개를 선별하여 염기서열을 확인한 결과 BaYMV의 외피단백질은 297개의 아미노산(891개 염기), BaMMV의 외피단백질은 251개의 아미노산(753개 염기)으로 구성되어 있었다. 즉, BaYMV의 외피단백질 유전자가 BaMMV의 외피단백질 유전자 보다 138염기(46개 아미노산)가 길었다. 이러한 결과는 柏崎 등(11,12)과 Foulds 등(6)의 보고(BaYMV의 coat protein은 891염기 및 297개의 아미노산으로 구성)와 일치하였으며, BaMMV 또한 柏崎 등(13,21)과 Lee 등(15)의 보고(753개 염기와 251개 아미노산으로 구성)와 일치하였다. 또한 BaYMV 및 BaMMV의 외피단백질 유전자의 sequence data를 DNASIS system을 이용하여 분석하여 본 결과 염기의 상동성은 45.6%, 아미노산의 상동성은 34.9%였다. 이러한 결과는 Kashiwazaki 등(12,13)의 결과와 같고, BaYMV 및 BaMMV가 같은 bymovirus에 속하지만 유연관계가 멀다는 보고와 관계가 있는 것으로 생각된다(8,9). 따라서 BaYMV와 BaMMV를 진단할 때는 본 실험에서 고안된 두쌍의 primer(BaYMV: S14+S13, BaMMV: S17+S15)를 이용할 것을 제안한다. 또한 우리나라의 각 지역에 분포하는 BaYMV 및 BaMMV를 RT-PCR하여 유연관계를 살펴보고 접종실험 등을 통하여 병원성을 조사하면 정확한 계통구분이 가능할 것으로 판단된다.

```

AADPLTDAQKEDARIAAADGARFELADADRRRKEADRVEAARVKKAAADAALKPVNLTAT      60
RTPTEDDGKCLKTPSGARIPSSAADGNWSVPATKQVNAGLTLKIPLNKLKSVPKSVMEHNN      120
SVALESELKAWTDAVRTSLGITDEAWIDALIPFIGWCCNNGTSDKHAENQVMQIDSGKG      180
AVTEMSLSPFIVHARMNGGLRRIMRNYSDETVLLITNKNLVAHWSMKHGASANAKYAFDF      240
FVPRSWMNPQDIEVSKQARLAAALGTGYNTMLTSDTTNLRKTTNHRVLDSDGHPFLT      297
    
```

**Fig. 3.** The deduced amino acid sequences of the coat protein gene (297 amino acid) of BaYMV (Haenam field isolate).

```

SGKDEPDPIVPPVSDTDLTNLAAAPPANTRSRAVVPRGTSWNLPEPKMRMLGFKSKINI      60
ETLADVPEGYMNTFASVATETQRRKWEETTRGDFGITDDEKWEKLLIAACIYFADNGTSP      120
NFDEELTMEVNGGLNSIKEYPVRPFVVRRAKKISLRRIFRCYSIETKLMFVKLRRVPQWA      180
IKHGCLDEIVFDFMIPDQFTSRTALETLKQTKLAAIGVGTNSLLTSEQTNMRTTETRRR      240
NDYDGHEALLR                                                              251
    
```

**Fig. 4.** The deduced amino acid sequences of the coat protein gene (251 amino acid) of BaMMV (Iksan field isolate).

## 요 약

RT-PCR를 이용하여 BaYMV와 BaMMV를 민감하고 신속하게 검정 및 동정 할 수 있는 방법을 고안하였다. 두 쌍의 primer로 BaYMV 및 BaMMV의 외피단백질을 구별할 수 있었다. BaYMV(900 bp)와 BaMMV(800 bp)의 PCR 증폭산물을 얻어 pT7Blue 벡터에 cloning하여 염기서열을 결정 한 결과 BaYMV의 외피단백질은 297 아미노산(891개 염기), BaMMV의 외피단백질은 251 아미노산(753개 염기)으로 구성되어 있었다. BaYMV와 BaMMV의 외피단백질 상동성을 보면, 염기는 45.6%, 아미노산은 34.9%였다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단의 1997년도 해외 Post-Doc. 지원에 의하여 수행된 연구의 일부입니다. 재료 채취에 도움을 주신 호남농업시험장 전작과 맥류실 관계자 여러분에게 감사 드립니다.

## 참고문헌

- Adams, M. J., Swaby, A. G. and Jones, P. 1988. Occurrence of two strains of barley yellow mosaic virus in England. *Pl. Path.* 36: 610-612.
- Barnett, O. W. 1991. *Potyviridae*, a proposed family of plant viruses. *Arch. Virol.* 118: 139-141.
- Berger, P. H., Wyatt, S. D., Shiel, P. J., Silbernagel, M. J., Druffel, K. and Mink, G. I. 1997. Phylogenetic analysis of the *Potyviridae* with emphasis on legume-infecting potyviruses. *Arch. Virol.* 142: 1979-1999.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Ehlers, U. and Paul, H. L. 1986. Characterization of the coat proteins of different types of barley yellow mosaic virus by polyacrylamide gel electrophoresis and electroblot immunoassay. *J. Phytopathology* 115: 294-304.
- Foulds, I. J., Lea, V. J., Sidebottom, C., James, C. M., Boulton, R. E., Brears, T., Slabas, A. R., Jack, P. L. and Stratford, R. 1993. Cloning and sequence analysis of the coat protein gene of barley mild mosaic virus. *Virus Res.* 27: 79-89.
- Hariri, D., Lapierre, H., Filleur, S., Plovie, C. and Delaunay. 1996. Production and characterization of monoclonal antibodies to barley yellow mosaic virus and their use in detection of four bymoviruses. *J. Phytopathology.* 144: 331-336.
- Huth, W., Leseman, D. E. and Paul, H. L. 1984. Barley yellow mosaic virus: purification, electron microscopy, serology and other properties of two types of the virus. *Phytopath. Z.* 111: 37-54.
- Huth, W. and Adams, M. J. 1990. Barley yellow mosaic virus (BaYMV) and BaYMV-M: two different viruses. *Intervirology* 31: 38-42.
- Ikata, S. and Kawai, I. 1940. Studies on wheat yellow mosaic virus. *Noji Kairyō Shiryo* 154: 1-123.
- Kashiwazaki, S., Hayano, Y., Minobe, Y., Omura, T., Hibino H. and Tsuchizaki, T. 1989. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of barley yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 70: 3015-3023.
- Kashiwazaki, S., Minobe, Y., Omura, T. K. and Hibino, H. 1990. Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA 1: a close evolutionary relationship with potyviruses. *J. Gen. Virol.* 73: 2173-2181.
- Kashiwazaki, S. 1996. The complete nucleotide sequence and genome organization of barley mild mosaic virus (Na1 strain). *Arch. Virol.* 141: 2077-2089.
- 이귀재, 소인영, 柏崎哲. 1998. 보리누른모자이크바이러스 (BaYMV)의 분리 및 동정. *한국식물병리학회지* 14: 62-67.
- Lee, K. J., Kashiwazaki, S., Hibi, T. and So, I. Y. 1996. Properties and capsid protein gene sequence of a Korean isolates of barley mild mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62: 397-401.
- Nomura, K., Kashiwazaki, S., Hibino, H., Inoue, T., Nakata, E., Tsuzaki, Y. and Okuyama, S. 1996. Biological and serological properties of strains of barley mild mosaic virus. *J. Phytopath.* 144: 103-107.
- Poggi Pollini, C., Giunchei, L., French, R., Langenberg, W. G. and Delogu, G. 1995. Polymerase chain reaction identification of barley yellow mosaic virus and barley mild mosaic virus. *Phytopath. Medit.* 34: 114-119.
- Richter, J., Rabenstein, E., Proll, E. and Vetten, H. J. 1995. Use of cross-reactive antibodies to detect members of the *Potyviridae*. *J. Phytopath.* 143: 459-464.
- Salm, S. N., Rey, M. E. C. and Rybicki. 1996. Phylogenetic justification for splitting the *Rymovirus* genus of the taxonomic family *Potyviridae*. *Arch. Virol.* 141: 2237-2242.
- Schenk, P. M., Steinbi, H. H., Mller, B. and Schmittz, K. 1993. Association of two barley yellow mosaic virus (RNA2) encoded proteins with cytoplasmic inclusion bodies revealed by immunogold location. *Protoplasma* 173: 113-122.
- Schlichter, U., Shon, A., Peerenboom, E., Schell, J. and Steinbisis, H. H. 1993. Molecular analysis of the capsid protein gene of a German isolate of barley mild mosaic virus. *Plant Cell Rep.* 12: 237-240.
- Shi, N. N., Zhu, M., Chen, J., Stratford, R., Wilson, T. M. A., Antoniw, J. F., Foulds, I. J., MacFarlane, S. A. and Adams, M. J. 1995. Molecular characterization of UK isolates of barley yellow mosaic bymovirus. *Virus Research* 38: 193-204.
- Shi, N. N., Chen, J., Wilson, T. M. A., Macfarlane, S. A., Antoniw, J. F. and Adams, M. J. 1996. Single-strand conformation polymorphism analysis of RT-PCR products of UK isolates of barley yellow mosaic virus. *Virus Research* 44: 1-9.

24. 소인영, 이귀재, 전길형, 柏崎哲, 土崎常男. 1998. 남부지방에 발생하는 보리마일드 모자이크바이러스(BaMMV)의 분리 및 동정. 한국식물병리학회지 14:68-73.
25. So, In Young, Lee, Kui Jae, Chon, Kil Hyung and Seo, Jae hwan. 1997. Distribution and screening for barley cultivars resistance to barley yellow mosaic virus and barley mild mosaic virus in southern Korea. *Korean J. Plant. Pathol.* 13:118-124.
26. Usugi, T. and Saito, Y. 1976. Purification and serological properties of barley yellow mosaic virus and wheat yellow mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 42:12-20.
27. Ward, C. W. and Shukla, D. D. 1991. Taxonomy of *Po-tyviruses*: Current problems and some solutions. *Intervirolgy* 32:269-296.

(Received July 20, 1998)