

## RT-PCR에 의한 박 종자의 오이녹반모자이크바이러스 검정

이숙경 · 송완엽<sup>1</sup> · 김형무\*전북대학교 농생물학과, <sup>1</sup>전북대학교 농업과학기술연구소Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Bottle Gourd Seeds by RT-PCRSook-Kyung Lee, Wan-Yeob Song<sup>1</sup> and Hyung-Moo Kim\*

Department of Agricultural Biology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

<sup>1</sup>Institute of Agricultural Science & Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received on January 26, 2004)

*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) was a major pathogen of watermelon and had affected seriously to watermelon production in Korea. Rapid and sensitive detection method of CGMMV associated with bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) seeds was developed by using RT-PCR in this study. A pair of primer, Wmf1 and Wmr1, specific for CGMMV was designed from coat protein gene sequences of CGMMV-W and used for amplifying 420 bp product in RT-PCR. To simplify the virus extraction procedure and reduce an inhibitor from the extract for the RT-PCR, some methods using ethanol precipitation, double filtration, polyethylene glycol precipitation and phenol/chloroform/ isoamyl alcohol extraction procedure were compared and the phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction procedure was selected by its enhanced sensitivity. This detection method using the selected extraction step and the primers for RT-PCR could reliably detect an infected level of one CGMMV-infested seed in 1,000 seeds. This rapid and sensitive RT-PCR assay provides a useful tool for the specific detection of CGMMV in bottle gourd seed samples containing high levels of background inhibitors.

**Keywords :** Bottle gourd seed, CGMMV, phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction procedure, RT-PCR

이녹반모자이크바이러스(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)는 Tobamovirus속의 바이러스로써 유럽에서 *Cucumber virus* 3(CV3)와 *Cucumber virus* 4(CV4)로 처음 보고 되었고(Ainsworth, 1935), 그 계통으로 Indian strain C(Vasudeva 등, 1949), watermelon strain(Komuro 등, 1971) 그리고 SH strain(Ugaki 등, 1991)이 보고되었다.

우리나라에서는 1989년 함안, 진주 지역 수박에서 CGMMV의 발생이 처음으로 확인되어 보고된 이후(Lee 등, 1990), 1998년에는 충청남도, 충청북도, 전라북도, 경상북도 전국 25개 시·군으로 발병지가 확대되고 있다. 이 CGMMV는 불활성화 온도가 90°C로 물리적 안정성이

높으며, 종자, 토양 및 즙액전염을 한다. 그 중에서 농업적 측면에서 경제적으로 가장 큰 비중을 차지하는 것은 종자 전염으로 수박 종자 및 대목용 박 종자이다(Lee, 1997). CGMMV는 박에는 큰 피해를 나타내지는 않지만, 박 종자에서 종자전염을 하고 이것을 대목으로 이용한 바이러스가 감염 과실의 상품성을 손실하게 되는 주요인으로 작용한다.

수박의 대목으로 사용하는 박 종자의 경우 무배유 종자로서 다량의 전분과 단백질을 함유하고 있어 일반적인 진단 방법인 ELISA에 의해서는 종자 추출물 내에 반응을 억제시키는 물질들이 함유되어 있어 특이성과 민감도가 크게 감소한다. RT-PCR에 의한 진단방법도 전체 RNA를 분리하는 과정에서 반응 억제물질이 함유되어 있어 진단이 어렵다. 이에 박 종자로부터 바이러스만을 추출하는 방법의 개발이 RT-PCR에 의한 진단으로 특이성과 민감

\*Corresponding author

Phone)+82-63-270-2527, Fax)+82-63-270-2531

E-mail)mc1258@chonbuk.ac.kr

도를 높이는 데 필요하다.

본 연구는 포장의 CGMMV 발병 억제를 위하여 이용될 수 있는 효율적인 종자 검정 방법 개발을 위하여 수박 대목용 박 종자로부터 CGMMV를 효율적으로 추출하고, 이를 RT-PCR로 진단해서 보다 신속하고 특이적으로 종자 검정하는 방법을 개발하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

**공시 식물 및 종자.** 1999~2003년도에 걸쳐 전북과 충남 지방의 박, 수박 재배 포장에서 녹만모자이크 병징을 보이는 개체를 수집하여 실험에 이용하였고, 원예연구소에서 2개의 Potyvirus속인 *Watermelon mosaic virus*(WMV), *Zucchini yellow mosaic virus*(ZYMV), 1개의 Cucumovirus속

인 *Cucumber mosaic virus*(CMV) 그리고 1개의 Tobamovirus속인 CGMMV-W를 분양 받아 실험에 대조구로 이용하였다.

**잎에서의 바이러스 증식 및 RNA 추출.** 수집에 의해 CGMMV로 의심되는 식물체를 독말풀(*Datura stramonium*)에서 3번 계대하여 단일 국부 병징을 확인한 후 박에서 증식시켰다. RT-PCR에서 primer와의 특이성 검정을 위하여, 증식된 잎에서 전체 RNA추출은 RNase Plant Mini Kit(QIAGEN)을 이용하여 실시하였다.

**이병 박 종자로부터 바이러스 추출.** 종자검정을 위한 간편한 바이러스 추출법을 선별하기 위하여, 1 M NaOAc와 95% ethanol을 이용하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 침전시킨 후 원심 분리하는 ethanol 침전에 의한 추출(Hildeman 등, 1997), 0.2  $\mu\text{m}$ 와 0.8  $\mu\text{m}$  filter를 이용한 double filtration에 의한 추출(Paul 등, 1991), 8% polyethylene glycol(PEG) 8,000

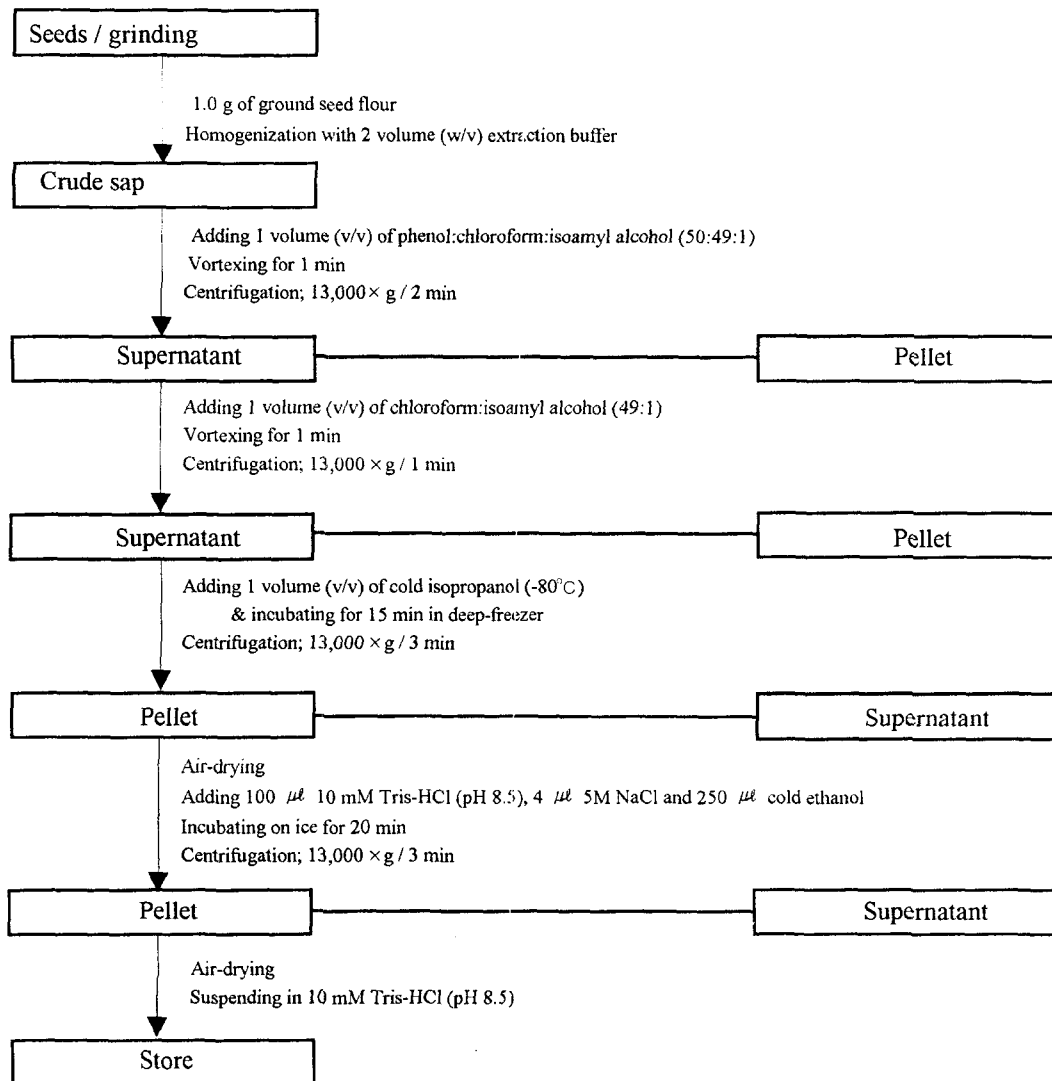


Fig. 1. Total RNA extraction procedure by phenol/chloroform/isoamyl alcohol method.

을 이용하여 1시간 동안 섞은 후 원심분리하는 PEG 침전에 의한 추출(Lewis 등, 1998) 및 phenol/chloroform/isoamyl alcohol에 의한 추출(Wylie 등, 1993; Njeru 등, 1997)(Fig. 1)을 시도하였다. 각 추출법에 사용된 박 종자는 1,000립(약 100 g)을 기준으로 사용하였다.

**외피단백질 유전자의 primer 제작 및 RT-PCR.** GeneBank에 보고된 CGMMV의 염기서열들을 비교하여 외피단백질 염기서열 중에서 strain에 homology가 있는 부위에서, OLIGO v5.0 program을 이용하여 CGMMV를 공통적으로 증폭시킬 수 있는 Wmf1(5'-TTATTGCGTTTAGTGCTTCTTATG-3')과 Wmr1(5'-AAAACGCGCTTCAAATG-3')로 primer를 고안하였다.

RT-PCR은 GeneAmp RNA PCR Kit(Perkin Elmer Cetus)을 이용하였으며, 먼저 20  $\mu$ l의 RT master mixture (5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 $\times$ PCR buffer II, 1 U RNase inhibitor, 2.5 U MuL<sub>v</sub> reverse transcriptase, 100 pmol Wmr1 primer, 1.0 mM dNTP, 3.0  $\mu$ l 전체 RNA)를 준비한 후 reverse transcription을 위하여 42°C에서 15분, 99°C에서 5분, 5°C에서 5분 처리하였다. PCR증폭을 위한 80  $\mu$ l의 PCR master mixture의 준비를 위해 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 $\times$ PCR buffer II, 1.0 U Taq DNA polymerase, 각각 100 pmol의 Wmr1과 Wmf1 primer 및 1-2  $\mu$ l의 RT산물을 혼합하여 94°C에서 2분 처리 후 94°C에서 50초, 62°C에서 50초(각 cycle마다 1°C씩 감소), 72°C에서 50초의 조건으로 12 cycle과 94°C에서 50초, 50°C에서 30초 및 72°C에서 50초의 조건으로 30 cycle의 PCR증폭을 수행하였으며 최종 RT-PCR 산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

**RT-PCR을 이용한 종자검정의 특이성 및 민감도 조사.** RT-PCR을 이용해서 종자 감염 여부를 진단하기 위해 원예연구소에서 건전 종자와 포장에서 80%이상의 CGMMV 이병을 보이는 박 종자와 수박 종자를 분양 받아 시료로 사용하였다. 진단방법의 민감성을 알아보기 위해 1개의 이병 박 종자에 감염되지 않은 건전 종자를 섞어 비율을 조정하였다. 비율은 1립의 이병 종자에 건전 종자 10(10%), 50(2%), 100(1%), 500(0.2%), 1,000(0.1%)립의 수준으로 조절하여 마쇄한 후 각각 1g씩 3반복을 취하여 각각의 바이러스 추출 방법에 의해 바이러스를 추출한 후 RT-PCR에 이용하였다(Wylie 등, 1993).

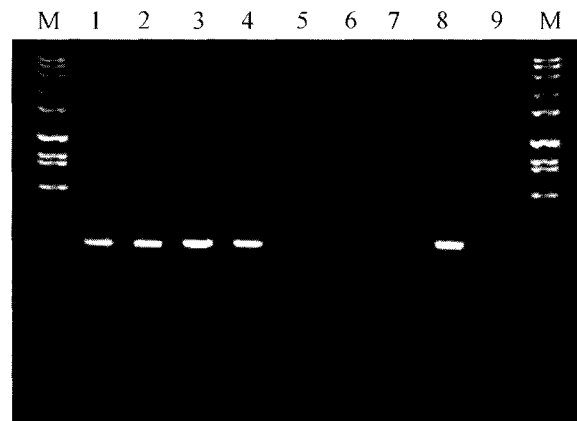
## 결과 및 고찰

**제작된 primer의 특이성.** GeneBank에 보고된 CGMMV의 외피단백질 관련 염기서열로부터 strain에 관계없이 특

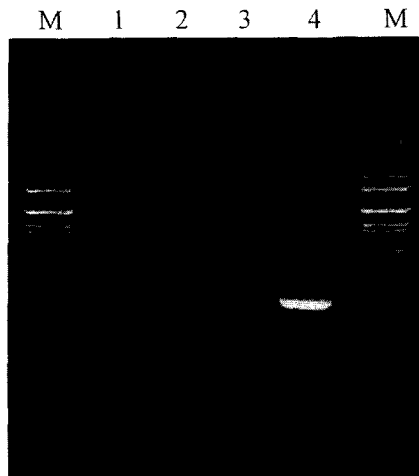
이성이 높은 부위에서 증폭이 가능한 Wmf1과 Wmr1의 primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다.

공시된 CGMMV-W 분리주와 포장에서 채집된 CGMMV에 감염된 박, 수박의 이병 잎에서 추출한 전체 RNA와 CGMMV에 감염된 박, 수박의 종자에서 추출한 바이러스를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 420 bp 크기의 증폭된 밴드를 확인하였다. 그러나 공시된 WMV, CMV, ZYMV에 감염된 잎의 전체 RNA 추출물에서는 증폭 산물이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이 결과로 제작된 primer들은 CGMMV에 특이성이 있음을 알 수 있다.

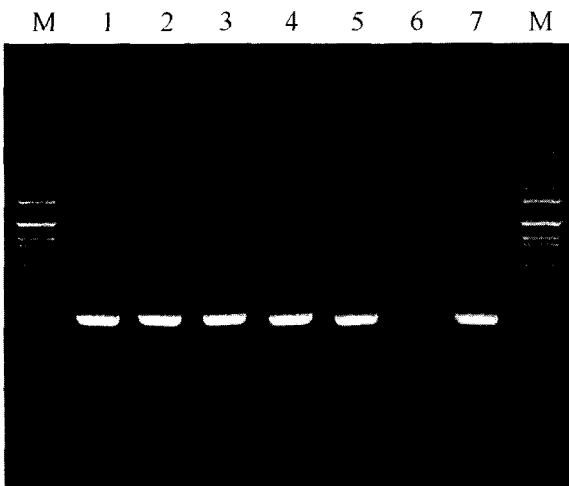
**이병 박 종자로부터 바이러스의 추출.** 80% 이상의 CGMMV에 오염된 박 종자를 이용하여 ethanol 침전에 의한 추출, double filtration에 의한 추출, PEG 침전에 의한 추출 및 phenol/chloroform/isoamyl alcohol에 의한 바이러스를 추출한 후 RT-PCR을 이용해서 검정하였다. 그 결과 ethanol 침전, double filtration, PEG 침전에 의한 추출법은 RT-PCR에 의해 DNA절편이 증폭되지 않았고, phenol/chloroform/isoamyl alcohol에 의한 추출법만이 420 bp의 CGMMV 바이러스가 분리되어 DNA절편이 증폭되었다(Fig. 3). 신속하고 간편한 종자검정 방법의 개발을 위하여 종자로부터 바이러스를 간편하게 추출할 수 있는 방법이 필요하다. 따라서, RT-PCR을 위한 간편한 추출법을 선별하기 위해 ethanol 침전, double filtration, PEG 침전 및 phenol/chloroform/isoamyl alcohol에 의한 추출법을 비교하였다. Ethanol 침전, double filtration 및 PEG 침전



**Fig. 2.** Specific RT-PCR detection of CGMMV by using total RNA extract from watermelon and bottle gourd leaves and seeds : lane 1, CGMMV-infested bottle gourd leaf; lane 2, CGMMV-infested bottle gourd seed; lane 3, CGMMV-infested watermelon leaf; lane 4, CGMMV-infested watermelon seed; lane 5, CMV-infested cucumber leaf; lane 6, WMV-infested cucumber leaf; lane 7, ZYMV-infested eggplant leaf; lane 8, CGMMV-W; lane 9, Healthy bottle gourd leaf (negative control); and lane M, Hi-Lo marker.



**Fig. 3.** Comparison of simplified virus extraction procedures from CGMMV-infested bottle gourd seeds by using RT-PCR: M, Hi-Lo marker; lane 1, double filtration procedure; lane 2, ethanol precipitation procedure; lane 3, polyethylene glycol procedure; and lane 4, phenol/chloroform/isoamyl alcohol procedure.



**Fig. 4.** Sensitivity of RT-PCR assay. CGMMV-infested seed added to the following number of healthy seeds; lane 1, 10; lane 2, 50; lane 3, 100; lane 4, 500; lane 5, 1000; lane 6, healthy seed extraction; lane 7, positive control (CGMMV-infested bottle gourd seed).

에 의한 추출법은 RT-PCR에 반응을 억제하는 불순물이 다량 함유되어 있어 RT-PCR에 의한 진단을 위해서는 부적합하였다. 반면 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 추출에 의한 RT-PCR 방법은 신속하고 특이적으로 박 종자로부터 CGMMV를 진단할 수 있다.

**RT-PCR에 의한 종자검정의 민감.** 박 종자로부터 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 추출 방법으로 바이러스를 추출하여 RT-PCR에 의한 종자 검정의 민감도를 조사하였

다. 그 결과 1립의 감염종자에 10, 50, 100, 500, 1,000립의 건전종자를 혼합한 감염수준에서 모두 420 bp 크기의 증폭된 밴드를 확인하였다(Fig. 4). Phenol/chloroform/isoamyl alcohol에 의한 추출법을 이용하여 RT-PCR과 ELISA를 비교해서 진단해본 결과 ELISA반응은 100립의 건전 종자에 1개의 이병 종자를 혼합한 수준(1%)까지 판별이 가능하였는데, RT-PCR에 의해서는 1,000립의 건전 종자에 1립의 이병 종자를 혼합한 수준(0.1%)까지 판별이 가능하였다. 이는 While 등(1993)의 실험에서 1,000립의 건전 종자에 1립의 이병 종자를 혼합한 수준(0.1%)까지 판별이 가능한 것과 같은 결과였다. 또한 1,000립이 마쇄된 약 100 g으로부터 1 g만을 취하여 검정을 해본 결과 3반복 모두 420 bp 크기의 증폭된 밴드가 확인되어 적은 양으로도 진단이 가능하였다. 본 연구에 의해 개발된 phenol/chloroform/isoamyl alcohol에 의한 추출된 바이러스를 RT-PCR에 의해서 검정하는 방법은 높은 농도의 RT-PCR 반응의 억제인자를 가지고 있는 박 종자로부터 효율적으로 바이러스 입자를 추출하고, 낮은 수준으로 감염되어 있는 종자도 빠르고 정확하게 진단할 수 있는 방법으로 확인되었다.

## 요 약

CGMMV는 한국에서 수박의 주요 병원균이고, 수박 생산에 심각한 영향을 미친다. 이 연구에서는 박 종자의 CGMMV를 RT-PCR을 이용하여 신속하고 민감하게 검정하는 진단방법을 개발하였다. CGMMV-W의 외피 단백질 유전자 sequence에서 제작된 CGMMV에 특이적인 primer인 Wmf1과 Wmr1은 RT-PCR에 의해 420 bp의 증폭산물을 증폭하였다. RT-PCR에 의한 진단을 위하여 바이러스 추출과정을 간소화하고 종자 추출물의 반응 억제물질을 감소시키기 위해 ethanol 침전, double filtration, PEG 침전, phenol/chloroform/isoamyl alcohol에 의한 추출법을 비교하였으며 phenol/chloroform/isoamyl alcohol에 의한 추출법이 민감성이 강한 방법으로 선발되었다. RT-PCR을 위해 선발된 primer들과 추출법은 1,000립의 건전 종자에 1립의 이병 종자를 혼합한 수준까지 판별이 가능하였다. 신속하고 민감한 RT-PCR에 의한 본 검정방법은 높은 반응 억제물질을 함유하는 박 종자에서 CGMMV의 특이적인 진단을 위해 유용한 방법이다.

## 참고문헌

Ainsworth, G. C. 1935. Mosaic diseases of the cucumber. *Ann.*

- Appl. Biol.* 22: 55-67.
- Hildeman, D. A. and Muller, D. 1997. Increased yield of plasmid DNA during removal of CsCl by ethanol precipitation. *BioTechniques* 22: 878-879.
- Komuro, Y., Tochihara, H., Fukatsu, R., Nagai, Y. and Yoneyama, S. 1971. *Cucumber green mottle mosaic virus* (watermelon strain) in watermelon and its bearing on deterioration of watermelon fruit known as "Konnyaku disease". *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 37: 34-42.
- 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 J. Plant Pathol.* 6: 250-255.
- 이기운. 1997. 수박에 발생하는 오이 녹반모자이크바이러스의 발생과 방제대책. *식물병과 농업* 3: 5-11.
- Lewis, G. D. and Metcalf, T. G. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1983-1988.
- Njeri, R., Ferris, D. C., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. 1997. Studies on seed transmission of *Subterranean clover mottle virus* its detection in clover seed by ELISA and RT-PCR. *Australian Journal of Agricultural Research* 48: 343-350.
- Paul, J. H., Jiang, S. C. and Rose, J. B. 1991. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2197-2204.
- Ugaki, M., Tomiyama, M., Kakutani, T., Hidaka, S., Kiguchi, T., Nagata, R. and Sato, T. 1991. The complete nucleotide sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* (SH strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 72: 1487-1495.
- Vasudeva, R., Raychaudhry, S. P. and Singh, J. 1949. A new strain type of *Cucumber virus 2*. *Indian Phytopathol.* 2: 180-185.
- Wylie, S., Wilson, C. R., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. 1993. A polymerase chain reaction assay for *Cucumber mosaic virus* in lupin seeds. *Australian Journal of Agricultural Research* 44: 41-51.