

# 보리누른모자이크병 매개곰팡이 (*Polymyxa graminis*) 검정 및 분포현황\*

이봉춘\*\* · 김상민\*\*\* · 배주영\*\*\* · 나지은\*\*\* · 김선림\*\*\* · 김강민\*\*\*\* · 이중환\*\*\*\*\*

## Detection and Distribution of Fungal Vector *P. graminis* of BaYMV

Lee, Bong-Choon · Kim, Sang-Min · Bae, Ju-Young · Ra, Ji-Eun ·  
Kim, Sun-Lim · Kim, Kang-Min · Lee, Joon-Hwan

*Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) is transmitted by a root-inhabiting *Polymyxa graminis* (*P. graminis*) and thus the disease is called “soil-borne”. In this study, the presence of *P. graminis* was confirmed by PCR test based on specific sequences of *P. graminis* type I (*P. graminis* f. sp. temperata) Internal Transcribed Spacer (ITS). *P. graminis* was detected in the BaYMV infected soil and root of barley plants. The monitoring of *P. graminis* was conducted in March 2015 in 8 Korean provinces. It was detected in the soil of all collected regions. This is the first report on a *P. graminis* survey of Korea.

Key words : *barley yellow mosaic virus*, *fungal vector*

## I. 서 론

국내에 보고된 맥류에 발생하는 바이러스병은 보리누른모자이크병(*Barley yellow mosaic virus*, BaYMV, *Barley mild mosaic virus*, BaMMV), 보리황화위축병(*Barley yellow dwarf virus*,

\* 이 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 : PJ01004204)에서 연구비지원으로 수행된 결과입니다.

\*\* 주저자, Corresponding author, 농촌진흥청 국립식량과학원(leebc21@korea.kr)

\*\*\* 농촌진흥청, 국립식량과학원

\*\*\*\* 전북대학교 생명공학부

\*\*\*\*\* 경상북도 농업기술원 생물자원연구소

BYDV), 보리모자이크병(*Soil-borne wheat mosaic virus*, SBWMV), 보리줄무늬모자이크병(*Barley stripe mosaic virus*, BSMV), 보리북지모자이크병(*Barley Northern cereal mosaic virus*, BaNCMV) 등이 보고되어 있다. BaYMV, BaMMV, SBWMV는 토양전염성 곰팡이인 *Polymyxa graminis* (*P. graminis*)에 의해 매개되며, BYDV는 진딧물에 의해 전염된다고 알려져 있다. 이들 바이러스병 중 국내 남부 보리재배지역에 주로 발생하는 바이러스병은 BaYMV와 BaMMV로 알려져 있다(Lee, 1981; So et al., 1997). 이 바이러스병의 병징은 모자이크 반점, 황화 및 위축병징 등이 대표적인데 기온이 15°C 이상이 되는 특정한 환경조건에서는 병징이 나타나지 않고 은폐되기도 한다(Chen et al., 1991). BaYMV, BaMMV는 보리 뿌리에 침입하는 균인 *P. graminis*로부터 매개되어지는데(Toyama and Kusaba, 1970) 매개균인 *P. graminis*가 보리의 뿌리를 침입하면 유주자 혹은 유주자낭에 부착된 바이러스가 기주 내에서 감염을 일으키게 된다(Adams et al., 2001; Adams et al., 1988; So, 1993). 포장이 일단 오염되면 매개균의 휴면포자에 존재하고 있는 이들 바이러스는 10년 이상 병원력을 유지하기 때문에 화학적 방제 및 윤작 등에 의한 재배학적 방법에 의해서도 완전히 오염원을 제거하기 어렵다(Kashiwazaki et al., 1989). 맥류에 발생하는 바이러스병을 방제하는 방법으로는 저항성품종 재배, 매개자인 *P. graminis*의 방제 방법 등이 있다. 본 실험에서는 우선 토양 중에 존재하는 매개곰팡이의 유무를 검정하고 보리 재배포장의 매개곰팡이 분포현황을 조사하여 저항성품종 재배 등의 농가기술지도에의 활용을 목적으로 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 매개곰팡이(*P. graminis*) 진단 특이 primer 제작

*P. graminis*의 유전자 진단을 위하여 *P. graminis* type I (*P. graminis* f.sp. *temperata*)의 Internal Transcribed Spacer(ITS) 영역의 염기서열을 이용하여 특이적인 primer로서 Forward : Pxfwd1 (5'-CTGCGGAAGGATCATTAGCGTT-3'), Reverse : Pxrev7 (5'-GAGGCATGCTCCGAGGGCTCT-3')을 제작하였다.

### 2. 지역별 토양시료 채집

2015년 10월 초 남부지역 익산, 김제, 부안, 고창, 영광, 나주, 밀양, 청도의 8개 지역에서 BaYMV 및 BaMMV가 발생한 보리 재배포장으로부터 토양을 채집하였다. 토양은 각 지역의 2개 포장으로부터 한 포장 당 3개 지점에서 채집 하였다. 실험실에서 같은 지역의 토양을 혼합한 후 60°C에서 24시간 건조시킨 다음 약 10 g의 토양으로부터 DNA (PowerSoil

DNA isolation Kit, MO Bio lab. Inc)를 추출하였다. 추출한 DNA는 -20℃에 보관하면서 *P. graminis*의 지역별 분포 조사에 사용하였다.

### 3. 이병 토양으로부터 *P. graminis* DNA 분리 및 PCR

실험실에서 BaYMV가 발생한 토양에서 건진 보리를 재배하여 인위적으로 BaYMV를 감염시켜 이병주를 제작하였다. 이병 토양(PowerSoil DNA isolation Kit, MO Bio lab. Inc) 및 이병토양에서 인위적으로 제작된 이병주의 뿌리, 잎(Exgene Plant SV kit, GeneAll)으로부터 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 -20℃에 보관하면서 *P. graminis* PCR 검정의 주형으로 사용하였다. *P. graminis*의 검출은 위에서 제작된 *P. graminis* 진단 특이 primer와 추출한 DNA를 주형으로 하여 PCR 반응으로 실시하였다(Premix kit, Takara, Japan). PCR 조건은 95℃에서 5분 1 cycle, 95℃ 20초, 53℃ 45초, 72℃ 1분으로 30 cycle 수행 후 72℃에서 7분 1 cycle로 실시하였다.

### 4. BaYMV RT-PCR 검정

BaYMV의 진단을 위하여 RNA 2 (GenBank AB920781)에 특이적인 primer로 Forward : (5'-GCTTCTAGTTCACGGCCACT-3'), Reverse : (5'-GTGATGCGAAAGCTTAGCGG-3')를 제작하였다. 실험실에서 BaYMV가 발생한 이병 토양에서 건진 보리를 재배하여 인위적으로 이병주를 제작하였으며 제작된 이병주로부터 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)로 RNA를 추출하였다. BaYMV의 감염은 특이 primer와 추출한 RNA를 주형으로 RT-PCR에 의해 확인하였다. RT-PCR 반응조건은 45℃에서 45분간 반응시킨 반응액을 95℃ 5분간 1 cycle, 95℃ 30초, 58℃ 1분, 72℃ 40초 35 cycle, 72℃ 10분간 1 cycle 조건으로 실시하였다.

## Ⅲ. 결과 및 고찰

### 1. 매개곰팡이 검정방법 확립

*P. graminis* 검정에 활용하기 위하여 실내에서 이병토양을 이용하여 인위적으로 BaYMV 이병주를 제작하였다(Fig. 1). 제작된 이병주로부터는 BaYMV 병징을 확인하였으며 RNA를 추출하여 BaYMV 진단 특이 primer로서 RT-PCR을 실시하여 BaYMV 감염을 확인하였다(Fig. 2). *P. graminis* 검정방법은 *P. graminis* type I (*P. graminis* f.sp. temperata) Internal transcribed spacer (ITS) 영역의 염기서열 특이적인 primer를 제작하였다(Ketta et al., 2012). 제작

된 특이적인 primer와 BaYMV가 발생한 이병토양 및 제작된 이병주의 뿌리와 잎으로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 검정을 실시하였다. *P. graminis*는 이병토양 및 병징이 관찰된 이병주 뿌리로부터 명확히 검출이 되었으며 잎에서는 병징 유무와 상관없이 검출이 되지 않았다(Fig. 3). 본 실험결과 *P. graminis*는 토양과 뿌리에 존재하는 것으로 확인되었다.

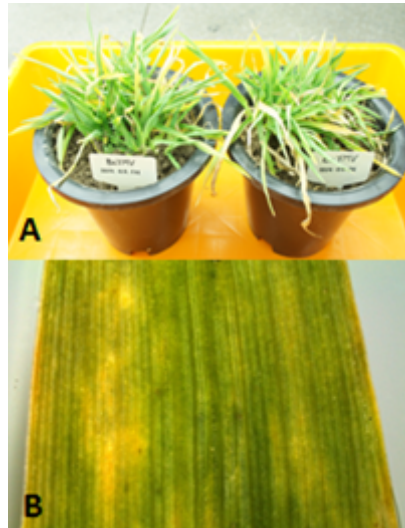


Fig. 1. The detection of *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) virus from the barley leaves.

- A. BaYMV infected barley plants.
- B. Yellow patches on barley leaf, which is typical symptom of BaYMV.

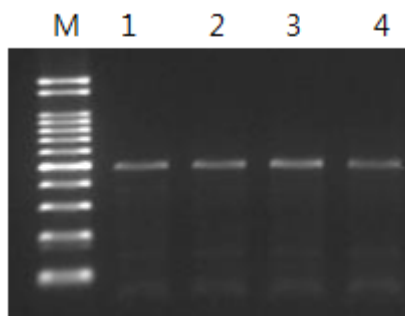


Fig. 2. Detection of *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) using RT-PCR.

Lanes : M, Marker 100 bp ladder, 1~4 : BaYMV infected plants (expected size 461 bp)

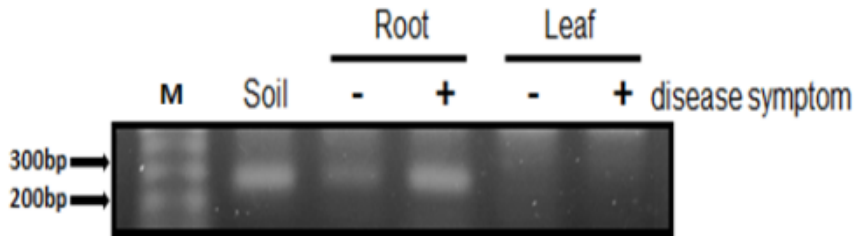


Fig. 3. The amplification of *Polymyxa graminis* from the soil collected from barley field heavily infected with *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV).

M: size marker.

## 2. 2015년도 보리 바이러스병 분포 현황 및 지역별 *P. graminis*의 분포

2015년 3월 본 실험에서 조사된 8개 지역을 포함하여 전남북, 경남북 등의 남부지역의 주요 보리 재배지역 15개 지역 91개 필지의 보리 바이러스병의 발생상황을 보면 대부분의 지역에서 10% 이상의 이병면적율을 나타내었다. 익산과 고창지역은 이병 포장 내 이병면적율이 각각 20%와 70%로 나타났다. 원인 바이러스는 대부분 BaYMV로 확인되었으며 영광에서는 BaYMV 및 BaMMV의 복합감염이 확인되었다(Bae et al., 2015). 2014년의 전국 조사결과에서도 전남북 및 경남북의 모든 지역에서 BaYMV가 확인되었고 전남의 일부지역에서는 BaYMV가 우점하면서 BaMMV가 복합감염된 양상을 나타내었다. 2014년과 2015년의 결과를 보면 남부지역의 보리 재배지역 대부분에서 *P. graminis*에 의해 매개되는 BaYMV 및 BaMMV가 발생하는 것으로 나타났다.

BaYMV 발생현황을 토대로 남부지역의 대표적인 보리 재배지역 8개 지역으로부터 이병 토양을 채집하여 *P. graminis*의 분포상황을 조사하였다. 본 실험에서 확립한 *P. graminis* 특이적인 primer와 지역별 보리재배 토양으로부터 분리한 DNA를 주형으로 하는 PCR을 실시하였다. 결과 조사한 지역 전체에서 *P. graminis*의 분포가 확인되었다(Fig. 4). 대조구로 사용한 전북대 익산캠퍼스의 일반 토양으로부터는 검출되지 않았다. 본 실험에서 검출된 결과는 PCR 검정 결과이므로 *P. graminis*의 정밀한 밀도측정은 불가능하나 PCR 밴드 차이로써 지역 간 상대적인 밀도차이는 확인 할 수 있었다. 보리가 재배되는 대부분의 포장에서는 *P. graminis*가 분포하는 것으로 알려져 있으나(Thompson et al., 2011), *P. graminis*의 정량에 관한 방법은 확립되어 있지 않다. 본 연구팀에서 *P. graminis*의 순수 유지방법을 개발하였으며 휴면포자의 정량 PCR로서 *P. graminis*를 정량하는 방법을 연구 중에 있다.

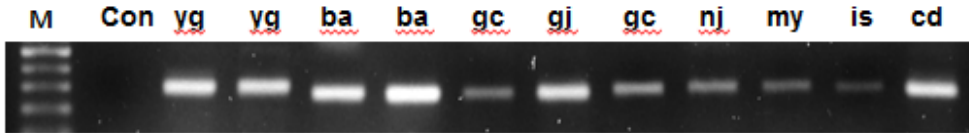


Fig. 4. The detection of *Polymyxa graminis* DNA from the barley cultivation fields in South Korea.

M: size marker, Con: negative control, yg: yeonggwang, ba: buan, gc: gochang, gj: gimje, nj: naju, my: miryang, ik: iksan, cd: cheongdo

#### IV. 요약

보리누른모자이크병은 토양전염성 곰팡이인 *Polymyxa graminis* (*P. graminis*)에 의해 매개된다. 본 연구에서는 BaYMV 이병토양 및 이병주 뿌리로부터 *P. graminis*의 PCR 검정방법을 확립하였다. *P. graminis* type I (*P. graminis* f.sp. temperata) *Internal Transcribed Spacer* (ITS) 영역의 염기서열 특이적인 primer를 제작하고, 이병토양 및 이병주의 뿌리와 잎으로부터 DNA를 추출하여 PCR 검정을 실시하였다. 결과 *P. graminis*는 이병토양 및 이병주 뿌리로부터 검출되었다. 남부지역의 대표적인 보리 재배지역 8개 지역으로부터 이병토양을 채집하여 PCR 검정에 의해 *P. graminis*의 분포상황을 조사하였다. 결과 조사한 지역 전체에서 *P. graminis*의 분포가 확인되었다.

[Submitted, April. 5, 2016; Revised, July. 1, 2016; Accepted, July. 5, 2016]

#### References

1. Adams, M. J., A. G. Swaby, and P. Jones. 1988. Conformation of the transmission of *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) by the fungus *Polymyxa graminis*. *Ann. Appl. Biol.* 112: 133-141.
2. Chen, J., A. G. Swaby, M. J. Adams, and Y. Ruan. 1991. Barley mild mosaic virus inside its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Ann. Appl. Biol.* 118: 615-621.
3. Kashiwazaki, S., K. Ogawa, T. Usugi, T. Omura, and T. Tsuchizaki. 1989. Characterization of several strains of Barley yellow mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 55: 16-25.

4. Ketta H., P. Rysanek, and M. Zouhar. 2012. Detection of *Polymyxa graminis* in a Barley Crop in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci.* 48(2): 65-71.
5. Lee, S. H. 1981. Studies on virus diseases occurring in various crops in Korea. *Res. Rept. RDA* 23: 62-74.
6. Park, J. C., J. H. Seo, H. M. Kim, K. J. Lee, S. R. Park, and D. Y. Seo. 2003. Effect of climatic factors on disease incidence of *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV). *Korea J. Crop. Sci.* 48: 156-159.
7. So, I. Y., K. J. Lee, and S. S. Cheong, 1988. Identification of *Barley yellow mosaic virus* and physio-ecological consideration on its vector. *Res. Rept. RDA* 31: 117-126.
8. So, I. Y. 1993. Transmission of *barly yellow mosaic virus* by the fungal vector, *Polymyxa graminis* Ledingham. *Korea J. Pl. Path.* 9: 128-139.
9. So, I. Y., K. J. Lee, K. H. Chon, and J. H. Seo. 1997. Distribution and screening for barley cultivars resistance to barley yellow mosaic virus and barley mild mosaic virus in southern Korea. *Korea J. Plant Pathol.* 13: 118-124.
10. Thompson, J. P., R. E. Clewett, J. G. Jennings, K. J. Sheedy, K. J. Owen, and D. M. Persley. 2011. Detection of *Polymyxa graminis* in a barley crop in Australia. *Australasian Plant Pathol.* 40: 66-75.
11. Toyama, A. and T. Kusaba. 1970. Transmission of *Soilborne barley yellow mosaic virus*. 2. *Polymyxa graminis* Led. As vector. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 36: 223-229.