최 종
연구보고서

분자생물학·세포생물학 기법을 응용한 맥주보리 바이러스 진단 및 저항성 유전자 추적기술 개발

Malting barley virus diagnosis and development of resistance gene tracing techniques using molecular and cell-biological method.

연구기관
작 물 시 험 장

농 림 부

최 종 보 고 서

1999 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 분자생물학·세포생물학 기법을 응용한 맥주보리 바이러스 진단 및 저항성 유전자 추적기술 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1999 . . .

주관연구기관 : 작 물 시 험 장

총괄연구책임자 : 하 용 웅

서 세 정 (인)

주관연구기관장 : 정 무 남

직 인

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “분자생물학·세포생물학 기법을 응용한 맥주보리 바이러스 진단 및 저항성 유전자 추적 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . . .

주관연구기관명 : 작물시험장
총괄연구책임자 : 하 용 웅
서 세 정
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 이 호 진
심 재 욱
협동연구기관명 : 전북대학교
협동연구책임자 : 소 인 영

요 약 문

Ⅰ. 제 목

분자생물학·세포생물학 기법을 응용한 맥주보리 바이러스 진단 및 저항성 유전자 추적기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

o 바이러스 병에 의한 피해

식물에 발생되는 바이러스는 600여 종으로 그 피해는 연간 수천억원 손해를 보이고 있다. 그 중에서 맥류에 발생하는 바이러스병은 토양전염성이 대부분으로 그 종류가 많고 병징에 유사점이 많아 정확히 바이러스를 동정하기가 어려운 실정이다.

우리나라에서는 최근에 이 병이 발생되기 시작하여 급격히 늘어나고 있는 실정으로 남부지방 보리 재배 포장 중에서 약 40%가 이 병에 감염되었으며 그 피해정도는 40-100%가 감수되기도 한다. 1985년까지 자급하였던 맥주보리가 최근에는 50% 정도를 도입에 의존하고 있는 한가지 원인도 맥주보리에는 이 병에 저항성인 장려품종이 전혀 없을 뿐 만 아니라 최근 맥주보리 재배 면적이 늘어남에 따라 그 피해가 급격히 늘어나고 있기 때문이다. 최근에는 경남 등지에서 이 병이 집단으로 심하게 발병하여 지역사회에서 문제가 되기도 하여 바이러스 병에 대한 대책을 시급히 서둘러야 할 것이다.

o 바이러스 병에 대한 방제 대책

이 병은 토양전염성인 바이러스 병으로 밝혀져 화학적 방제가 불가능하고 저항

성 품종을 육성하는 것 이외에는 방제 방법이 없다고 밝혀진 이후에는 저항성 품종을 육성하기 위하여 저항성 유전자에 대한 연구가 주로 이루어지고 있으며 바이러스를 순화하고 입자를 확인하며 이병된 조직의 변화, 혈청학적 유연관계, 바이러스 핵산 구조 등에 대한 연구가 수행되고 있다. 이 바이러스는 일본에서는 6개 , 독일에서는 3개 바이러스 계통으로 분류하고 이 병에 저항성인 유전자원을 탐색한 결과 목석항3, Ragusa에 있는 저항성 유전자를 이용하여 저항성 품종을 육성하였다.

o 바이러스 병 진단 기술

바이러스 병은 모자이크, 잎말림, 줄무늬, 위축 등 특징적인 외부 병징으로 알 수 있으나 여러 가지 영향으로 은폐되기도 하며 잠복형의 경우에는 식별이 어렵고 자연상태에서는 대부분 복합 감염되어 있으므로 정확한 동정 및 진단이 필요하다. 이러한 이유로 바이러스의 조기 검정과 진단은 바이러스 방제에 필수 불가결한 수단이다. 그 동안 이용되고 있는 진단 방법은 생물학적 방법, 혈청학적 방법이 있다. 생물학적 방법은 지표식물을 이용하여 그 반응을 보는 방법으로 고도의 경험이 필요하고 오판할 가능성도 매우 크고 시설과 시간이 많이 요구된다. 특히 보리 호위축병의 경우는 즙액접종도 어렵고 검정식물이 밝혀지지 않아서 더욱 곤란한 실정이다.

o 면역혈청학적 방법을 이용한 바이러스 진단

면역 혈청학적 방법이 널리 이용되고 있으며 그 중 대표적인 ELISA방법의 원리는 바이러스 외피단백질 특성을 이용하는데 항체(γ-globulin)와 항원을 결합시키고 효소결합항체와 기질을 반응시켜 발색여부로 판별한다. 바이러스 외피단백질은 바이러스 genome중 일부분의 정보에 기인한 것으로 대부분의 식물 바이러스는 1/4-1/5의 핵산정보만이 외피단백질에 관여한다. 그리고 대부분의 바이러스와 무관한 것도 혈청학적 반응을 나타내기도 하며 어떤 계통들은 혈청학적 유연

관계가 있어서 구분이 되지 않는 것도 있다. 그리고 항체 제작이 번거롭고 복합감염시 정확한 판별이 곤란하며 viroid와 같은 외피단백질을 가지지 않는 것은 검정할 수 없는 단점이 있다. 이러한 효소결합 항체법 이외에도 항체를 이용한 진단법으로는 radio-immunoassay, fluroscence immunoassay 등이 식물 바이러스 진단에 널리 이용되고 있다.

o 분자생물학적 방법을 응용한 바이러스 진단 기술

최근 비약적으로 발전한 분자생물학적 기법을 이용하여 바이러스 병 진단에도 많이 이용되고 있다. 일반적으로 PCR의 원리는 DNA에 상보적인 primer를 extension하여 특정의 DNA를 증폭하는 방법이다. 최근에는 핵산 hybridization방법을 이용하여 다량의 시료를 신속하고 정확하게 분석할 수 있으며 측정 감도도 높은 진단 방법이 다양하게 개발되고 있다. 이들 방법은 strain이 많은 경우에도 이들 strain을 정확하게 구분할 수도 있어서 PCR을 이용한 조기 진단법은 식물 바이러스 병의 진단에 새로운 장을 열 것으로 기대된다.

o 저항성 유전자 추적 및 저항성 품종 선발 기술

일본에서는 유전자원으로 세계에서 수집한 800여 보리 품종중에서 재래종인 목석항3이 고도의 저항성을 보여 이 품종을 이용하여 저항성 품종을 육성하고 있다. 독일에서는 재래종인 Ragusa에 있는 저항성 유전자를 이용하여 저항성 품종을 육성하였다. 지금까지 밝혀진 저항성 유전자는 4개로서 이 중 2개 유전자가 품종 육성에 이용되었고 이들 유전자의 유전양식 및 연관관계에 대한 연구가 진행되고 있다.

최근에 국내외적으로 널리 이용되는 분자유전학적 표지인자를 얻는 주요 방법으로는 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)와 Specific Amplication Polymorphism (SAP) 및 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석법 등이 있다.

또한 보리의 형태형질 및 동위효소 유전자좌에 대한 연관분석 및 mapping은 어떠한 작물보다도 세밀화되어 있어서 유전자 연관분석을 연구하기에 적합하지만 양적형질에 관련된 유전자의 경우에는 형태적 형질과의 연관 분석이 불가능하고, 동위효소와 같이 개수가 제한적인 변이를 가지고는 유전자 연관지도에 mapping을 하여 우량한 계통을 선발하는 육종연구에 이용하는 것은 불완전하다. 미국에서는 우량한 보리 육종을 위한 분자생물학적 인자의 개발에 관한 연구 결과 200개 이상의 DNA 인자들이 이미 개발되어 육종에 직접 응용하고 있다. 따라서 우리나라에서 보리 육종에 필요한 바이러스 병 저항성 및 양적형질들에 대한 초기선발을 위해서는 이러한 이미 개발된 표지인자를 분양 받아서 응용하는 것이 저렴하고 시간이 절약될 수 있을 것으로 생각된다. 이들 표지인자는 일부를 작물시험장의 국제 공동 연구로서 일부 분양 받았다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 호위축병 바이러스 저항성 검정
   - o 지역별 계통별 보리 호위축병 발병율 조사
   - o 병 발생이 농업과 관련된 형질에 미치는 영향 조사

2. 호위축병 저항성 유전검정 및 연관분석
   - o 국내 저항성 품종이 보유한 저항성 유전자의 대립성 검정
   - o 저항성 유전자의 유전검정
   - o RFLP 표지인자를 이용한 연관분석
   - o STS marker를 이용한 연관분석
   - o 저항성 유전자의 유전자 연관 지도 작성

3. 바이러스 계통 분류
   - o BaYMV의 분리 동정

o BaMMV의 분리 동정

o 보리오갈바이러스이 분리 및 동정

o RT-PCR을 이용한 바이러스 계통분류

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 호위축병 바이러스 저항성 검정

o 지역별 계통별 보리 호위축병 발병율 조사

국내 계통, 장려품종 및 도입품종 들에 대한 지역별 연차별 호위축병의 발병율을 조사한 결과 연차 및 지역에 관계없이 저항성 및 이병성을 나타내는 품종들이 있고, 지역에 따라 저항성 정도가 다르게 나타나는 품종들도 있었다.

o 병 발생이 농업과 관련된 형질에 미치는 영향 조사

진주 및 나주 2개의 지역에서 병 발생이 농업형질에 미치는 영향을 조사하였는데 출수기와 성숙기 및 수장은 병발생과 관련이 없었으며, 간장의 경우 병이 심한 지역에서는 감소하는 경향을 보였다. 수량은 병발생이 심한 지역에서 감소하는 경향이 나타났는데 이를 수량구성요소로 나누어 보면 병이 심한 경우 m2당 수수와 천립중이 감소하였는데 이 m2당 수수와 천립중이 감소함으로써 수량이 감소함을 알수 있었다.

2. 호위축병 저항성 유전검정 및 연관분석

o 국내 저항성 품종이 보유한 저항성 유전자의 대립성 검정

찰보리와 조강보리는 *rym3* 저항성 유전자를 갖는 Ea52와 대립적이며, Tokushima Kagawa Hadaka와 Lints의 경우는 *rym*과 *rym5* 저항성 유전자를 갖고 있는 Mokusekko3와 대립적으로 나타나 2개 이상의 유전자가 관여 하는 것으로 추측할 수 있었다.

o 저항성 유전자의 유전검정

진주와 익산의 호위축병 상습 발생지에서 저항성 품종과 이병성 품종간 교배조합들의 후대 분리비를 관찰한 결과 두산8호/강보리 조합과 Mokusekko3/백동 조합이 3:1의 분리비를 보여 단인자의 유전양상을 보였다.

o RFLP 표지인자를 이용한 연관분석

BSA(Bulked segregant analysis) 기법을 이용하여 강보리/두산8호 조합에 대하여 RFLP 표지인자를 사용하여 연관분석을 실시한 결과 강보리가 가지고 있는 저항성 유전자는 *rym3*이며 이 유전자가 7번 염색체에 존재하는 것이 확인되었다.

o STS marker를 이용한 연관분석

STS marker를 이용하여 연관분석을 실시한 결과도 RFLP 표지인자를 이용하여 연관분석을 실시한 결과와 동일하게 7번 염색체에 *rym3* 유전자가 위치하는 것으로 확인되었다.

o 저항성 유전자의 유전자 연관 지도 작성

연관된 DNA marker를 이용하여 F3 계통을 대상으로 RFLP 분석과 STS marker 분석을 실시한 결과 강보리가 갖고 있는 저항성 유전자 rym3는 Pst337과는 23.9cM, ABC302와는 14.7cM의 거리에 위치하였으며, 재조합빈도는 각각 22.2%와 14.3%였다.

3. 바이러스 계통 분류

o BaYMV의 분리 동정

BaYMV-HN을 고속원심분리와 CsCl 밀도기울기 원심법으로 정제한 바이러스를 전자현미경으로 관찰한 결과 폭 13nm, 길이 250 300nm 및 500 650nm 범위의 2입자성 사상형 바이러스였으며, 외피단백질의 전기영동상 계통간의 차이는 없었으며 주밴드의 분자량은 33KDa이고 작은 밴드는 각각 31KDa과 26KDa이었다.

o BaMMV의 분리 동정

BaMMV-Kor을 분리하여 전자현미경으로 관찰한 결과 폭 13nm, 길이 250 300nm와 500 600nm의 2입자성 사상 바이러스가 관찰되었다. 한천겔확산법에 의한 혈청반응은 BaMMV-Na1과는 뚜렷한 반응대를 형성하였고, BaMMV-Ka1,

BaMMV-M에서는 반응분지가 형성되었다. RNA의 크기는 7.5Kb의 RNA1과 3.5Kb의 RNA2로 분리되었으며 외피 단백질의 분자량은 33KDa이었다.

o 보리오갈바이러스이 분리 및 동정

밀양, 진주 지방의 알보리와 목세이고 3호에서 ELISA결과 SbWMV에 양성반응의 시료로부터 *Chenopodium quinoa, Ch. amaranticola*에 즙액접종 하였다. 국부반점을 채취하여 SbWMV를 순수 분리하였다(사진 2). 순수 분리된 SbWMV를 알보리, 백동, 노린61호, *Chonopodium quinoa, Ch. amaranticola*등에 재접종시켜 40일 후 ELISA 검정하여 바이러스 감염여부를 확인하였다.

o RT-PCR을 이용한 바이러스 계통분류

RT-PCR 기법을 활용하여 각 지역에서 수집한 감염주에 대한 바이러스 종류 및 계통을 조사한 결과 조건에 맞는 프라이머를 선택한 경우 바이러스 종류 뿐만 아니라 계통을 구분할 수 있었다.

4. 활용에 대한 건의

보리 바이러스 병은 종류도 다양할 뿐 만 아니라 각 바이러스에 대한 계통(strain)이 많아 저항성 품종을 육성하기가 쉽지 않다. Mokusekko3에서 유래한 호위축병에 저항성인 유전자 *rym*은 일본의 BaYMV-III, BaMMV에 이병되어 새로운 저항성 유전자를 도입하고 있다. 우리나라에서도 이 유전자를 도입하여 저항성인 맥주보리 신품종인 신호보리를 육성하였으나(1999) 익산에서 발생하는 바이러스 계통에는 이병되므로 다른 유전자 *rym3, rym4* 등을 도입하여 복합저항성인 품종을 육성하는데 노력을 기울여야 할 것이며 바이러스 계통별 분포를 명확히 하여 그에 맞는 저항성 품종을 보급하도록 하여야 할 것이다.

SUMMARY

I. Title

Malting barley virus diagnosis and development of resistance gene tracing technique using molecular and cell-biological method

II. Objectivv and Significance

o Damage caused by virus disease

The 600 kinds of vires appeared in plant is reported, the demage is very serious. It is very difficult to identify the virus because they are very similar each other.

Recently, the virus disease is widespreadly in SouthKorea and 40% of barley cultivated area is infected. Because there is no malting barley whitch has virus resistance genes. The damage caused by virus disease is now increasing.

o Control of virus disease

This disease is caused by soil-borne virus, so it is very difficult to control with chemical compound. The researchs about the resistance gene were carried out to breed the variety resistant to virus.

o Diagnosis technique of virus disease

It is very important to isolate and diagnose in early stage. Biological and immunological method was used to diagnose the virus.

o Immuno-serological method used in virus diagnosis

Immuno-serological method was widespreadly used to detect the virus. It can be easely detected but can not distinguish the strains.

o Virus diagnosis technique modified by molecular biology

Recently, Molecular biologcal technique was used in detecting the virus. This method was useful to distinguish the strains by using PCR. PCR technique is expected to play a major role of virus diagnosis.

o Tracing of resistance gene and selection technique of resistance variety

linkage analysis and mapping of barley about phenotypic characters and gene loci are more developed than other crops. The barley is fit to research the genetic linkage analysis.

III. Scope

1. Resistance test of barley yellow mosaic virus
   - o Incidence of barley yellow mosaic virus at different locations and years.
   - o Inspection of agronomic trait related in disease appearence.

2. Genetic and linkage analysis of barley yellow mosaic virus resistance gene
   - o Allelism test of domestic resistance varieties carring resistance genes
   - o Genetic analysis of resistance genes
   - o Linkage analysis using the RFLP markers
   - o Linkage analysis using the STS markers
   - o Construction of genetic linkage map of resistance gene

3. Classification of virus strains
   - o Isolation and identification of BaYMV
   - o Isolation and identification of BaMMV
   - o Isolation and identification of SbWMV
   - o Classification of virus using the RT-PCR

IV. Results and Recommendation

1. Resistance test of barley yellow mosaic virus

o Incidence of barley yellow mosaic virus at different locations and years.

From the result of investigating domestic, recommended and intrduced varieties, we can distinguish the resistant and susceptible one. The varietes whitch was different to locations and years was exsisted.

o Inspection of agronomic trait related in disease appearence.

Heading and maturing date are not related with disease appearence, but culm length became short in infected area and varieties. Yield is lower in severely infected area than in non-infected area because of decrease of number of spikes per m2 and 1000 kernel's weight.

2. Genetic and linkage analysis of barley yellow mosaic virus resistance gene

o Allelism test of domestic resistance varieties carring resistance genes

The allelism test between resistance genes of Korea and introduced varieties was conducted with the progenies after crossing between them. It was revealed the resistance genes of Chalbori and Chogangbori were allelic with *ym3* of Ea52, and "Tokushima Kagawa Hadaka" and Lintz were allelic with *ym1 and ym5* of Mokusekko3.

o Genetic analysis of resistance genes

From the result of investigating the segregating ratio of progeny from crosscombination between resistanc and susceptible varieties, the crosscombinations of Doosan8/Kangbori and Mokusekko3/Paekdong are inherited to single gene inheritance at ratio of 3:1.

o Linkage analysis using the RFLP markers

Resistance gene,"*rym3*", of Kangbori was confirmed to be located in barley chromosome 5H from the linkage analysis by using RFLP markers.

o Linkage analysis using the STS markers

Resistance gene,"*rym3*", of Kangbori was confirmed to be located in barley chromosome 5H from the linkage analysis by using STS markers.

o Construction of genetic linkage map of resistance gene

The resistance gene,"*rym3*", was mapped to the genomic region between Pst337 and ABC302 with 23.9cM and 14.7cM genetic distance, respectively.

3. Classification of virus strains

o Isolation and identification of BaYMV

BaYMV-HN were purified from infected plants a filamentous virus with 13nm in diameter and 250 300nm and 500 650nm in length. Specific antibody made by injecting the purified virus to the muscle of a rabbit. In gel-diffusion tests antibody to baYMV-HN did not make spur with two Japanese BaYMV isolates, BaYMV-II-1 or BaYMV-III. BaYMV-HN showed the symtom of yellowing and necrosis in host plants.

o Isolation and identification of BaMMV

Barley mild mosaic virus(BaMMV-Kor) was isolated from the southern part of Korea, and by mechenical inoculation onto barley cultivars, purifiction and production of antibody. BaMMV-Kor purified from infected plants were filamentous particle, with 13nm in diameter and 250 300nm and 500 650nm in length. Antibody of BaMMV-Kor was made by injecting the purified virus to the muscle of a rabbit. In gel-diffusion tests antibody to baMMV-Kor create spur with BaMMV-Ka1 and BaMMV-M, But did not make spur with BaMMV-Na1. BaMMV-Kor showed the symtom of mosaic and yellowing in barley plants.

o Isolation and identification of SbWMV

In view of how to diagnose a virus, there was no barley available for sap-vaccination diagnosis, but *Chenopodium amaranticola*(*Ch. quinoa*) showing

local affected parts was usable for a test plant. As a serological method, diagnosis can be made by an agar gel double diffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay, etc., without organic interconnections. The methods of diagnosis using an electron microscope include a leaf dip method, immunoelectron microscopy, immunoprotein A-gold complex electron microscopy, etc. by which simple and multiple infections were identified.

o Classification of virus using the RT-PCR

From the result of classification of virus infected in barley with RT-PCR method, barley virus disease epidemic in South Korea was mainly caused by single infection of BaYMV or complex infection of BaYMV and BaMMV. However, there was few cases of single infection of BaMMV.

CONTENTS

목 차

제 1장 서 론

식물에 발생되는 바이러스는 600여 종으로 그로 인한 피해액는 연간 수천억원에 이르고 있다. 그 중에서 맥류에 발생하는 바이러스병은 토양전염성이 대부분으로 그 종류가 많고 病徵에 유사점이 많아 정확히 바이러스를 동정하기가 어려운 실정이다. 특히 보리 호위축병은 1934년 일본 오카야마현에서 처음 발견 보고되었으며 (Miyamoto 등, 1958) 그 피해가 매우 심하여 국가에서 補償을 한 적도 있다.

최근 맥주보리가 주로 재배되고 있는 우리나라 남부지역에 바이러스에 의한 보리의 縞萎縮病(barley yellow mosaic virus : BaYMV)이 발생되고 있다. 또한 발병면적이 점차 늘어가고 있어 보리 재배 포장 중에서 약 40%가 이 병에 感染되어 있는 실정이다. 이 호위축병에 의한 보리의 수량감소는 40 100%에 이르는 것으로 보고되었다(Huth 등, 1984). 1985년까지 자급하였던 맥주보리가 최근에는 50% 정도를 도입에 의존하고 있는 한가지 원인도 맥주보리에는 이 병에 저항성인 장려품종이 전혀 없을 뿐 만 아니라 최근 맥주보리 재배면적이 늘어남에 따라 피해가 급격히 늘어나고 있기 때문이다. 이 병은 화학적 방제가 극히 어렵고 윤작 등에 의한 재배적 방법 등이 있으나 그 효과는 거의 없어 적극적인 방제 수단으로서 저항성 품종의 육성이 시급하다.

그러나 바이러스병 저항성 유전자를 도입하는 데에는 많은 시간과 노력 그리고 온실이나 포장 등의 시설이 요구될 뿐만 아니라 경우에 따라서는 바이러스 변이계통이 출현하기도 하고 또한 개체 수준에서는 저항성 검정이 불확실하다. 더우기 대부분의 저항성 유전자가 열성으로서 異形接合體 상태에서는 표현형에 의한 저항성 선발이 매우 힘들다. 따라서 효율적인 저항성 품종 육성 전략을 위해서는 다양한 유전자원을 확보하고 많은 유전적 지식과 정밀한 진단 방법이 필요하다.

보리 호위축병 저항성 품종을 육성하는데 있어서 많은 문제점들이 있지만 그 중에서도 우선적으로 보리에 침입한 바이러스를 정확히 진단을 하는 것이 중요하다. 이 병은 즙액접종이 확실치 않음으로 인하여 생물학적 방법인 지표식물을 사용하는 것이 어렵고 검정식물도 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 그리고 현재 가장 많이 사용되고 있는 바이러스 검정방법인 免疫血淸法은 判別의 정확도 측면이나 기술적인 측면에서

계통간의 구분이 어렵다는 것을 포함한 여러 가지 문제점이 제기되고 있는 실정이어서 보다 확실하고 민감한 바이러스 검정방법을 필요로 하고 있다.

우리나라의 재래종에는 저항성을 나타내는 품종이 있으나 맥주보리에는 저항성 품종이나 교배모본이 거의 없어 맥주보리의 재배면적이 늘어감에 따라 바이러스의 농도가 집적되어 그 피해가 늘어나고 있다. 뿐만 아니라 보리의 위축병을 일으키는 바이러스에는 여러 종류가 있으며(BaYMV, BaMMV, BaYDV, SBWMV, WSSMV 등) 특히 보리 縞萎縮病을 일으키는 BaYMV에는 일본과 독일 및 영국에서 여러 가지 생리형이 분화되어 있다고 보고되어 있다. 이들 生理型에 대한 저항성 유전자와 강하게 연관되어 있는 同位酵素나 RFLP marker를 발견하여 보리 縞萎縮病 저항성 품종 육성에 이용하고자 하는 시도가 이루어지고 있다.

보리에 발생하는 맥류 바이러스병은 매개방법에 따라 土壤傳染(Barr 등, 1976; Chen 등, 1991), 蟲媒傳染(Kojima 등, 1983; 村山大記 등, 1965) 및 種子傳染病(羅瑢俊 등, 1979; 李淳炯, 1981) 등으로 크게 구분할 수 있다. 우리나라에는 북지모자이크병(Northern cereal mosaic virus, NCMV)(李淳炯, 1981), soil borne wheat mosaic virus(SBWMV)(李淳炯, 1981), 누른모자이크병(호위축병, barley yellow mosaic virus, BaYMV)(李貴宰 등, 1998; 李淳炯, 1981; 蘇仁永 등, 1998), barley mild mosaic virus (BaMMV)(李貴宰, 1998; 蘇仁永 등, 1997, 1998), 줄무늬모자이크병(barley stripe mosaic virus, BaSMV)(羅瑢俊 등, 1979)등이 보고되어 있으나 남부 보리재배지역에 주로 발생하는 것은 BaYMV와 BaMMV로 밝혀졌다(蘇仁永 등, 1997). 곰팡이의 일종인 *Polymyxa graminis*에 의하여 토양전염이 이루어지는 BaYMV와 BaMMV는 우리나라 보리재배지역 전역에 걸쳐 발생하고 있고 그 피해도 막심하다(蘇仁永 등, 1991, 1993, 1997, 1998). 이들은 토양전염성이므로 방제가 어렵고, 저항성 품종육성 및 선발방법이 연구되고 있으나 지역적으로 BaYMV와 BaMMV의 발생이 뚜렷한 구분이 안되고, 심지어 같은 圃場內 및 同一植物體에서도 BaYMV와 BaMMV가 複合 및 單獨感染이 되고 있어서 많은 애로점이 있다(蘇仁永 등, 1997, 1998; 高橋 등, 1943).

보리 縞萎縮病(BaYMV)은 1934년 일본의 오카야마 현에서 처음으로 발견, 보고되어(Miyamoto, 1958; 牧野德彦, 1992), 주로 일본에서 발생하는 것으로 알려져 왔으며(Inouye 등, 1975), 1950년에는 관동지방 맥주보리에서 이 병이 만연되었고 1985년에

는 그 피해가 매우 컸다고 한다(證田, 1993). 독일에서는 1978년에 이 병이 처음으로 발생되었으며(Huth, 1984, 1988), 그후 영국(Hill, 1985), 우크라이나(Fantakhun, 1987), 프랑스(Signoret, 1991), 이탈리아(Rubies, 1991) 등 유럽각국과 중국(Zhu 등, 1993) 등 지에서도 이 병이 발생되는 등 전 세계적으로 그 피해가 확산되고 있다.

우리 나라에서는 1978년 보리 지역적응시험 중 호남작물시험장에서만 바이러스에 의한 피해에 대하여 조사하였으나 그 바이러스 종류는 명시하지 않고 있었다(농촌진흥청, 1978). 이(1981)는 국내 43개 작물에서 30종의 바이러스를 분류하고 동정하였으며, 그 결과 보리에서 NCMV, BaYMV 및 SBWMV를 分類 同定하였고 BaYMV는 종자전염은 되지 않고 토양에 의해 전염되며 남부지방에서 심한 피해를 입힌다고 하였다. 또한 그는 이 병에 저항성인 품종으로는 향맥, 밀양6호, 방사6호가 있으며, 이병성인 품종으로서는 영산보리, 부흥과 백동 등이 있다고 하였다. 김과 정(1983)은 보리 호위축병이 경남북, 전남북 및 충남 일부지역에서 발생되고 있었으며 백동과 영산보리는 이병성 품종이고, 香麥과 Azumamugi등은 저항성 품종임을 밝혔다. 그후 호남작물시험장에서는 보리 지역적응시험에서 호위축병 저항성 정도를 조사하여 송학보리 등이 호위축병에 저항성인 것으로 보고하였다.

소 등(1988)은 남부지방에서 호위축병이 발병되고 있다고 하고 바이러스 입자를 순화하였으며 토양 약제 처리의 효과는 인정할 수 없다고 하였고, 그 후 소 등(1990,1991)은 우리 나라 남부지방에서 재배되는 보리포장 중에서 39.6%가 바이러스 병징이 나타나고 찰보리 등은 이병이 되지 않으며 석회를 200kg/10a 산포하면 호위축병이 발병되는 것을 지연시킬 수가 있다고 하였다.

보리에서 호위축병이 발견된 초기에는 주로 방제법과 저항성 품종 선발에 대하여 연구되었는데 methyl bromide 등 몇 가지 약제를 처리하면 효과가 있으며, 이때 비닐을 피복하면 더욱 효과가 높다는 보고가 있다(Saito 등, 1964; Yasu 등, 1963). 또한 시비량, 석회시용, 토양담수처리, 토양피복, 파종시기 조절, 밀 등 저항성 작물과 윤작 등의 경종적 방법 및 살균제 등 약제 처리는 큰 효과가 없고 토양훈증 처리는 토양중에 살고 있는 모든 생물을 사멸시킴으로서 방제 효과는 있지만 경제적 가치는 없어(Adams 등, 1993; Miyamoto, 1958) 일부 연구 목적으로만 제한적으로 사용되고 있다. 그러나 이병정도는 품종간 차이가 있어 저항성 품종을 선발하고자 하는 연구가 계속

되어 Mokusekko3, Mihorihadaka, Ea52 등 저항성 품종을 선발할 수 있었다(Okamoto 등, 1963; Saito 등, 1964).

바이러스 계통을 분류하는데는 ELISA법 등 여러 가지가 있으나 이 들 방법으로는 정확한 계통을 분류 동정하는데 어려움이 있다. 따라서 PCR을 이용하여 바이러스의 핵산을 증폭시켜 식물체에 존재하는 바이러스를 분류하는 방법이 시도되고 있다. Poggi Pollini 등(1995)은 기존에 밝혀진 BaYMV와 BaMMV의 핵산염기서열을 이용하여 primer를 제작하고 이를 이용하여 BaYMV의 독일 분리주와 BaMMV의 일본 분리주인 Ka1을 구분하였다. Schenk 등(1995)은 RT-PCR기법을 활용하여 BaMMV와 BaYMV의 보리체내에서의 이동을 구명하였는데 저항성 품종에서는 BaMMV가 검출되지 않았다고 하였다.

보리 호위축병이 발견 보고된 이후로 초기에는 이 병을 방제하기 위한 연구와 저항성인 품종을 선발하고자 하는 시험이 주로 이루어 졌으나, 이 병이 토양전염성인 바이러스 병으로 밝혀져 화학적 방제가 불가능하며 저항성인 품종을 재배하는 것 이외에는 방제방법이 없다고 밝혀진 이후에는 저항성인 품종을 육성하기 위한 연구가 주로 이루어지고 있으며, 바이러스를 순화하고 입자를 확인하며 이병된 조직의 변화, 혈청학적 유연관계, 매개체 확인 등에 관한 연구도 수행되었다.

Takahashi 등(1973)은 Mokusekko3이 부분우성 저항성 유전자인 *Ym*을 갖고있으며 *Ym*은 3차망 유전자(*K*)와 29.37 %의 조환가를 가지고 연관되었다고 하였고, Gouis 등(1994)은 Mokusekko 3이 *ym4*와 대립적이거나 아주 가깝게 연관되어 있다고 하였다. 반면에 Konish 등(1989)은 Mokusekko3에서 유래한 BaYMV에 저항성인 계통을 이용하여 저항성 유전자는 Esterase 동위효소 유전자군(*Est1-Est2-Est4*)과 3번 염색체 장완 부위에 1.26 5.01%의 조환가를 갖고 아주 가깝게 연관되었다고 하였다. Konishi와 Kaiser(1991)는 Mokusekko 3과 Misato Golden의 BaYMV 저항성에 대한 유전적 차이를 검토하였는데 이 둘은 모두 3번 염색체에 위치한 *Est* 복합 유전자좌와 연관된 일반적인 저항성 유전자를 갖고 있고, Mokusekko3의 경우는 4번 염색체에 위치한 3차망 유전자(*K*)와 약하게 연관되어 있다. 이는 BaYMV의 모든 strain에 저항성을 보이는 Mokusekko3의 경우 적어도 2개의 저항성 유전자를 갖고 있는 것으로 추정된다고 하였다. *ym1*은 *K-gl3-ym1*의 순서로 4번 염색체(4H)에 위치하고, *ym5*는

*cu-Est-ym5*의 순서로 3번 염색체(3H)에 위치한다고 하였다(Konishi 등 1997).

유럽에서 재배되고 있는 보리 호위축병 저항성 품종들은 모두 "Ragusa" 품종에서 유래한 호위축병 저항성 유전자를 가지고 있으며 이 저항성 유전자는 단인자 열성으로(Friedt 등, 1985), 보리 호위축병 저항성 유전자(*Ym*)와는 대립유전자 또는 복대립 유전자이거나 아주 가까이 연관되어 있는 새로운 유전자로 알려져 *ym4*로 명명되었고, 이 유전자는 삼염색체 분석에서 3번 염색체 장완에 있음이 밝혀졌다(Kaiser 등, 1989). Graner 등(1993)은 Igri×Franka의 F1 anther derived doubled haploid line을 사용하여 *ym4*와 연관된 2개의 RFLP marker(MWG838:1.2cM, MWG010:1.2cM)를 탐색하였는데 이중 MWG010은 저항성 품종과 이병성 품종을 구분하는데 사용 할 수 있었다. Ordon 등(1995)은 *ym4* 저항성 유전자와 연관된 RAPD marker OP-Z04660H를 개발하였는데 *ym4*와는 1.6cM 떨어져 있으며 저항성 품종에는 밴드가 없고 이병성 품종에는 밴드가 나타났다고 하였다. 그후 Schiemann 등(1996)은 dominant 형태의 밴드인 OP-Z04660H를 codominant 형태의 밴드로 전환하여 Franka/Igri 조합에서 잘 적용되는 것을 확인하였고 Weyen 등(1996)은 Marker assisted selection에 활용하기 위하여 몇 개의 RAPD marker를 추가하였다.

현재까지 알려진 BaYMV와 BaMMV에 대한 저항성 유전자의 보리 염색체의 위치는 다음과 같다. *Ym*(*rym*으로 재명명)유전자는 4번 염색체(4H), *Ym2*는 1번 염색체(7H), *ym3*(rym3로 재명명)는 7번 염색체(5H), *ym4*와 *rym5* 및 *rym6*는 3번 염색체(3H), *ym7*은 5번 염색체(1H), *ym8*과 *ym9* 및 *ym11*은 4번 염색체(4H)에 있음이 밝혀졌다(Saeki 등, 1999).

RFLP(Restriction fragment length polymorphism)란 DNA를 제한효소로 절단할 때 생기는 DNA 단편 크기의 다형성을 의미하는데, Beckmann 등(1986)과 Kochert 등(1989)은 이와 같은 DNA의 자연적 변이 특성을 이용하여 교배세대의 핵 DNA를 분석함으로써 유전자 지도를 작성하고, 유전양식을 밝히거나 유전자원의 유연관계를 밝히는데 이용할 수 있다고 하였다. 또한 Tansley(1983)는 RFLP 표지인자가 식물 전체 조직이나 세포단위에서도 동일한 결과를 얻을 수 있으며, 자연적 변이를 재료로 하기 때문에 모든 염색체에 광범위하게 분포하는 많은 표지인자를 만들 수 있고, DNA를 직접 분석함으로써 공우성으로 발현되는 유전현상 때문에 유전자형과 표현형이 일치

하게 되며, 환경의 영향을 거의 받지 않고, 유전자의 상위작용이 없으므로 어떤 집단에서도 형질 분리가 편중되지 않을 뿐 아니라 양적형질의 검정에도 이용 가능하다고 하였다. 또한 DNA marker들은 isozyme에 비하여 확인 가능한 유전자좌의 수가 많기 때문에 그 이용성 면에서 더욱 유리하다고 하였다.

Tragoonrung 등(1992)은 재현가능성이 부족한 RAPD(random amplified polymorphism detection)의 대안으로 STS(sequence tagged site)를 제안하였다. 이 STS는 알려진 sequence로부터 유익한 primer를 설계해 쉽게 PCR기술을 이용하여 현재의 지도를 대치할 수 있다고 하였다. STS의 polymorphism은 삽입이나 절단에 의하거나, point mutation에 의하여 나타난다고 하였다.

Michelmore 등(1991)은 새로운 유전자의 DNA 마커와의 연관관계를 분석하는 방법으로 기존의 모본과 bulk집단으로 먼저 연관군을 검색하고 이후에 다시 개체들로 좀 더 밀접한 마커를 탐색할 수 있다고 하였는데, 이 방법을 이용하면 개체별로 연관분석을 하는 것보다 비용과 시간을 절감할 수 있다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 기존에 밝혀진 저항성인자들과 국내품종의 저항성 유전자들 간의 대립성 검정을 하여 새로운 저항성유전자를 찾아 이들 저항성 유전자와 연관된 RFLP marker나 PCR marker를 탐색하고, RT-PCR기법을 이용하여 보다 정확히 이병을 일으키는 바이러스 종류와 계통을 진단하는 방법을 구명하고자 수행하였다.

제 2장 재료 및 방법

제 1절 호위축병 바이러스 저항성 검정

1. 지역별 계통별 발병율 조사

보리 호위축병 저항성 유전자원을 수집 검정 및 선발하여 저항성 정도와 이병성 여부를 판별하고 이를 저항성 품종육성의 재료로 사용하기 위하여 1995년부터 1999년까지 5년 동안 수원, 익산, 진주, 나주, 밀양 등 5개 지역에서 포장저항성을 검정하였다.

공시재료는 Mokusekko3과 강보리를 포함한 60개 품종으로 국내 41개 품종, 국외 19개품종을 공시하였다. 재배법은 10립 혈파를 기본으로 하였고 시비량등 기타 재배법은 표준재배법에 준하여 재배하였다. 조사항목은 저항성, 이병성 정도를 발병정도에 따라 0에서 9까지 10단계로 측정하였다. 잎에 모자이크 반점이 없고 건전한 개체는 0, 생육에는 거의 지장이 없으나 반점이 약간 보이면 1, 생육이 약간 부진한 것을 3으로 판정하였다. 생육이 현저하게 불량해지면 5, 대부분의 모자이크 반점이 융합되어 잎이 누렇게 변하게 되어 더 이상 생육하지 못하는 경우는 7, 발병이 심해져 생육이 거의 불가능하게 되어 고사하는 것을 9로 판정하였다.

조사시기는 호위축병이 만연되는 2월 하순부터 3월 하순까지 각 지역에 걸쳐 2회로 나누어 각 지역에 따라 평균기온이 10℃ 전후인 시기를 골라 조사하였다.

2. 농업형질과의 관련성 조사

보리 縞萎縮病 발생과 농업관련형질 및 수량관련형질과의 관계를 알아보기 위해 진주 및 나주지역에 이병성품종인 진양보리, 두산29와 저항성계통인 수원맥344호, 수원맥346호를 파종하여 출수기, 성숙기, 간장, 수장, m2당수수, 1수립수, 천립중, 10a당 수량을 조사하였다.

시험구 면적은 구당 25cm × 6m × 6열 = 9m2로 하였고 난괴법 3반복으로 시험구 배치를 하였다. 파종은 98년 10월 25일 동시에 실시하였고, 조사는 표준조사법에 준하여 실시하였다.

제 2절 저항성 유전검정

1. 대립성 검정

국내 저항성 품종이 어떤 저항성 유전자를 갖고 있는지 확인하기 위하여 기존에 저항성 유전자가 밝혀진 품종들과 국내 저항성으로 확인된 10개의 품종을 인공교배하여 대립성 검정을 실시하였다.

표. 1. 기존의 저항성 품종과의 인공 교배.

모본		부본	
품종	저항성유전자	품종	저항성
		찰보리	-
		조강보리	-
Misato Golden	*rym*	내한쌀보리	-
Ea 52	*rym3*	마산과맥	-
Franka	*ym4*	남해과맥	-
Mokkuseko 3	*rym, rym5*	Tokushima Kagawa Hadaka	-
Sonate	*ym4*	자대맥	-
Diana	*ym4*	재래과	-
		재래맥	-
		Lintz	-

- : 저항성

인공교배에 사용한 품종들은 기존에 저항성유전자가 밝혀진 저항성 품종으로는 Misato Golden, Ea52, Franka, Mokusekko3, Sonate, Diana 등 6개를 사용하였고, 국내의 저항성 품종은 찰보리, 조강보리, 내한쌀보리, 마산과맥, Tokushima Kagawa Hadaka, 자대맥, 재래과, 재래맥 등 8개 품종과 도입품종중 저항성유전자가 밝혀지지 않은 Lintz를 사용하였다.

2. 저항성 유전자 분석용 인공교배

보리 호위축병 저항성 유전자의 위치를 확인하기 위하여 저항성 품종 6개와 이병성 품종 4개를 선정하여 8개 조합의 교배 집단을 작성하였다. 인공교배는 1997년 봄에 작물시험장 맥류포장에서 실시하였으며 교배종자는 여름에 세대단축온실에서 F2

종자를 채종하고 가을에 수원, 익산, 진주, 나주에 각각 1세트를 점파하여 98년 봄에 발병을 조사하였다. F3는 98년 가을에 파종하여 99년 봄에 발병정도를 조사하였다.

표. 2. F2 집단의 간장과 수장 분포.

저항성	이병성	간장			수장			비고
		범위		평균	범위		평균	
남해보리	사천6호	60	157	112.0	3.8	14.6	8.4	
Mokkuseko3	진양보리	75	152	114.5	5.0	16.0	8.0	*rym*, *rym5*
Franka	진양보리	71	143	110.2	5.0	16.0	8.8	*ym4*
두산8호	강보리	46	148	95.3	5.2	16.2	9.0	
Mokkuseko3	백동	70	145	122.0	4.0	12.0	7.6	*rym*, *rym5*
찰보리	백동	62	159	99.6	3.0	10.0	7.1	
조강보리	백동	77	164	126.7	3.2	9.4	6.3	

그림. 1. BaYMV and BaMMV에 대한 저항성 및 이병성 교배 후대 집단의 F3 검정.

3. 저항성 유전자 유전분석

98년 봄에 수확한 F3 종자는 수원 작물시험장, 익산 호남농업시험장, 나주 전남농업기술원, 진주 경남농업기술원의 상습 병발생 포장에 혈파 및 점파로 파종하였다. 발병 상태는 2월 하순에서 3월 하순까지 육안으로 검정하였다.

4. DNA marker를 이용한 저항성 유전자 연관 분석

가. DNA 추출

Causse 등(1994)의 방법을 약간 변형시켜 추출하였는데 보리 어린잎을 5-10g 채취하여 유발에 넣고 액체질소로 급냉동 시킨 후 미세한 분말로 마쇄한 다음 시료가 녹지 않은 상태로 50ml cap tube에 옮겨 담았다. Urea-phenol 추출 buffer와 섞고, SDS를 0.6% 첨가한 후 이 용액을 60℃ 항온수조에서 20분 동안 반응시키면서 2-3회 가볍게 혼합하였다. Chloroform:Isoamylalcohol(24:1) 혼합용액을 15ml 넣어 15분간 진탕하고, 2000×g로 15분간 원심분리 한 후, 상징액을 3겹의 거즈를 통해 거른 다음 새 튜브에 옮겼다. Chloroform:Isoamylalcohol 혼합용액으로 불순물 제거를 2회 실시하여 상징액을 새 튜브에 옮기고 동일량의 isopropanol을 넣어 잘 섞은 다음 -20℃에 30분간 두어 DNA를 엉기게 하였다. 5,000×g로 3분간 원심분리 후 침전된 DNA를 70% 에탄올로 씻어내고 15ml tube에 4ml TE를 넣어 60℃ 항온수조에서 20분간 DNA를 녹였다. 10ug/ml RNase를 4ul 넣어 37℃에 30분간 처리한 후 7,500×g로 12분간 원심분리하여 상등액을 옮겼다. 0.1 volume의 3M sodium acetate(pH5.2)와 2 volume의 absolute EtOH를 넣어 잘 섞은 다음 inverting에 의하여 DNA를 엉기게 한 후 끝이 굽은 pasteur pippet으로 건져 70%의 EtOH에 씻고 1.5ml eppendorf tube에 옮겨 진공건조기에서 EtOH를 제거후 TE buffer에 녹였다. DNA의 함량을 측정하기 위하여 DNA를 100배 희석하여 spectrophotometer의 260nm와 280nm의 파장에서 흡광도(O.D.)를 측정하였다. DNA의 순도는 O.D. 260/280 흡광도 비로 예측했으며 비율이 1.8-2.0인 DNA를 시료로 사용하였다. 각 시료 당 5ug DNA를 EcoRI으로 절단한 것과 절단하지 않은 DNA를 0.9% agarose gel에 전기영동하여 DNA에 대한 제한효소의 반응과 추출 시 DNA 절단상태를 검정하고, 50kb 이상의 양호한 DNA를 RFLP 분석과 STS 분석에 사용하였다.

나. RFLP 분석

(1) DNA의 제한효소처리 및 전기영동

2ug DNA당 2unit의 제한효소를 처리했으며, 제한효소의 활성을 유지하기 위하여 4mM spermidine을 첨가하여 37℃에서 12-15시간 반응시켰다. 0.9% agarose gel에 각 시료 당 8ug DNA를 loading하고 30volt로 15시간 정도 전기영동 하였다.

(2) Southern blotting

전기영동 후 gel을 0.25N HCl 용액에 10분간 depurination 시킨 후, 증류수 에 한번 씻고 0.4M NaOH buffer로 capillary transfer하여 Hybond N= membrane에 DNA를 transfer하는 alkaline transfer 방법을 따랐다. transfer 후 nylon membrane을 0.2M Tris-HCl(pH7.5/2X SSC buffer에 15분간 침적하여 중화시킨 후, 냉장보관 하였다가 사용하였다.

(3) DNA marker 및 Probe 작성

보리의 DNA 삽입단편을 포함하는 보리 genomic DNA와 보리cDNA, 귀리 genomic DNA(ABG:barley genomic DNA, ABC:barley cDNA, CDO:oat genomic DNA, BCD:barley cDNA)등 50종을 미국 USDA로부터 분양 받아 RFLP 분석에 이용하였다.

Probe의 labelling은 Dakara의 LaddermanTM Labeling Kit와 α-^{32}PdCTP를 사용하여 각 DNA marker를 random hexamer labeling법에 의하여 반응시킨 후 0.4N NaOH로 denature 시켜 DNA filter에 대한 probe로 이용하였다.

(4) Southern hybridization

Hybond N+ filter의 genomic DNA와 probe간의 hybridization은 0.5M sodium phosphate(ph7.2), 7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA(pH7.6)의 hybridization 용액에 filter를 넣고 65℃에서 4시간 동안 반응시킨 후 α-^{32}PdCTP로 label된 probe를 넣고 65℃에서 20시간 정도 hybridization하였다. Hybridization 후 filter를 65℃에서 처음에

는 2X SSC, 0.1% SDS 용액, 다음에는 1X SSC, 0.1% SDS 용액, 마지막으로 0.5X SSC, 0.1% SDS 용액으로 20분간 세척후 -70℃에서 3-5일간 X-ray film에 노출시켜 그 결과를 해석하였다.

표. 3. RFLP 표지인자의 연관위치.

염색체 위치	Clone name	ID number	염색체 위치	Clone name	ID number
1	ABC158	PA515	4	ABG397	PA588
1	ABC253	PA678	4	ABG472	PA594
1	ABC465	PA720	4	ABG601	PA601
1	ABG312	PA797	4	ABG618	PA606
1	ABG320	PA576	4	ABG714	PA615
1	BCD205	PA174	5	ABC160	PA670
1	BCD512	PA274	5	ABC164	PA672
2	ABC165	PA673	5	ABC257	PA679
2	ABC454	PA683	5	ABG053	PA572
2	ABG058	PA573	5	ABG373	PA580
2	ABG072	PA659	5	ABG702	PA799
2	ABG358	PA578	6	ABG378	PA796
2	ABG602	PA602	6	ABG379	PA581
2	BCD111	PA292	6	ABG458	PA591
2	BCD175	PA254	6	ABG466	PA706
2	BCD410	PA252	6	ABG711	PA613
3	ABC166	PA674	6	BCD269	PA316
3	ABC171	PA713	7	ABC155	PA712
3	ABG389	PA584	7	ABC302	PA701
3	ABG399	PA589	7	ABC483	PA721
3	ABG453	PA733	7	ABC622	PA722
3	ABG471	PA707	7	ABC718	PA723
3	BCD131	PA263	7	ABG473	PA595
3	BCD809	PA279	7	ABG708	PA664
4	ABC321	PA681	7	ABG712	PA614

(5)STS 분석

STS 분석을 위해서 사용된 primer는 몬타나 주립대학으로부터 작물시험장 맥류과가 분양 받은 primer 210개를 재분양 받아 사용하였다. PCR 기본 반응은 최종 25ul로 하였으며, 용액의 조성은 10× buffer 2.5ul, 2.5mM dNTP 2ul, Taq polymerase 1U, template DNA 200ng, primer 20pmole이었다. PCR 각 단계의 반응조건 및 온도조건은 full denaturation을 위해서 94℃에서 5분간 반응시킨 후, denaturation 95℃ 1분, annealing을 위해서는 primer에 따라 추천된 온도에 맞추어 55℃ 65℃에서 2분, extention은 72℃에서 1분간 35회 반응시킨 후 72℃에서 full extention 시켰다.

표. 4. 본 실험에 사용된 STS 마커.

STS marker	Number of markers	Type
ABG	87	barley genomic DNA
ABC	33	barley cDNA
MST	28	
WG	21	wheat genomic DNA
CDO	11	oat genomic DNA
Pst	6	barley genomic or cDNA
BCD	5	barley cDNA
ABA	5	
Etc	14	
Total	210	

PCR반응 후 전체용액 중 5ul로 DNA의 증폭 여부를 확인하고, DNA 5ul, 제한효소(Hae III, Alu I)를 5U, 10× buffer 2ul, 멸균된 증류수 12ul를 섞어, 37℃에서 4시간 처리하였다. PCR 반응 후 증폭된 DNA는 agarose 0.9 1.4% gel에 수평전기영동장치를 이용하여 분리하였다. 분리된 DNA는 ethidium bromide에 염색하여 UV trans-illuminator에서 관찰하고, polaroid 667 film을 이용하여 사진 촬영 후 결과를 해석하였다.

(6) BSA(bulked segregant analysis) 분석

BSA 분석을 수행하기 위하여 저항성을 보이는 개체 5개의 DNA와 이병성을 나타내는 개체 5개의 DNA를 농도를 맞추어 섞어 bulk DNA를 만들었다. 만들어진 bulk DNA는 각각의 모본 DNA와 함께 RFLP와 STS 분석에 사용하였다.

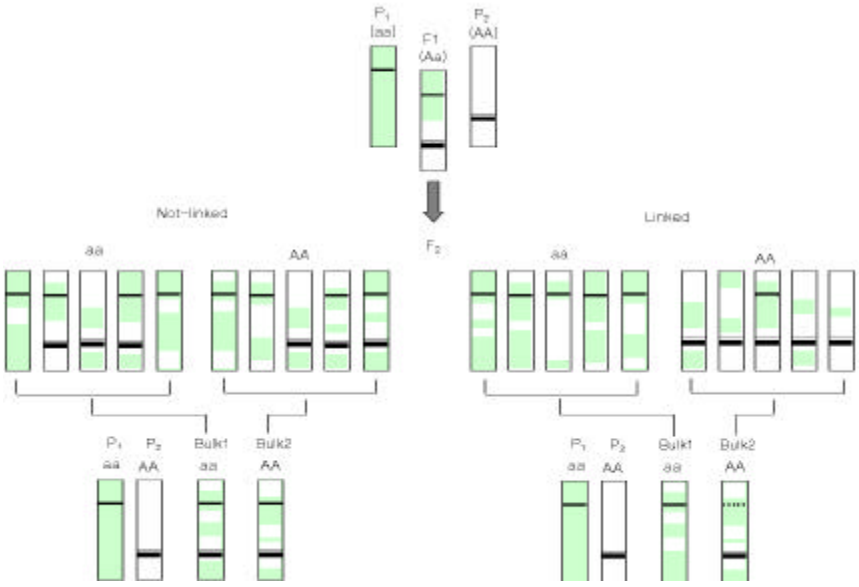


그림. 2. DNA marker와 연관된 목적유전자를 밝히는 Bulked segregant analysis(BSA)의 모식도.

제 3절. 바이러스 계통 분류

1. BaYMV의 분리 동정

가. 공시 바이러스 및 항혈청

실험에 사용한 BaYMV는 남부지방의 보리재배포장에서 바이러스 병징의 보리를 채집하여 효소결합항체반응법(ELISA)으로 BaYMV에 단독 감염된 보리즙액을 판별하기 위해 기주인 뉴골덴보리(barely cv. New Golden)에 즙액접종하여 순수분리하였다(BaYMV-HN). 대조바이러스인 BaYMV-Ⅱ-Ⅰ 및 BaYMV-Ⅲ 와 각 항혈청은 일본 농림수산성 농업연구센타에서 분양 받아 사용하였다.

나. 보리품종 및 기주반응

보리품종은 우리나라 보급종인 겉보리, 쌀보리, 맥주보리와 일본에서 도입한 겉보리와 맥주보리(표1)를 화분에 파종하여 공시하였다. 즙액접종은 BaYMV감염 보리생엽에 0.1M 인산완충액(pH 7.0 , 1mM KCN 함유)을 1 : 4 비율로 마쇄하여 1.5 2 엽기의 어린 보리 잎에 금강사를 살포 후 상이 즙액 접종하였다. 접종 후 자연과 생장상 (10 15℃)에서 생육시키면서 3 5주간 육안적 병징 관찰과 ELISA 검정으로 감염여부를 판정하였다.

다. 바이러스의 정제

BaYMV를 즙액접종으로 증식시킨 뉴골덴보리 감염잎을 사용하여 Usigi et al. (1971)의 방법을 응용하여 정제하였다. 감염엽에 액체질소와 3배량의 0.1N 구연산 완충액으로 마쇄하여 고속원심분리하고(137,500g) 바이러스를 침전시킨 후 120,000g /16시간 CsCl (1,28g/㎤) 밀도기울기 원심분리하여 바이러스 침전 밴드를 채취하여 바이러스를 얻었다.

라. 항혈청 제조 및 항혈청 반응

정제된 BaYMV-HN 와 freund's complete adjuvant를 1 : 1로 혼합하여 집토끼에 각각 1*ml* (1*mg*/1*ml*)씩 3주 간격으로 3회 근육주사와 채혈 1주일 전에 1회 이정맥주사 후 채혈하여 항혈청을 획득하였다. 한천겔이중확산법은 1% bacto-agar gel을 사용하여 정제한 BaYMV(OD260 =1.0)를 항원으로 반응시켰다. ELISA는 Clark and Adams (1977)의 방법을 사용하였고, 항원은 감염엽에 인산완충액 (PBS-T)을 1 : 40 (W/V)으로 마쇄한 즙액을 사용하였다. ELISA판정은 405*nm*에서 microplate reader를 이용하여 반응색도를 측정하였다.

마. 외피단백질의 분리 및 전기영동

정제한 바이러스 10 *ul*에 4 *ul* 의 용해용 완충액(0.25 M tris-HCl , pH 6.8 , 8% SDS , 8% 2-mercaptoethanol , 40% glycerin , 0.04% bromo-phenol blue)을 혼합하여 100℃에서 3분간 열처리 후 Laemmli (1970)의 방법에 준하여 SDS-PAGE 전기영동하였다. 전기영동은 5 12.5% polyacryamide gel을 이용하여 18mA에서 6시간 영동하였다. gel은 멸균증류수에서 30분간 2화 수세하고 2% coomassie briliant blue R 250 염색액으로 1시간 염색하여 탈색 후 영동대로 관찰

하였다.

바. 핵산의 추출 및 전기영동

RNA 추출은 정제된 바이러스(2*mg*/*ml*)에 0.5% SDS 및 proteinase K를 첨가하여 반응시켰다. 페놀과 크로르포름 및 에테르 추출 후 에타놀 침전하여 증류수에 용해시켜 자외선 흡광도를 측정하였다. 전기영동은 1.2% 아가로스 겔 및 TBE 완충액을 이용하여 20mA에서 10분 , 70mA에서 1시간 전개하였다. 염색은 ethidium bromide로 하여 polaroid 사진 촬영하였다.

2. BaMMV의 분리 동정

가. 공시 바이러스 및 항혈청

BaMMV-Kor 는 호남농업시험장 보리포장에서 바이러스 병징의 보리를 채취하여 ELISA 검정 결과 BaMMV에 단독 감염주로부터 이슈크시라슈(BaMMV 판별품종)에 즙액접종 사용하였다. 기타 일본산 BaMMV-Kor, -Nal 과 BaMMV항혈청 및 일본산 보리종자 등은 일본 농림수산성 농업연구센타로부터 분양 받아 사용하였다.

나. 즙액접종 및 기주반응

즙액접종은 BaMMV-Kor에 감염된 보리생엽을 0.1M 인산완충액(pH 7.0 , mM KCN 함유)에 1 : 4(w/v)비율로 마쇄하여 1.5 2엽기의 보리유묘 잎에 금강사 살포 후 상이즙액접종 하였다. 접종후 자연과 생장상(10 15℃)에서 생육시키면서 3 5주간 감염여부를 병징과 ELISA 로 판정하였다. 한국산 보리 종자는 호남농업시험장 맥류연구실로부터 분양 받았고, 화분 실험은 멸균배양토가 든 1화분당 10립 기준으로 파종하였다.

다. 바이러스의 정제

BaMMV-Kor 의 정제는 Usigi and Saito (1976)과 Kashiwazaki(1991) 등의 방법을 응용하였다. 바이러스 감염 보리 잎에 액체질소와 3배량의 0.1M 구연산 완충액(pH 6.8)으로 마쇄 후 CCl4 및 에테르를 처리하여 색소를 제거하고 고속원심분리(137,500 g) 하여 부분 정제한 BaMMV를 CsCl(1,28/㎤)밀도기울기원심분리(120,000 g/16시간 이상)하여 분리된 바이러스 밴드를 채취하여 정제바이러스로 사용하였다.

라. 항혈청 제조 및 반응

정제한 BaMMV-Kor (1mg/ml)을 Freund's complete adjuvant 와 1 : 1로 혼합하여 3주 간격으로 3외 근육주사하고 채혈 1주일 전에 이정맥 주사를 1회 하였다. 역가 검정 후 전량을 채혈하여 항혈청을 얻었다. 한천 겔 이중 확산법은 정제한 BaMMV-Kor을 항원으로 하고, 항체는 제조한 BaMMV- Kor 항혈청을 사용하였다. ELISA 검정은 Clark and Adams (1977) 방법에 준하여 실시하였다. IgG 정제는 유안염색법과 DEAE cellulose 컬럼을 사용하여 분리하였고, Conjugate는 IgG에 alkaline phosphotase를 결합시켜 사용하였다. 반응농도는 IgG는 400배희석액 , Conjugate는 800배 희석하여 반응시켰으며 판정은 흡광도 405nm에서 microplate reader로 측정하였다.

마. 바이러스의 외피단백질 및 RNA 핵산 추출

바이러스 RNA 추출은 정제한 BaMMV-Kor 에 0.5%SDS 및 Proteinase (1mg/ml)를 첨가하여 37℃에서 반응시킨 후 페놀과 크로르포름을 각 2회 처리후 에테르 및 메타놀 침전을 시켰다. 외피단백질의 분리는 정제한 BaMMV-Kor 에 용해용 완충액 (0.25M tris-HCl, pH 6.8 , 0.04% bromo-2-merecaptoethanol , 40% glycerin , 0.04% bromo-phenol blue)을 혼합하여 100℃에서 3분간 열처리하였다.

바. 외피단백질 및 핵산의 전기 영동

외피단백질의 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 5 12.5% polyacryamide gel을 이용하여 18mA에서 6시간 전기영동하였다. 겔의 염색은 coomassie brilliant blue R250으로 하고 탈색 후 전개상을 관찰하였다. 핵산의 전기영동은 추출한 핵산시료에 SDS (10%)을 혼합하여 1.5% 아가로스 겔 및 TBE 완충액을 처리하여 20mA에서 10분, 70mA에서 1시간 전기영동 후 증류수에 수세하고 ethidium bromide 에 염색하여 polaroid 사진을 촬영하였다.

3. 보리오갈바이러스의 분리 및 동정

가. 지역별 맥류품종 파종

경기도 수원, 충남의 예산, 경남의 밀양 및 진주, 전남의 영암, 영광 및 나주, 전북의 고창, 익산, 황등 및 전주 등 11개 지역에 겉보리, 쌀보리, 맥주보리, 밀 등

107개 품종을 1998, 10월 11월에 10립 기준 혈파 3반복으로 파종하였다. 맥주보리의 동해를 방지하기 위하여 방한 비닐을 12월에 피복하고 1월말에 제거하였다.

나. 기주반응

바이러스 접종원은 진주포장 알보리에서 ELISA반응으로 SbWMV에 양성반응을 나타낸 이병주를 채취하여 *Ch. amaraticola*에 접종하여 국부병징을 확인 후 국부병반을 수거하여 백동에 재접종하여 ELISA로 SbWMV의 감염 여부를 확인하고 생장상 보존하면서 접종원으로 사용하였다.

접종에 이용한 공시품종은 부농외 28품종을 이용하였다 (표3).

다. 공시 항혈청

일본에서 구입한 SbWMV의 polyclonal antiserum에서 ELISA용 IgG을 정제하고, alkaline phosphate를 결합시켜 ELISA 반응 적정농도를 구하였다.

IgG분리는 항혈청을 $NH_4(SO_4)_2$에 포화시켜 IgG을 침전시키고, 10,000rpm/10min /room temp. 하여 침전된 IgG를 PBS에 투석한다.

DEAE(diethylaminoethyl) cellulose column을 활성화시킨 다음 0.1N NaOH로 중성화시켜 IgG를 흡인 여과하여 column fraction을 받아서 UV spectrophotometer로 IgG의 농도를 측정하였다. ODE 0.01% 280 = 1.4로 조정하여 보관한다.

ELISA용 conjugate는 분리된 IgG에 alkaline phosphate를 첨가하고 Dialysis/4℃ /PBS/ over night 한다. 25% glutaraldedhyde/22℃/4hr 고정을 시킨다. PBS에 투석시키고 최종적으로 Bovin serum albumin을 1%가하여 효소를 안정화시킨다. 장기간 보관 시에는 0.02% $NaNO_3$을 첨가하였다.

반응농도는 IgG는 400배 희석액 , Conjugate는 800배 희석하여 반응시켰다. ELISA 검정은 Clark and Adams (1977) 방법에 준하여 실시하였다. 판정은 흡광도 405nm에서 microplate reader 로 측정하였다. 이병 재료는 남부지방의 보리재배포장에서 바이러스 병징의 보리를 채집하여 ELISA 실험을 하였다.

라. SbWMV의 순수분리 및 증식

밀양, 진주 지방의 알보리와 목세이고 3호에서 ELISA결과 SbWMV에 양성반응의 시료로부터 *Chenopodium quinoa, Ch. amaranticola*에 즙액접종 하였다. 국부반점을 채취하여 SbWMV를 순수 분리하였다. 순수 분리된 SbWMV를 알보리, 백동, 노린61호, *Chonopodium quinoa, Ch. amaranticola* 등에 재접종시켜 40일 후 ELISA 검정하여 바이러스 감염여부를 확인하였다.

SbWMV 감염 백동보리를 13℃/9,000Lux 생장상에 보존하면서 접종원 및 기타 실험 재료원으로 사용하였다.

마. 면역전자현미경관찰

항원은 바이러스 감염 보리 잎 조즙액을 3,000 10,000 rpm/15min 원심분리하여 색소를 제거하여 사용하였다. 항체는 항혈청 또는 정제된 SbWMV의 IgG를 사용하였다. Protein-A-gold complex(15nm) 농도는 bovin serum albumin-PBS로 20, 30, 50배로 희석하여 사용하였다. 전자염색은 uranyl acetate로5-10분간 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

바. RT-PCR에 의한 SbWMV의 진단

재료는 경상남도 진주시와 밀양시에서 채취한 SbWMV 감염주를 순수 분리하여 알보리와 노린 61호에 계대 접종 중인 재료를 채취하여 total RNA를 분리하는 재료로 이용하였다. 전체 RNA는 핵산 추출 시약인 Sepa Gene Kit(Sanko Junyaku Co.)를 이용하여 분리하였다. 감염잎 10㎎과 tris-buffer(sol. Ⅰ, 100㎕)를 넣고 power homogenizer로 마쇄한 후 guanidine tiocyanate가 함유된 단백질 변성제(sol. Ⅱ, 100㎕) 및 acetate buffer(sol. Ⅴ, 50㎕)를 첨가하여 잘 혼합하였다. 그리고 클로르포름(sol. Ⅲ, 700㎕) 및 추출제인 sodium acetate(sol.Ⅳ, 400㎕)를 넣고 15,000 rpm으로 10분간 원심 하였다. 상등액에 glycogen 2㎕ 및 iso-propanol 500㎕를 혼합하고 -80℃에 20분간 정치 후 15,000rpm으로 10분간 원심 시켜 핵산을 침전 시켰다. 핵산은 70% 에탄올로 수세 후 진공건조 시켜 멸균증류수에 재희석하여 RT-PCR 시료로 사용하였다.

RT-PCR반응은 RT-PCR high kit (Toyobo Co.)의 사용 설명서에 준하였다. 분리된 total RNA 1㎕에 5x RNase buffer, 0.1M DTT, 5mM dNTPs, dH_2O, Surper

Script RT(10U/㎕), RNase inhibitor(10U/㎕)를 넣고 42℃/30분간 역전사반응을 시켜 first strand cDNA를 합성시킨 다음 99℃/5분간 열처리하여 PCR반응에 이용하였다. First strand cDNA를 주형으로 해서 Ampli. Tag. DNA polymerase(2.5U/㎕)를 이용하여 PCR반응에 따라 증폭시켰다. Primer는 SbWMV의 염기서열에 준하여 특이 primer인 JK-2와 JK-1를 이용하였다. PCR반응은 94℃/1분, 65℃/2분 및 72℃/3분간 30 cycle의 조건으로 수행하고 72℃/7분간 신장반응을 시켰다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethium bromide(1㎎/㎖)에 염색 후 전기영동대를 확인하였다.

4. 보리 바이러스의 발생 분포 및 맥류 품종별 바이러스 감수성

가. 공시품종 및 실험포 설정

우리나라 맥류 품종은 겉보리 27품종, 쌀보리 32 품종, 맥주보리 9품종, 밀 13 품종 등 81 품종이고, 외국도입품종은 겉보리 13품종, 쌀보리 3품종, 맥주보리 13품종, 밀 1품종 등 30 품종으로 총 합계 111 품종으로 파종하였다(표 6. 7). 맥류종자는 농촌진흥청 작물시험장 맥류과에서 분양 받았다. 파종은 1997년 1998년 2개년에 걸쳐 지역 기상에 따라 10 11월 사이에 품종당 3반복, 10립 기준 혈파 하였다. 파종지역은 수원, 예산, 밀양, 진주, 나주, 영암, 영광, 고창, 익산, 전주, 황등 등 11개 지역이였다(표 7). 포장관리는 표준재배법에 준하였고, 중부지방은 겨울에 동해를 방제하기 위하여(맥주맥 동사) 12월말에 비닐피복 후 이른 봄(2월)에 제거하였다.

나. 발병율조사 및 항혈청 검정(ELISA)

발병율조사는 지역별 지상 특성을 고려하여 2월초순부터 4월 중순까지 30일 격차로 2회 조사하였다. 조사기준은 생육주수 대비 병징발현 주수로 품종별 3반복 합계치로 하였다. ELISA 검정은 각 지역별 각 품종별로 병징발현 주위 생엽을 채취하여 4℃에 보존하여 실험실로 운반하여 실시하였다. ELISA 검정은 Clark and Adams (1977)의 방법에 준하여 감염보리 생엽 대비 인산완충액(PBST) 40 배 마쇄액 조즙액을 항원으로 하고, 항혈청 농도 IgG 4㎍/ml, 효소 결합항체(Conjugate) 2.5 ug/ml , 기질은 10% diethanolamine 완충액(pH 9.8)에 1% P-nitrophenolamine를 사용직전에 용해시켜 반응시켰다. 반응 판정을 육안적 발색도와 3M NaOH 정지액 처리 후 microplate reader로 405 nm에서 흡광도 판정을 병행하였다. 항혈청 BaYMV와 BaMMV는 본 연구실에서 제조한 것이며, SbWMV 항혈청은 일본 농림수산성 농업연구센타 바이러스 연구실에서 분양 받아 사용하였다.

5. RT-PCR을 이용한 바이러스 계통분류

가. RNA 추출용 시료 채집

RT-PCR을 이용한 보리 바이러스 병 진단을 위하여 표 1과 같이 20여 개소(익산, 나주, 해남, 진주, 밀양 등)에서 총 50개의 표본을 채취하였다. 토양을 포함하여 뿌리가 상하지 않게 채취한 표본은 포장에 이식하여 4-5일 키운 후 증상이 뚜렷한 잎을 잘라 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하여 RNA 추출 시료로 사용하였다.

표. 5. 바이러스에 이병된 보리 식물체를 채집한 장소.

지역	수집개소	채집 식물체 수	비고
전라북도	1	4	호남농업시험장의 호위축병 검정포
전라남도	11	22	전남농업기술원 포장 및 인접농가 포장
경상남도	5	10	경남농업기술원 포장 및 인접농가 포장
충청남도	3	7	충남농업기술원 포장 및 인접농가 포장
경기도	1	7	작물시험장 맥류 포장

나. RNA 추출

보리 바이러스병 주 발생지에서 수집한 이병개체들은 저온생장상에서 생육시킨 후 병징이 있는 잎에서 total RNA extraction kit(Promega)를 사용하여 RNA를 추출하였

다. 추출된 RNA의 일부는 바로 사용할 수 있도록 멸균된 증류수에 녹여 -70℃에 보관하여 1차 분석에 사용하고 일부는 0.2M sodium acetate를 첨가한 에탄올에 녹여 장기 보관 후 2차 분석에 사용하였다. 추출된 RNA는 260nm와 280nm에서 순도 및 농도를 확인하고 RT-PCR의 주형으로 사용하였다.

다. Primer Design

각종 문헌과 밝혀진 sequence data를 참고하여 BaYMV 및 BaMMV에 특이적인 primer 5가지를 합성하여 1차 분석을 실시하였고, 2차 분석시에는 BaYMV에 특이적인 primer 2가지, 각각 BaMMV-Na1과 BaMMV-ka1에 특이적인 primer 3가지를 합성하여 실험에 사용한 개체의 감염 여부를 확인하였다. 각 primer의 염기배열 및 염기서열상의 위치는 표 6과 표 7에 나타내었다.

라. PCR 조건확립

기존에 확보된 primer를 활용하여 보리 바이러스병 진단을 위한 PCR 수행조건은 다음과 같다. 48℃에서 45분간 Reverse transcriptation을 시키고 94℃에서 2분간 Reverse transcriptation을 억제시키고 denaturation은 94℃에서 30초, annealing은 60℃에서 1분, extention은 68℃에서 2분간 실시한 후 이를 40회 반복하였다. 68℃에서 7분간 final extention을 한 후 4℃에 저장하였다.

표. 6. RT-PCR에 사용한 프라이머의 염기서열.

Primer	Primer 염기서열(5' → 3')
Poty4	GGA TCC GTN TGY GTN GAY TTY AAY AA
BaMMV7	AAC CTT TCC GGT ATA CA
BaMMV8	TTT TTT TTT TTA ACC TTT CCG
ATTTA	ATT TAC TTT CCG CCG CCC TAG CAT AAT TTA
T14	TTT TTT TTT TTT TT
Y1	GTT GAA GCG GAC CGT GTG GA
Y2	TAC GCA TGA TCC TTC GGA GT
S20	TCA TCT TAA TAG GTA GGC ATC AG
S21	GAC ATC GTC TCA ATA GAT GAT GA
S25	TTA CGA GCT GAT AGT AAT CAG CG

표. 7. **바이러스 핵산 염기 서열 내의 프라이머의 위치.**

프라이머	핵산 염기서열내의 프라이머의 위치	
Poty4	1948	1965 in BaMMV RNA1(Poggi et al, 1995)
BaMMV7	3930	3946 in BaMMV RNA1(Poggi et al, 1995)
BaMMV8	3937	3956 in BaMMV RNA1(Poggi et al, 1995)
ATTTA	2847	2876 in BaYMV RNA1(Poggi et al, 1995)
T14	3' polyadenylated tail	
Y1	140	159 in BaYMV coat protein
Y2	637	656 in BaYMV coat protein
S20	BaMMV-Ka1 3' non-coding region RNA2(Kashiwazaki, 1996)	
S21	BaMMV-Na1 3' non-coding region RNA2(Kashiwazaki, 1996)	
S25	BaMMV-Na1, Ka1 3' non-coding region RNA2(〃)	

제 3장. 結果 및 考察

제 1절. 호위축병 바이러스 저항성 검정

1. 지역별 계통별 발병율 조사

보리 縞萎縮病에 의한 被害 및 病徵은 그림 3-A에서 보는 바와 같이 보리 생육포장이 군데군데 누렇게 변하게 되며 동일 포장 내에서도 심하게 發病되는 장소와 전혀 발병이 되지 않고 건전하게 생육하는 장소도 있어 변이가 심하였다. 이를 자세히 살펴보면 그림 3-B에 보는 바와 같이 生育 再生期에는 잎이 누렇게 되어 濕害와 비슷하게 보이지만 습해는 잎이 전체적으로 노랗게 변하는 반면에 이 병에 감염된 잎은 모자이크 病斑이 있음으로 해서 습해와는 구별이 되었다. 이 병에 감염된 잎을 보면 그림 3-C에서와 같이 모자이크 반점이 있고 그 반점의 정도는 이병 정도에 따라서 달리 나타났다. 발병 정도에 따라 0에서부터 9까지 10 단계의 정도를 매겨 저항성 및 이병성 정도를 측정하였다. 건전한 개체(0)는 잎에 모자이크 반점이 없고 생육이 왕성하지만 이병에 1정도로 罹病이 되면 생육에는 거의 지장이 없으나 반점이 약간 보였고, 3정도로 罹病이 되면 생육이 약간 부진하였다. 그러나 罹病 정도가 5가 되면 생육이 현저하게 불량해지고 7정도로 罹病 되면 대부분의 모자이크 반점이 융합되어 잎이 누렇게 변하게 되어 더 이상 생육하지 못하였으며 9정도로 이병 되면 고사하였다. 이 병은 보리가 월동을 하고 봄에 재생될 때 평균기온이 10℃ 정도가 되면서 많은 병 발생을 확인 할 수 있는데 이는 전염 매개체인 *P. graminis*의 활성온도가 10℃가 적온이기 때문이라고 하였다(蘇 등, 1991). 온도가 올라가면서 전염 매개체의 활성이 줄어 병징의 회피현상도 나타나지만 병이 심해지면 그림 3-D에서와 같이 枯死하는 경우도 발생하였다. 따라서, 罹病정도가 심해짐에 따라 모자이크 반점이 융합되어 황백색으로 변하여 잎이 고사되었다. 심한 경우에는 분얼과 절간신장이 이루어지지 않아 수량에 막대한 지장을 초래하게 되고 어떤 경우는 전혀 수확을 할 수 없게 된다는 보고가 있다(Huth, 1984).

그림. 3. 초봄에 발생하는 이병성 품종에서 보이는 보리 호위축병 바이러스에 감염된 식물체의 전형적인 증상.
A : 호위축병 바이러스에 감염된 농가 포장.
B : BaYMV나 BaMMV에 감염된 보리 식물체에 나타나는 전형적인 증상 .
C : BaYMV나 BaMMV에 의해서 야기된 모자이크 반점을 확대한 사진.
D : 정상개체와 바이러스에 감염된 보리에서 나타나는 증상의 비교.

표 8은 1995년부터 1999년까지 5년간 국내 계통, 장려품종 및 도입품종들에 대한 지역별 연차별 縞萎縮病의 발병율을 조사한 것이다. 총 60개의 품종 및 계통들을 각 지역별로 2회에 걸쳐서 조사하였다. 전체적으로 살펴보면 연차 및 지역에 관계없이 저항성 및 이병성을 나타내는 품종들이 있고, 지역에 따라 저항성 정도가 다르게 나타나는 품종들도 있었다.

먼저 연차 및 지역에 상관없이 이병성을 나타내는 품종들로는 두산22호, 두산8호,

백동, 부농, 사천6호, 제주보리, 진광보리, 진양보리, 향맥 등이 있었고, 일본에서는 저항성으로 알려진 Haruna Nijo, Mikamo Golden, New Golden 등은 감수성으로 나타났으며, Misato Golden의 경우는 98년도까지는 저항성을 나타냈으나 99년도에는 4개 지역 모두에서 이병되는 현상을 보였다.

연차 및 지역에 관계없이 저항성을 나타내는 품종들로 국내 품종은 강보리, 남해보리, 내한쌀보리, 두루보리, 마산과맥, 새강보리, 새쌀보리, 새올보리, 새찰쌀보리, 알찬보리, 찰보리, 찰쌀보리, 탑골보리, 팔달보리 등이 있었으며, 도입품종으로는 Diana, Ea52, Franka, Haganemugi, Ishuku Shirazu, Lintz, Mokusekko3, Sonate 등이 있었다. 그 중 특이할만한 점은 Mokusekko3의 경우 어떤 균주도 침해하지 못한다고 보고(Takahashi 등, 1976)되었으나 99년도의 경우 미약하나마 병징이 나타나는 것으로 조사되어 추후 자세한 검토가 요망된다.

새쌀보리와 올보리의 경우는 지역과 연차에 따라 저항성 정도가 다르게 나타났는데 이는 이들 품종이 특정 균주에 대해서만 저항성을 나타내기 때문인 것으로 해석되었다. 또한 새찰쌀보리와 알찬보리의 경우는 98년도까지는 전체적으로 저항성으로 분류되었으나 99년도에는 발병이 많이 되어 이 부분에 대한 조사 또한 세밀한 검토가 필요할 것으로 판단되었다.

2. 농업형질과의 관련성

표 9는 이병성품종인 진양보리와 두산29호와 저항성 계통인 수원344호, 수원346호를 진주와 나주지역에 1998년 10월 25일에 파종하여 1999년 봄에 농업형질을 조사한 것이다. 나주지역에서는 호위축병이 발병되지 않았으며, 진주지역에서는 저항성 계통과 이병성 계통이 뚜렷하게 구분되었다. 진주 및 나주지역에서의 출수기와 성숙기는 병발생과 관계없이 일정한 양상을 보였으며, 간장의 경우 병이 발생하지 않은 나주지역의 경우 별 영향이 없었으나, 병이 뚜렷하게 나타난 진주지역에서는 저항성 계통들인 신호보리와 수원346호의 간장이 길어지는 경향을 나타내었다. 수장의 경우는 병이 발생하지 않은 나주지역에서는 진양보리와 두산29호가 약간 길었으며, 병 발생이 뚜렷했던 진주지역에서도 진양보리와 두산29호가 길게 조사되어 병발생과는 무관한 것으로 보였다. 일반적으로 병발생이 7이상이 되면 수장이 40%이상 감소된다는 보고가 있으나 본 실험의 경우 그보다는 적게 간장이 줄어드는 현상을 나타냈는데 이는 진양보리와 두산29호가 병의 회복이 빨라서 나타나는 현상으로 추측되는바 이에 대해서는 보다 더 정밀한 검토가 필요한 것으로 판단된다.

표. 9. 지역간 보리 품종들의 농업관련 형질.

품종	저항성 (0-9)		출수기		성숙기		간장 (cm)		수장 (cm)	
	NJ	JJ	NJ	JJ	NJ	JJ	NJ	JJ	NJ	JJ
진양보리	0	7	4.20a	4.18ab	5.24a	5.26a	72a	74c	6.1a	6.4ab
두산29호	2	9	4.19a	4.17b	5.23a	5.25a	77a	75c	6.2a	6.8a
신호보리	0	0	4.18a	4.19a	5.23a	5.25a	77a	102a	5.9a	6.4ab
수원346	1	0	4.18a	4.13c	5.23a	5.22b	80b	96b	5.3b	5.7b

NJ : 나주, JJ : 진주
파종기 : 나주(10.25), 진주(10.25)

표 10과 표 11은 진주와 나주지역에서의 병발생에 따른 계통간의 수량구성요소와 10a당 수량을 조사한 것이다. 표 11에서 살펴보면 m^2당 수수는 병이 발생하지 않은 나주지역의 경우 품종간의 차이가 있는 것으로 조사되었지만 병발생이 뚜렷한 진주지역에서는 품종간의 차이를 고려하더라도 진양보리의 경우 현저하게 감소하는 경향을

나타내었다. 1수립수의 경우 병의 발생과 관련 없이 계통간의 차이가 없었으며, 천립중의 경우 병이 발생하지 않은 나주지역에서는 차이가 없었으나 병발생이 뚜렷한 진주 지역의 경우 약간 감소하는 경향을 보여 병이 발생하면 천립중이 감소한다는 보고(Huth, 1984)와 일치하였다.

표 11은 진주와 나주지역에서의 10a당 수량을 조사한 것이다. 병이 발생하지 않은 나주지역의 경우 수량이 440kg에서 485kg으로 계통간에 약간의 차이는 있었지만 고른 분포를 보인 반면 병발생이 뚜렷한 진주지역에서의 수량은 450kg에서 685kg의 분포를 보여 계통별 현저한 수량의 차이를 나타내었다. 진주지역에서 감수성인 진양보리와 두산29호가 각각 448kg과 450kg, 저항성인 수원344호와 수원346호는 각각 668kg과 685kg으로 비슷하였는데 감수성인 품종들이 저항성계통에 비하여 대략 40%정도의 수량감소를 보였다. 서(1995)의 보고에 의하면 병발생이 3정도이면 대략 50% 감수하고, 5이상으로 진행되면 100kg/10a이하로 거의 수확할 것이 없다는 것이 밝혀졌으나, 본 실험의 경우는 병발생이 7과 9로 나타난 감수성 품종도 60%정도는 수확을 할 수 있었다. 이는 감수성 품종이라도 병이 발생하는 시점에서의 피해정도와 병이 회복되는 정도는 품종에 따라 다르기 때문인 것으로 판단되며 이에 대한 면밀한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

표. 10. 지역에 따른 저항성 및 이병성 계통의 수량구성요소.

품종	저항성 (0-9)		m²당 수수		수당립수		1000립중 (g)	
	NJ	JJ	NJ	JJ	NJ	JJ	NJ	JJ
진양보리	0	7	1156ab	794b	24a	25a	36.2a	41.6bc
두산29호	2	9	1009b	938ab	23ab	25a	38.8a	38.8c
신호보리	0	0	961b	959ab	23ab	25a	38.5a	45.5a
수원346호	1	0	1310a	1195a	22b	24a	38.6a	43.3ab

NJ : 나주, JJ : 진주

표. 11. 지역에 따른 저항성 및 이병성 계통간의 수량 비교.

품종	저항성		수량(kg/10a)	
	나주	진주	나주	진주
진양보리	0	7	441a	448a
두산29호	2	9	480a	450a
신호보리	0	0	453a	668b
수원346호	1	0	485a	685b
R			**	
C			**	
R×C			**	

제 2절 호위축병 저항성 유전검정 및 연관분석

1. 저항성 유전자 대립성 검정

보리 호위축병의 저항성 유전 양상을 구명하기 위해 1997년도에 교배하여 얻은 F1 7개 조합을 수원 및 익산 포장에 파종하여 병 발생을 조사하였으나 병 발생이 저조하여 대립성 검정을 수행하지 못하였다. 그래서 이듬해인 1998년도 10월에 수원, 나주, 익산, 진주 등 4곳을 선정하여 지역별 파종적기에 파종하여 1999년 봄에 각 지역 별로 2회에 걸쳐서 조사하였다.

표. 12. 연차별 익산, 진주 나주 지역에서의 모본으로 사용한 품종들의 저항성 정도.

품종	조성	과성	저항성 정도					
			'98			'99		
			익산	진주	나주	익산	진주	나주
Mokkuseko3	6	겉보리	0	0	0	0	1	0
Franka	6	겉보리	0	0	0	0	0	0
강보리	6	겉보리	5	0	0	0	0	0
찰보리	6	겉보리	0	0	0	0	1	0
조강보리	6	겉보리	0	0	0	1	1	0
남해보리	6	쌀보리	3	0	0	0	0	0
사천6호	2	겉보리	7	9	9	7	7	7
진양보리	2	겉보리	5	9	3	0	9	7
백동	6	쌀보리	9	9	7	9	9	9
두산8호	2	겉보리	7	7	7	7	9	3

표 12는 1998년, 1999년 2년에 걸쳐서 익산, 진주, 나주 3곳에서 모본으로 사용한 저항성 품종과 이병성 품종의 병 발생 상황을 조사한 것이다. 발병정도는 완전저항성을 나타내는 것을 0, 완전 이병성을 보이는 것을 9로 표기하여 10개의 등급으로 나누어 조사하였다. 표에서 알 수 있듯이 저항성 품종인 Mokusekko 3, Franka, 강보리, 찰보리, 조강보리, 남해보리 등은 연차별로 지역에 상관없이 저항성을 나타내었고, 이병성 품종인 사천6호, 진양보리, 백동, 두산 8호 등은 연차별 지역별로 모두 이병성을 보였다. 이들 3곳에서의 병발생은 본 실험을 수행 하는데 충분한 조건을 만든 것으로 생각되어 이들 품종들끼리 교배한 분리집단의 발병정도를 조사하고 후대 분리비를 검정하였다.

표. 13. 국내 저항성 품종들의 대립성 검정.

	Misato Golden (*rym*)	Ea 52 (*rym3*)	Franka (*ym4*)	Moku sekko 3 (rym,rym5)	Sonate (*ym4*)	Diana (*ym4*)
찰보리	+1) - 2)	- -	+ +	+ -	+ +	+ -
조강보리i	+ +	- -	+ +	+ +	+ -	+ -
내한쌀보리	+ +	- +	+ +	+ +	+ +	+ -
마산과맥	+ +	+ +	+ +	+ +	+ -	
남해과맥		+ +	+ +	+ +	+ +	
Tokushima Kagawa Hadaka	+ +	+ -	+ +	- -		
자대맥	+ -	+ +	+ +	+ -		
재래과	+ +	+ -	+ +	+ +		
재래맥	+ +	+	+ -	+ -		
Lintz	+ +	+ +	+ -	- -		

1) : 익산, 2) : 나주
- : 저항성, + : 이병성 또는 분리

표 13은 저항성유전자의 대립성 여부를 알아보기 위해 국내 저항성 품종과 기존에 알려진 저항성 품종간 교배하여 조사한 결과이다. 병은 진주와 익산 2개 지역에서 지역별로 2회로 나누어 조사하였고 (-)의 경우는 저항성을 표시하고 (+)의 경우는 이병성이나 분리하는 계통을 표기하였다. 표에서 살펴보면 찰보리와 조강보리는 진주와 익산 두 곳에서 *rym3* 저항성유전자를 갖는 Ea52와 대립적이며, Tokushima Kagawa Hadaka와 Lints의 경우는 *rym*과 *rym5* 저항성유전자를 갖고 있는 Mokusekko3와 대립적으로 나타나 2개 이상의 유전자가 관여하는 것으로 추측할 수 있었다. Lintz의 경우는 대립성검정과 더불어 연차별 지역별로 병발생 정도를 조사한 결과도 Mokusekko3의 저항성 반응과 비슷하게 나타나 Lintz는 Mokusekko3가 가지고 있는

저항성 유전자를 모두 가지고 있는 것으로 추정되었다(표 9).

찰보리의 육성과정을 보면 *rym3* 저항성 유전자를 갖고 있는 Haganemugi를 모본으로 육성된 강보리와 일부지역에서 저항성을 보이는 마산과맥과의 교배를 통하여 육성되었다. 따라서 강보리의 경우 *rym3* 유전자를 갖고 있는 것으로 판단되며 이 강보리와 여교잡을 통하여 육성된 찰보리의 경우 역시 *rym3* 유전자를 가지고 있을 것으로 추측되었는데 이는 대립성검정의 결과와 일치하였다. 또 *rym3* 유전자를 보유한 것으로 확인된 조강보리를 육성하는데 이용한 모본들 중 저항성을 갖는 품종으로는 Hyproly가 있었다. Hyproly의 경우 어떤 저항성 유전자를 갖고 있는가에 대해서는 밝혀진 바가 없었는데 조강보리가 *rym3* 유전자와 대립적이라는 결과로부터 Hyproly도 *rym3* 유전자를 갖는 것으로 추측할 수 있었다. 내한쌀보리 육성 모본들 중에도 Haganemugi가 있었음에도 내한쌀보리는 *rym3* 유전자와 대립적이라는 결론을 얻을 수가 없었는데 이는 추후 검토가 요망된다(부표 1과 2).

2. 저항성 유전 검정

표 14와 15는 진주와 익산의 호위축병 상습발생지에서 저항성품종과 이병성 품종간 교배조합들의 F_3계통의 후대분리비를 나타낸 것이다. 조사는 2회로 나누어 실시하였으며, 육안으로 저항성인 계통과 이병성인 계통으로 구분하고 일부 분리계통도 나타났으나 명확하지 않아 분리계통은 이병성 계통으로 취급하여 분리비를 계산하였다. 진주에서는 두산8호/강보리 조합과 Mokusekko3/백동 조합이 3:1의 분리비를 나타내어 단인자의 유전양상을 보였다.

표. 14. 진주 지역에서의 호위축병 저항성 유전자의 분리비.

교배조합	저항성	이병성	x^2(3:1)	P
사천6호/남해보리	75	106	27.91	< 0.05
Mokkuseko3/진양보리	110	184	24.16	< 0.05
Franka/진양보리	71	167	4.32	< 0.05
두산8호/강보리	67	168	1.54	0.20- 0.30
Mokkuseko3/백동	27	122	2.98	0.05- 0.10
찰보리/백동	92	128	35.58	< 0.05
조강보리/백동	115	181	30.29	< 0.05

익산에서의 교배조합들의 분리비는 사천6호/남해보리의 조합이 추가로 3:1의 분리를 보였다. Mokusekko3/백동 조합의 분리비가 3:1로 나타났는데 이는 지금까지 Mokusekko3는 *rym*과 *rym5* 2개의 저항성유전자를 갖는 것으로 보고된 것과 다른 결과를 보였다. 그러나 *rym5* 유전자를 갖고 있는 Misato Golden의 경우 익산에서 이병되어 *rym*만이 익산에서도 저항성을 나타내는 강력한 저항성 유전자라고 추측된다.

표. 15. 익산 지역에서의 호위축병 저항성 유전자의 분리비.

교배조합	저항성	이병성	x^2(3:1)	P
사천6호/남해보리	44	139	0.09	0.70- 0.90
Mokkuseko3/진양보리	170	129	163.93	< 0.05
Franka/진양보리	128	118	95.87	< 0.05
두산8호/강보리	52	181	0.89	0.30- 0.50
Mokkuseko3/백동	46	102	2.91	0.10- 0.20
찰보리/백동	128	88	135.20	< 0.05
조강보리/백동	92	197	6.79	< 0.05

3. RFLP 표지인자를 이용한 연관분석

표 14와 표 15에서 후대 분리비가 3:1에 적합한 Mokusekko3/백동, 강보리/두산8호 조합의 시료를 채취하여 DNA를 추출한 후 RFLP, STS marker를 이용하여 모본의 Polymorphism을 확인 후 분리집단의 Polymorphism을 검정하였다.

각 모본에 대한 survey filter를 제작하여 RFLP marker 50개(표 3)로 각각 Polymorphism을 확인 한 후, Bulked segregant analysis의 방법으로 저항성 유전자가 어떤 염색체에 속하는지를 확인하였다. BSA방법은 유전분석시 보다 적은 노력과 시간으로 찾고자 하는 유전자가 어느 염색체에 속해 있는지를 손쉽게 확인 할 수 있는 방법으로 보고되고 있다(Michealmore, 1991).

저항성품종인 조강보리, 남해보리, Franka, 마산과맥, 목석항 등 5개 품종과 이병성인 사천6호, 진양보리, 백동 등 3개 품종을 6개의 제한효소 (BamH I, Bgl II, Dra I, EcoR V, Hind III, Xba I)로 절단하였고, 재료로 사용한 DNA는 제한요소로 절단하였을 때 골고루 절단되어 DNA가 여러 종류의 크기로 절단된 것을 확인하였고 이 젤을 가지고 모본의 다형성 분석을 위한 필터를 제작하였다.

확보된 probe를 사용하여 각각의 제한효소에 대하여 모본의 다형 현상을 확인하고 이중 모본에서의 다형현상을 나타내는 probe를 RFLP 분석에 사용하였다. 표 16과 표 17은 강보리/두산8호 조합과 Mokusekko3/백동 조합의 모본의 다형성을 조사한 것이다. 강보리와 두산8호의 경우 모본사이의 다형현상이 많이 조사되었는데 이는 2조보리와 6조보리의 유연관계가 멀어 나타난 현상으로 해석되었다. 이중 강보리와 두산 8호에 대하여 모본의 다형현상을 보이는 probe를 유전분석 재료로 사용하였다.

표. 16. 6개의 제한효소로 절단한 강보리/두산8호 조합과 Mokusekko3/백동 조합의 RFLP.

	강보리/두산8호						Mokusekko3/백동					
	BH	Bg	Dr	EV	HIII	XI	BH	Bg	Dr	EV	HIII	XI
다형현상	5	4	6	4	4	8	2	4	5	5	6	5
계	21	21	21	21	21	21	40	40	41	41	41	40

BH:BamHI, Bg:BglII, Dr:DraI, EV:EcoRV, HIII:HindIII, XI:XbaI

표. 17. 제한효소 처리에 의한 다형현상의 수.

다형현상의 수	강보리/두산8호	Mokusekko3/백동
0	8	20
1	3	4
2	2	2
3	3	2
4	4	2
5	0	1
6	0	0
계	21	41

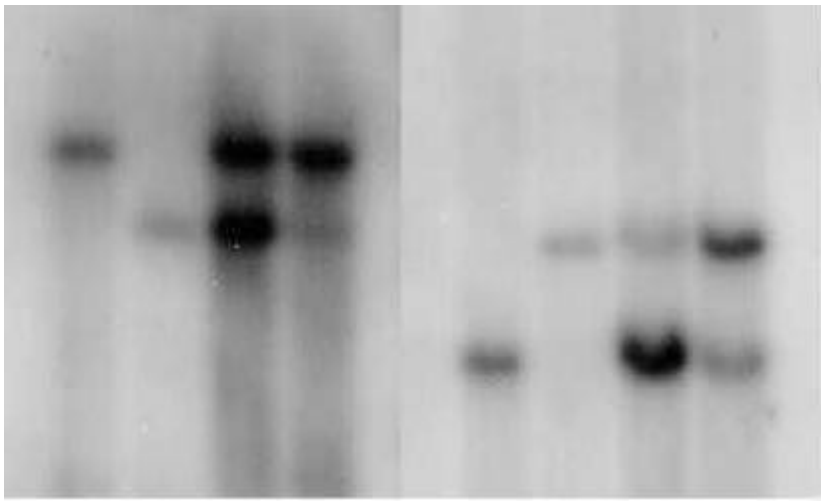


그림. 4. 강보리/두산8호 조합에서의 RFLP probes ABG253(7H)와 BCD111(2H)의 bulked segregant analysis. 저항성 유전자는 ABG253(7H)과 BCD111(2H)와는 연관되지 않았음.
사용한 제한효소 : Xba I

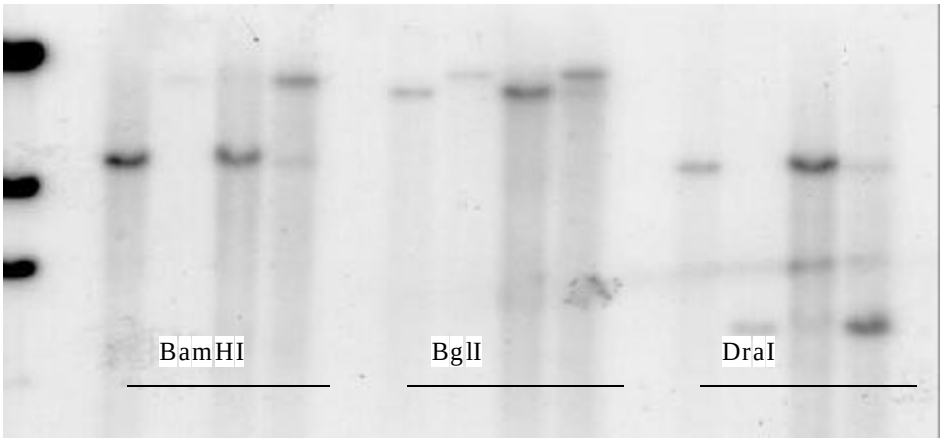


그림. 5. 강보리/두산8호 조합에서의 RFLP probes ABC302(5H)의 Bulked segregant analysis. 저항성 유전자는 ABC302(5H)와 연관되어 있음.
사용된 제한효소 : BamH I, Bgl II, Dra I

그림 4는 BSA(Bulked segregant analysis)기법을 이용하여 강보리/두산8호 조합에 대하여 연관분석을 한 것이다. RFLP probe ABG253(7H)와 BCD111(2H)에 대하여는 각 모본의 밴드가 저항성 및 이병성 bulk에 모두 나타나 이들은 저항성 유전자와 연관이 되지 않은 것으로 판단되며, 그림 5에서와 같이 ABC302(5H)는 각 모본의 밴드가 저항성 및 이병성 bulk의 밴드와 동일한 다형현상을 보여 이 저항성 유전자는 7번 염색체(5H)에 위치하는 것으로 판단되었다. 이러한 결과들은 Saeki(1999) 등이 *rym3* 저항성유전자를 갖고 있는 저항성 품종 Ishuku Shirazu와 감수성 품종인 Ko A의 후대에서 유전분석을 실시한 결과 *rym3*유전자는 7번 염색체(5H)에 존재한다고 하였는데, 본 실험에서도 강보리가 가지고 있는 유전자는 *rym3*이며 이 유전자가 7번 염색체(5H)에 존재하는 것으로 확인되었다. 그림 6은 강보리/두산8호 조합의 F3 계통별 ABC302와 *rym3*간의 연관 분석을 실시한 결과이다.

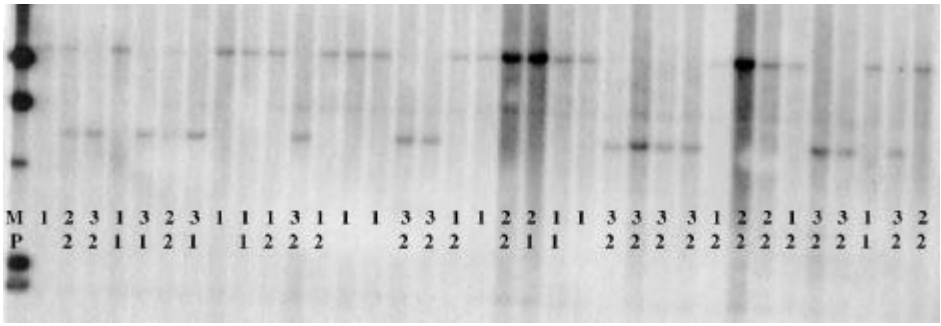


그림. 6. 강보리/두산8호 조합의 F3 계통별 ABC302와 *rym3*간의 연관 분석.
M : marker, P : phenotype

4. STS marker를 이용한 연관분석

STS marker를 이용하여 저항성 유전자의 연관분석을 하기 위하여 총 210개의 마커에 대하여 모본 polymorphism 검정을 실시하였다. 이중 Mokusekko3과 백동에 대한 polymorphism은 26개의 마커에서, 강보리와 두산 8호에 대해서는 31개의 마커가 모본들에 대한 polymophism을 보였다. 각 모본들에 대한 polymorphism을 분석하기 위하여 PCR을 수행하고 그 PCR산물을 제한효소로 절단하였고 PCR수행 후 polymorphism이 보이지 않은 primer 들에 대해서는 4 cut restriction enzyme인

HaeII와 AluI으로 절단하여 polymorphism을 확인하였다.

모본에 대한 다형성 검정을 기초로 하여 BSA 기법을 이용하여 연관분석을 실시하였다. 그림 7과 8은 강보리/두산 8호 조합에 대한 연관분석 결과이다.

RFLP분석에서와 같이 7번 염색체(5H)에 해당하는 ABA1과 Pst337이 각 모본에서 보여진 다형현상이 저항성 및 이병성 bulk에서도 동일하게 나타나 저항성 유전자와 연관되었음이 확인되었고 이는 Saeki(1999) 등이 밝힌 것과 같은 결과였다. ABA1의 경우는 bulk 집단에서 보였던 다형현상이 분리집단에서는 재현되지 않아 분리집단의 분석은 실시하지 못하였다. 그 원인은 이전에 사용하였던 primer와 새로 합성한 primer가 부분적으로 다른 이유인지 아니면 3-prime쪽의 sequence중 GC의 함량이 많아서 일 것으로 판단되나 차후 검토해야 할 것으로 생각된다. 따라서 이 Pst337 표지인자만을 사용하여 저항성유전자와의 유전자 지도상의 거리를 확인하기 위하여 연관분석을 수행하였다(그림 9).

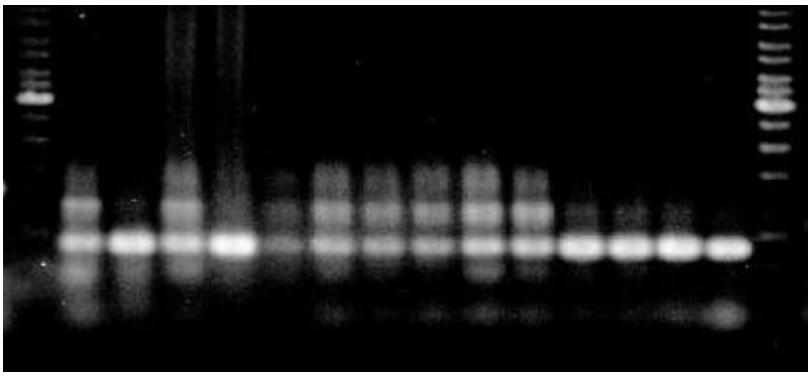


그림. 7. 강보리/두산8호 조합에서의 STS primer ABA1(5H)의 Bulked segregant analysis. 저항성 유전자는 ABA1(5H)과 연관되었음을 알수 있다.

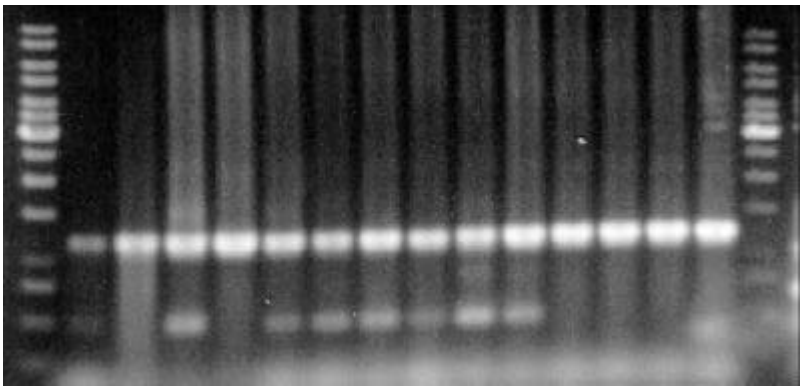


그림. 8. 강보리/두산8호 조합에서의 STS primer Pst337(5H)의 Bulked segregant analysis. 저항성 유전자는 Pst337(5H)과 연관되었음을 알수 있다.

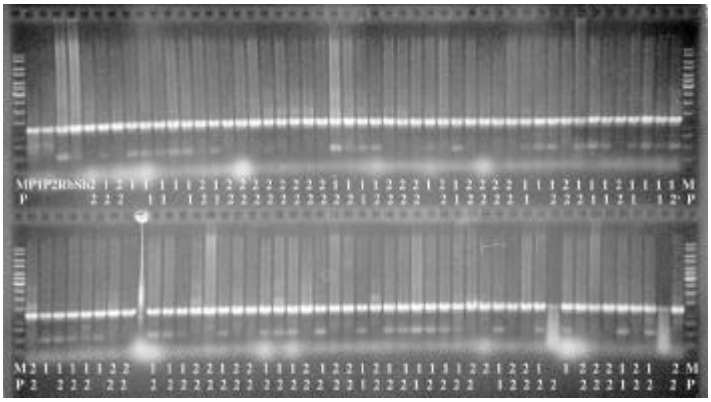


그림. 9. 강보리/두산8호 조합의 F3 계통별 STS 마커 Pst337와 *rym3*간의 연관 분석.

5. 유전자지도 작성

표 18은 강보리가 갖고있는 저항성 유전자 *rym3*와 연관된 RFLP marker ABC302와 STS marker Prt337에 대한 연관 분석을 실시한 결과이다. 연관 분석은 Mapmaker program을 사용하였다.

표에서 살펴보면 *rym3* 유전자는 STS marker Pst337과는 22.2%의 재조합 빈도로

연관이 되었고, RFLP marker ABC302와는 14.3%의 재조합 빈도로 연관이 되었음을 알 수 있다. Pst337과는 22.2%의 높은 재조합 빈도를 나타내었는데 이는 STS marker의 다형현상이 밴드의 유무로 판단되는 우성유전의 양상을 나타내어 저항성 밴드가 나타날 곳에서 나타나지 않아 3:1의 분리가 되지 않아 계산상의 오차로 작용한 것도 한 요인이라 생각된다. 또한 RFLP marker인 ABC302의 경우 Saeki(1999) 등이 보고한 바에 의하면 35.6cM 떨어져 있는 것과 비교할 때 상당히 차이가 있는 것으로 나타났는데 이는 분석집단이 달라서 생길 수 있는 것과 본 실험에서 실제 분석한 집단의 크기가 작아서 발생한 문제인 것으로 생각된다.

표. 18. 7번 염색체(5H)상에 존재하는 저항성 유전자 *rym3*와 연관된 RFLP와 STS 마커의 분리비.

표지인자	F3 집단의 분리비				조환가 (%)
	P1/P1 : P1/P2 : P2/P2		Total	*x*2	
Pst337	28	: 35	63	31.36	22.2
rym3	14 :	49	63	0.26	
ABC302	15 :	48	63	0.05	14.7

연관된 DNA marker를 이용하여 F3 계통을 대상으로 RFLP 분석과 STS marker 분석을 실시한 결과 강보리가 갖고 있는 저항성 유전자 rym3는 Pst337과는 23.9cM, ABC302와는 14.7cM의 거리에 위치하였으며, 재조합빈도는 각각 22.2%와 14.3%였다.

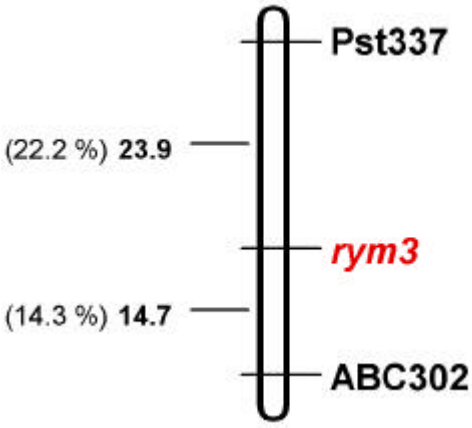


그림. 10. 저항성 유전자 *rym3*를 포함하는 7번 염색체(5H)의 유전자 지도.

제 3절. 바이러스 진단 및 계통 분류

1. 보리누른모자이크바이러스(BaYMV)의 분리 동정 및 진단

가. 즙액접종에 의한 기주반응

우리나라에서 순수분리한 BaYMV-HN 의 병원성을 조사하기 위하여 일본산 BaYMV-Ⅱ-Ⅰ를 대조로 하여 기주반응을 조사한 결과는 표 1과 같다. 맥주맥인 뉴골덴과 아가기 2조가 감수성으로 나타났으며 6조맥은 도산가와 73에만 감염되었다. BaYMV에 저항성 인자를 갖는 미사도골덴 (Ym 1), 이슈크시라슈 (ym3), 목세이코 3 (ym 1)와 아마기 2조, 하루나 2조, 가시마무기, 죠슈히로하다가에는 감염되지 않았다. 우리나라 보리품종에서는 전반적으로 감염율은 낮았으나 대부분이 모자이크, 황화 및 괴사 현상이 나타났다 (표2). 우리나라에서 분리한 BaYMV-HN 은 겉보리와 맥주맥에서는 모든 품종에 감염되었다. 그러나 쌀보리에서는 전반적으로 감염율이 낮았으며 흰쌀보리, 긴쌀보리, 새쌀보리, 새찹쌀보리 등은 감염되지 않았다. 일본산 BaYMV-Ⅱ-Ⅰ 계통은 우리나라에서 분리한 BaYMV-HN 보다 감염율이 낮았다. 그러나 맥주맥에는 모두 감염되었으며 겉보리와 쌀보리에서는 감염되지 않은 품종이 많았다. 이와 같은 결과는 우리나라의 BaYMV-HN과 일본산의 BaYMV -Ⅱ-Ⅰ간의 계통과 병원성의 차이로 생각되며 앞으로 BaYMV-HN의 병원성 연구가 더욱 필요하다고 생각된다.

나. 바이러스의 정제 및 입자의 크기

BaYMV-HN을 고속원심분리와 CsCl 밀도기울기 원심법으로 정제한 바이러스를 전자현미경으로 관찰한 결과 폭 13nm , 길이 120 1.750nm 범위에 분포하나 주로 250 300nm 및 500 650nm 범위의 2입자성 사상형 바이러스이었다 (그림 1.2) 또한 CsCl 밀도기울기원심분리에서는 1,33g/㎤ 밀도 부분에서 바이러스 띠가 단일로 형성되었으며, 자외선 흡수패턴은 측정한 결과 260nm에서 최고, 246nm에서 최저의 전형적인 바이러스 흡광도치를 나타냈다. 이와 같은 바이러스 입자의 크기는 Bymovirus 속의 BaYMV 및 BaMMV(Huth et al., 1984) , Wheat spindle streak mosaic virus (Shi et al., 1995), Wheat yellow mosaic virus (Inouye, 1969), Rice necrosis mosaic virus (Inoite and Saito , 1977) , Oat mosaic virus (Herbert and Panizo, 1975) 등의 입자크기인 13×250 300nm 및 500 650nm 범

위의 사상형 바이러스의 범주에 속하는 것이다. 또한 CsCl 밀도 기울기 원심분리의 결과도 Usigi and Saito (1976)의 BaYMV 정제 보고와 일치하였다.

나. 항혈청 반응

한국에서 분리한 BaYMV-HN 및 일본산 BaYMV-Ⅲ 항혈청과 BaYMV-HN , BaYMV-Ⅱ-Ⅰ, BaYMV-Ⅲ 항원을 한천 이중확산법으로 반응시킨 결과 항혈청 BaYMV-HN 및 -Ⅲ에서 항원인 BaYMVK-HN, -Ⅱ-Ⅰ, -Ⅲ 모두에서 뚜렷한 반응대가 형성되었으며 반응분지도 형성되지 않았다 (그림13).

다. 바이러스의 핵산 및 외피단백질의 전기영동상

BaYMV-HN , Ⅱ-Ⅰ,-Ⅲ 등 3개 계통의 RNA 전기영동상은 모두가 RNA 1은 7.6 Kb , RNA2은 3.5 Kb 의 2개 분리상이 나타났다(그림14). 또한 외피단백질의 전기영동상은 BaYMV-HN , Ⅱ-Ⅰ,-Ⅲ 등 3개 계통 모두에서 1개의 주밴드와 수개의 작은 밴드가 나타났다 (그림15).

계통간의 차이는 없었으며 주밴드의 분자량은 33KDa 이고 작은 밴드는 각각 31KDa 과 26KDa 였다. 이와 같은 핵산과 외피 단백질의 전기영동상은 Ehler and Paul (1986)과 Kashiwazaki et al.(1990) 등이 보고한 BaYMV의 핵산 및 단백질의 크기와 같은 결과이었다.

표 19. BaYMV계통간의 즙액접종에 의한 판별기주의 감수성 비교

보리품종(도입종)	바이러스 계통 a)	
	BaYMV - HN	BaYMV -Ⅱ-Ⅰ
2조맥		
뉴골덴	＋(b)	＋
아가기 2조	＋	＋
아마기 2조	－	－
하루나 2조	－	－
미사도 골덴(Ym1)a)	－	－
이슈크시라슈(ym3)	－	－
6조맥		
도산가와73	＋	＋
가시마무기	－	－
조슈히로하다가	－	－
목세이코	－	－

a) . ( )안의 표시는 저항성 유전자

b) . ＋ : 즙액전염에 의한 감수성 및 － : 비감염성

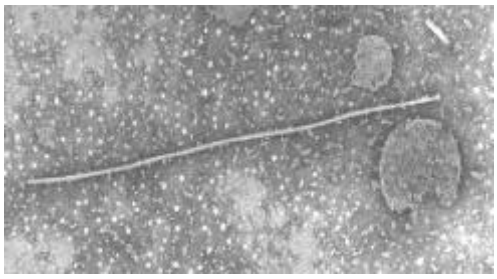
c) BaYMV-HN : 한국분리주, BaYMV-Ⅱ-Ⅰ : 일본분리주

표20. BaYMV 계통간의 즙액접종에 의한 보리품종별 감수성

보리품종(국내종)	바이러스계통 b)	
	BaYMV-HN	BaYMV-Ⅱ-Ⅰ
겉보리		
동보리 1호	8/42	0/31
동보리 2호	6/34	2/28
조강보리	1/34	0/32
밀양겉보리	3/41	0/32
새올보리	2/30	2/36
영남보리	1/31	1/29
탑골보리	4/37	10/39
쌀보리		
긴쌀보리	0/32	0/32
내한쌀보리	2/32	1/30
늘쌀보리	3/39	1/30
백동	11/36	10/35
새쌀보리	0/33	0/31
새찰쌀보리	0/32	—
송학보리	1/35	0/37
올쌀보리	2/37	—
찰보리	2/32	0/37
찰쌀보리	2/37	1/31
흰쌀보리	0/34	0/39
맥주보리		
두산22호	6/17	4/28
제주보리	1/25	2/23
진광보리	4/23	1/21

a) 분자는 병징발현 주수/ 분모는 접종주수.

b)BaYMV-HN 은 한국분리주, BaYMV-Ⅱ-Ⅰ은 일본 분리주



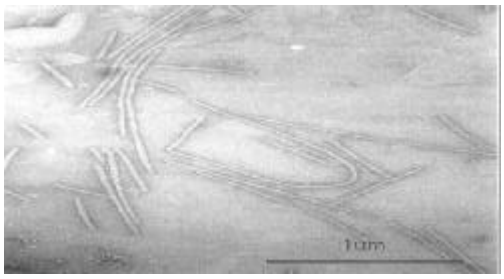


그림 11. Dip**법에 의한** BaYMV**의 입자** **그림** 12. BaYMV **바이러스의 순화입자**

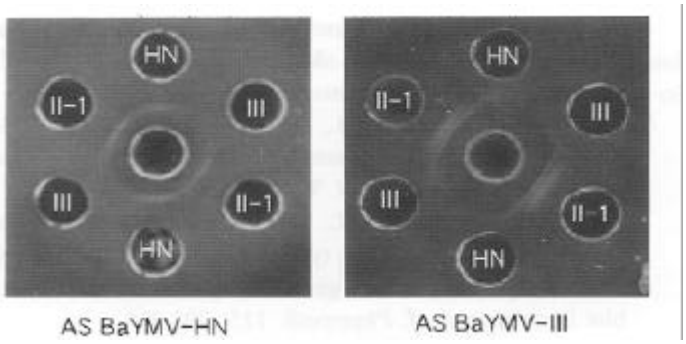
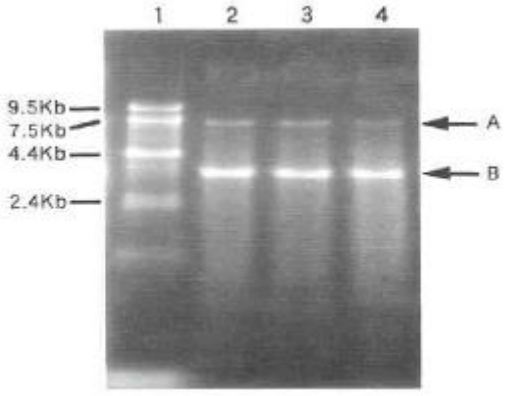


그림 13. **한천겔 확산법에 의한** BaYMV**의 계통간 반응 비교**

HN: BaYMV-Haenam, II-1: BaYMV-II-1(**일본**), III:BaYMV-III(**일본**)



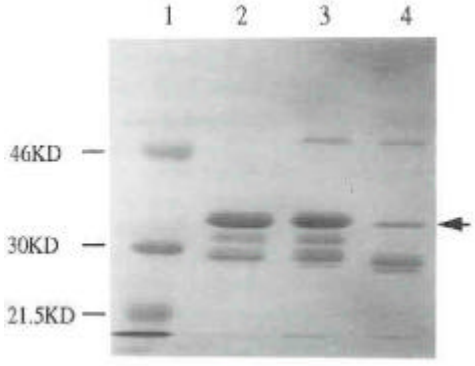


그림14. BaYMV**의 계통간** RNA **전기영동상** **그림**15. BaYMV**의 계통간** CP**전기영동상**

2. BaMMV의 분리 동정 및 진단

가. 즙액접종에 의한 기주반응

BaMMV-Kor을 인위적으로 즙액접종한 결과로는 뉴골덴 및 조슈히로하다가와 BaMMV에 저항성 인자를 갖인 미사도골덴(Ym 1) 및 이슈쿠시라슈(ym 3)등이 감수성으로 나타났다. 그러나 쥬구린 이바라기 1, 가시마무기 및 목세이고 (Ym 1) 등은 저항성으로 나타났다(표21). 이와같이 BaMMV-Kor에 대한 판별품종 반응은 Norura(1996)가 보고한 BaMMV-Nal 과 병원성이 유사한 것으로 생각된다. 한국산 보리품종에서도 쌀보리 품종과 겉보리 품종의 대부분이 감수성으로 나타났으나 새올보리, 찰보리, 흰쌀보리 등에서는 병징이 나타나지 않았다(표22).

나. 바이러스입자의 크기

정제한 BaMMV-Kor를 전자현미경으로 관찰한 결과 폭13nm, 길이 120 1,750nm범위를 갖는 사상형 바이러스가 관찰되었으며, 주로 250 300nm 및 500 600nm 크기를 나타내는 2입자성 바이러스였다(그림 16.17). 이와같은 결과는 Adams et al.(1998) 및 Huth et al.(1990)등이 보고한 BaMMV의입자크기와 일치하였다. 또한 CsCl 밀도기울기원심법으로 정제한 결과는 1.33g/㎤ 의 CsCl 농도 부위에 단일바이러스 침강대가 형성되었고, 260nm에서 최고 , 246nm에서 최저치인 자외선 흡수패턴을 나타내었다. 이와 같은 결과는 bymovirus에서 볼 수 있는 흡광곡선으로서 Usigi and Saito(1976), Kashiwazaki (1991) 및 Nomura(1996) 등이 보고한 BaMMV 의 성질과 일치하였다.

다. 항혈청의 역가 및 혈청 반응

정제한 BaMMV-Kor을 토끼에 근육 주사한 결과 반응 역가 680배의 항혈청을 얻을 수 있었다. BaMMV 계통간의 유연관계를 알아보기 위하여 한천겔 이중확산법으로 반응시킨 결과 항혈청 BaMMV-Kor에서 항원인 BaMMV-Nal , -Kor, -M 와 뚜렷한 반응대를 형성하였으며 반응분지도 형성되지 않았다. 그러나 BaMMV-Kor 및 -M 항혈청에서는 항원인 BaMMV-Kor 사이에 반응분지가 형성되었으나 BaMMV-Nal 항혈청과 BaMMV-Kor 항원사이에서는 반응대가 형성되지 않았다(그림18). 따라서 BaMMV-Kor 는 일본 분리주 BaMMV-Nal 과 유연관계가 깊은 것으로 생각된다.

라. 바이러스 핵산 및 외피 단백질의 전기영동상

정제한 BaMMV-Kor에서 추출한 RNA핵산은 자외선 흡광도 260nm에서 최고치를 나타내었다. RNA핵산을 전기영동한 결과는 RNA 1은 7.5Kb , RNA 2는 3.5Kb의 2개의 분리상이 나타났다(그림19). RNA 1은 BaMMV-Kor ,-Nal, -Kal, 및 -M 등 4개 계통간에 차이가 없었으나 RNA 2는 Kashiwazaki(1991), Foulds et al.(1993), Schlichter et al.(1993), Denssens and Mayer(1995) 등의 보고로 미루어 보아 계통간의 미미한 차이는 인정되며, Jacobi et al.(1995), Timpe and Kuhne (1995) 등에 따르면 이와 같은 차이는 BaMMV를 계대배양하면 핵산이 deletion 이 되어 RNA 2의 P2 단백질의 길이가 짧아진다는 보고와 관계가 있는 것으로 생각된다. 정제한 BaMMV-Kor로부터 분리한 외피단백질을 전기영동한 결과는 분자량 33KDa 인 주밴드와 수개의 작은 밴드가 나타났다(그림20). 이와 같은 현상은 BaMMV-Kor , -Nal , -Kal 및 -M 등 4계통간에 차이가 없었고, 또한 Kashiwazaki(1991)가 보고한 33KDa 분자량과도 일치하는 것이다.

표 21. BaMMV-Kor 의 즙액접종에 의한 보리품종별 감수성 비교

품종	즙액접종 감염율			
(도입종)	1차	2차	3차	계(%)
2조맥				
뉴골덴	0/15(－)	3/15(＋)	1/12(＋)	4/42(9.5)
미사도골덴(Ym1)	5/19(＋)	5/14(＋)	4/14(＋)	14/47(28.5)
아가기2조	0/18(－)	2/15(＋)	3/7(＋)	5/40(12.5)
아마기2조	3/14(＋)	2/13(＋)	3/16(＋)	8/43(18.6)
이슈크시라슈(ym3)	7/27(＋)	7/15(＋)	10/13(＋)	24/55(43.6)
하루나2조	14/18(＋)	5/15(＋)	12/16(＋)	31/45(68.8)
6조맥				
가시마무기	0/18(－)	0/15(－)	0/15(－)	0/48(0)
내한쌀보리	14/16(＋)	7/15(＋)	12/14(＋)	3/45(90.6)
늘쌀보리	13/16(＋)	7/16(＋)	11/14(＋)	31/46(67.3)
도산가와25	0/19(－)	1/13(＋)	1/16(＋)	2/48(4.1)
도산가와73	0/18(－)	0/16(－)	2/14(＋)	2/48(4.1)
도산가와81	2/16(＋)	1/15(＋)	1/16(＋)	4/47(8.5)
목세이고3(Ym1)	0/30(－)	0/15(－)	0/14(－)	0/59(0)
백동보리	16/16(＋)	9/13(＋)	14/14(＋)	39/43(90.6)
죠슈히로하다가	2/20(＋)	2/10(＋)	1/14(＋)	5/44(11.3)
주구린이바라기1	0/31(－)	0/15(－)	0/14(－)	0/60(0)
하가네무기	2/29(＋)	2/13(＋)	4/15(＋)	15/57(26.3)
밀				
노린61	0/15(－)	0/16(－)	0/31(－)	0/62(0)

멸균토양화분실험으로 3반복하였음.
(a)안은 저항성유전인자임
ELISA 검정 양성반응은 ＋, 음성반응은－로 표시하였음.

표 22. BaMMV-Kor 의 즙액접종에 의한 한국보리품종의 감수성

품종(국내종)	감염율	병징
겉보리		
강보리	20/98	N.M
새올보리	0/68	—
올보리	28/53	N.M.Y
오월보리	8/50	M.Y
탑골보리	6/36	M.Y
쌀보리		
무안보리	11/43	M.Y
백동보리	16/42	N.M.Y
영산보리	16/62	M.Y
찰보리	0/48	—
흰쌀보리	0/67	—
맥주보리		
두산8호	7/76	M.Y
두산22호	8/40	M.Y
진광보리	14/74	M.Y
향맥	19/67	M.Y

화분실험으로 3반복의 성적임.
감염율의 분자는 감염주수 / 분모는 접종주수임.
병징의 N : 괴사반점, M : 연한 모자이크, Y : 황화현상

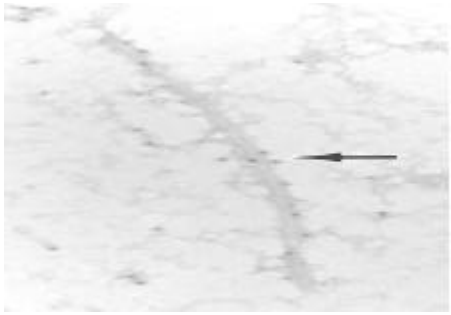


그림 16. Dip법에 의한 BaMMV의 입자

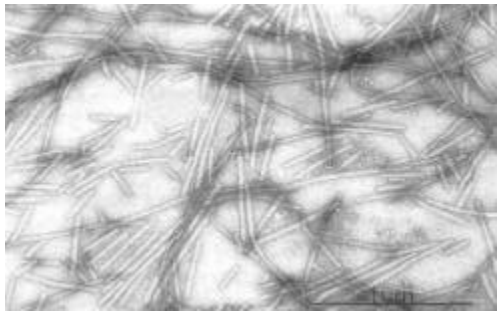


그림 17. BaMMV 바이러스의 순화입자

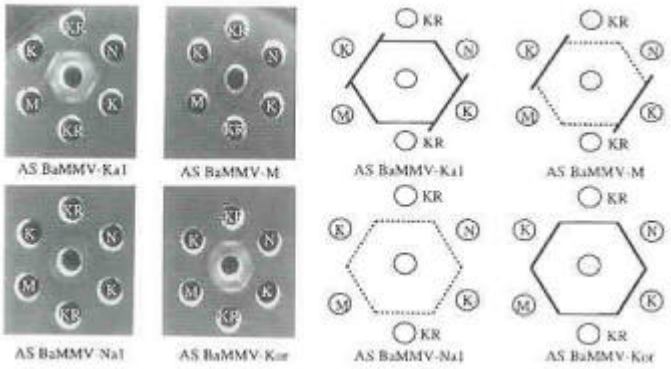


그림 18. **한천겔 확산법에 의한** BaMMV**의 계통간 반응 비교**

KR:BaMMV-KOR, K:BaMMV-Ka1, N:BaMMV-Na1, M:BaMMV-Germany.

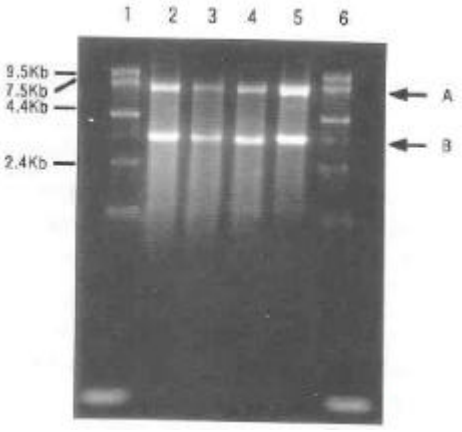


그림 19. BaMMV**의 계통간** RNA **전기영동상**

1,6:Marker, 2:BaMMV-Ka1, 3:BaMMV-M (**독일**), 4:BaMMV-Na1, 5:BaMMV-Kor

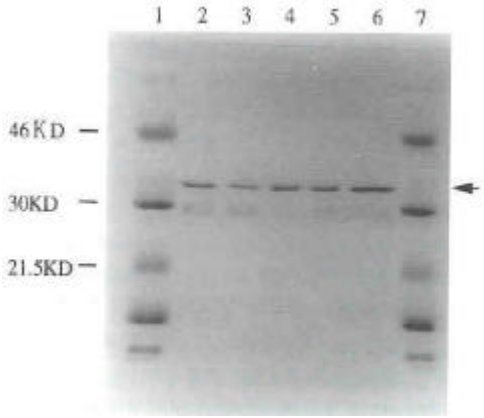


그림 20. BaMMV**의 계통간** CP **전기영동상**

1,7:Marker, 2,6:BaMMV-Kal, 3:BaMMV-M 4:BaMMV-Na1, 5:BaMMV-Kor

3. 보리오갈바이러스(SBWMV)의 분리 동정 및 진단

가. 지역별, 품종별 발병율 조사, 및 저항성품종 선발

10립 혈파 3반복 30주를 기준으로 육안적 병징과 발병식물을 채취하여 혈청학적 ELISA 검정을 한 결과는 표 1 및 2와 같다. 발병율 조사는 지역적 보리 생장생태를 고려하여 1999년 2월 말 4월초에 걸쳐 2회 실시하였다.

전체적으로는 표 1에서와 같이 약 33%의 바이러스병이 발생하였으며 지역적으로는 밀양(45.64%)과 전주(43.00%)지역이 심하였고, 영광(12.83%)포장이 적게 발생하였으며 영암포장은 발병이 안되며 조사성적에서 제거하였다.

품종별 발병율은 찰쌀보리(2.08%), 탑골보리(3.80%), 조강보리(5.94%), 찰보리(9.84%), 니쇼노지가라(9.13%)등이 저항성으로 발병율이 적었다.

밀 종류에서도 알찬밀(6.40%), 서둔밀(4.78%), 탑동밀(4.41%)등은 감수성으로 나타났다. 특히 일본에서 저항성으로 개발된 목세이고 3호(5.99%)도 진주와 전북지역의 포장에서 발병되어 검토의 대상이다.

지역별 및 107개 맥류품종별로 바이러스병징의 보리를 채취하여 SbWMV, BaYMV 및 BaMMV에 대한 ELISA 혈청 검정을 실시한 결과는 표 2와 같다.

지역적으로 수원, 밀양, 진주, 영광, 익산, 전주 포장에서 SbWMV가 검출되었고, 반면 예산, 나주, 고창, 황등 포장에서는 BaYMV, BaMMV에서만 ELISA양성반응을 나타내었다. 품종별로는 겉보리, 쌀보리, 맥주보리, 밀 등 모든 품종에서 SbWMV, BaYMV 및 BaMMV에 감수성 품종이 많았으나 특히 맥주보리에서 SbWMV에 대한 ELISA음성반응이 많이 나타나서 검토의 대상이다. 특히 다이아나 품종은 BaYMV에만 감수성이고 SbWMV 및 BaMMV에 ELISA음성반응을 나타내어 검토의 대상이다. 밀 품종에서는 금강밀, 남해밀, 다홍밀, 은파밀, 탑동밀 등에서 SbWMV에 양성반응으로 나타났다.

나. SbWMV의 순수분리 및 증식

밀양, 진주 지방의 알보리와 목세이고 3호에서 ELISA결과 SbWMV에 양성반응의 시료로부터 *Chenopodium quinoa, Ch. amaranticola*에 즙액접종 하였다. 국부반

점을 채취하여 SbWMV를 순수 분리하였다(사진 2). 순수 분리된 SbWMV를 알보리, 백동, 노린61호, *Chonopodium quinoa, Ch. amaranticola*등에 재접종시켜 40일 후 ELISA 검정하여 바이러스 감염여부를 확인하였다.

SbWMV 감염 백동보리를 13℃/3,000Lux 생장상에 보존하면서 접종원 및 기타 실험 재료원으로 사용하였다. 또한 노린61호에 접종하여 15℃의 생장상에서 순화용 재료로 증식시키고 있다.

SbWMV의 계통은 현재 일본계통 J-A, J-B, J-C, J-D 등과 미국계통 US-A, US-B, US-C, 등이 발표되고 있는 실정이다.

따라서 우리 나라에 발생하고 있는 SbWMV의 기주의 특성을 알아보고자 기주범위와 병징 특성을 조사한 결과 표 23과 같다.

표 23. 기주에 대한 SbWMV의 반응

품종	기주반응결과	품종	기주반응결과
겉보리		은파밀	2/10
부농	1/19	조춘호밀	7/15
알보리	2/26	칠보호밀	0/15
쌀보리		조	5/7
백동	8/23	옥수수	3/5
맥주맥		오차드그라스	0/10
사천61호	1/20	명아주	0/10
일본품종		명아주	3/8
쥬골덴	1/31	시금치	4/7
이슈구시라슈	0/30	토마토	3/7
목세이고	15/7524/83	동부	3/3
노린61		황금콩	2/6
밀	1/3	담배	0/8
고분밀	0/3	담배	0/10
그루밀	0/4	천일홍	0/5
금강밀	0/3	근대	0/6
남해밀	0/5	완두콩	0/5
알찬밀		강낭콩	0/6

다. SbWMV의 정제 및 혈청실험

진주와 밀양 포장에서 채취한 SbWMV 감염주로부터 순수 단일 분리하여 알보리와 노린61호(밀)에 증식시켰다.

라. ELISA Kit **실험**

일본에서 구입한 SbWMV **항체를** DEAE cellulose column**을 이용하여** IgG**을 정제하고,** alkaline phosphate**를 결합시켜** ELISA **반응 적정농도를 구하였다. 그 결과** ELISA **실시시에** IgG **항체는** 1mg/ml **농도를** 800 1,600**배까지 희석하여도 반응이 가능하였다.** SbWMV**에 감염된 보리 생엽을** 1:40 (W/V) PBST**로 희석 마쇄하여도** ELISA **반응이 가능하였다** (**사진**25).

마. 면역전자현미경관찰

이병엽육조직과 반응시킨 protein-A-gold particles**은** SbWMV**의 입자 주변에 금입자가 반응을 하고 있었다** (**사진**23).

바. 핵산 및 단백질의 RT-PCR **분석**

RT-PCR **재료는 경상남도 진주시와 밀양시에서 채취한** SbWMV **감염주를 순수분리하여 알보리와 노린** 61**호에 계대 접종 중인 재료를 채취하여 전체** RNA**를 분리하여** SbWMV**의 유전자 진단을 실시한 결과 사진** 5**에서 보는 바와 같다. 모든 반응주는 약** 0.6kb **부근에서** PCR **증폭산물 반응대를 얻었다. 향후** RT-PCR **산물을 정제하여** cloning**하여** sequecing**을 한다면 이미 보고되어 있는 일본계통등과 외피단백질부분을 비교하여 볼 수 있을 것으로 생각된다.**

사진21. **고창지역의 바이러스병 발생 포장 (위 포장은 건전 포장, 아래 이병포장)**

사진22. **백진과 보리의 바이러스병 병징 괴사 줄무늬가 나타남**

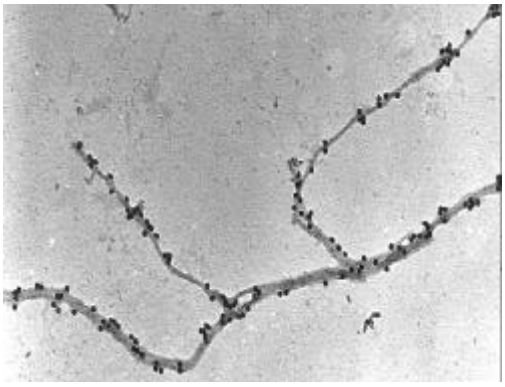


사진23. Immunogold method에 의한 SbWMV 바이러스 반응사진

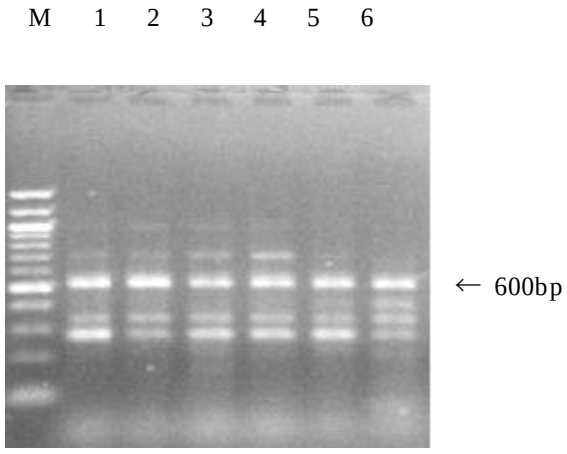


사진24. RT-PCR법에 의한 SbWMV의 외피단백질 전기영동 상

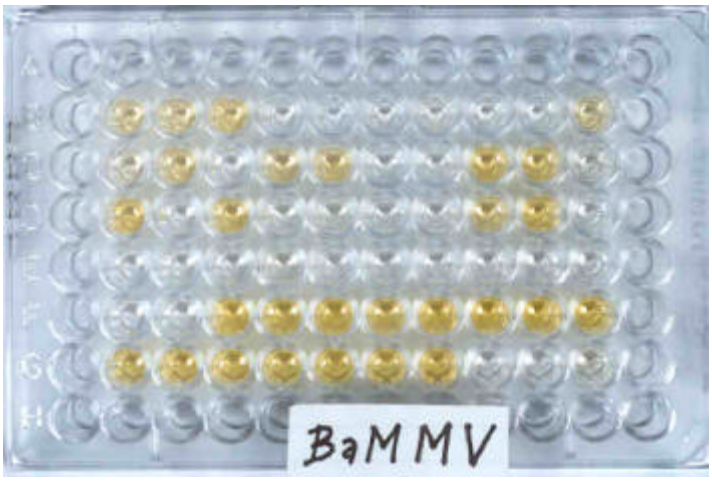


사진 25. 포장에서 채취한 이병주의 ELISA-test 결과

4. 보리 바이러스의 발생 분포 및 맥류 품종별 바이러스 감수성

가. 지역별 바이러스 분포

10개 보리재배 실험포에서 바이러스 병징의 보리를 채취하여 ELISA 검정을 한 결과 BaYMV , BaMMV, SbWMV 모두가 발생한 지역은 서원, 밀양, 진주, 영광, 익산, 전주 등이고 BaYMV, BaMMV 만 발생한 지역은 예산, 나주, 고창, 황등이었다 (표 6). 또한 바이러스병이 제일 많이 발생한 지역은 전주(42 51%), 밀양(41 47%)인 반면 적게 발생한 지역은 영광(10 12%), 익산(23 28%), 나주(26 27%)이고 10개 지역 평균 발병률은 32.37 33.53%이었다(표 7. 8). 바이러스병 발병상황은 대부분의 지역에서 BaYMV가 주로 많이 발생하고 있으나 고창과 예산은 BaMMV가 많이 발생하고 특히 SbWMV 는 밀양지역에 제일 많이 검출되었다.

바이러스병이 많이 발생한 밀양과 전주포장은 바이러스병 상습발생 포장의 흙을 채취 운반하여 성토한 바이러스병 검정포장이므로 토양전염성 바이러스병이 많이 발생한 것으로 생각된다. 반면 바이러스병이 적게 발생한 영광포장은 전라남도

농산물 원종장과 보리종자 생산 계약 재배한 포장으로 다른 지역 포장보다 경작자들의 포장관리가 철저하기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 10개 지역 전체의 바이러스병 평균 발병율이 30%이상을 상회한다는 것은 앞으로 보리생산에 많은 피해가 따를 것으로 사료된다.

나. 맥류 품종별 바이러스 감수성

10개 지역에 111맥류품종을 3반복 혈파하고 품종별로 바이러스병 감수성을 조사한 결과는 표 24. 25와 같다. 우리나라 품종(평균 32.37%)과 도입품종(평균 33.53%)간의 맥주보리 (평균 57.71%)의 감염율이 가장 많았고, 겉보리 (평균 32.40%)와 쌀보리 (평균 33.61%)는 큰 차이가 없었으며 밀 품종에서도 평균 4.64%의 감염율을 나타내었다. 품종별로는 탑골보리〉 조강보리〉 찰쌀보리〉 이리 35호〉 광활쌀보리〉 내한쌀보리〉 찰보리 등은 감수성이 큰 부농(82.17%), 백동(82.17%), 사천 6호(80.25%)에 비하면 저항성 품종으로 분석되었다(표 24, 25). 또한 알찬밀과 은파밀은 밀품종 중에서 감수성이 제일 높게 나타났다. 도입품종들도 우리나라 품종들과 비슷한 경향을 나타내고 있다(표 25). 겉보리 (평균 21.33%)가 쌀보리(평균 46.95%)와 맥주보리 (평균 46.68%)에 비하여 감염율이 다소 낮으나 도입종 전체 감염율은 33.53%로 우리나라 품종 전체 감염율 32.37%와 비슷하였다.

맥류품종별 바이러스병 감수성을 검토한 결과 이슈크시라슈(ym 3)는 Kashiwazaki et al.,,(1989)에 의하면 BaYMV에 저항성으로 보고되었으나 대부분의 실험포장에서 BaYMV와 BaMMV에 복합감염되어 있었다. 하루나2조, 아마기2조, 미사도골덴(ym1)등은 일본의 BaYMV-Ⅱ-Ⅰ계통에 저항성인 품종이나 우리나라대부분의 지역에서 BaYMV에 감염되었다. 가시마무기는 BaMMV에만 저항성이고, 하가네무기는 BaMMV에만 감수성으로 보고되어 있으나(Kashiwazaki et al., 1988) 본 실험에서는 BaYMV 및 BaMMV가 모두 검출되었다. 따라서 일본 판별품종의 병징으로 미루어 보아 BaYMV-Ⅰ,-Ⅲ 계통과도 일치하지 않는다. 또한 목세이고(Ym 1)는 일본에서는 모든 바이러스에 저항성으로 되어있으나 우리나라에서는 지역에 따라 다르지만 BaYMV, BaMMV, SbWMV 가 검출되었다. 따라서 일본에 발생하고 있는 바이러스와 우리나라에 분포하고 있는 BaYMV, BaMMV, SbWMV

등의 병원성이 차이가 있는 것으로 사료된다. 영국과 중국의 경우도 BaYMV 및 BaMMV 가 지역에 따라 병원성의 차이점이 나타나 병원성이 다른 분화형 바이러스 계통의 존재 가능성을 제시하고 있다(Yili et mal., 1984, Adams, 1991). 한국에서도 지역에 따라 일분의 판별품종에 대한 바이러스의 반응정도가 달라서 지역별로 병원성이 다른 분화형 계통이 발생하고 있을 것으로 추정되며 계통분화 문제는 앞으로 유전자 분석과 추가적 실험이 요구된다고 사료된다.

표 24. 맥류바이러스 병 발생검정포장 설치 지역

지역	주소	포장상태	비고
수원	경기도 수원시 농촌진흥청 작물시험장	맥류포장	
예산	충청남도 예산군 오가면 충남농산물원종장	전작포장	
밀양	경상남도 밀양시 영남농업시험장	맥류포장	바이러스검정포
진주	경상남도 진주시 경남 농업기술원	전작포장	
나주	전라남도 나주시 삼도면 전남농업 기술원	전작포장	침수검정불가
영암	전라남도 영암군 영암읍 계신리 산9번지 박찬오	답리작	
영광	전라남도 영광군 불갑면 안평리, 류연우	답리작	
고창	전라북도 고창군 대산면 춘산리 408, 김영채	답리작	
익산	전라북도 익산시 송학동 호남농업시험장	맥류포장	바이러스검정포
전주	전라북도 전주시 덕진동 전북대학교 농과대학 부속농장	전작포장	바이러스검정포
황등	전라북도 익산시 월성동 전북농산물원종장	전작포장	

1997, 1998 년 2개년간 파종 실험포 설치 장소임.

표 25. 지역별 바이러스병 발생 상황 (1998, 1999 2개년 합계)

ELISA 검정 결과 단독 감염주로 나타난 수치임.

지역	바이러스병 발생상황	국내품종		도입품종		계	
		Y단독	M단독	Y단독	M단독	Y단독	M단독
수원	Y〉 M〉 S	38	2	15	3	53	5
예산	Y〉 M	24	19	8	8	32	27
밀양	Y〉 M〉 S	34	0	20	0	54	0
진주	Y〉 M〉 S	32	7	10	0	42	7
나주	Y〉 M	40	4	14	1	54	5
영광	Y〉 M 〉S	12	5	7	1	19	6
고창	M〉 Y	20	26	10	9	30	35
익산	Y〉 M 〉S	27	4	11	0	38	4
전주	Y〉 M〉 S	25	1	19	1	44	2
황등	Y〉 M	41	2	20	0	61	2
계		293	70	134	23	427	93

Y: BaYMV , M: BaMMV , S: SbWMV

다. 인위적 즙액접종에 의한 진단

판별기주가 있을 경우 판별기주에 즙액접종하여 나타나는 특수병징으로 검정하는 것이 가장 예민한 방법이다. 접종원은 감염보리 생엽 대비 인산완충액 pH 7.0 (0.1mM KCN 함유)을 1 : 4 (w/v)로 마쇄하여 접종용 보리 1.5 2 엽기의 유묘에 금강사(400 mesh)를 살포하고 즙액접종한다. 접종한 보리는 반드시 10 15℃ 의 생장상 또는 같은 조건에서 생육시키면 30 40 일 후 신엽에 모자익 증상이 나타난다. 또는 ELISA 검정으로 확인하면 더욱 정확하다.

1) BaYMV 의 분리 진단

우리나라 보리 품종으로는 아직 판별 기주식물이 없다. 일본의 경우 판별기주로 뉴골덴이 BaYMV에만 감수성으로 되어있으나 우리나라에서는 BaYMV에도 감수성으로 나타나고 있다.

부농 겉보리 BaYMV 에 감수성 +

백동 쌀보리 BaMMV 에 감수성 -

뉴골덴 (일본판별품종) BaYMV 에만 감수성 +

목세이고3 (일본판별품종) BaYMV , BaMMV 에 저항성 -

2) BaMMV 의 분리 진단

국내 보리품종으로는 아직 판별기주 식물이 없다. 일본의 판별 기주인 이슈크시라슈(ym 3)가 BaMMV 에만 감수성으로 되어 있으나 우리나라에서는 BaYMV 에도 감수성으로 나타난다.

사천 6호 맥주보리 BaMMV 에 감수성 +

백동 쌀보리 BaMMV 에 감수성 +

이슈크시라슈(일본판별품종) BaMMV 에만 감수성 +

목세이고(일본판별품종) BaYMV, BaMMV 모두 저항성 -

3) SbWMV 의 분리 진단

명아주(*Chenopodium* spp.)을 검정식물로 사용한다. 명아주 잎에 즙액 접종하여 20 25℃에 생육하면 접종 7 10 일후 접종 잎에만 국부반점이 나타난다. 국부반점만을 채취하여 감수성이 큰 백동 또는 목세이고3, 노린61 등에 접종하여 증식시키면 순수분리된다.

명아주 (*Chenopodium amaranticola*) 감수성 + 붉은 반점

명아주 (*Ch. quinoa*) 감수성 + 퇴녹반점

백동보리 (4/10) 감수성 +, 모자이크

노린 61호 밀 (4/10) 감수성 + , 모자이크

목세이고 3 보리 (3/10) 감수성 + 모자이크

라. 혈청학적 진단

바이러스를 진단하는 방법 중에서 간단하면서도 정확성이 있기 때문에 현재 많이 사용되고 있는 방법이다. 그러나 혈청반응 방법이 다양하며 항혈청의 확보문제가 있다. 자기 스스로 항혈청을 제조하거나 또는 전문 연구기관으로부터 분양 받아 사용하여야 한다.

현재 가장 많이 보급 사용되고 있는 ELISA (Clark and Adams, 1977)과 혈청학적 유연관계를 식별할 수 있는 한천 이중 확산법(Lee et al., 1998)의 결과만을 보고하고자 한다.

1) 한천이중확산법(Agar gel double diffusion test)

한천겔판 (agar gel plate)의 제조는 바닥이 깨끗하고 매끈한 샤-레판에 0.8 1% 의 Bacto-agar gel을 부어 판을 만든 후 직경 2mm 정도의 구멍(well)을 중앙에 1 개, 주위(2cm간격)에 목적에 따라 수 개의 구멍을 만든다. 만약 구멍과 바닥사이가 밀착되어 있지 않으면 한천액을 추가로 1 2방울 구멍안에 떨어뜨려 액체가 바닥으로 흐르지 않게 만들어야 한다. 반응액의 제조는 항원(검정시료)의 정제바이러스 또는 비정제 감염주의 조즙액을 사용하고, 항혈청을 적당 농도로 희석 (20ug/ml)하여 사용한다. 반응은 검정목적에 따라 항원과 항혈청을 중앙과 주위 구멍에 적당량 (0.2 0.3ml)씩 넣고 건조되지 않게 파라핀 오일로 덥고 실온 또는 30 37 ℃에서 정치반응 시킨다. 바이러스 입자가 긴 사상형일 경우는 한천 겔 속의 확산을 위하여 초음파 절단을 하면 더욱 효과적이다.

결과는 항원, 항체 처리 후 24 48 시간 내에 항원 항체가 확산하여 마주치는 곳에서 결합 반응대가 선명하게 형성된다. 동일 바이러스는 단일 반응대, 동일 바이러스이나 계통이 다른 것은 분지 (Super)가 형성되고 서로 다른 바이러스이면 반응대가 전혀 형성되지 않는다 BaYMV , BaMMV , SbWMV 등은 혈청학적 유연관계가 전혀 없으므로 이 방법으로 3개 바이러스를 모두 검정 진단할 수 있다.

2) 효소결합항체 반응(ELISA)

ELISA 법은 항혈청량이 적게 들고 반응이 민감하며 단시간에 많은 시료를 처리할 수 있어 현재 가장 많이 보급되고 있는 방법이다. 그러나 ELISA에 사용하는 항체는 IgG (r-globulin G)만을 정제하여 사용하여야 하며 IgG 에 효소 (Phospho test)를 결합시킨 기질 (Conjugate)을 만들어야 한다. 따라서 ELISA 용으로 IgG 와 기질을 셋트화 하여 사용하는 것이 편리하다. IgG 와 효소결합 방법은 여러 가지가 있으나 본 연구에서 사용한 방법을 소개한다.

◎ IgG 의 정제방법

시판용 IgG 정제 컬럼(Protein A colum)

↓

10ml 의 세척용 Running buffer로 여과 세척

↓

항혈청 (Polyclonal antibody) : Running buffer (0.5 ml : 0.5ml)**을** 1: 1**로 혼합하여 컬럼이 흡착시킴**

↓

20*ml***의** Running buffer**로 여과 세척**

↓

2*ml* **의** Elution buffer **로 여과하여 여액은 폐기**

↓

1*ml* **의** Elution buffer **로 분액 여과**(1ml **씩 수집**)

↓

6 10**회까지 반복하며** 1*ml***씩 순서대로 분액 수집**

↓

분액 1*ml***씩** 2., 3, 4 7, 8, 9, 10**까지 분액수집**

↓

UV Spetrophptpmeter**에서** IgG **농도 측정**(ODE 280=1.4**에서 농도 조절하여 사용**)

Running buffer **조성**

Tris-HCl 0.05 M

NaCl 0.15M

Sodiumazid 0.0.% (w/v)

0.1N HCl **로** pH 8.0**으로 조절**

Elution buffer **조성**

Glycine -HCl 0.1 M

Thiomerosal bacterastat 0.01%(w/v)

0.1N HCl **로** pH 3.0**으로 조절**

◎**효소 표식항체**(Conjugate)**의 제조**

1 *mg* / *ml* **로 조절된** IgG 1*ml***에** 2*mg* Phosphotase alkaline**을 가하여 용해시킴** → **투석막에 넣고** Phosphate buffer salin (PBS)**용액에서** 12**시간** 4℃**에서 투석시킴** (PBS 1 **회 교환**)→ glutaraldehyde 0.05%(v/v)**을 가하여** 22℃**에서** 4**시간 정치 반**

응(항체고정)→PBS 완충액에서 24시간이상 4℃에서 투석한다. →Phosphotase 가 결합된 IgG-phosphatase 생성 →1% bovineserum albumin (w/v)을 용해시킨 후 sodium azid을 0.02%(w/v) 가하여 4℃에 보존하고 사용한다.

◎ELISA 진행 과정

1) 1차 항체 IgG (400배 희석) 처리

아크릴 반응판 (96 well microplate)의 각 처리구에 IgG 2*ug* /*ml* 농도로 Coating buffer (0.05M Sodium Carbonate buffer, pH 9,6)에 용해시켜 각 처리구당 200ul 씩 분주하고 37℃에서 2 4시간 반응시킴→ PBST 로 3회 세척하여 물리 완전 제거

2)검정시료(항원)처리

각 검정시료의 조즙액 (40배 PBST 조즙액)을 각 well 당 200ul (IgG 처리량과 동량) 씩 분주→ 37℃에서 1 4시간 반응(6℃정도에서 장시간 반응시킬수록 효과적임)→PBST 로 3회 세척

3) 2차 항체 기질(Conjugate)처리

Conjugate 800배 농도로 PBST 에 희석하여 각well당 200ul 씩 처리→37℃에서 3 4 시간 반응 (저온 장시간 반응이 효과적)→PBST로 3회 세척.

4)발색제 (Substrate)처리

P-Nitropheyle phosphate을 0.8 1mg/ml농도로 Diethanol amine buffer (Diethanol amine 97ml , Sodium azaid 0.2g , D・W 700ml , 1N HCl 로 pH 9.8 조절)에 용해시켜 각 well 당 전과 동량 분주하고 실온 / 암소/ 0.5 2시간 반응후 발색도를 관찰한다.

5)정지약 처리

12%(3M) NaOH 용액을 각 well에 50ul 씩 처리하여 반응을 중지시킨다. 405nm 파장에서 흡광도를 microplate reader로 측정하여 판정한다.

결과 판정에서 표준구로 건전주 즙액과 완충액구를 병행하여 처리하면 흡광도 판정시 매우 효과적이다. 또한 보리바이러스의 경우에는 조직속에 바이러스 농도가 적어서 조즙액은 1 :40(w/v) 비율로 PBST로 마쇄하는 것이 효과적이다. IgG 의 농도는 2 ug/ ml , Conjugate 의 농도는 1.2ug/ml 농도까지 반응이 양호하다. 각

시료당 2 well 씩 처리하는 것이 오판이 적고, well 당 처리량은 100ul 씩 하여도 반응이 양호하다. 반응시간 실온 또 4CE 6CE 정도에서 장시간 반응시키면 더욱 효과적이다. IgG 처리 Coating plate 는 PBST 로 수세 후 밀봉하여 저온상태에서 동결보존하면 오랜 기간동안 수시로 사용 할 수 있어서 시간 절약과 편리한 점이 많다.

마. 전자현미경 검경에 의한 진단.

전자현미경 관찰은 직접 바이러스 입자를 관찰 할 수 있는 방법으로서 편리하나 고가의 전자현미경이 설치되어 있어야 하는 단점도 있다. 또한 직접 바이러스 입자 형태만을 관찰하는 방법 외에도 항혈청을 이용하여 항원, 항체 결합상으로 복합 감염 여부를 판정하기도 하고, 금입자 표식 항체(Protein A gold complex)을 이용하여 금입자가 바이러스 표면에 직접 결합하는 상태를 관찰하여 바이러스의 존재부위(세포학적) 및 복합감염 여부도 판정 할 수 있는 이점이 있다.

1) 침지법 (Dipping method)

2% PTA (phospho-tangustin acid)용액을 슬라이드 그라스 또는 파라핀지 위에 한 방울 떨어뜨린 후 바이러스 감염엽(검점시료)을 1 2mm 2로 세절하여 용액에 침지 시킨 후 그 용액 위에 코로디온 또는 포름바막이 입혀진 그리드를 뒤집어서 띄워 놓고 바이러스 침출물이 충분히 흡착되도록 10분 정도 정치시킨다. 풍건 후에 바이러스 입자의 입체화를 위하여 30 40오 각도에서 투영 증착시켜 관찰한다. 이 방법은 바이러스 입자를 손상 없이 전체 길이를 관찰하는데 효과적이다.

2) 정제된 바이러스 입자 관찰

막이 입혀진 그리드 위에 정제된 바이러스를 분무 흡착시켜 풍건한다. 우라닐 용액(5% Uranil acetate)에서 5 8분 정도 전자염색하여 투영 증착한다. 검경 결과는 한 시야에 많은 바이러스 입자들이 관찰된다.

3) 면역전자현미경 관찰(Immuno-electron microscopy)

항원인 검정식물은 바이러스 감염 보리 잎 조즙액을 3,000 10,000 rpm / 15min 원심분리하여 색소를 제거하는 것이 깨끗한 상을 관찰할 수 있다. 항체는 항혈청 또는 정제된 IgG를 사용한다. 혈청농도는 40ug/ml 정도가 좋고 IgG 의 농도가 높으면 많은 입자들이 응집 결합되어 바이러스 입자상이 뚜렷하지 못하다.

시료제작 과정은 다음과 같다.

가) 탄소증착된 니켈 그리도 위에 항혈청 (IgG 40 ug/ml)한 방울 떨어뜨린다. 실온 습실 상태에서 5 10분간 항체를 흡착시킨 후 PBST로 세척하고 수분을 제거한다 (이 경우 PBST를 그리드 위에 5 10적 흘리고 나서 여지로 습기를 흡수시키면 편리하다.)

나) 항원처리 (검경 바이러스 조즙액)는 검정 조즙액 한 방울을 떨어뜨리고 실온 습실 상태에서 5 10분간 항원, 항체 반응을 시킨다. PBST로 세척하고 수분을 제거한다.

다) 항혈청을 재처리한다. (1차 처리과정과 동일하게)

실온 습실 상태에서 10 15분 반응시킨 후 PBST 세척하고 증류수로 수세한다.

라) 전자 염색은 2%PTA 또는 5% 우라늄산으로 5분하여 수세 풍건 후 검경한다. 결과는 바이러스 입자들이 항혈청과 응집 결합한 상이 침지법에 비하여 많이 나타난다.

4) 금입자 표식 면역 전자 현미경법(Immuno-protein A gold complex electron mocriscopy)

이 방법은 면역 전자 현미경적 관찰보다 선명한 바이러스 입자를 관찰 할 수 있고 복합 감염된 시료에서도 단일 바이러스 별로 식별 할 수 있는 장점이 있다. 그러나 시료 제작이 복잡하고 고가의 면역금입자(Protein A gold complex)을 사용하는 단점이 있다. 또한 (Protein A gold complex의 입자 크기가 너무 작을 경우 전자현미경 관찰 시에 고배율로 하여야 하므로 15Å크기의 입자가 좋다. 또한 동물 면역체는 IgG 항혈청 면역 동물과 다른 것이어야 한다.

시료 제작은 다음과 같다.

가) 바이러스 흡착은 반듯이 탄소 증착 니켈 그리드 위에 검정시료 조즙액(10,000 rpm 원심분리 또는 정제된 바이러스)을 한 방울 적하여 흡착시킨다. 실온 습실 상태에서 5 10분 처리한다. PBST로 세척하고 습기 제거함

나) 결합매체는 0.1 02% Boric serum albumin (BSA-PBST)용액을 1적 가하고 습실/37℃/15 30min 처리한다. 0.1% BSA-PBST 로 세척하고 습기제거

다) 항혈청 처리는 바이러스와 동일 계통의 IgG (40ug/ml) PBST에서 농도를 조절하여 처리한다. 습실/37℃/ 30min 1 hr 후 0.1% BSA-PBST로 세척 후 습기를 제거한다.

라) Conjugate로 gold particle complex (anti-rabbit serum) 처리, 습실/37℃/1hr 후 0.1% BSA-PBST로 세척 후 수분제거, 다시 증류수로 세척 후 수분 제거한다.

5) 전자염색은 5% 우라늄용액 또는 Lead acetate 용액에서 5 8분 염색 후 증류수로 수세 습기제거 및 풍건하여 전자현미경 검경하였다.

결과를 보면 다른 면역 전자현미경법에 비하여 바이러스 입자가 선명하게 보이며 금입자들이 바이러스 표면에 결합되어 있기 때문에 검경하기도 편리하다. 면역전자현미경 법으로 보리바이러스를 검경 진단하는 방법은 Shikata and Kojima (1978), 에 의하여 보고되었으며, Chen et al., (1991), So (1993) 등도 Protein A gold complex를 이용하여 바이러스의 식별을 한바 있다.

바. 분자 생물학적 방법에 의한 진단

최근 핵산이나 단백질 분리 추출 기술의 발전으로 소량의 바이러스 재료를 이용하여 polyacryl amide gel 전기 영동으로 분리된 영도 패턴을 분석하여 핵산과 단백질의 성분수와 분자량을 검색 할 수 있기 때문에 바이러스의 동정이 가능하게 되었다 (Usigi et al., 1989, Shi et al., 1995). 또한 핵산 Hybridzation (기술 유전자 진단, 핵산잡종 형성)은 바이러스 핵산으로 상보적 핵산(cDNA)을 만들어 이것을 probe로 사용하여 시료중 의 probe와 Hybridetide을 형성하여 핵산의 존재 여부를 검정하여 바이러스를 진단 할 수 있다(Batista et al.1989). 이 방법은 예민하고 정확성은 있으나 고가의 장비와 기술을 필요로 하는 단점이 있다.

1) 외피 단백질의 전기 영동에 의한 진단.

정제된 바이러스 10ul 에 용해용 완충액 (0.25M Tris-HCl, pH 6.8, 8% 2-mercaptoethanol, 40% glycine, 0.04% bromo-phenol blue) 4 ul을 혼합하여 100℃에서 3분간 열처리 후 SDS-PAGE 전기영동하였다. 전기 영동은 5% 12.5% polyacryamide gel을 이용하여 18 mA에서 6시간 영동하고, gel을 멸균 증류수에서

30분간 2회 수세하여 0.2% Coomassi briliant blue R250으로 1시간 염색한 후 12 시간 탈색하여 영동대를 관찰하였다.

결과는 BaYMV 및 BaMMV 의 외피 단백질 전기 영동상은 33KDa의 주밴드와 31KDa 및 26KDa의 작은 밴드가 관찰되었다.

2) 바이러스 핵산의 전기 영동에 의한 진단

정제된 바이러스 1mg/ml 에 5% SDS 및 Proteinase(1mg/ml)를 혼합하고 37℃에서 20분간 반응시킨 후 TE포화, pH 7.0의 페놀과 크로르포름 처리를 각 2회, 에테르 처리 후 에탄올 침전을 실시하였다. 70% 에탄올로 세척하여 진공 건조시켜 증류수 (Free RNase)에 용해시켜 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동은 1.5% 아가로스 겔 및 TEB 완충액(89mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA, 0.1% SDS)43을 이용하여 20mA로 10분, 70mA에서 1시간 영동하였다. 전개된 gel을 20 분씩 2회 수세하고 Ethium bromide 에 염색하여 Polaroid 사진을 촬영하여 분석하였다. 전기 영동 결과 BaYMV 의 핵산은 2분절로서 RNA 1은 7.6Kb이고, RNA 2 은 3.5Kb이였다. BaMMV의 RNA도 RNA1은 7.5Kb이고, RNA2는 3.5Kb로서 BaYMV 와 비슷한 전개패턴을 나타냈다.

이상의 전기영동에 의한 바이러스 외피 단백질 분자량과 핵산의 크기 등은 Ehlers and Paul(1986), Kashiwazaki et al.(1989), Foulds et al.(1993), Dessens and Mayer(1995) 등의 보고와 일치하는 결과이었다. 따라서 바이러스의 외피 단백질 및 핵산의 전기 영동상으로 BaYMV와 BaMMV의 동정이 가능하다고 생각된다. 바이러스의 진단 문제는 그 바이러스의 극성에 따라서 간단한 방법으로 진단 할 수도 있지만 유사한 바이러스의 경우는 정밀한 분자 생물학적 기법까지 사용하여야 된다. 특히 BaYMV, BaMMV, SbWMV 는 모두가 토양전염성이며 보리에 나타나는 병징도 비슷하고 , 입자의 크기도 사사상형으로 비슷한 형태이다. 따라서 즙액 접종으로 식별할 수 있는 판별품종의 연구가 시급한 실정이다. 또한 판별 기주가 없는 바이러스들은 위에서 제시한 혈청학적 방법, 전자 현미경적 방법 및 분자 생물학적 방법 등의 결과를 종합하여 진단 및 동정하여야 할 것으로 사료된다.

4. RT-PCR을 이용한 바이러스 분류

가. 수집 감염주의 RT-PCR 반응

각 지역에서 수집한 바이러스에 감염된 이병식물체에서 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 증폭된 PCR product를 비교하였다. RNA를 추출하기 위하여 육안으로 확실히 병징이 나타나는 개체들을 병 발생포장에서 뿌리와 뿌리 주변의 토양과 함께 채집하여 수원으로 운반한 후 이들을 포장에 이식하여 어느 정도 활력을 되찾게 한 후 RNA추출 키트를 사용하여 RNA를 추출하였다. 1차로 설계한 primer는 BaYMV의 경우 ATTTA와 T14를 사용하고 BaMMV의 경우 Poty4와 BaMMV7, BaMMV8을 사용하였는데 이들의 PCR 결과 산물은 각각 700bp와 2,000bp를 예측하였고 실제 RT-PCR을 수행한 결과 각 primer에 맞게 이 두 밴드가 나타나는 것이 확인되었다. BaMMV의 경우는 채집된 시료 중에서 1개체에서만 나타났다(그림 26, 표 26).

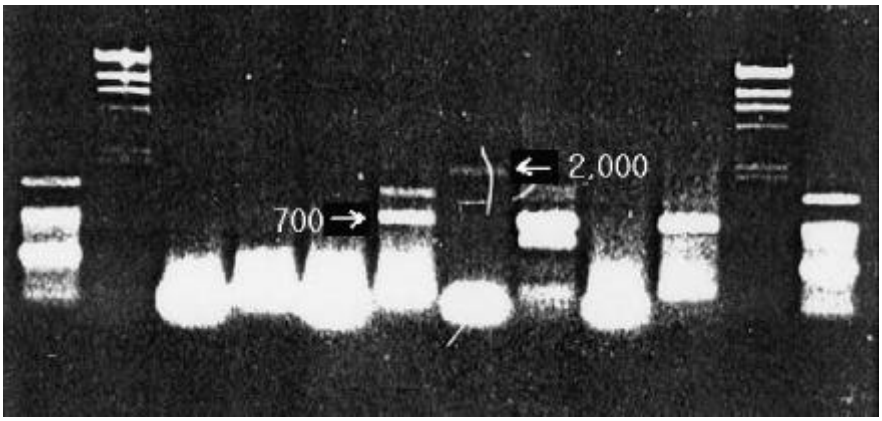


그림. 26. BaYMV에 감염된 식물체(700)와 BaMMV에 감염된 식물체(2,000)의 RT-PCR 산물의 전기영동상.

표. 26. ATTTA, T14, Poty4, BaMMV7와 BaMMV8 등 5 개의 프라이머를 사용한 감염된 식물체의 RT-PCR 분석.

채집지역	품종	감염여부	RT-PCR
익산	내한쌀보리	○	?
익산	찰보리	○	Y,M
익산	올보리	○	Y
함평	-	○	Y
영암	-	○	Y
영암	-	○	Y
강진	-	○	?
영광	-	○	Y
해남	백동	회피	Y
나주	사천6호	○	Y
나주	진양보리	○	?
나주	사천6호	○	Y
밀양	사천6호	○	Y
진주	사천6호	○	Y
진주	부농	○	Y
진주	두산29호	○	Y
진주	백동	○	Y
사천	-	○	Y
사천	-	○	Y
충남	큰알보리	○	Y
충남	오월보리	○	?
충남	새알보리	○	?
충남	올보리	○	Y
예산	찰보리	○	Y

Y : BaYMV, M : BaMMV

2차로 설계된 primer의 위치에 따라 증폭된 PCR product은 BaYMV는 약 514bp 정도이고, BaMMV-Na1은 약 500bp 정도이며 BaMMV-Ka1도 약 500bp 정도가 될 것으로 기대하였고 그림 27에서 보는바와 같이 이들 중 두 band가 gel상에 존재하였다 (BaYMV,BaMMV-Na1). 따라서 BaMMV-Ka1은 PCR 증폭이 나타나지 않아 수집한 표본들 중에는 BaMMV-Ka1이 없는 것으로 판단되었다(표 27).

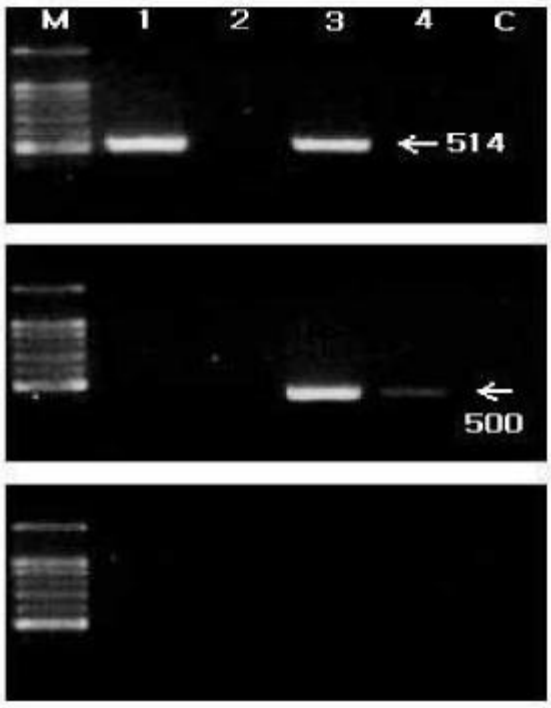


그림. 27. 이병된 식물체(Lane1-4)와 이병되지 않은 건전주 (control:C)의 RT-PCR 전기영동상.

표. 27. Y1, Y2, S20, S21과 S25 등 5개의 프라이머를 사용한 감염된 식물체의 RT-PCR 분석.

채집지역	품종	감염여부	RT-PCR
익산	내한쌀보리	○	?
익산	찰보리	○	?
익산	올보리	○	Y
함평	-	○	Y,M1
영암	-	○	Y,M1
영암	-	○	Y
강진	-	○	Y
영광	-	○	?
해남	백동	회피	Y
나주	사천6호	○	Y
나주	진양보리	○	Y
나주	사천6호	○	Y
밀양	사천6호	○	?
진주	사천6호	○	Y
진주	부농	○	?
진주	두산29호	○	Y
진주	백동	○	Y
사천	-	○	Y
사천	-	○	Y
충남	큰알보리	○	Y
충남	오월보리	○	Y
충남	새알보리	○	Y
충남	올보리	○	Y
예산	찰보리	○	M1

Y : BaYMV, M1 : BaMMV-Na1

나. RT-PCR과 ELISA 검정의 비교

표. 28. 감염된 식물체의 RT-PCR 분석과 ELISA 검정의 비교.

채집지역	품종	RT-PCR		ELISA
		1차	2차	
익산	내한쌀보리	?	?	Y, M
익산	찰보리	Y, M	?	Y, M
익산	올보리	Y	Y	Y, M
함평	-	Y	Y, M1	Y, M
영암	-	Y	Y, M1	M
영암	-	Y	Y	Y, M
해남	백동	Y	Y	Y
나주	사천6호	Y	Y	Y
나주	진양보리	?	Y	Y
나주	사천6호	Y	Y	M
밀양	사천6호	Y	?	Y
진주	사천6호	Y	Y	Y
진주	부농	Y	?	Y
진주	두산29호	Y	Y	Y
진주	백동	Y	Y	Y
사천	-	Y	Y	Y
사천	-	Y	Y	Y

Y: BaYMV, M: BaMMV M1: BaMMV-Na1

표 28은 각 지역에서 수집한 육안으로 보아 모자이크의 병반이 뚜렸하여 확실히 이병되었다고 판단되는 표본들에 대하여 1차로 합성한 BaYMV(ATTTA, T14)와 BaMMV(Poty4, BaMMV7, BaMMV8)에 특이적으로 반응하는 primer와 2차로 합성한 BaYMV(Y1, Y2)와 BaMMV-Na1(S20, S25) 및 BaMMV-Ka1(S21, S25)에 특이적으로 반응하는 primer를 사용하여 RT-PCR 분석을 한 것과 동일한 재료를 가지고 ELISA를 수행한 결과를 비교한 표이다. RT-PCR 분석은 BaYMV와 BaMMV가 복합

감염된 개체는 1차 분석의 경우 1개체, 2차 분석의 경우 2개체가 나타난 반면에 ELISA 검정의 경우 BaYMV 단독 감염이 10개, BaMMV 단독 감염이 2개체, 복합감염이 5개체가 확인이 되었다. 2차 수행한 RT-PCR의 경우 BaMMV-Na1과 BaMMV-Ka1 strain을 구분할수 있는 primer를 사용하여 분석하였는데 BaMMV-Ka1은 나타나지 않았다. 전체적으로 ELISA 검정에 비하여 RT-PCR로 검정한 경우 BaYMV와 BaMMV에 대한 복합감염의 경우가 적었는데 이는 검정에 사용한 primer가 BaMMV-Na1와 BaMMV-Ka1을 대상으로 설계되어 국내에서 발생하는 strain인 BaMMV-Kor에 반응하지 않았거나 또는 다른 strain이 존재함으로 인하여 나타난 결과로 판단된다. 이러한 문제들은 앞으로 각 strain에 특이적인 프라이머를 각각 설계하여 RT-PCR을 수행한다면 보다 더 정확한 strain 동정이 이루어질 수 있을 것으로 전망된다.

제 4장 인용문헌

Adamas, M. J. 1991. The distribution of barley yellow mosaic virus (BaYMV) and barley mild mosaic virus (BaMMV) in UK winter barley samples, 1987-1990. *Plant Pathology* 40: 53-58.

Adams, M. J. et al. 1993. The effect of cereal break crops on barley mild mosaic virus. *Annals cf Applied Biology*. 123(1): 37-45.

Barbel, F. W. 1991. Breeding for BaYMV resistance by recurrent selection alternating with haploid steps. *Barley Genetics Newsletter* 20: 26-31.

Barr, D. J. S. and J. T. Slykhuis. 1976. Further observations on zoosporic fungi associated with wheat spindle sterak mosaic virus. *Can. Plant Dis*. 56: 77-81.

Bauer, E., J. Weyen, A. Schiemann, A. Graner and F. Ordon. 1997. Molecular mapping of novel resistance genes against Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV). *Theor Appl Genet* 95: 1263-1269.

Bendiek, J., A. D. Davidson, S. C. Schulze, J. Schell and H. -H. Steinbiss. 1993. Identification and classification of a resistance breaking strain of barley yellow mosaic virus. *Ann. appl. Biol.* 122: 481-491.

Chague, V. J. C. Mercier, M. Guenard, A. de Courcel and F. Vedel. 1996. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theor Appl Genet* 92: 1045-1051.

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.

Chiemann, A., A. Graner, W. Friedt and F. Ordon. 1996. Specificity enhancement of a RAPD marker linked to the BaMMV/BaYMV resistance gene *ym4* by randomly added bases. *Barley Genetics Newsletter* 27.

Fantakhun, A. T. et al. 1987. The pathogen of barley yellow mosaic in the

Ukraine. *Mikrobiologicheskii Zhurnal.* 49(3): 76-80.

Friedt, W. et al. Genetic basis of breeding for resistance to barley yellow mosaic virus (BaMMV). Development in applied Biology 2. Viruses with fungal vectors 227-237.

Gotz, R. and W. Friedt. 1993. Resistance to the Barley Yellow Mosaic Virus Complex-differential Genotypic Reactions and Genetics of BaMMV-Resistance of Barley (*Hordeum Vulgare* L.). *Plant Breeding* 111: 125-131.

Gragoonrung, S., V. Kanazin, P. M. Hayes and T. K. Blake. 1992. Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor Appl Genent* 84: 1002-1008.

Graner, A. and E. Bauer. 1993. RFLP mapping of the *ym4* virus resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 86: 689-693.

Graner, A., E. Bauer, A. Kellermann, S. KIrchner, Y. K. Muraya, A. Jahoor, and G. Wenzel. 1994. Progress of RFLP-map construction in winter barley. V. *Barley Genetics Newsletter* 23: 53-59.

Han, F., J. A. Clancy and S. E. Ullrich. 1995. Conversion of an RFLP marker associated with malting quality to a PCR-based marker. *Barley Genetics Newsletter* 24: 7-9.

Hariri, Dj., et al. Resistance to barley yellow mosaic virus and to barley mild mosaic virus in barley. 46.

Hill, S. A. 1985. Barley yellow mosaic virus-reactions of UK varieties of winter barley. Mitteilungene Biologischen Bundesanstalt fur Land unt Forstwirtschaft, Berlin Dahlem No, 228: 54-58.

Hill, S. A. and E. J. Evans. 1980. New or unusual records of plant disease and pests. Plant Pathology 29: 197-199.

Huth, W. and M. J. Adams. 1990. Barley yellow mosaic virus (BaYMV) and BaYMV-M: two different viruses. *Intervirology* 31: 38-42.

Huth, W. 1984. The Barley yellow mosaic virus Diseases in the Federal Republic of Germany-Observations since 1978. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzen- schutzdienstes. 40(4): 49-55.

Huth, W. 1988. Ten years's investigations on barley yellow mosaic virus in the German Federal Republic. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. 40(4): 49-55.

Huth, W. et al. 1984. Barley yellow mosaic virus : Purification, Electron microscopy, Serology, and other Properties of two Types of the virus. Phytopath. Z., 111:37-54

Jacobi, V., E. Peerenboom, P. M. Schenk, J. F. Antoniw, H. H. Steinbiss and M. J. Adams. 1995. Cloning and sequence analysis of RNA-2 of a mechanically transmitted UK isolate of barley mild mosaic bymovirus. *Virus Res*. 37: 99-111.

Inouye, T. and Y. Saito. 1975. Barley yellow mosaic virus CMI/AAB Descriptions of Plant viruses No. 143.

Jacques, Le G., O. Frank and W. Friedt. 1994. Isozyme-electrophoresis for chromosomal localization of barley mild mosaic virus resistance genes different from *ym4*. *Barley Genetics Newsletter* 23: 36-39.

Kaiser, R. and W. Friedt. 1989. Chromosomal location of resistance to Barley Yellow Mosaic Virus in German winter-barley identified by trisomic analysis. *Theor Appl Genet* 77: 241-245.

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.

Kasshiwazaki, S., K. Nomura, H. Kuroda, K. Ito and H. Hibino. 1992. Sequence analysis of the 3'-terminal halves of RNA1 of two strains of barley mild mosaic virus. *J. Gen Virol.* 73: 2173-2181.

김희규, 정동희. 1983. **보리 병해 조사 및 유전에 관한 연구. 맥류연구소 시험연구보고**

서. 166-175.

Kleinhofs, A., A. Kilian, M. A. Saghai Moroof, R. M. Biyashev, P. Heyes, F. Q. Chen, N. Lapitan, A. Fenwick, T. K. Blake, V. Kanazin, E. Anaiev, L. Dahleen, D. Kudrna, J. Bollinger, S. J. Knapp, B. Liu, M. Sorrells, M. Heun, J. D. Franckowiak, D. Hoffman, R. Skadsen and B. J. Steffenson. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor Appl Genet* 86: 705-712.

Kojima, M., A. Matsubara, S. Yanase and S. Toriyama. 1983. The occurrence of barley yellow dwarf disease in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 49: 338-346.

Konishi, T. and R. Kaiser. 1991. Genetic difference in barley yellow mosaic virus resistance between Mokusekko 3 and Misato Golden. *Japan J Breed* 41: 499-505.

Konishi, T., N. Kawada, H. Yoshida and K. Sohtome. 1989. Linkage relationship between two loci for the barley yellow mosaic resistance of Mokusekko 3 and esterase isozymes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Japan J Breed* 39: 423-430.

Konishi, T., S. J. Suh, K. G. Park, and S. Matsuura. 1993. Comparative Studies in Isozyme Genotypes between Korean nad Japanese Barley Varieties. *Crop Production and Improvement Technology in Asia.* 405-411.

Konishi, T., T. Ban, Y. Iida and R. Yoshimi. 1997. Genetic analysis of disease resistance to all strains of BaYMV in a Chinese barley landrace, Mokusekko 3. *Theor Appl Genet* 94: 871-877.

Laing, K. G. and H. A. Coutts. 1998. The occurrence of two strains of barley yellow mosaic virus in England. *Neth J. Pl. Path* 94: 221-224.

Lee, K. J., S. Kashiwazaki, T. Hibi, and I. Y. So. 1996. Properties and Capsid Protein Gene Sequence of a Korean Isolate of Barley Mild Mosaic Virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 62(4): 397-401.

李貴莘. 1997. **한국에 발병하는 보리마일드모자이크 바이러스(BaMMV)의 특성 및 유전자 구조. 全北大學校 大學院, 博士學位論文.**

이귀재·소인영·柏崎哲. 1998. **보리누른모자이크바이러스(BaYMV)의 분리 및 동정. 한국식물병리학회지** 14: 62-67.

李淳炯. 1981. **韓國의 主要作物바이러스병에 관한 硏究. 農試報告** 23: 62-74.

Lee, S. H. 1981. Studies on virus diseases occurring in various crops in Korea. Res. report, Office Rural Develop. (Suwon Korea) vol. 23. (S. P. and M): 62-74.

Lida, Y., T. Ban and T. Konishi. 1999. Linkage analysis of the *rym6* resistance gene to Japanese strain II of barley yellow mosaic virus (BaYMV-II) in barley. *Barley Genetics Newsletter* 29.

Lundsgaard. T. 1976. Routine seed health testing for barley stripe mosaic virus in barley seeds using the latex-test. *J. of Plant Diseases and Protection* 278-283.

Miyamoto, Y. 1958. Studies on soil-borne sereal mosaics. II. On the barley yellow-mosaic virus. (part I) *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* XXIII: 69-75.

羅瑢後·朴良敎. 血淸學的 方法에 의한 보리와 밀種子의 보리줄무늬 모자이크 바이러스 感染相調査. 한국식물보호학회지 18: 29-33.

Ogawa, K. 1986. Outbreak of soil-borne virus disease of barley and wheat and their control. **식물방역** 40(4): 174-179.

Ogawa, K. et al. 1990. The ecology of barley yellow mosaic virus and its cultural control in two rowed barleys. **농업기술** 45(1): 25-29.

Okamoto, H. et al. 1963. Studies on the evaluation method of varietal resistance to yellow mosaic of barley (part 1). **中國農業試驗場 報告** A9: 127-134.

Ordon, F., A. Schiemann and W. Friedt. 1997. Assessment of the genetic relatedness of barley accessions (*Hordeum Vulgare s.l.*) resistant to soil-borne mosaic-inducing viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) using RAPDs. *Theor Appl Genet* 94: 325-330.

Ordon, F., E. Bauer, K. J. Dehmer, A. Graner and W. Friedt. 1995. Identification of a RAPD-marker linked to the BaMMV/BaYMV resistance genn *ym4*. *Barley Genetics Newsletter* 24: 123-126.

Plumb, R. T. et al. 1986. The effects of infection by barley yellow mosaic virus on the yield and components of yield of barley. *Plant Pathology* 35: 314-318.

Proeseler, G. and U. Kastirr. 1988. Studies on the effect of fungicides against *Polymyxa graminis* Led. as vector of barley yellow mosaic virus. Nachrichtenblatt fur den Pflanzenschutz in der DDR. 42(2): 116-117.

Rubies, Autonell, C. 1991. Virus diseases of cereal crops transmitted by *Polymyxa graminis*: transmission, epidemiology and control. Difesa delle Piante. 14(4): 43-77.

Saeki, K., C. Miyazaki, N. Hirota, A. Saito, K. Ito and T. Konishi. 1998. RFLP mapping of BaYMV resistance gene *ym3* in barley. *Barley Genetics Newsletter* 28.

Saeki, K., C. Miyazaki, N. Hirota, A. Saito, K. Ito and T. Konishi. 1999. RFLP mapping of BaYMV resistance gene *rym3* in barley (*Hordeum vulgare*). *Theor Appl Genet* 99: 727-732.

Saghai, M. A., G. P. Maroof, R. M. Biyashev, P. J. Maughan and Q. Zhang. 1996. Analysis of the barley and rice genomes by comparative RFLP linkage mapping. *Theor Appl Genet* 92: 541-551.

Saito, Y. and H. Okamoto. 1964. Studies on the soil-borne virus diseases of wheat and barley. V. Variation in varietal resistance of wheat and barley. Bulletin of the national institute of agricultural sciences (Japan) series c, No. 17: 75-102.

Saito, Y., K. Takanashi, Y. Iwata and H. Okamoto. 1964. Studies on the soil-borne virus diseases of wheat and barley. III. Influence of chemicals on the infected soils and viruses. The Bulletin of the national institute of agricultrual science (Japan) Series c, No. 17: 41-60.

Schenk, P. M., J. F. Antoniw, M. deF. Batista, V. Jacobi, M. J. Adams and H. -H. Steinbiss. 1995. Movement of barley mild mosaic and barley yellow mosaic viruses in leaves and roots of barley. *Ann. appl. Biol.* 126: 291-305.

Schiemann, A., E. Bauer, A. Graner, W. Friedt and F. Ordon. 1998. RAPD-markers linked to the BaMMV-resistance gene *ym9*. *Barley Genetics Newsletter* 28.

Schiemann, A., V. Dauck, W. Friedt, S. Streng, A. Graner and F. Ordon. 1999. Establishment of a fluorescence-based AFLP technique and rapid marker detection for the resistance locus *rym5*. *Barley Genetics Newsletter* 29.

徐世政. 1995. **보리 縞萎縮病 바이러스 系統 分類 및 抵抗性 品種育成의 基礎硏究**. **서울대학교 대학원 박사학위논문**.

Signoret, P. A. and W. Huth. 1991. Fungus-transmitted viruses of barley in southern France. 48.

Signoret, P. A. and W. Huth. 1993. Soil-borne viruses on barley in southern France. Zeitschrift fur Pflazenkrankheiten und Pflanzenschutz. 100(3): 239-242.

申正燮. 1992. **大麥** RFLP marker**의 開發**. **韓育誌**(`*Korean J. Breed.*) 24(3): 276-281.

So, I. Y., S. Kashiwazaki and T. Tsuchizaki. 1993. Barley mild mosaic virus occurring in south Korea. Abstracts of 9th Intern. Congress of Virol. 350p.

蘇仁永. 1993. *Polymyxa graminis***에 의한 보리호위축바이러스의 전염기작에 관한 연구**. **韓國植物病理學會誌** 9: 128-135.

소인영·이귀재·柏崎哲·土崎常男. 1998. **남부지방에 발생하는 보리마일드모자이크바이러스**(BaMMV)**의 분리 및 동정**. **한국식물병리학회지** 14: 68-73.

소인영·이귀재·전길형·서재환. 1997. **남부지방에 발생하는 보리호위축바이러스**(BaYMV) **및 보리마일드모자이크바이러스**(BaMMV)**의 분포와 저항성품종 선발**. **韓國植物病理學會誌** 13: 118-124.

蘇仁永·李貴帝·吳瀅鎬·鄭性洙. 1991. **보리縞萎縮바이러스**(BaYMV)**의 媒介體 檢定 및 防除法에 관한 硏究** II. **農試論文集 農業産學協同篇** 33**輯** 203-213.

蘇仁永·李貴帝·吳瀅鎬·鄭性洙. 1991. **보리縞萎縮바이러스**(BaYMV)**의 媒介體 檢定 및**

防除法에 관한 硏究 II. 農試論文集 農業産學協同篇 34輯 75-83.

蘇仁永·李貴帝·鄭性洙. 1998. 보리縞萎縮病바이러스 分類 同定 및 媒介體의 生理 生態에 關한 硏究. 農試論文集 農業産學協同篇 31輯 117-126.

蘇仁永·鄭性洙. 1991. 보리縞萎縮病바이러스에 感染된 보리 組織의 細胞學的 觀察. 韓國電子微生物學會誌 20(1): 120-127.

Takahashi, R., J. Hayashi, T. Inouye, I. Moriya and C. Hirao. 1973. Studies on resistanced to yellow mosaic disease in barley. I. Tests for varietal reactions and genetic analysis of resistance to the disease. *Ber Ohara Inst Landw Biol, Okayama Univ*. 16: 1-17.

Usuhi, T. and Y. Saito. 1976. Purification and serological properties of barley yellow mosaic virus and wheat yellow mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*. 42: 12-20.

Weyen, J., E. Bauer, A. Graner, W. Friedt and F. Ordon. 1996. RAPD-mapping of the distal portion of chiromosome 3 of barley, including the BaMMV/BaYMV resistance gene *ym4*. *Plant Breeding* 115: 285-287.

Yasu, M. and M. Yoshino. 1963. Ecological studies on the yellow mosaic of barley. Research Bulletin Saitama Agricultrual Experiment Station Ageo, Saitama Japan No. 25: 10115.

Zhu Muyuan et al. 1993. Biological studies onthe barley yellow mosaic virus study on the strain differentiation of BaYMV. Barley Science. 34:4-8

참여 연구원

담당연구	성 명	소속기관	직 위	연구참여직급
주관연구	하용웅	작물시험장	농업연구관	총괄연구책임자(전)
주관연구	남중현	작물시험장	농업연구관	선임급
주관연구	김재철	작물시험장	농업연구관	선임급
주관연구	서세정	작물시험장	농업연구사	총괄연구책임자(후)
주관연구	박광근	작물시험장	농업연구사	선임급
주관연구	백성범	작물시험장	농업연구사	선임급
주관연구	권순종	영남농업시험장	농업연구사	연구원급
주관연구	이야성	전남농업기술원	농업연구사	연구원급
주관연구	안병옥	작물시험장	농업연구사	연구원급
주관연구	강문석	작물시험장	농업연구사	연구원급
주관연구	김동구	작물시험장	보조원	연구원급
주관연구	장덕환	작물시험장	석사	연구원급
주관연구	박건용	작물시험장	기능직	연구원급
주관연구	최영원	종자관리소	박사	연구원급
협동연구1	심재욱	서울대학교	명예교수	협동연구책임자(전)
협동연구1	이호진	서울대학교	교수	협동연구책임자(후)
협동연구1	양무희	선문대학교	조교수	선임급
협동연구1	백남천	서울대학교	조교수	선임급
협동연구1	이강섭	농업과학기술원	농업연구사	연구원급
협동연구1	소은희	선문대학교	박사	연구원급
협동연구1	이정삼	서울대학교	박사과정	연구원급
협동연구1	정훈기	서울대학교	석사과정	연구원급
협동연구2	소인영	전북대학교	명예교수	협동연구책임자
협동연구2	이귀재	전북대학교	조교수	연구원급
협동연구2	박상래	호남농업시험장	농업연구관	선임급
협동연구2	최재성	호남농업시험장	농업연구사	연구원급
협동연구2	전길형	전북대학교	박사	연구원급
협동연구2	박준식	전북대학교	박사과정	연구원급

주 의

1. **이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.**

2. **이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.**

3. **국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.**