

누에 무름病 및 濃核病 바이러스의 主要 蠅나무 害蟲에 대한 交叉感染

姜錫宇 · 金槿榮* · 姜錫權**

農村振興廳 蠶業試驗場* 農村振興廳 試驗局,

**서울大學敎 農業生命科學大學 農業生物 新素材研究센터

Cross-Infection of Flacherie and Densonucleosis Virus of the Silkworm, *Bombyx mori*, to Mulberry Pests.

Suk Woo Kang, Keun Young Kim* and Seok Kwon Kang**

Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea.

*Research Bureau, RDA, Suwon, Korea.

**Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, College of Agriculture and
Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea.

Abstract

Flacherie virus (FV) and Densonucleosis virus (DNV) of the silkworm, *Bombyx mori*, which give the most severest damage to the silk production in Korea, were fed on the mulberry wild silkworm, *Bombyx mori mandarina*, the mulberry pyralid, *Gryphodes phyloalis*, and the American fall webworm, *Hypantria cunea*, to investigate cross infectivity by serological and histopathological observation.

By the Ouchterlony's double diffusion test, the mulberry wild silkworm was infected with both FV and DNV type 1 (DNV-1) and the mulberry pyralid with DNV-1, so those were confirmed the cross infection. But the American fall webworm was not recognized the cross infection by the same method.

The infection and multiplication of the FV in the mulberry wild silkworm was observed in the cytoplasm of the goblet cell with the appearance of the virus-specific vesicle. In DNV-1 infection to the mulberry wild silkworm and the mulberry pyralid, the nuclei of columnar cell in the midgut of both insects was hypertrophied and the nuclei of midgut cell of the mulberry pyralid positively stained with the Feulgen stain. Multiplication of DNV-1 in the midgut cell of the mulberry wild silkworm was replicated in two different patterns as linear arrays and large masses, while that of DNV-1 in the mulberry pyralid was multiplied as virus masses in several portion of the nuclei of the midgut cell.

Keywords : Mulberry wild silkworm, mulberry pyralid, American fall webworm, cross infection, Flacherie virus (FV), Densonucleosis virus (DNV).

緒 言

누에 바이러스성 무름病 및 濃核病은 封入體 非形成

바이러스에 의해 消化器官에만 感染 增殖하는 소화
기성 질병으로 배설되는 蠶糞에 다량의 바이러스가
존재하며 이것이 주된 2차 감염원으로 되고 있어 본

병 방제상 사육 후 糞糞, 糞沙의 효과적인 처리 등이 많이 연구되어 왔다. 특히 東 등 (1965)은 糞糞과 함께 배설된 무름병 바이러스(Flacherie virus 이하 FV)는 직사광선 및 100°C 30분의 건열처리에서 불활화가 어렵다고 하였으며, 더우기 퇴비중에 매몰한 경우 완전 불활화에 약 8개월이 소요되며, 토양중에 매몰한 경우는 1년 정도 소요된다고 하였다(服夫 1966). 또한 농핵병 바이러스(Densonucleosis Virus type 1, 이하 DNV-1)의 경우 자연조건하에서 數週 이내에 불활화 하지만 잠실내의 토양중에 매몰된 경우 1년 이상 병원성이 유지된다고 보고하였다(荒茂·柏村 1985). 이와같이 누에 바이러스성 무름병 및 농핵병 발생은 사육시 부주의로 인하여 잠실 등 사육환경에 오염된 FV나 DNV가 다음 사육기로 전파되는 垂直 전파가 병 발생의 주 원인으로 생각되어 왔으나, 이미 바이러스에 감염된 뽕나무 해충이 分泌한 배설물이 뽕잎과 함께 잠실내로 搬入되어 병 발생을 일으키는 水平전파도 문제가 되고 있어 누에와 뽕나무 해충간의 FV 및 DNV의 疫學 관계 구명이 본 병 방제상 중요시 되고있다. 이러한 관점에서 누에 FV의 뽕나무 해충에 대한 交叉感染에 관한 연구에서 멧누에 및 뽕나무 명나방은 FV에 감염되며 그 증식장소는 中腸皮膚膜의 盃狀細胞 세포질임을 확인하였으며(井上 등 1974, 度部·栗原 1982, Watanabe *et al.* 1988), 농핵병 발생과 뽕나무 해충과의 역학관계 조사에서 度部·清水(1980)는 농핵병 발생지역의 뽕나무 명나방에 DNV-1 항혈청과 반응하는 개체가 많았으며 이러한 마쇄액을 누에에 접종한 경우 농핵병잠이 발생한 것으로 보아 뽕나무 명나방이 DNV-1를 만성적으로 保持하고 있다고 추측하였으며 이와같이 사실은 度部·栗原(1982)에 의해 혈청학적 반응 및 조직학적 관찰로 재차 확인되었다. 한편 關(1986)는 DNV-2(山梨株)는 멧누에에 대한 감염 사실을 확인하였으나 뽕나무 명나방에는 전혀 인정되지 않았다고 보고하였다. 그러나 Watanabe *et al.* (1988)의 보고에 의하면 뽕나무 명나방 중에 FV, DNV-1, DNV-2 항혈청과 단독 내지 복합적으로 혈청 반응하는 개체를 확인하여 이들의 조직을 관찰한 결과 盃狀細胞 細胞質에 FV와 類似한 구형입자를, 圓筒細胞核에서 DNV와 유사한 입자를 관찰하여 누에 무름병 및 농핵병 바이러스의 起源을 뽕나무 명나방일 것이라고 제시하였다.

이와같은 보고에 따라 우리나라 養蠶에 문제가 되고있는 FV 및 DNV의 뽕나무 해충과의 交叉感染 與否를 究明하는 것은 본 병의 효과적인 防除法 확립에 중요한 基礎資料가 될 것이다. 따라서 본 연구는 바이러스성 무름병 및 농핵병 방제의 기초자료를 얻기

위하여 각각의 바이러스를 멧누에, 뽕나무 명나방, 흰불나방 등 主要 뽕나무 해충에 接種하여 血清學的 反應과 바이러스 增殖 組織 觀察로 感染性을 조사하여 感染經路를 追跡하고자 시험을 遂行하였다.

材料 및 方法

1. 供試蟲

잠업시험장 뽕밭에서 採集한 멧누에(*Bombyx mori mandarina*) 및 뽕나무 명나방 (*Glyphodes pyralis*)을 실험실에서 뽕잎으로 사육하고 採卵 및 孵化시켜 2~3령 幼蟲을 시험에 공시하였고, 흰불나방(*Hyphantria cunea*)은 잠업시험장 뽕밭 포장에서 2~3령 유충을 채집하여 공시하였다.

2. 바이러스 接種

1) 供試 바이러스

FV는 '89년 경기도 鄉南에서 분리한 바이러스를 사용하였으며 DNV는 清水 (1975)에 의해 양잠위작 농가에서 분리한 伊那株(DNV-1)를 사용하였다.

2) 바이러스 接種

FV 및 DNV-1 罹病蠶의 증장 무게에 5배량의 증류수를 가하여 5분간 마쇄한후 8,000 rpm에서 30분간 원심하여 그 上澄液을 원액으로하여 증류수로 10^{-2} 액을 조제하였다. 바이러스 접종은 10^{-2} 바이러스액을 상엽에 塗抹 및 陰乾한 후 2~3령 공시충에 24시간 添食시켰으며 접종 후 9~10일째 조직 관찰을 위한 시료로 공시하였다.

3. 抗血清 및 抗原 抗體反應

FV에 대한 항혈청은 金 등(1991)에 의해 토끼에서 생산한 것을 사용하였으며, DNV-1도 위와 같은 방법으로 제작한 것을 사용하였다.

2중 면역 확산법은 Kurihara *et al.*(1984)의 방법에 준하여 1% Agarose gel을 지지체로 하여 37°C 에서 48시간 반응시켰다.

4. 組織學的 觀察

누에 FV 및 DNV-1을 경구접종한 공시 유충을 9 일째 채취하여 formol acetone 固定液에 고정한 후 상법에 따라 paraffin에 包埋하여 rotary microtome 으로 5~7 μ m 두께로 절단하였으며 염색은 Lillie의 Feulgen염색법 (Ann Preece, 1965)으로 하여 광학 현미경으로 촬영하였다.

전자현미경 관찰을 위한 시료제작은 위에서와 같이 채취한 유충을 1.6% Paraformaldehyde와 3% Gluta-

radehyde가 함유된 1.0 M Sodium Cacodylate 완충액 내에서 중장 부위를 적출하여 3% Glutaraldehyde로 고정된 후 세척, 2차 고정, acetone series로 탈수하여 Epon 수지 (Epon 812)에 包埋한 후 Ultramicrotome으로 초박절편을 만들어 전자현미경 (Hitachi Hu-12A)으로 관찰하였다.

結果 및 考察

1. 2重 免疫 擴散法에 의한 感染與否 檢定

누에 FV 및 DNV-1을 각각 10^{-2} 농도로 멧누에, 흰불나방 및 뽕나무 명나방의 2~3령 유충에 경구접종한 후 9일째 채취하여 그 磨碎液을 FV 및 DNV-1 항혈청과 항원항체반응을 시킨 결과 다음과 같다.

그림 1은 누에 FV를 접종한 후 9일째 채취한 멧누에, 뽕나무 명나방 및 흰불나방 마쇄액과 FV항혈청과의 항원항체반응을 2중면역 확산법으로 시험한 것으로 멧누에 마쇄액은 항혈청과 뚜렷한 침강대를 형성하였으나, 뽕나무 명나방 및 흰불나방은 枕降帶 형성이 인정되지 않았다. 이와같은 결과로부터 누에 FV가 멧누에에 감염된다는 사실을 확인하였으며, 그림 2는 누에 DNV-1을 멧누에, 뽕나무 명나방 및 흰불나방에 접종하여 DNV-1항혈청과 반응시킨 결과로

서 멧누에 및 뽕나무 명나방은 DNV-1항혈청과 선명한 침강대를 형성하였으나 흰불나방은 인정되지 않았다.

이상의 결과로부터 누에 FV는 멧누에에 누에 DNV-1은 멧누에 및 뽕나무 명나방에 감염된다는 사실을 확인하였다.

2. 누에 FV의 멧누에에 대한 感染 및 增殖像

2중 면역 확산법으로 누에 FV가 멧누에에 감염된다는 사실이 확인됨에 따라 이들 바이러스가 멧누에의 어느 조직에 감염, 증식되는지를 電子현미경으로 관찰한 결과 그림 3과 같은 결과를 얻었다.

그림 3에서 보는 바와 같이 누에 FV는 멧누에 중장의 배상세포 세포질에 그 증식상이 관찰되었으며 누에에 감염된 경우와 같이 바이러스 特異 空胞를 형성하여 그 주위에 27 nm 크기의 구형 바이러스를 확인할 수 있었다. 이는 누에 FV의 멧누에에 대한 증식상을 螢光抗體法으로 조사하여 그 결과 멧누에의 中腸被膜의 盞狀細胞 細胞質에서 증식한다는 것을 명확히 한 井上 등 (1974)의 보고와 누에 FV에 감염된 멧누에의 배상세포 세포질에 FV입자와 특이적 소포체 (Virus-Specific Vesicle)가 동시에 출현하는 것을 관찰한 松井·度部(1974)의 보고와 잘 일치하고 있다.

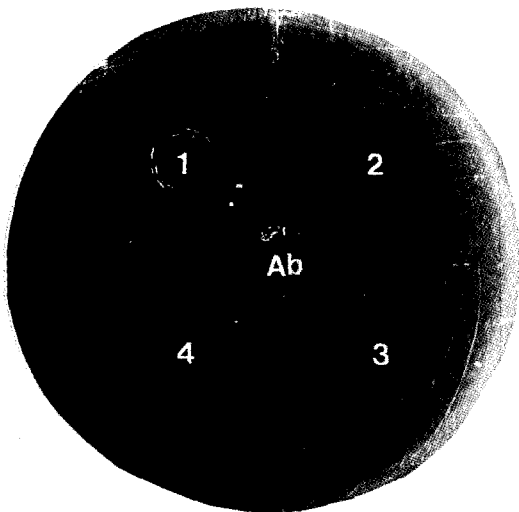


Fig. 1. FV detection in the mulberry wild silkworm, mulberry pyralid and American fall webworm larvae extracts of 9th days after FV inoculation by the Ouchterlony's double diffusion test.

Ab: anti FV rabbit serum, 1: mulberry wild silkworm, 2: mulberry pyralid, 3: American fall webworm, 4: PBS (phosphate buffered saline)

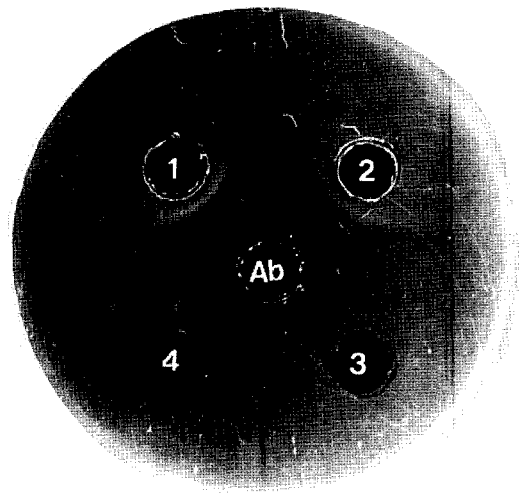


Fig. 2. DNV-1 detection in the mulberry wild silkworm, mulberry pyralid and American fall webworm larvae extracts of 9th days after DNV-1 inoculation by the Ouchterlony's double diffusion test.

Ab: anti DNV-1 rabbit serum, 1: mulberry wild silkworm, 2: mulberry pyralid, 3: American fall webworm, 4: PBS (phosphate buffered saline)

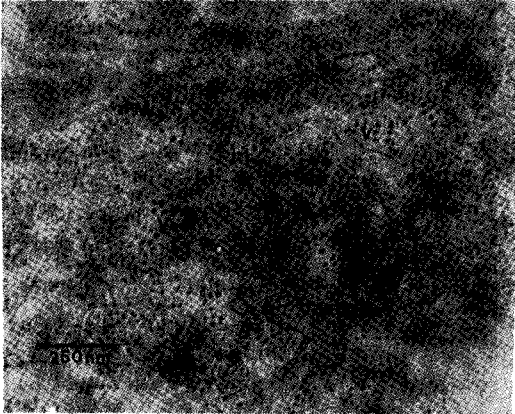


Fig. 3. Electron micrograph of goblet cell of the mulberry wild silkworm infected with FV.
V: virus, PM: plasmic membrane, VE: virus specific vesicle

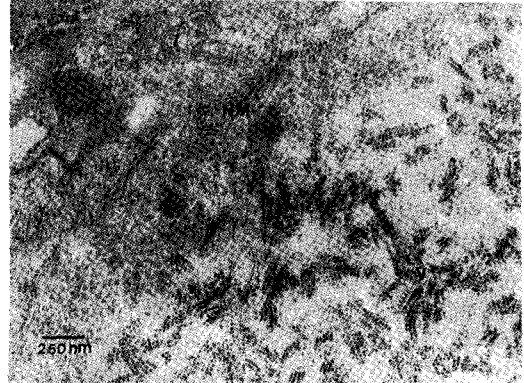


Fig. 5. Viruses replication in linear arrays in the nuclei of columnar cell of the mulberry wild silkworm infected with DNV-1.
V: virus, NM: nuclear membrane

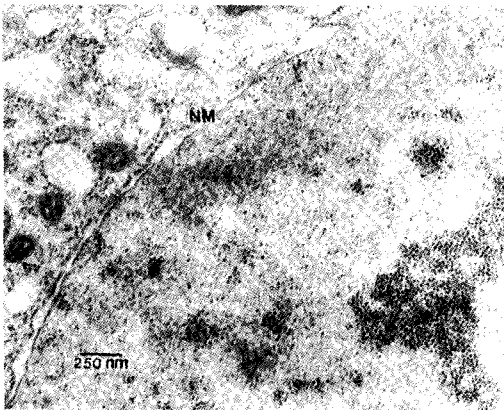


Fig. 4. Large masses of virions in the nuclei of columnar cell of the mulberry wild silkworm infected with DNV-1.
V: virus, NM: nuclear membrane

3. 누에 DNV-1의 멧누에에 대한 感染 및 增殖像

누에 DNV-1을 멧누에에 접종한 후 9일째에 증장 조직을 전자현미경으로 감염 부위 및 증식양상을 관찰한 결과 圓筒細胞의 핵이 肥大하였고 핵 전체에 전자 밀도가 높은 물질에서 20 nm 크기의 바이러스 형성이 관찰되었다(그림 4). 이와같은 바이러스 증식은 누에의 경우 Watanabe, Kurihara(1988)가 보고한 DNV-1 형태형성 과정과 다소 相異하였으며 오히려 DNV-2의 증식양상과 비슷하였다. 또한 그림 5의 경우처럼 바이러스 형성이 연쇄상으로 일어나는 특이한

증식 양상이 관찰되었으며, 이러한 바이러스 증식상은 Iwashita, Chun(1982) 이 中國株 DNV를 누에에 접종하여 관찰한 증식상과 일치하고 있다. 이와같이 누에 DNV-1의 멧누에에서의 增殖樣相의 변화는 사육환경에 기인하는 것인지 기주에 의한 차이인지 혹은 異種의 바이러스 混入에 의한 것인지는 불분명하나, Garzon, Kurstak (1976)이 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*) DNV의 증식상을 조직 부위별로 조사한 결과 지방체 및 진피세포의 핵에서는 군집형으로, 전사선, 일부 지방체 및 진피세포에서는 결정상 배열로 바이러스 증식이 이루어 진다는 보고로부터 누에 DNV-1을 접종한 멧누에도 個個 세포에 따라 증식 양상의 변화가 있었을 것이라 사료된다.

4. 누에 DNV-1의 뽕나무 명나방에 대한 感染 및 增殖像

누에 DNV-1을 접종한 뽕나무 명나방의 증장 조직을 feulgen 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과 圓筒細胞核의 肥大 및 消化管内로의 脫落, 新生細胞의 활발한 증가가 관찰되었으며 특히 비대한 핵내에 Feulgen陽性을 나타내는 赤紫色의 물질이 散在해 있는 것으로 보아 이들 물질이 DNA이며 또한 바이러스 일 것이라 추정되었다(그림 6). 이와같은 결과는 度部 등(1976)의 누에에서 관찰한 DNV-1의 증식상과 잘 일치하고 있다. 그림 7은 누에 DNV-1을 접종한 뽕나무 명나방의 증장 조직을 전자현미경으로 관찰한 것으로 원통세포핵의 비대 및 곳곳에 산재해 있는 전자 밀도가 높은 즉 virogenic stroma라 추정되는 물질에서 少數의 20 nm 크기의 바이러스 형성이 관

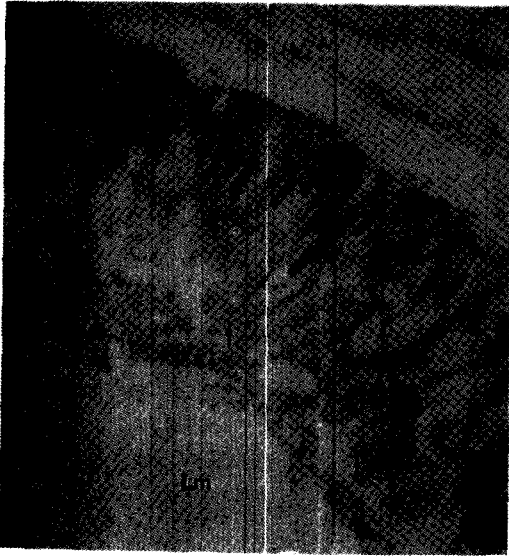


Fig. 6. Feulgen staining of midgut epithelium of the mulberry pyralid infected with DNV-1.

RC: regenerated cell, GC: goblet cell, Lm: lumen, →: hypertrophied columnar cell

찰되었다. 이와같은 결과는 야외에서採集한 뽕나무 명나방의 증장 원통세포핵에 DNV와 유사한 구형 입자가 핵내 여러곳에서少數의 바이러스가 증식하는 것을 관찰한 Watanabe *et al.* (1988)의 보고와 일치하는 경향이였다.

5. 摘要

數種의 主要 뽕나무 害蟲-맷누에, 뽕나무 명나방, 흰불나방-에 누에 무름병 바이러스(Flacherie virus; FV)와 濃核病 바이러스(Densonucleosis virus; DNV)를 接種하여 感染與否를 2重 免疫擴散法과 組織觀察로 조사하므로써 이들 누에病的 뽕나무 害蟲에 의한 傳染經路 遮斷 및 防除法 確立을 위한 基礎資料를 얻고자 試驗을 遂行하였다.

1. 맷누에는 누에 FV 및 DNV-1 各各의 抗血清과 反應하여 沈降帶를 形成하였고, 뽕나무 명나방은 DNV-1 抗血清과 反應하여 이들의 交叉感染을 認定할 수 있었으나, 흰불나방은 FV 및 DNV-1 항혈청과 反應을 일으키지 않아 交叉 감염을 인정할 수 없었다.

2. FV 接種 맷누에는 中腸 盂狀細胞 細胞質에 바이러스 特異 空胞 形成 및 27 nm크기의 바이러스 입자가 관찰되었다.

3. DNV-1 接種 맷누에는 中腸 圓筒細胞 核이 肥



Fig. 7. Electron micrograph of columnar cell of midgut epithelium of the mulberry pyralid infected with DNV-1.

V: virus, NM: nuclear membrane

大하였으며 群集型과 連鎖狀의 2種類의 바이러스 增殖 形態가 觀察되었다.

4. DNV-1 接種 뽕나무 명나방은 中腸 圓筒細胞의 一部 核에서 肥大 現象이 관찰되었고, feulgen 染色 結果 赤紫色으로 染色되었으며, 肥大한 圓筒細胞核 內에 少數의 바이러스들이 여러곳에서 增殖하는 것이 觀察되었다.

引用 文 獻

- Ann Preece, H. T. (1965) Manual for histologic technicians (Ann Preece, H. T. ed), J. & A. Churchill Ltd.: pp. 232-234.
- 志武義信 · 柏村鶴雄 (1985) 暖地におけるカイコウイルスの自然不活化. 蠶試彙報 125: 77-89.
- 東哲夫 · 細田茂和 · 松澤惺子 (1965) 傳染性F軟化病의 病原體と不活化に關する研究 11. 病蠶糞の直射光線および溫度による不活化. 長野蠶試要報 1: 165-169.
- 服部 保 (1966) 自然環境下における軟化病ウイルスの不活化試驗. 三重蠶試年報 9: 100-102.
- Garzon, S. and E. Kurstak (1976) Ultrastructural studies on the morphogenesis of the densonucleosis virus (Parvovirus). Virol. 70: 517-531.
- 井上 元, 佐藤文子, 鮎澤千壽 (1974) クワコにおけるカイコ軟化病ウイルスの增殖. 蠶絲研究 92: 120-125.
- Iwashita, Y. & C. Y. Chun (1982) The development of a densonucleosis virus isolated from silkworm larvae, *Bombyx mori*, of China. In "The ultrastructure and functioning of insect cells" (Akai, H., R. C. King and S. Morohoshi eds), The society for insect cells Japan: pp. 161-164.
- 金權榮 · 姜錫宇 · 姜錫權 · 金洛相 (1991) 韓國産 軟化病 바이러스의 分離 및 性狀. 韓蠶學誌 33(1): 13-20.

- 松井 正春・度部 仁 (1974) カイコの軟化病ウイルスに感染したクワコ中腸皮膜組織の電子顕微鏡觀察. 日蠶雜 43(6): 467-470.
- 關宏夫 (1986) 山梨株ウイルスによるカイコ濃核病の疫學的研究. 日蠶雜 55(5): 421-427.
- 清水 孝夫 (1975) 伊那市の農家の病蠶から分離した軟化病ウイルスの病原性. 日蠶雜 44(1): 45-48.
- 度部 仁・栗原 浩 (1982) クワノメイガと蠶病發生との關聯. 昆蟲病理談話會報 41: 6.
- Watanabe, H. and Y. Kurihara (1988) Comparative histopathology of two densonucleoses in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. 51: 287-290.
- Watanabe, H., Y. Kurihara, Y. X. Wang and T. Shimizu (1988) Mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*: Habitual host of nonoccluded viruses pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. pathol. 52: 401-408.
- 度部 仁・前田 進・松井 正春・清水 孝夫 (1976) 家蠶中腸皮膜における軟化病ウイルス(伊那株)の増殖について. 日蠶雜 45(1): 29-34.
- 度部 仁・清水 孝夫 (1980) 養蠶農家における濃核病發生の疫學的研究. 日蠶雜 49(6): 485-492.