

## 벼줄무늬잎마름병을 매개하는 애멸구의 전염생태

박진우\* · 이민호<sup>1</sup> · 이기운<sup>2</sup>

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물팀, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 유기농업과, <sup>2</sup>경북대학교 응용생명과학부

(2011년 12월 1일 접수, 2011년 12월 22일 수리)

### Studies on the Some Aspect of Small Brown Planthopper Transmission of *Rice stripe tenuivirus*

Jin-Woo Park\*, Min-Ho Lee<sup>1</sup> and Key-Woon Lee<sup>2</sup>

Applied Microbiology Laboratory, Agricultural Microbiology Team, NAAS, RDA, 441-707, Korea,

<sup>1</sup>Organic Agriculture Division, NAAS, RDA, 441-707, Korea,

<sup>2</sup>Applied Biology and Chemistry Division, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea

#### Abstract

*Rice stripe virus* (RSV) has been the main viral disease of rice plant in western coastal region of Korea since 2000. The control of the vector insect, small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*), is the most effective management method of the persistently-transmitted viral disease. Thus, ecological study between RSV and the vector insect was needed and investigated in order to make effective control plan, especially about study on the feeding and transmission of the virus by the vector insect. Each larval stage of vector insect differed in vector competence; larvae over 4th stage were shown as higher transmission after feeding on RSV-infected rice plant. These 4th and 5th larvae had higher transmission rates, 69.2% and 67.9% respectively, than 44.8% of the adult stage. The vector competence, however, was changed according to temperature; the highest transmission rate was 93.3% on 30°C in comparison to 70.6% on 25°C and 43.8% on 20°C.

**Key words** *Rice stripe tenuivirus* (RSV), Small brown planthopper (SBPH)

#### 서 론

벼줄무늬잎마름병(*Rice stripe tenuivirus*; RSV)는 우리나라에서 벼검은줄오갈병(*Rice black-streaked dwarf virus*; RBSDV), 벼오갈병(*Rice dwarf virus*; RDV)과 함께 벼에 발생하는 주요 바이러스로 우리나라에는 1930년대부터 낙동강 주변의 영남 지방에 발생하여 큰 피해를 일으켜 왔으며, 2000년대 이후 전국적으로 발생면적이 증가하여 큰 문제가 되고 있는 병해이다. RSV는 벼, 옥수수 등 화본과 37종을 기주로 하며 벼에 발생하는 주요해충인 애멸구(*Laodelphax*

*striatellus*; mall brown planthopper-SBPH)에 의해 영속적으로 경란전염하는데(Toriyama, 1983a) RSV에 감염된 벼는 초기의 퇴록 줄무늬가 진전되면서 결국에는 출수되지 않고 고사하여 수량감소에 결정적인 역할을 하게 된다.

RSV를 매개하는 애멸구는 대개 4령충의 형태로 논두렁이나 논의 화본과 잡초 등에서 월동약충은 2월 하순~3월 상순에 5령이 된 후 3월 중순경 우화하여 1세대 성충이 된다. 1세대 성충은 화본과 잡초나 보리, 밀, 이탈리아라이그라스에 산란하고 이 알에서 부화한 약충이 보리나 밀밭에서 서식하면서 5월 중하순경 이후 우화하여 2세대 성충이 되며 2세대 성충은 장시형으로 광범위하게 분산하여 대대적으로 논에 날아든다(Maramorosch & Harris, 1979). 애멸구는 그 자체로

\*연락처 : Tel. +82-31-290-0487, Fax. +82-31-290-0406

E-mail: jinwoopark@korea.kr

벼의 해충일 뿐 아니라 RSV를 매개한다는 점에서 매우 중요하기 때문에 전염생태에 관련된 많은 연구가 진전되어 왔다(Chung, 1974; Choi *et al.*, 1985; Chung *et al.*, 1966; Okuyama *et al.*, 1968; Narayama & Muniyappa, 1996; Gingery, 1988). 하지만 1970년대 이후 30여년간 병이 많이 발생하지 않아 국내에서는 연구가 거의 단절되어 왔으며 또 기후변화 등에 의한 생태환경의 변화로 발생양상이 예상치 못한 새로운 돌발적인 형태로 진행되고 있기 때문에 효율적인 방제전략 수립을 위해 전염생태와 발생에 관한 새로운 시각의 접근이 필요한 시점이다.

본 연구에서는 기후환경 및 재배여건의 변화에 따른 효율적인 RSV의 방제전략을 수립하기 위한 기초자료 축적을 목표로 RSV를 매개하는 애멸구의 흡즙 및 감염특성을 조사하는 동시에 과거에 수행되었던 전염생태 연구와의 비교분석을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 애멸구의 영기 및 흡즙시간이 RSV 전염에 미치는 영향

보독충을 온실에서 계대사육하면서 1령에서 5령 유충 및 성충을 채집하여 test tube에 이식한 건전한 묘령 14일의 추청벼 1주당 1마리씩 접종하였으며 각 영기별로 흡즙기간은 1~5일까지 1일 간격으로 처리하였다. 접종이 끝난 후 애멸구를 수거해 ELISA로 RSV의 보독여부를 확인한 후 무독충에 의해 흡즙된 벼는 폐기하였으며 보독충에 의해 흡즙된 벼만 포트에 정식하고 접종 30일 후 ELISA로 바이러스의 감염여부를 확인하였다. 처리당 초기접종 개체수는 30마리로 하였다.

### 온도가 RSV 전염에 미치는 영향

4령충의 애멸구를 이용하여 앞에서와 같은 방법으로 RSV를 접종한 후 20°C, 25°C, 30°C의 생육상에서 흡즙기간을 1, 2, 3일로 조절하고 30일 후에 ELISA로 RSV의 보독여부를 확인하였다. 처리당 초기접종 개체수는 20마리로 하였다.

### 애멸구 체내에서 RSV의 이동양상

애멸구가 이병주를 흡즙한 후 보독충 체내에서 바이러스가 검출되는 시간을 확인하기 위하여 흡즙 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간 후 3령 및 성충 보독 애멸구의 바이러스 검출여부를 RT-PCR로 분석하였다. 또한 애멸구 체내에서 바이러스 이동양상을 정량적으로 분석하기 위하여 애멸구 성충을 RSV

감염주에서 3시간 흡즙시키고 거품에 옮긴 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간 후에 5마리씩을 취하여 구침과 머리, 복부로 나누어 해부하고 별도로 hemolymph를 취한 후 부위별로 IC(Immuno-capture) real-time RT-PCR하였다. 애멸구의 해부는 40X 해부현미경 하에서 곤충핀과 미세절단 해부가위를 이용해 먼저 복부를 절개해 hemolymph를 채취한 다음 구침과 머리, 복부로 절단하였다.

### 애멸구의 경관전염 조사

애멸구의 RSV 경관전염을 조사하기 위해 수원과 연천, 강화, 서울에서 채집한 벼에 애멸구 집단을 방사하여 보독충을 만든 후 보독충 개체군별로 30 cm × 20 cm × 15 cm 크기의 아크릴 cage에서 사육하면서 세대가 경과할 때마다 채집하여 ELISA로 RSV 보독여부를 조사함으로써 경관전염을 확인하였으며 애멸구 19세대에 걸쳐 수행하였다.

### Immuno-capture(IC) real-time RT-PCR

IC real-time RT-PCR은 항체로 먼저 바이러스 입자를 포획한 다음 real-time RT-PCR을 수행하는 방법으로 바이러스 감염주로부터 total RNA를 추출하는 과정을 생략할 수 있다. 일본식물방역협회에서 구입한 RSV IgG(2 µg/ml)를 200 µl 용량의 PCR용 micro tube에 50 µl씩 넣고 37°C에서 2시간 incubation하였다. IgG를 제거한 tube를 PBS-T로 3회 washing한 후 50 µl씩의 시료를 넣고 37°C에서 2~3시간 동안 incubation하거나 4°C에서 overnight 시켰다. 시료를 제거하고 80 µl의 PBS-T로 tube를 3회 washing한 후 최종적으로 증류수로 washing하였다. Real-time RT-PCR은 Bio-Rad사의 iCycler iQ instrument와 SYBR Green I Supermix kit를 이용하여 two-step RT-PCR로 실시하였다. Primer는 예비실험을 거쳐 선발된 RSV-1(5'-CAGCCGCCACTTTCACCTTTC TTA-3')과 RSV-a(5'-AGGCTATGATGCTGCAACTCTGAT-3')를 각각 upstream과 downstream primer로 사용하였다. 추출된 RSV의 RNA를 역전사 반응을 시킨 후 PCR은 RSV 주형에 상보적인 cDNA 1 µl와 upstream과 downstream primer(5 pmol) 각 1 µl, 2X의 SYBR Green I Supermix(100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM each dNTP, 50 U/ml iTaq DNA polymerase, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I, 20 nM fluorescein) 12.5 µl를 포함하는 반응액의 최종농도를 RNase free water를 이용해 25 µl로 맞추고 real-time RT-PCR하였다. 95°C에서 5분간 전처리하고 95°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 polymerization

하였으며 매 cycle의 polymerization 후에 형광량을 측정하였다. PCR의 반복 cycle은 35cycle로 하였으며 annealing temperature는 온도 gradient 실험을 통해 58°C로 결정하였다. PCR이 끝난 후 55°C에서 0.5°C 간격으로 30초씩 온도를 95°C까지 증가시키면서 melting curve 분석을 하였다.

**결과 및 고찰**

**애멸구의 영기 및 흡즙시간이 RSV 전염에 미치는 영향**

애멸구의 영기별 RSV의 전염능력을 조사한 결과 RSV 감염주에서 3일 이상 흡즙한 4령충 이상이 바이러스 전염능력이 높았다(Table 1). 1령충과 2령충은 1일간 흡즙하였을 때 전염력을 획득하지 못하였고 3, 4령충이나 성충도 1일 흡즙시에는 10% 이하의 전염능력을 보였다. 이병주를 3일간 흡즙하였을 때 4령충과 5령충의 전염능력은 69.2%와 67.9%였으며 3령충의 전염능력은 50.0%였다. 4일 이상의 흡즙에서도 4령충과 5령충의 전염능력은 70% 이상으로 높았다. 1령충과 2령충의 경우에는 RSV 감염주를 3일 이상 흡즙하였을 경우에도 높은 전염능력을 획득하지 못하였으며 전체적으로

애멸구 성충의 전염능력보다 4, 5령충의 전염능력이 높았다.

**온도가 RSV 전염에 미치는 영향**

이병주 흡즙시의 온도에 따른 보독충의 전염능력을 확인한 결과 30°C에서 전염능력이 가장 높았다(Table 2). 30°C에서 3일간 흡즙하였을 때 전염능력은 93.3%로 25°C와 20°C의 70.6%, 43.8%에 비해 현저히 높았으며 1일과 2일 흡즙시에도 비슷한 경향을 나타내었으며 이는 기존의 성적(Chung, 1974, Narayama & Muniyappa, 1996)과 큰 차이가 없었다.

**애멸구 체내에서 RSV의 이동양상**

이병주를 흡즙한 애멸구에서 RSV를 검출하기 위해서는 3령충에서는 6시간, 성충에서는 3시간이 소요되었으며(Table 3) 흡즙을 통해 애멸구 체내에 들어간 RSV의 이동과 체내 부위별 축적의 경시적 변화를 조사하기 위해 IC real-time RT-PCR을 이용해 정량적인 분석을 하였다. 구침과, 복부, 머리 및 hemolymph로 분리한 각각의 시료를 분석한 결과 바이러스 흡즙 후 1시간 안에는 주로 구침에 많은 바이러스가 존재하며 gut를 포함하는 복부에도 많은 바이러스가 존재

**Table 1.** Effects of vector ages and inoculation feeding period (days) on the transmission of RSV

Feeding period	Ratio of viruliferous instars of SBPH					
	1st	2nd	3rd	4th	5th	adult
1	0.0	0.0	5.6	9.5	20.0	8.7
2	4.8	8.3	42.9	42.3	30.8	26.9
3	14.3	12.0	50.0	69.2	67.9	44.8
4	23.8	22.2	64.0	91.3	80.8	45.8
5	19.2	25.0	79.2	76.9	79.2	73.0

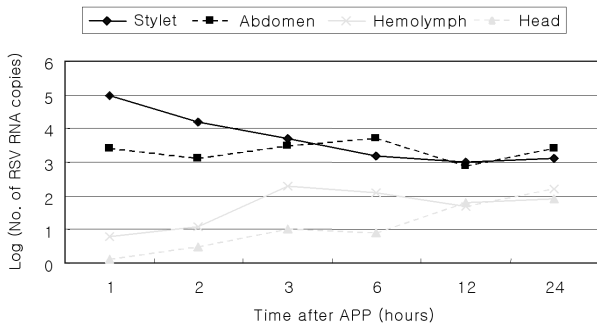
**Table 2.** Effects of temperature on RSV transmission by small brown planthopper

Temperature (°C)	Ratio infected plants after inoculation feeding period (days)		
	1	2	3
20	7.1	18.8	43.8
25	11.7	47.1	70.6
30	13.3	55.6	93.3

**Table 3.** Acquisition time of RSV to small brown planthopper by feeding on infected rice

Age	Hours after 3-days feeding					
	1	2	3	6	12	24
3rd instar	-*	-	-	+	+	+
adult	-	-	+	+	+	+

\*+: RSV positive, -: RSV negative, ♪: RSV was detected by using RT-PCR.

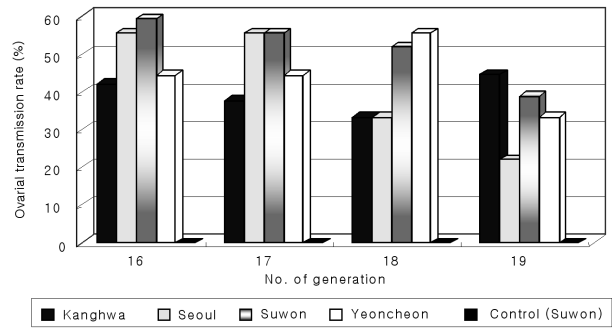


**Fig. 1.** Persistence kinetics of RSV in different organs of SBPH using IC real-time RT-PCR. Viruliferous SBPH maintained on low diet preference host *Leesia japonica* following 3-hours acquisition access feeding (AAP) on RSV-infected rice. At each sampling time the stylets, abdomen, hemolymphs and heads of 5 insects were dissected and frozen. The frozen samples tested by quantitative RT-PCR.

함을 알 수 있었다. 2시간이 지나면서부터는 구침의 바이러스는 감소하고 3시간째부터는 hemolymph의 바이러스 양이 증가하였으며 12시간 경과 후부터는 머리의 바이러스 양이 증가함을 알 수 있었다. 전반적으로 구침의 바이러스는 시간이 경과하면서 농도가 감소하는데 반해 hemolymph와 머리의 바이러스는 증가하며 복부의 바이러스 농도는 시간이 경과하더라도 큰 변화가 없이 유지되었다(Fig. 1). 이 실험에서 얻은 결과는 매미충의 체내에서 *Maize streak geminivirus*의 이동양상을 조사한 결과(Lett *et al.*, 2002)와 비교할 때 시간적인 차이는 다소 있었지만 유사한 경향을 나타내었다. 애벌거는 개체가 워낙 작기 때문에 gut의 정밀한 절단에는 어려움이 있어 복부를 통째로 절단하였기 때문에 오염의 문제가 있었을 것이며 정밀성에 한계가 있었을 것이다. 따라서 핵산 probe를 이용한 *in vitro* hybridization이나 형광항체법을 이용하여 보다 면밀한 검토가 이뤄져야 할 것이다.

**애벌거의 경란전염 조사**

보독충의 경란전염을 조사하기 위해 서울과, 연천, 강화, 수원에서 채집한 이병주에 건전애벌거를 흡즙시켜 보독충을 만든 후 19세대까지 계대사육을 하면서 후세대의 바이러스 감염율을 조사한 결과 20~60%대의 RSV 보독충율을 세대의 경과에 상관없이 지속적으로 유지하면서(Fig. 2) 경란전염을 하는 것으로 확인되었다. 본 논문에서는 애벌거의 19세대 이후로는 경란전염율을 더 이상 조사하지 못 하였지만 기존의 성적(Shinkai, 1962)을 참고로 할 때 더 많은 세대에까지 경란전염이 유지될 것으로 생각한다. 따라서 일단 애벌거가 RSV를 보독하게 되면 영구적으로 RSV 전파능력을 보유한



**Fig. 2.** Ovarial transmission of RSV-viruliferous small brown planthopper.

다고 생각할 수 있기 때문에 적극적인 애벌거의 방제나 RSV의 관리를 통해 보독충의 밀도를 줄이는 데 많은 노력을 해야 할 것이다.

**Acknowledgement**

This study was carried out with the support of “Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ007450022011)”, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

**>> 인 / 용 / 문 / 헌**

Choi, Y. M., S. H. Lee., J. S. Kim and J. T. Yun (1985) Effect of feeding preference and development of *L. striatellus* on some rice cultivars to infection of rice viruses. Res. Rept. RDA. 27(2):70~75.

Chung, B. J., S. H. Lee and S. J. Lee. (1966) Studies on the insect transmission of the rice stripe disease. Res. Rept. RDA. 9(1):217~220.

Chung, B. J. and S. H. Lee. (1969) Studies on the transmission mechanism of the rice stripe disease. Res. Rept. RDA. 12(3):105~110.

Chung, B. J. and S. H. Lee. (1971a) Studies on the host range rice stripe virus disease. Res. Rept. RDA. 14:94~98.

Chung, B. J. and S. H. Lee. (1971b) Studies on the damage of rice stripe virus disease. Res. Rept. RDA. 14:99~102.

Chung, B. J. (1974) Studies on the occurrence, host range, transmission, and control of rice stripe disease in Korea. Kor. J. Pl. Prot. 13(4):181~204.

Gingery, R. (1988) The rice stripe virus group. In *The Plant Viruses*, ed. RG Milne, 4:297~329. New York : Plenum.

- Lett, J-M., M. Granier, I. Hippolyte, M. Grondin, M. Royer, S. Blanc, B. Reynmud and M. Peterschmitt. (2002) Spatial and temporal distribution of geminiviruses in leafhoppers of the genus *Cicadulina* monitored by conventional and quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology* 92(1):65~74.
- Maramorosch, K. and K. F. Harris. (1979) *Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents*. New York : Academic. 654p.
- Narayana, Y. D. and V. Muniyappa. (1996) Virus-vector relationships of a planthopper-borne sorghum stripe tenuivirus. *Int. J. Pest Manag.* 42:165~170.
- Okuyama, S., K. Yora and H. Asuyama. (1968) Multiplication of the rice stripe virus in its vector, *Laodelphax striatellus* Fallen. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 34:255~264.
- Toriyama, S. (1983) Rice stripe virus. *CMI/AAB Description of Plant viruses*, No. 269.

## 벼줄무늬잎마름병을 매개하는 애멸구의 전염생태

박진우\* · 이민호<sup>1</sup> · 이기운<sup>2</sup>

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물팀, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 유기농업과, <sup>2</sup>경북대학교 응용생명과학부

**요약** 벼줄무늬잎마름병(*Rice stripe tenuivirus*; RSV)은 벼에 발생하는 주요 바이러스병으로 2000년대 이후 서해안을 중심으로 벼에 발생하여 큰 피해를 주고 있다. RSV는 벼의 주요 해충인 애멸구에 의해 영속적으로 전염되기 때문에 애멸구의 적절한 방제로 피해를 경감시킬 수 있다. RSV의 방제전략을 수립하기 위해서는 RSV와 애멸구 간의 생태학적 연구가 필요하며, 특히 애멸구의 흡즙 및 감염생태가 결정적인 키포인트가 될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 RSV에 감염된 벼에서 애멸구의 흡즙 및 감염특성을 조사하였다. 애멸구의 영기별 RSV 전염능력을 조사한 결과, RSV 감염주에서 3일 이상 흡즙한 4령충 이상에서 바이러스 전염능력이 높았다. RSV 이병주를 3일간 흡즙하였을 때 성충의 전염능력은 44.8%인데 비해 4령충과 5령충의 전염능력은 69.2%와 67.9%로 성충보다 4, 5령충의 전염능력이 높았다. 이병주 흡즙시 온도에 따른 보독충의 전염능력 조사 결과에서는 30℃에서 전염능력이 가장 높았으며, 30℃에서 3일간 흡즙하였을 때 전염능력은 93.3%로 25℃와 20℃의 70.6%, 43.8%에 비해 현저히 높았다.

**색인어** 벼줄무늬잎마름병, 애멸구