

경북 상주 양잠농가 바이러스병 발생 보고

김용균*, 김길호¹, 아메드 샤비르, 밀탄 찬드라 로이, 최두열안동대학교 생명과학대학 식물위학과, ¹경북대학교 실크연구소

Report of a Viral Endemic Occurrence in Sericulture Farms in Sangju, Kyungpook

Kim, Yonggyun*, Kim, Gilho¹, Ahmed Shabbir, Miltan Chandra Roy and Dooyeol Choi

Department of Plant Medicals, College of Life Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

¹Silk Institute, Kyungpook National University, Sangju 37224, Korea

ABSTRACT: Sericulture is a main insect industry in Sangju (Kyungpook, Korea). This study reports an occurrence of a viral disease in the sericulture farms in 2020. More than 20% silkworm larvae (*Bombyx mori*) suffered diarrhea and melted tissues with pathogenic lethality at 4th or 5th instars. PCR diagnosis showed a positive response against *B. mori* nucleopolyhedrosis virus (BmNPV) infection. Tissue extract of the infected larvae was applied to healthy larvae by a leaf-dipping method and exhibited the same viral symptoms. The viral extract was used to be overlaid on Sf9 cells. The infected Sf9 cells showed polyhedra in the cytoplasm. These results indicate that the silkworm larvae reared in the sericulture farms in Sangju were infected with BmNPV.

Key words: sericulture, baculovirus, diagnosis, endemic, BmNPV, Sangju

조 록: 양잠은 경북 상주지역의 주요 곤충 산업 가운데 하나이다. 본 연구는 이 지역에서 2020년도에 발생한 바이러스병을 보고한다. 약 20% 이상의 누에(*Bombyx mori*) 유충이 설사 및 조직용해를 보이면서 대부분 4-5령충 시기에 치사하였다. 병든 개체들에 대해 누에핵다각체바이러스(*B. mori* nucleopolyhedrosis virus: BmNPV)에 특이적 PCR 진단 기법을 적용한 결과 양성반응을 나타냈다. 병든 개체로부터 조직 추출액을 염침 지법으로 건전한 개체에 처리한 결과 동일한 병징을 확인하였다. 다시 이 바이러스 추출물을 Sf9 세포주에 처리한 결과 세포질에 다수의 바이러스 다각체를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 상주지역 양잠농가에 발생한 누에 유충 치사는 BmNPV에 의한 바이러스병에 기인된 것으로 확인되었다.

검색어: 양잠, 백콜로바이러스, 진단, 전염병, 누에핵다각체바이러스, 상주

핵다각체바이러스(nucleopolyhedrosis: NPV)는 나비목 곤충의 무름병(또는 연화병)을 유발한다(Kang, 1997). 이 바이러스는 고리모양의 이중나선형 DNA 계층을 갖으며 단백질 외피로 둘러싸이는 뉴클레오캡시드를 형성하게 된다(Keddie et al., 1989). 이 바이러스 입자들은 다시 다각체(polyhedron)라는 단백질로 이뤄지는 봉입체(envelope)로 둘러싸여 광학현미경에서도 바이러스의 유무를 관찰하게 한다. 이 봉입체에 둘러싸인 바이러스가 구강을 통해 나비목 중장에 들어오면 특이적인 염기성

pH 조건에서 다각체 단백질이 분해되고 이후 빠져나온 봉입체 유래 바이러스(occlusion-derived virus: ODV)가 중장세포막에 흡착하여 세포내 침입이 이뤄진다(Horton and Burand, 1993). 감염된 세포에서 이 바이러스는 기주의 복제, 전사 및 번역 기구를 이용하여 자신의 바이러스 유전체 및 외피단백질을 합성하게 된다. 이렇게 형성된 바이러스는 두 종류로서 하나는 ODV로서 다각체 단백질로 구성된 봉입체에 함입되어 치사된 개체로부터 외부로 노출된 후 타 기주를 감염시키는 수평전파에 이용된다(Ji et al., 2010). 또 다른 바이러스는 출아바이러스(budded virus: BV)로서 DNA 유전체와 외피단백질로만 구성되며 곤충 혈관에서 다른 세포를 감염하는 데 이용된다. 중장세포에서 증식된 BV

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

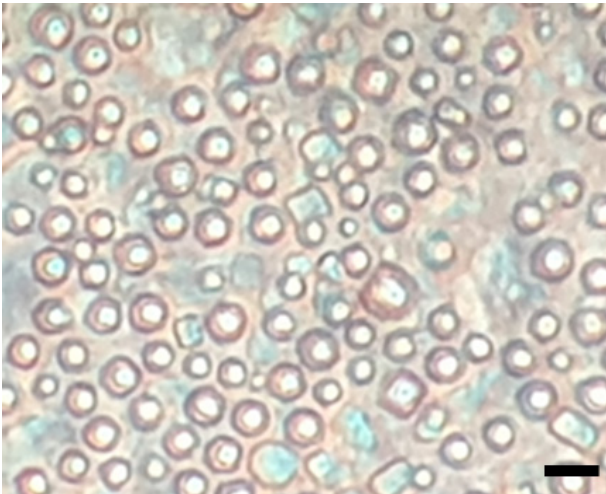
Received November 17 2020; Revised November 23 2020

Accepted November 27 2020

(A)



(B)



(C)

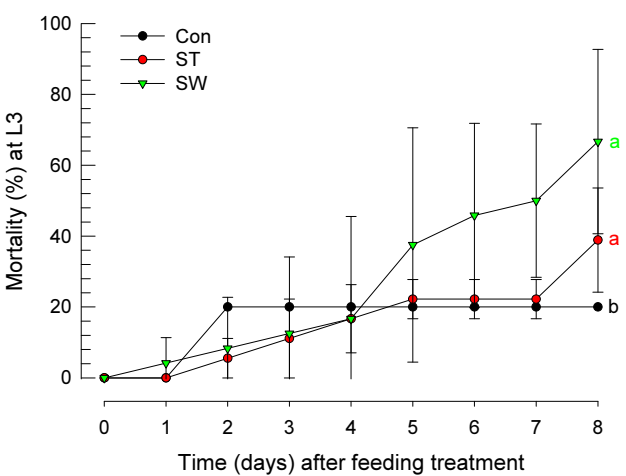
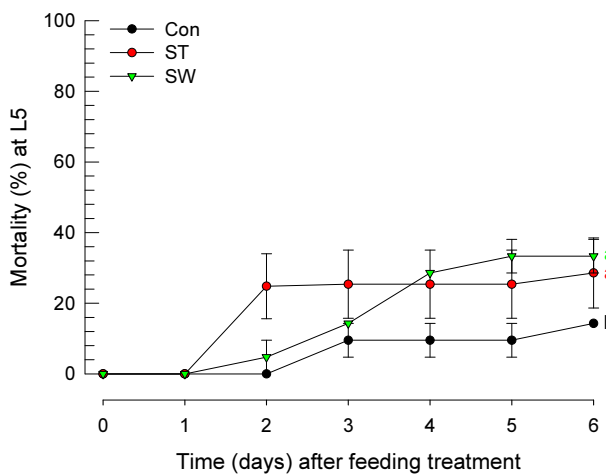


Fig. 1. Symptoms of silkworm larvae reared in sericulture farms (A) Photos of infected larvae collected from farms in Sangju. Arrows indicate diarrhea symptom. (B) Viral extract from the infected larvae (1,000x magnification, 1 μ m scale bar) and its infectivity by oral administration. Infected larvae exhibit diarrhea symptom (arrow). (C) Pathogenicity of the viral extracts from Saeter ('ST') and Seowon ('SW') farms against 3rd and 5th instar larvae. Each treatment used 10 larvae and was replicated three times. 'Con' represents untreated control. Different letters beside each treatment indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

는 주로 기관지세포를 따라 체내 혈강으로 이동하여 거의 모든 조직 세포를 감염시켜 궁극적으로 감염 곤충의 체내는 ODV가 봉입체에 둘러싸인 형태의 바이러스가 높은 밀도로 이뤄지게 된다(Passarelli, 2011). 이때 곤충의 체벽은 거의 와해된 상태로 일부 체벽의 붕괴는 내재한 봉입체 바이러스들을 방출하여 다른 개체를 감염시키는 생활환을 형성하게 된다.

누에의 경우 이 핵다각체바이러스는 BmNPV (*Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus)로 분류되며 약 127 kb 염기쌍으로 133 개의 바이러스 유전자를 암호하게 된다(Cheng et al., 2012). 감염력이 높아 어린 치잠에 0.01%의 낮은 수준의 바이러스 감염 개체빈도는 수평전염을 통해 이후 노숙 유충 시기에 20% 이상의 개체들이 감염되는 높은 전염성을 지니게 된다. 더욱이 경란전염을 통한 수직전파가 가능하여 일단 이 병이 양잠농가에

서 발생되면 완전구제에 어려움이 있다.

BmNPV를 진단하는 데 항체를 이용한 ELISA 진단법을 포함한 다양한 방법이 있으나 이 바이러스의 특이적 염기서열 부위를 중심으로 개발된 진단 프라이머를 이용한 PCR 기법이 주로 이용되고 있다(Hong et al., 2000). 또한 액틴 유전자의 발현을 같은 PCR 반응에서 조사하는 다중 PCR 기법도 개발되어 PCR 조건에 따른 결과의 신뢰도를 높이고 있다(das Neves Saez et al., 2014). 본 연구는 2020년 경북 상주에 소재한 양잠 농가에서 발생한 누에 바이러스 병징에 대한 분자진단 및 원인 바이러스 분리 동정에 대한 결과를 보고한다.

발병 의심되는 지역 농가는 상주시를 중심으로 30여개 장소에 위치하며 이 가운데 하나의 소규모 지역 작목반으로 구성된 12개 농가로부터 병든 개체를 채취하여 분석에 이용하였다. 병

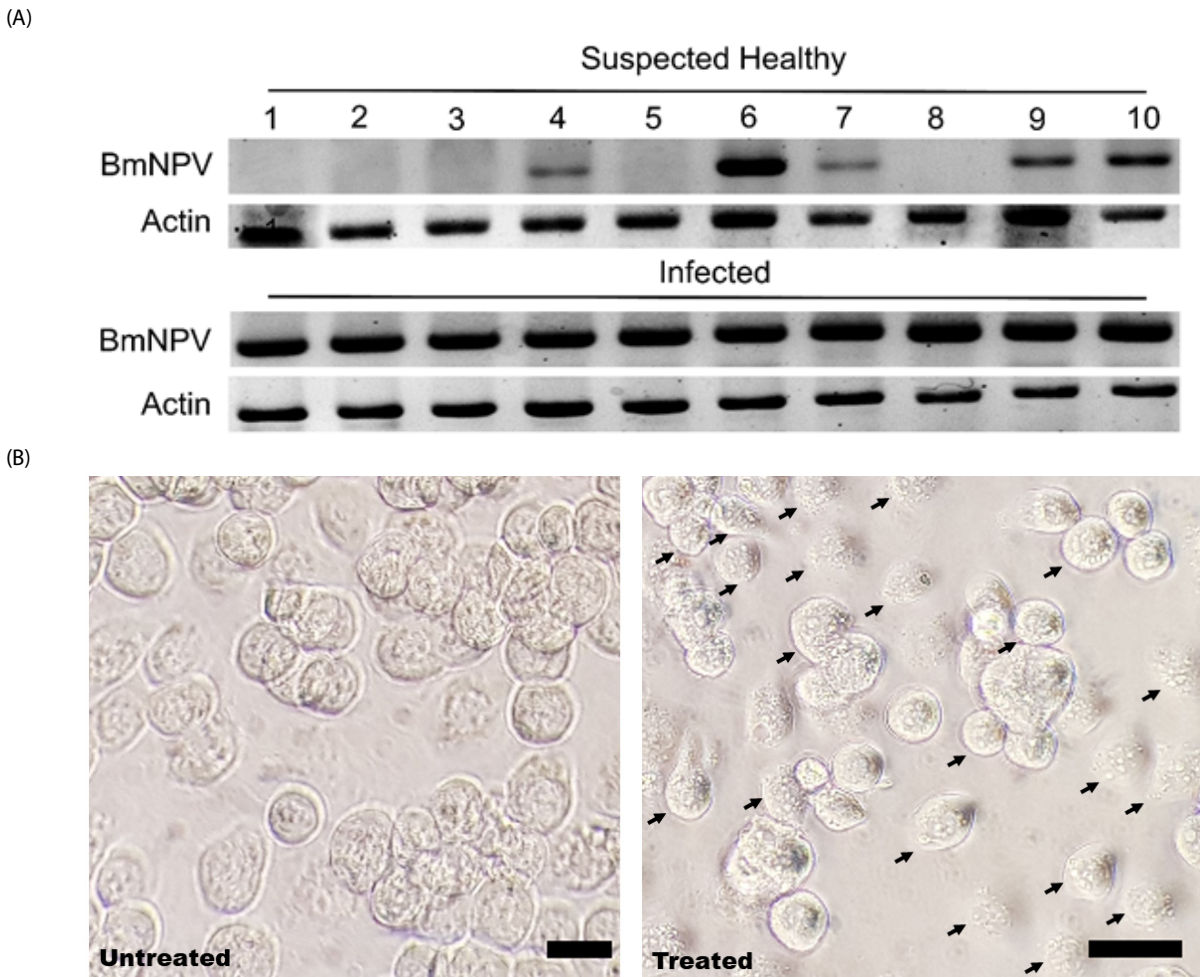


Fig. 2. Diagnosis of BmNPV infection using PCR (A) and Sf9 cells (B). For PCR diagnosis, larvae from farms were divided into infected and suspected healthy groups. Then 10 larvae were randomly selected from each group and used for PCR analysis. For Sf9 cell infection, the tissue extract of the infected larvae was filtered with 0.22 μm membrane and the resulting filtrate was overlaid on confluent Sf9 cells. After incubation for 3 days at 28 $^{\circ}\text{C}$, the cells were observed. Scale bar represent 10 μm . Arrows indicate cells containing polyhedral viruses.

든 개체의 병징이 설사 증세와 몸 조직이 와해되는 무름병 증세를 보여(Fig. 1A) 바이러스병으로 가정하고, 병든 개체로부터 바이러스를 추출하였다. 바이러스 추출은 두 지역 농가(새터와 서원)에서 각각 병든 개체 3 마리를 이용하여 100 mM 인산완충 용액 (pH 7.4)에 0.05%의 Triton-X100을 포함한 추출용액 (PBS-TX)을 1 mL 씩 넣고 조직을 분쇄하였다. 이 조직액을 12,500 × g에서 5분간 원심분리하여 상등액과 침전물로 분리하였다. 상등액은 다시 0.22 μm 여과지를 통해 세균을 제거하고 Sf9 세포주에 Jung and Kim (2006) 방법으로 여과액을 접종하였다. 침전물은 다시 PBS-TX로 현탁시킨 후 다시 원심분리하는 세척 과정을 3회 반복하였다. 이후 얻어진 침전물을 1 mL의 PBS-TX로 현탁시켰다. 이 추출액을 건전한 누에 유충에 입침 지법으로 처리하였다. 입침지법은 누에 5령(7일차)을 대상으로 10 마리 3 반복으로 진행하여 무처리와 살충율을 비교하였다. PCR 진단 기술은 das Neves Saez et al. (2014)의 방법을 따랐다.

병든 개체로 분리한 침전물에는 바이러스 입자로 보이는 결정형 입자가 다수 존재하였다(Fig. 1B). 이 침전물을 입침지법으로 건전한 누에에 섭식 처리한 결과 유사한 병징이 나타났다(Fig. 1C). 두 지역 농가(새터 및 서원)에서 분리된 추출물은 모두 무처리에 비해 높은 유충 사망률을 기록하였다. 처리된 누에 나이가 적을수록 병 발생에 의한 치사율이 높았다.

상주 양잠 농가에서 채집된 유충들을 외관상 병든 집단과 건전 의심 집단으로 나누고 여기서 각각 임의로 선발하여 PCR 진단 기술로 BmNPV 감염 여부를 확인하였다(Fig. 2A). 각각 10 마리를 대상으로 진단한 결과 감염층에서는 모두 BmNPV 양성 반응을 보였다. 반면 건전 의심 집단으로 분류된 개체들에서는 전체 10 마리 가운데 5 마리만 양성 반응을 보였다. 음성 반응을 보인 개체들에서도 액틴 유전자의 발현이 나타나 진단 PCR 방법에는 문제가 없는 것으로 판단되었다.

최종적으로 바이러스 추출물에서 BmNPV를 확인하고자 이를 Sf9 세포주에 접종하였다(Fig. 2B). 이 결과 무처리 대조구에 비해 이들 접종 세포의 세포질에서 다수의 전형적 BmNPV의 특징적 봉입체 바이러스 구조를 관찰하였다.

이상의 결과는 2020년 상주 지역 양잠 농가에서 발생된 누에 집단 치사 현상은 BmNPV에 의한 바이러스병으로 진단되었다. 이러한 진단 결과는 향후 유사한 누에병의 발생에 대한 병 발생을 및 전염 경로를 추적하는 역학 조사에 기초 자료로 제공된다.

사 사

본 연구는 2020년도 안동대학교 학생교육지도비로 지원되었다.

저자 직책 & 역할

김용균: 안동대, 교수; 실험설계 및 논문작성

김길호: 상주 작목반; 공시충 제공 및 실험설계

아메드 샤비르: 안동대, 전임연구원; 바이러스 분자진단 실험수행

밀탄 찬드라 로이: 안동대, 전임연구원; 바이러스 분리 실험수행

최두열: 안동대, 전임연구원; 바이러스 생물검정 실험수행

모든 저자는 원고를 읽고 투고에 동의하였음.

Literature Cited

- Cheng, R.L., Xu, Y.P., Zhang, C.X., 2012. Genome sequence of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus strain with cubic occlusion bodies. *J. Virol.* 86, 10245.
- das Neves Saez, C.R., Munhoz, R.E.F., Pereira, N.C., Bignotto, T.S., Fassina, V.A., Pessini, G.M., Garay, L.B., Ribeiro, L.F.C., Brancalhão, R.M.C., Fernandez, M.A., 2014. Detection of contamination and analysis of vertical transmission of BmNPV in eggs and moths of *Bombyx mori*. *Open J. Genet.* 4, 370-377.
- Hong, H.K., Woo, S.D., Choi, J.Y., Lee, H.K., Kim, M.H., Je, Y.H., Kang, S.K., 2000. Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Arch. Virol.* 145, 2351-2361.
- Horton, H.M., Burand, J.P., 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.* 67, 1860-1868.
- Ji, X., Sutton, G., Evans, G., Axford, D., Owen, R., Stuart, D.I., 2010. How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. *EMBO J.* 29, 505-514.
- Jung, S., Kim, Y., 2006. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila* K1, enhances baculovirus pathogenicity against *Spodoptera exigua* and *Plutella xylostella*. *J. Asia Pac. Entomol.* 9, 139-143.
- Kang, S.G., 1997. Studies on flacherie and ina-flacherie viruses of the silkworm, *Bombyx mori*. I. Purification of viruses. *Korean J. Seric.* 19, 25-32.
- Keddie, B.A., Aponte, G.W., Volkman, L.E., 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243, 1728-1730.
- Passarelli, A.L., 2011. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology* 411, 383-392.