

RT-PCR에 의한 벼 줄무늬잎마름병 정밀진단

이봉춘* · 홍연규 · 광도연 · 오병근 · 박성태 · 김순철

작물과학원, 영남농업연구소

Detection of Rice Stripe Virus using RT-PCR

Bong-Choon Lee*, Yeon-Kyu Hong, Do-Yeon Kwak, Byeong Geun Oh,

Sung-Tae Park and Soon-Chul Kim

Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS 1085, Milyang 627-803, Korea

(Received on December 4, 2003)

Until now, occurrence of rice stripe virus (RSV) is limited in southern part of Korea. However, recently the occurrence of RSV is increased and spreaded in central part of Korea including Chungcheong and Kyonggi province. It is very difficult to distinguish RSV symptoms on virus symptom physiological damage of rice. We detected RSV viral RNA from infected rice and its insect vector *Laodelphax striatellus* using specific primer of RSV-polymerase and coat protein gene with reverse transcription (RT)-PCR. The result of RT-PCR, we observed specific band including RSV-polymerase (1,023 bp) and CP (969 bp) in both host of rice and insect vector.

Keywords : *Laodelphax striatellus*, RSV, RT-PCR

벼 줄무늬잎마름병(Rice Stripe Virus, RSV)은 한국, 일본, 중국에서 벼에 발생하는 중요한 바이러스병으로 알려져 있다(정, 1973). RSV는 매개충인 애멸구(*Laodelphax striatellus*)에 의해서 영속전염되는 바이러스병으로 Tenivivirus 그룹의 type member이다. 이병은 1965년에 전국 평균 발병율이 약 6.5%로 벼 재배에 주요한 병으로 등장하기도 하였다(정, 1973). 그러나 1980년대 들어서는 줄무늬잎마름병 저항성품종인 낙동벼의 개발을 시작으로한 저항성 품종의 육종 및 매개충의 적극적인 방제등으로 이병에 의한 피해가 거의 눈에 띄지 않았다. 그러나 최근의 RSV 발생양상을 보면 1980년대 이후로 발병이 없었던 충청도 및 경기도일대까지 발병이 확산되는 경향을 보이고 있다. 최근들어 가장 발생이 많았던 2001년도에는 발병 필지율이 강화도에서 93.8%, 경기도 시흥 91.9%, 화성 66.2%, 김포 50.1%, 고양 43.6%, 충청도 부여 33.3%, 홍성 30.0%로 높게 나타났다. 발병율에 있어서는 충청도 당진 21.3%,

홍성 10%, 경기도 시흥 0.29%, 화성 0.16%로 나타났다. 최근 발병의 특징은 1980년도 이후 발병이 없었던 충청도 및 경기도를 포함한 중부지방까지 발병이 확산된 점이다. 그러나 상습발생지였던 남부지방에는 거의 발병되지 않았다. 발병확대의 몇가지 원인으로는 첫째 겨울철기온이 상승함에 따라 매개충인 애멸구의 월동한계선이 상승 하였을 것이라는 가능성과 둘째 중부지방에 RSV 저항성유전자가 도입되지 않은 고품질 품종이 많이 재배되었기 때문으로 생각된다. 남부지방에서 발병이 거의 되지 않았던 것은 그동안 낙동벼를 시작으로 한 RSV 저항성 유전자가 도입된 품종들이 많이 심겨졌기 때문으로 생각된다. 앞으로 전국적인 보리재배면적 확대계획과 함께 기온의 상승등 RSV의 발병 가능성은 더욱 증가되고 있다. RSV의 병징은 이병시기 및 품종에 따라 몇개의 형태로 분류할 수가 있으나 전체적인 병징형태는 생리적인 장애와 구별이 곤란한 경우가 있다. 본 실험에서는 최근에 발생이 증가된 RSV의 정밀진단을 위하여 RSV의 외피단백질 및 복제효소유전자에 특이적인 primer를 제작하였으며, RT-PCR법에 의해 이병주 및 보독애멸구로부터 RSV를 진단하였다.

*Corresponding author

Phone)+82-55-350-1273, Fax)+82-55-352-3059

E-mail)bcclee@rda.go.kr

재료 및 방법

대상재료. 식물체는 인위적으로 총매전염시켜 발병된 이병식물체 및 충청도와 경기도 일원에서 육안으로 발병이 확인된 품종(안성벼, 주안벼, 농안벼, 추청벼, 새추청벼, 진품벼, 대산벼, 서산벼, 일품벼)을 대상으로 하였다. 보독층의 검정은 인위적으로 흡즙시킨 애벌레 및 자연채집된 애벌레를 대상으로 하였으며 ELISA법 및 RT-PCR법으로 검정하였다.

ELISA 검정. 시료조제는 이병잎조직 1g에 추출완충액 5 ml을 첨가하여 조제하였으며, 애벌레는 한 마리씩 마쇄하여 사용하였다(Kaoru 등, 1997). 항체는 일본식물방역에서 구입하여 제품의 사용방법에 따라 수행하였다. 모든 반응이 완료된 후에는 ELISA reader에서 405 nm의 흡광도를 측정하여 이병 유무를 판단하였다.

RNA의 추출. 이병식물체의 total RNA추출은 RNeasy Total RNA isolation system(Promega)을 사용하여 제품의 사용법에 따라 사용하였다. 각 시료는 이병조직 100 mg으로 시작하여 최종적으로 20 μ l의 H₂O에 녹인 후 RT-PCR의 주형으로 사용하였다. 보독층에서 RNA 추출은 한 마리 층으로부터 TRIzol Reagent(Gioboco BRL)를 사용하여 전체 RNA를 추출하였으며 최종적으로 10 μ l의 H₂O에 녹인 후 RT-PCR의 주형으로 사용하였다.

RT-PCR. RT-PCR 반응은 위에서 추출한 RNA 1 μ l을 주형으로하여, 5'과 3'에 특이적인 primer 50 pmol로서 1step RT-PCR System(Promega, USA)을 사용하였다(Kim 등, 1999). AMV/Tfl 5x reaction buffer 10 μ l, 각각 10 mM dNTP mix 1 μ l, 25mM MgSO₄ 2 μ l, AMV Reverse transcriptase 5units, Tfl DNA polymerase 5units로 전체 50 μ l의 반응계에서 실시하였다. Primer는 RNA1의 복제효소유전자(GenBank No. D31879)와 RNA3의 외피단백질유전자(GenBank No. X53563)에 특이적인 염기배열로 작성하였으며, primer 염기서열은 다음과 같다. RNA 복제효소 유전자는 58~1,080까지의 부위로 5' atgacgacaccacctctcgttat 3'(upstream), 5' actaagtttctgggaacataact 3'(downstream)으로 하였으며 예상되는 크기는 1,023 bp이다. 외피단백질 유전자는 2,414~1,444의 부위로 primer 염기서열은 5'atgggtaccaacaagccagccactc 3'(upstream) and 5'ctagtcactgcaccttctgcctca 3'(downstream)으로 하였으며 예상되는 크기는 969 bp이다.

결과 및 고찰

ELISA 검정. 포장채집 이병식물체 및 매개충의 대량

검정은 ELISA법으로 하였으며, 일본 식물방역에서 구입한 RSV 항체를 사용하여 일반적인 방법으로 실시하였다. 검정결과 식물체에서 육안으로 유사병징이 확인된 것이라도 ELISA에서 반응이 나타나지 않는 것이 있었으며, 이것은 다음의 RT-PCR검정에서도 발병이 확인되지 않았다. RSV 병징은 후기로 진전되면 육안으로는 키다리병, 생리적인 장애와 구분이 불가능한 경우가 있으므로 ELISA, RT-PCR 검정이 필수적으로 생각된다. 매개충검정은 포장에서 채집한 매개충을 한 마리씩 마쇄하여 ELISA반응을 실시하였다. 식물체의 경우와 마찬가지로 ELISA에서 반응이 확인된 개체는 RT-PCR에서도 발병이 확인되었다(data not shown).

RT-PCR 검정. RSV 병징은 초기에 감염되면 잎이 황변하고 말리면서 결국에는 고사하여 말라죽어 출수가 되지않는다. 이러한 병징은 생리적인 현상과 육안으로는 구별이 불가능한 경우도 있다(Fig. 1). 본 실험에서는 RSV RNA1의 복제효소 유전자 및 RNA3의 외피단백질 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 RSV를 검정하였다(Kakutani



Fig. 1. Infected rice plants. The symptoms induced of general leaf striping, yellowing and a distinct white coloring of the leaf stripe.

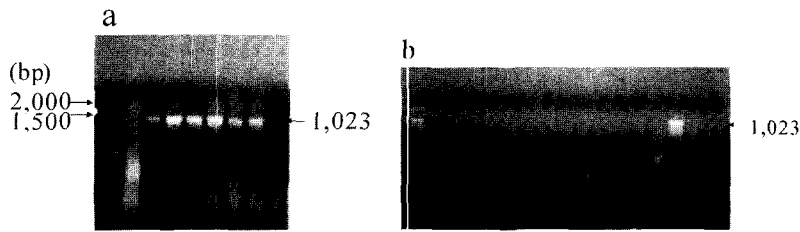


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products which are specific to RSV-polymerase gene from extracted with (a) infected plants (b) individual infected insect vector. Lane 1 in (a) and (b), 100 bp ladder molecular size marker. The expected size of 1,023 bp PCR fragment are indicated with arrowheads.

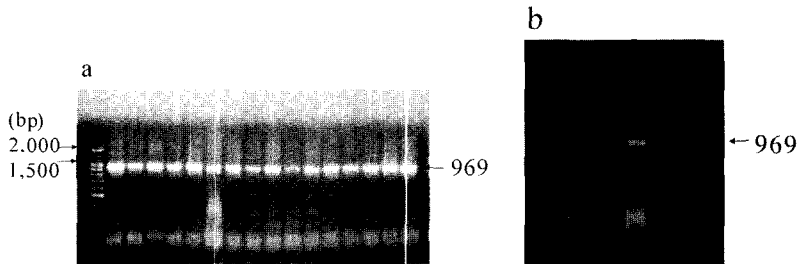


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products which are specific to RSV-coat protein gene from extracted with (a) infected plants (b) individual infected insect vector. Lane 1 in (a) and (b), 100 bp ladder molecular size marker. The expected size of 969 bp PCR fragment are indicated with arrowheads.

등, 1991, Zhu 등, 1992). 2001년 8월 충청도 및 경기도 일원에 발생한 RSV 이병주를 품종별로 채집하여 RT-PCR 검정을 실시하였다. 포장에서 발병된 안성벼, 추청벼, 새 추청벼, 주안벼, 농안벼, 추청벼, 진품벼, 대산벼 일품벼를 대상으로 하였다. RT-PCR 결과 키다리병, 생리적인 장애와 유사한 몇 개의 이병주를 제외하고는 육안으로 병징이 확인된 대부분 이병주에서 외피단백질 유전자 특이 primer를 사용하였을 경우 외피단백질 유전자에 해당되는 크기(969 bp)에 band를 형성하였다(Fig. 2a, 3a). 그러나 복제효소유전자 특이 primer를 사용하였을 경우는 외피단백질에서 발병이 확인된 이병주에서 band를 형성하지 않는 경우가 있었다. 검정에 사용할 수 있는 유전자는 복제효소유전자 부분보다는 외피단백질유전자 부분이 좀더 효율적인 것으로 나타났다. 매개충 한마리로부터 각각 total RNA를 추출하여 RT-PCR 검정한 결과 역시 복제효소유전자 보다 외피단백질 유전자를 사용한 경우가 검정효율이 높게 나타났다(Fig. 2b, 3b). 특히 외피단백질 유전자를 사용한 경우에는 매개충 각각의 PCR 증폭효율이 조금씩 다르게 나타났다. RSV는 애멸구의 충체내에서도 바이러스 증식이 일어난다고 알려져 있다. RT-PCR의 결과로서 바이러스의 정량은 불가능하나, 충체내에서 바이러스 증식량은 추후 좀더 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다. 또한 이병식물체에서 분리된 RSV 유래의 유전자와 곤충체내에서 분리된 RSV 유래 유전자가 같은 것인지,

아니면 어느 정도의 변이가 있는지가 또한 연구과제로 남아있다.

요 약

현재까지 벼 줄무늬잎마름병(Rice stripe virus, RSV)은 남부지방에 국한되어 발생되어 왔다. 그러나 최근에는 RSV의 발생이 충청도, 경기도를 포함한 중부지방까지 확산되는 경향을 나타내고 있다. 이병의 병징은 육안으로는 생리적인 장애 현상과 구분하기가 힘들다. 본 실험에서는 이병주 및 애멸구(*Laodelphax striatellus*)로부터 viral RNA를 추출한 후 RNA 복제효소 및 외피단백질유전자에 특이적인 primer를 제작하여 RT-PCR법에 의해 RSV를 검정하였다. 그결과 이병식물체 및 보독 애멸구로부터 RNA 복제효소 유전자에 특이적인 band(1,023 bp) 및 외피단백질유전자에 특이적인 band(969 bp)가 관찰되었다.

참고문헌

- 정봉조. 1973. 벼 바이러스병의 발생현황과 방제대책. 한국식물보호학회지. 12(4): 157~165.
- Hanada, K., Sakai, J. I., Tsurumachi, M. and Hayashi, T. 1997. Detection of rice stripe virus using viral antiserum and RT-PCR occurred at the Kyushu National Agricultural Experiment Station. *Proc. Assoc. Pl. Prot. Kyushu.* 43: 12-15.

- Kakutani, T., Hayano, T., Hayashi, T. and Minobe, Y. 1991. Ambisense segment 3 of rice stripe virus : the first instance of a virus containing two ambisense segments. *J. gen. Virol.* 72: 465-468.
- Kim, Y. H., Kim, O. S., Lee, B. C., Roh, J. H., Kim, M. K., Im, D. J., Hur, I. B. and Lee, S. C. 1999. Detection of Soybean Mosaic Virus Using RT-PCR. *Korean J. Crop Sci.* 44(3): 253-255.
- Zhu, Y., Hayakawa, T. and Toriyama, S. 1992. Complete nucleotide sequence of RNA4 of rice stripe virus isolate T, and comparison with another isolate and with maize stripe virus. *J. gen. Virol.* 73: 1309-1312.