

벼 바이러스(RSV, RBSDV)와 애멸구의 간편한 VC/RT-PCR 유전자 진단기술

김정수 · 이수현 · 최홍수 · 조점덕^{1*} · 노태환² · 김진영³농촌진흥청 국립농업과학원, ¹국립원예특작과학원, ²국립식량과학원, ³경기도농업기술원

Convenient Genetic Diagnosis of Virion Captured (VC)/RT-PCR for Rice Viruses (RSV, RBSDV) and Small Brown Plant Hopper

Jeong-Soo Kim, Su-Heon Lee, Hong-Soo Choi, Jeom-Deog Cho^{1*},
Tai-Whan Noh² and Jin-Young Kim³

National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-407, Korea

¹National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Suwon 441-440, Korea²National Institute of Crop Science, RDA, Iksan 139-774, Korea³Gyunggido Agricultural Research and Extension Services, Hwasung 315, Korea

(Received on April 7, 2009)

Genetic diagnosis method of Virion Captured (VC)/RT-PCR for *Rice stripe virus* (RSV) and *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV), Korean major rice viruses transmitted by small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus*, was developed. Virion extraction buffer for rice plant was 0.01M potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.5% sodium sulfite. However, the extraction buffer for *L. striatellus* was 0.01M potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.5% sodium sulfite and 2% polyvinylpyrrolidone wt 40,000 (PVP-40). Specific primers for detection of RSV and RBSDV were selected for VC/RT-PCR method. The specific primers were used as a duplex primer to detect viruliferous small brown plant hopper collected from Gimpo, Pyeongtaek and Siheung areas in Gyeonggi province. The genetic diagnosis methods of single and duplex VC/RT-PCR for RSV and RBSDV could be used easily and economically, especially on the diagnosis of *L. striatellus*. The rate of viruliferous insect (RVI) for RSV was compared with ELISA and VC/RT-PCR for *L. striatellus* collected from fields. RVI by ELISA was same as 9.2% with RVI by VC/RT-PCR. However, there were some different detection results between the methods. It could be suggested that there is a possibility of serological and/or genomic differences among RSV isolates. The portion of RVI detected simultaneously by ELISA and VC/RT-PCR was 71.0%, and the detection rate from VC/RT-PCR was higher as 3.2% than that from ELISA, which had a reason of simultaneous detection ability both RSV and RBSDV of VC/RT-PCR.

Keywords : ELISA, RBSDV, RSV, *Laodelphax striatellus*, VC/RT-PCR

우리나라에서 벼에 발생하는 바이러스병은 벼 줄무늬 잎마름병(*Rice stripe virus*; RSV), 벼 오갈병(*Rice dwarf virus*; RDV)과 벼 검은줄오갈병(*Rice black streaked dwarf virus*; RBSDV) 3종이다. RSV는 1935년에 최초로 보고된 이후 1964년, 1965년에 전국적으로 대 면적에 발생하여 피해를 주었으며(정 등, 1970), 2001년에는 경기지역에 발생하였다. 2007년에는 충남 서천, 전북 부안 등에서 약

4,450 ha(김 등, 2008)가 발생하여 피해를 주었으며, 2008년에는 전남 해남, 진도 지역을 중심으로 869 ha 발생하였다(김 등, 2009). RBSDV는 1973년 경북 선산지역에서 최초로 발생한 이후 1975년과 1976년에 전국적으로 대 발생하였으며(이 등, 1977), 1984년에 밀양지역에 약 8,400 ha 발생하였다(김 등, 2008). 벼 바이러스 발생은 90년대에는 비교적 발병율이 낮았는데 이는 저항성 품종 재배면적 확대와 함께 바이러스 매개충의 보독충 검정 기술인 ELISA 진단기술을 전국적으로도 농업기술원, 농업기술센터에 진단키트로 보급하여 병 발생 억제에 위한 매

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-6257, Fax) +82-31-290-6259

Email) jdcho@korea.kr

개충 방제 등 예찰에 적극적으로 활용한 결과로 볼 수 있다. 그러나 최근에는 RSV에 감수성 품종인 일반계 벼 품종의 확대 재배와 벼 바이러스의 적극적인 예찰 대응이 이루어 지지 않아 지역적인 피해가 발생하고 있다.

RSV와 RBSDV의 효과적인 방제를 위해서는 식물체와 바이러스 매개충인 애벌거를 신속 정밀하게 진단하는 기술을 개발하여 병 발생 예찰에 이용하는 것이 중요하다. 벼 바이러스 진단에 가장 정확하고 유용하게 사용되는 방법은 ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 방법과 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 방법이다. ELISA 방법은 시중에서 진단키트 구입이 용이하지만, 진단 감도가 균일한 항혈청을 이용하기가 어려우며, 항혈청을 지속적으로 생산하여야 하는 단점이 있다. 또한 RSV는 시판 ELISA 진단키트 구입이 가능하지만 RBSDV는 국내외적으로 구입이 곤란하기 때문에 애벌거가 동시에 전염하는 두 바이러스의 진단에 이용하기는 어렵다. 이러한 ELISA 진단법과 비교할 때 RT-PCR 진단법은 RSV와 RBSDV를 동시에 정밀 진단할 수 있어 매우 유용하다. 또한 식물체를 진단할 경우 우리나라에 발생하는 벼 바이러스 3종인 RSV, RBSDV, RDV를 동시에 진단할 수 있어 정밀진단뿐만 아니라 진단시간을 절약할 수 있어 매우 유용하다.

벼 바이러스의 유전자 진단법은 벼 바이러스 3종에 대하여 동시에 진단할 수 있는 기술이 개발되어 시판되고 있어 감염된 식물체나 매개충으로부터 누구나 바이러스를 진단하는데 이용이 가능하다. 그러나 일반적으로 식물체나 매개충의 벼 바이러스 유전자 진단을 하기 위해 상업용 키트나 복잡한 매뉴얼 과정을 거쳐 핵산을 분리하여 진단에 이용하는데, 진단 시료수가 많아지면 진단비용과 소요시간이 많이 필요하다. 이에 대해 벼 식물체에서 RSV를 간편히 진단할 수 있는 Virion Captured(VC)/RT-PCR 진단법이 2008년 개발되어 사용되고 있으나(김 등, 2007), RSV와 RBSDV를 매개하는 애벌거에 대한 VC/RT-PCR 진단법의 개발 및 실용화가 시급한 실정이다. 다량의 시료를 다루어야 하는 전국적인 벼 바이러스 매개충인 애벌거의 보독충률 조사의 지역별 반복시험을 위해 빠르고 정확하며 실용적인 진단법의 개발은 매우 필요하다. RT-PCR 진단법을 빠르고 간편하게 개발하려면 진단과정을 크게 줄이는 기술이 필요하다. RT-PCR진단과정 중 시간, 노동력, 비용이 많이 소요되는 핵산 분리과정을 시료로부터 특별한 분리키트나 시간의 투자 없이 핵산을 간단히 분리하여 진단할 수 있다면 빠르고 간편하게 다량의 시료를 PCR로 진단할 수 있는 유전자 진단기술이 개발될 수 있는 것이다.

최근에는 일반적 유전자 진단법의 단점을 극복하기 위하여 간단하고 빠르게 식물바이러스 진단기술에 대한 연구가 이루어져 왔다(Li와 Mock, 2005; Osman과 Rowhani, 2005). 이러한 방법 중 하나로써, 면역학적 방법을 겸한 IC/RT-PCR(Immuno-captured/RT-PCR)은 바이러스 핵산을 따로 분리할 필요가 없으므로 전체 핵산(total RNA)을 이용한 바이러스 핵산진단법에 비해 진단비용을 크게 절감할 수 있으며, 진단의 정확도를 한층 높여 식물바이러스 진단에 큰 역할을 하였다(Nolasco 등, 1993). 그러나 IC/RT-PCR 방법은 항체가 반드시 필요하며 항체 처리와 오랜 반응 시간이 필요하다는 단점이 있다. 이러한 모든 단점을 극복하기 위해 항체가 필요 없고 간단하며 빠르게 식물로부터 핵산을 추출할 수 있는 다양한 방법이 개발되었다(Suehiro 등, 2005). 국내에서는 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)에 대하여 바이러스 특별한 핵산 분리 과정 없이 간편하고 정확하게 바이러스를 진단하는 VC/RT-PCR 방법이 개발되었으며(조 등, 2006), 또한 DNA 바이러스인 토마토 황화 잎말림 바이러스(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)를 검정할 수 있는 VC/PCR 방법이 개발되어 실용화 되었다(조 등, 2008). 한편으로 여러 종류의 바이러스 진단 프라이머를 조합하여 한번에 여러 바이러스를 동시에 진단하는 방법이 많이 개발되었으며(Sharman 등, 2000) 또한 우리나라 박과작물에 가장 피해를 일으키는 종자전염 바이러스 3종을 동시에 진단할 수 있는 VC/RT-PCR 유전자 진단기술을 개발하여 이용하고 있다(조 등, 2007). 본 연구는 2008년 벼 바이러스 매개충인 애벌거의 보독충률 조사를 전국적으로 실시하면서 간편한 진단법의 개발이 시급함에 따라 개발되어 실용화 하였으며 벼 바이러스 식물체 및 매개충인 애벌거 감염 바이러스에 대한 다중 진단법인 VC/RT-PCR 유전자 진단법을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

벼 바이러스 감염 시료. Positive control로서 벼 바이러스 RSV와 RBSDV에 복합감염된 벼 식물체는 국립식량과학원에서 분양받아 사용하였으며, 애벌거는 RSV 감염 식물체에 흡즙시켜 보독충을 만들어 사용하였다. 보독 애벌거는 한 마리씩 사용하거나, 애벌거를 병든 식물체에서 사육하여 보독충률이 40% 이상되었을 때 애벌거 10마리를 한 개의 시료로 하여 보독 애벌거 감염 positive control 시료로 사용하였다. 벼 바이러스 감염 식물체 시료는 이전에 RSV 감염이 확인된 포장 시료의 조즙액을 이용하여 positive control로 사용하였다. 그러나 RDV에

감염된 시료는 실험에 이용하지 않았다. VC/RT-PCR 진단법 개발 후 경기도 김포, 시흥, 평택의 벼 노지 포장에서 채취한 애벌레에 대해 유전자 진단하고 결과를 각 지역별 94마리씩 이용하여 일반적인 ELISA진단으로 나타난 결과와 비교 분석하였다.

VC/RT-PCR 진단과정 및즙액추출 완충액. 식물체 즙액추출 완충액과 애벌레 마쇄용 기본 완충액(PPBS+SS)은 산화방지제인 sodium sulfite(0.5%)가 들어간 0.01 M 인산완충액(PPBS; potassium phosphate buffer, pH 7.0)으로 첨가제로서 BSA(0.5%)나 Triton X-100(1%)을 적용한 실험을 하였으며, 애벌레 마쇄의 경우 PVP-40(2%)를 추가하여 실험하였다. PCR 튜브에 핵산 포착을 위하여 식물체 즙액 또는 애벌레 추출액을 PCR 튜브에 30 μ l씩 넣고 37°C에서 10분간 처리하였다. 0.05%의 Tween-20를 넣은 인산완충액(1× phosphate buffered saline; PBS)을 세척 완충액(PBST)으로 이용하여 50 μ l씩 두 번 세척하고 튜브 내부를 깨끗이 비운 후 얼음위로 튜브를 옮겨 nuclease-free water 50 μ l로 한번 더 세척하고 비워진 튜브안에 프라이머와 master mix(Promega, AccessQuick™ RT-PCR System)를 넣어 RT-PCR을 하였다.

VC/RT-PCR용 바이러스 프라이머. 김 등이 보고한 벼 바이러스 진단용 프라이머를 이용하였다(2007). 벼에 발생하는 RSV, RBSDV와 함께 Rice dwarf virus(RDV)를 동시에 진단할 수 있는 triplex primer를 이용하였으나 본 실험에서는 끝동매미충이 매개하는 RDV감염 식물체에 대한 positive control을 확보하지 못하여 이를 제외하고 두 종의 바이러스 프라이머만 이용하였다. Triplex primer를 구성하는 3종의 프라이머는 식물로부터 분리한 핵산이나 Plasmid DNA를 이용하여 세가지 바이러스를 동시에 진단할 수 있도록 개발된 것이다. 이러한 세 종류의 프라이머 중 RSV 진단용 프라이머와 RBSDV 프라이머를 VC/RT-PCR진단법 개발에 이용하였다. RSV 프라이머는 RSV의 4개 RNA중 가장 작은 RNA4의 일부분인 571 base pair(bp)를 증폭하는 RSR4-C10와 RSR4-N30이었다. RBSDV는 segment10의 235 bp를 증폭하는 RBSDV-S10-C40와 RBSDV-S10-N40, 그리고 380 bp를 증폭하는 RBSD-S10-C40와 RBSD-S10-N30을 이용하였다.

증폭조건 및 전기영동. 유전자 증폭을 위한 조건은 42°C, 30분→94°C, 10분→[95°C, 30초→50°C or 52°C or 55°C, 1분→72°C→1분30초]35회→72°C, 5분→4°C 처리로 하였다. 증폭된 생산물은 1.2% agarose gel에서 100 V 전압으로 40분 전기영동 하였다. 한천이 녹으면 한천액 100 ml에 Goldview 5 μ l를 넣고 전기영동 틀에서 젤을 굳혀서 사용하였다. 증폭산물은 시료당 3~5 μ l를 loading buffer와

같이 섞어서 전기영동하였다.

결과 및 고찰

RSV 단독 검정. 식물체와 애벌레의 RSV 유전자 진단의 안전성 확인을 위하여 RSV 단독으로 VC/RT-PCR 진단을 하였다. 식물체 진단의 경우에는 PPBS+SS와 0.5% BSA를 첨가한 PPBS+SS로 추출한 시료에서 모두 VC/RT-PCR 진단이 잘 되었다(Fig. 1). 그러나 애벌레의 경우에는 2% PVP를 추출 완충액에 첨가하였을 때만 VC/RT-PCR 진단이 잘 되었고, 기본 완충액인 PPBS+SS나 0.5% BSA 혹은 1% Triton-X를 첨가한 추출 완충액에서는 진단이 되지 않았다. 식물체의 경우에는 김 등(2008)이 보고한 바와 같이 벼 RSV의 경우 VC/RT-PCR 진단이 잘 되었으나, 일반적으로 식물체의 경우 바이러스 단백질 및 핵산을 포착할 때에는 BSA를 사용하기도 하므로 바이러스가 PCR 튜브에 흡착되는데 큰 영향을 안 주었지만 RSV 보독 애벌레를 VC/RT-PCR 방법으로 진단할 경우에는 BSA나 Triton X-100은 효과적이지 못하였으며, PVP-40를 첨가하였을 때 바이러스 흡착 효율이 높아진 것으로 생각된다.

VC/RT-PCR을 이용한 RSV와 RBSDV 동시검정. 제공받은 벼 바이러스 Triplex primer는 Plasmid DNA와 감염식물체의 핵산을 이용하여 동시 진단하였을 때 RBSDV가 235 bp의 증폭산물을 만드는 프라이머(RBSDV S-10-C40과 N40, 이하 RBSDV-235로 명함)와 380 bp의 증폭산물을 만드는 프라이머(RBSDV S-10-C40과 N30, 이하 RBSDV-380으로 명함)에서 다 진단이 잘 되고 특히, 380 bp를 이용하고 프라이머 농도를 8 pmol로 진단하였을 때 뚜렷하게 3종이 구별되어 진단된다(Fig. 2).

VC/RT-PCR 진단법은 애벌레를 매개체로 전염되는 RSV와 RBSDV를 대상으로 감염된 식물체와 애벌레로부터 두 바이러스를 동시에 진단할 수 있는 개발하였다. 기본완충

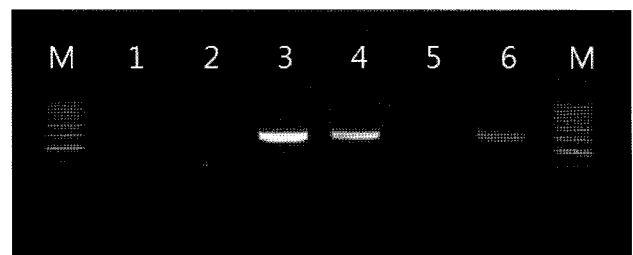


Fig. 1. VC/RT-PCR of RSV for leaves of rice plant and viruliferous insect of *Laodelphax striatellus*. 1, *L. striatellus* (LS), 2: LS+0.5% BSA; 3, Leaf, 4: Leaf+0.5% BSA; 5, LS+1% Triton X-100; 6, LS+2% PVP-40; M, Marker (100 base pair ladder, thick band is 500 bp).

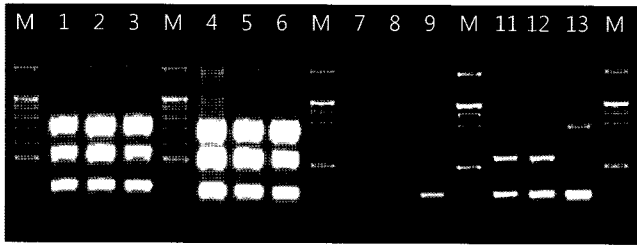


Fig. 2. Triplex RT-PCR of RDV, RSV and RBSDV. Lane 1 to 6 used Plasmid DNA as templates of RDV, RSV and RBSDV and lane 7 to 13 used total RNA from leaf of rice plants. Primer volume of 25 pmol and 8 pmol was used in lanes 1, 2, 3, 7, 8 and 9, and lanes 4, 5, 6, 11, 12 and 13, respectively. Annealing temperature was 50°C for lanes 1, 4, 7 and 11, 52°C for lanes 2, 5, 8 and 12, 55°C for lanes 3, 6, 9, and 13. *Photograph was offered kindly from Plant Pathology Division of Department Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science.

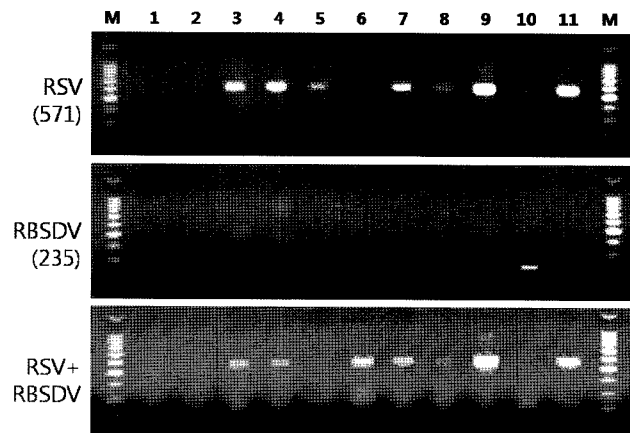


Fig. 3. VC/RT-PCR results from rice leaves infected with RSV, RBSDV and RSV+RBSDV, and from viruliferous vector of *Laodelphax striatellus* with RSV. 1: RSV viruliferous *L. striatellus* 10 heads macerated in 200 μ l of 0.01M PPBS+0.5% Sodium sulfite (LSS), 2: 10X of LSS, 3: 100X of LSS, 4: 1,000x of LSS, 5: RSV viruliferous *L. striatellus* 10 heads macerated in 200 μ l of 0.01M PPBS+0.5% Sodium sulfite+2% PVP(LSP), 6: 10X of LSP, 7: 100X of LSP, 8: 1,000X of LSP, 9: RSV infected leaf 1 g macerated in 6 ml 0.01M PPBS+0.5% Sodium sulfite, 10: RBSDV infected leaf 1 g macerated in 8 ml 0.01 M PPBS+0.5% Sodium sulfite, 11: RSV+RBSDV leaf 1 g macerated in 8 ml 0.01 M PPBS+0.5% Sodium sulfite. M, Marker (100 base pair ladder, thick band is 500 bp).

액(PPBS+SS)을 이용하여 마쇄한 보독충과 기본원충액에 2% PVP를 첨가하여 마쇄한 보독충을 각각 10배, 100배, 1,000배로 희석하여 진단하고 바이러스에 감염된 벼 잎은 기본원충액만을 이용하여 마쇄한 후 진단하였다(Fig. 3). 571 bp의 산물을 생산하는 RSV 프라이머(RSR4-C10&N30, 이하 RSV-571로 명함)를 단독으로 검정했을 때 애벌구는 PVP를 첨가하지 않은 경우 100배 이상 희석할 경우 진단이 잘 되었다. 그러나 PVP를 넣었을 때는 10배

희석 시료의 경우를 제외하면 원액부터 모든 희석액에서 VC/RT-PCR이 잘 되었다. RSV-571 프라이머와 RBSDV-235 프라이머를 섞어 동시에 VC/RT-PCR 진단한 결과도 PVP를 첨가하였을 때 RSV 감염 애벌구의 바이러스가 진단이 잘 되었다. 또한 바이러스 감염된 벼 잎의 경우 RBSDV-235 단독 프라이머 진단에서 RBSDV 단독감염된 벼 잎은 밴드가 잘 나타났고 RSV와 RBSDV가 각각 감염된 벼 잎을 같이 동량 섞은 즙액에서는 RBSDV 밴드가 다소 약하게 나타났다. 두 바이러스 프라이머를 동시에 넣어 진단했을 경우 RBSDV 단독 감염 벼 잎은 약하게 밴드가 나타났으나 RSV와 RBSDV 감염주를 섞은 즙액에서 RSV는 잘 진단되었으나 RBSDV 밴드가 나타나지 않았다. 이것은 RSV-571 프라이머가 매우 안정적임을

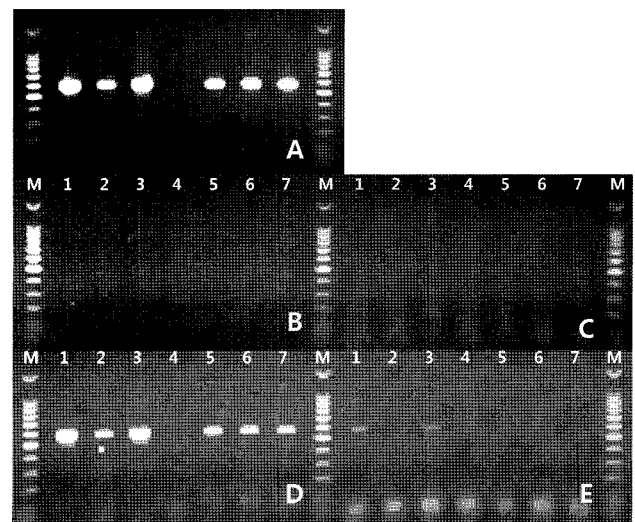


Fig. 4. VC/RT-PCR results from rice leaves infected with RSV, RBSDV and RSV+RBSDV, and from viruliferous vector of *Laodelphax striatellus* with RSV. RSV-571 primer could detect clearly all samples infected with RSV (A), RBSDV-235 primer could detect weakly in 4, 5 and 6 lanes (B), RBSDV-380 primer did not show any band in all lanes (C), duplex primer with RSV-571+RBSDV-235 could amplify all RSV but not any RBSDV (D) and duplex primer with RSV-571+RBSDV-380 could detect only RSV in 1 and 3 lanes but not any RBSDV. Samples amplified with primers were loaded in lanes as follows: 1, 100 dilution of RSV viruliferous *L. striatellus* 10 heads macerated in 200 μ l of 0.01M PPBS+0.5% Sodium sulfite; 2, 100 dilution of RSV viruliferous *L. striatellus* 10 heads macerated in 200 μ l of 0.01 M PPBS+0.5% Sodium sulfite+2% PVP; 3, RSV infected leaf 1 g macerated in 6 ml 0.01 M PPBS+0.5% Sodium sulfite; 4, RBSDV infected leaf 1 g macerated in 8 ml 0.01 M PPBS+0.5% Sodium sulfite; 5, RSV+RBSDV leaf 1 g macerated in 8 ml 0.01 M PPBS+0.5% Sodium sulfite; 6, RSV+RBSDV leaf 1 g macerated in 10 ml 0.01 M PPBS+0.5% Sodium sulfite; 7, RSV+RBSDV leaf 1 g macerated in 10 ml 0.01 M PPBS+0.5% Sodium sulfite+2% PVP. M, Marker (100 base pair ladder, thick band is 500 bp).

보여주는 결과이며 RBSDV-235의 경우는 RSV-571 프라이머와 섞여 쓸 경우 다소 불안정하나 진단은 가능한 것으로 판단된다. 다만 RSV와 RBSDV에 감염된 벼 잎을 섞은 즙액을 RBSDV-235 단독 프라이머로 진단했을 때 나타난 밴드도 약한 상태였으므로 두 바이러스 감염 벼 잎이 섞일 때 RBSDV감염 벼 잎의 바이러스 농도가 많이 낮았기 때문에 동시진단이 잘 안되었거나 RBSDV 진단이 저해된 것으로 판단된다. 그러나 이에 대해서는 Fig. 4에서 보여지는 경기도 김포, 평택, 시흥 벼 노지 포장에서 채취한 보독충 시료에 대한 두 바이러스 동시진단 프라이머를 이용한 VC/RT-PCR결과를 볼 때 RBSCV감염 보독충이 잘 진단된 것으로 보아 프라이머를 섞어 사용하므로 써 나타나는 진단 저해현상 보다는 농도에 따른 진단 감도 차이임을 미루어 짐작할 수 있다. 그러나 RBSDV-380은 VC/RT-PCR진단에서 단독으로 이용할 경우에도 진단감도가 낮았으며 RSV-571 프라이머와 동시 진단할 경

우에는 RSV까지 진단을 저해 받아 VC/RT-PCR진단용 프라이머로는 적당하지 않았다(Fig. 4).

ELISA와 VC/RT-PCR 진단 비교. RBSDV에 대한 ELISA진단키트는 확보할 수 없었으므로 ELISA진단법은 RSV만 수행되었다. 경기도 김포, 평택 및 시흥 지역 노지 포장에서 채집한 월동 애벌거에 대해 RSV를 ELISA 진단하였으며, VC/RT-PCR 진단방법으로는 RSV와 RBSDV를 동시에 진단하여 그 결과를 비교하였다(Table 1). VC/RT-PCR에 사용한 진단 프라이머는 RSV-571과 RBSDV-235를 사용하였다. 평택 지역의 애벌거에 대한 RSV 보독충률은 ELISA와 VC/RT-PCR 결과가 동일하였으나 김포 지역은 ELISA 결과가 높았고 시흥 지역은 VC/RT-PCR 결과가 높아 일반적으로 유전자 진단 결과가 높은 것과는 일치하지 않았다(Fig. 5). 그러나 RSV의 평균 보독충률은 9.2%로 동일하여(가는 흰 화살표) 시료수가 많아질 경우 두 진단 방법 간에 신뢰성은 동일한 것으로 생각된다. RBSDV의 애벌거 보독충률은 평택과 시흥지

Table 1. Rate of viruliferous insect for RSV and RBSDV by ELISA and VC/RT-PCR

Area collected	% viruliferous insect for ^a			
	RSV by ELISA	RSV by VC/RT-PCR	RBSDV by VC/RT-PCR	RSV+RBSDV by VC/RT-PCR
Gimpo	7.4	5.3	0.0	0.0
Pyeongtaek	10.6	10.6	1.1	0.0
Siheung	9.6	11.7	1.1	0.0
Average	9.2	9.2	0.7	0.0

^aSmall brown plant hopper collected from fields and the 94 individual insect per area was tested simultaneously with ELISA and VC/RT-PCR.

Table 2. Comparison of RSV viruliferous insect by ELISA and VC/RT-PCR

Area collected	No. of viruliferous insect detected by ^a			
	ELISA and VC/RT-PCR	ELISA only	VC/RT-PCR only	Total
Gimpo	5	2	1	8
Pyeongtaek	9	1	1	11
Siheung	8	1	3	12
Total	22 (71.0)	4 (12.9)	5 (16.1)	31 (100%)

^aSmall brown plant hopper collected from fields and the 94 individual insect per area was tested simultaneously with ELISA and VC/RT-PCR.

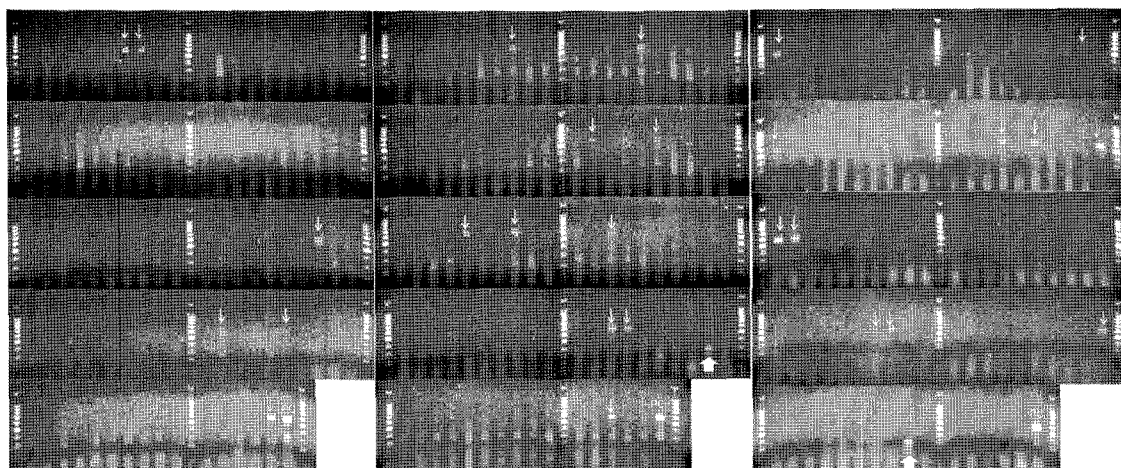


Fig. 5. Duplex VC/RT-PCR of RSV and RBSDV to *L. striatellus* collected from fields of Gimpo (Left), Pyeongtaek (Center) and Siheung (Right). Small arrow represented RSV and large arrow represented RBSDV. Positive control (PC) was the sap of rice plant infected mixedly with RSV and RBSDV.

분포하고 있었으며, 두 바이러스에 복합 감염된 보독 애멸구는 없었다.

RSV 보독충으로 진단된 애멸구를 개체별로 비교한 결과는 Table 2와 같다. 채집한 모든 애멸구에 대해 ELISA와 VC/RT-PCR 두 방법에서 모두 보독충으로 진단된 애멸구의 비율은 71%이었다. 그러나 ELISA 방법에 의하여서만 보독충으로 진단된 비율은 12.9%이었으며, VCRT-PCR 방법에 의하여서만 보독충으로 진단된 비율은 16.1%이었다. Table 1에 따르면 ELISA와 VC/RT-PCR의 보독충률 조사방법간에는 71%가 일치하였으며 VC/RT-PCR 진단의 경우 진단효율이 3.2% 높았다. 그러나 RSV 보독충의 13~16%는 두 방법에서 다르게 진단이 되었으므로 단백질 특성으로 진단하는 ELISA와 유전자 차이로 진단하는 VC/RT-PCR진단법의 특성을 고려해 볼 때 우리나라에 발생하는 RSV의 혈청학적, 유전적 계통 존재 가능성이 앞으로 검토하여야 할 것으로 생각된다.

요 약

우리나라 벼에 발생하는 주요 바이러스 중 애멸구에 의하여 전염하는 벼줄무늬잎마름병(RSV)과 벼검은줄오갈병(RBSDV)에 대한 간편한 유전자 진단법인 VC/RT-PCR 방법을 개발하였다. 벼 잎의 경우 즙액 추출 완충액은 0.5% sodium sulfite를 첨가한 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)을 기본 완충액으로 이용하고 애멸구를 진단할 경우에는 기본 완충액에 2% PVP를 첨가하였을 때 VC/RT-PCR 진단이 잘 되었다. VC/RT-PCR을 이용한 진단에 적합한 RSV와 RBSDV 프라이머를 선별하였고 이것을 이용하여 동시진단으로 경기도 김포, 평택, 시흥지역에서 채집한 애멸구의 RSV와 RBSDV의 보독충을 쉽고 경제적으로 진단할 수 있었다. ELISA에 의한 진단결과와 비교할 때 세 지역을 합하여 RSV에 대한 평균 보독충률은 9.2%로 동일하였으나 보독충 중 일부가 ELISA와 VC/RT-PCR 두 방법에 의한 진단결과가 다르게 나온 것은 RSV의 혈청학적, 유전적 계통 존재 가능성을 제시하고 있다. 포장에서 채집한 애멸구의 VC/RT-PCR 진단효율은 RSV와 RBSDV를 동시에 진단하므로써 RSV만 진단이 가능한 ELISA 결과 보다 3.2% 높았다.

감사의 말씀

이 논문은 농촌진흥청 국책연구 사업(No. 200802A01030008)으로 수행하였으며 이에 감사를 표합니다.

참고문헌

- Cho, J. D., Kim, J. S., Lee, S. H. and Chung, B. N. 2007. Triplex virion capture (VC)/RT-PCR for three seed transmission tobamoviruses of KGMMV, ZGMMV, KGMMV occurring on Cucurbitaceae. *Res. Plant Dis.* 13: 82-87.
- Cho, J. D., Kim, T. S., Kim, J. H., Choi, G. S., Chung, B. N., Choi, H. S. and Kim, J. S. 2008. Convenient Virion Capture (VC)/PCR for *Tomato yellow leaf curl geminivirus* occurring on tomato in Korea. *Plant Dis.* 14: 233-237.
- Cho, J. D., Kim, J. S., Kim, H. R., Chung, B. N. and Ryu, K. H. 2006. Convenient nucleic acid detection for *Tomato spotted wilt virus*: Virion captured/RT-PCR (VC/RT-PCR). *Res. Plant Dis.* 12: 139-143.
- Chung, B. J. and Lee, S. H. 1970. Studies on the transmission mechanism of the Rice stripe disease. *Res. Rept. RDA.* 12: 105-110.
- Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, H. S., Choi, G. S., Cho, J. D. and Chung, B. N. 2008. Survey of viral diseases occurrence on Major crops in 2007. *Res. Plant Dis.* 14: 1-9.
- 김정수, 이수현, 최홍수, 김미경, 광해련, 조점덕, 최국선, 김진영. 2009. 2008년 우리나라 주요 작물 바이러스병 발생 상황. *Res. Plant Dis.* 15: 1-7.
- 김정수, 최홍수, 이수현, 이민호, 이봉춘, 김주희. 2007. 우리나라 벼 바이러스병 현황/대책. 농촌진흥청 농업과학기술원. 발간등록번호 11-1390093-000174-01.
- Lee, Y. Y., Lee, S. H. and Chung, B. J. 1977. Studies on the occurrence of *Rice black-streaked dwarf virus* in Korea. *Kor. J. P. Prot.* 16: 121-125.
- Li, R. and Mock, R. 2005. An improved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of two cherry flexiviruses in *Prunus* spp. *J. Virol. Meth.* 129: 162-169.
- Nolasco, G. deBlas, C., Torres, V. and Ponz, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Viro. Meth.* 45: 201-218.
- Osman, F. and Rowhani, A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Meth.* 133: 130-136.
- Sharman, M., Thomas, J. E. and Dietzgen, R. G. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *J. Virol. Meth.* 89: 75-88.
- Suehiro, N., Matsuda, K., Okuda S. and Natsuaki, T. 2005. A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 125: 67-73.