

배추흰나비 顆粒病바이러스의 정제 및 병원성

Purification and Pathogenicity of the Granulosis Viruses of Common Cabbage Worm, *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*

柳江善¹·金槿榮¹·姜錫權²

Kang Sun Ryu¹, Keun Young Kim¹, and Seok Kwon Kang²

ABSTRACT This study was carried out to acquire some basic biological informations on the granulosis virus (GV) of *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*. Purified fractions of GV capsules in an sucrose density gradient centrifugation yielded on homogenous and sharp peak without a shoulder. Electron microscopy revealed that GV capsules were mostly ovalglove in shape. *P. rapae* and *P. rapae* GV isolated from *P. rapae* comprised granules(396 ± 38 × 238 ± 25nm for *P. rapae* GV. 375 ± 40 × 255 ± 28nm for *P. brassicae* GV) which contained single virus particle. The virus particles were 250-275 × 63-73nm for *P. rapae* GV and 243-250 × 63-75nm for *P. brassicae* GV containing a nucleocapsid 225 × 31nm for *P. rapae*, 225 × 29nm for *P. brassicae* within an envelope. The virulent difference between the two viruses was very small in their virulence for *P. rapae* larvae showing the LC₅₀(-log) with 5.5673 for *P. rapae* GV and 5.8104 for *P. brassicae* GV. Also the LT₅₀ of the 3rd instar *P. rapae* larvae against 10⁻⁶ inoculum was 8.17 days for *P. rapae* GV and 7.16 days for *P. brassicae* GV.

KEY WORDS *Pieris rapae*, *Pieris brassicae*, granulosis virus, purification, pathogenicity

초 록 배추흰나비 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV의 정제조건, 형태 및 *P. rapae* 유충을 숙주로한 병원성을 비교하였다. 바이러스封入體 蔗糖密度勾配遠心法(25,000 g, 40분)으로, 바이러스 입자는 30~60% 蔗糖密度勾配遠心法(52,000 g, 2시간)으로 정제하여 순도 높은 바이러스를 얻을 수 있었다. 封入體의 크기는 *P. rapae* GV의 경우 396 ± 38 × 238 ± 25nm, *P. brassicae* GV의 375 ± 40 × 255 ± 28 nm였으며, 바이러스 입자는 *P. rapae* GV가 250-275 × 63-73 nm이며 *P. brassicae* GV가 243-250 × 63-75 nm였다. 한편 nucleocapsid는 *P. rapae* GV가 225 × 31 nm, *P. brassicae* GV가 225 × 29 nm로 관찰되었다. *P. rapae*를 숙주로 하여 *P. rapae* GV와 *P. brassicae* GV의 병원성을 검정한 결과, *P. rapae* GV의 LC₅₀(-log)値는 5.5673, *P. brassicae* GV의 경우는 5.8104로 *P. brassicae* GV의 병원성이 약간 강하게 나타났으며, LT₅₀(바이러스농도 10⁻⁶)의 경우는 *P. rapae* GV는 8.17일, *P. brassicae* GV에서는 7.16일로 *P. brassicae* GV에서 약간 짧았다.

검 색 어 배추흰나방, 과립병바이러스, 정제, 병원성

배추흰나비는 배추, 양배추 및 열무 등 十字花科 植物에 막대한 피해를 주고 있는 해충으

로서 *Pieris rapae* L.와 *Pieris brassicae* L.로 분류되고 있으며 *P. rapae*는 미국, 유럽, 호주, 뉴질랜드 및 우리나라를 비롯한 아시아 지방에 널리 분포하고 있는 반면에, *P. brassicae*는 유럽지방을 중심으로 인도, 파키스탄 등 일부에

1 농촌진흥청 잠업시험장(Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon Korea, 441-100)

2 서울대학교 농과대학(College of Agriculture, Seoul National University, Suwon Korea, 441-744)

만 분포하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 *P. brassicae* 로命名되는 배추흰나비는 아직 우리나라에서는 미발견해충으로 간주된다.

배추흰나비 과립병바이러스(이하 GV로 약함)은 *P. rapae*에서 1926년 Paillot에 의해 최초로 보고된 이래, 일본에서는 北島(1938)가 脂肪病이라고 보고하였고 또한 Thompson(1951) 및 Tanada(1953)는 하와이에서 GV를 각각 분리하고, 병징과 바이러스의 성상에 대하여 보고하였다. 그 후 영국(Smith & Rivers, 1956), 뉴질랜드(Kelsey 1957), 호주(Wilson 1960) 등 여러국가에서 보고되었으나, 우리나라에서는 지금까지 배추흰나비 GV에 대한 연구는 극히 미진한 상태이다.

P. rapae GV의 封入體크기는 473×373 nm (阿久 1971)이고, *P. brassicae* GV는 350×200 nm(Brown 등 1977)로 서로 큰 차이를 보이고 있으며, 바이러스 입자의 크기에 대해서는 *P. rapae* 경우는 보고된 것이 없으나, *P. brassicae* GV의 바이러스 입자는 225×65 nm, nucleocapsid는 250×35 nm라고 보고(Brown 등 1977)하였다.

이들 2종의 바이러스는 交叉感染이 일어나고 (Kelsey 1958, Smith, 1967), 野外에서도 이들 두 숙주간에는 交叉感染이 일어난다고 보고되었다(David 1978).

Crook(1981)는 *P. rapae* GV와 *P. brassicae* GV의 병원성을 비교검정한 결과, 숙주를 *P. brassicae* 로 하였을 때 *P. brassicae* GV가 *P. rapae* GV보다 약 1,000배 정도 강했고, *P. rapae*를 숙주로 했을 경우는 거의 비슷한 병원성을 나타낸다고 보고하였으며, Payne 등(1981)은 *P. brassicae* GV에 대한 *P. rapae*와 *P. brassicae*의 感受性 비교시험에서 *P. rapae*가 *P. brassicae* 보다 월등히 感受性이 높은 것으로 보고하였다.

배추흰나비의 방제를 위해 해마다 많은 有機合成農藥이 사용되고 있으나 생식이 주가 되는 채소류는 보다 안정성이 높은 농약사용이 요구되어 GV를 이용한 배추흰나비의 微生物的 방

제시험에 관한 다양한 연구 보고(Kelsey 1957, 1958, Smith 1956, 1960, Wilson 1960, 阿久 1971)가 있으며 소련의 Lativan Agric.Academy가 1979년 *P. rapae* 방제를 위해 최초로 안전성이 높은 GV를 이용한 微生物殺蟲劑인 Virin GKB를 개발하여 시판하고 있는 것으로 알려져 있다(福原 1979). 이와 같은 현실에서, 한국에 주로 분포하고 있는 *P. rapae* GV의 形態 및 병원성을 *P. brassicae* GV와 비교분석하여 GV를 이용한 微生物農藥開發의 기초자료로 활용할 수 있는 결과를 얻었다.

재료 및 방법

실험재료

실험용 배추흰나비는 수원 근교 배추밭에서 채집한 유충을 網飼育裝置($50 \times 50 \times 100$ cm)로 사육하여 번데기를 自然光條件에서 羽化시켜 나비에 5% 설탕물을 제공하면서 採卵시켜 얻은 알을 자연조건에서 부화시켜 繼代飼育한 것을 실험곤충으로 이용하였으며, *P. rapae* GV는 1983년 수원 근교 배추밭에서 바이러스 羅病蟲으로 간주되는 배추벌레(그림 1)를 모아 電子顯微鏡으로 관찰, 확인하여 분리, 증식시킨 것을, *P. brassicae* GV는 美農務省 農業技術研究所(USDA/ARS, Beltsville) J. Adams박사로부터 분양받은 것을 실험에 사용하였다.

정 제

바이러스 封入體의 정제는 Brown 등(1977)의 방법에 준하여 그림 2와 같이 실시했다. 즉 GV 감염유충을 약 10배(W/V)의 0.05M Tris-HCl완충액(pH 7.2)에 넣고 마쇄기로 마쇄하여 二重기아제로 여과한 浮遊液을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 그 上澄液을 취하여 12,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 침전물을 얻어 그것을 Tris-HCl완충액(pH 7.2)으로 부유시켜 40~60% 蔗糖密度勾配에 重層하여 초원심분리기(日立 SCP55H)의 SPR-28SA rotor를 사용하여 25,000 g로 4℃, 40분간 원심분리



Fig. 1. Symptom of *P. rapae* larva infected with a granulosis virus.

하였다.

바이러스입자의 분리정제도 그림 2와 같이, 정제된 바이러스 封入體를 알칼리용액(0.1M Na₂CO₃, 0.01M EDTA, 0.17M NaCl; pH 10.9) 4 ml에 부유시켜 37°C에서 30분간 처리하였다. 처리 후 30~60% 蔗糖密度勾配에 重層하여 초원심분리기로 52,000 g에서 4°C, 2시간 원심분리하였다. 또한 nucleocapsid는 정제된 바이러스입자를 4 ml의 2% NP40에 부유시켜 37°C에서 30분간 처리한 후 20,000 rpm에서 1시간 원심분리하여 침전시켜 標品을 얻었다.

전자현미경 관찰

封入體의 전자현미경 관찰은 formvar를 입힌 grid에 봉입체 부유액을 떨어뜨려 말린 후, 2% phosphotungstic acid로 negative염색하여 透過電子顯微鏡(日立 HU11-EA型)으로 관찰하였다. 한편 封入體 일부는 親水化한 alumi-

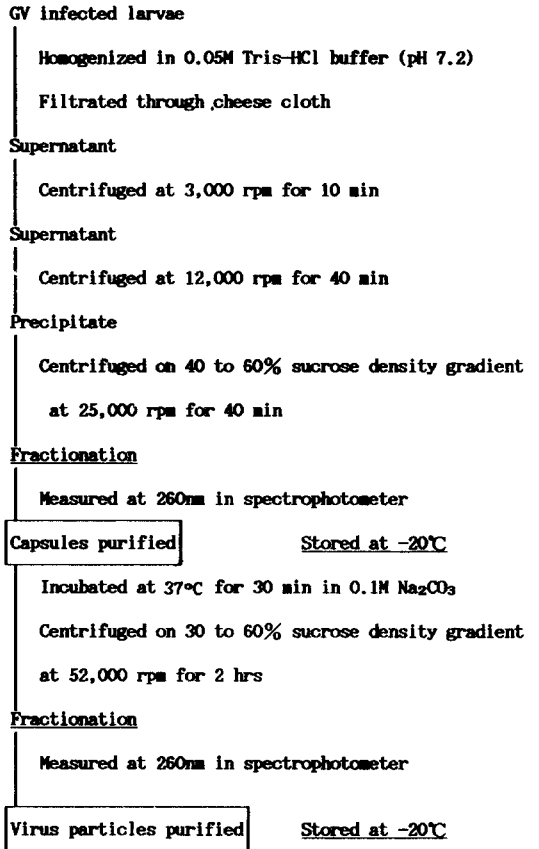


Fig. 2. Purification procedure for capsules and virus particles of *P. rapae* and *P. brassicae* granulosis viruses.

anium foil에 봉입체 부유액을 떨어뜨려 金蒸着 후 走査電子顯微鏡(日立 S-570型)으로 그 형태를 관찰하였다.

정제된 봉입체의 내부구조는 농축된 封入體를 Eppendorf tube에 넣어 원심분리(20,000 rpm, 30분)한 후, 1.6% paraformaldehyde와 3% glutaraldehyde가 함유된 0.1M sodium cacodylate 완충액으로 충분히 세척한 후, 동완충액으로 만든 1% osmium tetroxide로 2차 고정하였다. 그후 50, 70, 90, 100%의 에탄올 및 아세톤으로 탈수, Epon樹脂(Epon812)에 包埋, LKB-Ultratome(Sorval MT-2)으로 超薄切片을 만들어 전자현미경으로 관찰하였다.

병원성 검정

병원성검정은 계대사육 유충을 자연조건에서 網飼育裝置(50 × 50 × 100 cm)로 사육한 3령 유충에 바이러스를 접종하였다. 정제된 봉입체를 280 nm에서 흡광도 2.60으로 조정된 것을 원액으로하여 triton X-100이 0.01% 첨가된 증류수를 사용하여 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 4개 농도로 희석, 접종액을 준비하여 약 10 cm²의 양배추잎에 200 ul를 도달하여 음전한 후 이것을 20두의 실험유충에 24시간 접종하였다. 접종후 부터는 신선한 양배추잎을 급여하면서 27°C로 사레에서 사육하였으며, 매일 오전 10시에 病死蟲을 조사하였다.

결과 및 고찰

바이러스 정제

봉입체 바이러스입자를 蔗糖密度勾配 초원심

분리법에 의해서 分離하여 吸光度를 측정 한 결과, 그림 3, 4에서와 같이 봉입체의 경우, 31개

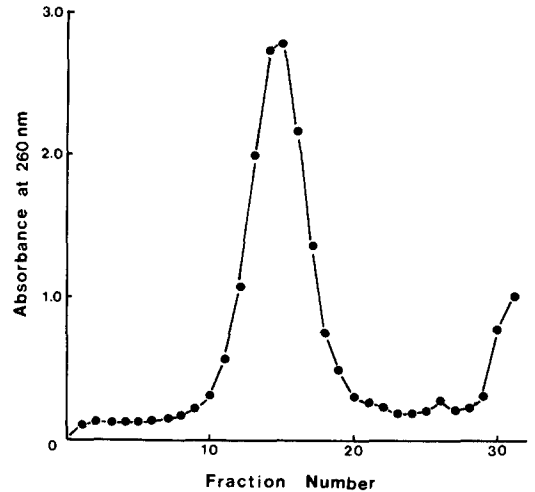


Fig. 3. A typical absorbance pattern of granulosis capsules of *P. rapae* GV after sucrose density gradient centrifugation.

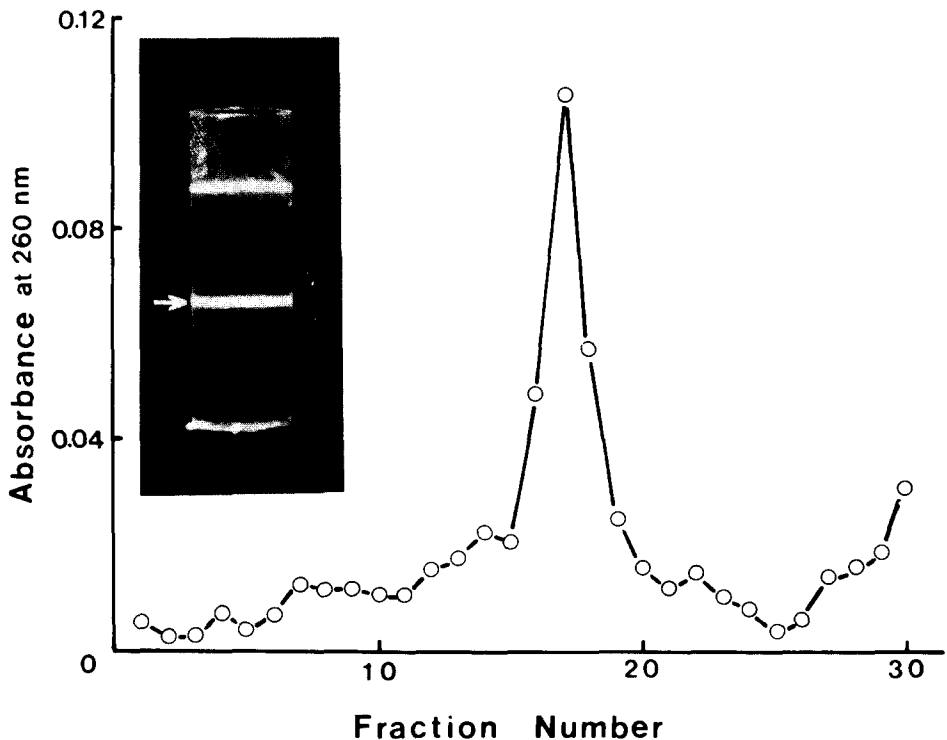


Fig. 4. An absorbance pattern of *P. rapae* granulosis virus through 30-60% sucrose density gradient centrifugation with purified virus particle band shown in the inlet.

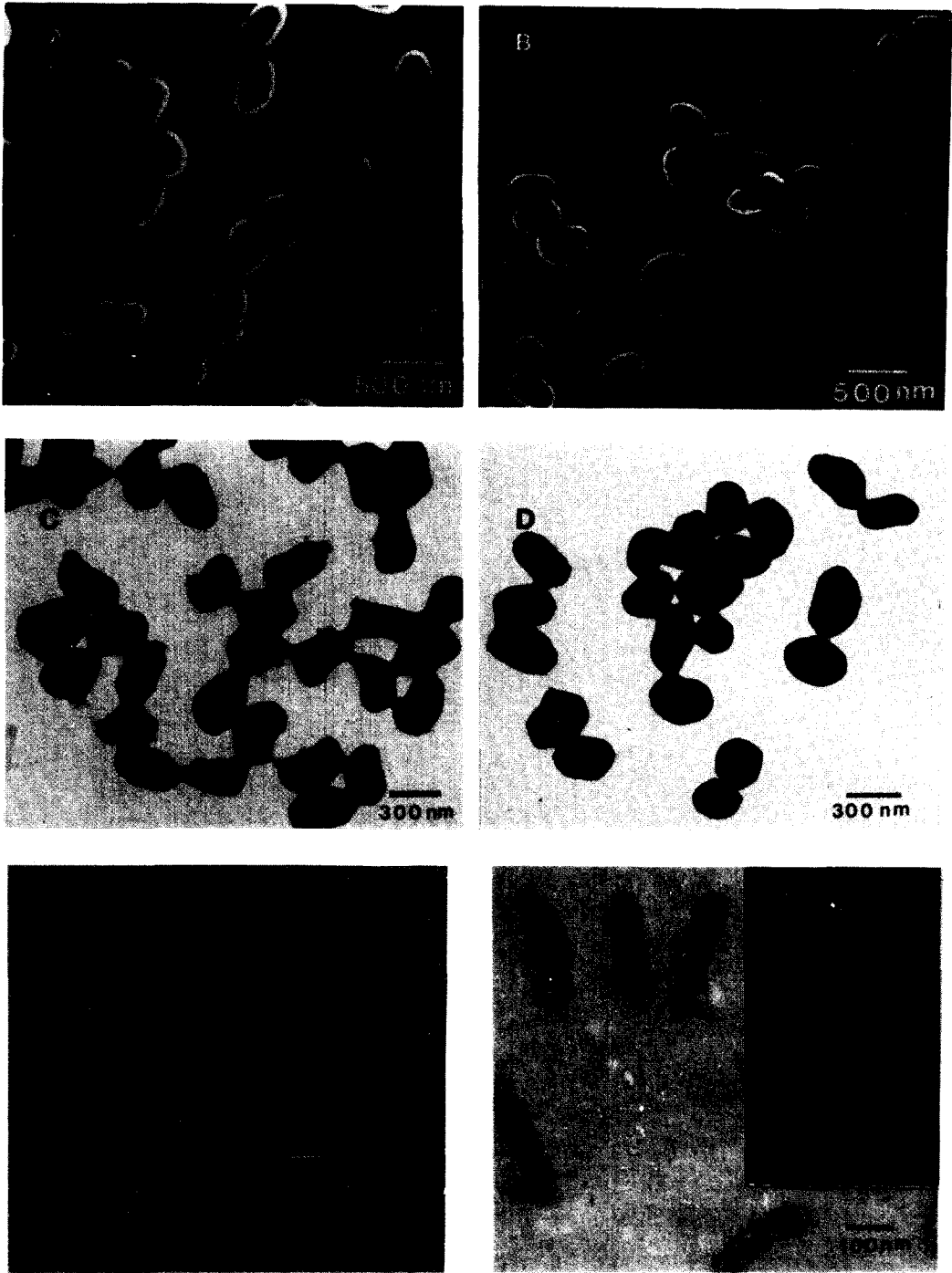


Fig. 5. Electron micrographs of the components of *P. brassicae* and *P. rapae* granulosis viruses. A, B : Capsules of *P. rapae*(A) and *P. brassicae* (B) with SEM, C, D : Negatively stained capsules of *P. rapae*(C) and *P. brassicae* (D) E, F : Virus particles of *P. rapae*(E). and *P. brassicae* (F) : note the banana shape of the particles, G, H : Nucleocapsids of *P. rapae*(G) and *P. brassicae* (H).

분획중 시험관번호 14, 15에서, 바이러스 입자의 경우는 30개 분획중 시험관번호 17에서 좌우대칭의 단일 peak가 각각 나타났으며, 또한 peak에 대한 base line이 상대적으로 매우 낮았다.

한편 Crook(1981)는 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV 封入體의 정제를 40~60% 蔗糖密度勾配遠心法(50,000 g, 1시간)으로, 바이러스 입자의 경우에 있어서는 Brown 등(1977)은 10~60% 蔗糖密度勾配遠心法(75,000 g, 45분)을 이용하여 정제하였다고 보고하였다. 본 시험의 경우 봉입체에서 40~60% 蔗糖密度勾配遠心法(25,000 g, 40분), 바이러스 입자의 경우 30~60% 蔗糖密度勾配遠心法(52,000 g, 2시간)과 이들의 보고와는 원심속도와 시간에서 상당히 차이가 있었다.

원심조건의 차이는 숙주에 따른 봉입체의 크기차이라 추측되어, 이 실험결과에서 보면, peak가 좌우대칭이고, base line이 낮으며 또한 전자현미경의 관찰결과에서 불순물이 전혀 없는 것 등으로 보아 그 순도는 매우 높았다.

바이러스의 형태 및 크기

정제된 바이러스의 크기와 형태를 조사하기

위해서 走査 및 透過電子顯微鏡으로 각각 관찰한 결과(그림 5), 走査電子顯微鏡 관찰에 의한 봉입체의 외부형태는 타원형이 대부분이었으나, 드물게는 부정형이 혼재되어 있으며, 봉입체의 크기는 *P. rapae* 및 *P. brassicae* GV에서 거의 비슷하게 나타났다(그림 5, 표 1). 한편 투과전자현미경 관찰에 의한 봉입체의 형태는 주사전자현미경의 경우와 거의 동일하고 봉입체의 크기는 *P. rapae* GV의 경우 $396 \pm 38 \times 238 \pm 25$ nm, *P. brassicae* GV는 $375 \pm 40 \times 255 \pm 28$ nm로서 주사전자현미경에 의한 크기보다 다소 작았는데(그림 5, 표 1), 이는 주사전자현미경 관찰을 위한 시료제작시에 금을 증착하기 때문인 것으로 추측된다.

바이러스입자의 형태는 일반적으로 桿狀으로서, 크기는 *P. rapae* GV의 경우는 $250-275 \times 63-73$ nm이고, *P. brassicae* GV는 225×29 nm로서 거의 동일 하였다. Brown 등(1977)은 *P. brassicae* GV의 봉입체 바이러스 입자 및 nucleocapsid의 크기를 각각 359×200 nm, 238×74 nm, 292×32 nm이라 하였으며, 何久(1971)는 *P. rapae* GV의 봉입체 크기를 473×373 nm로 보고하였다.

봉입체 크기에 있어서 *P. rapae*와 *P. brassicae*

Table 1. Physical dimensions(nm) of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae* (Pb) granulosis viruses components

| Component | Method | Pr GV | Pb GV |
|-----------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Intact capsules | SEM | $430 \pm 34 \times 274 \pm 27$ | $417 \pm 47 \times 262 \pm 31$ |
| | Negative staining | $396 \pm 38 \times 238 \pm 25$ | $375 \pm 40 \times 255 \pm 28$ |
| Virus particles | Negative staining | $250 - 275 \times 63 - 73$ | $243 - 250 \times 63 - 75$ |
| Nucleocapsids | Negative staining | 225×31 | 225×29 |

GV의 차이는 숙주의 차이에서 나타나는 것으로 생각되며 크기의 편차도 원래의 숙주가 아닌 *P. brassicae* GV에서 더 크게 나타났다. 바이러스 입자와 nucleocapsid의 경우 본 실험에서는 차이가 없었으나, Brown 등(1977)의 보고와 큰 차이를 나타낸 것은 *P. brassicae* GV경우 본 실험에서는 숙주를 *P. rapae*로 하여 증식하였기 때문으로 간주된다.

정제된 봉입체 내부에는 하나씩의 nucleoca-

psid가 들어있는 정상인 것만이 관찰되었고(그림 7), 이는 Brown 등(1977)의 보고와 일치하며 조직내에서 가끔 관찰되는 異常形封入體는 정제 시 밀도의 차이때문에 peak에서 제외되어 관찰되지 않은 것으로 생각된다.

바이러스의 병원성

2종의 배추흰나비(*P. rapae*, *P. brassicae*) 각각의 GV는 상호 교차감염이 일어난다는 보고

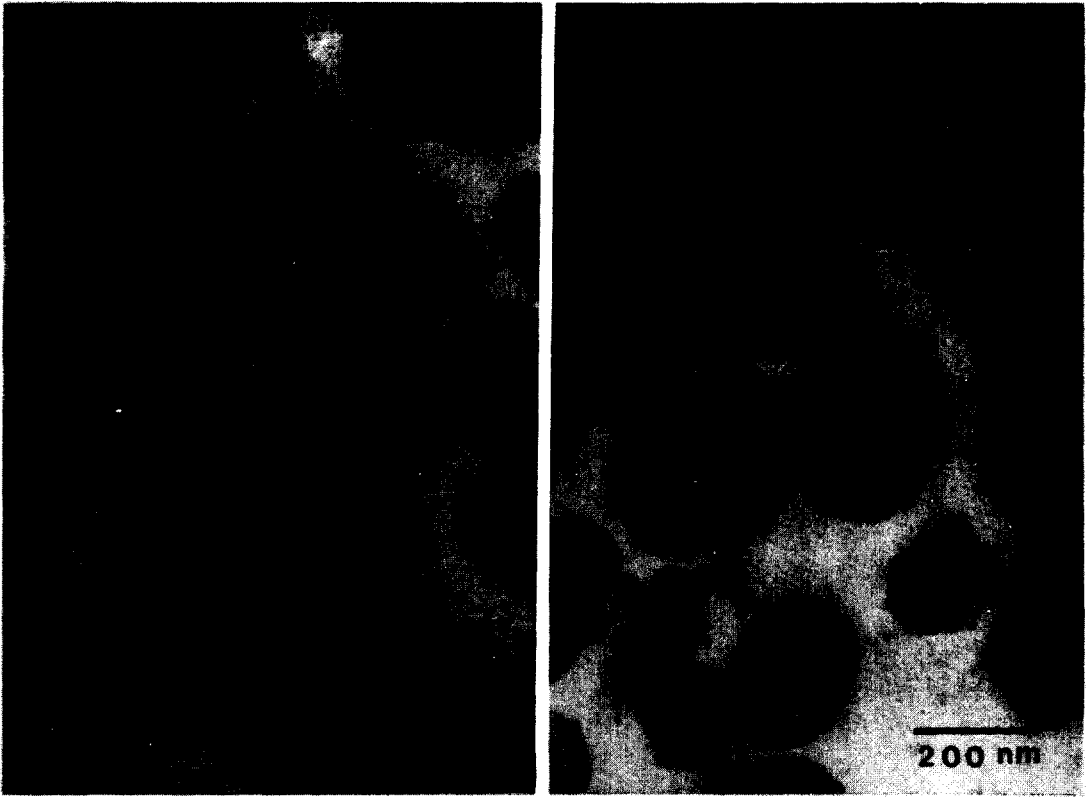


Fig. 6. Thin section of *P. rapae* (Pr) and *P. brassicae* (Pb) GV granules showing virus particles enclosed.

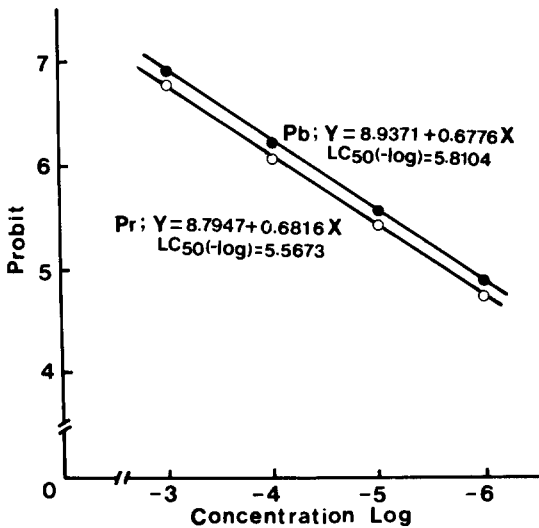


Fig. 7. Regression equation for mortality against 3rd instar *P. rapae* larvae infected with *P. brassicae* (Pr) and *P. brassicae* (Pb) granulosis viruses.

(Kelsey 1958, Smith 1967)에 따라 본 실험에서는 근연종이긴 하지만 숙주가 서로 다른 이들 두 GV의 병원성을 검정하기 위하여 *P. rapae* 유충을 숙주로 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV을 접종한 결과, *P. rapae* GV의 경우는 4일 후부터 病死蟲이 나타나기 시작하여 5일 후에 정점에 달하고 저농도에서는 6일 후에 病死蟲이 발생하였으며 *P. brassicae* 에서도 4일 후에 病死蟲이 나타나기 시작하여 5일 후에 정점에 달하였다.

死蟲率을 Finney(1971)의 방법에 따라 probit analysis한 결과, 회귀방정식은 *P. rapae* GV에서는 $Y = 8.7947 + 0.6816X$, *P. brassicae* GV에서는 $Y = 8.9371 + 0.6776X$ 를 보였다(그림 8). *P. rapae* GV의 $LC_{50}(-\log)$ 値는 5.5673, *P. brassicae* GV는 5.8104로서 *P. brassicae* GV가 *P. rapae* GV보다 병원성이 약간 강하게 나타났으며, LT_{50} 은 10^{-6} 농도에서 *P. rapae* GV의

Table 2. Median lethal time(LT₅₀) value of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae* (Pb) granulosis viruses tested against 3rd instar larvae of *P. rapae*

| Virus | Inoculum | LT ₅₀ (days) | Slope(b) | Intercept | 95% Fiducial limits | | X ² | df |
|-------|------------------|----------------------------|----------|-----------|---------------------|-------|----------------|----|
| | | | | | Lower | Upper | | |
| Pr GV | 10 ⁻³ | 4.72 | 11.2802 | -2.6032 | 4.28 | 5.08 | 0.8855 | 2 |
| | 10 ⁻⁴ | 5.38 | 6.0929 | 0.5465 | 4.59 | 6.03 | 2.2819 | 3 |
| | 10 ⁻⁵ | 6.19 | 7.3896 | -0.8517 | 5.59 | 7.36 | 0.5035 | 2 |
| | 10 ⁻⁶ | 8.17 | 4.2231 | 1.1454 | 6.81 | 19.45 | 0.9809 | 3 |
| Pb GV | 10 ⁻³ | 5.00 | 15.2242 | -5.6470 | 4.66 | 5.32 | 1.0036 | 2 |
| | 10 ⁻⁴ | 5.52 | 11.0952 | -3.2393 | 5.14 | 5.93 | 0.1479 | 2 |
| | 10 ⁻⁵ | 5.98 | 8.6149 | -1.6963 | 5.52 | 6.65 | 0.5274 | 2 |
| | 10 ⁻⁶ | 7.61 | 4.8149 | 0.7553 | 6.69 | 10.26 | 1.7995 | 3 |

경우 8.17일, *P. brassicae* GV는 7.16일로 *P. brassicae* GV가 비교적 빠른罹病을 보였다(표 2).

배추흰나비 GV의 병원성은 숙주에 따라서 상당한 차이를 보이고 있다. Crook(1981)와 Payne(1981)은 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV에 대한 병원성(LC₅₀)시험에서 *P. brassicae*를 숙주로 했을 경우 *P. rapae* GV는 $>5 \times 10^8$, *P. brassicae* GV는 5.9×10^5 , *P. rapae*를 숙주로 했을 경우 *P. rapae* GV는 3.7×10^2 , *P. brassicae* GV는 2.0×10^2 으로 *P. brassicae*를 숙주로 했을때는 약 1,000배 정도 *P. brassicae* GV가 병원성이 높았으며, *P. rapae* 숙주인 경우는 거의 비슷한 병원성을 갖는다고 보고하였다.

본 실험에서는 실험곤충의 미확보로 *P. brassicae*를 숙주로 한 병원성 검정은 할 수 없었으나 *P. rapae*를 숙주로 한 경우는 이들의 보고와 같은 경향임을 알 수 있었다.

인용문헌

阿久津 喜作 1971. 顆粒病ウイルスによるモシロチヨウ幼蟲の防禦. 應動昆. 15(2) : 56~62.
 淺山 哲 1975a. コナが顆粒病ウイルスの成熟過程. 應動昆. 19 : 149~156.
 Brown, D.A., H.M. Bud & D.C. Kelly. 1977. Biophysical properties of the structural components of a granulosis virus isolated from the cabbage white butterfly(*Pieris brassicae*). Virology 81 : 317~327.

Crook, N.E. 1981. A comparison of the granulosis viruses from *Pieris brassicae* and *Pieris rapae*. Virology 115 : 173~181.
 David, W.A.L. 1978. The granulosis virus of *Pieris brassicae*(L) and its relationship with its host. Advan. Virus Res. 22 : 111~161.
 Finney, D.J. 1971. Probit analysis. pp.333 Cambridge Univ. press, Cambridge.
 福原 敏彦. 1979. 昆蟲病理學, p.165 學會出版センター. 東京.
 Kawamoto, F., C. Suto, N. Kumada & M. Kobayashi. 1977. Cytoplasmic budding of a nuclear polyhedrosis virus and comparative ultrastructural studies of envelopes. Microbiol. Immunol. 21 : 255~265.
 Kelsey, J.M. 1957. Virus sprays for control of *Pieris rapae* L. N. Z. Jl. Sci. Technol. A 38 : 644~646.
 Kelsey, J.M. 1958. Control of *Pieris rapae* by granulosis virus. N. Z. Jl. Agric. Res. 1 : 778~782.
 北島 鐵雄. 1938. モシロチヨウ(*Pieris rapae crucivora* BOISIDUVAL)幼蟲の脂肪病に就て. 鹿兒島高農學報 13 : 111~116.
 Paillot, A. 1926. Sur une nouvelle maladie du noyau au grasserie des chenilles de *P. brassicae* et an nouveau groupe de microorganismes parasites. Compt. Rend. 182 : 180~182.
 Payne, C.C., G.M. Tatchell & C.F. Williams. 1981. The comparative susceptibilities of *Pieris brassicae* and *P. rapae* to a granulosis virus from *P. brassicae*. J. Invertebr. Pathol. 38 : 273~280.
 Smith, K.M. 1967. Insect virology. pp. 256 Academy Press, New York.
 Smith, K.M. & C.F. Rivers. 1956. Some viruses effecting insects of economic importance. Parasitology 46 : 235~242.
 Tanada, Y. 1953. Applied insect pathology in Hawaii. Hawaii Fm. Sci. 2 : 7~8.

Thompson, C.G. 1951. A granulosis of the imported cabbage worm. J. Econ. Ent. 44 : 255.
Wilson, F. 1960. The effectiveness of a granulosis

virus applied to field populations of *Pieris rapae* (Lepidoptera). Aust. J. Agric. Res. 2 : 485~497.
(1991년 3월 30일 접수)