

멸구과 8종의 ITS2 DNA 염기서열 비교 분석과 고리매개등온증폭법(LAMP)을 이용한 벼멸구 특이 진단법

서보윤* · 박창규 · 고영호¹ · 정진교² · 조점래 · 강찬영

국립농업과학원 작물보호과, ¹한림대학교 일송생명과학연구소, ²국립식량과학원 재배환경과

ITS2 DNA Sequence Analysis for Eight Species of Delphacid Planthoppers and a Loop-mediated Isothermal Amplification Method for the Brown Planthopper-specific Detection

Bo Yoon Seo*, Chang Gyu Park, Young-Ho Koh¹, Jin Kyo Jung², Jumrae Cho and Chanyeong Kang

Crop Protection Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

¹Ilson Institute of Life Science, Hallym University, Anyang 14066, Korea

²Crop Cultivation and Environment Research Division, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea

ABSTRACT: Estimates of evolutionary sequence divergence and inference of a phylogenetic tree for eight delphacid planthopper species were based on the full-length nucleotide sequence of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region. Size of the ITS2 DNA sequence varied from 550 bp in *Sogatella furcifera* to 699 bp in *Nilaparvata muii*. Nucleotide sequence distance ($d \pm S.E.$) was lowest between *N. muii* and *N. bakeri* (0.001 ± 0.001), and highest between *Ecdelphax cervina* and *Stenocranus matsumurai* (0.579 ± 0.021). Sequence distance between *N. lugens* and other planthoppers ranged from 0.056 ± 0.008 (*N. muii*) to 0.548 ± 0.021 (*S. matsumurai*). In the neighbor-joining phylogenetic tree, all planthoppers were clustered separately into a species group, except *N. muii* and *N. bakeri*. The ITS2 nucleotide sequence of *N. lugens* was used to design four loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer sets (BPH-38, BPH-38-1, BPH-207, and BPH-92) for *N. lugens* species-specific detection. After the LAMP reaction of three rice planthoppers, *N. lugens*, *S. furcifera*, and *Laodelphax striatellus*, with the four LAMP primer sets for 60 min at 65°C, LAMP products were observed in the genomic DNA of *N. lugens* only. In the BPH-92 LAMP primer set, the fluorescence relative to that of the negative control differed according to the amount of DNA (0.1 ng, 10 ng, and 100 ng) and incubation duration (20 min, 30 min, 40 min, and 60 min). At 65°C incubation, the difference was clearly observed after 40 min with 10 ng and 100 ng, but with a 60-min incubation period, the minimum DNA needed was 0.1 ng. However, there was little difference in fluorescence among all DNA amounts tested with 20 or 30 min incubations.

Key words: Planthoppers, *Nilaparvata lugens*, ITS2, Nucleotide sequence divergence, LAMP

초 록: 멸구과(Delphacidae) 8종의 internal transcribed spacer 2 (ITS2) DNA 염기서열로 종간 차이 추정값을 비교하고 분자계통수를 추론하였다. ITS2 DNA 염기서열 길이는 종(species)마다 550 bp (흰등멸구)에서 699 bp (겨울멸구)까지 차이를 보였다. 같은 *Nilaparvata* 속의 겨울멸구와 벼멸구붙이 사이의 염기서열 차이 추정값($d \pm S.E.$)은 0.001 ± 0.001 로 가장 낮았으며, 사슴멸구와 일본멸구 사이는 0.579 ± 0.021 로 가장 높았다. 벼멸구와 다른 멸구류들과의 종간 염기서열 차이 추정값은 0.056 ± 0.008 (겨울멸구)에서부터 0.548 ± 0.021 (일본멸구)로 구분되었다. 반면, Neighbor-joining 방법으로 추론된 분자계통수에서는 겨울멸구와 벼멸구붙이를 제외하고 나머지 멸구류들은 독립된 다른 그룹으로 분리되었다. 벼멸구의 ITS2 염기서열을 참고하여 벼멸구 특이 고리매개등온증폭(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 프라이머 4 세트(BPH-38, BPH-38-1, BPH-207 및 BPH-92)를 제작하였다. 이들 각각을 벼멸구, 흰등멸구 및 애멸구의 게놈 DNA와 65°C에서 60분간 반응시켰을 때, 벼멸구 시료에서만 증폭 산물들이 관찰되었다. BPH-92 LAMP 프라이머 세트로 65°C에서 벼멸구 DNA의 양(0.1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng)과 반응시간(20분, 30분, 40분, 60분)을 달리하여 형광반응을 관찰하였을 때, 20분과 30분 반응에서는 100 ng 까지에서도 발광여부 구별이 어려웠다. 그러나 40분 반응에서는 10 ng 이상에서, 60분 반응에서는 0.1 ng 이상에서 발광여부가 명확히 구별되었다.

검색어: 멸구류, 벼멸구, ITS2, 염기서열 차이, 고리매개등온증폭

*Corresponding author: seoby@korea.kr

Received September 11 2017; Revised October 18 2017

Accepted November 8 2017

벼멸구 [*Nilaparvata lugens* (Stål)]는 노린재목 멸구과 (Hemiptera: Delphacidae)에 속하는 몸 길이 5 mm 이하의 소형 곤충으로 주로 벼(*Oryza sativa*)가 재배되는 아시아와 오세아니아 지역에 분포한다(Wilson and Claridge, 1991). 우리나라에서 벼멸구가 월동하지 못하고 해마다 6월 중순부터 7월 하순 사이에 장시형 성충이 기류를 타고 비래 해와 생육중인 벼에 피해를 주고 있다(Uhm et al., 1988). 벼멸구는 벼의 체관부 수액을 직접 빨아먹고 대발생할 경우 벼를 집중고사(hopperburn)시키는 큰 피해를 주는 벼의 주요해충이다(Sogawa, 1982; Wilson and Claridge, 1991; Seo et al., 2009). 우리나라에서는 벼멸구가 전라남도도와 경상남도 등 서남부지역에서 주로 발생하는데 벼멸구 발생면적(ha)이 최근 20년 동안 1998년(164,577.80), 2013년(104,599.36), 2005년(90,500.40), 그리고 2006년(62,279.20) 순으로 넓었으며 2005년에는 집중고사 피해가 있었다(Fig. 1). 베트남 남부 벼 재배지역에서는 2005~2006년에 벼멸구에 의해 RRSV (rice ragged stunt virus)와 RGSV (rice grassy stunt virus)의 매개로 두 바이러스에 복합감염된 벼에서 “엘로우신드롬” 피해를 입어 약 1억 2천만 달러(\$) 상당의 경제적 손실이 있었다(Cabauatan et al., 2009).

우리나라에서는 벼멸구 등 벼 해충 발생정보를 전국에서 운영하고 있는 예찰포와 관찰포에서 지역의 예찰담당자들을 통해 체계적으로 수집하고 신속하게 공유하고 있다(Kim et al.,

2002). 그러나 예찰포에 설치된 유인등에서 매일 논 주변 벼과 잡초에서도 유인되어 잡히는 벼멸구 외 다른 유사한 30여 종의 크기가 작은 멸구류들에서 벼멸구를 정확하게 동정하기 쉽지 않다(Kim et al., 2002). 일부 지역에서는 벼멸구로 보고된 개체의 95%가 벼멸구가 아닌 다른 종으로 잘못 동정된 사례도 있었다(Recitation of Uhm and Han, 2000 by Kim et al., 2002). 이를 보완하고자 비전문가를 대상으로 논에 설치된 유인등 채집 멸구류의 정확한 동정을 돕기 위해 하이퍼텍스트 기반의 검색표를 개발하였으나 벼멸구 동정 효율을 높이지는 못하였다(Kim et al., 2002). 농촌진흥청에서는 매년 시·군 농업기술센터의 예찰 업무 담당자 및 관련 공무원을 대상으로 “병해충진단과정”을 통해 벼 멸구류 형태 구별을 위한 실습교육을 실시하고 있다. 병해충을 전공하지 않았고 해부현미경 작동 등 경험이 부족한 예찰 담당자가 유인등에 대량으로 채집된 멸구류에서 형태적 동정이 어려운 벼멸구를 구별하기 쉽지 않아 업무 부담이 가중되는 실정이다. 실험실 및 현장에서 형태적 동정을 보완해 줄 수 있는 간편하고 정확한 분자동정 기술이 요구된다.

생물의 DNA 유전정보를 활용한 중합효소연쇄반응(PCR)은 높은 민감도(sensitivity, >10 copies)와 특이성(specificity)으로 분자동정에 널리 활용되고 있으며, 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(elongation) 과정의 반복을 위해 정확한 온도와 시간 설정이 가능한 고가의 PCR 장비가 요구된다

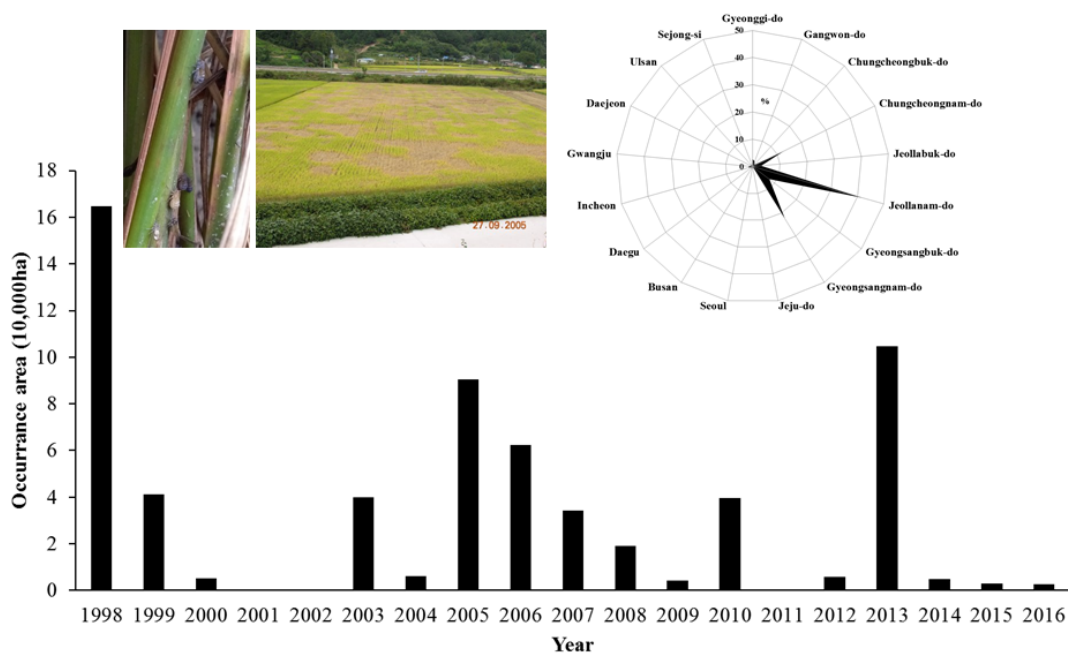


Fig. 1. Occurrence area of *Nilaparvata lugens* in Korea from 1998 to 2016. Left two inner pictures show the infestation of rice plants by a few *N. lugens* adults, and severe hopperburn damage by the outbreak of *N. lugens* in the paddy field in 2005. The right inner graph shows the percent distribution of the cumulative occurrence area of *N. lugens* in 17 regions of Korea from 2008 to 2016. Data were downloaded from NCPMS (National Crop Pest Management System) (<http://ncpms.rda.go.kr>).

(Nagamine et al., 2002). 등온조건에서 1시간 이내 반응으로 PCR과 유사한 민감도와 특이성을 갖는 고리매개등온증폭법 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)은 Notomi et al. (2000)에 의해 개발된 타켓 핵산 (DNA 또는 RNA)을 증폭할 수 있는 기술이다. 고리매개등온증폭을 위해서는 1) 두 개의 타켓 핵산 특이 프라이머 세트(외부 프라이머 세트: F3와 B3, 내부 프라이머 세트: FIP와 BIP), 2) *Bst* DNA 중합효소, 3) 반응용액, 4) 타켓 DNA가 기본적으로 필요하다. 내부 프라이머 FIP와 BIP는 스스로 고리가 만들어지도록 디자인되는데, 외부 프라이머인 F3와 B3 사이 영역 양쪽에서 각각 타켓 DNA의 서로 다른 두 개 지점에서 sense와 antisense 시퀀스를 참조하여 구성한다(예: FIP = F1c-F2, BIP = B1c-B2). 중합효소연쇄반응 (PCR)과 달리 변성(denaturation) 과정이 없고 접합(annealing) 과 신장(elongation) 과정을 60~65 °C의 등온조건에서 30~60 분간 유지하고 형광반응 또는 전기영동 등을 통해 증폭 결과를 확인할 수 있다. 추가적으로 F1과 F2 사이와 B1과 B2 사이 염기서열을 기반으로 제작된 Loop primer (LF와 BF)를 사용하면 증폭시간을 1/2 단축할 수 있는 효과가 있다(Nagamine et al., 2002). LAMP방법은 PCR방법보다 단기간에 저렴한 비용으로 분석이 가능하고 non-target DNA와 PCR inhibitors (혈액, 혈청, 음식물 성분 등)가 오염된 조건에서도 안정적으로 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다(Njiru, 2012; Zhang et al., 2014). LAMP 기술은 시료 준비 과정에서 원심분리 없이 신속하고 단순하게 진행될 수 있도록 개발되고 있으며, LAMP 결과를 확인하는 방법도 점진물 육안 검출에서 형광 실시간 검출 등 다양하게 개발되고 있고 현장에서 활용할 수 있도록 개선되고 있다(Njiru, 2012; Mori et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Bonizzoni et al. (2009)은 28S와 18S 리보솜 RNA 사이의 IGS (intergenic spacers) 영역을 이용하여 학질모기아과의 *Anopheles gambiae*와 *A. arabiensis*, 각각의 종(species) 특이 LAMP 프라이머를 제작하고 LAMP 반응을 수행한 결과, 기존의 PCR방법 대비 93~100% 민감도로 두 종을 특이적으로 구별할 수 있었다. Dickey et al. (2013)은 담배가루이[*Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae)] 중복합군(species complex)의 미토콘드리아 시토크롬 옥시다아제 I (mt COI) DNA 시퀀스 변이를 이용하여 미국 플로리다의 외래 침입 은밀종(cryptic species)인 MEAM1 (the Middle-East Asia Minor 또는 Biotype B)의 LAMP 특이 프라이머를 제작하고 LAMP 증폭효과를 다른 은밀종들과 비교하였다. 그 결과 담배가루이와 다른 종인 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*) 등 10종의 가루이(whitefly)와 Mediterranean (MED 또는 Biotype Q) 등 국내의 8종의 담배가루이 중복합군 은밀종에서는 LAMP 증폭이 없었고 미국

플로리다의 외래 침입 담배가루이 은밀종인 MEAM1을 증폭할 수 있어 미국에서 MEAM1을 특이적으로 구별하는데 활용될 가능성을 제시하였다(Dickey et al., 2013).

본 연구에서는 벼멸구(*N. lugens*), 겨울멸구(*N. muiroi*), 벼멸구붙이(*N. bakeri*), 북방멸구(*Changeondelphax velitchkovskiyi*), 흰등멸구(*Sogatella furcifera*), 애멸구(*Laodelphax striatellus*), 사슴멸구(*Ecdelphax cervina*) 및 일본멸구(*Stenocranus matsumurai*)로부터 핵내 리보솜 RNA 영역 ITS2 (Internal transcribed spacer 2)의 시퀀스를 해독하고 군외군(outgroup)으로 미국선녀벌레(*Metcalfa pruinosa*) (Hemiptera: Flatidae)와 톱다리개미허리노린재(*Riptortus pedestris*) (Hemiptera: Alydidae)의 ITS2 DNA 시퀀스를 함께 비교하였으며, 종(species) 간 뉴클레오티드 차이와 고리매개등온증폭(LAMP) 기술을 통해 흰등멸구와 애멸구로부터 벼멸구를 특이적으로 구별할 수 있는 방법을 보고한다.

재료 및 방법

실험군총

본 연구에 사용된 멸구과(겨울멸구, 벼멸구붙이, 북방멸구, 사슴멸구 및 일본멸구) 5종은 벼 예찰포에 설치된 유인등에 채집되어 국립농업과학원에서 형태 동정을 하였다(채집지역과 채집연도 미상). 벼멸구, 애멸구 및 흰등멸구 3종은 논에서 흡충기로 채집하여 국립농업과학원 곤충사육실에서 벼의 어린 모를 먹이로 공급하면서 누대사육 중인 것을 사용하였다. 미국 선녀벌레(*M. pruinosa*)는 2013년 충청북도 청원군(36°45' N 127°28' E)에서 채집된 성충을 분석에 사용하였다.

게놈 DNA 추출 및 ITS2 영역 시퀀스 해독

멸구류 8종(species)과 미국선녀벌레로부터 게놈 DNA 추출을 위해 Seo et al. (2014)의 방법을 사용하였다. 1.5 ml tube에 20 mM NaOH (Sigma-Aldrich, U.S.A.) 용액을 넣고 곤충조직을 마쇄하고 95 °C로 가열한 후 1 M Tris-HCl 용액(pH 8.0) (BIONEER, Korea)으로 중화시키고 원심분리하여 상청액을 얻는 순으로 수행하였다. 이렇게 얻어진 게놈 DNA는 5.8S와 28S 리보솜 영역 사이의 ITS2 영역 시퀀싱을 위해 사용되었다. 한편, LAMP 반응에 사용하는 벼멸구, 애멸구 및 흰등멸구의 게놈 DNA는 CTAB extraction solution (iNtRON biotechnology, Inc., Korea)과 2-mercaptoethanol (BioPure, U.S.A.)을 이용하여 추출하였다. CTAB extraction solution 10 ml에 2-mercaptoethanol 73 µl를 섞어 CTAB 추출 용액을 만들어 1.5 ml tube에 200 µl

를 넣고 한 개체를 마쇄하였다. 65°C 에서 1시간 동안 가열 시킨 후 chloroform/IAA (iNtRON biotechnology, Inc., Korea) 200 µl을 넣고 vortex하고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 새 1.5 ml tube로 옮기고 isopropyl alcohol (BioPure, U.S.A.) 100 µl와 잘 섞어 침전이 일어나도록 상온에서 20분간 보관 후 4°C 조건에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리를 하였다. 이후 70% EtOH을 이용하여 washing 후 멸균된 3차 증류

수 20 µl에 녹이고 RNase A (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) 1 µl를 넣어 30분간 상온에 놓아 둔 후 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.)을 이용하여 추출된 게놈 DNA 양을 측정하였다.

멸구류의 ITS2 영역 뉴클레오티드 시퀀스 정보를 얻기 위해 보존형 PCR 프라이머 ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGC AGC-3')와 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')가 사

Table 1. Mean distance ($d \pm$ S.E.) of the ITS2 region among planthoppers collected using a light trap or aspirator in a paddy field

	Species (Korean name)	GenBank ID	Length (bp)	Within species [d (S.E.)]	Estimates of mean distance by ITS2 sequence										
					Between species groups [d \ S.E.]										
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	<i>Nilaparvata lugens</i> (벼멸구)	KC417466.1 AB625608.1	693 693	0.000 (0.000)		0.008	0.008	0.018	0.020	0.018	0.019	0.021	0.025	0.020	
2	<i>Nilaparvata muiri</i> (겨풀멸구 or 이삭멸구)	KC417468.1	699		0.056		0.001	0.017	0.019	0.018	0.019	0.021	0.025	0.020	
3	<i>Nilaparvata bakeri</i> (벼멸구붙이)	KC417467.1	698		0.058	0.001		0.017	0.019	0.018	0.019	0.021	0.025	0.020	
4	<i>Changeonodelphax velitchkovskyi</i> (북방멸구)	KC417473.1	611		0.303	0.297	0.297		0.020	0.017	0.020	0.021	0.027	0.021	
5	<i>Sogatella furcifera</i> (흰등멸구)	KC417469.1	550	0.002 (0.001)	0.361	0.358	0.358	0.334	0.017	0.021	0.021	0.025	0.020		
		AB625596.1	550												
		AB625597.1	550												
		AB625598.1	550												
		AB625599.1	550												
		AB625600.1	550												
		AB625601.1	550												
		AB625602.1	550												
AB625603.1	550														
AB625604.1	550														
AB625605.1	551														
AB625606.1	550														
AB625607.1	550														
6	<i>Laodelphax striatellus</i> (애멸구)	KC417472.1 AB625609.1	600 600	0.000 (0.000)	0.351	0.348	0.348	0.296	0.236		0.021	0.021	0.026	0.021	
7	<i>Ecdelphax cervina</i> (사슴멸구)	KC417471.1	628		0.484	0.479	0.479	0.444	0.470	0.444		0.021	0.027	0.022	
8	<i>Stenocranus matsumurai</i> (일본멸구)	KC417470.1	566		0.548	0.535	0.535	0.562	0.560	0.548	0.579		0.024	0.020	
9	<i>Metcalfa pruinosa</i> (미국선녀벌레)	KF268031.1	332		0.668	0.669	0.669	0.647	0.631	0.632	0.691	0.699		0.029	
10	<i>Riptortus pedestris</i> (톱다리개미허리노린재)	AB725684.1	537		0.666	0.676	0.676	0.646	0.704	0.675	0.689	0.703	0.489		

Italic bold ones in GenBank ID were newly sequenced by using the PCR-direct sequencing method in this study. As an outgroup, ITS2 regions of (9) *Metcalfa pruinosa* and (10) *Riptortus pedestris* were compared in this study.

용하였다(White et al., 1990). PCR 반응은 Inclone™ Exel TB 2X Taq Premix with dye (Inclonebiotech CO., Korea) 조성액 12.5 µl에 멸균된 3차증류수, 보존형 PCR 프라이머 ITS3와 ITS4, 각각 10 pmol, 게놈 DNA를 최종 25 µl로 만들고 잘 섞어 준 후 다음과 같이 수행하였다. 변성을 위해 95°C에서 5분간 가열한 후(변성) 94°C 30초 - (접합) 56°C 30초 - (신장) 72°C 1분을 35회 반복하고 마지막(신장) 72°C 5분을 주었다. PCR 증폭 결과는 1 × TAE 버퍼의 1% 아가로스겔에 전기영동 하여 확인하였다. 증폭된 PCR 산물의 염기서열 정보는 (주)마크로젠(Korea)에서 PCR-direct sequencing을 통해 확보하였다. 본 연구에서 해독된 멸구과(Delphacidae)의 8종(species)과 미국선녀벌레(*M. pruinosa*)의 ITS2 DNA 염기서열 정보는 NCBI GenBank 데이터베이스에 등록하였다(Table 1). 톱다리개미허리노린재(*R. pedestris*)의 ITS2 DNA 염기서열은 NCBI GenBank database에 기존 등록되어 있는 정보를 활용하였다.

염기서열차이와 분자계통 분석

NCBI GenBank에 등록된 멸구과(Delphacidae)의 ITS2 DNA 염기서열이 포함된 22개 정보와 미국선녀벌레, 톱다리개미허리노린재(*R. pedestris*)의 ITS2 DNA 염기서열이 포함된

정보로부터 리보솜 RNA 부분 염기서열을 제거하고 순수한 ITS2 DNA 염기서열 정보를 The ITS2 Database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>)의 Annotate 기능으로 제거하였다. 전체 10개 종(species)으로부터 총 24개의 ITS2 DNA 염기서열 정보를 MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013)에 내장된 CLUSTAL W 알고리즘의 기본설정 조건으로 multiple sequence alignment를 수행하였다. 이 결과는 MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013)을 통해 각 종(species) 간 또는 종(species) 내 염기서열차이분석(Mean distance)과 Neighbor-Joining 방법으로 분자계통수 분석(Phylogeny)을 수행하였다. 미국선녀벌레와 톱다리개미허리노린재는 군외군(outgroup)으로 사용하였다.

LAMP 증폭 효과 검증

벼멸구(*N. lugens*)의 ITS2 유전자(NCBI GenBank ID: KC 417466)를 바탕으로 벼멸구 유사 곤충들의 ITS2 영역 DNA 정보와 비교하여 벼멸구 특이적인 LAMP 프라이머 후보들을 PrimerExplorer V5 소프트웨어(<http://primerexplorer.jp>)를 통해 설계하고 합성하였다(Table 2).

LAMP 반응은 DNA Amplification Kit (Eiken Chemical Co., LTD., Japan)를 구입하여 제조사의 사용방법에 따라 수행

Table 2. LAMP primer sets designed in this study to discriminate *Nilaparvata lugens* from other planthopper species

LAMP set	Primer	Nucleotide sequence (5' - 3')	Size
BPH-38	F3	CAATCGAGTCTTCATATTGTGT	22
	B3	CAACAGCTTGCAGGGATG	18
	FIP	ATGACAAGCCAATGCTGAGCTGATTGGATTCCACTTTGC	39
	BIP	TGCAGTTGTGTGTTTAAATGTCTTTCAAACAACATTGAATGTAGAGC	47
BPH-38-1 ¹⁾	F3	CAATCGAGTCTTCATATTGTGT	22
	B3	CATGGAAAGGTGTATTCATCG	21
	FIP	ATGACAAGCCAATGCTGAGCTGATTGGATTCCACTTTGC	39
	BIP	TGCAGTTGTGTGTTTAAATGTCTTTCAAACAACATTGAATGTAGAGC	47
BPH-207	F3	TGATTGGATTCCACTTTGC	19
	B3	TGTATTCATCGACCAGCATG	20
	FIP	GGCATGTGCATGTCAGAGTCGACATTTGTGGGGCTCAG	38
	BIP	AGTTGAAGCCATGTTATTGTGAGTCAACAGCTTGCAGGGATG	42
BPH-92	F3	CATCCCTGCAAGCTGTTG	18
	B3	TCTGGTTTCAGCTATGAACC	20
	FIP	GTGCAAACATCTTATTTC AAGCAGCTGGTTCGATGAATACACC	44
	BIP	TTGGTCAAGCACTGTCGATGTGGAATGCAGCTTCTACAC	39
	LF	CTCTGTCAATCATTGAGCATGGAAA	25
	LB	AAATATTGCCTCCAGTGTGTGTACC	25

¹⁾Only B3 primer of the LAMP set, "BPH-38-1" is different from that of the LAMP set, "BPH-38".

하였다. PCR tube(200 μ l)에 2 \times Reaction Mix 12.5 μ l, LAMP 프라이머 혼합액(FIP 40 pmol + BIP 40 pmol + LF 20 pmol + BF 20 pmol + F3 5 pmol + B3 5 pmol) 2.5 μ l, *Bst* DNA 중합효소 1 μ l, 멸균된 3차증류수 7 μ l, fluorescent detection reagent (calcein, Eiken Chemical Co., LTD., Japan) 1 μ l를 넣고 잘 섞은 다음 1 μ l의 게놈 DNA를 마지막으로 추가하여 최종 반응액이 25 μ l가 되도록 하였다. 음성대조군 또는 fluorescent detection reagent가 없는 처리의 LAMP 반응용액에는 그 대신 동일한 양의 멸균된 3차증류수로 채워 넣어 25 μ l의 최종 반응액으로 만들었다. 그리고 65 $^{\circ}$ C 항온조건에서 60분간 보관하여 증폭시킨 후 다시 80 $^{\circ}$ C 항온조건에서 5분간 두어 중합효소의 기능을 불활성화 시키고 LAMP 결과를 확인하였다. LAMP 결과는 1% 아가로스겔(핵산 염색: RedSafeTM Nucleic Acid Staining Solution

(20,000 \times), iNtRON biotechnology, Inc., Korea)에 로딩한 후 전기영동을 통해 확인하였다. 형광을 통해 반응 결과를 확인하는 경우에는 육안 또는 청색광(blue light illuminator, 470 nm)을 이용하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 분석된 멸구과(Delphacidae) 8종의 ITS2 영역 뉴클레오티드 염기서열 길이는 종(species)마다 550 bp (흰등멸구)에서 699 bp (겨풀멸구)까지 차이를 보였다(Table 1). 벼멸구의 ITS2 길이는 693 bp로 같은 *Nilaparvata*속의 겨풀멸구(699 bp), 벼멸구붙이(698 bp)와 5-6 bp 차이를 보였으며, ITS2 전체 영역의 종간 염기서열 차이 추정값($d \pm$ S.E.)에서도 벼멸

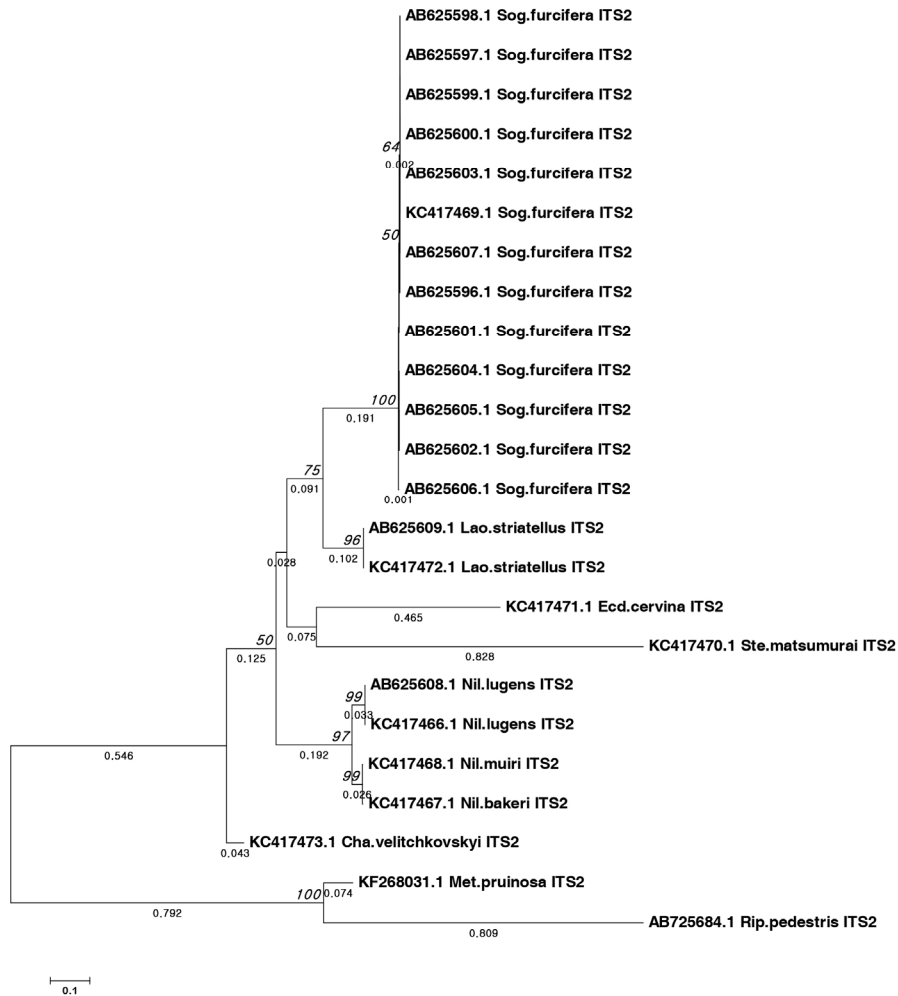


Fig. 2. Phylogenetic tree inferred using the neighbor-joining method (the sum of branch length = 4.42697072). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1500 replicates) is shown above the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths (below the branches) are in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Jukes-Cantor method and the units are based substitutions per site. The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution (shape parameter = 5).

구와 각각 0.056 ± 0.008 , 0.058 ± 0.008 로 구별되었다(Table 1). 그러나 겨풀멸구와 벼멸구붙이 사이의 ITS2 길이는 불과 1 bp 차이였으며, ITS2 전체 영역의 종간 염기서열 차이 추정값도 0.001 ± 0.001 이었다(Table 1). 이를 통해 ITS2 영역 정보만으로 겨풀멸구와 벼멸구붙이, 두 종을 구별하기는 어려울 것으로 판단된다. 본 연구에서 해독된 벼멸구(NCBI GenBank ID: KC 417466)와 애멸구(NCBI GenBank ID: KC417472)의 ITS2 영역 뉴클레오티드 염기서열은 외국에서 보고된 벼멸구(NCBI GenBank ID: AB625608)와 애멸구(NCBI GenBank ID: AB 625609)의 정보와 종내 염기서열 차이 추정 값은 0.000 ± 0.000 으로 염기서열이 모두 일치하였다(Table 1). 흰등멸구의 경우에는 ITS2 전체 영역의 뉴클레오티드 염기서열 길이가 550~551 bp로 종내 변이가 있었으며, 종내 염기서열 차이는 0.002 ± 0.001 로 매우 낮았다. 흰등멸구와 다른 멸구류들과의 염기서열 차이 중 가장 낮은 경우는 흰등멸구와 애멸구 사이로 0.236 ± 0.017 이었다. 이는 흰등멸구 종내 ITS2 염기서열 차이 추정 값보다 약 100배 이상 높았다. 흰등멸구를 제외하고 나머지 멸구류에서는 ITS2 영역의 종내 변이 정보가 부족하여 정확한 멸구류 종간 차이를 추정하기 어렵지만 1) 흰등멸구의 예에서처럼 종간 ITS2 영역의 변이가 매우 낮은 점(Hillis and Dixon, 1991)과 2) 벼멸구와 애멸구의 경우 서로 다른 지역에서 해독된 ITS2 결과가 일치하고 있다는 점을 통해 더 많은 개체들의 ITS2 정보를 비교하였을 경우에도 본 연구에서 분석된 ITS2 염기서열의 종간 차이 추정 값과 크게 다르지 않을 것으로 판단된다.

Neighbor-Joining 방법으로 추론된 분자계통수에서 균외군(outgroup)인 미국선녀벌레와 톱다리개미허리노린재를 제외하고 나머지 멸구류는 단계통군을 형성하였으며 벼멸구는 같은 *Nilaparvata*속의 겨풀멸구, 벼멸구붙이와 높은 확률로 분지되었다(Fig. 2). 이러한 결과들은 ITS2 염기서열 차이를 통해 벼멸구가 벼포장 또는 유인등에 채집되는 다른 유사 멸구류들과 구별될 수 있음을 뒷받침하였다. 그러나 겨풀멸구와 벼멸구붙이는 분자계통수에서 같은 그룹으로 분지되어 ITS2 염기서열 정보만으로 두 종이 서로 구별되지 않았다.

ITS2 염기서열을 참고하여 벼멸구 계통 DNA에서만 특이적으로 증폭하도록 설계된 LAMP 프라이머 세트 4종(BPH-38, BPH-38-1, BPH-207 및 BPH-92)을 제작하고(Table 2) 실제 벼멸구 계통 DNA에서 특이적으로 증폭효과가 있는지를 확인하였다. 먼저 Loop primer (LF, BF)가 없는 3종의 LAMP 프라이머 세트(BPH-38, BPH-38-1 및 BPH-207)에 대한 증폭 여부를 검토하였다. 벼멸구, 흰등멸구 및 애멸구 3종의 계통 DNA를 각각의 LAMP 프라이머 세트와 65°C 조건에서 60분간 반응시킨 후 아가로스겔에 전기영동 한 결과, 벼멸구 샘플에서만 특이

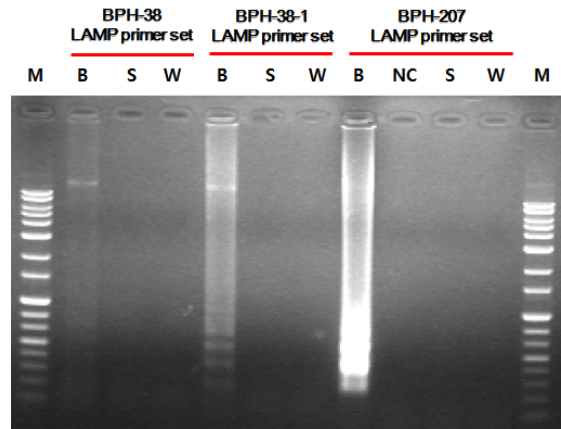


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis patterns after LAMP reaction of the genomic DNA of three rice planthoppers, (B) *Nilaparvata lugens*, (S) *Laodelphax striatellus*, and (W) *Sogatella furcifera*, with three LAMP primer sets (BPH-38, BPH-38-1, and BPH-207). For LAMP reactions, all samples (B: 360 ng, S: 390 ng, W: 400 ng, NC: 0 ng) were incubated at 65°C for 60 min. The LAMP reaction was inactivated by incubation at 80°C for 5 min. *M: 100bp ladder marker, NC: Negative control (Water instead of Genomic DNA)

적으로 사다리처럼 다양한 길이의 밴드들이 관찰되었으며 밴드의 밝기로 보아 LAMP 프라이머 세트별 증폭 정도는 BPH-207 > BPH-38-1 > BPH-38 순이었다(Fig. 3). 이때 각 LAMP 프라이머 세트별 사용된 벼멸구, 애멸구 및 흰등멸구 계통 DNA 양은 각각 360 ng, 390 ng, 및 400 ng이었다. 그러나 벼멸구 DNA 양을 200 ng부터 0.2 ng까지 희석하여 위와 동일한 방법으로 LAMP 프라이머 세트 BPH-207에 적용하였을 때 아가로스겔에서 확인할 수 있을 정도로 증폭되지 않았다(data not shown). 따라서 Loop primer (LF, BF)가 없는 3종의 LAMP 프라이머 세트(BPH-38, BPH-38-1 및 BPH-207)는 소량의 벼멸구 계통 DNA (e.g. ≤ 1 ng)에서는 활용하기 어려울 것으로 보였다.

한편, Loop primer (LF, BF)가 있는 BPH-92는 100 ng의 벼멸구 계통 DNA와 65°C 조건에서 60분간 반응시킨 후 아가로스겔에서 전기영동 결과 강하게 증폭된 사다리처럼 다양한 길이의 밴드들이 확인되었다(Fig. 4). 벼멸구 계통 DNA 양을 달리하여 BPH-92 LAMP 프라이머 세트와 65°C 조건에서 60분간 반응시킨 후 형광반응 결과를 통해 벼멸구 계통 DNA의 최소 필요량을 검토하였다. 벼멸구 계통 DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng, 및 0.1 ng은 LAMP 반응 후 청색광(blue light, 470 nm) 조건에서 강한 형광이 관찰되었으나 0.01 ng에서는 음성대조군(NC), 흰등멸구(WBPH), 애멸구(SBPH)와 마찬가지로 강한 형광빛이 관찰되지 않았다(Fig. 4). 그리고 LAMP 반응 결과 강하게 증폭

된 양성대조군(PC)과 벼멸구 계놈 DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng 및 0.1 ng의 경우는 백색광 조건(white light)에서 육안관찰시 연두색으로 보였다(Fig. 4). 반면에 나머지 음성대조군(NC)처럼 증폭이 안된 샘플들은 백색광 조건에서 육안으로 연한 살구빛을 보여 증폭여부가 쉽게 구별되었다. 한편, LAMP 반응 결과 강하게 증폭된 양성대조군(PC)과 벼멸구 계놈 DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng 및 0.1 ng의 경우는 4°C 냉장보관 후에 tube 바닥에서 하얀 침전물이 관찰되었다(data not shown). 이는 *Bst* Pol.에 의해서 dNTPs로부터 pyrophosphate 이온이 부산물로 만들어지게 되고 LAMP 반응 완충용액에 있는 Mg^{2+} 이온과 반응하여 magnesium pyrophosphate ($Mg_2P_2O_7$) 침전물이 생성된 것으로 LAMP 증폭의 성공여부를 육안으로 확인할 수 있는 간단한 방법 중 하나이다(Zhang et al., 2014).

LAMP 프라이머 세트에 Loop primer가 포함되어 있는 경우 증폭속도가 약 1/2 빨라질 수 있어 BPH-92 LAMP 프라이머 세트에서 벼멸구 계놈 DNA 0 ng, 0.1 ng, 10 ng, 및 100 ng을 각각 65°C 조건에서 20분, 30분, 40분, 및 60분간 반응시킨 후 증폭된 결과를 형광 밝기로 비교하였다. 그 결과 반응시간을 20분과 30분만 처리한 경우는 벼멸구 계놈 DNA 0~100 ng 모두 청색광(470 nm) 조건에서 형광 빛이 육안으로 뚜렷하게 관찰되지 않았고 각각의 밝기 차이를 판단하기 어려웠다(Fig. 5). 그러나 반응시간 40분에서는 벼멸구 계놈 DNA 10 ng과 100 ng에서 청색광(470 nm)에 강한 형광 빛을 내 0 ng, 0.1 ng과 분명하게

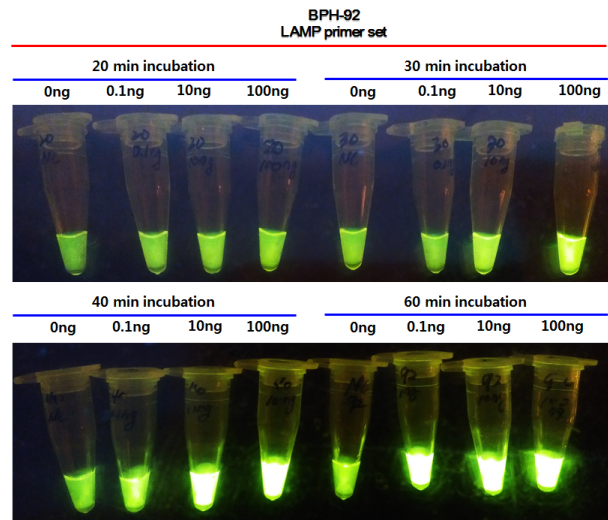


Fig. 5. Fluorescent detections after LAMP reaction with LAMP primer set (BPH-92) according to incubation time (20, 30, 40, and 60 min) and amount of genomic DNA (0, 0.1, 10, and 100 ng) of BPH. After the LAMP reaction, the enzyme within the tube was inactivated at 80°C for 5 min.

구별되었으며 60분에서는 0.1 ng에서도 강한 형광 빛이 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 벼멸구를 특이적으로 검출하는데 BPH-92 LAMP 프라이머 세트를 활용할 경우, 벼멸구 계놈 DNA 양이 적어도 10 ng 이상이면서 40분간 LAMP 반응 또는 0.1 ng 이상이면서 60분간 LAMP 반응이 필요하다는 것을 제안하였다.

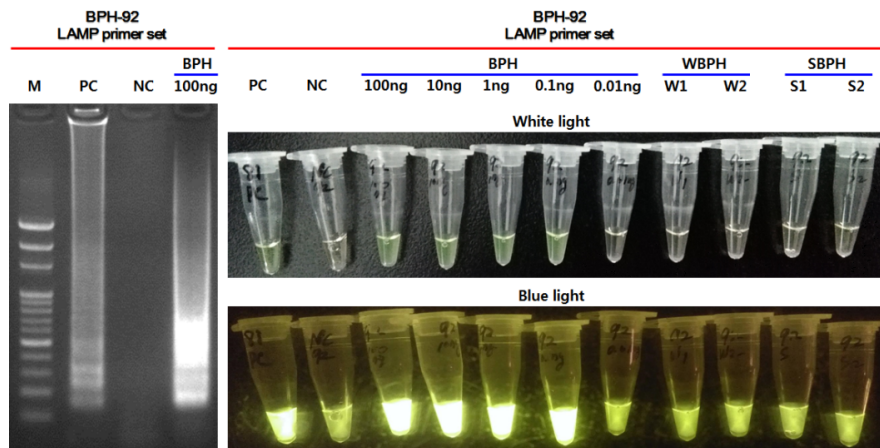


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis patterns (left) and fluorescent detections (right) after LAMP reaction of DNA samples with a LAMP primer set (BPH-92). In the agarose gel electrophoresis, various sizes of bands, such as ladder, were observed in the PC and 100ng BPH, but no bands were observed in the NC. This means that BPH-92 LAMP primer set designed in this study can strongly amplify the genomic DNA of BPH without self-amplification. Fluorescent detections showed that the BPH-92 LAMP primer set was able to specifically amplify BPH genomic DNA with a minimum sensitivity of 0.1ng, but not the other two rice planthoppers, SBPH and WBPH. For the LAMP reaction, all samples were incubated at 65°C for 60 min and the enzyme was inactivated at 80°C for 5 min.

*M: 100 bp ladder marker, PC: Positive control (LAMP primer set and DNA, both were provided by the manufacturer), NC: Negative control (BPH-92 LAMP primer set without DNA). The amount of genomic DNA of *Nilaparvata lugens* is expressed in 100, 10, 1, 0.1, and 0.01 ng, respectively. W1 and W2 in WBPH indicate individual genomic DNA of *Sogatella furcifera* (W1: 200 ng, W2: 180 ng). S1 and S2 in SBPH indicate individual genomic DNA of *Laodelphax striatellus* (S1: 250 ng, S2: 195 ng).

지금까지의 결과를 정리하면, 1) 벼멸구의 ITS2 영역 DNA 염기서열 정보는 다른 멸구과(Delphacidae) 멸구류들과 염기서열 차이가 유의하게 구별되었다. 2) 벼멸구의 ITS2 염기서열을 토대로 다른 멸구류들과 차이가 나는 부분을 포함하여 벼멸구 특이 LAMP 프라이머 세트 4개 후보를 설계하였다. 3) 벼멸구, 애멸구 및 흰등멸구의 게놈 DNA를 이용하여 벼멸구 특이 LAMP 프라이머 세트 후보의 증폭 효과를 검증하였는데, 4개 모두 벼멸구 특이성을 보였으나 증폭 효율은 BPH-92가 가장 좋았다. 4) BPH-92 LAMP 프라이머 세트의 성공적인 증폭 효과 확인을 위해서는 65°C에서 최소한 벼멸구 게놈 DNA 10 ng으로 40분간 또는 0.1 ng으로 60분간 LAMP 반응이 요구된다.

앞으로 본 연구에서 제작된 ITS2 영역 기반 LAMP 프라이머 세트 BPH-92가 눈에 설치된 유인등 트랩에 포획된 멸구류 중에서 벼멸구를 특이적으로 검출하는데 현장에서 활용되기 위해서는 벼멸구와 염기서열이 가장 유사한 같은 속(Genus)의 겨풀멸구(*N. muiri*)와 벼멸구붙이(*N. bakeri*) 게놈 DNA에서의 증폭여부가 추가로 검토되어야 한다. 본 연구에서 설계한 LAMP 프라이머 세트 BPH-92가 겨풀멸구와 벼멸구붙이의 게놈 DNA에서 증폭반응을 일으키지 않는다면 멸구과(Delphacidae)의 다른 멸구류에서도 증폭반응이 일어날 가능성이 훨씬 낮기 때문에 현장에서 벼멸구를 특이적으로 구별하는데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 시험연구사업(과제번호: PJ010452)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

Literature Cited

Bonizzoni, M., Afrane, Y., Yan, G., 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid identification of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 1030-1034.

Cabauatan, P.Q., Cabunagan, R.C., Choi, I.R., 2009. Rice viruses transmitted by the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål, in: Heong, K.L., Hardy, B. (Eds.), *Planthoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia*. International Rice Research Institute, Los Baños, pp. 357-368.

Dickey, A.M., Osborne, L.S., Shatters, Jr., R.G., Mckenzie, C.L., 2013. Identification of the Meam1 cryptic species of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) by loop-mediated isothermal amplification. *Fla. Entomol.* 96, 756-764.

Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66, 411-426.

Kim, H.Y., Park, C.G., Han, M.W., Uhm, K.B., Woo, K.S., 2002. Development of a hypertext-based polychotomous key for the identification of planthoppers caught by light trap in paddy fields. *Korean J. Appl. Entomol.* 41, 75-83.

Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T., 2013. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J. Infect. Chemother.* 19, 404-411.

Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16, 223-229.

Njiru, Z.K., 2012. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(6): e1572, doi:10.1371/journal.pntd.0001572.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28, e63.

Seo, B.Y., Jung, J.K., Park, K.J., Cho, J.R., Lee, G.S., Jung, C.R., 2014. Molecular identification of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) egg parasitoids of the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*, based on ITS2 rDNA sequence analysis. *Korean J. Appl. Entomol.* 53, 247-260.

Seo, B.Y., Kwon, Y.-H., Jung, J.K., Kim, G.-H., 2009. Electrical penetration graphic waveforms in relation to the actual positions of the stylet tips of *Nilaparvata lugens* in rice tissue. *J. Asia-Pac. Entomol.* 12, 89-95.

Sogawa, K., 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 27, 49-73.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.

Uhm, K.B., Park, J.S., Lee, Y.I., Choi, K.M., Lee, M.H., Lee, J.O., 1988. Relationship between some weather conditions and immigration of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Korean J. Appl. Entomol.* 27, 200-210.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California, pp. 315-322.

Wilson, M.R., Claridge, M.F., 1991. *Handbook for the identification of leafhoppers and planthoppers of rice*. CAB International, Wallingford, UK.

Zhang, X., Lowe, S.B., Gooding, J.J., 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.* 61, 491-499.