Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society
Vol. 22, No. 11 pp. 308-314, 2021

https://doi.org/10.5762/KAIS.2021.22.11.308
ISSN 1975-4701 / eISSN 2288-4688

누에 핵다각체 바이러스 조기 진단을 위한 기술 개발

홍정원[1], 이창훈[2], 정찬영[2], 박종우[2*]
[1]공주대학교 천연물연구소, [2]국립농업과학원 농업생물부

Development of Early Diagnosis Technology for Silkworm Nucleopolyhedrovirus

Jeong Won Hong[1], Chang Hoon Lee[2], Chan Young Jeong[2], Jong Woo Park[2*]
[1]Research Institute for Natural Products, Kongju National University
[2]Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, RDA

요 약 누에의 식·의약 원료로 이용은 더욱 철저한 위생관리 및 안정적인 생산을 요구하고 있다. 따라서 본 연구에서는 위생적인 누에 생산 및 생산성을 개선하기 위하여 국내 잠업 농가에서 흔하게 발생하는 핵다각체병 바이러스에 대한 조기 진단을 위한 기반 기술을 개발하고자 하였다. 바이러스 특성 분석을 위하여 연구실에서 동정된 누에 핵 다각체 바이러스를 경구 및 경피를 통해 1 x 10^5 cfu/ml의 농도로 감염시킨 결과, 50% 폐사에 소요된 시간은 각각 120 및 30시간가량이었다. 핵 다각체 바이러스를 검출하기 위한 중합효소 연쇄반응 프라이머를 제작하고, 인위적으로 바이러스를 감염시킨 누에의 핵산 추출물을 제작 후 유전자를 증폭한 결과, 핵다각체 바이러스의 유전자가 증폭되었음이 염기서열분석을 통해 확인되었다. 또한 제작된 프라이머의 진단 마커로서의 이용 가능성을 판단하기 위하여 전국 20개 누에 사육 농가의 병잠을 수집하여 제작된 프라이머를 이용하여 바이러스 핵 다각체의 유전자를 증폭한 결과, 11개의 농가의 병잠에서 바이러스가 검출되었다. 이러한 결과를 종합해볼 때 제작된 프라이머 및 핵산추출 방법을 누에 핵 다각체 바이러스 조기 진단 검출키트 제작에 이용 할수 있을 것으로 판단된다.

Abstract This study was undertaken to improve hygienic silkworm production and productivity, and to develop an early diagnosis technology for nucleopolyhedrovirus, a common scourge in domestic submersible farms. The silkworm nucleopolyhedrovirus identified in the laboratory was infected at a concentration of 1 x 10^5 cfu/ml, through oral and subcutaneous routes, and the 50% mortality rate was determined to be 120 and 30 hours, respectively. Polymerase chain reaction primers for detecting the nucleopolyhedrovirus were prepared, and the gene was amplified after preparing the nucleic acid extract of the silkworm on day 2 after infection. In order to determine the applicability of the prepared primer as a diagnostic marker, diseased silkworms were collected from silkworm breeding farms in 20 regions of Korea. Gene amplification of the viral nuclear polyhedrin using the prepared primer resulted in detection of the virus in silkworms obtained from 11 farms. Taken together, these results indicate that the rapid diagnosis of silkworm nucleopolyhedrovirus is highly probable through the prepared primer and nucleic acid extraction method.

Keywords : Sericultural Industry, Silkworm, Nucleopolyhedrovirus, Diagnostic, PCR

본 연구는 2021년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01001805)에 의해 이루어진 것임.
*Corresponding Author : Jong Woo Park(National Institute of Agricultural Science)
email: jwpark0824@korea.kr
Received September 15, 2021 Revised October 13, 2021
Accepted November 5, 2021 Published November 30, 2021

1. 서론

과거 실크 원료 생산에 주력했던 전통 양잠산업은 인공섬유가 발달함에 따라 새로운 수요를 찾을 필요성이 대두되었으며[1], 누에의 기능성 및 그 가치를 인정받으면서 기능성 양잠으로 전환을 맞이했다[2,3]. 하지만 식·의약 소재로의 이용을 위해서는 위생적이고 고품질의 누에 생산이 필수 불가결한 조건인 데 반하여 누에 생산체계는 과거와 같은 실정으로, 비닐하우스를 이용한 노지 사육 및 똥갈이를 생략한 뽕잎 급여 등 곤충 질병 발생에 취약한 환경에서 사육이 이루어지고 있다. 또한 사육 중 질병 발생에 관한 판단 및 대응 역시 전적으로 사육 경험에 의존하여 병잠의 제거 및 처분을 실시하고 있다. 따라서 양잠산업 규모 확대를 위한 농가 차원에서 안정적이고 양질의 누에를 생산하기 위한 기술이 필요한 실정이다[4,5].

최근 곤충산업이 미래 식량 산업으로서 관심이 증가함에 따라 사육 편의 개선에 대한 다양한 시도들이 이루어지고 있으며[3,6], 대표적인 것이 스마트팜을 이용한 곤충사육 시스템이다. 이러한 시스템은 자동화된 사육환경 제어를 통해 노동력의 부담은 줄이고 위생 및 생산성을 높이고 있다[7]. 이와 같은 자동화 시스템은 양질의 곤충 생산에 크게 기여하고 있지만, 단점 또한 존재하며, 그것은 바로 곤충 질병의 발생 및 확산이다. 다른 작물과 다르게 식용 곤충은 방제를 통한 질병 예방 및 발생 후 치료가 거의 불가능하다. 따라서 과거에 인력을 이용하여 사육 시에는 먹이 급여 및 사육환경 정비 시 지속적인 예찰을 통하여 질병 발생 개체들을 솎아내어 질병의 확산을 막고 손실을 최소화하였으나, 자동화 시스템에서는 인력의 투입이 줄어든 만큼 예찰 기회가 감소하여 질병 발생 시 인지가 늦어지게 되고 밀집도가 높은 환경 내에서 전염을 통한 전체 폐사가 발생할 가능성이 커졌다. 이에 따라 자동화된 시스템을 더욱 효율적으로 운용하기 위해서는 신속한 질병 진단 및 전염경로 차단이 필요한 실정이다[8,9].

누에에서 병을 일으키는 병원체는 곰팡이, 세균, 및 바이러스로 분류할 수 있으며, 각 병원체에 따라 발생하는 질병 또한 다양하다[10]. 대표적으로 *Bacillus thuringiensis* 및 *Serratia marcescens*에 의해 발생하는 세균성 질환으로는 졸도병 및 패혈증이 있으며, 바이러스성 질환으로서는 핵다각체 바이러스(nucleopolyhedrovirus; NPV)가 원인인 고름병, 세포질 다각체 바이러(Cytoplasmic Polyhedrosis Virus; CPV) 및 무름병 바이러스(Flacherie Virus; FV)에 의한 무름병 등이 있다[11]. 곰팡이 및 세균성 질환의 경우 전파 속도가 비교적 느리고 사육 전 시설에 대한 소독을 통해 질병 발생을 최소화할 수 있다. 하지만 바이러스성 질병의 경우 발병 후 시간 경과에 따라 누에의 체내에서 감염성 농의 배출이 이루어지고, 이에 따른 뽕잎의 오염이 발생함으로써 강한 전염성을 나타내며 집단 발생 경향을 보이고, 다각체 속에서 장기간 활성이 유지되기 때문에 차기 사육까지 질병 발생 가능성을 높이기 때문에 빠른 진단이 필요하다[12,13].

따라서 본 연구에서는 국내에서 누에 사육 중 흔하게 발생하는 핵다각체 바이러스를 빠르고 정확하게 진단하기 위하여, Fig. 1과 같이 주요 감염원인 바이러스를 연구실 환경 내에서 증식하여 감염에 따른 병징을 분석을 통해 마커를 개발하고, 이를 이용한 농가 수집 검체의 핵다각체 바이러스 감염 여부 분석 및 조기 진단을 위한 검출키트의 개발 가능성을 판단하고자 하였다.

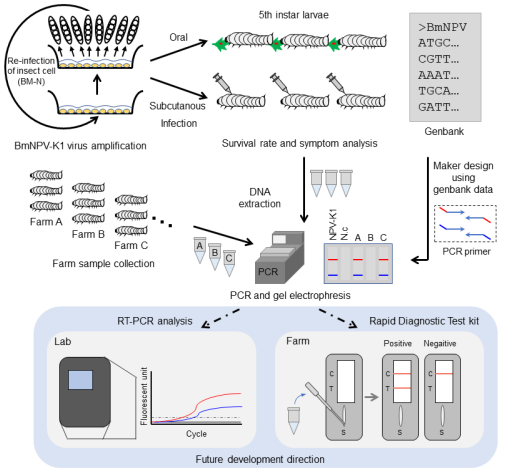

Fig. 1. Summary od rxperimental process and future development direction.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

누에 난소 세포주 BM-N (CRL-8910)은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 27℃에서 10% fetal bovine serum (FBS; GEMINI, USA)를 포함하는 TNM-FH 배지(WELGENE, Korea)를 이용하여 배양하였다. BmNPV

(BmNPV-K1)를[14] 양성 대조 구로 이용하기 위하여, BM-N 세포에 감염 및 증식하고, Baer 등[15]의 방법에 따라 바이러스 감염 역가 (plaque forming unit; pfu) 분석 후 이용하였다.

바이러스 감염 분석을 위한 누에는 2020년 6월부터 9월까지 누에를 사육하고 있는 전국 20개 농가 및 잠업기관을 방문하여 병잠(病蠶)으로 판단되는 이상잠을 각각 수집하고 -80℃에 동결보관 후 이용하였다.

2.2 BmNPV 감염 누에 제작

BmNPV 감명에 따른 누에의 병증 및 생존율을 분석하기 위하여, BM-N 세포에 대한 감염 및 증식을 통해 확보한 BmNPV를 멸균 식염수를 이용하여 1×10^3 및 1×10^5 pfu/ml의 농도가 되도록 희석한 후 5령 1일 누에에 감염시켰다. 경구감염을 위해서 준비된 바이러스 현탁액을 신선한 뽕잎에 분무 후 건조하여 누에에 급여하였으며, 피하 감염은 준비된 바이러스 현탁액 50 ul를 5령 누에의 배 측 첫 번째와 두 번째 마디 사이에 미세주사기를 이용하여 주입하였다. 바이러스 감염에 따른 생존율을 분석하기 위하여 감염 이후 신선한 뽕잎을 8일 동안 지속해서 급여 및 사육하며 죽은 개체를 개수 후 -80℃에 냉동하였다.

2.3 핵산 추출물의 준비

인위적 감염을 통해 제작된 BmNPV 감염 누에 및 농가에서 수집한 병잠을 멸균 식염수 5 ml에 넣은 후 균질기를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 준비된 균질액으로부터 200 ul를 채취하고 원심분리기(Tomy, Japan)를 이용하여 10,000 x*g*에서 5분 동안 원심분리 후 상층액을 제거하고 남은 침전물을 회수하였다. 이후 회수된 침전물은 50 ul의 cell lysis용액(10 mM Tris-Hcl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.25% NP-40)을 이용하여 현탁하고 mg/ml의 proteinase K를 첨가 후 65℃에서 20분간 단백질을 분해하고 95℃에서 10분간 열처리를 통해 proteinase K를 불활성화시켰다. 준비된 핵산 추출물은 멸균증류수를 이용하여 10배 희석 후 polymerase chain reaction (PCR)을 위한 주형으로 이용하였다.

2.4 BmNPV 유전자 증폭

BmNPV 검출을 위한 프라이머는 NCBI에 등록된 BmNPV의 전체 염기서열(Acc No. LC150780; BmNPV-H4)을 바탕으로 바이러스의 핵다각체 유전자 부위를 증폭할 수 있는 두 개의 크기로 제작하여 Table 1에 나타내었다.

각 시료에 존재하는 BmNPV 유전자 증폭 및 검출을 위한 PCR은 Multiplex PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하여, 준비된 핵산추출액 1 ul를 주형으로 이용하고 제작된 각각의 프라이머 쌍을 10 μM 농도로 첨가여 수행하였다. PCR은 Thermal cycler(TaKaRa, Japan)을 이용하여 95℃에서 5분간 초기 변성 후 95℃에서 20초 변성; 58℃에서 20초 결합; 72℃에서 30초 신장의 온도 주기를 35회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분간 추가 신장을 진행하였다. PCR 이후 생성된 증폭 산물은 1% agarose gel을 이용한 전기영동을 통해 분석하였다.

Table 1. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Product size
NPV-1	F: CTCAATCCTATTTGTAATTATTGAAT R: GCTGTCCTCAACAAAACGGG	471 bp
NPV-2	F: GCCGAAGATCCCTTTTTAGG R: ACGTCCATCACCTCTTGGTC	188 bp

F, forward; R, reverse

2.5 염기서열 분석

증폭 산물의 유효성을 검증하기 위하여 NPV-1 및 -2 프라이머 쌍에 의하여 증폭된 유전자를 pJET 1.2 blunt vector (Thermo Scientific, Lithuania)에 클로닝하여 염기서열을 분석하고, Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/services)를 이용하여 참조 유전자인 BmNPV-H4의 핵다각체 유전자와 상동성을 비교하였다.

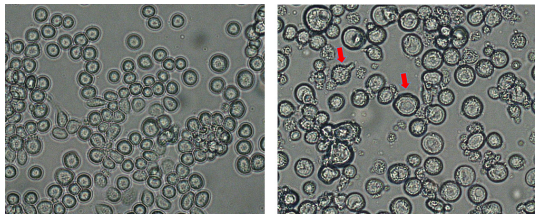

Fig. 2. Morphological changes in BmNPV-infected BM-N cells. (200X) Cell cultured for 120 h were examined that the majority of cells became larger and started to burst.

3. 결과 및 고찰

3.1 BmNPV의 감염 특성

양성대조군으로 이용하기 위한 BmNPV 바이러스를 증식시키기 위하여 BM-N 누에 세포에 감염시킨 결과 Fig. 2와 같이 정상 세포와 비교하여 세포의 부피가 증가하고, 72시간 이후부터는 세포의 사멸이 확인되었다. 이는 Katou 등[16]이 밝힌 곤충 세포에서 바이러스 증식 및 용출에 따라 발생하는 일반적인 증상으로 BmNPV 감염 후 120시간 뒤에는 대부분 세포가 사멸하여 BmNPV의 정상적으로 이루어졌음이 확인되었다.

BmNPV에 의한 누에의 치사율을 조사하기 위하여 20마리의 5령 누에에 바이러스를 감염시킨 후 신선한 먹이를 급여하며 8일간 사육한 결과 누에의 생존율은 Fig. 3(A)와 같았다. 바이러스 감염 후 50%의 누에가 폐사하는데 소요된 시간은 1 x 10^3 와 1 x 10^5에서 각각 192 및 120시간으로 확인되었다.

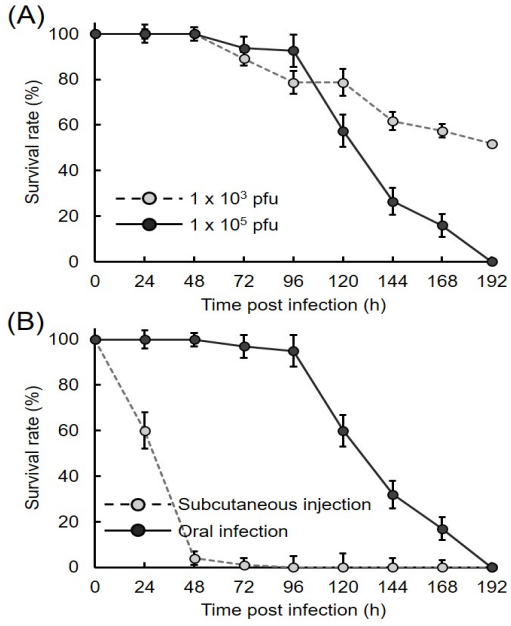

Fig. 3. Survival rate of BmNPV infectied Bombyx mori. (A) Changes in survival rate by oral infection by concentration of BmNPV. (B) Analysis of survival time according to oral and subcutanous infection. The values are mean±SD (n=20*3).

경구감염 및 피하 감염에 따른 누에의 생존율을 비교한 결과, Fig. 3(B)와 같이 경구감염에서는 50% 누에의 폐사에 120시간이 소요되었으나 피하주사를 통한 감염에서는 불과 48시간 이후 생존율이 5% 이하로 떨어졌다. 이는 Fu 등[17]이 밝힌 NPV 바이러스 감에 따른 바이러스 증식 속도 및 생존시간과 일치하는 결과로서 정상적인 사육 조건에서 피하 감염이 일어날 확률이 낮은 만큼 급격한 폐사가 시작되는 96시간 이전에 이를 진단하고 대응한다면 바이러스의 확산을 막을 수 있을 것으로 판단된다.

바이러스 감염에 따른 누에의 형태적 변화를 관찰한 결과, Fig. 4과 같이 48시간 이후에는 섭식을 중단하여 성장이 지연되었으며, 72시간 이후 표피가 검게 변하고 움직임이 없어졌다. 이후 입 및 항문에서 체액이 유출되어 누에 자리에 오염이 일어나기 시작하여 96시간 후 폐사하였고, 120시간째에는 완전히 검게 변하고 체액의 유출에 따라 수축한 형태를 나타냈다. 이러한 결과는 Sivaprasad가[18] 밝힌 감염 시기 따른 병증 중 대체로 식욕이 없어지고 몸이 부어오르며 피부가 연약하여 터지기 쉽고 피부가 터지면서 고름이 나오는 특성을 보인다는 증상과 일치하는 결과로 BmNPV-K1 감염에 의하여 누에가 핵다각체 바이러스에 성공적으로 감염되었음이 확인되었다.

Fig. 4. Physical appearance of the fifth-instar larvae of BmNPV infected silkworm. Larvae were captured at the following differnet time after the oral infected at (A) 48, (B) 72, (C) 96, and (D) 120 hours.

3.2 BmNPV 진단 마커 개발

바이러스 감염에 따른 누에 병의 분자 진단법을 개발하기 위하여, BmNPV의 유전정보를 기반으로 PCR 프라이머를 제작하였다(Table 1). 이후 진단을 간소화하기 위하여 누에 핵산 추출물을 준비를 위한 용매 및 처리조건을 확립하여, BmNPV 감염 후 2일째 누에에서 핵산 추출액을 준비하고 제작된 프라이머를 이용하여 BmNPV 유전자 일부를 증폭하였다. 그 결과 Fig. 5(A)

와 같이 NPV-1 프라이머를 이용한 PCR에서는 471bp의 증폭 산물이 확인되었으며, NPV-1 프라이머를 이용한 PCR에서는 188bp의 증폭 산물이 확인되었다. 또한 증폭된 유전자의 BmNPV 일치 여부를 분석하기 위하여, 각 증폭 산물을 정제 후 염기서열을 분석한 결과, Fig. 5(B)와 같이 NPV-1 프라이머를 이용한 증폭 산물은 참조서열로 이용한 BmNPV-H4의 서열과 약 0.5%의 차이를 나타내었으며, NPV-2 프라이머의 증폭 산물은 100% 동일한 것으로 확인되었다.

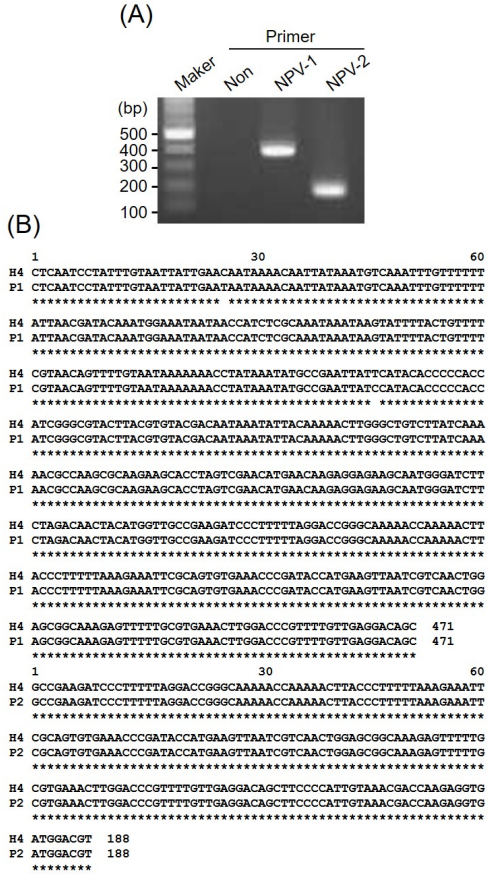

Fig. 5. Analysis of BmNPV detection and sequencing of each amplicons. (A) Detection of BmNPV in infected larvae. (B) Analysis of homology with PCR products GenBank registered BmNPV-H4, NPV-1; P1 and NPV-2; P2 sequence.

3.3 진단 프라이머의 유효성 검증

누에 핵 다각체 바이러스 진단을 위하여 제작된 프라이머의 유효성을 검증하기 위하여, 20개 농가에서 수집된 병잠의 핵산 추출물을 준비하고, NPV-1 및 -2 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고, 그 결과 Fig. 6에 나타냈다. PCR 및 전기영동 결과 각 농가에서 수집된 20개 검체 중 11개에서 밴드가 확인되었으며, NPV-1 프라이머를 이용한 PCR에서는 5번 시료의 밴드가 약하게 나와 양성 여부의 판단이 어려웠으나, NPV-2 프라이머를 이용한 PCR에서는 5번 밴드의 강도가 높게 검출되었다. 이러한 결과는 NPV-2 프라이머의 PCR 증폭 거리가 짧아 BmNPV 유전자에 일부 손실이 발생하더라도 증폭할 수 있기 때문으로 판단된다[13]. Shamim 등[19] 은 BmNPV에 대한 항체를 제작하고 이를 이용하여 BmNPV를 진단하는 시스템을 개발한 바 있으나, 바이러스 분리 과정의 손상 또는 낮은 농도로 인하여 검출에 한계가 존재한다고 보고하였다. 따라서 감염 초기에 체액 내에 낮은 농도로 존재하는 BmNPV를 검출하기 위한 프라이머로는 NPV-2가 적합할 것으로 사료된다. NPV-2 프라이머 증폭 산물의 신뢰도 확보를 위하여, 양성으로 판단된 11개 증폭 산물의 염기서열을 분석한 결과, BmNPV-K1의 핵 다각체의 염기서열과 100% 일치하여 수집된 검체의 감염률은 55%로 확인됐다. 이러한 결과를 통해 2020년 봄누에 사육시 발생한 질병 중 55%가량이 BmNPV에 의해 발생한 것으로, 매년 바이러스에 의한 농가 피해가 적지 않을 것임을 예상할 수 있다. 또한, Zhou 등[20] 은 이러한 농가 피해를 조사하고 관리하기 위하여 loop-mediated isothermal amplification assay (LMP assay)를 이용하여 NPV 바이러스를 현장에서 직접 진단할 수 있는 방법을 개발했으나 DNA 중합효소의 운반이나 증폭 장비의 휴대 등의 제약이 따르고 있어 휴대 및 이용이 편리한 진단시스템 개발을 위해서는 지속적인 연구가 필요하다.

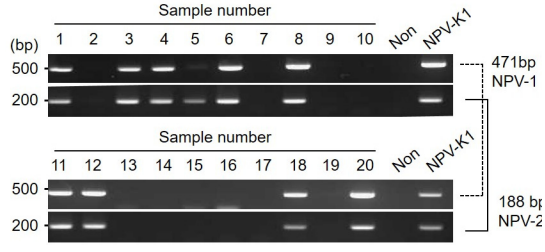

Fig. 6. Grasserie diagnosis of field-grown silkworm by PCR. Non, control without template; NPV-K1, BmNPV-K1 infected B. mori nucleic acid extract was used as a template.

이러한 결과를 종합해볼 때 최근 누에 사육 농가에서 요구되고 있는 병 발생에 대한 피해 원인 규명을 위하여 개발된 프라이머 및 분석 방법을 이용함으로써 농가에서 발생하는 질병을 예찰하고 BmNPV에 의한 발병 실태조사를 수행할 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 현장에서의 신속한 실태조사와 더불어 추가적인 연구 개발을 위해서는 개발된 프라이머를 이용한 Rapid Diagnostic Test (RDT) kit 및 실시간 분석법 개발이 이루어져야 할 것이다. 그래야만 연구실과 현장 환경에 적합한 신속 또는 정밀 진단 분석이 이루어질 수 있을 것이며, 나아가 BmNPV 전염원을 색출하고 예방 대책을 마련함으로써 감염 확산 방지를 통해 농가의 경제적 손실억제 및 위생적이고 안정적인 누에 생산에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

References

[1] PD Kang, SU Lee, IY Jung, BH Shon, YS Kim, et al. "Breeding of new silkworm variety golden silk, a yellow cocoon color for spring rearing season", *Korean J Seric Sci.,* Vol.49 No.1, pp.14-17, 2007. https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200735822483547.pdf

[2] TK Kim, HI Yong, YB Kim, HW Kim, YS Choi, "Edible insects as a protein source: A review of public perception, processing technology, and research trends", *Food Sci Anim Resour.,* Vol.39 No.4, pp.521-540, 2019. DOI: https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e53

[3] G. Melgar-Lalanne G, A. J. Hernandez-Alvarez, A. Salinas-Castro, "Edible insects processing: traditional and innovative technologies", *Compr Rev Food Sci Food Saf*, Vol.18 No.4, pp.1166-1191, 2019. DOI: https://doi.org/10.1111/1541-4337.12463

[4] H. P. Tao, Z. Y. Shen, F. Zhu, X. F. Xu, X. D. Tang, L. Xu, "Isolation and Identification of a Pathogen of Silkworm *Bombyx mori*", *Curr Microbiol*, Vol.62 No.3, pp.876-883, 2011. DOI: https://doi.org/10.1007/s00284-010-9796-x

[5] B. Bebitha, P. Mohanraj, S. Manimegalai, C. A. Mahalingam, "Silkworm diseases diagnosis through molecular approach and their management", *International J Plant Protect,* Vol.9 No.1, pp.343-352, 2016. DOI: https://doi.org/10.15740/HAS/IJPP/9.1/343-352

[6] MH Song, MH Han, SH Lee, ES Kim, KH Park, WT Lee, JY Choi, "Afield survey on edible insect farms in korea", *J Life Sci*, Vol.27 No.6, pp.702-707, 2017. DOI: https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.6.702

[7] SY Rho, JH Won, JS Lee, JH Baek, HD Lee, KS Kwak, "Development of the insect smart farm system for controlling the environment of *Protaetia brevitarsis* seulensis" *J Kor Soc Comp Inform*, Vol.24, No.12, pp.135-141, 2019. DOI: https://doi.org/10.9708/jksci.2019.24.12.135

[8] J. Eilenberg, J. M. Vlak, C. Nielsen-LeRoux, S. Cappellozza, A. B. Jensen, "Diseases in insects produced for food and feed", *J Insec F Feed*, Vol.1 No.2, pp.87-102, 2015. DOI: https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0022

[9] Z. Hossain, S. Chakraborty, S. K. Gupta, A. K. Saha, B. B.Bindroo, "Silkworm disease incidence trends during the years 1992–2011 in the Murshidabad district of West Bengal, India", *Int J Trop Insect Sci,* Vol.37, No.4, pp.259–270, 2017. DOI: https://doi.org/10.1017/S1742758417000182

[10] G. Ravikumar, S. Raje Urs, N. B. Vijaya Prakash, C. G. P Rao, K. V. Vardhana, "Development of multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of microsporidians, nucleopolyhedrovirus, and densovirus infecting silkworms", *J Invert Patholo*, Vol.107, No.3, pp.193-197, 2011. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.04.009

[11] K. P. K. Kumar, S. S. Naik, "Development of polyvoltinex bivoltine hybrids of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. tolerant to BmNPV", *Int J Zool Res*, Vol.7, No.4, pp.300–309, 2011. DOI: https://dx.doi.org/10.3923/ijzr.2011.300.309

[12] M. Gani, S. Chouhan, B. Lal, R. K. Gupta, G.Khan, N. B. Kumar, P. Saini, M. K. Ghosh. "*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmBPV): Its impact on silkworm rearing and management strategies" *J Biol Cont,* Vol.31, No.4, pp.189-193. 2017. DOI: https://doi.org/10.18311/jbc/2017/16269

[13] KW Kwak, SH Nam, JY Choi, SH Lee, HG Kim, et al., "Stimultaneous detction of fungal, bacterial, amd viral pathogens in insects by multiplex PCR and capillary electrophoresis", *Int J Indust Entomol*, Vol.30 No.2, pp.64-74, 2015. DOI: https://doi.org/10.7852/ijie.2015.30.2.64

[14] HK Hong, SD Woo, JY Choi, HY Lee, MH Kim, YH Je, SK Kang, "Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus", *Arch Virol.*, Vol.145, pp.2351-2361, 2000. DOI: https://doi.org/10.1007/s007050070025

[15] A. Baer, K. Kehn-Hal. "Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems" *J Vis Exp*, Vol.93, e52065, 2014. DOI: https://dx.doi.org/10.3791/52065

[16] Y. Katou, M. Ikeda, M. Kobayashi, "Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and High Five cells: defective nuclear transport of the virions" *Virology,* Vol.347, No.2, pp.455-465, 2006.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.043

[17] P. Lu, Y. He, F. Lin, Y. Pan, Q. Yu, Z. et al., "Rapid dectection of *Bombyx mori* didensovirus by loop-mediated isothermal amplifiction based lateral flow dipstick assay fo field applications" J *Invert Path*, Vol.163, pp.75-81, 2019.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.03.003

[18] V. Sivaprasad, K. Rahul, P. Makwana, Methods in Microbiology, Vol.49, pp. 27-46, 2021, ELSEVIER, 2021, pp.29-32.
DOI: https://doi.org/10.1016/bs.mim.2021.04.002

[19] M. Shamim, M. Baig, B. Nataraju, R. K. Datt, S. K. Gupta, "Evaluation of protein-a linked monoclonal antibody latex agglutination test for diagnosis of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm *Bombyx mori* L", *J Immunoass*, Vol.16, No.2, pp. 155-166. 1995.
DOI: https://doi.org/10.1080/15321819508013555

[20] Y. Zhou, J. Wu, F. Lin, N. Chen, S. Yuan, L. Ding, L. Gao, B. Hang, "Rapid detection of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) by loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick method" *Mol Cell Probes*, Vol.29, No.6, pp. 389-395, 2015.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2015.09.003

홍 정 원(Jeong Won Hong) [정회원]

- 2015년 2월 : 조선대학교 바이오신약개발학과 (이학박사)
- 2018년 8월 ~ 2020년 12월 : 국립농업과학원 전문연구원
- 2021년 2월 ~ 현재 : 공주대학교 천연물연구소 연구원

〈관심분야〉
천연물소재, 치료제

이 창 훈(Kil-Seo Hong) [준회원]

- 2020년 2월 : 경상대학교 식물의학과
- 2021년 1월 ~ 현재 : 국립농업과학원 연구원

〈관심분야〉
곤충소재, 생명공학

정 찬 영(Chan Young Jeong) [준회원]

- 2019년 8월 : 고려대학교 바이오시스템공학과
- 2020년 2월 ~ 현재 : 국립농업과학원 연구원

〈관심분야〉
곤충소재, 생명공학

박 종 우(Jong Woo Park) [정회원]

- 2014년 8월 : 조선대학교 의생명과학과 (이학박사)
- 2015년 3월 ~ 2020년 1월 : 국립농업과학원 박사후 연구원
- 2021년 2월 ~ 현재 : 국립농업과학원 농업연구사

〈관심분야〉
분자생물학, 단백질공학, 곤충소재