

高温 및 低温處理에 있어서 家蠶 Virus 多角體病의 誘發에 對하여

姜 錫 權

서울大學校 農科大學

Studies on the induction of nuclear and cytoplasmic polyhedrosis viruses by high and low temperature treatments in the silkworm, *Bombyx mori* L.

S.K. Kang

College of Agri. S.N.U.

Summary

The induction of polyhedroses in the silkworm, *Bombyx mori* L., was investigated treating the 5th instar larvae just after ecdysis with high temperature (hot water bath at 40°C for 5 minutes or dry heat shock at 40°C for 30 minutes) and low temperature (5°C for 24 hours).

The results obtained were as follows;

1. Comparing between the frequency of nuclear and cytoplasmic polyhedroses induced by cold and heat treatments (hot water bath at 40°C for 5 minutes), the induction ratio of the former is clearly less than that of the latter. But if the larvae tested with cold were left at room temperature (25°C) for 30-120 minutes till the next hot water bath (40°C) for 5 minutes and water bath (20°C) for 5 minutes, treatments, the frequency of induced cytoplasmic polyhedrosis was more than that in the case of cold or hot water bath treatment alone.

2. The frequency of nuclear and cytoplasmic polyhedrosis induced by cold and successive heat (dry heat shock at 40°C for 30 minutes), left at room temperature (25°C) till the second treatment, the frequency of nuclear polyhedrosis was less than that of cytoplasmic polyhedrosis.

3. The reaction of nuclear polyhedra to stains also differs sharply from that of the cytoplasmic type. In a smear of nuclear polyhedra on a slide staining with

Giemsa solution remains unstained against a stained back ground, in contrast to this, the cytoplasmic polyhedra take up stain readily.

I 緒 言

Virus 多角體病의 誘發에 關한 研究는 家蠶뿐만 아니라 Iepidoptera 外의 Diptera, Hymenoptera 等 여러 種類의 다른 昆蟲에 對해서도 많은 研究가 되어 왔다.

그런데 Virus 多角體病을 誘發시키는 Stressor는 크게 나누어서 Physical agents와 Chemical agents를 들수 있다. 그 중에서 Physical agents 對하여는 溫度와 거기에 隨伴되는 여러가지 要因, 紫外線(Ultraviolet light), X-Ray 및 振動(Vibration) 等에 依한 誘發을 包含 시킬 수 있고 Chemical agents에 對하여는 여러 種類의 化學 藥品을 家蠶에 處理하여 virus 多角體病의 誘發現象을 研究報告한 바 있다.

Aruga, Hukuhara (1960)⁽⁸⁾ 氏는 18 種의 Chemical agents를 5 齡起蠶에 處理한 結果, Sodium cyanide, Sodium fluoride, Arsenic acid, Monojodoacetic acid, Sodium azide, Hydroxylamine, Mercuric chloride, Uranium acetate, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), Disodium ethylene diamine tetraacetic acid (Na-EDTA) 等은 中腸型多角體病(C)에 誘發效果과 있다고 하였고 Aruga, Yoshitake (1964)⁽¹³⁾도 5 齡起蠶을 供試, 中腸型多角體病(C)의 多角體中 6 角形과 4 角形을 各各 接種하고 低温處理를 한 後에 Formatin, EDTA를 添食한 結果 對照區보다 多角體의 發生이 많다는 誘發現象을 報告한바 있다. 그외에도 Kurata (1968),⁽¹⁶⁾ 松原 (1968)^{(15), (17)} 등의 Chemical agent를 利用한 多角體 誘

發에 對한 많은 研究報告가 있다. 特히 松原(1968)⁽¹⁵⁾,
⁽¹⁷⁾氏는 各 齡別로 EDTA, Na-EDTA, 8-hydroxyquinolin
(Oxine), Sodium diethyl dithio carbamate(Na-DDTC),
Hydroxylamine (NH₂OH), Sodium fluoride (NaF)를
處理하여 核型多角體病(N), 中腸型多角體病(C), Virus
性軟化病(F)別로 誘發率을 調査한바 있다.

또 溫度를 Stressor 로 利用한 Virus 多角體病의 誘發
現象에 對하여 福原, 有賀(1959)⁽⁶⁾氏가 報告한 바에 依
하던 5 齡起蠶을 冷蔵處理(0°C~3°C, 16~24hrs)한 結
果, 核型多角體病(N), 中腸型多角體病(C)에 있어서 冷
藏效果에 依하여 對照區보다 病蠶이 많이 나타났고 間
歇的冷蔵處理(Intermittent cold treatment)와 持續的冷蔵
處理(Continuous cold treatment)를 비교하여 볼때 前者
가 後者보다 그 誘發效果가 크고 特히 누에의 腹部 2
環節을 中心으로 前半身과 後半身으로 나누어 45°C~
50°C의 高溫으로 5~10 分間 處理한 結果는 前半身이
後半身보다 多角體의 誘發이 많다고 報告하였다.

Aruga, Watanabe (1967)⁽¹⁴⁾氏는 4 齡起蠶을 供試하고
中腸型多角體病(C)의 4 角形多角體를 10⁶ ml의 量을 20
時間 添食시키고 25°C와 36°C의 溫度로 24 時間 處理
한 結果, 36°C의 高溫處理에 있어서 發病率이 많았다
고 하였다.

以上の 여러學者들의 研究結果로 Virus 多角體病은
低溫 및 高溫處理에 있어서 誘發現象이 일어난다는 事
實을 明確히 해주고 있다.

本實驗에서 筆者는 低溫處理와 高溫處理를 하는데 있
어서 Water bath를 利用한 것과 低溫 및 高溫處理를
時間 間隙을 두고 組合處理하여 Virus 多角體病의 誘發
現象을 調査하였다.

本 實驗을 하는데 있어서 金洛禎 教授의 指導와 崔官
鎬, 都大榮兩君의 Paraffin section 및 檢鏡에 있어서 始
終一貫 助力해 준데 對하여 感謝를 드리는 바이다.

II 材料 및 方法

가. 材料

1969年度 夏蠶期 및 秋蠶期에 모란×의들을 供試하
여 5 齡起蠶에 處理하였다.

나. 方法

1. 處理(I)

5 齡起蠶을 5°C 溫度로 24 時間 低溫處理하여 Water
bath, Hot water bath에 浸漬하였고 2次處理는 一定한
時間間격을 두고 處理하였으며 1次 處理後에는 25°C
室溫에 放置하였다.

Treatment I. Method in treatments of cold and hot water-bath in the 5th instar larvae.

Ist treatment	Time interval	2nd treatment
Cold		
Cold	0 min.	Water-bath
Cold	0 min.	Hot water-bath
Hot water-bath		
Cold	60 min.	Hot water-bath
Cold	60 min.	Water-bath
Cold	120 min.	Hot Water-bath
Cold	120 min.	Water-bath
Hot water-bath	0 min.	Cold

2. 處理(II)

5 齡起蠶을 5°C 溫度로 24 時間 低溫處理하여 一定한
時間間隙을 두고 40°C의 30 分間 高溫處理 (Oven 內의
乾熱)한 것과 反對로 高溫處理後 低溫處理를 하였다.

여기서 1次處理後에 2次處理까지 期間은 25°C의 室
溫에 保護하였다.

Treatment II. Method in treatments of cold and heat in the 5th instar larvae.

Ist treatment	Time interval	2nd treatment
Heat		
Cold	0 min.	Heat
Cold	30 min.	Heat
Cold	60 min.	Heat
Cold	90 min.	Heat
Cold	120 min.	Heat
Heat	0 min.	Cold
Heat	30 min.	Cold
Heat	60 min.	Cold
Heat	90 min.	Cold
Heat	120 min.	Cold

3. Virus 多角體의 檢鏡

核型多角體病(N), 中腸型多角體病(C) 및 併發型(NC)
으로 區分해서 核型多角體病(N), 中腸型多角體病(C)은
B.P.B (Brome phenol blue) Solution 染色法에 의하여
檢鏡하였고 併發型(NC)은 Giemsa solution 染色法⁽¹²⁾에
의하여 檢鏡하였으며 中腸型多角體病(C)은 Microtome
section^{(5) (11)}에 依해 10 μ 으로 切片하여 檢鏡하였다.

III 實驗結果 및 考察

Virus 多角體病은 低溫 및 高溫의 Stressor 를 使用하

Table 1. The frequency of polyhedroses induced by the treatment of cold and hot-water bath in the 5th instar larvae.

1st treatment	Time interval (min.)	2nd treatment	No. of larvae tested	Percentage of induced polyhedroses (Class of diseased larvae)			Percentage of nonvirus death
				N.	NC.	C.	
Control			25	0	0	0	4.0
Cold			25	4.0	4.0	20.0	0
Cold	0	Water-bath	25	0	8.0	28.0	4.0
Cold	0	Hot water-bath	25	0	0	4.0	0
Hot water-bath			25	0	0	8.0	0
Cold	30	Hot water-bath	25	0	0	24.0	0
Cold	60	Water-bath	25	0	4.0	28.0	4.0
Cold	120	Hot water-bath	23	4.0	0	56.0	0
Cold	120	Water-bath	25	0	0	48.0	0
Hot water-bath	0	Cold	25	4.0	4.0	8.0	8.0

Silkworm variety, Moran X Daedong; rearing season, summer in 1969; cold treatment, exposing the 5th instar larvae just after ecdysis to low temperature (5°C) for 24 hours; water-bath treatment, soaking larvae in water (20°C) for 5 minutes; hot water-bath treatment, soaking larvae in hot water (40°C) for 5 minutes. Larvae after the first treatment were left at room temperature (25°C) till the second treatment.

Table 2. The frequency of polyhedroses induced by the treatment of cold and heat in the 5th larvae.

1st treatment	Time interval (min.)	2nd treatment	No. of larvae tested	Percentage of induced polyhedroses (Class of diseased larvae)			Percentage of nonvirus death
				N.	NC.	C.	
Control			50	0	0	0	2.0
Heat			50	0	4.0	0	0
Cold	0	Heat	50	14.0	2.0	4.0	0
Cold	30	Heat	50	4.0	12.0	36.0	4.0
Cold	60	Heat	47	8.0	0	43.0	0
Cold	90	Heat	50	4.0	18.0	46.0	2.0
Cold	120	Heat	49	2.0	12.0	30.0	0
Heat	0	Cold	50	4.0	10.0	2.0	6.0
Heat	30	Cold	45	2.0	0	26.2	0
Heat	60	Cold	50	12.0	8.0	42.0	12.0
Heat	90	Cold	47	6.0	12.0	32.0	8.0
Heat	120	Cold	43	2.4	19.2	24.0	12.0

Silkworm variety, Moran X Daedong; rearing season, fall in 1969; cold treatment, exposing the 5th instar larvae just after ecdysis to low temperature (5°C) for 24 hours; heat treatment, exposing larvae to high temperature (40°C) for 30 minutes. Larvae after the first treatment were left at room temperature (25°C) till the second treatment.

있을 때 그誘發現象이 일어 난다는事實은 잘 알려져 있다. 그러나本實驗에서는 5齡起蠶을 供試하여 5°C 에 24時間 냉장하여 出庫後에 Water bath, Hot water

bath에 浸漬하고 또 一定時間을 두고 1次, 2次 處理한 것에 對하여 Virus 誘發率을 調査하였다.

그 結果는 表 1에서 보는바와 같이 核型多角體病(N)

에 대한誘發率을 보면 低溫處理, 低溫處理後 120分 時間間隙을 두고 Hot water bath, Hot water bath 處理後 低溫處理를 한 것 외에는 中腸型多角體病(C)의 誘發이 많았다.

특히 2種의 Stressor를 組合處理한 것을 보면 低溫處理 120分後에 Hot water bath, Water bath, 低溫處理 直後 및 60分後 Water bath, 60分後 Hot water bath 區는 中腸型多角體病(C)의 誘發이 많았다.

以上의 結果에서 中腸型多角體病(C)의 誘發은 低溫 單獨處理 보다는 Water bath, Hot water bath를 組合 處理한 複合處理의 效果가 더욱 크다.

그리고 低溫處理와 高溫處理(乾熱), 高溫處理와 低溫 處理를 複合處理하여 그 後에 나타난 Virus 多角體病의 誘發率을 調査한 結果는 表 2에서 보는 바와 같이 5°C에 24時間 냉장, 40°C의 乾熱로 30分間 處理한 것과 5°C에 24時間 低溫處理後에 0, 30, 60, 90, 120分間의 室溫(25°C)에 放置했다가 高溫(乾熱)으로 30分間 處理한 Virus 多角體病의 誘發率을 보면 高溫單獨 處理 區는 核型多角體病(N), 中腸型多角體病(C)은 全然 發生하지 않았고 低溫處理 直後 高溫處理한 區는 核型多角體病(N)이 比較의 많이 發生하였으나 그 外의 處理 區는 中腸型多角體病(C)이 많이 發生하였다. 특히 低溫處理後 90, 60, 30, 120分後에 高溫(乾熱) 處理한 區는 中腸型多角體病(C)이 많이 發生하였음을 보여 주고 있다.

以上의 實驗과는 反對로 高溫(乾熱) 處理後에 低溫處理한 Virus 多角體의 誘發率을 보면 高溫處理 60分後의 低溫處理區가 核型多角體病(N)이 他區보다 比較的 많이 發生한 경향이 있고 中腸型多角體病(C)은 核型多角體病(N)보다 많이 發生하였다.

특히 高溫處理後 60, 90, 30, 120分後에 低溫處理한 區가 많이 發生한 경향을 보여주고 있다.

本 實驗에서 나타난 것과 같이 Virus 多角體는 低溫, 高溫을 單獨 또는 複合處理 하였을 때 核多角體病(N)이나 中腸型多角體病(C)이나 併發型(NC) 多角體病이 그 Stressor에 依하여 誘發現象을 일으켰다.

그러나 이때까지 여러 學者들은 이들 誘發現象에 對하여 왜, 무엇때문에 誘發現象이 일어나게 되는지 實驗的으로 確證할만한 事實은 發見하지 못하고 있다. 다만 다음 두가지의 假說에 理論을 도우고 있고 이 假說 위에서 여러가지 研究를 하고 있다.

即 蠶體內的 Occult virus의 存在 및 어떤 條件에 依한 活性化, 蠶體細胞內的 生化學的인 物質에서의 Virus 生成 등을 提示하고 있다.⁽¹²⁾

또 低溫處理와 高溫處理의 誘發效果에 對하여 高溫處

理 보다 低溫處理가 그 效果가 크다는 여러 學者들의 報告가 있는데 Aruga(1957a, 1958a, 1958c)^(2,3,4) Aruga, Arai(1959)⁽⁷⁾ Aruga, Watanabe(1959)⁽⁹⁾는 低溫處理에 依한 Virus 多角體의 誘發率은 低溫의 條件, 蠶品種 또는 系統의 差異 即 Occult virus의 活性化에 關與해서 生理的 機能을 調節하는 遺傳的인 要因, 低溫處理時 누에의 經過, 低溫處理 以前의 누에에 給與된 桑葉의 飼料的 條件等에 依하여 決定된다고 報告하였다.

또 最近에는 4角形 Virus 多角體는 6角形으로 부터 Mutation에 依한 Mutant라고 提示하여 實驗的으로 證明하고 있다.

4角形 Virus 多角體를 接種하여 化蛹, 化蛾한 것을 다른 正常蠶과 Crossing시켜 産卵, 孵化한 누에를 低溫處理를 하여 調査한 結果, 元來의 接種시킨 4角形 Virus가 많이 나타난다고 하였다.

이상의 結果는 前代에 接種시킨 4角形 Virus 多角體는 幼蟲, 蛹, 蛾를 通하여 다음 世代로 옮겨진다고 볼 수 있다.^(1,9,12)

그러나 이러한 現象은 遺傳學的으로 볼때 解析이 곤란한 것은 事實이다. 그 理由는 Virus 多角體의 增殖과 生成은 細胞의 核과 細胞質에서 이루어 지는데 核型多角體病(N)의 核酸은 DNA이고 中腸型多角體病(C)의 核酸은 RNA이며 核內에는 DNA, RNA가 存在하나 細胞質에는 RNA만 存在하므로 遺傳學的인 解析으로 볼때 首肯이 가지 않는 것은 어찌할 수 없다.

그러나 細胞內的 核酸의 存在形態와 核型多角體病(N)과 中腸型多角體病(C)의 Virus 多角體의 形成의 位置 및 核酸의 種類와의 關係는 이상의 問題點을 解決하는데 좋은 暗示를 示唆하는 것은 事實이라 생각되어진다.

그런데 本實驗에서 特記할만한 事實은 核型多角體病(N)의 誘發率과 中腸型多角體病(C)의 誘發率을 比較하여 볼때 普遍的으로 處理(I), 處理(II)를 막론하고 中腸型多角體病(C)의 誘發率이 많은 現象을 보여 주고 있다.

또 低溫 및 高溫處理에 對하여는 單獨處理보다 兩處理를 組合하여 一定한 時間間隙을 두고 處理한 結果가 核型多角體病(N)보다 中腸型多角體病(C)이 많이 發生된 現象은 急激한 溫度變化가 누에의 生成機能을 障礙하여 誘發되었다고 推測되며 核型多角體病(N)보다 中腸型多角體(C)에 對하여 그 處理에 效果가 크다고 믿어진다. 即 高溫 및 低溫의 複合處理는 單獨處理보다 그 誘發效果가 커서 누에의 生理的 機能을 破壞하여 그 異常條件이 絶頂에 달하면 元來의 누에 體內的 不活性化인 Virus가 活性化하여 誘發現象이 이루어진다고 推測할 수 있겠다.

이러한 Virus 多角體病의 誘發現象이나 Occult virus의 性質에 對해서는 앞으로 細胞組織學的 및 生化學的으로 究明되지 않을가 생각되어 진다.

併發型(NC)의 檢鏡에 있어서는 一個體의 누에에서 核型多角體病(N)과 中腸型多角體病(C)이 併發하는 경우는 B.P.B 染色法에 依하여 核型多角體病(N) Microtome section에 依하여 中腸型多角體病(C)은 確認하였지만 누에의 血液과 中腸을 同時에 磨碎하여 Giemsa solution에 依하여 染色하여 調査하였다.

Giemsa solution에 依한 染色法은 核型多角體病(N)의 多角體는 染色이 되지 않으나 中腸型多角體病(C)은 잘 染色되었다. 結果적으로 核型多角體病(N)과 中腸型多角體病(C)은 Giemsa solution 染色法에 依하면 이 두가지의 多角體病을 區分하는데 좋은 資料가 될것이라 믿어진다.

IV 摘 要

家蠶의 Virus 多角體의 低溫 및 高溫處理에 對한 誘發現象을 調査하기 爲하여 5齡起蠶을 供試하고 低溫(5°C, 24hrs.), 高溫(Hot water bath에 40°C, 5min으로 浸漬 및 Oven內에 40°C, 30min.으로 乾熱處理), Water bath(20°C, 5min)으로 單獨 및 複合處理하여 核多角體病(N) 中腸型 多角體病(C), 併發型(NC)의 誘發率을 調査하고 同時에 核多角體病(N)과 中腸型多角體病(C)대하여 Giemsa solution 染色法에 依한 染色性을 調査하였다.

1. 冷藏(5°C, 24 時間) 處理와 高溫(Hot water bath, 40°C, 5 分間) 處理를 한 核復多角體病(N)은 中腸型多角體病(C)보다 그 誘發率이 적고 또 複合處理에 있어서도 中腸型多角體病(C)의 誘發率은 核多角體病(N) 보다 많다.

2. 冷藏處理後 高溫(40°C, 30 分間 乾熱) 處理, 反對로 高溫處理後 冷藏處理한 Virus 多角體의 誘發率도 中腸型多角體病(C) 보다 核型多角體病(N)의 誘發現象이 顯著하게 많이 나타났다.

3. Giemsa solution 染色法에 依한 核多角體病(N)의 多角體는 染色이 되지 않으나 中腸型多角體病(C)의 多角體는 잘 染色되어 染色性에 依하여 區別할수 있었다.

V 參 考 文 獻

- Iwashita, Y., and Aruga, H. (1957) Mechanism of resistance to virus diseases in the silkworm, *Bombyx mori*. III. Histological studies on the polyhedroses in the silkworm. J. Sericult. Sci. Japan, 26, 323-328.
- Aruga, H. (1957a) Mechanism of the virus resistance in the silkworm, *Bombyx mori*. L. II. On the relation between the nuclear polyhedrosis and the cytoplasmic polyhedrosis. J. Sericult. Sci. Japan, 26, 279-283.
- Aruga, H. (1958a) Mechanism of the virus resistance in the silkworm, *Bombyx mori* L. IV. N. On the relation between the polyhedral diseases and environmental factors. J. Sericult. Sci. Japan, 27, 5-9.
- Aruga (1958c) Mechanism of the virus resistance in the silkworm, *Bombyx mori*. (V) On the relation between the rearing season and the cytoplasmic polyhedrosis. J. Sericult. Sci. Japan, 27, 14-17.
- Peter Gray (1958) Hand book of basic microtechnique. 124-171.
- 福原敏彦·有賀久雄 (1958) 溫度處理による家蠶多角體病의 誘發現象·日蠶雜 28(4), 235-241.
- Aruga, H., and Arai, N. (1959) Studies on the induction of polyhedroses by the low temperature treatment between inbred lines and their hybrids in the silkworm, *Bombyx mori*. L. J. Sericult. Sci. Japan, 28, 302-307.
- Aruga, H., and Hukuhara, T. (1960) Induction of nuclear and cytoplasmic polyhedroses by feeding of some chemicals in the silkworm, *Bombyx mori* J. Sericult. Sci. Japan, 29, 44-49.
- Aruga, H., and Watanabe, H. (1959) Difference of induction rate of polyhedroses by some treatments between inbred lines and their hybrids in the silkworm, *Bombyx mori*. L. J. Sericult. Sci. Japan, 30, 36-42.
- 福原敏彦(1961) 家蠶中腸型多角體病ウイルス의 次代蠶への傳達 日蠶雜 30, 238.
- 深谷昌次, 石井象二郎, 山崎輝男(1963) 昆蟲實驗法 192-200.
- Steinhaus (1963) Insect pathology. Vol.1 499-530.
- Aruga, H., and Yoshitake, N. (1964) Interaction between cytoplasmic polyhedrosis viruses in the silkworm, *Bombyx mori* L. under certain conditions. J. Sericult. Sci. Japan, 33, 345-351.
- Aruga, H., and Watanabe, H. (1967) Effect of high temperature on the infection with cytoplasmic polyhedrosis viruses and on interference between viruses in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Japan 34, 391-394
- 松原藤好 (1967) 無菌飼育における蠶病に關する研究. IV. 藥品添食が無菌飼育におよぼす影響 日蠶雜 36, 159-164.

16. Kurata, K. (1968) Incidence of virus diseases in aseptically-grown silkworm, *Bombyx mori* L. II. Effect of feeding of chemical and irradiation of gamma-rays. Bull. Sericul. Exp. Sta. 23, 149-171.

17. 松原藤好 (1968) 無菌飼育における蠶病に関する研究. V. 自然暴露後薬品添食した場合の核多角體病誘發日蠶雜 37, 137-142.

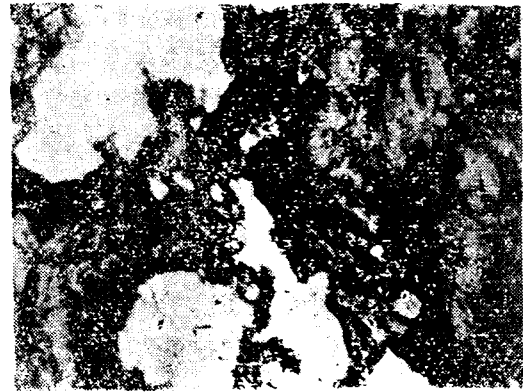
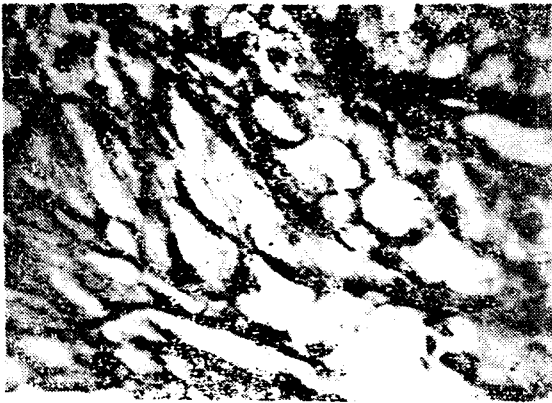


Fig. I. 中腸의 圓筒狀 細胞質에 나타난 中腸型多角體病 (C)의 多角體. $\times 430$.

Fig. II. 中腸型多角體病(C)의 多角體가 胃空方向으로 Release 된 形態. $\times 430$.

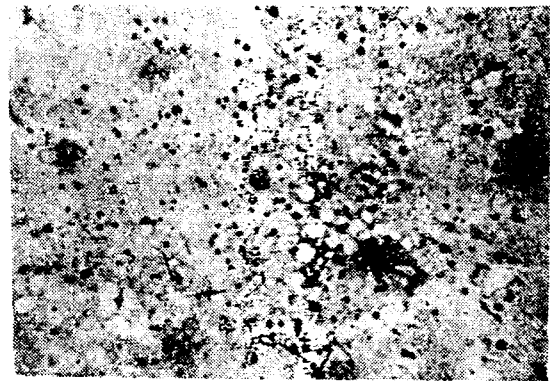
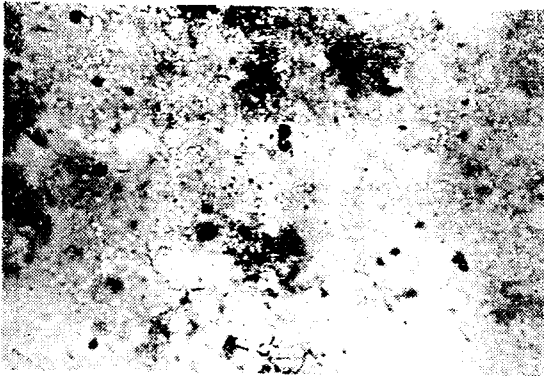


Fig. III. Giemsa solution 染色法에 의한 核多角體病 (N)多角體의 觀察. 染色이 되지 않고 있음. $\times 430$.

Fig. IV. Giemsa solution 染色法에 의한 中腸型多角體病 (C)의 多角體觀察. 染色이 잘 되었음. (Background에 흰 Spot 모양은 核多角體病의 多角體임) $\times 430$.