# Latex-Test에 依한 植物 바이러스의 検定

朴 銀 景 · 金 政 和 · 李 永 根

韓国煙草研究所 病理研究室

(1979. 3. 20 접수)

## Serological Detection of Plant Viruses with Latex-test

Eun kyung Park, Jeong Hwa Kim, Young Keun Lee

Korea Tobacco Reseach Institute.

(Received March 20, 1979)

## 초 록

低濃度의 바이러스 조건하에서도 반응의 민감도가 높은 바이러스病의 血清学的 診断法을 개발하고자 담배모자이크 바이러스(Tobacco mosaic virus), 보리줄무늬 모자이크 바이러스(Barley stripe mosaic virus) 및 大豆모자이크 바이러스(Soybean mosaic virus)의 抗血清으로부터 電気泳動에 의해 추출된 Immunoglobulin을 Latex(0.81 $\mu$, Difco)粒子에 흡착시켜 梢子毛細管(1×100 mm)내에서 各 罹病組織의 汁液과 반응시킨 결과 寒天拡散法이나 微量沈降法보다 민감도가 매우 높았다. 이 방법은 작업과정이 간편하고 빠른 시간내에 다량의 시료를 検定할 수 있으며 陽性反応과 陰性反応을 쉽게 구별할 수 있었다.

## Abstract

A simple test using latex-agglutination was developed to detect serologically tobacco mosaic virus (TMV), soybean mosaic virus (SoyMV), and barley stripe mosaic virus (BSMV) from infected plants.

Latex spheres (0.81 $\mu$, Difco) were adsorbed with immuno globulin purified by electrophoresis from crude antiserum against viruses. The antibody-sensitized latex suspension was mixed with sap from virus-infected leaves in a glass capillary tube (inner diam. 1 mm × 100 mm length) The mixture, after agitation, was observed, under a stereo microscope at low magnification (X 20 – X 40), to examine the reaction between antigen (Virus) and its antibody. Flocculation occurred when the reaction was positive.

This method was found highly sensitive in detection of rod-shaped viruses (TMV and BSMV) even at low virus concentration, simple and rapid in performance, and easy in reading.

## 緒 論

植物의 바이러스病을 診斷하는 데는 반응의 特異性(Specificity)과 빠르고 간편한 이점 때문에 血清学的인 방법이 많이 이용되고 있다. 지금까지 植物바이러스病 진단에 주로 이용되어왔던 寒天拡散法(Ouchterlony agar double diffusion test)이나 微量沈降法(Microprecipitin test)(1, 9)등은 바이러스粒子의 형태에 따라 利用範囲가 제한될 뿐만 아니라 試料가 微量이거나 바이러스濃度가 낮을때는 반응의 판별이 어려운 경우가 많았다.

Bercks(2)는 Bentonite와 Latex를 이용하여 低濃度의 바이러스도 血清学的 診斷이 가능함을 시사하였으며 이를 이용하여 현미경 slide glass 또는 試驗管內에서 반응을 시켜 微量의 바이러스를 検出하였다(6, 10). 그러나 이같은 방법은 抗源과 抗体가 잘 혼합되지 않아 이들의 반응에는 오랜 시간과 많은 양의 抗血清이 所要되는 관계로 가는 유리管을 사용하여 抗源과 抗体를 용이하게 혼합시킴으로서 빠른 시간내에 소량의 抗血清으로 바이러스를 検定하는 새로운방법을 개발하였다(4, 5). Lundsgaard(3)는 이 방법을 보리種子에 感染된 줄무늬모자이크 바이러스(Barley stripe mosaic virus)検定에 응용함으로써 작업이 용이하고 반응의 민감도도 높았다고 하였다.

본 시험은 담배모자이크 바이러스(Tobacco mosaic virus)와 大豆모자이크 바이러스(Soybean mosaic virus), 보리줄무늬 모자이크바이러스(Barley stripe mosaic virus)를 대상으로 低濃度의 바이러스도 단시간내 간편하게 検定이 가능한 방법을 모색하여 바이러스 진단에 활용하고자 실시하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試 바이러스源

가. 담배모자이크 바이러스(Tobacco mosaic virus : TMV).

韓国煙草研究所 水原分所에서 분리, 보관중이던 TMV를 *Nicotiana tabacum* var. *Samsun*에 接種하여 10일후 全身的으로 感染된 엽을 殺菌된 유발로 磨砕, 搾汁하여 低速遠心分離한 上清液을 사용하였다.

나. 大豆모자이크 바이러스(Soybean mosaic virus : SoyMV)

「덴막」種子病理研究所(Danish Government Institute of Seed Pathology)에서 분양받은 罹病組織을 大豆 品種"Hill"에 접종하여 2주후 全身感染된 잎 1gr에 Tris-Hcl Buffer(0.05*M*. pH 7.2. 0.02% $NaN_3$) 1 ml 을 넣고 磨砕, 搾汁한 것을 低速遠心分離하여 그 上清液을 사용하였다.

다. 보리줄무늬모자이크 바이러스(Barley Stripe mosaic virus).

「덴막」種子病理研究所에서 분양받은 보리 罹病種子(品種"Bomi")를 播種하여 3주후 全身感染된 잎을 TMV의 경우와 같이 上清液을 만들어 사용하였다.

### 2. 供試 抗血清

TMV, SoyMV 및 BSMV의 粗抗血清과 SoyMV와 BSMV의 Latex-antiserum은「덴막」의 種子病理研究所 Antiserum bank로 부터 분양받아 사용하였다.

### 3. Latex-antiserum의 造製

TMV의 粗抗血清을 Sephadex-G 25(Fine)

泳動帶上에서 電気泳動에 의해 분리된 Immunoglobulin을 Latex ( 0.81 $\mu$, Difco ) 에 결합시켜 사용하였다.

Mix 1 ml of latex suspension (1:14 in saline buffer) and Immunoglobulin solution.
Centrifuge the mixture at 3,000 rpm for 20 minutes, after keeping it at room temperature for 30 minutes.

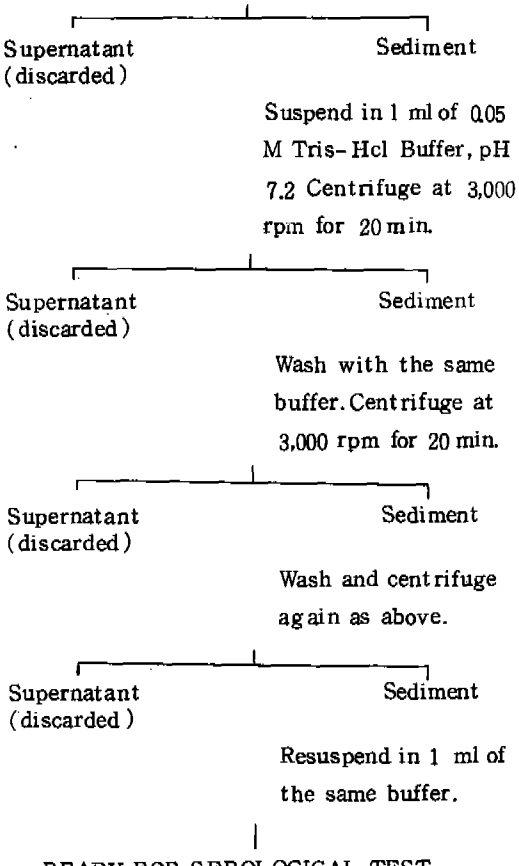


Fig. 1. Preparation of antibody- sensitzed latex balls.

### 4. 血清反応

Latex-test는 바이러스 罹病組織을 磨砕, 搾汁하여 遠心分離後 얻어진 바이러스汁液을 0.05 *M* Tris-Hcl Buffer ( pH 7.2, Polyvinylpyrrolidone 0.02%, $NaN_3$ 0.02%)로 倍量稀釈法에 의해 각 단계별로 희석하여 梢子毛細管 ( 內徑 1 mm, 길이 100 mm ) 에 Latex-antiserum 혼합액을 1 cm정도 빨아 올린다음 희석된 바이러스 汁液을 다시 2 cm정도 빨아 올려 室溫에서 15분간 회전시킨뒤 解剖顯微鏡 20~40배에서 반응을 관찰하였다. 이때 対照区로 latex-antiserum과 Tris-Hcl Buffer를 혼합하여 特異反応과 구별하였다.

寒天拡散法은 $NaN_3$와 Trypan blue가 각각 0.01%씩 포함한 0.8% 寒天 ( Oxoid, Ion Agar No. 2)을 사용하였으며 微量沈降法은 Van Slogteren의 방법에 준하였다.

## 結果 및 考察

檢定方法別 試驗結果, 同一한 TMV抗血清을 사용하였음에도 latex-test에서는 TMV 罹病汁液의 희석배수 1024배까지 陽性反応을 나타냈으나 微量沈降反応에서는 64배, 寒天拡散法에서는 16배까지만 陽性反応을 나타냈다. ( Table 1). 그러나 latex-test에서 罹病汁液의 稀釈倍数가 16배까지는 반응이 나타나지 않았으며 256배일때 가장 명확한 반응을 나타냈다. ( Fig. 2). 이와같이 低濃度의 바이러스 ( TMV)용액에서도 陽性反応이 나타난것은 抗体 ( Immunoglobulin ) 가 吸着되어 있는 latex ball과 ball사이를 바이러스粒子가 연결하여 줌으로써 latex ball의 沈降이 쉽게 일어나기 때문이며 반면, 높은 농도의 바이러스용액에서는 대부분의 latex-ball표면이 바이러스粒子로 飽和되어 있어 이 바이러스와 결합할 수있는 抗体의 결여로 陽性反応 특유의 沈降現象이 일어나지 않았던 것으로 생각된다.

POTY 바이러스群의 一種인 SoyMV의 경우 罹病葉으로부터 얻은 汁液은 稀釋倍数 8 배까지 検定이 가능하였으며 微量沈降反応法은 4배까지 가능하였다 ( Table 2). 그러나 SoyMV를 寄主植物의 一種인 *Lupinus albus*에 人工接種하여 그 全身感染葉으로부터 만들어진 汁液은 Latex-test에서 희석배수 16배, 微量沈降 反応에서

Table 1. Comparison of serological sensitivity to TMV in latex, precipitin, and agar gel double diffusion test

| Testing method \ Antigen titre | 1/1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1024 | 1/2048 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Latex | *− | − | − | − | ± | + | + | + | +++ | ++ | + | ± |
| Microprecipitin | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | + | ± | − | − | − | − |
| Agar gel double diffusion | +++ | +++ | ++ | + | + | − | − | − | − | − | − | − |

* +++, Strongly positive reaction ; ++, moderately positive; +, weakly positive ; ±, doubtful ; −, negative.
These signs are used in the same way in the following tables.

Table 2. Comparative sensitivity of letex ( L ) and precipitin test(P) in serological detection of soylcan mosaic virus

| Clarified sap dilution | Isolate I | | Isolate II | | Isolate I infected on L albus | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | L | P | L | P | L | P |
| 1 : 1 | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ |
| 1 : 2 | +++ | ++ | ++ | + | +++ | +++ |
| 1 : 4 | ++ | + | + | − | +++ | + |
| 1 : 8 | + | − | − | − | ++ | + |
| 1 : 16 | − | − | − | − | + | − |
| 1 : 32 | − | − | − | − | − | − |

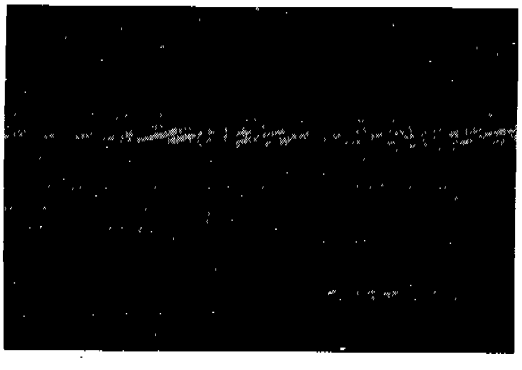

Fig. 2. The latex–test performed in capillary tubes. Flocculation of latex spheres, a positive reaction, is seen in the upper tube whereas no flocculation has occurred in lower tube. Bar represents 5 mm.

는 8배까지 檢定이 가능하였다. 이 결과는 寄主種類에 따라 SoyMV의 增殖정도가 다르기 때문으로 생각된다. 즉 SoyMV를 大豆(品種 ; Hill)와 *L. albus*에 人工接種하여 2주후 그 搾汁液을 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* cv. Top crop) 잎에 接種(7, 8)한 결과 *L. albus*에서 增殖된 것이 훨씬 바이러스濃度가 높았다(Table 3). 특히 大豆에서 증식된 SoyMV의 汁液을 그대로 抗血淸檢定에 사용하면 非特異的 沈降現象(Non-specific precipitin)이 일어나 특이반응과 혼동되기 쉬웠으며 罹病汁液을 中性에 가깝도록 酸度를 調節하는 것이 이 非特異沈降現象을 없애는 데 효과적이었다.

Latex-test에 의해 보리의 BSMV를 檢定한 결과, 罹病汁液의 희석배수 1024배까지 陽性反

Table 3. Comparison of virus multiplication when different host plants were inoculated with soybean mosaic virus

| Host plants | Number of local lesions * | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | Avg. |
| *Glycine max* cv. Hill | 130 | 116 | 178 | 105 | 132 |
| *Lupinus albus* | 235 | 255 | 165 | 250 | 226 |

* Assayed on *P. vulgaris* cv. Top crop.

応을 나타냈으며 128배에서 가장 명확한 반응을 보였다(Table 4). 이 결과는 TMV의 경우와 같은 경향으로 罹病汁液의 바이러스濃度가 높을 때는 오히려 반응이 나타나지 않거나 명확하지 않았다.

Table 4. Reaction of antibody-sensitized latex balls with plant sap containing BSMV at different dilution of antigen

| Dilution of sap* from BSMV-infected barley | Reaction |
|---|---|
| 1 : 4 | ± |
| 1 : 16 | + |
| 1 : 64 | ++ |
| 1 : 128 | +++ |
| 1 : 1024 | ++ |
| 1 : 2048 | ± |
| 1 : 4096 | − |

* The infected sap was obtained from barley(cv. Bomi) leaves 2 weeks after inoculation.

또 이 바이러스에 感染된 보리로부터 採種된 種子를 直徑 9cm의 petri-dish에 吸水시킨 濾過紙를 깔고 播種(25粒/petri-dish)하여 1주일간 発芽시킨후 어린 싹의 끝부분 1cm 정도와 Tris-Hcl Buffer(0.05*M* pH 7.2, 0.02% Polyvinylpirrolidone) 0.25ml을 petri-dish에 넣고 가볍게 茶솥가락으로 罹病組織을 눌러 室温에서 2시간(Table 5) 放置하여 罹病組織으로부터 Buffer 내로 바이러스가 유출되도록 한 다음 Latex-antiserum과 반응시킨 결과 뚜렷한 陽性反応을 나타냈다.

Table 5. Hourly change in serological sensitivity of the latex test to TMV and BSMV

| Viruses | standing hours | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 4 |
| TMV | + | + | +++ | +++ | +++ |
| BSMV | + | + | ++ | +++ | +++ |

또한 TMV에 全身感染된 담배(品種 : Hicks) 잎에서도 위와 같은 방법으로 検定한 결과 罹病葉 1cm² 정도면 명확한 陽性反応을 나타낼수 있었다 이 방법은 보리種子의 줄무늬모자이크 바이러스 感染여부를 검정하는데 매우 편리하고 효율적일 것으로 생각된다.

梢子毛細管을 이용하여 latex test를 할 때 TMV 罹病汁液과 latex-antiserum을 빨아들인 모세관을 2～3mm의 간격으로 부착시킨 현미경 slide glass (85×35 mm) 여러개를 한개의 回転軸에 걸고 5분에 한번씩 서서히 2～3 회전을 시켜 15분간 罹病汁液과 latex-antiserum을 반응시킨 결과 명확한 陽性反応을 나타냈다(Table 6).

Table 6. Effect of agitation period on distinctness of latex agglutination

| Minutes of agitation | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 40 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Distinctness of latex aggregation | ± | + | +++ | +++ | +++ | +++ |

Phatak(6)은 糸状形의 바이러스보다 短桿状 또는 球形의 바이러스가 latex-test의 경우 더욱 민감도가 높았다고 하였는데 본 실험에서도 SoyMV보다는 TMV와 BSMV의 민감도가 높게 나타났다.

이상에서와 같이 latex를 이용한 植物바이러스病의 血清学的 診断은 반응의 민감도가 높고 단시간내에 간편하게 검정할 수 있어 種子伝染性 바이러스의 種子検定 또는 罹病組織이 微量이거나 바이러스濃度가 낮은 경우의 검정에도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 參考文献


1. Ball, E. M., American Phytopathological Society, 16p. (1961).
2. Bercks, R., Phytopath. Z. 58 ; 1-17. (1967).
3. Lundsgaard, T., Z. Pflkrankh. Pflschutz 83 : 278-283 (1976).
4. Marcussen, O. F., Kgl. Vet.-og Landbohjsk. Arsskr. 44-48 (1975).
5. Marcussen, O. F., T. Lundsgaard, Z. Pflkrankh-Pflschutz 82 : 547-548 (1975).
6. Phatak, H. C., Seed Sci. & Technol. 2 : 3-155 (1974).
7. Quantz, Phytopath. Z. 43 : 79-101 (1961).
8. Soong, M. M., G. W. Milbrath, 2nd Internatl. Cong. Plant Path. Absters : 0925 (1973).
9. Van Slogteren, D. H. M., Proc. of the 2-nd Conference on Potato virus Diseases. Lisse-Wageningen, p. 51-54 (1955).
10. Yokoyama Tatsuo, Res, Comm. Inst. Ferment. Osaka 7 : 74-111 (1975).