

## Berberine Sulphate를 이용한 螢光顯微鏡技法에 의한 樹木마이코플라스마檢定<sup>1</sup>

朴元喆<sup>2</sup> · 羅瑤俊<sup>3</sup>

### Detection of Mycoplasma-like Organisms in Some Trees by Fluorescence Microscopy with Berberine Sulphate

Won Chull Bak<sup>2</sup> and Yong Joon La<sup>3</sup>

#### 要 約

螢光色素 berberine sulphate의 DNA 및 RNA-結合性質을 이용한 螢光顯微鏡技法의 마이코플라스마(mycoplasma-like organism ; MLO)感染診斷에 對한 效用價値를 調査하였다. 羅病 대추나무, 오동나무, 뽕나무 및 日日草의 組織切片을 berberine sulphate로 染色하여 螢光顯微鏡으로 觀察하였던 바, 篩部組織에서 MLO-特異螢光反應이 나타났으나, 健全組織의 篩部에서는 特異螢光이 觀察되지 않았다. 이와 같은 berberine sulphate의 組織染色法은 木本 및 草本植物의 MLO感染을 正確하게 診斷하는데 매우 有用한 方法임을 보여 주었으며, 使用이 簡單하고 費用이 低廉하므로 大量의 試料에 대한 迅速한 檢定에 利用될 可能性을 보여 주었다.

#### ABSTRACT

The efficacy of berberine sulphate, a fluorochrome having binding properties with both DNA and RNA, was investigated for the detection of mycoplasma-like organisms(MLOs) in jujube(*Zizyphus jujuba*), paulownia (*Paulownia tomentosa*), mulberry(*Morus alba*) trees and periwinkle (*Catharanthus roseus*) plant. When examined under fluorescence microscope, berberine sulphate-stained sections of diseased samples showed distinct MLO-specific fluorescent particles in the phloem area, while such fluorescence was absent in the healthy ones. This staining technique was proved to be a very accurate method for the diagnosis of MLO infections in woody and herbaceous plants. Furthermore, the cheap and easy procedure could be used to test a great number of samples on MLO infections with reliability and rapidity.

*Key words* : Detection, berberine sulphate, DNA, RNA, fluorescence microscopy, mycoplasma-like organisms.

#### 緒 論

우리나라에서 마이코플라스마(mycoplasma-like organism ; MLO)에 의한 植物病이 繼續 늘어나고 있으며, 特히, 主要 經濟樹인 대추나무

및 오동나무 등에 極甚한 被害를 주고 있다. 植物MLO病의 診斷을 위하여 아직까지는 電子顯微鏡技法이 MLO의 超微細構造까지 觀察할 수 있는 가장 確實한 方法으로 되어 있으나, 裝備의 價格이 매우 비쌌 뿐만 아니라, 檢鏡을 위한 試料製作에 많은 時間이 所要된다. 이 때문에,

<sup>1</sup> 接受 1991年 4月 4日 Received on April 4, 1991.

<sup>2</sup> 林業研究院 Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea.

<sup>3</sup> 서울대학교 農科大學 College of Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

aniline blue를 始作으로 여러가지 螢光色素를 利用한 MLO感染診斷法이 많이 試圖되어 왔고<sup>2), 5,8,9,13,14)</sup>, 특히, 螢光色素 DAPI의 效果는 이같은 螢光顯微鏡의 診斷研究에 크게 奇與한 바 있다.<sup>1,7,16,20)</sup> 이와 같은 螢光顯微鏡技法은 電子顯微鏡技法에 비해 매우 簡單한 데, 이는 大部分의 螢光色素가 MLO細胞의 DNA와 結合하는 單純한 性質에 根據를 두고 있기 때문이다. 그러나, MLO細胞에 있어서 DNA의 量이 적고, 篩管에서의 MLO의 密度가 낮기 때문에 着色하여 觀察할 物質이 적어 檢定에 限界가 있다. Razin等<sup>17)</sup>은 動物마이코플라스마 細胞의 乾量中 DNA가 4-7%, RNA는 8-17%를 차지하고 있다고 하였는데, 이는 같은 事實은 植物 MLO病的 診斷을 위해 DNA뿐만 아니라, RNA를 檢定하는 方法을 開發할 必要性을 充分히 提示해 주고 있다. 이러한 이유에서, Petzold와 Marwitz<sup>15)</sup>는 DNA 및 RNA와 結合하는 螢光色素인 berberine sulphate<sup>21)</sup>를 當담배(*Nicotiana rustica*)의 MLO 感染診斷에 使用하여 그 效果의 優秀性을 報告한 바 있다. 따라서, 새로운 螢光色素인 berberine sulphate를 대추나무, 오동나무, 뽕나무 및 日日草의 MLO檢定에 使用하여 MLO病에 대한 診斷效果를 調査하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試植物

1985年 忠淸北道 淸州에서 빗자루病에 걸린 대추나무(*Zizyphus jujuba*)와 오동나무(*Paulownia tomentosa*) 試料를 採集하였고, 오갈病에 걸린 뽕나무(*Morus alba*)는 農村振興廳 蠶業試驗場에서 採取하였다. 또한, 대추나무빗자루病을 마름무늬매미충(*Hishimonus sellatus*)에 依해 人工으로 蟲媒傳染을 시켜 約 40日後에 葉脈透化症狀이 나타나는 日日草(*Catharanthus roseus*)를 實驗에 使用하였다. 한편, 이들 4가지 植物의 實生幼苗를 健全試料로 使用하였다.

### 2. 螢光顯微鏡觀察

螢光顯微鏡觀察을 위한 試料準備에는 Petzold와 Marwitz<sup>15)</sup>의 方法을 多少 改變하여 使用하였다. 즉, 供試植物의 細枝, 葉柄, 葉脈 등을 1 cm 程度의 크기로 잘라 5% glutaraldehyde/0.1

M phosphate buffer (pH7.0)에 2時間以上 4℃에서 固定시키거나, 固定하지 않고 바로 0.5mm 程度의 두께로 橫斷 또는 縱斷 徒手切片을 만들었다. 이와 같은 切片을 0.125mM berberine sulphate/0.1M phosphate buffer (pH7.0)에 染色한 後, 바로 螢光顯微鏡(Olympus)으로 檢鏡하는데, 勵起필터는 BG3, 吸收필터는 O515를 使用하였다.

## 結 果

대추나무, 오동나무, 뽕나무 및 日日草의 罹病 組織切片을 berberine sulphate로 染色하여 螢光顯微鏡으로 檢鏡한 結果, 그림 1, 3, 4에서 보는 바와 같이, 黃綠色의 밝은 特異螢光이 篩部組織의 篩管에 나타나는 것을 觀察할 수 있었다. 日日草의 경우는 外側篩部 뿐만 아니라 內側篩部에서도 特異螢光을 보여 주었는데, 이러한 篩部構造는 협죽도科 植物의 特徵으로서 MLO가 양쪽 篩部に 同等하게 感染, 分布하고 있음을 알 수 있다. 한편, 이와 같은 MLO-特異螢光反應은 健全한 대추나무, 오동나무, 뽕나무 및 日日草의 篩部組織에서는 觀察되지 않아(그림 2), 이들 植物의 MLO感染에 대한 berberine sulphate의 診斷效果를 보여 주었다. 또한, 本 實驗에서 使用한 罹病試料를 電子顯微鏡으로 檢鏡하였던 바, 篩管에서 MLO가 密生하고 있는 것이 確認되어 berberine sulphate 染色法의 正確한 診斷效果가 立證되었다.

MLO의 DNA 및 RNA와 結合하여 나타나는 berberine sulphate의 特異螢光反應의 強度는 病徵이 甚해진 試料일수록 강한 傾向을 보였고, 木本植物보다는 草本植物에서 強했는데, 健全組織의 篩管에서는 전혀 特異螢光反應이 없기 때문에 診斷하고자 하는 植物組織의 篩管에서 若干이라도 特異螢光이 나타나면 組織이 MLO에 感染되어 있는 것으로 判斷할 수 있다. 한편, 罹病 및 健全試料의 木部組織이 螢光을 發하고 있었으며, 試料全體에 散在하고 있는 植物細胞의 核이 染色되어 螢光을 보이고 있었다. 그러나, 이러한 螢光은 弱할 뿐만 아니라 篩管에서 나타나는 MLO-特異螢光과는 쉽게 區別할 수 있었다. 때때로 罹病組織의 維管束이 甚하게 變形되어 있고(그림 1), 健全組織에 비해 篩部가 過度하게 發達되어

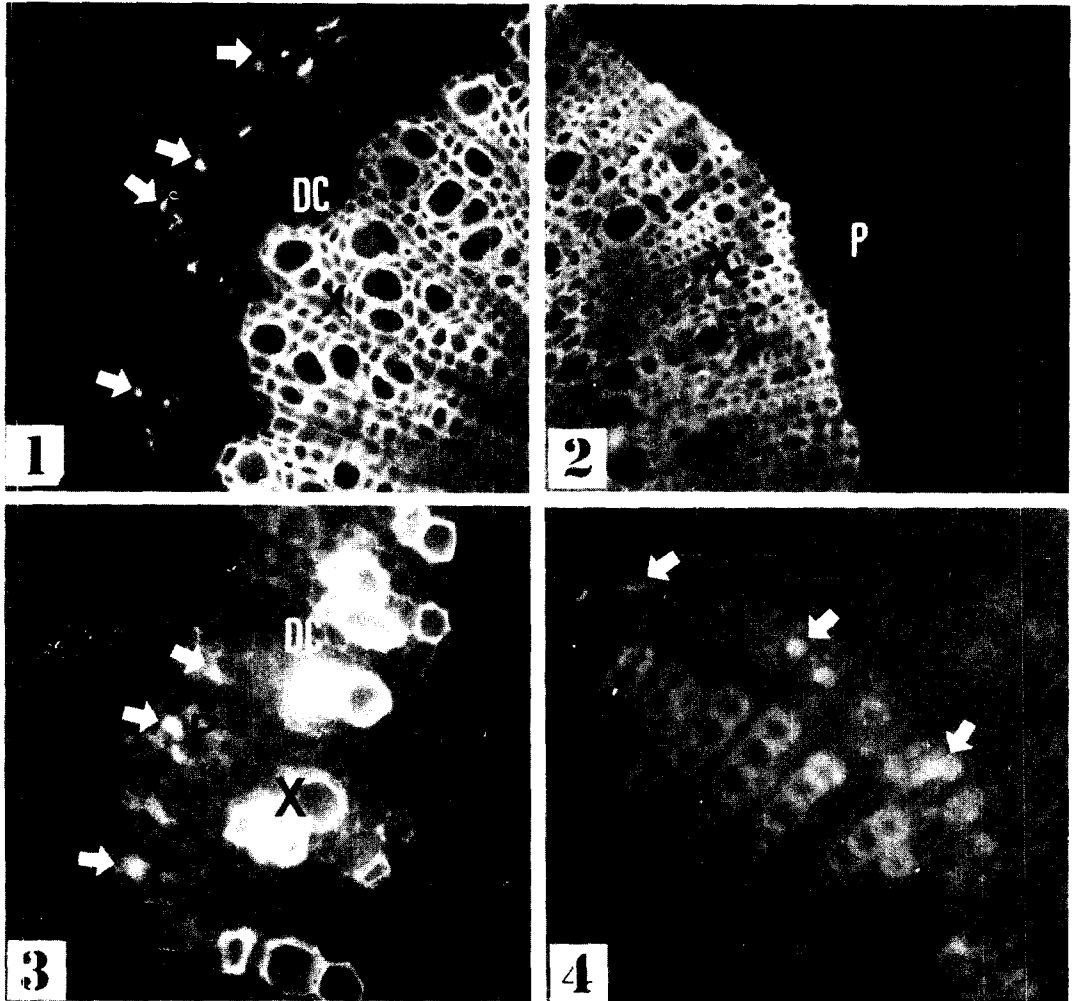


Fig. 1-4. Fluorescence micrographs of cross sections of plant stems stained with berberine sulphate. MLO-specific fluorescent spots (arrows) are visible in the phloem of diseased plants. P=phloem, X=xylem, DC=deformed vascular cambium. 1. Witches'-broom diseased jujube. 2. Healthy jujube. 3. Witches'-broom diseased paulownia. 4. Dwarf diseased mulberry.

있는 반면에 木部の 發達이 抑制어 있고 導管의 配列이 不規則함을 보여 주었다(그림 3, 4). 橫斷切片과 縱斷切片이 MLO-特異螢光을 觀察하는데 同等한 效果를 보여 주었으나, 罹病組織의 維管束形成層이 變形되어 있는 경우에 組織의 分化狀態를 明確하게 觀察하는데는 橫斷切片이 有利하였다. 한편, glutaraldehyde에 固定한 試料가 固定하지 않은 試料보다 MLO-特異螢光반응이 強하고 뚜렷했다.

## 考 察

DNA 및 RNA와 結合하는 性質을 갖는 螢光色素인 berberine sulphate를 使用하여 MLO 感染을 診斷한 結果, 몇가지 木本植物과 草本植物의 組織內 MLO 感染診斷에 有用하게 使用될 수 있음을 보여 줌으로써, Petzold와 Marwitz<sup>15)</sup>의 報告와 一致하였다. MLO-特異螢光이 篩部領域의 篩管에만 나타나는데, 이는 MLO가 寄主植物의 篩管에만 寄生하고, 다른 細胞에서는 거의

찾아 보기가 힘든데서 基因하는 것으로<sup>12)</sup>, MLO 感染與否는 罹病組織과 健全組織의 篩部를 比較, 觀察함으로써 簡單히 確認된다. 또한, MLO 感染에 의한 維管束形成層의 變形<sup>10)</sup>도 診斷을 위한 指標가 될 수 있는데, 이는 MLO의 寄生으로 寄主植物에서 生産된 toxin<sup>19)</sup>에 對한 寄主植物 自體의 反應이라고 생각된다. 既存의 螢光色素의 大部分이 MLO의 DNA와 結合하는데 比해, berberine sulphate는 RNA와도 結合하여 아주 강한 2次 螢光<sup>15)</sup>을 나타내는 점이 다른데, DNA-結合 螢光色素中 가장 강한 螢光을 내는 것으로 알려져 있는 DAPI와 同等한 效果를 보이고 있다. Berberine sulphate의 使用은 그동안 DNA에 依存했던 螢光顯微鏡的 診斷法을 RNA의 檢定으로 擴大시킨데에 큰 意義가 있다고 보며, 本 染色法의 過小評價할 수 없는 長點은 다른 螢光色素의 染色法에 比해 迅速하고, 使用上에 별다른 問題點이 없으며, 試藥의 값이 싼 것이다.

螢光顯微鏡技法은 電子顯微鏡技法의 短點을 克服한 매우 有用한 方法이지만, 반드시 螢光顯微鏡을 必要로 하고 있기때문에 螢光顯微鏡대신 一般光學顯微鏡을 利用하는 診斷法도 또한 試圖되어, Dienes 染色法<sup>4)</sup>은 몇가지 草本 및 木本植物에 대한 MLO 感染診斷에 效果가 있음이 報告된 바 있다. 그러나, 이 方法은 우리나라의 木本植物中 뽕나무<sup>11,18)</sup> 외에는 效果를 보지 못하고 있으므로, 染色法의 改善이 앞으로의 課題로 남아 있다.

一般的으로 試料를 2時間 以上 個定하는 것으로 되어 있으나, Dale<sup>3)</sup>은 20分間 固定하고 5分間 평균 다음, DAPI로 既存의 30分대신 5分間 染色하여 檢鏡하는 등, 모든 過程을 30分内外에 마칠 수 있다고 하였는데, berberine sulphate의 경우는 染色時間이 必要치 않으므로 이보다 더 時間을 短縮시킬 수 있고, 大量의 試料를 迅速히 檢定하고자 할 때는 固定을 省略 할 수도 있다고 생각한다.

한편, 試料製作에 있어서 Petzold와 Marwitz<sup>15)</sup>는 paraffin 包埋法을 使用하여 10 $\mu$ m 두께의 組織切片을 만들었는데, 이는 透過螢光顯微鏡(transmitted light fluorescence microscope)使用時 光源이 試料아래로 부터 빛을 通過시켜야 되기 때문에 아주 얇은 試料切片이 必要했던 것

으로 보인다. 本 實驗에서 使用한 落射螢光顯微鏡(reflected light fluorescence microscope)은 光源이 試料위에서 비추어져 反射된 螢光을 觀察하는 것이므로, paraffin에 包埋하는 過程을 거치지 않고 단지 손으로 0.5mm 程度 두께의 切片을 만들어도 뚜렷한 螢光反應을 보였다. 또한, 染色試藥 製造過程에서 phosphate buffer의 使用은 MgCl<sub>2</sub> buffer<sup>15)</sup>와 같은 效果를 나타냈다.

간혹, 罹病植物에서 MLO-特異螢光反應의 觀察이 힘든 경우가 있는데, 이는 植物MLO病이 全身性이지만 MLO가 植物組織 全體에 고르게 퍼져 있지는 않기 때문에, 罹病植物의 어느 한 部分에서 採取한 試料로 부터 製作한 相當히 얇은 切片에서 MLO가 檢出되지 않을 可能性이 充分히 있기 때문이다. 따라서, 보다 確實한 診斷을 위해서는 試料를 여러 部分에서 골고루 採取하여 檢鏡하는 것이 바람직하다. Douglas<sup>6)</sup>는 복숭아 X-disease의 경우 DAPI染色法으로 檢鏡한 바, 外觀上 病徵이 나타나기 6週前부터 MLO-特異螢光을 觀察할 수 있었다고 報告하고 있어, 대추나무 등 우리나라의 主要經濟植物에 對해서도 MLO의 潛伏感染을 berberine sulphate染色法으로 檢査함으로써 미리 感染植物을 除去하거나 治療하여 病被害를 보다 效果의으로 豫防하는데 큰 成果를 올릴 수 있다고 본다.

## 引 用 文 獻

1. Bak, W. C. and Y. J. La. 1985. Fluorescence microscopic diagnosis of mycoplasma infections in jujube, mulberry and periwinkle plants. Korean J. Plant Pathol. 1(1) : 12-16.
2. Cousin, M. T. and P. Jouy. 1984. Comparative study of methods using Hoechst reagent and polychromatic staining for the detection of mycoplasma-like organisms in plants. Agronomie 4 : 341-346.
3. Dale, J. L. 1988. Rapid compression technique for detecting mycoplasma-like organisms in leaf midrib sieve tubes by fluorescence microscopy. Phytopathology 78 : 118-120.
4. Deeley, J., W. A. Stevens and R. T. V. Fox. 1979. Use of Dienes' stain to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms. Phytopathology 69 : 1169-1171.

5. Dijkstra, J. and C. Hiruki. 1974. A histochemical study on sandal(*Santalum album*) affected with spike disease and its diagnostic value. Neth. J. Plant Pathol. 80 : 37-47.
6. Douglas, S. M. 1986. Detection of mycoplasma-like organisms in peach and chokecherry with X-disease by fluorescence microscopy. Phytopathology 76 : 784-787.
7. Hiruki, C. 1981. Fluorescence microscopy in diagnosis of tree diseases associated with mycoplasma-like organisms(MLO). Pages 317-322 in: Pro. XVII International Union Forest Research Organizations World Congress, Div. 2 (Tokyo).
8. Hiruki, C. and J. Dijkstra. 1973. Light and electron microscopy of Vinca plants infected with mycoplasma-like bodies of the sandal spike disease. Neth. J. Plant Pathol. 79 : 207-217.
9. Hiruki, C. and P. Shukla. 1973. Mycoplasma-like bodies associated with witches' broom of bleeding heart. Phytopathology 63 : 88-92.
10. 任綱彬·羅瑤俊·林雄圭·張卓重·申載斗·李淳炯. 1985. 옥시테트라 사이클린을 處理한 대추나무 빗자루病 感染木의 病態解剖學的 研究. 韓植病誌 1(2) : 101-108.
11. Kim, Y. H., Y. J. La and Y. T. Kim. 1985. Transmission and histochemical detection of mulberry dwarf mycoplasma in several herbaceous plants. Korean J. Plant Pathol. 1 : 184-189.
12. Nienhaus, F. and R. A. Sikora. 1979. Mycoplasmas, spiroplasmas, and rickettsia-like organisms as plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 17 : 37-58.
13. Petzold, H. and R. Marwitz. 1979. Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von mykoplasmaähnlichen Organismen nach der Feulgen-Reaktion mit Auramin O als Schiff'sches Reagenz. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz 86 : 577-583.
14. Petzold, H. and R. Marwitz. 1979. Über die Verwandbarkeit des Fluoreszenzfarbstoffes NN'-Diathylpseudoisocyaninchlorid zum Nachweis von mykoplasmaähnlichen Organismen. Z. Pflanzenkrankh., Pflanzenschutz. 86 : 670-674.
15. Petzold, H. and R. Marwitz. 1979. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis von mykoplasmaähnlichen Organismen mittels Berberinsulfat. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz 86 : 745-750.
16. Petzold, H. and R. Marwitz. 1980. Ein verbesserter fluoreszenzmikroskopischer Nachweis für mykoplasmaähnliche Organismen in Pflanzengewebe. Phytopathol. Z. 97 : 327-331.
17. Razin, S., M. Argaman and I. Arigan. 1963. Chemical composition of mycoplasma cells and membranes. J. Gen. Microbiol. 33 : 477-487.
18. Shin, H. D. and Y. J. La. 1984. Use of Dienes' stain in diagnosis of plant mycoplasma diseases and modification of diagnostic procedure. Korean J. Plant Prot. 23 : 215-220.
19. Schneider, H. 1977. Indicator hosts for pear declines, symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. Phytopathology 67 : 592-601.
20. Seemuller, E. 1976. Fluoreszenzoptischer Direktnachweis von mykoplasmaähnlichen Organismen im Phloem pear-decline-und triebsuchtkranker Baume? Phytopathol. Z. 85 : 368-372.
21. Yamagishi, H. 1962. Interaction between nucleic acids and berberine sulphate. J. Cell. Biol. 15 : 589-592.