

## 한국산 글라디올러스에 발생하는 바이러스

### 1. Bean Yellow Mosaic Virus 및 Clover Yellow Vein Virus

박인숙 · 김규원 · 권현정<sup>1</sup> · 장무웅<sup>1\*</sup>  
영남대학교 원예학과, <sup>1</sup>생물학과

## The Viruses in *Gladiolus hybridus* cultivated in Korea

### 1. Bean Yellow Mosaic Virus and Clover Yellow Vein Virus

In Sook Park, Kiu Weon Kim, Hyun Jung Kyun<sup>1</sup>, and Moo Ung Chang<sup>1\*</sup>

Dept. of Horticulture, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Biology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**ABSTRACT:** Gladioli (*Gladiolus hybridus*) showing flower colour breaking, leaf mosaics, necrotic fleck, and dwarfing or lack of visible symptoms were collected from gladioli growing areas in Taegu and Kyungpook province, Korea. The two viruses isolated from the naturally infected gladioli were identified as bean yellow mosaic virus (BYMV) and clover yellow vein virus (CIYVV) by their host range, immunosorbent electron microscopy (ISEM), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), direct tissue blotting immunoassay (DTBIA) and intracellular symptoms. In ultrathin sections of BYMV and CIYVV infected tissues, laminated aggregate-type inclusions, cytoplasmic bodies and nuclear inclusions as well as filamentous virus particles were observed in the cytoplasm of parenchyma cells. By DTBIA and ISEM, BYMV was detected in all tested gladiolus plants showing severe or mild mosaic symptoms, whereas CIYVV were mainly detected from those of mild mosaic symptoms. BYMV is the most prevalent in commercial gladioli and present major production problems. Detection sensitivity of BYMV and CIYVV in crude sap of infected gladiolus leaves by ISEM was about twice compared with ELISA. In a comparison of ELISA, ISEM, DTBIA, BYMV was detected in same degree by DTBIA in samples where sap extracts were positive in both ELISA and ISEM. DTBIA provides a specific, rapid, and simple tool for large-scale diagnosis of BYMV.

**Key words:** gladiolus virus, BYMV, CIYVV.

글라디올러스(*Gladiolus hybridus*)의 생산면적은 전세계적으로 8,500 ha에 이르며(30), 글라디올러스는 튜울립과 함께 2대 구근류로 꼽히며, 우리나라에서의 생산량 역시 백합에 이어 2위를 기록하고 있다(14).

전세계적으로 글라디올러스에 발생하는 바이러스를 문헌에 의거 정리하여 보면 14 종류로 다음과 같다. Arabis mosaic virus(7), Bean yellow mosaic virus(22, 32, 36, 37, 40), Clover yellow vein virus(33), Cucumber mosaic virus(1, 35, 37, 38), Narcissus latent virus(9), Strawberry latent ringspot virus(5), Tobacco mosaic virus(18), Tobacco rattle virus(30), Tobacco streak virus(8), Tobacco ringspot virus(4, 12, 37), Tomato black ring virus(6), Tomato ringspot virus(4, 11, 37), Tobacco necrosis virus(10), Tomato spotted wilt virus(26). 이들 바이러스는 대부분 글라디올러스에 1 종류 이상의 바이러스가 중복 감염되어 식물체의 생장 및 꽃의 크기, 수,

색깔에 영향을 주나, Nepovirus에 감염된 글라디올러스는 아주 경미한 병징이거나 무병징이다(30).

이들 바이러스에 감염된 글라디올러스의 영양번식은 바이러스의 확산을 급속도로 증가시키고 있고, 글라디올러스에서 분리된 바이러스 중에는 글라디올러스에만 발생하는 바이러스도 있으나 대부분은 다른 농작물에서 발생하는 바이러스이기 때문에 글라디올러스는 농작물 바이러스의 중요한 전염원이 된다는 사실도 보고되어 있다(24, 30).

한국에서 재배되고 있는 글라디올러스에 대한 바이러스 병의 조사는 1983년 이 등(27)에 의해 bean yellow mosaic virus, cucumber mosaic virus가 보고되었다.

이 연구에서는 대구 및 경북지역의 꽃판매점에서 수거한 글라디올러스와 영남대학교 농장에 재배중인 글라디올러스에서 모자이크, 괴저반점, 꽃잎 얼룩무늬 등의 증상을 나타내는 식물체로부터 DN법(16)에 의하여 전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 직경 28 nm와 30 nm의 구형입자, 80~100 nm의 구형입자, 40~200 nm의 여러 중

\*Corresponding author.

류의 막대입자, 780 nm의 사상입자, 5 종류의 바이러스 입자가 검출되었다. 이중 두 종류의 바이러스에 대하여 *Chenopodium amaranticolor*, *Cucumis sativus*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum*, *Vicia faba* 등의 지표식물을 이용한 기주범위, 감염조직 내의 바이러스 입자의 존재양식, immunosorbent electron microscopy(ISEM), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), direct tissue blotting immunoassay(DTBIA) 방법으로 바이러스를 동정하였다.

또한 글라디올러스에 감염된 주요 바이러스의 동정 및 조직배양에 의해 얻어진 유식물체의 바이러스 유무 판정을 위해 각종 바이러스 검정방법 들을 비교 및 분석하고, 이를 토대로 간편하고 저렴한 바이러스 검정법을 찾아보았다.

## 재료 및 방법

1994년부터 1996년까지 대구 및 경북지역의 꽃판매점에서 찾아낸 글라디올러스와 영남대학교 농장에 재배중인 글라디올러스에서 모자이크, 괴저반점, 꽃잎 얼룩무늬, 생육불량 등의 증상(Fig. 2-B, C, D)을 나타내는 식물체로부터 DN법(16)에 의하여 투과전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 28 nm 및 30 nm의 작은 구형입자, 80~100 nm의 대형 구형입자, 40~200 nm의 여러 종류의 막대입자, 780 nm의 사상입자 및 세포질 봉입체를 확인하였다. 이중 780 nm의 사상입자 및 세포질 봉입체가 확인된 글라디올러스 식물체(Fig. 2-B)를 바이러스의 시료원으로 하였다.

Potyviridae에 속하는 bean yellow mosaic virus(BYMV), clover yellow vein virus(CIYVV), turnip mosaic virus(TuMV; ATCC PVAS-134), watermelon mosaic virus(WMV; ATCC PVAS-644), zucchini yellow mosaic virus(ZYMV; ATCC PVAS-405)의 항혈청은 American Type Culture Collection(ATCC)에서 각각 분양 받아 면역학적 반응실험에 사용하였다.

바이러스에 감염된 글라디올러스 이병엽에 0.01 M 인산 완충액(pH 7.0)을 넣어 막자사발에서 잘게 갈아서 이중거즈로 착즙하여 바이러스의 즙액접종 시료로 carborandum을 이용한 방법에 의하여 접종하였다. 즙액접종 시험에 사용된 검정식물은 Table 2에 나타난 바와 같이 전 세계적으로 글라디올러스에 발생하는 14 종류의 바이러스 중에 즙액접종이 가능한 13 종류의 바이러스에 대한 가장 대표적인 판별 및 증식 기주식물 19 종류이다. 이들 식물체는 전부 온실에 키웠고, 주기적으로 살충제를 사용하여 진딧물 등 바이러스 매개곤충의 발생을 방제했다.

바이러스 입자의 검출은 처음에 2% phosphotungstic acid(PTA, pH 7.0)나 2% uranyl acetate를 이용한 DN법으

**Table 1.** Experimental host range of bean yellow mosaic virus (BYMV) and clover yellow vein virus (CIYVV) isolated from *Gladiolus* in Korea<sup>a)</sup>

| Test plant                       | BYMV         | CYVV        |
|----------------------------------|--------------|-------------|
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> | N. Sp/-#     | N. Sp/-     |
| <i>C. quinoa</i>                 | N. Sp/-#     | N. Sp/N.Sp# |
| <i>Cucumis sativus</i>           | -/-          | -/-         |
| <i>Cucurbita pepo</i>            | -/-          | -/-         |
| <i>Datura stramonium</i>         | -/-          | -/-         |
| <i>Gomphrena globosa</i>         | C. Sp/-      | +/-         |
| <i>Phaseolus vulgaris</i>        | N. Sp/Mo.D * | C. Sp/Vc,   |
| <i>Pisum sativum</i>             | +/Mo.Vc *    | -/-         |
| <i>Vicia faba</i>                | C.Sp/Mo *    | -/-         |
| <i>Vigna sesquipedalis</i>       | -/-          | -/-         |
| <i>Nicotiana glutinosa</i>       | -/-          | -/-         |
| <i>N. tabacum</i> (Xanthi)       | -/-          | C.Sp/-      |
| <i>N. tabacum</i> (Samsun)       | -/-          | C.Sp/-      |
| <i>N. clevelandii</i>            | C.Sp/Mo *    | C.Sp/Mt *   |
| <i>N. benthamiana</i>            | -/-          | C.Sp/D,Mo   |
| <i>Petunia hybrida</i>           | C.Sp/-       | -/-         |
| <i>Plantago asiatica</i>         | -/+          | -/+         |
| <i>Spinacia oleracea</i>         | -/-          | C.Sp/-      |
| <i>Tetragonia expansa</i>        | C.Sp/-       | N. Sp/-     |

<sup>a)</sup> Symptom abbreviation: C=chlorosis, D=distortion, G=green island, L=Line pattern, Mo=mosaic, Mt=mottle, Na=narrowing, N=necrosis, R=ring, S=symptomless, Sp=spot, St=stunt, Vc=vein clearing, W=wilt, +=uncertain, and -=no infection detected based on back-inoculation. Symptoms on inoculated leaves to the left of the slash and symptoms in systemically infected leaves to the right of the slash. \* and #: These plants were available for propagation(\*) and assay(#) of BYMV and CIYVV.

로 제작된 시료에 대하여 바이러스의 형태를 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다. 감염일 조직내의 바이러스 입자의 존재양식을 관찰하기 위하여 이병식물의 잎조직을 2.5% glutaraldehyde에 3시간 전고정하고, 1% osmium tetroxide에 1시간 후고정한 다음 ethanol로 탈수하였다. 이것을 Epoxy 수지에 포매하였다. 초박질편된 시료는 uranyl acetate와 lead citrate에 2중 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. ISEM은 Miline and Loison의 방법(31)에 따르거나, 최근에 수정법으로 사용되고있는 trap and decoration method로 수행하였다. ELISA법은 Clark and Adams의 microplate method(15)에 의거 실험하였다. DTBIA법은 Lin 등의 방법(29)을 약간 수정하여 Fig. 1과 같이 실시하였다.

## 결 과

**병원 바이러스의 동정.** 1994~1996년 사이 대구 및 경북지역의 꽃판매점에서 채집한 글라디올러스와 영남대학교 농장에 재배중인 글라디올러스에서 모자이크, 괴저반

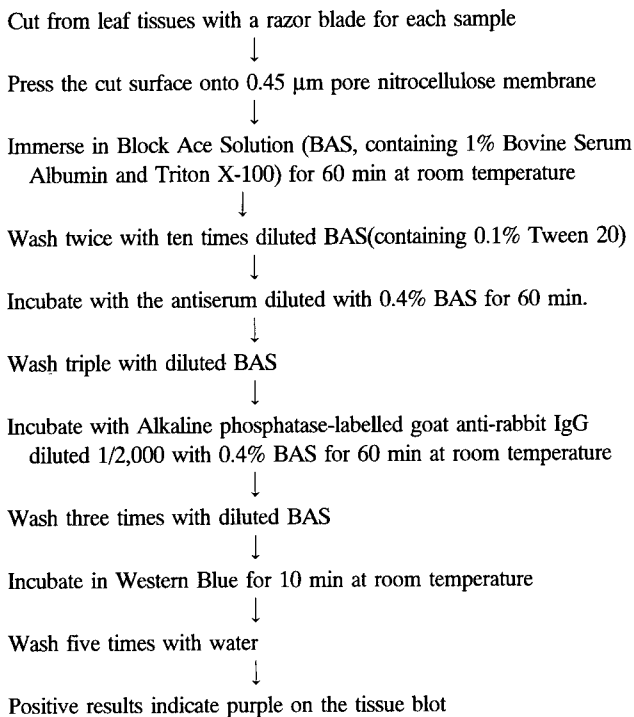


Fig. 1. Procedure for DTBIA.

점, 꽃잎 얼룩무늬, 생육불량 등의 증상을 나타내는 식물체(Fig. 2-B, C, D)로부터 5 종류의 바이러스를 분리하였다. 즉 DN법(16)에 의하여 투과전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 28 nm 및 30 nm의 작은 구형입자, 80~100 nm의 대형 구형입자, 40~200 nm의 여러 종류의 막대입자, 780 nm의 사상입자와 세포질 봉입체를 확인하였다(Fig. 3). 이 중 780 nm의 사상입자에 대하여 기주범위, 입자의 형태, 혈청학적 반응, 감염세포 내의 바이러스 입자의 소배양식 및 병변 등을 조사한 결과, bean yellow mosaic virus(BYMV)와 clover yellow vein virus(CYVV)로 동정하였다.

#### Bean yellow mosaic virus(BYMV).

##### ① 글라디올러스의 병징

이 바이러스는 모자이크, 괴저반점, 꽃잎얼룩무늬 등의 증상을 나타내는 글라디올러스에서 분리되었다. 모자이크 및 괴저반점의 글라디올러스(Fig. 2-B)에서는 BYMV의 입자가 반드시 검출되었으나, 꽃잎얼룩무늬에서는 BYMV 입자가 검출되지 않을 경우가 많았다. ISEM과 DTBIA에서 BYMV는 가벼운 병징을 포함한 모든 글라디올러스의 시료에서 검정되었으며 특히 Fig. 2-B의 병징과 같이 주로 황화 모자이크나 괴저반점의 식물체에서는 BYMV의 농도가 매우 높았다(Fig. 4-D, No. 2, 3, 5).

##### ② 바이러스 입자의 형태

자연 감염된 글라디올러스와 즙액접종에 의하여 감염된 *P. vulgaris*와 *Chenopodium quinoa*의 이병엽을 사용하여

DN법에 의해 투과전자현미경으로 관찰하였던 바, 약 780 nm의 사상입자와 세포질 봉입체의 단편이 많이 검출되었다(Fig. 3-A, B).

##### ③ 기주범위

즙액접종에서 *Pisum sativum*의 황색 모자이크 및 엽맥투명이 나타난 상엽이 BYMV에 단독 감염되었음이 ISEM으로 확인되었다. 단독감염이 확인된 *P. sativum*의 황색 모자이크 및 엽맥투명의 상엽을 사용하여 지표식물에 즙액접종한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. *P. sativum*의 접종잎에서는 특이적인 증상이 나타나지 않았으나, 바이러스는 검출되었고, 새로운 잎에 황색 모자이크 및 엽맥투명 증상이 나타나 전신감염이 확인되었다. *P. sativum*은 CIYVV, tobacco rattle virus(TRV), broad bean wilt virus(BBWV), cucumber mosaic virus(CMV)에는 즙액접종에 의하여 비감염이 확인되었기 때문에 이들 바이러스 중에 1 종류 이상의 혼합 감염된 글라디올러스로부터 BYMV를 단리하는데 유용하였다. *P. vulgaris*에서는 접종 잎에 괴저반점이 형성된 후, 2주째에 새로운 잎에 황색 모자이크 및 기형증상이 나타나 전신감염이 확인되었다. 전신감염의 특징은 CMV와 CIYVV와 현저하게 차이가 나서 유용한 지표 식물임이 확인되었고, 또한 바이러스 양도 많아 BYMV의 증식 식물로도 유용함이 확인되었다.

##### ④ 면역전자현미경적 관찰(ISEM)

이 바이러스의 기주범위, 입자의 형태 등의 결과가 BYMV와 유사하여 BYMV의 항혈청(ATCC PVAS-368, titer: 1:400,000)을 이용하여 ISEM법에 의하여 혈청학적 유연관계를 조사하였다. 그 결과 글라디올러스에서 분리한 780 nm의 바이러스는 Fig. 3-C의 전자현미경 사진에서 볼 수 있듯이 바이러스 입자의 외피단백질(coat protein)과 BYMV 항혈청과의 항원-항체반응으로 인해 decoration이 일어났음을 관찰할 수 있었다. BYMV에 감염된 글라디올러스의 즙액을 이용하여 ISEM, ELISA, DTBIA에 의한 BYMV의 검정 민감도를 조사한 결과 민감도에 있어서 ISEM이 ELISA와 DTBIA보다 거의 2배 정도로 높았다.

##### ⑤ DTBIA(Direct Tissue Blotting Immunoassay)

Tsuneoyoshi와 Sumi가 마늘 바이러스의 동정 및 감염여부를 판정하는 데 사용한 DTBIA법(39)을 적절하게 변형시켜(Fig. 1), 글라디올러스에서 BYMV의 존재 유무를 판정하였다. 그 결과는 Fig. 4-D에 나타난 바와 같이 BYMV 항혈청 원액을 200, 2,000, 20,000, 200,000배로 희석하여 처리한 nitrocellulose membrane에서 No. 1의 대조구에서는 무반응이었으나, No. 2~5에서는 항원항체 반응에 의해 자주색으로 발색되었다. 따라서 조직배양에서 얻어진 바이러스 무독인 대조구 No. 1은 무반응이었기에 이 실험은 유효한 것으로 판단하여 No. 2~5은 BYMV에 감염된 바이러스 시료로 하였다. 이들 시료에 대하여 ISEM과 기주범위로 바이러스의 동정을 시도하였던 바, BYMV로 확인하였



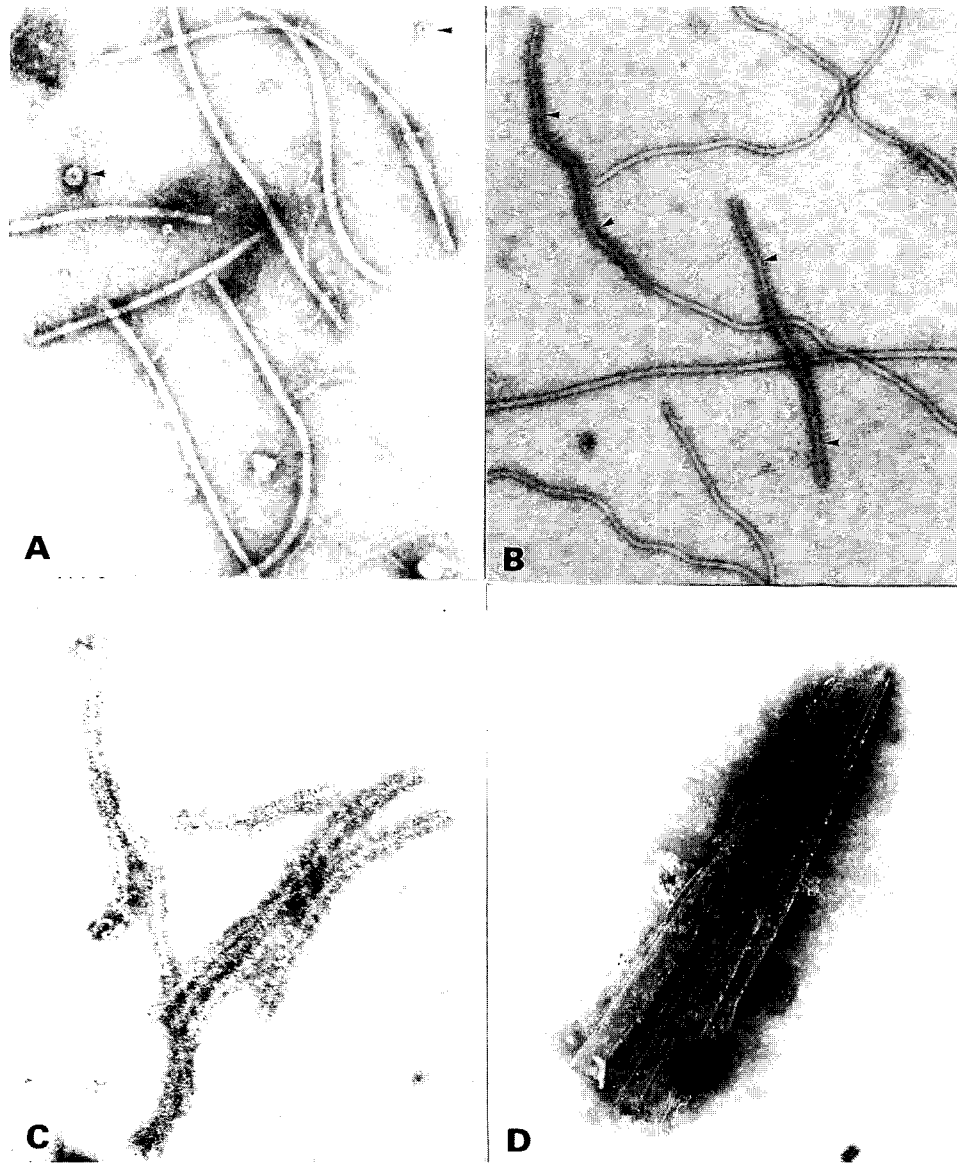
**Fig. 2.** A: Healthy *Gladiolus hybridus*, B: Symptoms (yellow mosaic and necrotic spot) in *Gladiolus hybridus* naturally infected with bean yellow mosaic virus (BYMV), broad bean wilt virus (BBWV), clover yellow vein virus (CIYVV). C: Symptoms (colour breaking) in *Gladiolus hybridus* naturally infected with BBWV, CIYVV, and cucumber mosaic virus (CMV). D: Symptoms (mosaic and stunting) in *Gladiolus hybridus* (left plant) naturally infected with BYMV, BBWV, CIYVV, CMV, and healthy plant (right; arrow).

다. ISEM과 비교실험에서 글라디올러스 잎에 BYMV의 농도가 높을 시에는 ISEM과 동등한 민감도(200,000배 희석액)로 바이러스 검정이 가능하였다(Fig. 4-D, No. 5).

#### ⑥ 감염 조직내 바이러스의 존재양식

즙액접종에 의하여 감염된 *P. vulgaris*와 *C. quinoa*의 이 병엽과 자연감염된 글라디올러스 잎을 초박절편하여 투과 전자현미경으로 관찰하였다. 어느 시료에서도 길이 약 700 nm 이내의 사상입자가 표피세포, 엽육세포, 통도조직의

유세포 등의 세포질과 액포에 산재하였거나 혹은 병행 배열로 존재하는 모습을 확인하였다(Fig. 4-A). Potyvirus의 감염세포에 특이적으로 생성되는 세포질내의 봉입체(cytoplasmic cylindrical inclusions)(Fig. 4-A) 및 특히 BYMV의 감염세포에 특이적으로 생성되는 세포질내의 비결정성 세포질성 봉입체(amorphous-appearing cytoplasmic body)가 반드시 관찰되었고, 가끔 이들 봉입체 내에 혹은 주위에 바이러스 입자의 집단 또는 병행 배열 상이 확인되었



**Fig. 3.** Electron micrograph of virus particles in negatively stained preparations from infected *Gladiolus hybridus* (Fig. 2-B). A: Filamentous particles of BYMV and CIYVV, spherical particles of BBWV (arrows) ( $\times 64,000$ ). B: CIYVV filamentous particles (arrows) decorated with CIYVV antiserum, but non-decorated BYMV filamentous particles ( $\times 64,000$ ). C: BYMV filamentous particles decorated with BYMV antiserum ( $\times 66,000$ ). D: Cytoplasmic cylindrical inclusion of CIYVV ( $\times 40,000$ ).

다. 또한 세포질 봉입체가 원형질막이나 내막계에 부착된 상이나, 바이러스 입자집단의 한쪽이 액포막(Fig. 4-A)이나 세포기관(Fig. 4-A)에 부착된 상도 관찰되었다. 엽육세포와 사부유세포에서는 원형질연락사 내에 다수의 바이러스 입자가 확인되어 세포에서 세포로 바이러스 입자의 이동이 시사되었다.

#### Clover yellow vein virus(CIYVV).

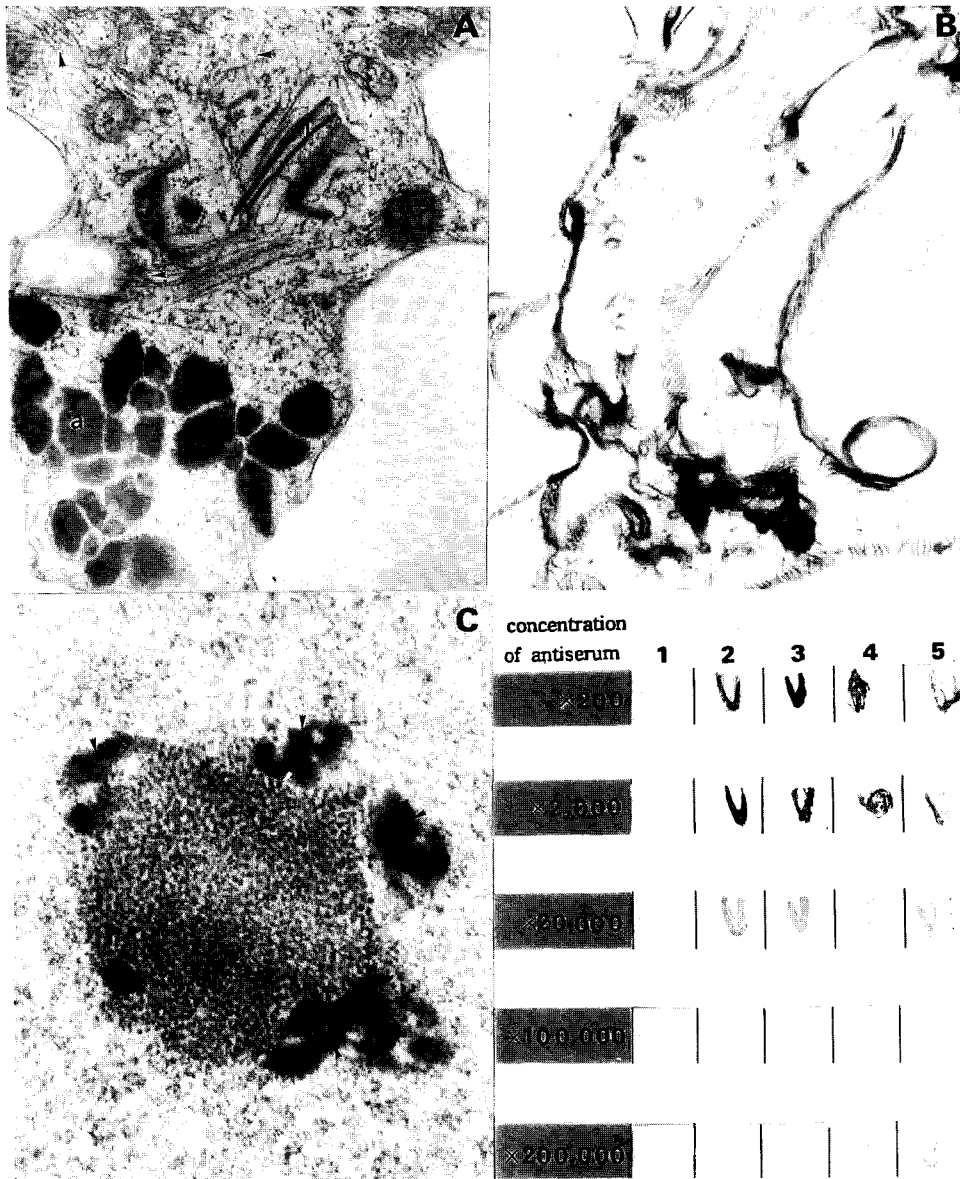
##### ① 클라디올러스의 병징

이 바이러스는 모자이크, 괴저반점, 꽃잎얼룩무늬 등의 증상을 나타내는 클라디올러스에서 분리되었다. 그러나

ISEM과 DTBIA에 의거 potyvirus 중에 CIYVV가 단독 감염이 확인된 클라디올러스의 병징은 아주 약한 퇴록반점이나 가벼운 모자이크 증상이었다.

##### ② 기주범위

ISEM과 즙액접종에서 *Phaseolus vulgaris*의 엽맥투명 상엽과 *C. quinoa*의 괴저반점 상엽이 단독·감염되었음이 확인되었다. 단독감염이 확인된 *P. vulgaris*와 *C. quinoa*의 상엽을 사용하여 검정식물에 즙액 접종한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. *N. tabacum*(Xanthi, Samsun)의 접종 잎에 퇴록반점이 형성되어 BYMV와 쉽게 구별되었다. *P.*



**Fig. 4.** A parenchyma cell of BYMV-infected *G. hybridus* leaf (A and B) A: Cytoplasmic cylindrical inclusions (laminated aggregates; l), amorphous-appearing cytoplasmic bodies (a), and virus particles (arrows) in the cytoplasm ( $\times 24,000$ ). B: One end of the virus particles aggregate adjacent to the tonoplast ( $\times 30,000$ ). C: Nuclear inclusions (arrows) closely associated with the nucleolus of a parenchyma cell of CIYVV-infected *G. hybridus* leaf ( $\times 40,000$ ). D: DTBIA for BYMV-infected gladiolus leaves to BYMV antiserum. Note that no signal appeared on lane 1 blots from virus-free gladiolus sample produced by shoot-tip culture.

*vulgaris*에서는 접종 외에 황화반점이 형성된 후, 2주째에 새로운 잎에 엽맥투명의 전신감염이 확인되었다. 이들 검정식물은 CIYVV, BYMV, TRV 3 종류의 바이러스 중에 1종류 이상의 혼합 감염된 글라디올러스로부터 CIYVV를 단리하는데 유용하였다.

③ 바이러스 입자의 형태

자연감염된 글라디올러스와 즙액접종에 의하여 감염된 *P. vulgaris*와 *C. quinoa*의 이병엽을 사용하여 DN법에 의해 투과전자현미경으로 관찰하였던 바, 약 780 nm의 사상

입자(Fig. 3-A)와 세포질 봉입체의 단편이 검출되었다(Fig. 3-D).

④ 면역전자현미경적 관찰(ISEM)

이 바이러스의 기주범위, 입자의 형태 등의 결과가 CIYVV와 유사하여 CIYVV의 항혈청(ATCC PVAS-123)을 이용하여 ISEM법에 의하여 혈청학적 유연관계를 조사하였다. 그 결과 글라디올러스에서 분리한 780 nm의 바이러스는 Fig. 3-B의 전자현미경 사진에서 볼 수 있듯이 바이러스 입자의 외피단백질(coat protein)과 CIYVV 항혈청

과의 항원-항체반응으로 인해 decoration이 일어났음을 관찰할 수 있었다. CIYVV에 감염된 글라디올러스의 조즙액을 이용한 ISEM법에 의한 CIYVV의 검출이 ELISA법에 의한 것보다 약 1.5배 정도 민감도가 높았다.

#### ⑤ DTBIA(Direct Tissue Blotting Immunoassay)

Tsuneyoshi와 Sumi가 garlic viruses의 동정 및 감염여부를 판정하는 데 사용한 DTBIA법(39)을 적절하게 변형시켜(Fig. 1), 글라디올러스에서 CYVV의 존재 유무를 판정하였다. 그 결과는 BYMV와 유사하였으나, ISEM과 비교 실험에서 글라디올러스 잎에 CYVV의 농도가 가장 높을 때에 ISEM과 동등한 민감도는 20,000배 희석액으로 바이러스 검정이 가능하였다.

#### ⑥ 감염 조직내 바이러스의 존재양식

즙액접종에 의하여 감염된 *P. vulgaris*와 *C. quinoa*의 이 병엽을 초박절편하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 어느 시료에서도 길이 약 700 nm 이내의 사상입자가 표피세포, 엽육세포, 통도조직의 유세포 등의 세포질과 액포에 산재 혹은 병행 배열로서 존재해 있는 상이 확인되었다. Potyvirus의 감염세포에 특이적으로 생성되는 세포질내의 봉입체(cytoplasmic cylindrical inclusions) 및 특히 CYVV의 감염세포에 특이적으로 생성되는 핵내의 봉입체(crystalline nuclear inclusions)가 반드시 관찰되었고(Fig. 5-C), 가끔 이들 봉입체 내에 혹은 주위에 바이러스 입자의 집단 또는 병행 배열 상이 확인되었다. 또한 세포질 봉입체가 원형질막이나 내막 계에 부착된 상도 관찰되었다. 엽육세포와 사부유세포에서는 원형질연락사 내에 다수의 바이러스 입자가 확인되어 세포에서 세포로 바이러스 입자의 이동이 시사되었다.

## 고 찰

글라디올러스 잎에 모자이크 및 괴사반점과, 꽃잎 얼룩 무늬 등의 단독증상 또는 복합증상을 나타내는 식물체로부터 분리한 780 nm의 사상 바이러스는 입자의 형태, 기주범위, 항원항체반응, 이병엽의 조직내의 바이러스 입자의 존재양식 등의 결과에 의하여 BYMV와 CYVV로 동정하였다.

바이러스에 감염된 식물의 신속한 영양변식은 삼목, 구근, 구경에 의한 번식으로 인하여 바이러스 확산의 위험을 증가시키고 있다. 식물 바이러스 병의 발생과 전파에 있어서 영양변식성 화훼류의 역할이 바이러스 전파의 생태학적 측면에서 매우 중요한 요소임이 알려져 있다(24, 30).

현재까지 세계적으로 글라디올러스에 발생하는 경제적으로 피해가 큰 중요한 14 종류의 바이러스를 서론에서 정리하였다. 이들 다수의 바이러스는 농작물에 큰 피해를 주는 중요한 식물 바이러스가 포함되어 있고, 또한 글라디올러스에도 생장 및 꽃의 크기, 수, 색깔에 영향을 준다. 글라

디올러스는 바이러스의 증식처이기도 하지만 이들을 전파하는 매개곤충의 서식장소로 알려져 있다(13, 14).

Potyviridae에 속하는 BYMV는 한국에서도 자연발생이 보고되어 있고, 글라디올러스에서도 분리되었다(23, 27). 이번 연구에서 특기할 만한 사항은 글라디올러스에서 가장 심한 병징과 관련이 있고, 자연 감염율도 가장 높았기 때문에 한국의 글라디올러스의 재배에 가장 위협적인 바이러스로 사료되었다.

Potyviridae에 속하는 CIYVV의 기주범위는 중정도로 9과 29속 59종에 감염성이 알려져 있다(17, 34). 한국에서 CIYVV의 자연발생이 이 논문을 통하여 처음으로 밝혀졌다. 글라디올러스에서 분리된 CIYVV의 기주범위의 결과는 Inouye 등, Lawson 등, Pratt가 보고한 CIYVV의 결과와 유사하였으나(21, 25, 33), *C. amaranticolor* 등의 몇 종에 있어서 병징에 약간의 차이가 있었다. 그러나 DTBIA, ELISA, ISEM에 의한 혈청학적 시험에서 CIYVV의 항혈청과는 특이적으로 반응하였으나, BYMV, TuMV, WMV, ZYMV 등의 Potyvirus들의 항혈청과는 반응하지 않아 CIYVV로 동정하였다(Fig. 3-B). CIYVV의 감염 세포 내에 특이적으로 생성되는 세포질내 봉입체(cytoplasmic cylindrical inclusions)의 laminated aggregates 및 세포질과 핵내 결정성 봉입체(crystalline dense bodies)의 구조는 이미 보고된 CIYVV에 생성된 봉입체의 구조와 유사하였다(17, 21, 28).

사상형 바이러스에 감염된 식물에 있어서 바이러스의 검정은 ISEM이 ELISA보다 훨씬 예민하다는 결과(20)가 이번 실험에서도 확인되었다. ISEM은 바이러스 항원과 항혈청의 반응을 전자현미경으로 직접 관찰할 수 있는 방법으로 매우 민감도가 높아 1~10 ng virus ml<sup>-1</sup> 범위에서 바이러스 검정이 가능하고, 낮은 역가의 항혈청으로 바이러스를 성공적으로 검정할 수 있다. 또한 기주 단백질의 항체를 함유한 항혈청이라도 특이적인 반응을 하여 좋은 결과를 얻을 수 있다는 사실도 알려져 있는데(3, 20), 이 연구에서도 동일한 결과가 확인되었다. 이 방법이 Anderson & Stanley에 의해 식물 바이러스에 처음 도입된 이래 바이러스 검정에 유효하게 이용되고 있지 않은 이유는 고가의 전자현미경의 보급이 일반화 되어있지 않았기 때문이었다(2). 이 실험에서는 사상형뿐만 아니라 공모양의 BBWV와 CMV에도 ISEM이 매우 유효하다는 결과가 얻어졌다. 선진국은 물론 한국에서도 전자현미경의 보급이 급격히 증가하여 어느 지역에서나 이용이 가능하게 되었다. 따라서 식물 바이러스의 진단에 있어서 이용이 간편하고 바이러스 검정이 예민한 ISEM을 권장하고 싶다.

DTBIA법은 최근에 개발된 바이러스 진단법으로 민감성, 신속성, 정확성, 수월성이 매우 높을 뿐만 아니라 대량 처리가 가능하고, 조작이 매우 간편하며 고가의 장비와 숙련된 기술과 지식이 불필요로 하다는 장점이 있어 바이러스

스의 진단 및 검정법으로 매우 유효함이 보고되어 있다 (19, 29, 39). 본 실험에서도 이와같은 사실이 확인되었다. 즉 ISEM과 비교실험에서 글라디올러스 잎에 BYMV의 농도가 높을 시에는 ISEM과 동등한 민감도(200,000배 희석액)로 바이러스 검정이 가능하였다(Fig. 4~No. 5).

## 요 약

대구 및 경북지역의 꽃판매점과 영남대학교 농장에 재배중인 글라디올러스에서 꽃잎얼룩무늬, 모자이크, 괴저반점, 비정상적인 생육 등의 증상을 나타내는 식물체로부터 2 종류의 바이러스가 분리되었다. 이들 바이러스는 전자현미경, 기주범위, 혈청학적 반응(ISEM, ELISA, DTBIA), 이병엽 조직내의 바이러스의 존재양식 등에 의하여 동정하였다. DN법에 의한 전자현미경 관찰에 의하여 BYMV와 CIYVV는 길이 780 nm의 사상형 입자를 확인하였다. 이들 2 종류의 바이러스는 면역전자현미경법(ISEM)에서 각각의 항혈청에 특이적으로 반응하였다. ISEM과 DTBIA에서 BYMV는 가벼운 병징을 포함한 모든 글라디올러스의 시료에서 검출되었으나, CIYVV는 많은 무병징 글라디올러스의 시료에서도 검출되었다. 이번 조사에서 BYMV가 시판되고 있는 글라디올러스에 만연되어있고, 피해도 가장 심한 바이러스로 확인되었다. 글라디올러스의 이병엽 조짐액을 시료로 하여 BYMV와 CIYVV의 검출을 시도한 결과, ISEM이 ELISA보다 2배 정도 민감도가 높았다. BYMV의 검정을 위한 ISEM, ELISA, DTBIA의 비교실험에서 신속성, 정확성, 수월성이 매우 높을 뿐만 아니라 대량처리가 가능한 DTBIA는 ISEM이나 ELISA와 같은 민감도를 나타내었다. 2종의 바이러스에 각각 감염된 이병엽 조직의 초박절편을 전자현미경으로 관찰한 결과, BYMV와 CIYVV에 감염된 엽육조직의 세포질 내에서 사상입자는 산재 혹은 막성분과 세포질 봉입체에 결합되어 있었고, 여러 형상의 세포질 봉입체가 확인되었다.

## 감사말씀

이 논문은 1995년도 농림수산특정연구과제 연구비에 의해 수행된 연구결과임.

## 참고문헌

1. Aly, R., Stein, A., Levy, S., Raccach, B. and Loebenstein, G. 1986. Spread and control of cucumber mosaic virus in gladiolus. *Phytoparasitica* 14 : 205-217.
2. Anderson, T. F. & Stanley, W. M. 1941. A study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antiserum. *J. Biol. Chem.* 139 : 339-344.
3. Ball, E. M. & Brakke, M. K. 1968. Leaf-dip serology for electron microscopic identification of plant viruses. *Virology* 36 : 152-155.
4. Bellardi, M. G. and Marani, F. 1985. Nepoviruses isolated from gladiolus in Italy. *Acta Hort.* 164 : 297-308.
5. Bellardi, M. G. and Pisi, A. 1985a. Survey of gladiolus viruses in Italy. *Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana* 69 : 133-144.
6. Bellardi, M. G. and Pisi, A. 1985b. Identification of three isolates of tomato black ring virus(TBRV) from gladiolus. *Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana* 69 : 299-309.
7. Bellardi, M. G., Canova, A. and Gelli, C. 1986. Comparative studies on gladiolus isolates of Arabis mosaic virus (ArMV). *Phytopathol. Mediterr.* 25 : 85-91.
8. Bellardi, M. G., Vicchi, V. and Gelli, C. 1987. Stunting of gladiolus flower spike associated with tobacco streak virus (TSV). *Phytopathol. Mediterr.* 26 : 73-80.
9. Beute, M. K., Milholland, R. D. and Gooding, G.V. 1970. A survey of viruses I in field grown gladiolus in North Carolina. *Plant Dis. Rep.* 54 : 125-127.
10. Bing, A. 1972. Virus. In: *The World of the Gladiolus*, N. Koenig and W. Crowley (eds) Edgewood Press, Edgewood, MD. pp.182-191.
11. Bozarth, R. F. and Corbett, M. K. 1957. Tomato ring spot virus associated with stunt or stub disease of gladiolus in Florida. *Plant Dis. Rep.* 42 : 217-221.
12. Brieley, P. and Smith, F.F. 1960. Transmission of tobacco ring spot virus on tools during harvesting flower and corms of Gladiolus. *Plant Dis. Rep.* 44 : 463-464.
13. Bridgman, G. H. and Walker, J. C. 1952. Gladiolus as a virus reservoir. *Phytopathology* 42 : 65-70.
14. 장무웅, 김규원. 1996. 관상용 구근류의 바이러스병. *한국 화훼연구지* 5 : 21-32.
15. Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 : 475-483.
16. Doi, Y., Toriyama, S., Yora, K., and Auyama, H. 1969. Direct negative staining methods for detection for virus particles in fresh preparations from infected plant tissue. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 35 : 180-187.
17. Edwardson, J. R. and Christie, R. G. 1991. The potyvirus group. Volumes I-IV, Florida Agricultural Experiment Station Monograph.
18. Heinis, J. L. 1954. Gladiolus virus survey in Oregon in 1954. *Plant Dis. Rep.* 38 : 733-735.
19. Hsu, H. T. and Lawson, R. H. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in impatiens. *Plant Dis.* 75 : 292-295.
20. Hsu, H. T., Vongsasitorn, D., and Lawson, R. H. 1992. An improved method for serological detection of cymbidium mosaic potyvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82 : 491-495.
21. Inouye, T., Maeda, T., and Mitsuhashi, K. 1988. A strain of clover yellow vein virus isolated from *Calanthe* sp. *Acta Horticulture* 234 : 61-68.
22. Kaniran, R. and Izadpanah, K. 1982. Isolation and iden-



- tification of bean yellow mosaic virus and tobacco ringspot viruses from gladiolus in Shiraz. *Iranian J. Plant Pathol.* 17: 1-10.
23. Kim, J. S., Choi, G. S., and Lee, K. H. 1991. A new potyvirus isolated from imported gladiolus showing yellow and white stripe symptoms in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 7: 42-47.
  24. Lawson, R. H. 1990. Production and maintenance of virus-free bulbs. *Acta Hort.* 266: 25-34.
  25. Lawson, R. H., Brannigan, M. D., & Foster, J. 1985. Clover yellow vein virus in *Limonium sinuatum*. *Phytopathology* 75: 899-906.
  26. Lee, T. C., Francki, R. I. B., and Hatta, T. 1979. A serious disease of gladiolus in Australia caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Dis. Rep.* 63: 343-348.
  27. Lee, S. H., Kim, J. S., and Choi, Y. M. 1983. Bean yellow mosaic virus and cucumber mosaic virus causing mosaic disease on gladiolus in Korea. *Korean J. Plant Prot.* 22: 198-202.
  28. Lesemann, D. E., Koenig, R., & Hein, A. 1979. Statice virus Y-a virus related to bean yellow mosaic and clover yellow vein viruses. *Phytopath. Z.* 95: 128-139.
  29. Lin, N. S., Hsu, Y.H., Hsu, Y.T. 1990. Immunological detection of viruses and mycoplasma-like organisms by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80: 824-828.
  30. Loebenstein, G., Lawson, R. H., and Brunt, A. A. 1995. In Virus and Virus-like diseases of Bulb and Flower Crops. 543pp. John Wiley and Sons.
  31. Milne, R. G. & Loisoni, N. 1977. Rapid immune electron microscopy. In methods in Virology, pp.265-281, Academic Press, New York.
  32. Nagel, J., Zettler, F. W. and Hiebert, E. 1983. Strain of bean yellow mosaic virus in relation to gladiolus production in Florida. *Phytopathology* 73: 449-454.
  33. Pratt, M. J. 1969. Clover yellow vein virus in North America. *Plant Dis. Rep.* 53: 210-212.
  34. Shukla, D. D., Ward, C. W., & Brunt, A. A. 1994. The Potyviridae. CAB international.
  35. Smith, F. F. 1961. Insect vectors of cucumber mosaic virus in gladiolus. *Gladiolus Gram* 48: 10-13.
  36. Stein, A., Salomon, R., Cohen, J. and Loebenstein, G. 1986. Detection and characterization of bean yellow mosaic virus in corms of *Gladiolus grandiflorus*. *Ann. Appl. Biol.* 109: 1154-1467.
  37. Sushak, P. M. 1977. Seed transmission of tobacco ringspot and tomato ringspot viruses in gladioli and inoculations of tissue-cultured virus-free gladiolus plants and calli with bean yellow mosaic virus and with cucumber mosaic virus. *Gladiolus Gram* 26: 2-7.
  38. Swenson, K.G. and Nelson R.L. 1959. Relation of aphids to the spread of cucumber mosaic virus in Gladiolus. *J. Econ. Entomol.* 52: 421-424.
  39. Tsuneyoshi, T. and Sumi, S. 1996. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. *The american phytopathological society.* 86(3): 253-259.
  40. Zettler, F. W. and Abo El-Nil, M. M. 1977. Bean yellow mosaic infections of gladiolus in Florida. *Plant Dis. Rep.* 61: 243-247.

(Received January 14, 1998)