

酵素結合抗體法에 의한 벼, 옥수수 및 媒介虫에서 벼 검은줄 오갈病的 檢定

禹龍範·李起運
慶北大學校 農科大學 農生物學科

Detection of Rice Black-Streaked Dwarf Virus in Rice, Maize and Insect Vectors by Enzyme- Linked Immunosorbent Assay

Yong Bum Woo and Key Woon Lee

Department of Agricultural Biology, College of Agriculture
Kyungpook National University, Daegu, Korea

要 約

酵素結合抗體法에 의한 벼검은줄오갈病 바이러스의 檢定에서, 抗原의 稀釋은 벼잎 320~2,560倍, 옥수수잎 320~5,120倍, 그리고 媒介蟲인 애벌레는 160~2,560倍로 하는 것이 效果的이었다. 以上の 檢定基準에 따른 地域別 越冬若蟲(애벌레)의 保毒蟲率 調査에서는 密陽 3.0%, 漆谷 2.3% 그리고 善山은 3.7%였다. 本 方法에 依하면 幼苗接種法으로는 不可能한 採集過程에서 죽은 蟲에서도 바이러스 感染與否를 檢定할 수 있었다. 圃場에서 任意로 採集한 벼와 옥수수 各 100株씩을 供試하여 其中 外部病徵이 없는 98株와 92株를 檢定한 結果, 벼에서는 98株中 4株가 罹病株로 나타났으며, 옥수수에서는 92株中 3株가 本 方法에 依해 感染된 것으로 나타나 포장에서의 잠복감염율은 벼에서는 4.11%, 옥수수에서는 3.25%로 나타났다. 따라서 효소결합항체법을 使用하면 병징이 잘 나타나지 않는 感染初期에도 檢定이 可能하였다.

ABSTRACT

Rice black-streaked dwarf virus(RBSDV) was purified from infected maize leaves. Antiserum against RBSDV was prepared for virus detection by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). In detection of RBSDV by ELISA, effective dilution range of antiserum extracted in RBSDV-containing host plants and insect vectors was from 320 to 2,560 times in rice plant, 320 to 5,120 in maize plant, and 160 to 2,560 times in insect vector, *Laodelphax striatellus* F, respectively. The percentage of viruliferous vector in overwintered nymphs of *Laodelphax striatellus* determined by ELISA were 3.0 in Milyang, 2.3 in Chilgok, and 3.7 in Sunsang area. Dead insect vector which could not be tested for virus infection by conventional rice seedling inoculation test could be tested by ELISA. One hundred plants of rice and maize were randomly sampled in the field and tested whether or not they were infected with RBSDV. In rice plants, 4 out of 98 plants turned out to be infected with RBSDV by ELISA. In maize plant, 3 out of 92 plants which were excepted 8 plants to be appeared symptom already were infected. As a result, ELISA could be detected even in case of symptomless plants at early stage of viral infection.

Key words: RBSDV, ELISA, effective dilution range, detection.

緒 論

材料 및 方法

우리나라에서 벼검은줄오갈병(水稻黑條萎縮病, Rice Black-Streaked Dwarf Virus, RBSDV)은 1973年 善山에서 처음 確認된(9, 11) 이래 매년 발병면적이 增加하고 있으며(12, 15) 1975年 검은줄오갈병으로 命名되었다(11). 이 병은 애벌레(Laelaphax striatellus Fallen)가 媒介하는 永續型 바이러스病으로 徑卵傳染을 하지 않는다(7, 12, 16).

最近 벼와 옥수수에 甚한 피해를 나타내는 검은줄오갈병은 기주식물에서의 심부기간이 비 오갈병이나 1호분리애벌레病보다 깊어서(7) 越冬 保毒蟲의 11月 檢定이 이러한 病發生 豫察上 問題點이 되고 있다.

酵素結合抗體法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)의 가장 重要한 特徵은 從來의 免疫沈降法에서보다 훨씬 더 낮은 virus 농도에서도 病原體를 檢定할 수 있으므로 보다 正確한 檢定을 할 수 있다는 것이다(2).

酵素結合抗體法을 植物病理學에 처음 도입한 것은 1973年 Derrick(4)에 의해서이며 그뒤 Clark 등(2)은 植物바이러스病의 定量的인 檢定에 利用하였다. 1982年 Clarke 등(3)은 Potato Leaf-Roll Virus를 塊莖 및 싹틔움에서 검정하였으며, Luisoni 등(14)은 벼에서 Rice Ragged Stunt Virus(RRSV)를 檢定하였고, Hibino 등(6)은 RRSV를 媒介蟲인 벼벌레의 蟲體에서 檢定하였다. 또한, Lommel 등(13)은 double antibody sandwich ELISA에 비해 더 敏感하고, 粗汁液으로도 檢定할 수 있는 Indirect ELISA에 대해 試驗하였다. 그後 檢定法 改善에 대한 많은 研究가 수행되어 Singh 등(17)은 抗原의 貯藏溫度가 ELISA 檢定에 미치는 영향에 대하여 報告하였으며, Goodwin 등(5)은 감자 virus S, X 및 Y를 檢定함에 있어 virus specific absorbance를 增加시키는 方法에 대한 研究를 수행하였다.

그뒤 血清學的 診斷의 技術으로써 酵素結合抗體法에 對한 國際的인 認識은 急激히 높아졌으나 우리나라에서는 아직 植物病의 檢定에 이 方法을 應用, 研究한 바가 없으므로 本 試驗에서는 植物바이러스病의 檢定 및 發生豫察을 위한 早期 檢定方法의 일환으로, 大體로 檢定時間이 많이 걸리는 벼검은줄오갈병바이러스를 供試하여 寄主植物 및 媒介蟲인 애벌레에서 感染바이러스를 檢定하였다.

抗原用 RBSDV의 寄主植物은 慶北農村振興院 圃場에서 검은줄오갈병에 感染된 벼와 옥수수잎을 採集하여 phosphate buffered saline(PBS; NaCl 4.0 g, KCl 0.1 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.45 g, KH₂PO₄ 0.1 g, 재증류수 500 ml, pH 7.4)에 各各 1:1(w/v)로 磨碎한 粗汁液을 二重 gauze 로 걸러 使用하였다.

抗原用 RBSDV의 媒介蟲은 애벌레를 검은줄오갈병에 感染된 벼에 2週口 동안 吸汁시킨 後 本 試驗에 供試하였다.

越冬 保毒蟲率 調査에서는 3月初旬 密陽, 漆谷, 善山 地域의 벼圃場에서 各 300마리의 若蟲을 採集하여 그 保毒蟲與否를 檢定하였다.

無毒애벌레를 검은줄오갈병의 罹病벼에 20日 동안 吸汁시킨 後 生存蟲과 죽은지 2日 經과한 死蟲 各 50마리를 供試하여 microplate의 各 well 當 1마리의 蟲을 PBS-Tween 緩衝液(PBS에 Tween-20을 0.05%(v/v) 되게 加한 溶液)에 磨碎하여 抗原으로 使用하였다.

또한, 실제 圃場에서의 검은줄오갈병바이러스 罹病株를 檢定하기 위하여, 圃場에서 8月 下旬에 벼와 옥수수를 任意로 採集하여 供試하였다.

Clark(1)의 方法을 改變한 酵素結合抗體法の 過程은 다음과 같다.

γ -globulin의 精製. 本 研究室에서 調製한 抗血清(力價 1,024⁻¹)을 各各 0.5 N의 NaOH와 KCl에 洗淨하여 1/2 PBS에 置換하여 좋은 DEAE-cellulose colum에 通過시켜 DEAE-cellulose에 吸着되지 않고 溶出되어 나온 γ -globulin의 分劃을 取하였다.

γ -globulin의 microplate coating. 정제된 γ -globulin을 0.05 M Na₂CO₃ 液에 1:10(v/v)의 濃度로 加하여 이 液을 microplate의 各 well에 0.2 ml씩 注入한 다음 37°C에 2시간 定置後 PBS-Tween으로 3回 洗淨하였다.

抗原의 coating. 罹病벼, 罹病옥수수잎 및 保毒애벌레의 檢定에서는 10倍에서 10,240倍까지 稀釋하여 使用하였고, 越冬若蟲의 保毒蟲率 檢定에서는 640倍로 稀釋하여 使用하였으며, 이에 非特以의 反應을 抑制하기 위하여 2%의 PVI(polyvinylpyrrolidone, mw 44,000)와 0.2%의 ovalbumin을

添加하였다. 稀釋된 抗原은 microplate 의 各 well 에 0.2 ml 씩 넣어 50°C 에서 하룻밤 定置하였다.

酵素結合抗體의 coating. 抗血清으로부터 精製한 1 ml 의 r-globulin 에 2 mg 의 alkaline phosphatase (Type I, Sigma Chemical Co.) 를 溶解시킨 後, 透析 tube 에 넣어 12 시간 以上 透析시키며 여기에 0.05 % (v/v) 의 glutaraldehyde 를 加하여 22°C 에 4 시간 定置하였다. 이것을 다시 PBS 에 하룻밤 透析시켜 1 % bovine serum albumine (BSA) 과 0.02 % 의 Sodium Azide (NaN₃) 를 添加하여 使用하였다. 이 酵素結合抗體를 抗原이 coating 된 microplate 의 各 well 에 約 0.2 ml 씩 넣어 37°C 에 5 시간 反應시킨 後 剩餘의 抗體를 除去하기 위하여 PBS-Tween 으로 3 回 洗淨하였다.

基質의 處理 및 吸光度 測定. 基質 (para-nitrophenylphosphate disodium salt, wako pure chemical Co.) 을 10 % diethanolamine 液에 1 : 1 (w/v) 의 濃度로 溶解하여 酵素結合抗體를 coating 시킨 microplate 의 各 well 에 0.3 ml 씩 넣어 30 分에서 2 시간 동안 定置하면서 黄色의 反應이 明瞭하게 나타나면 50 μl 의 3 M NaOH 로 反應을 停止시켰다. 反應程度는 Minireader II (Dynatech Co.) 吸光分析器로 405 nm 에서 測定하였다.

結果 및 考察

寄主植物 및 媒介虫에 感染된 RBSDV 의 檢定.

검은줄오갈병에 感染된 벼잎, 옥수수잎 및 바이러스를 保藏한 애벌레의 粗汁液을 濃度別로 稀釋한 것을 抗原으로 하여 酵素結合抗體法으로 檢定한 結果(그림 1), 罹病벼잎의 경우 10 倍 稀釋에서 吸光度가 0.74 였고, 2,560 倍 稀釋한 것은 0.02 의 吸光度를 나타내었다. 그러나 健全株의 粗汁液도 10 倍 稀釋에서 0.08, 160 倍 稀釋에서 0.02 의 吸光度를 나타내는 非特異的 反應이 나타나므로, 健全株과 罹病株를 區分할 수 없는 圃場狀態에서 感染初期의 罹病率 調査를 爲해서는 320 ~ 2,560 倍로 稀釋하는 것이 效果의이라고 생각되며, 또한 160 倍 以下로 稀釋하여도 吸光度가 0.09 以上이면 感染株로 診斷할 수 있는 것으로 나타났다.

罹病옥수수잎을 抗原으로 供試한 것에서는 10 倍 稀釋한 것은 0.86, 5,120 倍 稀釋한 것은 0.01 의 吸光度를 나타내었다. 그러나, 건전주에 있어서도 10 倍 稀釋에서 0.10, 160 倍 稀釋에서 0.02 의 吸

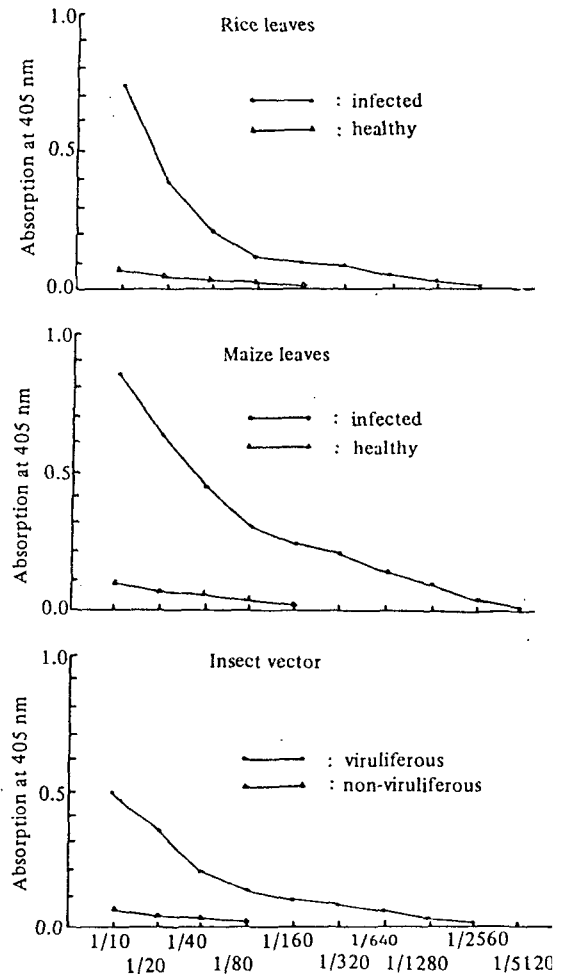


Fig. 1. Comparative analysis of rice, maize and smaller brown planthopper (*L. striatellus*) for detection of rice black-streaked dwarf virus infection by ELISA.

光度가 나타나므로 옥수수에 있어서 검은줄오갈병 바이러스를 檢定하기 위한 效果的인 稀釋範圍는 320 ~ 5,120 倍라고 생각되며 160 倍 以下에서도 吸光度 0.11 以上이면 感染된 것으로 볼 수 있다.

검은줄오갈병 바이러스를 保藏한 媒介虫(애벌레)의 蟲體 粗汁液에서는 10 倍 稀釋에서 0.50, 2,560 倍 稀釋에서 0.01 의 吸光度를 나타내었고, 無毒蟲의 粗汁液에서도 역시 80 倍까지는 反應이 나타나므로 160 ~ 2,560 倍로 稀釋하는 것이 바이러스 保藏有無檢定에 效果的이라 생각되며, 80 倍 以下로 稀釋하여도 吸光度 0.08 以上이면 保藏蟲으로 볼 수 있다.

Uyemoto 등(18)은 Maize Chlorotic Mottle Virus 罹病葉을 10 倍에서 2,000 倍로 稀釋하여 檢

定한 結果 非特以의 反應이 나타나지 않는 100 배에서 2,000 배로 稀釋하는 것이 적당하다고 하였으며, Hibino 등(6)은 RRSV에 감염된 벼를 檢定한 結果 320 배에서 5,120 배로 稀釋하는 것이 效果의이라 하였다. 이것은 본 실험에서 RBSDV에 감염된 벼잎을 供試하여 檢定한 것과 같은 경향을 나타내었다.

越冬若虫의 保毒虫 檢定. 越冬若虫의 保毒蟲率을 檢定하기 위하여 密陽, 漆谷, 善山의 各 地域 供試 300 마리의 越冬若虫을 採集하여 檢定한 結果, 밀양에서 採集한 媒介蟲 300 마리 中 그림 1의 檢定基準에 따른 健全蟲의 範圍인 吸光度 0.10 以下인 것은 모두 291 마리로 나타났고, 保毒蟲의 範圍인 吸光度 0.10 以上인 것은 9 마리로 나타나 3.0%의 保毒蟲率을 나타내었다(그림 2). 漆谷에서 採集한 媒介蟲은 293 마리가 健全蟲, 7 마리가 保毒蟲으로 나타나 2.3%의 保毒蟲率을 나타내었으며(그림 2), 선진에서 採集된 供試蟲에서는 健全蟲이 288 마리, 保毒蟲이 12 마리로 나타나 3.7%가 保毒蟲으로 나타났다(그림 2).

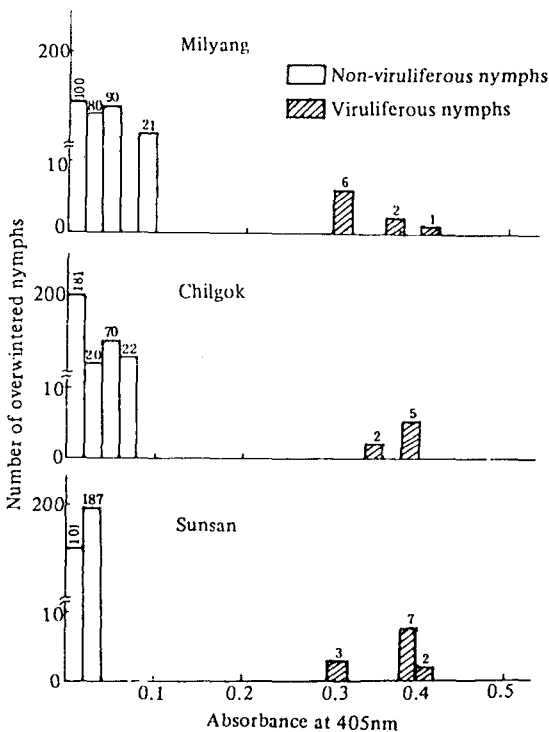


Fig. 2. Detection of viruliferous nymphs, *Laodelphax striatellus*, overwintered which were collected in Milyang, Chilgok, and Sunsan areas by ELISA. 300 individuals were tested in each area.

李 등(11)과 金 등(7)은 越冬若虫의 保毒蟲率 檢定을 生物檢定法인 個別幼苗接種法으로 行하였는데 이 境遇 1個月 以上의 기간과 많은 作業이 要求되지만 本 方法을 使用하면 3~4日의 짧은 期間內에 檢定이 可能하므로 病發生豫察을 위한 越冬若虫의 保毒蟲率 檢定에 매우 效果的이라고 생각된다.

生存蟲 및 死蟲에서의 바이러스 檢定. 生存蟲과 死蟲 各 50 마리를 供試하여 酵素結合抗體法으로 檢定한 結果(표 1) 먼저 生存蟲에 있어서 吸光度 0.00~0.10의 範圍에 屬하는 34 마리가 健全蟲으로 判定되었으며, 그 以上의 吸光度를 나타내는 16 마리가 保毒蟲으로 判定되었다. 死蟲에 있어서는 吸光度 0.00~0.10에 屬하는 36 마리가 健全蟲, 吸光度 0.11 以上인 14 마리가 保毒蟲으로 判定되어 生存蟲과 死蟲 사이에는 保毒蟲에 큰 差異를 나타내지 않았다.

Hibino 등(6)도 RRSV를 保毒한 벼편구를 죽여서 여러 溫度別로 處理한 後 生存蟲과의 保毒蟲率을 比較한 結果 거의 差異가 없음을 報告하였다. 以上의 結果에 依하면 從來 一般의으로 이용하고 있는 媒介蟲 個體幼苗接種法에 依한 判定方法으로는 반드시 媒介蟲이 살아있어야 檢定이 可能한데 비해 酵素結合抗體法을 利用한 경우 採集過程에서 죽은 蟲으로도 바이러스 保毒蟲의 檢定이 可能함을 알 수 있었다.

圃場에서의 罹病株 檢定. 벼와 옥수수 圃場에서 벼검은줄오갈病的 感染狀態를 調査하기 위하여 임의로 採集한 벼와 옥수수 各 100 株를 供試하여 酵素結合抗體法으로 檢定한 結果(표 2), 먼저 벼에 있어서는, 採集된 100 株의 벼중 外觀上 病徵이 없는 98 株를 本 方法으로 檢定하였고 이에 4 株가 바이러스에 感染된 것으로 나타나 4.11%가 潛伏感染되어 있었다. 옥수수에 있어서는 外觀上 病徵이 나타나지 않은 92 株를 檢定하였는데 3 株가 바이러스에 感染된 것으로 나타나 3.25%가 潛伏된 狀態로 감염되어 있었다.

따라서, 本 方法을 利用하면 潛伏感染되어 있는 것도 檢定할 수 있을뿐 아니라 圃場에서 RRSV의 병징이 잘 나타나지 않는 감염초기의 寄主植物에서도 바이러스를 檢定할 수 있을 것으로 판단되었다.

李 등(12)과 新海(16)는 벼검은줄오갈病的 接植時期가 빠를수록 病徵發見이 빠르고 萎縮정도가 심하다고 하였으며, 金 등(9)은 萎縮정도가 심할수록 數량에 미치는 影響이 크다고 하였다. 따라서 酵素

Table 1. The difference of reaction between living and dead smaller brown planthopper (*Laodelphax striatellus* F.) by enzyme-linked immunosorbent assay

A 405 nm values in ELISA	Number of vectors ^a			
	Living		Dead	
	Non-viruliferous	Viruliferous	Non-viruliferous	Viruliferous
0.00 - 0.05	33	0	26	0
0.06 - 0.10	1	0	10	0
0.11 - 0.20	0	1	0	3
0.21 - 0.30	0	1	0	1
0.31 - 0.40	0	9	0	10
0.41 - 0.50	0	4	0	0
0.51 - 0.60	0	1	0	0

^a50 adult vectors were tested 20 days after inoculation and then homogenized in 0.4ml of PBS-Tween(pH 7.4) containing 2% PVP.

Table 2. Detection of RBSDV by enzyme-linked immunosorbent assay in rice and maize plants symptoms in the fields

Sample	No. of sampled plants ^a	No. of tested plants ^b	No. of plants infected with RBSDV in ELISA	Percent of latent infection plants
Rice plant	100	98	4	4.11(4/98)
Maize plant	100	92	3	3.25(3/92)

^aThe samples were collected randomly in the field(Chilgok) in the late of August 1984.

^bThe plants which symptom appeared were excepted.

結合抗體法에 의한 벼검은줄오갈병바이러스의 早期
檢定이 매우 重要하다고 보며 이는 本病의 보다 正
確한 豫察手段으로 活用 可能하다고 여겨진다.

參 考 文 獻

1. CLARK, M.F.(1981). Immunosorbent assay in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathology* 19:83-106.
2. CLARK, M.F. & ADAMS, A.N.(1977). Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
3. CLARKE, R.G., CONVERSE, R.H. & KOJIMA, M.(1980). Enzyme-linked immunosorbent assay to detection potato leafroll virus in potato tuber and viruliferous aphids. *Plant Disease* 64:43-45.
4. DERRICK, K.S.(1973). Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56:652-653.
5. GOODWIN, P.H. & BANTTERI, E.E.(1984). Increased sensitivity of ELISA for potato viruses S, X and Y by polystyrene pretreatment, and additive and a modified assay procedure. *Plant Disease* 68:944-948.
6. IIBINO, H. & KIMURA, I.(1982). Detection of rice ragged stunt virus in insect vectors by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 7:656-659.
7. 鄭鳳朝·朴鍾聲.(1979). 韓國植物保護論考(水稻의 病). 17~25.
8. 金東吉.(1985). 嶺南地方의 벼 移秧時期가 줄무늬잎마름병과 검은줄무늬오갈병의 發病에 미치는 影響. *한식병지* 1 : 109~114.
9. 金東吉·朴來敬·鄭鍊泰·陳永大.(1983). 벼검은줄무늬오갈병이 數量과 數量構成要素에 미치는 影響. *한식보호지* 22(3) : 193~197.
10. KOENIG, R.(1978). ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 40:309-318.
11. 李在悅·李淳桐·鄭鳳朝.(1977). 韓國에서 벼黑條萎縮病 發生에 對하여. *한식보호지* 16 : 121~125.

12. 이 순형·최 용문·이 기운·이 재열·유 갑희·김 정수.(1980). 벼흑조위축병 피해 및 증매 전염에 관한 시험. 농기연서연보(생물부편). 203 ~ 225.
13. LOMMEL, S.A., MCCAIN, A.H. & MORRIS, T.J.(1982). Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72:1018-1022.
14. LUISONI, E., MILNE, R.G. & ROGGERO, P. (1982). Diagnosis of rice ragged stunt virus by enzyme-linked immunosorbent assay and immunosorbent electron microscopy. *Plant Disease* 66:929-932.
15. 朴來敬·鄭鍊泰·陳永大·金東吉·李道熙.(1982). 嶺南地域의 벼 virus 病 發生實態調查研究. 農試報告 24(作物編). 98 ~ 106.
16. SHINKAI, A.(1962). Study on insect transmission of rice virus disease in Japan. *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci. Ser. C 14:1-12*.
17. SINGH, R.P. & SOMERVILLE, T.H.(1983). Effect of storage temperature on potato virus infectivity levels and serological detection by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease* 67:1133-1136.
18. UYEMOTO, J.K.(1980). Detection of maize chlorotic mottle virus serotypes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 70:290-292.
19. VOLLER, A., BARLETT, A., BIDWELL, D.E., CLARK, M.F. & ADAMS, A.N.(1976). The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *J. Gen. Virol.* 33:165-167.