

Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 오동나무, 라일락, 미역취의 Phytoplasma 검출 및 유연 관계

이준탁* · 김은화 · 예미지 · 권오유
경북대학교 농과대학 농생물학과

Detection of Phytoplasmas from *Paulownia tomentosa*, *Syringa vulgaris* and *Solidago vir-aurea* var. *gigantea* Using Polymerase Chain Reaction (PCR) and Their Relationships

Joon-Tak Lee*, Eun-Hwa Kim, Mi-Chi Yea and O-Yu Kwon

Department of Agricultural Biology, College of Agriculture, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT : Specific DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the phytoplasmas (mycoplasma-like organisms, MLOs) from the diseased plants showing phytoplasma symptoms, witches'-broom, dwarf and yellows. Using the primers recognizing the 16S rRNA gene of phytoplasma, forward (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-GATT-3') and reverse (5'-AACCCCGAGAACGTATTCACC-3'), about 1.4 kbp DNA fragments were detected from DNA extract of the infected plants, *Solidago vir-aurea* var. *gigantea* Miq., *Paulownia tomentosa* Steud., and *Syringa vulgaris* L. To confirm the above results, when alternative primers recognizing another part 16S rRNA gene of phytoplasma were used, forward (5'-ACGAAAGCGTGGGGAGCAA-3') and reverse (5'-GAAGTCGA-GTTGCAGACTTC-3'), 0.5 kbp DNA fragments were detected from only infected plants described above. From the result of *AluI* digestion of two PCR products (1.4 kbp and 0.5 kbp), *P. tomentosa* and *S. vulgaris* shared the same band pattern, while *S. vir-aurea* var. *gigantea* showed a different pattern. In this respect, the evolutionary trend of the phytoplasma of *P. tomentosa* closely resembled that of *S. vulgaris*, but not that of *S. vir-aurea* var. *gigantea*.

Key words : phytoplasmas, PCR, *AluI*, *Syringa vulgaris*, *Solidago vir-aurea* var. *gigantea*, *Paulownia tomentosa*.

1967년 Doi 등(3)이 뽕나무 오갈병, 감자 빛자루병, aster 위황병 등의 병원체를 mycoplasma-like organisms(MLOs)이라고 밝혔으며, 1994년 국제마이코플라스마학회에서는 MLO의 속명을 *Phytoplasma*로 하는 것을 승인하였다(15). 지금까지 세계적으로 각종 주요 작물과 수목에서 phytoplasma에 의한 병이 300여 종의 식물에 발생하고 있다고 보고되어 있고 현재 우리나라에서는 20여 종의 식물에 발생하고 있으며 그 피해 범위도 증가하는 추세에 있다(2, 5, 8~13, 16).

이병식물에서 phytoplasma를 진단하기 위해서는 전자현미경(TEM)과 형광현미경에 의한 관찰, 면역학적

성질을 이용한 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)나 IEM(immunosorbent electron microscopy), polyclonal antibody, monoclonal antibody 등의 방법(2, 10, 16)이 있으며, 근래에는 phytoplasma DNA isolation과 DNA cloning과 같은 nucleic acid hybridization법(6, 14)을 개선시켜 phytoplasma를 진단하고 있지만, 이런 방법들은 많은 시간이 소요되고, 복잡한 과정을 거쳐야 하므로 이를 개선하기 위해 단시간 내에 간편하게 검출하는 방법으로 polymerase chain reaction(PCR) 방법이 많이 이용되고 있다(1, 12, 17). PCR 방법은 *in vitro*에서 DNA를 증폭하는 방법으로, 수 시간 내에 한 특정부위의 DNA를 $10^5 \sim 10^8$ 배까지 증폭할 수 있으며, genomic DNA cloning, cDNA cloning

*Corresponding author.

ing, sequencing, genomic footprinting, gene mapping, 종의 분류 및 동정, molecular phylogenetic analysis 등에 사용되어지고 있다(1, 4, 6~8, 12, 14, 17).

우리나라에서는 경제성이 높은 작물에 phytoplasma에 의한 병이 발생되고 있음에도 불구하고 발병식물에 관한 전반적인 조사도 미비할 뿐만 아니라, 병원 phytoplasma간의 유연관계에 관한 연구도 단지 몇 종류의 식물 즉, 뽕나무, 붉나무, 대추나무, 머루 및 천궁에 대해서만 이루어져 있을 뿐이다(2, 5, 10~12, 16). 따라서, 본 연구는 PCR을 이용하여 우리나라에서 발생하고 있는 phytoplasma 이병식물에서 phytoplasma를 검출하고 16S rRNA gene에 대한 분석을 통하여 phytoplasma간의 유연관계를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

재료. 본 연구에 사용한 재료는 6월~9월에 채집한 오동나무(*Paulownia tomentosa* Steud.), 라일락(*Syringa vulgaris* L.), 미역취(*Solidago vir-aurea* var. *gigantea* Miq.)로서 오동나무와 라일락은 경북 군위와 대구 지역에서 채집하였고, 미역취는 울릉도에서 채집하였다. 각 식물은 위축(dwarf), 황화(yellows), 총생(witches'-broom) 등 phytoplasma병의 전형적인 병징을 나타내는 이병식물과 control로서 각각의 건전식물을 사용하였다.

Total DNA 추출. Phytoplasma에 이병된 식물과 건전식물에서 total DNA를 추출하기 위해 Ahrens의 방법(1)을 수정하여 사용하였다. 이병식물과 건전식물을 각각 0.3 g씩 취하여 liquid nitrogen을 넣어 마쇄한 후, CTAB buffer[2.5 M NaCl, 0.2 M EDTA, 0.05 M Tris (pH 8.0), 1% CTAB(cetyltrimethyl ammonium bromide), 1% 2-mercaptoethanol] 0.9 ml를 가하여 다시 마쇄한 다음 현탁액을 1.5 ml microtube에 넣어 65°C에서 30분간 반응시키고, 12,000×g에서 5분간 원심 분리시켰다. 원심분리하여 얻은 상층액에 RNase (50 µg/ml)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 상층액과 같은 양의 phenol : chloroform(1 : 1)을 넣어

잘 섞고, 다시 12,000×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액에 같은 양의 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)을 넣어 잘 섞은 후, 12,000×g에서 5분간 원심 분리하였으며, 원심분리하여 얻은 상층액에 상층액 volume의 0.7배에 해당하는 isopropanol을 가하여 -20°C에서 하룻밤 정치시켰다. 그리고 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 pellet에 100 µl 70% EtOH를 넣어 2회 세척하고, vacuum pump로 건조시킨 후 pellet을 증류수에 녹여 DNA 농도를 측정한다 다음 사용할 때까지 4°C에 보관하였다.

Primers의 선택. 약 1.4 kbp와 0.5 kbp의 phytoplasma DNA 단편을 증폭하기 위해 Table 1에서와 같은 primer로서 1.4 kb의 forward와 reverse, 0.5 kb의 forward와 reverse(이하 1.4 kb(F, R), 0.5 kb(F, R)로 함)를 각각 사용하였다. 사용된 1.4 kb(F, R)는 Mollicutes, Rickettsias, *E. coli*, chloroplast와 gene bank database에 의거하여 높은 상동성을 가지는 forward(5'-GTT-TGATCCTGGCTCAGGATT-3' : 1-21, 21 mer)와 reverse(5'-AACCCCGAGAACGTATTCACC-3' : 1368-1348, 21 mer)를 선택하여 사용하였다(14). 그리고 0.5 kb(F, R)는 O-phytoplasma(*Oenothera hookeri*-phytoplasma)의 16S rRNA gene sequence에 의거한 forward(5'-ACGAAAGCGTGGGGGCAAA-3' : 759-778, 20 mer)와 reverse(5'-GAAGTCGAGTTGCAGATCTC-3' : 1316-1297, 20 mer)를 선택하여 사용하였다(1). 본 실험에 사용한 PCR primers의 sequence와 위치 및 길이는 Table 1에 정리하였다.

PCR 반응. Phytoplasma에 이병된 식물과 건전식물에서 추출한 total DNA에서 phytoplasma만을 증폭하기 위한 PCR 방법은 Ahrens(1)와 Namba(14)가 사용한 방법을 수정하여 사용하였다. 오동나무, 라일락 및 미역취의 건전식물과 phytoplasma에 이병된 식물에서 추출한 total DNA(100~200 ng), 10× reaction buffer(100 mM Tris pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin), 1 µM forward primer, 1 µM reverse primer, 250 µM dNTPs(dATP, dTTP, dGTP,

Table 1. Primers for PCR

Primer	Sequence	Position on 16S rRNA gene	Length (mer)
1.4 kb F ^a	5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'	1~21	21
1.4 kb R	5'-AACCCCGAGAACGTATTCACC-3'	1368~1348	21
0.5 kb F	5'-ACGAAAGCGTGGGGAGCAAA-3'	759~778	20
0.5 kb R	5'-GAAGTCGAGTTGCAGATCTC-3'	1316~1297	20

^a F : forward, R : reverse.

dCTP), 5 unit Taq polymerase를 넣고 최종 volume을 재증류수로 50 µl되게 맞추었으며, 반응과정의 증발을 막기 위해 mineral oil 50 µl를 넣었다. PCR에 사용한 기계는 Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT를 사용하였고 반응 조건은 Table 2와 같다.

PCR product의 전기영동. 1.4 kb(F, R)와 0.5 kb(F, R)를 각각의 primer로 하여 얻은 PCR 반응산물을 5 µl의 gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in water)와 섞어 8% polyacrylamide gel(30% acrylamide, 5×TBE, 10% ammonium persulfate, TEMED) 또는 0.7% agarose gel에 10 µl씩 loading하고 TBE buffer(89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA)에서 xylene cyanol이 gel 상단의 1/3 지점과 bromophenol blue가 gel 하단의 1/3 지점에 올 때까지 실온에서 40 mA로 전기영동한 후 2 µg/ml의 EtBr (ethidium bromide)에서 15분간 DNA를 염색하여 band pattern을 UV-transilluminator로 확인하였다.

제한효소처리. 1.4 kb(F, R)와 0.5 kb(F, R)를 각각 primer로 사용하여 얻은 PCR 반응산물을 각각 *AluI* 제한효소로 37°C에서 2시간 절단시킨 후 8% polyacrylamide gel에 5 µl의 gel loading buffer와 섞어 1×TBE buffer에서 40 mA로 전기영동하고 2 µg/ml의 EtBr에서 15분간 염색하여 band pattern을 UV-transilluminator로 확인하였다.

결과 및 고찰

PCR 반응. 1.4 kb(F, R)를 primer로 사용하여 얻은 PCR 반응산물을 8% polyacrylamide gel에서 전기영동한 결과, phytoplasma에 이병된 오동나무, 라일락, 미역취에서 추출한 각각의 total DNA에서는 1.4 kbp의 위치에서 band가 검출되었으나 control로 사용한 건전 식물에서는 어떠한 band도 검출되지 않았다(Fig. 1).

라일락과 미역취에서의 경우, 몇 개의 비특이적인 band가 특이적인 band와 함께 나타났기 때문에 특이적인 band를 확인하기 위하여 위의 실험에서 PCR하여 얻은 반응산물을 template DNA로 하여 다시 PCR해서 그 반응산물을 0.7% agarose gel에 10 µl씩 load-

ing하여 전기영동한 결과, 1.4 kbp에서 특이적인 band가 검출되었다(Fig. 2).

위의 결과를 재확인하기 위해 16S rRNA gene의 0.5 kb(F, R)를 primer로 사용하여 얻은 PCR 반응산물을 전기영동한 결과, phytoplasma에 이병된 오동나무, 라일락, 미역취에서 모두 약 0.5 kbp 위치에서 특이적인 band가 검출되었으나 control로 사용한 건전식물에서는 어떠한 band도 검출되지 않았다(Fig. 3).

Fig. 1과 2의 결과를 재확인하기 위하여 0.5 kb(F, R)의 primer를 사용하여 PCR 반응산물을 얻었다. Fig. 3에서와 같이 phytoplasma에 감염된 이병식물(lane 2, 4, 6)에서만 564 bp와 558 bp의 특이 band가 각각 검

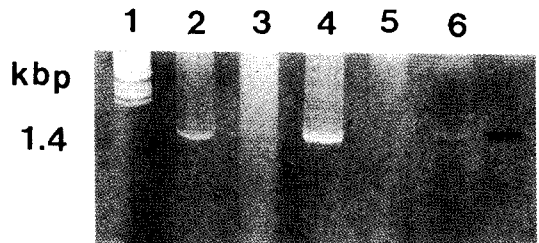


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products obtained by using a primer set (1.4 kb F and 1.4 kb R). Lane 1 : λ-DNA digested with *HindIII*; Lane 2 : infected *Paulownia tomentosa*; Lane 3 : healthy *P. tomentosa*; Lane 4 : infected *Syringa vulgaris*; Lane 5 : healthy *S. vulgaris*; Lane 6 : infected *Solidago vir-aurea* var. *gigantea*; Lane 7 : healthy *S. vir-aurea* var. *gigantea*. Arrow indicates PCR products.

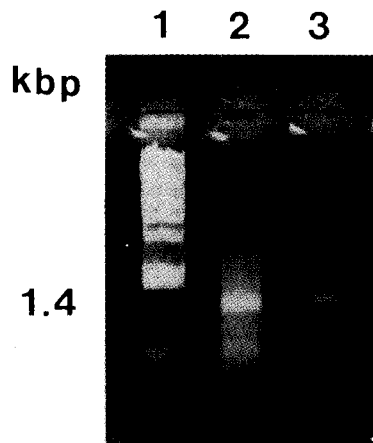


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained by using a primer set (1.4 kb F and 1.4 kb R). Lane 1 : λ-DNA digested with *HindIII*; Lane 2 : infected *Syringa vulgaris*; Lane 3 : infected *Solidago vir-aurea* var. *gigantea*.

Table 2. PCR conditions

Cycle	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	95°C/5 min	55°C/2 min	72°C/3 min
2~29	95°C/1 min	55°C/2 min	72°C/3 min
30	95°C/1 min	55°C/2 min	72°C/10 min

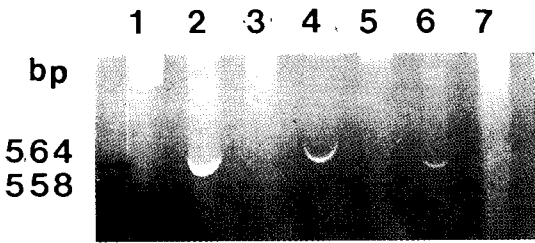


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products obtained by using a primer set (0.5 kb F and 0.5 kb R : *Oenothera hookeri*-phytoplasma oligonucleotide fragment). Lane 1 : λ -DNA digested with *Hind*III; Lane 2 : infected *Paulownia tomentosa*; Lane 3 : healthy *P. tomentosa*; Lane 4 : infected *Syringa vulgaris*; Lane 5 : healthy *S. vulgaris*; Lane 6 : infected *Solidago vir-aurea* var. *gigantea*; Lane 7 : healthy *S. vir-aurea* var. *gigantea*. Arrows indicate PCR products.

출되었다. 한편 control로 사용한 건전식물(lane 3, 5, 7)에서는 어떤 band도 검출되지 않았다. 이 결과로 보아 Fig. 1과 2에서 얻어진 특이 band는 phytoplasma에 이병된 식물체내의 phytoplasma의 16S rRNA gene이 증폭되어서 생긴 반응산물이라고 할 수 있다.

제한효소처리. 1.4 kb(F, R)와 0.5 kb(F, R)를 primer로 하여 얻은 오동나무, 라일락, 미역취의 PCR 반응산물을 제한효소인 *Alu*I(AG ↓ CT)으로 절단하여 8% polyacrylamide gel에 전기영동한 결과 1.4 kbp의 PCR 반응산물의 경우, 오동나무와 라일락은 동일한 band pattern을 나타내었고, 미역취는 오동나무와 라일락의 band와는 전혀 다른 band pattern을 나타내었다 (Fig. 4).

0.5 kb(F, R)를 primer로 사용하여 얻은 PCR 반응산물인 경우에도 phytoplasma에 이병된 오동나무와 라일락에서는 동일한 band pattern을 나타내어 이들 phytoplasma는 서로 유연관계가 가까운 것으로 생각되며, 미역취에서는 이들과 다른 band pattern을 나타내어 오동나무와 라일락의 phytoplasma와는 유연관계가 먼 것으로 추측된다(Fig. 5).

이상과 같이 본 실험을 통하여 초기단계에 phytoplasma에 이병된 식물체로부터 PCR 방법을 이용하여 신속하고 정확하게 phytoplasma를 검출할 수 있었고, 이들 PCR 반응산물에 대해 제한효소를 처리함으로써 phytoplasma들 간의 유연관계를 비교할 수 있었다. 그리고 phytoplasma 상호간의 유연관계를 더욱 상세하게 알기 위해서는 PCR 반응산물 중에서 16S rRNA에 해당하는 DNA 단편을 cloning하여 sequence 할 수 있고, 또한 수 종류의 10 mer single primer를 이

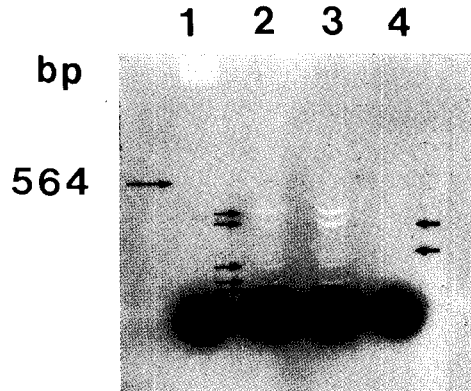


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Alu*I digestion of PCR products obtained from 1.4 kb 16S rRNA gene fragment. Lane 1 : λ -DNA digested with *Hind*III; Lane 2 : infected *Paulownia tomentosa*; Lane 3 : infected *Syringa vulgaris*; Lane 4 : infected *Solidago vir-aurea* var. *gigantea*. Small arrows indicate *Alu*I-digested PCR products.

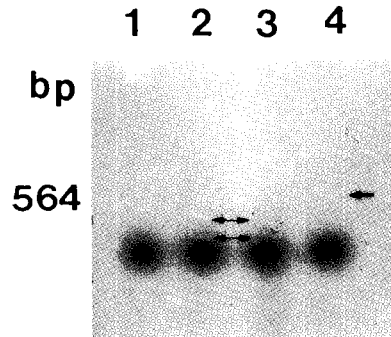


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Alu*I digestion of PCR products obtained from 0.5 kb 16S rRNA gene fragment. Lane 1 : λ -DNA digested with *Hind*III; Lane 2 : infected *Paulownia tomentosa*; Lane 3 : infected *Syringa vulgaris*; Lane 4 : infected *Solidago vir-aurea* var. *gigantea*. Arrows indicate *Alu*I-digested PCR products.

용하여 phytoplasma에 이병된 식물들의 total DNA를 template로 이용하여 얻어지는 PCR 반응산물의 분석에 의해서도 유연관계를 알 수 있다(1, 4, 6-8, 12, 14, 17). 따라서 본 실험에서 얻은 PCR 반응산물의 DNA 염기배열을 기초로 해서 phytoplasma를 grouping하여 evolution tree를 만드는 것은 앞으로의 과제이다.

요 약

위축, 황화, 총생 증상 등 전형적인 병징을 나타내는

phytoplasma에 감염된 식물에서 phytoplasma만을 특이적으로 검출하기 위하여 polymerase chain reaction (PCR) 방법을 이용하였다. Phytoplasma의 16S rRNA gene의 DNA 단편을 증폭하기 위하여 1.4 kb primers (forward, 5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'와 reverse, 5'-AACCCGAGAACGTATTCACC-3')를 사용하여 증폭한 결과, phytoplasma에 이병된 오동나무, 라일락 및 미역취에서는 약 1.4 kbp의 위치에서 특이 band가 검출되었으나 control로 사용한 건전주에서는 어떠한 band도 검출되지 않았다. 위의 결과를 재확인하기 위하여 약 0.5 kb의 primers(forward, 5'-ACG-AAAGCGTGGGGAGCAAA-3'와 reverse, 5'-GAAGTCGAGTTGCAGACTTC-3')를 사용하여 증폭한 결과, 0.5 kb의 위치에서 특이 band가 검출되었으나 control로 사용한 건전주에서는 어떠한 band도 검출되지 않았다. Phytoplasma에 이병된 식물의 PCR 반응산물을 제한효소인 *AluI*으로 처리한 결과, 오동나무와 라일락에서는 동일한 band pattern을 나타내어 서로 유연관계가 가까운 phytoplasma인 것으로 생각되며, 미역취에서는 이들과는 다른 band pattern을 나타내어 오동나무와 라일락의 phytoplasma와는 유연관계가 먼 것으로 추측된다.

감사의 말씀

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단 자유공모 연구과제의 연구비에 의하여 이루어진 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ahrens, U. and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82 : 828-832.
- Chai, J. K. and Kim, Y. H. 1989. Studies on witches' broom of *Ligustrum ovalifolium* Hasskari caused by mycoplasma-like organism (MLO). *J. Korean For. Soc.* 78(2) : 103-118 (Korean with English abstr.).
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 33 : 259-266 (Japanese with English abstr.).
- Firrao, G., Gobbi, E. and Locci, R. 1994. Rapid diagnosis of apple proliferation mycoplasma-like organism using a polymerase chain reaction procedure. *Plant Pathol.* 43 : 669-674.
- Kim, Y. H. 1990. Studies on mycoplasma-like organism associated with witches' broom of *Rhus javanica* (II). Transmission by insect vector and dodder. *Korean J. Plant Pathol.* 6(1) : 119-124 (Korean with English abstr.).
- Kison, H., Schneider, B. and Seemüller, E. 1993. Restriction fragment length polymorphisms within the apple proliferation mycoplasma like organism. *J. Phytopathol.* 141 : 395-401.
- Lee, I. M., Hammond, R. W., Davis, R. E. and Gundersen, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification mycoplasma like organisms. *Phytopathology* 83 : 834-842.
- Lee, I. M., Bertaccini, A., Vibio, M. and Gundersen, D. E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85 : 728-735.
- Lee, J. T. 1983. Mycoplasma-like organisms (MLOs) and mycoplasma diseases. In : *Studies on Virus Diseases of Medicinal Plants*. Ph.D. Thesis, University of Tokyo, pp. 267-278 (Japanese).
- Lee, J. T. 1994. Vector and outbreak of cnidium witches'-broom infected by mycoplasma-like organism (MLO). *Korean J. Mycoplasmaology* 5(1) : 60-68 (Korean with English abstr.).
- Lee, J. T. and Yea, M. C. 1992. New mycoplasma diseases of *Vitis* spp., *Rubus crataegifolius*, and medicinal plants in Korea. *Korean J. Mycoplasmaology* 3(1) : 64 (Korean abstr.).
- Lee, J. T. and Yea, M. C. 1993. Detection of mycoplasma-like organisms (MLOs) using PCR from diseased plants. *Korean J. Mycoplasmaology* 4(1) : 36-44 (Korean with English abstr.).
- Lee, J. T. and Kim, E. H. 1994. New witches'-brooms of *Syringa vulgaris*, *Quercus acutissima*, *Prunus salicina* and *Cryotaenia japonica* in Korea. *Korean J. Mycoplasmaology* 5(1) : 81 (Korean abstr.).
- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H. and Tsuchizaki, T. 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83 : 786-791.
- Namba, S. 1995. New unfolding on the studies of phytoplasma. *Plant Protection (Shokubutu bōki)* 49 : 11-14 (Japanese).
- Park, W. C., Yeo, W. H. and La, Y. J. 1993. Little-leaf symptom development in the periwinkle infected with paulownia witches'-broom mycoplasma-like or-

- ganism by the yellow-brown stink-bug, *Halyomorpha halys* Stål. (= *H. mista* Uhler). *Korean J. Plant Pathol.* 9(3) : 236-238 (Korean with English abstr.).
17. Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C. and Seemüller, E. 1992. Classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rRNA. *J. Gen. Microbiol.* 139 : 519-527.