

참깨 엽화병의 발생과 파이토플라스마의 검출

한무석*, 노은운, 윤정구¹

산림청 임목육종연구소, ¹충북대학교 농과대학 산림과학부

Occurrence of Sesame Phyllody Disease in Korea and Detection of Its Phytoplasma

Mu Seok Han*, Eun Woon Noh, and Jeong Koo Yun¹

Forest Genetics Research Institute, Forestry Administration, Suwon 441-350, Korea

¹School of Forest Resources, College of agriculture, Chungbuk National University,
Cheongju 360-763, Korea

ABSTRACT: In August 1996, phyllody disease of sesame (*Sesamum indicum* L.) caused by phytoplasmas was observed at Boeun, Chungbuk Province, Korea. Symptoms included extreme proliferation of growing tips and numerous small leaves, giving the infected plant a witch's-broom effect. Parts or all of the floral parts were transformed into green leaf-like structures, and little or no seeds were produced. Transmission Electron microscopy revealed the presence of phytoplasmas in the phloem sieve elements of infected plant. Since the infected sesame plants were growing near by phytoplasma infected jujubes (*Zizyphus jujuba*), we tried a polymerase chain reaction (PCR) technique to identify these two causal phytoplasmas. The DNA extracted from the stems of infected sesame plant was PCR-amplified using a primer set specific to 16S rRNA gene of known phytoplasmas. The amplification generated a 1.4kb band in both sesame samples and phytoplasma-infected jujubes, which also suggests the sesame plants were infected with phytoplasmas. The restriction digestion of the amplified band by four different enzymes, *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* or *TaqI* revealed that the phytoplasmas infecting jujubes and sesame plants were of different groups.

Key words: phytoplasmas, phyllody disease, sesame, PCR, RFLP.

아프리카 북부의 열대지방과 인도의 아열대 지역이 원산지로 추정되는 참깨(*Sesamum indicum* L.)가 우리나라에서 재배되기 시작한 것은 삼국시대 이전이라고 하며, 식용기름작물 중 가장 오랜 재배역사를 가지고 있다(8). 참깨는 주로 조미료, 식용유, 약용 등으로 다양하게 활용되고 있으며 그 수요는 경제성장과 더불어 계속 증가될 것으로 보인다. 이러한 참깨는 여러 가지 요인에 의해 수확량이 크게 감소되는데 그중 가장 큰 것은 병해에 의한 것이다(4, 15). 우리나라에서 발생하는 참깨병으로는 역병, 시들음병, 잎마름병, 점무늬병 등 19종이 밝혀져 있으나 phytoplasma에 의한 병의 기록은 없다(4). 그런데 아프리카, 인도, 버마 및 태국을 포함한 아시아 열대지방에서 보고된 phytoplasma에 의한 phyllody disease(2, 7, 12)와 비슷한 병

든 포기를 1996년 8월 충북 보은에서 발견하였다.

Phytoplasma의 진단이나 분류는 병징, 전자현미경에 의한 사관부 조직의 관찰, DAPI 염색법, ELISA법, 매개곤충의 특이성 등으로 하였으나 이러한 방법은 많은 시간이 소요되고 때로는 실험에 어려움이 있다. 최근 phytoplasma의 DNA를 PCR-RFLP(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)기법으로 분석하여 이를 동정하고 나아가 phytoplasma의 계통간의 유연관계를 밝히는 연구가 많이 이루어지고 있다(1, 9, 14, 17). 이미 타일랜드에서는 참깨 phyllody disease의 병원체인 phytoplasma를 전자현미경으로 관찰하였고(2), 16S rDNA의 증폭으로 phytoplasma를 검출하고 제한효소로 절단하여 다른 몇가지 phytoplasma의 계통을 비교한 바 있다(12).

본 실험에서는 우리나라에서 처음으로 발생한 참깨 phyllody증상의 병원체가 phytoplasma인지를 투과 전

*Corresponding author.

자현미경과 PCR기법으로 확인하고, 우리나라에서 많이 발생하는 대추나무 빗자루병 phytoplasma와의 관계를 RFLP로 분석함으로써 함께 phyllody disease(葉化病)의 효과적인 동정, 분류 및 방제를 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

이병재료. 1996년 8월 충북 보은군 보은읍 장속리 참깨 밭에서 엽화증상을 나타내는 개체로부터 줄기를 채취하였다. 비교식물로서 경기도 수원지역에서 대추나무(*Zizyphus jujuba*) 빗자루병에 걸린 당년생 가지를 채취하여 사용하였다.

투과 전자현미경에 의한 병원체 관찰. 참깨 엽화증상을 나타낸 잎의 주맥을 1×3 mm 정도로 잘라내어 75% 에탄올에 30초 가량 담근후 증류수로 30초간 세척한 후 물기를 제거한다. 시료를 Karnovsky's 고정액과 1% osmic acid에서 고정하고 0.5% Uranyl acetate로 염색을 한 다음 50, 75, 90, 95, 100% 알콜에 30~40분간 그리고 propylene oxide로 30~40분씩 탈수시킨후 propylene oxide와 epon수지에 포매하여 ultramicrotome으로 Thin section을 만들었다. 이들 절편을 초산우라닐 5% 용액과 lead citrate으로 이중염색하여 Hitachi H-800 전자현미경으로 관찰하였다.

Phytoplasma의 DNA추출. Namba(14)의 방법을 약간 변형하여 phytoplasma DNA를 추출하였다. 병든 조직과 대조구로서 건전조직의 외피를 벗겨내고 사부조직 1g을 유발에 넣어 액체질소로 얼린 다음 유봉으로 마쇄한 후 CTAB 추출용액(2.5 M NaCl, 0.5%(W/V) PVP-10(polyvinyl pyrrolidone-10), 1%(W/V) cetavlon(hexadecyltrimethylammonium bromide), 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.2M EDTA(pH 8.0), 0.2% β-mercaptoethanol)을 6 ml 첨가하여 혼합하였다. 얼었던 시료가 녹을때 유봉으로 잘 섞어서 원심분리 튜브(50 ml)에 넣어 30분 동안 65°C에서 정치한 후 1200×g로 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 1.5 ml의 원심분리 튜브로 옮기고 동량의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)을 넣어 서서히 흔들어 주면서 혼합한 후 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 1.5 ml의 원심분리 튜브로 옮기고 isopropanol을 원량의 0.7(v/v)에 해당하는 양을 넣고 잘 혼합한 다음 상온에서 5분간 정치한 후 12,000×g로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. pellet을 70% alcohol로 씻고 speed-vacuum으로 건조시켰다. 건조된 pellet을 50 μl TE buffer(10 mM Tri-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 녹여서 0.

7 % agarose gel(1×TAE buffer(0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0))을 이용하여 84 volt로 1시간 전기영동하여 ethidium bromide(0.5 μg/ml)에서 5분간 염색 후 20분간 탈색하였다. DNA band를 면도날로 분리한 후 일회용 filter(0.45 μm)을 사용하여 원심분리 후 DNA를 gel에서 빼낸 다음 fluorometer(Hoefler, TKO 100)로 DNA양을 측정하여 사용하였다.

PCR를 위한 프라이머. Namba(14)가 MLO의 16S rRNA유전자를 증폭하여 얻은 프라이머 쌍을 이용하였는데 염기서열은 아래와 같다.

SN910601 5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'
SN910502 5'-ACCCCGAGAACGTATTACC-3'

반응액의 구성 및 반응조건. 반응액의 구성은李 등의 방법(10)에 따라 total DNA를 500pg/μl의 농도로 희석하였다. PCR은 반응액 30 μl을 0.5 ml의 원심분리 튜브에 넣었고 thermal cycle은 처음 1 cycle은 94°C에서 2분간 denaturation시키고 두번째 cycle부터는 94°C로 1분간 denaturation, 50°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 3분간 extension하여 35 cycle을 행하였으며 마지막은 72°C에서 10분간 extension시켰다(9).

PCR산물의 RFLP분석. PCR반응 산물은 1.3% agarose gel(1×TAE)에서 84 volt로 1시간 전기영동하여 분석하였다. PCR로 증폭된 DNA를 정량하고 시료당 200 ng이 되도록 증류수에 희석한 후 다음 4개의 제한효소 *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* 및 *TaqI*로 절단하였다. 반응액의 구성은 위의 시료당 DNA용액과 3 μl 10X buffer(제한효소와 같이 공급됨), 제한효소 1.5 μl, BSA 0.5 μl, 나머지는 증류수를 첨가하여 30 μl로 맞춘 후 *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*은 37°C에서 *TaqI*은 65°C에서 각각 16시간씩 처리하였다. 이것을 1.7% agarose gel(1×TAE)에서 84 volt로 1시간 20분 전기영동하였다.

결과 및 고찰

참깨 엽화병의 발생. 1996년 8월 충북 보은군 보은읍 장속리 참깨 밭에서 엽화증상을 나타내는 2포기를 발견하였다. 병든 포기는 줄기 끝부분이 극도로 총생하여 전형적인 빗자루병징과 같이 작은 잎이 많이 형성되었다. 꽃잎은 전체 또는 일부가 녹색으로 변하고 열매가 거의 맺지 못하거나 전혀 맺지 못하였다(Fig. 1). 이 병징은 아프리카와 아시아 열대지방에서 보고된 phytoplasma에 의한 phyllody disease와 비슷하였으므로 아래와 같이 병원을 동정하고 병명은 엽화

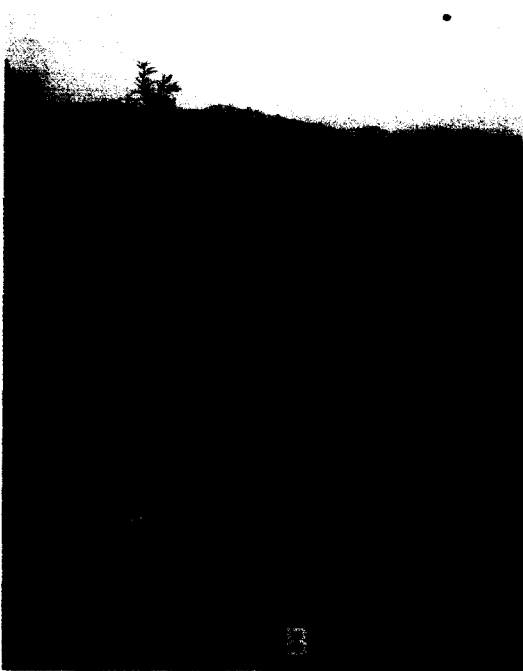


Fig. 1. Diseased plant (A) and healthy plant (B) of *Sesamum indicum* L.

병(葉化病)으로 제안한다. 이 병은 우리나라 뿐만 아니라(4) 일본에서도 아직 보고된 바 없다(12).

투과 전자현미경에 의한 phytoplasma의 관찰. 참깨엽화병 증상을 나타내는 잎의 주맥을 얇게 절편을 만들어 전자현미경으로 관찰한 결과 사부세포에서 구형내지 타원형의 단일막으로 구성된 phytoplasma가 관찰되었다(Fig. 2). 그러나 건전한 조직에서는



Fig. 2. Transmission electron micrograph of leaf midrib of *Sesamum indicum* L. infected with phytoplasmas. Phytoplasmas are observed in the sieve tube (ST). Arrow indicates phytoplasma. CW: cell wall. Scale bar: 2 μ m.

phytoplasma가 관찰되지 않았다. 위의 phytoplasma는 Choopanya(2)가 sesame phyllody조직에서 관찰한 것과 비슷하였다.

PCR에 의한 phytoplasma의 검출. 병든 식물체에서 추출한 DNA를 PCR로 증폭한 결과 1.4 kb 크기의 DNA band가 나타났는데 건전한 참깨와 건전한 대추나무에서는 band가 관찰되지 않았다(Fig. 3). 이것은 Namba(14)가 phytoplasma에 감염된 식물에서 얻은 결과와 일치하였으며, 건전한 식물체에서는 DNA band가 검출되지 않았다는 결과와도 일치하였다. 또한 위와 비슷한 연구로서 MLO에 감염된 식물체에서 추출한 DNA를 다른 프라이머쌍으로 처리하여 PCR산물을 얻었으나 건전식물에서는 얻지 못하였다(1, 9, 11). 우리나라에서도 MLO에 감염된 당년생 불나무 가지의 사부조직에서 추출한 DNA에서 PCR산물을 얻었으며(6), 몇가지 MLO에 감염된 식물체의 DNA에서는 PCR산물을 얻었으나 건전식물에서는 얻지 못하였다는 보고가 있다(20). 따라서 PCR기법을 이용한다면 식물체 내부에 감염되어 있는 phytoplasma의 DNA를 비교적 정확하게 증폭해낼수 있음을 알수 있다. 이러한 방법은 식물 및 동물조직에서 감염된 바이러스를

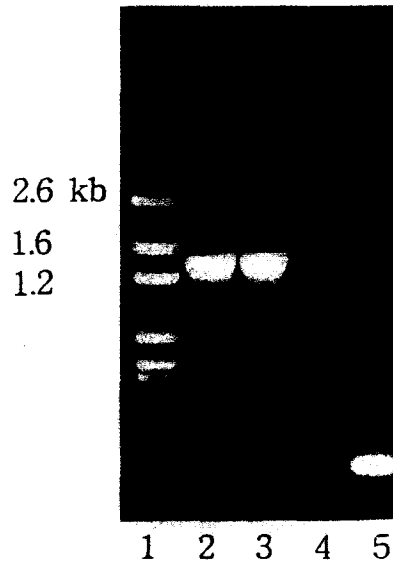


Fig. 3. Agarose gel (1.3%) electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) amplified 1.4 kbp 16S rRNA gene fragments from total DNA samples using the primer set (SN910601, SN910502). Lanes 1 to 5; PGEM DNA marker (lane 1), infected *Zizyphus jujuba* (lane 2), infected *Sesamum indicum* L. (lane 3), healthy *Sesamum indicum* L. (lane 4) and healthy *Zizyphus jujuba* (lane 5).

찾아내는데도 이미 널리 이용되고 있다(3, 19).

대추나무 빗자루병 phytoplasma와의 유연관계. PCR산물을 4가지의 제한효소 *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* 및 *TaqI*로 처리하여 전기영동한 결과 *AluI*으로 절단한 대추나무에서는 780 bp, 290 bp, 250 bp 크기의 3개 band가 나타난 반면에 참깨에서는 670 bp, 350 bp, 220 bp, 120 bp 크기의 4개 band가 나타났다. 또한 *HaeIII*로 절단한 대추나무에서는 1070 bp, 320 bp 크기의 2개 band를 보였으나 참깨에서는 680 bp, 310 bp, 200 bp, 180 bp 크기의 4개 band를 보였다. 한편 *HinfI*으로 절단한 대추나무에서는 960 bp, 400 bp 크기의 band 2개 나타난 반면에 참깨에서는 660 bp, 350 bp, 180 bp, 130 bp 크기의 4개 band가 나타났다. 그리고 *TaqI*로 절단한 대추나무에서는 960 bp, 370 bp 크기의 2개 band가 관찰되었으나 참깨에서는 830 bp, 410 bp, 130 bp 크기의 3개 band가 관찰되었다. 따라서 대추나무 빗자루병 phytoplasma와 참깨 엽화병의 phytoplasma와는 DNA의 band pattern이 전혀 다른 것으로 나타났다(Fig. 4). 16S rRNA 유전자는 진화적으로 비교적 보존된 염기서열을 가지고 있는 것으로 알려져 있으나 대추나무에 감염하고 있는 phytoplasma와 참깨의 그것과는 4가지 제한효소 절단 pattern에서 보존된 곳을 확인할 수 없었다. 이는 이 유전자 전체의 염기서열을 결정하여야 확인이 될 것으로 생각되지만 위의 결과를 토대로 생각할 때는 대추나무 빗자루병과 참깨 엽화병을 일으키는 phytoplasma는 서로 다른 그룹이라고 추정된다.

비슷한 연구로서 Namba(14)는 다른 매개충에 의해

전반되는 6종의 phytoplasma의 16S rRNA 유전자의 염기배열에 따라 phytoplasma를 I군, II군, III군의 진화적으로 다른 3개의 집단으로 나누고, 특히 I군은 매개충이 달라도 진화적으로는 동일종이라고 생각하였다. 본 연구에 앞서 Nakashima 등(12)은 참깨의 엽화병 phytoplasma는 MLO-II군(14)에 속하고, *Richardia* 엽화병과 참깨의 엽화병의 phytoplasma는 서로 같거나(12) 적어도 앞의 두 phytoplasma가 혼합되었다고 하였다(13). 이 밖에도 여러 가지 병든 식물에서 분리한 phytoplasma를 많은 제한효소로 절단하여 유연관계를 분석한 보문이 있다(1, 9, 18). 우리나라에서는 비슷한 연구로서 예(20)는 뽕나무, 대추나무, 머루 및 천궁의 phytoplasma를 PCR-RFLP 분석한 결과 서로 다른 3가지 그룹으로 나누었다. 본인들의 다른 연구(5)에서 뽕나무, 대추나무, 쥐똥나무 및 붉나무는 같은 그룹에 속하고, 오동나무는 다른 그룹에 속하며, 대추나무 중에서도 특정지역에서 채취한 표본은 제3그룹으로 나누어 지는 것을 확인하였다.

우리나라에서 처음으로 발생한 참깨 엽화병의 병원 phytoplasma를 투과전자현미경과 중합효소연쇄반응으로 동정하였으며, 제한효소로 절단한 결과 대추나무 빗자루병 phytoplasma와는 서로 다른 그룹이라는 것을 확인하였다. Phytoplasma의 동정은 종전의 DAPI염색법, ELISA법, 매개충에 의한 전염 등을 필요에 따라 병용할 필요가 있으며, 앞으로 더욱 많은 phytoplasma병의 시료를 분석하여 유연관계를 밝혀야 할 것으로 사료된다.

요 약

1996년 8월 충북 보은의 참깨 밭에서 전형적인 엽화병(葉化病; phyllody disease)이 발생하였다. 병징은 꽃이 잎처럼 녹색으로 변하고 이병엽은 정상엽보다 작고 잔가지가 마치 빗자루 모양으로 총생하였고 개화 및 결실이 되지 않았다. 투과 전자현미경으로 병든 잎의 사관요소에서 phytoplasma가 존재하는 것을 확인하였다. 병든 잔가지에서 추출한 DNA를 중합효소연쇄반응으로 분석한 결과 대추나무 빗자루병에 걸린 나무에서 증폭되는 DNA와 같은 크기의 band가 관찰되었다. 따라서 위의 시료는 phytoplasma병으로 확인되었으며 참깨 엽화병으로 명명하였다. 또한 참깨 엽화병을 일으키는 phytoplasma와 대추나무 빗자루병 phytoplasma를 PCR 증폭 및 제한효소로 절단하여 분석한 결과 이들은 서로 다른 그룹이라는 것을 알 수 있었다.

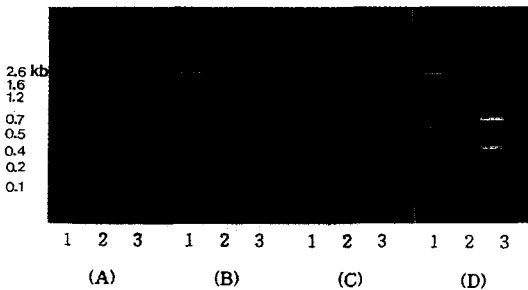


Fig. 4. Restriction profiles of 16S ribosomal DNA amplified by polymerase chain reaction using the primer set SN910502/SN910601 from template DNA extracted from diseased samples. PCR products were digested with the restriction enzymes *AluI* (A), *HaeIII* (B), *HinfI* (C), and *TaqI* (D) and separated by electrophoresis through a 1.7% agarose gel. Lanes 1 to 3; PGEM DNA marker (lane 1), infected *Zizyphus jujuba* (lane 2) and *Sesamum indicum* L. (lane 3).

인용문헌

1. Ahrens, U. and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
2. Choopanya, D. 1973. Mycoplasma-like bodies associated with sesame phyllody in Thailand. *Phytopathology* 63: 1536-1537.
3. Donofrio, M. A., J. D. Coonrod, J. N. Davidson, and R. F. Betts. 1992. Detection of influenza A and B in respiratory secretions with the polymerase chain reaction. pp.263-268. In PCR methods and application. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. 한국식물보호학회. 1986. 한국 식물병. 해충. 잡초명감. pp.24-25.
5. 한무석. 노은운. 이재순. 정후섭. 윤양. 윤정구. 1996. PCR-RFLP를 이용한 목본 식물의 phytoplasma 식별. 임목육종연구보고 32: 72-79.
6. 김영호. 1992. 중합효소연쇄반응에 의한 붉나무빛자루병 마이코플라스마의 DNA검출. 한국마이코플라스마학회지 3: 54-58.
7. Kolte, S. J. 1985. Mycoplasma disease: the phyllody. In Diseases of Annual Edible Oilseed Crops, Vol. II (Kolte, S. J. ed.), CRC Press, Boca Raton, pp.104-109.
8. 李正日, 李奉鎬, 成洛成, 朴來敬. 1989. 참깨의 研究 成果와 今後戰略. 農振廳 심포지움 8: 11-39.
9. Lee, I. M., Hammond, W., Davis, R. E. and Gundersen, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
10. 이재순. 노은운. 장석성. 이석구. 노의래. 이돈구. 1994. 열록채 DNA를 이용한 포플러 수종별 RAPD 표식 개발. 한육지 24: 335-339.
11. Maurer, R. and Seemüller, E. 1996. Witches' broom of *Rhamnus catharticus*: A new phytoplasma disease. *J. Phytopathol* 144: 221-223.
12. Nakashima, K., Hayashi, T., Chaleeprom, W., Wongkaew, P. and Sirithorn, P. 1995. Detection and differentiation of phytoplasmas associated with phyllody disease of sesame in Thailand with DNA-bases assay. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 519-528.
13. Nakashima, K., Hayashi, T., Chaleeprom, W., Wongkaew, P. and Sirithorn, P. 1996. Complex phytoplasma flora in Northeast Thailand as revealed by 16S rDNA analysis. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62: 57-60.
14. 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.
15. 박중성. 1965. 참깨 Fusarium 위조병에 관한 연구. 충남대학교 논문집 5: 29-75.
16. Poggi Pollini, Bissani, C., R., Giunchedi, L. and Vindimian, E. 1996. First report of phytoplasma infection in Olive tree (*Olea Europea* L.). *J. Phytopathol.* 144: 109-111.
17. Schaff, D. A., Lee, I. M. and Davis, R. E. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 1503-1509.
18. Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C. and Seemüller, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol* 139: 519-527.
19. Winters, M. A., M. Holodniy, D. A. Katzenstein, and T. C. Merigan. 1992. Quantative RNA and DNA gene amplification can rapidly monitor HIV infection antiviral activity in cell cultures. pp.257-262. In PCR methods and application. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
20. 예미지. 1993. Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 식물마이코플라스마(MLO)의 검출에 관하여. 경북대 석사학위논문. pp.1-25.

(Received June 4, 1997)