

“*Candidatus phytoplasma asteris*” Group에 속하는 아까시나무 빗자루병 검출

한 상 섭*

전북대학교 농업생명과학대학 산림과학부

Detection of “*Candidatus Phytoplasma Asteris*” Associated with Black Locust Witches' Broom in Korea

Han Sangsub*

Division of Forest Science, College of Agriculture & Life science,
Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

요 약: 전형적인 파이토플라스마성 빗자루증상을 보이는 아까시나무가 전북지방에서 발견되었으며, 일반적으로 작은 잎들이 총생하였고, 마디와 마디 사이가 짧고, 가지가 위축되어 있는 증상을 보였다. 파이토플라스마 검출 primer인 P1/P7(약 1.8 kb)과 R16F2n/R2(약 1.2 kb)를 이용하여 증폭한 결과 빗자루증상을 보인 아까시나무에서 파이토플라스마 검출되었으며, 건전한 아카시에서는 PCR산물이 증폭되지 않았다. 염기서열 분석에 의한 유의성 검정결과 아까시나무 빗자루병 파이토플라스마는 aster yellow, 뽕나무오갈병, maize bushy stunt, 물푸레나무 빗자루병, 붉나무 빗자루병 파이토플라스마와 99.2% 이상의 유의성을 보였으며, 아까시나무 빗자루병(GeneBank Accession No. AF 244363) 및 대추나무 빗자루병 파이토플라스마와는 각각 88.6% 및 87.7%의 유의성을 보여 본 연구에서 분석한 아까시나무 빗자루병 파이토플라스마는 *Candidatus phytoplasma asteris*(16Sr I) group에 속하였으며, 16Sr III(peach X-disease phytoplasma group) group에 속하는 아카시나무 빗자루병 파이토플라스마와는 다른 계통으로 분류되었다.

Abstract: Typical phytoplasma witches' broom symptoms were observed in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) in Korea. The symptoms of the disease were showing abnormally small leaves, shortened internodes and proliferation of shoots. The phytoplasmas were detected consistently in all the symptomatic samples by the amplification with phytoplasma universal primer pairs P1/P7 and R16F2n/R2, and the expected size was 1.8 kb and 1.2 kb. However, the phytoplasma DNA was not detected in healthy seedling. Based on sequence analysis of amplified region, this phytoplasma has close homologies with aster yellow, mulberry dwarf, maize bushy stunt, ash witches' broom and sumac witches' broom phytoplasmas, more than 99.2% but showed homologies with black locust witches' broom (GeneBank Accession No. AF 244363), and jujube witches' broom, 88.6% and 87.7%, respectively. This phylogenetic analysis indicates that the black locust witches' broom phytoplasma founded in Korea should be classified in the *Candidatus phytoplasma asteris* (16Sr I) group and clearly distinct from the black locust witches' broom group 16Sr III (peach X-disease phytoplasma group).

Key words : black locust, witches' broom, *Candidatus phytoplasma asteris*, phytoplasma

서 론

아까시나무(*Robinia pseudoacacia* L.)는 전국적으로 산야에 자생하고 있으며, 양봉을 위한 밀원식물로써 매우 중요하다. 아까시나무 빗자루병은 1898년경 미국과 유럽에서 처음으로 발생되었고(Waters, 1898; Hartley and Haasis, 1929; Grant and Hartley, 1938; Ciferri and Cote,

1960), 우리나라에서는 1960년 이전부터 발생한 기록이 있었으나(Kim *et al.*, 1964) 모두 바이러스에 의한 병으로 추측하다가 1976년 이후에 파이토플라스마에 의한 것으로 보고되었다(Seliskar *et al.*, 1961; Kim and Hwang, 1989; Davis and Dally, 2000).

우리나라에서는 1989년 Kim과 Hwang이 강원도 일원에서 아까시나무에 심세하고 왜소한 지엽의 총생에 의한 빗자루증상을 일으키고 있다고 보고하였으며, 빗자루증상은 일반적으로 벌목한 아까시나무 그루터기 부근의 맹아

*Corresponding author
E-mail: sshan@chonbuk.ac.kr

지에서 발생한다고 보고하였다. 특히 뿌리에서 발생하는 맹아지에서 빗자루증상이 현저하게 나타났으며, 왜소한 가지와 잎은 초가을까지도 계속 발생하여 겨울철에 고사한다고 하였다. 병든나무의 잎은 장타원형으로 심하면 피침형으로 되고 대개는 엽맥대화(vein-banding)를 이루며, 담록색 또는 담황색을 보이기도 하여 Dienes' stain으로 사부조직을 관찰결과 유관속 주변부에 전분립이 이상 축적된다. 전자현미경에 의한 관찰결과 사부세포에서 파이토플라스마를 확인하였으며, Jackson과 Hartley는 집목과 삼목에 의하여 아까시나무 빗자루병이 전파된다고 보고하였다. Davis와 Dally(2000)는 아까시나무 빗자루병 파이토플라스마는 파이토플라스마 분류군 중 16Sr III(peach X-disease phytoplasma group)에 속하며, subgroup I(Virginia grapevine yellows [VGYIII] phytoplasma)에 속해 있다고 보고하였다.

2003년 전북 완주 지역에서 자생하는 아까시나무에서 절간이 짧고, 잎이 소엽증상을 보여 전체적으로 위축 및 빗자루증상을 보이는 아까시나무가 발견되어 16S rRNA 유전자를 PCR법을 이용하여 파이토플라스마의 감염여부를 조사하였고, 염기서열분석을 통하여 아까시나무 빗자루병과 우리나라 수목 파이토플라스마성 빗자루병과의 유연관계를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료

빗자루증상을 보이는 아까시나무는 전북 완주에서 채취하였으며, 건전한 아까시나무는 온실내에서 종자파종한 나무를 이용하였다. 파이토플라스마에 감염된 대추나무, 뽕나무, 붉나무는 전북대학교 구내 온실에서 관리하고 있는 시료를 이용하였다.

2. 방 법

1) 전체 DNA 추출

전체 DNA 추출은 Kollar *et al.*(1990)의 방법을 수정하여 이용하였다. 아까시나무 시료의 경우 잎을 제거한 후 순수한 잎자루만을 채취한 시료 0.3 g을 막자사발에 넣고 액체질소를 이용하여 얼린 다음 막자를 이용해서 아주 곱게 간 후, CTAB 추출용액(2.5 M NaCl, 0.25 M EDTA, 0.5 M Tris-HCl(pH 8.0), 0.5% polyvinylpyrrolidone-10, 1% hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 3 mL와 2-mecaptoethanol 6 μ L를 첨가하여 다시 간 후, 현탁액을 1.5 mL tube에 넣어 65°C에서 45분간 반응시키고, 1,200 \times g에서 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리하여 얻어진 상층액에 같은 양의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 넣어 잘 섞고, 다시 1,200 \times g에서 10분간 원심분리하

였다. 원심분리하여 얻은 상층액의 70%에 해당하는 양의 isopropanol을 넣어 -20°C에서 12시간 정도 침강시킨 후, 1,200 \times g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 pellet에 70% ethanol 1 mL를 넣어 1회 세척하고 충분히 건조시킨 다음 pellet을 멸균증류수 150 μ L에 녹여 DNA 농도를 측정하였다. 전체 DNA는 -80°C에 보관사용 하였다.

2) Primer 및 polymerase chain reaction(PCR)

파이토플라스마 검출 primer로서는 16S rRNA 유전자를 증폭하는 phytoplasma primer인 P1(Deng *et al.*, 1991)/P7(Schneider *et al.*, 1995)과 R16F2n/R2(Gundersen *et al.*, 1996)를 이용하였다. PCR은 50-100 ng/ μ L total DNA, 1 \times PCR buffer(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH8.3), 2.0 mM MgCl₂, 0.5 mM forward primer, 0.5 mM reverse primer, 각 200 μ M 씩의 dNTPs, 1U AmpliTaq Gold DNA polymerase(Perkin-Elmer)를 넣고, 최종 volume 을 멸균 증류수로 30 μ L가 되게 맞추었다.

반응 조건은 먼저 denaturation을 95°C에서 10분간 수행한 후, denaturation을 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 2분, extension은 72°C에서 3분을 36회 반응시킨 후 마지막 extension은 10분간 하였다. P1/P7 primer를 이용하여 증폭된 PCR산물은 nested-PCR를 위하여 10배 희석한 후 같은 PCR 반응 조건으로 PCR을 수행하였으며, 단지 annealing온도를 52°C로 하여 총 30회 반응시켰다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동을 하고, ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다.

3) Cloning 및 Sequencing

R16F2n/R2primer에 의하여 증폭된 PCR산물(약 1.2 kb)은 PCR 2.1 Cloning Kit(Original TA cloning Kit, Invitrogen)을 이용하여 재조합하였으며, 염기서열을 결정하기 위해서 Sanger등의 dideoxy chain termination method을 이용하였으며, ABI 373 automated sequencer로 염기서열을 결정하였다.

계통분류를 위한 16S rRNA 유전자 부위의 염기서열은 GeneBank의 database 및 DNASIS 2.1를 이용하여 계통간 분류를 하였다.

결 과

1. 병 징

전북 완주지역의 아까시나무에서 마디와 마디 사이가 좁고, 가지와 가지 사이의 간격이 좁은 증상을 보였으며, 또한 잎의 크기가 건전주에 비해 소엽화되어 있어 전체적으로 빗자루증상을 보였다. 주변의 건전 아까시나무와 비교



Figure 1. Witches' broom symptoms (left) and new leaves on the branch (Right) of naturally infected with phytoplasma on black locust.

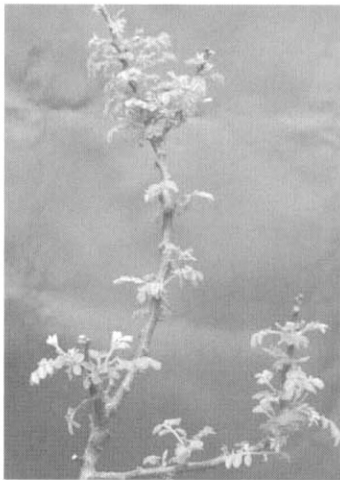


Figure 2. 1.5% agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from the petioles of phytoplasma-infected black locust using a P1/P7 phytoplasma primer pair. M: Molecular weight marker (100bp DNA ladder), Lane 1. BLWB-Ko-1 (black locust witches' broom) Lane 2. BLWB-Ko-2, Lane 3. JWB (jujube witches' broom), Lane 4. MD (mulberry dwarf), Lane 5. Su WB (sumac witches' broom) and Lane 6. Healthy black locust sample.

하여 전체적으로 나무가 위축되어 있었다(Figure 1, 2).

2. PCR법에 의한 phytoplasma의 검출

P1/P7 파이토플라스마 유니버설 primer를 이용하여 PCR 한 결과 공시한 시료 모두에서 약 1.8 kb정도의 PCR산물을 획득하였으며, 건전한 아까시나무 시료에서는 PCR산물이 증폭되지 않았다(Figure 3). Nested-PCR를 위하여 P1/P7 파이토플라스마 primer에 의하여 증폭된 PCR산물을 10배 희석한 후 R16F2n/R2 파이토플라스마 검출 primer를 사용하여 16S rRNA 유전자를 부위에 대한 PCR을 실시한 결과 빗자루증상을 보이는 아까시나무의 시료

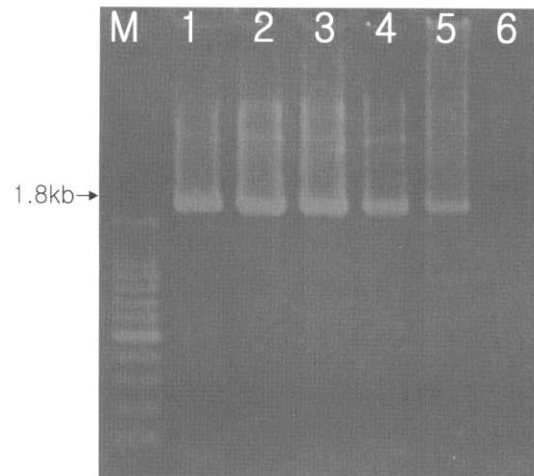


Figure 3. 1.5% agarose gel electrophoresis of Nested-PCR products amplified using R16Fn2/R2 phytoplasma primer pair and P1/P7 PCR products as templates. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), Lane 1. BLWB-Ko-1, Lane 2. BLWB-Ko-2, Lane 3. JWB, Lane 4. MD and Lane 5. SuWB.

에서 PCR산물(약 1.2 kb)을 획득하였다. 또한 대추나무 빗자루병, 뽕나무 오갈병, 붉나무 빗자루병 파이토플라스마 시료에서도 같은 크기의 PCR산물이 성공적으로 증폭되었다(Figure 3).

3. 염기서열분석

R16F2n/R2 파이토플라스마 primer를 이용하여 증폭된 PCR산물에 대하여 염기서열을 분석한 결과 전체 1,246 nt의 염기서열을 분석하였으며, NCBI GeneBank 및 DNASIS program를 이용하여 염기서열을 비교분석한 결과 아카시 빗자루병 파이토플라스마는 *Candidatus phytoplasma asteris* group(16Sr 1)에 속하였다.

Candidatus phytoplasma asteris(16Sr 1) group에 속하는

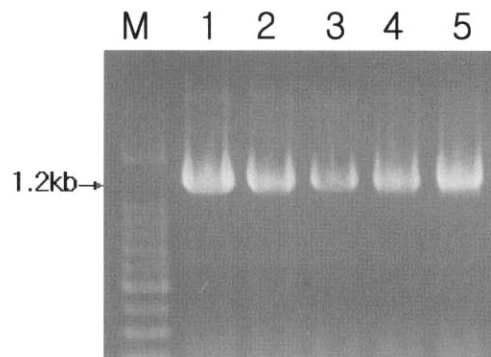


Figure 4 Phylogenetic tree of nucleotide sequences from the 16S rRNA gene of BLWB-Ko and other various phytoplasma isolates by DNASIS 2.1 version. BLWB-Ko: black locust witches' broom, AshWB: ash witches' broom, AY: aster yellow, MBS: maize bushy stunt, BLWB: black locust witches' broom and JWB; jujube witches' broom.

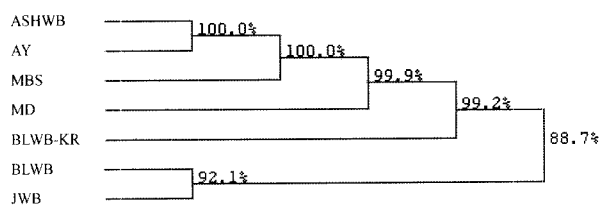


Figure 4 Phylogenetic tree of nucleotide sequences from the 16S rRNA gene of BLWB-Ko and other various phytoplasma isolates by DNASIS 2.1 version. BLWB-Ko: black locust witches' broom, AshWB: ash witches' broom, AY: aster yellow, MBS: maize bushy stunt, BLWB: black locust witches' broom and JWB; jujube witches' broom.

물푸레나무 빗자루병(AshWB, GeneBank Accession No. AY 566302), aster yellow(AY, GeneBank Accession No. EF489024), maize bushy stunt(MBS, GeneBank Accession No. AY 265208) 그리고 뽕나무 오갈병(MD, GeneBank Accession No. AY 075038) 파이토플라스마와는 99.2% 이상의 유의성이 있었으며, 대추나무 빗자루병(JWB, GeneBank Accession No. AY 072722) 파이토플라스마와는 87.7% 그리고 black locust witches' broom(BLWB, GeneBank Accession No. AF 244363) 파이토플라스마와는 88.6%의 유의성을 보여 Davis and Dally(2000)이 보고한 BLWB과 본 연구에서 밝혀진 black locust witches' broom(BLWB-Kr) 파이토플라스마는 다른 group에 속하여 있었다.

고 찰

전북 완주지역에서 발견된 아까시나무는 마디와 마디 사이가 좁고, 가지와 가지 사이의 간격이 좁은 증상을 보였으며, 또한 잎의 크기가 건전주에 비해 소엽화되어 있어 전체적으로 빗자루증상을 보여 강원도 지역에서 보고된 섬세하고 왜소한 가지와 잎이 총생하여 빗자루모양을 나타내는 증상과 같은 증상을 보였다(Kim and Hwang, 1989). 그러나 이러한 빗자루증상이 보통 벌목한 아까시나무의 그루터기에서는 발견하지 못하였고 보통 가느다란 줄기를 형성하면서 위축 및 소엽증상으로 보이는 3년생 정도의 아까시나무에서 발견되어 차이를 보였다. 보통의 빗자루증상은 가을까지 진행하다가 겨울에는 일부가지가 고사증상을 보였으며, 이듬해 봄에 다시 같은 증상을 보였다.

파이토플라스마를 검출하기 위하여 P1/P7 universal primer를 이용하여 뽕나무 오갈병, 물푸레나무 빗자루병, 대추나무 빗자루병, 뽕나무 빗자루병 파이토플라스마와 비교분석하기 위한 PCR검정에서도 공시한 시료 모두에서 파이토플라스마가 검출되었으며, 또한 P1/P7 PCR산물을 R16Fn2/R2 primer를 이용하여 nested-PCR 결과에서도 기대했던 PCR산물을 획득할 수 있었다. 파이토플라스마

검출법으로 파이토플라스마 universal primer 및 특이 primer를 이용하여 nested-PCR기법을 이용하여 왔으며(Lee et al., 1994; Waterworth et al., 1999), 본 연구에서의 아까시나무 빗자루병의 파이토플라스마 검출법으로 이용한 nested-PCR법에서도 direct-PCR를 이용한 방법보다도 더욱 민감하고 쉽게 파이토플라스마를 검출할 수 있었다.

염기서열에 분석에 의한 유의성 검정을 위한 R16F2n/R2 primer를 이용하여 증폭된 PCR산물(약 1.2 kb)에 대하여 염기서열을 분석한 결과, 아까시나무 빗자루병 증상들은 파이토플라스마 group들 중 *Candidatus phytoplasma asteris* group에 속하는 물푸레나무 빗자루병, 뽕나무 오갈병, AY 그리고 MBS와 99.2%이상의 유의성을 보여 아까시나무 빗자루병은 *Candidatus phytoplasma asteris* group임을 알 수 있었다. 그러나 Davis and Dally(2000)는 아까시나무 빗자루병 파이토플라스마는 파이토플라스마 분류군 중 16S rIII(peach X-disease phytoplasma group)에 속하며, subgroup I(Virginia grapevine yellows [VGYIII] phytoplasma)에 속해 있다고 보고한 것과 비교하면 본 연구에서 조사한 아까시나무 빗자루병은 전혀 다른 계통의 파이토플라스마임을 알 수 있었다.

최근 아까시나무 빗자루병은 본 연구기간 동안 여러 지역을 조사하였으나, 전북 완주지역의 몇 그루에서 발견된 빗자루 증상의외에는 발견되지 않아 아까시나무 빗자루병에 의한 피해상황을 알 수 없으나, 최근 아카시 황화병이 대발생되는 경우를 볼 때 아까시나무에서의 빗자루증상에 대한 폭넓은 피해지 조사가 필요할 것으로 사료된다. 또한 아직까지 아까시나무 빗자루병의 전염경로에 대해서는 조사되지 않아 앞으로 아까시나무 빗자루병을 전반시키는 전염원을 밝혀야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2003년 후반기 전북대학교 신입교수 연구지원비에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. Ciferri, R and Corte, A. 1960. Virus witches' broom of *Robinia pseudoacacia*, a new disease for Italy. Atti. Ist. Bot. Univ. Pavia Ser. 5(17): 122-128.
2. Davis, R.E and Dally, E.L. 2000. Black locust witches' broom phytoplasma is related to Virginia grapevine yellows phytoplasma. Phytopathology 90(6S): S18.
3. Deng, S.J. and Hiruki, C. 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. Phytopathology 81: 1475-1479.

4. Grant, T. and Hartley, C. 1938. A witches' broom on black locust and similar disease on honey locust. *Plant Dis. Repr.* 22: 28-31.
5. Gundersen, D.E., Lee, I.-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology. Mediterr.* 35: 144-151.
6. Hartley, C and Haasis, F.W. 1929. Brooming disease of black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Phytopathology* 19: 163-166.
7. Kim, C.J. 1964. Mosaic disease of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) I. Symptom and transmission by grafting. *Plant Protection* 3: 1-5.
8. Kim, C.J and Hwang, I.C. 1989. Witches'-broom symptom of locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Korean K. Plant Pathol.* 5: 413.
9. Kollar, A., Seemuller, E., Bonet, F., Saillaird, S. and Bove, J.M. 1990. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80: 3233-3237.
10. Lee, I.-M., Gundersen, D.E., Hammond, R.W. and Davis, R.E. 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primer for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84: 559-566.
11. Schneider, B., Seemuller, E., Smart, C.D. and Kirkpatrick, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, ed. by R. Razin and J.G. Tully, pp. 1:369-380. San Diego, CA: Academic.
12. Seliskar, C.E., Wilson, C.L and Bouene, C.E. 1973. Mycoplasma-like bodies found in phloem of black locust affected with witches' broom. *Phytopathology* 63: 30-34.
13. Waters, C.L. 1898. Witches' broom on the locust. *Plant World* 1: 83-84.
14. Watwerworth, H.E. and Mock, R. 1999. An assessment of nested PCR to detect phytoplasma in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined fruit tree germ plasm. *Plant Dis.* 83: 1047-1050.

(2007년 10월 4일 접수; 2007년 11월 20일 채택)