

## PCR-SSCP 분석법에 의한 뽕나무 오갈병 파이토플라스마의 유전변이 검출기법

한상섭<sup>1\*</sup> · 차병진<sup>2</sup> · 성규병<sup>3</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 농업생명과학대학 산림과학부,

<sup>2</sup>충북대학교 농과대학 식물의학과, <sup>3</sup>농촌진흥원 농업과학기술원

## Detection method of Genetic Variation of Mulberry Dwarf Phytoplasma by PCR-SSCP Analysis

Han Sangsub<sup>1\*</sup>, Byeongjin Cha<sup>2</sup> and Gyoobyung Sung<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Division of Forest Science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Plant medicine, Chongbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

<sup>3</sup>National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

**요 약:** 파이토플라스마 증폭 primer, R16F2n/R2를 이용하여 뽕나무 오갈병 파이토플라스마와 대추나무 빗자루병 파이토플라스마에 대하여 SSCP분석법을 이용하여 염기변이 분석을 하였다. 그 결과 뽕나무 및 대추나무 파이토플라스마는 약 1.2 kb PCR 산물을 이용하더라도 뚜렷한 밴드차이를 나타내었다. 유사한 SSCP밴드 패턴을 보이는 두 시료간의 밴드형태를 뚜렷하게 구별하는 방법을 찾기 위하여 뽕나무 오갈병 파이토플라스마와 대추나무 빗자루병 파이토플라스마의 PCR산물을 혼합한 후 SSCP분석 결과, 전기영동상에서 대추나무 파이토플라스마와 뽕나무 파이토플라스마의 SSCP 밴드패턴 모두를 관찰할 수 있었다. 본 연구 결과, 기존에 약 600 bp 크기로 한정된 것으로 알려진 SSCP 분석을 PCR 산물 1.2 kb을 이용하여 유사한 SSCP 밴드패턴을 보이는 두 시료간의 밴드형태를 두 시료의 PCR 산물을 혼합하여 SSCP분석함으로써 뚜렷하게 구별할 수 있었다.

**Abstract:** Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of MD and JWB phytoplasma isolates which amplified PCR products using the R16F2n/R2 phytoplasma universal primer pair were compared for variations of their nucleotide sequence. The MD and JWB phytoplasmas were clearly distinct each of the band patterns from about 1.2 kb PCR products. To clearly distinct of close SSCP band patterns, the MD and JWB phytoplasma PCR products were mixed and performed to detect their polymorphism. The SSCP band patterns show all of bands of MD and JWB on single lane and easily distinct their each band patterns. The PCR-SSCP analysis was possible to detect of 1.2 kb nucleotide sequence and near close band patterns were easily distinct by mixing two samples.

**Key words :** SSCP, MD, JWB, phytoplasma, polymorphism

### 서 론

뽕나무 오갈병 파이토플라스마병은 처음에는 생리적 장애로 알려졌으나, 1967년 일본의 Doi에 의하여 뽕나무 오갈병에 걸린 뽕나무 조직의 사부조직에서 파이토플라스마를 발견함으로써 파이토플라스마에 의해 발생하는 병으로 밝혀지게 되었다. 우리나라에서도 1971년에 뽕나무 오갈병 파이토플라스마가 보고되었으며(Chang *et al.*, 1971) 대추나무 빗자루병 및 오동나무 빗자루병 등과 함

께 주요 파이토플라스마성 수목병으로 알려지게 되었다. 뽕나무 오갈병에 관한 연구는 주로 기주범위 탐색 및 병의 방제법에 대한 연구가 주로 이루어졌으나, 최근 PCR법의 보급으로 인하여 분자학적 연구에 의한 검출 및 유연관계가 활발하게 이루어지고 있으며, 16S rRNA 유전자 부위에 대한 RFLP 및 염기서열에 의한 유연관계 분석결과 뽕나무 오갈병은 오동나무 빗자루병, 불나무 빗자루병과 같은 파이토플라스마군에 속해 있으며, 대추나무 빗자루병과는 서로 다른 유연관계를 보였다(한 등 2001, 김 등 1994, 한 등 2002a). 또한 ITS 유전자 부위에 대한 HMA법에 의한 단일염기변이에 대한 분석 결과에서는 뽕나무

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

오갈병은 오동나무 빗자루병과는 동일한 밴드패턴을 보여 단일염기변이가 없었지만(한 등 1998), SSCP분석 결과에서는 뽕나무 오갈병과 오동나무 빗자루병과는 아주 유사한 밴드패턴을 보여 단일염기변이가 있는 것으로 보고되었고 또한 대추나무 빗자루병과는 뚜렷이 다른 밴드패턴을 보였다고 보고하였다(한 등 2002b). 최근에 PCR기술을 기초로 한 단일염기변이 검출기법으로 SSCP법이 개발되어 여러 분야에서 특정부위에 대한 단일염기변이 검출법으로 사용되고 있다(Orita *et al.*, 1989., 한 등 2002b, 이 등 2003). SSCP법은 single-stranded molecules에 있어 단일염기서열이 다르다 하더라도 dsDNA를 denaturation시켜 ssDNA로 전환시키면 이들이 염기서열의 특성에 따라서 이차구조를 형성하고 이들 구조적인 변화는 전기영동을 통해 다형성을 조사할수 있다는 장점이 있다(Orita *et al.*, 1989). 그러나 SSCP법은 염기서열부위가 약 600bp 이하여야 된다는 단점이 있어 분석하고자 하는 부위가 600bp이상의 부위에 대해서는 단일염기변이 검출법으로서는 적당하지 않다. 또한 SSCP분석에 의한 연구결과를 도출하고자 할 경우 어느 경우에는 아주 근사한 밴드패턴을 보여 이 두 밴드간에 단일염기이상의 변이가 있는 것인지 아니면 전기영동 상에서 오는 밴드의 차이인지를 구별하기 어려울 경우가 많다. 본 연구에서는 SSCP기법을 응용하여 근연의 밴드패턴을 보이는 밴드간의 차이를 알아볼 수 있는 방법과 또한 넓은 유전자 부위에 대한 단일염기변이를 검출할 수 있는 기법을 찾고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물 재료

파이토플라스마에 감염된 뽕나무는 전북 완주군에 위치한 원종시험장내 뽕나무 포장에서 품종별(상일뽕, 수일뽕, 청일뽕)로 채취하였으며, 대추나무 빗자루병 파이토플라스마 시료는 전북 완주지역 대추나무 재배포장에서 전형적인 빗자루병징을 나타내고 있는 식물을 이용하였다.

### 2. 방법

#### (1) 전체 DNA 추출

전체 DNA 추출은 Kollar *et al.*(1990)의 방법을 수정하여 이용하였다. 뽕나무 및 대추나무 시료의 경우 잎을 제거한 후 순수한 잎자루만을 채취한 시료 0.3g을 막자사발에 넣고 액체질소를 이용하여 얼린 다음 막자를 이용해서 아주 곱게 마쇄한 다음, CTAB 추출용액(2.5M NaCl, 0.25M EDTA, 0.5M Tris-HCl(pH8.0), 0.5% polyvinylpyrrolidone-10, 1% hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 3 ml와 2-mecaptoethanol 6  $\mu$ l를 첨가하여 다시 마쇄한 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 원심분리하였다. 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 후 pellet을 멸균 증류수 150  $\mu$ l에 녹여 DNA 농도를 측정하였다. 전체 DNA는 -80°C에 보관하면서 사용 하였다.

### 3. 종합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)

파이토플라스마 검출 primer로서는 16S rRNA, 16S-23S rRNA ITS region 그리고 일부 23S rRNA부위의 유전자를 증폭하는 phytoplasma universal primer인 P1/P7(Deng *et al.*, 1991;Schneider *et al.*, 1995)을 이용하여 direct-PCR를 실시했으며, 증폭된 PCR산물을 20배의 비율로 멸균된 증류수에 희석하여 nest-PCR에 이용하였다. Nest-PCR primer는 R16F2n/R2(Lee *et al.*, 1994)를 이용하였다. PCR은 50-100 ng/ $\mu$ l total DNA, 1 $\times$ PCR buffer(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH8.3), 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM forward primer, 0.5 mM reverse primer, 각 200 uM 씩의 dNTPs, 1U AmpliTaq Gold DNA polymerase(Perkin-Elmer)를 넣고, 최종 volume을 멸균 증류수로 30  $\mu$ l가 되게 맞추었다.

반응 조건은 먼저 denaturation을 95°C에서 10분간 행한 후, denaturation을 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 2분, extension은 72°C에서 3분을 35회 반응시킨 후 마지막 extension은 10분간 하였으며, nest-PCR조건으로는 annealing 온도를 52°C에서 2분으로 하여 최종 30회를 실시하였다. 각 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동을 하고, ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다.

### 4. SSCP 분석

SSCP 분석은 R16F2n/R2 primer에 의하여 증폭된 PCR 산물을 이용하였으며, 2  $\mu$ l의 뽕나무와 대추나무의 PCR산물과 SSCP loading buffer(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) 10  $\mu$ l를 혼합하였으며, 다른 한편 뽕나무 파이토플라스마 PCR산물 2  $\mu$ l와 대추나무 파이토플라스마 PCR산물 2  $\mu$ l를 혼합한 다음 혼합액을 잘 섞은 후, SSCP loading buffer 8  $\mu$ l를 혼합하여 각각 최종 12  $\mu$ l로 한 다음, 끓는 물(100°C 이상)에 5분간 담가두어 열처리를 한 후, 빠르게 얼음으로 옮겨 10분간 급냉각한 후 4°C의 cold room에서 150V로 10시간 동안 6% polyacrylamide gel에 전기영동

을 하고 silver staining하여 band를 확인하였다.

**결 과**

**1. PCR법에 의한 phytoplasma의 검출**

P1/P7 파이토플라스마 검출 primer를 사용하여 16S rRNA 유전자부위와 16S-23S spacer region 그리고 일부 23S rRNA 유전자를 포함한 부위에 대한 PCR을 실시한 결과, 각각의 파이토플라스마 이병 뽕나무 및 대추나무 시료에서 PCR 산물을 획득하였다. 또한 R16F2n/R2 primer를 이용한 nest-PCR에서도 모든 시료에서 파이토플라스마 PCR산물이 약 1.2 kb에서 성공적으로 증폭되었다 (Figure 1과 2).

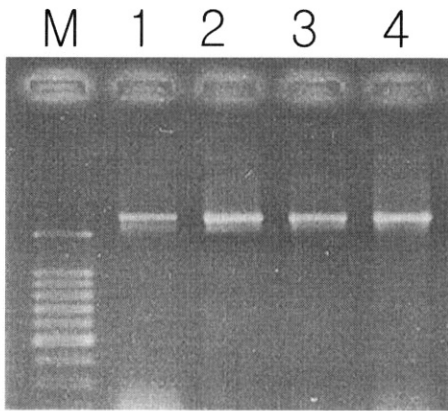


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from mulberry and jujube tree infected with phytoplasma using P1/P7 phytoplasma primer. M: Molecular weight marker (100bp DNA ladder), Lane 1, MD (Sang-il), Lane 2 MD (Su-il), lane3 MD (Cheong-il), and Lane 4, JWB.

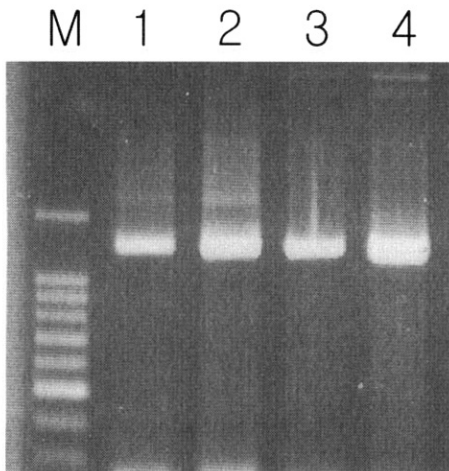


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of Nest-PCR products amplified from mulberry and jujube tree infected with phytoplasma using R16F2n/R2 phytoplasma primer. M: Molecular weight marker (100bp DNA ladder), Lane 1, MD (Sang-il), Lane 2 MD (Su-il), lane3 MD (Cheong-il), and Lane 4, JWB.

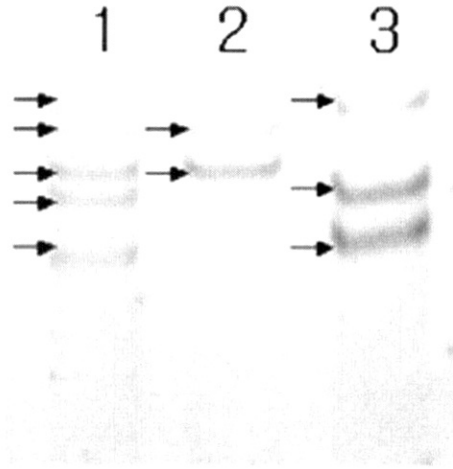


Figure 3. Single-strand conformation polymorphism patterns of the 16S rRNA genes amplified using R16F2n/R2 primer pair. Lane 1, MD+JWB; Lane 2, MD; Lane 3, JWB. →Arrows indicate SSCP band patterns.

**2. 단일염기변이 검출**

R16F2n/R2 파이토플라스마 primer에 의하여 획득한 PCR산물을 이용하여 뽕나무 및 대추나무 파이토플라스마간의 단일염기변이를 조사한 결과, 각각의 밴드패턴이 뚜렷이 나타나 이 두가지 파이토플라스마 간에는 염기변이가 있음을 알 수 있었으며, 또한 두가지 파이토플라스마의 PCR산물을 혼합한 밴드패턴은 뽕나무에서 나타난 밴드패턴과 대추나무에서의 밴드패턴을 혼합한 모두의 밴드패턴을 확인할 수 있었다. 일반적으로 이용하는 SSCP법에서는 확인할 수 없는 약 1.2 kb의 PCR 산물 크기에서도 뚜렷하게 확인할 수 있었다(Figure 3).

**고 찰**

P1/P7 primer를 이용한 뽕나무 오갈병 파이토플라스마의 PCR 검출은 공시한 시료 모두에서 파이토플라스마가 검출되었으며, 또한 P1/P7 PCR산물을 R16F2n/R2 primer를 이용하여 nest-PCR 결과에서도 기대했던 PCR산물을 획득할 수 있었다. 파이토플라스마 검출법으로 파이토플라스마 universal primer 및 group 특이 primer를 이용하여 nest-PCR기법에 의한 단일염기변이 검출은 이미 파이토플라스마 연구 분야에서 일반적으로 사용되고 있으며(Lee et al., 1994; Waterworth et al., 1999), 본 뽕나무의 파이토플라스마 검출법으로 이용한 nest-PCR법에서도 direct-PCR를 이용한 방법보다도 더욱 민감하고 쉽게 파이토플라스마를 검출할 수 있었다. SSCP법은 단일염기 돌연변이를 검출하기 위하여 개발되었으며(Orita et al., 1989), 파이토플라스마의 특정부위에 대한 단일염기 돌연변이의 검출에서도 사용되어 왔다(한 등 2002b;이 등 2003). 뽕나무

오갈병 파이토플라스마와 대추나무 파이토플라스마간의 단일염기변이에 대한 SSCP분석 결과에서도 이 두 기주간의 파이토플라스마는 서로 다른 파이토플라스마군으로서 SSCP밴드 양상을 보였으며(한 등 2002b), 중국 대추나무와 우리나라 대추나무 빗자루병 파이토플라스마 간의 SSCP다형성 조사에서도 단일염기 돌연변이가 있는 것으로 보고되었다(이 등 2003). 그렇지만 이들 조사에는 염기서열 크기가 약 350bp 정도의 크기를 가지고 조사하였으며, 근본적인 SSCP방법도 염기서열크기가 600bp 이하에서 검출가능하다고 보고되어, 실제적으로 600bp 크기 이상의 염기크기에서는 SSCP방법을 적용하기 어려웠다. 중국 대추나무 빗자루병과 한국 대추나무 빗자루병의 SSCP다형성 조사에서 2가지 형태의 밴드패턴을 보였지만(이 등 2003) 이들 두 밴드간에는 아주 유사한 밴드패턴을 실제적으로 구별하기가 어려운 경우가 많다. 본 연구에서는 SSCP법의 염기크기 범위를 1.2 kb 크기 정도의 PCR산물을 이용하였으며, 뽕나무 오갈병 파이토플라스마와 대추나무 빗자루병 파이토플라스마에 대하여 SSCP 분석결과, 뚜렷한 밴드패턴을 나타내어 앞으로 염기서열크기가 1 kb 이상에서도 가능하게 하였다. 또한 SSCP법에 의하여 두 밴드간에서 서로 밴드의 크기가 유사할 경우에는 이 두 밴드간의 다형성에 대하여 최종적으로 염기서열분석에 의해 결정해야 할 경우가 있다. 또한 이들 유사한 밴드패턴을 보일 경우 이 두 밴드패턴을 전기영동할 동안 파이토플라스마의 농도 차이에 의하여 나타나는 밴드 차이인지 아니면 gel 농도 및 buffer의 불안정 때문에 나타나는 밴드차이인지를 확신하지 못할 경우가 있다. 본 연구에서는 SSCP분석 결과, 근연의 밴드패턴을 보일 경우 두 샘플을 혼합하여 전기영동하면 각각의 시료에서 보이는 밴드패턴을 하나의 lane에서 모두 나타나게 되어 근연의 밴드패턴을 보인 각각의 시료와 비교 분석할 경우 두 시료간의 차이점을 정확하게 확인할 수 있다. 본 연구에서는 염기서열이 크게 다른 뽕나무와 대추나무 파이토플라스마에 대하여 조사하였지만, 앞으로 한 가지 기주에서의 파이토플라스마에 대하여 염기서열크기가 1 kb 이상의 유전자 부위에서의 염기서열변이를 조사하기 위하여 본 연구방법을 쉽게 적용할 수 있게 개발되어야 할 것으로 사료되며, 근연의 밴드패턴을 보이는 두 시료간의 차이점도 쉽게 확인할 수 있도록 개발되어야 할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(젊은과학자 지원 연구사업) (R08-2003-000-10100-0) 지원으로 수행되었습니다.

### 참고문헌

1. Chang, B.H and Kim, C.J. 1971. Studies on the dwarf disease of mulberry tree. *Seri. J. Korea* 13: 17-21.
2. 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.
3. Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or P.L.T. 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.
4. Han, S.S., S. Hiruki and S.M, Kim. 1998. Rapid analysis of genetic relationship of phytoplasma isolates by a DNA heteroduplex mobility assay. *Kor. J. of Plant Pathology*. 14(5): 382-385.
5. Han, S.S and B.J, Cha. 2001. Phylogenetic relationship of tree phytoplasma in Korea. *Korea. J. of Mycoplasmol.* 12(1): 38-47.
6. Han, S.S and B.J, Cha. 2002a. Genetic similarity between jujube witches' broom and mulberry dwarf phytoplasmas transmitted by same vector in Korea. *Kor. J. of Plant Pathology*. 18(2): 98-101.
7. Han, S.S and B.J, Cha. 2002b. Genetic differentiation of phytoplasma isolates by DNA heteroduplex mobility assay and single-strand conformation polymorphism analysis. *Kor. J. of Plant Pathology*. 18(6): 308-322.
8. Kim, Y.H., So, I.Y., and Han, S.S. 1994. MLO-DNA nucleotide sequence and diversity of mycoplasma tree disease in Korea. *Korea J. Mycoplasmol.* 5: 53-59.
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. Lee, S.H., B.J, Cha and S.S, Han. 2003. Genetic variation of jujube witches' broom phytoplasma isolates in Korea and China by PCR-SSCP analysis. *Korea. J. of Mycoplasmol.* 14(1): 46-53.
12. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 86: 2766-2770.
13. Schneider, B., Seemuller, E., Smart, C.D. and Kirkpatrick, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Morecu-*

*lar and Diagnostic Procedures in Mycoplasmatology*, ed. by R. Razin and J. G. Tully, pp. 1: 369-380. San Diego, CA: Academic.

14. Watwerworth, H.E., and Mock, R. 1999. An assessment of nested PCR to detect phytoplasma in imported dor-

mant buds and internodal tissues of quarantined fruit tree germ plasm. *Plant Dis.* 83: 1047-1050.

---

(2006년 3월 29일 접수; 2006년 10월 12일 채택)