

국내 얼룩반점 자두에서 발생한 호프왜화바이로이드(HSVd)의 유전자 변이

조인숙* · 정봉남 · 조점덕 · 최승국 · 최국선 · 김정수¹

국립원예특작과학원 원예특작환경과, ¹국립농업과학원 작물보호과

Hop stunt viroid (HSVd) Sequence Variants from Dapple Fruits of Plum (*Prunus salicina* L.) in Korea

In Sook Cho*, Bong Nam Chung, Jeom Doeg Cho, Seung-Kook Choi, Gug Seoun Choi and Jeong-Soo Kim

Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

¹Crop Protection Division, National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707, Korea

(Received on October 14, 2011; Revised on November 9, 2011; Accepted on November 18, 2011)

Dapple fruits of plum cv. Oiishiwase (*Prunus salicina* L.) were occurred at Gyeonggi-do and Gyeongsangbuk-do. The symptoms resembled the dapple fruit disease caused by *Hop stunt viroid* (HSVd). To identify the causal disease agents, RT-PCR was performed with the specific primers of HSVd. RT-PCR analysis showed that HSVd variants (DP1, DP2) were detected from dapple fruits. HSVd detection was also confirmed by the dot blot hybridization using a DIG-probe specific to HSVd. Nucleotide sequences of DP1 and DP2 had the identities of 94–100% with those of other 7 variants of HSVd in Genbank database. DP1 and DP2 were different in two nucleotides of CG and AA at position of 59 and 60, orderly. Based on nucleotide sequences at position of 59 and 60, HSVd variants associated with plum dapple fruits could be divided mainly into three groups as CG, AA and TG.

Keywords: Dapple fruits, HSVd, Plum, Sequence analysis

서 론

호프왜화바이로이드(*Hop stunt viroid*)는 *Hostuviroid* 속, *Pospiviroidae*과에 속하고 294-303개 염기로 구성된 원형의 외가닥 RNA이다. *Hop stunt viroid*(HSVd)는 포도를 비롯한 몇몇 종에서는 병징을 나타내지 않는 무병징 감염이지만 호프, 감귤류, 자두, 복숭아, 살구에서는 위축, 과실 얼룩반점, 기형과 등의 심한 병징을 일으켜 많은 피해를 주고 있는 것으로 보고되고 있다(Polivka 등, 1996; Sano 등, 1989; Shikata, 1990). 자두에서 발생하는 HSVd는 과실에 얼룩 반점 병징을 일으키는데, 1985년 일본에서 처음 보고되었고(Terai, 1985) 그 이후에 유럽과 중국에서 다양한 유전자 변이주가 보고되었다(Ragozzino 등 2002; Yang 등, 2008). HSVd에 의하여 나타나는 자두 과실의

병징은 품종에 따라 다르게 나타나지만 일반적으로 과피에 얼룩덜룩한 반점을 보이거나 과실의 표면이 매끄럽지 않은 증상을 나타낸다(Ragozzino 등, 2002; Sano 등, 1989). 국내에서는 2003년 자두에서 HSVd를 동정하여 2개의 변이주가 GeneBank에 등록되어 있으나(Accession no. AY425170, AY425171) 자두 과실의 얼룩 반점 증상에 관한 HSVd에 대한 보고는 현재까지 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구는 국내 자두 얼룩반점 과실에서 발생하는 HSVd를 분리하고, 염기서열 분석을 통하여 밝혀진 HSVd의 유전자 변이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료채집 및 RT-PCR 검정. 경기도와 경상북도 일대의 '대석조생' 자두 재배포장에서 과실 얼룩반점증상이 관찰되어 이들 과실을 채집하여 검정하였다. 검정할 시료의 전체 RNA는 실리카를 매개체로 사용하여 순도 높은 핵

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-6237, Fax) +82-31-290-6259

Email) tuat@korea.kr

산을 분리하는 방법인 NucliSens Extractor(Biomerieux, France)를 이용하여 추출하였다(Cho 등, 2010). 자두 재배 포장에서 관찰된 얼룩반점 과실들이 호프왜화바이러스(HSVd)에 감염되어 있는지를 확인하기 위해서 기존에 보고된 HSVd 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다(Yang 등, 2008). RT-PCR은 추출한 RNA를 주형으로 사용하여 HSVd RT-R1 프라이머와 역전사효소(M-MLV reverse transcriptase, Invitrogen, USA)를 이용하여 단일 쇠상의 cDNA를 합성한 후, HSVd-R2와 HSVd-F3 프라이머 그리고 Pfu DNA 중합효소(Solgent, Korea)를 이용하여 HSVd 전체 유전자를 증폭하였다. 자두 과실 얼룩반점증상이 다른 바이러스나 바이로이드에 의해 발생될 가능성도 배제할 수 없어서 핵과류에서 주로 발생하는 *Apple chlorotic leaf spot virus*(ACLSV), *Prune dwarf virus*(PDV), *Prunus necrotic ringspot virus*(PNRSV), *Plum pox virus*(PPV), *Peach latent mosaic viroid*(PLMVd) 등 5종에 대해서도 RT-PCR을 수행하였다. 각 바이로이드와 바이러스 진단에 사용한 프라이머 정보는 Table 1과 같다.

Dot-blot hybridization. HSVd가 감염된 것으로 진단된 2개의 변이주 시료에서 HSVd가 감염되었는지를 재확인하고자 Dot-blot hybridization(DBH)을 수행하였다. 또한 다량의 시료에서 HSVd 감염여부를 확인 방법으로 DBH의 가능성을 검토하였다(Yang 등, 2008). DBH는 6X SSC 용액으로 침지시킨 나일론막(Hybond-N⁺ Amersham, USA)

을 dot-bolt(96 wells, Bio-Rad, USA) 장치에 고정시킨 후 시료로부터 추출한 RNA를 100–200 ng씩 흡착시켜 UV (302 nm)로 고정시켰다. 추출한 RNA를 흡착시킨 나일론막은 DIG High Prime DNA Labeling & Detection Starter Kit 1(Roche, USA)의 방법에 따라 HSVd DNA probe와 교잡반응을 65°C에서 12시간 시키고 세척한 후 NBT/BCIP 용액으로 발색시켰다.

결 과

병징 및 발생. ‘대석조생’ 자두의 병징은 주로 과피가 정상과에 비해 착색이 불균일하고 얼룩얼룩한 반점이 전체적으로 나타났다. 특히, 큰 반점들이 모여 얼룩모양의 증상을 보이는 것과 작은 반점이 균일하게 나타나 모자이크 모양을 이루는 것의 두 가지 형태의 증상이 관찰되었다(Fig. 1). 경기도와 경상북도에서 발생된 자두 과실 얼룩반점 증상은 총 5 나무에서 관찰되었다. 큰 반점들의 얼룩모양 증상은 경기지역에서 3 나무가 관찰되었고 작은 반점들의 모자이크 모양 증상은 경상북도 지역에서 2 나무가 관찰되었다. 자두 과실에 나타난 병징을 바탕으로 기존의 보고와 비교 검토한 결과, 이들 증상은 HSVd에 의한 자두 과실 얼룩반점병과 매우 유사하였다(Sano 등, 1989). 이병은 주로 일본계 자두품종, 태양, 대석조생, 뷰티, 산타로사 등에서 과실 얼룩반점 증상을 보이

Table 1. Primer sequences for RT-PCR in this study

Pathogen ^a	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
HSVd	RT-R1 GCTGGATTCTGAGAAGAGTT	297	Yang et al. (2008)
	R2 AACCCGGGGCTCCTTTCTCA		
	F3 AACCCGGGGCAACTCTTCTC		
ACLSV	S TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	677	Menzel et al. (2002)
	AS AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA		
PDV	cpF CTTCCAACCTTTTCGACTGTTTG	650	Jarosova et al. (2010)
	cpR TCATCCACTGACTATTTTATCC		
PNRSV	P1 ATGGTTTGCCGAATTTGCAA	675	Kim et al. (2009)
	P2 CTAGATCTCAAGCAGGTCTT		
PPV	P2 CAGACTACAGCCTCGCCAGA	243	Wetzel et al. (1991)
	P1 ACCGAGACCACTACTACTCC		
PLMVd	S AACTGCAGTGCTCCGT	187	Boubourakas et al. (2006)
	AS CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG		

^aHSVd: *Hop stunt viroid*, ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, PDV: *Prune dwarf virus*, PNRSV: *Prunus necrotic ringspot virus*, PPV: *Plum pox virus*, PLMVd: *Peach latent mosaic viroid*.



Fig. 1. Dapple fruits symptoms on plum cv. Ooishiwase (*Prunus salicina* L.) infected naturally with *Hop stunt viroids* (HSVd). **A:** Dapple with chlorotic spots, **B:** Dapple forming mosaic pattern, **C:** Healthy control.

고 품종에 따라서 병징의 발현이 다름이 보고되고 있다 (Luigi 등, 2010).

RT-PCR 검정. 자두 과실 얼룩반점 증상이 관찰된 5 나무에서 각각 시료를 채취해서 RNA를 추출하고 추출된 시료로 유전자 진단을 한 결과 297 bp의 HSVd 특이 유전자 프라이머의 산물이 증폭되었다(Fig. 2). 증폭된 유전자 산물의 염기서열을 분석한 결과 2개의 서로 다른 HSVd 변이주인 DP1과 DP2를 동정하였다. 홍미롭게도 과실 얼룩 모양에 따라 변이주가 다른 양상을 보였다. DP1 변이주는 큰 반점들이 모여 얼룩모양의 증상을 보이는 것에서 동정되었고 DP2는 작은반점이 균일하게 모자이크 모양을 이루는 증상에서 동정되었다. 또한 ACLSV, PDV, PNRSV, PPV, PLMVd 5종에 대해서도 유전자 진단을 한 결과는 Fig. 2와 같다. PNRSV는 자두 과실 얼룩반점 증상의 5개 시료와 무병징 시료에서 감염이 확인되었으며, ACLSV는 과실 얼룩 반점 증상 시료 중 2번을 제외한 시료와 무병징 시료에서 예상된 크기의 유전자 산물이 약하게 증폭되었고 PDV, PPV, PLMVd는 감염되지 않았다. ACLSV와 PNRSV는 과실 얼룩반점 증상 시료에서 검출되었지만 대조구인 무병징 시료에서도 검출이 되었으므로 이들 바이러스에 의한 증상이 아닌 것으로 판단된다. ACLSV와 PNRSV는 핵과류에서 자주 발생하는 바이러스이며, 자두에서의 ACLSV는 나무줄기가 벗겨지는 증상과 청색계 자두품종의 과실에 흠이나 찌그러짐 증상을 일으키고(Martelli 등, 2008), PNRSV는 주로 앞에 괴

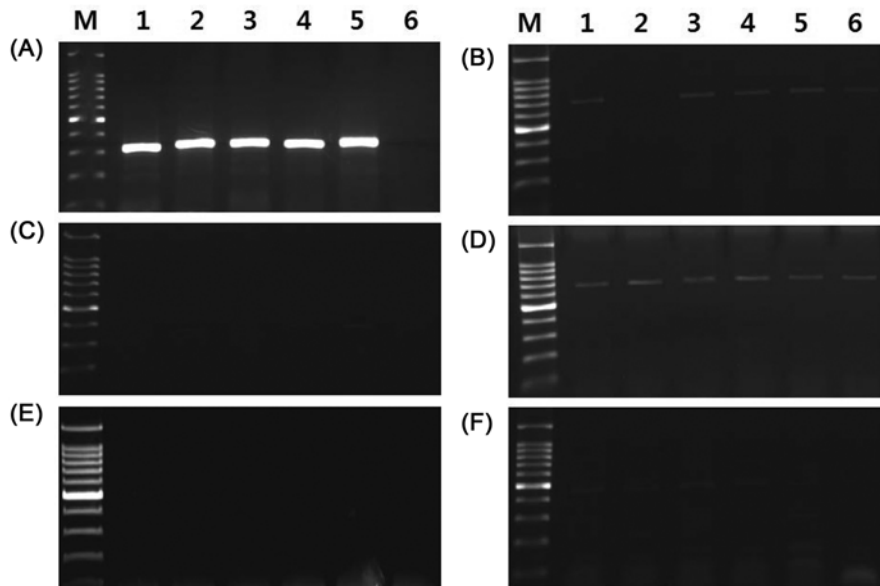


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic analysis of DNA fragments amplified by RT-PCR. M: 100bp DNA marker, lanes 1-3: Chlorotic spots fruit samples, lanes 4-5: mosaic fruit samples, lane 6: healthy control. **A:** *Hop stunt viroid* (HSVd), **B:** *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), **C:** *Prune dwarf virus* (PDV), **D:** *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), **E:** *Plum pox virus* (PPV), **F:** *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd).

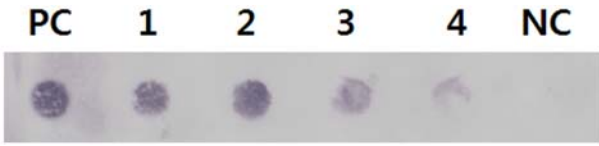


Fig. 3. Dot-blot hybridization to detect *Hop stunt viroid* (HSVd) from dapple fruits of plum. PC: Positive control of the pGEM-T easy-HSVd cDNA, 1-2: RNA samples extracted from dapple fruit with chlorotic spots, 3-4: RNA samples extracted from dapple fruit forming mosaic pattern, NC: Negative control of the RNA samples extracted of healthy fruit.

사반점들을 일으킨다고 보고되고 있다(Diekmann 등, 1996). 이들 결과로 자두 과실에 보이는 얼룩 반점 증상들은 HSVd에 의하여 특이적으로 발생하는 병징임을 알 수 있다.

Dot-blot hybridization. Dot-blot hybridization(DBH) 결과 자두 과실 얼룩반점 및 모자이크 증상 시료에서 모두 HSVd의 양성반응을 보였다(Fig. 3). 검정한 시료는 RNA(100-200 ng)와 HSVd DNA probe와의 교잡반응이 잘 일어나므로 다량의 시료에서도 HSVd를 검정하는데 DBH을 이용할 수 있을 것으로 본다. 앞으로 DBH 진단법은 RNA 추출 없이도 식물체 즙액을 직접 이용해 HSVd를 검정할 수 있는 간단한 방법으로 검토해 볼 필요가 있다.

유전체 염기서열 분석. 국내 자두의 과실 얼룩 반점증

상에서 분리된 HSVd는 유전자 염기서열 분석을 통해 59번과 60번 부위의 염기가 각각 CG, AA인 2개의 변이주, DP1과 DP2로 동정되었다. 이들과 GenBank에 등록된 자두 과실 얼룩 반점 증상을 일으키는 HSVd 변이주(일본, 이탈리아)들과의 염기서열을 비교한 결과, DP1은 AB098501(일본, FP1)과 염기서열이 100% 일치하였고, DP2는 AB098500(일본, FP2)과 염기서열이 100% 일치하였다(Fig. 4, Table. 2). 특이하게도, AY460202(이탈리아, Rome) 변이주와는 여러 부위에서 염기의 차이를 보여 94%의 상동성을 보였다. 기존의 국내에서 분리한 HSVd 변이주, AY425170(Whang), AY425170(Jabong)과의 비교에서도 DP1과 DP2는 59번, 60번 위치에서 서로 다른 염기서열을 보였다(C→T, AA→TG). 이들 결과로부터 DP1과 DP2는 자두 과실 얼룩반점에서 발생된 국내의 새로운 HSVd 변이주임을 알 수 있다. 또한 현재까지 동정된 국내의 자두 과실 얼룩반점 증상을 일으키는 HSVd 변이주는 59, 60번 부위의 염기가 TG, CG, AA인 3개의 군으로 크게 나눌 수 있다.

고찰

바이러스는 다섯 개의 도메인이 존재하는데 유전체

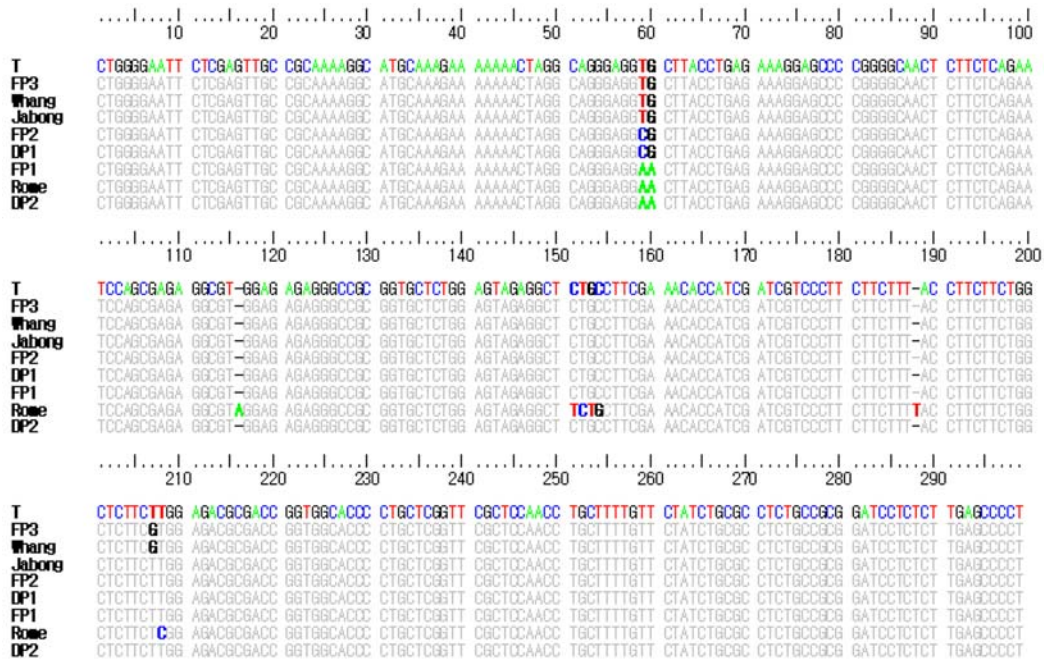


Fig. 4. Multiple alignment of the *Hop stunt viroid* (HSVd) variants sequences of plum. The sequences of HSVd variants were obtained from GenBank. The sequence of DP1 variant isolated from dapple fruit with chlorotic spots (Fig. 1A) and the sequence of DP2 variant isolated from dapple fruit forming mosaic pattern (Fig. 1B) were compared with those of other HSVd variants. HSVd variants from dapple fruits of plum grouped mainly as 3 types of TG, CG, AA at position of 59 and 60. The nucleotide positions are shown on the top of sequences.

Table 2. Listing and geographical location of HSVd variants characterized in this study or available at the GenBank

Access No.	Variant	Size (nt)	Geographic origin	Symptom	Reference
–	DP1	297	Korea	Dapple fruit	This work
–	DP2	297	Korea	Dapple fruit	This work
D13764	T	297	Japan	Dapple fruit	Sano et al., 1989
AB098500	FP1	297	Japan	Dapple fruit	None, 2002
AB098501	FP2	297	Japan	Dapple fruit	"
AB098502	FP3	297	Japan	Dapple fruit	"
AY460202	Roma	299	Italy	Dapple fruit	Ragozzino et al., 2002
AY425170	Whang	297	Korea	Unknown	None, 2003
AY425171	Jabong	297	Korea	Unknown	"

*None, Published only in GenBank database.

양쪽 끝에 왼쪽말단부(TL)와 오른쪽말단부(TR) 도메인이 있고 중앙에는 병원성도메인(P), 중앙보존도메인(C) 그리고 변화도메인(V)이 있다(Keese 등, 1985) 이들 도메인에서의 염기의 치환, 결손, 삽입 등은 병질발현에 변화를 가져오므로 바이로이드의 인위적인 염기변화를 통하여 병징 발현에 영향을 주는 부위를 찾고 기주와의 관련성을 밝히려는 연구가 진행되고 있다. 최근에는 감귤류에서 V 도메인에서 cachexia 발현 모티브를 확인하였고 그 모티브에서 염기 하나의 치환하여 다양한 병징을 유도 하였다(Serra 등, 2008). HSVd 진화에 관한 연구에서는 plum-type의 HSVd는 기주의 선택압에 있어서 독립적으로 작용하는 것으로 보고 HSVd 유전자의 58, 59, 60, 106, 206 번 염기에 주로 변이가 있다고 보고하였다(Kawaguchi 등, 2009). 이것은 기주에 상관없이 병원성을 가지는 특이적 발현 모티브가 존재하고 이들 모티브의 염기에 따라 발현되는 병징이 다를 수 있을 것으로 보였다. 본 연구에서 국내 자두의 과실 얼룩반점 증상에서 분리한 2개의 변이주, D1과 D2도 P도메인의 59번 염기와 C도메인의 60번 염기에 변이를 보였다. 56, 60번 염기의 변이는 앞서 언급한 HSVd 변이와도 같은 위치로 앞으로 이들 변이주의 접종 또는 인위적으로 염기를 변화시켜 자두 과실 얼룩반점 증상과 관련이 있는지에 대한 연구가 수행 되어야 할 것이다. 또한 plum-type의 HSVd는 염기의 조성이 같더라도 품종에 따라 병징이 보이지 않는 경우도 있어 기주의 선택압에서 독립적으로 작용한다는 보고와는 달리 어떤 특정한 요인이 기주 특이적으로 작용할 가능성도 배제할 수 없다. 새로 분리된 DP1과 DP2는 일본 변이주와 유전자 염기가 100% 일치하므로 국내에서 발생된 HSVd는 일본 변이주가 감염된 묘목에 의해 접목이나 영양번식으로 발생되었을 것으로 보여진다. HSVd 감염을 방제하기 위해서는 추후 국내의 HSVd 발생상황과 피해에 대한 조사가 필요하며 현재로서는 HSVd가 감염되지 않은

묘목을 사용함으로써 병의 확산을 막을 수 있다.

요 약

경기도와 경상북도 일대의 ‘대석조생’ 자두 재배포장에서 착색이 불균일한 얼룩 반점 증상의 과실이 발생하였다. 이들 시료로부터 유전자 진단(RT-PCR)과 Dot-blot hybridization 검정 결과 호프웨화바이로이드(HSVd)가 검출되었고 유전자 염기서열 분석을 통해 2개의 HSVd 변이주(DP1, DP2)를 동정하였다. GenBank에 등록된 자두 HSVd의 7개 변이주와 새로운 DP1, DP2 변이주와의 유전자 염기서열을 비교분석한 결과 94–100%의 높은 상동성을 보였다. DP1과 DP2의 유전자는 59번과 60번 염기가 각각 CG, AA로 서로 다른 변이를 보였다. 국내의 자두 과실 얼룩반점 증상에서 동정된 HSVd의 유전자는 특이적으로 59번과 60번 부위의 염기가 CG, AA, TG인 3개 군으로 크게 구분되는 것을 알 수 있었다.

References

- Amari, K., Gomez, G., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Pallas, V. 2001. The molecular characterization of 16 new sequence variants of *Hop stunt viroid* reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *J. Gen. Virol.* 82: 953–962.
- Amari, K., Ruiz, D., Gomez, G., Myrta, A., Pina, S., B., Pallas, V. and Egea, J. 2007. An important new apricot disease in Spain is associated with *Hop stunt viroid* infection. *Eur. J. Plant Pathol.* 118: 173–181.
- Canizares, M. C., Marcos, J. F. and Palla, V. 1999. Molecular characterization of an almond isolate of *Hop stunt viroid* (HSVd) and conditions for eliminating spurious hybridization in its diagnostics in almond samples. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:

- 553–558.
- Cho, I. S., Kim, D. H., Kim H. R., Chung, B. N., Cho, J. D. and Choi, G. S. 2010. Occurrence of pome fruit viruses on pear trees (*Pyrus pyrifolia*) in Korea. *Res. Plant Dis.* 16: 326–330. (In Korean)
- Diekmann, M. and Putter. C. A. J. 1996. Stone fruits. In : FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm, No. 16, pp. 34-35, FAO/IPGRI, Rome.
- Gazel, M., Serce, C. U., Caglayan, K. and Faggioli, F. 2008. Sequence variability of *Hop stunt viroid* isolates from stone fruits in Turkey. *J. Plant Pathol.* 90: 23–28.
- Jarosova, J. and Kundu. J. K. 2010. Detection of *Prune dwarf virus* by one-step RT-PCR and its quantitation by real-time PCR. *J. Virol. Meth.* 164: 139–144.
- Kawaguchi, Y., Li, S. F., Tagawa, M., Araki, H., Goshono, M., Yamamoto, S., Tanaka, M., Narita, M., Tanaka, K., Liu, S. X., Shikata, E. and Sano, T. 2009. Cultivated grapevines represent a symptomless reservoir for the transmission of *Hop stunt viroid* to hop crops: 15 years of evolutionary analysis. *PLoS ONE* 4: e8386.
- Keese, P. and Symons, R. H. 1985. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4582–4586.
- Kofalvi, S. A., Marcos, J. F., Canizares, M. C., Pallas, V. and Candresse, T. 1997. *Hop stunt viroid* (HSVd) sequence variants from *Prunus* species: evidence for recombination between HSVd isolates. *J. Gen. Virol.* 78: 3177–3186.
- Martelli, G. P. and Uyemoto, J. K. 2008. Plant virus diseases : Fruit trees and grapevine. In : Desk encyclopedia of plant and fungal virology, ed. by W. J. M., Briian, and H. V. V. R, Marc, pp. 433–434, Academic Press, NY, USA.
- Polivka, H., Staub, U. and Gross, H. J. 1996. Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alterations of hairpin I. *J. Gen. Virol.* 77: 155–161.
- Ragozzino, E., Faggioli, F., Amatruda, G. and Barba, M. 2002. Occurrence of dapple fruit of plum in Italy. *Phytopathol. Mediterr.* 41: 1–4.
- Sano, T., Hataya, T., Terai, Y. and Shikata, E. 1989. *Hop stunt viroid* strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J. Gen. Virol.* 70: 1311–1319.
- Semancik, J. S., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R. and Duran-Vila, N. 1988. *Citrus cachexia viroid*, a new viroid of citrus: Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69: 3059–3068.
- Serra, P., Gago, S. and Duran-Vila, N. 2008. A single nucleotide change in *Hop stunt viroid* modulates citrus cacheixa symptoms. *Virus Res.* 138: 130–134.
- Shikata, E. 1990. New viroids from Japan. *Semin. Virol.* 1: 107–115.
- Terai, Y. 1985. Symptoms and graft-transmission of plum dapple fruit disease. *Annu. Phytopathol. Soc. Jpn.* 51: 363–364.
- Yang, Y. Ai., Wang, H. Q., Wu, Z. J., Cheng, Z. M. and Li, S. F. 2008. Molecular variability of *Hop stunt viroid*: Identification of a unique variant with a tandem 15-nucleotide repeat from naturally infected plum tree. *Biochem. Genet.* 46: 113–123.
- Zhang, B., Liu, G. Y., Liu, C., Wu, Z., Jiang, D. and Li, S. 2009. Characterisation of *Hop stunt viroid* (HSVd) isolates from jujube trees (*Ziziphus jujuba*). *Eur. J. Plant Pathol.* 125: 665–669.