

단감나무 등근갈색 무늬병균 *Pestalotiopsis* spp.의 isozyme을 통한 유전다양성 분석

이윤수*¹ · 우수진¹ · 최혜선¹ · 김경수¹ · 강원희² · 김명조² · 심재욱³ · 장태현⁴ · 임태현⁴
¹강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, ²강원대학교 농업과학연구소,
³동국대학교 응용생물학과, ⁴(주)대유

Analysis of Genetic Diversity of Leaf Blight Pathogen of Sweet Persimmon *Pestalotiopsis* species with Isozyme Band Patterns

Y. S. Lee*¹, S. J. Woo¹, H. S. Choi¹, K. S. Kim¹, W. H. Kang², M. J. Kim²,
J. O. Shim³, T. H. Chang⁴ and T. H. Lim⁴

¹Div. of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701

²Institute of Agricultural Science, Kangwon National University

³Department of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715

⁴Research Institute of Plant Nutrition, Dae Yu, Co., Kyungsan Kyungbuk, Korea

ABSTRACT: In this study, we calculated the genetic relationships of *Pestalotiopsis* species collected from various places in southern part of Korea through isozyme analyses. As a result, EST showed the largest number of band, and the number of bands were ranged from 5 to 7 on the average. All the isozymes used in this study showed distinctive band patterns for each isolates. Similarities among the compared isolates ranged from 48 to 93%. Isolates SP7, SP19 and SP23 showed more than 90% similarities, and most isolates showed similarities ranging from 65 to 82%.

Key words: genetic relationship, isozyme, *Pestalotiopsis* species, similarity.

국내의 단감나무 재배는 단감의 특유한 맛과 농가의 수익성 보장 등으로 인하여 1980년에 2,700 ha에 불과했던 것이 1994년에 13,200 ha로 급격히 늘고 있는 실정이다(15). 주요 단감 품종으로 서촌, 부유, 대안 등이 재배되고 있으며, 이 중 부유 품종이 전체의 81.5%를 점유하고 있다. 단감나무재배지의 계속적인 재배면적의 증가와 단일 품종의 편중 등의 원인으로 1990년 부터 주요 재배지인 경상남·북도와 전라도에 걸쳐 이제까지 문제시 되지 않았던 *Pestalotiopsis* spp에 의한 단감나무 등근갈색 무늬병(윤반병)이 빈발하고 있으며, 이 병원균은 감나무를 비롯하여 넓은 기주범위를 가지고 있으며, 이로 인한 과실의 생육저하와 수세의 악화 및 이듬해의 개화에 심한 악영향이 문제시 되고 있다. *Pestalotiopsis* spp에 대한 연구 동향은 일본의 경우 단감나무에서 윤문열고병원균으로 *P. theae*가 보고된 적이 있으며(20, 21) 대부분의 경우 차나무에 대한 *P. theae*의 연구가 수행되었다(22-24). 국내의 경우 수목류에서 분리한 *Pestalotia* species간에 병원성과 유연성 관계를 처음으로 연구 발표했으며(16, 17) 근래에 들어 이병된 단감나무로부터 분리된 병원균

의 생태적 특징을 조사하여 *P. theae*가 단감나무의 등근갈색무늬병을 일으킨다고 보고하였다(18, 19).

본 연구는 기존에 *Pestalotiopsis* species를 규명하기 위해 의존해 온 분생포자의 모양, 크기, 세포구성수, 세포 색, 분생포자의 형성과 색깔, 자실체의 모양 등의 형태학적 특징 이외에(3, 4, 13), 동위효소를 이용하여 *Pestalotiopsis* spp. 간의 유전적 유연관계와 종간 식별을 하고자 실행하였다. 동위효소를 이용한 종간 균주 동정은 주로 상업적으로 가치가 있는 식용버섯과 산림에 큰 영향을 주는 목재 부후균에서 주로 실행되어 균주동정에 유용함이 밝혀졌으며(6, 10, 14) 본 실험에서는 3가지의 동위효소-esterase, malate dehydrogenase, acid phosphatase-를 이용했으며 특히 esterase의 경우 다양하고 많은 밴드가 검출되어 분류에 많이 이용되고 있다.

재료 및 방법

공시균주. 국내에서 재배되고 있는 단감나무를 비롯한 몇몇 기주의 이병조직으로부터 분리 동정한 균주와 일본 National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea(NIVOT)에서 분양받은 균주를 사용하

*Corresponding author.

Table 1. Isolates of *Pestalotiopsis* species used for isozyme analysis

Isolate No. ^a	<i>Pestalotiopsis</i> species	Sources	Locations
752002(1)	<i>P. theae</i>	Tea	Japan NIVOT
SP2(2)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Kyongju, Kyongsangbuk-do
SP3(3)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Khimhae, Kyongsangnam-do
SP7(4)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Kyongju, Kyongsangbuk-do
SP10(5)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Kyongju, Kyongsangbuk-do
SP19(6)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Kyongju, Kyongsangbuk-do
SP23(7)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Kyongju, Kyongsangbuk-do
SP26(8)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Khimhae, Kyongsangnam-do
SP31(9)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Khimhae, Kyongsangnam-do
SP36(10)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Khimhae, Kyongsangnam-do
SP40(11)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Miryang, Kyongsangnam-do
SP43(12)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Miryang, Kyongsangnam-do
SP54(13)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Angang Kyongju, Kyongsangbuk-do
SP63(14)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Angang Kyongju, Kyongsangbuk-do
SP65(15)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Angang Kyongju, Kyongsangbuk-do
MSP(16)	<i>P. theae</i>	Sweet Persimmon	Mooan, Chollanam-do
BT(17)	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	Tea	Bosoung, Chollanam-do
GP(18)	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	Grape	Kyongsan, Kyongsangbuk-do
BST(19)	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	<i>B. spicata</i> Thumb	Angang Kyongju, Kyongsangbuk-do
PK21(20)	<i>Pestalotia kaki</i>	Persimmon	Taejon
PK22(21)	<i>Pestalotia kaki</i>	Persimmon	Taejon
752001(22)	<i>P. longiseta</i>	Tea	Japan NIVOT

^aNumbers in parenthesis indicate the lane number in Fig. 1.

였다(Table 1). 균의 배양은 멸균한 filter paper를 무균 상태에서 PDA 배지위에 얹은 후 균주를 접종하여 15일간 24°C에서 배양하였다. Filter paper가 추가된 PDA 배지상에서 생장시킨 균사를 채취하여 이를 실험재료로 사용하였다.

단백질추출. 각 균주들의 균사를 채집하여 미리 차갑게 한 막자사발을 사용하여 액체질소와 함께 균사를 곱게 마쇄한 후 정량을 취하여 1.5 ml의 tube에 넣고 Protein extraction buffer(0.05 M sodium phosphate pH 7.5)와 폐놀성분을 제거하기위해서 PVP 40,000을 첨가하였다. 마쇄한 균사와 buffer가 잘 섞이도록 stirring한 다음 4°C에서 1시간 동안 보관한 후 각각의 tube를 13,000 rpm에서 4°C를 유지하면서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취했으며, Bradford(1976)의 방법에 의하여 단백질 농도를 결정하였고 이를 여러개의 tube에 분주하여 -20°C에 보관하여 시료로서 사용하였다.

겔의 준비와 전기영동. 본 실험에서 사용한 전기영동은 vertical 방식으로 polyacrylamide gel을 사용하여 discontinuous nondenaturing gel electrophoresis방법으로 실행하였다(11, 2). 겔(gel)은 Hames et al.(1981)의 방법에 의하여 제조되었으며 8% separating gel(30% Acrylamide 2.7 ml, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 2.5 ml, 4.8 ml dH₂O, 10% Amonium Persulphate 50 µl, Temed 5 µl)과 5% stacking gel(2.3 ml dH₂O, 30% acrylamide 0.67 ml, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1.0 ml, 10% amoni-

Table 2. List of enzymes with detectable activity, enzyme abbreviations and enzyme commission number used in the study

Enzymes and their pH	Enzyme Abbreviation	Enzyme Commission Number ^a
Esterase (pH 8.5)	EST	3. 1. 1. 1
Malate dehydrogenase (pH 7.4)	MDH	1. 1. 1. 37
Acid phosphate (pH 6.0)	ACP	3. 1. 3. 2

^aSource: Enzyme Nomenclature-Recommendation (1992) of International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 1992. Academic Press, Inc, 1250 6th Ave., San Diego, CA 92101-4311.

um persulphate 30 µl, Temed 5 µl)을 사용하였다. 미리 준비한 각각의 sample에 5×sample buffer(3.1 ml Tris-HCl pH 6.8, 5 ml glycerol, 0.5 ml 1% bromophenol blue, 1.4 ml dH₂O)를 5:1의 비율로 섞고 각각의 well에 lodging하였다. Electrophoresis buffer의 조성은 Tris-25 mM, glycine-192 mM, pH 8.8로 하였으며 120 V와 30 mA의 조건하에서 2~3시간 동안 진행시켜 Tracking dye가 gel의 바닥까지 도달할 때까지 전기영동을 하였다(7).

겔의 염색 및 고정. 전기영동한 겔은 esterase(EST), malate dehydrogenase(MDH), acid phosphatases(ACP)의 3가지 동위효소로 염색 하였으며, 염색조성은 Table 3에 정리하였다. 그리고 염색된 겔은 water : methanol :

Table 3. Composition of staining gradients

Enzyme	Buffer, substrate and dye
Esterase	0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 50 ml, α -Naphthyl acetate 51 mg in 50% acetone 1 ml, Fast blue RR salt 28.5 mg
Malate dehydrogenase (MDH)	0.2 M Tris-HCl buffer 35 ml, 2 M malic acid (pH 7.0) 5 ml, 0.5 M MgCl ₂ 0.3 ml, 1% NAD 2 ml, 1% NBT 1 ml, 1% PMS 0.5 ml, 1% MTT 1 ml
Acid phosphatase (ACP)	0.15 M Acetate buffer pH 6.0, α -Naphthyl acid phosphate 50 mg, Fast Blue salt 50 mg

glacial acetic acid가 5:5:1(v/v)로 혼합된 고정액에 고정시키거나 gel dryer를 이용하여 보관하였다.

데이터 분석. 동위효소에 의한 종간의 유연관계를 분석하기 위해 밴드의 유무, 즉 동일한 위치에 밴드가 있으면 1, 없으면 0으로 하였다. 유사도 분석(similarity coefficient)은 Nei(1987)의 방법에 따라 $[F=2m_{xy}/(m_x+m_y)]$ 식으로 F값을 구하였으며 m_{xy} 는 시료 x와 시료 y에서 공통으로 존재하는 밴드를 나타내며 m_x 와 m_y 는 시료 x와 y에 각각 존재하는 밴드의 수이다. 유연관계 분석은 NTSYS-pc software package를 이용하여 수행하였으며 dendrogram은 위의 유사도 값을 근거로 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic mean)법을 이용 작성하였다(9, 12).

결과 및 고찰

3가지의 동위효소 즉, esterase(EST), malate dehydrogenase(MDH), acid phosphatase(ACP)를 각각 염색하였다. 각각의 esterase, malate dehydrogenase, acid phosphatase의 염색에서 거의 같게 나타난 밴드의 형태를 보인 동위효소 염색은 다른 염색에서 확연히 다르게 나타남을 볼 수 있었다.

Esterase는 아주 다양한 밴드양상을 보였고 밴드의 숫자 또한 매우 많았다. 전체 밴드 수는 142개 정도가 검출됐고 각 균주는 평균 5~7개 정도의 밴드 수를 보였으며 모든 균주가 공통으로 갖는 밴드는 없었으며 서로 상이함을 보였다(Fig. 1). SP2와 SP26도 상이한 밴드패턴을 보였고 이는 MDH와 ACP의 염색에서도 서로 다른 형태를 보였으며, SP19와 SP23 또한 동일한 EST 밴드를 보였으며 이는 MDH와 ACP의 염색에서도 동일한 밴드를 보였다. 이 균주간의 유사도 또한 95% 수준으로 매우 동일함을 나타냈다(Table 4, Fig. 1). EST 염색에서는 비교적 각 균주마다 많은 밴드와 특이한 밴드를 보여 EST만으로 종간 분석과 종 규명에는 다소 미흡함이 있었다.

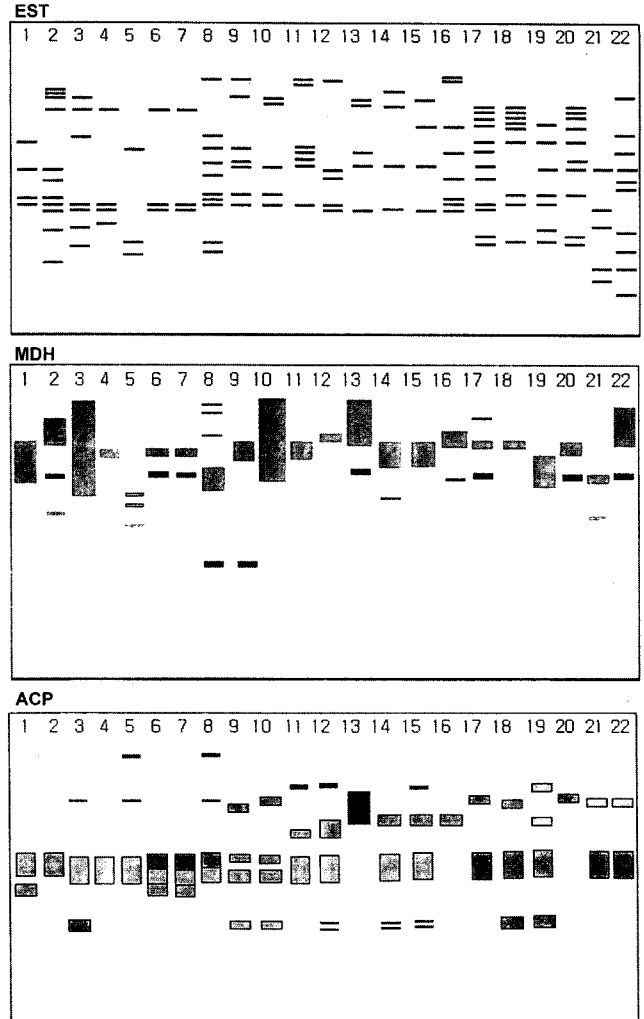


Fig. 1. Diagrammatic representation of different isozymes for *Pestalotiopsis* species.

Malate dehydrogenase는 esterase의 밴드 수에 비해 상당히 적은 수의 밴드가 나타났고 밴드의 형태 또한 뚜렷하게 구분되는 수는 적었고 대부분이 겔에 퍼지듯이 존재했다. 가장 많은 밴드를 보인 균주는 SP26으로 중간 부위에 흐리게 퍼진 밴드 위로 뚜렷한 3개의 밴드와 하위에 짙은 1개의 밴드를 보였다. 또한 하위에 짙은 밴드를 보인 SP31은 SP26과 70%의 유사성을 보였으며, 밴드가 비록 흐리게 퍼진 형태를 보였지만 SP3과 SP36에서는 많은 양의 MDH를 검출할 수 있었다. 본 동위효소에서 SP19, SP23, 그리고 PK21이 거의 같은 양상을 나타냈으며 SP10의 경우는 gel 상에서만 밴드를 구분할 수 있었지만 보관을 위해 dry한 상태에서는 분별하기가 매우 어려웠다(Fig. 1, Table 4).

Acid phosphatase의 경우, 겔의 중간 부위에 넓게 퍼진 밴드가 형성됐고 비교적 상위에 몇 개의 확연한 밴드만을 볼 수가 있었다. ACP 동위효소를 이용하여 염색한

결과 균주번호 SP54인 균주는 Fig. 1에 보는 바와 같이 굵고 짙은 1개의 밴드만을 나타내는 매우 특이성을 보였으며 이 균과 다른 균주와의 유사도는 평균 63%였고 SP36과는 85%였고 GP와는 53%의 유사성을 나타냈다.

세 가지의 isozyme staining에서 보인 동위효소의 밴드를 분석한 상관계수(coefficients of similarity)를 Table 4에 나타냈고 Fig. 2에는 dendrogram을 나타냈다. Table 4에서 중간 상관계수는 최고 95%에서 최저 48%

Table 4. Coefficients of similarity between 22 *Pestalotiopsis* spp. based on isozyme variability for three enzymes.

	752002	SP2	SP3	SP7	SP10	SP19	SP23	SP26	SP31	SP36	SP40	SP43	SP54	SP63	SP65	MSP	BT	GP	BST	PK21	PK22	
SP2	0.7000																					
SP3	0.5750	0.5750																				
SP7	0.8000	0.5500	0.6750																			
SP10	0.7750	0.5750	0.6500	0.7750																		
SP19	0.8250	0.5750	0.6500	0.9250	0.8500																	
SP23	0.8250	0.6250	0.7000	0.9250	0.8500	0.9500																
SP26	0.5500	0.5000	0.7250	0.6000	0.5750	0.5250	0.5750															
SP31	0.7500	0.5500	0.5750	0.7000	0.6250	0.6250	0.6250	0.7000														
SP36	0.7250	0.6250	0.7000	0.7250	0.7000	0.7000	0.7000	0.5750	0.7250													
SP40	0.7500	0.5000	0.4750	0.7500	0.6250	0.6750	0.6750	0.6000	0.7500	0.6250												
SP43	0.7000	0.6000	0.5750	0.6500	0.6250	0.6250	0.6750	0.6000	0.6500	0.5750	0.7000											
SP54	0.6250	0.6250	0.7000	0.7250	0.6500	0.6500	0.7000	0.6750	0.6750	0.8500	0.6250	0.6250										
SP63	0.7000	0.5500	0.6250	0.7500	0.6750	0.7250	0.7250	0.5000	0.7000	0.6750	0.7000	0.7000	0.6750									
SP65	0.6750	0.4750	0.6000	0.7250	0.6500	0.7000	0.7000	0.5250	0.6750	0.7000	0.7250	0.7750	0.7000	0.8250								
MSP	0.7250	0.6250	0.5000	0.7250	0.6500	0.7000	0.7500	0.6250	0.6250	0.5500	0.7750	0.7750	0.6500	0.6250	0.6500							
BT	0.6750	0.6750	0.6000	0.6250	0.5500	0.6000	0.6000	0.5750	0.6000	0.5750	0.4750	0.6000	0.5250	0.5500	0.6000							
GP	0.7500	0.6000	0.6750	0.7000	0.5750	0.6750	0.6750	0.5000	0.7000	0.6750	0.6000	0.5500	0.5250	0.6500	0.6250	0.5750	0.7250					
BST	0.7750	0.5750	0.6000	0.7250	0.6500	0.7000	0.7500	0.5750	0.6750	0.6500	0.6750	0.7750	0.6000	0.7250	0.7500	0.8000	0.6000	0.7750				
PK21	0.7000	0.6000	0.6250	0.6500	0.6250	0.6750	0.6750	0.5000	0.6500	0.6750	0.5500	0.5000	0.5750	0.6000	0.6250	0.5750	0.8250	0.8500	0.6750			
PK22	0.8000	0.6500	0.6250	0.7500	0.7750	0.7750	0.8250	0.6000	0.6000	0.6750	0.7000	0.7000	0.6250	0.7000	0.6750	0.7750	0.6250	0.6000	0.7750	0.6500		
752001	0.6000	0.5500	0.4750	0.6500	0.6250	0.5750	0.6250	0.5500	0.6000	0.6750	0.6500	0.5500	0.7250	0.6000	0.6250	0.6250	0.4750	0.5500	0.6250	0.5500	0.7000	

^aData matrix was made by scoring the presence or absence of the bands as 1 and 0, respectively. Similarity coefficients between two isolates were then calculated with modified formular of Nei (1987).

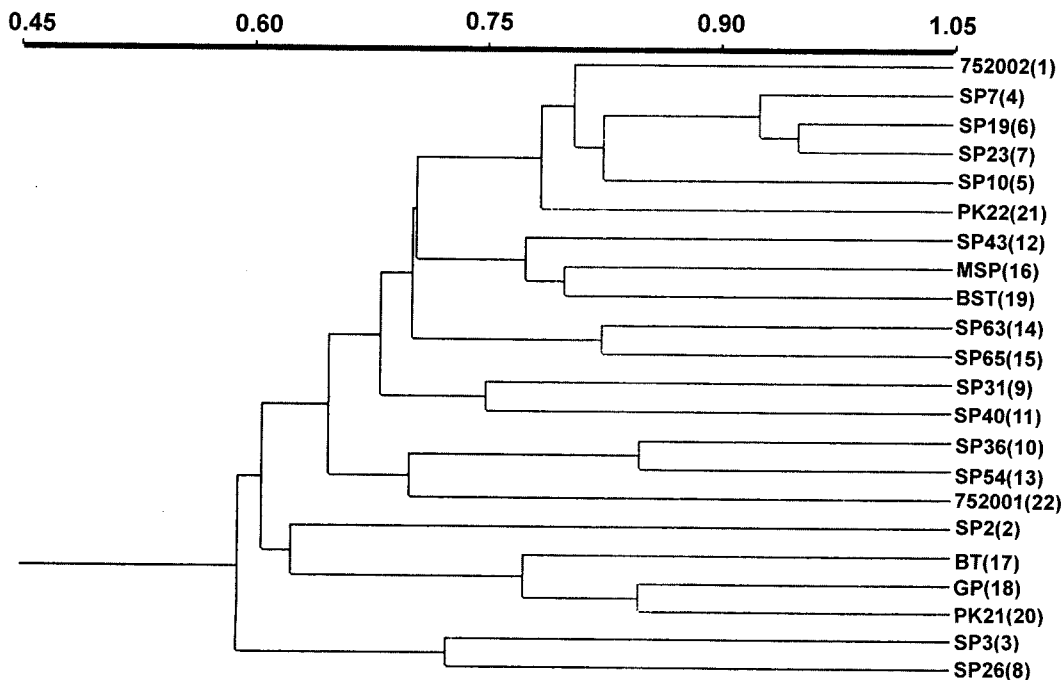


Fig. 2. UPGMA dendrogram showing the relationships among the 22 *Pestalotiopsis* species based on the band patterns formed in relation to different isozymes.

정도 수준을 보였으며 95%의 높은 유사성을 보인 종은 SP19와 SP23이며 SP7과 SP23도 93%의 유사함을 보였으며 SP65와 SP2, BT와 SP43은 48%정도의 낮은 유의성을 나타냈다. 유사도에서는 약 60%에서 2개의 그룹으로 나눌 때 SP3과 SP26은 한 개의 그룹을 이루고 있었으며 중간 유의성이 47% 정도인 몇 개를 제외하고는 대부분이 약 60% 정도의 수준을 보였다.

요 약

단감의 주요재배지인 경상도와 전라도에 심각한 문제가 되는 *Pestalotiopsis* species에 대한 연구가 국내에서 아직까지 전무한 상태에 있으며 이에 본 실험에서는 동위효소에 의한 방법으로 종의 구분과 규명을 행하고자 하였다. EST에서는 비교적 많은 밴드가 검출되었고 평균 5-7개 정도의 밴드를 가지고 있었으며 SP2와 SP26은 매우 유사한 밴드의 형태를 보였고 본 실험에서 행한 3가지의 동위효소 염색은 종을 구분하는데 상호보완적인 면이 있었다. 특히 ACP의 염색에서는 SP54가 다른 종과 비교시 확연히 구분될 수 있는 진하고 뚜렷한 밴드가 있었다. 집괴분석에서 전체균주는 상한값 0.93에서 하한값 0.48의 수준을 보였으며 90% 이상의 유사성을 보인 균주는 SP7, SP19, SP23만이 보였을 뿐이며 대부분의 균주들은 65%에서 82%간은 상동성을 보였다. 가장 낮은 유사성을 보인 균주는 752001에 대해서 SP3과 BT간, SP65와 SP2간, SP40와 SP3간으로 나타났다.

참고문헌

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brewer, G. J. 1970. An introduction to isozyme techniques. Academic Press. New York, London. 186pp.
- Guba, E. F. 1929. Monograph of the genus *Pestalotia* Part I. *Phytopathology* 19: 191-233.
- Guba, E. F. 1932. Monograph of the genus *Pestalotia* Part II. *Mycologia* 24: 355-397.
- Hames, B. D. 1981. In Hames, B. D. and D. Rick Wood (eds.) Gel electrophoresis of proteins: A practical Approach. IRL Press. Oxford and Washington, D. C. 290pp.
- Harris, J. W., Ballal, S. K. and Daniel, V. S. 1974. Starch gel electrophoresis of certain enzymes from five species of *Fomes*. *Biochem. Systematics and Ecology* 2: 53-57.
- Mclellan, T. 1982. Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal. Biochem.* 126: 94-99.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. pp. 106-107. Columbia University Press. New York.
- Rohlf, F. J. 1993. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. NTSYS-pc program. Applied Biostatistics. Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, New York 11733.
- Royse, D. J. and May, B. 1982a. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia* 74: 93-102
- Rothe, G. M. and W. D. Maurer. 1986. pp.37-140 in Gel electrophoresis of proteins. M. J. Ounn, ed. 407 pages IOP Publishing Limited, Bristol, England.
- Sneath, P.H., and Sokal, R. R. 1973. Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Company, San Francisco. USA.
- Steyaert, R. L. 1953. New and old species of *Pestalotiopsis*. *Transactions fo British Mycological Society* 36: 81-89.
- Zervakis, G. and Labarere J. 1992. Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *J. Gen. Microbiology* 138: 635-645.
- 김선봉. 1992. 단감재배 신기술. 오성출판사 35-80.
- 이규영. 1958. 諸數種の 病原性 *Pestalotia* 屬에 關한 研究. 韓國農學誌 4: 29
- 이규영. 1961. 諸數種の 病原性 *Pestalotia* 屬에 關한 研究. 韓國農學誌 7: 52-59
- 장태현, 임태현, 정봉구, 김병섭, 심형권. 1996. *Pestalotiopsis theae*에 의한 단감나무 둥근갈색무늬병(가칭)의 발생. 한국식물병리학회지 12: 377-379
- 장태현, 임태현, 정봉구, 김병섭. 1997. 둥근갈색무늬병원균 *Pestalotiopsis theae*의 배양적 특성. 한국식물병리학회지 13: 311-316.
- 野島友雄. 1928. 柿の葉枯病を基因する *베스타로시치아* 菌의二種類に就て(子報). 病莖雜 15: 85-91.
- 野島友雄. 1929. 柿葉に寄生する二種の *베스타로시치아* 屬菌に關する研究. 島高農學報. 7: 307-340.
- 堀川知廣. 1982. *チャ* 輪斑病の有效な防除藥劑と撒布時期. 茶業研究報告 56: 45-56.
- 堀川知廣. 1988. *Pestalotia longiseta* による *チャ* 新梢枯死の發生生態に防除. 植物防疫 42: 71-75.
- 堀川知廣. 1989. *チャ* 輪斑病, 新梢枯死の發生がその後の茶牙の生育に及ぼす影響. 静岡縣茶試研報 14: 43-51.

(Received September 7, 1998)