

## 참나무류에 시들음병을 일으키는 *Raffaelea quercus-mongolicae*와 *R. quercivora*의 유전적 특성

서상태\* · 김경희 · 이상현 · 권용남 · 신창훈<sup>1</sup> · 김혜정<sup>2</sup> · 이상용<sup>2</sup>

국립산림과학원, <sup>1</sup>한라수목원, <sup>2</sup>강원대학교 산림환경보호학과

### Genotypic Characterization of Oak Wilt Pathogen *Raffaelea quercus-mongolicae* and *R. quercivora* Strains

Sang-Tae Seo\*, Kyung-Hee Kim, Sang-Hyun Lee, Yong-Nam Kwon, Chang-Hoon Shin<sup>1</sup>, Hye-Jeong Kim<sup>2</sup> and Sang-Yong Lee<sup>2</sup>

Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

<sup>1</sup>Halla Arboretum, Jeju 690-816, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Forest Environment Protection, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

(Received on September 3, 2010; Accepted on October 14, 2010)

Recently, the oak wilt diseases especially on *Quercus mongolica*, have been increasing in various districts of Korea. A collection of 38 strains of the oak wilt pathogen *Raffaelea quercus-mongolicae* and *R. quercivora* isolated from *Quercus* spp. in Korea and Japan was characterized by  $\beta$ -tubulin gene sequence and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In cluster analysis based on  $\beta$ -tubulin gene sequence the strains were divided into 4 clusters, of which clusters 2 and 4 were composed of Japanese strains except for one Korean strain. RAPD analysis showed that they were also effectively differentiated by a strong RAPD fragments. On the basis of the two genetic analysis, significant differences were detected between Korean strains and Japanese strains.

**Keywords :** *Raffaelea quercus-mongolicae*, *R. quercivora*, RAPD,  $\beta$ -tubulin

국내에 분포하고 있는 참나무과(Fagaceae)에는 상수리 나무, 갈참나무, 떡갈나무 및 신갈나무 등 약 23여종이 보고되어 있으며(이, 1980), 이들 참나무과의 목재는 건축재, 가구재, 표고버섯 재배용 등으로 쓰이고, 껍질과 종자는 한약재, 코르크용 마개 등으로 쓰이는 유용한 나무이다. 이런 참나무과에 발생하는 병해로는 줄기썩음병, 녹병, 뒷면흰가루병 및 잎오갈병 등이 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2009). 참나무류 시들음병은 2004년 성남 이배재 지역에서 최초 발견되었으며, 국내 전국의 참나무과 나무, 특히 신갈나무를 중심으로 고사현상이 나타난 고사목으로부터 균을 분리하여 원인균을 *Raffaelea quercus-mongolicae*로 동정하여 신종 보고하였으며, 이 병

원균을 매개하는 매개충은 광릉긴나무좀(*Platypus koryoensis*)으로 밝혀졌다(Kim 등, 2009).

일본의 경우 1980년대부터 참나무과 나무의 쇠퇴 및 고사 현상이 급속히 확산 발생되었다(Kuroda, 2001). 국내에 발생하는 참나무류 시들음병과 일본에서 발생하는 참나무류 시들음병은 병원균, 피해 수종 및 병원균을 매개하는 매개충 등에서 차이를 보이고 있는데, 일본에 발생하는 참나무류 시들음병의 병원균은 *R. quercivora*로 주 피해 수종은 물참나무와 줄참나무이며 매개충은 *P. quercivorus*로 보고되었다(Kubono와 Ito, 2002; Kuroda, 2001). 그러나, 이들 병원균주들에 대한 유전적 관계를 연구한 자료는 거의 없으며, Kim 등(2009)이 국내균의 중동정을 위해 국내균과 일본균의 제한된 균주를 이용해 18S rDNA, ITS rDNA,  $\beta$ -tubulin 유전자를 이용한 연구가 보고되어 있을 뿐이다.

본 연구에서는 국내 참나무류 시들음병균과 일본 참나

\*Corresponding author

Phone) +82-2-961-2667, Fax) +82-2-961-2679

Email) stseo@forest.go.kr

무류 시들음병균의 유전적 관계를 분석하기 위해 국내 분리균 31균주, 일본 7균주 모두 38균주에 대해  $\beta$ -tubulin 유전자 sequence를 이용한 cluster 분석과 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)에 대한 연구 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

**병원균 분리.** 국내균주는 전국의 참나무과 나무 중 주로 신갈나무의 이병목으로부터 분리하였다(Table 1). 이 병부위를  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  cm 크기로 잘라 1% 차아염소산

**Table 1.** Strains of *Raffaelea* spp. used in this study

No.	Strain	Isolated from	Source	Year isolated	Cluster <sup>a</sup>	RAPD group <sup>b</sup>
1	RS 10-1	<i>Q. mongolica</i>	Gyeonggi Pocheon	2005	1	1
2	RS 11-2	<i>Q. mongolica</i>	Gyeonggi Namyangju	2005	3	1
3	RS 12-1	<i>Q. mongolica</i>	Gyeonggi Namyangju	2005	1	1
4	RS 13-4	<i>Q. serrata</i>	Gyeonggi Namyangju	-	1	1
5	RS 14-1	<i>Q. serrata</i>	Gyeonggi Namyangju	-	1	1
6	RS 15-3	<i>Q. serrata</i>	Gyeonggi Namyangju	-	1	1
7	RS 18-1	-	Gangwon Cheorwon	-	1	1
8	RS 25-2	-	Seoul	-	3	1
9	RS 32-1	-	Gangwon Gangneung	2005	1	-
10	RS 33-1	<i>Q. mongolica</i>	Gyeonggi Goyang	2007	1	1
11	RS 38-1	<i>Q. mongolica</i>	Seoul	2007	1	1
12	RS 49-1	<i>Q. mongolica</i>	Seoul	2007	1	1
13	RS 51-1	<i>Q. mongolica</i>	Seoul	2008	1	1
14	hc0903	<i>Q. mongolica</i>	Gyeongnam Hapcheon	2009	1	1
15	wj42	<i>Q. mongolica</i>	Jeonbuk Wanju	2009	1	1
16	wj43	<i>Q. mongolica</i>	Jeonbuk Wanju	2009	3	1
17	gh09	<i>Q. serrata</i>	Chungnam Boryeong	2009	4	-
18	PH09	<i>Q. mongolica</i>	Gyeonggi Gwacheon	2009	1	1
19	pc0905	<i>Q. mongolica</i>	Gangwon Pteongchang	2009	1	1
20	BH	-	Gyeongbuk Bonghwa	2009	1	1
21	CG	-	Gyeongbuk Chilgok	2009	1	2
22	CC	<i>Q. mongolica</i>	Gangwon Chuncheon	2009	1	2
23	GY	<i>Q. mongolica</i>	Gyeonggi Goyang	2009	1	2
24	YY	<i>Q. mongolica</i>	Gangwon Yangyang	2009	3	2
25	GR	-	Gangwon Gangneung	2009	1	2
26	BY2	-	Chungnam Buyeo	2009	1	2
27	JA	<i>Q. mongolica</i>	Jeonbuk Jinan	2009	1	2
28	CW	-	Chungbuk Cheongwon	2009	1	2
29	BU	-	Chungbuk Boeun	2009	1	2
30	KS	-	Chungbuk Goesan	2009	1	2
31	SC	<i>Q. aliena</i>	Jeonnam Suncheon	2009	1	2
32	RA 12309	-	Japan	-	4	3
33	RA 12355	-	Japan	-	2	3
34	RA 12457	-	Japan	-	2	3
35	RA 410918	-	Japan	-	4	3
36	RA 410920	-	Japan	-	4	3
37	RA 410921	-	Japan	-	2	3
38	RA 410922	-	Japan	-	2	3

<sup>a</sup>Cluster analysis on the basis of  $\beta$ -tubulin gene sequence, see Fig. 1.

<sup>b</sup>Randomly amplified polymorphic DNA, see Fig. 2.

나트륨(NaOCl) 용액에 약 2분간 침지하여 표면 살균한 후 멸균수로 3회 세척하고 감자한천배지(potato dextrose agar: PDA, Difco)에 치상하였다. 배양은 colony가 형성 될 때까지 실온에서 배양하였으며, 흰색에서 옅은 갈색의 단일 colony를 새로운 PDA 배지에 옮겨 순수 분리 배양하였다. 분리된 균들은 4°C에 보관하면서 시험에 이용하였고, 일본균주는 미에대학(Mie Univ.)의 Ito 교수로부터 분양받아 시험에 이용하였다.

**DNA 분리 및 유전적 특성조사.** 분리된 31개 국내균주와 분양받은 7개 일본균주의 DNA는 DNeasy tissue kit(Qiagen)를 이용하여 분리하였고,  $\beta$ -tubulin 유전자의 염기서열 분석을 위하여 Kim 등(2003)이 보고한 방법에 준하여 PCR을 실시하였다. PCR 용액의 조성은 최종농도 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTPs이었으며, 각 10 pmole의 primer 와 10 ng의 주형 DNA를 첨가하고 *Taq* DNA polymerase (Takara) 0.1 unit를 사용하여 총 반응용량을 50  $\mu$ l로 맞추었고, PCR 조건은 94°C에서 5분간 초기 DNA 변성 후, 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분에서 30 cycle 반응시킨 후 마지막으로 72°C에서 7분간 처리한 후 4°C에서 보관하였다. 증폭된 유전자는 PCR purification kit (QIAGEN)를 사용하여 정제 후 염기서열 분석에 이용하였다. 염기서열 분석은 BigDye Kit (Version 3.1, Applied Biosystems)를 이용하였으며, sequencer는 Applied Biosystems 3730xl Genetic Analyzer (Foster City, CA)를 이용하였다. 염기서열 비교분석은 NCBI BLAST search 프로그램을 활용하였으며, 계통도는 MEGA 프로그램(Version 4.0)을 이용하여 작성하였다.

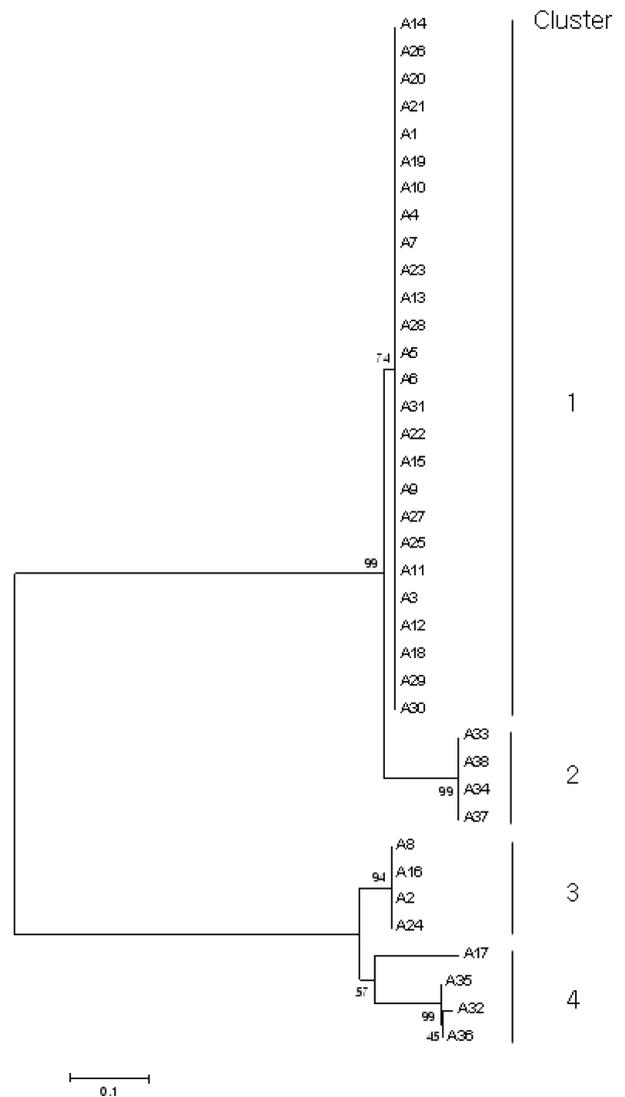
RAPD 분석은 OPC & OPD random primer kit (Operon)를 이용하여 실시하였으며, 1차 스크린 검토 후 최종 OPC-2, OPD-7, OPC-13 3개의 primer를 선발하여 이용하였다. PCR 용액의 조성은 위의  $\beta$ -tubulin 유전자 분석법에 이용된 조성과 같으며, 반응조건은 95°C에서 5분간 초기 DNA 변성 후, 95°C 30초, 38°C 30초, 72°C 2분에서 40 cycle 반응시킨 후 마지막으로 72°C에서 10분간 처리한 후 4°C에서 보관하였다.

### 결과 및 고찰

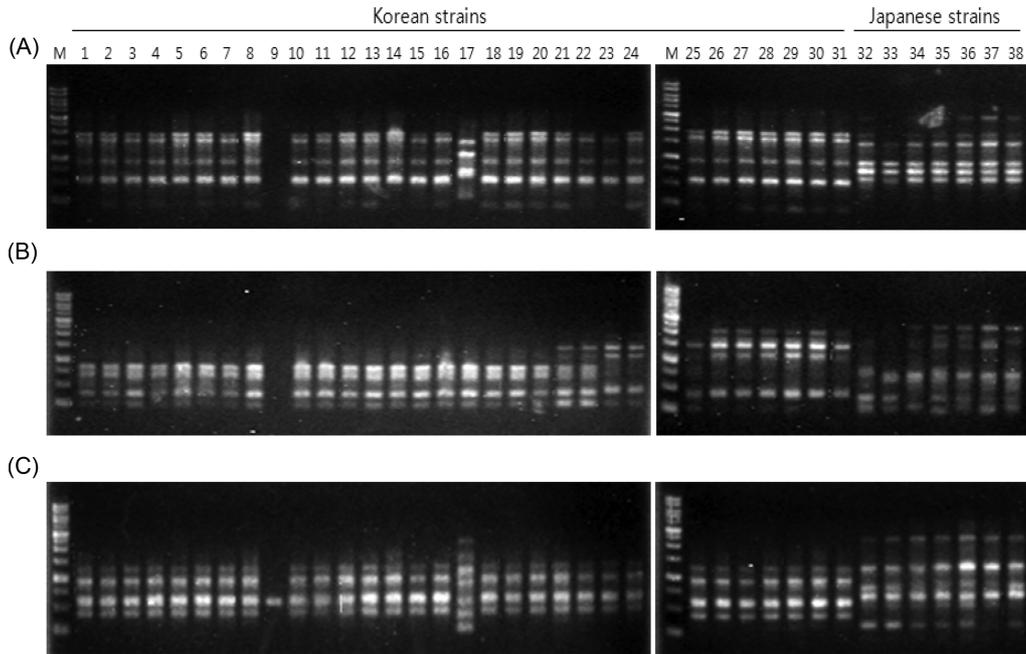
일본에서 먼저 발생한 참나무류 시들음병은 1980년대부터 피해가 급격히 증가하여, 현재 매개충인 *P. quercivorus*가 40여종의 나무를 공격하는 것으로 보고되고 있으며 그 중 참나무과의 참나무속 나무에서 가장 높은 고사율을 나타낸다고 보고하였다(Ito, 2000). 참나무과 중에서도

주로 물참나무와 졸참나무에 대해 고사율이 높게 나타난다(Murata 등, 2005). 국내에서도 2004년 성남에서 최초 발견된 후 그 피해가 증가하여 2008년에는 약 30만본의 참나무과 나무에 피해를 받았으며, 그 주 피해수종은 신갈나무이다(Park 등, 2008).

Matsuda 등(2010)은 일본의 *R. quercivora*의 지역별 유전적 다양성이 존재할 것이라고 보고하였는데, 이번 연구에서는 이런 참나무류 시들음병에 대한 기초연구로서 한국에서 분리한 참나무류 시들음병균 31균주, 일본에서 분리한 참나무류 시들음병균 7균주를 이용하여 유전적 특성을 조사하였다(Table 1).  $\beta$ -tubulin 유전자의 염기서열을 이용한 계통도 분석결과 한국균주 대부분(26균주)



**Fig. 1.** Phylogenetic tree of *Raffaelea* species inferred by MEGA analysis using the  $\beta$ -tubulin gene. Korean strains: A1 to A31, Japanese strains: A32 to A38.



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of RAPD PCR amplified DNA using primer OPC-2 (A), OPD-7 (B), OPC-13 (C). Lanes: M, DNA size standard; 1 to 31, Korean strains; 32 to 38, Japanese strains.

은 cluster 1에 속하였으며, 4균주는 cluster 3에 속하였고, 보령지역에서 분리한 1균주가 cluster 4에 속하였다(Fig. 1). 보령지역에서 분리한 17번 균주는 RAPD 분석에서도 어느 그룹에도 속하지 않는 band pattern을 보여주었다(Fig. 2). 일본균주는 cluster 2에 4균주가 속하였으며, 나머지 3균주가 cluster 4에 속하였다. *Raffaelea*속을 포함하는 ambrosia균은 복잡한 분류체계를 가지고 있는데 (Alamouti 등, 2009), 국내균주와 일본균주는 각각 2개의 큰 cluster를 가지고 있는 것으로 나타나 보다 정확한 유연관계 구명을 위한 추가실험이 요구된다.

RAPD 분석결과 한국균주는 2그룹으로 나뉘었는데, 1번 균주부터 20번 균주는 그룹 1에 속하였고, 21번 균주부터 31번 균주까지는 그룹 2에 속하였으며 일본균주는 모두 그룹 3에 속하였다(Fig. 2, Table 1). 강릉지역에서 분리한 9번 균주와 보령지역에서 분리한 17번 균주는 그룹을 판정할 수 없었다. 9번 균주와 17번 균주는 18S rDNA 염기서열 분석결과 *Raffaelea* 속으로 동정되었으며, RAPD 반복 실험에서는 Fig. 2에 나타난 band pattern을 나타내었다. RAPD 패턴을 분석한 결과 한국균주와 일본균주는 쉽게 구별이 되었으며, 앞으로 RAPD 패턴상에서 차이를 보이는 DNA band를 이용해 조기진단에 이용할 수 있는 연구를 진행할 계획이다.

$\beta$ -tubulin 유전자의 염기서열을 이용한 cluster 분석과 RAPD 분석을 종합한 결과 두 분석간에 특별한 유연관

계를 찾을 수 없었으나, 한국균주와 일본균주는 구별이 가능하였으며, 한국균주와 일본균주는 적어도 각각 2개 이상의 유전적 그룹이 존재함을 알 수 있었다.

## 요 약

최근 신갈나무를 중심으로한 참나무과 나무에 시들음병 피해가 증가하고 있다. 한국과 일본에서 분리한 38개의 시들음병 균주(*Raffaelea quercus-mongolicae*, *R. quercivora*)에 대해  $\beta$ -tubulin 유전자 염기서열 분석과 RAPD 분석을 이용해 유전적 특성을 조사하였다.  $\beta$ -tubulin 유전자 염기서열을 이용한 cluster 분석결과 시들음병 균주들은 4개의 그룹으로 나뉘었으며, cluster 2와 4에는 1균주를 제외하고 모두 일본균주가 속해 있었다. RAPD 분석결과 시들음병 균주들은 3개의 그룹으로 나뉘었으며, 한국균주와 일본균주는 쉽게 구별되었다.  $\beta$ -tubulin 유전자 염기서열 분석과 RAPD 분석결과 한국균주와 일본균주는 상당히 다른 유전적 특성을 가지고 있었다.

## 참고문헌

- Alamouti, S., Tsui, C. and Breuil, C. 2009. Multigene phylogeny of filamentous ambrosia fungi associated with ambrosia and bark beetles. *Mycol. Res.* 113: 822-835.

- 한국식물병리학회. 2009. 한국식물병명목록. pp. 573-575.
- Ito, S. 2000. Mass mortality of *Quercus* species (Fagaceae) - mystery in symbiotic relationships between fungi and ambrosia beetle. *Trans Nishi-Nippon Bran. Mycol. Sco. Jpn.* 10: 16-22.
- Kim, J. J., Kim, S. H., Lee, S. and Breuil, C. 2003. Distinguishing *Ophiostoma ips* and *Ophiostoma montium*, two bark beetle-associated sapstain fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 222: 187-192.
- Kim, K. H., Choi, Y. J., Seo, S. T. and Shin, H. D. 2009. *Raffaelea quercus-mongolicae* sp. nov. associated with *Platypus koryoensis* on oak in Korea. *Mycotaxon.* 110: 189-197.
- Kubono, T. and Ito, S. 2002. *Raffaelea quercivora* sp. nov. associated with mass mortality of Japanese oak, and the ambrosia beetle (*Platypus quercivorus*). *Mycoscience* 43: 255-260.
- Kuroda, K. 2001. Responses of *Quercus* sapwood to infection with the pathogenic fungus of a new wilt disease vectored by the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. *J. Wood. Sci.* 47: 425-429.
- 이창복. 1980. 대한식물도감. 향문사. pp. 227-235.
- Matsuda, Y., Kimura, K. and Ito, S. 2010. Genetic characterization of *Raffaelea quercivora* isolates collected from areas of oak wilt in Japan. *Mycoscience* 51: 310-316.
- Murata, M., Yamada, T. and Ito, S. 2005. Changes in water status in seedlings of six species in the Fagaceae after inoculation with *Raffaelea quercivora* Kubono et Shin-Ito. *J. For. Res.* 10: 251-255.
- Park, I. K., Shin, S. C. and Shin, J. H. 2008. Oak wilt disease in Korea. Pests & Disease Report No. 08-12. Korea Forest Research Institute.