

단 보

PCR을 이용한 벚나무 빗자루병원균(*Taphrina wiesneri*)의 월동부위 검출

손수연 · 이선근 · 서상태*
국립산림과학원 산림병해충연구과

Detection of Overwintering Sites Inhabited by Cherry Witches' Broom Pathogen *Taphrina wiesneri* with Species-specific PCR in Korea

Su-Yeon Son, Sun Keun Lee and Sang-Tae Seo*

Division of Forest Insect Pest and Diseases, Korea Forest Research Institute,
Seoul 130-712, Korea

요 약: 자낭균인 *Taphrina wiesneri*는 한국의 공원과 도로 주변에 주로 식재되는 왕벚나무에 빗자루병을 발생시킨다. 이 병원균은 생태적 특성이 잘 알려져 있지 않아 방제법 등을 개발하는데 어려움이 있다. 이번 연구에서는 빗자루 병원균의 월동부위를 조사하기 위해 빗자루 병징을 보이는 왕벚나무의 건전가지와 이병가지, 그리고 병징이 나타나지 않은 건전한 왕벚나무 가지에서 종 특이적 primer (TwITSF와 TwITSR)를 사용하여 월동부위를 조사하였다. 그 결과 빗자루병에 감염된 왕벚나무의 이병가지 뿐만 아니라 건전가지에서도 종 특이적인 PCR 증폭산물이 관찰되었으며, 그 이외의 건전한 왕벚나무와 감염목 주변의 다른 식물 종 샘플에서는 PCR 증폭산물이 관찰되지 않았다.

Abstract: *Taphrina wiesneri*, a pathogen of cherry witches' broom, is highly pathogenic to *Prunus yedoensis* Matsumura which are widely planted in parks and streets in South Korea. In order to control the disease, it is crucial to know the life cycle of the fungus. We attempted to detect the fungus tentatively overwintering in shoots and branches of cherry trees both having witches' broom and healthy before flowering and leafing in spring using PCR with species-specific primer set (TwITSF and TwITSR). Genomic DNAs were extracted from the symptomatic and the asymptomatic shoots or branches. Results indicated that *T. wiesneri* is present in leaf buds and inner bark not only in symptomatic branches but also in the asymptomatic branches in diseased trees. However, the fungus was not detected in flower buds of the symptomatic trees and any samples of healthy trees.

Key words: *taphrina wiesneri*, PCR, *prunus yedoensis matsumura*

서 론

벚나무는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽교목으로 주로 조경수로 이용되고 있으며, 국내에는 약 20여종이 분포하고 있다(Lee, 2006). 이들 중 왕벚나무(*Prunus yedoensis* Matsumura)는 국내에서 가로수 및 정원수로 전국에 식재되고 있다. 왕벚나무는 많은 병원균에 대해 감수성이 높은 식물로 알려져 있으며, 특히 *Taphrina wiesneri*에 의한 빗자루병 피해가 심각하다(Shimizu et al., 2009). 벚나무 빗자루병원균에 감염되면 가지가 비대해지고, 그 부분에서 작은 가지들이 밀생하며, 감염된 가지에서는 꽃이 거의 피지 않는다. 이러한 병징은 병원균이 기주에 호르몬 이상을 초래하여 나타나는 것으로 알려져 있다(Johnston과

Trione, 1974).

복숭아나무 잎오갈병의 원인이 되는 *Taphrina deformans*는 눈(bud)에서 월동한 후 눈이 틀 때 건전한 잎을 감염하기 시작하므로 방제시기를 선택하여 효과적인 방제를 할 수 있다(Agrios, 2005). 그러나 벚나무 빗자루병원균인 *T. wiesneri*의 월동부위에 대해서는 알려진 것이 거의 없기 때문에 방제를 효과적으로 할 수 없으며, 현재까지 알려진 유일한 방제방법이 감염부위의 제거이다(Yamamoto et al., 2007). 일본에서는 벚나무 눈에 살균제를 살포하여 실내 방제실험을 실시하였으나, 방제효과는 없었던 것으로 보아 적어도 벚나무 빗자루병원균이 눈의 표면에서 월동할 가능성은 적은 것으로 판단되었다(Shoji and Sato, 1980). 그러나 최근에 *T. wiesneri*의 종 특이적인 primer를 이용하여 벚나무 빗자루병원균을 검출한 결과 벚나무 감염 가지 안쪽과 눈 안쪽에서 월동하는 것으로 확인되었다

*Corresponding author
E-mail: stseo@forest.go.kr

Table 1. Fungal and bacterial strains used in this study.

Strain	Species	Isolated from	Source	Species-specific PCR ^z
TA1	<i>Taphrina wiesneri</i>	<i>Prunus</i> sp.	Gongju, Chungnam, 2009	+
TA2	"	"	"	+
TA3	"	"	"	+
TA4	"	"	"	+
TA5	"	"	"	+
TA6	"	"	Yongin, Gyeonggi, 2009	+
TA8	"	"	Hongcheon, Gangwon, 2009	+
TA10	"	"	Jeju, 2008	+
TA11	"	"	"	+
TA12	"	"	"	+
TA15	"	"	Seongnam, Gyeonggi, 2010	+
TA17	"	"	Cheongju, Chungbuk, 2010	+
TA19	"	"	Japan	+
RA1	<i>Raffaelea</i> sp.	<i>Quercus mongolicae</i>	Hongcheon, Gangwon, 2011	-
G2	<i>Glomerella</i> sp.	<i>Juglans sinensis</i>	-	-
C7	<i>Cryphonectria</i> sp.	<i>Castanea crenata</i>	-	-
F88	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
P9	<i>Pseudomonas</i> sp.	Soil	Jeongseon, Gangwon, 2012	-
B23	<i>Bacillus</i> sp.	"	"	-
X18	<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>Sophora japonica</i>	Seoul, 2012	-

^zPresence (+) or absent (-) of amplicon with primers TwITSF and TwITSR.

(Komatsu et al., 2010). 본 연구에서는 Komatsu et al. (2010)이 제작한 종 특이적 primer를 이용한 PCR을 실시하여 국내의 건전한 벗나무와 *T. wiesneri*에 감염된 벗나무로부터 *T. wiesneri*의 월동부위를 탐색하였다.

*T. wiesneri*는 Seo et al.(2009)의 방법을 이용하여 분리하였으며, 기타 공시균주는 국립산림과학원 산림병해충연구과에서 보존중인 균주를 이용하였다(Table 1).

공시한 균주들의 DNA는 PDA(Potato Dextrose Agar, BD Difco™, USA) 배지에서 2-3일간 배양 후 멸균수에 현탁하여 DNA extraction kit(DNeasy® Plant Mini kit, Qiagen, Netherlands)를 이용하여 분리하였고, 종 특이적 PCR은 PCR 용액의 조성을 제외하고 Komatsu 등(2010)이 보고한 방법에 준하여 실시하였다. PCR 용액의 조성은 최종농도 10 mM Tris-HCl(pH 8.5), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs 이었으며, 각 10 pM의 primer (TwITSF: 5'-GAA TCT TTG AAC GCA CAT TGC-3', TwITSR: 5'-ATC CCA GAA GGT TCG CAA GT-3')와 10 ng의 주형 DNA를 첨가하고 Taq DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq, TAKARA BIO INC., Japan) 0.1 unit를 사용하여 총 반응용량을 50 µL로 하였다. 첫 cycle은 94°C에서 2분간 denaturation 하고, 그 후 30 cycles 과정은 94°C에서 30초간 denaturation, 54°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension한 후, 마지막 extension은 72°C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여

UV lamp에서 확인하였다.

*T. wiesneri*의 월동부위를 탐색하기 위하여 2014년 3월 27일 경기도 가평에서 빗자루 병징을 나타내는 왕벗나무 내에서 이병가지와 건전가지를 채집하였다. 한편, 건전한 왕벗나무는 반경 30 m 내에 이병목이 없는 나무를 선택하여 꽃눈과 잎눈이 포함된 가지를 채집하였다. 또한, 왕벗나무 주변 식물에서의 월동 가능성을 검정하기 위하여 왕벗나무 이병목 근처에서 자라는 회양목(*Buxus microphylla* var. *koreana* Nakai), 사철나무(*Euonymus japonicus* Thunb.), 철쭉(*Rhododendron schlippenbachii* Max.)의 가지를 채집하였다. 채집한 가지들은 냉장보관상태를 유지시키고 실험실로 운반하여 70% ethanol을 이용하여 1분간 표면살균 한 후, 각각 꽃눈, 잎눈, 가지로 분류하여 2 mL microtube에 넣고 DNA 추출 전까지 -20°C에 보관하였다.

Komatsu et al.(2010)이 제작한 *T. wiesneri* 종 특이적 Primer에 대하여 국내 균주 적용의 가능성 여부를 확인하기 위해서 13개의 *T. wiesneri* 균주들과 대조구로 사용한 4종의 진균과 3종의 세균으로부터 DNA를 추출하고 *T. wiesneri*에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, *T. wiesneri* 균주들에서만 123 bp의 종 특이적인 증폭 산물이 검출되었으며, 대조구로 사용한 진균과 세균에서는 검출되지 않았다(Table 1). 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과, *T. wiesneri*의 염기서열과 100% 일치하였다. 따라서 본 연구에 사용된 primer는 일본 균주 뿐만 아니라 국내 균주에서도 특이적으로 반응하는 것이 확인

Table 2. Distribution of *Taphrina wiesneri* in shoots and branches of symptomatic *Prunus serrulata* was detected by PCR with the species-specific primers TwITSE/TwITSR.

Sampling parts	Detection of <i>T. wiesneri</i> from					
	<i>Prunus serrulata</i>			<i>Buxus microphylla</i>	<i>Euonymus japonicus</i>	<i>Rhododendron schlippenbachii</i>
	Infected tree		Healthy tree			
Asymptomatic branches	Symptomatic branches					
Flower bud	0 / 12 (0%) ^z	-	0 / 13 (0%) ^a	0 / 1	-	0 / 1
Leaf bud	2 / 9 (22.2%)	10 / 12 (83.3%)	0 / 6 (0%)	0 / 1	0 / 1	0 / 1
Twig	1 / 8 (12.5%)	7 / 8 (87.5%)	0 / 8 (0%)	0 / 1	0 / 1	0 / 1

^zThe number of detection / a total of samples (Detection rate, %: The number of detection / a total of samples × 100)

되었으므로 국내에서의 벚나무 빗자루병 진단연구에 효과적으로 이용될 수 있는 가능성을 제시하였다. 이를 위해 앞으로 좀 더 다양한 *Taphrina* 속 균들을 추가하여 이번 이용한 primer의 종 특이성을 검증할 필요가 있다.

한편, 벚나무 빗자루병 이병목의 건전부와 이병부의 가지로부터 *T. wiesneri*에 종 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 빗자루 병징을 나타내는 왕벚나무의 건전가지와 이병가지의 잎눈과 가지에서 종 특이적 증폭산물이 검출되었다(Table 2).

빗자루 병징을 나타내는 왕벚나무의 건전가지의 경우 모든 꽃눈 시료에서는 PCR 증폭산물이 관찰되지 않았지만, 잎눈 시료에서는 22.2%, 가지 시료에서는 12.5%의 검출율을 나타내었다. 이병가지의 경우 잎눈 시료에서는 83.3%, 가지 시료는 87.5%가 검출되었다. 한편, 건전한 왕벚나무의 모든 시료에서는 특이적 증폭산물이 관찰되지 않았다. 종 특이적 증폭산물이 관찰된 모든 샘플에서는 *T. wiesneri*가 분리되었으며, 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과, *T. wiesneri*의 염기서열과 100% 일치하였다. 또한, 회양목, 사철나무, 철쭉나무에서도 *T. wiesneri* 종 특이적 증폭산물은 관찰되지 않았다. Carrieri et al.(2010)은 건전한 양벚나무(*Prunus avium*)의 잎과 눈에서 *T. wiesneri* 균이 반복적으로 분리되어 내생균으로 존재할 가능성을 시사하였는데, 본 연구에서는 건전한 왕벚나무에서 병원균이 검출되지 않았다. 빗자루 병징을 나타내는 왕벚나무의 건전가지와 이병가지에서 가지 및 잎눈의 검출율의 차이는 건전가지의 경우 이병가지로부터 기주식물내의 건전한 가지로 2차 감염이 이루어져 병원체가 확산중이기 때문에 상대적으로 적은 검출률을 보인 것으로 추정된다(Komatsu et al., 2010). 본 연구에서는 빗자루 병징을 나타내는 이병가지와 잎눈에서의 검출율이 100%에 달하지 못하였는데, 이는 왕벚나무 내에서의 확산된 병원체의 양적인 면이 크게 영향을 미친 것으로 추정된다. 즉, 시료에 병원체의 양이 적었기 때문에 추출된 DNA 양이 적었기 때문에 PCR 검출의 효율이 떨어졌을 것으로 생각된다.

Komatsu et al.(2010)의 경우에도 가지에서 검출되지 않은 시료도 존재하였다. 반면에 벚나무 빗자루병원균이 주로 왕벚나무의 이병가지와 이병가지의 잎눈에서 월동하는 것으로 확인된 본 연구는 Komatsu et al.(2010)이 보고한 결과와 일치하였다.

현재까지 벚나무 빗자루병의 방제방법은 감염부위 제거가 유일한 방법이었다(Yamamoto et al., 2007). 그러나 본 연구에서는 이병가지에 비해 낮은 밀도지만 왕벚나무 이병목의 건전한 가지와 잎눈에서도 *T. wiesneri*균이 검출되었기 때문에 감염된 이병가지 뿐만 아니라 감염목 전체에 대한 체계적인 방제법 개발이 필요할 것이다.

References

- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology, 5th edn. Elsevier Academic Press. San Diego.
- Carrieri, R., D'Elia, I., Geraci, G., Alioto, D., Ragozzino, A. and Gaudio, R. 2010. Molecular evidence of *Taphrina wiesneri* in leaves and buds of healthy sweet cherry: A possible endophytism. Journal of Plant Pathology 92: 327-333.
- Johnston, J.C. and Trione, E.J. 1974. Cytokinin production by the fungi *Taphrina cerasi* and *T. deformans*. Canadian Journal of Botany 52: 1583-1589.
- Komatsu, M., Taniguchi, M., Matsushita, N., Takahashi, Y. and Hogetsu, T. 2010. Overwintering of *Taphrina wiesneri* within cherry shoots monitored with species-specific PCR. Journal of General Plant Pathology 76: 363-369.
- Lee, Y.N. 2006. New flora of Korea. Vol Kyo-Hak Publishing Co. Ltd. pp. 565-578.
- Seo, S.T., Kim, K.H., Shin, C.H., Lee, S.H., Kim, Y.M., Park, J.H., and Shin, S.C. 2009. Control efficacy of fungicides on cherry witches' broom caused by *Taphrina wiesneri*. Research in Plant Disease 15: 13-16.
- Shimizu, J., Fukuda, K. and Ikemoto, S. 2009. Distribution pattern of *Perenniporia fraxinea* on Izumino cherry street trees. Journal of Tree Health 13: 83-84.

Shoji, T. and Sato, K. 1980. Control of witches' broom on cherry trees caused by *Taphrina wiesneri* by pruning of the diseased twigs and fungicidal application. Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan 31: 95-97.

Yamamoto, A., Matsuda, Y., and Ito, S. 2007. Toward the estab-

lishment of control system on witches' broom of cherry-past knowledge and future direction of the study. Tree For Health 11: 115-120.

(Received: October 15, 2014; Accepted: December 9, 2014)