

리지나뿌리썩음병균 분리주들의 배양 특성 및 RAPD에 의한 유전적 다양성 분석

이상용^{1*} · 이선근¹ · 이종규¹ · 김경희² · 이승규²

¹강원대학교 산림자원보호학과, ²국립산림과학원 산림병해충과

Cultural Characteristics and Genetic Diversity of *Rhizina undulata* Isolates by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Sang Yong Lee^{1*}, Sun Keun Lee¹, Jong Kyu Lee¹, Kyung Hee Kim² and Seung Kyu Lee²

¹Department of Forest Resources Protection, College of Forest Sciences,
Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

²Division of Forest Insect Pests and Disease, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

요약: 국내에 분포하는 리지나뿌리썩음병균(*Rhizina undulata*)의 생리적 특성 및 유전적 다양성을 밝히기 위하여, 소나무(*Pinus densiflora*) 및 곰솔(*P. thunbergii*) 림으로부터 분리한 13종의 리지나뿌리썩음병균 분리주를 공시하여 각 분리주들의 배양 특성 및 RAPD에 의한 유전적 다양성을 분석하였다. *P. densiflora* 및 *P. thunbergii*로부터 제조한 수용성 추출물 첨가배지에서의 각 분리주들의 균사생장 특성을 조사한 결과, 각 분리주들의 기주와 분리주들의 기주로부터 추출한 수용성 추출물 배지에서의 균사생장량 간에는 상관관계를 발견할 수 없었다. 한편, 12종의 random primer를 사용하여 *R. undulata* 분리주들의 genomic DNA의 random amplified polymorphic DNA(RAPD)에 의한 유전적 다양성을 분석한 결과, 국내 분리주들의 RAPD profile은 모두 동일하였다. 그러나, 국내 분리주들의 RAPD profile과 일본 분리주와는 다소 차이를 나타내었는데 즉, RAPD profile의 phylogenetic tree 분석 결과, 국내 분리주들과 일본분리주와는 88%의 상동성을 나타내었다.

Abstract: To investigate physiological characteristics and genetic diversity of *Rhizina undulata* isolates distributed in Korea, cultural characteristics and random amplified polymorphic DNA (RAPD) of 13 *Rhizina undulata* isolates from *Pinus densiflora* and *P. thunbergii* stands were analyzed. There were no correlations between the host species of *R. undulata* isolates and the mycelial growth of *R. undulata* isolates on culture media supplemented with water-soluble extract from the two different host species, i.e., *Pinus densiflora* and *P. thunbergii*. Genetic diversity of genomic DNA from 13 *R. undulata* isolates was analyzed by RAPD using 12 random primers. There was no differentiation in RAPD profiles among the isolates from Korea. But, there was some differentiation in RAPD profiles between Korean isolates and Japanese isolates, with 88% homology by phylogenetic tree analysis.

Key words : *Rhizina undulata*, mycelial growth, RAPD, phylogenetic tree

서 론

소나무 리지나뿌리썩음병의 병원균은 *Rhizina undulata* Fr ex Fr. Syn. *R. inflata*(Schaeff) Karst(파상땅해파리버섯)으로, 국내에서는 주로 *Pinus* 속의 침엽수류 뿌리를 부후시켜 임목을 집단으로 고사시키는 병원균으로 알려지고 있는데, 구미 각국에서는 *Pinus* 속 이외에도 *Abies*, *Picea*, *Tsuga*, *Larix* 및 *Pseudotsuga* 속 등의 임목이 이에 의하여 피해를 받았음이 보고된 바 있다(Germmen, 1971; Ginns,

1968; Thompson and Tattar, 1973; Weir, 1915). 일본의 경우는 1968년 동북지방의 곰솔 해안림에서 처음으로 이 병이 발견된 후(木村重義, 1968), 리지나 뿌리썩음병원균의 생리적 특성 및 발병 생태 등이 밝혀졌으며(佐藤邦彦 등, 1974), 포착목(捕捉木)을 이용한 감염지역의 진단(八幡 -彥와 作山建, 1982), 발병환경 특성 분석(龍田利満와 千村俊夫, 1984) 등의 연구가 수행되기도 하였다.

한편, 우리나라의 경우는 1981년 경주 남산의 산불 임지에서 이 병에 의하여 고사된 소나무 및 곰솔이 처음으로 발견되어 이 병을 “리지나뿌리썩음병”이라 명명하였다(李昌根 등, 1982). 1987년에는 강릉시의 해안림에서 리

*Corresponding author
E-mail: sangyong@kangwon.ac.kr

지나뿌리썩음병에 의한 소나무림의 집단 고사현상이 발견되었고(이상용과 김완규, 1990), 이후 남으로는 경북 울진 지역 및 북으로는 강원 고성 지역까지 병의 발생이 확산되고 있는 실정이며(Lee et al., 2005), 최근에는 동해안 뿐만 아니라 서해안 충남 태안지역의 곰솔 해안림에서도 리지나뿌리썩음병에 의한 피해가 발생하고 있다. 이와 같이 국내의 리지나뿌리썩음병은 비교적 넓은 지역에 발생하고 있으며 소나무 뿐만 아니라 곰솔을 감염 기주로 하고 있기 때문에, 병원균인 *R. undulata*의 변이주 발생 가능성을 배제할 수 없게 되었다.

따라서, 이 연구는 *R. undulata* 분리주들의 각 기주로부터 추출한 수용성 추출물 첨가배지에서의 배양 특성 분석으로부터 기주 특이성을 확인하고, 각 분리주들의 random amplified polymorphic DNA(RAPD)에 의한 유전적 다양성을 분석함으로써(Williams et al., 1990), 향후 리지나뿌리썩음병의 효율적인 관리체계를 수립하는데 기초 자료를 제공할 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 균주 및 균사 배양

리지나뿌리썩음병 발병 임지로부터 채집한 *R. undulata*의 자실체는 이상용(1994)의 방법에 따라서 자실체로부터 단포자를 발아 및 분리하였으며, 단포자로부터 발아한 *R. undulata* 분리주들의 균사는 PDA 배지에 이식하여 25°C에서 계대 배양하였다. 공시 분리 균주의 기주 및 분리 지역 목록은 Table 1과 같다. 한편, PDJ-9(TPML02021) 균주는 일본의 Takanori Kubono 박사(Laboratory of Forest Pathology, Tohoku Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Japan)로부터 분양받아 사용하였다.

Table 1. The list of *Rhizina undulata* isolates used in this study.

Isolate code	Host species	Geographic origin
PDK - 1	<i>Pinus densiflora</i>	Gosung, Gangwon
PDK - 2	"	"
PDK - 3	"	"
PDG - 4	"	Gangneung, Gangwon
PDS - 5	"	Samchuk, Gangwon
PDS - 6	"	"
PDW - 7	"	Uljin, Gyeongbuk
PDW - 8	"	"
PDJ - 9	"	Iwate, Japan
PTT - 1	<i>P. thunbergii</i>	Taean, Chungnam
PTT - 2	"	"
PTT - 3	"	"
PTT - 4	"	"

2. 수용성 추출물배지의 제조 및 균사 배양

R. undulata 분리주들의 기주와 균사생장 간의 상관관계를 밝히기 위한 한가지 방법으로, 소나무 및 곰솔로부터 추출한 수용성 추출물 첨가배지에서의 *R. undulata* 각 분리주들의 균사생장 특성을 분석하였다. 수용성 추출물 배지는 이상용과 김완규(1990)의 방법에 준하여 제조하였다. 즉, 살아있는 각 수종의 가지를 채취하고 수세하여 약 1×1 cm 크기로 절단한 다음, 200g의 절편을 400 ml의 중류수와 함께 삼각플라스크에 넣고 1.5 kg/cm²에서 120°C 1시간 처리한 후 cheesecloth로 여과하여 수용성 추출액을 회수하였다. 수용성 추출물 배지는 수용성 추출액에 agar를 1.5%가 되도록 첨가한 다음 autoclave하여, 페트리접시에 분주하고 고화시켜 제조하였다. 이와 같이 제조한 각 수종별 수용성 추출물 배지에 PDA 배지에서 미리 배양한 *R. undulata* 각 분리주들의 균사체를 직경 5 mm의 cork borer를 이용하여 접종한 다음, 25°C에서 7일간 배양하고 분리주들의 균사 생장량을 측정하였다. 각 실험은 5반복으로 실시하였다.

3. Total DNA의 추출

균사로부터 total DNA의 추출은 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega Co.) 및 Yoon 등(1991)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 25°C PDA 배지에서 약 7일간 배양하여 수집한 50 mg의 균사체에 액체질소를 첨가하여 마쇄한 후, 20 mM EDTA 290 µl 및 20 mg/ml lyticase 7.5 µl를 혼합하여 37°C에서 30분간 정치한 다음 13,000 rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. Kit 중의 Nuclei Lysis Solution 300 µl 및 Protein Precipitation Solution 100 µl를 침전에 혼합하여 0°C에서 5분 동안 정치한 다음 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하였으며, 상층액에 isopropanol 300 µl를 첨가한 후, 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 total DNA를 침전시켰다. Total DNA는 70% ethanol 300 µl로 세척 후 13,000 rpm에서 2분간 원심분리에 의하여 회수한 다음, Kit 중의 DNA Rehydration Solution 50 µl에 혼탁하여 65°C에서 1시간 처리를 하였으며, Kit 중의 RNase Solution 1.5 µl/50 µl를 첨가하여 37°C에서 15분간 처리한 후, 각 실험에 사용하였다.

4. Polymerase Chain Reaction(PCR)

R. undulata 균사체로부터 추출한 total DNA를 대상으로 한 PCR reaction mixture의 조성은 total DNA 2 µl, Random primer 1 µl(5 pMole), Taq polymerase(Promega Co.) 2.5 units, 25 mM MgCl₂ 2.5 µl, 10x Taq buffer 2.5 µl (Promega Co.), 10 mM dNTP 1 µl의 총 25 µl로, PCR 반응은 Minicycler(MJ Research)를 사용하였고, PCR cycling의 조건은 94°C에서 1분간 denaturation과 35°C에서

Table 2. Nucleotide sequences of 10-mer primers used for RAPD analysis.

Primer No.	5'-3' sequences	Primer No.	5'-3' sequences
OPB - 01	GTTTCGCTCC	OPB - 11	GTAGACCCGT
03	CATCCCCCTG	13	TTCCCCCGCT
04	GGACTGGAGT	14	TCCGCTCTGG
05	TGCGCCCTTC	15	GGAGGGTGT
06	TGCTCTGCC	17	AGGAACGAG
10	CTGCTGGGAC	20	GGACCCTTAC

1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension으로 43 cycle을 반복 실행하였으며, 처음 denaturation은 94°C에서 3분간, 그리고 마지막 extension은 72°C에서 5분간 실시하였다. 한편, RAPD 용 Random primer는 Operon 10-mer Kit B(Operon Tech.) 중에서 12종을 사용하였다(Table 2).

PCR 증폭산물의 분석은 1.5% agarose gel(TBE buffer)에서 전기영동을 한 후 ethidium bromide로 15분간 염색하고 2차 층류수에 5분간 세척한 다음 Gel Documentation System(Bio-Rad)에서 사진촬영 및 UPGAMA program으로 phylogenetic tree를 분석하였다. Marker는 1 kb DNA ladder(Promega Co.)를 사용하였다.

결 과

1. 소나무 및 곰솔의 수용성 추출물 첨가배지에서 *R. undulata* 분리주들의 균사 생장 비교

소나무 및 곰솔의 수용성 추출물 첨가배지에서 각 분리주들의 균사생장량을 측정한 결과, 대부분의 *R. undulata* 분리주의 경우 소나무 수용성 추출물 배지에서 보다 곰솔 추출물 배지에서의 균사 생장이 양호하게 나타났다 (Figure 1). 그리고, *R. undulata* 각 분리주 간의 균사 생장 활성은 배지 종류와는 상관없이 동일한 경향을 나타내었는데 즉, 소나무 수용성 추출물 첨가배지에서의 균사생육이 다른 분리주보다 양호하거나 불량한 분리주의 경우는 곰솔 수용성 추출물 첨가배지에서도 이와 유사한 특성을 나타내었다. 따라서, 기주 수종과 기주 수종으로부터 추출한 수용성 추출물 배지에서의 *R. undulata* 분리주의 균사 생장량 사이에는 특별한 상관관계를 발견할 수 없었다.

2. *R. undulata* 분리주들의 RAPD 분석

12종의 random primer를 사용하여 *R. undulata* 각 분리주들로부터 추출한 total DNA의 RAPD를 실시한 결과, 각 primer당 2~7개씩 총 50 여종의 PCR 증폭 산물이 검출되었다(Figure 2). 한편, 공식한 모든 국내 분리주들의 RAPD profile은 분리 기주 및 지역에 관계없이 모두 동일하여, 기주 수종 및 지역별 분리주들은 total DNA의 RAPD profile 분석에서는 현재까지 변이의 발생을 확인할 수 없었다. 국내 분리주와 일본 분리주(PDJ-9)의 RAPD profile

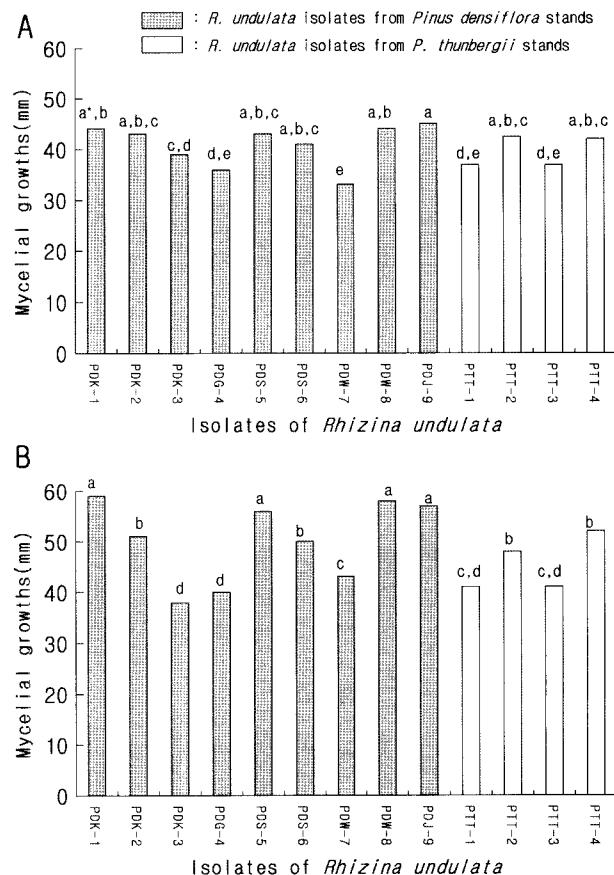


Figure 1. Mycelial growth of *Rhizina undulata* isolates on culture media supplemented with water-soluble extract from *Pinus densiflora* (A) and *P. thunbergii* (B). * : Data represent means of five replicates. Means with the same letter on the bar are not significantly different according to Duncan's multiple range test at 5% level.

도 대부분이 동일하였으나, OPB-6 및 17을 primer로 사용하였을 때에는 국내 분리주와 일본 분리주간의 RAPD profile에 약간의 차이를 나타내었다(Figure 2-E와 K).

RAPD 결과를 Gel-Doc 2000(Bio-Rad Co.)의 UPGAMA program을 이용하여 *R. undulata* 분리주들 간의 phylogenetic tree에 의한 유전적 유연관계를 분석한 결과 (Figure 3), 국내 분리주들은 100%의 상동성을 나타내었다. 그러나, 국내 분리주들과 일본 분리주 PDJ-9과는 약 88%의 상동성을 나타내었다.

고 칠

이상용과 김완규(1990)는 소나무와 23종의 수종으로부터 제조한 수용성 추출물 첨가배지에서의 *R. undulata*의 균사 생장을 조사하였을 때, 각 수용성 추출물 첨가배지에서의 뚜렷한 균사 생장의 차이를 확인할 수 있었다. 이 실험에서는 소나무 및 곰솔 가지 절편의 수용성 추출물 배지에서의 각 분리주들의 균사생장량을 측정하고 분석하였는데, 서로 다른 지역 및 다른 기주로부터 분리한 분

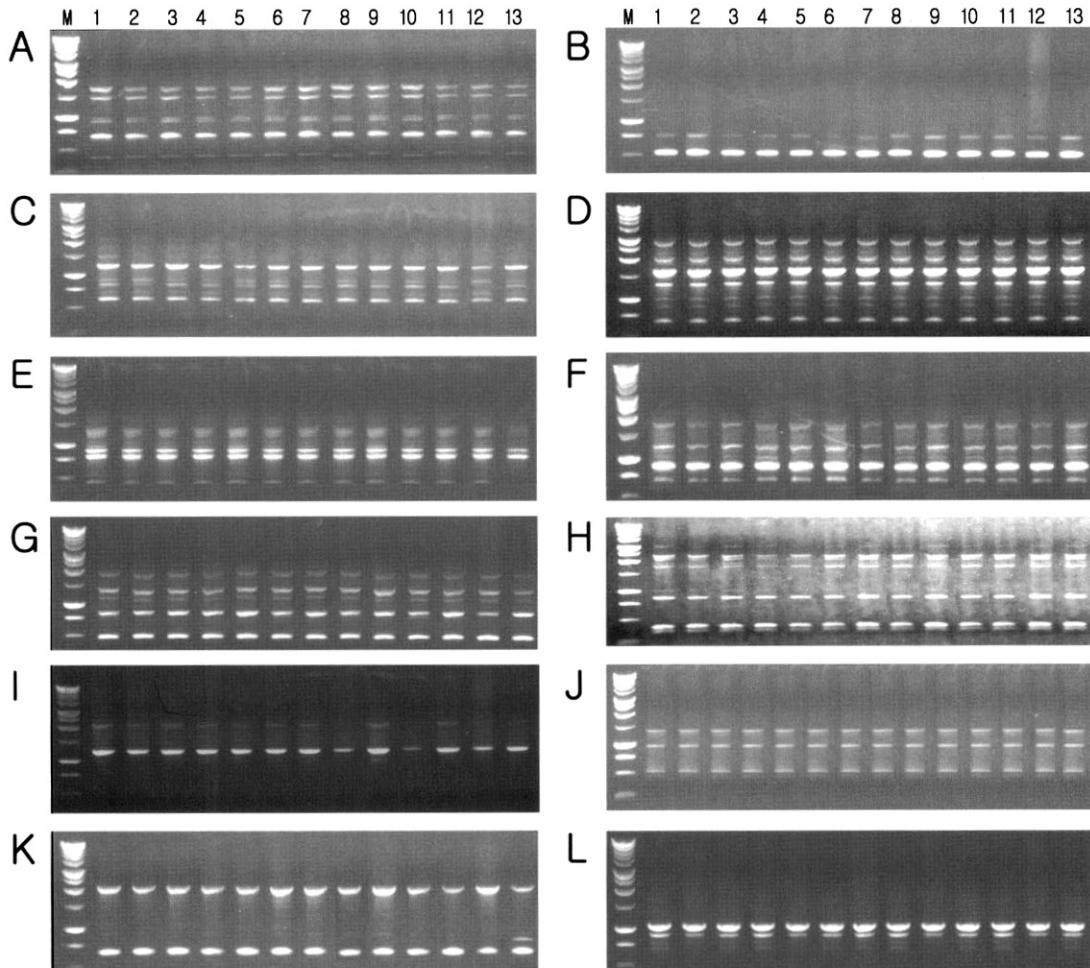


Figure 2. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of 13 *R. undulata* isolates generated from random primers (Operon 10-mer Kit B, Operon Tech.) OPB-1(A), OPB-3(B), OPB-4(C), OPB-5(D), OPB-6(E), OPB-10(F), OPB-11(G), OPB-13(H), OPB-14(I), OPB-15(J), OPB-17(K) and OPB-20(L). Lane M, 1 kb DNA ladder (Promega Co.); lane 1, PDK-1; lane 2, PDK-2; lane 3, PDK-3; lane 4, PDG-4; lane 5, PDS-5; lane 6, PDS-6; lane 7, PDW-7; lane 8, PDW-8; lane 9, PTT-1; lane 10, PTT-2; lane 11, PTT-3; lane 12, PTT-4; lane 13, PDJ-9.

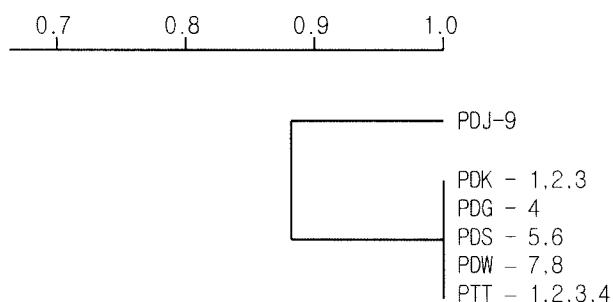


Figure 3. Phylogenetic tree derived from the RAPD profiles of 13 *R. undulata* isolates by UPGAMA method.

리주들의 그룹 간에는 특별한 상관 관계를 발견할 수 없었다. 즉, *R. undulata* 각 분리주의 수용성 추출물 배지에서의 균사생장 활성은 그 분리주를 분리한 기주 수종과는 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

서로 다른 지역의 소나무 및 곰솔림에서 분리한 *R. undulata* 분리주들을 공시하여 RAPD 분석을 실시하였으

나, 국내에서 분리한 모든 분리주들은 동일한 RAPD profile을 나타내었으며 따라서 phylogenetic tree 검정에서도 100%의 상동성을 보였다. 이러한 결과는, total DNA의 RAPD 분석에서 현재까지는 국내의 리지나뿌리썩음병 발생 지역이나 기주 수종에 관계없이 *R. undulata* 분리주들에서 유전적인 변이가 발생하지 않았음을 시사하여 주고 있다. 한편, 국내의 *R. undulata* 분리주들과 일본 분리주 사이에는 미세한 RAPD profile의 차이를 확인할 수 있었으며, phylogenetic tree 검정에서도 약 88%의 상동성을 보였다. 일본이 한국과 지리적으로 인접해 있으며, 리지나뿌리썩음병의 최초 발생시기가 일본(木村重義, 1968)은 1968년이고 한국(李昌根 등, 1982)은 1981년이라는 점을 고려할 때, 국내의 *R. undulata*는 일본으로부터 유입되었을 가능성이 크지만, 이 실험의 RAPD 및 phylogenetic tree 분석의 결과에서 국내의 *R. undulata* 분리주들은 최소한 일본의 Iwate에서 분리한 분리주와는 유전적으로 다소 차이

가 있다는 사실을 알 수 있었다.

따라서, 국내의 *R. undulata*가 어디로부터 유입되었는지를 명확하게 밝히기 위해서는 Iwate 이외의 일본 지역과 구미지역의 리지나뿌리썩음병이 발생하고 있는 모든 나라에서 분리한 분리주들의 유전적 다양성도 함께 밝혀져야 할 것이다. 아울러, 비교적 종(species)내에서도 유전적 변이가 큰 유전자 부위로 알려졌으며 상대적으로 손쉽게 해석할 수 있는 ribosomal DNA의 internal transcribed spacer(ITS) 부위의 염기배열 분석 등에 의한 보다 세부적인 유전적 다양성의 분석이 수행되어야 하겠다.

인용문헌

1. 李相龍. 1994. 江原道 소나무林의 特性에 關한 綜合的研究 (IV) - 소나무 리지나뿌리썩음 病原菌의 子囊孢子發芽 및 菌絲生長에 미치는 溫度 및 殺菌劑의 影響. 江原大學校 森林科學研究報告 10: 25-31.
2. 李相龍, 金完圭. 1990. 소나무 리지나뿌리썩음病에 關한 研究 - *Rhizina undulata*의 生理的 特性 및 病原性. 韓國林學會誌 79: 322-329.
3. 李昌根, 呂運鴻, 金教秀, 金京姬. 1982. 잣나무잎녹病等 樹木病害 3種에 關한 研究. 林業試驗場研究報告書 29: 253-262.
4. 木村重義. 1968. 石卷クロマツ海岸林における蟲害枯死木の 發生位置の 推移. 昭和42年度林業試驗場東北支場年報 229-238.
5. 龍田利滿, 千村俊夫. 1984. マツのつちくらげ病發生條件の一考察. 森林防疫 33: 12-16.
6. 佐藤邦彥, 橫澤良憲, 庄司次男. 1974. マツ類の群状枯死を起す [つちくらげ] 病に關する研究. 林業試驗場研究報告 268: 13-48.
7. 八幡一彦, 作山建. 1982. マツつちくらげ病の病原菌の捕捉とマツ枯損進行との關係. 日本林學會東北支部會誌 34: 111-112.
8. Germmen, J. 1971. *Rhizina undulata*. A review of research in the Netherlands. European Journal of Forest Pathology 1: 1-6.
9. Ginnns, J.H. 1968. *Rhizina undulata* pathogenic on Douglas fir seedlings in western north America. Plant Disease Reporter 52: 579-580.
10. Lee, J.K., Lee, S.Y., Lee, S.J. and Kim, K.H. 2005. Fruiting body development of a root pathogenic fungus, *Rhizina undulata*, after forest fire in eastern coastal pine forests of Korea. Forest Research 1: 33-37.
11. Thompson, J.H. and Tattar, T.A. 1973. *Rhizina undulata* associated with disease of 80-year-old red spruce in Vermont. Plant Disease Reporter 57: 394-396.
12. Weir, J.R. 1915. Observation on *Rhizina inflata*. Journal of Agricultural Research 4: 93-95.
13. Williams, J.B.K., Kubelick, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.
14. Yoon, C.S., Glawe, D.A. and Shaw, P.W. 1991. A method for rapid small-scale preparation of fungal DNA. Mycologia 83: 835-838.

(2006년 3월 31일 접수; 2006년 6월 16일 채택)