

사과흰날개무늬병균의 Cytochalasin E 독소 생산과 병원성

이동혁* · 최경희 · 엄재열¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 사과시험장, ¹경북대학교 농생물학과Cytochalasin E Production by *Rosellinia necatrix* and Its Pathogenicity on AppleDong-Hyuk Lee*, Kyung-Hee Choi and Jae-Youl Uhm¹

Apple Experiment Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Gunwi 716-812, Korea

¹School of Applied Biology and Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received on November 4, 2008)

Cytochalasin E (CE) is a secondary metabolite secreted by *Rosellinia necatrix*, caused by white root rot, and has toxicity to apple as a toxin during disease progress. This study was conducted to demonstrate the relationship between the production of CE and its pathogenicity. CE producing isolates and non-producing isolates of *R. necatrix* were isolated from the mycelial mat of diseased roots and was detected on that using a TLC and HPLC analysis and *in vivo* pathogenicity test. CE non-producing isolates were not pathogenic to apple roots and not detected CE by TLC and HPLC analysis. It was shown that the production of CE was related to the pathogenicity of *R. necatrix*.

Keywords : Apple, Cytochalasin E, Pathogenicity, *Rosellinia necatrix*

사과 흰날개무늬병(*Rosellinia necatrix*)은 토양병해의 일종으로 우리나라에서는 백 등(1967)에 의해 최초 보고된 이래 사과, 배나무 등의 과수에서 중요한 위치를 차지하고 있는 병해다. 사과 흰날개무늬병균은 대단히 넓은 기주범위를 가지고 있어 전세계에서 현재까지 30목 63속 약 170여종의 식물체를 침해하며, 과수류에 특히 피해가 심한 병해로 알려져 있다(Sztejnbrtg와 Madar, 1980; Francis, 1985). 이 병은 최초 뿌리에 감염, 발병하고 2차 병징으로 지상부의 병징이 나타나므로 樹木類에 있어서 육안으로 피해가 나타날 시기에는 이미 기주체 뿌리부위의 피해가 심하여 방제적기를 놓쳐 나무가 고사하기 때문에 경제적인 피해가 심각하다.

사과 흰날개무늬병균의 병원성 요소는 대단히 복잡하며 많은 이차대사산물이 식물체에 독성을 나타낸다는 사실이 알려져 있고(Aldridge 등, 1972), 많은 연구자들이 병원균으로부터 cytochalasin E(CE)를 분리하여 포유동물 세포에 독성 실험을 수행하였다. 그러나 식물체에 대한 독

성 연구는 매우 적으며(Satoko 등, 1997; Anandini 등, 2001), CE의 생산성과 병원성에 관한 연구는 여전히 불명하지 않다. 이 연구는 병든 사과나무 뿌리에서 형성된 매트상 균사 및 근권 토양에서 분리한 흰날개무늬병균의 병원성 및 비병원성 균주간에 CE 생산성과 식물체에 대한 CE의 병원성에 관한 역할을 구명하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

병원균 분리. 사과흰날개무늬병이 발생한 과수원에서 병든 나무의 뿌리와 병원균 균사속이 백색으로 형성된 근권토양을 채취하였으며, 병원균의 선택 분리를 위해 Mitsueda와 Shikata(1975), 이(1995)의 방법을 사용했다. 분리된 병원균을 PSA(1.5%, Potato Sucrose Agar) 배지상에 배양하면서 균사를 광학현미경(Nicon, Optiphot 2)으로 관찰하고 특징적인 서양배모양의 균사 격벽부 팽윤부위를 확인하여 동정했다(Sivanesan과 Holliday 1972; Richard, 1990).

병원성 검정. *R. necatrix* 균주별 병원성 검정을 위해 포장에서 잘라 온 사과나무 가지(길이 10 cm, 굵기 0.5~1.0 cm)를 실험실내 autoclave에서 30분간 살균하고 사과 흰

*Corresponding author

Phone) +82-54-380-3170, Fax) +82-54-380-3109

E-mail) apple@rda.go.kr

날개무늬병균을 분무접종하여 삼각플라스크(500 ml)에 넣어 암상태하에서 30~40일간 배양하여 접종원을 조제하는 이 등(2000)의 방법을 이용했다. 온실내 사과 실생유묘의 증식은 전년도에 채취한 사과 종자(개방수분된 후지품종)를 나일론망 자루에 담아 4°C 냉장고에서 75일간 보존하여 휴면을 타파시킨 후 상토:모래를 2:1(v/v)로 섞어 넣은 플라스틱 포트(52×27×5 cm, 72구)에 파종, 25±1°C, RH 75~80%의 성장조절실에서 발아시켰다. 발아 15~20일 후 자엽이 2~3매로 자란 유묘를 다시 직경 15 cm의 플라스틱 화분에 옮겨 심고, 온실에서 40~45일간 관리하여 초장 30 cm, 자엽 7~10매로 자란 유묘를 5 cm 거리의 4방향에서 접종원을 각 1개씩 5~10 cm 깊이로 파묻어 접종했다. 각 실험은 3반복으로 수행하였으며, 접종 7일 후부터 사과나무의 고사율을 조사하였다. 접종 후 90일이 경과해서도 병징이 나타나지 않는 균주가 발견되어 2회 반복 접종 실험하였고 균사팽윤부위를 확인하여 병원균을 동정한 후 비병원성 균주로 판단하고 다음의 실험을 수행하였다.

TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용한 CE 검출. 사과나무 뿌리에 매트 상으로 형성된 흰날개무늬병 균사체에서 CE 생산성 확인을 위해 병원균 접종 3개월 후 나무가 완전히 고사된 포트에서 뿌리를 채취, 표면에 붙어 있는 상토 및 모래를 완전히 털어내고, 흐르는 물에 씻어 균사체를 완전히 건조시켰다. acetone으로 2시간 추출하여 농축기(Model: EYELA rotary vacuum evaporator)를 이용, CE를 농축하였다. 용매에서 농축된 용질과 cytochalasin E(sigma, Cat No. 2149)를 methanol로 희석하여 silica gel plate (merck, silica gel 60 F254) 위에 micropepet을 이용하여 한 시료당 2.5 µl씩 네 번, 총 10 µl 적하한 후 hexane-acetone(1:2, v/v)로 10분간 전개시켰다. Eluent가 TLC plate 상단 1 cm 정도까지 전개된 plate를 꺼내어 드라이어기로 완전히 건조시키고 fume hood상에서 TLC plate위에 20% sulphuric acid(in 80% EtOH)를 뿌려 노출시켰다. plate를 꺼내어 hot plate(120°C) 상에 놓고 발색을 관찰하였고, “시료의 이동거리/용매의 이동거리”로 지연상수(Retardation Factor; Rf) 값을 계산하였다.

HPLCHigh-performance liquid chromatography)를 이용한 CE 검출. hexane 및 acetone으로 추출한 용액을 silica gel (merck, silica gel 60) column (10×φ1.6 cm)에 5 µl씩 주입하여 2회 크로마토그래피하였다. HPLC (Model: waters LC-10AT)상의 CE peak는 UV(A280)하에서 조사하였고, cytochalasin E(sigma, Cat No. 2149)와 머무름 시간(retention time)을 비교하였다.

CE 농축 및 독성검정. 사과나무 수체에 대한 CE의

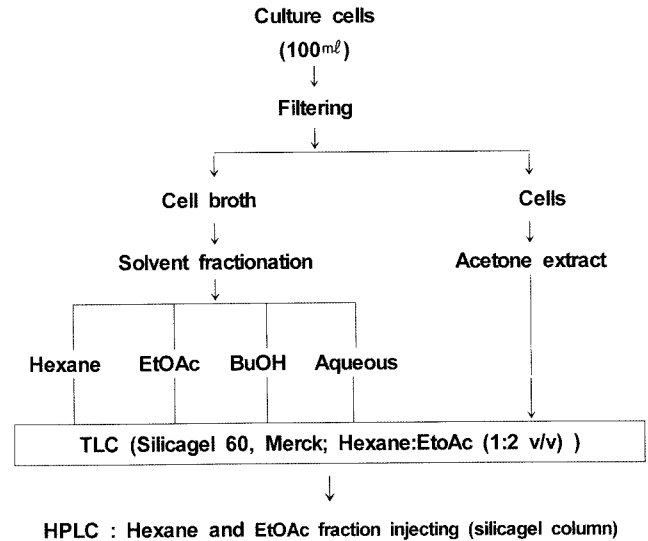


Fig. 1. Schematic procedure for isolation and purification of cytochalasin E from *Rosellinia necatrix*.

독성검정을 위해 흰날개무늬병균을 400 ml, 2%의 PDB 배지에서 2주간 배양한 후 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하여 배양여액과 균사체를 분리하였다. 배양여액은 hexane, ethyl acetate, butanol, aqueous로 각각 추출하여 농축기(Model: EYELA Rotary Vacuum Evaporator)상에서 농축하였으며, 균사체는 acetone으로 2시간 추출하여 같은 방법으로 농축했다(Fig. 1). 농축된 CE는 상기의 TLC 및 HPLC 방법으로 CE 유무를 확인했다. 사과나무 신초 잎이 8~10매로 전개된 1년생 가지를 각 처리별로 10개씩 잘라 농축된 CE를 1, 10, 100 ppm 농도별로 흡습시키며 실험실내에서 독성을 관찰하였다. 처리후 2일부터 7일까지 무처리와 비교하여 잎이 고사하는 비율과 고사하지는 않지만 잎맥을 따라 위조갈변되는 비율을 조사하였다.

결 과

흰날개무늬병 균주별 병원성 검정. 사과원에서 분리한 흰날개무늬병균의 병원성은 균주간에 차이가 있었으며 대부분이 접종후 25~60일 사이에 유묘를 고사시키는 강한 병원성을 가진 균주들이었지만 전북 익산 및 경북 군위 지방에서 분리한 균주 중 접종 90일이 지나도 병징이 나타나지 않는 균주가 발견되어 2회 반복 접종 실험하였고 역시 병원성을 확인할 수 없었다(Table 1). 이들 균주 가운데 강병원성(Rn-Gw04) 및 비병원성 균주(Rn-Is08)를 선발하여 병원성 검정을 한 결과 강병원성 균주를 접종한 사과 유묘의 신초신장량과 뿌리의 발근량은 비병원성 균주(Rn-Is08)를 접종한 처리구보다 현저하게 억제되었고,

Table 1. Isolates of *Rosellinia necatrix* obtained from apple roots and rhizosphere soil

Isolates	Host	Rootstocks	Geographic origin	Isolated from
Rn-Gw04	<i>Malus domestica</i>	M. 26	Gunwi	soil
Rn-Is08	<i>M. domestica</i>	M. 26	Iksan	root

Table 2. Pathogenicity of isolated *Rosellinia necatrix* to the potted seedlings of apple^a

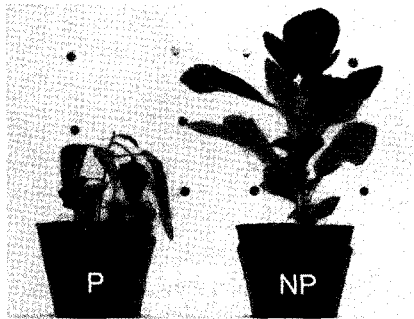
Isolates	No. of total plants	Apple seedling's growth ^b		Virulence	
		Mean of shoot growth	Mean of root dry weight	Degree ^c	Day ^d
Rn-Gw04	18	18.5 ± 1.35 a	0.8 ± 0.17 a	+	54
Rn-Is08	18	46.6 ± 3.69 b	1.4 ± 0.22 b	-	-
Control	18	48.4 ± 1.98 b	1.6 ± 0.18 b	-	-

^a A bundle of apple scions which the mycelial mat was formed by *R. necatrix*, was baited each pot. After inoculation with *R. necatrix*, surveyed a symptom appearance during 120 days.

^b Average of 3 replicates ± standard error, Values not followed by the same letter are significantly different at the 1% level (based on Waller-duncan K-ratio t test)

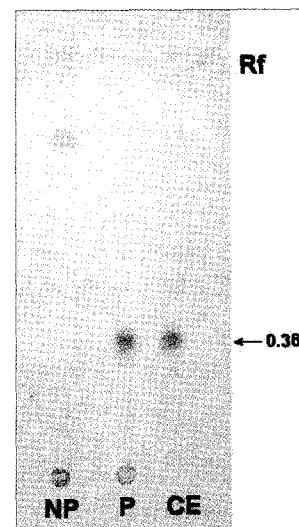
^c +, virulent; -, avirulent.

^d Number of days from inoculation to symptom appearance.

**Fig. 2.** Pathogenicity in seedling inoculated with *Rosellinia necatrix*; P, pathogenic isolate; NP, non-pathogenic isolate.

처리후 54일이 경과하여 완전히 고사되었다(Table 2) 그러나 비병원성 균주는 사과나무 뿌리에 mat 상의 균사속을 일부 형성하였지만 신초신장량과 뿌리의 발근량이 control과 차이가 없었고, 접종후 120일이 경과해서도 육안상으로 수체의 이상증상을 확인할 수 없었다(Fig. 2).

TLC 및 HPLC를 이용한 CE 분석. 병원성(Rn-Gw04) 균주 접종에 의해 형성된 병든 사과나무 뿌리 부위의 균사 매트를 acetone으로 추출하여 TLC 분석한 결과 Rf=0.36에서 표준물질인 CE(sigma, Cat No. 2149)와 동일한 밴드를 형성하였고(Fig. 3), 비병원성 균주(Rn-Gw08)를 접종한 사과나무 뿌리 부위에서는 CE를 확인할 수 없었다. HPLC로 CE의 검출을 시도한 결과 TLC에서와 마찬가지로 병원성 균주의 추출물에서는 sigma Co.로부터 도입한 CE와 동일한 retention time대인 8분에서 CE peak(A₂₈₀)를 검출할 수 있었으나 비병원성 균주에서는 CE의 생산성을 확인할 수 없었다(Fig. 4).

**Fig. 3.** TLC of the acetone extracts of Non-pathogenic and pathogenic strain of *Rosellinia necatrix*. Each lane was spotted with 100 µl of acetone extracts, and the right, 10 µg of Cytochalasin E was spotted as a marker. This plate was developed with hexane:acetone (1:2), and treated with sulphuric acid. NP, non-pathogenic isolate; P, pathogenic isolate; CE, Cytochalasin E (sigma, Cat No! . 2149).

CE 독성검정. 흰날개무늬병의 강병원성 균주(Rn-Gw04)를 PDB 배지상에 배양하여서 CE를 농축한 결과 crystalline 결정 형태로 얻어졌으며, 분리정제된 CE를 사과 가지에 농도별로 흡수시킨 결과, 처리 24시간만에 100 ppm 처리 농도에서 어린 신초 가장자리가 갈변되기 시작하였으며, 7일만에 모두 고사하였는데, 1 ppm 처리에서는 50%가 위조갈변증상을 나타내었으며, 20%가 고사하였다(Fig. 5).

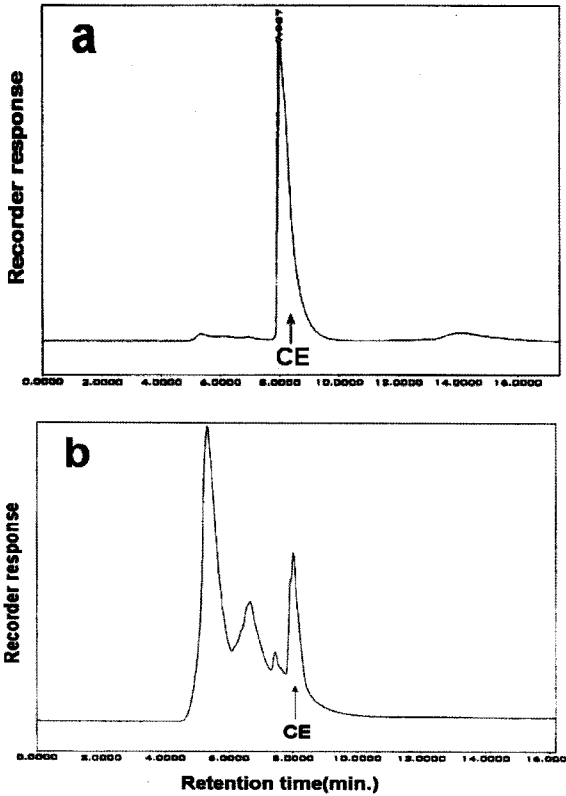


Fig. 4. HPLC profiles (A280) of acetone extract from apple roots infected with *Rosellinia necatrix*. (a) standard cytochalasin E (CE), (b) extracted CE.

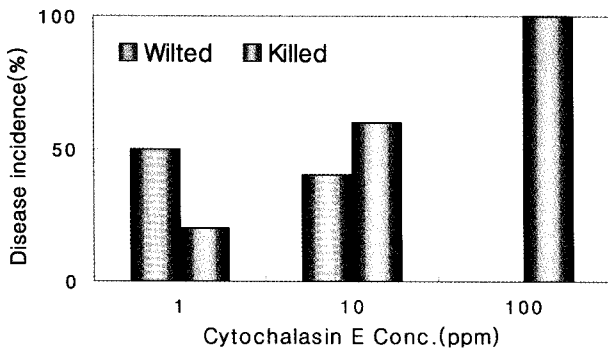


Fig. 5. Inhibition effect of cytochalasin E to apple seedlings at 7 days after incubation at 25°C.



Fig. 6. Wilting caused by cytochalasin E to apple twig-cuttings; (left) A, control; B, 10 ppm; C, 100 ppm, (right) arrows pointed wilting line. These pictures were taken 3 day's after soaking in CE solution at room temperature.

CE가 처리된 사과 실생유묘는 잎 가장자리에서부터 연한 노란빛을 띄며 병변이 앞전체로 확대되었고, 잎자루 부근에서는 건전한 조직과의 경계부에서 연보라빛 불규칙한 병반을 형성하였다(Fig. 6).

고 찰

사과흰날개무늬병균(*R. necatrix*)은 사과나무 뿌리 및 근권토양내에서 분포하며 자연상태에서 비병원성 균주의 분리에 대한 보고는 아직 없다. 이 연구에서는 매우 드물지만 비병원성 균주가 0.4% 비율로 분리된다는 점으로 볼 때 *R. necatrix* 균은 토양내에서 병원성 균주들과 비병원성 및 약 병원성 균들이 혼합되어 있는 것으로 생각된다(자료 미제시). 사과품종의 흰날개무늬병에 대한 저항성의 차이는 지금까지 보고된 바 없으며, 이 등(2000)은 사과나무 흰날개무늬병 생태 및 방제 시험결과 사과나무 대목간에 병 저항성 차이가 없었다고 보고한 바로 미루어 이 실험에서 얻어진 균주간의 병원성의 차이는 사과나무 실생 유묘의 저항성에 의한 것은 아닌 것으로 추정된다.

CE 독소는 Chen(1964)에 의해 최초로 *R. necatrix*균의 배양 여액으로부터 추출에 성공하였으며 독소의 분자식($C_{11}H_{10}O_5$), 융점(206~208°C), 구조식(6-carboxy-8-hydroxy-2-methylchromanone)을 결정하여 rosellinic acid로 명명하였고, Aldridge 등(1972)에 의해 cytochalasin E로 명명되었다. 사과 흰날개무늬병균의 cytochalasin E(CE)의 생산성은 Sawai 등(1982)에 의해 밝혀졌는데, 그 물질의 분자구조가 밝혀진 후 몇몇 연구자들이 CE를 중요한 병원성 요소로 보고했다(Aldridge 등, 1972; Kimura 등, 1989; Watanabe, 1992).

CE의 작용기작에 대해서는 보고로 Sawai 등(1982)은 CE처리후 상처 씨앗의 발아시험에서 뿌리의 성장과 형성에 CE가 큰 영향을 미치며 7일 후 모든 뿌리가 고사된다고 하였으며, Satoko 등(1997)은 *R. necatrix*에 감염된 식물체의 뿌리에서 CE가 독성을 나타냄을 확인하였고, 병 진전에 CE가 중요한 역할을 한다는 가능성을 제시하였다. 또한, Kshirsagar 등(2001)은 CE는 직접 광합성에 영향을 미친다고 보고하였고, Anandini 등(2001)은 CE를 사과 잎자루를 잘라 흡수시킨 후 어린 잎의 광합성에 미치는 영향에 관한 보고에서 CE는 잎의 위조증상을 동반하며 광합성 능력을 현격히 저해하였고, 이는 부분적으로 병원균의 병원성에 영향을 미친다고 하였는데, 이 실험에서도 CE에 의해 사과유묘의 잎 위조증상을 동반한 병변을 확인할 수 있었다.

CE의 병원성 관련 보고가 대단히 많지만 CE의 병원성

관련설과 상반된 결과도 보고된 바 있다. Satoko 등(1997)은 wild type과 UV 처리에 의한 mutant 균주의 배양여역에서 CE 생산성이 확인하고, mutant 균주의 CE 생산성은 wild type 균주의 4~7%에 지나지 않는다고 보고하였다. 또한, 배나무 유묘에 wild type과 mutant를 접종한 결과 양 균주 모두 병원성을 나타내어 CE 생산성은 병원성과 무관한 것으로 보고하였다. 그러나 mutant 균주에서 미량이지만 CE가 생산된다는 점과 CE의 1 ppm의 낮은 농도에서도 식물체에 영향을 줄 수 있다는 점을 고려할 때 mutant 균주가 비병원성 균주는 아닐 것으로 추정된다.

이 연구에서는 강병원성 균주(Rn-Gw04)에서는 CE가 검출되는 반면 비병원성균주(Rn-Is08)에서는 CE가 검출되지 않는다는 점과 CE에 의해 뿌리 및 잎의 이상증상이 관찰되는 점으로 볼 때 CE의 생산성과 병원성과는 관련이 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. 1994. Molecular Biology of the Cell, 3rd ed., Garland Publishing Inc., New York, pp. 823-826.
- Aldridge, D. C., Burrows, B. F. and Turner, W. B. 1972. Structure of fungal metabolites, cytochalasin E and cytochalasin F (*Rosellinia necatrix*). *J. Chem. Soc. Chemical Communications Section D* 3: 148-149.
- Anandini Kshirsagar, Amanda J. Reid, Suzanne M. McColl, Venetia A. Saunders, Anthony J. S. Whalley, and E. Hilary Evans. 2001. The effect of fungal metabolites on leaves as detected by chlorophyll fluorescence. *New Phytologist*. 151: 451-457.
- Chen, Y. S. 1964. Studies on the metabolic products of *Rosellinia necatrix* Berlese. Part II. The structure of rosellinic acid. *Agric. Biol. Chem.* 28: 431-435.
- Francis, S. M. 1985. *Rosellinia necatrix*. *CAB International Mycol. Inst. Sydowia*. 38:75-86 (이상범, 1995. 사과나무 흰날개무늬병균과 자주날개무늬병균의 병원학, 발생생태 및 방제. 충북대 대학원 박사학위논문. pp. 36에서 재인용).
- Khan, A. H. 1959. *Dematophora* root rot. *Calif. Dep. Agric. Bull.* 44: 167-170 (이상범, 사과나무 흰날개무늬병균과 자주날개무늬병균의 병원학, 발생생태 및 방제. 1995. 충북대학교 대학원 박사학위논문 pp. 15에서 인용).
- Kimura, Y., Nakajima, H. and Hamasaki, H. 1989. Structure of rosellichalasin, a new metabolite produced by *Rosellinia necatrix*. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1699-1701.
- Kshirsagar, A. Reid, A. J., McColl, S. M., Saunders, V. A., Whallery, A. J. S. and Evans, E. H. 2001. The effect of fungal metabolites on leaves as detected by chlorophyll fluorescence. *New Phytologist*. 151: 451-457.
- 이동혁, 김동아, 이순원, 엄재열. 2000. 농촌진흥청 원예연구소 시험사업보고서. pp. 208-218.
- 이상범. 1995. 사과나무 흰날개무늬병균과 자주날개무늬병균의 병원학, 발생생태 및 방제. 충북대학교 대학원 농생물학과 박사학위논문. pp. 46-48.
- Mitsueda, T. and Shikata, H. 1975. On the color change of aniline blue in the medium by the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix* (Hartig) Berl. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 44: 146-150.
- Richard, T. H. 1990. Illustrated genera of Ascomycetes. *APS press*. pp. 114-115.
- Satoko, K., Tateki, H. and Akisa, K. 1997. Isolation of *Rosellinia necatrix* mutants with impaired cytochalasin E production and its pathogenicity. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 425-431.
- Sawai, K., Okuno, T. and Ito, T. 1982. The toxicity of cytochalasin E on plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 48: 529-531.
- Sivanesan, A. and Holliday, P. 1972b. C. M. I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 352.
- Sztejnberg, A. and Madar, Z. 1980. Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white root rot disease in fruit trees. *Plant Dis.* 64: 662-664.
- Sztejnberg, A. 1991. *Rosellinia* (*Dematophora*) root rot. In : *Compendium of Apple and Pear Diseases* by A. L. Jones and H. S. Aldwinckle, pp. 46-47. APS press, USA.
- Watanabe, T. 1992. Sporulation of *Dematophora necatrix* in vitro and its pathogenicity. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 58: 65-71.