

Colletotrichum spp. 유래 scytalone dehydratase 유전자의 유전적 다양성 비교

윤여홍¹ · 현민우¹ · 서동연¹ · 김용민¹ · 김성환^{1,2*} · 최창원³ · 김영식⁴

¹단국대학교 미생물학과, ²기초과학연구소, ³배재대학교 생물약학과, ⁴상명대학교 식물산업공학과

Genetic Variation of Scytalone Dehydratase Gene in *Colletotrichum* spp.

Yeo Hong Yun¹, Min Woo Hyun¹, Dong Yeon Suh¹, Yong Min Kim¹, Seong Hwan Kim^{1,2*}, Chang Won Choi³
and Young Shick Kim⁴

¹Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

²Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

³Department of Biology and Medicinal Science, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

⁴Department of Plant Science and Technology, Sangmyung University, Cheonan 330-720, Korea

(Received June 15, 2009. Accepted June 29, 2009)

ABSTRACT: The production of dihydroxynaphthalene (DHN) melanin is known to be essential factor for pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium*. However, the genetic diversity of melanin genes was not much known among *Colletotrichum* spp. To investigate the variability of melanin gene in *Colletotrichum* spp. that cause anthracnose on diverse crops including tomato, we cloned and sequenced partial *sd*, one of DHN melanin genes encoding for scytalone dehydratase, from eight strains of *C. coccodes*, *C. acutatum*, *C. truncatum*, *C. caricae*, and *C. musae*. The size of PCR-amplified *sd* ranged 437 bp to 545 bp. The nucleotide sequence identity of *sd* among the *Colletotrichum* strains tested varied from 49% to 99%. All of the PCR-amplified *sd* from eight strains contain an intron and have two exons coding for 122 amino acids. Overall, the size and nucleotide sequence of *sd* varied among the five *Colletotrichum* spp. Sequence identity of the predicted scytalone dehydratase protein of 122 amino acids ranged 50 to 99%. Phylogenetic analysis based on the *sd* nucleotide sequences revealed that the five *Colletotrichum* spp. could be genetically divided.

KEYWORDS: Anthracnose, *Colletotrichum* spp., DHN melanin, Scytalone dehydratase gene, Tomato

동물과 식물, 세균 및 곰팡이 등에서 발견된 멜라닌(melanin)은 페놀 화합물로서 생합성 과정 중 산화 또는 중화를 통해 형성되는 고분자 화합물이며 그 특징은 생물체의 조직에서 짙은 갈색 또는 검은색의 색소 침착을 나타낸다. 일반적인 특징으로 단백질 및 탄소와 복합체를 이루고 있다(Bell and Wheeler, 1986, Butler and Day, 1998). 특히 균류의 멜라닌 중합체 합성과정은 티로신(tyrosine)을 전구체(precursor)로 이용하여 생성되는 페놀성 화합물인 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)경로를 통한 멜라닌 합성 경로와 Malonyl Co-A부터 시작되는 DHN 멜라닌(dihydroxynaphthalene) 생합성 경로가 가장 잘 알려져 있다(Bell and Wheeler, 1986). DHN 멜라닌 생합성은 주로 자낭균류들에서 보고 되어왔는데 그 과정은 pentaketide 합성과 함께 시작되며 중간 산물로서 scytalone이 생성된다. 그 다음 scytalone은 1,3,8-trihydroxynaphthalene(1,3,8-THN)

로 탈수되고, vermeline으로 환원된 후 다시 탈수되어 1,8-DHN으로 전환되어 최종산물인 멜라닌을 생성한다(Kubo *et al.*, 1991).

균류에 있어 멜라닌은 외부 환경에 견딜 수 있는 보호물질로서 그 일반적인 역할이 알려져 있는데 DHN 멜라닌은 일부 병원성 균류에 있어서 기주를 침입하는 침입구조(infection structure)의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Butler and Day, 1998). 식물병원 균류에 있어서 DHN 멜라닌 합성 경로에 관한 연구는 벼 도열병균(*Magnaporthe grisea*) 및 오이 탄저병균(*Colletotrichum lagenarium*)에서 연구가 수행된 바 있다. 이들 식물병원균류가 기주식물의 침입을 위해 필요로 하는 부착기(appressorium) 형성에 멜라닌이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Howard and Ferrai, 1989; Perpetua *et al.* 1996). 이러한 연구 성과를 통해 이들 병원균의 방제를 위해 멜라닌 합성의 중간 단계를 저해하는 물질(tricyclazole)이 개발되었다(Butler and Day, 1998; Woloshuk *et al.*, 1980; Zeun and Buchenauer, 1985).

*Corresponding author <E-mail : piceae@naver.com>

Colletotrichum spp.는 고추, 토마토, 조롱박, 콩과식물, 딸기, 사탕옥수수 등을 포함한 많은 기주식물에 탄저병을 일으키는 경제적으로 매우 중요한 병원균이다. 그러나 이들 균류에 있어서 DHN 멜라닌 합성 대사 관련 연구는 *C. lagenarium*에만 국한되어 연구가 진행되어 온 바 *Colletotrichum* 균류가 생성하는 멜라닌 합성에 관여하는 효소의 유전자 특성에 대한 정보가 전반적으로 매우 미흡한 실정이다. 따라서 탄저병균의 멜라닌 대사 경로를 확대 연구하고자 하는 일환으로 본 연구에서는 5종의 *Colletotrichum* 8개 균주로부터 DHN 멜라닌 합성경로의 중간산물 중 하나인 scytalone을 1,3,8-THN으로 전환시키는 과정에 작용하는 scytalone dehydratase 효소의 유전자(sd)의 부분 염기서열을 클로닝하고 염기서열을 분석 비교하여 균주간의 유전적 다양성을 조사 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지제조

본 연구에 사용된 5종 8개의 *Colletotrichum* 균주는 한국농업미생물자원센터(KACC)에서 분양받아 사용하였다(Table 1). 분양 받은 균주는 PDA(BD Science, USA) 배지에 접종한 후 25°C 암조건에서 배양하여 실험에 사용하였다.

Genomic DNA의 추출

Genomic DNA 추출을 위해 각각의 *Colletotrichum* 균주는 멸균된 셀로판 (BioRad, USA)을 깔은 PDA 배지에 5일 동안 25°C에서 암조건으로 배양하였다. DNA 추출은 배양 균사 200mg을 멸균된 2ml cryogenic vial에 옮겨 닦은 후 TSE buffer (50 mM Tris-HCl[pH8.5], 50 mM EDTA, 3% sodium dodecyl sulfate) 300 μ l를 첨가하여 균사를 부유시켰다. 부유된 균사는 vial 직경에 맞게 고안된 스텐레스 드릴비트(drill bit) 이용하여 얼음 위에서 2분 동안 분쇄하고 2분간 대기 하였다가 다시 2분간 분쇄 하였다 (Kim

et al., 1999). 분쇄된 균사 용액에 3 M sodium acetate (pH 5.2) 150 μ l를 첨가하고 섞은 후 -20°C에서 10분간 처리후 냉장원심분리기(Sigma, Germany)에서 13,000 $\times$ g로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 취하여 1.5 μ l 튜브에 옮겼다. 옮긴 튜브에 동량의 phenol : chlorform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1; Amresco, USA)를 첨가하여 잘 섞고 나서 다시 냉장원심분리기로 5분간 원심분리하였다. 원심분리된 상층액을 취하여 다시 새 튜브로 옮기고 동량의 isopropanol (Sigma, USA)을 첨가하여 상온에서 5분간 처리한 다음 처리된 튜브를 다시 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척 후 상온에서 건조하고 30 μ l의 TE buffer(10 mM Tris[pH 8.0], 1 mM EDTA)를 첨가 하여 UV-VIS spectrophotometer(Thermo Scientific, USA)를 이용하여 DNA양을 정량하였다.

PCR을 이용한 scytalone dehydratase 유전자 sd의 증폭

PCR 반응은 Gene Amp-950 cyclor(ABI, USA)를 이용하여 수행하였다. Scytalone dehydratase 유전자(sd)의 증폭을 위해서 degenerate primer인 SD1(GA(AG)TGGGCIGA(CT)(AT)(CG)ITA(CT)GA)과 SD2(CCIGC(AG)AA(CT)TTCCAIACICC)를 이용하였다(Wang *et al.*, 2001). PCR 반응물의 조성은 10 $\times$ reaction buffer 5 μ l, 10 mM dNTPs 1 μ l, 5 $\times$ Band doctor 2.5 μ l, 20 pmol primer 각 1 μ l, template DNA 2 μ l, 3차 멸균 증류수 37 μ l, 5 U EF-Taq polymerase 0.5 μ l(Solgent, Korea)를 첨가하여 총 50 μ l의 반응물을 만든 후 반응하였다. 반응조건은 94°C에서 4분간 pre-heating시킨 다음, 94°C에서 50초간 denaturation, 55°C에서 50초간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 1 cycle로 하여, 총 30 cycle을 반응시킨 다음 72°C에서 10분 동안 post extension하고 4°C로 유지하였다. PCR 반응산물은 1% agarose gel상에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였으며 크기는 1 kb DNA ladder marker(Promega, USA)와의 비교를 통해 확인하였다.

Table 1. Size of exon and intron in partial *sd* gene of *Colletotrichum* spp.

Species	PCR amplicon size	Intron size	Exon size	GenBank accession no.
<i>C. acutatum</i> KACC41832	437 bp	71 bp	366 bp	GQ266388
<i>C. acutatum</i> KACC40805	437 bp	71 bp	366 bp	GQ266384
<i>C. acutatum</i> KACC40990	437 bp	71 bp	366 bp	GQ266387
<i>C. caricae</i> KACC40984	546 bp	180 bp	366 bp	GQ266386
<i>C. coccodes</i> KACC40802	491 bp	125 bp	366 bp	GQ266383
<i>C. coccodes</i> KACC41949	491 bp	125 bp	366 bp	GQ266385
<i>C. musae</i> KACC40947	540 bp	174 bp	366 bp	GQ266389
<i>C. truncatum</i> KACC42118	490 bp	124 bp	366 bp	GQ266390
<i>C. lagenarium</i> 104-T	433 bp	67 bp	366 bp	D86079

KACC, Korea Agricultural Culture Collection. Size of *C. lagenarium* 104-T was obtained by counting nucleotide numbers positioned between the *sd* gene sequences which are recognized with SD1 and SD2 primers.

sd 유전자의 염기서열 및 계통 분석

sd 유전자의 PCR 산물은 Gel extraction kit(Qiagen, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 산물은 T&A Cloning vector (RBC, Taiwan)에 subcloning한 후 plasmid를 추출하고, HindIII 제한효소를 처리하여 cloning 여부를 확인하였다. 추출된 plasmid는 Macrogen사(Seoul, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열은 Chromas v2.31을 이용하여 편집하였다. 분석된 sd 유전자의 염기서열은 Expasy의 translate tool(<http://www.expasy.ch/>)을 이용하여 *C. lagenarium*의 SD 아미노산 서열(GenBank accession number, BAA13009)과 비교 분석하였다. 비교를 위한 다중염기서열정렬은 ClustalW 2 프로그램을 이용하여 수행 하였으며 기존에 보고된 다른 균류의 sd 유전자 염기서열은 GenBank 데이터베이스로부터 다운받아 사용하였다. 계통도 분석은 PAUP*4.010b를 이용하여 Neighbor-Joining 방법(Kimura, 1980)으로 제작하였고, 계통도내 분지의 신뢰도(bootstrap 값)를 조사하기 위해서는 1,000번의 bootstrap resampling 분석을 실시하였다(Swofford, 2002). Outgroup으로는 *Ceratocystis resinifera*의 sd 유전자 염기서열을 사용하였다.

결과 및 고찰

Colletotrichum spp. sd 유전자의 PCR 증폭 및 염기서열 분석

Colletotrichum 균주들에 대하여 SD1과 SD2 degenerate primer로 PCR 증폭을 실시하여 얻은 약 500 bp 정도의 PCR 산물을 T&A cloning vector에 재조합시켜 *E. coli* DH5α에 형질전환 시킨 후 추출한 플라스미드에 HindIII를 처리하여 전기영동으로 확인한 결과, 약 500 bp의 제한효소 절편이 검출 되어 *Colletotrichum* 균주에 따라 다소 차이가 나는 것을 확인 하였다(Fig. 1). 삽입된 PCR 산물을 sequencing 한 후 Blast 검색을 실시한 결과 sd 유전자로 확인 되었다. sd 유전자의 증폭에 사용된 primer는 *Ophiostoma floccosum*의

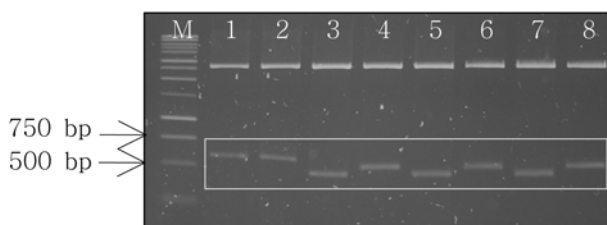


Fig. 1. Restriction enzyme digestion with HindIII of the recombinant T&A cloning vector containing partial sd gene of *Colletotrichum* spp. Insert DNA's are boxed. Lane M: 1kb DNA ladder marker, lane 1: *C. musae* KACC40947, lane 2: *C. caricae* KACC40984, lane 3: *C. acutatum* KACC41832, lane 4: *C. coccodes* KACC41949, lane 5: *C. acutatum* KACC40805, lane 6: *C. coccodes* KACC40802, lane 7: *C. acutatum* KACC40990, and lane 8: *C. truncatum* KACC42118.

증폭을 위해 *C. lagenarium*과 *Magnaporthe grisea*의 sd 유전자를 바탕으로 제작되었고, 본 실험에 사용된 8개의 *Colletotrichum* 균주에서 모두 증폭이 잘 이루어진 것을 볼 때 *Colletotrichum* 균류에 일반적으로 사용될 수 있을 것으로 여겨진다.

Colletotrichum 균주들의 sd 유전자의 크기는 Table 1에 제시되었다. PCR 증폭된 sd 유전자의 DNA 길이는 *Colletotrichum* 종간에 그 크기에 있어서 차이가 존재하였다. *C. caricae* KACC40984와 *C. musae* KACC40947은 각각 545 bp와 540 bp로 본 실험에 비교된 균주 중 길이가 긴 sd 유전자를 가지고 있었다. 그 다음으로 *C. coccodes*, *C. truncatum*, *C. acutatum* 순으로 길이가 차이가 있었다. *C. lagenarium*은 공시된 5종의 *Colletotrichum* 균주보다 크기가 작았다. 이러한 종간 sd 유전자의 크기에 차이가 생기는 이유를 알기 위하여 분석된 염기서열에서 인트론(intron)과 엑손(exon)을 조사한 결과 Table 1에서 보는바와 같이 엑손은 122개의 아미노산을 코딩 할 수 있는 366 bp의 크기를 모든 종에서 동일하게 나타내었다. 이 엑손 염기서열 사이에 존재하는 인트론은 종에 따라 크기가 달랐다. *C. lagenarium*의 인트론은 67 bp로 가장 작고, *C. coccodes* KACC41949는 125 bp로 가장 크며, *C. acutatum* 3개 균주는 모두 동일하게 71 bp의 인트론 염기서열을 가지고 있었다(Fig. 2). 결국 PCR 증폭된 sd 유전자의 크기에 있어서 차이는 인트론의 크기에 따라 차이가 생기는 것을 알 수 있었다.

Colletotrichum spp.의 sd 유전자간의 상동성을 pair-wise 방법으로 분석한 결과 일부 sd 유전자의 염기서열은 유전적으로 변이가 높게 나타났다. *C. lagenarium*과 *C. caricae* KACC40984는 가장 낮은 49%의 상동성을 나타냈고 *C. coccodes* 2 균주는 99%의 높은 상동성을 보였다 (Table 2). 이는 같은 종내에서는 상동성이 높고 종간에는 상동성에 낮음이 *Colletotrichum* sd 유전자에 나타나고 있음을 알 수 있다.

Colletotrichum 균주간 유전자 상동성의 차이원인을 분석하기 위해 엑손 부위와 인트론 부위의 염기서열을 정렬해 본 결과 인트론 부위에 sd 유전자의 종간 차이가 많음을 확인하였다(Fig. 2). 토마토에 병을 일으킬 수 있는 *C. acutatum*과 *C. coccodes*의 경우를 살펴보았을 때 *C. acutatum* 3개 균주 간에도 인트론의 염기서열에 변이가 존재하였던 반면, *C. coccodes* 2개 균주는 동일한 인트론 서열을 가지고 있었다. 따라서 *Colletotrichum* 속의 종에 따라 종 내에서 sd 유전자 염기서열의 변이정도가 다르다는 것을 보여준다.

SD 유전자의 아미노산 서열 분석

*C. lagenarium*의 full-length sd 유전자는 188개의 아미노산으로 이루어진 scytalone dehydratase 효소를 코딩하는데 2개의 인트론과 3개의 엑손으로 이루어져 있다(Kubo et al., 1996). 이를 바탕으로 본 실험에서 얻어진 염기서열

<i>C. acutatum</i> KACC40990	GTAAGTCATTC-----GCCTCA-CGGCGATGCTTTTCACTGCCTTCGGAGCAGGACGTT	53
<i>C. acutatum</i> KACC41832	GTAAGTAATCC-----GTTCCA-CGGCGCGGCTTTGCTACCTTCG-ACCACAGCTTT	52
<i>C. acutatum</i> KACC40805	GTAAGTCATTC-----GTCACA-CGGTGATGCTGTTCCCTGCTTTCAAATCAGGCC-TT	52
<i>C. coccodes</i> KACC40802	GTAAGTGAACCC-GACGGTCTATCGGCGCGCTGTGAC-CTGCACATGGATGACAACCCC	58
<i>C. coccodes</i> KACC41949	GTAAGTGAACCC-GACGGTCTATCGGCGCGCTGTGAC-CTGCACATGGATGACAACCCC	58
<i>C. truncatum</i> KACC42118	GTAAGTAAACCCGAGCGTCTCGCGCGCGCATGAA-CGGCGGCCCTGCTGTTCTGTC	59
<i>C. caricae</i> KACC40984	GTACGTCCCC-----CTCCACCATCTCCCCAATCCATCACTACCTACCCAACTCC	53
<i>C. musae</i> KACC40947	GTACGTCCCC-----CTCCACCATCTCCCCAATCCATCACTACCTACCCAACTCC	53
<i>C. lagenarium</i>	---GTAAGTCT---CTTCCCCAAATACACGAAA-CAGAAACCGTCGTCCA---CC	47
<i>C. acutatum</i> KACC40990	TGTGCTGA-CCGA-CTGCAG-----	71
<i>C. acutatum</i> KACC41832	TGAACTAA-CAGCACTATAG-----	71
<i>C. acutatum</i> KACC40805	TGTACTGA-CCGAATTACAG-----	71
<i>C. coccodes</i> KACC40802	TGT-CTG--GCGTCCGACATGAAGCCCTTCACAAAATAAATAAGAATCCCGGCTCAC	115
<i>C. coccodes</i> KACC41949	TGT-CTG--GCGTCCGACATGAAGCCCTTCACAAAATAAATAAGAATCCCGGCTCAC	115
<i>C. truncatum</i> KACC42118	GGCTTTGAGCCGTTTCATCGCAATACCATCTGGGCACCCGGCTCTGTGCTGACTCCAT	119
<i>C. caricae</i> KACC40984	CGCCCTC--GCGCCCCCTGCGCCCCCTCCACAACCCCAACCTGTCTCTCGTCTCTC	111
<i>C. musae</i> KACC40947	CGCCCTC--GCGCCCCCTGCGCCCCCTCCACAACCCCAACCCGTCTCTCTCGTCTCTC	111
<i>C. lagenarium</i>	GGTATTAAACCGAACGCAAG-----	67
<i>C. acutatum</i> KACC40990	-----	
<i>C. acutatum</i> KACC41832	-----	
<i>C. acutatum</i> KACC40805	-----	
<i>C. coccodes</i> KACC40802	GCGTCCCAAG-----	125
<i>C. coccodes</i> KACC41949	GCGTCCCAAG-----	125
<i>C. truncatum</i> KACC42118	CCCATCTGGGCACCCCGGCTCTGTGCTGACTCCATGCCAG-----	124
<i>C. caricae</i> KACC40984	CCGCCCGGTGGAGGGCGGCGACGATGACGACGCCCAACCCATCATCAAATCACAATCC	174
<i>C. musae</i> KACC40947	CCGCCCGGTGGAGGGCGGCGACGATGACGACGCCCAACCCATCATCAAATCACAATCC	171
<i>C. lagenarium</i>	-----TCAAATCACAATCC	167
<i>C. acutatum</i> KACC40990	-----	
<i>C. acutatum</i> KACC41832	-----	
<i>C. acutatum</i> KACC40805	-----	
<i>C. coccodes</i> KACC40802	GCGTCCCAAG-----	126
<i>C. coccodes</i> KACC41949	GCGTCCCAAG-----	125
<i>C. truncatum</i> KACC42118	GCCAG-----	124
<i>C. caricae</i> KACC40984	AGCCGCCCGGTGGAGGGCGGCGACGATGACGACGCCCAACCCATCATCAAATCACAATC	171
<i>C. musae</i> KACC40947	AGCCGCCCGGTGGAGGGCGGCGACGATGACGACGCCCAACCCATCATCAAATCACAATC	165
<i>C. lagenarium</i>	-----	
<i>C. acutatum</i> KACC40990	-----	
<i>C. acutatum</i> KACC41832	-----	
<i>C. acutatum</i> KACC40805	-----	
<i>C. coccodes</i> KACC40802	-----	
<i>C. coccodes</i> KACC41949	-----	
<i>C. truncatum</i> KACC42118	-----	
<i>C. caricae</i> KACC40984	CCGCACCAG	180
<i>C. musae</i> KACC40947	CCGCACCAG	174
<i>C. lagenarium</i>	-----	

Fig. 2. Comparison of intron sequences in partial *sd* gene of *Colletotrichum* spp. Sequence of *C. lagenarium* was from GenBank (D86079).

Table 2. Nucleotide sequence identity(%) / the deduced protein sequence identity(%) of the PCR-amplified partial *sd* genes in *Colletotrichum* spp.

	KACC 40805	KACC 41949	KACC 42118	KACC 40990	KACC 40984	KACC 41832	KACC 40947	<i>C. lagenarium</i> 104-T
<i>C. coccodes</i> KACC40802	90/98	99/98	85/95	90/98	79/93	89/97	79/95	76/95
<i>C. acutatum</i> KACC40805		89/97	91/98	94/100	61/93	90/99	61/95	83/94
<i>C. coccodes</i> KACC41949			85/96	89/98	80/92	89/97	79/95	76/95
<i>C. truncatum</i> KACC42118				89/97	81/94	88/99	81/95	76/95
<i>C. acutatum</i> KACC40990					60/93	90/99	61/95	82/94
<i>C. caricae</i> KACC40984						59/92	95/96	49/94
<i>C. acutatum</i> KACC41832							64/94	82/93
<i>C. musae</i> KACC40947								50/95

	▼
<i>C. acutatum</i> KACC40990	EWADRYDSKDWDLRKCIAPELRIDYRSFLDKIWEAMPAAEFIAMISDKSVLGNPLLKTQH 61
<i>C. acutatum</i> KACC41832	EWADRYDSKDWDLRKCIAPELRIDYRSFLDKIWEAMPAAEFIAMVSDKSVLGNPLLKTQH 61
<i>C. acutatum</i> KACC40805	EWADRYDSKDWDLRKCIAPELRIDYRSFLDKIWEAMPAAEFIAMISDKSVLGNPLLKTQH 61
<i>C. coccodes</i> KACC40802	EWADRYDSKDWDLRKCIAPELRIDYRSFLDKIWEAMPAAEFIAMISDKSVLGNPLLKTQH 61
<i>C. coccodes</i> KACC41949	EWADRYDSKDWDLRKCIAPELRIDYRSFLDKIWEAMPAAEFIAMISDKSVLGNPLLKTQH 61
<i>C. truncatum</i> KACC42118	EWADSYDSKDWDLRKCIAPELRIDYRSFLDKIWEAMPAAEFIAMISDKSVLGNPLLKTQH 61
<i>C. caricae</i> KACC40984	EWADSYDSKDWDLRKCIAPELRIDYPSFLDKIWEAMPAAEFIAMISDKSVLGSPLLKTQH 61
<i>C. musae</i> KACC40947	EWADRYDSKDWDLRKCIAPELRIDYRSFLDKIWEAMPAAEFVAMISDKSVLGNPLLKTQH 61
<i>C. lagenarium</i>	EWADSYDSKDWDLRKCIAPELRIDYRSFLDKIWEAMPAAEFIAMISDKSVLGNPLLKTQH 61
	**** *:****:***** ***** *:****:*****
<i>C. acutatum</i> KACC40990	FIGGTRWEKVSETEVIGHHQLRVPHQKYTDASRKEVAVKGHAHSYNKHWHYKKVDGVWKFAG 122
<i>C. acutatum</i> KACC41832	FIGGTRWEKVSETEVIGHHQLRVPHQKYTDASRKEVAVKGHAHSYNKHWHYKKVDGVWKFAG 122
<i>C. acutatum</i> KACC40805	FIGGTRWEKVSETEVIGHHQLRVPHQKYTDASRKEVAVKGHAHSYNKHWHYKKVDGVWKFAG 122
<i>C. coccodes</i> KACC40802	FIGGTRWEKVSETEVIGHHQLRVPHQKYTDASRTEVAVKGHAHSYNKHWHYKKVNGVWKFAG 122
<i>C. coccodes</i> KACC41949	FIGGTRWEKVSETEVIGHHQLRVPHQKYTDASRTEVAVKGHAHSYNKHWHYKKVDGVWKFAG 122
<i>C. truncatum</i> KACC42118	FIGGTRYEKVSDTEVIGHHQLRVPHQKYTDASRKEVAVKGHAHSYNKHWHYKKVDGVWKFAG 122
<i>C. caricae</i> KACC40984	FIGGTRWEKVSDTEVIGHHQLRVPHQKYTDASRKTAVKGHAHSYNMHWHYKKVNGVWKFAG 122
<i>C. musae</i> KACC40947	FIGGTRWEKVSDTEVIGHHQLRVPHQKYTDASRKTAVKGHAHSYNMHWHYKKVNGVWKFAG 122
<i>C. lagenarium</i>	FIGGSRWEKVSDTEVIGHHQLRVPHQKYTDASRTEVAVKGHAHSYNMHWHYKKVNGVWKFAG 122
	**** *:****:***** ***** *:****:*****

Fig. 3. Comparison of deduced amino acid sequences of the partial *sd* gene among *Colletotrichum* strains. Amino acid residue similarity in the consensus sequence is indicated in decreasing order from identical (*) to similar (:), to less similar (.). The position of intron location is marked with an arrow head. *C. lagenarium* sequence was from GenBank (accession no: BAA13009).

결과를 *C. lagenarium*의 전체 *sd* 유전자 및 아미노산 서열을 정렬을 해 본 결과, degenerate primer를 이용하여 본 실험에서 증폭한 *sd* 유전자 부위는 *C. lagenarium*의 *sd* 유전자의 두 번째 엑손의 일부분, 두 번째 인트론 그리고 세 번째 엑손의 일부분임을 확인하였다.

Fig. 2에 나타난 인트론의 염기서열은 Fig. 3에 제시된 아미노산 서열의 23번째 순서에 있는 isoleucine 아미노산 앞의 위치에 9개의 *Colletotrichum* 아미노산서열 모두에서 존재하였다. 이는 인트론의 존재 위치가 중간 및 종내에서 상당히 일정함을 보여준다. 본 실험에서 분석된 8개 *Colletotrichum* 균주의 *sd* 유전자 엑손은 모두 122개의 아미노산을 코딩하는 것을 확인하였으며 *C. lagenarium*을 포함하여 상동성을 분석한 결과 9개의 *Colletotrichum* scytalone dehydratase 아미노산 서열은 93~100%의 높은 상동성을 가지고 있었다 (Table 2). 다중정렬서열비교를 통해 얻어진 결과를 보면 비교된 총 9개의 *Colletotrichum* *sd* 유전자의 코딩 아미노산 서열 중 5, 27, 43, 46, 54, 66, 68, 73, 95, 96, 108, 112, 115번째 아미노산에서 변이가 있었고, 다른 아미노산들은 매우 잘 보존되어 있음을 확인하였다(Fig. 3). 이 결과로 미루어 볼 때 *Colletotrichum* 균주들의 exon 부위는 비교적 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. *C. lagenarium*과 높은 상동성을 나타낸 것을 볼 때 본 연구에서 결정된 *Colletotrichum*의 아미노산 서열은 DHN 멜라닌 생합성에 관계되는 scytalone dehydratase과 같은 기능을 할 것으로 예측된다. 이에 따라 본 실험에 사용된 8가지 *Colletotrichum* 균주의 SD 유전자의 염기서열을 NCBI GenBank에 등록하였다(GenBank accession no. GQ266383~GQ266390)(Table 1).

sd 유전자의 계통도 분석

sd 유전자의 일부 서열을 기반으로 Neighbor-joining 방법에 의해 계통 분석을 수행하였다(Fig. 4). 공시된 *Colletotrichum* 균주들은 *C. lagenarium*과 가까운 유연관계를 나타냈고, 다른 속들 중에는 *M. grisea*와 비교적 가까운 유연관계를 나타냈다. 반면에 *Ophiostoma* 속은 *Colletotrichum* 속과 유연관계가 가장 먼 것으로 나타났다. *C. acutatum*의 경우 중 내에서 균주간에 유전적으로 다소 변이가 있는 것으로 나타났다. *C. acutatum* 종은 다양한 색소를 형성하는(김 등, 1999) 것으로 알려져 있는바 DHN 멜라닌 색소 합성에 관여하는 유전자의 변이가 이러한 다양한 색소를 내는 형질과 어떤 연관이 있는지에 관해서는 향후 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, scytalone dehydratase 유전자의 인트론 부위는 *Colletotrichum* 균주의 종간 혹은 종내에서 유전적 변이가 존재하고, 엑손부위의 아미노산 서열은 매우 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. 향후 transcription 과정을 비교하면서 이러한 유전적 변이가 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 RNA 수준에서와 단백질 수준에서의 연구가 필요하다. 더불어 *sd* 유전자의 인트론 부위의 다양성으로 볼 때 특정 기주식물에 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum* 균의 검출마커 유전자로 이용할 가능성을 검정할 가치가 있다고 사료된다.

적요

본 연구는 토마토를 비롯하여 여러 식물에 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum* 균류로부터 멜라닌 유전자의 다양

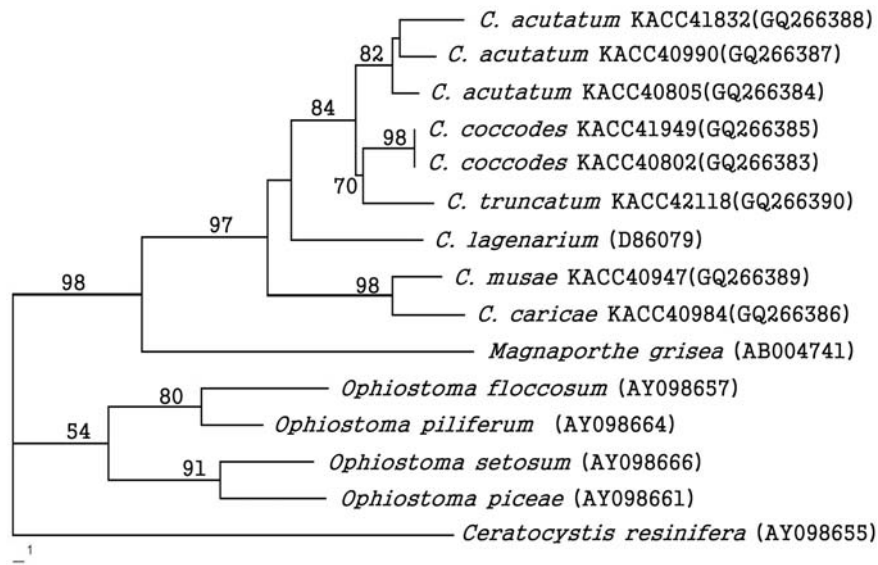


Fig. 4. Neighbor-joining phylogenetic tree of *Colletotrichum* strains based on partial nucleotide sequence of *sd* gene. The numbers above the nodes represent bootstrap values of > 50% (out of 1,000 bootstrap replication). *Ceratocystis resinifera* is used as an outgroup. A parenthesis is NCBI GenBank accession number.

성을 조사하기 위해 *C. coccodes*, *C. acutatum*, *C. truncatum*, *C. caricae*, *C. musae* 등 5종 8개 균주로부터 DHN 멜라닌 합성유전자중의 하나인 scytalone dehydratase(*sd*) 유전자의 부분 염기서열을 클로닝하여 분석하였다. 이들 균주로부터 PCR 증폭된 *sd* 유전자 amplicon의 크기는 437~545 bp로 차이를 보였다. 조사 비교된 *Colletotrichum* spp.간의 *sd* 유전자 염기서열의 상동성은 49~99%를 단백질 서열의 상동성은 50~99%를 각각 나타내었다. PCR 증폭된 *sd* 유전자는 분석된 8개 *Colletotrichum* 균주 모두에서 1개의 인트론과 122개 아미노산을 코딩하는 2개의 엑손이 존재하였다. 인트론의 크기와 염기서열은 중간에 차이가 있었다. *sd* 유전자 염기서열에 기초한 계통도분석 결과 5종의 *Colletotrichum* spp.는 유전적으로 구분 될 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Bell, A. A. and Wheeler, M. H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:411-451.
- Butler, M. J. and Day, A. W. 1998. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* 44:1115-1136.
- Howard, R. J. and Ferrai, M. A. 1989. Role of melanin in appressorium function. *Exp. Mycol.* 13:403-418.
- Kim, S. H., Uzunovic, A. and Breuil, C. 1999. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:287-290.
- Kim, W. G., Moon, Y. G., Cho, W. D. and Park, S. D. 1999. Anthracnose of safflower caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Pathol. J.* 15:62-67.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Kubo, Y., Katoh, M., Furusawa, I. and Shishiyama, J. 1986. Inhibition of melanin biosynthesis by cerulenin in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Exp. Mycol.* 10:301-306.
- Kubo, Y., Tsuda, M., Furusawa, I. and Shishiyama, J. 1989. Genetic analysis of genes involved in melanin biosynthesis of *Cochliobolus miyabeanus*. *Exp. Mycol.* 13:77-84.
- Kubo, Y., Takano, Y., Endo, N., Yasuda, N., Tajima, S. and Furusawa, I. 1996. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4340-4344.
- Perpetua, N. S., Kubo, Y., Yasuda, N., Takano, Y. and Furusawa, I. 1996. Cloning and characterization of a melanin biosynthetic *THR1* reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:323-329.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0 b10. Sinauer associates, Sunderland, MA.
- Wang, H. L., Kim S. H. and Breuil, C. 2001. A scytalone dehydratase gene from *Ophiostoma floccosum* restores the melanization and pathogenicity phenotypes of a melanin-deficient *Colletotrichum lagenarium* mutant. *Mol. Genet. Genomics.* 266:126-132.
- Woloshuk, C. P., Sisler, H. D., Tokousbalides, C. M. and Dutky, S. R. 1980. Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: Site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 14:256-264.
- Zeun, R., and Buchenauer, H. 1985. Effect of tricyclazole on production and melanin contents of sclerotia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Z.* 112:259-267.