

국내에서 분리된 *Verticillium dahliae*의 유전적 유연관계 분석

Shang Fei · 최유리 · 송정영 · 김홍기*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Genetic Relationship between Korean *Verticillium dahliae* Isolates and the Other *Verticillium* Species

Fei Shang, You Ri Choi, Jeong Young Song and Hong Gi Kim*

Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon, Korea

(Received 13, December 2010., Accepted 24, March 2011)

ABSTRACT : To provide basic information for *Verticillium* spp., molecular methods were applied to analyze genetic characteristics within *Verticillium* spp. including *Verticillium dahliae*, isolated from diseased plants in two regions of Korea. Five Korean isolates of *V. dahliae* causing Verticillium wilt on chrysanthemum were analyzed, together with six other *Verticillium* spp., using mitochondrial small subunit rRNA gene (*rns*) sequence and random-amplified polymorphic DNA (RAPD). In a phylogenetic tree based on *rns* region sequences, Korean *V. dahliae* isolates formed a single clade with foreign isolates, whereas the other *Verticillium* spp. formed separate groups. In addition to *rns* sequence analysis, a dendrogram based on RAPD fragment patterns also showed clustering of all *V. dahliae* isolates into one group, separate from the six different *Verticillium* spp., and the *V. dahliae* isolates formed three subgroups which corresponded to the regions of origin, Kumi, Busan city and Canada. This indicates that high genetic variation exists between regions, although the fungus was isolated from the same host plant, chrysanthemum. These results provide the foundation for the study of genetic diversity and relationships among *V. dahliae* isolates in Korea.

KEYWORDS : Genetic relationship, Mitochondrial small subunit rRNA gene (*rns*), Phylogeny analysis, RAPD, *Verticillium dahliae*

서 론

토양전염성 병원균인 *Verticillium dahliae*에 의해 발생하는 반쪽시들음병은 전 세계적으로 각종 작물재배포장에서 발견된다. 1879년 독일에서 감자의 반쪽시들음병이 최초로 보고된 이후(Sherf and MacNab, 1986) 미국의 Mississippi, Arkansas, Texas, New Mexico, California등 에서 반쪽시들음병의 심각성과 원인에 대하여 자세한 연구가 보고되었다(Bell, 1992). *Verticillium dahliae*의 기주는 가지와 감자를 포함하는 가지과작물, 사과와 딸기를 포함하는 장미과식물(Gordon *et al.*, 2006), 오이와 수박을 포함하는 박과작물을 비롯하여 해바라기, 고구마 등 약 660 종에 이르기까지 매우 다양하다. 또한 United State, Brazil, Argentina, Venezuela, Mexico, Uganda, Congo, Tunisia, Algeria, Tanzania, Greece, Spain, Russia, China 등 세계적으로 지역을 가리지 않고 여러 국가에 걸쳐 발생하고 있다.

한국에서는 1995년부터 토마토, 가지, 메론, 국화 등에 이

병이 보고되었으며, 2003~2005년 사이에 국화재배에 기호성이 높은 외래품종을 도입하면서 구미와 부산에서 *V. dahliae*가 분리되었다(Han *et al.*, 2007). *V. dahliae*에 의한 반쪽시들음병은 한국에서 피해가 계속 증가하고 있는 반면에 *V. dahliae*를 포함한 *Verticillium*속 균의 특성에 대한 연구는 아직도 많이 부족한 실정이다.

Nazar 등(1991)은 *Verticillium*속 내에서 ribosomal DNA의 ITS 영역을 비교하였으며, William 등(1990)에 의하여 개발된 RAPD 방법은 *V. dahliae*의 유연관계분석에 널리 사용되고 있다. Okoli 등(1994)은 RFLP 방법을 이용하여 *V. albo-atrum*과 *V. dahliae*로부터 독특한 병원성의 차이를 분석하여 보고하였다. 또한 Carder와 Barbara는 일본과 북아메리카로부터 분리된 균들을 대상으로 RFLP를 통하여 다양한 밴드패턴을 보이기도 했다(1994).

본 연구에서는 한국에 존재하는 *V. dahliae*와 국내외의 몇 가지 *Verticillium*속 균을 대상으로 mitochondrial small subunit rRNA gene (*rns*)영역 염기서열 분석과 RAPD분석을 같이 수행함으로써 한국의 *V. dahliae* 균주와 다른 *Verticillium* 종과의 유전적 다양성과 유연관계를 분석하였다.

*Corresponding author <E-mail : hgkim@cnu.ac.kr>

재료 및 방법

1. 공시균주

*Verticillium dahliae*를 포함한 8개 *Verticillium*속 균을 농촌진흥청, 농업유전자원센터(KACC), 미생물자원센터(KCTC), 한국미생물보존센터(KCCM), 강릉원주대학교(KWNU)로부터 분양을 받았으며(Table 1) 각 균주들은 PDA(potato dextrose agar)배지에서 25°C 조건으로 배양되어 4°C에 저장하며 실험에 사용하였다.

Table 1. Isolates of *Verticillium dahliae* and other species used in this study

No. of Isolate	Species	Origin	Year
V03-029	<i>Verticillium dahliae</i>	Kumi, Gyungbuk	2005
V05-105	<i>V. dahliae</i>	Kumi, Gyungbuk	2005
V05-001	<i>V. dahliae</i>	Kumi, Gyungbuk	2005
V07-087	<i>V. dahliae</i>	Busan City	2005
V07-088	<i>V. dahliae</i>	Busan City	2005
VC	<i>V. chlamydosporium</i>	Jinju(KACC ^a 40859)	1999
VAA	<i>V. albo-atrum</i>	England(KCTC ^b 6055)	2004
VDE	<i>V. dahliae</i>	Canada(KCTC6561)	2003
VT	<i>V. theobromae</i>	KCTC(16926)	2000
VAN	<i>V. araneum</i>	Begoro(KCTC16996)	2001
VB	<i>V. balanoides</i>	KCTC(16997)	2001
VL	<i>V. lecanii</i>	KCCM ^c (11850)	2007
VT-15	<i>V. albo-atrum</i>	KWNU ^d	2003
Vte-5	<i>V. theobromae</i>	KWNU	2003

^aKACC; Korean Agricultural Culture Collection.

^bKCTC; Korean Collection for Type Cultures.

^cKCCM; Korean Culture Center of Microorganism.

^dKWNU; Department of Applied Plant Science, Kangnung Wonju National University

2. Genomic DNA 분리

각 균주의 균사조각을 potato dextrose broth(PDB)에 접종하고 25°C에서 130 rpm으로 진탕배양(Jeio Tech SI-900R, Korea)하였다. 배양한 균사는 2겹의 거즈로 걸러 수거하고 동결건조하여 약 30~50 ng씩 1.5 ml tube에 담았다. Glass bead와 함께 균사체를 충분히 마쇄하고 extraction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 2×CTAB solution[2% CTAB(w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (Polyvinylpyrrolidone)]을 각각 300 µl씩 첨가하여 20분간 강하게 vortexing 하였다. 이를 600 µl의 Chloroform : Isoamylalcohol(24 : 1)로 처리한 후 13,000 rpm, 4°C조건으로 20분간 원심분리하여 약 400 µl의 상층액을 새 tube에 옮겨 담아 100% ethanol로 세척하고 다시 원심분리하여 ethanol을 제거하였다. Ethanol을 완전히 건조시킨 후에 50 µl의 멸균수를 첨가하여 DNA pellet을 녹여 다시 G-spin Kit을 처리하였다. 추출된 DNA는 1% agarose gel에 농도마커와 함께 전기영동하여 확인 및 정량화하였다.

3. 분자생물학적 기법을 이용한 유전적 다양성

Mitochondrial small sub-unit rRNA gene (*rns*) 염기서열분석

*Verticillium*속 내 균들의 유연관계분석연구에 일반적으로 사용되는 mitochondrial small sub-unit rRNA gene (*rns*) (Fahleson, 2004)을 증폭하여 실험에 사용된 *Verticillium dahliae*의 염기서열을 Genbank에서 등록된 국외 *V. dahliae* 균주들의 *rns*영역 염기서열과 비교하였다. 증폭은 DNA 50 ng, 10 mM dNTP mix 1 µl, Taq DNA polymerase 2 unit, 10×PCR buffer 5 µl에 각 primer 200 ng씩 첨가하여 total reaction volume 50 µl로 맞추어 이루어졌다. *rns*영역 증폭 primer의 염기서열과 증폭조건은 다음과 같다(Table 2, 3).

RAPD 분석

*Verticillium*속 내 병원균간의 유연관계를 알아보기 위하여

Table 2. Sequence of mitochondrial gene *rns* primers used for PCR amplification of *V. dahliae*

Primer	Nucleotide sequence(5'-3')	Size of PCR product	Reference
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	586bp	White <i>et al.</i> (1990)
MS2	GCGGATTATCGAATTAAATAAC		

Table 3. Condition of PCR using MS primer and random primers for RAPD analysis of this study

Primer	Initial denaturation	Step cycle				Final Extension
		Denature	Annealing	Extension	cycles	
MS primer	94/7min	94/1min	48/1min	72/3min	35	72/10min
OPA set	94/5min	94/1min	35/1min	72/1min	40	72/5min
URP set	94/4min	94/1min	35/1min	72/2min	35	72/7min

4개의 OPA primer와 6개의 URP primer를 선발하여 실험에 사용하였다. OPA primer는 genotech 사에 의뢰하여 제작하여 사용하였고, URP primer는 Seoulin Scientific Co. Ltd. 것을 실험에 사용하였다. PCR 증폭은 균사 DNA 30 ng, Taq DNA polymerase 0.5 units, 10×PCR buffer 3 µl, 10 mM dNTP mix 0.6 µl, 각 primer 100ng을 첨가하여 total reaction volume을 30 µl로 맞추어 수행하였다. 각 primer의 증폭조건은 Table 3과 같다. PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 polymorphism을 관찰하였다.

유연관계 분석

RAPD에 의하여 얻어진 DNA polymorphism은 밴드의 유무에 따라 1과 0으로 기입하고 NTSYS(Numerical Taxonomy System Using Multivariate Statistical Programs)를 사용하여 유사도를 구하였고, 이를 기초로 UPGMA(unweighted method with arithmetic means)을 이용하여 dendrogram으로 도식화하여 유연관계를 분석하였다.

$$\text{Similarity coefficients} = 2n_{xy}/(n_x + n_y).$$

n_x, n_y : Number of fragment in each strain.

N_{xy} : Number of fragments shared by the compared strains.

결과 및 고찰

염기서열분석

*Verticillium*속 균의 유연관계분석용 primer인 MS1/MS2를 사용하여 증폭된 *V. dahliae*의 *rns*영역 염기서열을 Genbank에서 제공하는 국외 균주들의 염기서열과 비교분석하였다. 실험에 사용한 5개의 국내 균주와 국외 1개 균주를 포함한 모든 8개의 *V. dahliae*균주들은 완벽하게 동일한 그룹으로 구분되었다. 다른 *Verticillium* spp.는 *Verticillium dahliae*와 분리되어 각각 그룹을 형성하여 종간의 유전적 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

RAPD 밴드양상

*rns*영역 염기서열분석을 통해 하나의 동일한 그룹으로 묶인 *V. dahliae*를 비롯한 *Verticillium*속 균의 유연관계를 더 자세히 확인하기 위하여 14개 *Verticillium*속 균을 10개의 primer를 사용하여 유전적 다양성을 비교하였다. 이들은 RAPD 분석하였을 때 *Verticillium*속 내에서 매우 다양한 밴드패턴을 나타냈다(Fig. 2). 같은 *V. dahliae*에서는 대체적으로 유사한 밴드패턴을 나타내었지만 분석에 사용된 primer에 따라서 약간의 패턴차이가 있었다. 특히 OPA10 primer를 사용하여 증폭한 경우(Fig. 2B) 국내 균주(lane 1~5)와 국외 균주

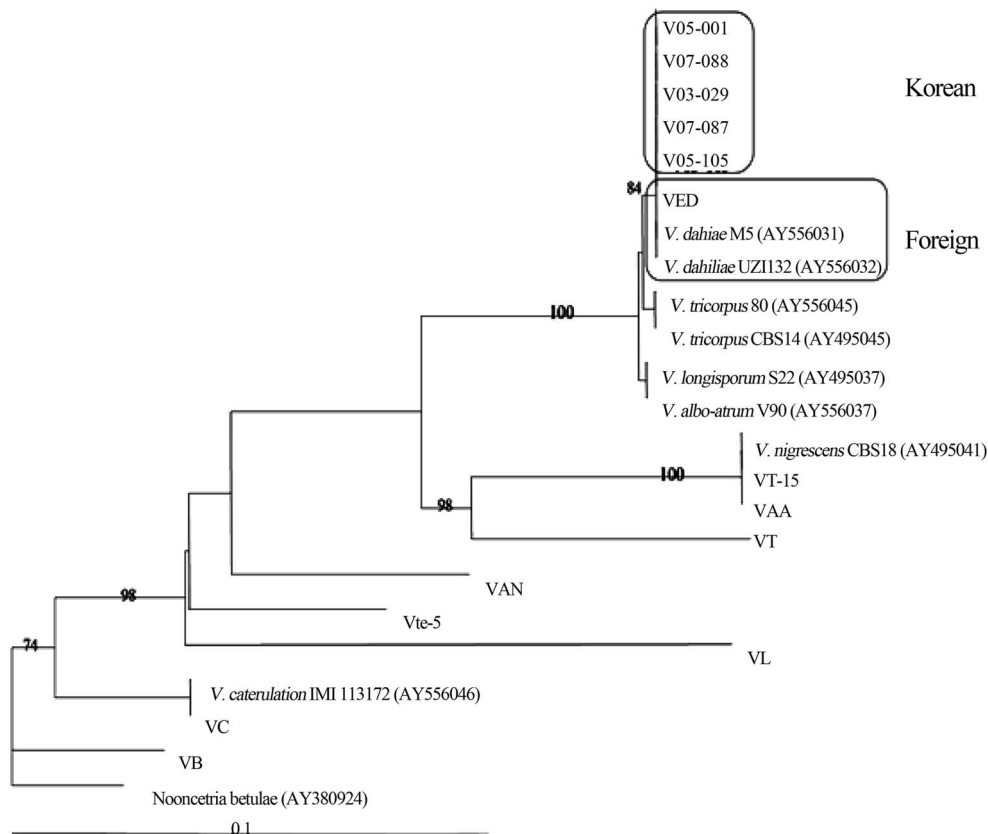


Fig. 1. Neighbor-joining tree based on the sequence of mitochondrial *rns* gene from *V. dahliae* and the relative species of *Verticillium*. The sequences of *Verticillium* species showing accession number were referred from GenBank.

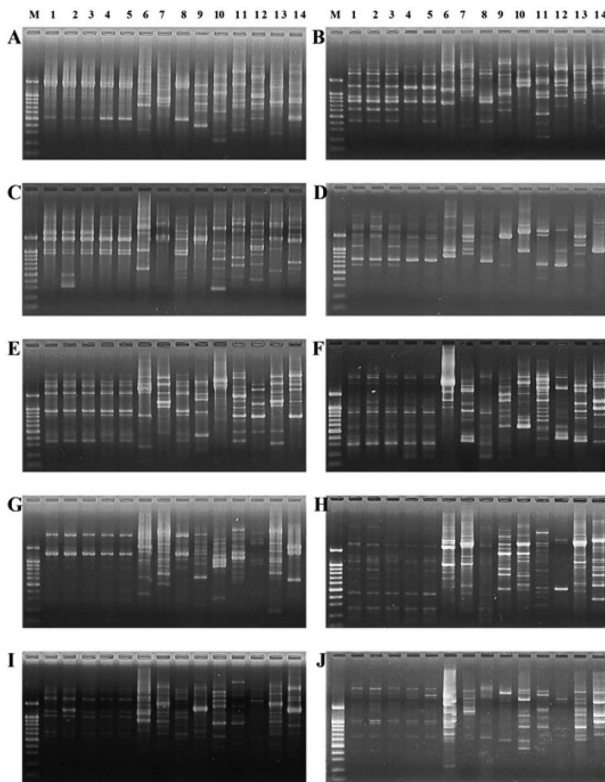


Fig. 2. DNA polymorphisms of *Verticillium* spp. isolates amplified by primer OPA2(A), OPA10(B), OPA11(C), OPA14(D), URP1(E), URP2(F), URP4(G), URP8(H), URP10(I) and URP11(J). Selected principal molecular weight markers(M) are indicated on the left. Lane 1-5, *V. dahliae*; lane 6, VC; lane 7, VAA; lane 8, VDE; lane 9, VT; lane 10, VAN; lane 11, VB; lane 12, VL; lane 13, VT-15; lane 14, Vte-5.

(lane 8)사이에서 밴드 구성의 차이가 보이며, Fig. 2의 C나 D의 경우에는 국내 균주들 사이에서도 차이를 확인할 수 있었다. 이에 따라 국내 균주사이에 유전적으로 다양성이 존재하는 것으로 판단된다.

RAPD에 의한 유연관계분석

RAPD 분석결과를 토대로 UPGMA 분석을 통해 균주들 간의 유전적 유연관계를 분석하였다(Fig. 3). *V. dahliae* 6개 균주는 RAPD 분석에 사용된 다른 *Verticillium*속 14개 균주와 분리되어 별도의 그룹을 형성하였다. 그러나 같은 *V. dahliae* 그룹 내에서도 국외 *V. dahliae*와 달리 국내 *V. dahliae*간에 유연관계가 더 가깝게 나타났으며 국내 균주들 사이에서도 V03-029와 V05-105, V07-087과 V07-088은 유전적 연관성이 높았다. 이 작은 소그룹들은 각각 구미와 부산에서 분리된 균들로서 지역적인 차이에 의하여 유전적 다양성이 존재함을 나타내는 것으로 보인다.

또한 국화와 작물에서 분리한 동일한 종인 *V. dahliae*의 균주간에 존재하는 유전적 변이양상은 *V. dahliae*가 유전적인 변이가 심하며 이는 국내에 다양한 유전형이 존재한다는 것을 의미한다.

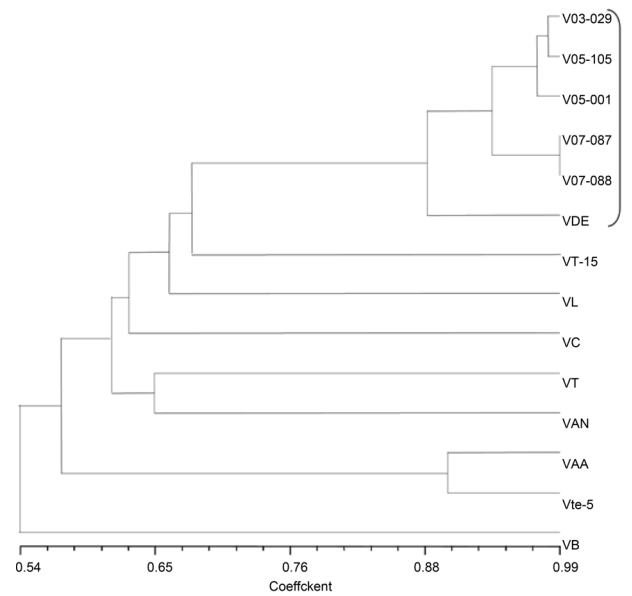


Fig. 3. Dendrogram showing genetic relationships between *Verticillium dahliae* and *Verticillium* spp. by RAPD using four OPA primer sets and six URP primer sets based on UPGMA program.

RAPD를 사용하여 일본에서 서로 다른 기주로부터 분리한 *V. dahliae*와 *V. albo-atrum*종간의 유전적 다양성을 보였던 Koike(1995)의 연구와 유사하게 본 연구는 RAPD 분석을 통해 *Verticillium* spp. 와 *V. dahliae*간의 유전적 차이와 *V. dahliae* 균주간 유전적 다양성을 확인함으로써 아직 연구가 부족한 국내 *V. dahliae*에 대한 기초적인 정보를 제공하게 될 것이다.

적 요

국내 *Verticillium dahliae* 균주를 공시하여 다른 *Verticillium* 종과의 유전적 차이와 다양성을 밝히고자 국내 두 지역으로부터 분리한 *V. dahliae*를 포함한 7종의 *Verticillium*속 14균주를 대상으로 mitochondrial small subunit rRNA gene (*rns*) 영역 염기서열 분석과 random-amplified polymorphic DNA (RAPD)를 실시하였다. *rns* 영역 염기서열의 분석에서 국내 분리균인 5개의 *V. dahliae*균주는 *Verticillium*속 내 다른 종들과 달리 하나의 그룹을 형성하였고, 외국 균주들과도 동일한 그룹을 이루었다. *rns* 영역 염기서열 분석뿐만 아니라 RAPD 분석에서도 *Verticillium*속의 다른 종들과 구별되어 *V. dahliae*가 한 그룹을 형성하였으나 *V. dahliae* 균주간에 형성된 세 개의 소그룹을 통하여 동일한 국화와 작물로부터 분리한 *V. dahliae* 간에 분리된 지역에 따라 유전적 다양성이 존재함을 확인하였다. 이러한 결과는 국내 *V. dahliae*의 유전적 다양성연구와 유연관계분석에 기초적인 자료로 사용될 것이다.

감사의 글

유용한 공시균주를 분양해 준 국립농업과학원 농업유전 자원센터와 강릉원주대학교 김병섭 교수님께 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Bell, A. A. 1992. Verticillium wilt, In: Hillocks R. J. ed. Cotten Diseases: 87-123, Wallingford, UK: CAB International.
- Carder, J. H. and Barbara, D. J. 1994. Molecular variation within some Japanese isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol.* 43:947-950.
- Fahleson, J., Hu, Q. and Dixelius C. 2004. Phylogenetic analysis of *Verticillium* species based on nuclear and mitochondrial sequences. *Arch. Microbiol.* 181:435-442.
- Gordon, T. R., Kirkpatrick, S. C., Hansen, J. and Shaw, D. V. 2006. Response of strawberry genotypes to inoculation with isolates of *Verticillium dahliae* differing in host origin. *Plant Pathol.* 55:766-769.
- Han, K. S., Park, J. H., Cheong, S. R. 2007. Occurrence and pathogenicity of Verticillium wilt on chrysanthemum caused by *Verticillium dahliae*. *Research in Plant Disease* 13:15-19.
- Horse, R. K. and Nelson, P. E. 1996. Compendium of Chrysanthemum disease, *American Phytopathol. Soc. Press.* pp. 81.
- Mona, A., Raja, K. and Bruce, R. L. 1999. Identification of molecular markers linked with Verticillium wilt resistance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Plant & Animal Genome VII Conference, Town & Country Hotel, San Diego, CA, January pp.17-21.
- Nazar, R., N. Hu, X., Schmidt, J., Culham, D. and Robb, J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of Verticillium wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathol.* 39:1-11.
- Okoli, C. A. N., Carder, J. H. and Barbara, D. J. 1994. Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and the relationships of some host adapted isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol.* 43:33-40.
- Sherf, A. F and MacNab, A. A. 1986. Vegetable disease and their control. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp.736.
- Williams, J. G., Kubelik, 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.