

배검은별무늬병균의 Scytalone Dehydratase 멜라닌유전자의 상동성

윤여홍 · 윤성권 · 손승렬 · 김성환*

단국대학교 미생물학과

Homology of Scytalone Dehydratase Melanin Gene in *Venturia nashicola*

Yeo Hong Yun, Seong Kwon Yoon, Seung Yeol Son and Seong Hwan Kim*

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

ABSTRACT : Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin is known to be present in some ascomycete fungi. To verify the type of melanin in *Venturia nashicola* that cause scab on pear, we investigated scytalone dehydratase (SD) gene, one of DHN melanin genes, from 11 isolates of *V. nashicola* from different provinces in Korea and Japan. Through PCR approach, 429 bp amplicon was produced from the 11 isolates and sequenced. All of the PCR-amplified sequences were determined as SD gene through GenBank database search. All the determined sequences were composed of an intron and two exons coding for 122 amino acids of SD. The homology of SD gene was 100% among the 11 isolates. Sequence identity of the predicted SD protein of 122 amino acids ranged 69 to 73% with other fungi. Our results proved that *V. nashicola* operates DHN melanin pathway.

KEYWORDS : DHN melanin, Pear scab, Scytalone dehydratase gene, *Venturia nashicola*

배는 유럽계 서양배 (*Pyrus communis* L.)와 중국배 (*Pyrus ussuriensis* M.) 그리고 일본배 (*Pyrus pyrifolia* N.)가 있으며 한국에서는 일본배가 주로 재배되고 있다. 배검은별무늬병 (pear scab)은 자낭균류에 속하는 *Venturia nashicola* Tanaka & Yamamoto에 의해 발생하며 서늘한 봄과 가을에 잎자루와 과실표면에 주로 발생한다. 검은별무늬병의 방제는 대부분 침투성 살균제인 ergosterol biosynthesis inhibitor (EBI)를 사용하고 있다. EBI에 대한 균류의 저항성 발현은

용이하지 않은 것으로 알려져 있으나 (Barug and Kerkenar, 1984), *Venturia inaequalis* (Thind *et al.*, 1986; Köller *et al.*, 1997)에서 저항성 균이 보고되었다. *V. nashicola* 균의 경우 EBI 계열인 hexaconazole과 flusilazole에 저항성을 보이는 균이 울산에서 분리되었다 (Kwon *et al.*, 2010). 이에 따라 배검은별무늬병균에 대한 새로운 항진균제의 필요성이 증대되고 있다.

멜라닌(melanin)은 페놀 화합물의 산화성 중합화(oxidative polymerization) 과정을 통해 생합성되는 고분자 화합물이며 그 특징은 생물체의 조직에서 짙은 갈색 또는 검은 색의 색소 침착을 나타낸다 (Bell and Wheeler, 1986). 멜라닌 생합성은 식물, 동물, 균류, 세균에서 보고되었다. 특히 균류에서는 세포벽의 electron-dense outer layer나 세포외 중합체에서 발견된다 (Bell and Wheeler, 1986; Caesar-TonThat *et al.*, 1995). 균류의 멜라닌 중합체 합성과정은 티로신(tyrosine)을 전구체(precursor)로 이용하여 생성되는 페놀성 화합물인 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) 경로를 통한 멜라닌 합성경로와 Malonyl Co-A부터 시작되는 DHN (dihydroxynaphthalene) 멜라닌 생합성 경로가 가장 잘 알려져 있다 (Bell and Wheeler, 1986). DHN 멜라닌 생합성은 주로 자낭균류와 불완전균류에서 보고되어 왔는데 그

Kor. J. Mycol. 2013 September, 41(3): 200-204
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.3.200
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

***Corresponding author**

E-mail: piceae@dankook.ac.kr

Received September 15, 2013

Revised September 26, 2013

Accepted September 26, 2013

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

과정은 pentaketide 합성과 함께 시작되며 중간 산물로서 scytalone이 생성된다. 그 다음 scytalone은 1,3,8-trihydroxy-naphthalene(1,3,8-THN)로 탈수되고, vermeline으로 환원된 후 다시 탈수되어 1,8-DHN으로 전환되어 최종산물인 멜라닌을 생성한다(Kubo *et al.*, 1996; Henson *et al.*, 1999). 균류에 있어 멜라닌은 자외선과 건조 등의 외부 환경으로부터 보호함으로써 극한환경에 생존할 수 있는 능력을 높여준다. 식물병원성균류에 있어서 DHN 멜라닌에 관한 연구는 오이 탄저병균(*Colletotrichum lagenarium*) 및 벼 도열병균(*Magnaporthe grisea*)에서 수행된 바 있다. 이들 식물병원균류가 기주식물의 표피세포를 침입하기 위해서는 부착기의 멜라닌화가 필요한 것으로 보고되었다(Howard and Ferrai, 1989; Perpetua *et al.*, 1996). 이러한 연구성과를 통해 이들 병원균의 방제를 위해 멜라닌 합성의 중간 단계를 저해하는 tricyclazole과 pyrouilon이 개발되었다(Butler and Day, 1998; Woloshuk *et al.*, 1980; Zeun and Buchenauer, 1985). 이 물질들은 사과와 배 검은별무늬병의 방제에도 사용되어 오고 있다. 그러나 배검은별무늬병균이 생성하는 멜라닌이 실제 DHN 멜라닌 생합성 경로로 만들어지는지에 대한 정보는 아직 없는 실정이다.

본 연구에서는 배검은별무늬병균이 DHN 멜라닌 합성경로로 멜라닌을 합성하는 시스템을 가지고 있는지 알아보고자 한국의 여러 지역 분리된 *V. nashicola* 균주를 대상으로 DHN 멜라닌 합성경로의 중간산물 중 하나인 scytalone을 1,3,8-THN으로 전환시키는 과정에 작용하는 scytalone dehydratase(SD) 유전자의 존재를 파악하고 지역별 균주 간에 유전적 다양성이 존재하는지 비교하여 조사하였다.

본 연구에 사용된 11개의 *V. nashicola* 균주는 국내 여러 지역에서 분리된 9개 균주와 일본에서 분리된 2개 균주였다(Table 1). 이들 균주들을 PDA(BD Science, USA) 배지에 접종한 후 20°C 암 조건에서 30일 동안 배양하여 실험에 사용하였다(Fig. 1). Genomic DNA 추출은 스탠레스 드릴 비트(drill bit)를 이용하여 추출하였다(Kim *et al.*, 1999). PCR 반응은 Gene Amp-950 cycler(ABI, USA)를 이용하여 수행하였다. SD 유전자의 증폭은 degenerate primer인 SD1(GA(AG)TGGGCIGA(CT)(AT)(CG)ITA(CT)GA) 과 SD2(CCIGC(AG)AA(CT)TTCCAIAICCC)를 이용하였다(Wang *et al.*, 2001). PCR 반응조건은 94에서 3분간 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 gel 상에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 확인하였으며 크기는 100 bp DNA ladder marker (Promega, USA)와의 비교를 통해 확인하였다. 확인된 PCR 산물은 High pure PCR purification kit(Roche, Germany)을 이용하여 정제하였다. 정제된 산물은 MacroGen사(Seoul, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열은

Chromas v2.31을 이용하여 편집하였다. 분석된 유전자의 염기서열은 Expasy의 translate tool(<http://www.expasy.ch/>)을 이용하여 오이탄저병균 *Colletotrichum lagenarium*이 지니고 있는 SD 유전자의 아미노산 서열(GenBank accession number, BAA13009)과 비교 분석하였다. 비교를 위한 다중 염기서열 정렬은 ClustalW 2 프로그램을 이용하여 수행하였으며 기존에 보고된 다른 균류의 SD 유전자 염기서열은 GenBank 데이터베이스(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)로부터 다운받아 사용하였다. 계통도 분석은 PAUP 4.010b를 이용하여 Kimura-2 parameter를 사용하여 Neighbor-Joining 방법(Kimura, 1980)으로 수행하였고, 계통도 내 분지의 신뢰도(bootstrap 값)를 조사하기 위해서는 1,000번의 bootstrap resampling 분석을 실시하였다(Swofford, 2002). Out group으로는 *Penicillium marneffeii*의 SD 유전자 염기서열을 사용하였다.

본 실험에 사용된 *V. nashicola* 균은 모두 인공배지에서 균사 생장이 매우 느리며, Fig. 1에 보이는 것처럼 균층은 검은색을 띠며 자랐다. 이 균은 자낭균으로 알려져 있는 바 DHN 멜라닌 합성경로가 있을 것으로 예상하여 국내에서 분리한 9개 균주와 일본에서 분리된 2개 균주의 genomic DNA를 추출하여 SD 유전자증폭을 시도하였다. Degenerate primer인 SD1과 SD2로 증폭한 PCR 산물을 전기영동으로 확인한 결과, 기대하였던 약 450 bp의 밴드를 확인하였다. PCR 산물을 정제하여 염기서열 분석 결과 최종 429 bp로 확인되었다. 이러한 결과는 일본에서 분리된 균과 국내 9개 지역에서 분리된 균주들 간에 동일하였다. 분석된 염기서열을 GenBank에 탐색하여 비교한 결과 11개 모두 곰팡이의 SD유전자로 판명되었다. 11개 염기서열을 다중 정렬분석 한 결과 모두 동일한 염기서열을 가지고 있었다. 이에 따라 배검은별무늬병균의 SD 유전자는 국내지역에 관계없이 동일하며 한국과 일본 균주 간에도 매우 잘 보존되어 있는 유전자임을 확인하였다. 분석된 염기서열에서 인트론과 엑손을 조사한 결과 122개의 아미노산을 코딩할 수 있는 366 bp 크기의 엑손에는 63 bp 크기의 인트론이 삽입되어 있는 것으로 나타났다. 이러한 특징 또한 국내와 일본에서 분리된 균주 모두가 동일하게 나타났다.

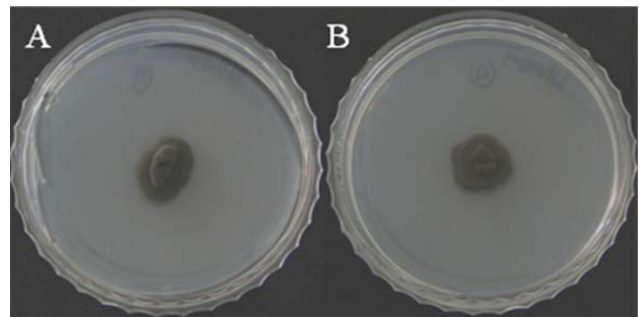


Fig. 1. Colony morphology of *Venturia nashicola* grown at 20°C for 30 days on PDA. A: KGB-1 isolate, B: NYP-1 isolate.

*C. lagenarium*의 SD 유전자는 2개의 인트론과 3개의 엑손으로 이루어졌으며, 188 개의 아미노산으로 이루어져있다(Kubo *et al.*, 1996). 이를 바탕으로 비교하였을 때 본 실험에서 얻어진 *V. nashicola* SD 염기서열은 *C. lagenarium*의 SD 유전자의 두 번째 엑손의 일부분과, 두 번째 인트론 그리고 세 번째 엑손의 일부분임을 확인하였다. *V. nashicola*와 다른 곰팡이의 SD 유전자 간의 상동성을 pair-wise 방법으로 분석한 결과, *C. lagenarium*와 67%, *M. oryzae*와 65%, *O. floccosum*와 64%로 나타났다. 염기서열을 아미노산 서열로 전환하여 유사성을 분석한 결과, 오이탄저병균 *C. lagenarium*이 73%로 가장 높았고, 그 다음은 벼도열병균 *M. oryzae*이 70%, 목재변색균 *O. floccosum*이 69%로서

높은 수준이었다. 인트론의 염기서열은 Fig. 2에 제시된 아미노산 서열의 23번째 순서에 있는 isoleucine 아미노산 앞의 위치에 존재하였다. 이는 인트론의 존재 위치가 종간 및 종 내에서 상당히 일정함을 보여준다. DHN 멜라닌 생합성 연구가 잘 이루어진 이들 3개 자낭균과 높은 상동성을 나타낸 것을 볼 때 본 연구에서 결정된 *V. nashicola*의 아미노산 서열은 DHN 멜라닌 생합성에 관계되는 scytalone dehydratase와 같은 기능을 할 것으로 예측된다. SD 유전자의 뉴클레오티드 일부 서열을 기반으로 neighbor-joining 방법에 의해 계통 분석을 수행하였다(Fig. 3). *V. nashicola* 균주들은 *C. lagenarium*과 가까운 유연관계를 나타냈고, 다른 속들 중에는 *M. grisea*와 비교적 가까운 유연관계를 나타낸

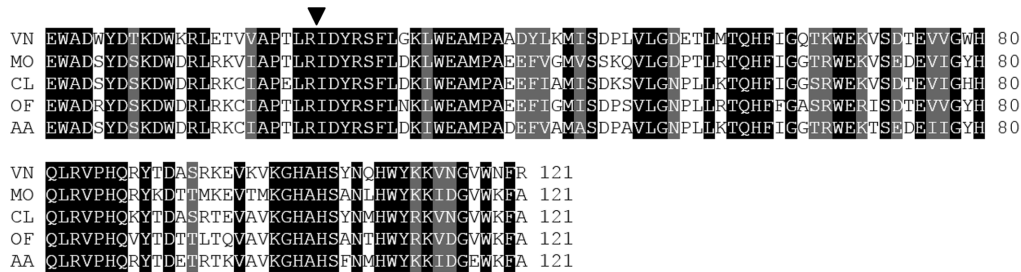


Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of scytalone dehydratase between *Venturia nashicola* and other species. Perfectly conserved positions are labeled with black color, whereas grey color mark less conserved amino acid positions. MO: *Magnaporthe oryzae*, CL: *Colletotrichum lagenarium*, OF: *Ophiostoma floccosum*, AA: *Alternaria alternata*. The position of intron location is marked with an arrow head.

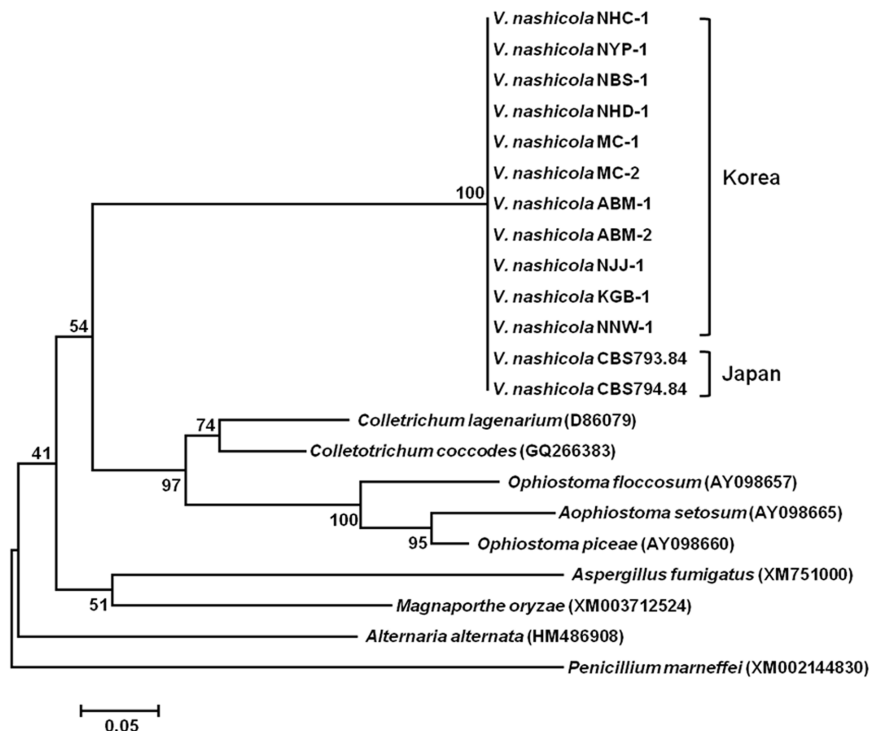


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree of *Venturia nashicola* based on partial nucleotide sequence of scytalone dehydratase gene. The number above the nodes represent bootstrap values of > 50%. *P. marneffei* was used as an outgroup. A parenthesis is NCBI GenBank accession numbers.

Table 1. *V. nashicola* isolates used for this study

Number	Isolate	Host	Location (year of collection)	PCR amplicon size (bp)	Exon size (n.t/aa)	Intron size	GenBank accession no.
1	NHC-1	Japanese pear	Hongcheon, Korea (2011)	429	366/122	63 bp	KF661519
2	NBS-1	Japanese pear	Boseong, Korea (2011)	429	366/122	63 bp	KF661520
3	NHD-1	Japanese pear	Hadong, Korea (2011)	429	366/122	63 bp	KF661521
4	ABM-1	Japanese pear	Ulsan, Korea (2008)	429	366/122	63 bp	KF661522
5	ABM-2	Japanese pear	Ulsan, Korea (2008)	429	366/122	63 bp	KF661523
6	NJJ-1	Japanese pear	Jinju, Korea (2011)	429	366/122	63 bp	KF661524
7	KGB-1	Japanese pear	Naju, Korea (2010)	429	366/122	63 bp	KF661525
8	NNW-1	Japanese pear	Namwon, Korea (2011)	429	366/122	63 bp	KF661526
9	NYP-1	Japanese pear	Yangpyeong, Korea (2011)	429	366/122	63 bp	KF661527
10	MC-1	Japanese pear	Mokcheon, Korea (2013)	429	366/122	63 bp	KF661528
11	MC-2	Japanese pear	Mokcheon, Korea (2013)	429	366/122	63 bp	KF661529
12	CBS793.84	Japanese pear	Tsukuba, Japan (1984)	429	366/122	63 bp	KF661530
13	CBS794.84	Japanese pear	Tsukuba, Japan (1984)	429	366/122	63 bp	KF661531

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Table 2. Nucleotide sequence identities (%) / the deduced protein sequence identities (%) of the partial *sd* genes

	<i>C. lagenarium</i>	<i>M. oryzae</i>	<i>O. floccosum</i>
<i>Venturia nashicola</i>	67/73	65/70	64/69
<i>Colletotrichum lagenarium</i>		73/77	77/83
<i>Magnaporthe oryzae</i>			67/77

반면에 *Penicillium* 속과는 유연관계가 가장 먼 것으로 나타났다. 이에 따라 본 실험에서 11개의 *V. nashicola* 균으로부터 얻어진 염기서열을 NCBI GenBank에 SD 유전자 염기서열로 등록하였다(Table 1).

결론으로서 본 연구는 배검은별무늬병균 *V. nashicola* 균에서 DHN 멜라닌 생합성에 관여하는 SD 유전자가 있음을 확인하였다. *V. nashicola* 균주의 scytalone dehydratase 유전자의 인트론 부위는 지역간 유전적 변이가 존재하지 않았고, 엑손 부위의 아미노산 서열도 매우 보존적임을 확인할 수 있었다. 이는 국내의 여러 배 재배지역과 일본 지역에서 발생한 배검은별무늬병균 *V. nashicola* 에 있어서 SD 유전자는 매우 높은 상동성을 지니고 있음을 시사한다. DHN 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자는 여러 가지가 있는 바 유전자간에 상동성이 SD 유전자에만 국한하는지 아니면 다른 멜라닌 유전자에도 존재하는지에 대해서는 좀 더 조사가 수행되어야 할 것이다. 그리고 배검은별무늬병 방제에 멜라닌 합성을 억제하는 약제를 적용할 수 있을 것으로 기대되는바 향후 약제방제 및 약제저항성과 관련하여 멜라닌 생합성 단계에 대해 확대된 연구가 필요하다고 사료된다.

적 요

일부 자낭균류는 Dihydroxynaphthalene(DHN) 멜라닌을 가지고 있다. 본 연구는 배에 검은별무늬병을 일으키는 *V. nashicola* 균이 어떠한 형태의 멜라닌을 가지고 있는지 확인하고자 DHN 멜라닌 합성유전자중의 하나인 scytalone dehydratase(SD) 유전자의 부분 염기서열을 국내 여러 지역과 일본에서 분리된 11개 균주로부터 분석하였다. PCR 방법을 사용하여 429 bp 크기의 반응산물을 11개 균주 모두로부터 증폭하였고 염기서열을 분석하였다. 증폭된 PCR 산물은 GenBank database에 비교 탐색한 결과 SD 유전자로 판정되었다. 분석된 11개 균주의 SD 유전자에는 모두 1개의 인트론과 122개 아미노산을 코딩하는 2개의 엑손이 존재하였다. 이들 11개 SD 유전자 간에 염기서열은 100% 상동성을 보였다. 결정된 *V. nashicola* SD 유전자의 아미노산 서열의 유사도는 다른 곰팡이와 비교할 때 69~73%로 수준이었다. 본 연구 결과는 *V. nashicola* 균이 DHN 멜라닌 생합성 단계를 운영하고 있음을 입증하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 지역전략작목산학연협력사업(PJ007883042013)과 국립생물자원관의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

Barug, D. and Kerkenaar, A. 1984. Resistance in mutagen induced mutants of *Ustilago maydis* to fungicides which inhibit ergo-

- sterol biosynthesis. *Pestic. Sci.* 15:78-84.
- 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.
- Caesar-TonThat, T. C., Kloeke, E. V., Geesey, G. G. and Henson, J. M. 1995. Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1968-1975.
- Henson, J. M., Butler, M. J. and Day, A. W. 1999. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 37:447-471.
- 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.
- 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.
- Köller, W., Wilcox, W. F., Barnard, J., Jones, A. L. and Braun, P. G. 1997. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* 87:184-190.
- 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.
- Kwon, S. M., Yeo, M. I., Choi, S. H., Kim, G. W., Jun, K. J. and Uhm, J. Y. 2010. Reduced sensitivities of the pear scab fungus (*Venturia nashicola*) collected in ulsan and naju to five ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicides. *Res. Plant Dis.* 16: 48-58.
- 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.
- Thind, T. S., Clerjeau, M. and Olivier, J. M. 1986. First observation on resistance in *Venturia inaequalis* and *Guignardia bidwelii* to ergosterol-biosynthesis inhibitors in France. *Proc. 1986 Brit. Crop Prot. Conf.* 2:491-498.
- 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.