

등근마(*Dioscorea bulbifera*)를 가해하는 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp. HSC)의 Cytochrome Oxidase Subunit II (COII) 염기서열 분석

한상찬 · 강상진 · 김용균*

안동대학교 농생물학과

Cytochrome Oxidase Subunit II (COII) Sequence Analysis of Root-knot Nematode, *Meloidogyne* sp. HSC, Infesting Yam (*Dioscorea bulbifera*)

Sangchan Han, Sangjin Kang and Yonggyun Kim*

Department of Agricultural Biology, Andong National University, Andong 760-749, Korea

ABSTRACT : Root-knot nematode damage was found on yam, *Dioscorea bulbifera* in Andong Korea. From the root-knots, female nematodes were isolated and subjected to DNA sequence analysis. Sequence of cytochrome oxidase subunit II (COII) was analyzed from the genomic DNA of the isolate. COII locus size and sequence of the nematode isolate were similar to those of *Meloidogyne javanica* or *M. incognita*. However, an analysis of *Hinf*I restriction site, a species-specific character between these two species, showed that the isolate did not match to either *M. javanica* or *M. incognita*.

KEY WORDS : Root-knot nematode, *Meloidogyne*, Yam, *Dioscorea bulbifera*, Mitochondria, Cytochrome oxidase II

초 록 : 경북 안동에서 재배하는 등근마(*Dioscorea bulbifera*)에서 뿌리혹선충 피해가 발견되었다. 피해 피경에서 다수의 암컷 선충을 분리하였고, 이들의 cytochrome oxidase subunit II (COII) DNA 서열을 분석하였다. 등근마의 뿌리혹 형성을 유도하는 식물 선충의 COII 유전좌위 크기와 염기서열은 *Meloidogyne javanica* 또는 *M. incognita*의 해당 영역과 높은 유사도를 보였다. 그러나 이들 두 종을 구분하는데 이용되는 제한효소(*Hinf*I) 위치에 있어서 본 등근마로부터 분리된 뿌리혹선충은 이들 두 종과 뚜렷한 차이를 보였다.

검색어 : 뿌리혹선충, *Meloidogyne*, 마, 등근마, 미토콘드리아, Cytochrome oxidase II

마는 마과(Dioscoreaceae)에 속하며, 등근마(*Dioscorea bulbifera*), 참마(*D. japonica*), 부채마(*D. nipponica*), 마(*D. oppositifolia*), 단풍마(*D. quinqueloba*), 국화마(*D. septemloba*), 각시마(*D. tenuipes*) 그리고 도꼬로마(*D.*

tokoro)의 유사종을 포함한다(Burkill, 1960; Lee, 1980). 이들 마는 동남아시아를 중심으로 분포하며, 우리나라에서는 안동, 영풍 및 진양 지역에서 재배되고 있다. 국내에서 재배되는 마는 재래종인 마(*D. oppositifolia*)가 장마와

*Corresponding author. E-mail: hosanna@andong.ac.kr

단마의 품종으로 재배되며, 최근 일본에서 둥근마가 도입되어 농가에 보급되었다(Park *et al.*, 2000).

약용작물로서 마는 신체허약, 정수고갈, 유정, 야뇨증 및 대하증의 증세에 한방에서 처방하는 한약재에 포함된다(Park *et al.*, 2000). 이러한 약리효과의 과학적 근거로서 마 덩이뿌리에서 추출된 락틴단백질은 장운동을 원활하게 해주며, 이들은 항균 작용을 갖는다고 보고되었다(Gaidamashvili *et al.*, 2004; Jeon *et al.*, 2006). 또한 마의 뮤코다당류는 대식세포의 분비활성을 촉진시켜, 면역기능의 제고에 기여한다고 보고되었으며(Choi *et al.*, 2004), 이외에 마의 점액은 항산화기능을 갖는다고 알려지고 있다(Hou *et al.*, 2002).

마 재배지에서 나타나는 토양 해충 가운데 뿌리혹선충이 경제적 피해를 줄 수 있다고 보고되었다(Min and Kang, 2000). 이들 마 재배지가 포함된 지역에서 조사한 결과를 살펴보면 총 10과 15속 25종의 다양한 식물기생선충이 약용작물을 가해하고 있었으며, 이 가운데 뿌리혹선충이 주종을 이루었다(Park *et al.*, 1992). 국내 경제적 작물을 가해하는 뿌리혹선충은 4종(*Meloidogyne hapla*, *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*)이 검출되고 있으며, 이는 기주에 따라 우점종 변이를 나타냈다(Choi and Choo, 1978). 뿌리혹선충의 기주범위는 거의 모든 작물을 포함하는 다양성을 보이며(Choi and Choo, 1978), 특별히

마와 같은 뿌리 작물에 대한 경제적 피해가 우려되고 있다. 본 연구에서는 둥근마(*D. bulbifera*) 재배지에서 나타난 뿌리 피해를 분석하는 과정에서 이들 피해가 뿌리혹선충에 의해 야기되었으며, 뿌리혹으로부터 분리된 뿌리혹선충의 cytochrome oxidase subunit II (COII) 염기서열 분석 결과 통해 국내 분포하는 뿌리혹선충과 차이점이 발견되어 이를 보고한다.

재료 및 방법

경북 안동시 북후면 소재 마 재배지에서 뿌리혹선충의 피해를 받은 둥근마를 채취하여 뿌리혹 부위를 절단하였다(Fig. 1). 해부현미경하에서 절단 부위를 검경하면서 암컷 선충을 약 200 μ l 부피의 양으로 수거하였다. 분리된 선충체로부터 COII 염기서열 분석을 위해 일반 게놈 DNA 분리방식(Sambrook *et al.*, 1989)으로 DNA를 추출하였다. COII 영역 증폭은 이 부위의 일반 보존영역 프라이머인 5'-GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG-3'과 5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3'을 이용하였다(Power and Harris, 1993). Polymerase chain reaction (PCR)은 94°C에서 1분, 48°C에서 1분, 72°C에서 2분씩 35회 반복 반응함으로써 이루어졌다. 반응용액은 Taq polymerase

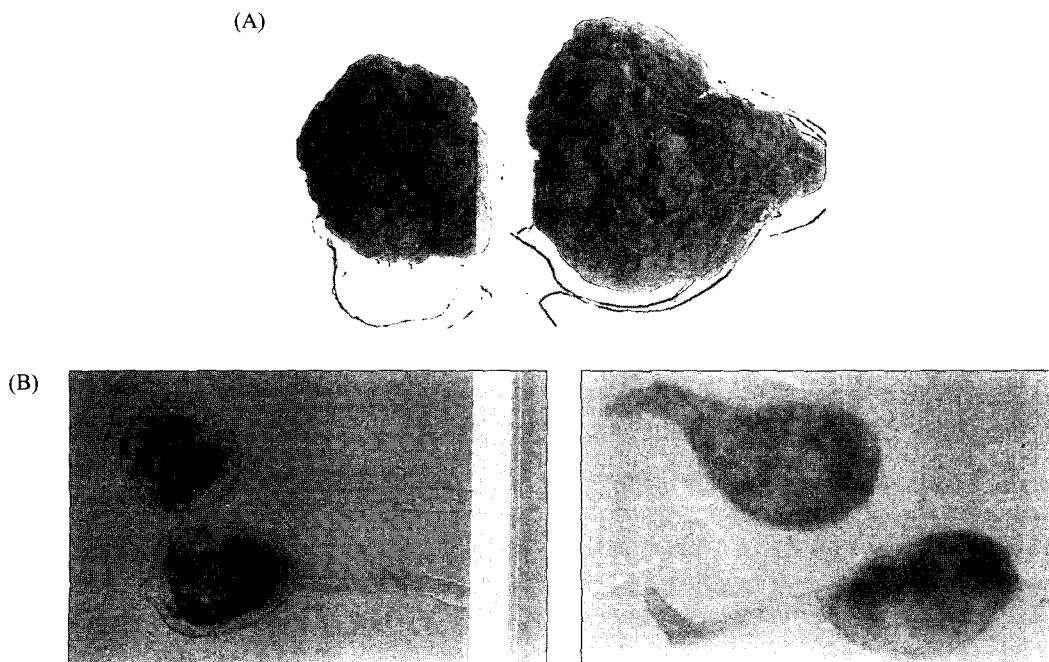


Fig. 1. Yam, *Dioscorea bulbifera*, infested by nematodes. (A) Control (left) and damaged (right) tuber shapes (B) Female adults isolated from the root nodules.

(Bioneer, Daejeon, Korea)의 제품 지시사항에 따랐다. 증폭된 PCR 결과물은 TA 클로닝 기술로 pGEM[®] 벡터 (Promega, Madison, USA)로 옮겨지고, SP6과 T7 시퀀싱 프라이머를 이용하여 양방향으로 염기서열이 결정되었다. 이렇게 해서 얻어진 염기서열 자료는 DNASTAR 프로그램(Version 5.01, DNASTAR Inc., Madison, USA)으로 단일 염기서열로 연결되었다. 또한 유사종과의 근연관계를 알아내기 위해 NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Blast 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

경북 안동지역을 중심으로 재배되는 마는 연작에 따른 선충피해가 보고되었고, 이중 뿌리혹선충 피해가 가장 큰 것으로 조사되었다(Min and Kang, 2000). 본 연구에서도 둥근마 재배지에서 뿌리혹 피해가 관찰되었다(Fig. 1A). 이들 뿌리혹을 절단한 결과, 혹 내부에서 뿌리혹선충

으로 보이는 암컷들을 다수 발견하였다(Fig. 1B). 이들 암컷들은 목 길이를 중심으로 크게 두 가지로 구분되었다. 목이 짧은 것은 같은 종내에 미성숙 암컷으로 사려되어 본 연구에서는 비교적 밀도가 높은 목이 짧은 암컷선충을 수거하여 분자지표를 이용하여 종 동정을 시도하였다.

뿌리혹선충 분류를 위한 분자지표로서 미토콘드리아 COII 영역이 이용되었다(Power and Harris, 1993). 이 영역을 증폭한 결과, 약 1.7 kb 크기의 증폭 산물을 얻었다. 동일한 PCR 프라이머를 이용한 경우 뿌리혹선충별로 길이 변화를 보이게 되어, *M. hapla*, *M. chitwoodi*, *M. marylandi*, *M. nataliei*, *M. naasi*는 0.5 kb, *M. arenaria*는 1.1 kb 그리고 *M. javanica*와 *M. incognita*는 1.7 kb를 나타내게 된다(Power and Harris, 1993). 이는 본 뿌리혹선충이 *M. javanica* 또는 *M. incognita*와 밀접하다는 것을 의미한다.

둥근마 분리 선충의 COII 전체 염기서열이 양방향으로 분석되었다(Fig. 2). NCBI Genbank를 통한 둥근마 뿌리혹선충의 COII 염기서열은 *M. javanica* 및 *M. incognita*

```

GGTCAATGTG CAGAAATTTG TGGTATTAAT CATTCAATTA TACCAATTTT GGTGAAATT ACTTTATTTG 70
ATTTTTTTAA GTTAAATTTA TTAACATAAT GATTATTTTA TTTTGTGGA AGCAAGAGAA AATATTAGCT 140
GTTTAAATTT TTTTATTAG TTTTAAAAAT AATAAAAAAT GTTTTAAAGT GATTAGGGAT TAAATTAACA 210
ATTGTATTAT TTATTATTAT AAGTTTTTTG AATATTATTT TGATTTTTTG TTATTTAATT TCTTTTTTTT 280
GTATTAATTT ATTTTTATAT TTTTGTGTA TTTTAAATTT TTATATTTGT AATTTTATCT ATAATAATTT 350
GTTAAATTTT TTTTCTAATT TGGGTGAATT AAAATTAGAG ATGAATTGAT TAGATTTTTT TTTGTATTAT 420
TAATATCATT TTTATTTATT ATTAGGATAT TTTCAATTGG TTGTGTTAAT CATTCTTTAT TAGATCGGGG 490
TTTAATAATG GGTTCCTTAT TGTGTTAATT ATTAATAATAT TATTTTGGTT TTTTAGTGAA ATTTTTTATT 560
TAATTTTATT TTATACGAAA AATTATTAGG GAAAATATTT TGATTTTTTG TTATTTAGAG TTTAAGTTCT 630
TTATAGAACA AAATTTTTTA TCTTTTTAGT ATTCTATTGA AATAGAAGAA TTATAAATTA GTTAATTCTA 700
ATTTTATTTA TTTTATATGG ATTATATAAA ATTTTAAATT TTTTGATTTT AGTTTATTTA CGTATTTAGT 770
TGATTTTTTA ATAGATTTAG TTCATCTGTT GATGTAACAC AGAGTGGCTC TTTAGTTAAT TTACCTGAAG 840
TTAAAAATGG TCAATTATAT GATATAACTT TTGGTTATCA TCAAGAATAT TTTAAGGAAA TTATGGTGTCT 910
CATCCTGATA AAGATCGTAA TTTTATAGT TGTGGTATTG TTATACGTCA ATCACAAGCT TTAGAAGAAT 980
ATCATAATGA ATTAATCAA TCTGTTAGT AAAAAATAGT TATTTTATT AATAGAGATA TAAGGAGATT 1050
TAATTTTTAA GTTAAATCCA ATTCGTAATG TTTGGAATTT ACCAAGGTAG AATTACACGT TAAATTTAGA 1120
AGAATTGTTG AAAAGAATGA ATTCCTAATG GAAACAGTAA GGATATTTTT TATATAATTA TTTTAAATAA 1190
TATTAATAAT AAAGCTATTA ATTTCAATG AATTTTTTAT TGTGATTTAA AAAGTTTTTG GCTAAATTTA 1260
TTTTTACAT TC TTTTTTAT TGTGAAAAA ATTAATAACA AATTTGTTTT TACAATAATT AAAATTTATA 1330
ATATTTCAAT TTTTAAATTT TAGTTTTAAA TAAAAATTAC AAATATGAAA AATAAAAAAA TTTTGTTATA 1400
AATTAATAAT ATTTATTAT ATTAATAATA TTTTTATAA TTTTATTTT TTTTATTTT TTAATAAAAA 1470
AATAATTTAA TTATAATTAT TTATTTAAAT TTAATAATTA AATATAAAAT TTTTATTTAA ATAAATTTAA 1540
TAATAAATGT TTTTAAATTT CTTTGAGGTT TTGATTTTTG ATTTTTTGT TCTGCTCATT GTTAAAGAAA 1610
AGCACTTTTA GCGTGATTGG TCAAAGGTA 1639

```

Fig. 2. DNA sequence of mitochondrial cytochrome oxidase subunit II of root-knot nematode isolated from damaged yam, *Dioscorea bulbifera*. The underlined sequences indicate the forward and reverse primers to clone this locus. A black box indicate a restriction site of *Hinf*I.

Table 1. Comparison of nucleotide sequences at cytochrome oxidase subunit II of *Meloidogyne* sp. HSC (NCBI access number: EF183527) with other *Meloidogyne* spp.

<i>Meloidogyne</i> spp.	Isolate					
	NCBI access number	Analyzed sequence (bp)	Nucleotide identity (%)	Nucleotide gaps (%)	Match score (bits) ^a	E value ^b
<i>M. javanica</i>	AY635612	1640	98	0	352	0.0
<i>M. incognita</i>	AY635611	1502	99	0	330	0.0
<i>M. arenaria</i>	AY635610	1112	100	0	103	2e-18
<i>M. hapla</i>	AY757804	529	- ^c	- ^c	58	1e-04

^a Match score was calculated by nucleotides that agree to the given score.

^b E value indicates the number of hits expected to occur by chance with the given score.

^c not measured because of low similarity

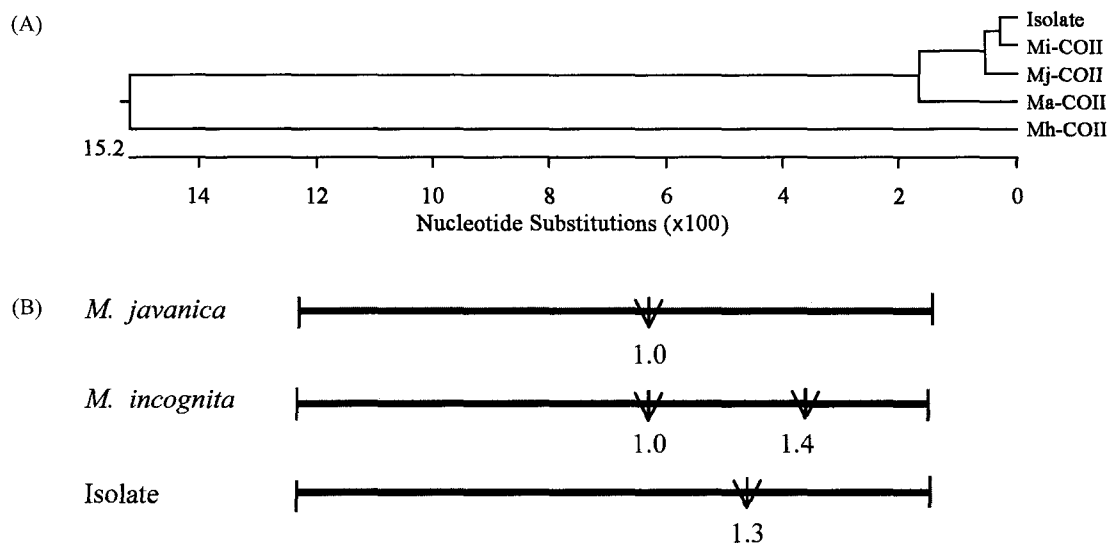


Fig. 3. Sequence analysis of mitochondrial cytochrome oxidase subunit II (COII) of root-knot nematode isolated from damaged yam, *Dioscorea bulbifera*. (A) COII phylogenetic analysis among different *Meloidogyne* species. Numbers on the phylogenetic tree indicate the percentage of similarity index on each branch analyzed by a Clustal W program. Gaps were introduced to optimize alignment with a parameter set of gap penalty (15.00), gap length penalty (6.66), delay divergent seqs (30%), and DNA transition weight (0.50). "Isolate" represents *Meloidogyne* sp. isolated from the damaged *Dioscorea bulbifera*. 'Mi', 'Mj', 'Ma', and 'Mh' represent *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, and *M. hapla*. Their COII sequences were obtained with NCBI Genbank accession numbers noted in the Table 1. (B) *Hinf*I restriction site analysis of COII locus. Both *M. javanica* and *M. incognita* PCR products would be expected as about 1.7 kb (Power and Harris, 1993) like COII of the isolate. Down arrows indicate the sites of the restriction enzyme.

와 가장 유사도가 높은 것으로 판명되었다(Table 1). 또한 Clustal W 프로그램을 이용하여 염기서열 유사도를 비교한 결과 이 두 선충종과 근연관계가 가장 높은 것으로 분석되었다(Fig. 3A).

본 연구에서 분리된 둥근마 뿌리혹선충과 유사성이 높은 이들 두 뿌리혹선충의 염기서열 차이점은 *Hinf*I의 제한 위치이다(Power and Harris, 1993). 둥근마에서 분리된 선충의 COII 염기서열을 분석하여 보면, *Hinf*I 제한위치가 1,267위치에서 한 개가 발견되었다(Fig. 2). *M. ja-*

*vanica*도 한 개의 *Hinf*I이 존재하나, 그 위치는 약 1 kb에 존재하여 본 둥근마 유래 뿌리혹선충과 차이점을 보였다. *M. incognita*의 경우 *M. javanica*와 동일한 1 kb 위치뿐만 아니라 다시 제2의 제한 위치를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Fig. 3B).

이상의 결과를 종합하면, 둥근마에서 분리된 뿌리혹선충은 *M. incognita* 또는 *M. javanica*와 높은 유사성을 보이나, 종 특이적 제한 위치에서 차이를 보여 이들 선충종들과 구별될 수 있다는 것을 의미하고 있다. 이에 대한

정확한 종 동정은 형태적 및 기타 생물적 특징으로 추후 이뤄져야 할 과제이다.

사 사

본 연구는 2004년도 안동대학교 특별학술연구지원사업에 의하여 지원되었다.

Literature Cited

- Burkill, I.H. 1960. The organography and the evolution of Dioscoreaceae, the family of the Yam, J. Linn. Soc. Bot. 56: 319-412.
- Choi, E.M., S.J. Koo and J.K. Hwang. 2004. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). J. Ethnopharmacol. 91: 1-6.
- Choi, Y.E. and H.Y. Choo. A study on the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) affecting economic crops in Korea. Kor. J. Pl. Prot. 17: 89-98.
- Gaidamashvili, M., Y. Ohizumi, S. Iijima, T. Takayama, T. Ogawa and K. Muramoto. 2004. Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities. J. Biol. Chem. 279: 26028-26035.
- Hou, W.C., F.L. Hsu and M.H. Lee. 2002. Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities *in vitro*. Planta Med. 68: 1072-1076.
- Jeon, J.R., J.S. Lee, C.H. Lee, J.Y. Kim, S.D. Kim and D.H. Nam. 2006. Effect of ethanol extract of dried Chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour containing dioscin on gastrointestinal function in rat model. Arch. Pharm. Res. 29: 348-353.
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-floatation technique for separating nematodes from soil. Pl. Dis. Rep. 48: 692.
- Lee, C.B. 1980. Illustrated book of Korean plants. Hyangmoon Co. Korea.
- Min, K.K. and D.K. Kang. 2000. A study on plant nematodes infesting yam, *Dioscorea batatas*. Annu. Rep. Kyungbuk Northern Experimental Station. Andong, Korea.
- Park, S.D., J.C. Kim, S.J. Kim, K.J. Kim, J.H. Kim, J.H. Park and K.S. Park. 2000. Illustrated book of medicinal plants. 342 p. Ui Song Medicinal Plant Experiment Station. Ui Song, Korea.
- Power, T.O. and T.S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. J. Nematol. 25: 1-6.
- Sambrook, J., E.F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

(Received for publication December 14 2006;
accepted December 28 2006)