

## 인삼포장에서 뿌리썩음병원균의 진단을 위한 RT-PCR KIT의 개발

도은수\*

중부대학교 한약자원학과

### Development of RT-PCR Kit for Diagnosis of Pathogenic Agent of Ginseng Root Rot in the Ginseng Field

Eun-Soo Doh\*

Dept. of Oriental medicin Resources, Joongbu University, Kumsan 312-800, Korea

#### ABSTRACT

*Cylindrocarpon destructans* is the major pathogen inducing the root rot disease in ginseng. Up to now, there is no reliable and convenient method to analyze the spore density or population of this pathogen in ginseng-growing soil or any contaminated farmlands. Therefore, it will be very valuable to develop a new and reliable method in detecting the spore of this pathogen. In this study, a molecular biological technique using two step nested PCR method, was developed. Two universal ITS primers, ITS5F and ITS4R were used in the first round of PCR to amplify a fragment of ITS region from the genomic DNA of *C. destructans*. The specific primers Nest 1 and Nest 2 were designed and used in the second round of PCR to amplify a inner fragment from the first round PCR product of *C. destructans*. *C. destructans* spore, only soil samples from the diseased ginseng farm produced the positive bands, suggesting its usefulness in detecting the *C. destructans* spores in soil samples. Thus it is recommended to first extract the whole genomic DNA from soil samples and use it for the PCR reaction, thereby eliminating the inhibitory activity of soil components.

**Key words :** *Cylindrocarpon destructans*, ITS, nested PCR

#### 서언

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 다년생 음지성 약용식물로서 해가림(일복)을 해주어야 하고, 4년-6년간 동일포장에서 장기간 재배를 하여야 하기 때문

에 뿌리썩음병 등에 의한 피해가 매우 커 연작장해의 발생가능성이 높아 대다수의 농가에서는 초작지의 재배에 주력하고 있다(조 와 김, 1994). 인삼재배시 뿌리썩음병(근부병)과 연작장해를 일으키는 여러 가지 원인 중에서도 인삼뿌리썩음병원균인

이 논문은 2001학년도 중부대학교 교내 연구비에 의하여 수행되었음.

\*교신저자 : E-mail : esdoh@mail.joongbu.ac.kr

*Cylindrocarpon destructans*의 밀도 증가로 인한 피해가 가장 주된 요인으로 알려져 있다(Chung 등, 1980; Matsuo와 Miyazawa, 1984). 또한 홍삼포의 경우에는 6년간 재배를 해야하기 때문에 4년근일 때 토양중에 미생물의 밀도가 높을 경우 백삼포로 활용하거나 4년에 수확하는 것이 바람직 할것으로 사료되지만 근본적으로 초작지에서부터 무병지를 선택하여 사용해야 할 것이다. 인삼뿌리썩음병의 효과적인 방제 및 연작장해를 사전에 예방하고 부족한 초작지에 문제 등을 해결하기 위해서는 인삼 뿌리썩음병원균인 *C. destructans*의 효과적인 포장내 밀도 파악이 선행되어야 한다(Montechio 와 Causin, 1995; Samules 와 Brayford, 1990). 인삼뿌리썩음병원균은 토양내에서 후막포자의 형태로 월동하며 기내배양에서 균사의 생장은 양호하지만 후막포자의 형성량이 매우 적어 밀도를 정확하게 측정하기가 어려운 상황이다(Matsuo et al, 1984). 최근에 분자생물학 기법을 발달되면서 여러 종류의 세균류에서 특이 유전자염기서열을 증폭하여 밀도를 확인할수 있는 PCR기법이 도입되었으며 특히 nested PCR기법에 의해서 극소량의 미생물도 밀도를 조사할 수 있는 방법이 개발되었다(Faggin 등, 1999; Mutasa 등, 1996). 이미 *Phytophthora parasitica*를 PCR를 통해서 밀도를 분석한 바 있으며(Tsai 와 Olson, 1992), 또한 인삼에서 문제가 되고 있는 *Cylindrocarpon destructans*도 일부 염기서열이 분석되었으며 이미 primer가 만들어 진 바 있다(Hamelin 등, 1996). 하지만 지금까지는 주로 실험실 수준에서 수행되어 왔으며 사용된 primer도 아직 검증되지 않았다. 따라서 효율적으로 *C. destructans*을 진단할 수 primer의 개발이 필요하며 이를 이용한 진단방법 및 포장에 있는 미생물의 진단할 수 있는 kit의 개발이 요구되고 있다. 따라서 인삼포 예정지나 연작장해가능지 그리고 홍삼포로 사용할 인삼포지에서 뿌리썩음병원균의 진단 kit를 만들어 사전에 예방을 한다면 장기간 재배해야 할 인삼사업에 커다란 도움을 줄 것으로 판단되어 본 실험을 수행하였던 바, 얻어진 결과를 이에 보고 한다.

## 재료 및 방법

### 공시균주 및 배양

실험에 사용된 균주(*C. destructans* 2018)는 한국인삼연초연구원에서 분리한 한국산 균주를 분양받아 사용하였으며, 배양은 PDA 배지에서 배양된 균사체 중에서 단균사를 떼어 PDA 배지에서 재분리를 하였고, 이것을 15-20 °C에서 배양하여 흑갈색의 colony와 주변에 진한 갈색색소를 형성하는지를 확인하여 실험에 사용하였다.

### 균주에서 DNA분리

*C. destructans* 2018을 PDA에 배양하여 형성된 균사체를 동결건조시키고, Kistler et al(1991)의 방법에 의해서 균사체를 마쇄하여 DNA를 분리하였다. 뿌리썩음병이 발병한 인삼포장에서 *C. destructans*를 확인하기 위해서 인삼근권의 토양을 수집하여 400mesh채로 걸러 토양을 음건 후 사용하였고 *C. destructans*의 DNA를 분리하기 위해서 Tsai 등(1991)의 방법에 따라 추출하였다.

### *C. destructans* 특이 Primer의 제작

NCBI에서 *C. destructans*에 관한 모든 염기서열의 탐색 및 alignment하여 ITS(internal transcribed spacer) 영역의 확인하였다. 특히 ITS5F와 ITS4R영역의 5.8S 부위의 염기서열을 확인하여 primer를 제작하였다. ITS 영역은 중간 혹은 종내에서도 차이가 가장 많이 나는 rDNA로서 *C. destructans*특이염기서열을 분석하여 형성되는 polymorphism를 이용하여 토양중의 *C. destructans* 분석하였다. ITS영역의 증폭은 제노텍(Daejeon, Korea)에서 제작한 ITS5F : 5-GGA-AGT-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-G-3, ITS4R : 5-TCC-TCC-GCT- TAT-TGA-TAT-GC-3을 사용하였다.

### *C. destructans* 특이 Primer를 이용한 효율적인 PCR 조건 구명

상기 제작된 primer에 의해서 최적 PCR조건을 구명하여 다형성여부를 조사하기 위해서 PCR에 사용되는 각종 효소 등의 최적농도조건 등을 조사하였

다. PCR이 수행되는 denaturation, annealing temperature, extension temperature 등을 조사하였다.

### Nested PCR조건 구명

토양 중에서 *C. destructans*를 조사하려면 매우 소량이 될 가능성이 높아 Nested PCR에 의해서 일가장 빈번히 나타나는 universal primer를 만들어 ITS를 확인하고 바로 *C. destructans*만 확인할 수 있는 specific primer를 이용하여 다형성여부를 조사하였다. Universal primer와 specific primer의 유기적인 관계를 조사하여 효율적으로 밴드가 형성될 수 있는 최적조건의 구명하고자 우선 one step PCR에 의한 *C. destructans* 특이 DNA를 증폭하였으며 상기 방법에 의해서 Nested primer를 제작하여 기존에 two step PCR방법을 one step PCR 방법으로 전환가능성을 조사하고 이에 알맞은 조건을 구명하였다. 또한 universal primer로 사용하여 나타난 밴드가 marker로 사용여부도 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 인삼 뿌리썩음병 유발병원균의 탐색

인삼에서 발생하는 주요한 병은 주로 *C. destructans*에 의해서 일어나는 뿌리썩음병과 Phytophthora Root Rot, Rusty Root, Stromatinia Black Root Rot, Rhizoctonia Root Rot, Root Knot Nematode 등이 보고 되어 있었으며 그 중에서도 *Cylindrocarpon*이 가장 문제가 되고 있었다. 특히 인삼은 4-6년간 장기간 재배를 해야하기 때문에 최초에 좋은 토지를 선별하여 인삼을 재배하는 것이 절대적으로 필요하다. 따라서 재배에 들어가기 전에 토양의 상태, 특히 인삼뿌리썩음병을 유발하는 병원균이 차단되어 있는 토지를 선별하는 것이 시급한 상황이다. *Cylindrocarpon*(Fig. 1)의 종류에는 *C. cyanescens*, *C. destructans*, *C. lichenicola*, *C. tonkinense*, *C. vaginae*, *C. tonkinense*이 보고되어 있으며, *C. destructans*(filamentous fungi)은 potato dextrose agar(Infusion from potatoes 1,000ml; Boil 200

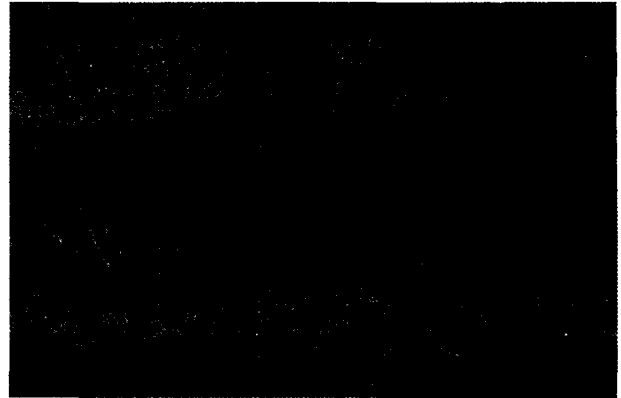


Fig.1. Spores of the fungus *C. destructans* 2018 isolated in soil.

g scrubbed and sliced potatoes in 1,000 ml water for 1 hour. Pass through fine sieve. Avoid new potatoes, glucose 20g, Agar 15g)에서 26 °C로 배양하는 것이 가장 양호한 결과를 나타내었다 (Fig. 2). *Cylindrocarpon*의 발병환경은 미부숙 퇴비가 과다하거나 해충 및 선충 등의 방제를 소홀히 한 토양 및 두둑이 낮거나 배수가 불량한 포장에서 발병이 특히 잘되었으며 이것은 소형분생포자, 대형분생포자, 후막포자를 형성하며 소형 분생포자의 크기는 6-11X 2-4 μm이다. 또한 대형분생포자는 1-4개의 격막을 갖고 있으며 후막포자는 인공배지상에서 잘 발아하지 않는다. 특히 PDA배지에서는 갈색 또는 어두운 갈색을 띄고 있었다((Fig. 2). 지금까지 보고된 *Cylindrocarpon*의 기주식물은 ginseng, Alfafa, sweet clover, arrowhead, lotus, cyclamen, oak, carrot, potato, conifer, tree peony, parsnip등이 보고 되어 있음 주로 root rot, storage rot, 유묘의 decay, black root rot, root canker등을 유발한다고 하였다(조 등, 1996; 유 등, 1995; 유 등 1996)).

### *C. destructans* 특이 Primer의 제작

인터넷상에는 *Cylindrocarpon*에 대해서 ITS의 영역의 염기서열이 분석된 것은 *C. magnusianum*, *C. macroconidialis*, *C. lichenicola*, *C. didymum*, *C. cylindroides*, *C. destructans* 등 6종이 보고되어 있으며, 각 균주의 염기서열간 상동성은 Fig. 3과 같고, 그 유전적인 분류표는 Fig. 4와 같다.

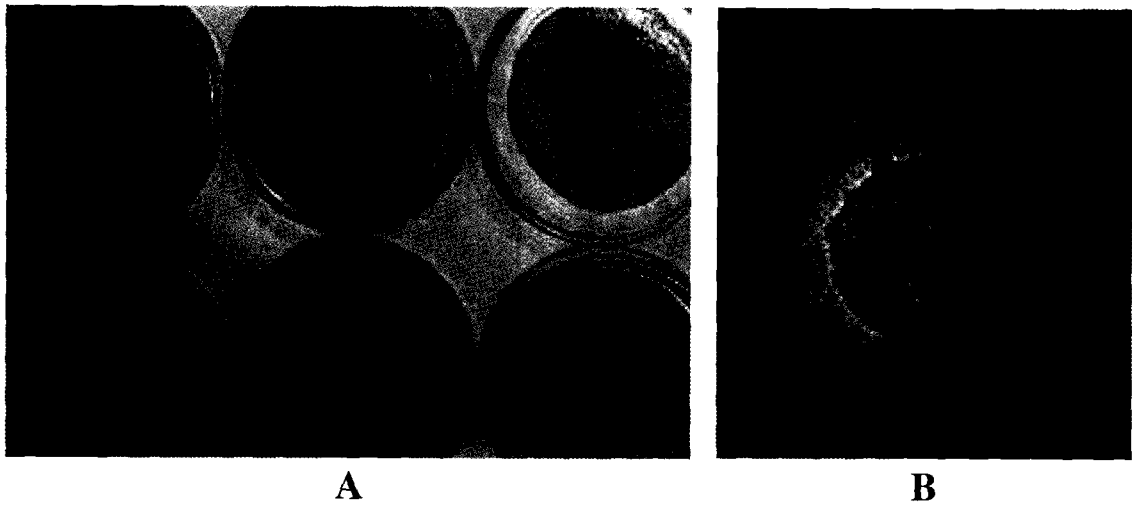


Fig.2. Growth of *C. destructans* 2018 on the PDA media(A) and it spores(B).

										705	706	720
1	<i>magnusianum</i>									AACTC	CC	AA-ACC
2	<i>macroconidialis</i>									AACTC	CC	AA-ACC
3	<i>lichenicola</i>									ACCTC	TCGGGGTTAC	AGC
4	<i>didymum</i>									AGCTG	CTGGTACTACTACCG	
5	<i>cylindroides</i>									GGCTA	CT	AC-ATC
6	<i>destructans</i>									TGAAG	CTTTGTTTAT	ATAT
		721	735 736	750 751	765 766	780 781	795 796	810				
1	<i>magnusianum</i>	-CCTG-TGAAC---	AT-ACC-TATCGT	T-GCCTCGGCGGTG-	-CCCGCT-CCGGCGG	---CCCGCCAG---	AGGACCCCCA-AACT					
2	<i>macroconidialis</i>	-CCTG-TGAAC---	AT-ACCA-TGTGCT	T-GCCTCGGCGGTG-	-CCCGCT-CCGGCGG	T---CCCGCCAG---	AGGACCCCCA-AACT					
3	<i>lichenicola</i>	-CTTGCTGAATT---	ATTCACCCTGTCTT	TTGCGTACTTCTTG-	-TTTCT-TGGTGGG	TTCGCCACCACT---	AGGACAAACATAAAC					
4	<i>didymum</i>	GCATGGTCACGCTGG	ATG-ACCA-GTCAT	TCGCCAAGATGAAGG	ACATGC-CCGTGGG	CTT-CCAAGGATATA	CCTACAGACACAAC					
5	<i>cylindroides</i>	-CAAG-GAAG---	-GCAGCA-GGCG-	-CGCAAATTACCCAA	TCCCGAC-ACGGGGA	GGTAGTGACAATA-	AATACTGATACAGGG					
6	<i>destructans</i>	TGATAATGACAGTAT	ATATATCG-TGTCTT	G-ACTAATTGCGTG-	-CCAGCAGTCGCGGT	AATACGTAAGAG-	ACTAGTGTATTTCAT					
		811	825 826	840 841	855 856	870 871	885 886	900				
1	<i>magnusianum</i>	CTTGTTTTAT---	ACAGTAT---	C-T TCTGAGTAACACG-	ATTAAT---	AAAT CAA-AACTT-TCA	ACAAC---	GGAT				
2	<i>macroconidialis</i>	CTTGATCTATT---	ACTGTATAT---	C-T TCTGAGTAA-ACG-	ATGAAAA-TCAAAT	CAA-AACTT-TCA	ACAAC---	GGAT				
3	<i>lichenicola</i>	CTTTTGAATT---	GCAATCAG---	C-G TC-AGTAACAA---	ATTAAT---	T-AAT TAC-AACTT-TCA	ACAAC---	GGAT				
4	<i>didymum</i>	CTCCCTTCATTG-	GCACTCTGCCACC-T	ACCAAGGATCGCGAG	ATCAAGTGGTGGGGT	CGC-AACATCTTA	GCAACCACCCGCGAG					
5	<i>cylindroides</i>	CTCTTTTGGGT---	CTTGTAAT---	T TGGAAATGAGTACA-	ATTTA---	AAT CCTTAACGA-GGA	ACAATTGGAGGGCAA					
6	<i>destructans</i>	CTTAATTAGGTTTAA	AGGGTACCCAGACGG	TC-AATATATCTTC	TATAATGTTAGTACT	TGACTAGAGTTTTAT	GTAAG-AGGGCAG					
		901	915 916	930 931	945 946	960 961	975 976	990				
1	<i>magnusianum</i>	CTCT---TGGTTCTG	GCATCGATGAAGAAC	GCAG---CGAAATGC	GATAAGT---AATGTG	AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCT					
2	<i>macroconidialis</i>	CTCT---TGGTTCTG	GCATCGATGAAGAAC	GCAG---CGAAATGC	GATAAGT---AATGTG	AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCT					
3	<i>lichenicola</i>	CTCT---TGGTTCTG	GCATCGATGAAGAAC	GCAG---CGAAATGC	GATAAGT---AATGTG	AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCT					
4	<i>didymum</i>	TCCTCCCTGGCCGGG	TGCTCTCCGACCCAC	CGGA---CGAGAAGG	ACTACGCTCAATGGA	AGGTCCCAACTCAC	TGAAGGAAGATATCG					

5 cylindroides	GTCT—GGTGCCA	GCAGCCGCGTAATT	CCAG—C—TCC	AATAGCGTATATTA	AGTTGTTGTGGTTAA	—AAAGCTCGTA—G
6 destructans	TACT—TGAGGAG	G-AGAGATGAAATTT	CGTGATACCAAAGGG	ACTCTGT-AAAGGCG	AAG-GCAGCCCTCTA	TGTAGAAACTGA-CG
	991	1005 1006	1020 1021	1035 1036	1050 1051	1065 1066 1080
1 magnusianum	TTGAACGC-----	ACATTG--C--GCCC	GCCAGTATTCTGGCG	G-GCA-TGCCGTGTC	GAGCGT-CATTTCAA	CC-CTCAAGCCCCCG
2 macroconidialis	TTGAACGC-----	ACATTG--C--GCCC	GCGAGTATTCTGGCG	G-GCA-TGCCGTGTC	GAGCGT-CATTTCAA	CC-CTCGAGCCCCCG
3 lichenicola	TTGAACGC-----	ACATTG--C--GCCC	TTTGGTATTCCGAAG	G-GCA-TGCCGTGTC	GAGCGT-CATTTGTA	CC-CTCAAGCTTT--
4 didymum	AC-AACGCCA-----	ACCGTC--T--GTTC	TTCGGAAGCAAGGGT	GCGCACTGGAAGTAC	GAGAAG-CATCGCAT	CTGCTGGGACGCATT
5 cylindroides	TTGAACCTTGG—	GCCTGG—CTGGCCG	GTCCGCCTCACC CGG	T-GTACTG—GTCC	GGCCGGGCTTTCCC	TCTGTGGAACCCCAT
6 destructans	TTGAAGGACGAAGGC	ACAGAGAACAACAG	GATTAGATACCCAAG	TAGTCTTTGCAGTAA	ATGATG—AATGCCA	TAGTGCAGATCTAA-
	1081	1095 1096	1110 1111	1125 1126		
1 magnusianum	GGCTTGGTGTGG-G	GATC—GGCGTGCCC	TC-GCGGCGCGCGT	CCCCAAAT		
2 macroconidialis	GGCTTGGTGTGG-A	GATC—GGCGGGCCC	TCCGGGGCGCGCGC	CTCCCAAAT		
3 lichenicola	-GCTTGGTGTGG-G	CGTCTTGTCTCTAGC	TTTGCTG-GAGACTC	GCCTTAAAG		
4 didymum	CACATC-TAGTGG-A	GATT---TCATCATC	TC-CCCGCACGCAGG	TGCCAAG		
5 cylindroides	GCCCTT-CACTGG-G	TGTG—GCGGGGAA	AC—AG-GACTTTT	ACTTTGAAA		
6 destructans	-ATTTAATGTTTATA	GATTATAAAAAGCGCC	TGAATTG-GCAATTT	TGC—AAA		

Fig. 3. ITS sequences alignment of *Cylindrocarpon* spp.

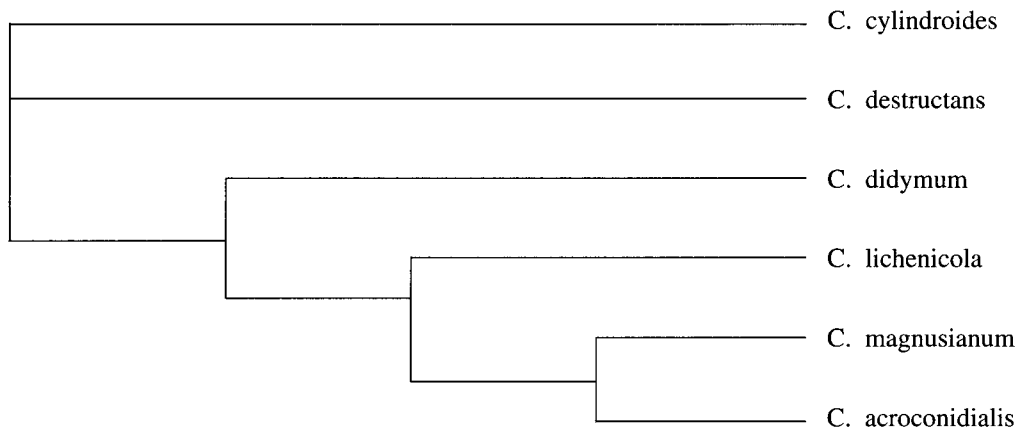


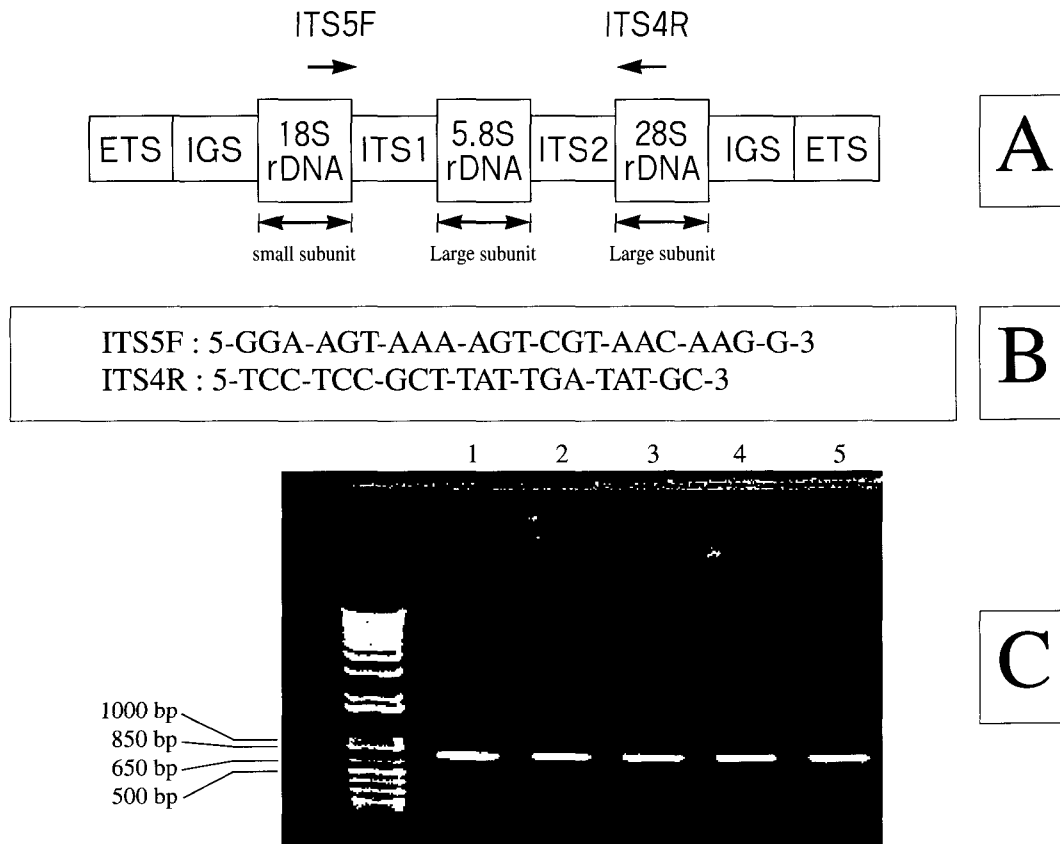
Fig. 4. The phylogenetic tree of the species within *Cylindrocarpon*.

**C. destructans 특이 Primer를 이용한 효율적인 PCR 조건 구명**

*C. destructans*의 primer 제작을 위한 ITS영역은 Fig. 5-A과 같으며, 이때 제작된 primer의 염기서열은 Fig. 5-B이고, 본 primer에 의해서 형성된 밴드는 Fig. 5-C과 같다.

**Nested PCR조건 구명**

Universal primer를 만들어 ITS를 확인하고, *C. destructans* specific primer로 다형성여부를 조사하기 위해서 nested PCR용 primer를 제작하였다. Primer의 염기서열은 nest-1; 5'-TTG-TTG-CCT-CGG-CGG-TGC-CTG-3' 와 nest-2; GGT-TTA-ACG-GCG-TGG-CCG-CGC -TGT-T-3' 을 사용하였으며, 본 nest primer를 사용할 경우 다음과 같은 *C. destructans*의 specific한 염기서열이 6종을 확인할 수 있었으며, 각



**Fig. 5.** A map of Nuclear rDNA region and the position of primer sets used for PCR(A), designed primer set for rDNA(B) and PCR products of ITS region in *C. destructans*(C).

염기서열간 상동성은 Fig. 6과 같으며 유전적인 분류는 Fig. 7과 같다.

**효율적인 Nested PCR 밴드형성을 위한 최적조건의 구명**

최종적으로 4개의 primer를 이용한 nested PCR에 의해서 수행한 결과 Fig. 8과 같은 밴드를 확인할 수

있어 효율적으로 토양에서 *C. destructans* 확인할 수 있었다. 따라서 본 4개의 primer가 RT-PCR mix와 혼합된 kit를 사용한다면 매우 쉽게 인삼포장에서 *Cylindrocarpon*의 농도를 조사할 수 있어, 인삼 예정지 관리시 사전에 토양의 선정에 많은 도움을 줄 것으로 생각된다.

*Cylindrocarpon destructans*

Page 1.1

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90	
1 ITS5.8S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
2 ITS1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
3 ITS2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
4 FMd2.1	GCCTAACGGCTGAAC	TGGCAACTTGGAGAA	GTGGCAAGTTTTATA	ATTAATAGTAATGAA	TATTTCTATTTTTAT	AAAATTCTATTAGAA		90
5 RTDF14	GCCTAACGGCTGAAC	TGGCAACTTGGAGAA	GTGGCAAGTTTTATA	ATTAATAGTAATGAA	TATTTCTATTTTTAT	AAAATTCTATTAGAA		90
6 JAT1551	GCCTAACGGCTGAAC	TGGCAACTTGGAGAA	GTGGCAAGTTTTATA	ATTAATAGTAATGAA	TATTTCTATTTTTAT	AAAATTCTATTAGAA		90

Page 2.1

	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
1 ITS5.8S	-----CCGAG	TTTACAAC	TCCAAA	CCCCTGT	GAACATAC	CATTGTT	GCCTCGG	CG-GTGC	TGCTT---	-CGGCAG	CCCCGCCAG		76
2 ITS1	-----CCGAG	TTTACAAC	TCCAAA	CCCCTGT	GAACATAC	CATTGTT	GCCTCGG	CG-GTGC	TGCTT---	-CGGCAG	CCCCGCCAG		76
3 ITS2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		0
4 Fmd2.1	TTGAATGA	AGCTTTG	TTTATAT	ATTGATAA	TGACAGT	ATATATAT	CGTGTCT	TGACTAAT	TGCGTG	CCAGCAGTC	GCGGTA	AATACGTAAG	180
5 RTDF14	TTGAATGA	AGCTTTG	TTTATAT	ATTGATAA	TGACAGT	ATATATAT	CGTGTCT	TGACTAAT	TGCGTG	CCAGCAGTC	GCGGTA	AATACGTAAG	180
6 JAT1551	TTGAATGA	AGCTTTG	TTTATAT	ATTGATAA	TGACAGT	ATATATAT	CGTGTCT	TGACTAAT	TGCGTG	CCAGCAGTC	GCGGTA	AATACGTAAG	180

Page 3.1

	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
1 ITS5.8S	AG---GACCCAAAC	C-CTTGATT	---TT	ATACAGT	ATCTTCTG	AGTAAATGA	---TTA	AATAAAT	CAAAACTT	TCAACAAC	CG---AT		151
2 ITS1	AG---GACCCAAAC	C-CTTGATT	---TT	ATACAGT	ATCTTCTG	AGTAAATGA	---TTA	AATAAAT	CA------	---	---		133
3 ITS2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		0
4 Fmd2.1	AGACTAGT	GTTATTC	ATCTTA	AATTAGGTTT	AAAGGGT	ACCCAGAC	GGTCAAT	ATATCTTC	TATAAT	GTTAGTACT	TGACTAG	AGTTTTAT	270
5 RTDF14	AGACTAGT	GTTATTC	ATCTTA	AATTAGGTTT	AAAGGGT	ACCCAGAC	GGTCAAT	ATATCTTC	TATAAT	GTTAGTACT	TGACTAG	AGTTTTAT	270
6 JAT1551	AGACTAGT	GTTATTC	ATCTTA	AATTAGGTTT	AAAGGGT	ACCCAGAC	GGTCAAT	ATATCTTC	TATAAT	GTTAGTACT	TGACTAG	AGTTTTAT	270

Page 4.1

	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	
1 ITS5.8S	CTCTTGGT	TCTGGCA	TCGATGA	AAGAACGCA	G---CG	AAATGC	GATAAGT	AATGTGAA	TTGCAGA	AATTCAGTG	AATCATC	---GAATCT	233
2 ITS1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	133
3 ITS2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
4 Fmd2.1	GTAAGAGG	GAGTAC	TTGAGG	AGGAGAGAT	GAAATTT	CGTGATAC	CAAAGGG	ACTCTGTA	AAGGCGA	AGGCAGCC	CTCTAT	GTAGAAACT	360
5 RTDF14	GTAAGAGG	GAGTAC	TTGAGG	AGGAGAGAT	GAAATTT	CGTGATAC	CAAAGGG	ACTCTGTA	AAGGCGA	AGGCAGCC	CTCTAT	GTAGAAACT	360
6 JAT1551	GTAAGAGG	GAGTAC	TTGAGG	AGGAGAGAT	GAAATTT	CGTGATAC	CAAAGGG	ACTCTGTA	AAGGCGA	AGGCAGCC	CTCTAT	GTAGAAACT	360

Page 5.1

	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450	
1 ITS5.8S	---TTGAAC	GCACA	TTGCGCC	CGCCAGTA	TTCTGGC	GGGCATGC	CTGTT	CGAGCGTCAT	TTCAACCC	TCAA-GC	CCCCGGGC	---	311
2 ITS1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	133
3 ITS2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	21
4 Fmd2.1	GACGTTGA	AGGACGA	AGGCAC	AGAGAACAA	ACAGGAT	TAGATACC	CAAGTAG	TCTTTGCA	GTAATG	TGATGAATGC	CATAGG	TCCAGATCTA	450
5 RTDF14	GACGTTGA	AGGACGA	AGGCAC	AGAGAACAA	ACAGGAT	TAGATACC	CAAGTAG	TCTTTGCA	GTAATG	TGATGAATGC	CATAGG	TCCAGATCTA	450
6 JAT1551	GACGTTGA	AGGACGA	AGGCAC	AGAGAACAA	ACAGGAT	TAGATACC	CAAGTAG	TCTTTGCA	GTAATG	TGATGAATGC	CATAGG	TCCAGATCTA	450

Page 6.1

	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540	
1 ITS5.8S	---TTGGT	GTT---	GGAGAT	CGCGTGCC	CCCCGGG	GGCGCCG	GCTCCCA	AATATAGT	GGCGGT	CTCGCTGTA	GCTTCCT	CTCGGTAG	394
2 ITS1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	133
3 ITS2	---TTGGT	GTT---	GGAGAT	CGCGTGCC	CCCCGGG	GGCGCCG	GCTCCCA	AATATAGT	GGCGGT	CTCGCTGTA	GCTTCCT	CTCGGTAG	104
4 Fmd2.1	AATTTAAT	GTTTATA	GATTATA	AAAAGCGCC	TGAATT	GGCAATTTT	GCAAAAA	AATTATAAA	TATTTAAA	AATTATTT	GGTCTA	TAAATGAAA	540
5 RTDF14	AATTTAAT	GTTTATA	GATTATA	AAAAGCGCC	TGAATT	GGCAATTTT	GCAAAAA	AATTATAAA	TATTTAAA	AATTATTT	GGTCTA	TAAATGAAA	540
6 JAT1551	AATTTAAT	GTTTATA	GATTATA	AAAAGCGCC	TGAATT	GGCAATTTT	GCAAAAA	AATTATAAA	TATTTAAA	AATTATTT	GGTCTA	TAAATGAAA	540

Page 7.1

	541	555	556	570	571	585	586	600	601	615	616	630	
1 ITS5.8S	TAGCACAC	CTCGCAC	TGGAAA	AC-AGCGTG	GCCACG	CCG---TT	AAACCC	---CCAC	TTCTGAA	AGGTT---	---		457
2 ITS1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		133
3 ITS2	TAGCACAC	CTCGCAC	TGGAAA	AC-AGCGTG	GCCACG	CCG---TT	AAACCC	---CCAC	TTCTGAA	AGGTT---	---		167
4 Fmd2.1	GTGTAAG	CATTTTAC	CTCAAG	AGTAATGTG	GCAACG	CAGGAAGT	AAATCA	CTAGACCGT	TTCTGAC	ACCAGTAG	TGAAGT		621
5 RTDF14	GTGTAAG	CATTTTAC	CTCAAG	AGTAATGTG	GCAACG	CAGGAAGT	AAATCA	CTAGACCGT	TTCTGAC	ACCAGTAG	TGAAGT		621
6 JAT1551	GTGTAAG	CATTTTAC	CTCAAG	AGTAATGTG	GCAACG	CAGGAAGT	AAATCA	CTAGACCGT	TTCTGAC	ACCAGTAG	TGAAGT		621

Fig. 6. ITS specific sequences alignment of *Cylindrocarpon* spp.

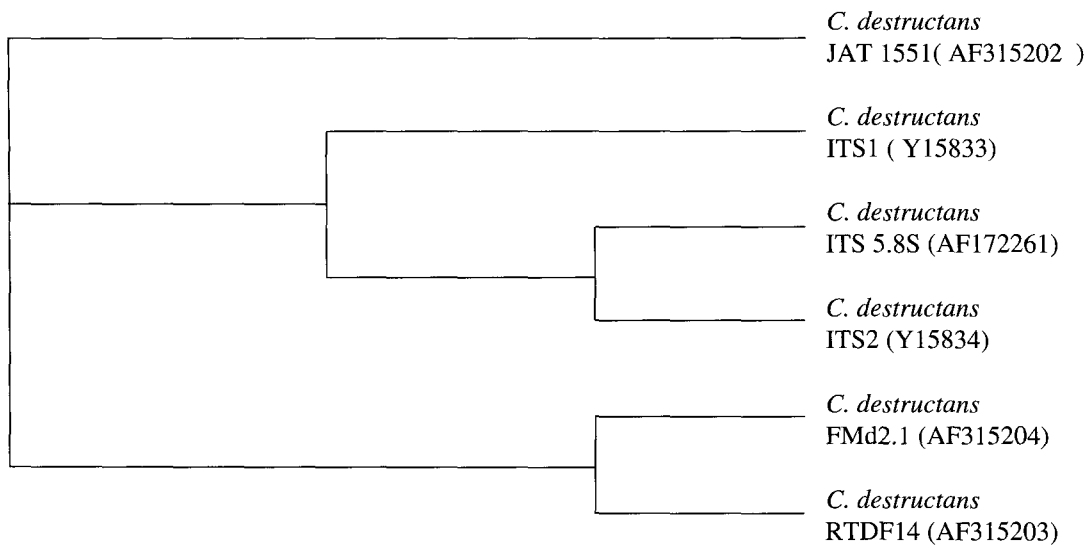


Fig. 7. The phylogenetic tree of the strains with *C. destructans*.

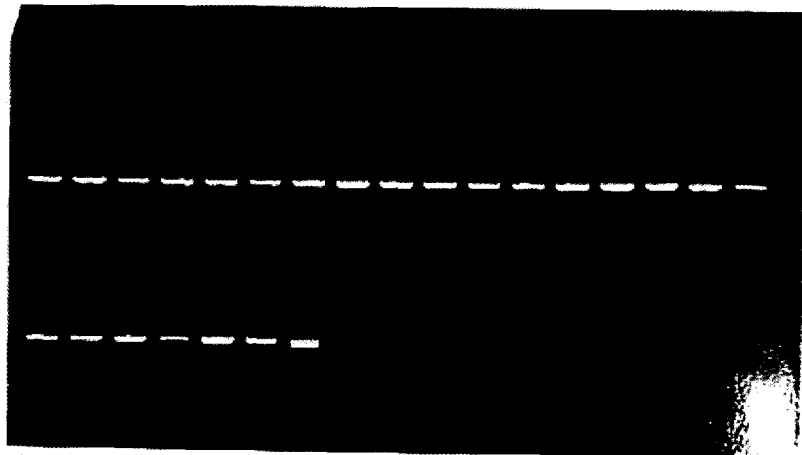


Fig. 8. PCR product of ITS regions of *C. destructans* using following nested PCR primers

- ITS5F : 5' -GGA-AGT-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-G-3'
- ITS4R : 5' -TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'
- Nest-1 : 5' -TTG-TTG-CCT-CGG-CGG-TGC-CTG-3'
- Nest-2 : 5' -GGT-TTA-ACG-GCG-TGG-CCG-CGC-TGT-T-3'

### 적 요

*C. destructans*는 인삼에서 가장 문제가 되고 있는 뿌리썩음병을 유발하는 매우 중요한 미생물이다. 현재까지 정상적인 인삼포장이나 폐포지에서도 이 병원균의 농도를 조사할 만한 방법이 없어 이를 쉽게

조사함으로써 인삼 예정지 관리시 도움을 줄 수 있는 새로운 방법이 절실이 요구되고 있다. 본 연구에서는 nested PCR이란 분자생물학적 방법을 이용하여 효과적으로 매우 낮은 농도의 *C. destructans*을 검출할 수 있는 방법을 개발하였다. 2개의 universal ITS primers(ITS5F와 ITS4R)을 사용하여



*Cylindrocarpon* spp.의 rDNA로부터 ITS영역을 증폭하였다. 이어 *C. destructans*의 specific primer(Nest 1과 Nest 2)을 사용하여 최적의 PCR조건으로 재증폭시켜 밴드를 확인하였다. 또한 이런 2번의 과정을 4개의 primer를 동시에 사용함으로써 한번에 확인할 수 있는 방법을 개발하였으며 이에 따른 PCR조건도 확립하였다. 따라서 본 방법에 의해서 인삼포장의 토양에서 채취된 매우 낮은 농도의 wild type *C. destructans* spore로부터 성공적으로 positive band를 확인함으로써 추후 인삼포장의 선정 및 4년생에서 6년까지(홍삼포) 재배기간등의 예측에 활용 될 것으로 생각된다.

### 인용문헌

- Chung, H.S. and C.H. Kim. 1980. Biological control of ginseng root rot with soil amendment. Proc. The 2nd International Ginseng Symposium 67-74.
- Faggin, R.S., R. Bulman, A.C. Lawrie and I.J. Porter. 1999. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. *Phytopathology* 89: 392-397.
- Hamelin, C.R., P. Berube, M. Gignac and M. Bourassa. 1996. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. *American Society for Microbiology* 62:4026-4031.
- Kistler, H.C., E.A. Momol and U. Beeny. 1991. Repetitive genomic sequences for determining relatedness among strains *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81:331-336.
- Matsuo, T. and Y. Miyazawa. 1969. *Cylindrocarpon panacis* sp. nov. causing root rot of ginseng. *Trans. Soc. Jpn.* 11, 109.
- Matsuo, T. and Y. Miyazawa. 1984. *Cylindrocarpon* sp. nov. causing root rot of ginseng. *Ann. Phytopath. soc. Jpn.* 50:649-652.
- Montechio, L. and R. Causin. 1995. First report of *Cylindrocarpon destructans* on English walnut in Italy. *Plant Dis.* 79:967.
- Mutasa, E.S., D.M. Chwarszcynska and M.J.C. Asher. 1996. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. *Phytopathology* 86:493-497.
- Samules, G. and D. Brayford. 1990. Variation in *Nectria raficicola* and its anamorph, *Cylindrocarpon destructans*. *Mycol. Research* 94:433-442.
- Tsai, Y. L. and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 1070-1074.
- Tsai, Y. L. and B.H. Olson. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58:754-757.
- 조대휘, 유연현, 오승환, 이호자. 1996. 인삼근부병균 *Cylindrocarpon destructans*(Zinssm.) Scholten의 포자생성에 미치는 배양기간, 온도, pH의 영향. *고려인삼학회지* 20: 88-95.
- 조재성, 김충수. 1994. 고려인삼의 담전운환 재배에 관한 기초연구. *한국과학재단연구보고서* 1-20.
- 유성준, 조진웅, 유승현, 조재성. 1995. 인삼근부병균 *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten 후막포자 발아에 관하여. *한국식물병리학회지* 11: 182-183.
- 유성준, 조진웅, 조재성, 유승현. 1996. 인삼뿌리썩음병균 (*Cylindrocarpon destructans*) 후막포자의 형성 및 발아에 영향을 주는 물리화학적 요인. *한국식물병리학회지* 12: 422-427.
- (접수일 2002. 12. 10)  
(수락일 2003. 1. 30)