

국화재배지의 식물기생선충 분포조사 및 뿌리썩이선충의 ITS와 D3-28S rDNA 특성조사

한혜림¹ · 이재국 · 최동로* · 한만중 · 박병용²농업과학기술원 농업해충과, ¹국립산림과학원 산림병해충과, ²작물과학원 인삼약초과Occurrence of Plant Parasitic Nematodes in Chrysanthemum and ITS and D3-28S rDNA Characterization of *Pratylenchus* spp.Hyerim Han¹, Jae-Kook Lee, Dong-Ro Choi*, Man-Jong Han and Byeong-Yong Park²

Applied Entomology Division, National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

¹Division of Forest Diseases and Insect pests, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea²Ginseng & Medicinal Crop Division, National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

ABSTRACT : A survey was conducted to find out the major plant parasitic nematode in *Chrysanthemum morifolium* fields in Korea from May to June in 2005. A genus of *Pratylenchus* was determined as the most important plant parasitic nematode based on analysis of total 50 samples from 8 cities of chrysanthemum field. *Pratylenchus* showed 86% occurrence rate and average numbered 1,095 per 200cc soils and 1g root. Five *Pratylenchus* isolates, 'Muan', 'Masan', 'Teon', 'Gumi', 'Jeongup', were selected for the molecular identification of the species of *Pratylenchus*, and ITS and D3-28S ribosomal DNA were amplified by PCR. For the ITS, only 'Muan' isolate was differentiated by total 1 kb PCR amplification, which was 200 bp larger than all the other isolates. There was no size variation in amplified D3-28S rDNA and all isolate represented approximately 320 bp of PCR product. Sequence data of D3-28S rDNA were analysed by MegAlign program in DNASTAR software and phylogenetic tree was constructed. Sequence homology was 100% between 'Gumi' isolate and 'Teon' isolate and 'Jeongup' isolate was also close to these isolates by 99.7% sequence homology. 'Gumi', 'Teon' group and 'Jeongup' isolate were determined to be closely related to *Pratylenchus vulnus* by 96.7% and 96.3% similarity in respectively. D3 sequence of 'Masan' isolate was 100% identical to *P. penetrans*, and 'Muan' isolate showed 99.7% similarity to *P. brachyurus*. This result was congruent with the branch divergence pattern shown in phylogenetic tree.

KEY WORDS : *Pratylenchus*, ITS, D3-28S, Molecular identification, *Chrysanthemum morifolium*

초 록 : 2005년 5월부터 6월까지 국내 주요 국화재배 포장에서 총 50개 토양시료를 채집하여 식물기생선충상을 조사하였다. 조사 결과, 뿌리썩이선충(*Pratylenchus*)의 포장발생률이 86%로 대부분의 포장에서 광범위하게 분포하였고, 밀도는 토양 200 cc와 뿌리 1 g에서 평균 1,095마리가 검출되었다. 분자생물학적 동정을 위하여, '무안', '구미', '태안', '정읍', '마산' 등 5지역을 선정하고, 그 지역의 뿌리썩이선충을 대상으로 ITS와 D3-28S rDNA의 유전자 분석을 하였다. PCR 결과 증폭된 ITS는 '무안'의 경우 1 kb 크기로 나타났고, 그 외의 다른 지역의 뿌리썩이선충에서는 0.8 kb로서 약 200 bp가량의 차이가 있었다. D3-28S rDNA의 PCR 결과에서는 모든 지역에서 약 320 bp로 일정한 크기의 gene이 증폭되었으며, 증폭된 DNA는 sequencer를 이용하여 염기서열정보를 얻었다. 얻어진 각 isolate의 D3 염기서열 정보는 DNASTAR 분석 소프트웨어의 MegAlign 프로그램을 이용하여 분석 및 phylogenetic tree를 형성하였다.

*Corresponding author. E-mail: drchoi@rda.go.kr

분석 결과 ‘구미’와 ‘태안’ isolate의 D3 염기서열은 100% 일치하였고, ‘정읍’ isolate는 이들 isolate와 99.7%의 유사성을 나타내었다. 또한 이들 세 isolate는 *Pratylenchus vulnus*와 근연종임이 확인되었는데, ‘구미’, ‘태안’은 96.7%, ‘정읍’은 96.3%의 유사성을 각각 나타내었다. 한편, ‘마산’ isolate는 *P. penetrans*와 100% 일치됨을 나타내었고, ‘무안’ isolate는 *P. brachyurus*와 99.7%의 유사성을 나타냄으로써 높은 상관성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 phylogenetic tree에서도 동일한 결과를 나타내고 있다.

검색어 : 뿌리썩이선충, ITS, D3-28S, 분자생물학적 동정, 국화

국화는 대표적인 절화류로 한국, 중국, 일본 등 아시아 지역에서 선호도가 높다. 국화의 국내재배 면적은 2003년 기준으로 약 760 ha이고, 10여 년 전부터 재배면적이 꾸준히 증가하고 있는 추세이며, 현재 80%가 시설에서 재배되고 있다(Web site of Chungnam Agricultural Research & Extension Services, Web site of Kumi Cooperation) 이들 농가는 장기간 연작으로 토양 염류집적, 토양병, 선충 등 여러 가지 문제에 직면하고 있는 상황이다. 연작에 의한 선충 밀도 증가는 뿌리근력을 약화시키고, 식물체의 면역을 저하시킴으로써 직·간접적으로 다른 병충해에 노출되었을 때 예상치 못한 손실을 야기할 수 있다.

국내 화훼류에 기생하는 선충은 2목 11과 26속 39종이 기록되어 있으며, 경제적으로 중요한 선충은 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.), 뿌리썩이선충(*Pratylenchus* sp.), 잎선충(*Aphelenchoides* sp.) 등 3개 속이다(Kim, 1989). 국화에 기생하는 선충은 9개 속이 보고되어 있으며, 이것들 중에 뿌리썩이선충이 가장 중요한 선충으로 알려져 있다(Kim, 1989). 뿌리썩이선충은 전 세계적으로 63종이 보고되어 있으며(Handoo and Golden, 1989), 국내에서는 현재 11종이 보고되어 있다(Park, 1996). 기주범위는 넓은 편으로 목본류를 포함한 대부분의 농작물을 가해하지만, 특히 국화, 거베라 등 숙근화훼류에 심한 피해를 주고 있다. 뿌리썩이선충은 이동성 내부기생성 선충으로서 작물의 뿌리조직을 뚫고 들어가 구침을 이용하여 세포를 흡즙하여 파괴한다(Acosta and Malek, 1981; Loof, 1991). 피해가 심하면 뿌리조직의 과사를 유발하여 발육이 억제되거나 부패하게 되는데, 이로 인하여 지상부는 왜화되거나 황화현상이 나타나게 된다(Loof, 1991). 하지만, 국내에서 뿌리썩이선충에 대한 기초적인 연구 성과는 미흡한 실정이며, 분류학적인 보고나 자료도 불충분하다. 또한 뿌리썩이선충의 형태는 중간 유사성이 높고, 변이의 폭이 넓어서 형태적인 특징이나, 측정치를 기준으로 동정을 하고자 할 때는 많은 애로점 들이 내포되어 있다. 이러한

뿌리썩이선충의 종내 변이에 대해서는 이미 1978년 Loof가 몇몇 *Pratylenchus* 종의 형태적 특징을 기술하면서 의견을 제시한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 국내 국화 시설재배지에서 분포하고 있는 식물기생선충 상을 조사하고, 그 중에서도 대표종이라고 할 수 있는 뿌리썩이선충의 지역별 대표군들을 선정하여 ITS-1과 28S 라이보솜 DNA 특징들을 이용하여 뿌리썩이선충의 분자생물학적인 종 동정법에 활용이 될 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채집

국화포장에서 발생하는 선충 조사를 위하여 2005년 5월과 6월에 걸쳐 경남 지역의 부산, 마산, 김해, 창원에서 32개 시료, 전남지역의 무안, 광주에서 10개, 전북 정읍에서 2개, 충남 태안에서 6개 등 총 50개 포장에서 국화뿌리와 토양을 채취하였다. 또한 DNA 분석을 위한 경북지역의 시료를 추가하기 위하여 구미 원예수출공사에서 채집한 국화에서 뿌리썩이선충을 분리하여 분석에 이용하였다.

선충 분리 및 조사

채집한 시료로부터 선충을 분리하기 위해서 우선 토양과 국화 뿌리는 각각 나누어 처리하였다. 토양의 경우 흙 200 cc를 정량하여 60 mesh와 400 mesh 체에서 순서대로 거른 다음, 설탕물을 이용한 원심분리법으로 선충을 분리하였다. 국화 뿌리는 물에 깨끗이 씻은 다음 표면의 물기를 제거한 후 가위로 0.5 cm 크기로 잘게 잘라 1 g을 정량하여 변형깔대기법(Modified Baermann funnel)(Hooper, 1990)을 이용하여 48시간동안 체에 올려둔 다음

선충을 분리하였다. 각각의 방법에서 분리한 선충은 해부 현미경하에서 속별로 계수하였다.

시험 선충

DNA 분석 실험을 위한 뿌리썩이선충은 전국에서 채집한 시료 중에서 각 도별 대표지역을 선정하여 분리한 선충을 사용하였다. 선정된 지역은 ‘마산’(경남), ‘구미’(경북), ‘무안’(전남), ‘정읍’(전북), ‘태안’(충남)으로 총 5개 지역이다. 각 지역에서 분리한 선충은 소국(spray 국화)에 재접종하여 온실에서 유지·증식하였다. 또한 뿌리썩이선충의 D3-28S 염기서열 분석에 이용된 GenBank 등록 자료는 다음과 같다. *Pratylenchus vulnus* (U47547), *P. musicola* (U47555), *P. coffeae* (U47552), *P. scribneri* (U47551), *P. hexincisus* (U47554), *P. throni* (U47550), *P. brachyurus* (U47553), *P. penetrans* (U47546), *P. minyus* (U47548), *P. zae* (AF303950), *P. crenatus* (U47549).

DNA 추출

QIAGEN의 DNeasy tissue kit (QIAGEN-Inc., Valencia, CA)를 이용하여 뿌리썩이선충 암컷 한 마리로부터 전체 genomic DNA를 분리하였으며, 그 방법은 다음 순서와 같다. 1) 뿌리나 토양에서 분리된 선충은 일차적으로 살균수에 여러번 헹구어 표면의 불순물을 제거한다. 2) 그런 다음 ATL buffer, 180 ul와 proteinase K, 20 ul를 섞은 용액을 microcentrifuge tube에 넣고 현미경하에서 건져 올린 선충을 옮긴다. 3) 선충이 옮겨진 tube는 55°C 항온수조에서 3시간 incubation 한다. 4) AL buffer, 200 ul를 첨가하여 다시 70°C에서 10분간 incubation한다. 5) 그런 다음, 95% ethanol 200 ul 첨가하여 섞은 다음, DNeasy mini spin column에 전체 용액을 옮긴 후, 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 한다. 6) washing buffer AW1과 AW2를 각각 500 ul씩 넣고 차례로 8,000 rpm에서 1분간 원심분리를 해준다. 7) 마지막으로 순수 DNA를 분리해내는 AE buffer, 50 ul를 직접 DNeasy membrane에 넣고, 상온에서 1분간 incubation한 다음, 8,000 rpm에서 1분간 원심분리를 해서 DNA를 분리하였다. 추출된 DNA는 -20°C에 보관하였다.

PCR

PCR을 위하여 PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, pH 9.0), 250 μM dNTP, 0.5 μM

Primer, 1.0U Taq DNA polymerase (Takara Bio Inc. Shiga, Japan), 그리고 5 μl DNA template를 포함하여 총 50 μl의 반응 용액을 준비하였다. ITS 증폭을 위하여는 Ferris 등(1993)이 고안한 forward primer, 5'-CGTAA-CAAGGTAGCTGTAG-3'와 reverse primer 5'-TCCT-CCGC TAAATGATATG-3'를 선택하였고, D3-28S rDNA의 증폭을 위해서는 Baldwin 등(1997)이 고안한 D3A, forward primer, 5'-GACC CGTCTTGAAACACGGA-3'와 D3B, reverse primer 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'를 이용하였다. ITS 부분의 PCR 증폭을 위한 적정 조건은 초기 95°C 5분간 denaturation과 이어진 95°C, denaturation 1분/48°C, annealing 30초/72°C, extension 1분으로 구성된 총 35 cycle, 그리고 마지막 72°C에서의 10분간 extension이다. D3-28S 부분은 위의 동일 조건에서 annealing 온도를 62°C로 조정하였다. PCR 프로그램은 DNA thermal cycler PTC-0200 (MJ Research Inc. Waltham MA)을 이용하여 성공적으로 수행되었으며, 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel상에서 전기영동을 통하여 확인하였다.

DNA 염기 서열 분석

PCR 증폭된 D3-28S ribosomal DNA는 PCR purification kit (QIAGEN, Valencia, CA)를 이용하여 DNA를 순수 분리한 다음, 코아바이오 sequencing lab에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 그 결과 각 지역별로 얻어진 뿌리썩이선충의 D3-28S DNA data는 DNASTAR Lasergene ver 6.0에 있는 MegAlign의 Clustal W 프로그램을 이용하여 multiple-alignment를 하였고, 이를 기준으로 한 phylogenetic tree를 형성하였다. 또한 sequence간의 유사도와 차이점은 ‘Percent identity 및 divergence’ 표를 참고로 하여 비교하였다.

결과 및 고찰

식물기생선충 분포 조사

전국 국화재배지 50개 포장에서 수집한 토양 시료를 조사한 결과 총 7개 속(genus)의 식물기생선충이 검출되었다(Table 1). 이 중에 뿌리썩이선충이 전체 50개 시료 중 43개 시료에서 검출됨으로써 86%의 검출율을 나타내며 가장 높은 분포를 나타내었다. 그 다음으로는 침선충(*Paratylenchus* sp.)이 60%, 참선충(*Tylenchus* sp.) 30% 순으로 조사되었다. 뿌리썩이선충은 지역별 차이가 크지

Table 1. Occurrence of plant parasitic nematodes infected in chrysanthemum

Sampling Area (No. of Samples)	No. of plant parasitic nematode / 200 cc soil and 1g of roots						
	<i>Pratylenchus</i>	<i>Paratylenchus</i>	<i>Meloidogyne</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Criconeimoides</i>	<i>Tylenchorhynchus</i>	<i>Tylenchus</i>
	8 ^a	9				1	4
Busan (10)	733±984 ^b (10~2,970) ^c	12,276±16,421 (60~52,860)	-	-	-	640	255±152 (25~453)
	11	4			1		3
Masan (11)	1,925±1,406 (10~4,300)	4,048±5,977 (40~12,940)	-	-	30	-	93±56 (16~145)
	2	3					
Gimhae (4)	1,030±552 (640~1,420)	17,860±28,465 (800~50,720)	-	-	-	-	-
	7	5					
Changwon (7)	1,031±1,015 (60~2,800)	2,716±3,096 (520~8,100)	-	-	-	-	-
	6	6					2
Muan (7)	1,265±2,547 (10~6,405)	8,716±14,102 (645~35,568)	-	-	-	-	93±88 (31~155)
	1	2					1
Gwangju (3)	330	16,755±19,283 (3,120~30,390)	-	-	-	-	240
	2	1	1	1			2
Jeongup (2)	50±28 (30~70)	30	150	270	-	-	375±278 (178~572)
	6				1		3
Teian (6)	457±468 (16~1,110)	-	-	-	30	-	182±84 (19~323)
Total the No. of Sample (50)	43	30	1	1	2	1	15
Average Nematode Density	1,095	9,322	150	270	30	640	199
(Occurrence Rate)	86%	60%	2%	2%	4%	2%	30%

^a The numbers of samples detect the nematode genus

^b The average number of nematode ± standard deviation

^c The range of nematode population density

않고, 전국적으로 고르게 분포하고 있는 것으로 나타났으나, 일반적으로 재배 연수가 10년 이상의 재배 농가의 경우 연작 장애와 더불어 수세가 약해진 포장에서 선충의 밀도가 높게 나타났다. 특히, 부산, 김해 지역은 염류 집적에 의해서 작물의 수세가 약해짐에 따라 흰녹병 등의 지상부 식물병해와 더불어 토양의 선충 피해도 증가하는 경향을 나타내었다. 마산 지역은 국내에서 가장 오래된 국화재

배지역으로 비교적 최근의 대규모 시설단지가 형성된 부산, 김해와는 다르게 소규모의 재배 농가들이 산발적으로 비닐하우스 단지를 형성하고 있었는데, 이 곳에서는 재배 기간이 30~40년 이상 된 농가들이 많았고, 이들 대부분의 농가에서는 뿌리썩이선충이 검출되었다. 또한 마산의 경우 뿌리썩이선충의 평균 밀도는 1,925마리로 조사지역 중에서 가장 높게 나타난 곳이다. 반면에 전북 정읍의 경우

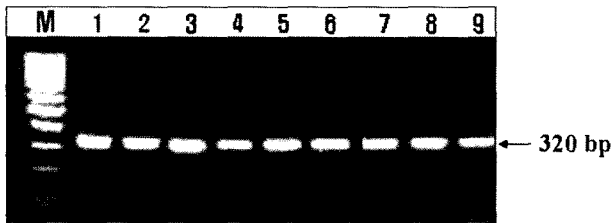


Fig. 1. D3-28S rDNA PCR amplification of *Pratylenchus* isolates on 1.2% agarose gel. M: A 100 bp molecular marker, 1, 2: 'Masan' isolate, 3, 4: 'Gumi' isolate, 5, 6: 'Tean' isolate, 7, 8: 'Jeongup' isolate, 9: 'Muan' isolate

는 50마리의 평균 밀도를 나타냄으로서 상대적으로 낮은 밀도를 나타내었고, 이 지역의 경우는 침선충의 평균 밀도도 30마리 정도로 낮게 나타났다. 한편, 정읍 지역에서는 타 지역에서 검출되지 않은 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.), 나선선충(*Helicotylenchus* sp.)이 검출되는 양상도 함께 관찰되었다. 침선충은 뿌리썩이선충 보다 검출률은 현저히 낮았지만 평균 발생 밀도는 9배나 높은 9,322마리를 나타내었다. 침선충의 발생 밀도는 김해, 광주 지역에서 가장 높았고, 반면 태안에서는 전혀 검출이 되지 않았다. 그러나 침선충을 포함한 참선충, 나선선충, 위축선충(*Tylenchorynchus* sp.), 주름선충(*Criconeoides* sp.) 등은 외부기생선충 종들로서 그 피해 기작이나 피해정도에 대한 명확한 보고 자료는 거의 찾아볼 수 없다.

PCR 결과

뿌리썩이선충 암컷 한 마리로부터 전체 genomic DNA를 추출하고, PCR의 template DNA로 이용하였다. ITS 증폭 실험에서는 PCR 결과 48°C annealing 온도조건하에서 '마산', '구미', '태안', '정읍' 지역의 뿌리썩이선충에서는 약 800 bp 크기의 ITS가 증폭되었지만, '무안' isolate는 이보다 200 bp가 큰 1 kb 크기로 증폭되었다. 따라서 '무안' 계통은 타 지역의 뿌리썩이선충들과 일차적으로 ITS 크기에서 차별화 되었다. 한편, D3-28S ribosomal DNA는 62°C annealing 온도의 PCR 조건하에서 성공적으로 증폭되었으며, 그 크기는 모든 지역의 뿌리썩이선충에서 약 320 bp크기로 동일하게 나타났다. 증폭된 DNA는 PCR purification system kit를 이용해 DNA만을 순수 분리한 후 Corebio의 sequencing Lab에 염기서열을 분석 의뢰를 하였다.

DNA 염기서열 분석

얻어진 D3-28S DNA 염기서열은 DNASTAR의 MegAlign

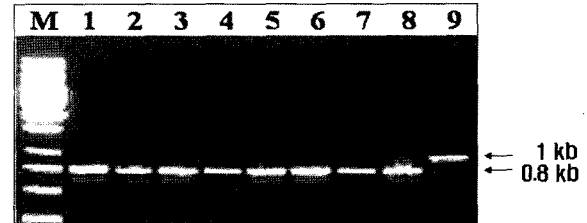


Fig. 2. ITS-rDNA PCR amplification of *Pratylenchus* isolates on 1.2% agarose gel. M: A 1 kb molecular marker, 1, 2: 'Masan' isolate, 3, 4: 'Gumi' isolate, 5, 6: 'Tean' isolate, 7, 8: 'Jeongup' isolate, 9: 'Muan' isolate

프로그램을 이용하여 분석하였다. Primer 부분을 제외한 증폭된 전체 D3 DNA 크기는 300~303 bp 범위 내에 속하였다. '마산'은 300 bp, '무안', '태안', '구미'는 301 bp, '정읍'은 303 bp 크기로 증폭 되었다. Table 2와 같이 지역적으로 서로 다른 '구미'와 '태안', '정읍' isolate가 D3 염기서열상으로는 가깝게 연관되어 있었고, 이들 세 isolate는 *P. vulnus*와 가장 높은 유사도를 나타내었다. '구미'와 '태안'의 경우 상호 유사도가 100%로서 완전히 일치함을 알 수 있었고, '정읍'의 경우는 '구미', '태안' isolate와 99.7%의 유사성을 가지고 있었다. *P. vulnus*와는 '구미'와 '태안'이 96.7%의 유사도를 나타내었고, '정읍'은 96.3%의 유사성을 나타내었다. '마산' isolate는 *P. penetrans*와 100% 유사도를 나타내었고, 한편 '무안' isolate는 *P. brachyurus*와 99.7%의 유사도를 나타내었다. 따라서 이상의 결과로 볼 때 우리나라 주요 지역별 국화재배지의 뿌리썩이선충 종은 *P. vulnus*, *P. penetrans*, *P. brachyurus*와 동일하거나 근연종임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 사실은 Fig. 3.에서 나타난 tree의 branch pattern에서 동일한 결과를 확인할 수 있다.

이상의 결과로 볼 때 D3-28S ribosomal DNA는 형태적인 구별이 어려운 뿌리썩이선충의 종간 특성이 잘 보존되어 있는 유전자 마커라고 할 수 있다. 이와 같은 특성을 이용하여 2004년 Al-Banna 등은 D3-28S ribosomal DNA에서 '종 특이적인 primer'를 고안하여 *P. brachyurus*, *P. neglectus*, *P. scribneri*, *P. penetrans*, *P. thornei*, *P. vulnus* 등 일반적으로 많이 분포하는 6종의 뿌리썩이선충을 동정할 수 있는 방법을 제시하기도 하였다. 비슷한 방법이지만 D3가 아닌 다른 ribosomal DNA를 이용하여 종 특이적인 primer를 개발하여 *P. coffeae*와 *P. loosi*를 구별화한 방법이 있으며(Uehara et al., 1998), 다른 식물기생선충 또는 동물기생선충의 종 동정법에도 종 특이적 primer가 이용되고 있다(Roos and Grant, 1993; Williamson et al., 1997). 또한 Duncan 등(1999)은 *P. coffeae*등 근연

Table 2. Percent identity and divergence among 16 different species and geographical isolates of *Pratylenchus*

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	99.7	91.0	92.4	92.4	91.4	90.0	92.4	93.7	93.7	91.0	93.4	93.4	96.7	91.0	100.0	1	Gumi
	2	0.3	■	91.3	92.0	91.4	90.4	89.4	92.0	92.7	93.4	91.3	92.7	92.7	96.3	90.7	99.7	2	Jeungup
	3	11.6	11.2	■	89.3	89.3	87.0	85.3	89.7	85.3	89.7	100.0	88.7	90.0	90.0	87.7	91.3	3	Masan
	4	8.2	8.5	13.3	■	99.7	96.0	89.4	98.7	89.7	94.4	89.3	96.7	94.0	93.0	90.7	92.4	4	Muan
	5	8.5	8.9	13.7	0.0	■	95.4	89.1	98.7	89.4	94.4	89.7	96.4	94.0	93.4	90.7	92.7	5	<i>P. brachyurus</i>
	6	9.2	9.6	15.0	4.5	4.5	■	88.4	95.7	88.7	94.7	87.0	96.0	93.4	92.0	89.7	91.4	6	<i>P. coffeae</i>
	7	10.5	10.9	17.1	12.5	12.8	12.3	■	90.0	88.1	90.4	86.0	90.1	88.7	91.7	89.3	90.4	7	<i>P. crenatus</i>
	8	3.2	8.6	13.1	0.7	0.7	4.2	11.0	■	89.7	94.0	89.7	96.0	93.7	93.0	89.7	92.4	8	<i>P. hexincisus</i>
	9	5.7	7.1	15.4	11.6	12.0	11.9	14.1	11.8	■	92.7	86.3	90.4	91.4	92.0	90.3	93.7	9	<i>P. minyus</i>
	10	6.7	7.0	11.2	6.3	6.7	6.3	9.7	5.6	8.9	■	89.7	97.0	94.0	93.7	90.3	93.7	10	<i>P. musicola</i>
	11	11.6	11.2	0.0	13.3	13.7	15.0	17.1	13.1	15.4	11.2	■	88.7	90.0	90.0	87.7	91.3	11	<i>P. penetrans</i>
	12	7.7	8.1	14.4	3.8	3.8	4.8	9.7	3.8	10.4	3.8	14.4	■	93.7	94.0	90.3	93.4	12	<i>P. scribneri</i>
	13	7.4	7.8	12.8	6.2	6.2	7.3	13.2	6.7	10.4	6.6	12.8	6.6	■	94.7	90.3	93.4	13	<i>P. thornei</i>
	14	3.4	3.8	11.2	7.8	8.1	8.9	9.3	7.8	8.6	6.7	11.2	7.0	6.3	■	91.3	96.7	14	<i>P. vulnus</i>
	15	10.0	10.4	13.2	10.0	10.4	11.5	13.7	10.1	9.7	10.0	13.2	11.1	11.6	9.6	■	91.3	15	<i>P. zeae</i>
	16	0.0	0.3	11.6	8.2	8.5	9.2	10.5	8.2	6.7	6.7	11.6	7.7	7.4	3.4	10.0	■	16	Teon
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

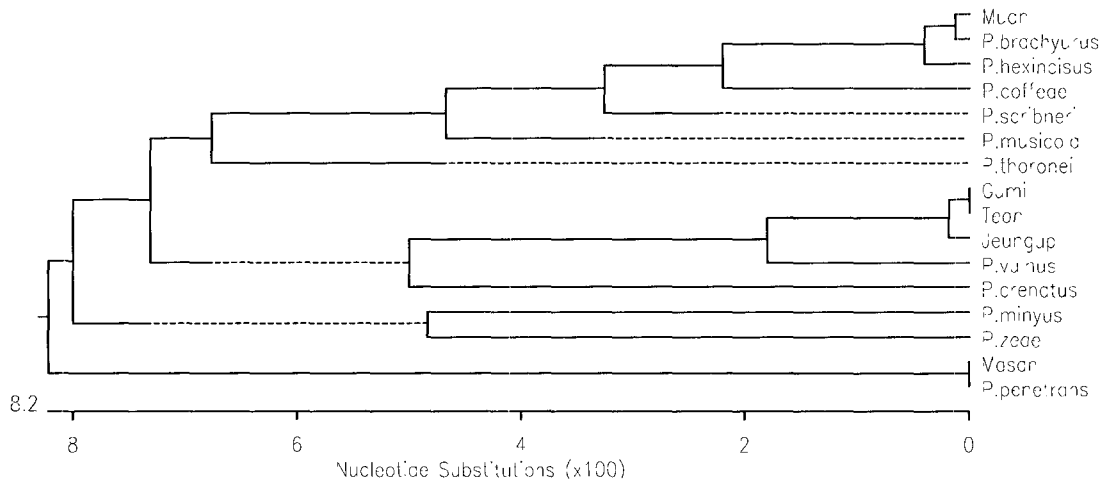


Fig. 3. Phylogenetic tree based on D3-28S ribosomal DNA sequence from different species and isolate of *Pratylenchus* spp. The tree was constructed by using MegAlign program in DNASTAR.

한 뿌리썩이선충 종들의 형태적인 특징과 D2/D3 유전적 특징을 연관하여 분석을 시도하였다. Handoo 등(2001)은 신종인 *P. arlingtoni*와 기존의 *P. convallariae*, *P. fallax* 종 간의 차이를 형태적 특징과 분자생물학적 차이를 함께 나타내기 위하여 D3-28S rDNA를 하나의 마커로써 활용하였다. 이러한 D3-28S rDNA의 활용에 관한 정보는 이미 1997년 Al-Banna 등이 10개의 뿌리썩이선충 종을 포함한 *Pratylenchus* 속과 다른 주요 식물기생선충 속과의 계통분류학적인 유연관계를 밝히는 데에 이용되면서 D3-28S rDNA의 기초정보를 제공하기도 하였다.

ITS 실험 결과의 경우 일본의 Orui (1996)의 실험 결과

와 비교해 보면, 일본의 경우 PCR 결과 *P. vulnus*와 *P. penetrans*는 약 0.8 kb에서 증폭되었고, *P. coffeae*의 경우 1.0 kb크기로 증폭이 되었다고 한다. 국내의 경우 *P. vulnus*와 가까운 종으로 나타난 ‘구미’, ‘태안’, ‘정읍’ isolate와 *P. penetrans*와 일치하는 종으로 나타난 ‘마산’ isolate의 경우 Orui의 결과와 동일한 0.8 kb에서 PCR 증폭이 되었다. 새로운 사실은 *P. brachyurus*와 거의 유사하게 나타난 ‘무안’ isolate의 경우 *P. coffeae*와 동일한 1.0 kb에서 증폭이 있었다는 점이다. Orui의 보고에 의하면, Alu I, Dde I, Hha I, Hinf I 등의 제한효소를 이용한 polymorphism을 이용하면 *P. vulnus*, *P. penetrans*, *P. coffeae* 세 종은 차별

화 될 수 있다. 하지만, 2000년 Waeyenberge 등은 rDNA의 PCR-RFLP 방법을 이용하여 보다 많은 18종의 뿌리썩이선충의 분자생물학적 특성을 보고한 바 있다. 따라서, 일본의 경우 단지 위의 뿌리썩이선충 세 종에만 국한된 방법이라는 한계점이 있기 때문에 이를 극복하려면, 국내의 경우 다양한 뿌리썩이선충 공시충의 확보와 ITS에 관한 유전적 정보를 충분히 확보하여 PCR-RFLP 방식을 체계화할 필요가 있다.

따라서 국내에 분포하는 뿌리썩이선충의 기본적인 종 분포 조사와 공시충의 확보가 이루어지면 ITS 뿐만 아니라 D3-28S rDNA의 sequence 자료의 활용도 역시 높아질 수 있다. 종 특이적 프라이머의 제작으로 종 동정에 이용할 수 가 있고, sequence data 그 자체로서 새로운 종이나 변이 종의 특성을 제시할 수도 있기 때문에 유용한 정보로서 가치가 있다. 따라서 본 논문에서 제시한 *Pratylenchus*의 D3-28S rDNA와 ITS의 복합적인 정보는 국내에서는 처음으로 다루어진 *Pratylenchus*의 유전적 특징으로서 의의가 있으며, 향후 국화뿐만이 아니라 다양한 기주와 다양한 지역의 뿌리썩이선충의 분류 및 동정을 위한 기초 자료로 활용될 것으로 기대한다.

Literature Cited

- Acosta, N. and R. B. Malek. 1981. Symptomatology and histopathology of soybean roots infected by *Pratylenchus scribneri* and *P. alleni*. *J. Nematol.* 12: 6-12.
- Al-Banna, L., A. T. Ploeg, V. M. Williamson, and I. Kaloshian. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *J. Nematol.* 36: 142-146.
- Al-Banna, L., V. Williamson, and S. L. Gardner. 1997. Phylogenetic analysis of nematodes of the genus *Pratylenchus* using nuclear 26S rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8: 249-259.
- Baldwin, J. G., L. M. Ferris, J. T. Vida, C. D. Eddleman, and W. K. Thomas. 1997. An evolutionary framework for the study of developmental evolution in a set of nematodes related to *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8: 249-259.
- Choi, D. R., Y. M. Choi and S. C. Han. 1992. Effect of *Pratylenchus coffeae* on Growth of Gebera. *The Research Reports of the Rural Development Administration* Vol. 34: 85-90. Chungnam Agricultural Research & Extension Services. <http://www.chungnam.rda.go.kr/chrysan/newhome/new/NEW.html>.
- Duncan, L. W., R. N. Inerra, W. K. Thomas, D. Dunn, I. Mustika, L. M. Frisse, M. L. Mendes, K. Morris, and D. T. Kaplan. 1999. Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species *Nematropica* 29: 61-76.
- Ferris, V. R., J. M. Ferris, and J. Faghihi. 1993. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundam. Appl. Nematol.* 16: 177-184.
- Handoo, Z. A., and A. M. Golden. 1989. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Lesion Nematodes). *J. Nematol.* 21: 202-218.
- Handoo, Z. A., L. K. Carta, and A. M. Skantar. 2001. Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus arlingtoni* n. sp., *P. convallariae* and *P. fallax* (Nematoda: Pratylenchidae). *Nematology* 3: 607-618.
- Hooper, D. J. 1990. Extraction and processing of plant and soil nematodes. pp. 45-68. *In Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* L. ed. by L. Luc 629 pp. CABI, Wallingford, UK.
- Kim, Young Jin. 1989. Nematodes associated with ornamental plants in Korea. Thesis on Doctor's degree, Graduate School of Kyungpook National University. p 1-93.
- Kumi Cooperation. <http://www.kumicorp.com/indust04.php>.
- Loof, P. A. A. 1978. The genus *Pratylenchus filipjev*, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae): A review of its anatomy, morphology, distribution, systematics, and identification. Research Information Center. Swedish University of Agricultural Science. Uppsala, Sweden.
- Loof, P. A. A. 1978. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. pp. 363-461. *In Manual of agricultural nematology.* ed by W. R. Nickle. 1,035 pp. MARCEL DEKKER, INC. New York.
- Orui, Y. 1996. Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Appl. Entomol. Zool.* 31: 505-514.
- Park, Byeong-Yong. 1996. Taxonomical study of *Pratylenchus* spp. in Korea. Thesis on Master's degree, Graduate School of Kon-Kuk University. p 1-49.
- Roos, M. H., and W. N. Grant. 1993. Species-specific PCR for the parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 23: 419-421.
- Uehara, T. T. Mizukubo, A. Kushida, and Y. Momota. 1998. Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* 44: 357-368.
- Waeyenberge, L., A. Ryss, M. Moens, L. Pinochet, and T. C. Vrain. 2000. Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. *Nematology* 2: 135-142.
- Williamson, V. M., E. P. Caswell-Chen, B. B. Westerdahl, F. F. Wu, and G. Caryl. 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *J. Nematol.* 29: 9-15.

(Received for publication 6 November 2006;
accepted 27 November 2006)