

잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 종 동정과 PCR 검출을 위한 종 특이적 Primer의 개발

송정영¹ · 임진하¹ · 남명현² · 김홍기¹ · 김병섭^{3*}

¹충남대학교 응용생물학전공, ²논산딸기시험장, ³강릉대학교 식물생명과학과

Development of PCR Primers for Specific Identification and Detection of *Botrytis cinerea* on Tomato

Jeong Young Song¹, Jin Ha Lim, Myeong Hyeon Nam², Hong Gi Kim¹ and Byung-Sup Kim^{3*}

¹Dept. of Agricultural Biology, Chungnam National University,

²Nonsan Strawberry Experiment Station, Chungnam ARES,

³Dept. of Plant Science, Kangnung National University

(Received November 24, 2008. Accepted December 19, 2008)

ABSTRACT: *Botrytis cinerea*, gray mold pathogen, causes serious losses in greenhouse tomato crop. In this study, a primer set was developed for identification and specific PCR detection of *B. cinerea* from tomato plants. The primer pair (BTF1/BTR1) was designed from polymorphic sequence region in pyruvate carboxylase gene (*pyc*) of *B. cinerea*. A PCR product (112 bp) was amplified on genomic DNA of 13 *B. cinerea* isolates from 10 different host plants, but not on those from 6 other *Botrytis* spp., 4 *Botryotinia* spp., 5 *Sclerotinia* spp. and 16 other genus of phytopathogenic fungi. The sensitivity limit of the primer set was 2 µg of genomic DNA of *B. cinerea*, approximately. The PCR assay using species-specific primer set was specifically able to detect the pathogen on naturally infected tomato plants and artificially infected plants. These results suggest that the sensitivity and specificity of this primer set can be applied in a rapid and accurate diagnosis of tomato disease caused by *B. cinerea*.

KEYWORDS : *Botrytis cinerea*, Pyruvate carboxylase gene, Species-specific primer, Tomato

토마토 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*, 완전세대: *Botryotinia fuckeliana*)은 토마토 이외에 가지, 고추, 딸기, 오이 등 채소류, 화훼류, 과수류 등의 200여 기주에 대해 병을 일으키는 다범성 식물병원균으로 국내는 물론 전세계적으로 널리 분포하며 경제적으로 심각한 피해를 일으킨다(Coley-Smith *et al.*, 1980; 김 등, 1997)

*B. cinerea*는 조건적 기생자로 알려져 있어 부생단계에서 이병잔재에서 균사나 균핵으로 존재하다가 늦가을에서 초봄 경 비닐하우스에서 토마토를 무가운 재배할 때 서늘하고 습한 조건에서 심하게 발병하며 수확후 저장과 수송시 발병하기도 한다(Chastagner and Ogawa, 1979; Coley-Smith *et al.*, 1980; Droby and Lichter, 2004; Williamson *et al.*, 2007). 또한, 월동한 균사와 균핵으로부터 비롯된 분생포자는 공기전염하여 식물체의 상처 부위나 연한 부분에 침입하여 발병하는데 특히 시든 꽃잎에 발생이 심하고 어린 과실로 전염되며 매우 빠른 속도로 병의 진전이 이루어져 그 방제가 매우 어렵다. 따라서 토마토 잣빛곰팡이병이 발생하기 전에 병원균이 잠복하는

식물체로부터 신속한 검출 및 정확한 종 동정을 통한 병 발생 예측은 효과적인 병 방제 대책 수립에 있어서 매우 중요하다.

최근 beta-tubulin 유전자, SCAR(sequence characterized amplified region) marker, IGS(intergenic spacer of the nuclear ribosomal DNA), ITS(internal spacer of the nuclear ribosomal DNA) 그리고 cutinase A 유전자 등의 다양한 특성을 갖는 DNA 염기서열들의 분석으로부터 얻어진 종 특이적 molecular marker와 이를 이용한 PCR (polymerase chain reaction) 분석방법이 *Botrytis* 속 병원균들의 종동정 및 병 진단에 있어서 매우 광범위하게 활용되어지고 있다(Chilvers *et al.*, 2007; Gachon and Saindrenan, 2004; Rigotti, *et al.*, 2002; Suarez, *et al.*, 2005).

본 연구에서는 새로운 종 특이적 molecular marker를 개발하기 위해 *B. cinerea*와 유전적으로 매우 유사한 *Botrytis*속내 다른 종들과 *Sclerotinia*속 종들의 pyruvate carboxylase(*pyc*) 유전자 내부의 변이 영역을 비교 분석하였으며, 개발된 *B. cinerea* 종특이적 primer를 PCR 기법을 이용하여 병 진단 및 종 동정에 활용하기 위해 그 민

*Corresponding author <E-mail : bskim@kangnung.ac.kr>

Table 1. Fungal species used in this study and their PCR detection using specific primer set (BTF1/BTR1)

Isolates	Fungal species	Host plants	Source ^a	PCR test ^b (BTF1/BTR1)
BC-RU	<i>Botrytis cinerea</i>	rubber tree	KN BC-RU	+
BC-ST	<i>B. cinerea</i>	strawberry	CNU BC-ST	+
BC-MA	<i>B. cinerea</i>	magnificus	CNU BC-MA	+
BC-TO	<i>B. cinerea</i>	tomato	CNU BC-TO	+
BC-YY2	<i>B. cinerea</i>	tomato	KN BC-YY2	+
BC-GR	<i>B. cinerea</i>	grape	KACC 43467	+
BC-IK21	<i>B. cinerea</i>	paprika	KN BC-IK21	+
BC-RRS	<i>B. cinerea</i>	paprika	KN BC-RRS	+
BC-LI	<i>B. cinerea</i>	lily	KACC 43463	+
BC-RO	<i>B. cinerea</i>	rose	KACC 43255	+
BC-58	<i>B. cinerea</i>	geranium	CNU BC-58	+
BC-447	<i>B. cinerea</i>	strawberry	CNU BC-447	+
BC-449	<i>B. cinerea</i>	strawberry	CNU BC-449	+
BOAC	<i>B. aclada</i>	allium	KACC 41297	-
BOBY	<i>B. byssoidea</i>	watermelon	KCTC 16833	-
BOCR	<i>B. croci</i>	crocus	KCTC 16835	-
BOEL	<i>B. elliptica</i>	lily	KACC 43461	-
BOFA	<i>B. fabae</i>	broad bean	KACC 40962	-
BOGA	<i>B. galanthina</i>	snowdrop	KCTC 16840	-
BTCA	<i>Botryotinia calthae</i>	caltha	KCTC 16834	-
BTCO	<i>Botryotinia convoluta</i>	iris	KCTC 16837	-
BTDR	<i>Botryotinia draytonii</i>	gladiolus	KCTC 16841	-
BTFI	<i>Botryotinia ficariarum</i>	plant debris	KCTC 16839	-
SLSC	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	lectucae	KACC 40457	-
SLBU	<i>Sc. bulborum</i>	peziza	KACC 43461	-
SLTR	<i>Sc. trifoliorum</i>	white clover	KACC 41270	-
SLSP	<i>Sc. spermophila</i>	white clover	KACC 41269	-
SLMI	<i>Sc. minor</i>	chinese cabbage	KACC 41066	-
SCCE	<i>Sc. cepivorum</i>	garlic	KACC 40482	-
SCDE	<i>Sc. delphinii</i>	german iris	KACC 41250	-
SCDE	<i>Sclerotium cepivorum</i>	lily	KACC 41251	-
SCHY	<i>Sclerotium delphinii</i>	victoria regia	KACC 41252	-
SCPE	<i>Sclerotium denigrans</i>	tulip	KACC 41253	-
SCRO	<i>Sclerotium hydrophilum</i>	apple	KACC 40832	-
SCTU	<i>Sclerotium perniciosum</i>	tulip	KACC 41270	-
SCWA	<i>Sclerotium rolfsii</i>	tulip	KACC 41257	-
SCBA	<i>Sclerotium tuliparum</i>	bean	KACC 40648	-
COAC	<i>Colletotrichum acutatum</i>	pepper	KACC 40689	-
PHIN	<i>Phytophthora infestans</i>	tomato	CNU-PHIN	-
ALSO	<i>Alternaria solani</i>	carrot	CNU-3509	-
CLCU	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	cucumber	KACC 40576	-
STLY	<i>Stemphylium lycopersici</i>	pepper	CNU-STLY	-
MOFR	<i>Monilinia fructicola</i>	apple	KACC 40328	-
ASNI	<i>Aspergillus niger</i>	pinus	CNU-ASNI	-
RHSO	<i>Rhizoctonia solani</i>	rice	KACC 40101	-
PYUL	<i>Pythium ultimum</i>	cucumber	KACC 40705	-
DIBR	<i>Didymella bryoniae</i>	melon	KACC 40669	-
FUFU	<i>Fulvia fulvum</i>	tomato	CNU-FUFU	-
PEDI	<i>Penicillium digitatum</i>	citrus	CNU-PEDI	-
RHOR	<i>Rhizopus oryzae</i>	sudan grass	KACC 40936	-
FOLY	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	tomato	CNU-FOLY	-
STNA	<i>Stromatinia narcissi</i>	narcissus	KACC 41258	-

^aCNU, Chungnam National University; KN, Kangnung National University, KACC, Korean Agricultural Culture Collection and KCTC, Korean Collection for Type Cultures.

^b-, negative; +, positive.

감도 및 특이성을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

공시균주로 사용된 *B. cinerea*와 기타 균주들은 충남대 (CNU)에 보관중인 것들과 강릉대(KNU), 생물자원센터 (KCTC) 그리고 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양받아 사용하였다(Table 1).

Genomic DNA 분리

공시균주들을 PDA 배지에 접종하여 각각 20~27°C에서 5일간 배양한 후 균사 소량을 PD broth에 접종한 후 5일간 진탕 배양한 균사체를 멸균된 2겹의 가이제로 걸러 effendorf 튜브에 넣고 -70°C에서 얼린 후 동결건조를 실시하였다. 동결건조된 균사체를 마쇄한 다음 400 μ l의 extraction buffer[200 mM Tris-HCl(pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 proteinase K(50 μ g)를 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하였다. 다음은 400 μ l의 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 첨가하여 잘 섞어 준 후 600 μ l의 chloroform:isoamylalcohol(24 : 1)로 추출하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 1.5 ml tube에 넣었다. 상등액에 0.7 배량의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 침강된 DNA는 70% ethanol을 이용해 같은 방법으로 세척하였다. 튜브내의 ethanol을 제거, 건조시킨 후 DNA를 100 μ l의 TE buffer에 녹인 다음 2 μ l(10 mg/ml)의 RNase를 첨가하여 RNA를 제거 한 후 agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인 및 정량하였다. 토마토 재배 포장에서 수집한 잣빛곰팡이병에 감염된 식물체(100 mg)와 *B. cinerea*를 상처 접종시킨 후 얻어진 병든 토마토 병반(100 mg) 및 균핵(20 mg)으로부터의 genomic DNA 분리도 위와 동일하게 실시하였다.

Pyruvate carboxylase(*pyc*) 유전자의 PCR 증폭

GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 공개된 *Botryotinia fuckeliana*(XM_001556508), *Sclerotinia sclerotiorum*(XM_001586211), *Podospora anserine*(XM_001913025), *Gibberella zeae*(XM_387251), *Magnaporthe grisea*(XM_367852) 등과 JGI(<http://www.jgi.doe.gov/>)에 공개된 *Mycosphaerella graminicola*(scaffold_10:33663-38012)와 *Nectria haematococa*(scaffold_10:34021-37633)의 pyruvate carboxylase(*pyc*) 유전자의 DNA 염기서열들을 비교 분석하여 그 일부를 공통적으로 증폭할 수 있는 변형된 universal primer set PYCUF1(5'-GGACHACNTTCACGA-3')/PYCUR5(5'-GGNGTYACCTTGAC-3')와 PYCUF(5'-

CACTTCTGTGAGCAAGC-3')/PYCUR(5'-GATGTTGG-AGTGACCTTG-3')를 설계하였다. 이를 이용해 pyruvate carboxylase(*pyc*) 유전자의 DNA 염기서열들을 얻고자 *B. cinerea*, *B. aclada*와 *B. fabae* 균주들에 대해서 PCR 증폭을 실시하였다. 각 유전자의 증폭을 위한 반응 mixture는 total volume을 50 μ l로 하고 template DNA 2~10 ng, 각 primer set 10 pmole, 250 μ M dNTPs, 10×PCR buffer 5 μ l, 2 mM MgCl₂, Taq DNA Polymerase 2 unit(Solgent Co.)을 첨가하여 PCR을 수행하였다. 유전자의 증폭은 initial denaturation을 94°C에서 5분간 실시한 후 denaturation 94°C/30초, annealing 55°C/90초, extension 72°C/90초로 35 cycles을 실시하고 final extension을 72°C/10분 실시하였다. MJ Research사의 PTC-100을 이용하여 PCR 증폭을 하였으며 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 100 V에 30분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다.

염기서열 분석

PCR 증폭 산물은 PCR prep kit(iNtRon Biotechnology)로 정제하고, BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Forster City, CA, U.S.A)를 이용, template 40 ng, primer(PYCUF1, PYCUR5, PYCUF, PYCUR)를 각각 3.2 pmol, terminator ready reaction mixture 8 μ l에 물을 첨가하여 20 μ l volume으로 조절한 뒤 96°C/10초, 50°C/5초, 60°C/4분으로 25 cycle의 PCR 반응을 수행한 후 ABI prism™ 3730 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)를 이용하여 sequencing을 실시하였다.

종 특이적 primer 선발

종 특이적 primer의 선발을 위해 본 연구에서 얻어진 *B. cinerea*, *B. aclada*와 *B. fabae*의 *pyc* 유전자 부분 염기서열 정보는 *B. fuckeliana*와 *Sc. Sclerotiorum*과 함께 EMBL-EBI(<http://www.ebi.ac.uk>)에서 clastralW 프로그램을 이용해 분석되었으며, Oligonucleotide Properties Calculator(<http://www.basic.northwestern.edu>)를 이용하여 *B. cinerea* 종 특이적 primer BTNF1; 5'-GCT TGA CCC AGG CTT GAA C-3'와 BTNR1 5'-TGG GTC TGG TCC CGT GTA A-3'를 설계했다.

종 특이적 primer의 특이성 및 민감도

개발된 primer의 종 특이성을 조사하고자 10개의 다른 기주식물에서 분리한 *B. cinerea* 13균주, 6종의 다른 *Botrytis* 속, 4종의 *Botryotinia*속, 7종의 *Sclerotinia* 속 및 그 이외의 16속 식물병원균 16균주들에 대해서 BTNF1/BTNR1 primer set을 이용해 PCR 반응을 실시하였다. 또한 민감도를 알아보기로 *B. cinerea* 균주(BC-TO)의 genomic DNA를 10배씩 연속적으로 희석시킨 후 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응 조건은 initial denaturation을 94°C

에서 5분간 실시한 후 denaturation 94°C/30초, annealing 65°C/30초, extension 72°C/30초로 35 cycles을 실시하고 final extension을 72°C/5분 실시하였다. PCR mixture는 genomic DNA의 *pyc* 유전자를 증폭할 때와 동일하게 제조하였다.

병든 식물체로부터 병원균 검출

토마토 포장에서 갯빛곰팡이병에 감염된 식물체를 채집하여 병원균을 분리하였다. 병든 식물의 절편은 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액으로 표면소독한 후 Streptomycin 300 ppm이 첨가된 potato dextrose agar(PDA) 배지에 치상하였고, 병든 식물의 절편으로부터 자라나는 균사의 선단을 떼어서 병원균을 분리한 후 4°C 냉장고에 보관하면서 공기균주로 사용하였다. 또한 병든 식물과 분리된 병원균은 상기 기술된 방법에 따라 DNA 분리를 수행하였으며, 종특이적 primer의 특이성 조사에 사용된 동일한 조건으로 PCR 실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

Pyruvate carboxylase(*pyc*) 유전자 염기서열 분석

거의 모든 생명체의 미토콘드리아 내에 존재하며 당 신생합성에 관여하는 촉매효소로 알려져 있는 *pyc* 유전자 (Jitrapakdee and Wallace, 1999)에 대한 *Botrytis* 속 균들의 종 특이적인 변이영역을 찾고자 GenBank에 공개된 DNA 염기와 아미노산 서열들을 비교 분석하였다(본문에 미보고). 이들 중 갯빛곰팡이병균 *B. cinerea*의 유성세대인 *Botryotinia fuckeliana*(3,630 bp)와 *Sc. sclerotiorum* (3,624 bp)가 서로 각각 90%, 94%의 DNA 염기서열 및 아미노산 서열 유사도를 보이며 유전적으로 가장 가깝게 나타났다. 또한 이들과 *pyc* 유전자의 아미노산 상동성이 70%가 넘으며 분류학상으로 매우 유사한 진균들을 대상으로 DNA 염기서열들을 비교 분석한 후 대부분 진균들의 *pyc* 유전자를 증폭할 수 있으며 내부 변이영역을 포함하고 있으며 종 특이적 primer 설계가 가능한 PCR 증폭 산물을 생성시키는 universal primer를 만들었다.

종 특이적 primer를 만들기 위해 *B. cinerea*와 유전적으로 매우 유사한 균들로 알려진 *B. aclada*와 *B. fabae* 균주들에 대한 *pyc* 유전자의 일부 영역을 PCR 증폭한 후 DNA 염기서열 변이를 분석하였다. 437 bp 크기인 국내 토마토 분리균 *B. cinerea*(BO-TO)의 PCR 증폭산물을 이 염기서열 정보가 공개된 외국균주로 *B. cinerea*의 완전세대인 *Botryotinia fuckeliana*에서의 2,339번째부터 2,775번째까지 동일한 크기의 DNA 영역과 비교한 결과 이들간 염기 변이가 2,628번째 한 곳에서만 발견되어 이 영역이 종내 유전자 염기정보가 동일한 종 특성을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 한편, *Sc. sclerotiorum* (437 bp)의 2,495부터 2,686번째 DNA 영역을 437 bp 크

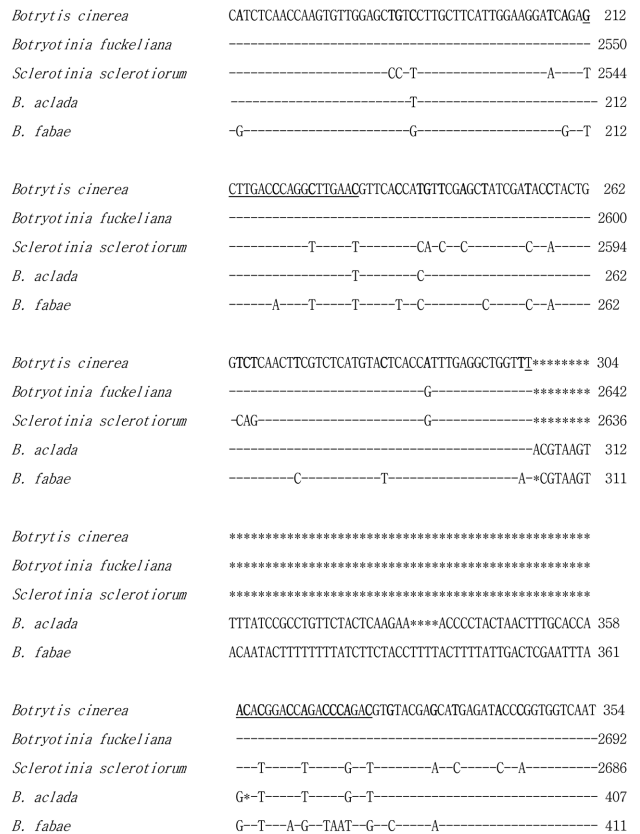


Fig. 1. Partial sequence alignment of pyruvate carboxylase gene (*pyc*). Underlined sequences indicates specific primers for *Botrytis cinerea*.

기의 *B. cinerea*와 비교시 DNA 염기 길이의 변이는 나타나지 않았지만 염기내 88% 정도만의 유전적 상동성을 나타냈다. 하지만 *B. cinerea*와 *B. aclada*(488 bp, 96%) 그리고 *B. fabae* (494 bp, 90%)를 비교했을 경우 DNA 염기길이는 서로 달랐지만 *Sc. sclerotiorum*에 비해 각각 더 높은 유전적 유사도를 나타냈다. 따라서 *Botrytis* 속 균들의 *pyc* 유전자는 동일한 종간에는 아주 안정적인 염기배열을 가지지만 유전자 내부에 종간 및 속간에 유전적 차이를 식별할 수 있는 변이 영역이 존재함을 알 수 있었다.

종 특이적 primer의 특이성 및 민감도

*B. cinerea*와 유전적으로 매우 유사한 진균들의 *pyc* 유전자 내부 변이영역에 대한 DNA 염기서열 비교를 통해 112 bp의 증폭산물을 생성시키는 종특이적 primer(BTF1/BTR1)가 만들어졌다(Fig. 2). 선발된 primer의 종 특이성을 조사하고자 국내의 토마토를 포함한 10가지의 다양한 기주식물에서 분리한 *B. cinerea* 13균주와 6종의 *Botrytis* 속균, 4종의 *Botryotinia*속균, 5종의 *Sclerotinia* 속 균 및 그 이외 16속의 다른 식물병원균들에 대해서 BTNF1/BTNR1 primer set을 이용해 PCR 반응을 실시한 결과 *B. cinerea* 균들에서만 종 특이적인 112 bp의 단일 증폭산물

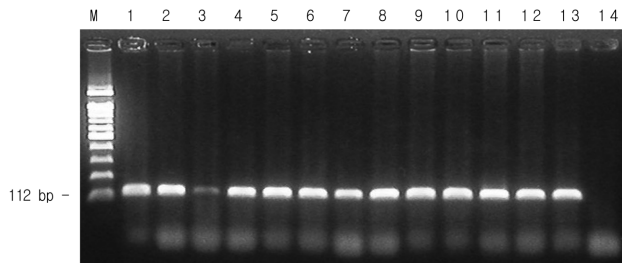


Fig. 2. Specific PCR amplification of *Botrytis cinerea* isolates by species-specific primer set (BTF1/BTR1). Genomic DNAs of *Botrytis cinerea* isolates (lanes 1~13: BC-RU, BC-ST, BC-MA, BC-TO, BC-YY2, BC-GR, BC-UK21, BC-RRS, BC-LI, BC-RO, BC-58, BC-447, BC-449) from various host plants were used for PCR analysis. M: 100 bp DNA ladder (iNtRON, Korea), lane 14: negative control (addition of sterile water to the PCR mixture).

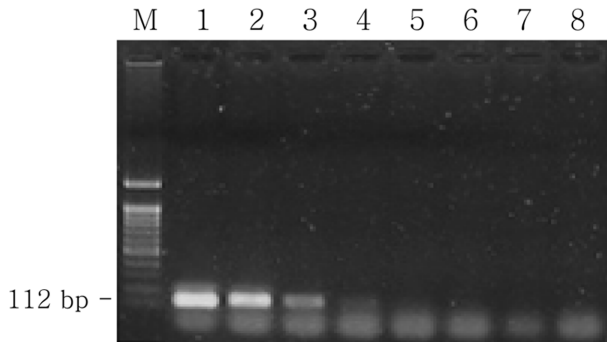


Fig. 3. PCR sensitivity of primer set BTF1/BTR1 for serially diluted genomic DNA of *Botrytis cinerea* (BC-TO), M, 100 bp DNA ladder (iNtRON, Korea); lane 1, 2 ng; lane 2, 200 pg; lane 3, 20 pg; lane 4, 2 pg; lane 5, 200 fg; lane 6, 20 fg; lane 7, 2 fg; lane 8, negative control (addition of sterile water to the PCR mixture).

들을 얻을 수 있었다(Fig. 2와 3). 또한 이들의 PCR 반응 민감도를 알아보려고 *B. cinerea*(BC-TO) genomic DNA를 10배씩 연속적으로 희석시킨 후 PCR 증폭을 실시한 결과 반응민감도 한계는 대략 2 pg임을 알 수 있었다(Fig. 4). Real time PCR은 본 연구에서와 같이 전기영동을 통해 결과를 확인하는 conventional PCR에 비해 PCR 반응민감도가 약 10~100배 이상 높게 나타나는 것으로 알려져 있지만 보다 정밀한 결과분석을 위해 작은 크기의 증폭산물을 만드는 종 특이적 primer가 우선적으로 요구되며, 증폭산물 내부에 probe의 제작이 가능한 종 특이적 변이영역을 필요로 하기도 한다(Minerdi *et al.*, 2008; Suarez, *et al.*, 2005). 따라서 본 실험에서 새롭게 개발된 종 특이적 primer는 112 bp의 최적 크기의 단일 증폭산물을 만들며 probe 제조시 필요한 증폭산물 내부의 종 특이적 변이영역이 존재해 real time PCR에서도 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

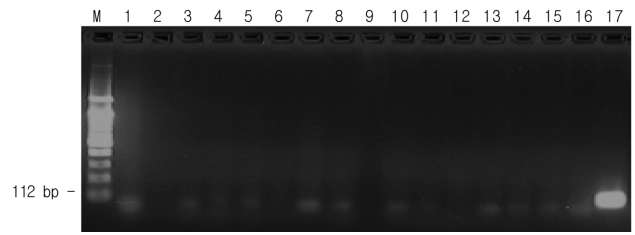


Fig. 4. Specificity test for primer set BTF1/BTR1 in different fungal species. No product was amplified on DNAs from negative control (addition of sterile water to the PCR mixture) (lane 1), 6 other *Botrytis* spp. (lanes 2~6), 4 *Botryotinia* spp. (lanes 7~10), 5 *Sclerotinia* spp. (lanes 11~15) and *Sclerotium cepivorum* (lane 16) isolates. Lane 17: positive control (2 ng/ μ l of *B. cinerea* (BC-TO) genomic DNA) and M: 100 bp DNA ladder (iNtRON, Korea).

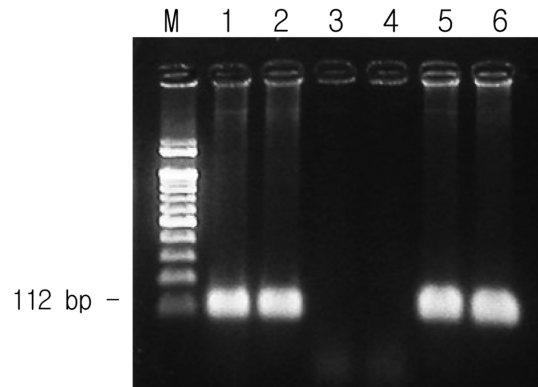


Fig. 5. PCR detection of *Botrytis cinerea* using DNAs extracted from diseased tomato plants, M: 100 bp DNA ladder (iNtRON, Korea), lane 1, artificially inoculated tomato plant; lane 2, naturally infected tomato fruit; lane 3, not infected tomato fruit; lane 4, negative control (addition of sterile water to the PCR mixture); lane 5, sclerotia of *B. cinerea*; lane 6, positive control (2 ng/ μ l of *B. cinerea* (BC-TO) genomic DNA).

병든 식물체로부터 병원균 검출

자연적으로 *B. cinerea*에 의해 감염된 토마토 식물체와 인공적으로 접종된 토마토 열매병반과 균핵으로부터 DNA를 분리 후 종 특이적 primer를 이용한 PCR을 수행한 결과 병원균의 검출이 이루어졌다(Fig. 5). 또한 이들 이병 식물체로부터 *B. cinerea*를 배지상에서 모두 순수하게 분리하였으며 이들 DNA에 대한 PCR 반응에 있어서도 112 bp 크기의 증폭산물들을 모두 확인할 수 있었다. *B. cinerea*는 식물체의 이병잔재 및 토양에서 생존하며 식물체를 침입하여 병징을 나타낼 때까지 발병전 꽃이 진 부위에 부생적으로 존재하기도하며 식물체에 잠복하다가 수확 후 저장시 피해를 주는 것으로 알려져 있다(Coley-Smith *et al.*, 1981; Droby and Lichter, 2004). 이러한 토마토 잿빛 곰팡이병 발생에 의한 피해를 최소화하기 위해서는 신속

정확한 병 진단 및 병 발생 예측을 통한 적절한 병 방제 대책을 수립하는 것이 가장 필요할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 새롭게 개발된 primer는 높은 반응민감도와 종 특이성을 나타내 추후 토마토 잣빛곰팡이병의 병 발생 전 빠른 진단 및 병원균의 정확한 동정에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

토마토 잣빛곰팡이병균(*B. cinerea*)은 비닐하우스에서 재배할 때 토마토의 꽃과 줄기의 감염을 통해 매우 심각한 피해를 입힌다. 이 연구에서 토마토에 발병하는 잣빛곰팡이병균의 검출 및 종 동정을 위해 새로운 종 특이적 primer set가 개발되었다. 종 특이적 primer(BTF1/BTR1)는 *B. cinerea*와 유전적으로 매우 유사한 진균들의 pyruvate carboxylase(*pyc*) 유전자 내부의 변이영역으로부터 설계되었다. 10개의 다른 기주식물에서 분리된 13균주의 모든 *B. cinerea*에서 112 bp 크기의 PCR 산물들이 만들어졌다. 그러나 6종의 다른 *Botrytis* 속균, 4종의 *Botryotinia* 속균, 5종의 *Sclerotinia* 속균 및 그 이외의 16속의 다른 식물병원균들에 대해서는 PCR 반응이 나타나지 않았다. 종 특이적 primer의 반응민감도 한계는 대략 2 pg이었다. 자연상태에서 *B. cinerea*에 감염된 토마토 식물체와 인공적으로 접종된 식물체로부터 종 특이적 primer를 활용한 병원균의 PCR 검출이 이루어졌다. 이 연구결과로 미루어 새롭게 개발된 primer는 높은 반응민감도와 종 특이성을 나타내 추후 토마토 잣빛곰팡이병의 빠른 진단 및 병원균의 정확한 동정에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 한국학술진흥재단(KRF-2005-214-C00157) 연구비 일부와 2008년도 농촌진흥청 FTA대응기술개발사업 토마토연구단의 일부 지원으로 수행되었습니다. 연구에 사용된 균주들을 분양해 주신 충남대학교 농생물학과

유승헌 교수님과 국립농업과학원 농업미생물과 김완규 박사님께 감사 드립니다.

참고문헌

- 김병섭, 박은우, 노성환, 조광연. 1997. 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 형태형 간의 생리적 다양성. 한국균학회지 25:320-329.
- Chastagner, G. A. and Ogawa, J. M. 1979. A fungicide-wax treatment to suppress *Botrytis cinerea* and protect fresh-market tomatoes. *Phytopathology* 69:59-63.
- Chilvers, M. I., du Toit, L. J., Akamatsu, H. and Peever, T. L. 2007. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. *Plant Dis.* 91:599-608.
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. 1981. *The Biology of Botrytis*, edited by Academic Press, London, New York.
- Droby, A. and Lichter, A. 2004. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds), pp. 349-367. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Gachon, C. and Saindrenan, P. 2004. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol. Biochem.* 42:367-371.
- Jitrapakdee, S. and Wallace, J. C. 1999. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340:1-16.
- Minerdi, D., Moretti, M., Li, Y., Gaggero, L., Garibaldi, A. and Gullino, M. L. 2008. Conventional PCR and real time quantitative PCR detection of *Phytophthora cryptogea* on *Gerbera jamesonii*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122:227-237.
- Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H. and Viret, O. 2002. Characterization for molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. In strawberry (*Fragaria x ananassa*) using PCR. *FEMS Microbiol.* 209:169-174.
- Suarez, M. B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S. and Barker, I. 2005. Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiol. Biochem.* 43:890-899.
- Williamson, B., Tudzynski, P., Van, K. and Jan, A. L. 2007. *Botrytis cinerea: the cause of grey mold disease*. *Mol. Plant Pathol.* 8:561-580.