

Real Time PCR을 이용한 *Colletotrichum acutatum*과 *C. gloeosporioides*의 검출김승한* · 권오훈¹경상북도농업기술원 봉화고냉지역초시험장, ¹영양고추시험장Detection of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* by Real Time PCRSeung-Han Kim* and Oh-Hun Kwon¹Bonghwa Alpine Medicinal Plant Research Station, ¹Yeongyang Pepper Research Station of Kyeongbuk Agricultural Research and Extension Service, Daegu 195-000, Korea

(Received on August 16, 2008)

Real time PCR was used to discriminate *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* for analysis of population density. Two primers, caInt2 and cgint, used for conventional PCR to discriminate two species were modified with fluorescent dye to make probe for real time PCR. Fluorescence signals were successfully detected by fCaInt2 and vCgint probe coupled with primer pair Unicof1 and Unicor1 resulting in discrimination of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* by comparison of delta Rn value.

Keywords : *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, Detection of *Colletotrichum* spp, Real time PCR

탄저병균은 국내에 44종이 보고되어 있으며 그 중 *Colletotrichum acutatum*과 *C. gloeosporioides*은 고추, 사과 등 주요 소득작물에 발생하며 그 피해가 가장 심각한 종이다. 이 두종은 형태적 유사성에도 불구하고 benomyl, iminoctadine-triacetate 등의 살균제에 대한 감수성의 차이가 나는 것으로 알려져 있으며(Peres 등, 2004; Chung 등, 2006), 토양 내에서 생존기간도 환경조건에 따라 약간의 차이가 있다(Freeman 등, 2002). 이 두 종에 대한 많은 분류적 생태적 연구가 진행되어 왔으나 포자의 형태 등 형태적 특성이 유사하여 두 종을 구분하기는 까다로우며(Afanador-Kafuri 등, 2003), 분류에 숙달된 전문가일지라도 균의 순수배양과정을 거쳐 포자를 확인하는 작업은 많은 시간과 노력이 들어 대량의 시료처리에는 적합하지 않다. 이러한 형태적 분류의 어려움을 극복하기 위해 분자생물학적 기술을 이용한 arbitrary primed PCR (Freeman과 Rodriguez, 1995), A+T rich analysis(Freeman 등, 1993), ITS부위를 이용한 PCR법 등(Adaskaveg와 Hartin, 1997; Afanador-Kafuri 등, 2003)이 개발되었다. 이러한 분자적 방법은 형태적 분류에 비해 오류를 줄이고

시간을 획기적으로 단축하였지만 균집간 비교를 위해 다수의 시료를 검정하기에는 여전히 많은 시간을 필요로 한다. 최근 유전자의 정량분석에 많이 사용되는 real time PCR의 경우 한번에 96개 이상의 시료처리가 가능하고 agarose gel을 이용한 확인과정이 필요 없으며 형광을 이용 증폭반응이 일어나는 allele을 표지 하는 것이 가능하여 대립형질의 분석 등에 다양하게 사용되고 있다(Fraaije 등, 2005). 따라서 본 시험은 지역간 *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*의 분포 분석을 위해 시간과 노력단축이 가능한 species-specific real time PCR 방법을 개발하기 위해 수행하였다.

균주 및 시료준비. 경상북도농업기술원 영양고추시험장에서 고추에서 분리한 *C. acutatum* 4균주와 경북대학교에서 분양 받은 *C. gloeosporioides* 4균주를 시험에 이용하였다. 각 균주들을 PDA배지에 접종하여 10일간 배양한 후 두 가지 방법으로 핵산을 분리하여 사용하였다. 첫째는 각 균주를 PDA배지에 접종하여 25°C에서 10일간 균체를 배양한 다음 살균된 메스로 배지표면의 균사체를 취하여 1 ml의 extraction buffer(100 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% beta-mercaptethanol, 1% CTAB)와 지름 5 mm의 ceramic bead 1개가 담겨 있는 2 ml 튜브에 넣고 10-30초간 vortex mixer로 진탕하여 세포를 파쇄하였다. 세포파쇄액을 12,000 rpm(VS-15000CFN, Vision)

*Corresponding author

Phone) +82-54-673-8064, Fax) +82-54-673-8066

E-mail) kshan1@gba.go.kr

Table 1. Overview of oligonucleotide used in this study

Name	Type	Sequence and labelling	Target
Ccyt4	Forward primer	TGGGTATAGGTTTCCTGGGTC	Cytochrome b
CGR2	Reverse primer	GCAGCTGGAGTTTGCATAGG	Cytochrome b
Unicof1	Forward primer	CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCAT	ITS
Unicor1	Reverse primer	GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTAAA	ITS
Cunif1	Forward primer	GCGGAGGGATCATTACTGA	ITS
Cunior1	Reverse primer	TGATATGCTTAAGTTCAGCGGG	ITS
fCaInt2	Probe	FAM-GGGGAAGCCTCTCGCGG ^a	ITS (<i>C.acutatum</i>)
vCgint	Probe	VIC-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG ^a	ITS (<i>C.gloeosporioides</i>)

^aAfanador-Kafuri *et al.* (2003).



Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR assay with boiled spore suspension and isolated DNA of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*.

Isolated DNA of *C. gloeosporioides* (A) and *C. acutatum* (B), boiled spore suspension of *C. gloeosporioides* (C) and *C. acutatum* (D), M: 100 bp ladder.

으로 원심분리하여 상층액을 취한 다음 기존에 기록된 CTAB법에 의하여 추출하였다(Freeman 등, 1993). 두 번째 방법은 다수의 시료를 검정할 때 핵산의 준비시간을 단축하기 위해 시험하였는데 위와 동일한 방법으로 배양한 균주에서 살균수를 이용 포자현탁액을 채취하여 2 ml 튜브에 포자현탁액 1 ml를 담아 110°C에서 10분간 가열한 다음, -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 두 가지 방법으로 준비된 시료를 AccuPower PCR PreMix(K-2012, Bioneer) 키트에 핵산순수분리 시료는 1 µl, 가열포자현탁액의 경우는 5 µl를 첨가하여 cytochrome b 유전자 부위를 대상으로 디자인한 primer Ccyt4와 CGR2로 (Table 1) 증폭하였을 때 동일한 감도의 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 핵산의 분리는 실험과정 중에서 상당한 시간이 소요되는 부분으로 이를 줄이기 위해 다양한 방법들이 개발되어 있으며 실험목적에 따라서 균사체를 버퍼에 넣어 가열하는 것만으로도 사용이 가능하나(Ward와 Akrofi, 1994; McCartney 등, 2003), AFLP나 Real time PCR을 수행하는 경우에는 부적합한 경우도 있는 것으로 알려져 있다(Haugland 등, 2002; Hollick 등, 2004). 본 실험에서 탄저병균의 포자현탁액을 10분간 가열하여 PCR과 Real time PCR을 수행하였을 때 핵산만 추출한 경우

와 동일한 결과를 얻을 수 있어 다수의 시료를 검정하기 위한 방법으로 적합하다고 할 수 있다.

Real time PCR. Taqman Probe를 이용한 species-specific Real time PCR을 수행하였다. Probe는 Afanador-Kafuri 등(2003)이 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*의 구분에 사용한 ITS 부위의 Cgint와 caInt2 primer의 염기서열에 각각 VIC과 FAM 형광으로 표지하여 probe를 제작하였다. Primer는 NCBI에(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 등록된 탄저병균의 염기서열 중 *C. gloeosporioides*는 AM947679, *C. acutatum*은 AJ301905를 사용하여 forward primer로 Unicof1, Cunif1 reverse primer로는 Unicor1, Cunior1을 디자인하였다(Table 1). 반응은 조성물이 미리 혼합되어 있는 AccuPower dualstar(K6101, Bioneer) 키트를 이용하였다. 이 키트에 가열한 포자현탁액을 10 µl, fCaInt2 0.175 µM, vCgint 0.25 µM, primer 각 0.5 µM, 50X reference dye (ROX) 0.4 µl를 넣고 살균수를 이용하여 전체량을 20 µl로 조정하였다. Real time PCR(Model : AB 7300, Applied Biosystems) 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C에서 15초와 62°C에서 2분을 60회 반복하는 것으로 증폭하였다. Real time PCR 결과 *C. acutatum*은 전형적인 형태의 증가곡선을 보였으나 *C. gloeosporioides*는 증가가 서서히 이루어졌으며 일반적인 증가곡선에서 나타나는 sigmoid 형태가 아닌 상향으로 서서히 증가하는 형태로 반응이 진행되었다(Fig. 2). 또한 *C. acutatum*에서는 FAM 값의 증가와 더불어 VIC값 또한 다소 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 증폭에 이용한 두 종류의 primer에서 모두 반응이 검출되었으나 Cunif1/r1 primer를 이용하였을 때는 *C. gloeosporioides*는 증폭효율이 상대적으로 낮아 적합하지 않는 것으로 판단된다. 실험에 사용한 두 개의 primer 모두 *C. gloeosporioides*에서 낮은 증폭을 보이는 이유로는 *C. gloeosporioides*를 위해 사용한 probe와 primer의 melting temperature(TM) 차이가 real

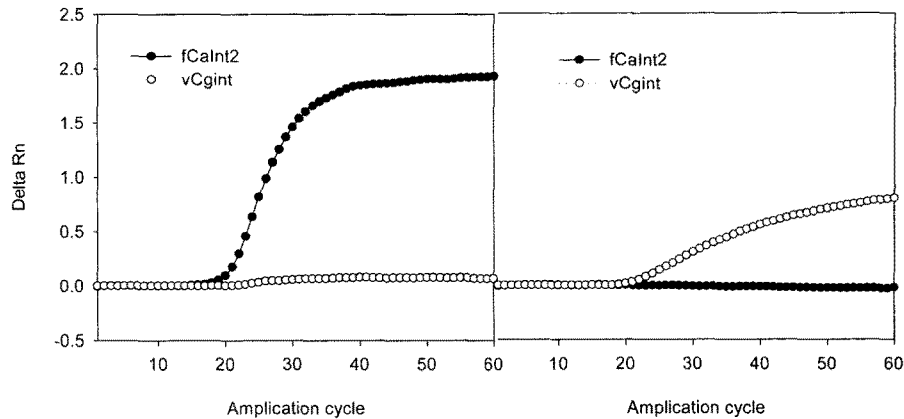


Fig. 2. Real-time amplification plot of *Colletotrichum acutatum* (left) and *C. gloeosporioides* (right) isolated from pepper fruits. fCaInt2 is specific probe for *C. acutatum* and vCgint is probe for *C. gloeosporioides*.

time PCR에 적절치 못하여 template DNA에 결합이 낮은 빈도로 일어나 증폭비율이 떨어지는 것으로 추측되며 몇 단계의 온도와 반응조건을 변화시켰으나 FAM과 VIC 두 반응이 정상적으로 증가하는 형태의 조건은 찾을 수가 없었다. *C. acutatum*에서 VIC신호의 증가가 일어난 이유는 핵산의 증폭반응으로 Template DNA의 양이 급격히 증가하면서 VIC probe도 비특이적으로 반응하여 일어난 것으로 추측할 수 있으며 비록 VIC값의 일부 증가가 있었다고 하더라도 FAM이 정상적인 증가를 보였으므로 *C. acutatum*에 대한 특이반응으로 판단할 수 있다. *C. gloeosporioides*의 경우 FAM과 VIC 두 형광반응을 비교 하였을 때 FAM의 경우는 Rn의 증가가 전혀 없었으나 VIC에서는 Rn값이 지속적으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 살균수를 사용한 대조구에서는 FAM과 VIC의 Rn 값 모두 증가가 없었다(Fig. 3). 그러므로 상대적으로 낮은 수치의 증가를 보였지만 *C. gloeosporioides*에서 나타나는 Rn값의 증가는 *C. gloeosporioides*에 대한 특이

반응으로 판단할 수 있다. 따라서 *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*의 구분에 Unico1, Unico1 primer와 함께 형광표지된 fCaInt2와 vCgint probe로 real time PCR을 이용 가능하며, 본 방법을 사용할 경우 대량의 균주를 단시간 내에 판별이 가능하므로 특정군집 내 개체군 밀도와 약에 유용할 것으로 판단된다.

요 약

*C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*의 개체군 밀도분석을 위해 기존 ITS부위를 이용한 PCR방법에 사용한 caInt2와 cgint 프라이머에 형광을 표지하여 *C. acutatum*에 특이적인 fcaInt2와 *C. gloeosporioides*에 특이적인 vcgint의 두 probe를 제작하였다. 이 두개의 프라이머와 Unico1, Unico1 primer를 이용 real time PCR을 수행하였을 때 *C. acutatum*은 fcaInt2 probe에, *C. gloeosporioides*는 vcgint에 특이적인 형광증폭곡선을 나타냄에 따라 delta Rn 값을 비교함으로써 두 종의 구분이 가능하였다.

참고문헌

- Adaskaveg, J. E. and Hartin, R. J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87: 979-987.
- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M. and Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93: 579-587.
- Chung, W.-H., Ishii, H., Nishimura, K., Fukaya, M., Yano, K. and Kajitani, Y. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit

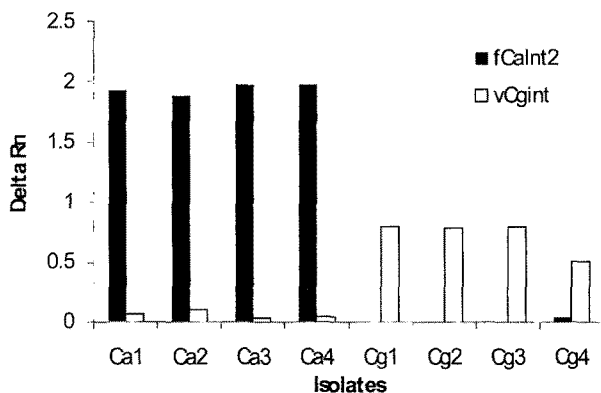


Fig. 3. Delta Rn value of *Colletotrichum acutatum* (Ca1 - 4) and *C. gloeosporioides* (Cg1- 4) after 60 cycle of real time PCR by TaqMan probe.

- crops in Japan. *Plant Dis.* 90: 506-512.
- Fraaije, B. A., Cools, H. J., Fountaine, J., Lovell, D. J., Motteram, J., West, J. S. and Lucas, J. A. 2005. Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 95: 933-941.
- Freeman, S., Pham, M. and Rodriguez, R. J. 1993. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+Trich DNA, and nuclear DNA analyses. *Exp. Mycol.* 17: 309-322.
- Freeman, S. and Rodriguez, R. J. 1995. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. *Mycol. Res.* 99: 501-504.
- Freeman, S., Shalev, Z. and Katan, J. 2002. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. *Plant Dis.* 86: 965-970.
- Haugland, R. A., Brinkman, N. and Vesper, S. J. 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J. Microbiol. Methods* 50: 319-323.
- Hollick, P. S., Taylor, R. J., McComb, J. A., Dixon, K. W. and Krauss, S. L. 2004. Optimisation of DNA extraction for AFLP analysis of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids *Caladeniinae* and *Drakaeinae*. *Plant Mol. Biol. Repr.* 22: 307a-307h.
- Mccartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A. and Ward, E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag. Sci.* 59: 129-142.
- Peres, N. A. R., Souza, N. L., Peever, T. L. and Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.* 88: 125-130.
- Ward, E. and Akrofi, A. Y. 1994. Identification of fungi in the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycol. Res.* 98: 219-224.