

PCR-SSCP 분석에 의한 *Phytophthora katsurae*의 분자생물학적 특성

이선근 · 장하나 · 이동현 · 이상현¹ · 이상용 · 이종규*

강원대학교 산림환경과학대학 산림환경보호학과, ¹국립산림과학원 산림병해충과

Molecular Characteristics of *Phytophthora katsurae* Using PCR-SSCP Analysis

Sun Keun Lee, Ha-Na Jang, Dong Hyeon Lee, Sang-Hyun Lee¹, Sang-Yong Lee and Jong Kyu Lee*

Department of Forest Environment Protection, College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Division of Forest Insect Pests and Diseases, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

(Received on November 30, 2010; Revised on May 25, 2011; Accepted on May 28, 2011)

Phytophthora katsurae is the fungus responsible for chestnut ink disease. The objectives of this study were to determine if a single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of rDNA-ITS region, elongation factor 1 alpha gene and β -tubulin gene could be used for rapid identification and genetic diversity of *P. katsurae*, and to assess the potential use of the SSCP technique as a diagnostic tool for *P. katsurae*. Each regions amplified by PCR using primers designed to overlap the genus *Phytophthora* were characterized for the *Phytophthora* species. PCR products were denatured and electrophoresed for SSCP analysis. *P. katsurae* isolates showed an unique pattern in SSCP analysis and were easily distinguished from other *Phytophthora* species used as the control. This indicates that SSCP analysis is an useful technique for distinguishing *Phytophthora* species from genetically close relatives, and show that the SSCP analysis of each region is an efficient detection tool for *P. katsurae*. But PCR-SSCP analysis of single-gene may have difficulty in distinguishing *P. katsurae* from other *Phytophthora* species. Therefore, PCR-SSCP analysis of multi-genes can be useful for rapid and effective identification of *P. katsurae*.

Keywords : Genetic diversity, Identification, PCR-SSCP analysis, *Phytophthora katsurae*

서 론

밤나무(*Castanea* spp.)는 참나무과 밤나무속의 낙엽교목성 수종으로, 12종이 북반구 온대 및 아열대에 분포하고 있으며(김, 2002), 우리나라 토종 밤나무는 평안도 및 함경도 등 경기도 이북에 주로 분포하는 약밤나무(*C. bungeana*)와 중부 지방 이남에 널리 분포하는 과실이 비교적 큰 한국밤나무(*C. crenata*)로 구분된다(김 등, 2007).

우리나라에서 밤나무에 주로 발생하는 병해는 흰가루병(powdery mildew)과 줄기마름병(chestnut blight)이 있으며, 충해에는 밤나무혹벌(*Dryocosmus kuriphilus*), 복숭아명나방(*Dichocrocis punctiferalis*), 밤바구미(*Curculio*

sikkimensis) 등이 있다. 이 중 밤나무 줄기마름병과 밤나무혹벌에 의한 피해가 대표적이다(김 등, 2007; 이 등, 2006). 밤나무 줄기마름병은 밤나무의 가지 및 줄기에 마름병을 일으키는 병으로써 우리나라에서 최초의 기록은 1925년이다. 전국적으로 밤나무 줄기마름병의 피해가 증가하여 밤나무 재배농가에 적지 않은 피해를 주고 있다(이 등, 2006).

밤나무 잉크병은 1838년 포르투갈에서 *Phytophthora cinnamomi*에 의해 밤나무(*Castanea* spp.)와 너도밤나무(*Fagus engleriana*)에 발생되었다는 것을 최초로(Verma와 Sharma, 1999), 19세기와 20세기에 걸쳐 남부 유럽에서 심각한 피해를 주었으며(Brasier 등, 2006), 여러 나라에서 밤나무 잉크병으로 인해 농가 수익에 큰 영향을 받았다(Abreu 등, 1999). 잉크병에 걸린 밤나무는 잎의 크기가 점차적으로 작아지며, 가지가 말라간다. 또한, 뿌리에 암갈색의 병반이 나타나고 뿌리와 가까운 곳의 감염된 부

*Corresponding author

Phone) +82-33-250-8364, Fax) +82-33-257-8361

Email) jongklee@kangwon.ac.kr

위에서 잉크색의 액이 나온다(Boutard, 2001).

우리나라에서는 2005년 경상남도 하동과 함천에서 밤나무 줄기마름병과는 다른 증상을 보이는 병이 발견되어 동정한 결과, 밤나무 잉크병으로 확인되었으며 병원체는 *P. katsurae*로 밝혀졌다(Oh 등, 2007). *P. katsurae*는 1976년 일본에서 발생한 밤나무 줄기썩음병(trunk rot of chestnut tree)의 병원체가 *P. castaneae*라고 보고하였으나(Katsura, 1976), 이후 분류학적인 문제로 *P. katsurae*로 개명하였다(Ko와 Chang, 1979).

Phytophthora 속은 대부분 전염성이 매우 뛰어나기 때문에 심각한 문제를 초래하는 것으로 알려져 있으며(Boutard, 2001; Vettraino, 2001, 2005), 이에 많은 연구자들이 *Phytophthora* 속에 대한 다양한 연구를 수행하였다. 최근에는 유전학적인 연구가 많이 진행되면서, 유전적 특성 규명을 위하여 ribosomal DNA(rDNA)의 internal transcribed spacer(ITS) 영역의 염기서열 분석을 실시하여 유전적 유연관계 분석하고, ITS 영역의 특이적인 primer를 제작하여 다양한 *Phytophthora* 종을 대상으로 polymerase chain reaction 진단을 실시하였다(Ersek 등, 1994; Jyan 등, 2002; Ristaino 등, 1998; Shen 등, 2005). 또한, Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)를 이용하여 *Phytophthora* 종 간의 유전적 다양성을 분석한 보고가 있고(Chang 등, 1996; Mahuku 등, 2000; Willem 등, 1998), Kong 등(2003, 2004, 2005)은 *P. ramorum*과 형태적으로 구분이 어려운 종들과의 구분 및 *Phytophthora* 속과 *Pythium* 속의 구분을 위해 Single-Strand Conformation Polymorphism(SSCP)을 실시한 바가 있다.

한편, 국내에서 분리한 밤나무 잉크병균(*P. katsurae*)에 관하여서는 형태적인 특성에 의한 동정과 rDNA의 ITS 영역의 염기서열 분석만이 이루어진 상태로서, 국내 *P. katsurae*와 다른 *Phytophthora* 종들과의 유전적인 유연관계에 관하여는 구체적으로 연구된 바가 없다.

따라서, 본 연구는 우리나라에서 분리한 *P. katsurae*의 유전적 특성을 구명하기 위하여 국내에서 분리한 *P. katsurae*를 대상으로 nuclear DNA(nDNA)의 β -tubulin(BTU)과 Elongation factor 1 alpha(EF1A), 그리고 rDNA ITS 부위의 PCR-SSCP 분석을 실시하여 *P. katsurae*와 *Phytophthora* 속 내에서 각 부위의 유전적 유연관계를 비교분석하고 동정에 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 genomic DNA 추출. 경상남도 하동과 함천의 밤나무 잉크병 발병임지로부터 분리한 *P. katsurae*

Table 1. The list of *Phytophthora* species used in the study

Source ^a	Species	Location	Source
TPML 06522	<i>P. katsurae</i>	Hadong	Bark of chestnut
TPML 08001	<i>P. katsurae</i>	Hapcheon	Bark of chestnut
TPML 07001	<i>P. citricola</i>	Oregon, USA	- ^b
TPML 07004	<i>P. cactorum</i>	Oregon, USA	American Ginseng
TPML 07005	<i>P. cinnamomi</i>	Oregon, USA	Hydrangea
TPML 07006	<i>P. cambivora</i>	Oregon, USA	Baited soil
TPML 07007	<i>P. lateralis</i>	Oregon, USA	Port-Orford Cedar
KACC 40173	<i>P. boehmeriae</i>	Hapcheon	Ailanthus
KACC 40185	<i>P. citrophthora</i>	Chilgok	Schizandra
KACC 40161	<i>P. cryptogea</i>	Incheon	Gerbera
KACC 40190	<i>P. drechsleri</i>	Goryeong	Tomato
KACC 40402	<i>P. nicotianae</i>	Pocheon	Eggplant
KACC 40711	<i>P. gonapodyides</i>	Oregon, USA	Douglas fir
KACC 40718	<i>P. infestans</i>	Pyeongchang	Potato
KACC 40194	<i>P. melonis</i>	Gongju	Melon
KACC 40712	<i>P. erythroseptica</i>	-	Potato
KACC 40468	<i>P. sojae</i>	-	Soybean
KACC 40409	<i>P. palmivora</i>	Suwon	Cymbidium

^aKACC; Korean Agricultural Culture Collection, TPML; Tree Pathology & Mycology Lab., Kangwon National University.

^b-; not confirmed.

와 대조로 공시한 균주는 강원대학교 산림환경보호학과 수목병리학 및 균학실험실과 KACC(Korea Agricultural Culture Collection, 한국농업미생물자원센터)로부터 분양 받았다(Table 1). 분양받은 균주들은 V8배지에 접종하여 25°C에서 약 7일간 배양한 후, 증식한 균사체를 채취하여 genomic DNA 추출 시료로 사용하였다.

균사에서의 genomic DNA 추출은 DNeasy Plant mini kit(QIAGEN Co. Venlo, Netherlands)를 사용하였다.

PCR Primer. PCR-SSCP 분석을 위한 primer는 GenBank에 등록된 mDNA의 BTU와 EF1A 그리고 rDNA의 ITS 부위의 염기배열(Table 2)을 대상으로 Clustal X(ver. 1.83)를 이용하여 alignment한 후, *Phytophthora* 종들에서 변이가 가장 많이 발생하는 부위를 포함하여 증폭시킬 수 있도록 각 부위의 공통 염기배열로부터 제작하여 사용하였다(자료 생략). 각 공시 균주로부터 PCR을 통해 얻을 수 있는 예상 DNA 증폭산물의 크기는 BTU가 226 bp, EF1A가 229 bp 및 ITS가 209 bp로서, 각각의 PCR에 사용한 primer는 국내에서 분리한 *P. katsurae* 균주를 기준으로 Table 3과 같다.

PCR-SSCP. *Phytophthora* 17종의 균사체로부터 추출한 genomic DNA를 대상으로 SSCP 분석을 위한 PCR reaction mixture의 조성은 genomic DNA 1 μ l, upstream

Table 2. GenBank accession numbers of *Phytophthora* species used for primer design

Species	ITS ^a	BTU ^b	EF1A ^c
<i>Phytophthora alni</i>	FJ802040	EU080606	EU080607
<i>P. arecae</i>	AF266781	AY564049	AY564105
<i>P. boehmeriae</i>	DQ297406	AY564050	AY564106
<i>P. botryose</i>	AF266784	AY564051	AY564107
<i>P. cactorum</i>	AF266772	AY564052	AY564108
<i>P. cambivora</i>	AB367381	EU080869	EU080870
<i>P. captiosa</i>	DQ297405	– ^d	–
<i>P. cinnamomi</i>	AF266764	AY564054	AY564110
<i>P. citricola</i>	AF266788	AY564055	AY564111
<i>P. citrophthora</i>	AF266785	AY564056	AY564112
<i>P. clandestine</i>	AJ131989	AY564057	AY564113
<i>P. colocasiae</i>	AF266786	AY564058	AY564114
<i>P. cryptogea</i>	AF266796	AY564059	AY564115
<i>P. drechsleri</i>	AF266798	AY564060	AY564116
<i>P. erythroseptica</i>	AF266797	AY564061	AY564117
<i>P. fallax</i>	DQ297398	EU080035	EU080036
<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	AF266762	AY564062	AY564118
<i>P. gallica</i>	DQ286726	–	–
<i>P. gonapodyides</i>	FJ801965	AY564066	AY564122
<i>P. hedraiaandra</i>	FJ802065	EU080877	EU080878
<i>P. heveae</i>	AF266770	AF564067	AF564123
<i>P. hibernalis</i>	EU686390	EU850961	EU080711
<i>P. humicola</i>	AF266792	AY564069	AY564125
<i>P. idaei</i>	AF266773	AY564070	AY564126
<i>P. ilicis</i>	AJ131990	–	AY564127
<i>P. infestans</i>	AF266779	AY564035	AY564093
<i>P. inflata</i>	AF266789	AY564072	AY564128
<i>P. insolita</i>	AF271222	AY564073	AY564129
<i>P. iranica</i>	AJ131987	AY564074	AY564130
<i>P. katsurae</i>	–	AY564075	AY564131
<i>P. katsurae</i>	–	EU080803	EU080804
<i>P. katsurae</i>	–	EU079815	EU079816
<i>P. kernoviae</i>	AY940661	EU080054	EU080055
<i>P. lateralis</i>	AF266804	AY564076	AY564132
<i>P. meadii</i>	EU515176	EU079888	EU079889
<i>P. megakarya</i>	AF266782	AY564078	AY564134
<i>P. megasperma</i>	AF266794	AY564079	AY564135
<i>P. melonis</i>	FJ801854	EU080472	EU080473
<i>P. mexicana</i>	FJ801253	EU080703	EU080704
<i>P. mirabilis</i>	AF266777	AY564038	AY564095
<i>P. multivesiculata</i>	AF266790	AY564080	AY564136
<i>P. nicotianae</i>	AF266776	AY564081	AY564137
<i>P. palmivora</i>	AF266780	AY564082	AY564138
<i>P. phaseoli</i>	AF266778	AY564044	AY564101
<i>P. polonica</i>	DQ396409	EU080264	EU080265
<i>P. porri</i>	FJ802110	EU079881	EU079882
<i>P. primulae</i>	FJ802110	EU080824	EU080825
<i>P. pseudotsugae</i>	AF266774	AY564084	AY564140
<i>P. quininea</i>	DQ275189	AY564085	AY564141

Table 2. Continued

Species	ITS ^a	BTU ^b	EF1A ^c
<i>P. ramorum</i>	AY540491	AY564092	AY564208
<i>P. sinensis</i>	AF266768	AY564087	AY564143
<i>P. sojae</i>	AF266769	AY564047	AY564104
<i>P. syringae</i>	AF266803	AY564088	AY564203
<i>P. tentaculata</i>	AF266775	AY564089	AY564145
<i>P. trifolii</i>	FJ802123	EU080084	EU080085
<i>P. undulata</i>	AB217686	EU080441	EU080442
<i>P. vignae</i>	AF266766	AY564090	AY564146

^a ITS: Internal transcribed spacer.

^b BTU: β -tubulin.

^c EF1A: Elongation factor 1 alpha.

^d -: not listed in GenBank.

primer 1 μ l, downstream primer 1 μ l ExTaq polymerase (Takara Bio Inc. Shiga, Japan) 5 unit, 10xExTaq buffer 5 μ l(+20 mM Mg²⁺), 2.5 mM dNTP 4 μ l의 총 50 μ l로, PCR 반응은 Mycycler(Bio-rad, Hercules, CA)를 사용하였고, PCR cycling의 조건은 94°C에서 20초간 denaturation, 55°C에서 25초간 annealing과 72°C에서 50초간 extension으로 40 cycle을 반복 실행하였으며, 처음 denaturation은 94°C에서 2분간, 그리고 마지막 extension은 72°C에서 10분간 수행하였다.

PCR 증폭산물의 분석은 Mupid 21(COSMO bio Co., Carlsbad, CA)을 사용하여 1.5% agarose gel(1xTAE buffer)에서 100 V 30분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, ethidium bromide로 15분간 염색하고 2차 증류수에 5분간 세척한 다음 Gel Documentation System(Bio-Rad)으로 증폭산물을 확인하였다.

SSCP 반응은 denaturing buffer(95% formamide, 20 mM EDTA) 9 μ l, PCR product 2 μ l, loading dye(Promega Co., Madison, WI) 4 μ l의 총 15 μ l로, 95°C에서 15분간 denature 시킨 뒤, 0°C에 급랭 처리 후, 7.5% acrylamide gel(1xTAE buffer)에서 200 V 180분간 전기영동(Owl Scientific Inc., Portsmouth, NH)을 실시하였다. 전기영동 후, ethidium bromide로 15분간 염색하고 2차 증류수에 5분간 세척한 다음 Gel Documentation System(Bio-Rad, Hercules, CA)으로 증폭산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

PCR-SSCP를 이용한 *P. katsurae*의 유전적 다양성 분석 및 동정. Oh 등(2007)이 하동, 함천, 영광의 밤나무에서 분리한 11개 *P. katsurae* 균주의 ITS 영역의 ITS1과 ITS4의 염기서열의 유연관계를 분석한 결과, Ivory coast

Table 3. The primers used in this study

Primer	Sequence	Product size (bp)
BTU- 684		703nt
684F	5' AAY GTG CAG AAC AAG AAC TC 3'	126
BTU- 810		
810R	5' CGC TTG AAC ATC TCY TGG AT 3'	
EF1A- 260		280nt
260F	5' AGK CYC GYT ACG AGG AGA TCA 3'	229
EF1A- 490		
490R	5' ATA CCG CCG ATC TTG TAM AC 3'	
ITS- 441		460nt
441F	5' TTC CTT CCG TGT AGT CGG TG 3'	186
ITS- 650		
650R	5' AAC CAT ACC GCG AAT CGA RG 3'	

에서 분리된 *P. katsurae*와 99%의 상동성을 나타내었고, 국내에서 분리한 균주들끼리는 100% 일치하는 것으로 보고하였으나, 최근에는 단일의 유전 부위의 염기서열에 의한 유전적 다양성의 분석보다는 복수의 유전적 부위의 염기서열에 의한 유전적 다양성 분석 결과가 보다 포괄적이며 객관성을 가질 수 있기 때문에 rDNA ITS 부위뿐만 아니라 nuclear DNA 및 mitochondrial DNA 내의 다양한 부위 염기서열 분석을 실시하여 유전적 유연관계를 확인하는 추세이다(Blair 등, 2007; Kroon 등, 2004; Martin과 Tooley, 2003).

이 연구에서는 PCR-SSCP를 이용한 *P. katsurae*의 유전적 다양성 분석 및 동정을 목적으로, NCBI GenBank에 등록된 *Phytophthora* 종의 nDNA BTU, EF1A 및 ITS 부위의 염기서열 중에서 가장 변이가 많이 발생하는 부분을 포함하는 특이적인 primer(Table 3)를 제작하여 PCR을 실시한 결과, 국내에서 분리한 *P. katsurae* 10개 균주

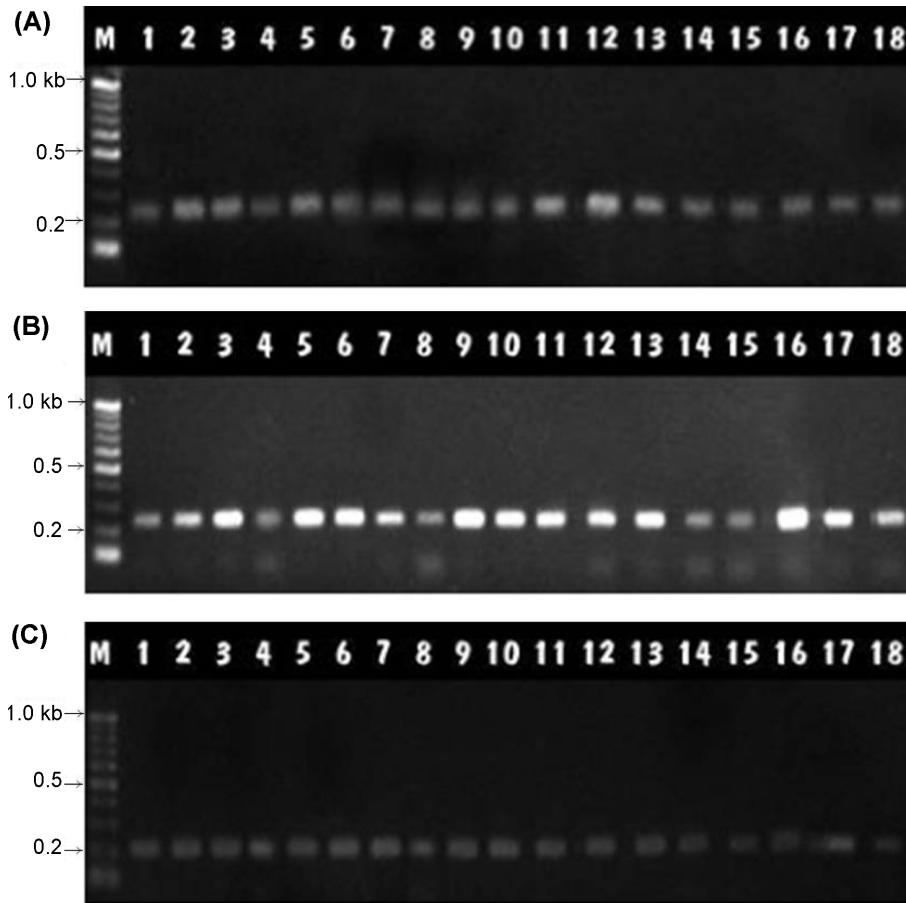


Fig. 1. PCR products amplified from *Phytophthora* species-specific primer. M represents 100 bp ladder. Lane 1, TPML 06522; Lane 2, TPML 08001; Lane 3, TPML 07001; Lane 4, TPML 07004; Lane 5, TPML 07005; Lane 6, TPML 07006; Lane 7, TPML 07007; Lane 8, KACC 40173; Lane 9, KACC 40185; Lane 10, KACC 40161; Lane 11, KACC 40190; Lane 12, KACC 40402; Lane 13, KACC 40711; Lane 14, KACC 40718; Lane 15, KACC 40194; Lane 16, KACC 40712; Lane 17, KACC 40468; Lane 18, KACC 40409.

뿐만 아니라 대조로 공시한 *Phytophthora* 종 모두에서 각각 226 bp, 229 bp 및 209 bp의 증폭 산물이 증폭되었다 (Fig. 1). 즉, PCR에 사용된 nDNA의 BTU, EF1A 및 rDNA의 ITS 부위의 primer는 *Phytophthora* 속에 특이적인 반응을 나타냄으로서, *Phytophthora* 속의 동정에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

각 부위의 특이적인 primer에 의한 PCR로부터 증폭된 증폭산물을 전기영동 방법을 이용하여 SSCP 분석을 실시한 결과, ITS를 제외한 BTU 및 EF1A 부위에서 *P. katsurae*(TPML 06522, 08001)와 다른 *Phytophthora* 종 간에는 denature된 single stranded DNA(ssDNA)의 패턴이 모두 다르게 나타났다(Fig. 2). ITS 부위의 KACC 40161, KACC 40190 및 KACC 40712의 경우, ssDNA의 패턴이 유사하였으나, BTU 및 EF1A 부위에서는 3균주 모두 ssDNA의 패턴이 다르게 나타났다. ITS의 KACC 40468의 경우, *P. katsurae*(TPML 06522, 08001)와 ssDNA 패턴

이 동일하였으나, BTU 및 EF1A 부위에서는 다르게 나타났다. 한편, BTU 부위의 TPML 07004 및 TPML 07006의 경우, ssDNA의 패턴이 유사하였으나, EF1A 및 ITS 부위에서는 두 균주의 ssDNA 패턴이 다르게 나타났다. 또한, EF1A 및 ITS 부위의 TPML 07001 및 TPML 07006의 경우, ssDNA의 패턴이 유사하였으나, BTU 부위에서는 두 균주의 ssDNA 패턴이 다르게 나타났다. 이와 같이 국내 *P. katsurae* 균주와 공시한 다른 *Phytophthora* 속 균주들은 3가지 부위를 동시에 비교함으로써 구분이 가능하였다. 그러나 한 가지 부위만을 이용한 PCR-SSCP 분석은 *Phytophthora* 종 간의 구분이 어려운 경우도 있었다. 따라서 보다 정확하고 명확한 *Phytophthora* 종의 유전적 다양성 분석 및 동정을 위해서는 단일 부위에 의한 PCR-SSCP보다는 복수 부위에 의한 PCR-SSCP를 실시하는 것이 바람직한 것으로 확인되었다.

SSCP는 염기서열을 분석하지 않고도 전기영동에 의하

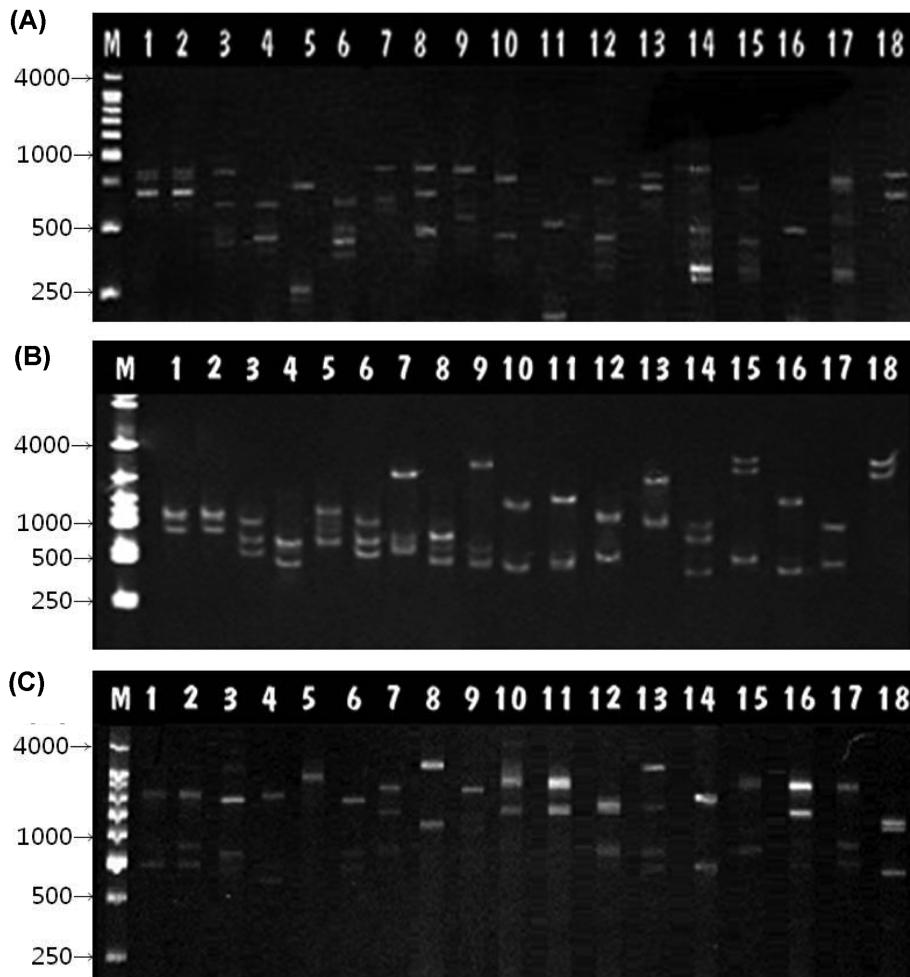


Fig. 2. SSCP analysis for *Phytophthora* species using a part of BTU (A), EF1A (B) and ITS (C) amplified by PCR. M represents 1 kb ladder. Lane 1, TPML 06522; Lane 2, TPML 08001; Lane 3, TPML 07001; Lane 4, TPML 07004; Lane 5, TPML 07005; Lane 6, TPML 07006; Lane 7, TPML 07007; Lane 8, KACC 40173; Lane 9, KACC 40185; Lane 10, KACC 40161; Lane 11, KACC 40190; Lane 12, KACC 40402; Lane 13, KACC 40711; Lane 14, KACC 40718; Lane 15, KACC 40194; Lane 16, KACC 40712; Lane 17, KACC 40468; Lane 18, KACC 40409.

여 염기서열의 차이를 확인할 수 있는 비교적 간단한 전기영동에 의한 유전자 분석 방법이고, 반응 민감도도 높기 때문에, 종 및 균주들의 변이 분석 및 동정에 자주 이용되는 방법이다(Hayashi, 1991; Hong 등, 2008; Kong 등, 2004, 2005). Kong 등(2004, 2005)은 SSCP를 이용하여 *P. ramorum*의 rDNA ITS 영역을 증폭하여 다른 18종의 *Phytophthora* 종과 SSCP 분석을 실시하였고, 또한, 부패균과(Pythiaceae)에 속하는 *Phytophthora*와 *Pythium*을 PCR-SSCP 분석을 통하여 구분한 보고가 있다. Hong 등(2008)은 미국에서 처음으로 발견된 *P. irrigata*를 다른 9종의 *Phytophthora* 종과 SSCP 분석을 실시하였다.

*Phytophthora*에 의한 식물병의 PCR 진단에는 rDNA의 ITS 영역의 종(species) 특이적인 염기서열에 기초하여 제작한 primer가 주로 많이 이용되어 왔다. 그러나 앞으로

는 ITS 영역뿐만 아니라 본 연구를 통해 밝혀진 BTU와 EF1A 영역에 특이적인 primer에 의한 *P. katsurae*의 PCR 검정 방법이 개발된다면 복합적인 유전자 부위를 이용한 동정 및 진단이 가능할 것이며, 형태학적, 병원학적, 생리생태학적 특성과 함께 복합적인 유전자 부위를 이용한 진단을 실시한다면 *P. katsurae*의 동정 및 진단의 정확도가 향상될 것으로 기대된다.

요 약

우리나라에서 분리한 *P. katsurae*의 유전적 특성을 구명하기 위하여 국내에서 분리한 *P. katsurae*를 대상으로 nuclear DNA(nDNA)의 β -tubulin (BTU)과 Elongation factor 1 alpha (EF1A) 그리고 rDNA ITS 부위의 PCR-SSCP 분석을 실

시하여, *P. katsurae*와 *Phytophthora* 속에 속하는 다양한 종들의 각 부위를 대상으로 유전적 유연관계를 비교분석하고 동정에 이용하고자 하였다. 각각의 *Phytophthora* 속에서 변이가 가장 많이 발생하는 부위를 포함하여 증폭시킬 수 있도록 각 부위의 공통 염기배열로부터 제작된 primer는 *Phytophthora* 종에 특이적인 반응을 나타냄으로써 동정 및 진단에도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되었다. SSCP 분석 결과는 국내 *P. katsurae* 균주와 공시한 다른 *Phytophthora* 속 균주들과의 구분이 가능하였으며, *Phytophthora* 종 간의 구분도 가능하였다. 그러나 한 가지 부위만을 이용한 PCR-SSCP 분석은 *Phytophthora* 종 간의 구분이 어려운 경우도 있었다. 따라서 보다 정확하고 명확한 *Phytophthora* 종의 유전적 다양성 분석 및 동정을 위하여서는 단일 부위에 의한 PCR-SSCP보다는 복수 부위에 의한 PCR-SSCP를 실시하는 것이 바람직한 것으로 확인되었다.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of 'Forest Science & Technology Projects (Project No. C1002315)' provided by Korea Forest Service.

참고문헌

- 김만조, 황명수, 김선창, 이욱. 2007. 한국의 밤나무 재배품종에 대한 밤나무혹벌 내충성 검정. 한국임학회지 96: 295-299.
- 김태욱. 2002. 한국의 수목. 교학사 pp. 64-65.
- 이상현, 김경희, 변재경, 이종규, 문병주. 2006. 밤나무 재배지에 서의 생물적, 환경적 요인이 밤나무 줄기마름병 발생에 미치는 영향. 한국임학회지 95: 139-144.
- Abreu, C. G., Carvalho, L., Gomes, M. J., Colaco, J. and Cardoso, A. O. 1999. Assessment of resistance to chestnut ink disease. *Acta Hort.* 494: 363-367.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M. and Kang, S. 2007. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Gen. Biol.* 45: 266-277.
- Boutard, A. 2001. The western chestnut: More information on chestnuts and ink disease. *The Western Chestnut Growers Assn., Inc.* 3: 6-11.
- Brasier, C. M. and Jung, T. 2006. Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees in natural ecosystems in Europe. Progress in Research on *Phytophthora* diseases in Forest trees. 5-16, Farnham.
- Chang, T. T., Yang, W. W. and Wang, W. Y. 1996. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. *Bot. Bul. Aca. Sinica* 37: 165-171.
- Érsek, T., Schoelz, J. E. and English, J. T. 1994. PCR Amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2616-2621.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications* 1: 34-38.
- Hong, C., Gallegly, M. E., Richardson, P. A., Kong, P. and Moorman, G. W. 2008. *Phytophthora irrigata*, a new species isolated from irrigation reservoirs and rivers in Eastern United States of America. *Fed. Eur. Microbiol. Soc.* 285: 203-211.
- Katsura, K. 1976. Two new species of *Phytophthora* causing damping-off of cucumber and trunk rot of chestnut. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 17: 238-242.
- Jyan, M. H., Huang, L. C., Ann, P. J. and Liou, R. F. 2002. Rapid detection of *Phytophthora infestans* by PCR. *Plant Pathol. Bull.* 11: 45-56.
- Ko, W. H. and Chang, H. S. 1979. *Phytophthora katsurae*, a new name for *P. castaneae*. *Mycologia* 71: 840-844.
- Kong, P., Hong, C. X., Richardson, P. A. and Gallegly, M. E. 2003. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal Gen. Biol.* 39: 238-249.
- Kong, P., Hong, C. X., Tooley, P. W., Ivors, K., Garbelotto, M. and Richardson, P. A. 2004. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. *Soc. Appl. Microbiol.* 38: 433-439.
- Kroon, L. P. N. M., Bakker, F. T., Van den Bosch, G. B. M., Bonants, P. J. M. and Flier, W. G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Gen. Biol.* 41: 766-782.
- Kong, P., Richardson, P. A. and Hong, C. 2005. Direct colony PCR-SSCP for detection of multiple *pythiaceae* oomycetes in environmental samples. *J. Microbiol. Meth.* 61: 25-32.
- Mahuku, G., Peters, R. D., Platt, H. W. and Daayf, F. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994 to 1996. *Plant Pathol.* 49: 252-260.
- Martin, F. N. and Tooley, P. W. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 95: 269-284.
- Oh, E. S., Lee, J. K., Lee, S. H. and Kim, K. H. 2007. Chestnut ink disease caused by *Phytophthora katsurae*. *J. Forest Sci.* 23: 65-71.
- Ristaino, J. B., Madritch, M., Trout, C. L. and Parra, G. 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 948-954.
- Shen, G., Wang, Y. C., Zhang, W. L. and Zheng, X. B. 2005. Development of a PCR assay for the molecular detection of *Phytophthora boehmeriae* in infected cotton. *J. Phytopathol.*

- 153: 291–296.
- Verma, L. R. and Sharma, R. C. 1999. Diseases of horticultural crops: fruits. Indus Publishing 226–228.
- Vettraino, A. M., Morel, O., Perlerou, C., Diamandis, S. and Vannini, A. 2005. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with ink disease and crown decline. *Eur. J. Plant Pathol.* 111: 169–180.
- Vettraino, A. M., Natili, G., Anselmi, N. and Vannini, A. 2001. Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. *Plant Pathol.* 50: 90–96.
- Willem, A. M., Wil, J. V., Elena, I., Arthur, W. A. M. de cock., Peter, J. M. B. and Rob, P. 1998. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology* 88: 922–929.