

밤나무 잉크병균, *Phytophthora katsurae*의 검출을 위한 Duplex PCR이동현 · 이선근 · 김혜정 · 이상현<sup>1</sup> · 이상용 · 이종규\*강원대학교 산림환경보호학과, <sup>1</sup>국립산림과학원 산림병해충과A Duplex PCR for Detection of *Phytophthora katsurae* Causing Chestnut Ink DiseaseDong Hyeon Lee, Sun Keun Lee, Hye Jeong Kim, Sang Hyun Lee<sup>1</sup>,  
Sang Yong Lee and Jong Kyu Lee\*

Department of Forest Environment Protection, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>1</sup>Division of Forest Insects and Diseases, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

(Received on May 31, 2012; Revised on June 8, 2012; Accepted on June 8, 2012)

*Phytophthora katsurae* is a fungal pathogen responsible for chestnut ink disease. We designed two duplex primer sets (SOPC 1F/1R+KatI 3F/5R, SOPC 1-1F/1-1R+KatI 3F/5R) to detect *P. katsurae*. SOPC 1F/1R and SOPC 1-1F/1-1R primer pairs were designed for sequence characteristic amplification regions (SCAR) marker, and KatI 3F/5R primer pair was used for *P. katsurae*-specific primer designed from internal transcribed spacer (ITS) region. To assess the sensitivity of duplex PCR, genomic DNA was serially diluted 10-fold to make the final concentrations from 1 mg/ml to 1 ng/ml. The sensitivity for two primer sets were 1 µg/ml and 100 ng/ml, respectively. To find detection limits for zoospores of *P. katsurae*, each zoospore suspension was serially diluted 10-fold to make the final concentrations from  $1 \times 10^6$  to  $1 \times 10^2$  cells/ml, and then DNA was extracted. The limits of detection for all of two primer sets were  $1 \times 10^5$  cells/ml. All of two primer sets were specific to *P. katsurae* in PCR detection and did not produce any *P. katsurae*-specific PCR amplicons from other 16 *Phytophthora* species used as the control. This study shows that duplex PCR using two primer sets might be a useful tool for rapid and efficient detection of *P. katsurae*.

**Keywords :** Chestnut ink disease, Duplex PCR, *Phytophthora katsurae*

## 서 론

2005년 전라남도 영광, 경상남도 하동과 합천 지역에서 잉크병에 의한 밤나무의 피해사례가 처음 보고된 이후 (Oh 등, 2007), 2010년에는 충청남도 공주까지 피해가 확산되어 앞으로 피해가 더욱 증가할 것으로 예측되기 때문에, 이에 대한 대책 수립이 요구되고 있다. 그러나 밤나무 잉크병에 대해서는 병원균인 *P. katsurae* 균주들의 염기서열에 의한 유연관계 분석과 병원균에 대한 밤나무 품종별 감수성/저항성 여부(Oh 등, 2007), 병원균의 생리와 생태(Lee 등, 2009) 등에 관한 연구만 수행되어 있을

뿐 밤나무 잉크병의 효율적인 방제에 필요한 진단에 관련된 연구는 현재까지 수행된 바가 없다.

*Phytophthora*는 대표적인 토양 병원균으로서 기주 범위가 광범위하며, 기주 내에서 발병 부위도 제한적이지 않으므로 수목과 초본 식물에 있어 가장 파괴적인 병원균 중의 하나이다(Boutard, 2001). 이 병원균은 토양 내에 존재하는 수분, 토양 관개수 또는 배수시설 등의 경로를 통해 운동성을 지닌 유주포자로 이동하여 병이 확산되며, 이로 인한 피해는 농경지를 비롯하여 산림생태계에까지 피해가 심각한 실정이다(Kroon 등, 2004; Vannini 등, 2010). 일단 감염된 토양 내에서는 발아하기 좋은 조건이 될 때까지 휴면상태로 존재할 수 있기 때문에 새로운 밤나무 재배단지의 조성 시에도 큰 제약과 경제적 손실이 따르게 된다(Andrea와 Anna, 2001; Boutard, 2001). 우리나라

\*Corresponding author

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

Email) jongklee@kangwon.ac.kr

의 주요 밤나무 품종은 일본에서 도입한 재배 품종들로서 현재 우리나라 전체 재배면적의 약 70% 정도를 점유하고 있는데(Kim 등, 2006), 이 품종들은 밤나무 잉크병균(*P. katsurae*)에 감수성이므로 밤 생산에 큰 피해를 줄 것으로 예상된다. 따라서 이 병에 의한 피해를 줄이기 위해서는 신속하고 정확한 진단이 필요하지만, 아직까지 우리나라에서 밤나무 잉크병에 대한 진단과 현장 적용에 대한 연구는 전무한 실정이다.

한편, 병원균의 형태적, 생리적 특성을 이용한 진단 방법은 비교적 많은 시간이 소요되어 비능률적이며, 병원균의 생리 및 생태에 대한 종합적인 지식이 요구되는 비효율적인 면이 있으므로 이를 개선하기 위한 방안이 강구되어야 한다(Schubert 등, 1999). 이를 극복하기 위하여 많은 연구자들이 internal transcribed spacer(ITS) 부위의 특이적인 primer와 Sequence Characterized Amplified Regions SCAR marker를 이용하여 형태적 및 유전적으로

비슷하다고 알려져 있는 *Phytophthora* 종을 대상으로 polymerase chain reaction(PCR) 검출(Bonants 등, 1997; Elnifro 등, 2000; Jyan 등, 2002; Schubert 등, 1999; Shen 등, 2005; Winton 등, 2001)을 실시하였으며, 종 특이적인 primer를 이용한 이별지 및 이병목 시료로부터의 검출 사례 또한 늘어나고 있다(Ioos 등, 2005; Merlier 등, 2005).

본 연구는 우리나라에서 분리한 *P. katsurae* 10개 균주와 대조군으로 사용한 16종의 *Phytophthora* 종을 대상으로 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)를 실시하였으며, RAPD profile에 기초하여 *P. katsurae*에 특이적으로 반응하는 SCARs marker를 제작하였다. 그리고 *P. katsurae*의 rDNA ITS 부위의 염기서열을 기초로 제작된 특이적인 primer와 SCARs marker를 조합하여 Duplex PCR을 실시하였으며, 이를 통해 밤나무 잉크병의 신속하고 정확한 진단에 활용하고자 하였다.

**Table 1.** *Phytophthora* strains used in this study

Strain*	Species	Source	Origin
TPML 06522	<i>Phytophthora katsurae</i>	Bark of chestnut	Hadong, Korea
TPML 08001	"	Bark of chestnut	Hapcheon, Korea
TPML 08002	"	Forest soil Bait: leaves of chestnut	Hadong, Korea
TPML 08003	"	Forest soil Bait: leaves of rhododendron	Hadong, Korea
TPML 08004	"	Bark of chestnut	Hapcheon, Korea
TPML 08005	"	Bark of chestnut	Hapcheon, Korea
TPML 08007	"	Bark of chestnut	Hapcheon, Korea
TPML 08008	"	Bark of chestnut	Hapcheon, Korea
TPML 08009	"	Bark of chestnut	Hadong, Korea
TPML 08010	"	Bark of chestnut	Hadong, Korea
TPML 07001	<i>Phytophthora citricola</i>	-	Oregon, USA
TPML 07004	<i>P. cactorum</i>	American Ginseng	Oregon, USA
TPML 07005	<i>P. cinnamomi</i>	Hydrangea	Oregon, USA
TPML 07006	<i>P. cambivora</i>	Baited soil	Oregon, USA
TPML 07007	<i>P. lateralis</i>	Port-Orford Cedar	Oregon, USA
KACC 40173	<i>Phytophthora boehmeriae</i>	Ailanthus	Hapcheon, Korea
KACC 40185	<i>P. citrophthora</i>	Schizandra	Chilgok, Korea
KACC 40161	<i>P. cryptogea</i>	Gerbera	Incheon, Korea
KACC 40190	<i>P. drechsleri</i>	Tomato	Goryeong, Korea
KACC 40712	<i>P. erythroseptica</i>	Potato	Korea
KACC 40711	<i>P. gonapodyides</i>	Douglas fir	Oregon, USA
KACC 40718	<i>P. infestans</i>	Potato	Pyeongchang, Korea
KACC 40194	<i>P. melonis</i>	Melon	Gongju, Korea
KACC 40402	<i>P. nicotianae</i>	Eggplant	Pocheon, Korea
KACC 40409	<i>P. palmivora</i>	Cymbidium	Suwon, Korea
KACC 40468	<i>P. sojae</i>	Soybean	Korea

\*TPML: Tree Pathology & Mycology Lab (Kangwon National University), KACC: Korea Agricultural Culture Collection.

## 재료 및 방법

**공시균주 및 배양조건.** 경상남도 하동과 합천의 밤나무 잉크병 발병입지로부터 채집한 *P. katsurae* 균주를 사용하였으며, 대조 공시 균주는 Korea Agricultural Culture Collection(KACC, 한국농업미생물자원센터)로부터 분양 받았다(Table 1). 실험에 사용한 *Phytophthora* 균주들은 V8배지에 접종하여 25°C에서 약 7일간 배양한 후, 증식한 균사체를 채취하여 genomic DNA 추출 시료로 사용하였다.

**유주포자의 발생유도 및 수확.** *Phytophthora katsurae* 균주(TPML 08003)를 V8배지에 접종하고 25°C 암조건에서 약 5일 동안 배양한 뒤, 코르크볼러(8 mm)를 사용하여 균층의 가장자리 부분에서 원형의 agar disc를 떼어내어 Petri plate(diameter 90 mm)에 다수 치상하고 Soil extraction solution을 agar disc의 상단면이 잠길 정도로 첨가한 후, 18°C 광조건(1000 lux)에서 약 2주간 배양하여 유주포자낭 형성을 유도하였다. 유주포자낭이 형성된 agar disc 한 개를 Petri plate(diameter 55 mm)에 치상하고 Soil extraction solution 3 ml를 첨가하여 배양한 뒤, 4°C에서 약 1시간, 25°C에서 약 2시간, 18°C에서 약 2-4시간의 순서로 암조건에 정치하여 유주포자를 발생시켰다.

유주포자낭 및 포자 발생의 유도를 위하여 사용한 Soil extraction solution은 산립 내 존재하는 유기토양 8 g을 400 ml의 증류수에 혼합한 후 약 10분 동안 교반기를 이용하여 혼합하고, 8000 g에서 20분간 원심분리 하여 큰 부유입자를 제거하였으며, 잔존하는 부유입자를 추가적으로 제거하기 위하여 vacuum pump를 이용하여 filter paper(Whatman No. 1)에 수용액만을 여과시켜 제조하였다(Li 등, 2009).

발생된 유주포자는 Soil extraction solution 3 ml가 첨가된 Petri plate(diameter 55 mm)에서 약 1 ml를 취하여 1.5 ml micro tube에 옮기고 약 1분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였으며, 이 과정을 두 번 더 반복하여 Petri plate(diameter 55 mm)에 형성된 유주포자만을 순수 분리하였다.

**Genomic DNA 추출.** 균사체로부터 genomic DNA의 추출은 DNeasy Plant mini kit(QIAGEN Co.)를 사용하였으며, 유주포자로부터의 genomic DNA 추출은 Power soil DNA isolation Kit(MOBIO Co.)를 사용하였다. 추출된 DNA는 -20°C에서 보관하였다.

**rDNA ITS 부위의 염기서열 분석 및 Primer 제작.** *P. katsurae*의 rDNA ITS 부위의 염기서열 분석에 사용된 primer는 rDNA의 ITS 부위를 증폭시킬 수 있는 universal

primer인 ITS1 및 ITS4를 사용하였다(White 등, 1992). 한편, Duplex PCR에 사용된 primer는 *Phytophthora* 종들의 rDNA ITS 부위의 염기배열을 대상으로 DNA STAR Program(Ver. 2.01: USA) 내의 Clustal W를 이용하여 align한 후, *Phytophthora* 종에서 변이가 가장 많이 발생하는 부위로부터 747 bp 크기가 증폭되는 *P. katsurae*의 종 특이적인 primer인 KatI 3F(5'-ACC AAT AGT TGG GGG CGA GT-3')와 KatI 5R(5'-CCA ATA AAG GCA CAC ACA AAT-3')을 제작한 뒤, SCAR marker와 조합하여 사용하였다.

**RAPD 및 SCAR marker 제작.** RAPD용 random primer는 Eurofins MWG Operon's RAPD<sup>®</sup> Kit C로 총 20종을 사용하였다. PCR reaction mixture의 조성은 genomic DNA 2 µl, random primer 1 µl, Taq polymerase(Takara Bio Inc.) 0.25 unit, 10×Ex Taq buffer 5 µl(+20 mM Mg<sup>2+</sup>), 2.5 mM dNTP 4 µl의 총 50 µl로, PCR 반응은 Mycycler(Bio-Rad)를 사용하였고, 사용한 genomic DNA의 농도는 모든 *Phytophthora* 종이 동일하였다. PCR cycling의 조건은 94°C에서 30초간 denaturation, 37°C에서 30초간 annealing과 72°C에서 1분간 extension으로 40 cycle을 반복 실행하였으며, 처음 denaturation은 94°C에서 3분간, 그리고 마지막 extension은 72°C에서 7분간이었다.

SCAR marker 제작을 위해서 *P. katsurae*를 대상으로 RAPD<sup>®</sup> 10-mer Kit C(Eurofins MWG Operon Tech.)를 이용하여 1차 screening을 실시하고 증폭산물의 특이성과 선명도를 기준으로 random primer, OPC-02(5'-GTGAGGCGTC-3')를 선별하였다. 선별한 random primer를 사용하여 *Phytophthora* 종들을 대상으로 2차 screening을 실시하고 RAPD 분석 결과로부터 *P. katsurae*에 특이적으로 증폭된 증폭산물을 선별하였다. 선별된 증폭산물을 클로닝하여 염기서열을 분석하고, DNA STAR Program(Ver. 2.01: USA)을 이용하여 1차 screening에서 선별된 random primer(OPC-02)를 포함한 23-24 nt 크기의 specific marker를 제작하였다(Table 2).

**클로닝 및 염기서열 분석.** RAPD 분석에서 선별한 *P. katsurae*에 특이적으로 증폭된 PCR 산물은 agarose gel로부터 QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification kit(QIAGEN Co.)를 이용하여 추출한 후, pGEM-T easy vector(Promega Co.)의 cloning site에 T4 DNA ligase를 이용하여 삽입시키고, *Escherichia coli* JM109(Promega Co.)의 competent cell에 형질전환시켰다. Ampicillin이 함유된 LB 한천배지로부터 형성된 균층에서 백색 균층만을 선별한 후, Wizard<sup>™</sup> Miniprep DNA Purification System(Promega Co.)을 사용하여 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드는 제

한효소 *EcoRI*(Promega Co.)으로 처리하여, 37°C에서 1시간 정치한 다음, 1.5% agarose gel에서 insert의 삽입 여부를 확인하였다. Recombinant DNA의 염기서열은 Bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit를 사용하여 ABIPRISM 3730XL analyzer sequencer(Applied Bio systems Co.)에 의하여 분석하였으며, 각 지역별 *P. katusrae* 균주들과 *Phytophthora* 종간의 염기서열 분석은 DNA STAR Program(Ver. 2.01: USA)을 사용하였다.

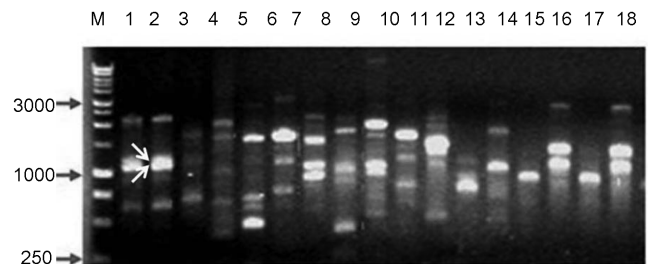
**Duplex PCR 조건.** Duplex PCR에 사용된 각 primer set는 *KatI* 3F/5R(5 pmol)+SOPC 1F/1R(20 pmol)과 *KatI* 3F/5R(5 pmol)+SOPC 1-1F/1-1R(20 pmol)로, 각 primer pair는 정해진 농도로 혼합하여 mixture를 제작하였다. PCR reaction mixture의 조성은 genomic DNA 2 µl, primer mixture 2 µl, Taq polymerase(Takara Bio Inc.) 0.25 unit, 10×Ex Taq buffer 5 µl(+20 mM Mg<sup>2+</sup>), 2.5 mM dNTP 4 µl의 총 50 µl로, PCR 반응은 Minicycler(MJ Research)를 사용하였다. PCR cycling의 조건은 95°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing과 72°C에서 1분간 extension으로 35 cycle을 반복 실행하였으며, 처음 denaturation은 95°C에서 2분간, 그리고 마지막 extension은 72°C에서 5분간이었다. PCR 증폭산물의 분석은 Mupid 21(COSMO BIO Co.)을 사용하여 1.5% agarose gel(1×TAE 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.

**Duplex PCR primer의 민감도 검정.** *P. katusrae* 균사량에 따른 검정 한계점을 확인하기 위해서 TU-1800 UV-VIS spectrophotometer(Human Co.)를 사용하여 DNA 농도를 측정하였다. 또한, 유주포자량의 경우에는 Hemacytometer를 사용하여 초기 농도인 1×10<sup>6</sup> cells/ml에서 1×10<sup>2</sup> cells/ml의 농도까지 10배율로 희석하고, 그 중 400 µl의 유주포자 현탁액을 Power soil DNA isolation KIT(MOBIO Co.)를 사용하여 각각의 sample 중의 genomic DNA를 추출한 후, *P. katusrae*에 특이적인 primer를 사용하여 한계점을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

**RAPD 분석 및 SCAR marker의 제작.** *P. katusrae*를 대상으로 RAPD<sup>®</sup> 10 mer-Kit C(Eurofins MWG Operon Tech.) 총 20종의 random primer를 사용하여 PCR을 실시하고, 공시한 primer 중에서 PCR 증폭 산물의 선명도 및 특이성을 기준으로 선발한 random primer(OPC-02)를 사용하여 *Phytophthora* 종들의 각 균주들로부터 추출한 genomic DNA의 RAPD를 실시한 결과, 다수의 PCR 증폭산물이 검출되었으며, 각 *Phytophthora* 종은 모두 다른 DNA pattern을 나타내었다(Fig. 1). 그 중 *P. katusrae*에 특이적인 증폭산물 2개를 선별하고 cloning하여, 염기서열을 분석한 결과 총 염기 수는 각각 1314 nt과 1205 nt였으며(자료 생략), 각 염기서열을 이용하여 random primer(OPC-02)가 포함된 *P. katusrae*에 특이적인 marker를 제작하였다(Table 2).

**Duplex PCR의 민감도 검정.** 순수 배양된 *P. katusrae* 균사로부터 추출된 genomic DNA로부터 Duplex PCR에 의한 검정 한계점을 확인한 결과, *KatI* 3F/5R+SOPC 1F/1R의 경우에는 1 mg/ml-1 µg/ml, *KatI* 3F/5R+SOPC

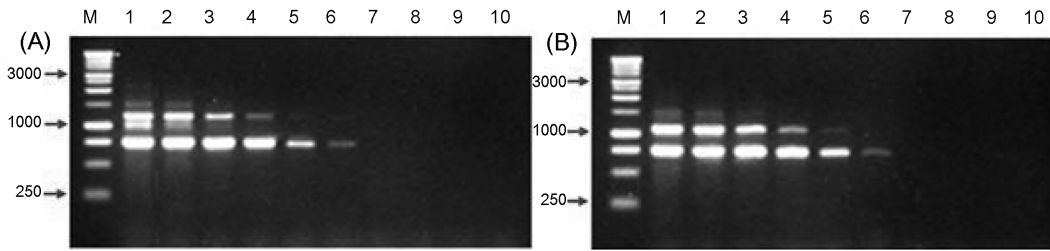


**Fig. 1.** RAPD profiles of 17 *Phytophthora* species generated from OPC-02 random primer (Operon 10-mer Kit C, Operon Tech.). Arrows represents specific amplicons of *P. katusrae* using SCAR maker design. Lane M: 1 Kbp DNA ladder (Promega Co.), lane 1: TPML 06522, lane 2: TPML 08001, lane 3: TPML 07001, 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.

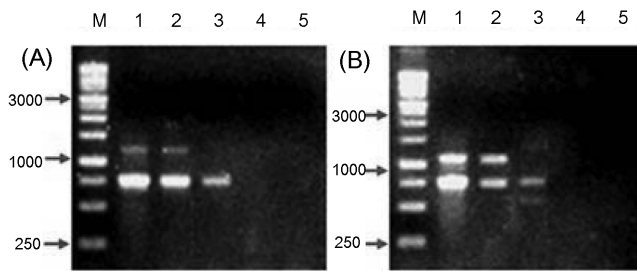
**Table 2.** *P. katusrae* specific marker designed for this study

Primer	Sequences*	PCR product size
SOPC 1F SOPC 1R	5' <u>GTG AGG CGT CGA</u> AGA ACG AGG AAT 3' 5' <u>GTG AGG CGT CCG</u> GTG TAG AAG AGG 3'	1209 bp
SOPC 1-1F SOPC 1-1R	5' <u>GTG AGG CGT CGA</u> CGA GGC AGA ACA 3' 5' <u>GTG AGG CGT CCA</u> ACA GGA TGC TT 3'	1100 bp

\*The underlined sequence represents the original random decamer primer (OPC-02) sequence used in the RAPD reaction.



**Fig. 2.** Sensitivity of Duplex PCR on *P. katusrae* mycelium using KatI 3F/5R+SOPC 1F/1R (A) and KatI 3F/5R+SOPC 1-1F/1-1R (B). M represents 1 Kbp ladder (Promega Co.). Lane 1-10, amplified product from DNA at the concentration of 1 mg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, and 1 pg/ml, respectively.



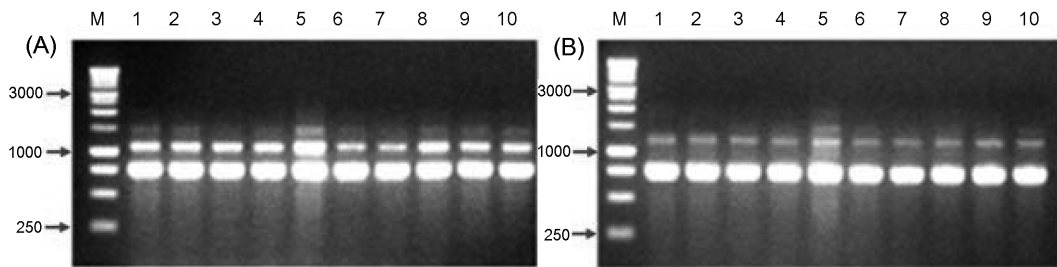
**Fig. 3.** Sensitivity of Duplex PCR on zoospore suspension of *P. katusrae* using KatI 3F/5R+SOPC 1F/1R (A) and KatI 3F/5R+SOPC 1-1F/1-1R (B). M represents 1 Kbp ladder (GeneDirex Co.). Lane 1-5, amplified product from DNA at the concentration of  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ , and  $1 \times 10^2$  cells/ml, respectively.

1-1F/1-1R의 경우에는 1 mg/ml-100 ng/ml에서 특이적인 증폭산물이 검출되었다(Fig. 2). 또한, 유주포자량에 따른 검정 한계점을 확인한 결과, 두 종류의 Duplex primer set 모두  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^5$  cells/ml까지 특이적인 증폭산물이 검출되었다(Fig. 3). Lee(2010)는 Nested PCR과 Conventional PCR 및 SCAR PCR에 의한 검출 효율성을 비교하였을 때, Nested PCR이 균사를 이용한 검정 한계점에서는 최소  $10^4$ 배에서  $10^2$ 배, 유주포자를 이용한 검정 시에는 약  $10^3$ 배 정도 효율이 높은 것을 확인하였다. 본 연구결과와 비교하였을 때, Duplex PCR은 Conventional PCR 및 SCAR PCR과 동일한 농도까지 검출이 가능하였으므로, 실제 이병목에서 채취한 시료로부터의 검출에서는 Duplex PCR이 Nested PCR보다 효율성이 낮을 것으로 추정되었다.

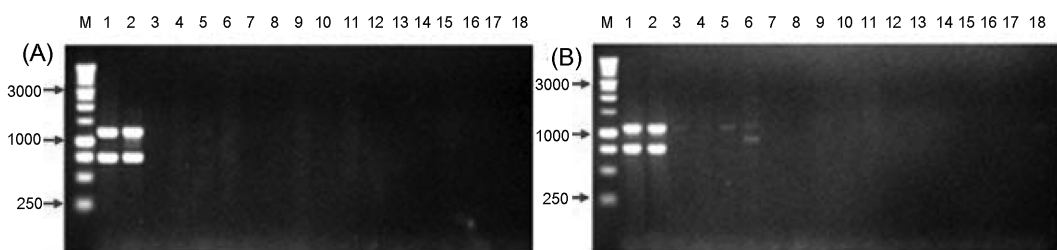
**Duplex PCR을 이용한 *P. katusrae*의 검정.** SCARs marker로 사용된 primer pair 2종(SOPC 1F/1R과 SOPC 1-1F/1-1R)과 rDNA ITS 부위의 염기서열을 이용하여 제작한 primer pair(KatI 3F/5R)를 사용하여 PCR을 실시한 결과, 각각의 primer set은 10개 지역의 *P. katusrae* 모든 균주에서 2개의 특이적인 증폭산물이 증폭되었다(Fig. 4). 또한 *P. katusrae* 2균주와 *Phytophthora* 16종을 각각의 primer set를 사용하여 PCR을 실시한 결과, *P. katusrae*

2균주에서만 특이적인 2개의 증폭산물이 발견되었으며, *Phytophthora* 16종에서는 *P. katusrae* 특이적인 증폭산물이 한 개만 발견되거나 발견되지 않았다(Fig. 5). Duplex PCR은 의학 및 식품과 관련한 미생물의 검출 효율성을 높이기 위해 널리 사용되는 실험 방법으로, 서로 다른 크기의 증폭산물을 갖는 primer 등의 조합으로 여러 종의 병원균을 단번에 검출하거나, 일반적인 PCR 과정에서의 비특이적인 증폭산물에 의해 발생한 종 동정 및 검출의 오류를 개선하고 시간적, 경제적으로 효율적인 것으로 보고되었다(Elnifiro 등, 2000; Morot-Bizot 등, 2004). 예로 원예작물과 삼나무에 심각한 피해를 발생시키는 *P. lateralis*에 대한 기존의 시간 소비적이고, 비효율적인 방법을 개선하고, 실제 이병지 및 이병목에서의 검출 효율성을 높이기 위해 rDNA ITS 부위의 특이적인 primer를 사용하여 Duplex PCR을 이용한 연구가 보고된 바 있다(Winton 등, 2001).

Duplex PCR은 *in vitro*에서 *P. katusrae* 병원균의 검출 및 종 동정에 Nested PCR 만큼의 높은 효율성을 기대할 수는 없지만, Conventional PCR 및 SCAR PCR과 비슷한 결과를 나타내었으므로 *Phytophthora* 종 내의 동정 및 검출에는 활용이 가능할 것으로 판단되었다. Nested PCR은 감염되지 않았거나 내생의 상태로 존재하고 있는 매우 소량의 병원체도 검출될 수 있고 단일 유전자 부위를 대상으로 하기 때문에 동정 및 진단에 오류가 발생할 수도 있다. 상동성이 높은 *Phytophthora* 속 병원균의 특성상 단일 부위에서만 종 동정 및 진단은 효율이 떨어진다는 사실이 다양한 연구를 통해 확인되었다(Kroon 등, 2004; Meng과 Wang, 2010). 하지만, Duplex PCR은 1회의 PCR로 특이적인 증폭산물을 2개 증폭시켜 다수 유전자 부위를 대상으로 하기 때문에 정확도에서는 Nested PCR보다 뛰어나다고 할 수 있다. 보다 정확한 동정 및 진단을 위해서는 Nested PCR과 Duplex PCR을 동시에 적용한다면 종의 검출 및 동정 과정에서의 오류를 더욱 줄일 수 있을 것이다.



**Fig. 4.** Duplex PCR detection of *P. katsurae* amplified by KatI 3F/5R+SOPC 1F/1R (A) and KatI 3F/5R+SOPC 1-1F/1-1R (B). M represents 1 Kbp ladder (Promega Co.). Lane 1: TPML 06522, Lane 2: TPML 08001, Lane 3: TPML 08002, Lane 4: TPML 08003, Lane 5: TPML 08004, Lane 6: TPML 08005, Lane 7: TPML 08007, Lane 8: TPML 08008, Lane 9: TPML 08009, Lane 10: TPML 08010.



**Fig. 5.** Duplex PCR detection of *Phytophthora* species amplified by KatI 3F/5R+SOPC 1F/1R (A) and KatI 3F/5R+SOPC 1-1F/1-1R (B). M represents 1 Kbp ladder (Promega Co.). 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.

## 요 약

*Phytophthora katsurae*는 밤나무 잉크병의 원인이 되는 병원성 균류이다. *P. katsurae*를 검출하기 위하여 2개의 duplex PCR primer set을 제작하였다(SOPC 1F/1R+KatI 3F/5R, SOPC 1-1F/1-1R+KatI 3F/5R). SOPC 1F/1R과 SOPC 1-1F/1-1R primer pair는 sequence characteristic amplification regions(SCAR)를 이용하여 제작하였고, KatI 3F/5R primer pair는 internal transcribed spacer(ITS) 부위로부터 제작하였다. 추출한 genomic DNA를 1 mg/ml에서 1 ng/ml까지 10배씩 순차적으로 희석하여 균사량에 따른 Duplex PCR의 민감도를 확인한 결과, 2개의 primer set은 각각 1 µg/ml와 100 ng/ml까지 검출이 가능하였다. 유주 포자를  $1 \times 10^6$ 부터  $1 \times 10^2$  cells/ml까지 10배씩 순차적으로 희석하고 genomic DNA를 추출하여 *P. katsurae*의 유주 포자량에 의한 검출 한계를 확인한 결과, 2개의 primer set 모두  $1 \times 10^5$  cells/ml까지 검출할 수 있었다. 각각의 primer set은 PCR 검출을 실시하였을 때 *P. katsurae* 균주에서만 PCR 산물이 증폭된 반면에, *Phytophthora* 16종에서는 *P. katsurae*에 특이적인 PCR 증폭산물이 생성되지 않았다. 따라서, 2개의 primer set을 이용한 Duplex PCR

은 *P. katsurae*의 신속하고 효과적인 검출에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

## Acknowledgment

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

## References

- Andrea, V. and Anna, M. V. 2001. Ink disease in chestnuts: impact on the European chestnut. *For. Snow Landsc. Res.* 76: 345–350.
- Bonants, P., Hagenaar-de Weerd, M., van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D. E. L. and Duncan, J. M. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 345–355.
- Boutard, A. 2001. The western chestnut: More information on chestnuts and ink disease. *The Western Chestnut Growers Assn. Inc.* 3: 7–11.
- DE Merlier, D., Chandelier, A., Debruxelles, N., Noldus, M.,

- Laurent, F., Dufays, E. and Claessens, H. 2005. Characterization of alder *Phytophthora* isolates from Wallonia and development of SCAR primer for their specific detection. *J. Phytopathol.* 153: 99–107.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J. and Klapper, P. E. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 559–570.
- Ioos, R., Husson, C., Andrieux, A. and Frey, P. 2005. SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 112: 323–335.
- 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.
- Kim, M. J., Kim, S. C. and Kim, S. C. 2006. Chestnut cultivars in Korea. Korea Forest Research Institute, Seoul, Korea. 197 pp. (In Korean)
- 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 Genet. Biol.* 41: 766–782.
- Lee, D. H. 2010. Detection of *Phytophthora katsurae* using PCR-techniques. Master's thesis. Kangwon National University, Chuncheon, Korea. (In Korean)
- Lee, J. K., Jo, J. W., Shin, K. C., Lee, S. H. and Lee, S. Y. 2009. Isolation, identification and characterization of *Phytophthora katsurae*, causing chestnut ink disease in Korea. *Plant Pathology J.* 25: 121–127.
- Li, Y., Minerdi, D., Garibaldi, A. and Gullino, M. L. 2009. Molecular detection of *Phytophthora cryptogea* on *Calendula officinalis* and *Gerbera jamesonii* artificially inoculated with zoospores. *J. Phytopathol.* 157: 438–445.
- Meng, J. and Wang, Y. 2010. Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infected tobacco tissue and soil samples based on its *YPT 1* gene. *J. Phytopathol.* 158: 1–7.
- Morot-Bizot, S. C., Talon, R. and Leroy, S. 2004. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four *Staphylococcal* species isolated from food. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1087–1094.
- Oh, E. S., Lee, J. K., Lee, S. H. and Kim, K. H. 2007. Chestnut ink disease caused by *Phytophthora katsurae*. *J. For. Sci.* 23: 65–71. (In Korean)
- Schubert, R., Bahnweg, G., Nechwatal, J., Jung, T., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M., Muller-Starck, G., Langebartels, G., Sanderman, Jr. H. and Obwald, W. 1999. Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot disease in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *Eur. J. Plant Pathol.* 29: 169–188.
- 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.
- Vannini, A., Natili, G., Anselmi, N., Montagni, A. and Vettraino, A. M. 2010. Distribution and gradient analysis of ink disease in chestnut forests. *For. Path.* 40: 73–86.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols : A guide to methods and application. Academic Press, New York, USA. pp. 315–321.
- Winton, L. M. and Hansen, E. M. 2001. Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in tree, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction. *For. Path.* 31: 275–283.