

# 배추 뿌리혹병균 *Plasmodiophora brassicae*의 종 특이적 프라이머 개발

## Development of Species-Specific Primers for *Plasmodiophora brassicae*, Clubroot Pathogen of Kimchi Cabbage

최진수 · 양슬기 · 송정영 · 김홍기\*

충남대학교 응용생물학과

**\*Corresponding author**

Tel : +82-42-821-5768  
Fax: +82-42-823-8679  
E-mail: hgkim@cnu.ac.kr

Jin Su Choi, Seul Gi Yang, Jeong Young Song and Hong Gi Kim\*

Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received November 29, 2012  
Revised February 14, 2014  
Accepted February 21, 2014

Clubroot caused by the obligate biotrophic protist *Plasmodiophora brassicae* Woronin is one of the most damaging diseases of *Brassicaceae* family. In this study, we developed species-specific primer sets for rapid and accurate detection of *P. brassicae*. The primer sets developed amplified a specific fragment only from *P. brassicae* DNA while they did not amplify a band from 10 other soilborne pathogens or from Kimchi cabbage. In sensitivity test, the species-specific primer set ITS1-1/ITS1-2 could work for approximately 10 spores/ml of genomic DNA showing more sensitivity and accuracy than previous methods. With quantitative real-time PCR test, the primer set detected less spores of *P. brassicae* than before, confirming that the species-specific primer set could be useful for rapid and accurate detection of *P. brassicae*.

**Keywords :** Clubroot pathogen, Detection, *Plasmodiophora brassicae*, Quantitative real-time PCR, Species-specific primer

### 서 론

뿌리혹병은 십자화과 채소에 가장 피해가 큰 병해로서 배추, 무, 양배추, 순무, 케일, 갓, 브로콜리 이외에 애기장대와 냉이뿐 아니라 비트, 한련화, 파파야 등에도 그 발생이 보고되었으며(Ludwig-Müller, 1999) 국내의 경우 배추에서 피해규모가 가장 크다(Cho 등, 2003). 병원균인 *Plasmodiophora brassicae* (Woron.)는 소련의 Woronin(1878)에 의해 최초로 발견되었고 한국에서는 1990년대 초부터 경기도 북부와 강원도의 전통적 배추재배지역을 위시하여 전국적으로 급격히 확산, 큰 피해를 주고 있다.

이 병원균은 기주 세포 내에서 다핵성 변형체를 형성하여 기주 조직의 이상비대를 초래, 뿌리로부터 혹을 형성하게 된다(Fähling 등, 2004). 조직 내에 증식된 다핵성 변형체로 인해 뿌

리의 유관속부가 정상적으로 분화하지 못하고 양분과 수분 흡수가 저해되어, 지상부는 생육이 부진하고 점점 시드는 증상이 심화, 결국에는 감염식물의 고사를 초래한다(Voorrips와 Kanne, 1997).

뿌리혹병균의 검출은 형광현미경을 이용한 형태 관찰법이 사용되고 있으나 검출에 시간이 많이 소요되고 고가의 장비가 필요하다. 뿌리혹병균의 검출을 위해 Ito 등(1999), Wallenhammar 등(2012)에 의해 종 특이적 프라이머가 제작되었고 국내 병원균 검출을 위한 프라이머가 Soh 등(2013)에 의해 개발되었다. 본 연구에서는 뿌리혹병균 검출 및 병원균의 양을 정량할 수 있는 보다 개선된 프라이머를 개발하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**공시 균주.** 사용한 배추뿌리혹병균(*P. brassicae*)은 강원도 평창, 인제, 홍천, 대관령, 강릉, 원주와 경기도 안성, 충남 홍성, 전라남도 해남, 진도 등 10여 곳의 배추 재배지역 포장으로부터

500여개의 뿌리혹을 채집하여 휴면포자를 분리한 다음 실험에 사용하였다.

**휴면포자의 분리.** 채집된 뿌리혹을 흐르는 물로 수 차례 씻어내어 토양입자와 불순물을 최대한 제거해 낸 후, 멸균된 메스와 가위를 이용하여 잘게 잘라낸 다음, 굵은 시험관(Pyrex, Ø30 mm)에 넣고 Homogenizer(IKA, 25 µm)로 잘게 마쇄하여 뿌리조직 내 휴면포자를 나출시켰다. 나출된 포자를 식물조직 및 토양 잔재물로부터 분리하기 위해 8겹의 거즈를 통해 걸러낸 후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 수거한 pellet에 멸균수를 첨가하고 원심분리기에서 15분간 씻어내는 과정을 2 차례 반복하였다. 최종적으로 수거한 pellet을 다음 실험 때까지 -20°C에 보관하였다.

**Genomic DNA의 분리.** DNA는 Jang(2006)의 방법으로 분리 및 정제하였다. 수거된 휴면포자로부터 DNA를 추출하기 위한 동결건조 전처리 과정으로써 pellet에 50 unit/ml 농도의 DNase I (Sigma, D-4263) 50 µl, Streptomycin 300 ppm과 Rifampicin 100 ppm을 처리하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. DNase I의 불활성화는 5 µl Proteinase K(25 µg/µl)를 37°C에서 1시간 동안 처리한 후, 5 mM EDTA 300 µl를 처리하고, 최종적으로 80°C hot block에서 5 분간 고열처리 하였다. DNase I 이 불활성화된 포자현탁액은 다시 4,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 동결건조하여 DNA 추출에 사용하였다. 전처리 후 동결건조된 pellet은 미세한 휴면포자의

세포벽을 효과적으로 파쇄하기 위해 Glass bead(0.09–0.15 mm)를 첨가하여 Pellet Pestile (Sigma)로 마쇄한 다음, 400 µl의 extraction buffer[200 mM Tris-Cl(pH 8.0), 200 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% PVP를 첨가하고 600 µl의 chloroform으로 추출하였다. DNA는 column purification(Intron, Korea) 과정을 통해 정제하고 100 µl의 distilled water에 녹인 다음, 이후 실험에 사용하였다.

**종 특이적 프라이머의 개발.** 종 특이적 프라이머의 선발을 위해 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)와 EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>)로부터 얻어진 *P. brassicae*의 ITS 영역 염기서열 정보를 토대로 참고하여 clustralW와 Oligonucleotide Properties Calculator(<http://www.basic.northwestern.edu>)를 활용하여 ITS1-1/ITS1-2와 ITS2-1/ITS2-2, PLF/PLR, PqF/PqR 등 총 4개의 프라이머 세트를 설계하였다(Fig. 1). 프라이머의 합성은 Genotech(Korea)사에 의뢰하였다(Table 1).

**프라이머의 특이성 및 민감도 검정.** 프라이머의 종 특이성을 조사하고자 10종의 주요 토양전염성 병원균과 배추의 DNA에 대해 앞서 개발한 프라이머 세트를 이용해 PCR 검정을 실시하였다. 또한 민감도를 알아보기 위해 *P. brassicae*의 포자를 10<sup>5</sup> spore/ml부터 10배씩 연속적으로 희석한 후 DNA를 추출하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응 조건은 initial denaturation을 94°C에서 5분 간 실시한 후 denaturation 94°C/30초, annealing 65°C/20초, extension은 72°C/20초로 35 cycles을 수

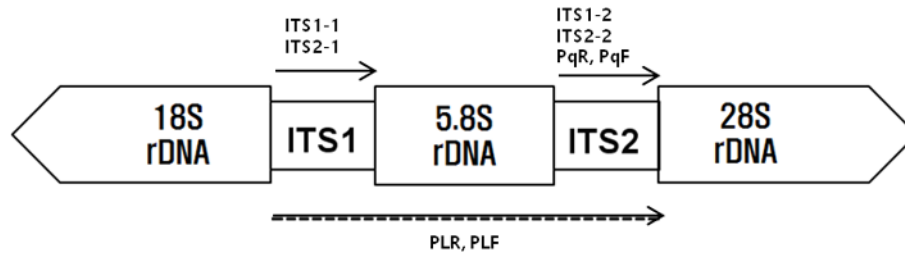


Fig. 1. Diagram of the ribosomal DNA repeat of *Plasmodiophora brassicae* showing the approximate locations of primers.

Table 1. List of primer sets used in this study

Primer set	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Product size
Primer 1 set	ITS1-1	CTA GCG CTG CAT CCC ATA TC	129 bp
	ITS1-2	TGT TTC GGC TAG GAT GGT TC	
Primer 2 set	ITS2-1	CGG CAT AGC TTG AAC GAA G	167 bp
	ITS2-2	GTG TGT GTC GAT CTG CGA TT	
Primer 3 set	PLF	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCT T	548 bp
	PLR	GAA CCT GCG GAA GGA TCA	
Primer 4 set	PqF	GCA AGA CAA TGA GCT TTG CTG	131 bp
	PqR	TGT GTG TGT CGA TCT GCG ATT	

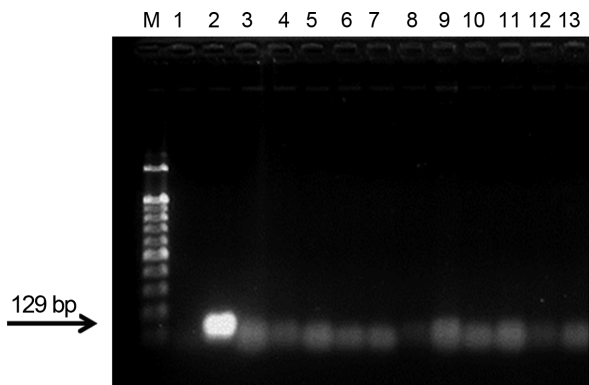
행하고 final extension을 72°C/5분 실시하였다.

Quantitative real-time PCR 분석은 증폭산물의 크기가 129 bp로 real-time PCR에 적용 가능한 ITS1-1과 ITS1-2 프라이머를 이용하였다. PCR 반응액의 총량은 20 µl로 하고 주형 DNA는 1 µl를 사용하였고, 2 µM의 primer를 사용하였으며 iQTM SYBR Green Supermix(BIO-RAD)를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 initial denaturation시켰고, 95°C/30초, 65°C/20초, 72°C/20초로 40 cycles 반응시킨 다음 72°C에서 5분간 final extension시킨 후, melt curve 값은 65°C에서 95°C까지 증가시켜 산출하였다.

### 결과 및 고찰

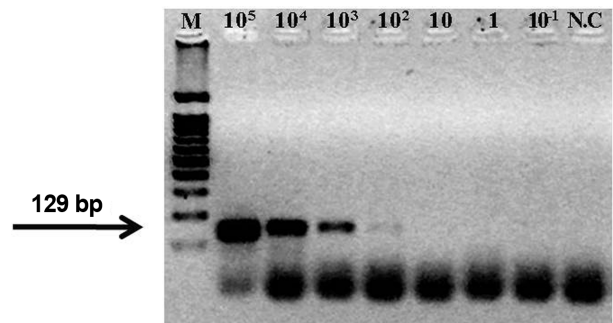
프라이머 ITS1-1/ITS1-2와 ITS2-1/ITS2-2, PLF/PLR, PqF/PqR를 이용하여 3개의 이병 배추뿌리혹으로부터 분리한 휴면포자의 DNA를 PCR 증폭한 결과, 4개의 primer set 모두 *P. brassicae*의 DNA를 증폭하였다. 증폭산물의 크기가 129 bp로 quantitative real-time PCR 사용에 가장 적합했던 ITS1-1/ITS1-2를 이용하여 특이성 검정을 실시한 결과, 토양 내에 존재하는 주요 병원균인 *Alternaria sojae*, *Fusarium oxysporum*, *Didymella bryoniae*, *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum*, *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* 등 다른 병원균 및 식물체의 DNA는 증폭이 이루어지지 않고 뿌리혹병균의 DNA만 증폭된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

민감도 검정을 위해 뿌리혹병균의 포자현탁액을 10<sup>5</sup> spore/ml로 조정한 후 10배씩 희석한 다음 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 앞서 개발한 primer ITS1-1/ITS1-2를 이용하여 1차

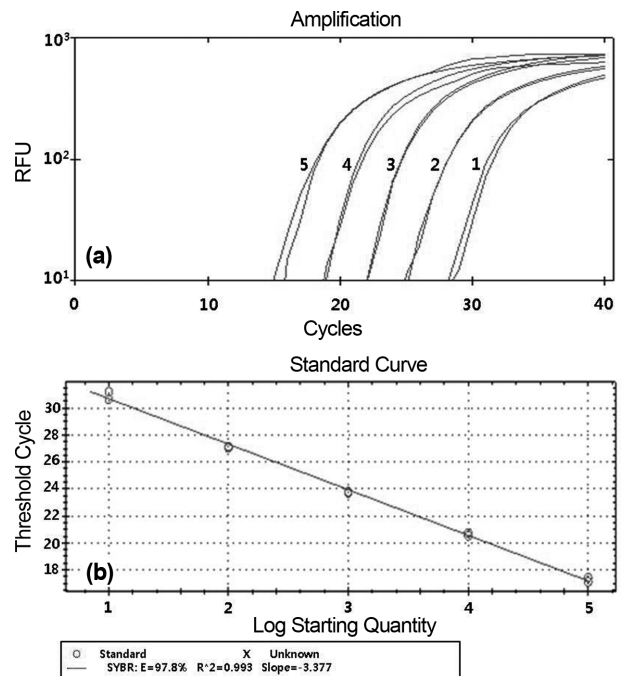


**Fig. 2.** Specificity of primer set ITS1-1/ITS1-2 for *Plasmodiophora brassicae* using conventional PCR. M: 100 bp marker, lane 1: negative control (not containing DNA), lane 2: *P. brassicae* DNA, lanes 3–12 (other soilborne fungi): *Alternaria sojae* (3), *Fusarium oxysporum* (4), *Didymella bryoniae* (5), *Phytophthora infestans* (6), *Pythium ultimum* (7), *Colletotrichum acutatum* (8), *Botrytis cinerea* (9), *Cylindrocarpon destructans* (10), *Rhizoctonia solani* (11), *Verticillium dahliae* (12), lane 13: Kimchi cabbage DNA.

PCR 증폭을 수행한 결과 포자 수 10개까지 검출이 가능하였다 (Fig. 3). 이전 연구에서 사용되었던 Faggian 등(1999)에 의해 개발된 특이적 primer PblITS set는 검출 민감도가 first round PCR에서는 포자 수 100개까지, nested PCR에서는 10개의 포자까지 증폭이 가능하여 ITS1-1/1-2의 민감도와 같지만 nested PCR은 극히 민감한 PCR로 실험방법도 더 까다로워 실제적으로는 first round PCR만을 수행하는 경우가 많기 때문에 본 연구에서 개발된 ITS1-1/1-2를 사용한 PCR 검정이 병원균 검출에 보다 유용할 것으로 판단된다. 또한 quantitative real-time PCR 검정을



**Fig. 3.** PCR sensitivity of primer set ITS1-1/ITS1-2 for *Plasmodiophora brassicae* DNAs with different concentration. M: 100 bp marker, lanes 1–7: serially diluted spores (from 10<sup>5</sup> spores/ml), N.C: negative control (not containing DNA).



**Fig. 4.** Sensitivity of primer set ITS1-1/ITS1-2 for *Plasmodiophora brassicae* on quantitative real-time PCR using SYBR Green. A Real-time amplification curves of different concentrations of DNAs (a) and standard curves (b), numbers 1–5: 10<sup>-1</sup> spores/ml (1), 1 spore/ml (2), 10 spores/ml (3), 10<sup>2</sup> spores/ml (4), 10<sup>3</sup> spores/ml (5).

위해 포자현탁액을  $10^3$  spores/ml로 조정된 후 DNA를 분리한 것을 10배씩 희석하고 ITS1-1/ITS1-2를 이용하여 quantitative real-time PCR을 수행했을 때  $10^{-1}$ 까지 검출이 가능하였다(Fig. 4). 이는 실험방법과 샘플에 다소 차이가 있으나 민감도에서 기존의 Wallenhammar 등(2012)에 의해 개발된 real-time PCR용 프라이머의 민감도  $500$  resting spores/g<sup>-1</sup> soil 보다 높은 민감도를 보였으며, 또한 희석된 DNA의 threshold cycle 값에 의해 작성된 standard curve 값(Fig. 4a)을 통해 여러 샘플 간의 DNA 농도에 대한 상대적인 정량이 가능하였다. 본 결과를 토대로 Real-time PCR에서 SYBR Green을 활용한 균주 특이적인 quantitative real-time PCR 검정이 가능할 것으로 사료된다.

## 요 약

*Plasmodiophora brassicae*는 십자화과 작물에 뿌리혹병을 일으키는 주요 병원균이다. 본 연구에서는 뿌리혹병균의 신속 정확한 검출을 위해서 뿌리혹병균에 대한 새로운 종 특이적 프라이머를 개발하고자 하였다. 새롭게 개발된 프라이머들은 10종의 주요 토양병원균을 비롯하여 기주인 배추 DNA와는 반응하지 않고 *P. brassicae*와만 반응하는 특이성을 갖고 있었다. 그 가운데 Primer ITS1-1/1-2는 민감도 검정 결과,  $10$  spores/ml의 DNA까지 검출이 가능함으로써, first round PCR용임에도 불구하고 이전의 검출법 보다 감도가 높고 정확한 결과를 얻었다. Quantitative real-time PCR로 분석할 경우에는 더 적은 수의 포자까지 안정적으로 검출해 낼 수 있어 새로운 *P. brassicae* 종 특이적 프라이머로서의 유용성을 확인할 수 있었다.

## Acknowledgement

This study was supported by research fund of Chungnam National University, Korea.

## References

- Cho, W. D., Kim, W. G. and Takahashi, K. 2003. Occurrence of clubroot in cruciferous vegetable crops and races of the pathogen in Korea. *Plant Pathology J.* 19: 64–68.
- Faggian, R., Bulman, S. R., Lawrie, A. C. and Porter, I. J. 1999. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. *Phytopathology* 89: 392–397.
- Fähling, M., Graf, H. and Siemens, J. 2004. Characterization of single-spore isolate population of *Plasmodiophora brassicae* resulting from a single club. *J. Phytopathology* 152: 438–444.
- Ito, S., Maehara, T., Maruno, E., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M. and Kishi, F. 1999. Development of a PCR-based assay for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil. *J. Phytopathology* 147: 83–88.
- Jang, S. J. 2006. Characteristics of infection and novel single-spore isolation method through two-step inoculation of clubroot pathogen, *Plasmodiophora brassicae*. Master's thesis, Chungnam National University, Korea. 67 pp.
- Ludwig-Müller, J., Bennett, R. N., Kiddle, G., Ihmig, S., Ruppel, M. and Hilgenberg, W. 1999. The host range of *Plasmodiophora brassicae* and relationship to endogenous glucosinolate content. *New Phytol.* 141: 443–458.
- Soh, J. W., Han, K. S., Lee, S. C. and Lee, J. S. 2013. Contamination of Chinese cabbage soil with *Plasmodiophora brassicae*. *Res. Plant Dis.* 19: 201–207. (In Korean)
- Voorrips, R. E. and Kanne, H. J. 1997. Genetic analysis of resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica oleracea*. II. Quantitative analysis of root symptom measurements. *Euphytica* 93: 41–48.
- Wallenhammar, A.-C., Almquist, C., Söderström M. and Jonsson, A. 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. *Plant Pathol.* 61: 16–28.
- Woronin, M. 1878. *Plasmodiophora brassicae*, Urheber de Kohlpflanzen-Hernie. *Jb. Wiss. Bot.* 11: 548.