

국내 식물검역대상 *Phytophthora pinifolia*의 PCR 검출을 위한 종 특이적 마커 개발

김나래 · 최유리 · 서문원 · 송정영 · 김홍기*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Species-specific Marker of *Phytophthora pinifolia* for Plant Quarantine in Korea

Narae Kim, You Ri Choi, Mun Won Seo, Jeong Young Song and Hong Gi Kim*

Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

ABSTRACT : To establish a rapid and accurate detection of *Phytophthora pinifolia*, which is a quarantine pathogenic fungus in Korea, a species-specific primer was developed based on the ras-related protein (*Ypt1*) gene. Species-specific primer based on the DNA sequences of *Ypt1* gene amplified 193 bp polymerase chain reaction (PCR) product for *P. pinifolia*. The primer pair yielded the predicted PCR product size exactly in testing with target pathogen DNAs, but not from the other 10 species of *Phytophthora* and 14 species of other phytopathogenic fungi. The primer pair also showed only the species-specific amplification curve on real-time PCR on target pathogen DNA. The detection sensitivity of real time PCR using species-specific primer pair was 10 to 100 times higher than conventional PCR, with 1 to 10 pg/ μ L.

KEYWORDS : Detection, *Phytophthora pinifolia*, Quarantine measure, Species-specific primers

서론

최근 여러 나라들과의 FTA협정에 의한 수입 농림산물의 증가로 인해 국내 존재하지 않는 병원균의 유입이 더욱 늘어날 것으로 예상되는 바 이들 병원균의 국내 유입을 차단하기 위하여 수입 농림산물 내 병원균 존재 여부에 대한 신속한 진단이 필요하다. 과수, 수목 및 화훼를 비롯한 거의 모든 식물에 병을 일으켜 경제적으로 큰 피해를 주는 병원균으로 알려진 *Phytophthora*속 병원균은 전세계적으로 123

종이 분포하며 23종의 임시종이 확인되었고(www.phytophthoradb.org, 2016), 국내에는 21종의 *Phytophthora*속 병원균이 보고되어 있다[1].

2004년 칠레에서 처음 보고된 소나무 역병균인 *Phytophthora pinifolia*의 경우는 2006년에 약 60,000 ha의 소나무 산림을 파괴시켜 칠레에 경제적으로 막대한 손실을 주었고 [2], 현재는 소나무 원목 수입국인 우리나라를 비롯해 전 세계적으로 그 위험성이 알려져 자국 내 유입을 막기 위해 칠레산 소나무 수입시 검역이 강화되고 있다. 이와 같이 수목류에 큰 피해를 끼치는 병원균들이 국내에 유입되게 된다면 산림의 대부분이 참나무류와 소나무류로 이루어져 있는 우리나라 같은 경우 큰 피해를 입을 수 밖에 없다. 이러한 위험을 사전에 예방할 수 있는 가장 효과적인 방법은 법적 방제인 식물검역이기 때문에 국내에 존재하지 않는 *P. pinifolia* 병원균에 대한 검역현장에서의 신속, 정확한 검출 및 중동정 시스템 구축은 매우 중요하고도 시급한 일이라고 할 수 있다.

분자유전학적 연구를 위해 분석된 *Phytophthora*속 병원균들의 유전영역은 일반적으로 균류에서의 종간 분류에 널리 이용되는 핵내 rDNA의 internal transcribed spacer (ITS) 영역 [3]을 비롯하여 미토콘드리아 내 cytochrome oxidase I

Kor. J. Mycol. 2016 June, 44(2): 103-107
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.2.103>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: hgkim@cnu.ac.kr

Received April 19, 2016
 Revised June 14, 2016
 Accepted June 23, 2016

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

과 II gene 등이 있었다[4]. 그러나 그동안 많은 병원균들의 유연관계 분석 및 종 특이적 마커를 개발하는데 활용되는 ITS 영역은 중간 변이가 충분하지 않아 일부 근연종 간의 경계가 모호한 경우가 있었다[3]. mtDNA-IGS 영역의 경우 종간과 종내에서 충분한 특이성이 존재하여 유연관계가 가까운 병원균의 종동정에 적합하다는 보고가 있었으나[5], 이 영역은 AT/GC의 비율이 높고 종내 변이가 심해 종동정을 위한 분자마커의 개발이 어렵다는 한계를 보였다[6]. 그러나 *Ypt1* (ras-related protein) 유전자 영역은 유전자 내부의 염기서열 상에 중간 변이가 존재하면서도 종내 변이는 적어 *Phytophthora*속 균주들의 분류와 종동정 및 검출을 위한 종 특이적 분자마커의 개발에 적합한 것으로 알려져 최근 이 영역에서 분자마커의 개발이 이루어지고 있다[7, 8].

본 연구에서는 *P. pinifolia* 병원균을 대상으로 *Ypt1* 유전자 영역의 DNA 염기서열을 이용해 유연관계를 분석하여 국내 식물검역대상 *P. pinifolia* 병원균의 분자적 종동정을 위한 conventional 및 real-time polymerase chain reaction (PCR)용 종 특이적 분자마커를 개발하였다. 나아가 종 특이적 분자마커들을 이용한 다양한 PCR 분석기법을 실제 검역 현장에서 신속 정확한 *P. pinifolia* 병원균의 신속 정확한 검출 및 종동정에 활용하도록 표준화된 검출 기법을 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

검역 대상 *Phytophthora*속 균주 및 대조균주 수집

국내 검역 대상 *Phytophthora*속 균주는 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Netherlands)로부터 7종, 10

균주를 구입하였고, 펜실베이니아 주립대학으로부터 4종, 6균주를 구입하여 사용하였다(Table 1). *Phytophthora*속 이외의 주요 식물병원균 균주들을 충남대학교 식물병리학 실험실에서 보관 중인 것과 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양 받아 종 특이적 primer의 특이성을 확인하기 위한 대조균주로 사용하였다(Table 2).

Genomic DNA 분리

공시균주들을 20% V8 juice agar 배지 상에서 25°C에서 5일간 배양한 후 각 균주들의 균총 가장자리로부터 cork borer를 사용하여 직경 5 mm 균총 원판을 4~5조각을 떼어 내어 20% V8 broth에 접종하였으며, 암 상태의 25°C 항온기내에서 5일간 정치배양한 다음 멸균된 2겹의 거즈로 균사체를 수확하여 effendorf 튜브에 넣고 70°C에서 얼린 후 동결건조하였다.

Murray와 Thompson [9]의 DNA 분리방법을 변형하여 동결건조된 균사체를 마쇄한 다음 400 µm의 extraction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 proteinase K 50 µg을 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하였으며, 이어서 400 µL의 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 넣어 섞어주었다. 600 µL의 chloroform: isoamylalcohol (24:1)로 추출하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 1.5 mL tube에 옮겼다. 얻어진 상등액에 0.7배량의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 하였으며, 70% ethanol을 이용해 같은 방법으로 세척하고 건조

Table 1. Summary of *Phytophthora* isolates used in this study

Culture	Species	Host	Country
CBS 117376	<i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>alni</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	Hungary
CBS 117377	<i>P. alni</i> subsp. <i>uniformis</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	Hungary
CBS 309.62	<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	<i>Fragaria</i> sp.	UK
CBS 109892	<i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i>	<i>Rubus coreanus</i>	UK
N331	<i>P. heveae</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	USA
P647	<i>P. hibernails</i>	<i>Navel orange fruit</i>	USA
CBS 122050	<i>P. kernoviae</i>	<i>Rhododendron</i> sp.	UK
CBS 122051	<i>P. kernoviae</i>	<i>Rhododendron</i> sp.	UK
CMP631	<i>P. lateralis</i>	<i>Rhododendron</i> sp.	USA
CBS 114870	<i>P. nemorosa</i>	<i>Lithocarpus densiflorus</i>	USA
CBS 122922	<i>P. pinifolia</i>	<i>Pinus radiata</i>	Chile
CBS 126739	<i>P. porri</i>	<i>Allium cepa</i>	Japan
CBS 101553	<i>P. ramorum</i>	<i>Rhododendron</i> sp.	Germany
PDA 2264-06	<i>P. ramorum</i>	<i>Rhododendron</i> sp.	USA
PDA 3403-09	<i>P. ramorum</i>	<i>Rhododendron</i> sp.	USA
PDA 5815A-12	<i>P. ramorum</i>	<i>Rhododendron</i> sp.	USA

Table 2. Phytopathogenic fungi used in this study

Isolate	Source ^a
<i>Alternaria alternata</i>	KACC79923
<i>Aspergillus niger</i>	KACC60060
<i>Botrytis cinerea</i>	BC413
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KACC40934
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CG01
<i>Didymella bryoniae</i>	KACC40669
<i>Penicillium digitatum</i>	KACC41828
<i>Phoma cucurbitacearum</i>	KACC41841
<i>Pyricularia grisea</i>	KACC40414
<i>Rhizoctonia solani</i> (RG2)	KACC40119
<i>Rhizopus oryzae</i>	KACC40936
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	KACC40172
<i>Stemphylium versicarium</i>	KACC4113
<i>Trichoderma harzianum</i>	KACC40509

^aTwo Isolates, BC413 and CG01, were prepared from CNU (Chungnam National University); the others were from KACC (Korean Agricultural Culture Collection).

시켜 100 µL의 3차 증류수에 녹인 다음 agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인 및 정량하였다. 확인된 DNA는 -20 °C에 보관하였고 universal primer와 specific primer 반응시 1 µL씩 사용하였다.

Ypt1 유전자영역 염기서열 분석 및 primer 개발

P. pinifolia 종 특이적 primer의 디자인을 위해 Chen와 Roxby [10]에 의해 제작된 universal primer (Ypt1F/Ypt4R)를 이용하여 *Phytophthora* 종들의 *Ypt1* (ras-related protein) 영역의 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열들을 Primer3 software와 Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)를 이용하여 *P. pinifolia* 종 특이적 primer를 설계하였다. 개발된 종 특이적 primer는 모두 내부에 hairpin loops를 형성하지 않으면서 primer 사이에서 dimer나 internal loop가 나타나지 않도록 하였다. 또한 밴드의 크기가 193 bp로 conventional PCR과 real-time PCR에서 모두 활용 가능하도록 설계하였다(Table 3).

Primer의 특이성 검증

개발된 primer는 사전에 BLAST 분석을 통해 사용가능한

지를 확인하고 다른 미생물의 유사염기서열과 반응하는지 특이성을 평가하였다. 그 후, 국내 식물 검역대상 *Phytophthora*속 병원균과 그 외의 식물병원균에 대하여 특이성을 확인하는 실험을 진행하였다. Conventional PCR은 2 ng의 template DNA와 각각 2 µM의 primer, 800 µM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, Taq polymerase 1 unit을 첨가하고 멸균수를 이용하여 총량을 20 µL로 조정하였다. 또한 real-time PCR 상에서도 적용가능한지 확인하기 위하여 SYBR Green real-time PCR (C1000 Touch thermal cycler; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 수행하였다. 모든 real-time PCR의 반응액에 iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad)를 첨가하고 template DNA 1 µL와 각각의 primer를 0.5 pM 사용하여 총량을 20 µL로 조정하였다.

Primer의 민감도 검증

개발한 종 특이적 primer의 검출한계를 확인하기 위하여 각각의 genomic DNA를 1 ng부터 10배씩 연속적으로 희석하여 각각의 primer set을 conventional PCR과 real-time PCR 분석에 활용하였다.

결 과

종 특이적 primer 선발

국내 식물검역대상 *P. pinifolia*에 대한 종 특이적 primer를 선발하기 위해 *Ypt1* 유전자 영역 상에서 가장 유사한 종들 간의 DNA 염기서열을 비교하였으며, 이를 기초로 primer를 선발하였다. 선발된 primer (PPINY F49, PPINY R241)는 각각 22개 염기로 구성되었으며, GC값의 분포는 50%, 54%였고, TM 값은 60.3°C, 62.1°C의 범위를 나타냈다(Table 3).

종 특이적 primer의 특이성

종 특이적 primer pair는 conventional PCR 뿐만 아니라 SYBR Green real-time PCR 분석에서도 다른 종의 *Phytophthora*속 병원균과 대조로 사용된 주요 식물병원균들의 DNA와는 반응하지 않았고 각각의 목표 병원균의 DNA에 대해서만 특이적 증폭곡선을 보였다(Fig. 1, Table 4). 또한 특정 melting peak 값이 나타나는 깨끗한 melt curve를 통해 primer pair가 단일 증폭산물을 형성시키며 증폭했다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Table 3. DNA sequences and PCR product of primer pair specific for *Phytophthora* species in this study

Target species	Primer	Primer sequence (5' → 3')	TM Value (°C)	GC (%)	Product size (bp)
<i>P. pinifolia</i>	PPINY F49	CTCCGTTGATGTCCACTACAAG	60.3	50	193
	PPINY R241	GGTGTCCCACTACACAAGAGAG	62.1	54	

PCR, polymerase chain reaction.

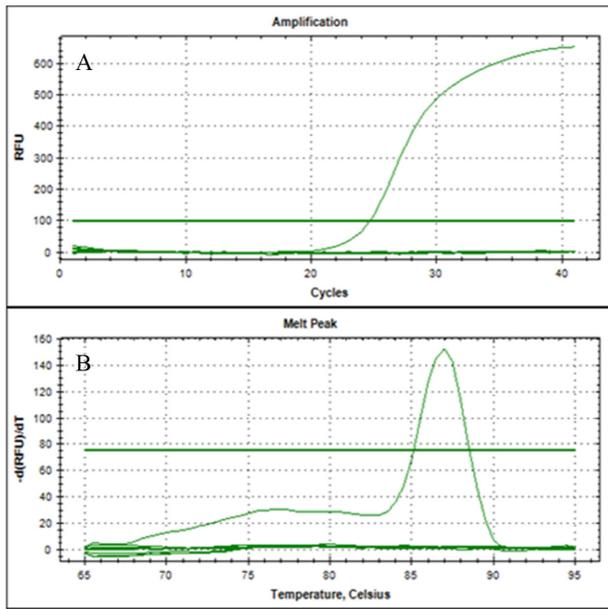


Fig. 1. Specificity of species-specific primer pair (PPINY F49/R241) for *Phytophthora pinifolia* using real-time polymerase chain reaction (PCR). No product was amplified on DNAs from other phytopathogenic fungi. A, PCR detection; B, Melt peak.

종 특이적 primer의 민감도

본 연구에서 개발한 종 특이적 primer의 검출한계를 확인하기 위하여 각각의 genomic DNA를 10배씩 연속적으로 희석하여 PCR 분석을 실시하였다. 본 연구에서 선발된 종 특이적 primer들은 conventional PCR에서 1~10 pg의 검출한계를 보였다. 그러나 대부분의 *Phytophthora*속 균들의 *Ypt1* 영역을 증폭할 수 있는 universal primer를 사용하여 1차 증폭하고 각각의 개발된 종 특이적 primer를 사용하여

2차로 nested PCR을 수행한 결과, PCR 민감도가 10~100 배 높아졌다(data not shown).

고 찰

이 연구는 농림산물에 큰 피해를 입힐 수 있으며 우리나라에서 주요 식물검역관리 대상으로 지정한 병원균인 *P. pinifolia*를 대상으로 검역현장에서 보다 더 신속하고 정확한 병원균 검출을 위해 다양한 PCR 기법을 활용할 수 있는 *Ypt1* 유전자 염기서열 분석으로 얻어진 분석용 종 특이적 분자마커를 개발하였다.

선행 연구들에서 *Phytophthora*속 종동정을 위한 primer의 개발이 다양하게 시도되었으나 대부분이 ITS 영역에 한정된 것이었다. 그러나 ITS 영역의 경우 유연관계가 높은 *P. pirimulae*, *P. brassicae*, *P. porri*의 중간 비교에 적합하지 않았고[11], *P. ramorum*과 *P. lateralis*에 있어서는 상호간의 유전적 유사도가 높아[12] 기존에 사용되었던 primer들의 평가에서 비특이적인 증폭을 낳거나[13], 특이성을 증가시키기 위해 두 가지 이상의 primer를 사용하여 두 번의 PCR을 수행해야 하는 단점이 있었다[14].

이 연구를 통하여 *Ypt1* 영역으로부터 개발된 primer pair는 유연관계가 가까운 *Phytophthora*종들에 대한 PCR 증폭을 통해 종 특이적인 primer로서 적합하다는 것이 확인되었고, 식물검역대상 *P. pinifolia*에 대한 동정 및 검출을 위해 conventional 및 real-time PCR 분석 모두에서 이 primer pair의 활용가치가 높다는 것이 증명되었다.

적 요

본 연구는 국내 주요 식물검역관리 대상 *Phytophthora pinifolia*를 대상으로 신속하고 정확한 병원균 종동정 및 검

Table 4. PCR specificity of species-specific primer pair against other *Phytophthora* species and phytopathogenic fungi

Species	PPINY F49/R241	Species	PPINY F49/R241
<i>Phytophthora pinifolia</i>	+	<i>Botrytis cinerea</i>	-
<i>P. alni</i>	-	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-
<i>P. fragariae</i>	-	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-
<i>P. heveae</i>	-	<i>Didymella bryoniae</i>	-
<i>P. hibernails</i>	-	<i>Penicillium digitatum</i>	-
<i>P. kernoviae</i>	-	<i>Phoma cucurbitacearum</i>	-
<i>P. lateralis</i>	-	<i>Pyricularia grisea</i>	-
<i>P. nemorosa</i>	-	<i>Rhizoctonia solani</i>	-
<i>P. porri</i>	-	<i>Rhizopus oryzae</i>	-
<i>P. ramorum</i>	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	<i>Stemphylium versicarium</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	<i>Trichoderma harzianum</i>	-

PCR, polymerase chain reaction; +, positive PCR reaction; -, negative PCR reaction.

출을 위해 *Ypt1* 유전자 염기서열을 활용하여 제작된 종 특이적 분석용 분자마커와 다양한 PCR 기법을 활용하여 병원균들에 대한 다양한 검출기술의 표준화 및 최적 검출 시스템 구축을 통하여 실제 검역현장에서 활용 가능한 병원균 존재여부의 신속, 정확한 판별기법을 개발하고자 수행하였다. *Ypt1* 영역의 염기서열을 기초로 선발된 종 특이적 primer는 1~10 pg의 검출민감도를 가지며 193 bp의 종 특이적 PCR 증폭산물을 형성시켰다. 또한 선발된 종 특이적 primer의 종 특이성을 확인하기 위하여 국내 식물검역대상에 포함된 *Phytophthora*속 종들과 주요 식물병원균들을 대상으로 conventional PCR과 real-time PCR을 수행한 결과 목표로 한 *P. pinifolia* DNA에서만 특이적 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었다. 선발된 종 특이적 primer에 대한 PCR의 검출 민감도를 확인했을 때 conventional PCR의 검출민감도는 1~10 pg이었다.

Acknowledgements

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

REFERENCES

1. The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.
2. Durán A, Gryzenhout M, Slippers B, Ahumada R, Rotella A, Flores F, Wingfield BD, Wingfield MJ. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathol* 2008;57:715-27.
3. Cooke DE, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genet Biol* 2000;30:17-32.
4. Martin FN, Tooley PW. Phylogenetic relationships among phytophthora species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 2003;95:269-84.
5. Wattier RA, Gathercole LL, Assinder SJ, Gliddon CJ, Deahl KL, Shaw DS, Mills DI. Sequence variation of intergenic mitochondrial DNA spacers (mtDNA-IGS) of *Phytophthora infestans* (Oomycetes) and related species. *Mol Ecol Notes* 2003;3:136-8.
6. Schena L, Cooke DE. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *J Microbiol Methods* 2006;67:70-85.
7. Meng J, Wang Y. Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infested tobacco tissues and soil samples based on its *Ypt1* gene. *J Phytopathol* 2010;158:1-7.
8. Chen Q, Li B, Liu P, Lan C, Zhan Z, Weng Q. Development and evaluation of specific PCR and LAMP assays for the rapid detection of *Phytophthora melonis*. *Eur J Plant Pathol* 2013;137:597-607.
9. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980;8:4321-5.
10. Chen Y, Roxby R. Characterization of a *Phytophthora infestans* gene involved in the vesicle transport. *Gene* 1996;181:89-94.
11. Winton LM, Hansen EM. Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction. *For Pathol* 2001;31:275-83.
12. Werres S, Marwitz R, Man In't Veld WA, de Cock AW, Bonants PJ, de Weerd M, Themann K, Ilieva E, Baayen RP. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycol Res* 2001;105:1155-65.
13. Martin FN, Coffey MD, Zeller K, Hamelin RC, Tooley P, Garbelotto M, Hughes KJ, Kubisiak T, Bilodeau GJ, Levy L, et al. Evaluation of molecular markers for *Phytophthora ramorum* detection and identification: testing for specificity using a standardized library of isolates. *Phytopathology* 2009;99:390-403.
14. Hughes KJ, Tomlinson JA, Griffin RL, Boonham N, Inman AJ, Lane CR. Development of a one-step real-time PCR assay for diagnosis of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 2006;96:975-81.