

RESEARCH NOTE

국화에 발생하는 반쪽시들음병균 *Verticillium dahliae* 검출용 등온 증폭법 개발

백창기¹, 박미정¹, 한경숙², 박종한¹¹국립원예특작과학원 원예특작환경과, ²국립원예특작과학원 기획조정과

Development of a Loop-mediated Isothermal Amplification Detection Assay for *Verticillium dahliae* Infection in Chrysanthemum

Chang-Gi Back¹, Mi-Jeong Park¹, Kyung-Sook Han², Jong-Han Park¹¹Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea²Planning and Coordination Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Corresponding author: plantdoctor7@korea.kr

ABSTRACT

Verticillium wilt disease is caused by a fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*, which attacks commercial crops such as chrysanthemum. The conventional methods so far used to identify this fungal pathogen require high expertise and are time-consuming. Therefore, in this study, we developed an assay for the rapid and specific detection of *V. dahliae* infection using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. For this assay, four primers for LAMP were designed for targeting cellulose-growth-specific protein partial mRNA gene in *Verticillium dahliae*. Under standard condition, the optimum reaction temperature for amplification is around 60 °C within 60 minutes. This LAMP assay was designed to amplify only present in *V. dahliae*. When this LAMP assay applied to the DNAs for four other soil-borne fungi and host plants, no amplification was detected. Therefore, this LAMP assay we developed for *V. dahliae* is expected to do detection at the early stage of its infection. The fast and reliable detection method will allow us to develop effective management system to monitor and control infection of this pathogen in chrysanthemum plant.

Keywords: detection, Loop-mediated isothermal amplification, *Verticillium dahliae*, wilt disease



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2019 December, 47(4): 437-41
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190048>

Received: December 19, 2019

Revised: December 19, 2019

Accepted: December 20, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

국화 (*Chrysanthemum morifolium*)는 우리나라, 일본, 중국 등 아시아에서 대규모로 재배되는 화훼작물이다. 국화 재배기간 중에는 잣빛곰팡이병 (*Botrytis cinerea*), 흰가루병 (*Erysiphe cichoracearum*), 역병 (*Phytophthora cactorum*), 흰녹병 (*Puccinia horiana*), 균핵병 (*Sclerotinia*

sclerotiorum) 등 곰팡이에 의해 발생하는 병과 세균, 바이러스, 바이로이드에 의한 병이 보고되고 있다 [1]. 국화의 주요 병해 중 하나인 반쪽시들음병은 *Verticillium albo-atrum*과 *V. dahliae*에 의해 발생하며 [2], 최근에는 *V. dahliae*에 의한 피해가 많다. *Verticillium*속 병원성 곰팡이들은 병든 식물체로부터 병원균을 분리배양하여 균학적 특성을 확인하고 진단하기까지 많은 시간과 노력이 소요되므로 진단을 통한 방제가 어려운 실정이다 [2]. 유전자 염기서열 분석 기술이 발달하여 미생물들의 특이 염기서열을 이용한 PCR, real-time PCR법 등의 검출기술이 개발되었으나 [3,4], 대부분의 검출기술은 고가의 장비와 시약, 전문적인 인력이 요구되므로 실험실내에서 활용되고 있다. 일정한 온도에서 특정 유전자를 증폭시키는 등온증폭기술 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)법이 2000년대부터 개발되어 [5, 6], 이 기술을 활용한 병원체 검출기술 개발이 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 *V. dahliae*에 의한 반쪽시들음병을 신속히 검출할 수 있는 등온증폭법을 개발하여 반쪽시들음병의 감염을 신속하게 진단하는데 활용하고자 한다.

등온증폭용 프라이머 제작 및 반응 조성물

국화 반쪽시들음병균 검출용 등온증폭법을 개발하기 위해 국립원예특작과학원 원예특작환경과에서 보유하고 있는 국화 반쪽시들음병균 (*V. dahliae*) 9균주를 사용하였다. 반쪽시들음병균의 종동정을 위하여 ITS rDNA 영역의 염기서열을 분석하여 *V. dahliae*임을 확인하였다 [7]. NCBI에 등록된 유전자 염기서열을 기반으로 반쪽시들음병균의 cellulose-growth-specific protein partial mRNA 유전자를 증폭하여 염기서열 (약 870 bp)을 확보하였고, Primer Explorer (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>) 프로그램을 이용하여 등온증폭용 프라이머 세트를 제작하였다 (Bioneer co., Korea, Table 1). 반쪽시들음병균 검출용 등온증폭을 위한 반응조성물로는 10 ng/ul의 주형 DNA를 비롯하여 등온증폭용 outer 프라이머 세트 (loop 형성 보조)는 F3/B3는 10 pmole의 농도로 각각 0.5 µl씩, inner 프라이머 세트(loop 형성) 10 pmole의 농도로 각각 2 µl씩 사용하고 10 mM dNTP 0.5 µl, 10X buffer 2.5 µl, 멸균증류수 15 µl로 총 24 µl로 반응시켰다. 등온증폭용 온도조건으로는 95°C에서 5분간 전 처리를 실시하고 *Bst* polymerase (8 unit/µl) 1 µl를 첨가하여 55°C에서 50분 반응시켰다. 등온증폭 반응이 끝난 증폭산물은 1.0% agarose gel을 이용하여 100 V로 30분간 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 관찰하였다. 그 결과, *V. dahliae*의 주형 DNA에서 목적하는 DNA단편이 증폭되는 것을 확인하였다.

Table 1. Information of specific primers for detection of *Verticillium dahliae* using LAMP

Amplification type	Primers	Sequence (5' → 3')	Length (bp)	Product size (bp)
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	F3	TCC TCC TCA ACA GGA GTG G	19	Laddering (Amplification size of outer primers is 181 bp)
	B3	CGA TCC CTG GCC CCA A	16	
	FIP	TCC TCT GCT GCC CCT GTC GTT	42	
	BIP	TTT GCT CAG TGT GAG TGG TGG GAG CGT CGG TGG CAA CAG GTT TTT CTT TAC CTG CTC TGG CGC	42	

등온증폭법의 특이성 검정

반쪽시들음병균 검출용 등온증폭법의 기질 특이성을 검정하기 위해 국립농업과학원 미생

물은행 (Korean Agricultural Culture Collection, KACC)으로부터 *Verticillium*균의 근연종인 *V. chlamydosporium* (KACC No. 40859)과 *Verticillium* sp. (KACC No. 42493) 균주를 분양 받아서 사용하였다. Total genomic DNA를 추출하여 동일 조건 하에서 10 ng/ul의 농도로 주형 DNA를 사용하여, *V. dahliae*를 대조구로 사용하여 비교하였다. 그 결과, 국화와 배추에서 분리한 반쪽시들음병균 *V. dahliae*에서만 특이적으로 유전자 산물이 증폭되었고, *Verticillium*속 근연종에서는 반응하지 않았다. 따라서, 반쪽시들음병균만을 특이적으로 검출할 수 있는 것으로 판단되었다. 또한 반쪽시들음병균 검출용 등온증폭용 프라이머 세트의 토양전염성 곰팡이와의 비특이적 반응 유무를 검정하였다. 채소작물에 주로 발생하는 토양전염성 곰팡이인 *Fusarium oxysporum* (NIHHS 13-198), *F. solani* (NIHHS 12-143), *Phytophthora capsici* (NIHHS 14-255), *Pythium* sp. (NIHHS 12-217)의 total genomic DNA를 추출하고 주형 DNA로 사용하여 앞서 전술한 방법대로 반쪽시들음병균 등온증폭용 프라이머 세트와의 비특이적 반응을 검정하였다. 그 결과, 반쪽시들음병균에서만 특이적으로 유전자산물이 증폭되었고, 토양전염성 곰팡이와는 반응하지 않았다. 기주식물인 국화와 배추의 total genomic DNA를 추출하고 주형 DNA로 사용하여 비특이적 반응을 검정한 결과에서도 반쪽시들음병균만 반응하였고, 기주식물의 뿌리 및 줄기와는 반응하지 않았다. 따라서, 본 연구에서 개발한 반쪽시들음병균 등온증폭용 프라이머 세트는 특이성이 높은 것으로 확인되었다.

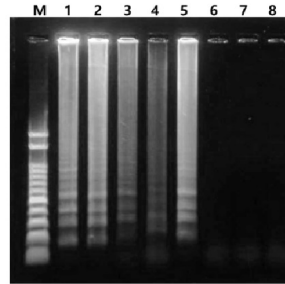


Fig. 1. Specificity test of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Verticillium* species. Lane M: 100 bp DNA Ladder, 1-3: *V. dahliae* (NIHHS 11-027, 13-118, 13-290) isolated from chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), 4-5: *V. dahliae* (NIHHS 13-252, 14-324) isolated by Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), 6: *V. chlamydosporium* (KACC No. 40859), 7: *Verticillium* sp. (KACC No. 42493), 8: Negative control.

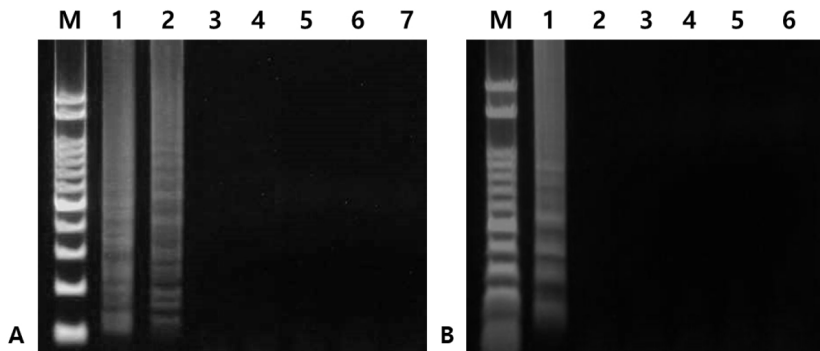


Fig. 2. Specificity test for soil-borne fungal pathogens and host plant. A, Lane M: 100 bp DNA Ladder, 1-2: *Verticillium dahliae* (NIHHS 13-118, 13-290) isolated by chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), 3: *Fusarium oxysporum* (NIHHS 13-198), 4: *F. solani* (NIHHS 12-143), 5: *Phytophthora capsici* (NIHHS 14-255), 6: *Pythium* sp. (NIHHS 12-217), 7: Negative control; B, Lane M: 100 bp DNA Ladder, 1: *V. dahliae* (NIHHS 13-290) isolated from chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), 2: Stem of chrysanthemum, 3: Root of chrysanthemum, 4: Stem of Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), 5: Root of Chinese cabbage, 6: Negative control.

SYBR Green I을 이용한 형광 검출

반쪽시들음병균 등온증폭법의 증폭산물을 육안으로 확인하기 위한 방법을 구축하기 위해 SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain (10,000X, Invitrogen) 시약을 1~2 µl로 나눠 사용하였다. 그 결과, 1 µl의 SYBR Green I solution을 사용하더라도 육안상으로 증폭산물이 들어있는 tube가 형광색으로 발색하였기 때문에 전기영동 없이 육안으로도 감염여부를 확인할 수 있었다. 하지만 2 µl의 SYBR Green I solution을 사용하였을 때에는 육안상으로 차이는 없었으나, UV transilluminator에서는 형광강도가 높은 것으로 확인되었다.

등온증폭기술을 이용하여 가축에 발생하는 질병을 신속하게 진단하는 기술이 많이 개발되고 있으며 [8], 최근에는 식물병원성 바이러스를 검출하는 기술로도 활용되고 있다 [9, 10]. 또한 과수작물에서 주요 세균병이나 채소작물의 무름병균을 검출하는 기술로 그 영역이 넓어지고 있다 [11-13]. *Verticillium*속 곰팡이는 영양배지 조건에서 배양되지만 생장이 느리기 때문에 병원균을 진단하기까지 상당한 시간이 소요된다. 이 병원균은 주로 줄기, 뿌리 등 토양 부근에서 발생하기 때문에 다른 토양전염성 병원균과의 육안상 구별도 사실상 어려움이 있다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 반쪽시들음병균 검출용 등온증폭법은 병원균의 조기진단과 이를 통한 초기 병 방제에 따른 경제적 손실을 최소화 하는 데 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

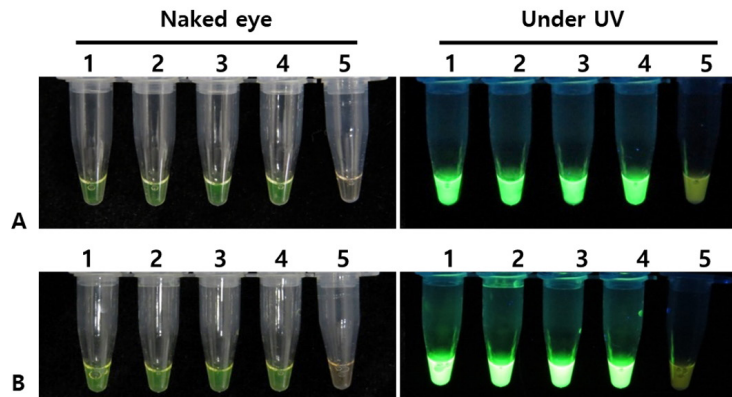


Fig. 3. Visualization test of *Verticillium dahliae* detection LAMP from product using SYBR Green I solution. Amplification was performed under standard conditions. A, 1 ul of SYBR Green I solution (1000 X) added; B, 2 ul of SYBR Green I solution (1000 X) added. Lane 1-2: *V. dahliae* (NIHHS 11-027, 13-118) isolated from chrysanthemum, 3-4: *V. dahliae* (NIHHS 13-252, 14-324) isolated from Chinese cabbage, 5: Negative control.

적요

국화에 발생하는 반쪽시들음병은 *Verticillium dahliae*에 의해 발생하는 진균병으로 국화 재배농가에 상당한 경제적 손실을 야기한다. 일반 식물병원균을 동정하는 방법으로는 병원균을 진단하기까지 상당한 시간이 소요된다. 본 연구에서는 *V. dahliae*를 신속하고 특이적으로 진단하기 위하여 등온증폭기술 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)을 적용한 검출법을 개발하였다. 이 방법은 반쪽시들음병균의 cellulose-growth-specific protein partial mRNA 유전자 염기서열을 이용하여 4개의 특이 프라이머 세트를 제작하였다. 최적 반응조건 및 시간은 60°C 내외의 온도조건에서 60분 이내에서 가장 효율이 좋은 것으로 나타났다. 이 등온증폭 검출법은 4종의 토양전염성 병원

균과 기주식물의 DNA에는 반응하지 않았다. 따라서 반쪽시들음병균 등온증폭법을 활용한다면 병원균의 감염 유무를 조기에 신속하게 진단할 수 있고, 반쪽시들음병을 효율적으로 모니터링하고 방제할 수 있을 것으로 기대한다.

Acknowledgements

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (Project No. PJ00850401)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.
2. Han KS, Park JH, Lee JS, Seo ST, Cheong SR. Occurrence and pathogenicity of *Verticillium* wilt on chrysanthemum caused by *Verticillium dahliae*. Res Plant Dis 2007;13:15-9.
3. Kim JY, Jang SW, Kim HY, Kim SH. Molecular markers for the rapid detection of *Colletotrichum coccodes*, an anthracnose pathogen of tomato. Kor J Mycol 2018;46:186-92.
4. Kim JY. Detection of anthracnose fungus *Colletotrichum circinans* by conventional PCR and real-time PCR. Kor J Mycol 2018;46:467-77.
5. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000;28:e63.
6. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002;16:223-9.
7. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
8. Kim EM, Jeon HY, Kim JJ, Kim HJ, Shin YK, Song JY, Yeo SG, Park CK. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of swine influenza virus. Korean J Vet Serv 2015;38:107-16.
9. Bae DH, Park CY, Kim BS, Lee YH, Yoon YN, Kang HW, Oh JH, Lee SH. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Soybean yellow mottle mosaic virus. Res Plant Dis 2016;22:178-83.
10. Kim JH, Lee SW, Jeon SH, Kim MS, Jang WC. Development of diagnostic system for rapid and specific detection of Cherry leaf roll virus. J Agric & life Sci 2017;51:39-45.
11. Kim JG, No JN, Park DS, Yoon BS. Development of a rapid detection method for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Korean J Microbiol 2011;47:103-9.
12. Shin DS, Heo GI, Son SH, Oh CS, Lee YK, Cha JS. Development of an improved loop-mediated isothermal amplification assay for on-site diagnosis of fire blight in apple and pear. Plant Pathol J 2018;34:191-8.
13. Li W, Lee SY, Back CG, Ten LN, Jung HY. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in peaches. Plant Pathol J 2019;35:635-43.