

*Phytophthora capsici*의 유전적 특성 분석을 위한 Repetitive DNA Probe의 개발

송정영 · 김홍기*

충남대학교 농업생명과학대학 농생물학과

Development of Repetitive DNA Probes for Genetic Analysis of *Phytophthora capsici*

Jeong Young Song and Hong Gi Kim*

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

(Received September 20, 2001)

ABSTRACT: To develop DNA markers for analysis of genetic characteristics of *Phytophthora capsici* population, randomly selected clones from *Hind*III-digested genomic DNA library of *P. capsici* 95CY3119 were surveyed by hybridizing to Southern blots of *Hind*III-digested total genomic DNA of *P. capsici*. Probe DNAs inserted into selected individual clones strongly hybridized with *Hind*III digests of *P. capsici*. Among probes examined, PC9 revealed the repetitive and highly polymorphic bands to *Hind*III digests of inter- and intra-field *P. capsici* isolates. Genetic diversity of individual isolates was also clearly revealed in cluster analysis based on its band patterns. The other probe, PC22, was hybridized only to DNA from *P. capsici* and this was highly repetitive. However, there was no response to other *Phytophthora* species and *Pythium* sp. These DNA probes could be used as very useful markers in analysing genetic diversity and identification for *P. capsici* population throughout the world.

KEYWORDS: Genetic analysis, Pepper, *Phytophthora* blight, *Phytophthora capsici*, Species-specific probe

*Phytophthora capsici*는 박과와 가지과 작물이외에도 매우 다양한 기주식물을 침해하며, 전세계적으로 널리 분포하고 있다(Erwin and Ribeiro, 1996). 특히, 국내 고추포장에서의 *P. capsici*에 의한 역병은 전국적으로 고르게 발생하고 있으며, 농가에 경제적으로 큰 피해를 주고 있다. 현재 고추 역병균의 방제에 가장 효과적인 방법으로 화학적 방제가 알려져 있다. 그러나 약제 저항성균의 출현으로 효과적인 병방제가 이루어지지 않는 등 병원균 집단의 지속적인 적응과 유전적인 변이로 인해 병방제에 많은 어려움을 주고 있다(Hwang and Kim, 1995; Oh and Kim, 1992).

병원균 집단에 대한 생물학적 연구 및 병방제 대책 수립에는 유전적 다양성과 그 특성분석이 요구된다. 특히 *P. capsici*는 다양한 생활사를 갖기 때문에 유전양식을 이해하는데는 selfing과 무성생식 그리고 유성생식 등 몇 가지 고려할 사항들이 있다. 또한 그들의 집단유전에 관한 연구는 표현형의 특성과 성장 조건들을 기초로 분석되고, 표현형은 형태적, 생화학적, 생리화적인 것과 그 외 다른 여러 가지 특성 등으로 설명된다. *Phytophthora* 속 병원균 집단들의 유전적인 다양성 분석에 있어서 사용되는 전통적인 지표들로는 형태적 특징과 병원성,

교배형, 약제저항성 등이 있다(Lamour and Hausbeck, 2000; Mchau and Coffey, 1995; Oudemans and Coffey, 1991). 이러한 병원균 집단들의 표현형 변화는 환경에 의해서 개별적으로 유도되며 대부분의 변화는 아주 미묘한 환경요인에 의해서 영향을 받을 것으로 추정된다. 따라서 병방제 대책을 수립하는데 있어서 병원균 집단들의 유전적 변이를 올바르게 정확하게 측정하기 위한 객관적인 유전적 marker들의 사용은 유전적인 변이요인을 더 정확하게 평가할 수 있도록 해 주었다.

최근 임의로 Cloning된 DNA 단편들이 *Phytophthora* 속 병원균 집단의 유전적 다양성 분석(Colas *et al.*, 1998; Goodwin and Fry, 1992) 및 중동정(Goodwin *et al.*, 1990a, 1990b; Judelson and Messenger-Routh, 1996)에 사용되어 왔다. 특히, 전세계적으로 분포하는 *P. infestans* 집단에 대한 DNA restriction fragment length polymorphisms(RFLPs) 분석에 있어서 독특한 유전적 특성을 밝힌 probe RG57이 발견되었다. 이 probe는 교배형 및 met-alaxy1 저항성 등과 더불어 병원균 집단의 유전적인 다양성 분석에 사용되고 있는 marker로서 아주 효과적으로 사용되고 있다(Goodwin *et al.*, 1992; Ordoñez *et al.*, 2000).

따라서 *P. capsici* 집단에 대해서도 다양한 유전적 특성을 분석할 수 있는 DNA marker가 선별된다면 병원균의 유전적 특성 분석에 매우 유용하게 활용될 것이다. 이에 본 연

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

구는 *P. capsici* 집단에 대한 유전적 다양성 분석과 중동정에 적합한 유용 DNA marker를 개발하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시균주

고추 역병균에 특이적인 유전 분석용 DNA probe를 선별하기 위해 국내의 고추 재배포장으로부터 분리한 *Phytophthora capsici* 95CY3119 균주를 사용하였다. 유전적 특성을 비교하기 위해 사용된 *Phytophthora* 및 *Pythium*속 공시균주들은 Table 1과 같다.

DNA 분리

공시균주들을 20% V-8 agar 배지 상에서 배양하고 직

경 6 mm 균총원판을 4~5조각 떼어 20% CV-8 액체배지에 접종한 후, 암상태의 25°C 항온기 내에서 5일간 정치배양 하였다. 냉동건조된 균사체를 마쇄하고 500 µl의 DNA 추출 buffer(100 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 mM β-mercaptoethanol, 1% SDS)를 첨가하고 잘 섞어 주었다. 이를 65°C에서 10분간 처리한 후 얼음에 둔 다음 찬 potassium acetate 250 µl를 첨가혼합하고 얼음에 20분간 처리하였다. 이어서 4°C, 12,000 g에서 10분간 원심분리 후 상등액을 취해 0.5 ml의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 첨가하고 2분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음 같은 방법으로 0.5 ml의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)을 처리하였다.

취해진 상등액에 2배량의 냉각된 100% ethanol을 넣

Table 1. Isolates of *Phytophthora* spp. and *Pythium* sp. used in this study

Isolate	Species	Host plant	Origin
95CA8202	<i>Phytophthora capsici</i>	Pepper	Andong, Kyongbuk
95CC3318	<i>P. capsici</i>	Pepper	Cheongyang, Chungnam
95CC3402	<i>P. capsici</i>	Pepper	Cheongyang, Chungnam
95CC3501	<i>P. capsici</i>	Pepper	Cheongyang, Chungnam
95CY3119	<i>P. capsici</i>	Pepper	Yaesan, Chungnam
95CC4107	<i>P. capsici</i>	Pepper	Chungju, Chungbuk
95CC4201	<i>P. capsici</i>	Pepper	Chungju, Chungbuk
95CY4203	<i>P. capsici</i>	Pepper	Yeumsung, Chungbuk
95CC7401	<i>P. capsici</i>	Pepper	Changnyong, Kyongnam
95CC7404	<i>P. capsici</i>	Pepper	Changnyong, Kyongnam
95CC7406	<i>P. capsici</i>	Pepper	Changnyong, Kyongnam
95CC7407	<i>P. capsici</i>	Pepper	Changnyong, Kyongnam
95CC7408	<i>P. capsici</i>	Pepper	Changnyong, Kyongnam
95CD3207	<i>P. capsici</i>	Pepper	Yusunggu, Daejeon City
95CD5107	<i>P. capsici</i>	Pepper	Damyang, Cheonnam
95CG3113	<i>P. capsici</i>	Pepper	Gongju, Chungnam
95CH5108	<i>P. capsici</i>	Pepper	Hwasun, Cheonnam
95CP2102	<i>P. capsici</i>	Pepper	Pyongtaek, Kyonggi
95CY2131	<i>P. capsici</i>	Pepper	Yeoju, Kyonggi
95CY1102	<i>P. capsici</i>	Pepper	Yongwol, Kangwon
95CY6229	<i>P. capsici</i>	Pepper	Imsil, Cheonbuk
95CY8101	<i>P. capsici</i>	Pepper	Yuisung, Kyongbuk
Tom1	<i>P. capsici</i>	Tomato	USA ^a
YEGG	<i>P. capsici</i>	Egg plant	Nonsan, Chungnam
P96118	<i>P. boehmeriae</i>	Ailanthus	NIAS ^b
CAC1	<i>P. cactorum</i>	Ginseng	Keumsan, Chungnam
PB2	<i>P. cambivora</i>	Apple	NIAS
SP70	<i>P. cinnamomi</i>	Larch	NIAS
KJ12	<i>P. cryptogea</i>	Gerbera	NIAS
BC13	<i>P. infestans</i>	Tomato	Puyo, Chungnam
CKS7	<i>P. infestans</i>	Potato	Kimje, Cheonbuk
KA6	<i>P. infestans</i>	Potato	Kangneung, Kangwon
CCP1	<i>P. parasitica</i>	Sesame	Chungju, Chungbuk
CGP2	<i>P. parasitica</i>	Tobacco	Gongju, Chungnam
CIP1	<i>P. parasitica</i>	Tobacco	Iksan, Cheonbuk
P9664	<i>P. sojae</i>	Soybean	NIAS
PY-1	<i>Pythium</i> sp.	Pepper	Yusunggu, Daejeon City

^aUniversity of Florida, USA.

^bNational Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea.

고 5분간 실온에 둔 후 4°C, 12,000 g에서 5분간 원심하였으 며, 침강된 DNA는 70% ethanol로 같은 방법으로 세척하였다. 튜브내의 ethanol을 제거, 건조시킨 후 DNA를 100 μ l의 TE(10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) buffer에 녹인 다음, 10 μ l(10 mg/ml)의 proteinase K를 56°C에서 1시간, 10 μ l(10 mg/ml)의 RNase를 37°C에서 1시간 처리하였다. 이어서 DNA의 순도를 높이기 위해 0.5 ml의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)로 처리한 후 ethanol로 침전시키고 5분간 원심분리 후 pellet을 건조시킨 다음 50 μ l의 TE buffer에 녹여 -20°C에 보관하였다.

Probe DNA 선발

Probe DNA를 조제하기 위하여 공시균주 중 *P. capsici* 95CY3119의 genomic DNA를 Vieira와 Messing(1987)의 방법에 따라 cloning하였다. Genomic DNA를 제한 효소 *Hind*III로 자른 후 *Hind*III로 자른 pBR322와 ligation시켰다. 이어 *Escherichia coli* strain DH 5 α 에 형질전환을 시킨 다음, 형질전환된 *E. coli*의 콜로니를 50~100 μ l의 checking buffer(0.4 M sucrose, 100 mM Tris pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% SDS, 0.01% bromo phenol blue)에 넣고 37°C에 30분간 반응시켰다. 이어서 전기영동을 통해 plasmid 존재여부를 확인하고, alkali lysis법에 의해 plasmid DNA를 분리하였다. 선발된 plasmid를 *Hind*III로 처리한 후 전기영동을 실시하여 insert DNA의 크기를 확인하였으며, 이를 nylon membrane에 전이시켜 표지된 95CY3119 균주의 genomic DNA를 probe로 이들과 hybridization하였다. Hybridization 후진한 밴드를 나타내는 단편을 포함하는 clone들을 선발하여 삽입된 DNA 단편을 추출하고 labelling한 다음 *P. capsici* 집단에 종특이적 및 유연관계 분석에 유용한 probe로서의 이용가능성 여부를 조사하였다.

Probe DNA의 labelling 그리고 hybridization 및 dig-DUTP의 형질학적 검출은 독일 Boehringer Mannheim사의 dig-kit을 이용하여 제조회사의 권장방법에 따라 실시하였다.

Southern hybridization

공시균주들의 genomic DNA를 제한효소로 자른 후, 0.7% agarose gel 상에서 22 V, 19시간 동안 전기영동하였다. Gel로부터 nytran membrane으로 DNA를 전이시킨 후 capillary action을 이용한 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 Southern hybridization을 행하였다.

UPGMA에 의한 집괴분석

Probe를 이용해 얻은 hybridization band pattern의 결과를 밴드의 유무에 따라 1과 0으로 나열해 컴퓨터에 입력할 data로 작성하였다. 그리고 NTSYS Program을

이용하여 유사도를 구한 후 그것을 기반으로 UPGMA에 의한 집괴분석을 실시하였다(Swofford, 1985).

결 과

형질전환된 clone내 임의로 삽입된 각 단편들의 특성

*Hind*III로 처리된 *Phytophthora capsici* 95CY3119 균주의 genomic DNA 단편들을 각기 임의로 형질전환시킨 후 checking buffer를 처리하여 agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 결과, 다양한 크기의 삽입단편을 포함하는 clone들을 얻었다. Checking buffer의 처리로 대략 1,200개 세균 콜로니들에 대해 20시간 내에 형질전환 여부를 모두 확인할 수 있었다. 또한 삽입된 genomic DNA 단편을 포함하고 있는지를 확인하고자 선발된 250개의 plasmid DNA들에 대해 *Hind*III를 처리한 후 전기영동을 실시한 결과 임의로 삽입된 다양한 크기의 genomic DNA의 단편이 나타났다.

선발된 clone내 삽입된 각 단편의 특성을 조사하기 위해 *Hind*III로 처리된 plasmid DNA를 nytran membrane에 전이하였다. 그 후 labelling된 95CY3119 균주의 *Hind*III로 처리된 genomic DNA를 probe로 하여 hybridization을 실시한 결과 다양한 위치에서 밴드들이 나타났다(Fig. 1). 이들 중 진한 밴드가 나타났던 clone pPC9, pPC15, pPC22 등에 포함된 DNA 단편들을 *P. capsici* genomic DNA 상에서 균의 유전적 특성분석에

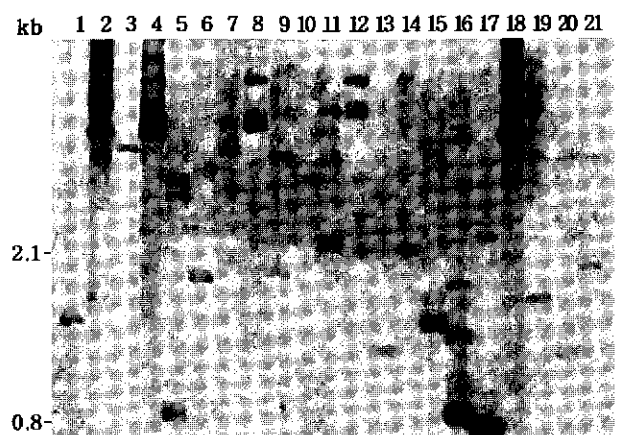


Fig. 1. Hybridization of genomic clones (pPC) obtained from *Hind*III-digested genomic DNAs of *Phytophthora capsici* isolate 95CY3119 with *Hind*III-digested genomic DNAs of *Phytophthora capsici* isolate 95CY3119. DNA fragments inserted into individual clones, which are strongly hybridized with *Hind*III digests of *P. capsici*, were selected for using probe. Lanes presented 1; pPC52, 2; pPC49, 3; pPC48, 4; pPC45, 5; pPC33, 6; pPC30, 7; pPC29, 8; pPC27, 9; pPC25, 10; pPC24, 11; pPC22, 12; pPC21, 13; pPC20, 14; pPC19, 15; pPC15, 16; pPC10, 17; pPC9, 18; pPC17, 19 pPC3, 20; pPC21, 21; pPC16.

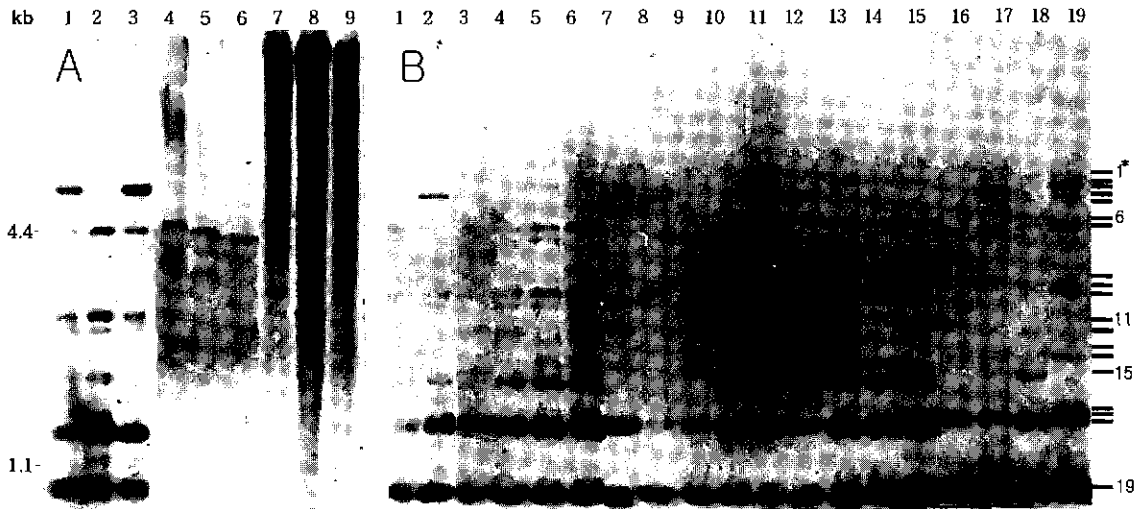


Fig. 2. Hybridization band patterns of *Hind*III-digested genomic DNAs of *Phytophthora capsici*, *P. parasitica* and *P. infestans* isolates probed with probe PC9. A. 1-3 lanes: *P. capsici* isolates (95CC7401, 95CC7404, 95CC7406); 4-6 lanes: *P. parasitica* isolates (CCP1, CGP2, CIP1); 7-9 lanes: *P. infestans* isolates (BC13, CKS7, KA6); B. lanes 1-19: *P. capsici* isolates from various origins, 95CA8202, 95CY8101, 95CC7407, 95CC7408, 95CY6229, 95CD5107, 95CH5108, 95CY4203, 95CC4201, 95CC4107, 95CD3207, 95CG3113, 95CC3501, 95CC3402, 95CC3318, YEGG, 95CP2101, 95CY2131, 95CY1102. *These are numbers of polymorphic DNA bands.

활용되는 repetitive copy 염기서열을 갖는 단편(Hamer *et al.*, 1989)으로 판단하여 RFLP 분석용 probe로서의 이용 가능 여부를 조사하기 위해 선발하였다.

***P. capsici* 종특이적 유전분석용 probe DNA의 선발**

Hybridization에서 95CY3119 균주의 genomic DNA probe에 의해 진한 밴드가 나타났던 각 clone 내의 삽입 단편을 agarose gel로부터 추출하여 labelling한 후 유전 분석용 probe로서의 이용가능성 여부를 조사하였다. 선발된 clone들 중 pPC9으로부터 비롯된 대략 0.7 kb 크기의 DNA 단편인 PC9을 probe로 *Hind*III 처리된 *P. parasitica*, *P. infestans* 그리고 *P. capsici*의 genomic DNA와 hybridization을 실시한 후 나타난 밴드양상을 비교하였다(Fig. 2A). *P. capsici*와 기주범위 및 형태적인 특성이 유사한 *P. parasitica*와 *P. infestans*에서는 1~2개의 진한 밴드만 형성되어 다수의 밴드가 나타난 *P. capsici*의 균주들과는 중간에 뚜렷한 밴드양상의 차이를 나타냈다. 특히 *Phytophthora* 속 균들의 분류체계상 동일한 II 그룹에 속하는 *P. parasitica*의 균주들에 대해서는 Table 1에 기재된 균주 이외에 다양한 지역으로부터 분리한 10균주에 대해 추가로 조사한 결과에서도 밴드양상의 차이는 나타났지만 공통적으로 2개의 밴드만을 나타냈다(data not shown).

한편, PC9을 probe로 전국의 18포장으로로부터 수집된 고추역병균 *P. capsici* 집단의 24균주들에 대한 DNA 분석시 5~15개의 밴드를 각각 형성하였으며, 총 19곳의 위치에서 다양한 밴드양상을 나타내 균주들 사이에 DNA polymorphism이 존재함을 나타냈다(Fig. 2B).

분리포장 및 지역이 다른 균주들 간에도 동일한 밴드양상을 나타내는 균주들이 존재하기도 했지만, 경남 창령 지방에서 분리한 95CC7401, 95CC7404, 95CC7406, 95CC7407, 95CC7408 균주들의 경우에서처럼 1개 포장에서 분리한 균주들 간에서도 그 밴드양상의 차이가 나타났다. 이들 결과를 토대로 UPGMA 분석을 실시한 결과에서도 *P. capsici* 균주들 사이에 유전적 다양성 등의 유전적 특성을 분석하기 좋도록 cluster가 형성되었다(Fig. 3).

Probe PC9과 마찬가지로 95CY3119 균주의 genomic DNA를 probe로 hybridization 했을때 진한 밴드가 나타

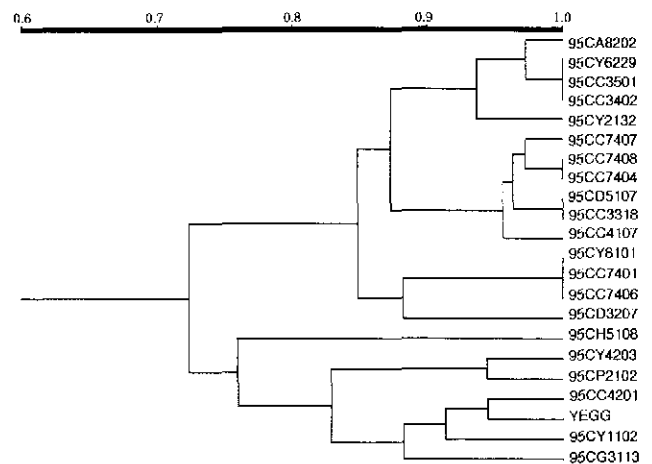


Fig. 3. Analysis of genetic variation and relationship based on the hybridization patterns of *Phytophthora capsici* isolates from various regions using probe PC9. This analysis was conducted by UPGMA.

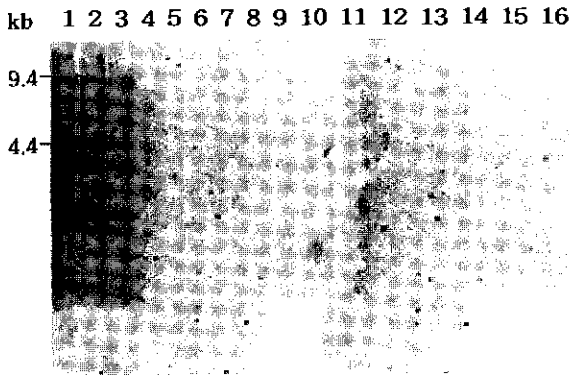


Fig. 4. Hybridization patterns of *Hind*III-digested total genomic DNAs of *Phytophthora capsici*, *Phytophthora* spp. and *Pythium* sp. hybridized with probe PC22. The lanes are 1-3; *P. capsici* (95CY3119, YEGG, TOM1), 4-6; *P. infestans* (BC13, CKS7, KA6), 7-9; *P. parasitica* (CCP1, CGP2, CIP1), 10; *P. boehmeriae* (P96118), 11; *P. cactorum* (CAC1), 12; *P. cinnamomi* (SP70), 13; *P. cryptogea* (KJ12), 14; *P. cambivora* (PB2), 15; *P. sojae* (P9664), 16; *Pythium* sp. (PY-1).

났던 대략 2.4 kb 크기의 DNA 단편인 PC22를 probe로 하여 southern blot 분석을 통해 그 특성을 조사하였다. 미국 및 국내의 다양한 지역과 기주로부터 각각 분리된 *P. capsici* 균주들에 대한 *Hind*III-genomic DNA와 hybridization을 실시한 결과, 최소 6개 이상의 진한 밴드와 최소 15개 이상의 옅은 밴드를 형성하였다(Fig. 4). 그러나 형태적 특징과 기주범위가 유사하여 *P. capsici*와 같이 *Phytophthora*속의 그룹 II에 속하는 *P. parasitica*를 비롯하여 국내에서 발생이 보고되어 있는 *P. boehmeriae*, *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. infestans*, *P. sojae* 등의 균주들과 *Pythium* sp.의 *Hind*III-genomic DNA들과는 밴드를 전혀 형성하지 않았다.

Probe DNA를 선별하기 위해 사용됐던 95CY3119 균주의 유전자로부터 유래된 20개의 무성세대의 자손균주들에 대해 probe PC9과 PC22에 의해 형성된 밴드의 유전 양상을 조사한 결과 모두 동일한 밴드양상이 나타나 그 특성이 안정적으로 후대에 유전되는 DNA marker임을 확인할 수 있었다. 한편, PC9과 PC22 등과 유사한 특성을 지닐 것으로 여겨졌던 PC15는 *P. capsici* 균주들에 대해 동일하게 형성되는 한 개의 진한 밴드를 포함하여 모두 2~5개의 밴드를 형성하였지만 공시균주들 간에 특이적인 유전적 차이를 나타내지 못했다(data not shown).

고 찰

반복 DNA 염기서열들을 probe로 이용한 식물 병원균에서의 효과적인 종내, 종간 유연관계 및 유전적 다양

특성분석에 유용하게 활용되고 있다(Goodwin *et al.*, 1992; Hamer *et al.*, 1989; Rosewich *et al.*, 1999). 본 실험에서 *P. capsici*의 genomic library로부터 임의로 선 발하여 probe DNA로 사용했던 PC9과 PC22는 다른 *Phytophthora*속의 균주들과는 2~3개의 밴드를 형성하거나 전혀 반응하지 않았다. 그러나 *P. capsici* 균주들에 있어서는 많은 밴드의 형성과 균주들간 그 양상의 차이가 다양하게 나타나는 반복 염기서열들로 이들이 감지하는 염기서열들은 *P. capsici* 집단에 대해 독특한 유전적 특성을 지니고 있는 것으로 여겨진다. 한편, 이들 probe DNA들은 무성세대의 자손균주들에 있어서 genomic DNA 상의 밴드 양상이 동일하게 나타나 유전적으로 안정적인 marker임을 확인할 수 있었다. 이들 DNA marker들을 *P. capsici* 집단의 유전적 특성 분석에 활용한다면 배양적 조건 및 미묘한 환경요인에 대해서도 변화가 쉬운 표현형을 marker로 이용했던 기존의 분석결과보다 더욱 신뢰할만한 결과를 얻을 수 있을 것이다. *P. infestans* 집단의 유전적 다양성 및 특성 분석에 아주 효과적으로 사용된 RG57(Goodwin *et al.*, 1992)과 벼도열병균 *Magnaporthe grisea*(Hamer *et al.*, 1989)에 있어서 분리기주에 따른 병원균의 유전적 차이까지 해석했던 MGR 등의 DNA probe들이 있다. 이 연구에서 개발된 genomic DNA 상에서 높은 반복수로 유전적인 차이를 나타내주는 probe PC9과 PC22는 *P. capsici* 집단의 유전 분석용 DNA marker로서 그 중요한 역할이 예상된다.

Probe PC9은 *P. parasitica*와 *P. infestans*에서와는 달리 *P. capsici* 균주들에 있어서 특이적으로 더 많은 수의 밴드를 형성하며 동일포장에서 발생한 균주들 간에도 DNA 밴드양상의 다양한 차이를 나타냈다. 공통적으로 나타났던 2개의 밴드는 probe DNA PC9의 밝혀지지 않은 대략 0.7 kb의 DNA 염기서열이 다른 *Phytophthora*속 균에 있어서도 공통적으로 존재하는 유전적인 요인을 말해준다. 또한 밴드 양상의 다양성은 *P. capsici* 집단내 균주들간의 미세한 유전적인 변이가 존재하고 있음을 잘 말해주고 있다. 따라서 이 probe는 국내 전지역에서 고루 발생하며 다양한 기주를 침해하는 *P. capsici* 집단의 유전적 변이나 다양성 분석에 매우 유용한 재료로 사용될 수 있을 것이다.

한편, 국내의 고추역병균 *P. capsici* 집단은 포장별로 A1 또는 A2 교배형만 발생하거나 동일 포장내에서도 교배형이 다른 균주들이 혼재하는 등 포장별 교배형 발생양상과 각 포장단위별 균주들의 유전적인 특성이 매우 다양할 것으로 여겨지고 있다(Kim *et al.*, 1995). 또한 효과적인 방제약제로 알려졌던 metalaxyl에 대해서도 이미 저항성균의 출현으로 병원균 집단내 변이가 나타나 것으로 보고되어 있다(Hwang and Kim, 1995). 이

적 차이를 식별해 내었던 DNA probe PC9을 이용하여 교배형 발생분포 특성 및 약제 저항성과 함께 유전적 다양성 등을 조사하여 병원균 집단의 유전변이에 관한 분석을 실시한다면 *P. capsici* 집단의 방제전략에 많은 정보를 제공할 것으로 판단된다.

*Phytophthora*속의 종동정과 식물체 내에서 병원균의 직접 검출을 위해 cloning된 DNA probe는 지속적으로 개발되어져 왔다(Goodwin *et al.*, 1990a, 1990b; Judelson and Messenger-Routh, 1996). 본 실험에서 선발된 probe DNA PC22는 국내에서 발생이 보고된 *Phytophthora*속 균들과 *Pythium* sp.의 *Hind*III-genomic DNA들과는 전혀 반응을 나타내지 않았던 반면 *P. capsici*에만 많은 밴드를 형성했던 종특이적인 DNA 단편일 것으로 여겨졌다.

세계적으로 고추에 발생하는 *Phytophthora*속 균들에는 *P. capsici* 이외에 *P. cactorum*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. parasitica*, *P. palmivora*, *P. megasperma* 등이 보고되어 있다(Erwin and Ribeiro, 1996). 비록 국내에는 이들의 고추에서의 병발생 보고가 아직 없으나 기주 범위가 유사하며 다른 작물에서의 병발생이 보고된 것으로 미루어 이들 *Phytophthora*속 균들이 고추 포장에서의 병발생 가능성이 상존하며 동일 포장에서의 동시 병발생 가능성을 배제할 수는 없다. 따라서 추후 종특이적 DNA probe인 PC22에 대해 더 많은 *Phytophthora*속 균들과의 비교조사와 그 염기서열의 분석 및 특성을 밝힌다면 토양이나 식물체의 이병부로부터 병원균의 신속한 검출, 그리고 병발생 예찰 등 *P. capsici*와 관련된 보다 다양하고 진일보한 연구에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

적 요

Phytophthora capsici 집단의 유전적 특성 분석용 DNA marker를 선발하고자 *Hind*III로 처리된 *P. capsici* 95CY3119 균주의 genomic DNA library를 임의로 cloning 시킨 후 southern blot 분석을 실시하여 선발된 clone들의 특성을 조사하였다. Probe로 사용하기 위해 선발된 clone 내에 삽입된 DNA 단편들은 *Hind*III로 처리된 *P. capsici* 95CY3119의 genomic DNA와 특이적으로 강하게 반응했다. 조사된 probe 중 PC9은 *Hind*III로 처리된 국내 *P. capsici* 균주들의 genomic DNA와 Southern 분석시 많은 밴드를 형성하였으며, 분리포장 단위별 균주들 간에는 물론 동일 포장 분리균주들 간에도 그 차이를 나타냈다. 그 밴드 양상을 기초로 집괴분석을 실시한 결과, 각 균주의 유전적 다양성이 잘 나타났다. Probe PC22는 다른 *Phytophthora*속과 *Pythium*속 균주들의 genomic DNA들과의 Southern hybridization에서는 반응을 나타내지 않았지만 특이적으로 *P. capsici* 균주들과는 다수의 밴드를 형성하였다. 이들 *P. capsici* 종특이적 DNA

probe들은 추후 국내 및 전세계에 분포하는 *P. capsici* 집단의 유전적 다양성 분석 및 종동정에 유용한 marker로서 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 자유공모과제 연구비 지원에 의하여 수행되었기에 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- Colas, V., Lacourt, I., Ricci, P., Vanlerberghe-Masutti, F., Venard, P., Poupet, A. and Panabières, F. 1998. Diversity of virulence in *Phytophthora parasitica* on Tobacco, as reflected by nuclear RFLPs. *Phytopathology* **88**: 205-212.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora*, Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul.
- Goodwin, P. H., English, J. T., Neher, D. A., Duniway, J. and Kirkpatrick, B. C. 1990a. Detection of *Phytophthora parasitica* from soil and host tissue with a species-specific DNA probe. *Phytopathology* **80**: 277-281.
- Goodwin, P. H., Kirkpatrick, B. C. and Duniway, J. M. 1990b. Identification of *Phytophthora citrophthora* with cloned DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 669-674.
- Goodwin, S. B. and Fry, W. E. 1992. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNA from *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.* **22**: 107-115.
- _____, Spielman, L. J., Matuszak, J. M., Bergeron, S. N. and Fry, W. E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in Northern and Central Mexico. *Phytopathology* **82**: 955-961.
- Hamer, J. E., Farrall, L., Orbach, M. J., Valent, B. and Chumley, F. 1989. Host specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of fungal plant pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9981-9985.
- Hwang, B. K. and Kim, C. H. 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis.* **79**: 221-227.
- Judelson, H. S. and Messenger-Routh, B. 1996. Quantitation of *Phytophthora cinnamomi* in avocado roots using a species-specific DNA probe. *Phytopathology* **86**: 763-768.
- Kim, H., G., Song, J. Y., Jung, Y. S., Hwang Y. E. and Choi, J. F. 1995. Occurrence ratio of mating type of *Phytophthora capsici*, pepper blight pathogen in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* **11**: 386-387 (Abstr.).
- Mchau, G. R. A. and Coffey, M. D. 1995. Evidence for the existence of two subpopulations in *Phytophthora capsici* and a redescription of the species. 1995. *Mycological Research* **99**: 89-102.
- Lamour, K. H. and Hausbeck, M. K. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* **90**: 396-400.
- Oh, J. S. and Kim, C. H. 1992. Varying sensitivity to metalaxyl of Korean isolates of *Phytophthora capsici* from red pepper field. *Korean J. Plant Pathol.* **8**: 29-33.
- Ordoñez, M. E., Honl, H. R., Ramon, M. P., Oyarazun, P. J., Smart, C. D., Fry, W. E., Forbes, G. A. and Erselius, L. J. 2000. A novel population of *Phytophthora*, similar to *P.*

- infestans*, attacks wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology* **90**: 197-202.
- Oudemans, P. and Coffey, M. D. 1991. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. *Mycological Research* **95**: 19-30.
- Rosewich, U. L., Pettway, R. E., Katan, T. and Kistler, H. C. 1999. Population genetic analysis corroborates dispersal of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* from Florida to Europe. *Phytopathology* **89**: 623-630.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Swofford, D. L. 1985. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony. Version 2. 4. 1. Illinois Natural History Survey. Champaign, IL.
- Vieira, J. and Messing, J. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 153, ed. by Wu and Grossam, pp. 3-11. Academic Press, San Diego.