

Nested PCR 기법을 이용한 인삼 뿌리썩음병원균의 특이적 검출

장창순 · 이정주 · 김선익² · 송정영 · 유성준¹ · 김홍기*

충남대학교 농업생명과학대학 농생물학과, ¹한국과학기술원 신기술창업지원단

²금산군 농업기술센터

Specific Detection of Root Rot Pathogen, *Cylindrocarpon destructans*, Using Nested PCR from Ginseng Seedlings

Chang Soon Jang, Jung Ju Lee, Sun Ick Kim², Jeong Young Song, Sung Joon Yoo¹ and Hong Gi Kim

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

¹Bioshield Co. Ltd. HTVC KAIST, Daejeon 305-701, Korea

²Geumsan Agricultural Development & Technology Center, Geumsan 312-702, Korea

(Received on March 2, 2005)

Cylindrocarpon destructans is a soil-borne plant pathogenic fungus causing root rot on ginseng and trees. Rapid and exact detection of this pathogen was practiced on ginseng seedlings by nested PCR using species-specific primer set. The second round of PCR amplification by Dest 1 and Dest 4 primer set formed 400 bp of species-specific fragment of *C. destructans* from the product of first round of amplification by ITS 1 and ITS 4 primer set. In the PCR sensitivity test based on DNA density, nested PCR detected to the limit of one fg and it meant the nested PCR could detect up to a few spores of *C. destructans*. Also, nested PCR made it possible to detect the pathogen from ginseng seedlings infected by replantation on artificial infested soil. Our nested PCR results using species-specific primer set could be utilized for diagnosis of root rot disease in ginseng cultivation.

Keywords : *Cylindrocarpon destructans*, Diagnosis, Ginseng, Nested PCR, Root rot

다년생의 숙근초로 오가피과에 속하는 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 우리나라를 대표하는 부가가치가 높은 작물이다. 인삼은 한 장소에서 4-6년 동안 재배되는 특성 때문에 토양 병원균들의 점진적인 밀도 증가와 그에 따른 연작장애가 발생하여 동일포장에서의 연속적인 재배가 불가능하므로 농가에서는 주로 초작지에서의 인삼경작을 선호하고 있다(목, 2000).

현재 인삼 연작장애는 토양식물병원균인 *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium solani*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* 등과 기타 병해가 복합적으로 관여한다고 보고되어 있으나, 최근 강한 병원성과 침입력을 가진 *C. destructans*에 의한 1차적인 감염이 가장 중

요한 원인이며, 이 균에 의한 뿌리썩음병이 요인으로 확인되었다(정, 1797; 홍 등, 1992; 정 등, 1980).

인삼 뿌리썩음병원균에 대한 국내 연구는 정(1979)에 의해 최초로 *Cylindrocarpon destructans*에 의한 병 발생 연구로부터 시작되었으나, 홍 등(1992)에 의해 재확인되기까지 여전히 인삼 연작장애의 주요 요인으로 토양내 독소물질의 축적, 미량원소의 결핍 등이 논의되어왔다. 한편, *C. destructans*에 대한 연구가 그동안 미흡했던 이유는 토양 내 존재형태인 후막포자의 발아율이 현저히 낮아 토양 내에서 균을 분리하는 것조차 어려우며(유 등, 1995), 가해 기주가 인삼 이외에는 대부분 경제성이 낮거나 식량작물이 아니고 수목류나 화훼작물에 국한되고 있어 연구자들의 관심도가 낮았기 때문이다.

인삼 뿌리썩음병원균(*C. destructans*)과 같은 토양병원균은 뿌리부위를 침해하므로 공기전염성 병해의 국부적인

*Corresponding author

Phone) +82-42-821-5768, Fax) +82-42-823-8679

E-mail) hgkim@cnu.ac.kr

병반과는 달리 식물 전체를 죽게 하는 전신감염성의 병해를 초래한다. 또한 조기발견이 어렵고 식물체가 시드는 증상이 발견된다 하더라도 이미 병이 만연되어 방제하기에 늦은 경우가 대부분이기 때문에 그 피해가 커지기 마련이다(김 등, 2002).

따라서, 연작장해를 보다 근본적으로 해결하기 위해서는 인삼포 예정지나 연작지에서 토양내 뿌리썩음병원균의 밀도를 측정함으로써 연작장해 가능성을 진단하고 묘삼의 뿌리썩음병원균 감염여부를 사전에 검정하는 것이 필수적이다(정, 1979; 홍 등, 1992). 그러나 *C. destructans*의 토양 내 존재 형태인 후막포자는 인공 배지에서의 낮은 발아율 때문에 전통적으로 사용된 균 배양에 의한 검출법의 활용이 어렵다(유 등, 1995). 또한 인공배양시 균사 생장이 매우 느리기 때문에 감염된 묘삼으로부터의 균 분리 및 검출조차 어려워 균학적, 생태학적 연구가 더욱 더딘 실정이다. 이런 문제를 해결하기 위해서는 균의 배양과정을 거치지 않고도 검출이 가능한 새로운 접근 방식이 필수적이다.

식물의 조직이나 토양으로부터 배양과정을 거치지 않고 직접 DNA를 추출하고 PCR을 통해 검출함으로써 좀 더 빠르고 정확한 진단을 적용하려는 시도가 계속되고 있다. 이 기법은 첫째, 주로 배양이 용이하지 않은 순환물 기생체(Wallenhammer 등, 2001; Ito 등, 1999; Frederik 등, 2002)나 둘째, 연작장해의 원인이 되는 토양전염성 진균(Li 등, 2003; Nazar 등, 1997), 셋째, 병원성이 강하고 전염이 빠른 *Phytophthora* 속 균(Ippolito 등, 2002; Kong 등, 2003) 등을 위주로 개발되었는데, 그 이유는 이런 종류의 식물병 진단에 적용되어온 전통적인 예찰법이 효과를 거두기 어렵기 때문이다. *C. destructans*는 후막포자의 배지 내 발아율이 저조하므로 순환물 기생체와 그 성격이 비슷하고, 연작장해를 일으키며, 병원성이 강한 특성을 가진다. 또한, 값이 비싸고 재식 과정을 거치며 4년 이상 재배해야 하는 등의 특성으로 인해 묘삼으로부터의 빠르고 민감한 검출법 개발 역시 더욱 요구되고 있는 실정이다. 따라서 이런 점으로 볼 때, 인삼 뿌리썩음병을 대상으로 한 PCR 진단법 또한 시급히 개발되어야 할 과제이다.

각종 수목의 뿌리썩음병을 유발하는 *C. destructans*를 어린 묘목의 뿌리 조직으로부터 검출하기 위해 Internal Transcribed Spacer(ITS) 영역에 기반한 종특이적 primer와 nested PCR 기법이 개발된 바 있다(Hamelin 등, 1996). 그러나 이 연구는 수목병에 국한되어 있고 검출 한계를 포함한 primer와 nested PCR의 특성에 관한 자료가 충분하지 못하기 때문에 인삼에의 적용을 위해서는 좀 더 세밀한 연구가 뒷받침되어야 할 필요가 있다. 본 연구에서

는 *C. destructans* 특이적 primer를 활용한 nested PCR기법의 인삼 뿌리썩음병원균에의 적용법을 찾고, 나아가 PCR 반응 민감도를 개선하고자 시도되었으며 균 배양과정 없이 인삼으로부터 직접 이 병원균을 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 기술을 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시 균주의 수집 및 분리

*Cylindrocarpon destructans*는 금산, 제천, 음성, 유성 등의 인삼재배 포장으로부터 채집된 전형적인 인삼 뿌리썩음병 병반으로부터 분리하였으며, 검출의 정확성을 기하기 위한 대조로 인삼포장에서 흔히 발견되는 주요 식물 병원균들을 사용하였는데 이들은 충남대학교 식물병리학

Table 1. List of plant pathogenic fungi used in this study

Isolates	Species	Source	Geographic origin
CDGS 401-5	<i>Cylindrocarpon destructans</i>	Ginseng	Kumsan, Chungnam
CDG 404-2	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Jinjam, Daejeon
CDG411-5	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Jinjam, Daejeon
CDGL404-3	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Yuseong, Daejeon
CDGL 402-2	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Yuseong, Daejeon
CDGLS 401-6	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Yuseong, Daejeon
Umseong 1-A	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Umseong, Chungbuk
Umseong 1-C	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Umseong, Chungbuk
Umseong 2	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Umseong, Chungbuk
Umseong 3-A	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Umseong, Chungbuk
Umseong 3-B	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Umseong, Chungbuk
Umseong 3-C	<i>C. destructans</i>	Ginseng	Umseong, Chungbuk
-	<i>Alternaria panax</i>	Ginseng	Jinjam, Daejeon
-	<i>A. panax</i>	Ginseng	Jinjam, Daejeon
BCJ 100	<i>Botrytis cinerea</i>	Tomato	Buyeo, Chungnam
BCJ 411	<i>B. cinerea</i>	Tomato	Buyeo, Chungnam
FSG 501	<i>Fusarium solani</i>	Ginseng	Andong, Kyungbuk
FSG 602	<i>F. solani</i>	Ginseng	Andong, Kyungbuk
-	<i>Rhizoctonia solani</i>	Ginseng	Kumsan, Chungnam
-	<i>R. solani</i>	Ginseng	Kumsan, Chungnam
-	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ginseng	Jinjam, Daejeon
-	<i>C. gloeosporioides</i>	Ginseng	Jinjam, Daejeon
Fcu 434	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Cucumber	Buyeo, Chungnam
Fcu 436	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Cucumber	Buyeo, Chungnam
-	<i>Phytophthora cactorum</i>	Ginseng	Kumsan, Chungnam
-	<i>P. cactorum</i>	Ginseng	Kumsan, Chungnam
-	<i>Pythium ultimum</i>	Ginseng	Jinjam, Daejeon

실험실에서 보관한 균주들이었다. 병원균의 분리는 단균 사 분리와 단포자 분리를 병행하여 하였다(Table 1).

순수분리를 위해 채집된 뿌리썩음 병반을 흐르는 물에 잘 씻은 후 5 mm 크기로 잘라 1% NaOCl에 2분간 침지한 다음 멸균수로 씻어내고 여과지로 수분을 제거하였다. 그리고 streptomycin 300 ppm이 포함된 PDA 배지에 올려놓고 15°C에서 5일간 배양한 후 단균사 분리하면서 적갈색 균총과 배지 전체를 검붉게 물들이는 색소의 유무를 *C. destructans*의 1차적인 동정 기준으로 하였다 (Samuels 등, 1990). 1차로 분리된 균주는 2주간 15°C 항온기에서 배양하여 분생포자를 유도하고 이를 수거한 다음 거즈를 이용해 균사를 제거하고 희석 평판으로 PDA 배지에 도말함으로써 순수분리를 마쳤다.

*Cylindrocarpon destructans*의 병원성 검정

분리된 *C. destructans*의 병원성을 조사하기 위해 120°C에서 30분간 멸균한 토양에 접종원을 투입하여 이병토를 만들어 사용하였다.

접종원으로 사용된 *C. destructans*는 100 ml PD broth 배지에서 20일간 배양된 것을 homogenizer를 이용하여 9500 rpm에서 1분간 분쇄하였다. 멸균수를 넣고 500 ml로 조정하여 토양 50 kg과 잘 섞은 다음 포트(가로×세로; 45×45 cm)에 묘삼을 각각 다섯 뿌리씩 심었다. 묘삼은 식재 후부터 1주일 간격으로 수확하여 그 발병정도를 확인한 후 0.02% tween 20 용액에서 3분간 세척함으로써 묘삼에 붙어있는 잔재물과 병원균을 제거하였고, 묘삼으로부터의 검출실험에 사용하기 위해 -20°C에 보관하였다.

병원균의 DNA 분리

Genomic DNA의 분리. 공시 균주들을 SNAY broth [1 g KH₂PO₄, 1 g KNO₃, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.5 g KCl, 0.2 g glucose, 0.2 g saccharose, 1 g Yeast extract/1 l H₂O] 배지에 접종하여 20°C에서 정지 배양하였다. 균사를 수확하여 1.5 ml eppendorf tube에 나누어 담아 -20°C에서 냉동시킨 다음 동결건조시켰고, 동결건조된 균사체는 Doyle 등(1990)이 수행한 CTAB method를 사용하여 DNA를 분리하였다. 먼저 동결 건조된 균사체를 멸균한 가는막대로 잘게 마쇄한 다음 400 µl의 extration buffer[200 mM Tris-Cl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 Proteinase K (50 µl)를 첨가하여 잘 섞어주었다. 그리고 2× CTAB solution [2% CTAB, 100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% PVP]을 첨가하여 섞어준 다음, 600 µl의 chloroform을 첨가하고 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리에 의해 나누어

진 상등액을 취하여 새 eppendorf tube에 담고 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하여 10분 동안 실온에 두었다. 이것을 다시 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시키고 pellet을 제외한 나머지를 제거한 다음 70% ethanol로 세척하고 실온에서 ethanol이 완전히 제거될 때까지 건조시켰다. 건조된 pellet에 50 µl의 멸균증류수를 넣고 RNase(10 mg/ml)를 2 µl 첨가하여 16시간 반응 후 다음 실험 때까지 -20°C에 보관하였다.

식물체로부터 DNA 분리. 식물체로부터 DNA를 분리하는 방법은 genomic DNA를 분리하는 방법과 기본적으로 같았다. 실험의 객관성을 부여하기 위해, 묘삼은 액체질소와 막자사발을 이용해 통째로 마쇄한 후 즉시 3 ml의 extraction buffer를 첨가함으로써 DNA의 손상을 예방하고, 그 중 500 µl를 취해 다음 과정을 진행하였다. 한편 비교를 위하여 병원균을 접종하지 않은 건전한 묘삼의 DNA를 분리하여 분석하였다.

PCR 증폭

본 연구에 사용된 primer 염기서열 합성과 PCR 수행 절차는 Hamelin 등(1996)의 문헌에 근거하였으며, primer 제작은 Genotech사에 의뢰하였다(Table 2).

1차 PCR은 ITS 1과 ITS 4 primer set을 이용하였고, 2차는 내부의 염기서열로부터 선발된 Dest 1과 Dest 4 primer를 이용하여 재증폭하는 nested PCR 기법을 사용하였다.

ITS 영역의 증폭. 1차 PCR에 의한 ITS 영역의 증폭은 ITS 1과 ITS 4 primer set을 이용하여 실행하였다. PCR 반응액은 총량을 50 µl로 하고 주형 DNA 5 ng, 0.4 µM의 primer, 250 µM dNTPs, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, Taq DNA polymerase (Takara Biomedicals Co., Japan) 1 unit를 첨가하였다. 이어서 Perkin Elmer사의 DNA thermal cycler 480을 이용하여 95°C에서 3분간 initial denaturation 시킨 후, 95°C/35초, 55°C/1분, 72°C/2분으로 35 cycle 반응시킨 다음 72°C에서 8분간 final extension시켜 PCR 반응을 마쳤다.

Two-step nested PCR. Two-step nested PCR에 사용된 Dest 1과 Dest 4 primer는 종 특이적 primer로 *C.*

Table 2. List of primers used for nested PCR amplification of *Cylindrocarpon destructans*

Primer	Primer sequence	Size of PCR product (bp)
ITS-1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	600
ITS-4	5'-TCCTCCGCTTATGTGATGC-3'	
Dest-1	5'-TTGTTGCCTCGGCGGTGCCTG-3'	399-400
Dest-4	5'-GGITTAACGGCGTGGCCGCGCTGTT-3'	

*destructans*에만 특이적으로 반응한다. 이 primer set에 의한 PCR 반응은 다음과 같이 수행되었다.

PCR 반응액은 총량을 50 μ l로 하고 주형 DNA는 1차 PCR 반응액 중 1 μ l를 취하고, 0.8 μ M의 primer를 사용하였으며 이외의 방법은 ITS 영역 증폭때와 동일하게 실시하였다.

Southern hybridization

Agarose gel로부터의 DNA 추출과 probe labeling. Nested PCR에 의해 증폭된 증폭산물을 probe로 제작하여 *C. destructans* 특이적 hybridization에 사용하였다.

먼저, 증폭된 PCR 생성물을 1.2% low melting point agarose gel에 전기영동하고 400 bp band를 mess로 절단하였다. 절단된 agarose 절편은 1.5 ml eppendorf tube에 담아 Wizard PCR Preps DNA Purification System kit (Promega, USA)을 사용하여 DNA를 수거한 후 마지막 과정을 100 μ l의 elution buffer에 녹였다. 이어서, phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1) 100 μ l를 넣고 4°C, 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후 상등액을 추출하여 2 μ l의 5 M NaCl과 100% ethanol 200 μ l를 첨가하였다. 그 후 -70°C에서 30분 동안 처리한 다음 4°C 12,000

rpm으로 15분간 원심분리하였다. Pellet은 10 μ l의 TE buffer로 녹이고 95°C에서 10분간 변성시켜 신속히 -70°C에 30분간 두었다가 Dig DNA Labeling and Detection kit (Roche, Germany)을 이용하여 권장 사용법에 따라 probe DNA를 제작하고 TE buffer 50 μ l에 녹여 95°C에서 10분간 변성시킴으로서 labeling을 마쳤다. Label된 probe DNA는 즉시 사용하거나, 보관 시에는 다음 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

Southern hybridization. Southern hybridization을 위해 PCR 산물을 0.5× TBE buffer 상에서 1.0% agarose gel에 전기영동하고, Sambrook(1989) 등의 방법으로 Schleicher & Schunell 사의 nylon membrane에 DNA를 전이시켰다. 이후의 hybridization 과정은 Dig DNA Labeling and Detection kit을 이용하여 권장사용법에 따라 수행하였다.

결과 및 고찰

*Cylindrocarpon destructans*의 동정

이병된 인삼으로부터 분리된 공시균을 PDA 배지 상에서 배양하면서 관찰하였다. *C. destructans*는 PDA 배지 상에서 배지를 물들이는 검붉은 색소를 내는 특징을 보

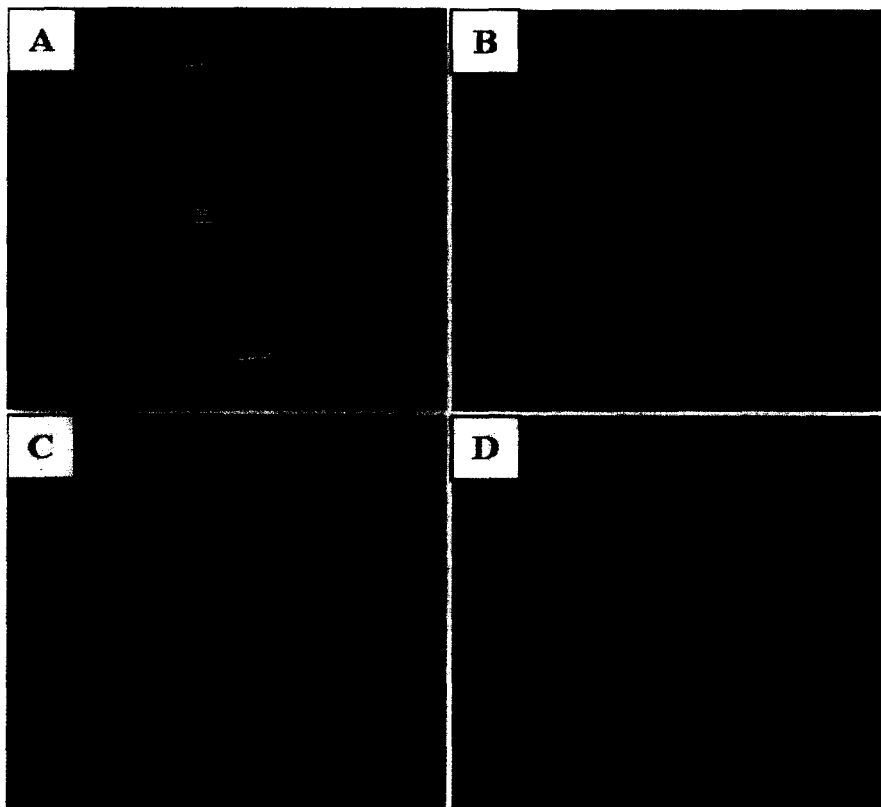


Fig. 1. Observations of *Cylindrocarpon destructans*. A: Growth on PDA for 3 weeks, B: Micro- and macroconidia observation under the microscope ($\times 400$), C~D: chlamydospores (C: $\times 100$, D: $\times 400$).

였다. 배양 초기의 균사는 백색이고, 격벽이 있으며 45°~90°로 분지하고 대형 및 소형 분생포자와, 20°C에서 30일 이상 배양하면 후막포자를 형성하였다. 소형 분생포자는 격막이 없거나 1개 있으며 대형 분생포자는 격막을 1~3개 형성하였다. 분생포자는 시간이 흐르면 격막을 사이로 원형화되는 모습도 관찰되었다. 균사의 후막화는 균사 전반에 걸쳐 오래된 균사에서 진행되는데, 그 후막화 되는 부위는 점점 갈색을 띄게 되어 완전한 구형의 후막포자 형태에서 가장 진한 황갈색~적갈색을 보였다. 완전한 구형을 갖춘 후막포자는 균사의 중간이나 혹은 말단의 구분 없이 형성되며, 1개 또는 3개 이상이 연쇄상으로 붙어있는 모습도 관찰되었다(Fig. 1). 이와같은 형태적 특징의 관찰은 Samuels과 Brayford (1990)의 보고와 일치하였기 때문에 *C. destructans*로 최종 동정하였다.

병원성 검정

공시된 병원균 중 CDGS 401-5, Umseong 1-A 균주를 대상으로 그 병원성을 확인하였다. 공시균주들의 병원성

은 매우 강하여 접종 2주부터 발병이 시작되고, 접종 3주째는 인삼뿌리 전체로 병징이 확대되어가는 것을 확인할 수 있었으나 지상부의 증상으로는 병의 유무를 진단할 수 없었다. 또한, 접종 4주째에는 표피만 남을 정도로 병이 급속히 진전되는 것을 확인하였다. 병징은 발병 초기에 붉은 빛의 내부가 노출된 상처가 점점 확대되고, 내부로 썩어들어가는 전형적인 인삼 뿌리썩음병의 증상이었다 (Fig. 2).

Nested PCR의 특이성 검정

*Cylindrocarpon destructans*와 인삼에 병을 일으키는 *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium ultimum* 및 토양 병원균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*에 대해 nested PCR의 종 특이성을 검정하였다. 각 병원균의 균주들로부터 genomic DNA를 추출한 후 약 1 ng을 취하여 1차 PCR 및 nested PCR을 수행하였을 때, 1차 PCR에서는 모든 병

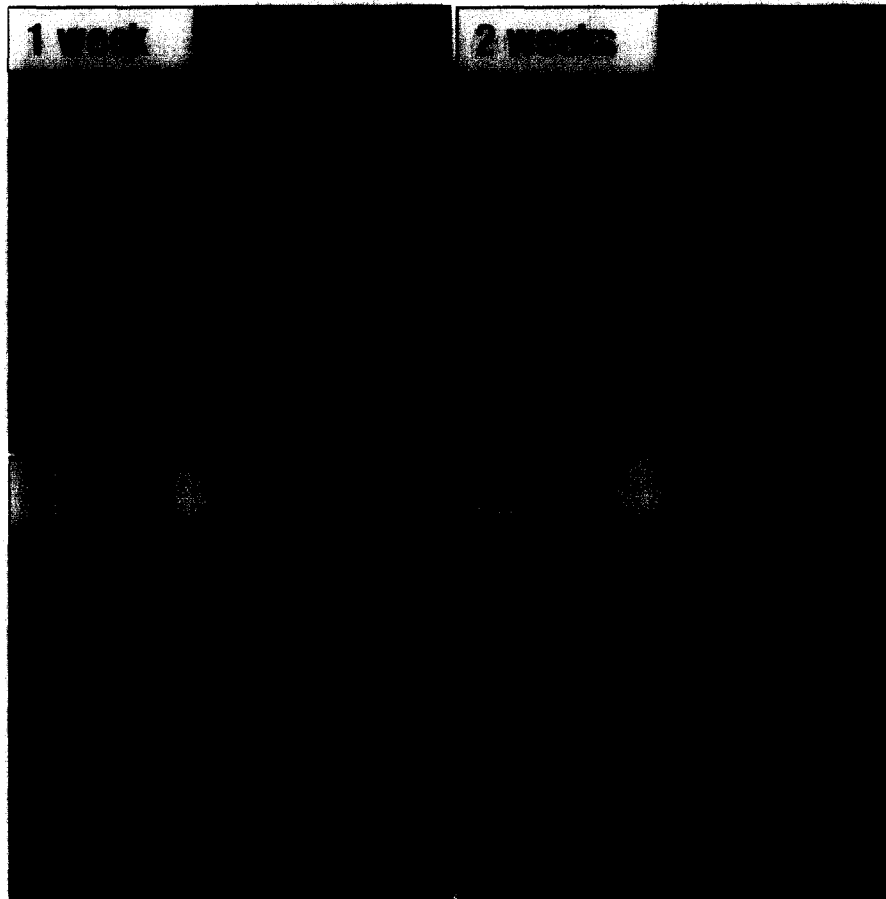


Fig. 2. Symptoms of the root rot caused by *Cylindrocarpon destructans* on one year old ginsengs (*Panax ginseng* C. A. Meyer). The ginseng seedlings were harvested on every week after replanting in infested soil.

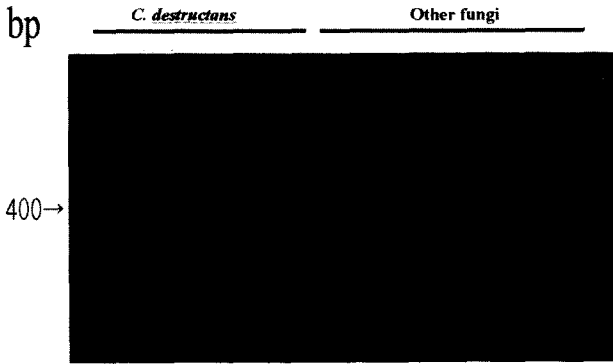


Fig. 3. Specificity test of Nested PCR for *Cylindrocarpon destructans*. Lane 1~12: *C. destructans* (CDGS 401-5, CDG 404-2, CDG 411-5, CDGL 404-3, CDGL 402-2, CDGLS 401-6, Umsung 1-A, Umsung 1-C, Umsung 2, Umsung 3-A, Umsung 3-B, Umsung 3-C), 13~14: *Alternaria panax*, 15~16: *Botrytis cinerea*, 17~18: *Fusarium solani*, 19~20: *Rhizoctonia solani*, 21~22: *Colletotrichum gloeosporioides*, 23~24: *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, 25~26: *Phytophthora cactorum*, 27: *Pythium ultimum* n.c.: PCR mixture without template DNA.

원균에서 밴드를 형성하였으나(data not shown) nested PCR에서는 *C. destructans*의 균주들에서만 약 400 bp 정도의 밴드가 형성되었으므로 그 중 특이성을 확인할 수 있었다. 이는 Hamelin 등(1996)의 nested PCR 기법을 이용해 다른 식물병원진균 및 *Cylindrocarpon* 종간 비교를 통한 특이성 검정 결과와 일치하였고, 이로써 처리방법만 잘 정립한다면 본 nested PCR 기법을 안정적으로 인삼에 적용할 수 있음이 검증되었다(Fig. 3).

Nested PCR의 민감성 검정

Hamelin 등(1996)의 연구에서는 nested PCR의 민감도와 관련된 결과가 제시되지 않았으므로 본 실험은 DNA 정량에 따른 검출 한계를 제시하고자 실행되었다. 먼저, PDB 배지에서 25°C로 2주간 배양한 Umseong 1-A 균주로부터 DNA를 분리하여 10 ng~0.1 fg까지 10 배씩 희석하여 ITS 1과 ITS 4 primer로 증폭한 후 1.2% agarose gel에 전기영동하였을 때 600 bp 증폭산물을 100 fg에서까지 얻을 수 있었고 Southern hybridization을 실시하였을 때에는 약 1 fg까지 증폭이 확인되었다. 이와 같이 PCR만을 행하였을 때보다 그 증폭산물을 hybridization하였을 때의 민감도가 약 100배 가량 더 증가함을 알 수 있다.

한편 Dest 1과 Dest 4 primer로 nested PCR을 실시한 데서는 400 bp의 증폭산물을 1 fg까지 얻을 수 있었으나, 그 증폭산물을 400 bp의 *C. destructans* 특이적 단편을 probe로 하여 southern hybridization하였을 때 nested PCR과 비교하여 더 민감해지지는 않았다.

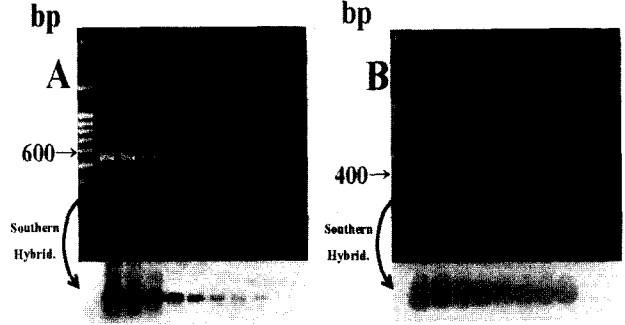


Fig. 4. PCR sensitivity test for *C. destructans* DNAs. **A:** 600 bp products of first round PCR by ITS 1 and ITS 4. **B:** 400 bp products of second round PCR using Dest 1 and Dest 4 from the first round. Both A and B were hybridized with specific fragments by Dest 1 and 4 as probe, respectively. M: 100 bp ladder, lane 1: 5 ng, 2: 1 ng, 3: 100 pg, 4: 10 pg, 5: 1 pg, 6: 100 fg, 7: 10 fg, 8: 1 fg, 9: 0.1 fg, n. c.: PCR mixture without template DNA.

이 결과는 nested PCR의 감도가 최저 DNA 양을 보여 줄 수 있을 만큼 폭발적이기 때문에 더욱 민감한 검출을 위한 Southern hybridization이 필요하지 않음을 보여주고 있다. 또한, 1차 PCR 증폭산물의 hybridization과 nested PCR 및 그 hybridization 결과가 동일하게 보여주는 1 fg이라는 증폭한계는 *C. destructans*의 약 1 copy 정도의 ITS 영역을 시사하고 있다. 이는 더욱 민감한 발색시약을 사용하는 hybridization과 같은 기술을 사용할 때조차 1 fg이라는 동일한 결과를 보여주고 있고, 그 증폭한계를 뛰어넘을 수는 없었기 때문이다(Fig. 4). 또한, 이것은 다른 식물병 진단을 위해 ITS 영역의 nested PCR에 기반한 종 특이적 primer를 개발한 많은 논문들에서 공통적으로 1 fg~0.1 fg의 증폭한계를 보여주는 것과도 일치하고 있다(Faggian 등, 1999; Ippolito 등, 2002).

또, 본 연구에서 사용된 DNA 추출법을 이용하여 *C. destructans*의 1개 포자로부터 얻을 수 있는 DNA 양을 측정하였을 때 약 50 fg이라는 수치가 나왔다(data not shown). 즉, 약 50 copy 이상의 rDNA 영역이 존재할 것으로 추산되어지는데, 이는 DNA 추출 시 손실되는 양을 감안하면, 단일 핵내 수백 copy로 알려진 rDNA 반복서열 개수의 예측범위라고 할 수 있다(Bruns 등, 1991).

식물체로부터 검출

병원성 검정을 위해 사용된 묘삼을 시기를 달리하여 뽑은 후 이 nested PCR 분석기법을 활용하여 뿌리에 감염된 *C. destructans*를 검출해 낼 수 있는지 확인하였다.

1차 PCR과 nested PCR을 거친 다음, agarose gel 전기영동을 통해 확인하였을 때, 접종 2주된 묘삼부터 4주된 묘삼들에서는 모두 *C. destructans*가 검출되었다. 먼저, 1

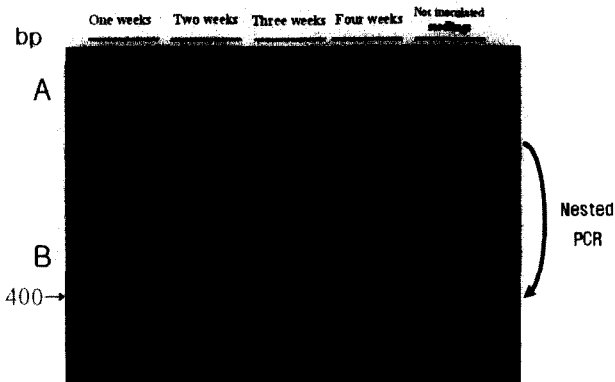


Fig. 5. Detection of *Cylindrocarpon destructans* from ginseng seedlings. **A:** The products of first round amplification by ITS 1, 4. **B:** 400 bp products of second round PCR using Dest 1 and 4 from the first round. **M:** 100 bp ladder, lane 1~4: ginsengs grown for one week after replanting in infested soil, 5~8: ginsengs grown for two weeks after replanting in infested soil, 9~12: ginsengs grown for three weeks after replanting in infested soil, 13~16: ginsengs grown for four weeks after replanting in infested soil, 17~20: not inoculated ginseng, n.c.: PCR mixture without template DNA.

차 PCR에서는 *C. destructans* 고유의 약 600 bp의 증폭 산물은 거의 증폭되지 않았고, 묘삽으로부터 온 약 700 bp 정도의 증폭산물만이 확인되었다. 따라서 감염 여부를 육안으로 확인하기 어려운 접종 2주째 묘삽으로부터 nested PCR을 통해 2차 PCR에서 *C. destructans*만을 특이적으로 증폭시킴으로써 뿌리썩음병균의 검출이 가능하였다(Fig 2, Fig 5). 이로써 식물체 유래의 DNA가 종 특이적 primer에 의한 증폭을 저해하지는 않는 것을 알 수 있다. 또한 접종 1주일된 묘삽에서 전혀 검출되지 않았던 것은 병원균이 기주와 처음 접촉하여 침입하기까지 일정한 시간이 필요하기 때문으로 생각된다.

요 약

*Cylindrocarpon destructans*는 인삼 및 수목에 뿌리썩음병을 일으키는 토양 전염성 식물병원균이다. 신속 정확한 검출 가능성을 알아보기 위하여 종 특이적인 primer와 nested PCR 기법을 활용하여 인삼 유묘로부터 뿌리썩음병균 *C. destructans*의 검출을 시도하였다. ITS 1과 ITS 4 primer를 이용한 1차 PCR 증폭산물에 대해 Dest 1과 Dest 4 primer로 2차 PCR 증폭을 실시한 결과 병원성이 확인된 *C. destructans*에서만 400 bp의 종 특이적 증폭산물을 얻을 수 있었다. 종 특이적 primer와 nested PCR 기법을 이용한 인삼뿌리썩음병균 DNA에 대한 반응 민감도는 최저 약 1 fg으로 나타나 단 몇 개의 포자만 존재해도 검

출이 가능하였다. 또한, nested PCR 기법은 실제 이병토양에 심었을 경우에도 *C. destructans*에 감염된 인삼 유묘로부터만 정확하게 병원균을 검출해 내었다. 종 특이적 primer와 nested PCR 기법을 이용한 본 연구 결과는 실제 재배농가에서 인삼 경작시 뿌리썩음병 진단에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- 정후섭. 1979. 인삼의 병. 한국식물병리학회 창립 15주년 기념 연구 논고 pp. 107-144.
- Chung, H. S. and Kim, C. H. 1980. Biological control of ginseng root rot with soil amendments. Proc. The 2nd International Ginseng Symposium pp. 67-74.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13.
- 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.
- Frederick, R. D., Snyder, C. L., Peterson, G. L. and Bonde, M. R. 2002. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology* 92: 217-227.
- Hamelin, R. C., Berube, P., Gignac, M. and Bourassa, M. 1996. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4026-4031.
- 홍순근, 오승환, 유연현. 1992. 인삼 토양 병해충 방제 및 농약 개발 연구. 한국인삼연구회 인삼연구보고서 pp. 121-160.
- Ippolito, A., Schena, L. and Nigro, F. 2002. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. *Eur. J. Pl. Pathol.* 108: 855-868.
- 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.
- 김충희, 김용기. 2002. 국내 토양병해 발생현황과 종합 관리방안. *식물병연구* 8: 146-161.
- Kong, P., Hong, C., Jeffers, S. N. and Richardson, P. A. 2003. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in irrigation water. *Phytopathology* 93: 822-831.
- Li, S. and Hartman, G. L. 2003. Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots and soil. *Plant Pathology* 52: 74-83.
- 목성근. 2000. 인삼재배. 표준영농교본. 농촌진흥청 pp 273.
- Nazar, R. N., Robb, E. J., Hu, X. V. and Lee, S. W. 1997.

- Development of PCR-based diagnostics for soil borne plant pathogens. *J. Plant Biol.* 40: 176-181.
- Sambrook, J., Fritsch, W. F. and Manuatus, T. 1989. Molecular cloning. Third edition. Cold Spring Harbor. New York.
- Samuels, G. and Brayford, D. 1990. Variation in *Nectria radicola* and its anamorph, *Cylindrocarpon destructans*. *Mycol. Research* 94: 433-442.
- Wallenhammar, A. C. and Arwidsson, O. 2001. Detection of *Plasmodiophora brassicae* by PCR in naturally infested soils. *Eur. J. Pl. Pathol.* 107: 313-321.
- 유성준, 조진웅, 유승현, 조재성. 1995. 인삼 근부병균 *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholt. 후막포자 발아에 관하여. *한국식물병리학회지* 11: 182-183.