

RESEARCH NOTE

양파 노균병균 *Peronospora destructor*의 분자계통학적 유연관계 분석과 PCR 검출기술 개발

백창기^{1†}, 황선경^{2†}, 박미정¹, 권영석³, 정희영^{4*}, 박중환¹

¹국립원예특작과학원 원예특작환경과, ²국립원예특작과학원 기술지원과, ³국립원예특작과학원 채소과, ⁴경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

Phylogenetic Analysis of Downy Mildew Caused by *Peronospora destructor* and a Method of Detection by PCR

Chang-Gi Back^{1†}, Sun-Kyung Hwang^{2†}, Mi jeong Park¹, Young-Seok Kwon³, Hee-Young Jung^{4*}, Jong-Han Park¹

¹Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea

²Technology Services Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea

³Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea

⁴School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

*Corresponding author: heeyoung@knu.ac.kr

†These authors contributed equally to this work.

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 December, 45(4): 386-393
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170046>

pISSN : 0253-651X
 eISSN : 2383-5249

Received: 7 November, 2017
 Revised: 25 November, 2017
 Accepted: 25 November, 2017

© 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.

Abstract

Onion downy mildew, caused by *Peronospora destructor*, is a major disease in onion cultivation areas in Korea. The causal fungi were collected and analyzed based on sequence similarity and molecular phylogenetic relationships of multi-gene sequences, including the internal transcribed spacer (ITS) region. All isolates from Changnyeong-gun, Hamyang-gun, and Hapcheon-gun in Gyeongnam province, and Muan-gun, Haenam-gun, and Sinan-gun in Jeonnam province were identical in the four types of gene sequences, indicating they were genetically the same strains. In this study, a PCR method was developed based on the ITS gene sequences to amplify the specific DNA fragment for *P. destructor* only. The detection limit of was total genomic DNA of the *P. destructor* and the plant 0.7 ng/μL. Therefore, the developed PCR method could be used to detect *P. destructor* effectively from symptomless onion leaves.

Keywords: Detection, Downy Mildew, Onion, PCR, *Peronospora destructor*

양파(*Allium cepa*)는 백합과에 속하는 식물로서, 한국뿐만 아니라 전 세계적으로 식용하고 있는 채소 중 하나이다. 한국농촌경제연구원에 따르면 국내에서는 1인당 양파 소비량이 24.8 kg에 달하며, 마늘, 고추 등 다른 양념채소에 비해 소비량이 많고, 국내에서는 109만 톤 가량 생산되고 있다. 양파 재배기간 중 잎에 발생하는 병은 검은무늬병(*Alternaria porri*), 검은곰팡이병(*Aspergillus niger*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis* spp.), 탄저병(*Colletotrichum circinans*), 노균병(*Peronospora destructor*), 검은점무늬마름병(*Septoria alliacea*), 잎마름병(*Stemphylium botryosum*), 꺾부기병(*Tubercinia cepulae*)이 있다[1]. 이 중 가장 문제시 되는 병은 *P. destructor*에 의한 노균병이지만 순활물곰팡이라 인공배양이 되지 않고, 초기 감염시기를 예측하기 어려워 방제 방법 연구가 미미하였다. 최근 유포기에 발생하는 노균병 방제를 위한 살균제 연구가 진행된 바 있다[2]. 따라서 본 연구에서는 육안상 건전한 잎에서 양파 노균병균을 검출할 수 있는 PCR 검출법을 개발하여 노균병균의 감염시기를 예측하고, 적절한 방제시기를 선정하는데 활용하고자 한다.

균주 수집 및 분자계통학적 유연관계 분석

우리나라 양파 재배지인 경남 창녕군, 함양군, 합천군과 전남 무안군, 신안군, 해남군에서 양파 잎에 발생한 노균병균 90균주를 수집하였다(Table 1). 수집한 균주의 계통학적 분석을 위해 각각의 노균병균 total genomic DNA를 추출하여 internal transcribed spacer (ITS) 영역의 유전자 염기서열을 분석하기 위해 ITS1F/ITS4 primer set를 이용하여[3], polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였다. PCR 반응의 조건은 ITS 영역은 94°C에서 2분간 pre-denaturation을 진행한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여 총 35회 진행하였다. 이후 72°C에서 final extension을 5분간 수행하였다[3]. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 한 후 ethidium bromide로 염색하고 UV illuminator 상에서 목적하는 DNA 단편의 증폭여부를 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 EXOSAP-IT (GE Healthcare, Amersham, UK)을 이용하여 정제 후 염기서열 분석(SolGent, Daejeon, Korea)을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 GENETYX 프로그램을 이용하여 각각의 상동성을 비교하였다. 우선 ITS 영역 유전자 염기서열 분석을 수행한 결과, 경남 창녕군, 함양군, 합천군과 전남 무안군, 신안군, 해남군에서 채집한 노균병균 90균주 모두 100%의 상동성을 보였다. 그리고 지역별로 양파를 재배하는 방식이 논이나 밭을 이용하였는데 이러한 재배 방식에 상관없이 모두 100%의 상동성을 보였다. 추가적인 유전자 분석을 위해 각 지역별로 2개씩 총 12균주를 선발하여 cytochrome c oxidase subunit II (cox2) 유전자는 cox2F1/cox2R1 primer set를 사용하였다[4]. 또한, nicotinamide adenine dinucleotide hydroxide (NADH) dehydrogenase subunit 1 (NAD1) 유전자는 NADHF1/NADHR1 primer set를, beta-tubulin 유전자는 TUBUF2/TUBUR2 primer set로 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하였다[5]. 그 결과, 앞선 ITS 유전자 염기서열 분석 결과와 동일하게 경남 3개 지역과 전남 3개 지역에서 채집하여 분석한 노균병균 12균주는 모두 3종의 유전자 염기서열이 100% 상동성을 보였다. 따라서, 우리나라 양파 주요 재배지역에서 발생하는 노균병균은 모두 동일한 종으로 판단되었다. 각각의 유전자 염기서열 분석 결과를 NCBI의 BLAST search를 통해 GenBank에 등록된 근연종들과의 유사도

Table 1. Isolate source of *Peronospora destructor* used in this study

No.	Name	Location	Cultivate areas	Accession no. of ITS
1	Perono-001	Changnyeong-gun, GN	RP	LC331696
2	Perono-002	Changnyeong-gun, GN	RP	LC331697
3	Perono-003	Hapcheon-gun, GN	DF	LC331698
4	Perono-004	Hapcheon-gun, GN	RP	LC331699
5	Perono-005	Hamyang-gun, GN	RP	LC331700
6	Perono-006	Hamyang-gun, GN	RP	LC331701
7	Perono-007	Muan-gun, JN	DF	LC331702
8	Perono-008	Muan-gun, JN	DF	LC331703
9	Perono-009	Sinan-gun, JN	DF	LC331704
10	Perono-010	Sinan-gun, JN	DF	LC331705
11	Perono-011	Haenam-gun, JN	DF	LC331706
12	Perono-012	Haenam-gun, JN	RP	LC331707
13	Perono-013	Changnyeong-gun, GN	RP	-
14	Perono-014	Changnyeong-gun, GN	RP	-
15	Perono-015	Changnyeong-gun, GN	RP	-
16	Perono-016	Changnyeong-gun, GN	RP	-
17	Perono-017	Changnyeong-gun, GN	RP	-
18	Perono-018	Changnyeong-gun, GN	RP	-
19	Perono-019	Changnyeong-gun, GN	RP	-
20	Perono-020	Changnyeong-gun, GN	RP	-
21	Perono-021	Changnyeong-gun, GN	RP	-
22	Perono-022	Changnyeong-gun, GN	RP	-
23	Perono-023	Changnyeong-gun, GN	RP	-
24	Perono-024	Changnyeong-gun, GN	RP	-
25	Perono-025	Changnyeong-gun, GN	RP	-
26	Perono-026	Hapcheon-gun, GN	DF	-
27	Perono-027	Hapcheon-gun, GN	DF	-
28	Perono-028	Hapcheon-gun, GN	RP	-
29	Perono-029	Hapcheon-gun, GN	RP	-
30	Perono-030	Hapcheon-gun, GN	RP	-
31	Perono-031	Hapcheon-gun, GN	RP	-
32	Perono-032	Hapcheon-gun, GN	RP	-
33	Perono-033	Hapcheon-gun, GN	RP	-
34	Perono-034	Hapcheon-gun, GN	RP	-
35	Perono-035	Hapcheon-gun, GN	RP	-
36	Perono-036	Hapcheon-gun, GN	RP	-
37	Perono-037	Hapcheon-gun, GN	RP	-
38	Perono-038	Hapcheon-gun, GN	RP	-
39	Perono-039	Hapcheon-gun, GN	RP	-
40	Perono-040	Hapcheon-gun, GN	RP	-
41	Perono-041	Hapcheon-gun, GN	RP	-

GN, Gyeongnam province; JN, Jeonnam province; RP, rice paddy; DF, dry field; ITS, internal transcribed space.

Table 1. (Continued)

No.	Name	Location	Cultivate areas	Accession no. of ITS
42	Perono-042	Hamyang-gun, GN	RP	-
43	Perono-043	Hamyang-gun, GN	RP	-
44	Perono-044	Hamyang-gun, GN	RP	-
45	Perono-045	Hamyang-gun, GN	RP	-
46	Perono-046	Hamyang-gun, GN	RP	-
47	Perono-047	Hamyang-gun, GN	RP	-
48	Perono-048	Hamyang-gun, GN	RP	-
49	Perono-049	Hamyang-gun, GN	RP	-
50	Perono-050	Hamyang-gun, GN	RP	-
51	Perono-051	Hamyang-gun, GN	RP	-
52	Perono-052	Muan-gun, JN	DF	-
53	Perono-053	Muan-gun, JN	DF	-
54	Perono-054	Muan-gun, JN	DF	-
55	Perono-055	Muan-gun, JN	DF	-
56	Perono-056	Muan-gun, JN	DF	-
57	Perono-057	Muan-gun, JN	DF	-
58	Perono-058	Muan-gun, JN	DF	-
59	Perono-059	Muan-gun, JN	DF	-
60	Perono-060	Muan-gun, JN	DF	-
61	Perono-061	Muan-gun, JN	DF	-
62	Perono-062	Muan-gun, JN	DF	-
63	Perono-063	Muan-gun, JN	DF	-
64	Perono-064	Muan-gun, JN	DF	-
65	Perono-065	Muan-gun, JN	DF	-
66	Perono-066	Muan-gun, JN	DF	-
67	Perono-067	Muan-gun, JN	DF	-
68	Perono-068	Sinan-gun, JN	DF	-
69	Perono-069	Sinan-gun, JN	DF	-
70	Perono-070	Sinan-gun, JN	DF	-
71	Perono-071	Sinan-gun, JN	DF	-
72	Perono-072	Sinan-gun, JN	DF	-
73	Perono-073	Sinan-gun, JN	DF	-
74	Perono-074	Sinan-gun, JN	DF	-
75	Perono-075	Sinan-gun, JN	DF	-
76	Perono-076	Sinan-gun, JN	DF	-
77	Perono-077	Sinan-gun, JN	DF	-
78	Perono-078	Sinan-gun, JN	DF	-
79	Perono-079	Sinan-gun, JN	DF	-
80	Perono-080	Sinan-gun, JN	DF	-
81	Perono-081	Haenam-gun, JN	RP	-
82	Perono-082	Haenam-gun, JN	RP	-

GN, Gyeongnam province; JN, Jeonnam province; RP, rice paddy; DF, dry field; ITS, internal transcribed space.

Table 1. (Continued)

No.	Name	Location	Cultivate areas	Accession no. of ITS
83	Perono-083	Haenam-gun, JN	DF	-
84	Perono-084	Haenam-gun, JN	DF	-
85	Perono-085	Haenam-gun, JN	DF	-
86	Perono-086	Haenam-gun, JN	DF	-
87	Perono-087	Haenam-gun, JN	DF	-
88	Perono-088	Haenam-gun, JN	DF	-
89	Perono-089	Haenam-gun, JN	DF	-
90	Perono-090	Haenam-gun, JN	DF	-

GN, Gyeongnam province; JN, Jeonnam province; RP, rice paddy; DF, dry field; ITS, internal transcribed space.

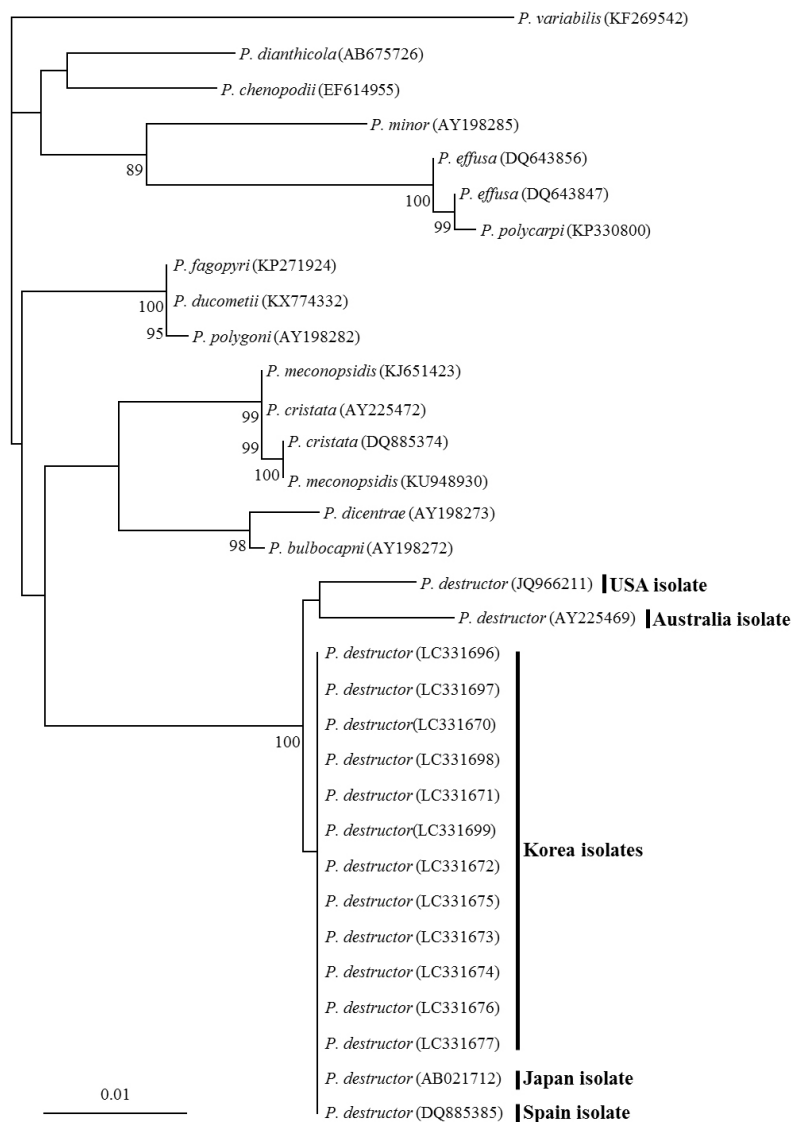


Fig. 1. Phylogenetic tree of *Peronospora destructor* and allied species based on the internal transcribed spacer (ITS) region. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 100 replicates. *Peronospora variabilis* (KF269542) was used as an outgroup.

를 확인한 결과, ITS 영역은 일본, 스페인에서 보고한 양파 노균병균 *Peronospora destructor*와 99% 이상의 유사도를 보였고, *cox2* 유전자 염기서열은 한국에서 보고한 *P. destructor*와 99% 이상의 유사도를 보였다. 이에 반해 NAD1 유전자 염기서열은 *P. destructor*가 등록되어 있지 않고, *Peronospora*속 근연종 3종과 95%의 유사도를 보였고, *beta-tubulin* 유전자 염기서열은 *Peronospora*속 염기서열이 없어, 난균문에 속하는 *Phytophthora*속 90%의 유사도를 보였다. ITS 유전자 염기서열 분석 결과를 바탕으로 분자계통학적 유연관계를 분석하였다. NCBI에 등록된 *Peronospora*속 근연종의 염기서열을 수집하고 MEGA 6.0 프로그램을 사용하여[6], 노균병균 균주와 근연종 간의 유연관계 분석을 수행하고, neighbor-joining법으로 계통수를 작성하였다[7, 8]. 계통분석을 위한 outgroup으로는 *Peronospora variabilis*을 사용하였다. 분석 결과, 우리나라에 발생하는 양파 노균병균은 *P. destructor*에 속하였고, 일본과 스페인에서 발생하는 균주와 하나의 그룹을 형성하였다(Fig. 1). 하지만 미국과 호주에서 보고된 노균병균[9]과는 유전적 차이가 발견되었다. 따라서, 4종의 유전자 염기서열의 상동성 비교 결과와 분자계통학적 유연관계를 분석한 결과를 종합해볼 때, 경남 창녕군과 전남 무안군에 발생하는 노균병균은 모두 동일한 균으로 최종 확인되었다.

양파 노균병균 PCR검출법 개발

앞서, 우리나라 양파 주산지에 발생하는 노균병균이 동일한 균주임을 확인하여 ITS 유전자 염기서열을 이용하여 노균병균 검출용 프라이머를 제작하였다. 노균병균 검출용 프라이머는 Perono-4F (5'-CTG CTG GTG GCA TGT TTT TG-3')와 Perono-1R (5'-CTA GCC ATA CTG ACA GCC TTC-3')이며, PCR 반응의 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 진행한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension을 1 cycle로 하여 총 35회 진행하였다. 이후 72°C에서 final extension을 5분간 수행하였다. 그 결과, 487 bp 크기의 목적하는 노균병균의 DNA 단편이 증폭되었다. 양파 잎에 발생하는 곰팡이병과 오이 노균병균의 비특이적 반응 검정을 위해, 잎마름병균(*Stemphylium* sp.), 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 오이 노균병균(*Pseudoperonospora cubensis*)으로 검정한 결과, 노균병균에서만 특이적으로 DNA 단편이 증폭되었다.

양파 노균병균 검출용 PCR법의 검출한계를 검정하기 위해, 노균병균이 감염된 식물체에서 추출한 주형 DNA (농도, 70 ng/μL)를 멸균수를 이용하여 10배, 100배, 1,000배로 순차적으로 희석하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용하는 중합효소는 manual 타입과 premix 타입 두 가지 모두를 이용하여 검정하였다. 그 결과, PCR에 사용하는 중합효소의 종류에 상관없이 100배 희석액(농도, 0.07 ng/μL)까지 충분히 노균병균의 감염이 확인되었다.

양파 노균병균 검출용 PCR법을 이용하여 2015년 12월부터 2주 간격으로 육안상 건전한 양파 잎을 채집하여 노균병균의 감염유무를 조사하였다. 그 결과, 12월 4째주부터 잎에서 노균병의 감염이 확인되었다. 따라서 기존에 2월에 육안상으로 확인이 가능한 노균병은 2월 상순 감염이 아닌 이미 월동기 동안 감염이 되는 것으로 확인되었다. 또한, 양파 재배농가에서 2월부터 3월 사이 건전한 양파에 비해 생장이 좋지 못한 양파들을 보통 1차 노균병에 감염되었다고 지칭한다. 2016년 3월 전남 무안군 양파 재배지에서 육안상 건전한 양파와 생육이 불량

한 양파를 채집하여 잎, 줄기, 인경, 뿌리 부분으로 나눠 70% 에탄올과 1% 차아염소산 나트륨으로 표면소독하고 건조시켰다. 각 부위별로 total genomic DNA를 추출하고, 이를 주형 DNA로 사용하여 노균병균 검출용 PCR법으로 진단하였다. 그 결과, 생육이 불량한 양파는 잎, 인경, 줄기, 뿌리 등에서 모두 노균병균의 감염이 확인되어, 양파 재배농가에서 말하는 1차 노균병에 감염된 것으로 확인하였다. 반면 육안상 건전하게 보인 양파에서도 잎과 뿌리 부근에서 노균병의 감염을 확인하였다. 본 PCR 검출법은 육안상 건전하게 보이는 양파에서도 노균병균이 검출되었다. 따라서, 노균병균 검출용 PCR법을 활용하면 육안상으로 노균병 감염유무를 확인하기 어려운 시기에도 충분히 노균병 감염유무를 짧은 시간 내에 확인이 가능하였다.

양파 노균병균에 대한 연구는 주로 방제용 살균제 선발 및 친환경 농자재를 이용한 관리 등의 연구가 많았다[2, 10-12]. 또한, 노균병 진단을 위한 포자 간지 검정방법 등 진단을 위한 연구도 진행되었다[13]. 국외에서는 양파 노균병균의 분생포자를 검출하기 위해 단일 클론 항체를 이용한 검출법도 개발된 바 있다[14]. 이번에 개발한 양파 노균병 PCR 검출법은 양파 재배지별 노균병의 감염시기를 알 수 있고, 지역별 노균병 초기 감염시기를 예측 가능하다. 이는 양파 노균병균 감염 초기 방제를 통해 효과적으로 병을 관리할 수 있는 방안이 마련되는 것이다. 또한, 본 검출기술을 활용하여 공정육묘 혹은 자가육묘로 재배되는 양파 육묘에서도 노균병 감염 확인이 가능하므로 건전한 육묘 생산과 초기 방제가 가능하다.

적 요

우리나라 양파 재배지의 주요 곰팡이병인 양파 노균병의 원인균 *Peronospora destructor*를 채집하여, internal transcribed spacer (ITS) 영역을 포함한 4개 유전자의 염기서열을 분석하여 상동성 비교와 분자계통학적 유연관계를 분석하였다. 그 결과, 경남 창녕군, 함안군, 함천군과 전남 무안군, 신안군, 해남군에 발생하는 *P. destructor*의 4종의 유전자 염기서열 모두 100% 상동성을 보였고, 유연관계 분석에서도 모두 동일한 계통으로 확인되었다. 본 연구에서는 ITS 영역 유전자 염기서열을 이용하여 *P. destructor* 검출용 PCR법을 개발하였고, 노균병균만을 특이적으로 검출하였다. 또한 식물체를 포함한 total genomic DNA로 검출한계를 검정한 결과, 0.07 ng/μL까지 가능하였다. 양파 노균병균 검출용 PCR법은 육안상 병징이 나타나지 않을 때도 충분히 감염유무가 확인되었다.

Acknowledgements

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (Project No. PJ011988012017)” Rural Development Administration, Republic of 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. Mo CY, Lee JH, Ko SJ, Yang KY. Control efficacy of several fungicides against downy mildew of onion at nursery seedling stage. *Res Plant Dis* 2016;22:208-12.
3. 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, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
4. Burger G, Lavrov D, Forget L, Lang BF. Sequencing complete mitochondrial and plastid genomes. *Nat Protoc* 2007;2:603-14.
5. Kroon LP, Bakker FT, van den Bosch GB, Bonants PJ, Flier WG. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequence. *Fungal Genet Biol* 2004;41:766-82.
6. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
7. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
8. Back CG, Lee SY, Jung HY. Molecular phylogenetic analysis of *Botrytis cinerea* occurring in Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:138-43.
9. Scott JB, Hay FS, Wilson CR. Phylogenetic analysis of the downy mildew pathogen of oilseed poppy in Tasmania, and its detection by PCR. *Mycol Res* 2004;108:198-205.
10. Develash RK, Sugha SK. Management of downy mildew (*Peronospora destructor*) of onion (*Allium cepa*). *Crop Prot* 1997;16:63-7.
11. Gisi U, Sierotzki H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur J Plant Pathol* 2008;122:157-67.
12. Jung BJ. Study on the control of downy mildew of onion with several new fungicide. *Korean J Plant Prot* 1964;3:11-4.
13. Choi IH, Lee ET, Kim CW, Hwang EJ, Nam SS. Development of simple test methods against spore of a downy mildew, *Peronospora destructor*, a disease of Onion. *Korean J Horti Sci Technol (suppl 1)* 2012;30:110.
14. Kennedy R, Wakeham AJ. Development of detection systems for the sporangia of *Peronospora destructor*. *Eur J Plant Pathol* 2008;122:147-55.