

Phytophthora species의 분자유전학적 분류 및 RAPD fingerprinting을 이용한 P. infestans-specific 분자마커의 선발

김경수 · 신한성 · 김희종 · 우수진 · 함영일¹ · 신관용¹ · 이정운¹
김병섭² · 심재욱³ · 이민웅³ · 이윤수*

¹농촌진흥청 고령지시험장, ²강릉대학교 원예학과,
³동국대학교 응용생물학과, 강원대학교 식물응용과학부

Molecular Genetic Classification of *Phytophthora* Species and *P. infestans*-specific Marker Selection by RAPD Fingerprinting

Kyoung-Su Kim, Whan-Sung Shin, Hee-Jong Kim, Su-Jin Woo, Young-Il Ham¹,
Kwan-Yong Shin¹, Jeong-Oon Lee¹, Byung-Sup Kim², Jae-Ouk Shim³,
Min-Woong Lee³ and Youn-Su Lee*

¹National Alpine Agricultural Experiment Station, RDA, Korea
²Department of Horticulture, Kangnung National University, Korea
³Department of Applied Biology, Dongguk University, Korea
Division of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT: Taxonomic and genetic analysis of *Phytophthora* species belonging to six different morphological groups (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI) was conducted using RAPD method. Amplified fragments ranged 0.3~3.2 kb in their molecular weights. Among total of 145 bands, there were 109 polymorphic bands. Seven isolates of *P. infestans* showed high similarities of 0.92~0.99, and *P. infestans* isolate 3 from potato showed similarities of 0.93~0.95 compared with other *P. infestans*. Among isolates of *P. capsici*, similarities of 0.77~0.86 were observed and they were grouped in 80% level. *P. cinnamomi* and *P. cryptogea* isolates which belonging to group GVI showed very similar RAPD fingerprinting pattern. Primers OPA-04, OPA-17, OPA-18, OPA-19, and OPB-12 showed high level of differences among the tested isolates in major bands and molecular weights. The similarity between the isolates was 0.67. *P. megasperma* and *P. sojae* in group GV showed similarity of 0.65. These two isolates showed big differences in single major band in reactions with primers OPA-08, OPA-17, and OPA-19. *Phytophthora*-specific and *P. infestans*-specific molecular markers were also selected with one of the random primers tested. In reaction with primer OPA-20, all the genus *Phytophthora* showed common band at 600 bp, and all the *P. infestans* isolates showed specific band at 680 bp. These markers can be useful for identification of *Phytophthora* species or *P. infestans*. As a result, *P. infestans* isolated from tomato and/or potato can easily be differentiated from other *Phytophthora* species with this primer.

KEYWORDS: *Phytophthora* species, *P. infestans*, RAPD fingerprinting, Molecular marker

Genus *Phytophthora*에는 약 40여 종이 알려져 있으며 Anton de Bary가 1876년에 최초로 *Phytophthora infestans*를 명명했고, Waterhouse(1963), Stamps(1990) 등은 형태학적인 기준으로 이들을 크게 6개의 그룹으로 분류했다. *Phytophthora*는 주로 토양에 서식하여 과실, 괴경, 뿌리, 잎 등의 썩음병과 괴사병, 시들음병, 역병 등을 야기시킨다(Holliday, 1989).

토마토와 더불어 감자에 역병을 일으키는 *P. infestans*는 작물의 생육기간 뿐만아니라 저장과 운송 중에도 병해를 야기시키고 있다(Fry et al., 1993; Peterson et al., 1992). 서

늘하고 습한 기상조건에서 병해가 더욱 심각해지는 *P. infestans*의 병징은 일반적으로 하위엽의 가장자리에서부터 발병하여, 원형 또는 부정형의 수침상 반점형태를 보이고 지속적인 과습 조건하에서 식물체 전체가 썩게되고 특징적인 냄새를 풍긴다(Clarke, 1983). 유럽과 미국 등에 막대한 경제적 손실(Irwin and Dale, 1982)을 끼친 감자역병은 1919년 우리나라에서도 처음으로 발견됐으며 이는 수입감자의 괴경을 통한 국내 침입으로 추정되고 있다. 이후, *P. infestans*에 의한 감자 역병은 전국적으로 확산됐으며 *P. infestans*에 의한 감염과 연속적인 2차, 3차 감염으로 진행된 감자생산과 저장에 저해가 되고 있으며 방제비용을 배가시키고 있다.

*Corresponding author

과거에는 대부분의 fungi를 분류하고 동정하기 위해 형태학적 관점에서 연구를 했지만 *Phytophthora*를 포함한 몇몇 genera의 경우 많은 어려움이 뒤따랐다. 형태학적 특성이 매우 다양하다는 것과 분리를 위한 뚜렷한 특징 보다 서로 간에 높은 연관성 때문에 새롭게 분자생물학적인 기법을 이용하여 *Phytophthora* 종에 특이한 DNA probe를 구축하거나 mitochondrial DNA 나 genomic DNA의 RFLP 등으로 분류와 동정 및 진단 등에 이용하고 있다(Goodwin *et al.*, 1992).

PCR을 이용한 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNAs) 분석은 극히 소량의 genomic DNA를 사용하기 때문에 노동력과 시간을 크게 줄일 수 있다는 장점과 방사선 동위원소를 사용하지 않는 높은 안전성을 갖고 있어 널리 이용되고 있다(Arnheim, 1990). 감자와 토마토 역병균인 *P. infestans*와 다른 *Phytophthora* species의 species-specific molecular marker 개발을 위한 예비 단계로 감자와 토마토에서 분리한 *P. infestans*와 다른 *Phytophthora* species간의 계통 분류학적 연구와 유전적 특성을 비교 분석하고 RAPD fingerprinting을 통한 species-specific molecular marker 선발을 위하여 실험이 수행되었다.

재료 및 방법

Fungal strains and genomic DNA isolation

본 실험을 수행하기 위하여 균주는 농업과학기술원, 충남대, 그리고 강릉대에서 분양받은 것과 이병조직에서 직접 분리한 것을 사용하였다(Table 1). 균주의 genomic DNA를

추출하기 위해 Rye liquid broth(rye 60 g, 20 g/l)에서 shaking incubator를 이용하여 20°C에서 10일간 배양한 균 사체를 filtering하고 막자사발과 액체질소를 가지고 곱게 마쇄했다. 마쇄한 균사 2~5 g을 15 ml의 extraction buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 10% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, pH 8.0)에 회석한 후 65°C의 항온수조에서 1시간 동안 열을 가하고 동량의 phenol : chloroform : isopropanol = 25 : 24 : 1으로 처리한 후, 이어 13,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하고 난 후 상층액과 동량의 chloroform : isopropanol = 24 : 1을 섞어 다시 원심분리하고 상층액을 추출했다. 추출한 상층액은 미리 차갑게 한 2.5 volume의 100% ethanol을 가지고 DNA를 침전시킨 후 70%의 ethanol로 세척하였다. 이후 건조시킨 DNA를 TE buffer(10 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8.0)에 녹인 후 RNase를 처리하고 gel 상에서 농도를 측정하였다.

Polymerase chain reaction(PCR), marker selection, and genetic analysis

본 실험에서 사용한 10 base oligonucleotide primer는 Operon Technologies Inc., USA에서 구입했다(Table 2). PCR 증폭은 Williams(1990)의 수정된 방법으로 수행하였다. 0.5 ml의 effendorf tube를 사용하여 총 20 μ l volume의 반응혼합물을 조성하였고 PTC-100™(MJ Research Inc.)을 이용하여 증폭을 수행하였다. 반응혼합물은 10 ng의 genomic DNA, 0.5 mM의 primer, 1 unit의 Taq DNA polymerase(Dynazyme™), 10 \times reaction buffer, 20 mM의 dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)로 하였다. 그리고 PCR 프로그램

Table 1. Fungal isolates used in this study for RAPD

Isolate	<i>Phytophthora</i> species	Group	Host plant
1	<i>Phytophthora infestans</i>	GIV	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
2	<i>P. infestans</i>	GIV	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
3	<i>P. infestans</i>	GIV	<i>Solanum tuberosum</i> L.
4	<i>P. infestans</i>	GIV	<i>Solanum tuberosum</i> L.
5	<i>P. infestans</i>	GIV	<i>Solanum tuberosum</i> L.
6	<i>P. infestans</i>	GIV	<i>Solanum tuberosum</i> L.
7	<i>P. infestans</i>	GIV	<i>Solanum tuberosum</i> L.
8	<i>P. infestans</i>	GIV	<i>Solanum tuberosum</i> L.
9	<i>P. megasperma</i>	GV	<i>Solanum tuberosum</i> L.
10	<i>P. sojae</i>	GV	<i>Glycine max</i> Merr.
11	<i>P. cactorum</i>	GI	-
12	<i>P. cinnamomi</i>	GVI	-
13	<i>P. citricola</i>	GIII	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill.
14	<i>P. cryptogea</i>	GVI	<i>Brassica campestris</i> subsp. <i>napus</i> var. <i>pekinensis</i> Makino
15	<i>P. capsici</i>	GII	<i>Capsicum annuum</i> L.
16	<i>P. capsici</i>	GII	<i>Capsicum annuum</i> L.
17	<i>P. capsici</i>	GII	<i>Capsicum annuum</i> L.
18	<i>P. capsici</i>	GII	<i>Capsicum annuum</i> L.
19	<i>P. capsici</i>	GII	<i>Capsicum annuum</i> L.
20	<i>P. capsici</i>	GII	<i>Capsicum annuum</i> L.
21	<i>Phytophthora</i> sp.	-	<i>Solanum tuberosum</i> L.

Table 2. The list of primers and their base sequences used for RAPD

Primer No.	Base sequences (5' to 3')	No. of bands	Remark
OPA01	CAG GCC CTT C	20(14) ^a	Operon Tech. Inc.
OPA04	AAT CGG GCT G	15(9)	
OPA07	GAA ACG GGT G	15(11)	
OPA08	GTG ACG TAG G	14(11)	
OPA17	GAC CGC TTG T	14(11)	
OPA18	AGG TGA CCG T	16(11)	
OPA19	CAA ACG TCG G	18(14)	
OPA20	GTT GCG ATC C	14(13)	
OPB12	CCT TGA CGC A	19(15)	
Total		145(109)	

^aThe numbers in the parentheses are the numbers of polymorphic bands for each.

램은 초기 denaturing 단계를 95°C에서 5분간 실행했고 최종 신장단계는 72°C에서 10분간 지속시키고 종결하였으며,

증폭은 94°C에서 1분간 denaturing 과정과 45°C에서 1분간의 annealing 단계 그리고 72°C에서 2분간의 extending 과정을 1회 증폭으로 45회 반복 증폭하였다. 1.5% agarose gel 을 사용하여 120V에서 2~3시간 동안 전기영동한 후, ethidium bromide(10 mg/ml)로 염색하고 UV transilluminator 상에서 사진 촬영하여 보관하였다. 각 균주의 primer에 의한 증폭 pattern의 비교는 동일한 크기의 band 존재여부로 행하였고 같은 크기의 band는 동일한 것으로 취급하였다. 균주간의 유사도(similarity coefficient)는 다음의 공식으로 계산하였다.

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

F: Similarity coefficient.

N_{xy}: The number of PCR products shared by isolates X and Y.

N_x + N_y: Total number of PCR products in isolates X and Y, respectively.

Dendrogram은 위의 유사도 값을 근거로 UPGMA(Un-

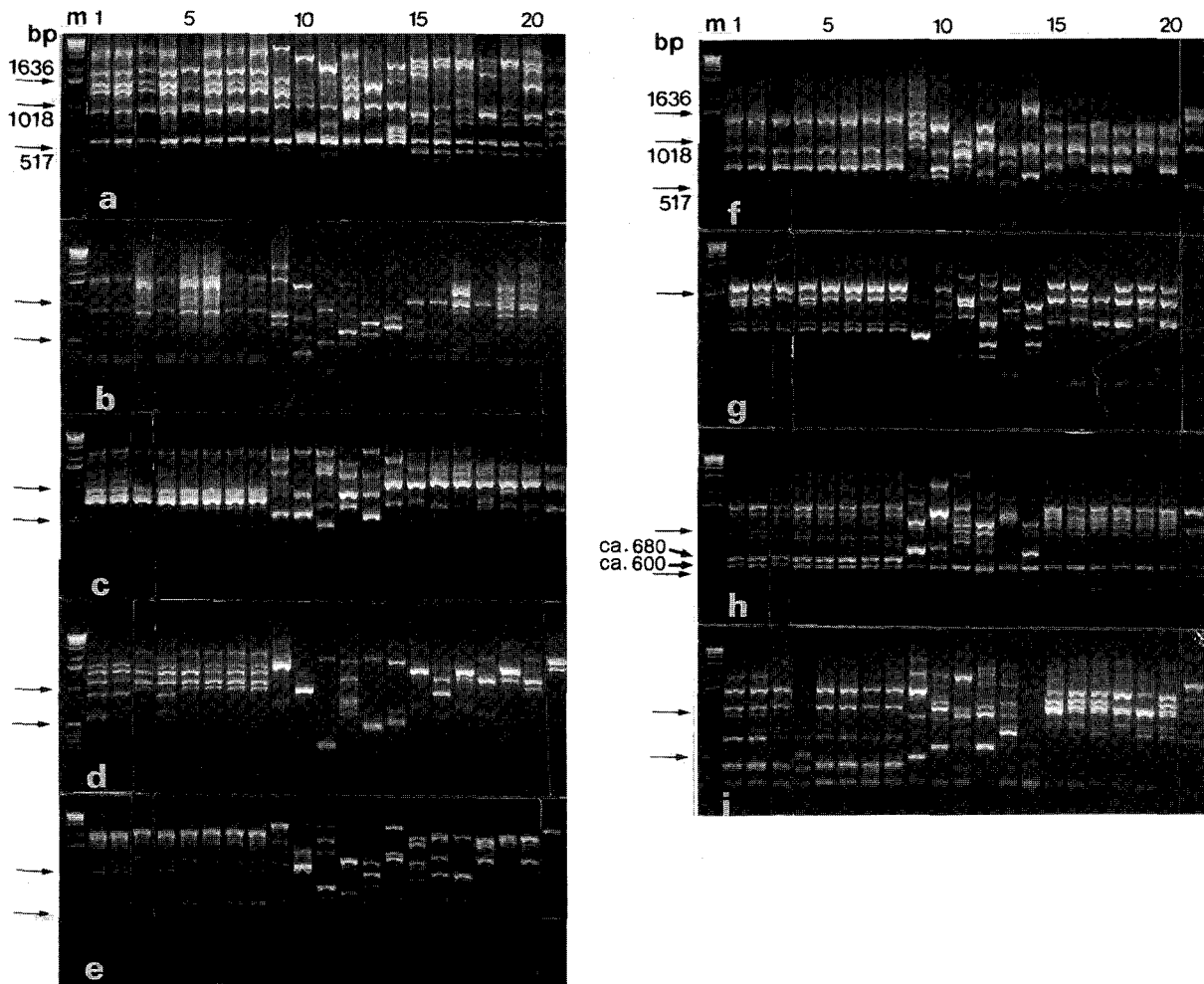


Fig. 1. PCR amplified genomic DNAs from the twenty-two isolates of *Phytophthora* species. Lane m is molecular weight marker and numbers on top of the lane indicate the isolate number of each species as shown in Table 1. The primers used were a; OPA01, b; OPA04, c; OPA07, d; OPA08, e; OPA17, f; OPA18, g; OPA19, h; OPA20, and i; OPB12.

weighted Paired Group Methods with Arithmetic Average)법을 이용해 작성하였다. 유사도와 dendrogram의 작성은 NTSYS-pc program Ver. 1.70을 이용하였다(Rohlf, 1988).

결과 및 고찰

본 실험에서는 감자의 이병조직에서 직접 분리한 isolate 3과 토마토에서 분리한 균주 등 모두 8개의 *Phytophthora infestans*와 6개의 *P. capsici*와 함께 여러 종의 *Phytophthora* 균주를 사용했다(Table 1). Table 2에 명시한 primer를 가지고 RAPD를 수행했으며 증폭된 DNA 절편들의 크기는 0.3~3.2 kb의 범위에 속했다. 분석시 오차를 줄이기 위해서 전체 22개의 isolates 모두 count 할 수 있는 band 만을 분석에 이용했으며 전체 145개의 밴드 중에 109개의 polymorphic band를 얻을 수 있었다(Fig. 1).

OPA-01 primer를 사용했을 때 감자의 이병조직에서 직접 분리한 균주인 isolate 3과 토마토에서 분리한 *P. infestans*와는 매우 유사한 패턴을 보였으며 이는 OPA-07, OPA-18, OPA-19, OPA-20, OPB-12의 primer에서도 같은 양상을 보여 형태학적으로 잠정 동정한 균주 isolate 3이 *P. infestans*라는 사실을 뒷받침했다. 이러한 결과는 기주와 상관없이 분리된 *P. infestans* 균주간에는 유전적 특성에 커다란 차이가 없음을 보여준다. *P. capsici*는 OPA-20 primer에서 6개의 *P. capsici*가 비슷한 유형의 밴드 형태를 보였고 다른 primer에서는 매우 상이한 밴드를 보여 *P. infestans* 보다 종내 유전양상이 더욱 다양하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

Primer OPA-20을 사용하여 genus *Phytophthora* 내에 공

통으로 존재하는 600 bp의 common band와 *P. infestans*에만 형성되는 680 bp의 specific band의 marker를 선별할 수 있었다. 토마토 이병조직에서 분리한 7개의 *P. infestans* 간에는 최저 0.92에서 최고 0.99의 높은 유사성을 보였으며 감자에서 분리한 isolate 3과는 0.93~0.95를 보여 유전적 유사정도가 기주에 상관없이 유사함을 확인할 수 있었으며 *P. capsici* 간에는 0.77~0.86의 유연성을 보였다(Table 3, Fig. 1). 8개의 *P. infestans*는 약 94% 수준에서 그룹을 형성했으며, *P. capsici*는 약 80% 수준에서 효과적으로 그룹화 됨을 알 수 있었다. 또한 미종의 isolate 21은 약 70% 정도에서 *P. capsici* 그룹에 속했다(Fig. 2, Table 3).

형태학적으로 GVI에 속하는 *P. cinnamomi*와 *P. cryp-*

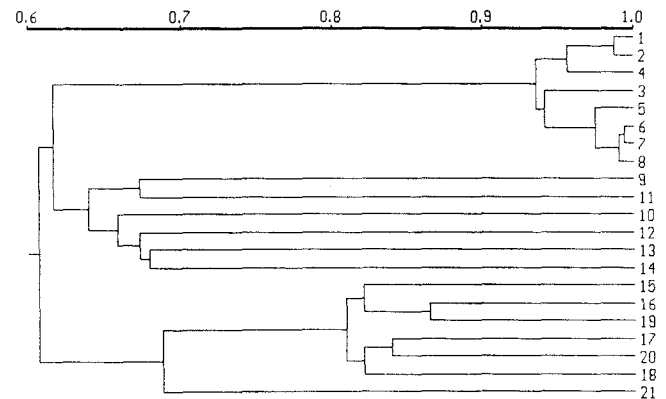


Fig. 2. UPGMA dendrogram showing the relationship among the *Phytophthora* species based on 1.5% agarose gel in RAPD.

Table 3. Similarity matrix based on the number of shared bands by the compared *Phytophthora* species and their crossed isolates of *Phytophthora* species on the 1.5% agarose gel in RAPD analysis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2 ^a	0.987																			
3	0.944	0.944																		
4	0.956	0.956	0.925																	
5	0.919	0.932	0.950	0.925																
6	0.938	0.950	0.944	0.944	0.981															
7	0.932	0.944	0.938	0.938	0.975	0.993														
8	0.925	0.938	0.932	0.932	0.969	0.987	0.993													
9	0.654	0.654	0.660	0.660	0.623	0.641	0.635	0.629												
10	0.641	0.654	0.648	0.635	0.648	0.641	0.635	0.629	0.654											
11	0.623	0.623	0.629	0.641	0.617	0.623	0.617	0.611	0.672	0.635										
12	0.555	0.555	0.561	0.537	0.561	0.555	0.549	0.543	0.617	0.641	0.648									
13	0.598	0.598	0.617	0.604	0.617	0.598	0.592	0.598	0.623	0.672	0.629	0.672								
14	0.635	0.648	0.641	0.641	0.617	0.623	0.617	0.611	0.635	0.660	0.666	0.672	0.679							
15	0.561	0.574	0.580	0.543	0.567	0.561	0.555	0.549	0.561	0.611	0.567	0.574	0.604	0.592						
16	0.617	0.629	0.635	0.598	0.635	0.629	0.623	0.617	0.617	0.641	0.623	0.592	0.623	0.623	0.820					
17	0.611	0.623	0.641	0.592	0.629	0.623	0.617	0.611	0.574	0.648	0.629	0.586	0.604	0.604	0.814	0.820				
18	0.623	0.623	0.641	0.592	0.629	0.623	0.617	0.611	0.598	0.635	0.617	0.586	0.592	0.567	0.802	0.820	0.814			
19	0.580	0.592	0.598	0.561	0.598	0.592	0.586	0.580	0.604	0.617	0.586	0.580	0.660	0.635	0.820	0.864	0.845	0.783		
20	0.561	0.574	0.604	0.543	0.592	0.574	0.567	0.561	0.611	0.611	0.604	0.611	0.617	0.580	0.790	0.771	0.839	0.827	0.833	
21	0.611	0.623	0.641	0.604	0.641	0.635	0.629	0.623	0.660	0.672	0.617	0.685	0.654	0.679	0.679	0.709	0.691	0.641	0.697	0.703

^aIsolate number.

togea 간의 RAPD fingerprinting pattern 은 Fig. 1에서 보이는 것과 같이 서로간에 상이한 밴드 패턴을 나타냈다. 특히 OPA-04, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPB-12에서는 major band의 molecular weight와 생성 밴드의 수에서 뚜렷한 차이를 보였다. 그리고 두 균주간의 유사성은 0.67로 나타났다. GV에 속하는 *P. megasperma*와 *P. sojae*의 경우, 유사성 정도가 0.65으로 나타났으며 이는 다른 균주와의 유사성 정도보다 가장 높은 수준을 보였다. 또한 이들 균주는 OPA-08, OPA-17, OPA-19를 사용했을 때 단일 major band에서 큰 차이를 보였다(Fig. 1, Table 3).

본 연구 결과, RAPD를 통해 공시재료로 사용된 *Phytophthora* species 간의 유전적 관계를 확인 할 수 있었다. 또한, RAPD fingerprinting 결과 *Phytophthora* species에 공통으로 나타난 marker와 *P. infestans*-specific marker를 이용하여 토양중에서 혹은 토마토나 감자의 이병조직으로부터 병징이 나타나기전에 오염정도나 감염정도 또는 감염여부를 확인할 수 있는 방법이 제시되었고, 앞으로 본 실험결과를 토대로 보다 높은 특이성을 지닌 *Phytophthora*-specific 혹은 *P. infestans*-specific marker의 개발이 가능하리라 여겨진다.

적 요

형태학적특징으로 분류된 6개의 그룹(GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI)에 속하는 수종의 *Phytophthora* species 간의 RAPD fingerprinting 양상을 살펴보았다. *Phytophthora*의 일부 균주는 배양시 균사생장 형태가 매우 유사하며, 분리를 위한 여러 가지 특징이 중첩되기 때문에 정확한 동정이 난해하다. 본 실험결과 감자에서 분리한 균주 뿐만 아니라 토마토에서 분리한 *P. infestans*에서 RAPD 분석을 통해서 동정이 가능함을 알 수 있었다. 증폭된 절편들은 0.3~3.2 kb의 범위에 속했다. 전체 145개 밴드 중에서 109개의 polymorphic band를 얻었다. 7개의 *P. infestans* 간에는 최저 0.92에서 최고 0.99의 높은 유사성을 보였으며 감자를 기주로한 isolate 3 과는 0.93~0.95를 보였고, *P. capsici* 간에는 0.77~0.86의 유연성을 보였으며 약 80%의 수준에서 효과적으로 grouping 되었다. 특히 OPA-20를 사용하여 genus *Phytophthora* 내에 공통으로 존재하는 600 bp의 common band와 *P. infestans*에만 형성되는 680 bp의 specific band를 얻어 marker로서의 활용이 가능함을 알 수 있었다. 형태학적으로는 GVI에 속하는 *P. cinnamomi*와 *P. cryptogea* 간의 RAPD fingerprinting pattern에서 상이한 band 패턴을 나타냈다. 특히 OPA-04, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPB-12에서는 major band의 molecular weight와 생성밴드의 수에서 뚜렷한 차이를 보였다. 그리고 두 균주간의 유사성은 0.67로 나타났다. GV에 속하는 *P. megasperma*와 *P. sojae*의 경우, 유사성 정도가 0.65으로 나타났으며 이는 다른 균주와의 유

사정도 보다 가장 높은 수준을 보였다. 또한 이들 균주는 OPA-08, OPA-17, OPA-19를 사용했을 때 단일 major band에서 큰 차이를 보였다.

감사의 글

본 실험에 사용한 균주의 일부를 분양해준 농진청 지형진 박사님과 충남대 김흥기 교수님께 사의를 표합니다.

본 연구는 농진청 농업특정 연구사업으로 수행되었음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Arnheim, N., White, T. and Rainey, W. E. 1990. The application of PCR: organismal and population biology. *BioScience* 40: 174-182.
- Clarke, D. D. 1983. Potato late blight: A case study, Pp. 3-17. *In: Biochemical Plant Pathology*. J. A. Callow (ed.), Wiley, New York.
- Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujkoski, L. S., Koh, Y. J., Cohen, B. A., Spielman, L. J., Deahl, K. L., Inglis, D. A. and Sandlan, K. P. 1993. Historical recent migration of *Phytophthora infestans*; chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77: 653-661.
- Goodwin, S. B., Spielman, L. J., Matuszak, J. M., Bergeron, S. N. and Fry, W. E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* population in Northern and Central Mexico. *Phytopathology* 82: 955-961.
- Holliday, P. 1989. A Dictionary of Plant Pathology. Cambridge University Press. New York, NY. 369 Pp.
- Irwin, J. A. G. and Dale, J. L. 1982. Relationships between *Phytophthora megasperma* isolates from chick pea, lucerne and soybean. *Australian Journal of Botany* 30: 99-210.
- Nakata et Takimoto. 1928. Bulletin of Suwon Agri. Expt. Sta. 15. Pp. 93.
- Peterson, P. D., Jr., Campbell, and Griffith, C. S. 1992. James E. Teschemacher and the cause and management of potato blight in the United States. *Plant Disease* 76: 754-756.
- Rohlf, F. J. 1988. *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. version 1.70. Exeter Software, Setanket, NY.
- Stamps, D. L., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. and Hall, G. S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Papers. No. 162. CAB International Mycological Institute. Kew. England.
- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Paper 92. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey. England. 22 Pp.