

# 배추무사마귀병 병원균 *Plasmodiophora brassicae*의 PCR 기법을 통한 DNA 표지인자의 개발과 활용에 관한 연구

이윤수\* · 김희종\* · 원상철\*\*

(\*강원대학교 농업생명과학대학 교수, \*\*인제군 농업기술센터 농촌 지도사)

## Development of Molecular Marker Using PCR Technique for Chinese Cabbage Club Root Pathogen *Plasmodiophora brassicae*

Youn-Su Lee\*, Hee-Jong Kim\*, Sang-Cheol Won\*\*

\*Division of Applied Plant Sciences, Kangwon National University,

\*\*Inje Agricultural Research Center

### 적 요

*Plasmodiophora brassicae*를 특이적으로 진단하기 위해 사용된 primer sequence는 TCAGCTTGAATGCTAATGTG이고 이 primer를 반응시켜 PCR로 증폭한 결과 상이한 2개의 band가 나타났다. *Fusarium* spp., *Rizoctonia* spp., 등에서도 band가 나타났지만 *Plasmodiophora brassicae*와 molecular weight이 다른 band가 나타났고, *Pseudomonas* spp.의 경우는 band가 전혀 나타나지 않았다. 감염되지 않은 배추 품종의 경우 증폭은 일어났으나 특이 band가 나타나지 않았다. 따라서 molecular weight가 1,000bp이면 *Plasmodiophora brassicae*에 특이적으로 반응하는 band인 것을 알 수가 있었다. 결론적으로 molecular weight가 1,000bp인 band가 검출되는 경우 공시재료가 *Plasmodiophora brassicae*에 의하여 감염되어 있음을 판정할 수 있었다.

### 1. 서론

양배추와 꽃양배추, 무, 배추등의 십자화과 작물의 무사마귀병은 전세계에 걸쳐 널리 분포하고, 십자화과 작물이 자라는 곳에서 발견된다. 특히 무사마귀병은 유럽과 북아메리카에서 가장 빈번하게 관찰되어 왔다. 우리나라에서도 1920년 9월 수원과 서울에서의 발병이 최초로 보고되었으며 최근 3년동안 경기도, 강원도 지역에 대규모로 발생되고 있는 상황이며 피해 정도는 지역에 따라 차이가 있으나 앞으로 한정된 면적에의 연작으로 인한 피해가 더욱 증가하리라 예

상된다.

*Plasmodiophora brassicae*는 휴면포자로 월동하는 토양에 널리 분포한다. 온도가 적합하고 습기가 많으면, 휴면포자는 1개의 유주자(zoospore)를 생성하고, 유주자는 뿌리털을 감염시키고 변형체(plasmodium)를 생성한다. 변형체는 유주자낭(zosporangium)으로 변형되고 나서, 수많은 2차 유주자를 생성하며, 뿌리 또는 괴경조직 속으로 침입한 유주자는 변형체를 생성하고 전형적인 병을 일으킨다.

무사마귀병균에 의해 오염된 것으로 알려진 포장에서 십자화과 작물의 재배는 피해야 한다. 이것이 불가능하다면 양배추와 다른 감수성 십자화과 작물

들은 중성보다 약간 높은 pH(보통 7.2)를 가진 배수가 잘 된 포장이나 적당한 양의 석회수를 첨가하여 pH가 7.2로 조정된 포장에서 재배해야 한다.

또한 *Plasmodiophora brassicae* 조기발견을 통한 병방제는 효과적인 방제대책의 하나이고 가장 적합한 방제대책 수립을 위한 기초자료 제공의 수단으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본연구는 분자생물학적 방법을 이용해 이병 식물체 조직으로부터 직접 DNA를 추출후 *Plasmodiophora brassicae*의 ITS 지역을 증폭하여 specific한 primer를 design한 후 이병여부를 조기 진단할 수 있는 marker 개발을 위하여 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료

공시재료로 *Plasmodiophora brassicae*가 감염된 고랭지 여름배추, 대통, 탐복을 사용하였으며 감염된 식물체와 비교하기 위해 성장상에서 자란 무병상태의 고랭지 여름 배추(Control 1)와 온실에서 재배된 이병되지 않은 고랭지 여름배추(Control 2)를 사용하였고, 각 품종의 이병된 혹은 건전한 뿌리를 실험재료로 사용하였다.

### 2. Genomic DNA 추출

식물조직을 마쇄한다음 무명천으로 걸러낸 후 *Plasmodiophora brassicae*의 spore를 순수분리하여 DNA를 얻는 다른 연구자의 방법과는 달리 본 실험에서는 이병 또는 건전 식물체내에 있는 *Plasmodiophora brassicae*를 직접 isolation하기 위하여 식물체 조직 전체의 DNA를 추출하였다. 채집한 시료의 뿌리에 붙은 흙을 깨끗이 털어내고 뿌리조직을 액체질소로 곱게 마쇄한 뒤 extraction buffer 750 $\mu$ l를 넣고 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 750 $\mu$ l 처리한후 10분간 서서히 섞어주면서 65°C에서 10분간 incubation을 시켰다. 그후 12,000rpm에서 10분간 centrifuge시킨 뒤 상층액 550 $\mu$ l를 꺼내 새로운 tube에

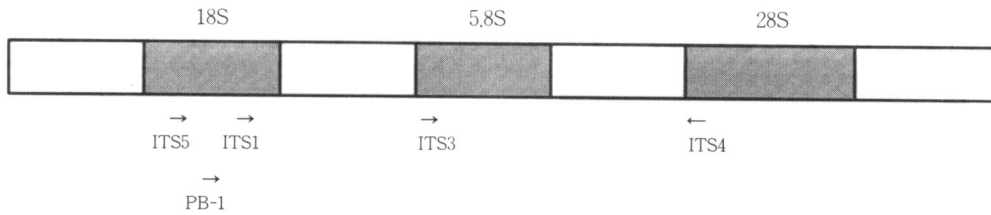
넣었고 이에 isopropanol 550 $\mu$ l 처리 후 DNA를 천천히 섞어준 뒤 -20°C에서 1시간처리를 했고, 그 뒤 12,000rpm에서 15분간 centrifuge시켰다. DNA를 washing하기 위해 70% alcohol로 DNA를 씻어준 뒤 다시 centrifuge를 시켜주었다. DNA pellet을 건조시킨 뒤 TE buffer 150 $\mu$ l와 RNase 1 $\mu$ l를 첨가한 뒤 37°C에서 1시간 동안 incubation시킨후 agarose상에서 maker DNA의 농도를 기준삼아 농도를 측정하였다.

### 3. rDNA의 ITS, ITS II 영역의 PCR 반응

rDNA의 noncoding region인 ITS I + 5.8S + ITS II 지역을 증폭하기 위하여 specific primer ITS 1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS 4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGCTGC-3', ITS 5 : 5' -TCAGCTTGAATGCTAATGTG-3'를 이용하였다(Fig. 1). PCR반응은 1X reaction buffer, 200 $\mu$ M dNTPs, 1 unit Taq polymerase, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 $\mu$ M primers를 첨가하여 전체량을 20 $\mu$ l로 하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 초기 변성 시킨후, 95°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1cycle로 최종 35 cycle을 반복하고 72°C에서 10분간 반응시킨후 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR산물은 0.5 $\times$  TBE(0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA) buffer를 사용하여 1% agarose gel에서 2시간 동안 전기 영동한 후 UV 상자에서 전개된 DNA 단편들의 양상을 관찰하였다.

### 4. ITS 증폭과 클로닝

Eukaryotic organism에서는 ITS 지역이 공동으로 존재하는데 균류와 식물체간의 ITS지역의 차이가 있다는 것을 착안하여 식물체 DNA와 *Plasmodiophora brassicae* DNA의 ITS지역을 공동으로 증폭하였다. 각 지역간에 차이를 보기 위하여 ITS1, ITS4의 primer를 이용하여 ITS I + 5.8S + ITS II 지역을 증폭시켰고, 또 ITS 4, ITS 5의 primer를 이용하여 18S + ITS I + 5.8S + ITS II 지역을 증폭을 하여 차이를 보았다. 18S + ITS I + 5.8S + ITS II에서 차이가 나는 band를



◎ Primer

ITS 1: 5' -TCCGTAGGTGAACCTGCCGG-3'

ITS 3: 5' -GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'

ITS 4: 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS 5: 5' -TCAGCTTGAATGCTAATGTG-3'

Fig. 1. Genetic map of a portion of the rDNA repeat showing the location of oligonucleotide primer site used to amplify rDNAs from *Plasmodiophora brassicae* species.

elution하기 위해서 Wizard® PCR Prep(DNA purification system, USA)을 사용하여 증폭된 DNA 절편을 정제했다. Taq DNA polymerase에 의한 PCR 산물은 양끝에 adenin이 붙는 특징이 있어 직접 ligation할 수 있도록 제작된 pGM®-T Easy vector를 이용하여 cloning을 하였고 이를 다시 cell에 transformation한 후 white/blue 선발을 거쳐 DNA가 삽입된 것으로 사료되는 colony를 선발하여 ampicillin (50µg/ml)이 들어 있는 LB broth에서 16시간 정도 배양한 후 QUANTA-plasmid Mini™(Quantum, USA)를 사용하여 plasmid를 추출하였다.

5. Primer 제작과 선발

sequencing한 data는 nucleotide sequence로부터 PCR용 primer를 디자인해주는 Program인 Primer3 (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, USA)로 design하였고 다른 토양미생물과의 반응을 알아보기 위하여 *Fusarium* spp, *Rizoctonia* spp, *Pseudomonas* spp. 등과도 반응을 하였다.

III. 결과 및 고찰

ITS1, ITS4의 pair primer를 이용하여 증폭시킨 ITS

I +5.8S+ITSII 지역은 이병된 조직과 건전한 조직간에 차이를 보이지 않았기 때문에 배추와 *Plasmodiophora brassicae*간에는 ITS 지역간의 차이가 없는 것을 알수가 있었다(Fig. 2a). 그러나 ITS5와 ITS4의 primer를 이용하여 증폭하였을 경우에 이병된 조직에서 배추의 ITS 지역과 다른 band가 검출이 되었다(Fig. 2b).

검출된 band가 *Plasmodiophora brassicae*인가를 확인하기 위하여 gel에서 이 band를 elution하였고 restriction enzyme으로 처리하였을 때 *Plasmodiophora brassicae*가 보이는 band와 비슷한 size의 band를 얻을 수 있었다(Fig. 3). 따라서 이 band를 pGM®-T Easy vector를 이용하여 cloning하였고 automatic sequencer를 이용하여 sequencing하였다. 그 결과는 Fig. 4, 5, 6에 나타내었다. 본 실험결과 밝혀진 sequence가 *Plasmodiophora brassicae*의 ITS 지역 sequence와 일치하는지 여부를 알기 위해서 Gene bank에 검색한 결과 *Plasmodiophora brassicae*로 확인되었고, nucleotide sequence로부터 PCR용 primer를 디자인해주는 Program인 Primer3(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, USA)로 primer를 제작하였다.

*Plasmodiophora brassicae*를 특이적으로 진단하기 위해 사용된 primer sequence는 TCAGCTTGAATGCTAATGTG이고 이 primer를 반응시켜 PCR로 증폭한

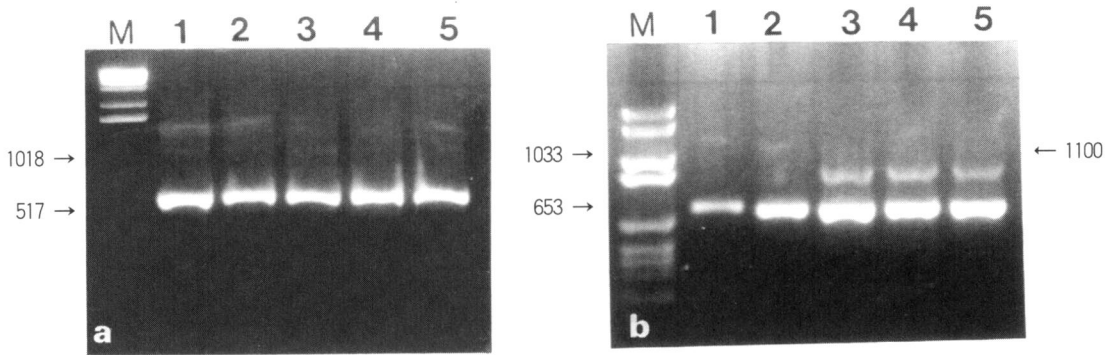


Fig. 2. PCR amplified portion of ITS I +5.8S+ITS II and a part of 18S+ITS I +5.8S+ ITS II region in *Plasmodiophora brassicae*(a: primer ITS1+ITS4, b: ITS4+ITS5).

Lanes; M: Molecular marker.

- 1: uninfected cv. Highland Summer seedling(Control 1).
- 2: uninfected cv. Highland Summer grown in greenhouse(Control 2).
- 3: infected cv. Highland Summer grown in the field.
- 4: infected cv. Daetong grown in the field.
- 5: infected cv. Tambok grown in the field.

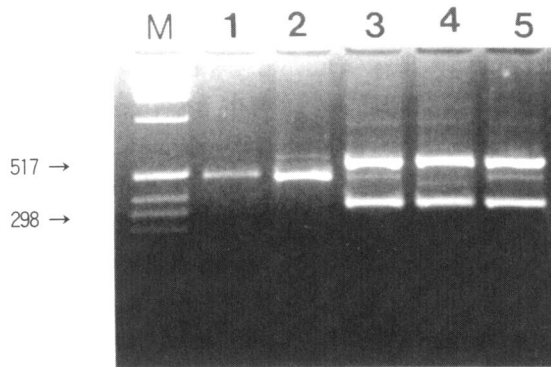


Fig. 3. Restriction fragment length polymorphism of *Plasmodiophora brassicae* and brassicae with *Dde I*.

Lanes; M: Molecular marker.

- 1: uninfected cv. Highland Summer seedling(Control 1).
- 2: uninfected cv. Highland Summer grown in greenhouse(Control 2).
- 3: infected cv. Highland Summer grown in the field.
- 4: infected cv. Daetong grown in the field.
- 5: infected cv. Tambok grown in the field.

PB-1.SEQ

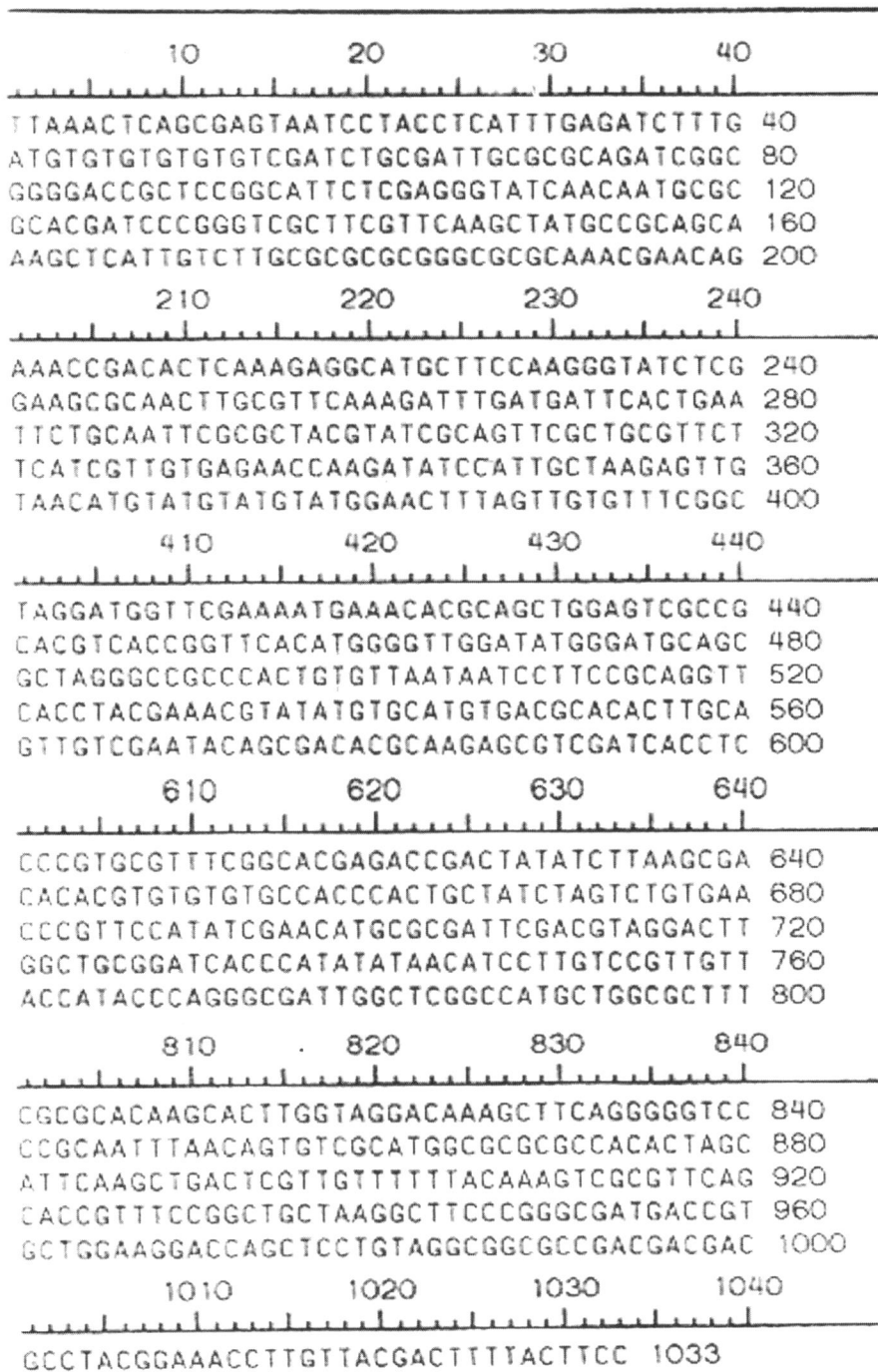


Fig. 4. The complete sequence of a part of 18S+ITS I +5.8S+ITS II of *Plasmodiophora brassicae* isolated from infected cv. Highland Summer grown in the field.

## PB-2.SEQ

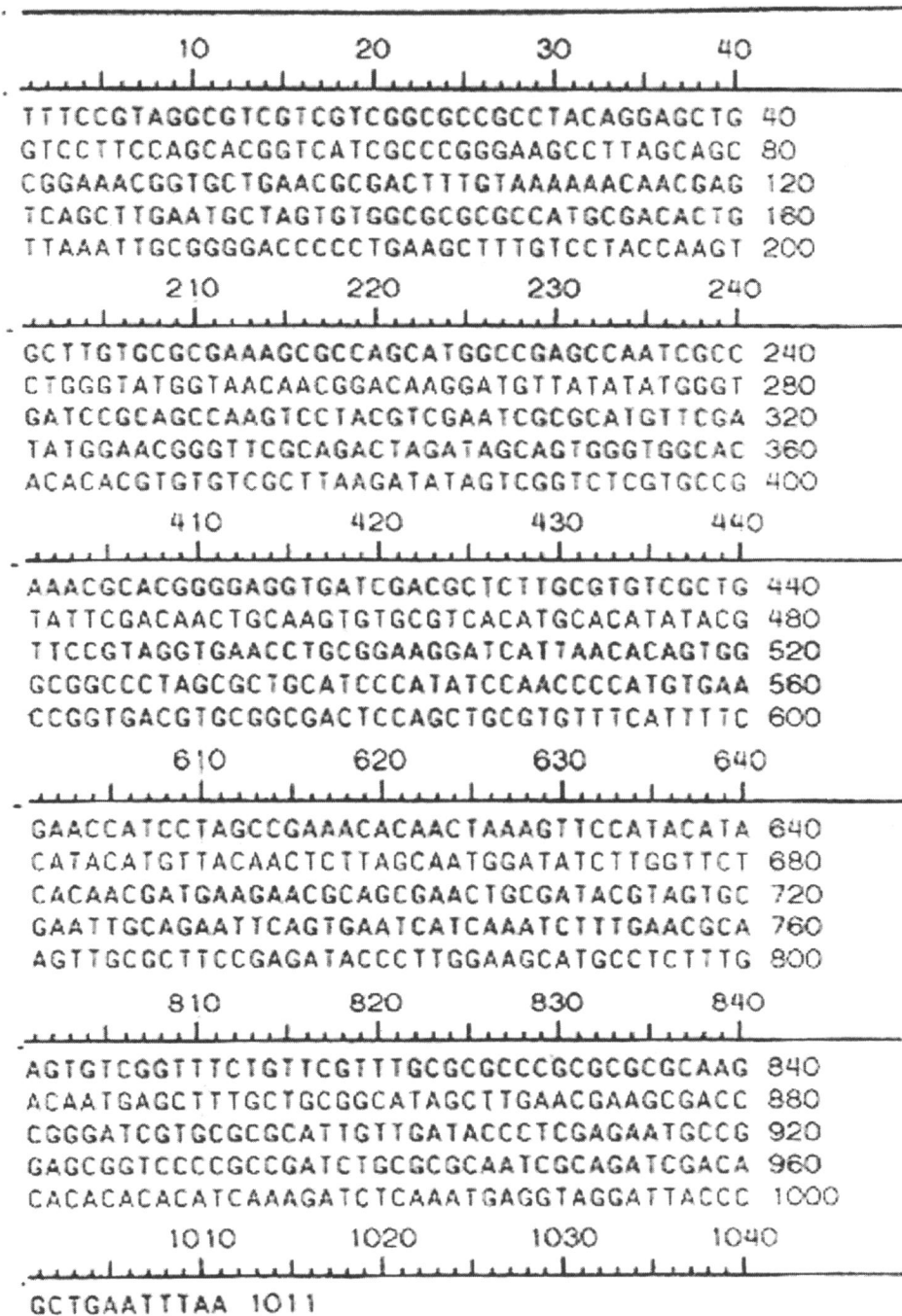


Fig. 5. The complete sequence of a part of 18S+ITS I +5.8S+ITS II of *Plasmodiophora brassicae* isolated from infected cv. Daetong grown in the field.

PB-3.SEQ

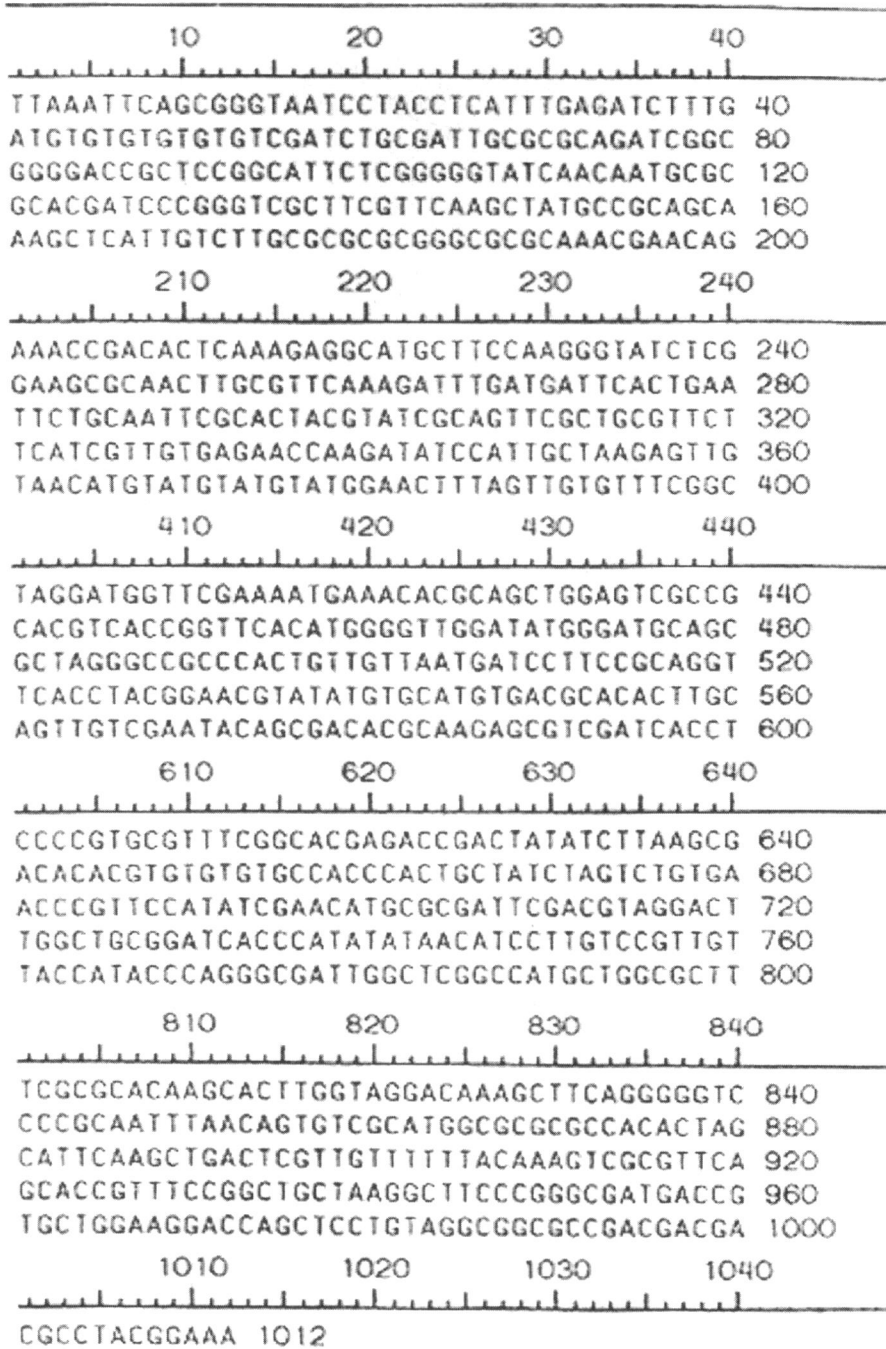


Fig. 6. The complete sequence of a part of 18S+ITS I +5.8S+ITS II of *Plasmodiophora brassicae* isolated from infected cv. Tambok grown in the field.

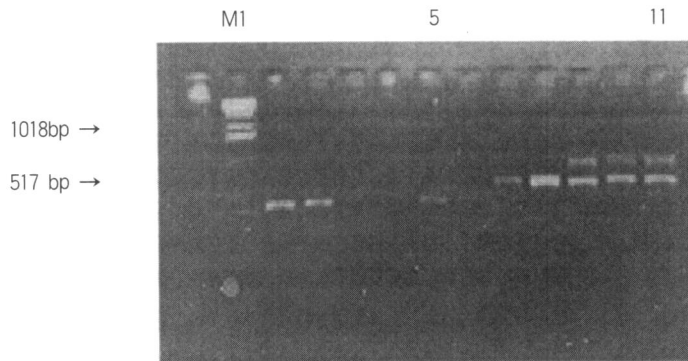


Fig. 7. The amplification of 1,000bp product using pair primer PB-1 and ITS4.

Lanes: M: Molecular marker .

- 1: *Fusarium moniliforme* (mating type A<sup>+</sup>)
- 2: *Fusarium moniliforme* (mating type B<sup>+</sup>)
- 3: *Pseudomonas solanacearum*
- 4: *Erwinia carotovora*
- 5: *Rizoctonia solani* (AG-1)
- 6: *Rizoctonia solani* (AG-2-1)
- 7: uninfected cv. Highland Summer seedling(Control 1)
- 8: uninfected cv. Highland Summer grown in greenhouse(Control 2)
- 9: infected cv. Highland Summer grown in the field
- 10: infected cv. Daetong grown in the field
- 11: infected cv. Tambok grown in the field

결과 상이한 2개의 band가 나타났다. *Fusarium* spp., *Rizoctonia* spp. 등에서도 band가 나타났지만 *Plasmodiophora brassicae*와 molecular weight이 다른 band가 나타났다. *Pseudomonas* spp.의 경우는 band가 전혀 나타나지 않았다. 감염되지 않은 배추 품종의 경우 증폭은 일어났으나 특이 band가 나타나지 않았다. 따라서 molecular weight가 1,000bp이면 *Plasmodiophora brassicae*에 특이적으로 반응하는 band인 것을 알 수가 있었다(Fig. 7).

결론적으로 molecular weight이 1,000bp인 band가 검출되는 경우 공시재료가 *Plasmodiophora brassicae*에 의하여 감염되어 있음을 판정할수 있으며, 차후 이 병원균을 검출할수 있는 DNA의 최소 농도결정과 특이성이 더욱 높은 marker의 개발이 필요하다고 사료된다.

### 참고문헌

1. Arrand, J. E., 1986, Preparation of nucleic acid probes. In: Hames, B. D. and Higgins, S. J. eds. Nucleic acid hybridisation: a practical approach. Oxford: IRL Press.
2. Buhariwalla, H., S. Greaves, 1995, Development of specific PCR primer for the amplification of polymorphic DNA from the obligate root pathogen *Plasmodiophora brassicae*. Physiological and Molecular Plant Pathology 47: pp.83-94.
3. Buhariwalla, H., S. Greaves, R. Magrath and R. Mithen, 1995, Development of specific PCR primers for the amplification of polymorphic



- DNA from the obligate root pathogen *Plasmodiophora brassicae*, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: pp.83-94.
4. Castbury L. A., and D. A. Glawe, 1993, A comparison of three techniques for inoculating Chinese cabbage with *Plasmodiophora brassicae*, *Mycologia* 85: pp.866-867.
  5. Castlebury, J. A., J. V. Maddox, & D. A. Glawe, 1994, A technique for the extraction and purification of viable *Plasmodiophora brassicae* resting spore from host root tissue, *Mycologia* 86: pp.458-460.
  6. Cenis, J. L., 1992, Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification, *Nucleic Acid, Res.* 20: p.2380.
  7. Dhingra, O. D., and J. B. Sinclair, 1995, *Basic plant pathology methods*, 2nd Ed, CRC Press.
  8. Ronald J. Bryan, Arthur T. Trese, and James P. Braselton, 1996, Molecular karyotypes for the obligate, intracellular, plant pathogens, *Plasmodiophora brassicae* and *Spongospora subterranea*, *Mycologia* 88(3): pp.358-360.
  9. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Ed, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.
  10. Scott, E. S., 1985, Production and characterization of single-spore isolate of *Plasmodiophora brassicae*, *Plant Pathology* 34: pp.287-292.
  11. Tatiana Volssiouk, E. J. Robb, and R. N. Nazar, 1995, Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms, *Applied and Environmental Microbiology* 61(11): pp.3972-3976.
  12. Tisserat, N. A., Hulbert S. H., Nus, A., 1991, Identification of *Leptosphaeria korrae* by cloned DNA probes, *Phytopathology* 81: pp.917-921.
  13. Ward, E., M. J. Adams, 1994, Characterization of *Polymyxa* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal DNA, *Plant Pathology*, 43: pp.872-877.