

## 핵 및 미토콘드리아 DNA 염기서열을 이용한 국내 *Phytophthora* 속의 Multi-locus phylogeny 분석

서문원 · 송정영 · 김흥기\*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

### Multi-locus Phylogeny Analysis of Korean Isolates of *Phytophthora* Species Based on Sequence of Ribosomal and Mitochondrial DNA

Mun Won Seo, Jeong Young Song and Hong Gi Kim\*

Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon, Korea

(Received June 7, 2010. Accepted June 17, 2010)

**ABSTRACT:** To investigate genetic relationships either interspecies or intraspecies of 14 Korean *Phytophthora* species, sequence analyses of nuclear DNA (*ypt* gene and rDNA-IGS region) and mitochondrial DNA (*Cox* gene,  $\beta$ -tubuline gene, and EF1A gene) were performed. All of 14 Korean *Phytophthora* species clearly clustered into foreign isolates of each species. These Korean isolates in *Phytophthora* species also showed no correlation between molecular classification and morphological classification like as in case of foreigners. *P. palmivora* KACC 40167 reported previously from genetic groups of *Phytophthora* species in Korea was not consistent with the classification system, and therefore was required re-examination for the genetic group analysis. Korean isolates of *P. drechsleri* KACC 40195 showed very close relationship with *P. cryptogea* KACC 40161 above 94% bootstrap value in *P. cryptogea*-*P. drechsleri* complex group. Identification of these isolates is still unclear, because *P. cryptogea* and *P. drechsleri* were not differentiated in this study. On the other hand, it was required to unify species for these two species, since *P. parasitica* and *P. nicotianae* were clustered into a group on the level of 99 to 100% sequence homology. Comparing to the sequences of foreigners, Korean isolates were newly divided to ten groups in the phylogenic system. These results could be prepared useful informations to understand genetic diversity of *Phytophthora* species in Korea.

**KEYWORDS :** Mitochondrial DNA, Multi-locus, Phylogeny analysis, *Phytophthora* species, Ribosomal DNA

*Phytophthora* 속 균들은 전세계적으로 거의 모든 식물에 발병하고 경제적으로 중요한 작물에 심각한 피해를 일으키는 식물병원균 그룹 중의 하나이며, 1876년 de Bary에 의해 난균문에 속하는 *Phytophthora*로 명명된 이래 95종과 5변종이 알려져 있다(Judelson and Blanco, 2005). 한편 국내에는 22종이 존재하는 것으로 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2009).

*Phytophthora* 속의 분류 및 동정을 위해 형태 및 배양학적 특성들이 주로 활용되기도 했으나(Erwin and Ribeiro, 1996), 종내 균주들 간에 발생하는 높은 변이성과 종간에 중복되는 특성 때문에 이들을 정확한 종동정의 기준으로 삼기는 매우 어렵다(Duncan and Cooke, 2002). 따라서 최근 *Phytophthora* 속의 분류 및 계통발생학적 분석과 더불어 분자생물학적인 기법을 이용한 분자유전학적 분석이 더 많이 수행되고 있다(Donahoo *et al.*, 2006; Ivors *et al.*, 2004; Kroon *et al.*, 2004).

*Phytophthora* 속의 분류 및 동정을 위한 초기 분자생물학적 연구는 종특이적 DNA probe를 구축하거나 RAPD나 RFLP

분석 기법을 이용한 핵 및 미토콘드리아의 DNA 분석을 통하여 진행되었다(Goodwin *et al.*, 1992). 또한 핵내 rDNA의 ITS 영역이나(Cooke *et al.*, 2000) 미토콘드리아의 cytochrome oxidase의 I과 II영역과 같이 개별적인 일부 유전적 영역 내 DNA 염기서열의 차이를 이용한 분자생물학적 분석방법이 활용되었다(Martin and Tooley, 2003).

이러한 연구들은 *Phytophthora* 속 균들의 형태적 특징에 의해 구분된 종들을 좀 더 세분화 할 수 있었지만 새로운 종으로 평가되는 종들과 동일 그룹을 이룬 유사종들과의 유전적 차이는 명확하게 식별하지 못하였다(Belbahri *et al.*, 2006; Dick *et al.*, 2006). 최근 핵과 미토콘드리아 내의 다수 유전자들에 대한 DNA 염기서열의 동시 분석으로 *Phytophthora* 속 균주들에 대한 좀 더 객관적이며 정밀한 분류 및 종 동정이 수행되고 있다(Villa *et al.*, 2006).

국내 *Phytophthora* 속의 분자생물학적 분류는 rDNA의 ITS 영역과 mitochondrial small subunit (SSU)의 PCR-RFLP 분석을 통하여 16종의 국내 균주가 13종으로 동정되었으며, *P. drechsleri* 균주들은 분리 기주에 따라 종내 3그룹으로

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

나누었다(Hong *et al.*, 1999). 그 후 Park 등(2003)은 DNA fingerprinting 분석을 통해 *P. drechseri* 균주들을 4그룹으로 더욱 세분화시켰으며 *P. drechseri*와 *P. cryptogea* 간의 밴드 양상이 거의 동일하게 나타난다는 것을 밝힌 바 있다. 또한 Hong 등 (2000)은 rDNA의 염기서열을 분석하여 국내 *Phytophthora* 속의 유전적 분류체계를 5개의 그룹으로 나눈 바 있다.

본 연구는 국내 *Phytophthora* 속의 핵 및 미토콘드리아 내에 존재하는 5개 유전자(Mitochondrial genome region between gene *Cox2* and gene *Cox1*,  $\beta$ -tubulin of mitochondrial genome region, Elongation factor 1 alpha(EF1A) of mitochondrial genome region, *Ras*-related protein (*Ypt1*) gene of the rDNA, Intergenic spacer (IGS) region of the rDNA) 영역에 대한 DNA 염기서열 분석을 통하여 국내의 *Phytophthora* 종간의 유전적 상동성을 밝히고, 유전적으로 매우 유사한 것으로 알려진 국내 *Phytophthora* 종간의 분자생물학적 유연관계 분석을 실시하였으며, *Phytophthora* 속과 형태적 분류체계와 분자생물학적으로 그룹화 된 종들 간의 분류학적 유연관계를 확인하고, 분자생물학적 분류체계를 재정립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시균주

*Phytophthora* 속 중 식물병리학적으로 중요하면서도 특성을 달리하는 대표적인 14종을 선정하였으며 균주는 충남대학교 (CNU) 식물병리학 실험실에서 분리한 것과 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양을 받아 사용하였다(Table 1). 분양된 균주들은 20% V8 juice agar 배지에 계대배양 한 다음 25°C에서 5일간 배양하여 균사선단을 취해 실험하였다.

### 2. Genomic DNA 분리

공시균주들을 20% V8 juice agar plate 상에서 25°C에서 5일간을 배양하였다. 각 균주의 균총 가장자리로부터 cork borer를 사용하여 직경 6 mm 균총원판을 4~5조각을 떼어내어 20% V8 broth에 접종한 후, 암상태의 25°C 항온기내에서 5일간 정치배양 하였다. 배양 후 균사체를 멸균된 2점의 거즈로 걸러 effendorf 튜브에 넣고 -70°C에서 얼린 후 동결건조 하였다. 동결건조 된 균사체를 마쇄한 다음 400  $\mu$ l의 extraction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 proteinase K 50  $\mu$ g을 첨가, 37°C에서 1시간 처리하였다. 이어서 400  $\mu$ l의 2 $\times$ CTAB solution [2% CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4M NaCl, 1% PVP(Polyvinylpyrrolidone)]을 첨가하여 잘 섞어 주었다. 이를 600  $\mu$ l의 Chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)로 추출하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 1.5 ml tube에 넣었다.

취해진 상등액에 0.7배 양의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를

**Table 1.** A list of isolates of *Phytophthora* species used in this study

| Species                  | Waterhouse group <sup>a</sup> | Genetic group <sup>b</sup> | Source <sup>c</sup> |
|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------|
| <i>P. boehmeriae</i>     |                               | 10                         | KACC 40173          |
| <i>P. cactorum</i>       |                               | 1                          | KACC 40183          |
| <i>P. cambivora</i>      |                               | 7                          | KACC 40159          |
| <i>P. capsici</i>        |                               | 2                          | KACC 40180          |
| <i>P. citricola</i>      |                               | 2                          | KACC 40184          |
| <i>P. citrophthora</i>   |                               | 2                          | KACC 40186          |
| <i>P. cryptogea</i>      |                               | 8                          | KACC 40161          |
| <i>P. drechseri</i>      |                               | 8                          | KACC 40195          |
| <i>P. erythrosetpica</i> |                               | 8                          | KACC 40704          |
| <i>P. infestans</i>      |                               | 1                          | KACC 40718          |
| <i>P. melonis</i>        |                               | 7                          | KACC 40489          |
| <i>P. palmivora</i>      |                               | 4                          | KACC 40167          |
| <i>P. parasitica</i>     |                               | 1                          | CNU phypara         |
| <i>P. sojae</i>          |                               | 7                          | KACC 40412          |

<sup>a</sup>Morphological criteria used to group *Phytophthora* species. This information is taken from Waterhouse (1963), Newhook *et al.* (1978) and Stamps *et al.* (1990).

<sup>b</sup>Genetic group used to group *Phytophthora* species. This information is taken from schena *et al.* (2006) and Jaime *et al.* (2008).

<sup>c</sup>KACC; Korean Agricultural Culture Collection, CNU; Chungnam National University.

**Table 2.** A list of references used in this study

| <i>Phytophthora</i> species | Source   | Nuclear DNA Mitochondrial DNA |          |                  |      |                  |
|-----------------------------|----------|-------------------------------|----------|------------------|------|------------------|
|                             |          | <i>ypt1</i>                   | rDNA-IGS | <i>Cox2-Cox1</i> | EF1A | $\beta$ -tubline |
| <i>P. alni</i>              | SCR2P    | o                             | o        | o                |      |                  |
| <i>P. arecae</i>            | P10213   |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. boehmeriae</i>        | P6950    |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. botryosa</i>          | P6945    |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. cactorum</i>          | P0714    |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. cactorum</i>          | SCR2P27  | o                             | o        | o                |      |                  |
| <i>P. cajani</i>            | P3105    |                               |          |                  |      | o                |
| <i>P. cambivora</i>         | P0592    |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. cambivora</i>         | SCR2P67  | o                             | o        | o                |      |                  |
| <i>P. capsici</i>           | P0253    |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. capsici</i>           | SCR2P103 | o                             | o        | o                |      |                  |
| <i>P. cinnamomi</i>         | P2159    |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. cinnamomi</i>         | SCR2P115 | o                             | o        | o                |      |                  |
| <i>P. citricola</i>         | P7902    |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. citricola</i>         | SCR2P130 | o                             | o        | o                |      |                  |
| <i>P. citrophthora</i>      | P6310    |                               |          |                  | o    | o                |
| <i>P. citrophthora</i>      | SCR2P179 | o                             | o        | o                |      |                  |
| <i>P. colocasiae</i>        | P6317    |                               |          |                  |      | o                |
| <i>P. cryptogea</i>         | P1088    |                               |          |                  | o    | o                |

Table 2. Continued

| Phytophthora species     | Source      | Nuclear DNA |          | Mitochondrial DNA |      |                  |
|--------------------------|-------------|-------------|----------|-------------------|------|------------------|
|                          |             | ypt1        | rDNA-IGS | Cox2-Cox1         | EF1A | $\beta$ -tubline |
| <i>P. cryptogea</i>      | SCR207      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. drechsleri</i>     | SCR232      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. drechsleri</i>     | P10331      |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. erythroseptica</i> | P1699       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. erythroseptica</i> | SCR240      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. europaea</i>       | SCR622      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. fragariae</i>      | P3821       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. fragariae</i>      | SCR245      | o           | o        |                   |      |                  |
| <i>P. hibernalis</i>     | P3822       |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. idaei</i>          | P6767       |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. ilicis</i>         | P3939       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. ilicis</i>         | SCR377      | o           | o        |                   |      |                  |
| <i>P. infestans</i>      | SC03.26.3.3 | o           |          | o                 |      |                  |
| <i>P. insolita</i>       | P6195       |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. insolita</i>       | SCR385      | o           |          |                   |      |                  |
| <i>P. inundata</i>       | SCR644      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. inundata</i>       | P8478       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. iranica</i>        | P3882       |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. katsurae</i>       | SCR388      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. kernoviae</i>      | SCR722      | o           |          |                   |      |                  |
| <i>P. lagoariana</i>     | P8223       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. lateralis</i>      | SCR390      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. lateralis</i>      | P3888       |             |          |                   | o    |                  |
| <i>P. medicaginis</i>    | SCR407      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. megakarya</i>      | P8516       |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. megasperma</i>     | SCR435      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. megasperma</i>     | P3136       |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. mexicana</i>       | P0646       |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. mirabilis</i>      | P3005       |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. nemorosa</i>       | SCR910      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. nicotianae</i>     | SCR468      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. nicotianae</i>     | P6303       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. palmivora</i>      | SCR526      |             | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. palmivora</i>      | P0255       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. pistaciae</i>      | P6197       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. pistaciae</i>      | SCR533      |             | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. pseudosyringae</i> | SCR674      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. psychrophila</i>   | SCR630      | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. quercina</i>       | SCR541      | o           | o        |                   |      |                  |
| <i>P. quinea</i>         | P3247       |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. ramorum</i>        | SCR911      | o           | o        |                   |      |                  |

Table 2. Continued

| Phytophthora species  | Source | Nuclear DNA |          | Mitochondrial DNA |      |                  |
|-----------------------|--------|-------------|----------|-------------------|------|------------------|
|                       |        | ypt1        | rDNA-IGS | Cox2-Cox1         | EF1A | $\beta$ -tubline |
| <i>P. richardiae</i>  | P10811 |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. sojae</i>       | SCR555 | o           | o        | o                 |      |                  |
| <i>P. sojae</i>       | P3114  |             |          |                   | o    | o                |
| <i>P. tentaculata</i> | P8497  |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. trifolii</i>    | P7010  |             |          |                   |      | o                |
| <i>P. vignae</i>      | P3019  |             |          |                   | o    | o                |

하였다. 침강된 DNA는 70% ethanol을 이용해 같은 방법으로 세척하였으며 튜브내의 ethanol을 제거, 건조시킨 후 DNA를 100  $\mu$ l의 DDW에 녹인 다음 agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인 및 농도 마커를 이용하여 정량하였다.

### 3. 분자생물학적 기법을 이용한 분자 유전학적 특성 분석

#### Multi-locus 염기서열 분석

본 연구에서는 *Phytophthora* 속 공시균주들의 Cox2-Cox1,  $\beta$ -tubline, EF1A, ypt1, rDNA-IGS 유전자에 대한 DNA 염기서열 분석을 위해 기존에 보고된 primer를 사용하였다. (Table 3, 4).

각각의 primer 0.5 pmol, 2 ng의 genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase에 멸균수를 첨가하여, 최종 volume을 50  $\mu$ l로 하여 PCR을 수행하였다. 모든 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 증폭 여부와 그 크기를 관찰하였고, 증폭된 PCR 산물은 솔젠트사의 PCR Purification Kit(Korea)로 정제하고, 마크로젠사에 sequencing을 의뢰한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 DNA 데이터베이스와 유사한 염기서열을 비교하였다(Table 2).

염기서열은 PHYDIT program version 3.2를 이용하여 정렬하였고 불분명하게 정렬된 부분은 분석에서 제외하였다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c package를 사용하여 Kimura's two-parameter model에 의해 작성하였으며 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였다. 이들 유전자 영역에 대한 유연관계 분석에 있어서 outgroup은 동일 유전자 영역을 증폭한 *Phythium* sp. 염기서열을 이용하였다.

### 결과 및 고찰

#### Multi-locus 염기서열을 통한 국내 *Phytophthora* 속의 유연관계 분석

*Phytophthora* 속의 핵 및 미토콘드리아 내에 존재하는 5개 유전자 영역에 대한 DNA 염기서열 분석을 통하여 국내외

**Table 3.** A list of major primers used in this study

| Target DNA                                                                | Primer  | Sequence(5' → 3')           | Reference <sup>a</sup>                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Mitochondrial genome region between gene <i>Cox2</i> and gene <i>Cox1</i> | IgCoxF  | AAAAGAGARGGTGTTTTTAYGGA     | Paquin et al. (1997)                                                         |
|                                                                           | IgCoxR  | GCAAAAAGCACTAAAAATTAAATATAA | Sachay et al. (1993),<br>Martin and Tooley(2003)<br>and Martin et al. (2004) |
| Ras-related protein ( <i>Ypt1</i> ) gene of the rDNA                      | Ypt1F   | CGACCATYGGYGTGACTTT         | Chen and Roxby (1996)                                                        |
|                                                                           | Ypt4R   | TTSACGTCTCRACGGCGTA         | Moorman et al. (2002)                                                        |
|                                                                           | Ypt5R   | GCAGCTTGTTACGTCTCR          | Schena et al. (2006)                                                         |
|                                                                           | Igs1F   | AAAGTGRKGMGGWGWGCKGA        | Liew et al. (1998)                                                           |
| Intergenic spacer (IGS) region of the rDNA                                | Igs2F   | AAGTRYMTKAACAACGCTCT        | Schena et al. (2006)                                                         |
|                                                                           | Igs3F   | GYGCGAAGGWKTGCTG            | Schena et al. (2006)                                                         |
|                                                                           | Igs6R   | CCCAGCRYAAACAACAACAC        | Schena et al. (2006)                                                         |
|                                                                           | Igs7R   | ATATCCTCCATACGWAAGAAGACG    | Schena et al. (2006)                                                         |
| Elongation factor 1 alpha(EF1A) of mitochondrial genome region            | EF1A_FL | GGTCACCTGATCTACAAGTGC       | Jaime et al. (2008)                                                          |
|                                                                           | EF1A_R2 | TTSACCGACACGTTCTTGAC        | Jaime et al. (2008)                                                          |
| $\beta$ -tubline of mitochondrial genome region                           | Btub_F2 | CGGTAACAACCTGGGCCAAGG       | Kroon et al. (2004)                                                          |
|                                                                           | Btub_R2 | GATCCACTCAACGAAGTACG        | Kroon et al. (2004)                                                          |

<sup>a</sup>Reference to available DNA sequences on which primers were based.**Table 4.** PCR conditions for primers used in this study

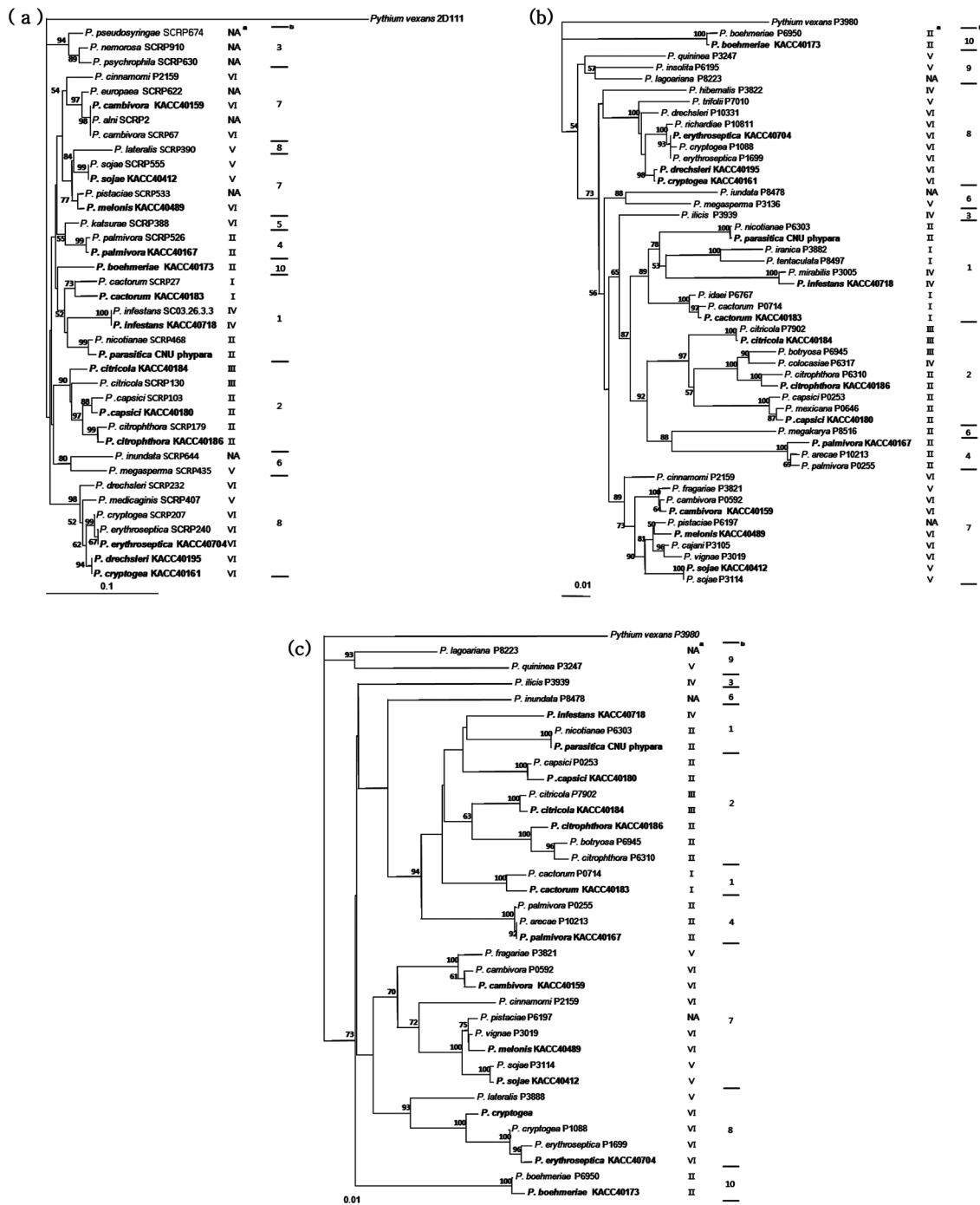
| Target DNA                | Initial Denature | Step Cycle      |                 |                |        | Final Extention |
|---------------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|--------|-----------------|
|                           |                  | Denature        | Annealing       | Extension      | Cycles |                 |
| <i>Cox2</i> - <i>Cox1</i> | 95°C/<br>2 min   | 94°C/<br>30 sec | 50°C/<br>30 sec | 72°C/<br>1 min | 35     | 72°C/<br>10 min |
| <i>ypt1</i>               | 95°C/<br>2 min   | 94°C/<br>30 sec | 55°C/<br>30 sec | 72°C/<br>1 min | 35     | 72°C/<br>10 min |
| rDNA-IGS                  | 95°C/<br>2 min   | 94°C/<br>30 sec | 50°C/<br>30 sec | 72°C/<br>1 min | 35     | 72°C/<br>10 min |
| EF1A                      | 94°C/<br>2 min   | 94°C/<br>30 sec | 60°C/<br>30 sec | 72°C/<br>1 min | 35     | 72°C/<br>5 min  |
| $\beta$ -tubline          | 94°C/<br>2 min   | 94°C/<br>30 sec | 60°C/<br>30 sec | 72°C/<br>1 min | 35     | 72°C/<br>5 min  |

*Phytophthora* 종간의 유전적 상동성과 국내 *Phytophthora* 종간의 분자생물학적 유연관계 분석을 실시하였다.

대부분 진핵세포의 미토콘드리아 유전자의 고유한 유전적 특성은 유, 무성 생식시 세포질 유전에 따른 모계유전 방식으로 후대에 매우 안정적으로 전해지는 것으로 알려져 있어 종간 유전적 다양성 분석에 많이 활용되어지고 있다(Martin and Tooley, 2003). 본 연구에서는 미토콘드리아 내에 존재하는 *Cox*,  $\beta$ -tubline, EF1A 유전자의 염기서열들을 이용해 국내 *Phytophthora* 속 종들과 기존에 보고된 외국 *Phytophthora* 균들 간의 DNA 염기서열 분석을 수행하였다. *Cox* 유전자의 분석에 있어서 국내 *Phytophthora* 속 균들은 10개의 clade 중 6개의 clade와 동일한 그룹을 형성하였다. Jaime 등 (2008)은 6개의 핵 및 미토콘드리아 내에 존재하는 유전자의 DNA 염

기서열 분석을 통해 Waterhouse 등의 형태적 분류에 따른 6개 그룹을 10개의 clade로 구분한 바 있다. 한편 국내에는 clade 5에 속하는 *P. katsurae*의 발생이 보고되어 있으나 본 연구에서는 활용치 못하였으므로 추후 이에 대한 보완연구가 필요하다(Fig. 1).

한편, 핵 유전자 내에 존재하는 소포체와 골지체 사이의 물질수송에 필수적 단백질을 코딩하는 *ypt1* 유전자에 대한 분석을 실시한 결과, 국내 *Phytophthora* 종들은 외국의 종들과 동일한 clade를 구성하였으며(Schena 등, 2006), 외국 균주들과 82% 이상의 bootstrap에 의해 지지되어 모두 유전적으로 동일한 종 특성을 갖고 있다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2a). 또한 핵내 rDNA-IGS 영역의 분석은 국내 11개 *Phytophthora* 종들과 기존에 알려진 *Phytophthora* 27종의 DNA 염기서열들에 대해 수행되어졌는데 그 결과는 Schena 등 (2006)의 rDNA-IGS 분석결과와 동일하게 나타났다. 하지만 이들 영역은 rDNA-ITS 영역과 마찬가지로 염색체 내 높은 반복수로 존재하지만 영역 내 DNA 염기서열의 변이가 많이 나타나 근연 종간의 분류에 유용하지만 종 내에서도 유전적 변이가 많이 존재하기 때문에 모든 *Phytophthora* 종들을 증폭할 수 있는 universal primer의 선발에 어려움이 있다(Moss et al., 1995). 본 연구에서도 rDNA-IGS 영역에 대하여 증폭이 가능한 모든 universal primers set을 이용하여 PCR 증폭을 실시하였으나 *P. infestans*, *P. boehmeriae*, *P. citricola* 균주들은 증폭되지 않았다(Fig. 2b). 이들 핵 내 유전자의 DNA 염기서열을 분석한 결과 *ypt1* 유전자는 미토콘드리아 내 유전자의 분석 결과와 동일하게 나타났는데 국내 *Phytophthora* 종들은 Jaime 등 (2008)이 외



**Fig. 1.** Neighbor-Joining tree of the Korean isolates of *Phytophthora* genus with reference isolates (in bold) based on the sequence of *Cox1* gene and *Cox2* gene (a),  $\beta$ -tubulin gene (b) and elongation factor 1 alpha DNA (c). The numbers at the branch points indicate the percentages of bootstrap values(based on 1,000 bootstraps).

<sup>a</sup>Morphological criteria used to group *Phytophthora* species. This information is taken from Waterhouse (1963), Newhook et al. (1978) and Stamps et al. (1990).

<sup>b</sup>Genetic group used to group *Phytophthora* species. This information is taken from schena et al. (2006) and Jaime et al. (2008).

국의 *Phytophthora* 종에 대해 구분한 10개의 clade 중 clade 5를 제외한 clade 1, 2, 4, 7, 8, 10에 구분되었지만, rDNA-IGS 영역은 증폭을 하지 못한 *P. boehmeriae* 종으로 인해 clade 10을 제외한 clade 1, 2, 4, 7, 8에 포함되었다. 한편, 미토콘드

리아 내 유전자들의 분석에서와 마찬가지로 핵 유전자의 DNA 염기서열 분석을 이용한 분자생물학적 분류와 형태학적 분류와는 연관성을 찾기 어려웠다(Fig. 2).

국내 *Phytophthora* 속 균들에 관한 연구에 있어서 Hong 등

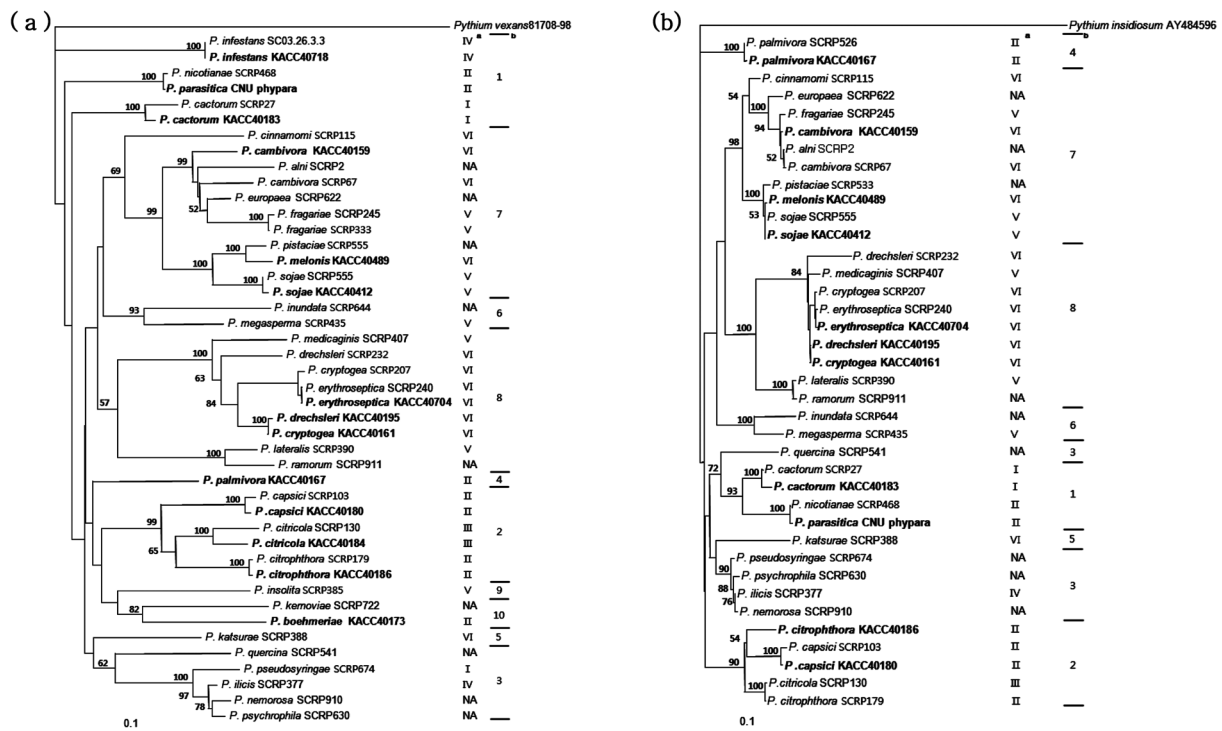


Fig. 2. Neighbor-Joining tree of the Korean isolates of *Phytophthora* genus with reference isolates (in bold) based on the sequence of *ras*-related protein (*Ypt1*) gene (a) and rDNA-IGS region (b). The numbers at the branch points indicate the percentages of bootstrap values (based on 1,000 bootstraps).

<sup>a</sup>Morphological criteria used to group *Phytophthora* species. This information is taken from Waterhouse (1963), Newhook et al. (1978) and Stamps et al. (1990).

<sup>b</sup>Genetic group used to group *Phytophthora* species. This information is taken from schena et al. (2006) and Jaime et al. (2008).

(2000)은 rDNA의 ITS 영역의 염기서열 분석을 통해 5개의 그룹(group A : *P. cactorum*, *P. infestans*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*; group B : *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. capsici*; group C : *P. cambivora*, *P. cinamomi*, *P. melonis*, *P. sojae*, *P. erythroseptica* 2군주; group D : *P. cryptogea*-*P. drechsleri* complex group; group E : *P. megasperma*)으로 나누었는데, 이들 A그룹에 속하는 *P. palmivora* KACC 40167 군주의 경우 본 연구의 *Ypt1* 유전자와  $\beta$ -tubulin 유전자의 염기서열 분석에 있어서 group B와 가까운 유연관계를 나타냈다. 또한 *Cox* 유전자 영역에 대한 분석에 있어서는 group C와 하나의 clade를 이루었고, rDNA-IGS 영역과 EF1A 유전자에서는 단독의 그룹을 형성하였다. 따라서 국내에 보고된 *P. palmivora*에 대한 정확한 종동정을 하기 위해서는 좀 더 상세한 형태적 특성과 유전적 분석이 요구된다(Fig. 1, 2).

국내 *Phytophthora* 종들의 5개 유전자 영역에 대한 분석에 있어서 국내 *Phytophthora*의 종들은 Jaime 등 (2008)이 나눈 clade에 따라 외국종들과 동일한 그룹을 형성하는 것으로 나타났다. 모든 국내 *Phytophthora* 종들이 외국의 *Phytophthora* 종들과 유전적 상동성이 매우 높음을 확인 할 수 있었다. 이들 중 대부분의 subclade로 나눈 clade 1의 경우, clade 1a에 포함되는 *P. cactorum* 군주와 clade 1c에 속한 *P. infestans* 군주는 서로 동일한 그룹을 형성하였으며, clade 1의 subclade를 형

성하는 *P. nicotianae* 군주는 국내 *P. parasitica* 군주와 한 그룹을 형성하였다. 현재 국내에서 중명으로 쓰이고 있는 *P. paracitica*의 경우, 이들 영역의 염기서열 분석에 의해 국내 *P. parasitica* CNU phypara 군주는 *P. nicotianae* SCR468, *P. nicotianae* P6303 군주와 99% 이상의 bootstrap 값을 나타냈다. 이는 *P. parasitica*와 *P. nicotianae*는 동일종 일 것이라는 Waterhouse 등(1963)의 주장을 뒷받침해준다. 그리고 현재 세계적으로 *P. nicotianae*로 통일하여 사용하고 있으나, 국내에서는 아직 이 두 종을 다른 종으로 보고되어 있다. 따라서 국내에서도 종명 통일이 요구된다.

국내 *Phytophthora* 종들의 ITS 영역을 분석한 Hong 등 (2000)은 일부 국내 *P. megasperma*는 *P. cryptogea*-*P. drechsleri* complex group과 밀접하게 연관되어 있다고 보고하였지만, Cooke 등 (2000)과 Schena 등 (2006)은 *P. megasperma* 종을 이들과 독립된 clade 6으로 분류한 바 있다. EF1A 유전자 영역을 제외한 4개 유전자 영역에 대한 분석을 수행한 본 연구에 있어서 clade 8에 동일한 그룹을 형성한 국내 *P. cryptogea*와 *P. drechsleri*와는 달리 외국의 *P. megasperma* 종은 clade 6에 포함되어졌다. 따라서 본 연구에서는 수행되지 않았지만 국내에서 발생하는 *P. megasperma*에 대한 정확한 종동정을 위해서는 종내 좀 더 많은 군주들을 대상으로 하는 보충 연구가 필요할 것을 판단된다.

5개 유전자 영역에 대한 DNA 염기서열 분석에 있어서 국내 *P. drechsleri* KACC 40195 균주는 외국의 *P. drechsleri* 균주들과 하나의 subgroup을 형성하지 않고 Hong 등 (2000)이 주장한 clade D에 포함된 *P. cryptogea* KACC 40161 균주와 subgroup을 이루며 94% 이상의 bootstrap 값을 나타냈다. 이는 Hong 등(1999, 2000)에 의한 일부 *P. cryptogea*와 *P. drechsleri*가 RFLP 분석과 rDNA의 ITS 영역의 염기서열 분석 결과에서 동일한 그룹을 형성한다는 주장과 동일한 결과를 얻었다. 한편, Mills 등 (1991)은 *P. cryptogea*-*P. drechsleri* complex group 내에서 두 종이 존재한다고 하였고, Park 등 (2003)은 DNA fingerprinting을 통하여 *P. drechsleri* 종의 경우 단독으로 있는 3개의 그룹과 *P. cryptogea* 종과 혼재되어 있는 그룹으로 나눈 바 있다. 그리고 Mostowfizadeh-Ghalefarsa 등 (2010)은 이들 종의 핵 및 미토콘드리아 DNA의 염기서열 분석을 통해 *P. drechsleri*의 경우 단독의 그룹을 형성했으며 *P. cryptogea*의 경우에는 3개의 그룹이 존재함을 보고했다. 따라서 본 연구에 사용된 국내 *P. cryptogea* 균주와 *P. drechsleri* 균주는 외국의 종들에 대해 유전적인 차이가 존재하거나 종동정이 잘못되었을 가능성이 존재한다. 따라서 추후 국내에 존재하는 *P. cryptogea* 종과 *P. drechsleri* 종들에 대한 정확한 종동정의 기준을 제시하기 위해서는 다양한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

### 적요

*Phytophthora* 속의 핵(ypt 유전자, rDNA-IGS region) 및 미토콘드리아(Cox 유전자,  $\beta$ -tubulin 유전자, EF1A 유전자) 내에 존재하는 5가지 유전자 영역을 이용하여 국내 *Phytophthora* 속 14종의 유전적 다양성을 분석하였다. 국내 *Phytophthora* 속은 외국의 *Phytophthora* 속과 동일한 clade를 형성하였으나, 외국의 *Phytophthora* 속과 마찬가지로 본 연구에서도 분자생물학적 분류와 형태학적 분류와는 연관성을 찾기 어려웠다. 기존에 보고된 국내 *P. palmivora* KACC 40167 균주의 그룹이 국내에서 보고된 분류체계와 일치하지 않아 추후 재검토가 필요하였다. *P. cryptogea*-*P. drechsleri* complex group 내 국내 *P. cryptogea* KACC 40161 균주와 *P. drechsleri* KACC 40195 균주는 서로 94% 이상의 유사도를 보여 재동정이 필요하였으며, *P. parasitica*와 *P. nicotianae*간의 유사도가 99% 이상으로 나타나 이 두 종간에 통일된 종명이 요구된다. 또한 현재 분자계통학상 5그룹으로 구분된 국내 *Phytophthora* 속을 외국균주들과 비교하여 10개의 그룹으로 새롭게 재분류하였다. 이러한 결과들은 국내 *Phytophthora* 속의 유전적 다양성 연구를 위해 유용한 자료가 될 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 충남대학교 학술연구비의 지원에 의해 이루어진 것임.

### 참고문헌

- Belbahri, L., Moralejo, E., Calmin, G., Oszako, T., Garcia, J. A., Descals, E. and Lefort, F. 2006. *Phytophthora polonica*, a new species isolated from declining *Alnus glutinosa* stands in Poland. FEMS Microbiol. Lett. 261:165-174.
- Chen, Y. and Roxby, R. 1996. Characterization of a *Phytophthora infestans* gene involved in the vesicle transport. Gene 181:89-94.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. and Brasier, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal Genet. Biol. 30:17-32.
- Dick, M. A., Dobbie, K., Cooke, D. E. L. and Brasier, C. M. 2006. *Phytophthora captiosa* sp. nov. and *P. fallax* sp. nov. causing crown dieback of *Eucalyptus* in New Zealand. Mycol. Res. 110:393-404.
- Donahoo, R., Blomquist, C. L., Thomas, S. L., Moulton, J. K., Cooke, D. E. L. and Lamour, K. H. 2006. *Phytophthora foliorum* sp. nov., a new species causing leaf blight of azalea. Mycol. Res. 110:1309-1322.
- Duncan, J. and Cooke, D. 2002. Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. Mycologist 16:59-66.
- Erwin, D. C. and Ribero, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APC Press, St. Paul, MN.
- 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.
- Hong, S. B., Jee, H. J., Lee, S. I. and Go, S. J. 1999. Restriction fragment length polymorphism of PCR amplified ribosomal DNA among Korean isolates of *Phytophthora*. Plant Pathol. J. 15:228-235.
- Hong, S. B., Jee, H. J., Kim, S. H. and Go, S. J. 2000. Phylogeny of Korean isolates of *Phytophthora* species based on sequence analysis of internal transcribed spacer of ribosomal DNA. Plant Pathol. J. 16:29-35.
- Ivors, K. L., Hayden, K. J., Bonants, P. J. M., Rizzo, D. M. and Gabelotto, M. 2004. AFLP and phylogenetic analyses of North American and European populations of *Phytophthora ramorum*. Mycol. Res. 108:378-392.
- Jaime, E. B., Michael, D. C., S. Y. Park, David, M. G. and Seogchan, K. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology 45:266-277.
- Judelson, H. S. and Blanco, F. A. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. Nat. Rev. Microbiol. 3:47-58.
- Kroon, L. P. N. M., Bakker, F. T., van den Bosch, G. B. M., Bonants, P. J. M. and Flier, W. G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Fungal Genet. Biol. 41:766-782.
- Liew, E. C. Y., Maclean, D. J. and Irwin, J. A. G. 1998. Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. Mycol. Res. 102:73-80.
- Martin, F. N. and Tooley, P. W. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially-encoded cytochrome oxidase I and II genes. Mycologia 95:269-284.
- Martin, F. N., Tooley, P. W. and Blomquist, C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. Phytopathology 94: 621-631.

- Mills, S. D., Forster, H. and Coffey, M. D. 1991. Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analyses. Mycol. Res. 95:31-48.
- Moorman, G. W., Kang, S., Geiser, D. M. and Kim, S. H. 2002. Identification and characterization of *Phythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. Plant Dis. 86: 1227-1231.
- Moss, T. and Stefanovsky VY. 1995. Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 50:25-66.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Panabieres, F., Banihashemi, Z. and Cooke, D. E. L. 2010. Phylogenetic relationship of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff and *P. drechsleri* Tucker. Fungal Biol. 114:325-339.
- Newhook, F. J., Waterhouse, G. M. and Stamps, D. J. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 143. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, U. K. 20pp.
- Paquin, B., Laforest, M. J., Forget, L., Roewer, I., Wang, Z., Longcore, J. and Lang, B. F. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. Curr. Genet. 31, 380-395.
- Park, D. S., Kang, H. W., Park, Y. J., Lee, B. M., Hahn, J. H. and GO, S. J. 2003. DNA fingerprinting analysis of the genus *Phytophthora* in Korea. Mycobiol. 31:235-243.
- Sachay, D. J., Hudspeth, D. S. S., Nadler, S. A. and Hudspeth, M. E. S. 1993. Oomycete mtDNA: *Phytophthora* genes for cytochrome c oxidase use an unmodified genetic code and encode proteins most similar to plants. Exp. Mycol. 17, 7-23.
- Schena, L. and Cooke, D. E. L. 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a 'molecular tool box' for the detection and characterization of *Phytophthora* species. Microbial. Meth. 67:70-85.
- Stamps D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. and Hall, G. S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Commonw. Agric. Bur. Int. Mycol. Inst. Mycol. Pap. 162. 28pp.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea(2009). Plant Pathol. 853pp.
- Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T. and Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin sequences. Mycologia 98:410-422.
- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Papers No. 92.