



# 한국의 고추 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum* 5종의 신속한 검출을 위한 포자 PCR 및 qPCR 방법

## Spore PCR and qPCR Methods for Rapid Detection of Five *Colletotrichum* Species Responsible for Pepper Anthracnose in Korea

### \*Corresponding authors

S.-Y. Park

Tel: +82-61-750-5187

Fax: +82-61-750-5187

E-mail: spark@scnu.ac.kr

K.-H. Kim

Tel: +82-2-880-4672

Fax: +82-2-880-2317

E-mail: sospicy77@snu.ac.kr

ORCID

<http://orcid.org/0000-0003-1267-1111>

†These authors equally contributed.

정해준<sup>1,2†</sup> · 윤종한<sup>1,2†</sup> · 박호영<sup>1,2†</sup> · 손민<sup>3†</sup> · 박숙영<sup>1,2\*</sup> · 김광형<sup>3\*</sup><sup>1</sup>순천대학교 식물학과, <sup>2</sup>순천대학교 IT-Bio 융합시스템(BK21 plus) 협동과정, <sup>3</sup>서울대학교 농생명공학부**Haejun Jeong<sup>1,2†</sup>, Jonghan Yoon<sup>1,2†</sup>, Hoyoung Park<sup>1,2†</sup>, Min Son<sup>3†</sup>, Sook-Young Park<sup>1,2\*</sup> , and Kwang-Hyung Kim<sup>3\*</sup>**<sup>1</sup>Department of Plant Medicine, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea<sup>2</sup>Interdisciplinary Program in IT-Bio Convergence System (BK21 plus), Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea<sup>3</sup>Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

Pepper anthracnose, caused by *Colletotrichum* spp., leads to a decrease in the quantity of pepper fruit production. Molecular diagnosis is crucial for rapid identification of pathogens and determination of fungicide resistance. However, the traditional process of isolating the pathogen, extracting genomic DNA, and analyzing the gene sequence is time-consuming, which delays rapid diagnosis. In this study, we introduced a method using conidia of *Colletotrichum* spp. instead of genomic DNA, eliminating the need for DNA extraction or special processing for diagnosis. To elucidate this method, sensitivity was assessed through polymerase chain reaction (PCR) and quantitative real-time PCR (qPCR) tests using internal transcribed spacer-based primer pairs. Both PCR and qPCR tests showed that detection is feasible with just one conidia, with over 1,000 conidia yielding results comparable to approximately 1 pg of genomic DNA. For amplifying the cytochrome b gene for quinone-oxidase inhibitor fungicide susceptibility testing, detection from a single conidium is achievable, but a stable PCR product is obtained by increasing the number of cycles to 35. Additionally, the addition of 10% grinding fresh chili pepper paste to V8-Juicea gar medium, which is known for inducing conidia rapidly from the isolates, resulted in 3.2 to 6.0 times more conidia compared to the commonly used potato dextrose agar medium, enhancing the potential for swift testing. Taken together, this study presents a direct utilization of pepper anthracnose conidia through PCR or qPCR, offering a valuable technique for amplifying target genes, such as the minimum conidial amount and barcode genes, for molecular identification of anthracnose disease in pepper through PCR and qPCR analysis.

**Keywords:** *Capsicum annuum*, *Colletotrichum* spp., Genomic DNA, Spore PCR, Quantitative real-time PCR

Received July 20, 2024

Revised August 10, 2024

Accepted August 14, 2024

## 서론

*Colletotrichum* spp.는 곡류, 콩, 과일 및 채소 등 다양한 기주  
를 침입하여 탄저병을 일으키며, 환경 조건이 병원균에 유리할

경우 경제적 손실을 초래하는 중요한 식물 병원균이다(Bailey와 Jeger, 1992). 이 중 고추(*Capsicum annuum*) 탄저병은 열매가 움푹 패이는 괴사 병징과 함께 감염 부위에 다량의 포자가 형성되어 주변 기주로 전파되어 상품성이 저하된다(Manandhar 등, 1995). 고추 탄저병에 의해 50% 이상의 수량 손실이 보고된 경우도 있다(Pakdeevaporn 등, 2005). 우리나라에서는 고추 탄저병으로 인한 피해가 연간 총 고추 생산량의 10%에 달하는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2008).

우리나라 고추 탄저병의 원인 병원균으로는 *C. acutatum* (Han 등, 2009; Park과 Kim, 1992), *C. scovillei* (Oo 등, 2017), *C. gloeosporioides* (Kim 등, 2006; Kim과 Nam, 1999; Park과 Kim, 1992), *C. coccodes* (Oh 등, 1988; Park과 Kim, 1992), *C. dematium* (Park과 Kim, 1992), *C. siamense* (Oo 등, 2021), *C. truncatum* (Oo와 Oh, 2019)이 보고되었다(Korean Society of Plant Pathology, 2022). 따라서, 탄저병균의 원인 병원균을 빠르고 정확하게 밝히고 농약 저항성 여부를 검정할 경우, 효과적인 탄저병 저항성 품종 육종 및 병 제어에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다(Freeman 등, 1998).

*Colletotrichum* 종을 동정하기 위해서는 형태학적 동정과 함께 종 복합체(species complex) 내에서 13개의 서로 다른 바코드 유전자의 염기서열 정보를 확보해야 한다. 확보된 염기서열 정보는 계통분류 연구에 활용되어 정확한 종 동정에 기여한다. 13개 바코드 유전자는 nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) (White 등, 1990), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (Guerber 등, 2003), chitin synthase (*CHS-1*) (Carbone과 Kohn, 1999), actin (*ACT*) (Carbone과 Kohn, 1999),  $\beta$ -tubulin (*TUB2*) (Glass와 Donaldson, 1995; O'Donnell과 Cigelnik, 1997), histone 3 (*HIS3*) (Crous 등, 2004), calmodulin (*CAL*) (Weir 등, 2012), DNA lyase (*APN2*), DNA lyase와 mating-type locus *MAT1-2-1* 유전자 간의 스페이스(*APN2/MAT-IGS*), *GAPDH*와 a hypothetical protein 간의 스페이스(*GAP2-IGS*), glutamine synthetase (*GS*), mating type gene (*MAT1-2-1*)과 manganese-superoxide dismutase (*SOD2*)로 구성된다(Vieira 등, 2020).

Damm 등(2012)에 의해 보고된 *Colletotrichum acutatum* 종 복합체는 최소 6개의 유전자 염기서열 정보(*ITS*, *GAPDH*, *CHS-1*, *ACT*, *TUB2*, *HIS3*)가 필요하며, Weir 등(2012)에 의해 보고된 *C. gloeosporioides* 종 복합체의 경우도 마찬가지로 최소 6개의 염기서열(*ITS*, *GAPDH*, *CHS-1*, *ACT*, *TUB2*, *CAL*)의 확보가 요구된다. 이외에도 *C. truncatum* 종 복합체와 *C. coccodes*의 경우에도 최소 6개의 염기서열 확보가 필요하다.

Damm 등(2012)에 의해 계통 분류에 사용된 6개의 바코드 유전자 정보를 활용하여 우리나라 농촌진흥청 씨앗은행(Korean Agricultural Culture Collection [KACC]; <https://genebank.rda.go.kr>)에 보유 중인 *C. acutatum* 종 복합체 균주들이 재동정되었다(Thao 등, 2023). 이 연구에서는 기존 고추 탄저병균으로 보고된 *C. acutatum* KACC 43123을 *C. nymphaeae*로 재동정하였다. Thao 등(2024)은 *C. acutatum*과 동일한 바코드 유전자 정보를 통해 *C. gloeosporioides* 종 복합체도 재동정하였으며, 기존에 고추 탄저병으로 보고된 *C. gloeosporioides* KACC 40003을 *C. fruticola*로 재동정하였다(Table 1).

곰팡이의 포자를 template DNA로 활용하여 polymerase chain reaction (PCR) 및 quantitative real-time PCR (qPCR)에 적용하는 방법은 공기 중에 존재하는 인간에게 해로운 곰팡이인 *Pneumocystis carinii*, *Stachybotrys chartarum* 및 *Penicillium roqueforti* 등에 성공적으로 적용되었다(Olsson 등, 1996; Wakefield, 1996; Williams 등, 2001). *Colletotrichum* 종에서는 박과 작물에 탄저병을 일으키는 *C. lagenarium*의 검출을 위한 특이적인 primer를 적용한 PCR 및 qPCR 검정법이 보고되었다(Kuan 등, 2011). 그러나 고추 탄저병을 일으키는 병원균에 적용된 사례는 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 농촌진흥청 국립농업과학원 씨앗은행에 기탁된 고추탄저병균 5개 종(*C. scovillei*, *C. nymphaeae*, *C. fruticola*, *C. coccodes*, *C. truncatum*)을 분양받아 공시 균주로 활용하였다(Table 1). 이 연구의 목적은 분양받은 균주들로부터 포자를 유도하여 게놈 DNA의 추출 없이 포자를 DNA 대신 PCR 또는 실시간 정량(qPCR)의 template DNA로 사용할 수 있는지의 여부를 검정하였다.

**Table 1.** List of *Colletotrichum* isolates used in this study

Species	Isolate no.	Previous identifications	Complex
<i>Colletotrichum scovillei</i>	KACC 410665	-	Acutatum
<i>C. nymphaeae</i>	KACC 43123	<i>C. acutatum</i>	Acutatum
<i>C. fruticola</i>	KACC 40003	<i>C. gloeosporioides</i> (Kim et al., 2006)	Gloeosporioides
<i>C. coccodes</i>	KACC 40009	-	-
<i>C. truncatum</i>	KACC 40013	<i>C. dematium</i> (Park and Kim, 1992)	Truncatum

또한, 게놈 DNA 대신 포자를 PCR 및 qPCR의 template로 활용할 수 있는 가능성을 검토하였으며, 이를 통해 6개의 바코드 유전자를 증폭할 수 있는지 여부도 살펴보았다. 더 나아가, 고추 탄저병의 퀴논-외부 저해제(Quinone-outside inhibitor, Qoi) 계열 살균제에 대한 저항성을 검출할 수 있는 cytochrome b (*cytb*) 유전자의 증폭 및 염기서열 분석 가능성을 평가하였다 (Forcelini 등, 2016). 마지막으로, 실험에 사용한 5개의 *Colletotrichum* 균주의 포자 유도용 배지를 개선하였다.

### 재료 및 방법

**고추 탄저병 5종 확보 및 병원균 배양.** 실험 대상 고추 탄저병 균주 총 5종(Table 1)은 KACC에서 분양받았다. 일반적인 균주의 배양은 감자 한천 배지(potato dextrose agar [PDA] media; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 수행하였다.

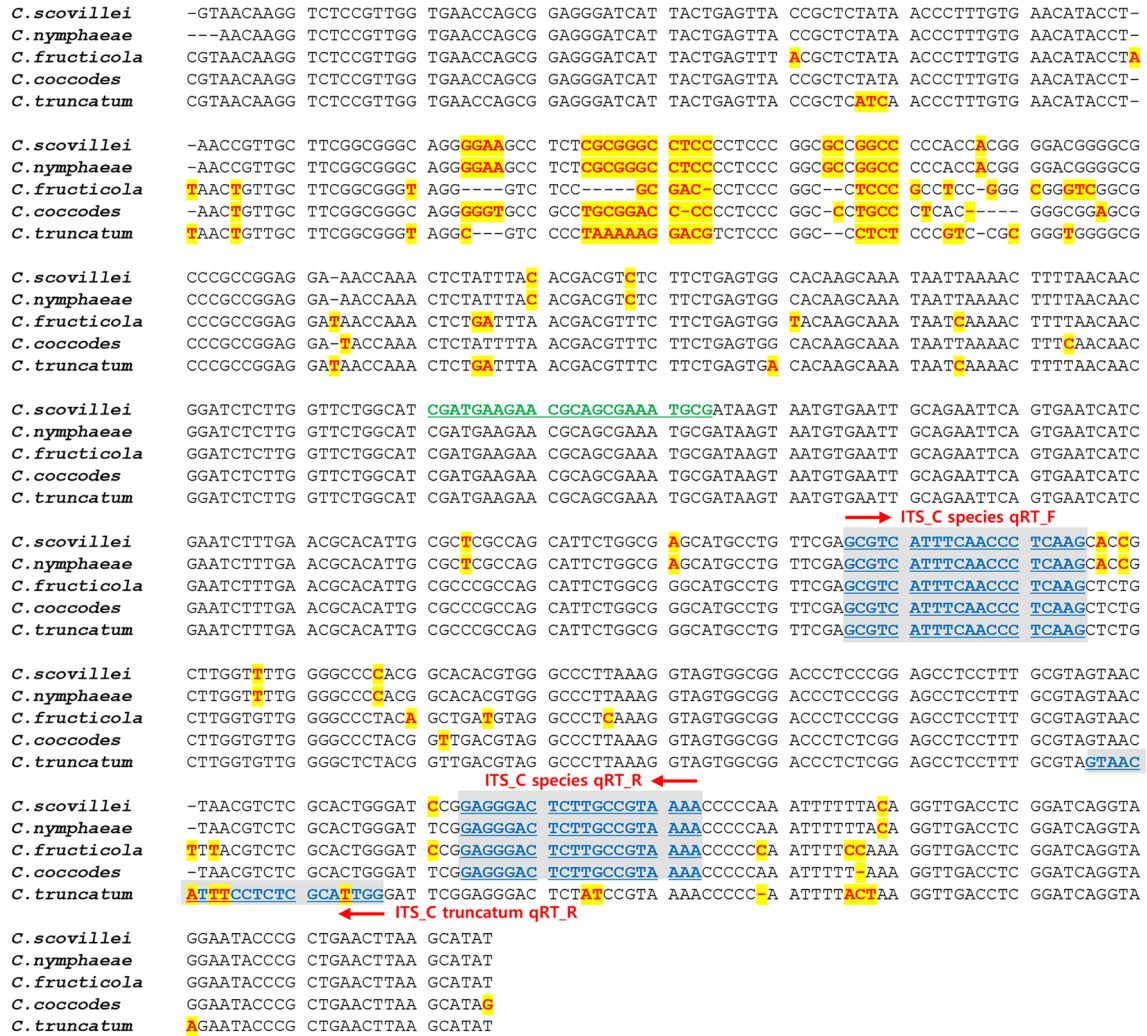
포자 형성을 촉진하기 위해 V8-Juice 한천 배지(8% Campbell's V8-Juice, 1.5% 한천, 0.1N NaOH를 사용하여 pH 7로 조정)와 V8-Juice 한천 배지에 간 고추 10%를 첨가한 배지(8% Campbell's V8-Juice, 10% 간 고추, 1.5% 한천, 0.1N NaOH를 사용하여 pH 7로 조정)를 사용하였다. 간 고추 준비는 고추를 세척하여 물기를 제거한 뒤 그라인더(Axlerim HEBL-EUB1BG; HappyCall, Kimhae, Korea)에서 1분씩 총 3회 곱게 갈아 부피 대비 10%로 배지에 넣어주었다. 모든 균주는 장기 보존을 위해 탄저병균의 포자 현탁액을 20% glycerol 용액에 희석하여 -80°C 초저온냉동고에 보관하였다.

**DNA 추출.** DNA 추출을 위해 탄저병균은 25°C에서 7일 동안 5 ml의 감자 액체 배지(potato dextrose broth; Difco Laboratories)에서 암 상태로 배양하였다. 게놈 DNA는 NucleoSpin Plant 키트(Macherey-Nagel, Düren, Germany)를 사용하여 추

**Table 2.** Primers used in this study

Locus	Primer	Primer sequence (5'-3')	Reference
Quantitative real-time PCR			
ITS	ITS_C species qRT_F	GCGTCATTTCAACCCCTCAAG	This study
	ITS_C species qRT_R	TTTTACGGCAAGAGTCCCTC	This study
	ITS_C.truncat qRT_R	CCAATGCGAGAGGAAATGTTAC	This study
Conventional PCR			
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990
GAPDH	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	Guerber et al., 2003
	GDR1	GGGTGGAGTCGTA CTGAGCATGT	Guerber et al., 2003
CHS-1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGAAGAAG	Carbone and Kohn, 1999
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	Carbone and Kohn, 1999
Actin	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	Carbone and Kohn, 1999
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Carbone and Kohn, 1999
TUB2	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell and Cigelnik, 1997
	Bt-2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass and Donaldson, 1995
HIS3	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	Crous et al., 2004
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG	Crous et al., 2004
CAL	CL1C	GAATTC AAGGAGGCCTTCTC	Weir et al., 2012
	CL2C	TTCTGCATCATGAGCTGGAC	Weir et al., 2012
<i>cytb</i>	C.gramcytb-bf1	GAAGAGGTATGTACTACGGTTCATATAG	Forcelini et al., 2016
	C.gramcytb-br1	TAGCAGCTGGAGTTGCATAG	Forcelini et al., 2016

PCR, polymerase chain reaction; ITS, internal transcribed spacer; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; CHS-1, chitin synthase; ACT, actin; TUB2, β-tubulin; HIS3, histone 3; CAL, calmodulin; *cytb*, cytochrome b.



**Fig. 1.** Sequence comparison of internal transcribed spacers (ITS) generated from five *Colletotrichum* strains. Red letters with yellow highlights indicate inconsistent sequences between the strains. Blue letters with gray highlights indicate polymerase chain reaction (PCR) and quantitative real-time PCR (qPCR) primers. The red arrow indicates the direction of the primer.

출하였다. DNA 농도는 NanoDrop ND-1000 분광기(NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, NC, USA)를 사용하여 측정하였다. 추출된 DNA는 실험 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

**PCR 및 qPCR용 primer 제작 및 특이성.** 분양받은 5종의 PCR 및 qPCR용 primer 제작을 위해 Table 2에 기술된 primer 쌍을 이용하여 염기서열을 확보하였으며, 이 중 실험에 사용한 ITS 염기서열 정보는 Fig. 1 및 Supplementary Data 1에 기술하였다.

포자수에 따른 DNA 함량을 확인하기 위한 PCR 및 qPCR용 primer의 제작은 온라인 소프트웨어 Integrated DNA Technologies의 scitools 내에 탑재된 RealTime qPCR Tool (<https://sg.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>)을 활용하였다. 확보된 염기서열 중 ITS 영역을 기반으로 4개 균주

(*C. scovillei*, *C. nymphaeae*, *C. fructicola*, *C. coccodes*)의 경우 ITS\_Cspecies\_qRT\_F를 forward primer로, 그리고 ITS\_Cspecies\_qRT\_R을 reverse primer로 PCR 및 qPCR을 수행하였다. *C. truncatum*의 경우 forward 방향 primer는 다른 4개의 *Colletotrichum* 종과 동일하게 사용하였으며, reverse primer로 ITS\_C.truncat\_qRT\_R을 사용하였다(Table 2).

**PCR 및 염기서열 분석.** PCR은 ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. PCR 증폭은 10 ng으로 희석한 DNA 1 µl와 10 pmol/µl 로 희석한 primer 쌍을 각각 1 µl씩 넣고, i-StarMAX II PCR master mix (iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)를 10 µl 넣어 총 20 µl의 부피로 멸균 증류수로 맞춘 뒤 PCR을 수행하였다. 모든 PCR 증폭은 다음과 같은 조건으로 동일하게 수행하였다:

(a) 96°C에서 3분; (b) 94°C에서 1분 동안 denaturation, 52°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분 동안 extension을 2회 반복; (c) 94°C에서 30초 동안 denaturation, 55°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 1분 동안 extension을 28회 반복; (d) 72°C에서 3분 동안 extension. 염기서열의 확보를 위해, ITS 영역 증폭은 Table 2에 기술한 primer 쌍을 이용하여 PCR 증폭한 뒤, PCR의 증폭 여부는 DNA 염색 시약(SolGent EcoDye™; DNA Staining Solution, Daejeon, Korea)이 첨가된 0.8% agarose gel을 이용하여 전기영동하였다. 염기서열 분석을 위해 PCR에 사용한 동일 primer 쌍을 이용하여 염기서열 정보를 확보하였다.

**qPCR 조건 및 표준 곡선.** 실험 균주들의 희석 DNA 농도에 따른 PCR 산물의 정량화를 위해 초기 DNA는 1× TE (10 mM Tris-Cl [pH 8.0]과 1 mM EDTA [pH 8.0])로 10 ng/μl로 희석하였다. 그 다음 qPCR에서 선택한 primer에 대한 표준 곡선을 작성하기 위해 DNA 템플릿의 1:10 연속 희석액을 7개 생성하여, 총 8개의 희석된 DNA 시료(10 ng/μl, 1 ng/μl, 0.1 ng/μl, 0.01 ng/μl, 0.001 ng/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl, 1 fg/μl)를 준비하였다. DNA 템플릿의 각 희석액을 3회 반복하여 준비하여 독립적으로 2회 이상 실험을 수행하였다.

qPCR은 Hard-Shell® low-Profile Thin-Wall 96-Well Skirted PCR Plates (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)와 CFX96 Touch™ Real-Time PCR System을 사용하여 수행하였다. 각 well당 5 μl의 2× iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 게놈 DNA 또는 포자 현탁액 1 μl, 각 primer 15 pmol로 총 10 μl가 되도록 준비하였다. qPCR 조건은 94°C에서 10분, 그 다음 94°C에서 15초, 60°C에서 1분으로 총 40 cycle로 수행한 뒤 확보된 cycle threshold (Ct) 값을 확보하였다. 이 값은 그래프를 그릴 때 사용하였다. 각 실험의 표준 곡선(standard curve)은 3회 반복 결과에 대한 평균값을 활용하였다. 시료당 3회 반복 실험을 수행하였으며, 독립적인 반복은 최소 2회 수행하였다.

Ct 값을 계산하기 위한 임계값(baseline)은 기기에서 자동으로 설정하였다. log gDNA 템플릿 농도를 Ct 값에 대해 회귀시켜 표준 곡선을 만들었다. 표준 곡선의 효율성이 90-110%이고 R-제곱 값이 0.99보다 높으면 결과 분석에 적합한 값으로 결정하였다(Quesada 등, 2018).

**Colletotrichum 포자 준비 및 검정.** 실험에 사용할 포자는 V8-Juice 또는 V8-Juice와 10% 간 고추 한천 배지에서 3-7일간 암 상태에서 배양한 뒤 멸균 증류수 2 ml를 이용하여 배지 표면을 긁어 포자를 수확한 뒤, 한 겹 miracloth (Calbiochem, Bil-

lerica, CA, USA)로 걸러 포자를 수거하였다. 수거된 포자는 혈구계산기(hemocytometer; Paul Marienfeld GmbH & Co., KG Lauda-Königshofen, Germany)로 현탁액의 농도를 계산하여 10<sup>8</sup> spore/ml로 희석하였다. 현탁액 농도를 μ당 1×10<sup>5</sup> spore/μ로 맞춘 뒤, 이 현탁액을 1:10으로 연속 5회 희석하여 포자 현탁액을 제조하였다. 이 희석을 통해 총 6가지 농도의 포자 현탁액을 준비하였다: (1) 1×10<sup>5</sup> spores/μl; (2) 1×10<sup>4</sup> spores/μl; (3) 1×10<sup>3</sup> spores/μl; (4) 1×10<sup>2</sup> spores/μl; (5) 10 spores/μl; (6) 1 spore/μl. 이 조정된 포자를 게놈 DNA 대신 사용하여 PCR 및 qPCR을 수행하였다. PCR 증폭은 준비한 포자현탁액 1 μl와 10 pmol/μl로 희석한 primer 쌍을 각각 1 μl씩 넣고, PCR의 경우 i-StarMAX II PCR master mix를 10 μl 넣어 총 20 μl의 부피로 멸균 증류수로 맞춘 뒤 PCR을 수행하였다. 모든 PCR 증폭은 앞서 기술한 동일한 조건에서 수행하였다. qPCR은 앞서 기술한 방법과 동일하게 수행하였다. 모든 실험은 시료당 3반복으로 수행하였으며, 독립적인 반복을 2회 수행하여 결과값을 확보하였다. 이를 통해 희석 end point를 분석하였다.

**기주 고추 열매 포자 형성 및 형성 포자 이용 Colletotrichum 검출.** 기주 식물 고추는 신청양 품종을 사용하였다. 신청양 품종 씨앗을 화분(직경 9 cm)에 파종한 후 16주 동안 온실에서 재배하였다. 온실의 온도는 22-30°C로 유지하였으며, 살균제는 적용하지 않았다. 이렇게 재배된 고추 열매를 기내 실험에 사용하였다. 접종 실험을 위해 고추 열매를 70% 에탄올로 표면을 닦아준 뒤, 멸균 증류수로 표면을 닦고 5분 동안 말렸다. 5개의 공시 균주의 포자 현탁액 농도를 혈구계산기로 측정하여 1×10<sup>6</sup> spore/ml로 맞추어 병원성 검정에 사용하였다.

감염된 시료 준비는 두 가지로 나누어 준비하였다. 첫 번째는 상처 접종하였다. 한 개의 고추 열매를 세 지점으로 나누고 멸균된 핀(0.18×8 mm; Qingdao Dongbang Medical Co., Ltd, Shandong, China)을 이용하여 지점당 멸균된 핀으로 10번씩의 상처를 낸 뒤, 포자 현탁액 10 μl를 떨어뜨려 접종하였다. 두 번째는 고추 열매에 준비된 포자 현탁액 총 400 μl를 무상처 접종하였다. 접종이 완료된 고추 열매는 100% 상대습도 상태의 챔버에서 25-27°C, 암 상태로 5-10일간 배양하였다. 탄저병 증상과 포자가 생성되면 PCR 및 qPCR의 포자 시료 측정을 위해 사용하였다.

**고추 탄저병 바코드 유전자 및 cytb 유전자 증폭.** 탄저병균 *Colletotrichum* 종을 동정하기 위한 바코드 유전자들의 증폭이 가능한지 여부를 검정하였다. 탄저병균에 감염된 기주의 열매에서 형성된 포자 덩이로부터 포자를 확보하여 PCR의

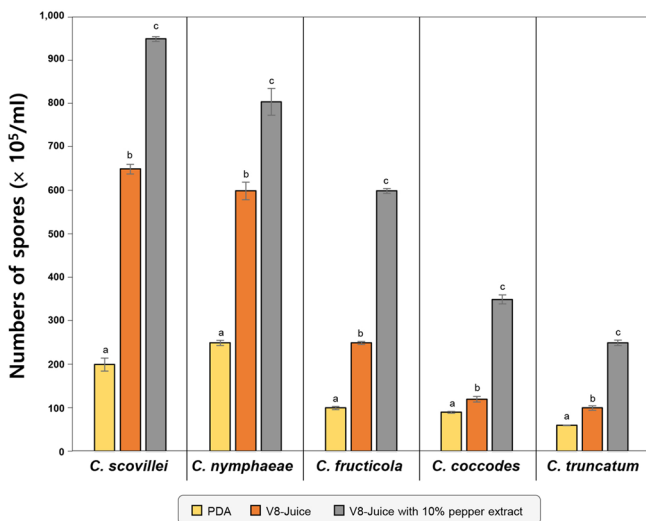
template로 사용하였다. 시료 채취는 감염된 열매의 표징이 나타난 곳에 멸균된 이쑤시개를 이용하여 세균 콜로니를 찍어 들어 올리는 것과 동일한 방식으로 포자를 확보하여 PCR mixture에 곧바로 희석하였다. 또 다른 포자는 V8-Juice 한천 배지 또는 V8-Juice 한천 배지에 10%의 간 고추를 첨가한 배지에서 형성된 포자를 이쑤시개로 동일한 방법으로 채취하여 PCR 실험을 수행하였다.

또한 QoI 저항성 및 감수성 여부를 판단할 수 있는 *cytb* 유전자 증폭 가능 여부를 알아보기 위해 PCR 검정을 수행하였다. 총 4가지 농도의 포자 현탁액을 준비하여 실험을 수행하였다: (1)  $1 \times 10^4$  spores; (2)  $1 \times 10^3$  spores; (3)  $1 \times 10^2$  spores; (4) 10 spores. 4가지로 조정된 포자를 1  $\mu$ l씩 계놈 DNA 대신 사용하여 PCR 실험을 수행하였다.

## 결과 및 고찰

**고추 탄저병 포자 유도 배지 개선.** 빠른 포자 확보를 위해, PDA 배지, V8-Juice 한천 배지 및 V8-Juice 한천 배지에 10%의 간 고추를 넣어 제조한 3가지 배지의 포자 형성률을 비교하였다(Fig. 2). 그 결과 실험에 사용한 탄저병균 모두 PDA 배지에 비해 V8-Juice 한천 배지가 적게는 1.3배(*C. coccodes*의 경우)에서 3.3배(*C. scovillei*의 경우) 더 많은 포자가 형성되었다.

그러나 V8-Juice 한천 배지에 10%의 간 고추를 넣을 경우 PDA에 비해 가장 적게는 3.2배(*C. nymphaeae*의 경우)에서 많



**Fig. 2.** Conidial production of five *Colletotrichum* strains on potato dextrose agar (PDA) medium, V8-Juice agar medium, and V8-Juice with 10% grinding chili pepper paste agar medium. <sup>a,b,c</sup>The same letters above the bar graph indicate no significant difference. Duncan's multiple test was used to determine significance at the 95% probability level.

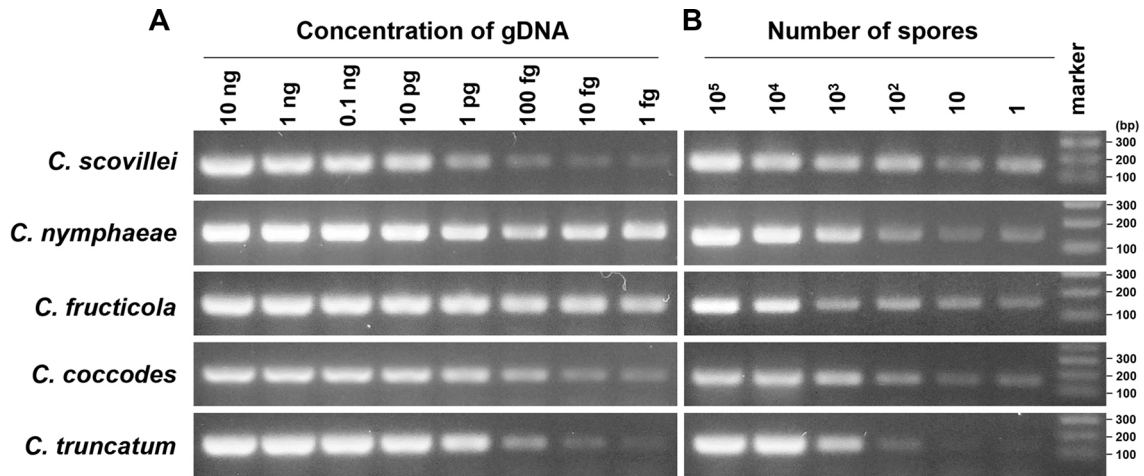
게는 6.0배(*C. fruticola*의 경우)의 높은 포자 형성률을 보였다. 이 결과를 통해 실험 전체적으로 V8-Juice 한천 배지에 10%의 간 고추를 넣은 배지를 사용하였다. 따라서 이 연구에서 사용한 V8-Juice에 10%의 간 고추를 넣은 한천 배지를 활용할 경우 고추 탄저병 포자를 다른 배지에 비해 빠르게 유도하여 다양한 실험에 적용할 수 있을 것이다.

**PCR 및 qPCR용 primer의 민감도.** 계놈 DNA 추출 없이 고추 탄저병균 포자만으로 PCR 또는 qPCR 실험 수행 가능성을 알아보기 위해, qPCR 검정에 적합한 primer 쌍을 개발하였다(Table 2). qPCR은 SYBR 기반으로 짧은 단편을 빠르게 증폭하기 때문에 증폭 산물이 70-250 bp가 되도록 디자인하게 되는데, PCR 실험 결과 모든 탄저병균에서 예측 크기가 증폭되었다(Fig. 3A). 각 탄저병균 계놈 DNA의 경우 10 ng부터 1 fg에 이르는 DNA 양의 범위에서 모두 성공적으로 증폭되었다(Fig. 3A). 특히  $10^{-3}$ 에  $10^{-4}$  (=1 pg에서 100 fg) 범위의 양으로 계놈 DNA를 template로 넣었을 때 3종의 탄저병균(*C. scovillei*, *C. coccodes*과 *C. truncatum*)의 경우 생성되는 PCR 산물의 양이 10 ng의 계놈 DNA를 넣었을 때와 동일한 증폭 산물이 증폭되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 나머지 2종의 탄저병균 *C. nymphaeae*와 *C. fruticola*는 10 ng에서 1 fg 범위까지 염기서열 분석이 가능한 수준으로 PCR 증폭 산물이 생성되었다(Fig. 3A).

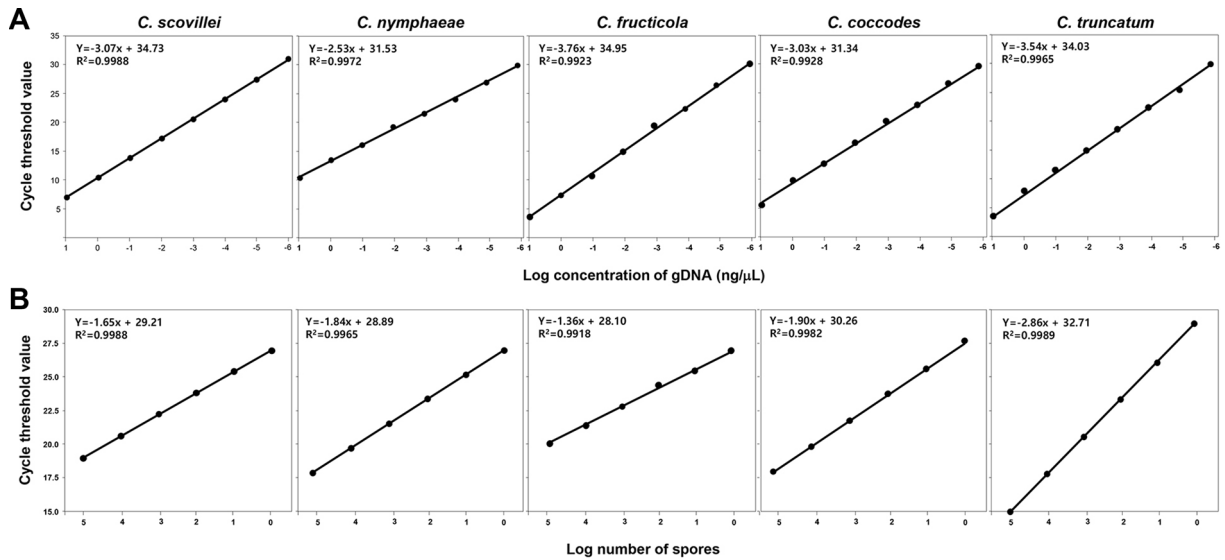
계놈 DNA 대신 포자 개수( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10, 1)를 달리하여 PCR을 수행한 결과, *C. scovillei*는  $10^5$ 개에서 단일(1개) 포자 까지도 PCR 산물이 증폭되었다. 이와 동일하게 *C. nymphaeae*, *C. fruticola*, *C. coccodes*에서도 동일하게 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 3B). 그러나 *C. truncatum*의 경우는  $10^5$ 에서  $10^2$ 개 포자 범위에서 증폭되었다. 이 결과는 다른 곰팡이에 비해 *C. truncatum*이 포자를 활용한 PCR을 수행할 경우, 더 많은 수의 포자가 요구되는 것으로 예측되었다.

이상의 결과는 PCR 증폭 연구에서 적용한 qRT primer 쌍이 정량된 계놈 DNA 대비 포자 수의 DNA 농도를 예측할 수 있을 만큼 높은 민감성을 검출할 수 있음을 보여주고 있으며, 정확한 DNA 양을 측정하기 위해서는 qPCR을 통해 분석이 이루어져야 할 것이다.

**표준 곡선과 분석 감도.** PCR 수행 결과로 검증된 동일한 primer 쌍을 이용하여 5개 *Colletotrichum* 균주의 포자 수가 지시하는 DNA 양을 정량하기 위해 qPCR을 수행하였다. qPCR 수행 결과 5종의 정량적인 표준 곡선은 실험에 적용한 primer가 5종의 *Colletotrichum*의 ITS 영역 모두 허용 가능한 효율(90-110%)과 낮은 분산( $r^2 > 0.95$ )임을 나타내었다(Fig. 4A). 또한, 포



**Fig. 3.** PCR amplification using ITS\_C species qRT\_F/R or ITS\_C species qRT\_F/ITS\_C.truncat qRT\_R. (A) Amplified PCR products using at concentration of 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, and 1 fg. (B) PCR result from different number of spore. PCR, polymerase chain reaction; ITS, internal transcribed spacer.



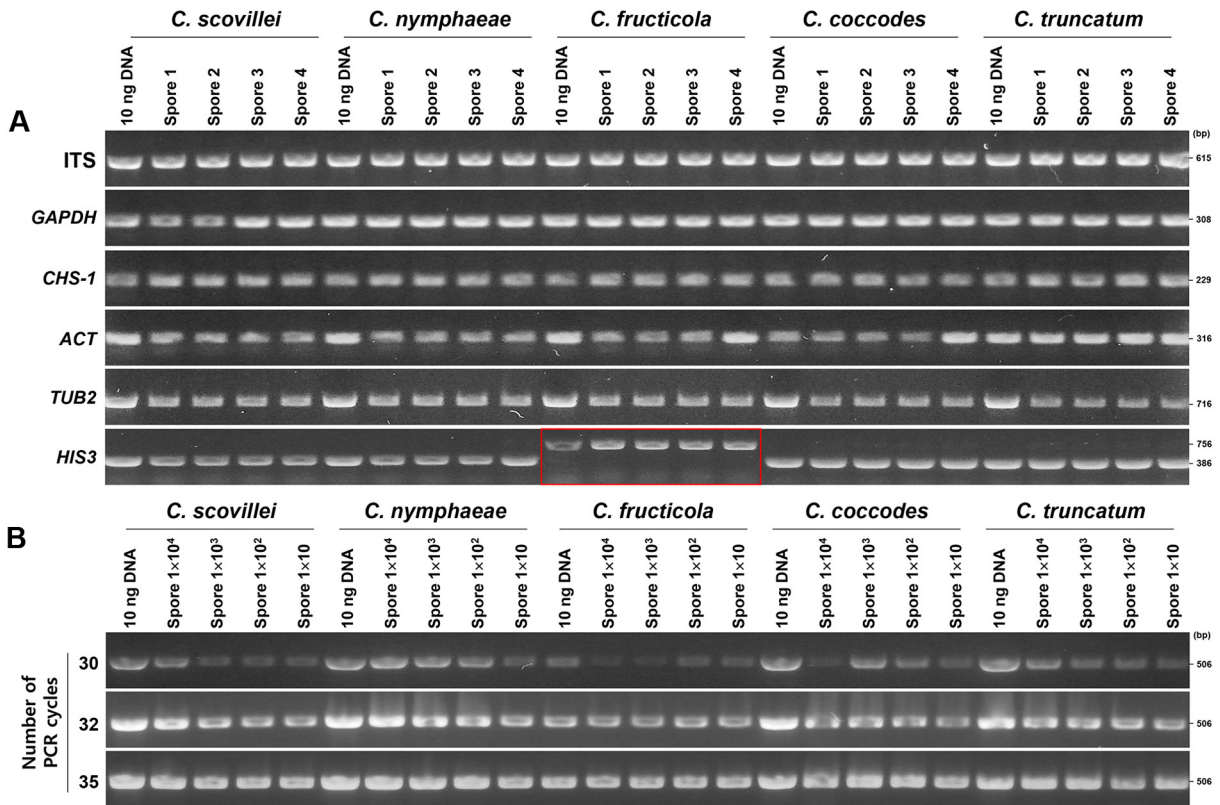
**Fig. 4.** Standard curve of serial dilution of genomic DNA and spores from *Colletotrichum* strains in quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Genomic DNA (A) and spores (B) from the five *Colletotrichum* strains in qPCR with ITS\_C species qRT\_F/R (first to fourth graph from the left) and ITS\_C species qRT\_F/ITS\_C.truncat qRT\_R (fifth graph on the right). ITS, internal transcribed spacer.

자 qPCR의 결과에서도 효과적으로 증폭되었다(Fig. 4B). 이 결과는 *Colletotrichum* 특정 종에 대한 특이적 primer를 제작할 경우 1개의 포자 이상에서 특정 종의 탄저병균을 검출할 수 있을 것임을 시사한다. 따라서 앞으로 빠른 진단을 위해 특이적 primer 쌍 개발이 요구된다.

Fig. 3과 Fig. 4의 결과를 종합해 보면, *C. truncatum*을 제외한 나머지 탄저병균(*C. scovillei*, *C. nymphaeae*, *C. fructicola*, *C. coccodes*)에서 1개의 포자에서도 PCR 증폭 산물 및 qPCR 값을 확보할 수 있을 것으로 예측되어, 앞으로 포장 내에서 수집한 시료를 이용하여 감염 여부를 판단할 때 적용 가능할 것으로 예

측되었다. 이에 더하여 안정적인 검출 및 염기서열 분석을 위한 PCR 증폭 산물 확보를 위해 1,000개 이상의 포자가 필요할 것으로 나타났다.

**고추 탄저병 바코드 유전자 및 *cytb* 유전자 증폭.** 순화된 게놈 DNA 추출 없이 탄저병 바코드 유전자를 증폭한 결과, 5개 탄저병균(*C. scovillei*, *C. nymphaeae*, *C. fructicola*, *C. coccodes*, *C. truncatum*)의 6개 유전자가 모두 병반과 배지에서 형성된 포자로부터 PCR 산물이 확보되었다. 특히 증폭 밴드는 positive control인 10 ng의 게놈 DNA와 동일한 수준으로 PCR 증폭 산



**Fig. 5.** Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products targeting on (A) DNA barcode internal transcribed spacer (ITS), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), chitin synthase (*CHS-1*), actin (*ACT*),  $\beta$ -tubulin (*TUB2*), histon-3 (*HIS3*) and calmodulin (*CAL*) gene, and (B) cytochrome b (*cytb*) gene. The amplified gene in the red square box indicates the *CAL* gene generated from *C. fruticola*. In (A), spores 1-2 represent spores lifted from the surface of a pepper fruit, while spores 3-4 represent spores formed from V-8 Juice with 10% grinding chili pepper paste agar medium.

물이 확보되었다(Fig. 5A). *TUB2* 유전자와 *CAL* 유전자의 경우 expected size가 각각 716 bp와 756 bp로 다른 유전자보다도 큰 size임에도 불구하고, 성공적으로 PCR 산물을 확보할 수 있었다. 증폭된 PCR 산물을 염기서열 분석한 결과 성공적으로 염기서열을 확보할 수 있었다. 또한 염기서열 분석 결과 해당 탄저병균과 동일한 염기서열이었다.

Qol 감수성 및 저항성을 판별할 수 있는 염기서열 부위인 *cytb* 유전자 506 bp의 증폭 여부를 검정하였다. Qol 감수성 여부 판별은 염기서열 분석이 필수적인데, 많은 양의 PCR 산물이 확보되어야 한다. *cytb* 유전자 증폭 결과 순화된 계놈 DNA와 동일하게  $1 \times 10^4$  to 10개 포자를 PCR template로 사용하여 30 cycle로 PCR을 수행하였을 때 성공적인 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 5B).

그러나 포자수 대비 염기서열을 분석할 만큼의 PCR 산물이 확보되지 않은 것으로 판단되어(Fig. 5B), 추가적으로 2 cycle과 5 cycle을 늘려 32 cycle과 35 cycle로 PCR을 수행한 결과 Fig. 5B의 그림처럼 PCR 산물이 cycle 수가 늘어남에 따라 PCR 증폭 산물이 증가하였다. 특히, 35 cycle에서는 모든 실험구가 대조구(10 ng/tube)만큼 PCR 산물이 증가하였다.

증폭된 모든 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과, 반응 tube 당 1,000개, 100개 그리고 10개 포자를 넣은 실험구에서 30 cycle보다도 32-35 cycle에서 염기서열의 peak 및 결과가 더 명확하게 제시되었다. 이 결과는 Qol 감수성 및 저항성 검정을 위해 PCR cycle의 수를 2-5 cycle 더 늘릴 경우 명확한 염기서열 정보를 확보할 수 있음을 지시한다.

특이적인 primer를 이용한 PCR과 qPCR의 높은 민감도(sensitivity)는 식물병을 진단할 때 중요하다. 특히 포자 1개만으로도 병 진단이 가능하다면 빠른 대응이 가능할 것이다. 이 연구에서는 계놈 DNA의 추출 과정 없이 포자를 이용하여 병원균의 바코드 유전자 및 *cytb* 유전자 증폭 가능성을 제시하였다. 또한 탄저병균 포자를 열처리(Fraczek 등, 2019) 등의 특별한 처리 없이 직접 실험에 사용 가능함을 다양한 방법을 통해 검증하였다. 따라서 만약 포장(field)으로부터 탄저병 여부를 진단할 경우 쉽고, 빠르며, 경제적으로 실험할 수 있을 것이다. 또한, 본 연구에서 개선한 V8-Juice에 간 고추를 첨가한 배지를 일부 포자 확보가 어려운 균주에 적용할 경우 탄저병 진단 및 병원성 검정을 위한 포자 확보가 가능할 것이다.



## 요 약

*Colletotrichum* spp.에 의해 감염되는 고추 탄저병은 고추 생산량에 경제적인 감소를 초래한다. 분자 진단은 병원균의 신속한 동정과 살균제 저항성을 결정하는 데 중요한 역할을 하는데, 이를 위한 병원균의 분리, 게놈 DNA 추출 및 유전자 염기서열 분석은 시간이 소요된다. 이 연구에서는 게놈 DNA 추출이나 특별한 처리 과정 없이 *Colletotrichum* 종의 포자를 사용하는 방법을 적용하였다. 방법의 명확성을 위해 ITS 기반의 primer 쌍을 이용하여 PCR 및 qPCR 검정으로 민감도를 분석하였다. PCR과 qPCR 실험 모두 탄저병균 1개의 포자에서도 검출되었다. 이 결과 1,000개 포자가 1 pg의 게놈 DNA와 동일하였다. Qol 계열 살균제 감수성 검정을 위한 *cytb* 유전자 증폭은 단일 포자에서도 검출이 가능하지만, cycle 수를 35 cycle로 늘릴 경우 염기서열 정보를 안정적으로 확보할 수 있을 만큼의 PCR 산물이 확보되었다. 또한, V8-Juice 한천 배지에 10% 간 고추를 첨가할 경우 일반적으로 사용되는 감자 한천 배지에 비해 3.2-6.0배 더 많은 포자가 형성되어 포자 기반 연구를 위해 적용 가능할 것이다. 본 연구를 종합하면, 이 연구는 PCR 및 qPCR 분석을 통해 고추 탄저병의 분자 동정을 위한 최소 포자량 및 바코드 유전자를 포함한 표적 유전자 증폭에 포자를 활용할 수 있는 유용한 기술을 제공한다.

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgments

This work was supported by the Rural Development Administration of Korea (RS-2022-RD010350).

## Electronic Supplementary Material

Supplementary materials are available at Research in Plant Disease website (<http://www.online-rpd.org/>).

## References

- Bailey, J. A. and Jeger, M. J. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford, UK.
- Carbone, I. and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J. M., Simoneau, P. and Hywel-Jones, N. L. 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Stud. Mycol.* 50: 415-430.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C. and Crous, P. W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73: 37-113.
- Forcelini, B. B., Seijo, T. E., Amiri, A. and Peres, N. A. 2016. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-oxidase inhibitor fungicides. *Plant Dis.* 100: 2050-2056.
- Fraczek, M. G., Zhao, C., Dineen, L., Lebedinec, R., Bowyer, P., Bromley, M. et al. 2019. Fast and reliable PCR amplification from *Aspergillus fumigatus* spore suspension without traditional DNA extraction. *Curr. Protoc. Microbiol.* 54: e89.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.* 82: 596-605.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1323-1330.
- Guerber, J. C., Liu, B., Correll, J. C. and Johnston, P. R. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95: 872-895.
- Han, K.-S., Park, J.-H., Han, Y.-K. and Hwang, J.-H. 2009. Pathogenicity and occurrence of pepper seedling anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Res. Plant Dis.* 15: 88-93. (In Korean)
- Kim, D.-H., Jeon, Y.-A., Go, S.-J., Lee, J.-K. and Hong, S.-B. 2006. Re-identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* isolates stored in Korean Agricultural Culture Collection (KACC). *Res. Plant Dis.* 12: 168-177. (In Korean)
- Kim, H. G. and Nam, M. H. 1999. Anthracnose of strawberry in Korea. *Plant Dis. Agric.* 5: 8-13. (In Korean)
- Kim, J. T., Park, S.-Y., Choi, W., Lee, Y.-H. and Kim, H. T. 2008. Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 24: 17-23.
- Korean Society of Plant Pathology (KSPP). 2022. List of Plant Diseases in Korea (LPDK). KSPP Press, Seoul, Korea. 630 pp.
- Kuan, C.-P., Wu, M.-T., Huang, H. C. and Chang, H. 2011. Rapid detection of *Colletotrichum lagenarium*, causal agent of anthracnose of cucurbitaceous crops, by PCR and real-time PCR. *J. Phytopathol.* 159: 276-282.
- Manandhar, J. B., Hartman, G. L. and Wang, T. C. 1995. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis.* 79: 380-383.
- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116.

- Oh, I. S., In, M. S., Woo, I. S., Lee, S. K. and Yu, S. H. 1988. Anthracnose of pepper seedling caused by *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes. *Kor. J. Mycol.* 16: 151-156.
- Olsson, M., Sukura, A., Lindberg, L. A. and Linder, E. 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scand. J. Infect Dis.* 28: 279-282.
- Oo, M. M., Kim, M.-R., Kim, D.-G., Kwak, T.-S. and Oh, S.-K. 2021. First report of *Colletotrichum siamense* causing anthracnose of chili pepper fruit in Korea. *Plant Dis.* 105: 1567.
- Oo, M. M., Lim, G., Jang, H. A. and Oh, S.-K. 2017. Characterization and pathogenicity of new record of anthracnose on various chili varieties caused by *Colletotrichum scovillei* in Korea. *Mycobiology* 45: 184-191.
- Oo, M. M. and Oh, S.-K. 2019. First report of anthracnose of chili pepper fruit caused by *Colletotrichum truncatum* in Korea. *Plant Dis.* 104: 564.
- Pakdeevaporn, P., Wasee, S., Taylor, P. W. J. and Mongkolporn, O. 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. *Plant Breed.* 124: 206-208.
- Park, K. S. and Kim, C. H. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 8: 61-69.
- Quesada, T., Hughes, J., Smith, K., Shin, K., James, P. and Smith, J. 2018. A low-cost spore trap allows collection and real-time PCR quantification of airborne *Fusarium circinatum* spores. *Forests* 9: 586.
- Thao, L. D., Choi, H., Choi, Y., Mageswari, A., Lee, D. and Hong, S. B. 2023. Re-identification of *Colletotrichum acutatum* species complex in Korea and their host plants. *Plant Pathol. J.* 39: 384-396.
- Thao, L. D., Choi, H., Choi, Y., Mageswari, A., Lee, D., Kim, D.-H. et al. 2024. Re-identification of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex isolates in Korea and their host plants. *Plant Pathol. J.* 40: 16-29.
- Vieira, W. A. D. S., Bezerra, P. A., Silva, A. C. D., Veloso, J. S., Câmara, M. P. S. and Doyle, V. P. 2020. Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 143: 106694.
- Wakefield, A. E. 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1754-1759.
- Weir, B. S., Johnston, P. R. and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73: 115-180.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, New York, NY, USA. 315-322 pp.
- Williams, R. H., Ward, E. and McCartney, H. A. 2001. Methods for integrated air sampling and dna analysis for detection of airborne fungal spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2453-2459.