



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0098792
(43) 공개일자 2013년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0020595

(22) 출원일자 2012년02월28일

심사청구일자 2012년02월28일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김연주

경기도 화성시반월동 868번지 신영동 현대이차아파트 212동 505호

양덕춘

경기도 용인시 기흥구서천동 1번지 경희대학교 생명과학대학

김민정

경기도 수원시 장안구 연무동 225-9번지 3층

(74) 대리인

특허법인다나

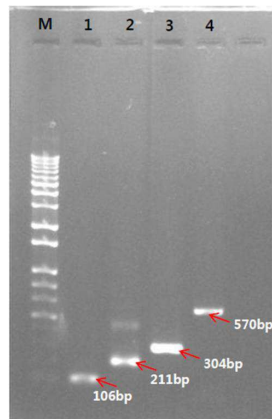
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 인삼 병원균 진단용 특이 프라이머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인삼에 병을 유발하는 토양 병원성 곰팡이 4종을 진단할 수 있는 종(species) 및 속(genus) 특이 프라이머 및 상기 프라이머에 관한 것으로, 토양 병원성 곰팡이 4종을 진단할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

정방향 프라이머가 서열번호 1 또는 서열번호 2로 선택되고, 역방향 프라이머가 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 핵산서열로 이루어진 군에서 하나 또는 그 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 인삼 병원균을 진단하기 위한 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인삼 병원균은 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 또는 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*)인 것을 특징으로 하는 인삼 병원균을 진단하기 위한 프라이머 세트.

청구항 3

토양 시료에서 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출된 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항에 따른 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는 인삼 병원균을 진단하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 인삼 병원균을 진단하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균 진단키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인삼에 병을 유발하는 토양 병원성 곰팡이 4종 중 적어도 하나 이상을 진단할 수 있는 종(species) 및 속(genus) 특이 프라이머 및 상기 프라이머를 이용하여 토양 병원성 곰팡이 4종을 진단할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인삼(*Panax ginseng*)은 다년생의 반음지성 속근초로 오가피과에 속하며 생육적온은 20℃전후로 주로 북반구의 극동지방에 자생하거나 재배되며 우리나라의 주산지인 경기 북부지역과 풍산 및 금산 지방이다. 인삼의 주 약리 성분은 사포닌으로서 자양강장, 면역증강, 피로회복, 중추신경계 조절, 항스트레스, 항당뇨, 항종양활성 등의 우수한 효능이 밝혀짐에 따라 그 소비가 증가추세에 있으며 특히 고려인삼의 우수함이 밝혀짐에 따라 그 소비 또한 꾸준히 늘어날 것으로 전망된다.

[0003] 그러나 인삼의 이러한 뛰어난 효능과 소비 욕구에도 불구하고 인삼의 특성상 한 장소에서 4 ~ 6년을 재배해야 하기 때문에 병충해의 영향을 크게 받고 뿌리썩음병 등으로 인한 연작 장애가 심하여 한번 재배한 후에는 그 장소에서의 재작 연한이 적어도 7년 이상이나 된다. 이 때문에 한번 인삼을 재배한 곳에서는 연작장애로 인해 더 이상 인삼을 재배하지 않고 인삼 재배지를 윽기게 되며 이로 인해 현재 인삼 재배지가 부족한 실정이다. 또한 2004년 한국식물병리학회의 발표에 따르면 우리나라에서 재배되고 있는 작물중 인삼의 병해가 총 38종으로 가장 많은 것으로 보고되기도 하였다.

[0004] 인삼의 가장 대표적인 병에는 모잘록병, 뿌리썩음병, 역병, 탄저병, 점무늬병, 회색곰팡이병, 균핵병, 줄기속무름병 등이 있으며 모잘록병을 유발하는 미생물 중 라이족토니아 솔라니 또는 피시움 울티멈, 뿌리썩음병을 유발하는 미생물 중 푸사리움 솔라니 또는 실린드로카폰 더스트럭턴스 등은 시간이 경과할수록 병원균 밀도가 증가되어 모잘록병 또는 뿌리썩음병에 의한 피해 발생이 크다. 따라서 재배농가는 상기 병원균의 감염을 막기 위해 인삼을 한번도 재배하지 않은 초작지를 선호하게 되나 병원균의 감염여부를 신속히 진단하기 곤란하여 초작지 선정에 어려움을 겪고 있다.

[0005] 이를 해결하기 위해 종래에는 연속적으로 희석한 재배 예정지의 토양시료를 선택배지에 생성되는 병원균 총수를 측정함으로써 토양내의 병원균을 검출하는 방법이 사용되었다. 그러나 토양내에 존재하는 병원균, 특히 실린드로카폰 더스트럭턴스의 후벽포자는 발아율이 현저히 낮아 병원균의 검출이나 정확한 밀도측정이 곤란하다. 또한 균 배양과 검출에 많은 시간과 인력이 소요되고 감염여부 판단의 정확도가 떨어진다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국내 공개특허 제10-2010-0053831호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 인삼에 병을 유발하는 토양 병원성 곰팡이 4종인 라이족토니아 솔라니, 푸사리움 솔라니, 피시움 울티멈 및 실린드로카폰 더스트럭턴스를 진단할 수 있는 프라이머 세트 및 상기 프라이머 세트를 이용한 진단 키트를 제공하고자한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 정방향 프라이머가 서열번호 1 또는 서열번호 2로 선택되고, 역방향 프라이머가 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 핵산서열로 이루어진 군에서 하나 또는 그 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 인삼 병원균을 진단하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 토양 시료에서 총 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출된 DNA를 주형으로 하고, 상기 정방향 프라이머가 서열번호 1 또는 서열번호 2로 선택되고, 역방향 프라이머가 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 핵산서열로 이루어진 군에서 하나 또는 그 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 인삼 병원균을 진단하기 위한 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는 인삼 병원균을 진단하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 상기 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균 진단키트를 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 인삼 병원균을 진단하는 방법 및 키트를 이용하여 토양에서 병원균의 유무를 확인하고, 인삼 재배에 있어 적합하지 않은 토양을 선별하며, 인삼 병의 감염 예방 및 신속하고 정확한 진단이 가능하게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 각 프라이머 세트의 전기영동사진이다.

도 2는 A 실험구의 전기영동사진이다.

도 3은 B 실험구의 전기영동사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 정방향 프라이머가 서열번호 1 또는 서열번호 2로 선택되고, 역방향 프라이머가 서열번호 3, 서열번호

호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 핵산서열로 이루어진 군에서 하나 또는 그 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 인삼 병원균을 진단하기 위한 프라이머 세트에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 프라이머 세트는 서열번호 1 및 3의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 4의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 5의 프라이머 세트 또는 서열번호 1 및 6의 프라이머 세트일 수 있다. 또한 서열번호 2 및 3의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 4의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 5의 프라이머 세트 또는 서열번호 2 및 6의 프라이머 세트일 수 있다.

[0015] 본 발명의 프라이머 세트는 상기 서열번호 1 및 3의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 4의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 5의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 6의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 3의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 4의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 5의 프라이머 세트 또는 서열번호 2 및 6의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 하나 또는 그 이상 선택될 수 있다. 따라서 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 인삼 병원균의 다중 진단이 가능할 수 있다.

[0016] 본 발명에서의 상기 인삼 병원균은 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*) 중 어느 하나일 수 있다.

[0017] 본 발명에서 "특이적"이라는 용어는 다른 병원균에 결합하지 않고 상기 인삼 병원균에만 특이적으로 결합하는 것을 의미한다.

[0018] 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 인삼 모잘록병 및 뿌리썩음병의 병원균인 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 또는 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*)의 유무를 진단 및 예방할 수 있으며, 모잘록병 및 뿌리썩음병이 발병되는 식물은 인삼에 한정되지 않으며, 또한 상기 병원균이 유발하는 식물병 및 토양에서의 상기 병원균의 유무를 진단하기 위하여 이용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 서열번호 1 및 3의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 4의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 5의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 6의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 3의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 4의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 5의 프라이머 세트 또는 서열번호 2 및 6의 프라이머 세트에서, 서열번호 1 및 서열번호 2는 정방향 프라이머이며, 서열번호 3 내지 6은 역방향 프라이머이다. 상기 역방향 프라이머에서 서열번호 3의 프라이머는 라이족토니아 솔라니의 역방향 프라이머이다. 상기 역방향 프라이머에서 서열번호 4의 프라이머는 푸사리움 솔라니의 역방향 프라이머이다. 상기 역방향 프라이머에서 서열번호 5의 프라이머는 피시움 울티멈의 역방향 프라이머이다. 상기 역방향 프라이머에서 서열번호 6의 프라이머는 실린드로카폰 더스트럭턴스의 역방향 프라이머이다.

[0020] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 내지 서열번호 5의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머 (21개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 서열번호 2의 프라이머(21개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 2의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한 토양 시료에서 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출된 DNA를 주형으로 하고, 상기 정방향 프라이머가 서열번호 1 또는 서열번호 2로 선택되고, 역방향 프라이머가 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 핵산서열로 이루어진 군에서 하나 또는 그 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 인삼 병원균을 진단하기

위한 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는 인삼 병원균을 진단하는 방법에 관한 것이다.

[0024] 본 발명의 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 증폭 산물의 검출 방법일 경우 이에 한정되지 않는다.

[0025] 본 발명의 상기 토양 시료에서 DNA를 추출하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 채취한 토양시료서 총 DNA를 추출할 수 있으며, 일례로, 추출은 Mobio Laboratories Inc의 Soil DNA kit 매뉴얼에 따라 수행될 수 있다.

[0026] 본 발명은 상기 토양 시료에서 추출된 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0027] 본 발명은 또한 상기 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균 진단키트를 제공한다.

[0028] 본 발명은 PCR 방법을 이용하여 본 발명에 따른 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균을 진단할 수 있는 키트에 관한 것이다.

[0029] 상기 키트는 본 발명에 따른 프라이머 세트 및 PCR에 필요한 시약을 포함하고 인삼 병원균 존재유무를 진단할 수 있는 키트에 관한 것이다.

[0030] 본 발명은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 P 또는 S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0031] 본 발명의 키트에서, 상기 PCR에 필요한 시약은 예를 들면, 이에 제한되지 않고, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머, 리보뉴클레아제 저해제, 내열성 중합효소 및 반응 완충액 등일 수 있으며, 반응 완충액은 Taq 중합효소 완충액 및 PCR 완충액 양자를 모두 포함하며, 내열성 중합효소는 EF Taq 중합효소 등을 이용할 수 있다.

[0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0033] <실시예>

[0034] 실시예 1. 인삼 병원균의 DNA 수집, DNA 추출, 시퀀싱

[0035] 인삼 병원균은 토양 병원균이면서 인삼 병해 중 심각한 연작장애를 일으키는 뿌리썩음병 원인균들인 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, 수탁번호 KACC 41092), 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*, 수탁번호 KACC 41077)와 모잘록병을 일으키는 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*, 수탁번호 KACC 42265), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*, 수탁번호 KACC 40123)를 농촌진흥청에서 운영하는 KACC(한국농업미생물자원센터)와 KCTC(생명연구자원본부)에서 분양받았다.

[0036] 분양받은 미생물은 25℃에서 약 1주일간 배양하여 어느 정도 군사가 자라면 일부를 떼서 DNA를 추출했다. DNA 추출은 solgent(주)사의 Fungi prep. kit를 이용하거나 논문 "A Quick and Safe Method for Fungal DNA Extraction" Plant Pathol. J. 25(1):108-111.(Lee, M., S. Park, et al.(2009).)을 이용하여 수행하였다.

[0037] 추출한 DNA는 ITS 1, 4 영역을 ITS 1, ITS 4 primer로 PCR을 수행하여 증폭하고 시퀀싱하였다.

[0038] 또한 NCBI(미국 국립생물공학정보센터) 홈페이지에서도 다른 연구자들이 기존에 시퀀싱하였던 병원균의 ITS 1,

4 영역을 다운로드 받아 직접 시퀀싱한 결과와 비교하고 참고하여 프라이머를 제작하였다.

[0039] 실시예 2. 프라이머 제작

[0040] 프라이머 제작은 시퀀싱한 DNA 핵산서열을 Bioedit프로그램을 이용하여 정렬하고 Primer Premier 5 프로그램을 이용하여 각 병원균 별 특이적인 DNA 영역을 찾아 프라이머로 제작하였다. 정방향 프라이머인 서열번호 1 및 서열번호 2는 표 1의 병원균에 공통적으로 존재하는 염기서열이다.

표 1

[0041] 프라이머 제작

병원균	Forward	Reverse	크기
리족토니아 솔라니(Rhizoctonia solani)	서열번호 1 5' - GAA TCA TCG AAT YTT TGA ACG -3'	서열번호 3 5' GAA TGG ACT ATT AGA AGC GGT 3'	283bp 304bp
푸자리움 솔라니(Fusarium solani)		서열번호 4 5' GCC TGA GGG TTG TAA TGA CG 3'	85bp 106bp
피시움 울티멈(Pythium ultimum)	서열번호 2 5' - AAT GTG AAT TGC AGA ATT CAG T -3'	서열번호 5 5' TTA GCG GGT AGT CT GTC TGC 3'	549bp 570bp
실린드로카폰 더스트럭턴스(Cylindrocarpon destructans)		서열번호 6 5' TGC GAG GTG TGC TAC TAC G 3'	190bp 211bp

[0042] 실시예 3. PCR 수행, 단일밴드 확인 및 적용

[0043] 제작한 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고 전기영동으로 밴드를 확인하며 가장 밴드가 명확하게 나오는 조건을 설정하였다. 또한 프라이머 제작시 의도했던 DNA 증폭물의 길이와 전기영동상의 밴드 위치가 그 길이에 맞는 적절한 위치에 있는지 확인하였다.

[0044] 상기 밴드 위치를 확인한 다음 실제로 적용하여 실험을 수행하였다. 인삼밭에서 토양시료(A 및 B 실험구)를 채취하여 그 DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. 정방향 프라이머로는 서열번호 2를 이용하였고, 토양시료는 표 1의 인삼 경작 지역에서 채취하였다. PCR 수행을 통해 정해진 위치에서 밴드가 확인되므로, 상기 토양시료에 병원균이 존재하는 것이고 이로써 인삼 병을 진단하거나 인삼 재배 전에 토양의 적합 유무를 판단할 수 있었다.

표 2

[0045] A 실험구 (27종 토양시료)

MID No	Sample	Concentration (ug/ul)	Yield of ginseng (kg/10a)	*th year after harvesting	Specific band detection of the fungi	PCR area for the
1	2006-A	43	1423.9	5	(3).(4)	포천
2	2006-B	17	640.1	5	2.3.4	연천
3	2006-C	17	323.2	5	2.3.4	연천
4	2007-A	12	854.9	4	2.3.4	연천
5	2007-B	17	527.9	4	(1).2.3.4	연천
6	2007-C	45	224.5	4	1.2.3.4	연천
7	2008-A	27	855.8	3	(1).2.3.4	연천
8	2008-B	24	524.0	3	2.4	연천
9	2008-C	13	192.5	3	2.4	연천
10	2009-A	25	1052.6	2	2.4.	연천
11	2009-B	25	513.2	2		연천
12	2009-C	14	117.9	2	2.4	연천
13	2010-D1	35	1156.8	1	4	연천

14	2010-D2	53	1017.8	1	(3).(4)	포천
15	2010-D3	62	979.1	1	3.4	포천
16	2010-E1	24	938.6	1	3.4	포천
17	2010-E2	49	925.0	1	1.(2).3.4	포천
18	2010-E3	21	894.0	1	(1).(3).(4)	연천
19	2010-F1	39	542.5	1	1.3.4	연천
20	2010-F2	15	541.5	1	1.3.4	연천
21	2010-F3	28	536.5	1	1.3.4	연천
22	2010-G1	27	213.8	1	1.2.3.4	포천
23	2010-G2	24	202.4	1	1.3.4	포천
24	2010-G3	14	216.5	1	1.3.4	파주
25	2010-H1	15	104.7	1	1.3.4	포천
26	2010-H2	16	96.2	1		포천
27	2010-H3	12	74.8	1		연천

[0046] 상기 표 2의 “*th year after harvesting” 값은 수확 이후 *년이 경과된 토양을 나타낸다. 상기 표2의 “Specific PCR band for detection of the fungi” 값은 밴드가 확인된 인삼 병원균을 나타낸다. 1은 피시움 울티멈, 2는 리족토니아 솔라니, 3은 실린드로카폰 더스트렉턴스, 4는 푸자리움 솔라니를 의미한다. 상기 A 실험구 토양을 이용한 전기영동은 도 2에 나타내었다.

표 3

[0047] B 실험구 (15종의 초작지, 재작지 및 예정지 시료)

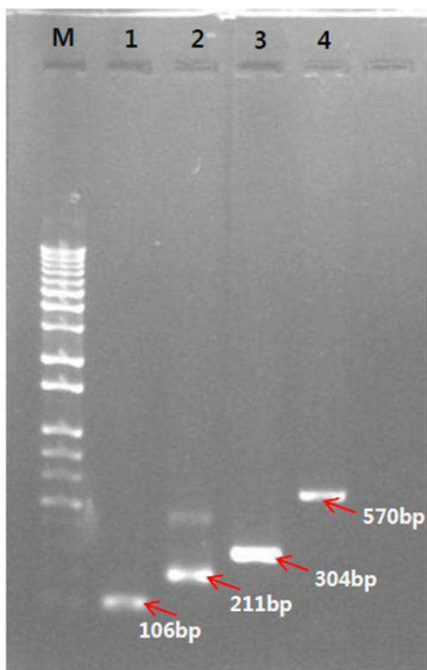
No No	식재 구분	시료채취 지역	토심 깊이(cm)	인삼 재배시 병발생 유무	경작기간 (년)	토양내 병원성 곰팡이유무			
						Pythium	Rhizoctonia	Cylindrocarpus	Fusarium
1	초작지	파주	2-A-10	건전	2년근	+	-	-	-
2	초작지	파주	2-A-20	건전	2년근	+	-	-	-
3	초작지	파주	2-A-30	건전	2년근	-	-	-	-
4	초작지	연천	4-B-10	이병	4년근	++	+	+	+
5	초작지	연천	4-B-20	이병	4년근	++	+	+	+
6	초작지	연천	6-A-10	건전	6년근	+	-	-	-
7	초작지	연천	6-A-30	건전	6년근	++	-	+	+
8	초작지	연천	6-B-30	이병	6년근	++	+	+	+
9	재작지	연천	R2-A-10	건전	2년근	+	+	+	+
10	재작지	연천	R2-A-20	건전	2년근	-	+	+	++

11	재작지	연천	R2-B-10	이병	2년근	-	+	+	++
12	재작지	파주	R4-B-10	이병	4년근	++	+	+	++
13	재작지	파주	R4-B-20	이병	4년근	+	+	+	++
14	재작지	연천	R6-A-10	건전	6년근	+	-	-	-
15	예정지	파주	0-A-20			-	-	-	-

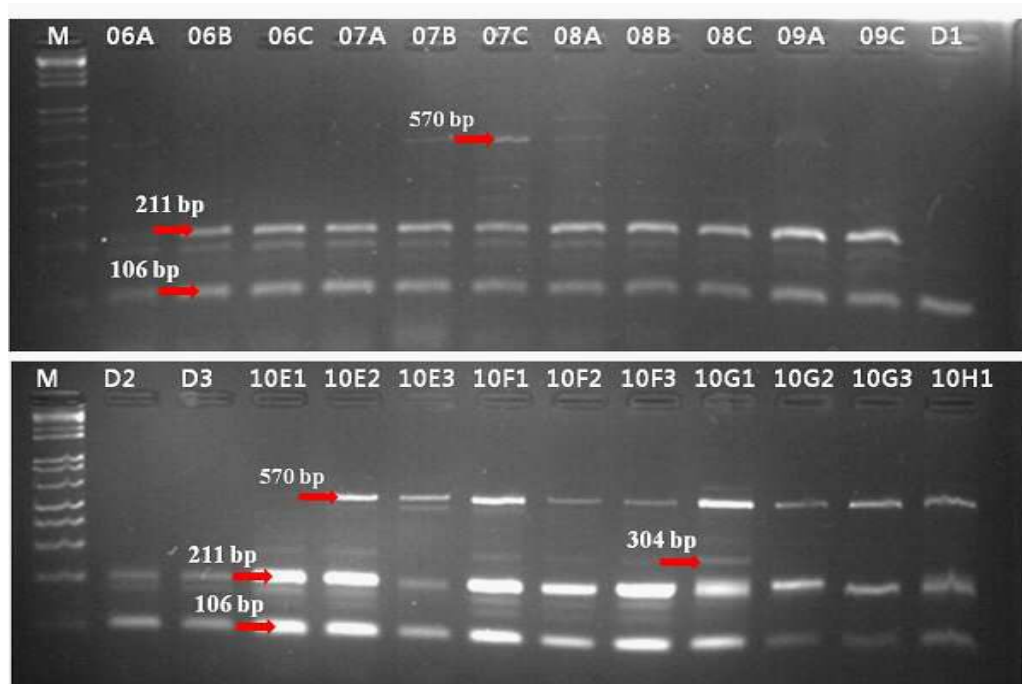
[0048] 상기 표 3에 따른 데이터에서 + 는 PCR 결과 밴드가 형성됨을 의미하며 토양내 이 균주가 존재함을 의미하며, - 는 PCR 결과 각 병원균이 특이적인 밴드가 형성되지 않음으로 토양내에 존재하지 않거나 균밀도가 희박하다는 것을 의미한다. 상기 표 3에서 토심 깊이 값은 토양 시료를 채취한 지점, 즉 표토지면으로부터 10 cm 깊이의 토양을 채취한 것을 의미한다. 예를 들어, 2-A-10은 2년근, 인삼 경작 시 인삼 병 발생상태가 일어나지 않은 건전한 인삼 및 그러한 경작지의 토심 10 cm깊이의 시료를 채취한 것을 의미한다. 4-B-10은 4년근 인삼 경작 시 인삼 병 발생상태가 심한 이병 인삼 및 그러한 경작지의 토심 10 cm깊이의 시료를 채취한 것을 의미한다.

도면

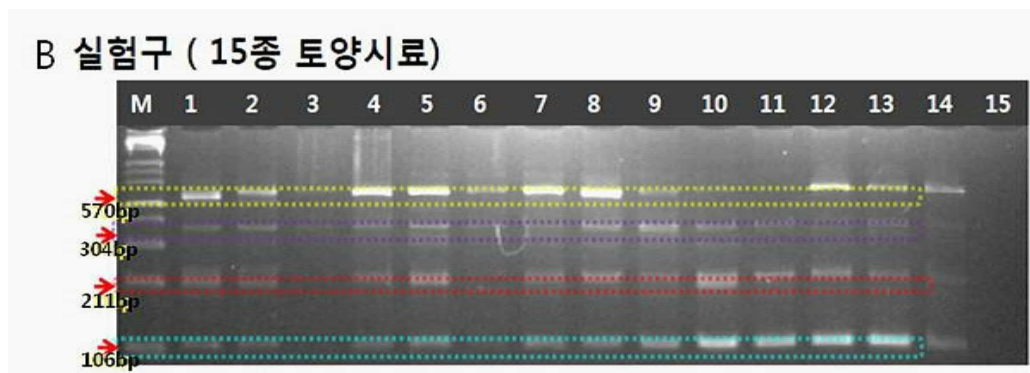
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Specific primers for detection of ginseng pathogenic fungi and
uses thereof
- <160> 6
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Forward primer No.1 for amplifying PCR conserved region from
pathogenic fungi

<400> 1
gaatcatcga atytttgaac g 21
<210> 2
<211> 22
<212>
DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer No.2 for amplifying PCR conserved region from
pathogenic fungi
<400> 2
aatgtgaatt gcagaattca gt 22
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer No.1 for amplifying PCR conserved region from
pathogenic fungus
<400> 3
gaatggacta ttagaagcgg t 21
<210>
> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer No.2 for amplifying PCR conserved region from
pathogenic fungus
<400> 4
gcctgagggt tgtaatgacg 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer No.3 for amplifying PCR conserved region from
pathogenic fungus
<400> 5

ttagcgggta gtctgtctgc

20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer No.4 for amplifying PCR conserved region from
pathogenic fungus

<400> 6

tgcgaggtgt gctactacg

19