

PCR다형성 밴드 유래 DNA probe에 의한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 특이적 검출

강희완* · 고승주 · 권순우
농업과학기술원

Specific Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by DNA Probe Selected from PCR Polymorphic Bands

Hee Wan Kang*, Seung Joo Go and Soon Wo Kwon
National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon 447-707, Korea

ABSTRACT: This study was carried out to develop DNA probe for specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Universal rice primer (URP, 20 mer) developed from repetitive sequence of rice was applied for producing PCR DNA fingerprints of *Erwinia* spp. In *E. carotovora* subsp. *carotovora* strains, primer URP2F amplified polymorphic bands which are distinguishable from other *Erwinia* spp. A PCR band of 0.6 kb selected from PCR polymorphic bands of *E. carotovora* subsp. *carotovora* strains was cloned and evaluated as a diagnostic DNA probe. Among 28 bacterial strains including 22 *Erwinia* spp, the probe (pECC2F) only hybridized to total DNAs from *E. carotovora* subsp. *carotovora* strains and *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, but sizes of hybridized bands were different between these subspecies, 10.0 kb and 3.5 kb respectively. In dot blot assays using probe pECC2F, as few as 10^3 colony forming units (CFU) of *E. carotovora* subsp. *carotovora* could be detected in a suspension containing about 1×10^3 CFU of soil bacteria.

Key words: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, PCR DNA fragment, DNA probe, specific detection.

*Erwinia carotovora*는 다양한 기주식물체에 재배기간 뿐만 아니라 저장중이나 운반중에도 무름병(soft rot)을 일으키는 대표적인 병원세균으로 알려져 있다. *Erwinia carotovora*는 생화학특성 및 기주특이성에 따라 4종의 subspecies로 분류하고 있는데(14, 23), 사탕무에 감염하는 *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*(25), 고추냉이에 감염하는 *E. carotovora* subsp. *wasabiae*(7), 저온에서 감자괴경에 감염하여 Blackleg라고 하는 특징적인 병반을 형성하는 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*(19)가 보고되어 있으며 그밖의 다른 특징을 보이는 것을 *E. carotovora* subsp. *carotovora*로 분류하고 있다. *E. carotovora* subsp. *carotovora*는 다른 subspecies에 비하여 광범위한 기주범위를 갖고 있으며 strain간에 유전적변이가 매우 다양한 것으로 알려져 있다(23). *E. carotovora*외에 soft rot에 연관된 병원세균으로서 *E. chrysanthemi*와 *Pseudomonas* spp.가 보고되어 있다(15, 24, 25).

국내에서는 여러지역의 과채류와 화훼작물 등으로부터 *E. carotovora*분리, 보고된바 있으며(2, 10, 13, 16, 18) 대부분 *E. carotovora* subsp. *carotovora*로 동정되었으나

다른 subspecies의 *E. carotovora*에 대한 보고가 거의 없어, *E. carotovora* subsp. *carotovora*는 국내에서 가장 높은 밀도로 분포하는 무름병원세균종의 하나로 주목되고 있다.

식물세균병의 효율적 방제법으로 발병예찰과 경종적 방법이 이용되어 왔으며 이를 위하여서는 병원균의 최소 밀도에서의 조기동정 및 진단이 매우 필요하다. 특히 병반부위에 다른 부생균과 병원균이 혼재할 경우 특정 병원균만을 특이적으로 검출하는 방법이 요구된다(17). *E. carotovora*의 동정법으로 Bergy's Manual(14) 또는 fatty acid조성(5, 28) 등의 이화학적 방법이 적용되어 왔으나 분석과정이 복잡하고 시간, 노력이 많이 요구되고 있다. 또한 항혈청 분석법이 개발되어 subspecies간 분류에 적용되어 왔으나(6, 11), 복잡한 serogroup들의 존재와 비특이적인 다른 세균 검출 등으로 subspecies 수준에서 특이적 검출을 행함에 문제점으로 지적되고 있다.

분자생물학적 기법의 발달로 DNA hybridization를 이용한 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)와 dot-blot방법에 의하여 *E. carotovora*의 특이검출이 시도되어(3, 21, 27) subspecies 수준에서 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*의 특이적 DNA다형성 검출에

*Corresponding author.

적용된바 있다(4, 27). 그러나, 기존의 probe는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*를 비롯한 다른 subspecies의 검출로 인하여 보다 정확한 subspecies 특이 검출을 위한 새로운 DNA marker의 개발이 요구된다.

DNA hybridization방법 외에 근래에 PCR 핵산지문법이 개발되어 널리 적용되고 있다. 그 방법중의 하나로 10~12 mer의 짧은 핵산으로 조성된 random arbitrary primer 이용한 RAPD(Random Amplified Polymorphism DNA)방법(29)이 적용되고 있으나, 그 방법은 PCR 조건에 따라 비 특이적인 DNA밴드의 검출과 낮은 재현성이 문제점으로 지적되어 왔다. 최근에 그러한 문제점을 개선한 URP(Universal Rice Primer) primer가 식물체로부터 유래된 repetitive sequence로부터 개발되었다(8, 9). 이 primer는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하는 다양한 생물종의 PCR 핵산지문에 모두 이용 가능한 universal primer의 특징을 가지고 있다. 특히, 이 primer는 20 mer로서 55°C 이상의 annealing 온도에서 PCR반응을 수행할 수 있어 높은 재현성으로 안정하게

PCR 다형성 밴드를 검출할 수 있고, 특히 PCR 생성물의 분리와 이용이 매우 용이하다.

본 연구는 국내 주요 무름병원세균중의 하나인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특이 검출 DNA probe 및 신속한 진단법 개발에 목적을 두고 수행하였다. URP (universal rice primer) primer를 *Erwinia* spp.의 PCR 핵산지문 분석에 적용하여, *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 공통적으로 존재하는 특이 PCR산물을 분리, *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특이적 검출을 위한 DNA probe로서의 활용성을 조사한 바, 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양. 본 연구에 이용된 *Erwinia* spp.와 다른 bacteria 종들은 Table 1과 같다. *E. carotovora* subsp. *carotovora*균주는 ATCC(American Type Culture Collection) 및 강원대학교와 충남대학교로부터 분

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species or subspecies	Origin		Hosts
	Location	Source	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (<i>E. c. c</i>)	Denmark	*ATCC 15173	Potato
"	Korea	**KACC 104144	Horseradish
"	Korea	KACC 102142	Chicory
"	Korea	KACC 105145	Chinese cabbage
"	Korea	KACC 106296	Potato
"	U.S.A.	KACC 111141	***NI
"	Japan	KACC 112141	Tomato
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>wasabiae</i> (<i>E. c. w.</i>)	Japan	ATCC 43316	Horseradish
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> (<i>E. c. a.</i>)	U.K.	ATCC 33260	Potato
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>betavasculorum</i> (<i>E. c. b.</i>)	U.S.A.	ATCC 43762	Sugarbeet
<i>E. chrysanthemi</i> (<i>E. chry.</i>)	U.S.A.	ATCC 11663	Chrysanthemum
<i>E. cypripedii</i> (<i>E. cyp.</i>)	U.S.A.	ATCC 29267	Lady-slipper
<i>E. herbicola</i> (<i>E. her.</i>)	Canada	ATCC 33243	NI
<i>E. mallotivira</i> (<i>E. mal.</i>)	Japan	ATCC 29573	<i>japonicus Mallotus</i>
<i>E. milletiae</i> (<i>E. mil.</i>)	U.S.A.	ATCC 33261	<i>Witeria floribunda</i>
<i>E. nigrifluens</i> (<i>E. nig.</i>)	U.S.A.	ATCC 13028	Walnut
<i>E. persicinus</i> (<i>E. per.</i>)	Japan	ATCC 35998	Tomato
<i>E. psidii</i> (<i>E. psi.</i>)	Brazil	ATCC 49406	<i>Psidium guajaya</i>
<i>E. quercina</i> (<i>E. que.</i>)	U.S.A.	ATCC 29281	Oak acorn
<i>E. rhapontici</i> (<i>E. rha.</i>)	England	ATCC 29281	<i>Rheum rhaponticum</i>
<i>E. rubrifaciens</i> (<i>E. rub.</i>)	U.S.A.	ATCC 29291	Walnut
<i>E. stewartii</i> (<i>E. ste.</i>)	U.S.A.	ATCC 8199	Sweet corn
<i>E. tracheiphila</i> (<i>E. tra.</i>)	U.S.A.	ATCC 33245	Melon
<i>E. uredovora</i> (<i>E. ure.</i>)	U.S.A.	ATCC 19321	Cereal rusts
<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. sp.</i>)	Korea	KACC 128253	pepper
<i>Enterobacter</i> sp. (<i>Ent. sp.</i>)	Korea	KACC 105263	Soil
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (<i>P. flu</i>)	Korea	KACC 105263	Soil
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (<i>X. c. c.</i>)	Korea	KACC 158053	Chinese cabbage
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. tum.</i>)	Japan	Nagoya Uni.	NI
<i>Escherichia coli</i> DH5 α (<i>E. coli</i>)		Commercial source	

*ATCC, American Type Culture Collection; **KACC, Korean Agricultural Culture Collection; ***NI, No Information

양받아 공시하였으며, 다른 *Erwinia* spp.와 세균들은 ATCC 및 KACC(Korean Agricultural Culture Collection, 농업과학 기술원)로부터 분양받아 사용하였다. 균 배양을 위하여 *Escherichia coli*는 LB 배지에서 37°C 상에서 배양하였으며, *Erwinia* spp.를 포함하는 *Bacillus subtilis*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 및 *Agrobacterium tumefaciens* 등의 세균들은 같은 배지에서 25°C로 배양하였다.

Genomic DNA 분리. *Erwinia* spp.를 비롯한 그람 음성세균으로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 각각의 LB 고체배지에서 형성된 colony들을 10 ml의 LB broth에 옮긴 후 200 rpm의 속도로 shaking incubator에 배양한 후 원심분리하여 bacterial cell을 침전시키고 추출용 완충액(200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) 400 μ l로 균체를 잘 현탁한 후, Proteinase K(20 mg/ml) 10 μ l를 첨가하여 37°C의 항온기에서 1시간 동안 보온하였다. 이 혼합액에 2×CTAB 용액을 동등한 volume으로 넣고 잘 혼합하여 65°C에서 15분간 방치한 후, 700 μ l의 phenol:chloroform (1:1)를 처리하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 새로운 원심튜브에 옮기고 0.54 volume의 isopropanol을 혼합하여 응결시킨 genomic DNA를 새 튜브에 옮겨 70%의 ethanol에 씻은 후 건조하여 200 μ l의 TE buffer에 녹여 실험에 사용하였다. *Bacillus* sp.와 같은 그람양성 세균으로부터의 genomic DNA분리는 Raymond(21) 등의 방법에 준하여 실시하였다.

PCR 조건. PCR핵산지문 분석을 위하여 20 mer의 URP2F primer가 적용되었으며, 주형 DNA는 *Erwinia* spp.로부터 분리된 50 ng의 genomic DNA를 사용하였다.

PCR반응 용액은 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200 μ M의 dNTP, 200 ng primer 및 2.5 unit of *Taq* polymerase(Promega, USA)를 넣고 전체 반응용액은 50 μ l가 되게하였다. PCR 증폭 조건은 PTC-100™(MJ Research)를 이용, 처음 DNA의 열변성을 위하여 94°C에서 3분간 1 cycle, 그리고 94°C 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 2분간으로 총 35 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA합성은 7분으로 하였다. 증폭된 PCR산물은 TBE 완충액(45 mM Tris-borate pH 8.0, 1 mM EDTA)에서 1.8%의 agarose gel로 전기영동한 후 ethidium bromide용액에 염색하여 UV lamp하에서 DNA 다형을 검출하였다.

PCR 증폭산물의 분리와 cloning. URP2F primer(8, 9)에 의해 증폭된 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 0.6 kb의 PCR 증폭산물을 agarose gel로부터 분리하여 PCR purification kit(Quiagen)을 이용 DNA를 회수하였다. 이 PCR 산물을 cloning하기 위하여 Klenow frag-

ment(Promega)로 blunt-ending한 후 polynucleotide kinase로 처리하여 DNA절편의 각 말단을 인산화시켰다. 이 DNA 절편을 pUC119의 *Sma*I 부위에 삽입한 후 Sambrook(22) 등의 방법으로 *E. coli*(DH5 α)에 형질전환하였다. Insert DNA는 Plasmid mini prep kit(Quia-gen, USA)를 이용 plasmid를 분리하고 *Eco*RI과 *Hin*dIII로 절단한 후 확인하였다.

Southern blot hybridization과 probe 준비. *Erwinia* spp.를 비롯한 각종 세균으로부터 분리한 genomic DNA (5 μ g)를 *Eco*RI으로 절단하고, 0.9%의 agarose gel에 전기영동(5 v/cm)하여 nylon membrane(Hybond +, Amersham)에 DNA를 흡착시켰다. Hybridization에 이용할 DNA probe는 URP2F에 의해 증폭된 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특이 PCR 증폭산물(0.6 kb)이 cloning된 pECC2F의 삽입부위를 Ladderman™ labeling kit (Takara)로 α -³²P-dCTP로 표지하여 probe로 이용하였다. Hybridization과정은 Amersham사에서 공급한 protocol에 준하여 실시 하였으며, X-ray film에 24시간 노출시킨 후 현상하여 그 결과를 분석하였다.

Dot blot 분석. 세균세포를 이용한 dot blot hybridization을 위하여 LB 고체배지에서 2일간 배양한 *E. carotovora* subsp. *carotovora*(ATCC15173)를 취하여 토양 추출액에 2×10⁵/ml의 colony forming units(CFU)로 처음농도를 조정하고 2배식 다양한 농도로 희석하여 준비 하였다. 토양 추출액은 Ward(26) 등의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 즉, 25 g의 토양에 0.01 M의 phosphate buffer saline(PBS) 10 ml를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 진탕한 후 30분 동안 토양입자를 침전시켜 상등액을 취하여 토양 추출액으로 사용하였다. *E. carotovora* subsp. *carotovora* 세균세포를 포함하는 토양추출액 5 μ l를 nylon membrane에 dot blot하였다. 이 membrane을 10%의 SDS가 흡수된 3 MM 여지에서 10분 동안 방치하고, 0.4M NaOH가 흡수된 3 MM 여지에 옮겨 10분 동안 방치한 다음 2×SSC로 membrane을 세척한 후 hybridization에 이용하였다. DNA를 이용한 dot blot는 genomic DNA를 100 ng/ μ l로 농도를 조정한 후 단계적으로 여러 농도로 희석하여, 95°C에서 3분간 DNA를 열변성한 후 nylon membrane(HybondN+, Amersham)에 dot blot하였다. 이 membrane을 0.4 M의 NaOH용액이 흡수된 3 MM 여지에서 10분 동안 정치하고 2×SSC 용액에 1분간 세척한 후 hybridization에 이용하였다.

결과 및 고찰

URP primer를 이용한 *Erwinia* spp.의 PCR핵산지문 분석. URP2F(8, 9)를 이용하여, 여러 지역의 기주 식물

체로부터 분리된 7 strain의 *E. carotovora* subsp. *carotovora*를 포함하는 18종의 *Erwinia* spp.를 대상으로 PCR 핵산지문분석을 실시하였다. Fig. 1에서 나타난 것과 같이 URP2F에 의하여 *Erwinia* spp.에 따라 0.3 kb에서 3.0 kb 사이에서 10개 이상의 다형성 밴드를 증폭하

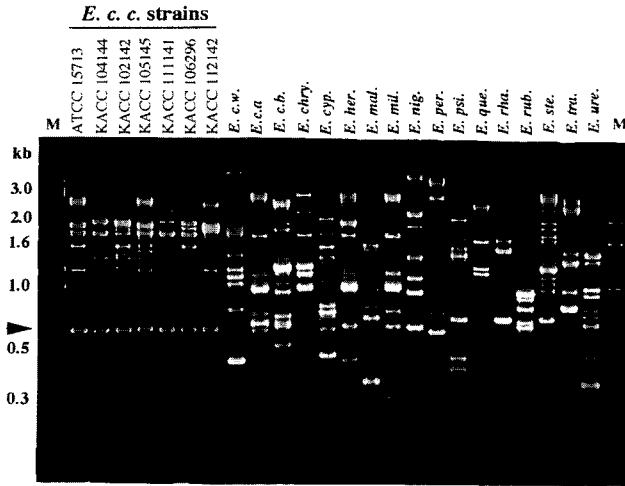


Fig. 1. PCR amplification of total DNAs extracted from *Erwinia* spp. by primer URP2F. Aliquots of 15 μ l from amplified PCR solution (50 μ l) were loaded on agarose gel (1.8%), electrophoresed and visualized by ethidium bromide. Arrow-head indicates conserved PCR products (0.6 kb) which are commonly appeared on *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Lane M contains 1 kb DNA ladder (Gibco, BRL). Abbreviative names of *Erwinia* spp. in respective lanes are described in Table 1.

였으며, 특히, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주들에서 다른 *Erwinia* spp.와 비교 되는 특징적인 PCR pattern이 관찰 되었다. *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주들의 PCR증폭 산물에서 0.6 kb의 특이적인 PCR밴드가 공통적으로 존재하고 있는 것이 확인되었으며, 1.6 kb에서 3.0 kb 사이에서는 균주에 따라 DNA다형성을 나타내었다. 그 결과로부터 URP2F는 *Erwinia* spp.간 또는 균주간에 특징적인 DNA다형성 검출에 유용하게 적용할수 것으로 생각되었다.

E. carotovora subsp. *carotovora* 특이 검출을 위한 DNA probe. URP2F에 의해 증폭된 PCR 다형성 밴드 중, *E. carotovora* subsp. *carotovora*에만 공통적으로 존재하는 특이 PCR밴드를 분리, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 검출용 DNA probe로서 이용 여부를 조사하였다. Fig. 1에서 나타난 모든 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 특이적으로 존재하는 0.6 kb의 PCR산물을 cloning하여 생성된 clone pECC2F의 insert DNA를 probe로 하여, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 7균주를 포함하는 15종의 *Erwinia* spp.와 *E. coli* 등 6속의 다른 세균으로부터 분리된 genomic DNA를 *EcoRI*으로 절단한 다음, Southern blot hybridization을 실시하였다. Fig. 2에서 나타난 결과와 같이, pECC2F probe는 10.0 kb의 동등한 위치에서 single copy로 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주에만 특이적으로 상동성 밴드를 검출하였으며, *E. carotovora* subsp. *wasabiae*에서는 3.5 kb의 다른 크기의 밴드를 검출하였으나, 그 밖의 *Erwinia* spp.와 다른 속의 세균 genomic DNA에서는 어떠한 밴드도 검출

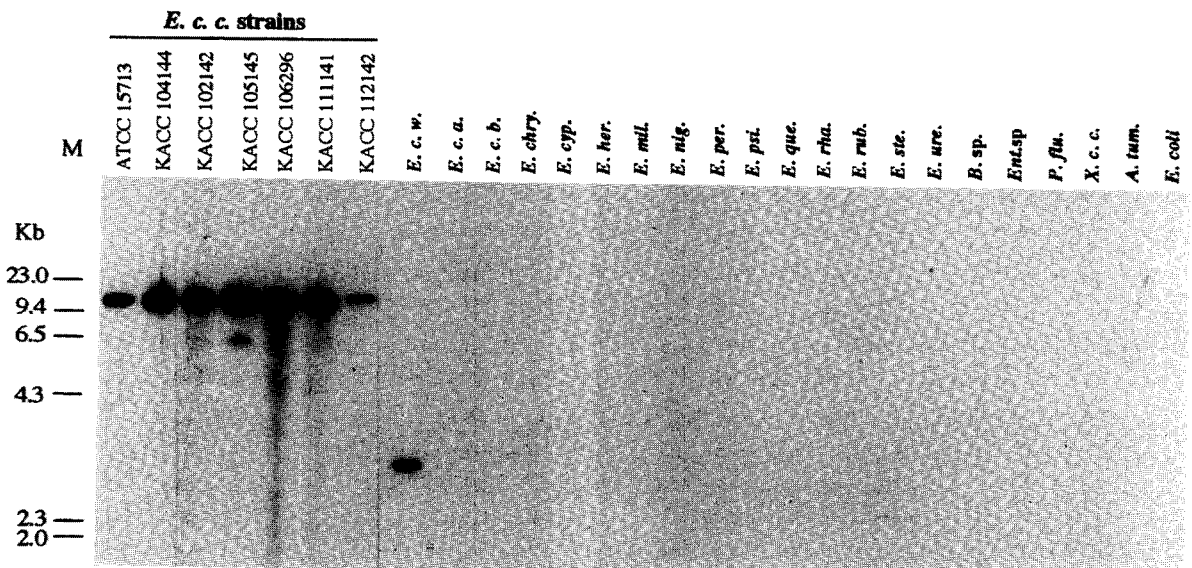


Fig. 2. Southern blot hybridization of *Erwinia* spp. and other bacterial genus using pECC2F as probe. Total DNAs isolated from bacterial strains were digested with *EcoRI*, electrophoresed on agarose gel (1%) and blotted onto a nylon membrane. The membrane was hybridized with ³²P-labeled pECC2F and then exposed on X-ray film. Lane M contains λ *Hind* III DNA marker. The abbreviative names of bacterial strains used in respective lanes are described in Table 1.

되지 않아, pECC2F는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*를 특이적으로 검출할 수 있는 DNA probe로 이용 가능할 것으로 사료되었다. 한편, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주에 검출된 다른 PCR산물을 같은 목적으로 실험을 실시하였으나 다른 *Erwinia* spp. 내에서도 밴드가 검출됨에 따라 특이 검출용 probe로서 이용에는 적절하지 못했다(자료생략).

E. carotovora subsp. *carotovora*와 *E. carotovora* subsp. *wasabiae*는 병원성면에서 차이가 없으며, genome에서 같은 GC함량을 갖고 있는 것으로 보고되었다(1, 7). 최근, rDNA 염기배열분석에서도 *E. carotovora*의 다른 subspecies에 비하여 *E. carotovora* subsp. *carotovora*는 *E. carotovora* subsp. *wasabiae*와 98.3%로 가장 높은 상동성을 나타낸다고 하였다(12). 위 보고들은 *E. carotovora* subsp. *carotovora*는 *E. carotovora* subsp. *wasabiae*와 매우 밀접한 유전적 연관관계가 있음을 시사하고 있으며, 본 실험에서 pECC2F probe에 의한 *E. carotovora* subsp. *wasabiae*의 검출은 위 보고와 연관된 것으로 사료되었다. genomic library탐색과 genomic subtraction방법에 의하여 선발된 DNA절편 및 *pel* 유전자가 *E. carotovora*의 특이적 검출용 probe로 이용되어, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*의 특이적 DNA다형성을 검출할 수 있었다(4, 26, 27). 그러나, 위의 probe들은 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주에 따라 또는 다른 subspecies내에서 특이성 없이 복잡하게 연관된 DNA다형성 band의 검출로 인하여, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*와의 다른 subspecies나 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 특이검출에는 적용할 수 없었다. 그러나, 본 연구에서 개발된 probe (pECC2F)는 다른 분리지역 및 기주체와 관계없이 다양한 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주에 동일한 상동성 밴드를 검출하는 높은 특이성을 보였다.

Dot blot에 의한 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 검출. pECC2F는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특이적 검출을 위한 probe로서 이용 가능 하나 Southern hybridization방법은 실험절차상 시간, 노력이 많이 요구된다. 따라서 DNA분리과정 없이 세균세포를 직접 이용하여 검출을 시도하였다. 먼저, 토양 미생물이 존재하는 조건에서 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특이적 검출이 가능한지 여부를 조사하기 위하여 토양에서 분리된 토양추출액에 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 세포 현탁액을 다양한 농도로 조정후 pECC2F를 probe로 하여 dot blot hybridization을 실시하였다. Fig. 3의 a에서 나타난것과 같이 이 probe는 10^3 CFU의 세포수까지 검출을 가능하게 하였으며, Fig. 3의 b에서 DNA농도상의 검출과 비교할 때 3 ng을 적용하였을 때와 유사한 결과를 보여주었다. 반면에, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 세포 현탁액이 존재하지 않은 살균수와 토양추출액에서

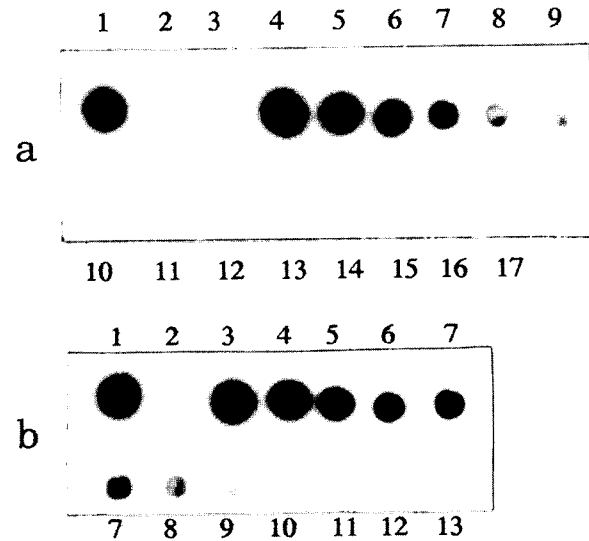


Fig. 3. Dot blot hybridization of DNA probe (pECC2F) to bacterial cells and purified DNA of *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Soil extracts containing 2×10^5 bacterial CFU/ml were loaded with serial two-fold dilutions of *E. carotovora* subsp. *carotovora* (panel a-4-17). A pure culture of *E. carotovora* subsp. *carotovora* at 2×10^5 CFU/ml was loaded in position a-1 as positive control. As negative controls, PBS buffer and soil extract without *E. carotovora* subsp. *carotovora* were loaded in positions a-2 and a-3, respectively. In panel b, total DNA (500 ng) purified from *E. carotovora* subsp. *carotovora* was loaded with serial twofold dilutions. As negative control, water without DNA of *E. carotovora* subsp. *carotovora* was loaded in position Panel b-2.

는 반응하지 않았다.

Ward(26) 등은 library screening으로 부터 선발된 *E. carotovora* 특이 probe를 이용하여 dot blot방법으로 다양한 *E. carotovora* 균주 검출을 시도한 결과 10^3 에서 10^2 CFU 범위의 세균세포를 검출 할수 있다고 하였다. 본 실험에 이용된 토양추출액 내에서 약 10^3 CFU의 다양한 토양세균이 존재하는 것으로 확인 되었으나, 그 환경 하에서 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특이적 검출이 가능함에 따라 토양내에 다른 세균의 존재하에서도 특이적 적용이 가능하다는 것을 시사해 주었다. 배지에 형성된 세균의 single colony(직경 1×1 mm)에는 대략 10^6 CFU의 세포수가 존재 하는 것으로 확인되어, single colony를 이용한 특이적인 검출이 충분히 가능한것으로 나타났다.

위 결과들로, pECC2F probe는 다른 세균중에 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특이적 검출에 이용할 수 있어, 감염초기의 조기진단, 이병조직 또는 토양중에 존재하는 밀도조사 등 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 monitoring system을 구축하는데 효율적으로 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 DNA probe를 이용한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*의 특이적 검출을 개발하는데 목적을 두고 실시하였다. URP2F primer가 *Erwinia* spp.의 PCR핵산지분석에 이용되었다. 이 primer는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*균주에서 다른 *Erwinia* spp.와 구별되는 특징적인 PCR pattern을 나타내었으며, *E. carotovora* subsp. *carotovora*에만 특이적으로 존재하는 0.6 kb의 PCR증폭산물(pECC2F)을 분리 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 특이 검출을 위한 DNA probe로서 적용하였다. pECC2F probe는 분리 기주체 및 지역에 관계없이 공시한 *E. carotovora* subsp. *carotovora*계통에 약 10.0 kb의 상동성 밴드를 검출하였다. 한편, *E. carotovora* subsp. *wasabiae*의 3.5 kb band를 제외한 14 *Erwinia* spp. 및 6속의 다른 세균에서는 상동성 밴드를 검출되지 않아, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 특이 검출 DNA probe로 이용할 수 있었다. 또한 이 probe는 dot blot hybridization으로 약 1×10^3 CFU의 토양미생물이 존재하는 토양추출액내에서 10^3 CFU/ml의 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 세포를 검출하는 높은 민감성과 특이성을 보였다.

감사의말씀

본 연구를 수행하는데 *E. carotovora* subsp. *carotovora*균주를 분양하여 주신 충남대학교 최재을 교수님과 강원대학교 임춘근 교수님께 감사를 드립니다.

참고문헌

- Brenner, D. J., Fanning, G. R. and Steigerhalt, A. G. 1974. Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwinia* and other Enterobacteriaceae: The gall, wilt, and dry-necrosis organisms (genus *Erwinia* Winslow et al, Sensu Stricto). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24:197-204.
- 최재을, 한광섭. 1989. 백합과채소의 세균성 부패병에 관한 연구 2: *Erwinia*속 세균에 의한 마늘 무름병. *한국식물병리학회지* 5:271-276.
- Darrasse, A., Kotoujanski, A. and Bertheau, Y. 1994. Isolation by genomic substration of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:298-306
- Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansk, A. and Bertheau, A. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *Pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1437-1443.
- De Boer, S. H. and Sasser, M. 1986. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* on the basis of cellular fatty acid composition. *Can. J. Microbiol.* 32:796-800.
- De Boer, S. H., Verdonck, L., Vrugink, H., Harju, P., Bang, H. and De Ley, J. 1987. Seological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. *J. Appl. Bacteriol.* 63:487-495.
- Goto, M. and Matsumoto, K. 1987. *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*. isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:130-135.
- Kang, H. W., Cho, Y. G. and Eun, M. Y. January 1997. DNA fingerprint of rice varieties (*Oryza sativa* L.) using primers designed from repetitive sequence of Korean red rice and its application to other organisms. 5th International Conference on Plant and Animal Genome. San Diego, CA, U. S. A. 80pp.
- 강희완, 조용구, 고승주, 은무영. 1997. 쌀 품종 및 다범위 생물종의 유전적 식별용 DNA 표지인자 개발. *한국특허출원(출원번호:97-16981)*.
- 김영숙, 박덕환, 임춘근. 1997. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 고추 세균성 무름병. *한국식물병리학회 추계발표회 초록집*. 50pp.
- Klopmeyer, M. J. and Kelman, A. 1988. Use of monoclonal antibodies specific for pectate lyase as seological probes in the identification of soft rot erwinia spp. *Phytopathology.* 78:1430-1434.
- Kwon, S. W., Go, S. J., Kang, H. W., Ryu, J. C. and Jo, J. K. 1997. Phylogenic analysis of *Erwinia* species based on 16S rDNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1061-1064.
- 이영근, 김영희. 1996. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 메론의 세균성 무름병 발생. *한국식물병리학회지* 12:116-120
- Lelliott, R. A., and Dickey, R. S. 1984. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* (Vol. 1), ed. by N. R. Krieg and J. G. Holt pp. 469-476. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Liao, C. H., McClallus, D. E. and Wells, J. M. 1993. Calcium-dependent pectate lyase production in the soft-rotting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 83:813-818.
- 임춘근. 1995. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 치커리 세균 무름병. *한국식물병리학회지* 11:116-119.
- Miller, S. A., and Martin, R. R. 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:409-432.
- 박종철, 송완섭, 김형수. 1997. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 콩나물 무름병 발생. *한국식물병리학회지* 13:13-17.
- P'erombelon, M. C. M. and Kelman, A. 1987. Blackleg and other potato disease caused by soft rot Erwinias: proposal for revision of terminology. *Plant Dis.* 71:283-285.
- Rasmussen, O. F. and Reeves, J. C. 1992. The probes for the detection of plant pathogenic bacteria. *J. Biotechnol.* 25:203-220.
- Raymond, L. R. and Robert, C. T. 1983. Recombinant DNA techniques: An introduction. Addison Wesley Publishing Company. London. pp. 162-163.

22. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. pp. 1.62-1.67.
23. Smith, C. and Bartz, J. A. 1990. Variation in pathogenicity and aggressiveness of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. *Plant Dis.* 74 : 505-509.
24. Starr, M. P. and Chatterjee, A. K. 1972. The genus *Erwinia*: enterobacteria pathogenic to plants and animals. *Annu. Rev. Microbiol.* 26 : 389-426.
25. Thomson, S. V. and Hilderbrand, D. C. 1981. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia* sugar beet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 71 : 1073-1042.
26. Ward, L. J. and De Boer, S. H. 1990. A DNA probe specific for serologically diverse strains of *Erwinia carotovora*. *Phytopathology.* 80 : 665-669.
27. Ward, L. J. and De Boer, S. H. 1994. Specific detection of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* with a digoxigenin-labeled DNA probe. *Phytopathology* 84 : 180-186.
28. Wells, J. M. and Moline, H. E. 1991. Differentiation of soft-rotting *Erwinias* (*carotovora* group) by fatty acid composition. *J. Phytopathol* 131 : 22-32.
29. Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymol.* 218 : 704-740.

(Received March 7, 1998)