

# 박과 작물에 과일썩음병을 일으키는 *Acidovorax citrulli* 검출을 위한 nested-PCR 검사법 개발

## Development of Nested-PCR Assay to Detect *Acidovorax citrulli*, a Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch at Cucurbitaceae

김영탁<sup>1</sup> · 박경수<sup>1</sup> · 김혜성<sup>1</sup> · 이혁인<sup>2</sup> · 차재순<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>(주)농우바이오, <sup>2</sup>농림축산검역본부, <sup>3</sup>충북대학교 식물학과

Young-Tak Kim<sup>1</sup>, Kyoung-Soo Park<sup>1</sup>, Hye-Seong Kim<sup>1</sup>, Hyok-In Lee<sup>2</sup> and Jae-Soon Cha<sup>3\*</sup>

**\*Corresponding author**

Tel : +82-43-261-2554  
Fax: +82-43-271-4414  
E-mail: jscha@cbnu.ac.kr

<sup>1</sup>Seed Certification Team, Quality Assurance Division, Nongwoo Bio Co., LTD., Yeosu 469-885, Korea  
<sup>2</sup>Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea  
<sup>3</sup>Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

The specific and sensitive nested-PCR method to detect *Acidovorax citrulli*, a causal agent of bacterial fruit blotch on cucurbitaceae, was developed. PCR primers were designed from the draft genome sequence which was obtained with the Next Generation Sequencing of *A. citrulli* KACC10651, and the nested-PCR primer set (Ac-ORF 21F/Ac-ORF 21R) were selected by checking of specificity to *A. citrulli* with PCR assays. The selected nested-PCR primer amplified the 140 bp DNA only from *A. citrulli* strains, and detection sensitivity of the nested PCR increased 10,000 times of 1<sup>st</sup> PCR detection limit (10 ng genomic DNA/PCR). The nested PCR detected *A. citrulli* from the all samples of seed surface wash (external seed detection) of the artificially inoculated watermelon seeds with 10<sup>1</sup> cfu/ml and above population of *A. citrulli* while the nested PCR could not detected *A. citrulli* from the mashed seed suspension (internal seed detection) of the all artificially inoculated watermelon seeds. When the naturally infested watermelon seeds (10% seed infested rate with grow-out test) used, the nested PCR detected *A. citrulli* from 2 seed samples out of 10 replication samples externally and 5 seed samples out of 10 replication samples internally. We believe that the nested-PCR developed in this study will be useful method to detect *A. citrulli* from the Cucurbitaceae seeds.

**Keywords :** *Acidovorax citrulli*, Bacterial fruit blotch, Cucurbitaceae seeds, Nested-PCR, Next Generation Sequencing

Received September 11, 2014  
Revised March 12, 2015  
Accepted March 25, 2015

### 서 론

*Acidovorax citrulli*는 박과 작물에 과일썩음병(bacterial fruit blotch, BFB)을 일으키는 종자전염성 병원세균이다(Hopkins와 Thompsin, 2002; Walcott 등, 2004). 과일썩음병은 1965년 미국

에서 처음 보고 되었으며(Sowel 등, 1978), 강력한 병원성을 가진 균주의 출현과 더불어 1980년대 미국 전역의 수박 재배지에서 대발생되어 경제적으로 큰 피해를 일으켰다(Latin 등, 1990). 이후 다른 박과 작물인 멜론, 오이 및 호박에서도 발병이 보고 되었다(Isakeit 등, 1997; Langston 등, 1999; Matin 등, 1999). 국내에서는 전북 고창의 수박 재배지에서 처음 보고되었으며(Song 등, 1991), 멜론에서는 전남 광주와 나주지역 재배지에서 처음 보고되었다(Seo 등, 2006).

#### Research in Plant Disease

©The Korean Society of Plant Pathology  
pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

병원균 *A. citrulli*는 *Pseudomonas*속으로 분류되었으나 병원성, 생화학적 특성, 16S rRNA 염기서열 분석 등으로 새롭게 *Acidovorax*속으로 재분류되었다(Willems 등, 1990). *A. citrulli*는 세계적으로 분포하고 있으며 수박을 포함한 중요한 박과 작물에 과일썩음병을 일으켜 큰 피해를 주고 있다(Latin 등, 1995; Schaad 등, 2003).

*A. citrulli*는 박과 작물의 중요한 종자전염성 병원균으로, 이 병원균에 감염된 종자는 1차 전염원 역할을 한다(Hopkins 등, 2002; Rane 등, 1992). 고부가가치를 가진 박과 작물의 종자 생산을 위해 박과종자 검사는 목표하는 종자전염성 병원 세균을 정확하고 민감하게 검출할 수 있어야 한다. 박과 종자에서 *A. citrulli*의 검출을 위해서 반선택배지 또는 grow-out 검사법을 사용하는 경우 배양된 세균의 추가적인 구별이 필요하고, 많은 시간, 공간, 노동력이 필요하다. 따라서 최근에는 PCR(Polymerase chain reaction), IMS-PCR(Immunomagnetic separation and polymerase chain reaction), Bio-PCR 그리고 Real-time PCR 방법 등에 의한 *A. citrulli*의 검사법이 보고되었

다(Ha 등, 2009; Latin 등, 1995; Randhawa 등, 2001; Schaad 등, 2002; Walcott 등, 2000).

그러나 이 방법들은 *A. citrulli* 균주를 인공적으로 접종한 종자를 사용하여 검출민감도 결과를 얻어서, 실제 1차 전염원 역할을 하는 종자감염 세균의 검출여부는 반영하지 못하고 있다(Bahar 등, 2008; Ha 등, 2009).

따라서 본 연구에서는 실제 박과 작물의 종자검사에 적용이 가능한 특이적이고 민감도가 높은 *A. citrulli* 검출법을 개발하고자 하였다. 개발된 nested-PCR 프라이머는 *A. citrulli*의 genome을 Next Generation Sequencing(NGS)에 의해 얻어진 *A. citrulli*의 전체 ORFs(open reading frames)로부터 디자인 하였으며, 개발된 프라이머의 종자에 적용과 상업적인 사용은 인공적으로 접종시킨 수박 종자와 자연감염 수박종자를 이용하여 확인하였다.

### 재료 및 방법

사용 균주 및 DNA 분리. 본 실험에서 사용한 세균 균주

Table 1. Bacterial strains used in this study and results of 1<sup>st</sup> PCR and nested-PCR

No.	Strains <sup>a</sup>	Host	1 <sup>st</sup> PCR <sup>b</sup>	nested-PCR
1	<i>Acidovorax citrulli</i> KACC10651	Unknown	+	+
2	<i>Acidovorax citrulli</i> CNUPBL AC37	Unknown	+	+
3	<i>Acidovorax citrulli</i> CNUPBL AC42	Unknown	+	+
4	<i>Acidovorax citrulli</i> CNUPBL LB09-308	Unknown	+	+
5	<i>Acidovorax citrulli</i> CNUPBL LB09-309	Unknown	+	+
6	<i>Acidovorax citrulli</i> CNUPBL LB10-233	Unknown	+	+
7	<i>Acidovorax citrulli</i> CNUPBL LB10-234	Unknown	+	+
8	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC016	Watermelon	+	+
9	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC024	Watermelon	+	+
10	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC058	Watermelon	+	+
11	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC074	Watermelon	+	+
12	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC076	Melon	+	+
13	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC107	Rootstock	+	+
14	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC108	Watermelon	+	+
15	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC109	Watermelon	+	+
16	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC110	Watermelon	+	+
17	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC111	Watermelon	+	+
18	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC172	Watermelon	+	+
19	<i>Acidovorax citrulli</i> NWB SC175	Cucumber	+	+
20	<i>Acidovorax valerianellae</i> NWB SC185	Watermelon	-	-
21	<i>Acidovorax valerianellae</i> NWB SC186	Watermelon	-	-
22	<i>Acidovorax avenae</i> CNUPBL294	Unknown	-	-
23	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> KACC10162	Zea mays	-	-
24	<i>Acidovorax</i> sp. KACC13277	Soil	-	-
25	<i>Acidovorax facilis</i> LMG2193	lawn soil	-	-
26	<i>Acidovorax cattleyae</i> LMG2364	Unknown	-	-
27	<i>Acidovorax konjaci</i> KACC10652	Konjac	-	-
28	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> KACC12856	Melon	-	-
29	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> KACC12857	Cucumber	-	-
30	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> KACC13264	Cucumber	-	-

Table 1. Continued

No.	Strains <sup>a</sup>	Host	1 <sup>st</sup> PCR <sup>b</sup>	nested-PCR
31	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> LMG5070	Cucumber	-	-
32	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> LMG5172	Cucumber	-	-
33	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> LMG5458	Cucumber	-	-
34	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> LMG5459	Cucumber	-	-
35	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> LMG5662	Melon	-	-
36	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> LMG2230	Rice	-	-
37	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> NWB SC125	Squash	-	-
38	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> NWB SC132	Squash	-	-
39	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> NWB SC137	Watermelon	-	-
40	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> Y1	Tomato	-	-
41	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Tomato	-	-
42	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> LMG5093	Tomato	-	-
43	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> LMG5509	Tomato	-	-
44	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> LMG5079	Pea	-	-
45	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> LMG5478	Pea	-	-
46	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> LMG5479	Pea	-	-
47	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> LMG5480	Pea	-	-
48	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> LMG5679	Pea	-	-
49	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> LMG8612	Pea	-	-
50	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> KACC11620	Unknown	-	-
51	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> KACC10575	Kidney bean	-	-
52	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> NWB SC126	Squash	-	-
53	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> NWB SC127	Squash	-	-
54	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>putida</i> NWB SC136	Watermelon	-	-
55	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> KACC10398	Coffee	-	-
56	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i> KACC11618	Unknown	-	-
57	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>japonica</i> KACC11638	Unknown	-	-
58	<i>Pseudomonas viridiflava</i> LMG6480	Chicory	-	-
59	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapsa</i> KACC12216	Unknown	-	-
60	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mellea</i> KACC12844	Unknown	-	-
61	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> KACC10390	Unknown	-	-
62	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> KACC10397	Unknown	-	-
63	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>myricae</i> KACC12845	Unknown	-	-
64	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>panici</i> KACC11619	Unknown	-	-
65	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG5077	Apple tree	-	-
66	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i> KACC12852	Unknown	-	-
67	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ribicola</i> KACC11622	Unknown	-	-
68	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>sesami</i> KACC10649	Unknown	-	-
69	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> KACC10388	Tobacco	-	-
70	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i> KACC10389	Unknown	-	-
71	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ulmi</i> KACC11633	Unknown	-	-
72	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> LMG5554	Unknown	-	-
73	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> KACC10751	Olive	-	-
74	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>passiflorae</i> KACC12846	Unknown	-	-
75	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> LMG5560	Cabbage	-	-
76	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> LMG7460	Rape	-	-
77	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> KACC11153	Pepper	-	-
78	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NWB SC191	Tomato	-	-

<sup>a</sup>KACC: Korean Agricultural Culture Collection, CNUPBL: Chungbuk National University Plant Bacteriology Lab, LMG: Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms, NWB: Nongwoobio Co., LTD.

<sup>b</sup>+: PCR product of the expected size was amplified, -: no PCR product was amplified.

는 *A. citrulli* 19균주를 포함한 *Acidovorax*속 및 *Pseudomonas*속 균주 등 총 78균주이다. 이 균주들은 BCCM/LMG(The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms/Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiële Genetica, Belgium)와 농업유전자원센터 미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC) 그리고 충북대학교 식물세균병학 및 분자유전학 실험실(CNUPBL)에서 분양 받아 사용하였다(Table 1). 이 균주들 중에서 국내 검역대상 균주는 검역절차를 거쳐 DNA 상태로 분양받아 사용하였으며, 일부 비교 균주는 (주)농우바이오(Nongwoobio. Co., LTD.)에서 수집한 균주들을 이용하였다. 모든 균주들은 glycerol 15%를 첨가한 King's B 액체배지에 현탁하여  $-75^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동고에 보관하였다. 보관된 균주들을  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 3일 동안 King's B(peptone 20.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g, glycerol 15.0 ml, agar 18.0 g/l) 배지에 배양한 후 자동핵산분리기(ROCHE, Basel, Switzerland)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 추출된 genomic DNA는 분광광도계(Mecasys, Deajeon, Korea)를 이용하여  $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ 로 정량한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 실험에 사용하였다.

**Next Generation Sequencing.** NCBI에 등록된 *A. citrulli*의 유전자들의 염기서열은 *Acidovorax*속 다른 종의 유전자들의 염기서열과 상동성이 높아 *A. citrulli*의 특이적 프라이머를 얻기 위해 (주)천랩(Chunlab, Seoul, Korea)에 의뢰하여 *A. citrulli*의 draft genome sequence을 얻었다. *A. citrulli*의 draft genome은 *A. citrulli* KACC10651균주의 genomic DNA를 이용하여 Next Generation Sequencing(NGS)을 수행하였으며, NGS는 Illumina (BMSKorea, Seoul, Korea)를 사용하였다.

**프라이머 제작.** NGS를 통해 얻은 *A. citrulli* KACC10651의 contig들에 들어있는 ORFs(open reading frames)들의 염기서열을 각각 NCBI에서 BLASTN하여 Genbank에 등록된 유전자 염기서열과 상동성이 낮고, 길이가 500 bp 이상인 ORF를 선발하였다. 선발된 ORF의 내부서열에서 Primer3(v. 0.4.0) 프로그램을 이용하여 PCR 프라이머를 제작하였으며, 제작한 프라이머들의 특이성 확인은 *A. citrulli* 19균주와 *Acidovorax*속 8균주를 포함하여 총 27균주로 PCR을 수행하고, PCR 결과 *A. citrulli*의 모든 균주에서 예상한 크기의 특이적 DNA를 증폭하는 프라이머들을 1차 선발하였다. 1차 선발한 프라이머들은 2차로 *Pseudomonas*속 등 51균주를 이용하여 PCR을 수행한 후 최종 프라이머를 선발하였다. Nested PCR 프라이머 제작은 앞서 *A. citrulli*에 대한 특이성이 확인된 프라이머의 PCR 증폭산물 내부 염기서열을 이용하여 Primer3(v. 0.4.0) 프로그램으로 100–200 bp 크기의 DNA가 증폭되도록 디자인하였다.

**PCR 조건.** PCR 조건은  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 initial denaturation 과정을 거친 다음  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 denaturation,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 30초

간 annealing,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 extension의 과정을 총 30회로 수행한 후  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 final extension하였다. PCR 반응액은 제넷바이오(Daejeon, Korea)의 Ex Taq PCR kit와 프라이머 ( $10\text{ pM}/\mu\text{l}$ ), 그리고 genomic DNA  $1\ \mu\text{l}$ (10 ng)를 이용하여 최종 반응액의 부피를  $20\ \mu\text{l}$ 로 조정하였다. Nested-PCR은 1차 PCR 산물을 50배 희석한 후  $1\ \mu\text{l}$ 를 사용하였으며 PCR 조건은 동일하게 수행하였다. 인공접종 한 종자와 자연감염 종자의 nested-PCR 검정 또한 동일한 방법으로 수행하였으며, 모든 PCR 산물은 1.2% Agarose gel에서 120 V, 60분 동안 전기영동 하여 결과를 확인하였다.

**자연감염 종자와 인공접종 종자 조제.** 개발된 PCR 방법이 종자검사에 적용이 가능한지를 알아보기 위해 인공접종 수박 종자와 자연감염 수박 종자를 이용하여 검정을 수행하였다. 여기서 사용한 자연감염 종자는 실제 육묘장에서 파종한 결과 과일썩음병이 발생한 종자이고, 종자의 자연감염을 확인하기 위하여 따로 실시한 grow-out 검사법에서 해당 종자로부터 받아하여 자란 묘의 10%에서 과일썩음병 병징을 확인하였다. 인공접종 종자 조제는 *A. citrulli* KACC10651 균주를  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 동안 배양 후 얻은 세균현탁액의 흡광도를 분광광도계(Mecasys, Deajeon, Korea)로  $\text{OD}_{600} = 0.1$ 로 조정하였다. 이 현탁액을  $10^8\text{ cfu}/\text{ml}$ 로 산정하고 10배 희석법으로  $10^8\text{ cfu}/\text{ml}$ 에서  $10^0\text{ cfu}/\text{ml}$ 까지 희석하여 세균 현탁액을 준비하였다. 각각의 세균 현탁액 10 ml에 수박 종자를 3 g씩 넣고 24시간 동안  $28^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm 조건으로 진탕 배양 후 상온에서 건조시켰다.

**종자 처리.** 종자 처리는 인공접종 수박 종자와 자연감염 수박 종자를 이용하였으며 종자의 외부검사와 내부검사로 구분하여 수행하였다. 인공접종 종자는 농도별로 처리된 종자 각 1 g의 종자를 이용하였으며, 자연감염 종자는 감염된 한 종류의 종자들로부터 1 g씩 10반복으로 샘플링 하여 진행하였다. 먼저 종자 외부검사는 멸균수 5 ml에 각각의 인공접종 종자와 자연감염 종자를 1 g씩 넣고 1시간 동안 200 rpm으로 진탕 후 이 현탁액으로부터 종자를 제거한 현탁액을 회수하여 DNA를 분리하였다. 종자 내부검사는 종자 외부검사에서 진탕 후 현탁액을 제거하고 얻은 종자를 종피 소독(클로락스 1% 10분 처리 후 알코올 3분 침지) 후 멸균수로 충분히 세척하고 건조하였다. 건조 후 마쇄기를 이용하여 종자를 마쇄한 후 종자 외부검사와 동일한 방법으로 진탕 후 얻은 현탁액으로부터 DNA를 분리하여 수행하였다. 모든 DNA 분리는 핵산분리기(ROCHE, Basel, Switzerland)를 이용하여 분리하였다. 종자 내부검사에 사용한 종자의 종피 소독(외부 세균의 완전한 제거)이 완전하게 이루어졌는지의 확인은 종피 소독 한 종자를 종자 외부검사와 동일한 방법으로 마쇄 없이 진탕하여 현탁액을 얻고 그 현탁액으로부터 분리한 DNA로 PCR을 수행하고 배지에서 배양 하여 *A. citrulli*가 검출되지 않음을 확인하였다.



Fig. 1. PCR result which was carried out with primer set, Ac-ORF 12F/Ac-ORF 13R and bacterial DNA. Lanes 1–78 is corresponding strain number 1–78 in Table 1. NE: water as negative control.



Fig. 2. Nested-PCR result which was carried out with primer set (Ac-ORF 21F/Ac-ORF 21R) and bacterial DNA. Lanes 1–78 is corresponding strain number 1–78 in Table 1. NE: water as negative control.

## 결 과

**PCR 프라이머의 특이성.** 본 실험에서는 NGS를 통해 *A. citrulli* KACC10651 DNA로부터 총 510개의 contig를 얻었으며, 각 ORF들의 상동성 검색을 통해 총 244개 프라이머를 제작하였다. 제작한 244개의 프라이머 중 *A. citrulli* 19균주와 *Acidovorax*속 8균주의 총 27균주를 이용하여 PCR을 수행하여 1차로 *A. citrulli*에서만 예상하는 크기의 DNA를 증폭하는 26개의 프라이머를 선발하였다. 특이성이 확인된 26개 프라이머를 다시 *Pseudomonas*속 등 51균주를 이용하여 PCR을 수행하여 특이성이 확인된 5개의 프라이머를 2차 선발하였다. 2차 선발된 5개의 프라이머 중에서 *A. citrulli* 19균주의 DNA에서 약 620 bp 크기의 DNA가 특이적으로 증폭되는 Ac-ORF 12F(5'-GCATCTTGTCAGC-CACGAC-3')와 Ac-ORF 13R(5'-ATTGGCAATCACCAAGACGC-3') 프라이머를 최종 선발하였다(Fig. 1). 또한 PCR 프라이머 Ac-ORF 12F와 Ac-ORF 13R에 의해 증폭된 산물의 내부 서열을 이용하여 nested-PCR 프라이머 Ac-ORF 21F(5'-AGCCACCTA-ATCCTCCCTT-3')와 Ac-ORF 21R(5'-TTATTCTGGGCGTCACCGTC-3')을 제작하였다. 제작된 nested-PCR 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 동일한 조건으로 PCR을 수행한 결과 *A. citrulli* 19균주들의 DNA에서만 약 140 bp 크기의 밴드가 증폭되었다(Fig. 2). 따라서 PCR 프라이머 Ac-ORF 12F와 Ac-ORF 13R, 그리고 nested-PCR 프라이머 Ac-ORF 21F와 Ac-ORF 21R은 검출 대상균인 *A. citrulli*에서만 예상하는 크기의 DNA를 증폭하여 *A. citrulli*에 대한 특이성이 확인되었다.

**PCR 프라이머의 민감도.** PCR 검출 민감도를 확인하기 위해 10 ng 농도로 정량한 genomic DNA를 10배 희석법으로 희석하여 PCR을 수행하였다. PCR 프라이머 Ac-ORF 12F와 Ac-ORF 13R로 PCR을 수행한 결과, 10 ng의 1,000배 희석 농도인

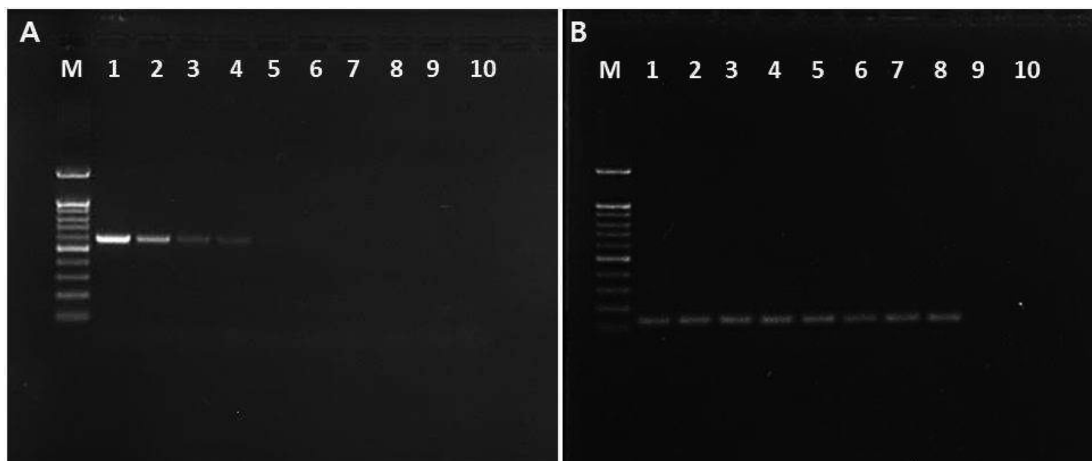
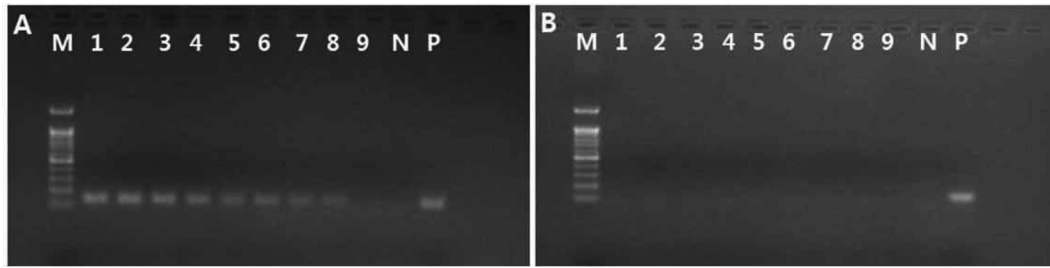
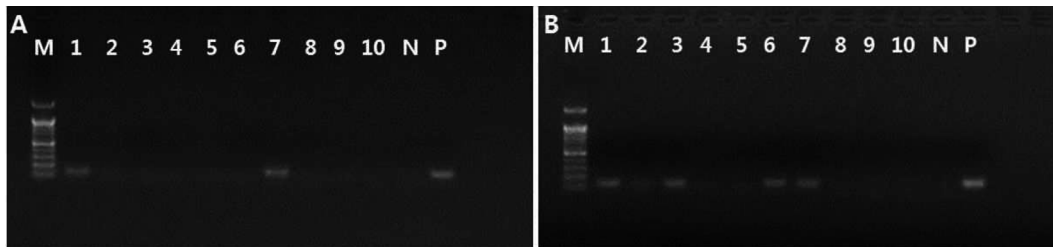


Fig. 3. PCR and nested-PCR results for determination of detection sensitivity of target bacterial genomic DNA. PCR was carried out with primer set, Ac-ORF 12F/Ac-ORF 13R and 10 ng of genomic DNA of *Acidovorax citrulli* (lane 1) and its ten-fold serial dilution (lane 2–9). Lane 10 was water as negative control (A). Nested-PCR was carried out with primer set, Ac-ORF 21F/Ac-ORF 21R and 1 µl of 50 times dilution of 1<sup>st</sup> PCR product (B).



**Fig. 4.** Nested-PCR results for detection of *Acidovorax citrulli* from external seed samples (A) and internal seed samples of the artificially inoculated watermelon seeds. Nested-PCR was carried out with primer set, Ac-ORF 21F/Ac-ORF 21R and DNA from external and internal seed preparation of the artificially inoculated seeds in  $10^8$  cfu/ml- $10^0$  cfu/ml (lane 1–9). N is negative control and P is positive control.



**Fig. 5.** Nested-PCR results for detection of *Acidovorax citrulli* from external seed samples (A) and internal seed samples of the naturally infected watermelon seeds. Nested-PCR was carried out with primer set, Ac-ORF 21F/Ac-ORF 21R and DNA from external and internal seed preparation of the naturally infected seeds. Lane 1–10 are 10 replication seed samples. N is negative control and P is positive control.

10 pg까지 DNA가 증폭되었다(Fig. 3). PCR의 증폭산물을 50배 희석한 후 1  $\mu$ l을 사용하여 nested-PCR을 수행한 결과 1차 PCR의 검출한계 농도의 10,000배 희석된 DNA에서도 목표로 하는 약 140 bp 크기의 밴드가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

**인공접종 종자로부터 검출.** *A. citrulli*의 현탁액을 10배 희석법으로 희석한 후 농도별로 인위적으로 오염시킨 수박 종자를 nested-PCR로 검정한 결과 종자 외부 검사에서는  $10^8$ - $10^1$  cfu/ml 농도로 오염시킨 모든 종자에서 예상한 크기(140 bp)의 DNA가 증폭되었다. 그러나 내부 검사에서는  $10^8$ - $10^0$  cfu/ml 농도로 오염시킨 모든 종자에서 140 bp 크기의 밴드가 증폭되지 않았다(Fig. 4). 이는 *A. citrulli*의 현탁액에 진탕하는 인공접종은 수박 종자의 외부에는 감염이 되지만 수박종자 내부는 감염을 시키지 못해 nested-PCR 검정 시 종자 외부에 존재하는 *A. citrulli*는 검출이 되었으나, 종자 내부의 *A. citrulli*는 검출되지 않는 것으로 판단된다.

**자연감염 종자로부터 검출.** 자연감염 된 하나의 종자들에서 1 g 씩 10반복으로 샘플링 후 nested-PCR 프라이머로 종자 외부 검사를 한 결과 총 10반복 중 1번과 7번 시료에서 *A. citrulli*가 검출되었다(Fig. 5). 종피 소독 후 종자 내부 검사에서는 종자 외부 검사에서 검출된 시료 1번과 7번을 포함하여 2번, 3번, 6번 시료에서도 *A. citrulli*가 검출 되었다(Fig. 5). 따라서 1번과 7번

종자시료는 종자의 외부 및 내부가 모두 *A. citrulli*에 감염되었고, 2번, 3번 그리고 6번 시료는 종자의 내부에만 *A. citrulli*에 의해 감염된 것으로 나타났다. 한 종류의 자연감염 종자들로부터 얻어진 10반복 종자에서 일부 반복에서는 *A. citrulli*가 검출되고 나머지 반복에서는 *A. citrulli*가 검출되지 않는 이유는 본 실험에 사용한 자연감염 종자가 grow-out 검사에서 전체 종자의 10%만 *A. citrulli*에 감염된 것으로, 수박 종자 1 g은 대략 18–20립으로서 자연감염 된 종자가 포함된 반복에서는 *A. citrulli*가 검출되고, 자연감염 되지 않는 종자만 있는 반복에서는 *A. citrulli*가 검출되지 않는 것으로 판단된다.

## 고 찰

본 연구에서는 수박을 포함한 박과 작물에 발생하여 큰 경제적 피해를 주는 과일썩음병 병원균 *A. citrulli*를 수박 종자로부터 검출하는 특이적이고 민감한 PCR 방법을 개발하였다. 종자에 매우 낮은 밀도로 감염된 병원세균을 성공적으로 검출하기 위해서는 PCR에 사용하는 프라이머가 검출하고자 하는 target 병원세균에 특이성이 매우 높아야 한다. 최근 식물병원세균의 특이적 검출을 위한 종 특이 또는 pathovar(pv.) 특이 PCR 프라이머를 식물병원 세균의 whole-genome 또는 draft genome을 분석을 통해 성공적으로 얻었다(An 등, 2015; Lang 등, 2010). 본 연구에서는 병원균인 *A. citrulli*에 특이성이 높은 프라이머를 얻기 위하여 *A. citrulli* KACC10651 균주의 draft genome

sequence를 Next Generation Sequencing(NGS)을 이용하여 얻었으며, 이를 통해 최종 선발한 Ac-ORF 12F/Ac-ORF 13R PCR 프라이머와 Ac-ORF 21F/Ac-ORF 21R nested PCR 프라이머는 수박, 멜론, 오이에서 분리한 19개의 모든 *A. citrulli*에서만 예상한 620 bp와 140 bp 크기의 DNA를 증폭시켜 그 특이성을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 개발한 PCR 방법의 검출한계는 PCR 반응 당 *A. citrulli*의 genomic DNA 10 pg이었으며, 검출의 민감도를 높이기 위해 개발한 nested PCR은 1차 PCR의 검출 한계를 약 10,000배 증가시켰다. 감귤 궤양병균 검출을 위한 LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)의 경우 검출한계가 genomic DNA 농도로 10 fg(Rigano 등, 2010) 보고되었는데, 본 연구결과로 얻은 nested-PCR의 검출한계는 이와 유사하거나 조금 더 민감한 방법으로 판단된다. 본 연구에서 개발된 nested-PCR을 인공접종 종자와 자연 감염 종자를 이용하여 종자 검사에 적용하여 상업적으로 이용 가능한지 확인하였다. 인공접종 종자의 외부 검사에서는  $10^1$  cfu/ml 농도로 오염시킨 종자에서도 검출이 되는 것이 확인되었으나 내부 검사에서는 검출이 되지 않았다. 이 결과는 인공접종 종자 조제 시 현탁액에 24시간 침중만으로는 종자 내부로의 오염이 되지 않은 이유일 것으로 판단된다. 자연 감염 종자의 경우 종자 외부검사에서도 10개 시료 중 2개 시료에서 *A. citrulli*를 검출하였고, 종피 소독 후 종자 내부 검사에서도 10개 시료 중 5개 시료에서 *A. citrulli*를 검출하였다. 본 실험에 사용한 자연감염 종자는 grow-out 검사에서 전체 종자의 약 10%만 감염되어 있는 것으로 나타난 종자이므로 10개 시료 중 5개 시료에서만 병원균 *A. citrulli*가 검출된 것으로 판단되며, 이 검출결과를 통해 개발된 nested-PCR 방법이 종자 검사에 사용할 수 있는 것 판단된다. 종자 회사에서는 F<sub>1</sub> 박과 작물 종자 생산 시 수확과 동시에 약제를 이용한 종자소독을 실시하고 있다. 또한 상업적으로 판매되는 수박 등의 박과작물 종자들은 종자소독을 필히 하고 있어 만약 BFB가 발생한다면, 종자 외부에 존재하는 *A. citrulli*보다는 종자 내부에 감염되어 있는 *A. citrulli*가 원인일 것이다. 종자 내부에 낮은 농도로 감염되어 있는 *A. citrulli* 검출을 위해서는 특이적이고 민감도 높은 검출법이 필요한데, 본 연구에서 개발한 nested-PCR의 경우 특이성 및 민감도가 높고 자연감염 된 수박 종자로부터 검출이 가능한 결과로 보아 박과작물의 종자로부터 병원세균 *A. citrulli*를 검출하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

박과 작물에서 과일썩음병(bacterial fruit blotch)을 일으키는 *Acidovorax citrulli*를 종자로부터 검출하기 위한 특이적이고 민감한 nested-PCR 방법을 개발하였다. 본 연구에서는 Next Generation Sequencing을 이용하여 draft genome sequencing을 얻은 후 이를 분석하여 PCR 프라이머를 디자인하였고, 이들

프라이머의 *A. citrulli*에 대한 특이성을 확인하여 Ac-ORF 21F/Ac-ORF 21R의 nested PCR 프라이머를 최종 선발하였다. Ac-ORF 21F/Ac-ORF 21R는 오직 *A. citrulli*에서만 특이적으로 140 bp 크기의 DNA를 증폭하였으며, 그 검출민감도는 1차 PCR 검출한계(10 ng genomic DNA/PCR)보다 검출한계를 10,000배 증가시켰다. 개발된 nested-PCR 방법을 통해 병원균을 인공접종한 수박 종자의 외부검사에서도  $10^1$  cfu/ml까지 인공 접종 한 모든 종자 시료에서 병원균을 검출하였고, 병원균을 인공접종한 수박 종자의 내부검사에서는 병원균이 검출되지 않았다. 자연 감염 수박 종자의 외부검사에서는 10개의 반복 시료 중 2개에서, 그리고 종자 내부검사에서는 10개의 반복 시료 중 5개에서 *A. citrulli*를 검출하였다. 본 연구에서 개발한 nested-PCR은 특이성과 민감도가 높고 인공접종과 자연감염 수박 종자에서도 병원균의 검출이 가능하여 박과 작물의 종자로부터 *A. citrulli*를 검출하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## Acknowledgments

This study was financially supported by research fund of Nongwoo Bio CO., LTD in 2014.

## References

- An, J. H., Noh, Y. H., Kim, Y. E., Lee, H. I. and Cha, J. S. 2015. Development of PCR and TaqMan PCR assays to detect *Pseudomonas corona-faciens*, a causal agent of halo blight of oats. *Plant Pathol. J.* 31: 25–32.
- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R. R. and Burdman, S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Pathol.* 57: 754–763.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G. and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Dis.* 89: 1339–1347.
- Dreier, J., BERPohl, A. and Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85: 462–468.
- Ha, Y., Fessehaie, A., Ling, K. S., Wechter, W. P., Keinath, A. P. and Walcott, R. R. 2009. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 99: 666–678.
- Himananto, O., Thummabenjapone, P., Luxananil, P., Kumposiri, M., Hongprayoon, R., Kositratana, W. and Gajanandana, O. 2011. Novel and highly specific monoclonal antibody to *Acidovorax citrulli* and development of ELISA-based detection in cucurbit leaves and seed. *Plant Dis.* 95: 1172–1178.

- Hopkins, D. L., Cucuzza, J. D. and Watterson, J. C. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Dis.* 80: 529–532.
- Hopkins, D. L. and Thompson, C. M. 2002. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits. *Hortscience* 37: 924–926.
- Hopkins, D. L., Thompson, C. M., Hilgren, J. and Lovic, B. 2003. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. *Plant Dis.* 87: 1495–1499.
- Lang, J. M., Hamilton, J. P., Diaz, M. G. Q., Van Sluys, M. A., Burgos, M. R. G., Vera Cruz, C. M., Buell, C. R., Tisserat, N. A. and Leach, J. E. 2010. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Dis.* 94: 311–319.
- Langstin, D. B. Jr, Walcott, R. R., Gitaitis, R. D. and Sanders, F. H. 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis.* 83: 100–107.
- Latin, R. X. and Fane, K. K. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Dis.* 74: 331–335.
- Latin, R. X. and Hopkins, D. L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical question becomes reality. *Plant Dis.* 79: 761–765.
- Martin, H. L. and Brien, R. G. 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. *Plant Dis.* 83: 965–970.
- Martin, H. L. and Horlock, C. M. 2002. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of Gramma in Australia. *Plant Dis.* 86: 1406–1500.
- Minsavage, G. V., Hoover, R. J., Kucharek, T. A. and Stall, R. E. 1995. Detection of the watermelon fruit blotch pathogen and seeds with the polymerase chain reaction. *Phytopathology* 85: 1162. (Abstract)
- Randhawa, P. S., Pannu, S. S. and Schaad, N. 2001. Improved Bio-PCR test for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. APS Joint Meeting. Salt Lake, USA.
- Rane, K. K. and Latin, R. X. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76: 509–512.
- Rigano, L. A., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Amara, A. M. D. and Vojnov, A. A. 2010. Rapid and sensitive detection of citrus bacterial canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods. *BMC Microbiol.* 10: 176.
- Schaad, N. W. and Frederick, R. D. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can. J. Plant Pathol.* 34: 250–258.
- Schaad, N. W., Postnikova, E. and Randhawa, P. 2003. Emergence of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a crop-threatening disease of watermelon and melon. In: Presentations from the 6th International Conference on *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens, ed. by N. W. Schaad, pp. 573–581. Kluwer Press, Maratea, Italy.
- Seo, S. T., Park, J. H., Lee, J. S., Han, K. S. and Cheong, S. R. 2006. Bacterial fruit blotch of melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Res. Plant Dis.* 12: 185–188. (In Korean)
- Shakya, D. D. 1987. Rapid diagnosis of *Pseudomonas avenae* by pathogenicity and serology. *Korean J. Plant Pathol.* 3: 300. (Abstract)
- Somodi, G. C., Jones, J. B., Hopkins, D. L., Stall, R. E., Kucharek, T. A., Hodge, N. C. and Watterson, J. C. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Plant Dis.* 75: 1053–1056.
- Song, W. Y., Kim, H. M., So, I. Y. and Kang, Y. K. 1991. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*: The causal agent of bacterial fruit blotch rot on watermelon. *Korean J. Plant Pathol.* 7: 177–182. (In Korean)
- Sowell, G. Jr. and Schaad, N. W. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: seed transmission and resistance of plant introduction. *Plant Dis. Rep.* 63: 437–441.
- Walcott, R. R., Fessehaie, A. and Castro, A. C. 2004. Differences in Pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts. *Phytopathology* 152: 277–285.
- Walcott, R. R. and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immuno-magnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 84: 470–473.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D. and Castro, A. C. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 93: 528–534.
- Walcott, R. R., Langston, D. B. Jr., Sanders, H. H. Jr. and Gitaitis, R. D. 2000. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. *Phytopathology* 90: 191–196.
- Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K. and De Ley, J. 1990. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 384–398.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K. and De Ley, J. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 107–119.