

화상병원세균 검출을 위한 Conventional PCR 향상

Enhancing Conventional PCR for Detection of *Erwinia amylovora*

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6432

Fax: +82-33-259-5558

E-mail: dhp@kangwon.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-8486-9544>

최현주¹ · 김연주¹ · 최정호¹ · 최동혁¹ · 박덕환^{1,2*} 

¹강원대학교 스마트농업전공, ²강원대학교 생물자원과학부 식물의학전공

Hyun Ju Choi¹, Yeon Ju Kim¹, Jeong Ho Choi¹, Dong Hyuk Choi¹, and Duck Hwan Park^{1,2*} 

¹Interdisciplinary Program in Smart Agriculture, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²Plant Medicine Program, Division of Bioresource Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Polymerase chain reaction (PCR) methods, including conventional PCR (cPCR) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR), with both plasmid- and chromosome-targeting primers, are currently the most reliable methods for detecting *Erwinia amylovora* due to their high sensitivity and specificity. Despite qRT-PCR's quantitative advantage, cPCR remains an attractive method to detect this bacterium in initial screenings of suspected host plants, as it is cost-effective and does not require skilled personnel in well-equipped laboratories. This study aimed to significantly improve cPCR robustness via application of bovine serum albumin (BSA) as a PCR facilitator, with a modified EaF/R primer pair, as previously reported. Experiments have shown that simple supplementation with BSA (10 mg/ml) enhances cPCR reactions using templates such as genomic DNA, bacterial cells, and infected symptomless host organs, including immature apple fruits and seedlings, with EaF/R primers. The cPCR method described in this study is simple, specific, and reliable, and can be applied in routine assays to diagnose fire blight.

Keywords: Detection, *Erwinia amylovora*, Facilitator, Fire blight, Polymerase chain reaction

Received August 23, 2024

Revised September 16, 2024

Accepted September 19, 2024

과수 화상병은 2015년 사과 및 배나무에서 국내 최초 발생되어(Myung 등, 2016; Park 등, 2016) 당해 사과 및 배나무 의심시료로부터 43시료가 확진 보고되었으며, 2016-2017년 17 및 33시료에서만 확진되어 감소 추세를 보이다가 2018-2019년 각각 67 및 188시료로 증가하였다(Ham 등, 2020). 이후 화상병에 대한 공격방제가 실시되고 있음에도 불구하고, 2020년 744시료와 2021년 618시료에서 확진되어 폭발적인 증가세를 보인 후, 2022년 245시료 및 2023년 234시료로부터 화상병원균이 검출되었다(Ham 등, 2024). Ham 등(2020, 2024)은 2015년 최초 발생 이래 과수 화상병의 급진적이면서도 지속적인 발생의 이유

로, 배나무는 20-30년생 노화된 과수와 사과나무의 경우는 비교적 어린 나무에서 발병 비율이 높게 나타나 재배수령에 따른 배나무 및 사과나무의 감염률이 높아질 수 있음을 보고하였다. 또한 동계 특히 1-2월 평균보다 높은 기온 및 강우일수일 경우와 병원세균의 증식 및 전파가 용이한 5-6월 강우일수가 평균 이상일 경우 발생 비율이 높아져 월동 및 새로운 기주식물로 감염 및 전파가 용이한 환경을 발병 증가의 이유로 설명하였다. 이는 과수 화상병원세균의 병환에서 잘 나타나고 있듯이(van der Zwet 등, 2012), 궤양과 같은 월동처에서 상대적으로 높은 기온과 습도가 지속될 수로 병원세균 월동이 잘 이루어질 수 있으며, 활성 시기에는 전파가 용이한 상대습도 또는 식물 표면습도의 상승이 주요 발병 증가 요인이라는 사실을 국내 과수 화상병 발생환경에서도 일치한다는 것을 보여주고 있다.

Research in Plant Disease

eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

© The Korean Society of Plant Pathology

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한편, 또 다른 국내 과수 화상병의 발병 비율의 증가 이유로 중앙정부의 적극적 모니터링에 의한 의심시료 선별과 농가의 자진신고 비율 증가를 생각할 수 있다. 이는 의심시료 선별 및 자진신고 후 확진을 위한 화상병원세균 진단 등 검출기술의 고도화가 직접적인 이유이다. 화상병원세균 진단기술에 대한 연구는 1990년대 초반부터 활발하게 이루어졌으며, 이를 통해 다양한 진단기술들이 개발되었으나 국내외적으로 polymerase chain reaction (PCR) 방법이 실험실 및 현장적용 진단기술로 최적화되고 있으며, 현재까지 다양한 PCR 방법에 따라 화상병원세균의 진단기술이 보고되었다. 먼저 conventional PCR (cPCR)에서는 intergenic transcribed spacer (ITS) 지역, amylovoran 생합성 유전자(*amsB*), *hrpN*, *pstS-glmS* 지역, recombinase A 지역, hypothetical protein 및 플라스미드 pEA29 등으로부터 제작된 특이 프라이머를 이용한 화상병원세균 진단 및 검출기술에 대한 연구가 이루어졌다(Bereswill 등, 1992, 1995; Gehring과 Geider, 2012; Ham 등, 2022; Jeng 등, 1999; Kokosková 등, 2007; Lagonenko 등, 2011; Obradovic과 Kevresan, 2010; Taylor 등, 2001; Wensing 등, 2011). 또한 최근에는 quantitative real-time PCR (qRT-PCR) (Dreo 등, 2012; Gottsberger, 2010; Pirc 등, 2009; Singh 등, 2021), loop-mediated isothermal amplification PCR (LAMP-PCR) (Bühlmann 등, 2013; Gosch 등, 2012; Moradi 등, 2012; Shin 등, 2018; Temple과 Johnson, 2011) 및 recombinase polymerase amplification PCR (RPA-PCR) (Ivanov 등, 2022) 등의 방법으로도 화상병원세균의 진단이 이루어지고 있다.

식물병 진단기술에서 고려되어야 하는 사항으로는 진단하고자 하는 병원균에 대한 특이성과 효율성 이외에도 진단절차에서의 시간, 비용 및 노동 절감 여부, 진단 주체자인 실험자의 기능적 숙련도, 타겟 병원균 배양 및 DNA 추출 등과 같은 절차의 간소화 그리고 현장에서 직접 진단하여 재배자와 같은 요구자에게 빠른 시간 내에 직접 결과를 통보할 수 있는 현장 활용도 등이 중요하게 여겨지고 있다(Ham과 Park, 2023; Jin과 Kim, 2023; Jin 등, 2023; Jung 등, 2023; Sabri 등, 2022). 이들 고려사항들에 대해 전반적으로 만족할만한 결과를 도출하고 있는 진단기술 방법은 PCR 기반 진단기술이 대표적이며, 이러한 이유로 PCR 방법은 특이 프라이머를 이용하여 DNA 증합효소는 타겟 지역을 기하급수적으로 증폭하며, 이 증폭 지역의 생성 유무에 따라 병원균 검출 유무를 판별할 수 있기 때문이다. 그러나 PCR 방법은 DNA 증합효소반응에 의한 결과로, 효소반응을 억제할 수 있는 다양한 종류의 PCR 억제제들에 매우 민감하며 이는 PCR 반응의 감도를 감소시킬 뿐만 아니라 위음성 결과를 초래하기도 한다(Schrader 등, 2012).

이에 본 연구에서는 국내 과수화상병원세균의 검출 방법에서 보편적으로 사용되거나 1차 선별 과정으로 이용되고 있는 cPCR 진단법에서 PCR 억제제를 제거할 수 있는 최적 촉진제를 선별하고, 이를 활용하여 cPCR의 효율성 증진과 더불어 기존 보고된 cPCR 특이 프라이머 중 적용할 수 있는 최적 프라이머를 선별하였으며, 이를 화상병원세균 기주 식물 감염 후 증상 및 무증상 시료에서의 활용 가능성을 확인하였다.

화상병원세균 배양 및 검출 시료 준비. 검출 대상 화상병원세균은 2015년 경기도 안성 이병배나무에서 분리된 *Erwinia amylovora* TS3128 균주를 MGY (D-mannitol 10 g, L-glutamic acid 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, yeast extract 1 g, and agar 18 g/l, adjusted pH 7.0) 액체 배지에서 28°C 24시간 배양하여 O.D.600 nm=0.001 현탁하여 10배 희석 방법으로 10^{-3} (3.4×10^3 colony forming unit [cfu/ml]), 10^{-4} (5.3×10^2 cfu/ml) 및 10^{-5} (4.2×10^1 cfu/ml)까지 희석하여 병원세균 세포단위에서의 cPCR 특이 프라이머 및 촉진제 첨가에 의한 증진 여부를 조사하였다. DNA 농도에 따른 cPCR 특이 프라이머 및 촉진제 첨가에 의한 검출한계의 증진 여부를 조사하기 위하여, TS3128 균주를 MGY 액체 배지에서 28°C 24시간 배양한 후 Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 1,000, 100, 1 및 0.1 fg/ μl 농도로 희석하여 검정하였다. 또한 기주식물 내에서 화상병원세균을 검출하기 위하여 TS3128 균주에 pBAV1K-T5-gfp 플라스미드를 도입시킨 kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 저항성 균주현탁액을 Zhao 등(2009)에 의한 방법에 따라 O.D.600 nm=0.001 (1.8×10^6 cfu/ml)로 사과(cv. Fuji) 미성숙과에 접종하였으며 각 반복당 5개의 미성숙과를 이용하여 2반복 실시되었다. 접종 미성숙과로부터 화상병원세균 검출은 접종 1일 및 4일 후, 접종부위로부터 0.5 cm 떨어진 부위를 no. 5 cork borer를 이용하여 0.5 cm² 채취한 후 10 mM MgCl_2 용액에 마쇄하여 5 μl 를 cPCR 특이 프라이머 및 촉진제 첨가에 의한 증진 여부에 사용하였다. 또한 사과 유묘(cv. M9)는 kanamycin 저항성 균주 O.D.600 nm=0.001 현탁액에 1분간 침지 접종하여 Murashige and Skoog (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 배지에 치상하여 미성숙과와 동일한 시기에 접종 유묘 전체를 10 mM MgCl_2 용액에 마쇄하여 5 μl 를 cPCR 검정시료로 활용하였다.

cPCR 프라이머 및 촉매제 PCR 반응 조건. 촉매제 첨가에 의한 cPCR의 화상병원세균 진단 증진을 판단하기 위한 특이 프라이머는 기존 과수 화상병 진단에서 초창기에 개발된 프

라이머들로 선발하였다. 먼저 화상병원세균이 가지고 있는 특이 플라스미드(pEA29) 타겟 프라이머 A(5'-CGGTTTTTAAC-GCTGGG-3')/B(5'-GGGCAAATACTCGGATT-3') (Bereswill 등, 1992)와 주요 병원성 인자인 아밀로보란 생합성 유전자 타겟 프라이머 AMSbL(5'-GCTACCAGCAGGGTGAG-3')/AMSbR(5'-TCATCACGATGGTGTAG-3') (Bereswill 등, 1995) 및 23S rRNA 유전자 지역 타겟 프라이머 EaF(5'-GCGCAGTAAAGGGTGACAGCCCCGTACACAAAAGGCACT-3')/EaR(5'-CCCTAGCCGAAACAGTGCTCTACCCCGG-3') (Maes 등, 1996)를 이용하였다. 이때 EaF/EaR 프라이머는 본 연구에서 annealing 온도가 너무 높고 각각 40- 및 29-mer의 크기로 비교적 진단용 특이 프라이머로서는 긴 염기서열로 인한 재현성의 문제로 인해 본 연구에서는 이로부터 짧은 단편의 프라이머 EaF(5'-GCGCAGTAAAGGGTGACAG-3')/EaR(5'-CCCTAGCCGAAACAGTGCT-3')를 새롭게 제작하여 사용하였다. cPCR 반응액은 총 50 µl로, 각각 접종 사과 미성숙과와 유묘 마쇄액 및 TS3128 세균 현탁액 또는 TS3128 genomic DNA 5 µl (희석농도별), dNTPs 4 µl (dATP, dTTP, dGTP, dCTP 각각 0.16 mM), forward 및 reverse 프라이머 2 µl (각각 0.2 µM), 10× buffer 5 µl (1×), BioFACT™ Thumb Taq Polymerase (BIOFACT, Daejeon, Korea) 0.5 µl (1.25 U) 및 2차 증류염금수 33.5 µl로 구성되었다. 여기에 PCR 촉진제 또는 PCR 억제물질 제거제로 알려진 (NH₄)₂SO₄(4 mM), bovine serum albumin (BSA, 10 mg/ml), Triton X-100 (0.01%), Tris-borate-EDTA buffer (1×), glycerol (5%) 및 betaine (1.5 mM) 5 µl

를 첨가하여 PCR 반응의 촉진 여부를 판단하였다(Rådström 등, 2008; Schrader 등, 2012). cPCR 반응 조건은 hot start를 위한 95°C 10분 후, A/B 프라이머는 93°C 1분, 52°C 2분 및 72°C 1분의 35 cycle 그리고 AMSbL/R 및 EaF/R 프라이머의 경우 94°C 30초, 60°C 30초 및 72°C 2분의 35 cycle 반응 후 마지막 단계로 72°C에서 7분간 PCR Thermal Cycler Dice Gradient 기계(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 최종 반응시켰다. cPCR 반응산물은 1% agarose 전기영동 젤에서 ethidium bromide 0.5 µl/ml로 염색하여 반응산물을 확인하였다. 양성반응은 TS3128 genomic DNA 100 µg/µl 및 음성반응은 DNA 무첨가로 나타내었으며, 실험은 2반복 수행하였다.

화상병원세균 DNA 및 현탁액 cPCR 반응 촉진. 본 연구에서 이용한 3종류의 화상병원세균 특이 검출 cPCR 프라이머와 6종류의 PCR 반응 촉진제를 이용하여 우선적으로 화상병원세균 DNA 및 현탁액 대상 반응 촉진 여부를 판단하였다. 먼저 화상병원세균 genomic DNA를 template로 하였을 경우, 3종류의 프라이머들 중 AMSbL/R 및 A/B 프라이머들은 각각 1,000 및 100 fg/µl 농도에서만 반응산물을 나타낸 반면, EaF/R 프라이머는 1 fg/µl DNA농도에서 565 bp 크기의 반응산물을 나타내어 본 연구에서 사용된 시약 및 기계 등의 시스템에서 최적 효율을 나타낼 수 있는 프라이머로 판단되었다(Table 1). 이는 이들 프라이머들에 대한 PCR 감도에 대한 이전 보고에서 1 pg/µl 이상의 DNA 농도에서만 검사가 이루어진 측면을 고려할 때 본 연구

Table 1. Comparisons of detection sensitivities of different PCR facilitators and primers using serial decimal dilutions of bacterial genomic DNAs and suspensions of *Erwinia amylovora* TS3128 strain as template

Facilitator	Primer												Primer											
	EaF/R				AMSbL/R				A/B				EaF/R				AMSbL/R				A/B			
	DNA concentration (fg/ul)												cfu/ml											
	1,000	100	1	0.1	1,000	100	1	0.1	1,000	100	1	0.1	10 ⁶	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁶	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁶	10 ³	10 ²	10 ¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	O	O	O	X					O	O	X	X	O	X	X	X	O	X	X	X	O	O	O	O
Bovine serum albumin	O	O	O	O					O	O	X	X	O	O	O	X	O	X	X	X	O	O	O	O
Triton X-100	O	O	O	X		ND			O	O	X	X	O	X	X	X	O	X	X	X	O	O	O	O
TBE buffer	X	X	X	X					X	X	X	X	O	O	X	X	O	X	X	X	O	O	X	X
Glycerol	O	O	O	X					O	O	X	X	O	O	O	X	O	X	X	X	O	O	O	O
Betaine	O	O	O	X					O	O	X	X	O	X	X	X	O	X	X	X	O	O	O	O
Control ^a	O	O	O	X	O	X	X	X	O	O	X	X	O	X	X	X	O	X	X	X	O	O	O	O

O and X indicate presence and absence of amplicons, respectively, in reactions using each facilitator and primer.

PCR, polymerase chain reaction; cfu, colony forming unit; ND, not determined; TBE, Tris-borate-EDTA.

^aControl indicates no addition of any facilitators.

에서처럼 낮은 DNA 농도에서는 검정이 이루어지지 않았거나 불가능하였기 때문에 사료된다. 그러나 세균 현탁액에 대한 PCR 감도는 A/B 프라이머가 4.2×10^1 cfu/ml까지 반응산물을 나타낸 반면, EaF/R 및 AMSbL/R 프라이머들은 1.8×10^6 cfu/ml의 높은 밀도의 세균수에서만 반응산물을 나타내었다(Table 1). 이는 Maes 등(1996)이 보고한 A/B 프라이머는 10^2 cfu/ml 밀도까지 화상병원세균의 검출이 가능하다는 사실과 동일하였으며, 이외 2종류의 프라이머들은 세균수 10^3 cfu/ml 이상의 밀도에서만 검출이 가능하다는 사실과도 같은 결과였다(Bereswill 등, 1992, 1995).

한편, cPCR 반응 촉진제 중에서는 BSA만이 EaF/R 프라이머를 이용한 genomic DNA 0.1 fg/ μ l 농도와 세균 현탁액 3.4×10^3 cfu/ml 및 5.3×10^2 cfu/ml에서 무첨가 대비 반응산물을 나타내어 최적의 촉진제로 판단되었다(Table 1). BSA는 일반적으로 시료 내 PCR 반응 억제물질이 DNA에 결합하여 Taq polymerase의 활성을 낮추는 효과를 BSA 자체가 억제물질과 결합함으로써 효소활성 효과를 유지시키는 PCR 반응 촉진제로 잘 알려져 있으며(Farell과 Alexandre, 2012; Rådström 등, 2008), 특히 시료 내 다량의 protease를 억제함으로써 PCR 반응을 촉진시킨다고 보고되었다(Schrader 등, 2012). 이에 모든 Taq polymerase buffer에는 평균적으로 1.2 mg/ml 수준 농도로 BSA가 함유되어 있으나, 본 연구에서는 10 mg/ml로 8.3배 추가 첨가가 BSA의 PCR 반응 촉진효과를 나타낸 것으로 사료된다. 따라서 감염 기주식물에서의 화상병원세균 검출을 위한 cPCR 반응의 촉진 여부는 EaF/R 프라이머와 BSA를 첨가한 PCR 반응으로 검증하였다.

화상병원세균 감염 기주식물 시료 cPCR 반응 촉진. 화상병원세균 감염 기주식물(사과 미성숙과 및 유묘)로부터 화상병원세균의 검출은 병징이 나타나기 전에 감염 여부를 판단하는 것이 중요하다. 이에 본 연구에서는 각각 사과 미성숙과 및 유묘 접종 1 및 4일 후 무증상 시료로부터 선발된 프라이머 및 촉진제에 의한 cPCR 반응 촉진 여부를 판단하였다. 접종 1일 후 미성숙과 및 유묘로부터 분리된 화상병원세균은 각각 $8.0 \times 10^2 \pm 4.4 \times 10^2$ cfu/ml와 $6.3 \times 10^6 \pm 7.9 \times 10^5$ cfu/ml로 나타났으며, 접종 4일 후에는 미성숙과 $2.1 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^7$ cfu/ml, 유묘 $4.9 \times 10^8 \pm 1.5 \times 10^8$ cfu/ml로 조사되었고, 4일 후까지 미성숙과와 유묘 모두 괴사 및 마름증상의 전형적인 병징이 나타나지는 않았으며 이후 접종 7일 후에 병징이 발생하였다. 이에 접종 1일 및 4일 후 미성숙과와 유묘시료로부터 EaF/R 프라이머와 촉진제로 BSA를 이용하여 PCR 반응한 결과, BSA를 추가 첨가하지 않은 반응에서는 미성숙과 및 유묘 모두에서 반응산물을 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 반면 BSA 추가 첨가 반응에서는 유묘에서는 접종 1일 및 4일 후 모든 시료로부터 반응산물이 나타났으나, 미성숙과에서는 접종 1일 후에는 PCR 촉진 효과가 없었으며 접종 4일 후 시료에서는 총 8개 시료에서 3개의 시료로부터 반응산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 접종 1일 후 BSA 촉진제에 의한 EaF/R 프라이머의 성공적인 검출이 유묘에서만 나타난 이유는, 접종 1일 후 유묘에서의 화상병원세균 밀도가 10^6 cfu/ml 이상의 고밀도로 존재하기 때문으로 사료되며, 미성숙과에서는 10^2 cfu/ml의 낮은 밀도 때문인 것으로 판단되나 세균 현탁액에서 10^2 cfu/ml 밀도도 검출된 결과로 보아 PCR 반응 억제제로 작용할 수 있

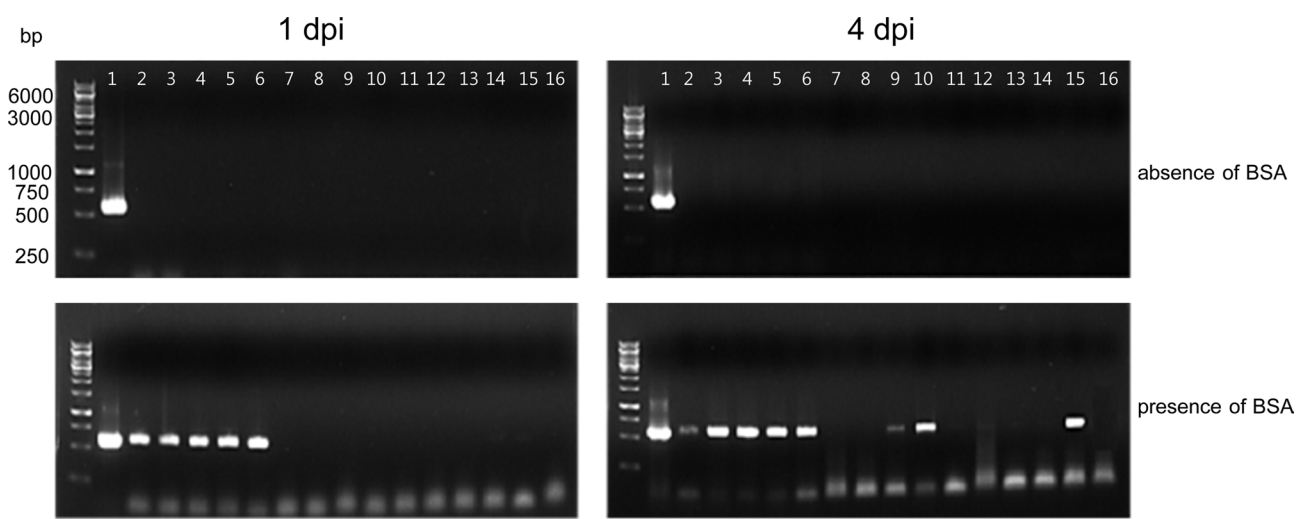


Fig. 1. Polymerase chain reaction amplification at 1 and 4 days post-inoculation (dpi) with the EaF/R primer and absence (upper panels) or presence (lower panels) of bovine serum albumin (BSA) (10 mg/ml) of a target sequence from extracts of immature apple fruits and seedlings inoculated with *Erwinia amylovora* TS3128 strain. Lane 1: TS3128 genomic DNA (100 μ g/ μ l) as positive control; lanes 2 to 6: extracts from immature apple fruits; lanes 7 and 16: negative controls (no TS3128 genomic DNA); lanes 8 to 15: extracts from apple seedlings, and M: GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

는 페놀릭 화학물질들이 유묘보다는 미성숙과에 다량 포함되어 있기 때문에 여겨진다. 그러나 화상병원세균의 밀도가 10^8 cfu/ml로 증가한 접종 4일 후에는 BSA에 의한 PCR 반응 촉진 효과가 유묘 및 미성숙과 모두에서 분명하게 나타났다. 따라서 화상병원세균 감염 기주식물로부터 10^2 cfu/ml 이상의 밀도로 잠복 감염되어 있는 무증상의 시료에서 EaF/R 프라이머와 BSA 촉진제 첨가에 의해 화상병원세균을 검출하여 조기진단 시스템에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

현재까지 화상병원세균 진단에서 가장 유용하게 사용되는 방법은 이들 병원세균의 플라스미드 또는 염색체 기반 특이 프라이머를 이용한 일반 PCR 및 정량 PCR 방법이 가장 민감하고 특이성 높은 방법으로 여겨지고 있다. 이들 PCR 중, 일반 PCR 방법은 가격적 측면과 연구자의 기능적 숙련도 및 고가의 장비를 요구하지 않는다는 측면에서 활용성이 유지되고 있다. 따라서 본 연구에서는 화상병원세균 검출에서의 일반 PCR 반응의 증진효과를 나타내기 위한 일반 PCR 프라이머 및 촉진제를 선발하고자 하였다. 이에 새롭게 제작된 EaF/R 프라이머와 PCR 반응액에 BSA를 10 mg/ml 농도로 추가 첨가한 경우가 화상병원세균 DNA 및 세균 자체 그리고 감염 후 무증상 시료 추출액을 주형으로 하는 일반 PCR 반응 모두를 증진시키는 결과를 확인하였다. 따라서 새롭게 제작된 EaF/R 프라이머 및 BSA 추가 첨가 방법은 최적 발생시기에 집중되는 대량 시료로부터 초기 화상병 이병시료를 선발할 수 있는 일반 PCR 방법의 효율성을 증대시켜 정밀 검진 대상시료의 최소화를 통한 확진시간의 단축 등에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Conflicts of Interest

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

Acknowledgments

This research was supported by Rural Development Administration (PJ014219032021), Republic of Korea.

References

Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmüller, I. and Geider, K. 1995. Identifi-

fication of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2636-2642.

Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3522-3526.

Bühlmann, A., Pothier, J. F., Rezzonico, F., Smits, T. H. M., Andreou, M., Boonham, N. et al. 2013. *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. *J. Microbiol. Methods* 92: 332-339.

Dreo, T., Pirc, M. and Ravnikar, M. 2012. Real-time PCR, a method fit for detection and quantification of *Erwinia amylovora*. *Trees* 26: 165-178.

Farell, E. M. and Alexandre, G. 2012. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Res. Notes* 5: 257.

Gehring, I. and Geider, K. 2012. Identification of *Erwinia* species isolated from apples and pears by differential PCR. *J. Microbiol. Methods* 89: 57-62.

Gosch, C., Gottsberger, R. A., Stich, K. and Fischer, T. C. 2012. Blue ^{Ea}LAMP—a specific and sensitive method for visual detection of genomic *Erwinia amylovora* DNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 134: 835-845.

Gottsberger, R. A. 2010. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Let. Appl. Microbiol.* 51: 285-292.

Ham, H., Kim, K., Yang, S., Kong, H. G., Lee, M.-H., Jin, Y. J. et al. 2022. Discrimination and detection of *Erwinia amylovora* and *Erwinia pyrifoliae* with a single primer set. *Plant Pathol. J.* 38: 194-202.

Ham, H., Lee, Y.-K., Kong, H. G., Hong, S. J., Lee, K. J., Oh, G.-R. et al. 2020. Outbreak of fire blight of apple and Asian pear in 2015-2019 in Korea. *Res. Plant Dis.* 26: 222-228. (In Korean)

Ham, H. and Park, D. S. 2023. Novel approach toward the understanding of genetic diversity based on the two types of amino acid repeats in *Erwinia amylovora*. *Sci. Rep.* 13: 17876.

Ham, H., Roh, E., Lee, M.-H., Lee, Y.-K., Park, D. S., Kim, K. et al. 2024. Emergence characteristics of fire blight from 2019 to 2023 in Korea. *Res. Plant Dis.* 30: 139-147. (In Korean)

Ivanov, A. V., Safenkova, I. V., Drenova, N. V., Zherdev, A. V. and Dzan-tiev, B. B. 2022. Comparison of biosensing methods based on different isothermal amplification strategies: a case study with *Erwinia amylovora*. *Biosensors* 12: 1174.

Jeng, R. S., Beliaeva, L., Hubbes, M., Svircev, A. M. and Myers, A. L. 1999. The use of 16S and 16S-23S rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* 489: 49-54.

Jin, J. H. and Kim, D. 2023. Protocol for diagnosing *Erwinia amylovora* infection using a fluorescent probe. *STAR Protoc.* 4: 102412.

Jin, Y. J., Lee, S. Y., Kong, H. G., Yang, S. I., Ham, H., Lee, M.-H. et al.

2023. Novel detection and quantification approach of *Erwinia amylovora* in vitro and in planta using SYBR green-based real-time PCR assay. *Plant Dis.* 107: 624-627.
- Jung, Y., Jin, J. H., Jung, M., Hwang, I. S., Vu, N. T., Park, Y. K. et al. 2023. On-site applicable diagnostic fluorescent probe for fire blight bacteria. *iScience* 26: 106557.
- Kokosková, B., Mráz, I. and Hyblová, J. 2007. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for reliable detection of *Erwinia amylovora*. *Folia Microbiol.* 52: 175-182.
- Lagonenko, A. L., Lagonenko, V. Y., Nikolaichik, Y. A. and Evtushenkov, A. N. 2011. Detection of *Erwinia amylovora* by PCR with primers to the *hrpN* gene. *Acta Hort.* 896: 85-92.
- Maes, M., Garbeva, P. and Crepel, C. 1996. Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathol.* 45: 1139-1149.
- Moradi, A., Nasiri, J., Abdollahi, H. and Almasi, M. 2012. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora* based on chromosomal DNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 133: 609-620.
- Myung, I.-S., Lee, J.-Y., Yun, M.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-K., Park, D.-H. et al. 2016. Fire blight of apple, caused by *Erwinia amylovora*, a new disease in Korea. *Plant Dis.* 100: 1774.
- Obradovic, D. and Kevresan, S. 2010. Optimization of PCR in application of hot start *Taq* DNA polymerase for detection of *Erwinia amylovora* with primers FER1-F and FER1-R. *Microbiology* 79: 816-821.
- Park, D. H., Yu, J.-G., Oh, E.-J., Han, K.-S., Yea, M. C., Lee, S. J. et al. 2016. First report of fire blight disease on Asian pear caused by *Erwinia amylovora* in Korea. *Plant Dis.* 100: 1946.
- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. and Dreo, T. 2009. Improved fire-blight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathol.* 58: 872-881.
- Rådström, P., Löfström, C., Lövenklev, M., Knutsson, R. and Wolffs, P. 2008. Strategies for overcoming PCR inhibition. *CSH Protoc.* 3: 1-10.
- Sabri, M., Achbani, E. H., Diouri, M., Benkirane, R., Ou-zine, M., El handi, K. et al. 2022. Simple direct DNA extraction protocols for efficient routine detection of plant pathogenic bacteria via conventional PCR. *J. Crop Improv.* 36: 514-525.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johnne, R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113: 1014-1026.
- Shin, D.-S., Heo, G.-I., Son, S.-H., Oh, C.-S., Lee, Y.-K. and Cha, J.-S. 2018. Development of an improved loop-mediated isothermal amplification assay for on-site diagnosis of fire blight in apple and pear. *Plant Pathol. J.* 34: 191-198.
- Singh, J., Cobb-Smith, D., Higgins, E. and Khan, A. 2021. Comparative evaluation of lateral flow immunoassays, LAMP, and quantitative PCR for diagnosis of fire blight in apple orchards. *J. Plant Pathol.* 103(Suppl 1): 131-142.
- Taylor, R. K., Guilford, P. J., Clark, R. G., Hale, C. N. and Forster, R. L. S. 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 29: 35-43.
- Temple, T. N. and Johnson, K. B. 2011. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Dis.* 95: 423-430.
- van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N. and Zeller, W. 2012. Fire blight history, biology, and management. The APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Wensing, A., Gernold, M. and Geider, K. 2011. Detection of *Erwinia* species from the apple and pear flora by mass spectroscopy of whole cells and with novel PCR primers. *J. Appl. Microbiol.* 112: 147-158.
- Zhao, Y., Sundin, G. W. and Wang, D. 2009. Construction and analysis of pathogenicity island deletion mutants of *Erwinia amylovora*. *Can. J. Microbiol.* 55: 457-464.