자두 검은점무늬병원균의 PCR진단 및 검출

류영현* · 이중환¹ · 권태영¹ · 김승한² · 김동근경상북도농업기술원 신물질연구소, ¹농업환경연구과, ²봉화고냉지약초시험장PCR Primer Developed for Diagnosis of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in PruneYoung Hyun Ryu*, Joong Hwan Lee¹, Tae Young Kwon¹, Seung Han Kim² and Dong Geun KimInstitute for Natural Products Research, ¹Dept. of Plant Environment Research, ²Bonghwa Alpine Medicinal Plant Experiment Station, Gyeongsangbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Korea

(Received on February 2, 2010; Accepted on July 21, 2010)

Bacterial black spot disease of prune fruit (*Prunus salicina* cv. *formosa*) has outbreak around major prune production area, Gimcheon, Euseong and Gunwi in Gyeongbuk province and has caused severe economic loss. *Integrans* PCR primer was designed along with sample pre-incubation and nested PCR method to enhance detection sensitivity for early detection of bacteria in fields. Designed *integrans* PCR primer successfully detected *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* from field collected samples, fruit, leaf, branch and even in raindrop collected from prune orchard. Pre-incubation along with nested PCR enhanced sensitivity to detect *X. arboricola* pv. *pruni* from seemingly healthy looking, symptomless branches. Designed *integrans* PCR can be used in prune nursery fields and in plant quarantine practice for the detection of *X. arboricola* pv. *pruni*.

Keywords : *Integrans*, Nested PCR, PCR detection, *Prunus*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

경북 김천, 의성, 군위지역을 중심으로 자두(*Prunus salicina* cv. *formosa*) 과실에서 검은점무늬병(일명: 잉크 병)이 발생하여 상품성의 자두 수량이 과원에 따라서 5~30% 정도 감소되는 문제가 발생되었다. 병 발생 포장에는 과실에 특징적으로 원형의 대형 흑색 반점이 생기고 줄기에는 부스럼 형태의 괴저현상이 나타나며 잎에는 천공현상이 발생하였다.

자두에 발생하는 세균성 병은 *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 등에 의한 궤양병과 *Brenneria nigrifluens* (= *Erwinia nigrifluens*) 및 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (= *X. campestris* pv. *pruni*)에 의한 세균성구멍병이 알려져 있는데(한국식물병리학회, 2009), 자두 검은점무늬병은 복숭아 잎에 천공을 발생시키는 *X. arboricola* pv. *pruni*와 동일한 균으로 추정되나 병원균의 분리 및 동정에 대해서는 아직까지 보고되지 않았다. 자두 검은점무늬병의

경우에 있어서 특히 문제가 되는 것은, 과실에 육안상으로 구분 가능한 병징이 나타나면, 이 과실은 이미 검은 반점으로 인하여 상품성이 상실되어 경제적 손실이 불가피해지므로 병원균의 밀도가 낮거나 병징이 나타나지 않는 시기에서의 조기진단과 방제가 특히 중요하다.

일반적인 식물병원성 세균의 진단 및 동정법은 병징 부위에서 세균을 분리하고 분리된 세균을 적합한 선택배지에 배양한 다음 생리적 특성이나 혈청학적 방법에 따라 진행된다. 이러한 방법들은 통상적인 진단에서는 효과적인 방법이나 단점으로 비교적 장시간이 소요되고, 또한 현장시료에 여러 종류의 세균이 존재하거나 원인 세균의 밀도가 낮을 경우에는 원인균의 순수분리가 어려운 문제점이 있다.

최근에 ITS나 *hrp* 유전자를 이용한 *Xanthomonas* 균의 PCR 진단방법들이 국내외에서 개발되고 있다(Hartung 등, 1993; Park 등, 2004). *Integrans*는 chromosome이나 plasmid에 존재하면서 항생제 저항성 유전자에 관여하는 integrase 유전자를 가지고 있는데(Collis와 Hall, 1992), *Xanthomonas*

*Corresponding author

Phone) +82-54-832-9669, Fax) +82-54-833-1359

Email) younghyunr@korea.kr

에서는 2종(*X. campestris*, *X. axonopodis*), 12 pathovar, 32 균주에서 특이적인 *integrans*이 알려져 있으며 pathovar에 따라서 integrase gene(*Int I*) 부분이 다양한 크기의 cassette 형태로 존재하고 있다(Gillings 등, 2005). 따라서 이러한 *integrans* 영역이 *Xanthomonas campestris*를 비롯한 *Xanthomonas*속 균의 pathovar 구분에 유용한 PCR 진단용 primer 부분이 될 수 있을 것으로 가정하고 이번 자두 검은점무늬병 진단용 primer 제작에 사용하였다.

Nested PCR법(2nd PCR)은 현장시료의 조사에 주로 이용되는데 목적하는 미생물의 밀도가 매우 낮아 1st PCR 만으로는 육안 식별이 곤란할 경우 검출감도가 향상되는 장점이 있다.

따라서 본 연구는 자두포장에서 자두 검은점무늬병원균을 검출할 수 있도록 *integrans*를 이용한 특이적 PCR primer를 설계하고 과실에 병징이 나타나기 전인 현장시료가 대상임을 고려하여 검출감도 향상을 위하여 전배양에 의한 DNA 추출방법과 nested PCR에 의한 방법을 시도하였다.

재료 및 방법

이병시료의 채집. 연구에 사용된 이병시료는 2004년에서 2005년 사이에 경북 의성군과 군위군 지역의 자두 검은점무늬병이 발생한 포장에서 채집한 것으로 나무 수령은 10~15년생 정도였다. 4월에서 5월 사이에 무균상태의 채집칼을 이용하여 잎, 가지, 과실을 채집하였다. 채집된 시료는 1회용 플라스틱봉지에 밀봉하여 4~5°C의 냉장고에 보관하면서 채집 후 2~3일 이내에 실험에 사용하였다.

DNA 추출방법 비교. 채집시료로부터의 DNA 추출은 직접법과 전배양법 2가지를 시도하였는데 1) 직접법은 시료 100 mg을 준비한 다음 lysis buffer(Tris 50 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.5 M, SDS 1%) 1 ml를 첨가한 후 소형 플라스틱 봉으로 분쇄하였다. 이 시료를 60°C에서 30분간 처리, 상등액을 chloroform으로 2회 추출, 원심분리한 다음 상등액을 100% 에탄올로 핵산을 침전, 건조한 후 TE buffer에 녹여 PCR에 사용하였다. 2) 전배양법은 시료에 존재하는 세균을 1차 증식시킨 후 DNA를 추출하는 방

법으로 1)의 방법에 사용된 것과 동일한 이병시료 100 mg 정도를 잘게 자른 후, 10% Luria-Bertani배지(LB배지, tryptone 1%, NaCl 1%, yeast extract 0.5%) 1 ml와 섞어 35°C에서 3~4시간 배양하였다(전배양 단계). 배양된 시료는 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 그 침전물에 대해서 lysis buffer 1 ml를 첨가하여 1)과 동일한 방법으로 핵산추출 단계를 진행하였다.

강우에 의한 *X. arboricola* pv. *pruni*의 비산을 확인하고자 자두 검은점무늬병이 발생한 나무 주위로 직경 15 cm 깔대기를 이용한 빗물받이를 설치하여 강우를 채취하고 채집된 빗물에서 검출여부를 조사하였다. 채집된 빗물중의 DNA추출은 강우 10 ml를 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상등액은 버리고 남은 침전물에 lysis buffer 800 µl를 현탁한 다음 1)과 같은 방법으로 진행하였다.

PCR 조건. PCR은 1st PCR과 nested PCR로 나누어서 실시하였는데 사용된, PCR반응액 조성은 1st PCR의 경우 추출된 핵산 1 µl, primer 각 20 pmole을 PCR premix(바이오니아, 한국)에 첨가하여 총 20 µl 반응액을 조성하였고, nested PCR의 경우 1st PCR의 반응물 0.1 µl, nested PCR primer 각 20 pmole을 PCR premix에 첨가하여 총 20 µl 반응액을 조성하였다. PCR이 완료된 다음 반응액 10 µl를 1% agarose gel에 전기영동하여 PCR 증폭여부를 확인하였다.

PCR 프로그램은 1st PCR의 경우 pre-denaturation 단계로 94°C에서 4분간 반응한 후 30 cycle의 94°C 1분, 55°C 30초, 72°C 1분을 진행하였고 final extension으로 72°C에서 5분간 반응하였다. Nested PCR의 경우 30 cycle의 94°C 30초, 55°C 20초, 72°C 30초를 진행하였고 final extension으로 72°C에서 2분간 반응하였다.

자두 검은점무늬병균 검출용 primer 설계. *X. arboricola* pv. *pruni*에 특이적인 PCR primer의 제작을 위해서 *Xanthomonas* sp. *integrans* 유전자 지도(Gillings 등, 2005)와 GenBank Access No. AY928793을 참조하였다. *X. arboricola* pv. *pruni*의 *integrans*를 다른 *Xanthomonas*속 균의 *integrans*에 비하여 *intI* 지역에 deletion된 부분이 존재하므로 이에 착안하여 *X. arboricola* pv. *pruni*에 대한 길이 및 염기서열 특이적인 PCR primer를 제작하였다(Table 1).

Table 1. Primers designed for the detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in this experiment

	1st PCR	Nested PCR
Forward	CAGCTATCTCAAATCCAAGGG	GACAAGATCCTGATCGACAT
Reverse	GGCACTGCTATTCTGTATC	CAGATACGATAAAGACCGCT
DNA products (bp)	760	260

결과 및 고찰

야외포장 시료에 대한 *integrans* primer PCR 진단.

*Xanthomonas*속 세균의 *integrans* 부분을 이용하여 제작된 primer로 자두검은점무늬병이 발생한 포장에서 채집된 자두의 과실, 잎 그리고 가지 등의 시료를 PCR한 결과 *X. arboricola* pv. *pruni*에 특이적인 크기인 760 bp로 증폭이 되었다. 이 primer는 *Xanthomonas*속내 다른 종의 세균에는 annealing되지 않고 *X. arboricola* pv. *pruni*에 대해서만 특이적으로 반응하는 것이 특징으로, 설계된 primer가 *X. arboricola* pv. *pruni*에 대한 진단용 primer로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 지금까지 개발된 *Xanthomonas* 검출용 primer들은 주로 ITS(Hartung 등, 1993)나 *hrp* 유전자(Leite 등, 1994) 부위를 이용한 것들이었는데 *integrans* region을 이용한 것은 이번의 연구가 처음이었다.

Xanthomonas 유래의 InterGenic(InterTranscribed) Spacer (Goncalves와 Rosato, 2002)나 *hrp* 유전자(Leite 등, 1994)를 이용하여 PCR할 경우 같은 속의 종 혹은 pathovar에 따라서 증폭산물의 길이 특이성을 재확인해야 하는 어려움이 있고 IGS(ITS)의 경우에는 길이변이가 작기 때문에 쉽게 판별하기가 곤란하다. 특히 *hrp*의 경우에는 몇 개의 증폭산물이 동시에 PCR되는 경우가 발생하기 때문에 특정세균에 특이적인 진단 primer로 이용되기에는 문제점이 있다. 그러나 이번에 제작된 *integrans* 영역의 primer를 이용한 경우에는 *X. arboricola* pv. *pruni*에 대해서만 특이적으로 증폭되어 760 bp의 특정한 크기만을 증폭하기 때문에 동정과 진단에 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

X. arboricola pv. *pruni*는 European and Mediterranean Plant Protection Organization(EPPO, 1997)에서 A2 수준의 검역병해충으로 지정되어 있는데 EPPO에서는 *X. arboricola* pv. *pruni*의 추천검정방법으로 detached leaf assay (Randhawa와 Civerolo, 1985)와 isolation-culture(Gitaitis 등, 1988)를 추천하고 있다. Detached leaf assay 방법은 병징

Fig. 1. Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* using *integrans* primer (Lanes 1~6: fruit lesion, 8~12: leaf lesion, 13~16: summer branch lesion, M: 100 bp size marker).

이 의심되는 시료에서 세균을 분리한 다음 표면 살균된 복숭아 잎에 70 CFU 정도를 여러 지점에 접종하고 25°C, 16시간의 광상태에서 2주간 배양하는 단계를 거쳐서 병원성을 검사하는 방법이다. 이러한 EPPO 추천방법은 병원성 검정에 2주일 이상이 소요되는 데에 비해서 이번이 이 연구에서 개발된 *integrans* 영역을 PCR primer로 이용할 경우 24시간이내의 짧은 시간에 진단할 수 있어 병징이 나타나기 전 발병의 조기진단이나 외국에서 수입되는 종묘의 검역에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

DNA 추출방법별 PCR 감도. 직접법과 전배양법간의 PCR감도를 비교한 결과(Fig. 2), 직접추출법에 비해서 전배양 후 DNA를 추출하는 방법에서 육안관찰이 더 용이하여 전배양법이 검출감도가 우수함을 알 수 있었다. 이는 시료에서 DNA를 직접 추출시 잎이나 과실에 존재하는 PCR 방해물질이 DNA 추출물에 포함되어 PCR시에 증폭효율을 감소시켰거나 혹은 10% LB배지를 이용한 전배양단계에서 시료에 존재하는 세균이 증식되어 검출감도가 높아졌을 것으로 생각하는데 *X. arboricola* pv. *pruni*의 경우 후자의 경우로 추측된다.

Nested PCR에 의한 검출감도의 향상. Nested PCR에서는 1st PCR에서는 검출이 되지 않았던 가지 및 강우시 채취한 빗물에서도 *X. arboricola* pv. *pruni*를 검출할 수 있었으며 증폭크기는 260 bp로 primer 설계시의 크기와 동일하게 나타났다(Fig. 3). Nested PCR은 육안으로 병징이 확인된 시료 이외에 증상이 없는 시료에 대해서도 육안으로도 확인 가능한 농도로 증폭이 가능하기 때문에 nested PCR primer는 세균의 밀도가 낮은 검역시료 혹은 병징을 확인할 수 있는 과실이 발생되지 않는 묘포장에서 *X. arboricola* pv. *pruni*에 대한 사전진단에 유용한 도구가 될 것으로 생각된다.

Fig. 2. Comparison of DNA extraction method for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* using *integrans* primer (Lanes 1~5: direct extraction from leaves, 7~11: after pre-incubation with 10% LB medium using same leaves used in direct extraction method, 6 and 12: healthy leaves, 13~14: negative control, M: 100 bp size marker).

Fig. 3. Nested PCR of symptomless leaves, summer branch and raindrops among infested prune tree using *integrans* primer (Lanes 1~5: leaves, 6~10: summer branch, 11-15: 10 ml of raindrops, 16: pure culture of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, M: 100 bp size marker).

요 약

자두 주산지인 경북 김천을 비롯하여 의성, 경산, 군위 지역에 발생하는 자두과실의 검은점무늬병 병원균을 조기 검출하기 위하여 *integrans*를 이용한 primer를 제작하고 DNA 추출향상을 위해 전배양법을 그리고 검출감도 향상을 위해 nested PCR을 시도하였다. 제작된 *integrans* primer로 병반 시료를 PCR한 결과 예상되는 크기인 760 bp로 증폭이 되어 검은점무늬병의 원인 병원균은 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*로 확인되었고 진단용 primer로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다. DNA 추출 방법별로 PCR 진단효율은 조사한 결과 직접 추출하는 방법보다는 10% LB배지로 전배양한 다음 DNA를 추출하는 방법이 더 효과적이었고 nested PCR을 이용할 경우에는 과원내 강우중의 *X. arboricola* pv. *pruni*의 검출도 가능하였다. 이번에 개발된 *Integrans* primer를 이용, 전배양법과 nested PCR을 실시할 경우 1일 이내에 병징이 나타나지 않은 유묘에서의 *X. arboricola* pv. *pruni* 감염여부나 식물검역에서의 *X. arboricola* pv. *pruni* 감염식물 진단 등에도 활용

이 가능할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 한국식물병리학회. 2009. 한국식물병명목록. 제5판. 한국식물병리학회. 209 pp.
- Collis, C. M. and Hall, R. M. 1992. Site-specific deletion and rearrangement of *integron* insert genes catalyzed by the *integron* DNA integrase. *J. Bacteriol.* 174: 1574-1585.
- EPPO. 1997. Data Sheets on Quarantine Pests : *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, www.eppo.org
- Gitaitis, R. D., Hamm, J. D. and Bertrand, P. F. 1988. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* from other yellow-pigmented bacteria by the refractive quality of bacterial colonies on an agar medium. *Plant Dis.* 72: 416-417.
- Gillings, M. R., Holley, M. P., Stokes, H. W. and Holmes, A. J. 2005. *Integrans* in *Xanthomonas* : a source of species genome diversity. *Proc. Nat. Acad. Sci. (PNAS)*. 102: 4419-4424.
- Hartung, J. S., Daniel, J. F. and Pruvost, O. P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Appl. Env. Microbiol.* 59: 1143-1148.
- Leite, R. P. Jr., Minsavage, G. V., Bonas, U. and Stall, R. E. 1994. Detection and Identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Env. Microbiol.* 60: 1068-1077.
- Park, Y. J., Lee, B. M., Hahn, J. H., Lee, G. B. and Park, B. S. 2004. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species specific primers based on *hrpF* gene sequences. *Microbiol. Res.* 159: 419-423.
- Randhawa, P. S. and Civerolo, E. L. 1985. A detached-leaf bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Phytopathol.* 75: 1060-1063.