가지과 종자에서 *Ralstonia solanacearum*의 검출을 위한 PCR 방법

조정희 · 임규옥¹ · 이혁인¹ · 백지현¹ · 차재순*

충북대학교 식물위학과, ¹국립식물검역원

Detection of the Causal Agent of Bacterial Wilt, *Ralstonia solanacearum* in the Seeds of Solanaceae by PCR

Jung-Hee Cho, Kyu-Ock Yim¹, Hyok-In Lee¹, Ji-Hyun Baeg¹ and Jae-Soon Cha*

Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

¹National Plant Quarantine Service, AnYang 430-016, Korea

(Received on February 15, 2011; Revised on May 9, 2011; Accepted on May 17, 2011)

Ralstonia solanacearum, a causal agent of bacterium wilt is very difficult to control once the disease becomes endemic. Thus, *Ralstonia solanacearum* is a plant quarantine bacterium in many countries including Korea. In this study, we developed PCR assays, which can detect *Ralstonia solanacearum* from the Solanaceae seeds. Primers RS-JH-F and RS-JH-R amplified specifically a 401 bp fragment only from *Ralstonia solanacearum* race 1 and race 3. The nested PCR primers, RS-JH-F-ne and RS-JH-R-ne that were designed inside of 1st PCR amplicon amplified specifically a 131 bp fragment only from *Ralstonia solanacearum* race 1 and race 3. The primers did not amplify any non-specific DNA from the seed extracts of the Solanaceae including tomato and pepper. When detection sensitivity were compared using the Solanaceae seeds inoculated with target bacteria artificially, the nested PCR method developed in this study 100 times more sensitive than ELISA and selective medium. Therefore, we believe that the PCR assays developed in this work is very useful to detect *Ralstonia solanacearum* in the Solanaceae seeds.

Keywords : PCR assays, Plant quarantine, Seed detection

서 론

*Ralstonia solanacearum*은 종자 전염성 병원세균으로, 가지과 작물에서 풋마름병(bacterial wilt)을 일으킨다(Lee 등, 2001; Saile 등, 1997). *R. solanacearum*에 의한 풋마름병은 기주범위가 넓고 전 세계적으로 경제적으로 중요한 작물에 큰 피해를 주고 있기 때문에 유럽 등의 세계 여러 나라에서 식물검역병으로 지정되어 있으며, 국내에서도 규제비검역병으로 지정되어 관리되고 있다(Caruso 등, 2002; Weller 등, 2000). 그람음성 세균인 *R. solanacearum*은 병을 일으키는 기주에 따라 6개의 레이스(race)로 분류되는데, 이들 중 경제적으로 큰 피해를 받

생시키는 레이스는 감자, 토마토, 고추 등에서 병을 일으키는 race 3과 담배 등에서 병을 일으키는 race 1으로 알려져 있다(Huang 등, 2009; Schonfeld 등, 2003).

현재 *R. solanacearum*의 검출을 위해 다양한 방법들이 사용되고 있으나, 사용중인 방법들은 식물검역을 위한 검출법으로는 여러 가지 문제를 가지고 있다. 반선택배지(Engelbrecht, 1994)의 경우 다양한 시료에 적용이 가능하고 간단하게 검출할 수 있다는 장점이 있지만, 배지에서 *R. solanacearum*의 전형적인 콜로니를 확인할 때까지 72시간 이상이 필요하고, 콜로니 형태가 유사한 부생성 세균이 함께 검출되는 단점과 함께 검출민감도가 낮은 문제점이 있다(Pradhanang 등, 2000). 항혈청을 이용한 DAS-ELISA(Caruso 등, 2002; Priou 등, 2006)을 통한 검출법의 경우 선택배지에 비해 검출 시간을 단축시킬 수 있지만, 항체의 교차반응(cross-reaction)에 의해 거짓 양성반응으로 인한 검출 특이성의 문제와 낮은 검출 민감도(Janse,

*Corresponding author

Phone) +82-43-261-2554, Fax) +82-43-271-4414

Email) jscha@cnu.ac.kr

1988)로 식물검역을 위한 풋마름병원균의 검출에 적합하지 않다(Poussier 등, 2002). 그 밖에 형광현미경을 이용한 FISH(Fluorescent in situ hybridization)에 의한 검출(Wullings 등, 1998)과 PCR 검출과 유사한 방법인 RNA를 이용한 NASBA(nucleic acid sequence based amplification)을 통한 검출(Van der Wolf 등, 2004)의 경우 비용이 많이 들고 일반 실험실에서 적용하기 어렵다는 단점을 가지고 있다. 현재까지 가장 빠르고, 정확하며 일반 실험실에서 보편적으로 적용할 수 있는 방법으로 다양한 PCR 검출법이 보고되어 있다(Caruso 등, 2003; Huang 등, 2009; Pradhanang 등, 2000; Schonfeld 등, 2003; Weller 등, 2000). 그러나 이들 방법은 주로 오염된 토양이나 물로부터 병원세균을 검출하는 방법들이며, *R. solanacearum*의 race 1과 race 3중 한 가지만 검출이 가능한 방법들이다. 수입종자로부터 *R. solanacearum*의 검출을 위해서는 종자에 직접 적용이 가능하고, 풋마름병 병원균 중 가장 문제가 되고 있는 race 1과 race 3을 동시에 검출할 수 있어야 한다. 따라서 본 연구에서는 식물 검역 현장에서 적

용이 가능한 가지과 종자로부터 *R. solanacearum* race 1과 race 3을 한 번의 PCR로 동시에 검출할 수 있는 검출법을 개발하고자 하였다. 또한 검출의 민감도를 높이기 위해 nested-PCR 및 DNA의 추출없이 종자 추출물을 직접 PCR에 이용하는 방법을 개발하였다.

재료 및 방법

세균 균주. 본 연구에 사용된 세균 균주는 Table 1과 같다. 서로 다른 나라에서 분리된 *Ralstonia solanacearum* race 1, 5개 균주와 race 3, 5개 균주, *Pseudomonas* 속의 균주들과 대표적인 식물 병원균들을 사용하였다. 본 연구에 사용한 균주는 한국농업미생물 자원센터(KACC)와 BCCM(Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms)로부터 분양받았다.

Genomic DNA 분리 및 프라이머 제작. *R. solanacearum*의 genomic DNA의 분리를 위해 실험에 사용한 균주들을 Nutrient Broth(NB)에서 28°C, 48시간 배양하였다. 배

Table 1. Bacterial strains used in this study

Bacterial strains ^a	Source ^b	Bacterial strains	Source
<i>R. solanacearum</i> race 1	LMG2296(Zimbabwe)	<i>P. saccharophila</i>	KCTC2350
<i>R. solanacearum</i> race 1	LMG17138(Brazil)	<i>P. maltophilia</i>	KCTC2437
<i>R. solanacearum</i> race 1	LMG17144(Fiji)	<i>P. syringae</i>	KCTC2440
<i>R. solanacearum</i> race 1	KACC10695(Korea)	<i>P. diminuta</i>	KCTC2473
<i>R. solanacearum</i> race 1	KACC10697(Korea)	<i>P. cepacia</i>	KCTC2475
<i>R. solanacearum</i> race 3	LMG2294(Colombia)	<i>P. reactans</i>	ATCC14340
<i>R. solanacearum</i> race 3	LMG2300(Isreal)	<i>P. tolaasii</i>	ATCC33618
<i>R. solanacearum</i> race 3	LMG2306(Portugal)	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	LMG2245
<i>R. solanacearum</i> race 3	LMG17142(UK)	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	LMG5144
<i>R. solanacearum</i> race 3	KACC10699(Korea)	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	LMG5509
<i>P. agarici</i>	KACC10143	<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	LMG5679
<i>P. viridifova</i>	KACC10523	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CNUPBL0023
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrotaciens</i>	KACC11626	<i>P. syringae</i> pv. <i>hibisci</i>	CNUPBL0024
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	KACC11637	<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunum</i>	CNUPBL0025
<i>P. taetrolens</i>	KCTC1064	<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	CNUPBL0026
<i>P. stutzeri</i>	KCTC1066	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	CNUPBL1557
<i>P. aeruginosa</i>	KCTC1637	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	CNUPBL1559
<i>P. acidovorans</i>	KCTC1638	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC10331
<i>P. putida</i>	KCTC1639	<i>P. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	KACC10342
<i>P. arvilla</i>	KCTC1643	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC11153
<i>P. fluorescens</i>	KCTC1751	<i>R. fascians</i>	LMG3601
<i>P. testosterone</i>	KCTC1772	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	LMG3687
<i>P. fragi</i>	KCTC2345	<i>X. campestris</i> pv. <i>glycines</i>	LMG8026
<i>P. paucimobilis</i>	KCTC2346	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	CNUPBL0260
<i>P. pseudoacaligenes</i>	KCTC2347		

^aR, *Ralstonia*; P, *Pseudomonas*; X, *Xanthomonas*; B, *Bacillus*; R, *Rhodococcus*; P, *Pectobacterium*; C, *Clavibacter*.

^bLMG, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms; KACC, Korean Agricultural Culture Collection; KCTC, Korean Collection for Type Cultures, ATCC, American Type Culture Collection; CNUPBL, Chungbuk National University Plant Bacteriology Lab.

양한 현탁액을 Exgene™ cell SV(GeneAll, Korea)을 이용하여 DNA를 추출하였고, 추출된 Genomic DNA의 정량은 Qubit™ fluorometer(Invitrogen™, USA)을 이용하였다. 추출한 DNA는 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 프라이머의 제작을 위해 GeneBank에 보고된 *Ralstonia* sp. 16S rDNA 염기서열(HQ829834.1)을 Primer3 프로그램을 이용하여 증폭크기가 401 bp가 되도록 RS-JH-F(5'-TYAMAMAYGMARGYCRARCR-3')와 RS-JH-R(5'-TYTYTMCRCRGRARARTRCY-3')을 제작하였고, PCR의 검출 민감도를 높이기 위해서 1st PCR의 증폭 영역의 내부의 염기서열을 이용하여 RS-JH-F-ne(5'-AYGRCYTRARGRTRAMARTR-3')와 RS-JH-R-ne(5'-GYTYAYCRTYCYCYCRGMCY-3')의 nested PCR용 프라이머를 디자인하였다. 모든 프라이머는 바이오니아(BioNeer Co., Korea)에서 합성을 하였다.

PCR 조건. *R. solanacearum* 검출을 위한 모든 PCR 실험은 Accupower HotStart PCR용 PreMix(BioNeer Co., Korea)와 GeneAmp PCR system2400(Perkin Elmer, USA)를 이용하여 수행하였다. 1st PCR에는 10 ng의 genomic DNA를 사용하였고, 증폭된 1st PCR 산물을 10배 희석 후 1 µl를 nested PCR에 사용하였다. 병원균의 DNA를 사용하지 않는 direct PCR법에는 인공오염 시킨 토마토 및 고추의 종자추출액을 PCR 실험에 사용하였다. 종자추출액 1 µl을 1st PCR에 사용하였고, nested PCR에는 1st PCR 산물을 10배 희석 후 그 희석액 1 µl를 사용하였다. PCR 조건은 1st PCR, nested PCR, direct PCR에 모두 동일하였다; 94°C에서 10분간 전처리 한 후, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초로 30 cycle을 수행한 뒤 72°C에서 5분간 처리하였다. 검출민감도를 조사하기 위해 DNA 농도를 10 ng/µl로 조정한 후 10배 희석법을 이용하여 DNA를 희석하고 각 희석액으로 PCR을 수행하였다. 종자 추출액을 이용한 PCR의 민감도 검정은 *R. solanacearum*을 각각의 농도 별로 인공오염 시킨 종자로부터 조제한 종자 추출액 1 µl씩을 PCR 반응에 사용하였다.

종자 추출액 조제. 종자 추출액은 기존에 보고된 조등(2010)의 방법을 사용하여 조제하였다. 토마토 및 고추 종자를 오염시키기 위해서 *R. solanacearum*을 28°C에서 48시간 배양 후 세균 배양액을 OD₆₀₀=0.1으로 맞춘 후 10배 희석법으로 세균을 희석하여 현탁액을 준비하였다. 준비된 세균 현탁액들의 20 ml에 토마토 및 고추 종자 각각 1 g씩 넣고 24시간 동안 28°C의 배양기에서 200 rpm 조건으로 진탕 배양 후 상온에 건조시켰다.

ELISA 및 반선택배지를 이용한 검출민감도 조사. 인공오염 시킨 토마토와 고추 종자 추출액을 이용하여 반

선택배지와 ELISA, PCR 검정을 수행하여 각 방법의 검출 민감도를 비교하였다. *R. solanacearum* 반선택배지를 이용한 검출은 m-SMSA 배지(Casamino acid 1 g, Peptone 10 g, Glucose 5 g, Agar 16 g, Crystal violet 1% 0.5 ml, Polymyxin B sulfate 1% 10 ml, Bacitracin 1% 2.5 ml, Chloromycetin 1% 0.5 ml, Penicillin 0.1% 0.5 ml, Cycloheximide 1% 2.5 ml)에 준비한 종자 추출액을 100 µl씩 도말하여 28°C에서 3일간 배양하였다. 배양 3일 후 전형적인 모양의 콜로니를 positive(+) 반응으로, 아무 것도 자라지 않는 것을 negative(-) 반응으로 판별하여 검출한도를 조사하였다. ELISA에 의한 검출은 *R. solanacearum* full kit(Kisan Biotech, Korea)와 키트가 제공하는 프로토콜을 이용하여 TAS-ELISA 방법으로 수행하였다. 실험에서 positive control은 키트에서 제공된 *R. solanacearum*의 현탁액을 이용하였고, O.D. 405 nm의 파장에서 3.0 이상을 positive control로 하였다. Negative control은 키트에서 제공된 샘플을 이용하였으며, O.D. 405 nm의 파장에서 0.03 이하인 것을 negative control로 하였다. O.D. 405 nm의 파장에서 0.1 이상의 값을 가진 것을 positive(+) 반응으로 인정하고 0.1 미만의 값이 나온 것을 negative(-) 반응으로 인정하여 검출 한계농도를 조사하였다. 개발한 프라이머를 이용한 direct PCR의 검출 한계농도를 기존의 검출방법들과 비교하기 위해 인공오염 시킨 종자를 이용하여 조제한 종자 추출액 1 µl씩을 이용하여 1st PCR과 nested PCR을 수행하였다.

결 과

PCR 프라이머의 특이성 및 민감도. 본 연구에서 개발된 *Ralstonia solanacearum* 검출용 프라이머의 특이성을 확인하기 위하여 서로 다른 국가에서 분리된 *R. solanacearum* race 1, 5개 균주와 race 3, 5개 균주, *Pseudomonas* 속 세균들 그리고 주요 식물 세균병원균의 DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과 *R. solanacearum* race 1과 race 3의 모든 균주의 DNA로부터 약 401 bp 크기의 밴드가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그러나 *R. solanacearum* 이외의 *Pseudomonas* 속의 균주와 주요 식물 병원세균 균주의 DNA에서는 어떤 DNA 밴드도 증폭되지 않았다(Fig. 1). 낮은 농도로 감염되어 있는 종자전염 병원세균의 검출에 적합하도록 PCR 검출의 민감도를 높이기 위해서 1st PCR 프라이머 RS-JH-F와 RS-JH-R의 내부 영역에서 디자인한 nested PCR용 프라이머인 RS-JH-F-ne와 RS-JH-R-ne을 이용하여 PCR을 수행하였을 때, 모든 *R. solanacearum* 균주들에서 약

Fig. 1. PCR was carried out with primers RS-JH-F, RS-JH-R and bacterial DNA. Lane 1–5: *R. solanacearum* race 1 strains, 6–10: *R. solanacearum* race 3 strains, 11. *P. agarici*, 12. *P. viridifova*, 13. *P. syringae* pv. *atrotaciens*, 14. *P. syringae* pv. *maculicola*, 15. *P. taetrolens*, 16. *P. stutzeri*, 17. *P. aeruginosa*, 18. *P. acidovorans*, 19. *P. putida*, 20. *P. arvilla*, 21. *P. fluorescens*, 22. *P. testosterone*, 23. *P. fragi*, 24. *P. paucimobilis*, 25. *P. pseudoacaligenes*, 26. *R. solanacearum* race 3 LMG2294, 27. *P. saccharophila*, 28. *P. maltrophilia*, 29. *P. syringae*, 30. *P. diminute*, 31. *P. cepacia*, 32. *P. reactans*, 33. *P. tolaasii*, 34. *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, 35. *P. savastanoi* pv. *glycinea*, 36. *P. syringae* pv. *tomato*, 37. *P. syringae* pv. *pisi*, 38. *P. syringae* pv. *syringae*, 39. *P. syringae* pv. *hibisci*, 40. *P. syringae* pv. *morsprunum*, 41. *P. syringae* pv. *actinidiae*, 42. *P. syringae* pv. *lachrymans*, 43. *P. syringae* pv. *tabaci*, 44. *X. oryzae* pv. *oryzae*, 45. *P. carotovora* subsp. *carotovora*, 46. *X. campestris* pv. *vesicatoria*, 47. *R. fascians*, 48. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, 49. *X. campestris* pv. *glycines*, 50. *X. campestris* pv. *campestris*.

Fig. 2. PCR were carried out with primers and 10 ng DNA purified from the extract of Solanaceae seeds. Lane 1: *R. solanacearum* race 1 KACC10695, 2–4: tomato seed DNA, 5–9: pepper seed DNA. (A) PCR was carried out RS-JH-F/R, (B) Neseted-PCR was carried out RS-JH-F/R-ne.

Fig. 3. PCR was carried out with primers, RS-JH-F, RS-JH-R, and 10ng of DNA of *R. solanacearum* race 3 KACC10699 (1) and its 10-fold serial dilution (2–6) (A). Nested PCR was carried out with primers, RS-JH-F-ne, RS-JH-R-ne and 1 μ l of 10 times dilution of 1st PCR product (B).

Table 2. Detection of *Ralstonia solanacearum* in the artificially inoculated Solanaceae seeds by semi-selective medium, ELISA and PCR assays

Assay ^a	Bacterial concentration (CFU/ml) of inoculum							
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
mSMSA	+	+	+	+	+	+	-	-
TAS-ELISA	+	+	+	+	+	+	-	-
1 st PCR	+	+	+	+	+	+	-	-
Nested PCR	+	+	+	+	+	+	+	+

^aPositive reaction (+), Negative reaction (-).

131 bp 크기의 DNA가 증폭되었다(data not shown). 본 연구에서 개발된 프라이머가 가지과 종자 DNA를 주형으로 DNA를 증폭시킬 가능성을 확인하기 위해 토마토 4품종과 고추 4품종, 총 8품종의 가지과 종자 DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과, 실험에 사용한 모든 가지과 종자 DNA로부터 어떤 DNA도 증폭되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 풋마름병 병원균 검출 PCR 민감도를 확인하기 위해서 DNA를 10 ng 기준으로 10배씩 희석하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과 10 ng의 1000배 희석액인 0.01 ng까지 특이적 DNA인 401 bp의 밴드가 증폭되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 1st PCR의 증폭산물을 10배 희석 후 그 희석액 1 µl을 사용하여 Nested PCR을 수행한 결과 1st PCR의 보다 민감도가 100배 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

가지과 종자에서 병원균 검출. 토마토와 고추 종자에 *R. solanacearum*의 세균 현탁액을 10배 희석법으로 희석하여 농도별로 접종 후, 종자 추출액을 이용하여 각 방법의 검출 한계농도를 비교 조사하였다. 반선택배지인 mSMSA에서는 배양 72시간 후에 *R. solanacearum*의 전형적인 콜로니가 나타나는 것을 확인하였고, 배양 4일 후부터 병원균 접종농도 10³ CFU/ml까지 검출이 가능하였다(Table 2). TAS-ELISA를 이용하여 풋마름병 병원균 검출 결과 접종농도 10³ CFU/ml의 종자까지 positive(+) 반응을 확인하였고, 토마토와 고추 종자 모두에서 동일한 민감도를 보였다(Table 2). 본 연구에서 새롭게 개발된 프라이머를 사용하여 1st PCR을 수행한 결과 다른 두 가지의 검출법과 동일한 검출 농도인 10³ CFU/ml까지 검출이 가능하였다. 1st PCR의 증폭산물을 이용하여 nested PCR을 수행한 결과 접종농도 10 CFU/ml까지 검출이 가능하였다. 이 결과는 nested PCR의 검출 민감도가 선택배지, TAS-ELISA 그리고 일반 PCR법보다 100배 높다는 것을 의미한다.

고 찰

종자 전염 세균병의 경우 매우 낮은 농도의 종자감염

에 의해서도 발병이 적합한 환경조건에서 매우 빠르게 전파하여 심각한 피해를 가져온다. 또한 오염 종자는 발생하지 않는 지역에 새로운 병원균이 도입되는 매우 중요한 수단이다. 따라서 종자로부터 발생하는 세균병의 피해를 최소화하고 종자를 통해 새로운 병원균이 도입되는 것을 막기 위해서는 종자로부터 신속하고 정확한 병원균 검출법이 필요하다(조 등, 2010; Kritzman, 1991). 풋마름병은 경제적으로 매우 중요한 작물에서 심각한 피해를 가져오는 병으로 병원균인 *R. solanacearum*은 세계의 여러 나라에서 검역대상병원균이며, 우리나라에서도 식물검역법상 규제비검역병으로 지정되어 관리되고 있어 종자로부터 신속하고 정확한 검출법이 필요하다.

본 연구에서 가장 흔히 사용하는 *Ralstonia solanacearum*의 검출법인 반선택배지(mSMSA)와 ELISA검출법을 새롭게 개발된 PCR 방법과 비교하였다. 반선택배지의 경우 *R. solanacearum*의 race의 구별없이 검출이 가능하다는 장점을 가지고 있지만, 전형적인 병원균의 콜로니를 관찰하기 위해서는 최소 3일의 시간이 필요하였다. 또한 ELISA의 경우 검출의 민감도가 낮은 문제점이 있었다. 이와 같은 문제점은 기존에 보고된 연구에서도 제기되었다(Caruso 등, 2003; Kang 등, 2007; Priou 등, 2006). 이러한 문제점을 해결하기 위해서 다양한 PCR 방법들이 개발되었지만, 오염된 종자를 대상으로 풋마름병 병원균을 검출하는 검출법은 현재까지 거의 연구가 되지 않았다. Huang 등(2009)의 연구에서는 개발된 PCR 방법의 경우 *R. solanacearum* race 1만을 특이적으로 검출할 수 있었고, Kang 등(2007)에 의해 개발된 PCR 검출법은 race 3만 특이적으로 검출할 수 있었다. 또한 두 방법 모두 일반 PCR용 프라이머만을 사용했기 때문에 오염된 종자에서 풋마름병을 검출하기에는 검출 민감도가 낮다는 단점을 가지고 있다. 현재까지 오염된 토양, 물 등에서 *R. solanacearum*을 검출하는 데 많이 사용되는 프라이머인 OLI-1/OLI2를 이용한 PCR 검출법의 경우 nested PCR 방법까지 개발되었지만 다양한 race를 대상으로 실험을 수행한 결과, race 3만을 특이적으로 검출할 수 있었다(Caruso 등, 2003;

Poussier 등, 2002; Pradhanang 등, 2000). PCR 검출법 중 TaqMan probe를 이용한 real-time PCR 검출법(Huang 등, 2009; Weller 등, 2000)은 높은 민감도와 거짓양성반응을 막을 수 있다는 장점을 가지고 있지만, 비용이 많이 들고 특별한 probe를 제작해야 되는 단점들 때문에 실제로로 검역현장 및 종자 검사에서 사용되지 못하고 있다.

본 연구에서는 16S ribosomal DNA의 염기서열을 이용하여 PCR 프라이머를 제작하였다. 16S rDNA의 경우 세균에서 고유의 기능을 잘 보존하고 있는 부분이기 때문에 다양한 세균을 특이적으로 검출하는 프라이머를 개발하는데 적합한 것으로 알려져 왔다(Jeng 등, 2001; Saglani 등, 2005). 본 연구에서 개발한 PCR과 nested PCR용 프라이머는 한 번의 PCR로 *R. solanacearum* race 1과 race 3 균주를 특이적으로 검출이 가능하며, 가지과 종자 DNA와는 반응하지 않는다. 또한 본 연구에서는 DNA의 추출 없이 종자 추출액을 직접 PCR에 이용하는 방법을 제시하였다. 종자 추출액을 직접 PCR에 이용하는 방법은, DNA를 사용하는 PCR 방법들(Kang 등, 2007; Poussier 등, 2002; Schonfeld 등, 2003)에 비해 시간을 절약할 수 있고 DNA 오염에 의해 나타날 수 있는 거짓양성반응을 방지할 수 있는 장점을 가졌다. 따라서 본 연구에서 개발된 PCR 방법은 가지과 종자로부터 신속하고 정확하게 *R. solanacearum*의 검출에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

*Ralstonia solanacearum*은 풋마름병(bacterial wilt)을 일으키는 종자 전염 병원세균으로 한번 발생하면 방제가 매우 어려운 병이다. 따라서 *Ralstonia solanacearum*는 한국을 비롯한 여러 나라에서 식물검역병으로 지정되어있다. 본 연구에서는 가지과 종자로부터 *Ralstonia solanacearum* 검출할 수 있는 PCR 방법을 개발하였다. 프라이머 RS-JH-F와 RS-JH-R는 오직 *Ralstonia solanacearum* race 1, 3 으로부터 401 bp 크기의 DNA를 증폭하였다. 1차 PCR 증폭산물의 내부에서 디자인 된 nested PCR 프라이머인 RS-JH-F-ne and RS-JH-R-ne는 오직 *Ralstonia solanacearum*로부터 131 bp 크기의 DNA를 증폭하였다. 이들 프라이머들은 토마토, 고추를 포함한 가지과 종자 추출액으로부터 어떤 비특이적 DNA도 증폭하지 않았다. 인공적으로 병원균을 접종한 가지과 종자를 이용하여 병원균 검출 민감도를 비교하였을 때, 본 연구에서 개발한 nested PCR 방법이 ELISA나 반선택배지보다 100배 높은 민감도를 보여주었다. 따라서, 본 연구에서 개발한 PCR 방법들은 가지과 종자로부터 *Ralstonia solanacearum*를 검출하는 때

우 유용한 방법으로 생각된다.

Acknowledgement

This work was supported by National Plant Quarantine Service, Republic of Korea.

참고문헌

- 조정희, 정민정, 송민지, 임규옥, 이혁인, 김정희, 백지현, 차재순. 2010. 강남콩 종자에서 *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*의 검출을 위한 PCR 프라이머의 개발. 식물병연구 16: 129-135.
- Caruso, P., Bertolini, E., Cambra, M. and Lopez, M. M. 2003. A new and sensitive co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *J. Microbiol. Methods* 55: 257-272.
- Caruso, P., Gorris, M. R., Cambra, M., Palomo, J. L., Collar, J. and Lopez, M. M. 2002. Enrichment double antibody sandwich indirect enzyme linked immunosorbent assay that uses a specific monoclonal antibody for sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic potato tubers. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3634-3638.
- Engelbrecht, M. C. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10: 3-5.
- Huang, J., Wu, J., Li, C., Xiao, C. and Wang, G. 2009. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil with quantitative, real-time PCR assays. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1729-1739.
- Janse, J. D. 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and som data on its sensitivity and specificity. *Bull OEPP* 18: 343-352.
- Jeng, R. S., Svircev, A. M., Myers, A. L., Beliaeva, L., Hunter, D. M. and Hubbes, M. 2001. The use of 16S and 16S-23S rDNA to easily detect and differentiate common gram-negative orchard epiphytes. *J. Microbiol. Methods* 44: 69-77.
- Kang, M. J., Lee, M. H., Shim, J. K., Seo, S. T., Shrestha, R., Cho, M. S., Hahn, J. H. and Park, D. S. 2007. PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* by amplification of cytochrome c1 signal peptide sequences. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 1765-1771.
- Kritzman, G. 1991. A method for detection of seedborne bacterial diseases in tomato seeds. *Phytoparasitica* 19: 133-141.
- Lee, Y. A., Fan, S. C., Chiu, L. Y. and Hsia, K. C. 2001. Isolation of an insertion sequence from *Ralstonia solanacearum* race 1 and its potential use for strain characterization and detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3943-3950.
- Poussier, S., Cheron, J. J., Couteau, A. and Luisetti, J. 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of

- Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *J. Microbiol. Methods* 51: 349–359.
- Pradhanang, P. M., Elphinstone, J. G. and Fox, R. T. V. 2000. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathol.* 49: 414–422.
- Priou, S., Gutarra, L. and Aley, P. 2006. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathol.* 55: 36–45.
- Saglani, S., Harris, K. A., Wallis, C. and Hartley, J. C. 2005. Empyema: the use of broad range 16s rDNA PCR for pathogen detection. *Arch. Dis. Child.* 90: 70–73.
- Saile, E., McGarvey, J. A., Schell, M. A. and Denny, T. R. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathol.* 87: 1264–1271.
- Schonfeld, J., Heuer, H., Van Elsas, J. D. and Smalla, K. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *filC* fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7248–7256.
- Van der Wolf, J. M., Van Beckhoven, J. R. C. M., Haan, E. G. De., Van den Bovenkamp, G. W. and Leone, G. O. M. 2004. Specific detection of *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by amplicon RNA. *Euro. J. Plant Pathol.* 110: 25–33.
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N. and Stead, D. E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2853–2858.
- Wullings, B. A., Van Beuningen, A. R., Janse, J. D. and Akkermans, A. D. L. 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4546–4554.