

PCR Assay 이용 콩 종자에서 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 검출 및 종자오염 조사

홍성준* · 홍연규¹ · 이봉춘 · 임미정 · 윤영남 · 황재복 · 송석보 · 박성태

작물과학원 영남농업연구소 식물환경과, ¹농업과학기술원 농업해충과

Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and Survey on Seed Contamination in Soybean Seeds Using PCR Assay

Sung-Jun Hong*, Yeon-Kyu Hong¹, Bong-Choon Lee, Mi-Jung Lim, Young-Nam Yoon, Jae-Bok Hwang, Seok-Bo Song and Sung-Tae Park

Plant Environment Division, Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS, RDA, Milyang 627-803, Korea

¹Applied Entomology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

(Received on November 6, 2007)

Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* is the causal agent of bacterial pustule of soybean (*Glycine max* (L.) Merr), which is one of the most prevalent bacterial diseases in Korea. In this study, Polymerase Chain Reaction (PCR) assay was applied to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and to survey on seed contamination in 36 soybean cultivars of Korea. And we have to compare PCR assay with dilution-plating assay of detection and identification. We confirmed detection of pathogen from artificial infected seeds and natural infected seeds using PCR assay. This assay gave results similar to a seed-wash dilution plating assay and proved more effective than classical methods. Results of survey on seed contamination by *X. axonopodis* pv. *glycines* from 36 cultivar seeds showed that the pathogen was detected from Pungsan-namulkong, Mallikong, Taekwangkong, Daemangkong, Ajukkarikong using PCR assay. Therefore, The PCR assay provides a sensitive, rapid tool for the specific detection of *X. axonopodis* pv. *glycines* in soybean seeds.

Keywords : PCR assay, Soybean seed, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

콩(*Glycine max* (L.) Merr)은 우리나라와 일본을 포함한 아시아권은 물론 세계적으로 중요한 식량작물이며, 지력유지 및 증진을 위한 작부체계의 측면에서도 매우 중요한 작물이다. 최근에는 성인병 예방은 물론 항암효과에 대한 연구결과들도 보고됨으로써 영양 및 건강식품으로 각광받아 콩의 수요가 증가하고 있으며 이에 따라 콩 재배면적도 조금씩 증가 추세에 있다(김 등, 2005).

콩의 생육기간중에는 다양한 종류의 병이 발생하는데 특히 세균성 병해 중 우리나라에서는 주로 잎에 발생하는 콩 불마름병이 문제시 되고 있다. 7월에서 9월까지 콩 재배포장 어디서나 관찰되는데, 근래 전국적으로 확산되고 있는 실정이다. 콩 불마름병에 의한 경제적피해는 콩

의 수량구성요소중 헵당립수 및 백립중을 감소시켜 7~15%의 수확량 감소를 가져온다(Laviolette 등, 1970; Hartwig와 Johnson, 1953). 특히 미국남부지역의 경우 자연전염을 통해 저항성 품종에 비해 감수성 품종에서 8~11%의 수량감소를 가져온다는 보고(Graham, 1953)가 있으며, 우리나라의 경우는 수량감소에 대한 보고가 아직까지 없는 실정이지만 외국의 보고보다 더 심각한 피해를 줄 것으로 생각되어진다.

콩 불마름병은 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*에 의해 발생하는 세균병으로 날씨가 고온 다습하고 비가 자주 오는 경우에 심하게 발생한다. 병원균의 월동은 종자나 이병식물체의 잔재, 밭의 뿌리 근권에서 월동을 하며 미국과 인도에서는 잡초에서도 월동이 보고되어 있다(Hartman 등 1999). 이중에서도 종자에서 병원균의 월동, 즉 종자전염은 병 발생이 적었던 새로운 지역으로 병원균의 전반을 야기하며 다음해 병 발생의 1차 전염원으로

*Corresponding author

Phone) +82-55-350-1269, Fax) +82-55-352-3059

E-mail) hongsj7@rda.go.kr

상당히 중요한 역할을 하게 된다. 이러한 이유 때문에 종자에서 병원균의 신속한 검출은 불마름병 병원균 밀도를 감소시켜 불마름병의 대발생을 막을 수 있는 첫 번째 방제방법이라 할 수 있겠다.

일반적으로 종자에서의 병원균 검출법은 선택배지를 이용한 dilution-plating assay, serology-based assay, seedling grow-out assay, PCR assay, RT-PCR assay, DNA chip (microarray) assay 등 여러 가지 방법들이 종자나 병원균 종류에 따라 개발되어 사용되고 있다(Walcott, 2003). 하지만 콩 종자에서 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 검출은 반선택배지 방법이 보고되어 있으나(Prathuangwong, 1994), 이 방법은 정확성과 시간면에서 비효율적인 검출법이라 생각되어진다. 따라서 본 연구는 PCR법을 이용하여 콩 종자내 *X. axonopodis* pv. *glycines*를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법을 제시하고, PCR 검출법을 이용하여 주요 콩 품종의 종자오염을 조사하였다.

재료 및 방법

시험종자 및 병원균. Seed-wash dilution-plating assay와 PCR assay 시험에 사용된 종자는 태광콩으로 불마름병에 대하여 감수성 품종이다. 태광콩 종자를 pot에 생육시키면서 콩 생육시기에 맞추어 제2복엽 완전 전개기(V3 stage), 제4복엽 완전 전개기(V5 stage), 개화성기(R1 stage), 착엽시(R3 stage) 총 4번을 스프레이 접종(10^6 CFU/ml)하였으며, 수확 후 종자를 병원균 현탁액(10^6 CFU/ml)에 1-2분간 침지시킨 후 충분히 건조시켜서 이병종자로 만들어 시험에 사용하였다. 건전종자는 포장에서 재배 후 육안상 건전한 종자를 선종하여 4°C 보관하면서 시험에 사용하였다. 인공접종시 사용된 *X. axonopodis* pv. *glycines*

는 이병잎의 병징에서 분리하여 동정 후(Biolog 및 PCR 이용) 병원성검정을 통해 병원성이 확인된 균주를 -70°C 동결보존하면서 시험에 사용하였다.

이병 콩 종자로부터 병원균 추출. 이병종자로부터 *X. axonopodis* pv. *glycines*를 간편하고 효과적으로 검출하기 위한 병원균 추출법을 알기 위하여(Seed-wash dilution-plating assay와 PCR assay를 하기 위한 전 과정), Alvarez 등(1995)과 Clafin 등(1987)이 사용한 방법을 참고하여 A-1부터 D-2까지 8가지 방법을 시험에 사용하였다. A-1은 이병종자(태광콩) 5 g을 25 ml의 saline buffer(0.01% tween 20을 포함한 0.85% NaCl 용액)가 들어있는 250 ml 삼각 플라스크에 침지한 후, 4°C에 16-18시간 정치배양 하였다. A-2는 A-1의 방법의 saline buffer 대신 살균수를 첨가하여 실험하였으며, B-1은 A-1 방법에서 4°C에 16-18시간 정치배양 대신 4°C에서 1-2시간 정치 후 28°C에서 150 rpm으로 진탕배양을 16-18시간 동안 실시하였다. B-2는 A-2에서 4°C 정치배양 대신 4°C에서 1-2시간 정치 후 28°C에서 150 rpm으로 진탕배양을 16-18시간 실시하였다. C-1방법은 종자 5 g을 막대사발에 마쇄한 후 A-1의 방법대로, C-2는 종자를 마쇄한 후 A-2의 방법, D-1은 종자 마쇄 후 B-1의 방법, D-2는 종자 마쇄 후 B-2의 방법으로 총 8가지 방법을 3반복 수행하였다(Table 1). 위의 8가지 방법의 현탁액을 dilution-plating assay와 PCR assay 시험에 이용하였다.

Seed-wash dilution-plating assay. 위의 방법으로 추출되어진 현탁액의 상층액을 멸균되어진 cheese cloth로 종자 불순물들을 여과시킨 후 10^5 까지 희석하여 배지에 100 μ l씩 도말하였다. 30°C 배양기에서 3-4일간 배양 후 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 노란색 colony를 계수하였다. 병원균 검출에 사용되어진 배지는 일반적으로 반선택

Table 1. Comparison of eight methods for *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* in soybean seed (Taekwangkong)

Medium	Method ^a							
	A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2	D-1	D-2
PSA	1.0×10^5	- ^b	2.0×10^7	2.9×10^7	1.1×10^5	2.0×10^5	5.0×10^6	2.5×10^7
MXP	-	-	1.0×10^7	3.0×10^7	-	-	-	-
XTS	1.0×10^5	-	-	-	-	3.1×10^5	-	-

A - 1 : Infected seeds (5 g) + 25 ml/ buffer (0.85% NaCl + tween 20 0.01%) + 16-18 h, at 4-5°C, static culture.

A - 2 : Infected seeds (5 g) + 25 ml/ sterile water + 16-18 h, at 4-5°C static culture.

B - 1 : Infected seeds (5 g) + 25 ml/ buffer + 16-18 h at 28°C, 150 rpm shaking culture.

B - 2 : Infected seeds (5 g) + 25 ml/ sterile water + 16-18 h at 28°C, 150 rpm shaking culture.

C - 1 : ground Infected seeds (5 g) + 25 ml/ buffer+ 16-18 h at 4-5°C, static culture.

C - 2 : ground Infected seeds (5 g) + 25 ml/ sterile water + 16-18 h at 4-5°C, static culture.

D - 1 : ground Infected seeds (5 g) + 25 ml/ buffer +16-18 h at 28°C, 150 rpm shaking culture.

D - 2 : ground Infected seeds (5 g) + 25 ml/ sterile water + 16-18 h at 28°C, 150 rpm shaking culture.

^aValues for methods A, B, C and D are expressed as CFU (colony-forming units)/ml of seed suspensions for three replicates.

^bBelow 1.0×10^2 CFU/ml.

배지로 쓰이는 PSA 배지(Bacto peptone 10 g, Sucrose 10 g, L-Glutamic acid 2 g, Agar 18 g, dH₂O 증류수 1 l), Clafin 등(1987)이 선택배지라고 보고한 MXP 배지 [Starch(soluble potato, Difco) 8 g, Glucose 1 g, Yeast extract 0.7 g, K₂HPO₄ 0.8 g, KH₂PO₄ 0.6 g, Potassium bromide 10 g, Methyl violet 2B(30.0 uL, 1% solution in 10% ethanol), Methyl green(60.0 uL, 1% aqueous solution), agar 18 g, dH₂O 1 l); 살균 후 첨가 chlorothalonil(1.0 ml, 1.2 ml to 38.8 ml water) + Cephalexin(10.0 ml, 1.0 g to 500 ml water) + Kasugamycin(10.0 ml, 100 mg to 500 ml water) + Gentamycin(5.0 ml, 50 mg to 5 ml ethanol)], Schaad 등(2001)이 보고한 XTS 배지[Nutrient agar 23 g, Glucose 5 g, dH₂O 1 l; 살균 후 첨가 cycloheximide (2.0 ml, 1.0 g to 10 ml of 75% ethanol) + Gentamycin (5.0 ml, 50 mg to 5 ml ethanol) + Cephalexin(1.0 ml, 50 mg to 5 ml of 75% ethanol)] 등 3가지 배지를 사용하였다.

PCR assay. PCR 기법을 이용하여 종자내 *X. axonopodis* pv. *glycines*를 검출하기 위하여 위에 기술한 8가지의 추출법을 사용하였으며, Tegli 등(2002), Meng 등(2004), Berg 등(2005), Molouba 등(2001)이 사용한 방법을 조금씩 변형하여 실험에 활용하였다. 각 추출방법의 현탁액에서 cheese cloth로 종자 불순물들을 여과시킨 후 상층액 1.5 ml을 13,000 rpm, 1분간 원심분리하여 형성된 pellet을 가지고 genomic DNA extraction kit(iNtRoN)에 기술되어진 방법대로 DNA를 추출하였다. genomic DNA 추출 후 PCR 반응에 사용된 heu2(5'-GACCGAAATGTATTCTTGGG-3'), heu4(5'-CATTGCGACTAGCAAGG-3') primer는 *X. axonopodis* pv. *glycines*에서 생성, 분비하는 glycinecin 이라는 Bacteriocin 생성에 관여하는 유전자내 염기서열에서 선별되어졌다. 이러한 glycinecin A gene은 약 1.7 kb 크기의 DNA에 모든 유전정보가 있으며 현재까지 알려진 어느 세균에서도 유사성이 알려져 있지 않아 거의 *X. axonopodis* pv. *glycines* 특이적인 유전자인 것으로 알려져 있다(Oh 등, 1999). PCR 반응액은 0.5 µg~1 µg의 주형 DNA, 1 uM의 primer, 각 200 uM의 dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10×buffer, 5 unit *Taq* DNA polymerase(Takara)를 포함하여 최종 부피가 100 uL 되게 하였다. PCR 반응온도는 95°C, 2분의 denaturation 후 94°C에서 90초, 52°C에서 90초, 72°C에서 90초 과정을 35회 반복 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켰다(Oh 등, 1999). PCR 산물은 0.5×TBE를 이용하여 1.0% Agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 하에서 확인하였다.

자연감염된 종자에서의 병원균 검출. 인공접종을 실시하지 않고 자연상태에서 종자전염을 확인하기 위해 2005

Table 2. Survey on seed contamination of 36 soybean cultivars by Dilution-plating and PCR assays

Cultivars	Assays			
	Dilution-plating		PCR	
	2005 ^a	2006	2005	2006
Pungsan-namulkong	- ^b	+	-	+
Mallikong	-	+	-	+
Taekwangkong	-	+	-	+
Daemangkong	-	+	-	+
Ajukkarikong	-	-	-	+
Others ^c (31 cultivars)	-	-	-	-

^a: Production year, ^b: - not detect, + detect.

^c: Daepungkong, Jangbaekong, Nogchaekong, Hwasongputkong, Danmikong, Miltakong, Hojangkong, Seonyukong, Anpyeongkong, Ilpumgeonjeongkong Hwangkeumkong, Pureunkong, Willams 82, Kwangankong, Doyoukong, Hannamkong, Agakong, Sobaegnamul-kong, Muhankong Danweonkong, limikong, Sohokong, Songh-akong, Jangkyongkong, Sangnamkong, Myeongju-namulkong, Jinpumkong, Dajangkong, Baegunkong, lksannamulkong, Suwon224.

년 포장에서 병 발생정도에 따라 구분하여 수확한 종자를 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 보관중인 종자(태광콩)를 육안상 건전한 종자와 불건전한 종자(변색, 피해립)로 구분하여 병원균을 추출하였으며, 검출방법은 위에서 기술한 Dilution-plating assay 및 PCR assay 방법을 사용하였다.

주요 콩 품종 종자오염 조사. 주요 콩 품종의 종자오염을 확인하기 위해 위에서 기술한 두 가지 검정법을 이용하여 수행하였다. 실험에 사용된 종자는 2005년, 2006년도에 작물과학원 영남농업연구소 포장에서 수확한 종자 36품종(Table 2)을 육안으로 건전종자를 선종하여 4°C 보관한 후 2007년도에 실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

Seed-wash dilution-plating assay를 통한 병원균 검출. 시험에 사용될 종자들이 이병되었는지 그리고 종자전염이 되는 것을 확인하기 위해 인공접종을 통한 이병종자를 pot에 파종하여 30°C, 85% RH, 12h light/12h dark 식물생장상에서 생육을 시켰다. 파종한 지 2주 후 제 1분엽에서 불마름병의 병징이 발현되었다(Fig. 1). 이 결과는 콩 불마름병 병원균이 인공접종을 통하여 종자전염이 가능하다는 Groth 등(1989)과 Prathuangwong 등(1998)의 보고와 일치하였으며, 시험에 사용된 종자들이 인공접종을 통해 이병되었다는 것을 확인할 수 있었다.

이병종자로 확인된 종자에서 반선택배지 희석평판법을 이용한 *X. axonopodis* pv. *glycines* 검출을 위한 가장 효

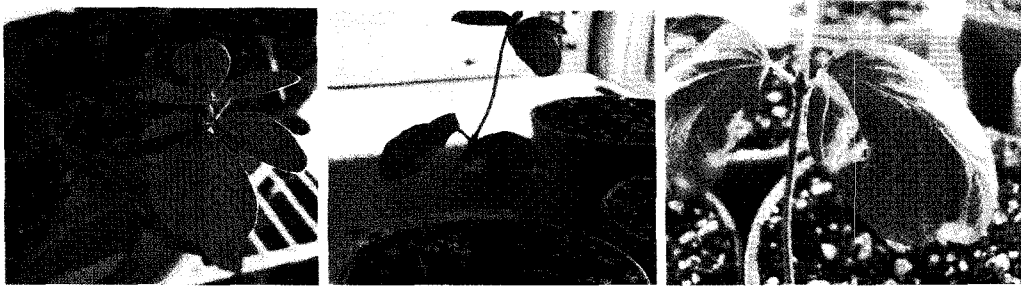


Fig. 1. Symptom of Bacterial pustule on soybean seedling caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. **Left:** Healthy seeds, **Middle & Right :** Infected seed of artificial inoculation.

유효적인 병원균 추출방법을 구명하고자 8가지 추출법으로 3종류의 배지에 희석 도말하였다. 반선택배지인 MXP, XTS의 경우 *Xanthomonas* 속의 특징적인 노란색 colony가 선택적으로 검출이 되기는 하지만 다른 종류의 세균도 적은 밀도로 발생하였고, 추출방법에 따라 검출이 되지 않는 경우가 발생하였다. 반대로 PSA 배지는 도말 후 다른 종류의 세균과 *Xanthomonas* 속 colony가 배지위에 혼합에서 나타나지만 모든 추출방법에서 colony가 검출되었다(Table 1). 하지만 3개의 배지모두 A-2 추출방법에서는 *Xanthomonas* 속 colony가 검출되지 않았다. 또한 PSA배지를 기준으로 했을 때 살균수 보다는 saline buffer가 4~5°C 정지배양 보다는 16~18시간 동안 28°C, 150 rpm으로 진탕배양하는 방법이 병원균 추출에 가장 효율적이었다(Table 1). Alvarez 등(1995)은 콩 종자에서 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 검출시 종자를 갈아서 2시간동안 220 rpm으로 교반하는 방법이 가장 많은 colony를 회수할 수 있다 하였으며, Clafin 등(1987)은 강낭콩 종자에서 *X. campestris* pv. *phaseoli* 검출하기 위해 0.5 g의 종자를 마쇄 후 살균수 보다는 buffer(12.5 mM PO₄, 10 mM MgSO₄, 0.01% Tween 20)에 4°C 보다는 28°C에서 6시간 동안 배양하는 방법이 colony 밀도가 높게 나타난다고 하였다. 이들의 결과는 본 실험의 결과와 매우 유사한 경향을 보였다. 하지만 종자의 마쇄유무에 따른 추출법에서 colony 밀도가 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서 종자

추출물에서의 불순물 및 PCR 반응 억제 물질을 줄이기 위해 종자를 마쇄하지 않고 추출하는 것이 PCR assay에서 더 효과적일 것으로 생각된다. Prathuangwong 등(1994)은 콩 종자에서 *X. axonopodis* pv. *glycines* 검출시 종자를 선택배지에 치상한 후 생성되어진 colony 중 형태적 특징이 유사한 colony들을 순수분리하여 생화학 테스트, 병원성 테스트를 통해 병원균을 동정하였다. 이와 같이 dilution-plating assay를 통한 병원균의 검출은 선택배지에 colony가 형성되어도 100% 확신할 수가 없기 때문에 순수분리하여 재동정하여야 하는 문제점이 있다. 이로 인해 배지에 배양하는 시간과 의심되어지는 부분에 대하여 순수분리하여 동정해야 하는 비효율적인 문제를 해결하고자 primer를 이용하여 주요 작물의 종자에서 병원균 검출 PCR assay가 개발되어졌다(Prosen 등, 1993; Audy 등, 1996).

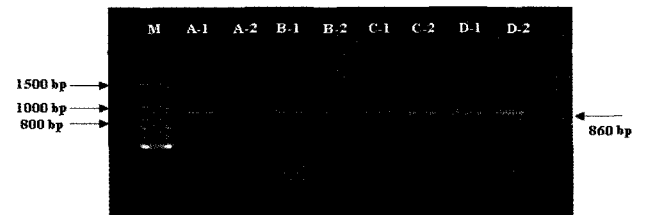


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR products from eight methods using PCR assay. **A-1~D-2:** The same as Table 1. methods.

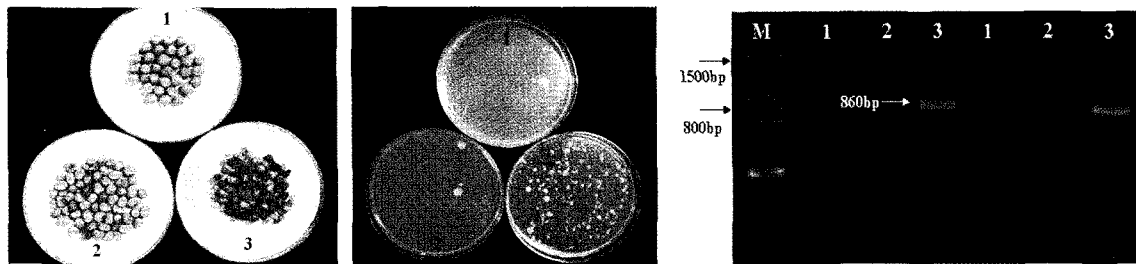


Fig. 3. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* from various natural Infected seed using PCR assay and Dilution-plating assay (Taekwangkong). 1, Healthy soybean seeds; 2, Semi-damaged soybean seeds; 3, Infected or discoloration soybean seeds; M, 100 bp DNA ladder.

PCR assay를 통한 병원균 검출. 위의 같은 문제점들을 해결하고 이병종자내 신속한 불마름병 병원균검출을 위해 PCR법을 이용한 검출실험을 수행하였다. Meng 등(2004)은 PCR로 병원균 검출시 종자 불순물에 의해 문제점이 발생할 수 있는데 종자현탁액에서 genomic DNA를 추출할 때 kit를 사용하는 것이 DNA를 순수하게 분리하는데 유리하다고 하였다. 본 실험에서도 DNA만 결합되는 column membrane type의 kit를 사용 8가지 방법의 종자추출 현탁액에서 DNA를 분리하여 실험에 사용하였다. Dilution-plating assay와 PCR assay를 비교하기 위해 dilution-plating assay시 사용했던 8가지 추출방법들을 PCR assay로 확인해 본 결과 A-2 추출방법을 제외한 나머지 추출방법에서는 모두 860 bp의 특이밴드가 확인되었다(Fig. 2). 860 bp의 특이밴드는 primer heu2와 heu4를 사용하여 PCR을 수행하였을 때 *X. axonopodis* pv. *glycines* 만이 특이적으로 증폭되는 size이다. 위 실험에서 A-2를 제외한 나머지 7개의 추출방법에서 불마름병 병원균이 추출되었으며 그 현탁액을 가지고 PCR을 수행하였을 때 병원균 검출이 가능하다는 것을 확인하였다. 이 결과는 dilution-plating assay의 결과와 일치하는 것으로 PCR assay에 의해서 검정하는 방법은 불순물 및 PCR 반응 억제 물질의 영향을 적게 받으면서 *X. axonopodis* pv. *glycines* 병원균을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법으로 증명되었다. 시험에 사용하고 있는 콩(대두, soybean)과 같은 과의 잠두(bean) 종자에서도 병원성 세균 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*(Tegli 등, 2002), *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*와 *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*(Molouba 등, 2001)를 PCR로 검출하는 방법이 기존의 전통적인 검출방법(agar plating, seedling grow-out assay)보다 신속하고 효율적이라고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보고하였다. 결과적으로 PCR assay를 하기 위한 효율적인 추출방법은 종자 추출물의 불순물 및 PCR 반응 억제 물질을 줄이기 위해 종자를 마쇄하지 않고 saline buffer에 침지 후 16~18시간 동안 28°C, 150 rpm으로 진탕배양하여 그 현탁액에서 DNA 추출하는

것이 효과적인 것으로 확인되었다.

자연감염된 종자에서의 병원균 검출. 포장에서 수확한 종자(태광콩, 2005년도 수확)의 자연감염을 알아보기 위해 병 발생이 심했던 포장과 병 발생이 적었던 포장에서 수확한 종자를 구분하여 2006년도에 병원균 검출 실험을 실시하였다. 병 발생이 적었던 포장(병반면적을 기준 10% 이하)에서 수확한 종자를 육안상 건전종자와 불건전한 종자(변색립, 피해립)로 구분하여 실험한 결과 육안상 건전종자와 약간의 피해를 받은 종자에서는 PCR assay와 Dilution-plating assay에서 병원균이 검출되지 않았으나 병해충에 의한 심한 피해립, 변질·변색립, 파쇄립 등을 보인 종자에서는 불마름병 병원균이 검출되었다(Fig. 3). 하지만 병 발생이 많았던 포장(병반면적을 기준 20% 이상)에서는 피해를 받은 종자뿐만 아니라 육안상 건전한 종자에서도 병원균이 검출되었다(Fig. 4). 이 결과로 콩 포장에서 자연감염에 의해 병원균이 종자로 전염된다는 것을 확인할 수 있었다. 변색립이나 피해립에서 병원균 검출이 많았던 것은 콩 생육중에 불마름병이 있거나 꼬투리에 발생이 되어지면 종자의 성숙 및 등숙에 영향을 미치는 것으로 생각되어지며, 병 발생이 심할수록 더 많은 영향을 미쳐서 종자감염을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다. Prathuangwong 등(1998)은 포장에서 콩 불마름병의 발생이 증가하면 종자감염도 증가하며, 두 사이에는 상관관계가 있다고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보고하였다. 하지만 Groth 등(1989)은 꼬투리 안에서 종자가 불마름병 병원균에 의해 감염되지 않는 것 같으며 콩 타작시 감염된 기주식물에 의해 종자가 오염되는 것 같다고 하였다. 또한 미국의 북동부 지역 포장에서 인공접종을 통한 불마름병 병원균의 종자전염정도는 2-3% 정도이고, 종자내 병원균의 밀도가 낮다고 하였으며, 브라질에서는 117개의 종자샘플구 중에서 오직 하나의 샘플구에서만 병원균이 검출되었다고 하였다(Fett, 1979). 이처럼 포장에서 불마름병의 발생이 심하게 발생되도 종자전염율이 적게 조사되는 것은 병원균의 밀도가 너무 낮아서 검출할 수 없거나 사용되어진 검출법이 효과적이지 못한

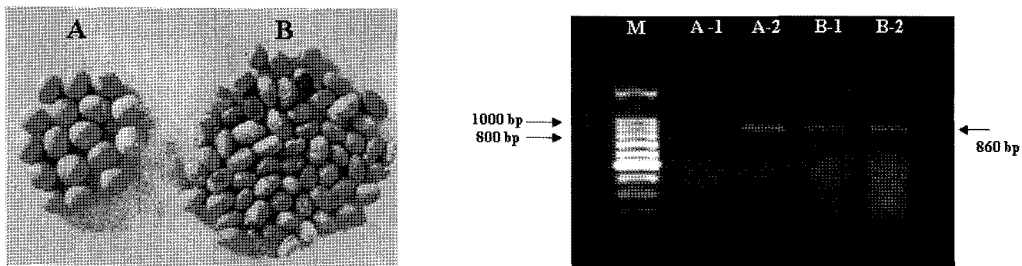


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the PCR assay products by seed extracts from infected or healthy seeds (Taekwangkong). A(A-1, A-2), Healthy soybean seeds; B(B-1, B-2), Infected or discoloration soybean seeds; M, 100 bp DNA ladder.

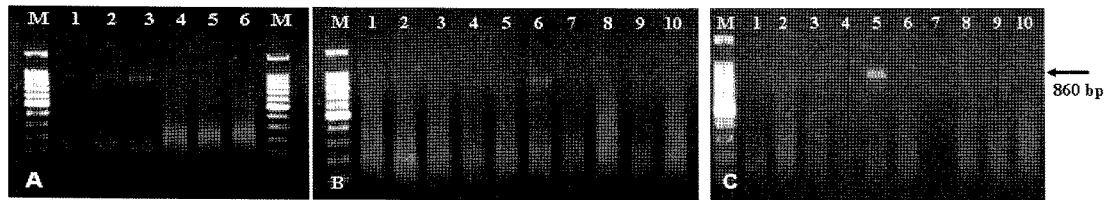


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of the PCR assay products from various soybean cultivars (produced at 2006 year) for survey on seed contamination.

A : Lane 1, Ilpumgeomjeongkong lane 2, Pungsan-namulkong lane 3, Mallikong lane 4, Hwangkeumkong lane 5, Pureunkong lane 6, Willams 82, **B :** Lane 1, Kwangankong lane 2, Doyoukong lane 3, Hannamkong lane 4, Agakong lane 5, Sobaegnamulkong lane 6, Daemangkong lane 7, Muhankong; lane 8, Danweonkong lane 9, limikong lane 10, Sohokong, **C :** Lane 1, Songhagkong lane 2, Jangkyongkong lane 3, Sangnamkong lane 4, Myeongju-namulkong lane 5, Ajukkarakong lane 6, Jinpumkong 2; lane 7, Dajangkong lane 8, Baegunkong lane 9, Iksannamulkong lane 10, Suwon224.

것에 그 이유가 있다(Prathuangwong 등, 1998).

주요 콩 품종 종자오염 조사. 위의 검출기법을 이용하여 주요 콩 품종에서 불마름병의 종자오염을 조사하였다. 2005년도와 2006년도에 수확한 36품종의 종자를 대상으로 종자오염을 조사한 결과 2005년도에 수확한 종자에서는 모든 assay에서 병원균이 전혀 검출되지 않았고, 2006년도에는 풍산나물콩, 만리콩, 대망콩, 태광콩, 아주까리콩에서만 병원균이 검출되었다(Fig. 5). 특히 아주까리콩의 경우는 Dilution-plating assay의 배지상에서는 병원균 colony가 검출되지 않았으나 PCR assay에서는 검출되었다. 즉 Dilution-plating assay로 검출되지 않는 낮은 병원균 밀도에서도 PCR assay는 민감하게 검출하였으며 이를 통해 신속하고 정확하게 종자오염 여부를 판단할 수 있었다(Table 2). 이번 실험에서 병원균이 검출되었던 5품종은 모두 불마름병 감수성 품종으로 품종에 따른 종자오염의 차이가 나타날 수 있다는 것을 확인하였다.

또한 2005년도에 수확한 품종 중에서 태광콩의 경우 2006년도(7월~9월) 실험에서는 병원균이 검출되었으나(Fig. 3, Fig. 4), 같은 종자를 2007년도(4월~6월)에 주요 콩 품종 종자오염 조사에서는 검출이 되지 않았다. 이런 결과로 미루어 보아 콩 불마름병 병원균은 4°C~8°C 온도의 보관상태로 종자에서 1년 이상은 생존하지 못하는 것으로 생각되어지며, 폴리에틸렌 봉지에서 불마름병 병원균이 9개월간 종자에서 생존할 수 있다는 Srivastava 등(1986)의 보고와 비슷한 결과를 나타내었다. 종자 마쇄유무에 따른 추출방법에서 병원균 colony 밀도가 큰 차이를 나타내지 않은 점, 그리고 병원균이 종자에서 1년 이상 생존하지 못하는 것으로 보아 병원균이 종자의 내부인 배유나 배 부위에 존재하는 것이 아니고 종자의 표면 즉 종피에 존재할 가능성이 높은 것으로 생각되어지며 좀 더 심도 있는 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

Xanthomonas axonopodis pv. *glycines*에 의해 발병되는 콩 불마름병은 한국에서 콩에 가장 많이 발생하는 중요한 세균성 병해 중 하나이다. 본 연구에서는 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*를 종자에서 검출하기 위해 PCR 기법을 이용하였으며, 한국의 36개 주요 콩 품종의 종자오염을 조사하였다. 그리고 병원균 검출과 동정을 위한 PCR assay와 dilution plating assay를 비교하였다. PCR assay를 이용하여 인공접종에 의한 이병종자와 자연감염된 이병종자로부터 병원균 검출을 확인하였다. PCR assay를 통한 이런 결과는 dilution plating assay와 비슷한 결과를 보여 주었으며 종자에서 병원균을 검출하는 다른 전통적인 방법보다 더 효과적인 방법으로 증명되었다. 36개 주요 콩 품종의 *X. axonopodis* pv. *glycines*에 의한 종자전염을 확인한 결과 풍산나물콩, 만리콩, 태광콩, 대망콩, 아주까리콩에서 병원균이 검출되었다. 그러므로 PCR assay는 콩 종자에서 신속하고, 민감하게 *X. axonopodis* pv. *glycines* 특이적으로 검출할 수 있는 효과적인 방법으로 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C. and Laroche, A. 1996. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* 86: 361-366.
- Berg, T., Tesoriero, L. and Hailstones, D. L. 2005. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. *Plant Pathology* 54: 416-427.
- Fett, W. F. 1979. Survival of *Pseudomonas glycinea* and *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis* in leaf debris and soybean seed in Brazil. *Plant Dis. Rep.* 63: 79-83.
- Graham, J. H. 1953. Overwintering of three bacterial pathogens of

- soybean. *Phytopathology* 43: 189-192.
- Hartman, G. L., Sinclair, J. B. and Rupe, J. C. 1999. Compendium of Soybean Diseases. APS PRESS Fourth edition: 6-7.
- Hartwig, E. E. and Johnson, H. W. 1953. Effect of the bacterial pustule disease on yield and chemical composition of soybeans. *Agron. J.* 45: 22-23.
- 김용욱, 조준형. 2005. 국내 육성 콩 품종의 논 재배에 따른 생육 반응과 수량성. *한국작물학회지* 50: 161-169.
- Lavolette, F. A., Athow, K. L., Probst, A. H. and Wilcox, J. P. 1970. Effect of bacterial pustule on yield of soybeans. *Crop Sci.* 10: 150-151.
- Meng, X. Q., Umesh, K. C., Davis, R. M. and Gilbertson, R. L. 2004. Development of PCR-Based Assays for Detecting *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, the Carrot Bacterial Leaf Blight Pathogen, from Different Substrates. *Plant Dis.* 88: 1226-1234.
- Molouba, F., Guimier, C., Berthier, C., Guenard, M., Olivier, V., Baril, C. and Horvais, A. 2001. Detection of Bean Seed-Borne Pathogens by PCR. *Proc. Int. Symp. on Molecular Markers* 603-607.
- Oh, C. S., Heu, S. G. and Choi, Y.-C. 1999. Sensitive and Pathovar-specific Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* by DNA Hybridization and Polymerase Chain Reaction Analysis. *Plant Pathol. J.* 15(1): 57-61.
- Prathuangwong, S., Khandej, K. and Goto, M. 1994. A semiselective medium for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in contaminated soybean seed. Soybean Feeds The World. B. Napompeth (ed.) Kasetsart University Press, Bangkok. 1: 197-201.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N. W. and Panopoulos, N. J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83: 965-970.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN.
- Srivastava, S. S. L. and Bais, B. S. 1987. Survival and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* causing leaf pustules of soybean. *Indian J. Plant Pathol.* 5: 22-23.
- Tegli, S., Sereni, A. and Surico, G. 2002. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. *Letters in Applied Microbiology* 35: 331-337.
- Walcott, Ron. R. 2003. Detection of Seedborne Pathogens. *HortTechnology* 13: 40-47.