

콩 종자에서 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*의 검출을 위한 Direct PCR 방법 개발

이용주 · 강미형* · 노태환 · 이두구 · 이건희 · 김시주

국립식량과학원 벼백류부 간척지농업과

Direct PCR Detection of the Causal Agents, Soybean Bacterial Pustule, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* in Soybean Seeds

Yong Ju Lee, Mi Hyung Kang*, Tae Hwan Noh, Du Ku Lee, Geon Hwi Lee and Si Ju Kim

Reclaimed Land Agriculture Division, Department of Rice and Winter Cereal Crop, National Institute Crop Science,
R.D.A., Iksan 570-080, Korea

(Received on July 15, 2009)

Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) method that combines biological and enzymatic amplification of PCR targets was developed for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* on soybean seeds without DNA isolation. Primers Xag F1 and Xag R1 were designed to specifically amplify a 401 bp fragment of the glycinecin A gene of *X. axonopodis* pv. *glycines*. Xag F1 and Xag R1 were used to carry out the PCR analysis with genomic DNA from 45 different bacterial strains including phylogenetically related bacteria with *X. axonopodis* pv. *glycines*, and other bacterial strains of different genus and species. The PCR assay using this set of primers were able to detect *X. axonopodis* pv. *glycines* with DNA concentration as low as 200 fg and 1.8×10^3 cfu/ml. The Xag was detected from the seed samples incubated for 2 hrs with shaking and the intensity of the band was increase with the incubation time of seeds. The Direct PCR assay method without DNA isolation makes detection of *X. axonopodis* pv. *glycines* on soybean seeds easier and more sensitive than other conventional methods. The developed seed assay using direct PCR method will be useful for the specific detection of *X. axonopodis* pv. *glycines* in soybean seed samples.

Keywords : Detection, PCR, Soybean seeds, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

콩(*Glycine max* (L.) Merrill)은 우리나라와 일본을 포함한 아시아권은 물론 세계적으로 중요한 식량작물이며, 지력유지 및 증진을 위한 작부체계의 측면에서도 매우 중요한 작물이다. 콩의 생육기간 중에는 다양한 종류의 병이 발생하는데 현재 우리나라에서 콩에 발생하고 있는 병은 3종류의 바이러스병, 4종류의 세균병, 23종의 진균병, 34종의 선충병이 보고되어 있다. 세균병에는 세균성점무늬병(*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*), 콩나물 세균성부패병(*P. putida*), 세균성갈색점무늬병(*P. syringae* pv. *syringae*), 불마름병(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)의 4종이 보고되어 있으며(한국식물병리학회, 2004), 우리

나라에서는 주로 잎에 발생하는 불마름병이 가장 문제시되고 있다. 콩 불마름병에 의한 경제적 피해는 외국의 경우 7~15%의 수확량 감소가 보고되어 있으며(Laviolette 등, 1970; Hartwig와 Johnson, 1953), 우리나라의 경우 1997년과 1998년 2년간에 걸쳐 전국적으로 조사한 바에 의하면 경기, 강원, 충북, 충남, 경북, 전북 등 9개 콩 재배포장 중 약 86%인 85개 포장에서 불마름병 발생이 확인되었고, 영남지역에서는 2005년과 2006년에 불마름병 발생을 조사한 결과 78개 포장 중 89.7%인 70개 포장에서 불마름병 발생이 확인되었다(이, 1999; 홍 등, 2007).

콩 불마름병과 같이 세균성 종자 전염성 병해의 발생을 감소하기 위해서는 저항성 품종을 선택하고 건전 종자를 파종하는 것이 가장 좋은 방제 방법으로 알려져 있다. 일반적으로 종자에서의 병원세균 검출법은 선택배지를 이용한 방법, 혈청학적인 방법 및 분자생물학적인 방

*Corresponding author

Phone) +82-63-840-2228, Fax) +82-63-840-2118

Email) mhkang@rda.go.kr

법 등 여러 가지 방법들이 종자나 병원균 종류에 따라 개발되어 사용되고 있다(Walcott, 2003). 콩 종자에서 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 검출은 반선택배지 방법이 보고되어 있으나(Prathuangwong, 1994), *Pseudomonas*와 *Pectobacterium* 등이 같이 분리되어 직접분리가 어렵고 정확성과 시간면에 비교하여 비효율적인 검출법이라 할 수 있겠다. 홍 등(2007)은 종자를 마쇄하지 않고 saline buffer에 침지 후 16~18시간 동안 28°C, 150 rpm으로 진탕 배양하여 그 현탁액에서 DNA를 추출하여 종자의 오염 정도를 조사하였다.

본 연구에서는 콩 불마름병 발생의 1차 전염원이 되는 *X. axonopodis* pv. *glycines*에 의해서 감염된 오염종자를 간편하고 신속하게 검정하기 위하여 *X. axonopodis* pv. *glycines* 특이 프라이머를 고안하고, DNA의 추출없이 종자침출액을 이용하여 PCR 분석하여 진단하는 direct PCR 방법을 수행하여 얻은 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

병원세균 분리·동정 및 병원성 검정. 병원균의 분리는 2007년과 2008년 전북 김제와 익산지역 포장에서 채집한 콩 종자 35개 품종과 불마름병 증상을 보이는 잎에서 각각 분리하였다. 종자에서의 분리는 tween 20이 0.01% 포함된 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4) 5 ml에 콩 종자 1 g을 넣고 28°C에서 24시간 진탕 배양하여 추출된 상등액을 10^{-5} 까지 희석한 후 yeast extract-dextrose-calcium carbonate(YDC)와 potato sucrose agar (PSA) 배지에 각각 도말 접종하여 28°C에서 5일간 배양 후 성장한 집락을 분리하였다. 이병 잎에서는 노란 달무리 부분을 포함한 갈색병반의 괴사 부분의 조직에서 분리하였다. 분리된 균주를 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml로 조절하여 육묘용 pot에 과종된 콩 유묘 잎에 문질러서 접종하여 콩 잎에 병징을 나타내는 병원성이 확인된 균주를 선발하였다(Table 1). 선발된 분리 균주의 동정을 위하여 지방산 분석을 실시하였고, 분리된 균주의 균체 지방산 분석은 Microbial Identification System(MIDI : Microbial ID, Inc., Newark, Del., USA)을 이용하였으며, KACC에서 분양받은 *X. axonopodis* pv. *glycines*를 대조균주로 사용하였다.

Genomic DNA 분리. 병원균의 genomic DNA의 분리는 NB broth에서 배양시킨 세균을 1.5 ml tube에 옮겨 7,500 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 모아진 pellet을 가지고 QIAGEN DNeasy Tissue Kit(QIAGEN Inc.)에 기술되어진 방법대로 DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 -20°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

Table 1. List of bacterial strains used in this study and results of PCR

Bacterial isolates	Source	PCR ^a
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> SBC	Chonamkong	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> SBD	Dawonkong	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> SBE	Eunhakong	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> SBM	Mallikong	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> SBI	Illpumgumjeungkong	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> SBP	Poongsan-namulkong	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> SBT	Taekwangkong	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	KACC ^b 11144	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	KACC 11146~11152	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i>	KACC 11119	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	KACC 12874	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	KACC 10161	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	KACC 10935	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KACC 10315	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 12870	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	KACC 12869	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	KACC 12867	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	KACC 10559	-
<i>X. axonopodis</i>	KACC 12122	-
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	KACC 13263	-
<i>P. putida</i>	KACC 10192	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	KACC 10393	-
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	KACC 10447	-
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	KACC 10466	-
<i>P. syringae</i>	KACC 10292	-
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	KACC 10477	-
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC 10057	-
<i>Erwinia amylovora</i>	KACC 10060	-
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	KACC 10162	-

^aPresence (+) or absence (-) of 401 bp target product.

^bKACC, Korean Agricultural Culture Collection, Korea.

Primer 제작 및 PCR 조건. GeneBank에 보고된 glycinecin A gene(GeneBank : AF281069)의 염기서열들을 비교하여 증폭 size가 401 bp인 XagF1(5'-GCGCAGAATCCAAAAC-AAAAC-3'), XagR1(5'-TCCTTCACGACGAATCCTGG-3') primer를 고안하였다. Primer Express Software v2.0(Applied Biosystems)을 이용하여 디자인하였고, Bioneer Corporation (Chungwon, Chungbuk, Korea)를 통해서 합성하였다.

PCR 반응은 genomic DNA 1 µl, 1.5 mM MgCl₂, 각각의 dNTPs 200 µM, 각각의 primer 10 pmole, 1× PCR reaction buffer II, 그리고 1.0 U AmpliTaq gold polymerase (Perkin elmer)를 포함하여 최종 부피를 25 µl로 하여 수행하였다. 모든 증폭은 ABI 9700을 이용하였다. PCR 증폭 조건은 94°C에서 10분간 처리한 후, 94°C에서 30초,

55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 조건으로 35 cycle을 수행한 뒤 72°C에서 5분간 처리하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 증폭산물의 5~10 µl를 1% agrose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 증폭 유무를 확인하였다.

PCR primer의 특이성 검정 및 민감도 검정. PCR primer의 특이성 검정은 콩 종자와 잎에서 분리한 23 균주와 *X. axonopodis* pv. *glycines*와 근연균주인 *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 등을 대상으로 검정하였다. 민감도를 조사하기 위해서 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 genomic DNA를 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정 후, 10⁻⁸까지 희석하여 사용하였다. DNA의 추출 없이 직접적인 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 증폭이 가능한지 확인하기 위하여, *X. axonopodis* pv. *glycines*의 현탁액을 OD_{600nm} 0.1로 농도 조정 후, 10 mM Tris-HCl을 이용하여 10⁻⁸까지 희석하였고, 각각의 희석액 1.0 ml를 3반복씩 -20°C에서 보관하였으며, 95°C에서 10분간 boiling한 후, PCR을 실시하였다.

Direct PCR에 의한 콩 종자침출액에서의 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 검정. 자연 감염된 종자에서 병원균의 검출을 확인하기 위하여 2007년에 수확한 태광콩 종자를 육안상 건전종자와 불건전한 종자(변색립, 피해립)로 구분하여 새로이 고안된 XagF1 & XagR1 primer를 이용하여 2008년도에 PCR 분석하였다. 콩 종자 약 5립 중에 해당하는 1.0 g을 tween 20이 0.01% 첨가된 PBS 5 ml에 침지하여 28°C에서 24시간동안 진탕 배양 후, 진탕된 종자 침출액을 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 모아진 pellet을 200 µl의 10 mM Tris-HCl로 현탁하였다. 현탁액을 95°C에서 10분간 boiling한 후, 종자 분쇄 등의 다른 처리나 DNA 추출없이 PCR에 사용하였다. 현탁액은 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 종자침출액에서 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 검출 최소시간을 확인하기 위하여 각 시간별로 진탕 배양 후, 침출액을 수거하여 DNA 추출 없이 PCR 분석하여 검출 한계시간을 조사하였다.

결과 및 고찰

제작된 PCR primer의 특이성 검정과 민감도 검정. 콩 불마름병균에 감염된 종자의 선별을 위해 DNA 추출 없이 콩 침출액을 이용하여 direct PCR 분석하기 위하여 개발된 Xag F1과 Xag R1 primer의 *X. axonopodis* pv. *glycines*에 대한 특이성을 확인하였다. 분리 균주 genomic DNA와 병원세균의 세포를 이용하여 확인한 결과 콩 종자와 잎에서 분리한 *X. axonopodis* pv. *glycines* 분리균주

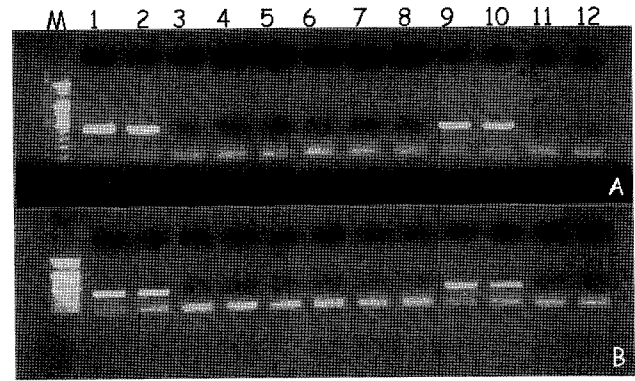


Fig. 1. Specificity of the PCR assay in detecting *X. axonopodis* pv. *glycines* in genomic DNA by conventional PCR (A) or in cell suspensions by direct PCR (B). Lane 1, *X. axonopodis* pv. *glycines* SBC1; lane 2, *X. axonopodis* pv. *glycines* SBM1; lane 3, *X. axonopodis* pv. *axonopodis* KACC 10935; lane 4, *X. axonopodis* pv. *citri* KACC 10315; lane 5, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* KACC 12870; lane 6, *Pseudomonas syringae* KACC 10292; lane 7, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* KACC 10162; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10057; lanes 9~10, *X. axonopodis* pv. *glycines* genomic DNA; lanes 11~12, negative control; and lane M, size marker (100 bp DNA ladder).

와 KACC에서 분양받은 *X. axonopodis* pv. *glycines* 균주들은 401 bp에서 PCR band가 형성됨을 확인하였다(Fig. 1). 그러나 *X. axonopodis* pv. *glycines*와 근연적으로 가까운 다른 균주와 콩 종자에 존재하는 것으로 알려진 균주 모두에서는 PCR 증폭이 이루어지지 않아서 Xag F1과 Xag R1 primer가 *X. axonopodis* pv. *glycines*만을 특이적으로 증폭함을 확인할 수 있었다(Table 1). Glycinecin A gene이 현재까지 알려진 어느 세균에서도 유사성이 알려져 있지 않아 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 특이적인 유전자인 것으로 알려져 있다는 Oh 등(1999)과 Heu 등(2001)의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다.

Xag F1과 Xag R1 primer를 이용하여 PCR 진단 시의 검출한계 농도를 확인하기 위하여 PCR 분석하였다. genomic DNA를 20 ng을 기준으로 희석하여 확인한 결과 200 fg까지 증폭이 확인되어 높은 민감도를 나타내었다(Fig. 2). Genomic DNA 뿐만 아니라 병원세균 현탁액을 직접 Xag F1과 Xag R1 primer를 이용하여 PCR 분석한 결과도 역시 *X. axonopodis* pv. *glycines*만이 증폭되는 특이적인 결과를 나타내었고, 세포현탁액을 이용한 민감도의 측정 결과 OD_{600nm} 0.1로 농도 조정 후, 10 mM Tris-HCl을 이용하여 10⁻⁸까지 희석하여 실시한 결과 10⁻⁶인 1.8×10³ cfu/ml까지 증폭이 확인되었다.

Direct PCR에 의한 콩 종자침출액에서의 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 검정. 자연 감염된 종자에서 병원균의 검

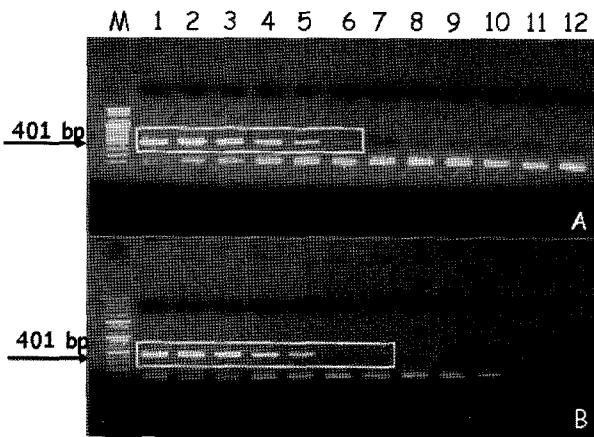


Fig. 2. Evaluation of detection sensitivity using PCR with bacterial genomic DNA extracted from a pure *X. axonopodis* pv. *glycines* culture in a 10-fold dilution series (A) or cells of *X. axonopodis* pv. *glycines* from plate cultures were suspended in 10 mM Tris-HCl adjusted to an absorbance of 0.1(O.D 600 nm) and a 10-fold serial dilution series (B).

출을 확인하기 위하여 2007년에 수확한 태광콩 종자를 육안상 건전종자와 변색 종자로 구분하여 콩 종자를 완충 용액에 넣고 배양한 뒤 DNA 추출 없이 2008년도에 PCR 분석하였다. 실험한 결과 다른 처리나 DNA의 추출 없이 direct PCR 방법으로 병원균의 검출이 가능하다는 것을 확인하였으며 홍 등(2007)이 보고한 자연 감염된 종자의 변색립, 파쇄립, 피해립 등에서 PCR 방법을 통해 병원균을 검출한 결과와 일치함을 확인하였다(Fig. 3). 육안상 건전종자에서의 병원균의 검출은 수확한 포장의 병 발생 정도에 따라 다르게 나타나는 것으로 생각되며, 본 실험의 결과는 전년도에 수확한 포장의 병 발생 정도가 미비하여 육안상 건전종자에서는 검출되지 않은 것으로 생각된다. 또한 홍 등(2007)의 보고에서와 같이 병원균이 종자 표면에 존재하는 것으로 고려되므로 육안상 건전종자에서도 충분히 병원균이 검출될 수 있을 것으로 생각된다. 콩 종자의 적정한 침출 배양 시간을 확인하기 위하여 진탕 배양 시간에 따른 병원균의 검출 정도를 direct PCR

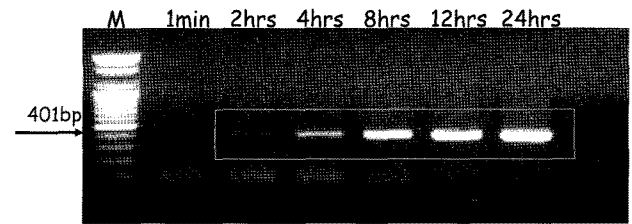


Fig. 4. Soybean seeds in PBST were incubated for 1 min shaking, 2 hrs, 4 hrs, 8 hrs, 16 hrs, and 24 hrs and detection of *X. axonopodis* pv. *glycines* using Direct PCR assay. M, 100 bp DNA ladder.

방법을 이용하여 검출한계시간을 조사하였다. 28°C에서 1 분, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간으로 구분하여 진탕배양한 뒤 direct PCR을 실시한 결과 진탕배양 2시간 부터 병원균의 검출이 확인되었으며 시간이 지날수록 증폭 밴드가 더욱 선명해 지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이는 배양 시간이 지날수록 병원균의 밀도 또한 증가하는 것으로 생각되어지며, 콩 종자를 침출액에서 2시간 정도 진탕 배양 후 direct PCR 방법을 이용하면 바로 이 병 종자를 간편하게 선별해 낼 수 있을 것으로 생각된다. 홍 등(2007)은 16~18시간 동안 진탕 배양하여 그 현탁액에서 DNA를 추출하는 것이 가장 효과적이라고 보고하였으나, 본 연구에서는 DNA를 추출하는 과정 없이 바로 현탁액을 이용하여 좀 더 간편하게 병원균의 검출이 가능하였다. PCR을 통해 콩 종자로부터 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*를 검출하는 방법이 보고된 바 있으며(Audy 등, 1996; Prosen 등, 1993; Schaad 등, 1995), 최근 종자에서 병원균 검출에 PCR 방법을 이용하여 검출하려는 시도가 활발하게 진행되고 있다. 현재까지는 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*와 *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 등 주요 식물 병원균에 대한 PCR 검출법이 소개되고 있으나(Tegli 등, 2002; Molouba 등, 2001) direct PCR 방법이 기존의 PCR 방법보다 시간과 비용면에서 효율적이라고 생각된다. PCR을 기본으로

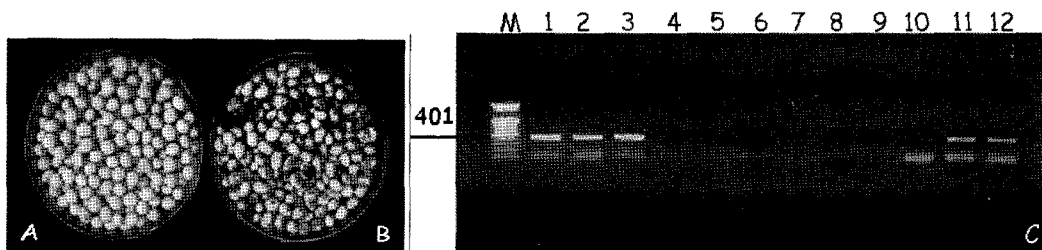


Fig. 3. Detection of *X. axonopodis* pv. *glycines* from various naturally infected seeds (Taekwangkong) using Direct PCR assay. A: Healthy soybean seeds, B: Infected or discolored seeds soybean seeds, C: Direct PCR assay. lane M: 100 bp DNA ladder, lanes 1~3; Infected or discolored seeds, lanes 4~9; Healthy seeds, lanes 10~12; *X. axonopodis* pv. *glycines* genomic DNA.

하는 종자 검정법에는 다른 종자 전염성 세균이나 inhibitor의 간섭을 피하고 검정한계를 최소화하는 방법이 필요하다. Xag F1과 Xag R1 primer를 이용한 direct PCR 분석할 경우, inhibitor의 간섭에도 불구하고 종자 검정시 특별한 DNA 추출없이 PCR 증폭이 가능하여 좀 더 간편하게 결과를 얻을 수 있었으며, 역학적 조사나, 자연 환경에서의 병원균을 검정하는데도 아주 유용할 것으로 생각된다.

요 약

콩 불마름병을 일으키는 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*를 종자에서 DNA 추출없이 바로 검출하는 방법에 대하여 연구하였다. 콩 종자에서 *X. axonopodis* pv. *glycines*를 특이적으로 검출하기 위해 특이적인 유전자로 알려져 있는 glycinecin A로부터 증폭 size가 401 bp인 primer Xag F1 & Xag R1을 고안하였다. Xag F1과 Xag R1 primer는 콩 종자와 잎에서 분리한 균주와 KACC에서 분양받은 *X. axonopodis* pv. *glycines* 균주를 증폭시켰으나 근연종인 *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 등은 증폭되지 않았다. 콩 종자에 존재하는 것으로 알려진 다른 세균들 역시 증폭되지 않았다. 고안된 Xag F1 & Xag R1 primer를 이용한 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 검출 한계 농도 측정은 genomic DNA와 세포 현탁액을 이용하였다. *X. axonopodis* pv. *glycines*의 genomic DNA는 200 fg까지 증폭이 되었으며, 세포현탁액은 OD_{600nm} 0.1로 농도를 조정 한 뒤, 10⁻⁸까지 희석하여 측정 한 결과 10⁻⁶인 1.8×10³ cfu/ml까지 증폭이 확인되었다. 자연 감염된 종자에서 병원균을 검출하기 위해 종자를 육안상 건전종자와 불건전한 종자(변색립, 피해립)로 구분하여 direct PCR 방법으로 실험한 결과 육안상 건전종자에서는 병원균이 검출되지 않았으나 불건전한 종자에서는 병원균의 검출이 확인되었다. 또한 진탕 배양 시간에 따른 병원균의 검출여부를 조사한 결과 진탕 배양 2시간부터 병원균의 검출이 확인되었으며 시간이 지날수록 증폭 밴드가 더욱 선명해 지는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 고안된 Xag F1 & Xag R1 primer를 이용한 direct PCR 방법은 다른 많은 미생물들로 오염되어진 콩 종자에 있는 *X. axonopodis* pv. *glycines*를 신속하고 민감하게 검정할 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.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명명목록. p436.
- 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.
- Heu, S. G., Oh, J. H., Kang Y. S., Ryu, S. R., K. Cho, S. M., Cho, Y. S., and Cho, M. J. 2001. *gly* Gene Cloning and Expression and Purification of Glycinecin A, a Bacteriocin Produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. *Appl Environ Microbiol.* 67: 4105-4110.
- 홍성준, 홍연규, 이봉춘, 임미정, 윤영남, 황재복, 송석보, 박성태. 2007. PCR Assay 이용 콩 종자에서 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 검출 및 종자오염 조사. *식물병연구*. 13: 145-151.
- Laviolette, 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.
- 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: 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 bean seed by polymerase chain reaction based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83: 965-970.
- Schaad, N. W., Cheong, S. S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N. J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85: 243-248.
- 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, R. R. 2003. Detection of seedborne pathogens. *HortTechnology* 13: 40-47.