식물병연구
*Res. Plant Dis. 17(3) : 376–380 (2011)*
http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2011.17.3.376

Note | Open Access

*Research in Plant Disease*
©The Korean Society of Plant Pathology

# 토마토 종자로부터 PCR을 이용한 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 검출

조정희 · 임규옥[1] · 이혁인[1] · 예미지[1] · 차재순*
*충북대학교 식물의학과, [1]농림수산검역검사본부 식물검역부

# Development and Evaluation of PCR-Based Detection for *Pseudomonas syrinage* pv. *tomato* in Tomato Seeds

**Jung-Hee Cho, Kyu-Ock Yim[1], Hyok-In Lee[1], Mi-Chi Yea[1] and Jae-Soon Cha***
*Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*
*[1]Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 433-1 Anyang, 430-016, Korea*
(Received on November 4, 2011; Revised on November 28, 2011; Accepted on November 28, 2011)

**The bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* leads to serious economic losses especially on fruits of susceptible genotype. Thus, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is a plant quarantine bacterium in many countries including Korea. In this study, we developed specific PCR assays for detection of the bacterium from tomato seeds. A specific primer set is designed from the *hrpZ* gene for specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato.* A 501 bp PCR product corresponding to *hrpZ* gene was amplified only form *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strains, but no PCR product was amplified from other tomato bacterial pathogens, such as *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea, P. syringae* pv. *maculicola, P. syringae* pv. *atropurpurea, P. syringae* pv. *morsprunorum,* and from other *P. syringae* pathovar strains. The nested-PCR primer set corresponding to an internal fragment of the 501 bp sequence (*hrpZ*) gine was used to specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato seed. A 119 bp PCR product using nested PCR primer was highly specific and sensitive to detect low level of *Pseudomonas syrigae* pv. *tomato* in tomato seeds. We believe that the PCR assays developed in this study is very useful to detect *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* from the tomato seeds.**

***Keywords*** **: Bacterial speck, Plant quarantine, Seed-borne disease**

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*(*Pst*)는 종자 전염성 병원세균으로 다양한 토마토 품종에서 bacterial speck병을 일으키고, 토마토의 재배지역에서 중요한 병원균 중 하나로 알려져 왔다(Cuppels와 Elmgirst, 1999). *Pst*에 의한 병징은 과실과 잎에서 다각형의 점무늬가 나타나고, 점무늬 주위에 점차 노란색의 달무리가 생긴다(Zaccardilli 등, 2005). *Pst*는 발병 시 토마토의 과실에 피해를 입혀 큰 경제적 손실을 가져오기 때문에 중요한 식물 세균병원균으로 알려져 왔고, 국내에서도 식물검역 관리병으로 지정되어 관리되고 있다(Zaccardilli 등, 2002).

지금까지 *Pst*의 검출을 위해 다양한 방법들이 개발되어 사용되고 있으나, 현재 사용 중인 방법들은 무병종자 및 무병종묘의 인증 프로그램과 식물검역 현장에서 사용했을 때, 여러 가지 문제점이 있다. Vogel-Bonner-tartate (VBTar)와 KBC 선택배지(Ovod 등, 1997; Schaad 등, 2001)의 경우 특별한 기기를 필요로 하지 않고 간단하게 검출할 수 있는 장점이 있지만, 병원균의 콜로니를 확인할 때까지 많은 시간이 필요하며, 부생균과 *Pst*의 콜로니를 구별하기 어려운 문제점들이 있다(Cuppels 등, 1999, 2006). IFAS(Indirect fluorescent antibody staining)과 ELISA(enzyme linked immunsorbent assay)등과 같이 항혈청을 이용한 방법은 현재까지도 식물검역과 무병종자 및 무병종묘 인증 프로그램에서 많이 사용하고 있지만, 이 방법들은 항체의 교차반응에 의한 거짓 양성반응과 종자에서 병원세균을 검출하기에는 민감도가 낮은 문제가 있다(Zaccardelli 등, 2005). Bereswill 등(1994)에 의해 개발

*Corresponding author
Phone) +82-43-261-2554, Fax) +82-43-271-4414
Email) jscha@cbnu.ac.kr

된 세균독소인 coronatine 생합성에 관련 유전자인 *cfl* 염기서열에서 제작한 프라이머를 이용한 PCR 방법의 경우 coronatine은 *Pst*뿐만 아니라 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea, P. syringae* pv. *maculicola, P. syringae* pv. *atropurpurea, P. syringae* pv. *morsprunorum* 등과 같이 토마토에 병을 일으키는 다른 병원세균도 합성하는 독소이므로 *Pst*만을 특이적으로 검출하는 방법으로는 적합하지 않다(Palmer와 Bender, 1993). Manceau와 Horvais(1997)에 의해 개발된 *Pst*의 16S-23S rDNA 영역에서 디자인한 프라이머를 이용하는 PCR방법의 경우 *Pst*의 16S-23S rDNA 영역이 다른 *P. syringae* 균주들과 거의 차이가 나지 않기 때문에 *Pst* 검출만을 위한 방법으로 사용되기는 어렵다. 본 연구에서는 새로운 PCR 프라이머를 이용하여 기존의 방법보다 더 빠르고, 특이성이 높으며, 민감한 검출방법을 개발하고자 하였다. PCR 프라이머는 *Pst hrp* pathogenicity island의 내부에서 *hrpZ* 유전자 부분을 이용하여 디자인 하였으며, PCR의 검출 민감도를 높이기 위해 1st PCR 산물의 내부 영역에서 nested PCR 프라이머를 개발하였다. 또한 검출방법을 단순화하기 위해 토마토 종자 추출물을 직접 PCR에 사용하였다.

**PCR 프라이머의 특이성 및 민감도**. 본 연구에 사용한 균주는 Table 1과 같으며, 각각 한국농업미생물자원센타(Korean Agricultural Culture Collection, Korea), 한국미생물자원센타(Korean Collection for Type Cultures, Korea), 벨기에 BCCM-LMG(Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms, Belgium)에서 분양 받았다. 또한 일부는 충북대학교 세균병학실험실 수집균주도 사용되었다. 본 연구에서 *Pst*의 검출을 위해 개발된 프라이머는 NCBI에서 보고된 *Pst* DC3000균주의 *hrp* pathogenicity island (AF232004.3)의 염기서열 내부에서 1113 bp 크기의 *hrpZ* 유전자 부분을 blast를 통해 확인 후 Primer3 프로그램을 이용하여 증폭산물이 501 bp 크기를 가지는 Pst-JH-F(5'-RGY TRA TYY RYG RAA AGY TC-3')와 Pst-JH-R(5'-CRT CGR YYT CGR GRT TTC YY-3') 1st PCR 프라이머를 선발하였다. PCR검출의 민감도를 높이기 위해서 1st PCR의 증폭 산물의 내부의 염기서열로부터 Pst-JH-F-ne(5'-RCA AGR CCC RGY YCC CYA CY-3')와 Pst-JH-R-ne(5'-TTG RYY AAY GRC RYC RAR AG-3')의 nested PCR용 프라이머를 디자인하였다. PCR 프라이머들의 특이성을 확인하기 위해서 Cho 등(2011)의 방법에 의해서 *Pst*균주 6개와 *Pseudomonas* spp., 그리고 주요 식물세균병원균들의 DNA와 프라이머 *Pst*-JH-F/R을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 실험결과, 오직 *Pst* 균주들에서만 501 bp 크기의 밴드가 증폭되는 것을 확인하였고, 다른 균주들에서는 어떤 DNA밴드도 검출되지 않았다(Fig. 1A). 종자에 낮은 농도로 감염되어 있는 *Pst*의 경우 일반 PCR 검출방법으로 검출이 불가능하기 때문에 민감도를 높이기 위해서 1st PCR 증폭산물의 내부 영역에서 nested PCR 프라이머인

**Table 1.** Bacterial strains used in this study

| Bacterial strains[a] | Source[b] | Bacterial strains | Source |
|---|---|---|---|
| *P. syringae* pv. *tomato* | CNUPBL 1556 | *P. saceharophila* | KCTC2350 |
| *P. syringae* pv. *tomato* | CNUPBL 1561 | *P. maltrophilia* | KCTC2437 |
| *P. syringae* pv. *tomato* | CNUPBL 1562 | *P. reactans* | ATCC14340 |
| *P. syringae* pv. *tomato* | LMG5509 | *P. taetrolens* | KCTC1064 |
| *P. syringae* pv. *tomato* | LMG5093 | *P. acidovorans* | KCTC1638 |
| *P. syringae* pv. *tomato* | CNUPBL263 | *P. putida* | KCTC1639 |
| *P. syringae* pv. *tabaci* | CNUPBL1559 | *P. arvilla* | KCTC1643 |
| *P. syringae* pv. *pisi* | LMG5679 | *P. fluorescens* | KCTC1751 |
| *P. syringae* pv. *syringae* | CNUPBL0023 | *R. solanacearum* | KACC10697 |
| *P. syringae* pv. *hibisci* | CNUPBL0024 | *X. campestris* pv. *vesicatoria* | KACC11153 |
| *P. syringae* pv. *morsprunum* | CNUPBL0025 | *X. campestris* pv. *campestris* | CNUPBL0260 |
| *P. syringae* pv. *actinidiae* | CNUPBL0026 | *X. campestris* pv. *glycines* | LMG8026 |
| *P. syringae* pv. *lachrymans* | CNUPBL1557 | *X. oryzae* pv. *oryzae* | KACC10331 |
| *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* | LMG2245 | *Pe. carotovora* subsp. *carotovora* | KACC10342 |
| *P. savastanoi* pv. *glycinea* | LMG5144 | *Rhodocucus. fascians* | LMG3601 |

[a] *P*: *Psuedomonas*, *R*: *Ralstonia*, *X*: *Xanthomonas*, *Pe*: *Pectobacterium*
[b] LMG: Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms, KACC: Korean Agricultural Culture Collection, KCTC, Korean Collection for Type Cultures: CNUPBL, Chungbuk National University Plant Bacteriology Lab.

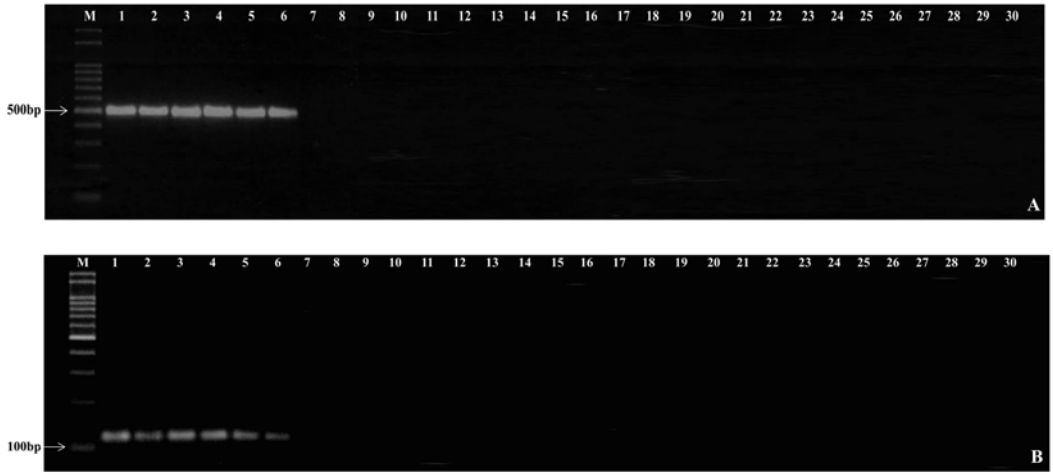


**Fig. 1.** PCRs were carried out with primers Pst-JH-F, Pst-JH-R and 10 ng of bacterial DNAs (A). Nested-PCRs were carried out with primers Pst-JH-F-ne, Pst-JH-R-ne and 1 μl of 10 times dilution of 1st PCR products (B). Lane 1: *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, 2: *P. syringae* pv. *tomato* AV1, 3: *P. syringae* pv. *tomato* Y1, 4: *P. syringae* pv. *tomato* LMG5509, 5: *P. syringae* pv. *tomato* LMG5093, 6: *P. syringae* pv. *tomato* CBNUPBL 263, 7: *P. syringae* pv. *tabaci,* 8: *P. syringae* pv. *pisi,* 9: *P. syringae* pv. *syringae*, 10: *P. syringae* pv. *hibisci*, 11: *P. syringae* pv. *maculicola*, 12: *P. syringae* pv. *actinidiae*, 13: *P. syringae* pv. *lachrymans*, 14: *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, 15: *P. savastanoi* pv. *glycinea,* 16: *P. saceharophila*, 17: *P. maltrophilia*, 18: *P. reactans*, 19: *P. taetrolens*, 20: *P. acidovorans*, 21: *P. putida*, 22: *P. arvilla,* 23: *P. fluorescens,* 24: *R. solanacearum*, 25: *X. campestris* pv. *vesicatoria,* 26: *X. campestris* pv. *campestris*, 27: *X. campestris* pv. *glycines,* 28: *X. oryzae* pv. *oryzae,* 29: *P. carotovora* subsp. *carotovora,* 30: *Rhodocucus fascians*.

*Pst*-JH-F/R-ne을 선발하였다. 선발된 nested PCR 프라이머의 특이성을 확인하기 위한 PCR에서 *Pst* 균주들에서만 119 bp 크기의 밴드가 증폭되는 것을 확인하였고, 다른 균주에서는 어떤 DNA도 증폭되지 않았다(Fig. 1B). 개발된 프라이머가 토마토 DNA를 주형으로 DNA를 증폭할 수 있는지 여부를 확인하기 위해서 2종류의 토마토 종자, 2종류의 고추 종자, 1종류의 알팔파 종자에서 DNA를 추출하여 동일한 PCR을 수행하였다. 실험결과, 모든 토마토 종자의 DNA에서 어떤 특이적인 DNA도 증폭되지 않았다(자료 미제공).

본 연구에서 개발한 PCR방법에 의해 증폭되는 주형 DNA의 농도 한계를 측정하기 위해 DNA를 10 ng 기준으로 10배씩 희석하여 PCR을 수행하였다. 실험결과, 10 ng의 1000배 희석농도인 0.01 ng에서 501 bp 크기의 특이적 DNA가 증폭되었다(Fig. 2A). 또한 1st PCR의 증폭산물들을 10배 희석 후 1 μl을 사용하여 nested PCR을 수행했을 때 1st PCR의 증폭 최종농도보다 100배 더 희석한 시료에서도 특이적 DNA가 증폭되었다(Fig. 2B).

**토마토 종자에서 병원균 검출**. *Pst*에 농도 별로 인공오염 시킨 토마토종자에서 DNA의 추출과정 없이 PCR을 수행하기 위해서 Cho 등(2010)의 방법을 이용하여 종자 추출물을 제조하였다. 토마토종자의 추출물을 이용하여 기존의 *Pst*의 검출방법으로 사용되었던 반선택배지(KBC)의 경우 배양 72시간 후에 조사하였을 때, *Pst*의 전형적인 콜로니가 배지상에서 나타났고, $10^4$ CFU/ml의 접종농도까지 검출이 가능하였다(Table 2). 접종농도 $10^3$ CFU/ml 미만에서는 반선택배지에 부생성 세균의 생장으로 인해 정확하게 *Pst*의 콜로니를 구별하기는 어려웠다. 혈청학적 검출방법인 ELISA의 경우 인공오염 된 토마토 종자에서 병원균 접종농도 $10^3$ CFU/ml까지 양성반응을 확인하였다(Table 2). 본 연구에서 개발된 PCR 프라이머를 이용하여 인공오염 시킨 토마토 종자에서 PCR을 수행한 결과, 1st PCR의 경우 $10^3$ CFU/ml까지 특이적 DNA가 증폭되었다. 1st PCR의 증폭산물을 10배 희석하여 사용한 nested PCR에서 접종농도 10 CFU/ml까지 특이적 DNA가 증폭되었다(Table 2). 이 결과는 nested PCR의 검출 민감도가 반선택배지, ELISA보다는 100–1,000배 더 민감하고, 1st PCR에 의한 검출보다 100배 더 검출 민감도가 높다는 것을 의미한다.

종자전염 세균병의 경우 $10^2$–$10^3$ CFU/ml 정도의 낮은 농도로 종자에 존재하며, 적합한 환경조건하에서 매우 빠르게 증식 및 전반을 통해 심각한 피해를 가져오는 것으로 보고되었다(Cho 등, 2010). Bacterial speck병을 일으키는 *Pst*는 전 세계적으로 토마토를 재배하는 지역에서 경제적 심각한 피해주는 종자전염세균으로(Cuppels 등, 1999), 아직 국내에서는 발병이 보고되지 않았다(The Korean society of plant pathology, 2009). 오염된 종자에 의한 식물병의 전파는 아직 병이 발생하지 않는 지역에 새로운

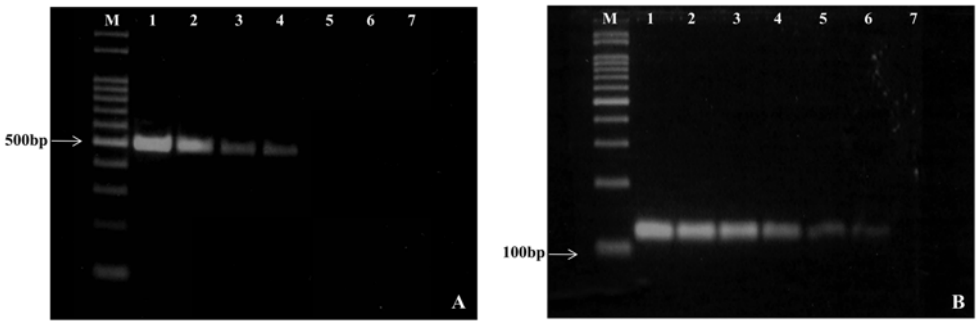


**Fig. 2.** Detection sensitivity of PCRs and nested PCRs for *P. syringae pv. tomato* LMG 5509 PCRs were carried out with primers, Pst-JH-F and Pst-JH-R (**A**) Lane 1: 1 μl of DNA (10 ng), Lane 2-7: 10-fold serial dilution (2-7) (**A**). Nested-PCRs were carried out Pst-JH-F-ne and Pst-JH-R-ne **(B).**

**Table 2.** Detection of *Pseudomonas syringae* pv. tomato in the artificially inoculated tomato seed by semi-selective medium, ELISA and PCR assays

| Assay[a] | Bacterial concentration (CFU/ml) of inoculum[b] | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $10^8$ | $10^7$ | $10^6$ | $10^5$ | $10^4$ | $10^3$ | $10^2$ | 10 |
| KBC[c] | + | + | + | + | + | - | - | - |
| DAS-ELISA | + | + | + | + | + | + | - | - |
| 1st PCR | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Nested PCR | + | + | + | + | + | + | + | + |

[a] Positive reaction (+), Negative reaction (-).
[b] The 20 ml of bacterial suspension containing each concentration was used to contaminate 1 g of tomato seeds artificially.
[c] KBC: King's medium B cephalexin.

병원균이 도입되는 매우 중요한 수단으로 병의 피해를 최소화하기 위해서는 종자로부터 빠르고 정확한 병원균의 검출방법의 개발이 필요하다(Cho 등, 2011; Kritzman, 1991). 현재까지 사용되는 *Pst* 검출방법 중 반선택배지의 경우 검출 시간이 최소 3일 이상 걸리고, KBC 배지의 경우 *Pst* 뿐만 아니라, 다른 *P. syringae* 균주들의 검출이 가능하다는 단점을 가지고 있다(Schaad 등, 2001). ELISA의 경우 종자에서 검출을 할 때 교차반응에 의해 거짓반성반응이 일어나고, 검출민감도가 낮아 종자에서의 *Pst*의 검출이 불가능하다는 단점을 가지고 있다(Cuppels 등, 2006). 본 연구에서 *Pst*의 특이적인 검출을 위해 *Pst*의 *hrp* pathogenicity island 영역에서 프라이머를 제작하여 PCR에 사용되었다. *Pst*의 *hrp* island 영역은 다른 *syringae* 균주들과 구별될 수 있는 특이적 염기 서열을 가지고 있다(Zaccardelli 등, 2005). 또한 *hrp*-유전자를 이용한 PCR검출방법은 *P. syringae* pv. *papulans*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*등 많은 병원세균들에서 신속한고 정확한 검출을 위해 많이 사용되고 있다(Kerkoud 등, 2002; Leite 등, 1994).

본 연구에서 개발된 PCR방법과 nested PCR방법은 기존의 PCR 검출방법들이 종자로부터 병원균을 검출할 수 있을 만큼 민감도가 충분하지 않다는 단점을 개선하였고, 또한 종자 추출액을 직접 PCR에 이용하는 방법은 기존의 *Pst*의 검출을 위해 DNA를 추출하여 PCR에 사용하던 방법들(Berewill 등, 1994; Cuppels와 Anisworth, 1995; Cuppels, 2006; Leite 등, 1994; Manceau와 Horvais, 1997; Zaccardelli 등, 2005)에 비해 DNA의 추출로 소비되는 시간을 절약할 수 있고, DNA의 오염 등에 의해 일어날 수 있는 거짓양성반응을 방지할 수 있다는 장점을 가졌다. 따라서 본 연구에서 개발된 PCR방법은 토마토 종자로부터 빠르고 정확하게 *Pst*를 검출하는데 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

*P. syringae* pv. *tomato*는 토마토에서 bacterial speck병을 일으키는 종자전염 세균으로, 감수성 품종에서 주로 발병하여 경제적으로 큰 손실을 입힌다. 따라서 *P. syringae* pv. *tomato*는 한국을 비롯한 많은 나라에서 식물 검역대상 세균으로 지정하여 관리되고 있다. 본 연구에서 우리는 토마토 종자로부터 PCR을 이용하여 *Pst*를 검출할 수 있는 방법을 개발하였다. *P. syringae* pv. *tomato*의 *hrpZ*

유전자에서 특이적인 프라이머를 개발하였다. 개발된 프라이머는 *P. syringae* pv. *tomato*에서만 501 bp 크기의 특이적 DNA를 증폭하였으며, *P. syringae* pv. *glycinea, P. syringae* pv. *maculicola, P. syringae* pv. *atropurpurea, P. syringae* pv. *morsprunorum*와 같은 다른 토마토 세균병원균과 *P. syringae* pathovar 균주들에서는 증폭되지 않았다. Nested PCR 프라이머를 이용한 PCR에서도 오직 *P. syringae* pv. *tomato*에서만 119 bp 크기의 특이적 DNA가 증폭되었고, 토마토 종자에서 *P. syringae* pv. *tomato*을 정확하고 민감하게 검출하였다. 본 연구는 현재까지 사용되고 있는 *Pst*의 검출방법의 민감도를 비교한 최초의 보고로 본 연구에서 개발된 PCR방법들은 토마토 종자에서 *Pst*을 검출하는 매우 유용한 방법으로 생각된다.

## Acknowledgement

This work was supported by Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Republic of Korea.

## References

Berewill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C. L. and Geider, K. 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2924–2930.

Cho, J. H., Jeong, M. J., Song, M. J., Yim, K. O., Lee, H. I., Kim, J. H., Baeg, J. H. and Cha, J. S. 2010. Development of PCR primers to detect *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* from the bean seeds. *Res. Plant Dis.* 16: 129–135. (In Korean)

Cho, J. H., Yim, K. O., Lee, H. I., Kim, J. H., Baeg, J. H. and Cha, J. S. 2011. Detection of the causal agent of bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum* in the seeds of solanaceae by PCR. *Res. Plant Dis.* 17: 184–190. (In Korean)

Cuppels, D. A. and Ainsworth, T. 1995. Molicular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3530–3536.

Cuppels, D. A. and Elmhirst, J. 1999. Disease development and changes in the natural *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on field tomato plants. *Plant Dis.* 83: 759–764

Cuppels, D. A., Louws, F. J. and Ainsworth, T. 2006. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Dis.* 90: 451–458.

Kerkoud, M., Manceau, C. and Paulin, J. P. 2002. Rapid diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans,* the causal agent of blister spot of apple, by polymerase chain reaction using specifically designed *hrpL* gene primers. *Phytopathology* 92: 1077-1083.

Kritzman, G. 1991. A method for detection of seedborne bacterial diseases in tomato seeds. *Phytoparasitica* 19: 133–141.

Leite, R. P., 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 *Xanthmonas campestris* pv. *vesicatoria. Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1068–1077.

Manceau, C. and Horvais, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato. Appl. Environ. Microbiol.* 63: 498–505.

Ovod, V., Rhudolph, K. and Krohn, K. 1997. Serological classification of *Pseudomonas syringae* pathovars based on monoclonal antibodies towards the lipopolysaccharide O-chains. pp. 526–531 Vol. 9: *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.

Palmer, D, A. and Bender, C. L. 1993. Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea. Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1619–1626.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun W. 2001. Lavoratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, pp. 84–120. APS press, Minnesota, USA.

The Korean society of plant pathology. 2009. List of plant disease in Korea. 5th ed. The Korean society of plant pathology, Suwon, Korea. pp 151–157. (In Korean)

Zaccardelli, M., Parisi, M., and Giordano, I. 2002. Susceptibility of tomato genotypes to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in the field conditions. *J. Plant Pathol.* 84: 200

Zaccardelli, M., Spasiano, A., Bazzi, C. and Merighi, M. 2005. Identificaion and *in planta* detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZ*$_{Pst}$. *Eur. J. Plant Pathol.* 111: 85–90.