

콩에 발생하는 주요 병원세균의 동시검출을 위한 다중 PCR 방법

이영훈*[†] · 김남구* · 윤영남* · 임승택* · 김현태* · 윤홍태* · 백인열* · 이영기**

*농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부, **농촌진흥청 국립농업과학원

Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection of Major Pathogenic Bacteria in Soybean

Yeong-Hoon Lee*[†], Nam-Goo Kim*, Young-Nam Yoon*, Seung-Taek Lim*, Hyun-Tae Kim*, Hong-Tae Yun*, In-Youl Baek*, and Young-Kee Lee**

*Department of Functional Crop, NICS, RDA, Miryang 627-803, Korea

**National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT Bacterial diseases in soybean are bacterial pustule by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, wildfire by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, bacterial blight by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycines* and bacterial brown spot by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Korea. It is difficult to identify each disease by early symptoms in fields, because the initial symptoms of these diseases are very similar to each other. In this study, we developed multiplex PCR detection method for rapid and accurate diagnosis of bacterial diseases. The glycinecin A of *X. axonopodis* pv. *glycines*, the tabtoxin of *P. syringae* pv. *tabaci*, the coronatine of *P. savastanoi* pv. *glycines* and the syringopeptin of *P. syringae* pv. *syringae* have been reported previously. These bacteriocin or phytotoxin producing genes were targeted to design the specific diagnostic primers. The primer pairs for diagnosis of each bacterial diseases were selected without nonspecific reactions. The studies on simultaneous diagnosis method were also conducted with primarily selected 21 primers. As a result, we selected PCR primer sets for multiplex PCR. Sizes of the amplified PCR products using the multiplex PCR primer set consist of 280, 355, 563 and 815 bp, respectively. This multiplex PCR method provides a efficient, sensitive and rapid tool for the diagnosis of the bacterial diseases in soybean.

Keywords : bacterial disease, bacteriocin, phytotoxin, *Glycine max*, multiplex PCR, bacterial pustule, bacterial blight, wildfire, bacterial brown spot

콩(*Glycine max* (L.) Merr.)은 세계적으로 중요한 식량작물이며, 영양 및 건강식품으로서 뿐만 아니라 지력유지와 증진을 위한 작부체계 측면에서도 매우 중요한 작물이다(Kim & Cho, 2005). 우리나라는 콩의 원산지인 발생하는 병원체의 종류도 다양하다. 또한, 품종과 환경여건에 따라 병해 발생 양상이 다르며, 잠재 병해의 대발생 위험성을 항상 가지고 있다. 현재 약 10여 종의 병원체가 콩을 침해하여 경제적으로 큰 피해를 주는 것으로 보고되어 있다. 바이러스병에는 콩모자이크바이러스병, 세균병으로는 불마름병과 들불병, 곰팡이병에는 검은뿌리썩음병, 점무늬병, 역병, 자주무늬병과 미이라병이 이들에 속한다. 최근 기후변화에 의한 온도 상승으로 현재와 미래에 경제적 피해를 줄 우려가 있는 병해는 세균병일 것으로 예상된다. 우리나라에서 콩 생육기에 발생하는 세균병은 불마름병, 세균점무늬병, 세균갈색점무늬병과 들불병 4종이 보고되어 있다(Myung *et al.*, 2009; The Korean Society of Plant Pathology, 2009). *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*에 의한 불마름병은 1990년 이후부터 국내에서 전국적으로 발생하여 큰 피해를 주고 있다. 불마름병이 발생된 콩은 조기낙엽되어 광합성 효율이 현저히 떨어지게 됨으로 종자의 크기가 감소되거나 미성숙된 종자가 생산되어 수량에 직접적인 영향을 준다. 품종에 따라 약 15%(Hartwig & Johnson, 1953)에서 40% 정도(Parthuangwong & Amnuaykit, 1987)의 수량감소를 가져온다. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*에 의한 들불병은 자연감염과정에서 불마름병과 동시에 발생하여 큰 피해를 주는 병으로 최근 국내 많은 지역에서 발생하고 있다(Kim *et al.*, 2010; Myung *et al.*, 2009). *P. savastanoi* pv.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-53-663-1110 (E-mail) sky3832@korea.kr

<Received 14 January, 2013; Revised 28 February, 2013; Accepted 18 March, 2013>

*glycinea*에 의해 발생하는 세균점무늬병은 국내와 미국에서 5~18%의 경제적 손실을 가져온다(Hartman *et al.*, 1999). *P. syringae* pv. *syringae*에 의한 세균갈색점무늬병은 국내 발생보고(The Korean Society of Plant Pathology, 2009)는 있으나 그 발생은 미비하다. 하지만 남아프리카 지역의 강낭콩에서 55%의 수확량 감소를 가져온다고 보고되어있다 (Muedi *et al.*, 2011).

일반적으로 종자, 식물체 등에서 병원세균을 검출하는 방법은 반선택배지를 이용한 희석평판법, 혈청학적인 방법 및 분자생물학적인 방법 등 여러 가지 방법들이 개발되어 사용되고 있다(Walcott, 2003). 콩의 종자에서 *X. axonopodis* pv. *glycines*의 검출을 위한 반선택배지 방법이 보고되어 있으나(Prathuangwong *et al.*, 1994), *Pseudomonas*와 *Pectobacterium* 등의 세균이 동시에 분리될 뿐만 아니라 정확성과 시간적 측면에서 비효율적이다. Hong *et al.*(2007)은 종자를 마쇄하지 않고 진탕배양한 현탁액에서 DNA를 추출하여 종자의 오염정도를 조사하였으며, Lee *et al.*(2009)은 DNA의 추출

없이 종자침출액을 이용하여 불마름병균을 검출할 수 있는 직접 PCR방법을 개발하였다. 또한, 각각의 균주들에 대한 특이독소를 이용한 PCR 진단법이 보고된 바 있다(Bereswill *et al.*, 1994; Lydon & Patterson, 2001; Oh *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 1998). 그러나, 세균병의 경우 초기 병징이 매우 유사하며, 다른 진균병이나 바이러스병과 복합감염이 되었을 때 병징을 육안으로 확인하기에는 매우 어렵다. 또한 단일 진단시에는 다중진단에 비해 많은 시간과 비용이 들어가는 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 콩에 발생하는 세균병의 특이 독소 유전자를 진단대상으로 하는 각각의 특이 진단 프라이머를 선별한 후에 이들을 이용하여 4종을 동시에 검출할 수 있는 다중진단법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

시험용 세균

X. axonopodis pv. *glycines* 8ra는 국립식량과학원 기능성

Table 1. Bacterial strains used for Multiplex PCR in this study.

Bacterial species	Strain	Source
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KACC ^a 14021	Rhizosphere soil
<i>P. cichorii</i>	KACC10524	Unknown
<i>P. fluorescens</i>	KACC12332	Rhizosphere soil
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	KACC13263	Soybean
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	KACC10575	Bean
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	KACC10591	Kiwifruit
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	KACC13262	Unknown
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	KACC10604	Soybean
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	KACC10439	Soybean
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	KACC12839	Unknown
<i>P. viridiflava</i>	KACC10523	Unknown
<i>Rhizobium</i> sp.	KACC10995	Soybean
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	KACC10161	Unknown
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KACC10315	Unknown
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	8ra	Soybean
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	KACC10491	Unknown
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	KACC10377	Cabbage
<i>X. campestris</i> pv. <i>carotae</i>	KACC10164	Carrot
<i>X. campestris</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	KACC10460	Unknown
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC11153	Unknown
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	KACC12972	Unknown

^aKACC, Korean Agricultural Culture Collection.

작물부에서 보관 중이던 균주를 사용하였으며, 나머지 20개 세균은 농촌진흥청 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양받았다(Table 1). 모든 세균은 -70°C 초저온 냉동고에 보존하면서, PDA배지(Potato dextrose agar medium)와 TSA배지(Tryptic soy agar medium)에서 배양하여 실험에 사용하였다.

프라이머 제작

목표 유전자의 염기서열은 NCBI GenBank에서 박테리옌(bacteriocin)과 파이토크신(phytoalexin) 유전자를 탐색하여, DNASTAR 프로그램에서 각각의 진단 프라이머를 설계하였다. 블라름병의 glycinecin A 유전자는 AF281069, 들불병의 tabtoxin 유전자는 DQ187985, 세균점무늬병의 coronatine 유전자는 U09027과 세균갈색점무늬병의 syringopeptin 유전자는 AF286216 유전정보를 프라이머 설계에 이용하였다. 설계된 각각의 진단 프라이머들은 1차 선발과정에서 채

택된 순방향 10개 프라이머와 역방향 11개 프라이머를 2차 선발에 이용하였다(Table 2). 선발된 프라이머들은 세균 4종의 다중진단을 위해 15가지 종류로 조합하였다(Table 3).

PCR 조건 및 전기영동

세균의 검출을 위한 모든 PCR은 PCR PreMix(BioNeer Co., Korea)를 사용하였으며, 단일 PCR의 경우에는 프리믹스 10 µl에 주형 1 µl, 프라이머 각 1 µl(20 pmol), 멸균수 7 µl를 첨가하여 최종 부피를 20 µl로 하였다. PCR 증폭은 95°C에서 10분간 처리 후, 94°C에서 30초, 63°C에서 45초, 72°C에서 45초의 조건으로 40 cycle을 수행한 뒤 72°C에서 10분간 처리하였다. 다중 PCR의 경우 프리믹스 10 µl에 주형 4종 각 0.5 µl, 프라이머 8종 각 0.5 µl(20 pmol), 멸균수 4 µl를 첨가하여 최종 부피를 20 µl로 하여 반응시켰으며, PCR 조건은 단일 PCR의 방법과 동일하게 하였다. 본 실험에 사용된 주형들은 PDA배지에서 배양된 세균들을 멸균수

Table 2. Primer sequences designed for multiplex PCR assay.

Target gene	Primer name		Oligonucleotide sequence(5'→3')	Length	Position ^a
Glycinecin A	GAB-N40	Forward	TTGATCCCCGTCGTCTTTCCATA	24	920-943
	GAB-C30	Reverse	AGCGCAGCCTTGAGGTCTATTTGA	24	1176-1199
	GAB-C20		GCTCGGCTCGGCATACCTTTCCCTC	24	1409-1432
Tabtoxin	TB-N10	Forward	CAGGGCCAACGCAGCGAAGAACA	23	472-494
	TB-N40		GCGCCTGCGTTTGCTTCTGC	20	2256-2275
	TB-N50		GGGCGTCGGCTAAACTCGTGCTA	24	6169-6192
	TB-N60		GCGCCGCATACCGATAACTTTGAG	24	8980-9003
	TB-C50	Reverse	CCCGGCCGATGCACTGGTCCTC	22	1188-1209
	TB-C30		CAGGTGTGCCCGCCGAATAACG	23	1248-1270
	TB-C20		CCCGGAAGATGAAGGCGTAAACA	24	6708-6731
	TB-C10		TGTCGCGCATTGCAGATTTAGAA	24	9833-9856
	Cfl-N20		TTGCGATCAGTCATTCAGCGTTACA	25	425-449
Coronatine	Cfl-N30	Forward	TGGAAATCGGCGCAGTGACAG	21	986-1006
	Cfl-N35		CCGGCACCACAGGAATAACTAAGG	24	1274-1297
	Cfl-C50		CGACGAGGCGCCGATTGATAG	21	1010-1030
	Cfl-C40	Reverse	GCTAGGCGGCCGCTTACTTG	20	1220-1239
	Cfl-C30		CTCAGCGGCAGTCGTTGTAGCA	22	1514-1535
Syringopeptin	SP-N40	Forward	CGCCTTTATGGTGCTGGACTCTTT	24	36159-36182
	SP-N50		TTCAACGACACAGCCACCCTTAT	24	50926-50949
	SP-C30	Reverse	CAGGTTGGCCGGTACATTGATT	22	36492-36513
	SP-C10		TGCCCGGTCCTACTTACTT	21	51662-51682

^aThe nucleotide position of the genes encoding enzymes for glycinecin A, tabtoxin, coronatine and syringopeptin sequences based on NCBI accession number AF281069, DQ187985, U09027 and AF286216, respectively.

Table 3. Combinations of primers for multiplex PCR.

No.	Primer pair I	Expected PCR product (bp)	Primer pair II	Expected PCR product (bp)	Primer pair III	Expected PCR product (bp)	Primer pair IV	Expected PCR product (bp)
1	Cfl-N35 Cfl-C30	262	SP-N40 SP-C30	355	GAB-N40 GAB-C20	513	TB-N50 TB-C20	563
2	Cfl-N35 Cfl-C30	262	GAB-N40 GAB-C20	513	TB-N50 TB-C20	563	SP-N50 SP-C10	757
3	Cfl-N35 Cfl-C30	262	SP-N40 SP-C30	355	GAB-N40 GAB-C20	513	TB-N60 TB-C10	877
4	Cfl-N35 Cfl-C30	262	GAB-N40 GAB-C20	513	TB-N60 TB-C10	877	SP-N50 SP-C10	757
5	GAB-N40 GAB-C30	280	SP-N40 SP-C30	355	TB-N40 TB-C30	481	Cfl-N30 Cfl-C30	550
6	GAB-N40 GAB-C30	280	TB-N40 TB-C30	481	Cfl-N30 Cfl-C30	550	SP-N50 SP-C10	757
7	GAB-N40 GAB-C30	280	SP-N40 SP-C30	355	TB-N40 TB-C30	481	Cfl-N20 Cfl-C50	606
8	GAB-N40 GAB-C30	280	TB-N40 TB-C30	481	Cfl-N20 Cfl-C50	606	SP-N50 SP-C10	757
9	GAB-N40 GAB-C30	280	SP-N40 SP-C30	355	TB-N40 TB-C30	481	Cfl-N20 Cfl-C40	815
10	GAB-N40 GAB-C30	280	TB-N40 TB-C30	481	SP-N50 SP-C10	757	Cfl-N20 Cfl-C40	815
11	GAB-N40 GAB-C30	280	SP-N40 SP-C30	355	TB-N50 TB-C20	563	Cfl-N20 Cfl-C40	815
12	GAB-N40 GAB-C30	280	TB-N50 TB-C20	563	SP-N50 SP-C10	757	Cfl-N20 Cfl-C40	815
13	SP-N40 SP-C30	355	GAB-N40 GAB-C20	513	TB-N50 TB-C20	563	Cfl-N20 Cfl-C40	815
14	GAB-N40 GAB-C20	513	TB-N50 TB-C20	563	SP-N50 SP-C10	757	Cfl-N20 Cfl-C40	815
15	SP-N40 SP-C30	355	GAB-N40 GAB-C20	513	TB-N10 TB-C50	738	Cfl-N20 Cfl-C40	815

1 ml에 현탁($10^4 \sim 10^5$ CFU/ml)한 것으로 PCR에 직접 이용하였다. PCR로 증폭된 생산물은 0.5×TBE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 이용하여 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동 한 후에 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 증폭된 생산물의 크기는 100 bp DNA ladder (BioNeer)와 비교하여 결정하였다.

채집 시료의 검정

진주, 의성, 익산과 나주에서 채집된 시료의 진단을 위하여 선발된 다중진단 프라이머 조합을 이용하여 Direct PCR을 실시하였다. 병반 부위를 0.5×0.5 mm 크기로 자른 5~10 조각을 표면살균하여 1 ml 멸균수에 침지하여, 교반배

양기에서 200 rpm, 1시간 배양하여 PCR에 이용하였다. 표 면살균은 70% 에탄올에 30초, 1% 차아염소산나트륨 용액에 30초 침지하여 소독한 후 멸균수로 세척하였다.

결과 및 고찰

콩에 발생하는 불마름병균, 들불병균, 세균점무늬병균과 세균갈색점무늬병균의 4종을 동시에 진단할 수 있는 다중진단 프라이머 조합을 개발하기 위하여 1차적으로 각각의 병원세균에만 특이적으로 반응하는 프라이머들을 선발하였다(Table 2). 선발된 프라이머들을 이용하여 15가지의 다중진단 프라이머 종류로 조합(Table 3)하여 4종의 병원세균에

대한 특이성을 검정하였다. 15개 조합을 이용하여 multiplex PCR을 하였을 때 3, 7, 9와 11번 조합이 4가지 병원균에 대하여 특이적인 반응을 나타내었다. 최종적으로 비특이적 반응이 없으며, 예상된 생산물의 크기와 정확히 일치하는 11번 조합이 선발되었다(Fig. 1). 11번 조합의 프라이머는 280 bp의 불마름병(glycinecin A), 355 bp의 세균갈색점무늬병(syringopeptin), 563 bp의 들불병(tabtoxin), 815 bp의 세균점무늬병(coronatine)으로 구성되어 있다. 11번 조합의 정확한 다중검정이 이루어지는지 확인하기 위하여 4종의 다중

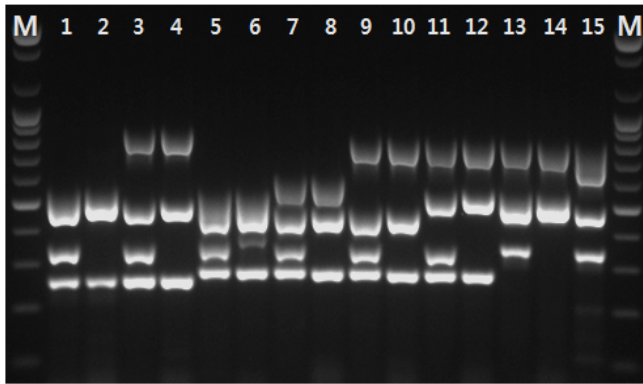


Fig. 1. Multiplex PCR performed with primer combinations (Table 3). M, size marker (100 bp DNA ladder); *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8ra, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* KACC10439, *P. savastanoi* pv. *glycinea* KACC13263 and *P. syringae* pv. *syringae* KACC10604 were used in all lanes.



Fig. 2. PCR products amplified with four pathogens by PCR primer set (No. 11 in table 3) in other to identify the nonspecific reactions. Lanes: M, DNA size marker (100 bp DNA ladder); 1, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8ra (Xag); 2, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* KACC10604 (Pss); 3, *P. syringae* pv. *tabaci* KACC10439 (Pst); 4, *P. savastanoi* pv. *glycinea* KACC13263 (Psg); 5, Xag+Pss; 6, Xag+Pst; 7, Xag+Psg; 8, Pss+Pst; 9, Pss+Psg; 10, Pst+Psg; 11, Xag+Pss+Pst; 12, Xag+Pss+Psg; 13, Xag+Pst+Psg; 14, Pss+Pst+Psg; 15, Xag+Pss+Pst+Psg.

진단 프라이머 세트를 이용하여 주형을 1종, 2종, 3종, 4종으로 첨가하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 1종, 2종, 3종, 4종의 세균에 대해 단독 또는 동시적으로 정확한 진단이 이루어지는 것이 확인되었다(Fig. 2). 또한 11번 세트에 대한 다른 균주들의 비특이적 밴드의 확인을 위하여 KACC에서 분양받은 17종의 세균을 주형으로 하여 PCR을 실시하였다. 그 결과, lane 1에서 대상 병원세균의 4종 혼합에서 목적 밴드가 모두 검출되었다. 또한 lane 2에서 *X. campestris* pv. *glycinea* KACC10491(glycinecin A), lane 16에서 *P. syringae* pv. *tomato* KACC12839 (coronatine), lane 17에서 *P. syringae* pv. *coronafaciens* KACC13262(tabtoxin)이 검출되었으며, 다른 비특이적 반응은 확인되지 않았다(Fig. 3). Lane 1의 목적 밴드 외에 확인된 lane 2, 16, 17의 밴드는 이미 보고된 병원세균의 특이독소와 그 결과가 일치하였다 (Lydon & Patterson, 2001). 포장에서 채집된 시료의 Direct 다중 PCR 진단에서는 10 lane을 제외한 모든 시료에서 불마름병이 확인되었으며, 4와 5 lane에서 들불병이 복합감염



Fig. 3. PCR product amplified with bacterial strains by multiplex PCR primer set (No. 11 in table 3) in other to identify the nonspecific reactions. Lanes: M, DNA size marker (100 bp DNA ladder); 1, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8ra+*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* KACC10439+*P. savastanoi* pv. *glycinea* KACC13263+*P. syringae* pv. *syringae* KACC10604; 2, *X. axonopodis* pv. *glycines* KACC10491; 3, *P. viridiflava* KACC10523; 4, *P. cichorii* KACC10524; 5, *Rhizobium* sp. KACC10995; 6, *P. fluorescens* KACC12332; 7, *X. oryzae* pv. *oryzicola* KACC12972; 8, *P. aeruginosa* KACC14021; 9, *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* KACC10161; 10, *X. campestris* pv. *carotae* KACC10164; 11, *X. campestris* pv. *campestris* KACC10377; 12, *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* KACC10460; 13, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* KACC10575; 14, *P. syringae* pv. *actinidiae* KACC10591; 15, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC11153; 16, *P. syringae* pv. *tomato* KACC12839; 17, *P. syringae* pv. *coronafaciens* KACC13262; 18, *X. axonopodis* pv. *citri* KACC10315.

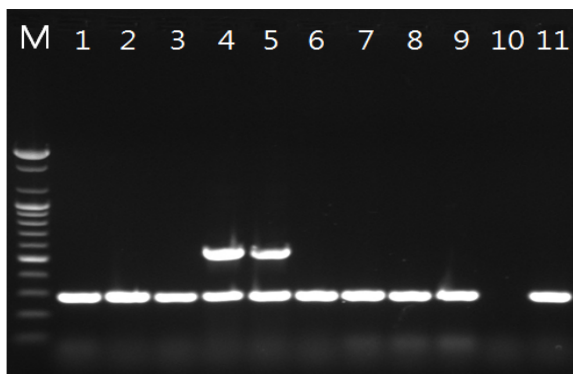


Fig. 4. Direct multiplex PCR detection of infected soybean leaf in soybean field. Lanes: M, DNA size marker (100 bp DNA ladder); 1~3, collected samples in Jinju; 4, 5, collected samples in Uiseong; 6~7, collected samples in Iksan; 9~11, collected samples in Naju.

되어 있는 것이 확인 되었다(Fig. 4).

선발된 단일 균주에 대한 다중 프라이머 조합의 경우 다중진단 뿐만 아니라 단일진단에서도 이용가능하며, 다중진단 프라이머 세트의 경우 기존 보고된 어떠한 진단법에 비해 시간과 비용을 줄일 수 있다. 또한, 이들 병해의 세균성독소 연구와 병원성 연구에 중요한 기초자료를 제공할 것이다. 콩에서 발생하는 병원세균의 경우 종차감염이 되지만, 육안으로 감염종자를 구별하기는 매우 어렵다. Lee *et al.* (2009)은 콩 종자의 침출액에서 *X. axonopodis* pv. *glycines*를 검정하는 방법을 개발하였다. 이 방법을 이용한다면 종자뿐 아니라 감염된 식물체에서도 감염된 세균을 검출해낼 수 있을 것이며, 본 연구에서 개발된 다중 진단프라이머 조합을 이용한다면 더욱 빠른 시간에 발생된 병을 진단할 수 있을 것이다. 선발된 다중 프라이머 조합은 각 병원균이 생산하는 서로 다른 박테리오신(bacteriocin)이나 파이토톡신(phytotoxin)을 생산하는데 관련된 유전자를 이용한 진단 프라이머들이다. 그러나, 기존 병원세균과 동일한 박테리오신(bacteriocin)을 분비하는 새로운 병원균이 발생할 경우에는 이번 다중 진단법으로는 구별이 어렵다. Bereswill *et al.*(1994)은 coronatine을 분비하는 *P. syringae* 계통들의 구분을 위하여 제한효소 *Cla* I, *Pst* I, *Sma* I를 이용한 PCR-RFLP 방법을 제안하였다. 금후 PCR-RFLP 방법을 이용하여 동일한 박테리오신(bacteriocin)이나 파이토톡신(phytotoxin)을 분비하는 균주의 구별방법에 대한 연구가 필요할 것이다.

적 요

국내 콩에서 발생하는 세균병해인 불마름병, 들불병, 세

균점무늬병, 세균갈색점무늬병의 다중 진단을 위한 PCR 방법을 요약하면 다음과 같다.

1. 콩에 발생하는 각각의 세균들은 서로 다른 박테리오신(bacteriocin)이나 파이토톡신(phytotoxin)을 생산하는데 이와 관련한 유전자를 목적으로 하여 진단프라이머를 설계하였다.
2. 불마름병은 glycinecin A, 들불병은 tabtoxin, 세균점무늬병은 coronatine과 세균갈색점무늬병은 syringopeptin을 목적유전자로 하여 다중 진단프라이머 조합을 설계하였다.
3. 1차 선발로 각각의 균주에 대한 단일 진단 프라이머를 선발하였으며, 여기서 선발된 21개의 프라이머들을 조합하여 4종 다중진단프라이머 선발을 위한 2차 선발에 이용하였다. 최종적으로 280 bp의 불마름병, 355 bp의 세균갈색점무늬병, 563 bp의 들불병과 815 bp의 세균점무늬병으로 구성된 다중진단 프라이머 조합이 개발되었다.
4. 선발된 4종 다중 진단 프라이머 조합의 경우 다른 세균들과의 비특이적 반응이 있는지 확인하기 위한 3차 선발을 거쳐 그 특이성을 검증하였다.

인용문헌

- Bereswill, S., P. Bugert, B. Völsch, M. Ullrich, C. Bender, and K. Geider. 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.
- Hartman, G. L., J. B. Sinclair, and J. C. Rupe. 1999. *Compendium of soybean diseases*. 4th ed. The American Phytopathological Society. p. 5.
- Hartwig, E. E. and H. W. Johnson. 1953. Effect of the bacterial pustule disease on yield and chemical composition of soybeans. *Agron. J.* 45 : 22-23.
- Hong, S. J., Y. K. Hong, B. C. Lee, M. J. Lim, Y. N. Yoon, J. B. Hwang, S. B. Song, and S. T. Park. 2007. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and survey on seed contamination in soybean seeds using PCR assay. *Res. Plant Dis.* 13 : 145-151.
- Kim, H. J., J. Y. Oh, D. K. Kim, H. T. Yun, W. S. Jung, J. K. Hong, and K. D. Kim. 2010. Evaluation of disease occurrence by cultivar, sowing date and locational difference in Korean soybean fields. *Res. Plant Dis.* 16 : 176-182.
- Kim, Y. U. and J. H. Cho. 2005. Growth and yields of Korean soybean cultivars in drained-paddy field. *Korean J. Crop Sci.* 50 : 161-169.

- Lee, Y. J., M. H. Kang, T. H. Noh, D. K. Lee, G. H. Lee, and S. J. Kim. 2009. Direct PCR detection of the causal agents, soybean bacterial pustule, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* in soybean seeds. Res. Plant Dis. 15 : 83-87.
- Lydon, J. and C. D. Patterson. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. Letters in Applied Microbiology 32 : 166-170.
- Muedi, H. T., H. D. Fourie, and N. W. McLaren. 2011. Characterization of bacterial brown spot pathogen from dry bean production areas of south Africa. African Crop S. J. 19 : 357-367.
- Myung, I. S., J. W. Kim, S. H. An, J. H. Lee, S. K. Kim, Y. K. Lee, and W. G. Kim. 2009. Wildfire of soybean caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, a new disease in Korea. Plant Dis. 93 : 1214.
- Oh, C. S., S. G. Heu, and Y. C. Choi. 1999. Sensitive and pathovar-specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* by DNA hybridization and polymerase chain reaction analysis. Plant Pathol. J. 15 : 57-61.
- Parthuangwong, S. and K. Amnuaykit. 1987. Studies on tolerance and rate reducing bacterial pustule of soybean cultivars/lines. Kesetsart J. of Nat. Sci. 21 : 408-426.
- Prathuangwong, S., K. Khandej, and M. Goto. 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.
- Sorensen, K. N., K. H. Kim, and J. Y. Takemoto. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 226-230.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea. 5th ed. 853 pp.
- Walcott, R. R. 2003. Detection of seedborne pathogens. HortTechnology 13 : 40-47.