



# 수박 과일썩음병을 일으키는 *Acidovorax citrulli*에 감염된 종자 검출을 위한 SYBR Green Real-Time PCR 방법

## Detection of *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Watermelon Bacterial Fruit Blotch, in Infected Seeds by SYBR Green Real-Time PCR

### \*Corresponding author

Tel: +82-63-238-3276

Fax: +82-63-238-3838

E-mail: hhham@korea.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-4795-1773>

최한석 · 기수진 · 이용환 · 함현희\*

농촌진흥청 국립농업과학원 식물병방제과

Han Suk Choi, Sujin Ki, Yong Hwan Lee, and Hyeonheui Ham\*

Plant Disease Control Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Acidovorax citrulli* is a seed-borne bacterium that causes bacterial fruit blotch (BFB) in cucurbit crops such as watermelon and melon. Contaminated seeds for watermelon cultivation can cause severe harvest losses. In this study, seed preparation conditions were optimized to enhance SYBR green real-time polymerase chain reaction detection of low-level *A. citrulli* in watermelon seeds, facilitating healthy seed selection. Watermelon seeds artificially inoculated with *A. citrulli* were processed using different soaking duration, with or without direct grinding, and various DNA extraction kits to compare the detection levels. The highest detection efficiency was obtained when DNA was extracted with a soil kit after either 24 hr of soaking or direct seed grinding. Furthermore, the optimized method successfully detected *A. citrulli* in seeds collected from watermelon fruits exhibiting BFB symptoms. These results indicate that the optimized detection conditions can be used to screen seed affected by BFB in watermelon.

**Keywords:** *A. citrulli*, Cucurbit crop, Seed-borne bacterium, Seed preparation, Watermelon seed

Received October 27, 2025  
Revised November 28, 2025  
Accepted November 30, 2025

박과 작물인 멜론, 수박, 오이 및 호박에서 과일썩음병(bacterial fruit blotch)을 일으키는 *Acidovorax citrulli*는 종자 전염성 병원균으로 1965년 미국에서 처음 보고되었다(Kim 등, 2015). 수박 과일썩음병은 주로 고온다습한 환경에서 발생한다. 과실 발달 초기에는 병징이 잘 나타나지 않으며, 수확 시기에 무르고 부패하여 큰 피해를 초래한다(Burdman과 Walcott, 2012; Lee 등, 2024).

국내에서 수박 과일썩음병은 1991년 전북 고창에 위치한 수박 재배 농가에서 최초로 보고된 이후 주기적으로 큰 경제적 피해를 유발하고 있다(Kim 등, 2021). 이병 종자는 외관상으로

는 건전 종자와 구별이 어려우며, 파종 후 병원균이 유모로 전이되어 1차 전염원으로 작용한다(Song 등, 2015). *A. citrulli*의 수박 종자 감염에는 크게 두 가지 경로가 있다. 첫째, 개화 후 약 2주 동안 과피에 왁스층이 형성되기 전 병원균이 과피 표면의 기공을 통해 내부로 침투하여 전형적인 과일썩음병 병반을 보인다(Frankle 등, 1993). 두 번째 경로는 병원균이 암술 주두에 정착한 뒤 화주를 따라 지방으로 이동하여 종자를 감염시키며, 무증상 과일에서도 감염된 종자가 형성될 수 있다(Dutta 등, 2015; Walcott 등, 2003). 과피 경로로 감염된 종자에서는 주로 종피 하부의 perisperm-endosperm (PE) 층에 병원균이 국한되는 반면, 암술 경로로 감염된 종자에서는 배(embryo)와 PE 층에서 균이 검출된다(Dutta 등, 2012a). 배와 배유에 깊숙이 위치한 균은 종자 저장 중 생존 가능성이 높고, 외부에서 액상 소

독 과정에서 제거 효율이 낮은 것으로 보고되어 있다(Dutta 등, 2016). 병원균 검출을 위해 균주의 분리 배양법, 면역학적 진단법, 유묘 검정 등이 이용되어 왔으나, 검출 시간, 특이성 그리고 효율성 측면에서 한계를 지닌다(Giovanardi 등, 2018; Gitaitis와 Walcott, 2007). 최근에는 분자생물학적 진단법이 부상하였으며, 특히 *A. citrulli* 검출을 위해 real-time polymerase chain reaction (PCR)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Ham 등, 2024; Tian 등, 2016; Zhao 등, 2022). 하지만 PCR 반응을 위한 종자 마쇄 또는 핵산 추출 과정에서 다량의 다당류, 폴리페놀 화합물 등이 함께 추출되어 PCR 반응에 영향을 줄 수 있으며, 검출에 정확성을 저하시킬 수 있다(Wang 등, 2021). 또한, 자연 감염 종자 내 병원균의 초기 밀도는 매우 낮아 직접 검출이 어려울 수 있다(Dutta 등, 2012a). 이러한 문제들을 해결하기 위해 일반적으로 종자 마쇄(Dutta 등, 2012b), 종자 침지(Öztürk와 Basim, 2022), 종자 침지액을 선택 배지에서 배양하여 증균(Zhao 등, 2009), DNA 추출 과정에서 polyvinylpyrrolidone을 이용한 PCR 저해 물질을 제거하는(Walcott와 Gitaitis, 2000) 방법 등이 사용되고 있다. 이런 방법들은 추가 배양으로 시간이 연장되고, 화학물질의 첨가, 특수 배지 제조 등의 실험적 어려움을 수반한다. 따라서 종자 내부의 병원균을 신속하고 정확하게 검출하기 위해서는 보다 효율적인 종자 처리 조건의 확립이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 Ham 등(2024)이 개발한 SYBR green real-time PCR을 통해 수박 종자에 감염된 수박 과일썩음병의 *A. citrulli* 검출 효율을 높이기 위해 종자로부터 세균의 추출을 위한 최적 조건을 구명하고, 기존에 시판되고 있는 DNA 추출 키트 3종을 대상으로 수박 종자 시료의 처리 조건을 비교분석하여 최적의 전처리 조건을 확립하였다. 또한 실제 *A. citrulli*에 감염된 수박에서 종자를 채취하여 전처리 방법을 검증하였다.

**인공감염 종자를 활용한 검출법 최적화.** 수박 종자 30 g을 70% 에탄올에 30분간 침지한 후 1% sodium hypochlorite에 30분간 침지하여 소독하고, 멸균 증류수로 3회 세척한 후 24시간 동안 침지하였다. 인공감염 종자를 생산할 때 *A. citrulli*의 농도를  $10^7$  cells/ml로 감압 처리 시 종피 및 종자 내부에 감염된다고 보고되어 있다(Kim 등, 2021). 이를 근거로 병원균 *A. citrulli* KACC 17001 균주를 48시간 동안 배양 후 멸균 증류수를 이용하여 세균 농도  $OD_{600}=0.1$  ( $4.1 \times 10^7$  cells/ml)로 맞추었다. 종자 30 g에 병원균 현탁액 250 ml를 넣어 1시간 동안 90 kPa에서 감압 처리한 후 실온에서 200 rpm으로 교반하여 병원균을 종자에 침투시키고 24시간 동안 무균 작업대에서 건조하였다. 대조군(control)은 병원균 대신 멸균 증류수 50 ml를 넣고 종자를

**Table 1.** Comparison of mean Ct of seed suspensions according to soaking time and DNA extraction kit

Seed soaking time (hr)	Bacterial DNA extraction kit (n=3)	Plant DNA extraction kit (n=3)	Soil DNA extraction kit (n=3)
Control	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND
1	34.41±1.56	34.67±0.17	37.38±1.76
3	32.97±0.39	32.57±0.62	36.74±1.98
5	33.94±0.25	33.76±1.38	31.34±0.32
10	29.75±0.58	32.77±0.27	29.87±2.93
24	31.24±0.07	31.60±0.97	26.19±2.61

Values are presented as cycle threshold (Ct)±standard deviation. ND, not detected.

감압 처리한 후 건조하였다.

인공감염 종자 1 g을 멸균 증류수 5 ml에 넣고 온도 27°C 및 200 rpm으로 0, 1, 3, 5, 10, 24시간 침지하였으며 각각의 처리구를 3반복(n=3)으로 실험하였다. 침지 후 현탁액에서 DNA를 추출하기 위해 bacterial (Promega, Madison, WI, USA), plant (Qiagen, Hilden, Germany) 및 soil DNA extraction kit (MP Bio, Santa Ana, CA, USA)를 사용하였다(Table 1). *A. citrulli* 검출을 위한 SYBR green real-time PCR 조건 및 primer는 기존 연구 결과(Ham 등, 2024)와 동일하게 수행하였다. PCR 결과, 3종의 DNA 추출 키트 모두에서 침지 시간이 길수록 cycle threshold (Ct) 값이 낮아지며 검출 효율이 증가하는 경향을 보였다(Table 1). 특히 soil DNA extraction kit (soil kit)로 DNA 추출 시 종자를 3시간 침지한 경우 Ct 값(36.74±1.98)이 높아 검출 효율이 낮았으나, 24시간 침지 후 Ct 값(26.19±2.61)이 감소하여 장시간 침지가 병원균 검출 효율을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다. 이러한 종자 침지는 종피 표면 및 내부 조직에 잔존하는 세균이 침지액으로 용출 및 확산하도록 하여 병원균 회수에 기여하였을 것으로 사료되며 선행 연구에 따르면, 이러한 침지 과정은 종자 내 병원균을 침지액으로 용출시켜 검출 효율을 높인다고 보고되었다(Grabicoski 등, 2015). 또한, 침지 과정에서 종자에서 용출된 탄소, 질소원 등이 제한적인 영양원으로 작용하여 침지액 내로 용출된 병원균이 증식했을 가능성이 있으며(Martins 등, 2018), 최종적인 병원균 검출 효율성을 향상하는데 기여한 것으로 사료되었다. 그리고 유럽 및 지중해 식물보호 기구(EPPO)에서 수박 종자에서 *A. citrulli*를 진단하기 위해 종자를 24시간 침지하여 병원균을 추출하는 절차를 권장하는 것과 일치하는 결과이다(EPPO, 2016).

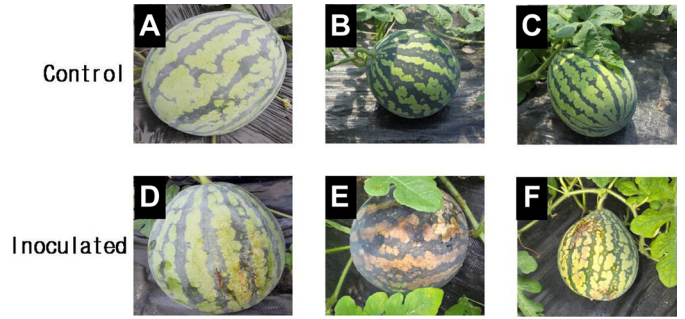
**Table 2.** Effect of soaking time after seed grinding and DNA extraction kit on mean Ct values

Seed soaking time (hr)	Bacterial DNA extraction kit (n=3)	Soil DNA extraction kit (n=3)
Control	ND	ND
0	ND	25.94±0.29
1	26.08±0.52	27.79±0.18
5	26.16±0.50	26.28±0.21
10	26.71±0.01	28.20±1.02

Values are presented as cycle threshold (Ct)±standard deviation. ND, not detected.

마쇄에 따른 침지 효과의 검출 효율을 비교하기 위해 액체질소를 이용하여 종자 마쇄 후 0.04 g씩 3회 반복 채취하여 soil kit로 각각의 시료로부터 DNA 추출하였다. 병원균을 검출한 결과 Ct 값이 25.94±0.29로 24시간 동안 종자를 침지한 후 병원균을 검출한 결과와 비슷한 양상을 보였다(Table 2). Giovanardi 등(2018)의 연구에서는 종자를 분쇄하였을 때보다 침지하였을 때 PCR 증폭 효율이 더 높다고 보고되어 있다. 이는 분쇄 과정에서 방출되는 다량의 전분립(starch granules)과 같은 PCR 저해 물질이 방출되기 때문이라고 설명하였다. 이에 PCR 증폭 효율을 위해 단순 침지 방법으로는 24시간 침지 후 soil kit로 DNA를 추출하는 방법이 효율적이다. 반면 마쇄는 암술을 통해 감염된 종자의 내부 PE 층뿐만 아니라 배에 존재하는 병원균을 검출함으로써 정확성을 높인다고 보고되어 있다(Dutta 등, 2016). 따라서 종자의 내외부에 존재하는 병원균을 모두 검출하기 위해서는 종자의 마쇄와 PCR 저해 물질을 정제하기 위한 DNA 추출 방법을 병행하는 것이 효율적이라고 사료된다.

**자연감염 종자를 활용한 검출법 검증.** 국립농업과학원 비닐하우스에서 2024년(품종: ‘Uri-kkul’)과 2025년(품종: ‘Dangdangha’, ‘Sambok-kkul’)에 수박을 재배하였다. 과일썩음병 발병을 위해 *A. citrulli* KACC 17001 (균주 농도 OD<sub>600</sub>=0.1, 5.12×10<sup>7</sup> cells/ml) 현탁액을 제조하여 수정된 암꽃에 접종 및 인공수분 후 2, 3, 4주째에 과피 표면에 분무 접종하였다(Fig. 1). 각 품종마다 병원균 무처리군과 병징이 나타난 수박을 각각 3통씩 수확하고 종자를 채종하였다. 채종한 종자를 70% 에탄올에 30분 침지한 후 1% sodium hypochlorite에 30분간 침지하여 소독하고, 멸균 증류수에 3회 세척한 후 48시간 동안 상온에서 건조하였다. 건조된 종자는 마쇄 후 0.3 g씩 3회 반복 채취하여 soil kit를 이용하여 각각의 시료로부터 DNA를 추출하였다. 실험 결과 2024년과 2025년에 채종한 종자에서 *A. citrulli*가 검출



**Fig. 1.** Watermelons were cultivated in a greenhouses in 2024 and 2025, respectively. (A-C) Inoculated with sterilized water, (D-F) inoculated with *Acidovorax citrulli* KACC 17001. Cultivars were (A, D) Uri-kkul, (B, E) Dangdanghan, and (C, F) Sambok-kkul.

**Table 3.** Mean Ct for control and treated watermelon seeds collected in 2024 and 2025

Year (cultivar)	Sample	Value (n=3)
2024 (Uri-kkul)	Control 1	ND
	Control 2	ND
	Control 3	ND
	Inoculated 1	32.67±0.66
	Inoculated 2	29.93±0.33
	Inoculated 3	31.83±0.13
2025 (Dangdanghan)	Control 1	ND
	Control 2	ND
	Control 3	ND
	Inoculated 1	28.63±0.47
	Inoculated 2	28.31±0.13
	Inoculated 3	29.20±0.32
2025 (Sambok-kkul)	Control 1	ND
	Control 2	ND
	Control 3	ND
	Inoculated 1	27.38±0.14
	Inoculated 2	27.76±0.15
	Inoculated 3	28.54±0.36

Values are presented as cycle threshold (Ct)±standard deviation. The seeds were ground, and DNA was then extracted using soil kit. ND, not detected.

되었으며, Ct 값은 2024년 종자(품종: ‘Uri-kkul’)에서 평균 31.48±1.40, 2025년 채종한 종자(품종: ‘Dangdanghan’, ‘Sambok-kkul’)에서 각각 평균 28.71±0.45와 27.89±0.59로 나타나 병원균이 안정적으로 검출되는 것을 확인하였다(Table 3). 이러한

결과는 종자를 마쇄한 후 soil kit로 DNA 추출하여 real-time PCR 수행할 경우 수박 내외부에 존재하는 병원균을 효율적으로 검출할 수 있음을 시사하였다.

## 요 약

*Acidovorax citrulli*는 박과 작물인 수박·멜론 등에 과일썩음병을 일으키는 종자 전염성 병원균이다. 수박 재배 시 *A. citrulli*가 오염된 종자를 사용하면 병원균이 기주에 감염하여 과실 수확 시 큰 피해를 끼칠 수 있다. 본 연구에서는 병원균이 오염된 수박 종자를 검출하고 건전 종자를 선별하기 위하여 SYBR green real-time PCR을 이용하여 수박 종자에 미량으로 존재하는 *A. citrulli*의 검출 효율을 높이기 위한 최적 전처리 조건을 확립하였다. *A. citrulli*를 인공 접종한 수박 종자를 침지 시간, 마쇄 여부 및 DNA 추출 방식을 다르게 하여 각각의 검출 농도를 비교하였다. 그 결과, 종자를 24시간 침지하거나 바로 마쇄한 후 soil kit로 DNA를 추출하여 real-time PCR 했을 때 검출 효율이 가장 높았다. 또한 최적화한 방법을 과일썩음병 발병 수박으로부터 채취한 종자에 적용한 결과 *A. citrulli*가 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에서 구명한 최적 검출 조건을 수박 과일썩음병 이병 종자의 선별에 활용할 수 있음을 시사한다.

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgments

This study was supported by Cooperative Research Program (Project No. PJ01727101) from the Rural Development Administration (RDA), Republic of Korea. This study was supported by 2025 the RDA Fellowship Program of National Institute of Agricultural Sciences, RDA.

## References

- Burdman, S. and Walcott, R. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Mol. Plant Pathol.* 13: 805-815.
- Dutta, B., Avci, U., Hahn, M. G. and Walcott, R. R. 2012a. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. *Phytopathology* 102: 461-468.
- Dutta, B., Ha, Y., Lessl, J. T., Avci, U., Sparks, A. C., Johnson, K. L. et al. 2015. Pathways of bacterial invasion and watermelon seed infection by *Acidovorax citrulli*. *Plant Pathol.* 64: 537-544.
- Dutta, B., Schneider, R. W., Robertson, C. L. and Walcott, R. R. 2016. Embryo localization enhances the survival of *Acidovorax citrulli* in watermelon seeds. *Phytopathology* 106: 330-338.
- Dutta, B., Vernaiz, M. A. C., Castro-Sparks, A. C., Scherm, H. and Walcott, R. R. 2012b. Location of *Acidovorax citrulli* in watermelon seeds affects efficiency of pathogen detection by seed health testing. *Seed Sci. Technol.* 40: 309-319.
- EPPO. 2016. PM 7/127 (1) *Acidovorax citrulli*. *EPPO Bull.* 46: 444-462.
- Frankle, W. G., Hopkins, D. L. and Stall, R. E. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. *Plant Dis.* 77: 1090-1092.
- Giovanardi, D., Sutton, S. A., Stefani, E. and Walcott, R. R. 2018. Factors influencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays. *Seed Sci. Technol.* 46: 93-106.
- Gitaitis, R. and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 371-397.
- Grabicoski, E. M. G., Jaccoud Filho, D. D. S., Pileggi, M., Henneberg, L., Pierre, M. L. C., Vrisman, C. M. et al. 2015. Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. *Sci. Agric.* 72: 69-74.
- Ham, H., Lee, B. W., Kim, K., Lee, W., Lee, Y. H. and Park, D. S. 2024. A novel and advanced diagnostic approach toward *Paracidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch in watermelon by direct SYBR green real-time PCR assay. *Plant Pathol. J.* 40: 671-680.
- Kim, S. W., Ju, H. J., Gwon, B. H., Adhikari, M., Kim, H. S., Park, M.-R. et al. 2021. Effect of microwave plasma on sterilization of *Acidovorax citrulli* infected watermelon seeds. *Res. Plant Dis.* 27: 8-16. (In Korean)
- Kim, Y.-T., Park, K.-S., Kim, H.-S., Lee, H.-I. and Cha, J.-S. 2015. Development of nested-PCR assay to detect *Acidovorax citrulli*, a causal agent of bacterial fruit blotch at Cucurbitaceae. *Res. Plant Dis.* 21: 74-81. (In Korean)
- Lee, S. M., Kim, G., Kim, H. and Choi, G. J. 2024. Screening method to identify watermelon cultivars resistant to *Acidovorax citrulli*, the cause of bacterial fruit blotch. *Plant Pathol. J.* 40: 593-602.
- Martins, S. J., Medeiros, F. H. V., Lakshmanan, V. and Bais, H. P. 2018. Impact of seed exudates on growth and biofilm formation of *Bacillus amyloliquefaciens* ALB629 in common bean. *Front. Microbiol.* 8: 2631.
- Öztürk, N. and Basim, H. 2022. A real-time PCR assay using locked nucleic acid probe for detection of *Acidovorax citrulli*. *J. Plant Dis. Prot.* 129: 395-409.
- Song, J. Y., Park, S. Y., Seo, M. W., Nam, M. H., Lim, H. S., Lee, S.-C. et al. 2015. Genetic characteristics of *Acidovorax citrulli* population causing bacterial fruit blotch against cucurbits in Korea. *Res.*

- Plant Dis.* 21: 82-88. (In Korean)
- Tian, Q., Feng, J.-J., Hu, J. and Zhao, W.-J. 2016. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by real-time PCR with propidium monoazide. *Sci. Rep.* 6: 35457.
- Walcott, R. R. and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 84: 470-474.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D. and Castro, A. C. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 93: 528-534.
- Wang, Q., Shen, X., Qiu, T., Wu, W., Li, L., Wang, Z. et al. 2021. Evaluation and application of an efficient plant DNA extraction protocol for laboratory and field testing. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 22: 99-111.
- Zhao, T., Feng, J., Sechler, A., Randhawa, P., Li, J. and Schaad, N. W. 2009. An improved assay for detection of *Acidovorax citrulli* in watermelon and melon seed. *Seed Sci. Technol.* 37: 337-349.
- Zhao, Z., Xiang, J., Tian, Q., Zhao, W., Zhou, T., Zhao, L. et al. 2022. Development of one-step multiplex RT-PCR assay for rapid simultaneous detection of five RNA viruses and *Acidovorax citrulli* in major cucurbitaceous crops in China. *Arch. Microbiol.* 204: 696.