

우리나라에서 분리된 참다래 꽃썩음병 병원세균(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)의 플라스미드와 Cu 저항성 유전자

박소연¹ · 한효심¹ · 이영선¹ · 고영진² · 신종섭³ · 정재성^{1*}

¹순천대학교 생물학과, ²순천대학교 식물외과, ³순천시 농업기술센터

Pseudomonas syringae pv. *syringae*는 우리나라에서 참다래 꽃썩음병의 원인세균으로 알려져 있다. 본 연구에서는 우리나라의 서로 다른 참다래 과수원에서 분리되어 동정된 11개 균주의 꽃썩음병균이 가지고 있는 플라스미드 양상을 pulsed-field 겔 전기영동으로 조사하였다. 그 결과 전체 균주들은 가지고 있는 플라스미드의 개수와 크기에 따라 6개 그룹으로 나누어 졌다. 플라스미드의 수는 0에서 4개, 크기는 22 kb에서 160 kb로 다양하였다. 이들 중 두 개의 플라스미드를 가지고 있는 그룹 III에 속하는 4균주가 Cu에 대한 저항성을 보였다. Southern blot hybridization 결과 Cu 저항성 유전자는 48 kb 크기의 플라스미드에 들어 있었다.

Key words □ copper resistance gene, kiwifruit, plasmid, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

우리나라에서 참다래[kiwifruit, *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson]에 발생하는 꽃썩음병은 껍질병과 함께 참다래 생산을 크게 감소시키는 주요 질병 중 하나이다. 꽃썩음병에 감염된 꽃은 열매를 맺지 못하고 떨어지거나 떨어지지 않더라도 기형과로 성장하게 되어 상품성을 잃게 된다. 특히 개화기인 5월 말경에 강우가 잦은 해에는 50% 이상 감수를 초래할 만큼 큰 피해를 주는 것으로 보고되고 있다(9).

참다래 꽃썩음병을 일으키는 원인세균에 대해 Wilkie 등(17)이 뉴질랜드에서는 *Pseudomonas viridiflava*라고 처음 보고한 이래 나라에 따라 *P. syringae* pv. *syringae*를 비롯한 *Pseudomonas* 속의 몇몇 종이 꽃썩음병에 관여하는 것으로 알려져 있다(3). 우리나라에서 분리된 꽃썩음병의 원인균은 *P. syringae* pv. *syringae* 인 것으로 보고된 바 있다(14).

대부분의 *P. syringae*의 pathovar들은 플라스미드에 다양한 유전자를 가지고 있다. 비록 플라스미드에 연관된 유전자에 대하여 알려진 바가 많지 않지만, 식물병원성 세균이 플라스미드를 가지고 있는 것이 보편적으로 세균에 유리하게 작용할 것으로 생각되고 있다(6). 특히 플라스미드가 세균 속에서 안정적으로 유지되는 사실은 플라스미드가 세균과 숙주 사이의 상호작용에 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다(10). 그렇기 때문에 플라스미드에 의해 암호화되는 유전자를 밝히는 일은 플라스미드와 세균과의 관계를 이해하게 함으로써 식물병원성 세균의 진화에 대한 추론을 가능하게 하고 있다. 지금까지 연구된 플라스미드에 연관된 유전자 중에는 비병원성(avirulence) 유전자(8), 식물독소인 coronatine 생합성 유전자(1)를 비롯하여 Cu 저항성유전자와

스트렙토마이신 저항성유전자(7, 15) 등이 보고되고 있다.

Cu 화합물은 세균 및 균류에 의한 식물병의 방제를 위해 폭넓게 사용되어 왔다. 그 결과 농업환경에서 Cu²⁺ 이온에 대해 저항성을 나타내는 많은 세균이 출현하게 되었다. 식물병을 일으키는 세균 중에는 *P. syringae* pv. *tomato* (4), *P. syringae* pv. *syringae* (15), *P. syringae* pv. *actinidiae* (13), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (5) 등에서 Cu 저항성이 보고되었다.

본 연구에서는 우리나라에서 분리된 참다래 꽃썩음병균인 *P. syringae* pv. *syringae* 균주들의 플라스미드 양상과 Cu 저항성과의 연관성을 조사하였다.

재료 및 방법

시험균주

우리나라의 참다래 과수원에서 채집하여 *P. syringae* pv. *syringae*로 동정된 11개 균주를 실험에 사용하였다(Table 1). 비교균주로는 우리나라에서 분리한 Cu 저항성 참다래 껍질병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3를 사용하였다. 균주들은 PS 배지(pepton 20 g, sucrose 20 g per liter)에 접종하여 28°C에서 배양하였다.

Cu 저항성 조사

참다래 꽃썩음병균의 Cu 저항성은 0, 0.5, 1.25, 3.0, 5.0 mM의 copper sulfate (CuSO₄)가 첨가된 3 ml의 PS배지에 10 μl의 배양액(OD₆₀₀=1.0)을 접종하고 28°C에서 48시간 진탕배양하여 최소저해농도를 측정함으로써 조사하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-61-750-3666, Fax: 82-61-750-3608
E-mail: jjung@sunchon.ac.kr

플라스미드 DNA의 분리

플라스미드의 분리는 Ausbel 등(2)의 방법을 변형하여 수행하였다. 각 세균 균주를 PS 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 얻었다. 여기에 200 µl의 용액 I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 200 µg/ml lysozyme, pH 8.0)을 넣어 현탁 시킨 후 실온에 10분간 방치하였다. 각 튜브에 400 µl의 용액 II (0.2 N NaOH, 1.0% SDS)를 넣고 얼음에 10분간 둔 뒤, 300 µl의 용액 III (1.32 M potassium acetate, pH 4.8)를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브에 옮겨 600 µl의 차가운 isopropanol을 넣어 -70°C에 두었다. 한 시간 후 22,250×g로 10분간 원심분리 하여 얻어진 침전물을 500 µl의 70% ethanol로 세척한 뒤 건조시켜 RNase가 첨가된 TE buffer에 녹여 보관하였다.

Pulsed-field 젤 전기영동

전기영동은 CHEF-DR II (Bio-Rad, USA)에서 0.65%의 Seakem agarose (Takara, Japan)와 0.5× TBE buffer를 사용하여 실시하였다. 14°C에서 6 V/cm로 8시간 전계 시킨 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

PCR primer 및 조건

Cu 저항성유전자의 일부를 증폭하기 위한 프라이머를 설계하기 위해 저항성 유전자 cluster들 중에서 상동성이 높은 부분으로 알려진 *copR*과 *copS*의 염기서열(11)로부터 PCR 프라이머를 설계하였다: *cop-F*; 5'-ACCTATCGGTTTGITGGCAC-3', *cop-R*; 5'-GCGATCTGGTTAATCGCTTC-3'이 primer는 982 bp의 DNA를 증폭시킬 것으로 예상되었다.

주형 DNA의 제조는 배양액 100 µl를 원심분리 한 다음 증류수로 세척 뒤 100 µl의 1% Chelex100 용액을 넣어 5분간 끓여 원심분리 하였다. 1 µl의 상층액을 PCR에 사용하였다. PCR 반응액은 0.25 µM의 primer, 각 200 µM의 dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 2.5

µl, 10× buffer, 1.25 unit *Taq* DNA polymerase (Takara, Korea)를 포함하여 최종 부피를 25 µl가 되게 하였다. PCR 반응온도는 94°C, 5분의 denaturation 후 94°C에서 30초, 53°C에서 30초, 72°C에서 30초 과정을 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 DNA 절편은 아가로스 젤 전기영동으로 확인하거나, DNA purification kit (Bioneer, Korea)로 정제한 후 Macrogen사(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다.

Southern hybridization

전기영동이 끝난 다음 DNA를 아가로스 젤로부터 nylon membrane (Roche, German)으로 capillary 방법으로 옮겼다(2). PCR를 통해 얻어진 Cu 저항성유전자의 일부를 random primed labeling 방법을 이용해 DIG-dUTP로 labeling 시킴으로써 hybridization probe를 제조하였다. Labeling과 detection은 DIG-high prime DNA labeling and detection starter kit II (Roche, German)를 사용하여 제조자가 제시한 방법을 따라 행하였다.

결과 및 고찰

우리나라 남부지역에 분포한 8개 지역, 11곳의 참다래 과수원에서 채집된 참다래 꽃썩음병균의 플라스미드 양상을 살펴 본 결과 플라스미드의 수와 크기에 따라 이들 균주를 6개 그룹으로 나눌 수 있었다(Table 1). 조사한 균주 중 2개를 제외한 9개 균주가 하나 이상의 플라스미드를 가지고 있었으며 그 수에서는 1개부터 4개에 이르기까지 다양하였다(Fig. 1). 플라스미드가 없는 균주는 BDR1과 HJD1으로 각각 보성군 득량면과 경남 하동군 진교면에서 분리된 균주였다. 한 개의 플라스미드가 들어 있는 균주인 HJD2는 하동군 진교면의 다른 과수원에서 채집된 균주이며 *EcoRI*로 절단하여 크기를 알아 본 결과 약 85 kb에 달하였다. 두 개의 플라스미드를 가지고 있는 그룹 III의 4균주는 남해군 남해면, 해남군 삼산면, 고흥군 점암면 및 남해군 이동면

Table 1. Bacterial strains used in this study

Group ^a	Number of plasmid	Bacterial strains	Geographic origin	
I	0	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	BDR1	Deukryang Bosung, Korea
			HJD1	Jingyo Hadong, Korea
II	1		HJD2	Jinkyong Hadong, Korea
			NNH4	Namhae Namhae, Korea
III	2		HSS3	Samsan Haenam, Korea
			KJA3	Jeomam Goheung, Korea
			NYH3	Yeedong Namhae, Korea
IV	3		KHP7	Heungyang Goheung, Korea
			BJB3	Josung Bosung, Korea
V	3		NNH2	Namhae Namhae, Korea
VI	4		KJA1	Jeomam Goheung, Korea
			JYG2	Jindo, Korea
		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>		

^a *P. syringae* pv. *syringae* strains were clustered according to the size and number of plasmids.

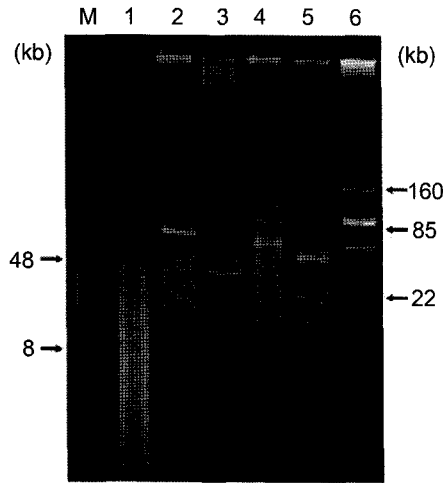


Fig. 1. Pulsed-field gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from *P. syringae* pv. *syringae*. The electrophoresis of the plasmid DNA was carried out for 8 hr at 6 V in a 0.65% agarose gel. Lane M, 8~48 kb ladder (GIBCO BRL.); lanes 1 to 6, *P. syringae* pv. *syringae* strains (BDR1, HJD2, NNH4, KHP7, NNH2, KJA1).

에서 분리된 균주였다. 흥미 있는 사실은 이 그룹에 속한 균주들만 Cu에 대해 저항성을 보인 점이다. 네 균주 모두 copper sulfate에 대한 최소저해농도가 3.0 mM으로 Cu에 대해 비교적 높은 농도의 저항성을 보였다. 한편 3개의 플라스미드를 가지고 있는 균주들은 크기에 따라 두 그룹으로 나누어졌다. 그룹 IV의 BJB3와 KHP7은 각각 고흡균 홍양면과 보성균 조성면에서, 크기가 다른 3개의 플라스미드를 가지고 있는 그룹V 균주는 남해균 남해면에서 분리되었다. 고흡균 점암면에서 분리된 KJA1은 다른 균주에 비해 크기가 큰 플라스미드를 포함하여 4개의 플라스미드를 가지고 있었다. 전체 플라스미드의 크기는 22 kb에서 160 kb에 이르기 까지 다양하였다.

이와같은 결과는 우리나라에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae*의 플라스미드 양상이 다양함을 보여 준다. 특히 같은 지역에서 분리된 균주들의 플라스미드 패턴이 서로 다른 것은 꽃썩음병균 집단이 유전적으로 다양성을 띠고 있을 가능성을 뒷받침해 준다.

11개 균주 중 Cu에 저항성을 가진 그룹 III에 속한 네 균주에 대한 저항성 유전자를 조사하였다. *P. syringae* pv. *tomato*에서 Cu 저항성 유전자는 플라스미드에 존재하며 한 방향으로 전사되는 4개의 ORF로 이루어진 *cop* operon으로 구성되어 있다고 보고된 바 있다(11). *cop* A, B, C, D의 네 유전자에 이어서 조절 단백질 유전자인 *copR*과 *copS*가 순서대로 존재하였으며 *copB*와 *copR* 사이는 1.4 kb였다. 한편 참다래 썩음병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*에서는 pv. *tomato*와 달리 *copB*와 *copR* 사이가 11 kb 떨어져 있는 구조였다(13). 두 균주 사이의 아미노산의 상동성도 A, B, C, D, R, S에서 각각 80%, 73%, 69%, 58%, 97%, 95%였다(12). 이 중에서 상동성이 높은 *copR*과 *copS*의 염기서열로부터 PCR 프라이머를 설계하였다. 이 프라이머와 genomic

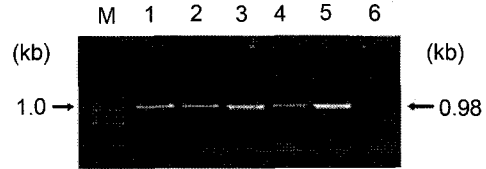


Fig. 2. PCR amplification products using *cop* primers. Lane M, 100 bp ladder (Bioneer Co.); lanes 1 to 4, *P. syringae* pv. *syringae* strains (NNH4, HSS3, KJA3, NYH3); lane 5, *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG2; lane 6, *P. syringae* pv. *syringae* BDR1.

DNA를 사용한 PCR 결과 네 개의 꽃썩음병 균주와 Cu 저항성을 갖는 썩음병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* 한 균주에서 예상되었던 982 bp의 PCR 산물이 확인되었다(Fig. 2).

우리나라 참다래 과수원에서 분리한 꽃썩음병 균주인 *P. syringae* pv. *syringae* HSS3와 썩음병 균주인 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3에서 증폭된 PCR 산물의 일부분에 대하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과 꽃썩음병 균주인 HSS3는 썩음병 균주인 JYG3는 염기서열에서 98%의 상동성을 보였으며 일본에서 보고된 썩음병균과는 약 95%의 상동성을 보였다(자료 미제시). 그러나 *P. syringae* pv. *tomato*와는 90%의 상동성을 보이는 사실은 우리나라 균주들의 Cu 저항성 유전자는 일본 참다래 썩음병균주와 유사할 가능성을 시사하고 있다. 이 유전자 절편의 존재는 참다래 꽃썩음병 균주의 Cu 저항성이 일본 썩음병균주와 마찬가지로 Cu-결합단백질에 의해 세포질로부터 세포막과 세포벽 사이 공간인 주변세포질로 이동되어 축적됨으로써 가능한 것을 말해준다(12). 유전자의 위치를 확인하기 위해 플라스미드와 염색체 DNA를 분리하여 앞서 증폭된 DNA를 탐침으로 Southern hybridization을 시행한 결과 네 균주 모두에서 Cu 저항성 유전자는 두 개의 플라스미드 중 크기가 큰 48 kb 정도의 플라스미드에 들어있었다(Fig. 3).

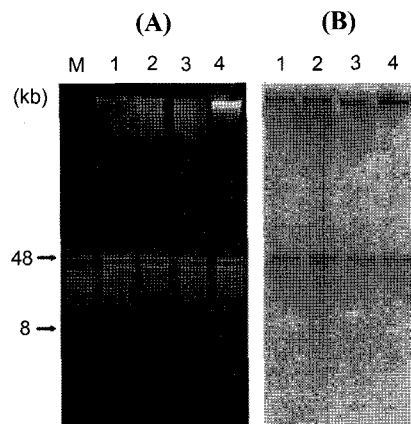


Fig. 3. Pulsed-field gel electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B) of plasmid DNA isolated from copper resistant *P. syringae* strains. Hybridization was performed by using DIG-labeled 982 bp PCR product as a probe. Lane M, 8~48 kb ladder (GIBCO BRL.); lanes 1 to 4, *P. syringae* pv. *syringae* strains (NNH4, HSS3, KJA3, NYH3).

Cu 저항성 플라스미드에 대한 정보가 충분하지 않지만 만일 이 플라스미드가 많은 식물병원성 세균의 플라스미드처럼 접합을 통해 이동할 수 있는 능력이 있다면 다른 병원성 세균으로의 전달도 가능할 것이다. 향후 Cu에 저항성을 띠는 다른 세균의 플라스미드와 비교하는 일과 우리나라에서 발견되는 Cu 저항성 세균의 빈도와 유전자의 구조를 분석하는 연구는 생태계에 미치는 Cu 화합물의 영향을 평가하는데 중요한 자료가 될 것으로 사료된다. 현재와 같이 식물병 방제를 위해 Cu 화합물이 계속 사용되면 국내의 농업생태 환경에서 Cu 저항성 균주의 출현이 증가할 것이기 때문이다.

감사의 말

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Alarcon-Chaidez, F.J., A. Penaloza-Vazquez, M. Ullrich, and C.L. Bender. 1999. Characterization of plasmids encoding the phytoxin coronatine in *Pseudomonas syringae*. *Plasmids* 42, 210-220.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1999. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA.
- Balestra, G.M. and L. Varvaro. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral bud of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. *J. Phytopathol.* 145, 375-378.
- Bender, C.L. and D.A. Cooksey. 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Conjugative transfer and role in copper resistance. *J. Bacteriol.* 165, 534-541.
- Bender, C.L., D.K. Malvick, K.E. Conway, S. George, and P. Pratt. 1990. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 170-175.
- Coplin, D.L. 1989. Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 187-212.
- Huang, T.C. and T.J. Burr. 1999. Characterization of plasmids that encode streptomycin-resistance in bacteria epiphytes of apple. *J. Appl. Microbiol.* 86, 741-751.
- Kobayashi, D.Y., S.J. Tamaki, and N.T. Keen. 1990. Molecular characterization of avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3, 94-102.
- Koh, Y.J., H.J. Chung, and J.H. Kim. 1993. Blossom rot of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae*. *Kor. J. Plant Pathol.* 9, 300-303.
- Long, S.R. and B.J. Staskawicz. 1993. Prokaryotic plant parasites. *Cell* 73, 921-935.
- Mellano, T. and D.A. Cooksey. 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.* 170, 2879-2883.
- Nakajima, M., M. Goto, K. Akutsu, and T. Hibi. 2004. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 223-226.
- Nakajima, M., M. Goto, and T. Hibi. 2002. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. *J. Gen. Plant Pathol.* 68, 68-74.
- Shin, J.S., J.K. Park, G.H. Kim, J.Y. Park, H.S. Han, J.S. Jung, J.S. Hur, and Y.J. Koh. 2004. Identification and ecological characteristics of bacterial blossom blight pathogen of kiwifruit. *Res. Plant Dis.* 10, 290-296.
- Sundin, G.W. and C.L. Bender. 1993. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1018-1024.
- Sundin, G.W. and C.L. Bender. 1996. Molecular analysis of closely related copper- and streptomycin-resistance plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plasmid* 35, 98-107.
- Wilkie, J.P., D.W. Dye, and D.R.W. Watson. 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *New Zealand J. Agri. Res.* 16, 315-323.

(Received November 8, 2007/Accepted December 14, 2007)

ABSTRACT : Plasmid Profiles of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Isolated from Kiwifruit Plants in Korea and the Copper Resistance Determinant

So Yeon Park¹, Hyo Shim Han¹, Young Sun Lee¹, Young Jin Koh², Jong Sup Shin³, and Jae Sung Jung^{1*} (¹Department of Biology and ²Department of Plant Medicine, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, ³Suncheon-si Agricultural Technology and Extension Center, Suncheon 540-804, Korea)

Pseudomonas syringae pv. *syringae* is a causal agent of bacterial blossom blight of kiwifruit in Korea. Eleven strains of the pathogen were isolated from different kiwifruit orchards in Korea and the plasmid profiles were obtained by pulsed-field gel electrophoresis. They could be clustered into six groups according to the number and size of plasmids. The number of plasmids per strain and size of these plasmids ranged from 0 to 4 and from 22 to 160 kb, respectively. Among them, four strains belonging to Group III which harbored two plasmids were resistant to copper sulfate. Southern blot hybridization of the plasmid DNA indicated that the copper resistance determinant was carried on a 48 kb plasmid.