

Biolog Program을 이용한 참다래 궤양병균 동정용 Data Base

고 영 진*

순천대학교 응용생물원예학부

A Data Base for Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the Pathogen of Kiwifruit Bacterial Canker, Using Biolog Program

Young Jin Koh*

Faculty of Applied Biology and Horticulture, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

ABSTRACT: Reactions of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* to 95 carbon sources in a 96-well microplate (BiOLOG GN MicroPlate™) were investigated. The bacterium used 9 carbon sources such as D-mannitol, sucrose, etc., but did not use 62 carbon sources such as α -cyclodextrin, dextrin, etc. Based on the reactions, a user data base for identification of *P. syringae* pv. *actinidiae* was constructed in Biolog program (BiOLOG MicroLog™ 2 system). *P. syringae* pv. *actinidiae* isolates collected from kiwifruits could be identified automatically with high similarity using the user data base, which could diagnose rapidly and easily whether the tree was infected with bacterial canker or not.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, identification, Biolog program, kiwifruit, bacterial canker

우리나라에서 재배되고 있는 참다래(키위, 양다래, kiwifruit, Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis* Planch)에는 1980년대 후반부터 궤양병이 발생하여 급속하게 확산되고 있으며, 제주도와 전라남도 일부 재배지역에서는 과수원을 폐원시킬 만큼 참다래 재배의 가장 큰 제한 요인으로 대두되고 있어 궤양병에 대한 방제대책이 시급한 실정이다(2-4). 궤양병의 방제는 항생제 또는 동제의 살포나 항생제의 수간 주입에 의해 부분적으로 성과를 거두고 있으나 감염초기 방제에 실패할 경우 소기의 방제효과를 거두기 어려운 한계점을 가지고 있다(3, 6, 8). 따라서 궤양병의 방제효과를 극대화시킬 수 있도록 병징발현 이전에 궤양병 감염여부를 조기에 진단할 수 있는 방법의 개발이 시급하다. 그러나 참다래 궤양병은 감염 후 1~2년 정도의 잠복기간을 거친 후에 잎이나 줄기에서 육안으로 병징이 관찰되기 때문에 외관상 건전해 보이는 줄기나 잎에 존재하는 궤양병균을 신속하게 동정하는 것이 궤양병 조기 진단의 관건이다(2).

참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)을 비롯하여 *Pseudomonas* 속에 속하는 식물

병원 세균의 종 또는 병원형(pathovar)은 여러가지 생리·생화학적 특성에 따라 동정하는데(1, 5), 이러한 전통적인 세균 동정방법은 까다로울 뿐만아니라 많은 시간과 노력이 소요되기 때문에 단시간에 간편하게 세균을 동정할 수 있는 시스템이 개발되고 있다. 그 중에서 Biolog program(BiOLOG MicroLog™ 2, Biolog Inc., Hayward, CA, USA)은 세균의 95개 탄소원 이용성질을 컴퓨터 프로그램에 의해 분석하여 세균을 분류할 수 있는 간편한 세균 동정시스템의 하나다. 이 Biolog program에는 *Pseudomonas* 속에 속하는 84개의 종, type 또는 병원형들의 95개 탄소원 이용여부에 관한 data base가 수록되어 있어 *Pseudomonas* 속에 속하는 식물병원 세균들을 신속하게 동정할 수 있다. 그러나 일본에서 Takikawa 등(7)에 의해 *P. syringae* 중에서 가장 최근인 1989년 처음으로 동정 보고된 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 data base는 수록되어 있지 않아서 Biolog program을 이용한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 동정이 불가능하다. 따라서 Biolog program을 이용하여 *P. syringae* pv. *actinidiae*를 동정할 수 있는 data base를 만들기 위하여 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 95개 탄소원 이용성질을 조사하였다.

data base 작성을 위한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균

*Corresponding author.

Table 1. The reactions of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* to 95 carbon sources of the 96-well microplate (BiOLOG GN MicroPlate™)

Well code	Carbon sources	Reactions	Well code	Carbon sources	Reactions
A1	water	- ^a	E1	p-hydroxy phenylacetic acid	-
A2	α-cyclodextrin	-	E2	itaconic acid	-
A3	dextrin	-	E3	α-keto butyric acid	-
A4	glycogen	-	E4	α-keto glutaric acid	-
A5	tween 40	±	E5	α-keto valeric acid	-
A6	tween 80	±	E6	D,L-lactic acid	-
A7	N-acetyl-D-galactosamine	-	E7	malonic acid	±
A8	N-acetyl-D-glucosamine	-	E8	propionic acid	-
A9	adonitol	-	E9	quinic acid	±
A10	L-arabinose	±	E10	D-saccharic acid	+
A11	D-arabitol	±	E11	sebacic acid	-
A12	cellobiose	-	E12	succinic acid	+
B1	i-erythritol	-	F1	bromo succinic acid	+
B2	D-fructose	±	F2	succinamic acid	-
B3	L-fucose	-	F3	glucuronamide	-
B4	D-galactose	-	F4	alaninamide	-
B5	gentiobiose	-	F5	D-alanine	-
B6	α-D-glucose	±	F6	L-alanine	±
B7	m-inositol	±	F7	L-alanyl-glycine	-
B8	α-D-lactose	-	F8	L-asparagine	±
B9	lactulose	-	F9	L-aspartic acid	+
B10	maltose	-	F10	L-glutamic acid	±
B11	D-mannitol	+	F11	glycyl-L-aspartic acid	-
B12	D-mannose	±	F12	glycyl-L-glutamic acid	±
C1	D-melibiose	-	G1	L-histidine	-
C2	β-methyl D-glucoside	-	G2	hydroxy L-proline	-
C3	D-psicose	-	G3	L-leucine	-
C4	D-raffinose	±	G4	L-ornithine	-
C5	L-rhamnose	-	G5	L-phenylalanine	-
C6	D-sorbitol	±	G6	L-proline	±
C7	sucrose	+	G7	L-pyrogutamic acid	-
C8	D-trehalose	-	G8	D-serine	-
C9	turanose	-	G9	L-serine	±
C10	xylitol	-	G10	L-threonine	-
C11	methyl pyruvate	±	G11	D,L-camitine	-
C12	mono-methyl succinate	±	G12	γ-amino butyric acid	±
D1	acetic acid	±	H1	urocanic acid	-
D2	cis-aconitic acid	+	H2	inosine	-
D3	citric acid	±	H3	uridine	-
D4	formic acid	±	H4	thymidine	-
D5	D-galactonic acid lactone	-	H5	phenyl ethylamine	-
D6	D-galacturonic acid	-	H6	putrescine	-
D7	D-gluconic acid	+	H7	2-amino ethanol	-
D8	D-glucosaminic acid	-	H8	2,3-butanediol	-
D9	D-glucuronic acid	-	H9	glycerol	+
D10	α-hydroxybutyric acid	-	H10	D,L-α-glycerol phosphate	-
D11	β-hydroxybutyric acid	-	H11	glucose-1-phosphate	-
D12	γ-hydroxybutyric acid	-	H12	glucose-6-phosphate	-

^a + : positive reaction, - : negative reaction, ± : variable.

주는 참다래 궤양병균을 처음 보고한 Shizuoka 감귤 시험장에서 분양받은 10개 균주를 공시하였다. 공시한 균주들을 BiOLOG Universal Growth Medium (BUGM)에 24시간 동안 배양하여 얻은 신선한 균총들을 cotton swab으로 채취하여 0.85% saline 용액속에 3×10^6 cells/ml 농도로 현탁시킨 후 세균현탁액을 microplate(BiOLOG GN MicroPlate™)의 96 well에 multichannel micropipette으로 150 μ l씩 분주하여 25°C에서 24시간 동안 각각 배양하였다. 각 균주를 배양한 microplate 상에서 탄소원 이용 여부는 Biolog program 사용설명서에 따라 각 탄소원이 함유된 well의 변색유무로 판명하였다. 즉 탄소원이 들어있지 않은 대조구(A1 well)와 동일하게 변색되지 않은 well은 탄소원이 이용되지 않은 것으로 판명하고 보라색으로 변색된 well은 탄소원이 이용된 것으로 판명하였다. 그 결과 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주들은 D-mannitol, sucrose, cis-aconitic acid, D-gluconic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromo succinic acid, L-aspartic acid, glycerol 등 9종의 탄소원을 잘 이용하였으나, α -cyclodextrin, dextrin 등 62종의 탄소원을 이용하지 못하였고, tween 40을 비롯한 24종의 탄소원에 대해서는 명확치 않거나 균주에 따라 다른 반응을 나타내었다(Table 1). 이러한 반응을 종합하여 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주들에 의해 이용된 탄소원은 + (positive)로, 이용되지 않은 탄소원은 - (negative)로 각각 판정하고, 반응이 명확치 않거나 균주간 변이가 있는 것은 \pm (variable)로 판정한 data를 Biolog program에 입력하여 참다래 궤양병균 동정용 'User data base'를 완성하였으며, *P. syringae* pv. *actinidiae*로 동정될 경우 'ACTINIDIAE'로 출력되도록 프로그램을 작성하였다. 완성된 User data base를 추가한 Biolog program에서 본 시험에 공시한 10개 균주들은 96.6~97.8%의 유사도를 나타내면서 'ACTINIDIAE'로 출력되어 *P. syringae* pv. *actinidiae*로 동정됨으로써 User data base의 효용성이 입증되었다.

한편 우리 나라에서 재배되고 있는 외관상 건전해 보이는 참다래로부터 분리된 미지의 세균들을 대상으로 참다래 궤양병균 여부를 동정하기 위해서 분리균을 Peptone Sucrose Agar(peptone 10 g, sucrose 10 g, agar 14 g, distilled water 1,000 ml, pH 6.8)에서 배양하여 단일 균총을 얻은 후 그람염색을 하였다. 선발된 그람음성 세균들을 위에 기술한 방법에 따라 microplate에서 배양하여 각 균주별 탄소원 이용여부에 관한 반응들을 조사하여 Biolog program에 입력시킨 결과 기존 data base와 새로 추가된 참다래 궤양병균

동정용 User data base와의 자동검색을 거쳐 미지의 세균들 중에서 참다래 궤양병균 균주들은 높은 유사도를 나타내면서 'ACTINIDIAE'로 출력되었다.

참다래 궤양병균 동정용 User data base의 완성으로 복잡하고 3~6개월이 소요되는 세균의 생리·생화학 적 반응조사를 통한 전통적인 세균 동정방법을 거치지 않고 Biolog program을 이용하여 1주일 이내에 신속, 정확하게 참다래 궤양병균을 동정할 수 있는 참다래 궤양병균 동정체계가 마련되었다. 따라서 외관상 건전해 보이는 참다래 나무일지라도 Biolog program을 활용하여 궤양병균 존재여부를 신속하게 동정하여 궤양병 감염여부를 조기에 진단함으로써 궤양병 방제 효과를 극대화시킬 수 있을 것으로 전망된다.

요 약

참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 microplate(BiOLOG GN MicroPlate™)에 있는 95개의 탄소원 이용성질을 조사하였다. 참다래 궤양병균은 D-mannitol, sucrose 등 9종의 탄소원을 잘 이용하였으나, α -cyclodextrin, dextrin 등 62종의 탄소원은 전혀 이용하지 못하였다. 이러한 microplate에서의 반응을 종합하여 참다래 궤양병균 동정용 'User data base'를 완성하여 Biolog program(BiOLOG MicroLog™ 2)에 입력시켰다. 이 data base를 이용하여 참다래에서 분리된 궤양병균 균주들은 높은 유사도를 나타내면서 *P. syringae* pv. *actinidiae*로 자동으로 동정되어 출력됨으로써 참다래 궤양병 감염여부를 빠르고 간편하게 진단할 수 있었다.

감사의 말씀

이 연구는 1994년도 농림부 농림수산물기술개발사업(현장애로기술개발사업) 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N., and Sands, D. C. 1988. *Pseudomonas*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd ed, ed. by N. W. Schaad, pp.60-80. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 164pp.
- 고영진. 1995. 참다래 주요 병. 식물병과 농업 1(1): 3-13.

3. 고영진, 박숙영, 이동현. 1996. 우리 나라 참다래 궤양병 발생 특성 및 수간 주입에 의한 방제. *한식병지* 12(3):324-330.
4. 고영진, 차병진, 정희정, 이동현. 1994. 참다래 궤양병의 격발 및 확산. *한식병지* 10(1): 68-72.
5. Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I, ed. by N. R. Krieg and J. G. Hort, pp.141-199. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 964pp.
6. Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., and Goto, M. 1989. Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: Description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55:427-436.
7. Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. and Goto, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 437-444.
8. Ushiyama, K. 1993. Studies on the epidemics and control of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Bulletin of the Kanagawa Horticultural Experiment Station* 43:1-76.

(Received March 28, 1997)