

Nested PCR을 통한 참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 검출

정재성¹ · 한효심¹ · 조운섭² · 고영진*

순천대학교 응용생물학과, ¹생물학과, ²난지과수시험장

Nested PCR Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the Causal Bacterium of Kiwifruit Canker

Jae Sung Jung¹, Hyo Shim Han¹, Youn Seob Jo² and Young Jin Koh*

Department of Applied Biology and ¹Department of Biology, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Subtropical Fruits Experiment Station, Wando-gun, Jeonnam 537-807, Korea

(Received on August 9, 2003)

A PCR method that combines biological and enzymatic amplification of PCR targets was developed for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit leaves. A nested PCR was performed with primers designed from the coding sequence of the *cfl* gene, which is involved in production of the phytotoxin coronatine. The first and second primer sets efficiently amplified expected 665 and 310-bp fragments, respectively. With two successive amplifications, as few as 20 CFU/ml of *P. syringae* pv. *actinidiae* could be detected on ethidium bromide-stained agarose gel. Leaf samples were collected from 4 kiwifruit trees showing yellow halo spots on leaves and incubated in pepton-sucrose broth for 12 h at 16°C before PCR amplification. Positive detection was obtained with one sample, which was proved as a diseased plant in the next spring.

Keywords : *cfl* gene, kiwifruit canker, nested PCR, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

참다래(*Actinidia chinensis*)는 다래과(Actinidiaceae)에 속하는 덩굴성 낙엽과수로서 우리나라에서는 1970년대 후반부터 재배하기 시작하여 제주도와 남해안 일대에 약 1,200 ha에 걸쳐 재배되고 있다. 참다래에는 과실무름병, 꽃썩음병과 함께 궤양병이 주요 병으로 알려졌다(고, 1995). 이 중 궤양병은 1980년대 후반부터 발생하여 심할 경우에는 참다래 과수원을 폐원시킬 정도로 큰 피해를 입히고 있다(고 등, 1994). 참다래 궤양병을 일으키는 병원세균은 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*로 일본에서 처음 보고되었으며(Takikawa 등, 1989), 이란 및 이탈리아에서도 발생이 보고된 바 있다(Mazarei & Mostofipour, 1994; Scortichini, 1994).

궤양병에 감염된 참다래 나무의 잎에서는 연두색 또는

노란색의 무리(chlorotic halo)가 나타나서 커지다가 가운데에 갈색의 점무늬가 생기고, 잎이 자람에 따라 지름이 0.5~1.0 cm 정도의 부정형 암갈색 무늬로 바뀌게 된다(고 등, 1994). 4월부터 6월 사이에 나타나는 잎의 병징을 통해서 비교적 감염 초기 단계에 궤양병 진단이 가능하지만 여러 가지 곰팡이에 의해 생기는 점무늬병처럼 다른 요인에 의한 유사한 증세가 나타나기 때문에 정확한 육안진단이 어려운 점이 있다.

한편 궤양병에 심하게 감염된 나무의 줄기나 가지에서는 크고 작은 균열이 생기고 균열된 부위에서 특이적인 세균 유출액(bacterial ooze)이 흘러나온다. 보통 2월부터 참다래 나무의 줄기나 가지에서 우유빛으로 흘러나오다 기온이 상승함에 따라 붉은색을 띠는 세균 유출액에 의해 궤양병을 쉽게 진단할 수 있다. 그러나 이러한 경우 궤양병에 심하게 감염된 상태이기 때문에 치료가 쉽지 않다.

이 연구에서는 PCR을 통해 참다래 잎에 궤양병균이 감염되었는지 여부를 감염 초기에 진단하는 방법을 확립함

*Corresponding author

Phone)+82-61-750-3865, Fax)+82-61-750-3208

E-mail)youngjin@sunchon.ac.kr

으로써 효율적인 조기방제에 기여코자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건. 실험에 사용한 참다래 궤양병균은 전남 완도에서 분리되어 순천대학교에 보존 중인 *P. syringae* pv. *actinidiae* WGD16을 사용하였다(Han 등, 2003). 균주는 pepton-sucrose(PS) 배지에서 배양하여 사용하였다.

실험재료 및 배양. 실험에 사용한 참다래 잎은 전남 완도의 난지과수시험장 포장에서 2001년 10월에 채취하였다. 참다래 잎에 노란색 무리가 있는 전형적인 초기 궤양병 증상을 나타내는 것으로 보이는 잎을 (Fig. 1) 참다래 나무 4 그루에서 각각 채취하였다. 채취된 잎을 적당한 크기로 잘라 50 ml의 PS broth에 넣고 18°C에서 12시간 동안 진탕배양하였다.

세포의 파쇄. PCR을 위한 주형 DNA를 얻기 위하여 Han 등(2003)의 방법을 사용하였다. 희석된 배양액 또는 생체시료를 배양하여 얻은 세포 배양액을 각각 100 μ l씩 취하여 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 침전된 세포를 멸균수로 두 차례 세척하였다. 여기에 1.0%(wt/vol) Chelex-100 resin(Bio-Rad Lab.) 100 μ l를 넣어 10분간 끓인 뒤 원심분리하여 상층액을 얻어 얼음에 보관한 뒤 PCR에 사용하였다.

PCR primers. 사용된 primer들은 coronatine 생합성 유전자 cluster 중 coronafacate ligase를 암호화하는 *cfl* 유전자의 염기서열(Bender 등, 1993)로부터 설계하였다. 검출의 감도를 높이기 위해 nested PCR을 행하였다. 첫번째 PCR의 primer *cfl*-1과 *cfl*-2는 655-bp의 DNA 절편을 증폭시키고(Bereswill 등, 1994), 두번째 PCR의 primer는 첫

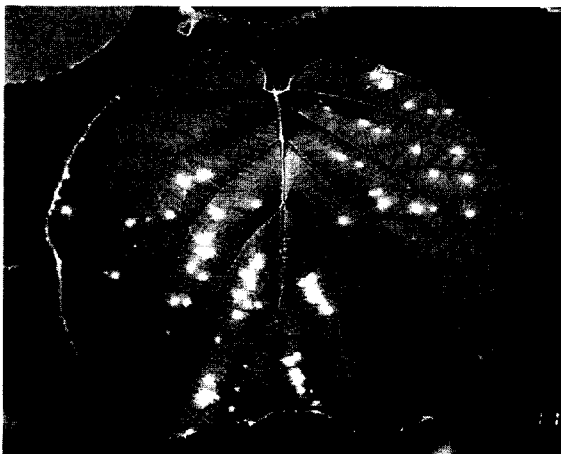


Fig. 1. Typical symptom of bacterial canker on a kiwifruit leaf.

Table 1. Primer sequences used for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in PCR

Primer	Sequences (5'→3')	Product Size	Reference
<i>cfl</i> -1	GGCGCTCCCTCGCACTT	665 bp	Bereswill <i>et al.</i>
<i>cfl</i> -2	GGTATTGGCGGGGGTGC		
<i>cfl</i> -3	TCCTACGGTACGACGGAGTC	310 bp	This study
<i>cfl</i> -4	ACGGGGGATATGGAATAAGC		

번째 PCR 산물의 안쪽에서 설계하였다. 두 번째 PCR primer *cfl*-3과 *cfl*-4는 310-bp의 DNA를 증폭시키는데 각 primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

PCR 조건. PCR 반응액은 1 μ l의 주형 DNA, 25 pmole의 primer 각 1 μ l, 1.25 unit의 Taq DNA polymerase와 200 μ M의 dNTP(Takara Co.)에 멸균 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 하였다. 반응조건은 Perkin Elmer사의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하여 94°C에서 5분간 pre-denature 시킨 후 94°C에서 30초간 denature, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 과정을 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

검출한계의 측정. Nested PCR을 통해 검출할 수 있는 세균 수의 한계를 측정하기 위해 *P. syringae* pv. *actinidiae* WGD16 배양액을 멸균증류수로 10⁻⁸까지 희석하였다. 희석된 세포액 각각을 100 μ l씩 PS agar에 도말시켜 배양한 뒤 균체 수를 세어 살아있는 세포 수를 측정하였다.

결과 및 고찰

PCR을 통한 참다래 궤양병균의 검출. *P. syringae*는 여러 가지 특성에 따라 57개의 병원형(pathovar)으로 나뉘어지고 있다(Gardan 등, 1997). 병원형의 동정에는 생리, 생화학적 특성 및 식물에 대한 병원성(Hildebrand 등, 1988), 유전적 fingerprinting(Clerc 등, 1998; Louws 등, 1994; Manceau, 등, 1997) 등을 조사하는 방법이 일반적으로 쓰이고 있다. 그밖에 각 병원형이 생산하는 식물독소의 종류가 *P. syringae*의 병원형을 구별하는 특성이 되기도 한다. 식물에 병원성이 있는 *P. syringae*에 의해 생산되는 식물독소에는 syringomycin과 syringopeptin 등의 lipodepsipeptide, coronatine, phaseolotoxin 및 tabtoxin 등이 있다(Bender 등, 1999). 각 병원형에 따라 기주 범위가 정해져 있고 각 병원형에 의해 생성되는 독소가 알려져 있으므로 독소의 생합성에 관련된 유전자의 존재 유

무를 검출함으로써 병원성 세균의 유무를 간접적으로 확인할 수 있다. *P. syringae*의 독소 유전자들은 여러 병원형 사이에서 잘 보존되어 있어 PCR을 통해 독소생산 세균을 특이적으로 검출할 수 있다(정 등, 2001; Audy 등, 1996; Bereswill 등, 1994; Bultreys & Gheysen, 1999; Lydon & Patterson, 2001; Sorensen 등, 1998).

참다래 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*는 콩과식물에 halo blight를 일으키는 *P. syringae* pv. *phaseolicola*와 함께 phaseolotoxin을 생산하는 것으로 알려져 있다(Mitchell, 1976; Tamura 등, 1989). 이 독소의 생합성에 관련된 유전자의 일부를 PCR을 통해 증폭함으로써 *P. syringae* pv. *phaseolicola*를 콩 종자로부터 조기에 검출하는 방법이 보고된 바 있다(Audy 등, 1996; Prosen 등, 1993; Schaad 등, 1995). 그밖에 독소에 저항성이 있는 표적의 유전자로부터 PCR primer를 설계하여 *P. syringae* pv. *actinidiae*와 pv. *phaseolicola*의 검출에 사용하기도 한다(Sawada 등, 1997).

그러나 최근 연구 결과에 의하면 우리나라에서 채집된 참다래 궤양병원균은 *P. syringae* pv. *actinidiae*로 동정되었으나 생산하는 식물독소는 phaseolotoxin이 아니라 coronatine이었다(Han 등, 2003). 따라서 phaseolotoxin에 관련된 유전자로부터 설계된 primer로는 우리나라의 참다래 궤양병균을 검출할 수 없다. 그러므로 이 연구에서는 coronatine 생합성 유전자로부터 설계된 primer를 사용하여 우리나라 궤양병균을 검출하고자 하였다. 우선 검출한계를 조사하기 위해 1/10 단위로 희석된 배양액으로부터 DNA를 노출시켜 PCR을 하였다. 그 결과 첫번째 PCR에서는 10^{-4} 의 희석농도까지 예상되었던 665-bp의 DNA를 확인할 수 있었으며, 두번째 PCR에서는 10^{-7} 까지 310-bp의 DNA가 확인되었다. 원배양액을 희석한 뒤 고체배지에 도말하여 확인한 세균 수가 2×10^8 CFU/ml이었으므로 nested PCR을 이용한 검출한계는 20 CFU/ml임을 알 수 있었다(Fig. 2).

참다래 잎에서 궤양병균의 검출. 실험실 조건에서의 검출한계는 20 CFU/ml이었으나 자연환경에서 채취된 시료에는 PCR 반응을 저해하는 여러 가지 불순물이 포함되어 있어 검출한계는 이보다 높아질 것으로 생각된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 이 연구에서는 PCR에 앞서 궤양병균을 증식시켜 개체 수를 늘리는 방법을 사용하였다. 참다래 궤양병균의 생육에 적합한 온도는 $12 \sim 18^\circ\text{C}$ 이므로(고 등, 1994) 채취된 잎을 액체배지에 넣어 16°C 에서 12시간 배양함으로써 궤양병균을 선택적으로 증식시키고자 하였다. 이렇게 얻은 배양액 100 μl 를 취해 세포를 파쇄시킨 후 상층액을 PCR에 사용하였다. 첫번째

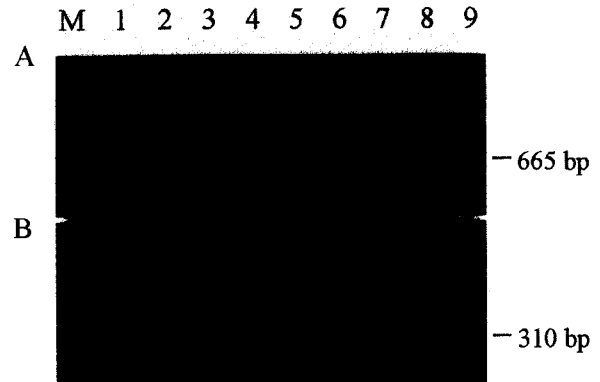


Fig. 2. Nested PCR products of *cfl* gene in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* WGD16 isolated from Korea. Amplification fragments were detected with *cfl*-1 and *cfl*-2 primer set by which a 665 bp product was amplified (A), and with *cfl*-3 and *cfl*-4 primer set by which a 310 bp was amplified (B). Lane M, size marker, 1 kb Plus DNA ladder (GIBCO BRL); lane 1-9, serial dilution of WGD16 culture (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}).

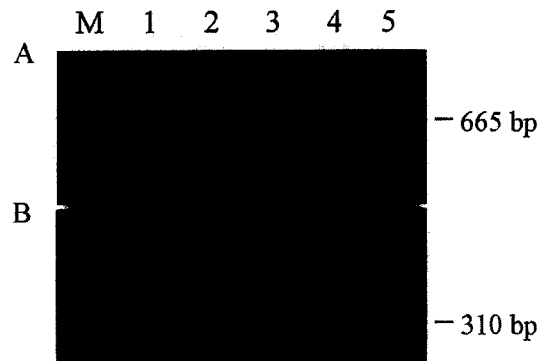


Fig. 3. Nested PCR products from lysed cells grown in culture of diseased kiwifruit leaves. Amplification fragments were detected with *cfl*-1 and *cfl*-2 primer set (A), and with *cfl*-3 and *cfl*-4 primer set (B). Lane M, size marker, 100 bp ladder (Bioneer Co.); lane 1-4, sample number 1-4; lane 5, positive control (*P. syringae* pv. *actinidiae* WGD16).

PCR에서는 양성 대조군으로 사용한 *P. syringae* pv. *actinidiae* WGD16에서만 예상되었던 밴드가 검출되었을 뿐 참다래 잎 시료에서는 아무런 밴드도 보이지 않았다. 그러나 두번째 PCR에서는 양성 대조군과 함께 1번 시료에서 310-bp의 DNA가 검출되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 4개의 시료 중 1번 시료에만 궤양병균이 감염되었음을 의미한다. 실제로 다음해인 2002년 2월 관찰한 결과에 따르면 1번 시료를 채취한 참다래 나무에서만 주간 및 가지에 세균 유출액과 균열 등이 나타나는 전형적인 궤양병 병징을 보였다.

참다래 궤양병의 방제에 대해서는 발생초기의 관리가

무엇보다 중요하다. 궤양병은 예방적 차원에서 초기 감염 단계에 약제살포가 이루어지지 않을 경우 도관을 통하여 급속하게 궤양병이 전신으로 진전되기 때문에 방제가 어렵다. 따라서 PCR을 이용한 이 방법으로 잎에 초기 궤양병 증상을 나타내는 참다래 나무에서 궤양병균을 검출함으로써 조기에 궤양병 감염여부를 진단하게 되면 항생제 또는 동제를 살포하거나 수간 주입함으로써 효율적으로 방제할 수 있을 것이다(고 등, 1996; 1999).

요 약

참다래 잎으로부터 궤양병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*를 배양하여 PCR을 통해 검출하는 방법을 개발하였다. Nested PCR을 위해 두 set의 primer를 식물독소인 coronatine의 생합성에 관여하는 유전자 *cfI*의 염기서열로부터 설계하였다. 이 primer set를 사용하여 665과 310-bp의 절편이 증폭되었으며 nested PCR을 통한 궤양병균의 검출한계는 20 CFU/ml이었다. 4 그루의 참다래 나무로부터 노란색 무리로 나타나는 궤양병 초기 증상을 보이는 잎을 채취하여 pepton-sucrose 액체배지에 넣어 16°C에서 12시간 배양 한 뒤 PCR을 시행한 결과 한 시료에서 예상했던 밴드가 증폭되었고 이듬해 봄 이 나무가 궤양병에 감염되었음을 확인하였다.

감사의 말씀

이 연구는 한국과학재단 특정연구과제(KOSEF 98-0402-07-01-3)로 수행되었습니다.

참고문헌

- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C. and Laroche, A. 1996. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* 86: 361-366.
- Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F. and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Rev.* 63: 266-292.
- Bender, C., Liyanage, H., Palmer, D., Ullrich, M., Young, S. and Mitchell, R. 1993. Characterization of the genes controlling biosynthesis of the polyketide phytotoxin coronatine including conjugation between coronafacic and coronamic acid. *Gene* 133: 31-38.
- Bereswill, 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.
- Bultreys, A. and Gheysen, I. 1999. Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1904-1909.
- Clerc, A., Manceau, A. and Nesme, X. 1998. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1180-1187.
- Gardan, L., Shaff, H. and Grimont, P. A. 1997. DNA relatedness among pathovars of *P. syringae* and related bacteria. In : *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*, ed. by Rudolph, K., Burr, T. J., Mansfield, J. W., Stead, D., Vivian, A. and Von Kietzell, J., pp.445-448. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Han, H. S., Koh, Y. J., Hur, J.-S. and Jung, J. S. 2003. Identification and characterization of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 110-118.
- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N. and Sands, D. C., 1988. *Pseudomonas*, In : *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, ed. by N. W. Schaad, pp.60-81. APS Press, St. Paul, Minn., USA.
- 정세성, 한효심, 고영진. 2001. *Pseudomonas syringae*의 식물독소와 독소 생산 균주의 검출을 위한 PCR primer. *식물병연구* 7: 123-133.
- 고영진. 1995. 참다래의 주요 병. *식물병과 농업* 1: 3-13.
- 고영진, 박숙영, 이동현. 1996. 우리나라 참다래 궤양병 발생 특성 및 수간주입에 의한 방제. *한식병지* 12: 324-330.
- 고영진, 서정규, 이동현, 신종섭, 김승화. 1999. 참다래 궤양병의 약제 방제. *식물병과 농업* 5: 95-99.
- 고영진, 차병진, 정희정, 이동현. 1994. 참다래 궤양병의 격발 및 확산. *한식병지* 10: 68-72.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. and deBruijn, F. J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2295.
- Lydon, J. and Patterson, C. D. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 166-170.
- Manceau, C. and Horvais, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains fo *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.
- Mazarei, M. and Mostofipour, P. 1994. First report of bacterial canker of kiwifruit in Iran. *Plant Pathology* 43: 1055-1056.
- Mitchell, R. E. 1976. Isolation and structure of a chlorosis inducing toxin of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytochemistry* 15: 1941-1947.

- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N. W. and Panopoulos, N. J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83: 965-970
- Sawada, H., Takeuchi, T. and Matsuda, I. 1997. Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 282-288.
- Schaad, N. W., Cheong, S. S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N. J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85: 243-248.
- Scortichini, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology* 43: 1035-1038.
- Sorensen, K. N., Kim, K. H. and Takemoto, J. Y. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 226-230.
- 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. Phytopathol. Soc. Japan* 55: 437-444.
- Tamura, K., Takikawa, Y., Tsuyumu, S. and Goto, M. 1989. Characterization of the toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal bacterium of kiwifruit canker. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 55: 512.