

PCR을 통한 토양에서 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*의 검출

한호심 · 김영진¹ · 정재성*
순천대학교 생물학과, ¹응용생물학과

Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Soil on the Basis of PCR Amplification

Hyo Shim Han, Young Jin Koh¹ and Jae Sung Jung*

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

(Received on November 18, 2004)

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* is the causative agent of bacterial canker in kiwifruit. A nested PCR detection method that uses primers designed from the *cfl* gene, involved in production of the phytotoxin coronatine, was applied on soil samples. These primers yielded 665 and 310-bp fragments in consecutive PCR amplification step with DNA from soil inoculated with Korean strain of *P. syringae* pv. *actinidiae*. This system was applied to survey soil samples from a kiwifruit orchard destroyed by bacterial canker. A specific 310-bp PCR product was obtained from all six samples of soil tested.

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

1970년대 후반부터 우리나라에서 재배하기 시작한 참다래는 (*Actinidia chinensis*) 남해안을 중심으로 약 1,400 ha에 달하는 면적에서 재배되고 있다. 참다래에는 궤양병, 꽃썩음병, 잣빛곰팡이병, 겹무늬병, 역병, 과실무름병 등이 발생하여 피해를 주는 것으로 보고되고 있다(고, 1995). 그 중에서도 궤양병은 참다래에 발생하는 대표적인 세균성 병해로 1983년 미국 캘리포니아에서 처음 보고된 후 (Opegenorth, 1983) 1984년 일본에서도 발생하여 큰 피해를 입힌 것으로 알려지고 있으며(Serizawa 등, 1989), 이란과 이탈리아에서도 발생이 보고된 바 있다(Mazarei와 Mostofipour, 1994; Scortichini, 1994).

우리나라에서 참다래 궤양병이 발생하기 시작한 것은 1980년대 중반으로 추정되는데 1987년 제주도에서 궤양병에 의해 폐원된 과수원이 나타나기 시작하여 1990년대 초반부터는 전남 완도군, 해남군, 고흥군 등에서도 발생하여 심할 경우 참다래 과수원을 폐원시킬 정도의 피해를 입히고 있다(고 등, 1994). 궤양병의 방제는 항생제 또

는 동제의 살포나 항생제의 수간주입에 의해 이루어지고 있으나 감염초기에 방제하지 않을 경우 효과를 거두기 어렵다(고 등, 1996). 따라서 궤양병의 효율적 방제를 위해서는 감염여부의 조기진단이 필요하다.

Takikawa 등(1989)에 의해 참다래 궤양병을 일으키는 병원세균을 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*로 명명되었으며 이들은 식물독소로 phaseolotoxin을 생산하는 것으로 알려져 왔다(Tamura 등, 1989). 그러므로 이 독소의 생합성에 관련된 유전자 또는 저항성 있는 표적 유전자 일부로부터 primer를 설계하면 PCR을 이용하여 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*를 검출할 수 있다(Prosen 등, 1993; Sawada 등, 1997). 그러나 국내에서 발견된 참다래 궤양병 세균들은 phaseolotoxin 대신 식물독소로 coronatine을 생산하였다(Han 등, 2003). 따라서 우리나라의 참다래 궤양병균을 검출하기 위해서는 coronatine 생합성 관련 유전자로부터 primer를 설계하여야 한다. 이를 위해 저자들은 coronafacate ligase를 암호화하는 *cfl* 유전자로부터 PCR primer를 설계하여 궤양병의 조기진단 방법을 보고한 바 있다(정 등, 2003).

본 연구에서는 토양으로부터 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*의 검출 방법을 확립함으로써 참다래 궤양병의

*Corresponding author
Phone)+82-61-750-3616, Fax)+82-61-750-3608
E-mail)jjung@sunchon.ac.kr

로 폐원된 과수원의 토양에 궤양병균이 존재하는지 여부를 확인하고자 하였다.

조사하려는 토양시료는 전남 고흥군 도화면 봉룡리 소재 과수원에서 채취하였다. 500평 규모의 이 과수원은 1985년 3년생 참다래 묘목을 식재하여 참다래를 생산하여 오던 중 2001년 봄 궤양병이 발생하여 2003년 5월 폐원되었다. 토양시료는 2004년 8월 이 과수원의 여섯 곳에서 채취하였다.

토양으로부터 DNA의 추출은 UltraClean soil DNA kit (Mo Bio Lab., Solana Beach, Calif.)를 사용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 행하였다. 이 방법을 사용하여 토양 0.25 g으로부터 300~500 ng의 DNA를 얻을 수 있었다(자료 미제시).

PCR primer는 coronatine 생합성 유전자 cluster 중 *cfl* 유전자의 염기서열(Bender 등, 1993)로부터 설계하였다(정 등, 2003). 첫번째 PCR primer인 *cfl*-1(5'-GGCGCTCCC TCGCACTT-3')과 *cfl*-2(5'-GGTATTGGCGGGGTGC-3')은 참다래 궤양병균의 *cfl* 유전자의 안쪽에서 665 bp의 DNA 절편을 증폭시킨다. 두번째 PCR은 첫번째 PCR 산물을 주형으로 하고 primer로 *cfl*-3(5'-TCCTACGGTACGACGGAGTC-3')과 *cfl*-4(5'-ACGGGGGATATGGAATAAGC-3')로 증폭시켰을 때 310 bp의 DNA가 증폭된다. PCR 반응액은 1 μ l의 주형 DNA(15 ng), 25 pmol의 primer 각 1 μ l, 1.25 unit의 *Taq* DNA polymerase(Takara Co.)에 멸균 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 하였다. 반응조건은 Perkin Elmer사의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하여 94°C에서 30초간 denature, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 과정을 30회 반복하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 하였다.

이 방법의 유용성을 검토하기 위해 궤양병이 발생한 과수와 발생하지 않은 과수 아래의 토양에서 DNA를 추출한 뒤 PCR을 행한 결과, 전자의 시료를 이용한 경우 두번째 PCR에서 예상했던 크기의 DNA 밴드를 검출할 수 있었다. 이 밴드의 크기는 운동장 토양에 국내에서 분리한 *P. syringae* pv. *actinidiae* WGD16(Han 등, 2003)을 2×10^4 cfu/ml되게 접종한 양성 대조군과 동일하였다. 이 경우 첫번째 PCR에서도 665 bp의 밴드를 검출할 수 있었다. 그러나 궤양병이 걸리지 않은 과수 아래의 토양과 음성 대조군으로 *P. syringae* pv. *syringae*를 접종한 운동장 토양에서는 밴드가 검출되지 않았다(Fig. 1). 동일한 방법을 폐원된 과수원의 토양에 적용한 결과 조사한 여섯 곳의 시료 모두에서 두 번째 PCR에서 310 bp의 밴드가 검출되었다(Fig. 2). 시료의 채취는 폐원된 과수원의 다양한 지점에서 이루어진 점에 비추어 과수원 전체 토

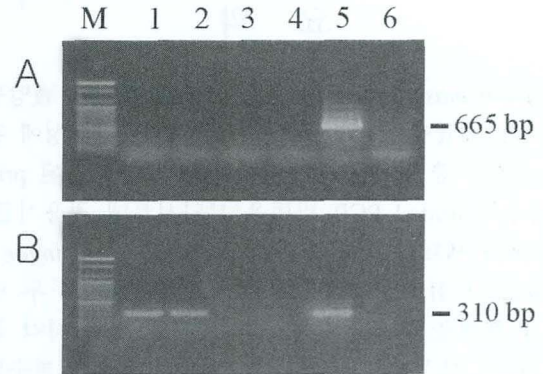


Fig. 1. Nested PCR products amplified with different soil samples. Amplification products were obtained with *cfl*-1 and *cfl*-2 primer set by which a 665 bp product was amplified (A), and with *cfl*-3 and *cfl*-4 primer set by which a 310 bp was amplified (B). Lane M, 100 bp ladder (Bioneer Co.); lane 1-2, soils collected from infected kiwifruit plants; lane 3-4, soils collected from uninfected kiwifruit plants; lane 5, playground soil inoculated with Korean strain of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*; lane 6, playground soil inoculated with *P. syringae* pv. *syringae*.



Fig. 2. Nested PCR products amplified with soil samples collected from destroyed kiwifruit orchard. Amplification products were obtained with *cfl*-1 and *cfl*-2 primer set (A), and with *cfl*-3 and *cfl*-4 primer set (B). Lane M, 100 bp ladder (Bioneer Co.); lane 1-6, soils collected from different sites in destroyed kiwifruit orchard; lane 7, playground soil inoculated with Korean strain of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*; lane 8, playground soil inoculated with *P. syringae* pv. *syringae*.

양에 궤양병균이 존재함을 알 수 있었다.

본 연구는 폐원된 과수원을 다시 복원하고자 하는 농가의 요청으로 시도 되었다. 지금까지 토양에 참다래 궤양병균의 존재 여부와 궤양병의 발병 사이에 직접적인 관계가 있음을 밝힌 보고는 없었다. 그러나 Fig. 1의 결과를 볼 때 토양에 존재하는 궤양병균이 새로 식재된 묘목에 궤양병을 일으킬 개연성은 충분하다. 그러므로 참다래 궤양병으로 폐원된 과수원의 복원을 위해서는 궤양병균의 제거를 위한 토양의 처리가 우선되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*는 참다래 궤양병을 일으키는 세균이다. 식물독소인 coronatine 생합성에 관여하는 유전자 중 하나인 *cf*의 염기서열로부터 설계된 primer를 사용한 nested PCR 방법을 토양시료에 적용시켰다. 이 primer 세트와 우리나라에서 분리된 *P. syringae* pv. *actinidiae*가 접종된 토양으로부터 얻은 DNA로 두 번의 PCR을 행했을 때 665 bp와 310 bp의 절편이 각각 증폭되었다. 이 시스템을 참다래 궤양병으로 폐원된 과수원의 토양조사에 적용시킨 결과 여섯 곳으로부터 채취한 토양시료 모두에서 특이적인 310 bp의 PCR 산물이 증폭되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- 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 cofonamic acid. *Gene* 133: 31-38.
- 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.
- 정재성, 한효심, 조운섭, 고영진. 2003. Nested PCR을 통한 참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 검출. *식물병연구* 9: 116-120.
- 고영진. 1995. 참다래의 주요 병. *식물병과 농업* 1: 3-13.
- 고영진, 박숙영, 이동현. 1996. 우리나라 참다래 궤양병 발생 특성 및 수간 주입에 의한 방제. *한식병지* 12: 324-330.
- 고영진, 차병진, 정희정, 이동현. 1994. 참다래 궤양병의 격발 및 확산. *한식병지* 10: 68-72.
- Mazarei, M. and Mostofipour, P. 1994. First report of bacterial canker of kiwifruit in Iran. *Plant Pathology* 43: 1055-1056.
- Opgenorth, D. C., Lai, M., Sorrell, M. and White, J. B. 1983. *Pseudomonas* canker of kiwifruit. *Plant Dis.* 67: 1283-1284.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N. and Panopoulos, N. J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* DNA from 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.
- Scortichini, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology* 43: 1035-1038.
- 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.
- 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.
- 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. Phytopath. Soc. Japan* 55: 512.