

참다래 꽃썩음병 병원세균 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)의 스트렙토마이신 저항성 유전자

박소연 · 한효심 · 이영선 · 고영진¹ · 정재성*

순천대학교 생물학과, ¹식물의학과

Streptomycin Resistant Genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the Causal Agent of Bacterial Blossom Blight of Kiwifruit

So Yeon Park, Hyo Shim Han, Young Sun Lee, Young Jin Koh¹ and Jae Sung Jung*

Department of Biology and ¹Department of Plant Medicine, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

(Received on June 14, 2007)

A total of 41 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of bacterial blossom blight, were isolated from kiwifruit plants in Korea. Among them, two strains showing streptomycin resistance were examined to investigate the structure of resistant determinants by PCR and nucleotide sequence analysis. PCR results suggested that the streptomycin resistance is mediated by *strA-strB* genes carried on Tn5393a. Insertion sequences, IS6100 and IS1133, which were located within or downstream of *tnpR* gene in *Xanthomonas campestris* and *Erwinia amylovora* were not found. Nucleotide sequences of *strA-strB* were 100% identical with Tn5393a. Two streptomycin resistant strains had three plasmids. Southern blot hybridization using *strA-strB* probe indicated that the resistant genes were carried on a 100 kb plasmid.

Keywords : Blossom blight, Kiwifruit, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Streptomycin resistance

참다래 꽃썩음병은 궤양병과 더불어 참다래에 발생하는 대표적인 세균성 병해 중 하나로 5월말 개화기에 발생한다. 해에 따라 다소 차이는 있지만 평균 20-35% 정도의 발병율을 보이고 개화기에 강우가 잦은 해에는 50% 이상 감수를 초래할 만큼 큰 피해를 주고 있다(Koh 등, 2003). 병원 세균은 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*로 동정된 바 있다(신 등, 2004). 식물에서 발생하는 대부분의 세균성 병해는 진균성 병해와는 달리 방제 약제가 항생제와 동제로 제한되어 있어 약제 방제가 어려울 뿐만 아니라 방제 약제도 예방 위주의 약효를 나타내기 때문에 방제시기를 놓칠 경우 치료가 거의 불가능하다. 또한 항생제 및 동제에 의한 약제방제에서 약제 저항성균의 출현은 불가피하기 때문에 참다래 재배지에 출현하는 꽃썩음병균 집단 내에서 약제 저항성균의 분포 및 빈도를 파

악하는 것은 약제방제의 효율성을 높이기 위하여 선행되어야 할 일이다.

더구나 세균에 있어서 약제저항성 유전자는 plasmid와 불가분의 관계를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 그렇기 때문에 참다래 꽃썩음병 병원세균 집단에서의 약제 저항성 발생 실태를 파악함과 함께 약제저항성 유전자를 확인하고, 병원세균 집단에 존재하는 plasmid에 대해 조사하는 등의 병원세균에 대한 집단유전학적 연구는 보다 효율적인 방제를 위하여 필요한 일이기도 하다.

국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로는 아그리마이신과 농용신 수화제만이 품목 고시되어 있을 뿐이다. 두 약제 모두 주성분이 스트렙토마이신으로 유사하기 때문에 약제의 연용은 필연적으로 저항성 세균의 출현을 야기시켜 방제효과가 떨어질 수밖에 없다.

본 연구에서는 우리나라에서 분리된 참다래 꽃썩음병원 세균에서 스트렙토마이신 저항성 유전자와 plasmid와의 관계를 살펴보고자 하였다.

*Corresponding author

Phone) +82-61-750-3616, Fax) +82-61-750-3608

E-mail) jjung@sunchon.ac.kr

재료 및 방법

시험 균주. 꽃썩음병 균주로는 전라남도과 경상남도 소재 8개 시·군의 서로 다른 참다래 과수원에서 2001년과 2002년에 분리되어 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 로 동정된 41개 균주를 실험에 사용하였다(Table 1). 대조 균주로 사용된 *Pseudomonas marginalis* BJW1은 국내의 참다래 과수원에서 채집되어 동정된 스트렙토마이신 저항성 균주이고, *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa11은 일본에서 분리된 참다래 궤양성 병원균주이다(Han 등, 2003). 균주의 배양은 PS 배지(pepton 20 g, sucrose 20 g per 1 liter)에 접종하여 28°C에서 시행하였다.

스트렙토마이신 저항성 조사. 스트렙토마이신 저항성 여부를 조사하기 위해 0, 10, 50, 100, 200, 500 ug/ml의 스트렙토마이신이 첨가된 PS 액체배지 3 ml에 O.D₆₀₀=1.0 되게 배양한 균주를 10 u/ 접종한 뒤 28°C에서 48시간 진탕배양한 후 최소저해농도를 결정하였다.

PCR primer의 제조. 식물에서 분리한 세균들이 가지고 있는 스트렙토마이신 저항성 유전자는 일반적으로 Tn5393 안에 *strA-strB* 유전자 형태로 들어 있다(Han 등, 2004). 국내에서 분리한 저항성 균주들이 *strA-strB* 유전자와 함께 이와 같은 transposon이 존재하는지 여부를 확인하기 위해 Tn5393 내에서 적절한 primer를 설계하였다(Fig. 1, Table 2).

PCR 조건. 주형 DNA의 제조는 배양액 100 u/를 원

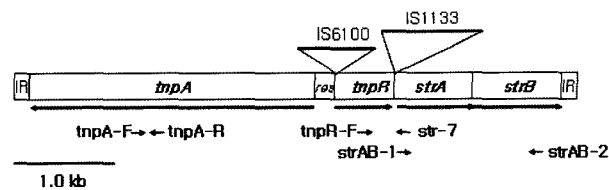


Fig. 1. Map of Tn5393a including the sites of insertion of IS1133 and IS6100 in *E. amylovora* and *X. campestris* pv. *vesicatoria*, respectively (Sundin and Bender, 1995). The direction of transcription is shown by the heavy lines with arrow. The small arrows indicate the location of oligonucleotide primers used to PCR.

심분리 한 다음 증류수로 세척 뒤 100 u/의 1 % Chelex100 용액을 넣어 5분간 끓여 원심분리 하였다. 1 u/의 상층액을 PCR에 사용하였다. PCR 반응액은 0.25 uM의 primer, 각 200 uM의 dNTP, 1.5 mM MgCl₂ 2.5 u/, 10X buffer, 1.25 unit *Taq* DNA polymerase(Takara)를 포함하여 최종 부피를 25 u/ 되게 하였다. PCR 반응온도는 94°C, 5분의 denaturation 후 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초 과정을 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다.

저항성 유전자의 염기서열 분석. StrAB primer로 증폭된 PCR 산물을 DNA purification kit(Bioneer)로 정제한 뒤 pGEM-T Easy 벡터(Promega)에 클로닝하였다. Ampicillin과 X-gal이 포함된 LB 배지에서 흰색 콜로니를 선별하여 plasmid DNA를 분리한 뒤 *EcoRI*으로 처리하여 DNA가

Table 1. Bacterial strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* used in this study

Bacterial strain	Location isolated	Streptomycin resistant strain
HOY4, HSS1, HSS3, HSS6, HSS7	Haenam, Jeonnam	
BBK3, BBK5, BDR1, BJB2, BJB3, BJB4	Bosung, Jeonnam	BJB3
KDK1, KHP7, KJA1, KJA3, KJA5, KJA6	Koheung, Jeonnam	KHP7
SCS1, SCS2, SCS3, SCS4	Suncheon, Jeonnam	
TKS4, TKS7, TDS1, TDS2, TDS3, TDS4, TKS2, TKS3	Tongyoung, Gyeongnam	
SSB2, SSB3, SSB5 SSB7,	Sacheon, Gyeongnam	
NNH2, NNH3, NNH4, NYH3, NYH7	Namhae, Gyeongnam	
HJD1, HJD2, HYT1	Hadong, Gyeongnam	

Table 2. Nucleotide sequences of PCR primers used to determine the structure of streptomycin resistant genes

Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Related gene	Expected size (bp)	Reference
StrAB-1	TGAATCGCATTCTGACTGGTT	strA-strB	1,640	Palmer <i>et al.</i> , 1997
StrAB-2	GCTAGATCGCGTTGCTCCTCT			
tnpA-F	GGCGGGATCTGCTTGTAGAG	tnpA	300	this study
tnpA-R	GCTTTCCATGGTCTCTGAGC			
tnpR-F	AACACGGTGAAGGAGCTGTC	tnpR	486	this study
str-7	TCACCACGTCGAAAAACAAA			

삽입되었는지 여부를 확인하였다. 확인된 plasmid는 Macrogen사에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다.

Pulsed-field gel 전기영동. 전기영동은 CHEF-DR(Bio-Rad)에서 0.65%의 젤과 0.5x TBE를 사용하여 14°C에서 8시간 전개시켰다. pulse time은 0.1-0.6 s, 전압은 6 V/cm였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 염색한 후 UV하에서 확인하였다.

Southern Hybridization. 전기영동이 끝난 다음 DNA를 아가로스 젤로부터 nylon membrane(Roche)으로 capillary 방법으로 옮겼다(Ausbel 등, 1999). 염기서열 분석을 위해 클로닝된 plasmid를 *EcoRI*로 처리하여 얻어진 삽입절편을 random primed labeling 방법을 이용해 DIG-dUTP로 labeling된 probe를 제조하였다. Labeling과 detection은 DIG-high prime DNA labeling and detection starter kit II(Roche)를 사용하여 제조자가 제시한 방법을 따라 행하였다.

결과 및 고찰

국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균들의 약제 저항성 정도를 파악한 결과, 총 분리균주 41개 중 스트렙토마이신에 저항성을 가지는 균주는 KHP7과 BJB3 두 균주로, 분리균주 중 5%의 출현빈도를 나타내었다(Table 1). 스트렙토마이신 저항성 균주들의 최소저해 농도는 두 균주 모두 100 ug/ml이었다. 참다래 재배지역에 따른 저항성 균주의 출현을 보면 전남 보성군과 고흥군에서 각 한 균주씩 스트렙토마이신 저항성 균주가 출현하였다. 이는 다른 지역의 참다래 재배 농가에서는 참다래 꽃썩음병에 대한 화학적 방제를 하지 않은데 비해 이 지역 대부분의 참다래 재배농가들은 개화기 이전에 아그리마이신이나 농용 신쿠퍼 수화제를 사용하여 두 번 이상 방제를 하고 있어 이러한 균주가 출현한 것으로 생각된다. 앞으로 약제 방제가 계속 늘어나게 되면 더욱 많은 저항성 균주들이 나타날 것으로 예상된다.

스트렙토마이신이 식물병 방제를 위해 농업용으로 사용되어 온 것은 1950년대 후반부터이다. 그러나 스트렙토마이신의 연용으로 인해 이 항생제에 대한 저항성 세균이 출현하여 널리 퍼지게 되었다. 특히 주요 식물병원균인 *Erwinia amylovora*(Chiou와 Jones, 1991), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*(Minsavage 등, 1990), *P. syringae* pv. *syringae*(Sundin과 Bender, 1993), *P. syringae* pv. *papulans*(Burr 등, 1988) 등에서 스트렙토마이신 저항성이 보고된 바 있다. 식물병원성 세균에서 분리된 스트렙토마이신 저항성 유전자는 *strA*와 *strB* 두 유전자가 간격 없이 병렬로 연결되어 있는 *strA-strB* 구조로(Sundin과 Bender, 1993),

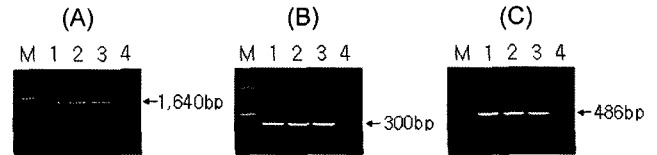


Fig. 2. PCR amplification products using *strAB* (A), *tnpA* (B), and *tnpR/str7* (C) primer sets. Lane M, 100 bp ladder (Bioneer); lane 1 and 2, *P. s. pv. syringae* BJB3 and KHP7; lane 3, *P. s. pv. actinidiae* PaI1; lane 4, negative control.

이 유전자는 aminoglycoside phosphotransferase인 APH(3")와 APH(6)을 각각 암호화하는 것으로 밝혀졌다(Jones 등, 1991; Minsavage 등, 1990).

식물병원성 세균에서 *strA-strB* 구조는 대부분 Tn5393과 함께 발견되고 있으며(Fig. 1) 기주 범위도 식물과 관련된 세균 뿐만 아니라 임상 병원균에서도 발견되고 있다(Chiou와 Jones, 1995; Tauch 등, 2000). 뿐만 아니라 IS1133이나 IS6100 등의 insertion sequence가 삽입되어 promoter를 제공함으로써 저항성 유전자의 발현을 증가시킴이 보고되고 있다(Sundin과 Bender, 1995).

스트렙토마이신에 저항성을 나타내는 두 개의 꽃썩음병균 KHP7과 BJB3의 저항성 유전자를 확인하기 위해 PCR을 수행하였고 양성 대조균으로 일본에서 분리한 참다래 궤양병균 중 스트렙토마이신 저항성이 있는 *P. syringae* pv. *actinidiae* PaI1을 사용하였다. *StrAB* primer set로 PCR을 수행한 결과 Fig. 2A에서와 같이 예상하였던 1,640 bp의 band가 검출되었다. 또한 *tnpA*와 *tnpR* 유전자와 insertion sequence의 유무를 확인하기 위해 동일 조건으로 PCR을 수행한 결과, *tnpA* primer set의 경우에서도 예상하였던 300 bp 크기의 band가 검출되었다(Fig. 2B). *tnpR-F*와 *str-7* primer를 사용하여 PCR을 수행하였을 때 insertion sequence가 존재한다면 1,776 bp의 band가 검출되어야 하지만 실험결과 486 bp의 band만 검출되어 두 균주 모두 insertion sequence가 존재하지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 이러한 결과는 우리나라 참다래 과수원에서 분리된 스트렙토마이신 저항성 *P. marginalis*의 결과와 일치하여(Han 등, 2003), Tn5393이 우리나라 식물병원성 세균에서 발견되는 보편적인 스트렙토마이신 저항성 유전자 구조임을 알 수 있었다.

strA-strB 구조 중에서 *strB*의 염기서열은 세균의 종류에 상관없이 100% 일치하는 것으로 알려져 있으나 *strA*의 경우 804 bp의 염기서열 내에서 5 bp의 polymorphism이 발견되는 것으로 보고되고 있다(Sundin, 2000). *P. syringae* pv. *syringae* KHP7과 BJB3이 가지고 있는 *strA-strB* 유전자의 염기서열의 변이를 파악하기 위해 *strA-strB*

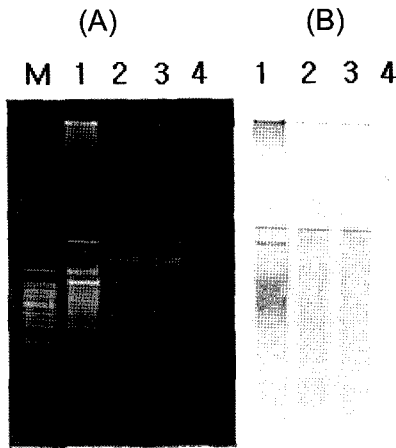


Fig. 3. Plasmid profiles of streptomycin resistance *Pseudomonas* strains (A), and hybridization with DIG-labeled probe amplified with primer strAB set (B). Lane M, size marker (8-43 kb ladder, Bibco BRL); lane 1, *P. s. pv. actinidiae*; lane 2 and 3, *P. s. pv. syringae* BJB3 and KHP7, respectively; lane 4, *P. marginalis* BJW1.

를 cloning하여 분석한 결과 strA의 염기서열이 *P. syringae* A2, *X. campestris*, *E. amylovora*, *Corynebacterium striatum* 등에서 나타난 것과 동일한 다섯 곳에서 polymorphism 양상을 보여주었다(자료 미제시).

스트렙토마이신 저항성 유전자의 위치를 확인하기 위해 StrAB primer로 증폭된 DNA 절편을 probe로 사용하여 Southern hybridization을 수행한 결과, Fig. 3과 같이 국내에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae* KHP7과 BJB3가 가지고 있는 3개의 plasmid 중 약 100 kb 정도의 크기가 큰 plasmid에 유전자가 존재하였다. 대조균으로 사용한 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa11의 경우는 2개의 plasmid에 streptomycin 저항성 유전자를 가지고 있었으며 이 중 하나는 국내의 참다래 꽃썩음병균이 가지고 있는 저항성 plasmid와 크기가 비슷하였다. *P. marginalis* BJW1은 chromosomal DNA에 저항성 유전자를 가지고 있었다.

저항성 유전자가 transposon에 연관되어 있음은 접합성 plasmid 등 다른 부위로의 전이가 가능함을 의미하며 약제의 연용이 선택압으로 작용할 때 스트렙토마이신 저항성 균주 집단의 급격한 증가를 예상할 수 있다. 이러한 현상을 막기 위해서는 스트렙토마이신이 주성분인 약제의 계속된 사용을 피하는 방제 프로그램을 사용해야 할 것이다.

요 약

우리나라 참다래 과수원에서 참다래 꽃썩음병을 일으키는 원인 세균인 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*를

분리하였다. 총 41개 균주 중 스트렙토마이신 저항성을 보이는 2개의 균주를 대상으로 PCR과 염기서열 결정을 통해 저항성 유전자 구조를 조사하였다. PCR 결과 스트렙토마이신 저항성 유전자는 Tn5359a에 들어 있는 strA-strB 구조인 것으로 밝혀졌다. *Xanthomonas campestris*와 *Erwinia amylovora*에서 알려진 IS6100과 IS1133은 발견되지 않았다. strA-strB의 염기서열은 이미 밝혀진 Tn5393a와 동일하였다. 두 스트렙토마이신 저항성 균주는 각각 3개의 플라스미드를 가지고 있었으며 저항성 유전자는 그 중 100 kb의 플라스미드에 들어 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moor, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Burr, T. J., Norelli, J. L., Katz, B., Wilcox, W. F. and Hoying, S. A. 1988. Streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple orchards and its association with a conjugative plasmid. *Phytopathology* 78: 410-413.
- Chiou, C. S. and Jones, A. L. 1991. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathol.* 81: 710-714.
- Chiou, C. S. and Jones, A. L. 1993. Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 175: 732-740.
- Chiou, C. S. and Jones, A. L. 1995. Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathol.* 85: 324-328.
- Han, H. S., Koh, Y. J., Hur, J. -S. and Jung, J. S. 2004. Occurrence of the strA-strB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas* species isolated from kiwifruit plants. *J. Microbiol.* 42: 365-368.
- Han, H. S., Nam, H. Y., Koh, Y. J., Hur, J. S. and Jung, J. S. 2003. Molecular bases of high-label streptomycin resistance in *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *J. Microbiol.* 41: 16-21.
- Jones, A. L., Norelli, J. L. and Ehret, G. R. 1991. Detection of streptomycin resistant *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in Michigan apple orchards. *Plant Dis.* 75: 529-531.
- Koh, Y. J., Jung, J. S. and Hur, J.-S. 2003. Current status of occurrence of major disease on kiwifruits and their control in Korea. *Acta Hort.* 610: 437-443.

- Minsavage, G. V., Canteros, B. I. and Stall, R. E. 1990. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 80: 719-723.
- Palmer, E. L., Teviotdale, B. L. and Jones, A. L. 1997. A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 detected in *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4604-4607.
- 신종섭, 박종규, 김경희, 박재영, 한효심, 정재성, 허재선, 고영진. 2004. 참다래 꽃썩음병균의 동정 및 발생생태. *식물병연구* 10: 290-296.
- Sundin, G. W. 2000. Examination of base pair variants of the *strA-strB* streptomycin resistance genes from bacterial pathogens of humans, animals and plants. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 848-849.
- Sundin, G. W. and Bender, C. L. 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 Bender, C. L. 1995. Expression of the *strA-strB* streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2891-2897.
- Tauch, A., Krieft, S., Kalinowski, J. and Puhler, A. 2000. The 51,409 bp R plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolated *Corynebacterium satriatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. *Mol. Gen. Gene.* 263: 1-11.