

*Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*에 의한 매실의 세균성궤양성김두영 · 한효심 · 고영진<sup>1</sup> · 정재성\*순천대학교 생물학과, <sup>1</sup>응용생물학과**Bacterial Canker of Japanese Apricot (*Prunus mume*) Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum***Doo Young Kim, Hyo Shim Han, Young Jin Koh<sup>1</sup> and Jae Sung Jung\*Department of Biology and <sup>1</sup>Department of Applied Biology, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

(Received on November 8, 2005)

Bacterial canker of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) was found in all orchards located at southern area of Korea. Typical symptoms were characterized by dark spots formed on fruits, brown lesions on leaves, and bacterial exudate oozed out of the cracked bark of diseased tree. Thirty-eight isolates from 16 different areas were identified on the basis of biochemical and physiological characteristics (LOPAT and GATTA test) and also on the basis of 16S rDNA and ITS sequences. Pathogenicity tests confirmed that bacterial canker of Japanese apricot in Korea is caused by *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*.

**Keywords :** Bacterial canker, Japanese apricot, *Prunus mume*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*,

매실나무(*Prunus mume*, Sieb. et Zucc.)는 동아시아의 온난한 지역이 원산지로서 알려져 있으며 한국, 중국, 일본, 대만 등에 야생종이 분포하고 있다. 매실나무는 핵과류 중에서도 개화기가 빠르고, 서리 및 동해에 약하기 때문에 연평균 기온이 12~15°C이고 개화기 기온이 10°C 이상인 지역에서 재배되고 있다. 우리나라에서는 삼국시대부터 꽃을 감상할 목적으로 정원에 심어 재배하다가 고려 중엽부터 열매를 약용으로 이용한 것으로 알려지고 있다. 그러나 오랜 재배 역사에 비추어 품종개량이나 재배법의 개선은 이루어지지 않고 가정용 과수로서 소규모로 재배되어 왔을 뿐이다.

최근 들어 매실을 사용한 양조산업의 발전과 절임과실의 수출확대, 매실추출물을 이용한 식품의 개발 등의 영향으로 매실이 새로운 소득과수로 등장함에 따라 재배면적이 급속히 확대되고 있다. 우리나라에서 집중적으로 재배되기 시작한 것은 1980년대 초로 1980년에는 200 ha에서 약 900톤이 생산될 정도로 미미한 정도였다. 그러나 1990년부터 재배면적과 생산량이 증가하기 시작하여 1995

년에는 1,371 ha에서 8,246톤으로 생산량이 급격히 늘어났으며, 2002년에는 9,148호 농가가 2,605 ha에 매실나무를 재배하여 18,547톤의 매실을 생산하였다(농림부, 2002).

재배 초기에는 매실이 병해가 없는 무병과수로 인식되었으나, 1990년부터 재배면적이 늘어나면서 병해가 발생하여 이에 대한 관심을 갖게 되었다. 그러나 수확기가 빠르며 과실 수확이 끝나면 관심이 사라지게 됨에 따라 병해 및 이에 대한 체계적인 방제에 관한 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다. 매실의 주요 세균성 병해에는 세균성구멍병과 궤양병을 들 수 있다. 특히 이들은 과실에 직접 피해를 주며 매실의 품질에 직접 영향을 미치는 병해이다. 매실궤양병은 과실에 작은 점무늬가 생기기 시작하여 직경 2~10 mm의 불규칙한 적갈색 반점이 되었다가, 병반이 과실 깊숙하게 진행된다. 매실을 비롯한 핵과류의 궤양병 원인세균은 *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*(한국식물병리학회, 2004; 최와 한, 2004; 김 등, 2005) 또는 *P. syringae* pv. *syringae*(Liang 등, 1994; Wimalajeewa, 1997)로 알려져 있으나 우리나라에서 매실 궤양병 병원균을 분리하여 동정한 보고는 없는 실정이다.

본 연구에서는 우리나라에서 매실나무가 재배되고 있는 남해안의 과수원으로부터 매실 궤양병균을 분리하여

\*Corresponding author

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

E-mail) jjung@sunchon.ac.kr

생리, 생화학적 방법과 분자유전학적 방법을 이용하여 동정하였다.

## 재료 및 방법

**병원세균의 분리.** 2004년 12월부터 2005년 6월까지 전남 강진, 곡성, 광양, 보성, 순천, 장흥, 해남, 화순 및 경남 사천, 진주, 하동지역 등 11개 시군의 16개 과수원에서 재배되는 매실나무를 대상으로 월동기와 수확기 기간에 궤양병의 병징을 보이는 식물체로부터 균주를 분리하였다. 궤양병 증상을 나타내는 매실나무의 목질부나 매실과육의 병환부를 잘라내어 분쇄한 후 살균수가 담긴 시험관에 현탁시켰다. 이 세균 현탁액을 King's B agar에 도말한 뒤 배지를 25°C에서 48시간 배양한 후 형광색을 나타내는 단일 균총을 수거하였다. 균주의 보관은 20% glycerol을 첨가시켜 -70°C에 보관하였다. 실험에 사용한 38개 균주는 Table 1에 나타내었다.

*P. syringae* pv. *morsprunorum*, *P. syringae* pv. *syringae*와 *P. syringae* pv. *glycinea*의 표준균주는 LMG Culture Collection(Belgium)에서 분양 받아 사용하였다.

**병원세균의 생리·생화학적 특성 조사.** 매실에서 분리한 세균을 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 생리·생화

학적 특성을 조사하였다. 세균을 동정하기 위하여 그람염색과 함께 levan 형성, oxidase, potato soft rot, arginine dihydrolase 활성과 37°C에서 성장 유무를 조사하였으며 (LOPAT), 병원형(pathovar)을 동정하기 위하여 gelatin 액화, aesculin 가수분해, tyrosinase 활성, tartrate의 이용 유무(GATTA)를 확인하였다.

**PCR.** 16S rDNA를 증폭하기 위한 PCR primer는 진정세균의 16S rRNA 유전자에 대한 universal primer로 *Escherichia coli* 16S rRNA의 49-58번 위치에 상응하는 16S-F primer (5'-TNA NAC ATG CAA GTC GAI CG-3')와 1510-1492번에 해당하는 16S-R primer (5'-GGY TAC CTT GIT ACG ACA TT-3')를 사용하였다(Moyer, 1994). ITS (internal transcribed spacer)의 증폭은 *P. syringae*의 16S-23S ITS 염기서열을 증폭할 수 있는 D21 (5'-AGC, CGT AGG GGA ACC TGC GG-3')과 D22 (5'-TGA CTG CCA AGG CAT CCA CC-3') primer를 사용하였다(Manceau와 Horvais, 1997).

PCR을 위한 주형 DNA는 Han 등(2003)의 방법으로 준비하였다. 세균 배양액을 100 µl씩 취하여 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세균을 침전시킨 뒤 멸균수로 두 차례 세척하였다. 여기에 100 µl의 0.1%(wt/vol) Chelex-100 resin (Bio-Rad Lab.) 용액을 넣어 10분간 끓인 후 원심분리하여 상층액을 주형 DNA로 사용하였다.

PCR 반응액은 1 µl의 DNA, 2U *Taq* polymerase (Takara Co.), 5 µl의 10X buffer (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH8.0), 각각 1 µM의 primer, 200 µM의 deoxyribonucleoside triphosphates를 넣고 증류수로 최종 반응용액의 부피를 50 µl로 조절하였다. Perkin-Elmer사의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하여 94°C에서 5분간 전처리한 후, 94°C에서 30초간 변성, 55°C에서 30초간 재생반응, 72°C에서 20초간 연장반응을 30회 반복하고 마지막 연장반응은 72°C에서 7분간 실시하였다. 증폭된 DNA 절편은 1.0% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

**염기서열의 분석.** 증폭된 PCR 산물은 agarose gel 전기영동으로 목적밴드를 분리한 다음 Ultra clean kit (Mobio Co.)로 정제하였고, ALF-Express automatic sequencer (Pharmacia Biotech, Lyon, France)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열의 비교분석은 GenBank의 NCBI BLAST search 프로그램을 활용하였다.

**병원성 검정.** 매실궤양병에 감염된 부위에서 분리하여 동정되어진 균주 중 하나인 MJA5 균주를 pepton-sucrose 배지에 24시간 배양한 후 살균수로 10<sup>5</sup> cfu/ml의 농도로 희석한 후 병원성 검정에 사용하였다. 준비된 세균 현탁액을 멸균된 주사기로 0.1 ml씩 매실과육에 접종하였다.

**Table 1.** Bacterial strains used in this study

No.	Geographic origin	Isolates
1	Jeonnam, Ganjin, Sungjeon	MKS1, MKS2
2	Jeonnam, Gokseong, Okgok	MKO1, MKO2
3	Jeonnam, Gwangyang, Daap	MGD3-1, MGD3-2, MGD3-3, MGD3-4
4	Jeonnam, Boseong, Josung	MBJ1, MBJ2, MBJ3, MBJ4
5	Jeonnam, Boseong, Yeadang	MBA3, MBA4
6	Jeonnam, Suncheon, Woldeung	MSW1, MSW2
7	Jeonnam, Jangheung, Anyang	MJA5, MJA6, MJA7, MJA8
8	Jeonnam, Haenam, Sanyee	MHS1, MHS2
9	Jeonnam, Hwasun, Hwasun	MWW1, MWW2
10	Gyeongnam, Sacheon, Mookgok	MSM1, MSM2
11	Gyeongnam, Sacheon, Sungbang	MSS1, MSS2
12	Gyeongnam, Sacheon, Jeabang	MSJ1, MSJ2
13	Gyeongnam, Jinju, Munsan	MJM1, MJM2
14	Gyeongnam, Hadong, Arkyang	MHA1, MHA2
15	Gyeongnam, Hadong, Jeockryang	MHJ1, MHJ2
16	Gyeongnam, Hadong, Hwaggae	MHH1, MHH2
Total		38

대조구로는 참다래 궤양병 균주인 *P. syringae* pv. *actinidiae*를 사용하였다. 접종된 매실은 배양병에 넣어 25°C 항온기에서 배양하였다.

### 결과 및 고찰

**병징.** 매실나무 궤양병의 병반을 살펴보면, 과실의 표피부분에는 진갈색으로 과육의 색이 변하며, 심한 것은 세균배양액이 나오기도 한다. 병반이 나타난 과실 부위를 절단해 보면 표피에 나타난 증상이 과육 속에서도 나타나 유사한 증세를 보이지만 병반이 속까지 진행되지 않는 세균성구멍병과 구별되었다(Fig. 1A). 궤양병 증상은 매실나무의 과육뿐만 아니라 잎과 주지, 1차 가지 모두에서 증상이 나타났으며, 주지와 1차 가지부분에서는 과육에서와 마찬가지로 세균 유출액이 나오는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1C-F).

**병원세균의 생리·생화학적 특성.** 매실나무와 과실

의 병환부에서 분리된 세균의 동정을 위해 그람염색을 한 결과 그람음성이었으며, KB배지에서 형광색소를 생성하였다. 또한 levan은 형성하였지만, oxidase와 arginine dihydrolase 활성을 나타내지 않았으며, potato soft rot에서도 활성을 나타내지 않았다. 대조구에서는 gelatin을 가수분해하였지만 이 세균은 그렇지 못하였으며, aesculin 가수분해에서는 활성을 나타냈다. Tyrosinase 활성은 나타나지 않았으나, tartrate는 이용할 수 있었다(Table 2). 분리된 38개 균주에 대하여 특성을 조사하여 동일한 결과를 얻었으나 표에는 두 균주만 표시하였다. 이러한 특성은 Schaad 등(2001)이 기술한 *P. syringae* pv. *morsprunorum*의 특성과 일치하였다.

**분자생물학적 특성조사.** 분리한 균주 중 지역별로 대표 균주 8개를 선정하여 16S rDNA와 ITS의 염기서열을 비교하였다. 먼저 PCR을 통해 16S rDNA를 증폭한 후 염기서열을 결정한 결과 전남 장흥에서 분리한 MJA5를 기준으로 할 때 전남지역에서 분리한 균주인 MKS1, MGD3,

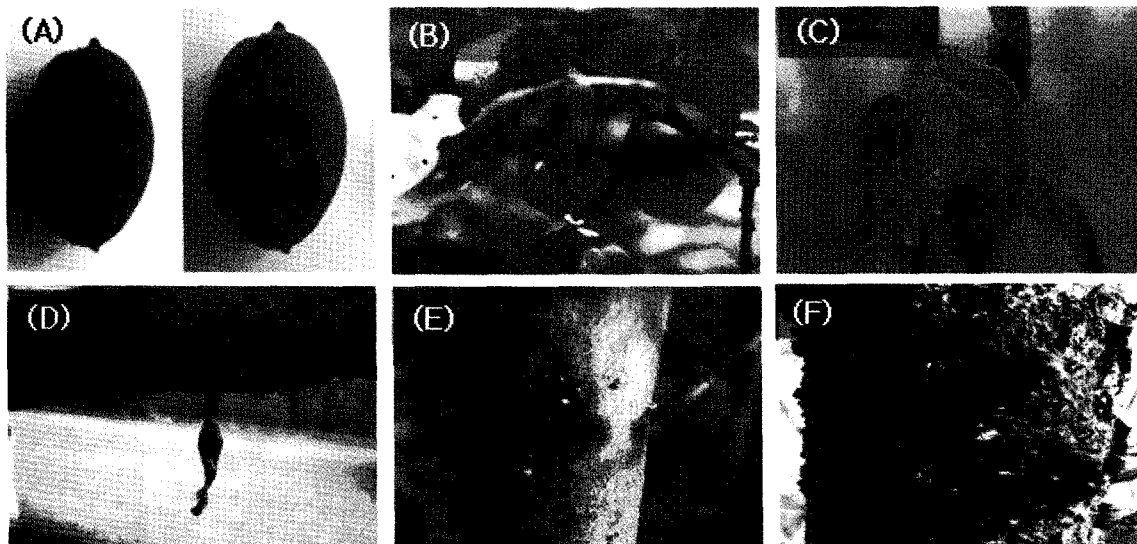


Fig. 1. Natural symptoms on disordered fruits (A-B), leaves (C), stem (D) and trunks (E-F) by bacterial canker pathogen.

Table 2. Characteristics of bacterial strains isolated from bacterial canker of Japanese apricot and reference strains

Strains <sup>a</sup>	G <sup>b</sup>	K	L	O	P	Ad	Gl	Ah	T	Tu
MKS1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
MGD3	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>P. sm</i>	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>P. sg</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>P. ss</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-

<sup>a</sup>*P. sm*, *P. syringae* pv. *morsprunorum*; *P. sg*, *P. syringae* pv. *glycinea*; *P. ss*, *P. syringae* pv. *syringae*.

<sup>b</sup>G, Gram stain; K, fluoresced green under UV light on KB; L, levan formation test; O, oxidase test; P, potato soft rot test; Ad, arginine dehydro-lase test; Gl, gelatin liquefaction test; Ah, aesculin hydrolysis test; T, tyrosinase activity test; Tu, tartrate utilization test.

**Table 3.** Sequence similarity of 16S rDNA and ITS sequences

Strains <sup>a</sup>	% similarity with MJA5		Strains	% similarity with MJA5	
	16S rDNA	ITS		16S rDNA	ITS
MKS1	100.0 (0/1462)	100.0 (0/610)	MSS1	99.9 (1/1462)	99.9 (1/610)
MGD3	100.0 (0/1462)	100.0 (0/610)	MJM1	99.9 (1/1462)	99.7 (2/610)
MBJ1	100.0 (0/1462)		<i>P. sm</i>	99.9 (2/1462)	99.7 (2/610)
MSW1	100.0 (0/1462)	100.0 (0/610)	<i>P. ss</i>	98.2 (27/1462)	98.5 (9/610)
MHS1	100.0 (0/1462)		<i>P. sg</i>	97.9 (31/1462)	97.7 (13/610)

<sup>a</sup>*P. sm*, *P. syringae* pv. *morsprunorum*; *P. ss*, *P. syringae* pv. *syringae*; *P. sg*, *P. syringae* pv. *glycinea*.

MBJ1, MSW1 및 MHS1과는 총 1,462개의 염기서열이 정확히 일치하였다. 그러나 경남지역에서 분리한 균주인 MSS1과 MJM1과는 1 bp의 차이를 보였다. 한편 표준균주인 *P. syringae* pv. *morsprunorum*의 16S rRNA 유전자와 99.9% (2/1462 bp)의 상동성을 보였으며, *P. syringae* pv. *syringae*와 98.2% (27/1462), *P. syringae* pv. *glycinea*와는 97.9% (31/1462)가 각각 일치하였다. ITS 염기서열 분석결과, 총 610 bp가 *P. syringae* pv. *morsprunorum*의 염기서열과 99.7%의 상동성을 나타내었다. *P. syringae* pv. *syringae*와는 98.5%, *P. syringae* pv. *glycinea*와는 97.7%의 상동을 나타내었다(Table 3). 국내에서 분리된 균주들 사이에는 염기서열에 차이가 거의 없어 유전적 유연관계가 가까울 것으로 생각되었다. 흥미 있는 점은 전남지역에서 분리된 균주들 사이에는 염기서열이 100% 동일하였으나 경남지역에서 분리된 균주와는 1~2 bp의 차이가 있었다.

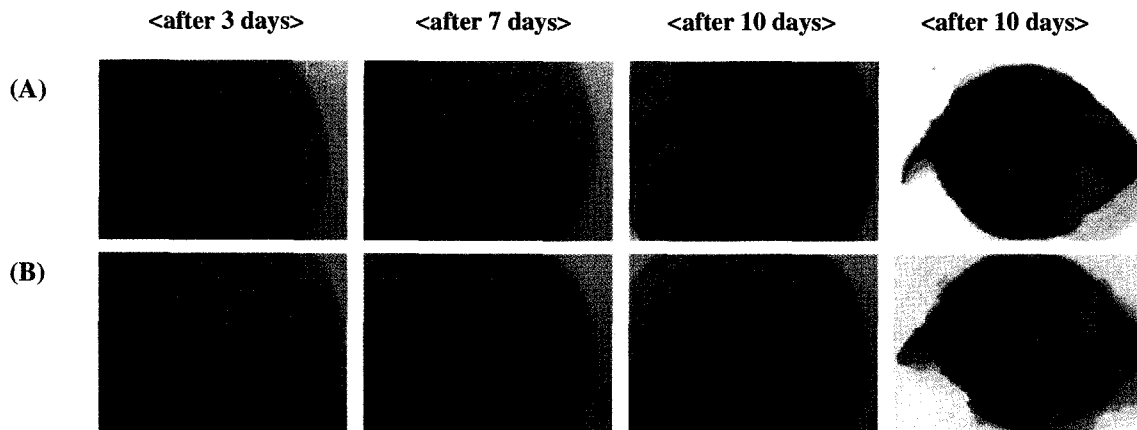
생리·생화학적 특성과 분자생물학적 방법을 이용한 분석 결과 우리나라의 매실궤양병균의 원인세균은 *P. syringae* pv. *morsprunorum*임을 알 수 있었다.

**병원성 검정.** *P. syringae* pv. *morsprunorum*으로 동정된 균주 MJA5를 배양한 뒤 주사기로 매실 과육에 접종

한 후 25°C 항온기에서 배양하면서 3일, 7일, 10일을 두고 관찰하였다. 그 결과 접종 3일 후부터 접종부위 주위로 진한 갈색의 병반이 생성되어지는 것을 확인할 수 있었다. 7일에는 3일보다 더 넓은 부위로 병반이 점점 커져 나가는 것을 확인할 수 있었으며, 10일이 지난 후에는 병반의 크기가 훨씬 더 커지고 앞에서도 병반이 나타났다 (Fig. 2). *P. syringae* pv. *actinidiae*를 접종한 대조구에서는 병징이 발생하지 않았다. 인공접종하여 발병된 병반부에서도 자연발병한 것과 똑같은 *P. syringae* pv. *morsprunorum*이 분리되었다.

## 요 약

한국의 남부지방에 소재하는 대부분의 매실 과수원에서 매실궤양병이 발견되었다. 감염된 나무에서는 과실에 검은 반점과 함께 잎에는 갈색 병반을 보이며, 감염된 줄기나 가지의 균열에서 붉은색의 세균 유출액이 흘러나오는 등 일반적으로 알려져 있는 궤양병의 징후가 나타났다. 16지역에서 분리한 38개 균주에 대하여 생리, 생화학적 특성을 (LOPAT과 GATTa 실험) 조사하고 16S rDNA



**Fig. 2.** Symptoms on fruits and leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* MJA5 (A) and *P. syringae* pv. *actinidiae* WGD16 (B; causal agent of kiwifruit canker, negative control).

및 ITS 염기서열을 분석함으로써 매실궤양병의 원인 세균을 동정하였다. 이 결과와 병원성 검정을 통해 한국에서 매실에 궤양병을 일으키는 원인 세균은 *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*임을 알 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

### 참고문헌

최재을, 한광섭. 2004. *Pseudomonas* 및 관련 속. 농업과학기술원. 45 pp.

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.

한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명목록. 342 pp.

김경희, 노일섭, 허재선, 이승돈, 고영진. 2005. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*에 의한 양앵두나무 궤양병. 식물

병연구. 11: 82-83.

Liang, L. Z., Sobiczewski, P., Paterson, J. M. and Jones, A. L. 1994. Variation in virulence, plasmid content, and genes for coronatine synthesis between *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and *P. s. syringae* from *Prunus*. *Plant Dis.* 78: 389-392.

Manceau, C. and Horvais, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *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.

Moyer, C. L., Dobbs, F. C. and Karl, D. M. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 871-879.

농림부. 2002. 농림통계연보.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, Minnesota, USA. 373 pp.

Wimalajeewa, S. C. 1997. Epidemiology and control of bacterial canker of apricot and cherry in Victoria, Australia. *Develop. Plant Pathol.* 9: 584-589.