

우리나라에서 분리한 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*의 유전적 다양성박소연 · 이영선 · 신종섭¹ · 고영진² · 정재성*순천대학교 생물학과, ¹순천시 농업기술센터, ²순천대학교 식물외과

Received January 7, 2009 / Accepted April 22, 2009

Genetic Diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* Isolated in Korea. So Yeon Park, Young Sun Lee, Jong Sub Shin¹, Young Jin Koh² and Jae Sung Jung*. Dept. of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, ¹Suncheon-si Agricultural Technology and Extension Center, Suncheon 540-804, Korea, ²Dept. of Plant Medicine, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea - *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, the causal agent of bacterial shot holes in stone fruits, was known to have a low population diversity. To investigate the genetic characteristics of *X. arboricola* pv. *pruni* isolated in Korea, three strains which have identical 16S rDNA sequences - including type strain (LMG852), Japanese isolate (MAFF301420) and Korean isolate (XWD1) - were analysed based on the nucleotide sequences of three DNA regions and RAPD pattern. No sequence diversity among the three strains was found within the ITS, *glnA* and *atpD* gene sequences. However, five of 756 nucleotides of the *atpD* gene determined (accession number FJ429319) were different from those of the French strain available from the Genbank database. RAPD analyses performed with 40 different arbitrary primers revealed that two strains isolated from Korea and Japan showed similarity in their band patterns distinguished by type strain. These results suggest that Korean and Japanese strains are very close and belong to a population with a low genetic diversity, and might have a different origin from strains found in West Europe.

Key words : *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, bacterial shot hole, genetic diversity, RAPD

서 론

Xanthomonas arboricola pv. *pruni*는 핵과류 과수에 세균성 구멍병을 일으키는 병원성 세균이다. 1903년 미국 미시간주에서 이 세균이 자두에 구멍병을 일으키는 것으로 처음 보고된 이래[12] *Prunus*속의 과수인 복숭아, 살구, 아몬드, 양앵두 등에 병을 일으키는 것으로 알려지고 있다[11].

유럽에서 세균성 구멍병 발생에 대한 최초의 보고는 국가에 따라 다르다. 이탈리아에서는 1934년 처음 보고된 이래 1970년대 후반 이후 복숭아와 자두에 커다란 피해를 입히고 있는 반면에[1], 루마니아에서는 1941년에 처음 보고되고 있다. 프랑스에서는 1995년 첫 보고 이후 2000년에 복숭아와 자두에 극심한 피해를 일으켰으며 병해가 발생된 과원이 증가되고 있는 실정이다[2]. 한편 이란에서는 2005년에 핵과류 과수에서 처음 이 병원균이 보고되었다[9]. *X. arboricola* pv. *pruni*에 의한 세균성 구멍병은 살구에 비해 복숭아와 자두에 특히 큰 피해를 주는 것으로 알려지고 있다[5]. 유럽연합에서는 이 병원균을 검역대상 세균으로 지정하여 관리하고 있다[6]. 우리나라에서 복숭아 세균성 구멍병에 대한 기록은 1928년부터이나 실제로 원인균을 분리하여 동정한 결과 *X. arboricola* pv. *pruni*와 함께 *Erwinia nigrifluens*가 원인세균이라는 것이 보고된 것

은 2000년의 일이다[3].

Boudon 등[2]은 여러 나라에서 분리된 64 균주에 대한 몇 가지 유전자 부위의 염기서열 비교와 FAFLP (fluorescent amplified fragment length polymorphism) 분석을 통해 이 병원균이 처음 북미에서 기원하여 전 세계로 퍼졌을 것이라는 가설을 제시하였다.

본 연구에서는 우리나라에서 분리한 *X. arboricola* pv. *pruni*의 *rrn* 오페론의 16S-23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS)와 2개의 housekeeping 유전자의 부분 염기서열을 결정하여 다른 나라에서 분리된 균주들과 비교하고, 아울러 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 분석을 통해 우리나라 균주의 유전적 다양성과 기원에 대하여 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

균주

우리나라 균주 9개(XWD1, XWD2, XWD3, XWD4, XWD5, XWD6, XWD7, XWD8, XWD9)는 전남 소재 복숭아 과수원에서 세균성 구멍병 병징을 보이는 과실에서 분리하여 생리·생화학적 방법을 통해 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*로 동정된 균주들이다. 대표균주인 *X. arboricola* pv. *pruni* LMG852와 *X. campestris* pv. *campestris* KACC 10913은 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터, *X. arboricola* pv. *pruni* MAFF301420은 일본 NIAS에서 분양받았다.

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3616, Fax : +82-61-750-5469

E-mail : jjung@suncheon.ac.kr

DNA 추출

Genomic DNA는 AccuPrep genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 추출하였으며, DNA의 양은 DyNA Quant200 fluorometer (Hoefer)를 사용하여 정량하였다.

PCR primer

16S rDNA, 16S-23S rDNA ITS와 *glnA* 및 *atpD*의 암호화 부위를 증폭하기 위한 PCR primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

PCR 증폭 및 Cloning

ITS의 PCR 증폭은 30 ng의 주형 DNA와 100 μ M dNTPs, 각 0.5 μ M의 primer, 0.75 U의 *Taq* polymerase (Bioneer)를 포함하는 25 μ l의 반응액에서 수행하였다. 반응 조건은 94°C에서 5분 전 처리 시킨 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 30 cycle 반복하였다. 16S rDNA, *glnA*와 *atpD* 유전자를 증폭 할 때 annealing 온도는 56°C였다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel로 분리한 뒤 밴드를 잘라내어 gel extraction kit (Bioneer)로 DNA를 회수하였다. 회수된 PCR 산물은 pGEM-T Easy 벡터(Promega)에 제조사에서 제시한 방법에 따라 재조합 시켰다. Ligation된 반응액을 *Escherichia coli* DH5 α 에 형질전환 시켰다. 재조합 플라스미드를 제한효소 *EcoRI*로 절단하여 삽입된 절편을 전기영동으로 확인하였다.

염기서열 분석

재조합 플라스미드의 삽입절편의 염기서열을 Solgent사에 의뢰하여 dideoxy chain termination 방법으로 결정하였다. 결정된 염기서열은 ChromasPro program (available at <http://www.technelysium.com.au/>)으로 확인한 뒤 Phydit program (available at <http://www.plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>)을 사용하여 정돈시켰다. 염기서열의 상동성은 BLAST를 이용하여 분석하였다.

RAPD 분석

RAPD 분석을 위해 사용된 primer는 Operon 사의 random

primer 40개를 사용하였다. PCR 반응액의 조성구와 반응 조건은 앞의 조건과 같았다. 단 annealing 온도는 37°C로 하였고 45 cycle을 반응시켰다. PCR 산물은 1.2%의 agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 밴드의 패턴을 확인하였다.

결과 및 고찰

생리·생화학적 특성과 16S rDNA 분석을 통해 국내에서 분리된 균주들이 *X. arboricola* pv. *pruni*임을 확인하였다. 우리나라 균주인 XWD1부터 XWD 9까지 9개 균주, 일본에서 분리된 균주인 MAFF301420과 pathovar의 대표 균주인 LMG852의 16S rDNA 염기서열은 각각 결정 한 결과 서로 100% 동일함을 확인하였다(accession number FJ606765). 같은 pathovar라 할지라도 이와 같이 지리적 기원을 달리하는 균주들 사이에 16S rDNA 변이가 전혀 없다는 사실은 이 세균의 유전적 다양성 정도가 낮음을 말해 준다. 그러므로 다른 염기서열에서의 변이를 살펴보고자 하였다.

ITS는 세균에 따라 크기와 염기서열에서 16S rDNA 유전자보다 다양한 유전적 변이를 보이기 때문에 세균의 종간 또는 종내의 유연관계를 밝히는 도구로 널리 쓰여 지고 있다 [7]. *Xanthomonas*속의 종들 사이의 유사도는 63-99%인 것으로 보고되고 있다[8]. 세 균주의 ITS를 분석한 결과 이들 사이의 염기서열은 동일하였으며 GenBank에 등록된 *X. arboricola* pv. *pruni*와도 같았다(accession no. AF035441).

Housekeeping 유전자 중에서 선택한 *glnA*와 *atpD* 유전자는 사람에게 병원성인 세균에 대한 유전학적 정보를 얻는데 주로 쓰였으며 식물에 병원성인 세균에 적용한 것은 Boudon 등[2]에 의해 처음 시도 되었다. *glnA* 유전자는 glutamine synthetase I을 암호화 하며 세균의 진화를 연구하는데 이용되고 있다[10]. 사람의 병원성 세균인 *Helicobacter pylori*에서 균주들 사이의 염기서열 상동성은 78%로 매우 낮은 것으로 나타났다 [13]. 그러나 본 연구에서 이루어진 세 균주의 유전자 염기서열은 이미 보고된 *X. arboricola* pv. *pruni*의 960 bp 염기서열과 동일하였다(accession no. AJ936968).

Table 1. Primers used in this study

Coding region	Primer	Nucleotide sequences (5'→3')	Length (bp)	Reference	
ITS	P-X-16S-Fb	GTTCCCGGGCCTTGTTACACAC	1,005		
	P-X-23S-Rb	GGTCTTTTTACCTTTCCCTC			
atpD	P-X-ATPD-F	GGGCAAGATCGTTCAGAT	756		Boudon, <i>et al.</i> , (2005)
	P-X-ATPD-R	GCTCTTGGTCGAGGTGAT			
glnA	P-X-GLNA-F	ATCAAGGACAACAAGGTCG	960		
	P-X-GLNA-R	GCGGTGAAGGTCAGGTAG			
16S rDNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1,517	Stackebrandt <i>et al.</i> (1993)	
	1525R	AAAGGAGGTGATCCAGCC			

한편 *H. pylori*에서 *atpD* 유전자는 81%의 상동성을 보이지만 *Samonella enterica* 균주들 사이에서는 99%의 염기서열이 동일하여[4] 종에 따라 변이의 폭이 다른 것을 알 수 있다. 이 유전자는 F1-F0-ATPase를 암호화한다. 본 연구에서 결정된 세 균주, LMG852, MAFF301420, XWD1의 *atpD*의 염기서열은 서로 동일하였다(accession no. FJ429319). 그러나 Boudon 등[2]에 의해 보고된 *X. arboricola* pv. *pruni* CFBP6653의 염기서열 756 bp (accession no. AJ936969)와 비교하여 5 곳에서 서로 다른 것으로 나타났다(Fig. 1). 저자들은 이 논문에서 프랑스 균주인 CFBP6653을 포함하여 서유럽 및 미국 등에서 분리된 64균주의 ITS와 housekeeping 유전자의 염기서열 총 3,898 bp를 결정하여 서로 동일하다고 보고하였다. 그러므로 본 연구에서 결정된 균주의 *atpD*의 염기서열이 이들과 다르다는 사실은 비록 5개의 염기이지만 병원균의 기원과 전파에 관한 단서를 찾는 데 중요한 의미를 갖는 것으로 생각되었다. 특히 type 균주인 LMG852는 뉴질랜드, MAFF301420은 일본, XWD1은 우리나라에서 분리된 균주임으로 이들 세 균주는 유럽에서 보고된 균주들과 다른 기원을 갖고 있음을 알 수 있다. 유럽에서 발견되고 있는 *X. arboricola* pv. *pruni*의 기원은 처음으로 보고되어 기재된 북아메리카로 생각되고 있다. 그 이유는 동일한 genotype의 균주가 지리적으로 격리된 두 대륙에서 병을 일으키고 있기 때문이다. 그러므로 처음 북미에서 발생한 병원세균이 사람에 의해 유럽으로 전파되었고 프랑스에는 최근에 유입되었을 것이라는 가설이 제기되고 있다[2]. 일반적으로 식물 병원성세균의 기원에 대해 야생 숙주에서 유래한 세



Fig. 1. Sequence alignment of the *atpD* region of *X. arboricola* pv. *pruni* strain LMG852 and strain CFBP6653. Dots indicate identical nucleotides.

균이 재배되고 있는 새 숙주로 옮겨져 점차 적응하고, 다양한 경로를 통해 전파되는 것으로 추정하고 있다. 과수에 심각한 질병을 일으키는 이 세균의 출현이 비슷한 시기에 여러 곳에서 일어났을 가능성이 있음을 비추어 볼 때 우리나라 균주를 포함하는 세 균주는 유럽 균주와 달리 북미에 기원을 두지 않고 있음을 추정할 수 있다.

동일한 병원균에 의한 식물병이 서로 다른 지역에서 발생할 경우, 병원균 개체군의 유전적 분석을 통해 개체군 사이의 유전적 다양성을 파악할 수 있을 뿐 아니라 유전적 변이를 살펴봄으로써 병원균의 전파에 대한 정보를 얻을 수 있다. 세균의 유전적 다양성을 분석하기 위하여 널리 쓰이는 방법 중 하나는 RAPD분석이다.

국내에서 분리된 9개 균주를 대상으로 PCR를 수행한 결과 사용된 모든 primer에서 모든 국내균주에서 동일한 DNA 절편이 증폭되었다. Fig. 2는 40개의 primer 중 증폭된 밴드 수가 적당한 세개 primer OPF1 (5'-ACGGATCCTG-3'), OPD3 (5'-GTCGCCGTC-3'), OPD7 (5'-TTGGCACGGG-3')에 의한 RAPD 결과이다. 이 결과는 국내에서 분리된 병원균의 집단이 유전적으로 동일한 한 종류의 genotype으로 이루어져 있음을 말해 준다. 이들 primer로 *X. arboricola* pv. *pruni*의 type strain인 LMG852, 우리나라 균주인 XWD1과, 일본 균주인 MAFF301420을 대상으로 RAPD를 수행하였다. *X. arboricola* pv. *pruni* 세 개 균주와 함께 대조군으로 사용한 *X. campestris* pv. *campestris*를 비교했을 때 pv. *campestris*는 pv. *pruni*와는 뚜렷하게 구별되는 밴드 양상을 보였다(Fig. 3A, B). 특히,

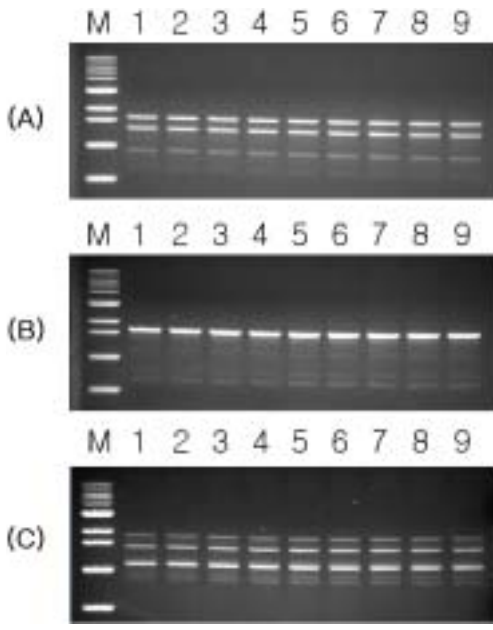


Fig. 2. RAPD profiles of *X. arboricola* pv. *pruni* strains isolated in Korea using primer OPF-1 (A), OPD-3 (B), and OPD-7 (C). Lane M, 1 kb marker (Bioneer); lanes 1 to 9, pv. *pruni* XWD1 to XWD9, respectively.

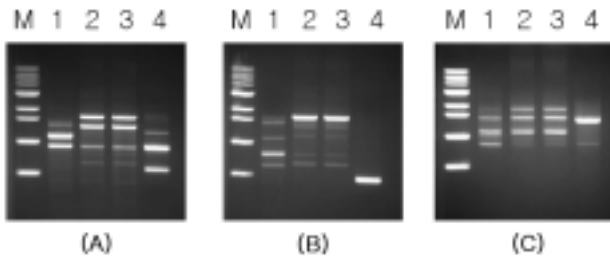


Fig. 3. RAPD profiles of *X. arboricola* pathovars using primer OPF-1 (A), OPD-3 (B), and OPD-7. Lane M, 1 kb marker (Bioneer); lane 1, *pv. pruni* LMG852; lane 2, *pv. pruni* MAFF301420; lane 3, *pv. pruni* XWD1; lane 4, *X. campestris* *pv. campestris* KACC10913.

이러한 결과를 통해 우리나라와 일본에서 분리된 *X. arboricola* *pv. pruni* 균주는 유전적으로 가까우며 뉴질랜드에서 분리된 type strain과는 다른 genotype임을 알 수 있다. 또한 세 균주의 *atpD* 염기서열이 서유럽이나 북미 균주와 다른 사실을 통해 이들과는 다른 기원과 전파 경로를 가졌을 것으로 생각된다.

요 약

핵과류 과수에 세균성구멍병을 일으키는 *Xanthomonas arboricola* *pv. pruni*는 집단의 다양성이 적은 것으로 알려져 있다. 우리나라에서 분리된 *X. arboricola* *pv. pruni*의 유전적 특성을 조사하기 위하여 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 *X. arboricola* *pv. pruni*의 type strain인 LMG852, 일본 균주 MAFF301420, 우리나라 균주 XWD1의 세 균주를 대상으로 세 개 유전자 부위의 DNA 염기서열과 RAPD 분석을 실시하였다. 그 결과 ITS와 *glnA*, *atpD*의 염기서열은 세 균주가 동일하였다. 그러나 756 염기로 구성된 *atpD*의 염기서열은 GenBank에 등록된 프랑스균주와 5곳에서 차이가 있었다. 40 개의 random primer를 사용한 RAPD 결과는 우리나라와 일본균주는 동일한 밴드 패턴을 보이나 대표균주와는 다른 양상을 보였다. 이러한 사실은 우리나라와 일본의 *X. arboricola* *pv. pruni*의 개체군은 매우 가까워 유전적 다양성이 낮은 것으로 보이며 유럽균주와는 다른 기원과 전파 경로를 갖는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(과제번호: 20070401-080-114-001-01)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Battilani, P., V. Rossi, and A. Saccardi. 1999. Development

of *Xanthomonas arboricola* *pv. pruni* epidemics on peaches. *J. Plant Pathol.* **81**, 161-171.

- Boudon, S., C. Manceau, and J. -L. Nottéghem. 2005. Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* *pv. pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology* **95**, 1081-1088.
- Choi, J. E., E. J. Lee, and Y. S. Park. 2000. Shot hole of peach and Japanese plum caused by *Xanthomonas campestris* *pv. pruni* and *Erwinia nigrifluens* in Korea. *Plant Dis. Res.* **6**, 10-14.
- Christensen, H. and J. E. Olsen. 1998. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of *atpD* encoding β subunit of ATP synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 89-96.
- Du Plessis, H. J. 1988. Differential virulence of *Xanthomonas arboricola* *pv. pruni* to peach, plum, and apricot cultivars. *Phytopathology* **78**, 1312-1315.
- EPPO/CABI. 1997. *Xanthomonas arboricola* *pv. pruni*. pp. 1096-1100. 2nd eds. In *Quarantine pests for Europe*, CAB International, Wallingford, GB.
- Forsman, P., A. Tilsala-Timisjarvi, and T. Atatosava. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiol.* **143**, 3491-3500.
- Gonçalves, E. R. and Y. B. Rosato. 2002. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **52**, 355-361.
- Jami, F., M. N. Kazempour, S. A. Elahinia, and G. Khodakaramian. 2005. First report of *Xanthomonas arboricola* *pv. pruni* on stone fruit trees from Iran. *J. Phytopathol.* **153**, 371-372.
- Pezole, G., C. Gissi, C. Lanave, and C. Saccone. 1995. Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 189-197.
- Ritchie, D. F. 1995. Bacterial spot. pp. 50-52, In Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, and J. K. Uyemoto (eds.), *Compendium of stone fruit diseases*. The American Pathological Society, St. Paul, Mn.
- Smith, E. F. 1903. Observations on a hitherto unreported bacterial disease, the cause of which enters the plant through ordinary stomata. *Science* **17**, 456-457.
- Solcà, N. M., M. V. Bernasconi, C. Valsangiacomo, L. -J. V. Van Doorn, and J. C. Piffaretti. 2001. Population genetics of *Helicobacter pylori* in the southern part of Switzerland analyzed by sequencing of four housekeeping genes (*atpD*, *glnA*, *scoB* and *recA*), and by *vacA*, *cagA*, *iceA* and IS605 genotyping. *Microbiology* **147**, 1693-1707.
- Stackebrandt, E. and W. Liesack. 1993. Nucleic acids and classification. pp. 152-189. In Goodfellow, M. and A. G. O'Donnell (eds.), *Handbook of New Bacterial Systematics*, Academic Press, London.
- Zaccardelli, M., P. Ceroni, and U. Mazzucchi. 1999. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Xanthomonas arboricola* *pv. pruni*. *J. Plant Pathol.* **81**, 173-179.