

국내에서 분리된 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* 균주들의 스트렙토마이신 저항성

Streptomycin Resistant Isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea

*Corresponding author

Tel: +82-61-750-3616

Fax: +82-61-750-3208

E-mail: jjung@scnu.ac.kr

이영선¹ · 김경희² · 송유림³ · 오창식³ · 고영진² · 정재성^{1*}¹순천대학교 생물학과, ²순천대학교 식물외과, ³경희대학교 원예생명공학과Young Sun Lee¹, Gyoung Hee Kim², Yu-Rim Song³, Chang-Sik Oh³, Young Jin Koh², and Jae Sung Jung^{1*}¹Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea²Department of Plant Medicine, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea³Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea

Streptomycin resistant isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker in kiwifruit, were found in Korea. A total of 734 isolates of *P. syringae* pv. *actinidiae* collected between 2008 and 2017 from bacterial canker infections in 111 kiwifruit orchards were assessed for streptomycin resistance. The survival of each isolate was screened against 100 µg/ml of streptomycin. Among 734 isolates, 38 streptomycin resistant *P. syringae* pv. *actinidiae* isolates originated from nine orchards were found. Streptomycin resistant isolates belonging to biovar 2 were found in several individual years, but ones belonging to biovar 3 were found in Korea only since 2016. Therefore, to use streptomycin for control of bacterial canker in kiwifruit orchards should be very careful, and it is necessary to check the streptomycin susceptibility of the pathogen before use in kiwifruit orchards.

Keywords: Bacterial canker, Kiwifruit, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidia*, Streptomycin resistance

Received March 2, 2020

Accepted March 17, 2020

국내에서 키위의 재배는 1970년대 후반 뉴질랜드에서 육종된 녹색과육 품종(*Actinidia deliciosa*)인 ‘헤이워드’로부터 시작되었다. 그 후 뉴질랜드의 황색과육 품종(*A. chinensis*)인 ‘Hort16A’가 2004년부터 재배되기 시작하였고, 2000년대 후반부터는 국내에서 육종된 ‘제시골드’, ‘한라골드’, ‘해금’ 등의 황색과육 품종들이 레드키위 품종(*A. chinensis*)인 ‘홍양’과 토종다래 품종(*A. arguta*)인 ‘치악’, ‘해연’, ‘만수’ 등과 함께 국내에서 재

배되고 있다(Kim 등, 2016a).

키위 재배에 있어 가장 큰 문제가 되는 병해는 그람 음성 세균인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)가 원인세균인 키위 궤양병이다. 키위 궤양병은 1984년 일본에서 처음 발병하여 보고된 이래(Takikawa 등, 1989), 국내에서는 1988년 처음 발병한 것으로 알려지고 있다(Koh 등, 1994). 국내에서 키위 궤양병이 처음 출현 했을 때에는 먼저 발생한 일본으로부터 원인세균인 Psa가 유입되었을 것으로 생각되었으나, 그 후 두 나라에서 분리된 Psa 균주가 생산하는 독소가 서로 다르다는 사실을 알게 되었다. 일본 균주는 식물독소인 phaseolotoxin을 생산하는 반면에, 국내 균주는 coronatine을 생산하였다(Han 등,

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

Table 1. Streptomycin resistant (Sm^R) strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated in Korea

Year	Total no. of isolates	Biovars of isolates surveyed		Biovars of Sm ^R isolates		% of Sm ^R isolates
		Biovar 2	Biovar 3	Biovar 2	Biovar 3	
2008	12	12	0	5	0	41.7
2009	5	5	0	0	0	0
2010	3	3	0	0	0	0
2011	5	1	4	0	0	0
2012	83	60	23	3	0	3.6
2013	38	31	7	7	0	18.4
2014	188	49	139	16	0	8.5
2015	204	82	122	0	0	0
2016	132	38	94	0	3	2.3
2017	64	8	56	0	4	6.3
Total	734	289	445	31	7	5.2

2003). 서로 다른 종류의 식물독소를 생산하지만 한국과 일본 균주가 모두 병원성이 높았기 때문에 양국의 키위산업 모두에 커다란 손실을 입혀왔다. 비슷한 시기에 이탈리아에서도 일본 균주와 같은 균주가 발견되었으나 그 피해가 심각하지 않아 관심의 대상이 되지 않았다(Scotichini, 1994). 그 밖의 다른 키위 생산 국가에서는 궤양병에 대한 보고가 없어 궤양병은 한국과 일본에서만 문제가 되는 식물병이었다.

그러나 2008년 이탈리아에서 키위 궤양병이 발생하여 치명적인 피해를 입히게 되었고 분리된 Psa 균주를 분석한 결과 한국과 일본 균주와 달리 식물독소를 생산하지 않는 균주였다. 이 균주는 곧이어 유럽의 여러 나라를 비롯하여 칠레, 뉴질랜드 등 주요 키위 생산국에서 보고되었다(McCann 등, 2017). 새로 출현한 균주를 포함한 Psa 균주들을 분자유전학적 방법으로 비교 분석한 결과, 이들을 biovar 1, 2, 3로 분류할 수 있었다(Chapman 등, 2012). 즉, 일본 균주는 biovar 1, 우리나라 균주는 biovar 2, 새로운 균주 집단은 biovar 3로 명명되었다. 최근 일본에서 biovar 5 (Sawada 등, 2014)와 biovar 6 (Sawada 등, 2016)가 보고되어 전체 Psa 집단은 5개의 biovars (1, 2, 3, 5, 6)로 분류된다. 이 중 전 세계적으로 문제가 되고 있는 그룹은 biovar 3에 속한 균주들이다(Scotichini 등, 2012). 국내에서 biovar 3는 2011년에 처음 분리되었으며(Koh 등, 2012), 현재 biovar 2 균주와 함께 전국에 걸쳐 궤양병을 일으키고 있다(Lee 등, 2017).

키위 궤양병의 방제를 위한 약제로 동제와 항생제가 주로 사용되고 있다. 국내에서 키위 궤양병 방제용 약제로서 동제는 코퍼하이드록사이드, 코퍼설페이트 등이, 항생제로는 스트렙토마이신, 옥시테트라사이클린, 발리다마이신, 가스가마이신 등

의 항생제의 조합으로 조성된 약제가 등록되어 있다(Koh 등, 2017). 항생제 성분의 약제 중 가장 많이 사용되는 항생제는 스트렙토마이신이다. 스트렙토마이신의 경우 아시아 국가와 뉴질랜드에서는 사용이 허가되어 있으나 유럽에서는 허용되지 않고 있어 유럽에서는 주로 동제에 의존하고 있는 실정이다(Cameron과 Sarojini, 2014). 동제 또는 항생제를 사용하는 데 생기는 공통적인 문제점은 저항성 세균의 출현과 식물체에 미치는 약해, 과일에 잔류하는 문제 등이다. 특히 약제에 저항성인 병원세균의 출현은 근본적으로 방제를 어렵게 하는 요인이 되므로 저항성 여부에 대한 주기적인 모니터링이 필요하다.

본 연구에서는 2008년부터 2017년까지 우리나라에서 분리된 Psa 균주들에 대한 스트렙토마이신 저항성 여부를 확인하였다. 키위 궤양병이 발생한 과수원에서 분리되어 전통적인 동정 방법과 궤양병 균주에 특이적인 프라이머를 사용한 PCR을 통해 Psa로 확인된 균주들이다. Psa 균주들에 대한 biovar의 판정은 앞선 연구에서 이루어진 바 있다(Lee 등, 2017). 조사가 이루어진 균주 수가 연도별로 차이가 나는 것과 궤양병의 발생 정도와는 연관이 없다. 또 이 균주들은 스트렙토마이신 저항성 조사를 목적으로 체계적으로 수집된 것들은 아니며, 본 연구팀이 순천대학교 생물학과에 보관하고 있는 균주들만을 대상으로 조사하였다. 균주가 분리된 지역은 전남, 경남, 제주 등에서 무작위적으로 이루어졌으므로 특정 지역에 대한 결과는 아니다. 스트렙토마이신에 대한 저항성 테스트는 Psa 균주를 100 µg/ml의 스트렙토마이신이 포함된 pepton-sucrose (PS) 액체배지에 접종한 뒤 26°C에서 24시간 배양하여 생장 여부를 확인하였다. 생장이 일어난 균주는 같은 농도의 스트렙토마이신이 첨가된 PS agar 배지에 접종하여 저항성을 확인하였다.

Table 2. Number of orchards from which streptomycin resistant (Sm^R) strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* were isolated

Year	Total no. of orchards	No. of Sm^R orchards	% of Sm^R orchards
2008	5	2	8.1
2009	1	0	0
2010	1	0	0
2011	2	0	0
2012	9	1	11.1
2013	8	2	25.0
2014	22	2	9.1
2015	31	0	0
2016	21	1	4.8
2017	11	1	9.1
Total	111	9	8.1

Psa 균주 중 스트렙토마이신 저항성 균주 수와 저항성 균주가 출현한 과수원 수를 Tables 1과 2에 나타내었다. 조사가 시작된 2008년에 수집된 12개의 Psa 균주 중 5개가 스트렙토마이신에 대하여 저항성을 나타내었다. 조사된 12개 균주는 5곳의 과수원에서 분리된 것이며, 저항성 세균이 출현한 과수원은 2곳이었고, 이들은 biovar 2에 속하는 균주였다. 2008년 이전까지 우리나라에서 분리된 Psa 균주 중에 스트렙토마이신에 저항성을 보이는 균주에 대하여 보고된 바 없다. 1998년에 우리나라 키위 과수원에서 분리된 120개의 Psa 균주 중에 스트렙토마이신에 저항성인 균주는 없었으며(Han 등, 2003), 1999년에 분리된 21개 Psa 균주 중에서도 스트렙토마이신에 저항성인 균주는 없는 것으로 보고되고 있다(Lee 등, 2005). 그러나 일본 균주에서는 스트렙토마이신 저항성에 대하여 1995년부터 보고되고 있다(Nakajima 등, 1995). 2009–2011년 동안 저항성 균주가 나타나지 않은 것은 조사된 균주 수가 3–5개이고, 과수원 수도 1–2곳으로 적었기 때문으로 보인다. 2015년에 조사된 31개 과수원으로부터 분리한 204개 균주 중 저항성 균주가 없는 것은 특이하다. 이 경우를 제외하면 2012년 이래 매년 저항성 균주가 출현하였다. 2013년에 조사된 한 과수원에서는 스트렙토마이신에 저항성을 띠는 균주와 그렇지 않은 균주가 동시에 검출된 경우도 있었다. 균주 수로 보면 조사된 734개 중 38개가 저항성을 보여 5.2%에 해당하였고, 저항성 균주가 출현한 과수원 수로 볼 때는 111개 중 9개 과수원에서 저항성 균주가 나타나 8.1%에 해당하였다.

국내에서 biovar 3 균주가 처음 발견된 것은 2011년 전남 고

흥에서이다(Koh 등, 2012). 그 후 2014년부터 제주도에서 검출되기 시작하여 2016년까지 전체 키위 재배지에서 매년 두 배 정도의 속도로 증가하였다(Kim 등, 2016a). Biovar 3 균주에서 스트렙토마이신 저항성 균주가 나타난 것은 2016년으로 처음 검출된 지 5년만이다. 2011년 첫 번째로 검출된 biovar 3는 2006년 묘목을 통해 중국에서 유입되었고, 2014년부터의 폭발적 증가는 Psa에 오염된 수입 꽃가루에 기인하는 것으로 추정하고 있다(Kim 등, 2016b). 그러므로 스트렙토마이신에 저항성인 biovar 3 균주의 경우 이 균주가 우리나라 환경에서 저항성을 획득하게 되었는지, 그렇지 않으면 저항성 균주가 외국으로부터 유입되어 확산된 결과인지 여부를 알기 위해서는 저항성 균주의 지리적 기원과 함께 저항성에 대한 분자유전학적 기전이 밝혀져야 할 것이다.

식물 병원성 세균에서 스트렙토마이신 저항성은 주로 두 가지 분자적 기전에 기인한다. 첫 번째 저항성 기전은 스트렙토마이신의 표적이 되는 30S 리보솜 소단위의 구성성분인 S12 단백질을 암호화하는 유전자인 *rpsL*에 단일염기 돌연변이가 일어나는 것이다(Chiou와 Jones, 1995b). 스트렙토마이신이 이 단백질에 결합하게 되면 단백질합성이 저해되어 박테리아가 죽게 된다. 그러나 돌연변이가 생기게 되면 스트렙토마이신이 S12 단백질에 결합하지 못해 정상적인 단백질 합성이 진행되어 저항성을 갖게 된다. 두 번째 저항성 기전은 박테리아가 *strA-strB* 유전자 복합체를 얻게 되는 경우이다. 이 유전자는 스트렙토마이신에 인산기를 붙이는 효소를 암호화한다. 이 효소가 스트렙토마이신에 인산기를 붙이게 되면 불활성화 되어 박테리아가 저항성을 갖게 된다(Chiou와 Jones, 1995a). 그밖에도 몇 가지 저항성의 원인이 보고되고 있지만, 주요 저항성 기전은 이 두 가지이다(Förster 등, 2015).

국내의 경우 스트렙토마이신 저항성 Psa의 출현 빈도와 저항성 세균이 검출된 과수원의 비율을 볼 때 약 5–8% 정도의 균주가 저항성을 가지고 있을 것으로 추정된다. 따라서 효율적으로 궤양병을 방제하기 위해서는 스트렙토마이신 성분의 약제를 사용하기 전에 병원균 집단의 스트렙토마이신 저항성 여부를 확인할 필요가 있다.

요 약

국내에서 분리된 키위 궤양병 원인균인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* 균주들에서 스트렙토마이신 저항성 균주가 확인되었다. 2008년부터 2017년 사이에 키위 궤양병이 발병한 111개 과수원에서 분리된 734개 균주의 스트렙토마이신 저항성을 조사하였다. 각 균주의 생존 여부는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙

토마이신 배지에서 검정하였다. 734개 균주들 중에서 9개 과수원에서 분리된 총 38개 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주가 저항성을 나타내었다. Biovar 2에 속하는 저항성 균주들의 경우 몇 개의 특정년도에 발견된 반면, biovar 3에 속하는 저항성 균주들은 2016년 이후에만 발견되었다. 따라서, 키위 궤양병 방제용으로 스트렙토마이신 사용 시 주의해야 하며, 만일 사용하려면 사용 전에 항생제 감수성 테스트가 필요하다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (No. 317012-4) for C.-S. Oh.

References

- Cameron, A. and Sarojini, V. 2014. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. *Plant Pathol.* 63: 1-11.
- Chapman, J. R., Taylor, R. K., Weir, B. S., Romberg, M. K., Vanneste, J. L., Luck, J. et al. 2012. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology* 102: 1034-1044.
- Chiou, C.-S. and Jones, A. L. 1995a. Expression and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*. *Gene* 152: 47-51.
- Chiou, C.-S. and Jones, A. L. 1995b. Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 85: 324-328.
- Förster, H., McGhee, G. C., Sundin, G. W. and Adaskaveg, J. E. 2015. Characterization of streptomycin resistance in isolates of *Erwinia amylovora* in California. *Phytopathology* 105: 1302-1310.
- Han, H. S., Nam, H. Y., Koh, Y. J., Hur, J.-S. and Jung, J. S. 2003. Molecular bases of high-level streptomycin resistance in *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *J. Microbiol.* 41: 16-21.
- Kim, G. H., Choi, E. D., Lee, Y. S., Jung, J. S. and Koh, Y. J. 2016a. Spread of bacterial canker of kiwifruit by secondary infection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 in Gyeongnam in 2016. *Res. Plant Dis.* 22: 276-283. (In Korean)
- Kim, G. H., Kim, K.-H., Son, K. I., Choi, E. D., Lee, Y. S., Jung, J. S. et al. 2016b. Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 in Korea. *Plant Pathol. J.* 32: 542-551.
- Koh, Y. J., Cha, B. J., Chung, H. J. and Lee, D. H. 1994. Outbreak and spread of bacterial canker in kiwifruit. *Korean J. Plant Pathol.* 10: 68-72.
- Koh, Y. J., Kim, G. H. and Jung, J. S. 2017. A proposed manual for the efficient management of kiwifruit bacterial canker in Korea. *Res. Plant Dis.* 23: 1-18. (In Korean)
- Koh, Y. J., Kim, G. H., Koh, H. S., Lee, Y. S., Kim, S.-C. and Jung, J. S. 2012. Occurrence of a new type of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain of bacterial canker on kiwifruit in Korea. *Plant Pathol. J.* 28: 423-427.
- Lee, J. H., Kim, J. H., Kim, G. H., Jung, J. S., Hur, J.-S. and Koh, Y. J. 2005. Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit. *Plant Pathol. J.* 21: 119-126.
- Lee, Y. S., Kim, J., Kim, G. H., Choi, E. D., Koh, Y. J. and Jung, J. S. 2017. Biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, isolated in Korea. *Res. Plant Dis.* 23: 35-41. (In Korean)
- McCann, H. C., Li, L., Liu, Y., Li, D., Pan, H., Zhong, C. et al. 2017. Origin and evolution of the kiwifruit canker pandemic. *Genome Biol. Evol.* 9: 932-944.
- Nakajima, M., Yamashita, S., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., Hibi, T. and Goto, M. 1995. Similarity of streptomycin resistance gene(s) in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* with *strA* and *strB* of plasmid RSF 1010. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 489-492.
- Sawada, H., Kondo, K. and Nakaune, R. 2016. Novel biovar (biovar 6) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Japan. *Jpn. J. Phytopathol.* 82: 101-115.
- Sawada, H., Miyoshi, T. and Ide, Y. 2014. Novel MLSA group (Psa5) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in Japan. *Jpn. J. Phytopathol.* 80: 171-184.
- Scortichini, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathol.* 43: 1035-1038.
- Scotichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M. and Firrao, G. 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 13: 631-640.
- Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. and Goto, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of kiwifruit canker in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 55: 437-444.