

Distribution of Subgroups in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Biovar 3 Strains Isolated from Korea

Young Sun Lee¹, Gyoung Hee Kim² and Jae Sung Jung^{1*}

¹Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

²Department of Plant Medicine, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

Received August 25, 2020 / Revised November 24, 2020 / Accepted November 25, 2020

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*, which causes bacterial canker in kiwifruit, is divided into five biovars (1, 2, 3, 5, 6) on the basis of genetic characteristics and toxin productivity. Among them, biovar 3 is responsible for the current global outbreak, and has been isolated in Korea since 2011. Biovar 3 strains isolated from Korea are subdivided into six genetically different lineages (subgroup I, IV, V, VI, VII, and VIII) based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In this work, the subgroup-specific sequence characterized amplified region (SCAR) primers were developed from sequenced differential RAPD bands. Distribution of the subgroups of the biovar 3 strains collected in Korea from 2011-2017 were examined using these subgroup-specific primer sets. Among the 54 strains tested, 35 strains (64.8%) belonged to subgroup V, 9 strains (16.7%) belonged to subgroup IV, 4 strains (7.4%) belonged to subgroup VI, 3 strains (5.6%) belonged to subgroup VII, 2 strains (3.7%) belonged to subgroup VIII, and 1 (1.9%) strain belonged to subgroup I. Strains belonging to subgroups IV, V, and VI were shown to be related to strains isolated from China, New Zealand, and Chile, respectively. The study revealed that the biovar 3 strains in Korea are genetically diverse and are estimated to have been introduced through pollen sourced from foreign countries.

Key words : Bacterial canker, biovar 3, kiwifruit, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

서 론

키위에 세균성 궤양병(bacterial canker)을 일으키는 원인세균은 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)이다. 키위가 과수로 육종된 것이 1930년대이고 Psa에 의한 키위 궤양병이 처음 발생한 것이 1980년대이므로 병 발생의 역사가 짧아 Psa는 식물에 발생하는 질병의 기원과 진화를 연구하는 재료가 되기도 한다[18]. Psa의 기원에 대해 다음과 같은 가설이 일반적으로 받아들여지고 있다. 동아시아 지역에 자생하고 있는 *Actinidia* 속(다래 속) 식물에 상존하는 비병원성 *P. syringae*가 다양한 형태의 유전자 교환을 통해 Psa의 원형이 되는 병원성 세균으로 변형되었고, 지역에 따라 현재 biovar에 해당하는 개체군으로 다양성을 갖게 된 것으로 추정하고 있다. 즉, 야생의 *Actinidia*속 식물에는 지역에 따라 다양한 Psa biovar가 존재하고 있는데, 이들 중 일부가 상업적으로 재배되는 키위를 만나게 됨으로써 세균성 궤양병을 일으키는 여러 종류의 biovar로 출현하게 된 것으로 추정하고 있다[17, 19].

현재 키위 궤양병으로부터 분리된 Psa는 유전적 특성 및 생산하는 식물독소에 따라 biovar 1, 2, 3, 5, 6 등의 5개 biovar로 분류된다[6]. 그중 우리나라에서는 biovar 2와 biovar 3에 속하는 Psa 균주가 키위 궤양병 병징으로부터 분리되고 있다[16]. 우리나라에서 처음으로 분리된 Psa는 biovar 2에 속하는 균주로 1988년 이후 지금까지 키위가 재배되고 있는 국내 전 지역에서 출현하고 있다[13]. Biovar 2 균주는 우리나라에서만 발견되고 있으며 식물독소로 coronatine을 생산하는 특징이 있다[7]. Biovar 3 균주는 우리나라에서 2011년에 처음 발견된 이래[14] biovar 2와 함께 국내의 모든 키위 재배지역에서 검출되고 있다[8, 16]. 일본에서는 1984년에 식물독소로 phaseolotoxin을 생산하는 biovar 1이 최초의 Psa로 보고된 후[24], 2014년에 처음 분리된 biovar 3과 함께 일본 전국에 걸친 키위 재배지역에서 발견되고 있다[22]. 최근 일부 지역에서 biovar 5와 6이 보고되어[20, 21], 지금까지 일본에서는 4종류의 biovar (1, 3, 5, 6)가 분리되고 있다[5, 6]. 우리나라와 일본을 제외한 다른 나라에서는 biovar 3 균주만이 보고되고 있다[17, 19]. 다만 이탈리아에서 1992년에 biovar 1에 속하는 균주가 제한된 지역에서 일시적으로 발견된 경우가 있었으나 병원성은 크지 않아 큰 문제가 되지 않은 바가 있다[23].

Psa biovar 3는 병원성이 매우 강한 균주로 전 세계적으로 팬데믹을 일으키고 있는 원인세균이다. 이 biovar는 2008년 이탈리아에서 처음 분리되었고[4], 2010년부터 전 세계의 키위 재배 국가에서 대유행을 일으킴으로써 키위산업에 막대한 피

*Corresponding author

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

E-mail : jjung@sunchon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

해를 주고 있는 biovar이다[17, 25].

우리나라에서 Psa biovar 3 균주는 2011년에 전남 고흥의 한 과수원에서 처음 발견되었다[14]. 그 후 2013년에는 biovar 3 균주에 의해 궤양병이 발생한 과수원은 발병된 전체 과수원 수의 3.1%에 불과하였다. 그러나 Psa biovar 3에 의한 궤양병의 발생률은 2014년에는 궤양병이 확인된 과수원의 44.0%, 2015년에는 55.0%로 급속히 증가하였고[10], 2016년에는 63.9%에 달해 biovar 3는 우리나라에서 분리되는 Psa 중에서 우점하는 biovar가 되었다[9]. 선행연구에서 우리나라에서 2014년 이후 Psa biovar 3에 의한 궤양병의 갑작스러운 증가는 2011년에 처음 분리된 균주와 구별되는, 유전적으로 다양한 균주들에 의하는 것을 알게 되었고, 국내에서 분리된 biovar 3 균주들을 6개의 subgroups (I, IV, V, VI, VII, VIII)으로 나눌 수 있었다[15].

본 연구에서는 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석을 기반으로 하여 우리나라에서 분리되는 biovar 3의 각 subgroup을 특이적으로 검출할 수 있는 PCR primers를 개발하고, 이를 통해 국내에서 분리된 biovar 3 균주들의 subgroup 분포를 밝히고 그 기원을 추적하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

실험에 사용된 균주는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*로 2011년 국내에서 처음 분리된 biovar 3 균주 2개(SYS1, SYS4)와 중국에서 분리된 2개 균주(P1, 155), 2014년부터 2017년 사이에 우리나라에서 키위 궤양병에 걸린 서로 다른 과수원으로부터 분리된 52개를 포함한 총 56개 균주이다(Table 1). Psa에 대한 자세한 분리 및 동정 방법은 선행연구에 기술하였다[15]. 요약하면 다음과 같다. 키위의 궤양병 병반에서 분리한 균주들을 세균학적 방법으로 1차 선별한 후, Psa에 특이적인 PCR primer [1]를 사용하여 병원균임을 최종적으로 확인하였다. Psa로 동정된 균주 중에서 biovar 3에 속하는 균주는 biovar 3에 특이적인 primer를 사용한 PCR로[12] 선별하였다. Psa biovar 3 균주로 확인되어 실험에 사용된 균주에 대한 분리 시기 및 장소 등에 관한 정보는 Table 1과 같다. Psa 균주는 peptone-sucrose 액체배지에(PS broth; 20 g peptone, 20 g sucrose per 1 liter) 접종한 뒤 28°C에서 48 hr 동안 진탕배양하였다.

Table 1. List of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 strains used in this study

No.	Strain	Origin	Isolation year	Subgroup	No.	Strain	Origin	Isolation year	Subgroup
1	KKB1531	Jeju	2015	I	29	JYG1561	Gyeongnam	2015	V
2	P1	China	-	II	30	KYH1561	Gyeongnam	2015	V
3	155	China	-	III	31	CHS1561	Gyeongnam	2015	V
4	KJB1451	Jeju	2014	IV	32	MHS1561	Gyeongnam	2015	V
5	HYH1471	Jeju	2014	V	33	ASR1561	Jeonnam	2015	V
6	KTS1471	Jeju	2014	VI	34	SDK1571	Jeju	2015	V
7	HJJ1471	Jeonnam	2014	VII	35	LJH1621	Jeju	2016	V
8	SYS1	Jeonnam	2011	VIII	36	KHS1621	Jeju	2016	V
9	KGC1451	Jeju	2014	IV	37	LCH1645	Jeonnam	2016	V
10	HSG1461	Jeju	2014	IV	38	KSS1641	Gyeongnam	2016	V
11	KST1531	Jeju	2015	IV	39	JC1641	Jeonnam	2016	V
12	KDS1541	Gyeongnam	2015	IV	40	SPD21661	Gyeongnam	2016	V
13	14004	Jeju	2014	IV	41	KJS31661	Gyeongnam	2016	V
14	14016	Jeju	2014	IV	42	KDS1664	Gyeongnam	2016	V
15	HIKH1651	Gyeongnam	2017	IV	43	LSJ1661	Gyeongnam	2016	V
16	YMS1721	Jeonnam	2017	IV	44	KSJ1721	Jeju	2017	V
17	KTS1461	Jeju	2014	V	45	KDN1731	Jeju	2017	V
18	YBH1561	Jeonnam	2015	V	46	HJH1741	Jeju	2017	V
19	LYJ1661	Gyeongnam	2016	V	47	KHO1741	Gyeongnam	2017	V
20	GDG12	Jeonnam	2012	V	48	KSHY1741	Gyeongnam	2017	V
21	HJC14061	Gyeongnam	2014	V	49	LYJ1741	Gyeongnam	2017	V
22	KSS14611	Gyeongnam	2014	V	50	JYM1741	Jeonnam	2017	V
23	KBJ1461	Jeju	2014	V	51	KHH16511	Gyeongnam	2016	VI
24	LSC1461	Jeju	2014	V	52	LSJ21661	Gyeongnam	2016	VI
25	JKS1471	Jeju	2014	V	53	HMF1661	Jeonnam	2016	VI
26	KDW1531	Jeju	2015	V	54	KCO15630	Jeonnam	2015	VII
27	LCH1571	Jeonnam	2015	V	55	PSG15311	Gyeongnam	2015	VII
28	KSR1531	Jeju	2015	V	56	SYS4	Jeonnam	2011	VIII

유전체 DNA의 분리

액체배지에서 배양된 세균의 DNA는 AccuPrep genomic DNA extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 추출하였고, DNA 농도는 NanoDrop 2000 분광광도계(Thermo Fisher Scientific, USA)로 측정하였다.

RAPD 분석

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)분석은 PCR Thermal Cycler Dice (Takara Bio Inc., Japan)를 사용하여 Lee 등[15]에 의해 기술된 방법에 따라 수행하였다. RAPD PCR에 사용된 random primer는 Operon사(USA)에서 구입하였다. PCR은 94°C에서 5분간 초기 변성을 시킨 후 다음 조건에서 40 cycles 수행하였다; 94°C에서 30초, 37°C에서 1분, 72°C에서 1분. 마지막으로 72°C에서 7분간 최종연장을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel 상에서 전기영동 한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

Subgroup에 특이적인 RAPD 밴드의 선발과 염기서열 결정

RAPD 분석을 통해 8개의 subgroup에서 각각 특이적으로 증폭된 DNA 밴드를 agarose gel에서 선발한 뒤 gel에서 잘라내어 AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)로 정제하였다. 정제된 DNA 절편을 pGEM T-Easy 벡터에(Promega, USA) 연결한 후 *Escherichia coli* JM109에 형질전환 시켰다. 재조합 플라스미드가 들어있는 *E. coli*는 X-gal과 ampicillin이 첨가된 LB 고체배지에서 흰색을 나타내는 콜로니로 선발하였다. 10개의 흰색 콜로니를 ampicillin이 들어있는 3 ml의 액체 배지에 배양한 후 플라스미드를 추출하고, 추출된 플라스미드를 제한효소 *EcoRI*로 처리하여 삽입된 절편의 크기를 확인

함으로써 올바른 재조합체를 선발하였다. 삽입절편의 염기서열은 SolGent사(Korea)에 의뢰하여 결정하였다.

SCAR primer의 제조

클로닝된 각 subgroup에 특이적인 RAPD 절편의 염기서열을 바탕으로 각 subgroup을 구별할 수 있는 sequence characterized amplification region (SCAR) primers를 Primer 3 프로그램을 사용하여 설계하였다. SCAR primer의 특이성은 각 subgroup을 대표하는 균주(Table 1, number 1~8)를 대상으로 확인하였다.

Biovar 3 균주들의 subgroup 판정

개발된 각 subgroup에 특이적인 primers를 사용하여 국내에서 분리된 54개 biovar 3 균주의 subgroup을 결정하였다. PCR을 통해 각 subgroup에 특이적인 primers를 사용하여 예상된 크기의 DNA가 증폭되는지 여부로 subgroup을 판정하였다. PCR은 94°C에서 5분간 초기 변성을 시킨 후 94°C에서 30초, 각 primer set의 annealing 온도(Table 2)에서 30초, 72°C에서 30초 과정을 30 cycles 수행하였다. 마지막으로 72°C에서 7분간 최종연장을 실시하였다.

결과 및 고찰

Psa biovar 3 균주들을 8개의 subgroup으로 세분하여 각각을 subgroup I-VIII로 명명한 바 있다[15]. 8개 subgroup에 속하는 대표균주들을 대상으로 30개의 RAPD primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이들 primer로 증폭된 DNA절편의 크기는 250-2,500 bp 범위였다. 그중 각 subgroup의 균주에서만

Table 2. Nucleotide sequences of subgroup specific SCAR primers

Subgroup	Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Expected size (bp)
I	Sub1-F	GTAAAGAGGAGCGGATATC	68	507
	-R	AATACAGGGACCCCGGAGCT		
II	Sub2-F	GTGTGCCCCACGTAAGGT	65	711
	-R	GTGTGCCCCATACTGCGTAA		
III	Sub3-F	CTGCATCGTGCCCCAGTCA	65	769
	-R	ATCGTGTGTGAACACAATGACT		
IV	Sub4-F	CCGCGCCTTGATCGCGGGCC	68	507
	-R	AGGATTTGCGGCTTATTGAG		
V	Sub5-F	TGAAACGCCGCTTTTTTCGGTG	65	533
	-R	CGGGCATTGATGGTGTGATGA		
VI	Sub6-F	GTTTCGCTCCGTTTGTCCGAT	65	473
	-R	CACTCGTCTCACAGCCACAA		
VII	Sub7-F	CGAAATGAACCGTTTAATATCG	65	380
	-R	ACGCCAGACACTATTAATTTGC		
VIII	PKN-F2	AGCGAGTCGCTGAATTGCGAAC	65	771
	-R4	ATGCTCGATACACCACACAATG		

특이적으로 증폭되는 DNA 밴드를 선별하여 염기서열을 결정하고, 이를 바탕으로 각 subgroup에 특이적인 SCAR primers를 설계하였다.

Subgroup I에 속하는 균주 KKB1531은 2015년 제주도의 한과수원에서 분리된 균주이다. 이 균주는 OPB-10 primer를 사용한 PCR에서 527 bp의 DNA를 특이적으로 증폭시켰다 (RAPD 자료 미제시, 이하 같음). DNA 염기서열로부터 subgroup I의 SCAR primer Sub1-F/R (Table 2)을 설계하였다. 이 primers는 subgroup I 균주인 KKB1531에서 507 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 1A).

Subgroup II에 속하는 균주 P1은 중국에서 분리된 균주이다. 이 균주는 RAPD primer인 OPD-8를 사용하였을 때 711 bp의 DNA를 특이적으로 증폭시켰다. 이 DNA 절편의 염기서열에서 10-mer의 RAPD primer 염기서열을 포함한 20-mer의 primer Sub2-F/R (Table 2)을 설계하였다. 이 primers는 subgroup II에 속하는 균주 P1에서만 711 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 1B).

Subgroup III에 속하는 균주인 155도 중국에서 분리된 균주이다. OPH-7 primer를 사용한 RAPD에서 약 800 bp의 DNA가 특이적으로 증폭되었고, 이 절편의 염기서열을 결정한 결과 773 bp임이 확인되었다. 이 염기서열에서 RAPD primer를 일부 포함하여 subgroup III 균주인 155에서만 769 bp의 DNA를 증폭시키는(Fig. 1C) SCAR primer인 Sub3-F/R (Table 2)을 개발하였다.

Subgroup IV에 속하는 균주인 KJB1451은 제주에서 분리된 biovar 3 균주이다. RAPD primer인 OPH-8로 증폭했을 때 subgroup IV 균주에서만 약 1,200 bp의 밴드가 확인되었다. 이 DNA절편의 염기서열을 결정한 결과 정확한 크기는 1,220 bp였으며 NCBI BLAST 검색에서 *P. syringae* pv. *actinidiae*

ICMP19455 clone Pac_ICE3_cl과 100% 상동성이 있는 것으로 나타났다. ICMP19455 균주는 칠레 균주로 보고되었으므로 [2], 이 subgroup에 속하는 균주는 칠레에서 기원한 균주들로 생각된다. 이 염기서열로부터 subgroup IV에 특이적인 primer Sub4-F/R (Table 2)을 설계하였다. 이 primer set는 subgroup IV 균주에서 507 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 1D).

Subgroup V에 속하는 균주 HYH1471은 제주에서 분리된 biovar 3 균주이다. OPC-2 primer를 사용하여 특이적으로 증폭된 약 800 bp의 DNA절편의 염기서열을 결정한 결과 정확한 크기는 793 bp인 것으로 확인되었으며, 염기서열의 검색에서 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pac_ICE1_nz와 100% 상동성이 있었다. 이러한 사실은 이 균주가 뉴질랜드에서 기원한 균주임을 시사한다[2]. 이 연구에서 결정된 염기서열로부터 subgroup V의 SCAR primer인 Sub5-F/R (Table 2)을 설계하여 subgroup V 균주에서만 533 bp의 DNA를 성공적으로 증폭시킬 수 있었다(Fig. 1E).

균주 KTS1471도 제주에서 분리된 biovar 3 균주로 subgroup VI로 분류되었다[15]. OPB-1 primer를 사용했을 때 특이적으로 증폭된 797 bp의 염기서열을 결정하여, NCBI BLAST 검색한 결과 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pac_ICE2_it와 상동성이 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 이 균주가 유럽 균주와 같은 기원을 가지고 있는 균주임을 시사한다[2]. 이 염기서열을 바탕으로 subgroup VI에 특이적 primer인 Sub6-F/R (Table 2)을 설계하였다. 이 primer set는 subgroup VI 균주에서 473 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 1F).

Subgroup VII에 속하는 균주 HJJ1471은 전남에서 분리된 biovar 3 균주이다. OPH-5를 사용한 RAPD에서 약 500 bp의 DNA 절편이 이 균주에서 특이적으로 증폭되었다. 염기서열이 결정된 504 bp의 DNA로부터 primer Sub7-F/R (Table 2)을

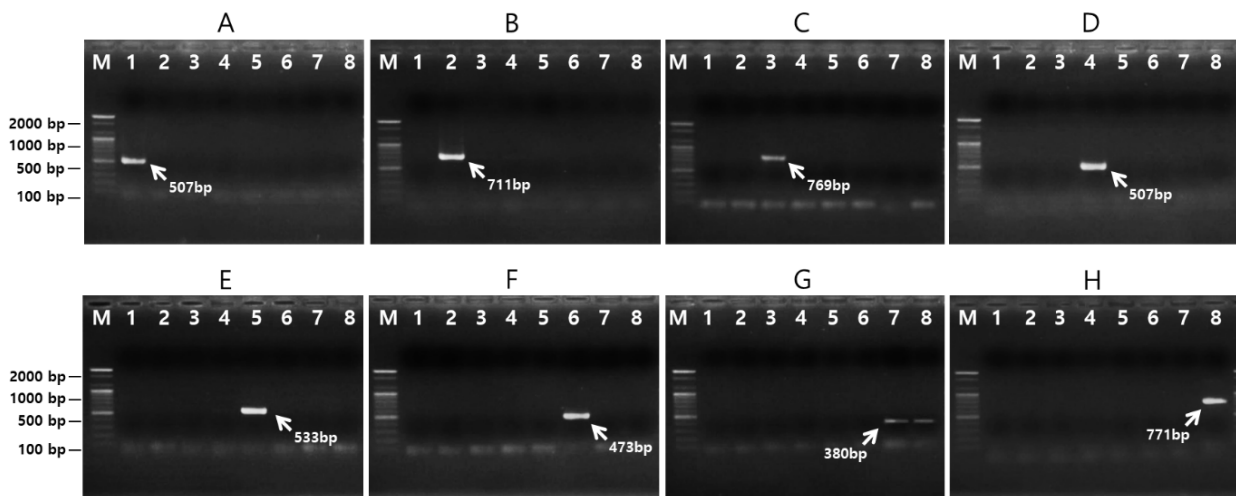


Fig. 1. PCR amplification of genomic DNA from biovar 3 strains with subgroup specific SCAR primers, (A) Sub1-F/R, (B) Sub2-F/R, (C) Sub3-F/R, (D) Sub4-F/R, (E) Sub5-F/R, (F) Sub6-F/R, (G) Sub7-F/R and (H) PKN-F2/R4. Lane M, 100-bp DNA ladder (Bioneer); lane 1-8 correspond to strain numbers 1-8 in Table 1.

설계하였다. 이 primer set는 subgroup-VII와 subgroup-VIII 균주에서 380 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 1G). 따라서 subgroup-VII를 subgroup-VIII과 구별하기 위해서는 Sub7-F/R로 증폭이 일어나지만 VIII를 검출하는 primer로는 증폭이 일어나지 않는 균주를 subgroup-VII로 판정하여야 했다.

Subgroup VIII에 속하는 균주 SYS1은 2011년에 전남 고흥에서 분리되었으며 우리나라에서 처음으로 발견된 biovar 3 균주이다[14]. Subgroup VIII 균주를 검출하기 위한 primer PKN-F2/R4 (Table 2)는 선행연구에서 설계되었다[15]. 이 primers는 subgroup-VIII 균주에서 771 bp의 DNA를 특이적으로 증폭시킨다(Fig. 1H). 각 subgroup에서 특이적으로 증폭되는 DNA의 염기서열에 대한 NCBI BLAST 검색 결과 subgroup IV, V, VI를 제외한 나머지 subgroup에서는 유의미한 상동성이 확인되지 않았다.

본 연구에서 개발된 각 subgroup에 특이적인 SCAR primer를 사용하여 2011년부터 2017년 사이에 국내에서 분리된 54개 biovar 3 균주들의 subgroup 분포를 조사하고 그 기원을 추적하였다. 각 나라에서 분리된 Psa 균주들의 유전체를 분석한 결과 2010년 이후 분리된 균주들은 서로 비슷하였으나 나라별로 구별되는 특징을 가진 것으로 나타났다. 특히 수평적 유전자 전달에 의해 획득된 유전자 집단인 genomic island에서 뚜렷한 차이를 나타내고 있다. 즉, 가지고 있는 integrative conjugative element (ICE)가 균주의 지리적 기원에 따라 서로 달랐다. 뉴질랜드 균주는 Pac_ICE1을 가지고 있는데 비해 이탈리아를 비롯한 유럽에서 분리된 균주는 Pac_ICE2를 가지고 있었으며, 칠레 균주는 Pac_ICE3를 가지고 있었다[2]. 그러므로 어떤 ICE를 가지고 있는가에 따라 그 균주가 어느 나라에서 기원했는지를 알 수 있다.

가장 출현빈도가 높은 개체군은 54개 중 35개로 64.8%를 차지한 subgroup V이다(Table 3). 선행연구에서 뉴질랜드 균주에 특이적인 primer [1]를 사용하여 HYH1471를 포함한 국내에서 분리된 4개의 subgroup V 균주가 뉴질랜드에서 기원하였을 가능성을 제기한 바 있다[15]. 최근 연구[11]에 의하면 국내에서 분리된 biovar 3 균주 중 10개 균주의 유전체 염기서

열이 결정된 결과 6개가 뉴질랜드에서 분리된 균주가 가지고 있는 염기서열의 특징을 가지고 있었다. 특히 본 연구에서 subgroup V으로 판명된 35개 균주 중 3개 균주(LCH1571, HYH 1471, YBH1561)의 전체 유전체를 분석한 결과 이 균주들에서 뉴질랜드 균주의 특징인 Pac_ICE1이 발견되었다. 또한 최근에 뉴질랜드에서 분리된 일부 균주에서 발견되는 Pac_ICE10이 국내 균주인 SDK1571에서 발견되었다[11]. 이들 균주가 서로 다른 ICE를 가지고 있음에도 개발된 SCAR primer set인 Sub5-F/R은 subgroup V에 속하는 모든 균주들을 검출해 낼 수 있었다(Table 3). Psa biovar 3에 의한 궤양병의 발병 시기가 우리나라보다 뉴질랜드가 빠른 점을 고려할 때[12], 우리나라에서 발견된 subgroup V 균주들은 뉴질랜드에 기원을 두고 있음을 짐작할 수 있다. 뉴질랜드에서 수입한 꽃가루에서 분리된 Psa 균주의 유전체를 분석한 결과 subgroup V에 속하는 균주들과 동일하였던 사실은[11], 이 subgroup에 속하는 균주들이 꽃가루를 통해 뉴질랜드로부터 유입되었을 것이라는 추정을 뒷받침해 준다. 우리나라에서는 인공수분에 필요한 키워 꽃가루를 뉴질랜드, 중국 및 칠레로부터 수입하고 있다[10].

두 번째로 많은 균주가 속한 집단은 subgroup IV로 54개 중 9개 균주(16.7%)가 여기에 속하였다(Table 3). 그중 2개 균주(KJB1451, HSG1461)의 유전체를 분석한 결과 칠레에서 분리된 균주의 특징인 Pac_ICE3를 포함한 염기서열의 특징을 가지고 있었다[11]. 이러한 사실로 subgroup IV 균주가 칠레에서 유입되었음을 알 수 있다.

Subgroup VI에 속하는 균주는 4개로 전체의 7.4%에 달한다(Table 3). 이 균주들은 유럽 균주에 특이적인 primer를 사용했을 때 예상된 733 bp DNA를 증폭시켰다[15]. 또한 이 subgroup에 속한 KTS1471의 유전체 분석결과 Pac_ICE2와 Pac_ICE8를 가지고 있는 점이 2010년 중국 Shaanxi에서 분리된 균주인 M228과 같았고[11], M228은 유럽에서 분리된 균주와 같으므로[2] subgroup VI은 중국 또는 유럽에서 기원하였음을 추정할 수 있다. 그러나 유럽으로부터의 꽃가루 수입은 없는 것으로 미루어 중국으로부터 꽃가루를 통해 유입되었을 것으로 추정된다.

Table 3. Distribution of subgroups of biovar 3 strains isolated in Korea during 2011-2017

Subgroup	Strain	Number (%)
I	KKB1531	1(1.9%)
IV	KJB1451, KGC1451, HSG1461, KST1531, KDS1541, 14004, 14016, HIKH1651, YMS1721	9(16.7%)
V	HYH1471, KTS1461, YBH1561, LYJ1661, GDG12, HJC14061, KSS14611, KBJ1461, LSC1461, JKS1471, KDW1531, LCH1571, KSR1531, JYG1561, KYH1561, CHS1561, MHS1561, ASR1561, SDK1571, LJH1621, KHS1621, LCH1645, KSS1641, JC1641,SPD21661, KJS31661, KDS1664, LSJ1661, KSJ1721, KDN1731, HJH1741, KHO1741, KSHY1741, LYJ1741, JYM1741	35(64.8%)
VI	KTS1471, KHH16511, LSJ21661, HMF1661	4(7.4%)
VII	HJJ1471, KCO15630, PSG15311	3(5.6%)
VIII	SYS1, SYS4	2(3.7%)
Total		54(100%)

Subgroup VIII에 속하는 2개 균주인 SYS1과 SYS4는 2011년 우리나라에서 처음 분리된 biovar 3 균주들이다. 전남 고흥에 위치한 한 과수원에서 발견된 이 균주들은 역학조사 결과 2006년 중국으로부터 묘목을 통해 유입된 것으로 밝혀졌다 [10]. 이 과수원은 2014년 공적방제를 통해 폐원되었다[8]. Subgroup VIII에 속하는 균주가 더 이상 발견되지 않은 것으로 보아 이 subgroup에 속하는 균주들의 확산은 일어나지 않은 것으로 생각된다.

조사된 균주 중 subgroup I에 속하는 균주는 KKB1531이 유일하다(Table 3). 이 균주의 유전체를 분석한 결과 지금까지 보고되지 않은 Pac_ICE11을 가지고 있었을 뿐 아니라 다른 biovar 3 균주들과 비교하여 독특한 계통군을 이루고 있었다 [11]. Subgroup VII에 속하는 균주(HJ)1471, PSG15311도 다른 균주들과 구별되는 독립된 계통군을 형성하고 있다[15]. 현시점에서 이 두 subgroup 균주들의 정확한 기원을 추정하기 어렵다. 다만 출현 시기가 2014년 이후이고 다양한 biovar 3 균주가 키위의 원산지인 중국에서 발견되고 있는 점[3] 등을 고려하면 subgroup I과 VII에 속하는 균주들도 꽃가루를 통해 중국으로부터 유입되었을 가능성이 있다. 그러나 국내에서 분리된 균주 중에 중국 균주인 P1과 155가 속한 subgroup II와 III에 해당하는 균주는 발견되지 않았다(Table 3).

2011년 Psa biovar 3 균주가 국내에서 처음 발견된 이래 짧은 기간 동안 유전적으로 다양한 biovar 3 계통군이 동시에 검출되는 현상은 이례적이다. 이러한 단기간에 일어난 국내 biovar 3 균주의 다양성은 자연적인 유전적 변이의 결과가 아닌 외부로부터 다양한 균주의 유입이 있었음을 시사한다. 여러 증거들은 뉴질랜드, 칠레 및 중국 등으로부터 수입된 꽃가루를 통해 유입되었음을 말해준다. Psa biovar 3가 우리나라에서 검역대상 병원체로 지정되어 관리되기 시작한 것이 2014년 12월이므로[8] 그 이전에 수입된 꽃가루에 의한 감염으로 보인다. 그러나 다양한 subgroup에 따른 병원성의 차이는 관찰되지 않았다.

이 연구를 통해 개발된 각 subgroup에 특이적인 primer sets는 키위 궤양병 병원균의 검역 과정에 활용될 수 있을 뿐 아니라 궤양병의 전파 및 확산에 관련된 역학적 연구에 사용될 수 있을 것이다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Balestra, G. M., Taratufolo, M. C., Vinatzer, B. A. and Mazzaglia, A. 2013. A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. *Plant Dis.* **97**, 472-478.
- Butler, M. I., Stockwell, P. A., Black, M. A., Day, R. C., Lamont, I. L. and Poulter, R. T. M. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. *PLoS One* **8**, e57464.
- Ciarroni, S., Gallipoli, L., Taratufolo, M. C., Butler, M. I., Poulter, R. T. M., Pourcel, C., Vergnaud, G., Balestra, G. M. and Mazzaglia, A. 2015. Development of a multiple loci variable number of tandem repeats analysis (MLVA) to unravel the intra-pathovar structure of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* populations worldwide. *PLoS One* **10**, e0135310.
- Ferrante, P. and Scortichini, M. 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *J. Phytopathol.* **157**, 768-770.
- Fujikawa, T. and Sawada, H. 2016. Genome analysis of the kiwifruit canker pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 5. *Sci. Rep.* **6**, 21399.
- Fujikawa, T. and Sawada, H. 2019. Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 6, which produces the phytotoxins, phaseolotoxin and coronatine. *Sci. Rep.* **9**, 3836.
- 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.
- Kim, G. H., Choi, E. D., Lee, Y. S., Jung, J. S. and Koh, Y. J. 2016. 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.
- Kim, G. H., Jung, J. S. and Koh, Y. J. 2017. Occurrence and epidemics of bacterial canker of kiwifruit in Korea. *Plant Pathol. J.* **33**, 351-361.
- Kim, G. H., Kim, K. H., Son, K. I., Choi, E. D., Lee, Y. S., Jung, J. S. and Koh, Y. J. 2016. Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 in Korea. *Plant Pathol. J.* **32**, 542-551.
- Kim, G. H., Lee, Y. S., Jung, J. S., Koh, Y. J., Poulter, R. T. M. and Butler, M. 2020. Genomic analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated in Korea suggest the transfer of the bacterial pathogen via kiwifruit pollen. *J. Med. Microbiol.* **69**, 132-138.
- Koh, H. S., Kim, G. H., Lee, Y. S., Koh, Y. J. and Jung, J. S. 2014. Molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated in Korea and a multiplex PCR assay for haplotype differentiation. *Plant Pathol. J.* **30**, 96-101.
- Koh, Y. J., Cha, B. J., Chung, H. J. and Lee, D. H. 1994. Outbreak and spread of bacterial canker in kiwifruit. *Kor. J. Plant Pathol.* **10**, 68-72.
- 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, Y. S., Kim, G. H., Koh, Y. J. and Jung, J. S. 2020. Evalu-

- ation of the genetic diversity of biovar 3 strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated in Korea. *J. Life Sci.* **30**, 1-9.
16. 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.
 17. McCann, H. C., Li, L., Liu, Y., Li, D., Pan, H., Zhong, C., Rikkerink, E. H. A., Templeton, M. D., Straub, C., Colombi, E., Rainey, P. B. and Huang, H. 2017. Origin and evolution of the kiwifruit canker pandemic. *Genome Biol. Evol.* **9**, 932-944.
 18. McCann, H. C., Rikkerink, E. H. A., Bertels, F., Fiers, M., Lu, A., Rees-George, J., Andersen, M. T., Gleave, A. P., Haubold, B., Wohlers, M. W., Guttman, D. S., Wang, P. W., Straub, C., Vanneste, J., Rainey, P. B. and Templeton, M. D. 2013. Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLoS Pathog.* **9**, e1003503.
 19. Sawada, H. and Fujikawa, T. 2019. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, pathogen of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathol.* **68**, 1235-1248.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Sawada, H., Shimizu, S., Miyoshi, T., Shinozaki, T., Kusumoto, S., Noguchi, M., Naridomi, T., Kikuhara, K., Kansako, M., Fujikawa, T. and Nakaune, R. 2015. Characterization of biovar 3 strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated in Japan. *Jpn. J. Phytopathol.* **81**, 111-126.
 23. Scortichini, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathol.* **43**, 1035-1038.
 24. 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. Japan* **55**, 437-444.
 25. Vanneste, J. L. 2017. The scientific, economic, and social impacts of the New Zealand outbreak of bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *Ann. Rev. Phytopathol.* **55**, 377-399.

초록 : 국내에서 분리된 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 균주들의 subgroup 분포

이영선¹ · 김경희² · 정재성^{1*}

(¹순천대학교 생물학과, ²순천대학교 식물외과)

키위에 세균성 궤양병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*는 유전적 특성과 생산하는 독소에 따라 5개의 biovar (1, 2, 3, 5, 6)로 나누어진다. 그중 최근 전 세계적으로 유행하고 있는 biovar 3는 2011년부터 국내에서 분리되고 있다. RAPD 분석을 바탕으로 국내에서 분리된 biovar 3 균주는 6개의 subgroup (I, IV, V, VI, VII, VIII)으로 나누어진 바 있다. 본 연구에서는 차등되는 RAPD 밴드의 염기서열로부터 6개 subgroup 각각에 특이적인 SCAR primers를 개발하였다. 각 subgroup에 특이적인 이들 primers를 사용하여 2011-2017에 국내에서 분리한 biovar 3 균주들의 subgroup 분포를 조사하였다. 조사된 54개 균주 중 35개(64.8%)가 subgroup V에, 9개(16.7%) 균주가 subgroup IV, 4개(7.4%)가 subgroup VI, 3개(5.6%) 균주가 subgroup VII, 2개(3.7%)가 subgroup VIII, 그리고 1개(1.9%) 균주가 subgroup I에 속하였다. Subgroups IV, V 및 VI에 속하는 균주들은 각각 중국, 뉴질랜드, 칠레 균주와 연관이 있었다. 이 연구에 따르면 우리나라의 biovar 3 균주들은 유전적으로 다양하며 꽃가루를 통해 외국으로부터 유입된 것으로 추정된다.