

## *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 가 생산하는 tabtoxin의 미생물학적 검색방법에 관한 연구

백형석 · 구재관 · 전홍기  
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

### Studies on the microbiological assay method for tabtoxin produced in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Baik, Hyung Suk, Jae-Gwan Gu and Hong-Ki Jun

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**ABSTRACT:** Tabtoxin produced in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* irreversibly inhibits its known physiological target, glutamine synthetase, so that causes wildfire disease on leaves of host plant.

In this study, we examined a rapid and sensitive microbiological method for tabtoxin assay in several media. In minimal A agar medium and minimal glucose agar medium, growth inhibition zone of *Agrobacterium tumefaciens* was larger than that of other indicator strain. However, mostly, growth inhibition zone of indicator strains on the minimal glucose agar medium was smaller than that of on the minimal A agar medium. In complex agar medium, growth inhibition zone was not observed in all the tested indicator strains. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* produced more tabtoxin according to the incubation time. When glutamine was added to the minimal glucose agar medium, growth inhibition zone of *Agrobacterium tumefaciens* was reduced.

**KEY WORDS** □ Tabtoxin, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, Growth inhibition zone

식물 병원성 세균인 *Pseudomonas syringae* 에 속하는 균주들은 그들의 숙주인 식물의 잎이나 뿌리에 질병을 야기하여 생육부진을 유발함으로써 이들의 수확량을 감소시키거나 품질의 저하를 초래한다. 이들 식물병 유발균들은 각기 특징적인 Phytotoxin 을 생성하여 병을 일으킨다.

이와 같은 특징적인 phytotoxin 생성에 의해 발생하는 식물병 및 원인균으로는 담배 잎에 들불병(野火病, wildfire disease)을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 와 콩의 일종인 *Phaseolus vulgaris* L. cv. Red Kidney의 잎에 채균성 점무늬병을 야기하는 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 가 있으며 (Durbin 등, 1984; Mitchell 등, 1983) 이외에 대두에 세균성 점무늬병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Carolyn 등, 1987; Osman 등, 1986), 토마토 잎에 세균성 점무늬병을 유발하는 *Pseudomonas coronafaciens* (Suresh 등, 1976), 양파 뿌리에 뿌리썩음병을 일으키는 *Pseudomonas cepacia* 등이 있다(Gail 등, 1987).

이 중에서도 특히 담배잎이나 콩잎에 들불병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 가 큰 문제로 대두되었으며 (Stewart, 1971), 이 균에 의한 들불병의 유발기작은 바로 이 균이 생성 분비하는 tabtoxin이 가수분해 됨으로써 생기는 tabtoxinine- $\beta$  lactam [2-amino-4-(3-hydroxy-2-oxo-azacyclobutan-3-yl)-butanoic acid] 에 기인한 것으로 밝혀졌다 (Durbin 등, 1985; Levi 등, 1986; Taylor 등, 1972; Thomas 등, 1985; Unkefer 등, 1987).

그러나 이들 식물 병원성 균들이 생성하는 phytotoxin의 검색은 주로 식물 숙주의 잎 등에 toxin 생성균을 점종하여 숙주에 나타나는 증상으로 관찰하고 있으나 이 검색법은 많은 시간이 소요되기 때문에 보다 간편한 방법으로 검색할 수 있는 검색법이 필요하다.

특히 유연종인 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 의 경우, 생성된 phaseoletoxin 을 *Escherichia coli* 와 *Salmonella typhimurium* 이 oligopeptide transport system을 통하여 흡수하는 성질을 이용한

미생물학적 독성 검사법이 보고되어 있다(Staskawicz 등, 1979; Staskawicz 등, 1980).

그러나 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*가 생성하는 tabtoxin에 대한 미생물학적 검색 방법은 극히 미미한 실정이므로 본 실험에서는 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 등 여러 세균을 이용하여 tabtoxin을 검색할 수 있는 방법에 대하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양방법

Tabtoxin 생성균주는 미국의 Wisconsin University 의 R. D. Durbin으로부터 분양받은 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*로서 Toxin<sup>+</sup>(pt113, 독성 tabtoxin 생성균) 균과 Toxin<sup>-</sup>(pa45, 비독성 tabtoxin 생성균) 균이었으며, 이들을 minimal medium과 complex medium에서 독소생성 최적온도인 18~20°C (Staskawicz 등, 1980)에서 진탕배양 하였다. Tabtoxin의 미생물학적 검색에 사용한 지시 균주는 Table 1과 같았으며 *Escherichia coli* 와 *Salmonella typhimurium*은 37°C 에서, 나머지 균들은 30°C에서 진탕배양하여 실험에 사용하였다.

### 사용배지

Bottom agar medium으로는 minimal A agar medium (Miller, 1972), minimal glucose agar medium (Maron 등, 1983)과 복합배지인 nutrient broth-yeast extract(NBYE) agar medium (Nordeen 등, 1983), nutrient agar medium(nutrient broth 8 g, agar 15g, 증류수 1000ml)을 사용하였으며 top agar medium으로는 2.0% molten agar를 지시균주의 증충시에 사용하였다.

### 숙주식물

분양받은 균주의 tabtoxin생성 유무에 대한 1차적인 검색을 위해서 사용한 숙주식물은 *Phaseolus*

*vulgaris* L. cv. Red Kidney이었으며, 물에 적신 솜이 깔린 petri dish에 종자를 넣고 30°C에서 발아시킨 다음, 화분에 옮겨 20±2°C 온실에서 재배하여 실험에 사용하였다.

### 숙주식물에 대한 독성검사

이식후 7~12일이 경과한 *Phaseolus vulgaris* L. cv. Red Kidney의 잎을, Carborundum을 묻힌 멸균된 면봉으로 가볍게 문질러 상처를 낸 다음, NBYE broth에서 30°C로 하룻밤 동안 배양한 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* toxin<sup>+</sup> 및 toxin<sup>-</sup>균을 접종하였다. 접종된 숙주식물은 20±2°C의 온실에서 12시간 간격으로 light-dark cycle을 반복하여 재배한 다음 10~14일 후에 잎에 나타나는 증상을 관찰하였다.

### 배지조성에 따른 독성 검사

*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 Toxin<sup>+</sup>균과 Toxin<sup>-</sup>균을 minimal medium과 complex medium에서 30°C로 하룻밤 동안 진탕배양한 다음, 배양액 40μl를 각각의 bottom agar medium에 접종하였으며 18~20°C에서 24시간 정지배양하여 tabtoxin을 충분히 생성시킨 후 지시균주를 증충하였다. 지시균주는 각각의 동일 액체 배지에서 *Escherichia coli* 와 *Salmonella typhimurium*은 37°C에서, 나머지 균주들은 30°C에서 하룻밤 동안 진탕배양한 후 2.0% molten agar 2ml에 동량의 균 배양액을 첨가하여 고루 섞은 다음 bottom agar plate에 증충시켰다. 증충된 균은 30°C 배양기에서 24시간 배양하여 tabtoxin에 의한 지시균주의 증식저지환을 관찰하였다.

### Glutamine 첨가에 대한 독성 검사

Glutamine을 첨가했을 때 tabtoxin에 대한 지시균주의 반응을 검토하기 위해서 bottom agar plate에 최고 800μg/ml의 glutamine을 첨가하여 지시균주인 *Agrobacterium tumefaciens*의 증식저지환을

Table 1. Bacterial strains used in the development of a microbiological assay for tabtoxin.

Strain	Source	Genotype
<i>Aerobacter aerogenes</i>	IFO 3317	Wildtype
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	IAM 1037	Wildtype
<i>Bacillus subtilis</i>	IFO 3007	Wildtype
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	IFO 12071	Wildtype
<i>Escherichia coli</i> C600	S.Y. Lee	F <sup>-</sup> thi-1 thr-1 leuB6 lac Y1 fhu A21 sup E44λ
<i>Micrococcus luteus</i>	IFO 3763	Wildtype
<i>Sarcina marginata</i>	IFO 3066	Wildtype
<i>Salmonella typhimurium</i> LT-2G46	B.N. Ames	hisG46
<i>Xanthomonas campestris</i>	IAM 1671	Wildtype

조사하였다.

**배양온도에 따른 tabtoxin 생성능 검토**

*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 Toxin<sup>+</sup>균을 minimal glucose agar plate에 20μl씩 접종하여 10℃, 20℃, 30℃에서 24시간 배양하여 tabtoxin을 생성케 한 후 지시균주로 *Agrobacterium tumefaciens*를 사용하여 증충시키고 30℃에서 24시간 배양하여 나타나는 증식저지환을 조사하였다.

**배양시간에 따른 tabtoxin 생성능 검토**

Minimal glucose agar plate에 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 Toxin<sup>+</sup>균 배양액을 20μl 접종하여, 20℃에서 1일부터 3일까지 배양하여 tabtoxin을 생성시키고 *Agrobacterium tumefaciens*를 지시균주로 사용하여 증충시킨 후 30℃에서 24시간 배양하여 나타나는 증식저지환의 크기를 비교 검토하였다.

**결과 및 고찰**

**숙주식물에 대한 독성 검사**

*Phaseolus vulgaris* L. cv. Red Kidney의 잎에 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Toxin<sup>+</sup>균을 접종하여 나타난 세균성 점무늬병은 Fig.1과 같았다. Toxin<sup>+</sup>균을 접종한 잎에서는 직경 2~3cm 정도의 세균성 점무늬병 증상을 확연히 나타내었으며 Toxin<sup>-</sup>균을 접종한 잎에서는 어떠한 병징도 관찰

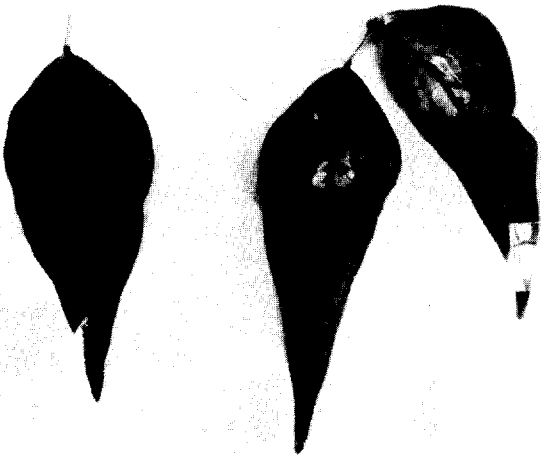


Fig. 1. Tabtoxin-induced chlorosis in *Phaseolus vulgaris* L. cv. "Red kidney" leaves  
(A) No toxin  
(B) Toxin-induced halo

할 수 없었다. 이 결과를 토대로 하여 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Toxin<sup>-</sup>균을 tabtoxin의 미생물학적 검색에 사용하였다.

**Minimal A agar medium을 사용한 독성 검사**

*Escherichia coli*와 *Agrobacterium tumefaciens*를 지시균주로 사용하여 minimal A agar medium에서 tabtoxin을 검색한 결과는 Fig. 2, 3과 같았다. *Escherichia coli*의 경우 직경 약 3~4cm의 증식저지환을 나타내었으며 *Agrobacterium tumefaciens*의 경우 약 6cm의 증식저지환을 나타내었다. 그외의 지시균주를 사용한 결과는 table2와 같았다. 따라서

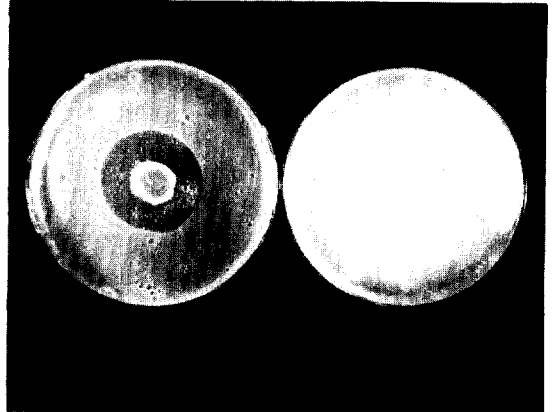


Fig. 2. Microbiological assay for tabtoxin by *Escherichia coli* in minimal A agar medium  
(A) Toxin<sup>+</sup>  
(B) Toxin<sup>-</sup>

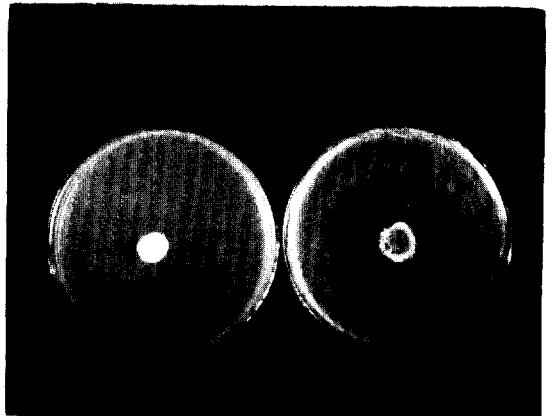


Fig. 3. Microbiological assay for tabtoxin by *Agrobacterium tumefaciens* in minimal A agar Medium  
(A) Toxin<sup>+</sup>  
(B) Toxin<sup>-</sup>

**Table 2.** Microbiological assay for tabtoxin in minimal A agar medium.

Strain	Inhibition zone(cm)	Colony zone(cm)
<i>Escherichia coli</i> C600	3-4	1.5
<i>Salmonella typhimurium</i> LT-2G46	5	1.5
<i>Aerobacter aerogenes</i>	—	1.5
<i>Bacillus subtilis</i>	5.5	1.5
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6	1.5
<i>Micrococcus luteus</i>	—	1.5
<i>Sarcina marginata</i>	—	1.5
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	—	1.5
<i>Xanthomonas campestris</i>	—	1.5

**Table 3.** Microbiological assay for tabtoxin in minimal glucose agar medium.

Strain	Inhibition zone(cm)	Colony zone(cm)
<i>Escherichia coli</i> C600	3	1.5
<i>Salmonella typhimurium</i> LT-2.G46	2	1.5
<i>Aerobacter aerogenes</i>	—	1.5
<i>Bacillus subtilis</i>	3.5	1.5
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	4.5	1.5
<i>Micrococcus luteus</i>	—	1.5
<i>Sarcina marginata</i>	—	1.5
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	—	1.5
<i>Xanthomonas campestris</i>	—	1.5

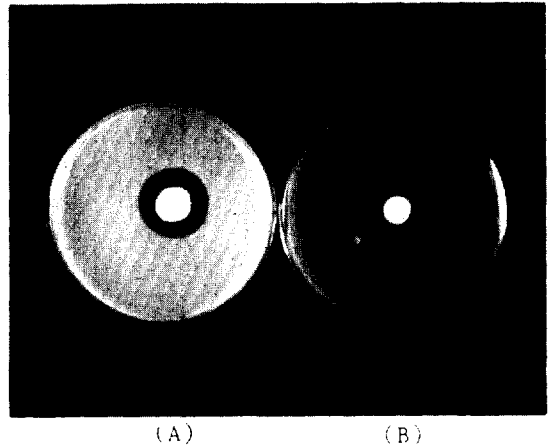
*Agrobacterium tumefaciens*가 tabtoxin에 가장 민감한 반응을 보임을 알 수 있었다.

**Minimal glucose agar medium 을 사용한 독성 검사**

Mimimal glucose agar medium 을 사용하여 tabtoxin 을 검색한 결과는 Fig. 4 및 Table 3 과 같았다. Fig. 4 는 지시균주로 *Escherichia coli*와 *Agrobacterium tumefaciens* 를 사용했을 때 생성된 증식저지환의 크기를 비교한 것으로 각각 약 3cm와 4.5cm의 증식저지환을 나타내었으며 이러한 결과는 minimal A agar medium 에서도 유사하였다. 따라서 *Agrobacterium tumefaciens* 가 사용된 지시균주 중에서는 tabtoxin에 가장 높은 감도를 나타내었다.

**Complex agar medium 을 사용한 독성 검사**

NBYE 와 nutrient agar medium에서 tabtoxin 을 검색한 결과 사용된 모든 지시균주가 tabtoxin 에 의한 증식저지환을 전혀 형성하지 않았다. 따라서 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*는 complex medium 에서 tabtoxin 을 생성하지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 유연종인 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*가 complex medium에서는 phaseolotoxin을 생성하지 않는다는 보고(Staska-



**Fig. 4.** Microbiological assay for tabtoxin by *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* in minimal glucose agar medium  
(A) *Escherichia coli* C600  
(B) *Agrobacterium tumefaciens*

wicz 등, 1979)와 일치하였다.

**Glutamine 첨가시 독성 검사**

Minimal glucose agar medium에 800mg/ml의

glutamine 을 첨가 했을 때 지시균주인 *Agrobacterium tumefaciens*의 tabtoxin 에 대한 반응은 Fig. 5 와 같이 증식저지환이 생성되지 않음을 알 수 있었다.

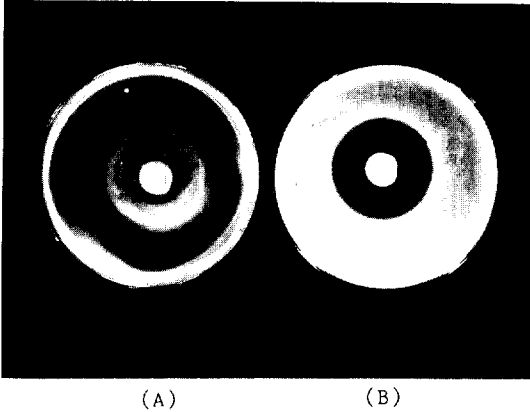


Fig. 5. Glutamine inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* by tabtoxin and its reversal by glutamine  
 (A) Minimal glucose agar medium  
 (B) Minimal glucose agar medium + glutamine

**배양온도에 따른 tabtoxin 생성능**

Minimal glucose agar medium 에서 10°C, 20°C, 30°C로 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*를 배양하여 생성된 tabtoxin 을 지시균주 *Agrobacterium tumefaciens* 로 검색한 결과 Fig.6과 같이 20°C 뿐만 아니라 30°C에서도 tabtoxin 이 생성됨을 알 수 있었다.

**배양시간에 따른 tabtoxin 생성능**

Minimal glucose agar medium 에서 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 의 배양시간에 따른 tabtoxin 생성능을 지시균주 *Agrobacterium tumefaciens*를 사용하여 증식저지환의 크기로 비교, 검토하였다. Fig.7에서와 같이 배양시간이 경과함에 따라 지시균주의 증식저지환이 1일 배양시 약 3.5cm, 2일 배양시 약 7cm, 3일 배양시 약 9~10cm 의 크기로 증식저지환이 커지는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과를

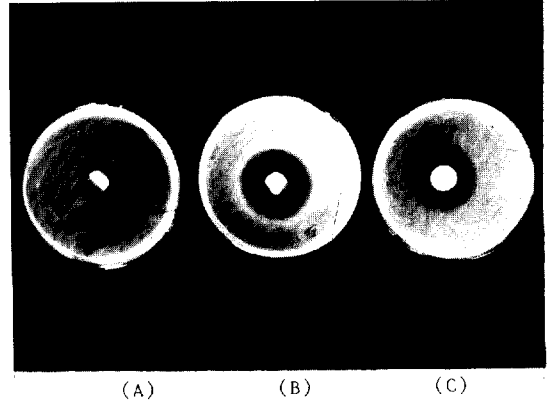


Fig. 6. Effect of temperature on tabtoxin production  
 (A) 10°C  
 (B) 20°C  
 (C) 30°C

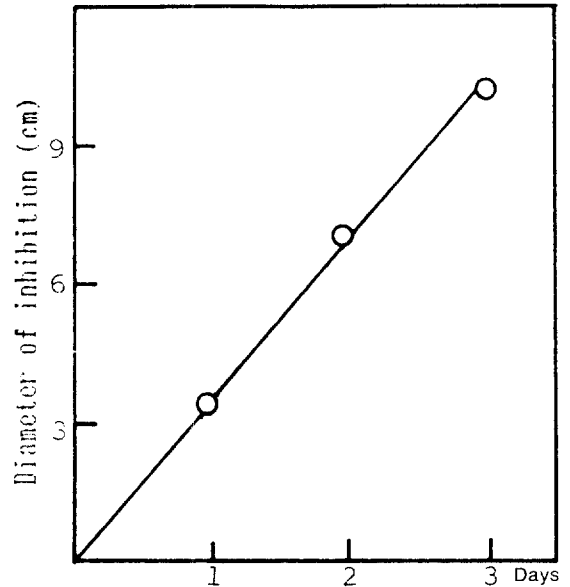


Fig 7. Inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* by tabtoxin

이용하면 배양시간에 따른 tabtoxin 생성량에 대한 정량적인 검토가 가능하리라 사료된다.

**적 요**

식물의 잎에 세균성 점무늬병을 야기시키는 식물 병원성균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*는 tabtoxin 이라는 phytotoxin 을 생성하는데 이 toxin을 미생물학적으로 간편하게 검색하는 방법을 여러가지 지시균주를 사용하여 각종 배지에서 검토하였다. Minimal A agar medium에서는 tabtoxin 검색에 *Agrobacterium tumefaciens*가 가장 유용한 균주였

으며 minimal glucose agar medium 에서도 역시 마찬가지로의 결과를 얻었다. Complex agar medium 에서는 사용된 모든 지시균주에 대해 증식저지환이 형성되지 않아, tabtoxin 이 생성되지 않음을 알 수 있었다. 배양온도에 따른 tabtoxin 의 생성능은 20℃ 및 30℃ 에서 최적이었으며 배양시간이 경과함에 따라 tabtoxin 생성량이 증가 하였다. Glutamine 을 minimal glucose agar medium 에 첨가하여 tabtoxin 에 대한 지시균주의 반응은 첨가한 glutamine 의 양이 증가할수록 tabtoxin 에 의한 생육억제가 감소함을 알 수 있었다.

### 참고문헌

1. Carol, L. B., and D.A. Cooksey, 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.*, **169**, 470-474.
2. Carolyn, N., and B. Staskawicz, 1987. Molecular characterization and nucleic acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.*, **166**, 66-71.
3. Durbin, R.D., and T.F. Uchytel, 1984. The role of intercellular fluid and bacterial isolate on the vivo production of tabtoxin and tabtoxinine- $\beta$ -lactam. *Physiol. Plant Pathol.*, **24**, 25-31.
4. Durbin, R.D., and T.E. Uchytel, 1985. Role of zinc in regulating tabtoxin production, *Experimentica*, **41**, 136-137.
5. Gail, E.S., H. Ree, and T.G. Lessie, 1987. Identification of transposable elements which activate gene expression in *Pseudomonas cepacia*. *J. Bacteriol.*, **169**, 8~13.
6. Levi, C., and R.D. Durbin, 1986. The isolation and properties of a tabtoxin hydrolyzing aminopeptidase from the periplasmic of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **28**, 245-552.
7. Maron, D.M., and B.N. Ames, 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**, 173-215.
8. Miller, J.H., 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
9. Mitchell, D.T., P.J. Langston-Unkefer, T.F. Uchytel, and R.D. Durbin, 1983. Inhibition of glutamine synthetase from pea by tabtoxinine- $\beta$ -lactam. *Plant Physiol.*, **71**, 912-915.
10. Nordeen, R.O., M.K. Morgan, and T.C. Currier, 1983. Isolation and partial characterization of bacteriophages of the phytopathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(6), 1890-1898.
11. Osman, S.F., W.F. Fett, and M.L. Fishman, 1986. Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas*
12. Staskawicz, B.J., and N.J. Panopoulos, 1979. A rapid and sensitive microbiological assay for phaseolotoxin. *Phytopathology*, **69**, 663-666.
13. Staskawicz, B.J., and N.J. Panopoulos, 1980. Phaseolotoxin transport in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* via the oligopeptide permease. *J. Bacteriol.*, **142**, 474-479.
14. Stewart, W.W., 1971. Isolation and proof of structure of wildfire toxin. *Nature*, **229**, 174-178.
15. Suresh, S.P., P. Youngblood, P. Christiansen, and R.E. Moore, 1976. Phaseotoxin A: An antimetabolite from *Pseudomonas phaseolicola*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **69**, 1019-1027.
16. Taylor, P.A., H.K. Schnoes, and R.D. Durbin, 1972. Characterization of hydrolyzing aminopeptidase from the periplasm of *Pseudomonas* sp.. *Biochim. Biophys. Acta*, **286**, 107-117.
17. Thomas, M.D., and R.D. Durbin, 1985. Glutamate synthetase from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*: Properties and inhibition by tabtoxinine- $\beta$ -lactam. *J. General Microbiol.*, **131**, 1061-1067.
18. Unkefer, C.J., R.E. London, R.D. Durbin, T.F. Uchytel, P.J. Langston-Unkefer, 1987. The biosynthesis of tabtoxinine- $\beta$ -lactam use of specifically  $C^{13}$ -labeled glucose and  $C^{13}$  MMR spectroscopy to identify its biosynthetic precursors. *J. Biol. Chem.*, **262**, 4994-4999.

(Received Jul.3, 1989)