

우리나라에 분포하는 고추와 토마토 풋마름병균 (*Ralstonia solanacearum*) 계통들의 유전적 다양성

서상태* · 박종한 · 한경숙 · 정승룡 · 이승돈¹

원예연구소 원예환경과, ¹농촌진흥청 연구관리과

Genetic Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains Isolated from Pepper and Tomato Plants in Korea

Sang-Tae Seo*, Jong-Han Park, Kyoung-Suk Han, Seung-Ryong Cheong and Seungdon Lee¹

Horticultural Environment Division, National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 441-440, Korea

¹Research & Development Bureau, Research Management Division 150 Suinro, Suwon 441-707, Korea

(Received on February 8, 2007)

A total of 35 strains of *Ralstonia solanacearum* isolated from wilted pepper and tomato plants in Korea were analyzed for their genetic diversity by bacteriological, pathological and molecular biological approaches. All the strains were identified as *R. solanacearum* biovar 4 on the basis of physiological and biochemical tests, and species-specific PCR primers. Pathogenicity of the strains was confirmed by inoculating on 4-week-old pepper and tomato seedlings. Using cluster analysis based on repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) genomic fingerprints, *R. solanacearum* strains isolated from pepper and tomato in Korea divided into 6 groups showing a high degree of genetic diversity at 55% similarity level. The genetic diversity of strains was not significantly correlated with their geographic origins and host plants.

Keywords : Genetic diversity, Pepper, *Ralstonia solanacearum*, Tomato

Ralstonia solanacearum(Yabuchi 등, 1996)은 고추, 토마토, 감자 등과 같은 주요 작물을 포함하여 약 50과 200 종 이상의 작물에 풋마름병(bacterial wilt)을 일으키는 경제적 피해가 매우 큰 병원세균이다(Hayward, 1991). 풋마름병균은 토양에서 오랫동안 생존이 가능하며, 주로 뿌리의 상처를 통해 기주에 침입한 후 물관의 이동을 막아 식물체를 고사시킨다. 풋마름병균의 생리적 분화는 매우 다양하여, 5개의 race(He 등, 1983), 5개의 biovar(Hayward, 1991), 2개의 RFLP cluster(Cook 등, 1989)로 구분할 수 있으며, race 3은 일반적으로 기주범위가 제한되어 있지만, race 1은 기주범위가 상당히 광범위하다. 국내에는 주로 race 1, 3과 biovar 2, 3, 4가 분포하는 것으로 보고되었다(이, 1999).

여러 지역과 기주에서 분리된 풋마름병균 계통들의 유

전적 다양성을 검정하기 위해서 다양한 방법들(randomly amplified polymorphic DNA, restriction fragment length polymorphism, repetitive sequence-based polymerase chain reaction)을 이용한 연구들이 진행되어져 왔다(Horita와 Tsuchiya, 2001; Thwaites 등, 1999). 또한, 국한된 지역에서의 풋마름병균 집단의 유전적 다양성에 관한 연구도 보고되었다(Grover 등, 2006).

풋마름병균의 유전적 다양성을 이해하는 것은 생태연구 및 방제를 위해서 매우 중요하다고 할 수 있을 것이다. 따라서, 이번 연구에서는 국내의 고추와 토마토 재배지에서 분리한 35개의 풋마름병균 계통들에 대해 유전적 다양성을 조사하여 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지. 이번 연구에 사용한 35개의 풋마름병균 계통들은 Table 1과 같다. 분리방법은 풋마름병균이 발생된 줄기의 일부분을 70% 에탄올로 멸균한 후 적

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-6242, Fax) +82-31-290-6259

E-mail) abiwoo@rda.go.kr

Table 1. Strains of *Ralstonia solanacearum* used in this study

Isolates	Host	Year	Geographical origin	Rs PCR ^a	rep-PCR group ^b	Biovar ^c
13	Pepper	2004	Miryang	+	1	4
15	Pepper	2004	Miryang	+	4	4
20	Pepper	2003	Damyang	+	6	4
100 (SL-0100)	Pepper	1999	Seosan	+	3	4
107 (SL-0107)	Pepper	1999	Hwasung	+	3	4
108 (SL-0108)	Pepper	1999	Hwasung	+	3	4
109 (SL-0109)	Pepper	1999	Hwasung	+	3	4
110 (SL-0110)	Pepper	2001	Changyeong	+	4	4
111 (SL-0111)	Pepper	2001	Naju	+	1	4
112 (SL-0112)	Pepper	2001	Naju	+	1	4
114 (SL-0114)	Pepper	2001	Naju	+	1	4
115 (SL-0115)	Pepper	2001	Naju	+	1	4
116 (SL-0116)	Pepper	2001	Naju	+	1	4
117 (SL-0117)	Pepper	2001	Naju	+	1	4
124	Pepper	2006	Hongchon	+	1	4
125	Pepper	2006	Hongchon	+	1	4
126	Pepper	2006	Hongchon	+	1	4
127	Pepper	2006	Eumsung	+	3	4
128	Pepper	2006	Eumsung	+	3	4
129	Pepper	2006	Hwasung	+	1	4
130	Pepper	2006	Hwasung	+	1	4
R2	Tomato	2005	Chungnam	+	1	4
R5	Tomato	2005	Chungnam	+	1	4
R6	Tomato	2005	Chungnam	+	1	4
R7	Tomato	2005	Chungnam	+	1	4
R8	Tomato	2005	Chungnam	+	1	4
R14	Tomato	2005	Uiwang	+	1	4
R16	Tomato	2005	Uiwang	+	1	4
R17	Tomato	2005	Uiwang	+	1	4
R18	Tomato	2005	Uiwang	+	1	4
R20	Tomato	2005	Pyeongtaek	+	3	4
R22	Tomato	2005	Pyeongtaek	+	3	4
R23	Tomato	2006	Hwasung	+	2	4
R24	Tomato	2006	Hwasung	+	2	4
R25	Tomato	2006	-	+	5	4

^aPCR detection of the *R. solanacearum* specific loci. See Fig. 1.^bCluster analysis on the basis of rep-PCR (BOX- and ERIC-PCR). See Fig. 2.^cBiovar analysis on the basis of physiological tests. See Table 3.

당한 크기로 잘라 microtube에 넣고 마쇄하였다. 마쇄한 조직은 멸균수를 가하여 10⁻¹배에서 10⁻⁵배까지 순차적으로 희석한 다음 TTC 배지(Kelman, 1954)에 도말배양하여 단일 colony를 얻었다. 순수 분리한 균들은 동결 보존용 배지(10% skimmed milk, 1.5% sodium glutamate)에 혼탁하여 -30°C에 보관하면서 시험에 이용하였다.

병원성 검정. TTC 배지에서 48시간 배양한 세균을 멸

균수에 혼탁하여 농도를 10⁸cfu/ml로 맞춘 다음 파종 4주된 고추(*Capsicum annuum* L.)와 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.)의 뿌리를 멸균된 가위를 이용하여 단근한 후 관주접종(10 ml)하였다. 28°C 습실 항온기에서 1일 배양 후 유리온실로 옮겨 1~4주 후 병원성을 관찰하였다.

병원세균의 생리적 특성조사. 분리된 세균은 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 특성을 조사하였다. 세균을 동정

하기 위해 그람염색, KB 배지에서의 형광유무, NBY 배지에서의 색소 형성 여부 등을 조사하였다.

Biolog system을 이용한 탄수화물 이용도 조사는 Lee 등(2005)이 보고한 방법에 준하여 실시하였다. 세균을 TSBA 배지(BD211825)에서 48시간 배양 후 GN/GP-IF 용액에 혼탁시켜 GN2 microplate(BIOLOG GN2 MicroPlateTM)에 분주하였다. 24시간과 48시간 배양 후 색깔변화 여부를 육안으로 관찰하였다.

유전적 특성조사. 실험에 이용된 균주들의 DNA는 InstaGene matrix(Bio-Rad)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 분리한 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 분리된 세균을 동정하기 위해 Schonfeld 등(2003)이 보고한 종특이적 primer(Rsol-fliCF, Rsol-fliCR)를 이용하여 PCR을 실시한 후 증폭산물의 유무를 조사하였다. PCR 반응은 Takara PCR thermal cycler MP(Takara, Japan)를 이용하였으며, PCR 반응액은 2 μl의 DNA, 2.5U *Taq* polymerase(Takara, Japan), 100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 각각의 dNTP 0.2 mM, primer 50 pmol을 넣고 멸균수로 최종 반응용액의 부피를 25 μl로 조절하였다. PCR은 초기 변성화 반응(95°C, 5분), 30 회의 증폭반응(94°C, 30초; 64°C, 45초; 72°C, 1분), 최종 확장반응(72°C, 10분) 조건으로 수행하였다.

16S rRNA 유전자는 universal primer인 fD1, rP2를 이용하여 William 등(1991)이 제시한 조건에 의해 증폭하였고, 증폭된 PCR 산물은 제한효소(*Taq*I, *Afa*I, *Dde*I, *Alu*I, *Hae*III, *Hinf*I, *Sau*3AI, *Hap*II, *Nci*I, *Cfr*13I, *Xsp*I)를 이용하여 RFLP 분석을 실시하였다. rep-PCR은 Louws 등(1994)이 보고한 방법에 준하여 실시한 후, unweighted pair-group method of arithmetic average (UPGMA) similarity index와 Applied-math의 BioNumerics 4.61을 이용하여 계통도를 작성하였다. RAPD 분석은 Grover 등(2006)이 보고한 방법에 준하여 실시하였고, primer는 OPA09 (GGGTAAACGCC)를 이용하였다.

결과 및 고찰

이번 연구에서는 우리나라 여러 지역에서 재배되고 있는 풋마름증상이 관찰된 고추와 토마토로부터 35개의 풋마름병균 계통들을 분리·동정하였으며, 풋마름병균 계통들의 유전적 특성을 비교 분석하였다. 분리한 풋마름병균 계통들의 동정을 위해 생리·생화학 실험을 실시한 결과 그람염색 음성, 형광색소 발현 음성, urease 양성 등 Schaad 등(2001)이 기술한 풋마름병균의 특성과 일치하였다(Table 2). 또한, Schonfeld 등(2003)이 보고한 종특이적

Table 2. Identification of the present strains isolated from pepper and tomato

Characteristics	Present strains	<i>Ralstonia solanacearum</i> ^a
Gram stain	- ^b	-
Aerobic growth	+	+
Yellow or orange colonies on NBY	-	-
Fluorescent pigment on KB	-	-
Urease	+	+
Growth at 37°C	+	+
Nitrite from nitrate	+	+
Grows anaerobically	-	-

^aDetails of the *R. solanacearum* are described by Schaad et al. (2001).

^b+: positive, -: negative.

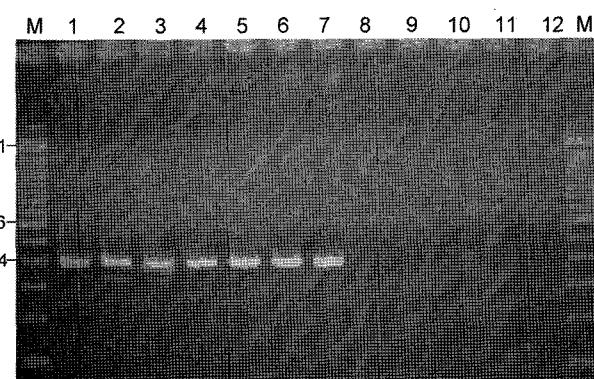


Fig. 1. Rsol-fliC amplification assay using species-specific primers for *Ralstonia solanacearum* strains. Lanes 1-12 contain, respectively, PCR amplicons obtained using DNA templates from 13, 20, 100, 114, R2, R8, R25, KACC 10003 (*Pseudomonas fluorescens*), KACC 10219 (*P. putida*), ATCC 15713 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), KACC 10298 (*Agrobacterium tumefaciens*), KACC 11125 (*A. rhizogenes*). Molecular size marker (100 bp ladder) were run in lane M.

primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 분리한 35균주에서만 400 bp의 풋마름병균 특이적 band가 관찰되었으며, 다른 속의 식물병원세균에서는 band가 증폭되지 않았다 (Fig. 1). 위의 생리·생화학 실험과 유전적 실험결과에 따라 고추와 토마토에서 분리한 35개의 균주를 풋마름병균(*Ralstonia solanacearum*)으로 동정하였다.

Yun 등(2004)은 토마토 재배토양 및 토마토로부터 분리한 71개의 풋마름병균중 36개 균주는 biovar 3으로, 35 개 균주는 biovar 4로 동정하였다. 또한, 이(1999)도 국내 풋마름병균은 biovar 3과 4의 존재가 많음을 보고하였다. 그러나, 이번 연구에서 분리균의 biovar를 결정하기 위해 Schaad 등(2001)이 기술한 방법과 Biolog system을 이용한 탄소원 이용도를 조사한 결과 풋마름병균 계통들

Table 3. Tests for biovar determination of *Ralstonia solanacearum* strains

Test	Present strains(35)		Biovar ^a				
	Pepper(21)	Tomato(14)	1	2	3	4	5
Utilization of Maltose	- ^b	-	-	+	+	-	+
Lactose	-	-	-	+	+	-	+
Cellobiose	-	-	-	+	+	-	+
Mannitol	+ (19)	+ (13)	-	-	+	+	+
Sorbitol	+ (12)	+ (9)	-	-	+	+	-
Trehalose	+	+	+	-	+	+	+
Gas from nitrate	+	+	-	-	+	+	+

^aDetails of the *R. solanacearum* biovar are described by Schaad *et al.* (2001).

^b+: positive, -: negative.

은 모두 biovar 4로 동정되었으며(Table 3), 고추와 토마토 분리균간의 특이한 생리적 특성은 나타나지 않았다. 또한, 풋마름병균 계통들을 고추와 토마토 유묘에 병원성을 실험한 결과 병원성 정도의 차이는 있었으나, 35균주 모두 고추와 토마토에 풋마름병증을 나타내었다. 토마토의 경우 빠르면 접종 5일 후부터, 고추에서는 접종 3주 후부터 병원성이 확인되었으며, 고추에서 분리한 20, 토마토에서 분리한 R22 균주가 가장 강한 병원성을 나타내었다. 고추와 토마토 분리균은 생리·생화학 성질과 병원성면에서 서로 상이한 점을 관찰할 수 없었는데, 11개의 제한효소를 이용한 16S rRNA 유전자의 RFLP 분석에

서도 모두 같은 RFLP pattern을 나타내어(결과 미제시), 균주간 16S rRNA 유전자 상동성도 매우 높게 나타났다.

그러나, rep-PCR(BOX-와 ERIC-PCR) 산물을 전기영동 후(Fig. 2A, B) 계통도를 작성한 결과 35개의 분리균은 6개의 그룹을 형성하면서 유전적 다양성이 높게 나타났다(Fig. 2C). 그룹 1에는 35균주 중 21균주가 속하며 가장 많은 균주가 속하였고, 다음으로 그룹 3에 8균주가 속하였다. 그룹 2와 4에는 2균주씩 속하였고, 그룹 5와 6에는 각각 1균주씩 속하였다. 그룹 5의 R25균주와 그룹 6의 20균주는 RAPD 분석에서도 다른 균주들과는 상이한 band pattern을 나타내었다(Fig. 3). rep-PCR의 각 그룹간

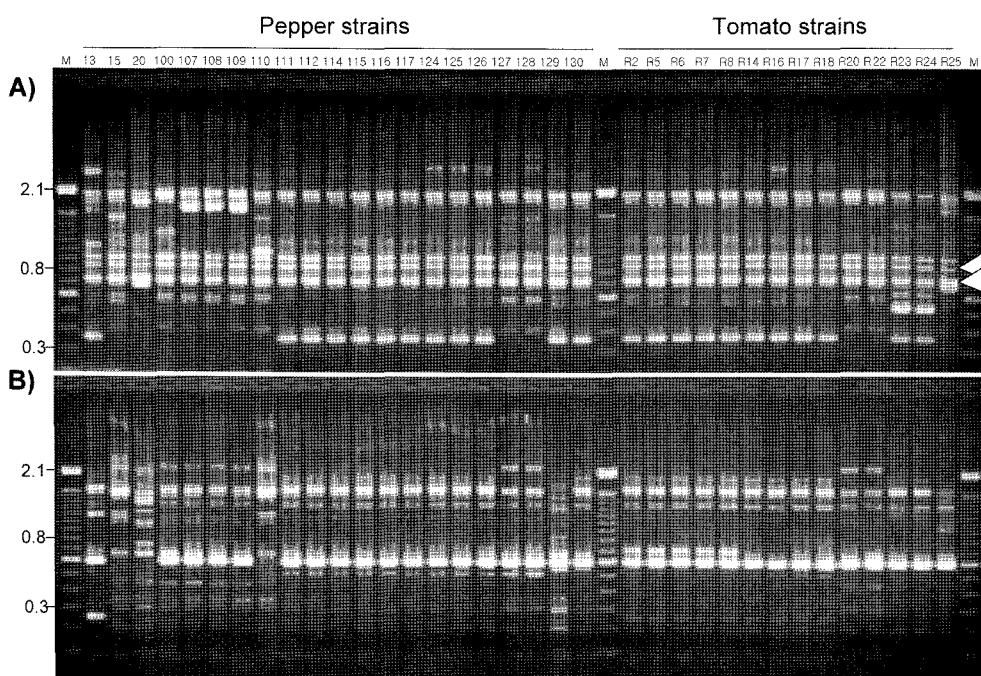
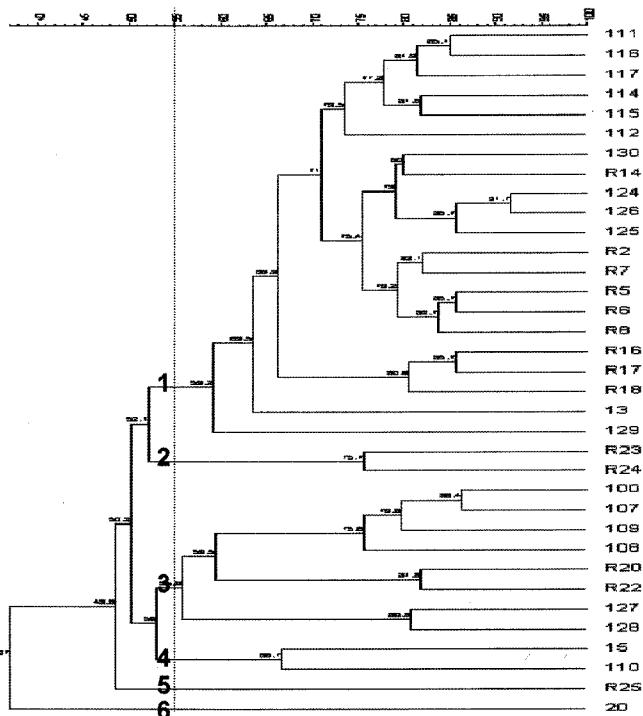
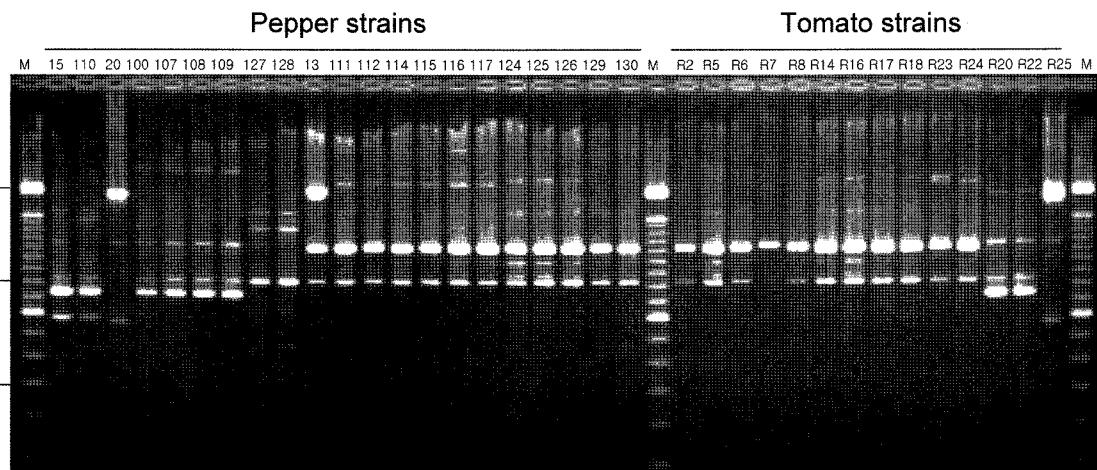


Fig. 2. Illustration of genotyping methods with representative *Ralstonia solanacearum* strains. (A) BOX-PCR, (B) ERIC-PCR and (C) dendrogram were produced as described in the text. Arrowheads identify similarities among *R. solanacearum* isolates. M, DNA size standard (100 bp ladder).

C)

**Fig. 2.** Continued.**Fig. 3.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) profile of 35 strains of *Ralstonia solanacearum* isolated from pepper and tomato plants. M represents 100 bp DNA ladder.

은 분리 지역 및 분리 기주와 상관관계가 나타나지 않았으며, 이는 RAPD 분석에서도 관찰되었다(Fig. 3). 이번 연구에서의 경우 국내에 분포하는 풋마름병균 계통들의 유전적 다양성 분석에 있어서는 rep-PCR이 16S rRNA 유전자의 RFLP 분석보다 적합하였다. 국내에 분포하는 풋마름병균의 유전적 다양성은 아마도 풋마름병균의 발생 지역과 기주범위가 광범위하며, 유전적 진화속도가 빠르기 때문이라고 생각된다. Grover 등(2006)은 한 지역에서만 분리한 44개의 풋마름병균에 대해 30개의 decamer

primer로 RAPD를 실시한 결과 균주간에 단 1개의 공통으로 나타나는 band도 관찰되지 않을 만큼 풋마름병균의 유전적 다양성이 높음을 보고하였다. 이런 다양성으로 말미암아 풋마름병균의 진단방법이 제한되고 있는 실정이다. 그러나, 이번 rep-PCR을 이용한 연구에서는 35개의 풋마름병균 계통들에 공통으로 나타나는 band가 관찰되었으며(Fig. 2), 이는 국내의 고추, 토마토에서 발생하는 풋마름병균의 진단법 개발에 이용할 수 있을 것이라 사료된다.

요 약

풋마름병징을 나타내는 고추와 토마토 식물체로부터 35개의 풋마름병균 계통들을 분리하여 생리·생화학 실험, 병원성 실험, 유전학적 실험을 통해 유전적 다양성을 연구하였다. 생리·생화학 실험과 종특이적 polymerase chain reaction(PCR)을 실시한 결과 풋마름병균 계통들은 모두 *Ralstonia solanacearum* biovar 4로 동정되었다. 분리균은 고추와 토마토 유묘를 이용해 병원성이 확인되었다. Repetitive sequence-based PCR(rep-PCR) 결과를 토대로 계통도 분석을 한 결과 고추와 토마토 분리균은 6개의 group으로 나뉘었으며, 유전적 다양성은 높게 나타났다. 풋마름병균 계통들의 그룹간에는 지역별, 기주별 특이성은 관찰되지 않았다.

참고문헌

- Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 113-121.
- Grover, A., Azmi, W., Gadewar, A. V., Pattanayak, D., Naik, P. S., Shekhawat, G. S. and Chakrabarti, S. K. 2006. Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. *J. Appl. Microbiol.* 101: 798-806.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87.
- He, L.Y., Sequeira, L. and Kelman, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67: 1357-1361.
- Horita, M. and Tsuchiya, K. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91: 399-407.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.
- 이승돈. 1999. 한국의 주요 식물세균병 발생 및 특성. 서울대학 교. 농학박사학위논문.
- Lee, S. D., Lee, J. H., Kim, Y. K., Heu, S. G. and Ra, D. S. 2005. Bacterial blight of sesame caused by *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*. *Res. Plant Dis.* 11: 146-151.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. and de Brujin, F. J. 1994. Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2295.
- Schonfeld, J., Heuer, H., Van Elsas, J. D. and Smalla, K. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7248-7256.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Plant pathogenic bacteria*. 3rd ed. APS Press, Minnesota, USA.
- Thwaites, R., Mansfield, J., Eden-Green, S. and Seal, S. 1999. RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. *Plant Pathol.* 48: 121-128.
- William, G. W., Susan, M. B., Date, A. P. and David, J. L. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Yabuchihi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. and Nishiuchi, Y. 1996. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 625-626.
- Yun, G. S., Park, S. Y., Kang, H. J., Lee, K. Y. and Cha, J. S. 2004. Contamination level of *Ralstonia solanacearum* in soil of greenhouses cultivation tomato plants in Chungbuk province and characteristics of the isolates. *Res. Plant Dis.* 10: 58-62.