

배추무름병 원인균 분리 및 특성 연구

권영희[†] · 이승주 · 박성아 · 조경순 · 임효상 · 김성준
미생물과

Study on Characterization of Soft Rot Bacteria Isolated from Napa Cabbage

Young-Hee Kwon[†], Seung-Ju Lee, Sung-Ah Park, Kyung-Soon Cho, Hyo-Sang Lim and Seong-Joon Kim

Microbiology Division

Abstract

In order to establish *in vitro* infection model for research of plant pathogen based on tissue softening disease in napa cabbage, eighty independent bacterial strains were isolated from the softened napa cabbage tissues. Eight bacterial isolates were primarily screened with the generation of reproducible tissue softening disease to fresh napa cabbage within 24-48 hours after inoculation. Through various microbiological, biochemical and morphological examinations, three Gram(-) isolates which harbor independent biological properties were finally chosen, and named as RB1, RB2 and RB6. Collective results obtained from API 20 E · 50 CHB · ID 32 E test and analyses of VITEK 2 COMPACT and nucleotide sequences of 16S rRNA of each isolate proposed that isolated RB1 and RB2 are close to the *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, and RB6 is close to the *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. These isolated grew optimally at 30°C with neutral pH culture condition. The isolated caused softening tissue disease with dose-dependent manner regardless of pre-surface damages of napa cabbage. Minimum dose to cause soft rot disease for RB1, RB2 or RB6 were 8.0×10^8 CFU/mL, 1.0×10^9 CFU/mL or 4.7×10^6 CFU/mL, respectively. These isolates caused tissue softening disease to eggplant, paprika and napa cabbage out of 14 different tested vegetables, indicating that these isolates damages specific plant tissues. The bacterial isolates obtained in this research and *in vitro* plant infection model will be adapted in the understanding of the mechanism of pathogenesis by plant pathogen.

Key Words : Bacterial plant pathogen, soft rot disease, cabbage, *Pectobacterium*

서 론

식물 병원체들은 바람, 비, 곤충, 경작과정을 통해 전파되며, 식물의 상처, 수공, 기공을 통하여 숙주식물내로 침입한 후 물관에서 증식하고, 이들이 분비하는 여러 가지 분해효소에 의해 식물 구성성분이 생화학적으로 변하면서 병증을 나타낸다¹⁾. 세균성 식물 병원체에 의한 발병 과정에서 독성단백질을 숙주로 운반하는 단계는 매우 중요하며, 최근 다양한 연구가 진행되고 있다. 식물병원체는 단백질 분비 경로인 type II, III, IV secretion system을 이용하여 독성단백질을 운반하고 이들로 하여금 숙주를 공격하게 한다^{2),3)}.

식물의 세균성 질병에 관한 연구는 발병양상과 그와 관련된 숙주반응을 설명해주며, 더 효과적이고 환경 친화적인 방제법을 개발하는데 도움을 줄 수 있다⁴⁾. 현재까지 집중적으로 연구된

세균성 식물병원체는 Proteobacteria문(대표적으로 *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*)이며, 이들은 점무늬병, 무름병, 시들병, 흑병, 암종병 등 다양한 질병증상을 일으키고 마침내 식물세포를 죽음에 이르게 한다^{5),6)}. 농작물이 감염되면 병원체가 급속히 주위로 퍼져 농작물의 질과 수확량을 떨어뜨리고 심각한 경제적 손실을 가져온다.

무름병을 유발하는 세균은 기주식물이나 잡초의 뿌리근치의 표토로부터 보통 15cm 이내의 토양에 생존하며 곰팡이 병원균처럼 식물의 표피를 뚫고 직접 침입하는 일은 어려우며 주로 관개수, 빗물, 토양곤충 등을 통하여 식물체의 상처부위로 침입한다. 땅과 닿는 부분이나 지하부의 상처부위에 수침상의 반점이 생겨서 포기전체로 퍼지면서 연빛으로 흐물흐물하게 썩으면서 심한 악취가 발생한다^{5),7)}.

[†]Corresponding author. E-mail : rich2u@korea.kr

Tel : +82-51-757-7502, Fax : +82-51-753-1424

Table 1. Strains of *Erwinia* used in this study

Bacterial Strain	Host
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	
*KACC 10225	Napa Cabbage
KACC 10342	Napa Cabbage
KACC 10371	Napa Cabbage
KACC 10458	Napa Cabbage
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	
KACC 10486(CFBP 1893 = LMG 13009)	Celery
KACC 12727(CFBP 1878 = LMG 17566)	Chicory

*KACC : Korean Agricultural Culture Collection.

본 연구에서는 유통 및 보관 과정에서 선별작업을 통해 버려지는 농산물 중 특히 배추에서 무름병 유발 세균을 순수분리 및 동정하여 분류학상의 다양한 특징 및 병원성에 대해 조사하고, 세균성 식물병원균의 연구에 있어서 유용한 *in vitro* 실험 모델을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시료채취 및 균주 분리

배추를 무르게 하는 원인 세균을 분리하기 위해서 2007년 4월~6월까지 부산광역시 반여농산물도매시장의 선별과정에서 버려진 배추의 병변 조직을 채취하여 시료로 이용하였다.

채취한 배추의 병변 조직을 멸균가위로 10 mm×10 mm 크기로 잘라낸 다음 멸균된 증류수로 표면을 씻고 5 mL의 생리 식염수에 넣어 멸균된 면봉으로 조직을 마쇄한 후, Vortex로 10분간 미생물을 탈리시켜 이를 검액으로 하였다. 검액을 10분 동안 실온에 정지한 후 멸균식염수로 희석한 희석액 200 μ L를 영양배지인 Luria-Bertani agar (LB agar)에 도말한 다음 30°C에서 24~48시간 호기 배양하였다⁸⁾.

공시균주의 선정

공시 균주의 분류학상 위치를 검토하기 위한 실험은 Manual of Methods for General Bacteriology 와 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology를 참고하였다^{9),10)}. 표준균주는 한국농업미생물자원센터로부터 분양받아 생화학 실험에 사용하였다(Table 1).

공시균주의 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특징 분석법

배양된 균을 그람염색법으로 염색한 후 광학현미경으로 각 균주의 형태학적 특징을 관찰하였다. 투과전자현미경 (TEM)으로 관찰할 재료는 일반적인 방법인 2.5% glutaraldehyde 및 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 고정시킨 후 에탄올 처리를 통

한 탈수과정을 거쳐 Epon 812에 포매하였다. 포매된 검체는 ultrathin section 후 uranyl acetate와 lead citrate 용액으로 이중 염색하여 투과전자현미경 (JEM-1200EX II, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

선택배지 선정을 위한 기초 자료를 마련하기 위해 식품공전에 규정되어있는 식중독균 9종에 대한 선택배지에 균주를 3분 도말한 다음 호기적, 미호기적 및 혐기적 조건을 만들어 30°C에서 24~48 시간 배양하여 집락의 생장 여부와 양상을 관찰하였다.

용혈성 확인 시험은 혈액천배지에 도말하여 30°C에서 24 시간 호기 배양하여 접종선 부위의 투명한 용혈대 형성 유무를 관찰하였으며, 운동성 시험은 Motility Gelatin-heart Infusion Medium (Difco)에 접종한 후 30°C에서 24 시간 호기 배양하여 접종선 주위에 퍼져 자라는지 유무를 확인하였다.

생화학적 특성을 알아보기 위해 1차 실험균주의 Gram 염색 결과를 바탕으로 API 20 E-50 CHB-ID 32 E strip (Biomerieux)을 이용하였으며 데이터분석은 인터넷 사이트 <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify>를 이용하였다.

다양한 미생물 동정법을 시도하여 분석결과의 신뢰도를 높이기 위하여 전자동 미생물 분석장비인 VITEK 2 COMPACT (Biomerieux)를 활용하였다. 공시균주를 LB 평판배지에 접종하여 30°C에서 24 시간 배양한 후 단일집락을 취하여 멸균된 0.45% NaCl 수용액 3 mL에 현탁시켜 MacFarland No. 0.5가 되도록 탁도를 맞춘 후 GN 카드를 장착하여 VITEK 2 COMPACT 카드 set up 절차를 진행하였다.

공시균주의 분자생물학적 특징 분석법

분리균의 분자생물학적인 동정을 위하여 각 균의 16S rRNA 염기서열 분석을 실시하였다. 일반적인 방법으로 각 균의 염색체 DNA를 추출한 후 세균의 rRNA 증폭에 흔히 활용되는 primer인 9F(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1512R(5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하여 PCR법으로 rRNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA의 염기서열은 (주)Genotech에 의

되어 해독하였다. 해독되어진 염기서열은 NCBI Blast search를 통해서 검색된 결과로 분석하였다.

표준균주와 분리균의 유전자 유형의 상동성을 비교분석하기 위하여 현재 가장 변별력이 높은 실험법인 Pulsed field gel electrophoresis(PFGE)를 전 세계 5개 global PulseNet Network에서 공통적으로 사용하고 있는 표준실험법에 따라 수행하였다. Agarose plug의 제조는 각 균을 TSA 한천배지에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 Cell suspension TE buffer {100 mM Tris (pH 7.5), 100 mM EDTA} 2 mL에 현탁하여 균의 농도를 bioMerieux Vitek Colorimeter 20%의 투명도로 조절한 후 현탁액 200 μ L에 12% Seakem gold agarose (FMC Bio Products) 200 μ L를 첨가하여 plug를 만들어 굳힌 다음 1.5 mL ES buffer {0.5M EDTA (pH 8.0), 1% Sodium lauroyl sarcosine}와 40 μ L proteinase K (20 mg/mL)를 첨가하여 55°C에서 2시간 처리하였고, 상온에서 Plug Wash TE buffer {10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA}로 washing용 PVC tube에 넣고 20분간 5회 세척하여 proteinase K를 제거하였다. 세척이 끝난 plug를 1 mm 두께로 절단한 후 제한효소 Xba I (NEB)의 반응혼합액 (10 \times Restriction enzyme buffer 10 μ L, 100 \times BSA 1 μ L, Xba I 40 unit, 멸균증류수로 최종 부피를 맞춤) 100 μ L를 첨가하여 37°C에서 4시간 반응 시킨 다음 반응혼합액을 제거하고 TE buffer로 채워 넣었다. 제한효소 처리가 끝난 plug를 gel comb에 올려놓고 틀에 넣어 고정 한 후 1% Seakem gold agarose를 부어 굳혀 만들어진 gel은 CHEF Mapper PFGE (bio-Rad)를 사용하여 0.5 \times TBE buffer로 initial sec 2.16 s, second sec 63.8 s, 6 Volt/cm (200 V), 14°C, 18시간 전기영동을 실시한 후 Ethidium bromide (0.5 μ g/mL)에서 30분간 염색하고 증류수로 30분씩 2회 탈색하여 Image Visualizer (Alpha Innotech)로 관찰하였다. PFGE 결과는 Molecular Analyst Fingerprinting Software (Bio-Rad)의 dice coefficient를 기초로 dendrogram을 작성하여 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

시료채취 및 순수분리

배추 무름병 세균을 분리하기 위하여 선별과정에서 버려진 배추의 무른 조직을 넣고 균질화한 검액을 단계별로 희석하여 LB 평판배지에 도말한 후 30°C에서 24~48 시간 배양한 결과 희거나 투명한 노란빛을 띠며 썩은 냄새를 풍기는 균의 집락이 무수히 자라났다. 크기, 모양, 형태, 냄새, 색깔의 특성이 다르다고 판단되는 집락을 순수 분리하였다. 시료채취 및 순수 분리의 반복과정을 통해 80개의 균주를 선정하여 다음 실험에 사용하였다.

공시균주의 선정

순수 분리된 80개의 균주 각각을 일정한 크기로 자른 싱싱한 배추의 주맥 표면에 상처유무의 조건을 달리하여 접종한 결과 상처를 내지 않은 경우 보다 상처를 낸 배추 조직의 무름면적이 더 넓게 관찰되었으며, 80개의 실험균주 중 배추 무름 증상이 뛰어난 8개의 균주를 Soft Rot Bacteria (RB) 1~8이라 명명하고 1차 실험균주로 선정하였다.

그람염색 후 광학 현미경 ($\times 1,000$) 상에서 8개의 균주 모두 그람 음성 짧은 간균으로 관찰되었다. 투과전자현미경 (JEM-1200EX II, JEOL, Japan)으로 관찰한 결과 0.5~0.8 μ m \times 1.0~1.8 μ m의 단간균 형태이며 편모가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1)

1차 선정된 RB 1~8 균주를 형성된 집락의 크기, 색깔 및 풍기는 냄새에 따라 3개의 그룹으로 나눌 수 있었으며, 연구의 편의를 위하여 각 그룹의 대표균으로 RB1, RB2, RB6를 선정하여 이후 계속되는 연구에 사용하였다. RB1 균주는 노란색의 작고 둥근 집락으로 단내가 가미된 썩은 냄새가 났으며, RB2와 RB6 균주는 노란빛의 투명한 둥근 집락으로 형태상으로는 유사하였으나 RB2는 시큼하면서 매우 불쾌한 냄새가 났으며 RB6는 다른 균주에 비해 부패한 냄새가 약했다.

식중독균 9종의 구별에 활용되는 선택배지에서 RB1, RB2, RB6 균주의 배양적 특징은 *Clostridium perfringens*의 선택배지인 Tryptose-Sulphite-Cycloserine agar에서 RB 6 균주는 혐기배양 48 시간 만에 작고 반투명의 노란빛을 띠는 흰색집락을 형성하였으며, 장출혈성 대장균인 *Escherichia coli* O157:H7의 선택배지인 Sorbitol-Mackonkey agar에서 공시균주 모두 Sorbitol을 분해하지 못하여 무색의 작고 둥근 집락을 형성하였다. 용혈성을 알아보기 위하여 Blood Agar Plate에 접종한 결과 공시균주 모두 용혈대를 형성하지 않았다.

공시균주의 생화학적 특성

그람음성세균 동정을 위하여 API 20 E strip (Biomerieux)을 이용한 각 균의 생화학적인 특성을 비교해 본 결과 배추에서 분리된 RB1, RB2 및 RB6는 *Pantoea* 속과 각각 60%, 75% 및 69%의 상동성을 나타내었다. 추가적으로 API 50 CHB-ID 32 E strip (Biomerieux) 및 VITEK 2 COMPACT (Biomerieux) Gram Negative card를 분석한 결과 Indole 등 다양한 기질에 대한 분해능력은 차이가 있었으며 동정된 *Pantoea* 속의 표준균주들의 특성과 비교해보니 RB6는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*의 표준균주(KACC 10225, KACC 10342, KACC 10371, KACC 10458)와 거의 유사하였고 RB1과 RB2는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, strain KACC 12727 (= LMG 17566)과 유사하였다(Table 2).

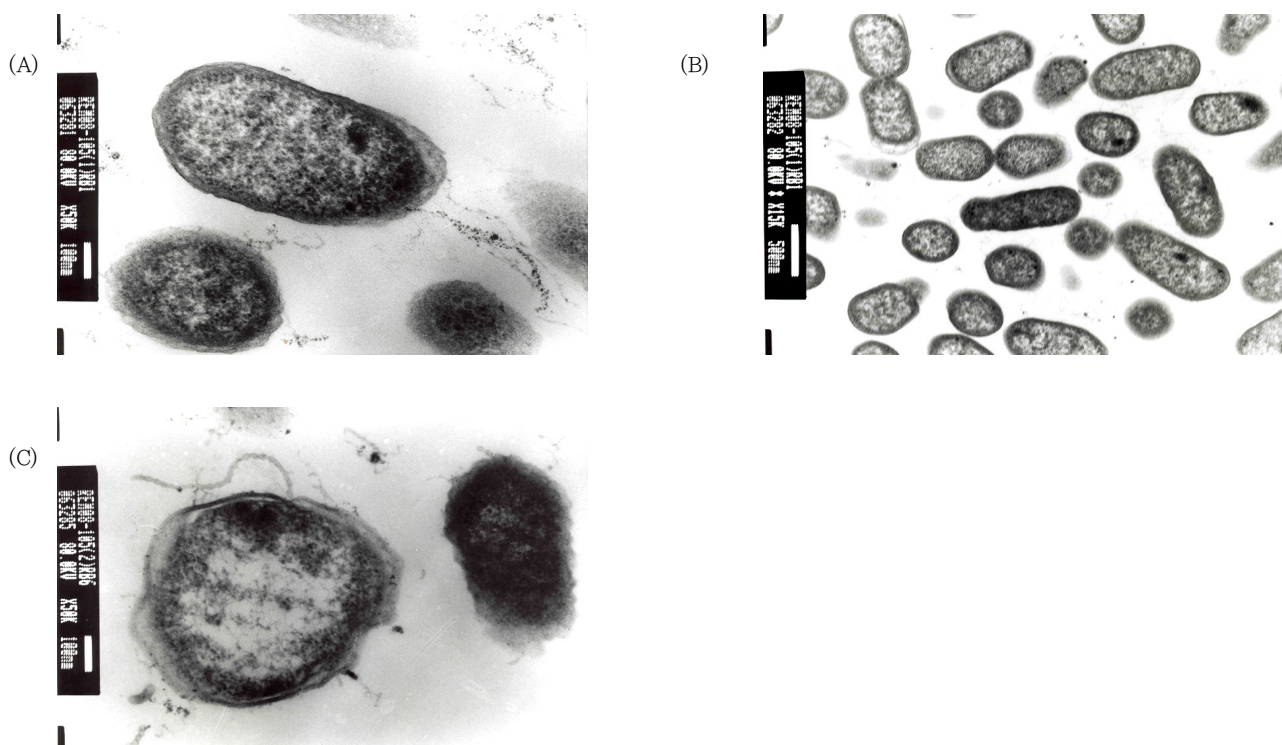


Fig. 1. Transmission Electron Micrograph of RB1 (A, B), RB6 (C) strains from napa cabbage in Busan.

Table 2. Result of API & VITEK 2 COMPACT test

No.	Mnemonic	Biochemical test (Substrate)	RB1	RB2	RB6	Pcc (n=4)	Pco (n=2)
API 20 E							
1	IND	Indole production	-	-	+	+	-
2	SOR	Sorbitol	-	-	-	-	50
API ID 32 E							
3	GAT	Galacturonate	-	+	+	75	+
4	RP	Phenol red	-	+	-	50	-
5	MAN	Mannitol	-	-	+	50	50
6	DARL	D-Arabitol	+	+	-	-	+
7	CEL	Celiobiose	+	+	-	75	-
API 50 CHB							
8	GNT	Potassium Gluconate	-	-	+	+	50
Gram Negative Card of VITEK 2 COMPACT							
9	PyrA	L-Pyrogutamic acid Arylamidase (Pyrase)	+	-	+	+	-

Pcc, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Pco*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*. Tests are scored as: -, 90~100% of strains negative; +, 90~100% of strains positive; numbers indicate percentage of strains that tested positive.

배추무름병 유발균의 동정 및 유전자 유형 비교분석

일반적으로 흔히 이용되는 rRNA 염기서열 분석을 통한 균의 동정을 위하여 RB1, RB2 및 RB6 염색체 DNA로부터 16S rRNA를 PCR법으로 증폭하여 염기서열을 확보하였다. 염기서열 해석의 정확성을 높이기 위하여 증폭된 DNA의 양가닥 서열을 읽어 비교하였다. 공시균주의 16S rRNA 염기서열을 NCBI Blast search를 통해 분석한 결과 RB1은 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*(*Pco*), strain LMG 17566-T 16S rRNA gene과 99%의 상동성을, RB6는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*(*Pcc*) 16S rRNA gene과 99% 상동성을 나타내었다. 표준균주와 분리균의 유전자 유형을 비교분석하기 위해 plug를 XBar I 으로 처리하여 PFGE를 실시한 결과 13~20개의 절편으로 절단되었으며(Fig. 2) 이 결과를 Molecular Analyst Fingerprinting Software (Bio-Rad)를 이용하여 clustering 하였다(Fig. 3). PFGE 양상은 RB1과 RB2가 dice coefficient 94.7%의 높은 상동성을 보였으며, RB1 및 RB2는 *Pcc* KACC 10225 및 *Pcc* KACC 10371와 89.2%의 상동성을, RB6는 앞의 균주그룹과 82.8%의 상동성을 보였다. RB1, RB2, *Pcc* KACC 10225, *Pcc* KACC 10371, RB6 그룹과 *Pcc* KACC 10458, *Pco* LMG 17566, *Pco* LMG 13009 그룹은 82%의 상동성을 보였다.

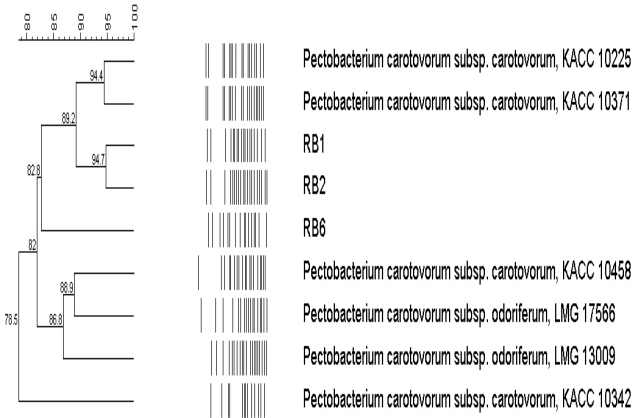


Fig. 3. Analysis of PFGE of reference strains and RB isolates from napa cabbage in Busan. DNAs were cleaved with XBar I. Dendrograms were constructed with Bio-Rad software analysis, Molecular Analyst.

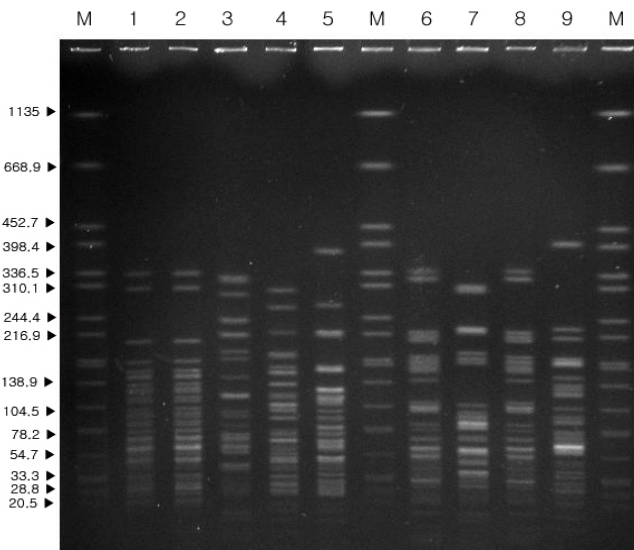


Fig. 2. PFGE analysis of XBar I-digested for Busan isolates. M, *Salmonella breanderup* BAA-664; lane 1, RB1; lane 2, RB2; lane 3, RB6; lane 4, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*(*Pco*) LMG 13009; lane 5, *Pco* LMG 17566; lane 6, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*(*Pcc*) KACC 10225; lane 7, *Pcc* KACC 10342; lane 8, *Pcc* KACC 10371; lane 9, *Pcc* KACC 10458.

공시균주의 생육특성 조사

공시균주의 LB 액체배지에서 온도조건을 0, 20, 30, 37, 40, 60℃로 다르게 하여 호기 배양한 결과는 공시균주 모두 20~40℃에서 성장하였으며 RB2는 40℃에서 최대 생육을 나타내었고 RB1과 RB6는 30℃에서 최대생육을 나타내었다(Fig. 4A). 특징적으로 RB1은 RB2와 RB6에 비해 훨씬 왕성한 생육도를 나타내었다.

배지의 pH 변화에 따른 공시균주의 생육도를 조사하기 위하여 pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10의 다른 조건으로 30℃에서 24 시간 호기 배양한 결과는 공시균주 모두 pH 5~8범위에서 성장하였으며 RB2와 RB6는 RB1에 비해 좁은 생육 pH spectrum을 나타내었다(Fig. 4B).

산소공급 조건에 따른 공시균주의 생육 결과는 호기와 미호기 조건인 경우 24 시간 만에 공시균주 모두 LB 평판배지에 작고 둥근 형태의 집락으로 자랐으며, 혐기 조건인 경우 48 시간 이상 배양하였을 때 RB6 균주만이 작은 집락을 형성하였다 (Table 3).

Table 3. Effect of Oxygen on growth of the isolated strains

strain	Oxygen condition		
	Aerobic	Microaerobic	Anaerobic
RB 1	+	+	-
RB 2	+	+	-
RB 6	+	+	+

+, growth; -, no growth

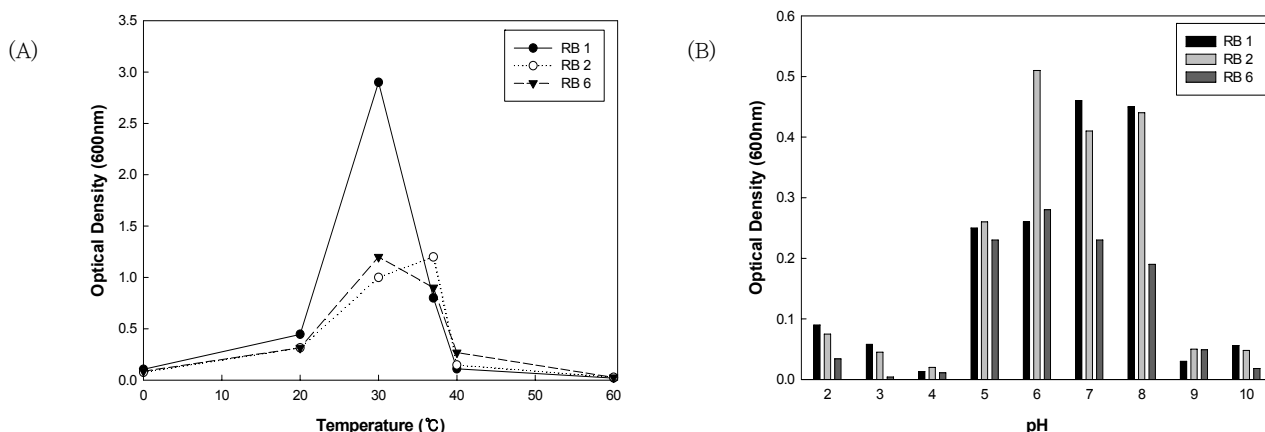


Fig. 4. Effect of temperature (A) and pH (B) on growth of isolated. Appropriately bacterial cells were inoculated to 6 flasks containing 10 mL LB broth. Each flask was incubated at indicated temperature with aeration. To determine pH spectrum for the optimum growth, bacterial cells were inoculated in flasks containing 10 mL LB broth adjusted pH as indicated in figure. Cells were incubated for 24 hr at 30°C. Bacterial growth was detected by optical density at 600 nm.

발병최소균량 및 숙주특이성 조사

배추 표면 상처 유무에 따른 무름병 유발정도 조사 및 원인균의 접종량에 따른 무름병 유발정도를 관찰하였다. RB1, RB2 및 RB6 모두 배추에 상처를 내지 않은 상태에서 무름병을 유발하였으며, 배추에 상처를 낸 상태에서 접종한 경우에는 그렇지 않은 경우 보다 병변을 나타내는 면적의 크기가 증가하였다. 초기 접종량에 따른 무름병 발병 범위를 조사한 결과 RB1의 경우 8.0×10^5 CFU/mL, RB2 균주는 1.0×10^9 CFU/mL, RB6는 4.7×10^6 CFU/mL에서 최초로 무름 증상을 나타냈다(Fig. 5). 무름병변의 크기는 초기 접종량에 비례하여 증가하는 현상을 보이는 것으로 보아 병변은 이들 균주들의 생육과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 추정된다. 병변의 크기대조군으로 PBS, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*를 사용하였는데 이들 모두는 배추 무름병변을 나타내지 않았다. 상기 결과는

RB1, RB2 및 RB6 모두 일정량의 균체가 있으면 배추의 상처 유무와 상관없이 감염이 가능하다는 것을 암시하며, 그 피해를 줄이기 위해서는 배추의 경작, 저장, 운반 과정에서 상처가 나지 않도록 관리하는 것이 중요함을 암시한다.

RB1, RB2 및 RB6 균주들이 비록 배추의 무름병을 유발한다는 것이 실험을 통해 증명되었지만 이들이 다른 과일 또는 채소에도 비슷한 병변을 유발하는지를 알아보기 위하여 농산물거래소에서 주로 거래되는 사과, 귤, 배, 감, 브로콜리, 당근, 옥수수, 가지, 파프리카, 상추, 깻잎, 토마토, 대파, 마를 확보하여 병변 형성을 관찰하였다. 특이하게도 이들 균주들은 가지와 파프리카를 선택적으로 무르게 하였다. 공시균주 모두 상처를 낸 가지와 파프리카에서 식물조직이 물러지면서 부피가 줄어들어 가는 병증을 확인하였으며 상처 내지 않은 경우에는 뚜렷한 변화가 없었다.

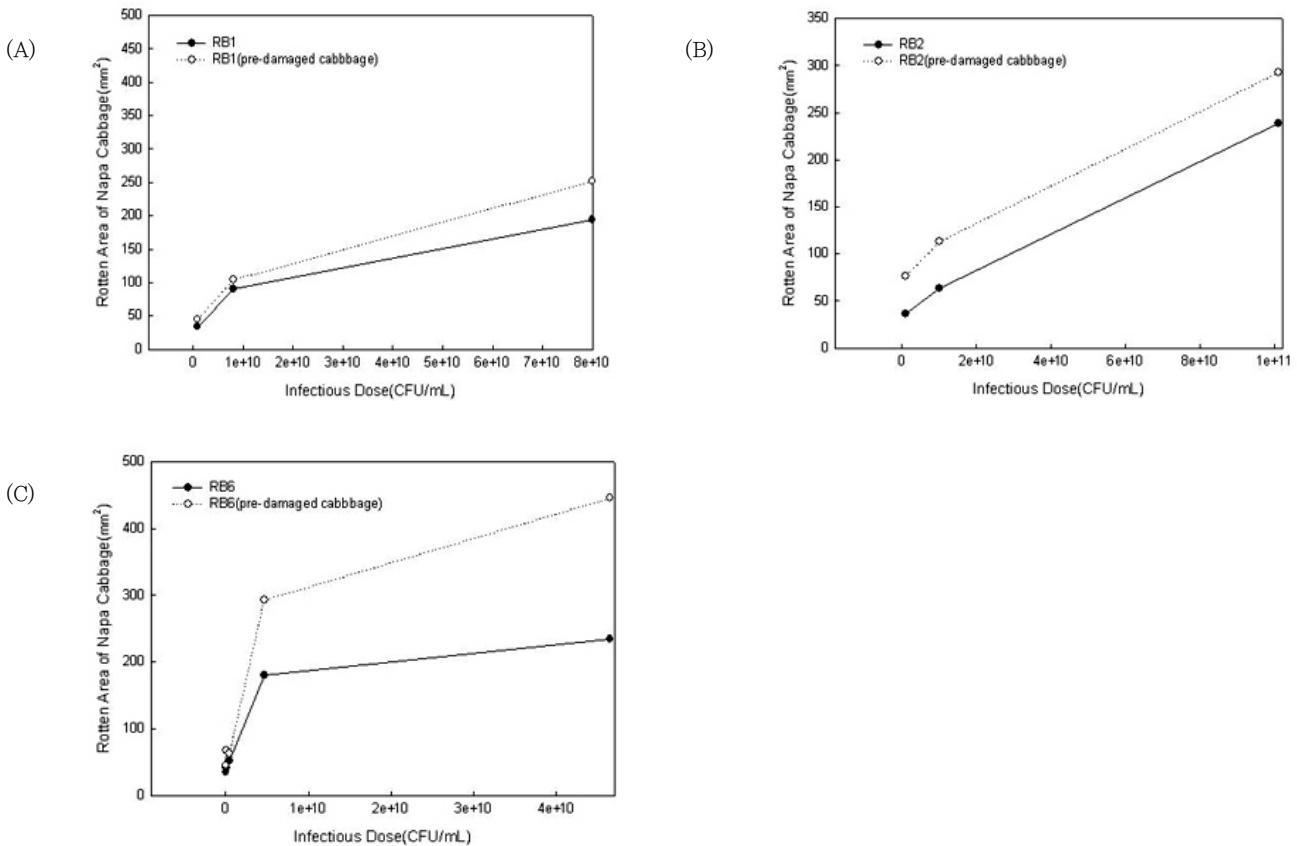


Fig. 5. Dose-dependent tissue softening by RB isolates. Slice fresh napa cabbage parts (20 mm×20 mm) were placed moisturized petridish. The volume of RB1 (A), RB2 (B) and RB6 (C) with indicated CFU were loaded on the top of cabbage surface. Disease symptom (depicted as rotten area, mm²) was assayed after 24 hr incubation at 30°C. Filled circle represents inoculation on undamaged cabbage surface. Open circle represents inoculation on pre-damaged cabbage surface.

종합하면 이 연구에서 배추에 무름병을 유발하는 3종류의 균 (RB1, RB2 및 RB6)을 분리하여 동정한 결과 RB1 및 RB2는 *Pectobacterium carotovorum*의 아종으로 이들은 실험실에서 설정한 인위적인 배추 감염모델에서 병변을 잘 나타내었고 배추, 가지 및 파프리카에 감염하는 숙주 특이성을 나타내었다. 이 연구에서 분리된 균주 및 이 연구에서 확립한 배추 무름병 유발 모델은 향후 식물병원균의 감염기작 해석에 큰 기여를 할 것으로 예상된다.

요 약

배추 무름병을 대상으로 식물병원균 감염모델을 확립하기 위하여 무름병변을 가진 배추조직으로부터 80개의 독립된 세균집락을 순수 분리하였다. 이들 균을 감염되지 않은 배추 잎의 주맥부위에 접종하여 24~48 시간 만에 무름병변을 나타내는 8개의 균주를 1차 선별하였다. 다양한 미생물학적, 생화학적, 형태학적인 시험을 통하여 분석한 결과 서로 다른 특성을 나타내는

균이라고 여겨지는 3개의 균을 최종 선정하였고 이들은 모두 그람 음성균으로 판명되었고 RB1, RB2 및 RB6로 명명하였다. API 20 E-50 CHB-ID 32 E 시험, VITEK 2 COMPACT 분석, 16S rRNA 염기서열 분석 등을 종합할 때 RB1, RB2는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* 아종으로, RB6는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 아종으로 추정되었다. 이들 균들은 30°C, 생리적 pH인 중성 pH에서 최적생육을 하였다. 이들은 배추의 상처 유무에 상관없이 초기 접종량과 비례하여 무름병을 유발하였으며, 상처가 없는 경우보다 상처가 있는 경우에 더욱 명확한 병변을 유발하였다. RB1의 경우 8.0×10⁸ CFU/mL, RB2 균주는 1.0×10⁹ CFU/mL, RB6는 4.7×10⁶ CFU/mL에서 최초로 무름 증상을 나타냈다. 이들 균의 숙주 특이성을 관찰하기 위하여 14종의 야채에 접종한 결과 배추, 가지 및 파프리카에서만 무름병변을 유발하는 숙주 특이성을 나타내었다. 이 연구에서 사용된 실험재료들 및 감염모델은 향후 식물병원균의 감염기작해석에 크게 기여할 것으로 예상된다.

참고 문헌

1. Rantakari, A., Virtaharju, O., Taira, S., Palva, E. T., Saarilahti, H. T. and Romantschuk, M., "Type III secretion contributes to the pathogenesis of the soft-rot pathogen *Erwinia carotovora*: partial characterization of the hrp gene cluster", MPMI, 14, pp.962~968(2001).
2. Toth, I. K., Bell, K. S. Holeva, M. C. and Birch, P. R., "Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes", Molecular Plant Pathology, 4, pp.17~30(2003).
3. Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H. Drenkard, E., Gummerov, B. C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M. W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C. L. and Tonpkins, R. G., "Plant and animals share functionally common bacterial virulence factors", proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, pp.8815~8821(2000).
4. Abramovitch, R. B., Anderson, J. C. and Martin, G. B., "Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity", Nat Rev Mol Cell Biol, 7, pp.601~611(2006).
5. Tournas, V. H., "Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazard", Crit Rev Microbiol, 31, pp.33~34(2005).
6. Toth, I. K. and Birch, P. R. J., "Rotting softly and stealthily", Current Opinion in Plant Biology, 8, pp.424~429(2005).
7. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B. and Givskov, M., "Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria", International Journal of Food Biology, 78, pp.78~97(2002).
8. Bertani, G., "Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*", J. Bacteriol, 62, pp.293~300(1951).
9. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B. : Manual of Methods for General Bacteriology(1981).
10. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneathe, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, Lippincott William and Wilkins Co. U.S.A, pp.175~289(1994).