

최 종
연구보고서

*Ralstonia solanacearum*의 기주특이성 및
유전적 다양성 monitoring을 통한
가지과 작물 세균성 풋마름병
발생 경감 체제 확립

Management of bacterial wilt by monitoring
genetic diversity and host range
determinants of *Ralstonia solanacearum*

연구기관

서울대학교 농업생명과학대학

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “*Ralstonia solanacearum*의 기주특이성 및 유전적 다양성 monitoring을 통한 가지과 작물 세균성 풋마름병 발생 경감 체제 확립”에 관한 연구 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 황 인 규

세부연구책임자 : 황 인 규

연 구 원 : 김 정 건

연 구 원 : 김 진 우

연 구 원 : 오 중 희

연 구 원 : 강 용 성

연 구 원 : 정 연 화

협동연구기관명 : 순천대학교

협동연구책임자 : 고 영 진

연 구 원 : 김 경 희

연 구 원 : 박 종 규

연 구 원 : 박 재 현

연 구 원 : 김 홍 철

요 약 문

I. 제 목

*Ralstonia solanacearum*의 기주특이성 및 유전적 다양성 monitoring을 통한 가지과 작물 세균성 풋마름병 발생 경감 체제 확립

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가지과 작물과 들깨, 참깨, 생강 등에 발생하여 가장 피해를 주는 세균병은 *R. solanacearum*에 의한 세균성 풋마름병이다. 세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum*은 토양 속에서 장기간 월동하다가 적당한 기주가 나타나면 상처 난 뿌리를 통해 침입하는 세균으로서 이 병원균에 의한 가지과 작물의 세균성 풋마름병은 열대, 아열대, 온대 지역에서 광범위하게 발생하고 있는 중요한 식물병 이다. 대부분의 토양전염성 세균병과 마찬가지로 세균성 풋마름병에 대해서도 효과적인 방제 약제가 없기 때문에 약제 방제가 불가능한 난치병임에도 불구하고 세균성 풋마름병이 다발하는 재배 농가에서는 세균성 풋마름병에 대해 약효가 없는 화학약제 또는 약효가 제대로 검증되지 않은 미생물제제 등을 무분별하게 사용하고 있으나 뚜렷한 효과를 거두지 못하고 있는 실정이다. 현재 국내에서 재배되고 있는 고추, 가지, 토마토, 담배를 비롯한 가지과 작물의 연작과 홍수, 고온등의 기후 변화는 세균병의 발달을 가져 왔다. 이전에는 곰팡이병이 주로 나타났으나 홍수, 고온등의 기후변화는 세균병의 발달을 가져왔다. 가지과 작물과 들깨, 참깨, 생강 등에 발생하는 세균성 풋마름병은 *Fusarium*, *Verticillium* 등의 곰팡이에 의한 시들음병과 그 증상이 유사하나 고온 다습의 환경 조건 하에서는 오히려 곰팡이에 의한 시들음병보다 병발생율이 훨씬 더 높고 짧은 시간 안에 광범위하게 발생하는 것으로 실제 재배상에서 나타나고 있으나 정확한 조사가 이루어지지 않은 실정이어서 본 병원균에 대한 비교적 정확한 피해 정도를 살펴 볼 수 없어 세균성 풋마름병에 의한 피해를 최소화시키기 위하

여 국내에 분포하는 세균성 풋마름병의 분포 상황이나 피해 정도에 대한 체계적인 조사 연구가 시급하다. 그리고 세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum*은 균주간의 상동성이 낮고 복잡하기 때문에 두 가지 분류체계로 균을 분류시키는데 그 중 첫 번째는 자연상태의 기주 범위를 이용한 분류로 최초 감염된 기주에 따라 5가지 race로 나뉘고 있으며 두 번째는 세가지 이당류와 세가지 6탄당, trehalose, meso-inositol, D-ribose의 이용여부에 따라 분류하는 것으로 6가지의 biovar로 나누는 것이다. 그리고 이들 race와 biovar간의 관계는 race 3과 biovar 2간의 관계를 제외하고는 그다지 유사하지 않기 때문에 biovar와 race 간의 변이점이 많이 존재한다. 국외에서는 이렇게 다양한 균을 좀더 근원적인 유전적 분석으로 group화하고 있다. 그러나 국내에서는 이러한 유전적 분석을 통한 분류가 제대로 되어 있지 않고 있기 때문에 우리나라 지리적 분포에 따른 균주간의 특징, race와 biovar간의 관계, 상동성, 차이점등을 몇 가지 유전적 분석으로 monitoring 해야 할 필요성이 대두되고 있다. 특히 *R. solanacearum*은 race간의 차이가 기주범위로 분명하게 드러나는데 다른 식물 세균병원균과는 달리 기주범위로 race가 달라지는 원인을 찾고자 한다. 이 병원균의 기주인식에 대한 연구는 이 병원균에 대한 복잡한 병발생 기작에 대한 이해는 물론 나아가서는 저항성 식물의 육성 등을 통한 이 병원균에 대한 차별적인 방제 방안을 제시할 수 있을 것으로 생각한다.

따라서 세균성 풋마름병원균에 대한 근본적인 이해를 도울 수 있는 유전적 다양성 및 기주특이성 monitoring 연구는 세균성 풋마름병원균의 지역적인 차이, 기주에 따른 차이를 해석하여 새로운 race의 확산을 미리 예방하고 기주인식에 대한 연구로 race 간의 차별적인 점을 이용하여 광범위한 병발생을 미리 차단하여 세균성 풋마름병의 발생을 효율적으로 경감시킬 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 및 기주특이성 monitoring 연구로서 다양한 지역 및 기주에서의 병원균 확보에서부터 확보된 병원균들의 AFLP 분석, 기주특이성 관련 유전자 동정 및 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도를 작성하는 방식으로 본 연구를 수행하였다.

1. 전국적으로 다양한 기주에서 세균성 풋마름병원균 균주 확보와 각 race 대표 균주의 선발 및 library 제작

1997년부터 2005년도에 이르기까지 경기도, 강원도, 충청도, 전라도, 경상도, 제주도 지역에서 고추, 감자, 토마토에서 풋마름 증상이 관찰되는 이병 식물체를 채집하여 TZC 배지에서 총 478개의 세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum*을 순수 분리 하였고 이렇게 분리, 확보된 총 478개의 세균성 풋마름병원균들을 세가지 disaccharide (lactose, maltose, cellobiose), 세가지 hexose alcohol(mannitol, sorbitol, dulcitol)과 trehalose, meso-inositol, D-ribose가 첨가된 biovar 검정용 기본 배지에 각 병원균들을 접종하여 배양한 후 각 탄소원들의 이용여부를 관찰하여 biovar를 검정하였다. 그리고 race 검정은 각 병원균들을 7-8본엽기의 토마토, 감자, 고추 유묘에 접종하여 실시하였다. biovar 검정과 race 검정을 통하여 분류된 세균성 풋마름병원균들중에서 고추와 감자 유묘에 병원성 검정하여 고추에 병을 일으키고 감자에 병을 전혀 일으키지 않는 race 1 균주 1개와 감자에 병을 일으키고 고추에 전혀 병을 일으키지 않는 race 3 균주 1개를 각각 race 1과 race 3의 대표균주로 선발하였다. 대표 균주로 선발된 race 1 균주인 SL341과 race 3 균주인 SL2029의 genomic DNA를 추출한 후 *Sau3AI*로 절단하여 약 20-25kb 크기의 DNA 절편들을 broad host range vector인 pLAFR3에 ligation하여 genomic library를 제작하였다.

2. 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균 균주들간의 비교 및 기주 특이적인 유전자를 가진 유전자 clone 확보

국내 여러 지역과 다양한 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 유연관계를 AFLP 방법으로 살펴보기 위해 특이 primer를 선발하고자 여러 균주들에서 genomic DNA를 추출하여 *EcoRI*, *MseI*과 *MspI*, *SacI* 제한효소를 처리한 후 각각의 제한효소에 맞는 adapter를 ligation 하였고 균주들간의 효과적인 분석을 위해 ^{32}P -ATP를 labelling한 *EcoRI* selective primer와 labelling 하지 않은 *MseI* selective primer를 하나의 set로 한 것과 ^{32}P -ATP를 labelling한 *SacI* selectiver primer와 *MspI* selective primer를 하나의 set로 한 것을 각각 PCR 한 후 6% aclyamide gel에서 electroporesis를 실시(AFLP)하였고 이중에서 좋은 결과를 보인 *MspI*, *SacI* primer 조합으로 PCR을 하여 6% aclyamide gel에서 electroporesis를 실시한 후 결과로 나온 fingerprint를 이분법으로 binary 정리한 후 UPGMA 분석법으로 여러 균들의 상관관계를 분석하였다.

그리고 대표 균주로 선발된 race 1 균주인 SL341 균주와 race 3 균주인 SL2029 library를 각각 배양하여 mating하였고 그 mating한 것을 BG 배지에서 24시간 배양 한 후 선택배지(TZC, Rifampicin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Tetracycline 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 3-4일간 배양해서 나온 transconjugant들을 7-8분엽기의 고추 유묘에 접종하여 병원성 검정을 실시하여 고추에 병을 일으키지 않는 transconjugant를 확보하였다.

3. 기주특이성 관련 유전자 동정 및 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 작성

세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum*의 기주 특이성에 관련된 유전자를 밝히기 위해서 SL341 균주 (race 1)와 SL2029 (race 3) library를 mating하여 나온 transconjugant들 중에서 고추에 병을 일으키지 않는 subclone인 이 pRS13에서 기주특이성에 관련된 유전자가 존재하는지 알아보기 위해 0.9kb의 염기 서열을 확보한 후 이 염기서열을 NCBI(National

Center for Biotechnology Information)를 사용하여 유전자를 검색하였다.

그리고 검색된 유전자, 즉, 기주 특이성에 관련된 이 *rsal* 유전자의 기능을 밝히기 위해 이 *rsal* 유전자를 *Tn3gusA* mutation 및 *rsal* 유전자에 다시 *rsal* 유전자를 가진 pRS13을 complementation 시켜서 고추와 감자에 병원성 검정을 실시하였고 그리고 각 균주들의 기주 내에서의 cell 변화를 살펴 보았다. 그리고 기주 특이성 유전자인 *rsal* 유전자가 세균성 풋마름병원균 race 1과 다른 세균들에도 존재하는지 알아보기 위해 southern blot을 실시하였고 β -glucuronidase assay를 실시하여 어떻게 기주특이성 유전자가 조절되는지 밝히고, 이 기주특이성 유전자에서 발현된 단백질이 병원세균과 식물간의 상호 작용 관계 중에서 어떠한 system으로 분비가 되는지 살펴 보기 위해 western blot 실험을 하였고 이 단백질의 secretion system을 확인 하기 위해 N-terminal sequencing을 실시하였다.

그리고 1997년부터 2005년까지 전국적으로 채집된 478개의 세균성 풋마름 병원균중에서 기주, biovar, 지역적 분포를 달리하는 106개의 한국 균주와 16개의 외국균주를 대표 균주로하여 각 병원균들의 유연관계를 AFLP 방법으로 나온 150-1000 bp의 각각의 fingerprint를 이분법으로 binary 정리한 후 NYSYS-pc의 unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) 분석법으로 여러 균들의 상관관계를 분석하였고 수집된 세균성 풋마름병 균주들의 biovar, race, 기주, 지역, AFLP 분석결과와 종합하여 국내 분포도를 작성하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 전국적으로 다양한 기주에서 세균성 풋마름병원균 균주 확보와 각 race 대표 균주의 선발 및 library 제작

1997년부터 2005년까지 전국적으로 채집된 세균성 풋마름병원균수는 총 478개이며 그중에서 biovar 1은 3개, biovar 2는 38개, biovar 3는 56개, biovar 4는 381개로 분류가 되었으며 biovar N2 균주들은 분리가 되지 않았다. 각 biovar 균주들의 병원성을 토마토, 고추, 감자에 실시한 결과 biovar

1균주들은 토마토, 감자, 고추에서 병원성을 보였고 biovar 2 균주들은 감자와 토마토에서만 병원성을 나타냈고 고추에서는 병원성을 전혀 보이지 않았다. 모두 56개의 biovar 3 균주들 중에서 48개의 biovar 3 균주들은 토마토, 고추, 감자에 모두 병원성을 보였고 5개의 biovar 3 균주들은 토마토와 고추에서만 병원성을 보이고 감자에는 병원성을 보이지 않았으며 3개의 biovar 3 균주들은 토마토와 감자에 병원성이고 고추에는 전혀 병원성을 보이지 않았다. 그리고 총 381개의 biovar 4 균주들 중 365개의 biovar 4 균주들은 토마토, 고추, 감자에 모두 병원성을 나타냈고 16개의 biovar 4 균주들은 토마토와 감자에만 병원성을 보이고 고추에는 병원성을 보이지 않았다. 이런 특징으로 볼 때 biovar 1, 3, 4 균주들은 모두 race 1으로 분류가 되었고 감자와 토마토에서만 병원성을 보이고 고추에서는 병원성을 전혀 보이지 않은 biovar 2 균주들은 race 3로 분류가 되었다.

전국적으로 가지과 작물에서 채집된 총 478개의 병원균 중에서 고추에서 100% 병원성을 일으키고 감자에서 병을 전혀 일으키지 않는 SL341 균주를 race 1의 대표균주로 선발하였고 감자에서 100% 병원성을 일으키고 고추에서 병을 일으키지 않는 SL2029 균주를 race 3균주의 대표균주로 선발하였고 각각의 race 1과 3의 대표 균주로 선발된 SL341과 SL2029 균주들의 library를 제작하고 다양한 유전자 확보를 위한 DNA pattern을 관찰하기 위해 *EcoRI* 제한효소를 처리하여 library의 다양성을 확인하였다

2. 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균 균주들간의 비교 및 기주 특이적인 유전자를 가진 유전자 clone 확보

국내 여러 지역과 여러 기주에서 분리된 세균성 풋마름병원균의 유연관계를 효과적으로 분석하기 위해 AFLP 방법에 필요한 restriction enzyme (*EcoRI*과 *MseI* 조합, *MspI*과 *SacI* 조합)과 각 제한효소에 맞는 adapters (*EcoRI*과 *MseI* adapter 조합, *MspI* 과 *SacI* adapter 조합), 그리고 selective primer (*EcoRI*과 *MseI* selective primer 조합, *MspI* 과 *SacI* selective primer 조합)를 각각 사용하여 AFLP를 한 결과 *MspI* 과 *SacI* 조합을 이용한 AFLP 분석결과에서 race 1과 race 3의 특징적인 band들이 관

찰 되었고 그 결과는 race 별로 크게 차이를 보였는데 특히 race 3에서만 존재하는 band를 관찰 할 수 있었다. 이 race 3에서만 존재하는 특이적인 band는 race 1에서는 존재하지 않았으며 이 특이적인 band로 race 3를 구분 가능하였다. 그리고 이 특이적인 band를 제외하고는 race 1과 race 3간에 서로 유사한 위치의 band들이 존재하였다. 이것은 세균성 풋마름병원균의 race 1과 3 사이의 유연관계가 가깝지 않다는 것을 의미한다.

그리고 기주 특이성 연구를 위해 SL341(race 1)과 SL2029 library를 mating하여 나온 transconjugant들을 약 1000여개 정도 획득하였으며 이들의 형질을 DNA로 확인 한 결과 다양한 plasmid (SL2029의 DNA)의 존재를 확인 하였고 이렇게 확보된 1000여개의 transconjugant들을 고추에 병원성 검정한 결과 SL341은 고추에 병을 일으켜 고추가 전체적으로 다 시들어서 죽은 반면 SL2029를 접종한 고추에서는 아무런 증상을 나타내지 않았고 1000여개의 transconjugant들 중에서 SL341(pJ372)만이 접종된 고추에서 아무런 증상을 일으키지 않았다. 이 clone이 고추의 기주 인식에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어 pRS1으로 재명명하였고 여러 가지 제한효소들을 사용하여 restriction map을 작성한 후 그 map에 따라 subcloning하고 각 subclone들을 다시 고추에 접종하여 고추에 병을 일으키지 않는 subclone을 확보하였다 (pRS13).

3. 기주특이성 관련 유전자 동정 및 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 작성

세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum*의 기주 특이성에 관련된 유전자를 밝히기 위해서 확보한 pRS13에서 동정한 *rsaI* 유전자의 기능을 밝히기 위해 이 *rsaI* 유전자를 *Tn3gusA* mutation 시킨 후에 이 mutation이 된 것을 고추에 병원성 검정한 결과 약 25%의 발병도를 보였고, 그 mutant에 다시 pRS13을 complementation 시킨 후 고추와 감자에 병원성 검정을 하였더니 고추에서는 0%의 풋마름 증상을 보였다. 그리고 이 mutation된 균과 complementation 된 균주들의 고추와 감자 내에서의 cell 성장을 살펴보게 되면 SL341은 고추 내에서 세균 수가 10^5 에서 10^9 이상으로 증가

한 반면 감자에서는 10^5 에서 10^3 으로 감소하였고, SL2029는 고추에서는 10^5 에서 10^4 으로 오히려 세균 수가 감소된 반면 감자에서는 10^5 에서 10^{11} 으로 세균 수가 증가하였다. 그리고 mutation이 된 균주인 SL2029, *rsal::Tn3gusA200* 균주는 고추에서는 세균 수가 10^5 에서 10^7 으로 증가하였고 감자에서는 10^5 에서 10^5 으로 세균 수가 거의 변화가 없었으며 *rsal* mutant에서 complementation 된 균주인 SL2029 *rsal::Tn3gusA200*(pRS13) 균주는 고추에서 10^5 에서 10^5 으로 세균 수가 변함이 없었으며 감자에서는 10^5 에서 10^9 으로 증가되었다. 이 결과는 *rsal* 유전자가 세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum* race 3 균주에서 기주 특이성에 중요한 작용을 하는 것을 보여준다. 이 *rsal* 유전자는 국내의 세균성 풋마름병 race 3균주에서만 존재하는 것을 southern blot으로 확인하였다. 그리고 이 *rsal* 유전자의 발현 실험으로 *rsal* 유전자는 HrpB에 의해 조절되는 것을 밝혔으며 이렇게 발현된 단백질은 secretion assay와 N-terminal sequencing으로 Type II secretion system으로 분비가 됨을 증명하였다.

109개의 국내 균주, 16개의 외국 균주들의 AFLP 분석 결과 각 균주들은 두 개의 division으로 분류가 되었는데 첫 번째 division은 국내 109개의 균주와 4개의 일본균주, 1개의 가이아나 균주로 구성되었으며 두 번째 division은 세계의 다양한 지역에서 수집된 11개의 LMG 균주들로 구성되었다. 첫 번째 division은 6개의 cluster로 세분화되었는데 제 I cluster는 충청남도, 경상남도, 경상북도, 전라남도에서 분리된 biovar 1, 3, 4 균주들로 구성되었다. 제 II cluster는 경상북도, 경상남도, 전라북도, 전라남도 지역에서 분리된 biovar 3과 4균주들과 일본의 가지와 고추에서 분리된 biovar 4 균주들로 구성되었다. 제 III cluster는 강원도, 경기도, 충청북도, 충청남도, 경상북도, 경상남도, 전라남도 지역에서 분리된 biovar 3과 4 균주들로 구성되었다. 제 IV cluster는 전라남도과 경상남도에서 분리된 biovar 4 균주들로 구성되었다. 제 V cluster는 전라남도, 경상남도, 제주도에서 분리된 biovar 2 균주들로만 구성되었다. 제 VI cluster는 경기도, 충청북도, 경상북도, 경상남도에서 분리된 biovar 3과 4 균주들로 구성되었다. 그리고 두 번째 division은 11개 나라에서 분리된 biovar 2 균주들(VII cluster)과 biovar 1과 3 균주들로 구성되었다.

이상의 결과로 수집된 균주들의 국내에서의 분포도를 살펴보면 강원도에서는 biovar 3, biovar 4, AFLP cluster II, III 균주들이, 경기도에서는 biovar 3, biovar 4, AFLP cluster III, VI 균주들이, 충청북도에서는 biovar 3, biovar 4, AFLP cluster III, VI 균주들이 충청남도에서는 biovar 3, biovar 4, AFLP cluster I, III 균주들이 전라북도에서는 biovar 4, AFLP cluster II 균주들이 전라남도에서는 biovar 2, biovar 3, biovar 4, AFLP cluster I, II, IV, V, VI 균주들이 경상북도에서는 biovar 3, biovar 4, AFLP cluster I, II, III, VI 균주들이 경상남도에서는 biovar 2, biovar 3, biovar 4, AFLP cluster I, II, III, IV, V, VI 균주들이 제주도에서는 biovar 1, biovar 2, biovar 4, AFLP cluster I, V 균주들이 분포하였다.

따라서, 국내에서 분포하는 세균성 풋마름병균의 유전적 다양성 monitoring 결과와 레이스 분포지도는 가지과 작물 재배지 선택과 연작 또는 윤작을 위한 기초적인 방제 자료로 활용하여 방제가 어려운 세균성 풋마름병의 발생에 대항하여 여러 작물들의 안정적인 생산량을 제공하고 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 연구 및 기주 특이성에 관련된 유전자의 기능 규명 연구를 통하여 선발된 국내에 분포하고 있는 다양한 병원균 주들간의 유연관계, race 간의 특징 등을 살펴볼 수 있는 특이적 primer로 인해 국외에서 도입되는 외국 균주들과의 비교 연구를 통한 외국 농산물들의 검역 체계에 활용이 가능할 것으로 보인다. 그리고 서로 다른 기주 범위를 인식하는 기작을 살펴봄으로써 광범위한 기주 범위를 가지는 풋마름병원균의 기주 인식 차단의 유용한 기초 자료로 이용하여 세균성 풋마름병원균의 저항성 관련 품종 육성의 자료로 활용하고자 한다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Management of bacterial wilt by monitoring genetic diversity and host range determinants of *Ralstonia solanacearum*

II. Objectives and Significance

R. solanacearum is a soil-borne pathogen that infects plants mainly through the roots. It invades xylem vessels and reaches the upper part of the plant after active multiplication. Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most important bacterial plant diseases in the world's tropical, subtropical, and warm temperate regions. The bacterium infects many economically important crops, including tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), potato (*Solanum tuberosum* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.), tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), eggplant (*Solanum melongena* L.). Effective control methods about this bacterial wilt disease were not informed. However, in farmer's fields, chemical treatments and unverified biocontrol agents are generally used to protect plants against the pathogens.

Bacterial wilt is a serious and chronic disease in tomato, potato, tobacco, eggplant, and pepper plants during the growing season in Korea, when the temperature and moisture levels are high. Bacterial wilt differs from fungal wilt in that fungi remain in the vascular tissues until plant death, whereas bacteria often destroy parts of the cell wall of xylem vessels. In bacterial wilt, the vascular tissues of diseased stems and roots turn brown and bacterial ooze flows in cross-sections. We believe that this disease is much more high disease incidence rate than fungal

wilt disease and this disease has the potential to occur epidemically in Korea. Recently, crop losses encountered cannot be quantified as no reliable data are available, nonetheless grower's reports emphasise that bacterial wilt is a major problem. The species *R. solanacearum* is a complex taxonomic unit with broad physiological and genetic diversity; therefore, it has been divided into seven biovars (based on biochemical properties) and five races (based on differences in host range). Although the biovar and race systems are widely accepted for the classification of *R. solanacearum*, there is no definite correlation between biovar and race: each race transects the biovars and each biovar contains various races. The only positive correlation between the biovar and race systems exists for biovar 2 and race 3. To circumvent such classical taxonomic methods and improve our understanding of the genetic relatedness among *R. solanacearum* strains, DNA-based analyses are now used. However, the genetic diversity among Korean *R. solanacearum* isolates is unknown. Thus, we investigated the genetic diversity of Korean isolates of *R. solanacearum* to create a race and biovar distribution map and improve the management of bacterial wilt. Unlike other phytopathogenic bacteria, race systems of *R. solanacearum* are not based on gene-for-gene interactions. Instead, they are based on the pathogenicity of each isolate in different kinds of host plants.

The studies on the host-recognition by *R. solanacearum* may help uncover the complex mechanisms of plant pathogenicity. In addition, these studies will provide new insights and strategies into the development or breeding of plant disease-resistance plants. Therefore, the researches of monitoring the genetic diversities and host-specificities helps the basal understanding of *R. solanacearum*. Finally, to preventing a new race from spreading and reduce a wide outbreak of bacterial wilt effectively, analyses of regional differences of bacterial wilt and disease severity on the hosts are quite necessary. Finally, our reports may

prevent a new race from wide distribution and reduce a wide outbreak of bacterial wilt effectively.

III. Contents and scope of the study

1. Isolation of *R. solanacearum* in all over the country on various host and construction of genomic libraries of type strains race 1 and race 3 of *R. solanacearum*

R. solanacearum isolates were collected from wilted tomato, pepper, eggplant, potato, perilla, sesame, paprika, peanut, pimiento, and sunflower plants at 90 different locations in 9 Korean provinces between 1997 and 2005. All of the isolates were purified on tetrazolium chloride (TZC) agar medium. Four hundred and seventy-eight isolates were classified into biovars based on their ability to oxidize three disaccharides (lactose, maltose, and cellobiose) and three hexose alcohols (mannitol, sorbitol, and dulcitol) as well as their ability to utilize trehalose, meso-inositol, and D-ribose. For the pathogenicity test, each plant (tomato, potato, and pepper) was inoculated at the fifth to sixth true-leaf stage, and each inoculation was repeated three times. To prepare the inoculum, bacterial cells were grown on TZC agar medium for 24 h at 28C, suspended in sterile distilled water, and adjusted to 10^8 CFU/ml. Among these isolates, we selected type strains that race 1 isolate was infected only on tomato, pepper and race 3 isolate was infected only on tomato, potato. Genomic DNA of type strains was partially digested with *Sau3AI*. The fractionated genomic DNA (20–25 kb) and vector pLAFR3 DNA were ligated with ligase. The ligated DNA was packaged into bacteriophage λ and then transfected into *E.coli* HB101.

2. The genetic diversity of Korean isolates of *R. solanacearum* and construction of plasmid carrying host specificity gene

Genomic DNA was digested with *EcoRI*, *MseI*, *SacI* and *MspI* restriction enzymes. Adapter ligation was achieved by adding *EcoRI*, *MseI*, *SacI* and *MspI* adapters. Selective amplifications were performed using the primers complementary to the adapter sequences with additional selective nucleotides. Digested and ligated DNA was added to mixture containing buffer, *EcoRI* and *SacI* selective primer labeled with [³²P]ATP, *MseI* and *MspI* selective primer, and *Taq* polymerase. DNA amplification by PCR was performed using a thermocycler. The amplified fragments were separated by electrophoresis on 6% polyacrylamide gels. Individual DNA fragments were detected reproducibly were scored as present or absent. Binary matrices consisting of 0 (absence of a given band) and 1 (presence of a given band) were analyzed to obtain simple matching coefficients among the isolates using the unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) algorithm in NYSYS-pc.

To identify genes responsible for host specificity of *R. solanacearum*, we transferred a genomic library of SL2029 (race 3) into SL341 (race 1) by triparental mating. Among 1,000 transconjugants, we found one transconjugant failed to induce wilt symptom in pepper.

3. Identification of host specificity gene and construction of race distribution map according to genetic diversity of Korean isolates of *R. solanacearum*

We then isolated a cosmid clone, pRS1 and subcloned the fragment conferring host specificity by deletion and mutational analyses. The fragment carries one possible open reading frame named as an *rsal*

gene.

To make the *rsal* mutant, mutagenesis of pRS13 with transposon Tn3gusA was performed. To identify *rsal* genes responsible for host specificity of *R. solanacearum*, we carried out southern blot analysis, β -glucuronidase assay, western blot, and N-terminal sequencing.

Genomic DNA from 125 representative isolates (109 domestic isolates and 16 foreign isolates) representing different hosts, biovars, and geographical origins. Genetic diversity among 125 representative isolates (109 domestic isolates and 16 foreign isolates) of *R. solanacearum* collected from various plants in Korea between 1997 and 2005 was determined based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). Individual DNA fragments, ranging between 150 and 1000 bp, that were detected reproducibly were scored as present or absent. Binary matrices consisting of 0 (absence of a given band) and 1 (presence of a given band) were analyzed to obtain simple matching coefficients among the isolates using NTSYS-pc (version 2.0, Exeter Biological Software, Setauket, NY). The simple matching coefficients were then clustered to generate similarity trees with the SHAN clustering program, using the unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) algorithm in NYSYS-pc. Thus, we investigated the genetic diversity of Korean isolates of *R. solanacearum* to create a race and biovar distribution map and improve the management of bacterial wilt.

IV. Results and recommendations for their application

1. Isolation of *R. solanacearum* in all over the country on various host and construction of genomic libraries of type strains race 1 and race 3 of *R. solanacearum*

Four hundred and seventy-eight *R. solanacearum* isolates were

collected from wilted tomato, pepper, eggplant, potato, perilla, sesame, paprika, peanut, pimiento, and sunflower plants at 90 different locations in 9 Korean provinces between 1997 and 2005. Of the 478 isolates tested, 3 were biovar 1, 38 were biovar 2, 56 were biovar 3, and 381 were biovar 4. Among the Korean biovar 2 isolates, none were identified as biovar N2. All biovar 1 isolates were pathogenic on tomato and potato and weakly pathogenic on pepper. Among the 56 biovar 3 isolates, 48 were pathogenic on tomato, pepper, and potato, 5 were pathogenic on tomato and pepper but nonpathogenic on potato, and 3 were pathogenic on tomato and weakly pathogenic on potato but nonpathogenic on pepper. Of the 381 biovar 4 isolates, 365 were pathogenic on tomato, pepper, and potato, 16 were pathogenic on tomato and potato and nonpathogenic on pepper. Overall, all biovar 1, 3, and 4 isolates belonged to race 1, and all biovar 2 isolates from tomato and potato were pathogenic on potato and weakly pathogenic or nonpathogenic on tomato and pepper, corresponding to race 3.

Among these isolates, we selected type strains; SL341 isolate was infected only on tomato, pepper and SL2029 isolate was infected only on tomato, potato. We constructed genomic libraries of SL341 isolate and SL2029 isolate.

2. The genetic diversity of Korean isolates of *R. solanacearum* and construction of plasmid carrying host specificity gene

We analyzed the isolates by AFLP. A total of 110 DNA fragments ranging from 150 to 1000 bp, which were consistently produced, were selected to analyze 109 Korean and 16 foreign isolates. Among the isolates tested, 62 unique AFLP fragments were identified, and among those 10 were present only in the Korean biovar 2 (race 3) isolates.

AFLP analysis indicate that biovar 2 isolates are genetically distinct from the other biovars.

We transferred a genomic library of SL2029 (race 3) into SL341 (race 1) by triparental mating. Among 1,000 transconjugants, we found one transconjugant failed to induce wilt symptom in pepper. We then isolated a cosmid clone, pRS1 and subcloned the 0.9-kb *Pst*I/*Hind*III fragment conferring host specificity by deletion and mutational analyses.

3. Identification of host specificity gene and construction of race distribution map according to genetic diversity of Korean isolates of *R. solanacearum*

To identify genes responsible for race specificity of *R. solanacearum*, we then isolated a cosmid clone, pRS1 and subcloned the 0.9-kb *Pst*I/*Hind*III fragment conferring host specificity by deletion and mutational analyses. The fragment carries one possible open reading frame named as an *rsal* gene. The SL341 carrying *rsal* and SL2029 caused hypersensitive response in pepper. When the *rsal* gene was disrupted by marker-exchange in SL2029, the mutant was virulent in pepper and much less virulent in potato. From southern hybridization analysis, we found that most of race 3 isolates we tested carry the *rsal* gene, however all race 1 isolates we tested do not have any homologous gene. Expression of *rsal* was regulated by HrpB, and a putative HrpB-binding box was present in the upstream of the *rsal* gene. This indicates that Rsa1 belongs to the HrpB regulon. Our secretion assay and N-terminal sequencing indicate that Rsa1 is secreted probably by Type II secretion systems.

A dendrogram generated by NTSYS-pc separated the isolates into two divisions: the first contained all 109 Korean isolates, 4 Japanese

isolates, and the Guyanese isolate (GMI1000), while the second contained the 11 LMG isolates. Isolates belonging to the first division were further divided into six clusters, designated I through VI. The first cluster, contained biovar 1, 3, and 4 (race 1) isolates collected in Chungcheongnam-do, Gyeongsangnam-do, Gyeongsangbuk-do, and Jeollanam-do. The second cluster, contained biovar 3 and 4 (race 1) isolates collected in Gyeongsangbuk-do, Gyeongsangnam-do, Jeollabuk-do, and Jeollanam-do as well as biovar 4 isolates in Japan. The third cluster, included biovar 3 and 4 (race 1) isolates collected in Gangwon-do, Gyeonggi-do, Chungcheongbuk-do, Chungcheongnam-do, Gyeongsangbuk-do, Gyeongsangnam-do, and Jeollanam-do. The fourth cluster, included biovar 4 (race 1) isolates collected in Jeollanam-do and Gyeongsangnam-do. The fifth cluster, included biovar 2 (race 3) isolates collected in Jeollanam-do, Gyeongsangnam-do, and Jeju-do. The sixth cluster, included biovar 3 and 4 (race 1) isolates collected in Gyeonggi-do, Chungcheongbuk-do, Gyeongsangbuk-do, and Gyeongsangnam-do. The second division, included biovar 1 and 3 isolates, and the seventh cluster contained biovar 2 isolates originating from 11 countries.

Therefore, genetic diversity study of *R. solanacearum* and construction of race distribution map may improve the management of bacterial wilt, prevent the crop rotation, and select to crop plantation. The experiments wish to utilize to quarantine system of abroad farm produces through comparative study with abroad strains that is introduced in outside the country to selective primer's development. These results provide that stable yield of several crops against *R. solanacearum* and wish to use to useful basic data in host recognition of the bacteria that have wide host range. New knowledge and techniques acquired through this study will be applied for protection of new race from wide distribution and reduction a wide outbreak of bacterial wilt disease.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of the study	25
Chapter 2. Status of research and development	28
Chapter 3. Experiments and Results	30
Section 1. Materials and Methods	30
1. Isolation of <i>R. solanacearum</i> in all over the country on various host and construction of genomic libraries of type strains race 1 and race 3 of <i>R. solanacearum</i>	30
a. Isolation on various regions and hosts	30
b. Biovar classification	31
c. Race classification and selection of type strains	32
d. Construction of genomic library of type strains	32
2. The genetic diversity of Korean isolates of <i>R. solanacearum</i> and construction of plasmid carrying host specificity gene	33
a. Selection of selective primer for AFLP analysis	33
b. Genetic diversity by AFLP analysis	34
c. Acquisition of transconjugants through effective mating method	34
d. Construction of plasmid carrying host specificity gene	35
3. Identification of host specificity gene and construction of race distribution map according to genetic diversity of Korean isolates of <i>R. solanacearum</i>	35
a. Identification of host specificity gene	35
1) Mutation and complementation	36
2) Southern blot	36
3) β -glucuronidase assay	37

4) Western blot	37
5) N-terminal sequencing	38
b. Genetic diversity of Korean isolates of <i>R. solanacearum</i>	38
c. Construction of race and biovar distribution map	39
Section 2. Results and Discussion	40
1. Isolation of <i>R. solanacearum</i> in all over the country on various host and construction of genomic libraries of type strains race 1 and race 3 of <i>R. solanacearum</i>	40
a. Isolation on various regions and hosts	40
b. Biovar classification	42
c. Race classification and selection of type strains	42
d. Construction of genomic library of type strains	47
2. The genetic diversity of Korean isolates of <i>R. solanacearum</i> and construction of plasmid carrying host specificity gene	48
a. Selection of selective primer for AFLP analysis	48
b. Genetic diversity by AFLP analysis	49
c. Acquirement of transconjugants through effective mating method	54
d. Construction of plasmid carrying host specificity gene	54
3. Identification of host specificity gene and construction of race distribution map according to genetic diversity of Korean isolates of <i>R. solanacearum</i>	59
a. Identification of host specificity gene	59
1) Mutation and complementation	61
2) Southern blot	63
3) β -glucuronidase assay	64
4) Western blot	65
5) N-terminal sequencing	66
b. Genetic diversity of Korean isolates of <i>R. solanacearum</i>	67
c. Construction of race and biovar distribution map	76

Chapter 4. Conclusion and contribution to the related fields.....	80
Section 1. The point aimed at research purpose, area and valuation.....	80
Section 2. The achievement of research purpose.....	82
Section 3. The contribution of technical development of related sphere.....	83
Chapter 5. Applications of the study.....	85
Section 1. Future research plan.....	85
Section 2. Application to other studies.....	85
Section 3. Application plan of the study.....	86
Chapter 6. Informations from other institutes.....	87
Chapter 7. References.....	89

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	28
제 3 장 연구개발수행내용 및 결과.....	30
제 1 절 연구개발수행내용.....	30
1. 전국적으로 다양한 기주에서 세균성 풋마름병원균 균주 확보와 각 race 대표 균주의 선발 및 library 제작.....	30
가. 다양한 지역과 기주에서 세균성 풋마름병원균의 분리.....	30
나. 보유 균주들의 biovar 검정을 통한 생리학적 분류.....	31
다. 다양한 기주에 대한 병원성 검정을 통한 race 분류 및 대표 race 균주 선발.....	32
라. 대표 race 균주의 library 제작.....	32
2. 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균 균주들간의 비교 및 기주 특이적인 유전자를 가진 유전자 clone 확보.....	33
가. AFLP 방법을 위한 효과적인 primer 선발.....	33
나. AFLP 방법을 이용한 보유 균주들의 유사점, 차이점 등 여러 가지 특징들 연구.....	34
다. 효과적인 mating 방법을 통한 많은 수의 transconjugants의 확보	34
라. 기주의 병원성 검정을 통한 기주특이성 관련 유전자를 가진 clone 확보.....	35
3. 기주특이성 관련 유전자 동정 및 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 작성.....	35
가. 세균성 풋마름병원균의 기주특이성 관련 유전자의 동정 및 기능 규명.....	35
1) Mutantion 및 complementation.....	36
2) Southern blot.....	36

3) β -glucuronidase assay	37
4) Western blot	37
5) N-terminal sequencing	38
나. AFLP 방법을 통한 유전적 다양성 연구를 UPGMA 방법으로 결과 해석	38
다. 국내외의 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 작성	39
제 2 절 연구개발 결과	40
1. 전국적으로 다양한 기주에서 세균성 풋마름병원균 균주 확보와 각 race 대표 균주의 선발 및 library 제작	40
가. 다양한 세균성 풋마름병원균 균주 확보	40
나. 세균성 풋마름병원균의 race 및 biovar 분류	42
다. 세균성 풋마름병원균 각 race의 대표 균주 선발	42
라. 대표 race 균주의 library 제작	47
2. 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균 균주들간의 비교 및 기주 특이적인 유전자를 가진 유전자 clone 확보	48
가. AFLP 방법에 효과적인 primer의 선발	48
나. AFLP 방법에 의한 세균성 풋마름병원균 균주들의 특징 확보	49
다. 효과적인 mating 방법을 통한 많은 수의 transconjugants의 확보	54
라. 기주 병원성 검정을 통한 기주특이성 관련유전자를 가진 clone의 확보	54
3. 기주특이성 관련 유전자 동정 및 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 작성	59
가. 세균성 풋마름병원균의 기주특이성 관련 유전자의 동정 및 기능 규명	59
1) Mutation 및 complementation	61
2) Southern blot	63
3) β -glucuronidase assay	64
4) Western blot	65

5) N-terminal sequencing.....	66
나. AFLP 방법을 통한 세균성 풋마름병원균 균주들의 유전적 다양성 확보.....	67
다. 국내외의 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 도출.....	76
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	80
제 1 절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점.....	80
제 2 절 연구개발 목표의 달성도.....	82
제 3 절 관련분야에서의 기술발전 기여도.....	83
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	85
제 1 절 추가연구의 필요성.....	85
제 2 절 타 연구에의 응용.....	85
제 3 절 연구결과의 활용계획.....	86
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	87
제 7 장 참고문헌.....	89

제 1 장 연구개발과제의 개요

현재 국내에서 재배되고 있는 발작물로는 배추, 무를 비롯한 십자화과 작물, 고추, 가지, 토마토 토마토등이 포함된 가지과 작물, 참깨를 비롯한 꿀풀과 작물, 들깨를 비롯한 과 작물, 오이, 참외, 수박 등이 포함된 외과 작물, 양파, 파, 마늘, 생강이 재배되고 있다. 그 중에서 고추, 가지, 토마토, 담배를 비롯한 가지과 작물은 여러 발작물 중에서 높은 비율을 차지하고 있다. 이러한 광범위한 동일 작물의 재배면적과 연작은 여러 가지 식물병을 유발해 왔다. 이전에는 곰팡이병이 주로 나타났으나 홍수, 고온등의 기후변화는 세균병의 발달을 가져왔다. 가지과 작물과 들깨, 참깨, 생강의 대표적인 세균병은 *R. solanacearum*에 의한 세균성 풋마름병, *Erwinia carotovora*에 의한 세균성 무름병이 있다. 세균성 풋마름병은 *Fusarium*, *Verticillium*, 등의 곰팡이에 의한 시들음병과 그 증상이 유사하나 고온 다습의 환경조건하에서는 오히려 곰팡이에 의한 시들음병보다 병발생율이 훨씬 더 높고 짧은 시간 안에 광범위하게 발생하는 것으로 보고되어 있다.

*R. solanacearum*은 토양 속에서 장기간 월동하다가 적당한 기주가 나타나면 상처 난 뿌리를 통해 침입하는 세균으로서 이 병원균에 의한 가지과 작물의 세균성 풋마름병은 열대, 아열대, 온대 지역에서 광범위하게 발생하고 있는 중요한 식물병이다. 1896년 Erwin F. Smith에 의해 가지과 작물에서 발생한 것을 보고한 것을 시작으로 이 식물병은 세계적으로 중요한 식물병 중의 하나가 되었다. 이 세균은 가지과 작물인 가지, 고추, 담배, 토마토를 비롯하여 바나나, 생강, 들깨, 딸기, 고구마, 수목, 잡초에 이르기까지 그 기주 범위가 50과 400종 이상이 된다. 현재 국내에서는 가지과 작물을 비롯하여 참깨, 들깨, 생강에서만 세균성 풋마름병원균의 기주로 보고가 되어 있다.

1997년과 1998년도의 세균성 풋마름병 분포 상황을 살펴보면 강원도 철원에서 토마토, 경기도 여주에서 가지, 수원에서 들깨, 광주 수원에서 토마토, 충청북도 청원, 음성에서 고추, 청주, 진천, 괴산, 보은에서 토마토, 충청남도 서산에서 고추, 보령에서 참깨, 여산에서 담배, 홍성에서 토마토, 경상북도 김천에서 토마토, 경상남도 합천에서 가지, 창녕에서 고추, 전라북도 김제,

완주에서 가지, 전라남도 광주, 보성, 순천에서 토마토, 제주 북제주, 남제주에서 감자, 북제주에서 토마토에서 본 병원균이 분리되었다. 그리고 보고에 따르면 토마토 양액 재배지에서 특히 심하게 발생했다고 되어있다. 그리고 1997년보다는 1998년도에 그 피해상황이 더 증가하였다고 보고만 되어 있을 뿐 그 뒤의 병 발생 조사는 거의 찾아 볼 수 없는 실정이며 점차적으로 그 피해가 증가한다고 알려져 오고 있으나 보다 정확한 조사가 이루어지지 않은 실정이어서 본 병원균에 대한 비교적 정확한 피해 정도를 살펴 볼 수 없다.

*R. solanacearum*은 균주간의 상동성이 낮고 복잡하기 때문에 두 가지 분류체계로 균을 분류시키는데 그 중 첫 번째는 자연 상태의 기주 범위를 이용한 분류로 최초 감염된 기주에 따라 5가지 race로 나뉘고 있으며 두 번째는 세 가지 이당류와 세가지 6탄당, trehalose, meso-inositol, D-ribose의 이용여부에 따라 분류하는 것으로 6가지의 biovar로 나누는 것이다. 그리고 이들 race와 biovar간의 관계는 race 3과 biovar 2간의 관계를 제외하고는 그다지 유사하지 않기 때문에 서로간의 변이점도 많이 존재하고 있다. 국외에서는 이렇게 다양한 균을 좀더 근원적인 유전적 분석으로 group화하고 있다. 국내에서는 이러한 유전적 분석을 통한 분류가 제대로 되어 있지 않기 때문에 우리나라 지리적 분포에 따른 균주간의 특징, race와 biovar간의 관계, 상동성, 차이점등을 몇 가지 유전적 분석으로 연구, 해결해야할 필요성이 대두되고 있다.

그리고 토양에서 생활을 하는 병원균의 생태적 특징상 본 병원균에 의한 피해를 받은 포장은 기주 범위가 넓은 병원균의 특징 때문에 방제를 하지 않고서는 다른 작물의 재배도 불가능하게 하고 있다. 특히 여름철의 폭우 등은 병원균들의 이동을 용이하게 만들어 갑작스런 병의 진전을 촉진 시킬 수도 있게 한다. 이런 성질 때문에 특히 토마토 양액 재배지상에서의 피해 상황은 더욱 심각할 수 있으며 한번 발생 했을 시 적절한 방제가 제공되지 못하면 전체 양액 재배지상에서 병발생의 정도가 심하게 되어 그해 농사를 망치게 될 수도 있다. 현재까지는 *R. solanacearum*의 적당한 방제방법이나 그 체계도 제대로 수립되지 않은 상황이어서 더욱더 방제의 필요성은 커지고 있다. 따라서 보다 효과적이고 안정적인 방제를 위해서는 국내에 분포하

고 있는 세균성 풋마름병원균의 기본적인 지식이 뒤따라야 할 것으로 보이며 국내 재배농가의 세균성 풋마름병의 피해 현황을 조사하고 균주를 채집, 분리하는 과정과 함께 진행되어야 더욱 효과적인 결과를 얻을 수 있을 것이라고 생각된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

*R. solanacearum*에 의한 세균성 풋마름병에 대한 연구는 1896년 Erwin F. Smith에 의해 가지과 작물에서 발생한 것을 보고한 것에서 시작되었다. 그 이후 점차적으로 이 식물병이 세계적으로 중요한 작물들에 발생함으로써 가장 중요한 식물병종의 하나가 되었다. 이 병원균의 보고된 기주들로는 가지과 작물인 가지, 고추, 담배, 토마토를 비롯하여 바나나, 생강, 들깨, 딸기, 고구마, 수목, 잡초에 이르기까지 그 기주 범위가 50과 400종 이상으로 알려져 있다. 그러나 현재 우리나라에서는 토마토, 담배, 고추, 가지, 참깨, 생강, 해바라기, 감자가 이 병원균의 기주로 보고가 되어 있다.

다른 식물병원성 세균들과는 달리 균주들간의 상동성이 낮고 복잡한 특성을 가지는 *R. solanacearum*에 대한 유연관계를 살펴보기 위해 국외에서는 이렇게 다양한 균을 좀 더 근원적인 측면에서 연구할 수 있는 유전적 분석으로 그들의 다양성을 살펴보고 있다. 기존의 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 연구에 대한 보고는 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)방법, rep-PCR 방법, PCR-RFLP 방법, AFLP (Amplified fragment length polymorphism), 16s rRNA sequence analysis 방법으로 실시하여 왔으나 세균성 풋마름병원균의 생태적, 생리적 특성으로 인하여 다른 어느 방법들보다 특이적 primer를 사용하는 AFLP 방법을 통한 유전적 다양성 연구가 세균성 풋마름병원균에 가장 적합하고 유리한 유연관계를 분석할 수 있다는 보고가 있다. 1980년대부터 현재에 이르기까지 미국, 유럽, 아시아 지역 균주들로 유전적 다양성 연구를 실시하였으나 한국 균주들이 포함되어 연구된 바는 없다. 그리고 광범위한 기주 범위를 가지는 본 병원균인 *R. solanacearum*의 기주 특이성에 관련된 연구로는 1980년대부터 지금까지 여러 연구가 진행되고 있으나 본 연구팀에서 행하는 race 1과 race 3간의 비교가 아닌 race 1에서만 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 다음과 같은 차별화된 결과를 얻을 것으로 생각된다. 먼저 우리의 연구 결과는 국내 균주들뿐만 아니라 일본 균주, 외국 11개 나라에서 분리된 균주들이 포함되어 있어 기존의 보고된 논문보다 더 다양한 지역에서 분리된 균주들간의 유전적 다양성을 연구할 수 있을 것으로 생각되며 본 병원균에 대

한 기주특이성 연구 결과인 type II secretion system에 대한 보고는 세계최초의 연구 보고가 될 것으로 생각된다. *R. solanacearum*은 race 1과 race 3 균주들간이 형태적으로는 같지만 생리적, 생태적 특성이 서로 차이가 많은 병원균들이므로 race 1과 race 3를 비교 연구하는 본 연구와 race 1을 주로 연구하는 국외에서 진행 중인 연구와는 차별화된 연구결과를 얻을 것으로 예상된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행내용

1. 전국적으로 다양한 기주에서 세균성 풋마름병원균 균주 확보와 각 race 대표 균주의 선발 및 library 제작

가. 다양한 지역과 기주에서 세균성 풋마름병원균의 분리

1997년부터 2005년도까지 전국적으로 세균성 풋마름병 증상이 관찰되는 다양한 이병식물체 (그림 1) 를 채집하여 ooze test를 거친 후에 ooze가 관찰되는 이병식물체의 줄기를 절단하여 1% sodium hypochlorite solution으로 표면 살균하고 살균수로 세척한 다음 물기를 제거하고 살균수가 담긴 tube에 살균한 조직을 넣고 약 10분간 ooze를 받은 후에 그 액을 희석하여 TZC medium에 100 μ l씩 도말하였고 28 $^{\circ}$ C에서 2-3일간 배양한 후에 관찰되는 single colony를 다시 새 TZC 배지에 옮겨 순수 분리 하였다.



토마토



파프리카



고추



들깨

그림 1. 여러 가지 작물에서의 세균성 풋마름병 증상

나. 보유 균주들의 biovar 검정을 통한 생리학적 분류

1997년부터 2005년까지 채집, 분리한 세균성 풋마름병원균들을 여섯 가지 탄소원(maltose, cellobiose, mannitol, sorbitol, dulcitol)과 trehalose, meso-inositol, and D-ribose이 첨가된 기본 배지[2 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.4 g KCl, 0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g peptone, 0.6 ml 1% [wt/vol] bromothymol blue/liter, pH 7.1] 2ml에 각 병원균들의 현탁액 ($10^8/\text{ml}$)을 $5\mu\text{l}$ 접종하여 2주일간 28°C 에서 배양한 후 각 탄소원들의 이용여부를 관찰하여 biovar를 결정하였다.

다. 다양한 기주에 대한 병원성 검정을 통한 race 분류 및 대표 race 균주 선발

1997년부터 2004년까지 전국 각 지역에서 채집하여 확보한 총 478개의 세균성 풋마름 병원균들을 TZC 배지에서 2-3일간 28°C에서 배양한 후 살균수에 현탁하여 ($10^8/ml$) 접종원으로 준비하였고 7-8분엽기의 토마토, 감자, 고추 유묘에 준비된 접종원을 20ml씩 분주하여 30일 간 온실 (자연광, 25-30°C)에서 병원성 검정을 실시하였으며 병원성 결과는 다음과 같이 표시하였다: - = n 세균성 풋마름 증상 없음; + = 25% 세균성 풋마름 증상, 1~2개 잎의 위조 ++ = 50% 의 세균성 풋마름 증상, 3~4개 잎의 위조; 75% 이상의 세균성 풋마름 증상, 5개 잎~ 전체 식물체의 위조 현상.

이와 같이 실시된 병원성 검정을 통해 총 478개의 세균성 풋마름병원균을 race 검정하였고 이 병원균들 중에서 고추에 병원성을 100% 나타내고 감자에 병을 전혀 일으키지 않는 race 1 균주 1개를 선발하고 감자에 병을 100% 일으키고 고추에 전혀 병을 일으키지 않는 race 3 균주 1개를 각각 race 1과 race 3의 대표균주로 선발하였다.

라. 대표 race 균주의 library 제작

대표 균주로 선발된 race 1균주인 SL341과 race 3균주인 SL2029 균주의 genomic library를 제작하기 위하여 SL341과 SL2029 균주를 B broth (Peptone 10g, Casamino acid 1g, Yease extract 1g, DW 1L)에서 28°C, 20시간 배양한 후 cell을 수거하여 다음과 같은 방법으로 DNA를 추출하였다; 수거된 cell을 0.9% NaCl로 2회 세척하고 GTE (50mM Glucose, 25mM Tris · Cl(pH 8), 10mM EDTA (pH 8)에 현탁 시킨 후 Lysozyme (2mg/ml)을 상온에서 30분간 처리 하고 10% SDS를 넣고 전체 내용물을 고무 잘 섞고 37°C에서 20분간 처리한다. 처리된 내용물에 RNase A를 다시 처리하여 37°C에서 1시간 둔 후 0.5M EDTA를 10분간 37°C에서 처리하고 proteinase K를 37°C, 1시간 처리한다. 이후에 새 tube에 위의 내용물을 옮긴 후 Cesium Chloride (CsCl)를 동일 양으로 넣은 후 천천히 Cesium Chloride를 녹인다. 다 녹으면 호일로 tube를 잘 감싼 다음 Ethidium Bromide (EtBr)을 첨가하고 원심분리 (40000rpm, 20°C, 48시간) 하였다. 원심분리가 끝난 후

UV lamp로 DNA층을 확인하여 주사기로 분리한 다음 isoamyl alcohol를 사용하여 EtBr를 제거 한 후 TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA (pH 8)에 투석하여 순수 DNA를 확보하였다.

확보된 순수한 DNA를 *Sau3AI* 제한효소를 처리하여 20~25kb fragment를 확보한 후 이를 broad host range vector인 pLAFR3와 ligation 시켜 packagene extracts와 잘 혼합하고 *E. coli* HB101과 잘 섞은 후 약 12시간 동안 37°C에서 진탕 배양하여 각 대표균주의 library를 제작하였다. 제작된 library는 -70°C에 보관하여 필요할 때마다 녹여서 사용하였고 다양한 유전자 clone확보를 위한 DNA pattern을 관찰하기 위해 *EcoRI* 제한효소를 처리하여 제작된 library의 다양성을 확인하였다.

2. 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 꽃마름병원균 균주들간의 비교 및 기주 특이적인 유전자를 가진 유전자 clone 확보

가. AFLP 방법을 위한 효과적인 primer 선발

국내 여러 지역 및 다양한 기주에서 분리한 세균성 꽃마름병원균의 유연관계를 AFLP 방법으로 살펴보기 위해 특이 primer를 선발하고자 각 지역, 각 기주에서 선발된 100개의 균주에서 genomic DNA를 추출하여 *EcoRI*, *MseI*과 *MspI*, *SacI* 제한효소를 처리한 후 각각의 제한효소에 맞는 adapter (*EcoRI* adapter ; 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3', *MseI* adapter ; 5'-GACGATGAG TCCTGAG-3', 5'-TACTCAGGACTCAT-3', *MspI* adapter ; 5'-GACG ATGAGTCCTGAA-3', 5'-CGTTCAGGACTCATC-3', *SacI* adapter ; 5'-CTCGTAGACTGCGTACAAGCT-3', 5'-TGTACGCAGTCTAC-3')를 ligation 하였고 균주들간의 효과적인 분석을 위해 각각의 selective primer(*EcoRI* selective primer; 5'-GACTGCGTACCAATTCC-3', *MseI* selective primer; 5'-GATGAGTCCTGAG-3', *SacI* selective primer; 5'-AGACTGCGTACAAGCTC-3', *MspI* selective primer; 5'-GATGAG TCCTGAACGGCG-3')를 이용하였는데 ³²P-ATP를 labelling한 *EcoRI* selective primer와 *MseI* selective primer를 사용하여 PCR (13 cycles; 94°C

에서 30초 (denaturation), 65°C에서 30초 (annealing; cycle당 0.7°C씩 온도를 낮춘다), 72°C에서 1분 (extension), 23 cycles; 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분, 94°C 30초)하였고 ^{32}P -ATP를 labelling 한 *SacI* selectiver primer와 *MspI* PCR 한 후 6% aclyamide gel에서 electroporesis 를 실시하였다.

나. AFLP 방법을 이용한 보유 균주들의 유사점, 차이점 등 여러 가지 특징들 연구

분리된 균주들간의 유연관계 및 상관관계를 살펴보기 위해 각 균주들의 DNA에 *MspI*, *SacI* 제한효소들을 처리하고 각각의 제한효소에 맞는 adapter(*MspI* adapter ; 5'-GACGATGAGTCCTGAA-3', 5'-CGTTCAGGACTCATC-3', *SacI* adapter; 5'-CTCGTAGACTGCGTACAAGCT-3', 5'-TGTACGCAGTCTAC-3')를 ligation 하였고 균주들 간의 효과적인 분석을 위한 selective primer로는 *MspI* adapter에 상보적인 single strand로 3' 끝에 CG nucleotide (5'-GATGAGTCCTGAACGGCG-3')가 *SacI* adapter에 상보적인 single strand로 3' 끝에 C nucleotide (5'-AGACTGCGTACAAGCTC-3')를 붙인 primer를 사용하여 PCR (이때 *Sac I* selective primer에 ^{32}P -ATP를 labelling 한 것을 사용)을 한 후 6% aclyamide gel에서 electroporesis를 실시한 후 결과로 나온 fingerprint를 이분법으로 binary 정리한 후 UPGMA 분석법으로 여러 균들의 상관관계를 분석하였다.

다. 효과적인 mating 방법을 통한 많은 수의 transconjugants의 확보

SL341(race 1)에 rifamficin marker를 붙인 후 B broth (rifampicin 50mg/ml 첨가) 에서 20시간 28°C에서 overnight 배양하고 다음날 이 배양액 중 일부를 다시 새 B broth (rifampicin 50mg/ml 첨가) 에 섞은 후 3~4시간 (28°C) 배양한 것(recipient, OD=0.8)과 제작된 SL2029(race 3) library중 100~200 μl 를 LB broth (tetracycline 10mg/ml 첨가)에 잘 혼합한 후 8~9시간 (37°C) 배양한 배양액(donor, OD=0.6)을 동일한 하나의 tube에 넣어 함께 cell을 수거한 후에 0.9% NaCl로 2회 세척한 후 BG 배지 (Peptone 10g,

Casamino acid 1g, Yease extract 1g, Glucose 5g, Agar 15g, DW 1L)에서 mating한 cell들을 24시간 (28℃) 배양한다. 24시간 배양한 후 배양된 세균들은 rifamycin과 tetracycline이 함유된 선택배지에 도말하여 3~4일간 28℃에서 배양하였다.

라. 기주의 병원성 검정을 통한 기주특이성 관련 유전자를 가진 clone 확보

SL341(race 1) 균주와 SL2029 library를 mating해서 나온 1000여개의 transconjugant들을 각각 TZC 배지에서 28℃, 48시간 배양시킨 후에 살균수로 10^8 농도의 균 현탁액을 만든 후 생육중인 7-8 본엽기의 고추 뿌리 근처에 20ml씩 분주한 후 병원균이 접종된 식물을 온실에서 (온도; 20~30℃, 빛; 자연광) 재배하면서 병원성 검정 결과를 30일간 관찰하였다. 그리고 확보된 clone에서 기주특이성에 관련된 유전자를 찾기 위해서 여러 가지 제한효소 (*EcoRI*, *PstI*, *HindIII*)들을 사용하여 제한효소 지도 (restriction map)를 작성하였고 각각의 제한효소로 해당 clone을 작은 크기의 plasmid로 subcloning하였으며 이 subclone들은 broad host range vector인 pLAFR3와 ligation 시켜 다시 SL341에 넣은 후 고추와 감자에 병원성 검정하였다.

3. 기주특이성 관련 유전자 동정 및 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 작성

가. 세균성 풋마름병원균의 기주특이성 관련 유전자의 동정 및 기능 규명

1) 기주특이성 관련 유전자의 동정

세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum*의 기주 특이성에 관련된 유전자를 밝히기 위해서 pRS13을 확보한 후 이 pRS13에서 기주특이성에 관련된 유전자가 존재하는지 알아보기 위해 이 pRS13을 전체 sequencing하여 0.9kb의 염기 서열을 확보한 후 이 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)를 사용하여 유전자를 검색하였다.

2) 기주특이성 유전자의 기능 규명

가) Mutation 및 complementation

확인된 유전자, 즉, 기주 특이성에 관련된 이 *rsal* 유전자의 기능을 밝히기 위해 이 *rsal* 유전자를 Tn3*gusA* mutation 시킨 후에 이 mutation이 된 것을 다시 고추에 병원성 검정을 실시하였고 이 해당 유전자의 기능을 좀 더 명확하게 규명하기 위해서 mutation이 된 유전자에 해당 유전자를 다시 회복시켰을 경우 그 유전자의 기능이 다시 회복되는지 알아보기 위해 mutation이 된 *rsal* 유전자에 다시 *rsal* 유전자를 가진 pRS13을 complementation 시킨 후 상기된 동일 병원성 검정 방법으로 고추와 감자에 병원성 검정을 실시하였다. 그리고 각 균주들의 기주 내에서의 cell 변화를 살펴보기 위해 각 균주들을 28°C, 48시간 배양시킨 후 10⁵으로 세균수를 맞춘 후 상기 병원성 검정 방법으로 고추와 감자에 각 균주들을 접종한 후 2일 간격으로 접종된 고추와 감자 줄기내의 세균수를 측정하였는데 측정하는 방법으로는 우선 접종된 감자와 줄기를 1g 으로 절단한 후 살균수 1ml이 담긴 1.5ml tube에 넣고 고르게 분쇄하여 나온 즙액을 희석하여 배지에 도말한 후 28°C, 48시간 배양시킨 후 나오는 세균수를 계수하였다.

나) Southern blot

기주 특이성 유전자인 *rsal* 유전자가 세균성 풋마름병원균 race 1과 다른 세균들에도 존재하는지 알아보기 위해 국내에서 분리된 *R. solanacearum* race 1과 3 균주들, 외국의 *R. solanacearum* race 1과 3 균주들, *Pseudomonas* spp.과 *Xanthomonas* spp.에 대해서 southern blot을 실시하였는데 우선 각 균주들에서 DNA를 제한효소 (*Pst*I/*Hind*III)로 처리하여 전기영동하고 전기영동한 gel을 nylon membrane에 옮겨서 hybridization을 실시하였다 (65°C, 16시간). 이때 사용된 probe는 Gene Images random primer가 labelling된 pRS13을 이용하였다. hybridization이 끝난 membrane은 2회의 washing과 anti-fluorescein AP 처리로 X-ray film 상에 감광을 하여 결과를 관찰하였다.

다) β -glucuronidase assay

기주 특이성 유전자인 *rsa1* 유전자의 조절 기작을 밝히기 위해 β -glucuronidase assay를 실시하였는데 우선 SL2029(pLAFR3), SL2029 *rsa1::Tn3gusA200*, SL2029 *rsa1::Tn3gusA200*(pRS20, *hrpB*), SL2029 *rsa1::Tn3gusA200*(*hrpB::\Omega*), SL2029 *rsa1::Tn3gusA200*, *hrpB::\Omega* (pRS20)를 MMG 배지 [KH₂PO₄ 13.6g, (NH₄)₂SO₄ 2g, FeSO₄ · 7H₂O 0.5mg, MgSO₄ · 7H₂O solution(MgSO₄ · 7H₂O 24.65g/100ml) 0.2ml, Glutamate 20mM/liter]에서 28 °C, 24시간 배양하여 cell을 수거한 후 GUS extraction buffer [50mM NaH₂PO₄ (pH7.0), 10mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) sodium lauryl sarcosine, 10mM β -mercaptoethanol]에 세균을 현탁하여 sonication한다. sonication하고 난 extract를 원심분리하여 상층액을 수거하여 GUS assay buffer (GUS extraction buffer에 1mM 4-MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide)이 함유된 buffer)에 반응시켜서 fluorescence를 측정하였다.

라) Western blot

세균성 꽃마름병원균의 기주 특이성 유전자인 *rsa1*의 기능을 밝히기 위해 우선 이 유전자에서 발현된 Rsa1 단백질이 병원세균과 식물간의 상호 작용 관계 중에서 어떠한 system으로 분비가 되는지 살펴보기 위해 *rsa1* 유전자를 가진 pRS13을 wild type인 SL2029에 넣은 SL2029(pRS13), *rsa1* mutant인 *rsa1::Tn3gusA200*에 vector만 넣은 *rsa1::Tn3gusA200*(pLAFR3), pRS13을 넣은 *rsa1::Tn3gusA200*(pRS13), 그리고 *hrp* mutant인 *hrcN::Tn3gusA*에 pRS13을 넣은 *hrcN::Tn3gusA*(pRS13), 총 4가지 strain으로 western blot을 실시하였다. 우선 위에서 설명한 4가지 균주들을 tetracycline (10 μ g/ml), congo red (100 μ g/ml)가 함유된 MMG 배지[KH₂PO₄ 13.6g, (NH₄)₂SO₄ 2g, FeSO₄ · 7H₂O 0.5mg, MgSO₄ · 7H₂O solution(MgSO₄ · 7H₂O 24.65g/100ml) 0.2ml, Glutamate 20mM/liter]에서 28°C, 20시간 배양한 후 두 번 원심분리(8000g, 20분)하였다. 원심분리한 cell pellet은 살균수로 두 번 세척한 후 20mM Tris-Cl buffer (pH 8.0)에 현탁하고 sonication하였다. 그리고 배양한 상층액은 bacterial cell을 제거하기 위해

filtering하고 TCA (Trichloroacetic acid)로 배양액을 농축한 후 그 supernatant의 pellet을 ethanol과 acetone으로 각각 3회씩 세척하고 2×sample buffer[0.5M Tris-HCl(pH 6.8) 2ml, glycerol 1.6ml, 10% SDS 3.2 ml, 2-Mercaptoethanol 0.8ml, 0.1% bromophenol blue 0.4ml/8ml]에 배양액의 1000배 농축하여 녹인다. 준비된 각각의 균주들에 대한 배양액에서 나온 단백질과 cell lysate들을 15% SDS-PAGE gel에 electroporesis를 실시하고 PVDF membrane에 transfer 시킨 후에 mouse polyclonal anti-Rsa1 항체 (1차 항체)를 1/5000배 희석하여 반응시키고 2차 항체로 alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-mouse IgG로 western blot을 실시하였고 one-step NBT/BCIP solution으로 각각의 signal을 detection하였다.

마) N-terminal sequencing

Rsa1 단백질을 발현시켜서 (28℃, 12시간 배양) 얻은 배양 상층액을 Ni-NTA Superflow Columns를 사용하여 순수 정제한 후 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) 하고 polyninylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 후 coomassie blue R-250으로 염색하여 육안으로 관찰되는 band (Rsa1 단백질을) 절취하여 Biosystems 477A automatic sequencer로 세포 외부로 분비되는 Rsa1 단백질의 아미노산 sequence를 분석하였다.

나. AFLP 방법을 통한 유전적 다양성 연구를 UPGMA 방법으로 결과 해석

1997년부터 2005년까지 전국적으로 채집된 478개의 세균성 꽃마름병원균중에서 기주, biovar, 지역적 분포를 달리하는 106개의 한국 균주와 16개의 외국균주(4개의 일본균주, 1개의 가이아나 균주, 세계 각 지역 (콜롬비아, 짐바브웨이, 미국, 이스라엘, 트리니다드, 포르투갈, 브라질, 키프로스, 스웨덴, 영국, 피지)에서 수집된 11개의 LMG 균주들)를 대표균주로하여 각 병원균들의 유연관계를 AFLP 방법으로 살펴보았다. 먼저 각 균주들의 genomic DNA (100ng)를 1 unit의 *MspI*, 1 unit의 *SacI* 제한효소, 2 μ l의 10 × OPA buffer[500mM potassium acetate, 100mM magnesium acetate,

100mM Tris-acetate (pH 7.5)], *MspI* adapter (50 pmol; 5'-GACGATGAG TCCTGAA-3', 5'-CGTTCAGGACTCATC-3'), *SacI* adapter (5 pmol; 5'-CTCGTAGACTGCGTACAAGCT-3', 5'-TGTACGCAGTCTAC-3'), 35 unit의 T4 DNA ligase, 2 μ l의 10 \times T4 DNA ligase buffer를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 처리한 후 10배 희석하여 selective primer를 이용한 PCR에 template로 사용하였다. 균주들 간의 효과적인 분석을 위한 selective primer로는 *Msp I* adapter에 상보적인 single strand로 3' 끝에 CG nucleotide (5'-GATGAGTCCTGAACGGCG-3')가 *SacI* adapter에 상보적인 single strand로 3' 끝에 C nucleotide (5'-AGACTGCGTACAAGCTC-3')를 붙인 primer를 사용하였다. selective primer를 사용한 PCR방법으로는 우선 각 균주들의 DNA에 *MspI* adapter과 *SacI* adapter를 반응시키고 희석한 DNA 1.3 μ l, 0.5 μ l의 10 \times AFLP buffer(500mM KCl, 100mM Tris-Cl[pH 7.0], 15mM MgCl₂, 1% Triton-X 100), ³²P-ATP를 labelling 한 *SacI* selective primer 3.475 ng, 7.54 ng *MspI* selective primer, 0.125 unit의 Taq polymerase 첨가하여 PCR (13 cycles; 94 $^{\circ}$ C에서 30초(denaturation), 65 $^{\circ}$ C에서 30초(annealing; cycle당 0.7 $^{\circ}$ C씩 온도를 낮춘다), 72 $^{\circ}$ C에서 1분(extension), 23 cycles; 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초 (cycle당 0.7 $^{\circ}$ C씩 온도를 낮춘다), 72 $^{\circ}$ C에서 1분, 94 $^{\circ}$ C 30초)하여 6% aclyamide gel에서 electroporesis를 실시 (AFLP)하였다. 그 결과로 나온 150-1000 bp의 각각의 fingerprint를 이분법으로 binary 정리한 후 NYSYS-pc의 unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) 분석법으로 여러 균들의 상관관계를 분석하였다.

다. 국내의 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 꽃마름병원균의 레이스 분포지도 작성

국내의 9개 각 도의 90개 지역과 9개의 기주에서 분리된 478개의 세균성 꽃마름병에 대한 이해를 위해 AFLP 분석에 의한 각 균주들의 유연관계, 병원성등과 결부하여 분포도를 작성하였다.

제 2 절 연구개발 결과

1. 전국적으로 다양한 기주에서 세균성 풋마름병원균 균주 확보와 각 race 대표 균주의 선발 및 library 제작

가. 다양한 세균성 풋마름병원균 균주 확보

1997년부터 2005년까지 전국적으로 채집된 세균성 풋마름병원균 수는 총 478개이며 각 지역 및 기주별로 살펴보면 경기도에서 토마토, 고추, 가지, 담배, 파프리카, 참깨, 해바라기에서 39개의 세균성 풋마름병원균이 분리가 되었고 강원도에서는 토마토, 고추, 가지, 담배에서 78개의 균주가 충청도에서는 토마토, 고추, 가지, 담배, 참깨에서 66개의 균주가 전라도에서는 토마토, 고추, 감자, 가지에서 101개의 균주가 경상도에서는 토마토, 고추, 감자, 가지, 담배, 파프리카, 땅콩에서 105개의 균주가 제주도에서는 토마토, 감자에서 88개의 균주가 분리가 되었다 (표 1).

표 1. 국내 *R. solanacearum* 균주

지역	기주	Biovar	Race	균주수
경기도	토마토	3	1	1
		4	1	18
	고추	3	1	1
		4	1	8
	가지	4	1	3
	담배	3	1	1
	파프리카	3	1	3
	참깨	4	1	3
해바라기	4	1	1	
강원도	토마토	4	1	31
	고추	3	1	4
	4	1	37	
	가지	3	1	3
	담배	3	1	3
충청도	토마토	3	1	4
		4	1	16
	고추	3	1	7
	4	1	34	
	가지	3	1	1
	담배	3	1	2
	참깨	3	1	1
4	1	1		
전라도	토마토	2	3	2
		4	1	6
	고추	3	1	1
	4	1	12	
	2	3	4	
	감자	3	1	7
	4	1	67	
가지	4	1	2	
경상도	토마토	3	1	2
		4	1	23
	고추	4	1	24
	2	3	9	
	감자	3	1	3
	4	1	33	
	가지	4	1	2
	담배	3	1	3
파프리카	4	1	5	
땅콩	4	1	1	
제주도	토마토	1	1	1
		2	3	2
	1	1	2	
	감자	2	3	21
		3	1	9
4	1	54		
계				478

나. 세균성 풋마름병원균의 race 및 biovar 분류

분리된 총 478개의 세균성 풋마름병원균 중에서 biovar 1은 3개, biovar 2는 38개, biovar 3는 56개, biovar 4는 381개로 분류가 되었으며 biovar N2 균주들은 분리가 되지 않았다 (표 2). 각 biovar 균주들의 병원성을 토마토, 고추, 감자에서 살펴보면 우선 biovar 1균주들은 토마토와 감자에서 병원성을 나타냈고 고추에서는 약한 병원성을 보였다. 그리고 biovar 2 균주들은 감자와 토마토에서만 병원성을 나타냈고 고추에서는 병원성을 전혀 보이지 않았다. 모두 56개의 biovar 3 균주들 중에서 48개의 biovar 3 균주들은 토마토, 고추, 감자에 모두 병원성을 보였으며 5개의 biovar 3 균주들은 토마토와 고추에서만 병원성을 보이고 감자에는 병원성을 보이지 않았으며 3개의 biovar 3 균주들은 토마토에 병원성이고 감자에 약 병원성이나 고추에는 전혀 병원성을 보이지 않은 결과를 보였다. 그리고 전국적으로 가장 널리 분포하는 총 381개의 biovar 4 균주들중 356개의 biovar 4 균주들은 토마토, 고추, 감자에 모두 병원성을 나타냈고 16개의 biovar 4 균주들은 토마토와 감자에만 병원성을 보이고 고추에는 병원성을 보이지 않았으며 나머지 9개의 biovar 4 균주들은 토마토와 감자에 병원성, 고추에는 약한 병원성을 보였다. 이런 특징으로 볼 때 biovar 1, 3, 4 균주들은 모두 race 1으로 분류가 되었고 감자와 토마토에서만 병원성을 나타냈고 고추에서는 병원성을 전혀 보이지 않은 biovar 2 균주들은 race 3로 분류가 되었다. 이 결과는 분리된 세균성 풋마름병원균중 92%가 race 1이며 이 race 1 균주들중에서 85%가 토마토, 고추, 감자에 높은 병원성을 보인다는 것을 의미한다.

다. 세균성 풋마름병원균 각 race의 대표 균주 선발

1997년부터 2005년까지 전국적으로 여러 작물에서 채집된 총 478개의 병원균들 중에서 고추에서 100% 병원성을 일으키고 감자에서 병을 전혀 일으키지 않는 SL341 균주를 race 1의 대표균주로 선발하였고 감자에서 100% 병원성을 일으키고 고추에서 병을 일으키지 않는 SL2029균주를 race 3균주의 대표균주로 선발하였다 (표 3과 4, 그림 2).

표 2. *R. solanacearum* 균주들의 biovar 검정

균주	탄소원 ^a						Biovar
	Maltose	Lactose	Cellobiose	Mannitol	Sorbitol	Dulcitol	
SL312	+	+	+	+	+	+	3
SL341	+	+	+	+	+	+	3
SL467	-	-	-	+	+	+	4
SL535	-	-	-	+	+	+	4
SL740	-	-	-	+	+	+	4
SL882	+	+	+	+	+	+	3
SL1020	-	-	-	+	+	+	4
SL1081	-	-	-	+	+	+	4
SL1172	+	+	+	+	+	+	3
SL1737	-	-	-	+	+	+	4
SL1870	+	+	+	+	+	+	3
SL1924	-	-	-	+	+	+	4
SL1977	+	+	+	+	+	+	3
SL1985	+	+	+	+	+	+	3
SL2025	+	+	+	+	+	+	3
SL2029	+	+	+	-	-	-	2
SL2078	+	+	+	-	-	-	2
SL2214	-	-	-	+	+	+	4
SL2249	-	-	-	-	-	-	1
SL2308	+	+	+	-	-	-	2
SL2313	+	+	+	-	-	-	2
SL2664	+	+	+	+	+	+	3
SL2729	-	-	-	+	+	+	4
SL3405	-	-	-	+	+	+	4
SL3428	-	-	-	-	-	-	1
SL3505	-	-	-	+	+	+	4
SL3702	-	-	-	+	+	+	4
SL3730	-	-	-	+	+	+	4
SL3781	-	-	-	+	+	+	4
SL3791	-	-	-	+	+	+	4
SL3809	-	-	-	+	+	+	4

표 2.

균주	탄소원 ^a						Biovar
	Maltose	Lactose	Cellobiose	Mannitol	Sorbitol	Dulcitol	
TW7	-	-	-	+	+	+	4
TW12	-	-	-	+	+	+	4
TW22	+	+	+	+	+	+	3
TW31	-	-	-	+	+	+	4
TW43	-	-	-	+	+	+	4
TW64	-	-	-	+	+	+	4
TW103	-	-	-	+	+	+	4
PAW1	-	-	-	+	+	+	4
PAW4	-	-	-	+	+	+	4
PAW7	-	-	-	+	+	+	4
PW7	-	-	-	+	+	+	4
PW15	-	-	-	+	+	+	4
PW41	-	-	-	+	+	+	4
PW93	-	-	-	+	+	+	4
PW104	-	-	-	+	+	+	4
PW134	-	-	-	+	+	+	4
PW147	-	-	-	+	+	+	4
EW2	-	-	-	+	+	+	4
EW4	+	+	+	+	+	+	3
EW8	-	-	-	+	+	+	4
POW8	-	-	-	+	+	+	4
POW33	-	-	-	+	+	+	4
POW44	-	-	-	+	+	+	4
POW57	-	-	-	+	+	+	4
POW58	-	-	-	+	+	+	4
POW89	+	+	+	-	-	-	2
POW96	+	+	+	-	-	-	2
POW106	-	-	-	+	+	+	4
SW1	-	-	-	+	+	+	4
SEW2	-	-	-	+	+	+	4
PEW1	-	-	-	+	+	+	4

^a 해당 탄소원을 이용하였을 경우는 +, 이용하지 않았을 경우는 -로 표시하였다.

표 3. *R. solanacearum* 균주들의 병원성

균주	지역	기주	Biovar	병원성 검정 ^a		
				토마토	고추	감자
SL312	경기도, 광주	토마토	3	+++	+++	++
SL341	경상북도, 김천	토마토	3	+++	+++	-
SL467	경기도, 여주	가지	4	+++	+++	+++
SL535	충청북도, 진천	토마토	4	+++	++	++
SL740	충청북도, 음성	토마토	4	+++	++	++
SL882	충청북도, 보은	가지	3	+++	++	++
SL1020	경기도, 수원	토마토	4	+++	++	++
SL1081	강원도, 철원	토마토	4	+++	+	+
SL1172	충청북도, 충주	토마토	3	++	++	+
SL1737	전라남도, 보성	토마토	4	+++	-	+
SL1870	제주도, 남제주	감자	3	+++	+++	+++
SL1924	경기도, 수원	토마토	4	+++	++	+
SL1977	경상북도, 영일	담배	3	+++	-	+
SL1985	충청북도, 청원	고추	3	+++	++	+
SL2025	충청남도, 보령	참깨	3	+++	++	++
SL2029	제주도, 남제주	감자	2	+	-	+++
SL2078	제주도, 남제주	감자	2	++	-	+++
SL2214	제주도, 북제주	감자	4	+++	++	+++
SL2249	제주도, 남제주	감자	1	+++	+	+++
SL2308	전라남도, 담양	토마토	2	++	-	+++
SL2313	경상남도, 남해	감자	2	++	-	+++
SL2664	전라남도, 보성	감자	3	+++	+	+++
SL2729	경상남도, 밀양	감자	4	+++	++	+++
SL3405	경상북도, 영천	토마토	4	+++	++	+++
SL3428	제주도, 남제주	토마토	1	+++	+	+++
SL3505	경상남도, 창녕	고추	4	+++	++	+++
SL3702	경기도, 여주	가지	4	+++	+	+++
SL3730	전라남도, 무안	감자	4	+++	+	+++
SL3781	경상남도, 밀양	감자	4	+++	++	+++
SL3791	제주도, 북제주	감자	4	+++	++	+++
SL3809	제주도, 남제주	감자	4	+++	++	+++

표 3.

균주	지역	기주	Biovar	병원성 검정 ^a		
				토마토	고추	감자
TW7	충청북도, 홍성	토마토	4	+++	++	++
TW12	전라북도, 정읍	토마토	4	+++	+	++
TW22	충청남도, 논산	토마토	3	+++	++	+
TW31	경상남도, 하동	토마토	4	+++	++	+++
TW43	전라북도, 김제	토마토	4	+++	++	+++
TW64	경상북도, 구미	토마토	4	+++	++	+++
TW103	강원도, 양구	토마토	4	+++	+	+++
PAW1	전라남도, 화순	파프리카	4	+++	+	++
PAW4	경상남도, 통영	파프리카	4	+++	+	++
PAW7	경상남도, 마산	파프리카	4	+++	+	++
PW7	강원도, 홍천	고추	4	+++	++	++
PW15	전라북도, 괴산	고추	4	+++	++	+++
PW41	전라남도, 함평	고추	4	+++	++	+++
PW93	경기도, 안성	고추	4	+++	+++	+++
PW104	충청북도, 음성	고추	4	+++	+++	+++
PW134	경상북도, 영주	고추	4	+++	+++	+++
PW147	경기도, 강화	고추	4	+++	++	++
EW2	전라남도, 나주	가지	4	+++	+	+
EW4	강원도, 홍천	가지	3	++	+++	+
EW8	경상남도, 거제	가지	4	+++	+	++
POW8	전라남도, 무안	감자	4	+++	+++	+++
POW33	전라남도, 영암	감자	4	+++	++	+++
POW44	경상남도, 밀양	감자	4	+++	++	+++
POW57	전라남도, 완도	감자	4	+++	++	+++
POW58	전라남도, 해남	감자	4	+++	+	+++
POW89	제주도, 남제주	감자	2	++	-	+++
POW96	제주도, 북제주	감자	2	++	-	++
POW106	제주도, 남제주	감자	4	+++	++	+++
SW1	경기도, 평택	해바라기	4	+++	++	++
SEW2	경기도, 연천	참깨	4	+++	++	+++
PEW1	경상북도, 칠곡	땅콩	4	+++	+	+++

^a 병원균을 토마토, 고추, 감자에 접종한 후 30일 후에 조사한 것이다.

표 4. *R. solanacearum* race 1과 race 3 대표 균주의 특징

균주	지역	기주	병원성 검정 ^a			Biovar	Race
			토마토	고추	감자		
SL341	경상도	토마토	+++	+++	-	3	1
SL2029	제주도	감자	+++	-	+++	2	3

^a 병원성 검정은 병원균 접종 후 30일 후에 조사한 것으로 다음의 수치를 나타낸다; - = 무병징, + = 25% 풋마름 증상, ++ = 50% 풋마름 증상, +++ = 75% 이상의 풋마름 증상.

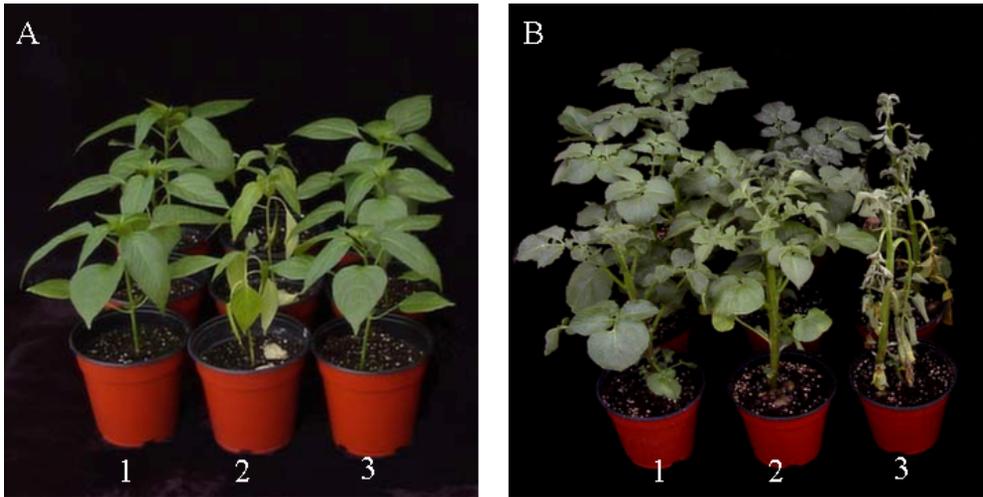


그림 2. 세균성 풋마름병원균 *R. solanacearum* race 1(SL341)과 race 3(SL2029)의 병원성 검정 (A; 고추, B; 감자, 1; Control, 2; SL341, 3; SL2029, 접종후 21일째의 풋마름 증상)

라. 대표 race 균주의 library 제작

대표 균주로 선발된 race 1균주인 SL341과 race 3균주인 SL2029 균주의 genomic DNA를 분리한 후 broad host range vector인 pLAFR3를 이용하여 library를 총 10ml (1.2×10^7 /ml) 제작하여 -70°C 에 보관하였으며 다양한 유전자 확보를 위한 DNA pattern을 관찰하기 위해 *EcoR* I 제한효소로 digestion하여 library의 다양성을 확인하였다 (그림 3).

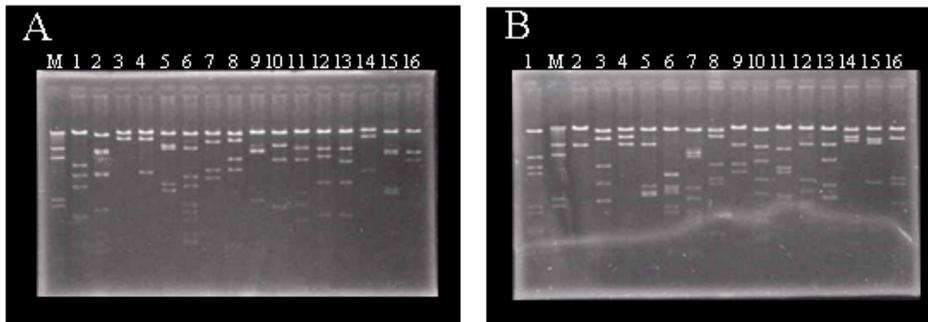


그림 3. *R. solanacearum* SL341(race 1, A)와 SL2029(race 3, B) genomic library clone들을 (1-16) *EcoRI*으로 digestion한 결과, M; lambda-HindIII marker.

2. 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균 균주들간의 비교 및 기주 특이적인 유전자를 가진 유전자 clone 확보

가. AFLP 방법에 효과적인 primer의 선발

국내 여러 지역과 여러 기주에서 분리된 세균성 풋마름병원균의 유연관계를 효과적으로 분석하기 위해 AFLP 방법에 필요한 restriction enzyme (*EcoRI* 과 *MseI* 조합, *MspI*과 *SacI*조합)과 각 제한효소에 맞는 adapters (*EcoRI* adapter과 *MseI* adapter 조합, *MspI* adapter와 *SacI* adapter 조합), 그리고 selective primer (*EcoRI* selective primer와 *MseI* selective primer 조합, *MspI* selective primer와 *SacI* selective primer 조합)를 각각 사용하여 AFLP를 한 결과 *EcoRI*과 *MseI*조합에서는 fingerprint상의 band들이 몇 개밖에 존재하지 않는 등 이 병원균들의 유연관계를 분석할 수 있는 결과를 보이지 않은 반면 *MspI*과 *SacI*조합을 이용한 AFLP는 race 1과 race 3의 특징적인 band들이 관찰 되는 등 이 병원균들의 유전학적 유연관계를 살펴보면 더 유용하게 사용되었다. 이 조합을 이용해서 1997년부터 현재까지 채집한 국내 여러 지역과 다양한 작물들에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 유전학적 유연관계를 살펴보면 유용하게 분석할 수 있을 것으로 생각 된다 (그림 4).

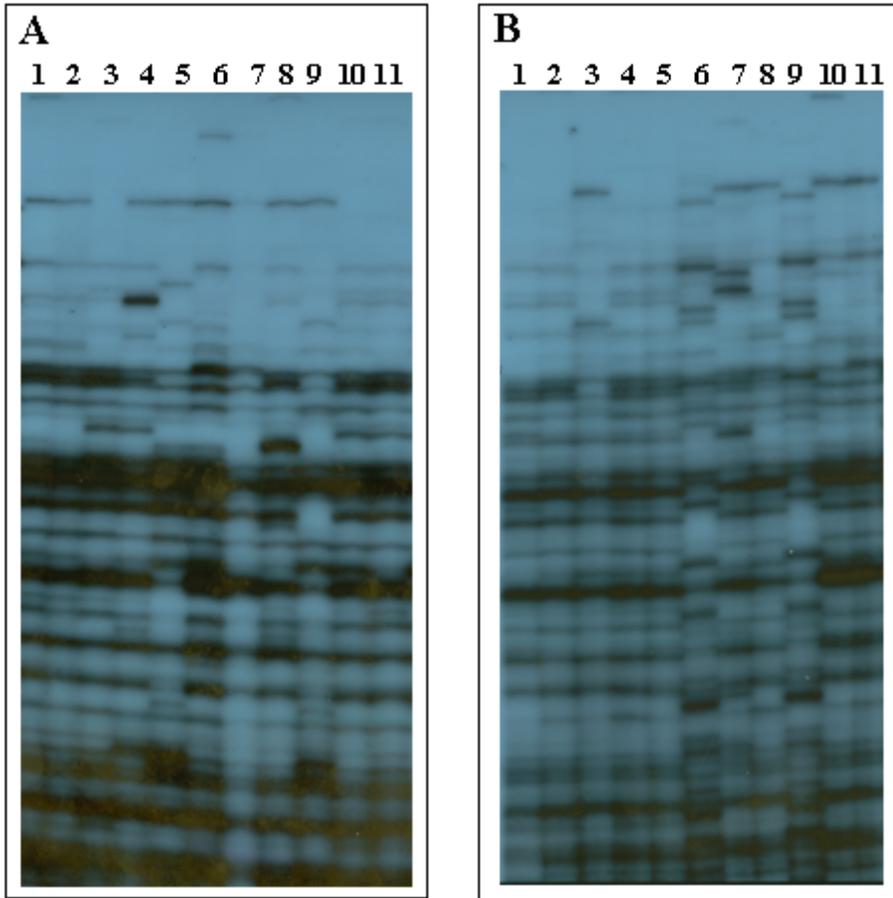


그림 4. *Msp* I 과 *Sac* I primer 조합을 이용한 AFLP fingerprints. A; race 1 균주 (1; SL2327, 2; SL2330, 3; SL2543, 4; SL2610, 5; SL3075, 6; SL3102, 7; SL3103, 8; SL3108, 9; SL3112, 10; SL3116, 11; SL3150), B, race 3 균주 (1; SL2249, 2; SL2251, 3; SL2029, 4; SL2263, 5; SL2264, 6; SL2268; 7; SL2274, 8; SL2280, 9; SLL2280, 10; SL2282, 11; SL2308)

나. AFLP 방법에 의한 세균성 풋마름병원균 균주들의 특징

1997년부터 전국 여러 지역과 여러 작물들에서 분리된 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 및 보유 균주들의 유연관계를 살펴보기 위해 위에서 언급한 선택적 primer로 PCR 하여 나온 AFLP를 각 채집 균주들에 대해서 비교해 본 결과 race 별로 크게 차이를 보였는데 특히 race 3에서만

존재하는 band를 관찰 할 수 있었다. 이 race 3에서만 존재하는 특이적인 band는 race 1에서는 존재하지 않았으며 이 특이적인 band를 제외하고는 race 1과 race 3간에 서로 유사한 위치의 band들이 존재하였다 (그림 5). 이 결과를 토대로 UPGMA 분석법을 사용하여 분석한 결과 5개의 AFLP cluster로 분류가 되었는데 (그림 6) 제 I cluster는 강원도, 충청도, 전라도 지역, 경상도 지역의 토마토, 고추, 감자 이병식물에서 분리된 병원균들로 비교적 다른 cluster들보다 다양한 지역, 다양한 기주에서 분리가 되었으며 여러 가지 작물들 (토마토, 고추, 감자, 담배)에 모두 병원성을 나타내는 biovar 3과 biovar 4, race 1이었다. 이 cluster에 속하는 병원균들은 경기도, 제주도를 제외하고 전국적으로 고른 분포를 하며 국내에서 재배되는 거의 모든 가지과 작물에 세균성 풋마름병을 일으키는 광범위한 기주범위를 가지는 균주들로 이루어졌음을 알 수 있었다. 그리고 제 II cluster는 충청도, 전라도, 경상도 지역의 세균성 풋마름 증상의 토마토, 고추, 감자에서 분리된 병원균들로 지리학적으로 볼 때 중부지역에 주로 분포를 하였으며 제 I cluster와 마찬가지로 biovar 3, 4로 구성된 race 1 이었으나 담배를 제외한 가지과 작물인 토마토, 감자, 고추에 병을 유발해 제 I cluster와는 차이는 병원성 결과를 나타냈다. 제 III cluster는 경기도, 강원도, 충청도, 경상도 지역의 토마토 재배지에서만 분리된 것으로 이 특징은 다른 두 cluster (I, II)와 구별되는 큰 특징이 되었고 제 1, 2 cluster와 유사하게 토마토, 감자, 고추에 병을 일으키는 biovar 3, biovar 4, race 1으로 구성되었다. 제 1, 2, 3 cluster는 모두 토마토, 감자, 고추에 병을 일으키는 biovar 3, biovar 4, race 1 으로 구성되었지만 서로의 cluster 간에는 약 75%의 유사관계를 보여 생태(기주 범위), 생리적인 면이 유사하지만 유전학적 측면에서 다소 차이가 나는 cluster들로 생각된다. 그리고 제 IV cluster는 전라도, 경상도 지역의 감자 재배지에서만 분리된 것으로 biovar 4이면서 race 1인 균주들로 구성되어 감자 cluster라고 볼 수 있었다. 이 제 IV cluster에 속하는 병원균들이 다른 cluster와는 다르게 지역적으로 남부지방에 주로 분포하는 것은 특정 작물(감자)을 재배하는 재배지의 환경적인 영향을 받은 것으로 생각된다. 그리고 마지막 제 V cluster는 전라도, 경상도, 제주도의 감자에서 분리된 병원균들로 다른 제 1, 2, 3, 4 cluster와는 전혀 다른 생태, 생리적인

측면을 소유하였다. 즉, 기주 범위도 토마토와 감자에 제한이 되어 있었고 지역도 전라도 남부와 경상도 남부, 제주도 지역에서만 분포를 하였다. 이 병원균들이 제 4 cluster와 다른 점은 전라도와 경상도 지역 및 제주도 지역 까지 분포를 한다는 것인데 중요한 생태적 특징인 기주 범위가 토마토, 감자라는 사실이다. 이 특징은 race 1과는 같은 세균성 풋마름병을 일으키지만 race 1과의 유전학적 유연관계가 약 60%밖에 되지 못하는 race 3를 구별하는 고유 특징이 되며 이 유전학적 유연관계를 결정짓는 이 AFLP 분석은 유연관계가 복잡한 세균성 풋마름병원균을 특징짓는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 재분석해보면 국내에서 분리된 균주들 간의 연관관계는 기주와 지역이 중요한 요인이 되고 특히 같은 감자에서 분리된 균주들이라 하더라도 race 1과 race3간의 유연관계가 약 60%정도밖에 되지 않아 국내의 race 1과 race 3 균주들 간의 유전학적 유연관계가 먼 것으로 생각된다. 그리고 국내 재배환경측면에서 볼 때 가을 감자보다는 봄 감자를 많이 재배하는 남부지방에서는 race 3에 의한 감자 풋마름병의 발생이 더 증가할 것으로 추측이 된다.

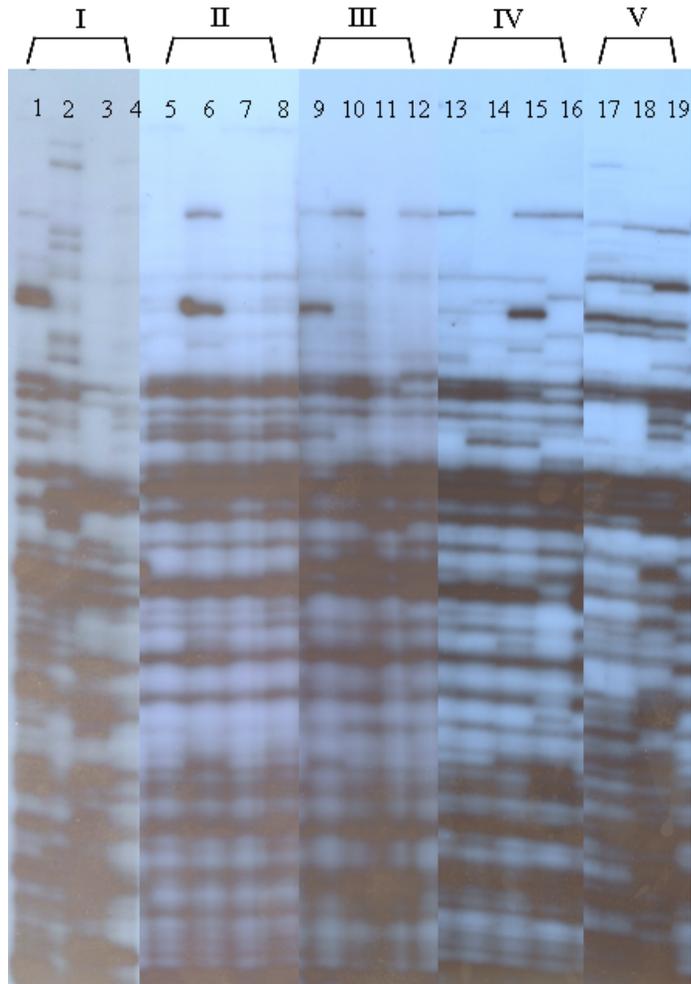


그림 5. AFLP fingerprints. Lanes: 1; GMI1000, biovar 3, race 1, 2; SL2025, biovar 3, race 1, 3; SL2330, biovar 4, race 1, 4; POW15, biovar 3, race 1, 5; POW25, biovar 4, race1, 6; TW38, biovar 4, race 1, 7; POW29, biovar 4, race 1, 8; POW1, biovar 4, race 1, 9; SL341, biovar 3, race 1, 10; TW29, biovar 4, race 1, 11; SL1020, biovar 4, race 1, 12; TW24, biovar 4, race 1, 13; POW47, biovar 4, race 1, 14; POW55, biovar 4, race 1, 15; POW70, biovar 4, race 1, 16; POW51, biovar 4, race 1, 17; SL2029, biovar 2, race 3, 18; SL2316, biovar 2, race3, 19; SL2317, biovar 2, race 3, 로마 숫자(I ~ V)는 AFLP cluster들을 표시한 것이다.

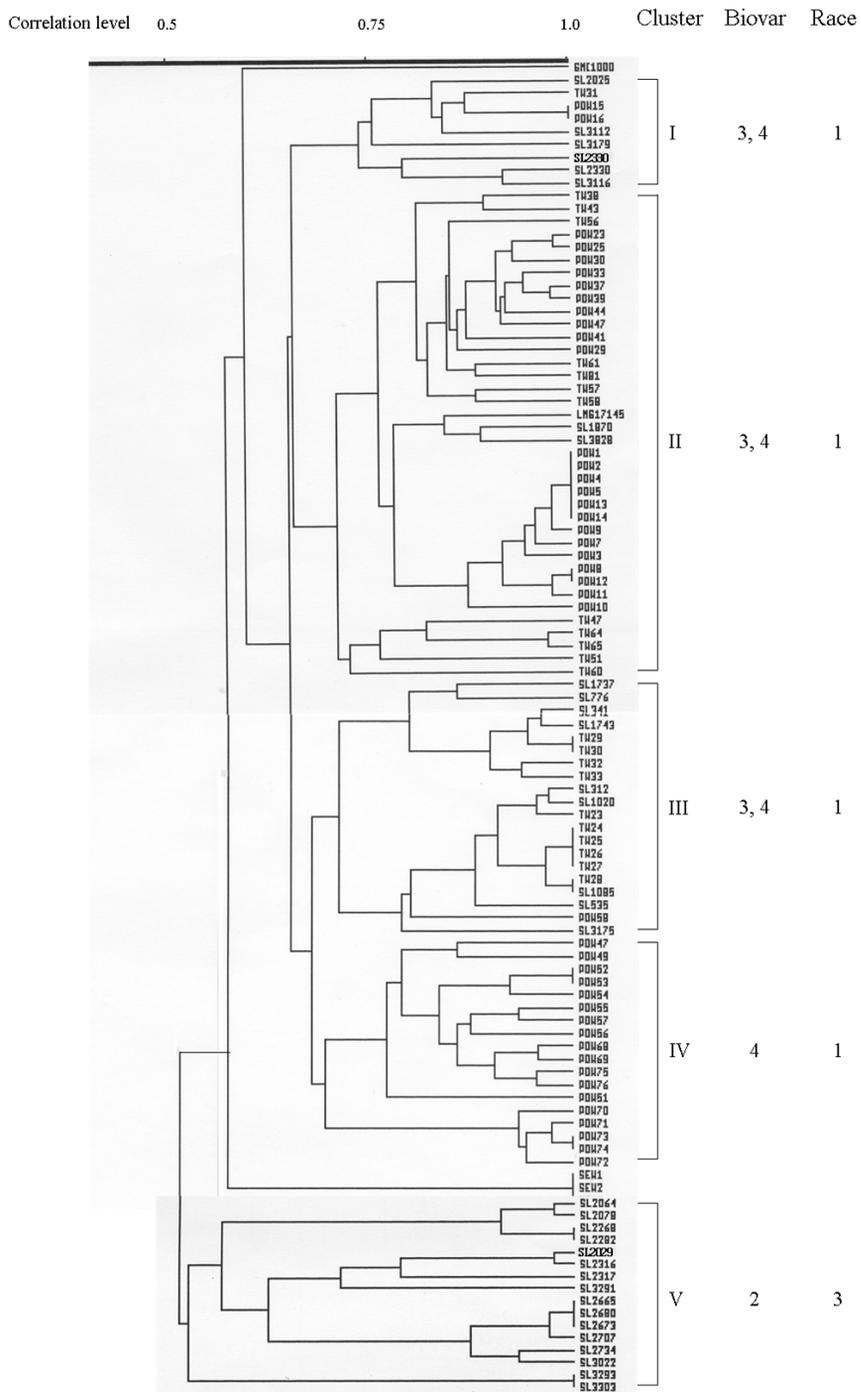


그림 6. *R. solanacearum* 균주들의 UPGMA 분석법을 이용한 유연관계도; 로마 숫자는 AFLP cluster들을 표시한 것이다.

다. 효과적인 mating 방법을 통한 많은 수의 transconjugants의 확보

SL341(race 1)과 SL2029 library를 mating하여 선택배지에서 생장한 transconjugant들을 약 1000개 정도 획득하였으며 이들 중에서 일부를 선발해서 DNA를 확인 한 결과 다양한 plasmid (SL2029의 DNA)의 존재를 확인할 수 있었다 (그림 7).

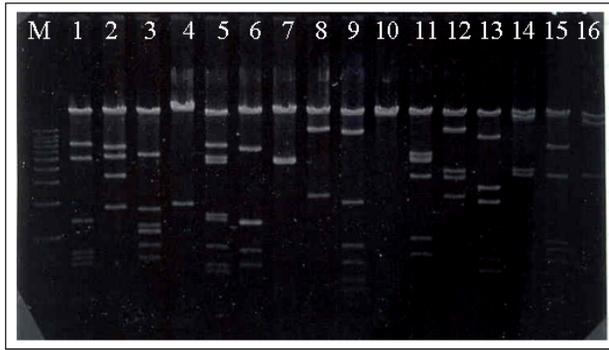


그림 7. *R. solanacearum* SL341(race 1)과 SL2029 (race 3) genomic library를 mating하여 나온 clone들을 (1-16) *EcoRI*으로 digestion한 결과, M; Kb marker.

라. 기주 병원성 검정을 통한 기주특이성 관련유전자를 가진 clone의 확보

SL341(race 1) 균주와 SL2029 library를 mating해서 나온 1000여개의 transconjugant들을 고추에 병원성 검정을 한 결과 병원균 접종 후 6일째부터 SL341은 고추에 병을 일으키기 시작해서 30일째에는 고추가 전체적으로 다 시들어서 죽은 반면 SL2029를 접종한 고추에서는 접종 후 30일까지 아무런 증상을 나타내지 않았다 (살균수를 접종한 control과 마찬가지로 증상). 그리고 SL341(race 1) 균주와 SL2029 library를 mating해서 나온 1000여개의 transconjugant들 중에서 SL341(pJ372)가 접종된 고추에서는 접종한 지 30일이 지나도록 아무런 증상을 일으키지 않았다 (표 5). 이는 고추에 병을 일으키지 않는 SL2029와 동일한 증상이었다. 그리고 이 clone이 고추의 기주 인식에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어 pRS1으로 재명명한

후 여러 가지 restriction enzyme들을 사용하여 restriction map을 작성하였고 그 map에 따라 subcloning하고 각 subclone들을 다시 고추에 접종하여 고추에 병을 일으키지 않는 subclone을 확보하였다; pRS13 (그림 8, 9, 10, 표 6).

표 5. SL2029 library clone을 가진 SL341의 병원성 검정

Strain	병원성 검정 ^a	Strain	병원성 검정 ^a
Control	-	SL341(pJ297)	+++
SL341	+++	SL341(pJ302)	+
SLL2029	-	SL341(pJ321)	+++
SL341(pJ1)	+++	SL341(pJ342)	+++
SL341(pJ16)	+++	SL341(pJ352)	++
SL341(pJ21)	+++	SL341(pJ372)	-
SL341(pJ34)	+++	SL341(pJ407)	++
SL341(pJ45)	+++	SL341(pJ412)	+++
SL341(pJ68)	++	SL341(pJ438)	+++
SL341(pJ90)	+++	SL341(pJ455)	+++
SL341(pJ115)	+++	SL341(pJ462)	+++
SL341(pJ124)	+++	SL341(pJ471)	+++
SL341(pJ146)	++	SL341(pJ491)	+++
SL341(pJ167)	+++	SL341(pJ504)	+++
SL341(pJ180)	+++	SL341(pJ518)	+++
SL341(pJ193)	+++	SL341(pJ525)	+++
SL341(pJ202)	+++	SL341(pJ547)	+++
SL341(pJ226)	+++	SL341(pJ558)	+++
SL341(pJ249)	+++	SL341(pJ578)	+++
SL341(pJ251)	+++	SL341(pJ565)	+++

표 5.

Strain	병원성 검정 ^a	Strain	병원성 검정 ^a
SL341(pJ597)	+++	SL341(pJ805)	+++
SL341(pJ602)	+++	SL341(pJ808)	+
SL341(pJ617)	+++	SL341(pJ810)	+++
SL341(pJ628)	+++	SL341(pJ811)	+++
SL341(pJ632)	+++	SL341(pJ822)	+
SL341(pJ645)	+++	SL341(pJ831)	+++
SL341(pJ658)	+++	SL341(pJ842)	+++
SL341(pJ669)	+++	SL341(pJ852)	++
SL341(pJ688)	+++	SL341(pJ868)	+++
SL341(pJ694)	+++	SL341(pJ877)	++
SL341(pJ700)	+++	SL341(pJ882)	+++
SL341(pJ704)	+++	SL341(pJ898)	+++
SL341(pJ716)	++	SL341(pJ905)	+++
SL341(pJ729)	++	SL341(pJ912)	+++
SL341(pJ737)	+++	SL341(pJ921)	+++
SL341(pJ743)	+++	SL341(pJ931)	+++
SL341(pJ762)	+++	SL341(pJ944)	+++
SL341(pJ777)	+++	SL341(pJ958)	+++
SL341(pJ789)	+++	SL341(pJ965)	+++
SL341(pJ790)	+++	SL341(pJ977)	+++
SL341(pJ799)	++	SL341(pJ988)	+++
SL341(pJ803)	+++	SL341(pJ999)	+++

^a 병원성 검정은 병원균을 고추에 접종한 후 30일 후에 조사한 것으로 다음의 수치를 나타낸다; -: 무병징, +: 25% 풋마름 증상, ++: 50% 풋마름 증상, +++: 75% 이상의 풋마름 증상.

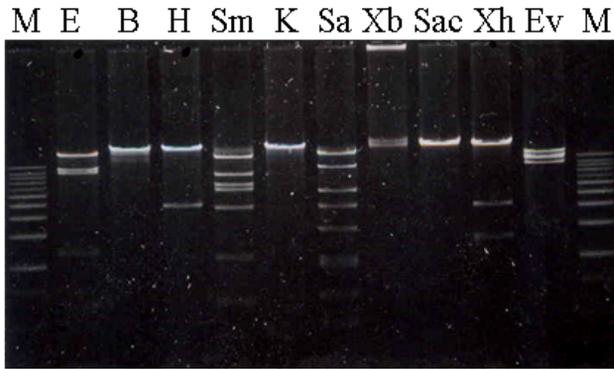


그림 8. Cosmid인 pRS1을 여러 가지 제한효소로 처리한 결과 (M; Kb marker, E; *EcoRI*, B; *Bam*HI, H; *Hind*III, Sm; *Sma*I, K; *Kpn*I, Sa; *Sal*I, Xb; *Xba*I, Sac; *Sac*I, Xh; *Xho*I, Ev; *EcoRV*)

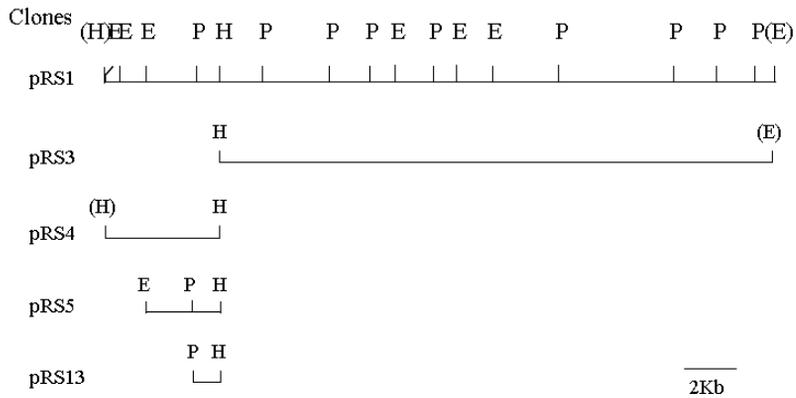


그림 9. SL2029 library clone의 restriction map (H; *Hind*III, E; *EcoRI*, P; *Pst*I).

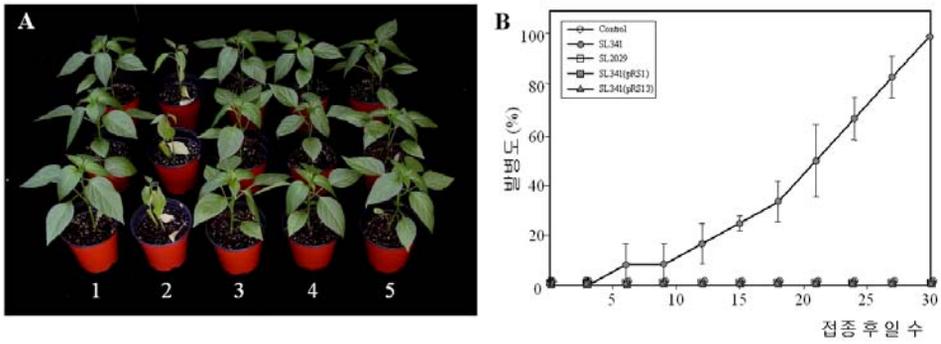


그림 10. A, 고추에서 병원성 검정. 1; Control, 2; SL341, 3; SL2029, 4; SL341(pRS1), 5; SL341(pRS13). B, 병발생 진전도.

표 6. SL2029 library clone 및 subclone을 가진 SL341의 병원성

Strain	병원성 검정 ^a
Control	-
SL341	+++
SL2029	-
SL341(pRS1)	-
SL341(pRS3)	+++
SL341(pRS4)	-
SL341(pRS5)	-
SL341(pRS13)	-

^a 병원성 검정은 병원균을 고추에 접종한 후 30일 후에 조사한 것으로 다음의 수치를 나타낸다; -: 무병징, +: 25% 꽃마름 증상, ++: 50% 꽃마름 증상, +++: 75% 이상의 꽃마름 증상.

3. 기주특이성 관련 유전자 동정 및 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 꽃마름병원균의 레이스 분포지도 작성

가. 세균성 꽃마름병원균의 기주특이성 관련 유전자의 동정 및 기능 규명

1) 기주특이성 관련 유전자의 동정

세균성 꽃마름병원균인 *R. solanacearum*의 기주 특이성에 관련된 유전자를 밝히기 위해서 상기의 방법들로 pRS13을 확보한 후 이 pRS13에서 기주특이성에 관련된 유전자가 존재하는지 알아보기 위해 이 pRS13의 전체 sequence인 0.9kb의 염기 서열을 확보한 후 이 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)를 사용하여 유전자를 검색한 결과 도 6과 같이 1개의 유전자를 찾을 수 있었으며 이 유전자 (*rsa1*이라 명명)는 full genome sequence가 밝혀진 GMI1000 균주의 sequence를 비교한 결과 putative transmembrane protein, probable signal peptide protein 등으로 검색되었는데 유사도가 높지 않아 위에서 언급한 유전자로는 생각되지 않으며 기존의 알려진 유전자보다는 새로운 유전자일 가능성이 클 것으로 생각되었다. 그리고 *rsa1* 유전자 sequence의 280~304 bp 앞에 다른 *R. solanacearum*에서 발견되는 PIP (Plant Inducible Promoter; TTCG-N₁₆-TTCG) box의 sequence를 확인하였다 (그림 11과 12).

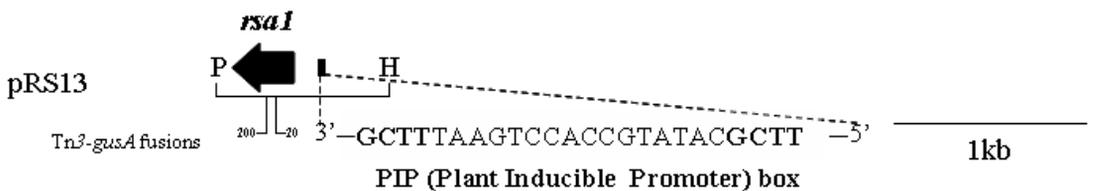


그림 11. 기주 특이성에 관여하는 *rsa1* 유전자를 가지는 pRS13의 모식도 (H; *Hind*III, P; *Pst*II).

<u>HindIII</u>	
1	AAAGCTTTAAGGATGCGAGGTCAACCTCCAT
31	CCCTACCGCAATCCCTTTAGCGGGCGATGT
61	GCCGCTCGCCGCAATGCTGCCGCCAGCAGC
91	CCCCAGTCATT TTCGCATATGCCACCTGA
121	ATTTCCG GGAGGATGGCCAATGTGCTGCTTC
151	TTTTTGTTTTATGCATAATCGACCAATAAA
181	TCCATACCACAATTTAAATCTCAAAAAATT
211	TCCCGCAATGAAAATATAGATTAGCCTCTG
241	ATACAGTCAGCTTGC GGTCGAGAAGAGAGG
271	TTGCATTATATGCCCCCAAGGGGGGCGG
301	ATTTTCACTGAAAGCCAGCCCCCTTTTCTC
331	AATCGCACACAATTAGTGC GCGCTAATCAT
361	CATTTGATCAACAACCCATCAATTAATCA
391	CATCCAGTTAATTCAATGAAAATCACCAA
	M K I T K
421	GATTACCGGAAAGAAAATCGTTTCTCTTTC
	I T G K K S F L F A
451	CGTCGCAACGGCTGGAATGCTGATTGCCGG
	V A T A G M L I A G
481	TTACGCCAGCGCCAGCAGTCGGTCGAGCT
	Y A S A Q Q S V E L
511	GACCGGCAAGAACCTGACTGCCAACTGCGT
	T G K N L T A N C V
541	GCGGTTTTATGTAAACGGCAACCAGGATGT
	R F Y V N G N Q D V
571	CAAGCCCGGCGATACACGTTTGCTGGGCAC
	K P G D T R L L G T
601	CGTGA AAAAGTAAACAGACATTCATGGGCTC
	V K S K Q T F M G S
631	CATTTTCAAGAGCCGCACTTGCGGTGGTGC
	I F K S R T G G C A
661	GCCAATCCAGAACTTCTGGTACACGACAAA
	A I Q N F W Y T T N
691	TACGGCAGCTAAGCAAACGTGGAATCCTCC
	T A A K Q T W N P P
721	GTATGCGCCAAGA ACTGATCGAGCCTAGC
	Y A A K N *
751	CGTGGCGGGGTTAAGTCCCACCCAGCCCA
781	CGGTTTTTGGAAGTCCATACCAGGAAAACC
811	AAACCACGTGGCGGCGTGCCGGTTCCATCG
841	GCGATGGATCGGCACGCCGCTCGTGTTAT
871	CTCGTATGTTTTGTGATGCGTTTATCCTGT
901	TGCCAGAGTTTCCTGCAG
	<u>PstI</u>

그림 12. 0.9-kb *HindIII*/*PstI* fragment (pRS13)의 염기 및 아미노산 sequences (RBS; ribosome binding site).

2) 기주특이성 유전자의 기능 규명

가) Mutation 및 complementation

이 *rsal* 유전자를 Tn3gusA mutation 시킨 후에 이 mutation 이 된 것을 다시 고추에 병원성 검정을 한 결과 약 25%의 발병도를 보이는 것으로 관찰되어 이 *rsal* 유전자가 *R. solanacearum*의 기주 특이성에 관련이 있음을 알 수 있었다. 그리고 이 유전자의 기능을 좀 더 명확하게 규명하기 위해서 mutation이 된 유전자를 다시 회복시켰을 경우 그 유전자의 기능이 다시 회복되는지 알아보기 위해 mutation이 된 *rsal* 유전자에 다시 *rsal* 유전자를 가진 pRS13을 complementation 시킨 후 고추와 감자에 병원성 검정을 하였더니 고추에 접종한 결과로는 원래 *rsal*을 가지는 pRS13을 접종 하였을 때와 마찬가지로 0%의 풋마름 증상을 보이는 것을 알 수 있었으며 감자에서는 고추 접종 결과와는 반대로 감자에 100% 발병도를 일으키는 SL2029 균주의 병원성 검정 결과와 동일하였다. 그리고 이 mutation 된 균과 complementation 된 균들의 실제 고추와 감자 내에서의 cell 생장을 살펴보게 되면 도 9의 그래프 상에서와 마찬가지로 고추에 100%풋마름 증상을 일으키는 SL341은 실제 고추 내에서 세균 수가 10^5 에서 10^9 이상으로 증가한 반면 감자에서는 10^5 에서 10^3 으로 감소됨을 알 수 있었으며 고추에 풋마름 증상을 일으키지 않는 SL2029는 고추에서는 10^5 에서 10^4 으로 오히려 세균 수가 감소된 반면 감자에서는 10^5 에서 10^{11} 으로 세균 수가 증가됨을 알 수 있었는데 이것은 실제 외견상 드러나는 풋마름 증상의 발병도와 일치하는 결과를 보였다. 그리고 mutation이 된 균주인 SL2029, *rsal::Tn3gusA200* 균주는 고추에서는 세균 수가 10^5 에서 10^7 으로 증가되었고 감자에서는 10^5 에서 10^5 으로 세균 수가 거의 변화가 없는 것으로 관찰되었는데 이는 실제 고추에서 약 25%의 풋마름 증상을 보이는 것과 일치되는 결과를 보였으며 *rsal* mutant에서 complementation 된 균주인 SL2029 *rsal::Tn3gusA200*(pRS13)균주는 고추에서 10^5 에서 10^5 으로 세균 수가 증가도 감소도 되지 않았고 감자에서는 10^5 에서 10^9 으로 증가되었음을 관찰할 수 있었다 (그림 13, 14, 15).

위의 결과들을 종합해 볼 때 이 *rsal* 유전자는 세균성 풋마름병원균인 *R.*

solanacearum race 3 균주에서 기주를 인식하는 즉, 기주 특이성에 중요한 작용을 하는 것으로 생각된다.

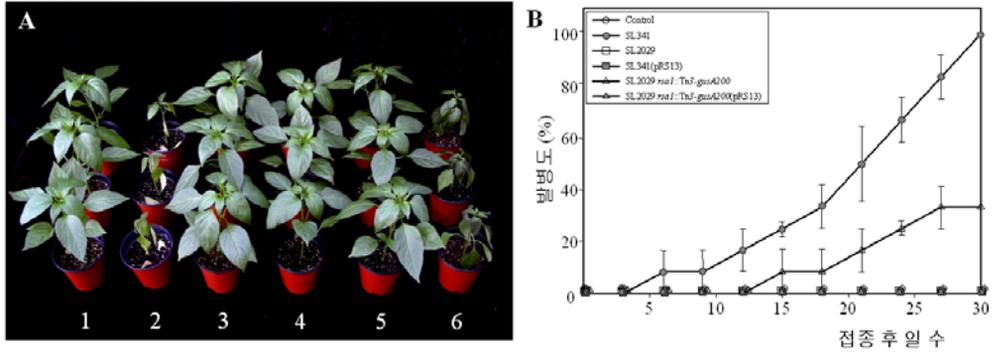


그림 13. A; 고추에서 병원성 검정 결과 (1; Control, 2; SL341, 3; SL2029, 4; SL341(pRS1), 5; SL2029 *rsal::Tn3gusA200*(pRS13), 6; SL2029 *rsal::Tn3gusA200*, 접종 후 21일째의 꽃마름 증상). B; 병원균 접종 후 고추에 나타나는 병 진전도.

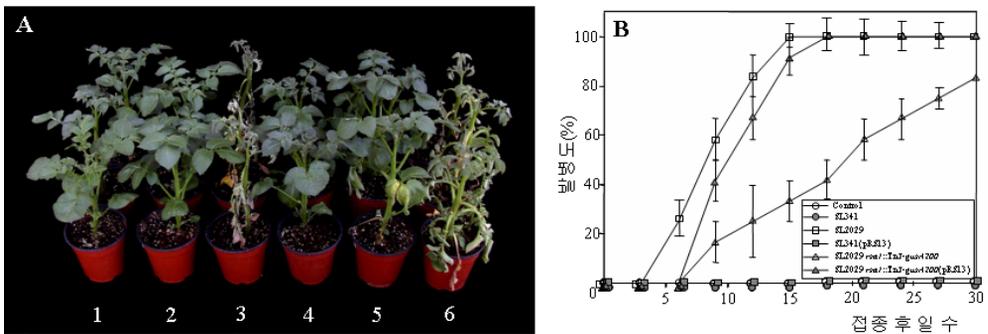


그림 14. A; 감자에서의 병원성 검정 결과 [1; control, 2; SL341, 3; SL2029, 4; SL341(pRS13), 5; SL2029 *rsal::Tn3gusA200*, 6; SL2029 *rsal::Tn3gusA200*(pRS13), 접종 후 15일째의 꽃마름 증상]. B; 병원균 접종 후 감자에 나타나는 병 진전도.

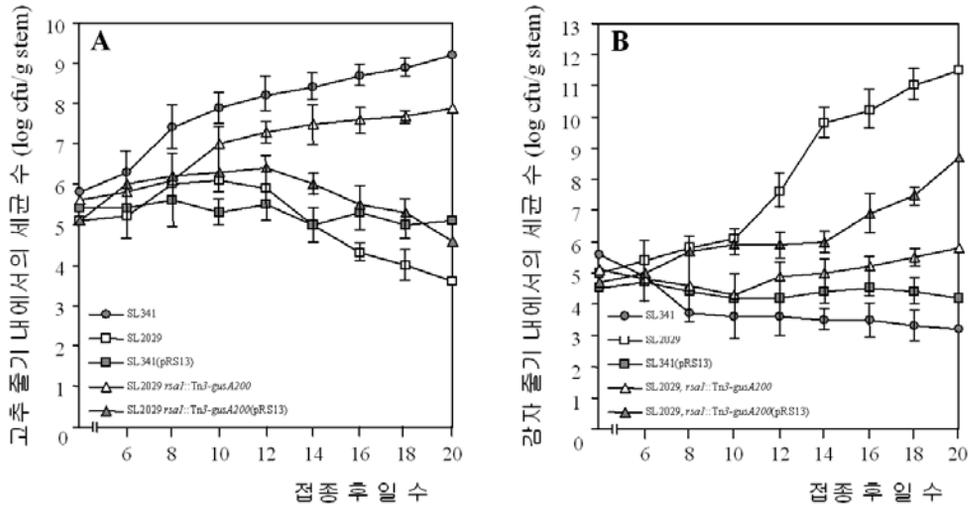


그림 15. A; 병원균 접종 후 고추 줄기내의 세균수의 변화도. B; 병원균 접종 후 감자 줄기내의 세균수의 변화도.

나) Southern blot

rsa1 유전자를 가지는 pRS13을 probe로 사용하여 *R. solanacearum* race 1과 3 및 여러 가지 식물병원성 세균에 대하여 southern blot을 실시한 결과 이 *rsa1* 유전자는 국내에서 분리한 *R. solanacearum* race 3 균주들에서만 signal이 존재하였고 국내의 *R. solanacearum* race 1 균주들, 외국의 *R. solanacearum* 1과 3 균주들, *Pseudomonas* 와 *Xanthomonas* 균주들에 대해서는 전혀 signal이 존재하지 않았다 (그림 16). 따라서 이 기주특이성 유전자인 *rsa1* 유전자는 국내의 *R. solanacearum* race를 구분하고 외국에서 유입되는 다른 종류의 *R. solanacearum*과도 비교 가능할 것으로 생각되어 *R. solanacearum*의 유용한 진단 자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

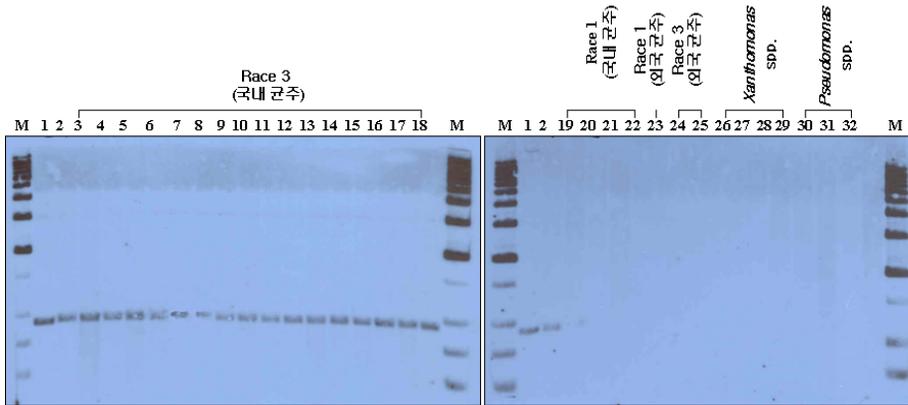


그림 16. Southern hybridization; pRS13을 probe로 사용. 1; *E. coli* DH5a (pRS13), 2; *R. solanacearum* SL2029, 3-18; *R. solanacearum* race 3 (SL2064, SL2078, SL2268, SL2282, SL2312, SL2313, SL2316, SL2317, SL2665, SL2673, POW89, POW96, POW101, POW102, POW103, POW104), 19-22; *R. solanacearum* race 1 (SL341, SL467, SL1870, TW1), 23; *R. solanacearum* GMI1000, 24; *R. solanacearum* LMG2294, 25; *R. solanacearum* LMG2296, 26 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KXO86, 27; *X. axonopodis* pv. *glycines* YR32, 28; *X. axonopodis* pv. *glycines* 8ra, 29; *X. campestris vesicatoria* CV1, 30; *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* NPS, 31; *P. syringae* pv *tomato* DC3000, 32; *P. syringae* pv *glycines* SG1.

다) β -glucuronidase assay

SL2029(pLAFR3), SL2029 *rsal*::Tn3*gusA200*, SL2029 *rsal*::Tn3*gusA200*(pRS20, *hrpB*), SL2029 *rsal*::Tn3*gusA200*(*hrpB*:: Ω), SL2029 *rsal*::Tn3*gusA200*, *hrpB*:: Ω (pRS20)에 대한 발현정도를 살펴보았는데 우선 *gus* 유전자가 들어있지 않은 SL2029(pLAFR3)는 β -glucuronidase activity가 1이었고 *gus* 유전자가 *rsal*에 들어있는 SL2029 *rsal*::Tn3*gusA200*는 43.8의 수치를 나타냈으며 *hrpB* 유전자가 더 첨가된 SL2029 *rsal*::Tn3*gusA200*(pRS20, *hrpB*)에서는 129.3으로 *rsal* 유전자만 발현이 되었을 때 보다 약 3배 가량 발현정도가 증가하였다. 그리고 *hrpB* 유

전자를 변이시킨 SL2029 *rsaI::Tn3gusA200(hrpB::Ω)*는 1의 수치를 나타냈는데 이 수치는 *gus* 유전자가 있지 않은 SL2029(pLAFR3)의 발현 정도와 일치하였다. 이 mutant에 다시 *hrpB* 유전자를 넣은 SL2029 *rsaI::Tn3gusA200, hrpB::Ω* (pRS20)는 135.1의 β -glucuronidase activity를 보여 *rsaI* 유전자에 *hrpB* 유전자를 넣은 *rsaI::Tn3gusA200*(pRS20, *hrpB*)의 특성을 회복하였다 (그림 17). 이 결과로 기주특이성에 관련된 *rsaI* 유전자는 H계B에 의해서 조절되는 것을 알 수 있었다.

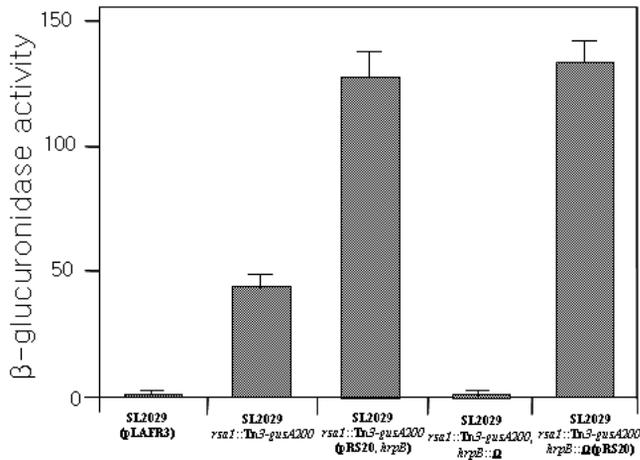


그림 17. β -glucuronidase assay

라) Western blot

SL2029(pRS13), *rsaI::Tn3gusA200*(pLAFR3), *rsaI::Tn3gusA200*(pRS13), *hrcN::Tn3gusA*(pRS13)에 대한 western blot 결과는 SL2029(pRS13)에서는 Rsa1 단백질이 cell 외부로 분비가 되었고 *rsaI::Tn3gusA200*(pLAFR3)에서는 *rsaI* mutant여서 전혀 signal을 관찰할 수 없었다. 그리고 *rsaI::Tn3gusA200*(pRS13)에서는 SL2029(pRS13)과 마찬가지로 cell 외부로 Rsa1이 분비가 되었으며 *hrp* mutant인 *hrcN::Tn3gusA*(pRS13)에서도 cell 외부로 분비가 되었다 (그림 18). 이 결과는 *rsaI* 유전자에서 발현된 Rsa1 단백질이 Hrp secretion system인 type

III secretion으로 분비가 되지 않음을 의미하는 것이다.

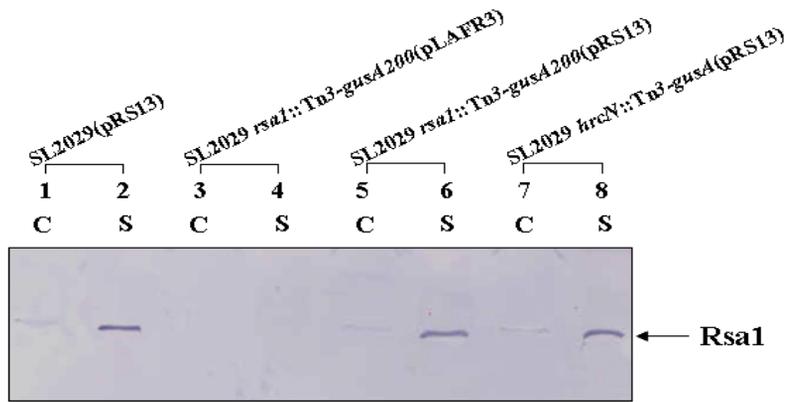


그림 18. *R. solanaceum* 균주들의 cellular (C) 와 secreted proteins (S)의 western blot.

마) N-terminal sequencing

Rsa1 단백질을 발현시켜서 cell 외부로 secretion된 단백질의 아미노산을 분석한 결과 총 110개의 아미노산 (MKITKITGKKSFLFAVAT AGMLIAGYASAQQSVELTGKNLTANCVRFYVNGNQDVKPGDTRLLGT VKSKQTFMGSIFKSRTC GGAAIQNFWYTTNTAAKQTNPPYAAKN)중에서 30번째의 아미노산인 QQSVEL sequence가 분석되었다 (그림 19). 이 sequence 결과는 Rsa1 단백질이 cell 외부로 분비되면서 signal peptide가 되는 type II secretion system으로 분비되는 것을 의미한다.

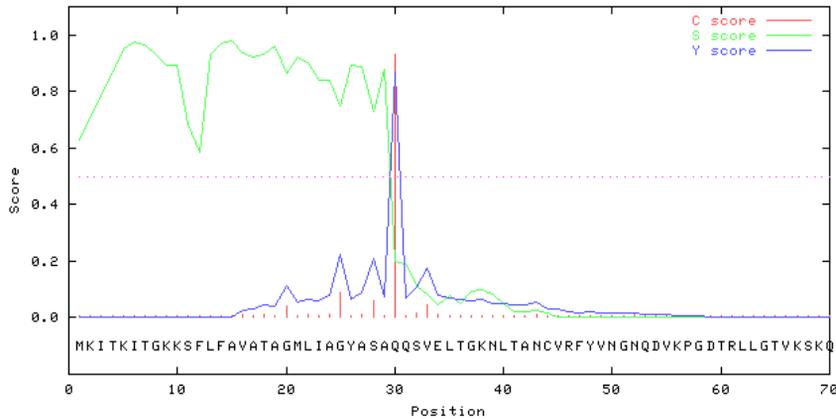


그림 19. RsaI의 signal peptide prediction.

나. AFLP 방법을 통한 세균성 풋마름병원균 균주들의 유전적 다양성 확보

109개의 국내 균주, 16개의 외국 균주들의 AFLP 분석 결과 각 균주들은 두 개의 division으로 분류가 되었는데 첫 번째 division은 국내 109개의 균주와 4개의 일본균주, 1개의 가이아나 균주로 구성되었으며 두 번째 division은 세계의 다양한 지역에서 수집된 11개의 LMG 균주들로 구성되었다. 첫 번째 division은 6개의 cluster로 세분화 (correlation level; 0.62)되었는데 제 I cluster (correlation level; 0.75)는 충청남도, 경상남도, 경상북도, 전라남도의 토마토, 고추, 감자, 참깨에서 분리된 biovar 1, 3, 4 균주들로 구성되었다. 제 II cluster (correlation level; 0.70)는 경상북도, 경상남도, 전라북도, 전라남도 지역의 토마토, 고추, 감자, 가지에서 분리된 biovar 3과 4 균주들과 일본의 가지와 고추에서 분리된 biovar 4 균주들로 구성되었다. 제 III cluster (correlation level; 0.72)는 강원도, 경기도, 충청북도, 충청남도, 경상북도, 경상남도, 전라남도 지역의 토마토에서만 분리된 biovar 3과 4 균주들로 구성되었다. 제 IV cluster (correlation level; 0.70)는 전라남도과 경상남도의 감자에서 분리된 biovar 4 균주들로 구성되었다. 제 V cluster (correlation level; 0.62)는 전라남도, 경상남도, 제주도 일부지역의 토마토와 감자에서 분리된 biovar 2 균주들로만 구성되었다. 제 VI cluster

(correlation level; 0.69)는 경기도, 충청북도, 경상북도, 경상남도 지역의 과프리카와 담배에서만 분리된 biovar3과 4 균주들로 구성되었다. 그리고 두 번째 division은 11개 나라에서 분리된 biovar 2 균주들(제 VII cluster)과 biovar 1과 3 균주들로 구성되었다 (그림 20과 21, 표 7). 이 결과에서 특이한 점은 국내 균주들은 분리된 지역과 기주, biovar에 따라 총 6개의 cluster로 분리가 되고 제 V cluster를 제외한 제 I, II, III, IV, VI cluster를 구성하는 균주들로는 biovar 4 균주들이 모두 포함된다는 것이다. 이것은 국내에 biovar 4 균주들이 세균성 꽃마름병원균의 대표 분포 균주임을 의미하는 것이다. 그리고 biovar 2 균주들은 그 유전적 다양성이 다른 biovar들과는 차이가 났는데 이 biovar2 균주들은 국내에서 분리된 것과 외국에서 분리된 것 간에도 유전적 상호관계가 원연관계인 것으로 나타났다. 이 점은 이 AFLP 분석으로 biovar 2 균주들을 유전적으로 분석하는 것에 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

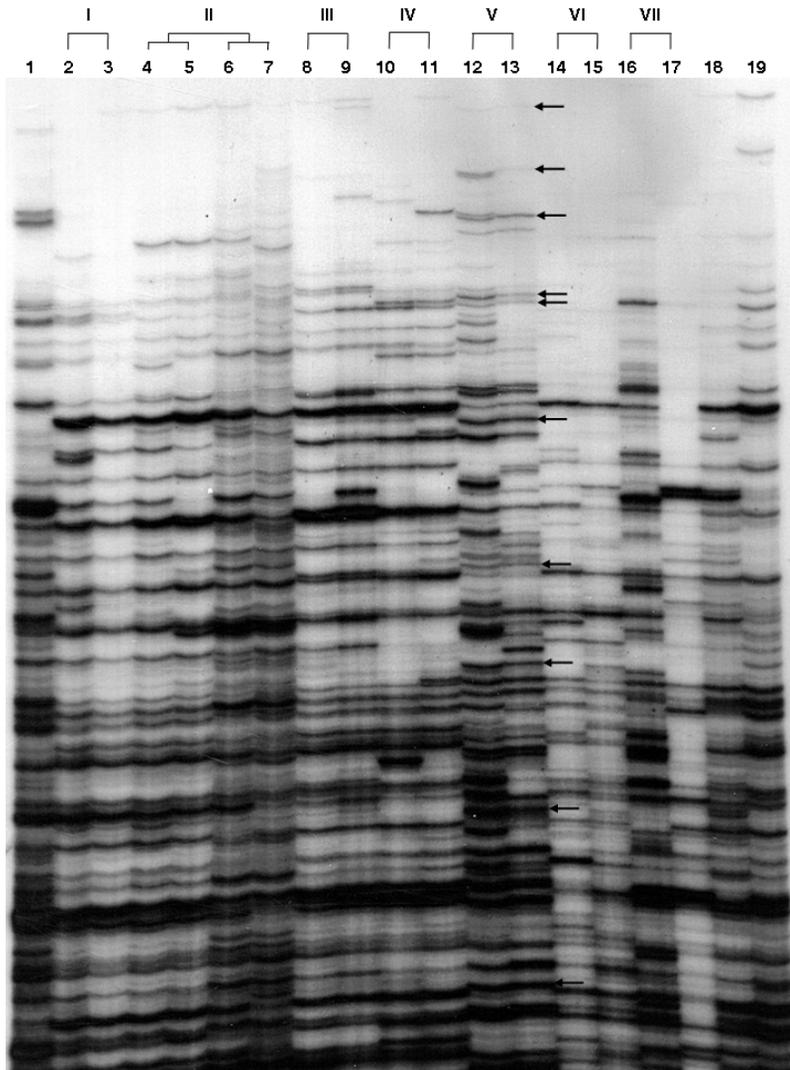


그림 20. *R. solanacearum* 균주들의 AFLP fingerprints. Lanes: 1, GMI1000; 2, PW17; 3, PW33; 4, POW1; 5, POW7; 6, N6211; 7, 7601; 8, SL341; 9, TW30; 10, POW55; 11, POW57; 12, SL2029; 13, SL2313; 14, SL1977; 15, TOW3; 16, LMGG2296; 17, LMG17138; 18, PEW1; 19, SEW2. 화살표는 AFLP cluster V (biovar 2) 균주들의 특이적인 band를 표시한 것이다.

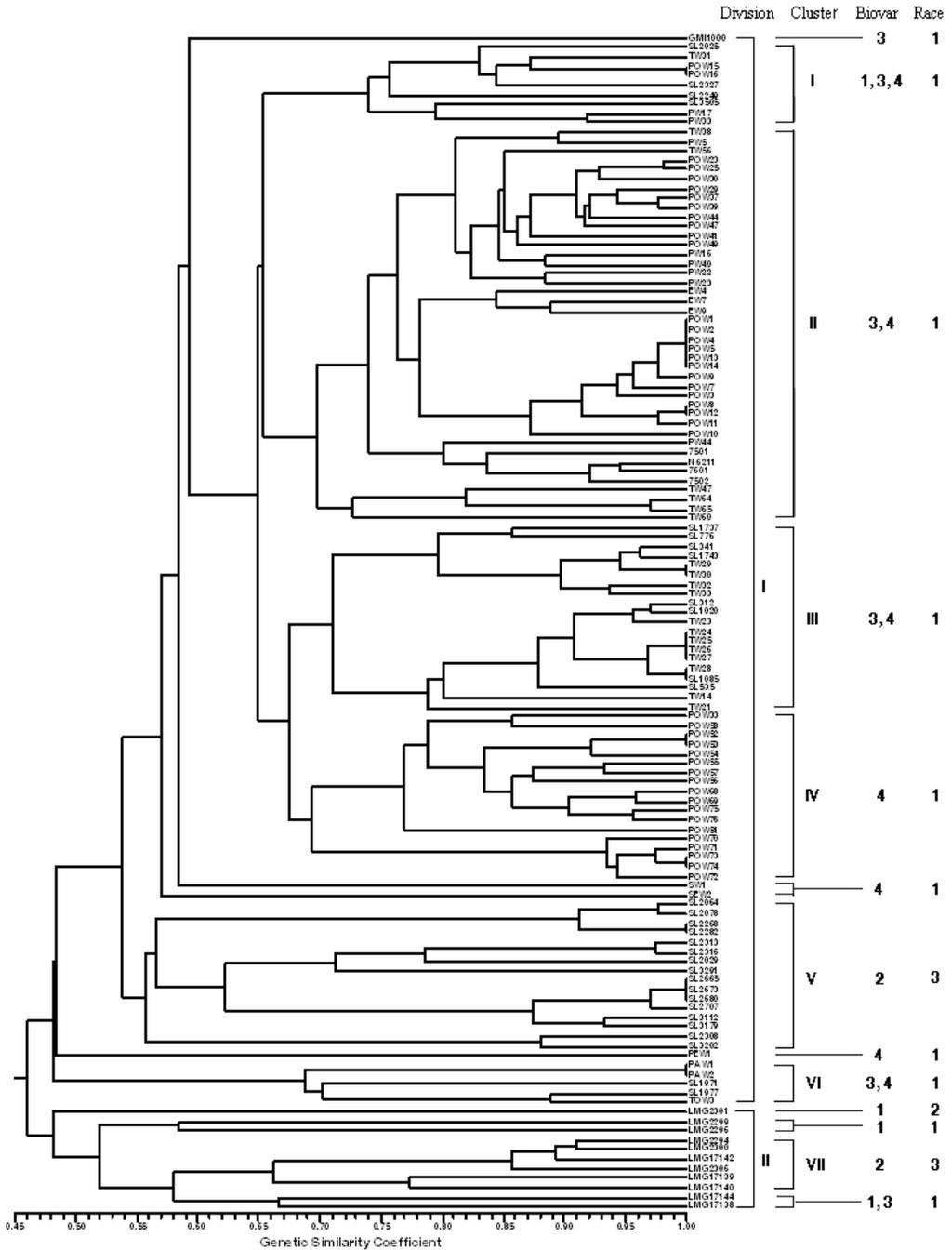


그림 21. *R. solanacearum* 균주들의 AFLP fingerprints의 UPGMA 분석법에 의한 유연관계도. LMG: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent, Belgium.

표 7. *R. solanacearum* 균주들의 분리지역, biovar, race, AFLP group에 대한 특징

균주 ^a	지역	기주	Biovar	Race	AFLP cluster	출처 ^b
SL312	경기도, 광주	토마토	3	1	III	본 연구
SL341	경상북도, 김천	토마토	3	1	III	"
SL535	충청북도, 진천	토마토	4	1	III	"
SL776	경상남도, 고성	토마토	3	1	III	"
SL1020	경기도, 수원	토마토	4	1	III	"
SL1085	강원도, 철원	토마토	4	1	III	"
SL1737	전라남도, 보성	토마토	4	1	III	"
SL1743	경상남도, 함안	토마토	4	1	III	"
SL1971	경기도, 수원	담배	3	1	VI	"
SL1977	경상북도, 포항	담배	3	1	VI	"
SL2025	충청남도, 보령	참깨	3	1	I	"
SL2029	제주도, 남제주	감자	2	3	V	"
SL2064	제주도, 남제주	감자	2	3	V	"
SL2078	제주도, 남제주	감자	2	3	V	"
SL2249	제주도, 남제주	감자	1	1	I	"
SL2268	제주도, 남제주	감자	2	3	V	"
SL2282	제주도, 남제주	감자	2	3	V	"
SL2308	전라남도, 담양	토마토	2	3	V	"
SL2313	경상남도, 남해	감자	2	3	V	"
SL2316	경상남도, 밀양	감자	2	3	V	"
SL2327	경상남도, 남해	감자	4	1	I	"
SL2665	전라남도, 보성	감자	2	3	V	"
SL2673	전라남도, 보성	감자	2	3	V	"
SL2680	전라남도, 보성	감자	2	3	V	"

표 7.

균주 ^a	지역	기주	Biovar	Race	AFLP cluster	출처 ^b
SL2707	경상남도, 김해	감자	2	3	V	본 연구
SL3112	경상남도, 남해	감자	2	3	V	"
SL3179	제주도, 북제주	감자	2	3	V	"
SL3202	제주도, 남제주	토마토	2	3	V	"
SL3291	제주도, 남제주	감자	2	3	V	"
SL3505	경상남도, 창녕	고추	4	1	I	"
EW4	강원도, 홍천	가지	3	1	II	"
EW7	경상남도, 거제	가지	4	1	II	"
EW9	경상남도, 김해	가지	4	1	II	"
PW5	강원도, 양구	고추	3	1	II	"
PW16	전라남도, 함평	고추	4	1	II	"
PW17	경상북도, 청도	고추	4	1	I	"
PW22	전라북도, 정읍	고추	4	1	II	"
PW23	전라북도, 고창	고추	4	1	II	"
PW33	경상북도, 칠곡	고추	4	1	I	"
PW40	전라남도, 영광	고추	3	1	II	"
PW44	강원도, 춘천	고추	4	1	II	"
PAW1	전라남도, 화순	파프리카	4	1	VI	"
PAW2	경상남도, 통영	파프리카	4	1	VI	"
POW1	전라남도, 영광	감자	4	1	II	"
POW2	전라남도, 영광	감자	4	1	II	"
POW3	전라남도, 영광	감자	4	1	II	"
POW4	전라남도, 영광	감자	4	1	II	"
POW5	전라남도, 영광	감자	4	1	II	"

표 7.

군주 ^a	지역	기주	Biovar	Race	AFLP cluster	출처 ^b
POW7	전라남도, 무안	감자	4	1	II	본 연구
POW8	전라남도, 무안	감자	4	1	II	"
POW9	전라남도, 무안	감자	4	1	II	"
POW10	전라남도, 무안	감자	4	1	II	"
POW11	전라남도, 보성	감자	4	1	II	"
POW12	전라남도, 보성	감자	4	1	II	"
POW13	전라남도, 보성	감자	4	1	II	"
POW14	전라남도, 보성	감자	4	1	II	"
POW15	전라남도, 보성	감자	4	1	I	"
POW16	전라남도, 보성	감자	4	1	I	"
POW23	전라남도, 영암	감자	4	1	II	"
POW25	전라남도, 영암	감자	4	1	II	"
POW29	전라남도, 영암	감자	4	1	II	"
POW30	전라남도, 영암	감자	4	1	II	"
POW33	전라남도, 영암	감자	4	1	IV	"
POW37	경상남도, 밀양	감자	4	1	II	"
POW39	경상남도, 밀양	감자	4	1	II	"
POW41	경상남도, 밀양	감자	4	1	II	"
POW44	경상남도, 밀양	감자	4	1	II	"
POW47	경상남도, 밀양	감자	4	1	II	"
POW49	경상남도, 밀양	감자	4	1	II	"
POW51	경상남도, 김해	감자	4	1	IV	"
POW52	전라남도, 영암	감자	4	1	IV	"
POW53	전라남도, 영암	감자	4	1	IV	"

표 7.

균주 ^a	지역	기주	Biovar	Race	AFLP cluster	출처 ^b
POW54	전라남도, 영암	감자	4	1	IV	본 연구
POW55	전라남도, 영암	감자	4	1	IV	"
POW56	경상남도, 밀양	감자	4	1	IV	"
POW57	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW58	전라남도, 해남	감자	4	1	IV	"
POW68	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW69	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW70	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW71	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW72	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW73	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW74	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW75	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
POW76	전라남도, 완도	감자	4	1	IV	"
TW14	충청북도, 충주	토마토	4	1	III	"
TW21	충청남도, 논산	토마토	3	1	III	"
TW23	경기도, 평택	토마토	4	1	III	"
TW24	경기도, 파주	토마토	4	1	III	"
TW25	경기도, 파주	토마토	4	1	III	"
TW26	경기도, 파주	토마토	4	1	III	"
TW27	경기도, 파주	토마토	4	1	III	"
TW28	경기도, 파주	토마토	4	1	III	"
TW29	경상북도, 영천	토마토	4	1	III	"
TW30	경상북도, 영천	토마토	4	1	III	"

표 7.

균주 ^a	지역	기주	Biovar	Race	AFLP cluster	출처 ^b
TW31	경상남도, 하동	토마토	4	1	I	본 연구
TW32	경상남도, 하동	토마토	4	1	III	"
TW33	경상남도, 하동	토마토	4	1	III	"
TW38	전라북도, 김제	토마토	4	1	II	"
TW47	경상남도, 고성	토마토	4	1	II	"
TW56	경상남도, 김해	토마토	4	1	II	"
TW60	경상북도, 김천	토마토	4	1	II	"
TW64	경상북도, 구미	토마토	4	1	II	"
TW65	경상북도, 구미	토마토	4	1	II	"
TOW3	충청북도, 청원	담배	3	1	VI	"
PEW1	경상북도, 칠곡	망콩	4	1	N ^c	"
SW1	경기도, 평택	해바라기	4	1	N	"
SEW2	경기도, 연천	참깨	4	1	N	"
7501	일본	가지	4	1	II	큐슈 대학교
7502	일본	가지	4	1	II	"
7602	일본	가지	4	1	II	"
N6211	일본	고추	4	1	II	"
GMI1000	가이아나	토마토	3	1	N	C. Boucher
LMG2294	콜롬비아	감자	2	3	VII	BCCM/LMG
LMG2296	짐바브웨이	토마토	1	1	N	" "
LMG2299	미국	토마토	1	1	N	"
LMG2300	이스라엘	감자	2	3	VII	"
LMG2301	트리니다드	바나나	1	2	N	"
LMG2306	포르투갈	토마토	2	3	VII	"

표 7.

균주 ^a	지역	기주	Biovar	Race	AFLP cluster	출처 ^b
LMG17138	브라질	감자	1	1	N	BCCM/LMG
LMG17139	키프로스	감자	2	3	VII	"
LMG17140	스웨덴	감자	2	3	VII	"
LMG17142	영국	감자	2	3	VII	"
LMG17144	피지	감자	3	1	N	"

^a 총 478개의 세균성 풋마름병원균 중에서 AFLP 분석을 위해 지역, biovar, race, 병원성을 근거로 선발한 125개의 대표균주.

^b BCCM/LMG: Belgian Coordinated Collection of Microorganismsss.

^c N 표시는 AFLP cluster에 포함되지 않은 균주들을 의미한다.

다. 국내외의 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 도출

수집된 균주들 별로 국내에서의 분포를 살펴보면 biovar 1 균주들은 제주도(남제주)의 토마토와 감자재배지에서만 분리가 되었으며 제주도의 다른 지역에서는 분리가 되지 않았다. biovar 2 균주들은 제주도(남제주, 북제주)의 감자, 전라남도(보성, 담양)의 감자, 토마토, 경상남도(밀양, 남해, 김해)의 감자에서만 분리가 되었고 biovar 3 균주들은 강원도(홍천, 양구)의 고추, 경기도(광주, 수원, 화성, 평택)의 고추, 토마토, 담배에서 충청북도(보은, 충주, 청원)의 가지, 토마토, 고추, 담배에서 충청남도(보령, 예산, 홍성, 부여, 서산, 논산)의 참깨, 담배, 토마토, 고추에서 전라남도(무안, 영광, 보성)의 감자, 고추에서 경상북도(김천, 영일, 안동, 봉화)의 토마토, 담배에서 경상남도(고성, 남해, 밀양, 김해)의 토마토, 감자에서 제주도(남제주, 북제주)의 감자에서 분리가 되었다. 그리고 biovar 4 균주들은 강원도(철원, 양구, 인제, 춘천, 횡성, 홍천)의 토마토, 고추, 피망에서 경기도(광주, 가평, 여주, 화성, 파주, 연천, 안성, 수원, 평택, 강화)의 토마토, 가지, 참깨, 고추, 파프리카, 해바라기에서 충청북도(청원, 진천, 음성, 충주, 보은, 괴산, 연기)의

토마토, 고추에서 충청남도(홍성, 논산, 성지, 부여)의 토마토, 고추에서 전라북도(정읍, 고창, 김제)의 토마토, 고추에서 전라남도(나주, 화순, 보성, 무안, 영광, 해남, 함평, 영암, 완도)의 토마토, 고추, 감자, 파프리카에서 경상북도(영천, 김천, 구미, 청도, 상주, 문경, 예천, 안동, 영주)의 토마토, 고추에서 경상남도(고령, 고성, 함안, 밀양, 남해, 김해, 창녕, 하동, 통영, 거제, 마산)의 토마토, 감자, 가지, 고추, 파프리카에서 제주도(남제주, 북제주)의 감자에서 분리가 되었으며 각 biovar 및 race, AFLP cluster별로 그 지리적 분포도를 표시하였다 (그림 22).

그리고 AFLP 분석 결과 나온 각 cluster와 biovar, race, 균주들간의 상관관계를 토마토, 고추, 감자에서의 병원성 검정으로 종합해 보면 우선 AFLP cluster I, II, III, IV, VI에 속하는 다수의 biovar 1, 3, 4 균주들은 토마토, 고추, 감자에서 모두 병원성을 보였으며 AFLP cluster II, III에 속하는 몇몇의 biovar 4균주들은 토마토와 감자에서만 병원성을 보이고 고추에서는 병원성을 보이지 않았다. AFLP cluster III에 속하는 일부의 biovar 3 균주들은 토마토와 고추에서만 병원성을 보이고 감자에는 병원성을 보이지 않았으며 AFLP cluster VI에 속하는 몇몇의 biovar 3균주들은 토마토에 병원성을 보이고 감자에서는 약병원성, 고추에서는 병원성을 보이지 않았다. AFLP cluster V에 속하는 균주들은 감자에 병원성을 보이고 토마토에서는 약병원성, 고추에서는 병원성을 보이지 않았다 (표 8).

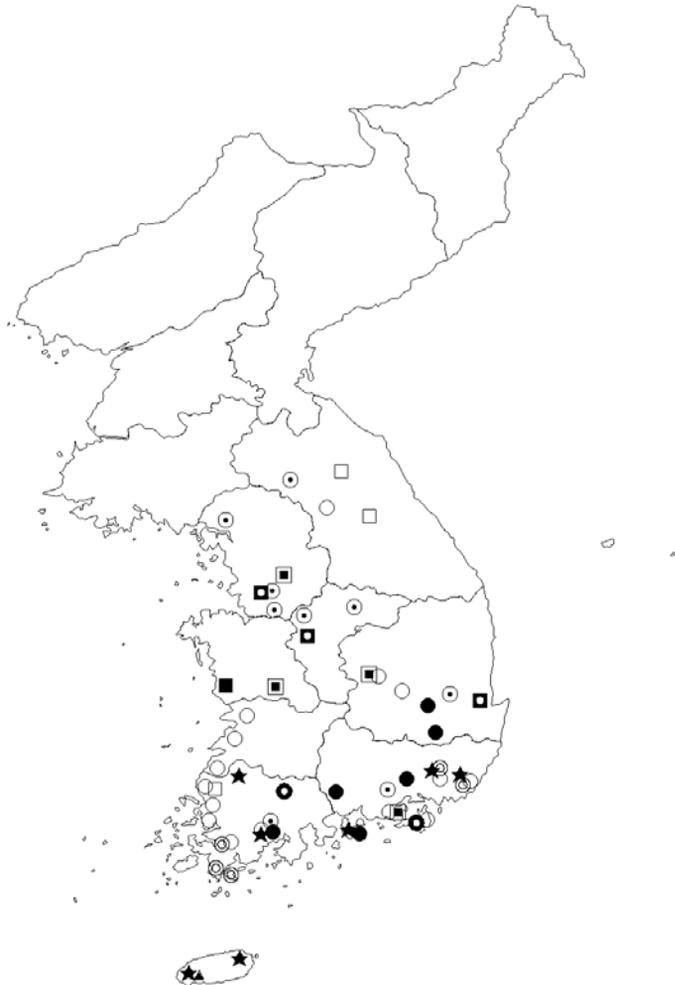


그림 22. 국내에서 분리한 *R. solanacearum* 균주들의 분포도. 각각의 symbol들은 다음의 균주들을 나타내며 같은 지역, 기주, biovar, race, AFLP cluster를 대표하여 표시하였다 (▲: biovar 1, race 1, AFLP cluster I; ■: biovar 3, race 1, AFLP cluster I; □: biovar 3, race 1, AFLP cluster II; ▣: biovar 3, race 1, AFLP cluster III; ▤: biovar 3, race 1, AFLP cluster VI; ●: biovar 4, race 1, AFLP cluster I; ○: biovar 4, race 1, AFLP cluster II; ◎: biovar 4, race 1, AFLP cluster III; ⊙: biovar 4, race 1, AFLP cluster IV; ⊚: biovar 4, race 1, AFLP cluster VI; ★: biovar 2, race 3, AFLP cluster V)

표 8. AFLP cluster 분류에 따른 *R. solanacearum* 균주들의 병원성

Race	Biovar (균주수)	기주	지역	병원성			AFLP cluster
				토마토	고추	감자	
1	1 (3) 4 (9)	토마토 파프리카 감자	충청남도 전라남도 경상북도 경상남도 제주도	+++	+	+++	I, VI
1	3 (8) 4(356)	토마토 고추 감자 참깨 담배	강원도 경기도 충청북도 충청남도 전라북도 전라남도 경상북도 경상남도 제주도	+++	+++	+++	I, II, III, IV
1	4 (16)	토마토 감자 가지	강원도 경기도 충청북도 충청남도 전라북도 전라남도 경상북도 경상남도	+++	-	+++	II, III
1	3 (5)	토마토	강원도 경기도 충청북도 전라남도 경상북도 경상남도	+++	+++	-	III
1	3 (3)	담배	경기도 충청북도 전라남도 경상북도 경상남도	+++	-	+	VI
3	2 (38)	토마토 감자	전라남도 경상남도 제주도	+	-	+++	V

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

본 연구의 최종 목표는 *R. solanacearum*의 기주특이성 및 유전적 다양성 monitoring을 통한 가지과 작물 세균성 풋마름병 발생 경감 체제 확립에 있다. 이를 위해 첫번째, 전국적으로 다양한 기주에서 많은 세균성 풋마름병원균을 확보하고 각 대표 race 균주의 선발 및 library 제작하였다. 이 단계에서 요구되는 평가사항으로서는 국내의 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 race 및 biovar 분류, 다양한 기주에 대한 병원성 검정을 통한 각 race의 대표 균주 선발, 대표 race 균주의 library 제작 내용이 있으며 그 내용에 부합되기 위해 다음과 같은 내용으로 연구를 수행하였다. 다양한 세균성 풋마름병원균의 확보는 1997년부터 2005년도까지 경기도, 강원도, 충청도, 전라도, 경상도, 제주도 지역의 고추, 감자, 토마토 등에서 풋마름 증상이 관찰되는 이병식물체를 채집하여 *R. solanacearum*을 순수 분리하였고 이렇게 분리, 확보된 총 478개의 세균성 풋마름병원균들을 biovar 검정하였다. 그리고 race 검정은 각 병원균들을 7-8본엽기의 토마토, 감자, 고추 유묘에 접종하여 race 검정을 실시하였다. biovar 검정과 race 검정을 통하여 분류된 세균성 풋마름병원균들 중에서 고추와 감자 유묘에 병원성 검정하여 고추에 병을 일으키고 감자에 병을 전혀 일으키지 않는 race 1 균주 1개와 감자에 병을 일으키고 고추에 전혀 병을 일으키지 않는 race 3 균주 1개를 각각 race 1과 race 3의 대표균주로 선발하였고, 대표 균주로 선발된 race 1 균주인 SL341과 race 3 균주인 SL2029의 genomic library를 제작하였다. 이 단계에서 요구되는 평가사항으로서는 국내의 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 race 및 biovar 분류, 다양한 기주에 대한 병원성 검정을 통한 각 race의 대표 균주 선발, 대표 race 균주의 library 제작 내용이 있다.

두 번째, 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균 균주들 간의 비교 및 기주 특이적인 유전자를 가진 유전자 clone을 확보하였다. 이 단계에

서 요구되는 평가 내용으로는 효과적인 mating 방법을 통한 많은 수의 transconjugants의 확보, 기주의 병원성 검정을 통한 기주 특이성 관련유전자를 가진 transconjugant의 확보, AFLP 방법에 효과적인 primer의 선발, 국내 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 monitoring이 있는데 이를 위해 실시한 연구로는 여러 가지 세균성 풋마름 병원균들의 유연관계를 살펴보기 위한 AFLP 방법에 필요한 특이적인 primer를 선발하고 이 특이적인 primer를 사용하여 AFLP 분석을 실시하고 대표 균주로 선발된 race 1 균주인 SL341 균주와 race 3 균주인 SL2029 library를 각각 배양하여 mating해서 나온 transconjugant들을 고추에 병원성 검정하여 고추에 병을 일으키지 않는 transconjugant를 확보하였다.

세 번째, 기주특이성 관련 유전자 동정 및 유전적 다양성 연구를 통한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 작성을 실시하였다. 이 단계에서 요구되어지는 평가 사항으로는 기주 특이성 관련 유전자의 동정 및 기능 구명, AFLP 방법을 통한 유전적 다양성 연구의 효과적인 해석, 국내 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 레이스 분포지도 작성이 있다. 이를 위해 다음과 같은 내용으로 연구를 실시하였다. 우선 세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum*의 기주 특이성에 관련된 유전자를 밝히기 위해서 SL341 균주 (race 1)와 SL2029 (race 3) library를 mating하여 나온 transconjugant들 중에서 고추에 병을 일으키지 않는 subclone을 찾고 이 clone (pRS13)에서 기주특이성에 관련된 유전자가 존재하는지 알아보기 위해 염기서열을 검색하였다. 그리고 검색된 유전자, 즉, 기주 특이성에 관련된 이 *rsal* 유전자의 기능을 밝히기 위해 이 *rsal* 유전자를 *Tn3gusA* mutation 및 complementation 시켜서 고추와 감자에 병원성 검정을 실시하고 각 균주들의 기주 내에서의 cell 변화를 살펴보았다. 그리고 기주 특이성 유전자인 *rsal* 유전자가 세균성 풋마름병원균 race 1과 다른 세균들에도 존재하는지 알아보기 위해 southern blot을 실시하였고 β -glucuronidase assay를 실시하여 어떻게 기주특이성 유전자가 조절되는지 밝히고, 이 기주 특이성 유전자에서 발현된 단백질이 병원세균과 식물간의 상호 작용 관계중에서 어떠한 system으로 분비가 되는지 살펴보기 위해 western blot 실험을 하였고 이 단백질의 secretion system을 확인하기 위해 N-terminal

sequencing을 실시하였다.

그리고 유전적 다양성 연구를 위해 총 478개의 세균성 풋마름병원균 중에서 기주, biovar, 지역적 분포를 달리하는 106개의 한국 균주와 16개의 외국균주를 대표균주로 하여 각 병원균들의 유연관계를 AFLP 분석하여 여러 균들의 상관관계를 살펴보고 수집된 세균성 풋마름병 균주들 중에서 biovar, race, 기주, 지역, AFLP 분석결과와 종합하여 국내 분포도를 작성하였다.

제 2 절 연구개발 목표와 달성도

본 연구개발을 통해 가지과 작물의 세균성 풋마름병 발생 경감 체제 확립하여 실제 농가에 양질의 농산물을 제공할 수 있을 것으로 생각되며 본 연구수행에 있어 평가받아야할 최종 목표는 다양한 기주에 대한 병원성 검정을 통한 세균성 풋마름병원균 대표 race의 선별, 세균성 풋마름병원균의 기주 특이성 관련 유전자의 동정 및 기능 구명, 국내 다양한 지역과 기주에서 분리한 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 monitoring 및 레이스 분포지도 작성에 있다. 본 연구는 세균성 풋마름병원균의 기주 범위 결정 유전자 동정 및 기능 규명을 위해 1997년부터 2005년까지 다양한 세균성 풋마름병원균 균주를 확보하였고, 이 병원균들의 race 및 biovar 검정하였다. 그리고 우리나라에서 중요하다고 생각되는 세균성 풋마름병원균 race 1과 3의 대표 균주 선별하였고 대표 race 균주의 genomic library 작성 후 기주 범위를 바뀌게 하는 clone을 확보 한 후 세균성 풋마름병원균 기주 범위 결정 유전자 동정하고 기능을 규명하였다. 그리고 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 monitoring 및 레이스 분포지도 작성을 위해 확보된 세균성 풋마름병원균을 AFLP 방법을 이용하여 세균성 풋마름병원균 국내외 균주간의 유전적 다양성을 비교 연구하였고 분포지도를 작성하여 국내 분포 세균성 풋마름병원균의 경시적 유전적 다양성을 monitoring할 수 있게 하였다. 따라서 본 연구는 계획하고 수행하고자 한 내용에 대해서 모두 실시하였다.

제 3 절 관련분야에의 기술발전 기여도

본 연구를 수행하여 얻은 결과로 기술적 측면과 경제, 산업적 측면에서 관련분야에 기여를 할 것으로 생각을 한다. 우선 기술적 측면에서 살펴보면 현재까지 국내에서는 세균성 풋마름병원균에 대한 연구가 거의 전무한 상태에 있었다. 주로 가지과 작물에 대해서 그 피해가 언급이 되어 왔지만 실제 포장에서는 가지과 작물은 물론 참깨, 들깨, 해바라기, 땅콩등의 작물에서도 피해가 알려져 오고 있고 우리나라 전역에 걸쳐 병원균이 분포하는 것으로 알려져 있다. *R. solanacearum* 의 경우 균주들간의 변이가 심해서 유전적 다양성 연구방법을 통하지 않고서는 균주들간의 유연 관계등을 살펴볼 수가 없다. 따라서 본 연구를 통해서 유전적 다양성 연구가 이루어지게 되면 국내 균주들 간의 유연관계는 물론 외국 균주들간의 비교를 통해서 국내 균주들 간의 차이를 명확하게 살펴볼 수 있고 또한 race 간의 특이성 및 변이 과정, 기주 범위, 병발생이 생태계에 미치는 영향 등, 세균성 풋마름병원균을 근본적으로 이해하는데 도움이 되리라 생각된다. 그리고 강원도, 경기도, 충청도, 전라도, 경상도, 제주도에 이르기까지 전국적으로 재배되고 있는 가지과 작물에서 고루 분포하는 현 시점에서 세균성 풋마름병원균에 대한 근본적인 이해를 도울 수 있는 유전적 다양성 및 기주특이성 monitoring 연구는 지역적인 차이, 기주에 따른 차이를 해석하여 새로운 race의 확산을 미리 예방하고 기주인식에 대한 연구로 race 간의 차별적인 점을 이용하여 광범위한 병발생을 미리 차단하여 세균성 풋마름병의 발생을 효율적으로 경감시킬 수 있는 방제 체계가 확립될 수 있을 것으로 기대한다. 그리고 경제, 산업적 측면에서 기여도를 살펴보면 국내는 물론 세계적으로 많은 작물에 피해를 일으키는 세균성 풋마름병원균은 그 작물의 중요성 및 광범위한 기주범위로 인해 가장 중요한 식물 병원 세균중의 하나로 인정받아 온바 . 따라서 국내에서 유전적 다양성 및 기주 특이성에 관계된 연구는 세균성 풋마름병원균들간의 특성을 근본적으로 이해하여 국내의 작물 재배 환경을 개선하는데 큰 도움을 줄 것으로 기대되며 가지과 작물에 발생하는 세균성 풋마름병에 대해 효과가 없는 약제 방제를 지양시킴으로써 불필요 농약 구입 및 살포 비용을 절약하여 생산비를 절감함으로써 간접적인 농가 소득 증대에

기여할 것으로 기대된다. 또한 세균성 풋마름병의 대 발생으로 몇 년간의 노력을 수포로 돌아가게 할 정도로 피해를 입고 있는 가지과 작물 재배농가에 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 연구 및 기주특이성 연구를 통한 풋마름병의 발생 경감 조치로 가지과 작물 재배농가에 안정적인 생산 체계를 확보시켜 줄 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

세균성 풋마름병원균인 *R. solanacearum*의 유전적 다양성 연구는 1980년대부터 현재에 이르기까지 연구가 되어오고 있는 학문 분야이다. 여러 가지 유전적 다양성 연구 방법 중에서 본 연구는 AFLP 분석으로 유전적 다양성 연구를 실시하여 각 병원균들을 cluster로 분류를 하여 비교를 하였는데 최근에는 복잡한 과정의 AFLP 분석보다 특정 유전자 (*endoglucanase*, *hrpB*, *mutS* 유전자)를 증폭하여 분석해서 phylotype으로 세균성 풋마름병원균들을 분류시키고 있다. phylotype에 의한 분류 연구를 실시하게 되면 이미 외국에서 실시된 phylotype 분류에 의한 세균성 풋마름병원균의 특징을 국내 균주들에도 접목하여 유용한 유전적 다양성 연구를 수행할 수 있을 것으로 생각이 된다. 그리고 기주특이성에 대한 연구에서는 현재 본 연구에서 밝혀진 바에 따라 *R. solanacearum* race 3에서 찾은 기주특이성 유전자인 *rsal*이 type II secretion system으로 분비가 되는데 이 type II secretion 단백질인 protease의 종류와 그 종류에 해당되는 protease inhibitor 연구등을 수행하게 되면 추후에 세균성 풋마름병원균의 저항성 고추 품종 육성 등의 연구에 활용할 수 있는 자료가 될 것으로 생각한다.

제 2 절 타 연구에의 응용

국내에서 분포하는 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 monitoring 결과와 레이스 분포지도는 가지과 작물 재배지 선택과 연작 또는 윤작을 위한 기초적인 방제 자료로 활용하여 방제가 어려운 세균성 풋마름병의 발생에 대하여 여러 작물들의 안정적인 생산량을 제공하고 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 연구 및 기주 특이성에 관련된 유전자의 기능 규명 연구를 통하여 국내에 분포하고 있는 다양한 병원균주들 간의 유연관계, race 간의 특징 등을 살펴볼 수 있는 특이적 primer의 개발로 국외에서 도입되는 외국 균주들과의 비교 연구를 통한 외국 농산물들의 검역 체계에 활용이 가

능할 것으로 생각된다. 그리고 서로 다른 기주 범위를 인식하는 기작을 살펴봄으로써 광범위한 기주 범위를 가지는 꽃마름병원균의 기주 인식 차단에도 유용한 기초 자료로 이용하여 세균성 꽃마름병원균의 저항성 관련 품종 육성의 자료로 활용하고자 한다.

제 3 절 연구결과의 활용계획

현재까지 본 연구결과는 논문발표 1건 (SCI, 출판중), 국내외 학술대회 발표 4건, 특허 출원 신청서 1건을 제출한 상태이며 과제 종료 후에도 지금까지의 연구 결과를 계속 논문으로 발표할 예정이다. 이 연구를 통해 도출된 세균성 꽃마름병원균의 기본적인 이해와 유전적 다양성 연구 분석 방법, 기주 특이성 유전자를 규명하고자 실시한 여러 가지 방법들은 작물보호기술의 교육 및 지도 자료 및 검역자료로 활용하고자 한다. 특히 가지과 작물 재배 농가와 세균성 꽃마름병원균을 연구하는 연구소, 검역소에 본 연구에서 도출된 이론과 기술에 대한 정보를 제공하고 의견을 교환하여 이 연구에서 개발된 방법을 범용화하고자 한다. 그리고 차후에 여러 전문가들과 협력하여 지금까지의 여러 연구들을 분석하고 정리하여 연구 지침서와 실용적인 책자를 발간하여 전문가들의 체계적인 연구를 보조하고 산업계에서 상용화 될수 있게 하여 작물의 친환경적인 생산에 기여하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한

해외과학기술정보

Cook (1989) 등은 RFLP(Restriction fragment length polymorphism) 방법으로 미국, 호주, 중국, 케냐, 브라질등에서 분리된 38개의 race 1, 17개의 race 2, 7개의 race 3로 유전적 다양성연구를 실시하여 2개의 division으로 분류를 하였는데 division I에는 race 1이면서 biovar 3, 4, 5가 구성되어 있으며 division II에는 race 1이면서 biovar 1인 균주들과 race2와 race 3가 구성되어 있음을 보고하였다.

Smith (1995)는 rep-PCR방법으로 고추에서 분리된 균주 1개, 토마토에서 분리된 균주 1개, 감자에서 분리된 균주 37개의 케냐균주로 실험을 하여 biovar 2와 race 3간의 유사성을 입증하였고, 이 연구로 biovar와 race 간의 유사성을 다양한 실험을 통해 입증하려고 했으나 다른 biovar와 race 간에는 유사성이 전혀 존재하지 않음을 보고하였다.

Horita (1998) 등은 rep-PCR방법으로 토마토 근권 토양에서 존재하는 세균성 풋마름병원균의 유전적 다양성 연구를 실시하여 race 1이면서 biovar 3인 40개의 일본 균주를 5가지 group으로 분류하였고 2001년에는 rep-PCR방법을 사용하여 일본에서 재배된 감자, 토마토, 가지 등에서 분리한 74개의 일본 균주와 미국, 필리핀, 스웨덴, 중국등에서 분리된 45개의 균주로 유전적 다양성 연구를 실시하여 7가지 group으로 분류를 하였는데 group A에는 biovar 4가 구성되어 있으며 group B에는 biovar N2가, group C, D, E, F에는 biovar 3가, group G에는 또 다른 N2가 구성되어 있음을 보고하였다.

Poussier (1999) 등은 전 세계에서 채집된 120개의 세균성 풋마름병원균을 PCR-RFLP방법으로 유전적 다양성 연구를 하여 8가지 division으로 분류를 하였는데 division I과 II는 미국 균주로 biovar 1인 균주들로 구성되어 있고, division III과 V는 biovar 1이면서 바나나에서 분리된 균주들, division IV는 biovar 2로 구성되어 있었으며 divisionVI는 biovar 3과 아시아에서 분리된 biovar 4균주들로 구성되었고 divisionVII은 biovar 1이면서

아프리카 균주들, divisionⅧ은 biovar 3이면서 아시아 균주들로 분류를 하여 "Asiaticum"division과 "Americanum"division으로 분류하였다.

Poussier (2000) 등은 전세계에서 채집된 185균주들을 PCR-RFLP, AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), 16s rRNA sequence analysis로 유전적 다양성 분석을 하여 AFLP 방법으로 7가지 group으로 분류를 하였는데 group I, II, III, V에 biovar 1이, group IV에는 biovar 2가, groupVI에는 biovar 3, 4가 groupVII에는 biovar 4, 5 균주들이 구성되어 있음을 제시하였고 다양한 유전적 다양성 연구방법들 중에서 AFLP 방법이 가장 유용함을 언급하였다.

그리고 Ma (1988) 등이 T2003균주(감자에만 병원성이 있는 균주, race 3)와 T2005균주(땅콩에 병원성이 있는 균주, race1)간의 특성을 이용해 각 균주들의 library를 제작하여 T2005균주와 T2003 균주 library 간의 mating을 통하여 나온 transconjugants를 병원성 검정(땅콩에서 병원성 검정)하여 땅콩에서 병원성이 약해진 transconjugant를 선발하여 그 transconjugant가 가진 DNA 중에서 12.8kb의 fragment가 기주 특이성에 관계된 유전자를 가지고 있을 것으로 언급을 하였다.

Carney (1990) 등은 담배에 병원성인 AW1균주들의 mutant를 만들어서 담배에 병원성이 상실되고 담배에 HR (Hypersensitive response)을 일으키는 mutant가 토마토와 가지에 병원성이 있는 것을 언급하면서 이 세균성 풋마름병원균과 기주가 되는 식물체간의 인식은 avirulence gene과 관계가 있음을 보고하였다.

Lavie (2002) 등은 race 1인 GMI1000 균주에서 기주 특이성에 관계하는 새로운 TypeⅢ effector인 PopP1에 대해서도 보고하였다.

Boucher (2002) 등은 전 세계적으로 광범위한 기주 범위를 가지고 있는 race 1인 GMI1000 균주의 전체 genome sequence를 보고하였다.

제 7 장 참고문헌

- Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4th Edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Buddenhagen, I. 1985. Bacterial wilt revisited. Pages 126-143 in: Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific. G. J. Persley, ed. Aust. Cent. Int. Agric. Res. Proc. 13. Canberra, Australia.
- Boucher, C., Martinel, A., Barberis, P., Alloing, G., and Zischek, C. 1986. Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Gen. Genet. 205:270-275.
- Boucher, C., Gijsegem, F., Barberis, P., Arlat, M., and Zischek, C. 1987. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. J. Bacteriology. 5626-5632.
- Carney, B., Denny, T. P. 1990. A cloned avirulence gene from *Pseudomonas solanacearum* determines incompatibility on *Nicotiana tabacum* at the host species level. J. Bacteriology. 4836-4843.
- Cook, D., Barlow, E., and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. MPMI. 2:113-121.
- Cook, D., Barlow, E., and Sequeira, L. 1991. DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: The example of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 103-108 in: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Vol. 1. H. Henneke and D. P. S. Verma, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Cook, D., and Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. Pages 77-93 in: Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB

- International, Wallingford, UK.
- Denny, T. P. 1995, Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:173-197.
- Dowling, D., and O’Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology* 12:133-141.
- Etchebar, C., Demery, D. T., Giksegem, F., Vasse, J. 1998. Xylem colonization by an HrcV-mutant of *Ralstonia solanacearum* is a key factor for the efficient biological control of tomato bacterial wilt. *MPMI.* 11:869-877.
- Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? Pages 449-461 in: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex.* C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Fegan, M., Taghavi, M., Sly, L. I., and Hayward, A. C. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. Pages 19-33 in: *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects.* P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. INRA Edition, Paris.
- Graham, J., Jones, D. A., and Lloyd, A. B. 1979. Survival of *Pseudomonas solanacearum* race3 in plant debris and in latently infected potato tubers. *Phytopathol.* 69:1100-1103.
- Grimault, V., Prior, P. 1993. Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathology.* 42:589-594.
- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. appl. B.* 27:265-277.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- Hayward, A. C., Hartman, G. L.(Eds.) 1994. *Bacterial wilt: the disease*

- and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB INTERNATIONAL.
- Horita, M., Tsuchiya, K. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91:399-407.
- He, L. Y., Sequeira, L., and Kelman, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis.* 67:1357-1361.
- Horita, M., and Tsuchiya, K. 2000. Comparative analysis of Japanese and foreign strains of *Ralstonia solanacearum* based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Plant Pathol.* 66:132-137.
- Horita, M., and Tsuchiya, K. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91:399-407.
- Jukes, T. H., and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Pages 21-132 in: *Mammalian protein metabolism*. H. N. Munro, eds. Academic Press, New York.
- Katsumi, K., and Kimura, S. 1984. Prevalence and temperature requirements of biovar II and IV strains of *Pseudomonas solanacearum* from potatoes. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 50:476-482.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- Kim, B. S., Cheung, J. D., Cha, Y. S., Hwang, H. S. 1998. Resistance to bacterial wilt of introduced peppers. *Korean J. Plant Pathol.* 14:217-219.
- Krieg, N. R. and Holt, J. G. eds. 9th ed. 1984. *Bergeys manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., and Boucher, C. 2002. PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *MPMI*.15:1058-1068.
- Li, X., Dorsch, M., Del Dot, T., Sly, L. I., Stackebrandt, E., and

- Hayward, A. C. 1993. Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA sequences. *J. Appl. Bacteriol.* 74:324-329.
- Ma, Q. S., Chang, M-F. Tang, J-L., Feng, J-X., Fan, M-J., Han, B., and Liu, T. 1988. Identification of DNA sequences involved in host specificity in the pathogenesis of *Pseudomonas solanacearum* strain T2005. *MPMI.* 1:169-174.
- Mew, T. W., and Ho, W. C. 1977. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology* 67:909-911.
- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., and Trigalet, A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16s rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology.* 146:1679-1692.
- Poussier, S., Vandewalle, P., and Luisetti, J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Applied and Environmental Microbiology.* 2184-2194.
- Prior, P. H., Allen, C., Elphinstone, J. (Eds.) 1998. Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, INRA Paris.
- Prior, P., and Fegan, M. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticultrae* 695:127-136.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex,

- T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., Boucher, C. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*. 415:497-502.
- Seal, S., Jackson, L., and Daniels, M. 1992. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 3751-3758.1
- Smith, J., Offord, L., Holderness, M., and Saddler, G. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology*. 4263-4268.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I., and Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:10-15.
- Thoquet, P., Olivier, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Laterrot, H., Grimsley, N., Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. *MPMI*. 9:826-836.
- Thoquet, P., Olivier, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Prior, P., Anais, G., Mangin, B., Bazin, B., Nazer, R., Grimsley N. 1996. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *MPMI*. 9:837-842.
- Tung, P. X., Rasco, E. T., Zaag, P. V., Schmiediche, P. 1990. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: II. Aspects of host-pathogen-environment interaction. *Euphytica* 45:211-215.
- Vasses, J., Pascal, F., and Trigalet, A. 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *MPMI*. 8:241-251.
- Villa, J. E., Tsuchiya, K., Horita, M., Natural, M., Opina, N., and

- Hyakumachi, M. 2005. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. J. Gen. Plant Pathol. 71:39-46.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.
- 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 cultivating tomato plants in Chungbuk province and characteristics of the isolates. Res. Plant Dis. 10:58-62.
- Yu, Q., Alvarez, A. M., Moore, P. H., Zee, F., Kim, M. S., de Silva, A., Hepperly, P. R., and Ming, R. 2003. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolate from ginger in Hawaii. Phytopathology 93:1124-1130.