

마름병 병원균 *Pseudomonas solanacearum*의
병원성 상실요인에 관하여

김을제, 윤경란, 이영하, 이청호*, 박지창*, 최광태*

충남대학교 자연과학대학 미생물학과, 한국인삼연구소 유전생리부*

**Determinant Involved in the Loss of Pathogenicity in Wilt-Inducing
*Pseudomonas solanacearum***

El-Chae Kim, Kyung-Ran Yoon, Young-Ha Rhee, Cheong Ho Lee*,
Ji-Chang Park*, and Kwang-Tae Choi*

Department of Microbiology, Chungnam National University,
Dept. of Genetics & Physiology, Korea Ginseng &
Tobacco Research Institute*

ABSTRACT

To study the determinants which are involved in the loss of pathogenicity in wilt-inducing *Pseudomonas solanacearum*, several physiological functions were compared in a virulent *P. solanacearum* strain and an avirulent, spontaneously derived mutant strain. The polyacrylamide gel electrophoresis showed the distinction between two strains in the patterns and the relative intensity of proteins produced intracellularly or extracellularly. Enzyme assays showed that the level of polygalacturonase activity in the culture filtrate of the avirulent mutant was markedly reduced, while carboxymethylcellulase (endo-glucanase) activity in both strains were nearly negligible. These results suggest that the loss of pathogenicity in mutant strain is attributed in part to the reduced production of polygalacturonase. In addition, comparative analyses by agarose gel electrophoresis of DNA molecules isolated from both strains show that the pathogenicity genes of *P. solanacearum* are not located on plasmid but are on chromosome.

서 론

세균성 마름병을 유발하는 병원균 *Pseudomonas solanacearum*은 33속 197종 이상의 기주 식물 범위를 가지며, 기주식물의 범위와 생화학적 특성에 따라 각각 3개의 race와 4가지의 biotype로 구분된다⁴⁾. 세균성 마름병은 우리나라의 경우 담배의 주요병으로 전국의 담배산지에 발생하여 해마다 큰 피해를 주고 있으며, 주로 뿌리와 지면부근의 줄기에 있는 상처를 통해 침입하여 결국 식물전체를 말라죽게 한다²⁷⁾.

병원성 *P. solanacearum*은 유기질소 성분의 함량이 높은 인공배지의 사용과 같은 특정의 배양조건하에서 높은 빈도 ($> 10^{-2}$)의 자연적 돌연변이에 의해 발병력이 상실되거나 약화된 비병원성균으로 전환되며^{14,15)}, 병원성균과 비병원성균의 콜로니는 외양적으로 상이한 특징을 가지고 있어 쉽게 구분이 된다¹⁴⁾. 자연적 돌연변이에 의한 이와같은 병원성 상실 현상은 세균성 마름병의 방제를 위한 활용면에서 뿐만 아니라 이 병의 발병기작을 이해하기 위한 정보를 제공해 줄 수 있다는 점에서 많은 관심을 불러 일으키고 있다. 세균성 마름병의 발병기작과 관련하여 Husain과 Kelman¹¹⁾은 기주식물의 도관에 침입한 병원균이 slime-polysaccharide를 생성하고 이것이 수분이동을 방해함으로써 마름병이 발병됨을 보고하였으며, 이러한 slime-polysaccharide 생성능의 상실이 병원성의 상실과 관계가 있음이 다른 연구자들에 의해 밝혀진바 있다²⁵⁾. 또한 세균성 마름병의 발병에는 기주식물 세포벽 분해와 관련된 cellulase 또는 pectinase의 작용이 중요하며^{5,12,15)}, 아울러 toxin의 생성 역시 중요한 발병 요인으로 제시되고 있다⁷⁾. 그러나 이와같이 세균성 마름병의 발병요인으로 알려진 생리적 기능들이 조사된 균주간의 형질 차이에 기인하는지 또는 비병원성균의 병원성 상실

과 직접적인 관련을 이루고 있는지에 대하여서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 최근 이 세균의 병원성 유발 기작과 관련된 분자유전학적 연구를 통하여 병원성 유발 유전자가 plasmid에 존재하고 있음이 밝혀지고 있으며, 특히 Boucher 등^{2,3)}은 200 megadalton 이상의 megaplasmid에 본 세균의 병원성 유발 유전자가 존재한다고 보고하였다. 그러나 Morales 등¹⁸⁾은 *P. solanacearum*의 여러 strain을 대상으로 plasmid의 존재유무와 병원성과의 관계에 대하여 조사한 결과 이 세균의 병원성과 plasmid 간에는 유의할만한 상관관계가 존재하지 않음을 시사함으로써 아직까지 병원성균과 비병원성균의 생리적인 차이가 어디에서 비롯되는지 불명확한 상태이다.

이러한 관점에서, 본 연구에서는 병원성균과 이로부터 자연적 돌연변이에 의해 형성된 비병원성균을 대상으로 이들이 생성하는 기주식물 세포벽 분해효소의 활성 및 기타 단백질등의 차이와 plasmid의 존재여부를 밝히고, 이러한 특징들과 병원성 발현 및 상실 기작과의 관계에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 한국인삼연초연구소 수원경작시험장에서 분리하여 제공받은 세균성 마름병 유발 병원균 *P. solanacearum* PS 8601과 이 균주를 계대 배양해서 얻은 비병원성균 *P. solanacearum* PS 8601-M을 사용하였다^{27,28)}. 균주는 Morales 등¹⁸⁾의 CPG 배지 (bacto-peptone 10g, casamino acid 1g, yeast extract 1g, glucose 2.5g/1)에서 30°C로 진탕배양하여 사용하였다.

Carboxymethylcellulase (endo-glucanase)의 활성도 측정

Kelman 등¹⁵⁾의 semisynthetic medium에서 병원성 균주와 비병원성 균주를 30°C로 72시간까지 배양하면서, 6~12시간 간격으로 시료(배양액)를 취하였다. 채취된 시료액을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 상등액을 효소액으로 취하고, 0.1ml의 효소액과 20mM sodium phosphate buffer (pH7.0)에 carboxymethyl cellulose (CMC)를 1.2% 되게 녹인 기질용액 0.9ml을 혼합한 후 50°C에서 1시간 반응시켰다. 효소의 활성도는 Somogyi²⁴⁾와 Nelson¹⁹⁾의 방법에 의해 형성되는 환원당량으로 측정하였다. 효소 활성도 1unit는 상기한 조건하에서 1분당 1 μ mol의 환원당을 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

Polygalacturonase의 활성도 측정

Schell 등²³⁾의 방법을 변형한 배지(50mM sodium-potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.07% $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0003% ZnSO_4 , 0.0005% NH_4NO_3 , 0.0005% CaCl_2 , 0.0002% MnSO_4 , 0.0003% FeCl_3 , 0.1% casamino acid, 0.1% yeast extract, 1% sucrose/1)에서 병원성균주와 비병원성균주를 각각 30°C로 72시간까지 배양하면서 6~12시간 간격으로 시료(배양액)를 취하였다. 준비된 시료를 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 효소액으로 취하여 0.1ml의 효소액과 50mM sodium potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 polygalacturonic acid를 0.5% 되게 녹인 기질용액 0.9ml을 혼합한 후 40°C에서 1시간 반응시켰다. 효소의 활성도는 Somogyi와 Nelson의 방법에 의해 형성되는 환원당

량으로 측정하였다. 효소활성도 1unit는 상기한 조건하에서 1분당 1 μ mol의 환원당을 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin (Sigma)을 표준 시료로 사용하여 Lowry 등¹⁶⁾의 방법으로 측정하였다.

SDS polyacrylamide gel electrophoresis

Dissociating polyacrylamide gel electrophoresis는 Hames 등⁸⁾의 방법에 의하여 slab gel의 형태로 discontinuous gel 전기영동을 행하였다. 세포내 단백질 시료는 CPG 배지에서 24시간 배양한 균체를 과쇄한 후 원심분리(10,000 xg; 20분)하여 얻은 상등액을 사용하였으며, 세포외 단백질 시료는 Schell 등²³⁾의 배지에서 각각 25시간 배양한 배양액을 원심배지(10,000 xg; 20분)한 후 상등액을 10배로 농축하여 사용하였다. 시료 20 μ l, 그리고 sample buffer (5% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 20% sucrose, 0.004% bromophenolblue in 0.01M phosphate buffer (pH 7.2)) 100 μ l를 혼합하여 잘 섞어 준 후 5분간 끓인 다음 세균시료는 30 μ l, 배양액 시료는 70 μ l씩 gel에 걸쳐 stacking gel에서는 80V, resolving gel에서는 120V로 전개하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie blue R250 0.25g을 methanol:glacial acetic acid:water (125:25:100)에 녹인 염색용액에 넣어 40-50°C에서 2-3시간 반응시킨 후 destaining solution (methanol:glacial acetic acid:water = 1:1:8)으로 탈색하여 관찰하였다.

Agarose gel electrophoresis

병원성균과 비병원성균의 plasmid를 비롯한 DNA molecule를 상호 비교하기 위하여 agarose gel 전기영동을 행하였다. 각 균주는 CPG 배지 (rich medium)와 Sayadi 등²¹⁾의 최소배지에서 배양하여 사용하였으며, 균체에서의 DNA의 추출은 alkaline method¹³⁾ 및 boiling method¹⁰⁾를 변형한 방법을 사용하였다. 0.8% agarose (in Tris-borate EDTA buffer, pH 8.0) gel에 DNA 시료를 7V/cm 하에서 2시간동안 전기영동한 후 50 µg/ml의 ethidium bromide 용액에 염색하여 UV를 비추어 나타난 DNA band를 관찰하였다.

결과 및 고찰

P. solanacearum 단백질의 SDS-PAGE

병원성균주와 비병원성균주의 세포내 및 세포외부로 분비하는 단백질의 차이를 알아보기 위해서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 하였다 (Fig. 1).

세포외부로 분비되는 단백질에서는 분자량 45Kd 부근에서 2개 이상의 단백질 band가 다름을 보였고, 36Kd 부근에서도 병원성과 비병원성균의 band에서 차이가 나타났다. 세포내의 단백질도 역시 band 전반에 걸쳐서 많은 차이를 보이고 있으며, 특히 35-25Kd 사이와 21-14.2Kd 사이에서 병원성세균에서 존재하던 단백질 band가 비병원성 세균에서는 상실 혹은 band의 density가 상당히 낮아졌다. 또한 14.2Kd 이하에서도 두균주의 단백질 band가 뚜렷한 차이를 보이고 있다. 나타난 결과로 미루어 병원성균주와 비병원성균주가 생성하는 단백질 종류에 있어서 많은 차이가 있음을 알 수 있고, 이는 병원성균주와 비병원성

균주의 생리적 기능상에 있어 상당한 차이가 있음을 시사해 준다.

세포벽 분해효소의 활성

대부분의 Gram 음성세균들이 세포외로 단백질을 분비할 수 있는 능력이 결여되어 있는 것과는 달리 *P. solanacearum*을 비롯한 식물병원균의 경우 여러 종류의 단백질을 세포외로 분비할 수 있다²⁰⁾. 특히 세포외 단백질 중에서는 기주식물의 세포벽 분해효소들이 많은 비중을 차지하고 있어 이러한 분해효소들이 병원력 유지에 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{5, 12, 15)}.

본 실험에서 사용된 *P. solanacearum*의 병원성과 비병원성균이 배양과정 중 세포외로 분비하는 총 단백질 양과, 기주식물 세포벽 분해와 관련된 cellulase (endoglucanase) 및 polygalacturonase의 활성 변화를 조사 비교한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 배양기간 중 병원성균과 비병원성균이 생산하는 세포외 단백질의 총량은 큰 차이가 없었으며, endo-glucanase의 경우 두 균주 모두 유의할만한 활성을 보이지 않았다. 특히 endo-glucanase의 활성은 cellulose를 비롯한 여러가지 유도물질을 탄소원으로 사용하였을 때에도 검출되지 않았는데 (미제시 자료), 이는 cellulase 활성이 *P. solanacearum*에 의한 미류병의 발병에 중요한 작용을 한다는 기존의 보고^{12, 15)} 뿐만 아니라 최근 *P. solanacearum*의 병원성균과, 비병원성균의 생화학적 비교연구를 통하여 43Kd의 분자량을 갖는 endo-glucanase의 상실이 병원성 상실과 관계가 있음을 밝힌 Scheil²²⁾의 결과와도 상치된다. 한편, 병원성균의 경우에는 배양 24시간 이후 polygalacturonase의 생성이 일어나는 반면에 비병원성균에서는 효소 생산이 나타나지 않았다. 최근 Scheil 등²³⁾은 *P. solanacearum*

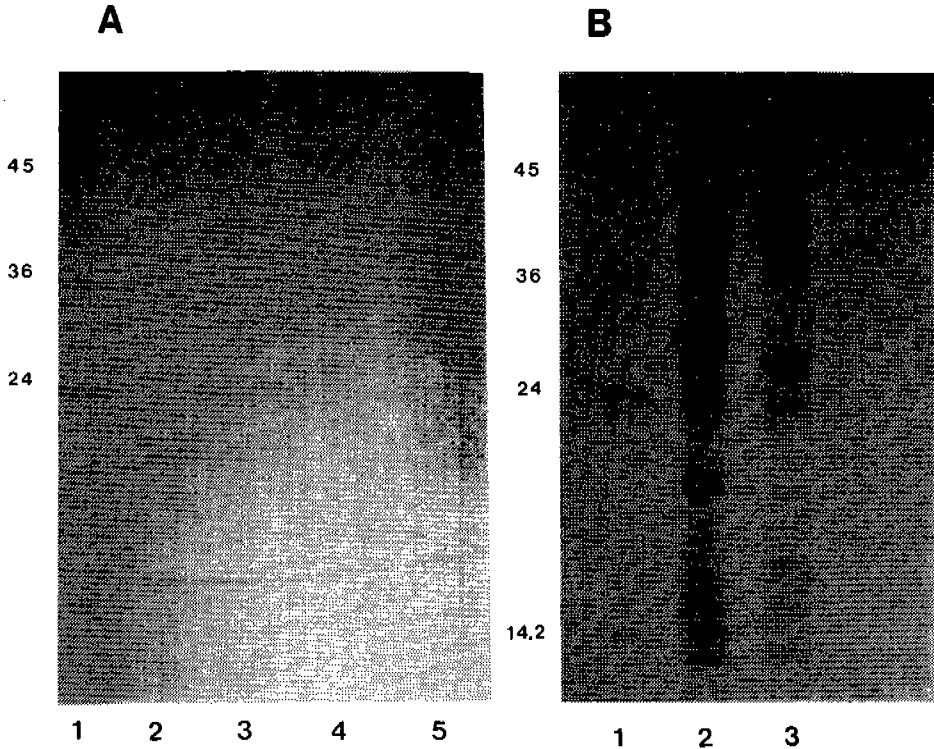


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of extracellular(A) and intracellular(B) proteins of virulent *P. solanacearum* and avirulent mutant.

- A. Lane 1. Standard molecular weight marker.
 Lane 2. 25 hrs culture filtrate of virulent strain.
 Lane 3. 25 hrs culture filtrate of avirulent mutant.
 Lane 4. 35 hrs culture filtrate of virulent strain.
 Lane 5. 35 hrs culture filtrate of avirulent mutant.
- B. Lane 1. Standard molecular weight marker.
 Lane 2. Intracellular proteins of virulent strain.
 Lane 3. Intracellular proteins of avirulent mutant.

의 병원성균은 비병원성균과는 달리 polygalacturonase를 생산할 수 있음을 보고한 바 있으며, 많은 종류의 식물병 유발 세균에 있어서 병원력이 pectin 분해효소의 활성과 관계 있음이 알려져 있다⁵⁾. 본 실험의 결과 역

시 병원성균주가 비병원성균주로 전환시 polygalacturonase 활성 상실이 동반됨을 보여 주는 것으로서, 이러한 생리적 변화로 미루어 polygalacturonase의 활성이 병원성 유발과 매우 관련이 깊은 것으로 생각된다.

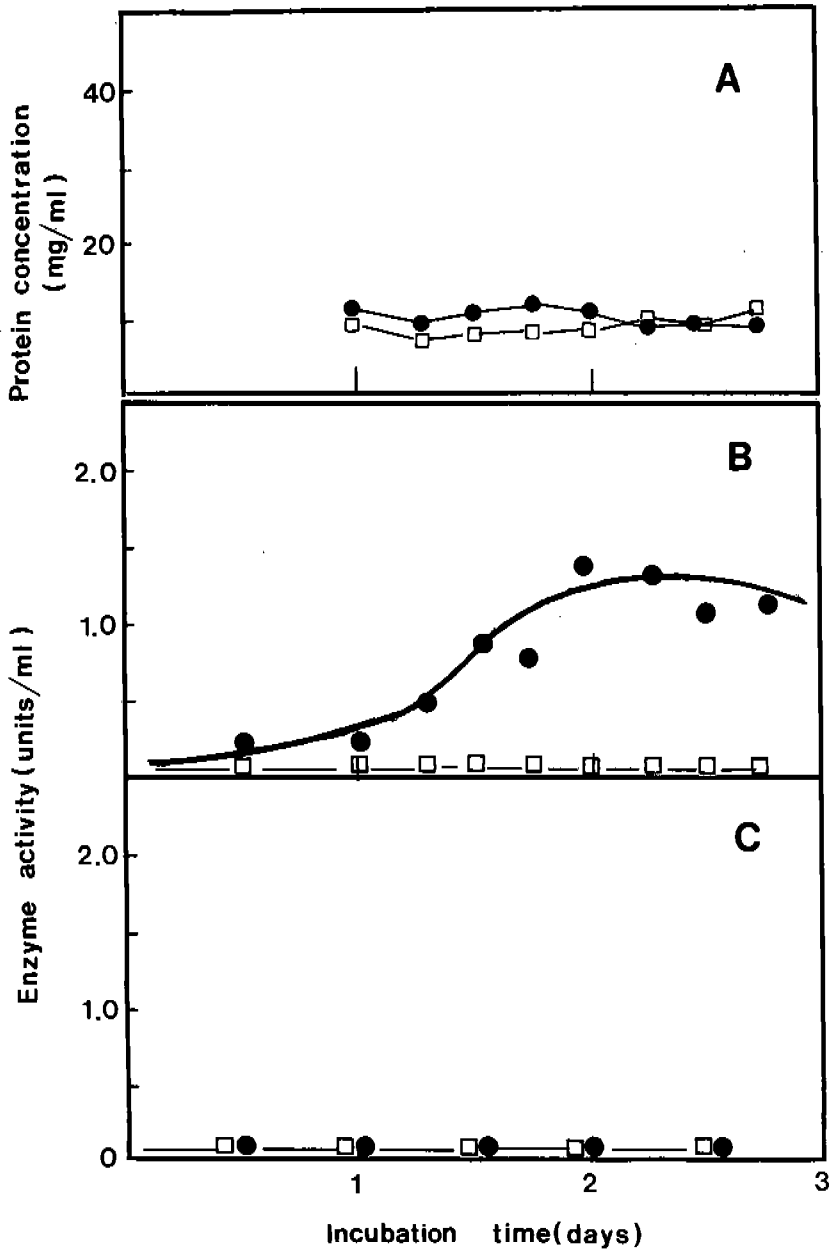


Fig. 2. Protein concentration(A), and activities of polygalacturonase(B) and cellulase(C) in culture filtrates of virulent (●—●) and avirulent (□—□) strains of *P. solanacearum*.

Agarose gel 전기영동

최근 Boucher 등³⁾은 *P. solanacearum*의 병원성 유발 유전자에 관한 분자유전학적 연구에서 이 유전자가 *P. solanacearum* 내

의 megaplasmid에 존재하고 있음을 밝혔다. 본 실험에서는 비병원성균의 병원성 상실이 plasmid의 curing에 의한 것인지의 여부를 확인하기 위하여 병원성균과 비병원성균의 세포에서 DNA를 몇가지 방법으로 얻어 그 양

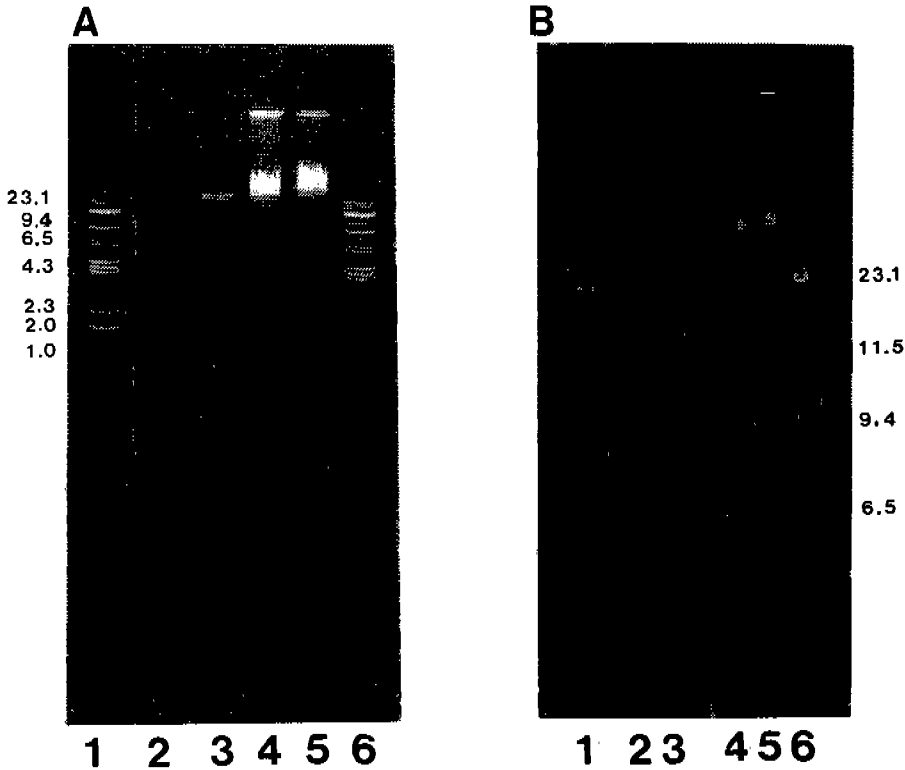


Fig. 3- Agarose gel electrophoresis of DNA molecules isolated from virulent and avirulent strains of *P. solanacearum* grown on minimal (A) and rich (B) medium.

- A. Lane 1,6. DNA size marker.
- Lane 2. virulent strain (by alkaline method).
- Lane 3. avirulent mutant (by alkaline method).
- Lane 4. virulent strain (by boiling method).
- Lane 5. avirulent mutant (by boiling method).

- B. Lane 1,6. DNA size marker.
- Lane 2. virulent strain (by alkaline method).
- Lane 3. avirulent mutant (by alkaline method).
- Lane 4. virulent strain (by boiling method).
- Lane 5. avirulent mutant (by boiling method).

상을 agarose gel 전기영동을 통하여 비교하였다. Fig.3A에서 보는 바와 같이 본 실험의 두 균주에서는 모두 plasmid가 발견되지 않았으며 chromosomal DNA molecule만이 검출되었다. 또한 분자량이 큰 DNA molecule을 확인하기 위하여 large trap으로 전기영동한 결과에서도 plasmid는 검출되지 않았으며 chromosomal DNA molecule만이 확인되었다(Fig.3B). Currier와 Morgan⁶⁾은 자연계에서 분리한 병원성 *P. solanacearum*의 20 균주 중 6 균주에서만 plasmid가 검출되었고 이들로부터 형성된 비병원성균도 동일한 plasmid를 보유함으로써 병원성 유발 유전자와 plasmid 사이에는 뚜렷한 관계가 성립하지 않는다고 보고한 바 있다. 본 실험의 결과 역시 *P. solanacearum*의 병원성 유발 유전자는 plasmid에 존재하지 않고 chromosomal DNA에 위치함을 보여 주었다.

결 론

세균성 마름병 유발 병원균 *P. solanacearum*의 병원성 상실과 관련된 요인들을 조사하기 위하여 *P. solanacearum*의 병원성균과 이로부터 자연적 돌연변이에 의해 형성된 비병원성균과의 생리적 특성을 비교하였다. 두 균주가 생성하는 세포내 및 세포외 단백질 간에는 많은 차이가 있었으며, 기주식물의 세포벽 분해 효소 중 polygalacturonase의 활성이 병원성균에서만 나타남으로써 polygalacturonase 생합성능은 병원성 유발 및 병원성 상실과 관련되지 않는 것으로 나타났다. 또한 agarose gel 전기영동의 결과 *P. solanacearum*의 세균성 마름병 유발 유전자는 chromosomal DNA에 존재하는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513.
2. Boucher, C., P. Barbelris, A. Trigallet, and D. Demery. 1985. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2449-2457.
3. Boucher, C., A. Martinel, P. Barberis, G. Alloing, and C. Zischek. 1986. Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Gen. Genet.* 205: 270-275.
4. Buddenhagen, I. W. and A. Kelman. 1964. Biochemical and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 204-230.
5. Collmer, A. and N. T. Keen. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 383-409.
6. Currier, T. C. and M. K. Morgan. 1981. Plasmids are not associated with formation of noncapsulated variants of *Pseudomonas solanacearum*. in *Proc. Fifth Conf. on Plant Pathogenic Bacteria*. CIAT. Cali. Colombia. pp. 420-425.
7. Gowda, S. S. and P. V. Rai. 1980. Phytotoxic glycopeptides produced by *Pseudomonas solanacearum* I.

- Methods of preparation, physical and chemical characterization. *Phytopathol. Z.* 98: 68-75.
8. Hames, B. D. and D. Rickwood. 1981. Gel electrophoresis of proteins - a practical approach. IRL press.
 9. Hankin, L., M. Zuker., and D.C. Sands. 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* 22:205-209.
 10. Homes, D.S. and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal. Biochem.* 114:193.
 11. Husain, A. and A. Kelman. 1958. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 48:155-165.
 12. Husain, A. and A. Kelman. 1958. The role of pectic and cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 48: 377-386.
 13. Ish-Horowicz, D. and J.F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acid Res.* 9:1989.
 14. Kelman, A. 1954. The relationship in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathol.* 44: 693-695.
 15. Kelman, A. and E.B. Cowling. 1965. Cellulase of *Pseudomonas solanacearum* in relation to pathogenesis. *Phytopathol.* 55:148-155.
 16. Lowry, O.H., N.J. Rosebough, A. L. Farr, and R.T. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-276.
 17. Lucas, G.D. 1975. Disease of tobacco. 3rd ed. Biological Consulting Associates, Raleigh, USA. p.621.
 18. Morales, V. M. and L. Sequeira. 1985. Indigenous plasmid in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 7(7):767-771.
 19. Nelson, N. 1944. A photomeric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.
 20. Oliver, D. 1985. Protein secretion in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:615-644.
 21. Sayadi, S., M. Nasri., J. N. Barbotin, and D. Thomas. 1989. Effect on environmental growth condition on plasmid stability, plasmid copy number, and catechol 2,3-dioxygenase activity in free and immobilized *Escherichia coli* cells. *Biotech. and Bioeng.* 33:801-808.
 22. Schell, M. A. 1987. Purification and characterization of an endoglucanase from *Pseudomonas solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2237-2241.
 23. Schell, M. A., D. P. Roberts,

- and T. P. Denny. 1988. Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by pol-A and its involvement in phytopathogenicity. J. Bacteriol. 170:4501-4508.
24. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195:19-23.
25. Whatley, M.H., N. Hunter, M.A. Cantrell, C. Hendrick, K. Keestra, and L. Sequeira. 1980. Lipopolysaccharide composition of the wilt pathogen, *Pseudomonas solanacearum*. Plant Physiol. 65:557-559.
26. Xu, P., S. Leong, and L. Sequeira. 1988. Molecular cloning of genes that specify virulence in *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. 170:617-622.
27. 이영근, 김정화, 강서규. 1982. 우리나라 담배 세균성마름병균 (*Pseudomonas solanacearum*)의 Race와 Biochemical type. Korean J. Plant Prot. 21(3):123-127.
28. 이영근, 이재열, 김정화. 1985. 담배 callus 및 삽수에 대한 세균성 마름병균 (*Pseudomonas solanacearum*) 배양 여액의 처리효과. J. Tobacco Science. 7(1):284-287.