

가지의 *Ralstonia solanacearum*에 의한 풋마름병 발생과 생리형의 분화

임양숙* · 이문중 · 정종도 · 류영현 · 김병수¹
경상북도농업기술원 원예연구과, ¹경북대학교 원예과

Occurrence and Biovar Classification of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* in Eggplant (*Solanum melongena*)

Yang-Sook Lim*, Mun-Jung Lee, Jong-Do Cheung, Young-Hyun Rew and Byung-Soo Kim¹

Gyeongbuk Agricultural Technology Administration, Daegu 702-708, Korea

¹Department of horticulture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received on January 7, 2008)

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of important and widespread diseases worldwide as well as in Korea. Bacterial wilt disease caused by *R. solanacearum* has been reported mainly in solanaceous crops including eggplant (*Solanum melongena*), tomato (*Solanum lycopersicum*), potato (*S. tuberosum*), and pepper (*Capsicum annuum*). A total of 48 strains of *R. solanacearum* from eggplant were collected during 2005 and 2006. They were confirmed as *R. solanacearum* by PCR amplification with primer pair flipcF/flipcR resulting in production of 470-bp DNA fragment. The 15 isolates exhibited pathogenicity on eggplant and tomato, but less virulent on pepper than other species. The biovar of collected isolates, which have been reported of five types worldwide, were classified as biovars 3 and 4 by physiological test. Biovar 4 was the dormant type without pathogenicity on eggplant rootstock, whereas biovar 3 had pathogenicity on eggplant rootstocks that is resistant to *R. solanacearum*, indicating necessity of breeding new rootstock with resistance to *R. solanacearum* biovar 3

Keywords : Biovar, Eggplant, *Ralstonia solanacearum*

최근 가지 시설재배 시 10,028천원/10a 정도의 수입이 가능하여 고소득 작목으로 인식되면서 점차 경남, 전남, 경북지역 등에서 재배가 확대되고 있으며, 동절기 축성재배로 주요한 작형 변화가 이루어지고 있다. 그러나 시설재배에 따른 연작으로 풋마름병이 다발하여 많은 농가에서 피해를 겪고 있는 실정이다. 이를 억제하기 위해서 저항성대목을 이용한 점목재배를 실시하고 있으나, 최근 경북, 경남지역의 저항성대목으로 점목된 재배포장에서도 풋마름병이 발생하여 치명적인 피해로 전혀 수확을 할 수 없는 농가가 발생하고 있다(Fig. 1). 풋마름병(bacterial wilt)을 유발하는 병원균은 *Ralstonia solanacearum*로 가지, 토마토, 고추, 감자, 관상용 바나나 등 열대 및 아열대에 분포하는 50과 200여 종의 식물을 침입하며 기주범위가 광범위함에 따라 생태적 분화의 다양화로 5개 race 및 5개

biovar로 구분되어진다(Hayward, 1991). 우리나라의 경우 토마토와 고추에서 발생하는 풋마름병균은 race 1과 biovar 4와 biovar 3에 속하며(Jeong 등, 2007; Park 등, 2007; 서 등, 2007), 일본에서는 가지를 침해하는 풋마름병균이 가지과작물, 잡초류 및 2배체바나나를 감염하는 균주등과 등과 같이 race 1에 속하고 생리형 분화도 다양화됨에 따라 풋마름병 방제용으로 사용되어지는 '톨범비가' 대목품종에서도 풋마름병 발생이 보고된 바 있다(Kazutaka 등, 2000).

본 연구에서는 가지 풋마름병 저항성 대목 육성과 효율적 방제 연구를 위하여 풋마름병원균의 지역적 발생상황과 몇 지역에서 수집된 균주의 생리적 분화 및 이에 따른 대목에서의 병원성을 조사하여 보고한다.

재료 및 방법

병원균 분리. 2005년~2006년에 걸쳐 경북 칠곡, 의성,

*Corresponding author
Phone) +82-53-320-0466, Fax) +82-53-320-0221
E-mail) lysook99@gba.go.kr

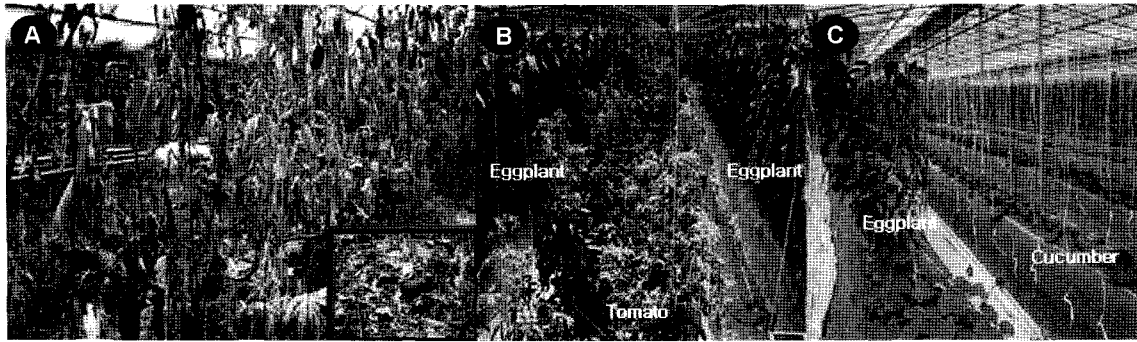


Fig. 1. Eggplant field infected by *Ralstonia solanacearum* in plastic house. Wilt symptoms of eggplant at the hottest time of the day (A), and replanted tomato and cucumber on behalf of eggplant infected to *R. solanacearum* (B,C).

대구, 달성, 경남 하동 등의 가지 재배포장에서 전형적인 풋마름병 증상을 나타내는 개체를 수집하여 분리에 사용하였으며, 일부는 2000년 농업과학기술원에서 수집 분리한 함안, 여주 균주를 분양받아 실험에 사용하였다. 병원균 분리는 줄기 일부분을 잘라 1% 차아염소산나트륨으로 표면 살균을 한 후 살균수로 2회 씻고 표면 살균된 조각을 1 ml 살균수가 들어있는 Eppendorf tube에 넣고 1시간 정도 상온에서 방치한 다음 현탁액을 TTC 배지 (Kelman, 1954)에 도말 배양하여 단일 colony를 순수 분리하였다.

PCR에 의한 동정. 분리된 균주를 TTC배지에 1일간 배양한 후 형성된 콜로니를 취하여 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 핵산을 분리하였다. PCR 반응액의 조성은 *Taq* DNA polymerase(Takara, Japan) 1U, $MgCl_2$ 1.5 mM, primer 각 10 pmole, dNTP 각 250 μ M으로 하여 2차 증류수를 사용하여 총 20 μ l 반응물로 조절하였다. 반응 사이클은 pre-denaturation으로 94°C에서 2분 경과 후, denaturation 94°C 30초, annealing 56°C 20초, extension 72°C 30초로 30회 반응시켰으며 최종 확장반응은 72°C에서 5분간 진행하였다. Primer설계는 *R. solanacearum* 편모영역 유전자 (GenBank Accession No. AF283285, Tans-Kersten 등, 2001)의 염기서열을 이용하여 primer 3(v.0.4.0, <http://frodo.wi.mit.edu>)로 *R. solanacearum*에 특이적인 flipF(5'-GAACGCAACGGTGC GAAC-3')와 flipR(5'-GGCGGCCTTCAGGGAGGTC-3')을 설계하였다. 설계된 primer는 NCBI BLAST기능을 이용하여 *R. solanacearum* 편모영역 유전자 이외의 세균이나 유전자에 반응하는지를 확인하였다. PCR 반응 후 증폭산물은 1% Agarose 겔(Takara, Japan)에서 전기영동을 실시하여 예상되는 크기인 470-bp band의 유무로 *R. solanacearum*을 동정하였다.

병원성 검정. 병원성 검정은 TTC배지에서 30°C, 48시

간 배양된 세균을 농도 $OD_{600}=0.4$ 로 멸균수에 현탁하여 맞춘 후 2~3엽기의 가지(*Solanum melongena*), 토마토(*Solanum lycopersicum*)와 고추(*Capsicum annuum*)의 뿌리를 가위로 십자형으로 절단하여 단근한 후 현탁액 10 ml을 관주하여 접종하여 온실에 보관하면서 발병을 유도하였다. 접종 후 10일 간격으로 발병을 조사하였으며 30일 후에 최종조사를 하였고 French의 발병기준에 의하여 1=병징이 보이지 않는 것; 2=일엽이상 전체의 1/2이하의 잎이 시들고 있는 것; 3=전체의 1/2정도 시드는 것; 4=거의 전체의 잎이 시드는 것; 5=완전히 시들어 말라죽는 것으로 구분하였다.

생리형 분화. 실험에 사용된 계통의 biovar 분화는 Hayward method(1964)에 의해 6개 carbohydrate인 cellobiose, lactose, maltose 등 disaccharide 활용과 dulcitol, mannitol, sorbitol 등 alcohol의 산화반응으로 조사하였다. 6개 10% carbohydrate solution이 첨가된 기본배지($NH_4H_2PO_4$ 1.0 g, KCl 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, Peptone 1.0 g, Bromothymol blue 0.03 g, Agar 3.0 g, Distilled water 1000 ml)에 도말된 세균현탁액의 색이 olivaceous green에서 yellow로 변화여부를 3일, 7일, 14일에 조사하였고 biovar 3, 4로 동정된 균주를 이용하여 가지 접수 2품종과 대목 3품종에 대해 병원성 정도를 조사하였다.

결과 및 고찰

본 실험에 사용된 균주는 Table 1과 같이 2005년~2006년에 경북 칠곡의 노지재배의 가지 포장에서 시드는 증상을 보이는 이병물을 채취하여 7개의 균주를 수집하였으며 대구 달성, 경남 하동 등 가지 주산지의 축성재배 하우스포장에서 풋마름병 증상을 보이는 개체의 줄기와 뿌리를 수집하여 대구 달성 24개, 대구시 3개, 경남 하동 10개, 경북 의성 4개의 균주를 수집하였다. 하우스재배 품

Table 1. *Ralstonia solanacearum* strains isolated from eggplants in Korea

Region	Year of collection	No. of strains	Scions	Rootstocks	Culture type
Chilgok	'05~'06	7	Chukyang	—	Field
Dalseong	'06. 7	24	Jangok	Torbambigor, House VF	Plastic house
Hadong	'06. 3	10	Jangok	Torbambigor, Daetaerang, House VF	Plastic house
Uiseong	'06. 6	4	Jangok	Daetaerang, House VF	Plastic house
Daegu	'06. 9	3	Jangok	Torbambigor, House VF	Plastic house
Haman*	'00. 10	1	—	—	—
Yeju*	'00. 10	2	—	—	—

*The isolates from NICE culture collection, —: not determined.

중은 대부분 '장옥'이 많았으며 주요대목은 '톨범비가' '하우스VF' '대태랑'이었고 점차 농가에서 풋마름병 방제를 위해서 저항성 대목인 '톨범비가' '대태랑' 접목묘를 많이 사용하고 있었으나 이들 대목을 사용한 포장도 풋마름병 풋마름병 발생이 점차 증가하고 있다(미발표). 한편 일본에서는 1997년경부터 풋마름병 저항성 대목인 '톨범비가'를 사용하는 축성재배 포장에서 발병이 증가하고 있어 새로운 저항성 대목의 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Kazutaka 등, 2000). 그러므로 가지종자를 일본에서 전량 수입하는 우리나라도 저항성 대목의 개발이 시급하다.

분리된 세균을 풋마름병원균 계통으로 동정하기 위해 *R. solanacearum*의 편모단백질 유전자에서 특이적인 primer

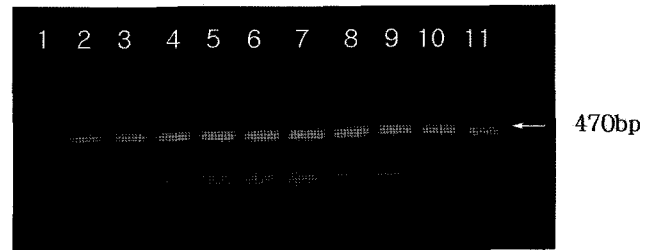


Fig. 2. Identification of *Ralstonia solanacearum* by amplified 470-bp DNA from the specific primer (flipcF/flipcR). Lane 1; 100-bp ladder marker, lane 2~7; Chilgok isolates, lane 8~11; Hadong isolates.

을 이용하여 PCR을 실시한 결과 6개의 칠곡균주와 4개의 하동균주에서 470-bp의 풋마름병 특이적 밴드가 관찰

Table 2. Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* isolates collected from Solanaceae plants at some different regions

Isolates	Region of isolates	No. of plants	Disease index ^a				
			Eggplant		Tomato	Pepper	
			Jangok	Chukyang	Momotaro	Daejangbu	Pocheongcheon
KV001	Chilgok	12	3.5	4.0	2.0	1.0	1.0
KV002	"	12	3.0	4.0	3.8	1.0	1.0
KV003	"	12	1.3	3.0	2.3	1.0	1.0
KV004	Hadong	12	2.0	4.3	3.5	1.0	1.0
KV005	"	12	3.3	4.5	3.8	1.0	1.0
KV006	"	12	2.3	2.0	1.0	1.0	1.0
KV007	"	12	1.3	1.8	3.3	1.0	1.8
KV008	"	12	1.2	2.5	3.8	1.0	1.0
KV009	"	12	2.0	3.5	2.3	1.0	1.0
KV010	"	12	2.8	3.6	3.7	1.0	1.0
KV011	"	12	3.3	3.0	5.0	1.0	1.0
KV012	"	12	2.9	4.1	3.9	1.0	1.0
KV013	"	12	3.0	2.5	4.5	1.0	1.0
KV014	"	12	3.5	4.8	4.3	1.0	1.3
KV015	"	12	1.8	3.5	4.8	1.3	1.5

^a1=no symptom; 2=one leaf wilting; 3=wilting about a half of leaves; 4=wilting nearly all the leaves; 5=whole plant wilting or dead.

되어 *R. solanacearum*으로 동정하였다(Fig. 2). Villa 등(2003)은 동일부위에서 다른 염기서열의 프라이머를 이용한 PCR 반응으로 282-bp의 특이적 밴드를 증폭하여 *R. solanacearum*을 동정할 수 있다고 보고하였다. 또한, Schonfeld 등(2003)도 종 특이적 primer(Rsol-fliCF/Rsol-fliCR)로 증폭되는 400-bp의 특이적 밴드로 동정하였다.

가지재배지에서 분리된 병원균 중 15개 균주의 병원성을 확인하기 위해 가지 '장옥' '축양' 2개 품종과 가지과 작물인 토마토 '모모타로' 1개 품종과 고추 '대장부' '포청천' 2개 품종에 대해 유묘검정을 실시하였다. 대부분의 균주가 가지와 토마토에 강한 병원성을 보였으나 KV006은 가지, 토마토와 고추, KV007, KV008은 가지, 고추에서 다소 약한 병원성을 나타내었다. 가지와 토마토는 접종 3일부터 시들음 증상을 관찰할 수 있는 강한 병원성을 나타냈고, 가지는 접종 7일 후부터 병징이 나타났다. 장옥품종 보다는 축양품종이 더 높은 감수성을 보였다. 그러나 고추는 접종 7일경 일부 시드는 증상이 나타났으나 점차 회복되어 거의 병징을 관찰할 수 없었다(Table 2).

가지에서 분리된 51개의 병원균에 대해 Hayward method(1964)에 의해 생리적 분화형을 조사한 결과 칠곡, 함안, 여주 병원균은 biovar 4로 동정 되었고 달성 균주

24개중 23개는 biovar 3가 23개 나머지 1개가 biovar 4로 동정되었다. 또한 하동, 의성, 대구 등 시설하우스재배의 균주들이 모두 biovar 3로 동정되어 우리나라 가지재배 포장의 *R. solanacearum* 생리적 분화는 biovar 3, 4 두 종류가 존재하는 것으로 조사되었다(Table 3). Mitsuo와 Kenichi(1999)는 가지 *R. solanacearum*을 Biovar 2, 3, 4로 구분하였고 Kochi현의 가지재배지에서 분리된 풋마름병원균은 biovar 1~4의 4종류가 분리되었으며 주종은 biovar 3와 biovar 4라고 보고했다(Kazutaka 등, 2000). 가지의 풋마름병 병원균 biovar 분화가 확인되어 biovar 3, 4로 동정된 KV011과 KV005 두 균주로 대목과 접수에 대해 병원성 정도를 조사한 결과 접수인 '장옥', '축양'은 모두 병원성에 큰 차이없이 강한 병원성을 나타냈다. 대목에 대해서 biovar 3인 KV011 균주는 일반대목인 '하우스VF'에 매우 높은 발병정도를 보였으며 풋마름병 저항성 대목인 '대태랑' '톨범비가'도 병원성을 나타내었다(Table 4).

그러므로 가지재배 농가에서 저항성 대목을 이용한 접목묘를 사용하더라도 앞으로 풋마름병의 발생은 더욱더 증가할 것으로 판단되며 풋마름병의 효과적인 방제를 위해 현재 지역별로 biovar 3의 분포정도와 저항성대목의 육종에 대한 연구가 필요할 것으로 사려된다.

Table 3. Oxidation of carbohydrates of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from eggplants in Korea

Regions	No. of strains	Biovars	Acid production from carbohydrates					
			Maltos	Lactose	Cellobiose	Mannitol	Sorbitol	Ducitol
Chilgok	7	4	+	+	+	+	+	+
Dalseong	23	3	-	-	-	+	+	+
	1	4	+	+	+	+	+	+
Hadong	10	3	-	-	-	+	+	+
Uiseong	4	3	-	-	-	+	+	+
Daegu	3	3	-	-	-	+	+	+
Haman	1	4	+	+	+	+	+	+
Yeju	2	4	+	+	+	+	+	+

*+, positive; -, negative.

Table 4. Severity of bacterial wilt on rootstocks and scions of eggplant by different biovars

Cultivar		Biovar3 (KV011)			Biovar4 (KV005)		
		Disease index		Dry weight (mg/plant)	Disease index ^a		Dry weight (mg/plant)
		Stem	Root		Stem	Root	
Rootstocks	Daetaerang	2.2	2.7	270	2.1	3.2	324
	Torbambigor	2.0	2.6	420	1.6	2.7	515
	House VF	3.9	4.3	136	1.2	2.7	729
Scions	Chukyang	4.8	4.9	-	4.4	4.7	-
	Jangok	4.6	4.8	-	4.4	4.6	-

^a1=no symptom; 2=one leaf wilting; 3=wilting about a half of leaves; 4=wilting nearly all the leaves; 5=whole plant wilting or dead.

요 약

*Ralstonia solanacearum*에 의한 풋마름병은 세계적으로 치명적인 병해중의 하나이며 우리나라에서는 가지, 토마토, 감자, 고추 등 가지과 작물에 발병이 보고되어 있다. 2005년~2006년 2년 동안 가지 주재배단지의 풋마름병 발생 포장에서 48개의 균주를 수집하여 분리 배양하였으며 *R. solanacearum*의 특이적인 flipcF/flipcR primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 470-bp의 풋마름병 특이적 밴드가 관찰되어 *R. solanacearum*으로 동정하였다. 분리 동정된 15균주로 각 기주별 병원성을 검정하였을 때 가지, 토마토에 병원성을 나타내었으나 고추는 저항성을 나타내었다. 가지 풋마름병원균의 biovar 분화는 biovar 3, 4로 동정되었으며 특히 biovar 3는 가지 풋마름병 저항성 대목에 다소 강한 병원성을 나타내어 저항성대목의 육종이 필요한 것으로 판단된다.

참고문헌

- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27: 265-277.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87.
- Jeong, Y., Kim, J., Kang, Y., Lee, S. and Hwang, I. 2007. Genetic diversity and distribution of Korea isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 91: 1277-1287.
- Kazutaka, Y., Yasuaki, M., Youich, K. and Shinji, K. 2000. Distribution of a bacterial group of *Ralstonia solanacearum* isolated from eggplants in Kochi prefecture and its control by using resistant rootstock. *Bull. Kochi. Agri. Res. Cent.* 9: 9-16.
- Kelman, A. 1954. The Relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.
- Mitsuo, H. and Kenichi, T. 1999. Phenotypic characteristics and cluster analysis of Japanese and reference strains of *Ralstonia solanacearum*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65: 604-611.
- Park, E-J., Lee, S-D., Chung, E-J., Lee, M-H. and Um, H-Y. 2007. Microtom-A model plant system to study bacterial wilt by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathol. J.* 23: 239-244.
- 서상태, 박종환, 한경숙, 정승룡, 이승돈. 2007. 우리나라에 분포하는 고추와 토마토 풋마름병원균(*Ralstonia solanacearum*) 계통들의 유전적 다양성. *식물병연구* 13: 24-29.
- Schonfeld, J., Heuer, H., Van Elsas, J. D. and Smalla, K. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of flhC fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7248-7256.
- Tans-Kersten, J., Huayu, H. and Caitilyn, A. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* 183: 3597-3605.
- Villa, J., Tsuchiya, K., Hortia, M., Opina, N. and Hyakumachi, M. 2003. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria based on 282-bp PCR-amplified fragment. *Plant Dis.* 87: 1377-1343.