

# *Ralstonia pseudosolanacearum* 생존에 관여하는 Sigma S 역할

## Sigma S Involved in Bacterial Survival of *Ralstonia pseudosolanacearum*

**\*Corresponding author**

Tel: +82-51-200-7551

Fax: +82-51-200-7505

E-mail: seonlee@dau.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-6142-7612><sup>†</sup>These authors equally contributed.최혜경<sup>1†</sup> · 조은정<sup>1†</sup> · 허지은<sup>1</sup> · 공현기<sup>2</sup> · 이선우<sup>1,3\*</sup> <sup>1</sup>동아대학교 응용생명과학과, <sup>2</sup>충북대학교 식물의학과, <sup>3</sup>동아대학교 농업생명과학연구소Hye Kyung Choi<sup>1†</sup>, Eun Jeong Jo<sup>1†</sup>, Jee Eun Heo<sup>1</sup>, Hyun Gi Kong<sup>2</sup>, and Seon-Woo Lee<sup>1,3\*</sup> <sup>1</sup>Department of Applied Bioscience, Dong-A University, Busan 49315, Korea<sup>2</sup>Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea<sup>3</sup>Institute of Agricultural Life Sciences, Dong-A University, Busan 49315, Korea

*Ralstonia pseudosolanacearum*, a plant pathogenic bacterium that can survive for a long time in soil and water, causes lethal wilt in the Solanaceae family. Sigma S is a part of the RNA polymerase complex, which regulates gene expression during bacterial stress response or stationary phase. In this study, we investigated the role of sigma S in *R. pseudosolanacearum* under stress conditions using a *rpoS*-defective mutant strain of *R. pseudosolanacearum* and its wild-type strain. The phenotypes of *rpoS*-defective mutant were complemented by introducing the original *rpoS* gene. There were no differences observed in bacterial growth rate and exopolysaccharide production between the wild-type strain and the *rpoS* mutant. However, the wild-type strain responded more sensitively to nutrient deficiency compared to the mutant strain. Under the nutrient deficiency, the *rpoS* mutant maintained a high bacterial viability for a longer period, while the viability of the wild-type strain declined rapidly. Furthermore, a significant difference in pH was observed between the culture supernatant of the wild-type strain and the mutant strain. The pH of the culture supernatant for the wild-type strain decreased rapidly during bacterial growth, leading to medium acidification. The rapid decline in the wild-type strain's viability may be associated with medium acidification and bacterial sensitivity to acidity during transition to the stationary phase. Interestingly, the *rpoS* mutant strain cannot utilize acetic acid, D-alanine, D-trehalose, and L-histidine. These results suggest that sigma S of *R. pseudosolanacearum* regulates the production or utilization of organic acids and controls cell death during stationary phase under nutrient deficiency.

**Keywords:** Bacterial wilt, *Ralstonia pseudosolanacearum*, Sigma S, Stress tolerance

Received May 6, 2024

Revised May 21, 2024

Accepted May 21, 2024

## 서론

*Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC)는 풋마름병을 유발하는 그람음성 식물병원세균으로 고온 다습한 온대,

아열대, 열대 기후 지역에서 가지과 작물을 포함한 50과 200종 이상 식물을 시들어 고사하게 한다(Hayward, 1991, 1994). 이 병원세균은 토마토, 감자, 가지, 담배, 고추 등 가지과 작물 외에 바나나, 생강 등과 같은 경제적으로 중요한 작물에 풋마름병을 유발하며(Hayward, 1994, 2000), 최근에는 장미과와 박과 작물에서 감염이 보고되어 병원균으로 인한 피해 우려가 높아지고 있다(Bergsma-Vlami 등, 2018; Wicker 등, 2007). 또한, 이 병원균은 토양서식세균으로 영양분이 없어도 식물 잔재물, 근권

**Research in Plant Disease**

eISSN 2233-9191

[www.online-rpd.org](http://www.online-rpd.org)

© The Korean Society of Plant Pathology

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

등에서 생존이 가능하며 물과 토양에서도 장기간 생존(Hayward, 2000; Ito 등, 1998)이 가능하여 방제가 어렵다.

RSSC는 최근 3개 종으로 세분화되었는데 기주 범위가 넓은 phylotype I과 III은 *Ralstonia pseudosolanacearum*으로 재명명되었다(Safni 등, 2014). RSSC 병원세균은 식물 뿌리나 줄기의 상처를 통하여 식물체에 침투하고(Roberts 등, 1988) 식물 세포벽 분해효소를 분비함으로써 물관으로 이동하여(Arlat 등, 1992; Genin과 Boucher, 2002) 급격히 증식한다. 증식 후 많은 양의 외피다당류를 분비하여 물관을 막아 수분 이동을 저지하고 세포벽을 파괴한다. 그 결과, 식물은 푸른 상태로 급속히 시들어 버리는 시들음 증상을 보인다. 밝혀진 병원성 요인으로는 병원성과 비기주 과민성 반응을 유도하는 제3분비계에 의해 분비되는 effector들 그리고 제2분비계에 의하여 분비되는 식물 세포벽 분해 효소, 외피다당류 등이 있다(Hikichi 등, 2007). 이외에도 RSSC 병원세균의 병원성 관련 후보로 호르몬, 독소, 부착에 관련된 단백질 등이 있다(Salanoubat 등, 2002). 특히 RSSC 병원세균은 기주 없이도 토양과 물에서 장기 생존하며 병원성을 유지하므로 병원세균 생태 연구가 병원균 제거에 매우 중요하다.

본 연구 대상인 sigma factor S (sigma S)는 *rpoS* 유전자에 의해 암호화되는 RNA 중합효소 복합체 일부로, 세균이 불리한 환경과 스트레스 환경 또는 정지기 동안에 많은 유전자 발현을 조절하며, 생존하게 한다(Asturova 등, 2007; Loewen과 Hengge-Aronis, 1994). *R. pseudosolanacearum* GMI1000의 sigma S는 기주 식물의 초기 인식과 감염에 관련되어 있음이 밝혀졌다. 본 연구에서는 다른 스트레스 조건들에서 *R. pseudosolanacearum* sigma S 역할과 병원성 및 기타 형질 관련 기능을 조사하기 위해서, *R. pseudosolanacearum*의 sigma S 변이체를 이용하였다. 이미 sigma S는 *R. pseudosolanacearum*에서 acyl-homoserine lactone 생산을 통한 quorum sensing과 다양한 스트레스 조건에서 생존에 관여한다는 것이 밝혀졌다(Flavier 등, 1998). 그러나 sigma S가 세균의 정지기 동안 많은 유전자 발현을 조절하므로 그중 어떤 경로로 sigma S가 세균의 오랜 기간 생존에 관여하는지 그 역할이 불분명하다. 따라서 *rpoS* 결여에 의해 변이체에 나타난 다양한 특징을 확인하기 위하여 야생형 균주와 변이체 비교 연구로 sigma S가 어떤 방식으로 병원세균의 장기 생존에 관여하는지 연구하였다.

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
DH5α	F <sup>-</sup> <i>recA1</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>hsdR17 thi-1 gyrA66 supE44 endA1 relA1</i> φ80d <i>lac</i> Δ( <i>lacZ</i> )M15	Sambrook et al. (1989)
HB101	F <sup>-</sup> <i>mcrB mrr hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galk2 xyl-5 mtl-1 rpsL20 supE44 λ<sup>-</sup></i>	Boyer and Roulland-Dussoix (1969)
<i>R. pseudosolanacearum</i> strains		
GMI1000	Wild type	Boucher et al. (1985)
RSSM	<i>rpoS</i> defective mutant of <i>R. solanacearum</i> GMI1000; Kan <sup>r</sup>	This study
R+pSSKm	Conjugant of <i>R. solanacearum</i> GMI1000 carrying pSSKm plasmid; Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	This study
Plasmids		
pSS1	Ap <sup>r</sup> ; 1.4 kb <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> fragment carrying the <i>rpoS</i> gene of <i>R. solanacearum</i> GMI1000 cloned into pGEM-T Easy	This study
pSS1-1	Tc <sup>r</sup> ; 1.4 kb <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> fragment of pSS1 in pRK415	This study
pSSKm	Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; gene replacement plasmid constructed in pRK415, donor for triparental mating	This study
pGEM-T Easy	Ap <sup>r</sup> ; TA cloning vector	Promega
pMKm	Km <sup>r</sup> ; kanamycin resistance cassette	Murillo et al. (1994)
pRK415	Tc <sup>r</sup> ; RK2-derived broad-host-range cloning vector	Keen et al. (1988)
pRK2013	Km <sup>r</sup> ; mobilization helper	Figurski and Helinski (1979)

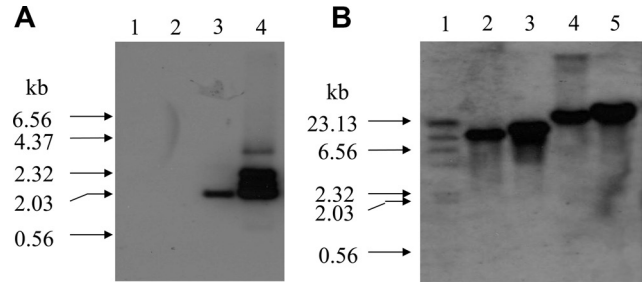
Kan<sup>r</sup>, chromosomal kanamycin resistance; Ap<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Tc<sup>r</sup>, tetracycline resistance; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance.

### 재료 및 방법

**사용 균주 및 배양 환경.** *R. pseudosolanacearum* 균주는 casamino acid-peptone-glucose (CPG) 배지(casamino acid 0.1%, peptone 1%, glucose 0.5%; Schaad 등, 2001)에서 24시간, 37°C, 혹은 CPG 배지에 2, 3, 4-triphenyl tetrazolium chloride이 첨가된 TZC 배지(Kelman, 1954)에서 통상 48시간, 30°C 조건에서 배양하였다. *Escherichia coli* 균주는 Luria-Bertani broth에 적절한 항생제를 첨가하여 24시간, 37°C에서 배양하였다(Miller, 1972). 본 실험에 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1과 같다. 사용한 항생제 최종 농도는 다음과 같다: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; tetracycline, 20 µg/ml.

***rpoS* 유전자 결여 변이체 제작.** Plasmid DNA 분리, genomic DNA 분리, DNA 재조합, 세균의 형질전환 등 일반적인 분자생물학 기술은 표준 방법(Sambrook 등, 1989)을 따랐다. *rpoS* 유전자가 결여된 *R. pseudosolanacearum* 균주는 GMI1000 균주를 야생형으로 제작하였다. *rpoS* 유전자는 아래의 프라이머를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)으로 증폭하였다. 사용한 한쌍의 primer는 다음과 같다: (SS-1: 5'-TACGGGAATTCTGTGCATCATCAAGCACAACG-3'; SS-2: 5'-TGCTGAAGCTGCGCGACGCGGAATAGACAACG-3'). PCR로 증폭한 GMI1000의 *rpoS* 유전자의 중간에 kanamycin 저항성 유전자가 삽입된 변이 플라스미드를 제작하였다(Fig. 1). 이 플라스미드를 이용하여 전통적인 marker exchange 변이기법으로 *rpoS* 유전자가 결여된 변이체를 선발하였다. 변이 유무는 Southern blot으로 확인하였다(Fig. 2). 선발된 변이체는 RSSM으로 명명하였다.

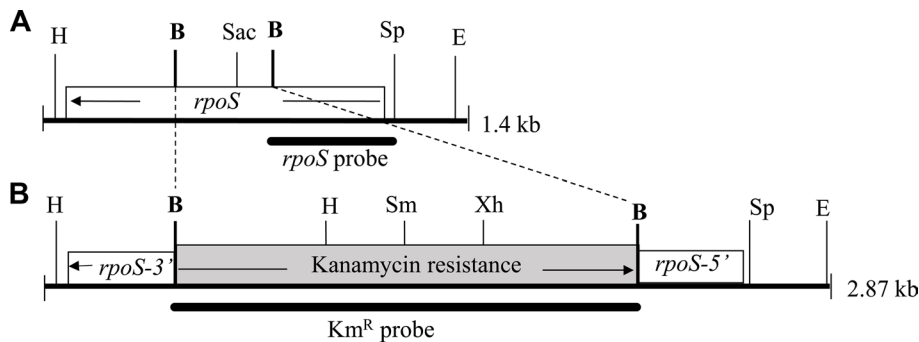
*rpoS* 유전자에 결함이 있는 균주인 *R. pseudosolanacearum* RSSM에 *rpoS* 유전자를 다시 도입하여 *rpoS* 유전자의 기능이



**Fig. 2.** Southern hybridization with kanamycin gene probe (A) and *rpoS* probe (B). (A) Lane 1, λDNA/*Hind*III marker; lane 2, wild type DNA; lane 3, mutant DNA; lane 4, kanamycin resistant plasmid 2.0 kb. Restriction. 2-4, *Pst*I. (B) Lane 1, λDNA/*Hind*III marker; lane 2, wild type DNA; lane 3, mutant DNA; lane 4, wild type DNA; lane 5, mutant DNA. Restriction. 2-3, *Eco*RI; 4-5, *Sca*I.

회복된 변이체를 준비하였다. 기능회복 변이체는 RSSM (*rpoS*-) 균주에 플라스미드 pSSM1-1를 보유하여 SSM1-1로 명명하였다. RSSM 변이체에 vector인 pRK415만 함유한 대조구는 SRK415로 명명하였다.

**다양한 조건에서 세균 생존 분석.** CPG 배지보다 peptone 이 1/10로 희석된 CPG 액체배지(dCPG)에 야생형 GMI1000과 변이체 RSSM을 3일 동안(정지기 유도) 배양한 후, 정지기인 배양액 생균수를 조사하였다. 영양분이 부족한 조건에서 세균 생존에 대한 실험을 위해서 dCPG 배지에서 3일 동안 배양하고, 추가로 15일 동안 배양하면서 날짜별로 TZC 배지에서 생균수를 조사하였다. 높은 활성산소 농도에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 내성(Baker와 Orlandi, 1995)에 대한 실험은 3일 동안 배양된 배양액 5 ml에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 20 mM 농도가 되게 처리하고, 60분 후에 생균수를 조사하였다. 그리고 낮은 활성산소에 대한 내성을 실험하기 위해서 mannitol-glutamate (MG) broth (10 g mannitol, 2 g L-glutamate, 0.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g NaCl, 0.2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O per liter)



**Fig. 1.** Restriction map of marker exchange mutagenesis construct for *rpoS* in *Ralstonia pseudosolanacearum*. (A) The restriction map of the 1.4 kb *Hind*III, *Eco*RI fragment of pSS1-1. The thin bars represent the cloning sites of pRK415. (B) Construction of a gene replacement plasmid by inserting kanamycin resistance gene in the middle of *rpoS* gene. H, *Hind*III; B, *Bam*HI; Sp, *Sph*I; E, *Eco*RI; Sm, *Sam*I; Xh, *Xho*I.

로 100배 희석된 세균 배양액 5 ml에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1.5 mM 농도로 첨가한 후, 60분 후에 생균수를 조사하였다. 상대적으로 낮은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 세균의 민감도는 세균의 초기 밀도가 낮을 때 명확하여 접종농도를 100배 희석하여 평가하였다.

다른 종류의 스트레스 내성도 다음과 같이 평가하였다. 정지기까지 배양한 세균 배양액을 최소배지 MG broth에서 10,000배 희석한 후, 다시 MG 액체배지에 100배 희석한 것을 46°C 수조에 10분 보관하며 수조에 넣기 전과 후에 생균수를 조사하였다. 이처럼 희석한 이유는 접종한 초기 세균 밀도를 4×10<sup>3</sup> cfu/ml로 맞추기 위함이다. 삼투압과 산(pH 4.0)에 대한 내성(Baker와 Orlandi, 1995)을 확인하기 위해서 MG broth에 10,000배 희석된 것을 각각 2 M NaCl 용액, 5 mM potassium biphthalate에 100배 희석하여 60분 후에 생균수를 조사하였다. 대조구는 다양한 스트레스에 대한 노출 없이 배양한 배양액을 시간별로 채취하여 살균수에 희석한 후, 생균수를 조사하였다.

**배지 pH 변화와 acetic acid 측정.** 서로 다른 pH (pH 6.2, pH 5.0, pH 4.0)로 조정된 dCPG broth에서 날짜별로 생균수를 조사함과 동시에 상등액을 취하여 pH 변화 정도를 측정하였고, dCPG broth (pH 6.2)에 세균을 날짜별로 배양하면서 그 상등액을 취하여 acetic acid analysis kit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany)를 이용해 acetic acid 농도를 측정하였다. 이때 초기 세균 접종은 지수성장기까지 전배양한 세균을 10<sup>8</sup> cfu/ml로 접종하며 희석된 배지에서 배양하며 조사하였다. Acetic acid의 농도는 acetic acid analysis의 UV 방법에 따라 측정하였다. 그리고 일원분산분석 방법을 통해 통계 분석하였다.

**세균 탄소원 이용 분석.** GMI1000, RSSM, SSM1-1 세 균주의 탄소원 이용능력의 차이를 분석하기 위해서 그람음성세균에 광범위하게 사용되는 Biolog GN2 MicroPlates (Biolog, Hayward, CA, USA)를 사용하였다. 두 균주는 CPG broth를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양한 후, 살균수에 현탁하여 OD<sub>600</sub> 값을 0.3으로 조정하였다. 준비된 세균 현탁액 150 µl를 96-well GN2 plates의 각 well에 넣은 후, 30°C에서 24시간 평판 배양하였다. 육안으로 색깔의 변화를 관찰하여 탄소원 이용 여부를 표기하였다. 보라색으로 색깔이 변화하면 +로 표기하였고 이는 well에 담긴 탄소원을 이용함을 의미하며, 색깔의 변화가 없으면 -로 표기하였고 이는 그 well의 탄소원을 이용하지 않음을 의미한다.

**Reverse transcription (RT)-PCR.** 세균의 탄소원 이용 차이를 비교하고 KEGG pathway를 통해 이에 관련된 유전자를 탐색하였다. 차이가 나는 탄소원과 연관되었다고 판단되는 유전자 발현을 RT-PCR로 비교하였다. 해당 유전자는 *R. pseudosolanacearum* GMI1000 균주의 alanine racemase인 *alr* (RSc1371)이었다. 사용된 primer는 대상 유전자의 651 bp 증폭하도록 다음의 서열로 준비하였다: (*alr*-F: 5'-AGCAATACCGACT-GACCAC-3', *alr*-R: 5'-TGATCATGTCCATCGACACG-3').

전체 RNA 분리는 CPG broth에서 2일 동안 배양한 후, 배양액의 1.5 ml를 원심분리로 pellet을 모아서 TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. RT-PCR은 OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따랐다.

## 결 과

***rpoS* 유전자 결여 변이체의 생육.** *R. pseudosolanacearum* 야생형 균주 GMI1000과 *rpoS* 결여 변이체 RSSM 사이의 생장 속도 및 외피다당류 생산에서는 차이가 나지 않았다. 두 균주는 액체배지와 고체배지에서 모두 동일한 속도로 자랐다(data not shown). 따라서, *rpoS* 변이가 *R. pseudosolanacearum*의 기초 생육에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다. 변이체는 토양관주 접종이나 줄기주입 접종에서 모두 야생형에 비해 병원성의 약화를 보였다(data not shown). 이는 기존에 *rpoS* 결여 변이체에서 병원성 약화에 대한 연구보고와 동일한 결과이다 (Flavier 등, 1998).

**스트레스 조건에서의 장기 생존에 관여하는 sigma S.** 야생형과 변이체를 다양한 조건에서 생존력을 검정하였다. 그 결과는 대부분의 조건에서 변이체의 생존율이 감소하였다(Table 2). 변이체의 감소된 생존율은 대부분 complementation 균주에서 회복되었다. *rpoS* 유전자가 암호화하는 sigma S의 이런 기능은 기존에 보고된 결과와 일치하였다(Flavier 등, 1998). 그러나 이전 보고와 달리 영양분이 매우 부족한 조건(peptone을 0.1% 함유하는 CPG 배지, dCPG)에서는 야생형 균주보다 변이체에서 생균수가 더 높게 유지되었다(Fig. 3). 이를 날짜별로 비교한 결과, 야생형인 GMI1000과 변이체 회복 균주인 SSM1-1의 경우 배양 5일째부터 생균수가 감소하기 시작하였고, 배양 7일째에는 두 균주에서 모두 생균수를 관찰할 수 없었다. 반면에, 변이체인 RSSM과 변이체 대조구인 SRK415의 경우 배양 10일째까지도 정지기 동안의 생균수와 비슷한 수준으로 생균수를 유지하였다(Fig. 3).

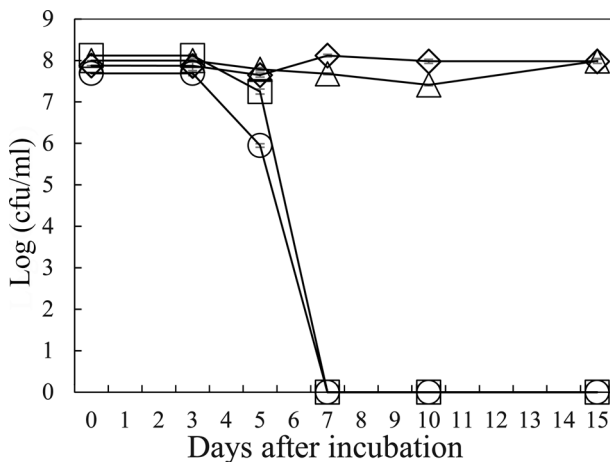
**Table 2.** Stress survival of *Ralstonia solanacearum* wild-type, *rpoS* mutant and complementation strain

Treatment <sup>a</sup>	Percent survival <sup>b</sup>		
	Wild type (GMI1000)	<i>rpoS</i> Mutant (RSSM)	Complementation (SSM1-1)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20 mM)	8.84	0.00014	26.43
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1.5 mM)	2.1	0.014	NT
NaCl (2.0 M)	2.77	15	NT
46°C	50	33.5	24.7
pH 4.0	0.15	0.135	0.076
Starvation	0	62.5	0

NT, not tested.

<sup>a</sup>Hydrogen peroxide at a final concentration of 20 mM was added to a stationary-phase culture containing ca.  $4.0 \times 10^9$  cfu/ml. Otherwise, cells were diluted to ca.  $4.0 \times 10^3$  cfu/ml before treatment.

<sup>b</sup>Percent survival was calculated as (cfu/ml after treatment/cfu/ml before the treatment)  $\times$  100.



**Fig. 3.** Viability of *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000, RSSM, SSM1-1, SRK415 strains in starvation condition. Cells were inoculated into 0.1% peptone CPG and incubated at 37°C, shaking incubation. Values are the average of three replications and vertical bars represent the standard deviation. □, GMI1000; △, RSSM; ○, SSM1-1; ◇, SRK415; cfu, colony forming unit; CPG, casamino acid-peptone-glucose.

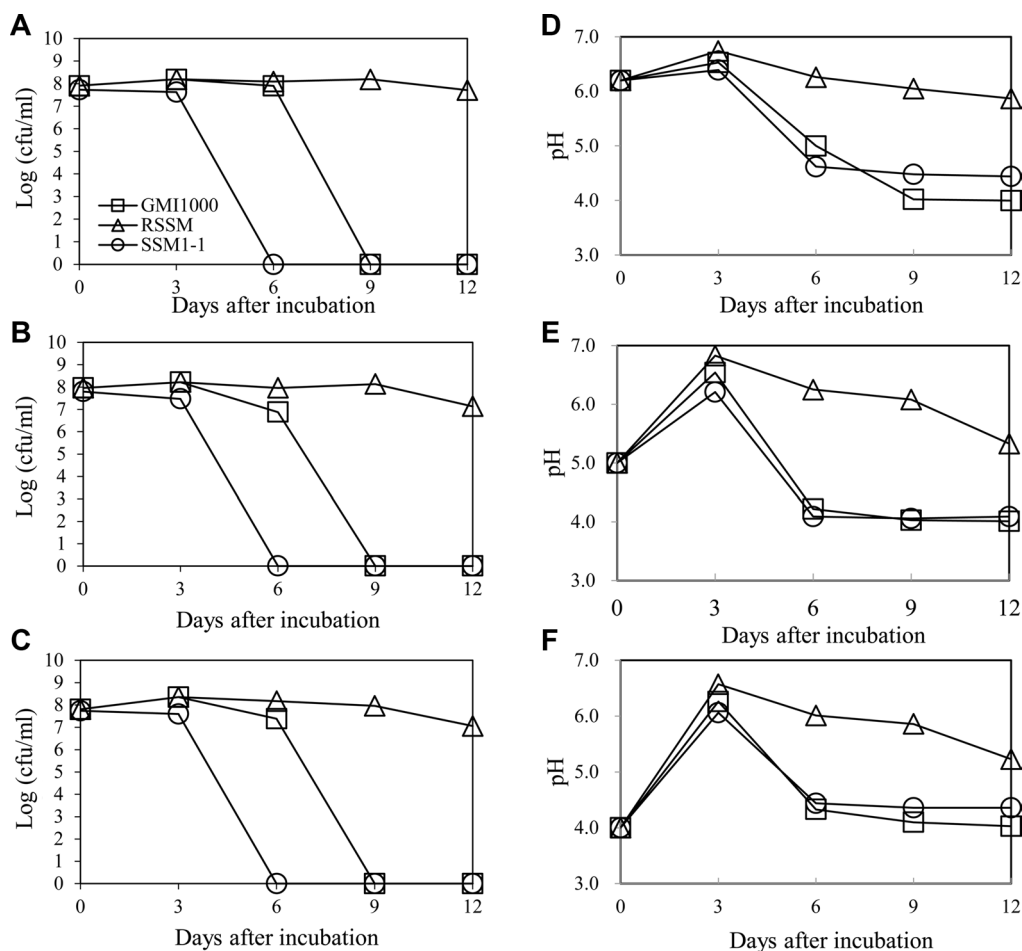
**영양결핍에서 변이체의 생존을 증가와 pH 변화 상관성.** 영양결핍 배지인 dCPG broth에서 야생형 균주가 변이체보다 더 빨리 사멸하는 원인을 분석하였다. 그 원인이 배지 산도의 변화일 가능성을 평가하기 위해 pH별(pH 6.2, pH 5.0, pH 4.0) dCPG broth에 야생형과 변이체를 12일까지 장기간 배양하면서 생균수를 조사하며 동시에 배양액을 취하여 pH 변화를 분석하였

다. dCPG broth의 pH와 상관없이 SSM1-1은 6일째 생균수를 관찰할 수 없었고, GMI1000은 9일째 생균수를 관찰할 수 없었지만, RSSM은 12일째까지 생균수가 유지되었다(Fig. 4A-C). 또한 pH 변화를 분석한 결과 dCPG broth의 pH와 상관없이 3일째까지 약 pH 7.0까지 증가하였다가 그 이후 6일부터 12일째까지 GMI1000과 SSM1-1은 pH 4.0으로 감소하였다(Fig. 4D-F). RSSM의 경우는 pH 6.0에서 안정화되었다(Fig. 4D). 이 결과는 정지기에 있는 세균의 pH에 대한 반응 결과와는 차이가 있었다. 정지기의 야생형과 변이체는 모두 초기 pH 4.0에서 매우 민감하여 균주가 급격히 사멸하였다(Table 2). 그러나 지수생장기의 세균이 높은 농도로 접종된 경우 정지기를 지나는 3일에서 6일 이후부터 야생형 균주의 생균수가 급격히 감소하고 배양액의 pH도 급격히 감소하였다(Fig. 4). 이는 dCPG broth에서 배양한 두 균주 배양액 간의 pH 차이가 생산되는 acetic acid 때문일 수도 있다고 예상되었다. 그러나 예상과 달리 3일, 7일째 acetic acid를 측정된 결과, RSSM이 GMI1000과 SSM1-1보다 농도가 2배 가까이 더 높았다(data not shown). 두 균주 배양액의 pH 차이는 예상과 달리 acetic acid에 기인한 것이 아님을 확인하였다.

**변이체 탄소원 이용의 변화와 변이체 생존.** 영양결핍 dCPG broth에서 pH를 변화시키는 유기산을 찾기 위해 Biolog로 탄소원 이용에서 변화를 비교하였다. 야생형과 변이체 회복 균주에서는 acetic acid, D-alanine, D-trehalose, L-histidine을 이용하였지만, 변이체에서는 그 탄소원들을 이용하지 못하였다(Table 3). 그리고 Biolog 분석 결과를 유전자 발현 수준에서 검정하였다. D-alanine의 이용경로를 KEGG 경로에서 탐색하였다. D-alanine의 이용은 alanine racemase를 암호화하는 *alr* 유전자에 의해 D-alanine이 L-alanine으로 전환된 후 이용된다. RT-PCR 결과, *alr* 유전자의 발현이 야생형 균주와 변이체 사이에서 RNA 발현의 차이를 보였다(Fig. 5). 변이체에서는 *alr*이 전혀 발현되지 않아서 *alr*이 *rpoS*에 의해 발현이 조절됨을 알 수 있었다.

## 고 찰

본 연구는 풋마름병을 유발하는 병원세균 *R. pseudosolanacearum*의 sigma S를 암호화하는 유전자 *rpoS*가 결여된 변이체를 이용하여 야생형 균주와 세균 생존과 연관된 특징을 비교하였다. 병원균이 아닌 다수 세균에서 이미 sigma S는 영양분 결핍, UV 노출, 활성산소종과 높은 온도에서 생존과 연관되어 있음이 보고되었다(Badger와 Miller, 1995; Fang 등, 1992; Lange와 Hengge-Aronis, 1991; Sarniguet 등, 1995). *R. pseudosolanacearum*에서 sigma S 유전자는 1개 존재하며 이



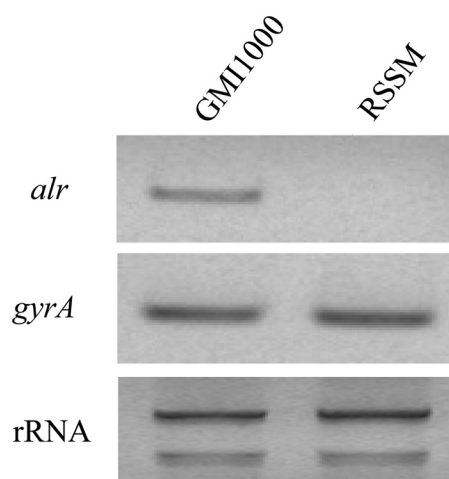
**Fig. 4.** Bacterial viability (A-C) and a pH change (D-F) of culture during the starvation condition. Initial pH of culture medium for (A) and (D) dCPG was pH 6.2, those for (B) and (E) dCPG were pH 5.0, and those for (C) and (F) dCPG were pH 4.0. Values are the average of three replications and vertical bars represent the standard deviation. □, GMI1000; △, RSSM; ○, SSM1-1; CPG, casamino acid-peptone-glucose.

**Table 3.** Nutritional characteristics of *Ralstonia solanacearum* strains using BIOLOG GN2 plates

Characteristic	Strains		
	GMI1000	RSSM	SSM1-1
Utilization of:			
Acetic acid	+	-	+
D-alanine	+	-	+
D-trehalose	+	-	+
L-histidine	+	-	+

+, utilization of C-source; -, no utilization of C-source.

는 이 sigma 인자가 세균병원성과 생존에 관여할 것을 시사한다. 본 연구에서 제작된 *rpoS* 유전자 결여 변이체는 고체배지에서 자라는 형태나 외피다당류의 생성이 야생형 균주와 차이가 없었고, 배지의 종류에도 크게 영향을 받지 않았다. 미생물



**Fig. 5.** Defect in D-alanine metabolism in *rpoS* mutant of *Ralstonia pseudosolanacearum* shown by RT-PCR analysis of *alr*. Lane 1, GMI1000 grown on CPG; lane 2, RSSM grown on CPG. RT *alr*, alanine racemase, RT *gyrA* (control); probable DNA gyrase (subunit a). RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; CPG, casamino acid-peptone-glucose.

의 최소배지 생장을 위해서는 아미노산, 비타민, 핵산을 합성하는 능력은 생장의 전제 조건이 되는데, 변이체가 완전배지뿐만 아니라 최소배지에서도 잘 자라는 것은 이러한 영양원을 합성하는 능력에 결함이 없었음을 의미한다. 이는 *R. pseudosolanacearum*의 sigma S가 세균의 일반적인 생장에는 관여하지 않음을 나타낸다.

다양한 스트레스 조건에서 야생형 균주와 *rpoS* 변이체의 생존을 비교하였을 때 야생형 균주는 과산화수소의 노출에서 변이체에 비해서 높은 생존수를 유지하는 반면에 영양분결핍 조건에서는 낮은 생존수를 보였다. 영양분결핍 조건에서 야생형 균주의 낮은 생존은 이전에 연구된 *R. solanacearum*의 AW1 균주와는 상반된 결과를 나타냈다(Flavier 등, 1998). 영양분결핍 조건에서 배양하며 야생형 균주와 변이체의 생존수를 비교해 본 결과(Fig. 3)는 sigma S가 세균의 정지기 이후 영양분결핍 조건에서 오랜 기간 생존과 관련되어 있을 것을 나타낸다. 이전의 연구에서 *E. coli*의 sigma S는 정지기유전자 발현에 관련이 있다고 밝혀졌지만(Hengge-Aronis, 1996a, 1996b; Kolter 등, 1993; McCann 등, 1991), 영양결핍 조건에서 변이체의 장기 생존과의 연관성은 보고된 바 없다. 세균의 정지기 이후에 영양분결핍 조건에서 장기 생존은 이 세균이 토양이나 물에서 생존하는 것과 직접적으로 연관되어 있을 수 있다.

정지기 이후에 영양분결핍 조건(dCPG 배지)에서 장기간 배양시 야생형 균주 급격한 사멸의 원인을 찾기 위하여 다양한 요인을 분석하였다. *Pseudomonas chlororaphis*의 sigma S는 alanine, proline, histidine, arginine, urea, ammonium, glutamine와 같은 질소원의 이용에 관여한다고 보고되었다(Astavrova 등, 2007). 그러나 최소배지인 MG 배지에서 질소원인 L-glutamic acid의 양을 줄인 배지에서 장기간 배양을 해보았을 때, GM1000 야생형 균주와 *rpoS* 변이체 사이 생존수에는 차이가 없었다(data not shown). 흥미롭게도 세균 배양 이후 dCPG broth 배양액의 pH를 측정하였을 때 야생형 균주 배양액이 산성화되었음을 확인하였다. 정지기에 있는 세균은 초기 산성 pH에서 매우 급격히 생존수가 감소하였는데(Table 2) 비해 지수성장기의 고농도 세균은 일정 시간 지난 후 정지기로 예상되는 시기에 pH 감소가 연동된 세균 생존수의 급격한 감소를 보였다(Fig. 4). 아마도 세균의 pH에 대한 민감도는 세균 성장기와 생리 상태에 따라 영향을 받는 것으로 여겨진다. 배양액의 산성화가 정지기에 들어선 야생형 균주의 이른 사멸의 원인으로 판단되는데 이는 배양액에서 어떤 유기산의 생산과 이용의 차이 때문일 것이라고 예상된다. 이전 연구에 따르면 인산결핍 조건에서 *E. coli* 야생형 균주의 배양액에서는 pH가 4.7이었고, *rpoS* 변이체 배양액의 pH는 6.8로 더 높았다. 그러나 이 경우 변이체 배

양액에서 acetic acid의 농도가 낮았다(Guillemet와 Moreau, 2008). 본 연구에서는 변이체에서 야생형 균주보다 배양액의 acetic acid 농도가 더 높았는데 이는 예상과 달랐으며 배양액에 다른 유기산의 축적이 야생형 균주에서 높을 것으로 여겨진다. 야생형 균주와 달리 변이체에서는 acetic acid와 일부 아미노산인 D-alanine, D-trehalose, L-histidine을 이용하지 못하였는데 이는 sigma S가 이들 이용에 관련이 있을 것으로 생각된다. 유기산 때문에 야생형 균주가 더 빨리 사멸하는지에 대한 직접적인 증거는 없으므로 향후 추가 연구 필요하다. 변이체는 야생형 균주와 달리 L-alanine은 이용하지만, D-alanine은 이용하지 못하였는데 이는 D-alanine으로부터 L-alanine을 생성하는 효소인 alanine racemase의 유전자인 *alr*가 변이체에서 발현이 감소하였기 때문이다. 그러므로 *rpoS* 변이체에 D-alanine의 높은 함량이 유지될 가능성이 있다. D-alanine은 세균에서 세포벽을 합성하거나 삼투압을 유지하는 데 중요한 역할을 하므로(Hwang, 2006; Song과 Lee, 2006) 이에 대한 후속 연구도 필요하다.

꽃마름병은 토양이나 물에서 생존하며 전염하는 RSSC 복합체 세균에 의해 유발되므로 토양과 물에서 병원세균을 제거하는 것이 가지과 작물을 꽃마름병으로부터 안전하고 키우는 전략이 될 수 있다. 본 연구는 *R. pseudosolanacearum*의 sigma S는 영양분의 결핍 조건에 병원세균이 민감한 반응을 조절하며 세균의 장기 생존에 관여함을 제시한다. 그러므로 sigma S가 어떤 기작으로 세균의 장기 생존에 관여하는지 그 유전경로를 파악하여 해당 유전경로에서 *R. pseudosolanacearum* 특이적인 경로를 탐구하는 것은 꽃마름병 방제를 위한 새로운 기회를 제공할 수 있다. 즉, *R. pseudosolanacearum* 특이적인 생존 경로를 파악하여 그 기능을 억제할 수 있다면, 병원균을 토양과 물에서 제거할 효과적인 방법을 탐구할 수 있을 것이다. 이를 위해 sigma S에 의해 조절되는 하위 유전자들의 병원균 생존관련 역할을 연구해야 한다.

## 요 약

*Ralstonia pseudosolanacearum*은 토양과 물에서 오랫동안 생존하고, 가지과 작물에 심각한 꽃마름병을 일으키는 식물병원세균이다. Sigma S는 세균의 스트레스 환경에서 반응 또는 정지기 동안 유전자 발현을 조절하는 RNA 중합효소 복합체의 일부인 단백질이다. 본 연구는 스트레스 조건에서 *R. pseudosolanacearum*의 sigma S의 역할을 조사하기 위해서, *R. pseudosolanacearum*의 GM1000 균주의 sigma S를 암호화하는 *rpoS* 유전자 변이체를 준비하여 야생형 균주와 세균의 특정

을 비교하였다. 아울러 *rpoS* 유전자 역할은 원래 유전자를 변이체에 도입하여 *rpoS* 유전자 표현형 회복을 확인하였다. 야생형 균주와 *rpoS* 결여 변이체는 성장 속도, 외피다당류 생산, 식물체에서 병원성, 식물 세포벽 분해 효소 활성에서 차이를 보이지 않았다. 그러나 야생형 균주는 영양분결핍 조건에서 변이체보다 더 민감하게 반응하였고 과산화수소가 첨가된 조건에서 변이체보다 덜 민감하게 반응하였다. 흥미롭게도 영양분결핍 조건에서 *rpoS* 결여 변이체에서는 장기간 생균수를 유지하지만, 같은 조건에서 야생형 균주 생균수는 빠르게 감소하였다. 그리고 두 균주 배양액 pH를 측정한 결과, 야생형 균주와 변이체 간에 상당한 차이가 나타났다. 야생형 균주는 성장하면서 빠르게 배지의 pH가 감소하여 산성화되었다. 그러므로 야생형 균주의 빠른 사멸은 배지가 산성화되면서 정지기 상태 세균의 산성 pH에 대한 민감도 때문일 것이다. Biolog 분석으로 *rpoS* 변이체는 acetic acid, D-alanine, D-trehalose, L-histidine을 이용하지 못함을 확인하였다. 본 연구 결과는 *R. pseudosolanacearum* 세균의 sigma S가 영양분결핍 조건에서 정지기 동안 유기산 생산 또는 이용을 조절하며 정지기 세포사멸도 조절하는 것을 보여준다.

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgments

This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant (No. 2020R1A2C3005453 and 2020R1A6A1A03047729), Biomaterials Specialized Graduate Program funded by the Korea government (MSIT, MOE, ME), Republic of Korea.

## References

- Arlat, M., Gough, C. L., Zischek, C., Barberis, P. A., Trigalet, A. and Boucher, C. A. 1992. Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5: 187-193.
- Asturova, O. B., Bass, I. A. and Khmel', I. A. 2007. Suggested interrelationships of RNA-polymerase sigma S subunit and nitrogen control system in *Pseudomonas chlororaphis*. *Genetika* 43: 1026-1031. (In Russian)
- Badger, J. L. and Miller, V. L. 1995. Role of RpoS in survival of *Yersinia enterocolitica* to a variety of environmental stresses. *J. Bacteriol.* 177: 5370-5373.
- Baker, C. J. and Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321.
- Bergsma-Vlami, M., van de Bilt, J. L. J., Tjou-Tam-Sin, N. N. A., Westenberg, M., Meekes, E. T. M., Teunissen, H. A. S. et al. 2018. Phylogenetic assignment of *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Phylotype I) isolated from *Rosa* spp. *Plant Dis.* 102: 2258-2267.
- Boucher, C. A., Barberis, P. A., Trigalet, A. P. and Demery, D. A. 1985. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2449-2457.
- Boyer, H. W. and Roulland-Dussoix, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-465.
- Fang, F. C., Libby, S. J., Buchmeier, N. A., Loewen, P. C., Switala, J., Harwood, J. et al. 1992. The alternative sigma factor katF (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89: 11978-11982.
- Figurski, D. H. and Helinski, D. R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76: 1648-1652.
- Flavier, A. B., Schell, M. A. and Denny, T. P. 1998. An RpoS (sigmaS) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 28: 475-486.
- Genin, S. and Boucher, C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Mol. Plant Pathol.* 3: 111-118.
- Guillemet, M. L. and Moreau, P. L. 2008. Fur-dependent detoxification of organic acids by *rpoS* mutants during prolonged incubation under aerobic, phosphate starvation conditions. *J. Bacteriol.* 190: 5567-5575.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87.
- Hayward, A. C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent *Pseudomonas solanacearum*, eds. by A. C. Hayward and G. L. Hartman, pp. 127-135. CAB International, Oxford, UK.
- Hayward, A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. In: Encyclopedia of Microbiology Vol. 4, ed. by J. Lederberg, pp. 32-42. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Hengge-Aronis, R. 1996a. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, eds. by F. C. Neidhardt, R. I. Curtis, J. L. Ingram, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, et al., pp. 1497-1512. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA.



- Hengge-Aronis, R. 1996b. Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21: 887-893.
- Hikichi, Y., Yoshimochi, T., Tsujimoto, S., Shinohara, R., Nakaho, K., Kanda, A. et al. 2007. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Biotechnol.* 24: 149-154.
- Hwang, S. Y. 2006. Alanine racemase specific activity detection and serine racemase expression and specific activity detection. M. S. thesis. Inha University, Incheon, Korea. 1-69 pp.
- Ito, S., Ushuima, Y., Fujii, T., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Yoshiwara, S. et al. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semiselective medium and a PCR technique. *J. Phytopathol.* 146: 379-384.
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D. and Trollinger, D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 70: 191-197.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.
- Kolter, R., Siegele, D. A. and Tormo, A. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855-874.
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R. 1991. Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J. Bacteriol.* 173: 4474-4481.
- Loewen, P. C. and Hengge-Aronis, R. 1994. The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 53-80.
- McCann, M. P., Kidwell, J. P. and Matin, A. 1991. The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 4188-4194.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA.
- Murillo, J., Shen, H., Gerhold, D., Sharma, A., Cooksey, D. A. and Keen, N. T. 1994. Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. tomato PT23. *Plasmid* 31: 275-287.
- Roberts, D. P., Denny, T. P. and Schell, M. A. 1988. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170: 1445-1451.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L. and Kappler, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 3087-3103.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M. et al. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415: 497-502.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. A. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. 1-3. Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
- Sarniguet, A., Kraus, J., Henkels, M. D., Muehlchen, A. M. and Loper, J. E. 1995. The sigma factor sigma S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 12255-12259.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Song, J. S. and Lee, Y. N. 2006. D-alaninepeptidase increases the vulnerability of bacterial cells to osmotic stress and antibiotics. *Kor. J. Microbiol.* 42: 299-305. (In Korean)
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M. et al. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6790-6801.