



ORIGINAL ARTICLES

국내 배추무름병균과 배추검은썩음병균의 스트렙토마이신 저항성 조사

이미현 · 고희래 · 이용환 · 홍성기 · 최효원^{1*}농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과, ¹농촌진흥청 재해대응과Investigation of Streptomycin Resistance of *Pectobacterium* spp. and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Isolated from Kimchi Cabbage in KoreaMi-Hyun Lee, Hyoung-Rai Ko, Yong Hwan Lee, Sung Kee Hong, Hyo-Won Choi^{1*}

Crop Protection Division, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Republic of Korea

¹Disaster Management Division, Rural Development Administration, Jeonju 54875, Republic of Korea

(Received on September 20, 2023. Revised on November 5, 2023. Accepted on November 7, 2023)

Abstract Kimchi cabbage is an important crop as one of the five major vegetable crops in Korea. It is reported that soft rot and black rot caused by *Pectobacterium* sp. and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* known in kimchi cabbage. In 2020 and 2021, samples showing symptoms of soft rot and black rot were collected from Taebaek, Haenam, Goesan, Wanju, and Gimje in Kimchi cabbage, and *Pectobacterium* sp. and *X. campestris* pv. *campestris* were isolated 19 and 4, respectively. Isolates of *Pectobacterium* sp. and *X. campestris* pv. *campestris* were screened for streptomycin resistance, with one from an field in Goesan showing resistance at 100 µg/ml streptomycin. *X. campestris* pv. *campestris* streptomycin-resistant SmR (XccSmR) occurs a point mutation that altered codon lysine (AAA) to arginine (AGG) of the ribosomal *rpsL* gene, containing codon 88. To assess the levels of streptomycin resistance, XccSmR showed resistance to streptomycin at levels 2,500 µg/ml. Identification of streptomycin-resistant strains is important to prevent the emergence of resistant populations. Thus, isolation of *X. campestris* pv. *campestris* from various kimchi cabbage-growing regions and resistance monitoring are needed to reduce the spread of streptomycin resistance strains.

Key words kimchi cabbage, *Pectobacterium* sp., *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, streptomycin resistance

서 론

배추는 한국의 5대 채소작물 중 하나로 매우 중요한 작물이다. 한국식물병명목록에 의하면 국내 배추에 발생하는 병은 33종이 보고되어 있으며, 특히 세균에 의한 무름병과 검은썩음병 등의 피해가 잘 알려져 있다(The Korean Society of Plant Pathology, 2022). 무름병균은 *Pectobacterium*속의 병원균으로 지제부와 잎에 무름증상을 나타내고, 특유의 냄새가 나서 다른 병과 구분이 가능하다. *Pectobacterium*속 내 16종이 감자, 배추, 무 등에서 병원성을 가지며, 국내 배추에서는 *P. carotovorum*, *P. brasiliense*, *P. odoriferum*,

P. aroidearum, *P. versatile*이 병을 일으키는 것으로 보고되었다(Lee et al., 2014; Park et al., 1999; Roh et al., 2009; Seo et al., 2004; Jee et al., 2020). 검은썩음병균은 *Xanthomonas*속의 병원균으로 배추, 양배추, 콜라비, 무 등 배추과 작물에 발생하며 잎 조직에 검은색의 병반을 만들며, 심하면 줄기까지 침입하는 것으로 알려져 있다(Velasco et al., 2013; Chan and Goodwin 1999; Vicente and Holub 2013). 또한 검은썩음병의 병반은 무름병을 일으키는 *Pectobacterium*속균과 부패병을 일으키는 *Pseudomonas*속균과 같은 다른 병원균이 쉽게 침투할 수 있게 되어 무름 증상이 동반되기도 한다(Williams 1980; Cook et al., 1952).

국내의 경우, 배추 무름병 방제를 위해 옥솔린산, 스트렙토마이신, 옥시테트라사이클린, 가스가마이신 등 항생제 8

*Corresponding author
E-mail: hyon338@korea.kr

개의 유효성분에 대해 단계 47개 품목, 합제 27개 품목이 농촌진흥청 농약안전정보시스템에 등록되어있다(Rural Development Administration Regulation of pesticide toxicity). 한편 인도, 케냐 등에서는 양배추의 검은썩음병 방제를 위해 스트렙토마이신, 옥시테트라사이클린, 동제 등을 이용한 방제 연구가 수행되었고(Knosel 1965; Bhat et al., 2000), 우리나라에도 양배추에는 여러 약제가 등록되어 있으나 배추 검은썩음병에는 등록된 약제가 없는 실정이다.

항생제는 1950년 대부터 인간의 세균병 치료를 위해 사용되었으며 식물 세균병 방제를 위한 농업용 스트렙토마이신은 벼에서 처음 사용되기 시작하였다(Sundin and Bender 1993, Yong et al., 2004). 전세계적으로 스트렙토마이신을 연속해서 사용함에 따라 최근 *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 등에서 저항성균이 보고되었다(Scheck et al., 1996; Xu et al., 2013; Sundin and Wang 2018). 스트렙토마이신 저항성 기작은 게놈 내 30S 리보솜의 S12 단백질을 코딩하는 *rpsL* 유전자의 단일염기 변이와 플라스미드 내 *strA*와 *strB* 유전자의 삽입에 의한 저항성 발현 등 2가지가 알려져 있다(Sundin and Bender 1993, Chiou and Jones 1995). 국내 식물병원 세균에 대한 항생제 저항성 연구 보고는 많지 않으나 최근에는 *Pectobacterium* sp.에 의한 무름병, *P. syringae* pv. *actinidiae*에 의한 참다래 궤양병 및 *E. pyrifoliae*에 의한 사과 가지검은마름병에서 스트렙토마이신 저항성이 보고되었다(Lee et al., 2020; Kim et al., 2021; Lee et al., 2023). 본 연구에서는 고령지 배추 재배지인 태백, 월동배추 재배지 해남, 가을

배추 재배지 괴산 등에서 분리한 배추 무름병균과 검은썩음병균을 동정하고, 국내 배추 무름병 약제로 사용되고 있는 스트렙토마이신을 대상으로 저항성 정도를 조사하였으며, 유전자 변이 분석을 수행하여 저항성 기작을 구명하였다.

재료 및 방법

병원균 분리

2021년과 2022년 태백, 괴산 등 배추 재배지에서 무름증상과 검은썩음병의 병징이 보이는 시료를 수집한 GPS 정보는 Table 1과 같다. 병원균을 분리하기 위하여 이병시료를 흐르는 수돗물로 세척한 후 물기를 제거하고, 이병부위의 시료를 채취하여 1% 차아염소산나트륨 70% 에탄올로 표면을 소독한 후, 멸균수로 세척하였다. 표면을 소독 한 시료에서 물기를 제거한 후 500 µl 멸균수와 비즈가 담긴 튜브에 넣고 30분간 방치하였다. Taco Prep Bead Beater (GeneReach, Taiwan)를 이용하여 마쇄한 후 마쇄액 10 µl를 이용하여 Tryptic soy agar (TSA, Difco)에 획선 도말한 후, 25°C에 배양하였고, 단일 균총을 취하여 균을 순수분리 하였다. 또한 실험에 활용하기 위한 대조균주로서 배추무름병균 *P. carotovorum* 2균주(KACC 18645, KACC 22674), *P. brasiliense* 2균주(KACC 22675, KACC 22678), *P. odorifum* 1균주(KACC 22680), *P. versatile* 1균주(KACC 22669), 검은썩음병균 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 6균주(KACC 10377, KACC 17966, KACC 19132, KACC 19135, KACC 19136), *Xanthomonas*속 2종 2균주(KACC

Table 1. GPS information on the fields from which the sample was collected

No.	Strain	City	GPS
1	MHPb01	Wanju	35.825531, 127.044364
2	MHPecto2101	Taebaek	37.324627, 128.971006
3	MHPecto2102	Taebaek	37.327345, 128.968922
4	MHPecto2103	Taebaek	37.277156, 128.991127
5	MHPecto2104	Taebaek	37.280820, 128.988684
6	MHPecto2105	Taebaek	37.268358, 128.953900
7	MHPecto2106	Gimje	35.853265, 126.903521
8	MHPecto2107	Gimje	35.853656, 126.912609
9	MHPecto2108	Gimje	35.853400, 126.904200
10	MHPecto2109	Gimje	35.853100, 126.904300
11	MHPecto2110	Haenam	34.376194, 126.614083
12	MHPecto2111	Haenam	34.377533, 126.616486
13	MHPecto2112	Haenam	34.377418, 126.618890
14	MHPecto2113	Haenam	34.377328, 126.606497
15	MHPecto2114	Haenam	34.390627, 126.607624
16	MHPecto2201	Taebaek	37.217939, 128.967567
17	MHPecto2202	Taebaek	37.215344, 128.970909
18	MHPecto2203	Goesan	36.8485731, 127.745617
19	MHPecto2204	Goesan	36.788083, 127.794183
20	MHXcc2101	Taebaek	37.217806, 128.967611
21	MHXcc2201	Goesan	36.848573, 127.745617
22	MHXcc2202	Goesan	36.788083, 127.794183
23	MHXcc2203	Goesan	36.701441, 127.724629

Table 2. Survey information for the field where streptomycin-resistant (SmR) *Pectobacterium* sp. and *Xanthomonas* sp. was detected

No.	Strain	Identification	Year	City	SmR	Codon 88 of <i>rpsL</i>
1	KACC 18645	<i>P. carotovorum</i>	2014	Jeongseon	-	-
2	KACC 22674	<i>P. carotovorum</i>	-	Jeongseon	-	-
3	KACC 22675	<i>P. brasiliense</i>	-	Pyeongchang	-	-
4	KACC 22678	<i>P. brasiliense</i>	-	Hongcheon	-	-
5	KACC22680	<i>P. odoriferum</i>	-	Gangneung	-	-
6	KACC22669	<i>P. versatile</i>	-	Gangneung	-	-
7	MHPb01	<i>P. brasiliense</i>	2021	Wanju	-	-
8	MHPecto2101	<i>Pectobacterium</i> sp.	2021	Taebaek	-	-
9	MHPecto2102	<i>Pectobacterium</i> sp.	2021	Taebaek	-	-
10	MHPecto2103	<i>P. carotovorum</i>	2021	Taebaek	-	-
11	MHPecto2104	<i>Pectobacterium</i> sp.	2021	Taebaek	-	-
12	MHPecto2105	<i>Pectobacterium</i> sp.	2021	Taebaek	-	-
13	MHPecto2106	<i>P. carotovorum</i>	2021	Gimje	-	-
14	MHPecto2107	<i>P. carotovorum</i>	2021	Gimje	-	-
15	MHPecto2108	<i>P. carotovorum</i>	2021	Gimje	-	-
16	MHPecto2109	<i>P. carotovorum</i>	2021	Gimje	-	-
17	MHPecto2110	<i>P. carotovorum</i>	2021	Haenam	-	-
18	MHPecto2111	<i>P. carotovorum</i>	2021	Haenam	-	-
19	MHPecto2112	<i>P. carotovorum</i>	2021	Haenam	-	-
20	MHPecto2113	<i>P. brasiliense</i>	2021	Haenam	-	-
21	MHPecto2114	<i>P. brasiliense</i>	2021	Haenam	-	-
22	MHPecto2201	<i>P. carotovorum</i>	2022	Taebaek	-	-
23	MHPecto2202	<i>P. carotovorum</i>	2022	Taebaek	-	-
24	MHPecto2203	<i>P. brasiliense</i>	2022	Goesan	-	-
25	MHPecto2204	<i>P. brasiliense</i>	2022	Goesan	-	-
26	MHXcc2101	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2021	Taebaek	+	AGG
27	MHXcc2201	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2022	Goesan	-	-
28	MHXcc2202	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2022	Goesan	-	-
29	MHXcc2203	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2022	Goesan	-	-
30	KACC 10377	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	-	-	-	-
31	KACC 17966	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	-	Gangneung	-	-
32	KACC 19132	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2013	Pyeongchang	-	-
33	KACC 19133	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2013	Gangneung	-	-
34	KACC 19135	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2013	Samcheok	-	-
35	KACC 19136	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2013	Taebaek	-	-
36	KACC 14864	<i>Xanthomonas</i> sp.	-	-	-	-
37	KACC 11139	<i>Xanthomonas</i> sp.	1999	Cheonan	-	-

* SmR : streptomycin-resistant

14864, KACC 11139)를 국립농업과학원 농업미생물은행 (KACC)에서 분양 받았다.

병원균 동정

병원균을 동정하기 위하여 순수분리한 23개의 균주로부터 DNA 추출 키트(Plant DNA extraction kit, Qiagen)를 사용하여 DNA를 분리하였다. 무름병균의 정확한 동정을 위한 multilocus sequencing analysis (MLSA)를 실시하기 위해 Aconitate hydratase 1 (*acnA*), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (*gapA*), Isocitrate dehydrogenase, specific for NADP+ (*icdA*), Malate dehydrogenase (*mdh*), Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*), Glucose-6-phosphate isomerase (*pgi*), Gamma-glutamylphosphate reductase (*proA*) 유전자의 염기서열을 확보하였다(Ma et al., 2007). 각 유전자 증폭은 Table 3의 프라이머를 이용하였고 PCR 조건은

Ma et al. (2007)에 기술된 방법에 따라 실시하였다. 7개의 유전자의 염기서열을 순서대로 붙여 총 3,118 bp의 서열을 대상으로 계통수를 작성하였다. 검은썩음병균은 16S rRNA를 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'), 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하고 염기서열을 확보하였다(Sanko et al., 2018). 확보된 염기서열을 이용하여 MEGA version 7.0.26에서 Maximum Likelihood Tree로 Bootstrap 횟수를 1,000번복으로 설정하고 Juke-Cantor model로 선택하여 계통수를 작성하였다.

스트렙토마이신 저항성 검정

병원균의 스트렙토마이신 저항성 검정을 위하여 TSA 배지에 스트렙토마이신 100 µg/ml을 첨가하여 제조하였다. 수집한 균주는 스트렙토마이신 100 µg/ml이 첨가된 배지에 평판 도말하여 저항성 균주를 선별하였고, 농업미생물은행에서

Table 3. Primers developed for MLSA of *Pectobacterium* sp.

Target	Primer	Primer sequence (5'-3')	Amplicon length (bp)
<i>acnA</i> (Aconitate hydratase)	acnA3F	CMA GRG TRT TRA TGC ARG AYT TTA C	288
	acnA3R	GAT CAT GGT GGT RTG SGA RTC VGT	
<i>gapA</i> (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A)	gapA326F	ATC TTC CTG ACC GAC GAA ACT GC	407
	gapA845R	ACG TCA TCT TCG GTG TAA CCC AG	
<i>icdA</i> (Isocitrate dehydrogenase, specific for NADP+)	icdA400F	GGT GGT ATC CGT TCT CTG AAC G	479
	icdA977R	TAG TCG CCG TTC AGG TTC ATA CA	438
<i>mdh</i> (Malate dehydrogenase)	mdh86F	CCC AGC TTC CTT CAG GTT CAG A	395
	mdh628R	CTG CAT TCT GAA TAC GTT TGG TCA	
<i>mtlD</i> (Mannitol-1-phosphate dehydrogenase)	mtlD146F	GGC CGG TAA TAT CGG CCG TGG	495
	mtlD650R	CAT TCG CTG AAG GTT TCC ACC GT	
	mtlDF	CTG YTG GAT GCI CTS AAC MGY CG	
	mtlDR	TCC ACR GCR GAA TCW ACR AAT CC	
<i>pgi</i> (Glucose-6-phosphate isomerase)	pgi815F	TGG GTC GGC GGC CGT TAC TC	616
	pgi1396R	TGC CTT CGA ATA CTT TGA ACG GC	
	pgiF2	CTG TCY ACC AAT GCS AAA GCC G	
	pgiR2	CAG CAG GAT GGA GTT GGT CGG	
	pgiF	TCT YTI GGI TTT GAK AAY TTT GA	
<i>proA</i> (Gamma-glutamylphosphate reductase)	pgiR	YGC CGC YGI AAA TTC IGC TTC	616
	proAF1	CGG YAA TGC GGT GAT TCT GCG	
	proAR1	GGG TAC TGA CCG CCA CTT C	

분양받은 균주는 희선도말하여 저항성 여부를 검정하였다.

스트렙토마이신 저항성 관련 유전자 검정 및 *rpsL* 유전자 변이 조사

총 23개 균주를 대상으로 스트렙토마이신 저항성을 검정한 결과, 괴산에서 분리된 MHXcc2101 1개 균주가 저항성인 것으로 나타났다. 이 균주의 저항성 발현기작을 분석하기 위해 DNA 추출 키트(Plant DNA extraction kit, Qiagen)를 사용하여 DNA를 분리하였다. *strA*와 *strB* 유전자와 *rpsL* 유전자 부위의 염기서열 변이를 분석하기 위하여 Table 4의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였고, PCR 조건은 Sharma et al. (2022)에 기술된 방법에 따라 실시하였다. PCR 산물 5 µl를 1% 아가로스겔에 로딩하여 PCR 증폭산물을 확인하였다.

스트렙토마이신 저항성 균주의 항생제 반응 검정

TSA에 배양된 스트렙토마이신 저항성 균주의 균총을 멸

균수 5 ml에 현탁하여 OD₆₀₀을 0.1로 조정된 세균 현탁액 100 µl를 취하여 TSA 배지에 평판 도말하였다. 평판 도말한 배지에 스트렙토마이신(0.064~1,024 µg/ml)이 농도별로 처리된 E-test (Biomérieux) 스트립을 배지에 올려놓고 28°C에서 24시간 배양하였다. 대조균으로 스트렙토마이신 감수성 균주인 *X. campestris* pv. *campestris* (KACC 10377)과 비교하였다. 또한 저항성 균주의 최소억제농도(MIC, minimal inhibition concentration)를 확인하기 위하여 저항성 균주를 평판 도말한 후 스트렙토마이신 0, 1, 5, 100, 500, 1,000, 2,500 µg/ml 농도를 8 mm paper disc (Toyo Roshi, Japan)에 올려 스트렙토마이신 반응을 조사하였다.

결과 및 고찰

병원균 동정

태백, 해남, 괴산, 완주, 김제에서 수집한 이병시료에서 병원균을 분리한 결과, 총 19개의 *Pectobacterium*균과 4개의

Table 4. Primers developed for polymerase chain reaction

Target	Primer	Primer sequence (5'-3')	Amplicon length (bp)
<i>strA</i>	strA-F	CCAAGTCAGAGGGTCCAATC	760
	strA-R	TGACTGGTTGCCTGTCAGAG	
<i>strB</i>	strB-F	TAGATCGCGTTGCTCCTCTT	758
	strB-R	ACGTTTCGCAACCTGTTCTC	
<i>rpsL</i>	rpsL-F	CAAGCGACCACCTACAAGAGT	315
	rpsL-R	GTACTTGGAAACGGCCTTGAC	

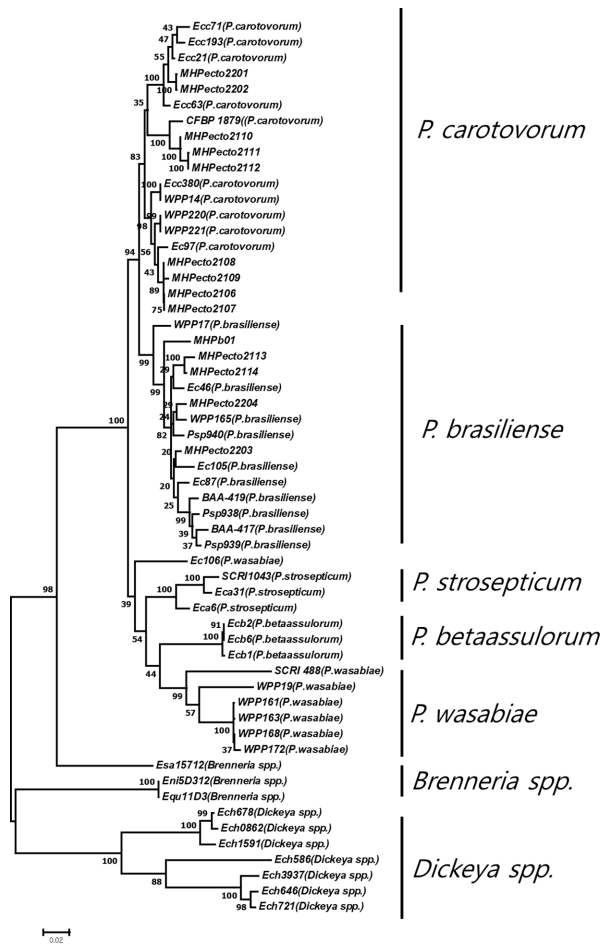


Fig. 1. Phylogenetic analysis of *Pectobacterium* strains based on sequences of *acnA*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *mtlD*, *pgi*, and *proA*. DNA sequences sourced from the NCBI database were aligned using ClustalW and phylogenetic trees were constructed and visualized using the maximum likelihood and MEGA7, respectively.

*Xanthomonas*균이 분리되었다. *Pectobacterium*균은 *Brenneria*속과 *Dickeya*속을 포함하여 MLSA 분석과 계통수 작성을 통해 *P. carotovorum*, *P. brasiliense* 2종으로 동정하였다 (Fig. 1). 대표균주 *P. carotovorum* 1종(GenBank: LC782010)과 *P. brasiliense* 2종(GenBank: LC645699, LC685064)의 16S rRNA 염기서열을 NCBI 데이터베이스에 등록하였다. *Pectobacterium*속은 *Brenneria*속, *Dickeya*속과 계통적으로 거리가 멀고, 종 단위로 그룹핑되는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 1). Jee et al. (2020) 등에 의하면 국내 배추재배지에서는 5종이 병을 일으키는 것으로 알려져 있으나 이번 조사에서 분리한 균주에서는 *P. odoriferum*, *P. aroidearum*, *P. versatileis*는 분리되지 않았다. 고랭지 지역인 태백에서 분리한 균주는 모두 *P. carotovorum*이었으며 해남 지역에서는 *P. carotovorum*과 *P. brasiliense* 두 종이 함께 분리되었다. 시료 수집 연도가 짧고 균주 수가 많지 않아 지역별 우점 병원균은 명확하지 않으나 지속적인 조사가 이루어진다면 지역별 우점종을 알 수 있을 것으로 사료된다. 태백, 괴산지역에서 분리한 검은썩음병균 4개 균주는 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 계통수를 작성한 결과 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*로 동정되었다(Fig. 2). 채집 당시 시료는 병반 부위에 무름병 등의 2차 감염은 없었으며 병원균 분리 시 검은썩음병 이외의 병원균은 분리되지 않았다. 분리한 균주를 배추 유품에 접종한 결과, 모두 병원성이 있는 것으로 확인되었다(데이터 미제시). 국내의 경우, 배추 검은썩음병에 대한 연구가 매우 적어 발생현황, 병원균의 특성 등에 대한 연구가 미진하다.

스트렙토마이신 저항성 검정

무름병균과 검은썩음병균의 스트렙토마이신 저항성을 검

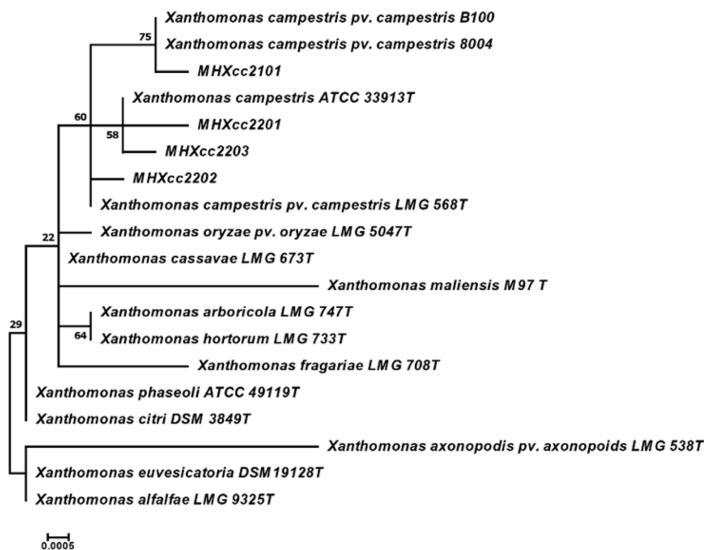


Fig. 2. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Xanthomonas* spp. based on sequences of 16S rRNA. DNA sequences sourced from the NCBI database were aligned using ClustalW and phylogenetic trees were constructed and visualized using the maximum likelihood and MEGA7, respectively.

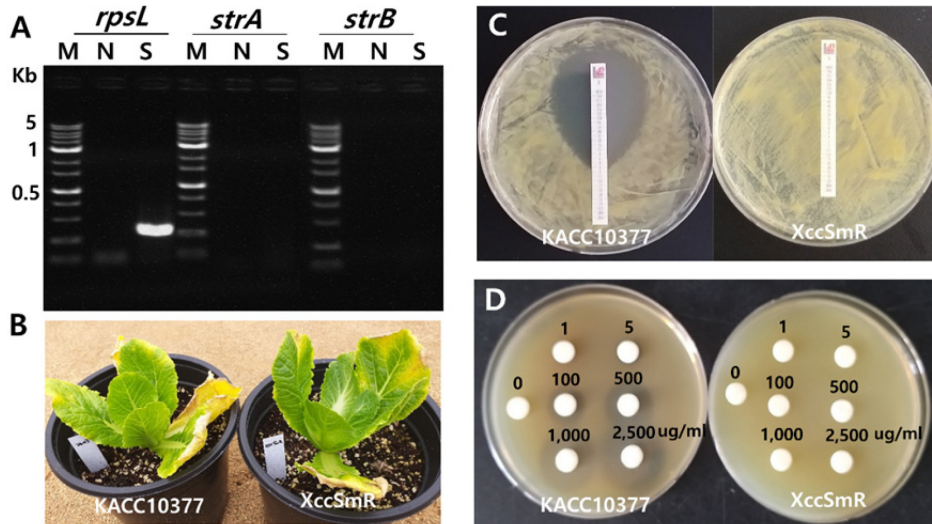


Fig. 3. A, Polymerase chain reaction (PCR) detection of the *rpsL* and *strA* and *strB*. Lane M: 1-kb ladder. N: Negative control. S: XCCSmR; B, Pathogenicity assay in kimchi cabbage inoculated with KACC10377 and XccSmR. KACC10377 and XccSmR produced similar symptoms in kimchi cabbage at 14 days postinoculation. C-D, Inhibitory effect of streptomycin on the growth of KACC10377 and XCCSmR, assessed using the E-test strip (C) and the paper-disc method (D). Streptomycin concentration: 0 - 2,500 µg/ml.

정한 결과, 무름병균에서는 저항성을 갖는 균주가 분리되지 않았으나 과산에서 분리한 검은썩음병균(XCCSmR) 1균주가 스트렙토마이신 저항성인 것으로 확인되었다(Table 2). 대조균으로 사용된 국립농업과학원 농업미생물은행(KACC) 균주는 모두 스트렙토마이신 감수성으로 확인되었다. 저항성을 나타낸 검은썩음병균(XCCSmR)을 스트렙토마이신이 농도별로 코팅되어 있는 E-test 스트립 테스트를 한 결과, 감수성 균주인 KACC10377는 최소억제농도가 3 µg/ml 인 것에 비해 저항성 균주는 1,024 µg/ml에서도 저지환이 형성되지 않아 스트렙토마이신에 저항성임을 다시 확인하였다(Fig. 3C). 저항성 균주(XCCSmR)를 배추 유묘 5주에 3 반복으로 접종한 결과, 감수성 균주와 비교하여 병원성에 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 3B).

본 연구에서 수집한 배추무름병균은 스트렙토마이신 저항성인 균주가 없었으나, 이전 연구에서는 배추, 무에서 분리한 76개의 무름병 균주 중 5개 균주가 스트렙토마이신 저항성인 것으로 조사된 바 있다(Kim et al., 2021). 현재 국내에는 배추 검은썩음병 방제를 위해 등록된 약제는 없으나, 스

트렙토마이신이 함유된 살균제가 배추 무름병 방제에 사용되고 있다. Stall and Thayer (1962)에 연구에 의해 스트렙토마이신 저항성 세균점무늬병균(*X. campestris* pv. *vesicatoria*)의 발생이 처음 보고되었으며, 이 후 Xu et al. (2013)에 의해 벼 흰잎마름병균(*X. oryzae* pv. *oryzae*)의 스트렙토마이신 저항성균주가 보고되었다. 본 연구에서 분리된 저항성 검은썩음병균의 경우, 배추 재배지에서 무름병 방제를 위해 스트렙토마이신 등의 약제 살포가 빈번히 이루어진 것이 저항성균이 출현한 원인으로 생각되며, 향후 여러 지역과 포장에서 검은썩음병균을 분리하여 저항성을 모니터링할 필요가 있다.

저항성 균주의 유전자 변이 분석

배추에서 분리한 스트렙토마이신 저항성 균주의 *strA*와 *strB* 유전자의 삽입 여부를 확인한 결과, 두 유전자의 삽입은 확인되지 않았다(Fig. 3A). 따라서 또 다른 기작 중 하나인 *rpsL* 유전자의 염기서열을 분석한 결과 88번 아미노산 부위에서 라이신(AAG)이 아르기닌(AGG)으로 변이가 발생

Table 5. Difference in *rpsL* sequence between the streptomycin-sensitive and -resistant isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Strain	SmR ^{a)}	Sequence
8004	-	CCGTGGTCTCTGATTCGTGGTGGTTCGCGTCAAGGATCTTCCC GGTTG
MAFF302021	-	CCGTGGTCTCTGATTCGTGGTGGTTCGCGTCAAGGATCTTCCC GGTTG
3811	-	CCGTGGTCTCTGATTCGTGGTGGTTCGCGTCAAGGATCTTCCC GGTTG
XccSmR	+	CCGTGGTCTCTGATTCGTGGTGGTTCGCGTCAAGGATCTTCCC GGTTG

^{a)} Absence (-) or presence (+) of streptomycin resistance

한 것을 확인하였다(Table 5). *Xanthomonas*속의 스트렙토마이신 저항성균주는 *rpsL* 유전자의 단일염기변이에 의해 43번 또는 88번 아미노산이 치환되면서 저항성을 획득하는 것으로 알려져 있다(Zhang et al., 2015). 따라서 본 연구에서 분리된 스트렙토마이신 저항성 검은썩음병균(XccSmR)은 *strA*와 *strB* 유전자의 삽입이 없고, *rpsL* 유전자의 88번 아미노산이 치환되면서 저항성을 획득한 것으로 나타났다. 본 저항성 균주의 최소 억제농도를 확인한 결과, 스트렙토마이신 2,500 µg/ml 이상에서도 억제되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3D). 기존 연구에 의하면 *rpsL* 유전자의 염기서열 변이에 의해 스트렙토마이신 저항성을 획득한 *E. amylovora* 등의 병원균 역시 MIC 농도가 2,000 µg/ml 이상인 것으로 보고되었다(Chiou and Jones 1995; McManus et al., 2002). 향후 국내 균주의 MIC 농도를 구하기 위해서 더 높은 농도에서의 조사가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 국내 배추 재배지에서 분리한 검은썩음병균의 스트렙토마이신 저항성균을 국내에서 처음으로 분리하였고, 계놈 내 단일염기변이를 확인하였다. 이는 배추 무름병 방제를 위한 지속적인 항생제의 살포가 방제 대상 병원균인 무름병뿐만 아니라 검은썩음병균이 항생제 저항성 획득할 수 있다는 가능성을 나타낸다. 따라서 배추 무름병의 방제를 위해 사용하는 항생제를 계통별로 교호 살포하고, 무름병 뿐만 아니라 검은썩음병, 세균검은무늬병 등의 세균병을 대상으로 항생제 저항성 모니터링을 지속적으로 실시하며, 효과적인 미생물 제제의 개발을 추진하는 등 항생제 저항성 관리를 위한 종합적 대책 마련이 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 연구과제(PJ01724 203)의 지원으로 수행되었습니다. 무름병균과 검은썩음병균을 분양하여 주신 국립농업과학원 농업미생물은행에 감사드립니다.

Author Information and Contributions

Mi-Hyun Lee designed and coordinated all the experiments. Mi-Hyun Lee, Hyo-Won Choi, Yong Hwan Lee, Sung kee Hong performed cultivation, DNA extraction, and purification. Hyoung-Rai Ko performed the genomic analysis. Mi-Hyun Lee wrote the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Mi-Hyun Lee, NAS, RDA, Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-9385-8393>

Hyoung-Rai Ko, NAS, RDA, Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-0643-6986>

Yong Hwan Lee, NAS, RDA, Senior researcher, <https://orcid.org/0000-0002-1721-991X>

Sung kee Hong, NAS, RDA, Senior researcher, <https://orcid.org/0000-0003-4204-8371>

Hyo-Won Choi, RDA, Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-3496-3855>

이해상충관계

저자들은 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

Literature cited

- The Plant Pathology Journal, 2022, List of Plant Diseases in Korea, Korea. (In Korean)
- Rural Development Administration, 2023, Regulation of pesticide toxicity. <http://psis.rda.go.kr/psis/agc/res/agchmregistStusLst.ps> (Accessed Oct. 10. 2023).
- Bhat NA, Masoodi SD, Sidique SH, 2000. Chemical control of black rot of cabbage under field conditions in Kashmir valley. Appl. Biol. Res. 2(1/2):87-89.
- Chan JWYF, Goodwin PH, 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Adv. 17(6):489-508.
- Chiou CS, Jones AL, 1995. Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. Mol. Plant Pathol. 85:324-328.
- Cook AA, Larson RH, Walker JC, 1952. Relation of the black rot pathogen to Cabbage seed. Phytopathology. 42(6):316-320
- Jee S, Choi JG, Lee YG, Kwon M, Hwang I, et al., 2020. Distribution of *Pectobacterium* species isolated in South Korea and comparison of temperature effects on pathogenicity. Plant Pathol. J. 36(4):346-354.
- Kim D, Kim N, Kim C, Jeong MI, Oh KK, et al., 2021. Investigation of antimicrobial minimum inhibitory concentration of *Pectobacterium* spp. isolated from agricultural produce. Korean J. Pestic. Sci. 25(4):333-342.
- Knosel D, 1965. On the effectiveness of antibiotics and other preparations against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage. Phytopath. Z. 54:31-39.
- Lee DH, Kim JB, Lim JA, Han SW, Heu S, 2014. Genetic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* isolated in Korea. Plant Pathol. J. 30(2):117-124.
- Lee M-H, Ham H, Choi H-W, Park DS. 2023. Isolation of streptomycin-resistant *Erwinia pyrifoliae* in Korea. Plant Dis. 107(3):616-619.

- Lee YS, Kim GH, Song YR, Oh CS, Koh YJ, et al., 2020. Streptomycin resistant isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. *Research in Plant Dis.* 26(1):44-47.
- Ma B, Hibbing ME, Kim HS, Reedy RM, Yedidia I, et al., 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology.* 97(9):1150-1163.
- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:443-465.
- Park D, Kim J, Lee H, Hahm Y, Lim C, 1999. Black leg of potato plants by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Dis. and Agricul.* 5(1):64-66.
- Roh EJ, Lee SD, Lee YH, Ra DS, Choi JH, et al., 2009. Diverse antibacterial activity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Korea. *J. Microbial. Biotechnol.* 19(1):42-50.
- Stall RE, 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Dis. Rep.* 46:389-392.
- Sanko TJ, Kraemer AS, Niemann N, Gupta AK, Flett BC, et al., 2018. Draft genome assemblages of 10 *Xanthomonas vasicola* pv. *zetae* strains, pathogens causing leaf streak disease of maize in South Africa. *Genome Announcements.* 6(26):e00532-18. DOI 10.1128/genomeA.00532-18.
- Scheck HJ, Pscheidt JW, Moore LW. 1996. Copper and streptomycin resistance in strains of *Pseudomonas syringae* from Pacific Northwest nurseries. *Plant Dis.* 80:1034-1039.
- Seo ST, Koo JH, Hur JH, Lim CK, 2004. Characterization of Korean *Erwinia carotovora* strains from potato and Chinese cabbage. *Plant Pathol. J.* 20(4):283-288.
- Sharma J, Manjunatha N, Pokhare SS, Patil PG, Agarrwal R, et al., 2022. Genetic diversity and streptomycin sensitivity in *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* causing oily spot disease in pomegranates. *Horticulture.* 8(5):441.
- Sundin GW, Bender CL, 1993. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(4): 1018-1024.
- Sundin, GW, Wang N, 2018. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56:161-180.
- The Korean Society of Plant Pathology, 2022. List of Plant Disease in Korea. (In Korean)
- Velasco P, Lema M, Francisco M, Soengas P, Cartea ME, 2013. In vivo and in vitro effects of secondary metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecules.* 18(9): 11131-11143.
- Vicente JG, Holub EB, 2013. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol. Plant Pathol.* 14(1): 2-18.
- Williams PH, 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis.* 64(8):736-742.
- Xu Y, Luo Q, Zhou M, 2013. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLOS.* 8(2): e55962. DOI 10.1371/journal. Pone.0055962
- Zhang Y, Chen Y, Zhu X, Xu Y, Hou Y, et al., 2011. A molecular mechanism of resistance to streptomycin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Phytoparasitica.* 39: 393-401.
- Zhang Y, Yang X, Zhou FY, Zhang AF, Zhu XF, et al., 2015. Detection of a mutation at codon 43 of the *rpsL* gene in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and *X. oryzae* pv. *oryzae* by PCR-RFLP. *Genet. and Mol. Res.* 14(4):18587-18595.

● ● 국내 배추무름병균과 배추검은썩음병균의 스트렙토마이신 저항성 조사

이미현 · 고희래 · 이용환 · 홍성기 · 최효원^{1*}

농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과, ¹농촌진흥청 재해대응과

요약 배추는 한국의 5대 채소작물 중 하나로 중요한 작물이다. 배추에서는 세균에 의한 무름병과 검은썩음병 등에 의한 피해가 알려져 있으며 배추, 무 등에서 분리한 무름병균의 스트렙토마이신 저항성균의 발생이 이미 알려져 있다. 2020년과 2021년 태백, 해남, 괴산, 완주, 김제에서 배추 무름증상과 검은썩음병의 병징을 보이는 시료를 수집하여 19개의 무름병균과 4개의 검은썩음병균을 분리하였다. 이들 균주의 스트렙토마이신 저항성 반응을 검정한 결과, 괴산에서 분리한 검은썩음병균에서 스트렙토마이신 저항성을 확인하였다. 스트렙토마이신 저항성 검은썩음병균(XccSmR)은 *rpsL* 유전자 88번 염기의 변이에 의해 아미노산 라이신(AAG)이 아르기닌(AGG)으로 치환되었다. 저항성균주(XccSmR)의 스트렙토마이신 최소억제농도를 검정한 결과 2,500 µg/ml 이상인 것으로 나타났다. 배추 재배지에서 무름병 방제를 위해 스트렙토마이신 등의 약제 살포가 빈번히 이루어진 것이 저항성균이 출현한 원인으로 생각되며, 향후 여러 지역과 포장에서 검은썩음병균을 분리하여 저항성을 모니터링할 필요가 있다.

색인어 배추, 무름병균, 검은썩음병균, 스트렙토마이신 저항성

● ●