

비병원성 Bacteriocin 생성 *Pseudomonas solanacearum*을 이용한 담배 세균성마름병 방제

이영근

한국인삼연초연구소

Protection of Tobacco Plants from Bacterial Wilt with Avirulent Bacteriocin-Producing Strains of *Pseudomonas solanacearum*

Y. K. Yi

Korea Ginseng and Tobacco Reaserch Institute

ABSTRACT

Control effect of an avirulent bacteriocin-producing strain(ABPS) Y61-1 of *Pseudomonas solanacearum* on bacterial wilt was 58.8 % when the bacterial suspension had poured onto the rhizosphere soil of tobacco cultivar NC82 on one day before transplanting to the field and of hilling time. Until eight weeks after inoculation, survival of the strain on rhizoplane and in stem of the plants inoculated was better than that of other four strains tested. It suggested that survival of the ABPS in and on the plants should be supported for the sufficient protection.

서 론

Bacteriocin 생성균주를 이용한 토양전염성 식물 세균병 방제는 과수의 근두암중병(*Agrobacterium tumefaciens*)에 대해서는 큰 성공¹⁾을 거두었으나,

다른 세균병에 대해서는 아직 실용적인 단계에 이르지 못하고 있다.

*Pseudomonas solanacearum*의 bacteriocin 생성균주는 Cupples 등⁴⁾에 의하여 처음 보고된 이후 담배세균성마름병 방제 시험에도 많이 이용^{1,2,3,13)}

되었으며, 그 방제효과 면에서 bacteriocin 비생성 균주를 이용할 때보다 더 효과적인 것으로 보고²⁾ 되어 있다. 그 방제효과를 높이기 위하여 담배뿌리 표면 및 식물체 내에서 bacteriocin 생성균주의 밀도 유지가 중요하다고 하였으며^{9,14)}, 토양 내 병원세균의 밀도도 병 방제효과에 영향을 미친다고 하였다^{8,9)}. 그러나 우리 나라 환경 조건에서 이러한 방제효과가 검토·보고된 바는 아직 없다. 그 방제기작은 bacteriocin 자체의 항균효과^{2,3)}, 기주식물체 내 항균물질 생성^{7,10,13,15)}, 병원균의 식물체내 감염 부위 선점^{3,5,11,12)} 등 여러 가지로 해석되고 있다.

이 시험에서는 비병원성 Bacteriocin 생성 *P. solanacearum* 균주들을 담배뿌리에 처리하여 세균성 마름병에 대한 방제효과를 비교하고, 여러가지로 해석되고 있는 방제기작의 일부를 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 담배품종

한국인삼연초연구소 경작시험장 제 3 연구실에 보존되어 있는 균주⁹⁾들을 담배에 접종한 후 재분리하여 nutrient한천배지(bacto-peptone 5g, beef extract 3g, glucose 5g, 한천 20g)에서 30°C로 2일간 배양된 것을 사용하였다. Bacteriocin activity의 검정은 Chen의 방법¹⁾에 따라 한천중층법에 의하여 병원성 지표균주에 대한 발육저지원의 직경을 측정하였으며, 균주별 3반복으로 하였다. 이 균주들의 현탁액(10⁹ cfu/ml)에 파종 후 5주된 BY4 품종의 담배뿌리를 30분간 침지시킨후 처리별 5주씩 이식하여 21일간 발병 정도를 조사하였다. 발병 정도는 건진(6)에서부터 고사(5)까지 6등급으로 나누어 조사하였다. 담배는 세균성마름병에 대하여 저항성 품종으로 알려진 NC82와 KF109, 감수성 품종인 BY4의 종자를 한국인삼연초연구소 경작시험장 제 2 연구실에서 분양받아 사용하였다.

담배뿌리 및 식물체 내에서의 세균 밀도변화 조사

담배뿌리를 세균현탁액(10⁹ cfu/ml)에 30분간 침지시킨 후 이식하고, 담배뿌리 및 줄기를 처리별

Table 1. Bacteriocinogenic activities and pathogenicities of bacteriocin-producing isolates of *Pseudomonas solanacearum*.

Isolate	Origin	Diameter of inhibition zone(mm)*				Disease index**
		Y 5	Y 7	Y 8	Y 9	
Y 5	K 60	0	0	0	35	5.0
Y 10	K 60	25	0	0	31	4.6
Y 61-1	Y 61	20	26	26	21	0.0
Y 61-2	Y 61	17	26	25	15	0.0
Y 61-3	Y 61	20	25	23	28	0.0
Y 61-4	Y 61	19	25	20	29	0.0
Y 61-5	Y 61	23	19	0	23	0.0
Y 95-1	Y 95	0	14	0	0	0.0

* Each bacterial isolates was seeded with 4mm-diameter aluminum rod on casamino acid-peptone-glucose agar plate in 9cm petridish. After incubation at 30°C for 2 days, bacterial cells were killed by exposing them to the vapor of chloroform.

** Roots of 5-wk-old tobacco cultivar BY4 were dipped in each bacterial suspension(10⁹ cfu/ml) before transplanting. Disease index ranged from 0 = no visible symptoms to 5 = completely wilted or dead. Figures listed are average of 12 plants observed at 14 days after transplanting.

3주씩 채취하여 접종된 균주의 밀도를 조사하였다. 세균밀도 조사방법은 Chen의 방법¹⁾에 따라 한천 증충법에 의하였으며, 지표균주인 Y9균주에 대하여 발육저지원을 형성하는 균총의 수를 조사하였다.

40주씩 난피법 3반복으로 황색종 개량멸칭 표준경 작법에 따라 이식하였으며, 수확이 끝나는 7월 하순까지 6등급으로 발병정도를 나누어 조사하였다.

세균성마름병 방제효과 조사

가식상에 심겨진 담배의 뿌리주변에 세균현탁액 (10^9 cfu/ml)을 주당 5ml씩 본포로 이식하기 하루 전 및 배토할 때에 각각 토양관주하였다. 처리별

결과 및 고찰

비병원성 bacteriocin 생성균주 선발

Table 2. Number of colonies of avirulent bacteriocin-producing isolates of *Pseudomonas solanacearum* detected from the roots of tobacco plants inoculated with same bacteria.

Isolate	Tobacco cultivar	Number of colonies(10^4 cfu/g frash wt.)*			
		0	1	4	8**
Y61-1	NC 82	125 ± 75	148 ± 141	137 ± 103	16 ± 13
	KF 109	120 ± 18	151 ± 63	127 ± 26	7 ± 5
	BY 4	58 ± 36	42 ± 34	8 ± 5	0 ± 0
Y61-2	NC 82	45 ± 40	65 ± 44	94 ± 57	7 ± 5
	KF 109	140 ± 54	182 ± 81	28 ± 16	3 ± 3
	BY 4	152 ± 48	72 ± 78	5 ± 8	0 ± 0
Y61-3	NC 82	125 ± 82	95 ± 55	45 ± 25	4 ± 1
	KF 109	173 ± 63	308 ± 166	52 ± 34	4 ± 2
	BY 4	86 ± 69	113 ± 111	29 ± 32	0 ± 0
Y61-4	NC 82	24 ± 29	69 ± 78	51 ± 36	4 ± 3
	KF 109	66 ± 26	152 ± 87	68 ± 53	2 ± 2
	BY 4	37 ± 22	69 ± 67	29 ± 40	4 ± 4
Y95-1	NC 82	142 ± 54	183 ± 178	29 ± 14	3 ± 0
	KF 109	87 ± 95	107 ± 113	181 ± 205	6 ± 4
	BY 4	158 ± 53	132 ± 110	29 ± 21	1 ± 1

* Tobacco roots were dipped in the bacterial suspension(10^9 cfu/ml) for 30 min prior to transplanting to soil. Whole root systems were washed in running water for 1 min. The roots were ground in glass tissue grinder. 0.5 ml of each root extract suspension was plated on the TZC agar medium before pouring 5 ml of melted 1.5% water agar on the agar surface. After inoculation, 4 ml of melted 0.7% water agar mixed with *P. solanacearum* strain Y-9 was poured over the agar surface. After additional incubation, *P. solanacearum* like colonies with inhibition zone were counted.

Values are means ± standard deviations of three tobacco plants.

** Weeks after root dipping in the bacterial suspension.

Y61균주에서 재분리된 4개 균주가 4개 지표균주 모두에 대하여 15 ~ 29mm 직경의 발육저지원을 형성하였으며, 이 4개 균주와 일부 지표균주의 발육을 억제시킨 2균주가 접종된 담배에서는 접종 3주 후 까지 아무런 병징을 발견할 수 없었다(표 1). 따라서 이 6개 균주는 비병원성 bacteriocin 생성균주로 인정되었다. 또한 Y9균주는 Y95-1균주를 제외한 모든 균주가 생성한 bacteriocin에 대하여

감수성이었기 때문에 bacteriocin 생성균주 검출을 위한 지표균주로 적합할 것으로 생각되었다.

담배뿌리 및 식물체 내 세균의 생육

담배에 접종된 대부분의 비병원성 bacteriocin 생성균주들의 밀도변화를 조사한 결과 뿌리에서는 접종후 1 ~ 2개월 이내에, 줄기에서는 1개월 이내에 급속히 감소되었으며, 이러한 감소현상은 뿌리

Table 3. Number of colonies of avirulent bacteriocin-producing isolates of *Pseudomonas solanacearum* detected from the stems of tobacco plants inoculated with the same the bacteria.

Isolate	Tobacco cultivar	number of colonies(10^4 cfu/g fresh wt.)*		
		1	4	8**
Y61-1	NC 82	70 ± 60	4.7 ± 4.2	2.5 ± 1.2
	KF 109	180 ± 70	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.4
	BY 4	70 ± 80	0.7 ± 0.6	0.0 ± 0.0
Y61-2	NC 82	130 ± 110	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.3
	KF 109	60 ± 60	0.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0
	BY 4	50 ± 50	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0
Y61-3	NC 82	180 ± 170	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.5
	KF 109	110 ± 100	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	BY 4	180 ± 110	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Y61-4	NC 82	430 ± 40	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2
	KF 109	160 ± 30	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	BY 4	40 ± 10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Y95-1	NC 82	140 ± 80	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.4
	KF 109	670 ± 470	3.1 ± 3.2	0.0 ± 0.0
	BY 4	180 ± 120	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2

* Tobacco roots were dipped in the bacterial suspension(10^9 cfu/ml) for 30 min prior to transplanting to soil. After sterilization in 7% sol. of sodium-hypochloride for 1 min, each tobacco stem was ground in mortar. 0.5ml of each stem extract suspension was plated on the TZC agar medium before pouring 5ml of melted 1.5 water agar on the agar surface. After inoculation, 4ml of melted 0.7% water agar mixed with *P. solanacearum* strain Y-9 was poured over the agar surface. After additional incubation, *P. solanacearum* like colonies with inhibition zone were counted.

Values are means ± standard deviations of three tobacco plants.

** Weeks after root dipping in the bacterial suspension.

에서 보다 줄기에서 더 심하였다(표 2,3). 그러나 Y61-1균주의 밀도는 담배품종 NC82 및 KF109의 뿌리와 줄기 모두에서 접종 후 8주까지 다른 균주에 비하여 높게 검출되었다. 또한 Y61-2균주는 NC82 품종의 줄기에서, Y61-4균주는 BY4의 뿌리에서, Y91-1균주는 KF109의 뿌리에서 각각 그 밀도가 높게 유지되었다. 박 등⁹⁾은 같은 방법으로 13개의 비병원성 bacteriocin 생성 균주를 3품종의 담배에 각각 접종한 후 접종된 균주의 밀도변화를 조사한 결과, 균주와 품종의 조합에 따라 각각 다른 밀도 변화를 보였다고 하여 이 시험결과와 같은 경향이 있음을 보고하였다. 이러한 결과는 재배품종에 적합한 균주를 선택하면 처리된 균주의 밀도를 효과적으로 유지할 수 있음을 보여준다.

담배 세균성마름병 방제효과

Y61-1균주 처리에 의하여, NC82 품종과 KF109 품종의 경우에는 무처리 담배에 비하여 각각 58%와 27%의 세균성 마름병 방제효과를 보였다. 그러나 감수성 품종인 BY4의 경우에는 그 처리효과가 인정되지 않았다(표 4). 따라서 세균성마름병에 대한 저항성이 강한 품종일수록 Y61-1균주 처리에 의한 병 방제효과도 높게 나타나는 경향이였다. 박 등^{8,9)}은 발병이 심한 포장에서는 감수성 품종인 BY4나 Hicks의 경우에 비병원성 균주나 bacteriocin 생성 균주 처리에 의한 병 방제효과를 얻을 수 없었으며, 병 피해가 적은 포장에서는 무처리 담배의 발병율이 낮았기 때문에 저항성 품종인 NC82에서 이들 균주처리에 의한 방제효과가 나타나지 않았다고 하였다. 이러한 결과를 종합할 때, 병원균에 의한

Table 4. Disease progress of bacterial wilt of the tobacco plants treated with four avirulent bacteriocin-producing strains of *P. solanacearum* in field naturally infested with the pathogen.

Tobacco cultivar	Isolate treated*	Disease severity**					
		20/June	27	3/July	10	18	24
NC 82	Y 61-1	0.04	0.04	0.11	0.19	0.88	1.58 a***
	Y 61-2	0.14	0.22	0.36	0.69	2.08	3.09 bc
	Y 61-3	0.13	0.24	0.34	0.78	2.68	3.70 c
	Not treated	0.11	0.20	0.27	0.83	2.79	3.76 c
KF 109	Y 61-1	0.14	0.14	0.20	0.42	1.88	2.98 ab
	Y 61-2	0.31	0.51	0.61	1.17	2.87	4.20 c
	Y 61-3	0.29	0.36	0.80	1.67	3.44	4.18 c
	Not treated	0.10	0.26	0.30	0.84	3.23	4.08 c
BY 4	Y 61-1	0.38	0.50	0.72	1.43	3.22	4.10 c
	Y 61-2	0.52	0.72	0.92	1.79	3.39	3.84 c
	Y 61-3	0.32	0.74	0.87	1.59	3.42	4.84 cd
	Not treated	0.80	1.20	1.48	2.39	4.19	4.91 d

* Five milliliter of the bacterial suspension(10^9 cfu/ml) was poured onto the root zone of each 10-wk-old tobacco seedling on 1 day before transplanting to the field and on hilling time, respectively.
 ** Disease index ranged from 0 = no visible symptom to 5 = completely wilted or dead. Values are means of five replicates. Each replicate consists of 40 tobacco plants.
 *** Duncan's multiple range test. Same letters mean no significant difference(P=0.05).

포장의 오염도에 따라 적절한 저항성 품종을 선택하는 것도 비병원성 bacteriocin 생성균주 처리에 의한 병 방제효과를 높이기 위해 매우 중요하다고 생각된다.

이 등^{14, 15)}은 비병원성 *P. solanacearum*이 식물체 내에 침입하여 세균성마름병균의 침입 및 증식을 억제할 수 있다고 하였고, 박 등⁹⁾도 비병원성 bacteriocin 생성균주의 담배뿌리 및 줄기내 밀도가 병 방제효과와 밀접한 관계가 있다고 하였다. 이 시험에서 병 방제효과가 인정된 Y61-1균주는 다른 2균주에 비하여 담배뿌리 및 줄기 속에서의 밀도가 높았기 때문에 박 등의 결과와 같은 경향이 인정되었다. 따라서 비병원성 bacteriocin 생성균주를 이용한 담배 세균성마름병 방제효과를 높이기 위해서는 담배근권 및 줄기에서 이 세균의 밀도를 높여줄 수 있는 방안이 강구되어야 할 것이다.

결 론

담배 세균성마름병균에 대해 생육억제 효과가 있는 비병원성 bacteriocin 생성균주 (*Pseudomonas solanacearum*)들을 선발하였다. 이 균주들을 본포로 담배를 이식하기 하루 전 및 배토할 때 담배 근권토양에 처리한 결과, Y61-1균주가 처리된 담배에서 품종에 따라 27~58%의 세균성마름병 방제효과를 얻을 수 있었다. 이 균주는 담배뿌리 및 줄기 속에서 다른 균주에 비해 오랫동안 높은 밀도를 유지하는 것으로 조사되었다. 따라서 담배의 근권 및 식물체 내에서 이 세균의 밀도를 높여줄 수 있는 방안이 강구된다면 더욱 효과적으로 세균성마름병을 방제할 수 있을 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Chen, W. Y. Ph. D. Thesis, Dept. of Plant Pathol., NC State Univ., Raleigh., p. 68 (1981)

2. Chen, W. Y. and E. E. Echandi. Plant Pathol. 33 : 245-253(1984)
3. Chen, W. Y. E. Echandi and H. W. Spurr, Jr. "Pro. 5th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria." pp. 482-492. Call. Columbia(1981)
4. Cupples, D. A., R. S. Hanson and A. Kelman. J. Gen. Microbiol. 109 : 295-303 (1978)
5. Graham, T. L., L. Sequeira and T. R. Huang. Appl. and Environ. Microbiol. 34 : 424-432(1977)
6. Kerr, A. Plant Disease 64 : 24-30(1980)
7. Obukowicks, M. and G. S. Kennedy. Physiol. Plant Pathol. 18 : 339-344(1981)
8. 박은경, 김정화, 손준수, 김상석, 이영근, 오명희, 강여규. "담배연구보고서 : 경작분야 육종 및 환경편". pp. 269-400. 한국인삼연초연구소(1986)
9. 박은경, 김정화, 손준수, 이영근, 오명희, 강여규. "담배연구보고서 : 경작분야 육종 및 환경편". pp. 161-263. 한국인삼연초연구소 (1988)
10. Rathmell, W. G. and L. Sequeira. Physiol. Plant Pathol. 5 : 65-73(1975)
11. Sequeira, L. Ann. Rev. Plant Pathol. 37 : 51-79(1983)
12. Sequeira, L., G. Garrd and G. A. DeZoeten. Physiol. Plant Pathol. 10 : 43-50(1977)
13. 田中 博, 宇都宮 담배試報. 21 : 1-66(1985)
14. 이영근, 김정화, 박원홍. 한식병지. 2 : 114-120(1986)
15. 이영근, 민태기, 박원홍. 한식병지. 3 : 203-209(1987)