

## 충북지역 토마토 시설재배지의 풋마름병균 (*Ralstonia solanacearum*) 오염도 및 분리균주의 특성

윤건식 · 박상용 · 강효중<sup>1</sup> · 이기열<sup>1</sup> · 차재순\*

충북대학교 식물외학과, <sup>1</sup>충북농업기술원

### Contamination Level of *Ralstonia solanacearum* in Soil of Greenhouses Cultivating Tomato Plants in Chungbuk Province and Characteristics of the Isolates

Gon-Sig Yun, Sang-Yong Park, Hyo Jung Kang<sup>1</sup>, Ki Yeol Lee<sup>1</sup> and Jae-Soon Cha\*

Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Chungbuk National University,  
Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

<sup>1</sup>Chungbuk Agricultural Research & Extension Service, Cheongwon, Chungbuk 363-883, Korea

(Received on January 15, 2004)

Contamination level and characteristics of *Ralstonia solanacearum* in soil of greenhouses cultivating tomato plants in Chungbuk province was determined. *R. solanacearum* was isolated with the semiselective media in 27 greenhouse soil samples out of 133 greenhouses soil investigated, which indicates 20.3% of tomato cultivating greenhouses in Chungbuk contaminated with the bacterial wilt pathogen. Density of *R. solanacearum* was estimated to  $10^{2-4}$  cfu/g in the contaminated soil. All 71 isolates of *R. solanacearum* which containing 12 isolates from the diseased tomato plants were race 1, and 35 isolates of them were biovar 3 and 36 isolates were biovar 4. More than 88% of 71 isolates were inhibited growth on nutrient agar containing oxolinic acid 0.5 µg/ml, streptomycin 25 µg/ml, tetracycline 5 µg/ml and cupric sulfate 375 µg/ml (1.5 mM). The 11.3%, 4.2% and 5.6% of the isolates can grow on nutrient agar containing 10 times more oxolinic acid, streptomycin, tetracycline than minimal inhibitory concentration of the sensitive strains. Five isolates were resistant to 2 bactericides and one isolates was resistant to all 3 bactericides.

**Keywords:** Bactericide resistance, Biovar, Contamination level, Race, *Ralstonia solanacearum*, Tomato plants

*Ralstonia*(*Burkholderia*, *Pseudomonas*) *solanacearum*은 450종 이상의 식물을 감염하여 풋마름병(bacterial wilt)을 일으키는 것으로 보고되어 있으며, 특히 경제적으로 중요한 많은 작물에 심각한 피해를 주는 병이다(Hayward, 1991). 병원균 *R. solanacearum*은 토양에서 오랫동안 생존이 가능하며(Hayward, 1991; Ito 등, 1998), 토양에서 식물의 뿌리나 땅 가 부분의 줄기에 생긴 상처를 통하여 침입하고 물관으로 이동하여 시들음병을 일으켜 식물을 고사시키는 것으로 알려져 있다(Denny와 Hayward, 2001).

*R. solanacearum*은 기주식물의 병원성에 따라 5개의 레

이스(race)로, 그리고 생리·생화학적 특성으로 5개의 생리형(biovar)로 구분된다. 우리나라에는 레이스 1, 3과 생리형 2, 3, 4가 존재하는 것으로 보고되어 있다(이 등, 1982; 이, 1999; 농촌진흥청, 2002).

풋마름병은 우리나라에서 토마토, 담배, 고추, 가지, 참깨, 생강, 해바라기 7가지 작물에 발생하는 것으로 보고되었으나(한국식물병리학회, 1998), 최근에 들깨와 감자에서도 발생하는 것으로 조사되었으며(이, 1999; 농촌진흥청, 2002), 그 중에서도 토마토에서 가장 심하게 발생하는 것으로 보고되었다(이, 1999). 충북지방에서 토마토는 노지재배보다 시설재배가 훨씬 더 많으며(농림부, 2002), 시설재배의 토마토에 풋마름병이 발생하면 시설 내 전체 포장으로 빠르게 전파되어 피해가 증가한다. 풋마름병균이 오염된 재배지에서는 풋마름병의 비기주로 윤작을 하

\*Corresponding author

Phone)+82-43-261-2554, Fax)+82-43-271-4414

E-mail)jscha@chungbuk.ac.kr

거나 저항성품종을 재배하는 것이 풋마름병의 중요한 실용적인 방제법이다.

토양으로부터 풋마름병균, *R. solanacearum*를 특이적이며 민감하게 검출 및 동정하는 것은 쉽지 않다. 병원균에 고도로 특이한 TaqMan probe를 이용한 PCR 법도 식물체로부터 잠복감염한 *R. solanacearum*를 검출하는 방법으로 보고되었으며(Weller 등, 2000), 병원균 검출에 흔히 사용되는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)와 면역형광현미경법(immunofluorescence)도 아직까지 토양으로부터 직접 병원균을 검출하는 데는 완전하지 않다(Denny와 Hayward, 2001).

본 연구에서는 충북지역의 토마토 시설재배지 토양에서 선택배지를 이용하여 풋마름병균 *R. solanacearum*를 분리하고, 분리균의 병원성 확인을 통하여 오염도를 파악하였고, 분리균의 레이스와 생리형을 결정하고, 배지에서 살세균제의 효과를 검정하여 병원균의 특성을 알아보았다.

## 재료 및 방법

**병원균의 분리 및 동정.** 충북 10개의 시·군의 총 133개 토마토 시설하우스에서 토양을 채집하였다. 한 시설하우스 내에서 3곳으로부터 약 300 g의 토양을 플라스틱 봉지에 채집하고 저온실(5-8°C)에 보관하여 실험에 사용하였다. 채집한 토양 10 g을 100 ml에 넣고 상온에서 30-40분 동안 진탕한 후(150-200 rpm), 이 현탁액 100 µl를 세가지 선택배지(Denny and Hayward, 2001), TTC(casamino acid 1 g, peptone 10 g, glucose 5 g, 5 ml의 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, agar 15 g/l l), SM-1(TTC배지 1 l에 0.1% merthiolate tincture 5 µl, crystal violet 50 mg, polymixin β sulfate 100 mg, tyrothricin 20 mg, chloromycetin 5 mg, cycloheximide 50 mg을 첨가), M-SMSA(glucose 5 g 대신에 5 ml의 glycerol를 포함한 TTC배지에 crystal violet 5 mg, polymixin β sulfate 100 mg, bacitracin 25 mg, chloromycetin 5 mg, penicillin 0.5 mg, cycloheximide 100 mg을 첨가)에 도말하고 25-28°C 배양기에 두었다.

배양 3일 후에 M-SMSA에 나타난 전형적인 *R. solanacearum* 콜로니를 세고, 콜로니 중 하나를 TTC배지에 다시 streak하여 순수배양하여 초저온냉동고(-70°C)에 저장하였다. 분리균의 병원성은 토마토 유묘(품종: 서광 102)의 잎자루에 상처접종하여 확인하였다. 토양으로부터 분리한 병원균과는 별도로 병든 토마토로부터 병원균을 분리하여 균의 특성을 밝히는 실험에 사용하였다. 병든 토마토의 갈색으로 변색된 도관 부분을 멸균한 칼로 2-5 mm 크기로 자른 다음 1 ml 멸균수가 든 microfuge tube에 넣

고 상온에서 약 30분간 방치한 후 멸균막대로 마쇄하여 얻은 현탁액을 M-SMSA에 도말하여 병원균을 분리하였다. 분리균의 동정은 Miller의 방법(1982)에 따라서 MIDI(microbial identification system, MIDI library version 3.90)을 이용하여 수행하였다.

**분리균의 레이스 및 생리형 결정.** 분리균의 레이스(race)는 이(1999)의 방법으로, 생리형(biovar)은 Hayward(1964)의 방법으로 결정하였다. 분리균의 생리형 결정을 돕기 위해 생리형 특이적 PCR 검정을 실시하였다. 분리균주의 total DNA는 DNeasy Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 분리하였고, biovar 2에 특이적 primers (DIV2F: 5'CGCTTCGGTTAATACC TGGAG3'/DIV2R: 5'CTGCCG TGGTAATCGCCCCC3')와 biovar 3, 4에 특이적 primers (DIV1F: 5'CGCACTGGTTAATACCTGGTG3'/DIV1R: CTACCGTGGTAATCGCCCTCC3') (농촌진흥청, 2002)를 사용하여 PCR를 수행하였다. PCR 반응 혼합액은 분리균주의 total DNA (10 ng/µl) 5 µl, 10 pM의 primer 각 1 µl, 10 mM dNTP 1 µl, 25mM MgCl<sub>2</sub> 3 µl, 10x buffer (100 mM Tris-Hcl, pH8.3, 500 mM KCl) 5 µl, Taq DNA polymerase(TAKARA 5U/µl) 0.2 µl, 멸균수 33.8 µl을 포함한 50 µl로 하였고, GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)를 사용하여 증폭하였다. PCR 반응조건은 처음 92°C에서 3분간 반응시킨 후, 92°C에서 1분, 62°C에서 1분, 72°C에서 1분간으로 30회 반복하였다.

**살세균제 최소억제농도(MIC) 결정.** 멸균한 nutrient agar (NA: beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 15 g/l l)를 50-55°C로 식힌 후 cupric sulfate (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, Sigma Chemical Co.), oxolinic acid (Sigma Chemical Co.), streptomycin (Sigma Chemical Co.) 그리고 tetracycline (Sigma Chemical Co)를 첨가하여 원하는 농도의 살세균제 배지를 만들었다. NA에서 하룻밤 배양한 분리균을 멸균수로 현탁한 후 현탁액의 흡광도를 600 nm = 0.1로 조정하였다. 이 현탁액 3 µl를 살세균제배지에 점적하고 건조시킨후 25-28°C 배양기에 3일간 배양한 후 세균의 성장여부를 조사하여 최소생장억제농도(MIC: minimal inhibitory concentration)를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

**토마토 시설재배지 토양의 오염도.** 토양으로부터 풋마름병균을 분리하기 위해서 세가지 선택배지를 비교한 결과 M-SMSA배지가 가장 우수하였다. *R. solanacearum*은 TTC에서는 성장속도는 빨랐으나 다른 균의 출현이 많았고, SM-1에서는 성장속도가 매우 느려서 배양 7일 후

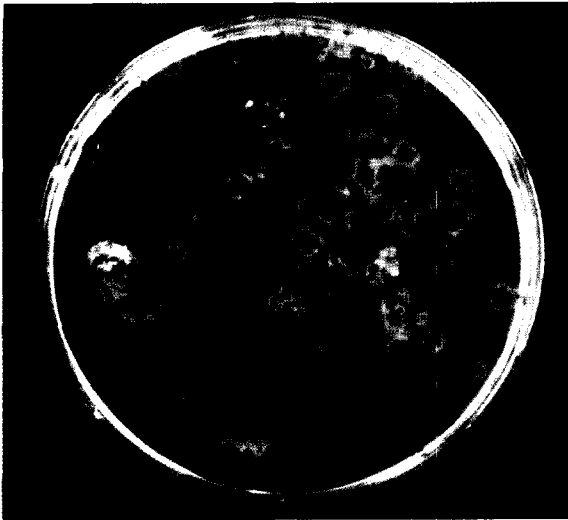


Fig. 1. Colonies on M-SMSA medium on which suspension of greenhouse soil sample was spread. Arrow points *Ralstonia solanacearum* colony.

에도 콜로니의 크기가 매우 작아 구별이 힘들었다. M-SMSA에서는 성장속도와 선택성이 모두 우수하였다. M-SMSA에서 배양 3일 후 *R. solanacearum*은 중앙은 선홍색이며 둘레는 우윳빛을 띤 부정형의 콜로니를 형성하였으며, 이 콜로니는 배지에서 형성된 다른 콜로니와 쉽게 구별할 수 있었다(Fig. 1).

충북지역의 토마토 시설재배지 조사포장 133곳 중 27곳에서 *R. solanacearum*이 분리되어 전체 포장 중 20.3%가 풋마름병균에 오염되어 있는 것으로 나타났다(Table 1). 20.3%의 오염율은 시설재배지 5곳 중 1개의 토양이 병원균으로 오염되어 있음을 의미하는 것으로 이미 상당히 많은 시설재배지 토양에 병원균이 오염되어 있음을 말해주고 있다. 지역별로 보면 주요 토마토 시설재배지인

청주(35.3%), 청원(35.3%), 보은(27.3%)에서 높게 나타났다. 한편 토마토 시설재배단지가 많은 충주에서는 12.5%로 상대적으로 분리비율이 낮았으며, 옥천의 경우 7개의 조사 포장 중 2곳에서 분리되어 분리비율(28.6%)은 높게 나타났다(Table 1). 지역별 분리비율은 지역별 조사재배지의 수가 다르므로 직접 비교하는 것은 무리가 있지만 토마토의 시설재배지가 많은 곳에서 분리비율이 높게 나타나는 경향이였다. M-SMSA 배지에 형성된 전형적인 *R. solanacearum* 콜로니 수를 세어 계산한 토양 g당 병원균의 밀도는  $10^{2-4}$  cfu이었다.

**분리균의 레이스 및 생리형.** 시설재배지 토양에서 분리된 59개 균주와 병든 토마토에서 분리된 12개 균주를 기주식물인 담배, 고추, 가지, 감자, 토마토에서 병원성을 조사하여 레이스를 검정한 결과 71개 모든 균주가 레이스 1로 나타났다. 생리형(biovar)은 토양분리균은 biovar 3이 28균주, biovar 4가 31균주(Table 1), 식물분리균은 biovar 3이 7, 4가 5균주로 전체 71개의 분리 중 biovar 3이 35균주, biovar 4는 36균주로 구분되었다. 생리형 특이 PCR 검정에서도 조사한 71개 균주 모두 biovar 3, 4 특이적 primers에 의해 1,033 bp의 DNA가 증폭되었다. 우리나라의 담배에서 레이스 1이 보고되었고(이 등, 1982), 감자에서는 레이스 1, 3과 생리형 2, 3, 4가 존재하며(농촌진흥청, 2002), 조사한 균주수가 많지 않았지만 이(1999)의 보고에 의하면 고추, 담배, 참깨에서 분리한 균주는 모두 생리형 3이었고, 토마토와 가지에서 분리한 균주는 생리형 3과 4가 비슷하였다고 하여, 본 연구에서 생리형 3과 4가 비슷하다는 연구의 결과와 일치한다. 국내의 감자에서 발견된 레이스 3은 가지와 토마토에도 침입한다고 보고(Buddenhagen과 Kelman, 1964; Griep 등, 1998) 되어 있지만 아직 충북지방의 토마토 재배지에서는 발견되지 않

Table 1. Isolation frequency of *Ralstonia solanacearum* from tomato greenhouse soil in Chungbuk and biovar of the isolates

Area	Greenhouses Investigated	Greenhouses pathogen isolated	Isolation frequency (%)	Number of isolate	
				Biovar 3	Biovar 4
Cheongju	17	6	35.3	12	7
Chungju	32	4	12.5	3	3
Jechon	13	2	15.4	1	1
Boun	22	6	27.3	8	4
Cheongwon	17	6	35.3	3	12
Eumseong	6	1	16.7	1	0
Goesan	5	0	0	0	0
Jincheon	8	0	0	0	0
Okcheon	7	2	28.6	0	4
Yeongdong	6	0	0	0	0
Total	133	27	20.3	28	31

았다. 감자 풋마름병이 아직 제주와 전남·북 및 경남의 남부지역에 발생한 것으로 조사되었으므로(농촌진흥청, 2002), 지역적인 차이에 기인하거나 또는 감자 풋마름병 발생지역인 남부지방의 다른 기주들(가지, 토마토)에서도 레이스 3이 발견되지 않았으므로(농촌진흥청, 2002), 병원성은 있지만 생태적으로 아직까지 다른 기주로 옮겨가지 않은 것으로 생각할 수 있다.

**배지에서 살세균제에 대한 감수성.** 농약으로 가장 흔히 사용되는 4가지 살세균제의 최소억제농도(MIC)을 조사한 결과 oxolinic acid는 0.5 µg/ml 이하에서 전체균주의 88.7%, streptomycin은 25 µg/ml 이하에서, 그리고 tetracycline은 5 µg/ml이하에서 전체 균주의 90.2%가 생장이 억제되었다. 구리의 경우는 375 µg/ml(1.5 mM)이하에서 94.4% 생장이 억제되었다. 살세균제의 살균효과의 절대농도로 보면 oxolinic acid가 가장 우수한 생장억제효과를, 그리고 구리가 가장 낮은 생장억제효과를 나타냈다(Fig. 2).

최소억제농도(MIC)가 가장 낮은 균주의 MIC보다 10배 이상인 균주를 그 살세균제에 대한 저항성균주로 간주한다면 oxlinic acid의 경우는 8개 균주(11.3%), streptomycin의 경우 3개 균주(4.2%) 그리고 tetracycline의 경우 4개 균주(5.6%)가 각각 해당 살세균제에 저항성균주로 볼 수 있다. 두가지 이상의 살세균제에 대한 반응을 분석해보면 71개 균주 중 2개 균주가 streptomycin과 oxolinic acid에 저항성을 나타냈으며, 5개 균주가 tetracycline와 oxolinic acid에, 1개 균주가 tetracycline과 streptomycin에 뿐만 아니라 oxolinic acid에 까지 세가지 모두에 저항성을 나타내었다. 세가지 모두에 저항성을 보인 균주는 oxolinic acid, tetracycline, streptomycin의 살세균 작용기작이 다르다는 점과 또한 현재 이들 살세균제 성분은 국내에서 풋마름병 방제용 농약으로 사용되고 있지는 않다는 것을 감안할 때 그 저항성의 유래가 매우 흥미로운 점이라고 생각한다.

## 요 약

충북지역 토마토 시설재배지 토양의 풋마름병 병원균 (*Ralstonia solanacearum*)의 오염도 및 분리균의 특성을 조사하였다. 총 133개 조사 토양 중 27개 토양에서 선택 배지로부터 *R. solanacearum*이 분리되어, 전체 시설재배지 토양의 20.3%가 풋마름병균에 오염되어 있음을 나타냈다. 오염 토양에서 병원균의 밀도는 토양 g 당  $10^{2-4}$  cfu로 조사되었다. 병든 토마토로부터 분리한 12균주를 포함한 총 71개의 분리균주는 모두 레이스 1이었고, 35개 균주가 생리형 3으로, 36개 균주가 생리형 4로 구분되었다. 전체 분리균의 88% 이상이 각각 oxolinic acid 0.5 µg/ml, streptomycin 25 µg/ml, tetracycline 5 µg/ml and cupric sulfate 375 µg/ml(1.5 mM)을 함유한 nutrient agar에서 생장이 억제되었고, 전체균주의 11.3%, 4.2% and 5.6%가 각각 감수성균주의 최소억제농도보다 10배 이상의 oxolinic acid, streptomycin, tetracycline가 함유된 배지에서 성장하였다. 5개 균주는 2개의 살세균제에 동시에 그리고 1개 균주는 3개의 살세균제 모두에 저항성을 보였다.

## 감사의 글

MIDI분석과 레이스 및 생리형 결정에 도움을 주신 농업과학기술원 병리과 이영기 연구사께 감사드린다.

## 참고문헌

Buddenhagen, I. and Kelman, A. 1964. Biological and

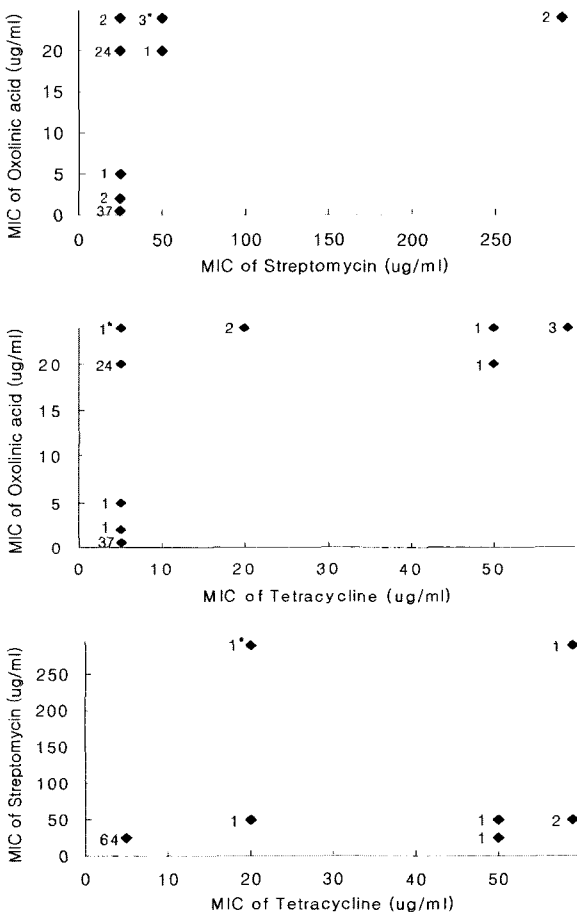


Fig. 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of tetracycline, streptomycin and oxolinic acid for *Ralstonia solanacearum* isolates. The number (\*) is number of isolates showed the same MIC.

- physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2: 203-230.
- Denny, T. P. and Hayward, A. C. 2001. II Gram-negative bacteria. *Ralstonia*. In *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. pp151-174. ed. by N. W. Schaad, J. B. Jones, and W. Chun, The American Phytopathological Society Press.
- Griep, R. A., van Twisk, C., van Beckhoven, J. R. C. M., van der Wolf, J. M. and Schots, A. 1998. Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* race 3. *Phytopathol.* 88: 795-803.
- 한국식물보호학회. 1998. 한국식물병목록. 144pp.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87.
- Ito, S., Ushijima, Y., Fujii, T., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Yoshiware, S. and Kishi, F. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semiselective medium and a PCR technique. *Phytopathol.* 146: 379-384.
- 이승돈. 1999. 한국의 주요 식물세균병 발생 및 특성. 서울대학교 농학박사학위논문.
- 이영근, 김정화, 강여규. 1982. 우리나라 담배 세균성마름병(立枯病菌: *Pseudomonas solanacearum*)의 race와 biochemical type. *한국식물보호학회지* 21: 123-127.
- Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxyl acids. *J. Clin. Microbiol.* 16: 584-586.
- 농림부. 2002. 농림통계연보. 107pp.
- 농업과학기술원 작물보호부. 2002. 감자 풋마름병 방제기술 개발. 농촌진흥청.
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N. and Stead, D. E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2853-2858.