

온탕소독과 prochloraz 침지소독이 벼 종자에 감염된 *Fusarium fujikuroi*의 포자와 균사의 형태에 미치는 영향에 대한 전자현미경적 연구

박우식 · 예완해 · 이세원 · 한성숙 · 이준성 · 임춘근¹ · 이용환*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과, ¹강원대학교 농업생명과학대학 응용생물공학과

Electron Microscopic Study for the Influence of Soaking in Hot Water and Prochloraz Solution on Spore and Mycelium of *Fusarium fujikuroi* Infected in Rice Seed

Woo-Sik Park, Wan-Hae Yeh, Se-Weon Lee, Seong-Suk Han, Jun-Seong Lee, Chun-Keun Lim¹ and Yong Hwan Lee*

Agricultural Microbiology Division, Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

¹Division of Bio-Resources Technology, College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received on November 14, 2008)

This experiment was conducted to find the causes of ineffective seed disinfection methods such as rice seeds soaking in hot water and prochloraz EC solution when the rice seeds were severely infected by Bakanae disease. In case of rice seeds collected from severely diseased field by Bakanae disease, the pathogen as the forms of spores and mycelium were infected in plumule and inner and outer integument of embryo, aleurone layer, and pericarp layer. When the rice seeds were soaked in hot water, the appearances of spores and hypha on the outer pericarp layer were severely disordered, however those of inner region of outer integument and aleurone layer were shown normal. The membrane of hypha on the outer pericarp layer was destroyed within 24 hours, while some spores were healthy and germinated 7 days after soaking, when the rice seeds soaked 24 hours in 125 ppm prochloraz solution at 30°C. These results indicated that the seed disinfection methods were ineffective on the Bakanae disease severely infected rice seed because the hot water did not transmit the pericarp layer of rice seed and also prochloraz solution did not effectively destroy the spore of pathogen.

Keywords : Hot water, Prochloraz, SEM, Seed disinfection

벼 키다리병(병원균 *Fusarium fujikuroi*)은 1828년 일본에서 Ito와 Kimura에 의해서 알려진 후 1898년 Hori 에 의해서 처음으로 공식보고 되었다(김, 1981). 우리나라의 경우 1960년대에 일부 농가에서는 모판에 발생이 심하여 새로운 종자를 대파하는 경우도 있었다. 그러나 prochloraz 등 효과가 우수한 침투이행성 종자 소독제가 개발되면서 벼 키다리병은 크게 문제가 되지 않았으나(박 등, 2003), 최근 기온 상승, 친환경재배 등 여러 가지 원인에 의하여

키다리병의 발생이 증가하고 있는데 2006년에는 전국적으로 28.8% 발생한 것으로 보고되었다(Han, 2007).

최근 연구에서 벼 육묘기간 중에 발생하는 벼 키다리병을 효과적으로 방제하기 위해서는 종자 소독 시 30°C~35°C 정도의 온도 유지가 중요하다고 보고되었다(박 등, 2003). 그러나 일반 농가에서는 조기 영농과 30°C 이상의 온도 유지를 위한 시설 부족으로 인해 종자소독 효과가 저하될 뿐만 아니라 최근 30°C 이상의 고온에서도 방제효과가 낮아 농업인의 종자소독제에 대한 불신이 증가하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이러한 종자소독효과 저하 원인을 구명하기 위하여 주사전자현미경을 이용하여 몇 가지 종자소독방법에 따라 종자 내 감염되어 있는 병원균

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-0419, Fax) +82-31-290-0406

E-mail) leeyhlee@rda.go.kr

에 미치는 영향을 관찰하여 종자소독효과 저하 원인을 분석하고 이를 해결할 수 있는 방법을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 키다리병 감염종자. 2006년 경기도 이천 포장에서 발병주율이 40% 이상인 포장에서 수확한 주남벼 종자를 온실검정 시 종자의 100% 감염률을 확인한 후 실험에 사용하였다.

시험 약제 및 침지소독 방법. 국내에서 가장 많이 사용되고 있고 벼 키다리 병에 대한 종자소독 효과가 가장 우수한 것으로 보고된 prochloraz(a.i. 25% EC)를 사용하였다(신 등, 2008). 본 실험에서는 2,000배의 prochloraz 유제물 수은 20°C와 30°C로 조절하고 종자를 24시간 침지처리한 후 세척하여 최아 후 파종하였다.

염수선 처리 방법. 비중 1.13(water 1 L; salt 225 g) 소금물에 시험에 사용될 종자를 침종시킨 후 10회 정도 벼를 골고루 섞어 주고 약 1분 정도 지난 후 물위로 뜨는 벼와 가라앉은 벼를 구분하여, 가라앉은 벼를 3회 수돗물로 헹구어 상온에서 2일 동안 건조 후 사용하였다(조 등, 1974).

온탕소독. 실험을 위해 선별된 종자를 멸균된 거즈에 싸서 미리 준비된 60°C 항온 수조에 10분간 처리 후 수조에서 꺼내 차가운 수돗물에 1회 세척하여 사용하였다(Hayasaka 등, 2002).

온탕소독 및 침지소독 혼합처리 시 소독 효과 온실 검정. 키다리병 감염종자를 비중 1.12 염수선처리와 수선처리 2종류로 구분하여 사용하였다. 종자소독 처리는 온탕침법, 20°C 침지소독, 온탕처리 후 20°C 침지소독, 온탕처리 후 30°C 침지소독 4처리로 하였다. 파종량은 모판 당 130 g을 기준으로 하여 직경 10 cm, 높이 4 cm의 포트에 처리별로 5반복 파종하여 온실에서 재배하였고 28

일 후 포트 당 발병 개체수를 조사하였다.

온탕소독 및 침지소독 혼합처리 후 벼알 부위별 병원균 검출 검정. 위와 같은 소독 방법으로 처리된 종자를 반복별로 각 100립씩 1% 차아염소산나트륨(NaClO)에 1분간 살균한 뒤 살균수로 세척 후 멸균된 면도칼을 이용 살균된 여과지위에 놓고 무균 상에서 각각의 종자를 배, 배유, 왕겨 부위로 분리하여 KCl 5%(Chung, 2007) Komada 배지에(Komada, 1975) 치상하여 28°C 항온기에서 15일간 배양 후 병원균의 균총과 포자를 실체현미경 및 광학현미경을 이용하여 각 처리 당 벼알 부위별 균 검출율을 조사하였다(Xu 등, 1995; Tiedt 등, 1988).

주사전자 현미경(SEM) 시료 제작. 키다리병 감염 종자를 무처리, 온탕 침법(60°C, 10분), prochloraz(0.5 m/L, 30°C에서 24시간) 처리한 후 20°C 항온기에서 1일과 7일간 침지하고 각각의 시료를 종단면으로 절단하여 4°C의 Karnovsky 용액에 12시간 동안 전 고정시킨 후 0.05M sodium cacodylate buffer (pH 7.2)로 10분간 3회 세척하였다. 1% osmium tetroxide 용액에 4°C에서 90분에서~180분간 후고정하여 다시 0.05M sodium cacodylate buffer로 3회 세척하였다. 앞서 처리된 것을 50%, 75%, 90%, 95%, 100% ethanol 용액에 각각 30분씩 탈수 후 isoamylacetate 로 실온에서 30분 동안 2회 치환하였다. 임계점 건조장치로 1시간 동안 건조시킨 후 gold 코팅하여 SEM(S-2460N; Hitachi, Japan)으로 20 kV에서 각 시료의 종단면과 종피 표면에서 포자 및 균사의 변화를 관찰하였다(성 등, 1985).

결과 및 고찰

종자소독 방법에 따른 온실 검정. 농가에서의 관행적으로 실시하는 24°C 이하 24시간 침지소독(이하 '20°C 침지소독')과 비교하여 벼 종자의 염수선 여부와 60°C에서 10분간 온탕소독 후 침지소독(이하 '온탕 후 침지소독')

Table 1. Effect of hot water soaking and the seed soaking in prochloraz (EC) solution for control of Bakanae disease^a

Treatment	Diseased plant ^d (%)		Seedling stand (%)	
	Brine ^e assortment	Water assortment	Brine assortment	Water assortment
Hot water soaking ^b	59.4	73.7	90.7	90.0
Hot water soaking+prochloraz (30°C)	17.2	47.2	92.4	91.7
Hot water soaking+ prochloraz (20°C)	38.2	46.5	96.5	94.0
Prochloraz ^c (20°C)	76.5	99.2	90.5	88.9
Control	100	100	85.4	83.6

^a 130 g seeds (cv. Junambyeo) per nursery box were sowed.

^b Dry seeds were soaked in hot water at 60°C for 10 minutes, and then washed in cold water.

^c Dry seeds were soaked in prochloraz (EC) solution of 124 ppm for 24 hrs.

^d Disease incidence was investigated 28 days after sowing.

^e Brine assortment was conducted at salt concentration of 225 g/L.

을 30°C와 20°C에서 실시하여 방제효과를 확인하기 위해 파종 28일 후에 발병묘율을 조사한 결과 염수선과 수선과의 차이에서는 무처리를 제외한 모든 처리가 염수선한 종자의 발병률이 낮았으며 무처리에서는 염수선 여부에 관계없이 100%의 발병률을 보였다(Table 1).

염수선 한 종자에서 온탕 후 30°C 침지소독 시 17.2%의 발병률로 가장 방제효과가 높았다. 반면 수선처리 후 20°C 침지소독 처리에서는 99.2%의 발병률을 보이며 방제효과가 거의 나타나지 않았다. 염수선한 종자를 온탕소독, 20°C 침지소독, 온탕 후 20°C 침지소독의 3처리로 비교 하였을 때 각각 59.4%, 38.2%, 76.5%의 발병률로 온탕 후 20°C 침지소독 처리가 가장 방제효과가 높았다. 하지만 수선한 종자의 경우에는 온탕 후 30°C 침지와 20°C 침지소독 처리가 47.2%와 46.5%로 처리간의 차이가 인정되지 않았다(Table 1). 이상의 결과를 토대로 키다리병 방제를 위한 종자소독 효과를 높이기 위해서는 염수선에 의한 불건전 종자를 선별하는 것이 필수적이라 할 것이다. 그러나 염수선을 하고 온탕과 침지소독을 병행하여도 발병률이 높았는데 이런 원인을 분석하기 위하여 종자 소독 후에 범씨 부위별로 키다리병균 감염률을 조사하였다.

종자소독 방법에 따른 범씨 부위별 감염률 조사. 염수선한 종자에서 종자소독 방법별로 100립씩 소독 후 범씨의 부위별로 병원균을 분리한 결과 무처리는 배 16%, 배유 28%, 왕겨 52%로 전체 96%의 감염률을 보였다(Table 2). 20°C 침지소독 처리의 왕겨 감염률은 44%였으나 온탕소독 및 온탕 후 20°C와 30°C 침지소독에서는 모두 2%의 감염률을 나타내었으나, 배나 배유 부분의 경우 20°C 침지소독 시 각각 12%와 25% 감염률로 무처리와 비교해 차이가 없었다. 온탕소독은 배 10%, 배유 8%로 무처리에 비해 감염률이 다소 감소하였으며, 온탕 후 20°C 침지소독에서는 배 6%, 배유 10%였으며, 온탕 후 30°C 침지소독에서는 배 6%, 배유 2%로 4처리 중 가장 높은 효

과를 보였으나 배나 배유 부분의 병원균이 완전히 억제되지 않는다는 것을 알 수 있었다(Table 2).

온탕 및 약제침지소독에 의한 종자 내부의 병원균 포자와 균사의 변화. 무처리의 이병종자를 침지 2일 후의 종단면(Fig. 1A)을 주사전자 현미경으로 관찰한 결과 종피(Fig. 1C-e) 부분에서 길쭉한 난형의 포자(Fig. 1D)와 배(Fig. 1B-d) 부분에서 난형의 포자와 균사를 확인하였다(Fig. 1F). 배와 배유 사이(Fig. 1B-c)에서는 배 조직 속에 박혀있는 균사(Fig. 1E)를 관찰할 수 있어서 키다리병균이 배 종자의 배와 배유 안쪽까지 감염되어 있음을 확인할 수 있었다.

무처리 종자 종피의 정상적인 균사(Fig. 2A)와 비교하여 온탕소독 7일 후에 종피(Fig. 2B)의 균사는 표면이 파괴되어 비정상적인 반면 배 주피 안쪽에 존재하는 균사(Fig. 2C,D)는 무처리의 균사와 차이가 없었다. 이는 온탕소독은 종피 표면의 균사는 억제 가능하지만 주피 안으로 한 겹만 안으로 들어가도 그 효과가 없다는 것을 알 수 있었다. 침지소독의 경우에는 종피의 균사가 소독 1일 후에는 세포벽이 파괴되어 벌어지고(Fig. 2E) 7일 후에는 완전히 파괴되었다(Fig. 2F).

무처리의 감염종자에서는 현미의 종피(Fig. 3A)에서 물에 1일(Fig. 3B)과 7일(Fig. 3C) 동안 침지 후에 정상적인 포자가 존재하였다. 온탕소독의 경우에는 처리 1일 후에 종피에서 찌그러진 기형의 포자를 관찰할 수 있었지만(Fig. 3D), 7일 후의 종피에서 정상과 기형의 포자(Fig. 3E) 뿐만 아니라 발아중인 포자(Fig. 3F)가 동시에 존재함을 확인할 수 있었다. 침지소독의 경우에도 처리 1일 후에 기형(Fig. 3G)과 정상의 포자(Fig. 3H)가 동시에 존재하였고 처리 7일 후에는 이미 발아한 포자도 볼 수 있어 완벽한 소독이 이루어지지 않은 것을 알 수 있었다.

온탕침지의 경우 열이 침투되어 종자 내부에 감염된 세균을 효과적으로 살균할 수 있다고 보고되고 있다(이 등,

Table 2. Detection of *Fusarium fujikuroi* from rice seeds using Komada's medium after seed disinfection^a

Treatment	Rate of detection ^b (%)			
	Embryo	Endosperm	Hull	Total
Hot water soaking ^c	10.0	8.0	2.0	20.0
Hot water soaking+prochloraz (30°C)	6.0	2.0	2.0	10.0
Hot water soaking+ prochloraz (20°C)	6.0	10.0	2.0	18.0
Prochloraz ^d (20°C) ³	12.0	25.0	44.0	81.0
Control	16.0	28.0	52.0	96.0

^a *F. fujikuroi* were investigated 15days after placing on medium.

^b Based on 100 seeds per treatment.

^c Dry seeds were soaked in hot water at 60°C for 10 minutes, and then washed in cold water.

^d Dry seeds were soaked in prochloraz (EC) solution of 125 ppm for 24 hrs.

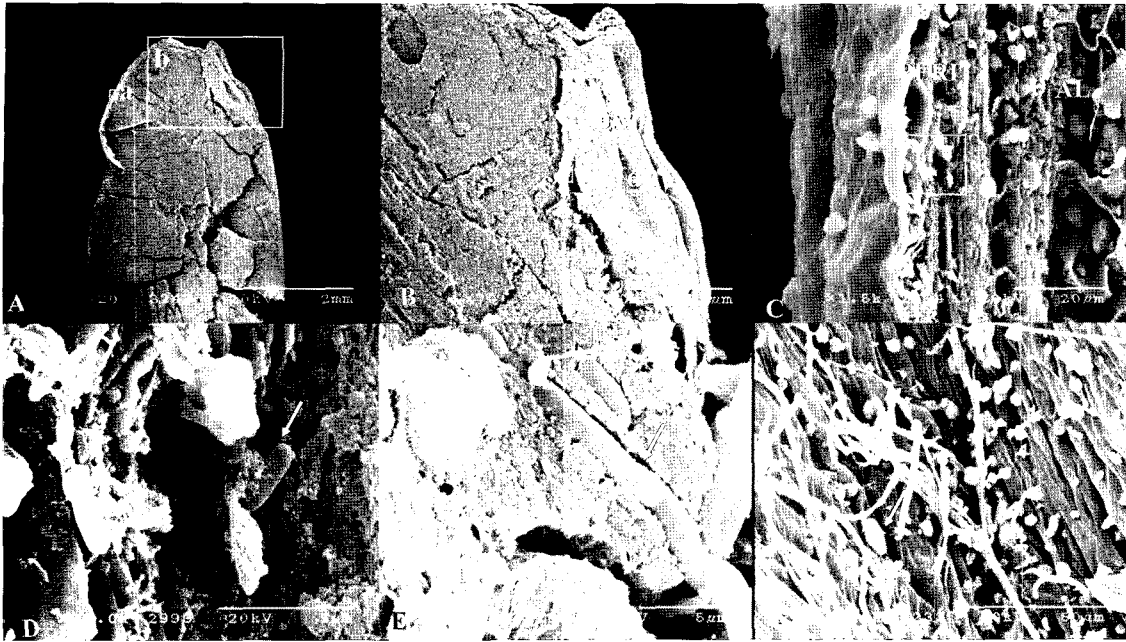


Fig. 1. Scanning electron micrographs of longitudinal sections of brown rice naturally infected by *Fusarium fujikuroi*. (A) longitudinal section of brown rice; (B) magnifying A-b; (C) magnifying A-a; (D) magnifying C-e, infected spores (arrow) between the pericarp layers; (E) magnifying B-c, infected mycelium (arrow) within the embryo; (F) magnifying B-d, infected spore (arrow) and mycelium in embryo (abbreviation : PERI, pericarp; AL, aleurone layer; EM, embryo).

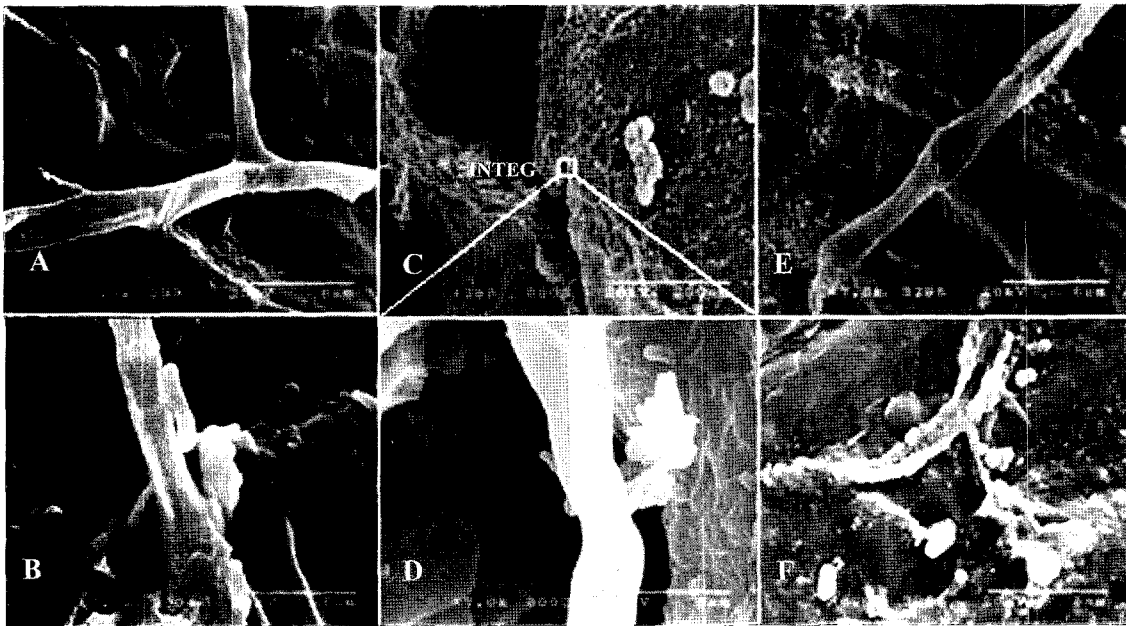


Fig. 2. Scanning electron micrographs of normal mycelium on the pericarp layer 7 days after water soaking (A), abnormal mycelium on the pericarp layer (B) and normal mycelium (D) within inner integument of embryo (C) after seed soaking in hot water of 60°C, and disordered mycelium on the pericarp layer 1 day (E) and 7 days (F) after seed soaking in prochloraz solution of 125 ppm (abbreviation: INTEG, integument).

2007; Nega 등, 2003). 하지만 본 실험에서는 온탕 침지의 영향을 받지 않은 주피 안쪽의 균사 및 종피의 포자를 확인할 수 있었는데 이는 종피 또는 포자의 세포벽 같

은 물리적인 한계로 인해 그 효과가 낮은 것으로 생각되었다. 또한 prochloraz의 종자소독 효과가 그리 높지 않다는 것은 100 ppm과 10 ppm의 농도에서 포자발아 억제율

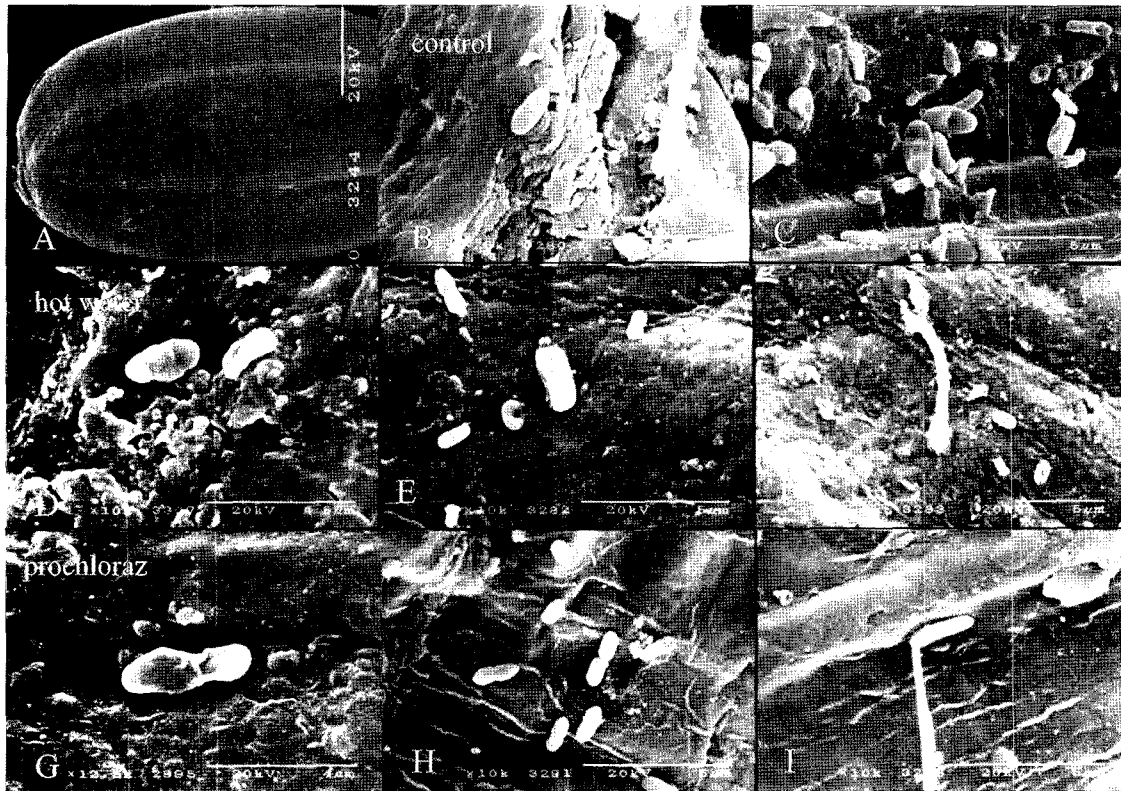


Fig. 3. Scanning electron micrographs of spores on the rice seed treated by soaking in hot water and prochloraz solution. (A) appearance of brown rice; (B) normal spores on the pericarp layer one day and (C) 7 days after water soaking; (D) shrunk spore on the pericarp layer one day after hot water soaking; (E) shrunk and normal spores and (F) spore germinated on the pericarp layer 7 days after hot water soaking; (G) shrunk spore and (H) normal spore on the pericarp layer one day after prochloraz disinfection; (I) spore germination on the pericarp layer 7 days after prochloraz disinfection.

이 95.5%와 50.7%였다는 기존 보고와 비교해 볼 때 prochloraz처럼 침투이행성이 높은 약제(신 등, 2007)라 할지라도 종자소독 기준 농도인 125 ppm으로는 종자 내부에 감염된 포자에 대해서는 완벽한 종자소독 효과를 기대하기 어려울 것으로 생각되었다. 또한 국내에서 시판 중인 농약을 이용하여 종자소독을 검정한 결과 단제만으로는 prochloraz 보다 좋은 효과를 보인 약제가 없다는 보고를 볼 때(신 등, 2007), 침투이행성을 증진시키기 위해서 종자의 최아 후에 분의처리소독을 병행하거나 기작이 다른 약제를 혼합하여 포자 억제효과를 높이는 등 여러 가지 방법들을 통해 종자소독효과를 높일 수 있는 방안을 강구해야 할 것이다.

요 약

본 연구는 키다리병에 심하게 감염된 종자를 온탕침법과 prochloraz 유제로 종자소독 시 그 효과가 떨어지는 원인을 규명하기 위해 시행하였다. 키다리병이 발병한 포장

에서 수확한 종자의 경우 병원균이 벼 종자의 배와 배유 안쪽까지 감염되어 있었다. 60°C에서 10분 동안 온탕 소독한 종자의 경우 종피 표면의 균사는 파괴되어 비정상적인 반면 배 주피 안쪽에 존재하는 균사는 정상적인 형태로 존재하였다. 포자는 종피 표면에서 비정상적인 포자와 정상적인 포자를 모두 확인하였다. prochloraz 유제로 30°C 24시간 침지소독 한 경우 종피의 균사는 완전히 파괴되었으나 포자는 정상과 비정상 포자 모두 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 온탕소독의 경우 종피 같은 물리적 한계로 인해 고열이 병원균에 전달되지 못하고, prochloraz의 경우 병원균 포자를 완전히 사멸시키기 못하기 때문에 종자소독 효과가 떨어짐을 알 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 2006년 농촌진흥청 공동연구과제(과제번호 20070101030003)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Chung, E. 2007. Using a KCl medium for easy inspection of *Fusarium moniliforme* in rice seed. *The Plant Pathology Journal* 23: 134-135.
- Komada, H. G. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research* 8: 114-125.
- Hayasaka, T., Ueno, K. and Ishiguro, K. 2002. Seed disinfection using hot water immersion to control several seed-borne diseases of rice plants. *Bulletin of the Yamagata Prefectural Experiment Station* 36: 67-78.
- Han, S. 2007. Review of disease occurrence of major crop in Korea in 2007. The KSPF Annual Meeting & Symposium, pp. 19-20.
- 조재영, 윤상영, 이은웅 외 13명. 1974. 신고 재배학 원론. 향문사. 246 pp.
- 김장규. 1981. 벼 키다리병의 발생생태에 관한 연구. 한국식물보호학회지 20: 146-151.
- 이지현, 신순선, 박용주, 류경열, 지형진. 2007. 채소 종자별 온탕침지 종자소독 효과검정. 식물병연구 13: 157-163.
- Xu, J.-R., Yan, K., Dickman, M. B. and Leslie, J. F. 1995. Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 74-84.
- Nega, E., Ulrich, R., Werner, S. and Jahn, M. 2003. Hot water treatment of vegetable seed an alternative seed treatment method to control seed-borne pathogen in organic farming. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110: 220-234.
- 박홍규, 신해룡, 이인, 김석언, 권오도, 박인진, 국용인. 2003. 벼 종자소독 시 수온, 처리시간 및 약량이 벼 키다리병 발병에 미치는 영향. 농약과학회지 7: 216-222.
- 성재모, 이순형, 유승현, 신광길. 1985. *Fusarium moniliforme* 감염벼종자의 소독과 주사전자현미경적 조직관찰. 한국식물병리학회지 1: 51-55.
- 신명욱, 이수민, 이용환, 강효중, 김홍태. 2008. 몇 가지 살균제의 벼 키다리병과 병원균에 대한 효과 검정. 농약과학회지 12: 168-176.
- Tiedt, L. R., Jooste, W. J. and Hamilton, A. V. L. 1988. Ultrastructure of collarette formation in *Fusarium* sect. *Liseola* and some taxonomic implications. *Transactions of the British Mycological Society* 90: 531-536.