

非病原性 *Pseudomonas solanacearum* 을 이용한 담배 세균성마름병의 防除

李永根 · 金政和 · 朴元穆*

韓國人蔘煙草研究所 病害虫研究室
*高麗大學校 農科大學 植物保護學科

Protection of Tobacco Plants from Bacterial Wilt with an Avirulent Isolate of *Pseudomonas solanacearum*

Y. K. Yi, J. H. Kim and W. M. Park*

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Suweon, Korea
*College of Agriculture, Korea University, Seoul, Korea

要 約

非病原性 *Pseudomonas solanacearum* 을 이용한 담배세균성마름병의 防除可能性이 검토되었다. Nutrient 液體培地 및 土壤에서 非病原性菌株는 병원성균주보다 生育速度가 빨랐으나 두 菌株를 혼합하여 培養할 때 병원성균주에 대한 生育抑制效果는 크지 않았다. 비병원성균주의 懸液에 感受性 담배品種인 BY 4 의 뿌리를 6 시간동안 沈漬시킨 후 병원성균주에 汚染된 土壤으로 移植한 결과, 높은 세균성마름병防除效果를 얻었다. 비병원성균주의 懸液을 假植狀態의 담배에 土壤灌注하고 24 시간 후에 圃場으로 移植한 결과 7월 상순까지는 30% 이상의 세균성마름병방제효과가 인정되었으나 그 후 방제효과가 급속히 감소되었다.

ABSTRACT

Microbial antagonism between virulent and avirulent isolates of *Pseudomonas solanacearum* was studied in relation to the control of bacterial wilt of tobacco. In nutrient broth media or in soil, the avirulent isolate of *P. solanacearum* grew faster than did the virulent one. Inhibitory effect of avirulent isolate against growth of virulent one was negligible in mixed culture of the two isolates. The disease severity of bacterial wilt was significantly reduced when the roots of cultivar BY4 susceptible to bacterial wilt was dipped in suspension of an avirulent isolate for 6 hours prior to transplanting to the soil infested with virulent bacteria. When the seedlings of tobacco were poured with the suspension of an avirulent isolate onto the soil in pre-planting pots 24 hours before transplanting, there was a significant reduction in disease severity in the field. However, the reduction was noticed until early July, but after middle of July, no difference between the avirulent isolate-treated and non-treated plants was found in severity of the bacterial wilt.

Key words: antagonism, biological control, *Pseudomonas solanacearum*.

緒 論

세균성마름병은 1910년 이전부터 우리나라 담배의 주요병으로 기록(2)되었으며, 현재는 전국의 담배產地에 고루 발생하여 해마다 막대한 피해를 주고있다. 이 병원균(*Pseudomonas solanacearum*)은 土壤細菌으로 藥劑에 의한 防除가 매우 어렵기 때문에 *P. solanacearum*의 非病原性菌株(1,11)나 bacteriocin生成菌株(3), 또는 熱處理하여 死滅시킨 菌株(10) 등을 이용한 防除試圖가 보고된 바 있으며, Kempe와 Sequeira(6)는 씨감자에 비병원성 *P. solanacearum*을 처리하여 좋은 세균성마름병 방제효과를 얻었다고 하였다. 그러나 이들의 보고는 대부분이 유묘기의 식물을 사용한 室內 實驗結果이었으며, 圃場條件에서 이 병에 대한 방제가능성이 보고된 바는 거의 없다. 본 실험은 병원세균을 人工培地에서 繼代培養한 결과 비병원성균주를 얻었기에, 이 비병원성균주의 병원성균주에 대한 拮抗效果를 검토하고, 비병원성균주를 담배유묘뿌리에 처리하여 세균성마름병에 대한 방제가능성을 온실 및 포장조건에서 검토하였다.

材料 및 方法

菌株 : *P. solanacearum*의 病原性菌株과 非病原性菌株을 사용하였다. 병원성균주는 한국인삼연구소 경각시험장 포장에서 채집된 담배의 罹病組織으로부터 분리하였고, 이 菌株를 繼代培養하면서 Tetrazolium 寒天培地(bactopeptone 10g, casein hydrolysate 1g, glucose 0.5g, bactoagar 20g, 0.5% 2,3,5-tetrazolium Cl sol. 10ml, 증류수 1l)상에서 형성된 非病原性形 colony를 Husain과 Kelman의 방법(5)에 따라 선별하여 비병원성균주로 사용하였다.

菌株의 同定 : 균주의 형태 및 주요 生理의 特性을 *P. solanacearum* (ATCC 11697)균주 및 Bergey's manual(8)에 기록된 세균의 특성과 비교하였다. 세균의 형태는 2% phosphotungstic acid로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였고, 생리적 특성조사는 Harrigan과 McCane(4) 및 Skelman(9)의 방법에 準하였다.

病原性檢定 : 프라스틱·풋트(8×27×35cm)에 殺菌土壤을 채우고 파종 후 50日쯤된 感受性 담배 품종인 BY 4의 幼苗를 20株씩 移植한 다음, 공시균주

의 懸液(10⁹ CFU/ml)을 풋트당 250ml씩 土壤 灌注하였다. 3반복으로 처리하여 30℃에서 4週間 보존하면서 發病여부를 관찰하였다.

非病原性菌株의 病原性菌株에 대한 生育抑制效果 調查 : 병원성菌株과 非病原性菌株의 懸液(2×10⁹ CFU/ml)을 1:1로 혼합한 것과 各菌株 단독으로 nutrient 液體培地(bactopeptone 5g, beef extract 3g, tryptone 10g, yeast extract 1g, glucose 5g, 증류수 1l) 150ml에 1ml씩 接種하고 30℃에서 150rpm으로 24時間동안 振盪培養한 후, tetrazolium 한천배지에 agar plate method로 처리하고 Husain과 Kelman의 방법(5)에 따라 병원성형 및 비병원성형 colony 수를 조사하였다. 즉 中央이 pink색인 白色 colony는 병원성형, 赤色 colony는 비병원성형으로 판정하였다.

煙草假植用床土를 含水率이 40%되게 조절하여 시험관(직경 23mm)에 45g씩 넣고, 동일한 방법으로 병원성 및 비병원성균주를 접종한 후 30℃에서 배양하면서 균주별 密度變化를 조사하였다. 密度調査方法은 液體培養試驗에서와 같았다.

非病原性菌株을 이용한 세균성마름병 防除效果 調查 : 播種 후 2개월된 담배(BY 4)의 뿌리를 비병원성균주의 懸液(10¹⁶ CFU/ml)에 6시간 및 24시간동안 沈漬시킨 다음 병원성균주에 오염된 토양(2×10⁵ CFU/g)에 移植하고 經時的인 發病率을 조사하였다. 직경 11cm의 풋트에 처리별 20株씩 3반복으로 하였다.

또한 感受性品種인 BY 4와 抵抗性品種인 NC 82가 심겨진 담배假植用풋트에 비병원성균주의 懸液(10⁹ CFU/ml)을 株當 30ml씩 土壤 灌注하고 24시간 후에 개량멸칭표준재배법으로 圃場에 移植하여 經時的인 自然發病率을 조사하였다. 처리별 40株씩 3반복으로 하였으며, 발병율은 다음 공식에 따라 조사하였다.

$$\text{發病率(\%)} = \frac{\sum(\text{發病指數} \times \text{發病株數})}{\text{調査株數} \times 5} \times 100$$

發病指數:

- 1 : 아랫잎 2~3枚 萎凋,
- 2 : 줄기의 땅가부분 褐變,
- 3 : 아랫잎 1/3 이상萎凋, 줄기 1/3 이상 褐變,
- 4 : 잎 2/3 이상萎凋, 줄기 2/3 이상 褐變,
- 5 : 枯死.

結果 및 考察

세균성마름병균의 同定 : 供試菌株들은 1~3 개의 單極毛를 가진 짧은 桿菌으로 그림陰性菌이었으며 indol test를 비롯한 7가지 主要 生理的 反應이 ATCC 11697 菌株의 特性 및 Bergey's manual (3)

에 기록된 *Pseudomonas solanacearum*의 특성과 일치하였으며 담배에 대한 병원성만이 相異하게 나타났다(表 1). 따라서 供試菌株들은 담배세균성마름병균인 *P. solanacearum* 및 同菌株를 人工培地에서 繼代培養한 결과 병원성을 상실한 非病原性變異菌株로 인정되었다.

非病原性菌株의 病原性菌株生育抑制效果 : 병원성균

Table 1. Diagnostic test for identification of 2 isolates of *Pseudomonas solanacearum* tested

Characteristic	Virulent isolate	Avirulent isolate	<i>P. solanacearum</i>	
			ATCC 11697	Bergey's ^b
Shape	short rod	short rod	short rod	short rod
Flagella (No.)	a polar (1-3)	a polar (1-3)	a polar (1-3)	> 1
Gram stain	- ^a	-	-	-
Pigment fluorescence	-	-	-	-
Indol production	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-
Cytochrom oxydase	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Denitrification	+	+	+	+
Pathogenicity to tobacco	+	-	-	+

a +: positive reaction, -: negative reaction.

b data from the Bergey's manual of systematic bacteriology(8).

주와 비병원성균주를 1:1로 혼합하여 배양하고 agar plate method에 의해 형성된 colony를 조사한 결과, 비병원성균 colony 수는 비병원성균주를 단독으로 배양했을 경우와 같은 水準이었으나, 병원성균 colony 수는 병원성균주를 단독으로 배양한 경우에 비하여 40%수준에 불과하였다(表 2). 따라서 人工培地에서 비병원성균주를 병원성균주와 혼합하여 배양할 경우에 병원성균주의 生育이 약하게나마 抑制된 수 있는 것으로 인정되었으며, 두 균주를 각각 단독으로 배양했을 경우에 비병원성균주는 병원성균주에 비하여 2배 이상 증식이 빠른 것으로 조사되

었다. 이들 균주를 土壤內에서 배양하였을 경우에도 그 生育速度는 많이 지연되었으나 液體培地에서 振

Table 2. Growth of virulent and avirulent isolates of *Pseudomonas solanacearum* after 48hrs of shaking incubation at 30°C

Isolate	No. of colonies (10 ¹⁴ CFU/ml)	
	Virulent type	Avirulent type
Virulent	9.0	0.0
Avirulent	0.0	21.5
Virulent + Avirulent	3.6	24.9

Table 3. Growth of virulent and avirulent isolates of *Pseudomonas solanacearum* in soil after incubation of different periods at 30°C

Isolate	No. of colonies (10 ¹⁰ CFU/ml)							
	4		8		12		16 ^a	
	V	AV	V	AV	V	AV	V	AV ^b
Virulent (V)	0.2	0	0.5	0	13	0	2,000	0
Avirulent (AV)	0	0.3	0	2	0	78	0	7,500
Virulent + avirulent	0.2	0.5	0.1	0.9	9	110	200	3,700

a days after inoculation.

b virulent or avirulent type colonies identified by method of Husain and Kelman (5).

滋培養한 결과와 같은 경향이 인정되었다(表 3).

Abo-El-Dahab과 El-Goorani(1)에 의하면 *P. solanacearum*의 비병원성균주는 병원성균주에 비하여 5배나 많은 IAA를 생성하는데, 병원성균주는 비병원성균주에 비하여 IAA에 대한 내성이 약하다고 하였다. 또 Baker와 Cook(2)는 영양, 산소 등에 대한 경합이 토양미생물들 사이에拮抗作用으로 나타날 수 있다고 하였다. 본 실험에서 병원성균주의 생육이 억제된 기작은 분명하지 않으나, 비병원성균주는 병원성균주와生理機能이 매우 비슷한 반면에 그生육速度가 훨씬 빠르다는 점에서 병원성균주의 경합상대로 매우 效果的이었을 것으로 생각된다.

非病原性菌株을 이용한 세균성마름병 防除效果 :
담배뿌리를 비병원성균주의 현탁액에 6시간 및 24시간동안 沈漬시킨 다음 병원성균주를 오염시킨 토양에 移植하고 3週 후에 발병율을 조사한 결과, 비병원성균주를 처리한 담배에서는 침지시간에 관계없이 80%이상의 높은 세균성마름병 방제효과를 나타내었다(表 4). 비병원성균주에 처리된 담배에서 移植 3日後의 發病率이 14日後 보다 더 높게 조사된 것은 이식 후 활착될 때까지 나타났던 잎의 시들음 현상이 세균성마름병의 初期病徵으로 誤診된 때문으로 생각된다. 6시간동안 비병원성균에 처리된 담배도 24시간동안 처리된 담배에 비하여 세균성마름병 방제효과가 뒤지지 않았으며, 活着前까지의 시들음현상도 輕微하였다.

한편, 假植狀態의 담배에 비병원성균주의 현탁액을 土壤灌注하고 圃場에 移植한 결과, 感受性品種인 BY 4의 경우에 7월상순까지 無處理에 비해 30%이상의 세균성마름병 방제효과를 나타내었다(그림

Table 4. Effect of root-dipping with suspension of avirulent *Pseudomonas solanacearum* on disease severity of bacterial wilt in tobacco seedlings

Time of root dipping (hrs)	Disease severity (%)		
	3	14	20 ^a
0	17.3	80.0	93.3 a ^b
6	9.3	4.0	6.7 b
24	24.0	8.0	17.3 b

a days after inoculation.

b Means followed by the same letter were not significant at $P = 0.01$ based on Duncan's multiple range test.

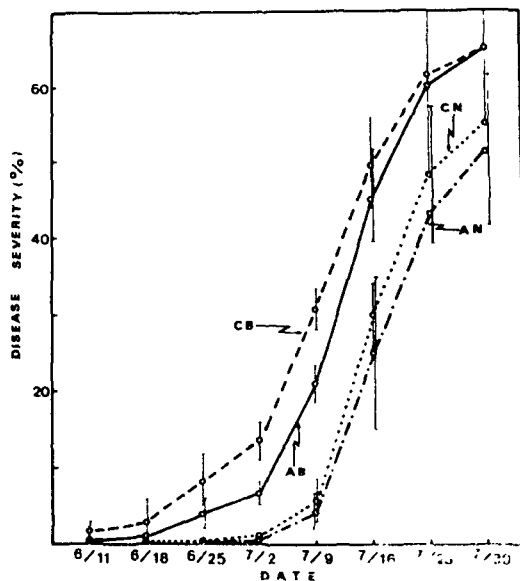


Fig. 1. Bacterial wilt severity of two tobacco cultivars in the naturally infested field when an avirulent *pseudomonas solanacearum* applied before transplanting.

AB : Cultivar BY 4 plants treated with an avirulent isolate,

CB : Cultivar BY 4 plants not treated,

AN : Cultivar NC 82 plants treated with an avirulent isolate,

CN : Cultivar NC 82 plants not treated.

1). 그러나 그 후 담배의 생육이 진전되면서 점차 방제효과도 떨어져서 마침내 수확이 끝나는 7월말에는 無處理와 같은 수준의 발병율을 보였다. 抵抗性品種인 NC 82의 경우에는 비병원성균처리에 의한 방제효과가 全生육期間을 통하여 인정되지 않았다.

*P. solanacearum*의 熱處理한 균이나 비병원성균주를 담배에 處理하여 세균성마름병에 대한 저항성을 유지시켰다는 보고는 70년대 이후에도 수없이 많았다(7, 10, 11). 최근에 Kempe와 Sequeira는 감자의 塊莖을 비병원성 *P. solanacearum*의 현탁액에 沈漬處理하여 播種하고 生育된 줄기 및 뿌리에 病原性菌株을 接種한 결과 좋은 세균성마름병 방제효과를 얻었다고 하였다. 그러나 그들은 감자의 뿌리에 상처를 주고 병원균을 接種한 경우에는 이와같은 유도저항성(induced resistance)의 효과를 기대할 수 없다고 하였다. 본 시험에서 7월상순까지는 세균성마름병에 대한 방제효과가 인정되었으나 그 후 그 효과가 급격히 떨어진 이유는 분명하지 않으나, 아

마도 土壤內 微小動物이나 強風 等 自然狀態에서 생기기 쉬운 뿌리의 상처도 그 원인 중의 하나였을 것으로 추측된다.

비병원성 *P. solanacearum* 처리에 의한 세균성마름병 방제기작으로 비병원성균주의 脂質多糖類(lipopolysaccharide)가 寄主植物細胞의 感染部位를 先占한다든지, 또는 기주식물내의 peroxidase 活産을 증가시키거나 다른 몇가지 isozyme을 출현시킨다는 보고(7)가 있으나, 本試驗에서 담배에 처리된 비병원성균주가 어떤 기작으로 세균성마름병 방제에 기여하였는지는 앞으로 더 조사되어야 할 것이다.

參 考 文 獻

1. ABO-EL-DAHAB, M. K. & EL-GOORANI, M. A. (1969). Antagonism among strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 59: 1005-7.
2. BAKER, K. F. & COOK, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
3. CHEN, W. Y. & ECHANDI, E. (1981). Protection of tobacco seedlings from granville wilt with avirulent bacteriocin producing strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 71:866 (Abstract).
4. HARRIGAN, W. F. & MCCANE, M. E. (1966). *Laboratory methods in microbiology*. Academic Press, New York.
5. HUSAIN, A. & KELMAN, A. (1958). Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 48:155-165.
6. KEMPE, J. & SEQUEIRIRA, L. (1983). Biological control of bacterial wilt of potato: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Disease* 67:499-503.
7. MCINTYRE, J. L. (1982). Induced resistance. In *Phytopathogenic prokaryotes. Volume 2*, Ed. by M. S. MOUNT & G. H. LACY, pp. 137-147. Academic Press. New York.
8. PALLERONI, N. J. (1984). Genus 1. *Pseudomonas*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1*, Ed. by N.R. KRIEG & J. G. HOLT, pp. 141-219. Williams & Wilkins, Baltimore.
9. SKELMAN, V. B. D. (1967). *Guide to the identification of the genera of bacteria*. William & Wilkins, Baltimore.
10. TANAKA, H. (1983). Protection of tobacco and tomato against root infection of *Pseudomonas solanacearum* by heat-killed bacterial cells. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 49:66-68.
11. ZEHR, E. I. (1971). Pathogenesis as influenced by the interaction of two virulent strains of *Pseudomonas solanacearum* in inoculated tobacco plants. *Phytopathology* 61:987-989.
12. 度支部 臨時財源調查局. (1910). 韓國煙草調查書. p. 11-29.