

비병원성 Bacteriocin 생성 *Pseudomonas solanacearum*의 저온성 균주를 이용한 담배 세균성마름병 방제효과

이영근, 손준수*

안동대학교 농생물학과, 한국인삼연초연구소 경작시험장*

Biological Control Effect of Treating Avirulent Bacteriocin-Producing Strain of *Pseudomonas solanacearum* Adapted to Low Temperature on Tobacco Bacterial Wilt

Y.K. Yi and J.S. Son*

Department of agricultural biology, Andong national university. Andong 760-749, Korea
Korea ginseng & tobacco research institute. Suwon 440-600, Korea*

ABSTRACT

Effect of an avirulent bacteriocin-producing strain(ABPS) of *Pseudomonas solanacearum* adapted to low temperature on the control of tobacco bacterial wilt was examined under the natural field conditions.

The ABPS of *P. solanacearum* were succeeding-cultured at gradually low temperature, 30°C to 13°C. The isolates adapted to low temperature grew faster than the wild type either in artificial media or on the tobacco rhizoplane. The control effect of one of the isolates on bacterial wilt was higher than that of the wild type when the bacterial suspension had been poured onto the tobacco rhizosphere soil on 1 day before and 15 days after transplanting to the field. It was suggested that ABPS of *P. solanacearum* adapted to the low temperature, might be more effective biological control agent than the wild type.

서 론

Bacteriocin생성 균주를 이용한 토양전염성 식물 세균병 방제는 과수의 근두암종병(*Agrobacterium tumefaciens*)에 대해서는 큰 성공⁶⁾을 거두었으나, 다른 세균병에 대해서는 아직 실용적인 단계에 이르지 못하고 있다.

*Pseudomonas solanacearum*의 bacteriocin생성 균주는 Cupples 등⁴⁾에 의해 처음 보고된 이후, 담배 세균성마름병 방제시험에도 많이 이용^{1, 2, 3, 5, 7, 10)}되었다. 그러나 많은 시험에서 bacteriocin생성균주를 담배근권토양에 처리한 이후 균주의 밀도가 급속히 저하되었으며, 이러한 밀도저하가 병 방제효과 감소의 한 원인으로 생각되었다^{1, 9, 10)}. 우리나라에서 담배를 본밭에 이식하는 4월 중순의 기온과 토양 온도는 *P. solanacearum*의 생육적온보다 훨씬 낮으며, 이러한 온도의 차이도 담배근권토양에 처리된 bacteriocin생성균주의 밀도저하원인 중의 하나가 될수 있을 것으로 생각되었다.

이 시험에서는 bacteriocin생성균주의 저온성생육을 유도하고, 이 저온성균주를 이용하여 세균성 마름병 방제효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 담배품종

한국인삼연초연구소 경작시험장 제3연구실에 보존되어 있는 세균성마름병균주¹⁰⁾들을 담배에 접종한 후 재분리하여, nutrient한천배지(bacto-peptone 5g, beef extract 3g, glucose 5g, 한천 20g)에서 30℃에서 2일간 배양된 것을 사용하였다. Bacteriocin activity의 검정은 Chen의 방법¹⁾에 따라 병원성균

주에 대한 발육저지원의 직경을 측정하였으며, 균주별 3반복으로 하였다. 이 균주들의 현탁액(10^9 cfu/ml)에 과종 후 5주일 된 BY4품종의 담배뿌리를 30분간 침지시킨 후, 처리별 5주씩 이식하여 21일간 발병정도를 조사하였다. 발병정도는 건전(0)에서 고사(5)까지 6등급으로 나누어 조사하였다. 담배는 황색종품종 KF109와 BY4의 종자를 한국인삼연초연구소 경작시험장 제2연구실로부터 분양받아 사용하였다.

2. Bacteriocin생성균주의 저온성생육 유도

비병원성 bacteriocin생성 *P. solanacearum* 균주를 30℃에서 시작하여 2주일에 1℃씩 13℃까지 온도를 낮춰가며 nutrient 한천배지 상에 계대배양하였다. 13℃에서 한달 이상 계대배양된 균주를 저온성균주로, 저온에서 배양하지 않은 균주를 야생균주로 사용하였다.

저온성균주와 야생균주의 현탁액(10^9 cfu/ml)을 0.1ml씩 10ml의 nutrient액체배지에 각각 접종하여 13℃에서 8일간 배양하였다. 배양된 균주의 밀도를 조사하기 위하여, Chen의 방법¹⁾에 따라 Y9-3균주에 대해 발육저지원을 형성하는 colony의 수를 세었다. 또 과종 후 7주일 된 KF109 품종의 담배뿌리를 저온성 및 야생균주의 현탁액(10^9 cfu/ml)에 30분간 침지시킨 후, 담배 가식용 상토를 채운 pot (직경 17×15cm)에 이식하였다. 이식이 끝난 담배는 15-18℃에 보존하면서, 뿌리에 처리된 세균의 밀도를 조사하였다. 뿌리에서의 세균밀도 조사는 Chan의 방법¹⁾에 따랐으며, Y-3균주에 대해 발육저지원을 형성하는 colony의 수를 세었다.

3. 저온성 bacteriocin생성균주 처리에 의한 담배 세균성마름병 방제효과 조사

KF109품종의 담배를 세균성마름병 상습발병포장에 이식하면서, 본발이식 하루전 및 배토할 때에 저온성 및 야생 bacteriocin생성균주의 현탁액 (10⁹cfu/ml)을 각각 근권토양에 관주하였다. 본발이식 하루 전에는 포기당 5ml씩, 배토할 때에는 포기당 30ml 씩 관주하였다. 처리별 40주 씩 3반복으로 황색증 개광멸칭표준재배법에 따라 이식하였으며, 발병정도를 6등급으로 나누어 수확이 끝나는 8월 하순까지 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 비병원성 bacteriocin생성 *P. solanacearum*의 선발

Y38등 4개 균주⁹⁾로부터 재분리된 8개 균주가 지표균주로 사용된 4개 병원성균주 모두 또는 일부의 발육을 저지시켰으며, 이 균주들을 접종한 담배에서는 접종 21일 후까지 세균성마름병의 병징을 찾아 볼 수 없었다. 따라서 이 8개 균주는 비병원성 bacteriocin생성균주로 인정되었다. 이 가운데 Y38-1 균주는 4개 지표균주 모두에 대하여

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

Isolate	Diameter of inhibition zone(mm)*				Disease index**
	Y 9-1	Y 9-2	Y 9-3	Y 9-10-2	
Y 38-1	21	24	20	19	0
Y 38-2	18	16	19	19	0
Y 38-3	19	21	20	18	0
Y 39	9	0	8	12	0
Y 61-1	8	0	9	10	0
Y 61-2	11	8	9	0	0
Y 94	8	0	10	11	0
Y 95	9	10	9	0	0

* Each bacterial isolate was seeded with 4mm diameter aluminum rod on casamino acid-peptone-glucose agar plate in 9mm petridish. After incubation at 30°C for 2 days, bacterial cells were killed by exposing them to the vapor of chloroform. Four ml of 0.7% melted agar mixed with challenger strain poured over the bottom layer of agar. After reincubation at 30°C for 2 days, inhibition zones were measured.

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

Table 2. Soil temperature of 20cm depth from the surface, Suwon region, during tobacco growing season*

Date surveyed	Range(°C)	Average(°C)
Early April	6.2 - 12.0	9.3
Mid-April	11.6 - 13.6	12.3
Late April	11.8 - 15.2	13.6
May	12.7 - 21.4	17.2
June	19.8 - 22.9	22.9
July	22.7 - 26.6	24.9

* Figures cited from Suwon meteorological station.

직경 19mm 이상의 발육저지원을 형성하였다(표 1).

2. Bacteriocin생성 균주의 저온성 생육 유도

우리나라에서 본밭으로 담배를 이식하는 시기는 4월 초에서 하순 사이가 권장되고 있다. 그런데 이

시기에 조사된 수원지방의 토양온도는 9-14°C로 *P. solanacearum*의 生育適溫인 30°C에 비하여 매우 낮았다(표 2). 따라서 담배 근권토양에서 비병원성 bacteriocin생성 균주의 생육을 돕기 위해서는 이 균주들을 저온성균으로 유도할 필요가 있다고 생각되었다.

Table 3. Number of colonies of avirulent bacteriocin-producing isolate of *P. solanacearum* cultured at 13°C*

Isolate	Number of colonies(cfu/ml)	
	Wild type	Mutant**
Y 38-1	$(1.3 \pm 0.8) \times 10^{10}$	$(1.2 \pm 0.6) \times 10^{14}$
Y 38-3	0.0 ± 0.0	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^{14}$
Y 39	$(1.8 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(2.4 \pm 0.6) \times 10^{14}$
Y 61-2	0.0 ± 0.0	$(2.8 \pm 0.2) \times 10^{10}$
Y 94	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{12}$	$(1.9 \pm 0.7) \times 10^{14}$
Y 95	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^{12}$	$(3.4 \pm 0.9) \times 10^{14}$

* 0.1 ml of each bacterial suspension was inoculated into 10 ml of nutrient broth media and incubated at 13°C for 8 days. 0.5 ml of each bacterial culture was plated on the TZC agar medium before pouring 5 ml of melted 1.5% water agar on the agar surface. After incubation, 4 ml of melted 0.7% water mixed with *P. solanacearum* strain Y9-2 was poured over the agar surface. After additional incubation, *P. solanacearum* like colonies with inhibition zones were counted. Values are means ± standard deviations of three replications.

** Mutant was originated from the wild type isolate through succeeding-culture at 30°C to 13°C, gradually.

8개 비병원성 bacteriocin생성 균주들을 점차 온도를 낮춰가며 계대배양한 후, 13°C에서 8일간 액체배양하여 증식된 정도를 야생균주와 비교하였다 (표 3). 그 결과, 저온에서 혼련된 균주들은 야생

균주에 비하여 10^{2-4} 배의 높은 밀도로 증식되어 있었다.

또한 이 저온성 균주들을 담배뿌리에 처리하고 15-18°C에 보존하면서 담배 뿌리에서의 세균밀도

Table 4. Number of colonies of avirulent bacteriocin-producing isolates of *Pseudomonas solanacearum* detected from the roots of tobacco plants inoculated with the same bacteria

Isolate	treated**	Number of colonies(cfu/g. fresh wt.)*			
		2		4	
		OR	OR	OR	ER
Y38-1	Wild type	$(9.6 \pm 1.0) \times 10^6$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^6$	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^5$	$(0.1 \pm 0.0) \times 10^3$
	Mutnat	$(4.3 \pm 2.4) \times 10^7$	$(8.0 \pm 3.0) \times 10^7$	$(4.3 \pm 1.0) \times 10^6$	$(1.1 \pm 0.6) \times 10^5$
Y38-3	Wild type	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^7$	$(7.2 \pm 5.5) \times 10^7$	$(2.0 \pm 0.9) \times 10^6$	$(4.4 \pm 2.6) \times 10^4$
	Mutnat	$(3.6 \pm 0.6) \times 10^7$	$(2.4 \pm 1.7) \times 10^7$	$(2.4 \pm 1.7) \times 10^6$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^5$
Y39-1	Wild type	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^7$	$(2.2 \pm 2.0) \times 10^5$	$(2.9 \pm 3.0) \times 10^4$	$(1.0 \pm 0.0) \times 10^2$
	Mutnat	$(1.8 \pm 0.9) \times 10^7$	$(4.3 \pm 2.4) \times 10^7$	$(9.5 \pm 1.0) \times 10^5$	$(8.0 \pm 5.0) \times 10^3$
Y61-2	Wild type	$(3.7 \pm 2.4) \times 10^6$	—	$(1.7 \pm 0.8) \times 10^4$	$(8.0 \pm 1.0) \times 10^3$
	Mutnat	$(4.5 \pm 4.0) \times 10^6$	$(2.5 \pm 2.2) \times 10^6$	$(3.0 \pm 2.5) \times 10^6$	$(1.2 \pm 1.1) \times 10^3$
Y94	Wild type	$(4.8 \pm 2.8) \times 10^6$	$(3.9 \pm 4.0) \times 10^5$	$(3.6 \pm 3.0) \times 10^4$	$(2.3 \pm 5.2) \times 10^4$
	Mutnat	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^7$	$(5.0 \pm 4.0) \times 10^6$	$(6.7 \pm 5.6) \times 10^4$	$(2.0 \pm 1.6) \times 10^4$
Y95	Wild type	$(2.4 \pm 2.0) \times 10^6$	—	$(2.4 \pm 2.5) \times 10^4$	$(1.4 \pm 1.0) \times 10^4$
	Mutnat	$(1.8 \pm 0.3) \times 10^7$	—	$(8.2 \pm 2.6) \times 10^4$	$(7.8 \pm 6.7) \times 10^4$

* Tobacco roots were dipped in the bacterial suspension (10^9 cfu/ml) for 30 min. prior to transplanting to soil. The tobacco plants treated with bacteria were cultivated at 18°C. Whole root systems were divided to original root treated with the bacteria before the transplanting (OR) and root extended (ER) after the transplanting. Each root was washed in running water for 1 min, and grounded in glass tissue grinder. 0.5ml of each root extract was plated on the TZC agar medium before pouring 5 ml of melted 1.5% water agar on the agar surface. After incubation, 4 ml of melted 0.7% water agar mixed with *P. solanacearum* strain Y9-2 was poured over the agar surface. After additional incubation, *P. solanacearum* like colonies with inhibition zones were counted. Values are means \pm standard deviations of three replicatins.

** Mutants were originated from the wild type isolate through succeeding-culture at 30°C to 13°C, gradually.

*** Weeks after root dipping treatment.

변화를 경시적으로 조사한 결과, 대부분의 균주들이 처리 후 8주까지 그들의 야생균주에 비하여 10배 정도 높은 밀도를 유지하고 있었다(표 4). Chen¹⁾은 담배뿌리에 처리된 비병원성 bacteriocin생성 균주가 이식 후 신장된 담배뿌리에서는 거의 검출되지 않았다고 보고하였는데, 본 시험에서 Y38-1의 저온성으로 유도된 균주는 신장된 뿌리에서도 야생균주에 비하여 높은 밀도로 검출되었다. 따라서 저온성 균주로 유도된 비병원성 bacteriocin생성균주는 담배뿌리에서의 정착능력이 야생균주에 비하여 훨씬 좋은 것으로 생각되었다.

3. 저온성 bacteriocin생성균주 처리에 의한 담배세균성마름병 방제효과

Y38-1의 저온성균주를 담배의 근권토양에 처리한 결과, 무처리 담배에 비하여 수확후기인 8월 중순까지 약 90%, 수확이 끝나는 8월 하순까지 56%의 세균성마름병 발생이 억제되었다(표 5). Y38-

1의 야생균주를 처리한 담배에서는 8월 상순까지 약 70%의 병 발생 억제효과를 보였으나, 그 후 병발생이 급속히 증가하여 무처리 담배와 같은 수준의 병 발생을 나타내었다. 이러한 방제효과와의 차이는 담배근권에서 처리된 균주의 초기 정착능력 차이에 의한 것일 가능성이 높다고 생각되며, 본발 후기에 신장된 담배뿌리에서도 이 균주들의 밀도를 높여줄 수 있다면 병 방제효과를 더욱 높일 수 있을 것으로 생각된다.

이¹⁰⁾는 bacteriocin생성균주를 이용한 세균성마름병 방제효과가 담배품종의 이 병에 대한 저항성 정도에 따라 다르다고 하였으며, 박 등⁹⁾은 담배밭의 병원균에 의한 오염정도에 따라서도 병 방제효과가 다르게 나타날 수 있다고 하였다. 박 등⁸⁾도 비병원성균주를 이용한 시험에서, 담배밭의 병원균에 의한 오염도가 낮아 병 발생이 적을수록 세균성마름병에 대한 방제효과가 높게 나타난다고 하였다. 이 시험에서는 담배재배기간중 심한 가뭄으로 인

Table 5. The disease progress of bacterial wilt of tobacco plants treated with an avirulent bacteriocin-producing isolate of *Pseudomonas solanacearum* adapted to low temperature in naturally infested field with the pathogen.

Isolate treated**	Disease severity(%)*			
	20 July	5 August	14 August	28 August
Y38-1 Mutant	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±0.0	29.3±3.3
Y38-1 Wild type	0.3±0.6	6.3±5.7	12.0±7.9	59.3±23.7
Not treated	0.5±0.9	22.6±10.5	30.8±13.6	66.7±25.5

* Five ml and 30ml of the bacterial suspension(10⁹cfu/ml) was poured onto the root zone of each 10-wk-old tobacco cultivar KF 109 on 1 day before and on 15 days after transplanting to the field, respectively. Disease index ranged from 0=no visible symptoms to 5=completely wilted or dead. Values are means± standard deviation of three replicates. Each replicate consist of 40 tobacco plants.

** Mutant was originated from the wild type isolate through succeeding-culture at 30°C to 13°C, gradually.

하여 세균성 마름병이 매우 늦게 발생되기 시작하였으며, 이러한 기상조건이 bacteriocin생성균주 처리에 의한 병 방제 효과가 늦게까지 높게 나타난 원인인 것 같다. 따라서 재배품종의 저항성 수준과 담배밭의 병원균에 의한 오염도, 처리지역의 기상 조건 등을 고려한 bacteriocin생성균주의 처리방법도 검토되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

비병원성 bacteriocin생성(ABPS) *Pseudomonas solanacearum*의 저온성 생육을 유도하고, 이 균주를 이용한 담배 세균성마름병 방제효과를 검토하였다.

ABPS균주들을 30°C부터 13°C까지 온도를 낮춰 가며 계대배양한 결과, 이 균주들은 야생주에 비하여 인공배지에서는 물론 담배뿌리에서도 증식이 빨랐다. 담배를 본밭에 이식하기 하루 전과 15일 후에 이 중 한 균주의 현탁액을 담배근권토양에 관주한 결과, 저온성 균주에 처리된 담배는 야생 균주에 처리된 담배에 비하여 높은 세균성마름병 방제효과를 보였다. 따라서 담배를 본밭으로 옮겨 심는 시기의 토양온도에 bacteriocin생성 균주를 적응시키는 것은 병 방제효과 제고에 도움이 되는 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Chen, W. Y. 1981. Biological control of bacterial wilt of tobacco with avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum*. Ph.D.Thesis, Department of plant pathology, NC state univ., Raleigh. pp. 68.
2. Chen, W. Y., and E. Echandi, and H. W. Spurr, Jr. 1984. Protection of tobacco plants from bacterial wilt with avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco. *Plant Pathol.* 33 : 245-253.
3. Chen, W. Y., E. Echandi, and H. W. Spurr, Jr. 1981. Protection of tobacco plants from bacterial wilt with avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 482-492. in : Lozano, J.C. ed. Proc. 5th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria, Call. Columbia.
4. Cuppels, D. A., R. S. Hanson, and A. Kelman. 1978. Isolation and characterization of bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* 109 : 295-303.
5. Hara, H., and K. Ono. 1990. Protection of tobacco plant from bacterial wilt of tobacco by weakly-virulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum*. CORESTA information bulletin 1990. pp. 238.
6. Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. *Plant Disease* 64 : 24-30.
7. 田中 博. 1985. タハコ 立枯病菌に對する抵抗性誘導とその機構. 宇都宮タハコ試報 21 : 1-66.
8. 朴銀景, 金政和, 孫俊秀, 金相奭, 李永根, 吳明熙, 姜呂奎. 1986. 煙草 病害蟲 發生機作 및 防除 研究. p. 271-400. 韓國人蔘煙草研究所. 담배 研究報告書(耕作分野 育種 및 環境編).
9. 朴銀景, 金政和, 孫俊秀, 李永根, 姜呂奎. 1988.

- 煙草 病害蟲 發生機作 및 防除 研究. p. 160—
263. 韓國人蔘煙草研究所. 담배研究報告書(耕
作分野 育種 및 環境編).
10. 李永根. 1991. 비병원성 bacteriocin생성 *Pseudo-
monas solanacearum*을 이용한 담배세균성 마
름병 방제. 한국연초학회지. 13 : 42—47.