

## Streptomycin 耐性 담배줄기속썩음병菌 방제약제 선발

강 여 규\*

한국인삼연초연구원 수원시험장  
(1996년 3월 15일 접수)

### Chemicals for the Control of Streptomycin-resistant Tobacco Hollow Stalk Pathogen, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Yue-Gyu Kang\*

Suwon Experiment Station, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute  
(Received March 15, 1996)

**ABSTRACT** : Chemicals including antibiotics and bactericides were screened for suppression of streptomycin-resistant *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) strains in laboratory and field conditions. Oxytetracycline, ethoquinolac and dichlorophen suppressed the growth of streptomycin-resistant Ecc strains *in vitro*. Fractional inhibitory concentration (FIC) indices of oxytetracycline and ethoquinolac mixed with streptomycin against the Ecc strains were equal to and less than one, respectively. Consequently the efficacy of those chemicals in mixture with streptomycin were non-antagonistic. But that of dichlorophen mixed with streptomycin was more than one, therefore the efficacy of the mixture was antagonistic. Spray of oxytetracycline, ethoquinolac and agrimycin-100 on the topped burley tobacco plants was efficacious in reducing tobacco hollow stalk at the same level of streptomycin treatment in three-year field trials, which suggests that those are promising chemicals to be alternative to streptomycin for control of tobacco hollow stalk.

**Key words** : Streptomycin-resistance, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, tobacco

---

\* 연락처자 : 440-600, 경기도 수원시 수원우체국 사서함 59호, 한국인삼연초연구원 수원시험장

\* Corresponding Author : Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Suwon Experiment Station, Suwon P.O.Box 59, Suwon, kyunggi-Do 440-600, Korea

담배의 병해를 감소시키기 위해서는 병원균과 담배 식물체의 생리 생태적 특성을 기초로한 물리 화학적 및 생물학적인 모든 방제수단을 종합하여 그 피해를 경제적 피해수준 이하로 유지 관리하는 것이 가장 합리적인 방법으로 알려지고 있다 (Linker, 1990). 따라서 약제 처리에 의한 방제법도 종합방제 체계의 일부로서 병해의 생리 생태적 특성에 따라 사용 약제의 선정 및 처리 방법이 고려되어야 할 것이다(Fry, 1977).

우리나라의 버어리종 담배산지에서 해마다 1-5% 정도 발생하여 1% 내외의 감수 피해를 주고 있는 담배줄기속썩음병 방제방법으로 그간 담배 적심부위에 streptomycin 처리가 추천되어 왔으며 일부 농가에서는 발병 최성기인 적심기 이후에 streptomycin을 담배의 경엽에 분무처리하여 왔다 (김 등, 1981; 강, 1988) 그러나 최근 버어리종 담배산지 발병조사 결과, 담배 줄기속썩음병 발생 및 피해정도가 감소되지 않고 있어서 약제처리에 의한 담배줄기속썩음병의 방제효과가 의심스러운 경우가 많았다(박 등, 1988; 손 등, 1989). 따라서 1988-1989년에 버어리종 산지를 대상으로 담배줄기속썩음병 이병주를 수집, 병원균을 분리하여 streptomycin에 대한 내성을 측정한 결과 검정 균주의 6.6-16.7%가 streptomycin내성균으로 조사되었으며 또한 streptomycin을 계속 처리했던 포장의 토양에서는 무처리 포장에 비해 3배나 많은 내성균이 검출되었다(손 등, 1989) 따라서 본 시험은 이러한 내성균에 의해 발생하는 병해의 효과적인 방제를 위해 streptomycin을 대체할 수 있는 약제를 선발하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

**공시균주 및 약제** : 1989년도 담배 산지에서 분리한 담배줄기속썩음병균 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Ecc)중 streptomycin 내성균인 Ec-126, Ec-258과 실험실에서 streptomycin 내성이 유도된 변이균 Ec-4R, Ec-94R과 감수성균인 Ec-4, Ec-94균주를 각각 대조균주로 사용하였다.

공시약제는 streptomycin과 oxytetracycline의 주사약을 시중 약국에서 구입하여 사용하였으며 agrimycin-100은 시판중인 농용항생제를 구입하여 사용하였다. Dichlorophen (a.i. 95%, Aldrich사 제품)과 기타 약제(Sigma사 제품)는 시약으로 구입하였으며 ethoquinolac은 농약회사 동방아그로(주)로부터 분양 받아 사용하였다. 공시약제의 담배포장 처리시에는 처리용액의 0.5%에 해당하는 Tween 20을 첨가하여 담배에 분무처리하였다.

**최소 발육저지 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 조사**: Penassay broth antibiotic medium 3 (Difco manual, 1984) 가 각각 3ml씩 들어있는 시험관 (1.5 x 1.5 cm)에 공시약제성분이 각각 1.5 $\mu$ g, 3.1 $\mu$ g, 6.3 $\mu$ g, 12.5 $\mu$ g, 25 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g/ml의 농도가 되도록 첨가하였다. 공시균주는 YDC agar 배지 (yeast extract dextrose calcium carbonate agar) 배지에서 28 $^{\circ}$ C로 24시간 배양하고 살균 증류수로 현탁시켜 약 10<sup>6</sup> cell/ml의 농도가 되도록 조정하였다. 준비된 공시균 현탁액을 50 $\mu$ l 씩 micropipette으로 공시약제 1.5~200 $\mu$ g/ml까지 각각 들어 있는 시험관에 접종하여 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양후 세균의 증식 여부를 확인하여 최소 발육저지 농도(MIC)를 조사하였다(尾迅,1972: 三橋,1980).

**부분 발육저지 농도 (fractional inhibitory concentration, FIC) 지수 조사** : Oxytetracycline, ethoquinolac 및 dichlorophen등의 약제를 streptomycin과 혼합한 액체 배양기에 상기 최소 발육저지 농도 조사에서와 같이 준비된 공시균 현탁액 50 $\mu$ l를 접종하고 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양후 MIC를 조사하였다. 조사된 최소 발육저지 농도치를 Chequer board method(三橋, 1980)에 의해 공식  $FIC\ index = a/a_0 + b/b_0$  ( $a_0$ : 약제 단독의 MIC, a: a약제와 b약제 혼합시 a 약제의 MIC,  $b_0$ : b약제 단독의 MIC, b: a약제와 b약제 혼합시 약제의 MIC)에 대입하여 부분 발육저지 농도 지수(FIC index)를 조사하였으며 FIC index가 1 이하이면 상승작

용, 1 이상이면 길항작용이 있는 것으로 판정 하였다.

**Streptomycin 대체 약제의 포장 선발 :** Oxytetracycline, ethoquinolac, dichlorophen 및 agrimycin-100 등을 공시약제로 streptomycin을 대조약제로 사용하였다. 버어리종담배(Burley 21)가 이식된 포장에서 공시약제 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 약액을 적심 직후 및 적심 2주후 2회에 걸쳐 각각 담배의 경엽에 분무처리하였으며 포장배치는 난괴법 3반복, 구당 공시담배는 72주였다. 약효 조사는 약제처리 3주 후에 발생된 이병주율을 조사하였다.

### 결과 및 고찰

**Streptomycin 감수성 및 내성 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 균의 약제에 대한 반응 :** Streptomycin 내성균 방제를 위한 streptomycin 대체약제 선발을 위하여 8종의 항생제와 5종의 살균제 등 13종의 약제에 대하여 1989년에 수집 분리한 streptomycin 내성균주 Ec-126, Ec-258과 실험실에서 저항성이 유도된 streptomycin 내성 변이균 Ec-4R 및 Ec-94R 균주와 감수성 균주 Ec-4 및 Ec-94 등에 대한 최소발육저지농도(MIC)를 조사한 결과 대체로 streptomycin에 내성을 보인 균주들에서 최소 발육저지 농도가 높게 나타났다. 그러나 streptomycin을 제외한 다른 공시약제들은 최소 발육저지 농도가 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하였으며 변이폭도 작았다. 따라서 이들을 streptomycin 대체 가능 약제로 선발하여 포장시험에 사용하였다(Table 1).

지금까지 streptomycin외에 Ecc에 의한 병해 방제로 사용되어온 약제로는 수송 및 저장중인 감자와 채소에 chlorine(Cooksey, 1990), 8-hydroxyquinoline(Harris, 1978), dichlorophen(Lund et al. 1979) 등이 있었다. 본 시험에서 streptomycin내성균에 대해서도 안정된 발육저지효과를 보인 oxytetracycline, dichlorophen 및 ethoquinolac 등은 포장 검정을 통하여 그 실용성을 검토하였다.

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of chemicals against streptomycin-sensitive and streptomycin-resistant strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Chemicals	MIC( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
	SS <sup>a</sup>	SR <sup>b</sup>
Streptomycin	25	100 - 500
Oxytetracycline	5	5 - 50
Penicillin G	5	5 - 100
Na-ampicillin	5 - 10	5 - 500
Na-epicillin	5 - 10	5 - 500
Chloramphenicol	10	10 - 500
Kanamycin sulfate	10 - 50	50 - 500
Colimycin	50	50 - 500
Gentamycin	50 - 500	50 - 500
Dichlorophen <sup>c</sup>	50	50
8-hydroxyquinoline	50 - 500	100 - 500
Sodium hypochlorite	500	500
Cupric hydroxide	1000	1000
Ethoquinolac <sup>d</sup>	5 >	5 >

<sup>a</sup> Streptomycin-sensitive strain: Ec-4, Ec-94

<sup>b</sup> Streptomycin-resistant strain: Ec-126, Ec-258, Ec-4R, Ec-94R

<sup>c</sup> 2,2'-methylene-bis(4-chlorophenol).

<sup>d</sup> 1-ethyl-1,4-dihydro-6,7-methylenedioxy-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid

**선발 약제들의 streptomycin과 혼용시 약효 변화:** Streptomycin에 내성인 Ecc균주들에 대하여 비교적 안정된 발육저지 효과를 보인 3종의 약제를 streptomycin과 혼용시 적합성 여부를 검토하고자 공시균주들에 대한 부분발육저지농도지수(fractional inhibitory concentration index, FIC index)를 조사한 결과 oxytetracycline과 혼용시 streptomycin 감수성균주들에서는 FIC index가 0.25로 약효의 상승작용을 보였으나 내성균주들에서는 FIC index가 1.00으로 병원균의 발육저지 효과에 영향이 없었다. Ethoquinolac과 streptomycin 혼용에서는 감수성균 및 내성균 모두에서 FIC index가 1.00로서 혼용시 약효에 영향이 없는 것으로 나타났다. 그

러나 dichlorophen의 경우는 FIC index가 2.00으로 streptomycin과 서로 약효의 길항작용을 보여 혼용하지 않는 것이 좋을 것으로 판단된다(Table 2).

일반적으로 단일약제의 지속적인 사용은 내성균의 출현으로 약효가 떨어지게 되어 더이상 사용할 수 없게 된다. Skylakakis(1983)는 살균제 사용시 약효가 서로 보완될 수 있는 다양한 혼합제의 사용은 병원균의 淘汰壓(selection pressure)에 영향을 주어 병원균의 약제에 대한 내성의 증가를 지연시킬 수 있다고 하였다. 특히 세균성 병원균에 있어서는 약제 내성인자가 병원균의 종간 또는 속간에도 이동되는 경우가 있어서 내성균 출현율이 빠르므로(Chatterjee et al. 1972) 작용기작이 다른 다양한 약제를 번갈아 사용하거나 혼합제를 사용함으

로써 하나의 약제에 대한 내성을 가진 병원균이 선발되더라도 작용기작이 다른 약제에 의해 사멸되도록 하여 병원균의 약제의 내성 출현에 관련된 유전자의 수를 늘리므로써 내성균의 출현빈도를 최소화하는 방법(Moller et al. 1981; Jones, 1982)이 모색되어야 할 것이다.

**담배줄기속썩음병 방제약제의 포장검정** : 실험실에서 streptomycin 내성균에 대하여서도 발육저지 효과를 보여 선발된 oxytetracycline을 비롯한 3종의 약제와 streptomycin과 혼합하여 사용시 약효의 상승효과를 보인 oxytetracycline과의 혼합제로서 시판되고 있는 agrimycin-100을 버어리종담배 포장에 처리하여 시험한 결과는 표 3에서와 같이 시험 수행년도의 기상여건에 따라 발병율의 차이가 크게 나타났으나 dichlorophen을 제외한 3종의 공시약제가 streptomycin과 같은 수준의 담배줄기속썩음병 방제효과를 나타내었다(Table 3).

Table 2. Fractional inhibitory concentration(FIC) index of chemicals applied with streptomycin against streptomycin-sensitive and streptomycin-resistant strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Chemicals	FIC index <sup>a</sup>	
	SS <sup>b</sup>	SR <sup>c</sup>
Oxytetracycline	0.25	1.00
Ethoquinolac	1.00	1.00
Dichlorophen	2.00	2.00

<sup>a</sup> Fractional inhibitory concentration index tested by Chequer board method :

$a/a_0 + b/b_0 = 1$ , antagonism;  $a/a_0 + b/b_0 < 1$ , synergism;

where  $a_0$  = Minimum inhibitory concentration of chemical A

$a$  = Minimum inhibitory concentration of chemical A mixed with streptomycin,

$b_0$  = Minimum inhibitory concentration of chemical B

$b$  = Minimum inhibitory concentration of chemical B mixed with streptomycin

<sup>b</sup> Streptomycin-sensitive strain: Ec-4, Ec-94

<sup>c</sup> Streptomycin-resistant strain: Ec-126, Ec-258, Ec-4R, Ec-94R

Table 3. Effect of chemical used for control of hollow stalk disease in burley tobacco fields\*

Chemicals **	Diseased plants(%)***		
	1989	1990	1991
Ethoquinolac	24.0 a	3.9 a	1.4 a
Oxytetracycline	25.0 a	5.9 a	0.9 a
Streptomycin	23.0 a	8.3 a	2.0 a
Agriymycin-100****	NT	NT	0.9 a
Dichlorophen	28.3 ab	5.8 a	NT
Control	36.2 b	20.5 b	8.2 b

\* The experiment was conducted with 72 burley tobacco plants per plot and with 3 replications.

\*\* 200 $\mu$ g a.i./ml chemical suspensions sprayed over tobacco plants at the time after topping and two weeks later.

\*\*\* Means followed by same letter within a column are not significantly different at P=0.05 according to Duncan's multiple range test, NT: not tested

\*\*\*\* 15% streptomycin sulfate + 1.5% oxytetracycline

Agrimycin-100의 경우는 실내실험 결과 FIC index가 streptomycin 감수성균에서는 0.25, streptomycin 내성균에서는 1.00이어서 선정된 약제로 포장처리 시험은 단 1회의 수행 결과이지만 구성성분 약제인 oxytetracycline과 streptomycin의 약효로 보아 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*의 streptomycin에 대한 내성을 억제하는 혼합제 또는 교호로 처리할 수 있는 약제로 판단된다.

지금까지 식물병원세균의 streptomycin 내성에 관해서는 많은 보고가 있었는데(Thomson et al. 1976: Schroth et al. 1978: Moller et al. 1981: Cooksey, 1990: Spott et al. 1995) 대체로 진균병에 비하여 약제처리 효과가 낮으며 내성이 빨리 생기는 것이 문제점으로 지적되어 왔다. 본 시험에서도 일반적으로 포장에서 약제처리 결과 담배줄기 속썩음병 방제율이 낮았으며 발병에 최적환경인 장마기에 발병이 많은 포장에서는 약제처리 효과를 거의 기대할 수 없는 경우가 산지 발병조사시에 많이 관찰된 바 있다. 그러므로 담배줄기속썩음병 방제를 위한 약제 처리는 담배 적심기 이후 발병 최성기인 강우가 집중되는 장마기 이전에 1-2회에 한하여 약제를 살포함으로써 담배 식물체 표면에 존재하는 병원균의 밀도를 감소시켜 발병율을 낮추는 것이 바람직하다(Schroth et al. 1978) 이상의 결과로 보아 oxytetracycline과 ethoquinolac은 streptomycin 내성균에 대한 효과가 높고 혼합시 약제간 약효의 길항작용이 없었으며 포장시험에서도 방제효과가 인정되므로 streptomycin 대체 또는 혼용약제로 사용된다면 streptomycin 내성균의 출현을 효과적으로 지연시킬 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 1970년대 초 미국 California, Oregon 및 Washington주 지역의 streptomycin내성 *Erwinia amylovora*의 방제를 위한 동제(銅劑; copper) 및 tetracycline으로 대체하여 방제효과를 얻었으나(Moller et al. 1981) 최근 조사에 의하면 이지역에서 다시 배나무 궤양병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*에서 동제와 oxytetracycline 및 streptomycin에 대한 내성균 검출이 보고되고 있어(Spotts and Cervantes, 1995) 약제처리

지역의 환경 및 미생물 생태계 전체를 대상으로 약제내성 억제를 위한 지속적인 연구와 노력이 있어야 할 것이다.

## 결 론

Streptomycin 내성 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(Ecc)를 방제하기 위한 약제를 실험실 및 포장에서 선발하였다. Streptomycin 내성 Ecc균주들에 대하여 높은 발육저지 효과를 보인 약제로 oxytetracycline, ethoquinolac 및 dichlorophen 등이 선발되었다. 약제 耐性菌 출현율을 낮추기 위한 混用時 部分發育沮止濃度指數(fractional inhibitory concentration index)를 조사한 결과 oxytetracycline과 ethoquinolac은 streptomycin과 藥效의 拮抗作用을 보이지 않았으나 dichlorophen은 길항작용을 보였다. 3년간 포장 시험결과 oxytetracycline, ethoquinolac 및 agrimycin-100 등은 streptomycin과 유사한 약효를 보여 streptomycin과 혼용 및 대체약제로 유망시 된다.

## 참 고 문 헌

1. Chatterjee, A. K. and M. P. Starr (1972) Transfer among *Erwinia* spp. and other Enterobacteria of antibiotic resistance carried on R factors. *J. Bacteriol.* 112:576-584.
2. Cooksey, D. A. (1990) Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28 : 201-219.
3. Difco Manual (1984) Dehydrated culture media and reagents for microbiology. p.78-86, Difco Lab., Detroit Michigan, U.S.A.
4. Fry, W. E. (1977) Management with chemicals in plant disease. An Advanced Treatise. Vol. 1. p.213-230, J. G. Horsfall, and E. B. Cowling Ed., Accademic Press, London, U.K.
5. Harris, R. I. (1978) A method for testing potential bactericides for the prevention of soft

- rotting of potato tubers. *Potato Res.* 21:231-233.
6. Jones, A. L. (1982) Phytopathogenic prokaryotes. Vol.2. p. 399-417, M. S. Mount and G. H. Lacy Ed. Academic Press, London, U.K.
  7. 강여규 (1988) 박사학위논문, 담배줄기속썩음병의 발생 생태 및 방제에 관한 연구. p. 81, 충남대학교, 대전.
  8. 김정화, 이영근, 박은경 (1981) 적심부위 항생제 처리에 의한 담배 공동병 2차감염 억제효과. *한국연초학회지* 3 :131-133.
  9. Linker, M. (1990) 1990 Burley Tobacco Information. p. 563-567, Agricultural Extension Service, NC Univ., U.S.A.
  10. Lund, B. M. and G. M. Wyatt (1979) A method of testing the effect of antibacterial compound on bacterial soft rot potatoes and result for preparation of dichlorophen and sodium hypochlorite. *Potato Res.* 22:191-202.
  11. 三橋 進 (1980) 藥劑感受性 測定法. p.68-136, 講談社, 東京, 日本.
  12. Moller, W. J., M. N. Schroth and S. V. Thomson (1981) The scenario of fire blight and streptomycin resistance. *Plant Disease* 65:563-567.
  13. 尾迅 望 (1972) Drug resistance. 蛋白質 核酸 酵素 編輯部編. 細菌 ファ-シ 遺傳學實驗法. p.119-121, 公立出版社, 東京, 日本.
  14. 박은경, 김정화, 손준수, 이영근, 오명희, 강여규 (1988) 공동병균의 항생제 내성에 관한 연구:연초 병해충 발생기작 및 방제 연구. 1988년도 담배연구보고서(경작분야 육종 및 환경편) p.208-213, 한국인삼연초연구소.
  15. Schroth, M. N., S. V. Thomson, W. J. Moler and W. O. Reil (1978) Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 69: 565-568.
  16. Skylakakis, G. (1983) Theory and strategy of chemical control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 21:117-135.
  17. 손준수, 김정화, 박은경, 이영근, 오명희, 강여규 (1989) 연초 병해충의 생리생태적 특성 구명 및 방제 연구. 1989년도 담배연구보고서 (경작분야 육종 및 환경편), p.143-218, 한국인삼연초연구소.
  18. Spotts, R. A. and L. A. Cervantes (1995) Copper, oxytetracycline and streptomycin resistance *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. *Plant Dis.* 79:1132-1135.
  19. Thomson, S. V., M. N. Schroth, W. J. Moler and W. O. Reil (1976) Efficacy of bacteriocides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flower by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 66:1456- 1459.