

Pseudomonas sp.를 이용한 콩 탄저병의 생물학적 방제

오정행* · 김규홍

단국대학교 생명자원과학대학

Biological Control of Soybean Anthracnose by Pseudomonas sp.

Jeung-Haing Oh* and Kyu-Hong Kim

College of Bio-resources Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received on July 28, 2003)

Pseudomonas sp. antagonistic to *Colletotrichum truncatum* and *C. gloeosporioides* was selected as a biological control agent for soybean anthracnose. *Pseudomonas* sp. inhibited the mycelial growth of pathogens effectively as the fungicides such as benomyl and fluazinam *in vitro* tests without any adverse effects on soybean. Seed treatment with the *Pseudomonas* sp. increased emergence rate of soybean seeds significantly after inoculation with *C. truncatum*. When the suspension of *Pseudomonas* sp. was sprayed on soybean plants, the control efficacy was not different from that of fungicides, benomyl and fluazinam two weeks after treatment, however the efficacy did not last long enough after three weeks.

Keywords : Biological control, *Colletotrichum truncatum*, *Pseudomonas* sp.

콩 탄저병은 온난 다습지역에서 피해가 크며 우리나라에서도 중요 병해 중의 하나로 되어 있다. 콩 탄저병에 의한 수량감소는 품종에 따라 16~26%에 이르며(Backman, 1982), 병원균은 *Colletotrichum truncatum*을 비롯하여 5종의 *Colletotrichum* spp.가 보고되어 있고, 이들 중 *C. truncatum*의 발생빈도가 높고 그 피해도 가장 큰 것으로 알려져 있다(Sinclair and Backman, 1989). 병든 식물의 잔재는 중요한 제1차 전염원이 되며, 생육초기에 식물체를 침입하여 감염상태로 있다가 여름 강우기에 잎, 줄기에 발생하고, 어린 꼬투리에 감염되어 병든 종자를 만들며 출현율 감소 및 유묘 잘록병의 원인이 되고 있다(Athow, 1987). 콩 탄저병은 기주 품종에 따라 감수성 차이는 있으나 아직 저항성 품종이 보고된 바는 없으며(Manandhar 등, 1988) 방제는 주로 살균제에 의존하고 있어(Oh and Kang, 2002) 잔류독성 및 환경오염이 우려되고 있다. 이와 관련하여 생물학적 방제는 친환경농업에 잘 부합되는 방제법일 뿐 아니라, 화학적 방제가 경제적이지 못한 식

물병의 대체 방제법으로 주목을 받고 있다(Cook, 1993; Mathre 등, 1999). 따라서, 본 연구에서는 *C. truncatum* 및 *C. gloeosporioides*에 대한 길항 미생물을 선발하여 콩 탄저병의 생물학적 방제 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

병원균 및 길항균의 분리, 동정. 실험에 사용된 콩 탄저병균 *C. truncatum*과 *C. gloeosporioides*는 콩 종자에서 분리하였다. 병든 종자를 NaOCl 1%용액에 1분간 침지하여 표면소독하고, 살균수로 세척하여 PDA배지에 치상한 후 발생한 병원균을 분리하여 Sinclair and Backman(1989)이 보고한 균학적 특성과 비교하여 동정하였다. 길항미생물은 콩 꼬투리, 종자 및 식물체에서 50개의 다양한 균주를 분리, *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*와 PDA배지에서 각각 대칭배양 하여 길항력이 가장 높은 균주를 선발하고, 선발된 길항세균은 배양적, 생리적 특성을 비교하여 동정하였다(Holt 등, 1994). 길항미생물의 분리는 공시재료에 살균수를 첨가하고 30분간 잘 혼든 다음, 10 ml을 취하여 90 ml 살균수에 희석하고 이것을 연속희석법으로 10^{-5} 까지 희석하였다. 각 희석액 0.5 ml을 분리용 배지에

*Corresponding author
Phone)+82-41-550-3625, Fax)+82-41-553-1618
E-mail)jhoh@dankook.ac.kr

분주, 도말접종하여 3~5일 후에 형성된 단일 균총을 분리용 배지에서 배양하였다. 길항세균 분리용 배지는 Nutrient agar(pepton 3 g, beef extract 5 g, agar 20 g, 중류수 1 l)를, 진균 분리용 배지는 Peptone dextrose rose-bengal agar ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, dextrose 10 g, rose-bengal 1%용액 3.3 ml, agar 20 g, 중류수 1 l, streptomycin 30 mg)을 사용하였다.

길항력 및 병원성 검정. 동정된 길항세균 *Pseudomonas* sp.의 콩 탄저병균에 대한 길항력을 검정하기 위하여 benomyl, fluazinam 1000배액과 *Pseudomonas* sp. 현탁액 (10^5 cfu/ml)에 침지한 직경 5 mm의 paper disk를 콩 탄저병균의 포자현탁액을 도말 접종한 PDA배지 위에 올려놓고, 25°C 항온기에서 5일간 배양한 후 paper disk를 중심으로 형성된 균 생장 저지원의 크기를 측정하였다. 길항세균의 기주에 대한 종자 감염성을 검정하고자 대원콩, 태광콩, 진품콩의 종자 50립을 선별하여 1% NaOCl에 3분간 침지, 살균수로 세척한 후 *Pseudomonas* sp. (10^5 cfu/ml), *C. truncatum* 및 *C. gloeosporioides* (10^5 conidia/ml)의 포자현탁액을 각각 분무 접종하고, 모래상에 파종하여 10일 후에 출현율을 조사하였다. *Pseudomonas* sp.의 경엽에 대한 병원성 검정을 위하여 모래흙을 담은 2 l 와그너 풋트에 콩을 재배하여, V₃기에(Fehr 등, 1971) 초생단엽, 제1 본엽, 제2 본엽에 편침접종 하였다. 편침접종은 편침기(OPEN INDUSTRY Co. Ltd.)를 사용하여 잎의 중앙 엽맥을 피해 조직이 상하지 않도록 직경 3 mm의 가벼운 상처를 만들고, 포자 현탁액을 1 ml 주사기로 한 방울씩 (12.5 μ l) 떨어뜨려 접종하였다. 접종된 식물체는 25°C의 접종상에서 3일간 암흑상태로 유지한 후 28°C의 생육상으로 옮겨 2주 후에 병반의 크기를 측정하였다.

***Pseudomonas* sp.의 병방제 효과.** 콩 종자 처리에 의한 *Pseudomonas* sp.의 탄저병 방제효과를 검정하기 위하여 대원콩 50립을 1% NaOCl 용액에 3분간 침지, 살균수로 세척한 후 *C. truncatum*의 포자현탁액 (10^3 conidia/ml)을 종자 표면에 분무접종, 1시간 후에 *Pseudomonas* sp. 현탁액 (10^5 cfu/ml), benomyl(1,000배액), fluazinam(1,000배액)을 각각 살포하였다. 이 처리 종자를 모래흙이 담긴 와그너 풋트에 파종하고, V₃기까지 생육시켜 출현율, 유묘 발병율, 초장, 엽면적, 식물체의 생체중을 조사하였다. *Pseudomonas* sp.의 병방제효과와 예방효과를 검정하기 위하여 대원콩 종자를 밭흙을 담은 와그너 풋트에 파종하고, 출현 후 속아 풋트 당 3개체씩 재배하였다. 식물체가 V₃기에 이르렀을 때 접종 + 무처리, 접종 + benomyl 처리, 접종 + fluazinam 처리 그리고, 접종 + *Pseudomonas* sp. 처리의 4처리를 하였다. 병원균의 접종은 초생단엽,

제1 본엽, 제2 본엽에 위의 방법으로 편침접종 하였고, 방제효과 실험은 병원균 접종 직후 살균제와 *Pseudomonas* sp.를 분무하고, 예방효과 실험은 살균제와 *Pseudomonas* sp.를 먼저 분무하고, 24시간 후에 병원균을 접종하였다. 처리 식물체는 25°C 접종상에서 3일간 유지한 후 28°C 생장상에 옮겨 7일 간격으로 형성된 병반의 크기를 조사하였으며, 분생자층 수는 접종 3주 후에 병반 부위를 중심으로 2 cm²씩 잘라 40배율 현미경하에서 5회 반복 조사하였다.

결과 및 고찰

***Pseudomonas* sp.의 길항력.** 선발한 길항세균은 세균학적 성질에 따라 *Pseudomonas* sp.로 동정하였다. 이 길항세균 *Pseudomonas* sp.의 콩 탄저병균에 대한 길항력을 살균제 benomyl과 fluazinam의 균사생장 억제효과와 비교한 결과는 Table 1과 같다. PDA에서 *Pseudomonas* sp.에 의한 균사생장 저지원의 크기는 2.7 cm로서 benomyl, fluazinam에 의한 저지원의 크기와 비슷하였고, *C. truncatum*과 *C. gloeosporioides*에 대한 억제효과 차이는 없었다.

***Pseudomonas* sp.의 병원성.** 길항세균 *Pseudomonas* sp.를 종자접종하여 콩 종자에 대한 병원성을 검정한 결과(Table 2) 포자농도 10^5 cfu/ml 접종에 의한 콩의 출현율 감소는 3.4%로 극히 낮았으며, 콩 품종간에도 차이가 없어 콩 종자에 대한 병원성은 거의 없는 것으로 보였다. *Pseudomonas* sp.와 콩 탄저병균을 편침접종하여 콩 잎에서의 병원성을 검정한 결과(Table 3) *Pseudomonas* sp.에 의한 병반의 진전이 엽위에 관계없이 나타나지 않아 잎에서의 병원성도 없는 것으로 보였다. 길항세균 *Pseudomonas* sp.는 콩 종자와 잎에 대한 병원성이 거의 없어 콩 세균성점무늬병을 일으키는 *P. glycines*(Sinclair and Backman, 1989)와는 다른 종으로 보였고, 따라서, 콩 탄저병의 생물학적 방제를 위한 이 길항세균의 이용 가능성을 검정하였다.

***Pseudomonas* sp.의 병방제효과.** 길항세균 *Pseudomonas*

Table 1. Antagonistic effects of the *Pseudomonas* sp. to the pathogens causing soybean anthracnose on PDA medium

Treatment	Inhibition zone (diameter, cm)		
	<i>C. truncatum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Mean
Benomyl	2.5	2.4	2.45
Fluazinam	2.5	2.5	2.50
<i>Pseudomonas</i> sp.	2.7	2.9	2.80
F-value	1.0 ^{ns a}	1.25 ^{ns}	

^ans indicates nonsignificant difference at 5% level.

Table 2. Pathogenicity of the *Pseudomonas* sp. and pathogens causing soybean anthracnose on soybean seeds

Treatment	Inoculum concentration	Emergence rate (%)			
		cv. Daewonkong	Taegwangkong	Jinpumkong	Mean ^a
No inoculation	-	91	90	85	89 (-)a ^b
<i>Pseudomonas</i> sp.	10 ⁵ cfu/ml	90	88	81	86 (3.4)a
<i>C. truncatum</i>	10 ⁵ conidia/ml	8	9	10	9 (89.9)b
<i>C. gloeosporioides</i>	10 ⁵ conidia/ml	14	13	15	14 (84.3)b
F-value	-	-	-	-	59.24**
LSD .05	-	-	-	-	8.03

^aValues in the parenthesis are reduction percent of emergence after inoculation.^bMeans followed by the same letters are not different significantly at 5% level by DMRT.

**indicates significant difference at 1% level.

Table 3. Pathogenicity of the *Pseudomonas* sp. and pathogens causing soybean anthracnose on soybean leaves after punch inoculation of intact plants

Isolate	Lesion size (mm) on the leaves ^a				Mean
	Primary	1st trifoliolate	2nd trifoliolate		
<i>Pseudomonas</i> sp.	4 b ^b	3 b	3 b		3.3 b
<i>C. truncatum</i>	7 a	6 a	6 a		6.3 a
<i>C. gloeosporioides</i>	5 b	4 b	4 b		4.3 b
F-value	12.59**	75.87**	50.56**		38.29**

^aLesion size produced by the isolates on the soybean leaves was measured 2 weeks after inoculation. Diameter of punched area was 3 mm.^bMeans followed by the same letters are not different significantly at 5% level by DMRT.

**indicates significant difference at 1% level.

Table 4. Control effect of the *Pseudomonas* sp. to *Colletotrichum truncatum* causing soybean anthracnose with seed treatments

Treatment	Emergence rate (%)	Seedling infection (%)	Plant height (cm)	Leaf area of primary leaf (dia., cm/leaf)	Fresh wt. of seedling (g/plant)
Inoculation ^a	13.3(-) ^b	100.0(-)	6.7	1.5	2.2
Benomyl	80.0(76.9)	25.7(74.3)	8.5	2.9	14.3
Fluazinam	83.3(80.7)	27.8(72.2)	8.7	2.5	12.3
<i>Pseudomonas</i> sp.	80.0(76.9)	51.9(48.1)	6.9	2.5	15.3
F-value	0.2 ^{ns c}	60.6**	0.5 ^{ns}	1.4 ^{ns}	12.6**
LSD .05	31.4	18.0	4.4	1.3	5.4

^aSeeds were inoculated with 10³ conidia/ml of *C. truncatum* and subsequently treated with 10⁵ cfu/ml of the *Pseudomonas* sp. and recommended concentrations of the fungicides, respectively.^bValues in the parenthesis are control values.^cns, **, indicate nonsignificant and significant difference at 1% level, respectively.

sp.를 종자처리 하여 *C. truncatum*의 방제효과를 검정한 결과 benomyl, fluazinam과 비슷한 방제효과를 보였다(Table 4). *C. truncatum*의 종자감염에 의한 출현을 감소의 방제가는 *Pseudomonas* sp. 처리구가 76.9%로 benomyl과 fluazinam 처리구의 76.9% 및 80.7%와 비슷하였다. 그러나, 유묘감염에 대한 *Pseudomonas* sp.의 방제가는 48.1%로서 benomyl의 74.3%, fluazinam의 72.2% 보다 낮았다. 유묘의 신장 및 엽면적은 차이가 없었으나 식물체의 생

체중은 무처리에 비해 현저히 증가하였고 benomyl, fluazinam과 비슷한 효과를 보였다. 경엽처리에 의한 *Pseudomonas* sp.의 *C. truncatum* 방제효과를 benomyl, fluazinam과 비교한 결과는 Table 5와 같다. 처리 3주 후에 조사한 *Pseudomonas* sp.의 방제가는 34.5%로서 공시 실균제의 방제가 39.1%와 큰 차이 없이 높았으며, 병반에 형성된 분생자충 수에서도 차이가 없었다. *Pseudomonas* sp.의 병진전 억제효과는 처리 직후에는 낮았으나 처리 2

Table 5. Control effects of the *Pseudomonas* sp. against soybean anthracnose by *Colletotrichum truncatum* after plant application

Treatment ^a	Lesion size (mm)			No. of acervulus
	1 week	2 week	3 week	
Control	4.3 a ^b	7.3 a	8.7(-) ^c a	20.63 a
Benomyl	4.0 a	4.3 b	5.3(39.1) b	16.93 b
Fluazinam	4.0 a	4.3 b	5.3(39.1) b	16.96 b
<i>Pseudomonas</i> sp.	4.3 a	4.3 b	5.7(34.5) b	16.90 b
F-value	17.94 ^{ns}	81.82**	48.33**	60.94**

^a Each was treated subsequent to punch inoculation of *C. truncatum*, and lesion size on the leaves was measured 1-3 weeks after inoculation.

^b Means followed by the same letters are not different significantly at the 5% level by DMRT.

^c Values in the parenthesis are control values.

** indicates significant difference at 1% level.

Table 6. Protective effects of the *Pseudomonas* sp. against soybean anthracnose by *Colletotrichum truncatum* after plant application

Treatment ^a	Lesion size (mm)			No. of acervulus
	1 week	2 week	3 week	
Control	6.2 a ^b	8.1(-) ^c a	9.2(-) a	22.25 a
Benomyl	3.1 c	4.2(48.1) cd	5.1(44.6) c	13.21 b
Fluazinam	4.2 b	5.2(35.8) b	7.1(22.8) bc	15.32 b
<i>Pseudomonas</i> sp.	4.2 bc	5.1(37.0) bc	8.2(10.9) ab	15.80 b
F-value	50.96**	45.20**	54.70**	115.90**

^a Each was treated a day prior to punch inoculation of *C. truncatum*, and lesion size on the leaves was measured by 1-3 weeks.

^b Means followed by the same letters are not different significantly at the 5% level by DMRT.

^c Values in the parenthesis are control values.

** indicates significant difference at 1% level.

주 후에는 공시 살균제와 같았으며, 처리 후 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다. 경엽처리에 의한 *Pseudomonas* sp.의 *C. truncatum* 예방효과는 처리 2주 후 37.0%로서 benomyl의 48.1%, fluazinam의 35.8%와 큰 차이 없이 높았으며, 병반에 형성된 분생자총 수에서도 차이가 없었다(Table 6). 그러나, 처리 3주 후의 방제가는 *Pseudomonas* sp.가 10.9%로 benomyl의 44.6%, fluazinam의 22.8%에 비해 현저히 감소하여 잔효성은 공시 살균제에 비해 낮은 것으로 보였다. 이러한 현상은 길항미생물을 이용한 생물학적 방제에서 나타나는 일반적 현상과 유사한 것이며(Hong 등, 1991; 양 등, 2002) 이를 보완하기 위해 2종류 이상의 길항미생물을 혼용하거나(De Boer 등, 2003) 반복처리 하는 방법이 이용되기도 한다(Steddom 등, 2002). 생물학적 방제에 이용되는 길항미생물은 다양하나, 그 중 *Pseudomonas* spp.의 이용 연구가 활발하며(Park 등, 1993; 문 등, 2002; De Boer, 2003), 그 작용기작은 siderophore에 의한 철분 및 각종 양분의 경쟁(Raaijmakers 등, 1995), 유도 저항성(Van Loon, 1998), 그리고 항생물질의 작용(Park 등, 1993) 등으로 알려져 있다. 본 연구에서 *Pseudomonas* sp.의 항균성 기작은 구명

하지 못했으나, *Pseudomonas cepacia*의 항균물질은 *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* 등에 대한 활성을 높고 *Colletotrichum*에 대한 활성을 낮은 것으로 알려져 있어(Park 등, 1993) 본 연구결과와 차이를 보였다. 종합적으로, 선발한 길항세균 *Pseudomonas* sp.가 살균제 benomyl과 fluazinam 만큼 잔효성을 크지 못하지만, *C. truncatum*에 대한 방제효과는 비슷하므로, 앞으로 항균성 작용기작을 구명하고, 처리 후 활성 유지를 위한 제제화 연구 등이 심도 있게 이루어 진다면 콩 탄저병의 생물학적 방제제로 이용 가능할 것으로 보였다.

요약

콩 탄저병의 생물학적 방제를 위하여 병원균 *Colletotrichum truncatum*과 *C. gloeosporioides*에 대한 길항세균 *Pseudomonas* sp.를 분리 동정하였다. *Pseudomonas* sp.의 균사생장 억제효과는 탄저병 살균제 benomyl, fluazinam과 비슷하였으며, 콩에 대한 병원성은 거의 없었다. *Pseudomonas* sp.의 종자처리는 *C. truncatum*을 접종한 콩 종자의 출현율을 현저히 증가시켰고, 경엽처리한 경우 잔효성은 낮았지

만 처리 2주 후의 방제효과는 benomyl, fluazinam과 비슷하게 높았다.

감사의 말씀

이 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었습니다.

참고문헌

- Athow, K. L. 1987. Fungal diseases. In: *Soybeans; improvement, production, and uses*. ed. by Wilcox, 712 pp. Madison, Wisconsin, USA.
- Backman, P. A., Williams, J. C. and Crawford, M. A. 1982. Yield losses in soybeans from anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum*. *Plant Dis.* 66: 1032-1034.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganism for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 53-80.
- De Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjes, J. J. B., van der Sluis, L., van Loon, L. C. and Bakker, P. A. H. M. 2003. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93: 626-632.
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T. and Pennington, J. S. 1971. Stage of development descriptions of soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. (Abstr.) *Crop Sci.* 11: 929-931.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th. ed. Williams & Wilkins, Baltimore. 787 pp.
- Hong, S. S., Nam, K. W. and Kim, C. H. 1991. Performance of antagonist's peat formulation to *Phytophthora* blight of red pepper in field. *Korean J. Plant Pathol.* 7(3): 147-152.
- Manandhar, J. B., Hartman, G. L. and Sinclair, J. B. 1988. Soybean germ plasm evaluation for resistance to *Colletotrichum truncatum*. *Plant Dis.* 72: 56-59.
- Mathre, D. E., Cook, R. J. and Callan, N. W. 1999. From discovery to use: Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Dis.* 83: 972-983.
- 문병주, 김철승, 송주희, 김현주, 이재필, 박현철, 신동범. 2002. 들깨 갓빛곰팡이병의 생물학적 방제 II. 미생물 농약의 제조 및 그 방제효과. *식물병연구* 8(3): 184-188.
- Oh, J. H. and Kang, N. W. 2002. Efficacy of fluazinam and iprodione + propineb in the suppression of *Diaporthe phaseolorum*, *Colletotrichum truncatum* and *Cercospora kikuchii*, the causal agents of seed decay in soybean. *Plant Pathol. J.* 18(4): 216-220.
- Park, K. S., Hagiwara, H. and Kim, C. H. 1993. Isolation of an antibiotic substance from *Pseudomonas cepacia* antagonistic to *Phytophthora capsici*. *Korean J. Plant Pathol.* 9(1): 1-6.
- Raaijmakers, J. M., Leeman, M., Van Oorschot, M. M. P., Van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P. A. H. M. 1995. Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85: 1075-1081.
- Sinclair, J. B. and Backman, P. A. 1989. Compendium of soybean diseases(3rd. ed.). APS press. St. Paul, Minnesota. 106 pp.
- Steddom, K., Menge, J. A., Crowley, D. and Borneman, J. 2002. Effect of repetitive applications of the biological bacterium *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal on citrus soil microbial communities. *Phytopathology* 92: 857-862.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieters, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- 양현숙, 손황배, 정영륜. 2002. *Bacillus stearothermophilus* YC4194에 의한 *Pythium* 모잘록 병의 생물학적 방제. *식물병연구* 8(4): 234-238.