

***Pseudomonas putida* P84 균주를 이용한 토마토 풋마름병의 억제**서상태* · 박종한¹ · 김경희 · 이상현 · 오은성 · 신상철국립산림과학원, ¹원예연구소**Suppression of Bacterial Wilt in Tomato Plant Using *Pseudomonas putida* P84**Sang-Tae Seo*, Jong-Han Park¹, Kyung-Hee Kim, Sang-Hyun Lee, Eunsung Oh and Sang-Chul Shin

Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

¹National Horticultural Research Institute, Suwon 441-440, Korea

(Received on January 31, 2008)

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* has become a severe problem on tomato in Korea and no effective control measures are available yet. *Pseudomonas* species play key roles for the biocontrol of many plant diseases especially in soil. A rhizobacterial population of 150 *Pseudomonas* strains, isolated from the rhizosphere soil of various plants grown at different sites, was screened for 2,4-diacetylphloroglucinol producing gene (*phlD*) by PCR. Two strains (P83 and P84) among them were found to be *phlD* positive. When the isolates were analysed by 16S rDNA (*Sensu Stricto*), all isolates yielded amplified products of 1,018 bp. Of the 150 isolates of *Pseudomonas* spp., a bacterial strain *P. putida* P84 isolated from tomato rhizosphere showed to suppress a wide range of phytopathogenic bacteria *in vitro*. The best source of carbon for P84 strain were glucose, arabinose, inositol and melibiose. In greenhouse experiments, P84 strain suppressed the development of bacterial wilt in tomato with a control value of 60%.

Keywords : Bacterial wilt, Biocontrol, *Ralstonia solanacearum*, Tomato

Ralstonia solanacearum(Yabuuchi 등, 1995)은 그람음성의 호기성 세균으로, 이 세균에 의한 풋마름병(bacterial wilt)은 전세계적으로 발생하며, 토마토, 고추, 감자 등 50과 200종 이상의 작물에 심각한 문제를 주는 병으로 알려져 있다(Hayward, 1991). 풋마름병균은 주로 뿌리의 상처를 통해 침입하며, 토양중에서 수년간 생존이 가능하다. 풋마름병균은 유전적, 생리화학적으로 매우 다양하여, 5개의 race(He 등, 1983), 5개의 biovar(Hayward, 1991) 그리고, 2개의 RFLP cluster(Cook 등, 1989)로 구분된다.

풋마름병의 방제에는 저항성 품종 육종, 토양소독, 윤작, 항생물질 등이 이용되고 있지만, 아직 효과적인 방제 방법을 찾지 못하고 있다(Ciampi-Panno 등, 1989). 저항성 품종 육종이 가장 이상적인 방법이지만 풋마름병균의 높은 다양성 때문에 품종 개발에 어려움을 겪고 있다. 또한, 토양소독이나 항생물질의 사용은 환경오염과 저항성 균을 유발하는 등의 문제점이 있어 이들 방제방법을 대

체할 수단으로 생물적 방제가 시도되고 있다. 현재 생물적 방제에 이용되는 가장 일반적인 세균은 형광성 *Pseudomonas*속 세균으로, 이 세균은 다양한 대사작용(항생물질 및 세포벽 분해효소 생산, induced systemic resistance 등)을 통해 식물병원균의 성장을 저해하는 것으로 알려져 있다(Winding 등, 2004). 특히, 2,4-diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, pyrrolnitrin, phenazine-1-carboxylic acid 등 많은 항생물질들이 *Pseudomonas*속 세균으로부터 생산되어 이를 생물적 방제에 이용하고 있다(Raaijmakers 등, 1997). 최근에는 *Pseudomonas*속 세균이 외에도 많은 종류의 미생물을 생물적 방제제로 이용하고자 하는 연구가 증가하고 있는 실정이다(Elabyad 등, 1993; Guo 등, 2004; Moss 등, 2007; Ran 등, 2005).

본 연구에서는 토마토 풋마름병의 생물적 방제를 위하여 여러 지역과 작물의 근권토양으로부터 형광성 *Pseudomonas* 세균을 분리하여, 실내 항균력 실험과 대량배양을 위한 탄소원 탐색 및 포트실험 결과를 보고한다.

*Corresponding author

Phone) +82-2-961-2667, Fax) +82-2-961-2679

E-mail) stseo@forest.go.kr

재료 및 방법

형광성 *Pseudomonas* 세균 분리. 고추, 토마토, 포도 등 15작물의 근권토양을 채집하여, 토양 10 g을 100 ml 멸균수가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 넣고 1시간 동안 진탕배양한 후 King's B 배지(Difco)에 100 μ l를 분주하여 평판희석법으로 배양하였다. 28°C에서 2일간 배양 후 UV를 조사하여 형광을 발현하는 단일 균총을 순수 분리 하였다. 분리된 균들은 동결 보존용 배지(10% skimmed milk, 1.5% sodium glutamate)에 현탁하여 -30°C에 보관하면서 시험에 이용하였다.

유전적 특성조사. 균주는 이번 실험에서 분리한 67균주와 냉동 보관중인 83 균주(서 등, 2006)를 이용하였다. 총 150균주의 DNA는 InstaGene matrix(Bio-Rad)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 분리하였고, -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 분리된 형광성 세균의 속 동정을 위해 Widmer 등(1998)이 보고한 *Pseudomonas* 속 특이적 primer(Ps-for, Ps-rev)를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 2.5U *Taq* polymerase(Takara, Japan), 100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 각각의 dNTP 0.2 mM, primer 50 pmol 반응액에 2 μ l의 분리된 DNA를 첨가한 후 멸균수로 최종 반응용액의 부피를 25 μ l로 조절하였다. 각 PCR 증폭산물 5 μ l를 1.2% agarose gel에 전기영동 후 EtBr로 염색하여 증폭산물의 유무를 조사하였다. 또한, Raaijmakers 등(1997)이 보고한 primer (Phl2a, Phl2b)를 이용해 항생물질인 2,4-diacetylphloroglucinol 생산 관련 유전자(*phlD*)의 유무를 조사하였다.

항균력 검정. 분리된 형광성 세균을 이용하여 식물 병원성 세균 10균주(Table 1)에 대한 실내 항균력 검정을

실시하였다. 분리된 형광성 세균과 식물 병원성 세균과의 항균력은 KB배지를 이용하였다. 각각의 식물 병원성 세균 현탁액 100 μ l(2×10^8 cfu/ml)를 50°C 정도로 식힌 KB 배지에 혼합한 후 petri-dish에 분주하였다. 클린벤치에서 충분히 응고시킨 후 신선하게 배양된 형광성 세균을 이쑤시개로 배지위에 접종하였다. 28°C 배양기에서 2일간 배양한 후 형성된 저지원의 길이를 측정하여 항균력을 검정하였다.

탄소원별 P84균주의 성장효과. 항균력 검정결과 가장 우수한 효과를 나타낸 P84 균주의 최적 배양조건을 탐색하기 위한 일환으로 탄소원별 성장효과를 조사하였다. 기초배지(1.25% K₂HPO₄, 0.38% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄, 0.5% Yeast extract)에 13개의 탄소원을 각각 1% 농도로 맞추고 28°C에서 2일간 진탕배양 후 흡광도를 조사하여 농도를 측정하였다.

포트실험. 포트실험에는 P84 균주를 이용하였으며, 이 균은 지방산 분석, 유전적 분석 등을 통해 *P. putida*로 동정되었다(서 등, 2006). 토마토 종자를 바로커 상토를 채운 포트에 파종하여 유리온실에서 재배하였다. 파종 3주 후 KB배지에서 새롭게 배양한 P84 균주를 멸균수에 10⁸ cfu/ml 농도로 현탁액을 제조하여 10 ml씩 포트에 분주하였다. P84 균주 이외에도 친환경 방제제를 탐색하기 위해 키토산(0.5%)과 엑스텐(동부한농)($\times 2,000$)에 대한 방제효과도 함께 실시하였다. 24시간 후 가위를 이용하여 토마토 뿌리에 상처를 낸 후 tetrazolium chloride(TTC)배지에서 새롭게 배양한 풋마름병균(*Rs12*)을 멸균수에 10⁷ cfu/ml 농도로 현탁액을 제조하여 5 ml씩 관주 접종하였고, 대조구에는 P84 균주 처리 없이 풋마름병균을 접종하였다. 각 처리는 30포트씩 3반복 실험하였다.

Table 1. Antibiotic spectra of the substance produced by *Pseudomonas putida* P84

Species	Activity index on KB
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> Avc1	++ ^a
<i>Burkholderia cepacia</i> KACC 10337	++
<i>B. cepacia</i> KACC 10190	++
<i>B. cepacia</i> KACC 10167	+
<i>Clavibacter michiganensis</i> cml	++
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> Ecc1	++
<i>Ralstonia solanacearum</i> Rs12	++
<i>Rhizobium radiobacter</i> KACC 10298	++
<i>R. rhizogenes</i> KACC 11125	+
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Xcv1	++

^aDiameter of inhibition zone: +, smaller than 20 mm; ++, larger than 20 mm.

결과 및 고찰

토양 근권 미생물은 생물적 방제나 식물 성장 촉진 등에 이용되는 중요한 미생물 그룹이다(Gamalero 등, 2003). 이번 연구에서는 국내 여러 지역의 토마토, 고추, 포도 등 15개 작물 재배지의 근권 토양으로부터 KB 배지상에서 형광을 발현하는 균주들을 순수 분리하였고, 이 균주들을 토마토 풋마름병의 생물적 방제제 개발을 위한 기초 연구에 이용하였다. 분리균의 속동정을 위하여 실시한 *Pseudomonas*속 특이적 PCR 결과 모든 분리균에서 1,018 bp의 증폭산물이 검출되어(Fig. 1A), UV 조사시 형광을 발현하는 특성과 PCR 결과를 종합하여 이들 분리균 모두 *Pseudomonas* 속으로 동정하였다.

모든 분리균을 이용하여 풋마름병균을 포함한 10개의

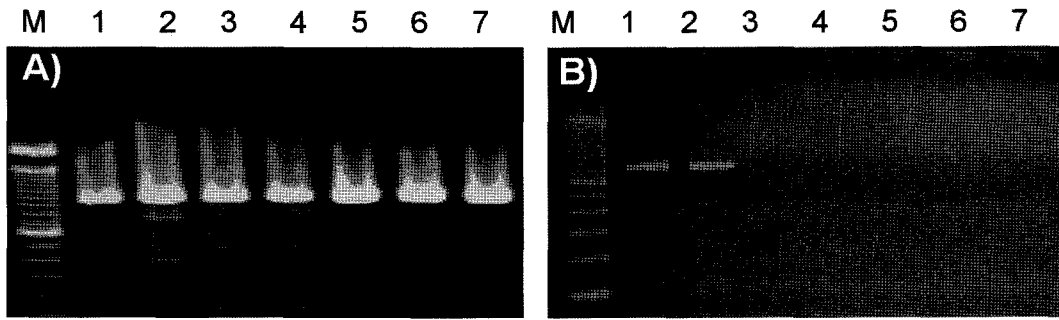


Fig. 1. A) 16S rDNA (Sensu Stricto) and B) *phlD* gene PCR amplification assay of fluorescent *Pseudomonas* isolates. Lanes: 1, P83; 2, P84; 3, P1; 4, P17; 5, P44; 6, P67; 7, P99. M, DNA size standard (100 bp ladder).

식물 병원성 세균에 대한 실내 항균효과를 검정한 결과 5개 균주(P66, P83, P86, P105, P106)가 10~20 mm 사이의 저지원을 형성하였고, 1개 균주(P84)가 대부분의 병원성 세균에 대해 20 mm 이상의 저지원을 형성하였다(Table 1). *Pseudomonas*속 세균을 이용한 생물적 방제에 관한 연구는 많이 보고되어 있으며, 특히 항생물질 생산이 항균력과 밀접한 관련이 있는데(De La Fuente 등, 2004), 그중 2,4-diacetylphloroglucinol이 가장 밀접하게 관련되어 있다(Picard 등, 2000). 2,4-diacetylphloroglucinol의 생산에는 6개의 cluster 유전자가 보고되어 있는데, 그중 *phlD* 유전자가 모든 2,4-diacetylphloroglucinol 생산균주에 안정적으로 존재하는 유전자로 알려져 있다(Raaijmakers 등, 1997). 이번 실험에 이용된 분리균에 대한 *phlD* 유전자의 검색을 위한 PCR 실험 결과 2개의 균주(P83, P84)에서만 750 bp의 유전자가 증폭되었는데(Fig. 1B), 이 2균주는 모두 실내 항균효과에서 항균력을 나타낸 균주들이었다. 이 결과로 2,4-diacetylphloroglucinol과 식물 병원 세균에 대한 항균력 사이에는 상호관계가 높은 것으로 나타났다.

선발된 유용 미생물을 산업화하기 위해서는 대량배양이 필수적 조건일 것이다. 이번 실내 항균력 실험결과 가장 우수한 방제효과를 나타낸 P84 균주의 탄소원별 생장효과를 검정한 결과 glucose를 첨가한 배지에서 생장이 가장 우수하였으며, 다음으로 arabinose, inositol, melibiose를 첨가한 곳에서 생장이 좋게 나타났으며, 나머지 9개의 탄수화물 처리 배지에서는 생장이 미미하였다(Fig. 2).

토마토 풋마름병 포트실험에는 P84 균주이외에 풋마름병의 친환경 방제제로 이용 가능성을 조사하기 위하여 키토산과 상품화된 생물적 방제제 엑스텐을 이용하였다. 키토산과 엑스텐은 항균활성과 기주식물의 저항성 증대효과를 높일 수 있는 것으로 알려져 있다(Park 등, 2001; Terry와 Joyce, 2004). 포트실험 결과 P84 균주의 방제효과가 60%로 가장 높게 나타났으며, 키토산과 엑스텐의 방제효과는 매우 미미하였다(Table 2, Fig. 3). 키토산과

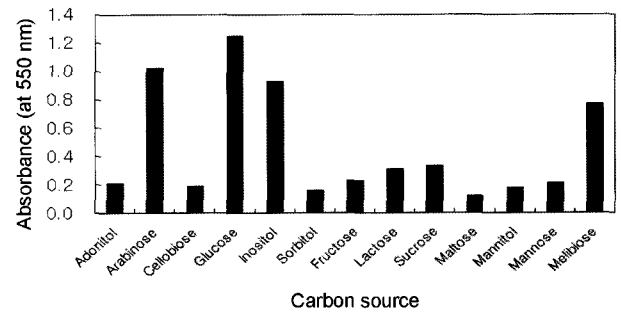


Fig. 2. Effect of various carbon sources on the cell growth of *Pseudomonas putida* P84. The strain were grown at 28°C for 2 days in a basal medium containing each carbon source.

Table 2. Efficacy of *Pseudomonas putida* P84 in controlling tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* Rs12

Treatments	Disease incidence (%) ^a	Control value ^b
P84 strain	37.7±5.6	60.0±6.4
EXTN (×2,000)	83.3±3.3	11.8±2.5
Chitosan (0.5%)	85.5±4.5	9.3±5.8
Control	94.4±2.2	-

^a100 × (number of wilted plants / total number of plants). The experiment was conducted three times.

^b[(disease incidence of control - disease incidence of treatment group] / disease incidence of control) × 100%.

엑스텐의 경우 식물에 저항성 증대효과가 있는 것으로 알려져 있는데, 이번 실험에서 방제효과가 낮게 나타난 것은 이번 실험조건이 토마토에 저항성을 유도하기에는 시간이 부족하였던 것으로 판단되었다. 제형화 되지 않은 *Pseudomonas*속의 생존력은 길지 않은 것으로 보고되고 있는데(Vidhyasekaran 등, 1997), 이번 P84 균주 처리의 경우 약 2주 후부터 방제효과가 떨어지기 시작하였다(결과 미제시). 따라서, P84 균주를 이용해 풋마름병을 방제하기 위해서는 제형화 또는 여러 차례의 처리가 이루어져야 할 것으로 생각되었다. *Pseudomonas*속 세균을 이용한

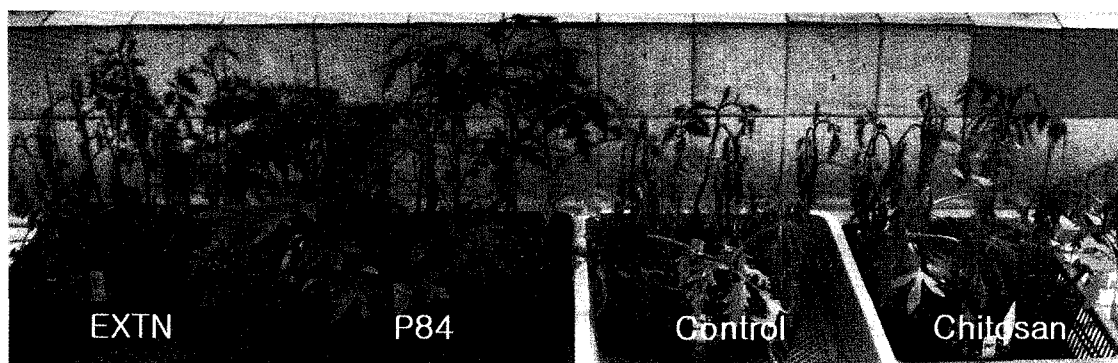


Fig. 3. Biological control effects of *Pseudomonas putida* P84 strain against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* Rs12. The pathogen was inoculated 24 hrs after the treatment of *P. putida* P84 and then disease severity was measured 10 days after inoculation.

생물적 방제 기작에는 항생물질, 식물호르몬, 식물성장 촉진물질, siderophore 생산 등이 보고되어 있는데 P84 균주의 풋마름병에 대한 방제효과가 항생물질 이외에 어떤 다른 기작이 작용하는지에 대해서는 추가 실험이 필요하다고 사료된다.

요 약

*Ralstonia solanacearum*에 의한 풋마름병은 토마토, 감자 등의 작물에 심각한 피해를 주고 있으나, 효과적인 방제법이 없는 실정이다. 일반 병원균의 생물적 방제를 위해 *Pseudomonas*속의 세균이 가장 일반적으로 이용되고 있는데, 이번 연구에서는 각종 작물의 재배지 토양에서 형광성 세균을 분리하여 *Pseudomonas*속 특이적 PCR과 항생물질(2,4-diacetylphloroglucinol) 생산 관련 유전자의 유무를 조사하였다. 분리된 150개의 *Pseudomonas*속 세균 중 항생물질 관련 유전자가 검출된 균은 2균주뿐이었으며, 그중 토마토 근권토양으로 분리된 *P. putida* P84 세균이 각종 식물 병원 세균에 대해 가장 높은 실내 항균력을 나타내었다. P84 균주의 탄소원별 증식효과는 glucose 첨가시에 가장 좋았으며, arabionse, inositol, melibiose 첨가시에도 우수한 증식효과를 나타내었다. P84 세균을 이용한 토마토 풋마름병의 포트실험 결과에서는 60%의 방제효과를 나타내었다.

참고문헌

Ciampi-Panno, L., Fernandez, C., Bustamante, P., Andrade, N., Ojeda, S. and Conteras, A. 1989. Biological control of bacterial wilt of potatoes caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Am. Potato. J.* 66: 315-332.
Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of

Pseudomonas solanacearum: Detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 113-121.

De La Fuente, L., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bajsa, N., Quagliotto, L., Chernin, L. and Arias, A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 671-681.
Elabyad, M. S., Elsayed, M. A., Elshanshoury, A. R. and Elsabbagh, S. M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant Soil* 149: 185-195.
Gamalero, E., Lingua, G., Berta and Lemanceau, P. 2003. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie* 23: 407-418.
Guo, J. H., Qi, H. Y., Guo, Y. H., Ge, H. L., Gong, L. Y., Zhang, L. X. and Sun, P. H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 29: 66-72.
Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87.
He, L. Y., Sequeira, L. and Kelman, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67: 1357-1361.
Moss, W. P., Byrne, J. M., Campbell, H. L., Ji, P., Bonas, U., Jones, J. B. and Wilson, M. 2007. Biological control of bacterial spot of tomato using *hrp* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biol. Control* 41: 199-206.
Park, K., Ahn, I. P. and Kim, C. H. 2001. Systemic resistance and expression of the pathogenesis-related genes mediated by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* EXTN-1 against anthracnose disease in cucumber. *Mycobiology* 29: 48-53.
Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A. 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at

- different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 948-955.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. and Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 881-887.
- Ran, L. X., Liu, C. Y., Wu, G. J., Loon, L. C. and Baaker, P. A. H. M. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biol. Control* 32: 111-120.
- 서상태, 박종한, 한경숙, 정승룡. 2006. 포도 잿빛곰팡이병의 생물적 방제를 위한 길항세균 선발. *식물병연구* 12: 267-271.
- Terry, L. A. and Joyce, D. C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: A brief review. *Postharvest Biol. Technol.* 32: 1-13.
- Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K. and Vasumathi, K. 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Biol. Control* 8: 166-171.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S. and Di Giovanni, G. D. 1998. A highly selective PCR protocol for detection 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2545-2553.
- Winding, A., Binnerup, S. J. and Pritchard, H. 2004. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 129-141.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hota, H. and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1986) comb. nov. *Microbiol. Immun.* 39: 897-904.