

## 담배세균성마름병(立枯病)에 대한 담배품종의 저항성 검정법

전용호\* · 강여규

KT&G 중앙연구원 생물자원연구소  
(2008년 6월 2일 접수)

## Screening Procedure of Tobacco Cultivars for Resistant to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*

Yong Ho Jeon\* and Yue Gyu Kang

Bio-resources Research Center, KT&G Central Research Institute

(Received June 2, 2008)

**ABSTRACT** : Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* has become a severe problem on tobacco in Korea. No effective single control measure is available at present time. One of the most potential way for controlling the bacterial wilt on tobacco is growing tobacco cultivars resistant to the bacterial wilt. In this study, optimal conditions for screening tobacco cultivars resistant to the bacterial wilt were examined to provide reproducible and efficient methods in growth chamber testing and field experiments for evaluating plant disease resistance. For this, already-known inoculation methods, inoculum densities, and incubation temperature, and plant growth stages at the time of inoculation were compared using tobacco cultivars resistant (*Nicotiana tabacum* cv. NC95), moderately resistant (*N. tabacum* cv. SPG70), and susceptible (*N. tabacum* BY4) to the bacterial disease. It was determined that root-dipping of tobacco seedlings at six true leaf stage into the bacterial suspension with inoculum level of  $10^8$  colony-forming units (CFU)/ml for 20 min before transplanting was simple and most efficient in testing for resistance to the bacterial wilt of tobacco caused by *R. solanacearum*, for which disease incidences and severities were examined at 2 weeks of plant growth after inoculation at 20~25°C in a growth chamber. These experimental conditions could discriminate one tobacco cultivar from the others by disease severity better than any other experimental conditions. In field testing, the optimum time for examining the disease occurrence was late June through early July. These results can be applied to establishing a technical manual for the screening of resistant tobacco cultivars against the bacterial wilt caused by *R. solanacearum*.

**Key words** : inoculation method, inoculum density, *Ralstonia solanacearum*, screening.

---

\*연락처 : 441-480 경기도 수원시 권선구 당수동 434 KT&G 중앙연구원 생물자원연구소

\*Corresponding author : Bio-resources Research Center, KT&G Central Research Institute, 434 Dangsu-dong, Guonsun-gu, Suwon, Gyunggi 441-480, Korea (phone: 82-31-400-1572; fax: 82-31-419-9434; e-mail: yongbac@ktng.com)

담배세균성마름병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*균은 열대에서 온대 지역에 걸쳐 전 세계적으로 널리 분포하고 있으며 담배, 토마토, 감자 등 가지과 식물을 비롯한 땅콩, 바나나, 생강, 뿌나무 등 50개과 450여종의 식물에 병을 일으키며 해마다 경제적으로 많은 피해를 가져오는 토양 전염성 세균이다(Agrios, 2005; Akiew and Trevorrow, 1994; Hayward, 1991; Hayward and Hartman, 1994; Lucas, 1975; Shew and Lucas, 1991). 우리나라에서도 1928년부터 담배산지의 주요 병으로 기록되었으며, 80년대 후반부터 우리나라 담배산지에서 중요한 병해로 대두되고 있다. 이 병은 흙속에 있던 병원세균이 담배의 뿌리나 줄기에 생긴 상처나 자연개공부로 침입하여 발병된다. 식물체내로 침입한 세균은 도관 속에서 급속히 증식하여 수분의 이동을 차단하고 식물전체가 시들어 죽게 된다(Husain, and Kelman, 1958; Melton, 1997). 대부분의 토양 전염성 세균병과 마찬가지로 아직 효과적인 방제를 위한 작물보호제가 보급되지 못하고 있다. 따라서 이 병의 방제를 위해서는 가장 효율적인 방제법인 저항성품종 보급이 시급한 실정이다(Melton, 1997; Mila and Radcliff, 2008). 세균성마름병에 대한 저항성 검정은 많은 연구자에 의해 여러 가지 방법으로 개발되어 사용되어 왔다(Chen, 1981; Daub, 1987; 김과 이, 1979; 임과 김, 1994; 박 등, 1988). 그러나 검정결과의 재현성이 낮아 포장검정 결과에 의존하는 실정이어서 본 연구는 기존에 보고되어 사용된 세균성마름병에 대한 저항성 검정방법을 비교 검토하여 보다 재현성이 높고 경제적인 유묘 및 포장검정 방법을 제시할 목적으로 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 사용 담배 품종 및 병원균

본 실험에 사용한 품종은 지금까지 보고된 시험결과와 포장 저항성 검정 결과를 바탕으로 하여 저항성 품종은 NC95, 중도저항성 품종 SPG70, 감수성 품종으로 BY4 품종을 사용하였다(강과 전, 2006; 이, 2002). 위 품종의 종자를 과중하여

3~4주후 묘판에 가식하고 5~6주 후 본엽이 6~8매가 된 유묘를 검정에 사용하였다.

담배세균성마름병균은 경북 예천, 경남 함양, 충북 제천, 전북 남원, 경기 수원 등에서 수집된 병든 담배조직으로부터 Kelman의 방법(1954)에 따라 분리하였다. 즉 병든 담배조직을 마쇄한 즙이나 bacterial ooze를 TZC 한천평판배지 (bacto peptone 10 g, casein hydrolysate 1 g, glucose 0.5 g, agar 15 g, 5% 1,3,5-tetrazolium chloride sol. 1 ml)에 streaking하여 중앙이 핑크색이고 주변이 우윳빛인 colony를 분리하였다. 분리된 세균은 병원성 검정을 거쳐 BioLog™ 3-Automated Microstation system (BioLog, USA)을 이용하여 *R. solanacearum*임을 확인하여 시험균주로 사용하였다. 담배 유묘를 이용한 저항성 검정 조건 확립 시험은 Fig. 1과 같은 과정으로 수행되었다. 각각의 실험과정에서 결정된 최적조건은 다음 단계의 실험에 적용하여 수행하였다.

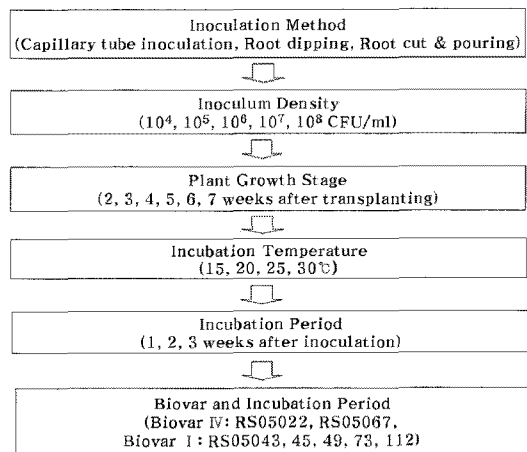


Fig. 1. Experimental procedure for screening of tobacco cultivars resistant to the bacterial wilt in a growth chamber.

### 접종방법 시험

접종방법별 저항성검정 효과를 조사하기 위해

- 1) 모세관 접종법(capillary tube inoculation),
- 2) 근부 침지법(root dipping), 3) 토양관주법

(root cut & pouring) 등의 3가지 방법으로 병원세균을 접종하였다. 모세관 접종법은 Daub (1987)의 방법에 따라 병원세균 현탁액을 흡수시킨 모세관 (Chase, 1~1.2 mm)으로 담배 지제부에 상처접종 하였으며, 근부 침지법은 Chen의 방법 (1981)을 사용하였다. 즉 담배뿌리를 세척 후 세균현탁액에 20 분간 담근 후, 이식하였다. 토양관주법은 김과 이 (1979)의 방법을 사용하였다. 포트에서 자란 담배의 뿌리를 칼로 절단한 후, 병원세균 현탁액을 포트당 50 ml씩 토양 관주하였다. 접종이 끝난 담배는 25℃의 온실에 보존하면서 세균성마름병 발병율을 조사하였다. 접종방법별로 6 주씩 3반복으로 접종하였다. 발병정도는 발병지수(0:건진, 1: 1/3 이내 잎 시들음, 2: 1/3~2/3 잎 시들음, 3: 2/3이상 잎 시들음, 4: 고사)로 조사하여 발병을 계산식 [발병율(%)=[ $\sum$ (발병지수×주수)÷(최고발병지수×총 조사주수)] × 100]에 의하여 산출하였다.

#### 병원균 접종 밀도 시험

병원균 밀도 다섯 수준 ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  CFU/ml)의 현탁액을 근부 침지법으로 접종하고 병발생율을 조사하였다. 병원균 현탁액 조제 방법은 다음과 같다. 병원세균을 nutrient한천배지(bacto beef extract 3 g, bacto peptone 5 g, agar 15 g, glucose 5 g)에 streaking하여 28℃ 배양기에서 2일간 배양한 후, 병원세균 현탁액을 조제하였다. 먼저  $10^8$  CFU/ml 농도( $OD_{590nm}$ ≐ 0.8)의 현탁액을 조제한 후, 10배량씩 순차적으로 희석하여  $10^7$  ~  $10^4$  CFU/ml 농도의 현탁액을 조제하여 사용하였다.

#### 유묘 묘령 시험

$10^8$  CFU/ml 밀도수준의 병원균 현탁액을 근부 침지법으로 접종하여 유묘의 묘령에 따른 품종별 저항성을 검정하였다. 검정유묘는 가식 후 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주 된 묘령의 유묘를 사용하였다.

#### 검정 온도 시험

유묘에 병원균을 접종한 후 식물체 배양 온도별

로 저항성 차이를 조사하였다. 검정온도는 15, 20, 25, 30℃로 시험하였다. 앞의 시험에서 결정된 가식 후 5주된 유묘에  $10^8$  CFU/ml 밀도수준의 병원균 현탁액을 근부침지법으로 접종하고 각 온도로 조정된 생장상에 배양하면서 발병을 조사하였다.

#### 조사시기 및 병원균의 Biovar 영향

상기 시험에서 얻어진 유묘 검정 최적 조건으로 저항성 검정을 실시하면서 1주 간격으로 병발생을 조사하여 저항성 판별을 위한 최적의 조사 시기를 결정하였다. 또한 Biovar I 과 IV의 저항성 반응 차이 적용여부를 조사하기 위하여 Biovar IV 2개 균주 (RS05022, RS05067)를 사용하였고, Biovar I 5개 균주(RS05043, RS05045, RS05049, RS05073, RS050112)를 사용하여 저항성 검정을 하였다.

#### 포장 저항성 검정

시험품종은 황색종 5품종 (KF118, NC95, K326, SPG70, BY4)과 버어리종 2품종(KB111, KB108)을 사용하였다. 각 품종을 온실에서 육묘하여 본엽이 6-8매정도 자란 유묘를 4월 20일경에 연구소의 오염 포장에 이식하였다. 처리구당 30주씩 난괴법 3반복으로 포장배치하여 수행하였으며, 시비 및 재배관리는 표준재배법에 준하였다. 세균성마름병의 발생 조사는 담배 이식 후부터 매 2주마다 조사하고 앞에서 사용하였던 발병율 계산식에 의하여 산출하였다.

## 결과 및 고찰

#### 접종방법별 저항성 검정

유묘의 병원균 접종방법별 저항성 결과와 포장 검정 결과간의 상관도를 분석을 하였을 때 근부침지법이 포장검정결과와 상관계수  $r=0.8616$ 로 5% 수준에서 유의한 결과를 나타내었다(Table 1). 저항성 품종인 NC95와 감수성 품종인 BY4는 접종 2주후에 약 45%의 발병률 차이를 보였다. 소요되는 시간과 접종방법이 간편하다는 면에서 가장 효율적이라는 이(2002)의 보고와 같이 모세관 접종법도 높은 유의성을 보였다. 그러나 모세관 접종

Table 1. Correlations between the incidence of bacterial wilt tested in field and those from different inoculation methods in greenhouse

Inoculation method <sup>a</sup>	Correlation coefficient <sup>b</sup>
Capillary tube	r=0.9032*
Root dipping	r=0.8616*
Root cut & pouring	r=0.1047

<sup>a</sup>Capillary tube: An axillary bud of tobacco plant was pricked with a capillary tube (1~1.2 mm of inner diameter) containing bacterial suspension (10<sup>8</sup> CFU/ml). Root dipping: Tobacco roots were immersed in the bacterial suspension for twenty min and were transplanted to pots containing soil. Root cut & pouring: Rootlets of tobacco plants were cut with knife and the bacterial suspension (50 ml/plant) were poured onto the rhizosphere soil.

<sup>b</sup>Asterisk indicate a positive correlation between the incidence of bacterial wilt in field and capillary tube method (r=0.9032\*) and root dipping method (r=0.8616\*).

범은 액아부위에 모세관을 꽂아 식물체의 물관에 정확히 접종하여야 하는 점 때문에 나타날 수 있는 실험오차를 줄이고자 근부침지법으로 다음 실험을 수행하였다.

### 접종원의 밀도별 저항성 검증

접종원의 밀도를 다섯 수준으로 조정하여 근부침지법으로 접종하고 발병율을 조사한 결과, 10<sup>4</sup> CFU/ml와 10<sup>5</sup> CFU/ml, 10<sup>6</sup> CFU/ml의 병원세균을 접종하였을 때 감수성 품종인 BY4 품종의 이병율이 41~45%수준으로 세 품종간의 뚜렷한 차이가 인정되지 않았다. 그러나 10<sup>7</sup> CFU/ml 이상의 병원균 밀도로 접종하였을 경우에는 감수성 품종 BY4의 이병율이 66.7~75%수준으로 높아서 저항성, 중도저항성 품종에 비해 현저한 병진전을 보였다. 10<sup>8</sup> CFU/ml의 병원세균을 접종하였을 경우에 품종별 저항성 차이가 가장 크게 나타났으며 유의성이 인정되었다(Fig. 2). Lucas 등 (1975)은 세균성마름병균을 10<sup>7</sup> CFU/ml의 농도로 담배에 접종하였을 때 10<sup>6</sup> CFU/ml로 접종한 경우보다 병 발생이 빨랐다고 하였다. 임과 김 (1994)도 풋마름병에 대한 고추의 저항성을 검증하기 위한 접종원의 농도로 10<sup>7~8</sup> CFU/ml가 적당하다고 보고하였고 본 실험결과도 같은 경향을 보였다.

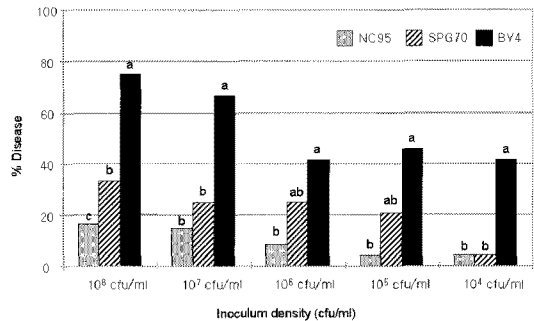


Fig. 2. Disease incidence in three tobacco cultivars with five inoculum densities inoculated by root-dipping with *Ralstonia solanacearum*. Disease rates were calculated by following formula. Disease rates (%) = [Σ (disease index × No. of the diseased plants) / (4 × No. of total tobacco plants)] × 100. The index ranged from 0=no visible symptom to 4=dead. The same letters above bars are not significantly different at P<0.05, using the Duncan's multiple range tests.

### 유묘의 묘령별 저항성 검증

유묘 묘령에 따른 품종별 발병도 차이를 비교한 결과, 가식 후 2주~4주 유묘에서 품종별 저항성 차이는 인정되지 않았다. 유묘가 어릴수록 병 진전이 급속히 이루어져 품종별 저항성 차이를 구분

담배세균성마름병[立枯病]에 대한 담배품종의 저항성 검정법

하기 어려웠다. 가식 후 2주된 유묘 사용의 경우는 3품종 모두 70% 이상의 발병율을 보였다. 가식 후 7주 유묘의 경우에는 BY4품종에서도 41%의 낮은 병 진전을 보였고, 저항성품종과 중도저항성 품종간의 저항성 차이가 인정되지 않았다. 가식 후 5주와 6주 유묘의 경우에는 품종별 저항성 차이가 인정되었다. 가식 후 5주 유묘를 사용하였을 때 품종별 저항성의 차이를 보였고 가식 후 6주 유묘보다 식물체의 크기가 작아 저항성 검정에 더 편리하다고 생각된다(Fig. 3).

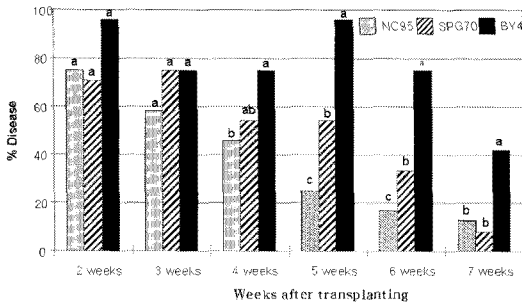


Fig. 3. Bacterial diseases incidence of three tobacco cultivars in different growth stages inoculated by root-dipping method with *R. solanacearum*.

온도별 저항성 검정

병원균 접종 후 식물체 배양온도별 발병을 조사한 결과 식물 성장상에서 15℃로 2주간 배양한 경우에는 병진전이 세 품종 모두 20% 이하로 품종간 차이가 없었으며, 30℃ 성장상에서는 세 품종 모두 90% 이상의 병 발생 양상을 보였다. 20~25℃의 성장상에 배양하였을 때 품종간 발병율의 차이가 크게 나타났다(Fig. 4).

조사 시기 및 biovar별 적용

위 실험에서 확인된 성장상 검정 최적조건으로 품종별 저항성검정 최적 조사시기와 Biovar별 적용여부를 조사하였다. 접종 후 2주에 조사하였을 때 품종별 저항성 수준에 따라 병 발생을 차이가 크게 나타났다. 즉, NC95의 경우 20% 내외수준,

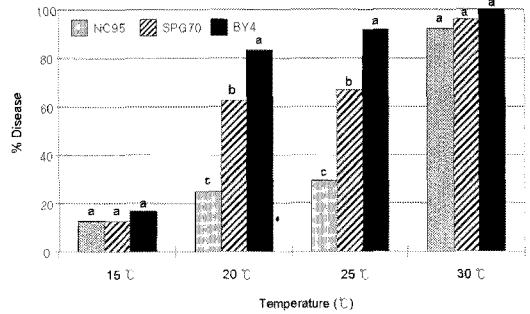


Fig. 4. Bacterial wilt incidence in three tobacco cultivars incubated in different temperatures after inoculation with *Ralstonia solanacearum*.

중도저항성인 SPG70의 경우 50% 내외수준, 그리고 감수성 품종 BY4의 경우 90% 내외의 높은 이병율을 보였다. 접종 1주 후에는 중도저항성 품종과 저항성 품종간 차이가 10% 내외로 2주후에 조사하였을 때 보다 차이가 적었다. 접종 3주 후에는 검정 품종 모두에서 50% 이상의 발병을 보여 저항성 수준 차이를 조사하기에는 역시 적합하지 않았다(Fig. 5). 또한 Biovar I과 IV 균주를 각각 적용시켜 보았을 때 품종별 저항성 반응은 biovar에 관계 없이 비슷한 경향을 보였다(결과자료 생략).

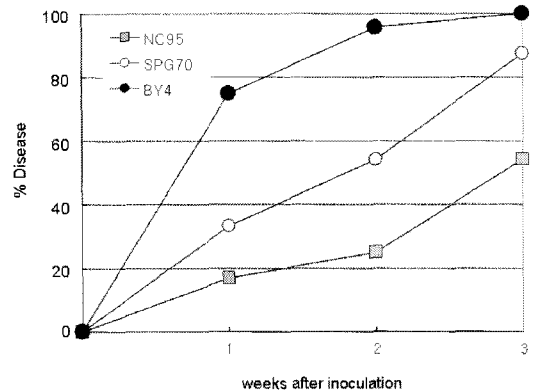


Fig. 5. Disease rates of three tobacco cultivars with different incubation periods.

**포장 저항성 검정 및 조사 시기**

황색종 다섯품종 및 버어리종 두 품종을 오염포장에 이식하여 매주 정기적으로 발병을 조사한 결과 NC95, K326, KF118이 저항성이 강하였으며, SPG70 품종이 중간 정도의 저항성을 보여주었고, 버어리종인 KB111, KB108과 황색종인 BY4가 60% 이상의 이병율을 보였다. 조사시기별 병 발생은 Fig. 6에서와 같이 이식 후 70일(6월 29일)이 경과하였을 때 품종간 병에 대한 저항성 반응의 차이가 뚜렷하였으며 이식 후 8주(6월 15일) 이전과 12주(7월 13일) 이후에는 저항성 구분이 분명치 않아 조사시기로 적절치 않았다. 그러므로 생물자원연구소(수원)의 기준으로 볼 때 포장저항성 검정시 발병조사는 6월 하순에서 7월 초순 사이에 실시하는 것이 적합하다(Fig. 6).

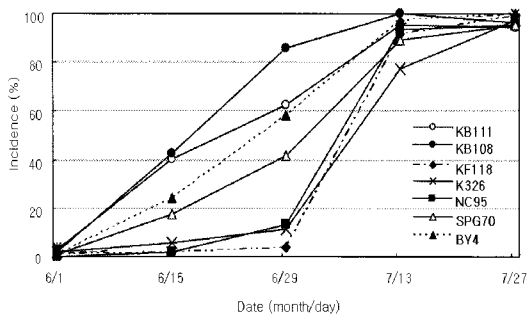


Fig. 6. Trend of bacterial wilt incidence of several tobacco cultivars in the field infested with *Ralstonia solanacearum*.

**유묘저항성 검정과 포장 저항성 검정 결과 비교**

실내 유묘 검정결과와 포장에서의 저항성 검정 결과를 비교하면 NC95의 경우 포장검정 6월 29일 조사와 실내검정에서 각각 13.3%와 18.8%의 이병율을 보였다. 중도 저항성 품종인 SPG70의 경우는 41.5%와 45.8%, 감수성 품종의 경우 58.2%와 68.8%의 이병율을 각각 보였다. 본 실험들을 통해 확립한 실내유묘 저항성 검정법은 포장에서의 결과와 유사한 경향을 보여 저항성 품종 선발 시 조기에 대규모로 선발할 수 있을 것으로 판단된다(Fig. 7).

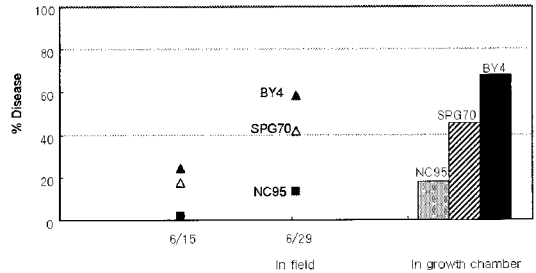


Fig. 7. Comparison of disease rates in field (June 15<sup>th</sup>, 29<sup>th</sup>) with those in growth chamber tests.

**결 론**

세균성마름병에 대한 담배의 저항성을 유묘기에 실내에서 간편하게 검정하는 방법은 본엽이 6엽까지 전개된 유묘(파종후 약 8주, 가식 후 약 5주)를 병원균 밀도 약 10<sup>8</sup> CFU/ml 인 병원균 현탁액에 20분간 침지 접종 후 20~25℃에 2주간 배양 후 발병 조사하는 것이 효과적이었다.

오염포장을 이용한 포장 검정은 6월 하순~7월 초순에 발병조사를 하는것이 가장 적절하였다. 조사 방법은 이병주율, 생존율 또는 발병율을 대조 품종과 비교하여 조사하는 것이 적절하였다. 위와 같이 완성된 저항성 검정 manual은 담배세균성마름병 저항성 품종 육성에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

**참 고 문 헌**

Agrios, G. N. (2005) Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, NY.  
 Akiew, E. and Trevorrow, P. R. (1994) Management of bacterial wilt of tobacco. In: Bacterial wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum* (eds Hayward, A. C. and Hartman, G. L.). p. 179-98. CAB International, Willingford, UK.  
 Chen, W. Y. (1981) Ph.D. thesis, Biological control of bacterial wilt of tobacco with

담배세균성마름병[立枯病]에 대한 담배품종의 저항성 검정법

- avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum*. Dept. of plant pathology, NCSU, Raleigh. N.C., USA.
- Daub, M. E. (1987) Cell culture techniques for the development of disease resistance in tobacco. p.60-61. Annual summary of activities. Dept. plant pathology, NCSU, Raleigh. N.C., U.S.A.,
- Hayward, A. C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87.
- Hayward, A. C. and Hartman, G. L. (1994) Bacterial wilt: The Disease and its causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK.
- Husain, A., and Kelman, A. (1958) Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 48: 155-165.
- Kang, Y.-G., Chung, Y.-H., and Y.-H. Yu. (2004) Relationship between the population of *Ralstonia solanacearum* in soil and the incidence of bacterial wilt in the naturally infested tobacco fields. *Plant Pathol. J.* 20: 289-292.
- Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- Lucas, G. B. (1975) Granville wilt. pp. 365-382 in: Diseases of tobacco 3rd ed. Biological Consulting Association, Raleigh NC.
- Melton, T. A. (1997) Disease management. p. 83-109. in: 1997 Flue-cured tobacco information. N.C. State Univ. Raleigh N.C. USA.
- Mila, M. and Radcliff, J. (2008) Managing disease. p. 155-184 in: Flue-cured tobacco guide. N.C. State Univ. Raleigh N.C. USA.
- Shew, H. D. and Lucas, G. B. (1991) Compendium of tobacco diseases. APS Press, USA.
- 강여규, 전용호 (2006) 담배 병해충 방제 연구, KT&G중앙연구원 담배연구보고서.
- 김정화, 이영근 (1979) 입고병에 대한 담배 품종별 저항성 검정. p193-198. 한국연초연구소 담배연구보고서. 314pp.
- 박은경, 김정화, 손준수, 이영근, 오명희, 강여규 (1988) 연초병해충 발생기작 및 방제연구. p. 161-263. 한국인삼연초연구소 담배연구보고서(경작분야 육종 및 환경편).
- 이영근 (2002) 세균성마름병에 대한 담배의 저항성검정 방법. 한국연초학회지 24: 27-31.
- 임양숙, 김병수 (1994) 고추의 풋마름병(靑枯病)에 대한 저항성. 한국식물병리학회지 10: 73-77.