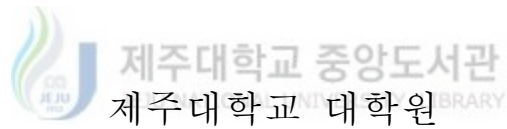


석사학위논문

오이 및 호접란에서
길항근권세균 처리에 의한
식물병에 대한 전신적 유도 저항성



농 학 과

이 경 후

2006년 6월

오이 및 호접란에서
길항근권세균 처리에 의한
식물병에 대한 전신적 유도 저항성

지도교수 전 용 철

이 경 후

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2006년 6월

이경후의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 印

위 원 _____ 印

위 원 _____ 印

제주대학교 대학원

2006년 6월

Systemic Induced Resistance against Plant Diseases in Cucumber and Orchid Plants by Pre-inoculated with Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Kyung-Hoo Lee

(Supervised by professor Yong-Chull Jeun)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2006. 6

목 차

ABSTRACT	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	10
1. 오이 식물체	
1-1. 오이 탄저병균과 길항근권세균의 배양	
1-2. 오이 식물체에서 ISR의 유도	
1-3. 오이 식물체에 탄저병균의 접종 및 관찰	
1-4. 길항근권세균의 처리에 의한 유도저항성의 자료분석	
2. 호접란 식물체	
2-1. 호접란 무름병균과 길항근권세균의 배양	
2-2. 길항근권세균의 직접적 항균효과 검증 및 전신적 저항성 유도	
2-3. 호접란에 무름병균의 접종	
III. 결 과	16
1. 오이 식물체	
1-1. 오이 탄저병 발생 정도에 대한 길항근권세균 전처리 효과	
1-2. 잎 표면의 형광현미경적 관찰	
2. 호접란 식물체	
2-1. 호접란 무름병에 대한 길항근권세균의 직접적 항균효과	
2-2. 길항근권세균 처리에 의한 호접란 무름병에 대한 전신적 저항성 유도	
IV. 고 찰	30
V. 적 요	35
VI. 참 고 문 헌	37

ABSTRACT

Resistance induction and antifungal effect by plant growth promoting rhizobacteria(PGPR) were investigated on the leaves of cucumber and orchid plants. PGPR with the rhizosphere of the plants that has been known as direct antifungal effect to plant pathogen as well as promotion of plant growth. Infection structures were observed at the penetration sites on the leaves of cucumber plants inoculated with *Colletotrichum orbiculare* using a fluorescence microscope. The cucumber plants were previously drenched with suspension of bacterial strains *Pseudomonas putida* or *Micrococcus luteus*. In the plants pre-inoculated with both bacterial strains resistance was induced after inoculation with *C. orbiculare*. To investigate the resistance mechanism by both bacterial strains, the surface of infected leaves was observed at the different time after the challenge inoculation. At 3 days after inoculation there were no differences in the germination and appressorium formation of conidia of *C. orbiculare* as well as in the callose formation of the plants between both bacteria pre-inoculated and non-treated plants. At 5 days, the germination and appressorium formation of the fungal conidia were, however, significantly decreased on the leaves of plants pre-inoculated with *M. luteus* at the concentration with 1.0×10^7 cfu/ml. Furthermore, callose formation of plant cells at the penetration sites was

apparently increased. In contrast, there were no defense reaction of the plants at the concentration with 1.0×10^6 cfu/ml of *M. luteus*. Similarly, inoculation with *P. putida* caused no plant resistance at the low concentration, whereas increase of callose formation was observed at the higher concentration, suggesting that the resistant mechanisms might be differently expressed by the concentration of pre-inoculation with bacterial suspension. On the other hand, a bacterial colony was isolated from a orchid plants showing soft rot symptom. This bacterium was identified as *Pectobacterium chrysanthemi*, which caused soft rot in orchid plants. In order to find a effective PGPR strain against the soft rot in orchid plants, suspension of *P. putida*, *M. luteus* and *Pseudomonas* sp.(TRH422-1) were mixtured with suspension of *P. chrysanthemi*. The suspension mixture with TRH422-1 showed decrease of lesion size after inoculation in orchid plants whereas the mixture of *P. putida* and *M. luteus*. The lesion area of the PGPR *P. putida* or *M. luteus* pre-inoculated plants was decreased compared to that of sterile water-treated plants, indicating a resistance induction in the orchid plants. Furthermore the level of resistance by the both bacteria was comparable that by antibiotic fungicide streptomycin. From these results it was suggest that PGPR may be effective to a broad spectrum of various crops and plant diseases.

I. 서 론

수년전부터 식물보호를 위한 화학약품 사용량의 증가는 농업생태계의 파괴, 화학약품에 대한 저항성 식물 병해충 출현, 화학약품의 잔류에 의해서 인간의 건강에까지 해를 끼치는 결과를 낳았다. 또한 지속적으로 증가하는 소비자의 신선하고 안전한 농산물에 대한 요구와 농업환경과 농산물의 안전성에 대한 관심의 증가는 정부의 농업 정책에 대한 변화를 일으키는 등 환경친화적인 작물재배가 중요한 위치를 차지하는 방향으로 변화되고 있다.

따라서 농약 사용량을 줄일 수 있는 친환경적 식물 병 방제에 관한 요구가 증대하게 되었고, 환경에 대한 부작용을 억제하는 동시에 농산물의 안전성과 품질을 향상시킬 수 있는 방안으로 식물체의 병에 대한 저항성을 이용한 유도저항성 식물체를 이용하는 방법을 들 수 있다(Jeun et al., 2002).

유도저항성의 특징을 살펴보면 첫째로, 유도저항성은 진균, 세균, 바이러스에 의한 병들에 대해 광범위하게 효과가 있다. 저항성이 유도된 식물체 내에서는 일반적으로 잘 알려져 있는 저항성 기작인 세포벽의 경화나 항균물질인 페놀화합물의 축적과 같은 비 특이적인 반응이 활성화되므로 식물 벽을 직접 침해하는 진균 뿐 아니라 세균과 바이러스에 의한 피해를 동시에 줄일 수 있다. 예를 들면 저항성이 유도된 오이식물은 진균, 세균, 바이러스에 의한 13가지의 식물 병에 대해 저항성을 나타내는 것으로 보고가 되어 있다. 특히 바이러스에 대한 농약이 개발되어 있지 않은 현실에서 유도 저항성을 이용한 바이러스 병 방제는 큰 효과를 기대할 수 있다(Jeun et al., 2002). 특히 아직까지는 바이러스 병에 대해 개발된 농약들이 없기 때문에 유도저항성을 이용한 방제법은 바이러스병 방제에 있어

매우 유용할 것으로 생각된다. 둘째, 농약에 대한 식물 병해충의 약제 저항성 유도가 없다. 약제를 지속적으로 널리 사용한 후에 항생제에 저항성인 인체 병원균 또는 살충제나 살비제에 저항성인 곤충과 응애가 생기는 것과 같이, 식물병원균도 여러 살균제에 저항성인 균주들이 출현하였다. 수년 동안 thiram, maneb, captan 등의 예방살균제가 사용되었을 때는 저항성 균이 관찰되지 않았다. 이것은 저항성이 되기 위해서는 많은 유전자가 바뀌어야 하는데, 이들 약제의 경우에는 여러 작용점이 있으므로 저항성이 유발되기 어려웠으리라 생각된다. 살균제 저항성은 1960년대에 벤젠고리를 포함하는 모든 살균제에서 발생되었는데, diphenyl에 저항성인 *Penicillium*, hexachlorobenzene에 저항성인 *Tilletia*, PCNB에 저항성인 *Rhizoctonia*가 자연 상태에서 발생했다. 그 후 dodine에 저항성을 나타내는 *Venturia inaequalis* (사과나무 검은별무늬병균) 저항성 균주가 출현하여 이 우수한 화합물이 넓은 지역에서 효과가 없어졌다. 불마름병을 일으키는 *Erwinia amylovora* 균주 중 침투성 streptomycin에 저항성인 균주가 1950년대 말경부터 보고 되어왔다. 그러나 이러한 살균제 중 한 종류 이상에서 저항성을 나타내는 수많은 균류의 균주가 출현하게 된 것은 침투성 살균제, 특히 베노밀, 그리고 이후에 metaraxyl과 Strobilurins 또는 QoI 살균제의 도입과 광범위한 사용에 의한 결과이다. 어떤 경우에는 살균제를 사용한 지 2년 후에 저항성 균주가 나타나서 널리 확산되기도 한다. 오늘날 중요한 병원균류인 *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Sphaerotheca*, *Mycosphaerella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Ustilago* 에서 하나 이상의 침투성 살균제에 대해 저항성을 나타내는 균주가 보고되었다. 그러므로 앞으로 하나의 작용점을 가진 약제가 널리 사용되는 곳마다 침투성 살균제에 대해 저항성을 보이는 다른 균류의 균주가 나타날 것으로 생각된다. 이것은 침투성

살균제의 작용점이 특이하기 때문이다. 예를 들면, 이들 약제가 균의 대사과정에서 유전적으로 조절되는 한 개 또는 2개의 반응에 영향을 미친 결과로서, 한 번의 돌연변이나 저항성 개체 선발에 의해 저항성 균주가 신속히 늘어날 수 있다(Agrios, 2005). 유도저항성은 주로 식물체 자신의 방어 반응을 향상시킴으로써 나타나기 때문에 이러한 현상에 대한 병해충의 적응을 불가능하게 만든다. 셋째, 유도저항성 발현 식물체로부터 생성된 물질은 인간건강에 해를 끼치지 않는다. 현재는 사용되고 있지 않지만, 수은(Hg), 카드뮴(Cd), 납(Pb) 등의 중금속이나 DDT, BHC 등의 농약 성분은 생물의 체내에 들어오면 분해되거나 배설되지 않고 먹이연쇄를 따라 이동하여 생물체내에 농축되고, 먹이 연쇄를 따라 이동하며 상위 영양 단계로 갈수록 농도가 높아지고 피해 또한 크다. 대표적인 사례로 1953년 일본의 미나마타라는 어촌 마을에서 발생한 미나마타병과 2차 세계대전 당시 살충제로서 탁월한 효과를 발휘하였으나 농작물의 해충뿐만 아니라 사람들에게도 여러 가지 피해가 나타나 사용이 금지된 DDT등이 그 예가 되겠다. 비록, 페놀화합물 같은 식물체 저항성을 위해 중요한 역할을 하는 일부 대사산물들이 유도저항성 발현 식물체에서 생산되지만 인간에게는 영향을 미치지 않는다.

유도저항성은 국부적 획득저항성과 전신적 유도저항성으로 구분된다. 국부적 획득저항성은 처음에 병원체에 의한 감염 또는 화학물질에 의해 생기는 식물체 피사점 주위에 국한되는데, 이것을 국부적 획득저항성(Local Acquired Resistance)이라고 한다. 예를 들면, 과민성 담배 품종에 담배 모자이크 바이러스(TMV)에 의해 생긴 국부 병반 주위 1~2mm 부위에 유도되며, 아마도 다른 기주-병원체 조합에서도 유도될 것이다. 국부적 획득 저항성은 이미 존재하는 병반 근처에는 새로운 병반이 생기지 않게 하고 적어도 1차 감염 2~3일 후에 접종이 이루어졌을 때에는 이미 존재하는 국부병반으로부터

터 더 진전되는 국부병반을 거의 없게 하거나 병반 크기를 작게 만든다 (Agrios, 2005). 전신적 유도저항성은 병원체, 비병원체에 감염되거나 또는 자연에서 존재하는 특정 생화학물질에 의해서 유도되는 저항성 Systemic Acquired Resistance(SAR) 과 식물의 성장을 촉진시키는 근권에 존재하는 길항세균(PGPR : plant growth promoting rhizobacteria)에 의해 유도되는 저항성 Induced Systemic Resistance(ISR) 두 가지로 정의된다. 이 두 가지 타입의 전신적 유도 저항성은 식물에 저항성이 유도되는 신호전달체계와 저항성이 발현되는 저항성 기작에 있어서 차이점을 나타낸다. 신호전달체계에 있어서 SAR발현을 위해서는 salicylic acid(SA)의 축적이 필요한 반면에, ISR의 신호전달체계는 SAR과 다르게 SA의 축적과는 상관없이 길항근권세균의 처리에 의해 저항성이 진행된다. 또한 SAR과는 달리 길항근권세균은 병원균에 대해서 직접적인 항균효과를 가지며 식물의 성장을 촉진시키고(Jeun et al., 2001) 유도저항성의 신호전달과정에서 식물호르몬인 ethylene, jasmonic acid이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Van Loon et al., 1998a). SAR의 저항성 기작은 품종 저항성에 기인한 저항성 기작과 유사하여 세포벽의 리그닌화(lignification), 병원체 침입부위에 papillae 형성, 식물세포의 과민성 반응(HR : hypersensitive reaction), 병 관련 단백질(PR-protein : pathogenesis related protein)의 생성 등이 있다. 반면에 ISR에 의한 저항성 발현 기작은 SAR과 근본적으로는 유사하나 몇 가지 차이점이 있는데 저항성 유도 인자인 길항근권세균은 병원체에 대한 직접적인 항균 효과가 있고 저항성 발현 정도가 철(Fe)의 영향을 받으며 식물의 성장을 촉진한다. 또한 일반적으로 ISR 발현 식물에서는 병 관련 단백질의 축적 없이도 저항성을 나타내기도 한다(Jeun et al., 2002).

농가에서 유도저항성의 이용은 병원체, 비병원체 혹은 생화학물질을 이용함으로써 발생할 수 있는 포장의 병원균에 의한 피해, 생화학물질의 농도조절의 어려움 등을 갖는 SAR의 이용보다는 식물의 근권에 존재하는 길항세균을 이용함으로써 식물의 생장을 촉진시키며 저항성을 유도하는 ISR을 이용하는 것이 더 유리할 것이다(Kleopfer et al., 1980). 포장에서 ISR 발현 식물체들을 가장 적합하게 적용시키기 위해서는 ISR발현에 영향을 주는 신호전달체계, ISR의 발현기작 또는 작물의 재배환경과 같은 ISR에 관한 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

그러나 아직까지는 ISR의 기작에 대해서는 명백히 입증되지는 않았다. 길항근권세균 *Pseudomonas putida*와 *Micrococcus luteus* 을 전처리한 오이 식물체에 *Colletotrichum orbiculare* 병원균을 접종했을 때 병 발생 정도가 억제되었다(Jeun et al., 2004a). 따라서 길항근권세균을 이용한 ISR의 유도는 식물 병 방제에 유용할 것으로 생각되며, 이번 실험에서는 병원균의 감염구조와 기주 식물의 방어반응을 *P. putida* 와 *M. luteus* 를 전처리한 오이 식물체의 잎 표면을 세포학적으로 조사하였다.

호접란은 대만, 태국, 필리핀, 타이, 말레이군도 등 고온 다습한 열대 아시아 지역에서 70여종의 원종이 발견되었으며 멀리 오스트레일리아까지 분포하고 있다. 유럽에서는 16세기에 남미와 동남아시아를 왕래했던 탐험가들에 의해 16세기에 유럽에 소개된 후 식물원이나 귀족들을 중심으로 재배되기 시작하였다(농촌진흥청, 2001a). 호접란은 종전에 분화와 절화용으로만 이용했지만 최근에 와서는 고급 꽃꽂이나 신랑 신부의 꽃다발용 등 용도도 다양해지고 있다(고, 2003). 과거에는 수요가 적고 개화가 1~2월에 집중되며, 병해에 약할 뿐만 아니라 겨울철에 고온을 필요로 하여 재배가 적었으나, 꽃 소비의 고급화로 화려한 자태를 가진 호접란의 인기가 높아지고 수요가 증가하여 심비디움 다음으로 재배면적이 증가하

였으나 IMF시대를 맞아 재배 농가에서도 큰 어려움을 겪고 있다. 최근에는 난과 식물 중에서 비교적 생육기간이 짧고, 개화조절에 의한 주년 생산이 가능하여 출하기간이 확대되어 분화 생산면적이 증가하여 왔다. 호접란은 고온성 착생란으로 매우 두꺼운 잎과 굵고 긴 뿌리를 가지고 있다. 건조지역에서 적합한 CAM(Crassulacean Acid Metabolism)형 식물인데 기온이 낮은 야간에 기공을 열어 탄산가스를 흡수하여 유기산으로 변화시켜 저장하고, 주간에는 기공을 닫아 수분의 증산을 방지하면서 유기산을 분해하여 광합성을 한다. 생육적온은 주간 25~30℃, 야간 18~23℃로 최저온도 15℃를 유지하여야 하며, 10℃ 이하에서는 잎이 붉게 변하여 낙엽이 지고 결국에는 고사한다. 잎의 성장속도와 잎면적 지수는 높은 온도에서 촉진된다(농촌진흥청, 2001b).

호접란의 생육이상을 일으키는 원인으로는 사상균, 세균, 바이러스에 의한 병해, 해충의 식해에 의한 상해, 양분 또는 수분의 과잉, 부족, 환경 오염, 저온, 고온 등에 의한 생리적 장애가 있다. 다른 작물에 비교하면 난의 병해충 피해는 적은 편이지만 병해충 방제에 대한 정보도 적고 다른 작물의 예를 참고하여 대처하고 있는 상황으로 병명도 확실하지 않은 경우가 많다(김, 1999). 호접란의 알려진 병해로는 탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. cinctum*, *C. orchidearum*), 역병(*Phytophthora palmivora*, *P. cactorum*), 입고병(*Fusarium oxysporum*, *F. cattleya*), 세균성갈반병(*Pseudomonas cattleyae*, *P. avenae*), 무름병(*Erwinia chrysanthemi*) 등이 알려져 있다. 이 중 호접란 무름병은 1991년초에 경기도 고양지방에서 처음 발견되었고, 지금은 전국적으로 널리 발생되고 있고, 호접란 재배에서 가장 방제가 어려운 병이며 그 피해가 점차 확산되고 있는 실정이다. 무름병의 증상은 잎에 초기에 수침상의 작은 반점으로 시작되어 점차 확대되면서 잎이 연하게 썩어간다. 보통 감염 후 2~3일

후에 식물체가 완전히 썩게 된다.

호접란의 병해에 대한 대책으로는 철저한 위생관리와 작물 재배환경의 조절이 가장 중요하겠다. 병해충이 존재하지 않으면 병해충도 발생하지 않는 것은 당연하다. 새로운 온실에 호접란을 재배하기 시작한 경우에는 특별한 방제를 하지 않아도 병해충은 발생하지 않는다. 그러나 오래된 온실에는 병해충이 잠재해 있기 때문에 병해충이 발생하기 쉽다(김, 1999). 그러나 난에 대한 연구는 아직 많이 미흡한 상태이고 주요 병해에 대해서는 다른 작물의 예를 참고하여 대처하고 있다. 또한 난의 주요 병해충에 대해 등록되어 있는 방제약제 조차 없는 실정이다. 따라서 이번 연구에서는 호접란 재배농가에서 문제가 되고 있는 무름병을 대상으로 농약을 대신하여 병원균에 대해 억제효과를 확인한 길항근권세균을 이용하여 방제 가능성을 여러 실험을 통해 알아보았다.



II. 재료 및 방법

1. 오이 식물체

1-1. 오이탄저병원균과 길항근권세균의 배양

수원 농촌진흥청 농업과학기술원 식물 병리과로부터 받은 탄저병원균 *C. orbiculare* 을 Green beans agar (GBA)배지에서 5일간 배양하였다. 탄저병원균이 자라고 있는 배지에 증류수 10ml을 붓고 loop를 이용하여 탄저병원균을 수거하였다. 잎 표면에서 포자의 부착력을 향상시키는 Tween20을 $100\mu\text{L}^{-1}$ 만큼 첨가한 포자현탁액(2.5×10^5 conidia/ml)을 오이 잎에 병원균 접종을 위한 접종원으로 사용하였다. 제주에서 한라산을 중심으로 해안지역, 중산간 지역, 산간지역에서 자생하고 있는 뿌리를 포함한 22개 식물체를 2003에 채집하였고 채집한 식물체는 바로 지퍼백에 넣어 상온에서 보관하였다. 근권 세균을 분리하기 위하여 식물의 뿌리를 수돗물로 깨끗이 씻었다. 채집한 식물의 뿌리는 전자저울을 이용하여 1g 이상이 되게 가위를 이용하여 절단했다. 뿌리를 막자사발을 이용하여 갈은 후 10ml의 멸균수를 넣었다. 마이크로 피펫으로 막자사발에 있던 1ml의 액체를 추출하여 여과한 후 미리 준비된 멸균수 9ml이 들어있는 테스트 튜브에 넣어, 희석법을 이용하여 10^{-10} 의 비율까지 희석하였다. 10^{-10} 비율 상태로 희석한 최종 희석액을 $300\mu\text{L}$ 씩 추출하여 TSA배지에서 28°C 에서 48시간 배양 후 잘 성장한 세포들을 다시 TSA배지에 옮겨 생육시켰다. 최종 57개의 세균 계통이 분리되었고, 분리된 세균은 ependorf tube에 글리세롤 (1) : TSB(1)의 비율로 섞인 후 -80°C 에서 사용되기 전까지 보관하였다. 분리된 세균들은 항균효과를 확인하기 위하여 근권에서 분리된 세균들을

PDA배지가 채워져 있는 페트리디쉬 반쪽의 가운데 부분에 옮겼고 반대편에는 PDA배지에서 자라고 있는 병원균의 끝 부분에서 병원균 균사체(직경 5mm)를 절취하여 세균이 옮겨진 배지의 나머지 반쪽 가운데 부분에 옮겼다. 세균들이 병원균들에 대한 항균작용 확인은 4가지 병원균(*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. orbiculare*)을 대상으로 진행되었다. 28℃에서 7일간 세균들과 병원균들을 배양 후 각각 병원균들의 균사 생장 억제 정도를 측정 한 후 식물병원균에 대해 강한 항균 작용을 보이는 세균 *P. putida*, *M. luteus* 를 선발하였다(전, 2005). 길항근권세균 처리에 의한 식물 병에 대한 전신적 유도저항성 실험에 사용하기 위해서 선발된 세균 *P. putida*, *M. luteus* 를 Tryptic soy agar (TSA) 배지에서 28℃에서 48시간 동안 배양하였다.



1-2. 오이식물체에서 ISR의 유도

오이종자(*Cucumis sativus* L. cv. Eun Sung)들은 10%의 펄라이트(Parat[®] Sam Son, Korea)가 함유된 상토(Choroc Nala[®] Bokyung Nongsang, Korea)를 플라스틱 트레이(72 holes, diameter 4cm)에 채우고 파종하였고, 주간 28℃, 야간 25℃로 유지되는 생육상에서 재배하였다. 각각의 *P. putida*, *M. luteus* 세균들의 농도는 Park 과 Kleopfer(2000)가 제시한 방법에 따라서 1.0×10^7 과 1.0×10^6 colony forming unit(cfu)/ml로 조정하였다. *C. orbiculare* 를 접종하기 7일전에 각기 다른 두 농도(1.0×10^7 과 1.0×10^6 cfu/ml)를 갖는 각각의 세균 현탁액 30ml씩을 오이 식물체마다 토양관주를 하였다. 부정적 비교구에는 세균 현탁액 대신에 증류수를 오이 식물체에 관주하였다.

1-3. 오이식물체에 탄저병균의 접종 및 관찰

탄저병균 *C. orbiculare* 포자 현탁액(2.5×10^5 conidia/ml)은 세균 현탁액 처리 후 7일째에 지상부의 오이 잎에 스프레이를 이용하여 분무하였다. 병원균 포자 현탁액을 접종한 식물체들은 습도가 100%로 유지되는 Humid chamber 에서 24시간 동안 두었고 이후에 습도가 60%로 유지되고 주간 온도 28℃, 야간 온도 25℃ 인 온실로 옮겼다.

감염구조의 관찰은 형광현미경(Olympus)을 이용하였다. 접종된 오이 식물체의 잎은 병원균 접종 3일 그리고 5일 후에 떼어냈다. 떼어낸 잎 조각들은 Jeun(2000)이 제시한 방법에 따라 염색하였다. 잎들은 cork borer(diameter 9mm)를 이용하여 잘랐고, 0.05M phosphate buffer(pH 7.2)로 제조된 2% glutaraldehyde에 2시간 동안 고정하였다. 고정 후 잎 조각을 10분씩 3회 phosphate buffer에 세척하였다. callose 형성과 같은 식물의 방어반응을 관찰하기 위하여, 잎 조각들을 0.005% aniline blue(W/V)에 20분 동안 침지 염색하였고, 다시 10분씩 3회 phosphate buffer에 세척하였다. 병원균 구조의 관찰을 위해서 잎 조각들을 0.02% Uvitex 2B(W/V)(Diethanol)에 20분 동안 침지 염색하였다. 잎 조각들을 꺼내어 10분씩 3회 phosphate buffer에 세척한 후 슬라이드 글라스 위에 놓고 그 위로 50% glycerin을 올려준 후 커버글라스로 덮었다. 침입부위에서 탄저병균의 감염구조는 BP 400-440, FT 460, LP470로 조정된 필터 조합이 갖추어진 형광현미경(Olympus)을 이용하여 관찰하였다. 탄저병균 *C. orbiculare* 의 발아한 포자수, 부착기수 그리고 부착기의 영향에 의해 스스로 형광을 띠는 식물세포들을 무처리 식물체와 두 미생물(*P. putida*, *M. luteus*)을 전처리 했던 식물체들의 잎 표면에서 각각의 개수를 세었다. 침입부위에서 부착기형성과 스스로 형광을 띠는 세포 비율을 3번의 반복실험에

서 각 4식물체로부터 절취한 4개 잎 조각에서 집계한 자료로부터 산출하였다.

1-4. 길항근권세균의 처리에 의한 유도저항성의 자료 분석

접종된 잎에서 병원균의 발아율, 부착기 형성을, 그리고 형광을 띠는 식물 세포들은 무처리 식물체와 미생물을 전처리했던 식물체간을 t-test($p=0.01$ and 0.005) 를 이용하여 비교하였다.

2. 호접란 식물체

2-1. 호접란 무름병균과 길항근권세균의 배양

호접란 재배 농가로부터 무름병으로 추정되는 병든 호접란에서 병원균을 분리하였다. 병에 감염된 호접란의 감염부위를 $1 \times 3\text{cm}$ 크기로 잘라 1% 차아염소산나트륨(NaClO)에 1분간, 70% 에탄올에 3분간 표면살균한 후 멸균수로 1분간 3회씩 세척하였다. 2% Water agar배지에 살균된 식물 조직을 넣고 28°C 에서 배양한 후 자라나는 미생물을 PDA 및 TSA배지에 각각 올려놓아 25°C 에서 배양하였고, PLLA이라 명명하였다. 분리한 PLLA를 을 Tryptic soy agar (TSA) 배지에서 28°C 에서 48시간 동안 배양한 후 균주 동정을 위해 배양시킨 PLLA를 전남대학교 식물 병리학 실험실로 보내어 동정을 의뢰하였다. 제주에서 선발된 *P. putida*, *M. luteus* (전. 2005) 그리고 *Pseudomonas sp.* (TRH422-1) 을 Tryptic soy agar (TSA)배지에서 28°C 에서 48시간 동안 배양하였다.

2-2. 길항근권세균의 직접적 항균효과 검정 및 전신적 저항성 유도

호접란 식물체에서 병원균 PLLA에 대한 길항근권세균의 직접적인 항균효과를 확인하기 위하여 *in vitro* 상에서 직접적인 항균작용을 보였던 길항근권세균 *Pseudomonas sp.* (TRH422-1) (1.0×10^6 cfu/ml) 과 호

접란 식물체에서 분리한 병원균 PLLA(1.0×10^7 cfu/ml)를 3:1, 1:1, 1:3의 비율로 혼합한 후 목재로 된 접종침(길이×직경=65×2mm) 끝을 혼합액에 잠시 담근 후 호접란 각각의 잎 윗면으로 6군데에 일정한 크기의 상처를 내면서 접종하였다. 혼합액을 접종한 호접란 식물체를 습도 100%, 온도 35℃가 유지되는 Humid chamber에서 24시간 동안 두었고 이후에 습도가 60%로 유지되고 주간 온도 28℃, 야간 온도 25℃ 인 온실로 옮겼다. 길항근권세균과 병원균 혼합액 각각을 접종한 후 2일째 되는 날 병반 발생상황을 조사하였고 호접란 식물체의 잎을 관찰하여 병반 직경을 측정하였다.

길항근권세균을 전처리한 호접란에서 호접란 병원균 PLLA에 대한 저항성 유도를 확인하기 위하여 병원균 PLLA를 접종하기 2일전에 길항근권세균 *P. putida* 와 *M. luteus* 를 각각 1.0×10^7 cfu/ml 의 농도로 조정 한 후 호접란 잎의 벌브로부터 약 1cm 지점, 잎 왼쪽에 직경 1cm 가 되도록 주사기를 이용하여 세균 현탁액을 주입하였다. 부정적 비교구에는 세균 현탁액 대신에 멸균수를 주입하였고, 긍정적 비교구에는 세균성 병해에 효과가 있는 것으로 알려진 항생물질인 800ppm 스트렙토마이신을 주입하였다.

2-3. 호접란에 무름병균의 접종

호접란 병원균 PLLA를 1.0×10^6 , 1.0×10^5 , 1.0×10^4 cfu/ml 의 농도로 조정하였다. 병원균의 농도는 Park 과 Kleopper(2000) 가 제시한 방법에 따라서 조정하였다. 멸균한 접종침을 이용하여 식물체의 잎 오른쪽에 호접란 잎의 벌브로부터 차례로 상처를 낸 후 1.0×10^6 , 1.0×10^5 , 1.0×10^4 cfu/ml 농도의 병원균 현탁액(20 μ l)을 상처 위로 dropping 접종하였다. 접종한 호접란을 습도 100%, 온도 35℃가 유지되는 Humid

chamber 에서 24시간 동안 두었고 이후에 습도가 60%로 유지되고 주간 온도 28℃, 야간 온도 25℃ 인 온실로 옮겼다. 병원균 접종 2일후에 호 접란 앞의 접종부위에서 진전된 병반의 면적 을 측정하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 오이 식물체

1-1. 오이 탄저병 발생 정도에 대한 길항근권세균 전처리 효과

병 발생 정도는 *C. orbiculare* 탄저병균을 접종한 후에 무처리 식물체와 두 미생물을 전처리한 오이 식물체의 잎을 관찰하여 측정하였다. 오이 식물체의 생장은 *M. luteus* 는 물론 *P. putida* 를 주입한 후에 향상되었다(data not shown). 병원균 접종 5일 후 부터는 가시적인 병반들이 나타났다. 그러나, 병반의 수는 무처리 식물체와 비교하였을 때 미생물을 전처리한 식물체들의 잎에서 유의적으로 감소하였다. 또한 무처리 식물체의 잎에서 병반의 크기가 두 미생물을 전처리한 식물체의 잎에서의 병반 크기에 비해 더 컸다(Fig. 1). 대체로 두 미생물을 전처리한 식물체에서의 병 발생 정도가 무처리 식물체와 비교하여 더 감소하였고, 두 미생물을 전처리함으로써 식물체에서 저항성이 유도됨을 보였다.

1-2. 잎 표면의 형광현미경적 관찰

저항성 발현은 두 미생물을 전처리한 오이 식물체의 지상부의 잎과 표피 세포층에서 형광현미경을 이용하여 조사하였다. 병원균의 포자는 접종 후 1일째에 식물체의 잎 표면에서 발아하였고 2일째에는 부착기가 형성되기 시작했다(Fig. 2). 병원균 접종 3일후에 전체포자의 약 35%가 무처리 식물체의 잎 표면에서 발아하였고, 전체포자의 약 30%는 부착기를 형성하였다(Fig. 3). 부착기 형성 없이 발아한 포자도 일부 있었다. 멜라닌을 함유하고 있는 대부분 부착기는 검정색(Fig. 2)을 띠고 있고, 반면에 멜라닌이 결핍된 소수 부착기들은 색을 띠지 않았다. aniline blue 는

β -glucans 을 염색하기(Kauss et al., 1989) 때문에, 형광색을 띠는 세포들은 세포벽에 callose 가 형성된 세포로 생각하였다. 식물 표피세포에서의 callose 형성은 무처리 식물체의 잎 조직에서는 많이 발견되지는 않았다(Fig. 2).

병원균 접종 3일 후 무처리 식물체와 두 미생물을 전처리한 식물체간에 포자의 발아율, 부착기 형성을 그리고 식물세포의 callose 형성을에서는 유의적인 차이가 없었고, 감염구조에서도 차이점이 없었다(Fig. 3).

병원균 접종 5일 후 발아율과 부착기 형성은 *M. luteus* 를 1.0×10^7 cfu/ml 로 전처리한 식물체들의 잎에서 약간 감소하였다(Fig. 4). 그러나 낮은 농도로 *M. luteus* 를 전처리한 식물체에는 포자의 발아율에도 부착기 형성에도 영향을 줄 수 없었다(Fig. 3, Fig. 4). 유사하게 *P. putida* 를 전처리한 식물체의 잎을 무처리 식물체와 비교했을 때 발아율과 부착기 형성을에서 차이점은 없었다(Fig. 3, Fig. 4). 그러나 식물 표피세포의 경우 두 미생물을 높은 농도로 전처리한 것은 callose 형성이 향상되는 반면에 낮은 농도에서는 그렇지 못했다(Fig. 3, Fig. 4).



Fig. 1. Induction of systemically induced resistance in cucumber plants against anthracnose disease at 7 days after inoculation with *Colletotrichum orbiculare* (2.5×10^5 conidia/ml). The presented plants were non-treated control (A), pre-inoculated with *Pseudomonas putida* (B) and *Micrococcus luteus* (C) 7 days before the challenge inoculation. The present pictures showed the developed lesions by anthracnose pathogen on the non-treated control plants (A) and the suppression of lesions on the leaves of *P. putida* (B) of *M. luteus* (C) pre-inoculated plants.

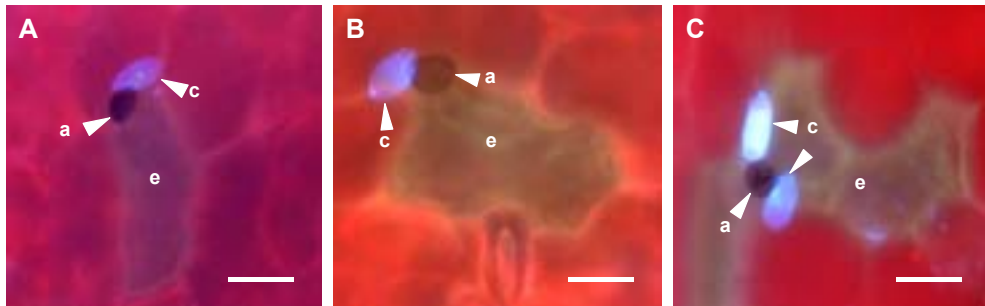


Fig. 2. Fluorescence Microscopical observation of infection structures and resistance response on the leaves of the cucumber plants non-treated (A), pre-inoculated with *Pseudomonas putida* (B) and *Micrococcus luteus* (C) at 5 days after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. Pre-inoculation with both bacterial strains (1.0×10^6 , 1.0×10^7 cfu/ml) were carried out 7 days before the challenge inoculation. The bars = 20 μ m. Abbreviations: a, appressorium; c, conidium; e, epidermal cell.

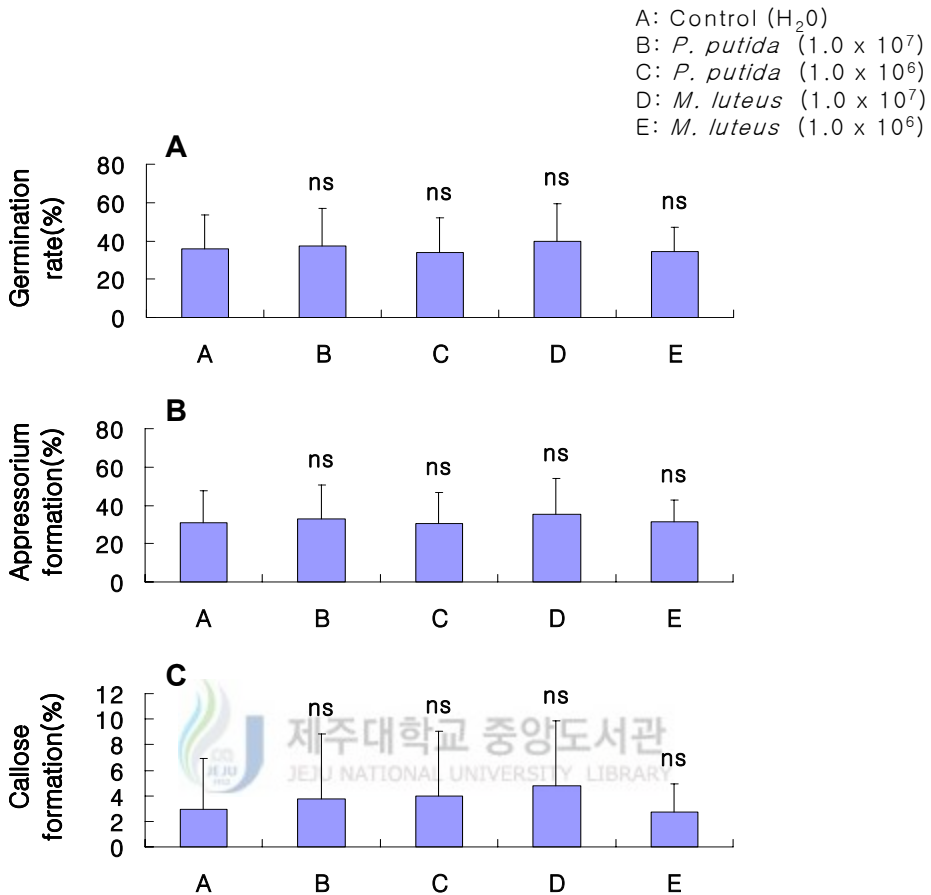


Fig. 3. Frequency of conidial germination (A) and appressorium formation (B) of *Colletotrichum orbiculare* and callose formation of plant cells (C) at the penetration sites on the leaves of cucumber plants non-treated, pre-inoculated with both bacterial strains *Pseudomonas putida* and *Micrococcus luteus* at 3 days after challenge inoculation with the fungal pathogen. The pre-inoculation with both bacterial strains (1.0×10^6 , 1.0×10^7 cfu/ml) were carried out 7 days before the challenge inoculation, respectively. The vertical bars indicate the standard deviation of the 3 separated experiments each containing 4 leaf discs from 4 plants per treatment. * = significant at the 1% probability level; ** = significant at the 0.5% probability level; ns = non-significant.

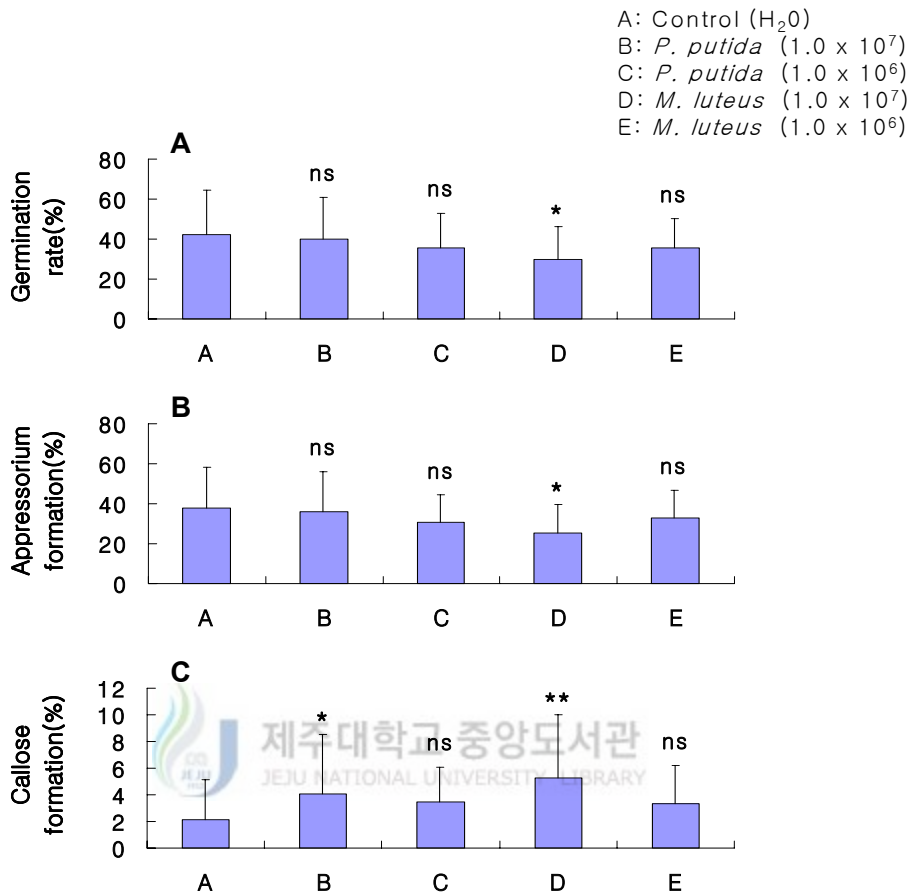


Fig. 4. Frequency of conidial germination (A) and appressorium formation (B) of *Colletotrichum orbiculare* and callose formation of plant cells (C) at the penetration sites on the leaves of cucumber plants non-treated, pre-inoculated with both bacterial strains *Pseudomonas putida* and *Micrococcus luteus* at 5 days after challenge inoculation with the fungal pathogen. The pre-inoculation with both bacterial strains (1.0×10^6 , 1.0×10^7 cfu/ml) were carried out 7 days before the challenge inoculation, respectively. The vertical bars indicate the standard deviation of the 3 separated experiments each containing 4 leaf discs from 4 plants per treatment. * = significant at the 1% probability level; ** = significant at the 0.5% probability level; ns = non-significant.

2. 호접란 식물체

2-1. 호접란 무름병에 대한 길항근권세균의 직접적 항균효과

전남대학교 식물 병리학 실험실에 균동정을 의뢰했던 균주는 염기서열 분석결과 *Pectobacterium chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*)로 동정되었으며, 이 외에도 다른 *Erwinia* 종과 *Enterobacter* 속등과의 유사성을 나타내었다(Fig. 5). 16S rRNA 염기서열 분석 결과는 PLLA는 *P. chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*와 동일균주)와 약 98%의 상동성을 나타내었으며 그 외에 다른 *Erwinia* 종과 *Enterobacter* 속등과도 높은 유사도를 나타내었다. 이들의 염기서열 data를 바탕으로 Phylogenetic tree를 그려본 결과 PLLA는 *P. chrysanthemi* 와 가장 근연종으로 보여지며, 본 균주는 작물에 있어 대표적인 무름병균을 일으키는 병원성 세균으로 보고 된 바 있다(Fig. 5).

길항근권세균 *Pseudomonas* sp.(TRH422-1)현탁액과 호접란 무름병균 *P. chrysanthemi*을 3:1, 1:1, 1:3 의 비율로 섞은 혼합액을 호접란의 잎에 접종한 후 2일째부터 병징의 발달 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 혼합액에 의해 발생한 병반은 길항근권세균 현탁액의 양이 더 많을수록 병반의 크기가 감소하였고, 병원균 현탁액의 양이 더 많을수록 병반의 크기가 증가하였다(Fig. 7). 병원균과 길항근권세균의 혼합액을 접종한 것은 병원균만 접종한 것과 비교하여 모두 병반의 크기가 감소하였다(Fig. 7).

2-2. 길항근권세균 처리에 의한 호접란 무름병에 대한 전신적 저항성 유도

병 발생 정도는 호접란 무름병균 *P. chrysanthemi* 을 접종한 후에 부정적 비교구인 멸균수를 처리한 식물체와 두 길항근권세균(1.0×10^7

cfu/ml) 을 처리한 식물체 그리고 긍정적 비교구인 스트렙토마이신 800ppm 을 처리한 식물체 잎의 병반 면적을 관찰, 측정하였다. 병원균 접종 2일 후에 호접란 식물체의 잎으로부터 병반이 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8). 병반의 면적은 멸균수를 전처리한 식물체와 비교하였을 때 길항근권세균을 전처리한 식물체와 스트렙토마이신을 처리한 식물체들의 잎에서 감소하였으며(Fig. 9) *P. putida* 39.3%, *M. luteus* 41.3% 그리고 스트렙토마이신 45.4% 의 병방제율을 보였다(Table 1). 길항근권세균을 전처리한 식물체와 긍정적 비교구인 스트렙토마이신 800ppm 을 전처리한 식물체를 비교하였을 때 병반의 면적은 차이가 없었다(Fig. 9).



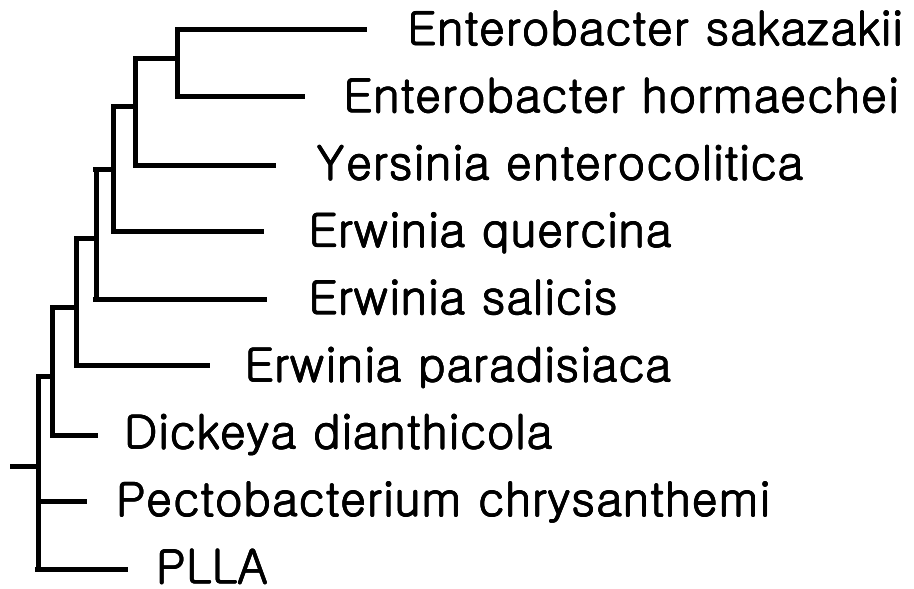


Fig 5. The phylogenetic tree result from 16s rRNA sequence analysis in separated in orchid plants. It was confirmed of most similarity between PLLA and *Pectobacterium chrysanthemi*.



Fig. 6. Direct antifungal to soft rot disease *Pectobacterium chrysanthemi* by PGPR *Pseudomonas* sp.(TRH422-1). It was inoculated to mixture of PGPR and soft rot disease of bacterial suspension that is between PGPR and soft rot disease in the ratio each 3:1(A), 1:1(B), 1:3(C). As a negative control, only soft rot inoculated plants were used(D).

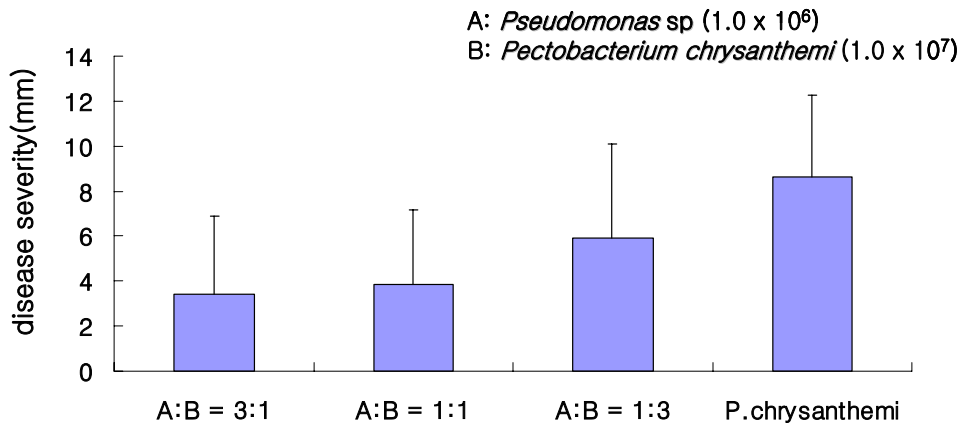


Fig. 7. Disease severity were measured at 2 days after inoculation. The figure shows that disease severity decreased in orchid plants as much high ratio of PGPR *Pseudomonas* sp.(TRH422-1) when it was inoculated to mixture of PGPR *Pseudomonas* sp.(TRH422-1) and soft rot *Pactobacterium chrysanthemii* of bacterial suspension. The vertical bars indicate the standard deviation of the 2 separated experiment 3 plants per treatment.

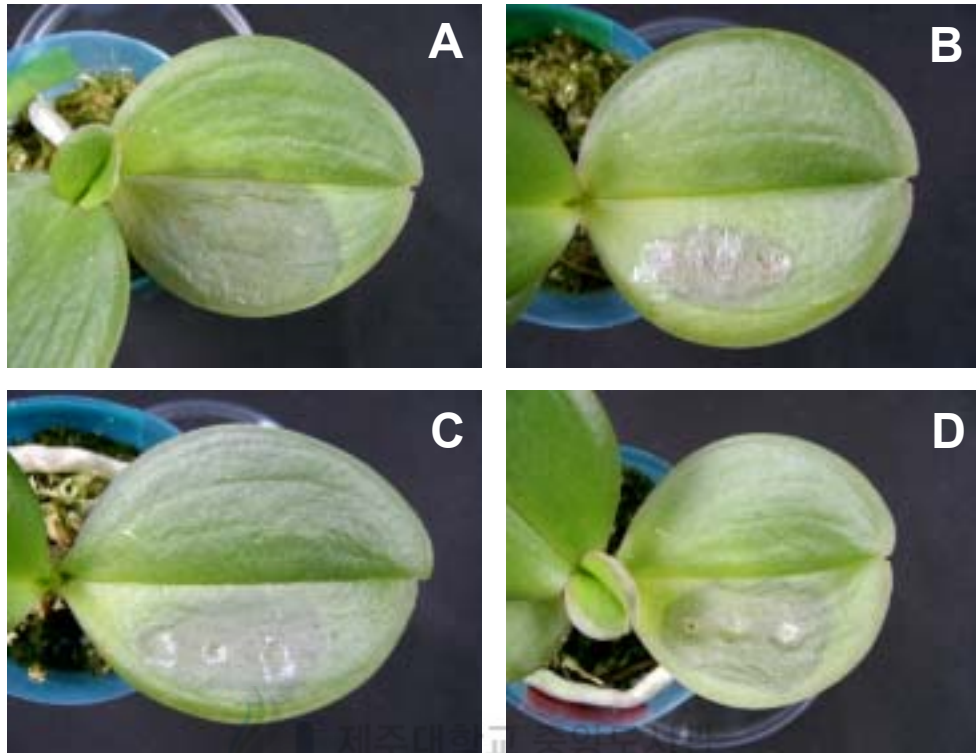


Fig. 8. Induction of systemically induced resistance in orchid plants against soft rot disease at 2 days after inoculation with *Pactobacterium chrysanthemi* (1.0×10^6 , 1.0×10^5 , 1.0×10^4 cfu/ml, sterile water). The presented plants were sterile water (A), *Pseudomonas putida* (B) and *Micrococcus luteus* (C) and streptomycin 800ppm (D) 2 days before the challenge inoculation. The present pictures showed the developed lesions by soft rot pathogen on the sterile water pre-inoculation plants (A) and the suppression of lesions on the leaves of *P. putida* (B) of *M. luteus* (C) or streptomycin 800ppm (D) pre-inoculated plants.

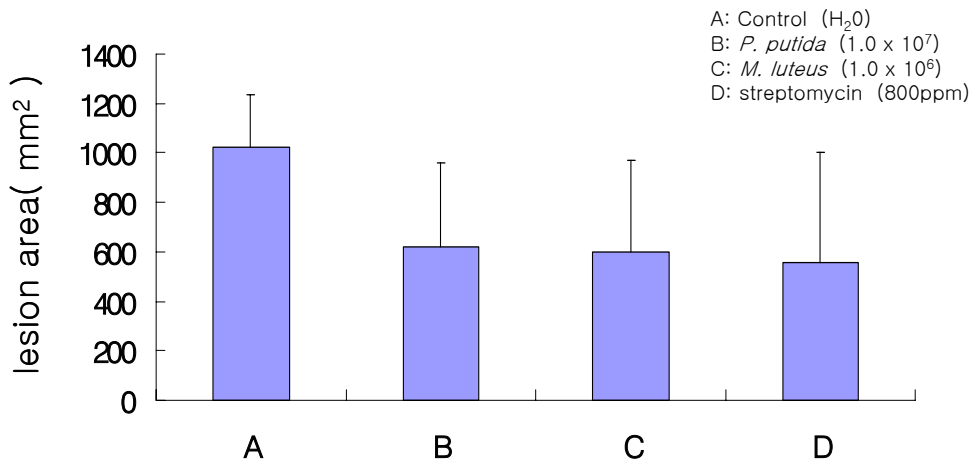
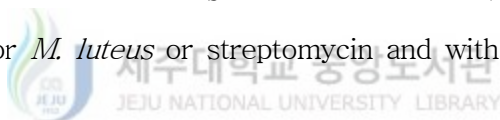


Fig. 9. Reduction of lesion area causing *Pectobacterium chrysanthemi* in the leaves of orchid plants by pre-inoculation with *Pseudomonas putida* (B), *Micrococcus luteus* (C) and streptomycin 800ppm (D). The lesion areas were measured at 2 days after challenge inoculation with *P. chrysanthemi*. The vertical bars indicate the standard deviation of 3 plants per treatment.

Table 1. Protective rate on the leaves of orchid plants pre-inoculated with *Pseudomonas putida* or *Micrococcus luteus* or streptomycin 2 days after challenge inoculation with *Pactobacterium chrysanthemi*.

Treatment	Protection rate (%) ^a
sterile water	-
<i>P. putida</i> (1.0×10^7)	39.3
<i>M. luteus</i> (1.0×10^7)	41.3
streptomycin (800ppm)	45.4

^a Percentage were calculated by the formula, protection (%) = 100 (1 - X / Y) in which X and Y are % of lesion area on the leaves of plants treated with *P. putida* or *M. luteus* or streptomycin and with sterile water.



IV. 고찰

식물 성장 촉진 길항근권세균(PGPR)에 의해 유발되는 저항성기작은 많은 실험실들에서 연구되어지고 있다(Park and Kleopfer, 2000 ; Jeun et al., 2004b). ISR의 기작은 주로 두 가지로 분류할 수 있다. 하나는 ISR의 신호전달체계이고, 다른 하나는 PGPR을 전처리한 식물체에서 저항성 발현의 기작이다.

ISR의 신호전달체계는 일반적으로 식물 병원체 또는 화학물질의 자극으로 인해 유도저항성(SAR)이 나타나는 식물체에서 신호전달에 중요한 역할을 하는(Malamy et al., 1990) salicylic acid(SA) (Van Loon et al., 1998) 의 축적과는 무관하다. Pieterse(1998)는 ethylene 또는 jasmonic acid에 영향을 받지 않는 애기장대 식물에서 PGPR의 전처리 후에 ISR은 유도되지 않는다고 보고하였다. 그것은 SA보다 ethylene 또는 jasmonic acid의 역할이 PGPR에 의한 저항성의 발현을 위해 중요하다는 것을 암시한다.

PGPR에 의한 저항성의 발현은 식물 병원균 또는 화학물질에 의해 유발되는 것과는 다른 것 같다. ISR이 나타나는 식물체들의 경우에 PR-protein 이 축적되지 않는다(Pieterse et al., 1996 ; Van Wees et al., 1997). 반면에 SAR이 나타나는 식물체에서는 항상 PR-protein이 축적된다(Sticher et al., 1997). 더군다나, 유도저항성을 중재하는 몇몇 PGPR 들은 직접적인 항균 활성을 갖고 있다. 우리는 예전 실험에서 *in vitro* 에서 직접적인 항균효과를 보여줬던 두 미생물 TR12-3(*Pseudomonas putida*) 과 TRK2-2(*Micrococcus luteus*)를 선발하였다(Lee et al., 2003). ISR 발현의 또다른 기작은 PGPR에서 철점착증 발생에 의해 쉽게 침탈될

수 있는 철(Fe)과 같은 미량 원소의 경합이다(Maurhofer et al., 1994; Van Loon et al., 1997; 1998).

PGPR인 *P. putida* 와 *M. luteus* 를 전처리한 오이 식물체들에서는 탄저병균인 *Colletotrichum orbiculare* 를 접종하였을 때 병 발생 정도가 감소하였다. 비슷하게 앞서 실험에서 ISR을 유도하는 두 미생물의 효력에 대해서 이미 확인했었다(Jeun et al., 2004a). 그러나 두 미생물을 전처리한 오이 식물체에서 어떻게 저항성 반응이 표현되는지는 확실하게 설명이 안됐었다.

이번 오이 식물체를 이용한 실험에서는 두 길항근권세균에 의해서 ISR이 발현되는 오이식물체의 잎 표면을 형광현미경을 이용하여 저항성 기작을 조사하였다. 병원균 접종 5일 후에 *M. luteus* 를 1.0×10^7 cfu/ml로 전처리한 식물체에서 *C. orbiculare* 포자의 발아율과 부착기 형성율은 약간 감소하였다. 그러나 그것이 방제로는 저항력이 매우 충분하게 발현되지 않기 때문에 본 실험에서 저항성 반응의 주요 논점이라고는 생각되지 않는다. 이와는 대조적으로 병원균의 침입에 저항하는 식물체의 방어반응 중 하나인 callose 형성율(strömberg and Brishammar, 1993; Kovats et al., 1991)은 *M. luteus* 를 1.0×10^7 cfu/ml로 전처리한 식물체들의 앞에서 침입부위에 유의적으로 증가하였다. 비록 *P. putida*를 전처리한 식물체에서 callose 형성율이 유의성있게 증가하지는 않았지만 많이 형성되었다(Fig. 3). 이러한 결과를 통하여 두 길항근권세균은 병원균을 공격하여 병 진전을 감소시키는 callose 형성의 활성을 유도한다는 것을 알 수 있다. *Serratia marcescens* 또는 *Pseudomonas fluorescens* 같은 길항근권세균을 전처리한 오이 식물체에 *C. orbiculare*를 접종했을 때 유사한 결과를 보였었다(Jeun et al., 2004b). 또한 병원균 침입부위로 생성되는 callose는 내생근균인 *Glomus intraradices* 를 전처리함으로써

ISR이 발현된 오이 식물체에서 증가하였다(Lee et al., 2005). 그러나 DL-3-amionbutyric acid (BABA)에 의해 SAR이 발현되는 오이 식물체에서는 탄저병균에 의한 부착기 형성뿐만 아니라 발아율도 크게 감소하였다. 하지만 callose 형성은 증가하지 않았다(Jeun et al., 2004b). 특이하게도 두 길항근권세균들을 1.0×10^6 cfu/ml의 낮은 농도로 전처리하였을 때의 발아율, 부착기 형성을 그리고 callose 형성을 무처리 식물체들과 비교하였을 때 차이가 없었다(Fig. 3 와 Fig. 4). 그것은 두 미생물을 높은 농도로 전처리함으로써 *C. orbiculare*의 침입에 대항하는 식물세포의 활성반응이 유도된다는 것을 암시한다. 두 길항근권세균들이 왜 다른 농도에서는 병원균 감염구조 또는 식물 반응에 영향을 줄 수 없었는지는 명확하게 설명하지 못했다.

호접란 식물체를 이용한 실험에서는 호접란 무름병균 *Pectobacterium chrysanthemi*에 대한 길항근권세균 *Pseudomonas* sp.(TRH422-1)의 직접적인 항균효과와 앞서 실험에서 ISR을 유도하는 길항근권세균인 *P. putida* 와 *M. luteus*의 전처리에 의한 무름병균 *P. chrysanthemi*에 대한 전신적 저항성이 유도되는지 조사하였다.

항생물질이란 미생물에 의해 생성되어 다른 미생물에 독소로 작용하는 물질을 말한다. 지금까지 알려진 대부분의 항생물질은 *Streptomyces* 같은 방선균과 *Penicillium* 같은 일부 균류에 의해 생성되는 물질로 대부분의 세균, 물리큐트, 일부 균류에 대해 독소로 작용한다. 거의 모든 항생물질의 화학구조는 복잡하고 보통 서로 관련이 없다. 식물 병에 사용되는 항생물질은 식물에 의해 제한적으로 흡수되어 이동하는 침투이행성이다. 항생물질은 병원균에 또는 기주에 작용함으로써 식물 병을 방제한다(Agrios. 2005). 길항근권세균 *Pseudomonas* sp.(TRH422-1) 과 *P. santhemii*의 현탁액을 3:1, 1:1, 1:3 의 비율로 혼합한 후 각각의 혼합

액을 접종하였을 때 *Pseudomonas* sp.(TRH422-1)의 현탁액의 비율이 높을수록 호접란 식물체에서 나타나는 병 발생 정도가 감소하였고, 길항근권세균과 혼합하지 않고 병원균으로만 접종하였을 때 다른 처리들과 비교하여 병 발생 정도가 가장 증가하였다. 오이 탄저병(*Colletotrichum orbiculare*) 및 감귤 탄저병(*C.gloeosporioides*)을 길항근권세균인 *Bacillus amyloqueliciens*와 인공배지에서 각각 대치배양 시킨 결과 두 탄저병균의 균사생장이 길항근권세균과 인접부위에서는 더 이상 자라지 않는 것으로 관찰되었다(Jeun et al., 2002). 또한 *B. amyloqueliciens*의 배양액에서 추출한 Lipopolysaccharide가 오이 탄저병균의 부착기 형성을 억제하는 것이 관찰되었다(Min et al., 2000). 이로써 길항근권세균에서 분비하는 Lipopolysaccharide와 같은 물질에 의해 병원균의 생장이 억제되는 것으로 여겨진다(Jeun et al., 2002).

유도저항성은 처음에 병원체에 의한 감염 또는 화학 물질에 의해 생기는 식물체 괴사점 주위에 국한되는데, 이것을 국부적 획득저항성(local acquired resistance)이라고 한다. 예를 들면, 국부적 획득저항성은 과민성 담배 품종에 담배 모자이크 바이러스(TMV)에 의해 생긴 국부 병반 주위 1~2mm 부위에 유도되며, 아마도 다른 기주-병원체 조합에서도 유도될 것이다. 국부적 획득저항성은 이미 존재하는 병반 근처에는 새로운 병반이 생기지 않게 하고 적어도 1차 감염 2~3일 후에 접종이 이루어졌을 때에는 이미 존재하는 국부병반으로부터 더 진전되는 국부병반을 거의 없게 하거나 병반의 크기를 작게 만든다(Agrios, 2005). 길항근권세균 *P. putida* 와 *M. luteus* (1.0×10^7 cfu/ml) 전처리 했던 호접란 식물체는 멸균수를 전처리 했던 호접란 식물체와 비교하여 병반 면적이 감소하였다(Fig. 9). 이를 통해 호접란에 길항근권세균에 의해 저항성이 유도됨을 짐작할 수 있다. 또한 직접적인 항균효과가 있는 스트렙토마이신

을 처리한 호접란에서 발생한 병반크기와 비슷한 것으로 보아 길항근권세균에 의한 호접란 무름병 방제의 가능성을 제시할 수 있다.

요약해서, 오이를 이용한 실험을 통해 탄저병균에 대항하는 ISR의 발현에 중요한 역할을 하는 callose 형성과 같은 식물체의 방어 반응으로 논의되었다. 그러나 ISR의 기작을 설명하기 위해서는 항균물질인 phytoalexin의 생성(Somssich and hahlbrok, 1998), 병관련 단백질(PR-protein)의 축적(Hwang et al., 1997; Jeun 2000), 활성 산소종(reactive oxygen species)의 대사작용을 포함하는 효소의 인식(Lamb and Dixon, 1997)과 같은 다른 저항성 반응들이 연구되어야 할 것이다. 또한 호접란을 이용한 실험을 통해 길항근권세균을 통한 병 방제 가능성을 확인할 수 있었다. 길항근권세균에서 분비되어 병원균의 병 진전을 억제하는데 중요한 역할을 Lipopolysaccharide와 같은 항생물질들에 대한 내용과 실제 포장에 최적으로 적용할 수 있도록 길항근권세균의 도입 방법 등에 대한 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 적 요

길항근권세균 (PGPR : plant growth promoting rhizobacteria)의 전처리에 의한 오이식물체의 탄저병균에 대한 저항성 발현 여부와 호접란 식물체의 잎에서 저항성의 유도과 항균작용을 조사하였다. 길항근권세균은 식물의 근권부위에 존재하며 식물의 생장을 향상시키고 또한 병원균에 대한 직접적인 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다. 오이 식물체에서 감염구조는 형광현미경을 이용하여 오이 탄저병균 *Colletotrichum orbiculare* 를 접종한 오이 잎의 병원균 침입부위를 관찰하였다. 오이 식물체에 길항근권세균 *Pseudomonas putida* 와 *Micrococcus luteus* 현탁액을 미리 관주하였다. 두 길항근권세균을 전처리한 식물체는 오이 탄저병균 *C. orbiculare* 를 접종한 후에 탄저병균에 대해 저항성을 나타냈다. 두 길항근권세균에 의해 나타나는 저항성 기작의 연구를 위해, 감염된 잎 표면을 병원균 접종 후에 각기 다른 시일에서 관찰하였다. 접종 3일 후에는 두 길항근권세균을 전처리한 식물체와 무처리 식물체에서 callose의 형성뿐만 아니라 *C. orbiculare* 포자의 발아와 부착기 형성에도 차이점이 없었다. 그러나 접종 5일 후에는 *M. luteus* 를 1.0×10^7 cfu/ml 의 농도로 전처리한 오이 식물체의 잎에서 포자의 발아와 부착기 형성은 유의적으로 감소하였다. 더군다나 침입부위에서 식물세포의 callose 형성을 두드러지게 증가하였다. 이와 대조적으로, *M. luteus* 를 1.0×10^6 cfu/ml 의 농도로 전처리한 식물체에서는 식물 방어반응이 없었다. 비슷하게 *P. putida* 를 전처리 하였을 때, 낮은 농도에서는 식물체 저항성이 나타나지 않았고, 반면에 높은 농도로 처리했을 때는 callose형성이 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 연구결과는 저항성 기작은 길항근권세균 현탁액의 전처

리 농도에 의해서 다르게 나타날 수 있다는 것을 시사한다.

반면에, 무름병 증상을 보이는 호접란 식물로부터 세균 colony를 분리하였다. 이 세균은 호접란에 무름병을 유발하는 *Pectobacterium chrysanthemi*로 동정되었고, 호접란 무름병에 대한 효과를 갖는 PGPR 계통을 찾기 위해 *P. putida*, *M. luteus*, *Pseudomonas* sp.를 *P. chrysanthemi*와 혼합하였다. *Pseudomonas* sp.(TRH422-1)과 혼합한 것을 호접란 식물에 접종한 후에 병반 면적이 감소함을 보였다. 호접란 식물체에서는 길항근권세균 TRH422-1 과 호접란 무름병균의 현탁액을 1:3, 1:1, 3:1의 비율로 혼합하여 접종하였을 때 길항근권세균 TRH422-1의 비율이 높을수록 호접란 식물체에서 나타나는 병 발생 정도는 감소하였다. 호접란에서의 길항근권세균에 의한 병원균에 대한 저항성의 유도는 길항근권세균 *P. putida* 와 *M. luteus* 을 전처리 했던 호접란 식물체는 살균수를 전처리했던 호접란 식물체와 비교하여 병반 면적은 감소되었다. 더군다나 두 길항근권세균에 의한 저항성 정도는 항균효과가 있는 살균제 스트렙토마이신의 저항성 정도와 비슷하였다. 이러한 결과를 통하여 길항근권세균은 여러 작물과 식물 병에 대해서 광범위하게 효과가 있을 것으로 생각된다.

VI. 참 고 문 헌

- Agrios, G. N. 2005. Systemic Acquired Resistance. P.237-242, and Antibiotics. P343-347. in: *Plant Pathology 5th ed. Elsevier Academic press. San Diego, California, USA.*
- Hwang, K. H., J. Y. Sunwoo, Y. J. Kim, and B. S. Kim. 1997. Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol. and Mol. Plants Pathol.* 51: 305-322.
- 전영수. 2005. 제주에서 분리한 길항근권세균 MRL3-1의 오이 탄저병 및 토마토 역병에 대한 전신적 유도저항성. 제주대학교 석사학위논문.
- Jeun, Y. C. 2000. Immunolocalization of PR-protein P14 in leaves of tomato plants exhibiting systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* induced by pretreatment with 3-aminobutyric acid and preinoculation with *Tobacco necrosis virus*. *J. Plant Disease and Protec.* 107: 352-367.
- Jeun, Y. C., J. Sigris, and H. Buchenauer. 2000. Biochemical and cytological studies on mechanisms of systemically induced resistance in tomato plants against *Phytophthora infestans*. *J. Phytopathol.* 148: 129-140.
- Jeun, Y. C. 2002. Signal pathway and resistance expression of systemic induced resistance. *J. Subtropic Agri. Biotech., Cheju Nat'l Univ.* 18(2):43-51.

- Jeun, Y. C., Y. J. Lee, and Y. S. Bae. 2004a. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in cucumber plants against anthracnose disease caused by *Colletotrichum orbiculare*. *Kor. J. Plant Pathol.* 20: 172-176.
- Jeun, Y. C., K. S. Park, C. H. Kim, W. D. Fowler, and J. W. Kloepper. 2004b. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control* 29: 34-42.
- Kauss, H. 1989. Fluorometric measurement of callose and other 1,3- β -glycans. Pp. 127-137. in: Modern methods of plant analysis. New Series, Volume 10, Plant Fibers. H. F. Linskens and J. F. Jackson, eds. Springer-Verlag.
- 김홍열. 1999. 호접란 수출 활성화 방안 모색을 위한 심포지움 : 호접란 대일 수출을 위한 고품질 생산기술. 경상남도 농업기술원 화훼시험장. P. 17-40.
- 고두배. 2003. 호접란의 고랭지 저온 및 생장조절제 처리에 따른 개화반응. 제주대학교 석사학위논문.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria, *Nature* 286: 885-886.
- Kovats, K., A. Binder, and H. R. Hohl. 1991. Cytology of induced systemic resistance of tomato to *Phytophthora infestans*. *Planta* 183: 491-496.
- Lamb, C. and R. A. Dixon. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Pl. Physiol. Mol. Biol.* 48:

251-275.

Lee, C. S., K. D. Kim, J. W. Hyun, and Y. C. Jeun. 2003. Isolation of rhizobacteria in Jeju island showing anti-fungal effect against fungal plant pathogens. *Mycobiology* 31: 251-254.

Lee, C. S., 2005. Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathol. J.* 21(3):237-243.

Malamy, J., J. Carr, D. Klessig, and I. Raskin. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.

Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, J.-P. Mraux, and G. Defago. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA*-gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84: 139-146.

Min, J. Y., Park, K. S. and Kim, C. H. 2000. Antifungal activity of crude extracellular polysaccharides(EPS) extracted from *Burkholderia cepacia* strain 923-87 on anthracnose of pepper fruit and cucumber plants. *The Plant Pathology Journal*. Vol. 16, 348.

농촌진흥청. 2001a. 고랭지화훼재배기술. 농경과 원예 P. 380-395.

농촌진흥청. 2001b. 양란재배. 농촌지도자중앙연합회. P. 87-130.

- Park, K. S., and J. W. Kloepper. 2000. Activation of PR-la promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biological Control* 18: 2-9.
- Pieterse, C. M. J., S. C. M. Van Wees, E. Hoffland, J. A. Van Pelt, and L. C. Van Loon. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8: 1225-1237
- Pieterse, C. M. J., S. C. M. Van Wees, J. A. Van Pelt, M. Knoerter, R. Laan, H. Gerrits, P. J. Weisbeek, and L. C. Van Loon. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1571-1580.
- Somssich, I. E. and K. Hahlbrock. 1998. Pathogen defense in plants—a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3: 86-90.
- Sticher, L., B. Mauch-Mani, and J. P. Métraux. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- Strömberg, A. and S. Brishammar. 1993. A histological evaluation of induced resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato leaves. *J. Phytopathol.* 137: 15-25.
- Van Loon, L. C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 753-765.
- Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, and C. M. J. Pieterse. 1998.

Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.

Van Wees, S. C. M., C. M. J. Pieterse, A. Trijssenaar, Y. A. M. Van't Westende, F. Gartog, and L. C. Van Loon. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* 6: 716-724.



감사의 글

드디어 석사학위 논문을 완성하게 되었습니다. 2년 반이라는 대학원 생활은 저에게는 새로운 것에 대한 도전이었고, 많은 것을 얻게 해준 소중한 시간이었습니다.

본 논문이 완성되기까지 모든 면에서 부족하기만한 제자를 위해 아낌없는 지도와 격려를 해주신 전용철 지도교수님께 깊은 감사를 드립니다. “자신을 너무 낮게 생각하지 마라. 모든 사람에게는 항상 세번의 기회가 찾아온다. 항상 준비되어 있어라.” 라는 교수님 말씀을 마음 깊이 새기어 열심히 생활하겠습니다. 바쁘신 중에도 논문 심사를 맡아주시고 많은 관심으로 부족한 논문을 보충해주신 송창길 교수님, 소인섭 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 농학도로써 기본적인 소양을 갖게 해주셨던 조남기 명예교수님, 고영우 명예교수님, 강영길 교수님, 김동순 교수님, 현해남 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

그리고 대학원 석사과정을 하면서 많은 조언과 관심으로 도움을 주셨던 고미라 선생님, 이충선 선생님, 박성준 선생님, 김상현 선생님, 김형철, 강소영, 송진영, 강정환, 우성배, 서연동 을 비롯한 많은 대학원 선후배님들께 감사를 드립니다. 특히, 대학원 생활 동안 함께 지내면서 항상 같이 웃어주고, 고생해준 실험실 동료들인 용준이, 효정이, 혜영이, 명희누나, 진영이, 소연이에게 더 잘해주지 못한 미안함을 덧붙여 감사의 마음을 전합니다. 또한 제가 힘들어할 때 항상 따뜻한 말과 바른 말로 격려해 주신 고동환 선생님, 원종이형, 만수형 그리고 많은 다른 선후배, 친구들에게도 이 지면을 빌어 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 제가 학업을 무사히 마칠 수 있도록, 믿고 지켜봐주시고 이끌어주신 저희 아버님, 어머님, 큰형님, 형수님, 작은형님께 그 어떤 것보다 더 큰 감사의 마음과 사랑을 담아 이 논문을 바칩니다.