

석 사 학 위 논 문

제주에서 분리한 길항근권세균 MRL3-1의
오이 탄저병 및 토마토 역병에 대한
전신적 유도저항성



농 학 과

전 영 수

2005년 6월

제주에서 분리한 길항근권세균 MRL3-1의 오이 탄저병 및 토마토 역병에 대한 전신적 유도저항성

지도교수 전 용 철

전 영 수

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2005년 6월

전영수의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____

위 원 _____

위 원 _____

제주대학교 대학원

2005년 6월

Induced Systemic Resistance by Bacterial Isolate
MRL3-1 to Cucumber Anthracnose and
Tomato Late Blight

Young-Su Jeon

(Supervised by Professor Yong-Chull Jeon)



A these submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Agriculture

Department of Agriculture
Graduate School
Cheju National University

2005. 6. .

목 차

I. SUMMARY	1
II. 서 론	3
III. 재료 및 방법	6
1. 제주도 지역 길항근권세균 조사	6
가. 길항근권세균의 채집 및 분리	6
나. 분리된 세균계통들의 항균효과 검정	6
2. MRL3-1 균주의 유도저항성 실험	7
가. 실험 재배 식물	7
나. 길항근권세균 MRL3-1의 배양 및 처리	8
다. 탄저병과 역병균의 배양 및 접종	8
라. MRL3-1의 유도저항성 평가	9
IV. 결 과	10
1. 제주도 지역 길항근권세균 조사	10
2. MRL3-1 균주의 유도저항성 실험	14
V. 고 찰	22
인용문헌	25

I. SUMMARY

To select active bacterial strains to control plant diseases, 57 bacterial strains were isolated from the rhizosphere of the plants growing in various areas as coast, middle and top of Halla Mountain in Jeju Island. Anti-fungal effect of isolated bacterial strains was tested *in vitro* by incubating in potato dextrose agar with isolates of four fungal plant pathogens *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Collectotrichum gloeosporioides* and *C. orbiculare*, respectively. Thirty-four bacterial strains inhibited the hyphal growth of the plant pathogens, from which 17 strains inhibited one of the tested fungi, 10 strains two fungi, six strains three and a strain TRL2-3 inhibited all of the tested fungi. Some bacterial strains could inhibit weakly the hyphal growth of the plant pathogens, whereas some did very strongly with apparent inhibition zone between the plant pathogens and bacterial strains indicating the unfavorable condition for hyphal growth. Although there was no apparent inhibition zone, some bacterial strains showed a strong suppression of hyphal growth of plant pathogens. Especially, the inhibition by TRL2-3 was remarkably strong in all cases of the tested plant pathogens in this study that could be a possible candidate for biological control of various plant diseases. Bacterial isolate MRL3-1 showing antifungal activity *in vitro* test against plant pathogens was tested for the ability of resistance induction by bioassay. The pre-treatment with MRL3-1 at the concentration 1.0×10^8 cfu/ml in the rhizosphere of cucumber plants could induce systemic resistance in the aerial part of cucumber plants against anthracnose caused by *Collectotrichum orbiculare*. The lower concentration of the bacterial isolate resulted in the decrease of the ability inducing systemic resistance after challenge inoculation with *C. orbiculare*. Similarly the pre-treatment with

MRL3-1 could trigger the systemic resistance against late blight disease caused by *Phytophthora infestanse* in tomato plants. As a positive control the treatment with DL-3-aminobutyric acid caused a remarkable reduction of disease severity whereas the lesions on the leaves of untreated plants developed apparently after the fungal inoculation. From these results it was discussed that disease control using the bacterial isolate inducing systemic resistance in the field where chemical application is forbid.



II. 서 론

농약은 병해충에 의한 농작물 피해를 감소시키고 수량을 증대하는데 많은 기여를 하여왔다. 그러나 지속적인 농약의 사용은 식물 병원체로 하여금 약제 저항성을 유발하도록 하여 농약의 효과를 감소시키고, 생태계의 파괴 및 농산물에 대한 농약의 잔류와 같은 많은 문제점들을 유발하고 있다. 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 농약을 줄이거나 사용하지 않는 친환경적 식물병 방제에 관한 요구가 증대하게 되었고, 환경에 대한 부작용을 억제하는 동시에 농산물의 안전성과 품질을 향상시킬 수 있는 방안에 대한 연구가 지속되었다. 최근 그의 한 방법으로 식물체의 병에 대한 저항성을 이용한 식물병 방제에 대하여 관심이 높아지고 있다. 식물이 병원균의 침입 시 식물체내에서 병원균에 대항 하는 능력이 생성되는데 이것을 유도저항성이라고 하며, 이러한 유도저항성을 이용한 식물병 방제는, 저항성이 유도된 식물은 오랜 기간 진화를 통해 획득한 식물의 자체 방어 기작이 활성화됨으로써 병원체에는 직접적인 영향을 미치지 않고 식물의 생리적 변화를 통한 저항성이 발현된다. 식물병 방제에 있어서 저항성이 유도된 식물의 이용은 농약을 이용한 식물병 방제에서와는 달리 새로운 약제저항성 병원체가 선발될 위험이 전혀 없으며, 환경친화적이며 농약의 대체 수단으로 이용되어 친환경적 작물재배에 대한 관심이 증가되는 상황에서 매우 유용한 방법의 하나가 될 것이다.

유도저항성은 Systemic Acquires Resistance(SAR)과 Induced Systemic Resistance(ISR)로 정의되며 식물체가 병원체에 대해 전신적 유도저항성을 나타내게 하는 것은 비슷하지만 그 차이점을 살펴보면 다음과 같다.

SAR은 병원체, 비병원체, 또는 특정 생화학적 물질과의 접촉에 의하여 식물체에 저항성이 유도되어 병원체에 대한 방어기작을 나타내며, 유도저항성의 신호전달 과정에서 생화학물질인 salicylic acid(SA)가 생성되는데 반하여, ISR은 토양근권에

존재하는 길항근권세균(plant growth promoting rhizobacteria: PGPR)을 토양에 처리할 경우 뿌리에 정착하여 저항성 기작을 나타내며, SAR과는 달리 병원균에 대하여 직접적인 항균효과를 가지며 식물생장을 촉진시키고(Jeun et al. 2001), 유도저항성의 신호전달과정에서 식물호르몬인 에틸렌, 야스몬산이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(van Loon et al. 1998a). PGPR에 의한 처리는 식물자체 방어기작에 의존하게 되며, 식물의 지상부의 전신저항성의 표현결과로 나타난다(van Loon et al. 1998a). 더욱이 PGPR에 의한 저항성의 표현은 식물병원체와 직접 접촉되는 것을 필요로 하지 않고 PGPR은 식물이 자라는 토양층에서 잘 자란다.

ISR은 SA의 축적 없이도 식물체에서 유도되어지며, SA는 병원체나 특정의 유도체에 의해 유도되는 SAR이 발현되기 위해서 반드시 필요하다(Pieterse et al. 1996). 형질전환식물을 이용함으로써 ISR의 신호전달 기작이 SAR의 신호전달 기작과 다르다는 것이 알려졌다. 이러한 사실은 애기장대에서 PGPR을 미리 접종함으로써 jasmonic acid와 에틸렌이 저항성 신호전달기작과 연관될 수 있다고 입증되었다. 또한 저항성의 표현은 SAR과 ISR사이에서 다르게 나타난다(Sticher et al. 1997; van Loon et al. 1998a). 예를 들면 병원성 관련단백질(pathogenesis related proteins: PR-proteins)을 많은 식물체들에서 SAR의 발현을 위해 중요한 저항성 요인 중의 하나로 알려져 있으나(van Loon et al. 1998a), 반면에 ISR을 발현하는 애기장대에서는 PR-protein이 발견되지 않는다.

또한 ISR의 특징을 살펴보면, 저항성품종과는 다르게 병원체에 대한 저항성이 유전되지 않으며, 방제 대상 병원체에 대한 적용범위가 매우 넓다는 것이다. 진균, 세균, 바이러스에 적용할 수 있으며, 특히 바이러스의 경우는 현재까지 방제용 약제 개발이 되지 않은 상황으로 바이러스에 적용할 수 있는 PGPR을 발견하는 것은 매우 유용하리라 생각된다. 또한 식물에서의 저항성이 유도되기까지의 시간과 저항성을 나타낼 수 있는 기간이 한정적이라는 특징을 가지고 있다. 이상으로 부터 PGPR을 이용한 ISR의 유도는 식물병 방제에 매우 효과적 일 것이라 판단되어 본 실험을 수행하게 되었다.

지금까지 항균 능력을 보이는 토양근권세균 계통들이 보고되었지만, 제주도에서는 매우 적었다(전, 2002). 따라서 본 실험은 다양한 식생을 가진 제주도의 한라산을 중심으로 해안과 중산간 지역의 식물의 근권으로부터 길항세균의 분리하고 세균 계통들의 식물병원균에 대한 직접적인 항균효과를 확인하고자 하였다. 또한 효과적인 ISR 유도체의 선발을 위한 식물체에 접종 실험을 통한 병 방제효율을 확인하고자 하였다. 접종 실험에 사용된 길항세균은 예비시험결과 오이와 토마토 식물체에서 항균효과가 높게 나타난 MRL3-1을 식물체에 접종하여 식물 병 방제효율을 확인하였다.



Ⅲ. 재료 및 방법

1. 제주도 지역 길항근권세균 조사

가. 길항근권세균의 채집 및 분리

제주도 한라산을 중심으로 해안지역, 중산간 지역, 산간지역에서 자생하고 있는 뿌리를 포함한 22개 식물체를 2003년 6월에 채집하였고 채집한 식물체는 바로 지퍼백에 넣어 상온에서 보관하였다. 근권 세균을 분리하기 위하여 식물의 뿌리를 수돗물로 깨끗이 씻었다. 채집한 식물의 뿌리는 전자저울을 이용 1 g 이상이 되게 가위를 이용하여 절단했다. 뿌리를 막자사발을 이용 같은 후 10 ml의 멸균수를 넣었다. 마이크로 피펫으로 막자사발에 있던 1 ml의 액체를 추출하여 여과 한 후 미리 준비된 멸균수 9 ml이 들어있는 테스트 튜브에 넣어, 희석법을 이용하여 10^{-10} 의 비율까지 희석하였다. 10^{-10} 비율 상태로 희석한 최종 희석액을 300 μ l 씩 추출하여 TSA 배지에서 28°C의 온도로 2일간 배양한 후, 세균 군체들은 눈에 보이는 차이에 따라 구분하였다. Streaking 방법으로 군체들을 TSA 배지 상에서 다시 분리하여, 28°C에서 2일간 배양 후 잘 성장한 세포들을 다시 TSA 배지에 옮겨 생육시켰다. 최종 57 개의 세균 계통이 분리되었고, 분리된 세균은 ependorf tube에 글리세롤 (1) : TSB (1)의 비율로 섞인 후 -80 °C에서 사용되기 전까지 보관하였다.

나. 분리된 세균계통들의 항균효과 검증

세균계통들의 병원균들에 대한 항균효과를 확인하기 위하여 근권에서 분리된 세균들을 PDA 배지가 채워져 있는 페트리디쉬 반쪽의 가운데 부분에 옮겼고

반대편에는 PDA 배지에서 자라고 있는 병원균의 끝 부분에서 병원균 균사체(지름 5 mm)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°C에서 7일간 세균들과 병원균들을 배양 후 각각 병원균들의 균사 성장 억제의 정도를 다음과 같은 기준으로 측정하여 기록하였다:

+, 약하게 억제; ++, 강하게 억제; +++, 매우 강하게 억제

실험에 사용된 식물병원균에 대하여 항균작용을 보이는 세균 계통에 의한 균사 생장의 억제율은 다음의 방법에 의하여 계산되었다:

억제율 (%) = [1 - (미생물과 가까운 쪽의 균사 성장 길이 / 미생물과 반대쪽의 균사 성장길이)] × 100

2. MRL3-1 균주의 유도저항성 실험



가. 실험 식물 재배

오이(*Cucumis sativus* L. cv. Eun Sung) 종자를 10%의 펠라이트(Parat[®] Sam Son, Korea)가 함유된 상토(Choroc Nala[®], Bokyung Nongsang, Korea)를 플라스틱 트레이(72 holes, Ø 4 cm)에 채우고 파종하였으며, 생육온도가 주간 28°C, 야간 25°C 가 유지되는 온실에서, 매일 30 ml의 수분을 공급하였고, 첫 번째 본엽이 나올 때까지 생육시켰다.

토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Super Dotaernag) 종자를 살균한 상토와 모래를 혼합(상토 : 모래, 3 ; 1, v / v)하여 플라스틱 포트(Ø 8 cm)에 채우고 파종하였다. 생육온도가 주간 25°C, 야간 20°C 가 유지되는 온실에서 생육하여 4엽기까지 자란 식물체를 실험균주 처리시 사용하였다.

나. 길항근권세균 MRL3-1의 배양 및 처리

항균효과를 보이는 근권에서 분리된 세균 계통 MRL3-1을 식물체에 있어서 ISR 유도 여부를 확인하고자 본 실험에 사용하였다. 세균은 tryptic soy agar 배지에서 28°C에서 24 시간 동안 생육되었다. 세균의 농도는 Park 과 Kloepper (2000)가 제시한 방법에 의하여 1.0×10^8 colony forming unit (cfu)/ml로 조정되었다. *C. orbiculare*와 *P. infestans*를 접종하기 7일전에 세균 현탁액 30 ml을 오이와 토마토에 각각 관주하였다. 각각의 실험에 이용된 식물체는 토마토의 경우 3반복(반복당 3주), 오이의 경우 3반복(반복당 6주)을 이용하였다. 부정적 비교구 (negative control)에는 세균 현탁액 대신 물을 관주하였다. 병원균을 접종하기 3일전에 SAR을 식물에 유도하고자 1 mM 농도의 DL-3-amino butyric acid (BABA) 30 ml을 상토에 관주 하였다. BABA가 처리된 식물체는 긍정적 비교구 (positive control)로 사용되었다.



다. 탄저병과 역병균의 배양 및 접종

오이 탄저병균이 *C. orbiculare*는 green been agar 배지에서 5일 동안 생육되었다. 10 ml의 증류수를 탄저병균이 자라고 있는 배지에 분고 브러쉬를 이용하여 탄저병균 포자들을 수거하여, 포자의 농도를 1.0×10^5 conidia/ml로 조정하였다. 오이 잎 표면에 탄저병균 포자들의 정착력을 향상시키기 위하여 포자현탁액에 tween 20을 100 μ l/L 비율로 첨가하여 사용하였다.

P. infestans (Mont.) de Bary는 유주자낭 형성을 위하여 V8 agar 배지에서 7일 동안 15°C에서 생육되었다. 유주자낭에서 유주자가 유출되도록 하기 위해 10 ml의 멸균수를 역병균 균사가 자란 배지에 부었다. 균사들이 완전히 멸균수에 잠기도록 하기 위하여 약수저를 이용 균사 사이의 공기를 제거하였다. 즉시 4°C 냉장고에 배지를 유주자가 유출될 때 까지 두었다. 유주자를 포함한 역병균 현탁액은 세 번 접은 cheesecloth를 이용하여 균사조각들을 걸렀으며 토마토에 접종원으로 사용하기

위하여 병원균 현탁액의 농도를 1.5×10^5 zoospores/ml로 조정하였다.

C. orbiculare 포자 현탁액과 유주자를 포함하고 있는 *P. infestans* 현탁액은 MRL3-1 미생물 현탁액 처리 후 5 일째 되는 날 지상부의 식물체 잎에 스프레이를 이용하여 살포되었다. 식물체에 병원균들을 접종하고 나서 식물체들을 습도가 100% 유지되는 humid chamber에 24 시간동안 두었고 그리고 나서 습도가 60% 유지되고 낮에 28°C 저녁에 25°C인 온실에 옮겨 병의 진전을 관찰하였다.

라. MRL3-1의 유도저항성 평가

*C. orbiculare*에 의해 발생한 병감염율(Disease severity)는 병원균을 접종하고 나서 7일 경과 후에 병반이 발생한 잎을 관찰하여 측정하였다. *P. infestans*에 의한 역병은 접종 후 5, 8, 그리고 11일 째 되는 날 각각 측정하였다. 병감염율은 오이와 토마토 각각에서 잎에 발생한 병반의 면적을 관찰하여 기록함으로써 측정되었다. 식물병에 대한 방제율은 Cohen(1994)이 제시한 방법에 의하여 계산되었으며 그 계산식은 다음과 같다:

$$\text{방제율(\%)} = [1 - (\text{접종 후 처리구에서의 병의 정도} / \text{접종 후 대조구에서의 병의 정도})] \times 100$$

*C. orbiculare*와 *P. infestans*에 의하여 발생한 병감염율을 나타내는 자료들의 유의성은 Duncan's multiple range test 및 MRL3-1 처리구와 대조구 사이의 *t*-test를 통하여 검증하였다.

IV. 결 과

1. 제주도 지역 길항근권세균 조사

제주지역 자생 식물체의 근권으로부터 57 개의 세균 계통이 분리되었다. 이 중에서 34 개의 세균 계통들이 적어도 1개의 식물병원균의 균사 성장을 억제하였고, 17 개의 세균 계통들은 1가지 병원균의 성장을 억제하였고, 10개의 세균 계통은 2가지 병원균의 성장을 억제하였고, 6개의 세균 계통은 동시에 3가지 병원균의 성장을 억제하였으며, TRL2-3은 시험에 사용된 병원균 모두의 성장을 억제하였다(Table 1).

항균작용은 세균 계통들과 인접해 있는 식물 병원균의 균사성장억제로 평가하였다(Fig. 1). 항균작용을 보이지 않는 세균계통을 항균효과에 대한 비교구로서 사용하였다(Fig. 1E). 세균 계통에 의한 균사성장억제는 다양했다. 일부 세균 계통들은 식물병원균의 균사 성장을 약하게 억제하였다(Figs. 1G, 1H). 몇몇 세균 계통들은 균사 성장을 강하게 억제하였고 균사 성장에 있어 나쁜 조건임을 나타내는 병원체와 세균 사이의 억제지역(inhibition zone)이 관찰되었다(Figs. 1B, 1I). 비록 뚜렷한 억제지역은 없지만, 일부 세균 계통들은 식물병원균의 균사 성장을 강하게 억제하였다(Figs. 1A, 1C, 1D, 1F). 세균 계통들은 양적 또는 질적으로 개별적인 다른 항균작용을 보였으며, 조사한 병원균들 중 최소 한개 이상 항균효과가 있는 균주를 선발하였다(Table 1). TRL2-3의 효과적인 항균작용의 확인을 위해, 기내 실험을 실시한 결과 TRL2-3에 의한 식물병원체의 현저한 억제가 나타났으며, 실험에 사용된 모든 병원체에서 50% 이상 균사 성장이 억제되었고, *C. orbicularis*의 경우 70%가 억제되었다(Table 2).

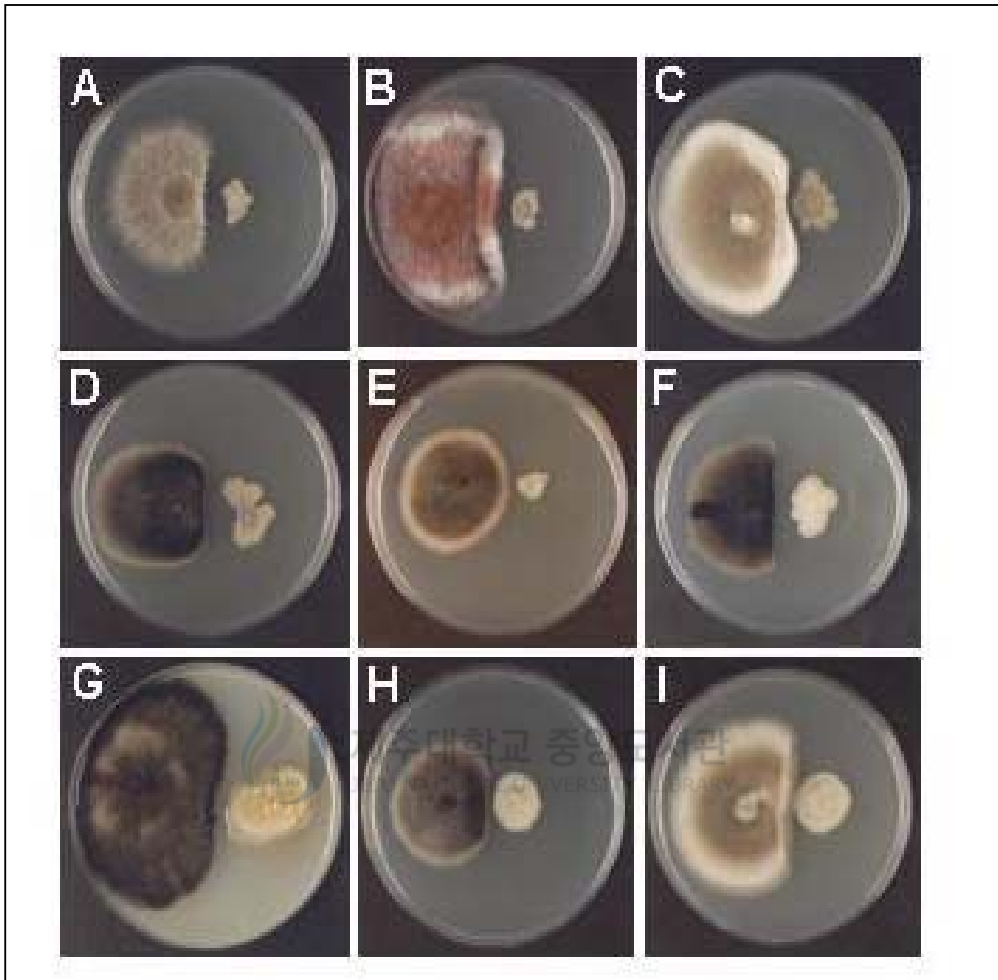


Fig. 1 . Inhibition of hyphal growth of plant pathogens *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. orbiculare* by bacterial strain TRL2-3 (A, B, C and D), *C. orbiculare* by TRK2-2, TRK1-2 and MRL2-3 (F, G and H), *C. gloeosporioides* by MRL2-3 (I) *in vitro*. Strain BRL2-1 showed no inhibition of hyphal growth of *C. orbiculare* (E).

Table 1. Inhibition of hyphal growth of plant pathogens *Rhizoctonia sloani*, *Fusarium oxysporum*, *Collectotrichum gloeosporioides* and *C. orbiculare* by various bacterial strains from the rhizosphere of the plants in Jeju

Bacterial isolate ^a	Plant pathogen			
	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. orbiculare</i>
CRJ1-2	- ^b	-	-	+
CRJ2-2	-	-	-	+
CRJ3-1	+	+	-	-
CRJ3-3	-	++	-	+
CRL1-3	++	-	++	+
CRL4-3	-	+	-	-
CRL5-1	-	-	-	+
MRJ1-1	++	-	-	-
MRJ1-3	-	-	-	+
MRJ2-2	-	-	+	+
MRJ2-3	-	+	-	+
MRJ3-1	-	+	-	-
MRJ3-2	+	-	-	-
MRJ3-3	-	+	-	-
MRL1-2	-	-	+	-
MRL2-1	-	-	+	-
MRL2-2	-	+	-	++
MRL2-3	++	-	+++	++
MRL2-4	-	-	+	+
MRL3-1	-	+	++	++
TRJ1-1	-	++	+	-
TRJ2-1	-	-	+	-
TRJ2-2	-	-	+	+
TRJ3-2	-	-	-	++
TRJ4-1	-	-	-	++
TRJ4-3	-	-	-	++
TRL2-1	-	+	+	-
TRL2-2	-	+	+	+
TRL2-3	++	+++	+++	+++
TRL3-1	-	++	+	+
TRK1-2	-	-	-	++
TRK2-2	+	-	++	+++
TRK3-1	-	-	-	++
TRK3-2	-	-	+	+

^aC means strains isolated from coast areas of the Mt. Halla; M, from middle areas; T, from top of the Mt. Halla

^b -, non inhibited; +, weakly inhibited; ++, strongly inhibited; +++, very strongly inhibited

Table 2. Inhibition rates of hyphal growth of pathogens *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. orbiculare* by the selected bacterial strain TRL2-3

Bacterial strain	Plant pathogens (%) ^a			
	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. orbiculare</i>
TRL2-3	67.2±9.6 ^b	55.0±13.2	58.6±7.4	70.0±11.4

^a Inhibition rate (%) = [1-(length of fungal colony near the strain/length of fungal colony opposite of the strain)] × 100

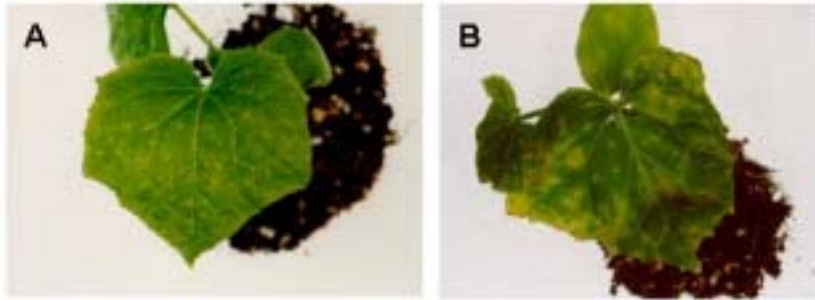
^b Values represent means±standard deviation of three separated experiment, each containing six plates per treatment



2. MRL3-1 균주의 유도저항성 실험

In vitro 실험에서 항균작용을 보인 제주지역 자생 식물의 근권에서 분리한 세균 계통인 MRL3-1의 오이에서 *Colletotrichum. orbicular*에 의하여 발생하는 탄저병과 토마토에서 *Phytophthora infestans*에 의해 발생하는 역병에 대한 병저항성 효율을 검증하고자 본 실험을 수행하게 되었다.

MRL3-1을 처리한 다음 5일째 되는 날 *C. orbiculare*를 접종하였으며, 병원균 접종후 7일째 되는날 병반 발생상황을 조사하였다. 병원균 접종후 7일째 되는 날 처리구(Fig. 2A)와 무처리구(Fig. 2B)에서 병징 발달 차이가 현저하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 탄저병에 의해 발생된 병반은 *C. orbiculare*를 접종한 이후 대조구의 오이 잎에서 잘 발달되었으며 접종 후 7일째 되는 날 병감염율은 약 70%였다(Fig. 3). MRL3-1을 고농도(1.0×10^8 cfu / ml)로 처리한 처리구에서는 병반의 진전이 잎의 감염된 부위로 제한되었다(Fig. 2, 4). 또한 병징은 대조구에 비하여 유의성 있게 감소되었으며(Fig. 3) 결과적으로 약 55%의 병방제율을 보였다(Table 3). 이와 비슷하게 낮은 농도(1.0×10^7 과 1.0×10^6 cfu / ml)의 MRL3-1 전처리하는 병감염율을 감소시키고 결과적으로 각각 47.9%와 36.6%의 병방제율을 나타내었다(Table 3). 본 실험의 긍정적 비교구로 DL-3-amino butyric acid(BABA)를 처리한 처리구에서는 1mM의 농도에서 탄저병에 대하여 병감염율의 현저한 감소와 높은 방제율을 보였다(Fig. 3과 Table 3). MRL3-1과 BABA의 비교실험을 통해 근권세균을 처리한 처리구와 BABA 처리구에서 병감염율의 감소와 방제율의 감소되는 것이 비슷하게 나타나는 것으로부터 유도저항성의 발현 시스템이 근권 세균에서도 적용되었다는 것을 알 수 있다.




 제주대학교 중앙도서관

Fig. 2 Induction of systemically induced resistance in cucumber plants against anthracnose disease at 7 days after inoculation with *Colletotrichum orbiculare* (1.0×10^5 conidia/ml). The presented plants were pre-treated with 30 ml of bacterial suspension of MRL3-1 (1.0×10^8 cfu/ml) (A) and untreated control (B) at 5 days before the challenge inoculation.

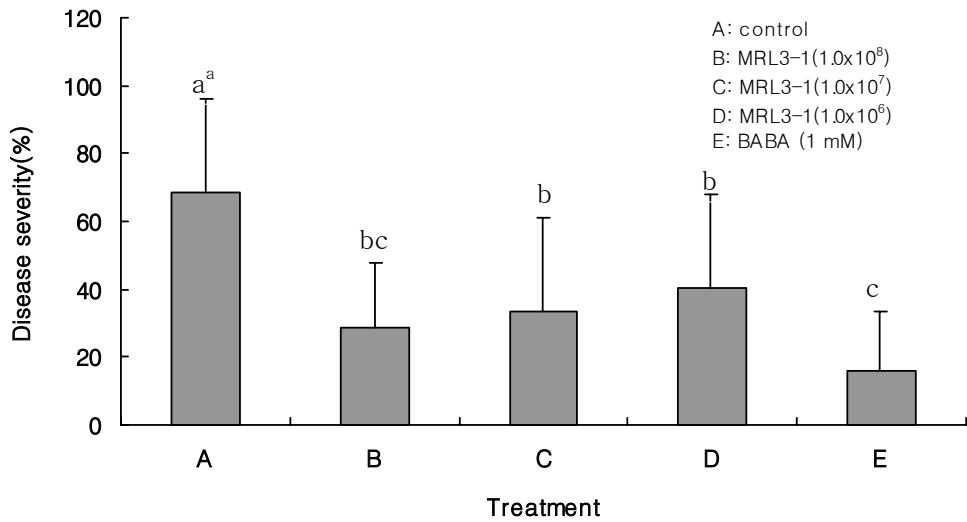


Fig. 3 : Disease severity on the leaves of cucumber plants pre-treated with different concentration of bacterial isolate MRL3-1 and non-treated after inoculation with *C. orbiculare* (1.0×10^5 conidia / ml). The disease severities were measured at 7 days after challenge inoculation. The vertical bars indicate the standard deviation of the three separated experiments each containing 6 plants per treatment.

a Duncan's multiple range test

Table 3. Protection rate of diseased cucumber leaves treated with different concentration of MRL3-1 or BABA

Control	MRL3-1 (cfu / ml)			BABA (1 mM)	
	1.0 x 10 ⁸	1.0 x 10 ⁷	1.0 x 10 ⁶		
Protection rate (%) ^a	0	55.1	47.9	36.6	74.8

a Protection rate (%) = [1-(disease severity of treated/disease severity of control)] x 100



길항근권세균을 처리한 오이에서 오이탄저병에 대한 저항성을 나타낸 것과 마찬가지로 MRL3-1을 처리한 토마토에서도 역병에 대한 저항성을 나타내었다. MRL3-1을 처리한 다음 5일째 되는 날 *P. infestans*을 접종하였으며, 병원균 접종후 5, 8, 11일째 되는날 병반 발생상황을 조사하였다. 병원균 접종후 2일 정도 경과후 병징이 관찰되었고, 대조구의 경우 감염부위를 중심으로 병반 발달이 빠르게 나타났으나, 처리구의 경우는 감염부위에서 주변으로의 확산이 더디게 진행되었다. 병원균 접종후 5일째 되는 날 처리구(Fig. 4A)와 무처리구(Fig. 4B)의 병징 발달 정도를 촬영한 것으로 병징 차이가 현저하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 역병균에 의하여 발생한 병반은 무처리구의 토마토에서 잘 발달하였으며 *P. infestans*를 접종하고 나서 11일째 되는 날 병감염율이 약 70%에 이르렀다 (Fig. 5). 이와 비슷하게 MRL3-1을 전처리한 토마토 앞에서는 병반의 발달이 제한되었다(Fig. 5). t-test를 이용한 유의성 검정결과 5, 8일째 무처리구에 대한 처리구의 병방제율은 33.9%로서 5%의 신뢰수준에서 유의성이 인정되고, 11일째 되는 날의 방제율은 43.6%로 1%의 신뢰수준에서 유의성이 인정되는 것으로 나타났다(Fig. 5, Table 4). 병감염율은 접종 하고 나서 5, 8, 11일 째가 됨에 따라 두드러지게 감소되었다(Table 4).

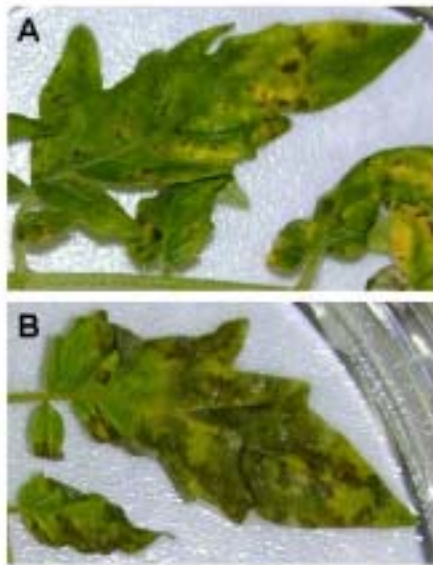


Fig. 4 : Induction of systemically induced resistance in tomato plants against late blight disease at 7 days after inoculation with *Phytophthora infestans* (1.5×10^5 zoospores/ml). The presented plants were pre-treated with 30 ml of bacterial suspension of MRL3-1 (1.0×10^8 cfu/ml) (A) and untreated control (B) at 5 days before the challenge inoculation.

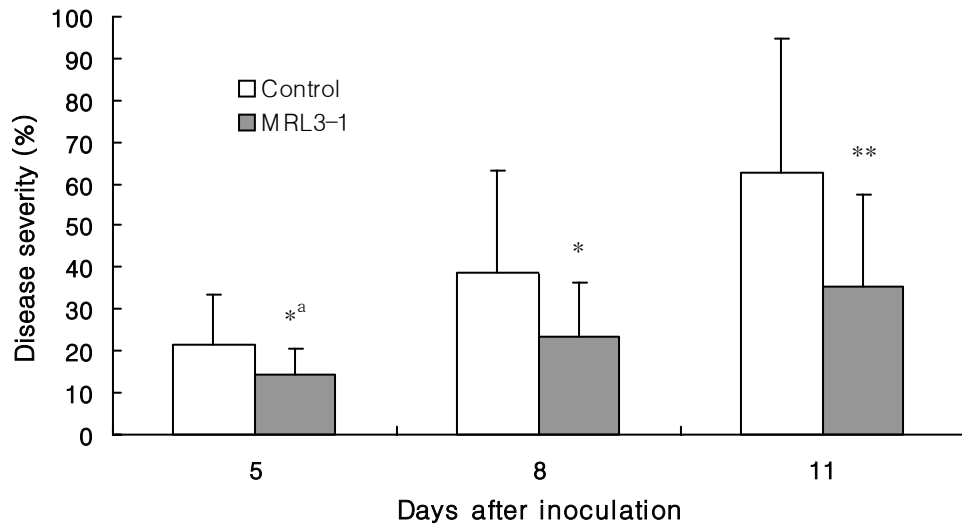


Fig. 5 : Disease severity on the leaves of tomato plants pre-treated with MRL3-1 (1.0×10^8 cfu/ml) and non-treated at different days after inoculation with *P. infestans* (1.5×10^5 spores/ml). The vertical bars indicate the standard deviation of the three separated experiments each containing 6 plants per treatment.

a T-test * = significant at the 5 % probability level;

** = significant at the 1 % probability level

Table 4. Protection rate of diseased cucumber leaves treated with MRL3-1 at different days after fungal inoculation.

	Days after inoculation		
	5	8	11
Protection rate (%) ^a	33.9	39.7	43.6

a Protection rate (%) = [1-(disease severity of treated/disease severity of control)] x 100

V. 고 찰

본 시험에서 분리된 총 세균 계통 가운데 50% 이상이 식물병원균에 대하여 항균 작용을 가지고 있는 것으로 한국의 다른 지역에서 분리된 세균 계통들과 비교하였을 때 항균 작용을 하는 세균의 분리 빈도가 높다(Jeun et al., 2001). 항균작용을 하는 34개의 세균 계통 가운데, 7계통은 제주지역의 해안가에서 분리되었고, 13계통은 중산간 지역에서 분리되었으며, 14계통은 산간지역에서 분리되었다(Table 1). 비록 어떠한 통계적 근거가 없지만, 바닷가 지역의 식물 근권 보다는 산간 지역의 식물 근권에서가 항균작용을 가지는 미생물이 분리되는 경우가 더 많은 것으로 사료된다. 다음의 내용과 관련하여 어떠한 설명도 없으나 효과적인 항균작용을 가지는 수많은 세균들은 상대적으로 낮은 온도가 세균의 생육에 더 좋다고 사료된다. 그러나 그러한 제안을 증명하기 위해서는 보다 많은 시험이 수행되어 져야 한다.

병원균에 항균작용을 가지는 세균들의 반수가 단지 하나의 시험에 사용된 식물 병원균에 대하여 항균작용을 보였다. 대부분의 세균들은 균사 성장을 약하거나 강하게 억제하였다(Table 1). 아주 강한 항균작용을 보이는 세균들은 적어도 세 가지의 다른 식물병원균에 대하여 항균작용을 나타내었다(Table 1). 이러한 결과를 바탕으로 세균에서부터 분비되는 lipopoly-saccharides와 같은 유효한 물질들이 식물병원균에 대하여 항균작용을 나타낸다고 추정되며, 또한 ipopoly-saccharides의 항균작용은 이미 알려져 있다(Dow et al., 2000).

TRL2-3은 시험에 이용된 모든 식물병원균에 대하여 항균작용을 보였으며(Table 1) 균사들의 성장을 아주 강하게 억제하였다(Table 2). TRL2-3의 효과적인 항균작용을 규명하고자, *in vitro* 상에서 반복 시험이 이루어졌으며 실험결과 TRL2-3이 식물병원균의 성장을 억제하는 정도가 유의성있게 나타났다(Table 2). 시험에 사용된 모든 식물병원균들의 균사생장이 50% 넘게 억제되었으며, *C. orbiculare*는 TRL2-3에 의하여 70%가 넘게 생장이 억제되었다(Table 2). 이러한 세균계통은 직접적이 항균작용 뿐만 아니라 식물체에 유도저항성을 유도함으로써 식물병을

방제할 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 근권세균들은 저항성을 유도 할 뿐만 아니라 식물의 생육을 촉진시킨다고 보고되었다(van Loon et al., 1998). 이러한 세균들을 길항근권세균(plant growth promoting rhizobacteria ; Kioepper et al., 1980)이라 한다. 식물병 방제를 위한 효과적인 세균을 찾기 위해서는 직접적인 항균효과와 저항성 유도 효율에 대한 검증이 이루어져야 한다.

병 방제를 위한 미생물을 사용하는 것은 화학적 약제사용 감소를 위한 방법으로 여러 해 동안 중요하게 여겨져 왔다. 하지만 포장에서 식물 병의 조절을 위한 미생물의 이용과 식물 병 방제를 위한 유도저항성을 작물에서 발현하는 것을 이용하는 것은 같이 항상 성공적이지는 않았다(van Loon et al., 1998a). 그러나 그것은 포장에서 화학적 약제 사용량의 감소를 가져왔다. 여기서는 식물병에 저항하는 ISR을 유도하는 효과적인 미생물체를 선택하기 위하여, 오이 탄저병과 토마토 역병에 대하여 직접적인 항균 효과를 가진 근권세균을 선택하여 실험하였다.

이 논문의 ISR은 분리된 세균을 낮은 농도로 전처리 했을 때 효과적으로 유인 되지는 않았다(Fig 4). 다른 분리된 세균을 낮은 농도로 처리한 경우 비슷하게 병징의 감소가 현저하게 결과 되었다(Fig. 3). 하지만, 식물에서 ISR의 유인의 시작을 위한 PGPR의 농도는 정확하지 않은 것 같다. *Serratia marcescens* 또는 *Pseudomonas fluorescens* 같은 몇몇의 PGPR 계통은 특정농도에서 오이의 탄저 병에서 저항하는 유도저항성을 효과적으로 유인한다(Liu et al., 1995). 오이에서 *Bacillus amyloquefaciens* EXTN-1과 *B. pumilus* INR-7을 이용한 ISR 유도를 통한 실험에서 병 방제율이 33.4%, 18.7%가 나타난다고 보고되었다(Jeun et al 2001). 본 실험의 결과(Table 3)와 수치만을 가지고 비교를 해 보면 MRL3-1 을 이용한 오이에서 탄저병에 대한 병 방제율이 높게 나타나는 것을 볼 수 있다.

ISR은 SAR의 기작과 비교하여(Jeun et al., 2004), 세부적으로 연구되어 왔다. SAR과 현저히 달라서 몇몇의 PGPR 계통은 직접적으로 항균 효과를 가지고 있다. 길항근권세균의 분리와 항균효과 실험에서 항균효과를 확인하였다. ISR의 발현의 또다른 기작은 PGPR에서 철점착증 발생에 의해 쉽게 침탈될수 있는 철과 같은 미량원소의 경합이다(Maurhofer et al., 1994; Van Loon et al., 1997; 1998b). 또한 영양분의 경합에 의한 저항성의 표현은 SAR을 나타내는 식물에서는

보고되지는 않았다. 하지만 ISR의 저항성 기작의 다른 것은, SAR의 이러한 것들과 비슷하게 저항성유전자 *npr1*에서 수반되었다(Pieterse and van Loon 1999).

DL-3 amino butyric acid(BABA)는 많은 식물체에서 잘 알려진 저항성 유도인자이다(Cohen 2002; Jeun and Park 2003; Zimmerli et al. 2000). 본 연구에서 BABA는 긍정적비교구로서 효과적으로 전신저항성을 유도했으며(Fig. 2, 4), 부정적 비교구처럼 무처리된 식물은 처리식물과 비교하여 높은 감염율을 나타냈다(Fig. 2, 4). 이러한 대조구는 둘 다 전신적 유도저항성이 가능한 근류세균을 특정 농도로 전처리한 경우 확실히 나타난다.

요약하자면 근권세균인 MRL3-1에 의해서 오이에서는 탄저병에, 토마토에서는 역병에 대항하여 ISR 유도가 가능했다. 근권세균에 의한 ISR이 BABA에 의한 SAR의 병저항성 보다 높게 나타나지 않더라도, 미생물을 사용한 식물보호가 포장이나, 화학물의 사용을 금지하는 장소 같은 특정조건에서 유용할 것이다. 이 목적을 위하여 ISR에 관하여 추가적인 연구가 이루어져야 한다.



인용문헌

- Cohen, Y. 1994. 3-aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44, 273-288.
- Cohen, Y.R. 2002. β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Dis.* 86 (5): 448-457.
- Dow, M., Newman, M. A. and Poepenack, E. 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 241-261
- Handelsman, J., and Stabb, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8: 1855-1869.
- Jeun, Y.C. and Park, E.W. 2003. Ultrastructures of the leaves of cucumber plants treated with DL-3-Aminobutyric acid at the vascular bundle and the penetration sites after inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathol. J.* 19(2):85-91.
- Jeun, Y.C., Park K.S., Kim C.H., Fowler W.D., and Kloepper. J.W. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biol. Control.* 29:34-42.
- Jeun, Y.C., Park, K.S. and Kim, C.H. 2001. Different mechanisms of induced systemic resistance (ISR) and systemic acquired resistance (SAR) against *Colletotrichum orbiculare* on the leaves of cucumber plants. *Mycobiology* 29(1): 19-26.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886
- Lee, C.S., Kim K.D., Hyun J.W. and Jeun Y.C. 2003. Isolation of Rhizobacteria in Jeju Island showing anti-fungal effect against various plant pathogens. *Microbiology*. In press.

- Liu, L., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85: 1064-1068.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mraux, J-P. and Defago, G. 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.
- Park, K. S., and Kloepper, J. W. 2000. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biol. Control* 18: 2-9.
- 전용철. 2002. 유도저항성의 신호전달체계 및 발현기작. *제주대 아농연*. 18(2): 43-21
- Pieterse, C. M. J., and Van Loon, L. C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4: 52-58.
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A., and Van Loon, L. C. 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.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1997. Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. In: Ogoshi, A., Kobayashi, Y., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S. eds. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present status and future prospects*. Sapporo: OECD, p. 50-57.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998a. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.

- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1998b. Induction and expression of PGPR-mediated induced resistance against pathogens. In: Duffy, B., Rosenberger, U., and Defago, G. eds. Molecular Approaches in Biological Control. Delemont: IOBC/OILB, p. 103-110.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J. P. and Mauch-Mani, B. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by DL-3-aminobutyric acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 12920-12925.



감사의 글

깊은 녹음이 그 푸르름을 더해가고, 벌써 여름이 시작되었나 할 정도로 무더워
집니다. 는 여름이 시작되려고 합니다. 또 하나의 뜨거운 여름이 시작하는 즈음
에 또 하나의 마침과 새로운 시작을 하게 됨을 뜻 깊게 생각합니다.

먼저 이 논문이 완성되기까지 여러 가지로 부족한 저에게 격려와 보살핌으로
지도하여 주시고 마음 고생을 많이 하신 전용철 지도교수님께 마음깊이 감사를
드립니다. 아울러 바쁘신 중에도 본 논문의 심사위원장을 맡아 세심하게 논문심
사를 이끌어 주신 강영길 교수님, 깊은 관심을 가지고 논문의 심사를 맡아주신
김동순 교수님께도 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 그리고 항상 가까이서 관심
을 가지시고 가르침을 주신 송창길 교수님, 퇴직하신 김한림 교수님, 조남기 교
수님, 고영우 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한 본 논문을 무사히 마칠 수 있도록 여러모로 도움을 준 이충선 조교선생
과 작물보호학 실험실의 대학원 동료들과 늘 지켜보며 격려해준 대학원 선·후
배님들 감사의 마음을 전합니다. 그리고 학업을 원만하게 마칠 수 있도록 많은
배려와 뒷받침 해주신 국립식물검역소제주지소장님과 동료 직원들께 깊은 감사
를 드립니다.

오늘이 있기까지 나의 길을 지켜 주신 어머니와 항상 막내를 생각하는 형님,
누님들 내외분과 장인, 장모님을 비롯한 처가 식구들에게도 감사를 드리며, 항상
곁에서 힘이 되어주고 격려하며 잔소리를 해준 사랑하는 아내 김미령과, 혜진,
준혁이에게 고맙다는 말과 아버지님 영전에 이 논문을 바칩니다.