고냉지 배추 뿌리마름병의 생물적 방제를 위한 길항미생물의 탐색

이윤수* · 김종진**

(*강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부 ·
**강원도 농촌진흥원)

Studies on the biological control agents against the brittle root rot pathogen (*Aphanomyces raphani*) of Chinese cabbage in the alpine areas

Lee, Youn-Su* · Kim, Chong-Jin**

(*Program of Plant Production and Genetic Engineering in the Div. of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon Nat. Univ. **RDA of Kangwon-Do)

적 요

배추 재배 토양과 이병된 배추 뿌리로부터 분리 동정된 10개의 *A. raphani* 모두는 공시 품종인 고냉지 여름 배추에 대하여 강한 병원성을 나타내었다. 기내에서의 길항성 검정결과 길항성을 나타내는 균주들은 형광성인 *Ps. fluorescence*나 *Pseudomonas* sp. 들이었다. 길항성이 있는 균주의 길항성 발현은 사용된 모든 배지에서 관찰되었다. 선발된 yeast균은 RA배지에서만 약한 길항성을 나타내었고, actinomycetes균 그리고 *Trichoderma* spp.는 전혀 길항성을 나타내지 않았다.

I. 서 론

소득의 향상과 아울러 신성한 야채류에 대한 소비자들의 욕구가 증대됨에 따라 무우, 배추의 재배는 다양한 양식으로 매년 그 재배가 이루어지고 있다. 배추는 서늘한 기후를 좋아하는 작물로 하절기에 생산되는 배추는 주로 고냉지에서 재배가 이루어지고 있으며, 고냉지가 많은 강원도와 경상도 산간 지역에서 많이 재배되고 있고 강원도가 전국 면적의 73.1%를 그리고 전국생산량의 75%를 차지하고 있어 여름 배추의 주산지로 정착되어 있다 (14, 22). 그러나 고냉지에서 재배되고 있는 여름 배추는 기상 여건에 따라 생산성이 좌우되므로 공급 부족으로 가격의 변동폭이 심하여 농가 소득의 불안정을 초래하는 악순환을 거듭하고 있는 것이 현실이다. 특히 6-8월에 계속되는 강우로 인한 근부성 병피해가 주요인으로 현재 우리나라에서 발생하는 근부성 병으로는 *Aphanomyces raphani*에 의한 뿌리마름병, *Erwinia carotovora*에 의한 무름병, *Rhizoctonia solani*와 *Pythium* spp.에 의한 잘록병등이 있고 고냉지 여름배추 뿌리마름병은 *Aphanomyces raphani*에 의해 발생되며, 그 피해도 가장 심한 것으로 보고되어 있다 (11, 22). 그리고 배추의 뿌리마름병을 유발하는 *Aphanomyces raphani*는 토양전염성

병원균으로 주로 토양 습도가 매우높거나 수분이 존재하는 조건에서 전염되는 수매 전염성이며 점질 토양이나 배수가 불량한 곳에서 특히 심하게 발생한다.

한편, 배추 뿌리마름병의 방제 방법으로 dexon 수화제 및 분제가 그리고 captan과 카바마이트계 살균제가 사용되고 있는 것으로 보고되었으나 국내에서는 효과적인 방제 방법이 구명되지 않아 매년 많은 피해를 보면서도 대책을 마련하지 못하여 농가에 막대한 손해를 끼치고 있는 실정이다 (11, 22). 따라서 강원도 고냉지 배추재배의 안정성을 기하고 농가 소득을 보장하기 위하여 배추 뿌리마름병에 대한 방제 방법의 구명이 선행되어야 한다. 그러나 현재까지 국내에서 이들 배추 뿌리마름병에 대한 예방 및 방제는 거의 농약에 의존하여 왔기 때문에 살포되는 농약의 양은 점점 증대되어 왔다. 이에 따른 환경오염 문제와 경비의 상승은 해결 되어야 할 문제점으로 제기되고 있다. 특히 배추의 생육 시기에 농약을 정기적으로 다량 살포할 경우 발생될 수 있는 사람에 대한 잔류 독성 문제는 매우 심각하며, 건전한 배추에 대한 약해 문제도 보고되고 있다 (11, 14, 22). 또한 농약 살포에 의해 배추 재배지의 미생물 집단의 생태를 변화시킴으로서 환경 생태의 파괴 문제도 중요한 문제로 인식되고 있다.

따라서 배추 뿌리마름병의 방제를 위해 환경에 친화한 방법을 이용함이 요구된다 하겠다. 그러나, 아직까지 배추 뿌리마름병의 생물적 방제에 대한 연구가 국내에서는 전혀 이루어 지지 않았으므로 이에 본 연구에서는 위에서 언급한 문제점을 줄여나갈 수 있는 종합적인 관리 체계의 일환으로서 생물적 방제법을 도입하여 병의 방제를 강구하고자 한다. 미생물을 이용하는 생물적 방제는 자연 상태에서 일어날 수 있는 경쟁, 기생, 포식 관계 또는 항생작용등의 상호작용을 인위적으로 조절하여 이용하는 것으로서 이에 환경과 다른 작물에 피해를 주지 않는 특성을 지닌 토착 길항미생물을 탐색하여 농용 항생제의 개발과 선발 길항균의 실용화를 위한 기초 자료 및 구체적인 산업화의 기초 자료를 제공하고자 본 연구를 수행하였다.

따라서 본 연구는 세균, 진균, 그리고 방사상균등 각종 토양 미생물을 분리하여 재배되고 있는 배추에 발생하는 뿌리마름병원균 *A. raphani*에 대하여 그 생장을 억제하거나 또는 병원균을 소멸시킬 수 있는 유용한 토양 미생물을 선발하여 실험실내에서 유용성을 검정하는 것을 연구의 범위로 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 병원균의 분리

고냉지 여름배추 재배 포장에서 지상부가 시들고, 지제부가 잘록해 지면서 옆으로 쓰러지는 증상을 보이는 배추의 배축부와 뿌리를 채집하여 병원균 분리 시료로 사용하였다.

병원균의 분리는 채집한 시료를 흙이 완전히 제거되도록 흐르는 물에 2~3회 잘 세척한 후 지제부 및 뿌리의 표피를 얇게 벗기고 갈변되기 시작하는 부위의 조직을 5 mm정도 크기로 잘라 alcohol에 수초간 침지한후 이를 다시 1% sodium hypochlorite에 1~2분간 침지하여 표면 살균하였다. 표면살균후 멸균 증류수로 2~3회 세척후 멸균 여과지로 수분을 제거한 후 선택배지인 MBVS 배지에서 25℃ 조건하에서 선택분리 한후 WA, RDA, RA, 그리고 CMA 배지등에 옮겨 배양하였다 (5, 8, 16).

병원균의 동정을 위해 직경 9 cm의 RA배지에서 7~10일간 배양후 그 위에 멸균 증류수 20 ml을 분주하고 20℃ 항온기에 7시간 정치 시킨 다음 *Aphanomyces* spp.의 특징인 유주자의 형성을 관찰하고 균의 형태적 특징은 RA배지상에서 7일간 배양후 검경을 통해 관찰하였다 (5, 6, 7, 8).

2. 병원성 검정

순수 분리한 *Aphanomyces raphani*의 병원성 검정은 배추 종자를 플라스틱 화분에 파종하여 25℃에서 2~3주 재배후 유주자 현탁액을 접종하여 실시하였고, 그 밖은 일반적으로 행해지는 병원성 검정 방법에 따라 행하였다 (5, 8).

3. 유용 미생물의 분리 및 길항성 검정

이미 서술된 방법과 각종 자료에 기초하여 배추 재배지와 그 밖의 다른 작물의 재배 토양에서 유용 미생물을 분리한 후 동정하였고 (2, 3, 4, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19), 길항성 검정은 Ayers 와 Lumsden (1), Sneh등 (18), Windels (20), Windels와 Kommedahl (21) 등의 방법에 따라 기내에서 각각 시행하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 병원균의 분리 및 병원성 검정

춘천, 홍천, 횡성, 평창등지의 배추 재배 토양과 재배지에서 지상부가 시들고 지제부가 잘록해 지면서 옆으로 쓰러지는 증상을 나타내는 배추의 배축부와 뿌리로 부터 RD 배지를 이용하여 모두 10개의 *Aphanomyces raphani*를 분리하였다 (Table 1). 분리된 병원균들은 고냉지배추를 공시 품종으로 하여 병원성 검정을 실시하였다 (Table 2). 그 결과 분리된 병원균들은 모두 고냉지 여름 배추에 대하여 강한 병원성을 나타내었다.

2. 유망 길항균의 선발

춘천, 홍천, 평창, 횡성등지의 배추재배토양, 이병 배추, 감자 토양, 감자 괴경등에서 각종 미생물들을 분리하였다. 분리된 미생물들중 길항균으로 추정되는 균으로 14개의 *Pseudomonas* sp., 6개의 *Ps. fluorescence,* 2개의 미확인 세균, 1개의 actinomycetes균, 1개의 yeast균 , 그리고 5개의 *Trichoderma* sp.를 선발하였다 (Table 3).

3. 유망 길항균의 기내에서의 길항성 검정

유망 길항균들이 *A. raphani*에 대하여 길항성을 지니고 있는지 서로 다른 구성분들로 구성된 PDA, KB, GYE, 그리고 RA 배지 (Table 4)를 이용하여 길항성을 검정하여 보았다. 그 결과 (Table 5) 균주 K95008, K95009 그리고 P7은 PDA 배지에서 매우 강한 길항성을 나타 내었고, 균주 K95014는 PDA 배지에서 비교적 강한 길항성을 그리고 K95010과 K95013은 약한 길항성을 나타내었다. 그 밖의 균주들은 PDA 배지상에서 전혀 길항성을 나타내지 않았다. KB 배지 내에서는 균주 K95008, K95009 그리고 K95014가 매우 강한 길항성을 나타내었고, 균주 P7, K95010 그리고 K95013은 비교적 강한 길항성을 나타내었다. GYE 배지에서는 균주 K95008, K95009 그리고 P7가 강한 길항성을 나타내었고, 균주 K95010, K95013 그리고 K95014는 약한 길항성을 나타내었다. RA배지 에서는 균주 K95008, K95009, P7, K95010 그리고 K95014가 강한 길항성을 나타내었고 균주 K95013이 비교적 강한 길항성을 나타내었다. 결론적으로 길항성을 나타내는 균주들은 주로 배추 재배 토양에서 분리된 Pseudomonas 균들이었고, 강한 길항성을 나타내는 *Ps. fluorescenc* (균주번호 P7)는 감자의 괴경에서 분리된 균주였다. yeast 균주는 RA 배지에서만 약한 길항성을 나타내었고, 미동정 세균과 *Trichoderma* spp.는 어느 배지에서도 길항성을 나타내지 않았다.

본 실험의 결과 배추 뿌리 마름병의 생물적 방제에 유용한 길항균의 선발은 배추가 재배되는 토양 또는 배추와 함께 고냉지 지역에서 넓은 면적에 걸쳐 재배되고 있는 감자의 재배 토양에서 가능하며, 경우에 따라 감자 재배 토양에서 *A. raphani*에 대하여 길항성을 나타내는 유용균의 밀도가 높다면 배추와 감자의 윤작을 통한 배추 뿌리마름병의 피해 경감을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, *A. raphani*에 대하여 길항성을 나타내는 균주를 배양후 그 배양여액이 항균성을 지니고 있는지 확인후 생물 농약으로 이용될 가능성도 있을 수 있다 하겠다.

IV. 결 론

배추 재배 토양과 이병된 배추 뿌리로부터 분리 동정된 10개의 *A. raphani* 모두는 공시 품종인 고냉지 여름 배추에 대하여 강한 병원성을 나타내었다. 기내에서의 길항성 검정 결과 길항성을 나타내는 균주들은 형광성인 *Ps. fluorescence*나 *Pseudomonas* sp. 들이었다. 길항성이 있는 균주의 길항성 발현은 사용된 모든 배지에서 관찰되었다. 선발된 yeast균은 RA배지에서만 약한 길항성을 나타내었고, actinomycetes균 그리고 *Trichoderma* spp.는 전혀 길항성을 나타내지 않았다.

인용문헌

1. Ayers, W. A. and Lumsden, R. D. 1977. Mycoparasitism of oospores of *Pythium* and *Aphanomyces* species by *Hyphochrytrium catenoides.* Can. J. Microbiology 23(1):38-44.
2. Barnett, H. L., and Hunter, B. B. 1972. Illustrated

genera of imperfect fungi. Burgess, Minneapolis, MN.
3. Benson, H. J. 1994. Microbiological applications. 6th ed. Wm. C. Brown Publications.
4. Bergey's manual of systemic bacteriology. Vol. 1, 2, 3, and 4. Williams and Wilkins Co., Baltmore.
5. Buczacki, S. T. 1983. Zoosporic plant pathogens: A modern perspective. Academic Press, London.
6. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 973. *Aphanomyces raphani*. Mycopathologia 106:187-188.
7. 寺中理明. 1978. Aphanomyces 屬菌の見分け方と分離法. 植物防疫. 32(7):33-36.
8. Dhingra, Onkar D., and J. B. Sinclair. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press.
9. Gerhardt, P. R. et al. 1981. Manual of methods for general bacteriology. Am. Soc. Microbi. Washington, D. C.
10. Hornby, D. 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens. C. A. B International.
11. 김충회, 조원대. 1986. 고냉지배추 재배 토양에서 배추에 뿌리썩음병을 일으키는 *Pythium ultimum, Pythium echinocarpum, Rhizoctonia solani*균의 병원력 및 토양 내 상대 밀도. 한식보호지 25(3):183-190.
12. Lee, Wang Hyu and Akira Ogoshi. 1986. Studies on the seed bacterization of sugar beets. II. Antibiosis to damping-off pathogens and growth stimulation of sugar beets by rhizoplane bacteria. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52:175-183.
13. Papavizas, G. C. 1966. Suppression of Aphanomyces root rot of peas by cruciferous soil amendments. Phytopathology 56:1071-1075.
14. 박상근, 김병수, 정범윤. 1987. 시설 채소의 생리 장해와 병해 진단. 서울종묘출판부.
15. Pfender, W. F. and P. A. Delwiche. 1984. A medium to enhance recovery of *Aphanomyces* from infected plant tissue. Plant Disease 68:845-847.
16. Satoshi Wakimoto, Nobuaki Matsuyama, Yoichi Takanami and Kazunori Tsuno. 1993. Laboratory guide for plant pathology and microbiology. Soft Science Publications. Tokyo.
17. Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide of identification of plant pathogenic bacteria. 2nd edition. Am. Phytopathol. Soc. 72 Pp.
18. Sneh, B, Humble, S. J. and Lockwood, J. L. 1977. Parasitism of oospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae, Phytophthora cactorum, Pythium* sp., and *Aphanomyces euteiches* in soil by Oomycetes, Chytridiomycetes, Hypomycetes, Actinomycetes, and bacteria. Phytophathology 67(5):622-628.
19. Subramanian, C. V. 1983. Hyphomycetes; Taxonomy and biology. Academic Press, New York.
20. Windels, C. E. 1981. Growth of *Penicillium oxalicum* as a biological seed treatment on pea seed in soil. Phytopathology 71:929.
21. Windels, C. E., and Kommedahl, T. 1978. Factors affecting *Penicillium oxalicum* as a seed protectant against seedling blight of pea. Phytopathology 68:1656.
22. 유병주, 김두열, 안문섭, 김동한, 허범량, 김득래, 성재모. 1992. 고냉지 배추 뿌리마름병 발병 요인과 방제 기술에 관한 연구. 농시논문집 34(1):12-17.

Table 1. List of *Aphanomyces raphani* isolated from diseased Chinese cabbages and soils cultivated with Chinese cabbage.

Isolate Number	Source	Location
Chun 1	root	Chuncheon
Hong 10	root	Hongcheon
Hong 11	root	Hongcheon
Youljhwa 20	root	Hongcheon
Youljhwa 21	root	Hongcheon
Youljhwa 22	soil	Hongcheon
Youljhwa 23	soil	Hongcheon
Pyung 30	root	Pyungchang
Pyung 31	root	Pyungchang
Pyung 32	soil	Pyungchang

Table 2. Pathogenicity of *A. raphani* to Chinese cabbage seedlings[1].

Isolate Number	Disease ratings[2]				
	1	2	3	4	Mean[3]
Chun 1	5	5	4	5	4.8a
Hong 10	5	5	5	5	5.0a
Hong 11	5	5	5	5	5.0a
Youljhwa 20	5	5	5	5	5.0a
Youljhwa 21	4	5	4	5	4.5a
Youljhwa 22	5	5	5	5	5.0a
Youljhwa 23	5	5	4	5	4.8a
Pyung 30	5	4	5	5	4.8a
Pyung 31	5	5	5	5	5.0a
Pyung 32	5	5	5	5	5.0a
Control	0	0	0	0	0.0b
LSD (p=0.05)					0.85

[1]Seedlings were inoculated with *A. raphani* in a pot.

[2]Disease ratings were based on 0-5 scales; 0=no disease, and 5=death of seedlings.

[3]Means with the same letter are not significantly different at p=0.05 (t-test)

Table 3. List of selected microbes isolated from various sources.

Isolate No.	Source	Location	Scientific Name
P1	potato tuber	Pyungchang	*Pseudomonas* sp.
P2	potato tuber	Pyungchang	*Pseudomonas* sp.
P3	potato tuber	Pyungchang	*Pseudomonas* sp.
P4	potato tuber	Pyungchang	*Pseudomonas* sp.
P5	potato tuber	Pyungchang	*Pseudomonas* sp.
P6	potato tuber	Pyungchang	*Pseudomonas* sp.
P7	potato tuber	Pyungchang	*Ps. fluorescence*
P8	potato tuber	Pyungchang	*Ps. fluorescence*
K95005	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Pseudomonas* sp.
K95006	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Pseudomonas* sp.
K95007	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Pseudomonas* sp.
K95008	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Ps. fluorescence*
K95009	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Ps. fluorescence*
K950010	Chinese cabbage field	Hongcheon	*Pseudomonas* sp.
K950011	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Pseudomonas* sp.
K950012	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Pseudomonas* sp.
K950013	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Ps. fluorescence*
K950014	Chinese cabbage field	Chuncheon	*Ps. fluorescence*
K95001	potato field	Pyungchang	Unknown bacteria
K95002	potato field	Pyungchang	Unknown bacteria
K95003	Chinese cabbage field	Pyungchang	*Pseudomonas* sp.
K95004	Chinese cabbage field	Pyungchang	*Pseudomonas* sp.
Yeast1	Chinese cabbage field	Pyungchang	Yeast
K950420	Chinese cabbage field	Hoengsung	Actinomycetes
F007	Chinese cabbage field	Hoengsung	*Trichoderma* sp.
F009	Chinese cabbage field	Hoengsung	*Trichoderma* sp.
F103	diseased Chinese cabba	Hoengsung	*Trichoderma* sp.
F220	diseased Chinese cabba	Hoengsung	*Trichoderma* sp.
F315	diseased Chinese cabba	Hoengsung	*Trichoderma* sp.

Table 4. Composition of media used for the selection of antagonists against brittle root rot pathogen *A. raphani*.

Components	PDA	KB	GYE	RA
Bacto agar	20g	20g	15g	20g
Dextrose	20g	-	-	10g
PDA powder	17g	-	-	-
Proteose peptone	-	20g	-	-
K_2HPO_4	-	1.5g	1g	-
$MgSO_4$ $7H_2O$	-	1.5g	-	-
Glycerol	-	1ml	5ml	-
Radish	-	-	-	200g
Yeast extract	-	-	2g	-

Table 5. Antagonism of different microbes against *A. raphani* on various media.

Isolate No.	Antagonism observed on different media tested[1]			
	PDA[2]	KB[3]	GYE[4]	RA[5]
P1	-	-	-	-
P2	-	-	-	-
P3	-	-	-	-
P4	-	-	-	-
P5	-	-	-	-
P6	-	-	-	-
P7	++++	+++	++++	++++
P8	-	-	-	-
K95005	-	-	-	-
K95006	-	-	-	-
K95007	-	-	-	-
K95008	++++	++++	++++	++++
K95009	++++	++++	++++	++++
K950010	++	+++	++	++++
K950011	-	-	-	-
K950012	-	-	-	-
K950013	++	+++	++	+++
K950014	+++	++++	++	++++
K95001	-	-	-	-
K95002	-	-	-	-
K95003	-	-	-	-
K95004	-	-	-	-
Yeast1	-	-	-	++
K950420	-	-	-	-
F007	-	-	-	-
F009	-	-	-	-
F103	-	-	-	-
F220	-	-	-	-
F315	-	-	-	-

[1]++++:very strong inhibition and -:no inhibitions observed

[2]PDA: potato dextrose agar

[3]KB: King-B medium

[4]GYE: Glycerol yeast extract medium

[5]RD: Radish dextrose medium