

Bacillus subtilis S37-2와 *Pseudomonas* sp. GHR1-1을 이용한 토마토 시들음병 방제 효과

이소연* · 김선국 · 김현지 · 김성우 · 김선곤 · 강정화

전라남도 농업기술원 친환경농업연구소

Biocontrol of Fusarium Wilt in Tomato Plants using *Bacillus subtilis* S37-2 and *Pseudomonas* sp. GHR1-1

So Youn Lee*, Sun Kook Kim, Hyeon Ji Kim, Sung Woo Kim,
Seon Gun Kim and Jung Hwa Kang

Environment-Friendly Agricultural Research Institute,
Jeollanamdo Agricultural Research and Extension Service, Naju 58213, Korea

*Corresponding author: chancy24@korea.kr

ABSTRACT

The control effect of tomato wilt disease was investigated using the strain developed by Rural Development Administration. As a result, *Bacillus subtilis* S37-2 and *Pseudomonas* sp. GHR1-1 showed an inhibitory effect on mycelial growth and spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The control effects of wilt disease in tomato seedlings showed that the disease severity was lower when the strains were treated in the sowing stage than in the two-leaf stage. In the sowing stage, the control effect of the tomato wilt disease was 94.6% when GHR1-1 was treated, and 87.1% when the GHR1-1 and S37-2 were mixed. These results suggest that the two strains may be used as environmentally friendly microbial agents.

Additional key words: *Bacillus subtilis* S37-2, *Pseudomonas* sp. GHR1-1, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

서 론

우리나라의 주요한 채소작물 중 하나인 토마토는 품질향상이나 생산량 증대 및 연중생산을 위해 시설재배를 시작한 이래로 현재 재배 면적은 전국적으로 5,782ha에서 355,107톤이 생산되고 있다(국가통계포털, 2018). 그러나 시설재배 특성상 생리장

해 및 각종 병해의 발생도 증가하고 있고, 발생되는 병으로는 시들음병을 포함한 32종의 병이 보고되어 있다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 토마토 시들음병(Fusarium wilt)을 일으키는 병원균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(FOL)는 대표적인 토양전염성 병해로 토마토뿐만 아니라, 다른 작물에도 심각한 문제를 주는 병으로 알려져 있

다(Larkin and Fravel 1998). FOL은 주로 뿌리나 상처를 통해 침입하며, 포장 정식 직후에 감염되는 경우가 많다. 토마토 시들음병의 첫 번째 증상은 아랫잎이 누렇게 변하고, 관다발 조직이 암갈색으로 변하며, 점차 식물 전체가 황화되어 결국 식물은 죽는다(Jones et al., 1991, Lim et al., 2006).

이를 방제하기 위해서 화학 살균제를 처리하면 기주의 발병률은 크게 감소하지만 새로운 살균제 내성 균주의 출현 가능성의 우려가 있고, 이러한 화학 살균제는 환경, 토양 내 비선택적 개체와 인체 건강에 악영향을 미친다(Cao et al., 2011). 이러한 문제를 해결하기 위해 화학 살균제를 대체할 수단으로 미생물을 이용한 생물학적 방제가 활발하게 연구되고 있다.

미생물을 이용한 토마토 시들음병 방제에 관한 연구로 Hariprasad 등(2011)은 근권토양에서 분리한 *Bacillus subtilis* CRB20 균주가 생산하는 chitinase에 의해 FOL의 감염을 억제하였다고 보고하였다. 또한 Srivastava 등(2010)도 fluorescent *Pseudomonas*, *Trichoderma harzianum*, *Glomus intraradices*을 혼합하여 처리했을 때 pots와 field에서 시들음병 발생 정도를 각각 74%, 67% 감소시켰다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 *Bacillus subtilis* S37-2와 *Pseudomonas* sp. GHR1-1 균주의 토마토 시들음병 방제제로서의 가능성을 검증하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 균주 및 병원균 준비

국립농업과학원 농업미생물과에서 개발된 *Pseudomonas* sp. GHR1-1과 *Bacillus subtilis* S37-2 균주를 TSB에 28℃로 48시간 동안 배양하여 10^7 cfu/mL 농도로 조정하여 사용하였다. 토마토 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*(KACC 40037)는 한국농업미생물자원센터에서 분양받아 PDA(Potato Dextrose Agar)에 접종하여 25℃에서 10일간 배양하였다. 페트리디쉬에 생육된 FOL을 직경 0.5 mm borer를 이용해 잘라 MEB(Malt Extract Broth)로 옮겨서 광조건에서 16시간, 암조건에서 8시간 주기로 25℃에서 7일간 배양하였다. 배양 후 4점의 거즈로 균사를 제거하고, 포자는 hemocytometer를

사용하여 멸균수로 10^6 cfu/mL 농도가 되도록 희석하였다.

2. 균사생장 억제 효과 검정

공시 균주의 항균활성 시험을 위해 paper disc법(Murray et al., 1999)으로 생장 억제율을 측정하였다. PDA 증양에 *F. oxysporum* 균사 절편을 접종하고, 이로부터 2.5 cm 떨어진 곳에 멸균된 paper disc(advantec, 10mm, lot.71010691)를 올려놓고 각각의 미생물을 65 μ L씩 접종하였다. 25℃에서 3일간 배양한 후 disc 주위의 균사 생장억제 정도(inhibition zone)를 조사하여 균사 생장 억제율을 계산하였다.

3. 분생포자발아 억제 효과 검정

S37-2와 GHR1-1의 토마토 시들음병 포자발아 억제 효과를 조사하기 위해 FOL 분생포자를 1×10^4 cfu/mL 농도로 희석하여 현탁액으로 만들어 사용하였다.

제조한 포자현탁액을 96 well microplate에 100 μ L 분주하고, 각각의 미생물을 1×10^7 cfu/mL 농도로 조정하여 각각 100 μ L를 동일한 well에 분주하였다. 28℃에서 24시간동안 배양한 후 현미경(Leica Microsystems, DE/DFC320) 20 \times 로 분생포자의 발아를 관찰하고 기록하였다. 임의로 30개 포자를 관찰하여 발아관의 길이가 분생포자 길이의 절반 이상 나온 것을 발아라 간주하여 다음과 같은 식으로 환산하여 나타내었다.

$$\text{발아율(\%)} = \frac{\text{분생포자 발아 수}}{\text{총 분생포자 수}} \times 100$$

4. 온실유묘검정

S37-2와 GHR1-1 균주의 처리 시기에 따른 토마토 시들음병 방제효과를 검정하기 위해 파종 시 5일 간격 3회 처리, 제2엽 전개 시 5일 간격 3회 처리로 구분하여 시험을 수행하였다. 파종시 처리는 상토에 40구 트레이에 담아 토마토 종자(베타티니, 피피에스)를 파종하였다. 각각의 미생물은 1×10^7 cfu/mL 농도로 희석하여 5일 간격으로 3회 주당 20 mL씩 관주 처리하였다. 제2엽 전개 시 처리는 토마토 제2엽이 전개될

때 FOL 포자현탁액을 6.9×10^6 cfu/mL 농도로 희석하여 접종하고, 각각의 미생물을 1×10^7 cfu/mL 농도로 희석하여 5일 간격으로 3회 주당 20 mL씩 관주 처리하였다. 대조구로는 시판자재를 권장 희석배수로 희석하여 처리하였고, 5주 후에 시들음병의 발병정도를 조사하였다. 발병 지수는 0=건전, 1=도관이 갈변되나 지상부의 생육은 정상인 것, 2=도관이 갈변되고 지상부의 생육이 약간 억제된 것, 3=도관이 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화한 것, 4=생육이 심하게 억제되고 황화하여 시들고 낙엽된 것, 5=고사 등 6단계로 하였다(Cai et al., 2003; Park et al., 2012; Park et al., 2013).

$$\text{이병주율(\%)} = \frac{\text{처리구 이병주수}}{\text{처리구 총 조사주수}} \times 100$$

$$\text{방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{처리구 이병주율}}{\text{무처리구 이병주율}} \right) \times 100$$

5. 통계분석

토마토 시들음병 방제효과 검정을 위해 4×10 연결 포트를 이용한 유도검정 외 모든 실험은 3회 이상 반복하여 이루어졌으며, PASW(PASW Statistics 18)를 사용하여 ANOVA 분석하였다. 처리 평균간 비교를 위해 Duncan's Multiple Range Test(DMRT)를 실시하였고, $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성을 검정하였다.

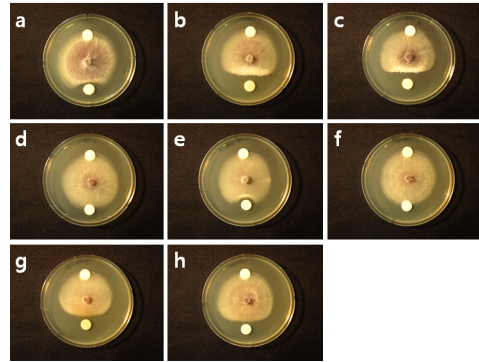


Fig. 1. Antifungal test of EM(effective microorganisms) by paper disc method against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *B. subtilis* S37-2 (a); *Pseudomonas* sp. GHR1-1(b); S37-2+GHR1-1(c); TSB(d); Biological agent 1 1×(e); Biological agent 1 500×(f); Biological agent 2 1×(g); Biological agent 2 500×(h).

결과 및 고찰

1. 군사생장 억제 효과

Paper disc법을 이용하여 공시 균주가 토마토 시들음병원균의 생육에 미치는 효과를 Fig. 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이 *Bacillus subtilis* S37-2와 *Pseudomonas* sp. GHR1-1 처리구 모두 병원균의 생육을 억제하였고, 두 균주를 혼합하여 처리한 처리구에서 39.5%로 가장 높은 억제효과를 보였다. 배지 자체 처리구에서는 병원균의 생육을 전혀 억제

Table 1. Effect of EM(effective microorganisms) on mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Treatment	Concentraion	Inhibition rate (%)
<i>Bacillus subtilis</i> S37-2	1.7×10^7 cfu/mL	24.0 ^d
<i>Pseudomonas</i> sp. GHR1-1	1.2×10^7 cfu/mL	38.4 ^a
S37-2+GHR1-1	1.45×10^7 cfu/mL	39.5 ^a
TSB	-	-
Biological agent 1	1×	27.6 ^{bc}
	500×	-
Biological agent 2	1×	29.7 ^b
	500×	24.9 ^{cd}

하지 못하였으며, 대조구인 생물농약 1과 생물농약 2 원액 처리구에서도 우수한 억제 효과를 보였다. 그러나 생물농약 1은 권장 희석배수인 500배로 희석하여 처리했을 때는 병원균의 생육을 억제하지 못했다. 따라서 분생포자발아 억제 효과 검증시험과 유묘검정 시험에서는 생물농약 2를 가지고 시험하였다.

2. 분생포자발아 억제 효과

유용미생물 처리에 따른 시들음병 포자 발아 억제 효과를 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 미생물 처리에서 멸균수를 처리한 무처리구에 비하여 포자 발아 억제효과를 보였으며, 특히 GHR1-1은 42.68%로 포자 발아를 억제하였다. TSB 배지를 단독으로 처리

했을 때와 대조자재를 처리했을 때는 무처리구에 비하여 포자 발아율이 더 증가하였다. 이 결과로 보아 대조자재는 군사생장억제에는 효과적이었으나, 포자 발아억제에는 효과적이지 못한 것으로 사료된다.

3. 미생물 처리시기에 따른 토마토시들음병 방제효과

처리시기에 따른 토마토 시들음병의 방제효과를 조사하기 위해 온실에서 유묘검정 시험을 실시한 결과를 Table 3에 나타내었다. S37-2와 GHR1-1을 파종기와 제2엽기에 각각 처리하였을 때 대조구의 발병 지수가 2.3과 3.0인 것에 반해 S37-2를 처리하였을 때는 발병지수가 각각 1.0과 1.3으로 나타났으며, GHR1-1

Table 2. Effect of different treatments on spore germination of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Treatment	Concentraion	Spore germination rate (%)	Inhibition rate (%)
<i>Bacillus subtilis</i> S37-2	1.7×10^7 cfu/mL	30.89 ^{ab}	12.83
<i>Pseudomonas</i> sp. GHR1-1	1.2×10^7 cfu/mL	20.31 ^a	42.68
S37-2+GHR1-1	1.45×10^7 cfu/mL	22.16 ^a	28.26
TSB	-	48.76 ^d	-
Biological agent 2	1×	41.59 ^{bcd}	-
	500×	45.45 ^{cd}	-
Sterile water	-	35.44 ^{bc}	-

Table 3. Control effect of fusarium wilt on tomato according to inoculation timing of EM

Inoculation timing	Treatment	Disease severity	Infected plant (%)	Control efficacy (%)
Sowing stage	<i>Bacillus subtilis</i> S37-2	1.0	19.5	58.1 ^b
	<i>Pseudomonas</i> sp. GHR1-1	0.1	2.5	94.6 ^a
	S37-2+GHR1-1	0.3	6.0	87.1 ^a
	TSB	1.1	22.0	52.7 ^b
	Biological agent 2	2.3	45.6	1.8 ^c
	Tab water	2.3	46.5	-
Two-leaf stage	<i>Bacillus subtilis</i> S37-2	1.3	26.5	55.8 ^b
	<i>Pseudomonas</i> sp. GHR1-1	1.2	24.0	60.0 ^b
	S37-2+GHR1-1	0.9	17.5	70.8 ^a
	TSB	2.1	41.5	30.8 ^c
	Biological agent 2	3.3	65.5	-
	Tab water	3.0	60.0	-

을 처리했을 때는 발병지수가 0.1과 1.2로 나타났다. 이것으로 보아 파종기에 처리했을 때 발병지수가 낮아지는 것을 볼 수 있었으며, 파종기에 GHR1-1을 처리했을 때 방제효과가 94.6%로 토마토시들음병에 대한 GHR1-1의 방제효과가 매우 우수한 것을 확인할 수 있었다. 반면에 대조구인 생물농약의 방제효과는 매우 낮았다.

토마토시들음병에 대한 생물적 방제로 토마토 식물로부터 분리한 내생균주 *Bacillus amyloliquefaciens* FBZ24 균주를 종자처리+종자침지+토양관주+엽면살포했을 때 효과적으로 발병도를 감소시켰다고 보고하였다(Park et al., 2013). 또한 키틴분해미생물 *B. subtilis* CRB20 균주를 토마토 종자에 처리했을 때 토마토 시들음병 발병을 감소시켰으며, CRB20 균주와 키틴, CFCW(곰팡이세포벽)을 함께 처리했을 때 토마토 초장, 생체중, 과실수가 증가했다고 보고하였다(Elanchezhiyan et al., 2018).

본 연구에서는 *Bacillus subtilis* S37-2와 *Pseudomonas* sp. GHR1-1을 이용하여 토마토 시들음병에 대한 항균활성과 유묘검정을 통해 우수한 병 방제효과를 확인하였다. 이러한 결과는 두 균주가 친환경 미생물제로서 활용 가능성이 있다고 보여진다.

요 약

농촌진흥청에서 개발한 공시균주를 이용하여 토마토 시들음병 방제효과를 조사하였다. 그 결과, *Bacillus subtilis* S37-2와 *Pseudomonas* sp. GHR1-1은 시들음병원균의 균사생장 및 포자 발아에 억제효과를 나타냈다. 최종적으로 토마토 육묘에 처리하여 방제효과를 확인한 결과, 파종기에 2종의 미생물을 처리했을 때 제2엽기에 처리했을 때보다 발병지수가 낮아지는 것을 볼 수 있었으며, 파종기에 GHR1-1을 처리했을 때 방제효과가 94.6%로 토마토 시들음병에 대한 *Pseudomonas* sp. GHR1-1의 방제효과가 매우 우수한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 두 균주가 친환경 미생물제로서 활용 가능성이 있다고 보여진다.

감사의 글

This study was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agricultural Science

& Technology Development (Project No. PJ010825)”, Rural Development Administration, Republic of Korea.

참고문헌

1. The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Diseases in Korea. 5:151-157.
2. Larkin, R. P., and Fravel, D., R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of fusarium wilt of tomato. Plant Dis. 82:1022-1028.
3. Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. and Zitter, T. A. 1991. Compendium of Tomato Diseases. Am. Phytopathol. Soc., Proc.
4. Lim, G. T. T., Wang, G. P., Hemming, M. N., Basuki, S., McGrath, D. J., Carroll, B. J. and Jones, D. A. 2006. Mapping the I-3 gene for resistance to Fusarium wilt in tomato: application of an I-3 marker in tomato improvement and progress towards the cloning of I-3. Australasian Plant Pathology. 356: 671-680.
5. Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B. and Shen, Q. 2011. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. Biol. Fertil. Soils. 47:495-506.
6. Hariprasad, P., Divakara, S. T. and Niranjana, S. R. 2011. Isolation and characterization of chitinolytic rhizobacteria for the management of *Fusarium* wilt in tomato. Crop Prot. 30:1606-1612.
7. Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U. S. and Sharma, A. K. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. Biol. Control. 53: 24-31.
8. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. 1999. Manual of Clinical Microbiology (7th). Washington DC, ASM. p 1527-1539.
9. Cai, G., Rosewich, Gale L., Schneider, R. W., Kistler, H. C., Davis, R. M., Elias, K. S. and

- Miyao, E. M. 2003. Origin of Race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology*. 93:1014-1022.
10. Park, M. S., Jeong, B. R., Jang, K. S., Choi, Y. H., Kim, J. C. and Choi, G. G. 2012. Development of efficient screening methods for resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 30:426-431.
 11. Park, M. S., Jang, K. S., Choi, Y. H., Kim, J. C. and Choi, G. J. 2013. Simple mass-screening methods for resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 31:110-116.
 12. Elanchezhian, K., Keerthana, U., Nagendran, K., Prabhukarthikeyan, S. R., Prabakar, K., Raguchander, T. and Karthikeyan, G. 2018. Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 103:92-101.
 13. Hariprasad, P., Divakara, S. T. and Niranjana, S. R. 2011. Isolation and characterization of chitinolytic rhizobacteria for the management of *Fusarium* wilt in tomato. *Crop Prot.* 30:1606-1612.