

씨감자에 발생하는 주요 병원균의 비파괴 검사를 위한 시료 제작 방법 개발

김윤석¹, 김상우¹, 거비르 람살¹, 최원기¹, 김대용², 조병관², 이윤수^{1*}

¹강원대학교 농업생명과학대학 식물자원응용공학과

²충남대학교 농업생명과학대학 바이오시스템기계공학과

(2012년 06월 11일 접수, 2012년 06월 15일 수리)

Development of Inoculation Method for Non-destructive Detection of Various Phytopathogens on Seed Potatoes

Kim, Y. S.¹, S. W. Kim¹, K. Lamsal¹, W. K. Choi¹, D. Y. Kim², B. K. Cho²
and Y. S. Lee^{1*}

¹Department of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Department of Biosystems Machinery Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

The experiment was carried out to evaluate the level of infection caused by pathogenic bacteria and fungi before performing non-destructive detection of symptoms on seed potatoes. This study was performed by using four phytopathogens isolates i.e., *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp. received from Korean Agriculture Culture Collection (KACC). The bacterial inocular were prepared with one fold, two folds, four folds and eight folds dilution of *P. atrosepticum*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* in the concentrations of 5.0×10^8 cells/mL and 6.2×10^6 cells/mL, respectively. The results showed that the initial disease symptom was observed one day after the inoculation on potato with four fold dilution of *P. atrosepticum*. In case of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* inoculation, initial disease symptom was occurred five days after one fold dilution inoculation. In fungal pathogen inoculations, the results showed that the initial symptom was observed 14 days after the inoculations. Further experiment will be carried out with one, two, four and eight folds dilution of fungal spore suspensions for the evaluation of initial disease symptom development concentrations. These results would be applied for the non-destructive diagnosis of disease symptoms using Vis/NIR spectrometry.

Key word: Non-destructive detection, Seed potato, Potato pathogens.

서론

감자(*Solanum tuberosum* L.)는 벼, 옥수수, 밀과 더불어 세계 4대 식량작물 중의 하나로 한국에서도 가장 많이 경작되는 작물 중 하나이다. 감자는 가지과에 속하는 1년생 작물로 에너지원으로서 중요할 뿐만 아니라 인간의 성장 및 건강을 돕는 양질의 단백질과 질소화합물이 풍부하게 함유되어 있는 식물이다. 19세기 초 우리나라에 감자가 전파된 이래로 중요한 식량작물로서 자리매김하고 있다. 감자는 지하부의 괴경을 이용하는 작물로 토양내 서식하

는 식물병원성 진균 및 세균의 침입을 받기 쉽고 재배 포장 전체로 감염을 확산시킬 수 있기 때문에 심각한 문제를 일으킬 수 있다. 그러므로 건전한 씨감자 생산을 위해 수확 후 해충이나 식물병원균의 피해를 받지 않도록 저장하는 것이 중요하다. 식물병원성 진균 및 세균에 의하여 발병하는 감자 식물병은 수확 후 저장시 저온으로 인하여 발병이 억제되다가 포장에 정식하기 전 상온에 노출되면 급속도로 증식하여 병징이 나타나고 감자의 외부 및 내부에서도 발병할 수 있기 때문에 건전한 감자 생산에 큰 문제가 되고 있는 실정이다. 따라서 병징의 유무를

*Corresponding Author: Youn Su, Lee (E-mail: younslee@kangwon.ac.kr)

육안으로 판별하는 것 뿐만 아니라 육안으로 판별할 수 없는 발병 초기나 괴경 내부의 병을 판별하는 기술이 필요하다(Kim et al., 2010). 분광분석 기술은 생물재료를 비파괴적인 방법으로 농산물 내부의 품질 및 병해충 감염 여부를 신속, 정확하게 판별할 수 있는 기술이다(Son et al., 2004; Kim et al., 2011). 본 연구에서는 건전한 씨감자를 생산하기 위하여 감자의 수확 후 저장 및 정식 시 발병할 수 있는 세균 병해인 감자 무름병과 둘레썩음병 그리고 진균 병해인 검은무늬병과 시들음병을 유발할 수 있는 *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Rhizoctonia solani* 그리고 *Fusarium* sp.를 감자에 인위적으로 접종하여 Vis / NIR spectrometry를 이용한 감자 주요 병해 발생 유무를 탐색하기 위한 식물 병원성균 접종 방법을 개발하고자 수행되었다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양

본 연구에서 사용된 세균병 균주인 *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 와 곰팡이병 균주인 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp.는 Korean Agriculture Culture Collection (KACC)에서 분양받아 사용하였다(Table 1). 무름병 균주인 *P. atrosepticum*은 NB (Nutrient Broth)배지에서 28°C, 암조건에서 진탕배양 하였으며, 감자 둘레썩음병 균주인 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*는 배양온도가 26°C 이상이 되면 생육저하 현상이 나타나기 때문에 TSB (Tryptic Soy Broth)배지 24°C에서 진탕배양 하였다. 또한 곰팡이병 균주인 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. 균주는 PDB (Potato Dextrose Broth)배지를 사용하여 26°C에서 14일간 진탕배양하여 포자현탁액을 만들어 접종 하였다.

최소발병농도 확인

세균병의 최소발병농도를 확인하기 위해 강원도 감자 종자진흥원에서 분양 받은 건전한 씨감자에 *Pectobacterium*

atrosepticum, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*를 각각 5.0 x 10⁸ cells/mL, 6.2 x 10⁶ cells/mL 농도로 배양하여 1배, 2배, 4배, 8배로 희석하여 접종하였다. 희석은 증류수를 이용하여 배수희석법으로 실시하였다. *P. atrosepticum*은 감자의 중앙에 50 uL를 접종 하였다. *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*은 감자의 표피의 조금 안쪽에 pipet의 tip으로 구멍을 뚫어 100 uL를 접종하였다. 또한 곰팡이병 균주인 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp.를 배양원액과 그 2배 희석액, 4배 희석액, 8배 희석액 각각, 2.5 x 10⁸ cells/mL, 1.2 x 10⁸ cells/mL, 6.2 x 10⁷ cells/mL 그리고 3.1 x 10⁷ cells/mL의 4 처리구로 나누어 접종하였다. 곰팡이 균주의 접종은 포자현탁액을 만들어 20초간 침지하여 표면접종 하였다(Marin and Robert, 2005).

최적 접종 방법 확인

감자 주요 병원균의 비파괴 신속진단을 위한 시료를 제작하기 위해 수돗물로 감자 표면을 세척 후 2% Sodium hypochloride (NaClO)에 20분간 침지시켜 1차 표면살균 하였다. 그 후 UV light 하에서 2시간 동안 정치하여 감자 표면에 묻어 있는 수분을 제거하면서 2차 표면살균 하였다(Ramakrishna et al., 1991). 액체 배양한 각각의 식물 병원균을 slice하여 접종한 것, half cut하여 접종한 것, conical 모양의 도구를 이용하여 접종하는 3가지 방법으로 실시하여 접종 후 시간이 경과함에 따라 접종 병반의 확대정도를 확인하였다.

결과 및 고찰

최소발병농도 확인

감자 주요 병해인 무름병과 둘레썩음병은 저장 및 포장에서도 많이 발생하여 피해가 심각한 병해로 무름병은 고온다습한 환경 및 호기 또는 혐기 조건에서도 발병 및 감염이 촉진된다. 또한 감자 둘레썩음병은 온도가 26°C 이상이면 발병 억제되는 현상을 보인다. 따라서 씨감자병해의 비파괴 신속진단을 위하여 최소발병 농도를 확인하

Table 1. Plant pathogens used in this study and their host plant

Pathogen	Name of the diseases	KACC accession No.
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Soft rot	KACC 10532
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Ring rot	KACC 20123
<i>Rhizoctonia solani</i>	Rhizoctonia canker	KACC 40137
<i>Fusarium</i> sp.	Fusarium dry rot	KACC 40050

였다. 무름병의 원인균인 *P. atrosepticum*은 5.0×10^8 cells/mL을 배양 원액으로 접종하였을 때 1일 만에 3.2 mm의 병반이 발생함을 관찰할 수 있었으며, 7일 경과 후에는 접종 한 감자 전체로 병반이 확대되어있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 증류수로 8배 희석한 배양액을 접종 하였을 때 3일 경과 후 육안으로 병징을 관찰할 수 있었으며, 9일 경과 후에도 13.1 mm의 병반크기를 보임을

확인할 수 있었다(Table 2). 또한 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*는 6.2×10^6 cells/mL을 증류수로 4배 희석하였을 때 7일 경과 후 병징을 육안으로 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 또한 식물 병원 진균인 *R. solani*와 *Fusarium* sp.는 2.5×10^8 cells/mL의 농도를 원액으로 한 4배 희석액에서 각각 7일과 3일 경과 후 병징을 육안으로 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

Table 2. Ring rot lesion size in diameter caused by bacterial pathogens *P. atrosepticum* on seed potatoes.

Concentration	Days after inoculation					
	Control	1	3	5	7	9
Original	0	3.2 ^a	5.4	10.7	whole	whole
5 x 10 ⁸ cells/ml	0	1.5	4.2	7.1	11.2	19.7
4 fold dilution	0	0	3.1	4.5	7.6	14.5
8 fold dilution	0	0	2.0	4.2	6.9	13.1

^a Unit: mm

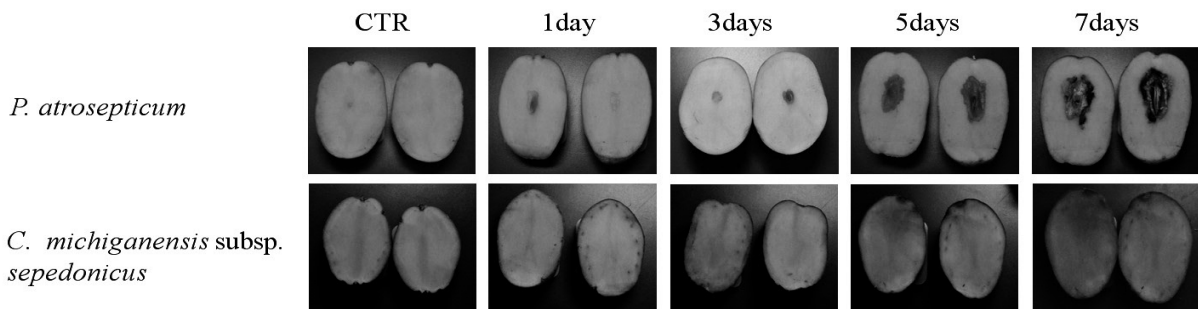


Fig. 1. Comparison of symptom development on potatoes caused by bacterial pathogens with different time intervals after the inoculation.

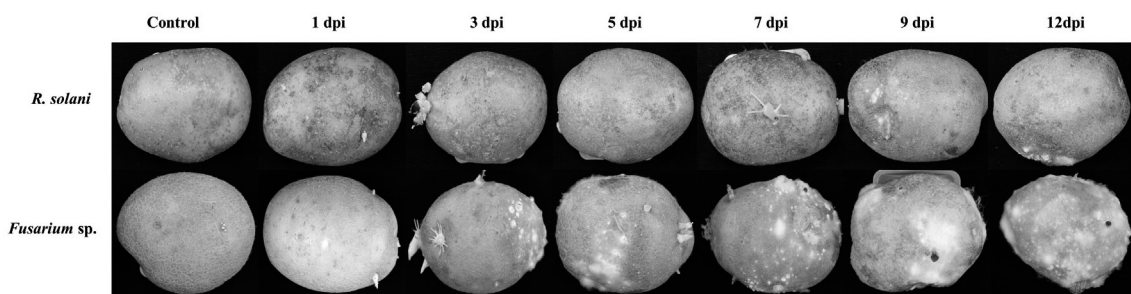


Fig. 2. Comparison of symptom development on potatoes caused by fungal pathogens inoculated 3 days of interval.

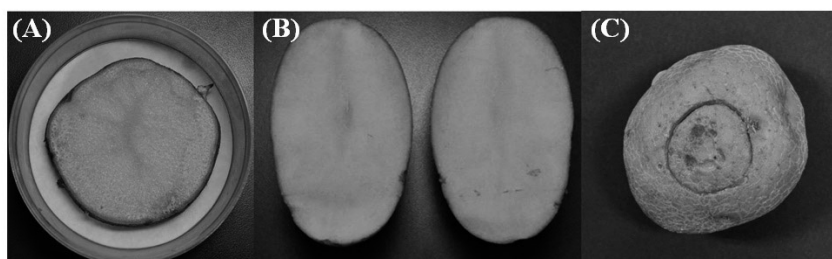


Fig. 3. Three different inoculation methods for bacterial pathogen *P. atrosepticum* on seed potatoes; (A) slice cut, (B) half-cut and (c) conical shape cut.

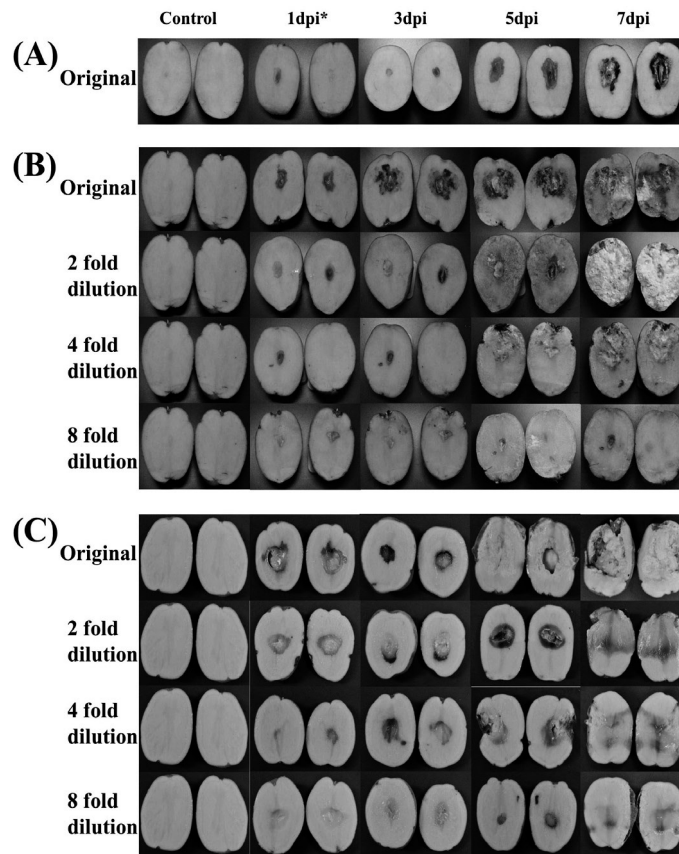


Fig. 4. Comparison of symptom development of bacterial pathogen *P. atrosepticum* inoculated with different methods on potatoes in two days of interval; (A) slice, (B) half-cut and (C) conical shape cut.
*dpi; days post inoculation of *P. atrosepticum*

최종 접종 방법 확인

씨감자 병해의 비파괴 신속진단을 위하여 인위적으로 씨감자에 병원균을 효율적으로 접종하기에 적합한 방법을 결정하기 위하여 감자를 slice, half cut, conical shape cut의 3가지 방법으로 절단 후 접종 하였다(Fig. 3). 3가지 접종 방법을 비교 실험한 결과 괴경 내부에 접종하는 것은 세균 및 다른 진균에 의한 교차오염의 위험이 큰 반면 표면살균 후 포자현탁액을 만들어 감자의 표면에 포자 형태로 접종하는 것이 가장 효율적이고 적합한 접종 방법이었으며, 세균균주의 접종 방법으로 가장 효율적인 것은 conical shape cutting으로 감자의 중심부까지 도려낸 다음 접종하여 다시 덮는 것이 노출면적의 최소화로 가장 적합한 방법이었으며, 특히 다른 균의 오염율이 적고 감자 내부의 수분 유지에 효과적이었다. 또한 conical shape cutting으로 실험을 하면 감자 내부에 목적하는 병원균의 접종이 원활하여 외부병징 외에도 내부병징의 비파괴 진단을 하기에 가장 효율적인 방법임을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

결 론

본 연구는 씨감자의 병해 유무를 발병초기 및 내부병징 발생을 육안 판별이 불가할 시 비파괴적인 방법으로 신속히 최소농도 감염을 진단하기 위한 시료 접종 개발에 그 목적이 있다. 본 연구에서 각 식물병의 최소발병농도를 확인하기 위하여 씨감자에 접종하여 병징 관찰 및 병징의 확대여부를 확인하였으며, 비파괴 실험을 위하여 식물 병원성 진균 및 세균을 씨감자에 접종하여 반사분광스펙트럼과 흡수분광스펙트럼으로 내부 및 외부에 발병된 병원균의 검출을 위한 접종 방법의 최적 방법을 결정하는 기초를 마련하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원으로 이루어진 것임.

참고문헌

- Cho, M., Jeong, W. D., Yoon, J. Y. (2007) Application of UV Technology for Surface Disinfection. J. KSEE 29(9):1020-1026.
- Kim, D. Y., Ahn, C. K., Back, I. S., Kim, J. G., Cho, B. K., Lee, Y. S., Kim, Y. S. (2011) Study on discrimination of disease-infected seed potatoes using transmittance and reflectance spectra., Proceeding of the KSAM 2011 Summer Conference 16(2):469-474.
- Kim, D. Y., Cho, B. Mo, C., Kim, Y. S. (2010) Study on prediction of internal quality of cherry tomato using Vis/NIR spectroscopy. J. Biosystems Eng. 35(6):450-457.
- Kim, D. Y., Cho, B. K., Lee, Y. S. (2011) Development of non-destructive measurement method for discriminating disease-infected seed potato using visible/near-Infrared reflectance. CNU J. Agric. Sci. 39(1):117-123.
- Brewer, M. T., R. P. Larkin (2005) Efficacy of several potential biocontrol organism against *Rhizoctonia solani* on potato. Crop Protec. 24:939-950.
- Ramakrishna, N., Lacey, J., Smith, E., (1991) Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. Int. J. Food Microbiol. 13:47-54.
- Son, J. R., Lee, K. J., Kim, G., Kang, S., Choi, K. H., Jang, I. J. (2004) Internal quality estimation of Korea red ginseng using VIS/NIR transmittance spectrum. J. Biosys. Eng. 29(4):335-340.