과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
중장기 Code	G	RIMS Code		20071390608000001	
연구과제 및 세부과제		연구분야 (code)	수행 기간	연구실	책임자
친환경 생물농약 개발		**작물보호 LS0603**	**'00~'07**	**강원도농업기술원 환경농업연구과**	**김성일**
3) 주요 토양병원균 방제를 위한 천연항균물질 분리		작물보호 LS0603	'00~'07	강원도농업기술원 환경농업연구과	김성일
색인용어	길항미생물, 항균물질, 길항작용, 생물적방제, 식물병원균				

ABSTRACT

Antibiotics are microbial toxins that can, at low concentrations, poison or kill other microorganisms. Most microbes produce and secrete one or more compounds with antibiotic activity. In some instances, antibiotics produced by microorganisms have been shown to be particularly effective at suppressing plant pathogens and the diseases they cause. Some examples of antibiotics reported to be involved in plant pathogen suppression. In all cases, the antibiotics have been shown to be particularly effective at suppressing growth of the target pathogen *in vitro* and/or *in situ*. To be effective, antibiotics must be produced in sufficient quantities near the pathogen to result in a biocontrol effect. *In situ* production of antibiotics by several different biocontrol agents has been measured; however, the effective quantities are difficult to estimate because of the small quantities produced relative to the other, less toxic, organic compounds present in the phytosphere. And while methods have been developed to ascertain when and where biocontrol agents may produce antibiotics, detecting expression in the infection court is difficult because of the heterogenous distribution of plant-associated microbes and the potential sites of infection. In a few cases, the relative importance of antibiotic production by biocontrol bacteria has been demonstrated.

Bacillus strains produce many kinds of bioactive peptides as secondary metabolites. Some of them are synthesized nonribosomally by a large multifunctional enzyme complex.

We isolated *B. subtilis*, *B. Polymyxa* and Streptomyses spp., which suppresses the growth of phytopathogenic fungi in vitro. The suppressive effect of strain YB8 is mainly due to production of the antifungal materials.

we have usually grown the three isolates in potato-dextrose+nutrient broth (PDNB), which may not have been an optimal growth medium for production of antifungal

materials. The medium composition modified to produce enough antifungal metabolites and The defined medium contains mannitol as a carbon source, and glutamic acid as a nitrogen source, along with inorganic salts. We have conducted studies with both the broth and agar-solidified form of this medium, finding that the bacteria grow well in both. In field test the metabolites inhibited diverse fungal plant-pathogens and they can be useable substituable for chemical fungicides.

1. 연구목표

본 연구는 환경친화적인 농산물재배에 필요한 식물병방제용 재료를 토양서식하는 미생물을 이용하여 개발하고자 수행하였다. 이 기술은 토양에 서식하고 있는 미생물인 세균류, 방선균류, 곰팡이류 중에서 식물병원균에 대해 생장을 억제하고 사멸시키는 물질을 생산하여 병발생을 억제해 주는 유용미생물 즉 길항미생물을 이용하며, 길항균미생물은 식물병원균이 살고 있는 공간에서 함께 서식하면서 영양경쟁관계, 기생작용 등을 통하여 병원균의 식물체 침입을 방지해준다.

최근 환경영향에 대한 관심과 환경친화적인 농산물에 대한 소비자들의 수요증가로 화학농약 사용에 대한 제한이 심화되고 있다. 그러나 소득을 목표로 작물을 재배하는 농업경영에서는 단일작목을 반복적으로 재배할 수 밖에 없다. 그에 따라 병해충의 밀도가 높아지고 이들을 방제하기 위해서는 농약의 사용이 불가피하고 지금까지 이룩한 농산물의 수량증대와 품질향상은 화학농약이 크게 이바지하였다. 그러나 화학농약사용에 대한 사회적 제한요인이 증가되고 이에 대응한 새로운 병해충방제 기술개발이 시급히 요구되고 있다. 화학농약을 대신할 차세대 방제수단으로 길항미생물에 대한 연구가 국내외적으로 활발히 연구진행고 있으며 몇몇 길항균들은 미생물농약으로 상품화되어 판매되고 있고 미국, 유럽, 일본 순으로 농업선진국 순으로 다양한 제품이 개발되어 판매되고 있다. 식물병방제를 위해 이용되는 길항미생물은 연작지에서 병발생이 자연적으로 억제되는 토양병억제토양(Suppresive soil)에 분포하는 다양한 미생물에 대한 연구에서 시작되었으며, 이러한 길항길항미생물 중 병원균에 대해 항균물질을 생산하는 균종들이 미생물농약개발의 원재료로 사용되고 있다.

길항미생물의 이용방법은 생균을 대량증식하여 제형화한 후 식물체의 지상부나 근권에 접종하여 병방제를 유도하는 방법, 길항균이 생산하는 생장조절물질, 항균물질을 정제하여 새로운 합성제품개발을 위한 전구물질로의 활용, 마이신과 같이 품종육성과 유전공학적 유전자 재조합기술을 이용한 파일럿 배양기술에 이용하는 방법들이 실용화되어있다. 대량배양공정의 성공여부는 단위 부피당 목적하는 항균물질의 생산량에 의해 결정되고 본 연구에서는 분리 보존중인 3종의 길항균에 대한 항균물질 생산을 위한 배지조성과 식물병원균들에 대한 방제효과를 조사하여 실용화여부를 연구하였다. 방제대상병은 시설재배지에서 발생하는 곰팡이병을 주 목표로 하였으며 각 식물병의 발병환경과 발병양상을 조사하여 효과적인 방제법을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 방제대상병

오이 흰가루병(*Sphaerotheca fuliginea*)은 정식 후 3주째부터 발생하기 시작하여 상위엽으로 병반이 계속 전이되었다. 토마토 흰가루병은 생육 후기인 4단 수확기부터 병반이 관찰되고 억제재배농가에서는 9월 중순부터 발생하여 10월말 수확후기 까지 병발생이 진행되었다(그림 1).

Sphaerotheca fuliginea

Erysiphe cichoracearum

<그림 1> 흰가루병(좌 - 오이, 우 - 토마토)

고추탄저병(*Glomerella cingulata*)은 8월 하순 야간온도가 낮아지고 일교차가 커짐에 따라 병반 출현율이 높아지고, 감염된 과는 초기 수침상으로 움푹패인 증상을 보이고 병이 진행됨에 따라 자낭각형성에 의해 검게 보이고 과는 말라비틀어진다. 감염된 고추는 수확 후 건조기에도 병반이 진전되어 상품성을 잃게한다(그림 2).

Glomerella cingulata

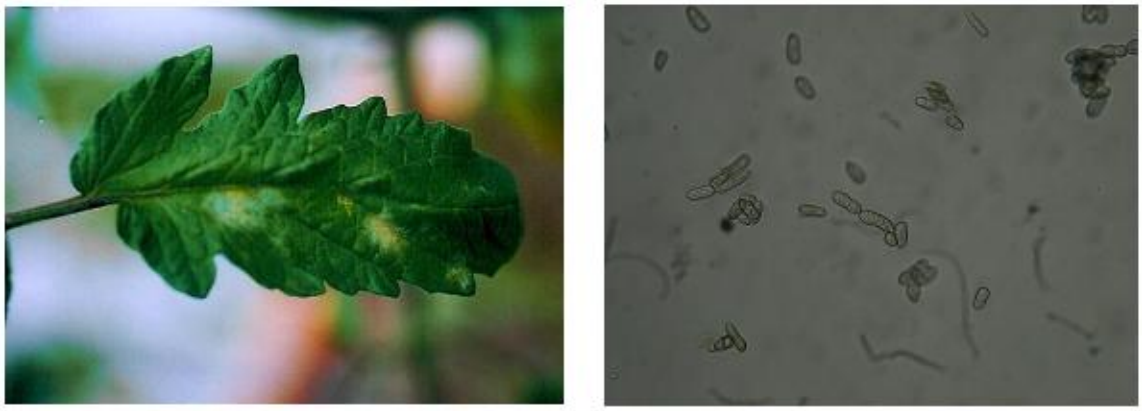
<그림 2> 고추탄저병

오이노균병(*Psedoperonospora cubensis*)은 장마철 비온 후 개인날 시설내온도가 급격히 올라가면 순식간에 병이 발생한다. 장마기에 발생한 노균병은 잎가장자리가 물에 대인 상태로 손상을 주고 농가에서는 세균병으로 오인하여 방제하는데 어려움을 겪고 있다. 가을철 수확후기에는 잎 전체에 황색의 병반이 형성되고 병진전 속도는 완만하다(그림 3).

Psedoperonospora cubensis

<그림 3> 오이노균병

잎곰팡이병(*Fulvia fulva*)은 육묘기에 병이 발생하여 정식후 병반이 진전되는 병으로 친환경농업실천농가, 무농약재배농가에 발생하면 경제적인 피해가 매우 크다. 이병은 발병 초기에는 줄기나 과에 병반을 형성하지 않아 피해정도가 미미하나 방치시 병반확대 속도가 빨라 잎의 광합성능력을 격감시킨다. 불완전균으로 포자형성능이 왕성하고 형성된 포자는 바람에 따라 퍼져나가므로 발생초기 이병잎을 제거하고, 약제살포시 잎 뒷면에 약액이 충분히 묻도록 주의를 요한다(그림 4).



Fulvia fulva

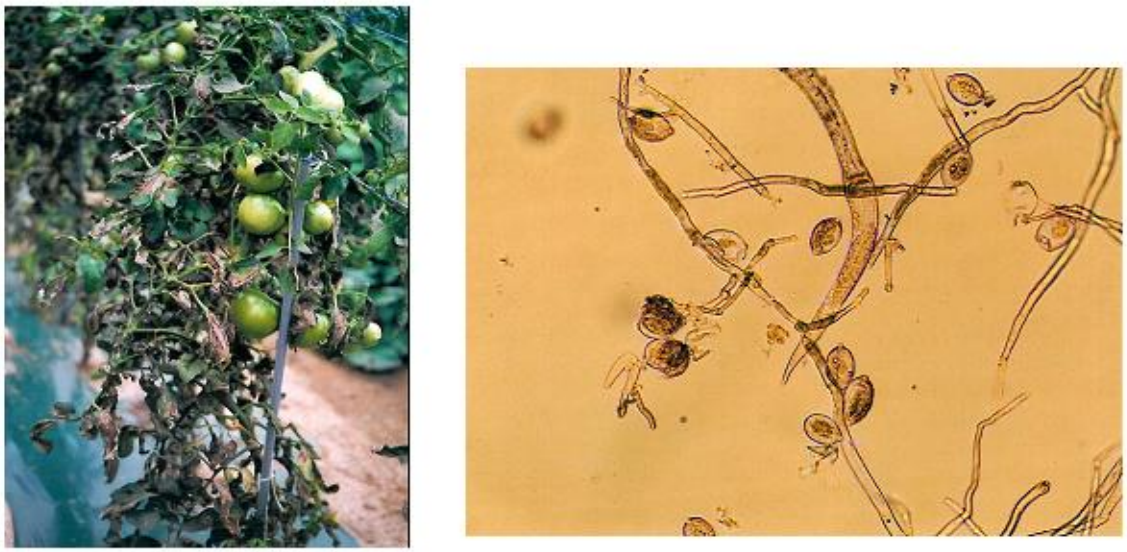
<그림 4> 잎곰팡이병

잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)은 꽃, 잎, 과, 줄기 지상부 모든 부위에서 발생하며 반촉성 재배시 4단 이상 착과시기인 4월 초·중순에 그 피해가 심하게 나타난다. 발병환경으로는 시설내온도가 20℃이하이고, 과습한 환경에서 병발생 정도가 심하다. 발병초기 예방을 철저히하여 포자의 비산을 최소화하고, 환기를 충분히 하여 공중습도를 낮게 유지하고, 광엽이 되지않도록 관수량을 최소화하여야한다(그림 5).

Botrytis cinerea

<그림 5> 잿빛곰팡이병

역병(*Phytophthora infestans*)은 가식육묘상, 4월, 장마철 저온 다습한 환경에서 년중 발생하며 발병부위는 엽맥을 따라 검은색의 수침증상을 보이고, 잎 뒷면에 솜털모양의 균사생장가 함께 유주낭을 형성한다. 형성된 유주자는 바람에 따라 확산되고 병원성이 강하여 단기간내에 넓은 면적에 피해를 준다. 발병초기 병든 부위는 흔들리지 않게 비닐 등에 넣어 제거하고 적용약제를 4~5일 간격으로 2회 정도 살포하여 방제한다(그림 6).



Phytophthora infestans

<그림 6> 역병

조기잎마름병(*Alternaria* sp.)은 수확후기(9월 말 이후) 야간기온이 떨어져 일교차가 심한 억제작형 시설내에서 발병한다. 주로 잎에서 발병하나 방치하여 병원균 밀도가 증가하면 과의 꽃받침 부위에서 증식하여 열과율을 높여 수량감소에 영향을 준다(그림 7).

Alternaria sp.

<그림 7> 조기잎마름병

잘록병(*Pythium aphanidermatum*)은 2월중·하순에 정식하는 반촉성재배농가에서 발생하고, 감염된 정식묘는 정식 후 10~15일 이내에 줄기 지제부가 꺾여 고사한다. 이병은 토양전염병으로 정식후 관수시 적용약제를 섞어 뿌려준다(그림 8).

Pythium aphanidermatum

<그림 8> 모잘록병

나. 토양미생물 분리

식물병원균에 길항력이 있는 미생물을 분리하기 위해 채취한 토양은 지퍼백 위한 비닐 포장지에 넣은 후 ice box에 보관하여 실험실에 옮겨 4℃ 냉장고에 보관하면서 분리작업을 수행하였다.

○ *Bacillus* 속

*Bacillus*속 세균류를 분리하기 위해 보관중인 토양을 2주간 음건하여 영양세포상태로 존재하는 세균류의 밀도를 낮추었다. 건조된 토양은 접종 loop 하나 분량을 취하여 멸균수 0.3㎖을 넣어 준비한 1.5㎖ 원심분리관에 넣은 다음 test tube mixer로 고루 섞어 토양현탁액을 준비하였다. 준비된 토양현탁액은 80℃ 항온수조에 10분동안 열처리하고, Peptone-yeast extract-dextrose agar(PYEDA; 2g peptone, yeast extract 2g, dextrose 5g, agar 15g, D.W. 1ℓ)배지에 도말접종하였다. 토양현탁액을 접종한 배지는 항온배양기(30℃)에 2일간 배양하고, 형성된 집락으로부터 균주를 채취하여 보관하였다. 보존 중인 균주는 gram-staining, endospore staining을 실시하여 *Bacillus* 속에 속하는 종여부를 확인하였다.

○ 방선균류

토양내 방선균류를 분리하기 위해 보관중인 토양은 25℃ 배양기(대류식)에서 10일간 건조시켜 균사상태의 방선균균체를 포자형태로 전환되게 유도하였다. 건조시킨 토양시료는 5g 취하여 250㎖ 삼각플라스크에 멸균수 45㎖와 섞어 10분간 진탕(150rpm)하여 토양현탁액을 준비하였다. 준비된 토양현탁액을 Egg albumin agar plate(EAA; Dextrose 1g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $Fe_2(SO_4)_3$ 0.01g, egg albumin 0.25g, agar 15g, cycloheximide 40㎎, D.W. 1ℓ)와 Chitin agar plate(CA; colloidal chitin 1g, K_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.5g, $MgSO_4$ 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g, $ZnSO_4$ 0.001g)에 0.1㎖씩 접종한 후 bead로 전면 도말접종하였다. 접종한 Plate는 28℃ 배양기에서 15일간 배양하면서 포자형성유무, chitin분해능 등을 확인하였다.

다. 길항력조사(대치배양법)

분리보존 중인 균주들은 PDA배지와 Nutrient agar배지를 1:1로 섞어 준비한 고체배지(PDNA)에서 정상적인 생장을 하였다. 각 보존균주들이 생산하는 대사산물들의 병원균에 대한 항균활성을 조사하기 위해 PDA와 V8 juice agar에 배양한 병원균 균사를 cork borer로 배지와 함께 떼어낸 다음 PDNA배지에 보존균주와 일정한 간격을 두고 동시에 접종한 후 배양기에 배양하면서 형성된 저지원의 거리를 조사하였다.

라. 길항균 동정

대치배양시 병원균에 대해 생육을 억제하는 저지원을 형성하는 균주는 gram stain과 전자현미경 관찰로 형태적 특성을 확인하고, catalase test, oxidase test를 세균동정기(Bio-log)를 이용하여 동정을 실시하였다.

마. 항균물질 분리

길항균이 생산하는 항균물질의 병방제 효과를 조사하기 위해 보존중인 Bacillus spp.는 Nutrient broth에 접종하여 30℃ 진탕배양기(130rpm)에서 24시간 배양하고, 방선균류는 P-PDA plate에 접종하여 25℃ 배양기에서 15일 배양하여 형성된 포자를 수확하여 접종원으로 사용하였다. 항균물질생산능 조사를 위해 CPM-Ca액체배지에 준비한 접종원을 접종하여 32℃에서 3일간 배양하였다. 배양체는 원심분리(6,000rpm, 15min)하여 균체를 제거하고 상층액을 모아 6N HCl로 pH가 2.5가되도록 조정한 후 원심분리(10,000rpm, 20min)하고 상층액을 모아 병방제효과를 조사하였다.

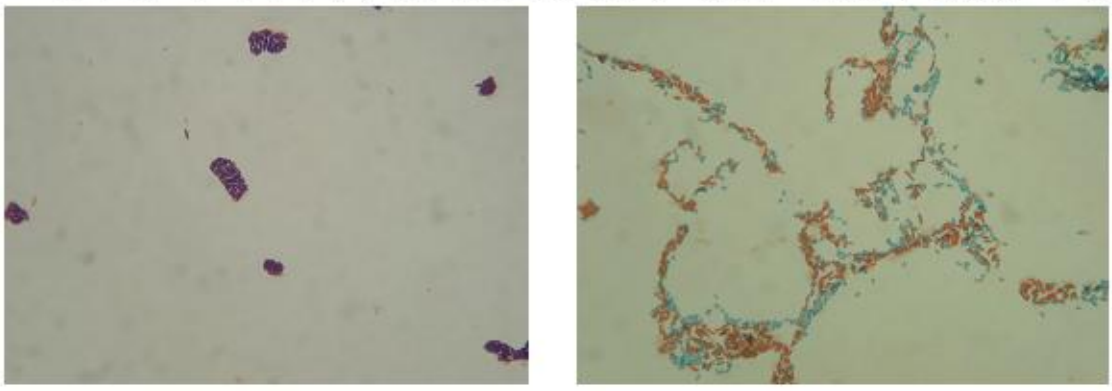
3. 결과 및 고찰

가. 공시병원균

시설재배지 주요병원균 중 흰가루병원균과 노균병을 제외한 균주들은 인공배지에서 배양이 가능하여 길항균들의 항균작용과 포장에서 방제효과를 용이하게 진행할 수 있었다. 역병균(*P. infestans*)는 19℃에서 정상적인 생장을 하고 9cm petri dish 중앙에 접종하여 가장자리까지 자라는 기간은 30일이상 소요되고 유주자낭 형성은 20일 이상 소요되었다. 따라서 역병의 식물체내 잠복기는 매우 길다고 예측할 수 있으며 방제시기는 관찰시점 보다 먼저 행함으로써 병의 확산을 예방할 수있을 것으로 예견된다. 잿빛곰팡이병원균(*B. cinerea*)은 PDA배지에서 포자형성이 부진하고 배양시 광의 영향이 크게 작용하였다. 잘록병원균(*P. aphanidermatm*)은 실내온도 이상에서 생육이 왕성하고 묘에 접종하면 12시간이내에 그림 8과 같이 꺾여 고사하는 급성병원성을 띄었다.

나. 토양미생물분리

토양에 분포하는 *Bacillus*는 경작지 토양 1g당 10^3~10^6cfu로 개체수분포가 높았으며 방선균류도 비슷한 분포수를 보였다. 분리한 *Bacillus* 균주들은 그램양성균으로 malachite green으로 염색하면 세포영양체 내부에 endospore를 형성하고 있음을 확인할 수 있었다(그림 9).



<그림 9> *Bacillus* sp.

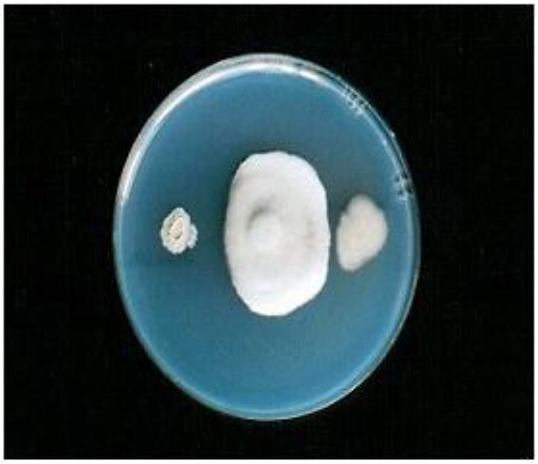
다. 길항력조사

*Bacillus subtilis*는 저온(19℃)에서 자라는 *P. infestans*과 고온(30℃)에서 잘자라는 *A. solani* 모두에 대해서 길항력을 보이고, 저지대도 균종에 따라 큰 차이를 보이지 않았다(그림 10).

방선균류는 *A. solani*와 *P. infestans*에 대한 길항력이 있으나 *F. oxysporum*과 *P. spinosum*에 대해서는 약하게 억제하였다(그림 11). *B. polymixa*는 공시한 7가지 병원균에 대해 억제력이 강하게 나타났으며 대치배양시 병원균의 대사산물에 의한 생장장애 현상이 거의 없었다 (그림 12).

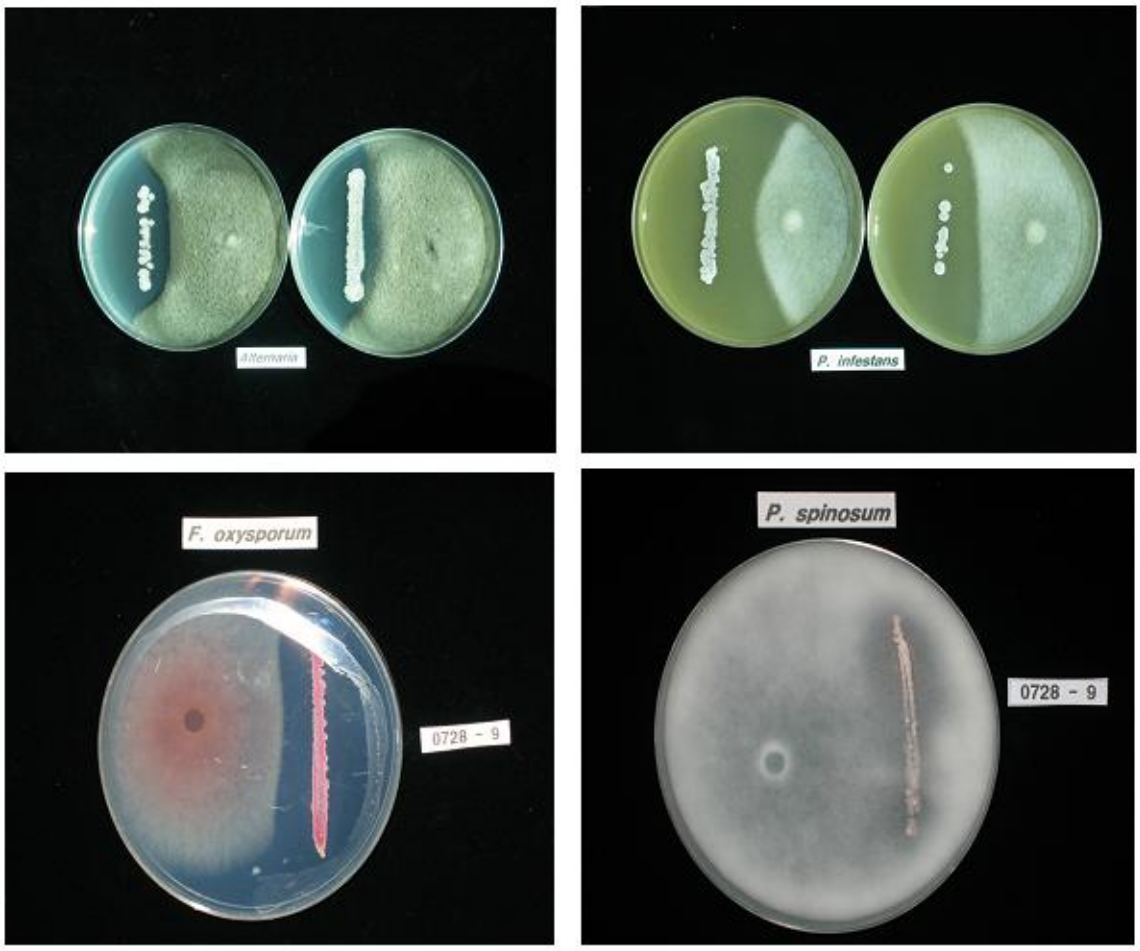
Alternaria solani

Fusarium oxysporum

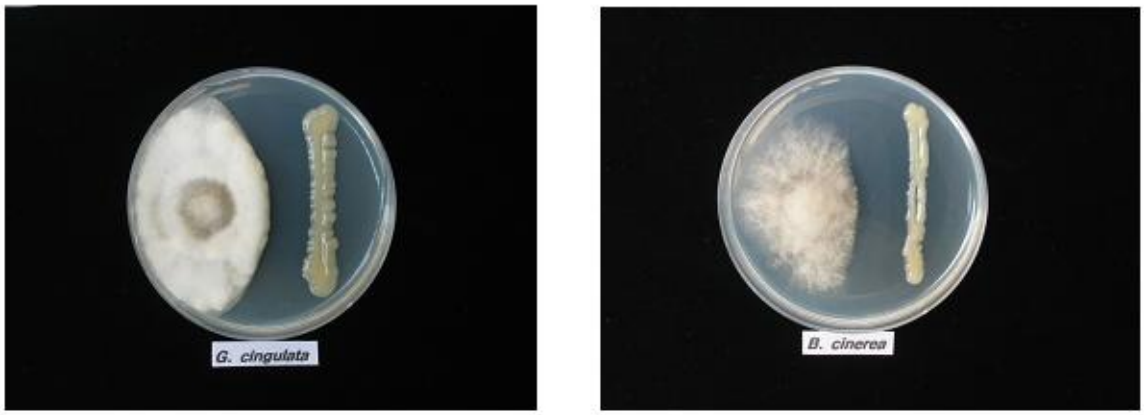


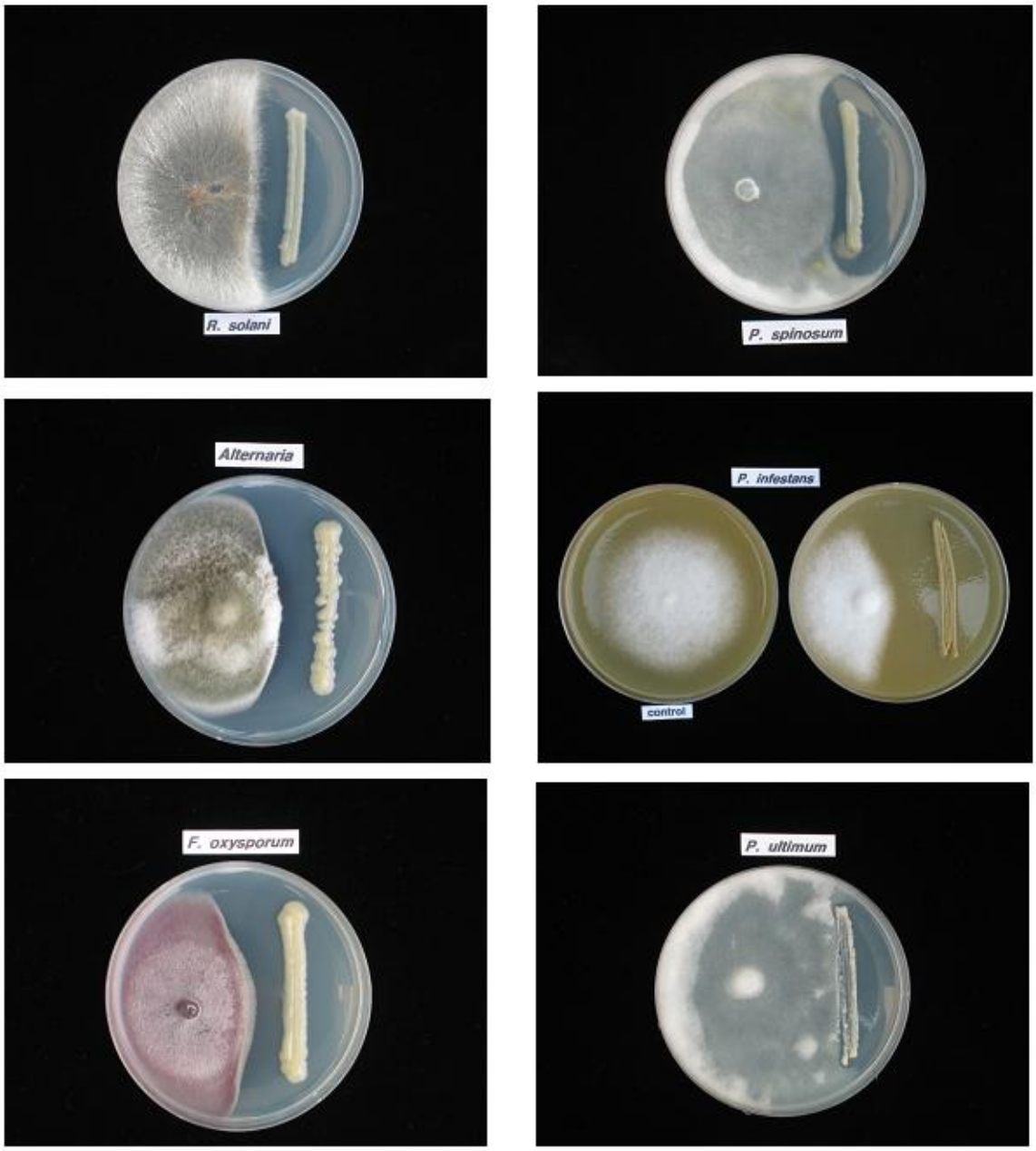
Glomerella cingulata

<그림 10> *Bacillus subtilis*의 병원균에 대한 균사생육억제능



<그림 11> *Streptomyces* sp. 병원균 균사 생육 억제





<그림 12> *Bacillus polymixa* 병원균 균사 생육 억제

라. 항균물질생산을 위한 배지조성실험

토양유래 주요식물병원균들인 역병, 반신위조병, 잘록병에 대해 항균력이 있는 길항균대사산물은 *Bacillus*는 CPM배지에서 방선균은 Soybean meal배지에서 왕성하게 생성하였다. 배양방법은 액체배지에서 폭기장치로 공기를 공급하면서 진탕배양하였으며 배양조건과 최종배지의 산도변화는 표 1과 같았다.

표 1. 항균물질 수확량 증대용 배지조성

균 주 명	배양배지	배양온도	배양일수	배양여액 pH
Bacillus subtilis	CPM	32℃	5일	6.8
B. polymixa	CPM	32℃	5일	6.8
Streptomyces sp.	Soybean meal	28℃	4일	8.2

고체배지에서 배양하여 동결건조시킨 후 각 용매조건에 따른 항균물질 추출여부를 확인한 결과 *Streptomyces sp.*가 생산한 항균물질은 비극성용매에서 추출이 용이하였으며 항균력조사는 추출된물질을 Methanol에 희석시킨 후 Paper disc에 흡착시켜 말린 다음 PDA배지 위에 대치배양하여 저지원 형성 유무로 항균력을 확인하였다. 추출된 물질 중 Chloroform : Methanol(20:1) 용매조건에서 항균력이 높은 물질이 추출되었다(표 2).

표 2. 토양병방제용 *S. griseus* 유래 항균물질 역가조사

추출용매조성 (chloroform:Methanol)	최저억제농도(㎍/㎖)			
	Fusarium oxysporum	*Phytophthora capsisi*	*Rhizoctonia solani*	*Pythium ultimum*
100:1	>1000	>1000	>500	>1000
50:1	>1000	>500	<100	>1000
20:1	<100	<100	<50	<50

액체배양에서 생산된 항균물질을 silica gel을 이용한 column chromatography로 분리하여 최대방출분획물들에 대한 항균력을 조사한 결과 병원균 종에 대한 항균력은 차이가 있었으나 *Streptomyces sp.* 이 생산한 항균력은 확인되지 않았다(표 3).

표 3. 길항균유기용매 추출물[b] 최저항균농도(MIC)

조사대상균	MIC(ppm)		
	Bacillus subtilis	*B. polymixa*	*Streptomyces sp.*
Fusarium oxsporum	100	100	500
Rhizoctonia solani	50	100	-
Pythium ultimum	200	100	-
Phytophthora infestans	500	500	-
P. capici	500	500	-

[b]유기용매, Silica gel(column,250㎖), Chloroform:Me-OH(50:1)

액체배양과 고체배양으로 생산한 각 길항균주들의 항균물질을 수확하여 용매 DMSO로 유화제로 시료를 준비한 다음 살포시에는 1,000배 희석비율로 물에 녹인 다음 농약사용지침에 따라 살포시기와 횟수를 수행하였다.

역병은 발병초기에 살포하여 주변 엽으로 전이되는 병반수를 조사하여 방제효과를 계산하였으며 현미경관찰시 병반부위의 균사와 유주자낭은 서로 격리되지 않고 말라 비틀어졌다.

잎곰팡이병은 1~2엽에 병반이 형성된 시점에서 살포하기 시작하여 5일간격으로 2회 살포한 후 수확후기까지 병반 진전정도를 조사하여 방제효과를 조사하였다. 살포후 균사와 포자의 이상증상은 관찰되지 않았으나 병반의 전이형상이 멈추고 *B. polymixa*와 *Streptomyses griseus*가 생산한 항균물질들이 80%정도의 방제효과를 보였다(표 4).

표 4. 길항균 대사산물 병방제효과조사

길 항 균	작물명	재배환경	병피해	방제효과(%)
Bacillus subtilis	토 마 토	노 지	역 병	73.2
		시 설 재 배	잎 곰 팡 이	64.4
			잿빛곰팡이병	86.7
	오 이	시 설 재 배	노 균 병	65.4
			흰 가 루 병	92.3
B. polymyxa	토 마 토	노 지	역 병	82.3
		시 설 재 배	잎 곰 팡 이	78.2
			잿빛곰팡이병	94.7
	오 이	시 설 재 배	노 균 병	67.8
			흰 가 루 병	74.3
Streptomyces griseus	토 마 토	노 지	역 병	86.7
		시 설 재 배	잎 곰 팡 이	87.3
			잿빛곰팡이병	64.2
	오 이	시 설 재 배	노 균 병	56.7
			흰 가 루 병	57.4

길항균 배양여액을 이용한 고추탄저병 방제시험은 10배 희석 후 고추탄저병방제용 농약사용지침에 따라 적용약제와 함께 수행하였다. 고추탄저병은 수확후기에 64.3%로 높게 발생하였으며, *B. subtilis*와 *B.polymixa*배양여액은 적용약제와 비슷한 방제효과를 보였다(표 5).

표 5. 길항균배양여액 고추탄저병 방제[b]효과(노지)

처리내용	희석배수	이병과율(%)	방제효과(%)
Bacillus subtilis	10배	17.3[b]	73.1
B. polymixa	10배	15.7[ab]	75.6
Streptomyces sp.	10배	20.4[b]	68.3
고 추 탄	1,000배	11.6[a]	81.9
포 름 디	1,000배	9.8[a]	84.7
대 조 구	-	64.3[c]	-

[b]살포방법 - 발병초기 10일간격 3회, 조사시기 - 최종살포 후 5일 DMRT 0.05

오이흰가루병에 대한 길항균 배양여액은 무처리에 비해서는 발병정도가 감소되었으나 적용약제처리구에 비해 발병이 진전되었다. 희석배수를 낮추거나 물길정제 후 약효성분확인이 필요하다고 사료된다.

표 6 길항균 배양여액 토마토, 오이흰가루병방제[b]효과

처리내용	희석배수	발병도(%)		방제효과(%)	
		토마토	오 이	토마토	오 이
Bacillus subtilis	100배	38.3[c]	49.7[y]	54.7	43.0
B. polymixa	100배	28.1[b]	54.4[y]	66.7	38.7
Streptomyces sp.	100배	22.4[b]	47.6[y]	73.5	46.3
해 비 치	4,000배	9.6[a]	18.3[x]	88.6	79.4
대 조 구	-	84.5[d]	88.7[z]	-	-

[b]살포시기 - 발병초기, 10일 후 2회, 방제효과 - 방제 후 7일, 상위엽이병도지수

*Streptomyces sp.*에서 분리한 항균물질은 50ppm저농도에서 흰가루병에 대한 방제효과가 확인되었으나 B. subtilis와 B. polymixa는 500ppm 이상에서 방제효과가 확인되었다(표 7).

표 7. 길항균유래 항균물질 토마토흰가루병 방제효과

길 항 균	방제효과			
	50ppm	100ppm	500ppm	1000ppm
Bacillus subtilis	−	−	+	+
B. polymixa	−	−	+	+
Streptomyces sp.	+	+	+	+

4. 적 요

가. 길항미생물선발을 위해 토양에서 분리한 미생물을 대치배양법을 이용하여 공시병원균 생장억제능이 확인된 길항균들을 수집보관하고, 이들이 생산한 모든 2차 대사산물의 항균력을 확인하기 위해 균체를 제거한 배양여액을 준비하여 10배로 희석한 후 고추노지 포장에 살포한 결과 탄저병방제효과가 68.3~75.6%로 높았다.

나. 토마토, 오이에 발생하는 흰가루병은 길항균 배양여액처리시 무처리구에 비해 상위 엽병 진행속도가 억제되었으나 병 방제효과는 54%이하로 낮았다.

다. 컬럼크로마토그라피로 정제한 물질들의 MIC조사결과 *Bacillus subtilis*는 *Fusarium oxysporum*과 *Rhizoctonia solani*에 *B. polymixa*는 *F. oxysporum, R. solani, Pythium ultimum*에 효과가 있었으나 *Streptomyces* sp.에서는 확인되지 않았다.

라. 토마토흰가루병 방제시험에서는 *Streptomyces* sp. 유래물질 50ppm에서 병진전을 억제하여 높은 방제효과를 보였다.

마. 길항세균의 균체를 제거한 배양여액을 Ethylacetate로 추출하여 준비한 시료들은 각각 다른 방제기능을 보였다.

바. *B. subtilis*는 잿빛곰팡이, 흰가루병에 *B. polymyxa*는 잿빛곰팡이에 *S. griseus*는 역병, 잎곰팡이병에 *P. cepacia*는 노균병을 제외한 3종에 높은 방제효과를 보였다.

사. 역병과 잎곰팡이병 방제효과가 높은 *S. griseus*는 컬럼크로마토그라프 분획시 Methanol 함량이 많은 극성유기용매조건에서 분리된 분획물이 *P. capsisi*와 *P. ultimum*에 대해 20,000배 희석시에도 병원균 억제효과를 보였다.

5. 인용문헌

Anderson, A. J., Tari, P. H., and Tepper, C. S. 1988. Genetic studies on the role of an agglutinin in root colonization by *Pseudomonas putida*. Appl. Environ. Microbiol. 54:375-380.

Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Hofte, M. 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin. Mol. Plant-Microbe Interact. 15:1147-1156.

Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. W., and Jacobsen, B. J. 2002. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. Physiol. Mol. Plant Pathol. 61:289-298.

Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. W., and Jacobsen, B. J. 2004. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. Biological Contr. 30:342-350.

Benhamou, N. 2004. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan. Phytopathology 94:693-705.

Benhamou, N., and Chet, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the intersection between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. Appl. Environ. Microbiol. 63:2095 - 2099.

Biermann, B., and Linderman, R. G. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. New Phytol. 95:97-105.

Bull, C. T., Shetty, K. G., and Subbarao, K. V. 2002. Interactions between Myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. Plant Dis. 86:889-896.

Catska, V. 1994. Interrelationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and rhizosphere microflora in apple replant disease. Biologia Plant. 36:99-104.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124:803-814.

De Meyer, G., and Hofte, M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. Phytopathology 87:588-593.

Duchesne, L. C. 1994. Role of ectomycorrhizal fungi in biocontrol. Pages 27-45 in: Mycorrhizae and Plant Health. F. L. Pfleger and R. G. Linderman, eds. APS Press, St. Paul, MN.

Duijff, B. J., Gianinazzi-Pearson, V., and Lemanceau, P. 1997. Involvement of the outer-membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* WCS417r. New Phytol. 135:325-334.

Elad, Y., and Baker, R. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* Ecol. Epidemiol. 75:1047-1052.

Fitter, A. H., and Garbaye, J. 1994. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil microorganisms. Plant Soil 159:123-132.

Garcia-Garrido, J. M., and Ocampo, J. A. 1989. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. Soil Biol. Biochem. 21:165-167.

Glandorf, D. C., Verheggen, P., Jansen, T., Jorritsma, J. W., Smit, E., Leefang, P., Wernars, K., Thomashow, L. S., Laureijs, E., Thomas-Oates, J. E., Bakker, P. A., and Van Loon, L. C. 2001. Effect of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r on the fungal rhizosphere microflora of field-grown wheat. Appl. Environ. Microbiol. 67:3371-3378.

Harman, G. E., Howell, C. R., Vitarbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Rev. Microbiol. 2:43-56.

He, P., Chintamanani, S., Chen, Z., Zhu, L., Kunkel, B. N., Alfano, J. R., Tang, X., and Zhou, J. M. 2004. Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. Plant J. 37:589-602.

Hoitink, H. A. J., and Boehm, M. J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate dependent phenomenon. Annu. Rev. Phytopathol. 37:427-446.

Homma, Y., Kato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H., and Suzui, T. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. Soil Biol. Biochem. 21:723-728.

Howell, C. R., Beier, R. C., and Stipanovic, R. D. 1988. Production of ammonia by

Enterobacter cloacae and its possible role in the biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off by the bacterium. Phytopathology 78:1075-1078.

Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping - off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluterin. Phytopathology 70:712-715.

Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., and Métraux, J. P. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:851-858.

Islam, T. M., Hashidoko, Y., Deora, A., Ito, T., and Tahara, S. 2005. Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 71:3786-3796.

Kageyama, K., and Nelson, E.B. 2003. Differential inactiviation of seed exudates stimulation of *Pythium ultimum* sporangium germination by *Enterobacter cloacae* influences biological control efficacy on different plant species. Appl. Environ. Microbiol. 69:1114-1120.

Keel, C. Voisard, C., Berling, C. H., Kahir, G., and Defago, G. 1989. Iron sufficiency is a prerequisit for suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescnes* strain CHA0 under gnotobiotic contiditions. Phytopathology 79:584-589.

Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. Plant Dis. 64: 25-30.

Kilic-Ekici, O., and Yuen, G. Y. 2003. Induced resistance as a mechanisms of biological control by *Lysobacter enzymogenes* strain C3. Phytopathology 93:1103-1110.

Kiss, L. 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. Pest Manag. Sci. 59:475-483.

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. 1980. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease suppression in soils. Current Microbiol. 4:317-320.

Kloepper, J. W, Ryu, C. M., and Zhang, S. 2004. Induce systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94:1259-1266.

Koumoutsi, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Gabriele, H., Franke, P., Vater, J., and Borris, R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J. Bact. 186:1084-1096.

Lafontaine, P. J., and Benhamon, N. 1996. Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radici-lycopersici*. Biocontrol Sci. Technol 6:111-124.

Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl. Environ. Microbiol. 71:4577-4584.

Leeman, M., Van Pelt, J. A., Den Ouden, F. M., Heinbroek, M., and Bakker, P. A. H. M. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to Fusarium wilt, using novel bioassay. Eur. J. Plant Pathol. 101:655-664.

Leeman, M., Van Pelt, J. A., Hendrickx, M. J., Scheffer, R. J., and Bakker, P. A. H. M. 1995. Biocontrol of Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. Phytopathol 85:1301-1305.

Linderman, R. G. 1994. Role of AM fungi in biocontrol. Pages 1-25 in: Mycorrhizae and Plant Health. F. L. Pfleger and R. G. Linderman, eds. APS Press, St. Paul, MN.

Lindsay, W. L. 1979. Chemical Equilibria in Soils. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Loper, J. E., and Buyer, J. S. 1991. Siderophores in microbial interactions of plant surfaces. Mol. Plant-Microbe Interact. 4:5-13.

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Métraux, J. P., and Defago, G. 1994. Induction of systemic resistance to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas*

fluorescens strain CHA0: influence of the *gac*A gene and of pyoverdine production. Phytopathology 84:139-146.

McKellar, M. E., and Nelson, E. B. 2003. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed-colonizing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 69:452-460.

McSpadden Gardener, B., and Fravel, D. 2002. Biological control of plant pathogens: Research commercialization, and application in the USA. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.

Meziane, H., Van der Sluis, I., Van Loon, L. C., Hofte, M., and Bakker, P. A. H. M. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Mol. Plant Pathol. 6:177-185.

Milgroom, M. G., and Cortesi, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. Annu. Rev. Phytopathol. 42:311-338.

Morris, P. F., and Ward, E. W. R. 1992. Chemoattraction of zoospores of the plant soybean pathogen, *Phytophthora sojae*, by isoflavones. Physiol. Mol. Plant Pathol. 40:17-22.

Morton, J. B., and Benny, G. L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (zygomycetes): a new order glomales, two new suborders, glomineae and gigasporineae and gigasporaceae, with an amendation of glomaceae. Mycotaxon 37:471-491.

Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., and Tuzun, S. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. J. Appl. Microbiol. 90:622-629.

Neilands, J. B. 1981. Microbial iron compounds. Annu. Rev. Biochem. 50:715-731.

Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Duffy, B., Haas, D., and Defago, G. 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene phlA in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. Phytopathology 91:873-881.

Numberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunological Rev. 198:249-266.

Odum, E. P. 1953. Fundamentals of Ecology. W. B. Saunders, Philadelphia / London.

Ongena, M., Duby, F., Rossignol, F., Fouconnier, M. L., Dommes, J., and Thonart, P. 2004. Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:1009-1018.

Ordentlich, A., Elad, Y., Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in the biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 78:84-88.

Palumbo, J. D., Yuen, G. Y., Jochum, C. C., Tatum, K., and Kobayashi, D. Y. 2005. Mutagenesis of beta-1,3-glucanase genes in Lysobacter enzymogenes strain C3 results in reduced biological control activity toward Bipolaris leaf spot of tall fescue and Pythium damping-off of sugar beet. Phytopathology 95: 701-707.

Paulitz, T. C., and Belanger, R. R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annu. Rev. Phytopathol. 39:103-133.

Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Ton, J., Van Pelt, J. A., and Van Loon, L. C. 2002. Signalling in rhizobacteria induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biol. 4:535-544.

Press, C. M., Loper, J. E., and Kloepper, J. W. 2001. Role of iron in rhizobacteria mediated induced systemic resistance of cucumber. Phytopathology 91:593-598.

Raaijmakers, J. M., Vlami, M., and De Souza, J. T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Anton. van Leeuw. 81:537-547.

Ross, E. W., and Marx, D. M. 1972. Susceptibility sand pine to *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 62:1197-1200.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J.W., and Pare, P. W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol.

134:1017-1026.

Sandra, A. I., Wright, C. H., Zumoff, L. S., and Steven, V. B. 2001. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 67:282-292.

Shanahan, P., O'Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D., and O'Gara, F. 1992. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physio-logical parameters influencing its production. Appl. Environ. Microbiol. 58:353-358.

Smith, K. P., Havey, M. J., and Handelsman, J. 1993. Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. Plant Dis. 77:139-142.

Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y., and Baker, R. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* suppressive soils. Phytopathology 74:1115-1124.

Tari, P.H., and Anderson, A. J. 1988. Fusarium wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2037-2041.

Thomashow, L. S., Bonsall, R. F., and Weller, D. M. 2002. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. Pages 638-647 in: Manual of Environmental Microbiology (2nd ed.), ASM Press, Washington DC.

Thomashow, L. S., and Weller, D. M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. Bact. 170:3499-3508.

Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bonsall, R. F., and Pierson, L. S. III. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent pseudomonas in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 56:908-912.

US Congress Office of Technology Assessment. 1995. Biologically-based technologies for pest control. OTA-ENV-636. US Government Printing Office, Washington, DC.

Vallad, G. E., and Goodman, R. M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture: review and interpretation. Crop Sci. 44:1920-1934.

van Dijk, K., and Nelson, E. B. 2000. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. Appl. Environ. Microbiol. 66:5340-5347.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36:453-483.

Van Peer, R., and Schippers, B. 1992. Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to Fusarium wilt. Neth. J. Plant Pathol. 98:129-139.

Van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y., and Hartog, F. 1997. Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:716-724.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root of tobacco under gnotobiotic conditions. EMBO J. 8:351-358.

Weller, D. M., and Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73:463-469.

Weller, D. M., Raaijmakers, J., McSpadden Gardener, B., and Thomashow, L. M. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 40:309-348.

Wilhite, S. E., Lumsden, R. D., and Straney, D. C. 2001. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. Appl. Environ. Microbiol. 67:5055-5062.

6. 연구결과 활용

연도 (연차)	활용구분	제 목
2007년도(6년차)	기초연구	

7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도	
					06	07
책임자	강원도농업기술원 환경농업연구과	농업연구사	김성일	세부과제 총괄	○	○
공동연구자	〃	〃	정태성	연구조사 검토 및 협조	○	○
공동연구자	〃	〃	이재홍	연구자료 검토 및 협조	○	
공동연구자	〃	〃	문윤기	연구협조		○
공동연구자	〃	연구보조원	김상효	연구보조	○	○
공동연구자	〃	〃	최승욱	연구보조	○	○