

길항균주를 이용한 고추탄저병균(*Colletotrichum acutatum*) 방제 및 식물생장촉진효과

한준희 · 김문종 · 김경수*

강원대학교 응용생물학과

Control of *Colletotrichum acutatum* and Plant Growth Promotion of Pepper by Antagonistic Microorganisms

Joon-Hee Han, Moon-Jong Kim and Kyoung Su Kim*

Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

ABSTRACT : Anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* is the most devastating disease of pepper plants in Korea. In this study, we evaluated the effect of selected antagonistic bacteria on control of anthracnose and plant growth promotion of pepper plants under field conditions. Four different bacterial isolates used in the current study were isolated from the pepper rhizosphere (GJ01, GJ11) and tidal flat (LB01, LB14) in previous studies. Four bacterial isolates, together with a control strain (EXTN-1), showed antifungal activity against *C. acutatum* in a dual culture assay. To test for plant growth promotion effect, seedling vigor index and growth parameters of pepper were measured under field condition. As a result, all four bacterial isolates were effective for improving plant growth promotion. The strain GJ01 was the most effective in improving the seedling vigor on pepper, but the strain GJ11 in increasing the pepper fruit yield. The incidence of anthracnose was inhibited in the range of 63.2~72.5% by treatment of four bacterial isolates. The current study indicated that the four bacterial isolates could be used as potential biological control agents of anthracnose disease of pepper.

KEYWORDS : Antagonistic microorganisms, Biological control, *Colletotrichum acutatum*, Pepper, Plant growth promoting rhizobium

서 론

국내 고추 생산의 대부분을 차지하는 노지재배의 경우, 역병, 탄저병 등의 병해가 심각하게 발생하여 안정적인 고추 생산에 위협적인 요소로 작용하며, 이로 인한 농가 손실과 국민 소비 부담을 증대시키고 있다. 병저항성 고추 품종

의 육종과 보급으로 역병에 대한 피해는 감소하고 있으나, 고추 탄저병에 대한 우수한 저항성 품종의 부재로 현재 고추 생산에 있어 가장 심각한 피해가 야기되고 있다[1]. 고추 탄저병은 연평균 30~40%의 이병율을 보이고 있으며, 심한 경우 발생률이 60~70%에 이르러 고추의 수량 감소와 상품성 저하를 초래하고 있다[2].

고추 탄저병은 미숙과인 푸른 고추와 성숙과인 붉은 고추에 발생하는 과실병으로 고추 결실과 수확시기 전반에 걸쳐 큰 피해를 입힌다. 국내 고추 탄저병의 원인균은 *Colletotrichum* 속에 속하는 *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *C. coccodes*, 그리고 *C. acutatum* 등의 종들이 보고되고 있다[3]. 그러나 최근에는 고추에 발생하는 탄저병균의 유전적 특성 분석과 종 특이적인 polymerase chain reaction (PCR) 분석을 통해 *C. acutatum*이 우점하고 있음이 밝혀졌다[4].

고추탄저병 방제를 위해서 저항성 신품종 개발 등의 지속적인 노력에도 불구하고, 현재의 고추 생산은 유기합성 농약을 이용한 화학적 방제에 의존하고 있는 실정이다[5]. 유기합성 농약의 지속적인 시비 및 오용으로 인한 농업생

Kor. J. Mycol. 2015 December, 43(4): 253-259
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.4.253>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: kims@kangwon.ac.kr

Received September 14, 2015
 Revised November 17, 2015
 Accepted November 25, 2015

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

대개 오염 및 파괴, 병원균의 약제 저항성 획득, 농산물의 잔류농약 위해성 등의 문제가 야기되고 있다[6-9]. 이를 대체하기 위하여 친환경적인 농법의 일환으로 길항미생물을 활용한 생물학적 방제가 활발하게 이루어지고 있으며, 이러한 길항미생물은 용균작용이나, 항생물질 분비, 경쟁적 길항작용 또는 식물 저항성 유도 등을 통하여 식물병원성 미생물을 제어하는 것으로 알려져 있다[10-12]. 최근에는 식물의 뿌리에 정착하여 식물생장촉진 뿐만 아니라, 동시에 식물병원성 미생물에 대한 방제 효과를 지닌 plant growth promoting rhizobacterium (PGPR)에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다[13]. PGPR은 옥신(auxin)이나 사이토키닌(cytokinin)과 같은 식물생장 호르몬을 생산하여 직접적으로 식물 생장에 유익한 효과를 가져다 주며[14, 15], 불용성 인산의 가용화와 2,3-butanediol과 같은 휘발성 물질생산을 통해 식물의 생장을 촉진하는 것으로 알려져 있다[16, 17].

본 연구에서는 고추 탄저병의 친환경적인 재배를 위하여 선행연구를 통하여 분리된 미생물 중 고추 탄저병의 균사생장 억제효과가 우수한 길항미생물 4종을 선발하였다. 그리고 길항미생물의 PGPR 효과를 알아보기 위하여 고추 종자에 대한 발아 및 초기 생장을 검정하였으며, 시험포장에서 고추의 생장 효과를 검정하고 고추 탄저병의 방제 가능성을 확인하였다. 본 연구 결과를 통하여 길항미생물을 이용한 고추 탄저병의 방제와 친환경적인 재배에 적용할 수 있을 것으로 생각한다.

재료 및 방법

고추탄저병균 및 길항미생물

고추탄저병균은 강원도 춘천시 소재의 탄저병에 걸린 고추 과실에서 분리하였다. 탄저병이 발생한 병반부와 건전부위의 경계 조직을 5 × 5 mm 크기로 절단하여 70% ethanol에 1분간 침지한 후 1% 차염소산나트륨 용액에 침지하여 표면 살균하고 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 멸균한 filter paper상에서 건조시킨 다음 water agar (1.5%)에 치상하여 25°C에서 배양한 후 자라난 균사를 potato dextrose agar (PDA)에 접종하여 고추탄저병균을 분리하였다.

분리된 고추탄저병균은 *C. acutatum* 특이 프라이머인 Ca1-1 (5'-CAG GGG AAG CCT CTC GCG GGC CT-3')과 ITS4 (3'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-5') 프라이머로 Kim 등[4]과 같은 방법으로 PCR하여 확인하였다. 이후에 단포자 분리를 통해 순수 분리하였으며, PDA에서 7일간 배양하여 생성된 포자들을 수거하여 만든 포자현탁액은 최종농도 15%가 되도록 glycerol을 첨가하여 -70°C deep freezer에 보관하면서 연구에 사용하였다. 본 연구에서 사용한 길항미생물은 선행연구를 통하여 식물병원성 진균에 대한 항균활성이 우수한 균주들로 선발하였다. Lee 등[18]이 분리한 *Bacillus* sp. GJ01, *Paenibacillus polymyxa* GJ10과 Han 등[19]이 분리한 *B. amyloliquefaciens* LB01, *B. atrophaeus* LB14를 선발하여 사용하였다. 그리고 시판중인 미생물제제(엑스텐 액상현탁제)를 구입하여 *B. valismortis* EXTN-1[20, 21]을 양성대조군(positive control)으로 사용하였다(Table 1).

길항미생물의 균사생장 억제효과

고추탄저병균에 대한 균사생장 억제효과를 보기 위해 병원균을 PDA 배지에서 7일 간 암조건에서 배양한 후 균사 끝 부분에서 4 mm 직경의 cork-borer로 agar plug를 떼어내어 LB agar (Duchefa, Haarlem, Netherlands)와 PDA를 50%씩 혼합한 PLA (PDA+LB)배지 한 가운데 접종하였다. 그리고 25°C, 암조건에서 하루를 배양시켰다. 이 후에 길항미생물을 접종하기 위하여 4 mm 직경의 cork-borer를 이용하여 PLA배지 가운데를 중심으로 3개의 구멍을 내었다. LB-broth에서 28°C, 200 rpm으로 배양한 길항미생물들은 O.D (optical density)값 1.0으로 조정된 뒤에 20 µL씩 구멍에 접종하였다. Control은 LB-broth배지를 20 µL 접종하였다. 그리고 25°C에서 7일 동안 빛을 차단하여 배양하였고, 자라나는 균사의 직경을 측정하였다. 균사생장 억제율은 Han 등 [19]에 따라 계산하였다. TD (treatment distance)는 길항미생물 접종 배지에서 자란 균사의 길이이며, CD (control distance)는 control 배지에서 자란 균사의 길이이다. 각 실험은 3 반복으로 수행하였다.

$$\text{균사생장 억제율(\%)} = (1 - \text{TD} / \text{CD}) \times 100$$

Table 1. The list of bacterial strains used in this study

Strain	Species	Location / Source	Reference
GJ01 ^a	<i>Bacillus</i> sp.	Chuncheon / Pepper field soil	[4]
GJ11	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Chuncheon / Pepper field soil	[4]
LB01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Yeongjongdo / Tidal flat	[18]
LB14 ^b	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Yeongjongdo / Tidal flat	[18]
EXTN-1	<i>Bacillus vallismortis</i>	Commercial production / Pepper field	[19, 20]

^aAccession number is KACC91870P.

^bAccession number is KACC92039P.

고추발아율 및 초기생육에 대한 길항미생물의 효과

길항미생물이 고추의 발아와 초기생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 seedling vigour index를 측정하였다. 고추 종자 마니따(Heungnong, Pyeongtaek, Korea)를 30초 동안 1% 차염소산나트륨 용액으로 표면 살균하고, 증류수에 2~3회 세척하였다. 이 후에 9 cm 포트에 원예용 상토(Balokeo; Seoul Bio, Eumseong, Korea)를 담고 멸균시킨 종자를 30개씩 심고 배양된 길항미생물을 포트 당 10 mL 접종하여 25°C 성장상에서 빛 조건 16 hr, 암조건 8 hr으로 배양하였다. 접종 7일 후에 종자의 발아율을 측정하였고 접종 15일 후에 발아된 종자에서 자란 지상부와 뿌리의 길이를 측정하였다. 성장지수는 Abdul-Baki 등[22]의 공식[성장지수 = (뿌리 길이 + 지상부 길이) × 발아율(%)]을 이용하여 계산하였으며, 모든 처리는 3반복으로 수행하였다.

시험포장에서 고추 성장효과 검정 및 고추탄저병 방제효과 검정

강원도 춘천시 효자동에 위치한 사양토 노지포장에서 시험을 진행하였다. 2015년 5월 4일에 식물 성장효과를 시험하는 포장과 고추탄저병 방제효과를 검정하는 포장 2곳에 마니따 품종의 유묘를 각각 120개씩 정식하였다. 정식 40일 후부터 15일 간격으로 3회 길항미생물을 처리하였다. 고추탄저병 방제효과 검정의 대조구로는 살균제 pyraclostrobin를 처리하였다. 길항미생물은 LB broth에 16시간 배양하여 1×10⁸ cfu/mL로 조정된 뒤 한 주당 20 mL씩 근권과 엽면에 골고루 살포하였다. 마지막 처리 15일 후에 성장촉진 효과를 검정하기 위하여 고추과실을 모두 수확한 후에 뿌리길이와 지상부 길이 그리고 생체중을 측정하였으며,

수확한 과실의 수와 생체중을 측정하였다. 고추탄저병을 발병시키기 위하여 고추탄저병균의 포자현탁액을 hemocytometer를 이용하여 1 × 10⁶ conidia/mL로 맞추어 준비하고 2차 처리 3일 후에 주당 10 mL씩 엽면과 과실에 스프레이 접종하여 발병을 유도하였다. 고추탄저병에 대한 이병율은 길항미생물의 마지막 처리 15일 후에 과실의 전수 조사(처리구 당 100개 이상)로 고추탄저병의 이병율을 측정하였다. 방제기는 [(무처리구의 이병율 - 미생물 처리구의 이병율) / 무처리구의 이병율] × 100의 계산식으로 수행하였으며, 모든 처리구는 난괴법 3반복으로 수행되었다.

통계분석

각 처리구 평균간의 차이에 의한 유의성 검정은 SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

결 과

길항미생물의 균사생장 억제효과

선발된 길항미생물 4개 균주와 대조균주 1개에 대하여 고추탄저병균에 대한 균사생장 억제효과를 보이는지 알아보기 위하여 대치배양법을 이용하여 검정하였다(Fig. 1A). PDA배지 plate 한 가운데 분리한 고추탄저병균을 접종하고 주위 3군데에 O.D 1.0의 길항미생물을 떨어뜨려 병원균에 대한 억제효과를 검정한 결과, LB01이 59.0%의 균사생장 억제로 가장 좋은 효과를 나타냈으며, GJ11과 EXTN-1이 각각 57.6%와 57.5%로 억제효과가 우수하였다. LB01과

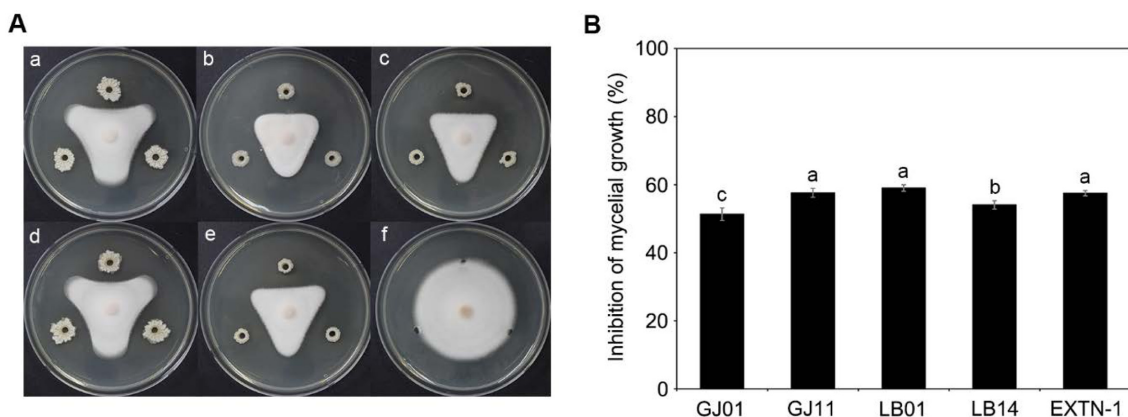


Fig. 1. Antifungal activity for *in vitro* inhibition of mycelial growth of *Colletotrichum acutatum* by antagonistic microorganisms. A, Dual culture assay. *C. acutatum* were cultured on potato dextrose agar (PDA) plates at 25°C for 7 days, then a mycelial disc was cut and placed center of LPA (LB + PDA) plate. LPA plates contained holes (4 mm in diameter) made with a cork borer. Bacterial strains were inoculated in the holes for plate. Results are shown for: a, *Bacillus* sp. GJ01; b, *Paenibacillus polymyxa* GJ11; c, *B. amyloliquefaciens* LB01; d, *B. atrophaeus* LB14; e, *B. vallismortis* EXTN-1; f, Control. B, Measurement of inhibition effects of bacterial isolates on mycelial growth of *C. acutatum*. Inhibition zones were measured after incubation at 25°C for 7 days. Error bars represent standard deviations of three replicates. Different letters on bars indicate significant differences according to Duncan's multiple range test at *p* = 0.05.

GJ11은 양성 대조군으로 사용한 EXTN-1과 통계적으로 차이가 없으므로 항균활성이 우수한 균주로 확인되었다. 다른 나머지 GJ01과 GJ14는 50% 이상의 균사생장 억제효과를 보였다(Fig. 1B). 고추탄저병균에 대한 4개 균주들의 길항성이 확인되어 포장시험 적용 시험을 수행하였다.

고추종자 발아율 및 초기생육 효과

선발된 균주들의 고추종자에 대한 발아와 초기생육에 미치는 영향을 알아보기 위한 seedling vigour index 시험 결과(Table 2), GJ01 처리구에서 고추 종자의 발아율은 93.3%로 가장 높았으며, LB14 처리구의 발아율은 89.0%로 나타났다. 대조 균주인 EXTN-1은 90.3%로 나타났으며, LB-broth 만을 동일한 양으로 처리하였을 때 91.0%의 발아율을 보였으며, 무처리구에서 88.0%로 나타났다. 종자 발아 이후의 초기생육 효과를 알아보기 위하여 뿌리 길이와 지상부 길이를 측정하였다. 그 결과 뿌리 길이는 GJ11 처리구가 3.00 cm로 가장 길게 자랐으며, 그 외 균주 처리구의 뿌리 길이는 2.13~2.36 cm였으며, 반면에 EXTN-1 처리구는 2.46 cm, LB-broth 처리구는 2.13 cm, 무처리구는 2.32 cm로 나타났다. 지상부 길이는 GJ01 처리구가 8.18 cm로 가

장 우수하였고 GJ11과 LB01이 각각 7.24 cm와 7.47 cm이었으며, 무처리구에 비교하여 많이 자란 것을 확인하였다. LB14 처리구에서는 지상부 길이가 6.76 cm이었으며, 이는 다른 3개 균주 처리구보다 비교적 느린 성장을 보였다. EXTN-1 처리구의 지상부 길이는 7.57 cm, LB-broth 처리구는 6.86 cm, 무처리구는 6.04 cm의 지상부 성장을 보였다. 이를 이용하여 vigour index 값을 계산해 본 결과, 건전한 고추경작지 토양에서 분리된 GJ01과 GJ11는 각각 무처리 대비 133.6%와 128.5%의 vigour index의 증가 효과를 보였다. 그리고 갯벌에서 분리된 LB01과 LB14는 각각 117.4%와 108.4%로 증가효과는 보였지만 토양에서 분리된 균주 2종보다는 비교적 낮은 효과를 나타내었다.

포장에서 식물 성장효과 검증

고추 포장에서 길항미생물의 식물 성장효과를 검증하기 위하여 정식 40일 후에 15일 간격으로 3회 처리하였다. 그리고 최종처리 15일 후에 뿌리 길이와 식물체 길이 그리고 생체중을 측정하였다(Table 3). 뿌리길이를 확인한 결과 EXTN-1 처리구의 뿌리 길이가 22.0 cm로 가장 길었고, GJ11 처리구는 20.3 cm이었다. GJ01, LB14 그리고 LB01

Table 2. Effect of antagonistic microorganisms on seedling vigour and seed germination

Treatment	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Germination (%)	Vigour index ^a
GJ01	2.36 ± 0.48bc ^b	8.18 ± 1.60a	93.3 ± 2.08a	983.4
GJ11	3.00 ± 0.35a	7.24 ± 1.78ab	92.3 ± 2.52a	945.2
LB01	2.13 ± 0.43c	7.47 ± 2.13ab	90.0 ± 2.65a	864.0
LB14	2.20 ± 0.43bc	6.76 ± 0.72bc	89.0 ± 2.65a	797.4
EXTN-1	2.46 ± 0.44b	7.57 ± 1.90ab	90.3 ± 3.51a	905.7
LB-broth	2.13 ± 0.53c	6.86 ± 2.05bc	91.0 ± 3.00a	818.1
Control	2.32 ± 0.72bc	6.04 ± 2.13c	88.0 ± 3.61a	735.7

^aVigour index = (shoot length + root length) × germination (%).

^bValues are means ± standard errors, calculated from three independent observations. Those sharing the same letter are not significantly different, based on the Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

Table 3. Effect of bacterial treatment with PGPR on growth parameters of pepper under field conditions

Treatment	Plant			Fruit	
	Root length (cm)	Height (cm)	Fresh weight (g/plant)	Number per plant	Fresh weight (g/plant)
GJ01	19.3 ± 2.3abc ^a	64.0 ± 2.0a	85.3 ± 7.0a	21.8 ± 5.2ab	362.4 ± 12.2b
GJ11	20.3 ± 3.2ab	62.7 ± 2.5a	96.3 ± 7.6a	23.0 ± 3.3a	383.4 ± 8.5a
LB01	16.7 ± 1.5bc	58.7 ± 5.1abc	82.7 ± 11.0ab	22.0 ± 5.4ab	358.3 ± 10.1b
LB14	17.3 ± 2.1abc	60.3 ± 3.5ab	95.3 ± 8.1a	19.5 ± 4.2ab	326.7 ± 7.4c
EXTN-1	22.0 ± 2.0a	61.3 ± 3.1a	91.7 ± 4.0a	21.8 ± 4.4ab	363.4 ± 14.1b
LB-broth	14.0 ± 1.7d	52.3 ± 4.5bc	69.0 ± 6.2bc	18.7 ± 4.2ab	274.5 ± 10.4d
Control	14.3 ± 1.5cd	51.7 ± 6.8c	65.7 ± 5.7c	17.0 ± 2.4b	264.3 ± 6.7d

PGPR, plant growth promoting rhizobacterium.

^aValues are means ± standard errors, calculated from three independent observations. Those sharing the same letter are not significantly different, based on the Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

처리구는 각각 19.3 cm, 17.3 cm 그리고 16.7 cm로 14.3 cm인 무처리구보다 길게 자라 뿌리생장에 효과가 있는 것을 확인하였다. 고추 식물체의 길이를 측정하여 성장효과를 검정한 결과 GJ01, GJ11 그리고 EXTN-1 처리구는 각각 64.0 cm, 62.7 cm 그리고 61.3 cm로 무처리구와 비교하여 우수한 성장효과를 나타내었다. 그리고 식물체의 생체중을 측정한 결과 GJ11, LB14, EXTN-1 그리고 GJ01 처리구가 각각 96.3 g, 95.3 g, 91.7 g 그리고 85.3 g으로 무처리구와 비교하여 우수한 성장효과를 나타내었다. 이로써 길항미생물 처리로 식물의 생장이 촉진된 것을 확인하였다. 다음으로 고추과실의 생산량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 과실의 개수와 무게를 측정하였다(Table 3). 한 주당 고추과실의 수는 GJ11 처리구가 23.0개로 가장 많았으며, LB01, GJ01, 그리고 LB14 처리구는 각각 22.0개, 21.8개 그리고 19.5개였다. EXTN-1 처리구는 GJ01 처리구와 동일한 21.8개였다. 무처리구의 한 주당 고추과실의 개수는 17.0개로 길항미생물을 처리하였을 때 114.7~128.2%의 수량증대효과를 보였다. 한 주당 고추과실의 무게는 수량이 가장 많은 GJ11 처리구가 383.4 g으로 가장 높았으며, GJ01, LB01 그리고 LB14 처리구는 각각 362.4 g, 358.3 g 그리고 326.7 g이었다. 반면에 LB-broth와 무처리구 고추과실의 무게는 각각 274.5 g과 264.3 g으로 길항미생물 처리로 인하여 고추과실의 생산량이 증가한 것을 알 수 있었다.

포장에서 고추 탄저병의 방제효과

포장에서 고추 탄저병에 대한 방제효과를 검정하기 위하여 길항미생물들과 양성대조군(EXTN-1) 그리고 살균제(pyraclastrobin)를 이용하여 시험하였다(Table 4). 그 결과 LB01 처리구의 고추 탄저병 방제효과가 72.5%로 가장 우수하였으며, GJ11 처리구와 EXTN-1 처리구는 각각 70.8%와 70.6%의 방제효과를 나타내었다. 또한, LB14 처리구와 GJ

Table 4. Effect of antagonistic microorganisms on reduction of anthracnose incidence in pepper fruits caused by *Colletotrichum acutatum* in field

Treatment	Disease incidence (%)	Control efficiency (%)
GJ01	16.7 ± 1.5b ^a	63.2 ± 7.2c
GJ11	13.3 ± 1.5b	70.8 ± 4.6bc
LB01	12.7 ± 2.1b	72.5 ± 2.1b
LB14	14.7 ± 2.5b	67.8 ± 7.2bc
EXTN-1	13.3 ± 1.5b	70.6 ± 6.3bc
Fungicide ^b	3.7 ± 1.5c	92.2 ± 2.7a
Control	46.0 ± 5.3a	-

^aValues are means±standard errors, calculated from three independent observations. Those sharing the same letter are not significantly different, based on the Duncan's multiple range test at *p* = 0.05.

^bThe used fungicide is pyraclastrobin.

01 처리구는 각각 67.8%와 63.2%의 방제효과를 보였다. 살균제 처리구는 92.2%의 방제효과를 보였으며, 무처리구의 발병율은 46.0%로 방제효과를 평가하기에 충분히 발병하였다. 따라서 본 연구에 사용된 길항미생물들은 고추의 친환경적인 재배에 적용 가능한 대체 약제로서 가능성이 있으며, 그 효능을 최적화하기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

고찰

고추는 우리나라에서 경제적 가치가 높은 작물이지만 최근 재배면적과 단위면적당 수확량이 감소하고 있다[23]. 고추의 수확량 감소에 큰 영향을 주는 고추 탄저병의 방제를 위하여 관행적으로 살균제를 사용하고 있다. 살균제는 적은 양으로도 효과가 우수하기 때문에 병 방제 및 수확량 증대에 큰 역할을 하였으나, 최근에는 안전한 농작물에 대한 관심이 증가함에 따라 기존 농약 사용을 대체할 수 있는 친환경적인 방제 전략에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[24-27]. 따라서 본 연구에서는 선행연구를 통해 분리된 길항미생물들 중 *in vitro*에서 고추탄저병균에 길항성을 보이는 균주를 이용하여 고추 작물에 대한 성장촉진 효과와 더불어 고추 탄저병에 대한 방제효과를 검정하고자 하였다.

고추탄저병균과 대치배양을 통해 균사생장 억제능력을 보인 4개의 균주는 건전한 고추 포장의 토양과 서해안 갯벌에서 분리된, *Bacillus* 속의 3종(GJ01, LB01, LB14)과 *P. polymyxa* (GJ11)이다(Table 1). 그리고 *Bacillus vallismortis* EXTN-1은 성장촉진 효과와 함께 광범위한 식물 병에 방제 효과가 보고되어 양성대조군으로 사용하였다[20, 21]. 선발된 4개의 길항미생물은 고추탄저병균의 균사 생장을 효과적으로 억제하였다(Fig. 1). 이는 길항미생물이 생산하는 항생물질[28, 29]과 더불어 휘발성 물질[30, 31] 등으로 고추 탄저병균의 균사를 더 이상 자라지 못하게 하는 것으로 보인다. 예를 들어, *Bacillus subtilis* JA균주는 2-ethyl-hexanol, 2, 4-bis (2-methylpropyl)-phenol 등 14종의 휘발성 물질을 생성하여 잿빛곰팡이병균의 포자 발아와 발아관 신장을 억제한다는 보고가 있으며[30], *B. amyloliquefaciens* NJN-6균주는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*의 포자 발아와 생장을 억제한다고 보고된바 있다[31]. 따라서 고추탄저병균의 균사 생장을 억제하는 길항미생물 4종에 대한 휘발성 물질의 생성 및 억제 활성 능력에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 보인다.

선발된 길항미생물 4종의 식물성장촉진효과를 검정하기 위하여 고추 종자발아와 생육 초기단계의 성장촉진효과, 그리고 포장에서 성장촉진효과를 시험하였다. 그 결과 길항미생물 4종 모두 무처리와 비교하여 생육초기부터 수확기까지 성장촉진효과가 있음을 알 수 있었다 (Table 2, 3). 국내 연구에 의해 건전한 경작지 토양의 미생물상이 속수

준까지 분류되어 상대적으로 *Pseudomonas* 속, *Bacillus* 속, *Azotobacter* 속, *Actinomyces* 속 등이 많은 것으로 보고되었다[32]. 이것은 토양 내에서 유익한 미생물과 식물의 상호작용으로 토양의 건전성에 영향을 미치고 있다는 것을 의미한다[33]. 그리고 식물생장촉진을 일으키는 식물생장촉진세균(PGPR)은 직접적으로 질소고정[34], 무기인산 가용화[35], 옥신(auxin), 시토키닌(cytokinin) 등의 식물호르몬[4, 17] 생산 그리고 siderophore를 생산하여 철성분 흡수로 유해 미생물과 경쟁적 길항작용으로 영향을 준다[36]. 또한 간접적으로는 식물 뿌리의 막 전위를 감소시키고 식물이 생산하는 에틸렌 전구체 ACC (amino-cyclopropane carboxylic acid)를 가수분해하는 효소인 ACC deaminase를 생산하여 스트레스환경의 적응 및 식물성장을 증진한다[37, 38]. 선발미생물 4종은 선행연구를 통하여 siderophore의 생성을 확인하였고, GJ11을 제외한 나머지 세 균주는 불용성 인산을 가용화하였는데 본 연구를 통해 나타난 식물의 생장촉진 효과와 관련이 있는 것으로 보인다[18, 19].

포장에서 고추 탄저병에 대한 억제효과를 검증한 결과 길항미생물 4종 모두 방제 효과를 나타내었다. 식물병 방제에 식물생장촉진세균은 유해한 식물병원균보다 밀도를 우점하여 경쟁적으로 병원균의 감염을 방지하고 부생균의 성장을 억제한다. 그리고 기주식물의 induced systemic resistance (ISR)을 유도하거나 항생물질[28, 29] 및 다양한 분해효소들을 생성하여 병원균의 성장을 억제할 수 있다[12, 15, 39]. 이전 연구를 통하여 LB01과 LB14 두 균주 모두 프로테아제(protease)의 분비를 확인하였으며, LB01은 셀룰로오스(cellulose)의 분해활성이 우수하였고, LB14는 키틴(chitin)을 분해하는 등의 여러 효소를 생성하였다[19]. 이러한 식물생장촉진세균의 다양한 기능들을 통하여 선발된 길항미생물들도 포장에서 고추 탄저병 방제 효과가 나타난 것으로 보인다.

본 연구는 선행연구에서 분리된 미생물 중 고추탄저병균의 균사생장을 억제하는 미생물 4종을 선발하였다. 그리고 고추 탄저병에 대한 방제효과를 검증하였고, 고추의 상품성 및 생산성을 증대시킬 수 있는 친환경적인 방제방법을 제시하였다. 본 연구를 통해 갯벌에서 분리된 길항미생물 2종(LB01, LB14)은 내륙의 고추포장에 적용이 가능함을 알 수 있었으며, 내염성 균주[40]로써 간척지 등의 염분조건에서도 적용이 가능한지에 대한 연구를 포함한 산업적 활용 적용 범위 및 기술 제고에 대한 노력이 필요할 것으로 보인다.

적 요

고추 탄저병은 국내 고추재배에 가장 큰 피해를 일으키며, *Colletotrichum acutatum*이 주요 원인균이다. 본 연구에서는 포장에서 고추탄저병의 방제와 식물생장촉진효과를 선발된 길항미생물을 이용하여 평가하였다. 4개의 길항미생

물은 이전 연구를 통하여 고추포장(GJ01, GJ11)과 갯벌(LB01, LB14)에서 선발하였다. 4개의 길항미생물은 대조균주 EXTN-1을 포함하여 *C. acutatum*과 대치배양에서 길항효과를 보였다. 식물생장촉진효과를 알아보기 위해 고추종자의 발아율과 초기생장효과, 그리고 포장에서 식물의 생장효과를 검증하였다. 그 결과 4개의 선발균주는 모두 식물생장효과가 있었다. 그 중에서도 GJ01은 초기생육에서 가장 높은 생장효과를 보였으며, GJ11은 포장에서 가장 높은 고추수확량을 얻었다. 그리고 포장에서 탄저병의 방제효과는 4개의 길항미생물 처리에 의해 63.2~72.5%의 방제가를 보였다. 현재 연구를 토대로 4개의 길항미생물은 고추 탄저병에 대한 잠재적인 생물학적 방제제로서의 가능성을 보여주었다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (PJ00932405) funded by the Rural Development Administration, by a grant (314027-03-2-HD050) funded by Export Promotion Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, and by BioHerb Research Institute, Kangwon National University, Republic of Korea.

REFERENCES

- Jee HJ, Shin SS, Lee JH, Kim WI, Hong SJ, Kim YK. Conidial disperse of the pepper anthracnose fungus *Colletotrichum acutatum* and its density on infected fruits. *Res Plant Dis* 2010;16:101-5.
- Park H. Breeding of anthracnose-resistant lines by interspecific hybridization in chile pepper (*Capsicum* spp.). *Annu Rep Res Agric Life Sci* 2001;5:40-2.
- Choi YH, Kim HT, Kim JC, Jang KS, Cho KY, Choi GJ. In vitro antifungal activities of 13 fungicides against pepper anthracnose fungi. *Kor J Pestic Sci* 2006;10:36-42.
- Kim JT, Park SY, Choi WB, Lee YH, Kim HT. Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. *Plant Pathol J* 2008;24:17-23.
- Mahoney MJ, Tattar TA. Identification, etiology, and control of *Euonymus fortunei* anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis* 1980;64:854-6.
- Jang MR, Moon HK, Kim TR, Yuk DH, Kim JH, Park SG. Dietary risk assessment for pesticide residues of vegetables in Seoul, Korea. *Kor J Nutr* 2010;43:404-12.
- Jung MK, Oakley BR. Identification of an amino acid substitution in the benA, beta-tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. *Cell Motil Cytoskeleton* 1990;17:87-94.
- Kegley SE, Neumeister L, Martin T. Disrupting the balance: ecological impacts of pesticides in California. San Francisco: Pesticide Action Network North America Regional Center; 1999.
- Miles S, Frewer LJ. Investigating specific concerns about different food hazards. *Food Qual Prefer* 2001;12:47-61.

10. Chet I, Ordentlich A, Shapira R, Oppenheim A. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant Soil* 1990;129:85-92.
11. Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;81:537-47.
12. Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, Tanaka H. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J Bacteriol* 1990;172:4017-22.
13. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 2009;63:541-56.
14. Jung HK, Kim JR, Woo SM, Kim SD. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH 18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2006;34:94-100.
15. Jung HK, Kim JR, Woo SM, Kim SD. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 2007;50:23-8.
16. Halder AK, Mishra AK, Bhattacharyya P, Chakrabartty PK. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J Gen Appl Microbiol* 1990;36:81-92.
17. Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4927-32.
18. Lee GJ, Han JH, Shin JH, Kim HT, Kim KS. Antifungal activity of *Bacillus* sp. GJ-1 against *Phytophthora capsici*. *Kor J Mycol* 2013;41:112-7.
19. Han JH, Shim HS, Shin JH, Kim KS. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *Plant Pathol J* 2015;31:165-75.
20. Park KS, Paul D, Kim YK, Nam KW, Lee YK, Choi HW, Lee SY. Induced systemic resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathol J* 2007;23:22-5.
21. Park KS, Paul D, Yeh WH. *Bacillus vallismortis* EXTN-1-mediated growth promotion and disease suppression in rice. *Plant Pathol J* 2006;22:278-82.
22. Abdul-Baki AA, Anderson JD. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Sci* 1973;13:630-3.
23. Statistics Korea. *Kor_news* [Internet]. Daejeon: Statistics Korea; 2014 [cited 2015 Jun 20]. Available from: http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/7/8/index.board?bmode=read&aSeq=349908
24. Cho SJ, Lee SK, Cha BJ, Kim YH, Shin KS. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS 03. *FEMS Microbiol Lett* 2003;223:47-51.
25. Freeman S, Minz D, Kolesnik I, Barbul O, Zveibil A, Maymon M, Nitzani Y, Kirshner B, Rav-David D, Bilu A, et al. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *Eur J Plant Pathol* 2004;110:361-70.
26. Kim PI, Bai H, Bai D, Chae H, Chung S, Kim Y, Park R, Chi YT. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J Appl Microbiol* 2004;97:942-9.
27. Tendulkar SR, Saikumari YK, Patel V, Raghotama S, Munshi TK, Balaram P, Chattoo BB. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J Appl Microbiol* 2007;103:2331-9.
28. Besson F, Hourdou ML, Michel G. Studies on the biosynthesis of iturin, an antibiotic of *Bacillus subtilis*, and alipopeptide containing beta-hydroxy fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1990;1036:101-6.
29. Eshita SM, Roberto NH, Beale JM, Mamiya BM, Workman RF. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J Antibiot (Tokyo)* 1995;48:1240-7.
30. Chen H, Xiao X, Wang J, Wu L, Zheng Z, Yu Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol Lett* 2008;30:919-23.
31. Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:5942-4.
32. Suh JS, Shin JS. Soil microbial diversity of paddy fields in Korea. *Kor J Soil Sci Fert* 1997;30:200-7.
33. Doran JW, Zeiss MR. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl Soil Ecol* 2000;15:3-11.
34. Malik KA, Bilal R, Mehnaz S, Rasul G, Mirza MS, Ali S. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant Soil* 97;194:37-44.
35. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 1999;17:319-39.
36. Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr Microbiol* 1980;4:317-20.
37. Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 2007;119:329-39.
38. Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007;34:635-48.
39. Than PP, Del Castillo CS, Yoshikawa T, Sakata T. Extracellular protease production of bacteriolytic bacteria isolated from marine environments. *Fish Sci* 2004;70:659-66.
40. Nakbanpote W, Panitlurtumpai N, Sangdee A, Sakulpone N, Sirisom P, Pimthong A. Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. *J Plant Interact* 2014;9:379-87.