

최 종  
연구보고서

식균선충과 길항세균을 이용한  
원예작물의 토양병 방제 기술 개발

Control of Soilborne Diseases in Horticultural  
Crops Using Fungivorous Nematodes and  
Antagonistic Bacteria

연구기관

서울대학교 농업생명과학대학

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식균선충과 길항세균을 이용한 원예작물의 토양병 방제 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 2월 14일

주관연구기관명: 서울대학교  
총괄연구책임자: 김 영 호  
세부연구책임자: 김 영 호  
연 구 원: 전 용 호  
연 구 원: 김 상 규  
연 구 원: 이 태 옥  
연 구 원: 김 현 우  
협동연구기관명: 허 브 킹  
협동연구책임자: 박 훈

# 요 약 문

## I. 제 목

식균선충과 길항세균을 이용한 원예작물의 토양병 방제 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

토양병은 지속적인 농산업을 유지하는데 가장 큰 장애요인 중의 하나이며, 농약이나 여러 가지 경종적 방법에 의한 방제 효율이 크지 않은 것으로 인식되고 있다. 더욱이 농약에 의한 토양병의 방제는 단기적인 효과를 가져다 줄 수는 있으나 토양 생태계에 악영향을 초래하고 장기적으로는 토양의 생산성을 악화시킬 수 있다. 토양병은 안전한 농산물 생산의 가장 큰 저해 요인이 된다. 따라서 효과적이고 환경친화적인 토양병 방제 방법은 안정적이고 고품질의 식물생산에 중요한 과제이다.

길항미생물에 의한 토양병의 생물학적 방제는 환경친화적이며 지속적으로 방제효과를 줄 수 있는 장점이 있는 반면, 일반적으로 방제가가 낮고, 지역이나 환경에 따라 방제효율의 변화가 심한 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하고 방제 효과를 극대화하기 위해 여러 가지 생물제제를 동시에 처리하거나 천연물을 첨가하여 생물학적 방제제의 효과를 제고함으로써 원예작물 토양병의 친환경적이고 효과적인 방제기술을 개발함에 이 연구의 목적이 있다. 특히 식균선충(*Aphelenchus avenae*)은 병원균을 식균하며 길항미생물을 이동시켜주므로 길항미생물의 근권 정착력을 도모할 수 있다. 연구를 통해 새롭게 알게 된 지식과 기술은 차후 다른 생물적 방제 기술 개발에 적용할 수 있을 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 각종 토양으로부터 우수한 식균선충 *Aphelenchus avenae*를 분리하고, 이의 배지로 활용할 곰팡이(길항곰팡이)를 선발하여 가장 적절한 식균선충-길항곰팡이 조합을 결정하고자 한다. 또한 이 길항곰팡이를 이용하여 지속적으로 대량배양할 수 있는 방법을 개발함으로써 온실이나 포장에서 사용할 수 있는 메체를 확보하고자 한

다. 길항세균의 경우에 있어서도 토양 및 식물체에서 균주들을 분리하여 여러 토양병원균에 대한 항균활성을 조사하고 또한 포트시험을 실시하여 중요 토양병(고추역병, 인삼 뿌리썩음병, 뿌리혹선충 등)에 대한 방제효과를 조사한다. 그리하여 각 병의 방제에 특이적으로 적합한 유용세균을 선정하고자 한다. 효과가 확인된 식균선충이나 세균 균주는 단독으로 또는 다른 생물제제와 혼용하여 방제효과의 상승작용 유무를 조사한다. 협동과제와 함께 수행한 포장시험에서는 생물제제의 처리에 의한 식물 생육과 병 방제 조사, 길항미생물과 식균선충의 대량배양을 위한 유기물 배지 조사 등을 실시하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

여러 토양으로부터 식균선충 *Aphelenchus avenae*를 분리 배양하였고, 이들 식균선충 분리주들이 병원균인 *Pythium*과 길항곰팡이인 *Trichoderma* 간의 식이선호성과 피해 정도를 비교 조사하고 식균선충-*Trichoderma* 조합을 처리하여 병방제 효과를 조사한 결과 *A. avenae*와 *T. harzianum*이 가장 이상적인 조합으로 판단되었다. 이는 *A. avenae*가 *T. harzianum*에서 잘 자라며 *T. harzianum*이 *Pythium*에 강한 항균력을 나타내고 있는 까닭이라 생각된다. 다른 조합에서는 *Trichoderma* 균주가 *A. avenae*의 생육을 저해하거나 *Pythium*에 항균력이 약한 것으로 나타나 혼합하여 처리하였을 때 단독 처리보다 방제효과 낮거나 비슷한 결과가 나타났다. 이 결과로 볼 때 *Trichoderma*는 가장 대표적인 길항미생물로 생물적 방제제로 활용되지만 이 경우 *Trichoderma*는 식균선충의 *Pythium* 방제에 협력자 또는 방해자로 보조적인 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 같은 *Trichoderma*속 균이라도 복합제제를 만들 경우 종에 따라 방제효과에 있어서는 상승작용 또는 저해작용으로 상반되는 결과를 초래할 수 있으므로 복합생물제제를 제조할 때에는 서로 간의 관계에 대한 엄밀한 조사가 이루어져야 할 것이다.

많은 유용세균들이 분리되었다. *Bacillus*의 일종인 G181 균주는 in vitro에서 높은 항균활성을 보였지만 포트시험에서는 토마토시들음병 및 *Rhizoctonia solani*에 의한 모잘록병에서 전혀 방제효과를 나타내지 않았다. 세균의 경우 식균선충과 처리하였을 때 방제효과의 상승작용을 기대할 수 없었다. 그러나 *Paenibacillus polymyxa*로 동정된 GBR-1은 인삼을 썩히는 *Fusarium*과 *Erwinia*를 인삼 절편에 낮은 농도로 접종하였을 때 방제효과가 있었다. 이 경우 GBR-1이 높은 농도( $10^8$  CFU/ml)에서는 방제효과가 없었고 오히려 낮은 농도( $10^6$  CFU/ml)에 효과가 나타났다. 이는 생

물학적 방제 효과를 최대화하기 위해서는 무조건 많은 양이 토양에 투입되어야 된다는 기존의 생각과는 달리 효과를 최대화하기 위한 적정 농도가 있음을 의미한다. 또한 GBR-1은 토마토의 뿌리혹선충 방제에 탁월한 방제효과가 있음이 확인되어서 이 세균을 이용한 복합병원균 방제 미생물제 개발이 기대된다. GBR-447 역시 *P. polymyxa*로 동정되었으며 역병에 대한 항균력과 유주자낭 형성을 저해하여 단기적인 병발생과 2차 병원균의 형성 억제에 효과가 있을 것으로 생각된다. *in vivo* 실험에서도 방제효과가 있어서 앞으로 역병 방제용 세균으로 기대해도 좋을 것이다. *Pseudomonas putida*로 동정된 JB-1은 항균력은 떨어지나 TMV의 감염을 차단하는 단백질 물질을 생산하였다. 이 물질은 열에 매우 안정한 물질이며 침투성 효과도 있으므로 바이러스 방제용으로 실제로 이용 가능한 물질로 사료된다.

Vermiculite에 PD broth로 영양분을 주입하여 *T. harzianum*을 접종한 배지에 식균선충을 증식시켜 실제 포장에 처리하여 병 방제효과와 식물 생육 상태를 조사하였다. 결론적으로 처리 후 어느 정도 시일이 경과된 후에 방제효과에 있어서 대조구와 차이가 나타났다. 그러나 처리한 생물제제보다 토양 상태에 더 많은 영향을 받는 것으로 나타났다. 따라서 생물적 방제를 위해서는 속효성의 약효를 나타내는 물질의 첨가가 필요하다. 또한 생물적 방제가 가능한 토양 상태인지를 처리 전에 판단하는 조사가 필요하다. 그렇지 않을 경우 방제효과가 나타날 수 있도록 토양 상태를 개량해 주는 작업이 선행되어야 생물적 방제효과를 기대할 수 있을 것이다.

연구 도중 천연물의 병방제 효과의 우월성을 인지하여 이에 대한 일련이 시험을 수행하였다. 목단피는 농도가 높아짐에 따라 뿌리혹선충의 방제효과가 높아졌고, 0.2% 토양에 혼화하여 처리한 결과 토마토에서 뿌리혹선충을 95% 방제하였다. 이러한 방제의 결과에 비례하여 지상부 식물의 크기나 생체중이 증가하였다. 세균 중 GBR-1의 뿌리혹선충 방제효과가 높으므로 GBR-1과 목단피 복합제를 이용하면 더 낮은 농도에서도 뿌리혹선충 방제효과를 높일 수 있고 이는 실제적으로 이용 가능한 생물제제로 개발할 수 있을 것으로 생각되며 추후 이에 대한 검토가 필요하다. 또한 목단피는 *R. solani*의 균사 생장은 억제하는 반면 길항미생물인 *T. harzianum*은 생장을 억제하지 않았다. 목단피 1.2%를 토양에 혼화하였을 때 무 모잘록병을 95% 방제하였다. 그러나 목단피 1.2% 농도에서는 무 유묘의 생장이 억제되는 약해가 있었다. 목단피 처리량이 0.1% 이하의 낮은 농도에서도 *T. harzianum*과 복합 처리하면 85% 이상의 방제가 올릴 수 있었고 약해도 나타나지 않았다. 이와 같이 천연물을

생물제제와 혼용하는 이 방법은 농약과 같이 낮은 농도에서 속효성의 효과를 낼 수 있어서 생물제제의 단점을 보완하면서 방제가를 높이고 또한 환경친화적이어서 차후 개발되어야 생물학적 기술이라 생각된다.

# SUMMARY

## (영문 요약문)

### I. Title

Control of Soilborne Diseases in Horticultural Crops Using Fungivorous Nematodes and Antagonistic Bacteria

### II. Objectives and Significance

Soilborne diseases are one of the most limiting factors for sustainable agriculture. They are hardly controlled by pesticides and agricultural practices. Controlling the diseases by agro-chemicals, moreover, causes harmful effects on soil environments and aggravates soil productivity in the long run, although it provides short-term control efficiencies. Also it gives a big problem in producing safe agricultural products. Thus, development of efficient and environmental-friendly control measures is an important subject for production of safe and high quality foods.

Biological control of soilborne diseases by antagonistic microorganisms has an advantage of providing durable and environmental-friendly controls. However, it is generally considered to have a low control value and fluctuate depending on geography and environments. This study aims to improve and maximize the control efficacy of biocontrol measures by combining two or more biocontrol agents and supplementing antibiotic natural materials, eventually developing biocontrol technologies of soilborne diseases for horticultural crops, which are favorable to soil environments and safe for human and animal health. Especially, fungivorous nematodes (*Aphelenchus avenae*) can feed on fungal pathogens and carry antagonistic microbes around rhizosphere to promote their establishment on the rhizosphere. New knowledge and techniques acquired through this study will be applied for the development of other useful biological control measures.

### III. Contents and Scope of the Study

In this study, fungivorous nematodes, *Aphelenchus avenae*, with feeding preference to *Pythium* spp. and an antagonistic fungus that can be used for nematode culture medium and is strongly antagonistic to pathogens are to be selected to determine the most suitable fungivorous nematode - antagonistic fungus combination. Also mass production method of the fungivorous nematodes using this antagonistic fungus is to be developed to be used in fields and greenhouses as carrier. Likewise, antagonistic bacteria are to be isolated from various soils and plant debris, and screened for antagonistic activity to various soilborne pathogens. Also with pot experiments on important soilborne diseases such as chili pepper phytophthora blight, ginseng root rot, and root-knot nematode, antagonistic bacterial agents specifically useful for the disease control are to be selected, These nematode isolates and bacterial isolates are to be examined for their biocontrol activity alone and in combination with other biocontrol agents to improve control efficacy. In field experiments conducted with a cooperative team, disease control and plant growth status followed by the treatment of biocontrol agents are to be examined together with mass production of fungivorous nematodes using organic materials.

### IV. Results and Recommendations for Their Application

Fungivorous nematodes, *Aphelenchus avenae* were isolated from various soils, and cultured. They were tested for feeding preference between pathogenic fungi, *Pythium* spp. and antagonistic fungi. As a result, the combination of *A. avenae* and *Trichoderma harzianum* was the most efficient combination as it had the most improved control value probably derived from good nematode growth on *T. harzianum* and strong antagonism of *T. harzianum* to *Pythium*. Other combinations gave no improved or even lowered control values, compared to single treatments alone. These results suggest that the most representative antagonistic microorganism *Trichoderma* is not a major determinant in controlling the disease in this case, but acts like a supporter and assistant or an inhibitor to *A. avenae*. Also the results suggest similar antagonistic microbes may result in



contradictory effects when they combined with other biological control agents.

Various useful bacteria were isolated and tested to have high antibiotic activities. A *Bacillus* strain G181 was highly antagonistic to various pathogens in vitro; however, it showed no control of tomato wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. No improved control efficiency was noticed by this bacterium in combination with fungivorous nematodes. On the other hand, GBR-1 identified as *Paenibacillus polymyxa* had control efficiencies of ginseng root rots inoculated with *Fusarium* and *Erwinia* with low inoculum potentials. Control effects were not shown at the high level of  $10^8$  CFU/ml of GBR-1, but were shown at the low level of  $10^6$  CFU/ml, suggesting that there may be an optimum concentration of the biocontrol agent for maximum control efficacy. GBR-1 also had a high control value over the root-knot nematode in tomato. Therefore, this bacterium can be applied for the development of a microbial pesticide for complex root diseases. *Paenibacillus polymyxa* GBR-447 was antagonistic to *Phytophthora parasitica* and inhibited its zoosporangial formation, thus preventing its infection and secondary inoculum production. Also this bacterium decreased disease incidence and severity of chili pepper phytophthora blight, which may be a potential for the biocontrol agent. JB-1 identified as *Pseudomonas putida*, although low in antagonistic activity, produced proteaceous material(s) that strongly inhibited *Tobacco mosaic virus* (TMV) infection. As this material was very stable to heat and showed systemic activity, it can be practically used for virus control in the field conditions.

*Aphelenchus avenae* nematodes cultured in vermiculite +PD broth colonized with *T. harzianum* were treated to ginseng fields to test disease control and examine plant growth status. Conclusively speaking, the control effects began to show up after a good while following the treatments, and were very subjective to soil environments. Thus, immediately effective antagonistic materials should be added to the biocontrol agents to prevent the initial disease outbreak. Also it is required to determine preliminarily whether the applying fields should be

appropriate for biological control or not. If they are not good for biological control, soil improvement practices should be preceded for the biocontrol agents to exhibit their best potentials.

As recognizing excellent control efficacy of natural materials during the study, a series of experiments were conducted using some medicinal herbs. Root bark of *Paeonia suffruticosa* (Moutan Cortex Radicis, MCR) had the strong control efficacy (CE) of root-knot nematode, increasing with the concentration, with the CE of 95% at 0.2%. Aboveground plant growths were also enhanced by the MCR treatment. As the biocontrol agent GBR-1 had a strong control effect to the root-knot nematode, the more powerful product would be generated if MCR is supplemented to GBR-1. Also MCR had the strongest antifungal activity against *Rhizoctonia solani* AG2-1 (the causal pathogen of ginseng damping-off) among 6 natural materials tested, while it was minimally antagonistic to *Trichoderma harzianum*. The biocontrol efficacy was greatly increased by the combined treatment of the biocontrol agent *T. harzianum* and the natural antifungal material MCR, compared to either of the two treatments alone, even though MCR was used at low concentrations. The differential antibiotic activity of MCR between the pathogen and the biocontrol agent might be the reason of the increased control efficacy. Because MCR is not a pesticide, MCR or its extract can be used as a safe additive to biocontrol agents for improving the control of soilborne diseases. This type of biocontrol products (mixture of antagonistic microbes and natural antifungal materials) may provide a promising technology as the natural materials compensate for microbes by increasing control value as well as exhibiting immediate activity like agro-chemicals, and are safe to soil environments and human health because they are edible oriental medicine.

# CONTENTS

## ( 영 문 목 차 )

<b>Chapter 1. Overview of the Study</b> -----	10
Section 1. Objectives and Background of the Study -----	10
Section 2. Significance of the Study -----	10
Section 3. Contents and Scope of the Study -----	12
<b>Chapter 2. Status of Research and Development</b> -----	13
Section 1. Analysis of Related Technologies -----	13
Section 2. Future Prospects -----	14
<b>Chapter 3. Experiments and Results</b> -----	15
<b>Section 1. Materials and Methods</b> -----	15
1. Biological control effect by use of useful fungivorous	
nematodes and antagonistic fungi -----	15
2. Disease control effect by antagonistic bacteria -----	16
3. Control of important soilborne diseases by multiple	
biological products in fields -----	18
4. Control of soilborne diseases with natural	
materials added (a new approach) -----	19
<b>Section 2. Results and Discussion</b> -----	20
1. Biological control effect by use of useful fungivorous	
nematodes and antagonistic fungi <i>Trichoderma</i> spp. -----	20
2. Disease control effect by antagonistic bacteria -----	24
3. Control of important soilborne diseases by multiple	
biological products in fields -----	39
4. Control of soilborne diseases with natural	
materials added (a new approach) -----	44

Chapter 4. Conclusion and Contribution to the Related Fields	50
Chapter 5. Applications of the Study	52
Section 1. Future Research Plan	52
Section 2. Application to Other Studies	52
Section 3. Application Plan of the Study	53
Chapter 6. Informations from Other Institutes	54
Chapter 7. References	54

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	10
제 1 절 연구개발 목적 및 배경 -----	10
제 2 절 연구개발의 필요성 -----	10
제 3 절 연구개발 내용 및 범위 -----	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	13
제 1 절 국내외 관련기술 현황과 문제점 -----	13
제 2 절 앞으로의 전망 -----	14
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	15
제 1 절 연구의 재료 및 실험적 수행 방법 -----	15
1. 우수 식균선충과 길항곰팡이 <i>Trichoderma</i> 균주 조합의 생물학적 방제효과 조사 -----	15
2. 길항세균 혼합 처리에 의한 병방제 효과 조사 -----	16
3. 복합생물제제에 의한 각종 토양병 방제(포장시험)(협동연구) -----	18
4. 천연물 첨가에 의한 토양병 방제(새로운 시도) -----	19
제 2 절 연구수행 내용 및 결과 -----	20
1. 우수 식균선충과 길항곰팡이 <i>Trichoderma</i> 균주 조합의 생물학적 방제효과 조사 -----	15
2. 길항세균 혼합 처리에 의한 병방제 효과 조사 -----	16
3. 복합생물제제에 의한 각종 토양병 방제(포장시험)(협동연구) -----	18
4. 천연물 첨가에 의한 토양병 방제(새로운 시도) -----	19
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	50
제 1 절 연구개발 목표와 주요 연구 내용 및 적용 -----	50
제 2 절 연구개발 목표의 달성도와 관련분야에의 기술발전 기여도 -----	51

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	52
제 1 절 추가연구의 필요성 -----	52
제 2 절 타 연구에의 응용 -----	52
제 3 절 연구결과의 활용계획 -----	53
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	54
제 7 장 참고문헌 -----	54

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적 및 배경

원예작물 토양병의 친환경적이고 효과적인 방제를 도모하기 위하여 흔히 생물제제를 사용하여 방제한다(Upadhyay and Rai, 1988; Weller, 1988). 이를 생물학적 방제라 한다. 생물학적 방제는 환경친화적이고 인축에 무해하지만 일반적인 단점으로는 방제효율이 낮고 토양의 물리화학적 성질과 생물적 환경에 따라 방제에 일관성이 없다는 점이다(Jung et al., 1980; Park, 1994, 김홍진 등, 1987). 이는 생물제제의 근권 정착 능력과 이미 선점하고 있는 다른 생물과의 경쟁에 있어서 경쟁력이 낮음에 그 원인이 있다.

본 연구는 이러한 단점을 보완하기 위해 두 가지 측면에서 연구개발에 목적을 두었다.

1. 여러 가지 생물제제를 동시에 처리함에 의해 방제 효율의 제고하고자 한다. 이는 여러 길항미생물을 사용하였을 때 길항작용의 상승효과와 방제효율의 변이 감소를 지향하기 위함이다(Bae et al., 1995; Brion et al., 1996; Dunne et al., 1998; Guetsky et al., 2001; Jeong et al., 1993). 특히 식균선충(*Aphelenchus avenae*)은 곰팡이를 섭식하는 능력으로 곰팡이병을 방제하고(Barnes et al., 1981; Caubel et al., 1981; Freckman and Caswell, 1985; Rhodes and Linford, 1959) 스스로 움직일 수 있어서 근권으로 길항미생물을 이동시켜주므로 길항미생물의 근권정착력을 제고시킬 수 있어서 우선적으로 식균선충을 사용한 복합생물제제의 개발을 고려하였다.

2. 천연항균보조제를 사용함으로써 생물학적 방제 효과 증진하고자 한다. 살균제와 생물학적 방제제를 동시에 사용하여 방제효과의 상승을 유도한 사례가 있으므로(Duffy, 2000; Kim et al., 1991) 농약대신 친환경적인 물질로 대체한다는 개념이다. 이는 병원균에 더 큰 항균활성을 나타내는 천연물(농약이 아님)을 처리함으로써 이미 선점하고 있는 병원균의 경쟁력을 약화시키고 길항미생물의 경쟁력을 제고하고자 한다. 이와 같은 연구개발 목적을 달성하기 위해 구체적으로 실시할 연구 목표는 다음과 같다.

- 우수 식균선충 *Aphelenchus avenae*와 식균선충의 배지로 활용할 길항곰팡이 *Trichoderma* 선발: 산지에서 분리한 식균선충과 길항곰팡이 균주 조합의 병 방제효과 조사로 우수 조합 선발

- 토양 및 식물체에서 분리한 세균의 항균활성과 토양병 방제 효과 조사: 대상: 고추역병균, 인삼뿌리썩음병균, 뿌리혹선충 등
- 천연항균물질 첨가에 의한 생물학적 방제 효과 제고 시험: 천연항균물질의 뿌리혹선충 및 *Rhizoctonia solani*에 의한 무의 모잘록병 방제효과 시험, *T. harzianum*과 천연항균물질 동시에 처리하였을 때 낮은 농도에서도 방제의 효과 및 식물의 성장효과 조사.
- 포장시험과 생물제제의 대량배양 시험: 위탁과제에서 함께 수행한 이 시험에서는 일반적으로 생물제제의 처리에 의한 식물생육과 병방제 조사. 길항미생물과 식균선충의 대량배양을 위한 유기물 배지 조사.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

토양병은 지속적인 농산업을 유지하는데 가장 큰 장애요인 중의 하나이다. 농약이나 여러 가지 경종적 방법에 의한 방제 효율이 크지 않은 것으로 인식되고 있다. 더욱이 농약에 의한 토양병의 방제는 단기적인 효과를 가져다 줄 수는 있으나 토양 생태계에 악영향을 초래하고 장기적으로는 토양의 생산성을 악화시킬 수 있다. 환경친화적인 방제 방법으로 생물학적 방제법의 대상은 주로 토양병이었으며 식물병 방제 관련 생물산업의 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 따라서 이의 효과적이고 환경친화적인 방제 방법은 안정적이고 고품질의 식물생산에 중요한 과제이다. 또한 환경문제에 대한 규제가 강화되며 이로 인한 생물농약의 중요성이 부각되고 있고, 그 사용량 역시 큰 폭으로 증가하고 있어 향후 세계 생물농약시장의 규모는 급증할 것으로 예견되고 있다.

길항미생물에 의한 토양병의 생물학적 방제는 환경친화적이며 지속적으로 방제효과를 줄 수 있는 장점이 있는 반면 일반적으로 방제가가 낮고, 지역이나 환경에 따라 방제효율의 변화가 심한 단점이 있다(Jung et al., 1980; Park, 1994, 김홍진 등, 1987). 이러한 단점의 주요 원인은 미생물체의 토양 주입시 작용점(근권)에 도달하여 정착하는 비율이 낮으며 병원미생물 등 이미 식물과 안정적 관계를 이루고 있는 자연적인 토양 환경 하에서 추가되는 미생물체는 상대적으로 경합력이 낮는데 기인한다.

토양에는 미생물, 무척추동물, 원생동물 등 여러 가지 생물들이 증식하고 활동하면서 서로 유기적인 관계를 가지고 있으며 토양의 여러 물리 화학적 환경에 영향을 받고 있다(Freckman and Caswell, 1985). 작물에 병을 일으키는 곰팡이, 세균 등 토양 병원미생물에 의한 식물병의 발생은 병원균의 견제 생물의 활동이 약화된 것과 깊은 관련이



있다. 토양 선충과 같은 토양 소동물이 토양 생태에 적지 않은 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 토양선충의 경우 유기물 분쇄, 미생물의 전반, 영양분의 변화의 기능을 가지고 있어서 다른 미생물의 활동에 큰 영향을 주고 있다. 따라서 미생물체의 효과를 극대화하기 위해서는 미생물체의 길항미생물의 근권 정착율을 제고하며 다른 미생물과의 경쟁력을 상승하는데 있으며 그 하나의 방편으로 식균선충을 이용한 생물학적 방제법 개발 필요성이 있다. 식균선충에는 여러 가지 종류가 있으나 지금까지 그 안전성에서 인정된 것은 *Aphelenchus avenae* 1 종만이 보고되었다(Freckman and Caswell, 1985). 다른 식균선충들은 식물기생선충으로서의 가능성도 배제할 수 없기 때문이다. 따라서 식균선충을 이용한 길항미생물에 의한 생물학적 방제법의 효과를 제고하는 방법을 개발함으로 생물농약 개발 연구를 활성화시키며 병방제에 있어서 생물농약이 차지하는 비율을 제고하고자 한다.

생물농약은 방제효과가 느린 또 하나의 단점이 있다. 이를 극복하기 위하여 길항미생물에 영향을 덜 주는 농약과 혼용하여 사용함으로써 방제가를 높이고 빠른 방제 효과를 나타내는 경우가 있다(Duffy, 2000; Kim et al., 1991). 이때 방제 농약은 병원균에 대해서는 살균력 또는 항균력이 매우 강하지만 길항미생물에 대해서는 항균력이 낮은 특성을 보여야 할 것이다. 그러나 농약을 사용할 경우에는 사용한 만큼 농약에 의한 폐해가 있고 완전 무농약 재배의 기준에는 미치지 못한다. 한편 유기 합성 농약 대신 항균성을 지닌 천연물을 사용하여 빠른 방제효과와 선택적 항균력을 통한 길항미생물의 경쟁력 제고를 모색할 수 있을 것이다.

현재 유기농산물의 수요가 급증과 함께 환경오염 문제, 화학 농약의 사용 기피 등으로 환경친화적인 지속적 농업이 사회적으로 강력히 요구되고 있으며 이에 따라 무농약 재배에서 생산성 제고를 위해 효과적인 토양병의 생물농약 개발이 필요하다. 그동안 생물농약의 방제 효과가 불안정으로 인해 생물농약에 대한 신뢰성이 결여되어 있었는데, 앞으로 친환경농업을 위해서는 생물농약의 사용 확대가 필요하며 이를 위해서는 효과 제고 방법을 개발하여 이의 신뢰성을 제고할 필요가 있다. 이를 위해서 복합생물제제, 천연항균물질 첨가 생물제제 등 여러 가지 방법 중 실제적으로 생물적 방제의 효과를 제고하는데 유용한 방법으로 사용될 수 있을 것이다.

### 제 3 절 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 다음과 같은 연구개발 내용과 범위를 포함한다.

1. 각종 토양으로부터 우수한 식균선충 *Aphelenchus avenae*를 분리하고, 이의 배지로 활용할 곰팡이(길항곰팡이)를 선발하여 가장 적절한 식균선충-길항곰팡이 조합을 결정한다. 또한 이 길항곰팡이를 이용하여 지속적으로 대량배양할 수 있는 방법을 개발함으로써 온실이나 포장에서 사용할 수 있는 매체를 확보하고자 한다.

2. 길항세균의 경우에 있어서도 토양 및 식물체에서 균주들을 분리하여 여러 토양 병원균에 대한 항균활성을 조사하고 또한 포트시험을 실시하여 중요 토양병(고추역병, 인삼뿌리썩음병, 뿌리혹선충 등)에 대한 방제효과를 조사한다. 그리하여 각 병의 방제에 특이적으로 적합한 유용세균을 선정하고자 한다. 효과가 확인된 식균선충이나 세균 균주는 단독으로 또는 다른 생물제제와 혼용하여 방제효과의 상승작용 유무를 조사한다.

3. 위탁과제와 함께 수행한 포장시험에서는 생물제제의 처리에 의한 식물 생육과 병방제 조사, 길항미생물과 식균선충의 대량배양을 위한 유기물 배지 조사 등을 실시한다.

4. 추가적으로 천연물의 항균효과와 병방제효과 및 생물제와 함께 사용하였을 때 병방제 상승효과를 조사하여 효율적인 생물학적 방제 기술 개발을 위한 새로운 방법으로서의 타당성을 조사한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 관련기술 현황과 문제점

길항미생물에 의한 생물학적 방제는 주로 토양병 대상으로 연구 개발되고 있다. 1999년도 기준으로 상품으로 등록된 길항미생물제는 세균 5종에 14 품목, 방선균 1종 1품목, 곰팡이 9종 23품목으로 알려져 있다(USDA, 1999). 국내에서는 대학이나 연구기관에서 다양한 토양 병해에 대한 생물농약의 개발이 시도되어 왔으나(Chung, 1991; Chung and Kim, 1978; Jung et al., 1980; Lee et al., 1990a, 1990b; Moon et al., 1995; Yeom and Park, 1995; 김홍진 등, 1987; 신동범 등, 1994; 조종택 등, 1992; 지형진 등, 1988), 현재까지 생물농약에 대한 등록은 미미한 실정이다.

토양병을 생물학적으로 방제하기 위하여 길항미생물을 배양하여 유기물과 함께 토양 전면에 투입하는 방법을 사용하는데 일반적으로 병방제 효율이 낮게 나타난다(Upadhyay and Rai, 1988). 이는 식물에 병을 일으키는 곰팡이나 세균들은 오랜 세월동안 그 작물을 재배하는 환경과 기주와 상호관계에 적응해 왔기 때문에 외부에서 도입한 미생물들과 경쟁에서 월등 우세하기 때문일 것이다. 많은 경우 실내 및 온실 실험에서 효과가 우수한 미생물제도 토양에 시용했을 때 효과가 감소하고 방제효과가 균일하지 않고 환경조건에 따라 변이가 큰 이유는 다양한 조건에서 미생물의 근권 정착의 불균일성과 병원균을 포함한 토양의 다른 미생물과의 경쟁력 저하가 주요 원인이다.

식균선충은 *Aphelenchus*를 중심으로 연구되었으나, 피식자의 종류, 실내 또는 온실에서의 병방제 효과 등에 국한하여 연구되었을 뿐이며 광범위한 연구는 이루어지지 않았다. 식균선충과 곤충기생선충의 복합처리로 병과 해충을 동시에 방제하려는 시도가 있었으나(Ishibashi et al., 1988), 대부분의 연구는 *Aphelenchus* 선충의 단일 처리의 병방제 효과에 국한되었었다(Barnes et al., 1981; Caubel et al., 1981; Freckman and Caswell, 1985; Rhodes and Linford, 1959). 한국인삼연초연구소에서는 *Aphelenchus* 선충의 *in vitro* 상에서의 병 방제효과, 인삼포에서의 *Aphelenchus* 밀도와 뿌리병과의 상관관계, 배양 방법 등에 대해 연구된 바 있다(Kim, 1994). *Aphelenchus* 선충을 생물학적 방제제로 개발하려는 연구가 미진한 이유는 일반적으로 생물농약에서 나타나는 단점인 방제 효과의 균일성 결여 외에도 식균선충의 작물

피해 가능성 여부가 확인되지 않았기 때문이며, 대량배양의 어려움과 shelf-life 문제 등 선충이 소동물이기 때문에 가지는 단점들이 있기 때문이라 생각된다. 그러나 생물제제의 다양성을 위해서 다양한 선충을 screening 하여 유용선충을 선발하고 배양 방법 등을 개발하여 식균선충이 가지는 장점을 최대한 이용한 생물학적 방제 기술을 모색하여야 할 것이다.

현재까지 개발된 길항미생물제는 제조의 편의성으로 인해 단일 미생물제가 대부분이다. 일부 생물제제의 경우는 세균, 곰팡이 한 가지씩을 혼합하거나 또는 여러 가지 미생물을 혼합 배양하여 처리하여 방제 효율을 증가시킨 보고가 있다(Bae et al., 1995; Brion et al., 1996; Dunn et al., 1988; Jeong et al., 1993). 그러나 대부분의 복합미생물제의 경우 출처불명의 유기물을 사용하거나 각각의 길항미생물의 역할에 대한 세부적인 내용들이 밝혀져 있지 않아 이용에 한계가 있다. Guetsky et al.(1999)에 의하면 복합 길항미생물제는 방제효과의 변이를 감소시킬 수 있다고 하였지만 방제효율을 극대화하기 위해서는 길항미생물 들의 구성이 이상적으로 이루어져 서로 상호보완적으로 작용하여야 할 것이다.

## 제 2 절 앞으로의 전망

생물학적 방제는 환경친화적이고 인축에 무해하지만 일반적인 단점으로는 방제 효율이 낮고 토양의 물리화학적 성질과 생물적 환경에 따라 방제에 일관성이 없다는 점이다. 이는 생물제제의 근권 정착 능력과 이미 선점하고 있는 다른 생물과의 경쟁에 있어서 경쟁력이 낮음에 그 원인이 있다. 이를 극복하기 위해 여러 길항미생물이 혼합된 복합길항미생물제를 사용하거나 농약과 미생물제를 혼용하여 병방제의 효율을 제고하고 있다.

복합길항미생물제에 의한 생물학적 방제 기술이 현재의 단일생물제제의 대안이 될 것이며 이를 위해 본 연구는 생물학적 특성이 현저히 다른 식균선충을 생물제제의 하나의 구성요소로 하고자 한다. 식균선충인 *Aphelenchus*는 일반적으로 알려진 것과는 달리 생리 생태형에 따라 다양한 식이선호성과 작물과의 관계를 가지고 있기 때문에 다양한 생리 생태형의 식균선충을 조사하여 특정 작물에서 병원균을 선별적으로 가해할 수 있는 식균선충의 이용으로 토양병을 효과적으로 방제할 수 있는 생물농약 개발에 활용할 수 있다. 복합미생물제를 사용하였을 때 포함되어 있는 식균선충이 토양병 방제에 어떠한 역할을 담당하는지 다른 길항미생물과의 관계는 어떠

한지를 구명하면 이를 토대로 효과적인 미생물제 개발에 유의한 정보를 제공할 수 있을 것이다. 이는 또한 복합길항미생물제의 개발에 연구에 기술적인 참고자료로 활용되어 생물학적 방제 기술개발 촉진을 유도하게 될 것이다.

생물제제에 농약을 혼용하는 경우도 농약을 사용하기 때문에 완전한 친환경농업이라 보기 어렵다. 따라서 농약을 대신할 수 있는 물질인 천연물을 생물제제와 혼용하는 방법을 사용하면 농약과 같이 속효성의 병방제 효과를 낼 수 있어서 생물제제의 단점을 보완하면서 방제가를 높이고 또한 환경친화적이다. 따라서 이 방법도 적극 고려되어야 할 생물학적 기술 개발 과제이다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구의 재료 및 실험적 수행 방법

#### 1. 우수 식균선충과 길항곰팡이 *Trichoderma* 균주 조합의 생물학적 방제효과 조사

##### 가. 식균선충인 *Aphelenchus* 선충 분리 및 배양

식균선충은 식물 뿌리 내에서도 간혹 발견되지만 대부분 근권에서 서식한다. 식균 선충을 분리하기 위해 2001-2002년도 여러 지역의 토양으로부터 근권토양을 채취하여 각각의 토양에서 Baermann funnel법에 의해 선충을 분리하였고, 해부현미경 하에서 식균선충인 *Aphelenchus avenae*를 확인하여 pipette로 한 마리씩 곰팡이 배지 (*Fusarium* sp.)에 옮겨놓았다. 분리한 토양에 따라 대부분의 토양에서는 *A. avenae*가 존재하지 않았으나 간혹 20 여 마리의 식균선충이 분리되는 토양도 있었다. 이렇게 분리 배양된 식균선충은 다시 Baermann funnel 법에 의해 재 분리한 후 광학현미경 하에서 다른 부생선충의 오염여부를 확인하고 다시 *Fusarium solani*에서 30일간 증식시켜 접종원을 확보하였다.

##### 나. 식균선충인 *Aphelenchus* 선충의 병원균 및 길항미생물의 식이선호성

식균선충을 길항미생물과 혼합 시에 방제효과를 제고하기 위해서는 병원균과 길항미생물 사이에 식이선호성이 뚜렷이 구별되어야 한다. *F. solani*에서 증식한 식균선충은 병원균인 *Pythium* spp. (*P. spinosum*, *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*)와 길항곰팡이인 *Trichoderma* spp. (*T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. koningii*) 및 *Gliocladium virens*에 식균선충을 50마리씩 접종하여 곰팡이 균사 피해 및 선충의 증식률을 조사하였다. 균사의 피해는 기중균사가 피해를 입어 균사체가 수침상으로 변하는 정도를 육안으로 조사하였고, 선충의 증식률은 Baermann funnel법에 의해 접종 15일 후에 조사하였다. 이때 사용한 곰팡이 균주는 *Pythium* spp.의 경우는 서울시립대 김진원교수에게서 분양받았으며, *Trichoderma*와 *Gliocladium* spp.의 경우는 서울대 농생대 역학연구실에서 분양받아 사용하였다. 6일 또는 13일 PDA에서 배양한 곰팡이 배지에 선충을 접종하였다.

## 다. 길항균의 항균력 조사 및 식균선충과 길항균의 동시 사용에 따른 토양병 방제 조사

길항곰팡이의 *Pythium* spp.에 항균작용을 aluminium ring test에 의해 조사하였다. 멸균한 알루미늄 링(지름 3cm, 높이 0.8cm)의 한 쪽 면을 aluminium foil로 봉하고 autoclave한 다음 PDA를 붓고 굳혔다. 이어 배지의 표면에 각각의 길항미생물을 접종하여 2일 동안 배양한 후 반대편에 aluminium foil를 제거한 후 병원균의 균사 조각(지름 5mm)을 접종하여 배양하였다. 배양 온도는 25℃에서 3일간 배양 후 병원균의 균사 성장을 육안으로 조사하였다.

병원균의 접종원은 oatmeal-sand medium(oatmeal 1, sand 20, distilled water 4)으로 준비하였다. 멸균한 oatmeal-sand medium에 potato carrot agar에서 배양한 *Pythium* spp. 균사체를 접종하여 25℃에서 14일간 배양하여 접종원을 만들었다. 길항미생물의 접종원은 쌀겨를 1 : 1.5(물) 비율로 섞어 멸균한 후 길항미생물 균사체를 접종하여 23℃에서 6일간 배양 후 사용하였다. 병원균의 접종농도는 토양과 5:3(v/v) 비율이며(약 50% 모잘록병을 일으켰음), 길항미생물의 농도는 0.5% 또는 0.1%(w/v)로 토양과 완전히 혼합하여 처리하였다. 멸균한 모래 토양에 병원균과 길항미생물을 접종하고 플라스틱 용기(11x9x4.5 cm)에 담고 무(품종 태산무)를 10립씩 3반복으로 심었다. 이후 각각의 용기에 5,000 마리씩 식균선충 현탁액을 골고루 뿌려 주어 접종하였다. 처리 10일 후 모잘록병 발생을 각 처리별로 모잘록병 발생을 조사하였다. 통계분석은 one-way variance analysis로 least significance difference(LSD) test에 의해 유의성을 검정하였다.

## 2. 길항세균 혼합 처리에 의한 병방제 효과 조사

### 가. 분리 세균의 항균성 screening 및 G181첨가 생물제제의 병방제 효과

토양이나 또는 식물체에서 세균의 분리는 nutrient agar에 희석한 토양현탁액 또는 식물즙액을 spreading하는 통상적인 방법에 의해 분리하였다. 분리한 세균은 LB 등의 배지에서 3-4일 배양 후 paper disc(지름 8mm)에 현탁액을 흡즙시킨 후 곰팡이를 접종한 agar plate에 올려놓은 다음 3일 후 저지원(inhibition zone)의 크기를 조사하였다. 곰팡이 병원균으로는 *Bipolaris cactivora*와 *Fusarium oxysporum*을 사용하였으며 paper disc 주위의 저지원의 크기에 의해 항균력을 가름하였다. 즉 +++:

>1.5 cm (radius), ++: 1.0-1.5 cm, +: 0.5-1.0 cm, -: <0.5 cm 등 4 수준으로 구분하였다.

토마토 시들음 병원균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)의 현탁액에 토마토 유묘의 뿌리를 침지한 후 pot에 이식하였으며, 이식 후 곧바로 약제(Benomyl 650 ppm)를 처리하거나 식균선충혼합제, 세균(이 경우 *Bacillus*로 동정된 G181) 등 생물제제를 관주 처리하였다. 처리당 40 개체의 식물체를 사용하였다. 처리 15일 후부터 46일까지 시들음 증상의 발생을 조사하였다. 방제가는 control value(%) = (무처리구 시들음 증상 식물체수 - 처리구 시들음 증상 식물체수)/무처리구 시들음 증상 식물체수 x 100으로 계산하였다.

호밀과 모래를 1: 1로 섞은 배지에 *Rhizoctonia solani*를 15일간 배양하여 토양에 0.1% 혼화 처리하였다. *Trichoderma harzianum* 배지에서 증식시킨 *A. avenae*를 살균수에 추출하여 식물 개체당 2,000마리 비율로 접종하였다 (개체당 5ml씩 현탁액을 관주하였다). 세균의 경우(G181)는 세균현탁액( $10^8$  CFU/ml)도 위와 같이 관주하였다. 이와 같이 처리하여 접종 후 일주일까지 무 출아율을 조사하였다. 방제가는(%)는 (no. sprouts in treatment - no. sprouts in control)/(no. sprouts with no pathogen - no. sprouts in control) x 100으로 계산하였다.

#### 나. GBR-1의 인삼뿌리병 방제 효과 조사

인삼 산지의 시장에서 4년 근 인삼을 구입한 후 근부 부위에서 세균을 분리하였다. 345 세균 균주를 분리하였으며 그 중 81균주가 *Bacillus*와 유사한 균총을 형성하여 이를 다시 *Paenibacillus* 특이 primer(PAEN515F, 1377R; 0.9kbp)와 *Paenibacillus polymyxa* 특이 primer(BAC11, POL; 660 bp)로 순차적으로 RAPD를 사용하여 *P. polymyxa*로 동정된 균주들을 선별하였다. 이들 균주들은 모두 20균주이며 배양학적 특성, 영양생리학적 특성, 16S rDNA sequence analysis, fatty acid analysis 및 Biolog program에 의해 *Paenibacillus polymyxa*로 확인되었다(Jeon et al., 2003). 그 중 GBR-1의 인삼뿌리병 방제 효과를 조사하기 위하여 인삼 절편을 이용하여 조사하였다. 뿌리를 부패하는 *Erwinia carotovora*와 *Fusarium solani* 등에 대한 병방제 효과를 조사하기 위해 병원균과 길항미생물 GBR-1을 동시에 접종하였다. 3일 후 인삼 뿌리 절편의 부패 정도를 측정하였고 접종한 인삼 뿌리 절편 전체를 살균수에 넣고 간 후 pour plate 법에 의해 시기별로 밀도를 조사하였다. 3반복으로 조사하였다. 인삼 뿌리 절편의 접종 부위는 Karnovsky's fixative와 osmium tetroxide로 이중 고



정하고 ethanol series에서 탈수한 후 Spur resin에 포매하여 현미경 관찰 시료로 사용하였다. 유리칼을 이용하여 ultramicrotome하에서 semi-thin section하여 0.1% toluidine blue O로 염색 후 광학현미경 하에서 관찰하였다.

#### 다. GBR-1의 뿌리혹선충 방제 효과

*Paenibacillus polymyxa* GBR-1의 뿌리혹선충 방제효과를 조사하였다. 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)은 오염된 참외 포장 토양(경상북도농업기술원 김동근 박사 제공)에서 토마토(*Lycopersicon esculentum* cv. Phungsaeng)를 심어 증식시켰다. 뿌리혹선충의 이병 뿌리를 마쇄한 후 Baermann funnel 법에 의해 부화하여 나온 2기 유충을 수거하여 시험관에서 가라앉히게 하여 농축하여 접종원으로 사용하였다. 비살균 사질 양토에 1개월 된 토마토 유묘를 1/5,000a 플라스틱 포트에 심고 2일 후 GBR-1 세균배양액 추출물이나 세균현탁액 및 저항성 유도물질로 알려진 dl- $\beta$ -amino-n-butyric acid (BABA), benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH)등을 처리하였다. 처리 3일 후(이식 후 5일 후) *Meloidogyne incognita* 유충을 식물체당 2,000 마리씩 접종하였다. 접종 35일 후에 뿌리혹 형성과 뿌리 무게, 길이, 식물체 무게 등을 조사하였다. 또한 GBR-1 세균배양액 chloroform 추출물과 세균현탁액 농도별로 처리하여 위와 같은 방법으로 농도별 뿌리혹선충 방제 효과와 식물체의 성장 효과를 조사하였다. Chloroform 추출물의 경우는 배양액 총량 기준의 사용량 백분율로 나타냈으며, 세균현탁액의 경우는 원심분리로 배양액을 제거한 세균을 사용하였으며 역시 배양액 총량 기준의 사용한 백분율로 표시하였다.

GBR-1의 배양배지에 따른 세균의 증식을 관찰하였다. 사용한 배지는 M523배지 (soluble starch 0.5%, yeast extract 0.05%, peptone 0.05%,  $K_2HPO_4$  0.3%,  $MgSO_4$  0.02%), M523배지+malt extract, M523배지+tomato leaves(0.1%), M523배지+tomato leaves(0.5%), *Pseudomonas* minimal media, 증식배지(Soluble starch 0.6g,  $K_2HPO_4$  0.24g,  $CaCO_4$  0.24g,  $MgSO_4$  0.12g, Urea 0.24g, Sucrose 10g /1 l), Brain Heart Infusion배지를 사용하였다. 24시간 간격으로 3일 동안 조사하였으며, dilution하여 plate에 도말하여 counting 하였다. 3일후 동량의 chloroform으로 추출하여 농축시킨 후 위에서와 같은 방법으로 각각의 배양액에서 추출한 chloroform 추출물을 선충방제에 이용하였다. 35일후 뿌리혹의 수, 뿌리의 길이 등을 조사하였다.

#### 라. 고추역병균 방제에 선충과 길항미생물 이용

*Paenibacillus polymyxa* GBR-447은 고추역병균(*Phytophthora parasitica*)에 특히 항균활성이 높았다. 각종 토양으로부터 역병균에 항균력이 있는 균주를 선발하였고, 이들 중 역병에 항균력이 강한 균주를 선발하였다. 선발 방법은 가운데 역병균 혹은 시들음병균을 치상하고 주위에 선발한 균주를  $10^8$  cells/ml 농도로 조절한 후 100 $\mu$ l spotting 하였다. 5일 후 clear zone의 지름을 측정하였다. 또한 GBR-447의 경우는 고추역병균에 대한 항균활성의 mechanism을 조사하기 위해 역병균 배지에 GBR 447 균주의 세균현탁액을 농도별로 처리하고 시기별로 역병균 배양액을 수거하여 유주자낭의 형성과 모양을 광학현미경 하에서 관찰하였다.

서울대 농생대 역병 이병 실험포장에서 5주 자란 고추(품종: 부강)를 *Aphelenchus avenae* 선충과 GBR-447 세균을 각각 처리하고, 정식하였다. 처리구는 식균선충을 단독처리하고 병원균을 처리한 실험구(Nematodes, N), 길항세균(GBR-447)을 단독처리하고 병원균을 처리한 실험구(Bacteria, B), 식균선충과 세균을 복합 처리하고 병원균을 처리한 실험구(NB), 대조구로 병원균만 접종한 실험구(Control, C)로 설정하였다. 정식 1 개월 후부터 10 - 15일 간격으로 시기별로 병 발생률을 조사하였다.

#### 마. JB-1의 TMV 방제효과 조사

인삼과 선인장 식물체에서 분리한 300 여 세균 균주들 중 50 균주를 담배 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc를 이용한 TMV 감염에 의한 국부병반법으로 항바이러스 활성을 조사하였다. 세균배양여액은 동량의 TMV가 전신 감염된 담배잎 (*N. tabacum* cv. NC 82) 즙액(200 배 희석)으로 혼합한 다음 TMV에 국부병반을 보이는 품종 Xanthi-nc의 반엽에 접종하고 대조로서 다른 반엽에 물로 2배 희석한 TMV 용액을 Carborundum(400 mesh)을 잎에 뿌려준 후 접종하였다. 접종한 식물체는 25-27 $^{\circ}$ C에 두었으며 접종 3-4일 후 반엽에 형성된 병반의 수를 비교하여 방제효과를 조사하였다. 3반복으로 실시하였다. 침투성 TMV 감염억제 효과 조사는 위와 같은 방법으로 조사하되 세균배양액을 잎의 뒷면에 처리하고 1 시간 후에 잎의 앞면에 TMV를 접종하였다. 대조로서 세균배양액 대신에 세균을 배양하지 않은 nutrient broth를 사용하였다. 접종 3-4일 후 각각의 잎에 형성된 병반의 수를 조사하였다. 또한 토양에 배양액을 식물체당 50ml씩 관주하여 일정 기간 후 TMV를 접종하고 무처리구와 비교함으로써 전신성 TMV 방제효과를 조사하였다.

JB-1은 안정의 선인장에서 분리한 균주로 가장 높은 항바이러스 활성을 보였다. 세균의 형태와 크기는 세균의 균총을 spatula로 Formvar가 입혀진 copper grid 위의 증류수에 옮겨놓고 말린 후에 2% uranyl acetate로 negative staining한 후 전자현미경(JEM 1010, JOEL, Japan)으로 관찰하였다. 또한 이 균주는 Biolog program, 16S ribosomal RNA gene sequencing, fatty acid composition analysis by Sherlock system (Microbial ID, Inc., Newark, Del) 등으로 동정하였다.

항바이러스 물질의 생산과 추출을 위해 nutrient broth를 사용하였다. 세균은 28°C에서 4일간 진탕배양(200 rpm) 하였다. 배양 후 10분간 원심분리(6,000 x g) 후 그 상정액을 사용하였다. TMV 감염억제물질의 분리는 유기용매와 물을 사용하여 순차적으로 분획하였고, 분획물은 농축하여 용매를 제거하고 다시 물에 희석하여(녹지 않을 경우 소량의 ethanol를 이용하여 녹인 후 물로 희석함) 위의 방법으로 항바이러스 활성을 반엽접종법에 의해 조사하였다.

배양기간별 항바이러스활성의 조사는 JB-1을 nutrient broth에서 28°C로 배양하면서 배양액을 시기별로 채취하여 TMV 감염억제효과를 위의 방법대로 조사하였다. 또한 항바이러스 활성물질의 특성을 조사하기 위해 활성이 있는 JB-1 배양액의 수용성 분획을 proteinase K((Type XIV, Sigma Chemical Co.; 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.3, 0.1 M CaCl<sub>2</sub>)로 최종농도 500 µg/ml로 37°C에서 60분간 처리한 후 사용하였다. 열에 대한 안정성 조사도 실시하였는데 JB-1 1ml을 vial에 담고 각기 다른 온도에서 15분간 처리한 후 그 용액을 반엽접종법에 의해 TMV 감염억제효과를 조사하였다. 고압살균은 15 psi, 121°C로 15분간 처리하였다.

### 3. 복합생물제제에 의한 각종 토양병 방제(포장시험)(협동연구)

토양에 대량으로 생물제제를 처리하기 위해서는 다른 미생물제는 이미 많은 연구가 되어 있다. 식균선충은 Agar 배지에 곰팡이를 배양하여 선충을 접종한 후 사용할 수 있으나 이 연구에서는 토양에 주입할 carrier를 이용하여 좀 더 효과적인 대량 증식 방법을 모색하고자 하였다. 토양에 주입할 기본 delivery 물질로는 Perlite와 Vermiculite였으며 각각에 영양액으로는 PB broth를 첨가하였다. 여기에 먼저 *Trichoderma harzianum*을 접종하여 선충의 먹이인 곰팡이를 성장하게 한 후 식균 선충을 60 ml 당 500 마리씩 접종하였다. 이를 장기간 배양하면서 필요시 소량의 배

지를 채취하여 Baermann funnel 법에 의해 선충의 밀도를 조사한 후 사용하였다. 또한 선충의 증식을 촉진시키기 위해 여러 가지 유기물을 0.1%씩 첨가하여 선충을 증식시켰으며 증식정도는 접종 15일 후 5일 간격으로 선충 밀도를 조사함으로써 계산하였다. 다른 미생물제나 천연물의 추가는 식균선충을 증식시킨 Vermiculite 배지에 미생물배양액이나 천연물을 중량비로 계산하여 첨가하였다.

인삼 뿌리썩음병 방제 효과를 조사하기 위한 포장은 충북 증평에 소재하고 있는 KT&G 중앙연구원 시험포를 사용하였다(2002년 포장시험). 이 포장은 인삼연작지로 *Cylindrocarpon destructans*에 의한 인삼뿌리썩음병과 적변이 심하게 발생하고 있는 곳이다. 식균선충 및 길항미생물(*Trichoderma harzianum*) 복합제를 인삼 2년근 묘삼 이식시 처리하고 뿌리썩음병에 의한 인삼의 결주율을 조사하였다. 위에서 언급한 Vermiculite(*A. avenae*와 *T. harzianum* 배양재료) 500 ml를 마사토 10 L와 혼합해 배양으로 하고 다시 배양과 마사토를 1:1 비율로 섞어서 적량으로 하였고, 처리량은 묘포 1칸당 2 L씩 뿌려주었다. 묘포 처리 1개월 및 2개월 후에 인삼의 잔존주율을 3 반복으로 조사하였다. 2003년도 포장시험에서는 항균성 천연물의 병방제 효과가 높은 것으로 나타나 식균선충복합 미생물제에 항균성천연물을 첨가하여 병방제 효과와 인삼의 생육을 조사하였다(경기도 포천 농가). 위의 배양재료 500 ml(식균성 선충 *A. avenae* 20만 여 마리 포함)와 모래 2l 를 섞어 인삼(2년근 묘삼) 재식시에 칸 당 골고루 처리하고 흙을 덮은 후 계피가루 혹은 목단피를 0.1%씩 뿌리고 다시 흙을 덮어주었다. 처리량은 묘포 1칸 당 2l 씩 뿌려주었고, 처리 후 3, 6개월 후의 잔존주율을 3반복으로 조사하였다. 이와 함께 *A. avenae*의 개체수 변화와 total bacteria와 total fungi의 밀도도 함께 조사하였다. 조사방법은 희석한 토양현탁액을 Nutrient agar와 PDA(acidified)에 pour plating 하여 조사하였다. 2004년도에는 경기도 안성 인삼 농가 포장(인삼 재작지)에서 실시한 포장시험에서도 같은 방법으로 처리하고 인삼 3년근 묘삼을 심고 인삼 채굴시기인 10월에 인삼을 채굴하여 인삼의 각종 생육지표를 생육을 조사하고 토양 미생물과 식균선충의 밀도를 조사하였다.

#### 4. 천연물 첨가에 의한 토양병 방제(새로운 시도)

연구 2년차까지 식균선충과 in vitro에서 우수한 길항세균을 선발하여 토양병방제 효과를 조사하였으나 항균성 천연물에 의한 효과에 미치지 못하였다. 항균성 천연물

은 생물제제는 그 자체 방제효과가 있을 뿐만 아니라 생물제제의 신속한 약효를 도울 수 있으므로 보조제로 첨가할 수 있기 때문에 3년차에서는 이에 대한 연구를 보다 심도 있게 수행하였다.

#### 가. 천연물에 의한 뿌리혹선충 방제

GBR-1에서와 마찬가지로 토마토(풍생 품종)를 사용하여 천연물의 뿌리혹선충 방제효과를 조사하였다. 토마토 파종 후 1개월 된 토마토 식물체를 1/5,000a 플라스틱 포트의 사양토(시중 견재상에서 구입한 건조한약재료 0.2%(w/v)씩 토양혼화)에 옮겨 심었다. 효과가 가장 우수한 목단피와 계피의 경우는 농도별로 처리한 후 토마토 식물체를 옮겨 심었다. 토마토 이식 5일 후 *M. incognita* 유충을 식물체당 2,000 마리씩 한 처리당 5반복으로 접종하였다. 처리 효과는 접종 35일 후 뿌리혹형성과 식물의 성장 지표로 조사하였다.

#### 나. 천연물 첨가에 의한 병방제 효과 상승 작용

##### 1) 천연물의 항균작용 및 무 모잘록병 방제효과

위 실험을 위해서 길항미생물로 *Trichoderma harzianum*을 사용하였고, 병원균은 *Rhizoctonia solani* AG2-1(KT&G 중앙연구원 연료연구소에서 분양)을 사용하였다. 시중에서 구입한 천연물 100 g을 ethanol 1 L에서 밤새 추출하고 25ml로 감압 농축한 후 그 추출액을 paper disc(지름 8 mm)에 흡즙시켜 말린 후 *R. solani* AG2-1과 *Trichoderma harzianum*과 3cm 거리에서 대치 배양하여 균사체의 생장을 조사하였다. 또한 유기물과 모래를 1:1 비율로 한 토양에 PDA에서 25℃로 10일간 배양한 *R. solani* AG2-1 균사체를 토양에 섞어 접종하고(이병율 70%로 조정) 건조한 천연물 가루를 토양에 골고루 섞어주었다. 이들 처리 3일 후에 무(*Raphanus sativus* cv. Daeseung) 종자를 5반복으로 파종하고(11x9x4.5 cm 플라스틱 용기당 20립) 5일 후 모잘록병 발생율을 조사하였다. 또한 천연물만을 처리하였을 때 종자 발아율과 유묘의 생육을 조사하였다.

모잘록병 방제에 가장 효과적인 천연물이 목단피로 조사되어 이에 대한 추가적인 시험을 수행하였다. 목단피의 처리농도별 *R. solani* AG2-1에 의한 무 모잘록병이 방제는 위에서 열거한 방법대로 수행하였다. 목단피의 항균작용의 mechanism을 조사하기 위해 주사전자현미경(SEM)으로 *R. solani* AG2-1의 균사체를 관찰하였다. SEM을 위한 시료 조제 방법은 위에서 언급한 전자현미경 시료제조 과정과 동일한 표준 방법에 준하였고 ethanol에 의한 수분 제거 후 critical point drying과 sputter

coater로 gold coating 한 후에 전자현미경(JSM-5410LV, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

목단피는 높은 농도에서 무 모잘록병 방제효과가 높았지만 그와 같은 농도에서는 식물의 생장을 억제하는 약해를 유발하였으므로 처리 농도를 낮추고 효과를 유지할 수 있는 방법으로 길항미생물 *T. harzianum*과 동시처리에 의한 방제효과의 협력적 상승을 기대하게 되었다. 그 이유는 in vitro 항균력 test에서 목단피는 *R. solani* AG2-1에 강한 항균력을 지닌 반면 *T. harzianum*에 대해서는 항균력이 거의 없었기 때문이다. *T. harzianum*의 접종원은 톱밥배지(소나무톱밥 4, 쌀겨 1, 수분 3)를 멸균한 후 PDA에서 25°C에서 10일간 배양한 곰팡이 균사를 접종하여 배양하였으며 이를 토양과 혼합 처리 하여 접종하였고 또한 건조한 천연물 가루를 토양과 혼합처리한 후 위의 실험과 마찬가지로 무 종자를 파종하고 5일 후 모잘록병 발생율과 식물의 생장을 조사하였다.

## 제 2 절 연구수행 내용 및 결과

### 1. 우수 식균선충과 길항곰팡이 *Trichoderma* 균주 조합의 생물학적 방제효과 조사

#### 가. 식균선충인 *Aphelenchus* 선충 분리 및 배양

2001-2002년도 각종 토양으로부터 식균선충인 *Aphelenchus avenae* 6 분리주를 확보하였고 이들을 곰팡이 배지(*Fusarium* sp.)에서 증식하였다. 분리한 식균선충은 모두 구침이 약하고, median bulb가 체폭의 3/4 이상으로 뚜렷하며, 꼬리끝이 둥근모양의 특징을 보여 *A. avenae*로 동정되었다.

#### 나. 식균선충인 *Aphelenchus* 선충의 병원균 및 길항미생물의 식이선호성

증식한 식균선충은 병원균인 *Pythium* spp.와 길항곰팡이인 *Trichoderma* spp. 및 *Gliocladium virens*에 접종하여 곰팡이 균사 피해 및 선충의 증식률을 조사하였다(표 1). 식균선충에 의해 *G. virens*와 *T. koningii*는 피해가 적었으며 그 외 길항곰팡이 및 병원세균인 *Pythium* spp.는 모두 선충에 의한 식이 피해가 컸다. 식균선충의 isolate에 따른 곰팡이의 피해정도에는 큰 차이가 없었다.

병원곰팡이와 길항곰팡이 균주에서의 식균선충의 증식율을 보면 그림 1과 같다. 식균선충 중 isolate 1, 2, 5가 길항곰팡이에서 증식이 양호하였으며 특히 *T.*

*harzianum*에서 증식률이 높았다. 병원균인 *Pythium* spp.에서는 isolate 3을 제외하고는 증식이 되었으며 식균선충 균주와 곰팡이 종류에 따라 차이를 나타내었다.

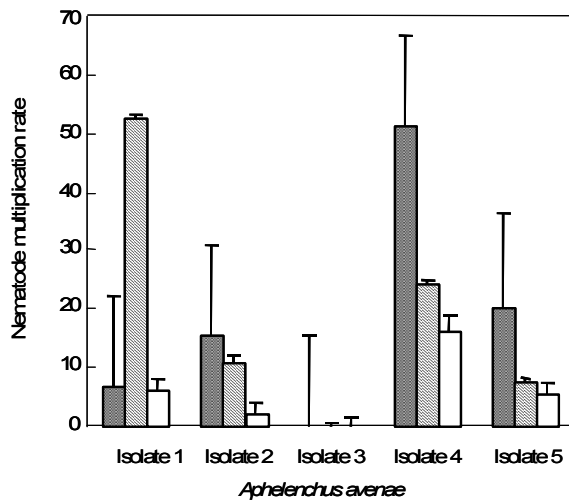
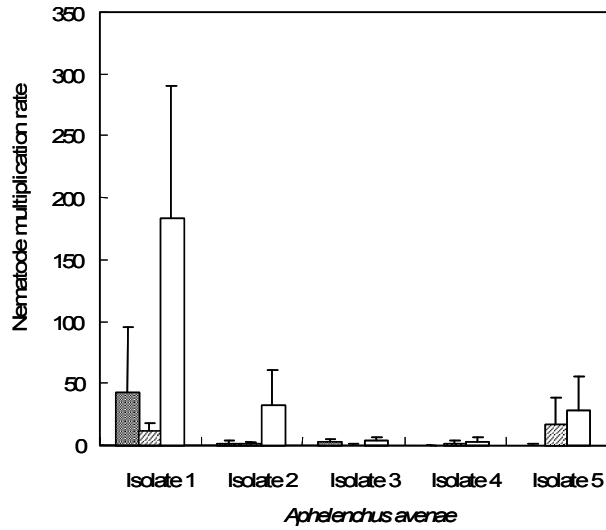
이상의 결과로 볼 때 식균선충은 *T. koningii*와 *G. virens*에 영향을 덜 주는 것으로 생각된다. 국내외적으로 생물적 방제제로 많이 사용되는 *T. harzianum*(Elad et al., 1982; Moon et al., 1995)은 선충에 의한 피해도 컸으며 선충의 증식률도 높았다. 따라서 Bae and Knudsen(2001)이 식균선충 *Aphelenchoides*의 관계에서 보고한 것처럼 *T. harzianum*은 식균선충을 동시에 처리함으로써 생물적 방제효과가 감소할 것으로 사료된다.

길항곰팡이의 무 모잘록병균(*Pythium* spp.)에 항균작용을 aluminium ring test에 의해 조사한 결과 (표 2), *T. harzianum*과 *G. virens*는 *Pythium*에 대해 강한 항균 활성이 나타났으나 *T. koningii*는 상대적으로 항균활성이 약하였다. Howell(2003)이 언급한대로 *Trichoderma* 종의 생물학적 방제 mechanism은 항생작용의 세기에 의존하여 높아지므로 이러한 점에서 *Pythium* 모잘록병의 방제효과는 *T. harzianum*과 *G. virens*가 *T. koningii*보다 높을 것으로 예상된다. 그러면 식균선충과 길항미생물 조합에서 가장 큰 방제효과를 기대하는 길항곰팡이 종은 식균선충에 영향을 덜 받고 항균작용이 강한 *G. virens*라는 결론에 도달할 수 있다.

표 1. 식균선충의 곰팡이 균사 가해 정도

<i>Aphelenchus</i> <i>avenae</i> isolate	길항미생물						<i>Pythium</i> spp.		
	9602	Taur	Thaz	Tham	Tpsen	Tkon	<i>spinosum</i>	<i>aphanidermatium</i>	<i>ultimum</i>
Isolate 1	±	+++	+++	+++	++	±	+++	++	+++
Isolate 2	±	+++	+++	+++	+++	±	+++	+++	+++
Isolate 3	±	+++	++	++	+++	±	++	++	+++
Isolate 4	±	++	++	++	+	+	+++	+++	+++
Isolate 5	±	++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++

+++ : Mycelium damaged completely, ++ : more than 50%, + : less than 50%, ± : little damaged (9602: *Gliocladium virens*, Taur: *Trichoderma aureoviride*, Thaz: *T. harzianum*, Tham: *T. hamatum*, Tpsen: *T. pseudokoningii*, Tkon: *T. koningii*).



위 (■: *Gliocladium virens*, ▨: *Trichoderma koningii*, □: *T. harzianum*)  
아래(■: *Pythium spinosum*, ▨: *P. aphanidermatum*, □: *P. ultimum*)  
그림 1. 식균선충의 각 곰팡이(위: 길항미생물; 아래 병원균) isolate별 밀도 증식



표 2. 길항곰팡이의 무 모잘록병균에 대한 항균작용 (균사생장 억제)

Pathogen	Antagonistic fungi	Growth of <i>Pythium</i>
<i>Pythium ultimum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	- -
	<i>T. koningii</i>	-
	<i>Gliocladium virens</i>	- -
	control	++
<i>P. aphanidermatium</i>	<i>T. harzianum</i>	- -
	<i>T. koningii</i>	-
	<i>G. virens</i>	- -
	control	++

\* --: very poor, -: poor, ++: very good mycelial growth.

#### 다. 식균선충과 길항균의 동시 사용에 따른 토양병 방제

위의 in vitro 실험 결과를 바탕으로 실제 방제효과를 선충의 두 isolate와 길항곰팡이를 사용하여 방제효과를 조사하였다 (표 3-4). 그 결과 *T. harzianum*과 식균선충을 동시 처리한 곳에서 단독처리보다 우수한 방제효과를 나타내었으나, 다른 조합(식균선충-*T. koningii* 및 식균선충-*G. virens*)에서는 방제효과가 단독 처리보다 커지 않거나 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 in vitro 실험에서 나타난 결과와 부합되지 않는다. 어느 경우도 길항곰팡이를 주 생물제제로 하였을 때는 in vitro 실험결과로는 설명되지 않는다. 그러나 식균선충을 주 생물제제로 설정한다면 설명이 가능한데 그것은 식균선충이 *T. harzianum*에서 가장 생육이 왕성하였으며 또한 이 길항곰팡이의 항균력이 가장 강하였기 때문이다. 이에 따라 *T. koningii*는 *Pythium*에 대한 항균활성은 약하고 오히려 식균선충은 잘 자라지 못하게 하므로 복합 처리하였을 때 오히려 방제효과의 저하가 초래되었다고 생각된다. 지금까지 생물학적 방제제로 *Trichoderma*가 주요인자요 다른 생물적 인자는 이의 협력인자 또는 저해요인으로 여기던 기존의 방제 개념(Bin et al., 1991; Dandurand and Knudsen, 1993; Hubbard et al., 1983)은 잘 들어맞지 않으며 오히려 식균선충이 주요 방제인자이며 *Trichoderma*는 협력인자로서 작용하고 있음을 보여준다. 따라서 식균선충의

배양시 *T. harzianum*에서 선충을 증식시켜 사용한다면 두 가지 생물제제를 동시 처리하는 효과를 향상 가질 수 있을 것이다.

표 3. 식균선충과 길항곰팡이를 동시 처리하였을 때 무 *Pythium ultimum* 방제효과

Treatment		Control effect (%)	
<i>Aphelenchus</i>	Antagonistic fungi	Exp. 1	Exp. 2
Isolate 1	<i>Trichoderma koningii</i>	39	49
	<i>T. harzianum</i>	50	75
	<i>Gliocladium virens</i>	19	30
	nematode only-	45	43
Isolate 2	<i>T. koningii</i>	34	19
	<i>T. harzianum</i>	58	81
	<i>G. virens</i>	40	38
	nematode only	44	34
No nematode	<i>T. koningii</i>	21	25
	<i>T. harzianum</i>	30	67
	<i>G. virens</i>	32	30
Control	no nematode, no fungus	0	0

Exp. 1: 5 nematodes / ml of soil, 5g of *Trichoderma* / L of soil

Exp. 2: 5 nematodes / ml of soil, 1g of *Trichoderma* / L of soil

표 4. 식균선충과 길항곰팡이를 동시 처리하였을 때 무 모잘록병 방제효과 (*Pythium aphanidermatum*)

Treatment		Control effect (%)	
<i>Aphelenchus</i>	Antagonistic fungi	Exp. 1	Exp. 2
Isolate 1	<i>Trichoderma koningii</i>	25	41
	<i>T. harzianum</i>	72	60
	<i>Gliocladium virens</i>	47	50
	nematode only-	57	42
Isolate 2	<i>T. koningii</i>	6	50
	<i>T. harzianum</i>	43	65
	<i>G. virens</i>	55	67
	nematode only	34	55
No nematode	<i>T. koningii</i>	25	72
	<i>T. harzianum</i>	32	55
	<i>G. virens</i>	28	55
Control	no nematode, no fungus	0	0

Exp. 1: 5 nematodes / ml of soil, 5g of *Trichoderma* / L of soil

Exp. 2: 5 nematodes / ml of soil, 1g of *Trichoderma* / L of soil

## 2. 길항세균 혼합 처리에 의한 병방제 효과 조사

### 가. 분리 세균의 항균성 screening 및 G181첨가 생물제제의 병방제 효과

통상적인 dilution pour plate 방법에 의해 각종 토양이나 엽면으로부터 세균을 분리하였다. 분리한 세균은 액체 배지에 배양한 후 paper disc(지름 8 mm)에 세균 현탁액을 흡즙시킨 후 곰팡이를 접종한 agar plate에 올려놓은 다음 3일 후 저지원(inhibition zone)의 크기를 조사하였다 (그림 2). 곰팡이 병원균인 *Bipolaris cactivora*와 *Fusarium oxysporum*에 대한 항균력 test를 수행한 결과 두 병원균 모두에서 큰 저지원(inhibition zone)을 형성한 균주는 G181 균주였다 (표 5). 59A와 41C도 큰 저지원을 형성하였으나 깨끗한 저지원을 형성하지 못하였고 GBR-1은 저지원의 크기는 작으나 매우 깨끗한 저지원을 형성하여 생산하는 항균물질의 양은 적

으나 강한 항균물질을 생산하는 것으로 생각되었다.



그림 2. G181(오른쪽), GBR-1(가운데), Control(오른쪽)의 PDA 배지에서 항균효과 조사. *Bipolaris cactivora* 균주 사용.

표 5. 분리한 균주의 항균성 조사

Isolates	<i>Bipolaris cactivora</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race1	비 고
G181	+++	+++	
G158	++	+++	
GBR-1	+	++	
G450	+	++	
G508	+	+	
NW1	+++	++	
3A	++	++	
6A-1	++	++	
15A	++	++	
63A	+	++	
59A	+++	+++	퍼져 자람
1B	++	+	
6K-1	++	+	
476	+++	++	
41C	+++	+++	퍼져 자람
E681	+	++	
N5-2	+	+	
N5-3	+	-	
N5-3'	-	-	
USII-3	-	-	
DN2	-	-	

저지원의 크기: +++: >1.5 cm radius, ++: 1-1.5 cm, +: 0.5-1 cm, -: <0.5 cm

1) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 의한 토마토시들음병 방제 효과

토마토 시들음병균의 현탁액에 토마토 유묘의 뿌리를 침지한 후 pot에 이식하였으며, 이식 후 곧바로 생물제제를 관주 처리하였다. 처리당 40 개체의 식물체를 사용하였다. 처리 15일 후부터 40일까지 시들음 증상의 발생을 조사하였다. 그 결과 *Aphelenchus avenae*와 이 선충을 키운 배지 (+*Trichoderma harzianum*)에서만 유의성 있는 방제 효과가 있었고(57%), 세균을 첨가하거나 단독으로 처리하였을 때는 대조구와 동일한 발병 증상을 나타내었다. 방제약제인 benomyl을 처리하여도 방제 효과가 없었다(표 6).

표 6. 미생물제와 약제에 의한 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 의한 토마토시들음병 방제 효과

Treatments	No. plants showing wilt symptoms(/40 plants)						control value(%)
	15 days	20 days	33 days	34 days	39 days	46 days	
Control	16	23	22	9	16	23	-
Benomyl (650 ppm)	22	27	26	6	22	25	-
<i>Aphelenchus</i> (A) + <i>Trichoderma</i> (T)	11	11	11	0	6	10	56.5
G181+ A+ T	10	17	20	5	6	23	-
G181	22	26	24	12	22	22	-

\* 시들음 증상을 보이는 식물체의 수가 증감하는 것은 온실 내 고온으로 인한 일시적인 시들음 증상을 계상하였기 때문임. Control value(%) = (무처리구 시들음 증상 식물체수 - 처리구 시들음 증상 식물체수)/무처리구 시들음 증상 식물체수 x 100

2) *Rhizoctonia*에 의한 모잘록병 방제

호밀과 모래를 1: 1로 섞은 배지에 *Rhizoctonia solani*를 15일간 배양하여 토양에 0.1% 혼화 처리하였다. *T. harzianum* 배지에서 증식시킨 *A. avenae*를 살균수에 추출하여 식물 개체당 2,000마리 비율로 접종하였다 (개체당 5ml씩 현탁액을 관주하였다). 세균의 경우(G181)는 세균현탁액( $10^8$  CFU/ml)도 위와 같이 관주하였다. 이와 같이 처리하여 접종 후 일주일까지 무 출아율 조사한 결과(표 7), 생물제제에 의해서는 전혀 방제효과가 없었으며 오히려 모잘록병이 심화되었다. 그러나 항균성물질을 포함하고 있는 천연물의 가루(0.1% w/v)를 토양에 혼화하였을 때 계피는 100%의 방제효과를 보였고, 천궁이 93%, 목단피가 79%의 방제효과를 보였다. 이 결과로 보아

생물제제 처리 시 항균성 천연물을 함께 처리하면 좋지 않는 토양 조건에서도 병방제 효과가 있을 것으로 생각되며 차후 이들 천연물을 이용한 첨가한 생물제제 개발이 연구되어야 할 것이다.

표 7. 미생물제와 각종 천연물에 의한 *Rhizoctonia solani* AG2-1에 의한 무 모잘록병 방제효과

Days Treatments	No. of sprouting plants(/45 plants)					Control value(%)
	2 days	3 days	4 days	6 days	7 days	
No pathogen	3	23	24	31	36	(100)
Control	2	10	14	14	22	-
G181	11	17	18	18	20	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	4	9	9	9	9	-
<i>Aphelenchus(A)+ T. harzianum(T)</i>	5	9	9	9	9	-
G181+ A. + T.	4	8	8	8	8	-
계피	2	18	22	24	36	100
정향	3	15	17	20	23	-
황련	6	14	21	23	32	71
대황	0	9	14	14	30	57
소회향	1	16	22	23	32	71
목단피	3	7	18	20	33	79
황백	2	10	17	17	32	71
천궁	7	20	22	23	35	93

\* 방제가(control value, %) = (no. sprouts in treatment - no. sprouts in control)/(no. sprouts in no pathogen - no. sprouts in control) x 100

#### 나. GBR-1의 인삼뿌리병 방제 효과 조사

항균력을 조사한 여러 가지 균주 중 GBR-1이 저지원의 크기는 작지만 분명하여 항균작용에 의한 병방제 효과의 가능성을 조사하였다. 이 균은 배양적, 생리적 특성 및 16S rDNA sequence analysis, fatty acid analysis 및 Biolog에 의해 *Paenibacillus polymyxa*로 동정되었다 (Jeon et al., 2003). 우선 GBR-1의 인삼뿌리

병 방제 효과를 조사하기 위하여 인삼 절편을 이용하여 조사하였다. 뿌리를 부패하는 *Erwinia carotovora*와 *Fusarium solani* 등에 대한 병방제 효과를 조사하기 위해 병원균과 길항미생물 GBR-1을 동시에 접종하였다. 3일 후 인삼 뿌리 절편의 부패 정도를 측정하였다 (표 8). 그 결과 GBR-1은 낮은 농도( $10^6$  CFU/ml)의 접종농도에서는 부패증상을 보이지 않았으나 높은 농도( $10^8$  CFU/ml)에서는 인삼 뿌리 절편에 부패 증상을 유발하였다. GBR-1은 낮은 접종 농도의 병원균을 접종하였을 때와 낮은 GBR-1을 처리하였을 때 방제효과가 나타났으나 둘 다 높은 접종 농도에서는 인삼의 부패가 오히려 심화되었다.

이러한 결과는 지금까지 생물학적 방제에 있어서 길항미생물의 농도가 높을수록 방제효과가 높아진다는 일반적인 상식과는 반대되는 결과이다. 적어도 *P. polymyxa*를 이용한 생물학적 방제에 있어서는 적절한 수준의 밀도가 높은 방제효과를 낼 수 있음을 보여주고 있다. 이는 지금까지의 생각과는 달리 낮은 농도의 생물제제라도 충분한 방제효과를 나타낼 수 있고 이에 따라 생물제제 개발의 큰 한계인 제제의 양과 관계되는 경제적인 문제점이 다소 경감될 수 있을 것으로 사료된다.

표 8. *Paenibacillus polymyxa* GBR-1과 병원미생물의 동시 처리에 의한 인삼절편의 부패 증상의 발생

Microorganisms	Inoculum concentration (CFU/ml)	Inoculum concentrations of GBR-1 (CFU/ml)		
		0	$10^5$	$10^8$
Control		-	-	++
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> SR-1	$10^5$	+++	+	+++
	$10^8$	+++	+++	+++
<i>Bacillus subtilis</i> 168	$10^5$	-	-	++
	$10^8$	-	-	±
<i>Fusarium solani</i> 1015	$10^5$	++	-	++
	$10^8$	++	++	++
<i>Pseudomonas putida</i> JB-1	$10^5$	++	-	++
	$10^8$	++	++	++

Disease severity was counted 3 days after inoculation as +++: early rot (rotted 2 days after inoculation), ++: brown rot, +: mild brown rot, ±: yellowish discoloration, and -: no discoloration.

*Paenibacillus polymyxa*가 낮은 농도에서 방제효과를 나타낼 수 있었던 작용 기작을 조사하기 위하여 이 세균을 인삼 절편에 접종하였다. 그 결과 그림 3에서 보는 바와 같이 고농도에서는 인삼 절편이 부패되었으나 저농도에서는 부패되지 않았다. 저농도에서 부패가 일어나지 않은 이유는 그림 4에서 보는 바와 같이 접종 부위에 경계층이 형성되어 세균의 세균에 의한 독소의 침투를 차단하였기 때문이라 생각된다. 이러한 경계층은 고농도 접종시에는 형성되지 않았다. 따라서 이러한 경계층은 다른 병원미생물의 침입의 차단에 관여하여 낮은 농도에서 병발생을 억제하였을 것으로 사료된다. *P. polymyxa*는 항균작용이 알려져 있으며 PGPR로 저항성을 유도하는 생물학적 방제인자로 알려져 있으므로(Kharbanda et al., 1999; Kim, 1995; Mavingui and Heulin, 1994; Seldin et al., 1999; Timmusk and Wagner, 1999) 이러한 경계층의 형성은 아마도 저항성 반응의 일종이 아닌가 생각된다.

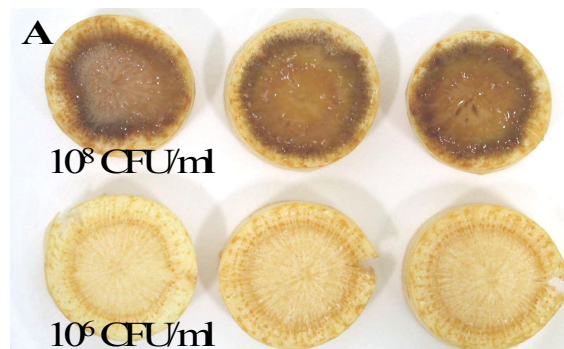


그림 3. *Paenibacillus polymyxa* GBR-1을 인삼 절편에 접종하였을 때 3일 후 나타난 부패 증상



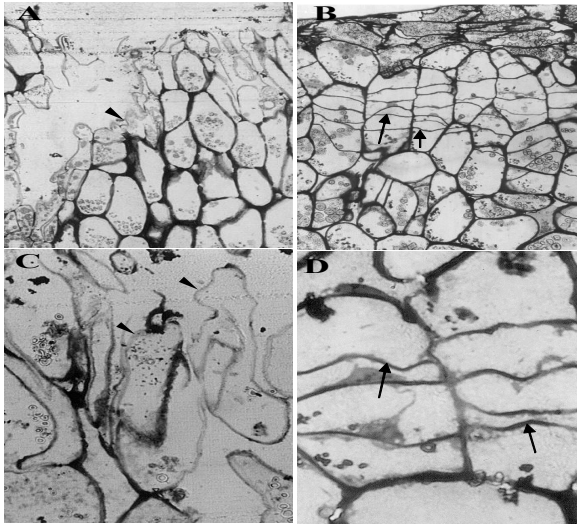


그림 4. *Paenibacillus polymyxa*를 고농도( $10^8$  CFU/ml)(A, C)로 접종하였을 때와 저농도( $10^6$  CFU/ml)(B, D)로 접종하였을 때 4년근 인삼 절편조직의 반응. A, C: 세포들이 와해되어 있음(arrowhead). B, D. 경계층(boundary layer)(arrow)이 접종부위를 둘러쌌. A, B: x400. B, D: x1000.

또한 접종 후 *P. polymyxa*의 밀도를 인삼 절편에서 조사하였더니 그림 5와 같이 높은 농도에서는 밀도가 증가하여 3일후부터 평형을 이루었으나 낮은 농도에서는 2일까지 다소 증가하나 그 이후는 밀도가 낮아지는 경향을 보였다. 이로 미루어보아 경계층의 형성은 *P. polymyxa*의 밀도 증가에도 저해요인으로 작용한다고 생각된다.

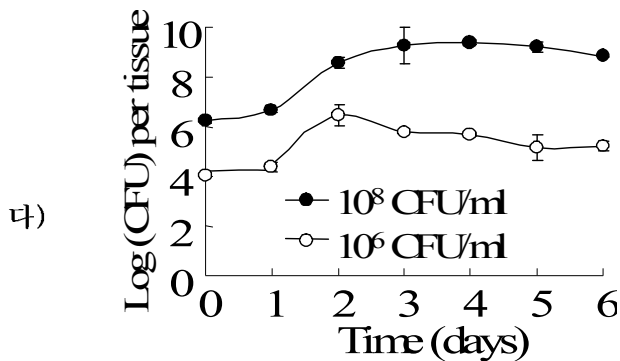


그림 5. *Paenibacillus polymyxa* GBR-1을 인삼 절편에 접종하였을 때 접종 농도에 따른 세균의 밀도 변화

#### 다. GBR-1의 뿌리혹선충 방제 효과

살균하지 않은 토양에 토마토 묘를 심고 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)을 접종하고 접종 2일 후 저항성 유도물질과 GBR-1의 chloroform extract를 처리하였을 때 모든 처리구에서 뿌리혹선충 방제효과가 있었지만 GBR-1의 방제효과가 가장 높았다 (표 9). GBR-1의 농도는 배양액 2% 수준이었다. 토마토 뿌리의 생체중은 GBR-1 처리구에서 가장 낮았는데 이는 뿌리혹이 가장 적게 형성되었기 때문이며, 지상부 묘(shoot)의 생체중은 가장 컸다. 이 결과로 볼 때 GBR-1의 추출물은 저항성 유도물질인 BABA(dl-β- amino-n-butyric acid)나 BTH(benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester)보다 더 큰 뿌리혹선충 방제효과를 지니고 있음을 시사한다.

Table 9. Effect of chemicals and *Paenibacillus polymyxa* GBR-1 on the control of root-knot nematode on tomato

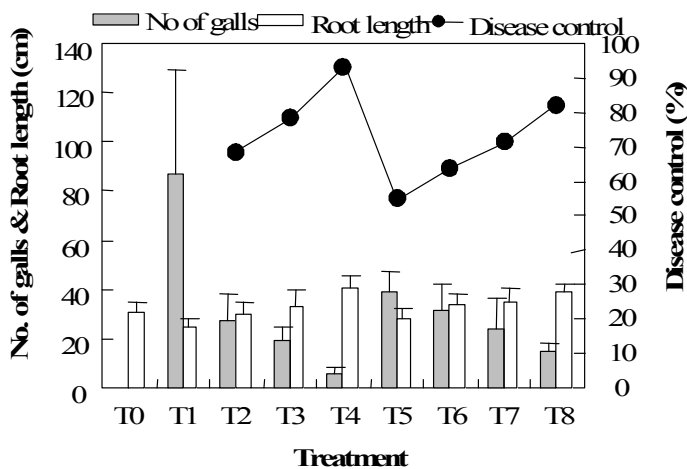
Treatment <sup>a</sup>	No. of galls	STDEV	%disease control
Control	112.2 a	41.7	-
20 mM BABA	36.6 b	15.8	67.4
40 mM BABA	17.6 bc	7.6	84.3
20 mM BTH	42.6 b	11.6	62.0
40 mM BTH	37.8 b	11.1	66.3
GBR-1	9.2 c	2.9	91.8

<sup>a</sup> 2% chloroform extract of GBR-1 culture

아래 그림 6에서 보는 바와 같이 배양액의 chloroform 추출물 및 세균만을 농축하여 현탁액을 처리한 결과는 농도 의존적으로 효과가 상승하는 것으로 나타났다. 추출물 8%에서는 95% 정도의 방제 효과를 나타내어 가장 높았다. 세균 현탁액의 경우 추출물보다는 상대적으로 방제효과가 낮았다. 이는 세균 배양액 자체를 사용하지 않고 배양액을 제거한 후 세균만을 처리하였기 때문에 배양액에 존재하는 선충 억제 물질이 희석되어 초기 선충의 감염을 효과적으로 억제하지 못하였기 때문으로 생각된다. 그러나 추출액 1%에서는 70% 방제효과, 세균현탁액 1%에서는 50% 이상의

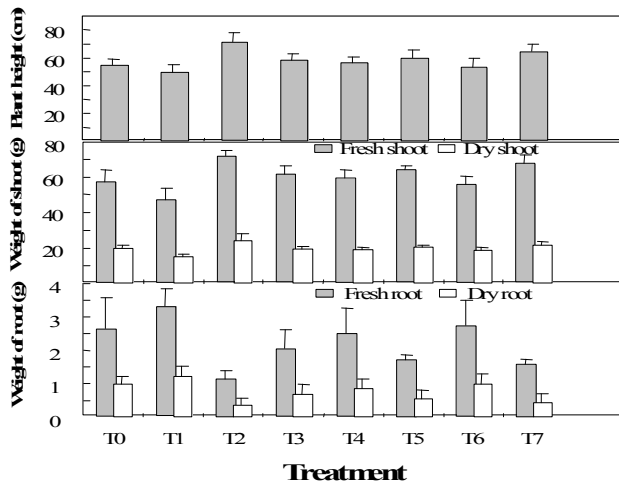
방제효과가 있어서 낮은 농도에서도 충분한 효과가 나타났기 때문에 생물학적 방제제로서의 가치가 있다. 더욱이 사용한 토양이 살균토양이 아니고 자연 상태 그대로의 토양을 사용하였기 때문에 적어도 온실재배에서 적용 가능성이 높다고 생각된다. 또한 세균 배양액을 그대로 사용하면 선충억제물질과 세균을 동시에 처리하는 효과가 있으므로 방제효과의 상승을 가져올 수 있으며, 낮은 농도에서도 방제효과가 높아질 것으로 예상된다. 단지 배양액의 영양분이나 염분 등에 의해 식물의 약해 가능성을 배제할 수 없으므로 면밀한 실험을 거쳐 이 세균을 이용한 뿌리혹선충의 생물학적 방제 실용화를 검토하여야 할 것이다.

처리별 토마토의 생육을 보면 그림 7과 같다. 즉 세균배양액의 chloroform 추출액 1%와 세균현탁액 4%에서 지상부의 묘 생육이 가장 양호하였다. 이는 높은 배양액 추출물을 처리할 경우 뿌리혹선충 방제 효과는 제고될 수 있으나 식물의 생육에는 오히려 좋지 못한 영향을 줄 가능성이 있음을 시사한다.



**T0**, Healthy plant; **T1**, Control (inoculated with *M. incognita*); **T2**, 1% Chloroform layer of GBR-1; **T3**, 2% Chloroform layer of GBR-1; **T4**, 4% Chloroform layer of GBR-1; **T5**, 1% suspension of GBR-1; **T6**, 2% suspension of GBR-1; **T7**, 4% suspension of GBR-1; **T8**, 8% suspension of GBR-1

그림 6. *Paenibacillus polymyxa* GBR-1의 chloroform 추출물 및 세균현탁액의 농도별 뿌리혹선충 방제효과



**T0**, Healthy plant; **T1**, Control (inoculated with *M. incognita*); **T2**, 1% Chloroform layer of GBR-1; **T3**, 2% Chloroform layer of GBR-1; **T4**, 4% Chloroform layer of GBR-1; **T5**, 1% suspension of GBR-1; **T6**, 2% suspension of GBR-1; **T7**, 4% suspension of GBR-1

그림 7. *Paenibacillus polymyxa* GBR-1의 chloroform 추출물 및 세균현탁액의 농도 별 처리에 의한 식물생육에 영향

각종 배지에서 GBR-1의 밀도 변화와 배양액 추출물의 선충방제효과를 조사하였다. 각각의 배지에서 밀도변화를 조사한 결과 BHI, M523+malt extract, M523+Oat meal 배지에서 다른 배지보다 밀도 증가가 컸다 (그림 8). 그러나 뿌리혹선충 방제 실험에서 GBR-1의 배양 추출액(chloroform 층)은 배지와 관계없이 모두 효과가 있었으며, 그 중 *Pseudomonas minimal media*와 BHI 배지에서 배양 후 chloroform 추출하여 처리한 실험구가 다른 실험구에 비해 높은 방제 효과를 보였다 (그림 9).

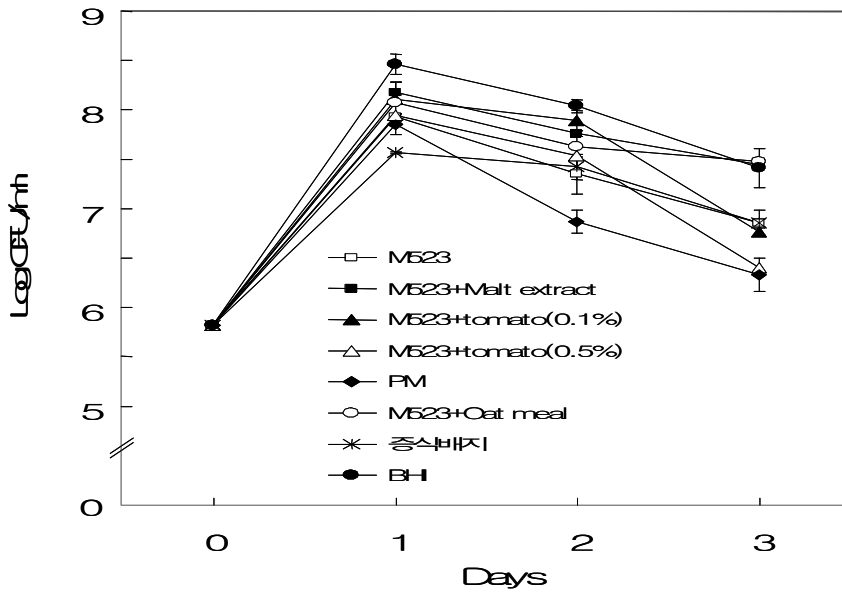
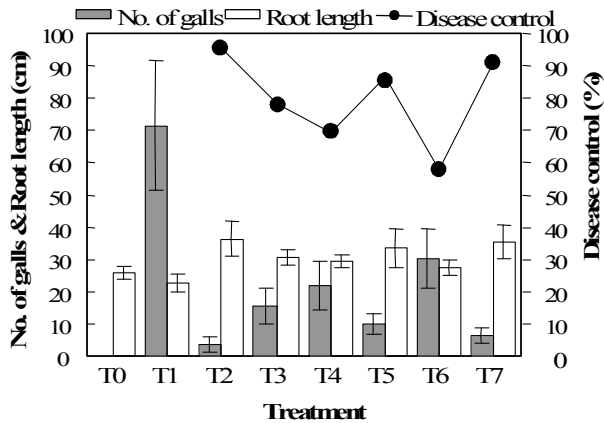


그림 8. 배지별 GBR-1의 밀도변화.



**T0**, Healthy plants; **T1**, Control (inoculated with *M. incognita*); **T2**, *Pseudomonas minimal media*; **T3**, M523+Oatmeal (1.5%); **T4**, M523+Malt extract (0.5%); **T5**, M523+Tomato leaf (0.1%); **T6**, Nutrient media for multiplication; **T7**, Brain Heart Infusion media.

그림 9. 배지종류별 GBR-1 배양액 chloroform 추출물의 뿌리혹선충 방제 효과

### 라. 고추역병균 방제에 선충과 길항미생물 이용

각종 토양으로부터 역병균에 항균력이 있는 균주를 선발하였고, 이들 중 역병에 항균력이 강한 균주를 선발하였다. 선발 방법은 가운데 역병균 혹은 시들음병균을 치상하고 주위에 선발한 균주를  $10^8$  cells/ml 농도로 조절한 후 100 $\mu$ l spotting 하였다. 5일 후 clear zone의 지름을 측정하였다.

그 결과 GBR-447 등 여러 균주가 역병균에 대한 항균활성이 높았다. 특히 GBR-447은 *Fusarium*보다는 역병균에 특이적으로 높은 항균활성을 보였다 (그림 10). GBR 447 균주의 세균현탁액을 농도별로 처리하고 역병균의 생장을 조사한 결과 고농도( $10^7$ ,  $10^8$  cells/ml) 처리에서는 역병균의 포자낭이 형성되지 않았으며 저농도( $10^{3-6}$  cells/ml)에서는 포자낭의 변형을 보이고, 유주자낭 안에 유주자가 형성되지 않았다 (그림 11). 이 결과로 볼 때 GBR-447은 균사생장을 저지하고 유주자낭의 형성을 저해하므로 병원균의 침입을 차단하고 또한 낮은 농도에서도 유주자의 형성을 저해하므로 병의 지속적인 발생을 억제할 가능성이 있다.

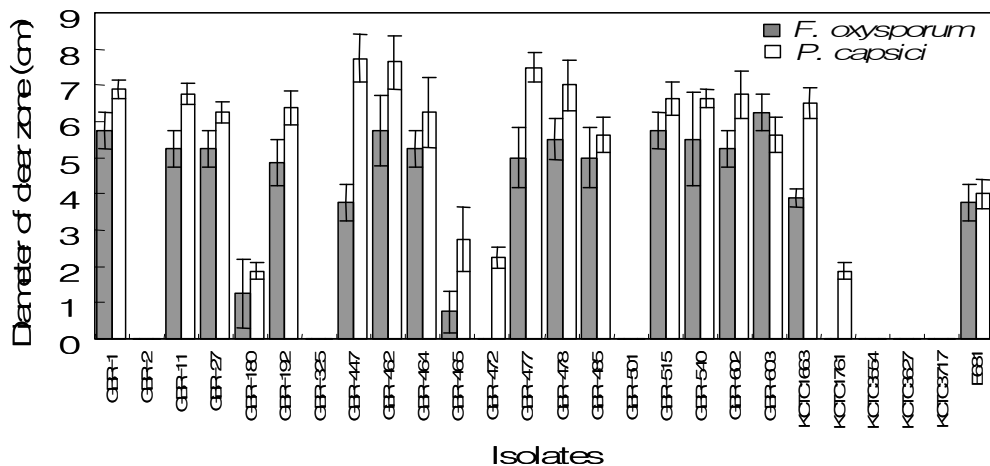


그림 10. 역병균과 시들음병균에 대한 분리한 세균 isolates의 항균력 비교. 3반복 평균 및 표준편차

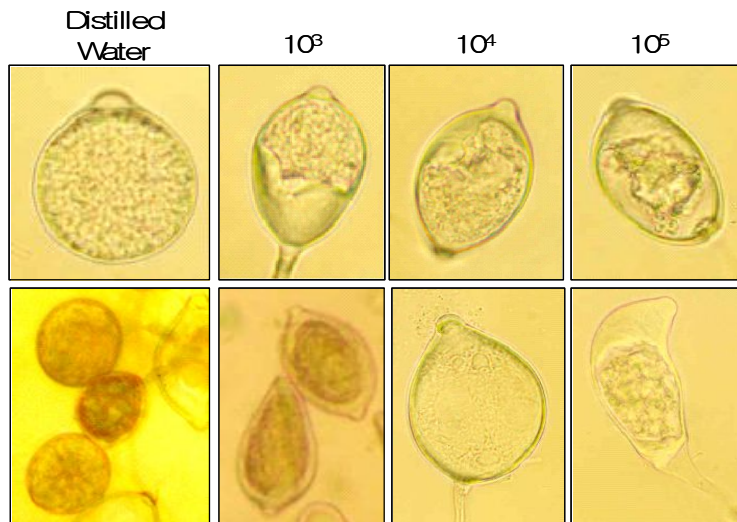


그림 11. *Paenibacillus polymyxa* GBR-447 처리에 의해 역병 유주자낭이 변형되고 유주자낭 속에는 유주자 형성이 저해된 모습.  $10^7$ - $10^8$  cells/ml 처리에서는 유주자낭이 형성되지 않았음.

GBR-447 균주의 동정을 fatty acid analysis, Biolog program, 그리고 16S rDNA sequencing 수행 결과 GBR-1과 마찬가지로 *Paenibacillus polymyxa*로 동정되었다 (Table 10, 11) (16S rDNA sequence 결과 data 생략).

표 10. fatty acid analysis에 의한 GBR 447 균주의 동정

Retention Time	Area	% Area	Named Area	% Named	Total Amt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref	ECL Shift
1.603	424449594	0.025		7.014	SOLVENT PEAK		< min rt		
1.870	2	0.000		7.547			< min rt		
2.492	802	0.022		8.785			< min rt		
6.716	2063	0.035	0.986	13.619	14:0 ISO	1.57	ECL deviates 0.000	Reference	0.012
7.236	2174	0.034	0.976	13.999	14:0		ECL deviates -0.001	Reference	0.010
8.195	6750	0.039	0.962	14.623	15:0 ISO	5.34	ECL deviates 0.000	Reference	0.010
8.335	67463	0.038	0.960	14.714	15:0 ANTEISO	53.29	ECL deviates 0.001	Reference	0.012
8.775	1018	0.038	0.955	15.000	15:0	0.80	ECL deviates -0.000	Reference	0.010
9.421	456	0.044	0.949	15.388	16:1 w7c alcohol	0.36	ECL deviates 0.001		
9.817	13370	0.040	0.945	15.627	16:0 ISO	10.40	ECL deviates -0.000	Reference	0.009
10.035	1862	0.039	0.944	15.759	16:1 w11c	1.45	ECL deviates 0.002		
10.436	13709	0.040	0.941	15.999	16:0	10.62	ECL deviates -0.001	Reference	0.008
11.525	3418	0.043	0.935	16.631	17:0 ISO	2.63	ECL deviates 0.001	Reference	0.009
11.684	10449	0.044	0.935	16.723	17:0 ANTEISO	8.04	ECL deviates -0.000	Reference	0.008
11.919	643	0.043	0.934	16.859	17:1 w6c	0.49	ECL deviates -0.001		
12.576	890	0.042	0.932	17.235	16:0 2OH	0.68	ECL deviates 0.002		
13.616	1358	0.072	0.930	17.827	18:1 w7c	1.04	ECL deviates 0.004		
13.921	1887	0.046	0.929	18.000	18:0	1.44	ECL deviates 0.000	Reference	0.008

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref	ECL Shift
424449594	127508	127508	100.00	121533	10	0.001		0.010

TSBA40 [Rev 4.10]	Species	ECL Deviation	Ref	ECL Shift
	Paenibacillus		0.644	(Bacillus)
	P. polymyxa*		0.644	(Bacillus)
	Kocuria		0.353	(Micrococcus)
	K. varians*		0.353	(Micrococcus)
	Cellulomonas		0.345	(Oerskovia turbata)
	C. turbata*		0.345	(Oerskovia turbata)
	C. cartae*		0.310	
	C. fimi*		0.245	

표 11. Biolog program에 의한 GBR-447 균주의 동정

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	-15	<999><999><982>		11	15	48	0	10	-6	44	
B	<868>	-3	<933><873><787>		10	<871>	15	100	{174}<953>	-13		
C	<999><926><997><904><894><807>				9	<971><617><655>	127+	100+				
D	<936>	3	<807><238><999>		-2	<443><918>	-2	50	<999><947>			
E	10	<919><627>	1	<965>	10	-1	12	-1	-0	-5	9	
F	4	-2	2	-3	76	18	80	6	61	-1	-1	7
G	-3	-1	0	-1	-2	9	-4	0	-1	-2	19	<610>
H	{229}	115	{230}<354><548>		4	-2	0	11	-2	3	-1	

=> Species ID : PAENIBACILLUS POLYMYXA <=

ML4.0 SPECIES	PROB	SIM	DIST
=>1 ) PAENIBACILLUS POLYMYXA	100	0.823	2.65
2 ) PAENIBACILLUS PABULI	0	0.000	10.34
3 ) PAENIBACILLUS MACERANS	0	0.000	12.88
4 ) BACILLUS CIRCULANS	0	0.000	16.30

서울대 농생대 역병 이병 실험포장에서 5주 자란 고추(품종: 부강)를 *Aphelenchus avenae* 선충과 세균을 각각 처리하고, 정식하였다. 처리구는 식균선충을 단독처리하고 병원균을 처리한 실험구(N), 길항세균(GBR-447)을 단독처리하고



병원균을 처리한 실험구(B), 식균선충과 세균을 복합 처리하고 병원균을 처리한 실험구(NB), 대조구로 병원균만 접종한 실험구(C)로 설정하였다. 역병균 접종 후 3번의 병 발생 조사를 수행한 결과, 식균선충 단독처리, 길항미생물 단독처리, 선충과 미생물 복합 처리했을 때 대조구에 비해서 상대적으로 높은 방제율을 보였다. 그러나 시간이 지남에 따라 역병에 의한 병발생이 점차 늘어났으며, 2003년 8월 11일에 수행한 병 조사에서 대조구보다는 높은 방제율을 보였으나 모두 30% 미만의 낮은 방제효과를 보여주었다. 이러한 결과는 생물학적 방제에 있어서 흔히 나타나는 결과로 *in vitro* 상에서 높은 항균력을 보였고 현미경 하에서도 역병균의 포자낭의 형성과 유주자생성능이 현저히 억제되었음에도 불구하고 포장실험에서 방제효과가 낮은 이유는 계속된 강우로 인하여 세균과 식균선충의 정착이나 활력을 저해하고 병원균의 발병환경에는 매우 적합하게 되어 병방제 효과가 낮아진 것으로 생각된다 (Lee et al., 1990a; Upadhyay and Rai, 1988). 이러한 조건은 생물학적 방제에 있어서 상황에 따라 항상 예측하여야 할 사항이며 이를 극복하기 위해서는 속효성의 방제 인자를 첨가하든지 또는 포장 조건을 개선하여 환경의 영향에 덜 민감하게 하는 사전작업이 있어야 할 것으로 생각된다.

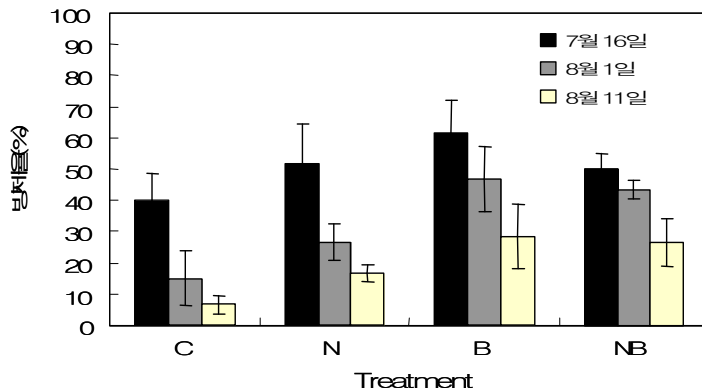


그림 12. 고추역병에 대한 방제효과. C: Control, N: Nematode(*Aphelenchus avenae*), B: Bacteria(GBR-447), NB: Nematode+Bacteria. 날짜는 조사 시기(1차: 2003년 7월 16일, 2차: 8월1일, 3차: 8월11일).

마. JB-1의 TMV 방제효과 조사

JB-1은 각종 토양 병원균에 대한 항균활성은 높지 않았으나 이례적으로 바이러스 감염을 차단하는 효과가 있어서 항바이러스용 생물적 방제제로의 효용성을 조사하기 위해서 일련의 실험을 수행하였다. 그림 13은 토양과 식물체에서 분리한 세균 배양액의 TMV 감염차단효과를 조사한 것이다. JB-1은 90% 이상의 방제가를 나타내었다. 또한 직접적인 바이러스 감염차단 효과가 100%에 가까운데 비해 잎 뒷면에 처리하였을 때에도 침투효과를 나타내어 약 50% 방제효과를 보였다 (그림 14).

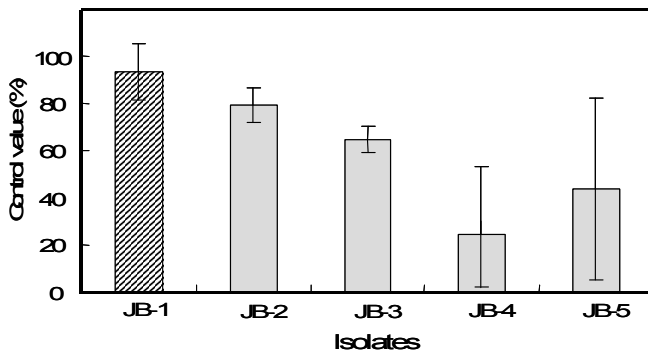


그림 13. 세균배양액의 담배모자이크바이러스(TMV) 방제효과. 3 반복 평균치와 표준편차.

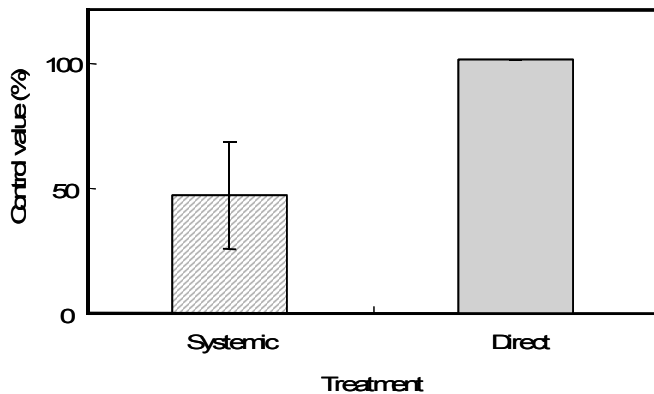


그림 14. JB-1 세균 배양액의 직접 및 간접적(침투성) TMV 감염 차단 효과. 직접적인 감염 차단 효과는 반염접종법에 의해 조사하였고, 침투성 효과는 잎의 뒷면에 처리한 후 잎의 앞면에 바이러스를 접종하였다. 3반복 평균 및 표준편차.

JB-1의 배양현탁액을 토양에 50 ml씩 담배 유묘(Xanthi-nc)에 관주하고 일정 시간 후에 담배 잎에 TMV를 접종하여 local lesion의 수를 관찰하여 전신저항성 유도에 의한 병방제 효과를 관찰하였다 (그림 15). 그 결과 접종 1일전 처리한 경우에 방제 효과가 가장 높게 나타나 60%를 상회하는 방제효과를 보였다.

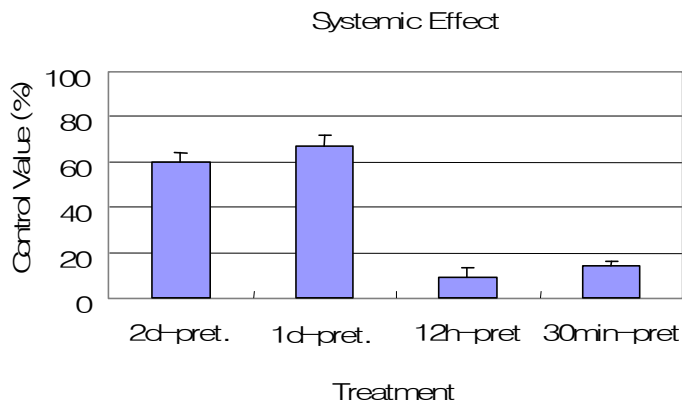


그림 15. JB-1 배양액의 토양관주 처리에 의한 *Tobacco mosaic virus* 감염 차단 효과 조사. 무처리 대조구 대비 바이러스의 국부반점의 수에 의한 비교, 3반복 평균 및 표준편차.

그림 16은 배양기간별 JB-1의 밀도 변화와 TMV 방제효과를 나타낸 것이다. 배양기간이 길어질수록 밀도가 다소 감소하였지만 TMV 방제효과는 배양기간이 길어질수록 높아지는 경향이였다. 이는 2일 후부터는 세균의 군집이 퇴화하여 밀도저하가 일어나지만 TMV 감염을 차단하는 물질은 축적된다는 것을 의미한다. 이 물질은 그림 17에서 보는 바와 같이 수용성인 물질로 나타났다. 또한 분리한 물질을 proteinase-K로 처리한 후 반엽접종법에 의해 TMV 방제효과를 조사하였더니 방제 효과가 나타나지 않았다 (그림 18). 이로 미루어보아 이 물질은 단백질로 판단된다. 또한 고온처리 하였을 때도 활성이 낮아지지 않는 것으로 보아 열에 대해 매우 안정적인 물질로 판단된다 (그림 19). 세균에 의한 TMV 방제는 이미 보고된 바 있으나(Klement et al., 1966), 이 균이 생산하는 물질은 침투성이며 열에 매우 안정적이어서 포장상태에서도 효과를 검증해볼 가치가 있다고 생각된다.

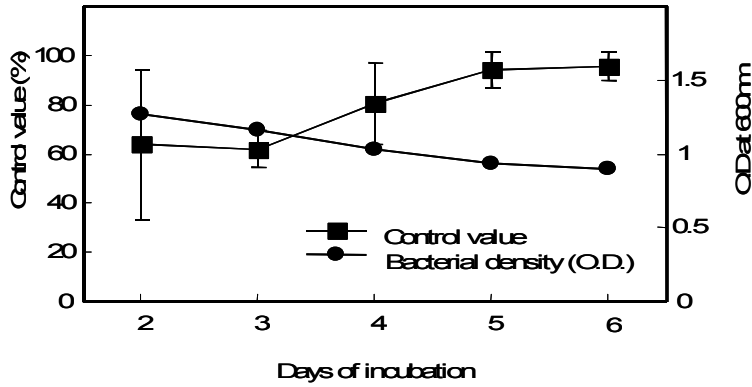


그림 16. JB-1의 배양기간별 밀도변화 및 배양액의 TMV 방제효과. 3반복 평균치 및 표준편차.

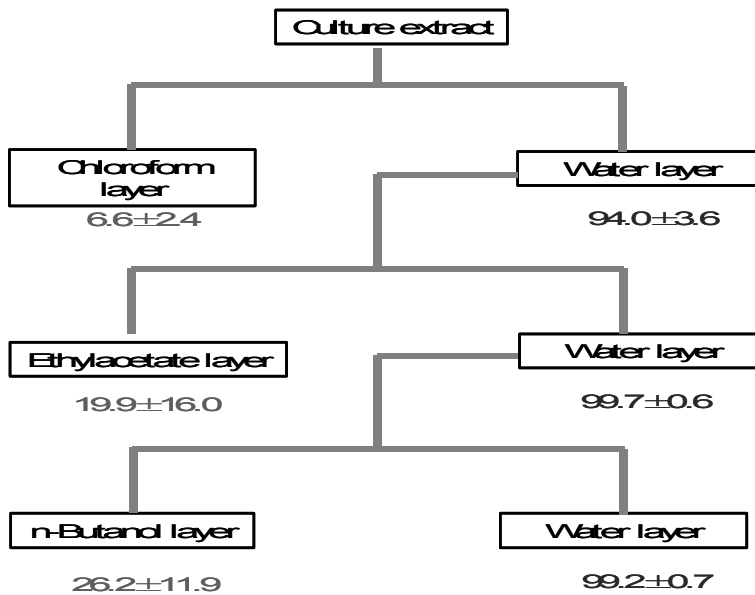


그림 17. JB-1의 배양액에서 TMV 감염차단물질 분리 과정. 아래 숫자는 TMV 방제효과. 9반복 평균치

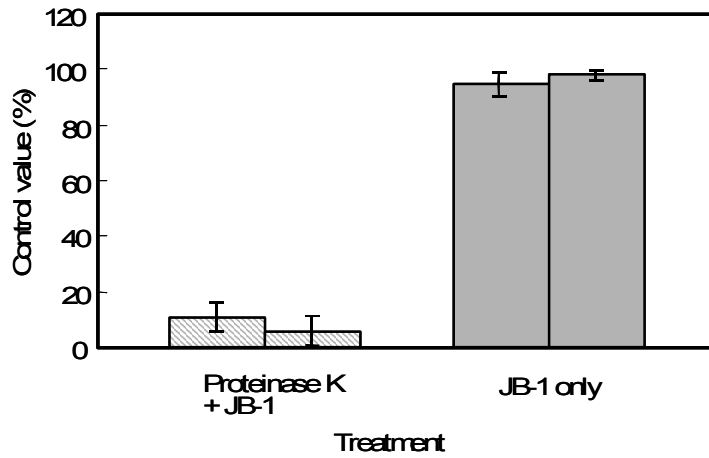


그림 18. JB-1의 수용성 물질의 proteinase K 처리 후 TMV 방제효과. 3반복 평균 및 표준편차.

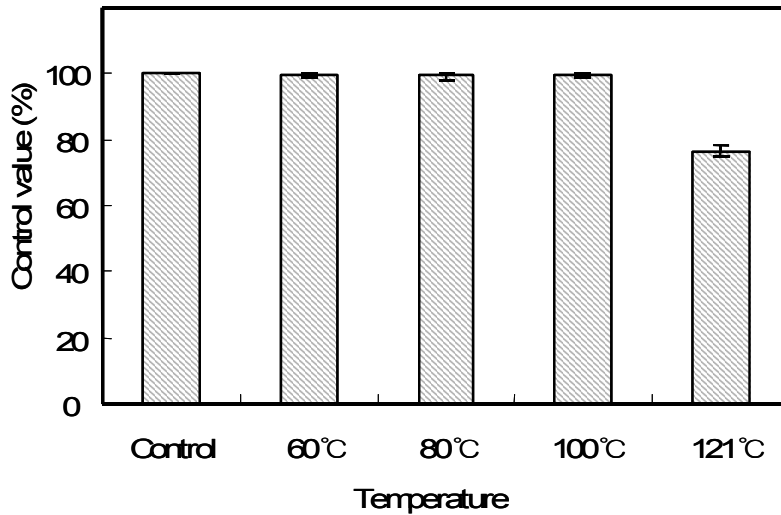


그림 19. JB-1 수용성 물질을 열처리 한 후 TMV 방제효과 조사. 3반복 평균 및 표준 편차. 121°C는 autoclave한 것임.

Schaad(1988) 등에 의한 세균 분류동정 결과 JB-1은 속생(lophotrichous) 편모를 가진 간상의 세균(그림 20)이며 배양학적 및 생리학적 특성조사 결과(data not shown) *Pseudomonas putida*로 동정되었으며, Biolog(표 12) 및 16S rDNA sequence 분석에 의해 *P. putida*로 확인되었다.

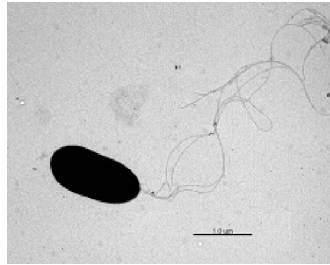


그림 20. JB-1 세균의 negative staining에 의한 전자현미경 사진 (2% uranyl acetate 염색).

표 12. JB-1 균주는 Biolog system에 의해 *Pseudomonas putida*로 동정

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	4	47	<121>{ 92}	<149>	13	3	5	23	11	31	
B	44	<624>	24	12	27	<686>	4	13	11	47	25	<528>
C	38	{ 69}	<125>	4	37	21	29	47	42	32	<406>	<234>
D	<360>	<999>	<833>	<572>	-2	<952>	<860>	18	<946>	<296>	<622>	16
E	49+	{ 66}	<198>	<886>	<191>	<504>	<412>	<343>	<798>	<897>	24	<477>
F	<346>	<182>	<225>	<458>	<416>	<475>	<304>	<999>	<999>	<999>	40	<312->
G	<823>	23+	<334>	{ 80}	{ 82}	<904>	<132>	{ 81}	<974>	<441>	<569>	<917>
H	20	<799>	<433->	23	24+	<528>	<443>	<107->	<724>	-5	0	16

=> Species ID : PSEUDOMONAS PUTIDA BIOTYPE A <=

Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1) PSEUDOMONAS PUTIDA BIOTYPE A	99	0.622	5.70	GN-NENT OXI+
2 ) PSEUDOMONAS PUTIDA	1	0.003	7.43	GN-NENT OXI+
3 ) PSEUDOMONAS MACULICOLA	1	0.003	7.47	GN-NENT OXI+
4 ) PSEUDOMONAS FULVA	0	0.001	7.83	GN-NENT OXI+
5 ) PSEUDOMONAS VIRIDILIVIDA	0	0.000	8.73	GN-NENT OXI-
6 ) PSEUDOMONAS RESINOVORANS	0	0.000	10.91	GN-NENT OXI+
7 ) AQUASPIRILLUM DISPAR	0	0.000	10.96	GN-NENT OXI+
8 ) PSEUDOMONAS PUTIDA BIOTYPE B	0	0.000	12.54	GN-NENT OXI+
9 ) ACINETOBACTER BAUMANII/GENOSPECIES 2	0	0.000	12.57	GN-NENT OXI-
10 ) PSEUDOMONAS FRAGI	0	0.000	13.04	GN-NENT OXI+
Other )				

### 3. 복합생물제제에 의한 각종 토양병 방제(포장시험)(협동연구)

#### 가. 식균선충 복합제제 제조

토양에 대량으로 생물제제를 처리하기 위해서는 다른 미생물제는 이미 많은 연구가 되어 있다. 식균선충은 Agar 배지에 곰팡이를 배양하여 선충을 접종한 후 사용할 수 있으나 이 연구에서는 토양에 주입할 매체를 이용하여 좀 더 효과적인 대량 증식 방법을 모색하고자 하였다. 토양에 주입할 기본 carrier로 Perlite와 Vermiculite를 이용한 배지 구성을 아래와 같이 구성하여 곰팡이의 생육을 도모하고 선충을 500 마리씩 (60ml 당) 접종하여 선충의 증식률을 조사한 결과 Perlite에서는 선충 증식이 불량하였으며, Vermiculite에서는 증식이 이루어졌는데 특히 굴껍질과 단풍잎 가루를 첨가한 배지에서 선충의 증식률이 높았다 (표 13). 그러나 반복 실험에서는 같은 결과가 재현되지 않았고 Vermiculite와 PD broth만을 첨가한 배지에서 증식이 잘 이루어져 이 배지에서 선충을 증식하여 포장에 처리하였다.

표 13. Vermiculite를 이용한 선충 대량 배양 시험 결과

Day Treatment	증식률(배)				
	15 days	20 days	25 days	30 days	35 days
굴껍질	90	95	130	96	117
단풍잎	68	23	40	42	60
Green powder	5	15	3	1.5	6
Control	13	21	6	12	2

- 배지 조성 및 선충 접종 (왕겨 100 ml, Perlite 또는 Vermiculite 900 ml, Potato Dextrose Broth 0.1%, Plant Material[굴껍질, 단풍잎, green juice powder<GP>] 0.1%), *Trichoderma harzianum* Spores suspension ( $1 \times 10^7$ ) 2 ml, 증류수 150 ml)

- Plastic box에 60 ml씩 배지를 넣고 선충 500 마리씩을 접종함 (5반복)

- 결과 조사는 5 g씩 5일 간격으로 채취하여 선충 수를 현미경하에서 조사함.

#### 나. 선충-길항세균 인삼 포장 처리 및 병방제 효과 조사

식균선충인 *Aphelenchus avenae*와 *Trichoderma harzianum*을 함께 인삼뿌리썩음병이 심하게 감염되어 있는 연작지 포장에 처리하였다 (KT&G 중앙연구원 증평시험장). 선충의 경우 *A. avenae*와 *T. harzianum* 배양재료(500 ml)를 마사토 10 L와 혼합해 배양으로 하고 다시 배양과 마사토를 1:1 비율로 섞어서 적량으로 하였고, 처

리량은 묘포 1칸당 2 L씩 뿌려주었다. 1개월 및 2개월 후의 잔존주율을 3반복으로 조사하여 개체간의 유의성을 평가하였다 (표 14, 15). 그 결과 식균선충과 길항곰팡이 처리효과가 전혀 나타나지 않았다. 이는 포장이 너무 심하게 오염되어 있었고 처리한 양이 너무 적어 효과가 전혀 나타나지 않았던 것으로 생각된다. 대조구보다 잔존율이 낮은 이유는 포장 간의 차이로 인한 것으로 생각되며 특별히 생물적제제가 병을 유발하였다고 보기는 어려웠다. 이병 부위에서는 항상 뿌리썩음병균인 *Cylindrocarpon destructans*가 분리되어 이 포장이 연작장해가 심한 포장임을 알 수 있었다. 또한 근권 토양에서 선충을 분리한 결과 토양 100 ml 당 *Aphelenchus avenae*의 수는 1-2마리 정도 검출되어 주입한 선충의 수가 부족한 것으로 생각되었다.

표 14. 식균선충 및 길항곰팡이 처리 1개월 후 인삼의 잔존주율

반복 시료	I	II	III	Mean
대 조	43	41	46	43.3 a
적 량	20	18	14	17.3 b
배 량	15	16	10	13.6 b

\* Means with same letters are not significantly different, by Duncan Multiple Range test (DMRT) at  $p = 0.05$

표 15. 식균선충 및 길항곰팡이 처리 2개월 후 인삼의 잔존주율

반복 시료	I	II	III	Mean
대 조	13	40	16	23.0 a
적 량	7	8	3	6.0 b
배 량	3	2	2	2.3 c

\* Means with same letters are not significantly different, by Duncan Multiple Range test (DMRT) at  $p = 0.05$



**다. 항균성천연물 (목단피, 계피가루)과 식균선충(*Aphelenchus avenae*) 인삼 포장 처리 및 병방제**

2-가의 실험에서 항균성 천연물의 병방제효과가 높은 것으로 나타나 식균선충복합 미생물제에 항균성천연물을 첨가하여 병방제 효과와 인삼의 생육을 조사하였다. 식균성 선충의 경우 *A. avenae* 20만 마리와 *T. harzianum* 배양재료 (500 ml) 및 모래 2l 를 섞어 인삼 재식시에 칸 당 골고루 처리하고 흙을 덮은 후 계피가루 혹은 목단피를 뿌리고 다시 흙을 덮어주었다. 처리량은 묘포 1칸 당 2l 씩 뿌려주었고, 묘포 처리기간은 3, 6개월 후의 잔존주율을 3반복으로 조사하였다. 이와 함께 *A. avenae*의 개체수 변화와 total bacteria와 total fungi의 밀도도 함께 조사하였다.

복합미생물제 처리와 천연물 처리효과가 전혀 나타나지 않았으므로 인삼뿌리썩음병의 방제에 효과가 나타나지 않았다 (그림 21). 또한 이들 처리가 총세균 밀도와 곰팡이의 밀도에도 큰 영향을 주지 않았다 (그림 22).

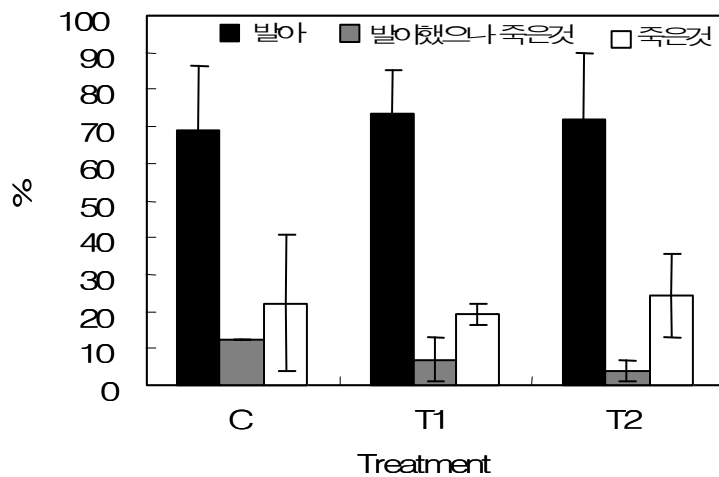


그림 21. 유기물과 식균선충복합제 처리에 의한 인삼병 방제효과, 1차 실험결과. C: Control, T1: 계피가루+식균선충복합제처리구, T2: 목단피+식균선충복합제처리구.

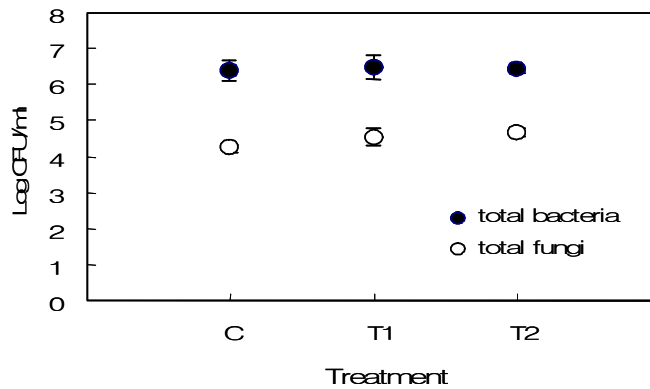


그림 22. Total bacteria와 total fungi의 밀도. 1차 조사. C: Control, T1: 계피가루+ 식균선충처리구, T2: 목단피+식균선충처리구.

2차 조사에서는 식균선충복합제와 천연물 처리구에서 뚜렷한 병방제 효과를 관찰할 수 있었고 인삼의 생육도 유의적으로 양호하였다 (그림 23). 그러나 곰팡이와 세균의 밀도 변화는 관찰할 수 없었고 (그림 24), 식균선충 *A. avenae*의 밀도도 크게 증가하지 않았다. 근권 토양에서 선충을 분리한 결과 토양 100g 당 *A. avenae*의 수는 1마리 정도 검출되어 주입한 선충의 정착에 문제가 있는 것으로 보인다 (data 생략). 이러한 결과로 보아 야외 포장에서 생물적 방제효과가 나타나기까지는 다소 장시간을 요하며 처리한 실험구가 대조구에 비해 건전묘가 더 많은 것은 처리한 항균성 천연물(계피가루, 목단피)이나 식균선충의 배지로 사용한 *Trichoderma harzianum*의 항균물질에 의한 작용으로 생각된다. 작용 mechanism은 생물체제가 직접적으로 세균과 곰팡이의 증식을 억제하기보다는 병원균의 침입으로부터 식물체를 보호하거나 저항성의 유도 현상에 기인한 것으로 생각된다.

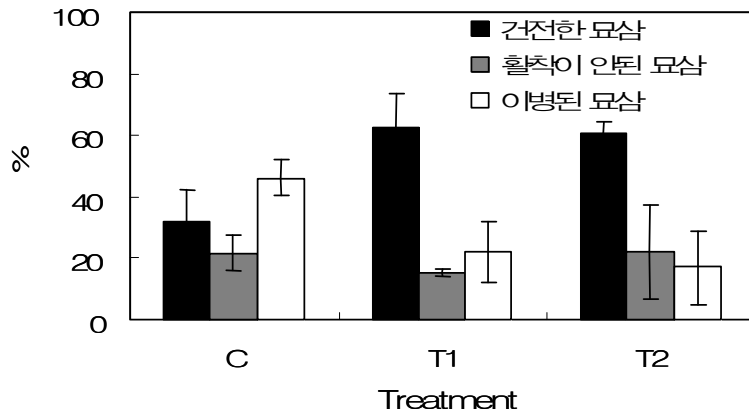


그림 23. 유기물과 식균선충 처리에 따른 인삼병 방제효과, C: Control, T1: 계피가루 +식균선충복합제처리구, T2: 목단피+식균선충복합제처리구.

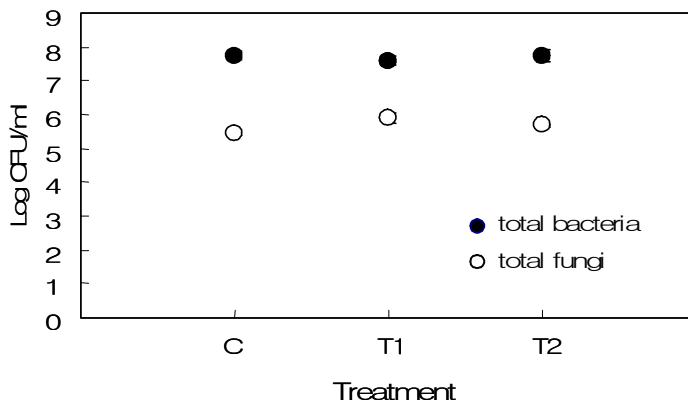


그림 24. total bacteria와 total fungi의 밀도. C: Control, T1: 계피가루+식균선충복합제 처리구, T2: 목단피+식균선충복합제 처리구

#### 라. 재작지 인삼포에서의 처리 효과 조사

식균선충인 *Aphelenchus avenae*와 *Trichoderma harzianum* 배지 및 천연물 처리하여 인삼 3년근을 채굴하여 생육을 조사하고 토양 미생물과 식균선충의 밀도를 조

사하였다 (그림 25). 그 결과 뚜렷한 방제효과와 미생물의 밀도변화를 찾을 수 없었다. 이는 인삼의 재식지 토양환경의 불량으로 인하여 생물제제의 작용이 위축되었을 가능성이 높으며 천연물의 항균효과도 방제효과를 나타내기에는 역부족이었기 때문이라 생각된다.

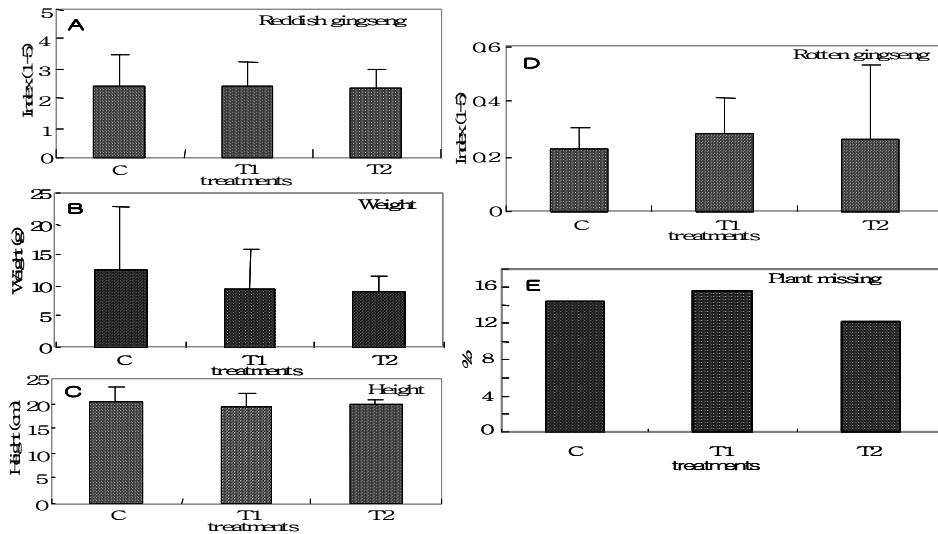


그림 25. 인삼 재식지 포장에서 식균선충복합제와 항균성천연물 처리 효과. A: 적변(reddish ginseng), B: 인삼 3년근 생체중(weight of ginseng), C: 뿌리 길이(height of ginseng), D: 뿌리썩음(rotten ginseng), E: 결주율(plant missing).

C: 무처리(control), T1: 계피(stem bark of *Cinnamomum cassia*) + *Aphelenchus avenae* with *Trichoderma harzianum*, T2: 목단피(root bark of *Paeonia suffruticosa*) (MCR) + *A. avenae* with *T. harzianum*. \* Disease severity index 0: no symptom (0%), 1: weak symptom (0~20%), 2: intermediate (20~40%), 3: high (40~60%), 4: severe (60~80%), 5: very severe (80~100%).

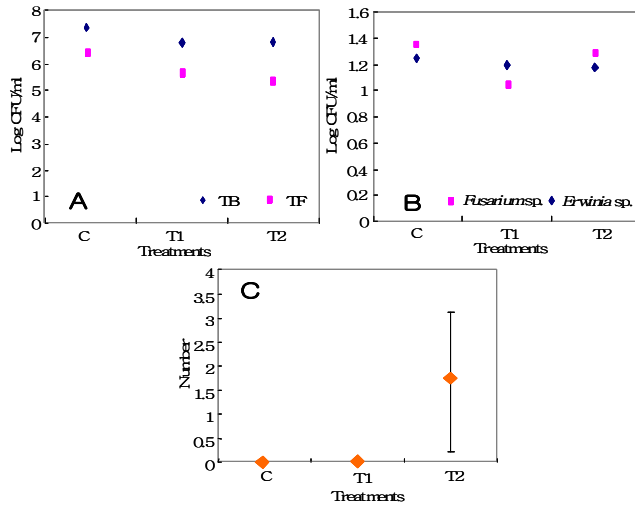


그림 26. 인삼 재식지 포장에서 식균선충복합제와 항균성천연물에 의한 미생물과 식균선충의 밀도 변화.

A: population of total fungi (TF) and total bacteria (TB), B: Population of *Erwinia* spp., and *Fusarium* spp., C: number of *Aphelenchus avenae* in 100 g of soils. C: 무처리(control), T1: 계피(stem bark of *Cinnamomum cassia*) + *Aphelenchus avenae* with *Trichoderma harzianum*, T2: 목단피(root bark of *Paeonia suffruticosa*) (MCR) + *A. avenae* with *T. harzianum*.\*

#### 4. 천연물 첨가에 의한 토양병 방제(새로운 시도)

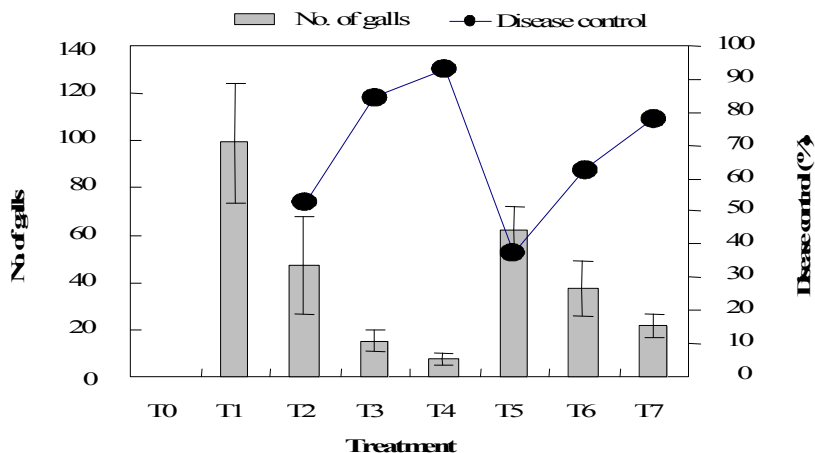
연구 2년차까지 식균선충과 in vitro에서 우수한 길항세균을 선발하여 토양병방제 효과를 조사하였으나 항균성 천연물에 의한 효과에 미치지 못하였다. 항균성 천연물은 생물제제는 그 자체 방제효과가 있을 뿐만 아니라(Browers and Locke, 2000; Ferris and Zheng, 1999; Katan et al., 1989; Ketkar and Ketkar, 1990; Khan et al., 1974; Kim et al., 1996; Lin et al., 1999; Miyazawa et al., 1983, 1984; Pitarokili et al., 2003). 생물제제의 신속한 약효를 도울 수 있으므로 보조제로 첨가할 수 있기 때문에 3년차에서는 이에 대한 연구를 보다 심도 있게 수행하였다.

##### 가. 천연물에 의한 뿌리혹선충 방제

*Paenibacillus polymyxa* GBR-1에 의해 온실의 포트 실험에서 토마토 뿌리혹선충

이 효과적으로 방제되었다. 그러나 포장 상태에서는 효과의 증진이 필요하고 이에 향선충효과가 있는 천연물을 선발코자 하였다. 각종 천연물 가루를 0.2%씩 토양에 혼화하여 처리한 결과 모든 천연물이 방제효과가 있으나 뿌리혹선충 방제효과가 가장 높은 천연물은 목단피로 95%의 방제효과를 보였고, 그 다음은 계피로 91%의 방제효과를 보였다 (표 17).

가장 방제 효과가 컸던 목단피와 계피를 농도별로 토양에 혼화하여 뿌리혹선충의 방제효과를 조사한 결과 이전 실험과 마찬가지로 목단피의 방제효과가 높았으며 농도가 높아짐에 따라 방제효과도 상승함을 알 수 있었다 (그림 27). 이러한 방제의 결과에 비례하여 지상부 식물의 크기나 생체중이 증가하였다 (그림 28). 그러나 식물의 뿌리는 뿌리혹의 무게로 방제가에 반비례하였다. 목단피와 계피 0.2% 농도는 식물 생육에 지장을 초래하지 않는 것으로 생각되며 앞서 처리하여 효과가 있었던 세균과 병행하여 처리하면 뿌리혹선충 방제 효과에 상승작용을 기대할 수 있을 것이다. 목단피는 여러 acetopheneone 물질들이 집적되어 있고 (Lin et al., 1999), 휘발성 정유 물질 등이 포함되어 있으므로(Miyazawa, 1983, 1984), 이러한 물질들이 뿌리혹선충의 감염을 저지하는 효과가 있었으리라 생각된다.



T0= Healthy Plants; T1= Control (inoculated with *M. incognita*); T2= 0.05% *Mutan. radicis* solution+ *M. incognita*; T3= 0.1% *M. radicis* solution+ *M. incognita*; T4= 0.2% *M. radicis* solution+ *M. incognita*; T5= 0.05% *Cassia cortex* solution+ *M. incognita*; T6= 0.1% *C. cortex* solution+ *M. incognita*; T7= 0.2% *C. cortex* solution+ *M. incognita*

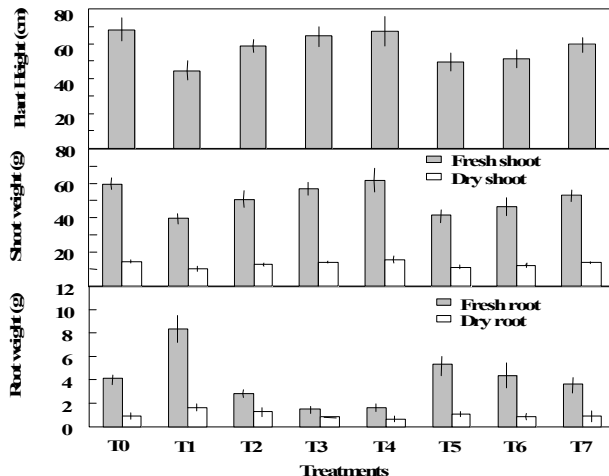
그림 27. 목단피와 계피 가루 처리 농도별 뿌리혹선충 방제 효과

표 16. 천연물 토양 혼화 처리에 의한 *Meloidogyne incognita* 에 의한 토마토 뿌리혹 선충 방제

Treatment <sup>a</sup>		Korean name	No. of galls/plant <sup>b</sup>	Control efficacy (%)
Plant species	Plant parts used			
Control	-	-	132.2±60.8	-
<i>Anethum graveolens</i>	Fruit	Sariza	53.8±25.4	59.3
<i>Syzygium aromaticum</i>	Flower bud	Jeong-hyang	31.0±15.8	76.6
<i>Cnidium officinale</i>	Rhizome	Cheon-gung	21.0±12.2	84.1
<i>Coptis chinensis</i>	Root	Hwang-ryeon	21.6±7.7	83.7
<i>Paeonia suffruticosa</i>	Root bark	Mokdan-pi	62±3.4	95.3
<i>Phellodendron amurense</i>	Stembark	Hwang-baek	36.0±13.9	72.8
<i>Cinnamomum cassia</i>	Stembark	Gyae-pi	11.8±4.7	91.1

<sup>a</sup> About 0.2% (w/v) of dried plant materials were incorporated with non-sterilized soil in pots 5 days before inoculation with *Meloidogyne incognita* juveniles. Root gall formation was examined 35 days after inoculation. Control: inoculation only.

<sup>b</sup> Numbers are averages and standard deviations of five replications.



T0=Healthy Plants; T1=Control (inoculated with *M. incognita*); T2=0.05% *Mutan radicis* solution+*M. incognita*; T3=0.1% *M. radicis* solution+*M. incognita*; T4=0.2% *M. radicis* solution+*M. incognita*; T5=0.05% *Cassia cortex* solution+*M. incognita*; T6=0.1% *C. cortex* solution+*M. incognita*; T7=0.2% *C. cortex* solution+*M. incognita*

그림 28. 목단피와 계피 가루 처리 농도별 식물의 성장 지표 비교

나. 천연물 첨가에 의한 병방제 효과 상승 작용

1) 천연물의 항균작용 및 무 모잘록병 방제효과

토양병 방제에 있어서 항균성 천연물의 효과를 극대화하기 위해서는 길항미생물에는 억제작용이 없고 병원균에만 강한 길항작용을 나타내는 물질을 선발하는 데 달려 있다. 몇 가지 항균성이 있는 천연물로 알려진 한약제의 추출물의 항균효과를 비교한 결과 표 17에서 보는 바와 같이 목단피(MCR)와 계피(CC)가 *R. solani*의 균사 생장 억제효과가 가장 컸다. 그러나 *Trichoderma harzianum*은 모든 천연물에 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다. 이들 천연물의 무 모잘록병 방제효과도 목단피가 가장 높아 95%의 방제가를 보였다 (표 18).

표 17.. 천연물과 대치 배양시 *Trichoderma harzianum*과 *Rhizoctonia solani* AG2-1의 균사 생장

Medicinal material <sup>a</sup>	Mycelial growth (cm) (treatment / control)	
	<i>T. harzianum</i>	<i>R. solani</i> AG2-1
FF	4.5±0.1/4.5±0.0	2.5±0.1/2.5±0.2
MCR	4.4±0.2/4.5±0.0	0.8±0.1/1.5±0.2
CC	4.2±0.2/4.4±0.1	1.1±0.4/2.2±0.2
CR	4.5±0.0/4.5±0.0	2.5±0.6/2.6±0.4
PC	4.5±0.0/4.5±0.1	2.5±0.2/2.5±0.2
CNR	4.2±0.1/4.4±0.0	2.1±0.4/2.5±0.1

<sup>a</sup>Four-fold concentrated ethanol extracts were tested using the paper-disc method. FF: fruit of *Anethum graveolens*, MCR: root bark of *Paeonia suffruticosa*, CC: stem bark of *Cinnamomum cassia*, CR: rhizome of *Coptis chinensis*, PC: stem bark of *Phellodendron amurense*, CNR: rhizome of *Cnidium officinale*



표 18. 여러 가지 천연물의 *Rhizoctonia solani*에 의한 무 모잘록병 방제 효과

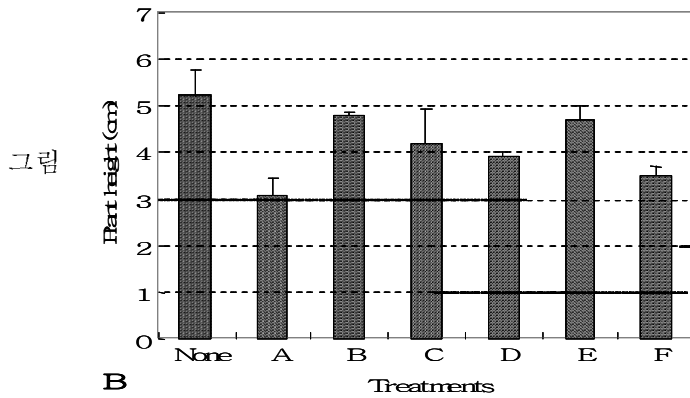
Treatments <sup>a</sup>	Disease incidence (%)	Control value (%)
MCR	2.3±2.5	95.1 a <sup>1</sup>
CC	8.1±3.6	82.9 ab
CNR	16.9±3.1	64.2 abc
CR	16.7±1.8	64.6 abc
FF	34.0±7.4	28.0 bc
PC	32.7±9.6	30.9 c
No treatment	47.3±2.8	0.0 d

<sup>a</sup>1.2% soil amendment (w/v)

MCR: root bark of *Paeonia sffructicosa*, CC: stem bark of *Cinnamomum cassia*, CNR: rhizome of *Cnidium officinale*, CR: root of *Coptis chinensis*, FF: fruit of *Anethum graveolense*, PC: stem bark of *Phellodendron amurense*. Figures are means and standard deviations of 3 replications

<sup>1</sup>Same letters denote no significant difference at P=0.05 by least significance difference (LSD) test.

주사전자현미경으로 관찰한 결과 목단피에 영향을 받은 *R. solani* 균사는 균사의 세포 길이가 짧아지고 기형으로 변하였다(data not shown). 그러나 토양 혼화 처리한 1.2% 농도에서는 무 종자의 발아에는 별 영향이 없었으나 유묘의 성장이 저해되었다 (그림 29). 또한 1.2%의 높은 농도는 경제적으로도 실용 여부를 고려하여야 할 것이다.



29. 천연물 가루(1.2%, w/v) 처리에 의한 지상부 생육.

A: stem bark of *Cinnamomum cassia*, B: rhizome of *Coptis chinensis*, C: stem bark of *Phellodendron amurense*, D: fruit of *Anethum graveolens*, E: rhizome of *Cnidium officinale*, F: root bark of *Paeonia suffruticosa*

무 모잘록병 방제에 특히 효과가 있었던 목단피를 농도별로 처리하여 병방제 효과를 조사하였더니 0.8% 이상에서 괄목할 만한 효과가 있었으나 0.4% 이하에서는 50% 정도 또는 그 이하의 효과밖에 없었다 (표 19). 그러나 식물의 성장 저해는 0.4% 이상부터 나타나 실제적으로 안전하게 목단피를 사용하기 위해서는 0.2% 이하의 농도에서 사용가능 하다고 할 수 있다.

표 19. 목단피(root bark of *Paeonia suffruticosa* (MCR)) 농도별 무의 Rhizoctonia damping-off 방제 효과

MCR <sup>a</sup> (g/100ml soil)	Disease Incidence (%)	Control Value (%)
No treatment	82.1±4.8	0.0 a <sup>b</sup>
0.1	55.2±12.3	32.8 b
0.2	38.1±8.0	53.6 bc
0.4	37.2±8.4	54.8 cd
0.8	13.3±5.9	83.7 d
1.2	6.7±3.0	91.9 d

<sup>a</sup>Dried root bark powder was incorporated in soil.

<sup>b</sup>Means with the same letter are not significantly different at p=0.05 according to the Turkey's multiple range test (P=0.01)

## 2) 천연물과 미생물의 복합제에 의한 무 모잘록병 방제효과

고농도에서 천연물의 토양병 방제 효과와 식물의 생육저해 작용 문제점을 해결하기 위하여 길항미생물과 천연물을 동시처리 하여 무 모잘록병 방제효과를 조사하였다. 그 결과 목단피를 처리하지 않았거나 또는 길항미생물 단독 처리구보다 복합처리구에서 모두 방제효과가 유의성 있게 제고되었다(표 20). 특히 목단피 처리량이 0.1% 이하에서도 85% 이상의 방제가를 나타내어 실제 포장 처리에서도 방제효과가 기대된다고 할 수 있다. 지금까지 농약과 생물제제를 병행하여 사용함으로써 방제효과를 제고시킨 사례는 종종 있었다(Duffy, 2000; Kim et al., 1991). 이는 농약을 사용한다는 점에서 완전한 친환경적인 방제법이라 보기 어렵는데 비해 천연물을 혼용하는 이 방법은 농약과 같은 효과를 낼 수 있으면서 환경친화적이어서 실용화를 위해서 앞으로 포장실험 등 다양한 추가적인 연구가 있어야 할 것이다.

표 20. *Trichoderma harzianum*(T.h.)과 목단피(root bark of *Paeonia suffruticosa* (MCR)) 병합처리에 의한 무의 *Rhizoctonia* damping-off 방제

Treatments		Disease incidence(%)	Control value (%)
MCR conc. <sup>a</sup> (%)	<i>Th</i> conc. (%)		
0	0	90.9±15.8	0
	0.2	53.4±4.8	42.3 c
	0.4	46.3±5.4	49.1 c
	0.6	44.1±8.7	51.5 c
0.05	0	51.7±3.7	43.1 c
	0.2	22.6±8.9	75.1 ab
	0.4	20.1±2.4	77.9 ab
	0.6	16.3±2.4	78.5 ab
0.08	0	42.5±1.7	53.2 c
	0.2	23.3±12.6	74.3 b
	0.4	13.2±4.5	85.5 ab
	0.6	11.23±6.2	87.6 a
0.1	0	41.2±10.6	54.7 c
	0.2	26.9±7.6	71.4 ab
	0.4	12.3±3.1	86.4 ab
	0.6	14.9±10.7	83.6 ab
LSD <sub>0.05</sub>			12.9

<sup>a</sup>conc.: concentration (w/v)

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표와 주요 연구 내용 및 적용

이 연구의 최종 목적은 식균선충과 길항미생물(길항세균)의 혼합제를 이용한 효과적인 토양병 방제용 생물 농약 기술 개발에 있다. 이를 위해 각종 토양이나 식물체에서 식균선충과 길항세균을 분리하였고 이들의 식균성이나 항균력을 in vitro에서 조사하고 또한 주요 원예작물의 토양병의 방제효과를 in vivo에서 조사함으로써 우수한 식균선충이나 길항세균을 분리하였다. 여러 가지 미생물의 혼합제 및 천연물을 이용하여 방제 효율을 제고함으로써 보다 유용한 생물학적 방제 기술을 개발함도 이 연구의 목표에 포함되어 있다.

우수한 식균선충 1종과 이의 배지로 사용될 길항곰팡이 *Trichoderma harzianum* 에서의 배양을 통한 생물제제를 제조에 성공하였다. 이 배양체는 식균선충뿐만 아니라 자체적으로 길항곰팡이를 포함하고 있으므로 배양 후 다른 처리 없이 직접 포장 처리가 가능하다. 식균선충과 길항곰팡이 조합에 있어서 다른 *Trichoderma* 종은 효과가 낮아 복합미생물제의 제조 시 길항생물 서로간의 관계를 엄밀히 조사한 후에 상승작용을 기대할 수 있는 조합으로 구성하여야 방제효과의 제고를 기대할 수 있다.

세균의 경우는 효과면에서 다양한 균주를 분리하고 동정하였다. *Bacillus* sp.로 동정된 G181 균주의 경우 in vitro에서 강한 항균력을 나타냈으나 in vivo에서는 효과가 없었다. GBR-1과 GBR-447의 경우는 모두 *Paenibacillus polymyxa*로 동정된 세균으로 전자는 뿌리혹선충과 인삼의 뿌리썩음병 방제효과가 있었다. 뿌리혹선충 방제 경우 세균 배양액의 chloroform extract와 세균현탁액 모두 방제효과가 높았는데 이는 세균의 배양액에 뿌리혹선충의 감염을 차단하는 물질이 있으며 동시에 plant growth promoting rhizobacterium(PGPR)인 이 균이 식물체뿌리에 내생균(endophyte)으로 뿌리혹선충의 감염을 차단하였을 것으로 생각된다(Mavingui and Heulin, 1994; Shishido et al., 1996; Timmusk and Wagner, 1999). 여러 가지 처리 방법을 개선하며 생물학적 방제제로 실용 가능성이 있을 것으로 생각되며 특히 살선충 효과가 있는 미생물이나 천연물을 첨가하여 방제효과를 제고함으로써 생물농약 개발이 기대된다. 또한 GBR-1의 경우 *Erwinia*와 *Fusarium* 균의 감염 정도가 낮을

때 인삼 질편의 부패를 차단하였는데 이 때 GBR-1의 밀도가 높을 때보다 낮을 때 가 더 효과적이었다. 이는 GBR-1으로 생물제제를 만들 경우 주의를 요하는 한편 적은 양의 생물제제로도 방제효과를 높일 수 있으므로 경제적인 면에서 개발가능성을 높일 수 있다. GBR-447 균주는 역병의 균사 생장과 유주자의 형성을 억제하여 병발생을 억제하며 2차 전염원의 생성을 차단하므로 지속적인 방제효과를 가져올 수 있을 것이다. 낮은 세균의 밀도에서는 항균력은 낮아지나 유주자량이 기형으로 변하고 유주자의 형성이 억제되므로 장기적으로 지속적인 병발생 억제를 기할 수 있을 것이다.

생물학적 방제의 단점 중 하나는 속효성의 병방제를 이룰 수 없다는데 있다. 이를 보완하기 위해서 항균성 천연물의 사용이 검토되었는데 천연물 중 목단피가 매우 유용한 것으로 나타났다. 첫째, 목단피는 뿌리혹선충 방제효과가 높아 GBR-1에 첨가하여 사용하면 방제효과를 제고할 수 있고 실용성을 높일 수 있을 것이다. 둘째, 병원균인 *Rhizoctonia solani*에는 항균력이 강하나 길항균인 *Trichoderma harzianum*에는 항균력이 미미하여 길항균과 동시에 처리하였을 때 *R. solani*에 모잘록병 방제 효과가 크게 제고되었다. 이는 생물제제의 처리 농도를 크게 낮출 수 있으므로 생물학적 방제 기술의 실용화에 가장 큰 장애요인을 제거하는 셈이 된다. 앞으로 병원균에 따라 특이적으로 항균력을 보이는 천연물을 선별하여 같은 방법으로 이용한다면 효과적인 생물학적 방제제 개발에 보탬이 될 것이다.

포장시험에서 생물제제의 방제효과는 역시 만족한 것이 못되었다. 토양병이 심화된 곳은 농약을 포함한 어떠한 방제 방법도 효과가 없었다. 또한 토양 환경이 불량한 곳은 생물제제의 활동 역시 제한되어 방제효과가 잘 나타나지 않았다. 생물제제를 처리하기 전에 그 포장이 생물제제로 방제가 가능한지 토양의 병의 종류와 상태 등을 판단하는 것이 필요하며 토양상태가 생물제제가 활동하기에 적합하지 않으면 토양 개량이 우선되어야 할 것으로 생각된다.

## 제 2 절 연구개발 목표의 달성도와 관련분야에의 기술발전 기여도

이 연구개발을 통해 생물제제에 의한 생물학적 방제 신기술을 개발하고 이에 대한 이론적 지식을 정립함으로써 차후에 이를 관련 전문가에게 전수함으로써 작물병의 생물학적 방제 기술 개발에 도움을 주고 작물 토양병의 친환경적 관리 체계를 구축

하여 안전하고 우수한 품질의 작물 생산에 기여하는데 그 목적이 있다. 원래의 생물 제제 대상은 식균선충과 길항미생물에 한정하였으나 연구 도중 식균선충의 증식용 먹이인 길항곰팡이 *Trichoderma harzianum*도 자연히 포함하게 되었다. 이 연구에서 도출된 몇 가지 신기술은 1) 식균선충 *Aphelenchus avenae*와 길항미생물 *T. harzianum* 조합의 생물복합제제 제조법, 2) *Paenibacillus polymyxa* GBR-1과 목단피에 의한 뿌리혹선충 방제제 개발 (그 복합제의 가능성은 추후 연구가 있어야 할 것임), 3) *Rhizoctonia solani*에 의한 모잘록병(또는 벼 잎집무늬마름병 가능) 방제용 목단피와 *T. harzianum* 복합제 개발 등이다.

생물학적 방제의 변이를 줄이기 위해 여러 생물제제의 복합제를 사용하지만 (Guetsky et al., 2001), 이 연구에서 나타났듯이 주된 방제역할을 하는 인자와 보조제간의 관계가 방제효과의 상승에 중요하다는 이론적 배경이 제시되었다. 앞으로 복합제 제조시 이에 대한 검토가 요구된다. 항균성 천연물을 첨가한 생물학적 방제 기술의 확대 보급 필요성이 시사되었다. GBR-1의 경우 낮은 농도에서 오히려 병의 방제효과가 높아 최대 방제효과를 기하기 위해 적정농도의 개념을 새롭게 도입하였다. 또한 포장에서 생물제제를 사용할 때 고려하여야 할 사항을 도출하였다. 이러한 결과로 볼 때 생물학적 방제 신기술 개발과 이론적 지식 정립의 전반적인 연구 목표는 달성되었다고 사료되며 위 2)와 3)의 기술은 적용시험을 거쳐 산업화가 가능하리라 생각된다. 3년 동안에 얻은 연구 결과의 일부는 이미 국내 학술진흥재단 등재 학술지에 2건 게재하였으며, 국내외 학술대회에서 5건 발표를 하였다. 국내 특히 1건은 출원 예정이다. 연구가 종료된 후에도 계속 논문을 발표할 예정이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

이 연구에서 생물학적 방제 기술로 실용성이 예상되는 연구결과는 *Paenibacillus polymyxa* GBR-1과 목단피의 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*) 방제효과 및 목단피와 *Trichoderma harzianum* 합제에 의한 모잘록병(*Rhizoctonia solani*) 방제효과이다. 뿌리혹선충 방제는 각각의 방제효과가 확인되었고 아직 두 제제의 합제에 의한 효과 상승은 확인되지 않았으므로 이에 대한 검증 시험이 필요하다. 대상 선충의 범위를 넓혀 씨스트 선충(*Heterodera* sp.)과 뿌리썩이선충(*Pratylenchus* sp.)도 포함시키고자 한다. GBR-1 배양액의 chloroform 추출액이 효과가 있으므로 이 추출물의 선충 방제 mechanism 연구와 추출물의 제제화연구도 추가할 예정이다. 모잘록병 방제에 있어서는 목단피 0.08%와 *T. harzianum* 배지 0.4%에서 85%의 방제가를 가지므로 포장실험을 통한 방제 확증 시험이 필요하다. 이들 연구를 통해 실제적으로 포장에서 활용할 수 있고 경제성이 있는 생물농약이 개발될 수 있을 것이다.

### 제 2 절 타 연구에의 응용

특정 길항미생물은 작용범위가 좁은 경우가 많아 한 병해에 방제효과가 높더라도 다른 병해에 대해서는 그와 같은 방제효과를 기대하기가 어려울 경우가 많다. 따라서 끊임없는 새로운 균주의 발굴을 위해 노력을 경주해 왔으며 새로운 유용 균주를 찾았다 하더라도 실제로 실용화되는 사례는 극히 드물었다. 그러나 복합미생물제나 천연물을 포함한 미생물제의 경우는 각각의 균주나 천연물이 포함할 수 있는 대상 병원균의 종류를 넓힐 수 있고 또한 적절한 균주조합이나 천연물을 사용한다면 생물학적 방제를 실용화 가능성을 높일 수 있다. 특히 복합미생물제나 천연물첨가 미생물제를 종자코팅이나 유묘처리 등에 활용한다면 더욱 경제성 있는 생물학적 방제 기술을 개발할 수 있을 것이다. 이러한 생물체제의 개발에 있어서는 이 연구에서처럼 생물체제의 주종관계와 상호간의 관계 규명이 우선적으로 이루어져야 효과적인 방제법 개발을 이룰 수 있다.

아직 전 세계적으로 생물학적 방제 연구에 있어서는 개발 연구가 대부분이며 생물학적 성공 및 실패의 사례를 세밀하게 분석하여 이를 보완하는 후속 연구가 부족



하여 연구 간의 연계성과 생물학적 방제에 관한 체계화된 연구자료(특히 방제 기작)가 부족한 실정이다. 따라서 엄밀한 의미에서 그동안 생물학적 방제에 관한 지식과 기술의 축적은 타 분야에 비해 매우 미미한 정도이다. 이는 초기의 생물학적 기술 수준과 현재의 수준을 비교해볼 때 큰 차이가 없음을 보아도 잘 알 수 있다. 우량 미생물 균주의 개발, delivery system의 개발 등으로 악화된 토양을 회복시키기엔 역부족임을 알아야 할 것이다. 다행히 임의의 유기물(다양한 미생물군으로 이루어져 있음)로 토양을 개량한 포장에서 병의 발생이 적고 작물의 생육이 양호한 사례들이 있음을 보아왔다. 이제 대안은 단일생물에 의존한 생물학적 방제가 아니라 여러 미생물을 조화롭게 구성하여 만든 복합미생물제나 천연물과 미생물유래 항균물질의 복합물제 등에서 찾을 수 있을 것이다. 특히 낮은 농도에서 상호작용으로 높은 효과를 낼 수 있는 미생물 조합이나 물질 조합은 병원균의 선택압을 줄여 저항성의 발달 기회를 줄이고 기주식물에게도 안전하여 지속가능하며 더욱 환경친화적인 생물학적 방제법 개발에 도움을 줄 것이다. 이러한 의미에서 복합미생물제나 복합물제는 또한 항생제 내성균의 문제를 해결하는데 응용될 수 있을 것이다.

### 제 3 절 연구결과의 활용계획

현재까지 본 연구결과는 논문발표 2건, 학술대회 발표 5건 등이며 과제종료 후에도 지금까지의 연구 결과는 계속 논문으로 발표할 예정이다. 또한 연구결과 중 1건은 특허를 출원할 예정이다. 이 연구를 통해 도출된 생물학적 방제의 이론과 기술은 작물보호기술의 교육 및 지도 자료로 활용하고자 한다. 특히 토양병 방제 전문가들에게 이 연구에서 도출된 이론과 기술에 대한 정보를 제공하고 의견을 교환하여 이 연구에서 개발된 방법을 범용화하고자 한다. 이를 위해 개발된 균주와 기술을 공개하여 실제 현장에서 실시해봄으로써 이에 대한 검증이 뒤따라야 할 것이다. 차후 국내 토양병의 생물학적 방제 전문가와 협력하여 지금까지의 여러 연구들을 분석하고 정리하여 연구 지침서와 실용적인 책자를 발간하여 전문가들의 체계적인 연구를 보조하고 산업계에서 사용할 수 있게 하여 작물의 친환경적인 생산에 기여하고자 한다. 또한 추가 연구가 가능하면 위에서 언급한 2가지 정도의 생물체제는 산업화가 가능하다고 생각된다. 선충 방제의 경우 적용범위 확대를 위해 이미 미국 University of Arkansas에서 2개월간 연구를 할 수 있는 기회를 획득하여 2005년 상반기 중에 이를 시행하고자 한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

생물학적 방제에 있어서 해결해야 할 가장 큰 문제는 지역간 방제의 변이이다. 이에 대한 최근의 접근 방법의 하나는 유전체학(genomics)과 전사체학(transcriptomics) 등 post-genomics를 이용한 생물학적 방제 유전자의 규명을 통해 변이에 관여하는 원인을 연구하고자 하고 있다. 이를 위해 미국 USDA의 Loper 등은 *Pseudomonas fluorescens* Pf-5를 모델 균주로 하여 토양병의 억제와 관련된 유전자와 유전자 발현을 조사함으로써 방제의 mechanism을 규명하고 방제 변이의 원인을 파악하는 연구를 수행하고 있다. 국내에서는 생명공학연구원에서 *Paenibacillus polymyxa*를 대상으로 전체유전자지도가 거의 완성 단계에 이르러 앞으로 이 정보를 이용한 생물학적 방제 관련 유전자를 선별하고 응용하여 이 균의 병방제와 관련된 생물정보학 연구가 기대된다. 본 연구에서 *P. polymyxa*는 인삼뿌리썩음병, 고추역병, 토마토에서의 뿌리혹선충에 생물학적 방제효과가 크므로 그 mechanism의 규명이 요구되는데 본 연구실에서 이미 20여 균주에 대한 16S rDNA sequence를 확인하여 Genbank에 등록한 바 있고, transposon mutants를 이용한 이 균의 생물학적 특성들을 조사하였다. 그러나 이 균은 토마토 유묘와 몇 가지 식물에 병을 일으킬 수 있으며 고밀도로 존재할 때 저장 중 뿌리식물을 썩힐 수 있어서 사용에 주의를 요한다. 토양에 살포하는 경우보다 종자코팅 등의 처리를 할 경우 특히 적절한 밀도로 사용하여야 방제효과를 높이고 약해도 방지할 수 있을 것이다.

생물학적 방제제로 대표적인 미생물은 *Trichoderma*로 알려져 있으며 이 균의 작용기작은 항생작용(antibiosis), 기생(mycoparasitism) 및 여러 형태의 경쟁(competition)으로 알려져 있으나 최근에는 많은 *Trichoderma* 균주가 전신유도저항성을 유발하여 곰팡이, 세균 및 바이러스까지도 방제에 유효하게 이용되고 있다. 그 예로 *Trichoderma virens*에 의한 phytoalexin을 유도하는 기능이 조사되었다. *Trichoderma*는 또한 코코아 나무 등에서는 endophyte로서 식물과 공생하는 균으로 조사되기도 하여 균주에 따라 그 역할이 다양함을 보여준다. 본 연구에서 *Paenibacillus polymyxa* GBR-1, 목단피 등이 뿌리혹선충 및 *Rhizoctonia solani*에 의한 모잘록병 방제에 효과가 높았고, 특히 목단피와 *T. harzianum*은 낮은 농도에서도 모잘록병의 방제에 효과가 컸다. 따라서 이 세 가지를 조합하면 효과적인 생물학적 방제 기술을 개발할 수 있을 것이라 생각된다.

## 제 7 장 참고문헌

- Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4<sup>th</sup> Edition, Academic Press, San Diego, CA.
- Ahn, Y. J., Kim, H. J., Ohh, S. H. and Choi, S. Y. 1982. Effect of soil fumigation on growth, root rot and red discoloration of *Panax ginseng* in replanted soils. J. Ginseng Res. 6:164-173.
- Ash, C., Priest, F. G., and Collins, M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 Bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test; proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. Antonie van Leeuwenhoek 64: 253-260.
- Backman, P., Brannen, P. M. and Mahaffee, W. F. 1994. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. In "Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria", ed. by M. H. Ryder, P. M. Stephens and G. D. Bowen, CSIRO, Adelaide, pp. 3-8.
- Bae, Y.S. and Knudsen, G. R. 2001. Influence of a fungus-feeding nematode on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91:301-306.
- Bae, Y. S., Shim, C. K., Park, C. S. and Kim, H. K. 1995. Synergistic effects of *Gliocladium virens* and *Pseudomonas putida* in the cucumber rhizosphere on the suppression of cucumber Fusarium wilt. Korean J. Plant Pathol. 11:287-291.
- Baker, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 6:263-294.
- Bardin, S.D., Huang, H. C. and Moyer, J. R. 2003. Control of Pythium damping-off of sugar beet by seed treatment with crop straw powders and a biocontrol agent. Biol. Control. 4: 1-8.
- Barnes, G. L., Russel, C. C., Foster, W. D. and McNew, R. W. 1981. *Aphelenchus avenae*, a potential biocontrol agent for root rot fungi. Plant Dis. 65:423-424.
- Bin, L., Knudsen, G. R. and Eschen, D. J. 1991. Influence of an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* on growth and ability of *Trichoderma*

- harzianum* to colonize sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Phytopathology* 81: 994-1000.
- Bowers, J. H. and Locke, J. C. 2000. Effect of botanical extracts on soil populations of *Fusarium* and other soilborne pathogens. *Plant Dis.* 6: 46-49.
- Brion, K. D., Andrew, S. and Weller, D. M. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology* 86:188-194.
- Caubel, G., Jouan, B. Queneherve, P. and Radwan, J. 1981. Lutte contre *Rhizoctonia solani* Kuhn, parasite du cotonnier par le nematode, *Aphelenchus avenae* Bastian. *Rev. Nematol.* 4:93-98.
- Chung, H. S. 1975. Studies on *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten causing root rot of ginseng. *Rep. Tottori Mycol. Inst. (Japan)* 12: 127-138.
- Chung, H. S. 1991. Recent studies on biological control of soil-borne fungal disease in Korea. *OASERD* 12-21.
- Chung, H. S. and Kim, C. H. 1978. Biological control of ginseng root rots with soil amendments. *Proc. 2nd Intl. Ginseng Symp.*, pp. 67-74, Seoul, Korea.
- Chung, Y. R., Ohh, S. H., and Chung, H. S. 1989. Antagonistic activity of *Streptomyces* species against *Fusarium solani* causing ginseng root rot. *Kor. J. Microbiol.* 27:56-62
- Cubeta, M. A. and Echandi, E. 1991. Biological control of *Rhizoctonia* and *Pythium* damping-off of cucumber: an integrated approach. *Biol. Control* 1: 227-236.
- Dandurand, L. M. and Knudsen, G. R. 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. *Phytopathology* 83: 265-270.
- Dijksterhuis, J. Sanders, M., Gorris, L. G., and Smid, E. J. 1999. Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *J. Appl. Microbiol.*

86: 13-21.

- Duffy, B. 2000. Combination of penicycuron and *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 for integrated control of Rhizoctonia root rot and take all of spring wheat. *Crop Protection* 19:21-25.
- Dunne, C., Mienne-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D. N. and O'Gara, F. 1998. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium* mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathol.* 47:299-307.
- Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28:719-725.
- Ferris, H. and Zheng, L. 1999. Plant sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *J. Nematol.* 31:241-263.
- Freckman, D. W. and Caswell, P. C. 1985. The ecology of nematode in agroecosystems. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23:275-296.
- Glick, B.R., Patten, C. L., Holguin, G. and Penrose, D. M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London
- Griffiths, B. S. and Bardgett, R. D. 1997. Interactions between microbe-feeding invertebrates and soil microorganisms. In: *Modern Soil Microbiology* ed. by J. D. van Elsas, J. T. Trevors and E. M. H. Wellington, pp. 165-182. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y. and Dinor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91:621-627.
- Harman, G.E., Chet, I. and Baker, R. 1980. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. *Phytopathology* 71:569-572.
- Hirai, T. 1977. Action of antiviral agents, p. 285-306. In J. G. Horsfall and E. B. Cowling (eds.), *Plant Disease. An Advanced Treatise*, vol. 1. Academic Press, New York.
- Hofte, M., Boelens, J. and Verstrete, W. 1991. Seed protection and promotion of

- seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strains 7NSK2 and ANP15. *Soil Biol. Biochem.* 23:407-410.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87:4-10.
- Hubbard J. P., Harman, G. E. and Hadar, Y. 1983. Effect of soil borne *Pseudomonas* spp. on the biological agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. *Phytopathology* 73:655-659.
- Hussey, R. S. and Roncadori, R. W. 1981. Influence of *Aphelenchus avenae* on vesicular-arbuscular endomycorrhizal growth response in cotton. *J. Nematol.* 13:48-52.
- Ishibashi, N., Choi, D-R. and Tanaka, K. 1988. Possible integrated control of soil pests by mixed application of fungivorous and entomogenous nematodes with chemicals. *The 5th International Congress of Plant Pathology*: 157 (Abstr.)
- Jatala, P. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:453-489.
- Jeon, Y. H., Chang, S. P, Hwang, I. and Kim, Y. H. 2003. Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13:881-891.
- Jeong, M. J., Park, C. S. and Kim H. K. 1993. Compatibility and synergism of *Gliocladium virens* and *Pseudomonas putida* and their improved competitive potential with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Korean J. Plant Pathol.* 9:12-18.
- Jetiyanon, K. and Kloepper, J. W. 2002. Mixture of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control* 24:285-291.
- Jun, O. K. and Kim, Y. H. 2004. *Aphelenchus avenae* and antagonistic fungi as biological control agents of *Pythium* spp. *Plant Pathol. J.* 20:271-276.
- Jung, Y. R., Ohh, S. H. and Park, C. S. 1980. Studies on microbial ecology and biological control. *Research Report on Korean Ginseng, Korea Ginseng and*

- Tobacco Research Institute. Pp. 23-46.
- Kaiser, W. J., Hannan, R. M. and Weller, D. M. 1989. Biological control of seed rot and pre-emergence damping-off of chickpea with fluorescent pseudomonads. *Soil Biol. Biochem.* 21:269-273.
- Katan, T., Elad, Y. and Yunis, H. 1989. Resistance to diethofenocarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 38:86-92.
- Ketkar, C. M. and Ketkar M. S. 1990. Versatile neem a source for plant protection. *Proc. Symp. Botanical Pesticides in IPM Rajahmundry*, 118-124.
- Khan, A. M., Alam, M. M., and Saxana, S. K. 1974. Mechanism of the control of plant parasitic nematodes as a result of the application of oil cakes to the soil. *Indian J. Nematol.* 4:93-96.
- Kharbanda, P. D., Yang, J., Beatty, P., Jensen, S., and Tewari, J. P. 1999. Biocontrol of *Leptosphaeria maculans* and other pathogens of canola with *Paenibacillus polymyxa* PKB1. *Proc. 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.*
- Kim, D.-G. 2001. Occurrence of root-knot nematodes on fruit vegetables under greenhouse conditions in Korea. *Res. Plant Dis.* 7:69-79.
- Kim, D.-G., Choi, D.-R., and Lee, S. B. 2001. Effects of control methods on yields of oriental melon in fields infested with *Meloidogyne arenaria*. *Res. Plant. Dis.* 7:42-48.
- Kim, H. K., Kim, K. D. and Jee, H. J. 1991. Enhanced suppression of red-pepper Phytophthora blight by combined applications of antagonist and fungicide. *Korean J. Plant Pathol.* 7:221-225.
- Kim, Y. H. 1994. Effects of *Aphelenchus avenae* on suppression of soilborne diseases of ginseng. *Korean J. Plant Pathol.* 10:319-324.
- Kim, Y. H., Lee, J. H., Ohh, S. H., Yu, Y. H. and Lee, I. H. 1993. Ginseng growths in abolished ginseng fields and factors affecting the ginseng growth. *Korean J. Ginseng Sci.* 17:45-51.
- Kim, Y. H., Yu, Y. H. and Oh, S. H. 1996. Screening for antagonistic natural materials against *Alternaria alternata*. *Korean J. Plant Pathol.* 12:68-71.

- Kim, Y. K. 1995. Biological control of phytophthora blight of red pepper by antagonistic *Bacillus polymyxa* 'AC-1'. Seoul Nat'l Univ. Ph. D. Thesis. 78 pp.
- Klement, Z., Kiraly, J. and Pozsar, B. I. 1966. Suppression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following inoculation with a saprophytic bacterium. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1 : 11-18
- Kwon, T. Y., Jung, K. C., Park, S. D., Sim, Y. g., and Choi, B. S. 1998. Cultural and chemical control of root-knot nematodes, *Meloidogyne* sp. on oriental melon in plastic film house. *RDA J. Crop Prot.* 40:96-101.
- Lee, E. J., Lee, H. J., Park, K. S. and Kim, C. H. 1990. Studies on biological control of Phytophthora blight of red-pepper IV. Performance of antagonistic agents in field under polyethylene filmhouse. *Korean J. Plant Pathol.* 6:58-64.
- Lee, J. K. 2003. Occurrence, ecology and control of root-knot nematodes under greenhouse cultivation system. Ph. D. Thesis. Chungnam National University, Taejon, Korea.
- Lee, J. T., Bae, D. W., Park, S. H., Shim, C. K., Kwak, Y. S., and Kim, H. K. 2001. Occurrence and biological control of postharvest decay in onion caused by fungi. *Plant Pathol. J.* 17: 141-148.
- Lee, M. G., and Park, G. J. 1993. Studies on biological control of plant pathogenic microorganisms. Research Report on Korean Ginseng. Korea Ginseng and Tobacco Research Institute. Pp. 449-508.
- Lee, Y. H., Shim, G. Y., Lee, E. J. and Mew, T. W. 1990. Evaluation of biocontrol activity of fluorescent pseudomonads against some rice fungal disease in vitro and greenhouse. *Korean J. Plant Pathol.* 6:73-80.
- Lin, H.C., Ding, H. Y., Ko, F.N., Teng, C.M. and Wu, Y.C. 1999. Aggregation inhibitory activity of minor acetophenones from *Paeonia* species. *Planta Medica* 65:595-599.
- Mavingui, P. and Heulin, T. 1994. In vitro chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 26:801-803.



- Miyazawa, M., Maruyama, H. and Kameoka, H. 1983. Essential oil constituents of 'Moutan Radicis Cortex' *Paeonia moutan* SIMS. (= *P. suffruticosa Andrews*). Agric. Biol. Chem. 47:2925-2927.
- Miyazawa, M., Maruyama, H. and Kameoka, H. 1984. Essential oil constituents of 'Paeoniae Radix' *Paeonia lactiflora* Pall. (= *P. albiflora* Pall.). Agric. Biol. Chem. 48:2847-2849.
- Moon, B. J., Chung, H. S. and Park, H. C. 1995. Studies on antagonism of *Trichoderma* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* V. Biological control of Fusarium wilt of strawberry by a mycoparasite, *Trichoderma harzianum*. Korean J. Plant Pathol. 11:298-303.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. of Phytopathol. 23: 23-54.
- Park, C. S. 1994. Impact of rhizosphere competence of biocontrol agent upon the disease suppression and plant growth promotion. Proc. Int. Symp. On Biological Control of Plant Diseases. pp. 27-49, Suwon, Korea.
- Park, D. 1960. Antagonism—the background of soil fungi. In: The Ecology of Soil Fungi. ed. by Parkinson, D. and Waid, J.S., pp.148-159. Liverpool University Press, Liverpool, U.K.
- Park, S. D., Kwon, T. Y., Jun, H. S., and Choi, B. S. 1995. The occurrence and severity of damage by root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in controlled fruit vegetable field. RDA J. Agric. Sci. 37:318-323.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A. and Harvala, C. 2003. Volatile metabolites from *Salvia fructicosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. J. Agric. Food Chem. 11:3294-3301.
- Rao, M. V. and Ramopando, S. S. 1993. Neem research in Andhra Pradesh. World Neem Conference Souvenir organized by Indian Society of Tobacco Science, CTRI Rajahmundry (A. P.) India. 25-29.
- Rhodes, H. L. and Linford, M. B. 1959. Control of *Pythium* root rot by the nematode *Aphelenchus avenae*. *Plant Dis. Rep.* 43:323-328.
- Rosado, A. S. and Seldin, L. 1993. Production of a potentially novel anti-microbial

- substance by *Bacillus polymyxa*. World J. Microbiol. Biotechnol. 9: 521-528.
- Schaad, N. W. 1988. Gram-positive bacteria, C. Bacillus. Pages 120-127 in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Schippers, B., Bakker, A. W. and Bakker, P. A. H. M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annu. Rev. Phytopathol. 25:339-358.
- Seldin, L., de Azevedo, F. S., Alviano, D. S., Alviano, C. S., and de Freire Bastos, M. C. 1999. Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic micro-organisms. Lett. Appl. Microbiol. 28: 423-427.
- Shishido, M., Massicotte, H. B., and Chanway, C. P. 1996. Effect of plant growth promoting *Bacillus* strains on pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection. Ann. Bot. 77:433-441.
- Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y. and Barker, R. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from Fusarium-suppressive soil. Phytopathology 74:259 (Abstr.)
- Timmusk, S. and Wagner, E. G. H. 1999. The Plant growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. Mol. Plant Microbe Interact. 12:951-959.
- Upadhyay, R. S. and Rai, Bharat. 1988. Biocontrol agents of plant pathogens: Their use and practical constraints. In: Biocontrol of Plant Diseases, Vol. 1, ed. by K. G. Mujerjii and K. L. Garg, pp. 15-36. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- USDA. 1999. Commercial Biocontrol Products for Use Against Soilborne Crop Diseases. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center.
- Walker, G. E. 1984. Feeding trials of *Aphelenchus avenae* on soil bacteria and

- actinomycetes. *Plant Soil* 78:431-432.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
- Wilhelm, S. 1951. Effect of various soil amendments on the inoculum potential of the verticillium wilt fungus. *Phytopathology* 41:684-690.
- Xi, K., Stephens, J. H. G. and Verma, P. R. 1996. Application of formulated rhizobacteria against root rot of field pea. *Plant Pathol.* 45:1150-1158
- Yeom, J. R. and Park, C. S. 1995. Enhancement of plant growth and suppression of damping-off of cucumber by low temperature growing *Pseudomonas fluorescens* isolates. *Korean J. Plant Pathol.* 11:252-257.
- Yu, Y. H. 1987. Root rot disease of *Panax ginseng* and their control in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 3:318-319.
- Yu, Y. H. and Ohh, S. H. 1993. Research on ginseng diseases in Korea. *Korean J. Ginseng Sci.* 17: 61-68
- Zhu, Y.P. 1998. Chinese Materia Medica. OPA, Amsterdam.
- 김홍진, 박규진, 이순구, 이종화. 1987. 인삼 연작 장애의 생물학적 방제 연구. 인삼연구보고서 (재배분야: 환경 및 육종편), pp. 3-141. 한국인삼연구소.
- 박규진, 김영호, 박은경, 김동성. 1995. 미생물제에 의한 잔디의 토양전염병 방제 효과. *식물병과 농업* 1:19-29.
- 신동범, 小林紀彦, 이준탁. 1994. 길항미생물에 의한 시설재배 딸기 눈마름병의 생물학적 방제. *한식병지* 10:112-118.
- 조종택, 손석련, 문병주. 1992. 길항세균 *Pseudomonas gladioli*와 유기물 첨가에 의한 덩굴쪄김병의 억제효과. *한식병지* 8:8-13.
- 지형진, 남충구, 김충희. 1988. 고추역병에 대한 생물학적 방제연구 I. 길항균 분리 및 실내와 온실에서의 역가검정. *한식병지* 4:305-312.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.