

최 종
연구보고서

GOVP1200609910

결구상추의 균핵병과 밑둥썩음병 방제를 위한
엽면살포제 및 종자처리제 미생물 농약개발

Development of New Biofungicide and Seed Coating Technique
for Bottom rot and Sclerotinia rot of Crisphead Lettuce

연구기관

동아대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “결구상추의 균핵병과 밀둥썩음병 방제를 위한 엽면살포제 및 종자처리제 미생물 농약개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 28일

주관연구기관명 : 동아대학교

총괄연구책임자 : 문 병 주

세부연구책임자 : 정 순 재

세부연구책임자 : 이 진 우

연 구 원 : 김 현 주

연 구 원 : 박 종 영

연 구 원 : 백 정 우

연 구 원 : 이 광 열

연 구 원 : 전 옥 주

요 약 문

I. 제 목

결구상추의 균핵병과 밀둥썩음병 방제를 위한 엽면살포제 및 종자처리제
미생물 농약개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1992년 UN 환경개발회의 리우 선언 이후 지구 환경 보호를 위한 노력과 WTO가 창립되면서 환경과 무역을 연계시킨 그린라운드가 진행되면서 농업도 환경친화적 농업으로의 전환이 시급해졌다. 특히, 화학 농약 사용량의 제한 및 잔류허용량 강화로 저독성, 저약량 제품 또는 생물농약의 개발이 필요하게 되었는데, 국내에서도 최근 친환경농업 육성 5개년 계획의 수립으로 화학농약 사용량을 2005년도까지 원제 기준으로 30%를 감소시키고 저농약 재배로 친환경 농업 재배 면적을 확대시키는 친환경농업 구현을 계획하여 실행하고 있다(농림부, 2001). 따라서, 현재 국내에서는 미생물 농약에 대한 관심이 크게 일어나 많은 연구자와 벤처기업 등에서 연구가 진행되고 있으며, 생물 농약의 개발과 보급은 필수가 되어 이는 앞으로도 계속 가속화될 전망이다.

현재 전세계 미생물농약시장은 앞으로도 고속 성장할 것으로 예상되나, 국내에서 개발되어 등록, 시판되고 있는 미생물농약은 극히 미흡한 상태이고 이에 이용되는 균주의 특허문제 등 많은 문제가 산적해 있지만 우리나라 실정에 맞는 균주의 선발과 이를 이용한 미생물농약 개발 및 정확한 방제 방법 확립으로 품질은 물론이며 수량을 향상시키는 친환경농업을 일반화하는데 본 연구의 목적이 있다.

우리나라의 결구상추 시설재배는 하우스내의 다습조건으로 인해 밀둥썩음병(*Rhizoctonia solani*)이 1차 발생하면 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)과 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)이 2차 발생하여 그 피해가 더욱 심해지고 결구상추의 수확량과 품질을 저하시켜 농민들에게 많은 어려움을 주고 있다.

특히, 결구상추는 잎을 생식하는 건강채소이므로 화학농약에 의존할 수가 없고, 지금까지 결구상추 밀둥썩음병과 균핵병 방제용으로 공시된 화학약제가 없어 생물학적 방제로서 농작물을 보호하고자 한다.

이에, 본 연구에서는 항진균성 길항세균인 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 및 *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주를 이용하여 결구상추 밀둥썩음병 방제용 엽면살포제 및 종자처리제를 개발하고, *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 균주로는 균핵병 엽면살포제 개발에 이용하여 환경친화적인 병 방제용 미생물농약을 개발하고 이를 실용화하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1 세부과제 : 병원균과 길항균의 특성 및 미생물농약의 병방제효과 검정

- 결구상추 포장의 토양과 건전식물체로부터 이미 분리된 길항균 외 항균활성이 높은 길항균의 지속적 분리
- 배지상에서 길항효과 검정
- 병원균과 길항균의 배양적 특성 검정 및 동정
- 제2, 3세부과제에서 개발된 제제의 유묘와 생육상내 방제효과 검정
- 제2, 3세부과제에서 개발된 제제의 유묘와 온실내 방제효과 검정
- 개발제제의 포장적용시험
- 개발제제의 자연발생 농가실증시험

제 2 세부과제 : 밀등썩음병 방제용 종자처리 미생물농약 제조기술확립

- 항균활성물질 대량생산을 위한 최적조건 확립 및 대량배양용 배지선발
- 종자처리를 위한 전달매체개발
- 종자처리제의 최적화실험
- 종자처리제 제조기술확립 및 제제화
- 종자처리제의 근권정착력 및 활성검정
- 종자처리제의 안정성 및 경시적 유효도 검정

제 3 세부과제 : 균핵병 방제용 엽면살포 미생물농약 제조기술확립

- 균핵병 방제용 길항균의 대량배양을 위한 최적조건 확립 및 대량배양용 배지선발
- 엽면살포제를 위한 전달매체개발
- 엽면살포제의 최적화실험
- 엽면살포제 제조기술확립 및 제제화
- 엽면살포제의 엽권정착력 및 활성검정
- 엽면살포제의 안정성 및 경시적 유효도 검정
- 엽면살포제의 우수제형 최종 선발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

제 1 연구 목표 : 결구상추 밀둥썩음병 방제용 미생물농약 개발
연구책임자 : 제 1 세부과제 (정 순 재)
제 2 세부과제 (이 진 우)

1. 유용미생물의 탐색 및 동정

가. 밀둥썩음병 발생 및 발병을 조사 경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 플라스틱 하우스에서 2003년 10월에서 11월 사이에 발생한 밀둥썩음병의 평균 이병주율은 5.3%이었다.

나. 밀둥썩음병 병원균의 분리 및 동정 병든 결구상추의 잎 아래 밀둥부위에서 분리하여 병원성이 강한 것으로 확인된 PY-1 균주를 공식 병원균으로 선발하고 동정한 결과, *Rhizoctonia solani* AG1 (IB)로 동정되었다.

다. 병원성 검정 *R. solani* PY-1 균주의 병원성 검정을 위한 접종원 및 최적처리량과 농도 선발에서 플러그포트의 유묘 검정에서는 접종원 군사조각부유액 1 ml ($A_{550}=0.8$)을, 생육실 포트검정의 성체식물에는 군사조각부유액 10 ml ($A_{550}=1.0$)을, 그리고 플라스틱하우스 토경재배에서는 접종원인 WRSP(밀기울: 미강: 톱밥: PDB배지=30 g: 10 g: 10g: 100 ml, w/w/w/v)배지 40 ml 을 선발하였다.

라. 우수길항균 선발 결구상추의 밀둥부위 뿌리 및 근권 토양으로부터 분리된 702 균주 중 병원균 PY-1 균주에 대해 군사생육저지효과를 지닌 7균주를 선발하여 유묘와 성체식물에서 방제효과를 검정하고 이들을 다시 종자처리한 유묘에서의 생육촉진효과를 검정한 결과, BW-13 균주는 밀둥썩음병 방제용 엽면살포제 개발에, LY-11 균주는 종자처리 미생물농약 개발에 이용할 우수 길항균으로 최종 선발되었다.

마. **선발 길항 세균의 동정** BW-13 균주와 LY-11 균주의 생화학적, 형태적 특성 및 16S rDNA sequence analysis를 통해 동정한 결과, *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13과 *Pseudomonas aeruginosa* LY-11로 각각 최종 동정, 명명되었다.

2. 밀등씩음병 방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립

가. *S. maltophilia* BW-13 균주의 최적배양조건 확립

삼각플라스크배양 BW-13 균주는 NB배지에서 20시간 배양체에 $A_{550}=1.6$ 에 도달하였고 48시간이 되어도 변화없이 OD값이 1.3으로 생장이 지속되었다. 생육온도는 35℃에서 가장 세균밀도가 높았으며, 증식 최적 pH의 범위는 6~8이었다. BW-13 균주의 생육 및 길항력에 가장 효과적인 탄소원과 질소원은 제빵개량제(3.0%)와 Yeast extract(0.5%)로 선발되었다. 그러나, 제빵개량제에는 이미 질소원으로 대두유 12%가 함유되어 있기 때문에 발효배양에서는 질소원을 따로 선발하지 않기로 하였다. 따라서, 기초배지에 3% 제빵개량제를 첨가한 제빵개량제배지가 길항균 증식과 항생물질에 의한 병원균의 군사생육저해가 높아 대량배양용 배지로 1차 선발되었다.

발효기 배양 대량배양용 제빵개량제배지에 BW-13균주를 배양(450 rpm, 35℃, 2.0기압, pH 6~7)한 후 생균수를 조사한 결과, 배양 48시간과 72시간 후에 각각 4.4×10^{22} , 3.1×10^{22} cfu/ml로 현저히 높았다. 하지만, 제빵개량제배지에 우수 저분자탄소원으로 선발된 Sucrose(1%)를 첨가하여도 세균밀도의 증진효과는 없었다.

대량배양용배지 선발 플라스크 및 발효기 배양 결과로 기초배지(K_2HPO_4 1.25%, KH_2PO_4 0.38%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%)에 3.0% 제빵개량제를 첨가한 제빵개량제배지를 *S. maltophilia* BW-13 균주의 대량배양용 배지로 최종 선발하였다.

나. ***Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 균주를 이용한 엽면살포제 제형화** 대량배양용 제빵개량제배지 4 L에 BW-13균주를 접종하고 72시간 발효기 배양 (450 rpm, 35℃, 2.0기압, PH6~7)한 다음 각종 천연물 고분자(옥수수 전분, 변성전분, 타피오카전분, 메주가

루)을 혼합하여 1차 제제 7종과 2차 제제 3종 등 총 10종(수화제 9종, 액상수회제 1종)으로 제형화하였다.

3. *S. maltophilia* BW-13 균주를 이용한 엽면살포제 방제효과

가. **생육실포트 검정** BW-13 균주로 종자코팅제 개발을 진행하던 중 엽면살포제로서의 가능성이 타진되어 연구수행 내용과는 별도로 엽면살포제를 개발하고 밀등썩음병에 대한 방제효과를 생육실 포트 검정하였다. 1차 제제 7종 중 선발된 BW13-A제제와 2차 제제 3종을 추가하여 생육실포트에서 방제효과를 비교 검정한 결과, BW13-A, BW13-I 및 BW13-H 제제가 각각 76.6, 75.6, 71.8%로서 유의차 없이 방제가가 높았고, 화학농약 펜시쿠론의 방제가 50.6%보다 훨씬 효과적이어서 생육실 포트재배의 밀등썩음병 방제용 엽면살포제로 *S. maltophilia* BW-13 균주를 이용하여 제조한 수화제형 BW13-A 및 BW13-I 제제를 최종 선발하였다.

나. **플라스틱하우스 토경재배 검정** 생육실 포트검정에서 선발된 BW-13 균주의 수화제형 BW13-A와 BW13-I 제제를 플라스틱하우스내 토경재배한 결구상추에서 밀등썩음병에 대한 방제효과를 검정한 결과, 수화제형 BW13-A 제제가 방제가 75.7%로 가장 우수하였으며, 다음으로는 69.8%의 BW13-I 제제이었다. 화학농약 펜시쿠론은 56.3%로 낮은 방제가를 보였다. 따라서, 토경실험 결과 밀등썩음병 방제용 엽면살포제로서 수화제형 BW13-A제제가 BW13-I 제제에 비하여 효과적인 것으로 확인하였다.

다. **엽면살포제 수화제형 BW13-A 제제의 저장 안정성** 밀등썩음병 방제용 엽면살포제 수화제형 BW13-A 제제의 온도차이에 따른 저장 안정성을 조사한 결과, 초기 세균수는 제제 1 g 당 1.8×10^{14} cfu/ml에서 7개월이 경과하는 동안 4℃에서는 1.2×10^{13} cfu/ml과 실온에서는 1.6×10^{13} cfu/ml으로 매우 높은 수치의 세균수가 유지되었다. 따라서, 본 미생물 제제의 안정성은 매우 높으며, 냉장보관 혹은 실온에서의 보관에 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다.

4. 밀둥썩음병 방제용 종자처리 미생물농약 제조기술확립 및 방제효과 검증

가. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주에 의한 우수코팅종자 선발 종자처리 미생물농약 개발용으로 선발된 LY-11 균주를 전달매체(AF300, clay, zeosil, diatomaceous earth 325)와 함께 종자에 피막화하고 5종의 코팅종자를 제조하였다. 이들의 출아율을 조사한 결과, C와 E 코팅종자의 발아율이 각각 78.9, 71.1%로 대체로 높았으나, 비코팅종자의 발아율 92.2%보다는 낮고, 반복 실험에 따른 오차가 많아 효율적인 새로운 종자코팅방법이 요구되었다.

나. *P. aeruginosa* LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅기술 개발 LY-11 균주를 NB배지에 24시간 진탕배양(28℃)한 후 세균부유액을 A₅₅₀=1.0으로 조정하여 멸균된 sodium alginate solution과 혼합한 배양액을 10 ml용 주사기를 이용하여 종자에 피막시켜 0.1 M calcium chloride 용액에 떨어뜨려서 구형으로 될때까지 방치하여 alginate 코팅종자를 제조하였다.

다. Aalginate 종자코팅제의 방제효과

유묘 및 플라스틱하우스 포트 검증 LY-11 균주를 이용한 alginate 코팅제제는 각각 모잘록병(유묘검정)에서 70.4%, 밀둥썩음병(플라스틱하우스 포트검정)에서 85.4%의 방제가를 보여 *P. aeruginosa* LY-11 균주를 이용하여 제조한 alginate 코팅종자가 모잘록병과 밀둥썩음병에 모두 효과적이었다.

라. alginate 코팅종자의 근권 및 엽권정착력 및 안정성 검증

근권 및 엽권정착력 검증 *P. aeruginosa* LY-11R 균주를 이용한 alginate 코팅종자를 파종하고 유묘(파종 후 4주)에서 존재하는 생균수를 조사한 결과, 밀둥부위에서 잎중간부분(6.8×10^7 cfu/ml)과 밀둥에서 뿌리부분(1.3×10^7 cfu/ml)이 가장 높았으며 뿌리의 중간에서 끝부위는 1.1×10^6 cfu/ml로 약간 감소하였다. 그러나 잎의 중간에서 끝부위 부분은 밀둥부분에서 뿌리부분보다 낮았으며, 잎 끝부위는 LY-11 균주가 조사되지 않았다. 중간

성체식물(과종후 6주)에서는 전반적으로 유묘와 동일한 경향이였으며, 성체식물(과종후 8주)에서는 밑둥부위의 일부분과 뿌리부분이 각각 3.2×10^6 , 1.8×10^5 cfu/ml로 세균수가 가장 많았으며 뿌리의 중간 부위까지는 유사하였으나, 뿌리 끝부분은 약간 감소하였다. 그러나 잎에서는 잎의 밑둥부위를 제외하고는 LY-11 균주가 관찰되지 못하였다.

저장 온도에 따른 안정성 검정 온도별(4℃, 15℃, 25℃, 35℃, 40℃)로 밀봉하거나 밀봉하지 않고 7일간 보관한 코팅종자의 상태를 조사한 결과, 15℃와 25℃는 종자가 자연적으로 발아되었으며, 35℃와 40℃에서는 alginate의 건조현상이 심하게 일어나 부적합하였다. 4℃에서도 밀봉하지 않을 경우 일부 건조 및 발아되는 종자가 관찰되므로 최종적으로 4℃에 밀봉 보관하는 것이 가장 효과적이었다. 안정성 검정에서는 4℃에서 7일간 밀봉보관한 alginate 코팅종자내 세균수는 초기에 4.5×10^7 cfu/ml였으나 1일째는 5.2×10^6 cfu/ml, 7일째는 2.0×10^7 cfu/ml으로 큰 변화가 없었으며, 50일째 조사한 결과에도 세균수가 안정적으로 지속되었다.

제 2 연구 목표 : 결구상추 균핵병 방제용 미생물농약 개발

연구책임자 : 제 1 세부과제 (정 순 재)

제 3 세부과제 (문 병 주)

1. 유용미생물의 탐색 및 동정

가. 균핵병의 발생 및 발병율 조사 2003년 경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 농가에서 발생한 1, 2월 달의 이병주율은 각각 39.0%, 30.1%로 평균 이병주율 21.9%보다 훨씬 높았고, 3월은 24.2%, 4월과 5월은 매우 낮았다. 2차 조사 시기인 2003년 11월부터 2004년 4월까지의 평균 이병주율은 8.3%로 2003년초에 비하여 현저히 낮아졌다.

나. 균핵병 병원균 분리 및 동정 병든 결구상추로부터 분리한 총 140여 균주 중 병원성이 강한 것으로 확인된 YR-1 균주를 공시하고 형태적 및 배양적 특성을 조사하여 기존의 보고와 비교한 결과, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1로 동정, 명명하였다.

다. 병원성 검정 *S. sclerotiorum* YR-1 균주의 병원성 검정을 위하여 균사조각 부유액을 접종원으로 하여 접종원의 최적처리량과 농도를 선발한 결과, 접종 농도 $A_{550}=0.4$ 또는 0.6에서 40 ml 처리시 50%의 발병을 나타내는 ED_{50} 값에 가까워 이를 최적 접종농도 및 처리량으로 선발하였다.

라. 길항미생물의 분리 건전 결구상추의 밑동부위, 뿌리 및 근권토양으로부터 분리된 702 균주 중 병원균 *S. sclerotiorum* YR-1에 대해 균사생육저지효과가 큰 10균주를 길항세균으로 1차 선발하고 이들 일차 길항세균에 의한 방제효과를 생육실 포트검정하여 3균주 (A-2, A-7, RH-4)를 2차 선발하고 2차 선발 균주와 추가공시된 3균주의 방제효과를 비교하여 최종 선발하였는데, A-7 균주의 방제가가 91.0%로 가장 높았고, Pro-EB-15 균주가 90.1%로 다음으로 높았으나 서로 유의차가 없어 방제가가 다소 높은 A-7 균주를 균핵병 방제용 우수길항균으로 최종 선발하였다.

마. 우수 길항 세균의 동정 균핵병 방제를 위해 최종 선발된 길항세균 A-7 균주의 동정을 위하여 생리학적, 생화학적 특성 및 16S rDNA와 gyrase A 유전자의 염기서열을 분석한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 동정, 명명되었다.

2. 균핵병 방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립

가. *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 최적배양 조건 확립

삼각플라스크배양 A-7 균주는 배양 14시간째에 최대값인 $A_{550}=1.0$ 에 도달하였으며, 14시간 이후에는 점차 감소하며 24시간 이후에 급격히 감소하였다. 증식 최적온도는 25℃로 확인되었으며, 생육 최적 pH는 6과 7로 확인되었다. A-7 균주의 생육 및 길항력에 가장 효과적인 탄소원과 질소원은 현미유(3%)와 Yeast extract(0.5%)로 선발되었다. 따라서, 기초배지에 현미유 3.0%, Yeast extract 0.5%를 첨가한 현미유 배지를 *B. amyloliquefaciens* A-7균주의 플라스크배양에서 대량배양용 배지로 1차 선발하였다.

발효기 배양 플라스크 배양에서 선발된 대량배양용 배지인 현미유 배지를 발효기에 넣고, A-7 균주를 발효기 배양(30℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 7)하여 생균수를 조사한 결과, 배양 72시간과 96시간 배양에서 각각 56×10^{17} , 73×10^{17} cfu/ml로 가장 높게 나타났다. 따라서, 발효기에서 길항세균을 배양하는 기간은 세균밀도가 가장 높은 72시간으로 정하였다.

대량배양용배지 선발 이상 플라스크 및 발효기 배양 결과로 기초배지(K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0005%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0005%, $FeSO_4$ 0.0025%)에 현미유 3.0%, Yeast extract 0.5%를 첨가한 현미유 배지를 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 대량배양용 배지로 최종 선발하였다.

나. *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용한 엽면살포제 제형화

7 L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 A-7 균주를 접종한 배양액에 전달매체인 옥수수 전분, 타피오카 전분, 변성전분, 메주가루, 올리브유, Fructose등을 혼합하여 1차에서

4차까지 총 수화제형 21종을 제조하였다. 제형화를 달리하고자 5차, 6차에서는 전달매체를 찰옥수수 전분, 썬 크리미, 썬 텐더, 썬 프리젤, 썬 사이즈, 썬 캡, 썬 슈퍼젤, 썬 배터, 제오 실, 변성전분 등을 이용하여 수화제형 8종과 액상수화제 2종을 제조하였다.

3. *B. amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용한 엽면살포제 방제효과

가. 생육실 포트검정 1차에서 6차까지 제조한 미생물제제의 생육실 포트검정 결과 방제가 가장 높았던 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용하여 제조한 액상수화제형 A7-2 제제 및 수화제형 A7A 제제를 균핵병 방제용 엽면살포제의 우수제형으로 최종 선발하였다.

나. 플라스틱하우스 토경재배 검정 플라스틱하우스 포트 검정에서 최종선발된 액상수화제형 A7-2제제 및 수화제형 A7A제제와 방제효과가 높았던 수화제형 A7-4 및 A7W제제 2 종류를 추가로 공시하여 플라스틱하우스내 토경재배한 결구상추에서 균핵병에 대한 방제효과를 검정한 결과, A7-2제제가 살포 20일 쯤의 방제가가 80.5%로 가장 우수하였으며, 다음으로는 A7A제제가 79.1%의 방제가를 보였다. 그러나 이들은 서로 간에 유의차는 없었으나 대조구인 베노밀 처리구 75.2%보다는 유의적으로 높았다. 따라서, A7-2제제와 A7A 제제는 생육실 포트검정에서와 마찬가지로 플라스틱하우스내 토경재배에서도 균핵병 방제용으로 효과적인 것으로 확인되었다.

다. 밀등썩음병과 균핵병의 동시방제 효과 최종선발된 밀등썩음병 방제용 엽면살포제인 수화제형 BW13-A제제와 균핵병 방제용 엽면살포제인 액상수화제형 A7-2제제를 포트 재배한 결구상추에 분무살포하여 밀등썩음병과 균핵병을 동시방제하기 위해 생육실 포트검정한 결과, A7-2 제제의 단독처리가 2종류의 병원균 혼합접종에 대해 81.3%의 방제가로 2종류 제제의 혼합처리 70.6%보다는 높았으나 유의차는 없었다. 그러나, BW13-A제제의 단독 처리는 2종류의 병원균 즉, 밀등썩음병과 균핵병의 혼합 접종에 대해 방제가가 높지 않았으므로 A7-2제제 만으로도 두가지 병원균에 대한 방제는 가능할 것으로 판단되었다.

라. 미생물농약의 자연발생 농가실증시험

2004년 경상남도 의령군 재배포장에서의 방제효과 2004년 10월 말경 균핵병이 자연발생하기 시작한 결구상추의 경상남도 의령군 재배포장에서 수화제형 A7A제제 및 액상수화제 A7-2제제의 방제가를 베노밀 처리와 비교하여 검정한 결과, A7-2 및 A7A제제 100배 희석 처리구와 베노밀처리구간에는 유의차가 없었고 무처리구의 60.0% 이병주율에 비하여 각각 방제가가 84.7%, 84.3%, 87.0%이었다. 한편 A7-2제제 500배 희석처리에서도 70.3%의 방제가를 보였다. 실용적인 면에서 수화제 A7A제제는 약하지만 약흔이 발생되었으나 액상수화제인 A7-2제제는 이러한 약흔의 단점을 보완하면서도 500배 처리에서도 방제가가 높아 산업화의 가능성이 높은 제제로 확인되었다.

2005년 김해시 대동면 재배포장에서의 방제효과 2005년 3월말경 균핵병이 자연발생하기 시작한 경남 김해시 대동면 결구상추의 재배포장의 플라스틱 하우스에서 경남 의령군의 재배포장에서 방제효과가 확인된 A7-2제제를 처리 농도별로 달리하여 제제의 방제효과를 화학농약인 베노밀 처리와 비교, 검정하였다. 그 결과, 무처리의 이병주율이 28.0%로서 A7-2제제 100배 처리가 76.7%의 방제가로 베노밀 처리의 75.0%와 유사하였으며, A7-2제제의 500배에서는 60.7%로 이보다는 낮았다. 그러나, 2005년 대동면 재배지에서의 무처리 발병율이 2004년 의령군에 비하여 현저히 낮았음에도 불구하고 미생물농약 뿐만 아니라, 화학농약에 의한 방제효과도 의령군에 비하여 약간 낮은 경향이였다.

4. A7-2제제의 엽권정착력 검정 및 안정성 검정

토경재배한 결구상추에서의 A7-2제제의 엽권정착력 검정 Rifampicin 저항성 *B. amyloliquifaciens* A-7R 균주를 이용하여 제조한 액상수화제형 A7-2R 제제를 결구상추 잎에 1회 처리한 후 21일 동안 A-7 균주의 생균수를 근권토양, 밀등부위 및 잎 부위에서 측정하였다. 그 결과, 초기 세균수는 2.8×10^{13} cfu/ml 이었으며 경시적으로 약간 감소하였으나 처리 21일째에 근권토양, 밀등부위 및 잎 부위에서는 각각 2.8×10^9 , 1.4×10^9 , 6.8×10^9 cfu/ml로써 A-7균주의 엽권정착력이 장기간 유지되는 것으로 확인되었다. 따라서, A7-2제제 1회 처리 후에도 A-7균주의 엽권정착력이 장기간 유지되는 것은 A7-2제제는

물론 A7A제제의 방제효과가 균핵병 발생 포장에서도 높았던 원인일 것으로 생각되었다.

저장 안정성 검정 선발된 미생물제제 수화제형 A7A제제와 액상수화제형 A7-2제제를 저장 온도 및 저장 기간에 따른 안정성을 조사한 결과, 2003년 10월의 A7A제제 초기 세균밀도는 1.5×10^{18} cfu/ml이었으며, 1년 후 2004년 12월의 4℃와 실온에서의 세균 밀도는 각각 2.0×10^{17} cfu/ml와 7.0×10^{16} cfu/ml이었다. 이는 2005년 9월까지 1년 8개월간 조사되었는데 각각의 세균 밀도는 4.1×10^{14} cfu/ml와 3.2×10^{14} cfu/ml로 초기보다는 낮아졌으나 여전히 높은 밀도의 세균수가 유지되고 있었다. 이때 실온과 4℃ 보관에 따른 세균 밀도 차이는 초기 세균밀도와 별 차이가 없었으나, 3개월째부터는 실온보관에서 10^1 cfu/ml 정도 낮아졌으나 큰 차이는 없었다.

액상수화제 A7-2제제의 경우, 2003년 10월의 초기 세균수가 3.8×10^{18} cfu/ml이었으며, 1년 뒤인 2004년 12월의 4℃와 실온에서의 세균 밀도는 각각 2.8×10^{17} cfu/ml와 4.3×10^{16} cfu/ml로 4℃와 실온 보관에 따른 세균의 밀도 차이가 다소 낮아졌다. 연구가 종료되는 2005년 9월에는 각각 5.9×10^{14} cfu/ml와 5.3×10^{14} cfu/ml로 초기보다는 낮아졌으나 여전히 높은 세균수가 유지되고 있었고 A7A제제보다는 A7-2제제가 다소 높은 세균수로 유지되는 경향이였다. 결과적으로, 선발 미생물제제(A7A, A7-2)의 보관상 안정성에는 문제가 없을 것으로 보여지며, 보관방법은 실온보다는 4℃ 보관이 좋으나 실온에 보관하여도 안정성에는 문제가 없을 것으로 생각된다.

또한, 4℃에서 3개월과 8개월간 4℃에서 보관되어 있었던 A7-2제제를 PDA배지상에서 균핵병원균과 대치배양한 결과, 각각 5.0 mm, 5.3 mm의 저지대를 보였으며, 1년간 보관한 A7-2제제를 농도별로 희석하여 대치배양한 결과 1,000배 희석에서도 4.5 mm 이상의 저지대를 보여 장기간의 보관에도 매우 안정성이 매우 높음을 재차 확인하였다.

제 2 절 활용에 대한 건의

1. 본 연구로부터 탐색 분리된 항진균활성세균인 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주는 결구상추 균핵병 방제용 엽면살포제 미생물농약의 제제화에 최초로 이용되었으며, (주)한국바이오

케미칼에 기술 이전 예정에 있다.

2. 결구상추 밀둥썩음병 방제용인 종자처리제 개발에 이용된 *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주와 엽면살포제 개발에 이용된 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13은 밀둥썩음병 방제에 처음으로 이용되었으므로, 균주 특허 및 미생물농약 제조 관련 특허 출원에 활용된다.

3. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주로부터 생성되는 물질 연구는 본 세균에 의한 항진균 화합물의 보고가 지금까지 알려진 바가 적어 신규화합물일 가능성이 있고, 물질 분리 후 물질특허 출원과 동시에 유기 합성 및 유도체합성을 시도하여 다양한 약제개발 및 생산에 활용될 것이다.

4. 항진균활성물질 중 소분자량 폴리펩타이드는 농약용 또는 의약용 항진균제로의 개발에 이용될 것이다.

5. 지금까지 보고된 연구 또는 국내외 등록된 특허와 전혀 다른 formulation의 구성성분으로 미생물제제가 완성되어 국내특허에 출원예정에 있다.

6. 종자코팅법의 신기술 개발로 국내특허 또는 기술이전으로 활용될 수 있다.

SUMMARY

I. Title

Development of New Biofungicides and Seed Coating Technique for
Sclerotinia rot and Bottom rot of Crisphead Lettuce

II. Purpose and importance of research and development

Development of new biofungicides and seed coating technique using antagonistic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* A-7, *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13, and *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 strain for Sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and Bottom rot caused by *Rhizoctonia solani* on crisphead lettuce

III. Contents and extents of research and development

1. Screening of useful antagonistic bacteria from soils
2. Identification of plant pathogenic fungus and antagonistic bacteria
3. *In vitro* and *In vivo*, antifungal activities of antagonistic bacteria, *B. licheniformis* N1 strain
4. Optimization of culture condition and mass production for *Bacillus amyloliquefaciens* A-7, *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13, and *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 strain.
5. Scale up of the fermentation process
6. Formulations of the biofungicide
7. Control effects of the biofungicides in a growth chamber, a plastic house, and the fields naturally occurred gray mold rot
8. Storage ability of biofungicide under the different conditions

IV. Results and proposal practical use of research

〈 Objective 1 〉

Development of microbial pesticides to control crisphead lettuce bottom rot

1. Isolation and Identification of pathogen and antagonistic bacteria

Occurrence of crisphead lettuce bottom rot

The occurrence of crisphead lettuce bottom rot at Sinban-Ri, Burim-Myeon, Euryeong-Gun of Gyung-Sang Namdo was investigated from October of 2003 to November of the same year. The ratio of average number of diseased plants was 5.3%.

The symptoms of the crisphead lettuce bottom rot include round water-soaking light brown or brown spots on the crown of the plant. When disease became severe, the symptoms were enlarged as irregular lesions and plant leaves became rotten and finally dead as brown blight tissue. The subsequent infection of the plant by sclerotinia and gray mold caused the dramatic yield loss on the crisphead lettuce.

Identification of a causative pathogen

The candidate causative fungi were isolated from the diseased plant tissues and tested for the virulence on the healthy crisphead lettuce. One of the isolate, PY-1, showed the original bottom rot symptom and were identified as *Rhizoctonia solani* AG-1 (IB).

Pathogenicity test

For the pathogenicity test, triturated mycelia-inoculum ($A_{550}=1.0$) of PY-1 isolate was selected as the most effective inoculum showing disease incidence of 51.1% for the mycelial inoculation at pot assay. Otherwise, WSRP media-inoculum (wheat bran, sawdust, rice bran, PDB media) of PY-1 isolate was effectual inoculum showing disease incidence of 61.6% for soil inoculation at the plastic house.

Selection of potential biocontrol agents

A total of 702 bacterial antagonists were isolated from crisphead lettuce plant rhizosphere and tested for in vitro antifungal activity against *R. solani* PY-1. Among initially selected 7 isolates, an isolate BW-13 exhibited the excellent disease suppression activity on seedlings and adult plants of crisphead lettuce. Growth inhibition zone assay against the fungal pathogen also allowed us to select another antagonist LY-11. Plant growth promotion activity was investigated using seedlings of the crisphead lettuce and the isolate LY-11 exhibited the good plant growth promotion activity such as the increase of root length, fresh weight and dry weight. Therefore, the BW-13 and the LY-11 were selected to estimate the potential as microbial pesticide for foliar spray on plants and seed-coating strain of crisphead lettuce seeds, respectively.

Identification of antagonistic microorganism

Based on microscopy, biochemical test and 16S rRNA gene analysis, BW-13 and LY-11 were identified as *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 and *Pseudomonas aeruginosa* LY-11, respectively.

2. Development of biofungicide for bottom rot disease

Optimum culture condition of antagonistic bacteria BW-13

The highest cell density of $A_{550}=1.6$ was obtained by 20 hr cultivation of *S. maltophilia* BW-13 and the density was maintained until 48 hr cultivation without

significant decrease of the OD. The optimum temperature and pH range for the bacterial growth was 35°C and pH 6 ~ 8, respectively.

In flask cultivation experiment

Measurement of bacterial density and assay of antagonistic activity of bacterial culture broth allowed us to select the best carbon source and nitrogen source for mass production of antifungal compounds from the BW-13 strain. Dough-conditioner and yeast extract were finally selected as the best carbon and nitrogen source, respectively. However, since dough-conditioner itself contained 12% of nitrogen compounds, we used dough-conditioner as a major nutrient for bacterial fermentation culture instead of addition of yeast extract.

Establishment of mass-production of antifungal compounds

Therefore, we used a basal salt medium with 3% dough-conditioner for fermentation broth. The bacterial density after 48 hr and 72 hr fermentation under the defined temperature and pH condition was exceptionally high upto approximately 4.4×10^{22} cfu/ml and 3.1×10^{22} cfu/ml, respectively. The addition of 1% of sucrose in the dough-conditioner media did not make a difference in the bacterial density.

Formulation of BW-13 for foliar spray

Various additives such as starches were supplemented into the 4 liter fermentation culture of *S. maltophilia* BW-13 grown under the defined condition. Among 10 different formulations tested, a liquid formulation using suncreamy as an additive exhibited the excellent disease control activity without the toxicity problem. Other formulations also showed good disease control activity but residual marks on the sprayed leaves.

3. Biological control effect of biofungicides

Pot assay at growth chamber

Ten different formulations of BW-13 strain were evaluated for disease control activity against crisphead lettuce bottom rot in pots of plastic house. Formulations such as BW13-A, BW13-I and BW13-H exhibited disease control value of 76.6, 75.6, 71.8%, respectively. This control value was significantly higher than that of chemical fungicide Pencycuron with 50.6% of disease control value. Since BW-13H showed residual marks on treated leaves, liquid formulation BW13-A and BW13-I were finally selected as microbial pesticide to control the crisphead lettuce bottom rot and further tested in plastic house.

Pot assay at a plastic house

The BW13-A and BW13-I exhibited disease control value of 75.7% and 69.8% in plastic house experiment, respectively, while chemical fungicide showed 56.3% disease control value. Therefore, BW13-A was finally selected as a microbial pesticide to control the crisphead lettuce bottom rot.

Storage stability of BW13-A formulation on foliar leaves

Storage of BW13-A at 4°C and room temperature did not significantly affect the number of viable bacteria during 6 months. The number of bacteria was maintained at the level of 1.8×10^{14} cfu/ml (initial), 1.2×10^{13} cfu/ml (4°C) and 1.6×10^{13} cfu/ml (room temperature). Therefore, BW13-A formulation is remarkably stable irrespective of storage temperature.

4. Seed-coating technique for crisphead lettuce bottom rot and its biological control effects

Establishment of seed-coating by *Pseudomonas aeruginosa* LY-11

Seed coating of BW-13 was performed with various coating materials including adhesives, various salt and gelling materials under various culture conditions. Bacterial culture condition did not affect the activity for seed coating and plant growth promotion activity. Although modified starch supergel was selected as a good coating material, seed germination was not satisfactory.

Seed coating of crisphead lettuce seeds with *Pseudomonas aruginosa* LY-11 was performed using carrier AF300, clay, zeosil, diatomaceous earth 325 with various concentrations. Seed germination ratio was 78.9, 71.1% according to carriers but the germination ratio was lower than non-coated seeds. The seed coating process using the material might make a damage on crisphead lettuce seeds.

Alginate coating–seed technique by *P. aeruginosa* LY-11

Seed coating of crisphead lettuce seeds with *Pseudomonas aruginosa* LY-11 was performed with more mild materials such as sodium alginate. The alginate seed coating method was easy and showed good seed germination. Therefore, alginate coating of the seeds was evaluated for disease control activity and plant growth promotion

.

Effect of alginate coating to control the crisphead lettuce bottom rot

Suppression of seedling damping off by *R. solani* in crisphead lettuce was investigated with alginate coating seeds with the LY-11 strain and without the strain in plugpots by artificial inoculation of the pathogen. Disease severity from coating seeds with bacteria was 28.9% and that from uncoated seeds was 97.7%. Thus, disease control value by alginate seed coating with LY-11 strain was 70.4%. Similarly, disease control value of alginate seed coating with LY-11 strain against bottom rot was 85.4%, indicating the excellent seed coating effect of alginate with the strain LY-11.

Colonization of LY-11 from alginate coated seeds on roots and leaves of crisphead lettuce

Colonization of crisphead lettuce plant by LY-11 strain from the alginate coated seeds was estimated from various plant parts. The cfu/g of plant tissues were estimated as 6.8×10^7 and 1.3×10^7 in leaves and shoots of crisphead lettuce plant and was 1.1×10^6 at the root tips. The density of bacteria in shoot tips or tip of the leaf were not detectable. The similar colonization of the bacteria were observed from the 30-days old adult plants and the 50-days old adult plants. The cfu/g of plant tissues in adult plant root tips was maintained as 3.1×10^6 and 1.8×10^5 .

Stability of formulations and coated seeds.

Storage of alginate coated seeds of crisphead lettuce above 15°C induced the seed germination and caused seed drying subsequently reducing seed germination ratio. Since unsealed storage of alginate coated seeds at 4°C also caused seed drying, storage of the seeds at 4°C by sealing was the best to maintain the seed viability. Storage of the seeds at the defined conditions maintained the stable bacterial viability upto 7 days from 4.5×10^7 cfu/ml of bacteria (initial) to 2.0×10^7 cfu/ml of bacteria (7 days). The number of viable bacteria was not decreased upto 50 days storage at the defined condition.

«Objective 2»

Development of microbial pesticides to control crisphead lettuce sclerotinia rot

1. Isolation and Identification of pathogen and antagonistic bacteria

Occurrence of crisphead lettuce sclerotinia rot

The crisphead lettuce sclerotinia rot at Sinban-Ri, Burim-Myeon, Euryeong-Gun of Gyung-Sang Namdo was significantly occurred from January of 2003 to May of the same year. The ratio of average number of diseased plants were 21.9%. The same disease was also occurred from November of 2003 to April of 2004. The symptoms of the crisphead lettuce sclerotinia rot include irregular water-soaking brown lesions on the crown of the plant and progressed into leaves. When disease became severe, the leaves became rotten and finally dead as brown blight tissue. Fungal mycelia and sclerotium were observed from the diseased tissues. The subsequent infection of the plant by gray mold caused the dramatic yield loss on the crisphead lettuce.

Identification of a causative pathogen

A total of 140 isolates of the candidate causative fungi were isolated from the diseased plant tissues and 80 of them were identified as *Sclerotinia sclerotiorum*. One of the isolate YR-1 with the highest pathogenicity on crisphead lettuce plant was selected and described in detail morphologically and culturally in this report.

Pathogenicity test

The pathogenicity test of the isolated strain YR-1 was performed by the defined condition in this report. the most suitable inoculum quantity of YR-1 strain

was selected as the mycelial suspension of $A_{550}=0.8$, 40 ml showing disease incidence of 94% at the whole plant.

Identification of antagonistic microorganism

A total of 702 bacterial antagonists were isolated from crisphead lettuce plant rhizosphere and tested for in vitro antifungal activity against *S. sclerotiorum* YR-1. Among initially selected 6 isolates, A-7 and Pro-EB-15 exhibited the excellent disease suppression activity (91% and 90.1%, respectively) on seedlings and adult plants of crisphead lettuce. Since A-7 strain showed stable activity, the A-7 was finally selected to estimate the potential as microbial pesticide to control crisphead lettuce sclerotinia rot.

Based on microscopy, biochemical test and molecular analysis of 16S rRNA gene and *gyrA* gene, the isolate A-7 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*.

2. Development of biofungicide for Sclerotinia rot

Optimum culture condition of antagonistic bacteria A-7

The highest cell density of OD 1.0 was obtained by 14 hr cultivation of *B. amyloliquefaciens* A-7 and the density was reduced dramatically 24 hr later. The optimum temperature and pH range for the bacterial growth was 25°C and pH 6~7, respectively.

In flask cultivation experiment

In flask cultivation experiment, measurement of bacterial density and assay of antagonistic activity of bacterial culture broth allowed us to select the best carbon source and nitrogen source for mass production of antifungal compounds from the BW-13 strain. Using the Bacillus basal medium with 0.5% of yeast extract and NH_4NO_3 , corn oil and yeast extract were finally selected as the best carbon and nitrogen source. Addition of other carbon sources for enhancing antifungal activity production in culture media did not significantly increase the antifungal

activity.

Establishment of mass-production of antifungal compounds

Therefore, we defined the optimum media for A-7 mass cultivation with the following ingredients: K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0005%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0005%, $FeSO_4$ 0.0025%, corn oil 3.0% and yeast extract 0.5%. a basal salt medium with 3% dough-conditioner for fermentation broth. The A-7 bacterial density after 72 hr and 96 hr fermentation culture under the defined media, temperature and pH condition was exceptionally high up to approximately 56×10^{17} and 73×10^{17} cfu/ml, respectively. The antifungal activity of the fermentation culture against *S. sclerotiorum* YR-1 was remarkably high with fungal growth inhibition zone of 15 mm.

Formulation of A-7 for foliar spray

Various additives and carriers such as starches, suncreamy, vegetable oils and cereal oils were supplemented into the 4 liter fermentation culture of *B. amyloliquefaciens* A-7 grown under the defined condition. Among 24 different formulations tested, a wettable powder formulation and a liquid formulation exhibited the excellent disease control activity without the toxicity problem. Some formulations also showed good disease control activity but residual marks on the sprayed leaves.

3. Biological control effect of biofungicides

Pot assay at a growth chamber

Twenty four different formulations of A-7 strain were generated through 6 round of formulation process and evaluated for disease control activity against crisphead lettuce sclerotinia rot in pots of a growth chamber. Formulations such as A7-2 and A7-A exhibited disease control value of 90.2 and 83.1%, respectively.

This control value was not significantly lower than that of chemical fungicide Benomyl with 95.86% of disease control value. In conclusion, liquid formulation A7-2 and wettable powder formulation A7-A were finally selected as candidate microbial pesticides to control the crisphead lettuce sclerotinia rot and further tested in plastic house.

Pot assay at a plastic house

The A7-2 and A7-A exhibited disease control value of 80.5% and 79.1% in plastic house experiment, respectively, while chemical fungicide Benomyl showed 75.2% disease control value. Both A7-2 and A7-A application showed significantly higher disease control value than Benomyl application.

Synergy effect of A7-2 and BW-13A formulations for bottom rot and sclerotinia rot at pot assay in a plastic house

Simultaneous application of A7-2 and BW-13A in crisphead lettuce plant grown in pots in plastic house showed lower disease control value of 70.6% against crisphead lettuce bottom rot and sclerotinia rot compared to A7-2 single application (81.3%). However, single application of BW13-A did not show effective disease control activity against two diseases. Therefore, A7-2 alone can be applied to control both crisphead lettuce bottom rot and sclerotinia rot.

Field trials in production condition.

Trial 1 in Euryeong: Application of 100-fold diluted A7-2, A7-A and Benomyl in production condition of crisphead lettuce showed similar disease control value of 84.7%, 84.3% and 87.0%, respectively. Dilution of A7-2 to 500-fold exhibited 70.3% disease control value. The A7-2 formulation turned out to be excellent microbial pesticide.

Trial 2 in Kimhae (Feb. 2004): Natural occurrence of sclerotinia rot of

crisphead lettuce in Kimhae was observed and different dilution effect of A7-2 was investigated in the production condition. Treatment of the 100-fold dilution of A7-2, 500-fold dilution of A7-2 and Benomyl showed 76.7%, 60.7% and 75% of sclerotinia rot control value. The A7-2 formulation was the desirable microbial pesticide at 100-fold dilution treatment.

Stability of the selected microbial pesticide.

The rifampicin resistant A7 mutant was generated by spontaneous mutation and named as A7R. The A7R strain was used to evaluate the bacterial viability in lettuce rhizosphere over time. The number of A7R in rhizosphere, on lettuce plant leave and in plant crown was stably maintained up to 2.8×10^9 , 1.4×10^9 , 6.8×10^9 cfu/ml, respectively until 21 days.

Storage stability assay of BW13-A formulation on foliar leaves

Storage of both A7-2 and A7-A at 4°C and room temperature did not make significant difference on bacterial survival. Bacterial density of both liquid formulation A7-2 and wettable powder formulation A7-A stored at 4°C and room temperature was stable over 1 year 8 month. In addition, antifungal activity against *S. sclerotiorum* was stably retained in both A7-2 and A7-A.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	38
Section 1. Purpose and significance of the research	38
1. Background of the research	38
2. Importance of the research	40
Section 2. Contents and scope of the research	44
1. Final goal of the research	44
2. Contents and scope of the research	45
Chapter 2. Research trend and problems in Korea and foreign country	46
1. Research trend in foreign country	46
2. Research trend in Korea	46
3. Patents of biopesticides in Korea	49
4. Problems of technology	53
5. Future prospect	55
6. Validity of technology transfer	57
Chapter 3. Research contents and results	58
《Objective 1》 <u>Development of microbial pesticides to control crisphead lettuce</u> <u>bottom rot</u>	
Section 1. Introduction	58
Section 2. Isolation and identification of microorganism	63
1. Materials and methods	63
2. Results	63

가. Isolation and identification of pathogen	69
나. Pathogenicity test	73
다. Selection of antifungal bacteria	76
라. Synergistic effects of antifungal bacteria	82
마. Identification of antifungal bacteria	85
Section 3. Development of biopesticides to control bottom rot	90
1. Materials and methods	90
2. Results	93
가. Determination of optimal cultivation condition for BW-13	93
1) Flask cultivation	93
2) 7 L Jar fermentation	100
나. Formulation of biofungicide	101
1) Wettable powder formulations BW13-A~G	101
2) Suspension concentrate BW13-H and wettable powder formulation BW13-I,J	101
Section 4. Development of seed coating technique to control bottom rot	103
1. Materials and methods	103
2. Results	105
가. Effects of coated seeds by <i>S. maltophilia</i> BW-13	105
나. Effects of coated seeds by <i>P. aeruginosa</i> LY-11	112
다. Alginate seeds coating technique by <i>P. aeruginosa</i> LY-11	116
Section 5. Control effects of developed biofungicides and selection of suitable formulation for crisphead lettuce	118
1. Materials and methods	118
2. Results	119
가. Control effect of formulations by <i>S. maltophilia</i> BW-13	119

나. Control effect of alginate coating seeds by <i>P. aeruginosa</i> LY-11	122
1) Damping-off	122
2) Bottom rot	124
Section 6. Application of selected biofungicides in plastic house	126
1. Materials and methods	126
2. Results	126
Section 7. Survival of cell in the alginate coating seeds on roots and leaves of crisphead lettuce	129
1. Materials and methods	129
2. Results	129
Section 8. Storage stability of biopesticide and alginate coating seeds	133
1. Materials and methods	133
2. Results	133
가. Storage stability of BW13-A formulation	133
나. Storage stability of alginate coating seeds	134
 《Objective 2》 <u>Development of microbial pesticides to control crisphead lettuce</u> <u>Sclerotinia rot</u>	
Section 1. Introduction	137
Section 2. Isolation and identification of microorganism	140
1. Materials and methods	140
2. Results	145
가. Isolation of identification of pathogen	145
나. Pathogenicity test	152
다. Isolation and antifungal bacteria	155

라. Synergistic effects of antifungal bacteria	162
마. Identification of selected antifungal bacteria	164
Section 3. Determination of optimal cultivation condition for A-7	169
1. Materials and methods	169
2. Results	171
가. Determination of optimal cultivation condition for A-7	171
1) Flask cultivation	171
2) 7 L Jar fermentation	178
Section 4. Development of biopesticide for Sclerotinia rot	180
1. Materials and methods	180
2. Results	181
Section 5. Control effects of developed biofungicides and selection of suitable formulation for crisphead lettuce	185
1. Materials and methods	185
2. Results	185
가. Control effect of formulations by <i>B. amyloliquifaciens</i> A-7	185
1) Pot assay	185
가) Wettable powder formulations A7A, A7B, A7C, A7D, A7E, A7F ..	185
나) Wettable powder formulations A7G, A7H, A7I, A7J, A7K, A7L ..	185
다) Wettable powder formulations A7M, A7V, A7O, A7P, A7Q	187
라) Wettable powder formulations A7R, A7S, A7T, A7U	188
마) Wettable powder formulations A7-1, A7-3, A7-4, A7-5, A7-7, A7-8, A7V and soluble concentrate A7-2, A7-6	184
바) Wettable powder formulation A7W	193
Section 6. Application of selected biofungicides in plastic house	195

1. Materials and methods	195
2. Results	196
가. Sclerotinia rot	196
나. Sclerotinia rot and bottom rot	197
 Section 7. Application of biopesticides in a field experiment	 200
1. Materials and methods	200
2. Results	200
가. Uiryong-Gun, Gyeongsangnam-Do, October, 2004	200
나. Dae-dong, Kimhae, Busan, March 2005	202
 Section 8. Storage stability of biopesticide	 204
1. Materials and methods	204
2. Results	205
가. Storage stability of A7-2 formulation	205
나. Storage stability	206
 Chapter 4. Accomplishment and contribution to the related field	 210
Section 1. Achievement of research goal	210
Section 2. Contribution to the related field and expected impacts	221
 Chapter 5. Future Application of the research	 223
Chapter 6. Overseas scientific information	225
Chapter 7. References	236

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	38
제 1 절 연구개발의 목적과 필요성	38
1. 연구의 배경	38
2. 연구개발의 필요성	40
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	44
1. 최종연구목표	44
2. 연구개발의 내용 및 범위	45
제 2 장 국내외 기술개발 현황	46
제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점	46
1. 외국에서의 개발현황	46
2. 국내에서의 개발 현황	49
3. 국내의 특허관련 동향	53
4. 관련기술 문제점	55
5. 앞으로의 전망	56
6. 기술도입의 타당성	57
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	58
《 제 1 연구 목표 》 결구상추 밀둥썩음병 방제용 미생물농약 개발	
제 1 절 서 론	58
제 2 절 유용미생물의 탐색 및 동정	63
1. 연구수행 방법	63
2. 연구 결과	69
가. 밀둥썩음병 발생과 병원균 분리 및 동정	69
나. 병원성 검정	73
다. 우수길항균 선발	76

라. 길항미생물의 혼합처리에 의한 방제효과 증진 검정	82
마. 선발 길항 세균의 동정	85
제 3 절 밀등썩음병 방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립	90
1. 연구수행 방법	90
2. 연구결과	93
가. <i>S. maltophilia</i> BW-13 균주의 최적배양조건 확립	93
1) 삼각플라스크배양	93
2) 발효기 배양	100
나. 엽면살포제의 제형화	101
1) 1차 제형화 (수화제형, BW13-A~G)	101
2) 2차 제형화 (액상수화제형 BW13-H 및 수화제형 BW13-I, J)	102
제 4 절 밀등썩음병 방제용 종자처리 미생물농약 제조기술확립	103
1. 연구수행 방법	103
2. 연구결과	105
가. <i>S. maltophilia</i> BW-13 균주에 의한 종자처리효과	105
나. <i>P. aeruginosa</i> LY-11 균주에 의한 우수코팅종자 선발	112
다. <i>P. aeruginosa</i> LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅기술 개발	116
제 5 절 미생물농약의 방제효과 검정 및 우수제형 선발	118
1. 연구수행 방법	118
2. 연구결과	119
가. <i>S. maltophilia</i> BW-13 균주를 이용한 엽면살포제의 방제효과	119
1) 생육실 포트재배에서의 밀등썩음병 방제효과	119
나. <i>P. aeruginosa</i> LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅제의 방제효과	122
1) 모잘록병 방제효과	122
2) 생육실 포트재배에서의 밀등썩음병 방제효과	124

제 6 절	플라스틱 하우스내 토경재배에서의 방제효과 검정	126
1.	연구수행 방법	126
2.	연구결과	126
제 7 절	Alginate 코팅종자의 작물에서의 근권 및 엽권정착력 검정	129
1.	연구수행 방법	129
2.	연구결과	129
	가. 종자처리제의 근권 및 엽권정착력 검정	129
제 8 절	엽면살포제와 alginate 코팅종자의 안정성 검정	133
1.	연구수행 방법	133
2.	연구결과	133
	가. BW13-A 엽면살포제의 저장 안정성	133
	나. Alginate 코팅종자의 저장 온도에 따른 안정성 검정	134

《 제 2 연구 목표 》 결구상추 균핵병 방제용 미생물농약 개발

제 1 절	서론	137
제 2 절	유용미생물의 탐색 및 동정	140
1.	연구수행 방법	140
2.	연구 결과	145
	가. 균핵병 발생과 병원균 분리 및 동정	145
	나. 병원성 검정	152
	다. 길항미생물의 분리	155
	라. 길항미생물의 혼합처리에 의한 방제효과 증진 검정	162
	마. 우수 길항 세균의 동정	164
제 3 절	길항세균의 대량배양기술확립	169
1.	연구수행 방법	169

가. 균핵병 방제효과 검정	196
나. 밀등썩음병과 균핵병의 동시방제 효과	197
제 7 절 미생물농약의 자연발생 농가실증시험	200
1. 연구수행 방법	200
2. 연구결과	200
가. 2004년 결구상추의 경상남도 의령군 재배포장에서의 방제효과	200
나. 2005년 김해시 대동면 재배포장에서의 방제효과	202
제 8 절 선발 미생물농약의 작물에서의 엽권정착력 및 저장안정성 검정	204
1. 연구수행 방법	204
2. 연구결과	205
가. 토경재배한 결구상추에서의 A7-2제제의 엽권정착력(활성) 검정	205
나. 저장 안정성 검정	206
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	210
제 1 절 연구개발목표의 달성도	210
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 기대효과	221
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	223
제 6 장 해외과학기술정보	225
제 7 장 참고문헌	236

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

1. 연구의 배경

국제화시대인 21 세기에는 고품질의 고기능성 채소 생산을 위해 국제간의 경쟁이 치열해질 것으로 예상되며, 우리나라 역시 작물의 수출 가치를 높이기 위해 모든 작물의 고품질화를 목표로 국산채소의 소비를 촉진시키고 국가경쟁력을 강화하여야 한다. 이러한 추세에 미루어 고품질 생산을 위한 집중적인 기술이 필요하며, 특히 최근에 일고 있는 채소의 이용 증대 효과를 지속적으로 뒷받침하기 위해 채소의 재배법 개발 및 병 방제의 연구 개발이 지속적으로 이루어져야 한다(농림부, 2002).

우리나라에서 재배되고 있는 서양채소 중 가장 많이 재배되고 있는 신선채소 결구상추 (*Lactuca sativa var. capitata*)는 상추, 해바라기, 민들레, 과꽃, 치커리, 국화와 같이 국화과에 속하는 1년생 초본 작물로 일반적으로 양상추 혹은 통상추라고 불린다. 16~17세기경 프랑스 네덜란드에서 개량된 품종들이 유럽 온대, 아프리카 북부, 아시아 서부지역으로 들어와 가장 많이 분포하고 있으며, 우리나라는 해방 이후 미군에 의해 들여온 후 군납용으로 재배하기 시작하였으며(김완규 1997), 현대에는 결구상추에 포함되어 있는 다량의 수분(94~95%), 탄수화물·조단백질·조섬유·비타민C 등의 섭취로 노약자 및 어린이에게 좋은 것으로 보고 되어 웰빙의 붐을 타고 샐러드, 짬밥 등의 웰빙 음식의 선호로 재배량이 증가하고 있는 추세이다(유태웅 1997, 농진청 1996).

우리나라에서는 봄, 여름, 가을, 겨울 주년재배로 이 중 70%가 여름철 고랭지 지역인 평창, 횡성, 태백, 정선 등에서 생산되고 있으며, 겨울 시설재배 하에서는 경남 의령, 진주, 하동, 김해, 전남 광주 일원에서 주로 생산되고 있다. 생산량은 92년 이후 꾸준히 증가해 오다가, 95년에서 98년까지 3년간은 급격히 감소하였으나, 99년부터는 생산량이 4배 이상 증가하여 전국재배면적이 471ha, 생산량이 17,141톤에 달하였으며, 2001년도에는 673ha에 22,226톤 이상이 되었다. 이 중 경남 의령은 약 5ha에 5.5천톤 이상이 재배되고 있다(농림부, 2001).

하지만, 최근 시설재배를 통한 연작과 하우스내의 다습조건 때문에 각종 병해충의 발생으로 수량과 품질이 저하되어 방제 대책이 시급한 실정에 있다(Hausbeck, 1996). 경상남도의 결구상추 주산지인 하동과 의령군의 시설재배지에서는 늦가을부터 봄까지에 땅가 부위의 아랫 잎에 수침상의 병반이 생기고 병반이 진전되면서 결구상추 포기 안쪽까지 병이 확대되어, 습도가 높을 때는 균핵이 관찰되기도 한다. 결국에는 병반이 확대되어 포기 전체가 고사하게 되고, 주변의 작물에 2차적으로 균핵병과 잿빛곰팡이병이 발병되어 극심한 피해를 입히고 있다.

일반적으로 알려진 결구상추의 병해는 밑등썩음병(*Rhizoctonia solani*)(김완규, 1995)과 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)(문병주, 2002)도만이 보고되어 있으나 같은과 작물인 상추에서는 밑등썩음병(*Rhizoctonia solani*), 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*), 잿빛곰팡이병 등 13종이 보고되었다(한국식물병리학회, 1998). 이중 균핵병과 밑등썩음병에 의한 1차적인 피해가 가장 심각하다.

밑등썩음병(bottom rot)을 일으키는 병원균인 *Rhizoctonia solani* Kühn (완전세대 ; *Thanatephorus cucumeris* (Frank))는 토양전염성 병원균으로서 전세계적으로 폭넓은 기주를 가지고 있는 다범성균이며, 국내에서도 이 균에 의한 피해가 많이 보고되어 있으나 이 균의 생리생태학적 특성상 동정이 매우 어렵고 병해의 진단 및 방제 또한 어렵다. 주로 작물의 뿌리, 줄기, 괴경 등에 피해를 주는데 병징은 작물에 따라서 매우 다르며 때로는 같은 기주 작물에서도 다른 병징이 나타난다. 이 균은 밑등썩음병(bottom rot) 이외에도 모잘록병(damping off), 뿌리썩음병(root rot), 줄기썩음병(basal stem rot), 줄기궤양병(stem canker) 등의 증상 등을 유발하는데 때로는 작물의 수확 후 저장 중 부패를 유발하거나 지표면에서 가까운 잎의 마름 또는 점무늬증상을 유발시키기도 한다(김완규, 1995). 또한, 토양병원균이므로 침수지역이나 건조한 지역의 토양보다는 적당히 젖어 있는 토양에서 발생이 더 심하며, 어린 식물체에서의 감염은 부적당한 환경으로 인해 생장이 느린 경우 더욱 심하게 된다. 하지만, 일반적으로 빨리 자라는 식물체는 생육초기에 본 균에 의한 감염으로부터 다소 벗어날 수는 있으나(Peter W. W., 1987), 1차적으로 감염되면 2차적으로 균핵병이나 잿빛곰팡이병이 발생하여 그 피해가 더 확산된다. 이러한 2차적인 병의 방제를 위해서는 1차 감염원인 *Rhizoctonia* 균의 방제는 필수적이다. 하지만, 지금까지 결구상추 밑등썩음병 방제를 위한 화학약제는 공시된 바가 없으며, 농가에서는 주로 프로파, 베노밀 등의 약제를 이용하여 살포하고 있으나 그 효과가 매우 미미한 상태이다.

최근, 생물학적인 방법에 의해 농작물을 보호하려는 연구가 활기를 띠고 있어, 생물학적 제제의 실용화 가능성이 부각되어 외국에서는 진균과 세균을 이용한 주요 미생물 농약이 상업적으로 판매되고 있다. 현재 세계 생물농약시장은 전체 농약시장 규모 약 300억 달러(97년 기준)의 3% 정도로 소규모이지만, 2010년에는 500% 증가되어 430억 달러의 10%를 차지할 것이라고 예측되고 있으며, 미생물농약 분야는 연간 15~20%의 고속성장을 지속하여 2013년에는 생물농약의 시장규모가 세계적으로 50억불이 될 전망이다. 국내 역시 2010년에는 전체시장의 약 10%로 증가하여 약 1,220억원의 시장이 예상되고 있다.

미생물농약의 제형화는 저장, 배송 및 대상작물과 토양에서 적용 방법이 기존의 화학적 산물과는 다른 접근이 필요한데, 미생물 농약의 안정성은 적어도 1년 이상은 지속되어야 한다. 세균에게 안정적인 영양 공급을 해야하며, 저장 산물에서의 독소의 대사과정을 제거해야 하고, 세균을 치사시키지 않는 범위에서 대사활성을 낮추어야 한다(David K Rodham, 1999). 또한, 길항세균의 치사량을 최소화하려면 복합적인 배지를 사용하여 세균을 생장시켜야 하고 건조 방지를 위하여 보호제를 첨가하여 안정성에 있어 유리하게 조정해 주어야 한다.

국내외의 결구상추 밀둥썩음병과 균핵병 방제에 관련된 연구가 미흡하고, 또한 생물학적 방제를 위한 미생물제제의 개발 또한 전무하여, 결구상추에 발생하는 밀둥썩음병을 방제하고, 농가의 수익을 극대화하기 위하여 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 본 연구에서 개발한 미생물농약이 제품으로 개발될 경우, 국내 공급은 물론 세계적으로 결구상추의 주요생산 국가로의 수출이 가능하며, 국내의 결구상추 생산 효율을 증대시켜 농가 소득 향상은 물론 전반적인 농업경쟁력 재고에 기여할 수 있을 것이다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 1) 엽채류 채소 중 결구상추와 배추 밀둥썩음병과 균핵병을 방제하는 방제기술 확립
- 2) 국내에서 문제되는 타 작물에서의 밀둥썩음병과 균핵병 동시 방제 가능
- 3) 작물들의 안정적 생산 체계 확립
- 4) 화학농약의 대체 물질의 개발
- 5) 유용미생물을 이용함으로써 환경오염 감소

- 6) 새로운 종자처리제 및 엽면살포용 제형화 기술의 확립
- 7) 미생물농약 제제 개발의 독자적인 모델 구축 및 자료 제공

나. 경제·산업적 측면

1) 유기합성 농약 시장은 약 20조원으로 2000년대까지 연간 매출고 27조원에 이를 것으로 전망되나 최근에 선진 각국에서 환경공해 문제가 크게 부각되면서 유기합성농약의 성장세가 크게 둔화되어 연평균 성장률 2%로 정체 상태를 면하지 못하고 있다.

2) 최근, 생물학적인 방법에 의해 농작물을 보호하려는 연구가 활기를 띠고 있으며 생물학적 제제의 실용화 가능성에 크게 낙관적이며, 미국에서는 진균과 세균을 이용한 주요 미생물 농약이 상업적으로 판매되고 있다(Fruh. T., 1996, 頁 1). 현재 전세계 생물농약시장은 7000억원 정도로 소규모이지만 매년 12%정도의 고속성장을 지속하고 있으며, 특히 미생물농약 분야는 연간 15~20%의 고속성장을 지속할 것이라고 예측하고 있다(Knight, S. C., 1997).

표 1. 미국에서 상업적으로 이용되고 있는 주요 미생물 농약

(USDA, 2000)

방제미생물	상품명	대상병원균
세균		
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Galltrol-A 외 3종	뿌리혹병
<i>Bacillus subtilis</i>	Kodiak 외 4종	뿌리썩음병, 시들음병
<i>Burkholderia cepacia</i>	Intercept	각종 토양병
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BlightBAN A506외 3종	사과·배나무 화상병
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Conquer 외 2종	양송이세균성갈색무늬병
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bio-save 100 외 1종	갯빛곰팡이병, 푸른곰팡이병
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Mycostop	각종 토양병
곰팡이		
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	AQ10	각종 흰가루병
<i>Candida oleophilia</i>	Aspire	갯빛곰팡이병, 푸른곰팡이병
<i>Coniothyrium minitans</i>	Contans 외 1종	균핵병
<i>Fusarium oxysporum</i>	Biofox C 외 1종	시들음병
<i>Gliocladium virens</i>	SoilGard	모잘록병, 뿌리썩음병, 팻취병
<i>Gliocladium catenulatum</i>	PreStop 외 1종	모잘록병, 뿌리썩음병, 팻취병
<i>Pythium oligandrum</i>	Polygandron	모잘록병, 뿌리썩음병
<i>Talaromyces flavus</i>	Protus	뿌리썩음병, 시들음병
<i>Trichoderma harzianum</i>	Binab T 외 12종	균핵병, 역병, 뿌리썩음병, 시들음병

3) 본 연구에서 개발하고자 하는 미생물 농약은 결구상추 밀둥썩음병을 포함한 엽채류의 뿌리썩음병 및 균핵병에 대한 뚜렷한 방제 약제가 없으므로 제품이 개발될 경우 국내 공급은 물론 세계적으로 결구상추의 주요생산 국가로의 수출이 가능하며, 국내의 결구상추 생산 효율을 증대시켜 농가 소득향상은 물론 전반적인 농업경쟁력 재고에 기여할 수 있다.

4) 길항미생물을 이용한 밀둥썩음병, 뿌리썩음병 및 균핵병 방제제의 성공적인 개발에 있어서 환경스트레스에 강하면서도 토양에 길항미생물이 정착하여 그 역할을 하기에 어려운

줄기나 옆면의 환경에 적합한 제제, 즉 길항미생물이 유해한 환경으로부터 보호하고, 정착성을 높이는 보조제 뿐만 아니라, 토양 개선을 위한 토양 첨가제의 개발 역시 산업적으로 응용될 수 있다.

5) 현재까지 미생물을 이용하여 토양병을 방제하고, 생육을 촉진시키는 방법으로 토양에 직접 미생물 제제를 직접 처리하는 방법이 이용되어 왔으나, 이는 비경제적이며 그 효과가 미흡하다는 주장들이 있어, 새로운 종자처리 방법 개발이 필요하다.

다. 사회·문화적 측면

1) 결구상추는 우리나라 식생활 개선으로 인하여, 육류, 햄버거 등 가공식품의 소비가 증대됨에 따라 결구상추의 소비가 증대되어 재배면적과 생산량이 증가 추세에 있으므로 국민 건강과 기호도 만족을 위하여 품질이 좋은 생산물 공급기반이 필요하다.

2) 실제 농가에서는 정확한 생리장해 및 병해 진단을 위한 전문가 도움을 얻기가 어려워 적기 방제 및 재배관리의 어려움으로 인해 농약을 주기적으로 살포하여 남용하는 사례가 자주 있다.

3) 미생물 농약의 개발로 유기합성 농약과 비료의 남용을 줄임으로서 농산물 안정을 향상 시키고, 환경오염을 경감시키는데 기여함으로써 환경친화적 농업을 지향할 수 있다. 또한 생력화 및 생산비 절감효과에 의한 농가소득 증대에 기여할 수 있다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 최종연구목표

항진균성 길항세균인 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 및 *Pseudomonas aruginosa* LY-11 균주를 이용하여 결구상추 밀둥썩음병 방제용 엽면살포제 및 종자처리제를 개발하고, *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 균주로는 균핵병 방제용 엽면살포제의 환경친화적인 미생물농약을 개발하고 이를 실용화하고자 한다.

2. 연구개발의 내용 및 범위

제 1 세부과제 : 병원균과 길항균의 특성 및 미생물농약의 병방제효과 검정

- 결구상추 포장의 토양과 건전식물체로부터 이미 분리된 길항균 외 항균활성이 높은 길항균의 지속적 분리
- 배지상에서 길항효과 검정
- 병원균과 길항균의 배양적 특성 검정 및 동정
- 제2, 3세부과제에서 개발된 제제의 유묘와 생육상내 방제효과 검정
- 제2, 3세부과제에서 개발된 제제의 유묘와 온실내 방제효과 검정
- 개발제제의 포장적용시험
- 개발제제의 자연발생 농가실증시험

제 2 세부과제 : 밀등썩음병 방제용 종자처리 미생물농약 제조기술확립

- 항균활성물질 대량생산을 위한 최적조건 확립 및 대량배양용 배지선발
- 종자처리를 위한 전달매체개발
- 종자처리제의 최적화실험
- 종자처리제 제조기술확립 및 제제화
- 종자처리제의 근권정착력 및 활성검정
- 종자처리제의 안정성 및 경시적 유효도 검정

제 3 세부과제 : 균핵병 방제용 엽면살포 미생물농약 제조기술확립

- 균핵병 방제용 길항균의 대량배양을 위한 최적조건 확립 및 대량배양용 배지선발
- 엽면살포제를 위한 전달매체개발
- 엽면살포제의 최적화실험
- 엽면살포제 제조기술확립 및 제제화
- 엽면살포제의 엽권정착력 및 활성검정
- 엽면살포제의 안정성 및 경시적 유효도 검정
- 엽면살포제의 우수제형 최종 선발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

1. 외국에서의 개발현황

가. 미생물 자체를 이용한 생물농약

각종 식물병원균에 대해 그들의 증식을 억제시키거나, 기생하거나, 항생작용 및 포식 작용을 나타내는 미생물을 이용하여 병방제에 활용하는 생물학적 방제법이나 이들 미생물을 농약화시킨 미생물 농약은 현재 실용화 된 것이 16종, 실용화로 추진 중인 것이 29종이 알려져 있으며 실제로는 그 이상의 건들이 추진되고 있다. 2005년 현재 미생물농약으로 등록된 유용미생물로서 살균성세균은 10종, 곰팡이 11종, 살충성세균은 9종, 곰팡이 6종, 선충 7종, protozoa 1종, 바이러스 11종 등이다. 살선충곰팡이는 1종, 선충 1종, 제초성 세균 1종, 곰팡이는 2종으로 총 80여종의 미생물이 등록된 상태다.

미생물을 이용한 병해 방제시도 연구는 1927년 미국에서 감자 더덩이병 방제용으로 방선균을 이용한 것이 최초이며, 1960년 이후부터 농약의 형태로 실용화되기 시작하였고, 일본에서는 1962년에 담배 허리마름병에 *Trichoderma* 생균 제제를 시초로 이후에 많은 제품이 미국에서 개발되었으며 대부분의 실용화 제품이 육묘중 발생하는 묘잘록병 방제용으로 개발되었음이 주목되었다(표 1). 2000년 현재까지 미국에서는 약 44 종 이상의 미생물농약이 등록되었고 지속적으로 발표되고 있다(표 2).

병해 방제용 생물농약중 가장 획기적인 성공 제품으로는 각종 작물 중에서도 특히 다년생 목본류의 뿌리에 발생되고 있는 뿌리혹 세균병(Crown gall)에 길항미생물인 *Agrobacterium radiacter* strain 84 및 K1026균주를 이용한 Galltrol, Dygall, Nogall, Bakuterozu 제품이 있다. 현재의 유기합성농약이 모든 세균병에 효과가 저조하나 특히 뿌리혹 세균병은 유기합성농약 효과를 전혀 볼 수 없는데 비해, 이 생물농약은 확실한 효과를 나타내어 우수한 방제제로 이용되고 있다. 이 생물농약의 방제기작으로는 *A. radiobacter* 세균이 생산하는 아그로신(Agrocin)이라는 항균성 물질이 병원균의 세포벽 합성을 저해하는 것이 기작이다.

표 1. 병해방제용 미생물살균제 실용화 생물농약

(농과원 최용철)

미생물	이 용 균 주	대 상 병 해	상 품 명	등록국(년)
세 균	<i>Agrobacterium radiobacter</i> strain 84	Crown gall	Galltrol Bakuterozu Dygall	USA('79) Japan('89) Canada
	<i>A. radiobacter</i> K1026	Crown gall	Nogall	Australia
	<i>Bacillus subtilis</i>	Seedling root diseases Infection seed-born	Quantum 4000 GUS 2000	USA USA
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Seedling root	Blue circle	USA
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EG-1053	Damping-off	Dagger G	USA('88)
	<i>Streptomyces griseovirides</i>	Damping-off(Fusarium, Alternaria etc.)	Mycostop	USA
곰팡이	<i>Gliocladium virens</i> GL-21	Dampint-off (Rhizoctonia, Pythium)	WRC-GL-21-W RC-AP-1	USA('90)
	<i>Pythium ligandam</i>	Sugar beet disease	Polygandron	Czechoslovakia
	<i>T.harzianum Rifaistrain</i> KRL-AG 2	Damping-off (Pythium)	F-Stop	USA
	<i>T. harzianum /polysporum</i>	Wood-decaying fungus	BinabTM T	USA
	<i>T. lignorum</i>	Southern blight Sore shin(Tobacco)	Trichoderma (spore)	Japan('62)
	<i>T. viridae</i>	Verticillium in mushroom Plum silver leaf disease	BINAB T SEPPIC BINAB	France UK

표 2. 미국에서 상업적으로 이용되고 있는 주요 미생물 농약

(USDA,2000)

방제미생물	상품명	대상병원균
세균		
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Galltrol-A외 3종	뿌리혹병
<i>Bacillus subtilis</i>	Kodiak외 4종	뿌리썩음병, 시들음병
<i>Burkholderia cepacia</i>	Intercept	각종 토양병
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BlightBAN A506외 3종	사과·배나무 화상병
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Conquer외 2종	양송이세균성갈색무늬병
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bio-save 100외 1종	젓빛곰팡이병, 푸른곰팡이병
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Mycostop	각종 토양병
곰팡이		
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	AQ10	각종 흰가루병
<i>Candida oleophila</i>	Aspire	젓빛곰팡이병, 푸른곰팡이병
<i>Coniothyrium minitans</i>	Contans 외1종	균핵병
<i>Fusarium oxysporum</i>	Biofox C외 1종	시들음병
<i>Gliocladium virens</i>	SoilGard	모잘록병, 뿌리썩음병, 팻취병
<i>Gliocladium catenulatum</i>	PreStop외 1종	모잘록병, 뿌리썩음병, 팻취병
<i>Pythium oligandrum</i>	Polygandron	모잘록병, 뿌리썩음병
<i>Talaromyces flavus</i>	Protus	뿌리썩음병, 시들음병
<i>Trichoderma harzianum</i>	Binab T외 12종	균핵병,역병,뿌리썩음병,시들음병

나. 항생물질을 이용한 생물농약

미생물을 인공적으로 배양할 때 배양액에 미생물이 생산하는 대사물질을 배출하게 되는데 이러한 대사 활성물질을 분리 정제하여 의약품 및 농업용 항생물질로 활용하고 있다. 이러한 항생물질은 약 8,000종 이상이 알려져 있으며 이중 실용화 추진 중인 것은 약 600여종이며 농업용으로 활용되는 것은 20여종, 그중 병해방제용으로 많이 사용되고 있는 것은 6종이 실용화되고 있다(표 3). 농업용 항생물질 생산균은 토양내에 많이 분포하고 있는

방선균(Actinomycetes)중 *Streptomyces*속 균주로부터 많은 물질이 알려져 있다. 세계 최초의 농업용 항생물질은 1958년 도열병 방제용 항생물질로 알려져 있는 Blasticidin S를 선두로 Kasugamycin, Polyoxin, Validamycin 등이 사용되고 있다. 이들 농업용 항생물질은 미생물 자체가 아닌 생산물인 물질을 이용하게 되므로 농약으로서의 안전성 평가는 유기합성물인 화학농약과 동일한 수준에서 평가되고 있으며 화학농약에 비해 매우 저독성인 것으로 알려져 있다.

표 3. 병해방제용 농업용 항생물질

(농과원 최용철)

항 생 물 질	생 산 균 주	대 상 병(작물)	등록년도 (한국)
Blasticidin-S	<i>Streptomyces griseochsomogenes</i>	Blast(Rice)	'58('66)
Kasugamycin	<i>St. kasugaensis</i> <i>St. kasugapinus</i>	Blast(Rice)	'64('69)
Validamycin	<i>St. hygrosopicus</i> var. <i>limoneus</i>	Sheath blight(Rice)	'70('76)
Polyoxin	<i>St. cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Sheath blight(Rice) Alternaria leaf spot(Apple) Powdery mildew (Apple, Pear, Cucumber) Black rot(Pear) Brown spot(Tobacco) Gray mold(Red pepper) Scab(Pump) Canker(Apple)	'64('71)
Streptomycin	<i>St. griseus</i>	Canker(Citrus) Bacteria shot hole(Peach) Late blight(Potato)	'44('81)

2. 국내에서의 개발 현황

미생물 자체를 이용하거나, 미생물이 생산하는 생리활성물질에 대한 국내의 연구 및 개발은 외국에 비해 30~50년 뒤늦은 1980년대에 기초적 연구가 수행되어 왔으며, 전문가가 부족한 실정과 체계가 갖춰져 있지 않은 상황에 의해 실용화되고 있는 제품은 개발되어 있

지 않다. 그러나, 최근에 체계적인 연구실과 전문가들에 의해 꾸준한 노력에 따라 연구역사에 비해 연구수준은 많이 향상되어 좋은 결과가 이루어지고 있다. 미생물자체를 이용하여 병해방제용으로 연구된 것으로는 1985년부터 국가연구기관 및 대학의 병리학자를 주축으로 담배의 모자이크병 (TMV), 세균성마름병(Bacterial wilt), 오이의 시들음병(Fusarium wilt), 고추의 역병(Phytophthora blight), 딸기의 시들음병, 눈마름병(Rhizoctonia bud rot), 사탕무우의 잘록병(Damping-off), 벼의 도열병, 문고병 방제등에 관한 연구가 보고되어 있다(표 3). 특히, 보고된 연구결과중 현재 활용가능성이 높아 일부 군주에 특허를 취득 또는 특허중인 것은 고추역병 방제를 위한 길항미생물군주인 AC-1, 오이 덩굴쪼김병 방제용인 비병원성 군주와 각종 작물에 발생하고 있는 흰가루병균에 기생하는 기생균에 의한 방제방법은 곧 실용화가 가능한 것으로 생각된다.

표 4. 국내에서의 미생물에 의한 각종 작물병해 방제 연구

작 물	대 상 병	미생물 종류	보고 년도
Tobacco	TMV	Virulence virus	'85
	Bacterial wilt	Non pathogenic <i>P. solanacearum</i>	'85
Cucumber	Fusarium wilt	<i>Rhixosphere antagonists</i>	'87
		<i>P. gladioli</i>	'92
		Non pathogenic strain of <i>Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum</i>	'93
		<i>Gliocladium virens</i> <i>P. putida</i>	'95
Red pepper	Phytophthora blight	<i>Bacillus sp.(AC-1)</i>	'86
		<i>P. cepacia</i>	'88
		<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Enterobacter agglomerans</i>	'89
		Non pathogenic strain of <i>Phytophthora capsici</i>	'92
Strawberry	Fusarium wilt	<i>Trichoderma sp.</i>	'88
		<i>T. harzianum</i>	'95
	Rhizoctonia bud rot	<i>P. gladioli</i>	'90
		<i>Antagonistic microorganisms</i>	'94
Sugar beet	Damping-off	<i>Pseudomonas sp.</i>	'88
Rice	Blast, sheath blight	<i>Pseudomonas sp.</i>	'90

한편, 미생물 생산 활성물질인 농업용 항생물질 연구 역시 외국에 비해 20~30 년 후에 추진되었으며 현재도 신물질 탐색에 힘쓰고 있다. 지금까지 결과로는 벼 흰잎마름병 방제용으로 cycloheximide를 분리 동정한바 있으며, 방선균 streptomyces균에 의한 Maculocin을 분리한 바 있으나, 신물질 분리나 유망한 물질의 활용까지는 이르지 못하고 있다. 이제까지 국내에서 미생물 자체를 이용한 병해방제용 생물적 방제중 가장 많은 연구가 이루어진 고추역병균 방제용 AC-1 균주를 생물농약으로 등록하기 위한 제반시험을 완료한 단계이며, 실용화를 추진중이다.

*Botrytis cinerea*의 생물학적 방제 중 수확 후 발생하는 각종 저장성 병해도 보고되고 있는데, 예를 들면 장미(*pyrrolnitrin*), avocado(*Bacillus subtilis*), 포도(*Trichoderma* spp.), 사과(*Pseudomonas cepacia*, 배(*P. cepacia*, *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens*), citrus(*Candida olephila*), cyclamen(*Ulocladium atrum*)가 보고되고 있다. 전세계적으로 약 40종의 생물농약 제품이 식물병의 방제용으로 시판되고 있는데, *Trichoderma*속 균을 이용한 제제인 Trichodex (Deborah 등, 년도불명)와 *Pseudomonas syringae*를 이용한 Bio-save 110 등이 국외에서 시판되고 있으나 작물 살포용 뿐만 아니라 길항세균을 이용한 미생물농약은 전혀 개발되지 않고 있다.

국내에서 복성해 등(생명공학연구소, 1992)에 의해 *B. subtilis*를 길항균으로한 딸기 잿빛곰팡이병 방제용 미생물농약의 개발을 성공적으로 수행하였으나 수년이 지난 현재까지 그 실용화 여부가 불분명한데 최근 미생물농약 등록 기준이 마련되어 품목고시가 될 것으로 기대하고 있다. 최근 BT계 미생물농약의 약효를 10배이상 오래 지속시키고 싼 제조공정에 성공했다고 밝혔다.

최근 경상대학교 정영륜 교수 연구팀에 의해 2000년도에 개발된 토리(상품명)는 *T. harzianum*을 이용한 미생물농약으로 잿빛곰팡이병에 매우 탁월한 효과가 있는 것으로 보고 (정영륜 등, 1993)되고 있으며 현재 시판 중에 있다(표 5).

2002년 3월 국내 처음으로 그린바이오텍이 고추 역병 살충제와 잿빛곰팡이용 살균제 등 3종을 등록을 하였으며 2003년도에 완제품을 출시하였다.

2003년 전남대 지연태와 정순주 교수팀이 NIN(대표 김희경)와 공동연구한 결과 천연 무독성 농약 개발에 성공하였다. 이는 미국 등의 학자들이 2010년 개발을 목표로 앞지른 것으로서 이 무독성 농약은 천연물을 이용해 만든 생물전환제제로 단백질원과 식물성 지방산을 원료로한 물질을 추출해 이를 나노 입자를 제조하였다. 이는 벼문고병, 벼도열병, 잔디 패치병, 고추탄저병, 장미역병, 오이 흰가루병과 잣빛곰팡이병 등을 완전 구제한다고 발표하였다.

2005년 동부한농화학은 비티제인 '*B. thuringiensis* 살충제' 등 10 여종 이상의 미생물농약을 개발 중에 있으며 현재 5개 종이 등록절차를 진행중에 있다. 또한, 환경친화적 제초제인 DBH-129, 원예용 살충제 DBI-3204, 미생물살균제 AC-1, 나방류 방제에 주로 활용되는 "바이오박"을 상품화하였다.

배재대 바이오의약센터 소장 이기성 교수는 동부한농화학과의 산학협력으로 KL1114MBF 세균을 이용한 무공해 무독성 농약을 개발하고 곧 상품으로 출시된다. 이 농약은 입제, 수화제, 종자코팅제 등의 다양한 상품으로 개발되었는데, 특히 배추무사마귀병 방제용 종자코팅제는 작물의 뿌리에 미생물이 정착, 각종 병해를 일으키는 병원균의 침입을 억제하는 것으로 환경에 전혀 영향이 없다고 밝혔다.

본 연구실에서는 1999년 *B. licheniformis* N1 균주로 제조한 Soy제제의 들깨 잣빛곰팡이병 예방효과와 치료효과를 입증하였고, 이를 이용하여 1999년에서 2002년까지는 수화제형 N1E제제를 딸기, 토마토, 결구상추의 잣빛곰팡이병을 약 90% 이상 방제하였음을 증명하였다. 게다가 수화제형 N1K제제 역시 상기의 작물에서 잣빛곰팡이병에 대한 높은 방제효과를 보여 새로운 미생물농약의 방제 가능성을 보였다. 2004년에서 2005년도에는 결구상추 밑등썩음병 방제용으로 수화제형 BW-13A제제의 방제효과를 실제 포장에서 검증하였고, 결구상추 균핵병방제용으로 액상수화제 A7-2제제와 수화제 A7-I 제제 역시 방제효과가 자연병 발생 포장에서 방제효과가 뛰어나 특허 출원 준비 중에 있다.

표 5. 국내에서 살균제로 개발 중인 미생물 균주와 개발된 미생물 제품

대상 식물병	균 주	연구팀	제품명
인삼뿌리썩음병	<i>Bacillus, Arthrobacter, Pseudomonas</i> 등 복합균주	한국인삼연초연구소 투엠바이아연구소	바이코나 1, 2 (1987)
고추역병	<i>Bacillus</i> AC-1	농업과학기술원	흰나라 등 (1994)
모잘록병 등	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	경상대	3년차 포장실험 (1995)
채소시들음병	<i>Paenibacillus koreensis</i>	경상대	3년차 포장실험 (1998)
배추무사마귀병	<i>Bacillus</i> sp.	배재대, 동부한농	(2000)
젓빛곰팡이병 잎곰팡이병 겹등근무늬병	<i>Trichoderma harzianum</i>	경상대 제일그린	토리 (2000)
흰가루병, 고추역병	<i>Paenibacillus polymyxa</i> AC-1	그린바이오텍	탑씨드 (2003)
젓빛곰팡이병, 모잘록병	<i>Bacillus subtilis</i> GB413	그린바이오텍	썰러스 (2004)
흰가루병	<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ94013	그린바이오텍	큐펙트 (2004)

3. 국내의 특허관련 동향

1) 국내 생물농약에 관한 기술 개발은 외국에 비해 3-4년도의 기술 격차가 있으나 생물농약에 관한 특허는 87년 BT 균의 대량제조방법으로 첫출원이 이루어졌다가 94년에 항바이러스 단백질을 함유하는 바이러스 방제제의 특허가 출원되었다. 2002년 5월까지 총 19건으로 매년 점점 늘어나고 있는 추세이다.

2) 국내 미생물농약은 총 8개 품목이 등록되었는데, 이중 국내 선두업체인 그린바이오텍이 2002년 3월 국내 처음으로 고추 역병 살충제와 젓빛곰팡이용 살균제 등 3종의 원제 등록과

더불어 2004년도에 2종의 미생물농약(셀러스, 큐펙트)를 추가하여 총 5개 품목을 등록하였다. 이어 2005년에는 잔디용미생물농약을 1건 추가하여 총 6개 품목을 등록한 것으로 밝혔다.

3) 2003년 전남대 지연태와 정순주 교수팀이 NIN(대표 김희경)와 공동개발한 천연무독성 농약 개발로 세계 29개국에 특허 출원하였다. 현재 이 연구팀은 작물안전성 검사를 마친 것으로 알려졌다.

4) 동부한농화학은 BT제인 '*B. thuringiensis* 살충제' 등 10 여종 이상의 미생물농약을 개발 중에 있으며 현재 5개 종이 등록 절차를 진행 중에 있다. 환경친화적 제초제인 DBH-129, 원예용 살충제 DBI-3204, 미생물살균제 AC-1, 나방류 방제에 주로 활용되는 “바이오박”을 상품화하였다.

5) 복성해(생명공학연구소) 박사팀은 최근 BT계 미생물농약의 약효를 10배 이상 오래 지속시키는 싼 제조공정의 개발로 26개국에 특허 출원하였고, 삼성물산과 캐나다의 2개 회사와 산업화를 추진 중에 있다.

6) 고려바이오연구소, 엔바이오시스, 한국바이오세라믹, 한국녹색환경, 비아이지 등의 바이오벤처기업과 경농, 한국화학연구원, 한국과학기술원 등도 연구개발을 활발히 진행하고 있다.

7) 본 연구실의 경우, 2005년 현재 과리목 해충에 대해 방제효과를 가지는 바실러스슈린지 에스 균주를 이용한 미생물 살충제(제 0458765 호)와 바실러스 리케니포미스 N1 및 이를 포함하는 식물병원성 진균 방제용 미생물 제제(제 0506721 호) 등의 2건이 미생물농약의 제형화로 특허 등록되었다.

4. 관련기술 문제점

가. 국내 개발의 문제점

- 1) 국내 개발기술은 연구역사가 짧고 기술수준이 낮고 연구인원이 수적으로 부족하며 연구가 산발적이며 중심체제가 없어 활성화가 지연되고 있다.
- 2) 방제대상의 선택성이 좁고, 제한적이다.
- 3) 농약 제조 판매측면에서 수익보장이 어렵고, 개발여력이 없다.
- 4) 사용자 측면으로는 속효성인 화학농약을 선호한다.
- 5) 농약 등록시 국내여건상 제출서류 작성 해결 부족 및 시일이 많이 걸린다.
- 6) 국내 미생물농약 등록을 위한 GLP 인정 독성시험기관이 미흡하며 이를 뒷받침할 국가차원의 적극적 지원이 필요하다.
- 7) 산학협력 체제의 미성숙으로 기술을 습득한 연구원들의 취업난때문에 기술 연계가 이루어지지 않는다.

나. 생물농약의 등록 요건

미국, 캐나다, 영국, 유럽 등의 외국에서는 화학농약과 생물농약의 등록 평가기준이 상세히 정해져 있으며, 안전성 평가부분에서도 요건별로 차이를 두고 있으나, 국내의 경우에는 농약관리법에 생물농약 등록규정이 있기는 하나 그 내용이 현재로서는 명확하지 않아 그 기준이 매우 모호한 실정이다. 일본의 경우에도 최근 생물농약의 실용화품목이 증가됨에 따라 새로운 규정에 의해 생물농약이 등록되고 있으며 등록규정이 정립되어 실용화를 간단히 추진되도록 하고 있다. 따라서, 국내에서도 새로운 생물농약 등록기준이 세부적으로 나뉘어 명료하게 설정되어 저독성이면서 안전한 생물농약이 활용될 수 있는 방법이 제시되어야 할 것으로 생각된다. 금후, 생물농약으로 실용화하기 위한 검토기준 중 연구자가 생각하여야 할 참고 사항으로는

- 1) 화학농약의 규격, 성상과 같은 수준으로 이용생물의 분류상의 위치와 특성을 명확히 파악한다.
- 2) 인간이나 가축에 대한 감염성의 유무, 병원성의 유무를 밝혀야 하며
- 3) 농약으로서의 실용적인 효과를 확인한다.
- 4) 표적작물에 대한 약해 및 이상증상 등에 영향이 없어야 하며
- 5) 환경이나 표적 외 생물(누에, 꿀벌, 지렁이 등 유용곤충)에 영향이 없고
- 6) 농약으로서의 제품관리(수송, 보관, 유효기간 등)가 되어야 한다.

다. 이용상의 문제점

- 1) 화학농약과는 달리, 그 효과가 서서히 나타나는 경우가 많다.
- 2) 주위 환경에 의해 효과가 영향을 받는 경우가 많다.
- 3) 재연성이 떨어지는 경향이 있다.
- 4) 화학농약 보다 낮은 방제가를 목표로 한다.
- 5) 화학농약에 비해 고가인 경우가 많다.
- 6) 사용상의 주의점이나 효과를 발휘하기 위한 조건이 있다.
- 7) 화학 농약과의 동시사용 영향 평가가 어렵다.
- 8) 화학농약에 비해 가격이 비싸나 생산물의 가격반영이 어렵다.

5. 앞으로의 전망

환경 친화적 미생물농약은 농약의 잔류독성 및 축적과 환경 오염 등 문제를 야기하는 화학농약의 대체 품목으로 시장이 확대될 것이다. 미생물농약 제조는 다른 분야에 비해서 비교적 외국과의 기술 격차가 적고, 미래 산업으로서 전망이 밝다. 하지만 개발 소요기간, 기술, 자금 등 많은 문제로 민간 기업이 이를 전부 해결해 나가기 어려운 실정이다. 이에 정부차원에서의 지원이 시급하다.

생물농약이 세계적으로 차지하는 매출액은 전체 농약 300억불 중 1%에 해당하는 3억 불에 지나지 않으며, 개발 실용화된 70여종 중 각국에서 많이 사용되고 있는 미생물 살충제인 Bt제를 제외하면 대부분의 생물농약 사용량은 많지 않다. 이외에 사용중인 생물농약은

화학농약보다 효과가 우수하거나, 화학농약에 의한 문제점으로 도출된 약제저항성 문제해결 또는 방제가 어려운 뿌리혹 세균병의 방제제로 이용되고 있다. 그러나, 이제까지 사용되고 있는 화학농약이 과학기술의 발달에 의해 밝혀지지 않았던 독성의 문제점이 점차 밝혀짐에 따라 저독 안전한 생물농약의 개발 및 실용화는 더욱 촉진될 것으로 생각된다. 특히, 생물농약은 환경생태계에 안전하며, 약제저항성 출현이 없고, 농산물의 안전성 및 부존자원을 이용한 저렴한 개발비 등으로 볼 때 개발은 꼭 필요하다.

국내의 입장으로 볼 때 농약을 필수적으로 사용하지 않으면 안될 상황에서는 자체개발 생물농약은 필요한 자재이다. 현재, 개발하고 있는 국내의 연구결과를 확대발전 시킨다면 단기간내에 실용화가 가능할 것이며, 외국에서 개발된 것보다는 국내 자원을 이용한 생물농약이 국내환경에 잘 적응할 뿐만 아니라 기술축적 측면에서 육성시켜야 할 분야로 보며, 21세기에 화학농약 대체로 생물농약 사용이 바람직할 것으로 볼 때 실용화 촉진은 필수적인 과제라 생각된다.

6. 기술도입의 타당성

가. 외국에서 상품화된 것은 특정 작물의 특정 병을 대상으로 하는 미생물농약이 주종을 이루고 있으나, 국내에서 많이 발생하는 병과는 양상이 다르므로 이에 대한 방제효과가 의문시된다. 설령 기술을 도입하더라도 기술의 종속, 기술료 등 아직까지 작은 우리나라 미생물농약 시장에서 경제성을 맞추기가 쉽지 않을 것이다.

나. 미생물농약의 개발은 장기간에 걸친 기술, 정보, 경험의 축적으로 이루어지며, 한번의 기술도입으로 그러한 능력을 갖출 수 없으므로 기술도입에 의한 기술의 정립은 불가능하다. 국제적인 기술 보호 여건이나 이를 극복해야 하는 국내 여건으로 볼 때 국내의 우수 연구진과 국내 기업이 효과적인 연구 공조체계를 이루어 연구를 진행해야 한다.

다. 미생물을 이용한 미생물 제제는 그 환경에 적응하는 능력이 중요하므로 국내에서 분리한 균주를 이용하는 것이 가장 바람직하다고 보여 진다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 연구 목표 : 결구상추 밀둥썩음병 방제용 미생물농약 개발

세부과제별 연구기관 : 동아대학교
연구책임자 : 제 1 세부과제 (정 순 재)
제 2 세부과제 (이 진 우)

제 1 절 서 론

결구상추(*Lactuca sativa var. capitata*)는 해바라기, 민들레, 과꽃, 치커리, 국화와 같이 국화과에 속하는 1년생 초본작물로 일반적으로 양상추 혹은 통상추라고 불린다. 16~17세기경 프랑스 네덜란드에서 개량된 품종들이 유럽 온대, 아프리카 북부, 아시아 서부지역으로 들어와 가장 많이 분포하고 있으며, 우리나라는 해방 이후 미군에 의해 들여온 후 군납용으로 재배하기 시작하였다(농림기술관리센터, 1997). 결구상추는 수분이 전체의 94~95%를 차지하고, 그 밖에 탄수화물·조단백질·조섬유·비타민C 등이 다량 함유되어 있어 노약자 및 어린이에게 좋으며(유태웅, 1997), 최근 햄버거 및 육류의 소비가 증가하면서 셀러드로 이용되어 재배지가 늘어나고 있는 추세이다.

우리나라에서는 봄, 여름, 가을, 겨울 주년재배로 이 중 70%가 여름철 고랭지 지역인 평창, 횡성, 태백, 정선 등지에서 생산되고 겨울 시설 재배하에서는 경남 의령, 진주, 하동, 김해, 전남 광주 일원에서 주로 생산된다. 생산량은 92년 이후 꾸준히 증가해 오다가 95년에서 98년 사이에 급격히 감소하였고, 99년부터는 생산량이 4배 이상 증가하여 전국재배면적이 471ha, 생산량이 17,141톤에 달하였고 2001년도에는 22,226톤 이상이 되었다. 이 중 경남 의령은 약 5ha에 5.5천톤 이상이 재배되고 있다(농진청 2002).

하지만, 최근 시설재배를 통한 연작과 하우스내의 다습조건 때문에 각종 병해충의 발생으로 수량과 품질이 저하되어 방제 대책이 시급한 실정에 있다(Hausbeck과 Moorman, 1996). 경상남도의 결구상추 재배지인 하동군과 의령군의 시설재배지에서는 늦가을부터 봄까지 밀둥썩음병이 발생하여 땅가에 접한 하위엽에 수침상의 병반이 생기고 병반이 진전되면서 결구상추 포기 안쪽까지 병이 확대되고 습도가 높을 때는 병반이 확대되어 포기 전체

가 고사하고 주변의 작물에도 전염하여 극심한 피해를 입히고 있다.

일반적으로 알려진 결구상추의 병해는 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)(문 등, 2002), 밑둥썩음병(*Rhizoctonia solani*)(김 등, 1995)정도만이 보고되어 있으나 동일 과 작물인 상추에서는 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*), 밑둥썩음병(*Rhizoctonia solani*), 갈색무늬병(*Cercospora longissima*), 잎마름병(*Septoria lactucae*), 세균성썩음병(*Pseudomonas* spp.), 모자이크병(CMV), 노균병(*Bremia lactucae*) 등이 알려져 있다. 이중 균핵병과 밑둥썩음병에 의한 1차적인 피해가 가장 심각하다.

밑둥썩음병(Bottom rot)을 일으키는 병원균인 *Rhizoctonia solani* Kühn (완전세대 ; *Thanatephorus cucumeris* (Frank))는 토양전염성 병원균으로서 세계적으로 폭넓은 기주를 가지고 있는 다범성균이며, 국내에 이 균에 의한 피해가 많이 보고되어 있으나 이 균의 생리생태학적 특성상 동정이 매우 어렵고 병해의 진단 및 방제 또한 어렵다. 주로 작물의 뿌리, 줄기, 괴경 등에 피해를 주는데 병징은 작물에 따라서 매우 다르며 때로는 같은 기주 작물에서도 다른 병징이 나타난다. 이 균은 밑둥썩음병 이외에도 모잘록병(damping-off), 뿌리썩음병(root rot), 줄기썩음병(basal stem rot), 줄기궤양병(stem canker) 등의 증상 등을 유발하며 때로는 작물의 수확 후 저장 중 부패를 유발하고 지표면에서 가까운 잎마름 또는 점무늬증상을 일으키기도 한다(농진청, 1995). 또한, 토양병원균이므로 침수지역이나 건조한 지역의 토양보다는 적당히 젖어 있는 토양에서 발생이 더 심하며, 어린 식물체에서의 감염은 부적당한 환경으로 인해 생장이 느린 경우 더욱 심하게 된다. 하지만, 일반적으로 빨리 자라는 식물체는 생육초기에 본 균에 의한 감염으로부터 다소 벗어날 수는 있으나(농업과학기술원, 1995), 1차적으로 감염되면 2차적으로 균핵병이나 잿빛곰팡이병이 발생하여 그 피해가 더 확산된다. 이러한 2차적인 병의 방제를 위해서는 1차 감염원인 *Rhizoctonia* 균의 방제는 필수적이다. 하지만, 지금까지 결구상추 밑둥썩음병 방제를 위한 화학약제는 공시된 바가 없으며, 농가에서는 주로 프로파, 베노밀 등의 약제를 이용하여 살포하고 있으나 그 효과가 매우 미미한 상태이다.

현재 결구상추 밑둥썩음병을 포함한 엽채류의 뿌리썩음병에 대한 뚜렷한 방제 약제가 공시된바가 없으므로, 본 연구에서 개발한 미생물농약이 제품으로 개발될 경우, 국내 공급은 물론 세계적으로 결구상추의 주요생산 국가로의 수출이 가능하며, 국내의 결구상추 생산 효율을 증대시켜 농가 소득 향상은 물론 전반적인 농업경쟁력 재고에 기여할 수 있을 것이다.

세계적으로 결구상추의 밑둥썩음병을 일으키는 병원균 *Rhizotconia solani*의 생물학

적 방제에 관한 연구로서 *Trichoderma harzianum*을 이용한 콩 모잘록병 방제와 *Penicillium*. spp., *Trichoderma*. spp.를 이용한 포인세티아(Poinsettia) 뿌리썩음병 방제, *Paecilomyces lidacinus*, *Burkholderia cepacia*를 이용한 콩 썩음병 방제 그리고, 딸기 눈마름병의 생물학적 방제에 이용된 방선균과 중복기생효과를 보인 *Trichoderma*. spp., 가지와 고추의 잘록병 방제에 *Penicillium ultimum*을 이용한 생물학적 방제 및 *Bacillus subtilis*와 *Trichoderma harzianum*을 이용한 생물학적 방제에 관한 보고는 있으나, 아직 이를 이용한 미생물농약은 개발은 전무하며 토양첨가제나 처리제로서는 시험만 되었을 뿐, 종자처리용 또는 작물살포용으로 길항미생물을 이용한 미생물농약은 전혀 개발되지 않고 있다.

목화에서의 생물학적 방제를 위해 *Pseudomonas fluorescens*가 분비하는 항생물질인 Pyrrolnitrin, Pyoluterin 및 키틴을 토양에 처리한 예가 있으며, 진균인 *Cladorrhinum foecundissimum*를 이용한 제제화에 관한 연구(Jack and Robert, 1998)와 *Trichoderma spp.*에 의한 제제화 방법에 대한 보고(Jack and R.D, 2001)만 되어 있을 뿐, 결구상추에서의 밀둥썩음병을 방제하기 위한 길항미생물과 항생물질을 이용한 미생물 제제에 관한 연구는 거의 전무하다(표 1).

미생물을 이용한 제제는 병원균에 대한 강한 길항력과 함께 기주의 근권에 잘 정착할 수 있는 능력이 있어야 하고 다른 근권미생물과의 경쟁에서 이겨야 하며 다양한 환경조건하에서도 길항력을 나타낼 수 있어야 하나 지금까지 생물학적 방제 연구에 보고된 길항 세균들은 주로 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속 균인 예가 대부분이어서 본 연구자는 지금까지 방제제 개발에 전혀 이용된 바가 없고 항균활성이 높은 새로운 균주를 탐색하고자 하였는데, 현재까지 의학, 생물공학 또는 환경정화(biodegradation) 분야의 연구에서 보고되어 왔으나, 작물에 대한 생물학적 방제 연구에서는 이용되지 않았던 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 균주를 확보하였다. 본 균주는 *P. maltophilia*와 *Xanthomonas maltophilia*로 보고 (hugh 등, 1980)되었다가 1993년에 *Stenotrophomonas* 속으로 재동정되었는데(Norberto J. Palleroni 등 1993), 본 연구의 공시길항세균인 BW-13균주를 16S rRNA gene sequence로 동정한 결과, *S. maltophilia*균과 99%의 상동성을 보였다. 본 균에 의한 밀둥썩음병의 생물학적 방제 기작은 아직 밝혀진 바가 없으므로 지속적인 연구가 요구된다.

표 1. 미생물의 길항물질을 이용한 생물학적 방제

기주	병원균	길항미생물	길항물질
Various host	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Antifungal compd.
Apple, Pear	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Burcholderia cepacia</i>	Pyrolnitrin
Cut rose	<i>Botrytis cinerea</i>		Pyrolnitrin
Strawberry	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pseudomonas antimicrobica</i>	Antifungal compd.
Lettuce	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Streptomyces griseovirides</i>	Cell respension
		<i>Fusarium</i> spp.	
		<i>Penicillium claviforme</i>	
		<i>Exophiala jeanselmia</i>	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Cladorrhinum foecundissimum</i>	
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Agrocin
Seeds	various pathogens	<i>Bacillus subtilis</i>	Antifungal compd.
Cotton	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pyrolnitrin
	<i>Pythium</i> spp.	<i>Trichoderma harzianum</i>	Pyoluternin
Various host	<i>Pythium</i> spp.	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Antifungal compd.
	<i>Verticillium</i> spp.		
Various host	<i>Fusarium</i> spp.,	<i>Streptomyces griseovirides</i>	Antifungal compd.
	<i>Pythium</i> spp.		
Various host	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Antifungal compd.

Giesler 등(1989)은 잔디의 브라운 팻취병 방제에 *S. maltophilia* C3균주를 biological agent로 이용하였고, Dunne 등(1997)은 *Pythium ultimum* 의 방제에 *S. maltophilia* W81 균주를 이용하였으며, Nakayama 등(1999)등은 사탕수수의 damping-off 방제에 *Stenotrophomonas* spp.의 xanthobacin의 연구결과를 보고하고 있다. Zhang 등은 1997년부터 2001년까지 *S. maltophilia* C3 균주의 병원성 진균에 대한 chitinase 특성과 기작연구(1997, 1999) 및 tall fescue에 발생한 *Bipolaris sorokiniana*에 대한 방제에 대한 연구 결과(1999, 2000)를 최근까지 발표하고 있으며 2001년에는 chitinase를 순화하여 2가지 종류의 chitinase를 분리 동정하였다.

한편, 유용미생물을 이용한 종자코팅제에 관한 국내의 연구는 1998년 김상달 등(영남대학교)에 의해 고추종자에 길항세균을 피막처리한 코팅종자가 고추역병에 효과적이었음을 보고하였고, 김충희 등(농업과학기술원, 2002년)은 고효성 유도저항성 근권균(EXTN-1)을 미생물종자 pellet 제형개발에 이용하고 종자처리수화제로 오이 탄저병, 배추 뿌리혹병, 고추 바이러스병(TMV), 오이 잘록병을 방제하였다. 안준철 등(2001)에 의한 연구에서는 키토산-

올리고당으로 배추, 무, 오이, 수박, 참외 종자를 코팅하여 항균필름으로 이용하기도 하였는데, 상기에 보고된 결과물들을 실용화한 예는 극히 드물다. 최근 배재대 바이오의약연구센터 소장 이기(李基)교수가 동부한농화학(주)과의 산학협력을 통해 배추무사마귀병 방제용 종자코팅제를 개발하고 코팅종자를 시판한다고 보고하였으나, 국내외의 결구상추 밀둥썩음병에 관련된 연구는 전무하다.

따라서, 본 연구에서는 현재까지 결구상추 밀둥썩음병에 대한 뚜렷한 방제 약제가 공시된바 없으므로, 밀둥썩음병을 방제하는 엽면살포제와 종자코팅제를 제형화하여 국내의 결구상추 생산 효율을 증대시키고 농가 소득 향상은 물론 전반적인 농업경쟁력 재고에 기여코자 한다.

제 2 절 유용미생물의 탐색 및 동정

1. 연구수행 방법

가. 공시작물 및 품종

경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 농가에서는 봄과 가을철에 20일에서 25일 마다 결구상추 종자를 파종하고, 25일된 유묘를 플라스틱 하우스에 재식하여 50일 내지 60일 후에 성체를 수확하며 겨울철에는 파종 40일~45일 후에 하우스에 재식하고 80~90일 후에 수확하고 있다. 이에 본 연구에서도 경종은 농가관행시설재배에 준하였다. 결구상추 품종은 서늘하고 건조한 기후조건에서 잘 육성되고 안정적인 생산을 유도하는 품종이어야 하므로 현재 농가에서 통상적으로 사용하고 있는 엠파이어(상품명: 유레이크) 여름품종과 샤크라멘트(상품명: 세레나) 겨울품종으로 공시하여 생육실 포트 검정, 온실내 포트 검정 및 플라스틱하우스내 토경 실험 등에 공시하였다.

나. 밑둥썩음병의 발생과 발병율 조사

2003년 10월 초순부터 2004년 2월 중순까지 경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 농가에서 발생한 밑둥썩음병(bottom rot)의 발병율을 조사하였는데, 이때 밑둥썩음병 발병율은 재식한지 50일된 결구상추 재배 플라스틱 하우스 6동을 1하우스당 5 구역(구역당 300×300cm)으로 임의 선정하고, 총 조사 주수(6동×100주×5구역)에 대한 이병주수를 조사하여 이병주율로 환산하였다.

다. 병원균 분리 및 동정

밑둥썩음병이 발생한 경상남도 의령군 부림면 신반리와 경상남도 하동군의 결구상추 재배 플라스틱하우스에서 이병 결구상추를 채집하여 밑둥썩음병원균(*R. solani*)를 분리하였다. 이병 결구상추의 아래 잎 밑둥의 각 부위 면적을 1cm²가 되도록 잘라 감자한천배지(Potato Dextrose Agar)와 스트렙토마이신(Streptomycin)이 50 µg/ml 첨가된 물한천배지(Water Agar)배지에 올려 25℃ 암조건에서 7일간 배양하여 순수 분리하였다.

분리된 30 균주 중 병원성이 가장 강한 것으로 확인된 공시병원균 PY-1 균주의 동정을

위해, 먼저 균주를 WA 또는 PDA 평판배지에 이식하고, 25°C에 1주간 배양 후 광학현미경으로 균사 및 핵 형태를 조사하였다. 균사체의 핵관찰은 공시병원균 PY-1을 PSA(Potato sucrose agar)배지에서 1~3일간 배양(25°C)하고 절취한 5 mm 균총 절편을 멸균한 슬라이드 글라스 위에 올려 놓고 25°C 습실에서 1~2일간 배양하였다. 이를 HCl-Giemsa(Kim, 1989)로 염색하여 균사세포 내의 핵 수를 조사하였다. 균사용합균 조사는 영남과학연구소로부터 분양받은 AG1, AG2, AG4, 2핵 Rhizoctonia spp. 등의 표준균주를 공시병원균 PY-1 균주와 함께 셀로판지로 덮은 물한천평판배지에 2~3 cm 거리를 두고 올려 놓은 다음 25°C 배양기에서 1~2일간 대치배양하여 균사접촉부위를 광학현미경(Zeiss, Germany, 400배)하에서 균사용합 여부를 관찰하였다. 이때, AG1의 배양형(subgroup) 동정을 위해 PY-1 균주를 2~3주간 WA 배지상에서 배양한 후 광학현미경하(100배)에서 균핵의 크기 및 형태를 조사하여 IA와 IB로 분류하였다(김완규, 1993, 1994).

라. 병원성 검정

1) 밀둥썩음병

공시병원균 PY-1 균주의 효과적인 병원성 검정을 위해 2종류의 접종원을 준비하여 결구상추에 처리하고 이들의 발병도를 조사하여 가장 적합한 접종원 종류와 처리농도를 선발하였다. 먼저 균사조각부유액(triturated mycelia-inoculum) 접종원은 PDA배지에 전배양한 PY-1 균주를 yeast extract glucose broth (YGB, glucose 15.0 g, K₂HPO₄ 5.20 g, KH₂PO₄ 43.18 g, NH₄Cl 0.54 g, yeast extract 0.50 g, MgSO₄ 0.12 g, distilled water 1 L)에 6일간 진탕배양(150 rpm, 25°C) 한 후 균사를 걸러내어 탈이온수로 5회 세척하고 분쇄기(Waring, USA)로 15초간 균사를 절단하여 완충용액(pH 7.0)으로 농도(A₅₅₀ = 0.6, 0.8, 1.0)를 조정하여 접종원으로 사용하였다. 다음은 WRSP배지 접종원을 이용하였는데, 3000 ml용 삼각플라스크에 WRSP배지(밀기울: 미강: 톱밥: PDB배지=30 g: 10 g: 10g: 100 ml, w/w/w/v)를 잘 혼합하여 고압살균 (121°C, 20분)하고 여기에 PY-1 병원균의 균사절편(9 mm)을 10개 이식한 후 25°C의 항온기에 3주간 배양하여 흰색의 균사가 삼각플라스크내에 완전히 퍼지면 살균수 1 L를 첨가하여 분쇄기로 15 초간 갈아 접종원으로 이용하였다. 이때, 균사조각부유액 접종원은 포트재배한 30일된 결구상추 잎에 주당 40 ml를 농도별로 분무살포하였으며, WRSP배지 접종원은 포트내 토양 800 g 당 20, 30, 40 ml의 처

리량별로 토양표면과 아랫잎 밑등부위에 접종하였다. 접종한 결구상추를 생육실(25℃, 상대 습도 90%)에 보관하면서 매일 발병도(%)를 조사하였다. 이때 각 처리구는 포트당 1주씩 3 포트, 3반복으로 3회 조사되었으며 이를 평균하여 주당 발병도로 표시하였다. 발병도(%)는 농약등록시험 기준과 방법에 따라 병반면적율을 조사하여 다음과 같이 발병도로 환산하였다 (한국농약공업협회, 2001).

$$\text{발병도}(\%) = \frac{(\text{발병수} \times \text{계수})}{4 \times \text{엽수}} \times 100$$

- 계수 : 0- 발병무,
 1- 병반면적율 1~5%,
 2- 병반면적율 5.1~20%,
 3- 병반면적율 20.1~40%,
 4- 병반면적율 40% 이상

2) 모잘록병

결구상추 종자를 과중한 플러그포트재배의 유포에서 모잘록병에 대한 병원성 검정은 앞서의 밑등썩음병 병원성 검정과 동일한 방법으로 PDB배지에 PY-1 균주를 진탕배양하고 균사조각부유액(A₅₅₀=0.8)을 준비하여 한 플러그 당 1 ml, 2 ml, 3 ml로 플러그내 토양에 처리하였다. 종자를 플러그포트 당 1개씩 과중하여 25℃, 상대습도 90%의 생육실에 보관하면서 과중 후 7일까지 매일 이병주율을 조사하였다.

마. 길항 미생물의 분리

경상남도 의령군 부림면 신반리 결구상추 재배 포장에서 건전 결구상추의 밑등부위, 뿌리 및 근권토양 10 g을 살균수 50 ml과 각각 혼합한 후, 분쇄기(Waring, USA)에 10~30초간 마쇄한 다음 nutrient agar배지에 평판희석법으로 배양하였다. 각 시료를 30℃에서 배양하고 48시간 이후에 생성된 다양한 세균 균총에서 약 600 균주를 분리하였다. 또한, 유용미생물의 확보를 위해 근권 토양에서 추가적으로 분리된 약 102 균주들을 포함하여 총

702 균주가 분리되었다. 각 분리균주를 PDA배지상에서 병원균 PY-1균주와 25℃에서 5~7일간 대치배양하여 균사생장 저지대(inhibition zone)를 조사하여 저지대가 큰 세균을 길항세균으로 1차 선발하였다.

선발된 7 균주들을 각각 Nutrient broth 배지에서 1일간 진탕배양(30℃)한 후 세균부유액(1×10^6 cfu/ml)을 조제하여 플러그포트에 파종하여 2주된 결구상추 유묘 및 포트에 재식 후 4주(파종 후 8주)된 성체식물에 각각 50 ml, 100 ml씩 골고루 분무접종하였다. 이것을 25℃ 생육실에 24시간 보관한 다음, Yeast extract glucose broth (YGB배지)에서 진탕배양한 병원균 PY-1 균주의 균사조각 부유액($A_{550}=1.0$)을 유묘에 10 ml, 성체에는 40 ml 씩 길항세균 처리한 결구상추 잎에 골고루 분무 접종하고(Kim 등, 2004), 3일 후 플라스틱 하우스에 옮겨서 7일 이후에 방제가를 조사하였다. 각 처리구는 5포트씩 3반복으로 시행하였으며 이때, 방제가가 우수한 균주를 길항균으로 최종 선발하고 미생물농약 제조에 이용하였다.

한편, 최종선발 길항균 외에 2차년도에 추가로 분리된 KT-25, LY-11, N1, Pro-EB-15, CT-11, CT-13 등 6균주에 대한 밀둥썩음병균에 대한 군사생육저지효과를 조사하여 항균활성이 높은 세균을 추가로 선발하였다. 또한, 이들 선발 세균의 세균부유액(1×10^6 cfu/ml)을 종자에 처리하여 유근 길이, 유묘 생체 및 건조중을 조사하고 유묘 생육촉진효과를 보인 세균을 종자처리 미생물농약 제조에 이용할 길항세균으로 최종 선발하였다.

바. 길항미생물의 혼합처리에 의한 방제효과 증진 실험

엽면살포제 개발에 이용될 길항균으로 최종선발된 BW-13 균주 외 추가로 R-13 및 R-26 균주 등 3 균주를 공시하여 단독 혹은 혼합 처리하여 방제효과를 증진코자 하였다. 앞서의 생육실 포트재배의 방제효과 검정 방법과 동일한 방법으로 수행되었다. 처리구로는 단독처리구(R-13, R-26, BW-13) 및 혼합처리구(R-13+R-26, R-26+BW-13, R-13+BW-13, R-13+R-26+BW-13)로 나누어 각각 분무 살포되었으며 생육실에서 24시간 보관 후 병원균 YR-1 균주의 군사부유액을 처리하여 발병도를 조사하고 방제가로 환산하였다. 이상의 실험에서 방제가를 다음과 같이 환산하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{\text{무처리의 발병도} - \text{처리구의 발병도}}{\text{무처리구의 발병도}} \times 100$$

사. 선발 길항세균의 동정

최종 선발된 엽면살포제 미생물농약 제조에 이용될 길항 미생물 BW-13 균주 및 종자 처리제 미생물 농약에 이용될 길항미생물 LY-11 균주의 동정을 위하여 투과전자현미경 (TEM)을 이용한 형태 관찰 및 API system (API 20E kit, bioMerieux, France)를 이용한 생리학적 특성을 조사하였으며, 기타 생화학적 특성을 Bergey's manual을 기초로 하여 조사하였다.

1) TEM(Transmission electronic microscopy)을 이용한 형태관찰

BW-13균주를 Nutrient agar(NA)배지에서 1일간 배양 후 이 세균부유액을 3차 증류수로 1/2, 1/4, 1/16, 1/32의 순으로 희석하고, grid를 각각의 희석된 세균부유액에 묻힌 후, 1% aqueous uranyl acetate를 떨어뜨려 1~2분 방치하여 세균의 형태와 편모를 관찰하였다. 이때, negative staining은 grid 위에 1% aqueous uranyl acetate를 처리하였다.

2) 생리·생화학적 특성 및 API test 검정

Bergey's manual을 기초로 하여 그람염색, 혐기생장, 온도 조사, catalase, protease, 전분의 가수분해 등을 조사하였다. Gram staining 및 생리·화학적 특성을 조사하여 동정하고 또한, API system(API kit 20E, 50CHB, bioMerieux, France)을 이용하여 동정하였다.

3) 16S rRNA gene sequence analysis

BW-13 균주의 정확한 동정을 위한 16S rDNA sequence 분석을 위하여, LB배지에서 1일간 배양한 세균으로부터 Genomic DNA purification kit (Promega, U.S.A)를 사용하여 chromosomal DNA를 준비하였으며, 16S rDNA의 증폭을 위한 primer는 universal primer 27mF (5'-AGA GTT TGA TCH)와 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다. PCR 반응은 초기 변성화 반응(95°C, 3분), 30회의 증폭반응(94°C, 1분; 45°C, 30초; 72°C, 1분 30초) 그리고 최종 확장반응(72°C, 5분) 조건으로 수행되었다. PCR 반응물은 최종 50 µl 부피에 약 40 ng의 DNA, 1 × *Taq* DNA polymerase 완충액, 0.2 mM의 각 dNTPs, 2 mM의 MgSO₄, 그리고 0.25 µM의 primer, 2.5 units의 *Taq* DNA polymerase 가 혼합되었다. PCR product는 pGEM-T vector (Promega, U.S.A)에 cloning하였으며, 유전

자의 염기서열은 GenBank에서 BLASTN으로 분석하였다. 최종선발된 길항세균 BW-13 균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하고 PAUP 프로그램의 default setting으로 Maximum parsimony 분석을 통해 계통분류적 위치를 확인하였으며, 계통분류 tree의 신뢰를 위해 200회 반복으로 Bootstrap 분석을 수행하였다.

2. 연구 결과

가. 밑둥썩음병 발생과 병원균 분리 및 동정

1) 밑둥썩음병 발생 및 발병율 조사

2003년 10월에서 11월사이에 경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 플라스틱 하우스 6동에 발생한 밑둥썩음병의 발병율을 조사한 결과, 평균 이병주율은 5.3%이었다(Table 1, Fig. 1A). 밑둥썩음병의 병징은 발병 초기에 아랫잎 밑둥 부위에 수침상의 원형 내지 타원형의 담갈색 또는 갈색 점무늬가 나타나고, 진전되면 윗 잎쪽으로 병반이 부정형으로 크게 확대되어 결국 잎이 무르게 썩고 누렇게 변하며 종이처럼 말라 죽는 증상이 관찰되었다(Fig. 1B, 1C, 1D). 한편, 밑둥썩음병의 발생 후에 2차적으로 균핵병과 잿빛곰팡이병이 유발되어 작물에 더 큰 피해를 주었는데, 기온이 다소 높고 비가 많이 오는 장마철이나 가을비가 계속되는 시기에 수확기가 가까워지면서 병반이 확대되고 그 표면에 검고 편평한 균핵이 발생하는 등 그 피해 정도가 심각해졌다.

Table 1. Occurrence of bottom rot of crisphead lettuce caused by *Rhizoctonia solani* in crisphead lettuce fields at Gyung-sangnam-do in 2003

Plastic house ^a	Disease severity index (%) ^b
I	0.004
II	6.6
III	6.8
IV	8.5
V	8.0
VI	2.1
mean	5.3

^a Plastic houses were selected randomly.

^b Disease severity index (%) was obtained by estimating the number of plants infected by *Rhizoctonia* spp.

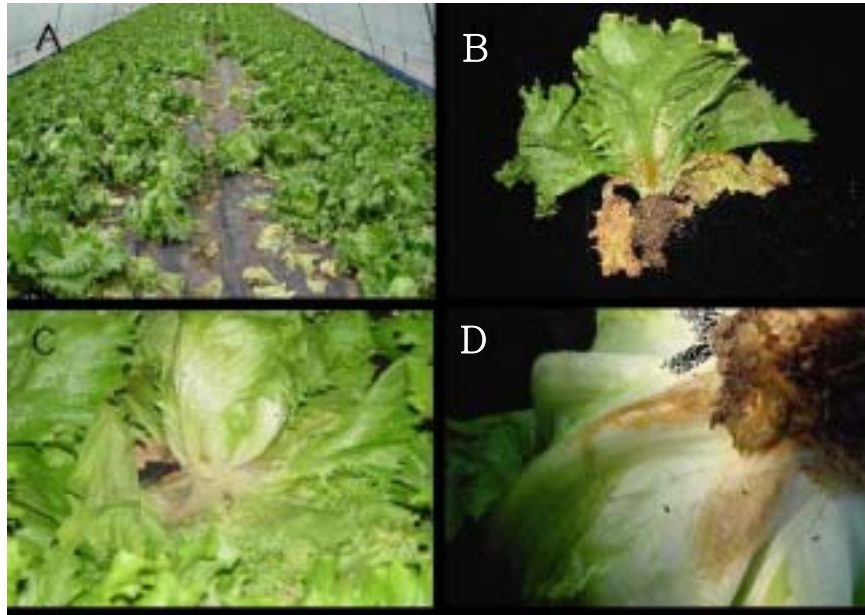


Fig. 1. Occurrence of bottom rot caused by *Rhizoctonia* sp. on crisphead lettuce fields in 2003. A, Infected crisphead lettuce in the fields eventually died; B, Infected lower leaves of crisphead lettuce at early-heading stage; C, Infected bottom lesion of crisphead lettuce at mature stage; D, Typical symptoms on lettuce induced by artificial inoculation of *Rhizoctonia solani* PY-1 isolate.

2) 밑둥썩음병 병원균의 분리 및 동정

병든 결구상추의 아랫잎 밑둥부위에서 분리된 30 균주를 결구상추의 윗잎과 아랫잎에 각각 접종하여 병원성 검정을 실시하였다. 그 결과 대부분의 균주가 윗 윗부분과 아래 밑둥부분에서 강한 병원성을 보였으며, 윗 윗부분과 아래 부분에서 모두 병원성이 강한 PY-1 균주를 공시 병원균으로 최종 선발하였다(Fig 1D). 공시 병원균 PY-1 균주의 배양적·형태적 특성을 조사한 결과, PDA배지에서 균사가 짙은 갈색으로 뒤덮였으며 불규칙한 구형의 균핵이 생성되었으나, 분생포자는 생성되지 않는 배양적 특성을 보였다(Fig. 2). 형태학적 특성으로 주축균사의 폭이 넓고 측지균사는 분기점에서 가늘고 잘록하였으며, 이로부터 가까운 곳에 격벽이 생기고 오래된 균사는 직각으로 분기되는 특징을 보였다(Fig. 3A). 또한 pseudohypha도 관찰되었으며(Fig. 3C), 균사체의 핵은 다핵성이었다. 이상의 결과로

보아 PY-1 균주는 *Rhizoctonia solani*로 동정되었으며, PY-1 균주와 공시 표준균주와의 균사융합 여부를 관찰한 결과, AG1 균과 불완전 융합하는 것이 관찰되어 PY-1 균주는 AG1 균에 속하는 것으로 확인되었다(Fig. 3B). 또한, AG1의 배양형 동정에서는 균사의 색 변화가 밝은 갈색에서 짙은 갈색으로 변하며, 균핵은 불규칙한 구형으로 산만하게 퍼져 자라거나 배지 중앙에 모여 형성되고, 균핵 크기는 보통 0.4-1.3 mm으로서 Parmeter (1969) 등에 따라, 최종적으로 균사융합균·배양형은 *R. solani* AG-1(IB)로 동정되었다. Herr(1992)는 결구상추의 밀둥썩음병으로부터 분리한 균주들은 *R. solani* AG2-1, AG1-IB, AG-IC, AG-4 및 binucleate *Rhizoctonia* spp.이었다고 보고하였는데, 본 연구결과에서도 공시병원균PY-1 균주는 AG-1에 속하였으며 PDA 배지상에서 초기에 흰색의 균사가 넓게 확산되다가 나중에 담갈색 또는 암갈색으로 변하였으며, 암갈색의 부정형 또는 구형의 균핵을 형성하였고, 균사를 염색하여 동정한 결과 2개 이상의 핵을 가지고 있었다(Peter william wareing, 1987, Kim, 1993). 본 연구의 공시병원균 *Rhizoctonia solani* PY-1 균주를 다음 실험에서와 같이 결구상추에 병원성 검정을 실시한 결과 밀둥썩음병 증상을 보여 기존의 보고와 일치하였다.

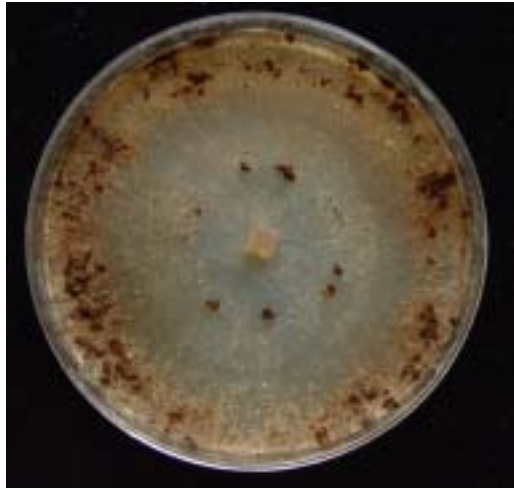


Fig. 2. Cultural characteristics of *Rhizoctonia solani* PY-1 (AG1-IB) isolate grown for 5 days on potato dextrose agar (PDA) media at 25°C.

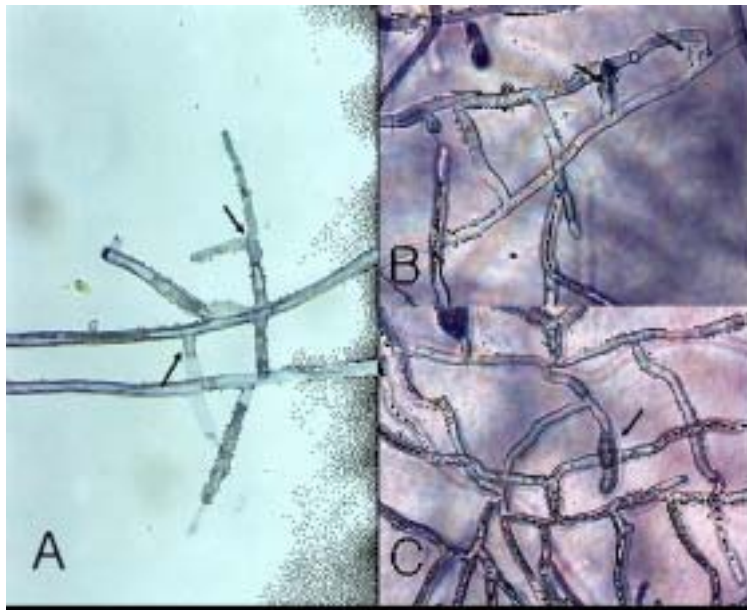


Fig. 3. The branching near the distal septum of cells in young vegetative hyphae (A), hyphal anastomosis between PY-1 isolate from infected crisphead lettuce and *Rhizoctonia solani* AG1 (B) and pseudohyphae of PY-1 isolate (C).

나. 병원성 검정

1) 접종원 종류 및 처리농도

밀등썩음병원균 *R. solani* PY-1 균주의 접종원 선발을 위해 군사조각부유액과 WRSP 배지를 각각 포트내 결구상추의 토양 표면 및 잎 아래 밀등부분에 접종하고 병원성을 검정한 결과, 50%의 발병을 나타내는 ED50 값에 가까운 접종원 처리 농도는 WRSP 배지 접종원 40 ml 처리시 9일째 평균 주당 발병율 61.6%인 경우와 군사조각부유액 접종원의 $A_{550}=1.0$ 처리시 평균 주당 발병율 51.1%인 경우이었다. 따라서, 두 접종원의 효과는 유사한 것으로 확인되어 병원성 검정 방법이 용이하면서도 효율적인 군사조각 부유액 접종원은 플러그포트와 생육실 포트 검정용으로 선발하고, 부생적 착생을 위한 플라스틱 하우스내 토경 재배 검정용으로는 WRSP 배지 접종원을 선발하였다(Fig. 4).

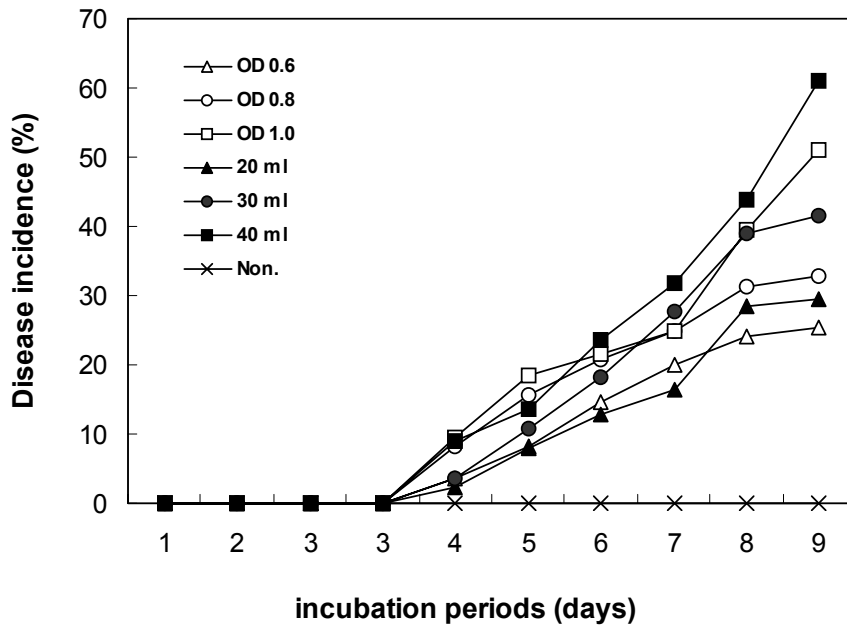


Fig. 4. Selection of effective inoculum concentration of *Rhizoctonia solani* PY-1 isolate for the pathogenicity on crisphead lettuce at pots in a growth chamber. Disease severity index (%) was obtained by measuring the percentage of infected leaf area on each plant by *R. solani* PY-1 isolate. $A_{550} = 0.6$ (-△-), 0.8 (-○-) and 1.0 (-□-) of triturated mycelia-inoculum ; 20ml (-▲-), 30ml (-●-), and 40ml (-■-) of WRSP inoculum ; -×-, non-treatment.

2) 모잘록병의 병원성 및 균사조각부유액의 최적 처리량

R. solani PY-1균주의 균사조각부유액의 처리량에 따른 모잘록병의 병원성 검정을 실시한 결과, 플러그포트 재배에서 1 플러그당 1 ml($A_{550}=0.8$)을 처리한 구가 7일째에 50%의 이병주율을 나타내어 가장 적절한 접종원의 처리량으로 선발되었다(Table 2).

Table 2. Pathogenicity and selection of suitable inoculum volume of *R. solani* AG-1 on crisphead lettuce at plugpots experiment

ml/plant ^b	Disease severity index (%) ^a						
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days
1	24.4	40.0	41.1	44.4	46.7	47.8	50.0
2	32.2	44.4	52.2	61.1	65.6	67.8	71.1
3	57.8	65.6	73.3	86.7	100	100	100
Control	0	0	0	0	0	0	0

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the number of plants infected by *R. solani* AG-1

^b triturated mycelial suspension ($A_{550} = 0.8$)

이때 유묘에서의 모잘록병 병징은 감염초기에 잎 아래 부분에 원형 내지 타원형의 암갈색 점무늬가 형성되고 진전되면서 부정형으로 확대되었다. 병이 심해지면 줄기의 지체부가 잘록해지고 썩어 결국 유묘가 쓰러지고 심하게 감염된 잎은 흑색으로 변하여 썩어 말라 죽었다(Fig 5).

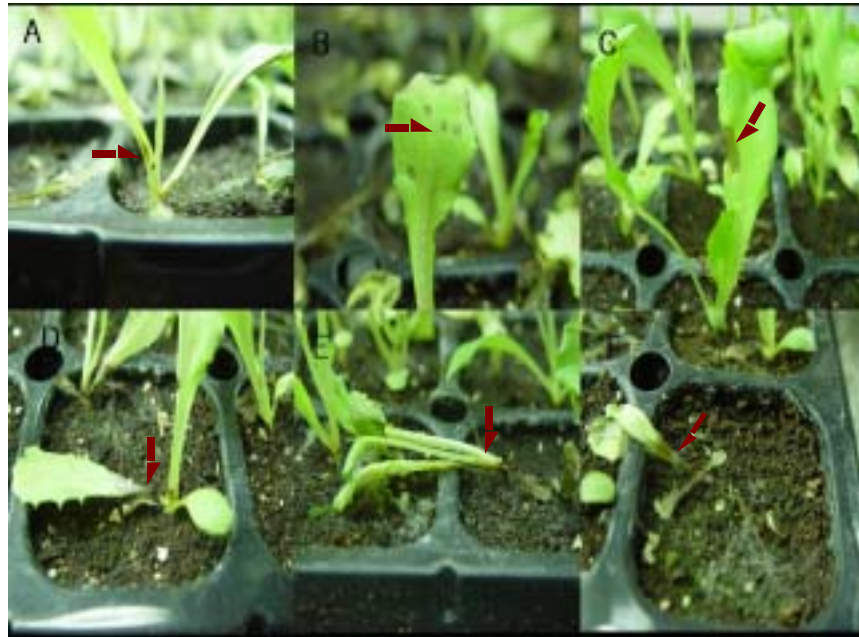


Fig. 5. Symptoms of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* PY-1 isolate for the pathogenicity on crisphead lettuce at plugpots in a growth chamber. A, spot rot on stem; B, spot rot on leaves; C, irregular spot rot on leaves; D, rotten leaves; E, fallen seedling; E, decay of seedlings.

다. 우수길항균 선발

토착 생육력이 강한 길항세균을 분리하기 위하여 재배 포장내의 건강한 결구상추의 밑둥부위, 뿌리 및 근권토양에서 토양세균을 분리한 결과 총 702균주가 분리되었다. 이들 중 밑둥썩음병원균인 *R. solani* PY-1에 대해 길항능을 지닌 균주를 선발하기 위하여 PDA배지에 서 병원균과 분리 세균과의 대치배양한 결과, 강한 항균활성을 나타낸 7균주를 1차 선발하였다(Table 3, Fig. 6).

Table 3. Effect of 7 antagonistic bacterial isolates on the *in vitro* growth of *Rhizoctonia solani* PY-1 in growth inhibition assays

Antagonistic bacteria	Inhibition zone
R-13	+ ^a
R-26	++
R-39	++
RH-1	+
RH-4	++
CAA-2	++
BW-13	+++

^a Symbols: +, Inhibition zone less than 2 mm; ++, Inhibition zone between 2 mm and 5 mm; +++, Inhibition zone more than 5 mm.

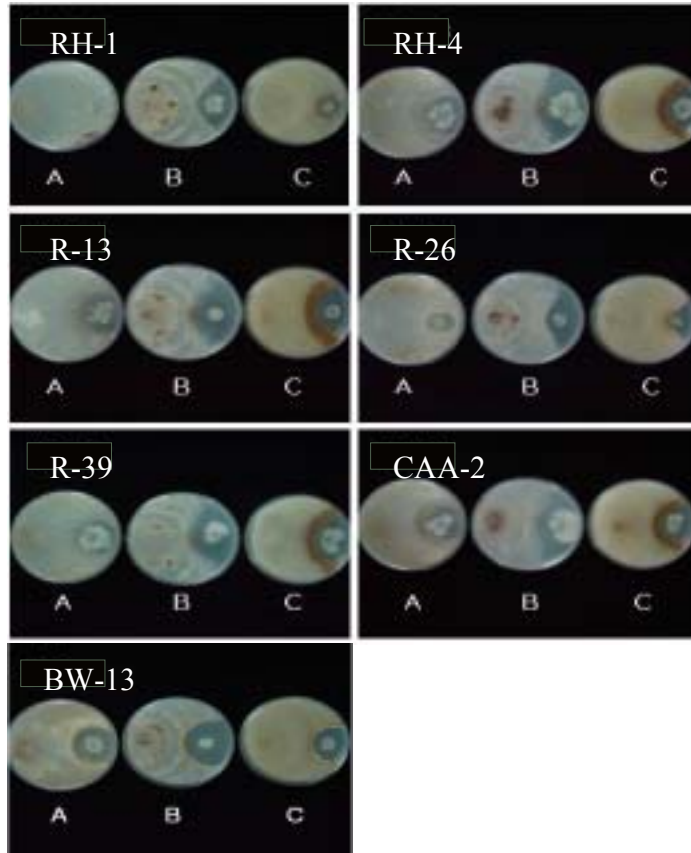


Fig. 6. Growth inhibition of three *Rhizoctonia solani* strains by 7 bacterial isolates on PDA medium. *R. solani* strains were isolated from diseased crisphead lettuce obtained in plastic house at Uiryeong-Gun, Gyeong Sang Nam-Do. A, *R. solani* PY-1 ; B, *R. solani* AG 2-1 ; C, *R. solani* AG-4

1차 선발된 7 균주의 각 세균부유액(1×10^6 cfu/ml)을 유묘에는 50 ml, 성체에는 각각 100 ml씩 분무접종하고 24시간 후에 병원균 균사조각부유액을 유묘에는 10 ml을, 성체에는 40 ml 씩 접종하고 접종 10일 후에 방제가를 조사하였다. 그 결과, 유묘에서 R-13 처리구가 82.4%의 방제가로 가장 높았고, 다음은 BW-13, R-26 순으로 각각 72.4%, 63.7%의 방제가를 나타내었다. 그 외의 균주들은 모두 50% 미만으로 낮은 방제가를 나타내었다. 성체 식물에서는 BW-13 균주가 70.3%의 방제가로 가장 우수하였고, 다음으로는 R-13, R-26 순으로

각각 65.1%, 63.4%의 방제가를 나타내었다. 따라서 유묘와 성체에서 모두 방제가가 높았던 BW-13 균주를 엽면살포제 미생물농약 제조에 이용될 길항균으로 최종 선발하였다(Fig. 7, 8)

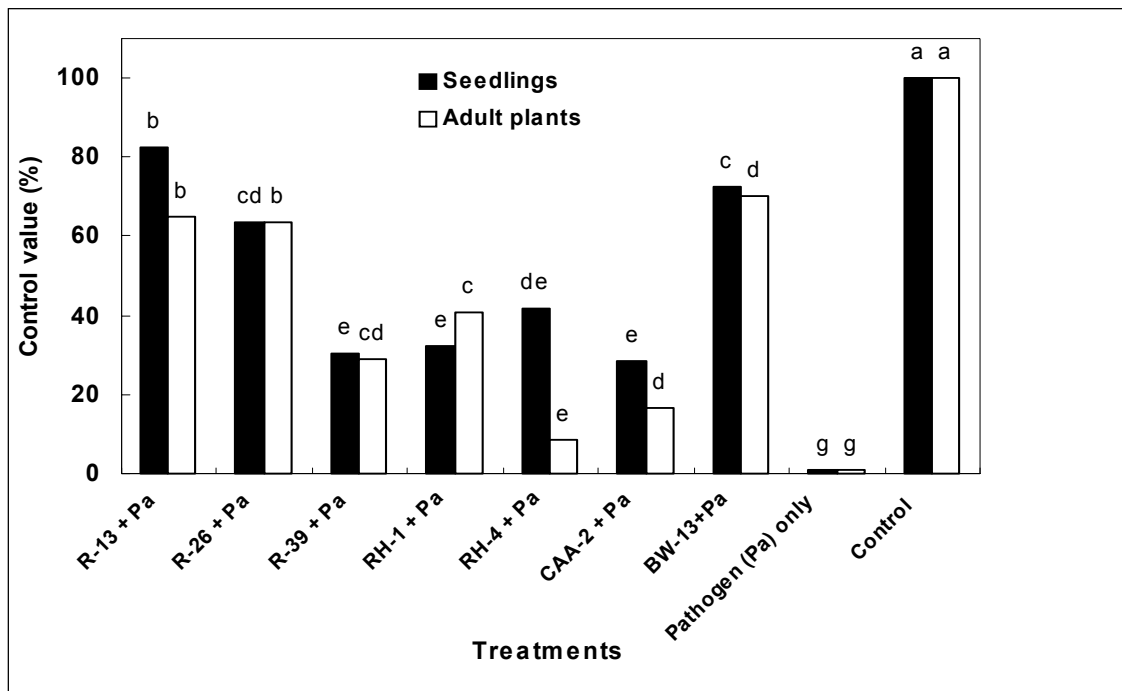


Fig. 7. Effects of bacterial antagonists on seedlings and adult plants of crisphead lettuce infected with *Rhizoctonia solani* in the growth chamber evaluations. Disease control value (%) was calculated by estimating the percent (%) of non-infected leaf area on each plant by *R. solani* PY-1.

* Mean separation by Duncan's multiple range test at 5% level.

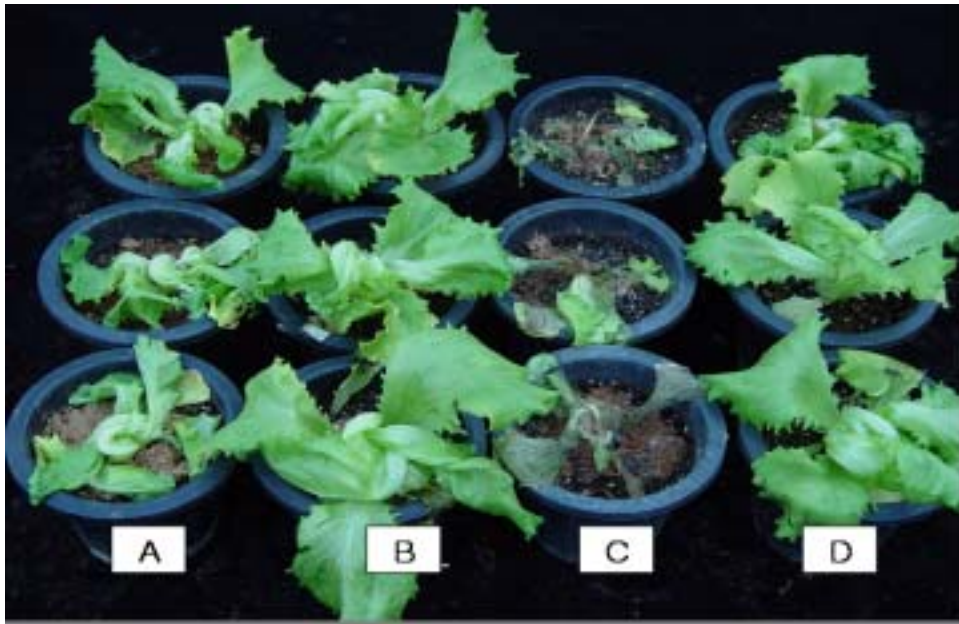


Fig. 8. Disease control effects of Rhizoctonia bottom rot of crisphead lettuce by the antagonistic bacterial isolates in a dew chamber. A, RH-1+Pa ; B, BW-13+Pa; C, Pathogen (Pa) only; D, Control.

엽면살포제 제조에 이용될 길항균으로 최종 선발된 BW-13 균주와 2차년도에 추가로 분리된 6균주(KT-25, LY-11, N1, Pro-EB-15, CT-11, CT-13)를 공시하여 밀둥썩음병균에 대한 균사생육저지효과를 조사한 결과, BW-13 균주와 LY-11 균주에서 각각 4.5 mm와 7.0 mm의 높은 저지대를 보였다(Table 4).

Table 4. Inhibitory effect of 14 antagonistic bacteria on mycelial growth of *R. solani* PY-1 on PDA medium

Isolates	Inhibition zone (mm)
BW13	4.5 b ^a
KT-25	0.0 d
LY-11	7.0 a
N1	2.8 c
Pro-EB-15	2.8 c
CT11	0.0 d
CT13	0.0 d

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

이들 2균주를 포함한 총 11 균주를 결구상추 종자에 처리한 후 유묘의 성장촉진효과를 검정한 결과, LY-11 균주가 BW-13 균주보다 유근의 길이, 묘 생체중 및 건조중의 촉진효과가 약간 우수하였다. 따라서, 종자처리미생물농약 제조에 이용할 길항세균으로 LY-11 균주를 최종 선발하게 되었다(Table 5).

이상의 결과로, BW-13 균주는 밀둥썩음병 방제용 엽면살포제 개발에, LY-11 균주는 종자처리 미생물농약 개발에 이용할 우수 길항균으로 각각 최종 선발되었다.

Table 5. Growth of coated crisphead seeds with the each 11 antagonistic bacteria

Isolates	Length of young root (cm)	Seedling	
		Dry weight (g)	Fresh weight (g)
R-13	10.6 c ^a	11.4 e	3.0 c
R-26	13.7 a	16.5 a	3.5 b
R-39	11.0 c	12.4 d	3.8 a
S-8	13.4 ab	15.5 b	2.6 de
LY-11	13.8 a	16.6 a	3.9 a
BW13	10.3 c	12.8 cd	2.6 de
Pro-EB-15	13.7 a	15.5 h	2.4 df
RH-1	13.0 ab	14.7 b	3.9 a
RH-2	13.4 ab	15.1 b	2.3 f
RH-3	11.0 c	12.2 de	3.5 b
RH-4	8.6 d	10.4 f	2.3 f
Control	12.8 ab	13.5 c	2.7 d

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

라. 길항미생물의 혼합처리에 의한 방제효과 증진 검정

엽면살포제에 이용할 길항균으로 최종 선발된 BW-13 균주 외 R-13, R-26 균주를 공시하여 단독처리하거나 또는 혼합처리하여 밀등썩음병에 대한 방제효과를 검정하였는데 그 결과, 3균주를 혼합한 처리구(R13+R26+BW13)가 96.6%의 방제가로 가장 우수하였으나, 3균주를 각각 단독 처리한 구와 비교하여도 서로 유의적인 차이는 없었다(Table 6, Fig. 9).

Table 6. Control effect of single treatment and mixed treatment of A-7, R-13, R-26, and BW-13 to *R. solani* PY-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber

Treatments	Control value (%)
	7 days after inoculation
R-13 + Pa	86.7 ab ^a
R-26 + Pa	75.3 b
BW-13 + Pa	89.4 ab
R-13+R-26 + Pa	90.1 ab
R-13+R-26+BW13 + Pa	96.6 a
Pathogen (Pa) only	0.0 d
Control	100.0 a

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig. 9. Control effect of single treatment and mixed treatment of A-7, R-13, R-26, and BW13 against *R. solani* PY-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber. A, A-7; B, R-13; C, R-26; D, BW-13; E, A-7+BW-13; F, R-13+R-26; G, R-13+R-26+BW-13; H, A-7+R-13+R-26+BW-13; I, Pathogen only; J, Control.

마. 선발 길항 세균의 동정

1) BW-13 균주의 동정

가) 생화학적, 형태적 특성조사

그람 염색법과 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰한 결과, 그람 음성의 간균이었으며 편모가 있어 운동성이 있는 것으로 조사되었다(Fig. 10). 또한, 생화학적 특성을 조사한 결과, catalase, protease의 활성 그리고 starch 분해능이 있었으며, citrate와 glucose을 이용하였고, oxidase에 양성반응을 나타냈다. 또한 진균의 세포벽을 가수분해할 수 있는 chitinase 활성은 나타났지만 미미한 수준이었고, 식물에 대한 병원성은 나타나지 않았다. 이상의 생리·생화학적 및 형태학적 특성을 Bergey's manual과 비교한 결과 *Stenotrophomonas maltophilia*와 가장 유사하였다(Table 7).

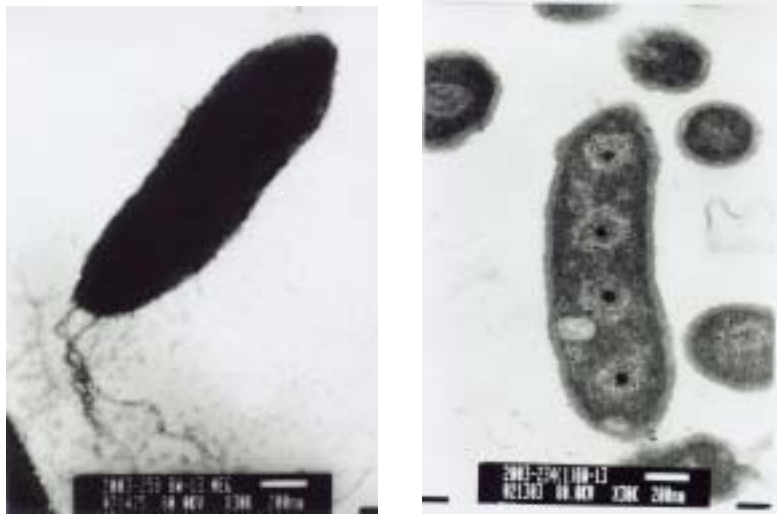


Fig 10. Transmission electron microscopic (TEM) images of the BW-13 isolated from soil. (Magnification : A, X30,000 : B, X30,000)

Table 7. Comparison of the cultural, physiological and biochemical characteristics of an antagonistic bacterium, BW-13 compared with *Stenotrophomonas maltophilia* type strain described in Bergey's manual

Characteristics	BW-13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^a
Gram strain	—	—
No. of flagella	>1	>1
Endospore formation	—	—
Cell diameter > 1.0 μm	—	—
Anaerobic growth	+	+
Growth in NaCl 2%	+	+
5%	+	+
7%	—	+
Growth at 20°C	+	+
25°C	+	+
30°C	+	+
35°C	+	+
37°C	—	+
Growth at pH 6.0	+	+
pH 7.0	+	+
pH 8.0	+	+
Activity of Catalase	+	+
Protease	+	+
Chitinase	\pm^b	—
Starch Hydrolysis	+	+
Nitrate reduction	+	+
Utilization of Citrate	+	+
Glucose	+	+
Sorbitol	—	+
Oxidase reaction	+	+
Plant pathogenicity	—	—

^a Refer to Bergey's manual

^b The BW-13 strain exhibited a very low chitinase activity in chitin agar plate assay.

나) API system, 16S rDNA sequence analysis를 통한 동정

API system의 분석과 16S rDNA sequence 분석결과 각각 98.8%와 99%의 유사도를 보였다. 또한, 계통분류적 분석 결과 BW-13이 database의 *S. maltophilia*와 가장 유사한 것으로 나타났다. 따라서 본 균주를 *S. maltophilia* BW-13으로 최종 동정하였다 (Fig. 11, 12).

```
1 GAGTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACG
61 GCAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGG
121 AATCTACTTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTA
181 CGGGTCAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC CGATTGAATGAGCCGATGTCCGATTAGC
241 TAGTTGGCGGGGTAAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
301 AGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
361 GGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTG
421 TAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCGGTTGGGATGACGGTAC
481 CCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAG
541 CGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGC GTAGGTGGTCGTTTAAAGTCCGTTGTGAA
601 AGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGG
661 TAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTCAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGA
721 AGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
781 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGC
841 ACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTTGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA
901 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGC
961 AACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTGCGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGC
1021 CTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
1081 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAA
1141 CTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGAAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG
1201 GCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTAATAAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGG
1261 CGACGGTAAGCCAATCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
1321 CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCG
1381 GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGCAGGTAGCTA
1441 AACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA
```

Fig. 11. 16S rDNA sequencing result of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13

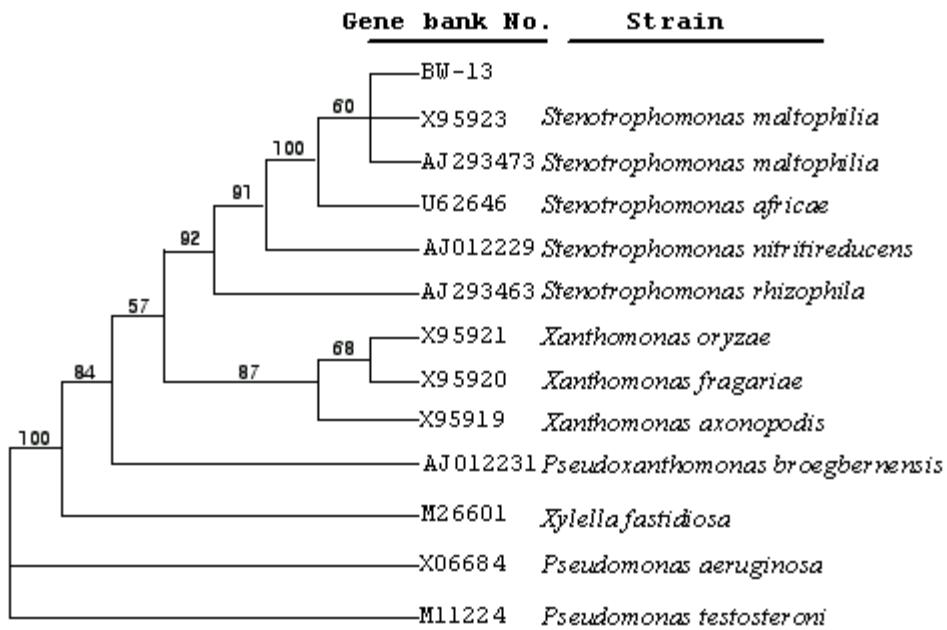


Fig. 12. Phylogenetic tree by rRNA gene analysis of the isolate BW-13 and other related bacteria. The tree was generated by the Maximum Parsimony Analysis of PAUP program. Bootstrap values are shown for each node that had >50% support in a bootstrap analysis of 200 replicates.

2) LY-11 균주의 동정

LY-11 균주의 16S rRNA 분석을 실시하고 NCBI의 blast program을 통해 동정한 결과, LY-11균주는 *Pseudomonas aeruginosa* (NCBI)와 99% 상동성을 지녀 *Pseudomonas aeruginosa* LY-11로 동정되었다(Fig 13). 따라서, 이들 두 균주에 의한 결구상추 밀둥썩음 병 방제에 대한 생물학적 방제 연구 또는 방제제 개발에 이용된 연구보고가 극히 드물어 균주 특허 및 논문투고의 활용에 기여도가 클 것으로 판단되었다.

```
1 GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGC
61 TTGCTCCTGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGG
121 GGATAACGTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGAT
181 CTTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGG
241 CCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAG
301 ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCC
361 TGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGG
421 GAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGG
481 CTAACCTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG
541 GCGGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
601 GGAACCTGCATCCAAAACACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGT
661 AGCGGTGAAATGCGTATATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTG
721 ATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
781 ACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAAC
841 GCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCAATGAATTGACGGG
901 GGCCCGCACAAAGCGGTGAAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
961 CCCTTGACATGCTAAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAG
1021 GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGC
1081 GCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA
1141 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACA
1201 CACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATA
1261 AAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAG
1321 TAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
1381 ACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACC
1441 ACGGAGTGATTCATGACTGGGGTG
```

Fig. 13. 16S rRNA sequencing result of *Pseudomonas aeruginosa* LY-11

제 3 절 밀등썩음병 방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립

1. 연구수행 방법

가. *S. maltophilia* BW-13 균주의 최적배양조건 확립

1) 삼각플라스크 배양

가) 배양시간

밀등썩음병 방제용 엽면살포제 개발에 선발된 BW-13 균주의 최적배양 시간을 조사하였다. NB배지에서 24시간 종균배양한 BW-13 균주의 세균부유액 50 ml을 1,000 ml 용 삼각플라스크의 500 ml NB배지에 접종하고 30℃에서 160 rpm으로 48시간 진탕배양하면서 2시간 간격으로 생육정도를 조사하였다. 각 시료를 10배 희석하여 분광광도계 (spectrophotometer, Pharmacia, Biotech, UK)에서 OD값을 조사하였으며, 각 처리구 당 5반복, 3회 실시하였다.

나) 생육 온도 및 pH

앞서의 생육조사에서와 동일한 방법으로 수행하였으며, 온도 범위는 5℃ 간격으로 20~50℃사이에서 조사하고, pH는 pH 4~8사이에서 pH 1 간격으로 조사되었다. 24시간 및 48시간 배양한 각 시료는 10배 희석하여 분광광도계(spectrophotometer)에서 각 처리구 당 5반복, 3회 실시하여 OD값을 측정하였다.

다) 탄소원

BW-13균주를 300ml 용 삼각플라스크에 100 ml의 *Pseudomonas* 배양용 기초배지(K_2HPO_4 1.25%, KH_2PO_4 0.38%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%)에 저분자 탄소원 (Cellulose, Fructose, Glucose, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Sorbitol, Sucrose, Trehalose)과 고분자 탄소원 (제빵개량제, 옥수수전분, 고구마전분, 흑설탕, 갈색설탕, 미강)을 각각 3% 되도록 첨가하고, 질소원 yeast extract는 0.5%가 되도록 첨가하였다. 여기에 NB배지에서 24시간 전배양한 세균부유액($A_{550}=1.0$) 1 ml을 접종하고 5일간 진탕배양(30℃, 160 rpm)하여

균체를 회수하여 살균수로 10배 희석 후 분광광도계(550 nm)로 OD 값을 측정하였다. 이 때 대조구로는 NB배지를 사용하였다. 또한, 2차로 1차에서 OD 값이 높았던 것으로 확인된 고분자 탄소원인 제빵개량제와 미강 외에 현미유를 추가하여 적정 탄소원을 선발하였다.

BW-13균주의 항균물질 분비에 의한 병원균의 군사생장 저해에 미치는 탄소원 영향을 조사하기 위해, 앞서의 저분자 및 고분자 탄소원 선발 실험에서 길항세균 BW-13 균주를 접종하여 배양한 배양액의 상등액을 회전농축기로 농축하였다. 이것을 100배 희석하여 PDA배지에서 병원균 *R. solani* PY-1 균주와 5일간 대치배양하여 저지대의 직경을 조사하였다. 대조구로는 NB배지를 사용하였다.

라) 질소원

BW-13균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해 기초배지에 앞에서 선발된 탄소원 제빵개량제(3%)를 첨가하고 공시된 저분자 질소원(Casein, Casamino acid, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Beef extract, Yeast extract)과 고분자 질소원(대두박, 콩가루, 비지가루)을 각각 0.5%로 첨가하여, 세균부유액($A_{550}=1.0$) 1 ml을 접종한 후 5일간 진탕배양(30℃, 160 rpm)한 뒤 24시간마다 균체를 회수하여 살균수로 10배 희석한 것을 분광광도계(550 nm)에서 5일간 측정하였다. 이때 대조구로서 NB배지를 사용하였다. 그리고 질소원에 사용된 대두박, 콩가루, 비지가루 등은 80℃에서 24시간 건조된 것을 이용하였다.

앞서의 저분자 및 고분자 질소원 선발 실험에서 BW-13 균주를 접종하여 배양한 배양액 상등액을 회전농축기로 농축하였다. 이것을 100배 희석하여 PDA배지에서 병원균 *R. solani* PY-1 균주와 5일간 대치배양하여 저지대의 직경을 조사하였다. 대조구로는 NB배지를 사용하였다.

2) 발효기 배양

가) 제빵개량제 배지를 이용한 발효

7 L 발효기에 제빵개량제 배지 4 L를 넣은 후, 종균 배양된 길항 세균 BW-13 균주를 400 ml 접종하였다. 제빵개량제 배양시에 발생하는 거품을 제거하기 위해 antiform 용액을 10 ml (0.25%) 첨가하여 배양(300 rpm, 1.5 atm, 35℃)하면서 24시간 간격으로 72시간

까지 희석평판법으로 생균수를 측정하였다.

7 L 발효기에 제빵개량제 배지 단독 또는 저분자탄소원으로 우수하였던 1% Sucrose를 첨가한 후 antiform용액을 10 ml (0.25%) 첨가하고 종균 배양된 길항세균 BW-13을 400 ml 접종한 후 발효기에서 72시간 배양(300 rpm, 35°C, 1.5 atm)하였다. 발효가 진행되는 동안 배양기내의 생균수를 24시간 간격으로 72시간까지 측정하여 제빵개량제 배지 단독 배양과 Sucrose를 첨가한 배양에서의 생균밀도를 비교하였다.

나. 엽면살포제의 제형화

1) 1차 제형화 (수화제 BW13-A~G)

BW-13 균주를 이용하여 미생물농약으로 제형화하기 위해 먼저 앞서 선발된 대량배양용 제빵개량제 배지 4 L 에 BW-13 균주를 400 ml 접종하고 72시간 배양(35°C, 300 rpm, 1.5 atm)한 후, 배양액 1 L당 천연고분자물질인 옥수수전분, 타피오카전분, 메주가루, 변성전분 등을 일정 비율로 혼합하여 섞고 55°C 원디오븐에서 24~48시간 동안 완전히 건조시켰다. 건조된 제제를 블라인더로 곱게 분쇄하고 200 mesh의 체에 쳐서 통과하는 분말을 수화제형 BW13-A, B, C, D, E, F, G 제제로 1차 제조하였다. 제제는 유리병에 넣고 마개에 구멍을 뚫어 탈지면으로 봉한 후 공기가 통하게 하여 상온에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 2차 제형화 (액상수화제 BW13-H와 수화제 BW13-I, BW13-J)

1차 제형화에서와 동일한 방법으로 제조되었으며, 이때 첨가된 천연고분자물질은 변성전분, 썬크리미(suncremy), 썬사이즈(sun size), 썬슈퍼젤(sunsuperjel)을 공시하였으며 이들을 각각 2.4%로 세균이 배양된 제빵개량제 대량배지에 첨가하여 55°C의 원디오븐에서 2~3일간 건조 후 액상수화제 BW13-H와 수화제 BW13-I, BW13-J 제제로 2차 제조하였다. 앞서의 1차 제형화와 동일하게 보관하면서 모든 실험에 이용하였다.

2. 연구결과

가. *S. maltophilia* BW-13 균주의 최적배양조건 확립

1) 삼각플라스크배양

가) 배양시간

S. maltophilia BW-13 균주를 NB배지에 30℃에서 48시간동안 배양하면서 2시간 간격으로 생육정도를 조사한 결과, 20시간째에 최대의 밀도인 $A_{550}=1.6$ 에 도달하였으며, 48시간이 되어도 변화없이 OD값이 1.3으로 생장이 지속되었다(Fig. 14)

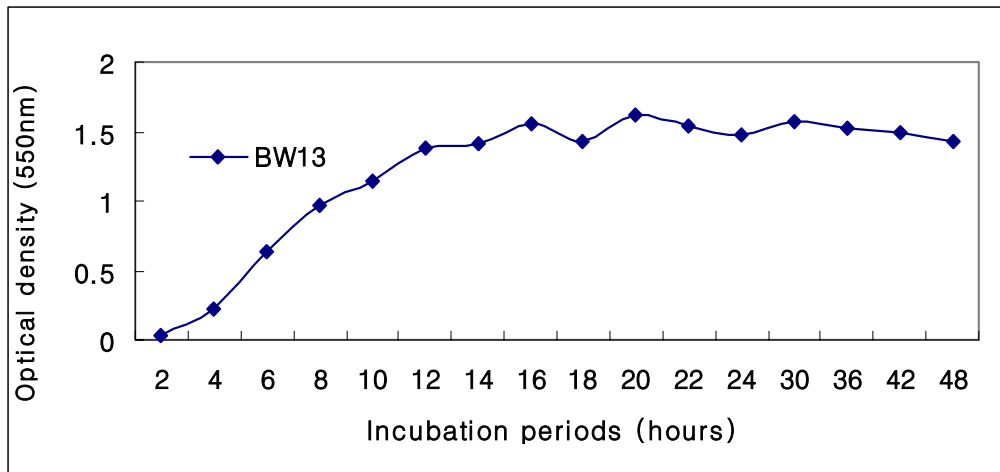


Fig. 14. Cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 strain in NB medium, 30℃, 160 rpm.

나) 생육온도

24시간과 48시간 배양에서는 35℃에서 세균의 밀도가 가장 높았으며, 다음은 30℃였다(Fig. 15).

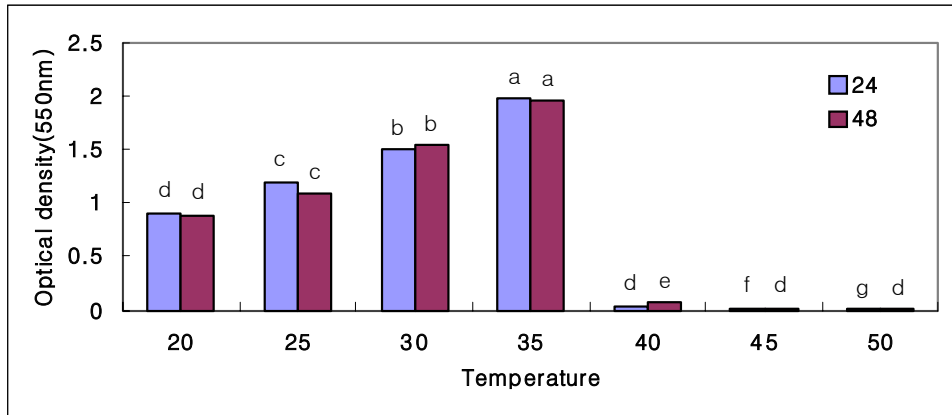


Fig. 15. Effect of temperature (°C) for cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 strain in NB medium.

다) 생육 pH

pH 7, 8에서 세균의 밀도가 가장 높았으며, 다음으로 pH 6으로 유의차는 없으나 48시간이 되면 24시간 배양보다 밀도가 다소 낮아졌다. 따라서, BW-13균주의 최적 pH의 범위는 6~8이었다(Fig. 16).

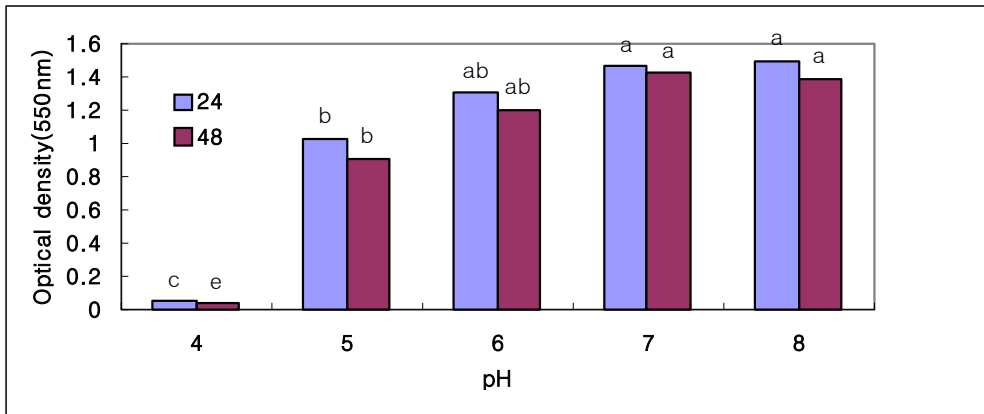


Fig. 16. Effect of pH for cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 strain in NB medium.

라) 탄소원

질소원 0.5%가 포함된 기초배지에 탄소원 3%을 종류별로 첨가하고, 길항세균 BW-13균주의 생육에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과, 고분자 탄소원이 저분자 탄소원에 비하여 OD값이 현저히 높았으며, 특히 고분자탄소원인 제빵개량제(Dough Conditioner)와 미강에서 각각 $A_{550}=2.58$ 과 $A_{550}=2.41$ 의 OD값을 보여 가장 높았다(Fig 18). 저분자 탄소원에서는 Sucrose와 Glucose에서 각각 $A_{550}=1.03$, $A_{550}=0.98$ 순이었다(Fig 17).

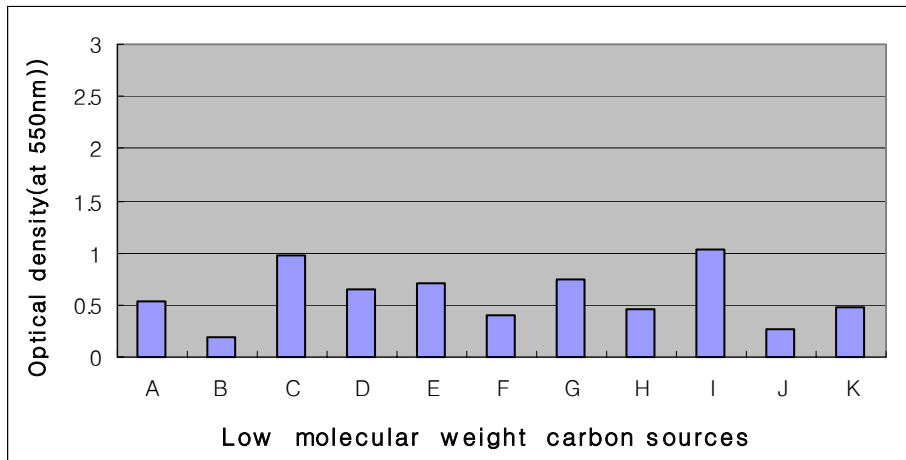


Fig 17. Effects of low molecular weight carbon sources on cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 at 30°C, 160 rpm in flask culture for 5 days. A, Cellulose; B, Fructose; C, Glucose; D, Lactose; E, Maltose; F, Mannitol; G, Mannose; H, Sorbitol; I, Sucrose; J, NB; K, Basal medium

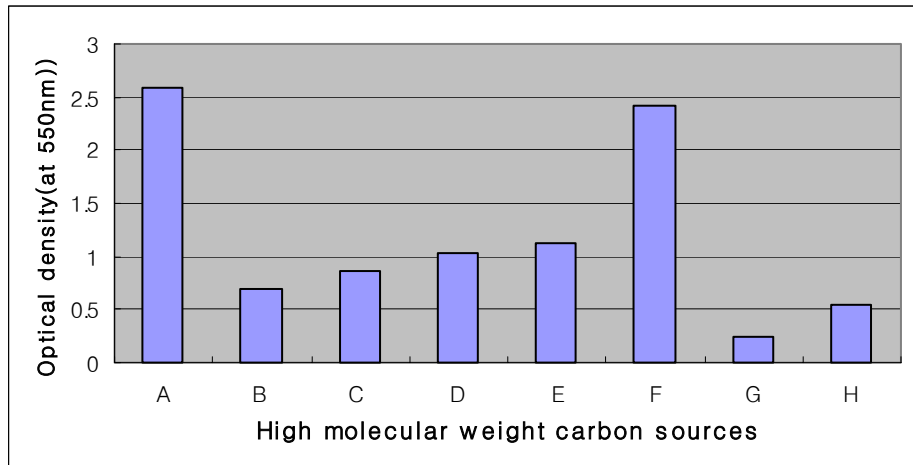


Fig. 18. Effects of high molecular weight carbon sources on cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 at 30°C, 160 rpm in flask culture for 5 days. A, Dough Conditioner; B, Corn starch; C, Sweet potato starch; D, Black sugar; E, Yellow sugar; F, Rice bran; G, NB; H, Basal medium

앞서의 저분자 및 고분자 탄소원 선발에서 길항세균 BW-13균주를 접종하여 배양한 배양액 상등액을 *R. solani* AG-1 병원균과 PDA배지상에 대치배양하여 탄소원의 종류에 따른 균사생장 저해효과를 조사하였다. 그 결과, 고분자 탄소원인 제빵개량제에서 저지대 6.8 mm로 가장 높았으며 다음은 저분자 탄소원인 Sucrose에서 5.9 mm이었다(Fig 19, 20).

이상의 실험 결과, BW-13 균주의 생육 및 길항력에 가장 효과적인 고분자 탄소원은 제빵개량제로 선발되었다.

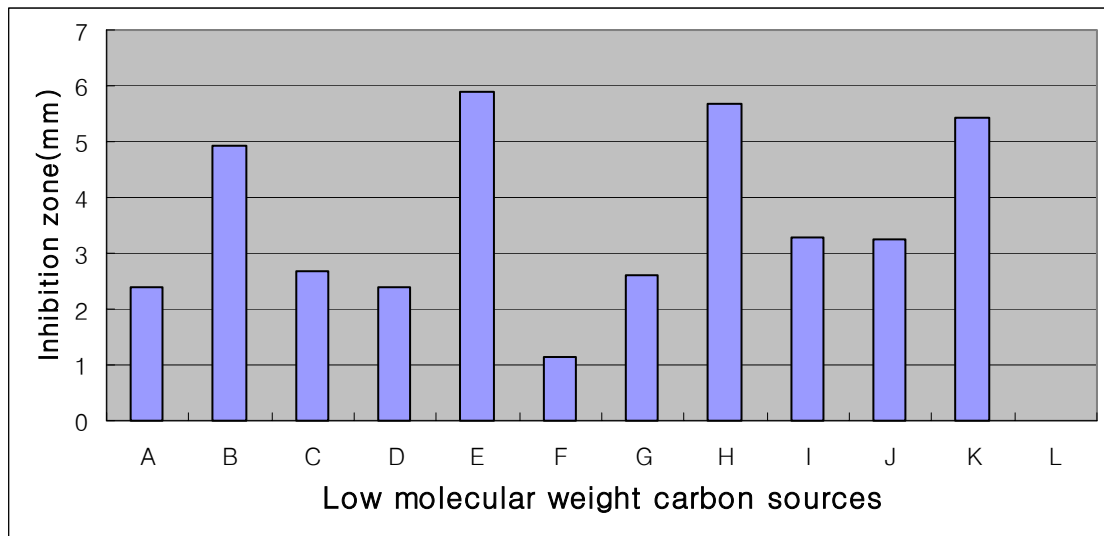


Fig. 19. Effect of low molecular weight carbon sources for the antifungal activity of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 to *Rhizoctonia solani* AG-1 on PDA medium after 5 days dual incubation. A, Cellulose; B, Fructose; C, Glucose; D, Lactose; E, Sucrose; F, Maltose; G, Mannitol; H, Mannose; I, Sorbitol; J, NB; K, PBMM; L, Control.

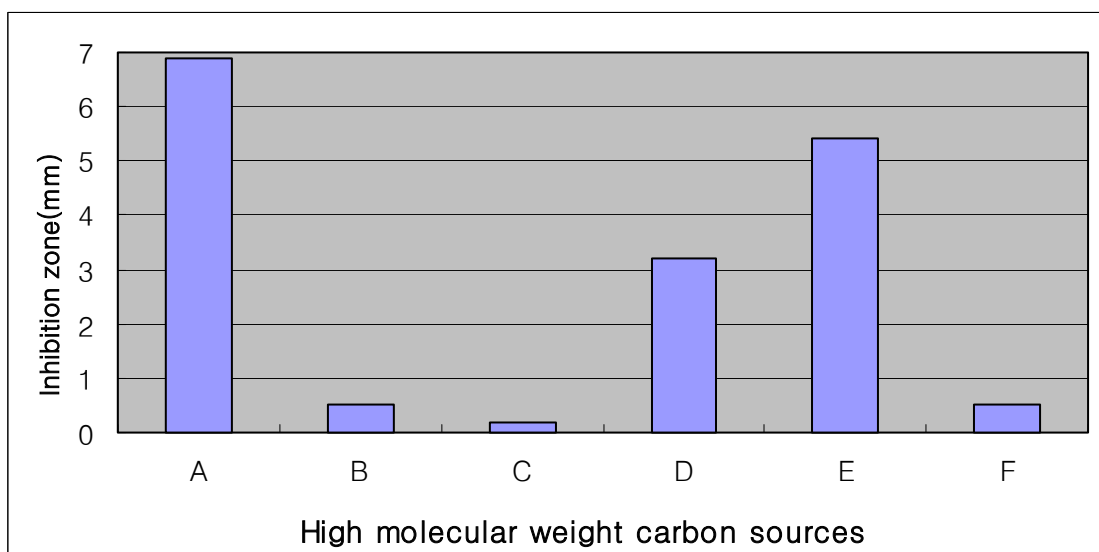


Fig. 20. Effect of high molecular weight carbon sources for antifungal activity *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 to *Rhizoctonia solani* AG1 on PDA medium after 5 days dual incubation. A, Dough Conditioners; B, Rice bran; C, Rice oil; D, NB; E, PBMM; F, Control

마) 질소원

길항세균 BW-13균주의 생육에 미치는 질소원 영향을 조사하기 위해서 탄소원제 빵개량제(3.0%)가 첨가된 기초배지에 저분자 질소원(Casein, Casamino acid, (NH₄)₂SO₄, Beef extract, Yeast extract)과 고분자 질소원(Soy flake, Soy meal, Biji)을 각각 0.5%로 첨가하고 여기에 BW-13균주를 접종하여 진탕배양 5일동안 OD값을 측정하였다. 그 결과 Yeast extract와 비지가루(Biji)배지에서 OD 값이 A₅₅₀=5.9와 A₅₅₀=5.6 순으로 높았다 (Table 8).

Table 8. Effects of low and high molecular weight nitrogen sources on cell growth of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 at 30°C, 160 rpm in flask culture for 5 days

Nitrate sources	Optical density (550nm) ^a				
	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
Casein	4.5a	4.8a	5.0a	5.0ab	5.0bc
Casamino acid	1.8e	2.0e	2.2e	2.7c	3.2d
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1f	0.0f	0.1f	0.1e	0.1f
Beef extract	4.0b	4.3ab	4.6ab	4.5b	4.6c
Yeast extract	4.0b	4.2ab	4.9a	5.2a	5.9a
Soy flake	3.1cd	3.3cd	3.8cd	4.5b	4.8bc
Soy meal	2.5d	2.9d	3.1d	3.1c	2.8d
Biji powder	3.4bc	3.8bc	3.9bc	4.7ab	5.6ab
NB	1.5e	1.8f	1.9f	1.8e	0.2f
Basal media	0.0f	0.1e	0.1e	0.1d	1.8e

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

앞서의 저분자 및 고분자 질소원 선발에서 BW-13 균주를 접종하여 배양한 배양액 상등액을 *R. solani* PY-1 병원균과 PDA배지 상에 대치배양하여 질소원에 의한 균사생장 저해효과를 조사한 결과, yeast extract가 저지대 8.8 mm로 가장 효과적이었다. 반면, 고분자 질소원에서는 비지가루(Biji)배지가 저지대 5.6 mm으로 우수 질소원이었다(Table 9). 하지만, BW-13 균주의 생육에 가장 양호한 것으로 확인된 탄소원 제빵개량제는 이미 질소

원으로 대두유 12%가 함유되어 있기 때문에 발효기배양에서는 질소원을 따로 선발하지 않기로 하였다.

이상의 플라스크배양 실험 결과로 BW-13 균주의 대량배양용 배지로 기초배지에 3% 제빵개량제를 첨가한 제빵개량제 배지가 길항세균 BW-13 균 증식과 항생물질에 의한 병원균의 균사생육저해가 높았기 때문에 선발되었다.

Table 9. Effects of low molecular weight nitrogen sources for *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13, antagonistic bacteria to the mycelial growth of *Rhizoctonia solani* PY1

Nitrogen sources (0.5%)	Inhibition zone (mm) ^a
	BW-13
Casein	3.3d
Casamino acid	4.3c
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.9e
Beef extract	2.0e
Yeast extract	8.8a
Soy flake	2.1e
Soy meal	4.0c
Biji powder	5.6b

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

2) 발효기 배양

가) 제빵개량제배지를 이용한 발효

대량배양용 제빵개량제배지(기초배지에 제빵개량제 3%첨가)에 길항세균 BW-13 균주의 세균부유액을 400 ml 접종하고 3일간 배양한 후 24시간 간격으로 생균수를 조사한 결과, 배양 48시간과 72시간 후의 생균 밀도는 각각 4.4×10^{22} , 3.1×10^{22} cfu/ml로 현저히 높았다(Table 10).

Table 10. Effects of dough conditioner medium for mass production of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 in the 7 L fermenter jar

Time	cfu/ml
24 hr	1.0×10^{23}
48 hr	4.4×10^{22}
72 hr	3.1×10^{22}

제빵개량제배지에 저분자 탄소원으로 우수하였던 Sucrose(1%)를 넣은 후 길항세균을 400 ml을 접종하여 제빵개량제배지 단독배양과 Sucrose 첨가한 배지에서의 세균밀도를 비교 조사하였다. 그 결과, 제빵개량제배지 단독배양은 48시간째 4.35×10^{22} cfu/ml였으며, 제빵개량제배지에 Sucrose 첨가배양에서는 3.52×10^{22} cfu/ml로 제빵개량제 배지에 Sucrose를 첨가하여도 세균밀도의 증진효과는 없었다(Table 11).

Table 11. Effects of mixed carbon sources of dough conditioner and sucrose for mass production of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 in the 7 L fermenter jar

media	cfu/ml		
	24 hr	48 hr	72 hr
Dough Conditioner	1.03×10^{23}	4.35×10^{22}	3.14×10^{22}
Dough Conditioner+ Sucrose	3.41×10^{22}	3.52×10^{22}	2.90×10^{20}

이상 플라스크 및 발효기 배양 결과로 기초배지(1.25% K₂HPO₄, 0.38% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O)에 3.0% 제빵개량제를 첨가한 제빵개량제배지를 BW-13 균주의 대량 배양용 배지로 최종 선발하였다.

나. 엽면살포제의 제형화

1) 1차 제형화 (수화제, BW13-A~G)

7L 발효기에 대량배양용 제빵개량제배지 4L에 BW-13균주를 접종하여 72시간 배양(450rpm, 35°C, 2.0기압, PH6~7)하고 이 배양액에 각종 천연물 고분자인 옥수수 전분, 변성전분, 타피오카전분, 메주가루 등을 Table 12와 같이 혼합하여 1차 미생물 제제 7종을 제조하였다. 수화제 BW13-A 제제의 완성된 시제품의 모습이다(Fig. 21).

Table 12. Formulation of biofungicides using commercial additives and carriers

Formulation name	Sources
BW13-A	Corn starch 40%, Modified starch 10%
BW13-B	Modified starch 40%
BW13-C	Corn starch 40%
BW13-D	Tapioca starch 40%, Modified starch 10%
BW13-E	Tapioca starch 40%
BW13-F	Corn starch 40% , Meju flour 5%
BW13-G	Modified starch 40%, Meju flour 5%

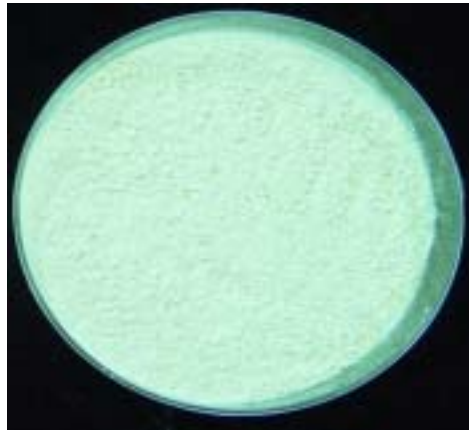


Fig 21. Powder type formulation BW13-A using commercial additive and carrier

2) 2차 제형화 (액상수화제 BW13-H 및 수화제 BW13-I, J)

1차 제형화에서 개발된 7종의 수화제가 포트재배의 방제효과 검증에서 방제효과가 우수하였으나 반면, 결구상추의 잎에 약제 성분의 흔적이 남아 미관상 좋지 않았다. 이들의 단점을 극복하고자 새로운 종류의 변성전분을 공시하여 살포 후에 흔적이 남지 않는 무색 투명한 제제를 만들하고자 하였는데, 이에 기존과는 다른 변성전분인 썬크리미, 썬사이즈, 썬슈퍼겔를 8%의 농도로 BW-13균주가 배양된 제빵개량제배지와 혼합하여 3종의 BW13-H, I, J 제제를 2차 제조하였다(Table 13)

Table 13. Formulation of biofungicides using commercial additives and carriers

Formulation name	Sources
BW13-H	Suncreamy 8%
BW13-I	Sunsize 8%
BW13-J	Sun supergel 8%

제 4 절 밀등썩음병 방제용 종자처리 미생물농약 제조기술확립

1. 연구수행 방법

가. *S. maltophilia* BW-13 균주에 의한 종자처리효과

1) 종자처리효과

밀등썩음병원균 PY-1 균주에 대하여 우수 길항균으로 최종 선발된 BW-13 균주 및 LY-11 균주와 추가로 R-13 균주를 공시하고 이들을 각각 NB배지에 24시간 진탕배양한 후 여기에 결구상추 종자(상품명: 세레나)를 침지하고 3시간동안 진탕배양하였다. 배양 후 1시간 동안 음건하여 플러그포트내 병원균 처리 토양(병토)에 파종하였다. 병토는 살균한 상토에 병원균 PY-1 균주의 균사조각부유액($A_{550}=1.0$) 10 ml을 처리하였으며, 파종 7일 후에 종자의 출아율, 유근의 길이, 근면정착 세균밀도 및 T50값을 조사하였다.

2) 종자처리 실험 조건 확립

가) 진탕배양시간, 침지시간, 음건시간

삼각플라스크의 BW-13균주 배양액에 종자를 처리하는 동안의 진탕배양 시간, 종자침지 시간, 종자 처리 후 음건시간에 따른 출아율과 유근길이, 근면정착 세균밀도, T50 값을 검정하였다. 각 처리시간별(10분, 30분, 1시간, 3시간, 4시간, 6시간, 12시간)로 종자를 세균부유액에 진탕배양 또는 침지한 후 토양에 파종하고 출아율, 유근길이, 세균밀도, T50값을 조사하였다. 또한 종자를 처리한 후 음건하는 시간에 따른 출아율과 유근길이, 세균밀도, T50 값을 조사하였다.

나) 무기염류 처리가 종자에 미치는 영향

무기염은 종자의 수분 흡수력을 촉진시켜 생리적 발아를 유도하는 것으로 알려져 있다. 결구상추종자를 각각의 K_3PO_4 , NaCl, KNO_3 , KH_2PO_4 , $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, PEG8000 등의 무기염류가 50, 100, 200 mM의 농도로 첨가된 BW-13 세균부유액에 침지하고 진탕배양하면서 결구상추 종자의 출아율과 유근 길이, 근면정착 세균 수, T50 값을 대조구인 세균부

유액만을 처리한 종자, 세균부유액과 무기염을 함께 처리한 처리구와 비교하였다.

다) 접착제 처리가 종자에 미치는 영향

접착제인 methyl-cellulose 400, tween 80, polyvinyl alcohol, carboxymethyl cellulose, arabic gum의 5종을 각각 0.5%, 1%, 1.5% 로 농도를 달리하여 유산지 2장이 깔린 petridish에 물 10 ml와 함께 첨가하고 세균 처리된 결구상추 종자(세레나)를 올려 놓고 이를 생육실(25℃)에서 4일간 보관 후 발아한 유근의 길이를 조사하였다.

라) 코팅물질 별 종자에 미치는 영향

코팅물질은 결구상추 종자의 표면에서 길항세균을 보호하고 발아율을 향상시키는 등 최종적으로 병충해를 효율적으로 예방하는 역할을 하는데, 코팅물질이 각각 1%씩 첨가된 BW-13 배양액에 결구상추 종자를 진탕배양 후, 1시간 동안 음건하고 petridish 내 결구상추 종자 (세레나)를 올려 놓고 이를 생육실(25℃)에서 4일간 보관 후 발아한 유근의 길이를 조사하였다.

나. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주에 의한 우수코팅종자 선발

앞서의 밀등썩음병 방제용 엽면살포제 이용으로 선발된 *S. maltophilia* BW-13 균주를 이용한 종자처리 제 개발 대신에 종자처리제로 선발된 *Pseudomonas. aeruginosa* LY-11를 결구상추 종자에 처리하고 우수코팅종자를 선발하고자 하였다. 먼저, 종자코팅용 드럼(회전기)에 결구상추종자 20 g을 넣고 LY-11 균주 배양액 (297 ml)과 접착제 썬슈퍼젤 (3 g, 1%)을 혼합한 접착제 배양액을 분당 1회씩 스프레이로 총 5~10회 정도 살포한 다음 접착제 배양액이 골고루 입혀지면 전달매체(carrier)인 AF300(생석회형 흡습제, 왕표화학)을 Table 18의 코팅종자별 성분에 따라 1회당 처리량별로 손으로 종자에 흩뿌려 피막화하였다. 경우에 따라 수분이 과도하게 살포되어 피막화하는데 어려움이 있을 경우 드럼이 회전하는 동안 드라이어로 수분을 재빨리 증발시킨다. 이때, 전달매체 AF300의 1차 코팅이 완료되면 접착제 배양액을 계속 살포해주면서 2차 코팅물질인 clay, zeosil을 혼합하여 소량씩 손으로 으깨어주면서 흩뿌려준다. 이어 3차코팅 물질인 zeosil과 AF325(규조토, diatomaceous earth 325, 왕표화학)을 처리량별로 피막화한 다음, 적절한 습도만을 유지한

체 드럼 회전으로 자연 건조시키고 일정한 크기의 공모양으로 피막화가 된 후 4℃에 보관하면서 모든 실험에 이용하였다. 세균부유액과 각종의 전달매체로 코팅된 종자는 상토를 넣은 플러그포트에 파종하고 생육실(25℃, 상대습도 71%)에서 12일간 배양하여 종자의 출아율(%), 유근길이, 주근의 길이를 측정하여 이들 중 가장 효과적인 코팅종자를 선발하였다.

다. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅기술 개발

P. aeruginosa LY-11 균주를 이용하여 alginate 종자코팅기술을 개발하고자 하였는데, LY-11 균주를 NB배지에 24시간 진탕배양(28℃)한 후 세균부유액을 A₅₅₀=1.0으로 조정하였다. 한편, sodium alginate를 증류수에 3%(w/v)가 되도록 첨가하고 magnetic stirrer를 이용하여 완전히 용해될 때까지 교반한 다음 1회 15분간 고압살균(121℃)하여 멸균된 sodium alginate solution을 준비하였다. LY-11 균주의 세균부유액과 sodium alginate solution의 혼합 배양액을 최종농도가 1.0%가 되도록 10 ml용 주사기에 주입하고, 주사기 끝에 종자가 오도록 하여 주사기 속의 배양액으로 피막화하였다. 이를 즉시 0.1 M calcium chloride 용액으로 떨어뜨려서 구형이 되도록 방치하고 alginate 코팅종자로 제조하였다. 코팅종자는 4℃에 보관하면서 모든 실험에 이용하였다.

2. 연구결과

가. *S. maltophilia* BW-13 균주에 의한 종자처리효과

1) 종자처리효과

밀등썩음병원균 PY-1에 대해 우수 길항균으로 최종 선발된 BW-13, LY-11 및 추가로 R-13 균주를 결구상추 종자에 처리하여 병원균 처리된 상토(병토)에 파종하고 세균에 의한 종자처리효과를 검정하고자 출아율, 유근길이, 근면정착 세균수 및 T50값을 조사하였다. 그 결과, 건전토양에서의 BW-13과 LY-11균주로 처리한 종자의 출아율은 각각 91.1%, 81.1%로서 무처리구의 77.8%보다 촉진되었으며, 병토에서는 BW-13과 LY-11균주에서의 출아율은 각각 48.9%, 44.4%로서 병원균 단독처리 26.7%에 비하여 효과적이었다. 이때 종자에

BW-13 균주와 LY-11 균주로 세균처리한 종자의 유근 길이는 길었으며 T50값은 감소하였다. 건전토에서의 근면정착 세균수는 BW-13균주와 LY-11균주에서 각각 5.6×10^6 , 5.0×10^6 cfu/ml로 병토에서보다 모두 높았다(Table 14). 따라서, BW-13와 LY-11 균주는 병원균 *R solani* PY-1균에 대해 길항효과가 높고 근권정착 능력이 확인되어 종자처리제 개발용 균주로 선발되었다.

Table 14. Emergency rate, length of root, cfu/ml, and T50 of crisphead lettuce seeds coated with *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 strain

Treatments		Emergency rate (%)	Length of root (cm)	$10^6 \times$ cfu/ml	T50 (days)
Non-contaminated soil	R-13	77.8ab ^a	8.5a	4.2a	2.8
	LY-11	81.1b	8.0a	5.0a	2.6
	BW-13	91.1a	8.4a	5.6a	2.6
contaminated soil	R-13	33.3bc	6.4b	2.2b	3.9
	LY-11	44.4b	6.7b	2.0b	3.8
	BW-13	50.9b	7.0b	2.9b	3.7
Pathogen only		26.7c	4.8c	-	4.7
Control		77.8ab	8.1a	-	2.6

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

2) 종자처리 실험 조건 확립

선발 BW-13균주를 종자에 처리하고 진탕배양 시간, 종자침지 시간, 종자 처리 후 음건시간에 따른 출아율과 유근길이, 근면정착 세균 수, T50 값을 검정한 결과, 진탕배양 처리와 침지처리에 따른 시간대별 출아율, 유근길이, 세균밀도, T50값에는 서로 유의적인 차이는 없었으나, 진탕배양이 침지처리보다는 출아율이 높았다(Table 15, 16).

또한, 종자처리 후 음건하는 시간도 세균처리 후 1시간 동안 음건 하였을 때가 각각 출아율 94.0%, 유근길이 6.8cm, 세균밀도 6.7×10^6 cfu/ml, T50 값 2.6일로 대조구보다는 높았으나 각 처리구간에는 유의차가 없었다(Table 17).

Table 15. Emergency rate, length of root, cfu/ml, and T50 of crisphead lettuce seeds coated with *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 strain according to the different shaking time

Treatments	Shaking time	Result of experiment			
		Emergency rate (%)	Length of root (cm)	1×10 ⁶ cfu/ml	T50 (days)
BW-13	10 min.	92.0a ^a	6.3a	0.2bc	2.8
	30 min.	92.0a	6.4a	1.3b	2.7
	1 hr.	94.0a	6.7a	4.3a	2.7
	3 hr.	96.0a	6.8a	4.7a	2.5
	4 hr.	94.0a	6.5a	4.9a	2.6
	6 hr.	88.0a	6.5a	4.8a	2.7
	12 hr.	16.0b	5.3b	5.0a	4.8
Control		90.0a	6.5a	-	2.8

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 16. Emergency rate, length of root, cfu/ml, and T50 of crisphead lettuce seeds coated with *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 strain according to the different soaking time

Treatments	Soaking time	Result of experiment			
		Emergency rate (%)	Length of root (cm)	1×10^6 cfu/ml	T50 (days)
BW-13	30 min.	86.0a ^a	6.1a	0.2b	2.9
	1 hr.	88.0a	6.3a	1.0b	2.8
	3 hr.	92.0a	6.2a	4.3a	2.7
	4 hr.	88.0a	5.9a	4.2a	2.8
	6 hr.	88.0a	6.0a	4.5a	2.9
	12 hr.	12.0b	4.7b	4.3a	4.9
Control		90.0a	6.5a	-	2.8

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 17. Emergency rate, length of root, cfu/ml, and T50 of crisphead lettuce seeds coated with *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 strain according to the different drying time

Treatments	Dry Time	Result of experiment			
		Emergency rate (%)	Length of root (cm)	1×10^6 cfu/ml	T50 (days)
BW-13	5 min.	90.0a ^a	6.4a	6.4a	2.7
	10 min.	88.0a	6.8a	6.9a	2.6
	20 min.	88.0a	6.7a	6.7a	2.6
	30 min.	90.0a	6.6a	6.5a	2.7
	1 hr.	94.0a	6.8a	6.7a	2.6
	3 hr.	92.0a	6.4a	6.7a	2.7
Control		90.0a	6.5a	-	2.8

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

3) 무기염류 처리가 종자에 미치는 영향

결구상추종자에 무기염류를 처리한 결구상추 종자의 출아율과 유근길이, 근면정착 세균 수, T50 값에 미치는 영향을 검정한 결과, 무기염을 세균부유액과 함께 처리한 구는 세균부유액 단독처리 구와 비교해 출아율에 아무런 영향을 미치지 않았으나, 50 mM KH₂PO₄ 처리구에서는 유근길이가 가장 길었다. 한편, NaCl은 효과가 없었다(Table 18).

Table 18. Effect of mineral salts treatment with *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 strain on crisphead lettuce seeds germination

Treatments	mineral salts	Emergency rate (%)	Length of root (cm)	T50 (%)	1×10 ⁶ (cfu/ml)	
BW-13	K ₃ PO ₄	50mM	94.0a ^a	6.4ab	2.6	4.7a
		100mM	92.0a	6.3ab	2.9	4.8a
		200mM	88.0a	6.0ab	3.6	4.2a
	KH ₂ PO ₄	50mM	96.0a	7.1a	2.2	4.9a
		100mM	94.0a	6.5ab	2.4	4.8a
		200mM	90.0a	6.4ab	2.7	4.1a
	KNO ₃	50mM	92.0a	6.3ab	2.6	4.6a
		100mM	88.0a	6.0ab	2.7	4.5a
		200mM	84.0a	5.4ab	3.2	4.5a
	NaCl	50mM	20.0c	5.9ab	-	4.6a
		100mM	0.0d	-	-	-
		200mM	0.0d	-	-	-
	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	50mM	96.0a	6.5ab	2.3	4.7a
		100mM	92.0a	6.1ab	2.7	4.5a
		200mM	86.0a	5.7ab	2.9	4.4a
	PEG8000	0.5%	94.0a	6.4ab	2.5	4.7a
		1.0%	86.0a	6.2ab	2.7	4.7a
		2.0%	74.0b	6.0ab	3.1	4.5a
Only BW-13		92.0a	6.3ab	3.1	4.6a	

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

4) 접착제 처리가 종자에 미치는 영향

접착제 methyl-cellulose 400, tween 80, polyvinyl alcohol, carboxymethyl cellulose, arabic gum의 5 종을 농도별로 처리한 결구상추 종자(세레나)의 유근 길이를 조사한 결과, arabic gum, methyl cellulose 400이 농도에 관계없이 유근의 길이가 가장 길었으며, Methyl cellulose 400은 농도가 높을수록 효과적이었으나, arabic gum은 정반대의 경향이였다. 따라서 가장 유근 길이가 높았던 1.5% methyl cellulose 400를 접착제로 선발되었다(Table 19). 하지만, 다음의 LY-11 균주를 이용한 종자코팅제 개발에서는 접착제 재료는 환경친화적이면서 길항미생물의 생육을 돕는 무독한 물질을 선발하고자 노력하였으며, 최종적으로 변성전분의 종류인 슈퍼겔을 접착제로 선발하여 이용하였다.

Table 19. The effect of adhesives (0.5%) on germination of crisphead lettuce seeds

Adhesives	Young root length (cm)		
	0.5%	1.0%	1.5%
Methyl cellulose 400	1.66ab ^a	3.44a	3.60a
Tween 80	0.74c	0.80cd	0.26d
Carboxymethyl cellulose	0.25c	0.20d	0.19d
Polyvinyl alcohol	0.69c	0.90cd	0.9cd
Arabic gum	2.25a	2.13b	1.91b

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

5) 코팅 물질별 종자에 미치는 영향

코팅물질 종류별로 각각 1%씩 첨가된 BW-13 배양액에 결구상추 종자를 진탕배양한 후, petridish 내에 종자를 올려 놓고 보관한 다음 발아한 유근의 길이를 조사한 결과, dolomite, celite, kaolin 순서로 효과적이였다(Fig 22). 하지만, dolomite와 celite는 드럼에서 종자코팅시 잘 뭉쳐지지 않았으며, kaolin은 자체적으로 너무 뭉침이 심해 종자코팅의 형태가 만들어지지 않는 단점이 있었다.

따라서, 발아율은 낮지만 종자코팅의 형태를 좋게 유지해주는 생석회형 흡습제 AF300을 최종 선발하였다.

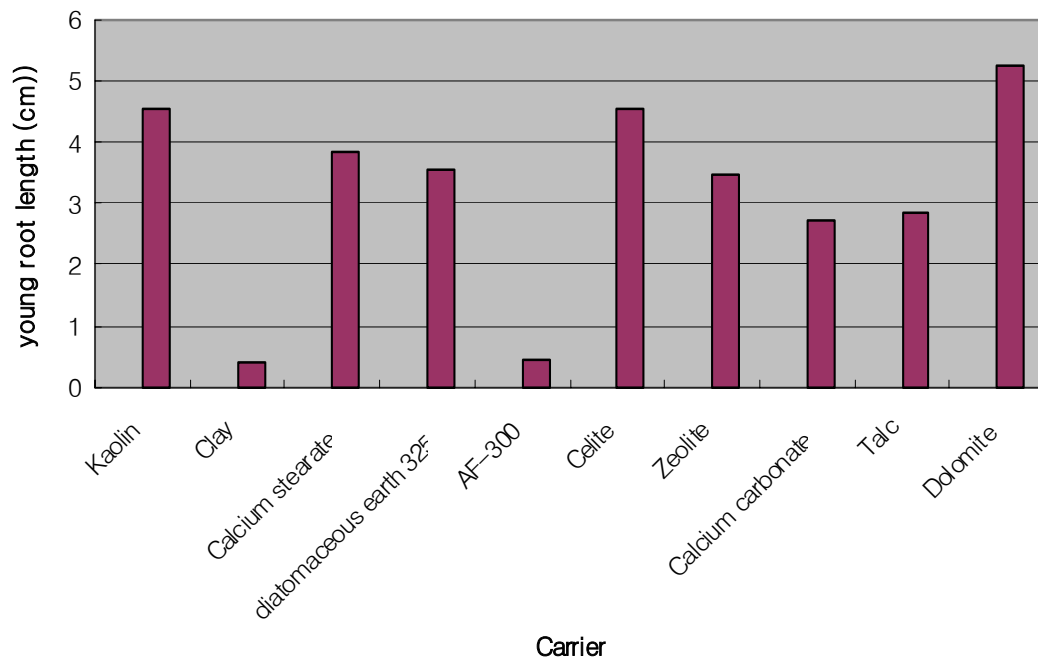


Fig. 22. The effects of various carriers as coating material on the young root length of crisphead lettuce.

※ 최종적으로, 밀둥썩음병 방제용 종자처리제 개발을 위해 최종 선발된 BW-13 균주와 LY-11 균주 중 BW-13 균주를 이용하여 코팅종자를 개발한 결과, 플러그포트내의 출아율이 그렇게 높지 않은 것으로 확인되어 방제효과가 높지 않을 것으로 예상될 뿐만 아니라, 기존의 알려지지 않은 환경친화적 접착제와 전달매체 개발로 시간이 지연되어 충분한 연구 결과를 도출하지 못해 종자코팅제 개발에는 BW-13 균주를 이용하지 않기로 하고 2차년도에는 LY-11 균주를 이용한 새로운 코팅종자법 기술을 개발하고자 하였다.

나. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주에 의한 우수코팅종자 선발

앞서 선발되었던 전달매체(carrier) AF300을 길항균과 함께 1차 코팅한 후, clay, zeosil 및 diatomaceous earth 325의 농도를 달리하여 2차 코팅과 3차 코팅의 3단계를 종자코팅용 드럼에서 총 5종의 코팅종자를 제조하였다(Fig 23, 24). 이들 개발 코팅종자의 전달매체 종류와 처리량은 아래와 같다(Table 20). 개발 5종의 코팅종자를 플러그포트에 파종하고 생육실(25℃, 습도 71%)에 보관하면서 12일 후에 출아율을 조사하였다. 그 결과, C와 E 코팅종자의 발아율이 각각 78.9%, 71.1%로 대체로 높았으나, 비코팅종자의 발아율 92.2%보다는 낮았다(Table 21). 이는 드럼내에서 종자가 전달매체(carrier)와 접착제(sticker) 등에 의해 혼합되는 동안 종자가 다소 손상을 입는 것으로 예측되었다.

Table 20. Amount of coating materials for seed coating using by adhesive and carriers

(unit : g)

Type of coating seeds	coating materials (carrier)					
	1st	2nd			3rd	
	AF300	clay	zeosil	AF325	zeosil	AF325
A	4	6	12	12	0	0
B	20	18	34	0	0	0
C	20	18	3.4	0	1.72	6
D	12	6	12	12	0	0
E	12	6	12	12	4	4

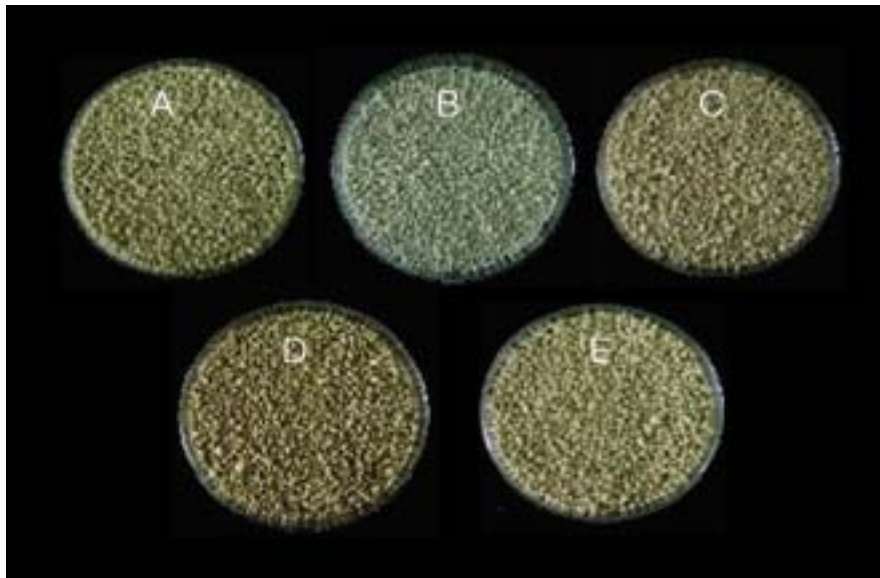


Fig. 23. Coated seeds of crisphead lettuce capsulated with LY-11, adhesive and carrier.



Fig. 24. Coated seeds of crisphead lettuce capsulated with LY-11, adhesive and carrier.

Table 21. Emergency rate (%) of coated seeds with antagonistic bacteria LY-11 strain, adhesive and carrier

Type of coated seeds	Emergency rate (%)
	12 days after sowing
A	51.1bc ^a
B	61.1ab
C	78.9ab
D	22.2c
E	71.1ab
uncoated seeds	92.2a

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

또한, 이들의 줄기와 유근 길이를 조사한 결과, 줄기 길이는 D 코팅종자가 33.0 mm로 가장 길었으나, A, C, E 코팅종자와 무처리구는 그 다음순으로 서로 유의차가 없었다. 반면, 유근길이 비교에서는 A 코팅종자가 48 mm로 가장 길었으며, B 종자가 47.4 mm로 다음 순으로 무처리 종자보다 현저히 길었다(Table 22, Fig 25). 결론적으로 A와 B 종자인 경우 유근 길이는 길었으나 전반적으로 발아율이 낮았고, C, E 종자는 출아율은 높았으나 줄기와 유근 길이가 무처리구 보다 낮고 재 반복 실험에 따른 오차가 많아 효율적인 새로운 종자코팅방법이 요구되었다.

Table 22. Stem and root length (mm) of coated seed with antagonistic bacteria LY-11 strain, adhesive and carrier after germination

Type of coated seeds	12 days after sowing	
	Young stem length(mm)	Young root length (mm)
A	22.3bc ^a	48.0a
B	15.7c	47.4ab
C	28.2ab	33.2c
D	33.0a	35.4c
E	26.2ab	38.5bc
uncoated seeds	25.9ab	38.3c

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

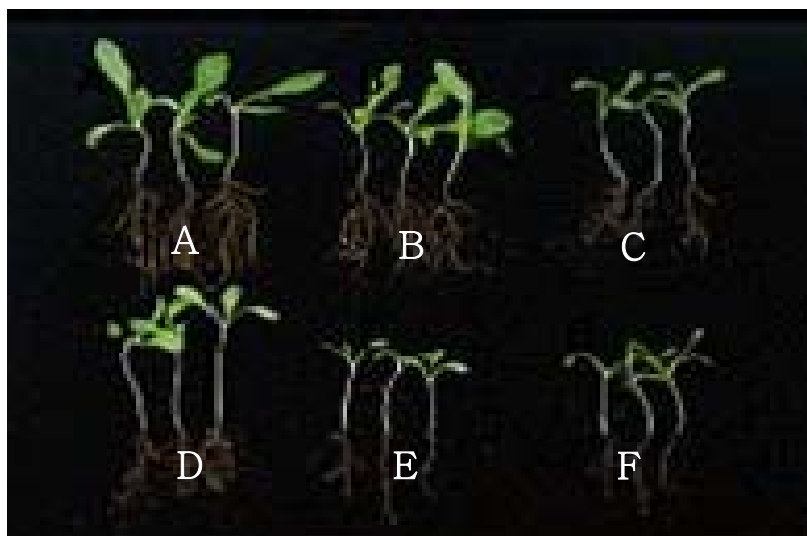


Fig. 25. Germination of coated seeds (Type A. B. C. D. E) with LY-11 and carrier.

다. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅기술 개발

1) Sodium alginate를 이용한 결구상추 종자의 코팅 기술개발

LY-11 균주를 NB배지에 24시간 진탕배양(28℃)한 후 세균부유액을 $A_{550}=1.0$ 으로 조정하여 멸균된 sodium alginate solution과 혼합한 배양액을 10 ml용 주사기를 이용하여 종자에 피막시켜 0.1 M calcium chloride 용액에 떨어뜨려서 구형으로 될때까지 방치하여 alginate 코팅종자를 제조하였다. 다음은 결구상추 코팅종자의 완성된 모습이며 이를 PDA배지에서 밀둥썩음병원균 *R. solani*와 대치배양하여 균사생장이 억제되는 결과를 확인하였다 (Fig. 26, 27).

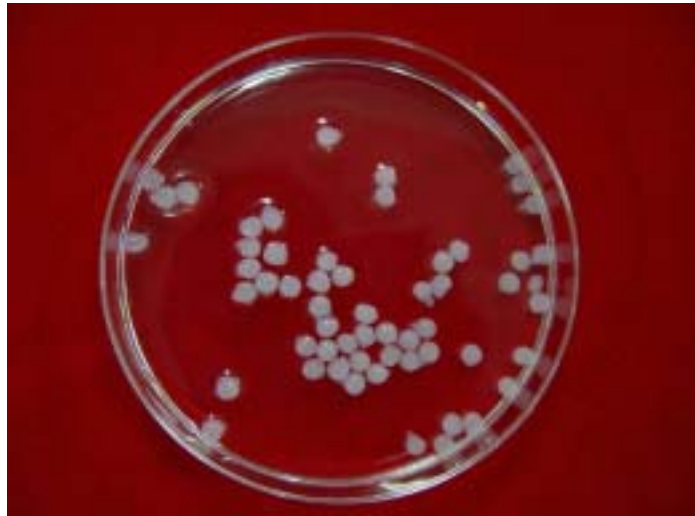


Fig. 26. Coated seeds using sodium alginate solution (1%) and *P. aeruginosa* LY-11 strain.

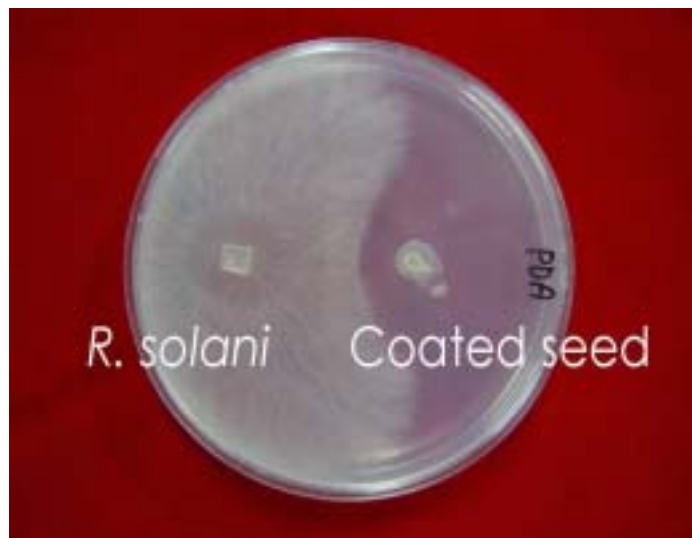


Fig. 27. Growth inhibition of *R. solani* by coated seed with *P. aeruginosa* LY-11 strain

제 5 절 미생물농약의 방제효과 검정 및 우수제형 선발

1. 연구수행 방법

가. *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 균주를 이용한 엽면살포제의 방제효과

1) 생육실 포트재배에서의 밀등썩음병 방제효과

BW-13 균주를 이용하여 제조한 1차 개발 미생물제제와 2차 개발 미생물제제의 밀등썩음병 방제효과를 생육실 포트재배에서 검정하였다. 먼저, 미생물 제제 100배 희석액 (BW13A~G, BW13H~J)과 화학농약 펜시쿠론(Pencycuron, 품목명: 몬세렌 액상수화제) 1000배 희석액을 분무기로 포트재배한 8주된 결구상추 잎의 앞, 뒷면에 골고루 각각 100 ml 씩 살포하고, 살포 24시간 후에 밀등썩음병균 *R. solani* PY-1 균주의 균사조각부유액 접종원(A₅₀₀=1.0) 40 ml을 잎의 앞, 뒷면에 골고루 살포하여, 생육실(상대습도 90%, 온도 24~25℃)에 보관하였다. 접종 7일과 10일 후 발병도를 조사하고 방제가로 환산하였다. 균사조각부유액은 300 ml의 YGB (yeast glucose broth)배지에 PDA배지에서 전배양한 PY-1 균주의 균사절편 15개를 접종하여 7일간 진탕배양(25℃, 160 rpm)한 후 균사를 걸러내어 탈이온수로 5회 정도 세척하였다. 이를 분쇄기(Warning, USA)로 15초간 균사를 마쇄한 후 농도를 A₅₅₀=1.0이 되도록 완충용액으로 조정하여 이용하였다. 방제가는 다음과 같이 환산하였다.

$$\text{방제가 (\%)} = \frac{(\text{무처리구의 발병도} - \text{처리구의 발병도})}{(\text{무처리구의 발병도})} \times 100$$

나. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅제의 방제효과

1) 모잘록병의 방제효과

LY-11 균주를 이용한 alginate 코팅종자와 비코팅종자를 플러그포트에 1개씩 파종하고 발아한지 3일된 어린 유묘에 밀둥썩음병원균 *R. solani* PY-1 접종원 균사조각부유액($A_{550}=0.8$) 1 ml을 접종하고 이를 25°C, 상대습도 90%의 생육실에서 4일간 보관한 뒤 하우스로 옮겨 접종 7일 후에 이병주율을 조사하여 방제가로 환산하였다. 균사조각부유액은 앞서의 생육실 포트재배에서의 밀둥썩음병 방제효과 검정과 동일하였다.

2) 생육실 포트재배에서의 밀둥썩음병 방제효과

LY-11 균주를 이용한 alginate 코팅 또는 비코팅한 종자를 플러그포트에 파종한 지 4 주 뒤에 유묘를 재식하고 플라스틱하우스에서 재배하였다. 재식 후 4주(파종 후 8주)된 성체식물 잎의 앞, 뒷면에 *R. solani* PY-1 접종원인 균사조각부유액($A_{550}=1.0$) 40 ml을 분무접종한 후 25°C, 상대습도 90%의 생육실에 보관하면서 접종 7일 후 발병도를 조사하여 방제가로 환산하였다. 균사조각부유액은 앞서의 모잘록병의 방제효과에서와 동일한 방법으로 준비하였다.

2. 연구결과

가. *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 균주를 이용한 엽면살포제의 방제효과

결구상추 밀둥썩음병 방제용 미생물농약 개발은 당초 BW-13 균주로 종자코팅제 개발을 진행하던 중 엽면살포제로서의 가능성이 타진되어 연구수행 내용과는 별도로 BW-13 균주를 이용한 엽면살포제를 개발하고 이들의 방제효과를 추가로 수행하였다.

1) 생육실 포트재배에서의 밀둥썩음병 방제효과

가) 1차 제제

BW-13 균주를 이용하여 1차 미생물 제제 7종을 제조하여 밀둥썩음병에 대한

방제효과를 화학농약, 펜시쿠론 과 비교 검정한 결과, 수화제형 BW13-A제제의 방제가가 10일째 85.2%로 펜시쿠론의 방제가 50.4%에 비하여 높았다.. 그 외 6종의 제제들은 대체로 방제가가 매우 낮아 BW13-A제제를 1차 선발하였다(Table 23).

Table 23. Disease control effects of various formulations and chemical fungicide, Pencycuron against *R. solani* PY-1 on chishead lettuce at pots of growth chamber

Formulations	Disease severity index ^a (Disease control value ^b ,%)	
	after 7 days	after 10 days
BW13-A + Pa ^c	19.2(72.4) ^a ^d	20.2(85.2)a
BW13-B + Pa	42.5(44.0)bcd	75.9(14.9)e
BW13-C + Pa	60.0(18.7)e	75.9(14.9)e
BW13-D + Pa	39.2(48.4)bc	59.1(33.6)cd
BW13-E + Pa	62.5(17.7)e	78.4(4.5)fg
BW13-F + Pa	70.9(6.6)fg	88.(0.9)g
BW13-G + Pa	71.7(5.5)fg	84.2(5.6)fg
Pencycuron	31.9(52.6)bc	37.7(50.4)bc
Pathogen (Pa) only	75.9(0.0)g	89.2(0.0)g
Control	0.0(100)a	0.0(100)a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area on each plant by *Rhizoctonia solani* AG1

^b Disease control value (%) = (disease severity index in control plants-disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Rhizoctonia solani* (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

나) 2차 제제

BW-13 균주를 이용하여 2차 미생물 제제 3종을 추가하여 1차 선발에서 가장 효과가 높았던 BW13-A제제와 비교 검토한 결과, BW13-A, BW13-I 및 BW13-H 제제의 방제가가 각 76.6, 75.6, 71.8%로서 유의차 없이 높았으며, 이는 화학농약 펜시쿠론의 방제가 50.6%보다는 훨씬 효과적이었다. 따라서, 수화제형 BW13-A제제와 BW13-I 제제를 밑둥썩음병에 대한 우수 제제로 최종 선발하였다(Table 24, Fig 28).

Table 24. Disease control effects of 4 formulations using *S. maltophilia* BW13 and chemical fungicide, Pencycuron against *R. solani* PY-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber

Formulations	after 6 days	
	disease severity index (%) ^a	disease control value (%) ^b
BW13-H + Pa	28.2	71.8b ^d
BW13-I + Pa	24.4	75.6b
BW13-J + Pa	37.7	62.3c
BW13-A + Pa	23.4	76.6b
Pencycuron + Pa	9.4	50.6d
Pathogen (Pa) only	100.0	0.0e
Control	0.0	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area on each plant by *Rhizoctonia solani* YR-1

^b Disease control value (%) = (disease severity index in control plants - disease severity index in treated plants) / (disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Rhizoctonia solani* (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig 28. Disease control effects of 4 formulations against *R. solani* PY-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber. A, BW13-A; B, BW13-H; C, BW13-I; D, BW13-J; E, chemical fungicide, Pencycuron; F, Pathogen(R.S); G, Control.

나. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅제의 방제효과

1) 모잘록병 방제효과

LY-11 균주를 이용한 alginate 코팅종자와 비코팅종자를 플러그포트에 1개씩 파종하여 발아한지 3일된 어린 유묘에 밀둥썩음병원균 *R. solani* PY-1 접종원의 균사조각부유액 ($A_{550}=0.8$) 1 ml을 접종하고 이를 22°C의 생육실에서 4일간 보관한 뒤 하우스로 옮겨 이병주율을 조사하고 방제가를 환산한 결과, 코팅종자는 발병율이 28.9%, 비코팅종자는 97.7%로서 방제가가 70.4%이었다. 한편 대조구로서 병원균이 처리되지 않은 코팅종자와 비코팅종자 처리구에서는 모두 병이 발생되지 않았다(Table 25, Fig. 29).

Table 25. Disease control value (%) of crisphead seeds coated with sodium alginate and *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 against damping-off caused by *R. solani* YR-1

Treatment	disease severity index (%) ^b	Disease control value (%)
Coated seed + Pa ^a	28.9	70.4b ^c
Uncoated seed + Pa	97.7	0.0c
Coated seed	0.0	100.0a
Uncoated seed	0.0	100.0a

^a Pathogen, *Rhizoctonia solani* (Pa)

^b Disease severity index (%) was obtained by estimating the number of infected seedlings showing damping-off by *R. solani* 7 days after inoculation.

^c In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

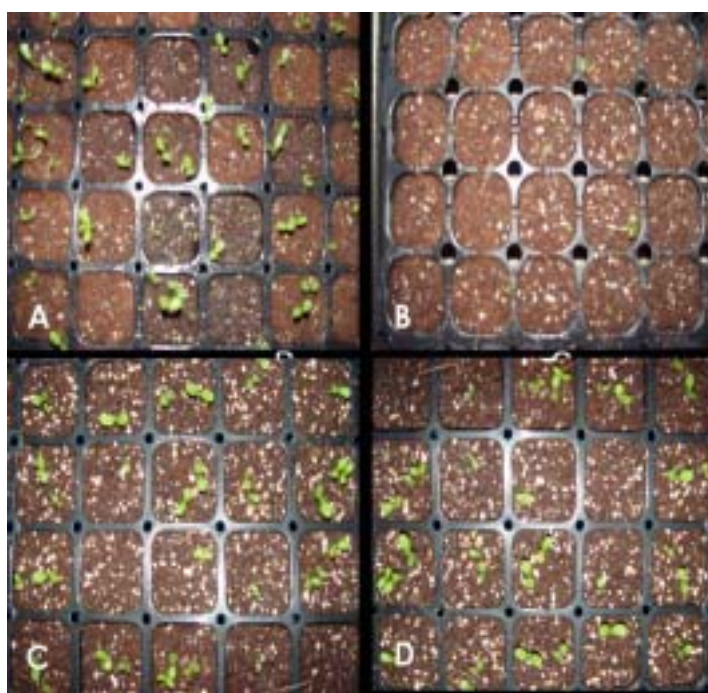


Fig. 29. Seedlings occurrence of seeds coated with sodium alginate and *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 at a plug pot experiments
A, Coated seed + Pathogen (*R. solani*); B, Uncoated seed + Pathogen (*R. solani*);
C, Coated seed (Control -1); D, Uncoated seed (Control -2)

2) 생육실 포트재배에서의 밑등썩음병 방제효과

LY-11 균주를 이용한 alginate 코팅 또는 비코팅한 종자를 플러그포트에 파종한 지 4 주 뒤에 유묘를 포트에 재식한 후 2주된 중간 성체식물(파종 후 6주) 잎의 앞, 뒷면에 *R. solani* PY-1 접종원인 균사조각부유액(A₅₅₀=1.0) 40 ml을 분무접종한 후 생육실에 보관하면서 발병도를 조사하여 방제가로 환산한 결과, 병원균처리 토양에서의 비코팅종자는 100%의 발병도를 보인 반면, 코팅종자는 14.6%로서 방제가는 85.4%이었다(Table 26, Fig 30).

Table 26. Disease control effect of coated seeds against bottom rot caused by *R. solani* YR-1 on crisphead lettuce in a growth chamber

Treatment	Disease severity (%) ^b	Disease control value (%) ^c
Coated seed + Pa ^a	14.6b ^d	85.4b
Uncoated seed + Pa	100.0a	0.0a
Coated seed	0.0c	100.0c
Uncoated seed	0.0c	100.0c

^a Pathogen, *R. solani* AG-1 (Pa)

^b Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area on each plant by *R. solani*

^c Disease disease control value (%) = (disease severity index in control plants - disease severity index in treated plants) / (disease severity index in control plants) x 100

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

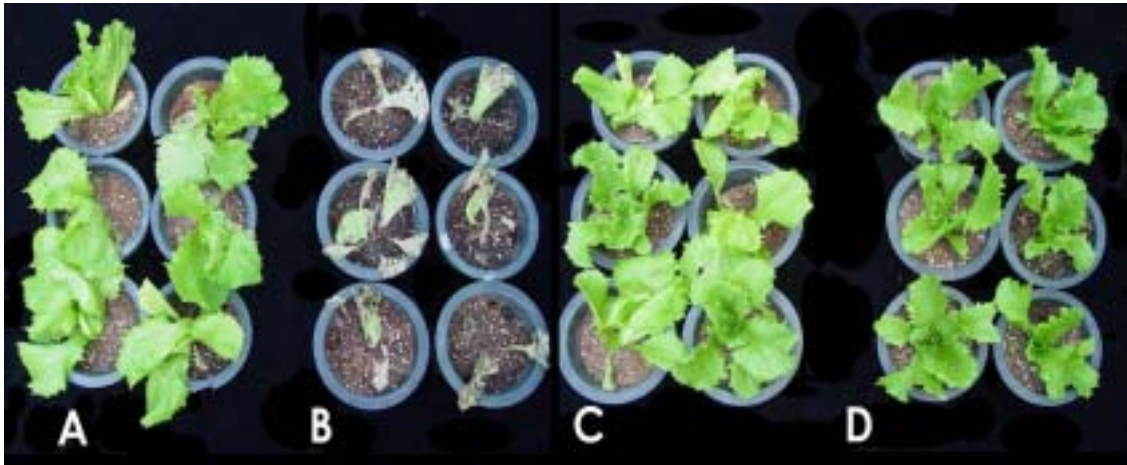


Fig. 30. Disease control effect of seed coating by alginate using *P. aeruginosa* LY-11 and pencycuron against bottom rot caused *R. solani* AG-1 on crisphead lettuce in a growth chamber.

A, Coated seed + Pathogen (*R. solani*); B, Uncoated seed + Pathogen (*R. solani*);
C, Coated seed (Control -1); D, Uncoated seed (Control -2)

결 론

1. *Stenotrophomonas maltophilia* BW13 균주를 이용한 수화제형 엽면살포제 BW13-A제제 및 BW13-I제제를 각각 우수미생물제제로 최종 선발하였다.
2. *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주를 이용한 alginate 코팅제제는 각각 모잘록병에서 70.4%, 밑둥썩음병에서는 85.4%의 방제가를 보였다.

※ 따라서, 생육실 포트재배에서 방제효과를 검정한 결과, 밑둥썩음병 방제용 엽면살포제는 *S. maltophilia* BW-13 균주를 이용하여 제조한 수화제형 BW13-A 및 BW13-I 제제를 선발하였으며, *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 균주를 이용하여 제조한 alginate 코팅종자는 모잘록병과 밑둥썩음병에 효과적이었다.

제 6 절 플라스틱 하우스내 토경재배에서의 방제효과 검정

1. 연구수행 방법

밀등썩음병 방제용 엽면살포제로 생육실 포트재배 검정에서 최종 선발된 수화제형 BW13-A제제와 BW13-I 제제를 플라스틱하우스내 토경에서 재배한 결구상추의 밀등썩음병에 대한 방제효과를 검정하였다. 먼저, 2종 미생물제제 100배 희석액과 펜시쿠론 1000배 희석액을 압축식분무기로 파종한지 4주된 유묘를 플라스틱하우스내 토양에 재식하여 4주(파종 후 8주)된 8~9엽기의 성체 식물 앞, 뒷면 및 근권토양에 골고루 각각 100 ml 씩 살포하였다. 약제처리 24시간후에 밀등부위와 근권토양에 밀등썩음병 PY-1 균주의 접종원 WRSP배지 40 ml 씩 접종하였다. 각 처리구는 평균면적 2 m² (1 x 2 m) 당 20주 씩, 3반복, 완전임의배치법으로 실시하였다. 이들의 발병도를 약제살포 20일째에 조사하고 방제가로 환산하였다.

2. 연구결과

플라스틱하우스내 포트검정에서 가장 효과가 우수하였던 *S. maltophilia* BW-13 균주의 수화제형 BW13-A와 BW13-I 제제를 플라스틱하우스내 토경재배한 결구상추에서 밀등썩음병에 대한 방제효과를 검정한 결과, BW13-A 수화제가 살포 20일째의 방제가가 75.7%로 가장 우수하였으며, 다음으로는 69.8%의 BW13-I 이었다. 대조구인 화학농약 처리구는 56.3%로 낮은 방제효과를 보였다(Table 27, Fig. 31).

Table 27. Disease control effect of wettable powder formulation, BW13-A and BW13-I to bottom rot by *R. solani* PY-1 on crisphead-lettuce fields

Formulations	20 days after treatment
	disease control value (%) ^a
BW13-A + Pa ^b	75.7b ^c
BW13-I + Pa	69.8c
Pencycuron	56.3d
Pathogen (Pa) only	0.0e
Control	100.0a

^a Disease control value (%) = (disease severity index in control plants - disease severity index in treated plants) / (disease severity index in control plants) x 100

^b Pathogen, *R. solani* AG-1 (Pa)

^c In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

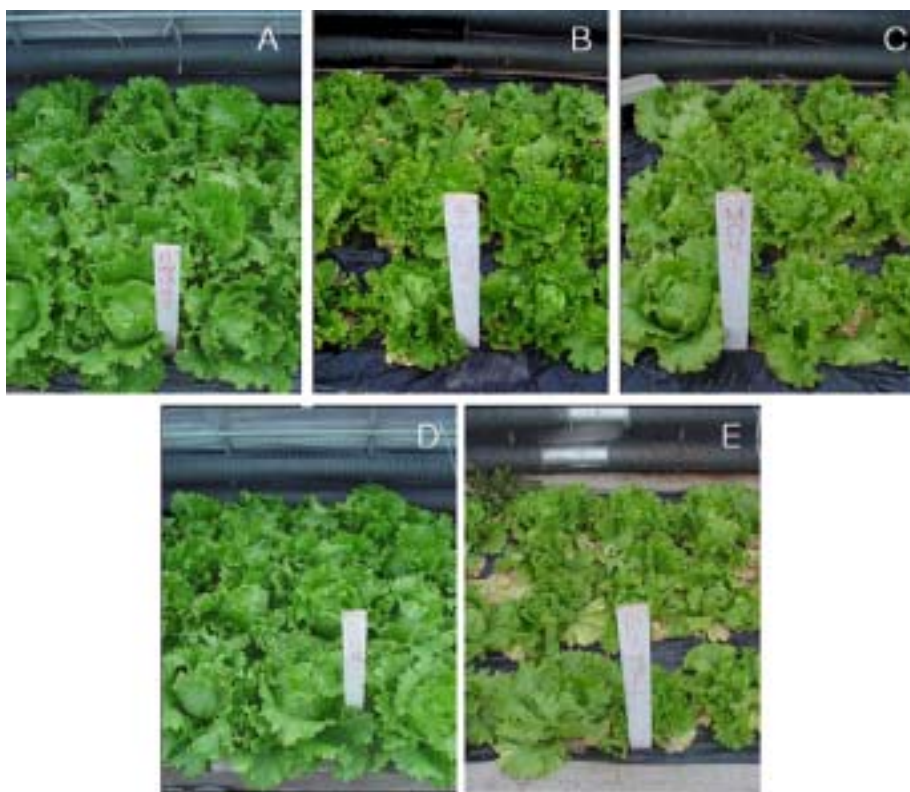


Fig. 31. Effects of wettable powder formulation, BW13-A and BW13-I against bottom rot caused by *R. solani* PY-1 on crisphead lettuce fields at plastic house. A, BW13-A; B, BW13-I; C, Chemical fungicide, Pencycuron ; D, non-treatments; E, Pathogen only

제 7 절 Alginate 코팅종자의 작물에서의 근권 및 엽권정착력 검정

1. 연구수행 방법

가. 종자처리제의 근권 및 엽권정착력 검정

P. aeruginosa LY-11 균주를 이용하여 제조한 alginate 코팅 종자를 플러그포트에 파종하고 4주된 유묘(평균 잎길이 6 cm), 6주된 중간성체 식물 (평균 잎길이 20 cm), 8주된 성체식물 (평균 잎길이 30 cm)에서 LY-11 균주의 근권 및 엽권 정착력을 검정하였다. 먼저 결구상추 유묘, 중간 성체 및 성체 식물을 포트내 토양에서 뽑아 뿌리 주변의 흙을 깨끗하게 털어 낸 다음 유묘와 중간 성체식물은 잎과 뿌리부분을 각각 3등분으로 나누고, 성체식물은 15 mm 간격으로 잎은 4 등분, 뿌리는 6 등분으로 나눈 다음, 각 부분에 정착하고 있는 LY-11 균주의 생균수를 조사하였다. 이때, 공시된 LY-11R 균주는 *P. aeruginosa* LY-11 균주를 rifampicin 100 ug/ml이 포함된 nutrient agar (NA)배지에 2주간 계대하여 획득한 rifampicin 저항성 균주로서 이를 이용하여 제조한 코팅종자를 사용하였다. 코팅종자의 초기생균수는 4.5×10^7 cfu/ml 이었다.

2. 연구결과

가. 종자처리제의 근권 및 엽권정착력 검정

Rifampicin 저항성 균주인 *P. aeruginosa* LY-11R 균주를 이용한 alginate 코팅종자를 파종하고 유묘에서 존재하는 생균수를 조사한 결과, 밑동부위에서 잎 중간부분(0-1')과 밑동에서 뿌리부분(0-1)에 각각 6.8×10^7 , 1.3×10^7 cfu/ml으로 가장 높았으며 뿌리의 중간에서 끝부위는(1-3)에는 약간 감소하였으나, 1.1×10^6 cfu/ml 정도로 유지되었다. 그러나 잎 중간에서 끝부위 부분(1'-2')은 9.8×10^5 cfu/ml로 밑동에서 뿌리부분보다 낮았으며, 잎 끝부위(2'-3')에서는 LY-11 균주가 조사되지 않았다. 파종한지 6주된 중간 성체식물에서는 전반적으로 유묘와 동일한 경향이었는데 밑동부위의 잎 중간에서 끝부위 부분(0-1')과 밑동에서

뿌리부분(0-1)은 각각 7.3×10^7 , 2.1×10^7 cfu/ml로 가장 높았으며 뿌리끝부분에서는 3.1×10^6 cfu/ml으로 유지되었으며, 잎중간부분(1'~2')에 서로 9.6×10^3 으로 유지되었으나 잎끝부분에서는 관찰되지 않았다(Table 28, Fig 32).

Table 28. Growth of *P. aeruginosa* LY-11 on coated seeds along seedlings (4 weeks after sowing) and adult plant growth (6 weeks after sowing) was investigated on various section of adult plants

		Section	cfu/g of tissue	Log (cfu/g of tissue)
seedlings	Leaf	2'-3'	-	-
		1'-2'	9.8×10^5	5.99
		0-1'	6.8×10^7	7.83
	Root	0-1	1.3×10^7	7.11
		1-2	1.2×10^6	6.05
		2-3	1.1×10^6	6.01
Adults	Leaf	2'-3'	-	-
		1'-2'	9.6×10^3	6.98
		0-1'	7.3×10^7	7.86
	Root	0-1	2.1×10^7	7.32
		1-2	1.5×10^6	6.17
		2-3	3.1×10^6	6.49



Fig 32. Growth of *P. aeruginosa* LY-11 on coated seeds along seedlings (2 weeks after sowing) and middle age-adult plant growth (6 weeks after sowing) was investigated on various section of seedlings (A) and middle age-adult plant (B).

또한, 8주째의 성체식물에 존재하는 생균수를 조사한 결과, 밑둥에서 일부분(0-1')과 밑둥에서 뿌리부분(0-1)이 각각 3.2×10^6 , 1.8×10^5 cfu/ml로 세균수가 가장 많았으며 뿌리의 중간 부위까지는 유사하였으나(2-5), 뿌리 끝부분(6-11)은 약간 감소하였지만 최소 1.8×10^4 cfu/ml 정도로 유지되었다. 그러나 앞에서는 앞의 밑둥부위(0-1')을 제외하고는 LY-11 균주가 관찰되지 못하였다(Table 29, Fig 33).

Table 29. Growth of *P. aeruginosa* LY-11 on coated seeds along adult plant growth (8 weeks after sowing) was investigated on various section of adult plants

Section		cfu/g of tissue	Log (cfu/g of tissue)
Adults	Leaf	5'-6'	-
		4'-5'	-
		2'-3'	-
		0-1'	3.2×10^6
	Root	0-1	1.8×10^5
		2-3	2.5×10^5
		4-5	1.2×10^5
		6-7	2.1×10^4
		8-9	1.8×10^4
		10-11	3.1×10^4



Fig 33. Growth of *P. aeruginosa* LY-11 on coated seeds along adult plant growth (6 weeks after sowing) was investigated on various section of adult plants.

제 8 절 엽면살포제와 alginate 코팅종자의 안정성 검정

1. 연구수행 방법

가. BW13-A 엽면살포제의 저장 안정성 검정

수화제형 BW13-A 제제의 저장 안정성을 알아보기 위하여 2005년 3월부터 2005년 9월 까지 6개월간 냉장실(4℃)와 실온(22~25℃)에서 제제를 보관하고 매월 동일한 날짜에 제제 내에 포함되어 있는 생균수를 평판회석법으로 조사하였다. 제제 1 g을 9 ml의 살균수가 들어 있는 시험관에 넣고 vortex로 세계 흔들어 완전히 녹인 다음, 10단계회석법으로 NA배지에 각 시료별로 3반복으로 수행하여 생균수를 조사하였다.

나. Alginate 코팅종자의 저장 온도에 따른 안정성 검정

온도별로 4℃, 15℃, 25℃, 35℃, 40℃에서 alginate 코팅종자를 밀봉보관과 밀봉하지 않은 것으로 나누어 7일간 보관하고 이들에 대한 보관상태를 관찰하였다. 그 결과, 4℃에서 보관하는 것이 가장 양호한 것으로 확인되어 4℃에서 alginate 코팅종자를 밀봉하여 보관하고 저장일수별로 이들에 대한 생세균수를 NA배지에서 회석평판법으로 조사하였다.

2. 연구결과

가. BW13-A 엽면살포제의 저장 안정성

밀동씩음병 방제용 엽면살포제 수화제형 BW13-A 제제의 온도차이에 따른 저장 안정성을 조사한 결과, 초기 세균수는 제제 1 g 당 1.8×10^{14} cfu/ml에서 7개월이 경과하는 동안 4℃에서는 1.2×10^{13} cfu/ml과 실온에서는 1.6×10^{13} cfu/ml으로 매우 높은 수치의 세균수가 유지되는 것으로 조사되었다. 따라서, 본 미생물 제제의 안정성은 매우 높으며, 냉장보관 혹은 실온에서의 보관에 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다(Table 30).

Table 30. Cell density in BW13-A formulation according to storage periods at various temperature condition (°C)

검정 날짜	세균수 (cfu/ml) ^a						
	2005/03	2005/04	2005/05	2005/06	2005/07	2005/08	2005/09
(냉장보관) 4°C	1.4×10 ¹⁴	1.0×10 ¹⁴	0.7×10 ¹⁴	4.8×10 ¹³	4.0×10 ¹³	3.2×10 ¹³	1.2×10 ¹³
(실온) 22~25°C	1.6×10 ¹⁴	1.4×10 ¹⁴	1.0×10 ¹⁴	4.8×10 ¹³	3.8×10 ¹³	2.4×10 ¹³	1.6×10 ¹³

^a This result is survey in the changes of bacterial viability of formulation BW13-A at 4°C and room temperature over time. The initial density (1.8×10¹⁴ cfu/ml/1g of BW13-A formulation) was estimated from March, 2005 to July, 2005.

나. Alginate 코팅종자의 저장 온도에 따른 안정성 검정

온도별(4°C, 15°C, 25°C, 35°C, 40°C)로 밀봉하거나 밀봉하지 않고 7일간 보관한 코팅종자의 상태를 조사한 결과, 15°C와 25°C에서는 밀봉처리구와 밀봉처리를 하지 않은 구 모두 3일 후부터 종자가 자연적으로 발아되어 보관 온도로는 부적합하였으며, 35와 40°C에서는 밀봉과 밀봉하지 않은 두 조건 모두 코팅종자를 싸고 있는 alginate의 건조현상이 심하게 일어나 적합하지 않았다. 건조된 후 alginate를 sodium citrate에 용해시켜 희석평판법으로 생균수를 조사한 결과, 길항세균인 LY-11는 전혀 관찰되지 않았다(Fig 34). 따라서, 4°C에서는 밀봉하지 않을 경우 일부 건조 및 발아되는 종자가 관찰되므로 최종적으로 4°C에 밀봉해서 보관하는 것이 가장 우수한 보관법으로 선발되었다.

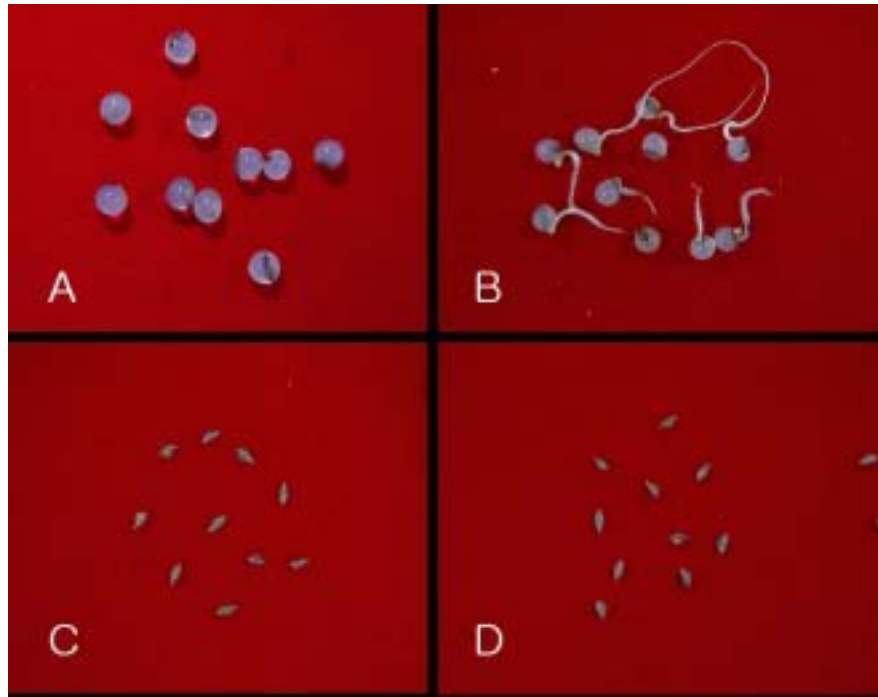


Fig 34. Cell density of LY-11 strain in coating seeds under various temperature condition (°C). A, 4°C; B, 15°C and 25°C; C, 35°C D; 40°C

따라서, 4°C에서 7일간 밀봉 보관한 alginate 코팅종자의 생균수를 조사한 결과, 코팅에 사용된 초기 세균수는 4.5×10^7 cfu/ml였으나 1일째에 5.2×10^6 cfu/ml로 조사되었다. 1 일 간격으로 7일이 지나도 2.0×10^7 cfu/ml으로 큰 변화가 없었으며, 50일째 조사한 결과에도 생균수가 안정적으로 지속되는 것을 확인하였다(Table 31).

Table 31. Total viable cell density of *Pseudomonas aeruginosa* LY-11 in coating seeds according to storage period at 4°C

Stored period (Day)	cfu/4 seeds
0	4.5×10^7 ^a
1	5.2×10^6
2	8.1×10^6
3	8.0×10^7
4	4.4×10^7
5	3.6×10^7
6	2.0×10^7
7	2.0×10^7
8	3.6×10^7
9	2.1×10^7
10	1.0×10^7
11	3.5×10^7
12	5.4×10^7
13	6.5×10^7
14	5.3×10^7
20	3.2×10^7
30	4.5×10^7
40	3.1×10^7
50	7.2×10^7

제 2 연구 목표 : 결구상추 균핵병 방제용 미생물농약 개발

세부과제별 연구기관 : 동아대학교
연구책임자 : 제 1 세부과제 (정 순 재)
제 3 세부과제 (문 병 주)

제 1 절 서 론

결구상추는 국내에서 가장 많이 재배되고 있는 양채류 중의 하나로 가장 많은 재배면적과 생산량을 차지하며, 94~95%의 수분과 탄수화물·조단백질·조섬유·비타민C 등이 다량 들어 있어 노약자 및 어린이에게 좋은 것으로 보고(유태웅, 1997)되어 있다. 우리나라에서는 주로 쌈과 샐러드로 소비되고 있는데 다른 일반채소류에 비하여 수분이 많은 편이며 칼슘과 무기염류가 많이 들어 있고 비타민의 함량도 상당히 높다. 또, 상추에는 독특한 쓴맛이 있으며, 그 주성분이 lactucerin, lactucin, lactucic acid 등인데, 이것은 일종의 alkaloid로서 아편과 유사한 성질이 있어, 아편 대용으로 최면·진통제로 사용되기도 하며 상추 쌈을 먹으면 졸리워 숙면을 취할 수 있는 것도 이 성분들의 작용 때문이다. 그리고 최근 햄버거 및 육류 등의 가공식품의 소비가 증가하면서 매년 생산량과 소비량이 증가하고 있는데, 생산된 결구상추의 주 소비처는 최근 식생활 변화 추세에 따라 대중화되면서 일반가정 소비가 약 35%, 관광호텔 및 고급 음식점이 약 35%, 그리고 군납이 약 30% 정도로 추정되고 있다(농진청, 1998; 농진청, 2000).

결구상추는 고냉지권(해발 600m이상)에서는 1~2기작 재배를 하고 있으며 2기작 재배를 위해서 보통 5월 초순에 재식하여 6월 중하순에 수확하고, 두 번째 재식은 6월 하순이나 7월 초순에 재식하여 8월 중하순에 수확하는 작형을 주로 하고 있다. 여름철 결구상추의 수확기에 따라 가격의 진폭이 큰 편으로 수확기의 가격조사 및 생산 동행을 면밀히 파악할 필요가 있다. 그리고 안정적 생산할 수 있는 품종 선택이 중요하다. 기존의 보급된 품종들은 100% 외국에서 수입되고 있는 형편이며, 원래 육성지가 서늘하고 건조한 기후조건에서 육성된 특성을 갖고 있는 관계로 우리나라처럼 여름철 장마기인 고온 다습한 환경에 적합한 품종의 선택이 좁은 것이 사실이다. 현재 도입 재배되고 품종들이 일본 및 미국에서 도입된 품종들인 유레이크, 텍사스그린, 사크라멘트, 시스코 등이 대부분 차지하고 있다. 사크라멘트

와 시스코는 여름철 보다는 겨울철 재배에 적합한 것으로 알려져 있다. 따라서 여름철 재배에 적합한 품종을 선택하는 것이 무엇보다도 중요하며 여름철 재배시 가장 유념할 것은 고온기 재배로 인한 추대와 다습으로 인한 무름병 및 균핵병 방제에 주의를 기울여야한다(농진청, 1998; 농진청, 2000).

최근 결구상추는 시설재배를 통하여 연중 재배되고 연작과 하우스내의 다습조건 때문에 균핵병이 발생으로 수량과 품질이 저하되어 방제 대책이 시급한 실정에 있다. 경상남도의 결구상추 재배지인 하동과 의령군의 시설재배지에서는 재배기간인 9월 중순부터 익년 5월 초까지 처음에는 그루 땅가 부위에 수침상, 담갈색, 부정형의 병반이 생기고 차츰 잎 위쪽과 안쪽으로 진전되면서 물렁하게 썩고 결국 그루 전체가 썩어 말라 죽으며, 병반에는 처음에 흰 솜 모양의 균사가 자라고 후에 부정형의 검은 균핵이 형성되는 전형적인 균핵병의 증상이 발생되었다. 동일 국화과인 상추(잎상추) 균핵병에 관해서는 이미 보고되어 있으나(한국식물병리학회, 1998), 결구상추 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)은 국내 미기록 병해이며 국내·외적으로 연구가 매우 미흡하다.

균핵병(*Sclerotinia rot*)은 *Sclerotinia sclerotiorum*에 의해 발생하는 다범성 병해로 많은 채소류와 화훼 류 그리고 일부 관목에도 심각한 피해를 준다. 균핵병은 전세계적으로 분포하며 유포기와 성숙기 등의 모든 생장단계에 걸쳐 발생되며 수확 후 운송과 저장 중에서도 발생한다. 고랭지 채소재배지, 십자화과 채종지, 유채재배지, 시설원예재배지에서 많이 발생하는데, 특히 시설재배 엽채류에 발생하여 많은 피해를 초래하고 있으며, 방제에 어려움을 겪고 있다. 이 병의 가장 뚜렷하고 전형적인 표징은 균핵으로 발달할 하얀 솜털 같은 균사체가 감염된 식물체상에 형성하는 것이다. 상추와 셀러리, 무와 같은 식물들의 잎과 엽병은 균핵 병원균이 줄기와 하위엽들을 감염시킴에 따라 갑작스레 붕괴되고 죽게 되며 또한 줄기를 통해 급속히 침해하고 전반되어 식물체가 고사한다. 균총과 균핵은 보통 바깥쪽 잎의 표면에 나타나지만 습한 조건에서는 식물체를 침해하여 썩히고 전 식물체 상에 하얀 솜털 같은 균사체가 성장한다. 균핵 병원균은 감염된 조직에서 균핵으로 월동하거나 지면위에 떨어진 균핵으로 월동한다. 균핵은 발아하여 컵모양의 자낭반이 형성되고 자낭반에 자낭과 자낭포자를 형성한다. 자낭반으로부터 수많은 자낭포자들이 대기중으로 방출되어 감염을 일으키는데, 시설재배 등에서는 균핵의 발아로 균사에 의한 감염이 주로 이루어진다(제주도농업기술원, 2000).

하지만, 지금까지 결구상추 균핵병 방제를 위한 화학약제는 공시된 바가 없으며, 농

가에서는 주로 프로파, 베노밀 등의 약제를 이용하여 살포하고 있으나 그 효과가 매우 미미한 상태이다.

식물의 병해충 방제에는 친환경적인 기술이 보급되도록 추진되고 있는데 생물농약은 그 동안 경제성과 제제의 제조방법 및 사용 방법상의 문제 등으로 인해 대규모로 생산되지는 못하였다((농경과원예사, 2001; Fruh 등, 1996; Steve, L., 1999). 최근 식물병의 생물학적 방제 연구가 활기를 띠어 미생물 제제의 실용화 가능성으로 외국에서는 길항 진균과 세균을 이용한 미생물 농약에 대하여 많은 개발이 이루어지고 있다(Cook and Baker, 1983; Kim 등, 1990; Dandurand 등, 2000; Jack and Robert, 1998; Jack and Robert, 2001). 균핵병의 생물학적 방제 인자로서 *Coniothyrium minitans*(Whipps and Gerlagh, 1992), *Serratia plymuthica* (Merav 등, 2003), *Ulocladium atrum*(Li 등, 2003), *Pseudomonas fluorescens*(Pedras 등, 2003), *Bacillus megaterium* N4(이재필 등, 2002), *Nostoc* strain ATCC 53789(Biondi 등, 2004)등이 보고된 바 있다.

현재 전세계 생물농약시장은 7000억원 정도로 소규모이지만 매년 12%정도의 고속성장을 지속하고 있으며, 특히 미생물농약 분야는 연간 15~20%의 고속성장을 지속할 것이라고 예측하고 있다(농경과원예사, 2001; Steve, L., 1999; Knight 등, 1997).

따라서, 본 연구에서는 결구상추 균핵병을 포함한 엽채류의 균핵병에 대한 뚜렷한 방제 약제가 현재까지 공시된바가 없으므로, 균핵병 방제용 미생물농약을 개발하여 국내의 결구상추 생산 효율을 증대시켜 농가 소득 향상은 물론 전반적인 농업경쟁력 재고에 기여하고자 한다.

제 2 절 유용미생물의 탐색 및 동정

1. 연구수행 방법

가. 공시작물 및 품종

경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 농가에서는 봄과 가을철에 20일에서 25일 마다 결구상추 종자를 파종하고, 25일된 유묘를 플라스틱 하우스에 재식하여 50일 내지 60일 후에 성체를 수확하고 있으며, 겨울철에는 파종 40일-45일 후에 하우스에 재식하고 80~90일 후에 수확하고 있다. 이에 본 연구에서도 경종은 농가관행시설재배에 준하였으며, 결구상추 품종은 현재 농가에서 통상적으로 사용하고 있는 엠파이어(상품명: 유레이크) 여름품종과 샤크라멘트(상품명: 세레나) 겨울품종을 공시하여 생육실 포트 검정, 온실내 포트 검정 및 플라스틱하우스내 토경 실험 등 이하의 모든 실험에 공시하였다.

나. 균핵병의 발생과 발병을 조사

경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 농가에서 발생한 균핵병의 발병을 조사를 위해 2003년 1월부터 5월에 걸쳐 1차 조사되었으며, 2003년 11월부터 2004년 4월까지 2차 조사되었다. 이때, 발병율은 결구상추 재배 플라스틱 하우스 3동 (1동에는 400주 이상 재배)을 1하우스당 5 구역(구역 당 3 × 3 m)으로 임의 선정하였으며, 총 결구상추 조사 주수(3동×100주×5구역)에 대한 결구상추 이병주수를 이병주율로 환산하였다.

다. 병원균 분리 및 동정

균핵병이 발생한 경상남도 의령군 부림면 신반리와 경상남도 하동군의 결구상추 재배 플라스틱하우스에서 이병 결구상추를 채집하여 잎, 줄기, 뿌리의 각 부위의 면적을 1cm²가 되도록 잘라 감자한천배지(Potato Dextrose Agar)와 스트렙토마이신(Streptomycin)이 50 µg/ml 첨가된 물한천배지(Water Agar)배지에 올려 25℃ 항온기에 배양하여 분리하였다.

결구상추에서 분리한 균핵병원균인 YR-1 균주의 동정을 위해 균핵의 크기 및 균핵의 수 그리고 균핵의 분포에 따라서 동정되었고, 자낭반 크기, 자낭반 모양, 자낭반 수, 자낭포자 크기, 자낭포자 수, 자낭포자내의 핵 수에 따라서 정확하게 분류하였다. 자낭반 형성을

위해 먼저 PDA배지에 생성된 균핵을 암조건의 0℃에서 1달간 방치한 후 500 ml의 삼각 플라스크에 공극이 있는 모래를 넣고 충분히 수분을 가하여 2일간 살균한 다음 여기에 균핵을 5개 내지 7개 정도 0.5cm 길이로 모래속에 심고 면솜으로 막은 뒤, 15℃에서 광/암(12시간/12시간)상에서 1~2개월 동안 교호배양하였다. 1개월 뒤 생성된 자낭반을 현미경하에서 관찰하였다.

라. 병원성 검정

공시 병원균 YR-1 균주의 효과적인 병원성 검정을 위해 군사조각부유액의 최적농도 및 최적처리량에 따른 병원성 검정을 실시하였다. 군사조각부유액은 PDA배지에 이식한 YR-1 균주를 항온기에 4~5일간 배양(암, 25℃)한 뒤, 절취한 군사절편(직경 1 cm)을 PDB 배지에 100 ml 당 5개씩 넣고 3~4일간 진탕배양(25℃, 150 rpm)하였다. 배양된 군사를 걸러내어 탈이온수로 5회 정도 세척하고, 이것을 블랜더(Warning, USA)로 15초간 군사를 절단한 다음, 한 포트당 농도를 A_{550} =0.4, 0.6, 0.8 및 1.0이 되도록 완충용액으로 조정하여 농도별로 결구상추에 처리하였다. 또한 처리량별로 한 포트 당 20, 40, 60, 80 ml을 포트에 재식한 4주(파종 후 8주)된 결구상추 잎에 골고루 분무 살포하여 접종하였다. 이들을 25℃, 상대습도 90% 이상의 생육실에서 7일간 배양하면서 매일 발병도(%)를 조사하여 최적 농도 및 처리량을 결정하였다. 각 처리구는 5포트씩 3반복으로 3회 조사되었으며 이를 평균하여 주당 발병도(%)로 표시하였다. 발병도(%)는 농약등록시험 기준과 방법에 따라 병반면적율을 조사하여 다음과 같이 발병도로 환산하였다(한국농약공업협회, 2001).

$$\text{발병도}(\%) = \frac{(\text{발병수} \times \text{계수})}{4 \times \text{엽수}} \times 100$$

- 계수 : 0- 발병무,
 1- 병반면적율 1~5%,
 2- 병반면적율 5.1~20%,
 3- 병반면적율 20.1~40%
 4- 병반면적율 40% 이상

마. 길항 미생물의 분리

경상남도 의령군 부림면 신반리 결구상추 재배 포장에서 건진 결구상추를 채집하여 밑동부위, 뿌리 및 근권 토양 10 g을 살균수 50 ml와 각각 혼합한 후, 분쇄기(Waring, USA)에 10~30초간 마쇄한 다음, Nutrient agar배지에 평판희석법으로 배양하였다. 각 시료를 30°C에서 48시간 배양한 후 세균 균총을 분리하여 순수배양하고 각 균주별로 균핵병원균에 대한 길항능을 조사하였다. 이때 1차 분리균 600 균주와 2차 분리균 102개 균주 등 모두 702 균주를 각각 PDA배지에서 병원균 *S. sclerotiorum* YR-1 균주와 25°C에서 5~7일간 대치배양하여 균사생장저지대(Inhibition zone)를 조사하여 저지대가 큰 세균을 길항균으로 1차 선발하였다.

1차 선발된 균핵병원균에 대한 길항세균 10균주를 각각 생육실 포트검정을 실시하여 균핵병 억제에 우수한 길항세균을 2차 선발하였다. 2차 선발균의 균핵병에 대한 방제효과 검정은 NB배지에 24시간 진탕배양한 각 길항세균의 부유액(1×10^6 cfu/ml)을 1 포트당 100 ml씩 포트에 재식한 지 4주(과중 8주)된 결구상추 잎에 골고루 분무살포한 다음 25°C의 생육실에 24시간 보관하고 여기에 PDB배지에 진탕배양한 *S. sclerotinia* YR-1 균주의 균사조각 부유액을 1 포트당 적정농도인 40 ml ($A_{550}=0.6$)을 처리하여 생육실(25°C, 상대습도 90%)에 보관후 6일째에 발병도를 조사하여 방제가로 환산하였다. 2차 선발 길항균 외에도 2차년도에 분리된 7 균주의 방제효과를 위와 동일하게 포트검정하여 방제가가 높은 균주를 우수길항균으로 3차 선발하였다.

바. 길항미생물의 혼합처리에 의한 방제효과 증진 검정

생육실 포트재배 검정에서 방제효과가 우수하여 2차로 선발된 길항균 A-2, A-7, RH-4 균주를 단독 혹은 혼합처리하여 방제효과를 증진코자 하였다. 앞서의 생육실 포트재배에서의 방제효과 검정 방법과 동일한 방법으로 수행하였으며, 처리구로는 단독처리구(A2, A7, RH4) 및 혼합처리구(A2+A7, A7+RH4, A2+RH4, A2+A7+RH4)로 나누어 분무 살포하였으며 24시간 후 병원균 YR-1 균주의 균사부유액을 처리하여 방제가를 조사하였다. 앞서의 생육실 포트재배에서의 방제효과 검정과 동일하게 수행되었다.

사. 우수길항세균 동정

균핵병 방제용 우수길항균으로 최종 선발된 A-7 균주를 API test, TEM을 이용한 형태 관찰, 생리·생화학적 특성 및 16S rDNA gene sequence analysis 또는 *gyrA* sequence analysis를 이용하여 동정을 실시하였다.

1) TEM(Transmission electronic microscopy)을 이용한 형태관찰

A-7균주를 1일간 NA배지에서 배양한 후 세균현탁액을 3차 증류수에 1/2, 1/4, 1/16, 1/32의 순으로 희석하고, grid를 각각의 현탁액에 묻힌 후, 1% aqueous uranyl acetate를 떨어뜨려 1-2분 방치한 후에 세균의 형태와 편모를 관찰하였다. 이때, negative staining으로 grid 위에 1% aqueous uranyl acetate를 처리한 것을 사용하였다.

2) 생리·생화학적 특성 및 API test 검정

Bergey's manual을 기초로 하여 그람염색, 혐기생장, 온도 조사, catalase, protease, 전분의 가수분해 등을 조사하였다. Gram staining 및 생리·화학적 특성을 조사하여 동정하고 또한, API system(API kit 20E, 50CHB, bioMerieux, France)을 이용하여 동정하였다.

3) 16S rDNA gene sequence analysis

A-7 균주의 정확한 동정을 위하여, LB배지에서 1일간 배양한 각 세균의 chromosomal DNA를 promega genomic DNA purification kit (Promega., U.S.A.)를 사용하여 genomic DNA를 준비하고(Chun, 1995), 이를 forward 및 reverse primer를 사용해 16S rDNA를 PCR amplication하였다. PCR product를 QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN Inc., Germany)를 사용하여 정제한 후, pGem-T vector (Promega, U.S.A.)에 cloning 하여, ABI 100 automated DNA sequencer(Takara Korea, Korea)로 분석하고, 이 염기서열을 기초로 NCBI 에 blast 하여 동정하였다.

4) *gyrA* sequence analysis

Bacillus 속균에 포함하는 A-7 균주의 정확한 속 동정을 위해 gyrase subunit A sequence 분석을 실시하였다. Wizard genomic DNA extraction kit(Promega Inc, USA)를

이용하여 각 균주들의 genomic DNA를 Universal primer(p-gyrA-F 5'CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT3', p-gyrA-r 5'CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT3')를 이용하여 PCR amplication하였으며, 이 PCR product를 Qia Quick spin column (Qiagen Inc, Germany)을 이용하여 다시 정제한 후 pGem-T vector (Prom ega Inc, USA)에 ligation시켜 *E.coli*로 증폭하였다. plasmid extraction kit(Atman bio, korea)를 통해 추출한 gyrA gene의 sequence를 NCBI의 blast program을 통해 동정하였다.

2. 연구 결과

가. 균핵병 발생과 병원균 분리 및 동정

1) 균핵병의 발생 및 발병율 조사

경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 농가에서 2003년 1월에서 5월까지 균핵병이 발생되어, 신반리 농가의 도움으로 수확초기의 플라스틱하우스 1동 당 수확되는 결구상추 주수에 대한 이병주율을 조사하였다. 2003년도에 조사된 평균 이병주율은 21.9%인데 비해, 1월과 2월의 이병주율은 각각 39.0%, 30.1%로 평균보다 훨씬 높았으며, 3월은 24.2%이고 4월과 5월은 매우 낮았다(Table 1). 2차 조사된 2003년 11월부터 2004년 4월까지의 평균 이병주율은 8.3%로 2003년초에 비하여 현저히 낮아졌다(Table 2). 이는 2003년도 여름 태풍피해로 인해 농가에서 플라스틱 하우스의 재건축, 토양 객토 및 토양소독을 실시하여 토양내 균핵병균의 밀도가 급격히 감소하였기 때문으로 생각된다. 하지만 수확초기에 한번 발병되면 수확 말까지 점점 피해가 증가되어 말기에는 피해율이 50% 이상으로 급격히 확산되는 것을 확인하였다. 발생한 균핵병의 병징은 그루 땅가 부위에 수침상, 담갈색, 부정형의 병반이 생기고 차츰 잎 위쪽과 안쪽으로 진전되면서 물렁하게 썩었으며(Fig. 1A), 결국 그루 전체가 썩어 말라 죽었다(Fig. 1C, 1D). 병반부에 흰 솜 모양의 균사가 자라고, 이후에 부정형의 검고 대형의 균핵이 형성되었다(Fig. 1B). 한편 균핵병이 발생한 결구상추에서는 잿빛곰팡이병이 2차적으로 발생하여 작물에 큰 피해를 주었다. 균핵병의 발병이 심각한 경상남도 의령군 부림면 신반리와 경남 하동의 결구상추 재배 플라스틱 하우스의 병든 결구상추에서 분리한 YR-1균주 이외에 140 균주를 분리하여 병원성을 조사한 결과, 자연 발병된 결구상추 균핵병의 병징과 동일한 것으로 확인되었다

Table 1. Occurrence of Sclerotinia rot by *Sclerotinia sclerotiorum* on the crisp head lettuce in plastic houses at Uiryeong-Gun, Gyeong Sang nam-Do in 2003

Plastic house	Disease severity index (%)				
	January	February	March	April	May
A ^b	38.2 ^a	32.4	26.4	12.4	6.8
B	36.5	27.1	20.6	8.7	2.1
C	42.3	30.9	25.5	10.1	8.2
Average (%)	39.0a	30.1b	24.2b	10.4c	5.7c

^a Disease severity index (%) was estimated by counting the number of plants infected by *S. sclerotiorum*.

^b Total number of tested crisphead lettuce plants ; A, 4600 plants; B, 4300 plants ; C, 4300 plants.

Table 2. Occurrence of Sclerotinia rot caused by *Sclerotinia* sp. on the crisphead lettuce in plastic houses at Uiryeong-Gun, Gyeong Sangnam-Do from 2003 to 2004

Plastic house	Disease severity index (%)					
	2003 - November ^a	2003 - December	2004 - January ^b	2004 - February	2004 - March	2004 - April
A ^c	8.3 ^d	5.4	9.2	10.3	14.8	0.6
B	7.9	7.5	10.5	13.4	12.5	0.6
C	7.5	6.9	8.2	11.1	14.1	0.6
Average(%)	7.9	6.6	9.3	11.6	13.8	0.6

^a Year 2003

^b Year 2004

^c Total number of tested crisphead lettuce plants ; A, 4600 plants; B, 4300 plants; C, 4300 plants

^d Disease severity index (%) was estimated by counting the number of plants infected by *S. sclerotiorum*.

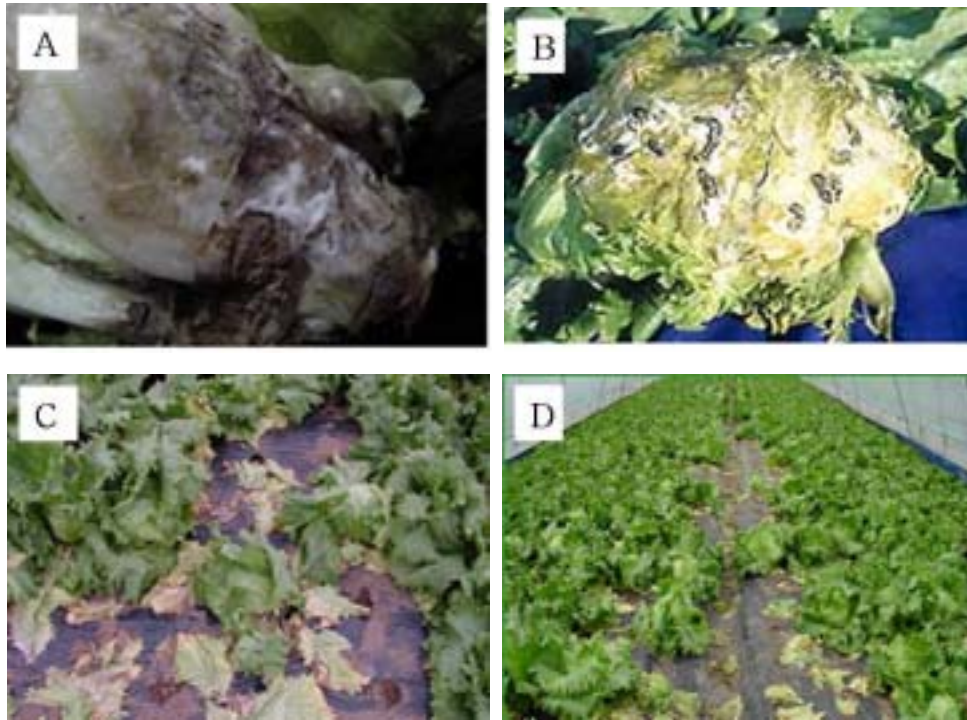


Fig. 1. Symptoms of sclerotinia rot of crisphead lettuce caused by *Sclerotinia* sp.. A: Typical symptoms on leaf in the field, B: The white mycelial growth and sclerotia formed on the leaves, C: Infected plants became rotted then blighted, and eventually died, D: Occurrence of sclerotinia rot in the crisphead lettuce fields at Uiryong-Gun, Gyeong San Nam-Do in 2003.

2) 균핵병 병원균 분리 및 동정

경상남도 의령군 부림면 신반리에서 병든 결구상추로부터 분리한 병원균 140여 분리 균주 중 약 80 여 균주가 *S. sclerotiorum*로 동정되었으며 전형적인 *S. sclerotiorum*의 균핵이 관찰되었다(Fig. 2, Fig. 3A). 분리균의 균사절편을 결구상추의 잎에 부착하여 병원성을 검정한 결과, 대부분의 균주에서 높은 병원성을 보였으며, 이 중 YR-1 균주의 병원성이 가장 강한 병원성을 나타내어 이하의 모든 실험에 공시하였다(Fig. 3A). 공시 병원균 YR-1 균주의 배양적 특성을 관찰한 결과, 균총 색깔은 처음 무색에서 흰색으로 변화하였으며, 불규칙한 검은색의 균핵이 petridish 당 14~23개 정도 형성되었다. 균핵의 크기는 2.1~5.5×2.0~4.4 mm으로 크고 굵었으며, 균핵의 분포는 균총의 가장자리에 주로 형성되었는데 형태는 구형 또는 납작한 타원형이거나 부정형이었다(Fig. 3A).

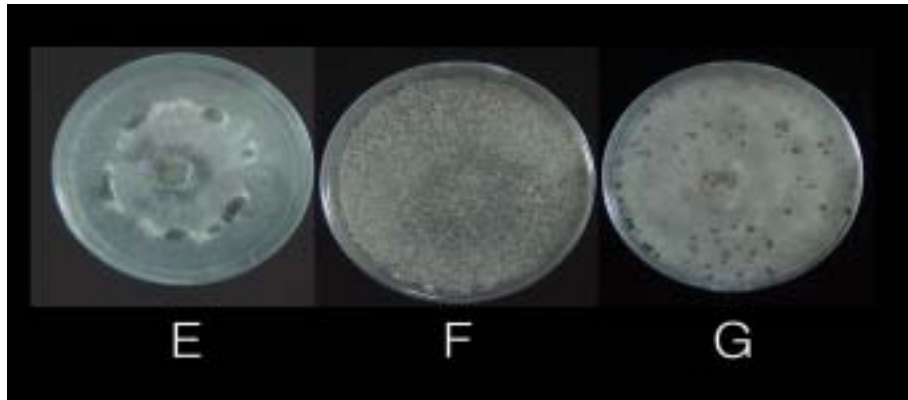


Fig. 2. Isolation of *Sclerotinia* spp. from diseased crisphead lettuce leaves at Uiryecung-Gun, Gyeong Sang nam-do.

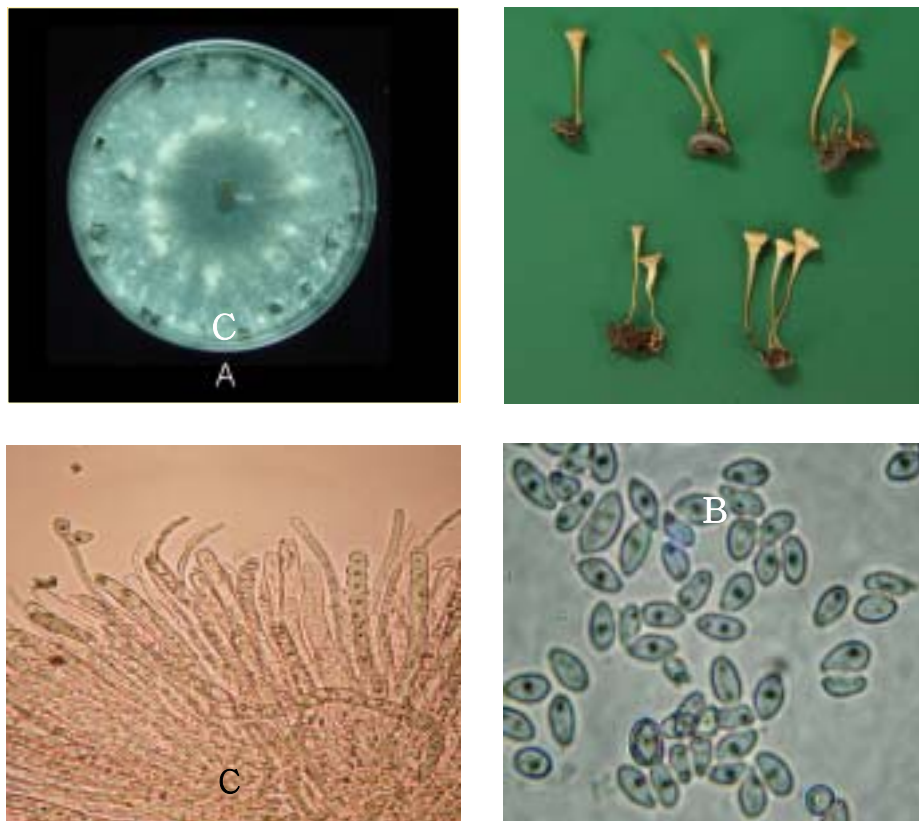


Fig 3. Morphological characteristics of *Sclerotinia* sp. YR-1 isolated from crisphead lettuce. A: The colony and sclerotia of *Sclerotinia* sp. grown on PDA, B: Apothecia produced from sclerotia, C: Asci, D: Ascospores

좀 더 정확한 동정을 위해 균핵을 습한 모래 속에 넣고 15℃ 항온기에서 1달간 배양하여 자낭반 형성 및 자낭포자를 관찰하였는데, 균핵으로부터 1~2개씩의 자낭반 형성되기 시작되어 40일 이후에는 균핵 한 개당 1~5여개의 자낭반을 관찰할 수가 있었다. 자낭반은 컵모양으로 크기는 1.5~3.9 mm이었고, 자루는 가늘고 원통형이며 크기는 7.9~18.2 mm이었으며, 두부는 원반모양으로 황갈색이고, 크기는 0.7~2.1 mm이었다(Table 3, Fig 3B). 자낭반에는 무수히 많은 자낭이 존재하였으며, 자낭의 크기는 100.0~165.0 × 7.5~12.5 μm이고 원통형으로 자낭안에 자낭포자가 8개 들어있으며, 측사는 실 모양이었다(Table 3, Fig 3C). 자낭포자는 난형 또는 타원형으로 단세포이며, 무색이고 크기는 11.5~23.0 × 5.0~10.0 μm이었으며 자낭안의 핵수는 2개이었다(Table 3, Fig 3D). 또한, 삼각플라스크 안에서 형성된 성숙한 자낭반을 건드리면 자낭포자가 연기처럼 수많이 비산되는 것을 관찰할 수가 있었다. 이상과 같이 병징과 병원균의 균학적 특징으로 분류, 동정한 결과 Mordue(1972)에 의해 보고된 *Sclerotinia sclerotiorum*의 특징과 일치하였다. 따라서, YR-1균주는 *Sclerotinia sclerotiorum*로 동정되었으며, 본 균주를 *S. sclerotiorum* YR-1로 명명하였다(Table 3).

Table 3. Morphological and cultural characteristics of *Sclerotinia* sp. YR-1 isolated from crisphead lettuce

		YR-1 isolate	<i>S. sclerotiorum</i> ^a
Examination	Division	Description of characteristics	
Sclerotium	Formation	14~23/Petri dish	
	Color	Black	Black
	Shape	Globose to irregular ^a	Globose to irregular
	Size	2.1~5.5×2.0~4.4 mm	
Apothecium	Formation	1~5/sclerotium	
	Shape	Cup-shaped	Cup-shaped
	Diameter of disks	1.5~3.9 mm	
	Length of stalks	7.9~18.2 mm	0.5~2cm
	Width of stalks	0.7~2.1 mm	
Ascus	Shape	Cylindrical	Cylindrical
	Size	100.0~165.0×7.5~12.5 μm	80~250×4.5~22.5 μm
Ascospore	Shape	Ellipsoid to ovoid	Ellipsoid to ovoid
	Size	11.5~23.0×5.0~10.0 μm	9~13×4~6.5 μm
	No. of nuclei	1~2	
	Color	colorless	colorless

^a Described by Udagawa et al., (1980)

추가로 공시 병원균 *S. sclerotiorum* YR-1의 배양적 특성을 위해 증식온도를 조사하였는데, 20℃~25℃에서 균핵 형성이 가장 빨랐으며 균핵 크기도 가장 크고 갯수도 많았다. 반대로, 10℃와 15℃에서는 균사 증식이 거의 일어나지 않았고, 30℃에서는 증식이 다소 늦는 경향이였다. 이때, 균핵의 크기와 수는 매우 작았고 나타나는 시기도 매우 늦었다. 35℃에서도 역시 증식이 매우 늦고 저조하였으며 균핵 형성이 관찰되지 않았다. 결과적으로 YR-1균주의 최적 증식온도는 20℃~25℃로 확인되었다(Table 4).

Table 4. Effect of temperature on the mycelial growth and Sclerotium formation of *S. sclerotiorum* YR-1 strain on PDA medium

Examination	Temperature (°C)					
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Mycelial growth	-	-	+++	+++	++	+
Sclerotium size (mm)	-	-	4.2×3.6	4.8×3.8	2.3×2.5	-
No. of sclerotium	-	-	19	18	10	-
Sclerotium formation time (days)	-	-	10	10	15	-

나. 병원성 검정

분리 균주 중 예비실험에서 병원성이 강한 것으로 확인된 *S. sclerotiorum* YR-1 균주의 균사조각부유액을 농도별로 접종하여 최적처리량과 처리농도를 선발하고 병원성 검정을 수행하였다.

1) 접종원의 최적 처리량 선발

S. sclerotiorum YR-1 균주의 균사조각부유액($A_{550} = 0.8$)을 처리량 별로 병원성 검정 후 최적처리량을 선발한 결과, 80 ml와 60 ml의 처리량에서는 2일째 이후부터 병이 발생하기 시작하여 5일째에 100%의 발병도를 나타내었으며, 40 ml처리에서는 3일째에 40% 발병도를 보이기 시작하여 7일째에 90%로 서서히 병이 진전되었다. 한편, 20 ml 이하의 처리량은 7일째까지도 70%의 낮은 발병도를 나타내었다. 길항균의 방제효과 검정에서는 병원균의 접종량이 많을 때는 효과적인 검정이 어렵기 때문에 4-5일째까지 60%의 발병도를 보인 40 ml를 접종원 최적처리량으로 선발하였다(Table 5, Fig. 4).

Table 5. Selection of suitable inoculum volume of *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 pathogenicity on crisphead lettuce at pots experiments

ml/pot	Disease severity index (%) ^a						
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days
80	0	30	70	90	100	100	100
60	0	20	60	80	100	100	100
40	0	0	40	60	60	80	90
20	0	0	30	40	40	60	70
Control	0	0	0	0	0	0	0

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the diseased leaf area of the plants by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1



Fig. 4. Pathogenicity test of *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 with different volume of inoculum on crisphead lettuces at the pots experiments. A, 80 ml; B, 60 ml; C, 40 ml; D, 20 ml; E, Control(non-treatment).

2) 접종원의 최적처리 농도 선발

S. sclerotiorum YR-1 균주의 균사조각부유액을 농도별($A_{550}=0.2, 0.4, 0.6, 0.8$)로 접종하여 최적농도를 선발한 결과, $A_{550}=0.2$ 의 농도에서는 4일째부터 병이 발생하기 시작하여 11일째까지의 발병도가 46%였으며, $A_{550}=0.4$ 와 0.6의 농도에서는 3일째부터 병이 발생하기 시작하였지만, 11일째는 55%정도로 조금 낮게 나타났다. 한편 $A_{550}=0.8$ 의 농도에서는 3일째부터 병이 발생하기 시작하였으며 11일째의 발병도도 94%의 높은 발병도를 보였다 (Table 6).

따라서, 앞서의 접종된 최적 처리량과 농도 선발 결과와 함께 접종 농도 $A_{550}=0.4$ 또는 0.6의 농도에서 40 ml 처리시 50%의 발병을 나타내는 ED_{50} 값에 가까워 이를 최적 접종농도 및 처리량으로 선발하였다(Table 6, Fig. 5).

Table 6. Pathogenicity of *S. sclerotiorum* YR-1 with the suitable density of inoculum on crisphead lettuce at pots experiments

Treatment density (A_{550})	Disease severity index (%) ^a							
	1day	2 days	3 days	4 days	5 days	7 days	9 days	11 days
0.2	0.0	0.0	0.0	4.6	18.7	27.5	37.8	46.2
0.4	0.0	0.0	2.8	10.2	29.3	40.9	52.8	53.4
0.6	0.0	0.0	5.3	13.9	30.8	44.3	55.1	56.3
0.8	0.0	0.0	13.4	30.7	60.8	87.2	90.0	94.4
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of diseased leaf area on each plant by *S. sclerotiorum* YR-1



Fig. 5. Pathogenicity of *S. sclerotiorum* YR-1 with the different concentration of fungal inoculum on crisphead lettuce at pots experiments. A, $A_{550}=0.2$; B, $A_{550}=0.4$; C, $A_{550}=0.6$; D, $A_{550}=0.8$.

다. 길항미생물의 분리

건전 결구상추의 밑동부위, 뿌리 및 근권 토양으로부터 분리한 세균 총 702 균주의 결구상추 균핵병원균 *S. sclerotiorum* YR-1에 대한 균사생육저지효과를 PDA평판배지에서 조사한 결과, 10 균주가 높은 저지대를 보여 1차 길항세균으로 선발되었다(Table 7, Fig. 6).

Table 7. Inhibitory effect of 10 antagonistic bacteria selected among 702 bacteria from healthy crisphead lettuce against mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on PDA medium

Isolates	Inhibition zone (mm) ^a
A-2	9.6
A-7	9.8
RH-1	7.1
RH-2	7.2
RH-3	7.4
RH-4	9.6
R-13	7.2
R-26	8.5
R-39	8.2
S-8	7.2

^a Growth inhibition was determined after 7-day-incubation at 25°C.

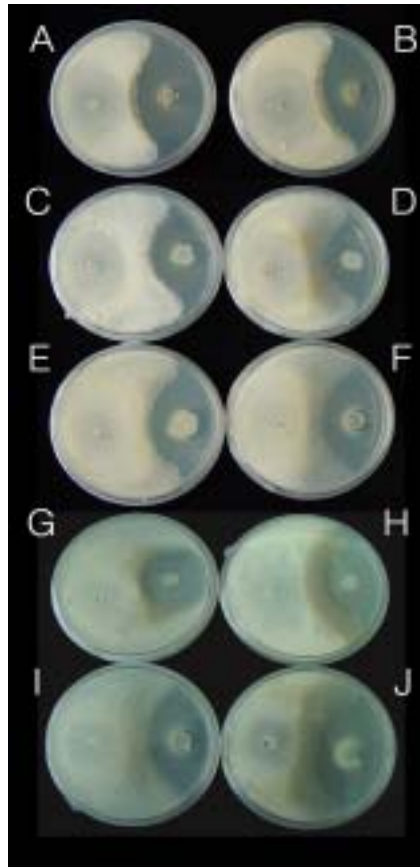


Fig. 6. Fungal growth Inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 by 10 bacterial isolates on PDA medium. A, A-2; B, A-7; C, RH-1; D, RH-2; E, RH-3; F, RH-4; G, S-8 ; H, R-13; I, R-26; J, R-39

일차 선발 길항세균 10 균주를 파종한지 4주된 결구상추에 처리하여 균핵병원균에 대한 방제효과를 생육실 포트 검정하였다. 그 결과, 10 균주 중 A-2, A-7, RH-4 균주의 방제가가 각각 80%, 85%, 80%로 가장 높았으며 서로 유의적인 차이는 없었다(Table 8, Fig. 7). 따라서, 균핵병에 대한 우수 길항균으로 A-2, A-7, RH-4 3균주를 생육실 포트 검정을 통해 2차 선발하였다.

Table 8. Suppressive effects of 10 antagonistic bacteria on disease severity of sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber.

Treatment ^a	6 days after	
	Disease severity	Disease control
	index (%)	value (%)
A-2 + Pa	20.0	80.0 ab ^b
A-7 + Pa	15.0	85.0 ab
RH-1 + Pa	50.0	50.0 de
RH-2 + Pa	40.0	60.0 cde
RH-3 + Pa	30.0	70.0 bc
RH-4 + Pa	20.0	80.0 ab
R-13 + Pa	55.0	45.0 e
R-26 + Pa	30.0	70.0 bc
R-39 + Pa	40.0	60.0 cde
S-8 + Pa	30.0	70.0 bcd
Pa alone	100.0	0.0 f

^a Crisphead lettuce plants were treated with both antagonistic bacteria and *S. sclerotiorum* YR-1(Pa). Plants inoculated with *S. sclerotiorum* YR-1(Pa alone) served as a check.

^b Means with the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple test (p=0.05).



Fig 7. Disease control effect of 12 antagonistic bacteria to *Sclerotinia* rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber.

A, A-2; B, A-7; C, R-13; D, R-26; E, R-39; F, RH-1; G, RH-2; H, RH-3; I, RH-4; J, BW13; K, CAA2; L, S-8; M, Pathogen only; N, Control

한편, 지속적인 균주 분리를 통해 1차년도에 분리된 총 702개 균주 외에도 2차년도에 추가된 균주의 방제효과를 조사하였는데 그 결과, Pro-EB-15 균주는 89.2%의 방제가로 앞서 1차 선발된 균주들보다 방제가가 높았으며, 다음으로는 Pro-EB-17 균주가 83.5%로 높

았다. 그 다음으로는 Pro-EC-3 균주가 72.4%의 방제가를 보여 결국 Pro-EB-15균주, Pro-EB-17 균주 및 Pro-EC-3 균주를 우수길항균으로 3차 선발하였다(Table 9, Fig 8).

Table 9. Disease control effect of 7 antagonistic bacteria against *Sclerotinia* rot by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber

Treatment	Disease control value (%)
	9 days after
BJ 2-2 + Pa	59.4 ^a d
BJ-4 + Pa	55.1de ^b
Pro-EC-3 + Pa	72.4c
Pro-EC-8 + Pa	49.4de
Pro-EC-10 + Pa	46.1e
Pro-EB-15 + Pa	89.2ab
Pro-EB-17 + Pa	83.5b
Pathogen (Pa) only	0.0f
Control	100.0a

^a Disease control value (%) = (disease severity index in control plants–disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^b In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig 8. Disease control effect of 7 antagonistic bacteria against *Sclerotinia* rot by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber.

A, BJ 2-2; B, BJ-4; C, Pro-EB-15; D, Pro-EB-17; E, Pro-EC-3; F, Pro-EC 8; G, Pro-EC 10; H, Pathogen; I, Control

이상 2차 선발된 3균주(A-2, A-7, RH-4)와 3차 선발된 3균주(Pro-EC-3, Prp-EB-15, Pro-EB-17)를 최종적으로 생육실에서 방제효과를 비교 검정한 결과, A-7 균주가 방제가 91.0%로 가장 높았으며, Pro-EB-15 균주가 90.1%로 다음으로 높았다. 그러나, A-7과 Pro-EB-15 균주의 방제에는 서로 유의적인 차이가 없어 방제가 다소 높은 A-7 균주를 균핵병 방제용 우수길항균으로 최종 선발하였다(Table 10, Fig. 9).

Table 10. Disease control effect of 6 antagonistic bacteria against *Sclerotinia* rot by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber

Treatment	7 days after inoculumn	
	disease severity index (%) ^a	Disease disease control value (%) ^b
A-2 + Pa	11.2	88.4 b ^c
A-7 + Pa	8.7	91.0 ab
RH-4 + Pa	12.3	87.2 b
Pro-EC-3 + Pa	17.4	81.9 b
Pro-EB-15 + Pa	9.6	90.1 ab
Pro-EB-17 + Pa	11.9	88.1 b
Pathogen (Pa) only	95.9	0.0 c
Control	0.0	100.0 a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area on each plant by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1

^b Disease control value (%) = (disease severity index in control plants–disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^c In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig 9. Disease control effect of A-2, A-7, RH-4, Pro-EC 3, Pro-EB 15, Pro-EB 17 to Sclerotinia rot by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on cristhead lettuce at pots in a growth chamber. A, A-2; B, A-7; C, RH-4; D, Pro-EC 3; E, Pro-EB-15; F, Pro-EB-17; G, Pathogne ; H, Control

라. 길항미생물의 혼합처리에 의한 방제효과 증진 검정

앞서의 균핵병 방제효과 검정에서 2차 선발한 길항균들의 단독 혹은 혼합처리로 방제효과를 증진코자하였는데, 혼합처리구인 A-7+RH-4는 90%의 방제가로 가장 우수하였으며, 다음으로는 단독처리구인 A-7, RH-4와 혼합처리구인 A-2+A-7의 방제가가 80%로 높았다. 그러나 이들간의 유의적인 차이는 없었다. 한편, 3개의 균주를 모두 혼합한 처리구인 A-2+A-7+RH-4는 방제가가 60%로 가장 낮았다(Table 11, Fig. 10).

Table 11. Disease control effect of single treatment or/and mixed treatment of A-2, A-7 and RH-4 against Sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber

Treatment	Control value (%) ^a
A-2 + Pa	75.0 ab ^b
A-7 + Pa	80.0 ab
RH-4 + Pa	80.0 ab
(A-2+A-7) + Pa	80.0 ab
(A-7+RH-4) + Pa	90.0 a
(A-2+RH-4) + Pa	75.0 ab
(A-2+A-7+RH-4) + Pa	60.0 b
Pathogen (Pa) only	0.0 c
Control	100.0 a

^a Disease control value (%) = (disease severity index in control plants–disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^b In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig 10. Disease control effect of single treatment or/and mixed treatment of A-2, A-7 and RH-4 against *Sclerotinia* rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber.

A, A-2; B, A-7; C, RH-4; D, A-2+A-7; E, A-7+RH-4; F, A-2+RH-4; G, A-2+A-7+RH-4; H, Pathogen only; I, Control.

마. 우수 길항 세균의 동정

1) 배양, 생리, 생화학적 및 형태적 특성 조사

균핵병 방제를 위해 최종 선발된 길항세균 A-7 균주의 동정을 위하여 생리학적, 생화학적 특성 및 투사형 전자현미경을 이용한 형태학적 특성을 조사하였다. 그 결과, A-7 균주는 주모성 편모를 가지는 간상형 형태를 지녔으며(Fig. 11), API kit를 이용한 생화학적 특성분석 결과, *Bacillus subtilis*와 73.2%의 유사도를 나타내었다. 그러나 생리학적 특성에 서는 10% NaCl농도에서 생육이 가능하였고 D-glucose와 L-arabinose는 탄소원으로 잘 이

용하였으나 D-xylose와 D-mannitol에서는 유기산을 생성하지 못했다. 이러한 특성들을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 *Bacillus* 동정기준에 의해 동정된 결과 *Bacillus subtilis* 보다는 *B. amyloliquefaciens*와 높은 유사도를 보였다(Table 12).



Fig. 11. Transmission electron micrograph of antagonistic bacterium, A-7 strain isolated from roots and rhizosphere of crisphead lettuce against *S. sclerotiorum* YR-1 (A, 125,000, B, 40,000× Magnification).

Table 12. Cultural and biochemical characteristics of antagonistic bacterium, A-7 strain, against *S. sclerotiorum* YR-1 compared with *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*.

Characteristics	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	A-7
Gram stain	+ ^a	+	+
Endospore	+	+	+
Cell diameter>1.0 μm	—	+	+
Motility	+	+	+
Voges-Proskauer test	+	+	+
Catalase test	+	+	+
Acid from D-glucose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
D-Xylose	+	—	—
D-Mannitol	+	d	—
Gas from glucose	+	—	—
Hydrolysis of Casein	+	+	+
Gelatin	+	+	+
Starch	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	+
Nitrate reduced of nitrite	+	+	+
Growth at pH 6.8 NB	+	+	+
5.7	+	+	+
Growth at NaCl 2%	+	+	+
5%	+	+	+
7%	+	+	+
10%	ND	+	+
Growth at 5°C	—	—	—
10°C	d	+	+
30°C	+	+	+
40°C	+	+	+
50°C	d	—	—

^a Symbol: +, 90% or more positive; —, 10% or less positive; d, 11-89% positive; ND, no data available

2) 16S rDNA와 gyrase A 유전자의 염기서열 분석

A-7 균주의 16s rDNA PCR 증폭에 의해 약 1.5 kb의 유전자를 확보하였으며, 이 PCR fragment의 염기서열을 분석하여 GeneBank의 database에서 검색한 결과 Bacillus

amyloliquefaciens와 99.7%, *B. amyloliquefaciens*와는 99.4%의 유사성을 보였다(Fig. 12). 그러나, 생화학적 특성 및 16S rDNA 염기서열 분석실험만으로는 A-7 균주의 동정에 있어서 확실한 결론을 내릴 수가 없었다. 특히 *Bacillus*종의 경우 종래의 생화학적 특성에 따른 분류방법으로 정확하게 구분하기가 어려운 것으로 알려져 있어 세균 분류에 가장 많이 사용되는 16S rDNA 분석법의 경우 근접한 종에서의 염기서열의 유사도(99.2~99.6% 염기서열 유사도)가 거의 비슷한 실정이다. 따라서, 길항세균 A-7 균주의 정확한 동정을 위하여 gyrase A 유전자의 염기서열을 분석하였다. A-7 균주의 gyrase A 유전자를 PCR 증폭한 후 PCR fragment를 partial sequence한 결과를 GeneBank에서 BLAST를 이용하여 검색한 결과, *B. amyloliquefaciens*와 96%의 유사도를 보였다(Fig. 13). 결론적으로 A-7 균주의 동정을 위한 세 가지 실험결과에 의해 최종적으로 *B. amyloliquefaciens*로 동정되었으며, 본 균주를 *B. amyloliquefaciens* A-7으로 명명하였다.

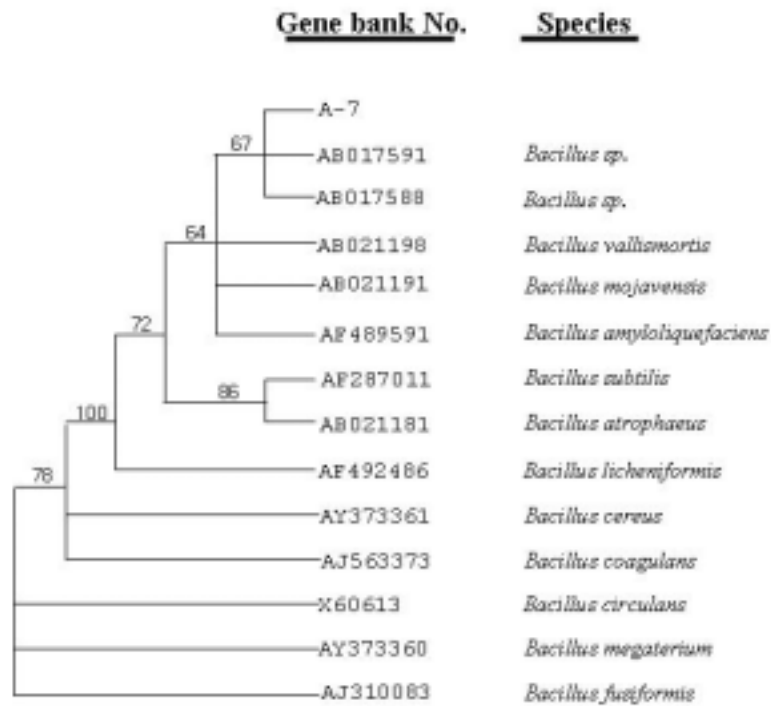


Fig. 12. Phylogenetic tree for various strains of *Bacillus* species on the basis of 16S rDNA sequence similarity. Maximum parsimony phylogenetic tree generated by using PAUP program. Numbers indicate parsimony bootstrap scores for the branch.

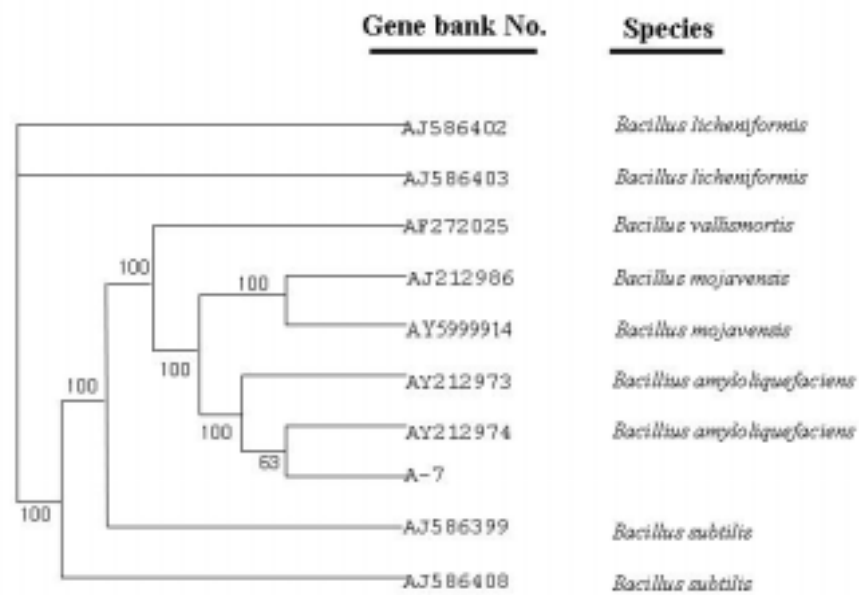


Fig. 13. Phylogenetic tree for various strains of *Bacillus* species on the basis of *gyrA* sequence similarity. Maximum parsimony phylogenetic tree generated by using PAUP program. Numbers indicate parsimony bootstrap scores for the branch.

제 3 절 길항세균의 대량배양기술확립

1. 연구수행 방법

가. *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 최적배양조건확립

1) 삼각플라스크배양

가) 배양시간

균핵병 방제용 우수 길항세균으로 최종 선발된 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 최적 배양 시간을 조사하였다. NB배지에서 24시간 종균배양한 A-7 균주의 세균부유액 50 ml을 1,000 ml용 삼각플라스크의 500 ml NB배지에 접종하고 30℃에서 150 rpm으로 48시간 진탕배양하면서 2시간 간격으로 생육정도를 조사하였다. 각 시료를 10배 희석하여 분광광도계(spectrophotometer, Pharmacia, Biotech, UK)에서 각 처리구 당 5반복으로 3회 실시하여 OD값을 측정하였다.

나) 생육 온도 및 pH

앞서의 생육조사에서와 동일한 방법으로 수행하였으며, 온도 범위는 5℃ 간격으로 20~50℃사이에서 조사하고, pH는 pH 4~8사이에서 pH 1 간격으로 조사되었다. 24시간 배양한 각 시료는 10배 희석하여 분광광도계(spectrophotometer)에서 각 처리구 당 5반복, 3회 실시하여 OD값을 측정하였다.

다) 탄소원

질소원인 yeast extract 0.5%가 포함된 Bacillus 배양용 기초배지(K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, MnCl₂·4H₂O, 0.0005%, CaCl₂·2H₂O 0.0005%, FeSO₄ 0.0025%) 100 ml을 300 ml용 삼각플라스크에 넣고 저분자 탄소원(glucose 등 12종류)과 고분자탄소원(제빵계량제 등 6종류) 3%를 종류별로 첨가한뒤 A-7 균주를 접종하고 3일간 진탕배양(30℃, 150 rpm)하면서 24시간마다 균주의 증식조사를 OD 값을 측정하였다. 한편, OD 값이 높은 것으로 확인된 고분자 탄소원 제빵계량제, 미강 외에 현미유와 당밀을 추가로 선발하여

A-7 균주의 OD 값을 조사하였다.

탄소원 3.0%와 질소원(yeast extract) 0.5%를 넣은 기초배지에 길항세균 A-7 균주를 접종한 후 5일간 진탕배양하고 배양액의 상등액을 회전농축기로 농축하여 100배 희석한 시료를 PDA배지에서 병원균 YR-1 균주와 대치배양하여 항생물질에 의한 병원균의 균사생육 저해효과에 미치는 탄소원의 영향을 조사하여 우수 탄소원을 선발하였다.

한편, 단독 또는 혼합 탄소원(3.0%)을 질소원(0.5%)이 첨가된 기초배지에서 72시간 배양한 배양액의 상등액을 농축하여 100배 희석하고 균핵병원균 YR-1균주와 대치배양하여 항생물질에 의한 YR-1 균주의 생육저해효과를 조사하고 적정 탄소원을 선발하였다.

선발 탄소원인 현미유 외에 fructose, 제빵개량제를 각각 단독 (3.0%) 또는 혼합 처리한 것(1.5%)을 질소원 0.5%가 첨가된 기초배지에 넣고 여기에 A-7 균주를 접종한 후 72시간 진탕 배양하여 24시간마다 OD 값을 측정하여 탄소원 혼합처리에 의한 생육 증진효과를 조사하였다.

라) 대량배양용 배지 선발

이상의 실험 결과로 A-7 균주의 증식과 병원균의 균사생육 저해에 효과적인 것으로 확인된 탄소원인 현미유를 기초배지에 3% 첨가하고 질소원인 yeast extract 또는 NH_4NO_3 를 첨가하였다. 여기에 A-7균주를 접종하고 3일간 진탕배양 (30℃, 200 rpm, 1.5 atm, pH 7)하면서 24시간별로 배양액의 OD 값을 측정하였다.

2) 발효기 배양

가) 현미유배지를 이용한 발효

플라스크 배양에서 선발된 대량배양용배지인 현미유배지 4 L를 7 L용 발효기에 넣고, 종균배양한 A-7 균주 400 ml을 접종하여 발효기 배양(30℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 7)하였다. 120 시간까지 배양하고 24시간 별로 OD 값과 희석평판법으로 세균밀도를 측정하여 생균수를 조사하였다.

현미유배지 4 L를 7 L용 발효기에 넣고 A-7 균주 400 ml 을 접종하여 72시간 배양(30℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 7)하고 배양액의 상등액을 농축하고 시료를 100배 희석하여 균핵병원균 YR-1균주와 대치배양하여 군사생육저해효과를 검정하였다.

2. 연구결과

가. *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 최적배양 조건 확립

1) 삼각플라스크배양

가) 배양시간

균핵병 방제용 우수 길항세균으로 최종 선발된 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 증식곡선을 NB배지에서 조사한 결과, A-7균주는 배양 14시간째에 최대값인 $A_{550}=1.0$ 에 도달하였으며, 14시간 이후에는 점차 감소하며 24시간 이후에 급격히 감소하였다(Fig. 14).

나) 온도

A-7 균주의 최적 증식 온도를 조사한 결과, 25℃에서 $A_{550}=1.0$ 으로 가장 높았고, 다음으로 30℃, 35℃, 20℃ 이었으며, 40℃이상의 고온에서는 증식이 매우 저조하였다(Fig. 15). 따라서 증식 최적온도는 25℃로 확인되었다.

다) pH

A-7균주의 pH에 따른 생육정도를 조사한 결과, pH 6과 7에서 증식이 가장 높았으며, 다음은 pH 5와 8 이었다(Fig. 16). 따라서 생육 최적 pH는 6과 7로 확인되었다.

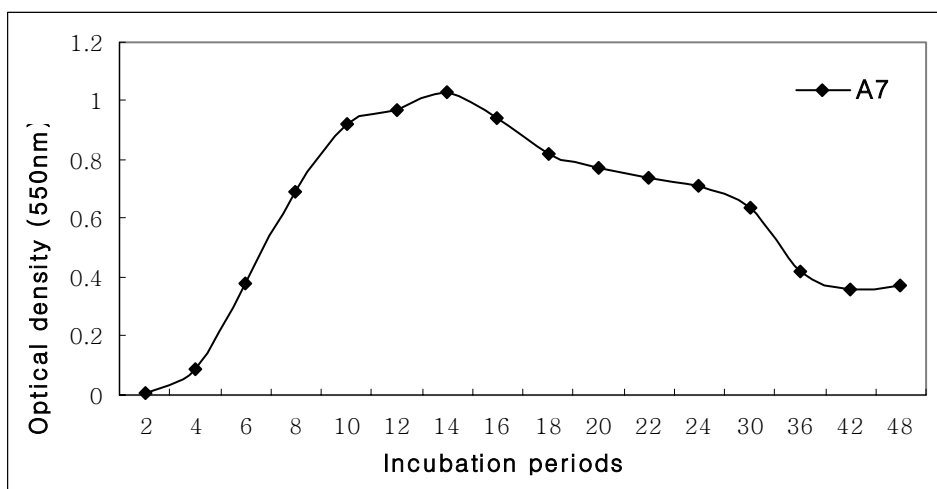


Fig. 14. Growth curve of *B. amyloliquefaciens* A-7 strain in NB medium at 30°C for 48 hours.

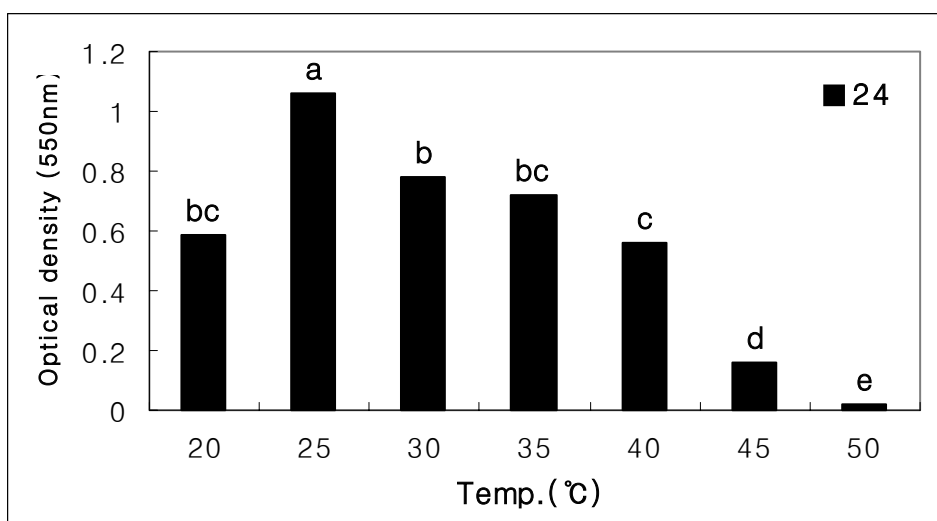


Fig. 15. Effect of temperature (°C) for cell growth of *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 strain in NB medium for 24 hours.

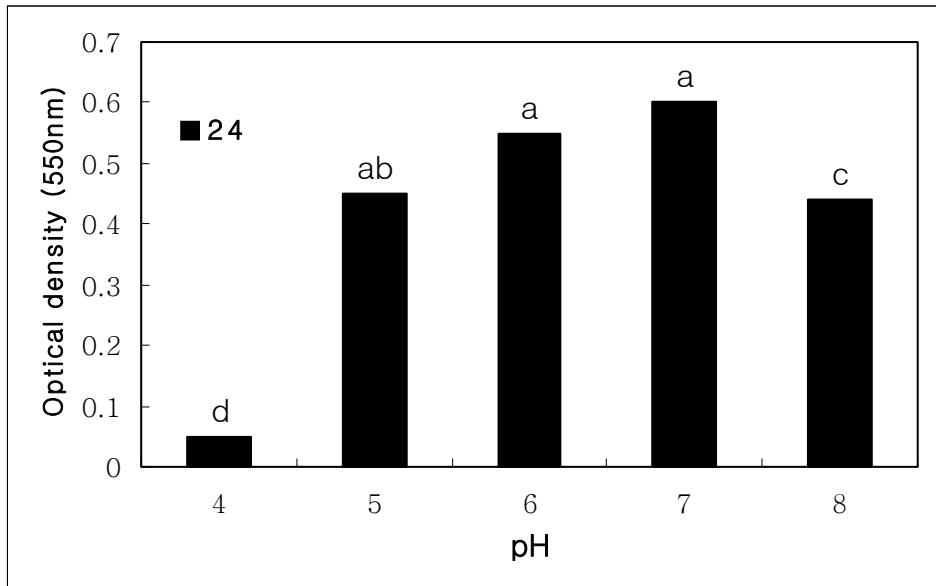


Fig. 16. Effect of pH for cell growth of *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 strain in NB medium for 24 hours.

라) 탄소원

질소원인 yeast extract 0.5%가 포함된 *Bacillus* 배양용 기초배지에 저분자 탄소원 3%를 종류별로 첨가한 뒤 A-7 균을 접종하고 3일간 진탕배양하면서 배양액의 OD값을 측정한 결과, Fructose, Glucose가 각각 1.93, 1.91로 가장 높았다(Table 13).

Table 13. Effects of low molecular weight carbon sources on cell growth of *B. amyloliquefaciens* A-7 at 30°C and 160 rpm in flask culture

Low molecular weight carbon sources	Optical density (at 550 nm)		
	24 h	48 h	72 h
Glucose	0.38	0.69	1.91 b ^a
Sucrose	0.30	0.31	0.32 k
Lactose	0.25	0.28	0.25 L
Mannitol	1.02	0.85	1.18 f
Xylose	0.15	0.45	0.69 i
Glycerol	0.56	0.47	0.58 j
Fructose	1.57	1.14	1.93 a
Dextrin	0.77	1.41	1.27 e
Arabinose	0.38	0.56	0.83 h
Souble starch	0.36	0.90	1.45 c
Inositol	0.44	2.71	0.85 g
Cellobiose	1.62	1.23	1.31 d

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

또한, 질소원 yeast extract 0.5%가 포함된 기초배지에 고분자 탄소원 3.0%를 종류별로 첨가하여 A-7 균주를 접종하고 진탕 배양하여 균주의 증식을 조사한 결과, OD값은 고분자 탄소원이 저분자 탄소원보다 현저히 높았으며 그 중에서도 제빵개량제 72시간 배양에서 $A_{550}=2.89$ 로 가장 높았으며 다음은 미강, 옥수수 순으로 각각 $A_{550}=2.65$, $A_{550}=2.34$ 이었다(Table 14).

한편, OD 값이 높았던 고분자 탄소원 제빵개량제, 미강 이외에 고분자 탄소원인 현미유(Rice oil)와 당밀을 추가로 선발하여 A-7 균주의 증식을 조사한 결과, 현미유가 $A_{550}=2.89$ 로서 가장 높았으며 다음은 제빵개량제가 $A_{550}=2.53$ 이었다(Table 15). 결과적으로 추가 선발한 현미유에서의 생육정도가 제빵개량제보다 높아 최종적으로 효과적인 탄소원으로 현미유를 선발하였다.

Table 14. Effects of high molecular weight carbon sources on cell growth of *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 at 30°C and 160 rpm in flask culture

High molecular weight carbon sources	Optical density (at 550 nm)		
	24 h	48 h	72 h
Dough conditioner	1.85	2.43	2.89 a ^a
Rice starch	0.89	1.94	2.34 c
Sweet potato starch	1.18	1.33	1.69 e
Black sugar	1.48	1.39	1.75 d
Yellow sugar	1.64	1.6	1.40 f
Rice bran	1.76	2.13	2.65 b

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 15. Effects of high molecular weight carbon sources on cell growth of *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 at 30°C and 160 rpm in flask culture

High molecular weight carbon sources	Optical density (at 550 nm)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Dough conditioner	0.69	1.72	2.66	2.53 b ^a
Rice bran	0.36	0.89	0.95	1.18 c
Rice oil	0.06	2.03	2.82	2.89 a
Molasses	0.13	0.51	0.68	0.85 d

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

탄소원 3.0%와 질소원(yeast extract) 0.5%를 넣은 기초배지에 길항세균 A-7 균주를 접종한 후 5일간 진탕배양하고 배양액의 상등액을 PDA배지 상에서 병원균 YR-1 균주와 대치배양하여 병원균의 균사생육 저해효과를 조사한 결과, fructose, mannitol, inositol, glycerol에서 저지대가 각각 12.0 mm, 12.5 mm, 11.8 mm, 11.5mm로 길항력이 높게 나타났으나, 고분자에서는 균사생육저해 효과가 다소 낮았다(Table 16).

다음은, 저해효과가 높았던 Fructose 외 제빵개량제와 현미유를 추가 공시하여

단독 및 혼합에 의한 병원균의 균사생육저해 효과를 조사한 결과(Table 17), 탄소원 혼합효과는 나타나지 않았으며, 현미유의 저지대는 9 mm로서 Fructose 10 mm, 제빵개량제 7 mm와 유사하였다.

Table 16. Inhibitory effects of addition of carbon sources for antifungal activity on mycelial growth of *S. sclerotiorum* YR-1 on PDA medium

Carbon sources	Inhibition Zone (mm)	Carbon sources	Inhibition Zone (mm)
Glucose	7.3 d	Soube starch	7.0 d ^a
Inositol	11.8 ab	Dough conditioner	7.0 d
Lactose	8.0 cd	Sweet potato	7.0 d
Mannitol	12.5 a	Black sugar	9.8 bc
Xylose	7.3 d	Sucrose	0.0f
Glycerol	11.5 ab	Cellobiose	0.0f
Fructose	12.5 a	Rice bran	0.0f
Dextrin	4.3 e	rice	0.0f
Arabinose	2.8 e	Yellow sugar	0.0f

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 17. Inhibitory effects of addition of carbon sources for antifungal activity on mycelial growth of *S. sclerotiorum* YR-1 on PDA medium

Carbon sources	Inhibition Zone (mm)
Fructose	10 a ^a
Dough conditioner	7 ab
Rice oil	9 a
Fructose + Dough conditioner	8 a
Fructose + Rice oil	8 a
Dough conditioner + Rice oil	4 b

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

선발 탄소원인 현미유 외에 fructose, 제빵개량제를 각각 단독 (3.0%) 또는 혼합 처리한 것(1.5%)을 질소원 0.5%가 첨가된 기초배지에 넣고 여기에 A-7 균주를 접종한 후 진탕 배양하여 균주의 세균 밀도를 측정된 결과, 기초배지에 현미유나 제빵개량제에 단독으로 첨가하는 것이 Fructose와 혼합처리하는 것보다 OD가 현저히 높았는데, 현미유 단독 첨가한 72시간 배양한 것이 $A_{550}=3.37$ 로서 가장 높았으며, 다음은 제빵개량제 단독 첨가가 $A_{550}=2.76$ 이었다(Table 18). 따라서, 탄소원의 혼합처리에 의한 증진효과가 나타나지 않았다.

Table 18. Effects of low molecular weight carbon sources and high molecular weight carbon sources on cell growth of *B. amyloliquefaciens* A-7 at 30°C and 160 rpm in flask culture

Carbon sources	Optical density (550 nm)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Fructose	0.03	0.57	0.57	0.62 f ^a
Dough conditioner	0.69	2.02	2.84	2.76 b
Rice oil	0.06	2.81	3.25	3.37 a
Fructose + Dough conditioner	0.53	0.94	1.02	1.54 e
Fructose + Rice oil	0.01	0.64	1.07	1.75 d
Dough conditioner + Rice oil	0.60	0.97	2.01	2.1 8c

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

마) 대량배양용 배지 선발

A-7균주의 증식과 병원균의 군사 생육저해에 효과적인 것으로 확인된 탄소원 현미유에 질소원인 yeast extract 또는 NH_4NO_3 를 첨가한 후 A-7균주의 밀도를 조사하였다. 질소원을 0.5% 첨가한 경우가 질소원 무처리구에 비하여 OD 값이 높았으며, 질소원으로써 Yeast extract를 첨가시 OD 3.35로 가장 높았다(Table 19).

따라서, 기초배지(K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%, FeSO_4 0.0025%)에 현미유 3.0%, Yeast extract 0.5%를 첨가한 현미유 배지를 *B. amyloliquefaciens* A-7균주의 플라스크배양에서 대량배양용 배지로 최종 선발하였다.

Table 19. Effects of nitrogen sources on cell growth of *B. amyloliquefaciens* A-7 at 30°C and 160 rpm in flask culture

Nitrogen sources	Optical density (550 nm)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Rice oil	0.06	2.58	2.94	3.17 c
Rice oil + Yeast extract	0.08	2.74	3.14	3.35 a
Rice oil + NH ₄ NO ₃	0.08	2.63	3.03	3.25 b ^a

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

2) 발효기 배양

가) 현미유배지를 이용한 발효

플라스크 배양에서 선발된 대량배양용 배지인 현미유 배지를 발효기에 넣고, A-7 균주를 접종하고 배양(30°C, 350 rpm, 1.5 atm, pH 7)하여 OD 값과 희석평판법으로 세균밀도를 측정된 결과, 72시간과 96시간 배양에서 각각 $A_{550}=9.12$, $A_{550}=7.13$ 으로 증식이 가장 높았으나(Table 20), 생균수는 72시간, 96시간에서 각각 56×10^{17} , 73×10^{17} cfu/ml으로 가장 높게 나타났다. 그래서 발효기에서 길항세균을 배양하는 기간은 세균밀도가 가장 높은 72시간으로 정하였다(Table 20).

현미유배지에 A-7 균주를 72시간 배양하고 배양액의 상등액을 균핵병원균 YR-1균주와 대치배양하여 길항력을 검정하였다. 그 결과, 저지대 직경은 15 mm이었다(Table 21).

이상의 플라스크배양과 발효기배양의 결과, *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 대량배양용배지로 증식과 항균물질에 의한 병원균의 군사생육저해효과가 높은 것으로 확인된 현미유배지를 최종 선발하였다.

Table 20. Cell growth of *B. amyloliquefaciens* A-7 in the rice oil media using 7 L jar fermenter at 30°C and 350 rpm and 1.5 atm

Culture time	Optical density (550 nm)	Cell density (cfu/ml) ^a ×10 ¹⁷
0 h	0.09	0.0
24 h	4.10	0.01
48 h	5.62	0.72
72 h	9.12	56.0
96 h	7.31	73.0
120 h	5.71	19.0

^a Cell density was measured by colony count on a nutrient agar plate after serial dilution with saline..

Table 21. Antifungal activity of the fermentation culture on mycelial growth of *S. sclerotiorum* YR-1 on PDA medium

Culture medium	Inhibition zone (mm)
Rice oil medium	15

제 4 절 균핵병방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립

1. 연구수행 방법

가) 균핵병 방제용 엽면살포제의 제형화

1) 1, 2차 제제 (수화제, A7A~A7L 제제)

7 L 발효기에 대량배양용배지인 현미유배지 4 L를 넣고, 병원균 YR-1균주의 길항세균인 공시균주 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주 40 ml를 접종하여 30℃, 350 rpm, pH 7, 1.5 atm에서 3일간 배양하였다. 이 배양액에 옥수수 전분, 타피오카 전분, 메주가루, 변성전분 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여, 건조기(55℃)에서 2~3일간 건조 후 분쇄기로 갈아 수화제형 제제를 제조하였다.

2) 3, 4차 제형화 (수화제, A7M~A7U 제제)

앞서의 제형화와 동일한 방법으로 배양한 A-7 균주의 배양액에 옥수수 전분, 타피오카 전분, 변성전분 등의 전달매체를 다양한 농도로 첨가하고 혼합하여, 건조기(55℃)에서 2~3일간 건조한 후, 분쇄기로 갈아 수화제형 제제를 제조하였다.

3) 5차 제형화 (수화제 A7-1, A7-3, A7-4, A7-5, A7-7, A7-8, A7V 제제, 액상수화제 A7-2, A7-6 제제)

앞서의 4차 제형화와 동일한 방법으로 배양한 A-7균주의 배양액에 찰옥수수전분, 썬 크림, 썬 테더, 썬 프리젤, 썬 사이즈, 썬 캡, 썬 슈퍼젤, 썬 배터, 제오실, 변성전분 등의 전달매체를 다양한 농도로 첨가하고 혼합하여, 건조기(55℃)에서 2~3일간 건조한 후, 분쇄기로 갈아 수화제 및 액상수화제 제제를 제조하였다.

4) 6차 제형화(수화제, A7W 제제)

5차 제형화에서 제오실을 이용하여 만든 A7-V제제의 방제효과는 높았으나, 약흔이 많이 나타났다. 이런 문제점을 보완하기 위하여 제오실의 첨가농도를 10%로 낮추어서 변성전분 8.3%와 혼합하여 수화제형 제제를 제조하였다.

2. 연구결과

가. 길항세균 A-7 균주를 이용한 엽면살포제의 제형화

1) 전달매체 선발

제형화를 위한 전달매체로서 옥수수 전분, 타피오카 전분, 메주가루, 변성전분을 사용하여 수화제형으로 제조하였다. 이들은 물에 대한 용해성은 높으나 결구상추 잎에 살포된 후 약흔을 남겨 미관상 좋지 않았으며 살포기의 입구를 막는 등 여러 가지의 단점이 있었다. 이를 보완하기 위해 액상수화제형을 제조하고자 투명하면서 약흔을 남기지 않고 끈적임의 특성이 높은 찹옥수수전분, 썬 크리미, 썬 테더, 썬 프리젤, 썬 사이즈, 썬 캡, 썬 슈퍼젤, 썬 배터, 제오실, 변성전분, 제오실 등을 농도별로 달리 선발하여 액상수화제로 제형화를 시도하였다. 그러나 이들 중 액상수화제는 썬 크리미와 썬 캡을 첨가하였을 경우에 가능하였으며 나머지의 경우는 수화제형으로 제조되었다. 본 연구에서 시도된 제형화 기술은 미생물 농약 개발에 처음으로 시도되었으며, 이들은 모두 변성전분의 일종으로서 가격면에서도 저렴하여 산업경쟁력이 있으며, 자외선 차단 및 부착정도가 높아 이를 전달매체로 선발하였다.

2) 제형화

가) 1차 제제

7L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주를 접종하여 72시간 배양(30℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 7)하고 이 배양액에 옥수수 전분, 타피오카 전분, 변성전분, 메주가루 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 수화제형 1차 제제 (A7A, A7B, A7C, A7D, A7E, A7F)를 제조하였다(Table 22).

나) 2차 제제

A-7균주 배양액에 옥수수 전분, 타피오카 전분, 올리브유, Fructose 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 수화제형 2차 제제(A7G, A7H, A7I, A7J, A7K, A7L)를 제조하였다(Table 23).

다) 3차 제제

A-7균주의 배양액에 옥수수 전분, 변성전분 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 3차 제제 수화제형 (A7M, A7V, A7O, A7P, A7Q)제제를 제조하였다(Table 24).

라) 4차 제제

A-7균주의 배양액에 타피오카 전분, 변성전분 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 수화제형 4차 제제(A7R, A7S, A7T, A7U)를 제조하였다(Table 25).

마) 5차 제제

A-7균주의 배양액에 찹옥수수 전분, 썬 크림미, 썬 텐더, 썬 프리젤, 썬 사이즈, 썬 캡, 썬 슈퍼젤, 썬 배터, 제오실, 변성전분 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 수화제형 5차 제제(A7-1, A7-3, A7-4, A7-5, A7-7, A7-8, A7V와 액상수화제형 A7-2, A7-6)를 제조하였다(Table 26).

바) 6차 제제

A-7균주의 배양액에 제오실과 변성전분을 첨가하고 혼합하여 수화제형 5차 제제(A7W)를 제조하였다(Table 27).

Table 22. Composition of wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. amyloliquefaciens* A-7

Formulation	Sources of Formulation	
A7A	Corn starch 40%,	Modified starch 10%
A7B	Corn starch 40%	
A7C	Tapioca starch 40%,	Modified starch 10%
A7D	Tapioca starch 40%	
A7E	Corn starch 40%,	Meju flour 5%
A7F	Modified starch 40%,	Meju flour 5%

Table 23. Composition of wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. amyloliquefaciens* A-7

Formulation	Sources of Formulation		
A7G	Corn starch 40%,	Olive oil 5%,	Fructose 2.5%
A7H	Corn starch 40%,	Fructose 2.5%	
A7I	Tapioca starch 40%,	Olive oil 5%,	Fructose 2.5%
A7J	Tapioca starch 40%,	Fructose 2.5%	
A7K	Corn starch 40%,	Rice oil 5%,	Fructose 2.5%
A7L	Tapioca starch 40%,	Rice oil 5%,	Fructose 2.5%

Table 24. Composition of wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. amyloliquefaciens* A-7

Formulation	Sources of Formulation	
A7M	Corn starch 50%	
A7N	Corn starch 30% ,	Modified starch 20%
A7O	Corn starch 20% ,	Modified starch 30%
A7P	Corn starch 10% ,	Modified starch 40%
A7Q	Modified starch 50%	

Table 25. Composition of wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. amyloliquefaciens* A-7

Formulation	Sources of Formulation
A7R	Tapioca starch 50%
A7S	Tapioca starch 30% , Modified starch 20%
A7T	Tapioca starch 20% , Modified starch 30%
A7U	Tapioca starch 10% , Modified starch 40%
A7Q	Modified starch 50%

Table 26. Composition of suspension concentrate wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. amyloliquefaciens* A-7

Formulation	Sources of Formulation
A7-1	Waxy rice 40%, Modified starch 10%
A7-2	Sun creamy 8%
A7-3	Sun tender 40%, Modified starch 10%
A7-4	Sun size 8%
A7-5	Sun fregel 40%, Modified starch 10%
A7-6	Sun cap 40%, Modified starch 10%
A7-7	Sun supersel 8%
A7-8	Sun batter 40%, Modified starch 10%
A7V	Zeocil 34%, Modified starch 8.3%

Table 27. Composition of wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. amyloliquefaciens* A-7

Formulation	Sources of Formulation
A7W	Zeocil 10% , Modified starch 8.3%

제 5 절 미생물농약의 방제효과 검정 및 우수제형 선발

1. 연구수행 방법

가. *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용한 균핵병 방제용 엽면살포제의 방제효과

1) 생육실 포트재배에서의 방제효과

B. amyloliquefaciens A-7 균주를 이용하여 제조한 1차 미생물 제제(A7A~A7F), 2차 미생물 제제(A7G~A7L), 3차 미생물 제제(A7M~A7Q), 4차 미생물 제제(A7R~A7U), 5차 미생물 제제(A7-1~A7-8 및 A7V), 6차 미생물 제제(A7W)의 100배 희석액과 화학농약 베노딜 1000배 희석액을 생육실 포트재배에서 방제효과를 검정하였다. 각 약제의 희석액을 파종하여 8주된 결구상추 잎의 앞, 뒷면에 100 ml씩 골고루 살포하고, 24시간 후에 *S. sclerotiorum* YR-1균주의 접종원인 균사조각 부유액(A₅₅₀=0.6) 40ml을 잎의 앞, 뒷면에 골고루 접종하여 상대습도 90%, 온도 24~25℃의 생육실에 보관하였다. 7일 후에 발병도를 조사하여 방제가로 환산하였다. 균사조각부유액의 조제는 YR-1균주를 PDB배지에서 3일간 진탕배양(25℃, 160 rpm)후 균사를 걸러내어 탈이온수로 5회정도 세척하였다. 이를 분쇄기(Waring, USA)로 15초간 균사를 절단한 후 그 농도를 A₅₅₀=0.6이 되도록 완충용액으로 조정하였다.

2. 연구결과

가. *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용한 균핵병 방제용 엽면살포제의 방제효과

1) 생육실 포트검정에서의 방제효과

가) 1차 제제

B. amyloliquefaciens A-7 균주를 이용한 6종류의 미생물 제제를 1차 제조하여

결구상추 균핵병에 대한 방제효과를 화학 농약 베노밀과 비교 검정한 결과, 수화제형 A7A 제제가 87.7%의 방제가로 가장 높은 방제효과를 보였으나 베노밀의 95.2%보다는 낮았다 (Table 28). 따라서, A7A제제를 1차로 선발하였다.

Table 28. Disease control effects of 6 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 and Benomyl against Sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber

Formulations	Disease severity index (%) ^a	Disease control value (%) ^b
A7A + Pa ^c	12.3	87.7b ^d
A7B + Pa	32.1	67.9d
A7C + Pa	22.7	77.3c
A7D + Pa	44.8	55.2e
A7E + Pa	52.4	47.6f
A7F + Pa	58.3	41.7g
Benomyl	4.8	95.2a
Pathogen (Pa) only	100.0	0.0h
Control	0.0	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease control value (%) = (disease severity index in control plants - disease severity index in treated plants) / (disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

나) 2차 제제

1차 제제 개발 후 6종류의 미생물 제제를 2차로 추가 제조하여 결구상추 균핵병에 대한 방제 효과를 화학농약 베노밀과 비교 검정하였다. 그 결과 수화제형 A7I제제의 방제가

가 60.1%로 가장 높았으나, 그밖의 A7G, A7H, A7L, A7J, A7K 제제는 48.4%, 41.7%, 38.8%, 36.6%, 29.8%로 전반적으로 방제가가 낮았다. 결국, A7I제제는 1차 선발 제제인 A7A제제의 87.8%의 방제가 보다는 낮아 선발되지 못하였다(Table 29).

Table 29. Disease control effects of 6 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 and Benomyl against Sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber

Formulations	Disease severity index (%) ^a	Disease control value (%) ^b
A7G + Pa ^c	51.6	48.4c ^d
A7H + Pa	58.3	41.7cd
A7I + Pa	39.9	60.1b
A7J + Pa	63.4	36.6de
A7K + Pa	70.2	29.8e
A7L + Pa	61.2	38.8de
Benomyl	8.7	91.3a
Pathogen (Pa) only	100.0	0.0f
Control	0.0	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease control value (%)=(disease severity index in control plants-disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

다) 3차 제제

2차 개발된 제제의 방제효과가 다소 낮아 5종류의 미생물 제제를 3차로 추가 제조

하여 결구상추 균핵병에 대한 방제 효과를 베노밀 및 1차 선발 제제인 A7A의 방제 효과와 비교 검토한 결과, 수화제형 A7Q 제제가 78.3%의 방제가로 높았다. 그러나, A7Q 제제는 1차 선발된 A7A제제의 86.5%의 방제가보다 방제효과가 낮아 선발되지 못하였다(Table 30).

Table 30. Disease control effects of 6 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 and Benomyl against Sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber

Formulations	Disease severity(%) ^a	Disease control value (%) ^b
A7M + Pa ^c	40.9	59.1d ^d
A7N + Pa	59.4	40.6e
A7O + Pa	38.5	61.5d
A7P + Pa	67.2	32.8f
A7Q + Pa	19.7	78.3c
A7A + Pa	13.5	86.5b
Benomyl	8.5	92.5b
Pathogen (Pa) nly	100.0	0.0g
Control	0.0	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease control value (%) = (disease severity index in control plants - disease severity index in treated plants) / (disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

라) 4차 제제

4차로 4종류의 미생물 제제를 추가 제조하여 결구상추 균핵병에 대한 방제 효과를

베노밀의 방제 효과와 비교 검정하였다. 그 결과, 모두 방제가 66.7% 이하로 전체적으로 매우 낮았다.. 따라서, 1차 선발된 A7A보다는 모두 방제가 낮아 추가 선발되지 못하였다 (Table 31).

Table 31. Disease control effects of 5 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 and Benomyl against Sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* YR-1 on crithead lettuce at pots in a growth chamber

Formulations	Disease severity index (%) ^a	Disease control value (%) ^b
A7R + Pa ^c	36.5	63.5cd ^d
A7S+ Pa	33.3	66.7c
A7T+ Pa	45.8	54.2ef
A7U+ Pa	41.4	58.6e
Benomyl	9.7	90.3b
Pathogen (Pa) only	100.0	0.0g
Control	0.0	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1

^b Disease control value (%)=(disease severity index in control plants-disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

마) 5차 제제

9종류의 미생물 제제를 5차로 추가 제조하여 결구상추 균핵병에 대한 방제 효과를 베노밀과 비교한 결과, 액상수화제형 A7-2제제의 방제가 90.2%로 가장 우수하였으며,

베노밀의 95.8% 보다는 낮았으나 유의차는 없었다. 다음은 수화제형 A7-4 및 A7V제제로 방제가가 각각 88.4%, 83.1% 이었다(Table 32, Fig 17).

Table 32. Disease control effects of 9 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 and Benomyl against Sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber

Formulations	Disease severity index (%) ^a	Disease control value (%) ^b
A7-1 + Pa ^c	53.7	46.3ef ^d
A7-2 + Pa	9.8	90.2abc
A7-3 + Pa	72.2	27.8g
A7-4 + Pa	11.6	88.4ad
A7-5 + Pa	46.6	53.4e
A7-6 + Pa	25.5	74.5d
A7-7 + Pa	24.8	75.1cd
A7-8 + Pa	68.1	31.9fg
A7V + Pa	16.9	83.1bcd
Benomyl	4.2	95.8ab
Pathogen (Pa) only	100.0	0.0h
Control	0.0	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease control value (%)=(disease severity index in control plants-disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig 17. Disease control effects of 9 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 and against *Sclerotinia* rot caused by *S. sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber.

A, A7-6 formulation; B, A7-7; C, A7-8; D, A7V; E, chemical fungicide, Benomyl; F, Pathogen; G, A7-1; H, A7-2; I, A7-3; J, A7-4; K, A7-5.

또한, 5차 제제의 방제효과 검증에서 방제가가 높았던 A7-2 제제 외 4종류의 제제를 추가로 공시하여 방제효과를 재검정한 결과, A7-2제제의 방제가가 88.2%로 높았으며 다음은 A7-4 제제 및 A7V 제제 순이었으나 서로간에 유의차는 없었다. 그러나, A7V 제제의 경우 처리한 결구상추에 약흔이 발생되어 미생물제제로 이용하기에는 미관상 문제점이 발견되었다(Table 33, Fig 18).

Table 33. Disease control effects of five formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 and Benomyl against Sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in a growth chamber

Formulations	Disease severity index (%) ^a	Disease control value (%) ^b
A7-2 + Pa ^c	11.8	88.2bc ^d
A7V + Pa	17.2	82.8cd
A7-4 + Pa	14.2	85.8cd
A7-6 + Pa	32.6	67.4e
A7-7 + Pa	20.0	80.0d
Benomyl	6.5	93.5ab
Pathogen (Pa) only	100.0	0.0f
Control	0.0	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease control value (%)=(disease severity index in control plants–disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig 18. Disease control effects of 5 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 and against *Sclerotinia* rot caused by *S. sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber. A, A7V formulation; B, Benomyl; C, Pathogen; D, Control; E, A7-2; F, A7-4; G, A7-6; H, A7-7.

마) 6차 제제

수화제형 A7W 제제를 6차로 추가 제조하여 5차 제제 실험에서 방제효과가 우수하였던 2종의 제제 즉, 수화제형 A7-4제제 및 액상수화제형 A7-2 제제와 1차 선발된 수화제형 A7A 제제 등 모두 4종류 제제의 방제효과를 재검정한 결과, 4종류 제제간에 유의차가 없었으나 그 중 A7-2와 A7A의 방제가가 각각 84.9%, 83.8%로 가장 높았다(Table 34).

따라서, 생육실 포트재배의 방제효과 검정 결과, 방제가가 가장 높았던 *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용하여 제조한 액상수화제형 A7-2 제제 및 수화제형 A7A 제제를 균핵병 방제용 엽면살포제의 우수제형으로 최종 선발하였다.

Table 34. Disease control effects of 3 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 against Sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* on crisphead lettuce at soils in a growth chamber

Formulations	Disease severity index (%) ^a	Disease control value (%) ^b
A7A + Pa ^c	9.3	83.8c ^d
A7-2 + Pa	8.6	84.9c
A7-4 + Pa	10.8	81.2cd
A7W + Pa	11.1	80.6cd
Benomyl	6.2	89.2b
Pathogen (Pa) only	57.3	0.0f
Control	0.0	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease control value (%)=(disease severity index in control plants-disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

제 6 절 플라스틱 하우스내 토경재배에서의 방제효과 검정

1. 연구수행 방법

가. 균핵병 방제효과 검정

균핵병 방제용으로 최종 선발된 수화제형 A7A제제와 액상수화제 A7-2제제 외 플라스틱하우스 포트검정에서 방제효과가 높았던 수화제형 A7-4 및 A7W 제제 2 종류를 추가로 공시하여 플라스틱 하우스내 토경에서 재배한 결구상추에서 균핵병에 대한 방제효과를 검정하였다. 플러그포트에 파종하여 4주된 유묘를 하우스내토양에 재식한지 4주(파종후 8주)된 성체식물인 결구상추 잎의 앞, 뒷면에 미생물농약을 100배로 희석하여 100 ml 씩 골고루 처리하였다. 24시간 뒤 균핵병원균 YR-1 균주의 균사조각부유액 접종원($A_{500}=0.6$) 80 ml을 역시 잎의 앞, 뒷면에 골고루 살포 접종하였다. 이때 대조약제로서 화학농약 베노밀(품목명: Benomyl 수화제)를 1000배 희석하여 사용하였으며, 병원균 YR-1 균주의 균사조각부유액은 PDA배지에 이식한 YR-1 균주를 항온기에 4-5일간 배양(암, 25°C)한 뒤, 절취한 균사절편(직경 1 cm)을 PDB배지에 100 ml 당 5개씩 넣고 3-4일간 진탕배양(25°C, 150 rpm)한 다음, 배양된 균사를 걸러내어 탈이온수로 5회 정도 세척하고, 이것을 분쇄기(Warning, USA)로 15초간 균사를 갈아 농도를 $A_{550}=0.6$ 으로 조정하여 사용하였다. 각 처리구는 평균면적 2 m²(1 x 2 m) 당 20주 씩, 3반복, 완전임의배치법으로 실시하였으며, 적어도 2회 이상 평균하였다. 약제 처리 후 20일 후에 발병도를 조사하여 방제가로 환산하였다.

나. 밀둥썩음병과 균핵병의 동시방제효과 시험

최종선발된 균핵병 방제용 엽면살포제인 액상수화제 A7-2제제와 밀둥썩음병 방제용 엽면살포제인 수화제형 BW13-A 제제를 포트재배한 결구상추(파종 후 8주)에 분무 살포하여 밀둥썩음병과 균핵병을 동시 방제하기 위하여 생육실 포트검정을 하였다. 이는 포장에 적용하기 위한 예비실험 단계로서 A7-2제제와 BW13-A 제제의 단독처리 그리고 혼합처리(A7-2+BW13-A제제)를 각각 100배로 희석하여 결구상추에 골고루 100 ml씩 분무살포하였

다. 24시간 후 결구상추에 밀등썩음병원균(*R. solani*, $A_{550}=0.4$) 및 균핵병원균(*S. sclerotiorum*, $A_{550}=0.8$)의 균사조각부유액을 각각 40 ml 씩 단독 또는 혼합 접종하여 상대 습도 90%, 온도 24~25℃의 생육실에 보관하면서 7일 후에 발병도를 조사하여 방제가로 환산하였다.

2. 연구결과

가. 균핵병 방제효과 검정

플라스틱하우스 포트 검정에서 최종선발된 *B. amyloliquifaciens* A-7 균주의 액상수화제형 A7-2제제 및 수화제형 A7A 제제와 방제효과가 높았던 수화제형 A7-4 및 A7W제제 2 종류를 추가로 공시하여 플라스틱하우스내 토경재배한 결구상추에서 균핵병에 대한 방제효과를 검정한 결과, A7-2 제제가 살포 20일 재의 방제가가 80.5%로 가장 우수하였으며, 다음으로는 A7A 제제가 79.1%의 방제가를 보였다. 그러나 이들은 서로간에 유의차는 없었으나 대조구인 베노밀 처리구 75.2%보다는 유의적으로 높았다(Table 35).

따라서, A7-2 제제와 A7A제제는 생육실 포트검정에서와 마찬가지로 플라스틱하우스내 토경재배에서도 균핵병 방제용으로 효과적인 것으로 확인되었다.

Table 35. Disease control effects of 3 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* . A-7 against Sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* on crisphead lettuce at soils in a plastic house

Formulations	20 days after treatment
	disease control value (%) ^b
A7A + Pa ^c	79.1b ^d
A7-2 + Pa	80.5b
A7-4 + Pa	70.2c
A7W + Pa	69.6d
Benomyl	75.2c
Pathogen (Pa) only	0.0f
Control	100.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected leaf area caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease control value (%)=(disease severity index in control plants-disease severity index in treated plants)/(disease severity index in control plants) x 100

^c Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (Pa)

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

나. 밀둥썩음병과 균핵병의 동시방제 효과

최종선발된 밀둥썩음병 방제용 엽면살포제인 수화제형 BW13-A제제와 균핵병 방제용 엽면살포제인 액상수화제형 A7-2제제를 포트 재배한 결구상추에 분무살포하여 밀둥썩음병과 균핵병을 동시방제하기위하여 생육실 포트검정한 결과, A7-2제제의 단독처리가 2종류의 병원균 혼합 접종에 대한 방제가가 81.3%로서 2가지 제제의 혼합처리 70.6%보다 높았으나 유의차는 없었다(Table 36, Fig 19).

그러나, BW13-A 제제의 단독처리는 2종류의 병원균 즉, 밀등썩음병과 균핵병의 혼합 집중에 대해 방제가가 높지 않았다. 따라서, A7-2 제제 만으로도 두가지 병원균에 대한 방제는 가능할 것으로 판단되었다.

Table 36. Disease control effect of *S. maltophilia* BW13 and *B. amyloliquefaciens* A-7 and mixture of two bacteria against pathogens (strains R.S and S.S) on crisphead lettuce at pots in a growth chamber

Formulations	Pathogens	Seven days after inoculation	
		Disease severity index ^d (%)	Disease control value (%)
A7-2	SS+RS	15.0	81.3a ^e
BW13-A	SS+RS	38.3	52.1b
(A7-2 + BW13-A) ^a	SS+RS	23.3	70.6ab
(A7-2 + BW13-A)	SS ^b	23.9	70.5ab
(A7-2 + BW13-A)	RS ^c	21.3	72.0ab
Benomyl	SS	9.6	89.7a
Pencycuron	RS	5.6	92.6a
Pathogen	SS+RS	80.3	0c
Pathogen	SS	90.8	0c
Pathogen	RS	73.1	0c

^a Formulations A7-2 and BW13-A were equally mixed to produce mixed formulation

^b S.S ; *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1

^c R.S ; *Rhizoctonia solani* YR-1

^d Disease control value (%) = (disease severity index in control plants - Disease severity in treated plants) / (disease severity index in control plants) x 100

^e In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig 19. Disease control effect of BW13, A-7 and mixture of two bacteria against pathogens (strain R.S and S.S) on crisphead lettuce at pots in growth chamber A, Control; B, Pathogen (S.S); C, Pathogen(R.S); D, Pathogen(S.S+R.S); E, Benomyl+(S.S); F, Pencycuron +R.S; G, A7-2+(S.S+R.S); H, BW13-A + (S.S+R.S); J, Mixture+(S.S+R.S)

제 7 절 미생물농약의 자연발생 농가실증시험

1. 연구수행 방법

2004년 10월 말경 경상남도 의령군과 2005년 3월 말경 김해시 대동면에서 균핵병이 자연발생하기 시작한 농가의 플라스틱하우스에서 앞서의 균핵병에 대한 토경재배 검정을 통해 최종 선발된 수화제형 A7A제제와 액상수화제형 A7-2제제를 화학농약과 비교하여 방제효과를 검정하였다. 자연발생지로는 2004년도에 경상남도 의령군과 2005년도에 김해시 대동면 소재의 농가의 플라스틱하우스 재배 포장을 임대하여 모든 실험을 수행하였다. 품종은 의령군에서는 샤프라멘트(상품명:세레나)를 8월 25일에 파종하고 파종 30일 후(9월 24일)에 재식한 다음 50~60일 뒤에 수확하였고, 대동면에서는 엠파이어(상품명:유레이크) 품종을 1월 20일에 파종한 뒤 파종 40일 후(3월 8일)에 재식하여 80~90일 후에 수확하였다. 본 연구는 균핵병이 약간 발생하기 시작한 시점인 2004년 10월 24일과 2005년 3월 28일에 균핵병 발생이 시작된 플라스틱하우스를 골라 약제를 처리하였다. 처리방법은 미생물농약 수화제형 A7A제제와 액상수화제형 A7-2제제를 각각 100배와 500배로, 화학농약 베노밀 수화제는 1,000배로 희석하여 결구상추 잎의 앞과 뒷면에 골고루 살포하였는데, 1주 간격으로 3회 처리하고 4주째인 의령군에서는 2004년 11월 14일과 대동면에서는 2005년 4월 14일에 각각 발병율을 이병주율로 조사하여 방제가로 환산하였다. 각 처리구는 평균면적 2 m²(1 x 2 m) 당 15주식 5반복, 완전임의배치법으로 실시하였다.

2. 연구결과

가. 2004년 결구상추의 경상남도 의령군 재배포장에서의 방제효과

2004년 10월 말경 균핵병이 자연발생하기 시작한 결구상추의 경상남도 의령군 재배포장에서 선발 제제인 수화제형 A7A 및 액상수화제 A7-2 제제의 방제가를 화학농약 베노밀 처리와 비교하여 검정한 결과, A7-2 및 A7A제제 100배 희석 처리구와 베노밀처리구간의 유의차가 없었는데 무처리구의 60.0% 이병주율에 비하여 각각 방제가가 84.7%, 84.3%, 87.0%이었다. 한편 A7-2 제제 500배 희석처리에서도 70.3%의 방제가를 보였다. 실용적인 면에서

수화제 A7A 제제는 약하지만 약흔이 발생되었으나 액상수화제인 A7-2제제는 이러한 약흔의 단점을 보완하면서도 500배처리에서도 방제가가 높아 산업화의 가능성이 높은 제제로 확인되었다(Table 37, Fig 20).

Table 37. Disease control effects of 2 formulations using *Bacillus amyloliquefaciens*. A-7 against *Sclerotinia* rot caused by *S. sclerotiorum* at crisphead lettuce fields in Uiryeong-Gun, Gyeongsangnam-Do, October, 2004

Formulations ^c	Eleven days after treatment	
	Disease severity index (%) ^a	Disease control value (%) ^b
A7A (100)	9.4	84.3a ^d
A7-2 (100)	9.2	84.7a
Benomyl (1,000)	7.8	87.0a
A7-2 (500)	17.8	70.3b
Control	60.0	0.0d

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected plants caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease control value (%) = (disease severity index in control plants - disease severity index in treated plants) / (disease severity index in control plants) x 100

^c Each formulatios were sprayed three times with one week interval and disease severity was examined on the fourth week, and subsequently converted into disease control value (%).

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Fig 20. Disease control effects of 2 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-7 and against sclerotinia rot caused *S. sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at soils in the plastic house in Uiryeong-Gun, Gyeongsangnam-Do on December, 2004.

나. 2005년 김해시 대동면 재배포장에서의 방제효과

2005년 3월말경 균핵병이 자연발생하기 시작한 경남 김해시 대동면 결구상추의 재배포장의 플라스틱 하우스에서 경남 의령군의 재배포장에서 방제효과가 확인된 A7-2 제제를 처리 농도별로 달리하여 제제의 방제 효과를 화학농약인 베노밀 처리와 비교, 검정하였다. 그 결과, 무처리의 이병주율이 28.0%로서 A7-2제제 100배 처리가 76.7%의 방제가로 베노밀 처리의 75.0%와 유사하였으며, A7-2 제제의 500배에서는 60.7%로 이보다는 낮았다(Table 38). 그러나, 2005년 대동면 재배지에서의 무처리 발병율이 2004년 의령군에 비하여 현저히

낮았음에도 불구하고 미생물 농약 뿐만 아니라, 화학농약에 의한 방제효과도 의령군에 비하여 약간 낮은 경향이였다.

Table 38. Disease control effect of different treatment of formulation using *B. amyloliquifaciens* A7-2 and Benomyl against Sclerotinia rot by *S. sclerotiorum* on crisphead lettuce at Dae-dong, Kimhae, Busan, March 2005

Treatment	Four weeks after treatment	
	disease severity index (%) ^a	Disease disease control value (%) ^b
A7-2 (500)	11.0	60.7b ^d
A7-2 (100)	6.5	76.7c
Benomyl (1,000)	7.0	75.0c
Control	28.0	0.0a

^a Disease severity index (%) was obtained by estimating the percentage of infected plants caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1.

^b Disease disease control value (%) = (disease severity index in control plants - disease severity index in treated plants) / (disease severity index in control plants) x 100

^c Each formulatios were sprayed three times with one week interval and disease severity was examined on the fourth week, and subsequently converted into disease control value (%).

^d In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

제 8 절 선발 미생물농약의 작물에서의 엽권정착력 및 저장안정성 검정

1. 연구수행 방법

가. 작물에서의 A7-2 제제의 엽권정착력 검정

우수 미생물제제인 액상수화제형 A7-2제제의 엽권정착력 검정을 위해, 플라스틱하우스내 토경재배한 결구상추(파종 후 8주)에 A7-2제제를 1회 처리한 후 21일까지 근권토양, 밑등부위 및 잎 부위별 1 g에 존재하는 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 생균수를 조사하였다. 이때, 공시된 A7-2 제제는 A-7 균주를 rifampicin(100 ug/ml)이 포함된 nutrient agar(NA) 배지에 2주간 계대배양하여 획득한 rifampicin 저항성 균주(A-7R)로 액상수화제(A7-2R제제)로 제조하고 결구상추 잎의 앞, 뒷면에 골고루 1회 살포하였다. A-7 균주의 생균수는 rifampicin 100 ug/ml이 포함된 nutrient agar (NA) 배지에서 처리 부위별로 희석평판법으로 조사되었으며, 제제의 초기 세균수는 각각 2.8×10^{18} cfu/ml 이었다.

나. 저장 안정성 검정

선발된 미생물제제인 수화제형 A7A와 액상수화제형 A7-2제제를 실온과 4°C에서 각각 보관하면서 매달 동일한 날짜에 제제에 포함되어 있는 A-7균주의 생균수를 NA배지에서 희석평판법으로 조사하여 미생물제제의 안정성(storage stability)을 조사하였다. 또한 4°C에서 3개월과 8개월 동안 보관되어 있던 액상수화제 A7-2제제를 PDA배지상에서 균핵병원균과 대치배양하였으며, 1년간 보관하였던 A7-2제제의 농도별(100, 500, 1000배) 희석액을 균핵병원균과 대치배양하여 저지대를 조사함으로써 이들의 장기간 보관 시의 안정성을 조사하였다.

2. 연구결과

가. 토경재배한 결구상추에서의 A7-2제제의 엽권정착력(활성) 검정

Rifampicin 저항성 *B. amyloliquefaciens* A-7R 균주를 이용하여 제조한 액상수화제형 A7-2R 제제를 결구상추 잎에 1회 처리한 후 21일 동안 A-7 균주의 생균수를 근권토양, 밑동부위 및 잎 부위에서 측정하였다. 그 결과, 초기 세균수는 2.8×10^{13} cfu/ml 이었으며 경시적으로 약간 감소하였으나 처리 21일째에 근권토양, 밑동부위 및 잎 부위에서는 각각 2.8×10^9 , 1.4×10^9 , 6.8×10^9 cfu/ml로써 A-7 균주의 엽권정착력이 장기간 유지되는 것으로 확인되었다(Table 39).

Table 39. Survival of *Bacillus amyloliquefaciens* A7R, rifampicin resistance isolate of A7-2R formulation on lettuce leaves during 3 weeks at soils in plastic house

Days after treatment	No. of bacteria (cfu/ ml)		
	Rhizoshere soil	Bottom of lettuce	Leaves
0	2.8×10^{13}	2.8×10^{13}	2.8×10^{13}
1	4.0×10^{13}	3.2×10^{13}	1.3×10^{13}
3	3.6×10^{12}	1.6×10^{12}	3.2×10^{12}
5	2.8×10^{12}	1.4×10^{12}	6.6×10^{12}
7	8.1×10^{11}	5.9×10^{11}	4.5×10^{11}
14	5.6×10^{10}	3.8×10^{10}	3.5×10^{10}
21	2.8×10^9	1.4×10^9	6.8×10^9

따라서, A7-2 제제 1회 처리 후에도 A-7 균주의 엽권정착력이 장기간 유지되는 것은 A7-2 제제는 물론 A7A제제의 방제효과가 균핵병 발생 포장에서도 높았던 원인일 것으로 생각되었다.

나. 저장 안정성 검정

선발된 미생물제제 수화제 A7A와 액상수화제 A7-2 제제를 저장 온도 및 저장 기간에 따른 안정성을 조사한 결과, 2003년 10월의 A7A제제 초기 세균밀도는 1.5×10^{18} cfu/ml 이었으며, 1년 후 2004년 12월의 4°C와 실온에서의 세균 밀도는 각각 2.0×10^{17} cfu/ml와 7.0×10^{16} cfu/ml이었다. 이는 2005년 9월까지 1년 8개월간 조사되었는데 각각의 세균 밀도는 4.1×10^{14} cfu/ml와 3.2×10^{14} cfu/ml로 초기보다는 낮아졌으나 여전히 높은 밀도의 세균수가 유지되고 있었다. 이때 실온과 4°C 보관에 따른 세균의 밀도 차이는 초기 세균 밀도는 별 차이가 없었으나, 3개월째부터는 실온보관에서 10^1 cfu/ml 정도 낮아졌으나 큰 차이는 없었다.

액상수화제 A7-2제제의 경우, 2003년 10월의 초기 세균수는 3.8×10^{18} cfu/ml이었으며 1년 뒤인 2004년 12월의 4°C와 실온에서의 세균 밀도는 각각 2.8×10^{17} cfu/ml와 4.3×10^{16} cfu/ml으로 4°C와 실온 보관에 따른 세균의 밀도 차이가 다소 낮아졌다. 연구가 종료되는 2005년 9월에는 각각 5.9×10^{14} cfu/ml와 5.3×10^{14} cfu/ml로 초기보다는 낮아졌으나 여전히 높은 세균수가 유지되고 있었으며 A7A제제보다는 A7-2 제제가 다소 높은 세균수로 유지되는 경향이였다. 결과적으로, 선발 미생물제제(A7A, A7-2)의 보관상 안정성에는 문제가 없을 것으로 보여지며 보관방법은 실온보다는 4°C 보관이 좋으나 실온에 보관하여도 안정성에는 문제가 없을 것으로 사료된다(Table 40).

Table 40. Bacterial cell density in A7A formulation according to storage periods under various temperature conditions (°C)

Cell density (cfu/ml) Periods (Date)	Cell density (cfu/ml) ^a			
	A7A formulation		A7-2 formulation	
	4°C	RT	4°C	RT
2003년 11월	0.9×10^{18}	0.6×10^{18}	2.5×10^{18}	7.5×10^{18}
12월	0.7×10^{18}	0.6×10^{18}	2.0×10^{18}	3.0×10^{18}
2004년 1월	0.7×10^{18}	4.2×10^{17}	2.3×10^{18}	2.0×10^{17}
2월	5.2×10^{17}	3.5×10^{17}	6.2×10^{17}	1.6×10^{17}
3월	4.3×10^{17}	3.5×10^{17}	5.8×10^{17}	1.3×10^{17}
4월	4.0×10^{17}	2.4×10^{17}	5.7×10^{17}	1.0×10^{17}
5월	4.0×10^{17}	2.0×10^{17}	6.0×10^{17}	9.0×10^{16}
6월	3.8×10^{17}	8.2×10^{16}	5.7×10^{17}	1.9×10^{16}
7월	3.7×10^{17}	8.3×10^{16}	5.2×10^{17}	1.5×10^{16}
8월	3.6×10^{17}	7.5×10^{16}	4.0×10^{17}	0.9×10^{16}
9월	2.5×10^{17}	7.4×10^{16}	3.2×10^{17}	4.8×10^{16}
10월	2.0×10^{17}	7.0×10^{16}	3.0×10^{17}	4.8×10^{16}
11월	2.0×10^{17}	7.0×10^{16}	3.1×10^{17}	4.8×10^{16}
12월	2.0×10^{17}	7.0×10^{16}	2.8×10^{17}	4.3×10^{16}
2005년 1월	8.0×10^{16}	8.2×10^{15}	1.7×10^{17}	3.8×10^{16}
2월	6.0×10^{16}	7.2×10^{15}	1.5×10^{17}	3.2×10^{16}

Cell density (cfu/ml) Periods (Date)	Cell density (cfu/ml) ^a			
	A7A formulation		A7-2 formulation	
	4°C	RT	4°C	RT
2005년 3월	7.5×10^{15}	6.2×10^{15}	4.8×10^{16}	4.9×10^{16}
4월	7.3×10^{15}	5.8×10^{15}	4.4×10^{16}	8.8×10^{15}
5월	6.5×10^{15}	4.6×10^{14}	4.3×10^{16}	7.2×10^{15}
6월	6.2×10^{14}	3.9×10^{14}	4.0×10^{15}	6.0×10^{14}
7월	4.6×10^{14}	3.5×10^{14}	3.2×10^{15}	5.5×10^{14}
8월	4.6×10^{14}	3.0×10^{14}	3.6×10^{14}	5.0×10^{14}
9월	4.1×10^{14}	3.2×10^{14}	5.9×10^{14}	5.3×10^{14}

^a This results is servey in the changes of bacterial viability of formulation A7A and A7-2 stored at 4°C and room temperature over time. The initial bacterial densities for A7A and A7-2 were 1.5×10^{18} cfu/ml and 3.8×10^{18} cfu/ml, respectively. The initial density was estimated on November of 2003.

또한, 4℃에서 3개월과 8개월간 4℃에서 보관되어 있었던 A7-2제제를 PDA배지상에서 균핵병원균과 대치배양한 결과, 각각 5.0 mm, 5.3 mm의 저지대를 보였으며, 1년간 보관한 A7-2제제를 농도별로 희석하여 대치배양한 결과 1000배 희석에서도 4.5 mm 이상의 저지대를 보여 장기간의 보관에도 매우 안정성이 매우 높음을 재차 확인하였다(Fig 21).

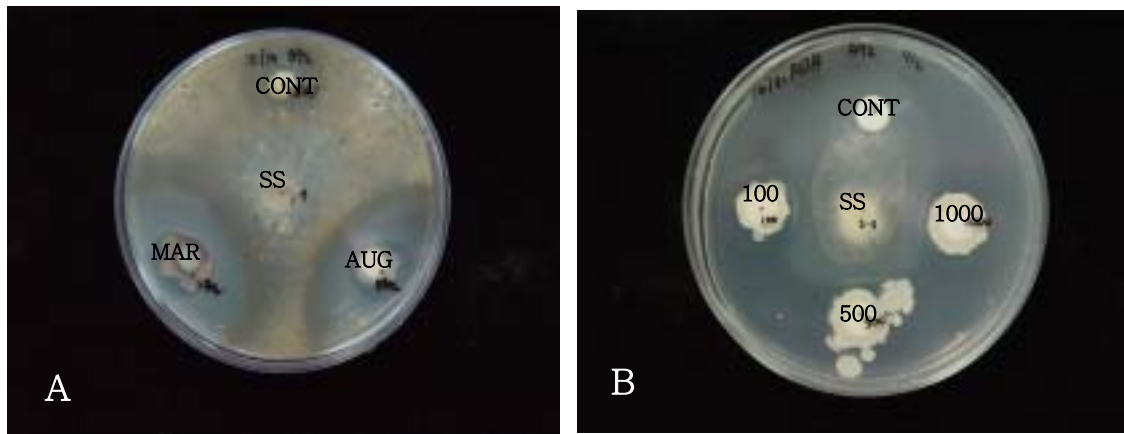


Fig 21. Storage stability of A7-2 formulations (MAR and AUG) of *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 against mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (SS) on PDA medium. A, storage periods (MAR, stored at 4 °C for 3 months; AUG, stored at 4 °C for 8 months; B, dilutions (100, 500, and 1000 fold-diluents of A7-2 formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* A-7.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도 (점수)	
1차년도 (2003)	▶제1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 밀등씩음병과 균핵병의 발병율 조사 및 병원균 분리 ○ 밀등씩음병과 균핵병의 병원성 검정 ○ 우수 길항균 선발 및 동정 	10 10 10
	▶제2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 밀등씩음병 방제용 엽면살포제를 위한 대량배양조건확립 ○ 밀등씩음병 방제용 엽면살포제를 위한 전달매체 선발 ○ 밀등씩음병 방제용 엽면살포제의 제형화 	20 20
	▶제3세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 균핵병 방제용 엽면살포제를 위한 대량배양조건 확립 ○ 균핵병 방제용 엽면살포제를 위한 전달매체 선발 ○ 균핵병 방제용 엽면살포제의 제형화 	10 10 10
2차년도 (2004)	▶제1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 엽면살포제와 종자처리제의 생육실편트 검정 ○ 엽면살포제와 종자처리제의 플라스틱하우스내 포트 및 토경에서의 방제효과 검정과 우수제형 선발 	15 25
	▶제2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 밀등씩음병 방제용 종자처리제를 위한 전달매체 선발 ○ 밀등씩음병 방제용 종자처리제의 최적화실험 ○ 밀등씩음병 방제용 종자처리제 코팅종자 기술확립 	15 10 15
	▶제3세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 균핵병 방제용 엽면살포제의 최적화실험 ○ 균핵병 방제용 엽면살포제 제조기술확립과 제형화개발 	10 10

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항		
		척도 (점수)	
3차년도 (2005)	▶제1세부과제	○ 개발제제의 포장적용시험	20
		○ 개발제제의 자연발생 농가 실증시험	20
	▶제2세부과제	○ 밀등썩음병 방제용 엽면살포제와 종자처리제의 엽권 근권 및 엽권정착력 검정	15
		○ 밀등썩음병 방제용 엽면살포제와 종자처리제의 저장 안정성 검정	10
		○ 밀등썩음병 방제용 우수제형 최종 선발	15
	▶제3세부과제	○ 균핵병 방제용 엽면살포제의 엽권정착력 및 활성화검정	5
○ 균핵병 방제용 엽면살포제의 저장 안정성 검정		5	
○ 균핵병 방제용 우수제형 최종 선발		10	
최종 평가	○ 밀등썩음병 방제용 엽면살포제 및 종자코팅제 개발	30	
	○ 균핵병 방제용 엽면살포제 개발	25	
	○ 플라스틱하우스내 포트 및 토경에서의 방제효과 검정 및 우수 제형 최종 선발	25	
	○ 개발제제의 포장적용시험 및 자연발생 농가 실증시험	20	

최종목표인 미생물 농약을 개발하기 위한 본 과제의 연도별 연구개발목표에 따라 성공적으로 연구결과를 도출하였으며, 세부기관 사이에 유기적 연결에 의해 연구가 진행되었다. 이를 통해 연도별 연구 목표뿐만 아니라 최종목표를 성실히 수행하였다.

단, 본 연구의 연구목표 달성도를 연도별로 작성할 경우 본 연구결과를 이해하는데 혼돈을 초래할 수 있으므로 연도별이 아닌 연구목표에 따른 연구 결과와 기술발전의 기여도 등을 기술하였다.

【 제 1, 2 세부과제: 결구상추 밀둥썩음병 방제용 미생물농약 개발 】

1. 유용미생물의 탐색 및 동정

가. 밀둥썩음병 발생 및 발병을 조사 경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 플라스틱 하우스에서 2003년 10월에서 11월 사이에 발생한 밀둥썩음병의 평균 이병주율은 5.3%이었다.

나. 밀둥썩음병 병원균의 분리 및 동정 병든 결구상추의 잎아래 밀둥부위에서 분리하여 병원성이 강한 것으로 확인된 PY-1 균주를 공시 병원균으로 선발하고 동정한 결과, *Rhizoctonia solani* AG1(IB)로 동정되었다.

다. 병원성 검정 *R. solani* PY-1 균주의 병원성 검정을 위한 접종원 및 최적처리량과 농도 선발에서 플러그포트의 유묘 검정에서는 접종원 균사조각부유액 1 ml ($A_{550}=0.8$)을, 생육실 포트검정의 성체식물에는 균사조각부유액 10 ml ($A_{550}=1.0$)을, 그리고 플라스틱하우스 토경재배에서는 접종원인 WRSP(밀기울: 미강: 톱밥: PDB배지=30 g: 10 g: 10g: 100 ml, w/w/w/v)배지 40 ml 을 선발하였다.

라. 우수길항균 선발 결구상추의 밀둥부위, 뿌리 및 근권토양으로부터 분리된 702 균주 중 병원균 PY-1 균주에 대해 균사생육저지효과를 지닌 7균주를 선발하여 유묘와 성체식물에서 방제효과를 검정하고 이들을 다시 종자처리한 유묘에서의 생육촉진효과를 검정한 결과, BW-13 균주는 밀둥썩음병 방제용 엽면살포제 개발에, LY-11 균주는 종자처리 미생물농약 개발에 이용할 우수 길항균으로 최종 선발되었다.

마. 선발 길항 세균의 동정 BW-13 균주와 LY-11 균주의 생화학적, 형태적 특성 및 16S rDNA sequence analysis를 통해 동정한 결과, *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13과 *Pseudomonas aeruginosa* LY-11로 각각 최종 동정, 명명되었다.

2. 밀등썩음병 방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립

가. *S. maltophilia* BW-13 균주의 최적배양조건 확립

삼각플라스크배양 BW-13 균주는 NB배지에서 20시간 배양체에 $A_{550}=1.6$ 에 도달하였고 48시간이 되어도 변화없이 OD값이 1.3으로 생장이 지속되었다. 생육온도는 35℃에서 가장 세균밀도가 높았으며, 증식 최적 pH의 범위는 6~8이었다. BW-13 균주의 생육 및 길항력에 가장 효과적인 탄소원과 질소원은 제빵개량제(3.0%)와 Yeast extract(0.5%)로 선발되었다. 그러나, 제빵개량제에는 이미 질소원으로 대두유 12%가 함유되어 있기 때문에 발효기배양에서는 질소원을 따로 선발하지 않기로 하였다. 따라서, 기초배지에 3% 제빵개량제를 첨가한 제빵개량제 배지가 길항균 증식과 항생물질에 의한 병원균의 군사생육저해가 높아 대량배양용 배지로 1차 선발되었다.

발효기 배양 대량배양용 제빵개량제배지에 BW-13균주를 배양(450 rpm, 35℃, 2.0기압, PH6~7)한 후 생균수를 조사한 결과, 배양 48시간과 72시간 후에 각각 4.4×10^{22} , 3.1×10^{22} cfu/ml로 현저히 높았다. 하지만, 제빵개량제배지에 우수 저분자탄소원으로 선발된 Sucrose(1%)를 첨가하여도 세균밀도의 증진효과는 없었다.

대량배양용배지 선발 이상 플라스크 및 발효기 배양 결과로 기초배지(1.25% K_2HPO_4 , 0.38% KH_2PO_4 , 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)에 3.0% 제빵개량제를 첨가한 제빵개량제배지를 *S. maltophilia* BW-13 균주의 대량배양용 배지로 최종 선발하였다.

나. *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 균주를 이용한 엽면살포제 제형화 대량배양용 제빵개량제배지 4L에 BW-13균주를 접종하고 72시간 발효기 배양(450 rpm, 35℃, 2.0기압, PH6~7)한 다음 각종 천연물 고분자(옥수수 전분, 변성전분, 타피오카전분, 메주가루)을 혼합하여 1차 제제 7종과 2차 제제 3종 등 총 10종(수화제 9종, 액상수회제 1종)으로 제형화하였다.

3. *S. maltophilia* BW-13 균주를 이용한 엽면살포제 방제효과

가. 생육실포트 검정 BW-13 균주로 종자코팅제 개발을 진행하던 중 엽면살포제로서의 가능성이 타진되어 연구수행 내용과는 별도로 엽면살포제를 개발하고 밀등썩음병에 대한 방제효과를 생육실 포트 검정하였다, 1차 제제 7종 중 선발된 BW13-A제제와 2차 제제 3종을 추가하여 생육실포트에서 방제효과를 비교 검정한 결과, BW13-A, BW13-I 및 BW13-H 제제가 각각 76.6, 75.6, 71.8%로서 유의차 없이 방제가가 높았고, 화학농약 펜시쿠론의 방제가 50.6%보다 훨씬 효과적이어서 생육실 포트재배의 밀등썩음병 방제용 엽면살포제로 *S. maltophilia* BW-13 균주를 이용하여 제조한 수화제형 BW13-A 및 BW13-I 제제를 최종 선발하였다.

나. 플라스틱하우스 토경재배 검정 생육실 포트검정에서 선발된 BW-13 균주의 수화제형 BW13-A와 BW13-I 제제를 플라스틱하우스내 토경재배한 결구상추에서 밀등썩음병에 대한 방제효과를 검정한 결과, 수화제형 BW13-A 제제가 방제가 75.7%로 가장 우수하였으며, 다음으로는 69.8%의 BW13-I 제제이었다. 화학농약 펜시쿠론은 56.3%로 낮은 방제가를 보였다. 따라서, 토경실험 결과 밀등썩음병 방제용 엽면살포제로서 수화제형 BW13-A제제가 BW13-I 제제에 비하여 효과적인 것으로 확인하였다.

다. 엽면살포제 수화제형 BW13-A 제제의 저장 안정성 밀등썩음병 방제용 엽면살포제 수화제형 BW13-A 제제의 온도차이에 따른 저장 안정성을 조사한 결과, 초기 세균수는 제제 1 g 당 1.8×10^{14} cfu/ml에서 7개월이 경과하는 동안 4℃에서는 1.2×10^{13} cfu/ml과 실온에서는 1.6×10^{13} cfu/ml으로 매우 높은 수치의 세균수가 유지되었다. 따라서, 본 미생물 제제의 안정성은 매우 높으며, 냉장보관 혹은 실온에서의 보관에 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다.

4. 밀등썩음병 방제용 종자처리 미생물농약 제조기술확립 및 방제효과 검정

가. *Pseudomonas aruginosa* LY-11 균주에 의한 우수코팅종자 선발 종자처리 미생물농약 개발용으로 선발된 LY-11 균주를 전달매체(AF300, clay, zeosil, diatomaceous

earth 325)와 함께 종자에 피막화하고 5종의 코팅종자를 제조하였다. 이들의 출아율을 조사한 결과, C와 E 코팅종자의 발아율이 각각 78.9, 71.1%로 대체로 높았으나, 비코팅종자의 발아율 92.2%보다는 낮고, 반복 실험에 따른 오차가 많아 효율적인 새로운 종자코팅방법이 요구되었다.

나. *P. aruginosa* LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅기술 개발 LY-11 균주를 NB배지에 24시간 진탕배양(28℃)한 후 세균부유액을 A₅₅₀=1.0으로 조정하여 멸균된 sodium alginate solution과 혼합한 배양액을 10 ml용 주사기를 이용하여 종자에 피막시켜 0.1 M calcium chloride 용액에 떨어뜨려서 구형으로 될때까지 방치하여 alginate 코팅종자를 제조하였다.

다. Aalginate 종자코팅제의 방제효과

유묘검정과 플라스틱하우스포트검정 LY-11 균주를 이용한 alginate 코팅제제는 각 각 모잘록병(유묘검정)에서 70.4%, 밀등썩음병(플라스틱하우스 포트검정)에서 85.4%의 방제가를 보여 *P. aeruginosa* LY-11 균주를 이용하여 제조한 alginate 코팅종자가 모잘록병과 밀등썩음병에 모두 효과적이었다.

라. alginate 코팅종자의 근권 및 엽권정착력 검정 및 안정성 검정

근권 및 엽권정착력 검정 *P. aruginosa* LY-11R 균주를 이용한 alginate 코팅종자를 파종하고 유묘(파종 후 4주)에서 존재하는 생균수를 조사한 결과, 밀등부위에서 잎중간부분(6.8×10^7 cfu/ml)과 밀등에서 뿌리부분(1.3×10^7 cfu/ml)이 가장 높았으며 뿌리의 중간에서 끝부위는 1.1×10^6 cfu/ml로 약간 감소하였다. 그러나 잎의 중간에서 끝부위 부분은 밀등부위에서 뿌리부분보다 낮았으며, 잎 끝부위는 LY-11 균주가 조사되지 않았다. 중간 성체식물(파종 후 6주)된에서는 전반적으로 유묘와 동일한 경향이었으며, 성체식물(파종 후 8주)에서는 밀등부위의 일부분과 뿌리부분이 각각 3.2×10^6 , 1.8×10^5 cfu/ml로 세균수가 가장 많았으며 뿌리의 중간 부위까지는 유사하였으나, 뿌리 끝부분은 약간 감소하였다. 그러나 잎에서는 잎의 밀등부위를 제외하고는 LY-11 균주가 관찰되지 못하였다.

저장 온도에 따른 안정성 검정 온도별(4℃, 15℃, 25℃, 35℃, 40℃)로 밀봉하거나 밀봉하지 않고 7일간 보관한 코팅종자의 상태를 조사한 결과, 15℃와 25℃는 종자가 자연적으로 발아되었으며, 35와 40℃에서는 alginate의 건조현상이 심하게 일어나 부적합하였다. 4℃에서도 밀봉하지 않을 경우 일부 건조 및 발아되는 종자가 관찰되므로 최종적으로 4℃에 밀봉 보관하는 것이 가장 효과적이었다. 안정성 검정에서는 4℃에서 7일간 밀봉보관한 alginate 코팅종자내 생균수는 초기에 4.5×10^7 cfu/ml였으나 1일째는 5.2×10^6 cfu/ml, 7일째는 2.0×10^7 cfu/ml으로 큰 변화가 없었으며, 50일째 조사한 결과에도 생균수가 안정적으로 지속되었다.

【 제 1, 3 세부과제: 결구상추 균핵병 방제용 미생물농약 개발 】

1. 유용미생물의 탐색 및 동정

가. 균핵병의 발생 및 발병율 조사 2003년 경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 농가에서 발생한 1, 2월 달의 이병주율은 각각 39.0%, 30.1%로 평균 이병주율 21.9%보다 훨씬 높았고, 3월은 24.2%, 4월과 5월은 매우 낮았다. 2차 조사 시기인 2003년 11월부터 2004년 4월까지의 평균 이병주율은 8.3%로 2003년초에 비하여 현저히 낮아졌다.

나. 균핵병 병원균 분리 및 동정 병든 결구상추로부터 분리한 총 140여 균주 중 병원성이 강한 것으로 확인된 YR-1 균주를 공시하고 형태적 및 배양적 특성을 조사하여 기존의 보고와 비교한 결과, *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1로 동정, 명명하였다.

다. 병원성 검정 *S. sclerotiorum* YR-1 균주의 병원성 검정을 위하여 균사조각 부유액을 접종원으로 하여 접종원의 최적처리량과 농도를 선발한 결과, 접종 농도 $A_{550}=0.4$ 또는 0.6에서 40 ml 처리시 50%의 발병을 나타내는 ED_{50} 값에 가까워 이를 최적 접종농도 및 처리량으로 선발하였다.

라. 길항미생물의 분리 건전 결구상추의 밑동부위, 뿌리 및 근권토양으로부터 분리된 702 균주 중 병원균 *S. sclerotiorum* YR-1에 대해 균사생육저지효과가 큰 10균주를 길항

세균으로 1차 선발하고 이들 일차 길항세균에 의한 방제효과를 생육실 포트검정하여 3균주 (A-2, A-7, RH-4)를 2차 선발하고 2차 선발 균주와 추가공시된 3균주의 방제효과를 비교하여 최종 선발하였는데, A-7 균주의 방제가가 91.0%로 가장 높았고, Pro-EB-15 균주가 90.1%로 다음으로 높았으나 서로 유의차가 없어 방제가가 다소 높은 A-7 균주를 균핵병 방제용 우수길항균으로 최종 선발하였다.

마. 우수 길항 세균의 동정 균핵병 방제를 위해 최종 선발된 길항세균 A-7 균주의 동정을 위하여 생리학적, 생화학적 특성 및 16S rDNA와 gyrase A 유전자의 염기서열을 분석한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 동정, 명명되었다.

2. 균핵병 방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립

가. *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의 최적배양 조건 확립

삼각플라스크배양 A-7 균주는 배양 14시간째에 최대값인 $A_{550}=1.0$ 에 도달하였으며, 14시간 이후에는 점차 감소하며 24시간 이후에 급격히 감소하였다. 증식 최적온도는 25°C로 확인되었으며, 생육 최적 pH는 6과 7로 확인되었다. A-7 균주의 생육 및 길항력에 가장 효과적인 탄소원과 질소원은 현미유(3%)와 Yeast extract(0.5%)로 선발되었다. 따라서, 기초배지에 현미유 3.0%, Yeast extract 0.5%를 첨가한 현미유 배지를 *B. amyloliquefaciens* A-7균주의 플라스크배양에서 대량배양용 배지로 1차 선발하였다.

발효기 배양 플라스크 배양에서 선발된 대량배양용 배지인 현미유 배지를 발효기에 넣고, A-7 균주를 발효기 배양(30°C, 350 rpm, 1.5 atm, pH 7)하여 생균수를 조사한 결과, 배양 72시간과 96시간 배양에서 각각 56×10^{17} , 73×10^{17} cfu/ml으로 가장 높게 나타났다. 따라서, 발효기에서 길항세균을 배양하는 기간은 세균밀도가 가장 높은 72시간으로 정하였다.

대량배양용배지 선발 이상 플라스크 및 발효기 배양 결과로 기초배지(K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0005%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0005%, $FeSO_4$ 0.0025%)에 현미유 3.0%, Yeast extract 0.5%를 첨가한 현미유 배지를 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주의

대량배양용 배지로 최종 선발하였다.

나. *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용한 엽면살포제 제형화

7 L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 A-7 균주를 접종한 배양액에 전달매체인 옥수수 전분, 타피오카 전분, 변성전분, 메주가루, 올리브유, Fructose등을 혼합하여 1차에서 4차 까지 총 수화제형 21종을 제조하였다. 제형화를 달리하고자 5차, 6차에서는 전달매체를 찹옥수수 전분, 썬 크리미, 썬 텐더, 썬 프리젤, 썬 사이즈, 썬 캡, 썬 슈퍼젤, 썬 배터, 제오실, 변성전분 등을 이용하여 수화제형 8종과 액상수화제 2종을 제조하였다.

3. *B. amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용한 엽면살포제 방제효과

가. **생육실 포트검정** 1차에서 6차까지 제조한 미생물제제의 생육실 포트검정 결과 방제가 가장 높았던 *B. amyloliquefaciens* A-7 균주를 이용하여 제조한 액상수화제형 A7-2 제제 및 수화제형 A7A 제제를 균핵병 방제용 엽면살포제의 우수제형으로 최종 선발하였다.

나. **플라스틱하우스 토경재배 검정** 플라스틱하우스 포트 검정에서 최종선발된 액상수화제형 A7-2제제 및 수화제형 A7A 제제와 방제효과가 높았던 수화제형 A7-4 및 A7W제제 2 종류를 추가로 공시하여 플라스틱하우스내 토경재배한 결구상추에서 균핵병에 대한 방제효과를 검정한 결과, A7-2 제제가 살포 20일 쯤의 방제가 80.5%로 가장 우수하였으며, 다음으로는 A7A 제제가 79.1%의 방제가를 보였다. 그러나 이들은 서로간에 유의차는 없었으나 대조구인 베노밀 처리구 75.2%보다는 유의적으로 높았다. 따라서, A7-2 제제와 A7A 제제는 생육실 포트검정에서와 마찬가지로 플라스틱하우스내 토경재배에서도 균핵병 방제용으로 효과적인 것으로 확인되었다.

다. **밀등썩음병과 균핵병의 동시방제 효과** 최종선발된 밀등썩음병 방제용 엽면살포제인 수화제형 BW13-A제제와 균핵병 방제용 엽면살포제인 액상수화제형 A7-2제제를 포트재배한 결구상추에 분무살포하여 밀등썩음병과 균핵병을 동시방제하기 위해 생육실 포트검정한 결과, A7-2 제제의 단독처리가 2종류의 병원균 혼합접종에 대해 81.3%의 방제가로 2종류 제제의 혼합처리 70.6%보다는 높았으나 유의차는 없었다. 그러나, BW13-A 제제의 단

독처리는 2종류의 병원균 즉, 밀등썩음병과 균핵병의 혼합 접종에 대해 방제가가 높지 않았으므로 A7-2 제제 만으로도 두가지 병원균에 대한 방제는 가능할 것으로 판단되었다.

라. 미생물농약의 자연발생 농가실증시험

2004년 경상남도 의령군 재배포장에서의 방제효과 2004년 10월 말경 균핵병이 자연발생하기 시작한 결구상추의 경상남도 의령군 재배포장에서 수화제형 A7A 및 액상수화제 A7-2 제제의 방제가를 베노밀 처리와 비교하여 검정한 결과, A7-2 및 A7A제제 100배 희석 처리구와 베노밀처리구간에는 유의차가 없었고 무처리구의 60.0% 이병주율에 비하여 각각 방제가가 84.7%, 84.3%, 87.0%이었다. 한편 A7-2 제제 500배 희석처리에서도 70.3%의 방제가를 보였다. 실용적인 면에서 수화제 A7A 제제는 약하지만 약흔이 발생되었으나 액상수화제인 A7-2제제는 이러한 약흔의 단점을 보완하면서도 500배처리에서도 방제가가 높아 산업화의 가능성이 높은 제제로 확인되었다.

2005년 김해시 대동면 재배포장에서의 방제효과 2005년 3월말경 균핵병이 자연발생하기 시작한 경남 김해시 대동면 결구상추의 재배포장의 플라스틱 하우스에서 경남 의령군의 재배포장에서 방제효과가 확인된 A7-2 제제를 처리 농도별로 달리하여 제제의 방제효과를 화학농약인 베노밀 처리와 비교, 검정하였다. 그 결과, 무처리의 이병주율이 28.0%로서 A7-2제제 100배 처리가 76.7%의 방제가로 베노밀 처리의 75.0%와 유사하였으며, A7-2 제제의 500배에서는 60.7%로 이보다는 낮았다. 그러나, 2005년 대동면 재배지에서의 무처리 발병율이 2004년 의령군에 비하여 현저히 낮았음에도 불구하고 미생물 농약 뿐만 아니라, 화학농약에 의한 방제효과도 의령군에 비하여 약간 낮은 경향이였다.

4. A7-2제제의 엽권정착력 검정 및 안정성 검정

토경재배한 결구상추에서의 A7-2제제의 엽권정착력 검정 Rifampicin 저항성 *B. amyloliquifaciens* A-7R 균주를 이용하여 제조한 액상수화제형 A7-2R 제제를 결구상추 잎에 1회 처리한 후 21일 동안 A-7 균주의 생균수를 근권토양, 밀등부위 및 잎 부위에서 측정하였다. 그 결과, 초기 세균수는 2.8×10^{13} cfu/ml 이었으며 경시적으로 약간 감소하였으나

처리 21일째에 근권토양, 밑동부위 및 잎 부위에서는 각각 2.8×10^9 , 1.4×10^9 , 6.8×10^9 cfu/ml로써 A-7 균주의 엽권정착력이 장기간 유지되는 것으로 확인되었다. 따라서, A7-2 제제 1회 처리 후에도 A-7 균주의 엽권정착력이 장기간 유지되는 것은 A7-2 제제는 물론 A7A제제의 방제효과가 균핵병 발생 포장에서도 높았던 원인일 것으로 생각되었다.

저장 안정성 검정 선발된 미생물제제 수화제형 A7A제제와 액상수화제형 A7-2 제제를 저장 온도 및 저장 기간에 따른 안정성을 조사한 결과, 2003년 10월의 A7A제제 초기 세균밀도는 1.5×10^{18} cfu/ml 이었으며, 1년 후 2004년 12월의 4℃와 실온에서의 세균 밀도는 각각 2.0×10^{17} cfu/ml와 7.0×10^{16} cfu/ml이었다. 이는 2005년 9월까지 1년 8개월간 조사되었는데 각각의 세균 밀도는 4.1×10^{14} cfu/ml와 3.2×10^{14} cfu/ml로 초기보다는 낮아졌으나 여전히 높은 밀도의 세균수가 유지되고 있었다. 이때 실온과 4℃ 보관에 따른 세균의 밀도 차이는 초기 세균 밀도는 별 차이가 없었으나, 3개월째부터는 실온보관에서 10^1 cfu/ml 정도 낮아졌으나 큰 차이는 없었다.

액상수화제 A7-2제제의 경우, 2003년 10월의 초기 세균수는 3.8×10^{18} cfu/ml이었으며 1년 뒤인 2004년 12월의 4℃와 실온에서의 세균 밀도는 각각 2.8×10^{17} cfu/ml와 4.3×10^{16} cfu/ml으로 4℃와 실온 보관에 따른 세균의 밀도 차이가 다소 낮아졌다. 연구가 종료되는 2005년 9월에는 각각 5.9×10^{14} cfu/ml와 5.3×10^{14} cfu/ml로 초기보다는 낮아졌으나 여전히 높은 세균수가 유지되고 있었으며 A7A제제보다는 A7-2 제제가 다소 높은 세균수로 유지되는 경향이였다. 결과적으로, 선발 미생물제제(A7A, A7-2)의 보관상 안정성에는 문제가 없을 것으로 보여지며 보관방법은 실온보다는 4℃ 보관이 좋으나 실온에 보관하여도 안정성에는 문제가 없을 것으로 사료된다.

또한, 4℃에서 3개월과 8개월간 4℃에서 보관되어 있었던 A7-2제제를 PDA배지상에서 균핵병원균과 대치배양한 결과, 각각 5.0 mm, 5.3 mm의 저지대를 보였으며, 1년간 보관한 A7-2제제를 농도별로 희석하여 대치배양한 결과 1000배 희석에서도 4.5 mm 이상의 저지대를 보여 장기간의 보관에도 매우 안정성이 매우 높음을 재차 확인하였다.

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 기대효과

가. 국내외적으로 결구상추 밀둥썩음병과 균핵병에 대한 연구가 미흡하여 농민들과의 꾸준한 정기 모임을 통해 본 연구 목표와 결과에 대해 토의 한 바, 매년 포장에서의 발병도가 실질적으로 감소되었다.

나. 2004년 식물병연구에 밀둥썩음병의 발생과 병원성에 대해 보고하였으며, 이는 지금까지 결구상추 발생 상황에 대해 보고한 바가 없어 경남지역에 자연발생한 결구상추 밀둥썩음병의 발생을 처음으로 보고하고 병원균의 균사융합군과 배양형을 밝혔다(김현주 외 2004). 이어 2005년 식물병연구에 ‘*Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밀둥썩음병 방제균주 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13의 분리 및 동정’ 과 ‘길항세균 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13의 대량배양을 위한 최적배양조건’에 관한 내용으로 논문투고하여 심사중에 있다.

다. 균핵병에 관한 연구 역시 경남지역의 발생 상황에 대해 보고한 바가 없어 2004년 식물병연구에 *Sclerotinia sclerotiorum*에 의한 결구상추 균핵병(*Sclerotinia rot*)의 발생과 병원성에 관한 연구와 결구상추 균핵병균(*Sclerotinia rot*)에 대한 길항세균의 분리 및 동정으로 식물병 연구에 투고 완료하였다.

라. 밀둥썩음병의 병원성 검정을 위한 접종원으로 플러그포트 및 생육실 포트에서는 균사조각부유액을, 플라스틱하우스 토경재배에서는 WRSP배지(밀기울: 미강: 톱밥: PDB배지=30 g: 10 g: 10g: 100 ml, w/w/w/v)를 접종원으로 선발하였는데, 이는 병원성 검정에 매우 용이 하면서 토경재배 검정을 위해서 효과적일 것으로 판단되며 이는 결구상추용 접종원으로 처음 보고하는 것이다.

마. BW-13 균주는 밀둥썩음병 방제용 엽면살포제 개발에, LY-11 균주는 종자코팅제 개발에 적합한 우수 길항균으로 각각 최종 선발되었는데, 이들 두 균주에 의한 결구상추 밀둥썩음병 방제에 대한 생물학적 방제 연구 또는 방제제 개발에 이용된 연구보고가 극히 드물어 균주 특허 및 논문투고의 활용에 기여도가 클 것으로 판단되었다.

바. BW-13 균주, LY-11 균주 및 A-7 균주를 위한 대량배양배지선발에 있어서 제빵개량제 배지와 현미유 배지는 산업화에 적용시 유용미생물의 세균밀도 증가, 항생물질 생산, 저렴한 단가 등으로 산업화에 매우 유리한 배지를 선발한 것으로 판단되며 특허출원 및 논문 투고를 준비 중에 있다.

사. 썬크리미로 제조된 액상수화제 (A7-2제제)는 지금까지 알려진 바가 없는 독특한 형태의 제형화 형태로서 썬크리미는 끈적임이 많고 무독성이며, 유용미생물에 영양분을 공급하는 미세한 변성전분의 전달매체로서 환경보존적인 새로운 미생물농약을 개발한 것으로 사료된다.

아. 길항균의 세균부유액과 살균된 sodium alginate solution를 혼합한 배양액을 10 ml용 주사기로 0.1 M calcium chloride 용액에 한방울씩 떨어뜨리면서 종자를 포함한 원형의 모양이 생성될 때까지 방치하였다가 건조시켜 새로운 형태의 alginate 종자코팅기술을 개발하였다. 보고된 바에 따르면, sodium alginate를 이용한 코팅방법은 유용미생물만을 포집하여 제형화한 것으로 알려져 왔다. 하지만, 본 연구에서는 이를 이용해 세균과 종자를 동시에 피막화하는 새로운 방식의 종자코팅법이 개발되었다.

자. 제형화를 위한 전달매체로서 옥수수 전분, 타피오카 전분, 메주가루, 변성전분을 사용하여 수화제형을 제조하였다. 이들은 물에 대한 용해성은 높으나 결구상추 잎에 살포된 후 약혼을 남겨 미관상 좋지 않았으며 살포기의 입구를 막는 등 여러 가지의 단점이 있어 이를 보완하기 위해 약혼을 남기지 않고 끈적임의 특성이 높은 찰옥수수전분, 썬크리미, 썬테더, 썬프리젤, 썬사이즈, 썬캡, 썬슈퍼젤, 썬배터, 제오실, 변성전분, 제오실 등을 농도별로 달리 하여 제형화하였다. 썬크리미와 썬캡으로 액상수화제를 개발하였으며 본 제형화 기술은 미생물농약 개발에 처음으로 시도되는 바 기술이전 등의 가치가 있을 것으로 판단되며, 본 연구에서 사용한 모든 전달매체는 저렴한 가격으로 산업경쟁력이 있으며, 환경보존적이며 자외선 차단 및 부착정도가 높은 장점이 있어 새로운 제형화 기술개발에 기여하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

논문 발표

1. 김현주, 박종영, 백정우, 이진우, 정순재, 문병주. 2004. *Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밑등썩음병(Bottom rot)의 발생과 병원성. 식물병연구 14(4):689-695.
2. 백정우, 김한우, 김현주, 박종영, 이광렬, 이진우, 정순재, 문병주. 2004. *Sclerotinia sclerotiorum*에 의한 결구상추 균핵병(*Sclerotinia rot*)의 발생과 병원성. 식물병연구 10(4):324-330.
3. 김한우, 이광렬, 백정우, 김현주, 박종영, 이진우, 정순재, 문병주. 2004. 결구상추 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)에 대한 길항세균의 분리 및 동정. 식물병 연구. 10(4):331-336
4. 박종영, 김한우, 김현주, 전옥주, 정순재, 최우봉, 이선우, 문병주. In process. 길항세균 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13의 대량배양을 위한 최적배양조건. 식물병 연구.
5. 김한우, 박종영, 김현주, 이광렬, 이진우, 최우봉, 이선우, 문병주. In process, *Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밑등썩음병 방제균주 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13의 분리 및 동정. 식물병 연구
6. *P. aruginosa* LY-11 균주를 이용한 alginate 종자코팅법은 새로운 종자코팅 산업에 활용될 것이며 해외논문에 투고될 예정이며, 다수의 논문 투고 예정 중에 있다.

석사학위 논문

1. 박종영, 2003. 결구상추 밑등썩음병 (*Rhizoctonia solani* PY-1) 발생 및 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13에 의한 생물학적 방제
2. 백정우. 2004. 결구상추 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)의 방제를 위한 미생물 제제의 개발 및 그 방제효과

특허 출원 준비

1. 본 연구로부터 탐색분리된 항진균활성세균 *Bacillus amyloliquefaciens* A-7 균주를 결구상추 균핵병 방제용 엽면살포제를 위한 미생물농약의 제제화에 최초로 이용되어 제제 공법에 대한 특허 출원 준비중에 있다.
2. *Stentrophomonas maltophilia* BW-13 균주를 결구상추 밀등썩음병 방제용 엽면살포제 개발에 최초로 이용되어 균주특허 및 제제 공법에 대해 특허 출원 준비중에 있다.
3. 종자코팅제에 이용된 *Pseudomonas aruginosa* LY-11 균주는 코팅종자용 미생물농약의 제제화에 최초로 이용되어 국내 특허출원 준비 중에 있다.

산업체 기술이전에 의한 수입대체

1. 실온에서도 효과가 지속되고, 사용방법이 간편하여 농민이 사용하기 편리한 미생물 농약이므로 현장 보급시 유리할 것이다.
2. 엽면살포제 및 종자처리제의 상품화 및 산업체의 기술이전로 본 미생물농약 제제화 기술 등을 산업체(주식회사 한국바이오케미칼)에 이전하고, 산업체에서는 이의 상품화가 가능할 것이다.
3. 가격이 저렴한 식품 부산물 및 환경친화적 농가폐기물을 이용한 미생물농약 개발로의 응용과 식품 부산물 및 농가폐기물을 이용한 미생물농약 개발로 인한 고부가가치화를 기대할 수 있다.
4. 종자처리제, 퇴비부숙제, 토양개량제 및 생리활성제 등의 길항미생물 자재로서의 활용 기대
5. 대량 생산기술의 실용화에 의한
참여 기업에 의한 생산 및 판매 회사의 설립과 이에 의한 지역의 수입 증대

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 생물농약의 개발 현황

생물농약은 농작물의 해충, 병원미생물 및 잡초를 방제하기 위하여 자연환경에서 분리된 병원균, 기주 저항성 미생물, 천연물 농약 및 천적을 제품화한 것으로 그 역사는 1888년 California의 감귤 이세리아각지벌레를 호주산 베다리아 무당벌레(*Vedalia beetle*)로 방사하여 방제에 성공한 이후, 1920년대 영국에서 토마토 온실가루이를 온실가루이좀벌로 방제하였고, 1960년대에는 European spruce sawfly(잎벌류)를 virus로, 나방류는 *Bacillus thuringiensis*로 방제에 성공하였다. 1991년도에는 식물저항성 유도미생물로 미생물 종자처리제를 개발하여 저항성이 유도된 식물 스스로 병 발생을 억제하도록 하였다. 1998년 말 현재 미국에서는 180여종의 유효성분이 생물농약으로 등록되었고, 제품의 수는 약 700여 종에 달한다. 현재 세계적으로 상품화되어 보고된 생물농약은 크게 미생물농약, 페로몬을 포함한 생화학농약, 식물농약, 천적 및 기타로 구분하여 보고되어 있다(표 1). 이 중에는 대부분이 살충성 생물농약으로 119개 품목이 있고 다음으로 살균성, 살선충성이며 세균, 곰팡이, 바이러스 등으로 구성된 미생물 농약이 주종을 이루고 있다. 그 외 페로몬과 천적이 40-45개 품목이 보고된 것으로 보아 이 분야의 발전도 기대되고 있다.

국내는 1930년대 사과면충을 사과면충좀벌을 이용하여 방제에 성공한 이후 1976년도에 제주도 감귤에 발생하는 루비각지벌레를 일본에서 도입한 루비붉은강충좀벌로 방제시킨 예가 있으며, 1987년에는 인삼뿌리썩음병 방제를 위해 바이코나가 개발된 예가 있었다. 그 후 1994년에는 역병방제용으로 AC-1을 개발하는 등 여러 종류의 길항 미생물들이 개발되어 소개되었다. 최근에는 미생물제제라고 하여 살충, 살균 효과가 있다고 알려져 있는 제품들이 34개회사로부터 72 품목이 시장에 소개되어 있는데 국내에 정식으로 등록된 토양 미생물 제제는 1999년 현재 총 57개 품목이었으며 살충제 6품목, 살균제 27품목, 그 외에는 효소제나 유용미생물 제제로 되어 있다. 우리나라는 2000년도 6월에 미생물 농약의 등록 기준과 방법이 고시되어 토양미생물 제제들 중에서 살균 및 살충 효과가 인정되는 제품들도 미생물 농약의 범주에 들어오도록 제도적 뒷받침이 마련되면서 본격적인 생물 농약 시대에 접어들었다. 천적은 1996년부터 본격적으로 연구를 시작하여 아직 상업화하기에 미진한 점이 있으나 벤처기업을 중심으로 꾸준히 개발하고 있어 곧 천적에 의한 방제 사례도 많이 발생하게

될 것이다.

표 1. 1998년까지 개발된 신규 생물농약 수 및 개발 제품

(Biopesticide Manual, 1998)

구분		살균	살충	살선충	제초	계
미생물	세균	10	9	(2)	1	20
	곰팡이	11	6	1	2	20
	선충	-	7	1	-	8
	원생동물	-	1	-	-	1
	바이러스	-	11	-	-	11
페로몬		-	45	-	-	45
천적		-	40	-	-	40
계		21	119	2	3	145

2. 현재 생물 농약의 시장 규모

영국의 CPL 사에서 조사한 세계 생물농약 시장은 2000년도에 약 1억5천불 정도로 예상되었고 그 중에서 BT가 1억천불로 대부분을 차지하고 있으며 미생물 농약은 4천만불로 보고되어 있다. 이 시장은 전체 농약 시장의 약 0.5%로 미비하지만 현재 개발 중인 미생물 농약, 생화학 농약 및 천적 등과 환경친화형 농업으로 전환 추세에 있다는 것을 볼 때 시장이 확대될 것으로 예상된다(표 2).

현재 생물농약 시장의 규모는 전체 농약시장 규모 97년 기준의 약 300억 달러의 3%에 지나지 않지만 2010년에는 430억 달러의 10%를 차지할 전망이다. 2013년에는 전세계적 생물농약 시장은 약 50억불이 될 전망이다.

표 2. 세계 생물농약 시장

(단위:백만달러)

연도	계	BT계	미생물제
1996-1997	85-90	70	15-20
1998	120	90	30
1999	130-135	100	30-35
2000	150	110	40

Biopesticides 5th Edition, CPL Sci., 1999

일본 농약요람에서 조사한 생물농약 시장을 보면 2000년 현재 12억엔으로 살충성 생물농약이 약 10.9억엔으로 85%를 차지하며 그 중 BT 계가 7.6억엔이며 살균성 생물농약은 13억원에 불과하며, BT를 제외한 생물농약은 5.6억엔 규모로서 일본 전체 농약 시장의 0.34%로 세계 농약보다 미약한 실정이다. 일본에서 판매중인 생물농약은 총 22개 품목으로 살충제 17품목, 살균제 4품목, 제초제 1품목으로 전체 품목 구성도 아직 취약한 실정이다(표 3).

표 3. 일본의 생물농약시장

(단위: 백만엔)

연도	계	살충제			살균제	제초제
		BT계	기타제	소계		
1998	1,075	799	221	1,020	5.2	49.8
1999	1,174	844	252	1,096	5.4	72.6
2000	1,272	756	332	1,088	118.0	65.7

2000농약요람(일본식물방역협회)

국내 미생물농약 시장을 보면 세계 시장과 마찬가지로 BT 계가 주이며, 2000년에는

판매액이 33억원 정도였고 살충, 살균 효과가 있다고 주장하는 토양미생물제제의 판매액을 추정한 금액을 더하면 77억원 정도이며 그 중 BT를 제외한 살충제가 약 13억원, 살균제는 31억원 정도로 추정되며 전체농약 시장의 0.31%에 해당되는 극히 미약한 시장을 형성하고 있다. 이 구성은 현재의 세계 시장에서 생물 농약이 차지하는 비율보다도 낮은 수준이지만 우리나라는 국토가 좁고 다양한 작물이 재배되고 있는 만큼 다양한 병해충 및 잡초도 많이 발생되고 있어 국내의 시장 잠재력은 크다고 하겠다(표 4).

표 4. 국내 생물 농약 시장 현황

(단위: 백만원)

연도	계	BT제*	토양미생물제제(추정치)**			천적 등
			살충제	살균제	제초제	
1995	4,359	4,359	-	-	-	-
1998	3,723	2,324	300	1,000	-	-
1999	6,933	3,133	800	3,000	-	-
2000	7,682	3,282	1,300	3,100	-	-

*BT제는 농약연보,

**토양미생물제제 중 살균, 살충효과가 있다고 주장하는 제품의 판매액 추정량

3. 국내의 생물농약 시장 추정

생물농약의 판매 가능 시장을 추정해보기 위하여 화학농약의 최근 3년 평균 판매금액을 적용 대상별로 구분하여 정리해본 결과 침투할 수 있을 것으로 예상되는 시장은 약 3310억원으로 추정되며 그 중 살균제는 958억원, 살충제는 2353억원으로 살충제 시장이 클 것으로 예상되며 제초제 시장은 불확실할 것으로 예상된다.

현재 등록된 생물농약의 분포는 살충제 75%, 살균제 15%, 제초제 5%, 기타 5% 정도를 차지하고 있다. 친환경재배지의 경우 천적은 약 5%, 살균제, 살충제는 각각 20% 정도 사용될 것으로 가정하였고, 시설재배지에서는 친환경재배와 겹치는 면적을 제외하고 천적은 10%, 살균제 살충제는 각각 20% 사용될 것으로 가정하였고, 노지재배에서는 천적이 0.5%, 살균제는 1%, 살충제는 2% 사용될 것으로 예상하여 농약사용정도가 다른 재배형태별로

2010년도 생물농약의 시장을 추정해본 결과 BT, 천적을 포함하여 821억원으로 예상되었고 그 중에서 BT 류가 약 50억원, BT를 제외한 살충제가 319억원, 살균제가 186억원, 천적이 258억원, 제초제는 약 7억원 정도로 생물농약이 전체 농약 시장의 6.2% 정도 차지할 것으로 예상된다(표 5).

표 5. 생물농약 시장 추정(2010년)

구분		계	친환경재배	시설재배	노지재배	
재배면적(ha)		2,000,000	104,000	117,500	1,778,500	
생물농약 (백만원)	살충제	BT	5,000	500	1,500	3,000
		그외	31,950	8,320	9,400	14,230
	살균제	18,630	6,240	7,050	5,340	
	제초제	700	500	-	200	
	천 적	25,800	5,200	11,750	8,850	
	소 계	82,080	20,760	29,700	31,620	
화학농약 (백만원)	1999년	932,700	1,000	235,200	696,500	
	2010년	1,242,200	26,500	196,500	1,019,200	
총계		1,324,280	47,260	226,200	1,050,820	

천적:(친환경재배×0.05+시설재배×0.1+노지재배×0.005)×100만원/ha = 258억, 살균제:(친환경재배×0.2+시설재배×0.2+노지재배×0.01)×30만원/ha = 186억, 살충제:(친환경재배×0.2+시설재배×0.2+노지재배×0.02)×40만원/ha = 319억, *노지재배 농약비에는 골프장이 포함됨

4. 해외 개발기술의 최근 연구동향

1) 초기에는 증량제(filler)로 peat를 섞거나 전착제를 혼합하여 살포하여 제품의 효과를 증진하려 하였으나, 최근에는 알긴산, 폴리아크릴아마이드, 카라기난 같은 생체고분자물질속에 포자를 고정화한 후, 각종 첨가제(영양원, 전착제, UV 차단제, 증강제, PGPR 등)와 혼합

하여 포장에 살포하는 방법이 개발되었다(Burges, 1998).

2) 미생물이 생산하는 항생물질을 대량생산하도록 하여 산업화하였다(Lumsden 등, 1995).

3) 미생물(*G. virens*)을 종자에 처리하여 전착제인 Pelgel로 피막화하여 종자처리제로 개발하였다(Mao 등, 1998).

4) *Mycobacteria*에서 발견된 soraphen 화합물이 식물병원균에 우수한 활성을 보여 진균의 acetyl-CoA carboxylase 연구가 새로운 살균제 탐색에 이용되고 있다(Gerth 등, 1994).

5) Tublin(Butters 등, 1995)과 mitochondria respiration(Anke 등 1977) 및 glucose의 transport-associated phosphorylation(Arima 등, 1965)등을 억제하는 화합물들이 미생물농약 연구에 이용되고 있다.

6) 병원균에 대한 방어기작인 식물체가 생산하는 chitinase, β -1,3-glucanase 등의 PR 단백질 연구가 최근 진행되고 있다(Yun 등, 1997).

7) 최근, 유전공학기법에 의한 고생산성 변이주 탐색으로 미생물농약에 적용될 수 있도록 활발하게 연구되고 있다.

5. 종자처리제 및 코팅종자에 관한 연구 동향

1990년대 후반부터 유용미생물을 종자에 처리하여 작물의 성장을 촉진시키거나 작물에 발생하는 병을 방제하려는 노력은 종자 및 작물생산에 있어서 대단히 중요한 과제로 부각되어 왔다. 하지만, 지금까지 길항미생물의 토양처리에 의한 생물학적 방제는 다양하게 시도되었으나, 현재까지 확실하게 실용화된 바가 국내외적으로 매우 드물고, 특히, 종자처리에 의한 생물학적 방제 연구는 지상부에 발생하는 병과는 달리 일단 병이 발생되면 지금까지 개발된 어떠한 농약으로도 방제가 어려워 병발생예찰과 치료가 불가능하므로 작물이 심겨지기 전에 대책을 강구해야 하는데, 이때 극복해야 할 매우 중요한 문제점은 종자 또는 유묘에서 길항미생물이 병원균 침입부위에서 효과적으로 정착하여야 하며, 병원균의 침입을 억제할 만큼 충분한 밀도를 유지해야 하고, 미생물의 항균능력을 충분히 발휘해야 한다는 것이다. 종자처리기술은 대부분 국가나 회사마다 철저히 가려져 있으므로 국내연구자들에 의해 우리나라만의 고유 종자관련기술들이 다양하게 개발되어야 하는데, 우선 뿌리정착능력이 뛰어난 유용미생물의 확보와 Bio-priming 법 개발 그리고 종자코팅기술 개발로 심각한 국내의 토양병 방제의 문제

점을 극복해야 한다. 근권정착력을 높이기 위한 연구를 위해 우리나라 농촌지역, 특히 각 지방 해당지역의 기후, 풍토에 장기간 토착화되어 그 지역의 토양환경에 복원 우점화되기 용이한 토착 길항미생물들을 선발하는 것이 중요하며, 길항기작별로 선발된 각종 토착 생물방제균이나, 육종된 생물방제균을 해당 지역 현지 토양내에서 신속히 우점화 되고 그 방제력이 유지될 수 있도록 하기 위해 길항미생물의 식물종자 피막화 등 새로운 전달체계를 구명, 확립함으로써 실용성 있고 경쟁력이 우수한 생물방제균 전달체계를 개발해야 한다. 또한, 몇몇의 연구자들에 의해 식물의 성장에 관련되는 공생균인 내생균근(Arbuscular mycorrhiza)분리로 식물뿌리의 공생관계를 연구되고 있다. 토착 길항미생물들의 생물학적 방제기작의 유전자를 유전공학적으로 통합, 부가, 증강하여 다기능적 단일 생물방제균주로 유전 육종함으로써 여러 가지 복수 길항기작의 처리체계를 단순화하여 토양내 전달효과를 향상시키며, 부수적으로 우리 고유의 길항기작 유전자원을 확보하는 예도 있는데, 항생작용(antibiosis) 또는 PGR의 생성과 두가지 병행 생성가능성을 가설로 길항력과 근권정착력이 우수한 길항균의 우수한 형질의 균을 세포융합, 염색체 전이방법 등으로 새로운 균을 창출하여 이들 융합력의 생화학적 분자생물학적 성질을 연구하며, 토양내 미생물군의 생태학적 동태를 추적(monitring)하기 위하여 bio-report 유전자인 green fluorescence protein (GFP) gene을 선발된 생물방제균주내 유전공학적으로 도입 발현시킴으로써 새로운 토양내 검증법을 개발하여 첨단적 생물방제법을 실시하기도 하였다.

6. 작물생장촉진인자를 이용한 종자코팅제 및 토양처리제

토양병은 지상부에 발생하는 병과는 달리 지금까지 개발한 어떤 농약으로도 방제가 어렵고, 병발생예찰도 불가능하다. 일단 병이 발생하면 치료가 불가능하므로 작물이 심겨지기 전에 대책을 강구해야 한다. 이때 토양병의 방제의 문제점을 극복할수 있는 대안으로 미생물 처리가 제시되어 방제연구가 다양하게 시도되었으나 현재까지 실용화된 경우는 국내외적으로 많지 않다. 최근 토양병 방제와 관련하여 작물의 성장을 촉진시켜주는 성장촉진 근권세균(PGPR, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)에 대한 연구가 진행되고 있으나 *A. tumefaciens*외의 다른 세균에 의해서는 아직 실용적인 단계에 이르지 못하고 있다. PGPR이 처리기술은 종자처리, 근권처리, 토양처리로 구분되는데 이 중 가장 효과적인 것이 종자

처리이다.

대표적인 외국의 연구결과들을 살펴보면, Auburn 대학의 Kloepper 등(1980)는 PGPR 균주들의 존재를 발표한 이래 대단위의 포장실험에서 미생물에 의해 작물의 수확량이 증가할 뿐만 아니라, 토양병을 방제할 수 있다고 보고하였고, 채소종자와 땅콩, 목화종자에 처리하는 *B. subtilis* GB03을 Kodiak이라는 상품으로 전세계에 판매하고 있다. 2000년도에는 Kloepper 등이 그동안 개발해오던 PGPR 균주 중 토양병 억제 균주와 식물에 대한 유도저항성(ISR)이 우수한 균주를 선발하여 선충을 방제할 목적으로 chitosan을 혼합하여 Biological preparation을 개발하였다. 육묘기간동안 담배, 오이 토마토의 생육이 촉진되었으며, 지상병인 오이세균성반점병, 담배노균병, 토마토케양병에 성공적으로 방제되었다고 하였다.

Arizona 대학의 Pierson 등은 밀그루썩음병을 효과적으로 방제하는 *Pseudomonas* 종이 이들이 밀도를 조절하는 autoinducer를 생산하고 이러한 물질이 균주의 항생물질 생산 유전자를 활성화한다고 보고하였다. 이러한 autoinducer를 미리 낮은 농도로 처리한다면 방제의 효율을 높일 수 있을 것이다.

미국의 Reddy M.S. 등은 PGPR 균주들을 액상으로 만들어 오이세균성반점병, 담배노균병, 토마토케양병을 방제하였는데, PGPR 균주에 의한 ISR효과를 얻는 가능성을 제시하였다.

제5차 PGPR Workshop(2000)에서는 미생물제제를 활용하기 위한 환경규제의 완화, 국제적 지적재산권보호, 제품에 대한 시장의 거부감완화와 효능에 대한 예외 적용, 각 지역별 협력자, 제품개발에 대한 성공에 대한 기대감 공유들을 합의하였다.

네덜란드의 Bloemberg, G.V 등은 *Pseudomonas* 속 세균들이 식물뿌리에 정착하기 위한 유전자를 탐색하였는데, pillin 생성을 coding하는 *pilA* 유전자와 기능성 pilus 유전자 *pilT*, O=antigen 생성과 관련된 nd 유전자 발현이 토마토 근권에 정착하는 *Pseudomonas*에서 증명되었다.

Auburn 대학의 Yan, Z 등은 PGPR균주들이 작물성장촉진 또는 유도저항성을 위해서는 10^8 /ml 이상의 농도가 필요하다고 발표하였다.

McInroy, J.A.(2000)는 옥수수종자의 발아를 촉진하는 세균에 Solid matrix priming(PMP) 처리시에 단독처리보다 50%이상 발아한다고 보고하였다.

Thomashow 등은 2,4-diacetylphloroglucinol(DAPG)을 생성하는 *P. fluorescens* Q8r1-96을 이용하여 밀의 take-all 방제효과에 의한 성장촉진효과를 증명하고 이들의 관련성을 지속적으로 연구하고 있다.

Merav Kamensky (2001) 등은 *Serratia plymuthica* IC14는 항균물질 pyrrolnitrin, siderophore를 생산하고 각종 단백질 분해효소와 chitin 분해효소를 분비하며 IAA와 같은 식물생장조절물질을 생산한다고 보고하고 있다. 오이잿빛곰팡이병과 균핵병을 방제한다고 하였다.

Boruah(2002) 등은 형광성 *Pseudomonas* 종이 생산하는 siderophore가 식물의 성장을 촉진한다고 보고하였다.

Patten(2002) 등은 *P. Putida* GR-12-2가 식물호르몬인 IAA(옥신)을 분비하여 식물 성장을 촉진한다고 보고하였다. 현재 PGPR에 의한 실용화에 적용 중이다.

특히, 전세계적으로는 *Rhizobacteria*, *Gliocladium* 및 *Trichoderma* 등의 토양미생물에 의한 식물성장촉진효과는 단편적으로 보고되어 있으나, 식물성장촉진 기작에 연구는 매우 미흡하며 이들 성장촉진효과가 뿌리근권의 식물병원균에 대한 길항작용에서 기인된 것인지 아니면 호르몬과 같은 식물성장촉진물질을 생산하기 때문인지는 명확하지 않을 뿐만 아니라, 특히 유용사상균에 의한 길항 및 식물성장촉진 기작과 관련된 유전자수준의 연구는 전무한 실정에 있다.

7. 종자의 priming 및 코팅 기술

priming은 종자를 삼투용액에 침지함으로써 종자가 수분을 흡수하게 하여 생리적 발아를 유도하는 것인데 이 priming의 효과에 대해서 여러 연구자들에 의해서 광범위하게 다루어져 왔는데 공통적으로 발아소요일수 단축과 균일한 발아 및 발아 증진에 있다. 이와 같이 priming 효과를 증진시키기 위해 priming 시 성장조절물질(Brocklehurst 등, 1983; Cantliffe, 1989; Motes, 1982), 영양물질(Davis, 1990; Thomas, 1989) 및 유용미생물(Callan 등, 1990; Hadar 등, 1983; Harman 등, 1989; Osburn과 Schroth, 1988; Rush, 1991)등과의 혼용처리에 대한 연구를 하고 있으며, 이미 외국의 종묘회사에서는 seed priming을 상업적으로 이용하고 있다.

종자 coating은 부족한 노동력 문제를 완화시킬수 있는 기계화, 유묘시 병충해 방제 등으로 우량묘 생산을 위한 방법이지만 대부분의 작물에 널리 이용될수 있는 효율적인 코팅 방법이 개발되어 있지 않은 실정이다. 종자처리시 성장조절물질, 영양물질 및 유용미생물 등과의 혼용처리에 대한 연구도 필요한 실정이며, 이미 선진국에서는 80년대 초반부터 이에 대한 연구가 이루어져 왔고 이미 90년대 초반부터는 고품질 종자를 판매하고 있다.

코팅연구자들은 종자가 발아에서 유묘에 정착하기 까지 수분결핍 및 과다 등 환경스트레스에 대해 관심을 가졌는데, 이를 시초로 수용성 폴리머가 본격적으로 종자코팅에 이용되었다(Weaver, 1976).

특히, 유용미생물을 이용한 종자코팅은 적절한 carrier와 미생물의 생존이 종자처리를 결정하는 요인인데, 미생물을 종자에 처리한 후 접착제를 사용하여 미생물의 부착성을 높이거나(Burton, 1961), 미생물을 종자에 압력이나 진공으로 주입하는 방법이 있다(Brockwell와 Hely, 1962). 1977년에는 Hale과 Mather가 접착제에 유용미생물을 첨가한 코팅종자를 산업화하였다.

우리나라에서는 아직까지 여러작물에 널리 이용될수 있는 효율적인 종자코팅 방법이 개발되고 있지 않은 실정이며, 산업화를 위한 대량코팅에 대해 축적된 노하우가 부족한 형편이다.

8. 시장 확대 가능성

생물농약은 생산비가 높고 수율이 낮고, 약효발현이 늦고, 효과발현기구가 명확하지 않으며 경엽처리에서는 생물요인(포자발아)과 비생물요인(UV, 살균제 등)에 의해 영향을 쉽게 받는 단점이 있다. 특히, 토양처리에서는 토양물리성에 의해 영향을 크게 받으며, 효과에 비해 가격이 다소 고가이고 생물체 자체로 방제하므로 저장기간이 짧고 기주 특이적이라 대상 방제 범위가 좁다. 그러나 생물농약 시장의 확대를 가능케 하는 특징으로는 천연 생물 또는 천연물질이므로 부수적 피해가 없고 환경친화적이며, 먹이사슬에 축적되지 않아 수확기까지 사용될 수 있으며, 특히, 강, 호수에 오염 없이 병해충을 방제할 수 있어 저항성 병해충 방제에도 매우 효과적이다.

이처럼 생물농약은 화학농약과는 다른 특성을 가지고 있으므로 이를 개발, 보급, 유통, 판매, 사용하기 위해서는 전 분야에서 새로운 관점으로 접근해야 한다. 따라서 초기 시장 접근이 쉬운 제품을 개발해야 하는데 화학농약과 직접 경쟁되지 않는 분야에서 효과가 우수하고, 약효 발현기간이 빠르며, 사용하기 편리하고, 저장성이 우수한 제품의 개발이 필요하고 호기심으로 사용한 소비자들이 계속 사용하도록 유도해야 한다. 생물농약 시장은 적은 면적 작물, 특이한 병해충, 토양병해충, 저항성 병해충, 농약 잔류문제로 생겨나는 시장에 적용될 수 있는 제품들이 우선 개발되는 것이 좋으며, 이렇게 개발된 제품들은 시장에 정착되기 위해서 정밀한 사용 방법이 개발·보급되어야 한다. 결론적으로 화학농약을 배제한 작물보호가 아니라 화학농약을 합리적으로 적게 사용하면서 생물농약과 교호 살포하여 화학농약 수준의 방제효과를 보여주는 환경친화적이고 저농약 재배법 보급이 생물농약 시장의 확대에 중요한 역할을 할 것으로 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다.

제 7 장 참고문헌

Anke, T., F. Oberwinkler, W. Steglich, and G. Schramm. 1977. The Strobilurins—new antifungal antibiotics from the bacidiomycetes *Strobilurus tenacellus*. *J. antibiot.* 30 : 806~810.

Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M. C., Rodolfi, L., Smith, G. D., Tredici, M. R. 2004. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(6):3313-3320.

Burges, H. D. 1998. Formulation of microbial biopesticides : Beneficial microorganism, nematodes, and seed treatments. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, Boston. London.

Butters, J. A., S. J. Kendall, I. E. Wheeler, and D. W. Hollomon. 1995. Tubulins: lessons from existing products that can be applied to target new antifungals, p. 131-142. In G. K. Dixon, L. G. Copping and D. W. Hollomon (eds). *Antifungal agents -Discovery and Mode of action*, Bios Scientific Publisher, Oxford.

Cook, R. J. and Baker, K. F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. APS. St. Paul, Minnesota. 539pp.

Dandurand, L. M., Mosher, R. D. and Knudsen, G. R. 2000. Combined effects of Brassica napus seed meal and *Trichoderma harzianum* on two soilborne plant pathogens. *Can. J. Microbiol.* 46(11): 1051-1057

David K Rodham, 1999 David K Rodham, Youlin Wang, John B Cantwell, Peter DWinn and Jill Founding, 1999. Formulation Microcontrol agentst, *Pestic Sci.* 55: 340-342

Deborah R. Fravel, William J. Connick jr and Jack A. Lewis. Formulation of

microorganisms control plant diseases. Formulation of microbial biopesticides. 187-202pp.

Dunne, C., Crowley, J. J., Monne-Loccoz, Y., Dowling, D. N., de Bruijn, F.J. and O'Gara, F. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* 143:3921-3931

Fruh, T., C., P., E., J. and farooq, S. 1996. Natural products as pesticides: Two examples of stereo selective synthesis. *Pestic. sci.* 46:37-47.

Fruh, T., Chemla, P., Ehrler, J. and Farooq, S. 1996. Natural products as pesticides: Two examples of stereo selective synthesis. *Pestic. sci.* 46: 37-47.

Gerth, K., N. bedrof, H. Irschik, G. Hofle, and H. Reichenbath. 1994. The Soraphens: A family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum*. I. Soraphen A: Fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* 47: 23~31.

Giesler, L. J. and Yuen, G. Y. 1998 Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease. *Crop Prot.* 17:509-51

Gutterson, N. 1990. Microbial fungicides: Recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 69-91.

Hausbeck, M. K. and Moorman, G.W. 1996. Managing *Botrytis* in green house-grown flower crops. *Plant Dis.* 80:1212-1219

Herr, L. J. 1992. Characteristic of *Rhizoctonia* isolates associated with bottom rot of lettuce in organic soils in Ohio. *Phytopathology* 82:1046-1050.

Ilan C and Leonid, C. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple

mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 35:

Jack A. L. and Robert, P. L. 2001. Biological control of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Protectio.* 20: 49-56.

Jack A. Lewis and Robert P. Larkin. 1998. Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce Damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Biological Control*, 12(3):182-190

Jack A. L. and Robert, P. L. 2001. Biological control of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Protectio.* 20: 49-56.

Jack, A. L. and Robert P. L. 1998. Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce Damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Biological Control.* 12(3): 182-190.

Kim, C. H., Jee, H. J., Park, K. S. and Lee, E. J. 1990. Studies on biological control of Phytophthora blight of red-pepper V. Performance of antagonistic agents in fields. *Korean J. Plant Pathol.* 6(2):201-206.

Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A.J. Heaney, S. P., Murray, D.C., Powell, K. A., Schulz, M.A., sinks, C.A., Worthington, P. A. and Youle, D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 349-372.

Li, G. Q. Huang, H. C. and Acharya, S. N. 2003. Antagonism and biocontrol potential of

Ulocladium atrum on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 28: 11-18.

Lumsden, R.D., J.A. Lewis, and D.R. Fravel. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. pp. 162~182. in: Biorational pest control agents formulation and delivery(F.R. Hall and J.W. Barry, eds). American Chemical Society, Washington DC.

Mordue, J. E. M. 1972. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 513. Motes 등, 1982

Nakamura, L. K. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizisenii* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1121-1215.

Norberto J. P. and John F. B.. 1993. *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bact.* 606-609

Parmeter 1969 Parmeter, J. R. Jr., Sherwood, R. T. and Platt, W. D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59:1270-1278.

Pedras, M. S., Ismail, N., Quail, J. W., Boyetchko, S. M. 2003. Structure, chemistry, and biological activity of pseudophomins A and B, new cyclic lipodepsipeptides isolated from the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry* 62(7): 1105-1114.

Peter W. W., 1987 Peter W. W., 1987. Studies on *Rhizoctonia solani* causing bottom rot of lettuce. B. Sc(Hons)(Leeds). 134p.

Peter William Wareing, 1987, Kim, 1993 Peter W. W., 1987. Studies on *Rhizoctonia solani* causing bottom rot of lettuce. B. Sc(Hons)(Leeds). 134p.

Whipps, J. M. and Gerlagh, M. 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycol. Res.*96: 897-907.

Yun D. J., Y. Zhao, J. M. Pardo, M. L. Narasimhan, B. damasz, H. Lee, L. R. Abad, M.P. D'Urazo, P.M. Hasegawa, and R.A. Bressan. 1997. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. USA.* 94: 7082~7078.

김완규. 1995. 작물 라이족토니아병 진단 및 방제. 농업과학기술원 작물 보호부 병리과. 167pp.

김현주, 박종영, 백정우, 이진우, 정순재, 문병주. 2004. *Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밑등썩음병(Bottom rot)의 발생과 병원성. *식물병연구* 14(4):689-695.

농경과원예사. 2001. 농경과 원예, 1:62-77

농림부, 2001 농림부. 2001. 친환경농업 5개년계획. 105pp.

농촌진흥청. 1998. 시험연구사업보고서, 고령지농업시험장.

농촌진흥청. 2000. 시험연구사업보고서, 고령지농업시험장.

문병주, 김철승, 송주희, 김현주, 이재필, 박현철, 신동범. 2002. 들깨 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제 II. 미생물농약의 제조 및 그 방제효과. *식물병연구*. 8(3):184-188.

문병주, 2002. *Botrytis cinerea*제어용 환경친화적 미생물농약개발 및 실용화 농림부. 203p

문병주, 노성환, 손영준, 강형석, 이재필, 김병섭, 정대수. 1998. *Botrytis cinerea*에 의한 들깨

갯빛곰팡이병의 발생. 한국식물병리학회지 14(5): 467-472 .

안준철, 정영재, 김성호, 김용식, 여문환, 황백, 송형철, 유광재, 김정우. 2001. 키토산올리고당이 주요 종자의 발아와 in vitro 유식물의 생육에 미치는 효과, 한국

유태용 1997, 음식과 궁합. 도서출판 동지, 서울. 255pp.

이재필, 손지희, 노성환, 손영준, 문병주. 2002. *Bacillus megaterium* N4 를 이용한 들깨 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)의 생물학적 방제. 균학회소식 12(1): 73p.

정영륜, 신원교, 강수웅. 1993. 시설원에 작물의 갯빛곰팡이병 방제용 미생물농약 개발. 경남 농촌진흥원 연구보고서. 24pp.

제주도농업기술원, 2000. 주요소득작물 재배기술. 새로운 제주 농업 제42호 12월. 19-32.

문병주, 노성환, 손영준, 강형석, 이재필, 김병섭, 정대수. 1998. *Botrytis cinerea*에 의한 들깨 갯빛곰팡이병의 발생. 한국식물병리학회지 14(5): 467-472.

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 아니됩니다.