

GOVP1200608881

최 종  
연구보고서

# 벼모싹음병의 생물학적 방제 기술 개발

Development of Technology for Biological  
Control of Seedling Disease  
in Water-Seeded Rice

연구 기관

건국대학교  
(작물과학원)

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “벼모썩음병의 생물학적 방제 기술 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 천 세 철

연 구 원 : 심 정 보

연 구 원 : 김 유 석

협동연구책임자 : 최 경 진

연 구 원 : 박 태 식

연 구 원 : 이 상 복

# 요 약 문

## I. 제 목

1. 과제명: 벼모식음병의 생물학적 방제 기술 개발

가. 세부과제명

벼모식음병의 생물학적 방제기술 개발

나. 협동과제명

벼모식음병 저항성 유전자원 평가 및 선발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라의 쌀 생산은 주로 육묘과정을 거친 후 기계이앙을 하는 재배방식을 통하여 다수확 위주로 이루어져 왔으나 WTO의 개방체제에 따라 정부의 수곡가에 대한 제한으로 쌀의 생산도 비용의 발생 및 이익의 측면에서 고려되어야 할 시점에 이르렀다. 최근 정부에서도 소규모 농지의 면적을 감소시키고 쌀의 가격을 낮추려는 정책을 추진하고 있어 농가가 소유하는 농지면적이 보다 대규모화로 되면서 생산비용을 절감하는 측면에서 직파재배의 면적이 증가될 추세에 있다. 담수직파재배는 여러 가지의 장점을 가지고 있다. 모내기에 의한 이앙재배는 약 한달 이상 육묘기간을 거치고 키운 모를 다시 본답에 이앙하게 되는데 담수직파를 하면 육묘 및 이앙에 소요되는 막대한 노동과 비용을 절감할 수 있다.

상기와 같은 담수직파재배의 장점에도 불구하고 직파를 하게 되면 파종된 많은 량의 종자가 모식음병에 감염되며 일반적으로 정상적인 출아율은 약 60% 내외가 될 뿐 아니라 입모가 불균일하여 농가에서 도입을 기피하고 있는 실정이다. 그러나 지역에 따라 모식음병에 관여하는 병원균의 종류나 분포에 대한 연구뿐 아니라, 친환경적인 생물학적 방제, 저항성 유전자원 등에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

최근 농약으로 인한 환경 오염과 식품 안정성 차원에서 생물학적 방제에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히 벼 재배에 있어서 농약의 과다한 사용은 수질과 자연 생태계를 직접적으로 오염시키기 때문에 생물학적 방제는 친환경적인 농업의 한 대안으로서 그 의의가 크다 하겠다.

모식음병균과 같은 토양균에 대한 생물학적 방제는 근권과 가장 관련이 깊다. 근권(뿌리권)이란 식물의 뿌리에 의하여 가장 영향을 많이 받는 토양이라고 정의할 수 있다. 뿌리부터의 누출(exudate)은 세균과 곰팡이를 포함하여 미생물의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 생물학적 방제를 위하여는 영양 요구성이 다양하고, 성장이 빠르고, 또한 일부 세균들은 식물병원균에 대하여 억제효과를 가지기 때문에

세균에 특히 관심을 갖고 생물학적 방제 균주를 분리하고자 한다. 생물학적 방제가 때로는 그 결과가 균일하지 못할 때도 있지만 세균 생물학적 방제 균주를 사용하여 뿌리를 침해하는 식물병원균을 성공적으로 방제한 사례가 매우 많이 있다 (Weller, 1988).

생물학적 방제의 가장 큰 단점 중의 하나인 그 효과가 장소와 시간에 따라 불규칙적이라는 것이다. 최근에 이러한 결점을 보완하기 위하여 여러 방제균주를 혼합하여 쓰거나 살균제와 혼용할 수 있는 균을 선발하여 농약의 사용량을 줄이고자 하는 노력이 이루어져 왔다. 최근 모썽음병에 대한 생물학적 방제의 효과를 증진시키기 위하여 방제균과 식물병원균의 탄소이용도 연구를 하여 방제균만이 잘 이용하는 탄소원을 첨가하여 준 결과 효과를 크게 증진시켰으며 (Chun, 1997), Colbert 등은 (1993) salicylate을 잘 이용하도록 유전적으로 조작된 *Pseudomonas putida* R20 (NAH7)의 밀도가 salicylate를 첨가하여 주면 그렇지 않은 토양에 비하여 현저히 증가하였다고 보고하였다. Janisiewicz 등은 (1992) 사과와 푸른곰팡이병의 생물학적 방제균의 효과를 증진시키기 위하여 방제균주에 의해서만 잘 이용되는 질소원을 첨가하여 준 결과 병의 발생정도를 효과적으로 감소시킬 수 있다고 하였다.

우리 나라에서도 생물학적 방제에 대한 연구가 많이 되어왔지만 주로 균주의 선발 등에 많은 노력이 집중되었고, 특히 탄소원 등의 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진에 관한 연구, 제제 종류에 따른 생존 기간, 처리한 생물학적 방제균주 등의 환경에서 모니터링 등에 대한 연구가 매우 미진하다.

본 연구에서는 담수직파재배시 발생하는 모썽음병의 원인 구명하고 생물학적 방제균 분리 및 동정하고 생물적 방제균에 의해서만 잘 이용되는 탄소원을 선발하여 방제균의 분말에 첨가하여 생물학적 방제 효과를 증진시키고, 한편으로는 모썽음병에 대한 재래종, 잡초성벼, 야생종 및 재배품종의 저항성 평가 및 선발을 통하여 담수산과 재배시 균일한 입모를 갖을 수 있는 저항성 유전자원을 확보하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1) 제 1세부과제: 벼모썽음병의 병원학 및 생물학 방제 기술 개발

##### ○ 병원균의 분리, 분류 동정 및 분포 조사

담수직파재배시 발생하는 모썽음병의 병원균을 서산간척지 등 우리나라의 여러 재배 지역에서 이병 샘플을 채취하여 *Pythium* 등의 병원균을 선택배지를

사용하여 분리하고 corn meal agar에 보관 유지하면서 병원성을 조사하고 병원성이 있는 균주들에 대하여 Plaats-Niterink (1981) 등의 문헌을 참조하여 병원균을 분류 동정하였다.

#### ○ 생물학적 방제균주의 분리 및 선발, 방제효과의 증진

담수직과재배 지역에서 특히 병 발생이 억제되는 곳에서 토양, 뿌리, 종자를 수집하고 *Pythium* 등의 모썩음병균에 대하여 항균 활성을 보이면서 벼 종자, 싹, 뿌리에 잘 정착하는 세균을 풍부하게 만든 후 분리하였다. 특히 방제 세균들은 환경 내성이 매우 강한 내생포자를 생성할 수 있는 *Bacillus* 등을 위주로 선발하였다. 병원성이 큰 균주들과 생물학적 방제 효과를 나타내는 균주 들에 대하여 Chun (1997) 등의 *Bacillus* 와 *Pythium* 등에 SFT, SFP, YT Biolog microplate (Biolog INC, USA) 등을 통한 탄소원 이용도에 대한 자료에 근거하여 *Bacillus* 들에 의해서 잘 이용되는 탄소원들을 Claus (Sneath, 1986)의 기본배지를 사용하여 검증을 하여서 생물학적 방제 처리시 첨가하여 증진 효과를 구명하였다. 종자에 처리하는 방법으로서서는 최아 과정에 방제 균주를 처리하는 방법과 종자 coating하는 방법을 사용하였다.

#### ○ 포장시험

건국대학교 경기도 여주 벼 재배 시험장 담수직과재배 포장에서 생장실과 온실에서 효과가 탁월한 균주들만을 대상으로 하고 종자에 대한 생물학적 방제 균주의 처리는 생장실과 온실에서와 같은 방법으로 하였고 모든 실험은 **작물** 과학원 벼 시험포장에서 1회 이상 반복하여 입모율과 수확량을 조사하였다.

#### ○ 환경 모니터링

방제 효과가 우수한 균주에 대하여 리팜피신 저항성 돌연변이균을 선발하여 수대의 계대배양을 통해 저항성 형질이 안정적으로 유전되는지 조사한 후, 종자에 처리하여 파종한 후 일정 간격으로 샘플을 회수하여 dilution plate 법으로 세균이 종자에서 얼마 동안 높은 밀도를 유지하는지 모니터링하였다.

#### ○ 고품형 제제

생물학적 방제 균주를 위한 제제(formulations)로는 talc, perlite, zeolite 등을 이용하여 고품형 제제를 제조하고 온도별 기간별로 생존력 검정을 실시하였다.

### 2) 제 2세부과제: 벼모썩음병 저항성 유전자원의 선발

#### ○ 유전자원의 평가 및 선발

종자를 발아시켜 담수직과한 포트에 병원성이 확인된 순수 분리된 *Pythium*, 세균 등의 모썩음병균을 접종하고 국내 재래종, 국내 장려품종, 통일형 품종, 북한벼 품종과 일본, 미국 및 이탈리아에서 수집한 벼 품종, 국제미작연구소에서 개발한 indica 계통 등 168 품종 및 계통을 파종하여 인공기상연구동에서 선발

하고, 그 중에서 저항성이 우수하다고 판단된 품종 및 담수직파 적응성이라고 인정된 품종에 대해 최종년도에 포장 실험을 하여 평가하였다.

○ 포장실험

인공기상연구동에서 2년에 걸쳐 조사, 선발된 품종 및 담수직파재배에 적응성이 있다고 인정된 품종에 대해 m<sup>2</sup>당 420개의 발아된 종자를 점파하였는데 실험은 완전임의배치 6반복으로 수행하였다.

○ 모썩음병 발생 환경 구명

작물시험장 인공기상연구동을 활용하여 처리온도 및 담수깊이별로 모썩음병의 발생정도를 구명하여 모썩음병이 선호하는 환경을 조사함

○ 담수직파종자의 입모와 모썩음병과의 관련성

생육환경에 따른 담수직파된 벼종자의 출아, 입모정도, 입모충실도 등과 모썩음병 발병과의 관련성을 조사하여 환경에 따른 상호 선호성 정도를 연구

○ 모썩음병 저항성 생리 연구

모썩음병에 저항성인 품종과 약했던 품종에 대한 종자의 주요 형질을 파악하고 모썩음병 저항성과 관련된 종자생리 연구

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구결과

#### 1) 제1세부과제: 벼모썩음병의 병원학 및 생물학적 방제 효과

##### 가. 벼모썩음병의 분리

**Pythium의 분리.** 서산, 여주, 광주 송정리 및 경남 사천, 전남 해남, 나주, 충남 익산 등지의 직파재배지의 샘플 및 토양에 벼씨종자를 파종 후 병에 걸린 것을 바로 PV배지에 치상하여 각각 총 100개의 *Pythium*을 분리하였다.

**Fusarium의 분리.** 종자를 치상한 Water agar에서 자라나는 일부 균들은 PDA에서 자라면서 pink색의 콜로니를 나타내는 것들에 PDA에 이식한 결과 pink색의 콜로니를 나타내는 균에 대하여는 1/2 strength의 PDA나 V8 주스 배지에서 28℃에 7일간 항온한 후 대형포자(macroconidia)의 형성 유무를 관찰하여 *Fusarium* 균으로 분리하였다.

##### 나. 병원성 조사

현재까지 조사한 *Pythium* 분리균주 100개들은 담수직파시 모썩음병을 일

으며 입모율이 0 ~ 40%로 무접종구의 58-94% 입모율에 비하여 현저히 감소하였다. *Pythium* P136, P140, KASPII-03, 09 등 몇 개의 균주들은 입모율이 0%-3%로 병원성이 매우 강하였지만 일부 *Pythium* p133과 p134 등은 병원성이 다소 약한 것으로 조사되었고 YB21 등 일부 균주는 병원성이 없었다.

분리된 *Fusarium* 균들은 담수상태에서는 병원성이 없었으나 담수하지 않은 상태에서 접종할 경우 종자가 발아한 이후 입모에 병을 일으켰다. 그러나, 뜻밖에도 *Fusarium* F128, F151은 오히려 입모율을 촉진시켰다. 이중에서도 *Fusarium* F151은 담수에서는 입모를 촉진하였으나 담수하지 않은 상태에서는 모썩음증상을 일으켰지만, *Fusarium* F128은 담수하지 않은 상태에서도 모썩음증상을 일으키지 않으면서도 담수시에는 입모율을 현저히 증가시켜서 비병원성 *Fusarium* 생물학적 방제균으로서 매우 성공 가능성이 높음을 암시하여 주었다. 기타 2개의 *Fusarium* 균들은 입모율이 30~34%로 무접종구의 40% 입모율과 비교하였을 때와 현저한 차이가 없었다. 종자를 포자현탁액에 침지한 후 test tube의 water agar에 파종한 후 담수하지 않았을 때는 *Fusarium* F151, F188 접종처리는 발아후 2주후에는 감염된 어린모가 각각 70, 78%로 무접종구의 6%에 비하여 현저히 모썩음증상이 증가되어서 건전 입모가 현저히 감소하였다.

#### 다. *Pythium*의 동정

Plaats-Niterink의 문헌을 참고로 하여 지난해의 병원성이 강한 것으로 확인이 된 서산 분리균 P140, P136, P139은 *P. aquatile*, 광주에서 분리된 KASPII-04, 05, KBP-01, 02, 03, 04 균주들은 *P. pulchrum*, 사천에서 분리된 SH-01, 03 및 SL-01, 02, 03은 *P. rostratum*으로 동정되었다. 기타 균주들은 유성기관인 난포자를 형성하지 않아서 동정할 수가 없었다.

#### 라. 생물학적 방제 효과

생물학적 방제 효과가 우수한 *Bacillus cereus* D324, *B. cereus* D302, *B. cereus* D303, *B. cereus* D311, *B. marisflavi* D313, *B. marisflavi* D315, *B. marisflavi* D301, *B. marisflavi* D310, *B. macroides* D305, *B. cephaericus* D323, *B. megaterium* 031702 (이상 *Bacillus* 12종), 기타 미동정된 57개 균주들을 선발하였다. 특히 *Bacillus cereus* D324는 무접종구의 입모율 92%와 유사한 80%의 입모율을 보여주어 생물적 방제 효과가 우수하여 특히 출원이 가능한 균주로 생각되었다.

#### 마. 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발

세균들만이 잘 이용하고 *Pythium* 종들은 이용하지 못하는 탄소원으로 세균들마다 약간의 차이가 있었으며, *Pythium* 종은 일반적으로 Mannitol, Sorbitol, Lactose, D-galactose 등을 잘 이용하지 못하였으나 D308, D316, D324 등 생물학적 방제균은 이들 탄소원을 잘 이용할 수 있었다. 이러한 탄소원들은 생물학적 방제 효과의 증진을 위해 다음 시험에서 사용되어졌다. 각각의 탄소원에 대한 세균의 이용 정도는 세균의 종류에 따라 다양한 차이가 있었다. Glucose, Proline 등은 *Pythium* 종들이 잘 이용할 수 있었으며, Glucose는 세균과 *Pythium* 종들이 모두 잘 이용하는 탄소원들이었다.

#### 바. 분말제제의 생존력 검정

1개월 보관 결과, 대부분의 선발된 생물학적 방제균주들은 초기에 비하여 농도가 감소하였지만 분말제제 1 그람 당 농도는 여전히 생물학적 방제 효과를 달성하기 위해서 필요한  $10^7 - 10^9$ (CFU, colony forming unit)의 균체수를 가지고 있었다. 분말제제의 12개월 보관후 세균의 수는 5 °C에서 가장 많았다. 세균에 따라서 균체수의 감소는 달랐는데, 특히 그람음성균의 균체수의 감소가 가장 컸었다. 그러나 그람 양성균 D324등은 talc 고형제제에서 농도가 초기에 비하여도 크게 감소하지 않았다.

#### 사. 생물학적 방제 효과의 증진

*Bacillus cereus* D324에 D-sorbitol, D-Mannitol, D-Alanine, D-galactose와 같은 탄소원을 첨가한 분말로 종자를 분의한 것은 세균만을 처리한 것의 입모율(36%) 보다도 입모율을 64-74%로 현저히 증가시켰다. 따라서 생물적 방제균만이 잘 이용하는 D-sorbitol, D-galactose, D-Mannitol, D-Alanine을 생물제제에 첨가하여주면 생물학적 방제 효과를 크게 증진할 수 있음을 제시하여 주었다.

#### 2) 제2세부과제:벼모썩음병의 저항성유전자원의 평가및선발

1. 모썩음병 병원균 접종으로 벼 담수직과 종자의 감염을 판단할 수 있는 최적 조건의 환경은 처리온도 24°C, 담수깊이는 4cm이었지만 우리나라의 중부지역 벼 담수직과 시기로 볼 때 21°C 및 담수깊이는 4cm가 적당한 것으로 사료되었다.
2. 온도와 담수깊이를 제외한 모썩음병의 발생요인 중 차광조건은 효과가 미미하였으나 토양내의 모썩음 병원균의 존재 여부는 매우 중요한 요인이었다.
3. 벼 품종 중 담수직과에 유리한 품종으로 판단할 수 있는 기준은 모썩음병에 강하고 출아율이 높으며 착근율이 좋은 품종으로 나타났으며 실험에 사용된 품종 중

이 조건에 부합되는 품종은 우리나라에서 개발한 농립나1호, 금남벼, 미향벼, 향미벼1호, 설향찰벼, 흑진주벼, 화봉벼 및 농호벼 등이었고 미국의 M-201이 우수한 품종으로 나타났다.

4. 벼 담수직파시 포장조건에서의 입모정도는 품종에 따른 차이는 크게 나타났지만 모썩음 병원균의 접종여부는 효과가 적었는데, 이는 작물과학원 실험포장이 담수 표면직파가 최초로 시행되어서 모잘록병균의 밀도가 낮았고, 균을 인위적으로 접종한다 하여도 벼포장에서 벼의 출아 및 입모는 품종의 특성과 토양내의 병원균, 미생물, 수분상태 및 기상조건 등 종합적인 환경에 영향을 크게 받았기 때문으로 사료되었다.
5. 모썩음병에 강하다고 판단되었던 품종들의 생리적 특성은 약하다고 판단된 품종들 보다 발아 후 배유의 소모량이 많았고 탄수화물을 분해하는 효소인  $\alpha$ -amylase 활력이 높았다.

## 2. 결과활용에 대한 건의

1. 벼 모썩음병을 일으키는 병원성 *Pythium* 종은 담수직파재배지에서는 국내에서 처음 분리되었다. 따라서 병원균의 종류와 균을 분리하는 선택배지 이용 방법은 벼모썩음병 연구를 위한 연구자에 좋은 정보가 될 것이다. 벼썩음병의 균을 분리하지 못하여 벼모썩음병의 원인이 세균 또는 토양물리화학적 원인으로 생각기도 하였다.
- 2 D-sorbitol, D-Mannitol, D-galactose과 같은 특정한 탄소원을 생물학적 방제균과 함께 코팅하는 기술과 특정 탄소원 첨가에 의하여 생물적 방제 효과가 증진될 수 있었기 때문에 이러한 연구결과는 타작물의 생물농약개발에 참고가 될 수 있을 것이므로 국내 생물 농약 개발 회사에 그 연구 결과를 제공할 것이다.
- 3 *B. cereus* D324, *B. cereus* D302, *B. cereus* D303 등은 특허 신청하고 이러한 생물학적 방제균이 타 작물의 식물병에도 방제 효과가 있는지 조사될 것이다.
- 4 Talc, Zeolite, Perilte 등을 이용한 제제의 분말제조 방법은 생물농약회사에 생물농약제조 정보로서 제공될 것이다. 분말로 된 생물 농약의 보조 효과가 1년 정도 되어서 분말제제의 보조성분으로 사용될 수 있을 것이다.
- 5 벼 품종 중 담수직파에 유리한 품종으로서 모썩음병에 강하고 출아율이 높으며 착근율이 좋은 품종은 우리나라에서 개발한 농립나1호, 금남벼, 미향벼, 향미벼1호, 설향찰벼, 흑진주벼, 화봉벼 및 농호벼 등이었고 미국의 M-201이 우수한 품종으로 나타났다. 이 자료는 벼썩음병 저항성 육종에 자료가 될 수 있도록 육종 연구자나 관계 기관에 건의할 것이다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of technology for biological control of rice seedling disease

## II. Objectives and significance

Rice was cultivated through mechanical transplanting after seedlings were grown in nursery bed for the high grain yield. However it is time to reconsider the high grain yield as the first priority under free trade trend leaded by WTO. Now rice production should be considered based on cost and net profit.

### A. Significance

- Recently, government guides farmers to produce rice in big size of rice field and rice faces low price due to rice import by MMA. The massive production will consider water-seeded rice system for reduction of production cost.
- Water-seeded rice has several advantages such as less weeds through flooding and low cost for cultivation compared with mechanical transplanting that requires seed bed preparation.
- Although water-seeded rice have several advantages, seedling diseases is one of major problems causing irregular seedling stands. However, there is no researches on the etiology of this disease of water-seeded rice, biological control and resistant genetic resources. Biological control of seedling disease and disease resistant genetic resources for water-seeded rice is necessary.

### 1) Technology aspect

- *Pythium* spp. have been isolated from seed bed and transplanted rice seedling in certain areas in Korea and their pathogenicity was confirmed (Lee et al., 1978; Sung et al., 1983). Study on etiology of seedling disease in water-seeded rice never have been conducted. Seedling diseases were reported to be caused by *Achlya*, *Fusarium* and certain bacteria in addition

to *Pythium* spp. It needs to be studied on distribution of pathogens causing seedling diseases depending regions using selective media for these pathogens.

- Interest on biological control has been increased for reduction of the environmental contamination and food safety because of chemical pesticides. Water-seeded rice has ideal system for biological control of seedling disease. Water-seeded rice has been increased but researches on biological control of seedling disease in water-seeded rice and formulation has not been conducted much.
- Metalaxyl is a effective fungicide on oomycetes fungi including water mold causing seedling disease and fungicide resistant isolates are readily occurred. There has been no report on resistant rice against seedling disease in the world.
- Recent study reported that certain weedy rice showed very strong resistant to seedling disease (Jun, personal communication). Selection of resistant rice cultivars could provide genetic resources and this could be utilized for breeding of resistant cultivars.

## **2) Economical aspect**

- Rice will be still main food grain of our country even though rice market will be open by the agreement under Uruguay Round (trade pact) of WTO. Thus, water-seeded rice might be the most appropriate method of rice cultivation with large land scale.
- If we maintain quality and name value of rice, our rice may be still competitive to foreign import rice. Stable rice production is so important to economy of Korea that we should maintain appropriate production. In this respect, water-seeded could be one of alternatives that could provide better competition to manage importation of foreign rice. It will be significant that stable security of seedling stands will be most important in water-seeded rice for stable production of rice. Also, selection of resistant genetic resource against rice seedling disease will be important.

## **3) Social and cultural aspect**

- Rice cultivation contributes to not only the security of foodstuff but also control of flooding, clarification of environment, and conservation of culture. Rice could be utilized to make traditional food and drink. In order to secure of stable rice production, more competitive cultivation method of rice like water-seeded rice should be spread, thus technology in relation to rice cultivation should be developed.

## **B. Background and problems of domestic and foreign technology**

Rice seedling disease has becoming a problem since water-seeded rice was spread. However, etiology of this disease is not well studied. Biological control could be an alternative as an friendly environment agriculture for reduction of the environmental and water contamination, and food safety because of chemical pesticides. Biological control has been studied in also Korea and selection of biocontrol agents was focused mainly but there has been not much study on increase of efficacy of biological control agent, formulation and monitoring of biological control agents.

## **C. Rationales for importation of technology**

Biological control agents are based on the biology of the organism which distributed and adapted differently depending on the region and location. Therefore importation of technology is meaningless. Resistant cultivars against seedling disease never have been reported in the world. Thus we will have advantages over other countries in the development of breeding technology for resistant cultivars and gene discovery.

## **D. Objectives**

- Etiology of rice seedling disease in water-seeded rice. Searching on the causes of seedling disease.
- Isolation of pathogens of seedling disease and its identification.
- Isolation of biological control agent and identification, efficacy test.
- Study on the utilization profile of carbon sources
- Increase of efficacy of biological control by amending carbon sources.
- Viability test of formulation depending on the storage temperature and periods

- Monitoring of biological control agents
- Study on the incidence of seedling disease depending on the water depth and temperature
- Interaction of seedling germination environment and seedling disease incidence
- Selection and evaluation of the conventional variety, weedy and wild rice and cultivation variety against seedling disease
- Seed physiology in relation to resistant variety and susceptible varieties

### III. Contents and scope of research

#### 1) First subject: Etiology and development of biological control technology of rice seedling disease

##### ○ Isolation and identification, distribution of pathogen

Seedlings showing symptoms was taken from Seosan, Yeosu, Gwanju, and samples were plated on the selective media for oomycetes such as *Pythium*. Pure isolates showing pathogenicity were grown and maintained to be further identified according to Plaats-Niterink (1981).

##### ○ Isolation and selection of biocontrol agents and increase of efficacy of biocontrol

Seeds, seedling, roots, soil of water-seeded rice were taken to isolate bacterial biocontrol agents. Specifically spore forming bacteria of *Bacillus* were selected to further study on carbon utilization. Differential carbon utilization of *Bacillus* spp. and *Pythium* spp. were conducted in the basal media of Claus (Sneath, 1986) amended with different carbon sources based on the study of Chun (1997). Seeds coated with specific carbon sources were tested for increase of efficacy of biological control.

##### ○ Field test

Field tests were conducted in rice field plot of Rural Development of Agricultural Administration and rice field of Yeosu experimental station of Konkuk University. Only the isolates shown good biocontrol activity were tested. Seedling emergence and yield was determined.

##### ○ Monitoring

Rifampicin mutants of *Bacillus* D324 were selected to study population dynamics. Mutants were transferred to rifampicin non-amended media of tryptic soy agar for ten times if the mutants were stable. Seeds coated with mutants were planted in the growth chamber and population of the bacteria were determined by dilution plate techniques around seeds.

#### ○ **Formulation**

Formulations for the bacteria were talc, zeolite, perlites. Viability of the bacteria in the formulations were tested depending on the storage temperature and periods.

### 2) **Second subject: Selection of resistant genetic resource to seedling disease**

#### ○ **Evaluation and selection**

168 varieties of rices were tested for resistance to *Pythium* spp. inoculated in phytotron for 2 years at 21°C. The best varieties were tested in the field

#### ○ **Field test**

Good rice varieties selected in previous year's test in phytotron and some varieties which were known to suitable in direct seeding method were tested in field condition for resistance against rice seedling disease. The test was conducted by completely randomized design in six replications.

#### ○ **Ecology of seedling disease**

Effect of temperature and water depth on seedling disease were investigated in phytotron.

#### ○ **Relation of completeness of seedlings and seedling disease**

Effect of seedling emergence and completeness of seedlings on seedling disease were analysed in relation to environment.

## ○ Study of seed physiology in relation to seedling disease

Traits and characteristics of resistant and susceptible varieties were investigated in relation to seedling disease with regard to seed physiology.

## IV. Results, utilization and recommendation

### 1. Results

#### 1) First subject: Etiology and developmet of biological control technology of rice seedling disease

##### A. Isolation of *Pythium* and *Fusarium*

Total 100 *Pythium* spp. were isolated from diseased seedlings or soils of Seosan, Yeosu, Icheon, Kwanju, Naju, Haenam, Iksan, Sachun on PV media. Several fungi showing pink color in the PDA were identified as *Fusarium* spp. which made macroconidia.

##### B. Pathogenicity

Some of *Pythium* spp. like KSPII-09 among 100 isolates showed strong virulence, resulting in 0-40% seedling emergence compared to 58-94% noninoculated ones. Also, some of isolates was not pathogenic to rice seedling.

*Fusarium* spp. isolated did not show pathogenicity but they infected seedlings planting in water agar. *Fusarium* F128 did not cause seedling disease but increased seedling emergence in water-seeded rice. Thus *Fusarium* F128 was considered as a non-pathogenic *Fusarium* sp.

##### C. Identification of *Pythium*

Isolates were identified as *Pythium aquatile*, *P. pulchrum*, *P. rostratum* according to Plaats-Niterink. Other isolates could not be identified because they did not develop sexual spores in cleared V8 juice agar amended with  $\beta$ -sitosterol.

##### D. Biological control

Twenty six isolates of total 57 bacteria including *Bacillus cereus* D324 and 0330201 increased seedling emergence significantly compared to untreated seeds with bacterial suspension. Inoculation with *Pythium* spp. reduced seedling emergence by 24–64%. However bacterial treatment to seeds reduced seedling emergence by 34–80% compared to 49–92% of the noninoculated. *Bacillus* D324 which was one of best biological control agents was used as an model organism for further carbon utilization study in relation to increase efficacy of biocontrol activity.

#### **E. Selection of specific carbon sources for biological control**

There was a difference in carbon utilization between *Pythium* spp. and biological agents. We could find specific carbon sources that could be only utilized by biological control agents but not by the *Pythium* spp. In general *Pythium* spp. could not utilize oligosaccharides such as mannitol, sorbitol, lactose, D-galactose but bacterial biocontrol agents could utilized well. Glucose and proline were utilized well by *Pythium* spp. Glucose were well utilized by both of bacterial biocontrol agents and *Pythium* spp.

#### **F. Viability of formulation**

Most biocontrol agents in the formulation of talc, zeolite and perlite were significantly reduced to  $10^7 - 10^9$ (CFU, colony forming unit)/g formulation at one month after storage at every temperatures of 5, 25, 30°C. After reduction at one month of storage, population of most gram positive bacteria maintained stable population upto one year at 5 °C. Specially population of gram negative bacteria were significantly reduced at one year after storage at 30°C compared to gram positive bacteria.

#### **G. Increase of efficacy of biological control**

Amendment of carbon sources such as sorbitol and galactose specifically utilized by only bacterial biocontrol agents onto seeds significantly increased seedling emergence in water-seeded rice compared to the untreated. Also, in field

trial, amendment of carbon sources significantly increased seedling emergence.

## 2. Utilization and recommendation

1. Information on *Pythium* species causing seedling diseases and selective media for *Pythium* will be useful for researcher who study on seedling rot of rice. *Pythium* species never have been isolated in water-seeded rice in several areas in Korea. It was thought that seedling rot in water-seeded rice in Korea was occurred by other causes such as bacteria and soil chemistry.
2. Fifty seven strains including *Bacillus cereus* D324 and *B. cereus* D 302 were selected as good biological control agents. When seeds were coated with D-sorbitol, D-Mannitol, D-galactose utilized well by biocontrol agents, seedling emergence were significantly increased compared with only biocontrol agents coated seeds without those specific carbon sources. The specific carbon sources could be applied to the control of other plant disease and these results and formulation methods will be delivered to industries.
3. *Bacillus cereus* D324, *B. cereus* D 302 and *B. cereus* D303 will be applied for patent and these strains will be tested for the control of other plant disease.
4. Talc, zeolites, perlite were evaluated as appropriate formulation inert components. Bacteria could be survived well enough for biological control.
5. Good rice cultivars showing resistance to seedling rot, high emergence rate and high rooting rate were Nongrimna-1-ho, Mihyangbyeo, Hyangmibyeo-1-ho, Sulhyangchal byeo, Hukjinjubyeo, Hwabongbyeo and Nonghobyeo and American breeding cultivar M-201. These cultivars will be useful for genetic resources for breeding of rice resistant to seedling rot.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Outline of research development</b> .....	1
Section 1. Significance .....	1
1. Significance of research .....	3
2. Problems and situation of technology of domestic and foreign countries .....	5
3. Prospection in the future .....	6
<b>Chapter 2. Objectives and Scopes</b> .....	7
1. Final objectives .....	7
2. Scopes of the study .....	7
3. Objectives and scopes of each year .....	10
<b>Chapter 3. Strategy of the research</b> .....	13
<b>Chapter 4. Materials and Methods, and Results</b> .....	14
Section 1. First subject: Etiology and biological control of seedling disease .....	14
1) Materials and Methods .....	14
1. Seeds and materials .....	14
2. Isolation and identification .....	14
3. Physiochemical involvement to seedling disease .....	15
4. Pathogenicity .....	15
5. Isolation of biological control agent .....	16
6. Biological control of seedling disease .....	16
7. Increase of efficacy of biological control by amendment of specific carbon sources .....	16
8. Viability of formulation .....	18
9. Population dynamics of biological control agent .....	18
2) Results .....	18
1. Disinfestation of sodium hypochlorite .....	18
2. Isolation of pathogen of seedling disease .....	20
3. Physiochemical involvement to seedling disease .....	22
4. Pathogenicity .....	23

5. Inhibition of biocontrol agents on pathogens .....	29
6. Biological control of seedling disease .....	32
7. Viability of formulation .....	45
8. Population dynamics of biological control agent .....	57
Section 2. Second subject: Evaluation and selection of resistant genetic resources to seedling disease in water-seeded rice .....	59
1) Materials and Methods .....	59
1. Optimum condition of seedling disease occurrence .....	59
2. Evaluation and selection of resistant genetic resources .....	59
3. Evaluation of resistant genetic resources in field .....	60
2) Results .....	61
1. Optimum condition of seedling disease occurrence .....	61
2. Evaluation of resistant genetic resources to seedling disease pathogens .....	64
3. Relationship between seedling completeness and seedling disease ·	68
4. Evaluation and selection of resistant genetic resources to seedling disease .....	73
5. Basic physiology in relation to seedling disease .....	76
Chapter 5. Expectation .....	85
1. Technological aspects .....	85
2. Economical aspects .....	85
Chapter 6. Utilization and applications .....	85
Chapter 7. Next steps of the accomplishment .....	86
Chapter 8. Points for evaluation .....	87
Chapter 9. Reference .....	88

# 차 례

<b>제 1장 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>1</b>
가. 연구개발의 필요성 .....	1
나. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점 .....	3
다. 앞으로의 전망 .....	5
라. 기술도입의 타당성 .....	6
<b>제 2 장 연구개발의 목표 및 내용</b> .....	<b>7</b>
가. 연구개발의 최종목표 .....	7
나. 연구개발의 내용 .....	7
다. 연차별 연구개발 목표 및 내용 .....	10
<b>제 3 장 연구개발 추진 체계</b> .....	<b>13</b>
<b>제 4 장 연구개발 수행내용 및 결과</b> .....	<b>14</b>
제1 세부과제 :모썩음병의 병원학 및 생물학적 방제 기술 개발 .....	14
1) 재료 및 방법 .....	14
가. 공시재료 및 종자 소독 .....	14
나. 병원균의 분리 및 동정 .....	14
다. 발생 토양의 이화학적 요인의 병 관련 여부 조사 .....	15
라. 병원성 조사 .....	15
마. 생물학적 방제균의 분리 .....	16
바. 생물학적 방제균주의 모썩음병 방제 효과 시험 .....	16
사. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진 .....	16
아. 분말제제의 생존력 검정 .....	18
자. 생물적 방제균의 밀도 변화 .....	18
2) 연구 결과 .....	18
가. 차아염소산의 소독 효과 .....	18
나. 모썩음병원균의 분리 .....	20
다. 발생 토양의 이화학적 요인의 병 관련 여부 조사 .....	22
라. 병원성 조사 .....	23
마. 생물학적 방제균주의 길항력 검정 .....	29
바. 생물학적 방제 효과 .....	32

사. 분말제제의 생존력 검정 .....	45
아. 생물학적 방제균의 밀도 변화 .....	57
제 2 세부과제 : 벼모식음병에 대한 저항성 유전자원 선발 .....	59
1) 재료 및 방법 .....	59
가. 벼모식음병의 발생 최적 환경 .....	59
나. 저항성 유전자원 평가 및 선발 .....	59
다. 저항성 품종에 대한 포장 평가 .....	60
2) 결과 .....	61
가. 모식음병 발생 최적 환경 구명 .....	61
나. 모식음 병원성 균주에 대한 저항성 유전자원평가 .....	64
다. 담수직과 종자의 입모성과 모식음병과의 관련성 .....	68
라. 모식음병 저항성 유전자원의 평가 및 선발 .....	73
마. 모식음병 저항성 관련 기초 생리 연구 .....	76
제 5 장 기대효과 .....	85
가. 기술적 측면 .....	85
나. 경제·산업적 측면 .....	85
제 6 장 활용방안 .....	85
제 7 장 연구개발성공시 다음 단계 조치사항(최종연도에 한함) .....	86
제 8 장 연구평가의 착안점 .....	87
제 9 장 참고자료 및 문헌 .....	88

## 제 1장 연구개발과제의 개요

### 가. 연구개발의 필요성

- 근래 우리나라의 쌀 생산은 주로 육묘과정을 거친 후 기계이앙을 하는 재배방식을 통하여 다수확 위주로 이루어져 왔으나 WTO의 개방체제에 따라 정부의 수곡가에 대한 제한으로 쌀의 생산도 비용의 발생 및 이익의 측면에서 고려되어야 할 시점에 이르렀다.
- 최근 정부에서도 농지의 면적을 감소시키고 쌀의 가격을 낮추려는 정책을 추진하고 있어 농가가 소유하는 농지면적이 보다 대규모화로 되면서 생산비용을 절감하는 측면에서 직파재배의 면적이 증가될 추세에 있다.
- 담수직파재배는 여러 가지의 장점을 가지고 있다. 모내기에 의한 이앙재배는 약 한달 이상 육묘기간을 거치고 키운 모를 다시 본답에 이앙하게 되는데 담수직파를 하면 육묘 및 이앙에 소요되는 막대한 노동과 비용을 절감할 수 있다.
- 상기와 같은 담수직파재배의 장점에도 불구하고 직파를 하게 되면 파종된 많은 량의 종자가 모썩음병에 감염되며 일반적으로 정상적인 출아율은 약 60% 내외가 될 뿐 아니라 입모가 불균일하여 농가에서 도입을 기피하고 있는 실정이다. 그러나 지역에 따라 모썩음병에 관여하는 병원균의 종류나 분포에 대한 연구뿐 아니라, 친환경적인 생물학적 방제, 저항성 유전자원 등에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

#### 1) 기술적인 측면

- 모썩음병의 원인으로는 *Pythium* 등이 일부 지역에서 기계이앙을 위한 육묘상자와 이앙 후의 활착기에 병원성이 확인되었지만 (Lee et al., 1978; Sung et al., 1983), 담수직파재배시 벼포장에서 발생하는 모썩음병에 대한 연구는 매우 미흡하다. 또한, 모썩음병이 *Pythium*에 의해 전부 발생하는 것이라고도 보기 어려우며, 이외에도 *Achyla*, *Fusarium* 등이 모썩음병을 일으키는 것으로 보고되었고, 또한 일부는 세균병에 의한다는 보고도 있어 분리균마다 병원성이 현저히 다르기 때문에 지역을 달리한 실제 포장에서 어떠한 병원균이 어떠한 빈도로 분리되는지를 선택배지 기술을 이용하여 조사할 필요가 있다.
- 최근 농약으로 인한 환경 오염과 식품 안정성 차원에서 생물학적 방제에 대한 관심이 증가하고 있는데, 담수직파재배는 생물학적 방제를 적용하기에는 매우 이상적인 재배시스템을 갖고 있다. 담수직파재배 면적이 증가하고 있으나 우리

나라에서는 모썽음병에 대한 생물학적으로 방제 균주의 분리나 균주가 잘 생존할 수 있는 생물학적 제제의 개발에 대한 연구가 매우 미진하다.

- 메타락실은 담수직재배시 발생하는 있는 물곰팡이를 포함하여 분류학적으로 난균류에 효과적인 살균제이지만 약제내성균이 쉽게 나타난다는 단점이 있으며, *Pythium* 등의 모썽음병에 대한 저항성 벼 품종은 물론 모잘록병에 대한 저항성 작물이 세계적으로 없는 것으로 알려져 있는데,
- 최근 연구에 의하면 일부 잡초성벼(앵미 등)는 모썽음병에 대한 저항성이 매우 강한 것으로 나타났다 (Jun, personal communication). 따라서 현재 재배 품종과 기존 수집된 야생종 및 잡초성벼를 유전자원으로 평가 선발하여 모썽음병에 대한 저항성 유전자원을 선발할 수 있다면, *Pythium* 등에 의한 모썽음병의 저항성 유전자원을 확보하고, 저항성 품종 육성 및 저항성 유전자 탐색에 있어서 세계적으로 기술적 우위를 점할 수 있는 기초적인 자료를 제공할 수 있을 것이다.

## 2) 경제 산업적 측면

- 쌀은 우리 나라의 주식으로서 WTO에 의한 쌀 시장개방에 의한 시장자유화가 이루어지더라도 국내 농업 분야에서 가장 중요한 위치를 차지할 것이다. 그러나 비용과 이익을 감안하지 않는 단순한 최대 수확량을 목표로 하여서는 시장개방화의 현실에 있어서는 경쟁력이 충분치 않다고 보아야 할 것이다. 따라서 담수직파재배는 소득과 비용을 고려하여(특히 규모의 확대시에는 중요) 쌀 경영 재배 차원에서 보면 매우 유리한 재배방법이라고 하여야 할 것이다.
- 우리 나라가 WTO 체제 아래에서도 품질, 지명도 등을 바탕으로 하여 최소 비용 측면의 경영 시스템을 가진다면 외국과의 가격 경쟁력에서 절대적으로 불리하다고 하기에는 아직 이를 것이다. 우리 나라 주식으로서의 쌀의 안정적인 생산이 국가경제에 미치는 영향은 매우 크므로 벼 재배의 경영 차원에 매우 유리한 담수표면산파에서의 안정적인 입모율 확보를 위하여는 모썽음병의 원인과 생태를 구명하여 다양한 방제 대책을 수립하고 저항성 유전자원을 선발하는 것은 매우 의의가 크다 하겠다.

## 3) 사회 문화적 측면

- 벼의 재배는 식량 안보적 차원뿐만 아니라 홍수 조절 기능, 환경정화, 민족문화 보존 등 공익적인 기능을 유지하고 있고, 쌀을 소재로 한 전통가공 식품, 음료 등의 가공 식품의 생산에도 기여함으로써 쌀에 기반을 둔 우리 나라 전통문화의 유지 발전에도 큰 의의가 있다. 따라서 쌀 생산이 안정적으로 이루어질 수

있도록 최소 비용과 이익의 극대화를 추구하는 경영 차원에서 담수직파재배의 지속적인 확대보급이 이루어질 수 있도록 미래 지향적 기술개발이 필요하다.

- 생물학적 방제를 통한 친환경적인 방제 방법은 과다한 농약 사용으로 인한 자연 생태계 교란 등을 감소시킬 수 있는 한 대안으로서 생태계의 다양한 생물 자원의 보전과 유지에도 유익할 것이다.
- 저항성 유전자원을 선발하고 저항성 유전자 탐색의 source를 제공하여 미래에 궁극적으로 모썩음병균에 대한 저항성 품종을 육성할 수 있다면 이 또한 큰 범주의 생물학적 방제로서의 자연 생태계의 보전에 기여할 수 있을 것이다.

## 나. 국내의 관련기술 현황과 문제점

모썩음병은 담수직파재배에서 입모을 확보의 가장 큰 제한 요인이 되고 있지만, 우리 나라에서는 주로 이앙재배에 의해 쌀생산이 이루어져 왔기 때문에 그 동안 큰 문제가 되지 않았으나 담수직파재배가 늘어나면서 모썩음병이 문제가 되기 시작하였다. 그러나 이에 대한 원인이 체계적으로 구명되지 않았으며 모썩음병 원인균의 분리와 병원성에 대한 연구가 일부 있었으나 특정 지역에 국한된 균의 분리였고, 묘상과 이앙 후 뿌리에서 분리된 것이어서 담수직파재배시 발생하는 출아묘가 수면으로 출현하지 못하고 죽거나 종종 미발아하여 죽게 되는 모썩음병의 병원균과는 약간의 거리가 있을 가능성도 배제할 수는 없을 것이다.

최근 농약으로 인한 환경 오염과 식품 안정성 차원에서 생물학적 방제에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히 벼 재배에 있어서 농약의 과다한 사용은 수질과 자연 생태계를 직접적으로 오염시키기 때문에 생물학적 방제는 친환경적인 농업의 한 대안으로서 그 의의가 크다 하겠다. 모썩음병균과 같은 토양균에 대한 생물학적 방제는 근권과 가장 관련이 깊다. 근권(뿌리권)이란 식물의 뿌리에 의하여 가장 영향을 많이 받는 토양이라고 정의할 수 있다. 뿌리부터의 누출(exudate)은 세균과 곰팡이를 포함하여 미생물의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 생물학적 방제를 위하여는 영양 요구성이 다양하고, 성장이 빠르고, 또한 일부 세균들은 식물병원균에 대하여 억제효과를 가지기 때문에 세균에 특히 관심을 갖고 생물학적 방제 균주를 분리하고자 한다. 생물학적 방제가 때로는 그 결과가 균일하지 못할 때도 있지만 세균 생물학적 방제 균주를 사용하여 뿌리를 침해하는 식물병원균을 성공적으로 방제한 사례가 매우 많이 있다 (Weller, 1988).

많은 요인들이 유입된 세균의 뿌리 정착에 영향을 준다 (Weller, 1988; Parke, 1991). 가장 큰 제한 요인은 수분의 유용성이다 (Parke, 1991). 이것은 세균의 성장을 위하여 요구되어질 뿐만 아니라 자라나는 뿌리에 확산되기 위하여도 필

요하다. 생물학적 방제 균주는 일반적으로 마른 종자에 처리되고, 마른 흙에 파종된다. 따라서 유입된 많은 세균들은 관개수나 비가 와서 젖을 때까지 생존하여야 하며 젖고 마르는 것이 반복되는 조건아래서도 자라나는 뿌리나 다른 침입 부위에 증식하고 유지될 수 있어야 한다. 수분의 부족은 토양전염균의 생물학적 방제나 마른 종자를 파종하는 경우의 작물에서 균일치 못한 결과를 가져오게 하는 주 요인으로 생각된다. 담수직파에서의 세균의 생물학적 방제균주가 성공 가능성이 높다고 하는 것은 이와 같은 이유이다. 최아 후 벼 종자는 물속 토양 표면에 가라앉을 때까지 젖은 상태에 있게 될 것이다. 토양 표면에서 발달하게 되는 뿌리는 토양속에 뿌리를 내릴 때까지 며칠을 유지하게 될 것이고 이때가 가장 병원균에 감수성일 때다.

많은 연구자들은 세균이 생물학적 방제 효과를 나타내는 기작에 대하여 연구해왔다. 형광성의 어떤 pseudomoads 균주(Schippers et al., 1987)와 곰팡이(Schneider, 1994)는 근권에 유입될 때 뿌리의 감염부위에서 영양분과 장소에 대해 매우 경쟁적이어서 뿌리 감염을 억제한다. 유용 pseudomoads 들은 또한 식물병원균을 하나 이상의 항생물질(Fravel, 1988; Smith et al., 1986), siderophore (Loper, 1988; Loper and Ishimaru, 1991), 또는 다른 물질(Webster and Gunnell, 1992)를 분비하여 억제한다. Iron siderophore (organic chelating agent)를 분비하는 pseudomoads들은 식물병원균으로부터 철분 성분을 빼앗을 뿐 아니라 항균 활성을 가지고 있기도 하다 (Loper and Ishimaru, 1991). 근권의 세균들은 또한 모의 출현 및 활력을 촉진하여 생물학적 방제와는 다른 별개의 기작으로 작물의 수량을 증대하는 것으로 알려져 있다 (Kloepper et al., 1992).

생물학적 방제의 가장 큰 단점 중의 하나인 그 효과가 장소와 시간에 따라 불규칙적이라는 것이다. 최근에 이러한 결점을 보완하기 위하여 여러 방제균주를 혼합하여 쓰거나 살균제와 혼용할 수 있는 균을 선발하여 농약의 사용량을 줄이고자 하는 노력이 이루어져 왔다. 최근 모썩음병에 대한 생물학적 방제의 효과를 증진시키기 위하여 방제균과 식물병원균의 탄소이용도 연구를 하여 방제균만이 잘 이용하는 탄소원을 첨가하여 준 결과 효과를 크게 증진시켰으며 (Chun, 1997), Colbert 등은 (1993) salicyate을 잘 이용하도록 유전적으로 조작된 *Pseudomonas putida* R20 (NAH7)의 밀도가 salicyate를 첨가하여 주면 그렇지 않은 토양에 비하여 현저히 증가하였다고 보고하였다. Janisiewicz 등은 (1992) 사과와 푸른곰팡이병의 생물학적 방제균의 효과를 증진시키기 위하여 방제균주에 의해서만 잘 이용되는 질소원을 첨가하여 준 결과 병의 발생정도를 효과적으로 감소시킬 수 있다고 하였다.

생물학적 방제가 성공적이 되기 위하여는 대상 작물의 근권에 잘 정착하는 미생물이어야 한다. 즉, 여러 지역의, 다양한 토양, 특히 병이 억제되는 곳에서 생물학적 방제 균이 분리되어야 할 것이다 (Schneider, 1984). 모썩음병에 대한 효과

적인 생물학적 방제 균주가 선발된다면, 재배 환경에서 그 균주의 생존 추적 조사가 필요할 것이다. 종자에 유입시킨 균주가 얼마동안 생존할 수 있고 종자로부터 뿌리와 새싹에 또는 식물과 식물간에 얼마나 확산할 수 있는지 등에 대한 조사는 매우 중요할 것이다. 여러 가지 방법들이 많은 연구자들에 의하여 시도되었다. Kluepfel과 Tonkyn은 (1992) 생태학적 연구에 항생 물질 저항성 marker를 주입한 미생물의 사용과 이의 문제점을 상세히 검토하였다. 먼저, 토양으로 방출된 항생 물질 저항성 marker는 그들의 야생형(wild type)에 비하여 종종 현저히 적은 수로 recover 되었다 (Compeau et al., 1988). 생물학적 방제 능력은 항생물질 저항성 marker의 선발에 의하여 영향을 받았을 지도 모르는 것이다 (Maplestone and Campbell, 1989). Drahos 등은 (1986) 생태학적 연구에 *lac ZY* marker를 쓰기도 했다. 간단히 말하면, *lac Z*와 *lac Y*는 대장균 (*Escherichia coli*)에서 lactose 이용을 code 하는 유전자로 세균의 염색체 삽입하게 된다. 다른 연구자들도 이 방법의 유용성을 확인하였다 (Kluepfel and Tonkyn, 1992). 이 방법은 특히 대부분의 pseudomonads 세균들이 lactose 이용 유전자가 없기 때문에 pseudomonads 세균의 생태학적 연구에 효과적이다. 그러나 *lac ZY* 시스템은 lactose을 이용할 수 있는 세균 group 들에는 주의를 해야한다. 예를 들면, *Bacillus* 속에서는 lactose을 이용할 수 있는 형질이 가지고 있는 세균이 매우 다양하게 분포되어 있다 (Sneath et al., 1986).

생물학적 방제 균주가 상업적으로 사용되기 위하여는 제제 형태의 제품이 생산과 판매 과정에서 지속적으로 균주의 생존력을 잘 유지하여야만 한다. Powell (1992), McIntyre과 Press 등은 (1991) 세균으로서의 생물학적 방제 균주를 위한 제제(formulations)에 대한 문헌 review를 하였는데 peat, polymer gels, talc에 기본을 둔 분말 제제들이 오랜 기간 동안 가장 높은 세균의 생존을 유지한다고 기술하고 있다.

우리 나라에서도 생물학적 방제에 대한 연구가 많이 되어왔지만 주로 균주의 선발 등에 많은 노력이 집중되었고, 특히 탄소원 등의 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진에 관한 연구, 제제 종류에 따른 생존 기간, 처리한 생물학적 방제 균주 등의 환경에서 모니터링 등에 대한 연구가 매우 미진하다.

## 다. 앞으로의 전망

식물병의 생물학적 방제 기술의 개발은 자연 생태계에 대한 교란이나 환경오염을 줄이는 동시에 생산성과 수익성 차원에서 지속유지가능한 친환경적인 농업의 근간을 이룰 수 있을 것이다.

노동과 비용을 최대한 절감할 수 있는 담수직파재배 방법의 보급에 큰 역할을 할 수 있을 것이며, 모썽음병에 대한 친환경적 방제 방법을 통하여 안정적인 입

모을을 확보함으로써 효율적인 농업 경영을 이룩하여 WTO 개방 체제하에서도 경쟁력을 갖출 수 있을 것이다.

모씩음병 저항성 유전자원을 갖게 됨으로서 세계적으로도 아직 개발되어 있지 않은 *Pythium* 등에 의한 모씩음병 저항성 품종의 육성이나, 유전자의 탐색에 있어서 선진국에 대한 기술 우위를 선점할 수 있을 것이다.

## 라. 기술 도입의 타당성

식물병에 대한 생물학적 방제는 그 지역에 따라 효과나 병원균의 특성 또는 분포가 매우 다르기 때문에 기술 도입에 의하여 바로 해결될 수 있는 성질이 아니고 우리 나라의 기후 조건 및 토양 조건에 맞는 방제 균주 들이 선발되고, 상업적으로 이용 가능한 그 고유 균주에 맞는 제제의 생산이 이루어져야 할 것이다. *Pythium* 등에 의한 저항성 유전자원은 세계적으로도 보고된 바가 없으므로 기술 도입의 의미가 없어, 우리 나라가 먼저 이에 대한 연구를 착수한다면 이 방면의 연구와 앞으로의 품종 개발, 유전자 탐색에 있어서 유리한 위치를 차지하게 될 것이다.

## 제2장. 연구개발의 목표 및 내용

### 가. 연구개발의 최종 목표

- 담수직파재배시 발생하는 모썩음병의 원인 구명
- 식물병원균의 분리 및 동정
- 생물학적 방제균 분리 및 동정, 효과 시험
- 방제균과 병원균의 탄소이용도 조사
- 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진
- 세균 제제의 온도 및 보유기간에 따른 생존 활성 조사
- 방제 균주의 환경 모니터링
- 처리온도별 담수 깊이별 모썩음병 발생 영향 평가
- 담수직파종자의 발아환경과 모썩음병 발생과의 상호 관련성
- 모썩음병에 대한 재래종, 잡초성벼, 야생종 및 재배품종의 저항성 평가 및 선발
- 모썩음병 내성 품종과 이병품종 비교로 모썩음병 관련 종자생리 연구

### 나. 연구개발 내용

#### ○ 병원균의 분리, 분류 동정 및 분포 조사

담수직파재배시 발생하는 모썩음병의 병원균을 서산간척지 등 우리 나라의 여러 재배 지역에서 이병 샘플을 채취하여 *Pythium* 등의 병원균을 선택배지를 사용하여 분리하고 corn meal agar에 보관 유지하면서 병원성을 조사하고 병원성이 있는 균주들에 대하여 Plaats-Niterink (1981) 등의 문헌을 참조하여 병원균을 분류 동정한다.

#### ○ 생물학적 방제균주의 분리 및 선발

담수직파재배 지역에서 특히 병 발생이 억제되는 곳이 있다면, 그러한 곳에서 토양, 뿌리, 종자를 수집하고 *Pythium* 등의 모썩음병균에 대하여 항균 활성을 보이면서 벼 종자, 쌀, 뿌리에 잘 정착하는 세균을 풍부하게 만든 후 분리한다. 특히 방제세균들은 환경 내성이 매우 강한 내생포자를 생성할 수 있는 *Bacillus* 등을 위주로 선발한다. 병원성이 큰 균주들과 생물학적 방제 효과를 나타내는 균주들에 대하여 Chun (1997) 등의 *Bacillus* 와 *Pythium* 등에 SFT, SFP, YT Biolog microplate (Biolog INC, USA) 등을 통한 탄소원 이용도에 대한 자료에 근거하여 *Bacillus* 들에 의해서 잘 이용되는 탄소원들을 Claus (Sneath, 1986)의 기본배지를 사용하여 검증을 하여서 생물학적 방제 처리시 첨가하여 증진 효과를 구명한다. 종자에 처리하는 방법으로는 최아 과정에 방제 균주를 처리하는 방법과 종자 coating하는 방법을 사용한다. 또한 살균제 농약과의 혼용 가능성을 조사하기 위하여는, 메타락실을 첨가한 배지에서 식물병 억제 효과가 있는 세균의 성장 여부도 조사하여 농약의 기존 사용량을 2 배이상 감소시킨 상태에서도 모썩음병을 효과적으로 방제할 수

있는지 구명한다.

#### ○ 포장시험

건국대학교 경기도 여주 벼 재배 시험장 담수직파재배 포장에서 이루어질 것이다. 생장실과 온실에서 효과가 탁월한 균주 들만을 대상으로 하고 종자에 대한 생물학적 방제균주의 처리는 생장실과 온실에서와 같은 방법으로 한다. 모든 실험은 적어도 1회 이상 반복하고 입모율과 수확량이 조사될 것이다.

#### ○ 환경 모니터링

방제 효과가 우수한 균주에 대하여 리팜피신 저항성 돌연변이균을 선발하여 수대의 계대배양을 통해 저항성 형질이 안정적으로 유전되는지 조사한 후, 종자에 처리하여 파종한 후 일정 간격으로 샘플을 회수하여 dilution plate 법으로 세균이 종자에서 얼마 동안 높은 밀도를 유지하는지, 종자에서 뿌리, 싹 등으로 및 토양, 이웃하는 식물로 얼마 확산하는지 모니터링 될 것이다. 리팜피신에 의한 추적이 비효율적일 경우, 앞서 언급되었던 *lacZY* 시스템이 환경 모니터링하는데 사용될 것이다. 생물학적 방제효과가 가장 우수한 균주들은 플라스미드 대신에 염색체에 유전자를 삽입시키는 Drahos 등 (1986), Kluepfel과 Tonkyn (1992)의 방법으로 형질 전환될 것이다.

#### ○ 고품 제제

분리된 균들은 10% 그리세롤에 보관하고, 식물병 방제 효과가 있는 균주 들에 대하여는 동결건조하여 보관한다. 생물학적 방제 균주를 위한 제제 (formulations)로는 맥섬석, peat, polymer gels, talc 등을 이용하여 고품 제제를 제조하고 온도별 기간별로 생존력 검정을 실시한다.

#### ○ 유전자원의 평가 및 선발

병원성이 확인된 순수 분리된 *Pythium*, 세균 등의 모썩음병균을 담수 상태의 플라스틱 용기에 접종에 하고 약 300 여종의 재배품종, 유색미, 및 야생벼 (앵미 등) 등을 매년 150여종의 품종을 파종하여 생장실 및 온실에서 선발하고, 그 중에서 저항성이 우수한 재배 품종, 재래종 및 야생종 등에 대하여는 최종년도에 포장 실험을 하여 최종적으로 평가 선발한다.

#### ○ 포장실험

이병포장에 1평방미터당 10g개의 종자를 1, 2차년도에 선발한 품종을 직파하여 입모율이 우수한 품종을 평가 선발한다. 실험은 6반복으로 하며 표준시비량으로 완전입의배치구로 plot을 배치한다.

#### ○ 모썩음병 발생 환경 구명

작물시험장 인공기상연구동을 활용하여 처리온도 및 담수깊이별로 모썩음병의 발생정도를 구명하여 모썩음병이 선호하는 환경을 조사

- **담수직파종자의 입모와 모씩음병과의 관련성**  
생육환경에 따른 담수직파된 벼종자의 출아, 입모정도, 입모충실도 등과 모씩음병 발병과의 관련성을 조사하여 환경에 따른 상호 선호성 정도를 연구
  
- **모씩음병 저항성 생리 연구**  
모씩음병에 저항성인 것으로 알려진 주요 잡초성벼와 장려품종중 저항성인 품종 및 이병성인 품종 선발을 통하여 모씩음병과 관련된 종자의 주요 형질 또는 특성 파악하고 모씩음병 저항성과 관련된 종자생리 연구

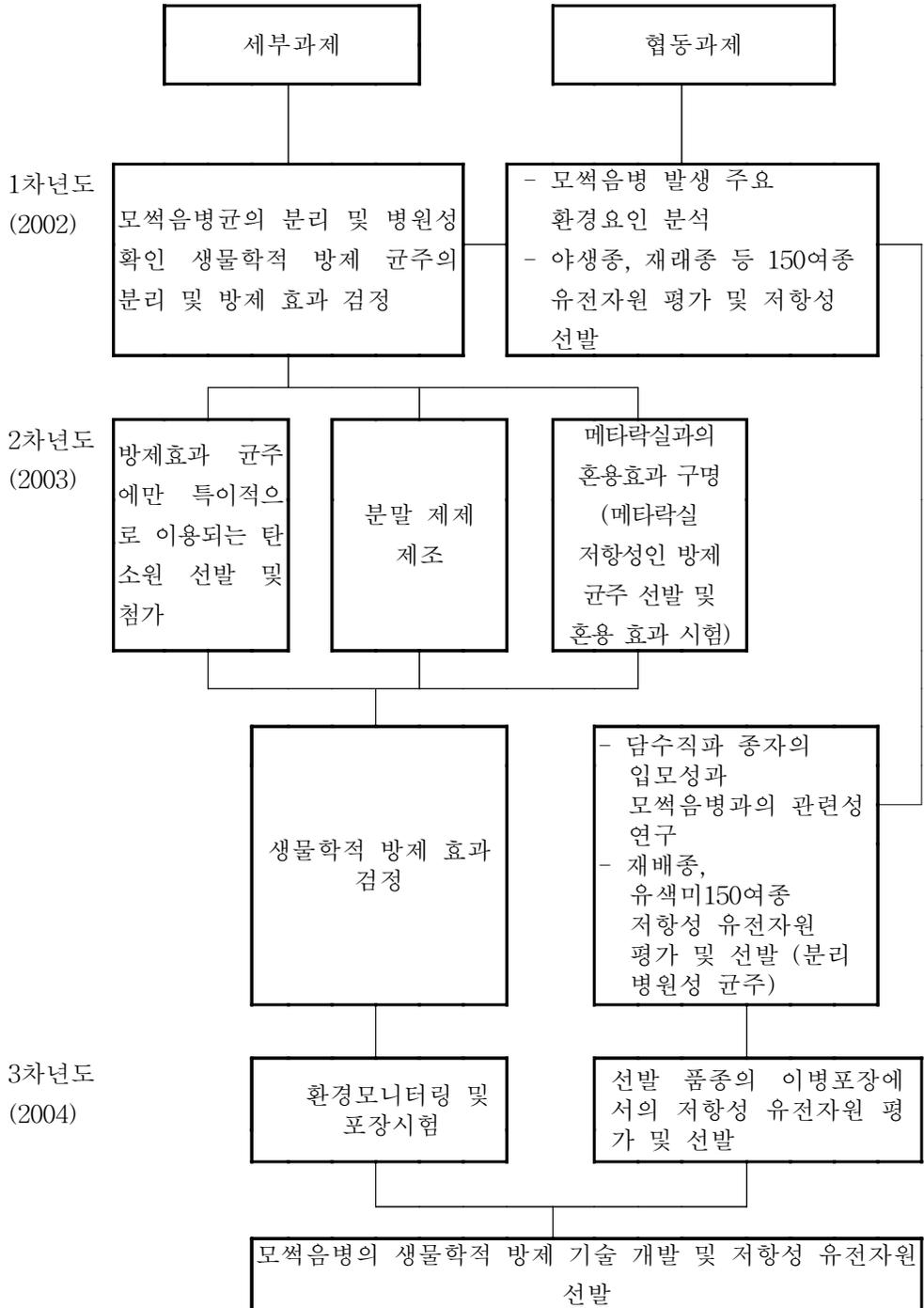
### 다. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	세부과제명	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2002)	세부과제	모씩음병균 분리 및 생물학적 방제 균주의 분리 및 효과 검정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발생 토양의 생물적 요인의 병 관련 여부 구명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 서산간적치 등 모씩음병 발생 지역의 이병 식물 채취하여 <i>Pythium</i> species 등의 식물병원균 100여종을 PV 등의 선택배지를 사용하여 분리 및 동정</li> <li>- 순수 분리된 균주에 대하여 접종 방법을 확립하고 병원성(pathogenicity)과 병독성(virulence)을 시험</li> </ul> </li> <li>○ 발생 토양의 이화학적 요인의 병 관련 여부 구명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 멸균 처리 토양에 대한 병 발생 여부 분석</li> </ul> </li> <li>○ 생물학적 방제균의 선발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Pythium</i> 등의 모씩음병균에 대하여 항균활성을 보이면서 벼 종자, 싹, 뿌리에 잘 정착하는 세균을 풍부하게 만든 후 분리한다.</li> <li>- 분리된 세균은 10% 글리세롤에 보관하면서, 종자에 처리하여 모씩음병 억제 효과 검정</li> <li>- 효과가 우수한 균주에 대하여는 지방산 분석에 의한 분류 동정</li> <li>- 메타락실과 혼용이 가능한 균주 선발</li> </ul> </li> </ul>
	협동과제	저항성 유전자원 평가 및 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 야생종, 재래종 및 재배종 벼에 대한 모씩음병 이병성 조사 및 균주 채집               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 이병성 및 저항성 종자의 분리 선발</li> <li>- 이병된 종자의 균주 분리를 위한 채집</li> </ul> </li> <li>○ 모씩음병 발생 최적환경 구명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 온도조건 : 15℃~27℃</li> <li>- 담수 깊이 : 1~10cm</li> <li>- 시험종자 : 이병성 품종 및 저항성 품종</li> </ul> </li> <li>○ 150종(야생종, 재래종 및 재배종)에 대하여 분리 병원성 균주에 대한 저항성 유전자원 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 균주 접종 방법 : 균사</li> <li>- 시험구 배치: 완전 임의 배치구</li> <li>- 병원성 균주를 접종하여 저항성 검정 및 확인</li> </ul> </li> </ul>

구분	세부과제명	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
2차년도 (2003)	세부과제	모썩음병균의 동정 및 발생 생태 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 방제효과 균주만에 잘 이용되는 탄소원 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chun 등의 <i>Bacillus</i>만이 잘 이용하는 L-arabinose, D-galactose 등의 탄소원을 첨가한 Claus의 기본배지에 군사 또는 세균을 접종하여 28C에 진탕배양하고 탄소이용도는 광흡수계를 사용하여 600 nm에서 측정</li> </ul> </li> <li>○ 특정 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과 증진 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 종자의 최아 과정에 방제균주에만 잘 이용되는 탄소원을 처리 효과 생장실과 온실에서 검증</li> <li>- 종자를 coating할 때 상기의 탄소원을 첨가한 후 생물학적 방제 효과 구명</li> </ul> </li> <li>○ 메타락실과의 혼용 효과 구명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 벼 종자의 침지시 사용되는 농도를 2배 이상 희석하고 방제 효과가 우수한 균주를 처리하여 생물학적 방제 효과 구명</li> </ul> </li> <li>○ 고형 제제 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 효과가 우수 균주를 NA 배지에서 키운 후 균의 현탁액을 만들고 talc, 맥섬석, vermiculite 등 다양한 물질과 혼합하여 제제를 만들고 온도별 기간별에 따른 생존력 검증</li> </ul> </li> </ul>
	협동과제	저항성 유전자원 평가 및 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 담수직과 종자의 입모성과 모썩음병과의 관련성 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 온도조건 : 15℃~27℃</li> <li>- 주요 조사내용 : 출아율, 입모율, 입모충실도, 발병율, 감염정도</li> </ul> </li> <li>○ 150종(재배품종, 유색미)에 대하여 분리 병원성 균주 및 포장 이병 토양을 사용하여 저항성 유전자원을 평가 및 선발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 균주 접종 방법: 군사</li> <li>- 시험구 배치: 완전 임의 배치구</li> <li>- 표준시비량</li> <li>- 반복수: 6 반복</li> <li>- 조사항목: 입모율</li> </ul> </li> </ul>

구분	세부과제명	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
3차연도 (2004)	세부과제	모썩음병의 방제 방법 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 환경모니터링 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 효과 우수 균주에 대한 리팜피신 저항성 돌연변이 선발: 농도별로 리팜피신 첨가 nutrient agar(NA)에서 돌연변이를 선발하고 수회 이상 계대배양하여 저항성 형질이 안정적으로 유지되는지 조사</li> <li>- <i>lacZY</i> 시스템 이용</li> <li>- 종자에 처리한 후 과종하여 일정 간격으로 종자를 회수하여 dilution plate법으로 세균의 밀도 변화를 조사</li> </ul> </li> <li>○ 포장시험 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생장실과 온실에서 생물학적 방제 효과가 우수한 균주들에 대하여 담수직파재배 포장에서 효과 확인</li> <li>- 최소한 1회 이상 실험 반복하고 입모율 및 수확량을 조사</li> </ul> </li> </ul>
	협동과제	저항성 유전자원 평가 및 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 모썩음병 저항성 기초생리 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 온도조건 : 15℃ ~ 27℃</li> <li>- 시험종자 : 주요 잡초성벼, 이병성 품종 및 저항성 품종</li> <li>- 주요 조사내용 : 발아활성 물질, 종자함유 주요성분, 환경변이 등</li> </ul> </li> <li>○ 선발된 벼 품종에 대하여 포장의 이병 토양을 사용하여 저항성 유전자원을 평가 및 선발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 병해 발생 포장</li> <li>- 시험구 배치: 완전임의배치구</li> <li>- 반복수: 6 반복</li> <li>- 표준시비량</li> <li>- 조사항목: 입모율</li> </ul> </li> </ul>

### 제3장. 연구개발 추진 체계



## 제4장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 제1 세부과제: 모썽음병의 병원학 및 생물학적 방제 기술 개발

#### 1) 재료 및 방법

##### 가. 공시재료 및 종자 소독

별씨종자는 일품 품종을 사용하였으며, 10% NaCl에 염수선 처리하고 시험의 균일성을 위하여 발아율을 검정하고 종자에 오염되어 있는 곰팡이를 제거하기 위하여 차아염소산나트륨 용액의 pH가 발아율과 곰팡이 오염제거에 미치는 영향을 조사하였다. 차아염소산나트륨의 source는 유한락스 (4% available NaOCl)을 사용하였고, 멸균수에 1:1로 희석한 차아염소산 2% 용액과, 소독효과가 더 높은 것으로 알려진 pH 7.3의 완충용액의 차아염소산 용액을 이용하기 위하여 4% 차아염소산 용액을 0.6 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 에 1:1 혼합하여 (v:v) 완충용액 차아염소산 2% 용액에 종자를 2시간 침지한 후 소독하여 petridish에 2겹의 whatman filter을 놓고 멸균수를 완전 흡수하게 한 후 종자를 파종하여 하여 발아율을 검정하였고, 곰팡이의 오염율은 산성 potato dextrose agar(APDA)에 처리 종자를 치상하여 28°C에 배양후 검정하였다.

##### 나. 병원균의 분리 및 동정

충남 서산 간척지, 경기도 여주, 이천, 전라남도 광주 송정리, 경상남도 사천, 경상북도 하동과 영주시, 전라남도 나주시와 해남, 및 전라북도 익산 및 만경 평야지 등의 직파재배지에서 이병주 및 토양 샘플을 수집하여 1% 차아염소산나트륨에 1분간 침지 소독한 후 water agar, corn meal agar (CMA)의 배지에 치상한 후 28°C에서 3~5일간 배양하면서 균사가 자라는지를 관찰하고 자라나는 균사는 *Pythium* 선택배지에 (PV, 25 ppm pentachloronitrobenzene, 300 ppm vancomycin HCl, 10 ppm pimaricin) 치상하여 3회에 걸쳐 순수분리하였고, 장기간 보존이 가능하도록 water agar에서 자란 균사조각을 멸균 증류수병에 10 조각을 넣어 보관하면서 사용 가능하도록 하였다. *Pythium*인지를 확인하기 위하여는 V8 주스 배지 (V8 주스 800ml, 2 g  $\text{CaCO}_3$ , 17 g bacto agar)에 균사 조각을 치상하여 24시간 28°C에

배양하고 가장 자리의 균사 3 조각을 토양 추출물에 치상한 후 28℃에 24~48시간 배양 관찰하면서 hyphal swelling이나 난포자, 유주자 형성 유무를 조사하여 *Pythium* spp.로 동정하였다. Water agar에서 자라나는 균들에 대하여 PDA에 이식한 결과 pink 색의 콜로니를 나타내는 균에 대하여는 1/2 strength의 PDA나 V8 주스 배지에서 28℃에 7일간 항온한 후 대형포자(macroconidia)의 형성 유무를 관찰하여 *Fusarium* 균으로 분리하였다..

*Pythium*인지를 확인하기 위해서는 V8 주스 배지와 토양 추출물을 사용하였다. 또한, V8 주스를 원심 분리하여 상등액과 β-시테스테레올을 첨가한 cleared V-8 주스 배지도 이용하여, 난포자강, 난포자의 모양, hyphal swelling, 유주자 형성 등을 관찰하여 *Pythium*을 동정하였다. 또한, 벤트그라스의 잎을 멸균시킨 후 water agar에 무균적으로 치상한 후 균주를 접종하여 난포자의 발생 특징을 조사하여 Plaats-Niterink의 문헌을 참고로 하여 종으로 동정하였다.

## 다. 발생토양의 이화학적 요인의 병 관련 여부 조사

서산 직파재배지의 토양을 50cm x 30cm x 15cm의 플라스틱 용기에 8샘플의 무처리 토양과 4샘플의 멸균 토양을 깊이가 3cm로 넣은 후 담수하여 종자를 용기당 각각 25개 파종하여 입모율을 조사하였다.

## 라. 병원성 조사

병원성 조사를 위한 범씨종자는 일품 품종을 사용하였으며, 10% NaCl에 염수선 처리하고 시험의 균일성을 위하여 발아율을 검정하고 종자에 오염되어 있는 곰팡이를 제거하기 위하여 2% 차아염소산나트륨 용액에 2시간 침지한 8번 멸균수로 세척하여 말린 후 사용하였다.

***Pythium*.** 분리된 *Pythium* p133 등 37개 균주를 PV에 2일간 28C에 배양하고 자란 균사의 가장자리에서 코크보러로 편치하여 250ml의 삼각플라스크에 분주된 100ml의 potato dextrose broth(PDB)에 플라스크당 3개의 균사조각을 접종하여 28℃에 7일간 배양하였다. 배양 7일 후 균사를 멸균수로 4-8회 세척한 후 저속의 blender에 10초간 마쇄하여 균사현탁액을 만들어 농도가 광흡수도가 600nm에서 1.5가 되도록 멸균증류수로 조정하였다. 직경 8cm x 높이 120cm의 유리병에 40분간 연속 이틀 고압증기살균한 토양과 멸균증류수를 각각 120ml 씩 넣고 (물의 깊이가 2cm) 병당 20개의 종자를 파종하고 균사현탁액을 1.5ml 씩 균일하게 접종하였다. 접종한 병들은 30/20C(주간/야간=12h/12h)의 생장실에 배양하고 파종 12후 수면위에

나온 입모의 비율을 조사하였다.

**Fusarium.** 분리 균주들을 V8 주스 agar에 28°C에 7일간 배양한 후 멸균 증류수를 넣은 후 대형포자 및 소형포자를 수득하고 hemocytometer를 사용하여 포자 현탁액의 농도를  $10^{-7}$ 이 되도록 조정된 후 범씨 종자를 2시간 동안 침지한 담수 용기에 파종하거나 담수하지 않은 test tube의 water agar에 test tube 당 10립을 파종하여 입모율이나 모씩음증상을 조사하였다.

#### 마. 생물학적 방제균의 분리

여주의 직파 재배지에서의 입모율이 좋았던 직파재배지의 토양 및 입모의 샘플을 멸균 증류수로  $10^{-3}$ 까지 희석한 후 현탁액을 tryptic soy agar(TSA)에 도말 시킨 후 28°C에 2일간 배양후 단콜로니를 분리하고 3회에 걸쳐 단콜로리로 계대배양하여 순수 분리하고 30%의 멸균 글리세롤에 보관하면서 길항 능력 및 방제 효과를 조사하였다.

#### 바. 생물학적 방제 균주의 모씩음병 방제 효과 시험

분리된 균주들의 단콜로니 현탁액을 만들어 TSA에 도말한 후 28°C에 하루 동안 배양한 후 멸균 증류수로 균체를 수득한 후 종자를 세균 현탁액에(O.D.=약 2.0) 침지하고 28°C에 하루 동안 배양하였다. 침지된 종자를 파종하고 병원균을 접종하여 30°C/20°C (주/야, 12hr/12hr)의 생장실에 항온하고 12일 후 입모율을 조사하였다.

#### 사. 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진

생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발. 생물학적 방제 효과가 우수한 D324, D316, D308, 031702, 033201, 035903, 037201 등만이 잘 이용하는 탄소원을 선발하기 위하여 Alanine, Mannitol, D-galactose 등의 탄소원을 첨가한 Claus의 기본배지에 PV배지에서 자란 균사조각 (코크보러 이용 직경 2mm의 3조각) 또는 세균을 (loop 이용) 각각 25ml의 탄소원 액체 배지에 접종하여 28°C에 각각 7일과 48시간 진탕배양하고 탄소이용도는 광흡수기를 사용하여 600 nm에서 측정하여 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되지만 *Pythium* P140, P136, P139 등은 이용하지 못하는 탄소원을 선발하였다.

**미생물 분말 제제의 제조.** 균주 당 100g의 formulation (분말 제제)을 만들 수 있도록 NA plate를 준비한 후 세균을 도말하여 28°C에 일야 배양하여 균체를 수득한다. Perlite, Talc, Zeolite 등의 carrier에 각각 1:1, 1:1, 1:1.7 (carrier:세균현탁액 = w:w)의 비율로 균체의 현탁액을 잘 혼합하여 플라스틱 용기에 얇게 펼친 후 실온에서 건조시켰다.

타트, 지올라이트, 펄라이트 등과 혼합하여 만든 분말제제를 냉장(5°C), 25°C, 30°C에 보관하면서 보관기간에 따라서 분말현탁액을 희석 평판하여 세균 밀도 변화를 조사하였다.

**탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진.** 생물학적 방제 효과가 우수한 D324, D316, D308, 031702, 033201, 035903, 037201 등만이 잘 이용하는 탄소원을 선별하기 위하여 Alanine, Mannitol, D-galactose 등의 14개의 탄소원을 첨가한 Claus의 기본배지에 PV배지에서 자란 균사조각 (코크보러 이용 직경 2mm의 3조각) 또는 세균을 (loop 이용) 각각 25ml의 탄소원 액체 배지에 접종하여 28°C에 각각 7일과 48시간 진탕배양하고 탄소이용도는 광흡수기를 사용하여 600 nm에서 측정하여 생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되지만 *Pythium* P140, P136, P139 등은 이용하지 못하는 탄소원을 선별하였다.

그람양성균이 생존력이 길다는 점을 고려하여 D324 등 분리한 생물학적 방제 균에 대하여는 방선균은 배지에 성장하는 특징이 사상형으로 나타나는 것으로 그람양성으로 판단하였고, 다른 일반적인 세균에 대하여는 그람염색법과 3% KOH 용액을 만들고 슬라이드글라스 위에서 분리된 균체를 세균 계대이식용 loop를 사용하여 3% KOH와 균체의 콜로니를 섞어 그람양성 또는 음성균인지의 여부를 판단하였다.

생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 D-galactose와 D-sorbitol 등과 같은 탄소원의 농도별 현탁액으로 세균 분말 제제를 만들고 종자를 분의하고 병원성 검정 방법에서 제시되는 방법과 같이 병원균 접종 용기에 분의된 종자를 파종하여 방제 효과의 증진을 조사하였다.

**포장 방제효과 실험.** 경기도 여주와 작물시험장에서 실험실에서 탄소원과 생물학적 방제세균으로 코팅한 종자를 비포장 1m<sup>2</sup> 당 25g의 종자를 파종하고 난피법으로 실험구로 5반복하여 생물학적 방제 효과를 조사하였다. 파종후 1개월 후 입모을 조사하였고, 수확하여 증수 효과가 있는지도 조사하였다.

**메타락실과의 혼용 효과 구명.** 생물학적 방제 효과가 우수한 세균의 7개 균주에 대하여 메타락실을 40ppm(*Pythium* 등의 모색음병원균은 20ppm의 농도에서 성장할 수

없음)으로 첨가한 TSA배지에서 저항성 세균을 선발시험을 한 결과, 세균들은 메타락실에 대한 감수성이 없어서 종자를 기존 살균제 사용량의 1/2의 농도로 메타락실 저항성 세균 현탁액에 침지하여 메타락실과 혼용시 생물학적 방제 효과를 증진시킬 수 있는지를 조사하였다.

## 아. 분말제제의 생존력 검정

**미생물 분말 제제의 제조.** 균주 당 100g의 formulation (분말 제제)을 만들 수 있도록 nutrient agar (NA) plate를 준비한 후 세균을 도말하여 28°C에 일야 배양하여 균체를 수득하였다. 버미쿨라이트, 타크, 지올라이트 등의 carrier에 각각 1:1, 1:1, 1:1.7 (carrier:세균현탁액 = w:w)의 비율로 균체의 현탁액을 잘 혼합하여 플라스틱 용기에 얇게 펼친 후 실온에서 건조시켰다.

타크, 지올라이트, 버미쿨라이트 등과 혼합하여 만든 고휘분말제제를 냉장(5°C), 25°C, 30°C에 1개월부터 3개월 단위로 보관하면서 분말 1 그램을 멸균수에 현탁하여 일련의 희석농도를 가진 현탁액을 만든 후 1ml을 플레이트에 분주한 약 50-55°C의 TSA를 분주하여 굳힌 후 28°C에 2일간 배양하여 분말 1 그램 균체수를 (CFU) 측정하여 세균 밀도 변화를 조사하였다.

## 자. 생물학적 방제균의 밀도 변화

*Bacillus cereus* D324의 돌연변이를 50ppm의 리팜피신 항생제가 첨가된 TSA에서 선발한 후 10번의 계대배양을 리팜피신이 첨가되지 않은 배지에서 배양하여 돌연변이의 안정성을 확인하였다. D-galactose가 첨가된 *Bacillus cereus* D324 RF01S의 제제와 D-galactose가 첨가되지 않은 제제로 종자를 코팅한 후 이미 기술된 바와 같이 유리 용기에 (직경 80cm x 높이 120cm) 각 25개의 종자를 파종한 후 0, 1, 2, 4, 6일후 종자를 샘플하여 전제 세균의 밀도와 리팜피신 돌연변이의 밀도를 조사하였다.

## 2) 연구결과

### 가. 차아염소산의 소독 효과

병원성 실험이나 토양에 종자를 파종하여 병원균을 분리하는 실험을 위하여 사용된 일품종자는 곰팡이에 대한 오염율이 매우 높았었다. 따라서, 종자의 소독을 위하여 차아염소산 2% (2% available chlorine, 유헤락스)를 사용하였으며, 소독한 종자가 소독처리 하지 않은 종자에 비하여 곰팡이 오염을 제거 효율, 말아울, 입모울 등에 미치는 영향을 산성 PDA, 2cm 물깊이의 담수에서 조사하였는바, 차아염소산 2%의 종자처리가 처리하지 않은 종자에 비하여 오염율을 현저히 제거하

였으나 발아율과 입모율은 처리간에 현저한 차이가 없었다 (Table 1-1 and 1-2, Fig. 1-1) (LSD,  $P=0.05$ ). 그러나, 반복간의 변이가 소독처리하지 않은 것은 높았고, 곰팡이에 의한 오염도 높아서 이후의 병원성 실험 및 생물학적 방제 효과 실험에서 계속적으로 차아염소산(NaOCl) 2% 용액에 침지 소독한 종자를 사용하였다. 입모율에 미치는 영향은 2% 차아염소산 용액과 pH가 7.3인 2% 차아염소산 용액과의 차이도 없었다.

Table 1-1. Effect of sodium hypochlorite solution on germination and surface sterilization

Treatment	Germination(%) <sup>c</sup>	Contamination(%) <sup>c</sup>
Untreated	72±10a <sup>d</sup>	100±0a
NaOCl <sup>a</sup>	91±2a	34±2b
Buffered NaOCl <sup>b</sup>	85±3a	18±3c

<sup>a</sup>Seeds were immersed in 50% household bleach (2% NaOCl) for 2 hr and rinsed thoroughly and dried.

<sup>b</sup>Seeds were immersed in buffered household bleach (2% NaOCl) in a final concentration of 0.3M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, rinsed thoroughly and dried.

<sup>c</sup>Seeds were plated on acidified potato dextrose agar and rate of germination and contamination were determined 5 days after incubation at 28°C.

<sup>d</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different (LSD,  $P=0.05$ ).

Table 1-2. Effect of sodium hypochlorite solution on seedling emergence

Treatment	Seedling emergence(%) <sup>e</sup>
Untreated <sup>a</sup>	70±10a <sup>f</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	72±11a
NaOCl <sup>c</sup>	84±4a
Buffered NaOCl <sup>d</sup>	76±2a

<sup>a</sup>Dry seeds were soaked in sterile distilled water for 2 hr.

<sup>b</sup>Seeds were immersed in 0.3M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and rinsed thoroughly.

<sup>c</sup>Seeds were immersed in 50% household bleach (2% NaOCl) for 2 hr and rinsed thoroughly.

<sup>d</sup>Seeds were immersed in a buffered household bleach solution (2% NaOCl) in a final concentration of 0.3M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and rinsed thoroughly.

<sup>e</sup>Seeds were planted on water agar in test tubes (25mm in diameter) filled with 2 cm water level and seedling emergence was determined 10 days after planting. There were 5 replications with 10 seeds per tube.

<sup>f</sup>Means followed by same letters are not significantly different (LSD,  $P=0.05$ ).

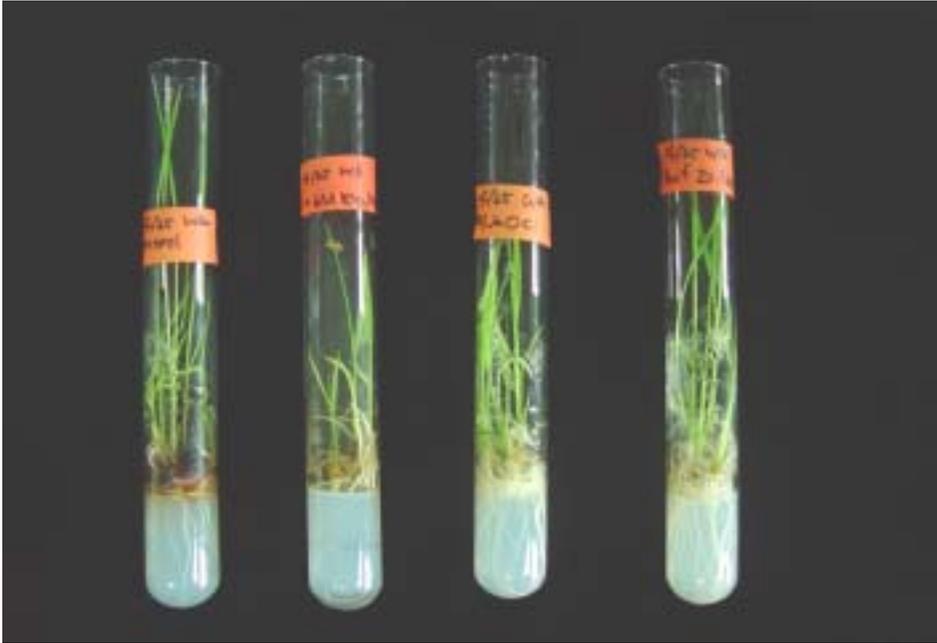


Fig. 1-1. Effect of sodium hypochlorite solution on seedling emergence of rice

#### 나. 모썩음병원균의 분리

**Pythium의 분리.** 벼모썩음병의 샘플을 스트렙토마이신, 밴코마이신 등 여러 가지의 항생제가 첨가된 것에 바로 치상 배양하면 균의 억제가 너무 심할 수도 있어 병원균을 분리할 가능성이 낮아지므로 먼저 샘플을 water agar에 치상하였다. 서산 간척지 지역에서 water agar에서 150여개의 진균이 분리되었으나 *Pythium* 선택배지인 PV 배지 및 soil extract를 사용하여 *Pythium* 균인지의 여부를 확인한 결과 매우 소수인 7개만이 담수직파의 벼모썩음병과 관련된 *Pythium* 균으로 판명이 되었다. 따라서, water agar에 일차로 균을 배양하고 다시 *Pythium* 선택배지인 PV에 계대 배양할 경우 병원균의 분리 효율이 지나치게 낮았다. 이러한 점 때문에 이천과 여주 지역에서 균을 분리할 때는 바로 PV배지에 모썩음병에 걸린 것으로 생각되는 썩은 종자를 70%의 에탄올에 1분간 소독후 치상하여 13개 *Pythium*을 분리하였다 (Table 1-3). 이 방법은 항생제에 의한 균억제 때문에 PV에서의 직접적인 *Pythium*균 분리에 어려움 있을 것이라는 예상과 달리 *Pythium*균 분리에 더 효율적이었다.

광주 송정리 및 경남 사천의 직파재배지의 샘플 및 토양에서 볏씨종자를 파종 후 병에 걸린 것을 바로 PV배지에 치상하여 각각 12, 5개 *Pythium*을 분리하

었다. 사천 지역에서는 5월 초순경 파종한 논에서는 예년에 비하여 비가 자주오고 구름이 많은 날씨로 인하여 온도도 낮아 입모율이 (1,200평의 논 면적70%가 입모율이 매우 저조) 매우 저조하여 재 파종하여야 하는 경우도 발생하였다 (Fig. 1-1a and b).

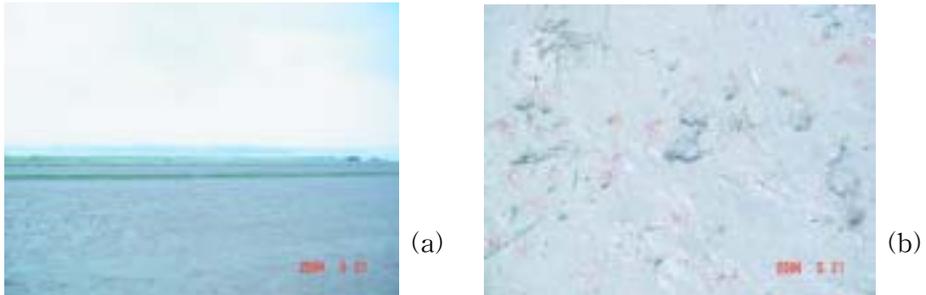


Fig. 1-1a and b. Water-drained water-seeded rice field (a) and rotted rice seeds sawn into the soil of some areas of the field in Sachun, Kyungnanm province. The seeds were planted on the first week of May, 2004.

***Fusarium*의 분리.** Water agar에서 자라나는 일부 균들은 PDA에서 자라면서 pink색의 콜로니를 나타내는 것들에 PDA에 이식한 결과 pink 색의 콜로니를 나타내는 균에 대하여는 1/2 strength의 PDA나 V8 주스 배지에서 28℃에 7일간 항온한 후 대형포자(macroconidia)의 형성 유무를 관찰하여 *Fusarium* 균으로 분리하였다.

Table 1-3. Isolates of *Pythium* species from different locations

Location <sup>a</sup>		Number of <i>Pythium</i> isolate <sup>b</sup>
Chungnam	Seosan	5
Kyunggido	Yeoju · Icheon	13
Kwangju	Songjungri	12
Gyeongnam	Sachun	5
	Hadong	13
Gyeongbuk	Youngju	7
Jeonnam	Naju	13
	Haenam	14
Jeonbuk	Insan · Mankyung	19

<sup>a</sup>Seedlings that did not emerged through water were sampled from the respective locations.

<sup>b</sup>Isolates were grown on PV media. Mycelial plugs grown on V8 agar were placed into soil extract and incubated at 28°C for 24-48 hr to observe zoospore, hyphal swelling and oogonium production for the confirmation of *Pythium* species.

Table 1-4. Isolates of *Fusarium* species from seedlings planted in the soils of different locations.

Location <sup>a</sup>	Isolate <sup>b</sup>
Seosan	9
Icheon	5
Yeoju	7

<sup>a</sup>Soil and seedlings that did not emerged through water were sampled from the respective locations.

<sup>b</sup>*Fusarium* species were indentified on the basis of macroconidia production on V8 agar.

#### 다. 발생토양의 이화학적 요인의 병 관련 여부 조사

멸균토양의 50%의 입모율에 비하여 무처리 토양의 경우는 1%로 현저히 낮아서 병원균에 의한 입모율의 저하가 가장 큰 원인으로 생각되었다 (Table 1-5)

Table 1-5. Effect of soil sterilization on seedling emergence.

Treatment <sup>a</sup>	Seedling emergence <sup>b</sup> (%)
Untreated	1
Autoclaved	50

<sup>a</sup>Soil was sampled from water-seeded rice field in Seosan, Chungnam Province.

## 라. 병원성 조사

현재까지 조사한 *Pythium* 분리균주 21개중 10개의 균주들은 담수직파시 모썩음병을 일으켜 입모율이 0 ~ 40%로 무접종구의 58% 입모율에 비하여 현저히 감소하였다 (Dunnett,  $P=0.05$ ) ( Table 1-6 and Fig. 1-2). *Pythium* p136, p140 등 몇 개의 균주들은 입모율이 0%로 병원성이 매우 강하였지만 일부 *Pythium* p133과 p134 등은 병원성이 다소 약한 것으로 조사되었고 YB21 등 일부 균주는 병원성이 없었다 (Table 1-6). 멸균처리 토양에서도 입모율이 낮은 것은 사용된 일품 품종의 종자가 담수상태의 산소 부족 등을 극복할 수 있을 정도로 발아력과 발아세가 높지 않은 원인으로 생각된다. 담수하지 않은 상태에서의 상기 종자의 발아율은 70% 이상이었다.

*Pythium* 분리균주 17개중 15개의 균주들은 담수직파시 모썩음병을 일으켜 입모율이 0 ~ 40%로 무접종구의 62% 입모율에 비하여 현저히 감소하였다 (Dunnett,  $P=0.05$ ) (Table 1-6). *Pythium* KASPII-03, 09 등 몇 개의 균주들은 입모율이 0%-3%로 병원성이 매우 강하였지만 일부 *Pythium* KBP-02등은 병원성이 다소 약한 것으로 조사되었고 사천 지역에 분리한 병원균들은 전반적으로 병원성이 중간에서 낮은 정도였다 (Table 1-6). 멸균처리 토양에서도 입모율이 낮은 것은 사용된 일품 품종의 종자가 담수상태의 산소 부족 등을 극복할 수 있을 정도로 발아력과 발아세가 높지 않은 원인으로 생각된다. 담수하지 않은 상태에서의 상기 종자의 발아율은 70% 이상이었다 (data not shown).

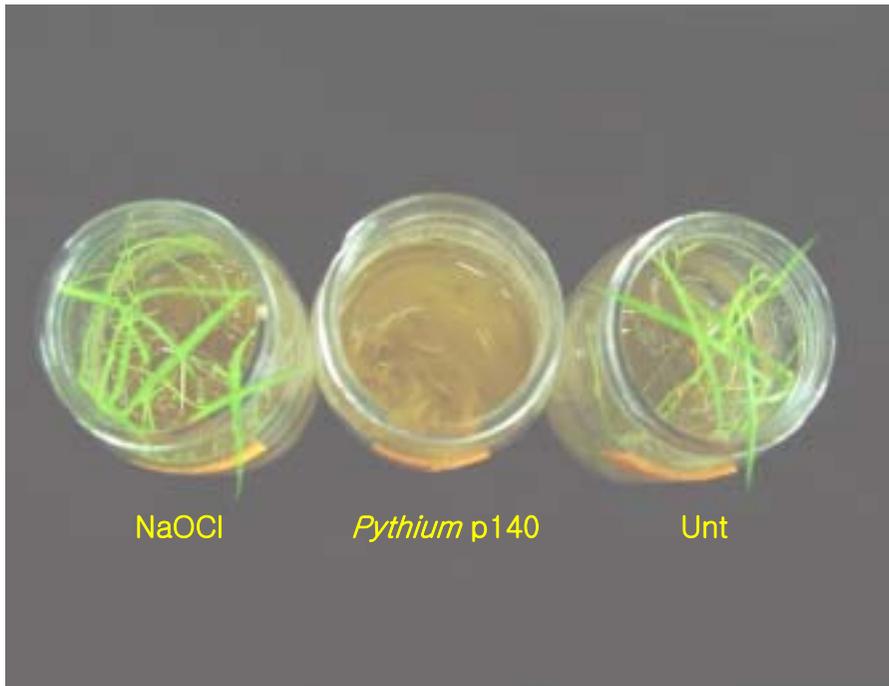


Fig. 1-2. Pathogenicity of *Pythium* p140 on rice seedling. NaOCl and Unt denote for 2% NaOCl and untreated, respectively.

분리된 일부 *Fusarium* 균들은 담수상태에서는 병원성이 없었으나 담수하지 않은 상태에서 접종할 경우 종자가 발아한 이후 입모에 병을 일으켰다. 그러나, 뜻밖에도 *Fusarium* F128, F151은 오히려 입모율을 촉진시켰다. 이중에서도 *Fusarium* F151은 담수에서는 입모를 촉진하였으나 담수하지 않은 상태에서는 모썩음증상을 일으켰지만, *Fusarium* F128은 담수하지 않은 상태에서도 모썩음증상을 일으키지 않으면서도 담수시에는 입모율을 현저히 증가시켜서 비병원성 *Fusarium* 생물학적 방제균으로서 매우 성공 가능성이 높음을 암시하여 주었다. 기타 2개의 *Fusarium* 균들은 입모율이 30~34%로 무접종구의 40% 입모율과 비교하였을 때와 현저한 차이가 없었다 (LSD,  $P=0.05$ ) (Table 1-7, Table 1-8). 종자를 포자현탁액에 침지한 후 test tube의 water agar에 과종한 후 담수하지 않았을 때는 *Fusarium* F151, F188 접종처리는 발아후 2주후에는 감염된 어린모가 각각 70, 78%로 무접종구의 6%에 비하여 현저히 모썩음증상이 증가되어서 건진 입모가 현저히 감소하였다 (LSD,  $P=0.05$ ) (Table 1-9 and Fig. 1-3). 이것은 담수직파가 아닌 기계이앙을 위한 모판 과종에서는 이와 같은 병원균에 의하여 건진 입모가 모썩음병에 의하여 크게 피해를 입을 수 있음을 가르쳐 주었고, 담수직파에서는 *Fusarium*에 의한 모썩

음병은 심각한 것이 아닐 수도 있음을 제시하여 주었다.

Table 1-6. Seedling emergence in water-seeded rice with inoculation of several *Pythium* species (Exp. 1)

Isolate <sup>a</sup>	Percent seedling emergence <sup>d</sup>
p133	9*
p134	3*
p136	0*
p139	0*
p140	0*
YB008	44
YB010	44
YB013	23*
YB015	24*
YB016	33*
YB017	45
YB018	35
YB019	40*
YB020	44
YB021	51
YB022	37*
YB023	48
YB024	46
Ridomil <sup>b</sup>	67
Non-inoculated <sup>c</sup>	58

<sup>a</sup>Mycelial suspensions (1.5 ml, Absorbance at 600nm = 1.5) of *Pythium* isolates were inoculated into each glassware.

<sup>b</sup>Seeds were soaked in Ridomil 500x dilution for 24hr before planting.

<sup>c</sup>*Pythium* was not inoculated.

<sup>d</sup>There were five replications. Twenty seeds were planted into each glassware containing 120 cm<sup>3</sup> soil and 120 cc distilled water. Percent seedling emergence was determined 10 days after incubation at 30°C/20°C (day and night, 12hr/12hr).

\*Significantly different from non-inoculated and Ridomil treatments (Dunnnett,  $P=0.05$ ).

Table 1-7. Seedling emergence in water-seeded rice with inoculation of several *Pythium* isolates (Exp. 2 and Exp. 3)

Experiment 2		Experiment 3	
Isolate <sup>a</sup>	Percent seedling emergence <sup>c</sup>	Isolate <sup>a</sup>	Percent seedling emergence <sup>c</sup>
KASPII-01	30*	HDP1-25	89±7
KASPII-02	1*	HDP1-26	60±6*
KASPII-03	3*	HDP1-30	81±4
KASPII-04	35*	HDP1-38	76±2
KASPII-05	38*	HDP2-01	68±3*
KASPII-09	0*	HDP2-03	54±2*
KASPII-10	7*	HDP2-04	71±3*
KBP-01	30*	HDP2-10	81±4
KBP-02	40	HDP2-25	78±1
KPB-03	49	HDP2-28	79±4
KBP-04	25*	HDP2-29	75±5
SH-01	31*	YDP-01	78±6*
SH-03	33*	YDP-04	85±2
SL-01	34*	YDP-05	58±8*
SL-02	24*	YDP-16	50±8*
SL-03	34*	YDP-17	78±8
Ridomil <sup>b</sup>	68	YDP-18	83±4
Non-inoculated <sup>d</sup>	62	YDP-19	64±10*
		HDP1-23	20±6*
		HDP1-24	85±5
		Non-inoculated <sup>d</sup>	91±2

<sup>a</sup>Mycelial suspensions (2 ml, Absorbance at 600nm = 1.5) of *Pythium* isolates were inoculated into each glassware.

<sup>b</sup>Seeds were soaked in Ridomil 500x dilution for 24hr before planting.

<sup>c</sup>*Pythium* was not inoculated.

<sup>d</sup>There were four replications. Twenty seeds were planted into each glassware containing 120 cm<sup>3</sup> soil and 120 cc distilled water (2 cm water level of depth). Percent seedling emergence was determined 14 days after incubation at 30°C/20°C (day and night, 12hr/12hr).

\*Significantly not different from non-inoculated and Ridomil (500x dilution, Metalaxyl 25% a.i.) treatments (Dunnett,  $P=0.05$ ).

Table 1-8. Seedling emergence in water-seeded rice with inoculation of several *Pythium* isolates (Exp. 4)

Isolate <sup>a</sup>	Percent seedling emergence <sup>c</sup>	Isolate <sup>a</sup>	Percent seedling emergence <sup>c</sup>
HNP-01	36±2*	MJP-11	71±4*
HNP-22	58±1*	MJP-12	81±4
HNP-32	66±6*	MJP-13	56±8*
HNP-34	49±8*	MJP-16	43±3*
HNP-38	78±3	MJP2-04	48±3*
HNP-39	76±2	MJP2-07	76±6
HNP-40	88±1	MJP2-07	61±7*
HNP-41	59±4*	MJP2-08	65±5*
HNP-42	73±3*	MJP2-09	64±1*
HNP-43	51±6*	MJP2-14	68±8*
HNP-44	80±4	MJP2-18	65±5*
HNP-45	74±2*	MJP2-19	50±6*
HNP-46	61±8*	MJP2-24	16±3*
HNP-47	81±3	MJP2-25	64±8*
IKP-05	79±6	MJP2-30	70±5*
IKP-06	58±5*	MJP2-31	43±11*
NBP2-05	70±4*	NBP3-13	45±3*
NBP2-07	61±3*	NBP3-14	72±3*
NBP3-11	48±5*	P140	73±2*
NBP3-12	78±3	KASPII-09	66±4*
MJP-04	49±1*	Non-inoculated <sup>b</sup>	94±1

<sup>a</sup>Mycelial suspensions (2 ml, Absorbance at 600nm = 1.5) of *Pythium* isolates were inoculated into each glassware.

<sup>b</sup>*Pythium* was not inoculated.

<sup>c</sup>There were four replications. Twenty seeds were planted into each glassware containing 120 cm<sup>3</sup> soil and 200 cc distilled water (2 cm water level of depth). Percent seedling emergence was determined 14 days after incubation at 30°C/20°C (day and night, 12hr/12hr).

\*Significantly not different from non-inoculated and Ridomil (500x dilution, Metalaxyl 25% a.i.) treatments (Dunnnett, *P*=0.05).

Table 1-9. Seedling emergence in water-seeded rice with inoculation of *Fusarium* species

Isolates	Seedling emergence <sup>b</sup>
F128	54a <sup>c</sup>
F151	50a
F129	48ab
F188	31c
F196	34c
Non-inoculated <sup>a</sup>	40c

<sup>a</sup>Non-inoculated control did not have *Fusarium*.

<sup>b</sup>There were five replications. Twenty five seeds were planted for each glassware described as perviously. Percent seedling emergence was determined 10 days after incubation at 30°C/20°C (day and night, 12hr/12hr).

<sup>c</sup>Means followed by the same letter are not significantly different (LSD,  $P=0.05$ ).

Table 1-9. Seedling infection of rice planted onto water agar with inoculation of *Fusarium* species

Isolates	Number of infected seedling <sup>b</sup>
F128	8a <sup>c</sup>
F129	18a
F151	70b
F188	78b
F196	8a
Non-inoculated <sup>a</sup>	6a

<sup>a</sup>Non-inoculated control did not have *Fusarium*.

<sup>b</sup>There were five replications. Ten seeds were planted for each test tube and number of infected seedlings were counted 2 weeks after incubation at 30°C/20°C (day/night, 12hr/12hr).

<sup>c</sup>Means followed by same letters were not significantly different (LSD,  $P=0.05$ )



Fig. 1-3. Pathogenicity of *Fusarium* 151 and 188 on rice seedling in water agar without water.

**Pythium의 동정.** Plaats-Niterink의 문헌을 참고로 하여 지난해의 병원성이 강한 것으로 확인이 된 서산 분리균 P140, P136, P139은 *P. aquatile*, 광주에서 분리된 KASPII-04, 05, KBP-01, 02, 03, 04 균주들은 *P. pulchrum*, 사천에서 분리된 SH-01, 03 및 SL-01, 02, 03은 *P. rostratum*으로 동정되었다. 기타 균주들은 유성 기관인 난포자를 형성하지 않아서 동정할 수가 없었다.

#### 마. 생물학적 방제 균주의 길항력 검정

여주 지역에서 분리된 16개 세균의 *Pythium* YB013에 대하여 길항능력을 조사한 결과, 034801, 034803, 033202 등 3개 세균만이 각각 PDA배지에서 10, 7, 3 mm의 억제 지대를 보이면서 균사생장을 억제할 수 있었다 (Fig. 1-4 and Table 1-10). 길항능력이 우수한 034801 균주가 다른 여러 *Pythium* 분리균들에 대하여도 동일한 억제 능력을 갖는지를 조사한 결과, 이 분리 세균은 대부분의 다른 *Pythium* 분리균들에 대하여도 2 ~ 8 mm의 균사생장 억제 지대를 보여서 우수한 길항 능력

을 갖고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 1-5 and Table 1-11). 그러나, 길항력과 생물학적 방제효과간에 항상 상관관계가 있는 것은 아니기 때문에 길항력이 없는 모든 균주들도 생물학적 방제의 효과 시험에 포함되었다 (Chun, 1997).

Table 1-10. Inhibition of different bacterial isolates against *Pythium* YB013

Bacterial Isolate <sup>a</sup>	Inhibition zone (mm in distance) <sup>b</sup>
030601	0
030902	0
033201	0
033202	3
033203	0
033204	0
034601	0
034801	10
034802	0
034803	7
034804	0
035901	0
035902	0
035903	0
037201	0
037301	0

<sup>a</sup>Bacterial isolates were streaked on the center of PDA and mycelial plugs of *Pythium* YB013 were confronted on the other sides.

<sup>b</sup>Inhibition zones were measured 2 days after incubation at 28°C.

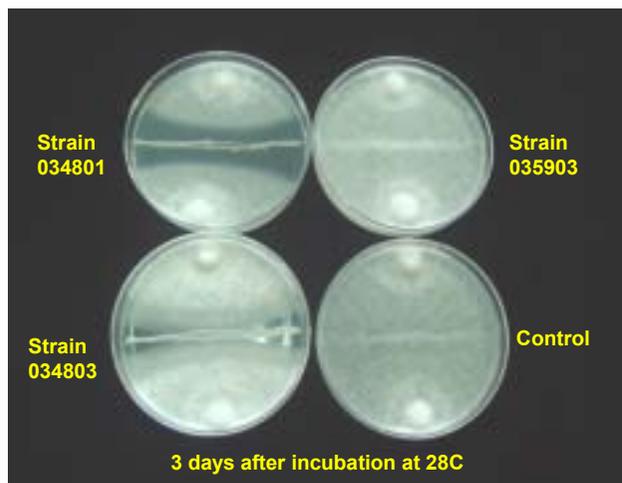


Fig. 1-4. Inhibition of bacterial isolates against *Pythium* YB013.

Table 1-11. Inhibition of bacterial isolate 034801 against different *Pythium* isolates

<i>Pythium</i> isolates	Inhibition zone (mm in distance) <sup>a</sup>
p133	2
p134	2
p136	5
p140	1
p138	3
p139	0
p141	0
YB008	8
YB016	7
YB010	4

<sup>a</sup>Bacterial isolate 034801 were streaked on the center of PDA and mycelial plugs of different isolates were confronted on the other sides. Inhibition zones were measured 2 days after incubation at 28°C.

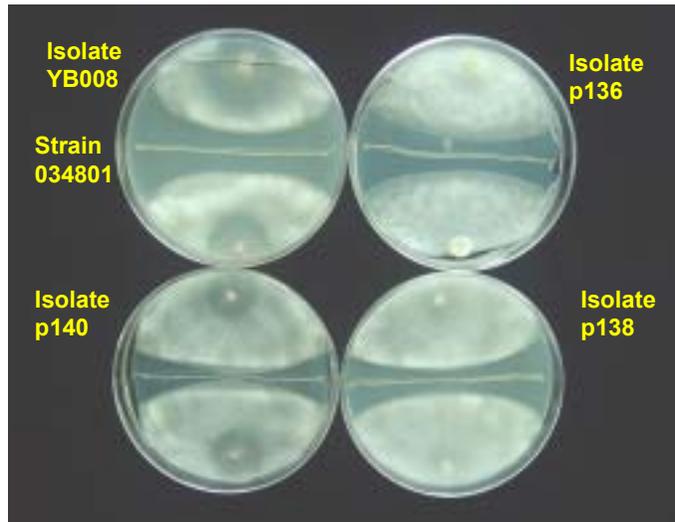


Fig. 1-5. Inhibition of bacterial strain 034801 against several isolates of *Pythium* species.

#### 바. 생물학적 방제 효과

조사한 분리 세균 중에 D324, 033201 등 8개의 균주들을 처리한 구에서는 입모율이 세균을 처리하지 않는 균주들에 비하여 현저히 높았다 (Dunnett,  $P=0.05$ ) (Table 1-12, 1-13, 1-14, and 1-15). 본 실험에서는 길항력과 생물적 방제효과와는 상관 관계가 없는 것으로 나타났다 (Table 1-10, 1-11 and 1-12). Exp. 4 (Table 1-15) 에서 전반적으로 일품벼의 입모율이 우수하였던 것은 성장실의 광의 조도가 LED (발광다이오드, Light Emitting Diode) source에 기인한 (조도가 약 20,000 lux) 자외선 조사가 포함되어 식물을 강하게 해줌) 것으로 고려된다. 기존의 성장실은 광의 source (조도가 약 10,000 lux)가 형광등이었다.

Table 1-12. Biological control of seedling disease in water-seeded rice with bacterial biological control agents (Exp. 1)

Treatment <sup>a</sup>	Seedling emergence (%) <sup>e</sup>
030601 <sup>b</sup>	41*
031702	48*
033201	49*
033202	28
033203	36
033204	15
034601	25
034801	29
034802	39*
034803	40*
034804	40*
035901	21
035902	37
035903	41*
037201	43*
037301	35
No bacteria <sup>c</sup>	13
Non-inoculated	41*
Ridomil <sup>d</sup>	51*

<sup>a</sup>All treatments were inoculated with *Pythium* YB013 except for non-inoculated described as previously.

<sup>b</sup>Seeds were soaked in each bacterial suspension (1.5 ml, Absorbance at 600nm = about 1.0) for overnight at 28°C and seeds drained on the next day were planted into each glassware.

<sup>c</sup>Seeds were soaked in sterile distilled water.

<sup>d</sup>Seeds were soaked in 500x dilution of Ridomil for 24 hr before planting.

<sup>e</sup>There were five replications per treatment. Thirty seeds were planted for each glassware as described previously. Seedling emergence through water was determined 10 days after planting.

\*Significantly different from no bacteria treatment (Dunnett,  $P=0.05$ ).

Table 1-13. Biological control of seedling disease in water-seeded rice with bacterial biological control agents (Exp. 2)

Treatment <sup>a</sup>	Seedling emergence (%)±SEM <sup>d</sup>
Non-Inoculated <sup>b</sup>	49±2*
Inoc.(No bacteria) <sup>c</sup>	34±1
B204	33±4
B410	25±6
B414	24±5
B402	17±6
B407	21±3
B413	41±3*
B401	28±4
B301	15±1
B409	36±3
B412	28±5
B408	20±2
B403	21±5

<sup>a</sup>All treatments were inoculated with *Pythium* P140 except for non-inoculated described as previously.

<sup>b</sup>Seeds were soaked in sterile distilled water.

<sup>c</sup>Seeds were soaked in each bacterial suspension (2 ml, Absorbance at 600nm = about 2.0) for overnight at 28°C and seeds drained on the next day were planted into each glassware.

<sup>d</sup>There were four replications per treatment. Twenty five seeds were planted for each glassware as described previously. Seedling emergence through water was determined 10 days after planting.

\*Seedling emergence is significantly different from no bacteria treatment and all the other bacterial treatments did not increase seedling emergence (Dunnnett,  $P=0.05$ ).

Table 1-14. Biological control of seedling disease in water-seeded rice with bacterial biological control agents (Exp. 3)

Treatment <sup>a</sup>	Seedling emergence (%)±SEM <sup>d</sup>
Non-Inoc <sup>b</sup>	67±6*
Inoc(No bacteria)	24±3
308 <sup>c</sup>	38±5*
305	50±4*
311	42±2*
302	40±5*
313	38±7*
315	59±2*
329	41±6*
303	54±5*
307	51±7*
304	41±4

<sup>a</sup>All treatments were inoculated with *Pythium* P140 except for non-inoculated described as previously.

<sup>b</sup>Seeds were soaked in sterile distilled water.

<sup>c</sup>Seeds were soaked in each bacterial suspension (2 ml, Absorbance at 600nm = about 2.0) for overnight at 28°C and seeds drained on the next day were planted into each glassware.

<sup>d</sup>There were four replications per treatment. Twenty five seeds were planted for each glassware as described previously. Seedling emergence through water was determined 10 days after planting.

\*Significantly different from no bacteria treatment (Dunnett,  $P=0.05$ ).

Table 1-15. Biological control of seedling disease in water-seeded rice with bacterial biological control agents (Exp. 5)

Treatment <sup>a</sup>	Seedling emergence (%)±SEM <sup>d</sup>
Non-Inoc <sup>b</sup>	92±3*
Inoc(No Bac) <sup>c</sup>	63±3
D324	80±5*
D316	78±3*
D311	76±5*
D315	76±4*
D305	75±4*
D302	74±3*
D320	74±2*
D303	73±3*
D308	73±4*
D310	73±2*
D323	73±3*
D301	72±3*
D313	71±5*
91-51	70±2*
D317	70±1*
D322	70±3*
D326	70±2*
D309	69±4
D318	69±4
D319	68±5
D304	67±1
D327	67±3
D307	66±2
D306	65±5
D325	65±6
D312	63±3
D314	62±4

<sup>a</sup>All treatments were inoculated with *Pythium* P140 except for non-inocultaed described as previously. The light source was LED (Light Emitting Diode).

<sup>b</sup>Seeds were soaked in sterile distilled water.

<sup>c</sup>Seeds were soaked in each bacterial suspension (2 ml, Absorbance at 600nm = about 2.0) for overnight at 28°C and seeds drained on the next day were planted into each grassware.

<sup>d</sup>There were four replications per treatment. Twenty five seeds were planted for each glassware as described previously. Seedling emergence through water was determined 10 days after planting.

\*Significantly different from no bacteria treatment (Dunnett,  $P=0.05$ ).

생물학적 방제 균주에 의해서만 잘 이용되는 탄소원 선발. 세균들만이 잘 이용하고 *Pythium* 종들은 이용하지 못하는 탄소원으로 세균들마다 약간의 차이가 있었으며, *Pythium* 종은 일반적으로 Mannitol, Sorbitol, Lactose, D-galactose 등을 잘 이용하지 못하였으나 D308, D316, D324 등 생물학적 방제균은 이들 탄소원을 잘 이용할 수 있었다. 각각의 탄소원에 대한 세균의 이용 정도는 세균의 종류에 따라 다양한 차이가 있었다 (Fig. 1-6a, b, c, d, e, f, and g). Glucose, Proline 등은 *Pythium* 종들이 잘 이용할 수 있었으며, Glucose는 세균과 *Pythium* 종들이 모두 잘 이용하는 탄소원들이었다. 탄소원 이용도 조사에 사용된 균주들은 037201을 제외하고는 모두 그람양성균으로 판정되어 고품체제의 보존기간에 문제가 없이 사용될 수 있음을 제시하여 주었다 (Table 1-16; 농과원 응용미생물과 분석).

Table 1-16. Identification of biological control agents

Isolated BCAs	Identification <sup>a</sup>	Matching Number <sup>b</sup>
D301	<i>Bacillus marisflavi</i>	310/311
D302	<i>Bacillus cereus</i>	311/311
D303	<i>Bacillus cereus</i>	341/341
D305	<i>Bacillus macroides</i>	291/291
D308	그람 양성	
D310	<i>Bacillus marisflavi</i>	310/311
D311	<i>Bacillus cereus</i>	331/331
D313	<i>Bacillus cereus</i>	340/341
D315	<i>Bacillus cereus</i>	341/341
D316	그람 양성	
D317	<i>Alcaligenes faecalis</i>	321/321
D323	<i>Bacillus cephaericus</i>	345/350
D324	<i>Bacillus cereus</i>	468/480
031702	<i>Bacillus megaterium</i>	194/202
033201	그람 양성	
037201	그람 음성	
035903	그람 양성	

<sup>a</sup>Identified on the basis of their 16s rDNA gene sequences

<sup>b</sup>Number of base showing sequence homology

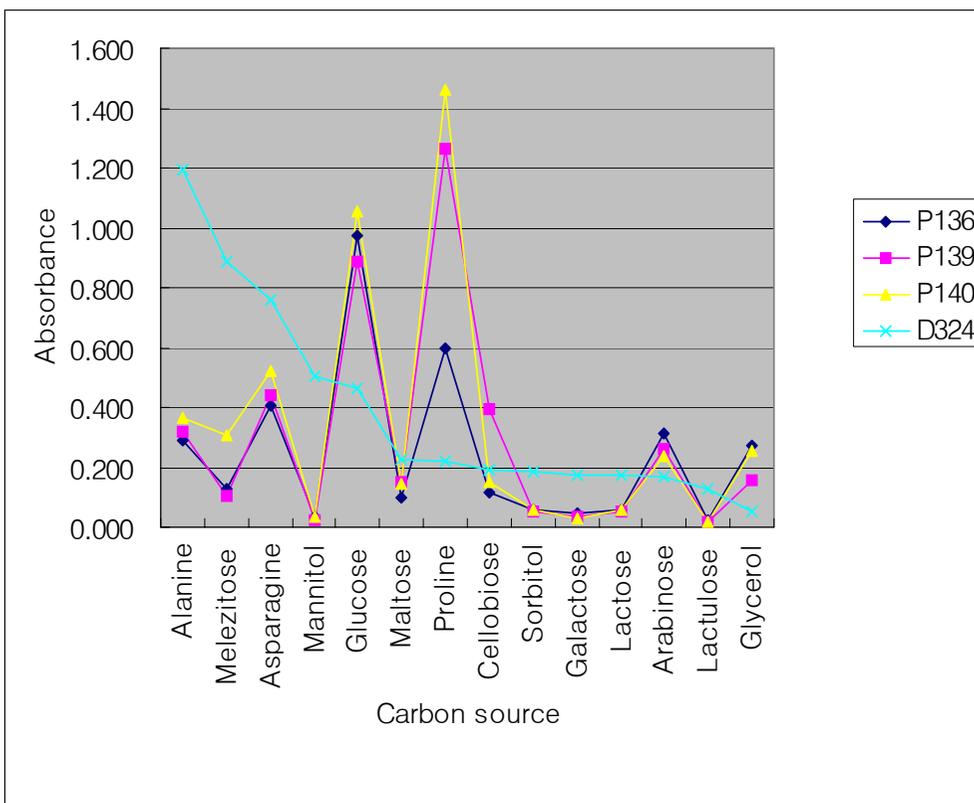


Fig. 1-6a. Comparative carbon utilization by the biological control agent (*Bacillus cereus* D324) and three *Pythium* species. The three mycelial plugs of the isolates grown on PV were dropped into 25ml of basal media supplemented with the respective carbon sources and incubated at 28°C for 7 days. The mycelium grown were blended for 10 sec and the respective absorbances were measured at 600nm after auto-zeroed with the respective solution of the carbon sources. A loop of single colonies of bacterial strain grown on TSA was inoculated into 25ml of basal media supplemented with the respective carbon sources and incubated at 28°C for 48 hrs. The respective absorbances of bacteria grown were measured at 600nm after auto-zeroed with the respective solution of the carbon sources.

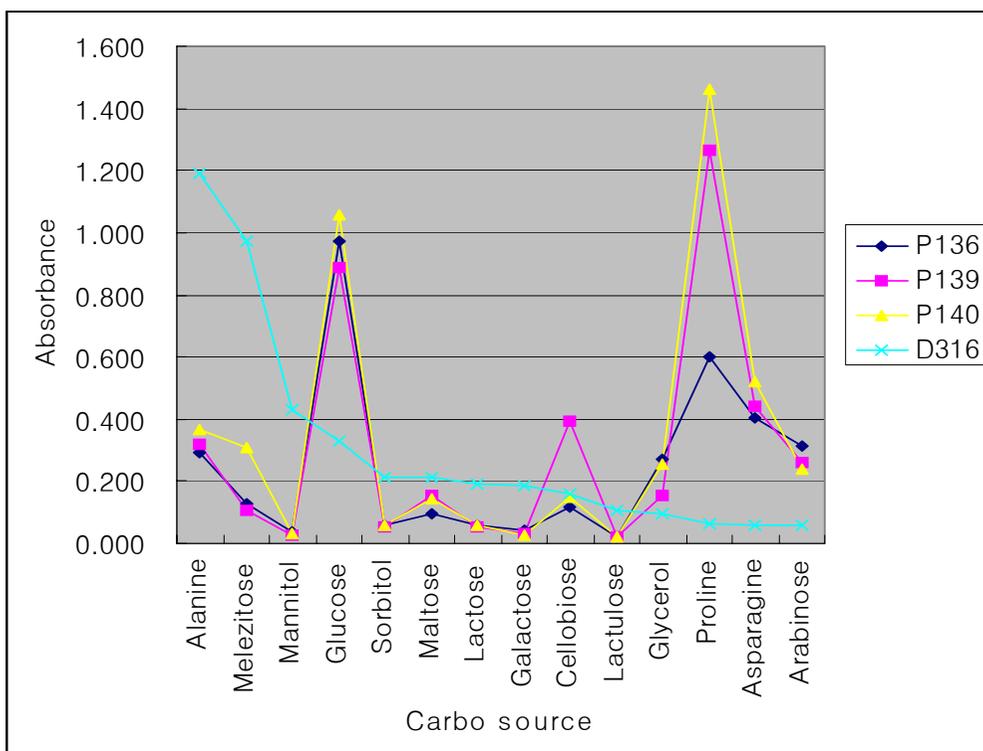


Fig. 1-6b. Comparative carbon utilization by the biological control agent (Strain D316) and three *Pythium* species.

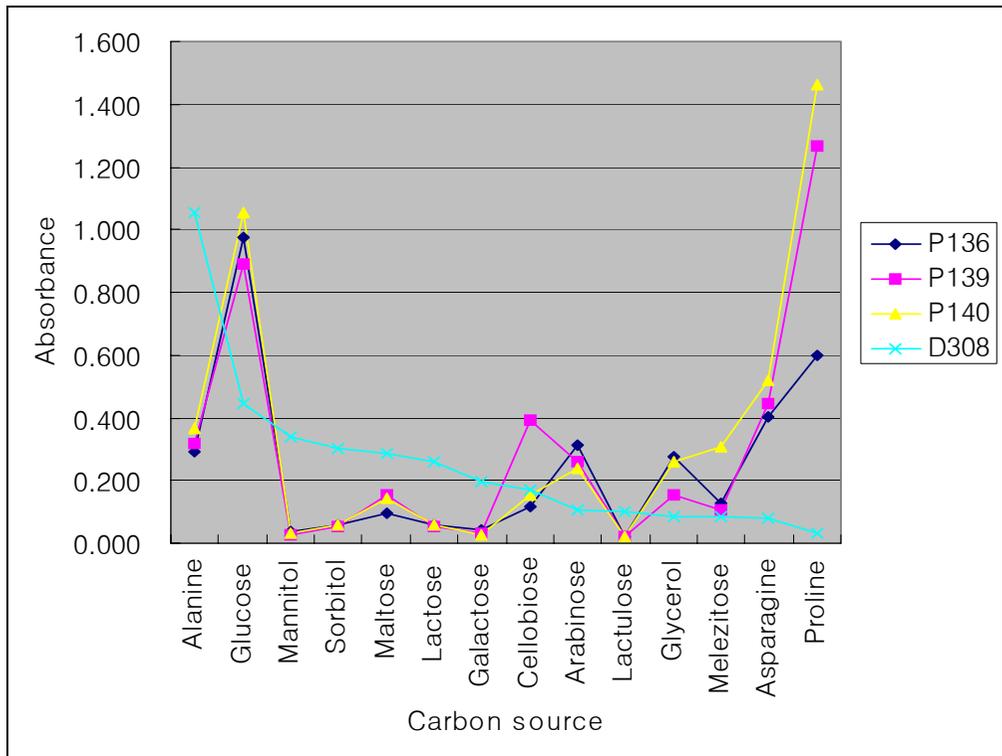


Fig. 1-6c. Comparative carbon utilization by the biological control agent (Strain D308) and three *Pythium* species.

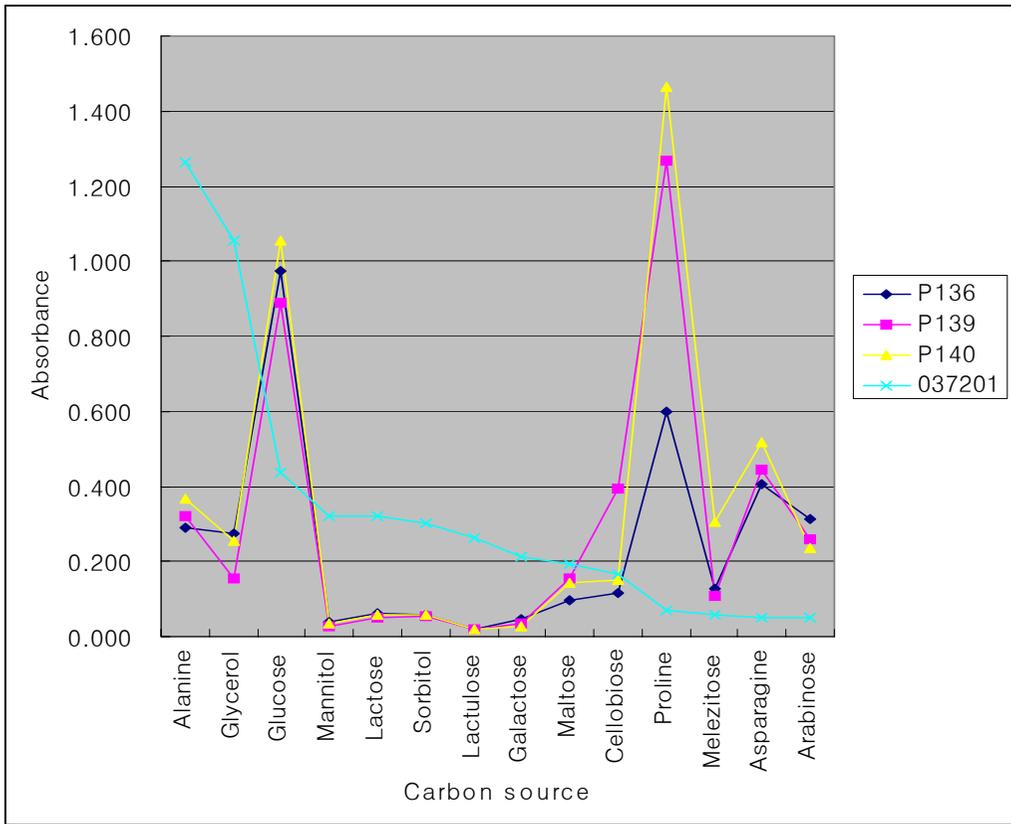


Fig. 1-6d. Comparative carbon utilization by the biological control agent (Strain 037201) and three *Pythium* species.

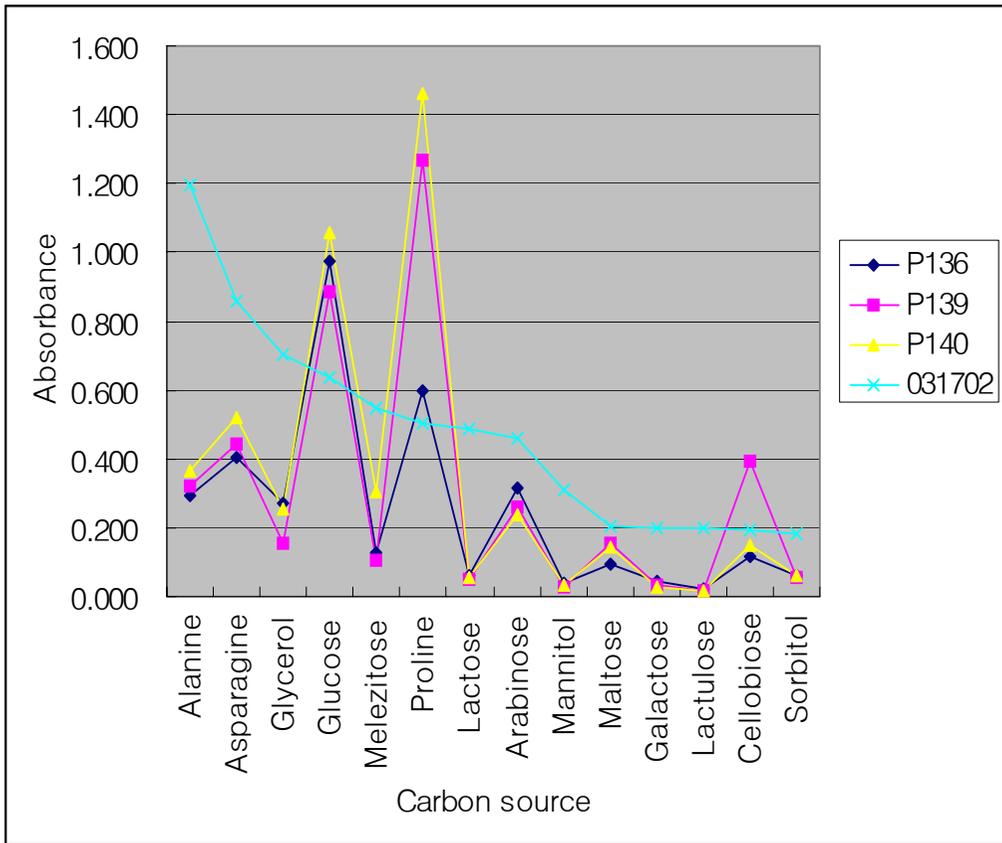


Fig. 1-6e. Comparative carbon utilization by the biological control agent (Strain 031702) and three *Pythium* species.

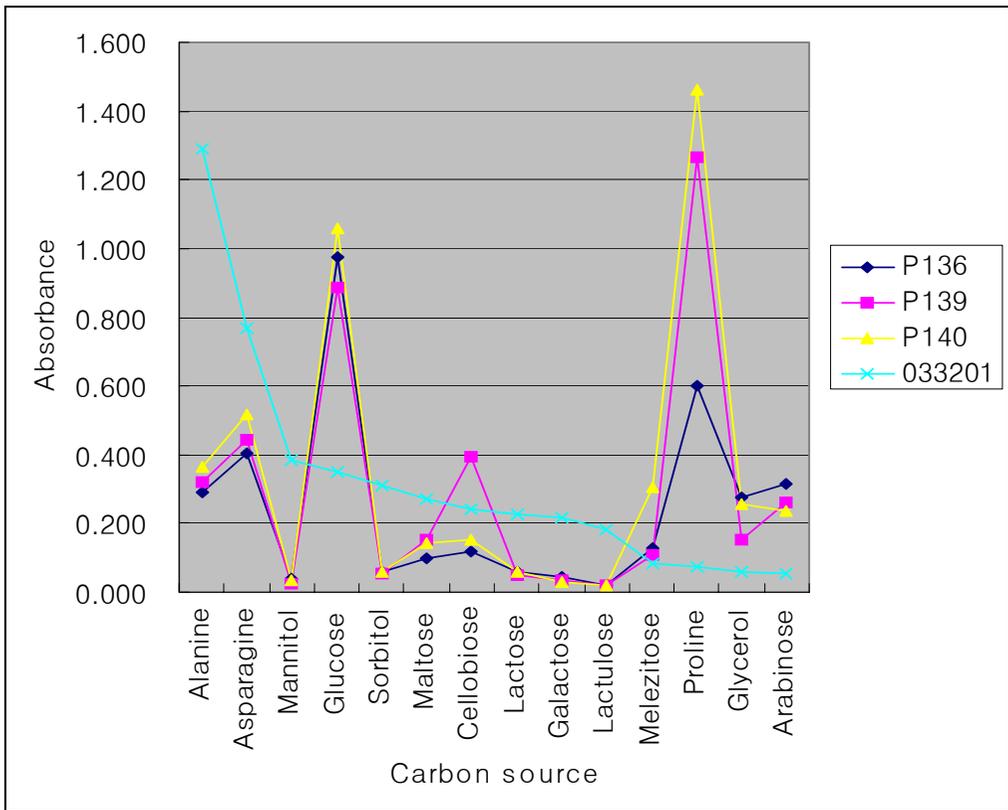


Fig. 1-6f. Comparative carbon utilization by the biological control agent (Strain 033201) and three *Pythium* species.

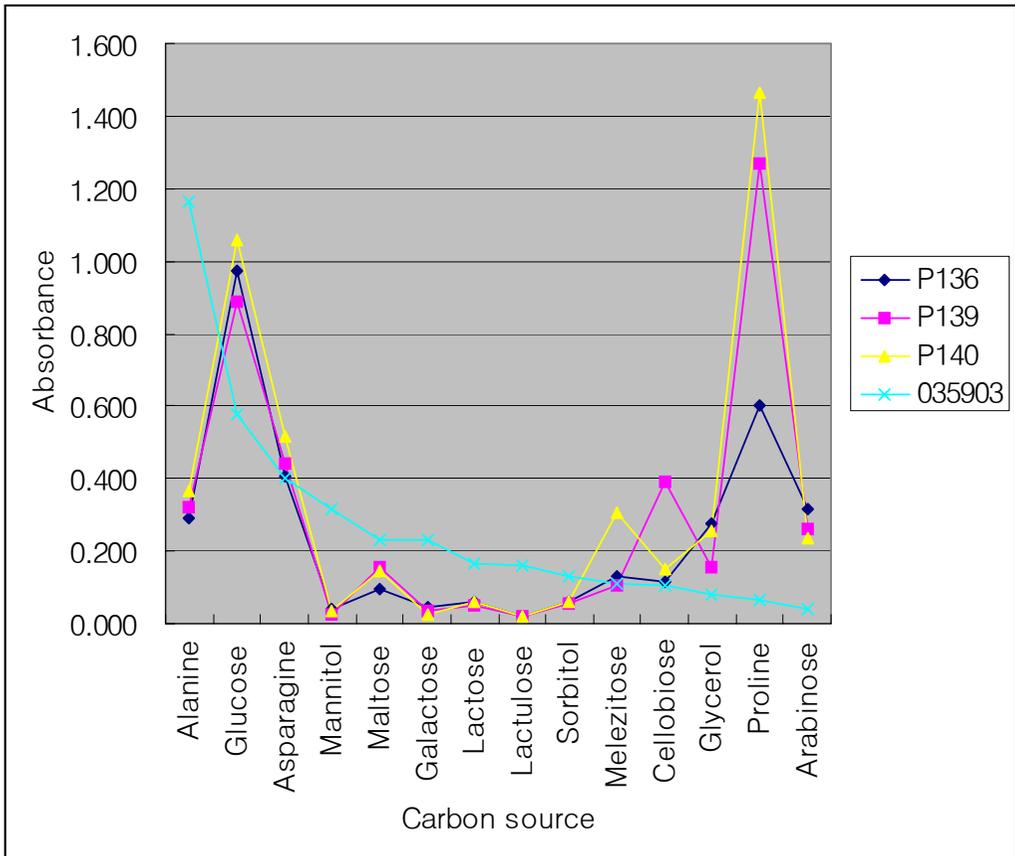


Fig. 1-6g. Comparative carbon utilization by the biological control agent (Strain 035903) and three *Pythium* species.

**메타락실과의 혼용 효과 구명.** 생물학적 방제 효과가 우수한 D324 등 3개의 균주에 대하여 메타락실을 40ppm으로 첨가한 TSA배지에서 저항성 세균을 선발하는 시험에서 세균들은 메타락실에 모두 저항성이었으나 모썽음병원균은 모든 완전히 억제되어 (Fig. 1-7), 종자를 기존 살균제(메타락실) 사용량의 1/2의 농도로 세균 현탁액에 침지하여 메타락실과 혼용시 생물학적 방제 효과를 증진시킬 수 있는지를 조사하였는데 메타락실의 종자 침지의 방제 효과가 뚜렷하지 않았다.



Fig. 1-7. Resistance of bacterial biocontrol agent and complete inhibition of *Pythium* sp. to 40ppm of metalaxyl. Left and right are the bacteria and *Pythium*, respectively.

#### 사. 분말제제의 생존력 검정

균주 당 100g의 formulation (분말 제제)을 만들 수 있도록 NA plate를 준비한 후 세균을 도말하여 28°C에 일야 배양하여 균체를 수득하였다. 타크, 지올라이트, 펄라이트 등의 carrier에 1:1, 1:1, 1:1.7 (carrier:세균현탁액 = w:w)의 비율로 균체의 현탁액을 잘 혼합하여 플라스틱 용기에 얇게 펼친 후 실온에서 건조시켰다. 미생물 분말 제제의 생물학적 방제 효과 실험은 미생물 분말 제제에 종자를 일야 동안 침지한 후, 또는 종자를 분의할(Fig. 1-8) 때 탄소원을 첨가하여 병원균 접종 용기에 파종하여 방제 효과를 구명하였다.



Fig. 1-8. Talc formulation and coating of rice seeds. Left is formulation, Middle for untreated seed, and Right for coated seeds.

타크, 지올라이트, 펄라이트 등과 혼합하여 만든 분말제제를 냉장(5°C, 25°C, 30°C)에 보관하면서 보관기간에 따라서 분말현탁액을 희석 평판하여 세균 밀도 변화를 조사하였다. 1개월 보관 결과, 대부분의 선발된 생물학적 방제균주들은 초기에 비하여 농도가 감소하였지만 13개월 보관까지 분말제제 1 그램 당 농도는 여전히 방제하기에 충분한  $10^7 - 10^9$ (CFU, colony forming unit)의 균체수를 가지고 있었다 (Fig. 1-9a, b, c, d, e, f, g, h). 세균에 따라서 균체수의 감소는 달랐는데, 특히 그람음성균의 균체수의 감소가 가장 컸었고 온도의 영향이 그람음성균인 037201에서 가장 크게 나타났다 (Fig. 1-9b). 그람 양성균 D324등은 talc 고형제에서 농도가 초기에 비하여도 크게 감소하지 않았다.

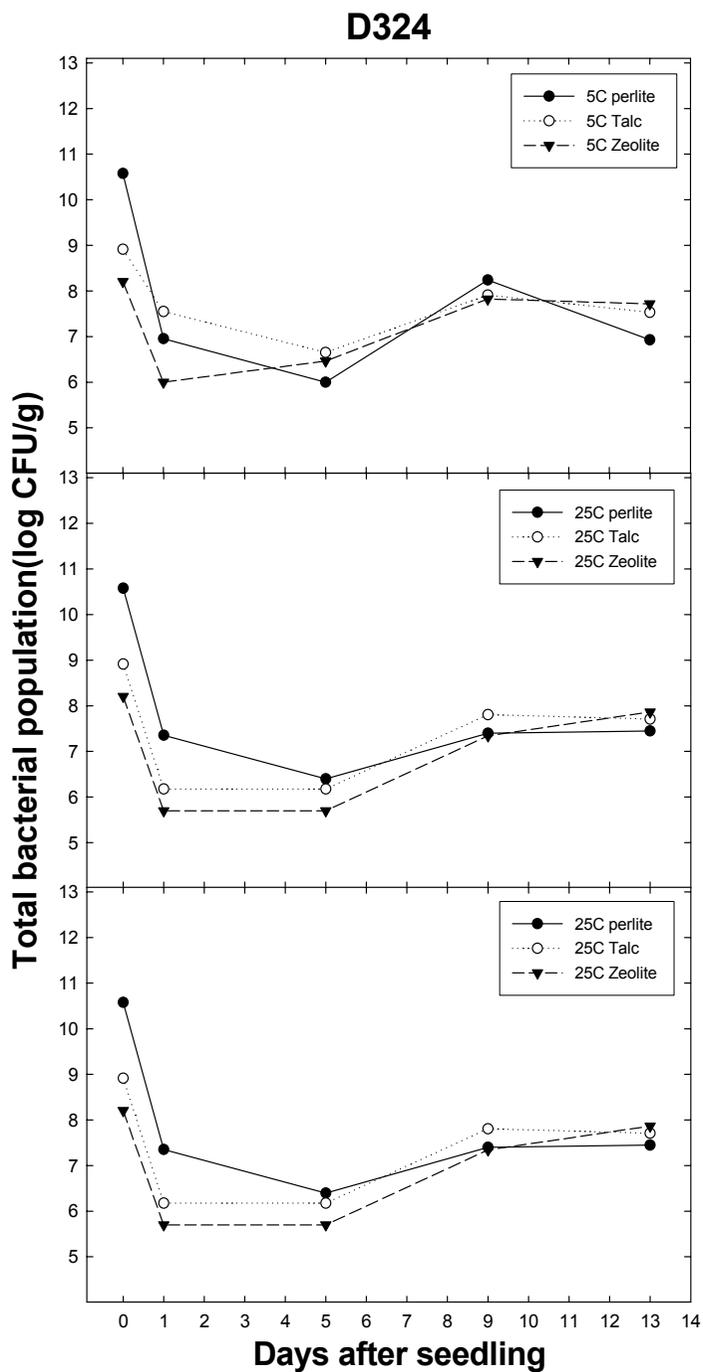


Fig. 1-9a . Effect of storage period and temperature on viability of formulation by *Bacillus cereus* D324

# 037201

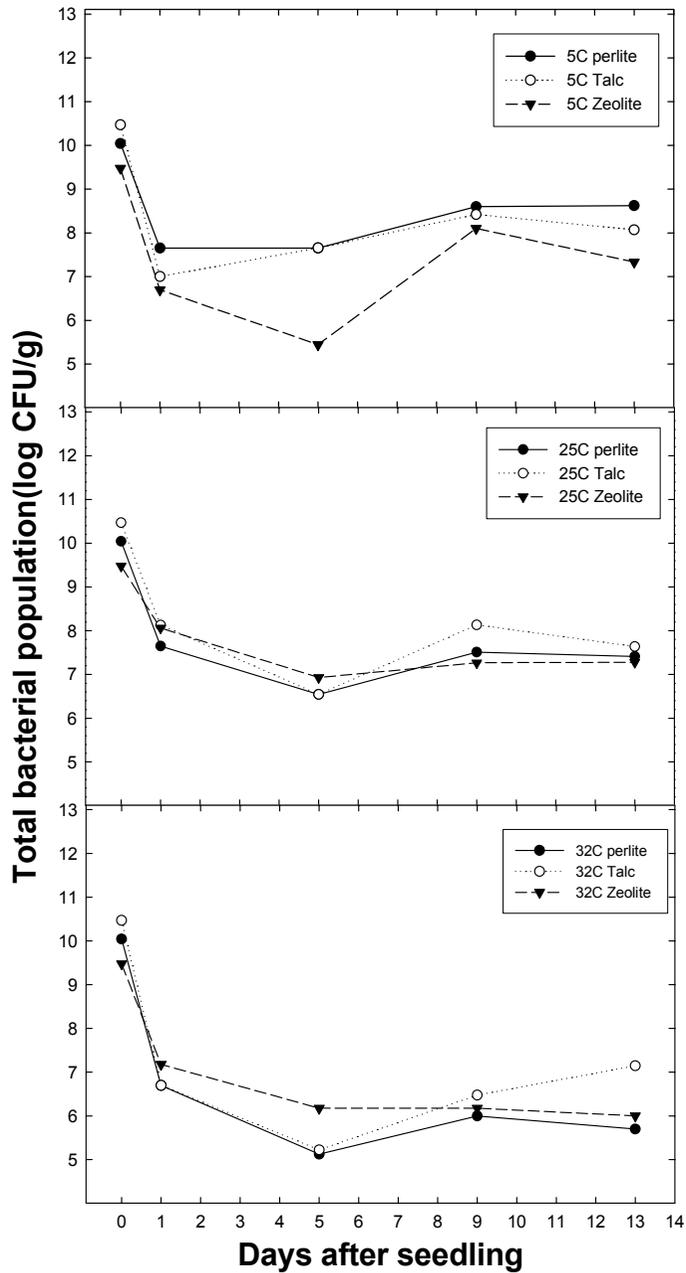


Fig. 1-9b . Effect of storage period and temperature on viability of formulation by bacteria 037201 (gram negative)

# D308

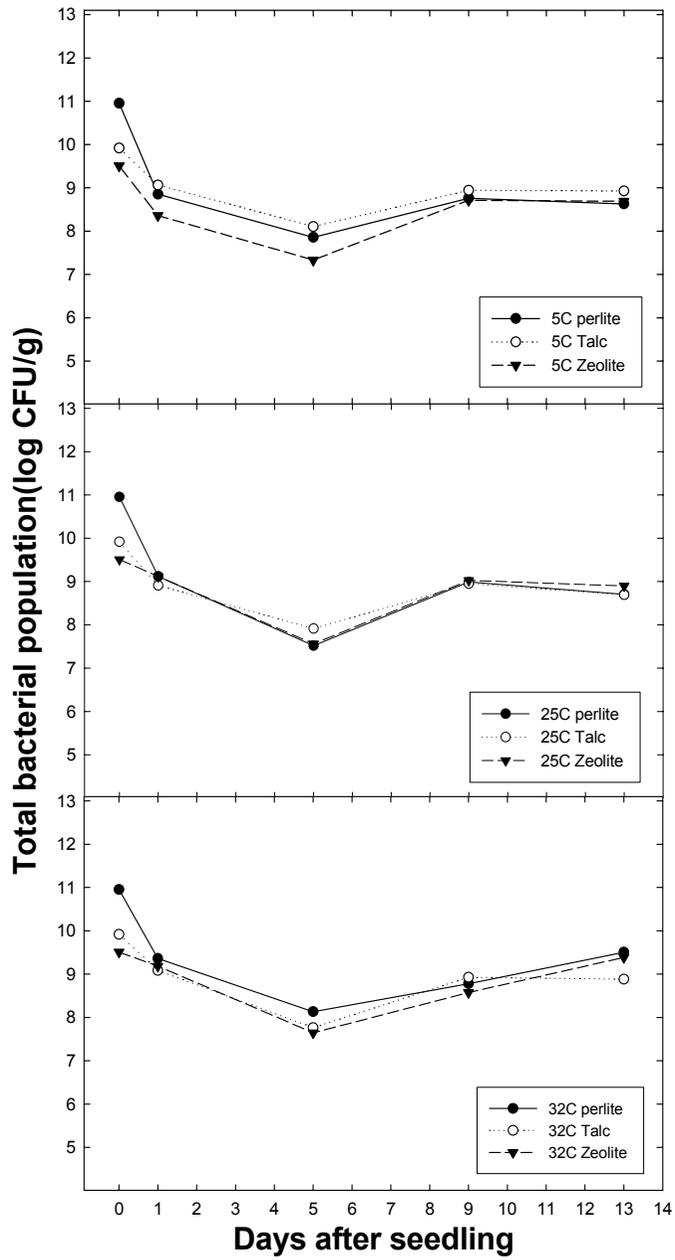


Fig. 1-9c . Effect of storage period and temperature on viability of formulation by bacteria D308 (gram positive)

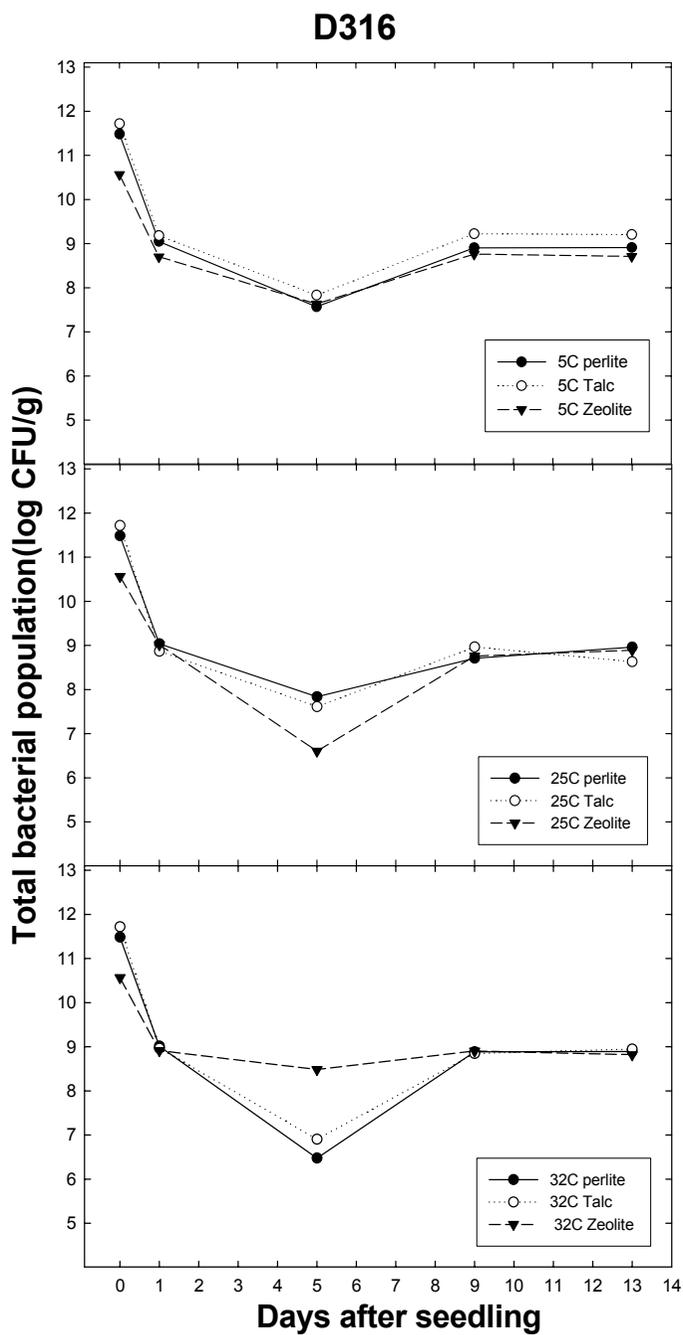


Fig. 1-9d . Effect of storage period and temperature on viability of formulation by bacteria D316 (gram positive)

### 035903

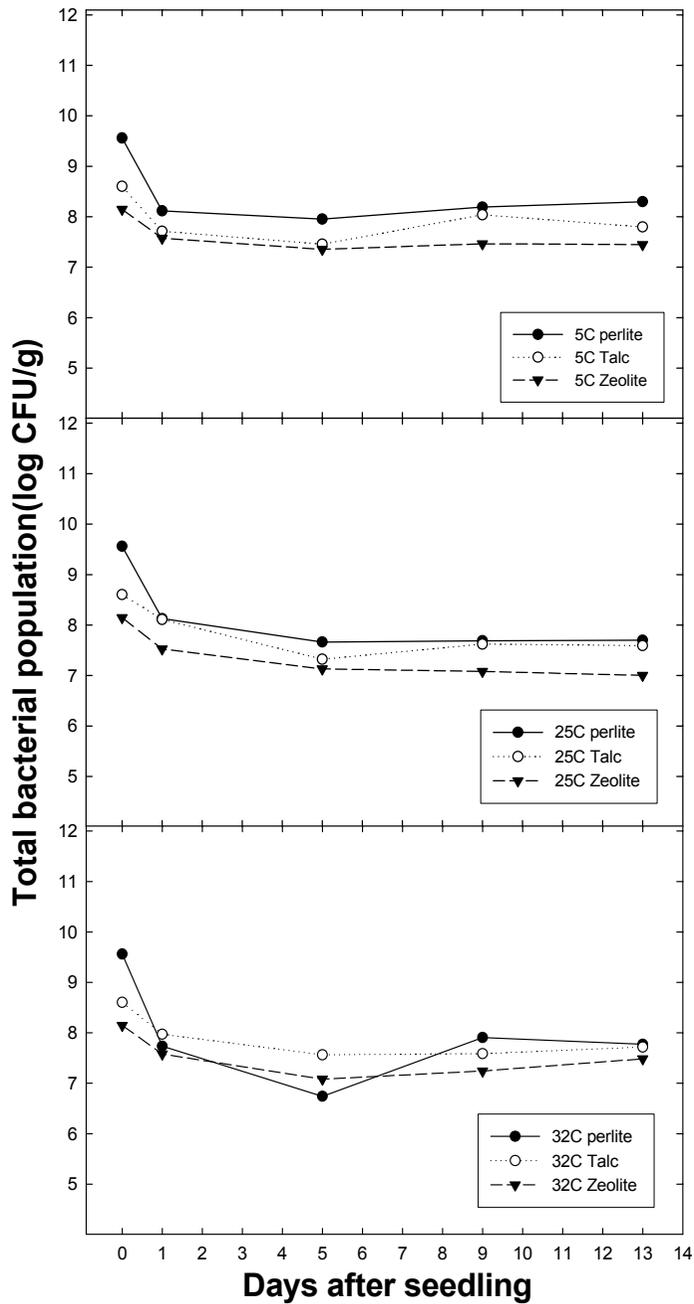


Fig. 1-9e . Effect of storage period and temperature on viability of formulation by gram positive bacteria 035903.

### 033201

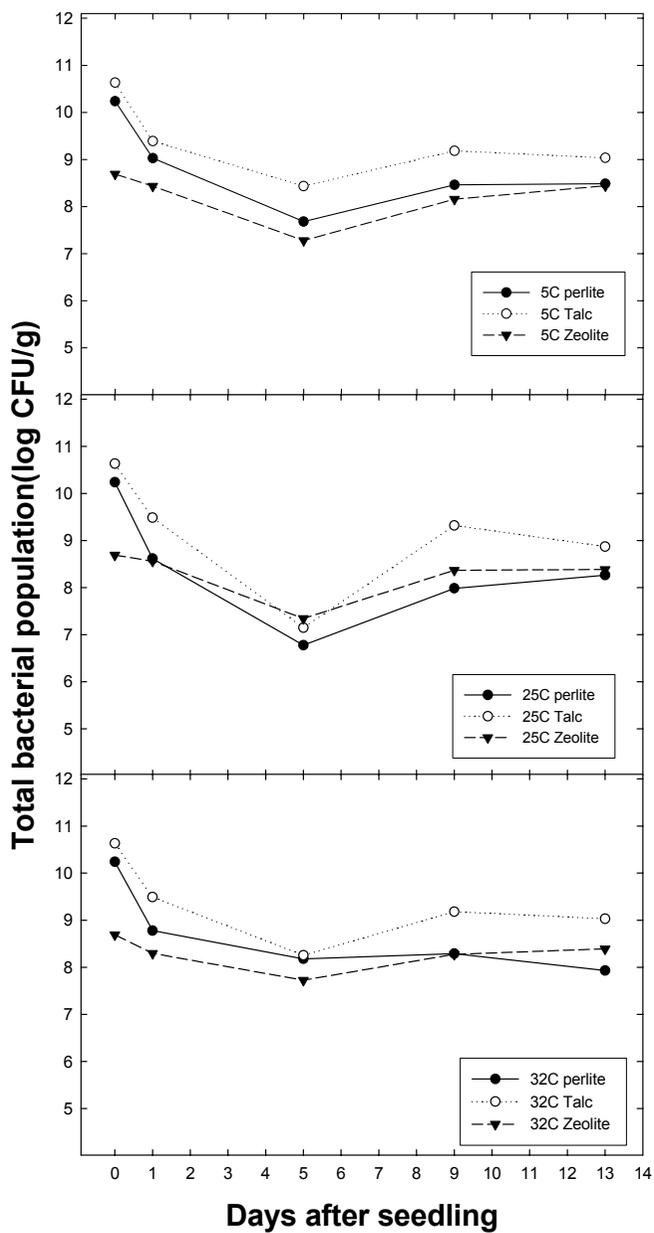


Fig.1-9f . Effect of storage period and temperature on viability of formulation by bacteria 033201 (gram positive)

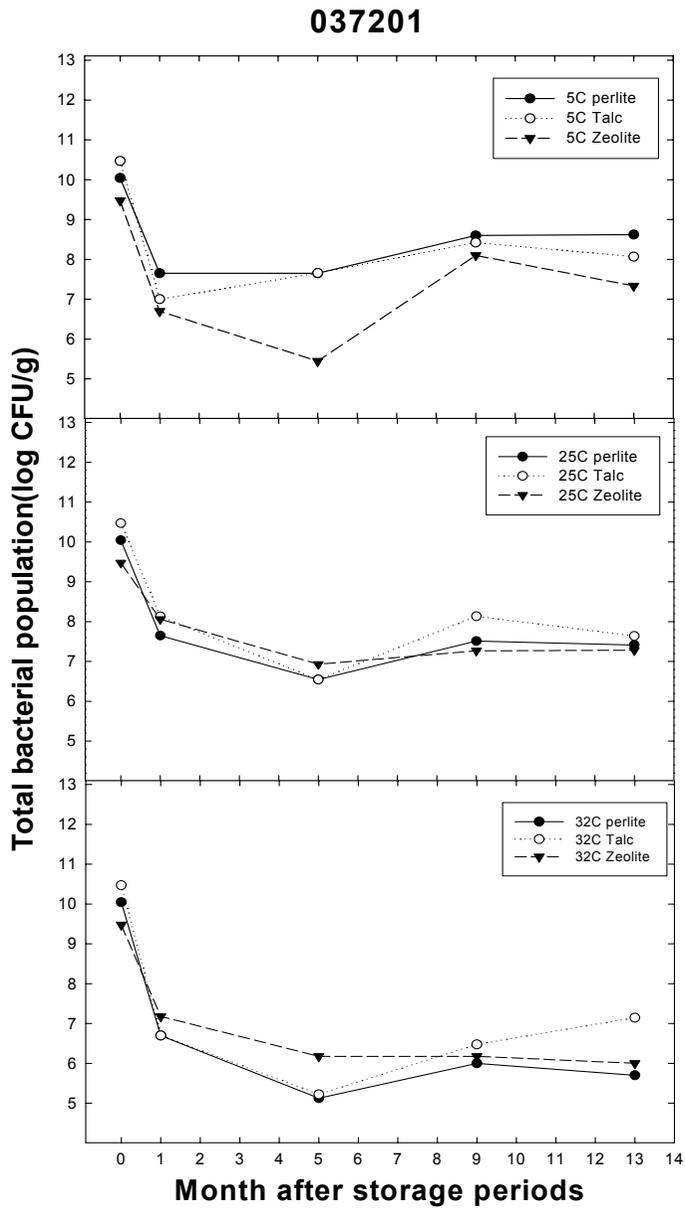


Fig.1-9g . Effect of storage period and temperature on viability of formulation by bacteria 037201 (gram negative)

031702

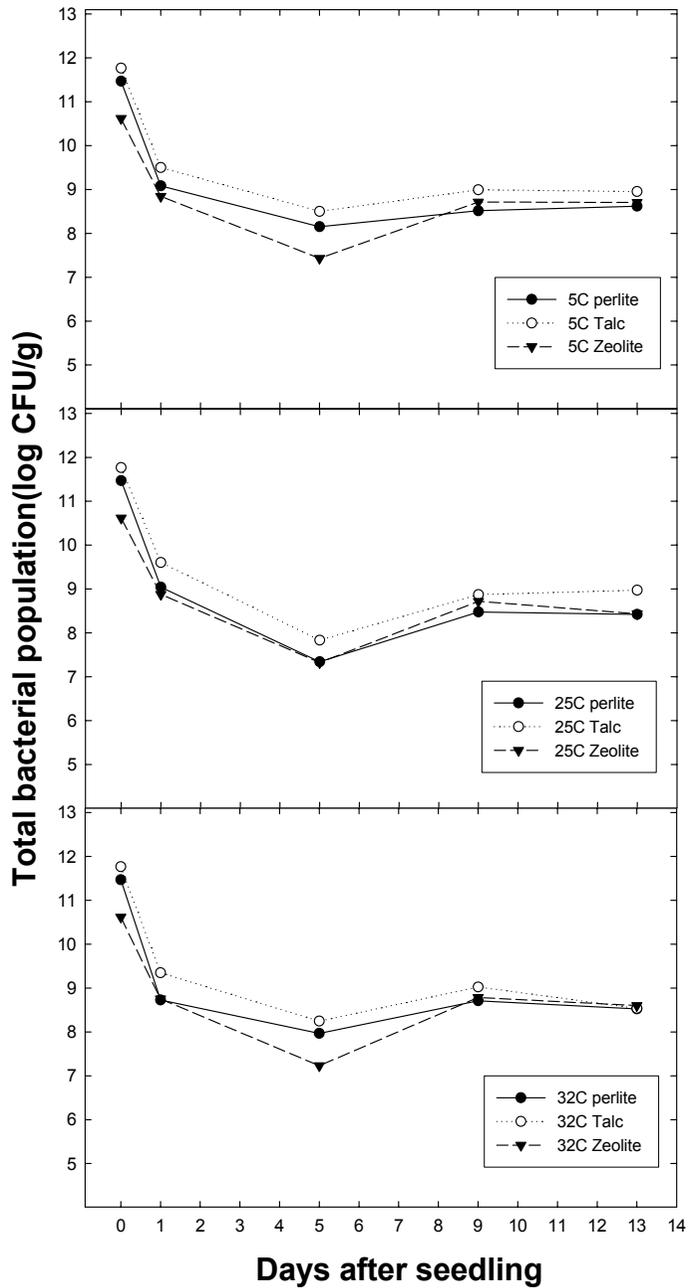


Fig.1-9h . Effect of storage period and temperature on viability of formulation by *Bacillus megaterium* 031702

생물학적 방제 효과의 증진. *Bacillus* D324에 D-sorbitol과 D-galactose와 같은 탄소원을 첨가한 분말로 종자를 분의하여 생장실과 (Table 1-17) 포장에서도 (Fig. 1-10) 입모율을 현저히 증가시켰다. 심지어 세균에 의하여만 특이적으로 잘 이용되는 탄소원만을 첨가한 처리의 경우도 무처리에 비하여 입모율이 증가하였다 (Table 1-17 and Fig. 1-10). 그러나, 포장에서의 수확량의 증가는 특별한 탄소원을 생물학적 방제균에 첨가한 것이 가장 뚜렷하였다 (Table 1-18).

Table 1-17. Effect of different carbon sources on efficacy of biological control

Treatment	Seedling emergence(%) ± SEM
Non-inoculated seed - Pyth	68.0± 4
Base <sup>a</sup> + D324 + 8% Alanine + Pyth	74.0± 5
Base + D324 + 8% Galactose + Pyth	73.0± 6
Base + D324 + 8% Sorbitol + Pyth	69.0± 9
Base + D324 + 8% Mannitol + Pyth	68.0± 4
Base + 8% Sorbitol + Pyth	66.0± 2
Base + 8% Galactose + Pyth	62.0± 5
Base + 8% Alanine + Pyth	60.0± 5
Base + D324 + 8% Glucose + Pyth	57.0± 3
Base + D324 + 8% Proline + Pyth	55.0± 13
Base + 8% Mannitol + Pyth	53.0± 10
Base + 8% Proline + Pyth	50.0± 6
Base + 8% Glucose + Pyth	49.0± 3
Base + D324 + Pyth	44.0± 10
Base + Pyth	36.0± 9

<sup>a</sup>Base denotes for talc and 1% guar gum; D324 for BAC; + Pyth for *Pythium* inoculation; - Pyth for non-inoculation.

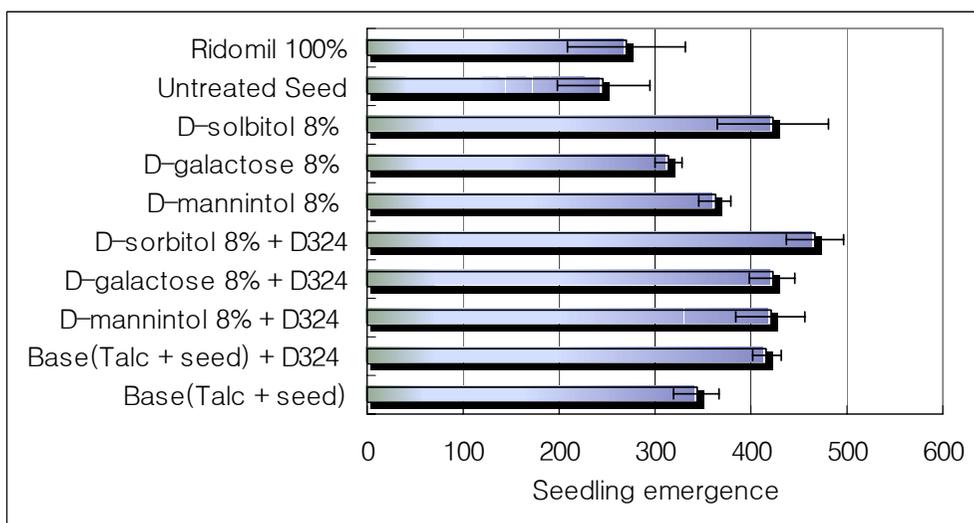


Fig. 1-10. Effect of carbon sources on seedling emergence in water-seeded rice in the field. Seedling stands were counted per square meter and there 5 replications. Bars indicates standard error of the mean.

Table. 1-18. Effect of carbon sources on harvest in water-seeded rice in the field

Treatment	Dry weight ( g/plot ) ± SEM
Base <sup>a</sup>	790.84 ± 31.80
Base + D324	855.41 ± 37.54 *
D-mannintol 8% + D324	829.33 ± 31.57 *
D-galactose 8% + D324	833.84 ± 35.51 *
D-sorbitol 8% + D324	873.02 ± 22.75 *
D-mannintol 8%	807.73 ± 27.52
D-galactose 8%	792.14 ± 30.69
D-sorbitol 8%	791.23 ± 22.56
Untreated Seed	705.89 ± 24.04
Ridomil 100%	751.04 ± 63.42

<sup>a</sup>Base denotes for talc and 1% guar gum; D324 for *Bacillus cereus* D324

\*Significantly different from untreated seed treatment (Dunnnett,  $P=0.05$ )

## 아. 생물학적 방제균의 밀도 변화

종자에 특별한 탄소원을 첨가한 처리는 초기 밀도는 높았으나 과중 1일후 탄소원 첨가구는 처리하지 않은 구에 비하여 오히려 전체 세균의 밀도에 있어서 낮게 나타났다 (Fig. 1-11, top and bottom). 또한, 생물학적 방제균의 밀도에 있어서도 탄소원 첨가에 의하여 생물학적 방제균인 리팜피신 돌연변이인 *Bacillus cereus* D324 RF01의 밀도가 D-galactose를 첨가한 처리에 비하여 특별한 더 높아지지 않았다 (Fig. 1-12). 이것은 예상하였던 결과와 다른 것으로서 생물학적 방제의 효과가 단순히 방제균의 밀도 증가에 의하지만은 않은 것이라 판단된다. 이 결과는 생물학적 방제 효과가 발아하는 종자권에서의 전체 세균의 밀도 증가에 기인하기 보다는 양적인 또는 질적인 변화에 기인하는 것임을 제시하여 준다고 하겠다 (Chun, 1997). Gilbert 등은 (1996) UW85n1 (*Bacillus cereus*)을 처리한 밀의 뿌리에서 뿌리권의 미생물 집단의 변화가 식물병 억제와 관련된다고 제안하였다.

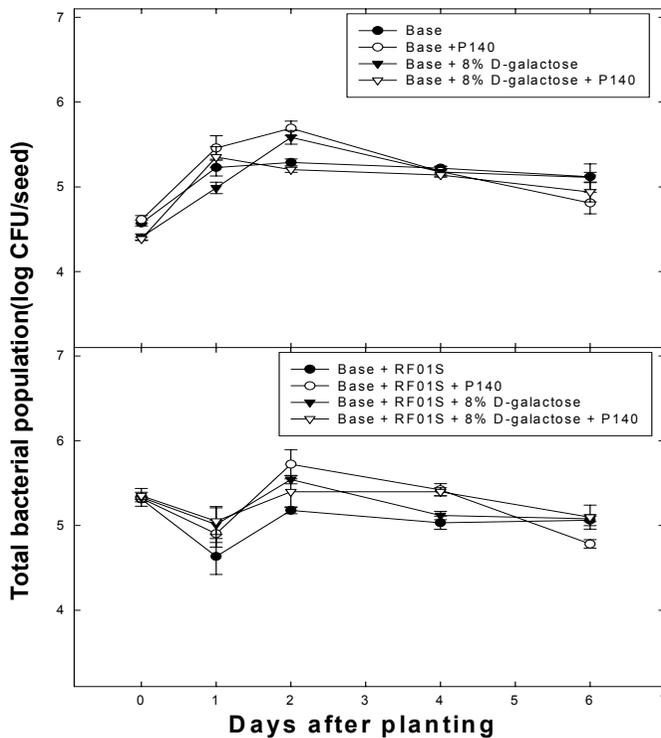


Fig. 1-11. Population dynamics of *Bacillus cereus* D324(wild type) and RF01S (rifampicin mutant). Base is 1% guar gum plus talc that was used to coat seeds.

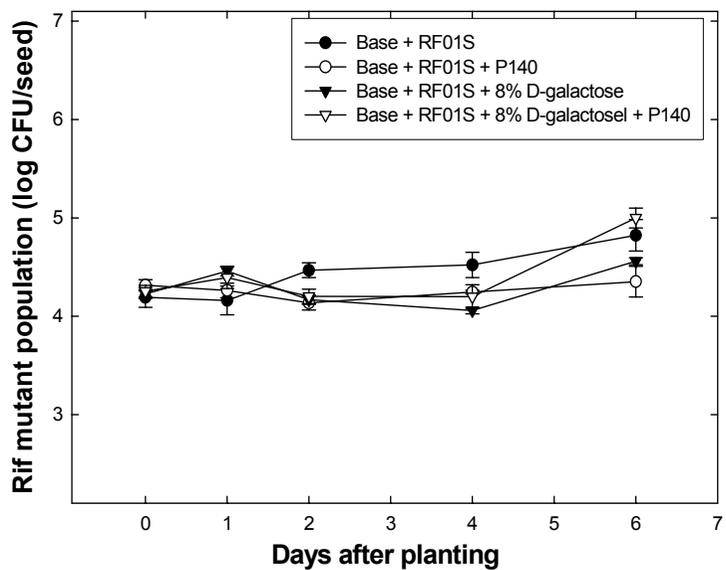


Fig. 1-12. Population dynamics of *Bacillus* wild type and RF01S (rifampicin mutant). Base is 1% guar gum plus talc that was used to coat seeds.

## 제2 세부과제: 벼모썩음병에 대한 저항성 유전자원 선발

### 1) 재료 및 방법

#### 가. 벼모썩음병의 발생 최적 환경

벼 모썩음병이 발생할 수 있는 최적 환경을 구명하기 위하여 작물시험장내 인공기상연구동 정밀유리실을 활용하여 실험을 실시하였다. 모썩음 병원성 균주를 선발·추출한 후에는 모썩음병의 발생율이 높은 환경조건을 찾기 위한 실험이 수행되었다. 화성벼와 대안벼를 시험품종으로 하여 종자를 담수상태로 침지하여 출아를 시켰으며, 포트에 수도용 상토를 담아 출아된 종자를 1립씩 파종하고 모썩음병을 크게 유발시키는 병원성 균주인 *Pythium* p133을 접종하였다. 균주가 접종된 종자는 평균온도 15, 18, 21, 24, 27℃에서 생육시켰으며, 담수깊이 별로는 2, 4, 6cm 깊이에서 평균온도는 21 및 27℃조건으로 실험을 수행하였다.

#### 나. 저항성 유전자원 평가 및 선발

분리 병원성 균주에 대한 저항성 유전자원 평가를 위하여 국내 재래종, 국내 장려품종, 통일형 품종, 북한벼 품종과 일본, 미국 및 이탈리아에서 수집한 벼 품종, 국제미작연구소에서 개발한 indica 계통 등 168 품종 및 계통을 선정하여 모썩음 병원성 균주에 대한 저항성 정도를 조사하고자 하였으며 실험에 사용된 품종 및 계통 부표 2-1에 나타내었다.

1차년도 실험 결과에 따라 벼 모썩음병이 비교적 잘 나타나고 벼 담수직파 재배 파종기와 유사한 온도조건인 평균온도 21℃, 담수깊이 4cm로 실험을 진행하였다. 우선 모썩음병 저항성 유전자원을 선발하기 위한 실험에 사용된 벼 품종은 생태형에 따라 분류하여

- 조생종 40품종(금오벼, 금오벼1호, 금오벼2호, 남원벼, 대진벼, 둔내벼, 만안벼, 만월벼, 만추벼, 문장벼, 삼백벼, 삼천벼, 상미벼, 상산벼, 상주벼, 상주찰벼, 새상주벼, 소백벼, 신운봉벼, 오대벼, 오봉벼, 운두벼, 운봉벼, 운장벼, 인월벼, 적진주벼, 조령벼, 중산벼, 중화벼, 진미벼, 진봉벼, 진부벼, 진부울벼, 진부찰벼, 태백벼, 태봉벼, 향미벼2호, 화동벼, 흑진주벼)
- 중생종 34품종(간척벼, 광안벼, 남천벼, 내풍벼, 농립나1호, 대립벼1호, 동해벼, 만풍벼, 봉광벼, 삼평벼, 상남발벼, 서안벼, 서진벼, 설향찰벼, 소비벼, 수라벼, 신선찰벼, 안산벼, 안성벼, 안중벼, 영해벼, 원황벼, 장안벼, 주안벼, 중안벼, 진품벼, 청명벼, 팔 달, 해평벼, 화봉벼, 화선찰벼, 화성벼, 화안벼, 화영벼)
- 중만생종 44품종(계화벼, 고아미, 금남벼, 낙동벼, 남강벼, 남평벼, 농호벼, 대산벼,

- 대안벼, 대야벼, 대청벼, 동안벼, 동진1호, 동진벼, 동진찰벼, 만금벼, 미향벼, 백진주벼, 새계화벼, 새추청벼, 석정벼, 설갱벼, 수진벼, 신동진벼, 아랑향찰벼, 양조벼, 영남벼, 영안벼, 일미벼, 일품벼, 중남벼, 주남벼, 추청벼, 탐진벼, 향남벼, 향미벼1호, 호안벼, 호진벼, 화남벼, 화명벼, 화삼벼, 화신벼, 흑남벼, 흑향벼)
- 통일형 13품종(다산벼, 안다벼, 아롬벼, 용문벼, 용주벼, 장성벼, 중원벼, 청청벼, 칠성벼, 통 일, 팔공벼, 풍산벼, 한강찰벼)
  - 재래종 8품종(녹두도, 아롱조, 유월조, 잔다다기, 조동비, 조정도, 중생은방주, 황조)
  - 북한벼 7품종(룡성찰벼, 평양16호, 평양9호, 함남10호, 함남14호, 함남1호, 함남24호)
  - 일본벼 11품종(고시히카리, 기호니시키, 도토리키와세, 무시시코카네, 사사니시키, 신석조생, 아이치노가오리, 오마치카네, 유키히카리, 키노히카리, 히토메보레)
  - 서양벼 4품종(Arroz da Terra, M-201, M-202, Mercury)
  - 필리핀벼 7품종(IR71682-39-2-1-2, IR72975-y61-1-1-1, IR71204-91-2-2, IR69860-10-1-2-k1-3-7, IR72225-29-1-1-3-1, IR71451-40-3-1, IR73111-B-R-15-3-1) 등 총 168품종이었다.

실험은 몇 회에 걸쳐 수행되었는데 168품종에 대해 파종 후 모썩음병원을 접종하고 감염정도와 생육을 조사하였다. 또한 비교적 착근율이 우수하고 감염에 저항성이 있는 8품종을 선발하여 차광처리에 따른 효과와 토양내 모썩음병원의 존재 유무에 따른 효과도 검토하였다.

#### 다. 저항성 품종에 대한 실내 및 포장 평가

1, 2차년도의 실험 결과에 따라 온실조건의 벼 답수직과 상태에서 첫째, 착근율이 높았고 둘째, 병원균 감염율이 낮았으며 셋째, 출아율이 높았다고 판단된 품종 중 우리나라에서 개발된 8 품종을 대상으로 포장에서의 모썩음병에 대한 저항성을 검정함과 동시에 최근 개발된 우리나라 벼 품종 중 직파에 적응성이 있다고 인정되어 온 5 품종을 동시에 검정하였다.

우리나라에서 개발한 품종 중 온실실험 조건에서 착근율이 높았고 병원균 감염율이 낮았으며 출아율이 높았던 품종은 원황벼, 상주찰벼, 금남벼, 탐진벼, 농립나1호, 미향벼, 설향찰벼, 흑진주벼 등 8품종이었으며 직파적응 품종으로 인정된 품종 중 이번 실험에 사용된 품종은 주안벼, 대산벼, 광안벼, 동안벼, 농호벼 등 5품종이었다.

저항성 품종에 대한 포장평가의 실험방법은 답수직과를 하기 위해 눈에 물을 대어 썩레질 한 후 내경이 0.15m<sup>2</sup> 크기인 플라스틱 바구니에 바닥을 도려내어 눈에 밀착시키고 발아를 시작한 벼 종자를 각 품종 및 반복당 63립씩 파종하였는데 실험 규모는 모썩음 병원균(phytium-133 및 phytium-140) 처리 유무, 품종 11 및 각 처

리당 6반복씩으로 하여 전체 실험규모는 132개였다. 파종시기는 수원지역에서 담수직과 파종에 적당한 5월 12일에 파종하였다.

또한 모썩음병 저항성에 대한 기초생리 연구로는 인공기상연구동을 이용하였으며 실험에 이용된 벼 품종은 모썩음병에 강하였다고 판단된 4품종(상주찰벼, 탐진벼, 농립나1호, 미향벼)과 약하다고 판단된 4품종(계화벼, 새추청벼, 주남벼, 흑남벼)을 사용하였는데 온도조건은 평균 18, 21, 24, 27℃ 조건에서 담수직과 하여 생육의 진전정도에 따라 온도 및 품종별 배유의 잔존비율을 구하고 발아시 전분을 분해하는 효소인  $\alpha$ -아밀라제의 활력을 측정하였다.

## 2) 결과

### 가. 모썩음병 발생 최적환경 구명

모썩음병 최적환경을 구명하기 위한 실험은 화성벼와 대안벼를 시험품종으로 하고 처리온도를 평균온도 15, 18, 21, 24, 27℃ 등 5처리로 하여 실험을 실시하였다. 담수상태에서 종자를 출아시켜 포트에 파종하고 모썩음병 병원성 균주인 *Pythium*-140을 접종한 다음 담수깊이를 2cm로 하여 모썩음병 발병 최적온도를 조사함과 동시에 담수깊이별 모썩음병의 발생여부는 평균온도 21 및 27℃에서 담수깊이를 2, 4, 6cm로 하여 실험을 수행하였다.

온도조건별 모썩음병의 발생여부는 표 2-1 및 그림 2-1에서 보는 바와 같으며 처리온도 15℃에서는 감염에 의한 출아불량은 있었으나(사진 2-1 참조) 감염 후 벼가 계속 성장하지는 못하였지만 18℃ 이상에서는 비록 모썩음병에 감염은 되었지만 벼의 생장은 지속되는 현상을 나타내었다(사진 2-2 참조). 품종별로 보면 화성벼는 처리온도 24℃에서 감염율이 가장 높았으며 대안벼는 18~24℃ 사이에서는 비슷한 감염율을 보여 모썩음병이 발생하는 최적온도는 품종에 따라 다소 달라지며 감염정도 또한 품종에 따라 고도의 유의성을 나타내었다.

표2-1. 온도별 시험품종의 모썩음병 발생 상황

처리온도 (평균 °C)	시험품종	감염에 의한 발아불량(%)	감염후 생육 지속(%)	총 감염율(%)
15	화성벼	10.4	0	10.4
	대안벼	5.2	0	5.2
18	화성벼	6.3	12.5	18.8
	대안벼	7.3	3.1	10.4
21	화성벼	14.6	7.6	22.2
	대안벼	2.8	4.2	6.9
24	화성벼	11.1	20.1	31.3
	대안벼	2.1	7.6	9.7
27	화성벼	7.6	4.2	11.8
	대안벼	2.1	0.7	2.8

Source	df	SS	MS	F value
온도	4	1445.4	361.4	5.68**
품종	1	2113.5	2113.5	33.23**
온도×품종	4	510.5	127.6	2.01
오차	50	3180.1	63.6	
전체	59	7249.5		

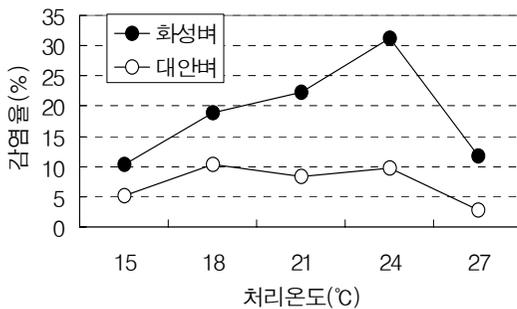


그림 2-1. 평균 온도별 시험품종들의 모썩음병 감염 정도



사진 2-1. 모썩음병에 감염되어 출아가 중지된 종자

또한 파종후 담수깊이에 따른 모썩음병의 발생 정도를 파악하고자 처리온도를 21, 27°C로 하고 담수깊이를 2, 4, 6cm로 처리한 결과는 표 2-2 및 그림 2-2에서 보는 바와 같이 벼 모썩음병은 21°C가 27°C보다 발생이 월등히 많았으며 담수깊이는 시험품종에 관계없이 4cm 깊이에서 모썩음병의 발생이 가장 많았다. 그러나 담수

깊이에 따른 벼의 착근정도는 사진 2-3에서 보는 바와 같이 담수깊이 2cm에서는 벼의 착근 상태가 양호하였고 4cm 깊이에서는 착근 중 들뜬 뿌리가 다소 발생하였으며 6cm 깊이에서는 대다수의 벼 종자에서 착근이 잘되지 않고 들뜬 뿌리가 발생하여 물속에서 위치의 이동이 심하였다.

표 2-2. 처리온도 및 품종별 담수깊이에 따른 모썩음병 감염정도

처리온도	시험품종	담수깊이 (cm)	감염후 발아불량(%)	감염후 생육(%)	총 감염율(%)
21℃	화성벼 대안벼	2	14.6 2.8	7.6 4.2	22.2 6.9
	화성벼 대안벼	4	16.7 4.9	21.5 10.4	38.2 15.3
	화성벼 대안벼	6	17.4 2.8	9.0 2.8	26.4 5.6
27℃	화성벼 대안벼	2	7.6 2.1	4.2 0.7	11.8 2.8
	화성벼 대안벼	4	7.6 6.3	9.7 2.1	17.4 8.3
	화성벼 대안벼	6	12.5 5.6	2.8 0	15.3 5.6

Source	df	SS	MS	F value
온 도	1	1432.0	1432.0	24.58**
담수깊이	2	1016.3	508.2	8.72**
품 종	1	3762.8	3762.8	64.59**
온도×담수깊이	2	233.9	116.9	2.01
온도×품종	1	488.3	488.3	8.38**
담수깊이×품종	2	49.8	24.9	0.43
온도×담수깊이×품종	2	44.7	22.3	0.38
오 차	60	3495.2		
전 체	71	10522.9		

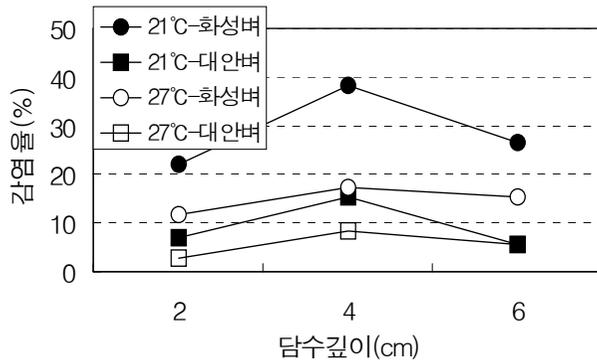


그림 2-2. 처리온도 및 담수깊이에 따른 벼 품종별 모썩음병 발생 정도

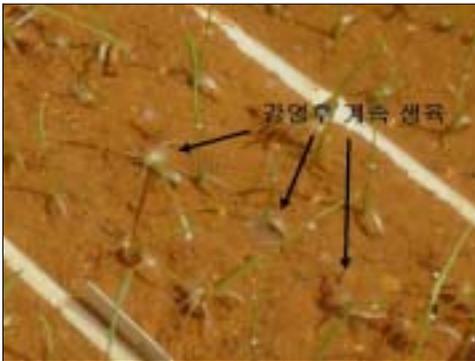


사진 2-2. 모썩음병에 감염되었으나 생육을 계속하는 벼 식물체

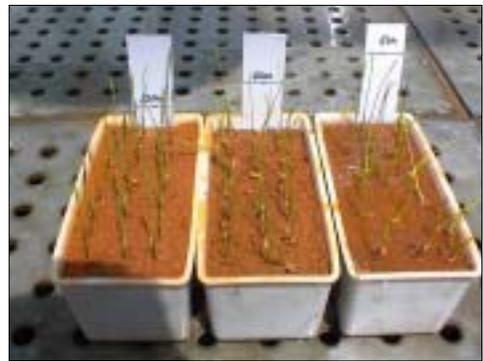


사진 2-3. 담수깊이별 출아종자의 착근정도

#### 나. 모썩음 병원성 균주에 대한 저항성 유전자원 평가

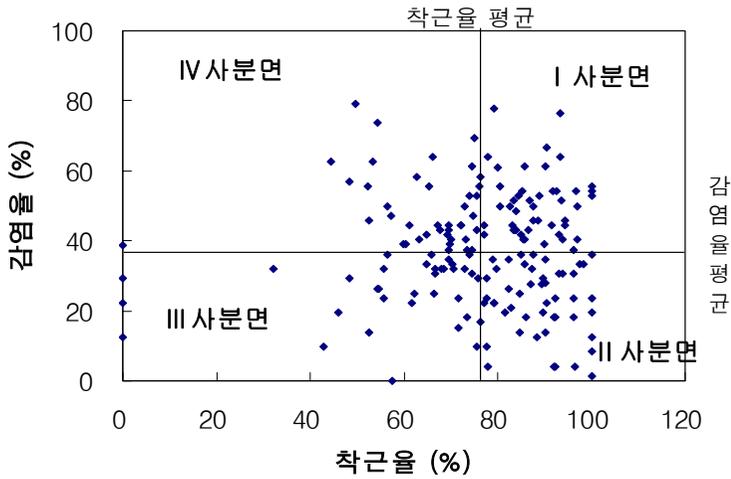


사진 2-4. 담수직파 재배에서 착근이 양호한 품종(좌)과 착근이 불량한 품종(우)

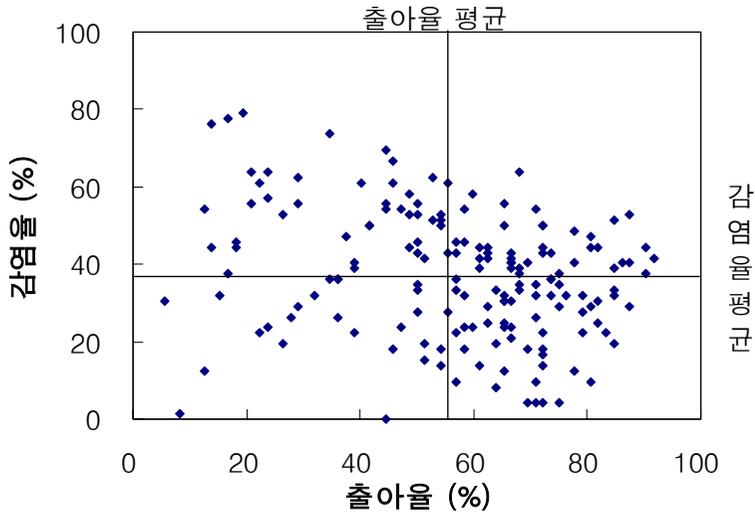
모썽음병이 가장 많이 발생하는 적정 환경조건은 평균기온 24℃ 및 담수깊이 4cm 였지만 우리나라에서 담수직파를 하는 시기의 온도를 고려하여 평균기온 21℃ 및 담수깊이 4cm인 조건에서 실험을 실시하였다. 일품벼 등 국내외 168품종 및 계통을 이용하여 싹을 틔운 종자를 포트에 파종하고 모썽음병 병원성 균주인 phytiun-133을 고농도로 접종한 다음 담수깊이를 4cm로 하여 평균온도 21℃(최고 24 / 최저 17℃, 변온)에서 모썽음병의 발생과 벼 뿌리의 착근 정도 및 생육을 관찰한 결과 각 품종별 조사결과는 <부표-1>에 별도로 나타내었고, 실험에 사용된 168 품종을 국가별로 분류하고, 우리나라 벼 품종은 다시 생태형별로 분류하여 각 품종군별 출아율과 감염율 및 뿌리 착근율을 조사한 결과는 <표 2-3>에서 보는 바와 같이 모썽음병 접종에 의한 출아율은 우리나라 품종군이 조생종, 중생종, 중만생종 및 통일형 품종 모두 상대적으로 높았으며 일본에서 도입된 품종이 가장 낮았고 우리나라 재래 품종과 북한품종, 서양품종 등은 중간정도의 출아율을 나타내었다. 또한 모썽음병에 감염된 비율은 서양에서 도입된 품종이 16.7%로 가장 우수하였고 그 외 품종군은 대체로 28.5~41.5%내에서 비슷한 경향을 나타내었고, 직파재배에서 꼭 필요한 주요 요인인 착근율은 서양에서 도입된 품종이 비교적 높게 나타났으며 필리핀에서 도입된 인디카 계통은 착근율이 저조하였고 현재 전국적으로 우리나라에서 재배되고 있는 조생종, 중생종 및 중만생종 품종들은 아주 양호한 것으로 나타났다. 따라서 서양품종군은 출아율만 향상시키면 직파에배에 적합한 품종이었고 전반적인 우리나라 품종들은 직파재배에 양호한 것으로 사료되었다.

<표 2-3> 모썽음병 접종에 의한 주요 품종군별 출아율, 감염율 및 착근율

품 종 군(품종수)		출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
한국품종 (139)	조생종(40)	66.7	37.9	77.8
	중생종(34)	57.4	41.3	78.1
	중만생종(44)	60.4	36.5	81.4
	통일형 품종(13)	65.1	29.0	70.6
	재래품종(8)	44.7	39.1	79.6
북한품종(7)		42.3	39.9	71.7
일본품종(11)		28.2	28.5	66.9
서양품종(4)		47.9	16.7	83.1
필리핀품종(7)		52.6	41.5	58.8
전 체 (168)		56.8	37.2	76.4



<그림 2-3> 모썩음병 집중에 의한 각 품종별 착근율과 감염율



<그림 2-4> 모썩음병 집중에 의한 각 품종별 출아율과 감염율

실험에 사용된 168품종에 대한 착근율과 모썩음병 감염율을 동시에 그림으로 표시한 결과는 <그림 2-3>에서 보는 바와 같으며 착근율과 감염율의 각 평균치에 실선을 표시하여 4등분으로 나누었다. 착근율이 높고 모썩음병 감염율이 낮은 II사분면에 분포한 품종들이 벼 직파에 유리한 품종들이며 착근율이 낮고 모썩음병에 감염율이 높은 IV사분면에 분포한 품종들은 직파재배에 이용할 수 없는 품종들이었다.

따라서 II사분면에 분포한 품종중 아주 우수한 품종들은 우리나라 품종중 탐진벼, 농립나1호, 대산벼, 금남벼, 미향벼, 상주찰벼 등이며 북한품종은 함남1호, 일본품종은 오마치카네, 미국품종은 M-201, 이탈리아 품종은 Arroz da Terra 등이었다.

또한 출아율도 직파재배에 영향을 미치는 주요한 요인으로 출아율이 높고 모썩음병 감염율이 낮은 품종이 직파재배에 유리한 품종으로 인정되며 실험에 사용된 168품종으로 출아율과 감염율을 동시에 표현한 내용은 <그림 2-4>에 보는 바와 같으며 <그림 2-3>과 같이 출아율과 감염율의 평균치 실선을 표시하고 4등분으로 나누었다. 입모율이 높고 모썩음병 감염율이 낮은 II사분면에 분포한 품종들이 벼 직파재배에 유용한 품종들이며 입모율도 낮고 모썩음병에 감염율이 높은 IV사분면에 분포한 품종들은 직파용으로 사용할 수 없는 품종이었다. II사분면에 분포한 품종중 직파재배에 유리한 품종들은 우리나라 품종중 농립나1호, 흑진주벼, 탐진벼, 설향찰벼, 적진주벼, 농호벼, 미향벼, 수진벼, 종남벼 등이었고 미국품종은 M-201이었다.

담수직파에 적합한 벼 품종이 되려면 여러가지 생육특성중 우선 모썩음병에 저항성이 있어야 하며 뿌리가 토양속으로 잘 뻗는 착근율이 높아야한다. 그리고 어느 정도 개체수가 형성되려면 입모가 안정적이어야 하는데 실험에 사용된 품종중 착근율이 높고 모썩음병 감염정도가 낮았던 20품종은 <표 2-4>에서 나타난 바와 같이 착근율이 높고 모썩음병에 감염율이 낮았던 품종은 순위에 따라 탐진벼, 오마치카네, M-201, 농립나1호 등 20품종이었으며 출아율까지 우수했던 품종은 순위에 따라 M-201, 농립나1호, 흑진주벼, 탐진벼 등 20품종으로 두가지 선발조건에 모두 포함되어 직파재배에 상대적으로 우수하다고 인정된 품종은 굵은 글씨체로 표현된 탐진벼, M-201, 농립나1호, 금남벼, 미향벼, 상주찰벼, 원황벼, 설향찰벼, 흑진주벼, 농호벼 등 10품종이었다.

<표 2-4> 착근율과 감염율에서 직파에 적응성이 있는 우선순위 20품종과 착근율과 감염율 및 출아율까지에서 높은 우선순위 20품종

우선순위	착근율 +감염율 (평균순위)	품종명	착근+감염+출아 (평균순위)	품종명
1	5	탐진벼	19	M-201
2	6	오마치카네	20	농립나1호
3	6	M-201	22	흑진주벼
4	9	농립나1호	31	탐진벼
5	15	함남1호	31	설향찰벼
6	18	대산벼	31	적진주벼
7	19	금남벼	32	농호벼
8	20	미향벼	33	미향벼
9	21	Arroz da Terra	33	수진벼
10	27	상주찰벼	35	중남벼
11	27	원황벼	35	상주찰벼
12	27	설향찰벼	36	금남벼
13	27	향미벼1호	36	동진1호
14	31	흑진주벼	37	장성벼
15	34	조령벼	38	Mercury
16	35	농호벼	41	만안벼
17	35	화봉벼	42	평양16호
18	36	백진주벼	42	고아미
19	39	화성벼	42	칠성벼
20	40	금오벼1호	46	원황벼

#### 다. 답수직파 종자의 입모성과 모썩음병과의 관련성

벼 답수직파재배에서 모썩음병과 종자의 입모성과의 관련성을 찾기 위하여 이미 실험된 168품종 중에서 착근정도가 비교적 우수하였던 우리나라 벼 8품종을 선발한 후 답수직파 파종후 연속강우 조건을 감안한 출아기의 차광조건과 자연광조건을 설정하고 또 토양에 모썩음병 병원균이 이미 존재하는 조건을 감안하여 토양조건을 무균상태 및 기 접종된 토양을 사용하는 조건을 설정하여 실험을 수행하였다. 차광은 차광막을 이용하여 70% 차광한 후 파종과 동시에 출아기간 1주일간 차광처리 하였으며 그 이후는 무차광과 같이 자연광 조건에서 모를 생육시켰다. 벼 생육에 사용한 토양중 무균상태의 토양은 바로 포장을 뜬 벼 육묘용 상토를 사용하여 파종후 병원균을 접종하였으며, 병원균 접종 토양은 앞선 실험에서 벼 종자를 파종하

고 모씩음 병원균을 접종하여 1개월간 벼를 생육시켜 실험을 끝낸 후 생육중인 벼를 뽑아내고 상토를 재사용하여 토양 내부에 모씩음 병원균이 존재하는 상태의 토양을 사용하면서 새로운 종자를 파종하고 또 모씩음 병원균을 추가로 접종하였다. 각 처리에 따른 모씩음병 발병 및 품종별 벼의 생육상태는 <표 2-5>에서 나타내었다.

<표 2-5> 차광 및 토양중 모씩음 병원균의 보유여부에 따른 벼 품종들의 생육

차광여부	토양상태	품종명	출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
차광	무균토양 + 병원균접종	금남벼	70.1	6.6	97.6
		농립나1호	70.1	16.7	98.3
		미향벼	65.3	24.7	97.9
		주남벼	64.2	12.2	98.6
		탐진벼	65.6	26.7	97.6
		화동벼	59.7	44.4	96.5
		화영벼	47.6	4.9	93.8
		화중벼	53.1	44.4	98.3
		<b>평 균</b>	<b>62.0</b>	<b>22.6</b>	<b>97.3</b>
	균 보유토양 + 병원균접종	금남벼	31.3	46.9	97.2
		농립나1호	76.7	32.6	96.5
		미향벼	51.7	47.9	94.8
		주남벼	48.6	43.1	96.9
		탐진벼	59.4	37.2	89.2
		화동벼	46.9	51.4	95.5
화영벼		58.3	31.9	86.8	
화중벼		38.5	46.2	97.2	
	<b>평 균</b>	<b>51.4</b>	<b>42.1</b>	<b>94.3</b>	

<표 2-5 계속>

차광여부	토양상태	품종명	출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
무차광	무균토양 + 병원균접종	금남벼	70.8	14.6	96.5
		농립나1호	79.5	10.1	99.7
		미향벼	67.7	4.9	100.0
		주남벼	60.4	0.7	100.0
		탐진벼	72.2	14.9	100.0
		화동벼	70.5	23.6	98.6
		화영벼	52.4	5.9	96.9
		화중벼	64.9	12.8	97.6
		<b>평 균</b>	<b>67.3</b>	<b>10.9</b>	<b>98.7</b>
	균 보유토양 + 병원균접종	금남벼	71.2	44.4	94.1
		농립나1호	72.9	21.9	97.6
		미향벼	54.2	46.9	98.3
		주남벼	45.1	44.4	97.6
		탐진벼	62.8	33.7	93.1
		화동벼	70.1	30.2	95.5
		화영벼	67.7	26.4	97.2
		화중벼	34.7	61.5	98.6
<b>평 균</b>		<b>59.9</b>	<b>38.7</b>	<b>96.5</b>	

○ 토양상태와 품종간 비교

- 출아율

Source	df	SS	MS	F-value
토양상태	1	648.0	648.0	7.65*
품 종	7	1753.8	250.5	2.96
토양*품종	7	918.1	131.2	1.55
오 차	16	1354.6		
전 체	31	4674.5		

- 감염율

Source	df	SS	MS	F-value
토양상태	1	4476.9	4476.9	46.93**
품 종	7	1810.0	258.6	2.71
토양*품종	7	859.9	122.8	1.29
오 차	16	1526.5		
전 체	31	8673.3		

- 착근율

Source	df	SS	MS	F-value
토양상태	1	54.34	54.34	9.70**
품 종	7	77.07	11.01	1.96
토양*품종	7	35.00	5.00	0.89
오 차	16			
전 체	31	256.1		

무균상태의 토양에 종자 파종후 모썩음 병원균을 접종한 처리와 이미 모썩음 병원균이 함유된 토양에 다시 병원균을 접종한 처리는 벼 출아율에서 유의성이 인정되어 병원균을 보유한 상태에서 병원균의 추가 접종은 출아율을 떨어뜨리는 것으로 나타났고, 감염율과 뿌리 착근율에서도 고도의 유의성이 인정되어 모썩음 병원균의 추가접종은 직파재배에서 벼의 출아, 및 활착에 큰 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

○ 차광여부와 토양상태

- 출아율

Source	df	SS	MS	F-value
차광여부	1	378.1	378.1	2.92
토양상태	1	648.0	648.0	5.00*
차광*토양	1	18.9	18.9	0.15
오 차	28	3629.4		
전 체	31	4674.5		

- 감염율

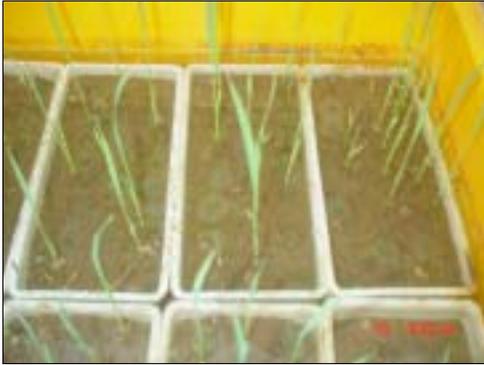
Source	df	SS	MS	F-value
차광여부	1	456.8	456.8	3.55
토양상태	1	4476.9	4476.9	34.76**
차광*토양	1	133.3	133.3	1.03
오 차	28	3606.3		
전 체	31	8673.3		

- 착근율

Source	df	SS	MS	F-value
차광여부	1	25.7	25.7	4.13
토양상태	1	54.3	54.3	8.72*
차광*토양	1	1.57	1.57	0.25
오 차	28	174.4		
전 체	31	256.1		

벼 종자가 출아할 당시 1주일간의 차광처리는 벼의 출아율과 모썩음병 감염율 및 착근율에 별 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며 단지 토양내에 이미 모썩음 병원균의 존재 여부에 의해 출아율과 모썩음병 감염율 및 착근율이 크게 영향을 받는 것으로 사료되었다.

또한 무균토양과 모썩음 병원균 보유토양에서 균의 추가접종에 의한 입모중 모썩음 병 발생 양상은 <사진 2-5>에서 보는 바와 같으며 무균토양에서 모썩음 병원균이 접종되면 감염된 부위는 밝은 색(또는 흰색)을 나타내었으나 이미 모썩음 병원균이 보유된 토양에 추가로 균을 접종하면 감염된 부위는 검거나 어두운 색으로 나타났는데 모썩음 병원균을 보유한 토양에서의 추가접종은 아마 모썩음 병원균외에 그동안 토양내에서 번식하였던 다른 세균이나 곰팡이의 영향이 컸던 것으로 여겨지나 이는 추가로 연구가 필요할 것으로 사료되었다.



<무균토양+모썩음 병원균 접종>



<모썩음 병원균 보유토양+추가 접종>

<사진 2-5> 무균토양과 모썩음 병원균 보유토양에서 균의 추가접종에 의한 입모중 모썩음병 발생 양상

#### 라. 모썩음병 저항성 유전자원의 평가 및 선발

벼 담수직파시 온실조건에서 모썩음병에 저항성이면서 착근율과 출아율이 높다고 판단된 8품종에 대한 포장평가는 <표 2-6>에서 보는 바와 같으며 온실내의 실험에서 높았던 출아율과는 달리 포장조건에서는 품종들 간에 고도로 유의한 입모율의 차이를 보였는데 실험에 사용된 품종중 설향찰벼의 입모율이 67.7%정도로 가장 높았고 흑진주벼는 12.2%의 입모율을 나타내어 온실조건과는 큰 차이를 나타내었다. 직파재배에 적응성인 품종을 이용하여 수원지역에서 조사된 벼 담수직파는 과거 5년간의 평균성적으로 볼 때 출아율은 대개 73%정도이며 입모율은 69% 내외로 출아율보다 낮았는데, 비록 출아가 되더라도 완전히 입모를 확보하는 과정에서 병원균, 미생물, 수분관리, 기상 등 각종 환경적인 변이에 의해 방해를 받는 것으로 알려져 있다. 그러므로 좋은 환경에서 출아가 많이 확보되는 품종이라도 일반적인 포장에서의 입모는 품종별로 큰 차이가 나타난다는 것을 알 수 있었다.

phytium-133, 및 phytium-140 등의 모썩음 병원균 접종에 의한 품종간 입모율 차이는 원황벼와 탐진벼의 경우 모썩음 병원균 무처리구에서 처리구보다 입모율이 다소 높았던 것으로 판단되나 통계적으로 처리에 대한 차이는 인정되지 않았다. 이는 벼가 출아하고 난 후 입모가 확보되는 시기까지는 모썩음 병원균의 영향도 있겠지만 그 외의 환경적인 요인이 훨씬 더 크게 작용하여 모썩음 병원균의 효과는 상대적으로 적게 나타났기 때문이라고 판단된다.

<표 2-6> 모썩음병에 저항성이면서 착근율과 출아율이 높다고 판단된 품종의 입모율

품 종	입모율(%)			품종군
	병원균 처리	무처리	평 균	
원 황벼	49.2	57.1	53.2	B
상주찰벼	57.4	59.0	58.2	B
금남벼	47.6	52.6	50.1	BC
탐진벼	36.8	45.5	41.1	C
농림나1호	48.4	33.6	41.0	C
미 향벼	52.6	49.7	51.2	B
설향찰벼	68.5	66.9	67.7	A
흑진주벼	11.6	12.7	12.2	D
평 균	46.5	47.2	46.8	

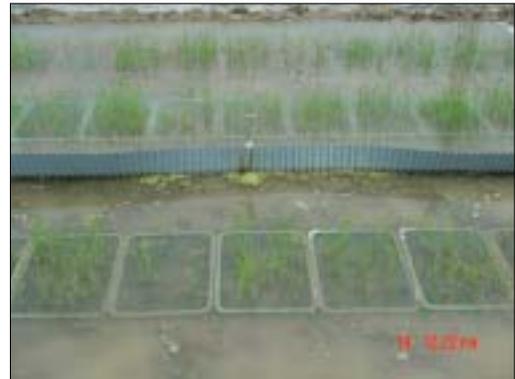
Source	df	SS	MS	F value
병원균 처리	1	9.7	9.7	0.08
품 종	7	22856.5	3265.2	27.13**
병원균×품종	7	1188.9	169.8	1.41
오 차	80	9629.0	120.4	
전 체	95	33684.1		

또한 일반적으로 농촌진흥청에서 직파 적응성이라고 인정된 품종의 처리별 입모율은 <표 2-7>에서 보는 바와 같이 모썩음 병원균 처리와 무처리간의 입모율 변이는 통계적인 차이를 볼 수 없었으며 품종에 따른 입모율의 차이만 인정되었다. 그러나 직파재배에 적응성이 인정된 품종들은 <표 2-9>에서 사용된 품종들 보다 입모율이 비교적 안정적이었는데 동안벼의 입모율이 63.0%로 가장 높았고 대산벼가 39.4%로 가장 낮았다.

<표 2-7> 직파적응성으로 인정된 품종의 입모율

품 종	입모율(%)			품종군
	병원균 처리	무처리	평 균	
주안벼	51.1	50.5	50.8	B
대산벼	41.5	42.1	39.4	B
광안벼	53.4	52.1	52.8	B
동안벼	64.0	61.9	63.0	A
농호벼	49.5	45.2	47.4	B
평 균	51.9	50.4	50.7	

Source	df	SS	MS	F value
병원균 처리	1	105.6	105.6	0.73
품 종	4	1950.1	487.5	3.39**
병원균×품종	4	313.3	78.3	0.55
오 차	50	7184.3	143.7	
전 체	59	9553.2		



<사진 2-6> 모썩음 병원균에 대한 포장 저항성 실험 광경

## 마. 모썩음병 저항성 관련 기초생리 연구

평균온도 24℃인 온실에서 모썩음 병원균에 강하다고 판단된 4품종과 약하다고 판단된 4품종의 과종 후 생육시기별 잔존 배유량을 조사한 결과는 <표 2-8>에서 보는 바와 같으며, 강하다고 판단된 품종들의 배유 소모량이 많아 약하다고 판단된 품종들의 배유보다 많이 소모되었는데 강하다고 판단된 품종들의 배유 소모량은 약하다고 판단된 품종에 비해 배유 소모량이 많았는데 과종 15일후에는 약하다고 판단된 품종 대비 약 18.2% 정도의 배유를 더 소모하였다. 모썩음병에 강하다고 판단된 품종 중 미향벼는 배유 소모량이 가장 많아 과종 15일후에 총 배유량의 60% 이상을 소모하였다. 이는 출아 후 배유 소모량이 많은 품종이 생육 진전 정도가 빨라 모썩음 병원균에 저항성을 나타낼 수 있는 것으로 판단되었으나 추가적인 검토가 필요하다고 사료되었다.

<표 2-8> 벼 담수직파에 따른 생육시기별 시험 품종간 잔존배유 변이

병원균 저항성	시험 품종	잔존 배유량(%)			
		과종기	DAS 15	DAS 19	DAS 23
강	농립나1호	100	46.9	5.3	0.7
	미향벼	100	39.2	3.2	0
	상주찰벼	100	49.8	2.6	0.9
	탐진벼	100	49.1	2.7	0
	평 균	100	46.2	3.4	0.4
약	계화벼	100	54.8	7.6	0
	새추청	100	49.6	2.8	2.4
	주남벼	100	52.1	8.6	0
	흑남벼	100	61.3	8.2	0.7
	평 균	100	54.5	6.8	0.8

벼가 수분을 흡수하여 발아할 때부터 종자에 있는 탄수화물을 생육에 이용하기 위해서 amylose가 amylopectin을 분해하여 glucose와 maltose를 생산하게 되는데 모썩음병에 강하다고 판단된 품종들과 약하다고 판단된 품종들을 담수직파로 과종한 후 온도 및 생육시기별  $\alpha$ -amylase 활력의 변이를 검토한 결과는 <표 2-9>에서 나타낸 바와 같다.  $\alpha$ -amylase의 활력은 생육온도가 높을수록 벼의 출아 초기부터

활력이 높았을 것으로 보이지만 파종 후 15일에는 고온조건인 24 및 27℃에서 21℃보다 낮았는데 이는 고온조건에서는 생육 진전이 빨라 종자에 함유되었던 탄수화물의 많은 양이 이미 당으로 전이되어 벼에 이용된 결과라 판단되며 저온조건인 18℃에서는 파종 후 19일이 지났는데도 상당한 활력이 유지되었다. 또한 생육온도 18℃조건을 제외하면 모썩음병에 강하다고 판단된 품종들의  $\alpha$ -amylase 활력이 약하다고 판단된 품종들보다 높은 것으로 나타났는데, 이는 배유 소모량과 비슷한 결과로 보여  $\alpha$ -amylase 활력이 높은 품종이 낮은 품종보다 생육의 활력이 높아 모썩음병에 저항성이 큰 것으로 나타낸 것이라고 사료되었다.

<표 2-9> 벼 답수직파에 따른 온도 및 생육시기별  $\alpha$ -amylase 활력의 변이

처리온도	모썩음병 저항성	$\alpha$ -amylase 활력			
		파종기	파종후 일수		
			DAS15	DAS19	DAS23
18℃	강	0.848	0.471	0.405	0.091
	약	0.892	0.636	0.287	0.054
	평 균	0.870	0.554	0.346	0.073
21℃	강	0.848	0.715	0.182	0.013
	약	0.892	0.532	0.247	0.056
	평 균	0.870	0.624	0.215	0.035
24℃	강	0.848	0.546	0.000	0.000
	약	0.892	0.489	0.043	0.019
	평 균	0.870	0.518	0.022	0.010
27℃	강	0.848	0.406	0.033	0.015
	약	0.892	0.374	0.055	0.007
	평 균	0.870	0.390	0.044	0.011

<부표-1> 모썩음병 집중에 의한 시험품종별 출아율, 감염율 및 착근율

생태형	품종명	출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
조생종 (40품종)	그루벼	66.7	40.3	93.9
	금오벼	70.8	34.7	79.0
	금오벼1호	65.3	30.6	93.7
	금오벼2호	76.4	31.9	70.6
	남원벼	68.1	33.3	64.8
	대진벼	87.5	52.8	88.9
	둔내벼	73.6	36.1	85.1
	만안벼	72.2	13.9	84.6
	만월벼	37.5	47.2	57.1
	만추벼	73.6	31.9	87.2
	문장벼	52.8	62.5	53.4
	삼백벼	66.7	43.1	83.5
	삼천벼	62.5	44.4	67.2
	상미벼	66.7	30.6	74.4
	상산벼	81.9	44.4	83.1
	상주벼	72.2	50.0	82.6
	상주찰벼	54.2	18.1	92.4
	새상주벼	77.8	48.6	84.0
	소백벼	70.8	31.9	68.5
	신운봉벼	66.7	38.9	59.8
	오대벼	72.2	50.0	72.9
	오봉벼	18.1	44.4	94.4
	운두벼	50.0	43.1	84.0
	운봉벼	80.6	29.2	77.6
	운장벼	75.0	29.2	75.7
	인월벼	91.7	41.7	85.0
	적진주벼	84.7	33.3	98.3
	조령벼	56.9	22.2	90.4
	중산벼	70.8	26.4	82.4
	중화벼	84.7	31.9	73.0

생태형	품종명	출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
조생종	진미벼	59.7	23.6	71.5
	진봉벼	54.2	52.8	84.4
	진부벼	70.8	54.2	91.8
	진부올벼	50.0	55.6	80.5
	진부찰벼	84.7	51.4	93.5
	태백벼	51.4	19.4	45.9
	태봉벼	80.6	44.4	91.6
	향미벼2호	22.2	22.2	0.0
	화동벼	68.1	63.9	77.9
	흑진주벼	77.8	12.5	88.2
중생종 (34품종)	간척벼	69.4	40.3	70.0
	광안벼	73.6	36.1	65.9
	남천벼	79.2	22.2	79.1
	내풍벼	73.6	43.1	75.7
	농림나1호	72.2	4.2	96.4
	대립벼1호	45.8	61.1	80.0
	동해벼	44.4	54.2	96.7
	만풍벼	52.8	51.4	86.7
	봉광벼	44.4	55.6	76.0
	삼평벼	86.1	40.3	85.6
	상남밭벼	56.9	33.3	97.6
	서안벼	80.6	47.2	74.9
	서진벼	54.2	51.4	83.5
	설향찰벼	69.4	18.1	92.0
	소비벼	12.5	54.2	100.0
	수라벼	75.0	37.5	74.5
신선찰벼	59.7	58.3	76.3	

생태형	품종명	출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
중생종	안산벼	66.7	20.8	83.0
	안성벼	38.9	38.9	0.0
	안중벼	68.1	34.7	69.5
	영해벼	13.9	76.4	93.3
	원황벼	61.1	13.9	90.3
	장안벼	58.3	45.8	87.6
	주안벼	48.6	44.4	61.3
	중안벼	58.3	31.9	66.7
	진품벼	90.3	37.5	73.6
	청명벼	72.2	43.1	69.4
	팔? 달	48.6	52.8	74.0
	해평벼	50.0	27.8	90.1
	화봉벼	66.7	23.6	92.4
	화선찰벼	50.0	34.7	82.5
	화성벼	58.3	18.1	86.0
	화안벼	50.0	52.8	100.0
화영벼	16.7	77.8	79.2	
중만생종 (44품종)	계화벼	44.4	69.4	75.0
	고아미	87.5	29.2	89.6
	금남벼	70.8	4.2	92.3
	낙동벼	50.0	33.3	85.9
	남강벼	84.7	38.9	89.9
	남평벼	77.8	40.3	85.7
	농호벼	84.7	19.4	89.7
	대산벼	45.8	18.1	96.3
	대안벼	51.4	41.7	77.0
	대야벼	40.3	61.1	85.8
	대청벼	47.2	54.2	85.2
	동안벼	54.2	50.0	97.0
동진1호	81.9	25.0	84.6	

생태형	품종명	출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
중만생종	동진벼	61.1	44.4	77.1
	동진찰벼	38.9	22.2	79.2
	만금벼	58.3	23.6	77.6
	미향벼	69.4	4.2	92.1
	백진주벼	65.3	30.6	96.1
	세계화벼	41.7	50.0	56.5
	새추청벼	55.6	61.1	90.2
	석징벼	90.3	44.4	72.2
	설깁벼	65.3	25.0	66.3
	수진벼	79.2	27.8	89.4
	신동진벼	58.3	54.2	92.7
	아랑향찰벼	31.9	31.9	79.6
	양조벼	66.7	41.7	69.3
	영남벼	56.9	43.1	67.6
	영안벼	70.8	9.7	42.9
	일미벼	12.5	12.5	0.0
	일품벼	72.2	44.4	72.1
	종남벼	81.9	30.6	93.0
	주남벼	65.3	55.6	100.0
	추청벼	68.1	37.5	96.1
	탐진벼	63.9	8.3	100.0
	향남벼	23.6	63.9	66.3
	향미벼1호	65.3	23.6	96.1
	호안벼	63.9	33.3	70.3
	호진벼	72.2	22.2	77.0
	화남벼	61.1	38.9	69.7
	화명벼	63.9	19.4	81.7
	화삼벼	36.1	36.1	56.4
	화신벼	48.6	58.3	62.6
	흑남벼	20.8	63.9	93.3
	흑향벼	45.8	66.7	90.5

생태형	품종명	출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
통일형품종 (11품종)	다산벼	66.7	40.3	73.1
	아름벼	62.5	41.7	64.8
	안다벼	68.1	38.9	60.3
	용문벼	72.2	18.1	73.4
	용주벼	62.5	29.2	48.5
	장성벼	87.5	40.3	96.9
	중원벼	54.2	13.9	52.7
	청청벼	34.7	73.6	54.3
	칠성벼	80.6	9.7	77.6
	통 일	55.6	27.8	87.0
	팔공벼	65.3	50.0	80.6
	풍산벼	56.9	9.7	75.5
	한강찰벼	72.2	16.7	76.3
재래품종 (8품종)	녹두도	38.9	40.3	63.3
	아롱조	56.9	45.8	88.5
	유월조	18.1	45.8	94.4
	잔다다기	83.3	22.2	61.7
	조동지	55.6	43.1	83.6
	조정도	56.9	36.1	100.0
	중생은방주	26.4	52.8	75.5
	황조	13.9	44.4	69.4
북한품종 (7품종)	룡성찰벼	23.6	56.9	48.5
	평양16호	75.0	34.7	90.2
	평양9호	36.1	36.1	73.9
	함남10호	22.2	61.1	74.4
	함남14호	50.0	45.8	52.5
	함남1호	26.4	19.4	100.0
	함남24호	62.5	25.0	62.1
일본품종 (11품종)	고시히카리	47.2	23.6	55.7
	기호니시키	20.8	55.6	65.3
	도토리키와세	51.4	15.3	71.7
	무시시코카네	36.1	26.4	54.5

생태형	품종명	출아율(%)	감염율(%)	착근율(%)
일본품종	사사니시키	29.2	55.6	52.4
	신석조생	15.3	31.9	55.6
	아이치노가오리	5.6	30.6	66.7
	오마치카네	8.3	1.4	100.0
	유키히카리	16.7	37.5	69.4
	키노히카리	44.4	0.0	57.4
	히토메보레	34.7	36.1	87.5
	서양품종 (4품종)	Arroz	23.6	23.6
M-201		65.3	12.5	100.0
M-202		27.8	26.4	54.4
Mercury		75.0	4.2	77.9
필리핀품종 (7품종)	IR71682-39-2 -1-2	41.7	50.0	87.6
	IR72975-y61- 1-1-1	29.2	62.5	44.3
	IR71204-91-2 -2	29.2	29.2	0.0
	IR69860-10-1 -2-k1-3-7	65.3	31.9	32.2
	IR72225-29-1 -1-3-1	79.2	31.9	68.0
	IR71451-40-3 -1	61.1	41.7	93.0
	IR73111-B-R -15-3-1	62.5	43.1	86.4

<부표 2> 파종기 및 파종 후 온도 및 생육시기별  $\alpha$ -amylase 활력의 변이

품 종	파종기	18℃			21℃		
		DAS15	DAS19	DAS23	DAS15	DAS19	DAS23
계화벼	0.872	0.528	0.328	0.097	0.631	0.045	-0.005
농립나1호	0.857	0.492	0.250	0.177	0.764	0.504	0.092
미향벼	0.419	0.505	0.426	0.064	0.684	0.074	-0.078
상주찰벼	1.068	0.354	0.490	0.076	0.661	0.053	-0.046
새추청	0.703	0.823	0.214	-0.066	0.248	0.168	-0.029
주남벼	1.199	0.546	0.277	0.094	0.847	0.632	0.105
탐진벼	1.049	0.531	0.455	0.048	0.749	0.095	0.082
흑남벼	0.795	0.645	0.327	0.089	0.401	0.144	0.153
<b>평 균</b>	<b>0.870</b>	<b>0.553</b>	<b>0.346</b>	<b>0.072</b>	<b>0.623</b>	<b>0.214</b>	<b>0.034</b>

품 종	파종기	24℃			27℃		
		DAS15	DAS19	DAS23	DAS15	DAS19	DAS23
계화벼	0.872	0.223	0.117	-0.021	0.354	0.077	0.026
농립나1호	0.857	0.282	0.017	-0.029	0.508	0.040	-0.195
미향벼	0.419	0.551	-0.054	-0.004	0.473	0.051	0.109
상주찰벼	1.068	0.518	-0.018	-0.110	0.149	0.037	0.160
새추청	0.703	0.576	-0.065	-0.002	0.399	0.018	-0.002
주남벼	1.199	0.470	0.067	-0.001	0.386	0.025	-0.009
탐진벼	1.049	0.833	0.038	0.007	0.494	0.002	-0.015
흑남벼	0.795	0.687	0.054	0.099	0.358	0.099	0.012
<b>평 균</b>	<b>0.870</b>	<b>0.518</b>	<b>0.020</b>	<b>-0.008</b>	<b>0.390</b>	<b>0.044</b>	<b>0.011</b>

## 제 5장. 기대 효과

### 가. 기술적 효과

- 모썽음병균의 분리 기술의 확대 보급
- 모썽음병균의 생물학적 방제 기술개발로 친환경적인 담수직과재배의 안정적인 입모율 향상에 기여
- 특정 탄소원의 첨가 생물학적 방제 효과의 증진으로 친환경적인 방제 기술인 생물학적 방제의 신뢰성 증가
- 메타락실과 혼용함으로써 기존 농약의 사용량을 절감하는 기술의 개발
- 모썽음병균의 저항성 유전자원의 선발로 저항성 품종 및 유전자 탐색의 교두보를 제공하여 세계에서의 기술적 우위 선점
- 모썽음병균의 활동 환경 구명으로 모썽음병을 최대한 억제시킬 수 있는 재배적 기술 및 생물학적 방제법 개발

### 나. 경제 산업적 측면

- WTO에 의한 쌀 시장개방과 최근의 정부의 쌀 가격 하락을 통한 감산정책에 대응한 비용과 이익 측면에서의 최소 비용이 소요되는 담수직과재배의 쌀 재배로 순익 차원의 경영 가능
- 안정적인 입모의 확보를 통하여 직과재배에서 가능한 규모의 농업 발달을 촉진
- 친환경적인 방제 방법인 생물학적 방제 기술의 개발로 생물농약의 발달 촉진
- 수입에 의존하고 있는 화학 농약에 대한 대체 효과 기대
- 아직 세계적으로 개발되어 있지 않은 모썽음병균의 저항성 유전자원의 선발로 저항성 품종 육성 및 유전자원 탐색을 통하여 장기적으로는 종자 산업 경쟁에 있어서 선진국에 선점

## 제 6장. 활용방안

담수직과재배에서 가장 제한적인 요인인 모썽음병균에 대한 연구는 그 동안 매우 미미하였는데, 본 연구는 다양한 지역의 병원균 분리와 생물학적 방제 방법 및 방제 효과의 증진, 저항성 유전자원의 선발을 포함하고 있어서 국내 생물 농약 벤처 기업이나 전문 육종 기관에 매우 유용할 것이다.

- 담수직과 재배지에서의 생물학적 방제 균주의 분리 기술은 전문 연구자들과

벤처 기업의 생물농약 기술 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것임.

- 특정 탄소원의 첨가에 의한 생물학적 방제 효과의 증진은 이미 개발되어 사용되고 있고 또는 새로 개발되는 생물농약의 첨가물로서 사용 및 새로운 첨가물의 개발 등의 연구를 촉진하여 생물 농약의 산업 발달에 기여하는 바가 클 것이다.
- 효과가 탁월한 균주 *Bacillus cereus* D324 및 특정 탄소원들의 첨가에 의한 방제 기술들은 특허 출원하고 균주의 대량 생산 체계를 가진 일부 생물농약 벤처 기업체 등에 기술을 이전할 것이다.
- 선발된 저항성 유전자원은 국내 전문 육종 기관에 모썽음병균의 저항성 품종의 육성에 매우 유용하게 될 것이며, 또한 좋은 품종이 육성된다면 세계적으로도 매우 획기적인 일이 될 것이다.
- 담수직파 재배에서 종자소요량 감소 및 입모 안정으로 직파재배 면적 증가에 따른 생산비 및 노력 절감 효과

## 제 7장. 연구개발성공시 다음단계의 조치사항 (최종년도에 한함)

- 생물적 방제균 *Bacillus cereus* D324, *Bacillus megaterium* 031702와 탄소원 이용도에 대한 내용은 국내 특허에 출원할 예정임
- 저항성 유전자원은 육종 품성 육성시 사용할 것을 제안하고, 담수직파시 위한 품종은 지도 사업에 활용할 것임
- 관련 내용은 국내외 논문 발표 예정

## 제 8장. 연구평가의 착안점

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도 (점수)
1차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다양한 지역의 병원균 분리 및 병원성 확인</li> <li>○ 순수 분리 균주에 대한 접종 방법 확립</li> <li>○ 생물학적 방제 균주의 분리 및 효과 검정</li> <li>○ 메타락실과 혼용 가능한 균주 선발</li> <li>○ 재래종 및 야생종에 대한 저항성 유전자원 평가 및 선발</li> <li>○ 모썩음병 발생 최적환경 구명</li> </ul>	20 10 20 10 20 20
2차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물학적 방제 균주에만 잘 이용되는 탄소원 선발</li> <li>○ 특정 탄소원 첨가에 의한 생물학적 방제 효과 증진</li> <li>○ 생물학적 방제균의 메타락실 혼용 효과 구명</li> <li>○ 분말제제의 생존력 검정</li> <li>○ 담수직과 종자의 입모성과 모썩음병과의 관련성 연구</li> <li>○ 재래종 및 야생종에 대한 저항성 유전자원 평가 및 선발</li> </ul>	20 20 10 10 20 20
3차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 환경모니터링</li> <li>○ 포장시험</li> <li>○ 모썩음병 저항성 기초생리 연구</li> <li>○ 유전자원 평가 및 선발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생장실 및 온실에서 저항성을 보인 재배품종 및 야생종등 선발 품종에 대한 이병 포장에서의 포장시험</li> </ul> </li> </ul>	30 30 20 20
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 모썩음병의 원인 구명</li> <li>○ 생물학적 방제 기술 확립</li> <li>○ 특정 탄소원에 의한 생물학적 방제 효과 증진</li> <li>○ 분말제제의 생존력 검정</li> <li>○ 환경모니터링</li> <li>○ 모썩음병 관련 환경변이 및 기초생리 연구</li> <li>○ 모썩음병 저항성 유전자원 평가 및 선발</li> </ul>	10 20 10 10 10 20 20

※ 척도(점수)의 합계는 각 연도 100임.

## 제 9장. 참고자료 및 문헌

Chun, Se-Chul. 1997. Etiology and Biological Control of Rice Seedling Disease in Water-Seeded rice. Ph. D. dissertation. Louisiana State University. pp 104.

Colbert, S. F., Hendson, M., Ferri, M., and Schroth, M. N. 1993. Enhanced growth and activity of a biocontrol bacterium genetically engineered to utilize salicylate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2071-2076

Compeau, G., Al-Achi, B. J., Platsouka, E., and Levy, S. B. 1988. Survival of rifampicin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl. Environ. Microbiology.* 54: 2432-3438.

Drahos, D. J., Hemming, B. C., and McPherson, S. 1986. Tracking recombinant organisms in the environment: Beta-galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. *Bio/Technology* 4: 439-444.

Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:75-91.

Janisiewicz, W. J., Usall, J., and Bros, B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology* 82:1364-1370

Kloepper, J. W., Wei, G., and Tuzon, S. 1992. Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. Pages 185-192 in: *Biological Control of Plant Disease. Progress and*

Challenges for the Future. E. C. Tjamos, G. C. Papavizas, and R. J. Cook, eds. Plenum Press, NY.

Kluefel, D. A. and Tonkyn, D. W. 1992. The ecology of genetically engineered bacteria in the rhizosphere. Pages 407-413 in: Biological Control of Plant Disease, Progress and Challenges for the Future. E. C. Tjamos, G. C. Papavizas, and R. J. Cook, eds. Plenum Press, NY.

Loper, J. E. 1988. Role of fluorescent siderophore production in biocontrol of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78: 166-172.

Loper, J. E., and Ishimaru, C. A. 1991. Factors influencing siderophore-mediated biocontrol activity of rhizosphere *Pseudomonas* spp. Pages 253-261 in: *The Rhizosphere and Plant Growth*. D. L. Kerister and P. B. Cregan, eds. Kluwer Academic Publishers, Boston, M. A.

Maplestone, P. A. and Cambell, R. 1989. Colonization of roots of wheat seedlings by bacilli proposed as biocontrol agents against take-all. *Soil Bio. Biochem.* 21:543-547.

McIntyre, J. L., and Press, L. S. 1991. Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promotion rhizobacteria (PGPR). Pages 289-295 in : *The Rhizosphere and Plant Growth*. D. L. Keister and P. B. Cregan, eds. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.

Parke, J. L. 1991. Root colonization by indigenous and introduced microorganism. Pages 33-42 in: *The Rhizosphere and Plant Growth*. D. L. Keister and P. B. Cregan, eds. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.

Plaats-Niterink, A. V. D. 1981. Monograph of the Genus *Pythium*.

Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn, Institute of the Royal Netherlands, Academy of Sciences and Letters. In Studies in Mycology No. 21.

Powell, K. A. 1992. Biocontrol product fermentation, formulation and marketing. Pages 381-387 in: Biological Control of Plant Diseases. Progress and Challenges for the Future. E. C. Tjamos, G. C. Papavizas, and R. J. Cook, eds. Pleum Press, NY.

Schippers, B., Bakker, A. W., and Bakker, P. A. H. M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganism and the effect of cropping practices. Annu. Rev. Phytopathol. 25: 339-358.

Schneider, R. W. 1984. Effect of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on root infection by *F. oxysporum* f. sp. *appi* and a novel use of the Linweaver-Burk double reciprocal plot technique. Phytopathology 74: 646-653.

Schneider, R. W. 1994. Biological control of seedling disease in water-seeded rice. Pages 4-22 in: USDA CSRS NRICGP proposal.

Smith, C. M., Bagent, J. L., Linscombe, S. D., and Robinson, J. F. 1986. Insect Pests of Rice in Louisiana. Louisiana Agric. Exper. Sta. Bulletin No. 774. 24pp.

Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. Pages 1104-1207 in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.

Webster, R. K. and Gunnell, P. S. eds. 1992. Compendium of Rice Diseases. APS, St. Paul, Mn.

Weller, D, M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.