

최 종  
연구보고서

고활성 생육촉진 / 유도저항성 미생물의 상업화  
Commercialization of Rhizobacteria Promoting Plant  
Growth and Inducing Systemic Resistance

연 구 기 관

아리스타 라이프사이언스 코리아 (주)

농림수산식품자료실



0017060

농수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고활성 생육촉진/유도저항성 미생물의 상용화에 대한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 아리스타

라이프사이언스 코리아 (주)

총괄연구책임자 : 김 은 우

세부연구책임자 : 김 은 우

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 박 경 석

협동연구기관명 : 공주대학교

협동연구책임자 : 문 석 식

## 요 약 문

### I. 제 목

고활성 생육촉진 / 유도저항성 미생물의 상용화

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

작물의 재배 및 생산에 있어 병해충의 관리와 작물생육을 위한 영양분의 관리가 최종 생산에 매우 중요하게 작용한다. 근래까지 이와 같은 목적을 달성하기 위해 사용되어 온 방법은, 합성 농약과, 화학비료의 사용이었으나. 환경에 대한 고려와, 안전에 대한 공감대가 확산되면서, 기존의 농업방식을 보완, 개선할 방법에 대한 연구가 많이 이루어 지고 있으나, 근본적인 개념에 있어, 기존의 화학농약 - 직접적인 살충 살균 -과 기존의 화학비료, 즉 외부로 부터의 절대량 투입이라는 개념에서 크게 벗어나고 있지 않은 것이 현실이다.

환경에 투입되는 부하량을 줄이면서도, 기존의 생산량의 유지하는 방법으로 대두되는 것이, 작물의 내적 에너지를 이용하는 PGPR / ISR을 이용하는 것이다. 토양 중에는 수많은 미생물 군들이 살아가는데 일부 미생물은 식물생육에 악영향을 끼치며 또 다른 유용균의 그룹 중 식물의 뿌리주변에 서식하면서 식물로부터 생산되는 영양성분을 이용하는 근권미생물들이 있다. 이 근권미생물의 일부는 일반적인 미생물 가지는 작용이외에 작물에 특별한 영향을 줄 수 있는 능력이 있는데 그것은 식물 병원균의 번식을 양분선점등에 의해 억제하거나, 항생물질의 생산하여 직접적인 항균작용을 한다. 또한 작물체의 방어기작을 발현시키기도 하는데, 보통의 경우 작물의 생육을 증진시키는 효과를 동반한다. 이러한 근권미생물을 PGPR(Plant growth promoting rhizobacteria)라고 하며 이러한 근권미생물이 발현시키는 저항성을 ISR(Induced systemic resistance)라고 한다. 근권미생물의 유도저항성 및 생육증진 효과를 이용하는 것은 농업환경에 부담을 주지 않는 새로운 병방제기술 및 작물생육 증진 기술로 식물의 자체 방어기작을 활성화시켜 바이러스, 세균, 곰팡이 등 주요 식물 병에 대한 신속한 억제효과를 갖게 할 뿐 아니라 환경스트레스로부터 저항성도 높여주어 작물의 안전생산에 기여한다. 또한 근권미생물이 작물의 생육에 미치는 영

향은 뿌리의 발육, 종자발아와 개화촉진등으로 나타나 전반적인 작물생육 및 품질, 수량에 영향을 미치게 된다. 이러한 연구는 주로 살아있는 미생물을 근권에 정착시키는 방법이 주로 사용되었는데, 살아있는 미생물은 보관성 및 정착성이 환경에 영향을 많이 받아 상용화에 어려움이 있다. 따라서 근권미생물이 작물이 이로운 효과를 나타내는 과정 및 원인을 연구하여, 상용화와 현실적 경제성을 갖는 제품을 개발하는 것이 중요하다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 작물의 생육을 촉진하고 식물의 면역기능을 활성화시켜 다양한 식물병을 복합적으로 방제 할 수 있는 고효성의 근권미생물과 이 균이 생산하는 생육촉진 및 병저항성 활성 물질인 EPS (Extrapolysaccharide)를 추출하여 농업생태계에 별다른 영향 없이 작물을 재배 할 수 있는 신 기능성 물질을 상용화 하는데 목적이 있다. 연구내용 및 범위는 아래와 같다.

생육촉진/유도저항성 미생물의 산업화 공정 개발

- 근권세균 균주의 대량배양기술 확립
- 유도저항성 균주 근권세균의 제제화 기술 확립
- 유도저항성/생육촉진 근권세균 처리제 제제화 공정개발

생육촉진/유도저항성 미생물의 생물활성 특성 검정

- 유도저항성/생육촉진 근권균의 활성 스펙트럼 검정
- 근권세균 생산 유도저항성/생육촉진 활성물질의 작용기작 검정
- 유도저항성/생육촉진 근권세균 시용기술 및 포장 실증시험
- 유도저항성 활성증진을 위한 복합처리효과

생육촉진/유도저항성 활성물질의 동정 및 기능분석

- 근권세균 생산 활성물질별 고효성 분획 및 특성 구명
- 근권세균 생산 활성물질의 화학구조구명
- 유도체 별 이화학적 특성 및 생물활성검정

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

기 선발된 근권미생물의 세포벽외물질이 가지는 생육촉진 효과 및 유도저항성 발

현 효과를 상업적으로 이용하는 농업자재의 개발 및 상용화를 위하여, 배양 세포의 조출물을 이용하는 방법이 가장 효율적인 것으로 선발되었으며, 원료물질의 생산 최적화를 위한 배양 조건 설정 시험 및 조출물의 제형화를 위한 carrier의 선발이 이루어 졌다.

원료물질의 안정성 검증을 위한 품질관리 방법을 개발하였으며, 최종적으로 토양 처리용 입제 및 종자 및 엽면처리가 가능한 수용제가 개발 완료되어, 친환경유기농자재 목록공시제에 등재되어 합법적인 농업자재로서 판매가능하게 되었다.

상용화를 위한 제제화 공정과 병행하여, 활성물질의 분석이 수행되었으며, 유도저항성 검정을 위한 생물시험이 다각도로 수행되었는데 그것은 다음과 같다. 원료물질은 세포벽 조출물을 대량생산하기 위한 최적배양조건으로 질소원으로 CSL(Corn steep liquor)와 탄소원으로 Molasses가 선발되었으며, 28℃, pH 7.0인 것으로 규명하였다. 상용화시 요구될 수 있는 친환경성을 고려하여, 미량요소 및 합성 첨가제의 사용을 배제하였다. 대량배양에서 산소량이 영양원의 이용에 절대적인 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 배양중 pH 변화가 급격하여 pH 조절이 필요하였다. 또한 최적 배양시간은 36~42시간으로 규명하였다 .

활성물질의 규명을 위해서 물질의 다음과 같은 방법이 선발되었는데 분리 방법은 고체배양액을 메탄올로 추출하여 추출액을 농축하였다. 이 농축액을 butanol로 추출하여 농축액을 flash chromatography하였다. 이때 용출은 물부터 메탄올까지 순차적으로 용매의 극성을 바꾸면서 진행하였다. 여기서 얻은 11개의 분획 중 3개의 분획이 PGPR 활성을 보였으며 TLC에서 비슷한 모양을 보였다. *Rhizoctonia solani*에 활성을 보이는 분획에 대해 각각 역상 HPLC 하였으며, 이것은 pyrrolnitrin을 판명되었다.

선발 미생물의 생물활성 검정을 위해서 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 오이시들음병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 및 잘록병(*Rhizoctonia solani*)에 대한 항균 활성을 검정한 결과 공시 병원균에 대한 억제 효과가 매우 우수하였다.

조출물은 EPS의 생물활성 검정을 위하여 생육증진 효과 및 병해 저감 효과를 수행하였는데, 생육증진효과에서 씨감자를 대상으로 100ppm에서 가장 우수한 효과를 나타내었으며 15.6% ~ 200%까지의 생체중 증가 효과를 확인하였다. 병해 저감효과로는 오이탄저병, 토마토 시들음병, 옥수수깨씨무늬병, 잣빛곰팡이병에 대한 유도항성에 의한 병해 저감 효과를 확인하였다.

상용화를 위한 제제 시험에서, 친환경성을 고려하여, 부재료의 사용을 최소화하고, 천연물의 부재료를 사용하였다.

개발된 토양처리용 입제와 종자 및 엽면 처리용 수용제는 아릅들 G와 신무기라는 이름으로 상표출원되었으며, 친환경유기농자재 목록공시제에 등재되었다. (유기농자재목록공시 08-유기-3-076, 유기농자재목록공시 08-유기-3-077) 현재 판매와 마케팅이 진행 중이며, 원료물질의 해외 판매를 위한, 독성 및 이화학자료의 생산을 수행

중에 있다. 해외 전시회 참가와 마케팅 네트워크를 활용을 통하여 제품 및 원료물질의 수출 가능성을 높이는 중이다.

또한 기존의 미생물 제제 및 비료등과의 혼합제 개발을 위한 상승효과를 검토 중에 있으며, 기존의 농업자재의 효과를 증대시키고, 화학 농자재의 사용을 절감할 수 있는 중요 방법으로 개발될 가능성이 높은 것으로 예상된다.

## SUMMARY

### I. Title

Commercialization of Rhizobacteria Promoting Plant Growth and Inducing Systemic Resistance

### II. Objectives and Background

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are naturally occurring soil microorganisms that colonize roots and stimulate plant growth. Such bacteria have been applied to a wide range of agricultural crops for the purposes of growth enhancement, including increased seed emergence, plant weight, and crop yields, as well as disease control. PGPR strain *Burkholderia pyrrocinia* K87 induces systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, *Colletotrichum orbicularae*, as well as plant viral diseases like TMV, PVX and Y virus on potato. Infiltration of fractions from culture filtrates of PGPR strain *B. pyrrocinia* K87 induced PR-1a promoter and hypersensitive reaction as well as shown antifungal activities against major plant fungal pathogens. The culture of the bacteria grown on King's B agar (10 liters) was soaked with 85% MeOH and then concentrated by vacuum evaporation. The collected extract was eluted with a MeOH-water gradient using Lichroprep RP-18 and LH-20 sephadex column chromatography. The other fractions were purified by various separation methods. All eluted fractions were assayed for the induction of PR-1a and the hypersensitive reaction on transgenic tobacco plants except antifungal fraction A. Pyrrolnitrin from K87 was identified as antifungal substance, which was purified from diethyl ether extract of K87 grown on King's B medium. The compound was more active to *Colletotrichum orbiculare* and *Rhizoctonia solani* than *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Phytophthora capsici*, and *Pythium ultimum*.

EPS from K87 induced systemic resistance in various crops. In challenge inoculation with the cucumber anthracnose pathogen and angular leaf spot on

cucumber seedlings, pre-infiltration of EPS significantly induced the expression of PR-1a and HR compared to the non-treated water control resulting in decreased number of diseased lesions on the leaves. These results indicate that a bacterial metabolite from PGPR strain K87 can activate plant defense reactions, leading to systemic protection against foliar pathogens.

In conclusion, Exopolysaccharide from *Burkholderia pyrrocinia* K87 can be used for plant growth promotion and improving product quality of vegetables as well as inducing systemic resistance on vegetables against plant pathogens.



# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	10
Section 1. Objectives .....	10
Section 2. Importance of the research .....	11
Chapter 2. Current situation and trends of research and technology .....	13
Chapter 3 Research contents and results .....	15
Section 1. Biological property of growth promoting and ISR microbe .....	15
1. Biological spectrum of microbe .....	15
2. Mode of action analysis of active materials .....	20
3. Field test of biological efficacy of microbe and active materials .....	23
4. Synergistic effect test .....	42
Section 2. Identification of active materials and function analysis .....	48
1. Isolated highly active fractions and characterization .....	48
2. Chemical identification of active materials .....	51
Section 3. Development of commercialization process .....	61
1. Setting up the condition for mass production system .....	61
2. Establishing formulation technology .....	67
3. Development of commercial production system .....	71
Chapter 4. Accomplishment and Contribution .....	76
Section 1. Criteria of assessment of the accomplishment .....	76
Section 2. Accomplishment rate .....	77
Chapter 5. Application of the research results .....	78
Chapter 6 Oversea scientific and technological informatoin .....	80
Chapter 7 References .....	84

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	10
제1절 연구개발의 목적 .....	10
제2절 연구개발의 필요성 .....	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	15
제1절 생육촉진/유도저항성 미생물의 생물활성 특성 검정 .....	15
1. 유도저항성/생육촉진 근권균의 활성 스펙트럼 검정 .....	15
2. 근권세균 생산 유도저항성/생육촉진 활성물질의 작용기작 검정 .....	20
3. 유도저항성/생육촉진 근권세균 시용기술 및 포장 실증시험 .....	23
4. 유도저항성 활성증진을 위한 복합처리효과 .....	42
제2절 활성물질의 동정 및 기능분석 .....	48
1. 근권세균 생산 활성물질별 고활성 분획 및 특성 구명 .....	48
2. 근권세균 생산 활성물질의 화학구조구명 .....	51
제3절 산업화 공정 개발 .....	61
1. 근권세균 균주의 대량배양기술 확립 .....	61
2. 유도저항성 균주 근권세균의 제제화 기술 확립 .....	67
3. 유도저항성/생육촉진 근권세균 처리제 제제화 공정개발 .....	71
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	76
제1절 연구개발목표의 달성 평가의 착안점 및 기준 .....	76
제2절 계획대비 연구개발목표 달성도 .....	77
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	78
제 6 장 해외과학기술정보 .....	80
제 7 장 참고문헌 .....	84

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

토양 중에는 식물생육에 관련하여 다양한 기능을 나타내는 많은 종류의 미생물들이 살아가고 있다. 특히 식물 근권(rhizosphere)에 살아가는 미생물군은 토양뿐 아니라 뿌리에서 분비되는 각종 유기물을 취하며 생존하는데 식물이 직접 흡수할 수 없는 성분을 식물이 이용 가능하도록 변환시켜 주거나, 도와주는 역할을 한다. 즉, 불용성 인산의 가용화, 질소 고정 등을 통해 식물생육촉진 효과를 부여하며 항생물질, HCN, siderophore 등의 생산을 통한 병원균의 군사생육 및 식물체 침입억제 결과 식물병 방제 효과를 갖게 한다. 본 연구과제에서 제안하는 근권세균을 이용한 작물 영양원 이용도 증진을 통한 생육촉진 및 병해충 저항성 유도는 국내 농업에의 친환경적 작물재배 방식 정착을 위한 INM(Integrated Nutrient Management) 과 IPM(Integrated Pest Management)의 실현에 중요한 역할을 할것이다. 연구과제에 이용되는 근권세균은 농업과학기술원 식물병리과에서 2000년부터 현재까지 PR-1a GUS 및 PDF1.2 GUS 유전자를 이용한 대량 검정시스템을 이용하여 국내의 다양한 환경에서 수집한 1,800여 근권세균중 유도저항성 활성이 가장 뛰어난 근권세균 (*Pseudomonas* sp)을 선발된 것으로 이 균주의 세포외벽물질(EPS, Extracellular polysaccharide)로 부터 식물의 병해충 저항성을 유도하며, 작물 생육을 촉진하는 분자량 300-500만의 고분자 물질과 항진균성 활성물질이 생성되는 것으로 확인되었다.

이 물질을 50ppm-200ppm 처리 하였을 때 오이탄저병 (*C. orbiculare*), 오이 반점세균병 (*Pseudomonas syringae* pv *cucumerinum*), CMV (cucumber mosaic virus), 감자 바이러스 (PVX, PVY)에 대하여 50 -98% 까지의 탁월한 병해 방제가를 나타내며 배양액의 Butanol 층으로부터 분리한 활성물질은 오이 및 고추 탄저병 (*Colletotrichum orbiculare*, *C. gloeosporioides*)과 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)에 대하여 강한 억제효과를 나타낸다. 본 연구과제에서 제안하는 근권세균과 EPS에 의해 유발되는 유도저항성 및 작물 생육촉진 효과는 광범위한 병해와 작물에 동일한 활성을 나타내며 기작을 달리하는 강력한 항진균물질을 함유한 것으로 보아 미생물 제제로서의 실용화 가능성이 매우 높은 것으로 판명 되어. 그간의 연구 결과를 종합하여 유도저항성/생육촉진 근권세균 생산 활성물질을 개발에 충분한 실용성이 있다고 판단하여 보 연구를 수행하였다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

유기합성농약의 사용은 환경에 대한 부담이나 농산물에 대한 잔류성 때문에 생물학적 방제와 같은 친환경적 방법으로 점차 대체되고 있는 추세에 있다. 유도저항성 근권균을 이용한 생물학적방제는 자연 토양내에 살고있는 근권균을 이용하여 작물체의 각종 병해에 대한 저항성을 유발시켜 병해를 방제하는 방법으로 일단 고효성 근권균이 선발되면 작물의 종자에 분의 하거나 근권균 현탁액에 종자를 침지하는 방법으로 사용이 가능하므로 그 처리방법이 매우 간단하지만 상용화하기에 처리대상물체가 매우 제한적이어서 그 실용성과 경제성이 매우 뚜렷하다. 근권중에는 PGPR균(plant growth-promoting rhizobacteria)처럼 유도저항성 능력 뿐 아니라 작물체의 성장촉진 능력을 동시에 가진 균도 있어 병 방제와 수량증진, 숙기 단축과 같은 효과도 동시에 기대할 수 있으므로 자연 토양내 수없이 많이 존재하는 근권균을 대상으로 활성이 높은 균주를 검정할 수 있는 시스템 개발이 필요하다.

산업적인 측면에서 생육촉진 효과 및 유도저항성을 이용한 작물재배 및 병 방제방법은 여러 작물에 동시에 적용이 가능하며 그 활성범위가 어떤 특정 병해에 그치지 않고 광범위하게 작용하므로 농업적 이용에 편리성을 더해준다. 그러나 상업화를 위한 제품의 안정성 및 사용자의 편의성을 고려하여, 살아있는 생균제제의 한계를 극복할 수 있는 대안 개발이 필요하다.

- 합성 화학농약 및 화학비료의 사용은 환경부하의 증가 및 환경오염 문제 야기로 인해 그 사용량의 감소가 불가피 함.
  - 최근의 농업생산 특히 채소류의 소비형태는 고품질, 고생산성 뿐 아니라 내가 먹고 있는 먹을거리는 얼마나 안전한가에 대한 우려감이 커지고 있음.
- 정부는 2004년 친환경농업 육성책을 발표하여 2013년까지 현재 화학농약/화학비료의 사용량을 현재사용량의 40%를 감축하기로 하였으며, 유기농을 비롯한 친환경농업 면적을 전체 경지면적의 10%까지 확대하기로 함.
- 정부의 시책과 친환경 농산물에 대한 소비자의 수요 증대에 따른 친환경 농작물 생산에 대한 필요성은 계속 증대되고 있으나, 이러한 화학농약/화학비료에 대한 의존도를 줄인 농작물 생산을 현실화 할 수 있는 작물 병해충/양분 관리 제품이 매우 부족함.
- 본 근권세균 및 생산 물질처리는 유도저항성 능력뿐만 아니라 작물체 성장촉진

능력을 동시에 가지므로 화학농약/화학비료 사용량 감축을 통한 IPM/INM의 실현 및 수량증진, 숙기단축과 같은 효과도 기대할 수 있는 장점이 있음.

- 따라서 선발된 고효성 근권세균의 배양에 의한 활성물질의 대량생산과 상용화는 이러한 농업현장의 요구사항을 충족시킬 수 있는 하나의 대안이 될 것 임.
- 본 근권세균 및 생산물질을 이용한 제품은 종자에 coating하거나 수화제형으로 제조하여 관주 및 직접 살포용으로 개발될 수 있으며, 여러 가지 제형을 실용화 하기 위한 연구가 반드시 필요하며 또한 이들 제형의 안전생산 및 처리효과의 규명이 반드시 수행되어야함.
- 본 근권세균 및 생산물질을 이용한 병해충 저항성 유도 및 생육촉진효과는 종자, 유묘, 그리고 토양 관주 및 엽면 처리등 다양한 방법으로 적용이 가능하며 그 활성범위가 어떤 특정병해 및 특정작물에 그치지 않고 광범위하게 작용하므로 실용적임.
- 근권세균 및 생산 물질 의한 유도저항성/생육촉진효과를 이용한 작물재배는 합성화학농약/화학비료와는 달리 환경에 대해 부담을 주지 않고 작물에 독성이 잔류하는 등의 부작용이 없어 요즈음 특히 강조되는 친환경적 방제방법이라고 할 수 있음.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 근권미생물에 의한 유도저항성 이용에 관한 국내연구는 '90년대 후반 본 연구 주관기관인 농업과학기술원에서 처음 시작하여 우수균주인 *Bacillus vallismortis* EXTN-1를 선발하여 개발 완료되어 산업화 제품이 2005년 부터 동부한농화학을 통해 상토, 수화제, 액제등으로 시판되고 있음.

그 외의 유용미생물을 이용한 생물방제제는 국내의 벤처기업을 중심으로 수십종이 개발되고있으며 대부분 미생물의 항균활성을 기초로한 제품이며 유도저항성을 주축으로 개발된 제품은 EXTN-1이 국내외적으로 유일함.

- 국내 대학의 연구동향

국내의 경우 유도저항성 능력이 있는 내생근권세균을 이용한 고추역병균의 생물적 방제 연구를 고려대학교 김기덕 교수팀이 수행 중이며, 전남대학교 김영철 교수팀은 식물의 근권에서 분리한 유도저항성 *Pseudomonas*의 일종을 이용한 식물병의 생물학적 방제 연구를 수행하고 있으나 아직 상업화된 제품은 생산치 못하고 있음.

- 세계 대학의 연구동향

네덜란드 Utrecht 대학의 van Loon 및 C. A. Pieterse 교수를 중심으로 한 근권세균인 *Pseudomonas fluorescens* W415 균주에 의한 생물학적 방제 기작연구를 수행하고 있으며 이 균주에 의한 유도저항성은 SA 의존적 경로이기보다는 주로 Jasmonic acid 및 Ethylen 경로에 따름을 밝혔다. 최근 후속 연구를 통하여 근권세균에 의한 유도저항성은 식물의 NPR 유전자에 의하여 SA 와 JA/Ethylen 경로의 정도가 결정됨을 확인하였다. 이와 같이 Utrecht 그룹의 연구는 근권균에 의한 병저항성경로의 규명에 초점이 있으나 농업적 이용을 위한 실용적인 측면에서 연구되지 않고 있다.

- 상용화된 유도저항성(ISR)/전신획득저항성(SAR) 관련 제품

구분	회사명	제품명	Active ingredient
SAR	Syngenta	Actigard, Bion, Boost	Acibenzolar-S-methyl

	Eden bioscience	Messneger	Harpin protein <i>Erwinia amylovora</i>
	Safescience	Elexa	Carbohydrate formula
ISR	Gustafson LLC	BioYield, Yieldshiald	<i>Paenobacillus macerans</i> and <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	BioSciences	Naturize	PGPR

2005년 생물농약에 대한 시험기준 및 방법 및 관련 법이 제정되어, 법률적 테두리 밖에서 특정한 기준없이 산제되어 있던 친환경 농업관련 자제들의 법률적 기준이 마련되었음. 또한 농촌진흥청의 유사 농약에 대한 규제의 강화에 따라, 유사 농업자제의 연구/개발에 대한 중요도가 점점 커지고 있음. 또한 정부의 친환경 농업 및 관련 제품에 대한 보조 및 활동 장려가 이루어 지고 있음. 이러한 국내 환경의 변화에 따라서 본 연구과제의 주요 내용인 생육촉진/유도저항성 미생물의 법률적 위치와 그 사회적 요구도가 점점 커지고 있다.

2005년 호주에서 개최된 IFOAM 회의에서 많은 신기술에 대한 발표가 이루어 졌으며, 많은 선도적 화학농약회사를 비롯하여, 유럽의 NPP를 비롯한 많은 연구 중심 회사들에서 작물별, 병해충별 특화된 제품들의 개발이 이루어지고 있으며, 많은 수의 제품이 2005년 상용화 되어 출시되었음. 또한 기존의 유일한 SAR제품인 Harpin protein을 이용한 Eden bioscience의 Messenger와 유사한 신 SAR유도체인 Cerebroside가 일본 Meigi대학 연구팀에 의해 개발되어 2006년 상용화되어졌다.

현재 많은 PGPR균주들이 상업화를 시도하고 있으나, 처리시기 및 환경에 따라 많은 차이를 나타내었으며, 상업화의 최대 난점은 제품의 보관방법 및 유효기간의 설정인데 본 과제의 최종 목적에도 나타나있듯이, 고효성의 미생물을 이용하여, 활성물질의 생산량을 최대화한 후, 환경에 안정한 물질을 이용한 제품을 상용화 하는 것이 가장 중요하다.

유사한 개념 및 방법으로 세계최초로 상용화된 유도저항성 단백질인 Harpin protein은 배나무화상병원균인 *Erwinia amylovora*로부터 유래된 것으로 살균처리된 후 제품화되어 미국, 유럽등 세계적으로 판매되고 있다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 생물활성 특성 검정

##### 1. 유도저항성/생육촉진 근권균의 활성 스펙트럼 검정

###### 1) 식물병원균에 대한 K87 균주의 항균 활성

주요 식물병원균인 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 오이시들음병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 및 갈록병(*Rhizoctonia solani*)에 대한 K87 균주의 항균 활성을 검정한 결과 그림 1 및 표 1에서와 같이 3개 공시 병원균에 대한 억제 효과가 매우 우수하였다.

표. 1. K87 균주 처리에 의한 주요 식물병원균의 균사 생장억제효과

Plant Pathogen	Inhibition zone(mm)
<i>Rhizoctonia solani</i>	30.3±2.9
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	39.3±3.9
<i>Phytophthora capsici</i>	44.5±3.2



그림. 1. K87 균주 처리에 의한 주요식물병원균 억제효과 (A: *Phytophthora capsici*,



B: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, C: *Rhizoctonia solani*)

K87균주의 활성물질 조추출(EPS)을 위해서, 균주는 King's B agar 배양하여 MeOH로 추출한 다음 남아있는 고형물에 살균증류수를 부어서 MeOH로 고형화된 시료를 액상으로 한 다음 Agar를 제거하였다. 여액은 Bacterial cell을 제거하기 위하여 8000G로 15분간 원심분리 하였으며 상등액을 농축하여 Aceton 및 Methanol을 부어서 고형화된 부분의 시료를 수거하였다. 이 시료를 냉동건조하여 Crude EPS로 하였다. (그림2. 3)

Crude EPS는 Sephacryl S-100을 이용하여 정제하였는데 먼저 16 x 90cm 크기의 컬럼에 채워진 Sephacryl S-100을 activation 시킨후 0.15M NaCl로 elution 시켰다. 공시 시료는 0.15M NaCl 용액에 녹인다음 0.22um의 cellulose filter로 여과하여 사용하였다. UV디텍터 206nm로 모니터링하였으며 분당 chart speed는 0.1mm/min이었으며, 유속은 0.3ml/min 이었다.

분리된 분획은 투석후 처리별로 0.1mM proteinase K로 37C에서 peptide를 분해시켰다. 정제된 시료는 냉동건조후 저온실에 보관시험에 이용하였다. 정제된 EPS의 LPS 함유량을 조사하기위하여 Charles River Endosafe 사의 LAL kit를 이용하여 분석하였다.

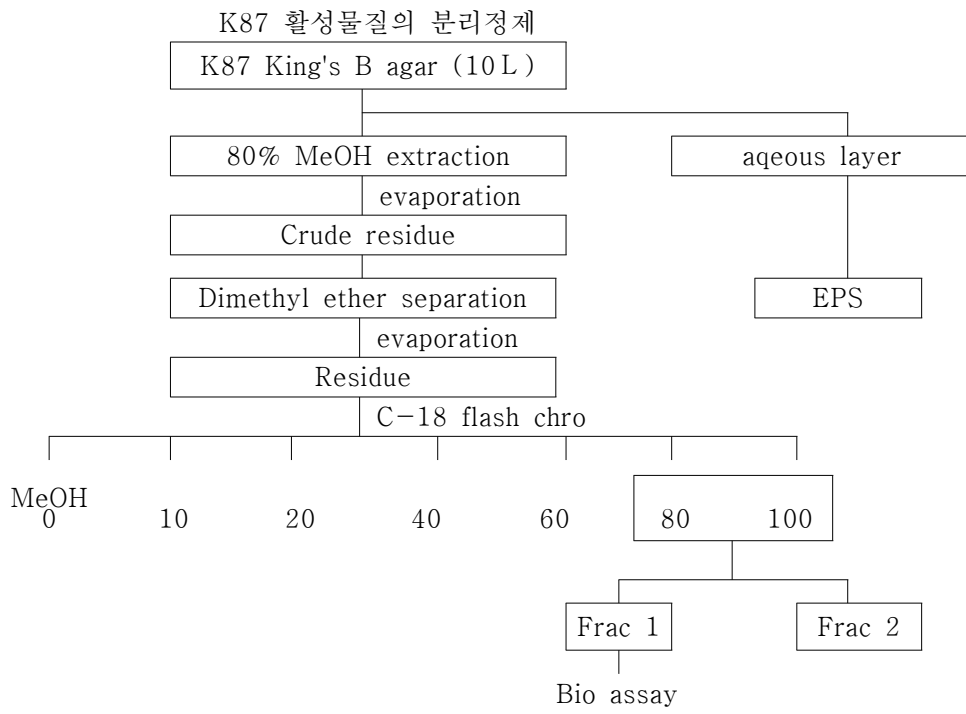


그림 2. 고효성 근권균 K87생산 항균 활성물질의 분리 정제

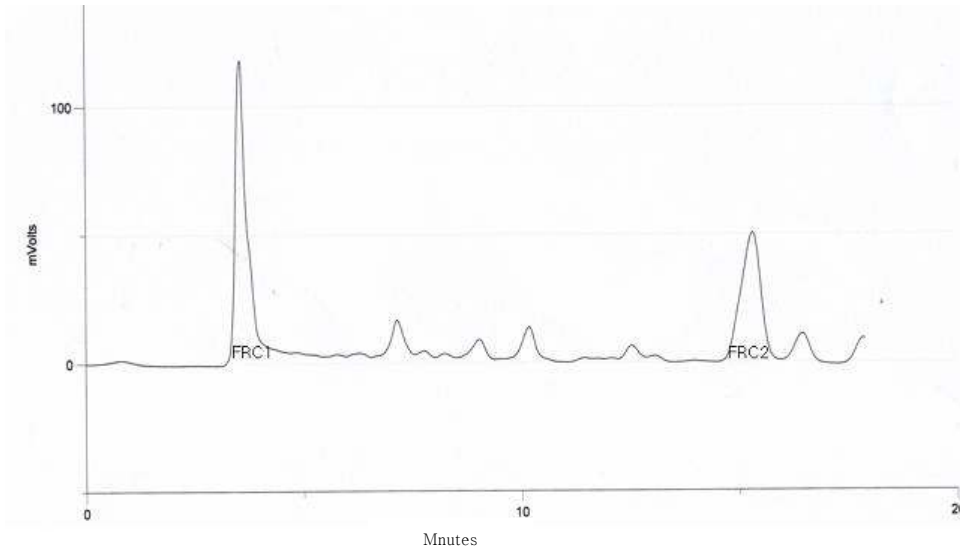


그림 3. K87 생산 항균 활성 분획의 분리 정제

K87 균 배양액에 병저항성을 일으키는 물질이 존재하는지를 확인하기 위하여 K87 King's B 배양액에서 Live cell을 제거시킨 다음(0.22um휠터사용, Fisher Co.) 병저항성유전자인 PR-1a promoter에 GUS 유전자가 결합된 형질전환 담배식물에 주사하였다. 3일후 식물체에서 GUS protein을 추출하여 MUG에 처리별로 추출된 시료를 반응시켜 자외선 상에서 발현된 GUS 발현량을 조사한 결과 그림 1에서와 같이 K87 King's B 배지 배양액내에 병저항성 유도 물질이 존재하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 4)

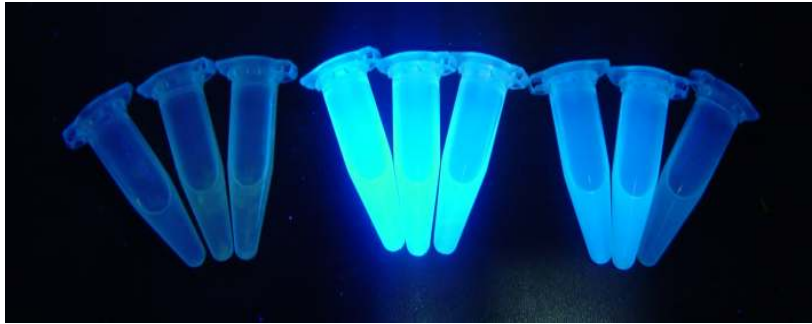


그림 4. K87 배양액 처리에 의한 PR1a GUS 발현 ( A: Control, B: BTH 0.1mM, C: K87 배양원액)

#### 가. 주요 병해에 대한 유도저항성 검정

K87 균주 생산 EPS의 항균활성을 검증하기 위하여 그림 1의 방법에 의해 분리된 물질을 분획 I, II 대하여  $100\mu\text{g}/\text{disc}$ 로 처리하여 8개 주요병원균에 대하여 inhibition zone을 측정하였으며, 그 결과는 표2와 같다. 표2에서 나타난 바와 같이 K87균주가 생성하는 항균물질의 두 분획중 분획II는 모든 균주에 대하여 전혀 항균활성을 나타내지 않았으며, 분획 I 은 난균류에 대해 상대적으로 낮은 항균성을 나타내었으며, *Pythium ultimum*에 대하여서는 항균성이 전혀 없는 것으로 나타났다. 분획 I 난균류를 제외한 다른 속의 균에 대하여서는 높은 항균성으로 나타내었다.

표 2. K87 생산 항균활성물질의 생물활성 검정

Treatment	inhibition zone diameter(mm)a	
	Frac I	Frac II
<i>Rhizoctonia solani</i>	25.2	0
<i>Colletotrichum orbialane</i>	18.5	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	22.0	0
<i>Botrytis cinerea</i>	32.0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	15.0	0
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	20.0	0
<i>Phytophthora capsici</i>	5.2	0
<i>Pythium ultimum</i>	0.0	0

a: sample 100 $\mu$ g /disc

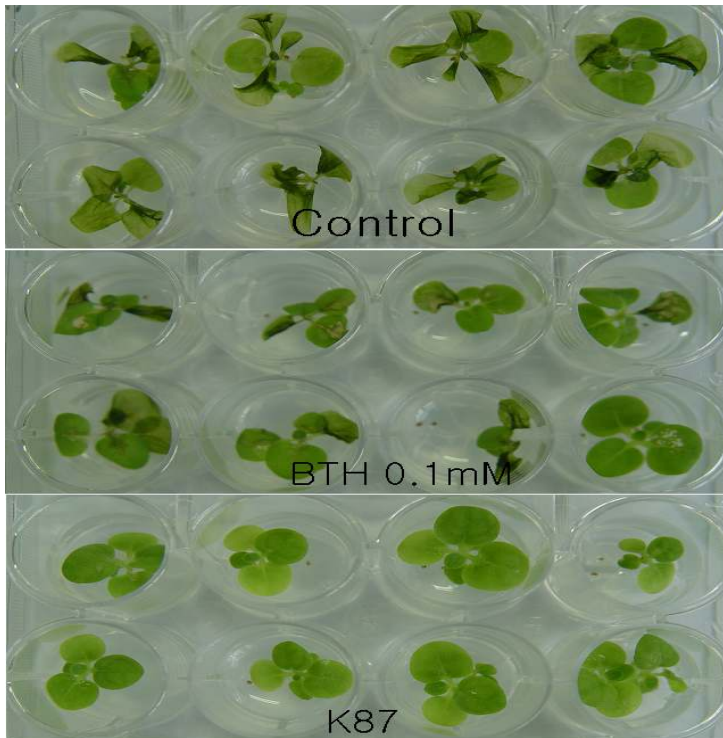


그림 5. 고효성 근권균 K87 근권 처리에 의한 담배 무름병(*Erwinia carotovora* SCC1) 방제효과

K87균의 처리에 따른 담배무름병(*Erwinia carotovora* SCC1)에 대한 병발생 억제 효과를 검증하기 위하여 담배 유묘에 K87과 BTH 0.1mM을 처리한 후, 균을 접종하여 병 발생을 조사한 결과, K87처리에 의한 병 발생 억제효과가 분명하게 나타났다. (그림 5)

## 2. 근권세균 생산 유도저항성/생육촉진 활성물질의 작용기작 검증

K87균주에 의하여 생산된 EPS (extra polysaccharide)는 식물생육과 식물의 병저항을 발현 시켜 각종 식물병에 대한 면역능력을 강화 시킨다. 본 연구에서는 이와 같은 병저항성이 식물이 가지고 있는 2가지 저항성 경로중 어디에 속하며 발현량은 얼마나 되는지를 알기 위하여 수행하였다. PR-1 유전자의 발현은 보통 SAR(Systemic Acquired resistance)와 ISR(Induce systemic resistance) 등 두가지의 주요 경로가 잘 알려져 있는데 SAR의 경우 Salicylic acid가 elicitor의 역할을 하며 SA pathway로 불리기도 하며 이때 PR-1a 유전자의 발현이 필수적이다. 또 다 fms 기작으로서 Ethylen-JA 기작이 있는데 대체로 이 경로는 비병원성 근권미생물에 의하여 발현되는 것으로 알려져 있는데 이때 PDF1.2의 발현이 필수적이다. 그림 2에서 보는 바와 같이 BTH 0.1mM 및 SA 10mM 처리는 PR-1 유전자의 발현에만 관여되는 것을 볼 수 있으며 EPS 처리의 경우 PR-1 및 PDF1.2가 동시에 발현되는 것으로 보아 K87 EPS는 두가지 병저항성 경로를 모두 가동시키는 것으로 증명되었다. EPS 1.0ppm 처리의 경우 PR-1 유전자의 발현이 나타나지 않았는데 반복시험에서도 동일한 결과를 나타내어 향후 결과가 주목된다. 처리농도 별 PR-1유전자 발현은 SA 혹은 BTH 보다 낮은 농도를 나타내었다(그림 6)

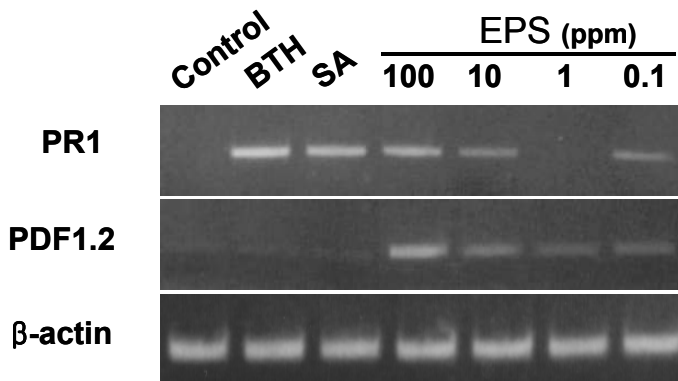


그림 6. K87로부터 분리한 EPS 분획 처리에 의한 병저항성 유전자 PR-1 및 PDF 1.2의 발현( BTH: 0.1mM, SA: 10mM )

식물체에서 특정 엘리시터 의 처리에 의한 Hydrogen peroxidase 등 활성 산소의 생성은 병저항성의 초기 signal 로서 매우 중요한 기작이다. 본 시험에서는 병저항성 유도물질인 K87 생산 EPS가 oxidative burst를 일으키는지를 규명하기위하여 수행하였다. 오이 열매조직 disc에 농도별로 Luminol과 같이 처리된 EPS처리는 농도가 높을 수록 강하게 발현되었으며 positive control인 0.3% Hydrogen peroxidase 처리는 강하게 발현하였다. 이로서 K87 EPS 처리에 의하여 병저항성 초기단계인 oxidative burst가 일어나는 것을 확인 할 수 있었으며 이와 같은 반응은 K87 EPS의 처리가 병저항성을 일으킨다는 확실한 단서라 할 수 있다(그림 7).

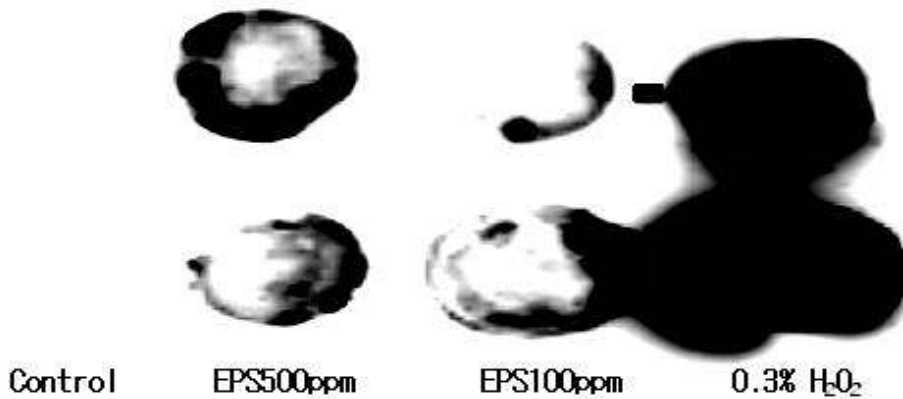


그림 7. K87 EPS 처리에 의한 활성산소 생산 (LAS 3000,Cold CCD camera)

K87균이 생산하는 물질의 유도저항성 물질의 함유여부를 측정하기 위하여 2분획에 대하여 PDF 1, 2 GUS활성을 측정하였다. 그 결과 두 분획 모두에서 높은 활성이 조사되었으며, 따라서 두 분획 모두 유도저항성 물질을 포함하고 있는 것으로 판단 되었다. (표 2)

표 2. K87 생산 항균활성물질의 PDF1, 2 GUS 활성

Treatment	PDF 1, 2 GUS activity(n Mol Mu/10mg F.W/hr)			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Combined data
Control	394	400	482	425.3
Frac 1	16,006	22,963	23,867	20,945.3
Frac 2	38,422	30,672	9,607	26,233.7
LSD (P=0.05)				17,901.5

또한 K87균이 생산하는 물질의 Peptide의 작물의 병 저항성 유도 및 작물 생육증진 효과를 측정하기 위하여, 담배에 대하여 분리 Peptide를 농도별로 처리 하고 BTH 0.1mM을 대조로 하여 시험 하였다. 담배는 Samsu 과 Xanthi 두 품종에 대하여 수행 하였으며, 그 결과 peptide 10ppm에서 가장 높은 생물활성을 나타냈었. . (표 3)

표 3. K87 peptide 분획 처리에 의한 담배 생육촉진

Treatment	Fresh weight(mg)		Diseased plant(%) ISR against SCC1	
	Samsun	Xanthi nc	Samsun	Xanthi nc
Control	137.5	63.80	33.3	50.0
BTH 0.1mM	88.1*	48.23	33.3	83.3
Peptide 1000 ppm	67.3*	45.60	16.7	50.0
Peptide 100 ppm	124.9*	71.64	16.7	33.3
Peptide 10 ppm	203.7*	102.30*	16.7	60.0
Peptide 1.0 ppm	94.1*	78.00	16.7	50.0
Peptide 0.1 ppm	79.4*	92.10*	50.0	33.3
Peptide 0.01 ppm	121.5*	118.80*	33.3	16.7
LSD(P=0.05)	7.2	30.5	—	—

Peptide contained one arabinose and 5 amino acid as Ile, Val, Ser, Glu Asp (Arabinose-Ile-Val-Ser-Glu-Asp).

### 3. 유도저항성 / 생육촉진 근권세균 사용기술 및 포장 실증 시험

K87의 감자에 대한 생육증진 및 유도저항성 효과를 시험하기 위하여 K87균주와

K87 EPS를 씨감자에 처리하여 생육(초장) 및 잿빛곰팡이 발병을 그리고 생산량에 대한 조사를 수행하였다. K87 균주의 씨감자 유묘 침지효과는 무처리에 비하여 15.6%의 초장증가라는 생육촉진을 일으켰으며(표 4) K87 EPS의 처리에 의하여 씨감자의 생산은 무처리가 0.25/주 일때 K87 EPS는 주당 0.43gm 으로 58%의 생체중 증가를 나타내었다(표 5). 또한 K87 EPS 처리는 잿빛곰팡이병의 발생에도 무처리에 비하여 발생량이 다소 감소하였다.(표 5)

표 4. 근권균 K87 처리에 의한 씨감자의 생육촉진효과

처 리	초장(cm)			
	반복1	반복2	반복3	합계
무처리	37.7	38.3	39.1	38.4
BTH(0.5mM)	33.6*	37.7	29.9*	33.7*
<b>K87 Live cell</b>	<b>46.0*</b>	<b>46.1*</b>	<b>44.5*</b>	<b>45.5*</b>
TE5*	58.0*	61.2*	58.2*	59.1*
LSD( $p=0.05$ )	3.9	5.0	4.5	4.5

\* TE5 : 생육증진효과 근권 미생물

표 5. K87 생산 EPS 처리에 의한 씨감자 증수효과

처리	초장(cm)	잿빛곰팡이발병율(%)	생체중/주
무처리	7.9	92.0	0.25
923-87 <sup>1</sup>	-	-	0.26
Messenger <sup>2</sup>	8.5	94.0	0.27
<b>K87 EPS</b>	<b>9.7</b>	<b>85.7</b>	<b>0.43*</b>
LSD( $p=0.05$ )			0.05

923-87<sup>1</sup> : 생육증진효과 근권 미생물

Messenger<sup>2</sup> : Harpin protein 이용 상용제품 (Edenbio, 미국)

좀 더 세밀한 시험을 수경재배 씨감자에 대한 K87균과 EPS에 대한 시험을 수행



하였다. 배양된 씨감자를 조직배양실에서 K87 및 EPS를 상용화된 유도저항성 제품인 Harpin protein(Messenger)을 대조로 처리 한 후, 3주간 육묘된 감자 유묘를 비닐하우스내 수경재배 육묘시설로 옮겨서 재배하여, 감자의 생육, 및 수량, 그리고 품질을 조사하였다. 표6에서와 같이 K87 생균 처리, 및 K87 EPS 단독처리, 대조처리인 Messenger 처리 모두에서 생육촉진 및 증수효과가 인정되었다. 모든 처리 중 K87 EPS(100ppm) 처리는 초장, 감자수량 및 상품율에서 가장 우수한 하였다. 시험결과 K87 EPS 처리가 K87균주 처리와 비등 이상임을 알 수 있었다. (표 6. 그림 7).

표 6. 고효성유도저항성 근권균 EXTN-1의 수경재배 씨감자 유묘관주 처리효과

처리	초장(cm)	감자수량(g/20주)	상품율(%)
Control	46.6	2434.0	93.0
K87 Live cell	57.8	2484.0	95.7
K87 Live cell+ Messenger	65.5	2953.0	95.5
<b>K87 EPS</b>	<b>61.8</b>	<b>3205.6</b>	<b>92.0</b>
Messenger	61.8	2282.0	89.0

LSD(p=0.05)



그림 7. 수경재배 감자에 처리된 K87 EPS의 씨감자 증수효과

또한 K87 EPS의 유도저항성 및 생육증진 효과를 처리시기에 따라 조사하기 위하여 감자 수경재배 시스템에 처리하여 조사하였다. 조직배양 육묘단계의 감자에 K76EPS를 100ppm에 2시간 동안 침적하여, 감자의 종서에 K87 EPS 수용액이 충분히 묻도록 하였다. 이후 감자의 유묘를 Perlite인공 수경 배양기에서 배양하여, 감자의 생육, 병해발생 억제 그리고 종서의 품질을 비교하였다.

그 결과 K87 EPS처리에 의해 감자의 초장은 12%이상 그리고 최종 종서의 무게는 70%이상 증가하였다. 그리고 잿빛곰팡이병의 발병은 6.3% 감소하였다.

표 7. 수경재배 조건의 감자 유묘에 처리된 K87에 의한 감자 생육 및 수량 비교

Treatment	Plant height(cm)	% diseased plant	Fresh Weight(g)/plant
Control	7.9	92.0	0.25
Messenger	8.5	94.0	0.27
K87 EPS 100ppm	9.7*	85.7*	0.43*
LSD(p=0.05)	0.8	5.5	0.05

K87 균주 및 K87 EPS에 대한 토마토의 생육촉진 효과 및 병해 방제 효과를 규명하기 위하여 실 포장 시험을 수행 하였다. 2주된 토마토 묘종을 1mM BTH, K87( $10^7$  cfu/ml+100ppm EPS)를 유묘관주 처리하였다. 이 후 노지 포장에 정식한 후 시들은 병원균을 접종한 뒤, 토마토의 생육 및 병 발생 현황을 1주 간격으로, 그리고 품질을 조사하였다.

무처리에서 7월 중순경에 시들은 병이 발병하여 8월 중순 (43일 후) 100% 시들은 병이 발병하였으나, 같은 기간 BTH 처리와 K87 EPS처리는 낮은 병 발병율을 나타내었다. BTH의 경우 43일 후 약 8% 그리고 K87 EPS의 경우 40%의 병 발병율을 나타내었으며, K87 EPS의 경우, 21일 후 까지 4%의 병발병율을 나타내어 병발생 억제 효과 지속기간을 가늠할 수 있게 하였다. (표 8)

K87 EPS의 처리에 대한 토마토의 생육증진 및 병해방제 효과는 그림 8에 분명하게 나타나는데, 화학유도저항성 물질인 BTH의 경우 병 발생 억제효과는 뛰어난 것으로

나타났지만, 토마토 생육에 있어서 부정적 효과를 나타내는 것으로 조사되었다. 이에 반해 K87 EPS와 근권미생물인 TE5의 경우 생육 증진효과가 무처리 및 BTH처리에 비해 유의차 있게 증대되는 것을 알 수 있었다. (그림8, 표 9)



그림 8. 근권균 K87 처리에 의한 토마토 시들음병 방제효과

표 8. 근권균 K87 처리에 의한 토마토 시들음병 방제효과

처리	토마토 시들음병 발생율(%)						
	7.4	7.11	7.18	7.25	8.1	8.8	8.16
Control	0.0	0.0	6.0	20.0	32.0	64.0	100.0
BTH*	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	4.0	8.0
<b>K87+EPS</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>4.0</b>	<b>4.0</b>	<b>14.0</b>	<b>40.0</b>
TE5	0.0	0.0	4.0	10.0	24.0	50.0	98.0

표 9. K-87 처리에 의한 토마토 생육촉진효과

처 리	초장(cm)			
	반복1	반복2	반복3	합계
무처리	37.7	38.3	39.1	38.4
BTH(0.5mM)	33.6*	37.7	29.9*	33.7*
K87+EPS	46.0*	46.1*	44.5*	45.5*
TE5	58.0*	61.2*	58.2*	59.1*
LSD( $p=0.05$ )	3.9	5.0	4.5	4.5

옥수수 깨씨무늬병에 대한 K87 EPS 처리억제효과를 규명하기 위하여 K87 EPS를 옥수수종자에 코팅한 다음 포장에 직파하였다. 이 시험을 통해 생육중기이후에 발생하는 깨씨무늬병 (*Cochliobolus heterostrophus*)에 대한 방제 효과를 규명하였다. 종자 처리된 K87 EPS를 화학유도저항성 물질은 BTH와 비교하였으며, 그 결과는 표 10과 그림 9와 같다. 이 것으로 화분과의 옥수수에 대하여, K87 EPS는 종자처리에 의해서 발현된 저항성이 생육중기에 발생하는 옥수수 깨씨무늬병의 발병 억제에 효과적으로 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

표 10. K-87 종자처리에 의한 옥수수 깨씨무늬병 억제효과

처리	병반수 / 잎
Control	31.7
K87+EPS	11.7*
BTH 0.1mM	8.3*
LSD (p=0.05)	17.1



**무처리**

**K87 EPS**

그림 9 K87 생산 EPS 종자처리에 옥수수 깨씨무늬병의 방제 효과

K87 EPS에 의한 유도저항성 발현을 규명하기 위하여 오이에 대하여 시험을 수행하였다. 본 시험은 K87 EPS의 처리 농도 및 처리방법에 따라 유도저항성의 발현이 달라지는 것을 확인하기 위함이며, K87 EPS의 농도를 50ppm, 100ppm 그리고 200ppm으로 하고, 화학유도저항성 물질은 BTH를 대조로 하여, 오이 종자에 침적시켜 coating 처리한 것과 유묘에 관주하여 나타나는 오이 탄저병의 억제 효과를 관찰하였다. 본 시험 결과 종자 처리시 농도에 비례하여, 병 발생량을 나타내었으나, 관주처리의 경우 농도에 따라 다른 병 발생량은 관찰 되지 않았다. 모든 처리에서 BTH 보다 높은 병 발생량을 나타내었으며, 무처리에 비해 유의하게 낮은 병발생량을 나타내었다. (표 11)

표 11. K87 EPS 처리농도 및 처리방법에 따른 오이 탄저병 억제 효과

Treatment	Lesion no./leaf	
	Seed coating	Soil drench
Control	406.5	411.8
BTH 0.1mM	81.3*	6.1*
EPS 50ppm	252.5*	318.5
EPS 100ppm	134.8*	253.5*
EPS 200ppm	174.5*	235.8*
LSD (p=0.05)	110.6	135.0

K87 EPS의 처리방법을 달리하여, 오이탄저병에 대한 병 발생 억제 효과를 조사하였는데, K87 EPS를 규조토에 혼합하여, 약식 수화제로 만들어 시험에 사용 하였다. 시험에는 규조토에 K87 EPS를 0, 0.1, 1, 5, 그리고 10%로 혼합하였으며, 2반복 시험 하여 그 효과를 규명하였다.

표 12. K87 EPS celite formulation 제형의 처리 농도별 오이 탄저병 억제 효과

Treatment	Lesion No. / Leaf		
	first BTL	second BTL	Combined
control	108.3	216.2	324.5
BTH 0.1mM	13.2*	108.8	122.1*
EPS 0%	92.5	167.0	259.5
EPS 0.1%	104.7	214.0	318.7
EPS 1%	15.2*	105.2	120.4*
EPS 5%	29.3*	162.2	191.5*
EPS 10%	97.5	224.7	322.2
LSD (p=0.05)	51.5	71.2	122.7

그 결과 K87 1%이상의 구조토 혼합물에서 유의하게 병 발생 억제 효과를 나타냈으며, 화학유도저항성 물질인 BTH와 비등한 효과를 보였다.

K87 EPS의 병저항성 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 담배에 대한 병저항성 발현에 따라 나타나는 병징의 크기로 조사하였다.

K87 균주, 배양형태별 EPS 그리고 화학 유도저항성 물질인 BTH에 대하여 조사하였으며, EPS는 100ppm 과 200ppm의 2농도로 시험 하였다. 그 결과 담배에 나타나는 유도저항성의 발현도는 고상평판배양에서 얻어진 EPS가 액상배양에서 얻어진 EPS보다 강하게 나타났다. (표 13)

표 13. K87 EPS 배양 조건별 담배에 대한 병 저항성 발현

Treatment	Lesion Diameter (ISR activity against scc1)
Control	12.50
BTH 0.1mM	4.26
K87 Bacterial cell	7.62
EPS from solid culture of K87 EPS 100ppm	8.12
EPS from solid culture of K87 EPS 200ppm	4.00
EPS from liquid culture of K87 EPS 100ppm	10.46
EPS from liquid culture of K87 EPS 200ppm	10.14
LSD(P=0.05)	4.26

담배에 대한 K87 EPS의 농도별 병 저항성 유도에 따른 병 발생억제를 잣빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)과 담배무름병(*Erwinia.carotovora* SCC1)에 대하여 시험하였다. K87 EPS를 0.1, 1.0, 10, 50, 100, 200, 400, 1,000ppm으로 하고, BTH 1mM과 50mM을 대조로하였다. 시험결과 잣빛곰팡이병 및 담배무름병에 대해 K87 EPS 농도에 비례하여 병 감소율을 나타내었다. 농도구배에 따른 병 발병의 감소는 직선적이지 않고 계단형식이었는데, 잣빛곰팡이병에 대하여는 K87 EPS 100ppm이 담배무름병에 대해서는 K87 EPS 50ppm이 대표성을 가졌다. (표 14)

표 14. K87 EPS 처리에 의한 담배 유도저항성

Treatment	Lesion size(mm) against % Disease severity against	
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>E. carotovora</i> SCC1
Control	27.2	50.0
BTH 1mM	20.7	75.0
BTH 50mM	19.8	50.0
EPS 0.1ppm	12.0	50.0
EPS 1.0ppm	24.3	50.0
EPS 10.0ppm	24.3	50.0
EPS 50.0ppm	19.8	25.0
EPS 100ppm	16.9	0.0
EPS 200ppm	13.2	25.0
EPS 400ppm	16.9	25.0
EPS 1,000ppm	17.8	0.0

또한 K87 EPS의 농도구배에 따른 담배의 생육증진효과를 조사하였는데, 그결과 K87 EPS 1.0ppm이 대표성을 나타내었다.

표 14. K87 EPS 처리별 담배 생육촉진

Treatment	Fresh weight (mg) / Plant
Control	23
BTH 1mM	28
SA 50mM	32
0.1 ppm	33
1.0 ppm	43
10.0 ppm	38
50.0 ppm	44
100.0 ppm	33
200.0 ppm	34
400.0 ppm	40
1,000.0 ppm	41



K87 EPS 처리에 따른 박과 작물 중 메론에 대한 생육 촉진 효과를 규명하였는데 K87 EPS 농도구배에 따른 생육증진효과를 조사하였다. 시험결과 표 15에 나타나있듯이 K87 EPS 10ppm에서 가장 높은 생육증진을 나타내었으며, 이후 K87 EPS의 농도가 높아질 수록, 메론의 생육이 억제되는 것을 관찰 하였다. 이것은 유도저항성 물질이 사용농도에 따라, 부의 효과를 가질 수 있음을 나타내는 것으로 향후 상용화 후 매우 중요하게 작용할 것으로 판단되었다. (표 15)

표 15. K87 EPS 처리에 의한 메론 생육촉진 효과

Treatment	Plant height(cm)	
	14 DAT	17 DAT
Control	8.8	12.2
BTH	9.1	12.9
EPS 10ppm	9.9*	13.4
EPS 100ppm	8.1	10.9
EPS 200ppm	8.5	12.1
EPS 400ppm	5.9	9.8
LSD (P=0.05)	1.1	0.8

K87 EPS처리에 따라 나타난 옥수수에 대한 수량증대효과는 다음의 표 16과 같은데, K87 EPS 100ppm과 K87 균주를 BTH를 대조로 하여 처리하였다. 처리 결과 K87 EPS의 처리가 화학 유도저항성 물질인 BTH와 비등이 상의 수량 증대 효과를 나타내었다. 하지만 중량에 있어서는 처리구간의 통계적으로 유의한 차이를 볼 수 없었다. (표 16, 17)

또한 옥수수 이삭의 길이에서도 K87 균주 처리에서 약간의 증가가 있었지만, K87 EPS 처리구에서의 증가는 없는 것으로 나타났다.

표 16. K87 EPS의 종자 처리에 의한 옥수수 수량 증대

Treatment	Ear / 10 plants			Average
	Rep1	Rep2	Rep3	
Control	20	19	24	21.00
BTH 0.1mM	22	20	24	22.00
K87	23	17	20	20.00
K87 EPS 100ppm	22	21	27	23.33

표 17. K87 EPS의 종자 처리에 의한 옥수수 수량에 미치는 영향

TREATMENT	Ear weight/10plant(g)			Average
	Rep1	Rep2	Rep3	
Control	152.90	110.63	138.83	134.12
BTH 0.1mM	168.09	124.20	129.50	140.60
K87	126.48	116.12	153.30	131.97
K87EPS 100ppm	114.27	115.71	126.30	118.76

표 18. K87 EPS의 종자 처리에 의한 옥수수 수량에 미치는 영향

Treatment	Ear Length (cm)			Average
	Rep1	Rep2	Rep3	
Control	17.02	15.94	17.53	16.83
BTH 0.1mM	18.90	17.75	17.37	18.01
K87	17.00	16.86	18.69	17.52
K87EPS 100ppm	16.09	16.84	18.03	16.99

앞서 살펴본 감자에 대한 시험에서 K87 균주와 K87 EPS의 처리에 대한 생육증진 효과는 명확하게 나타났으며, 그 결과를 토대로, 고구마에 대한 K87 EPS의 영향

을 조사하였다. K87 균주와 K87 EPS 100ppm을 처리하였으며, 표 19의 결과에 나타나 있듯이, 덩이뿌리의 수에서 무처리 보다 29% 이상 증가하였으며, 덩이뿌리의 생체중에서 9%이상 증가한 것을 알 수 있었으며, K87 EPS 100ppm처리에서 덩이뿌리 생체중 증가는 23%이상 증가하였다.

표 19. K87 EPS 처리에 의한 고구마 생육촉진

Treatment	No.tuberous root/plant	Total tuberous root (g. F.W)/plant
Control	10.7	1290.0
K87 bacteria cell	14.7	1382.0
K87 EPS 100ppm	13.3	1580.7

K87 EPS 0.1%로 coating한 이탄 입제를 이용하여, 1차 선발된 제형인 토양입상처리제의 포장 실증 시험을 수행하였으며, 시험은 동일한 이탄 입자에 아인삼염과, 아미노산을 각각 처리하여, 다른 첨가물에 의한 생육촉진 효과비 비교하였다. K87 EPS와 아인산 3% (아인산염으로) 시험 결과 고추의 경우 최초 수확일에 수확량이 일반 관행의 화학 비료 처리구에 비해 84%이상 증가하였으며, 총 수확량에서도 20% 이상 증가된 결과를 나타내었다. 다른 재료가 첨가된 처리구에서는 화학비료처리구에 비해 낮은 수확량을 나타내었으며, 이탄 입자만 처리한 처리구에서는 가장 낮은 수확량을 나타냈다 (표 20, 그림 10) 본 시험결과는 기존의 화학비료의 유기질재료로 대체할 수 있는 가능성을 보여주는 의미있는 결과를 도출 시켰다.

동일한 시험을 토마토에 대하여 수행 되었는데 그 결과는 고추의 그것과 일치하였다. K87 EPS 처리구에서 수확량으로 약 29%이상의 증대효과를 나타냈으며, 착과수에서도 36%이상 증대하였다. 이 실험결과는 PGPR균이 전반적인 작물의 생육뿐만 아니라, 작물의 생식생장에도 영향을 준다는 종전의 시험결과와 일치하는 것으로, K87 균주가 생산하는 EPS에 포함된 유도저항성 물질 및 생육촉진 물질이 같은 역할을 한다는 것일 입증하는 것이다.

이러한 사실은 향후 제품화에 있어, 보존성과, 유효성이 높은 제품을 양산할 수 있는 중요한 요건이 될 것이다.

표 20. K87입상화 제형의 화학비료 및 유기질 비료의 고추 수확량 비교 시험 결과

Treatment	처리량	수확량 (8월22일)	수확량 (9월5일)	총 수확량 (KG)
Chemical fertilizer	10-11-9	4.4	3.2	7.6
Peat granule	100kg	3.6	2.6	6.2
Peat granule + amino acid (10%)	100kg	4.8	2.8	7.6
Peat granule + phosphorus acid (10%)	100kg	4.2	2.4	6.6
Peat granule + K87(0.1%)	100kg	7.2*	3.6	10.8*



그림 10. K87 입상화 제형의 고추에 대한 수확량 증대효과 시험

표 21. K87입상화 제형의 화학비료 및 유기질 비료의 토마토 수확량 비교 시험 결과

Treatment	처리량	수확량 (kg)	수량 (개)	수확량지수
Chemical fertilizer	14-16-8	36.9	247	100
Peat granule	100kg	30.9	230	84
Peat granule + amino acid (10%)	100kg	34.8	250	94
Peat granule + phosphorus acid (10%)	100kg	33.4	247	91
Peat granule + K87(0.1%)	100kg	47.8*	337*	130



그림 11. K87 입상화 제형의 토마토에 대한 수확량 증대효과 시험

K87 EPS를 포함하는 토양처리용 이탄 입제를 이용하여 다년생 구근 작물인 인삼에 미치는 영향을 조사하였다. 시험은 경남 밀양지역의 인삼재배지에서 수행되었으며, 3년과 4년근에 대한 생육상태 및 토양의 이화학성을 조사하였다. 시험지의 조건은 2005년에 예정지 관리를 한 포장으로 2005년 2, 3월에 전면포장을 고르게 포장상면을 정리하였고 상토를 높이 25cm, 폭90cm, 이랑폭 90cm로 만들어 놓았다.

묘삼을 이식하기 전 만들어진 상토상면에 K87 EPS 이탄입자를 칸 당 81g, 162g, 324g 을 각각 상토 상면의 토양에 뿌리고 골고루 흙과 섞은 후에 인삼 이식기를 이용하여 묘삼을 이식하였다. 묘삼이식은 인삼재배농가에서 분양 받은 묘삼을 주간 15cm 간격으로 묘삼 6개를 이식하였다. 묘삼을 이식한 후에는 대조구와 동일한 방법에 의하여 재배관리를 실시하였으며 인삼 상토상면을 벗길수로 덮어 잡초 및 수분 증발을 방지하는 벗짚피복 재배로 생육시켰다

3년근 재배 후 K87 EPS에 의해 나타난 토양물리화학성을 조사한 결과는 표 22와 같은데, 전반적인 EC의 수치가 낮아졌으며, 토양내 인의 함량이 감소한 것으로 알 수 있었다. 이것은 인삼 생육에 따라 양분의 이용효율이 무처리에 비해 증가한 것을 나타내는데, K87 EPS가 인삼의 생육에 주요한 영향을 미치는 것을 의미한다고 할 수 있겠다.

표 22. K87 EPS의 혼합처리가 토양물리화학성에 미치는 효과(3년근)

구 분	Soil depth (cm)	Porosity (%)	Hardness (mm)	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex.cation (cmol+/kg)		
								K	Ca	Mg
무처리	0~10	74.2	8.1	6.51	1.71	9	94	0.21	9.3	2.7
	10~20	72.3	8.7	6.07	1.15	9	112	0.17	9.5	2.9
	20~30	70.3	8.3	6.90	1.28	8	104	0.14	9.3	2.5
표준처리	0~10	69.5	8.5	6.3	2.33	8	95	0.25	9.2	3.3
	10~20	69.3	8.1	6.5	1.15	9	97	0.25	9.3	2.7
	20~30	66.2	7.9	6.9	0.95	9	99	0.19	9.3	2.8
배량처리	0~10	70.3	8.9	6.4	1.42	9	86	0.25	9.5	2.8
	10~20	65.1	8.5	6.7	0.88	8	90	0.21	9.2	2.7
	20~30	67.7	7.8	6.7	0.79	8	85	0.19	9.7	2.8

이러한 경향은 인삼의 년수가 늘어나면서 더욱 분명해 지는데 그것은 표23에 나타나 있다. 토양내 인의 함량은 약 27% 가량 감소하였으며 EC의 수치도 약 54% 이상 감소하였다. 이것은 토양내 양분의 이용효율이 K87 EPS 이탄 입제의 처리에 의해 비약적으로 증가한 것으로, K87 EPS와 이탄 자체가 가지는 토양개량효과가 동시에 나타난 것으로 판단된다. (표 23)

표 23. K87 EPS의 혼합처리가 토양물리화학성에 미치는 효과(4년근)

구 분	Soil depth (cm)	Porosity (%)	Hardness (mm)	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex.cation (cmol+/kg)		
								K	Ca	Mg
무처리	0~10	74.2	8.1	6.51	1.71	9	94	0.21	9.3	2.7
	10~20	72.3	8.7	6.07	1.15	9	112	0.17	9.5	2.9
	20~30	70.3	8.3	6.90	1.28	8	104	0.14	9.3	2.5
표준처리	0~10	67.6	7.4	5.4	2.24	5	83	0.16	8.7	2.5
	10~20	67.9	6.9	5.8	1.05	7	88	0.18	8.7	2.3
	20~30	61.9	7.2	5.8	0.89	8	92	0.12	8.7	2.1
배량처리	0~10	67.3	7.4	5.3	1.34	9	76	0.20	8.4	2.4
	10~20	64.2	7.8	6.3	0.69	8	82	0.18	8.3	2.4
	20~30	64.7	7.2	5.9	0.59	7	76	0.09	8.5	2.2

인삼은 다년생 작물로 지하부의 생육을 지상부의 생육으로 단정할 수는 없지만, 식물생육의 주요 지표인 엽록소 함량을 살펴봄으로서 K87 EPS 이탄 입제의 처리에 따른 효과를 추정할 수 있다. 표 24는 인삼의 엽록소 함량, 엽면적, 경장, 경직경을 측정하여 3년근과 4년근에 대하여 조사를 수행 하였다. 조사결과는 K87 EPS 이탄 입제에 의해 전반적인 수치가 증가함을 알 수 있었는데, 처리량에 따라 큰 변화는 없는 것으로 나타났다. 엽면적은 3년, 4년에서 25%이상 증가하였으며, 엽록소 함량도 3, 4년생 모두 10%이상 증가하여 K87 EPS의 처리가 공히 작물의 외적 생육에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 경장, 경직경 모두 5~19% 증가하여, 처리에 의해 작물의 외적 생장이 일 뿐만 아니라 전체적인 생육을 증진 시키는 것으로 조사되어, 인삼의 생육에 긍정적이 영향이 있을 것으로 판단되었다. (표 24)

표 24. K87 EPS에 따른 인삼의 지상부 생육특성

구 분	엽록소 함량 (SPAD values)		엽면적 (cm <sup>2</sup> /개체)		경장 (cm)		경직경 (mm)	
	3년근	4년근	3년근	4년근	3년근	4년근	3년근	4년근
무처리	32.2b	35.9b	264.4b	590.4b	23.9b	37.8b	4.6b	5.8b
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
표준 처리	35.7a	36.8a	331.1a	730.4a	25.4a	39.9a	5.5a	6.8a
	110.9%	102.5%	125.2%	123.7%	106.3%	105.6%	119.6%	117.2%
배량 처리	34.8a	37.4a	315.2a	745.2a	27.8a	39.4a	5.1a	6.4a
	108.1%	104.2%	119.2%	126.2%	116.3%	104.2%	110.9%	110.3%

상기의 추론은 인삼의 지하부 조사에서 확인되었는데, 표준 처리구, 배량 처리구에서의 근장, 동체, 근직경의 수치가, 지상부의 측정 수치가 양의 상관관계를 가지는 것을 알 수 있었다.

다만 3년과 4년근의 근장은 무처리구에 비해 다소 5~20%가량 짧아졌는데, 이것은 인삼이 근 주변의 양분을 흡수하여, 지하 수직생장의 필요성이 낮아진 것으로 판단된다. 이것은 동체의 길이와 근직경의 수치가 5~19%가 증가한 것으로 확인되는데, 인삼의 소비특성상 굵은 근을 선호하는 소비특성으로 고려할 때 K87 EPS 이탄 입체의 처리에 의해 인삼의 상품성이 향상된 것으로 판단할 수 있었다.

표 25. K87 EPS에 따른 인삼 지하부 특성

	근 장(cm)		동 체(cm)		근 직 경(mm)	
	3년근	4년근	3년근	4년근	3년근	4년근
무처리	25.1a	28.9a	12.4b	15.2b	6.1b	7.2b
	100%	100%	100%	100%	100%	100%
표준처리	22.5b	23.2b	14.5a	15.9a	7.1a	8.6a
	89.6%	80.3%	116.9%	104.6%	116.4%	119.4%
배량처리	23.8b	21.2b	14.4a	16.1a	6.9a	8.4a
	94.8%	73.4%	116.1%	105.9%	113.1%	116.7%



이것은 다시 인삼의 생체중과 건물중을 조사함으로써 재차 확인되었는데, 생체중과 건물중이 3년과 4년근에서 공이 6~29% 가량 증가된 것으로 조사되어, 앞의 인삼 뿌리의 외형 조사결과와 일치하는 것으로 나타났다. (표 26)

표 26. K87 EPS에 따른 인삼의 수량변화

	생체중(g/개체)		건물중(g/개체)	
	3년근	4년근	3년근	4년근
무처리	15.4 100%	32.3 100%	4.4 100%	9.0 100%
표준처리	17.2 111.7%	34.7 120.9%	4.7 106.8%	10.2 114.6%
배량처리	17.9 116.2%	37.1 129.3%	4.8 109.1%	10.4 116.9%

K87 EPS 이탄 입자가 인삼의 품질에 미치는 영향을 최종 종합적으로 판단하기 위해 생산된 인삼을 중량별로 조사하였다. 표 27을 살펴보면 K87 EPS 이탄 입자의 처리에 의한 무처리 대비 중량이 증가된 인삼뿌리의 비율이 3년근에서 16~26%가량 증가하며 4년근에서 27~30%이상 증가됨이 조사되었다. 이것은 K87 EPS 이탄 입체의 처리가 인삼의 생육에 긍정적인 영향을 미치며, 이것을 곧 인삼의 중량증대, 품질 증가로 이어지는 것을 알 수 있었는데, 중요한 사실은 시간이 흘러 갈수록 그 영향은 점점 증가하는 것을 나타내었는데, K87 EPS 이탄 입체에 의한 초기생육 증대 효과가 지속적인 인삼의 생육에 지속적인 영향을 미치는 것으로 추정할 수 있었다. (표 27)

그림 12에 나타나 있듯이 K87 EPS 이탄 입자의 처리에 의한 인삼 뿌리의 생육증진 효과는 분명하게 나타나며, 3배량 처리에서 볼 수 있듯이, 처리량 증가에 따른 이상증상은 확인 할 수 없었다.

상기의 시험결과들로 볼 때, K87 EPS 이탄입체의 처리가 다년생 구근작물인 인삼에 긍정적인 효과를 가지며, 따라서 1년생의 원예작물과 더불어 주로 다년생으로 이루어진 약용작물에 대해서도 K87 EPS가 생육증진의 효과를 가질 것으로 판단되었다.

표 27. K87 EPS 처리가 인삼 품질 처리에 미치는 영향

	50g이상	50g~40g	40g~30g	30g~20g	20g이하
3년근 무처리	-	-	-	-	51 100%
표준처리	-	-	-	8 16.7%	40 83.3%
배량처리	-	-	-	13 26.5%	36 73.5%
4년근 무처리	-	12 27.3%	17 38.6%	11 25.0%	4 9.1%
표준처리	13 27.1%	11 22.9	14 29.2%	10 20.8%	-
배량처리	14 30.4%	12 26.1%	9 19.6%	11 23.9%	-



**무처리구**

**정량**

**배량**

**3배량**

그림 12 K87 EPS 이탄 입체의 처리에 따른 인삼 생육특성

#### 4. 생육촉진 / 유도저항성 활성 증진을 위한 복합처리효과

K87 EPS는 단독으로도 우수한 효과를 가지나, 시험결과 기존의 생육증진효과를 가지는 미생물과의 복합처리에 의해 유도저항성 능력이 향상되는 것으로 나타났는데 이것은 K87 EPS가 가지는 상승효과 특성을 반증하는 것으로, 다른 미생물 및 비료, 병해충 관리제품들과의 혼합처리에 의해 상승효과를 기대할 수 있음을 보여주는 것으로 매우 중요한 결과라고 하겠다. 표 28의 결과에서 보여지듯이 시험구의 처리는 K87 균주와 K87 EPS, M1, 그리고 K87 균주 + M1 그리고 K87 EPS + M1으로 구성되었으며, 합성유도저항성 물질은 BTH 0.1mM을 대조로 사용하였다. 그 결과 K87 EPS의 제형화를 위하여 Peat를 입제화하여 K87 EPS를 흡착시켰다. 제형화된 입제를 상토에 10% 수준으로 넣고 표면살균된 오이 종자를 pot 당 2개씩 심어 14일간 육묘한다음, 오이탄저병균을 살포하여 병저항성을 검정하였다. K87 EPS 2mg 과 M1 균주 처리가 가장 우수하였다

표 28. K87 EPS의 Peat formulation의 오이 생육 및 오이 탄저병 방제 효과

Treatment	plant height(cm)	Leaf width(cm)	Lesion No/first leaf
control	15.6	79.1	500.2
BTH 0.1mM	15.0	72.4	11.8*
K87 live cell	15.9	84.7	397.8*
M1*	16.2	84.3	461.2
K87+M1	16.1	81.9	340.5*
K87 EPS 2mg/g+M1	16.3	85.1	291.5*
LSD (p=0.05)	0.8	5.8	75.9

\* M1 : 생육촉진 미생물

K87 EPS와 M1 균주의 복합처리에 의한 작물 반응은 앞이 오이에서의 경우와 마찬가지로 벼의 발아 및 뿌리생육에 대한 시험에서도, 비슷한 반응을 나타냈는데, 이 경우 K87과 M1의 복합처리에 의해 생육은 증대되었으나, 생육촉진 미생물인 M1의 단독처리보다는 낮은 결과를 나타내었다. (표 29, 그림 13)

표 29. K87 및 M1처리에 의한 벼 유묘 생육촉진 효과

Treatment	Plant height (mm)	root length (mm)	No. of root
Control	84.3 de	12.4 c	1.3 b
BTH	80.0 e	13.2 c	2.3 b
K87	89.1 cde	9.4 c	5.4 a
K87+ M1	95.3 bc	16.7 bc	5.9 a
M1	133.1 a	47.7 a	6.1 a

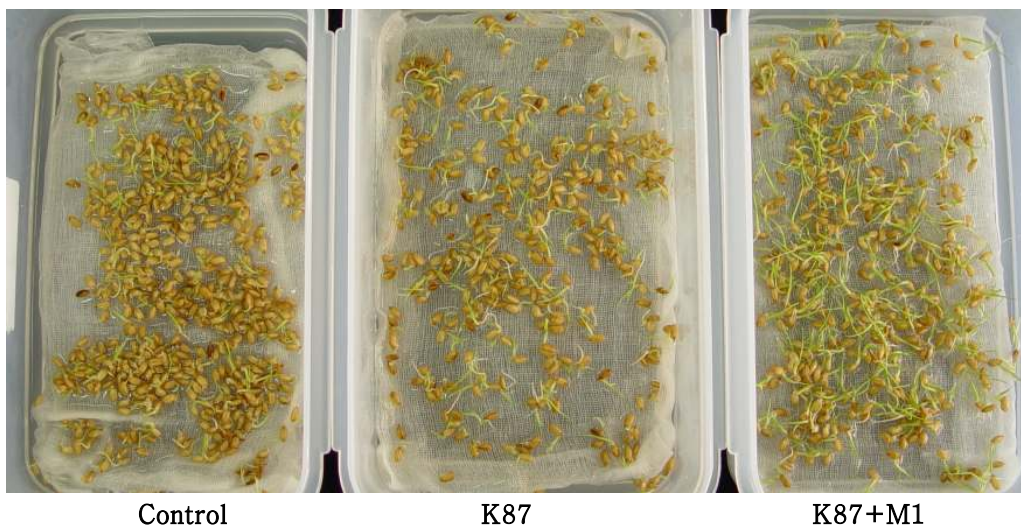


그림 13. K87 및 M1 처리에 의한 벼 발아촉진

K87 EPS의 처리 농도 및 방법에 따른 오이 생육에 대한 효과를 시험하기 위하여 K87 EPS의 농도를 50, 100, 200ppm으로 하고, 토양관주, 종자침종하여 처리하였다. 처리결과 작물의 생육증진 효과는 종자침종보나 20ml씩 토양관주 하였을 때 우수하게 나타났으며, K87 EPS의 농도에 따른 오이의 생육증진, 초장 및 엽폭의 크기 차이는 미미하였다. 이러한 결과는 오이의 경우 K87 EPS의 처리에 따른 생육증진 효과를 나타나지 않으며, 주로 병저항성 유도가 일어나는 것으로 판단할 수 있다. (표 30)

표 30. K87 EPS의 처리 농도 및 방법에 따른 오이 생육 비교

Treatment	soil drench(20ml/pot)		seed soaking	
	plant height (cm)	Leaf width (cm)	Plant height (cm)	Leaf width (cm)
Control	24.1	103.7	22.0	104.4
BTH 0.1mM	20.7*	78.9*	22.1	97.0*
EPS 50 ppm	24.3	113.3	22.0	103.9
EPS 100 ppm	23.7	107.5	21.8	104.2
EPS 200 ppm	23.3	103.9	21.0	102.0
LSD (p=0.05)	1.2	7.0	1.1	7.3

이러한 K87 EPS의 오이에 대한 생육증진효과에 있어 M1균주의 복합처리는 음의 상관성을 나타냈는데, 이것을 처리방법에 따라 다시 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 생육에 대한 영향 및 M1균주의 복합처리 효과가 변이가 크고, K87 EPS와 M1복합처리에서 생육억제 효과를 확인하였다.

식물생육에 미치는 EPS처리는 식물체 주사의 경우에는 모든처리에서 무처리보다 생육이 억제되었으며 살포의 경우에는 K87, EPS 및 M1 복합처리 모두에서 생육이 우수하였다. 토양 처리의 경우에는 EPS의 처리보다 K87 EPS 생산균주를 직접 처리한 것이 가장 효과적이었다. EPS에 의한 생육촉진효과가 낮은 것은 EPS의 농도가 높기 때문으로 생각되며 50-100ppm의 처리농도가 유효할 것으로 생각된다. (표 31)

하지만 K87 EPS와 M1 균주의 복합처리효과는 병저항성 유도에서 그 상승효과가 분명하게 나타났는데 표32에서 나타났듯이 관주를 제외한 침투 및 살포방법에서 병발생이 억제되었으며, M1 복합처리에 의해 단독처리시 보다 30% 가량의 병발생이 억제되는 것으로 조사되었다.

K87 EPS 200ppm 처리는 모든 조합에서 효과적으로 병저항성을 발현시켜 대상 병원균인 오이 탄저병의 발생을 억제 시킬 수 있었으며 특히 K87 live cell, EPS200ppm 및 M1의 복합 처리가 병 방제에 가장 효율적이었다 (표32, 그림14)

표 31. 오이 생육에 미치는 K87 EPS의 처리 효과 검정

Treatment	Plant height (cm)		
	Infiltration	spray	Soil drench
Control	111.4	110.7	118.1
BTH 0.1mM	91.1*	107.0	102.3*
K87	79.6*	113.7	123.8
EPS 200ppm	109.7	120.0	115.5
K87+EPS 200ppm	90.5*	115.8	124.2
M1	114.0	114.5	119.0
K87+M1	95.4*	116.0	112.0
EPS 200ppm+M1	107.9	116.7*	117.7
K87+EPS 200ppm+M1	92.6*	118.1*	88.4*
LSD (p=0.05)	9.2	5.6	9.5

표 32. K87 EPS처리 방법별 오이 탄저병(*C. orbiculare*)억제 효과

Treatment	Lesion No / Plant		
	infiltration	spray	Soil drench(20ml/pot)
Control	196.0	147.7	138.0
BTH 0.1mM	4.3*	24.2*	8.3*
K87	252.8	54.1*	119.3
EPS 200ppm	128.8*	20.2*	177.6
K87+EPS 200ppm	86.2*	15.2*	101.8
M1	177.2	70.2*	93.2*
K87+M1	139.7	22.3*	48.3*
EPS 200ppm+M1	103.2*	33.2*	84.8*
K87+EPS 200ppm+M1	60.8*	14.1*	21.7*
LSD (p=0.05)	60.9	23.6	50.1

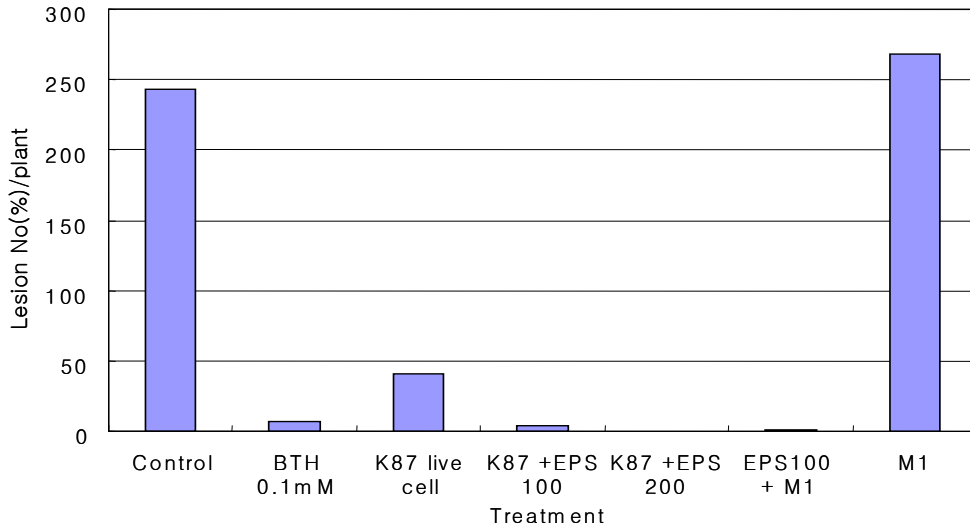


그림 14. 고효성 근권균 K87 및 EPS처리에 의한 오이탄저병 억제효과

K87 EPS의 처리에 의한 병저항성능력을 배가시키기 위하여 M1균주 배양액을 적용하였다.M1균주는 효모의 일종로 토양에서 분리된 미 동정 균주로서 스스로는 병저항성을 상승시키지 않으면서 K87 live cell 혹은 EPS 복합 처리에 의하여 병저항성을 대폭 증가 시키는 것으로 나타냈다(그림 14).

M1균주 배양액의 배양액 역시 K87균주의 경우와 마찬가지로, 병 저항성 및 항균활성에 상승효과를 나타내는 지를 확인하기 위하여, K87 균의 배양액과, M1균의 배양액의 항균성을 시험하였다. (표 33)

K87균주는 배지상에서 *Rhizoctonia solani* 및 *Colletotrichum orbiculare* 및 *Fusarium* 균 등에 우수한 항균 활성을 나타내는데 M1 추출액을 추가 할 경우 항균활성도 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 M1 PDA 배양액은 식물병원균에 대한 항균활성이 전혀 없으면서 K87 Live cell과 K87 배양액처리 및 추출액처리등 함께 처리 할 경우 항균 활성이 증가되어 본 연구 목표와 아주 잘 부합되었다.

M1 균주 배양액 복합처리에 의해 *Rhizoctonia solani* 에 대한 항균활성 능력이 약 80% 가량 향상된 것으로 나타났다.

표 33. 고효성 근권균 K87 및 M1 추출액 처리에 의한 항균활성 증대

Treatment	Inhibition Zone(mm)	
	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
K87 CF*	3.75	7.0
K87 CF + M1 CF	7.0	8.1
K87 CF +M1 EtoAc extract	6.75	7.8
M1 CF	0.0	0.0
M1 EtoAC extract	0.0	0.0

CF\* : Culture filtrate

그러나 벼잎집무늬마름병( *Rhizoctonia solani* )의 방제 효과의 경우 M1 복합처리 보다 K87 단독 처리의 효과가 가장 우수한 방제 효과를 나타내었는데 M1 배양액이나 M1 균주가 생물방제균인 K87 live cell 뿐 만 아니라 벼잎집무늬마름병균의 활력도 증가 시키는 것으로 생각된다(표 34 및 그림 15)

표 34. 고효성 근권균 K87 처리에 의한 벼 잎집무늬마름병 억제 및 생육촉진

Treatment	Diseased plant(%)	Plant height(cm)	Root length(cm)
control	85	22.8	5.0
BTH 0.1mM	95	20.4	5.1
K87	20	28.8	6.2
M1	85	25.6	5.5
K87*M1	95	28.7	5.3





그림 15. 고효성 근권균 K87 처리에 의한 벼 잎짚무늬마름병 억제효과(좌:처리 우:무처리)

## 제 2 절 활성물질의 동정 및 기능분석

### 1. 근권세균 생산 활성물질별 고효성 분획 및 특성 구명

King's B agar 배양기에서 1주간 배양된 배양액을 80%메탄올로 추출하여 농축한 다음 C-18 reverse phase sephadex column을 통하여 메탄올 gradient 조건으로 MeOH 0%부터 1000%까지 순차적으로 분획한 다음 rotary evaporator로 농축한 다음 0.01부터 1.0ppm의 농도로 담배식물에 처리하였다. 식물체는 25C 인큐베이터에서 자라면서 생육을 조사하였다. 실험결과 0.01ppm 농도로 처리된 배지의 Frc 2, Frc4,, Frc 6에서 가장 좋은 식물생육을 나타내었다(표 35).

가장 담배 생육촉진효과가 좋았던 Frc 2, 4, 6 번의 분획을 2차 시험하여 0.0001 ppm부터 1.0pp까지의 농도로 담배에 처리한 다음 담배무늬병균인 *Erwinia carotovora* SCC1에 대한 병저항성을 검정한 결과, Frc 6번 처리의 무늬병 발생율이 무처리 95%인 반면 24.3%의 발병 감소를 나타내었다 (표 36, 그림 16) 가장 효과적인 농도는 0.01 - 0.1ppm 농도였다.

표 35. K87 생산 유도저항성 활성 elicitor fraction 처리에 의한 식물생육촉진

Treatment	Fresh weight (mg) / plant		
	1.0ppm	0.1ppm	0.01ppm
Control	16.2	16.2	16.2
FRC 1	16.4	13.0*	12.8*
FRC 2	6.2 *	11.7*	20.0*
FRC 3	12.1*	12.9*	14.3
FRC 4	13.9	15.8	25.6*
FRC 5	15.2	16.5	11.6
FRC 6	12.1*	16.5	24.7*
FRC 7	19.6	13.4*	15.0
FRC 8	14.4	17.5	11.7*
FRC 9	10.8*	10.6*	8.0*
FRC 10	9.6*	11.5*	14.2
LSD (P=0.05)	3.2	2.2	2.8

표 36. K87으로부터 분리된 ISR활성분획의 담배 *E. carotovora* SCC1의 억제효과

Treatment	발병주율 (%)				
	1.0 ppm	0.1	0.01	0.001	0.0001
Control	95.8				
BTH(0.1mM)	27.3				
Frc 2	83.2	100.0	100.0	86.3*	95.8
Frc 4	100.0	76.3*	86.8	95.8	89.7
Frc 6	85.3	24.3*	31.9*	66.7*	76.1
LSD(P=0.05)	17.5	13.3	26.7	21.8	35.8

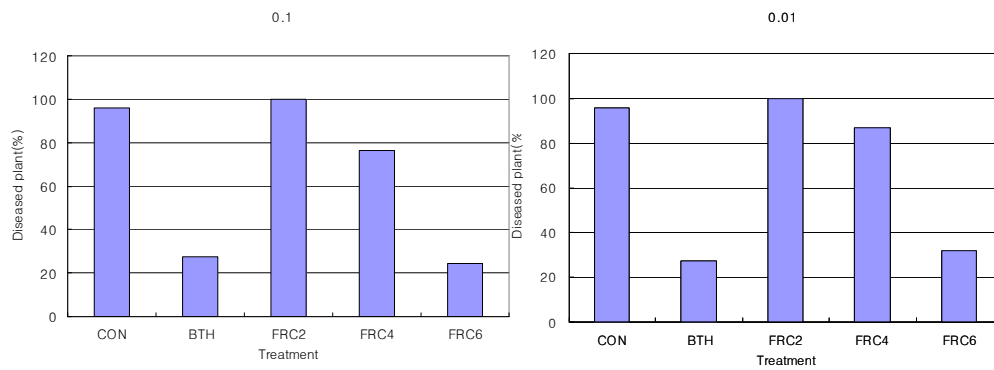


그림 16. K87으로부터 분리된 ISR활성분획의 담배 *E. carotovova* SCC1의 억제효과 (좌 : 0.1ppm처리, 우 : 0.01ppm처리)

균주 K87 근권세균의 발효액 10L를 메탄올로 추출하여 농축한 후, 이들을 C-18 flash 칼럼 크로마토그래피하여 11개의 분액을 모았다. 이때 용출액은 물로부터 메탄올까지 극성을 낮추면서 1L씩 사용하였다. 각각의 분액들의 물질분포는 TLC하여 살펴보았다. 이 중에서 #G에서 #K까지에서 *Rhizoctonia solani*에 억제 활성을 보였다. (표 37)

표 37. 분액 #G-#K의 양 및 *Rhizoctonia solani* 억제력

분액번호	G	H	I	J	K
양 (mg)	239	350	587	258	750
억제력 (mm)	10	11	10	12	10

여기서 활성을 보인 #G를 다시 C-18 MPLC(50 um, 30 x 300mm)한 후 HPLC하여 활성물질을 순수 분리하였다. 이 물질은 연한 갈색 또는 조금 짙은 갈색을 띠며, 열에 안정해보이며,  $^1\text{H}$  NMR 자료( $\delta$  7.53, 7.44, 7.43, 6.84, 6.82 ppm)  $^{13}\text{C}$  NMR 자료( $\delta$  149.4, 130.3, 130.6, 128.8, 127.8, 125.1, 117.6, 116.8, 115.6, 112.1 ppm)을 바탕으로 물질의 화학 구조를 추정해보면, pryrolnitrin 계열의 물질로 판단된다. 이 물질은

*Rhizoctonia solani*에 활성을 보이는 것이며, 생육촉진과는 관련이 없다. 생육촉진에 관여하는 물질은 LH-20에서 이 물질보다 앞에 나오는 것으로 보아서 분자량이 좀더 큰 것으로 판단된다.

## 2. 근권세균 생산 활성물질의 화학구조 규명

K87 10L 고체배양액을 메탄올로 추출하여 추출액을 농축하였다. 이 농축액(K872)을 butanol로 추출하여 농축하여 얻은 180 g을 C-18 flash chromatography하였다(40 X 63 um, Merck, 90 id X 70 mm). 이때 용출은 물부터 메탄올까지 순차적으로 용매의 극성을 바꾸면서 진행하였다. 여기서 얻은 11개의 분획(A ~ K)을 얻었다. G, H, I가 PGPR 활성을 보였으며 TLC에서 비슷한 모양을 보였다. 이들을 합하여 갈색의 고체물 578.7 mg을 얻었다. 이들을 C-18 HLC (Cosmosil 40, 320 X 40 mm, flow rate 5 mL/min, 50% MeOH isocratic mode, 50% to 80% MeOH gradient mode, 100% MeOH isocratic mode)하여 4개의 분획을 얻었다. 1번째와 2번째 분획을 합하여 역상 HPLC (0% to 40% MeCN for 80 min, 40% to 80% MeCN for 20 min, washing 20 min, Varian C-18 column 250 X 21.4 mm, 210 nm)하여 GHI1A (12.6 mg), GHI1B (0.12 mg), GHI1C (0.39 mg), GHI1D (0.36 mg), GHI1E (62.44 mg) and GHI2A (0.6 mg), GHI2B (0.8 mg), GHI2C (3.0 mg), GHI2D (8.97 mg), GHI2E (8.5 mg)를 얻었다. 3번과 4번은 *Rhizoctonia solani*에 활성을 보였으므로 이들을 합하여 농축하여 279 mg을 얻었다. 이들을 각각 역상 HPLC (Varian C-18 column 250X21.4mm, 50% MeCN isocratic, 7 mL/min)하여 GHI34C (9.0 mg), GHI34E (7.0 mg), GHI34G (14.0 mg)을 얻었다. GHI34G이 가장 강하였으며, 이것은 pyrrolnitrin을 판명되었다.

분획 J와 K를 합하여 역상 C-18 MPLC (Cosmosil 40, 320 X 40 mm, 5 mL/min, 50% MeOH isocratic, 50% to 80% MeOH gradient, 100% MeOH isocratic)하여 5의 분획을 얻었다. 1번째 분획을 76.0 mg을 역상 HPLC (10% to 21% MeCN for 20 min, 21% to 50% MeCN for 10 min, 50% to 80% MeCN for 40 min, Varian C-18 column 250 X 21.4 mm)하여 JK1A (14.4 mg), JK1B(6.5 mg), JK1F(1.6 mg)를 얻었다. 2번째 분획 JK2 (136.0 mg)를 역상 HPLC (10% to 21% MeCN for 20 min, 21% to 50% MeCN for 10 min, 50% to 80% MeCN for 40 min, Varian C-18 column 250 X 21.4mm)하여 JK2B(3.2 mg)을, JK3(117.0 mg)을 역상 HPLC (75%

to 85% MeCN for 44 min, Varian C-18 column 250 X 21.4 mm)하여 JK3A (1.6 mg), JK3F (1.5 mg), JK3I(1.0 mg)을 얻었다. 5번째 분획 JK5를 역상 HPLC (75% to 85% MeCN for 60 min, Varian C-18 column 250 X 21.4 mm)하여 JK5A (32.06 mg), JK5B (0.2 mg), JK5C (4.1 mg), JK5D (0.59 mg), JK5E (5.52 mg), JK5F (4.3 mg), JK5G (8.0 mg)를 얻었다. JK1F, JK2B, JK3I는 pyrrolnitrin으로 판명되었다.

고체발효액으로부터 얻은 EPS 고체를 황산용액으로 120°C에서 가수분해하였다. 이 가수분해 액으로부터 EPS의 단당류 조성을 알기 위하여 TLC (100:3:1 BuOH-MeOH-AcOH)하였다. 이 12 개의 표준탄수화물과 비교하여 그중에서 Rhamnose가 Rf 0.24에서 분명하게 탐지되었으며, 미확인 당도 감지되었다(TLC 참조). 이 Rhamnose는 가수분해 혼합물의 NMR 측정자료에서도 확인되었다.( $\delta_H$  4.97, 1.15 ppm;  $\delta_C$  96.58, 16.4)

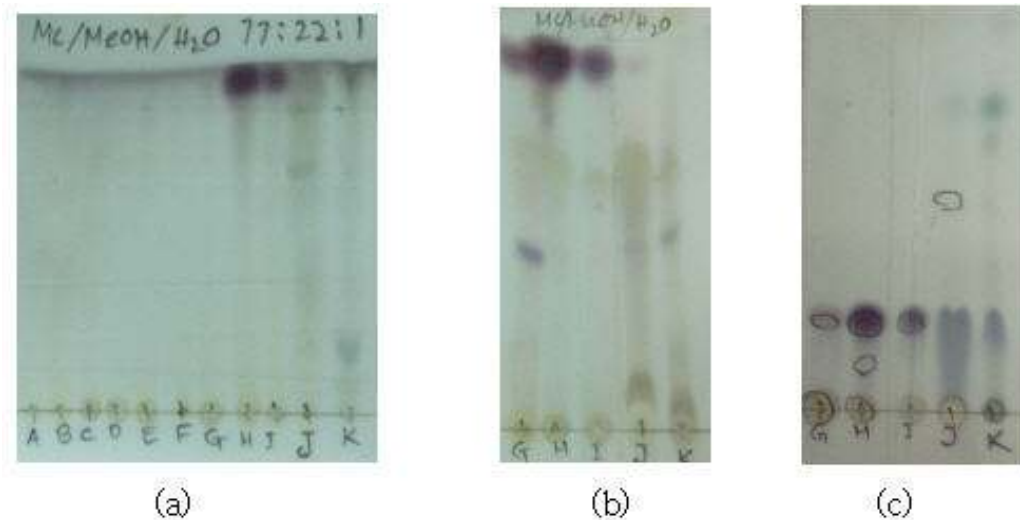


그림 17. 분액들의 TLC 스펙트럼[a(77:22:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O): 분액 #A-#K; b(90:9.5:0.5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O): 분액 #G-#K; c(8:2 hexane:EtOAc): 분액 #G-#K]

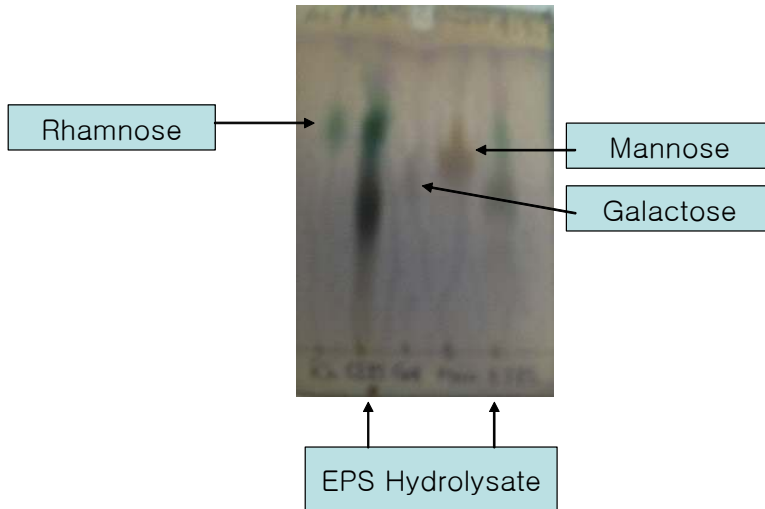


그림 18. EPS 가수분해물의 TLC 그림(시료: EPS 가수분해물, Rhamnose, Mannose, Galactose)

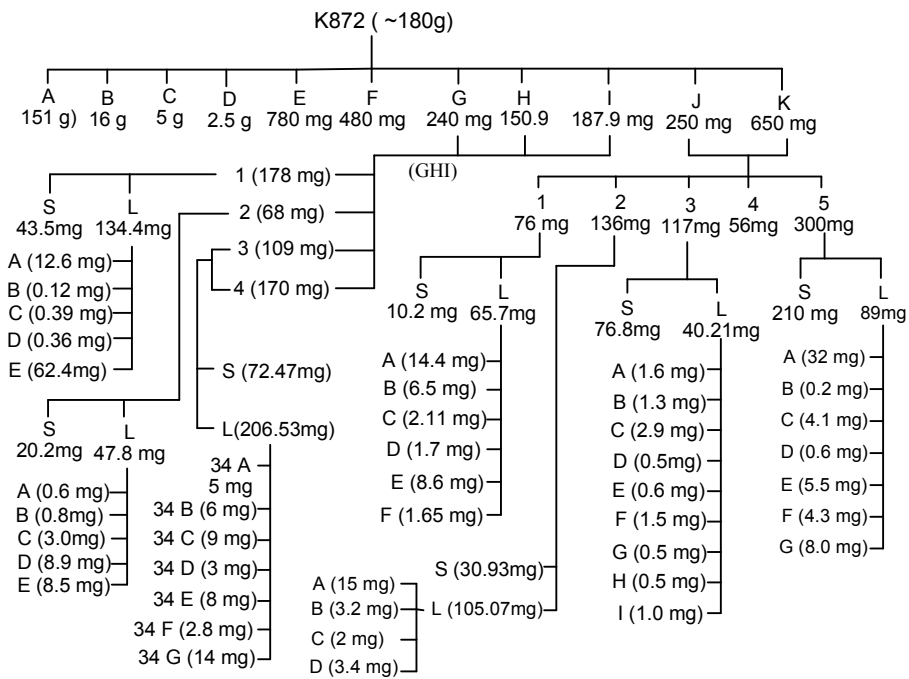
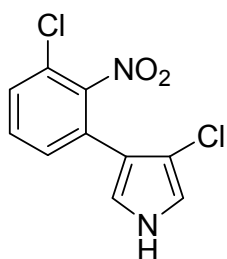
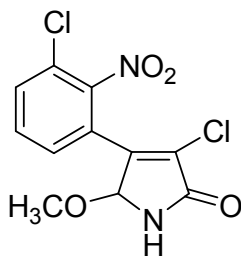


그림 19. 고체배양액(K87)으로부터 물질의 분리정제도

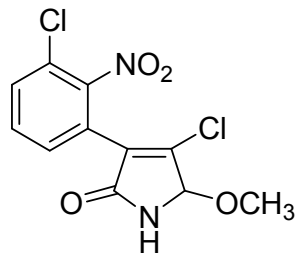
물질 34G는 문헌의 자료값과 비교하였을 때, pyrrolnitrin으로 규명되었다. 물질 34E는 연한 갈색 점성 액체로 얻어졌으며, 광학활성도는 -2.4 (c 0.25, MeOH)로 매우 적게 나왔다. 분자량은 질량분석기 (HRTOFMS)에서 [M+H]<sup>+</sup>가 m/z 302.9931 (calcd. for [M+H], 302.9939)에서 나왔으며, UV 최대흡광도는 214 및 303 nm에서 관찰되었다. IR 스펙트럼은 3448, 1718 및 1654 cm<sup>-1</sup>에서 최대 흡광도를 보였다. 이것은 OH (or NH), C=O, and C=C 등이 존재하는 것을 제시하는 것이다. 1H NMR 스펙트럼에서 ABC 스핀 형태의 삼치환 형태를 δ 7.69 (t, J = 8.0 Hz), 7.80 (d, J = 8.0 Hz), 및 7.57 (d, J = 8.0 Hz)에서 보였으며, δ 3.31에서 단일피크 (methoxy protons), δ 5.49에서 단일 피크가 관찰되었다. 1H-1H COSY, HSQC, HMBC 스펙트럼을 해석한 결과 구조는 3-chloro-2-nitrophenyl group을 가지고 있으며, HC(OMe)-C=C-C=O group도 존재하는 것으로 판단되었다. HMBC 먼거리 관계식으로부터 이 물질의 구조는 신물질인 3-chloro-4-(3-chloro-2-nitrophenyl)-5-methoxy-3-pyrrolin-2-one로 규명되었다. 물질 34F는 연한 갈색 점성 액체로 얻어졌으며, 광학활성도는 +11.9 (c 0.063, MeOH)로 측정되었다. UV와 IR 스펙트럼은 물질 34E와 비슷한 모양을 보였으며, 질량도 같은 수치를 나타냈다. 이것은 물질 34E와 물질 34F가 이성질체라는 것을 제시한다. 2D NMR 자료(COSY, HSQC, HMBC)를 분석한 결과 이 물질은 4-chloro-3-(3-chloro-2-nitrophenyl)-5-methoxy-3-pyrrolin-2-one로 규명되었다.



물질 34G (pyrrolnitrin)



물질34E



물질34F

그림 20. 물질 34E, F, G의 구조

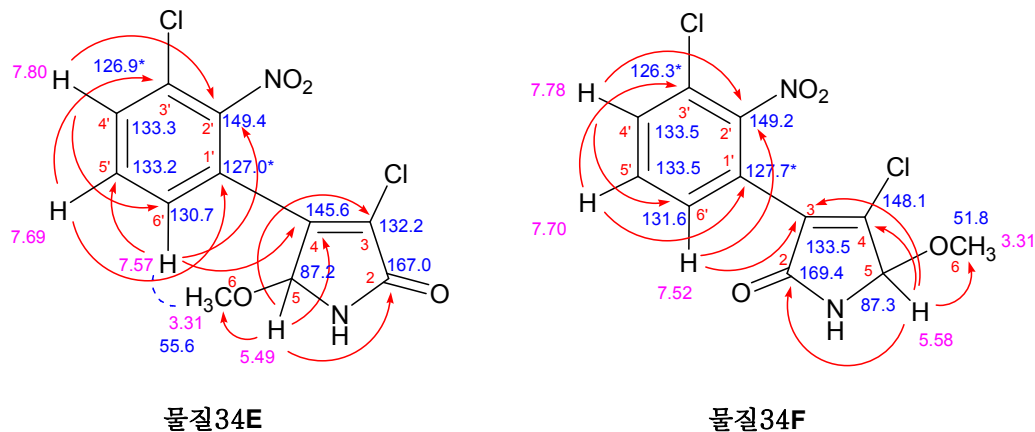


그림 21. 물질 34E, F, G의 NMR 자료와 HMBC 상호관계

분리한 pyrrolnitrin은 paper disc diffusion assay 방법으로 측정된 결과 50 µg/disc (25 mm 억제넓이)로 *R. solani*에 강한 항진균 활성을 보였으나, 물질 34E와 afnwlf 34F는 250 µg/disc에서 약 1 mm 정도로 매우 약한 활성을 보였다.

이 물질 34E와 F는 pyrrolnitrin이 발효과정에서 광분해되어서 methanol로 추출하는 과정에서 생긴 물질로 추정된다. 이 물질들은 pyrrolnitrin이 광분해 기작의 중간체로 추정되는 물질의 구조이다. 이런 결과는 아직까지 보고되지 않은 것들이다.

#### 물질34E의 물리적특성

물질 34E: 3-chloro-4-(3-chloro-2-nitrophenyl)-5-methoxy-3-pyrrolin-2-one (2): light brown oil [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -2.4 (c 0.25, MeOH); UV (MeCN)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 214 (4.15), 303 (3.21) nm IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3448, 2926, 1718, 1654, 1541, 1508, 1458, 1061 cm<sup>-1</sup> 1H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  7.80 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4'), 7.69 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-5'), 7.57 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 5.49 (1H, s, H-5), 3.31 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 13C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  167.0 (C, C-2), 149.4 (C, C-2'), 145.6 (C, C-4), 133.3 (CH, C-4'), 133.2 (CH, C-5'), 132.2 (C, C-3), 130.7 (CH, C-6'), 127.0a (C, C-1'), 126.9a (C, C-3'), 87.2 (CH, C-5), 55.6 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>); HRTOFMS(+ESI mode) [M+H]<sup>+</sup> m/z 302.9931 (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H, 302.9939) R<sub>f</sub> (3:7 hexane-EtOAc) 0.23.



물질 34F: 4-chloro-3-(3-chloro-2-nitrophenyl)-5-methoxy-3-pyrrolin-2-one (3): light brown oil  $[\alpha]_{20D} +11.90$  (c 0.063, MeOH); UV (MeCN)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 214 (3.98), 306 (3.06) nm IR (KBr)  $\nu_{max}$  3423, 2932, 1719, 1541, 1363, 1204, 1132  $cm^{-1}$   $^1H$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  7.78 (1H, dd, J = 8.0, 1.2 Hz, H-4'), 7.70 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-5'), 7.52 (1H, dd, J = 8.0, 1.2 Hz, H-6'), 5.58 (1H, s, H-5), 3.31 (3H, s, OCH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  169.4 (C, C-2), 149.2 (C, C-2'), 148.1 (C, C-4), 133.5a (C, C-3), 133.5 a (CH, C-4'), 133.5 a (CH, C-5'), 131.6 (CH, C-6'), 127.7b (C, C-1'), 126.3b (C, C-3'), 87.3 (CH, C-5), 51.8 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>) (a values are overlapped, b values are interchangeable) HRTOFMS (+ESI mode)  $[M+H]^+$  m/z 302.9929 (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H, 302.9939). R<sub>f</sub>(3:7 hexane-EtOAc) 0.26.

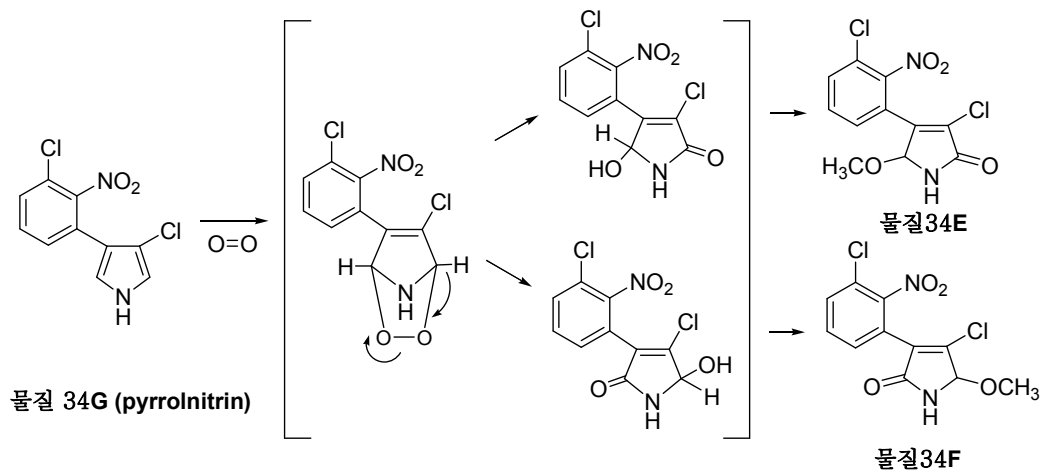


그림 22. Scheme pyrrolnitrin의 물질 34E와 F로의 변환 과정(생합성과정)

K5LG는 alkyl phthalate로서 구조는 알려지지 않는 신규물질이다. 이 물질은 R. solani에 항균활성은 보이지 않았으나, Candida kruisii에 200 ug/disc에서 10 mm의 억제력을 나타냈다.

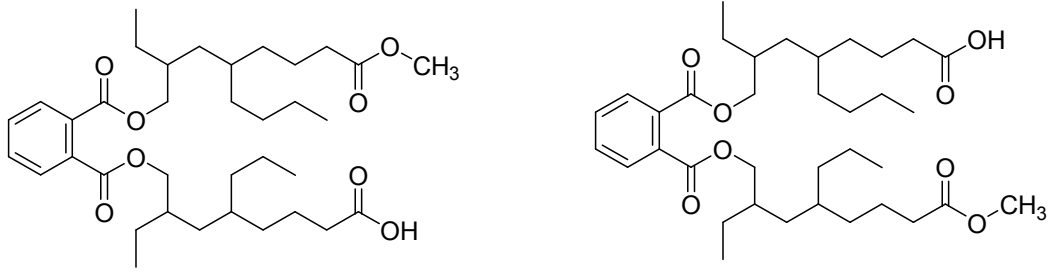


그림 23. K5LG의 가능한 구조

발효액에서 분리한 EPS의 주요부분을 charcoal로 물질을 분리하여 polysacchrade와 단백질 부분으로 나누었다(분리정제도 참조). 단백질 부분을 가수분해하여 아미노산의 구성성분을 TLC와 HPLC로 분석하였다(그림 23 참조). glycine, alanine, proline, valine 등이 많이 들어 있는 조성을 보였다. (표38)

표 38. K87 EPS 내 포함된 아미노산의 종류 및 함량

HPLC analysis <sup>1</sup>	% of Amino acids	TLC (Rf) analysis <sup>2</sup>	Configuration <sup>3</sup>
Aspartic acid	3.5	0.36c	
Glutamic acid	5.9	0.43c	
Serine	5.7	0.35c	D
Glycine	12.7		
Histidine	1.1		
Arginine	3.4		
Threonine	4.4	0.40c	
Alanine	14.4	0.41a	
Proline	18.5		
Tyrosine	0.5		
Valine	7.9	0.54c	D
Methionine	0.1		
Cystine 2	0.1		
Isoleucine	5.6	0.65c	D
Leucine	8.9	0.68b	
Phenyl alanine	2.7	0.71b	
Lysine	4.6	0.18c	
Total Amino acids	100%		

<sup>1</sup>HPLC condition: Waters pico-tag column (3.9 x 300 mm, 4 $\mu$ m), Waters 996 photodiode array detector (PDA, 254 nm), 1 mL/min

Solvent: Gradient

Time	%A*	%B**
Initial	100	0
9.0	86	14
9.2	80	20
17.5	54	46
17.7	0	100
18.2	0	100
20.0	0	100
20.7	0	100
21.0	100	0
24.0	100	0
25.0	100	0

\* % A: 140 mM sodium acetate (6% acetonitrile)

\*\* %B: 60% acetonitrile

<sup>2</sup>TLC Solvents: <sup>a</sup>BuOH-acetic acid-water 60:30:25, <sup>b</sup>BuOH-acetic acid-water 80:20:20, <sup>c</sup>Phenol-water-NaCN 75:25:0.02 (3 times run), Staining reagent: Ninhydrin in BuOH.

<sup>3</sup>Determination of configuration by HPLC analysis: Chiralpak WH, 0.25mM CuSO<sub>4</sub> aqueous isocratic elution, 1 mL/min, UV 254 nm.

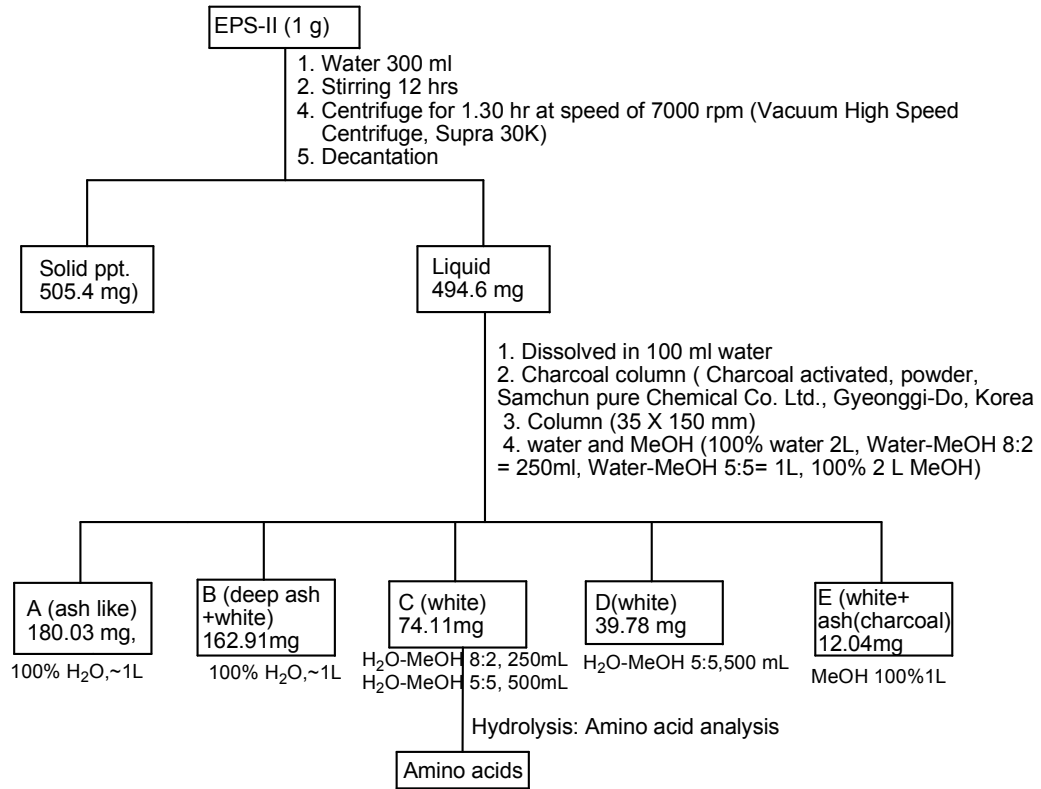


그림 24. EPS에서 분리한 단백질의 아미노산 조성 분석 scheme

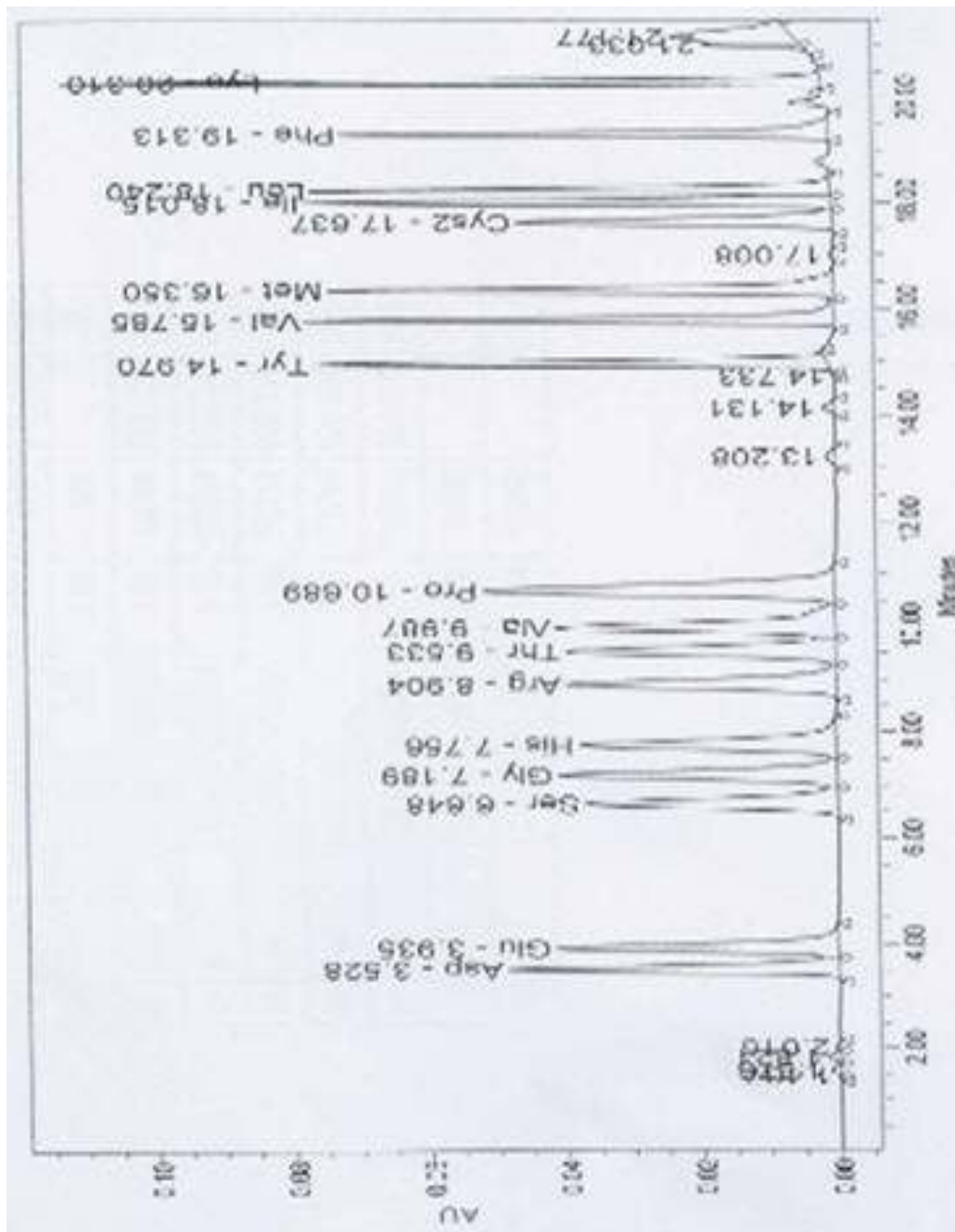


그림 25. EPS에서 분리한 단백질의 아미노산 조성 HPLC 스펙트럼

### 제 3 절 산업화 공정 개발

#### 1. 근권세균 균주의 대량배양기술 확립

K87 균주의 대량배양을 위한 최적 pH를 조사한 결과 pH 5.0-8.5 사이에서 생육이 양호하였으며 또한 이 범위에서 자란 K87 균주배양액의 항균 활성도 가장 우수하였다.

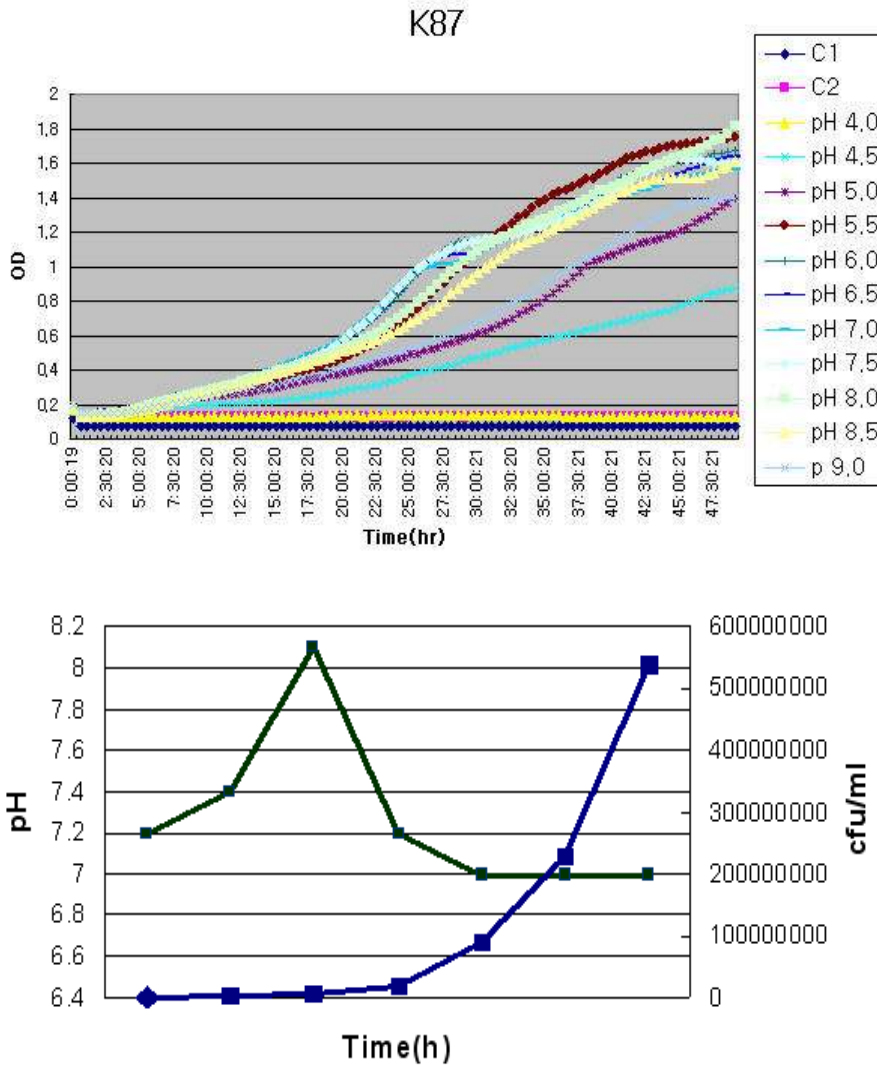


그림 26. K87 균주의 pH 별 성장곡선

K87 균주 배양의 특성 조사를 위해 다양한 질소원에 대한 시험을 수행하였으며, 배양공정내 합성첨가물의 포함을 최소화하기 위하여, 다양한 원료를 검토하여 그중 옥수수 침출액 (Corn steep liquor, CSL)을 선발하여 균주의 성장을 조사하였다. (그림 27, 28, 29, 30)

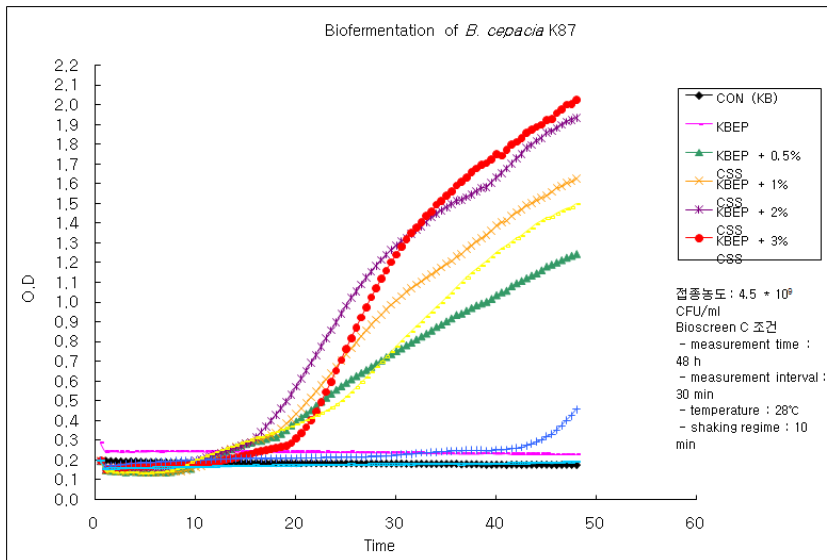


그림 27. Corn steep oil 농도별 K87 균주의 성장 곡선(28°C)

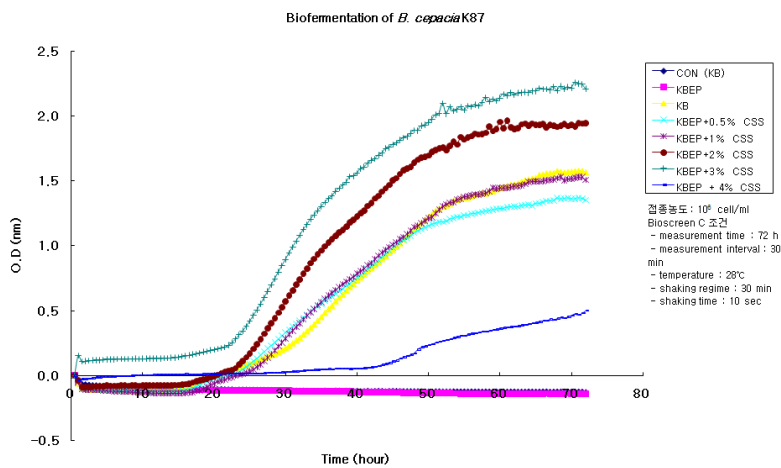


그림 28. Corn steep oil 농도별 K87 균주의 성장 곡선(28°C)

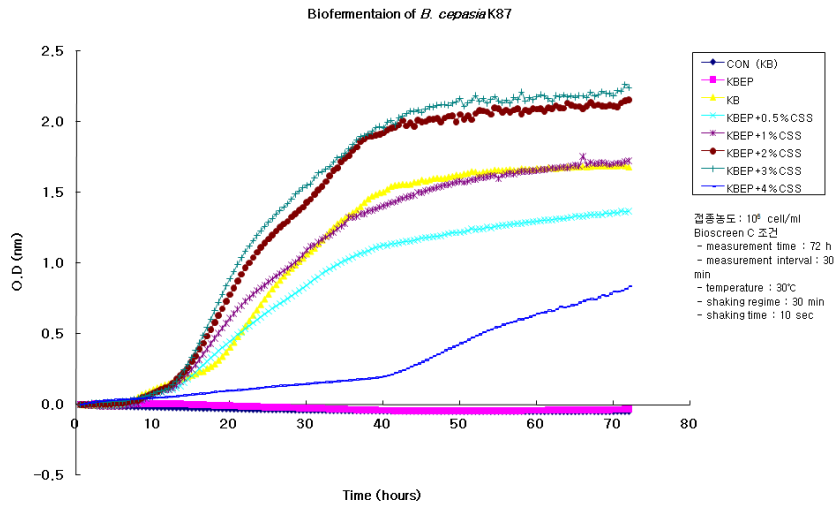


그림 29. Corn steep oil 농도별 K87 균주의 성장 곡선(30°C 배양)

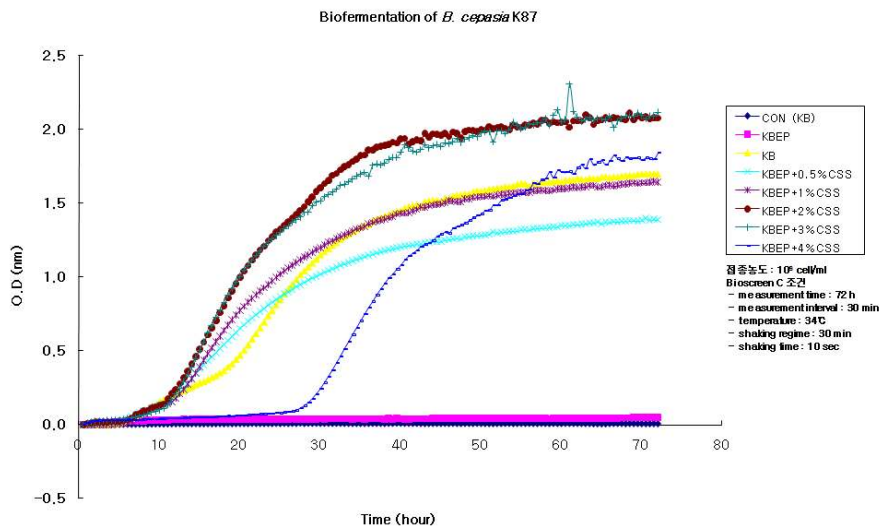


그림 30. Corn steep oil 농도별 K87 균주의 성장 곡선(34°C 배양)



액상배양에서 균주의 최적화 생산을 위하여 영양조건인 탄소원 (Glycerol) 과 질소 원 (Peptone) 그리고 환경조건인 pH와 산소의 조건을 달리하여 시험을 수행하였으며, 배양 volume을 7L, 50L, 500L 3,000L로 상승시켜, 각 환경별 균주 증식의 양태를 조사 하여, 최종 3,000L 액상 배양에서의 최적조건을 확립하였다. (그림9, 그림10, 그림11)

7L 배양시험에서 산소의 량이 Cell Growth에 심각한 영향을 미쳤으며, Cell Groth 에 따라 배양액내 pH의 변화가 급격하게 이루어졌다. 7L 배양 시험결과를 토대로 배양 Volume을 50, 500, 3,000L로 증가시킨 상태에서도 고농도의 EPS를 수확할 수 있는 조건을 확립하였다. (그림 31, 32, 33, 34, 35, 36)

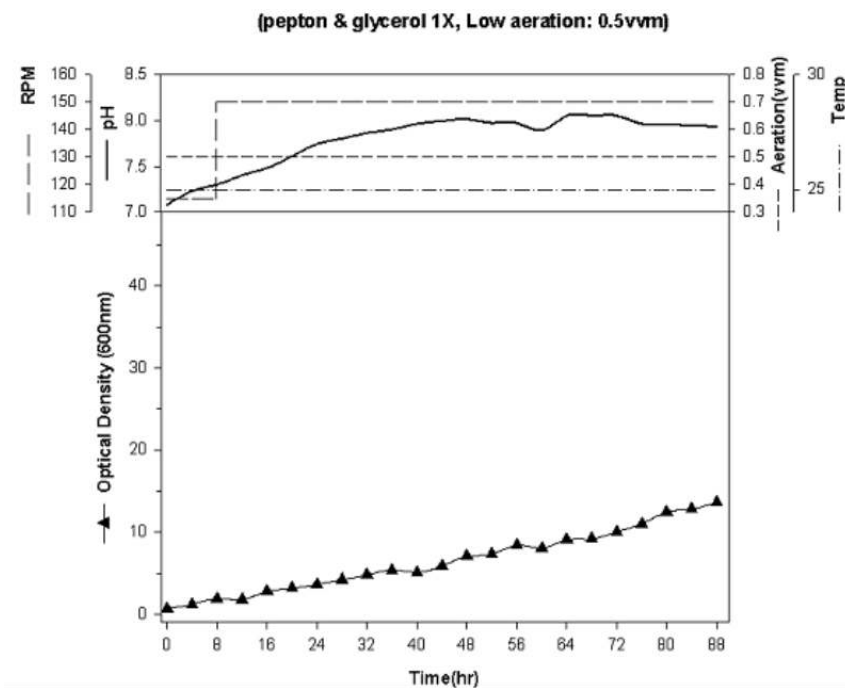


그림 31. 저 산소조건에서 균 생육 (Pepton & Glycerol 1배)

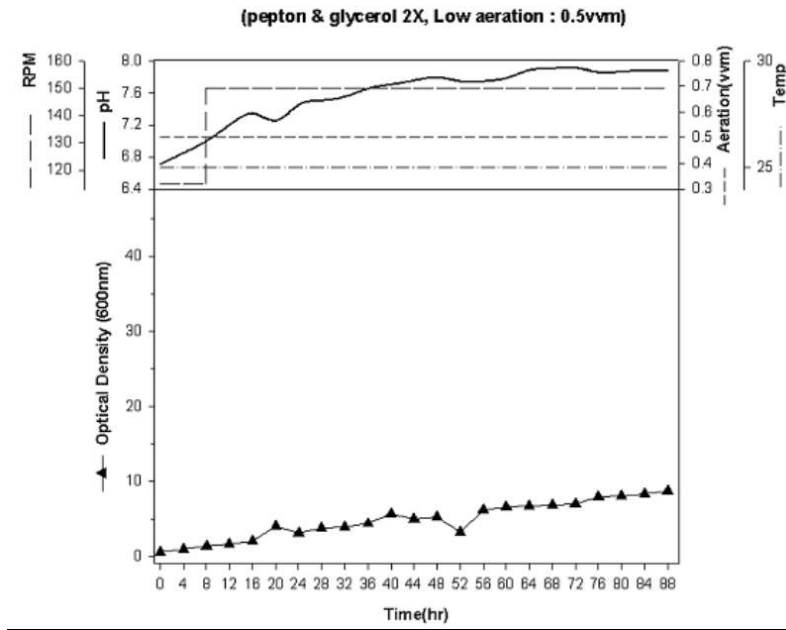


그림 32. 저 산소조건에서 균 생육 (Pepton & Glycerol 2배)

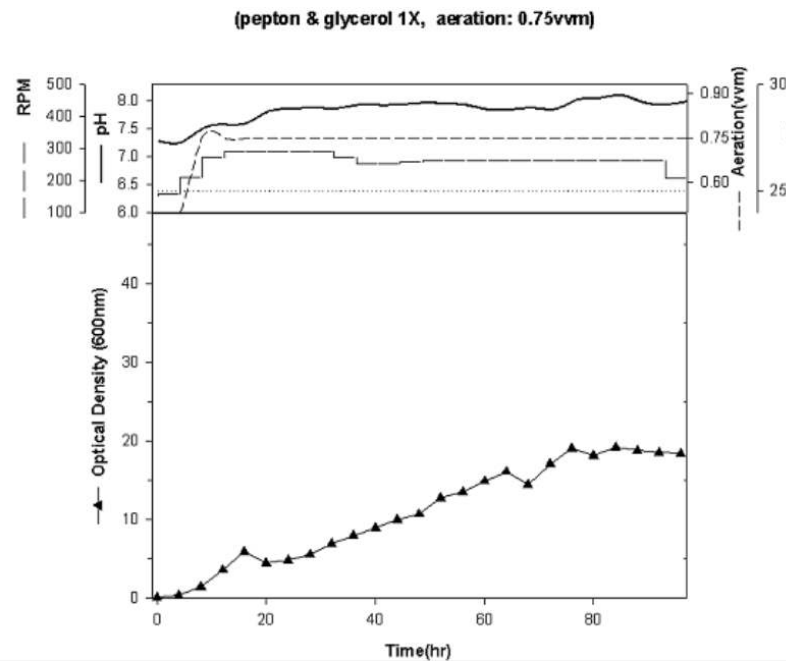


그림 33. 고 산소조건에서 균 생육 (Pepton & Glycerol 1배)

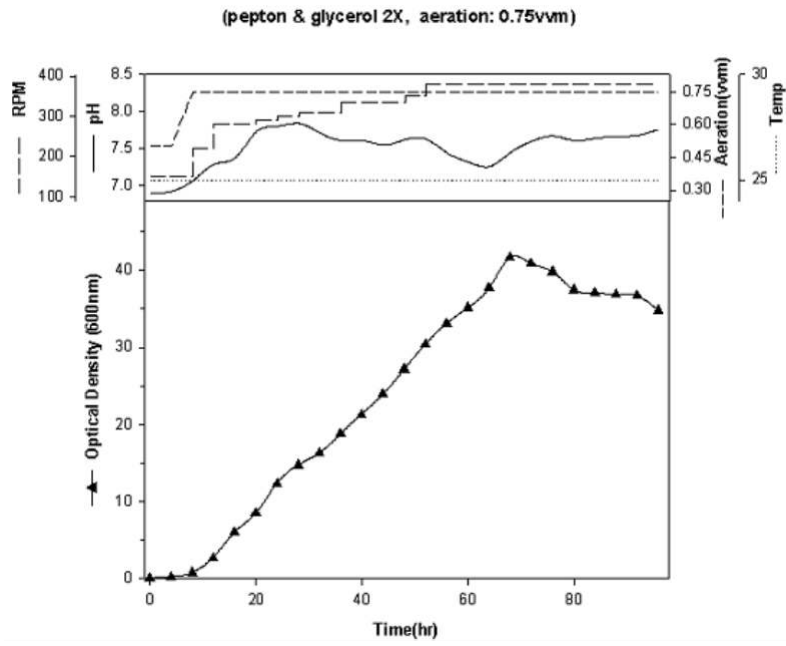


그림 34. 고 산소조건에서 균 생육 (Pepton & Glycerol 2배)

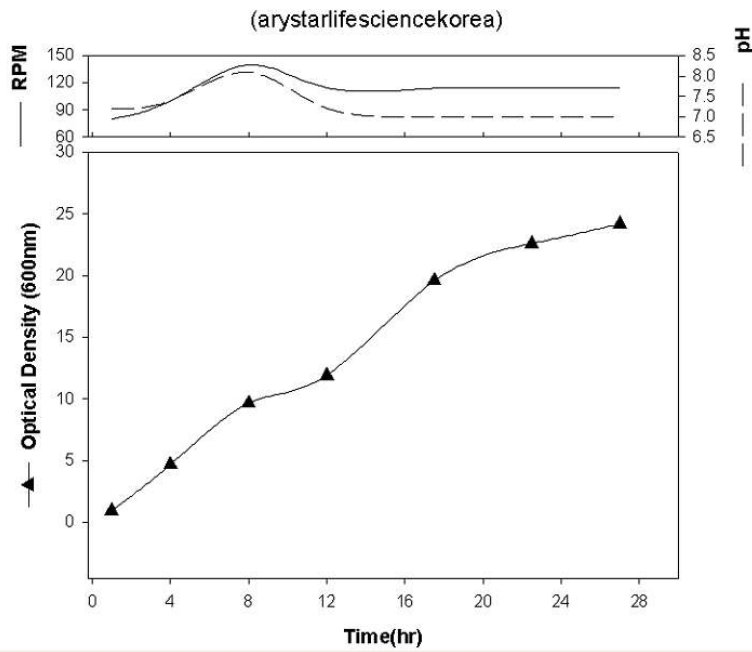


그림 35. 7L 배양기 내 시간별 세포수 변화

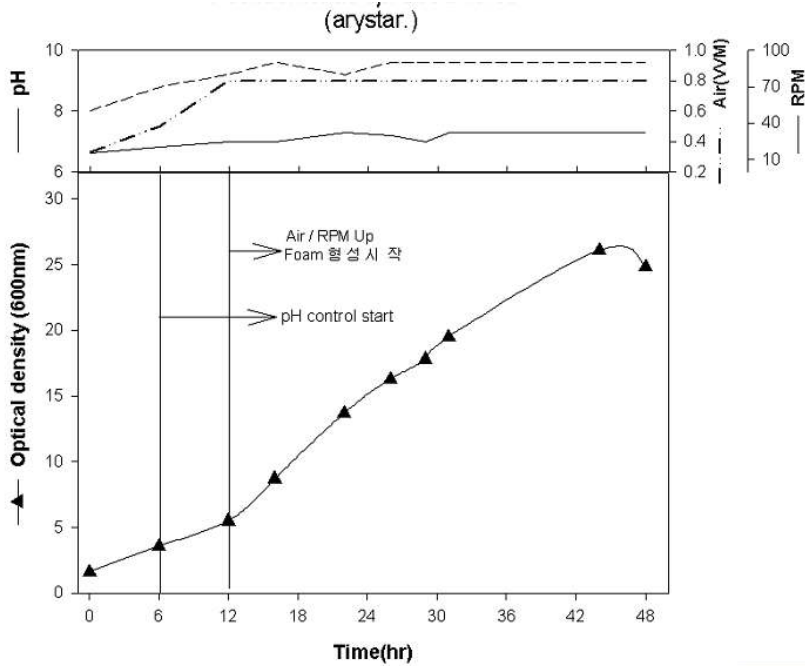


그림 36. 3,000L 배양기 내 시간별 세포수 변화 및 pH 조절 및 거품조절

## 2. 유도저항성 균주 근권세균의 제제화 기술 확립

선행 수행된 근권세균 및 생산물질을 이용한 역가 검정 결과에 따라 K-87 50ppm~200ppm 처리 기준으로 제제화 계획을 하였으며, 규격을 5%~20% 수화제 (1000배 희석 살포용), 0.5%~4% 입제(3kg/10a)로 정하고 제제화 시험을 실시하였다. 물성 특성이 수용성인 점을 살리기 위해 수용제, 수화제 형태의 제제를 검토하였다. 그중 수화제의 제제가 보관시험에서 물리적인 안정성을 잘 유지 하였다.(표 39) 입상유기질비료에 접착성 재료를 이용하여 본 주성분을 코팅하는 제제화 시험을 실시하였다. PVA(Poly Vinyl Alcohol) 수용액을 스티커로 하여 코팅하였으며 원하는 규격으로 제제가 가능하였다. 또한 같은 입상유기질비료에 용액화한 K-87을 함침 시키는 제제 시험에서 일정 강도를 유지시키면서 원하는 규격의 제제화가 가능한 것을 확인하였다.(표40)

그밖에 광물질 분말, 유기질 피트 등 담체와 텍스트린, 스타치, 당밀 등 결합제를 이용한 입상화, 펠렛화 제제를 검토하였다.(표 41)

표 39. 수용제, 수화제 제제화를 위한 연구

Material	SP-01	SP-02	WP-01	WP-02
K-87	5	20	20	20
SAA 1	5	10		
Carrier 1	Rest	Rest		
SAA-2			10	10
ADD 1			5	5
Carrier 2			Rest	
Carrier 3				Rest
Total(%)	100	100	100	100

수용성, 분산성	보통	불량	-	-
수화성, 분산성	-	-	양호	양호

SP : Soluble Powder, WP : Wettable Powder, SAA : Surfactant, ADD : Additives

표 40. 입제 제형화를 위한 제제 연구

Material	CG-01	CG-02	IG-01	IG-02
K-87	2	4	2	4
PVA	0.5	1	-	-
Water	-	-	10	12
Carrier 4	Rest	Rest	Rest	Rest
Total(%)	100	100	100	100

CG : Coated Granule, IG : Impregnated Granule

부착성	양호	양호	-	-
경도, 함침	-	-	양호	양호

표 41. 입제 제형화를 위한 결합제 제제 연구

Material	PG-01	PG-02	PG-03	PG-04
K-87	2	4	2	4
PVA	0.5	1	0.5	1
ADD 2	-	-	10	10
Carrier 3	50	50	50	50
Carrier 5	20	20	20	20
Carrier 6	Rest	Rest	Rest	Rest
Total(%)	100	100	100	100

수중붕괴성, 경도	양호	양호	양호	양호
-----------	----	----	----	----

PG : Pellet Granule

입제 처방 검토를 위해 Carrier로는 재질이 부식산(Humic acid)이며 둥근 원형 형태인 입상유기질비료를 사용하였다. 수용해시 점성을 갖는 K-87 특성으로 용액화가 어려웠으나 이번 시험에서는 Glucose 첨가로 습윤효과(Wetting effect)를 주어 물에서 풀(Paste)처럼 되지 않고 수화가 잘되고 용해가 잘 되도록 하였다. 이보다 앞서 검토된 것은 입상 펠렛에 텍스트린, 스타치, 당밀 등의 결합제 또는 접착성 재료인 PVA(Poly Vinyl Alcohol) 수용액 등을 Sticker로 이용하여 분상 K-87 주성분을 코팅하는 방식 또는 액상 아미노산에 분산 용해 시킨후 흡착하는 방식이었으나, 이번에 검토된 것은 K-87과 Glucose를 혼합하여 분쇄한 후 물에 녹이고 입상 부식산 표면에 수용액을 분사하여 흡착 코팅하는 것으로 경도를 유지시키면서 원하는 규격의 제제화가 가능하도록 한 것으로서 이전보다도 훨씬 개선된 제제 방식으로 개선되었다. (표 12)

수용성의 특성을 갖는 K-87을 수화제 제형으로 개발하기 위해 Wetter로서 Glucose를 첨가하고 그외 분산효과를 갖는 Dispersant와 Anticaking agent 그리고 이화학적으로 안정된 Carrier를 첨가 사용하여 수화제 처방을 검토하였다. 검토되고 있는 수화제 처방은 보관시험에서 이화학적으로 그 활성을 잘 유지시키면서 장기적인 유통이 가능한 제품이 될 수 있을 것으로 판단되었다.



그림 37. K-87 배양액 및 추출고형물을 이용한 4가지 제형

입상화 제형 연구를 통해 선발된 제조처방을 바탕으로 K87 EPS를 포함하는 이탄질의 입제를 개발하였으며 그 조성은 다음의 표 42와 같다. 또한 수화제의 처방을 완결하였으며 그 처방은 다음의 표 43과 같다

표 42. 입상제품 생산을 위한 처방

Material	IG-03	IG-04	Remark
K-87	0.01	0.002	K-87+Glucose+Water→Spray
Glucose	0.01	0.002	
Water	1	1	
Humic acid GR	Rest	Rest	
Total(%)	100	100	
경도, 부착성	양호	양호	

IG : Impregnated Granule, GR : Granule

표 33. 수화제 제품 생산을 위한 처방

Material	WP-03	WP-04	WP-05	WP-06
K-87	2	0.4	2	0.4
Glucose	1	1	0.5	0.5
SAA-1	10	10		
SAA-2			10	10
ADD 1	3	3	3	3
Carrier 2	Rest		Rest	
Carrier 3		Rest		Rest
Total(%)	100	100	100	100

수화성, 현수성	양호	양호	양호	양호
----------	----	----	----	----

WP : Wettable Powder, SAA : Surfactant(Dispersant), ADD : Additives

### 3. 유도저항성/생육촉진 근권세균 처리제 제제화 공정개발

완성된 K87 EPS를 포함하는 토양처리용 입제 및 수용제의 개발을 위해 다음의 공정을 거쳐 생산하게 된다

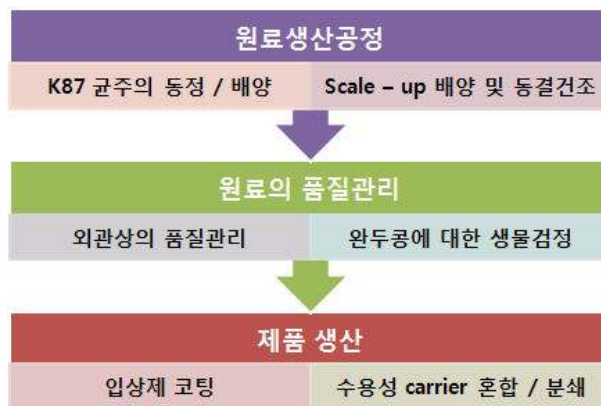


그림 38 K87 EPS 이탄 및 수용제의 생산공정



1단계 생산공정인 원료의 생산은 K87 미생물의 동정 및 배양특성을 확인함으로써 시작되며, 그림 39, 40, 42, 42의 균주특성을 가지게 된다.

```

>K87 (733bp)
GATTGAACGC TGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGCC
GAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCTGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGA
TTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGAT
GGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGA
CCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAAT
GGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTGTCC
GGAAAGAAATCCTTGGTTCTAATATAGCCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGTGCCG
AGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGGTGACTGGCAGGC
TAGAGTATGGCAGAGGGCGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACC
GATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCA
//
    
```

그림 40. K87 16S rDNA 염기서열

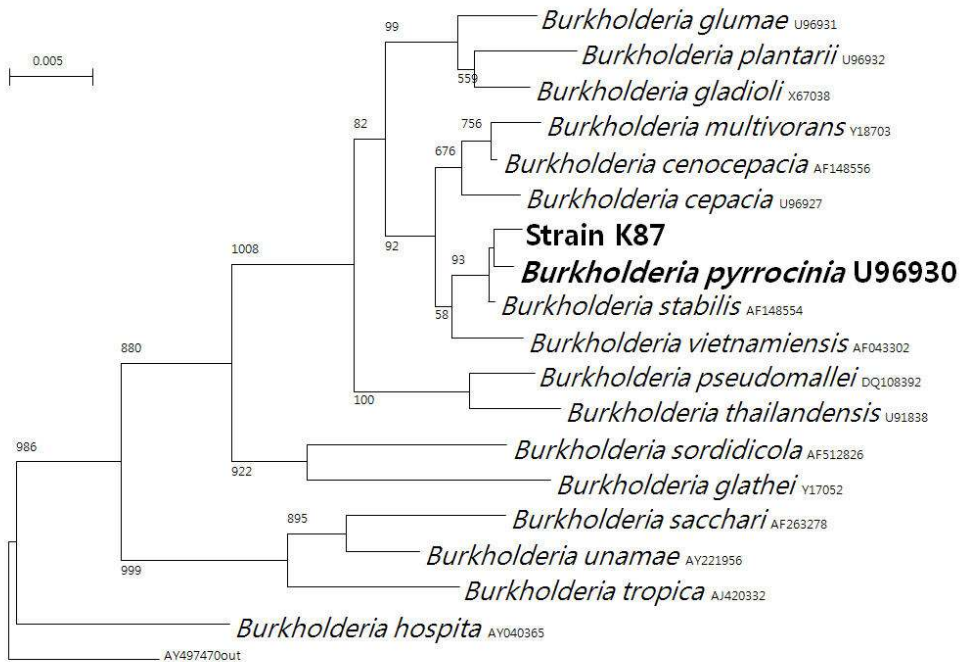


그림 41. K87 균주 계통도



그림 42. K87 미생물의 균주 특성 (배지)

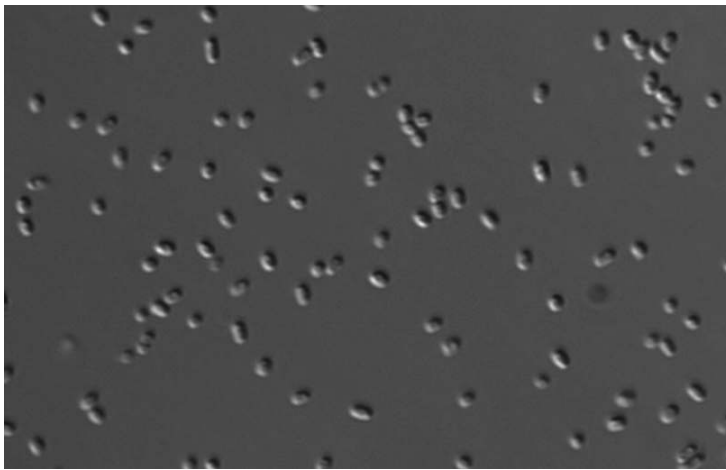


그림 43. K87 미생물의 균주 특성 (현미경)

동정이 확인된 후, 설정된 배양공정에 따라, Corn steep liquor와 Molasses 를 영양원으로 하여, 배양을 수행하게 된다. 72시간 배양완료 후, 배양여액은 농축 후, 동결 건조하여, 고형분말을 얻게 된다.

이 건조 분말에 대하여, 오염미생물의 분석과 완결된 품질관리 기준에 따라 완두콩에 대한 재배시험을 수행하여, 원료로서의 사용여부를 가늠하게 된다. (그림 41)

이때 오염미생물에 대한 분석은 친환경유기농자재목록공시 요령에 따라 수행되며, 생물활성에 대한 시험은 저양양 인공토양에서 뿌리생육증대율 10%이상을 기준으로 한다.



그림 44. K-87 배양원제

품질관리를 합격한 배양원제를 이용하여, 제품을 생산하게 되는데, 그 공정은 입고된 원료물질을 분쇄한 뒤 5% 수용액으로 이탄 입자에 분사 코팅하여 입제를 생산하게 되고, 원료물질은 glucose 에 2%로 혼입하여 분쇄한 뒤 수용제를 생산하게 된다. 완성된 제품은 그림 46의 상표로 상업화가 연결되었다.



그림 45. K-87 EPS 이탄 입제 생산 공정 (Mixer)

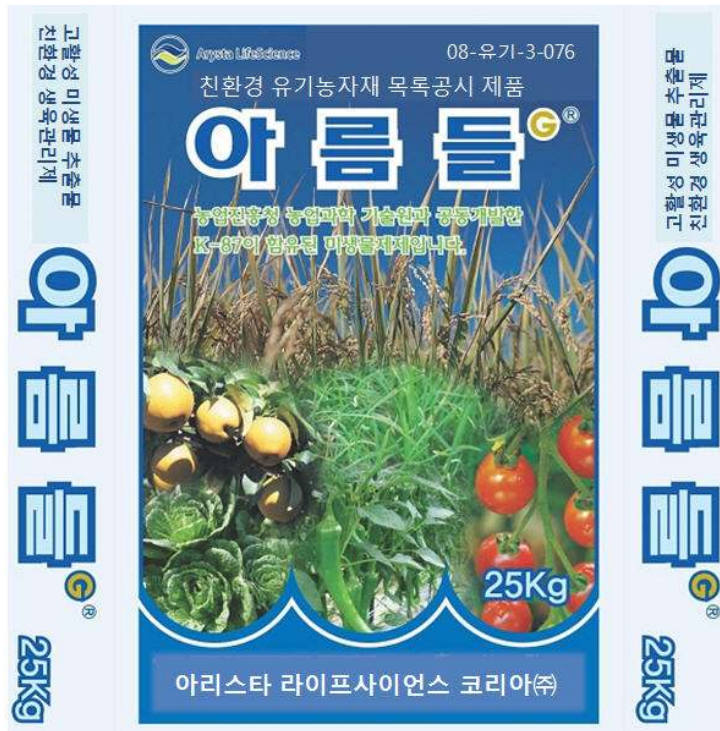


그림 46 상용화된 토양처리용 입제(상)와 수용제(하)의 상품라벨

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발목표의 달성 평가의 착안점 및 기준

구 분	평가방법 및 평가항목	
	평 가 항 목	비율(%)
1차년도 (‘05~’06)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 근권세균 생산 활성물질의 분리정제 기술 확립</li> <li>○ 근권세균 균주의 대량배양기술개발</li> <li>○ 유도저항성 근권균 활성 스펙트럼 검정</li> </ul>	30 30 40
2차년도 (‘06~’07)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 근권세균 생산 유도저항성 활성물질의 작용기작</li> <li>○ 근권세균 생산 활성물질의 화학구조구명</li> <li>○ 유도저항성 근권세균의 제형화 기술 확립</li> </ul>	40 30 30
3차년도 (‘07~’08)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성물질의 화학특성 및 유도체 합성</li> <li>○ 유도저항성 활성증진을 위한 제형화 특성검정</li> <li>○ 유도저항성 근권세균 사용기술 및 포장 실증시험</li> </ul>	40 30 30
최 종 평 가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 균주생산 유도저항성 활성물질의 실용화</li> <li>○ 유도저항성 활성물질의 동정 및 작용기작</li> <li>○ 유도저항성 근권세균 및 활성물질의 제제화</li> </ul>	40 30 30

최종목표인 활성물질을 이용한 상용화를 위한 본 과제의 연도별 연구개발목표는 목표달성을 위한 합리적이며 성공적인 결과를 도출하였으며, 각 세부과제 책임기관의 유기적 연결을 거쳐 성실히 수행하였다.

## 제 2 절 계획대비 연구개발목표 달성도

구 분	평 가 항 목	비율 (%)	달 성 내 용	달성도 (%)
1차년도 ('05~'06)	○ 근권세균 생산 활성물질의 분리정제 기술 확립	30	✓ 활성물질 분리 제제화	100
	○ 균주의 대량배양기술개발	30	✓ 배양조건 및 배지 조성 확립	100
	○ 근권균 활성 스펙트럼 검정	40	✓ 주요병원균 대상 검정	100
2차년도 ('06~'07)	○ 유도저항성 활성물질의 작용기작	40	✓ 추정 작용기작 규명	80
	○ 활성물질의 화학구조구명	30	✓ 활성분획 NMR 분석	100
	○ 활성물질의 제형화 기술 확립	30	✓ 입제, 수용제 제제 기술확립	100
3차년도 ('07~'08)	○ 활성물질의 화학특성 및 유도제 합성	40	✓ 활성물질의 특성 구명	80
	○ 유도저항성 활성증진을 위한 제형화 특성검정	30	✓ 상승효과를 위한 부재 검색	100
	○ 유도저항성 근권세균 사용 기술 및 포장 실증시험	30	✓ 주요 작물에 대한 실증 시험	100
최종평가	○ 활성물질의 실용화	40	✓ 상용제품 유기농자재 등재	100
	○ 활성물질의 동정 및 작용기작	30	✓ 활성분획내 지표물질 탐색	80
	○ 활성물질의 제제화	30	✓ 입제, 수용제 제제화 기술 표준	100

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 천연물 및 미생물을 이용한 친환경 농업생산자재의 경우, 단순 유용미생물을 이용하거나, 일부 식물추출물을 이용하는 것이 현실이며, 대부분이 짧은 유통기한과 제한된 효과를 가지고 있다, 현재 생물농약등록제품은 28개 제품이며 (2007.10.31, 농촌진흥청), 2007년 친환경유기농자재 목록공시에 등재 되어 사용가능한 제품은 71제품이다. 그러나 이중 상당수가 생육관리자재이거나 무기를 이용한 병해충 관리자재로, 그 종류의 확대에 어려움이 있다.
- 현재 복합기능성 제품으로는 Harpin protein과 동부하이텍의 PGPR 미생물을 이용한 제품 익스텐이 있다.
- 안전한 농업자재의 시장 규모는 영세제조 및 수입업체의 난립으로 정확한 통계가 없으나 2006년 농림수산물식품부, 농촌진흥청 추산으로 연간 약 2,000~3,000억원으로 추산됨

### 2. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 미국이나 유럽의 경우, 기존의 화학농약 또는 비료와 구별하여, 천연물에서 유래하거나 환경에 대한 영향이 적은 농업자재를 개발, 상품화 하고 있으며, 농약 또는 비료와 구별하여 식물강화제라는 독특한 종류를 가지고 있다. (유럽, 독일)
- 미국 Eden Bioscience 사의 Messenger 제품이 식물강화제로 유럽에서 판매되고 있으며, Biobest, Valent bioscience, Certis USA 등 여러나라에서 미생물 및 곤충페로몬을 이용한 제품을 생산하고 있으나, 대부분이 미생물을 직접처리하는 형태이며, 작물의 복합저항성 및 생육증진을 일으키는 제품의 상용화는 극히 미미한 실정이다.

### 3. 핵심기술과 그 활용 계획

1) 미생물 활성 물질 분리기술은 활성물질을 분리하는 미생물을 대량배양하고, 추출에 있어, 화학물질의 첨가를 최소한 공정으로, 불필요한 자원의 낭비 및 환경의 부담을 절감하는 데 있다.

2) 활성물질의 품질관리 기술은 미생물 및 미생물 대사산물 이용에 있어서, 기존의 이화학적 분석 및 단순 개수 방법에서 벗어나, 작물에 대한 활성효과를 근본으로 하여, 원료물질 생산 및 제품의 안정성을 도모할 수 있다. 이러한 생물활성검정 시스템의 확립으로 보다 저렴한 비용을 보다 신뢰성이 높은 품질관리 기준을 확립할 수 있어 차후 제2, 제3의 활성물질의 상업화에 이용할 수 있다.

3) 기 확보된 원료물질의 생산 및 품질관리 기술을 바탕으로 다양한 제품의 상업화가 가능한데, 작물의 기비용을 사용할 수 있는 토양처리용 입제가 2008년 상용화되어 판매중에 있으며, 종자 및 엽면처리용 수용제는 2008년 안정화 실증시험을 거쳐 2008년 말 상용화 예정에 있다.

4) 유기농업의 활성화에 따른 친환경적 작물생육관리 및 병해충 관리제품에 대한 요구도가 증가함에 따라, 상용화 제품 및 원료물질의 판매를 국내에 국한 하지 않고, 해외 마케팅 네트워크를 활용하여, 시장 개척 및 각 시장에 맞는 제품 개발을 추진할 예정이다. 이러한 제품군의 다양화는 본 연구과제의 성과물인 K87 EPS가 가지는 환경에 대한 안정성을 기반으로, 기존의 화학비료 및 병해충 방제 농약의 효과를 증대시켜, 결과적으로 종합적인 사용량의 감소를 유도할 수 있도록 할 것이다.



## 제 6 장 해외과학기술정보

생물농약의 시장 및 개발현황은 최근 2006년 과 2007년 REBECA 와 IBMA에 발표된 자료를 바탕으로 분석해보면 다음과 같다. (2001, Frost and Sullivan)

세계 농약 시장 규모 : 270억 달러  
생물농약 (1%) : 270백만 달러  
미생물제제 (65%) : 200백만 달러  
이중 Bt제제 : 110백만 달러

유럽 농약 시장 규모 : 50억 달러  
생물농약 (<2%) : 97백만달러  
미생물제제 25백만달러  
이중 Bt제제 : 20백만달러

시장현황에서 보다 시피 대부분의 미생물 제제는 Bt(*Bacillus thuringiensis*)로 구성되어 있으며, 수화제, 입상수화제, 액상수화제 등의 제형으로 몇몇 회사에서 *kurstaki*, *aizawai*, *israelensis* 그리고 *tenebrionis* 아종이 상업화 되어 있다.

환경친화적 병해충 관리제제의 개발 압력은 환경에 대한 고려가 폭넓게 공유되면서 높아지고 있지만, 효과가 높은 미생물 종의 적고, 법적 제한에 의해 많은 미생물의 상업화가 이루어지지 않고 있다.

Bt를 제외하고 유럽에 *Paecilomyces fumosoroseus*, *Coniothyrium minitans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Ampelomyces quisqualis*, *Gliocladium catenulatum*, *Bacillus subtilis*, *Beauveria bassiana*, *beauveria brongniartii*, *Cydia pomonella granulosus virus*, *Metarhizium anisopliae*, *phlebiopsis*, *gigantea*, *pythium oligandrum*, *streptomyces griseoviridis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma viride*, *Verticillium dahliae*, *Verticillium lecanii*, *Burkholderia cepacia G (상표명 Deny)*, *Erwinia carotovora*가 2005년 현재 병해충 방제용으로 등록되어 있다.

또한 *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudozyma flocculosa*, *Agrobacterium radiobacter*, *Spodoptera exigua NPV*, *Zucchini Yellow Mosaic Virus*가 검토 중에 있다.

미생물을 이용한 농약 대체제 이외 식물추출물을 이용한 대체제 역시 검토 중에 있는데 그것들은 다음과 같다.

Plant	Family	Active substance	Target effect	Non Target effect
Nicotiana sp	Solanaceae	Nicotine	Insecticide neurotoxicity	Mammals, birds
Ryania speciosa	Liliaceae	Ryanodine	Insecticide Podenticide Neurotoxicity	Fish
Derriis elliptica Lonchocarpus nicou	Fabaceae	Rotenone	Insecticide cell respiration inhibition	Cold blood animals
Chrysanthemum cinerariifolium	Asteraceae	Pyrethrum	Insecticide neurotoxicity	Toxic to fish and honeybee
Azadirachta indica	Meliaseae	Azadirachtin	Insect growth disruptant, mold inhibitor	non toxic for mammals, low persistence
Swietenia macrophylla	Meliaceae	Humiinolide	Growth inhibitor for <i>Ostrinia nubilalis</i>	
Tymus vulgaris	Lamiaceae	Essential oil, Terpens, polypheonls	Insecticide for <i>Acanthoscelides</i>	

대부분의 생물학적 방제제의 개발에 있어서, 활성 미생물의 개발이나, 상품화의 마지막 단계는 자국 및 타국에의 등록을 거쳐 법적 지위를 획득하는 것인데, 유럽과 미국의 생물학적 방제제의 등록 체계를 비교해 보면 다음과 같다.

다음과 같은 자료들은 제품의 개발과정에서 반드시 고려해야 할 법적인 사항을 명기할 것으로, 단순히 대상에 대한 효과 검증만으로 개발이 완료되는 것이 아니라, 환

경에 대한 영향, 독성, 추적가능성등을 모두 고려해야 한다는 것이다. 이렇게 다른 나라의 등록 규정을 확인하는 것이, 개발완료된 제품의 수출 및 해외 시장 개척에 있어 매우 중요할 것이다.

요구 자료	EU	USA	Canada
제형, 오염미생물에 대한 자료	-	+	+
근연종과의 관계	+	-	+
인체피부기생 미생물과의 연관성	-	-	+
교차저항성에 발현 가능성	+	-	-
미생물 및 대사산물의 잔류량 정량화 및 등록 후 관리분석 방법	+	-	-
자극성 자료	(-)	+	-
유전독성(곰팡이, 방선균) (대사산물 포함)	+	-	+
급성독성, 병원선, 감염성 (최소 28일)	+	-	-
관찰된 위험성에 대한 연구 보충 자료	+	+	+
잔류성 (위험성이 있을 경우)	(+)	-	(+)
환경내의 행적 (위험성이 있을 경우)	-	(+)	-
조(鳥)류 독성 (온실내 사용시)	-	+	+
어류, 물벼룩, 조류, 자생식물 영향	+	(+)	+/-
꿀벌에의 영향	+	(+)	+
지렁이 및 토양 미생물의 영향	+	-	(-)

최근의 연구에서 새로운 경향은 곰팡이의 대사산물의 이용에 대한 것인데, 왜냐하면 잘 알려진 생물학적방제용으로 사용되는 곰팡이중에서 인간의 건강 및 환경에 부정적 영향을 줄 가능성이 있기 때문이다. 다음은 중요 생물학적 방제용 곰팡이의 대사산물의 목록이다.

즉, 대상에 생물에 대한 영향, 작물에 대한 생육저해, 비대상 곤충 및 생물에 대한 영향이며, 이러한 영향을 평가하기 위해서 유럽에서는 위해성의 규명과, 노출성을 평가하기위한 연구를 수행 중에 있다.

	적용대상	대사산물
Trichoderma spp	Fungi	peptaibols (23 families, 182 forms) trichothecenes, a-pyrone, isonitriles
Gliocladium spp	Fungi	Glilotoxin, gliovirin, viridin, viridiol, glisoprenins, anti amoebic, heptelidic acid
Fusarium spp	Fungi, Insects, and weeds	Trichothecenes, beauvericin, moniliformin, fusaric acid, naphthazarins
Metharizium anisopliae	Insects	Destruixins(>27 types), swainsinone, cyochalasin C
Beauveria bassiana	Insects	Bassianin, beauvericin, bassianolide, beauverolides, tenellin
Beauveria brongniartii	Insects	Oosporein
Verticillium lecanii	Insects	Dipcolonic acid, hydroxycarboxylic acid, cyclosporin
Colletotrichum spp	Weeds	Colletotrichin
Stagonospora spp	Weeds	Elsinochrome A, cercosporin, leptosphaerodione

## 제 7 장 참고문헌

- Alstrom, S. 1991. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 495-501.
- Beilmann, A., Albrecht, K., Schultze, S., Wanner, G. and Pfitzner, U. M. 1992. Activation of a truncated PR-1 promoter by endogenous enhancers in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **18**: 65-78.
- Benhamou, N., Kloepper, J. W., Quadts-Hallmann, A. and Tuzun, S. 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol.* **112**: 919-929.
- Binet, M., Humbert, C., Lecourieux, D., Vantard, M. and Pugin, A. 2001. Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol.* **125**: 564-572.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S. and Dong, X. 1994. characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1583-1592.
- Cohen, Y. 1994. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids. *Phytopathology* **84**: 55-59.
- Davis, K. R. and Ausubel, F. M. 1989. Characterization of elicitor-induced defense responses in suspension-cultured cell of Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**: 363-368.
- De Wit, P. J. G. M. and van der Meer, F. E. 1986. Accumulation of the pathogenesis-related tomato leaf protein P14 as an early indicator of incompatibility in the interaction between *Cladosporium Fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*) and tomato. *Physiol. Mol. Plant P athol.* **28**: 203-214.
- Deising, H., Heiler, S., Rauscher, M., Xu, H. and Mendgen K. 1996. Cellular aspects of rust infection structure differentiation. Spore adhesion and fungal

morphogenesis. In: Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions, M. Nicole and V. Gianinazzi-Person(eds.) pp. 135-156, Kluwer Academic Publishers.

Delaney, T. P. 1997. Genetic dissection of acquired resistance to disease. *Plant Physiol* **113**: 5-12.

Doke, N., Ramirez, A. V. and Tomiyama, K. 1987. Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall components of the fungus. *J. Phytopathol.* **119**: 232-239.

Dubery, I. A., Teodorczuk, L. G. and Louw, A. E. 2000. Early responses in methyl jasmonate- preconditioned cells toward pathogen-derived elicitors. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **3**: 105-110.

Felton, G. W., Bi, J. L., Mathews, M. C., Murphy, J. B., Korth, K. L., Wesley, S. V., Lamb, C. and Dixon, R. A. 1999. Cross-talk between the signal pathways for pathogen-induced insect resistance. *Norvartis Found. Symp.* **223**: 166-171.

Felton, G. W., Korth, K. L., Bi, J. L., Wesley, S. V., Huhman, D. V., Mathews, M. C., Murphy, J. B., Lamb, C. and Dixon, R. A. 1999. Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. *Curr. Biol.* **9**: 317-320.

Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M. G., Meier, B., Dincher, S. S., Staub, T., Uknes, S., Mettraux, J.-P., Kessmann, H. and Ryals, J. A. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* **10**: 61-70.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Nagrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756.

Gorlach, J., Volrath, S., Kanuf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**: 629-643.

Grüner, R. and Pfitner, U. M. 1994. The upstream region of the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. *Biochem.* **220**: 247–255.

Hammerschmidt, R. and Kuc, J. A. 1995. *Induced Resistance to Disease in Plants*. Dordrecht, Netherland, Kluwer Academic Publishers.

Hoffland, E., Hakulinen, J. and van Pelt, J. A. 1996. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology* **86**: 757–762.

Howard, R. J. and Ferrari, M. A. 1989. Role of melanin in appressorium function. *Exp. Mycol.* **13**: 403–418.

Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H. and Money, N. P. 1991. Penetration of hard substrates by fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**: 11281–11284.

Hunt, M. D. and Ryals, J. A. 1996. Systemic acquired resistance signal transduction. *Critical reviews in plant sciences* **15**: 383–606.

Hwang, B. K., Sunwoo, J. Y., Kim, Y. J. and Kim, B. S. 1997. Accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant pathol.* **51**: 305–322.

Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* **5**: 387–405.

Jetiyanon, K. 1997. Interaction between PGPR and cucumber during induced systemic resistance: Recognition and Early Host Defense Responses. Ph. D. dissertation, Auburn Univ. Auburn, AL, USA.

Jetiyanon, K., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. 1997. Lignification, peroxidase and superoxide dismutases as early plant defense reactions associated with PGPR-mediated induced systemic resistance. In : *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria—Present Status and Future Prospects*. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y.

Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds. pp. 265–268 Nakanishi Printing, Sapporo.

Jeun, Y. C. 2000. Immunolocalization of PR–protein P14 in leaves of tomato plant exhibiting systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* induced by pretreatment with 3–aminobutyric acid and preinoculation with *Tobacco necrosis virus*. *J. Plant Disease and Protection* **107**: 352–367.

Jeun, Y. C., Park, K. S. and Kim, C. H. 2001. Different mechanisms of induced systemic resistance and systemic acquired resistance against *Colletotrichum orbiculare* on the leaves of cucumber plant. *Mycobiology* **29**: 19–26.

Jeun, Y. C., Siegrist, J. and Buchenauer, H. 2000. Biochemical and cytological studies on mechanism of systemic induced resistance in tomato plant against *Phytophthora infestans*. *J. Phytopathol.* **148**: 129–140.

Ji, P., Wilson, M., Campbell, H. L. and Kloepper, J. W. 1997. Rhizobacterial mediated induced systemic resistance for the control of bacterial speck of fresh–market tomato. In : Plant Growth–Promoting Rhizobacteria–Present Status and Future Prospects. A. Ogoshi, K. Kobaysahi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds. pp 273–276. Nakanishi Printing, Sapporo.

Kang, M. K., Park, K. S. and Choi, D. 1998. Coordinated expression of defence–related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco. *Mol. Cells* **8**: 388–392.

Kastner, B., Tenhaken, R. and Kauss, H. 1998. Chitinase in cucumber hypocotyls is induced by germinating fungal spores and by fungal elicitor in synergism with inducers of acquired resistance. *Plant J.* **13**: 447–454.

Katz, V. A., Thulke, O. U. and Conrath, U. 1998. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol.* **117**: 1333–1339.

Kauss, H. 1992. Callose and callose synthase. In: Gurr S. J., McPherson M. J. and Bowles D. J. eds. Molecular Plant Pathology: A practical Approach IRL Press, Vol. II, Pp. 1–8.



- Kauss, H., Krause, K. and Jeblick, W. 1992a. Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 304–308.
- Kauss, H., Theisinger–Hinkel, E., Mindermann, R. and Conrath, U. 1992b. Dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inducer of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant J.* **2**: 655–660.
- Kim, S., Ahn, I. P., Park, C., Park, S. G., Park, S. T., Jwa, N. S. and Lee, Y. H. 2001. Molecular characterization of the cDNA encoding an acidic isoform of PR-1 protein in rice. *Mol. Cells* **11**: 115–121.
- Klessig, D. F., Malamy, J., Hennig, J., Sanchez–Casas, P., Indulski, J., Gryniewicz, G. and Chen, Z. 1994. Induction, modification, and perception of the salicylic acid signal in plant defence. *Biochem. Soc. Symp.* **60**: 219–229.
- Kloepper, J. W., Zehnder, G. W., Tuzun, S., Murphy, J. F., Wei, G., Yao, C. and Raupach, G. 1996. Toward agricultural implementation of PGPR–mediated induced systemic resistance against crop pests. In : *Advances in Biological Control of Plant Diseases*, (T. Wenhua, R. J. Cook, and A. Rovira, eds.), pp. 165–174. China Agricultural University Press, Beijing.
- Knoester, M., Pieterse, C. M. J., Bol, J. F. and van Loon, L. C. 1999. Systemic resistance in Arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylen–dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant–Microbe Interact* **12**: 720–727.
- Kogel, K.–H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munch, S. and Romme, Y. 1994. Acquired resistance in barley–The resistance mechanism induced by 2, 6–dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race–specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* **106**: 1269–1277.
- Kovats, K., Binder, A. and Hohl, H. R. 1991a. Cytology of induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Planta* **183**: 484–490.
- Kovats, K., Binder, A. and Hohl, H. R. 1991b. Cytology of induced systemic resistance of tomato to *Phytophthora infestans*. *Planta* **183**: 491–496.

- Kuc, J. A. 1982. Induced immunity to plant disease. *BioScience* **32**: 854–860.
- Lawton, K., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K. and Delaney, T. 1996. Bezothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*. **10**: 71–82.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S. and Ryals, J. 1995. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. plant Microbe Interact.* **8**: 863–870.
- Lee, S., Stenger, D. C., Bisaro, D. M. and Davis, K. R. 1994. Identification of loci in Arabidopsis that confer resistance to geminivirus infection. *Plant J.* **6**: 525–535.
- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **85**: 843–847.
- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995b. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **85**: 695–698.
- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995c. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria : duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* **85**: 1064–1068.
- Malamy, J., Carr, J., Klessig, D. and Raskin, I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002–1004.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiology* **88**: 936–942.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mettraux, J. P. and D efago, G. 1994.

Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO : influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84**: 139–146.

Maurhofer, M., Reimmann, C., Schmidli-Sachere, P., Heeb, S., Haas, D. and Défago, G. 1998. Salicylic acid biosynthesis genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* **88**: 678–684.

McDowell, J. M. and Dangl, J. L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 79–82.

Midoh, N. and Iwata, M. 1996. Cloning and characterization of probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol.* **37**: 9–18.

Murphy, A. M., Chivasa, S., Singh, D. P. and Carr, J. P. 1999. Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci.* **4**: 155–160.

Murphy, J. F., Zehnder, G. W., Schuster, D. J., Sikora, E. J., Polston, J. E. and Kloepper, J. W. 2000. Plant growth-promoting rizobacterial mediated protection in tomato against tomato mottle virus. *Plant Dis.* **84**: 779–784.

Musson, G., McInroy, J. A. and Kloepper, J. W. 1995. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. *Biocontrol Science and Technol.* **5**: 407–416

Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004–1006.

Ohshima, M., Itoh, H., Matsuoka, M., Murakami, T. and Ohashi, Y. 1990. Analysis of stress-induced or salicylic acid-induced expression of pathogenesis-related 1a protein gene in transgenic tobacco. *Plant Cell* **2**: 95–106.

- Park, K. S. and Kloepper, J. W. 2000. Activation of PR-1a promoter by Rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biological control* **18**: 2-9.
- Park, K. S., Ahn, I. P. and Kim, C. H. 2001. Systemic resistance and expression of the pathogenesis-related genes mediated by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* EXTN-1 against anthracnose disease in cucumber. *Mycobiology* **29**: 48-53.
- Park, K. S., Suh, M. C., Cheong, J. J. and Choi, D. 1999. Isolation of defense-related genes from *Nicotiana glutinosa* infected by tobacco mosaic virus using a modified differential screening. *Plant Pathol. J.* **15**: 295-301.
- Peng, Y. L., Shirano, Y., Ohta, H., Hibino, T., Tanaka, K. and Shibata, D. 1994. A novel Lipoxygenase from rice. Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J. Biol. Chem.* **269**: 3755-3761.
- Pieterse, C. M. J. and van Loon, L. C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in plant science* **4**: 52-58.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., van Pelt, J. A. and van Loon, L. C. 1996. Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225-1237.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. and van Loon, L. C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1571-1580.
- Press, C. M., Wilson, M., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. 1997. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 761-768.
- Quadt-Hallmann, A. and Kloepper, J. W. 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Can. J. Microbiol.* **42**: 1144-1154.

- Quadt–Hallmann, A., Hallmann, J. and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in cotton : location and interaction with other plant–associated bacteria. *Can. J. Microbiol.* **43**: 254–259.
- Raupach, G. S. and Kloepper, J. W. 1998. Mixtures of plant growth–promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* **88**: 1158–1164.
- Raupach, G. S. and Kloepper, J. W. 2000. Biocontrol of cucumber disease in the field by plant growth–promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* **84**: 1073–1075.
- Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth–promoting rhizobacteria(PGPR). *Plant Dis.* **80**: 891–894.
- Raupach, G. S., Wei, G., Zehnder, G. and Kloepper, J. W. 1997. Potential of PGPR as replacements for methyl bromide fumigation. In : Plant Growth–Promoting Rhizobacteria– Present Status and Future Prospects. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds. pp. 183–185. Nakanishi Printing, Sapporo.
- Ross, A. F. 1961a. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**: 329–339.
- Ross, A. F. 1961b. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**: 340–358.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809–1819.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Col Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SAS Institute. 1995. JMP Statistics and Graphics Guide. Version 3. Pp. 65–95.

Cary, NC.

Schnider, S. and Ullrich, W. R. 1991. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **45**: 291–301.

Siegrist, J., Orober, M. and Buchenauer, H. 2000.  $\beta$ -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* **56**: 95–106.

Staswick, P. E., Su, W. and Howell, S. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6837–6840.

Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Métraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**: 235–270.

The Arabidopsis Genome and Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.

Ton, J., Pieterse, C. M. J. and van Loon, L. C. 1999. Identification of a locus in Arabidopsis controlling both the expression of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) and basal resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 911–918.

Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negrotto, D., Williams, S., Thompson-Taylor, H., Potter, S., Ward, E. and Ryals, J. 1993. Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* **5**: 159–169.

van de Rhee, M. D., van Kan, J. A. L., González-Jaén, M. T. and Bol, J. F. 1990. Analysis of Regulatory elements involved in the induction of two tobacco genes by salicylate treatment and virus infection. *Plant Cell* **2**: 357–366.

van Loon, L. C. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Swapan, K. D. and Subbaratnam M. eds. Pathogenesis-related protein in plants. Pp. 1–20.

- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1997. Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. In: Ogoshi, A., Kobayashi, Y., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S. eds. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present status and future prospects*. Sapporo: OECD, Pp. 50-57.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998a. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998b. Induction and expression of PGPR-mediated induced resistance against pathogens. In: Duffy, B., Rosenberger, U. and Defago, G. eds. *Molecular Approaches in Biological Control*. Delemont: IOBC/OILB, Pp. 103-110.
- van Peer, R., Niemann, G. J. and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*. **81**: 728-734.
- van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van loon, L. C. and Pieterse, C. M. J. 1999. Rhizobacteria-mediated induce systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* **41**: 537-549.
- van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., van't Westende, Y. A. M., Hartog, F. and van Loon, L. C. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 716-724.
- Wei, G., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **81**: 1508-1512.
- Wei, G., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* **86**: 221-224.
- Wilson, K. J., Jefferson, R. A. and Hughes, S. R. 1992. The *Escherichia coli* *gus*

operon : Induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In : GUS Protocols : Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. S. R. Gallagher, Ed. pp. 7–22. Academic Press, New York.

Yang, Y., Shah, J. and Klessing, D. F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11**: 1621–1639.

Yao, C., Zehnder, G. W., Sikora, E., Murphy, J. and Kloepper, J. W. 1997. Evaluation of induced systemic resistance and plant growth promotion in tomato with selected PGPR strains. In : Plant Growth–Promoting Rhizobacteria–Present Status and Future Prospects. (A. Ogoshi, K. Kobayshi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds.) pp. 285–288. Nakanishi Printing, Sapporo.

Zehnder, G., Kloepper, J. W., Yao, C. and Wei, G. 1997. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles(*Coleoptera* : *Chrysomelidae*) by plant growth–promoting rhizobacteria. *J. Econ. Entomol.* **90**: 391–396.

Zehnder, G., Kloepper, J. W., Tuzun, S., Yao, C., Wei, G., Chambliss, O. and Shelby, R. 1997a. Insect feeding on cucumber mediated by rhizobacteria–induced plant resistance. *Entomol. Exp. Appl.* **83**: 81–85.

Zhou, T. and Paulitz, T. C. 1994. Induced resistance in the biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. on cucumber. *J. Phytopathology* **142**: 51–63.

Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J. P. and Mauch–Mani, B. 2000. Potentiation of pathogen–specific defense mechanisms in arabidopsis by beta–aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12