최 종
연구보고서

고품질 고추생산에서 무공해 역병방제 시스템 개발

Development of Anti-Pollution Control Strategies of Phytophthora Blight in Production of High Quality Pepper

연구기관

고 려 대 학 교
농업과학기술원

농 림 부

최 종 보 고 서

1998년도 농림특정연구사업에 의하여 완료한 고품질 고추생산에서 무공해 역병방제 시스템 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1998. 12. .

주관연구기관 : 고려대학교 자연자원대학

총괄연구책임자 : 황 병 국 (인)

주관연구기관장 : 고려대학교 총장 직인

농 림 부 장 관 귀 하

제　출　문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "고품질 고추생산에서 무공해 역병방제 시스템 개발"과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998.　12.　.

주관연구기관명 : 고려대학교 자연자원대학
총괄연구책임자 : 황 병 국
협동연구기관명 : 농촌진흥청 농업과학기술원
협동연구책임자 : 김 충 회

요 약 문

Ⅰ. 제 목

고품질 고추생산에서 무공해 역병 방제 시스템 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

고추는 우리나라에 들어온지 300여년이 지나는 동안 한국인의 식생활에 뿌리깊이 토착화되어 전통적 식생활에서 빼놓을 수 없는 중요한 식품이 되고 있다. 고추는 생산면에서도 전체 채소재배면적 중에서 가장 많이 재배되고 있는 양념채소작물로서 농가소득에 기여도가 높다. 1993년도 고추재배면적은 85,000 ha로 전체 채소재배면적의 22.5%를 차지하고 있는 실정이다. 고추의 국민 1인당 소비량은 1985년의 1.5 kg에서 매년 평균 7.1%씩 증가하여 1993년에는 2.6 kg이 되고 있다.

고추역병은 고추재배에 있어 가장 피해가 심한 병으로서 우리나라 고추생산에 큰 감수요인이 되고 있다. 이 병은 묘상부터 전 생육기간에 걸쳐 발생한다. 최근에 고추재배는 노지뿐 아니라 비닐하우스 재배면적도 급격히 증가되고 있으며 재배기술의 지역적인 특이성으로 인하여 주산지화 되고 있다. 이러한 단지에서 고추만큼 소득을 올릴 수 있는 대체작물이 없기 때문에 자연히 이어짓기가 불가피하게 되고 그로 인하여 고추역병이 완전히 고사되는 시기까지를 재배시한으로 보고있는 실정이다.

고추역병을 일으키는 병원균(*Phytophthora capsici*)은 토양전염되기 때문에 방제상의 많은 문제점을 가지고 있다. 고추역병은 토양살균제를 처리하여 쉽게 방제가 되지 않을 뿐 아니라 병든포기가 생기게 되면 병원균이 비바람

에 의하여 식물체 윗부분에 피해를 일으키게 됨으로 윤작을 실시하여 1차점염원을 제거하거나 길항균을 이용한 생물적 방제, 저항성 고추품종을 재배하는 것이 가장 효과적인 역병방제법이라고 할 수 있다.

고추역병방제용 살균제가 개발되어 시판되고 있지만 매우 비싸고 환경오염과 식품잔류문제를 일으키고 있어 근권길항미생물을 이용한 생물적 방제와 유도저항성을 이용한 역병방제는 저렴한 비용으로 장기적이며 효율적인 방제법이므로 이에 대한 연구개발이 절실하게 필요한 실정이다. 또한 환경에 비파괴적이며 농약이 잔류되어 있지 않은 무공해, 고품질의 고추를 생산, 소비자에게 신선한 고추를 제공하기 위해 유도저항성과 근권길항미생물을 이용한 무공해 역병방제시스템 개발이 바람직하다.

본 연구개발의 목적으로는 1) 고추식물에 비살균성 화학물질 Aminobutyric acid를 처리하여 역병에 대한 저항성의 유도여부를 평가하고 저항성유도기작을 구명하며, 2) 고추의 근권환경에서 근권길항미생물을 찾아내어 최적관리기술을 개발, 이에 의한 생물적 고추역병방제법을 개발하고, 3) 유도저항성과 근권길항미생물을 동시에 이용하여 무공해 고추역병방제시스템을 개발, 포장에서 실용화 가능성을 파악코저 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1) 유도저항성을 이용한 고추역병 방제법의 개발

고추식물에 비살균성 화학물질인 Aminobutyric acid를 처리하여 저항성 유도 여부를 평가하고 또한 부수적으로 이들 화학물질이 다른 종류의 경제적으로 중요한 고추병인 탄저병에 대해서도 저항성이 유도되는지 조사하였다. 이러한 실험결과를 토대로 Aminobutyric acid처리가 고추역병에 대한 저항성유도에서 어떠한 저항성기작을 가지는지 구명하였고 이것은 유전공학

기술을 이용한 유도저항성 transgenic고추를 개발하기 위한 기초자료가 될 것이다. 세부적 연구개발내용 및 범위는 다음과 같다.

- 화학물질(Aminobutyric acid)처리에 따른 고추식물의 저항성유도효과 평가
- 고추식물의 생육기에 따른 ABA의 저항성유도효과 조사
- ABA 잔류기간에 따른 고추식물의 저항성유도검정
- ABA의 처리농도와 병원균의 농도에 따른 고추식물의 저항성 유도효과 조사
- ABA의 처리방법에 따른 저항성유도 여부검정
- ABA처리후 저항성유도시 병저항성 관련 단백질의 역할구명
- 저항성유도와 β-1, 3-glucanase와 chitinase isoform활성의 관계구명
- ABA처리에 의한 저항성유도와 phytoalexin(capsidiol)생성과의 관계 평가
- ABA처리에 의한 저항성유도와 salicylic acid생성과의 관계평가

이러한 실험을 통하여 온실조건하의 고추식물 실험에서 ABA처리, 특히 ABA의 이성체인 DL-β-amino-n-butyric acid (BABA)처리시에 역병에 대해 저항성이 유도되는지 심도있게 여러 가지 방향에서 평가하고 이들 유도저항성의 기작을 구명하는 방향에서 연구가 진행되었다.

2) 근권미생물을 이용한 고추역병방제법의 개발

역병균에 대해 길항효과가 높은 미생물을 찾기 위해서는 역병균이 활동하는 장소 즉, 고추 근권에서 함께 서식하면서 역병균과 경쟁하여 이길 수 있는 미생물에 대해 연구하는 것이 가장 효율적이다. 따라서 본 연구의 길항미생물 탐색은 고추 근권으로 제한하여 연구를 수행하였으며 아래와 같은 3가지 연구단계로 나누어 단계적으로 실험을 실시하였다.

첫째로 고추역병이 발생하는 토양내 환경을 면밀하게 분석하였다. 고추역병균이 토양속에 존재한다고 해서 반드시 병이 발생하는 것이 아니기 때문에 병원균과 기주식물과 환경과의 상호관계에 대한 정보가 꼭 필요하다.

토양환경에는 토양의 화학성, 물리성 그리고 본 연구에서 가장 중요시하는 생물학적인 환경이 있다. 이러한 환경에서 고추 역병균이 어떻게 상호작용하여 생존, 증식하고 고추를 침해할 수 있는가에 대한 생태연구로서 고추 근권내 미생물의 시기적 동태를 조사하고 나아가 근권환경과 다양한 미생물간의 관계를 구명하여 근권미생물의 동태와 역병균간의 상호작용을 파악함으로써 자연 토양내 일어나는 역병의 발생생태를 조사하였다.

둘째로 역병균과 서식처가 같은 근권 미생물 집단을 동정하였다. 근권에는 영양물질이 풍부함으로 고추뿌리에서 분비하는 물질을 영양원으로 삼는 미생물들이 주로 서식한다. 이러한 고추 근권 서식 미생물중에서 우점하고 있는 미생물을 찾아내어 고추 역병균에 대처하여 영양물질의 경쟁에서 이기고 역병균의 생육을 억제하는 활성이 높은 미생물군을 찾아내었다. 더 나아가서 근권미생물의 근권 우점화에 영향을 미치는 주 환경요인을 파악하고 근권미생물중 고추역병균을 효과적으로 억제할 수 있는 미생물을 선발하여 그 근권미생물이 고추 근권에서 어떻게 생존하며 증식하고 고추의 생육시기와 어떤 관계에 있는지 중점적으로 조사하였다.

셋째로 선발한 근권미생물의 최적 관리기술을 개발하였다. 근권미생물이 가진 고추 역병균의 생육억제능력을 최대한으로 발휘시킬 수 있는 환경을 동정하여 가능한한 고추 재배기간중 그러한 환경을 인위적으로 조성하여 줌으로써 최대한의 방제효과를 얻을 수 있었다. 주로 선발 근권 미생물과 기주식물인 고추와의 상호관계를 구명하여 실용화를 위한 제반기술을 연구하였다. 선발 근권미생물의 고추 품종에 대한 효과의 안정성을 조사하였고 고추의 경종관리가 근권미생물의 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 평가하였으며 선발 미생물을 대량 배양하여 제형화하는 기술을 연구하였고 직접 포장에서 다양한 형태로 시용하여 고추 역병에 대한 발생억제효과를 조사하는 포장실증시험을 수행하였다.

3) 유도저항성과 근권미생물을 동시 이용한 역병방제 시스템 개발

본 연구는 3년차 시험으로서 주관 연구기관 고려대학교 덕소농장 포장과 협동연구기관 농업과학기술원 병리과 수원 포장에서 시험방법을 달리하여 동시에 수행되었다.

- **저항성을 유도하여 역병에 대해 고추식물을 보호하는 효과를 주는 비살균성 화학물질 ABA의 이성체인 DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)를 포장조건에서 처리방법(엽면살포, 토양관주)을 달리하여 노지포장에서 실용화를 위하여 포장시험을 행하였다.**
- **1, 2년차 시험에서 얻어진 근권균의 활성이 여러 환경에서 어떻게 나타나는지 조사하였으며 근권균을 여러형태로 제형화하여 역병 방제효과를 조사, 그 실용성을 검토하였다.**
- **BABA의 저항성 유도에 의한 역병 억제효과와 BABA, 근권미생물을 단독 또는 함께 처리하였을 때 포장에서 실제 방제효과를 평가하여 무공해 역병 방제시스템을 개발하였다.**

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

<u>**연구개발결과**</u>

1) 유도저항성에 의한 고추역병 방제법의 개발

본 연구에서 비살균성 화학물질 DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)를 고추식물에 처리하면 고추역병과 탄저병에 대해 저항성이 유도되어 이들 병을 효율적으로 방제할 수 있음이 입증되었다. 이 BABA의 처리농도와 처리방법을 달리하여 고추식물의 여러 생육기에 처리하면 이 비살균성 화학물질에 의해 고추역병과 탄저병에 대해 높은 수준의 저항성이 유도, 고추식물을

보호하였다. BABA 처리와 역병균이나 탄저병균의 접종사이의 간격이 약1일 정도이면 고추식물에 저항성이 유도되었으며 유도저항성은 질적이기보다는 양적으로 나타났다. BABA를 엽면살포하거나 토양관주하였을 때 고추에 저항성이 유도되었다.

BABA 처리에 의한 고추식물에서 역병에 대해 저항성의 유도가 어떠한 기작에 의해서 일어나는지 분석하였다. BABA를 처리하면 고추조직에 병생성 및 저항성과 관련있다고 알려져 있는 β-1,3-glucanase와 chitinase의 합성과 축적을 유도하여 저항성 유도에 중요한 역할을 하고 있음을 확인하였다. BABA 처리는 고추조직에 phytoalexin인 capsidiol 생성을 촉진시키지 못하였으나, 역병에 감염된 조직에서는 capsidiol을 강하게 축적하여 병원균 감염시 BABA는 고추에서 capsidiol의 합성능력을 증진시키는 것 같다. 그러나 고추조직에서 BABA 처리는 저항성유도의 신호전달물질이라고 알려져 있는 salicylic acid 함량을 급격하게 증가시켰다.

결론적으로 BABA처리에 의해 유도되어지는 고추에 있는 내생적인 신호전달 물질 salicylic acid가 병에 대한 저항성의 특정요인을 활성화시키고 β-1,3-glucanase와 chitinase등의 병생성 및 방어관련 단백질을 유도, 축적케 함으로써 역병에 대한 저항성을 유도케 하는 것으로 추정되어 진다.

2) 근권미생물을 이용한 고추역병방제법의 개발

고추역병의 발생과 비형광성 Pseudomonad 근권균의 밀도와의 관계는 고추 역병을 생물학적으로 방제하는데에 매우 중요한 정보이다. 고추 역병이 심해지면 이 근권균의 밀도가 줄어들고 근권균의 밀도가 높을 때는 고추 역병의 발생이 감소하였다. 비형광성 Pseudomonad 중에서 고추 역병균의 생육을 억제하는데 가장 좋은 효과를 보이는 균이 950923-29로 이 균주는 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었다. 이 균주는 고추 근권에서 생육하며

고추 주산단지의 토양에서 10^3-10^4cfu/g 토양의 밀도로 흔히 발견되고 고추의 생육기인 6월에는 10^5cfu/g 토양 이상으로 근권에서의 생존력이 매우 뛰어난 균으로 밝혀졌다. 이 균주는 고추 역병균의 생장을 현저하게 억제하는 능력이 있을 뿐만 아니라 비형광성 Pseudomonad 그룹중에서도 우점종으로 밝혀지고 있어 근권에 흔히 살면서 고추 역병균과 경쟁하여 영양원을 선점할 수 있는 능력이 가장 뛰어난 종이었다. 또한 이 근권균은 고추 유묘의 역병발생을 효과적으로 억제하였을 뿐만 아니라 고추의 생육촉진효과가 뛰어나 고추 뿌리의 생육을 20% 이상 신장하는 효과가 있어 식물생장촉진근권세균(PGPR, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) 균주의 일종으로 추정되었다.

이 균주 *P. aeruginosa* 의 고추역병 방제효과는 주로 고추 근권을 병원균의 침입으로부터 보호하는 작용에서 오는 것으로 밝혀지고 있으며 이미 역병균에 의하여 침입된 고추에는 방제효과가 없는 것으로 나타나고 있어 고추 역병의 예방적인 측면에서 이 균이 활용되어야 한다. 이 균은 고추 근권뿐만 아니라 근면에서의 생존, 증식력도 우수하게 나타나고 있으며 토양의 구성성분이나 토양의 수분정도 등의 토양환경에도 비교적 영향이 적어 고추 역병을 생물학적으로 방제하는 PGPR 길항균으로 매우 이상적인 균이다. 다만 이 균의 생물학적 방제균으로서의 이용측면에서 문제가 되는 것은 고추 역병의 방제효과를 극대화시키기 위해서 이 균의 근권밀도를 자연토양내 서식밀도 이상으로 높여주는 것이 필요한데 10^8cfu/g 토양의 고밀도로 고추 근권에 접종하였다 하더라도 접종후 시간이 경과할수록 밀도가 감소하여 2-3개월 후에는 자연토양내 밀도 수준으로 낮아진다. 그러나 이러한 현상은 자연상태에서 일어나는 생물학적인 균형현상의 일환으로 어떠한 생태계에서도 자연스럽게 발생하고 있으며 생물학적 방제의 측면에서는 이 균의 주기적인 시용으로 기술적인 극복이 가능하다.

이 근권길항균을 실용화하기 위해서는 대량배양이 필요하여 950923-29 균주는 보통의 배지에서도 균의 생장이 좋아 손쉽게 배양이 가능하고 발효조를 이용하면 2-3일 내에 많은 양의 고농도 접종원을 손쉽게 얻을 수 있다. 이 균의 포장시용 방법으로는 균액을 고추 식물주변 토양에 관주접종하는 방법 이외에도 고추를 육묘할 때 이용하는 상토와 이 균을 peat 등의 배양매체에 기른 배양토를 9:1의 비율로 섞어서 고추를 육묘하여 고추 근권에 접종하는 방법이 있으며 고추의 정식시에 손쉽게 사용가능하도록 입제형태로 조제하여 정식시 고추식물주변에 2-3g 정도 시용하여 고추 근권내 이 균의 밀도를 다시 높혀 줄 수가 있다. 또한 고추의 포장 생육기에는 950923-29 균주의 고농도 현탁액을 고추 땅갓부위에 주당 10㎖의 양으로 한달에 한번씩 3회 관주하면 고추 근권내 균의 밀도를 높은 수준으로 유지시킬 수가 있다.

3) 유도저항성과 근권미생물을 동시 이용한 역병 방제 시스템 개발

본 연구에서는 저항성을 유도시키는 비살균성 화학물질 BABA와 근권길항세균 *Pseudomonas aeruginosa* 균주 950923-29를 비닐하우스와 노지포장(덕소, 수원)에서 단독 또는 함께 처리하여 고추역병 방제효과를 조사, 실용화 가능성을 평가하였다. BABA 처리는 비닐하우스, 노지포장에서 모두 역병 방제효과가 컸으며 근권세균 950923-29 균주도 이들 토양에서 높은 밀도를 유지하여 고추역병을 효과적으로 억제하였다. 또한 이 근권세균은 역병방제 효과 이외에 고추의 초장 생장을 촉진시키는 효과가 있어 PGPR균으로서 실용가능성이 매우 높았다. 더욱이 BABA와 근권세균 950923-29를 함께 고추재배 포장에 처리하였을 때 고추역병 방제효과가 이들 각각을 단독처리하였을 때보다 훨씬 뚜렷하여 이들 저항성 유도화합물 BABA와 근권세균의 실용화 가능성이 매우 컸다.

활용에 대한 건의

- 저항성 유도 비살균성 화학물질 DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)를 역병 방제를 위해 실용적으로 활용하기 위하여 다양한 환경조건에서 살포방법, 살포농도를 달리하여 여러차례 포장시험을 수행하여야 한다. 또한 BABA는 현재 시약용으로 시판되고 있으나 25g당 78.5$로 가격이 매우 비싸서 대량생산하여 제제화함으로써 농용 식물보호제로 사용하기 위한 면밀한 공정방법과 경제성 분석이 검토되어야 한다. 아울러 농약업체에서는 이 BABA의 화학구조를 선도화합물(lead compound)로 이용하여 새로운 비살균성 무공해 농용 식물보호제의 개발에 활용할 수 있을 것이다.

- *Pseudomonas aeruginosa* 950923-29 균주를 농가포장에서 실제 사용 가능하도록 실용화하기 위해서는 이 균주의 고추역병 방제능력을 환경이 다른 다양한 조건에서 때와 장소를 달리하여 여러번에 걸쳐 포장시험을 수행, 그 능력을 입증해야 한다. 그 결과 여러 가지 다른 환경에서 안정적이며 지속적인 효과가 있다고 판정되면 농가사용이 가능하도록 제제화하는 공정이 개발될 것이며 이를 위하여 950923-29 균주 뿐만 아니라 대량배양 및 공정 제조방법에 대한 국내외 특허 출원이 가능하다.

- 본 연구결과에서 BABA의 고추역병과 탄저병에 대한 저항성유도 효과와 유도기작에 대한 결과는 국제학술지(SCI 공인잡지)에 3편의 논문이 이미 게재되었거나 게재중에 있으며 고추근권생태, 역병균과 근권균(950923-29)과의 상호작용, 우점 근권균의 생물활성, 온실과 포장에서의

BABA와 근권균 시용효과 등에 대해서는 논문으로 국내외 학술지에 게재하거나 국내외 학술회의에서 발표할 예정이다. 또한 본 연구의 BABA의 저항성 유도효과와 근권길항균 950923-29 균주의 생물적 방제효과에 대한 결과는 식물병리학 분야 및 농약업계에 크게 기여하여 앞으로 우리나라의 무공해 식물병 방제 시스템 개발에 크게 활용될 것이다.

SUMMARY

Pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the most important crops in Korea based on consumption, nutritional value and cash value to farmers. Pepper plants have the longest growing season of all annual crops in Korea. The continuous monocroping of pepper plants results in various problems, including deterioration of soil physico-chemical properties, the accumulation of toxic compounds, and the increase of plant pathogens in the soil, which sometimes requires the replanting of pepper.

Phytophthora blight of pepper, which is incited by *Phytophthora capsici*, is one of the most devastating soil borne diseases of pepper in Korea. The lack of effective measures to control Phytophthora blight of pepper results in severe loss of pepper production every year. Accordingly, development of the most effective control strategies for Phytophthora blight of pepper is urgently required to achieve the stable production of high quality pepper.

The objectives of this study are 1) to examine whether or not non-fungicidal chemical aminobutyric acids may induce resistance to Phytophthora blight and the anthracnose disease, 2) to elucidate the mechanisms of induced resistance at the biochemical aspects, 3) to screen the rhizosphere microorganisms effective for biological control of Phytophthora blight, and 4) to establish the most effective anti-pollution control strategies of Phytophthora blight using practically both the induced resistance and rhizobacteria in the fields. The results obtained in the present study are as follows.

Treatment of pepper plants with the non-protein amino acid, DL-β-amino-n-butyric acid (BABA) induced local and systemic resistance to subsequent infection by *Phytophthora capsici* or *Colletotrichum coccodes*. A relatively high concentration of BABA at 1,000 μg ml-1, which had no antifungal activity *in vitro* against *P. capsici*, was required to induce resistance against Phytophthora blight or the anthracnose disease with a foliar and stem spray. About 1-5 day interval between BABA-treatment and challenge inoculation was sufficient to induce resistance in pepper plants. BABA applied to the root system also protected pepper plants from *P. capsici* or *C. cocodes* infection.

BABA treatment induced the synthesis and accumulation of β-1,3-glucanases and chitinases in the stem tissues of pepper plants. Their accumulation was very pronounced in the stems challenge-inoculated with *P. capsici* after BABA treatment. Several β-1,3-glucanase and chitinase isoforms accumulated in BABA treated *P. capsici*. When analysed by immunoblot of the denatured proteins, the 20 kDa β-1,3-glucanase and 32 kDa chitinase were found in pepper stems treated with BABA and/or infected by *P. capsici*. BABA treatment did not stimulate capsidiol production in pepper stems, but prior treatment led to high accumulation in *P. capsici*-infected ones. Unlike capsidiol production, BABA treatment triggered a dramatic increase in the endogenous levels of salicylic acid (SA) in pepper stems. The increase in endogenous SA was much pronounced in *P. capsici* infected stems after BABA treatment. In conclusion, the induction of resistance to *P. capsici* in pepper plants by BABA treatment positively correlated with the accumulation of certain β-1,3-glucanase and chitinase isoforms, and SA. These results suggest strongly that SA may act as an endogenous signal responsible for activating particular components of resistance to *P. capsici* and the induction of pathogenesis-related proteins such as β-1,3-glucanase and chitinase.

The non-fluorescent *Pseudomonas* isolate 950923-29 was very effective in suppressing the growth of *P. capsici*. The rhizobacteria isolate was identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The survivability of the isolate 950923-29 was very superior in the soil around the rhizosphere, especially with 105 cfu/g soil of pepper-growing fields during the pepper cultivation season. The isolate effectively inhibited not only the development of Phytophthora blight on pepper seedlings, but also promoted the growth of pepper plants, indicating that it may belong to the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). To practically apply the isolate 950923-29 for control of Phytophthora blight, various types of formulations such as granules or peat were developed. *In vitro* efficacy of BABA and the PGPR isolate 950923-29 for control of Phytophthora blight was evaluated in polyethylene film house or field trials. Treatment with BABA effectively suppress disease incidence of Phytophthora blight in naturally infected or artificially inoculated pepper fields. The PGPR isolate 950923-29 also reduced the Phytophthora disease by maintaining a high density of the antagonist populations in field soils. Moreover, combined applications of BABA and the isolate 950923-29 were more effective than treatments with each of them in controlling the Phytophthora disease in pepper growing fields.

In conclusion, all the results obtained by the present study strongly recommend that anti-pollutional, environment-compatible management of Phytophthora blight in pepper production can be accomplished by combining the judicious use of defense-activators such as DL-β-amino-n-butyric acid (BABA) with the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) such as the isolate 950923-29 in pepper growing fields.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 배경

고추역병은 고추 생산의 가장 큰 제한요인으로 해마다 20-30%의 감수를 초래하고 있다. 농민들은 이병을 「왔다병」 혹은 「웬병」으로 부르면서 농사철 내내 탄저병과 함께 이병의 방제에 심혈을 기울이고 있지만 비가 많이 오는 해, 특히 기온이 높은 해에는 대발생하여 심한 고추밭은 거의 수확을 포기해야 하는 지경에까지 이르기도 하는 무서운 병이다.

역병을 일으키는 병원균은 곰팡이의 일종으로 *Phytophthora capsici* 라는 학명을 가지고 있으며 병원성이 강하다. 이 균은 주로 물속에서 살면서 진화해 왔는데 토양속에 장기간 살면서 토양속의 수분을 따라 이웃으로 전파되고 고추 생육기에는 주로 고추의 뿌리와 땅갓 부위 즉 지제부를 침해하여 줄기를 따라 병이 진전되어 전체 식물에 퍼진다. 겨울동안에는 혹독한 환경에서 잘 견딜 수 있는 월동형태인 난포자를 형성하여 토양속에서 월동한다 (Hwang and Kim, 1995).

본 연구의 대상병인 고추 역병은 병원균이 토양속에 살면서 작물의 지하부를 가해한다는 점에서 지상부 병과는 근본적으로 다르다. 토양내의 병원균을 방제대상으로 하므로 병의 증상을 발견할때는 이미 식물은 죽은 상태가 되므로 농약을 살포하려해도 지상부에 나온 병반처럼 병원균이 있는 곳이 국한되어 있지 않으므로 농약을 집중해서 살포할 수가 없는 것이다. 따라서 고추역병처럼 토양전염성 병은 농약의 살포효과가 매우 낮아서 농약을 살포하여도 효과적인 방제가 되지않고 환경오염을 일으키게 한다. 그렇기 때문에 현재에는 많은 농민들이 해마다 20-30%씩 고추가 죽어가도 속수무책으로 피해를 당하고 있다.

고품질 고추생산은 효율적인 역병방제에 의해서만 가능하다. 농약에 의한

방제가 어려우므로 다른 형태의 방제방법을 찾아야 하는데 병원균이 토양속에 있으므로 토양속에 살면서 병원균과 싸워 이길 수 있는 가장 효과적인 방제방법인 생물학적 방제법과 식물의 저항성을 이용하는 방법이다. 병원균이 사는 토양내에는 수많은 미생물이 살고 있으며 이중에는 병원균의 생육을 억제하는 길항균들이 많이 존재한다. 이들 길항균중에서 병원균과 사는 곳이 유사하며 비슷한 영양원(고추)를 먹고 병원균과 대치되어 경쟁할 수 있는 미생물을 알아내어 이 미생물의 생존, 증식에 유리한 환경을 만들어 주면 고추역병을 일으키는 병원균의 접근은 효과적으로 차단되어 병 발생은 현격하게 줄어들 것이다. 또한 역병방제를 위한 저항성 고추품종이 육성되지 않아 고추식물에 저항성을 유도케 하여 역병방제가 가능할 것이다.

제2절 연구개발의 필요성

고품질, 무공해 고추 생산은 효율적 역병 방제에 의해서만 가능하다. 고추 역병은 토양전염병이므로 살균제 살포로서는 방제가 불완전하며 토양 환경오염을 일으키게 한다. 역병균이 서식하는 토양생태계에 근권길항미생물을 투입하여 역병 발생을 효율적으로 줄일 수 있으며 역병 방제를 위한 저항성 고추 품종이 육성되지 않아 고추 식물에 저항성을 유도케 하여 역병 방제가 가능할 것이다.

고추역병 방제용 살균제가 개발되어 시판되고 있지만 매우 비싸고 환경오염과 식품잔류문제를 일으키고 있어 근권길항미생물을 이용한 생물적 방제와 유도저항성을 이용한 역병방제는 저렴한 비용으로 장기적이며 효율적인 방제법이므로 이에 대한 연구개발이 절실하게 필요한 실정이다. 또한 고추 역병의 생물적 방제에 대한 기술을 농가에 보급하게 위해서는 이들 기술이 특정지역 (나라) 환경에 친화적이어야 하기 때문에 기술을 도입하기 보

다는 토착, 적응성을 지닌 기술을 자체 개발하는 것이 경제적이며 실용적이다.

환경에 비파괴적이며 농약이 잔류되어 있지 않은 무공해, 고품질의 고추를 생산, 소비자에게 신선한 고추를 제공하기 위해 유도저항성과 근권길항미생물을 이용한 무공해 역병방제 시스템 개발이 바람직하다.

제3절 연구개발의 목적

본 연구개발에서는 1) 고추식물에 비살균성 화학물질 Aminobutyric acid를 처리하여 역병에 대한 저항성 유도여부를 평가하고 저항성 유도기작을 구명하여, 2) 고추의 근권환경에서 근권길항미생물을 찾아내어 최적관리기술을 개발, 이에 의한 생물적 고추역병 방제법을 개발하고, 3) 유도저항성과 근권길항미생물을 동시에 이용한 무공해 역병 방제 시스템을 개발, 포장에서 실용화 가능성을 파악하고 더 나아가서 농가에 보급하여 고품질 고추생산을 최종 목표로 한다.

제 2 장 유도저항성을 이용한 고추역병 방제법의 개발

제1절 고추식물에서 역병 및 탄저병에 대한 저항성 유도 검정

1. 서 론

식물은 여러 가지 저항성기작을 발전시켜 병원균의 공격에 대해 자신을 방어한다. 이들 방어 기작의 어떠한 것은 미생물이 식물에 도달되기 전에 식물에 이미 확립되어 있으나 다른 방어 기작은 병원체의 신호(signal)를 감지하자마자 유도되어 감염 위치뿐만 아니라 식물을 전신적으로 보호할 수 있다. 모든 이러한 저항성 기작은 많은 병원체에 대한 식물의 천부적 면역성(natural immunity)의 토대가 된다.

이러한 유도저항성은 저항성의 한가지 형태로 감염 위치에 바로 인접한 조직에서 병원균 생장의 제한을 가져오며 국부적 세포죽음을 유도하여 조정된다. 가시적인 괴저병반(necrotic lesion)으로 대부분의 경우에서 명시되어 있는 이러한 국부적 세포죽음을 과민반응(HR)이라고 일컫는다. 과민반응의 징후가 나타난 후에 식물체 전체에 신호전달 과정을 활성화시켜 여러 가지 병원체의 계속되는 감염에 대해 저항성을 증진시킨다. 소위 전신적 유도저항성[(systemic acquired resistance(SAR)]이라고 불리우는 이러한 반응은 많은 불친화적 식물-병원체 상호작용에서 발견되는 일반적인 현상이다.

전신적 유도저항성(SAR)은 분명한 신호전달경로(signal transduction pathway)로 간주되며 병원균에 대한 식물의 방어능력에 중요한 역할을 한다. 과민반응(HR)이나 병징으로서 국부적 병반(necrotic lesion)을 형성한 후에 전신적 유도저항성 경로가 활성화된다. SAR이 신호전달(signal transduction pathway)의 모형으로서 흥미롭지만 또한 실용적 가치를 가지고 있다. 이 SAR 상태로 가져오는 생화학적 변화를 이해함으로써 유전공학으로 증진된 저항성을 지닌 식물을 개발할 수 있고 식물의 유전적인 병저항성 기작을 촉진시켜서 작동하는 새로운 작용기작을 지닌 식물 보호약제를 개발할 수 있다.

식물에 병원균이 국부적으로 감염되면 감염된 부위에 국부적으로 또는 감염되지 않은 부위에 전신적으로 2차적 병원균 감염에 저항성을 유도할 수 있다. 이러한 저항성은 동일한 병원균에 대해서는 물론 다른 관련없는 곰팡이, 세균, 바이러스 병원체에 대해서도 유도된다. 본 실험실의 이전 연구에서 고추역병균의 병원성 균주에 대한 저항성이 비병원성 균주를 전접종하거나 동시에 접종하면 유도되었음을 밝혀냈다 (Hwang and Kim 1992).

화학물질을 식물에 처리하여서도 병저항성을 유도할 수 있다. 이러한 무생물적 유도체로서 저항성을 유도시킬 수 있는 화학물질로 polycyclic acid (Gianinazzi and Kassanis 1974), acetylsalicylic acid (White 1979), salicylic acid (White 1979), 2,6-dichlroisonicotinic acid (Metraux *et al*. 1991; Uknes *et al*. 1992a, b), benzothiadiazole(BTH) 유도체 (Friedrich *et al*. 1996) 등이 알려져 있다. DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)도 *Phytophthora infestans*에 대해 토마토에서, *Peronospora tabacina*에 대해 담배에서 저항성을 유도시켰다 (Cohen 1993; Cohen *et al*. 1994).

본 연구에서는 비살균성 화학물질인 aminobutyric acid isomer들을 고추식물에 처리하여 역병에 대한 저항성의 유도여부를 평가하여 어떠한 화학물질이 저항성을 유도하는지 파악하고자 실험을 수행하였다. 또한 부수적으로 aminobutyric acid isomer 처리시 다른 종류의 고추병인 탄저병에 대해서도 저항성이 유도되는지 평가하였다.

2. 재료 및 방법

1) 공시 품종: 고추 품종 한별

공시 역병균, 탄저병균 및 처리 물질

- 고추 역병균 (*Phytophthora capsici*) S197 균주, 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*) 2-25 균주
- 화학적 유도 물질 (chemical inducer)

: DL-α-amino-n-butyric acid(AABA)

DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)

γ-amino-n-butyric acid(GABA)

2) 고추 역병 유도저항성 시험

고추식물(*Capsicum annuum* L. 품종 한별)을 원예 용토가 들어 있는 플라스틱 폿트에 파종하여 4엽기에서 다른 폿트에 이식, 27℃의 식물 생육실에서 길렀다. 상이한 aminobutyric acid(ABA) isomer를 물에 녹여 여러 가지 농도로 여러시간 간격으로 고추식물에 균일하게 살포하였다. ABA처리된 식물은 역병균 유주자 현탁액으로 접종할 때까지 식물 생육실에 놓아 두었다. ABA를 엽면 살포한 후에 여러 시간대 별로 역병균 유주자 현탁액(105 유주자/ml)을 살균된 솜에 적셔서 토양 표면에서 1.5 cm 떨어진 고추식물의 줄기 부위를 테이프로 감아서 줄기 조직에 역병균이 침입하기에 유리하도록 습기가 유지되게 하였다. 접종된 고추식물을 25∓2℃의 생육실에 놓아 생육케하였다.

고추식물에서 역병 피해도(Disease severity)를 역병균 접종후에 다음의 조사기준(0-5 scale)으로 매일 조사하였다.

0 : 병징이 나타나지 않음

1 : 줄기에 갈색 병반이 나타나기 시작하며 잎이 다소 시들기 시작함

2 : 식물의 30-50%가 병 진전

3 : 식물의 50-70%가 병 진전

4 : 식물의 70-90%가 병 진전

5 : 식물이 완전 고사

대조구 접종식물과 ABA처리 접종된 식물에서 역병피해도의 시간 경과에 따른 변화와 차이를 조사하였다. 역병 보호율(percentage protection)은 다음 공식으로 계산하였다.

보호율(% Protection) = 100 (1 - X/Y)

X : ABA처리 접종식물(treated-challenged plant)에서 병 피해도

Y : 무처리 접종 대조 식물(untreated-challenged plant)에서 병 피해도

3) 고추탄저병 유도저항성 시험

고추식물 (품종 한별)을 원예용토가 들어 있는 플라스틱 폿트에 파종하여 2엽기에 다른 폿트에 이식, 27℃의 식물 생육실에서 길렀다. 상이한 aminobutyric acid(ABA) isomer를 물에 희석하여 여러 가지 농도로 고추식물에 살포하였다.

6엽기의 고추식물에 이들 ABA의 isomer를 살포하거나 토양관주한 후에 탄저병균 (*C. coccodes*)의 포자현탁액으로 접종하였다. 이들 inducer의 지속효과를 조사하기 위하여 탄저병균이 접종된 여러 기간 간격으로 8엽기의 고추식물에 토양관주하였다. 전신적 보호효과를 평가하기 위하여 고추식물의 줄기기부 하위 2엽에 BABA 용액을 살포하였다. 1-7일 후에 BABA가 처리된 전체 고추식물에 엽면살포하여 *C. coccodes*를 접종하였다. BABA 처리에 의한 탄저병의 병반 크기 억제효과를 조사하기 위하여 접종원 (20μl, 105 conidia/ml)을 BABA가 처리된 고추식물의 잎 위에 올려 놓았다. 접종되어진 고추식물을 암조건의 습실에 28℃에서 36시간 처리한 후에 27℃의 생육

실에서 배양하였다.

고추잎에 형성된 병반수와 크기를 *C. coccodes* 접종 후 7일 만에 조사하였다.

보호율 (% protection) = 100(1-X/Y)

X : BABA처리된 식물에 발생한 병반수

Y : 탄저병균만 접종한 식물에 발생한 병반수

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)를 고추식물에 처리하면 고추역병균 (*P. capsici*)의 병원성 균주로 후접종시 역병에 대해 저항성을 유도시킨다는 사실을 알 수 있었다. 단백질의 구성 아미노산이 아닌 이 BABA는 *P. capsici*의 유주자 발아와 균사 생장에 대해 억제효과가 없었으나 고추식물에서 역병을 효율적으로 억제하였다. 시험된 aminobutyric acid의 3가지 이성체(isomer) 중에서 오직 β-isomer인 BABA만 고추식물에서 역병에 대해 저항성을 유도시키는데 효과적이었으나 α-와 γ-isomer는 효과가 없었다.

가. 고추 역병에 대한 저항성 유도 검정

1) 화학물질 (Aminobutyric acid : ABA) 처리에 따른 역병 저항성 유도효과

Aminobutyric acid 이성체 AABA, BABA, GABA가 *in vitro*에서 고추역병균의 균사 생장과 유주자 발아에 직접 영향을 미치는지 실험해 본 결과 1,000 ㎍/ml 농도에서도 역병균에 영향을 미치지 않았다(실험 데이타 미제시). 또한 이들 ABA의 이성체를 고추식물에 엽면살포하였을 때 1,000 ㎍

g/ml에서도 고추에 약해가 없었다. 그러나 BABA를 고추식물에 엽면살포하면 2,000 μg/ml에서 상위 어린잎에서 다소 황화현상(chlorosis)을 보였다.

ABA 이성체 처리시 역병발생이 억제되는지 시험해본 결과, 제 2분지기의 고추식물에 1,000 μg/ml BABA를 살포하였을 때 고추역병감염에서 완전하게 고추식물을 보호하여 역병이 발생하지 않았다(Fig. 1). 그러나 ABA의 다른 이성체 AABA와 GABA를 처리하였을 때는 고추역병을 억제시키지 못하였다. 이러한 실험 결과를 평가하여 볼 때, BABA에 의해 고추식물이 역병에 대한 저항성을 유도함을 알 수 있었다.

Fig. 1. Effect of spray treatments (1,000 μg ml-1) with water (CK), DL-α-amino-n-butyric acid (AABA), DL-β-amino-n-butyric acid (BABA), and γ-amino-n-butyric acid (GABA) on *Phytophthora capsici* infection in pepper plants (cv. Hanbyul) at second-branch stage. Photograph was taken 6 days after challenge inoculation.

2) ABA처리 농도에 따른 역병 저항성 유도효과

ABA의 상이한 이성체의 여러 가지 농도로 1분지기의 고추식물에 살포한 후 4일만에 고추역병균을 줄기 접종하였을 때 역병에 대한 고추식물의 저항성유도 정도는 ABA의 이성체에 따라 달랐다(Fig. 2). GABA처리된 식물에서는 고농도 GABA처리에서 역병억제가 전혀보이지 않았다. 또한 AABA처리된 고추식물에서는 역병발생이 어느 정도 억제되어 1,000-2,000 ㎍

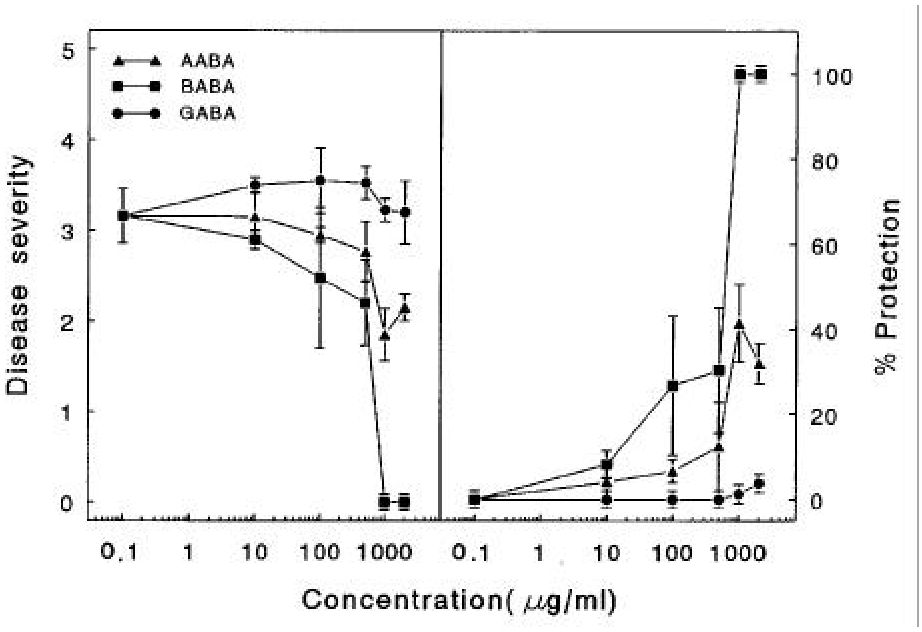


Fig. 2. Protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Phytophthora capsici* infection by various doses of DL-α-amino-n-butyric acid (AABA), DL-β-amino-n-butyric acid (BABA), and γ-amino-n-butyric acid (GABA). Plants at first-branch stage were uniformly sprayed with various doses of compounds and challenged 4 days later. Disease severities were recorded 8 days after challenge inoculation. Vertical bars represent standard deviations.

g/ml에서 30-40%보호효과를 보였다. 그러나 BABA처리된 식물에서는 병발육이 크게 감소되어 100 ㎍/ml, 500 ㎍/ml에서 26%와 30%의 보호효과를 보여 주었다. BABA 1,000-2,000 ㎍/ml 처리시 100% 방제되었다.

비교적 고농도의 BABA가 잎과 줄기에 살포시 고추역병에 대해 저항성을 유도하는데 필요하였다. 그러나 이 BABA를 낮은 농도로 처리해도 고추식물에서 역병에 대해 단지 낮은 수준의 저항성을 유도하였다.

3) 고추식물의 생육기에 따른 BABA의 역병 저항성 유도 효과

BABA처리에 의해 고추역병감염에 대해 저항성유도는 고추생육기가 크게 영향을 미친다(Fig. 3). BABA를 4엽기의 고추식물에 처리하였을 때, 무처리 식물이나 AABA 또는 GABA처리식물에 비하여 역병감염이 서서히 진

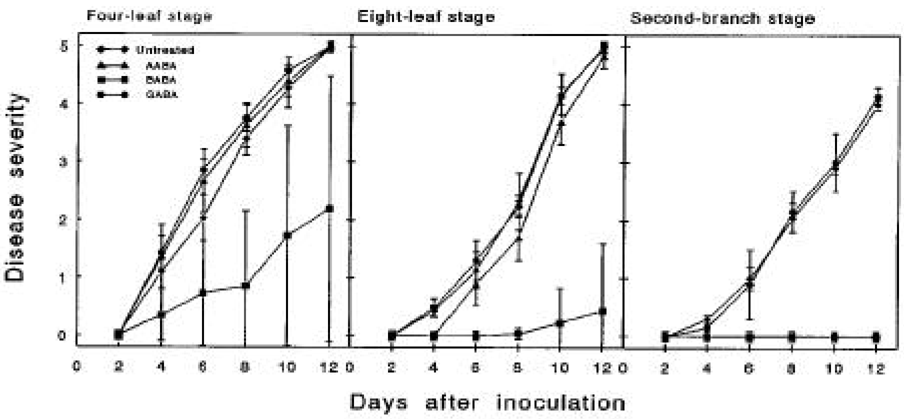


Fig. 3. Effect of plant growth stages on protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Phytophthora capsici* infection by DL-α-amino-n-butyric acid (AABA), DL-β-amino-n-butyric acid (BABA), and γ-amino-n-butyric acid (GABA). Plants at different growth stages were uniformly sprayed with 1,000 μg ml-1 of compounds and challenged 4 days later. Vertical bars represent standard deviations.

전되었다. 특히 BABA는 8엽기의 고추에서 강한 방제 효과(90%)를 유도했고 제2분지기에서는 저항성을 유도하여 역병을 완전 방제하였다. 이에 반하여 다른 ABA이성체인 AABA, GABA는 시험된 모든 생육기의 고추식물에서 고추역병감염을 감소시키지 못했다.

고추의 생육기도 역병에 대한 BABA 처리에 의한 저항성 유도에 크게 영향을 미쳤다. BABA 처리하였을 때 생육후기에 역병 방제효과가 유묘기보다 더 뚜렷하여 생육후기에서 역병 저항성의 증가 (Kim *et al.* 1989; Kim and Hwang 1992)가 BABA에 의한 저항성 유도에 기여함을 시사해 주고 있다. 또한 고추식물의 생육후기에 고추 줄기에서 phytoalexin인 capsidiol 생성이 촉진된다는 사실 (Hwang 1995)과 성숙된 고추식물에서 저항성 유도 기작과 밀접한 관계가 있는 것 같다.

4) BABA의 식물체에 잔류기간에 따른 저항성 유도 효과

고추역병균을 접종전 4일, 7일에 BABA를 1,000㎍ 처리하면 역병에 대해 85-100%의 높은 수준의 방제효과를 보였다(Fig. 4). 그러나 역병균 접종전 1일에 BABA를 처리하면 47%의 중간 정도의 방제효과를 보였다. 그렇지만 10-100㎍/ml BABA를 처리하면 BABA의 잔류기간에 관계없이 거의 역병을 방제하지 못하였다.

고추식물에서 BABA의 잎, 줄기 살포시 역병에 대해 저항성을 유도하는데 BABA 살포와 역병균의 후접종사이에 약 4일의 기간이 필요하였다. 또한 이 유도저항성은 BABA 처리 후 약 15일이 지속되어 고추역병에 대한 고추식물의 보호가 몇주 정도 지속되리라고 사료된다.

5) BABA의 토양 관주시 역병 저항성 유도 여부 검정

저항성 유도물질 BABA를 고추식물 조직내에 주입시키기 위하여 토양관

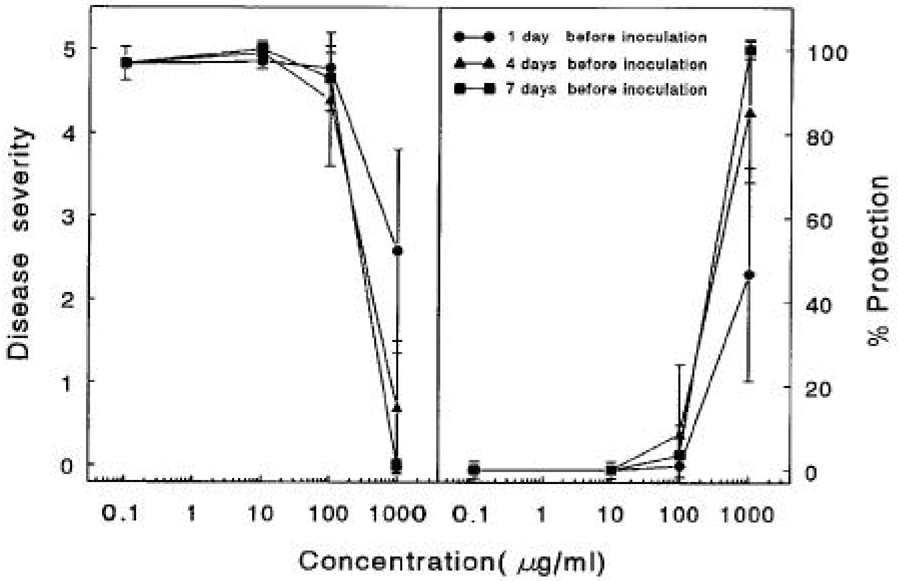


Fig. 4. Effects of chemical treatment before challenge-inoculation on protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Phytophthora capsici* infection by various doses of DL-β-amino-n-butyric acid. Plants at eight-leaf stage were uniformly sprayed with various doses of the compound 1, 4, and 7 days before inoculation and then challenged. Disease severities were recorded 12 days after challenge-inoculation. Vertical bars represent standard deviations.

주 기술을 사용하였다(Table 1). 일반적으로 제1분지기의 고추식물에 BABA를 상이한 농도로 토양 관주하면 역병에 대해 저항성을 유도하지 않는다. Challenge 접종후 초기에 역병은 BABA 농도에 관계없이 고추식물에서 균일하게 발생하였다. Challenge 접종후 6일에는 BABA처리된 식물에서 역병 발생이 처리되지 않은 식물에서 보다 다소 느렸다. Challenge 접종후 8일에는 2,000 μg/ml BABA처리외의 다른 농도의 BABA를 처리한 식물에서 병 발생은 무처리 식물과 비슷하였다.

Table 1. Effects of a soil drench with different doses of DL-β-amino-n-butyric acid on *Phytophthora capsici* infection in pepper plants (cv. Hanbyul) at first-branch stage[a]

Chemical concentration	Disease severity (mean±SD, days after inoculation)		
	6 days	8 days	10 days
Water(control)	1.4±0.47 *a*	2.7±0.45 *ab*	3.7±0.28 *bc*
10 μg ml^{-1}	1.2±0.34 *abc*	3.0±0.69 *a*	4.4±0.40 *a*
100 μg ml^{-1}	1.3±0.34 *ab*	2.9±0.50 *a*	4.0±0.25 *ab*
1000 μg ml^{-1}	0.9±0.15 *bc*	2.1±0.60 *b*	3.4±0.66 *c*
2000 μg ml^{-1}	0.8±0.26 *c*	2.5±0.50 *ab*	3.7±0.30 *bc*

[a]Pepper plants at first-branch stage were treated by a soil drench with DL-β-amino-n-butyric acid and 4 days later challenged with *P. capsici*.
[b]Figures in columns followed by the same letter are not significantly different at the 5 % level according to Duncan's multiple range test.

6) 고추식물 뿌리의 BABA용액에 침지효과

BABA용액을 고추 뿌리에 처리하였을 때 역병에 대해 저항성이 유도되는지 조사하였다(Fig. 5). 노출된 뿌리에 BABA를 처리하면 제1분지기의 고추식물은 고추 역병 감염에서 보호되었으나 제8엽기에서는 보호되지 않았다. BABA 농도를 증가시키면 제1분지기에서 방제효과는 증가하였다. 2,000 μg/ml BABA를 고추 뿌리에 처리하면 고추잎에 어느정도 약해가 발생하였다.

본 실험 결과에서 뿌리 시스템에 BABA를 처리하면 고추역병에 대해서 고추식물을 보호할 수 있음을 입증하였으며 BABA가 뿌리를 통하여 줄기조직으로 수송됨을 알 수 있다.

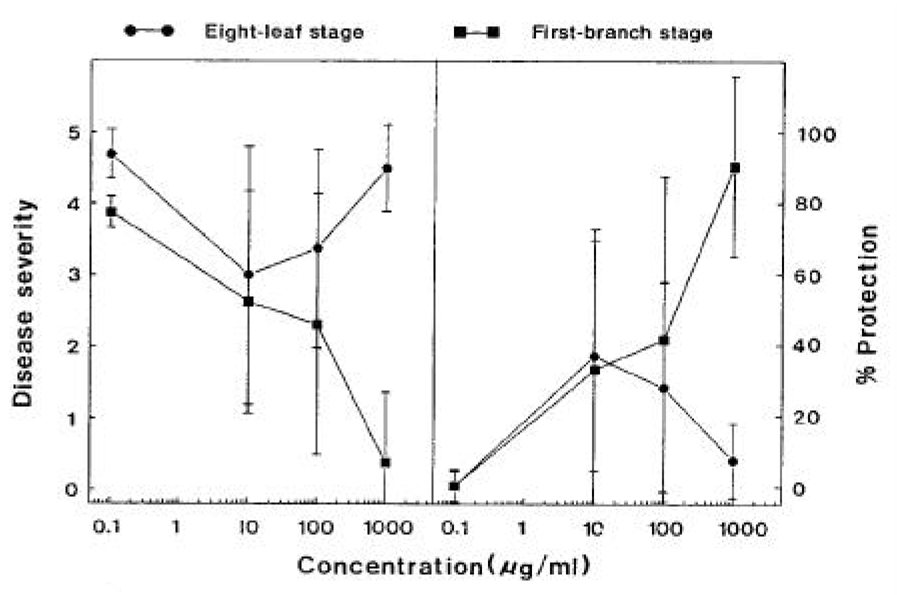


Fig. 5. Protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Phytophthora capsici* infection by DL-β-amino-n-butyric acid applied to the root systems. The root systems of pepper plants at 8-leaf and first-branch stages were dipped in BABA solutions for 6 hr. The plants treated with BABA were transplanted into the pots and challenged 4 days later. Disease severities were recorded 7 days after challenge inoculation. Vertical bars represent standard deviations.

7) BABA의 처리 농도와 역병균 농도에 따른 저항성 유도 효과

역병균의 유주자를 상이한 수준으로, BABA를 상이한 농도로 처리한 4엽기의 어린식물에 접종하였을 때 역병 발생에 대해 뚜렷하게 영향을 미쳤다 (Fig. 6). 10^2, 10^3, 10^4/ml 유주자현탁액으로 저농도 접종원을 challenge 접종한 후에 높은 농도의 BABA를 처리한 어린 고추식물에서 방제 효과가 매우 높았다. 그러나 10^5, 10^6 유주자의 높은 접종원으로 challenge접종하면

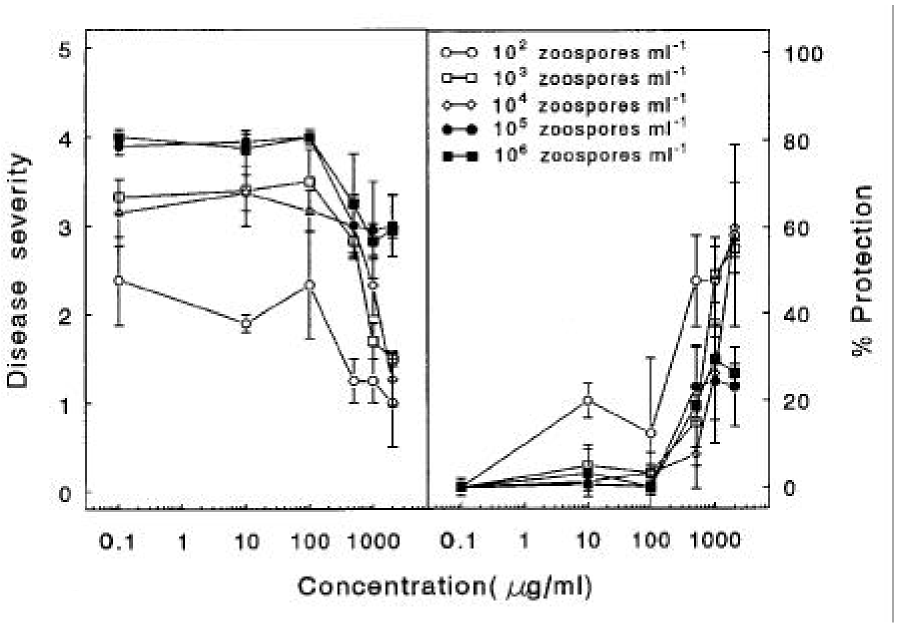


Fig. 6. Effects of challenge inoculum on protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Phytophthora capsici* infection by various doses of DL-β-amino-n-butyric acid. Plants at four-leaf stage were uniformly sprayed with various doses of the compound and challenged 4 days later with different concentrations of zoospores. Disease severities were recorded 6 days after challenge inoculation. Vertical bars represent standard deviations.

BABA**처리된 식물에서 방제가**(10-25%)**가 낮았다**.

이 접종원 농도 실험 결과로부터 BABA **처리된 고추식물에서 역병을 발병시키려면 고농도의 역병균 접종원이 필요함을 알 수 있다**.

나. 고추의 탄저병에 대한 저항성 유도 검정

1) ABA의 처리방법에 따른 고추탄저병에 대한 저항성 유도 효과

6엽기 식물에서 1,000 μg/ml BABA 처리후에 4일째 *C. coccodes*를 접종한 고추식물 (품종 한별)에서 탄저병 진전을 관찰하였다(Fig. 7). 탄저병은 접종한지 4일만에 나타났고, 탄저병균 접종전 BABA 처리된 고추식물에서 100% 방제 효과를 보였다. 접종 후 4일만에 접종된 고추의 잎과 엽병에 진한 녹색으로 약간 들어간 부정형의 둥근 병반이 형성되었으며, 병반의 진전에 따라 병반이 서로 융합되기도 하면서 갈색의 테두리를 가지는 연회갈색의 병반으로 진척되었다. 그러나 탄저병균 접종전에 BABA 처리된 고추식물에서는 병반이 거의 형성되지 않았으며, 71%의 방제효과를 보인 100μg/ml의 처리구에서는 접종후 6일만에 진한 갈색의 매우 작은 병반이 형성되는 것으로 병진전이 제한되었다.

6엽기에서 aminobutyric acid를 토양관주하였을 때 고추 탄저병의 방제효과가 평가되었다(Fig. 8). BABA를 토양관주하였을 때 다른 aminobutyric acid 처리와 비교해서 고추 탄저병에 대한 저항성 유도가 뚜렷하였다. 100μg/ml의 BABA 처리시 각 농도에서 73%, 85%의 보호효과를 보였다.

Figure 7, 8에서 알 수 있는 것처럼 DL-α-amino-n-butyric acid (AABA)와 BABA는 *C. coccodes* 감염에서 고추식물을 보호해 주었다. 그러나 DL-γ-amino-n-butyric acid (GABA)도 약하게 보호효과를 보였다. 특히 BABA를 1,000 μg/ml로 엽면살포하거나 토양관주하였을 때 탄저병에 대해 100% 방제하여 주었다. 이러한 발견에서 aminobutyric acid(ABA)의 isomer 특이성이 고추식물에서 저항성을 유도하는데 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 이러한 ABA의 isomer 특이성이 비슷하게 토마토-*Phytophthora infestans* 시스템에서 존재하는 것 같다 (Cohen 1994; Cohen *et al.* 1994). 특히 BABA는 고체배지에서 *C. coccodes*의 생장억제를 일으키

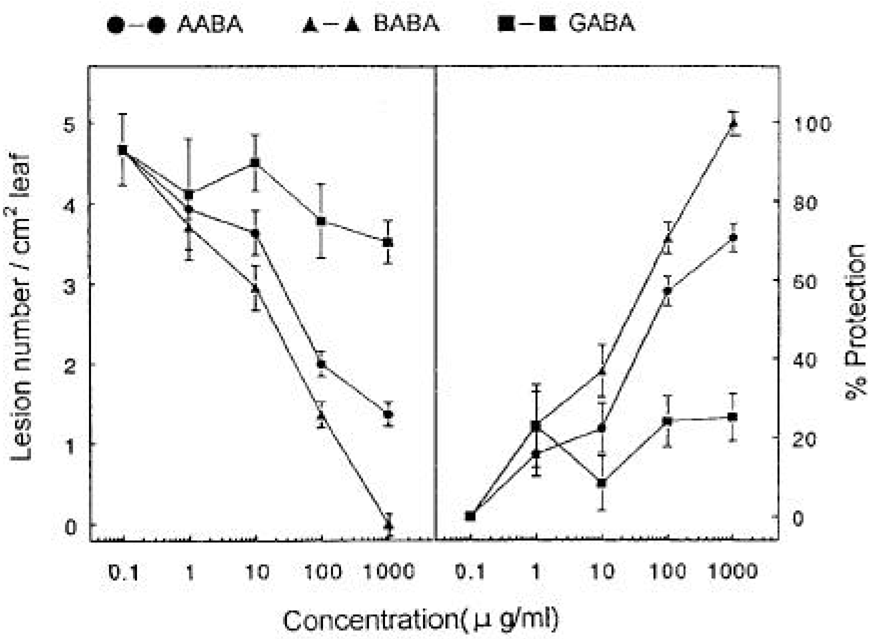


Fig. 7. Effect of foliar spray on protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Colletotrichum coccodes* infection by various doses of DL-α-amino-n-butyric acid (AABA), DL-β-amino-n-butyric acid (BABA), and γ-amino-n-butyric acid (GABA). Plants at six-leaf stage were uniformly sprayed with various doses of the compounds and challenged 4 days later with 1.5 x 105 conidia ml-1. Numbers of lesions produced on the leaves were recorded 7 days after challenge inoculation. Vertical bars represent standard errors.

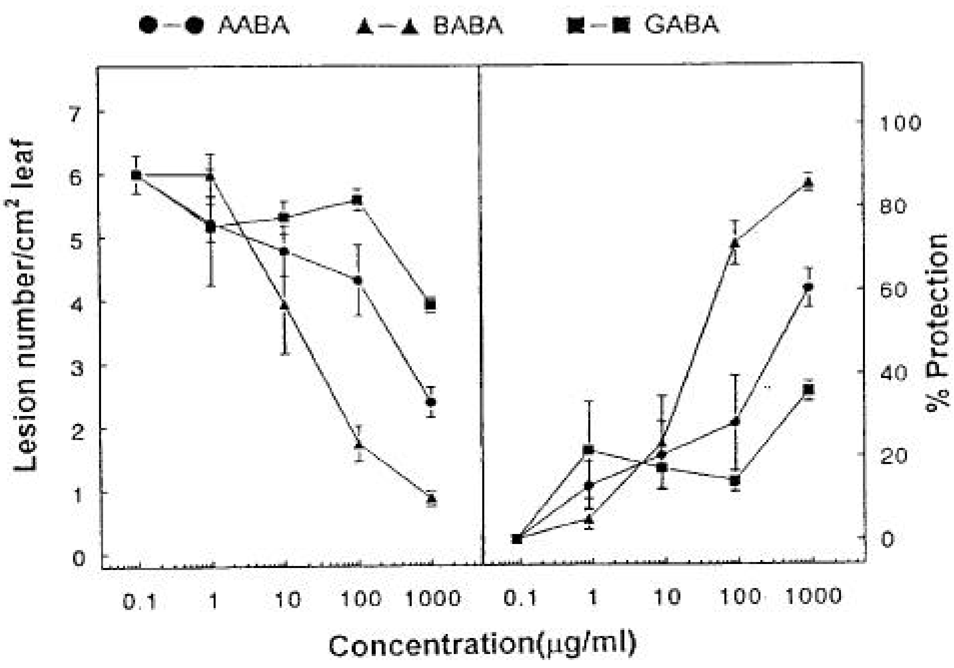


Fig. 8. Effect of soil drenches on protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Colletotrichum coccodes* infection by various doses of DL-α-amino-n-butyric acid (AABA), DL-β-amino-n-butyric acid (BABA), and γ-amino-n-butyric acid (GABA). Plants at six-leaf stage were uniformly sprayed with various doses of the compounds and challenged 4 days later with 4.0 x 105 conidia ml-1. Numbers of lesions produced on the leaves were recorded 7 days after challenge inoculation. Vertical bars represent standard errors.

지 않으므로 BABA는 고추식물에서 탄저병에 대해 저항성 유도 물질인 것 같다.

탄저병에 대해 고추식물이 저항성을 유도하기 위하여 비교적 높은 농도의 BABA가 필요하였으며 BABA 처리시 탄저병의 병반수와 크기를 감소시켰다. BABA는 엽면살포가 토양관주에서보다 탄저병의 보호효과가 더 뚜렷하였다.

2) BABA의 처리시기에 따른 고추탄저병에 대한 저항성 유도 효과

BABA를 여러 가지 농도로 토양관주한 후에 탄저병에 대한 보호효과를 평가했을 때 BABA의 저항성 유도가 뚜렷하였다(Fig. 9). BABA 토양관주 후에 5, 10, 15일에 탄저병균을 접종하였을 때 1,000 μg/ml BABA를 처리한 고추식물이 각각 93, 96, 85% 보호효과를 보였다. 그러나 BABA 처리 즉시 탄저병균을 접종한 식물은 약 50% 방제효과를 나타냈다.

저항성 유도된 식물에서 병반크기로 보호효과를 평가한 결과 접종 후 8일에 무처리 대조구 식물을 병반크기가 2.5 mm이었으나 BABA 처리된 식물은 0.9-2.0 mm 직경의 병반을 생성하였다. 탄저병균 접종 후 즉시 BABA를 토양관주하였을 때 병반 크기를 효율적으로 억제하지 않았다 (Table 2). BABA 처리 농도를 증가시켰을 때 BABA 처리 후 5일, 10일, 15일에 생성된 병반크기는 점차 감소되었다. BABA 토양관주와 탄저병균 접종간의 5일 간격이면, 고추 잎에서 병반크기를 감소시키기 위해 충분하였다.

3) BABA 처리에 의한 고추탄저병에 대한 전신적 유도저항성 발현

8엽기 고추식물의 하위 2엽에 1,000 μg/ml BABA를 처리하였을 때 상위 잎에서 탄저병 발생이 억제되어 전신적 유도저항성이 발현되었다 (Fig. 10). 탄저병을 접종 전 7일에 하위 2엽에 BABA를 처리하면 처리하지 않은

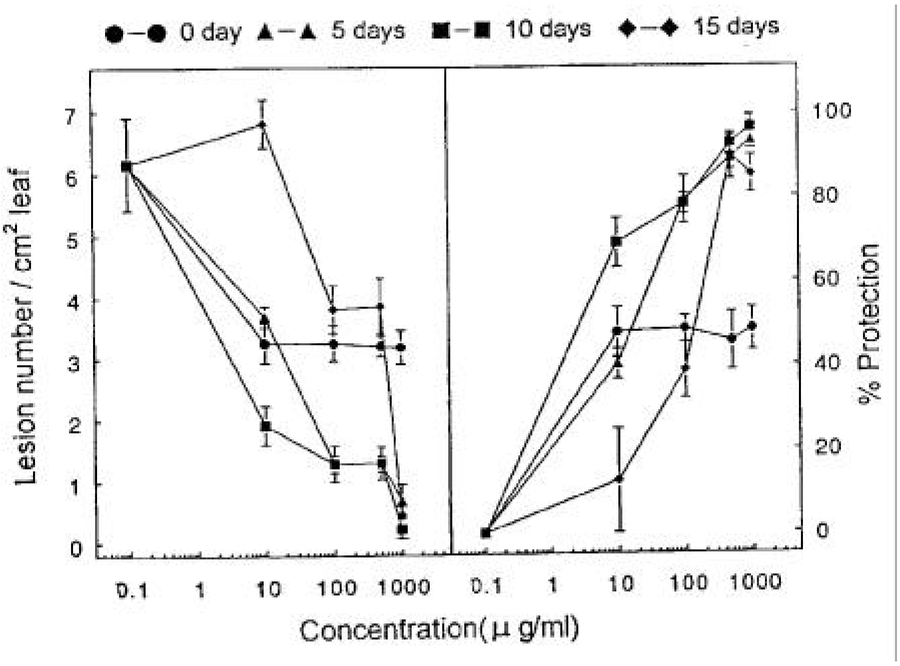


Fig. 9. Effect of time of treatment with different doses of DL-β-amino-n-butyric acid on protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Colletotrichum coccodes* infection. Pepper plants at eight leaf stage were treated by a soil drench with different doses of DL-β-amino-n-butyric acid at 0, 5, 10, 15 days before challenge inoculation. Numbers of lesions produced on the leaves were recorded 7 days after challenge inoculation. Vertical bars represent standard errors.

Table 2. Effects of time of treatment with different doses of DL-β-amino-n-butyric acid on the sizes of lesions produced on pepper (cv. Hanbyul) leaves by *Colletotrichum coccodes* infection[a]

Days after chemical treatment	Lesion diameter (mm ± SD) at chemical concentration				
	0	10	100	500	1000 μg/ml
0	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2 (12)[b]	1.9 ± 0.1 (24)	2.0 ± 0.1 (17)	1.8 ± 0.1 (28)
5	2.5 ± 0.2	2.0 ± 0.1 (17)	1.0 ± 0.1 (60)	1.2 ± 0.2 (52)	0.8 ± 0.1 (68)
10	2.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2 (32)	1.7 ± 0.1 (32)	1.2 ± 0.1 (52)	1.0 ± 0.1 (60)
15	2.5 ± 0.2	1.9 ± 0.3 (24)	1.9 ± 0.2 (24)	0.8 ± 0.1 (68)	0.9 ± 0.1 (64)

[a] Pepper plants at eight-leaf stage were treated by a soil drench with various doses of BABA at 0, 5, 10, and 15 days before challenge inoculation. Sizes of lesions were recorded 8 days after challenge inoculation.

[b] Values in the parentheses are percentages of protection by treatment with BABA.

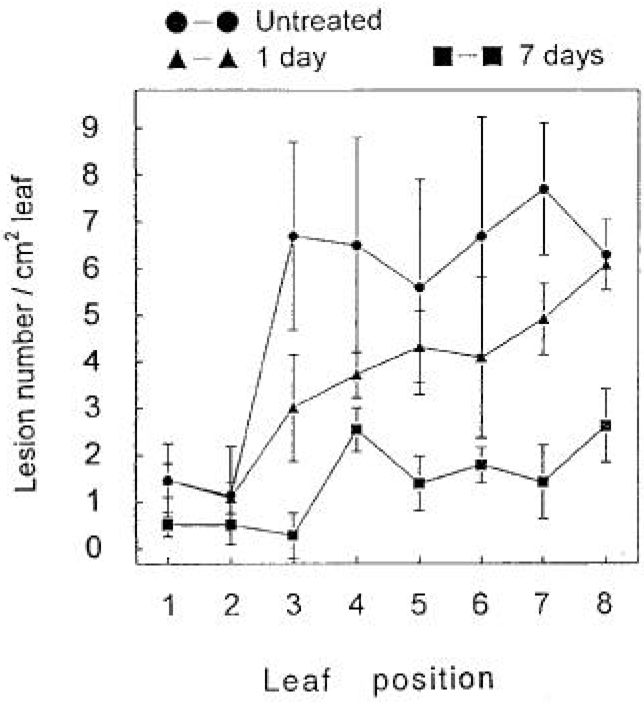


Fig. 10. protection of pepper plants (cv. Hanbyul) against *Colletotrichum coccodes* infection by treatment with DL-β-amino-n-butyric acid at 1,000μg/ml on the two lower leaves from the stem base of plants at eight leaf stage at 1 and 7 days before challenge inoculation. Numbers of lesions produced on the leaves were recorded 7 days after challenge inoculation. Vertical bars represent standard errors.

상위 3-8엽에 병반형성을 감소시켰다. 개개 잎에서 전신적 유도저항성 수준을 조사하기 위하여 하위 2엽에 BABA를 처리한 후에 상이한 위치의 잎에 탄저병균의 포자현탁액을 방울로 접종하여 병반의 크기를 조사하였다. 1,000

μg/ml**로 처리한** BABA**는 처리하지 않은** 6-7**엽에서 병반크기를 유의성 있게 감소시켰다**(Fig. 11).

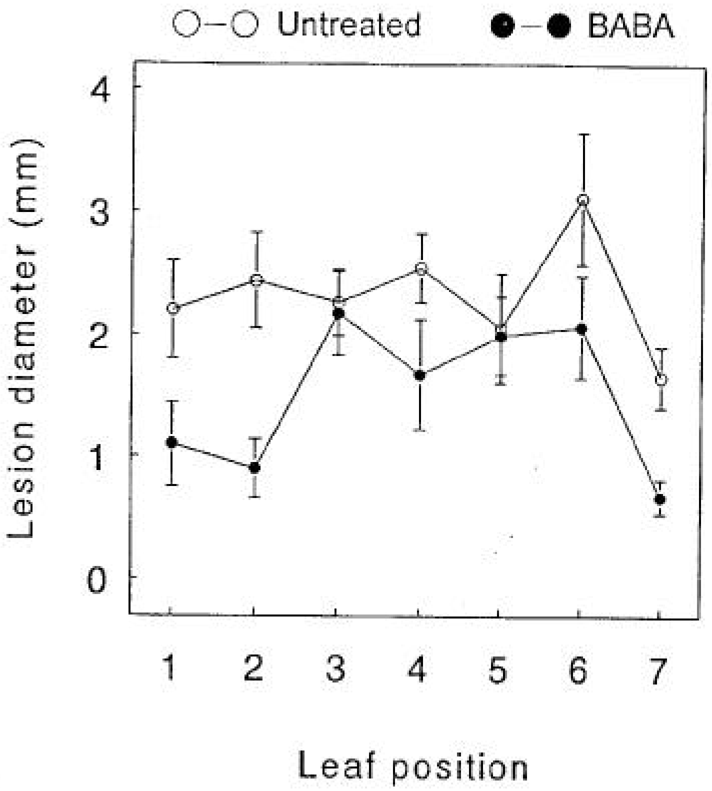


Fig. 11. Inhibition of lesion enlargement of *Colletotrichum coccodes* on different pepper leaves by treatment with DL-β-amino-n-butyric acid at 1,000μg/ml on the two lower leaves 1 and 2 from the stem base of pepper plants at eight leaf stage. Two inoculum droplets (20μl containing 105 conidia ml-1) were placed on each of the leaves at different positions 4 days after BABA treatment. Vertical bars represent standard errors.

본 실험 결과에서 알 수 있듯이 고추의 하위엽에 BABA를 처리하면 고추탄저병에 대해 상위엽에서 크게 보호효과를 보이고 있으므로 BABA가 상향적 이행(acropetal translocation)이 일어나고 있음을 추정할 수 있다. 이러한 BABA에 의하여 전신적 저항성(systemic resistance)이 유도된다는 사실을 최근의 Cohen과 Gisi (1994)의 토마토-역병에 대한 연구결과가 잘 뒷받침해 주고 있다.

제 2 절 고추 역병에 대한 저항성 유도 기작 연구

1. 서 론

전신적 유도 저항성(Systemic acquired resistance, SAR)과 관련하여 많은 수의 생화학적, 생리적 변화가 병원체 감염과 연관되어 있다. 이러한 변화로는 세포의 죽음과 oxidative burst (Low and Merida 1996), callose와 lignin의 집적 (Vance et al. 1980; Kauss 1987)과 새로운 단백질 (Bol et al. 1990; Bowles 1990; Linthorst 1991)등이 알려져 있다. 이들 단백질은 병생성관련 단백질 (pathogenesis-related protein)이라고 불리어지며 병저항성과 관련이 있는 것 같다.

어떤 단백질의 존재나 활성이 저항성 상태의 유지와 밀접하게 상관관계가 있을 때 이 단백질을 전신적 유도저항성(SAR) 단백질로 분류한다 (Neuenschwander et al. 1996). SAR 단백질을 분석하여 보면 이들 많은 단백질이 병생성관련(PR) 단백질에 속하며 담배 잎에 TMV 감염 후에 축적되는 원천적으로 새로운 단백질로서 동정되었다(Van Loon and Van Kamen 1970; Van Loon 1985). 담배에서 PR-1(PR-1a, PR-1b, PR-1c), β-1,3-glucanase(PR-2a, PR-2b, PR-2c), class II chitinase(PR-3a, PR-3b, 소

위PR-Q), hevein-like protein(PR-5a, PR-5b), class III chitinase의 산성 및 염기성 isoform을 구성하고 있는 적어도 9개 family로 SAR marker들이 구성되어 있다(Ward et al. 1991). 또한 다른 SAR 유전자 pattern과 뚜렷하게 다른 유전자 발현 pattern을 보이며 SAR시작동안 유도되는 SAR 8.2이라고 불리는 염기성 단백질 family가 또한 기술되었다(Ward et al. 1991; Uknes et al. 1992a, b).

쌍자엽 식물에서 수많은 바이러스, 세균, 진균성 병원체에 의해서 SAR marker 유전자가 발현되고 SAR가 활성화될 수 있다(Neuenschwander et al. 1996). SAR유전자가 저항성이 유지될 때에 강하게 발현되기 때문에 encode된 단백질은 저항성에 기여할 수 있다. 담배 PR-1a(Sandoz 1991), chitinase(PR-3; Schlumbaum등 1996), β-1,3-glucanase(PR-2), PR-4 (ponstein등 1994), osmotin(PR-5; Woloshuk et al. 1991)이 in vitro에서 항미생적 활성이 있다는 사실들이 이러한 생각을 뒷받침해 주고 있다. 더구나 chitinase와 β-1,3-glucanase에서 항균작용에서 상승적인 활성이 있음이 발견되었다.

β-1,3-Glucanase와 chitinase같은 PR-protein은 단독으로 또는 함께 *in vitro* 항균활성을 가진다고 알려져 있다(Mauch et al. 1988; Vigers et al. 1991). Intercellular washing fluid를 연구한 논문에서 β-1,3-glucanase와 chitinase가 감염된 식물조직의 apoplast에 위치한다고 시사되고 있다(De Wit et al. 1986; Kaufmann et al. 1987; Legrand et al. 1987; Kombrink et al. 1988). Immunocytochemistry와 생화학적 fractionation을 행하여 β-1,3-glucanase와 chitinase가 세포의 어디에 분포되었는지 심도있게 조사되었다(Mauch and Staehelin 1989).

세포의 chitinase는 기주식물체내에 균사가 침입하자마자 병원균의 생장을 제한하는 데 역할하며 액포에 있는 chitinase는 세포의 용해후에 2차적

또는 지연효과를 가질 수 있다. 곰팡이 세포벽이 β-1,3-glucanase의 작용으로 방출되는 oligosaccharide가 phytoalexin의 축적을 일으키는 생합성과정의 elicitor로서 역할할 수 있으므로 chitinase처럼 β-1,3-glucanase는 식물체내의 방어반응을 간접적으로 일으킬지도 모른다(Keen and Yoshikawa 1983; Ride and Barber 1990). Phytoalexin의 축적으로 병원균 감염후에 저항성을 생성케할 수 있다. 이전의 연구에서 저항성고추식물이나 살균제 metalaxyl을 처리한 고추식물에서 phytoalexin capsidiol 생성은 고추역병방제와 상관관계가 있음이 입증되었다(Hwang and Sung 1989; Hwang and Kim 1990; Hwang 1995).

오이, 담배, *Arabidopsis*에 괴저반응을 일으키는 병원균이 감염된 후에 salicylic acid(SA)농도가 급격하게 증가되는 것으로 보아서 SA는 유도저항성의 내재적인 신호물질인 것으로 사료되었다(Malamy et al. 1990; Métraux et al. 1990; Rasmussen et al. 1991; Raskin 1992; Gaffney st al. 1993; Uknes et al. 1993). 병원균이 감염된 잎에서 SA의 축적과 PR protein유도 및 저항성 유도와 상관관계가 있으나(Malamy et al. 1990; Métraux et al. 1990; Yalpani et al. 1991; Uknes et al. 1993), PR단백질이 SA에 의해 유도된 저항성에서 어떠한 역할을 하는지 아직 밝혀져 있지 않다.

본 연구에 이전 실험에서 nonprotein 아미노산 DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)처리시 고추식물에서 고추역병에 대해 저항성이 유도됨을 입증하였다. 이러한 발견으로 β-1,3-glucanase와 chitinase같은 병생성관련 단백질(PR-ptotein), phytoalexin capsidiol, salicylic acid가 고추역병에 대해 저항성 유도시 축적되어 유도저항성에 어떠한 역할을 하는지 구명하기 위하여 본 연구가 수행되었다. 이러한 실험결과를 토대로 BABA처리가 고추역병에 대한 저항성 유도에서 어떠한 생화학적 기작을 가지는지 구명하여 유전공학적 기술을 이용한 유도저항성 transgenic작물을 개발하기 위한 기초자료로서

제공하려 한다.

2. 재료 및 방법

1) 화학물질 처리, 병원균 접종, 병 평가

고추(품종 한별)종자를 원예용토를 함유하고 있는 플라스틱 용기에 파종하여 4엽기까지 생육시킨 후에 작은 폿트 (5×15×10cm)에 이식하였다. 이식된 고추식물을 25±3℃의 식물생육실에서 길렀다. 모든 실험은 *P. capsici* 의 병원성균주 S197로 행하였으며 유주자 현탁액(10^5유주자/ml)을 접종원으로 사용하였다.

제 1분지기의 고추식물에 균일하게 1,000 ㎍/㎖ DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)용액을 살포하였다. BABA처리후 4일에 고추줄기의 상위, 중위, 하위부위에 1cm 정도로 상처를 낸후 역병균의 유주자 현탁액이 적셔 있는 솜을 상처부위에 놓아 접종하였다. 접종된 부위에서 줄기의 절단부위를 역병균 접종후 여러시간 간격으로 수확하여 분석할때까지 -70℃에 보존하였다. 고추식물에서 발생한 역병의 피해도는 0-5 scale로 접종후 매일 평가하였다.

2) 고추줄기 추출액 마련

액체 질소로 얼린 고추줄기를 15 mM 2-mercaptoethanol을 함유하고 있는 0.5M sodium acetate buffer(pH5.2)에서 균질화시켰다. 이 조추출액을 10,000g, 4℃에서 60분동안 원심분리하여 상등액(supernatant)을 4℃, 20,000g에서 60분동안 다시 원심분리하였다. 이 투명한 상등액을 수집하여 단백질 함량을 Bradford(1976)방법을 이용하여 정량하였다.

-20℃에서 acetone 4배양으로 1일동안 조추출액에 있는 단백질을 침전시켰다. 15분동안 15,000g에서 원심분리하여 침전물을 수집하여 차거운 acetone으로 두 번 세척하고 건조시켰다. 30mM sodium acetate buffer (pH5.2)에서 이 잔재물을 재현탁시켜서 15,000g에서 15분동안 원심분리하여 -70℃에서 보관하였다.

3) β-1,3-glucanase와 chitinase활성의 측정

고추줄기 추출액에 있는 β-1,3-glucanase활성을 Kauffmann 등(1987)의 칼로리메터 분석법을 이용하여 측정하였다. 이 분석법은 기질(substrate)로 사용하는 laminarin에서 β-1,3-glucanase활성에 의해 형성된 환원당을 정량한다. Glucose가 standard로 사용되었으며 이 효소 활성은 katal(Kat)로 평가되었다. Katal(Kat)은 1 mol glucose중량/초을 형성하는데 촉매하는 효소 활성으로 정의된다.

고추줄기 추출액에서 chitinase활성을 Reissig 등(1955)의 방법을 사용하여 측정하였다. Chitinase활성을 katal로 표시하였으며 1 katal(Kat) 은 1 mol N-acetyl-glucosamine형성을 촉매하는 효소활성으로 정의된다.

4) Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)와 isoelectric focusing(IEF)

단백질의 전기영동은 15% polyacrylamide gel을 사용하여 수행하였다. Anodic polyacrylamide gel은 Davis(1964)방법에 따라 1.5M Tris-HCl(pH 8.8)에서 완충시켰고, cathodic polyacrylamide gel은 Reisfeld 등(1962)의 방법에 따라 0.3M pottasium acetate buffer(pH 4.3)에서 완충하였다.

줄기 추출액에 있는 단백질의 isoelectric focusing은 제조업체(LKB)의 protocol에 따라 ampholine(pH 3.0-10.0)을 함유하고 있는 10% polyacrylamide gel에서 수행하였다. pI 3.6-pI 9.3범위내의 pI marker를 함께 전기영동하여 여러 가지 단백질의 pI값을 추정하였다.

5) 전기 영동 젤에서 β-1,3-glucanase와 chitinase isoform의 검색

전기 영동한 후에 PAGE gel을 50mM sodium acetate(pH 5.2)에서 20분동안 처리하였다. 그 후에 이 gel을 0.5% laminarin을 함유하고 있는 25mM sodium acetate(pH5.2)에서 37℃, 60분동안 배양하였다. Pan 등 (1989)의 방법을 사용하여 β-1,3-glucanase isoform의 band를 검색하였다.

전기영동이나 isoelectric focusing한 후에 glass plate에 접착된 gel을 0.1M sodium acetate(pH 5.2)에서 equilibrium시켰다. 그 후에 이들 gel위에 0.1M sodium acetate(pH 5.2)에 0.04%(w/v)glycol chitin을 함유하고 있는 7.5% (0.75mm 두께) polyacrylamide overlay gel로 싸아서 37℃에서 2시간동안 배양하였다. Overlay gel을 0.5M Tris-HCl(pH 8.9)에 있는 0.01%(w/v)fluorescent brightener 28에서 5분동안 실온에서 배양한다 (Trudel and Asselin 1989). Chitinase isoform은 UV transilluminator에 overlay gel을 놓으면 검색되었다.

6) 전기 영동후에 PR protein의 immunoblotting

Immunoblotting전에 SDS-PAGE가 15% SDS polyacrylamide gel에서 Laemmli(1970)방법에 따라서 수행되었다. 14.4-97.4 kDa의 분자량 marker를 5 mA의 일정한 전류에서 여러 가지 단백질의 분자량을 측정하기 위하여 함께 전기영동하였다.

Immunodetection을 위하여 SDS-PAGE에서 분리한 단백질을 6시간동안 nitrocellulose membrane에서 electroblotting하였다. 토마토의 β-1,3-glucanase, chitinase, PR-1 protein에 대한 항혈청을 네덜란드 Wageningen Agricultural University의 Dr. Joosten에게서 분양받았다. 그 blots을 blocking한 후에 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척하고 이들 antibody로 5시간동안 배양하였다. 다시 PBS로 세척하고 150mM NaCl과 50mM Tris(pH 7.5)용액에서 두 번 equilibrium한 후에 이들 blots에 goat anti-rabbit IgG(H+L)-alkaline phosphate-conjugate (1:5,000 희석)을 부가하여 1시간동안 배양하였다. Alkaline phosphatase반응을 위하여 substrate로서 BCIP와 NBT에서 배양한 후에 antigen이 검색되었다.

7) Capsidiol 정량

고추줄기조직 2g을 40% ethanol용액으로 추출한 ethyl acetate로 분획하였다. Ethyl acetate층에 있는 capsidiol을 gas chromatography를 이용하여 정량하였다(Hwang and Sung 1989).

8) Salicylic acid 정량

고추 줄기조직 1g을 90% methanol에 갈아서 12,000g에서 이 추출액을 원심분리하였다. 이 추출액에 있는 salicylic acid는 HPLC를 이용하여 fluorescence에 의하여 정량하였다(Raskin et al. 1989; Yalpani et al. 1991).

3. 결과 및 고찰

1) 고추 역병에 대한 BABA의 저항성 유도

제 1 분지기에서 1,000 ㎍/㎖ BABA처리후에 4일째 *P. capsici*접종한 고추 식물(품종 한별)에서 역병 진전을 조사하였다(Fig. 12). 역병은 접종후 2일만에 나타났고 역병균 접종전 BABA처리된 고추 식물에서 병발생이 현저하게 감소되어 75% 방제 효과를 보였다. 접종후 2일만에 접종된 고추 줄기 표면이 다소 갈색으로 되고 움푹 들어가기 시작하였다. *P. capsici* 감염으로 고추 줄기가 암갈색으로 변색되고 심하게 부패하였고 전체 식물이 갑자기 시들었다. 그러나 역병균 접종전에 BABA처리된 고추식물에서는 오직 감염된 부위에서만 암갈색 줄기 병반이 제한적으로 발생하였다.

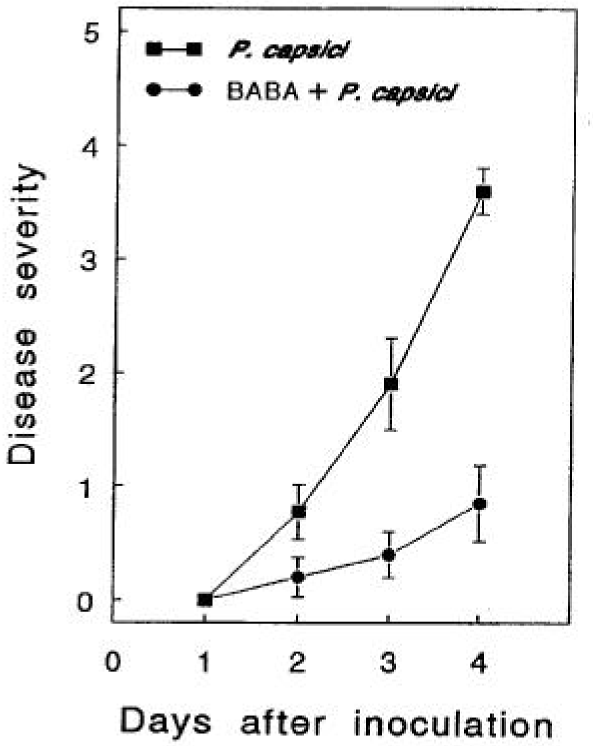


Fig. 12. Protection of pepper plants (cv. Hanbyul) at the first-branch stage against *Phytophthora capsici* infection by DL-β-amino-n-butyric acid. Plant were uniformly spray with 1,000 μg ml-1 of the compound and challenge- inoculated 4 days later on pepper stems. Vertical bars represent standard deviations.

2) 저항성 유도시 병저항성 관련 단백질의 역할

병생성관련 단백질로 알려져 있는β-1,3-glucanase**와** chitinase**활성을** BABA**가 처리되고 역병균이 접종된 고추식물에서 측정하였다**(Fig. 13). β-1,3-glucanase**와** chitinase**활성은 건전한 고추줄기에 낮은 수준으로 존재하였으나** BABA**처리된 줄기에서는 크게 이들 활성이 증가하였다. 특히 이들**

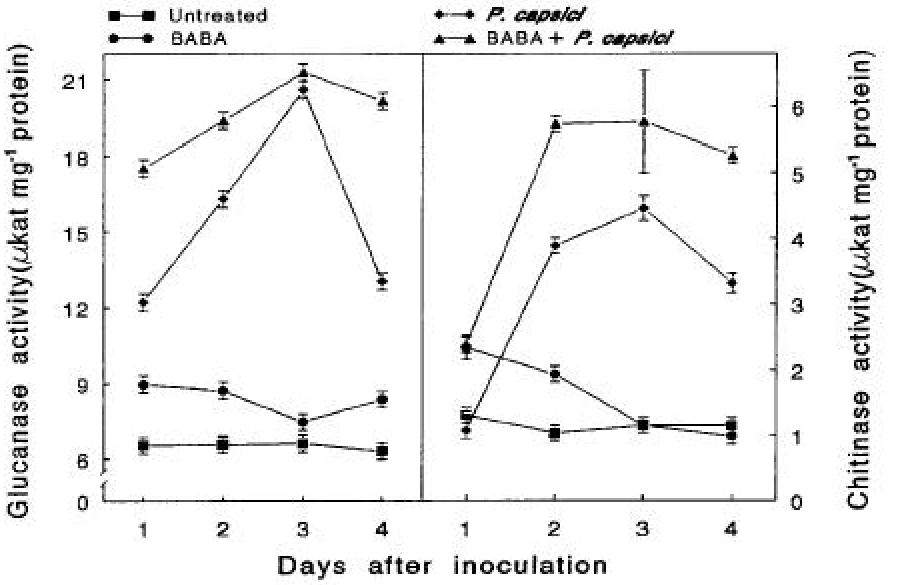


Fig. 13. Time courses of β-1,3-glucanase and chitinase activity in stem extracts from pepper (cv. Hanbyul) plants treated with 1,000 μg ml-1 of DL-β-amino-n-butyric acid and challenge-inoculated 4 days later with *Phytophthora capsici* at the first-branch stage. Vertical bars represent standard deviations.

활성은 BABA처리후에 역병이 감염된 고추 줄기에서 최대로 생성되었다. 흥미롭게도 BABA만 처리된 고추 줄기에서 상당한 수준의 이들 가수분해효소가 축적되었다. 이러한 실험결과는 BABA처리가 토마토식물에서 P14a, β-1,3-glucanase, chitinase같은 PR-protein을 높은 수준으로 축적시켰다는 Cohen 등(1994)의 연구결과와 일치하였다.

3) BABA에 의한 저항성 유도와 β-1,3-glucanase isoform활성

15% native PAGE gel을 사용하여 BABA처리후 역병균을 접종한 후 여러 시점에서 산성 및 염기성β-1,3-glucanase isoform을 고추줄기에서 조사

하였다(Fig. 14). 동일한 양의 단백질을 전기 영동 gel에 loading하였기 때문에 isoform band의 강도를 개개β-1,3-glucanase isoform의 특이적인 활성으로 간주할 수 있었다. 산성 β-1,3-glucanase isoform Ga1과 5 개의 염기성 β-1,3-glucanase isoform Gb1, Gb2, Gb3, Gb4, Gb5가 BABA 처리되고 역병균 접종된 고추줄기에서 발견되었다. 그러나 isoform Ga1과 Gb4는 처리되지 않고 감염되지 않은 대조구 고추줄기에서 낮은 수준으로 발생하였다.

산성 isoform Ga1의 활성은 오직 BABA처리되거나 접종되어 있는 고추줄기에서 매우 높았다. 염기성 isoform Gb1, Gb2, Gb3, Gb4의 활성은 BABA가 처리되고 접종되어 있는 고추줄기에서 높은 수준으로 발생하였다. 특히 BABA 처리후에 역병균이 감염된 고추줄기에서 isoform Gb5의 축적이 현저하게 높았다.

BABA처리와 역병균 감염시에 유도되어지는 β-1,3-glucanase의 등전점(pI)을 결정하기 위하여 감염 후 4일에 고추줄기에서 추출한 효소들은 pH 범위 3.0-10.0에서 10% IEF gel에서 isoelectric focusing을 하였다(Fig. 15). 산성 isoform(pI 5.2)과 4개의 염기성 isoform(pI 7.3, 8.8, 9.3, 9.5)을 IEF후에 발견하였다. BABA처리와 *P. capsici*감염후에 고추줄기에서 pI 5.2의 산성 isoform과 pI 8.8의 염기성 isoform이 유도되었다. pI 7.3, 9.3, 9.5의 염기성 β-1,3-glucanase isoform은 BABA처리되고 고추줄기에서 매우 낮은 수준으로 존재하였으나 BABA처리되고 역병을 접종한 고추줄기에서 비교적 높은 수준으로 발생하였다.

PAGE 와 IEF gel을 사용하여 β-1,3-glucanase의 상이한 isoform이 BABA처리시 고추식물에서 *P. capsici*에 대한 저항성 유도에서 중요한 역할을 하는지 확인할 수 있었다. 본 실험결과를 평가하여 볼 때 β-1,3-glucanase의 Ga1같은 어떠한 isoform이 BABA처리와 *P. capsici* 감염시 고추식물에서 유도 되었다.

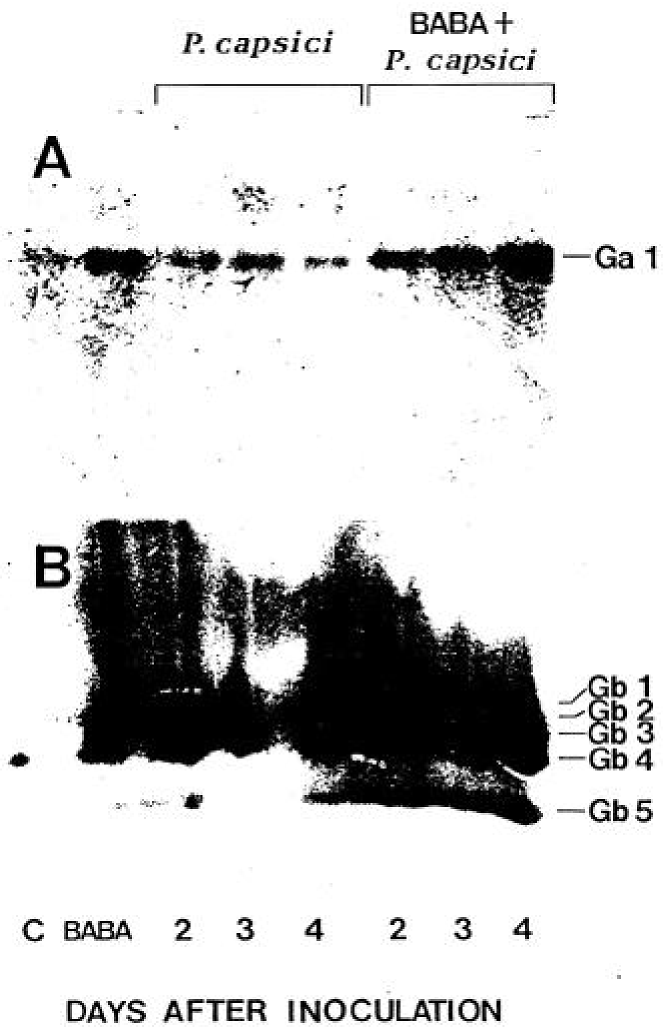
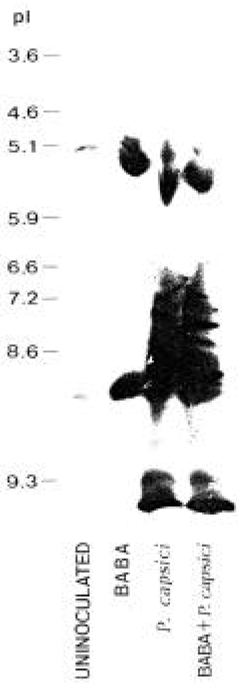


Fig. 14. Detection of acidic and basic β-1,3-glucanase isoforms after anodic (A) and cathodic (B) native polyacrylamide gel electrophoresis of stem extracts from pepper (cv. Hanbyul) plants treated with 1,000 μg ml-1 DL-β-amino-n-butyric acid and/or 4 days later challenge-inoculated with *Phytophthora capsici* at the first branch stage. Crude enzyme extracts (1 μg protein for anodic PAGE, and 5 μg protein for cathodic PAGE) were loaded on 15 % PAGE gels and stained for β-1,3-glucanase isoforms.

Fig. 15. Detection of β-1,3-glucanase isoforms after isoelectric focusing (pH 3-10) of stem extracts from pepper (cv. Hanbyul) plants treated with 1,000 μg ml-1 DL-β-amino-n-butyric acid and/or 4 days later challenge-inoculated with *Phytophthora capsici* at the first-branch stage. Crude enzyme extracts (22 μg protein) were loaded on the 10 % isoelectric focusing gels and stained for β-1,3-glucanase isoforms.



4) BABA에 의한 저항성 유도와 chitinase isoform 활성

BABA 처리되거나 역병 접종된 고추줄기의 추출물에서 산성과 염기성 chitinase isoform을 조사하였다(Fig. 16). BABA처리되거나 역병 감염된 고추에서 3개의 산성 chitinase isoform(Ca1, Ca2, Ca3) 과 8개의 염기성 isoform(Cb1-Cb8)이 발견되었다. 단지 3개 isoform Ca1, Ca2, Ca3만이 건전한 줄기와 BABA처리된 줄기에 낮은 수준으로 존재하였다. 그러나 isoform Ca3는 BABA처리시 고추줄기에 비교적 높은 수준으로 축적되었다. 감염된

고추줄기에서 BABA가 처리되거나 처리되지 않은 경우 모두에서 이들 Ca3 활성이 강하게 축적되었다. 특히 BABA 처리에 관계없이 역병에 감염된 줄기에서 염기성 isoform Cb3의 유도와 축적이 더 뚜렷하였다. BABA가 처리되고 감염된 줄기에서 다른 염기성 chitinase isoform이 비교적 높은 수준으로 유도되었다.

BABA 처리와 역병균 감염으로 유도된 chitinase isoform의 등전점을 결정하기 위하여 감염된 후 4일된 고추줄기의 추출효소액을 pH 범위가 3.0-10.0을 지닌 IEF gel에서 isoelectricfocusing을 행하였다(Fig. 17). Chitin overlay gel에서 3개의 산성(pIs 3.6, 4.1, 4.2), 7개의 염기성(pIs 7.2, 7.6, 7.8, 8.2, 9.0, 9.2, 9.4) chitinase isoform을 발견하였다. pIs 3.6, 4.1, 4.2, 9.0을 지닌 4개의 isoform이 시험된 모든 고추줄기에서 발견되었다. 역병균 접종전에 BABA로 처리된 접종된 고추줄기에서 현저하게 이들 효소의 활성이 증가되었다. 역병균에 감염된 고추줄기나 감염 전 BABA처리된 경우에서 몇가지 염기성 chitinase isoform 이 유도, 축적되었다. 염기성 isoform(pIs 9.2와 9.4)은 BABA처리에 의해서 감염된 줄기에서만 유도되었다.

Ca1과 특히 Ca3는 무처리되고 역병균 접종된 줄기에서 보다 BABA처리되고 접종된 줄기에서 더 많이 증가되었다. 이 결과는 친화적, 불친화적 상

Fig. 16. Detection of acidic and basic chitinase isoforms on overlay gel after anodic (A) and cathodic (B) native polyacrylamide gel electrophoresis of stem extracts from pepper (cv. Hanbyul) plants treated with 1,000 μg ml-1 DL-β-amino-n-butyric acid and/or 4 days later challenge-inoculated with *Phytophthora capsici* at the first-branch stage. Crude enzyme extracts (1μg protein) were loaded on 15 % PAGE gels.

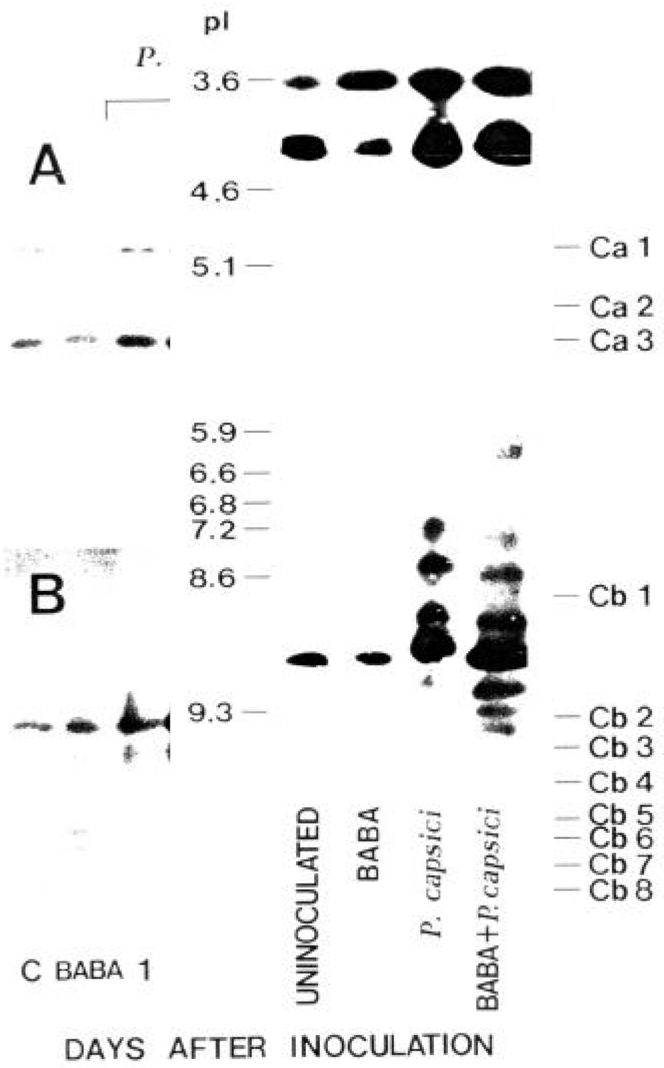


Fig. 17. Detection of chitinase isoforms on overlay gel after isoelectric focusing (pH 3-10) of stem extracts from pepper (cv. Hanbyul) plants treated with 1,000 μg ml-1 DL-β-amino-n-butyric acid and/or 4 days later challenge-inoculated with *Phytophthora capsici* at the first-branch stage. Crude enzyme extracts (5 μg protein) were loaded on the 10 % isoelectric focusing gels.

호작용에서의 차이와 비슷한 경향을 보였다(Kim and Hwang 1994). 그러나 BABA처리되거나 *P. capsici*감염된 고추줄기에서 개개 염기성 chitinase isoform이 강하게 유도되고 축적되는 것은 BABA가 처리되고 *P. capsici*접종된 고추줄기에 chitinase가 높은 활성으로 존재하는 토대가 될지 모른다. 또한 BABA는 고추식물에 유도저항성을 가져오는 병생성 반응에서 몇가지 염기성 chitinase isoform을 축적케 하는 것 같다.

5) BABA-역병균 상호작용에서 PR-protein의 immunodetection

PR-protein이 BABA에 의해서 유도되는지 평가하기 위하여 단백질 추출액을 western blot을 행하여 분석하였다(Fig. 18). 토마토 β-1,3-glucanase, chitinase와 PR-1 protein에 대해 얻어진 antiserum에 대해 cross-reaction 하는 단백질이 BABA처리되거나 역병균이 감염되어있는 고추줄기에서 발견되었다(Fig. 18A). 그러나 20kDa isoform β-1,3-glucanase는 BABA처리하거나 *P. capsici*감염에 의해서 고추줄기에 유도, 축적되었다. BABA처리된 모든 고추줄기에 69kDa chitinase는 구조적으로 발현되었다(Fig. 18B). 그에 반하여 32 kDa chitinase는 건전한 고추줄기에서 낮은 수준으로 발견되었으나 BABA처리되고 역병균 감염되거나 BABA처리 역병균 감염된 줄기에서 강하게 축적되었다. PR-1 protein의 항체와의 교차 반응에서 이에 상응하는 단백질이 역병균이 감염되거나 동시에 BABA처리하였을 때 크게 축적되었으나 BABA만 처리시 이 PR-protein이 생성되지 않았다(Fig. 18C).

고추 줄기에서 얻어진 단백질을 immunoblot분석한 결과 BABA처리나 *P. capsici* 감염후에 고추줄기에 β-1,3-glucanase, chitinase, PR-1 protein의 축적을 확인할 수 있었다. 특히, PR-protein이 저항성보다 역병 감염과정에서 관여한다고 사료되었다.

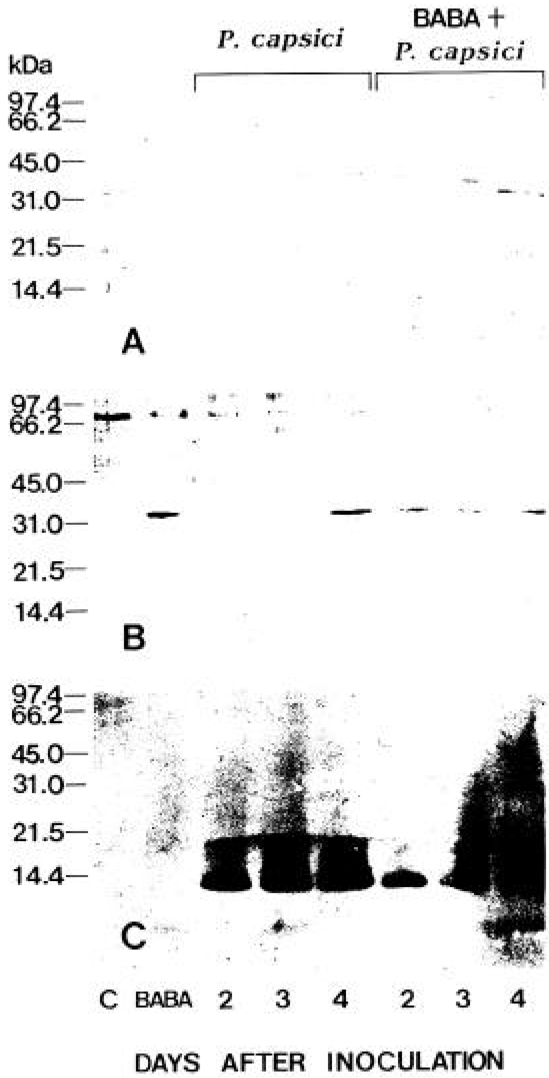


Fig. 18. Immunodetection of β-1,3-glucanase (A), chitinase (B), and PR-1 protein (C) in stem extracts from pepper (cv. Hanbyul) plants treated with 1,000 μg ml-1 DL-β-amino-n-butyric acid and/or 4 days later challenge-inoculated with *Phytophthora capsici* at the first-branch stage. Crude enzyme extracts (7 μg protein) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against β-1,3-glucanase, chitinase or PR-1 proteins of tomato, respectively.

6) BABA처리시 capsidiol과 salicylic acid생성과 유도저항성의 관계

BABA처리한 후에 여러 시간에 고추줄기에 capsidiol과 salicylic acid함량을 평가하였다(Fig. 19). 처리 후 5일을 제외하고는 BABA처리된 고추줄기에서 capsidiol의 농도는 건전한 무처리 고추줄기의 농도보다 다소 낮거나 비슷하였다. Salicylic acid양은 BABA처리후 5일에 대조구 고추줄기보다 BABA처리된 고추줄기에 4배 이상 축적되었으나 BABA처리후 시간이 경과함에 따라 다소 감소하였다.

역병균 감염 후에 여러 시간에 BABA가 처리되거나 접종된 고추줄기에서 capsidiol과 salicylic acid농도를 측정하였다(Fig. 20). BABA처리 또는 무처리된 고추줄기에서 capsidiol농도는 매우 낮은 수준이었다. 그러나 challenge 접종 후 3일과 4일에서 특히 BABA처리시 고추줄기에 강하게 capsidiol을 축적하였다. 단지 *P. capsici*감염 경우에 고추줄기에서 capsidiol 축적을 유도하였으나 BABA처리 경우에서 보다 축적이 다소 낮았다. BABA처리후 5일 고추줄기에서 salicylic acid농도가 다소 증가하였고 점차 무처리 수준까지 감소하였다. 그러나 salicylic acid축적은 단지 역병균 감염시 보다 더 뚜렷하게 증가하였고 challenge접종 후 3일에 최대가 되었다.

고추 식물에서 저항성을 유도하는데 BABA가 효과적이지만(Sunwoo et al. 1996) BABA를 처리하면 고추줄기에서 capsidiol 생성을 촉진시키지 않았다. 그러나, BABA처리는 *P. capsici*에 감염된 고추줄기에서 capsidiol생성을 강하게 촉진시켰다. 이러한 결과는 BABA자체가 고추식물에서 capsidiol 생산을 유도하지 않지만 역병감염에 반응하여 고추식물의 capsidiol합성능력을 증가시킴을 의미한다. 비슷한 현상이 침투성 살균제 metalaxyl을 처리하고 *P. capsici*에 접종한 고추식물의 줄기에서 capsidiol생성에 대한 이전의

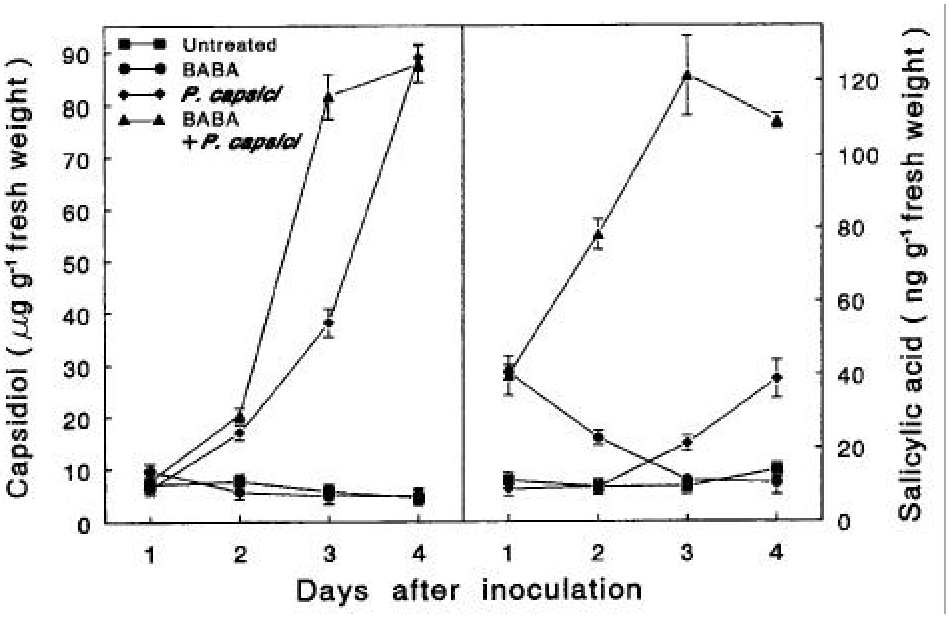


Fig. 20. Levels of capsidiol and salicylic acid in the stem extracts from pepper (cv. Hanbyul) plants at the first-branch stage treated with 1,000 μg ml-1 DL-β-amino-n-butyric acid (BABA) and/or challenged 4 days later with *Phytophthora capsici*. Vertical bars represent standard deviations.

연구에서 심도있게 분석되었다(Hwang and Sung 1989).

BABA**를 처리하면** *P. capsici***접종후** 3**일까지 고추줄기에서 약** 12**배의** salicylic acid(SA)**생성을 촉진시켰다. 이러한 결과에서** SA**는** BABA**처리시 고추식물에 역병저항성을 유도시키는데 결정적으로 중요한 내생적으로 합성되는 화합물임을 시사해 주고 있다.**

최근에 전신적 유도 저항성(systemic acquired resistance)**을 발현시키는데 신호전달**(signal transduction pathway)**에서 유일하게 확인된 단계가** SA **축적이라고 알려져 있다**(Malamy et al. 1990; Métraux et al.; Gaffney et al.

1993).

결론적으로 종합한다면 특정 β-1,3-glucanase와 chitinase isoform이 역병에 대한 BABA에 의한 유도저항성 반응에서 고추줄기조직에 유도, 축적되는 것 같다. BABA처리시 고추식물에서 역병 저항성이 유도되는 것과 고추줄기에서 β-1,3-glucanase, chitinase같은 몇가지 PR-protein과 내생적인 SA의 축적과 상관관계가 있었다. 본 연구에서 얻어진 데이타는 고추식물에서 역병에 대한 저항성의 특정 요인을 활성화시키고 PR-protein을 유도하는데 내생적 신호물질로서 SA가 역할하리라는 가설을 뒷받침해 준다. SA가 *P. capsici*-고추조합에서 알려져 있거나 알지 못하는 저항성 기작을 활성화시키는지 구명하기 위하여 더 심도 있는 연구가 요청되고 있다.

제 3 장 근권미생물을 이용한 고추역병 방제법의 개발

제 1 절 자연 토양내 고추역병 발생의 생태연구

1. 서 론

고추 역병의 발생은 기주식물이 가진 저항성 정도, 토양 및 기상을 포함한 환경, 그리고 병원균의 질적, 양적 상태와의 상호관계의 결과로 일어나는 것이다. 따라서 고추 역병을 생물학적으로 방제하기 위해서는 고추 근권에서 일어나는 위에 열거한 인자들간의 상호작용을 먼저 이해하지 않으면 안된다. 어떤 환경이 고추 역병의 발생을 촉진시키며 어떠한 상호작용이 역병발생을 억제하는가에 대한 정보없이는 성공적인 생물학적 방제방법의 개발은 불가능할 것이다.

근권 환경내의 여러 인자간의 상호작용을 인지하기 위해서 근권 토양에서의 물리적, 화학적, 생물학적 환경을 조사할 필요가 있으며 특히 고추 역

병균과 동일 서식처에서 생존하고 경쟁하고 있는 미생물의 동태에 대한 정보는 필수적이다. 또한 병원균을 포함한 미생물들이 기주식물이 생장함에 따라서 그 밀도가 어떻게 변하는지 그리고 기주식물의 이병유무와 관련하여 미생물상이 어떻게 변하는지에 대한 정보는 각 단계에서 병원균을 억제하는 미생물집단 생태를 연구하는데 핵심적인 요소가 된다.

2. 재료 및 방법

1) 고추 주산지 토양의 이화학성 검정

충북 음성, 경남 남지, 전북 임실지역의 고추 주산단지에서 지역별 5개 포장을 임의로 선정하여 포장당 3곳에서 표토(초3cm)와 심토(10cm)를 각각 500g씩 채취하여 잘 섞은후 농업과학기술원 토양관리과에 의뢰하여 토양의 이화학성을 표준조사법에 의하여 조사하였다. 경남 남지의 포장은 촉성재배 시설하우스 포장이었으며 음성과 임실의 포장은 일반 노지포장이었다. 토성은 사양토, 양토, 식양토, 사토로 나누어 조사하였으며 토양의 화학성은 토양산도, 유기질 함량, 유효인산 및 치환성 양이온량을 조사하였다.

2) 토양의 생물상 조사

경남 남지, 충북 음성, 전북 임실, 경북 의성지역 고추 재배포장에서 각 지역당 5개 포장을 선정하여 고추의 근권토양을 포장당 3곳에서 20-30g씩 채취하여 토양내 미생물상을 조사하였다. 표본의 채취는 재배작형과 상관없이 모든 포장에서 고추가 생육하고 있는 시기인 6월에 채취하였다.

미생물은 전세균, 전진균, 전방선균, 고추 역병균의 밀도를 조사하였으며 근권미생물의 대부분을 차지하고 있는 세균중에서 *Bacillus*, 형광성, 비형광성 *Pseudomonas* 밀도를 구분하여 조사하였다. 각 미생물들의 밀도는 주로 선택배지를 이용하였는데 희석농도별 선택배지의 효율을 알아보기 위하여

예비시험을 수행하였다. 선택배지로는 세균의 경우 YEA 배지와 EGG-AL 배지, 방선균의 경우 GSAA 배지, 진균의 검출에는 RBA 배지, *Bacillus*는 HP 배지와 MHM 배지를 사용하였고 *Pseudomonas*의 검출에는 형광성일 경우 MKB, 비형광성은 SNR 배지를 사용하였고 고추 역병균은 MK 배지를 사용하였다.

3) 고추 생육시기별 근권 미생물상 조사

고추의 생육 단계별 근권 미생물상의 변동상황을 경남 남지의 촉성재배 포장과 충북 음성, 전북 임실, 경북 의성의 노지재배 포장에서 표본을 채취하여 조사하였다. 촉성재배 포장은 근권토양을 앞서 설명한 바와 같이 정식 30일후인 2월과 생육기인 4월, 5월 6월에 채취하였으며 노지재배 포장에서는 정식기인 4월부터 한달 간격으로 8월까지 근권토양을 채취하여 선택배지상에서 각 근권균의 밀도변동을 추적하였다. 각 시료는 5반복하였다.

4) 근권환경과 고추역병 발생과의 상관조사

고추 역병에 걸린 포기와 건전한 포기에서의 근권내 미생물상을 조사하기 위하여 경북 의성지역에서 8월에 표본을 채취하여 조사하였다. 3개 포장을 임의로 선정하였으며 포장당 5개 포기를 임의로 선택하여 각각의 포기에서 근권토양과 근면토양을 채취하였다. 근권토양은 뿌리를 뽑아 흙을 털어버린후 뿌리에 붙어있는 토양을 근권토양으로 간주하였으며 근면토양은 뿌리에 붙어있는 흙덩어리를 완전 제거후 뿌리표면에 묻어있는 흙의 가루를 붓으로 긁어모은 것을 근면토양 표본으로 하였다.

고추의 생육기별 근권토양에서의 고추역병 전염원의 밀도를 5월, 6월, 8월에 조사하였다. 토양표본은 음성, 임실, 의성지역의 5개 포장에서 채취하였으며 *Phytophthora capsici*의 밀도는 선택배지를 이용하여 조사하였다.

역병 발생정도가 다른 포장에서 고추 근권내 미생물상을 조사하기 위하여 주산지당 3개 포장에서 역병 이병 단계별로 각각 근권토양을 채취하여 병원균 밀도와 함께 진균, 세균, 방선균, 형광/비형광성 *Pseudomonas*, *Baillus*의 밀도를 앞서의 방법대로 조사하였다. 역병 발생정도는 소발생(<1%), 중간발병(1-5%), 심한발병(10%≦)으로 나누어 포장을 선택하였다.

역병 발생정도로 보아 적은 발병(<1%)와 심한발병(10≦) 포장의 이화학성을 조사하기 위하여 남지, 임실, 의성지역에서 지역당 3개 포장을 선정하여 전항에서 설명한 방법대로 토양표본을 채취하여 토성, 산도, 유기물 함량, 치환성 양이온 등을 조사하여 비교하였다. 고추역병 발생과 기상요인과의 상관을 조사하기 위하여 기상요인중 고추역병 발생과 가장 관련이 깊은 온도와 강우량을 선정하여 역병의 발병추이와 비교하였다. 온도는 5월부터 9월까지의 일일 평균온도를 산출하여 사용하였으며 강우량은 누적 강우량을 산출하여 비교하였다. 고추역병의 발생소장은 전북 임실지역에서 5개 포장을 선정하여 재배기간중 평균 발생소장을 조사하였다.

5) 근권미생물의 분리 및 보관

시험기간중 토양미생물상 조사에서 검출된 미생물을 순수 분리하여 PDA 배지와 NA 배지에 배양하여 기본 균주들은 동결 건조시켜 보관하여 차후의 시험에 공시하였다. 검출 미생물들은 검출지역별로 미생물의 종류별로 나누어 보관하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 주산지 토양의 이화학성

고추 재배지의 토성은 사양토 식양토 토성이 대부분이었으나 전북 임실지역의 토성이 충북 음성, 경남 남지에 비해 점질토의 성분이 많고, 낙동강

강변 지역인 남지의 경우는 사양토 포장이 대부분이었다(Table 1).

고추 재배지 토양의 pH는 평균 5.5 6.0이었으며 유기물 함량은 2.1 3.0%, 인산함량은 500 700ppm 이었고, 양이온 함량은 성분에 따라 0.1 4.4me/100g 의 범위였다. pH, 유기물 함량은 음성지역 포장이 임실, 남지보다 약간 높았고 인산함량이나 치환성 양이온은 남지지역에서 낮은 경향이었다. 임실지역은 충북 음성과 비슷하게 나타났다. 이상의 수치로 보면 3개 고추 주산단지의 화학성은 큰 차이가 없었으나 토성에 있어서는 지역적인 차이를 보였다.

2) 주산지 토양의 생물상

미생물별로 선택배지의 정량효율을 보면 세균의 경우 EGG-AL이 YEA보다 우수하게 나타나고 있으며 방선균은 10^{-6}의 토양희석농도가 적당하였다(Table 2). 진균의 RBA 배지에서 10^{-4}이 적합한 희석농도로 밝혀졌고 *Bacillus*의 검출은 HP 배지에서 10^{-4}의 희석농도가 검출에 알맞은 농도로 나타났다. 형광 및 비형광성 *Pseudomonas* 의 검출은 10^{-3}과 10^{-4}이 적당하였고 MKB, SNB 배지 사용이 가장 우수한 것으로 나타났다.

고추 역병균은 그동안 검출방법에 많은 논란이 있어 왔으나 본 연구에서는 MK 배지에서 토양 표본을 희석없이 그대로 사용하는 것이 가장 적당하였다. 고추 역병균은 토양내 밀도가 매우 낮기 때문에 현재까지 정량방법에 많은 곤란이 있었다. 그러나 본 연구에서 Ko 등의 방법을 개선하여 역병균의 토양내 밀도를 정량할 수 있는 방법을 개발하여 사용하였다.

주산지 토양내 미생물상을 보면 근권토양에서는 지역과 상관없이 세균의 밀도가 g 토양당 10^{7}cfu 수준으로 가장 높고 진균, 방선균, 비형광성 *Pseudomonas*, *Bacillus*의 밀도가 10^{5} 10^{6}cfu 수준으로 중간이었으며 형광

성 *Pseudomonas*의 밀도는 10^3 10^4cfu 수준으로 가장 낮게 나타나고 있다 (Table 3). 지역별로 보면 남지와 음성지역의 진균, 방선균, 세균, 형광성/비형광성 *Pseudomonas*, *Bacillus*를 포함한 근권미생물상은 매우 유사하였으나 임실과 의성지역에서는 진균과 방선균을 제외한 세균, 형광성/비형광성 *Pseudomonas*, *Bacillus* 밀도가 남지, 음성지역에 비해 다소 낮게 나타나고 있다. 이와같이 지역별로 미생물상에 약간의 차이가 보이는 것은 재배지역의 작부체계나 토성, 유기물 시용을 포함한 경종관리 방법이 다소 다르기 때문에 나타나는 현상으로 보인다.

Table 1. Physico-chemical environments of rhizosphere soil of pepper plants in major production areas

Geographical area	Cultivation type	Frequency(%)			pH	O.M (%)	P_2O_5 (ppm)	Exchangeable cation(me/100g)			
		Sandy loam soil	Loam soil	Silty loam soil				Ca	Mg	K	Na
Umsung	Open field	20	60	20	6.0	3.0	508	4.00	1.70	1.69	0.20
Namji	Vynil-house	100	0	0	5.5	2.1	668	3.30	0.96	0.92	0.10
Insil	Open field	0	60	40	5.5	2.1	490	4.40	1.20	1.55	0.26

* Values are means of 5 fields sampled.

Table 2. Detection efficiency of selective media for various microorganisms from rhizoplane and rhizophere soil

Dilu - tion rate	Total bacteria		Total actinomyces	Total fungi	*Bacillus*		Fluorescent *Pseudomonas*	Non-fluorescent *Pseudomonas*	*Pythophthora capsici*
	YEA	EGG-AL	GSAA	RBA	HP	MHM	MKB	SNR	MK
10-7	6.0	13.0	-	-	-	-	-	-	-
10-6	40.0	70.7	32.0	-	-	-	-	-	-
10-5	285.7	241.3	79.0	5.7	-	35.3	-	12.9	-
10-4	-	-	-	37.3	29.7	-	-	60.4	-
10-3	-	-	-	182.3	-	-	5.0	240.6	-
10-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 0	-	-	-	-	-	-	-	-	3.8

* YEA : Yest extract, ECG-AL : Egg-albumin agar, GSAA : Glucose-starch-asparaine agar, RBA : Rose-bengal agar, HP : Heat and pepton agar, MHM : Mundt and hinkle medium, MKB : Modified King's B modium, SNR : Sorbitol neutral red, MK : Modified Ko medium.
* Values indicate log cfu/g soil.

Table 3. Status of biological properties of rhizosphere soil of pepper plants in major production areas

Microbe group	Density (log cfu / g soil)			
	Namji	Umsung	Imsil	Euisung
Fungi	5.11	4.67	5.14	5.65
Actinomyces	5.14	5.44	5.20	5.15
Bacteria	7.52	7.28	6.82	6.78
Fluorescent *Pseudomonas*	4.21	4.29	3.60	3.48
Non-fluorescent *Pseudomonas*	5.77	5.73	4.56	5.16
Bacillus	5.93	5.97	4.99	4.97

* Values are means of five soil samples taken in June from pepper fields.

3) 고추 생육시기별 근권미생물상의 변동 추이

촉성재배지 시설하우스 포장내의 고추 근권내 미생물상의 변동을 생육시기별로 보면(Table 4), 진균과 세균의 경우는 고추 생육시기와 상관없이 g 토양당 각각 10^5cfu와 10^7cfu 수준으로 시기적으로 밀도에 큰 변동이 없는 것으로 나타나고 있다. 방선균과 *Bacillus*의 밀도는 고추 생육초기(2월)에 높았다가 생육중기인 4, 5월에 다소 감소하고 생육후기인 6월에는 다시 증가하는 경향을 보이고 있다. 형광성 *Pseudomonas* 세균의 밀도는 생육후기에 달하면 두배 이상으로 급격히 증가하였으며 반대로 비형광성 *Pseudomonas*의 밀도는 생육초기에 높았다가 생육후기로 갈수록 감소하여 흥미로운 현상을 보였다. 역병발생과 관련하여 보면 역병발생이 많아지는 생육후기에 있어서 근권내 형광/비형광성 *Pseudomonas* 세균의 이와 같은 일관성 있는 증감은 역병균의 전염원에 어떤 영향을 주고 있을 가능성이 있어 이에 대한 연구를 계속 추진하였다.

Table 4. Temporal change of density of rhizosphere microorganisms of pepper plants growing in plastic-film houses at Namji, Kyungnam province

Microbe group	Density (log cfu / g soil)			
	Feb	Apr	May	Jun
Fungi	5.06	4.85	5.10	5.11
Actinomyces	6.71	3.63	4.67	5.14
Bacteria	7.32	7.07	7.54	7.52
Fluorescent *Pseudomonas*	1.57	1.04	2.93	4.21
Non-fluorescent *Pseudomonas*	7.15	6.41	5.53	5.77
Bacillus	5.84	4.27	4.61	5.93

* Growing period : Feb to Jun. Values indicate averages of five fields.

노지재배 포장의 미생물상의 경시적 변동상황을 보면 전진균과 전세균의 밀도는 생육기간동안 변화가 적은 것으로 나타나고 있으며(Table 5) 반면에 방선균과 *Bacillus*의 밀도는 생육중기 이후 뚜렷이 증가하였다. 형광성 *Pseudomonas*는 촉성재배지와 마찬가지로 노지재배지에서도 생육후기에 급격히 증가하였으며 비형광성 *Pseudomonas*는 고추 생육초기에 비하여 후기에 갈수록 점차 감소하는 경향을 보여 촉성재배지의 경우와 비슷한 양상을 보였다. 따라서 고추 역병의 증감과 *Pseudomonas*속 세균의 증감간에는 어떠한 관련성이 있는 것처럼 생각되었기 때문에 후속 연구는 다른 미생물보다 *Pseudomonas*속 미생물을 중심으로 연구가 수행되었다.

이상의 결과를 보면 하우스 포장과 노지포장간에 환경의 차이에서 오는 미생물의 경시적인 밀도변화에 다소 차이가 있음에도 불구하고 ① 진균과 세균의 경시적인 밀도변화는 적었고 ② 방선균과 *Bacillus*속의 밀도는 생육후기로 갈수록 높아지며 ③ 형광성 *Pseudomonas*속 세균들은 생육후기로 갈수록 그 수가 급격히 증가하고 비형광성 *Pseudomonas*의 밀도는 반대로 감소하는 경향을 볼 수 있었다.

Table 5. Temporal changes of density of rhizosphere microorganisms of pepper plants in fields at Umsung, Chungbook province

Microbe group	Density (log cfu / g soil)			
	Apr	May	Jun	Aug
Fungi	4.78	4.81	4.67	4.00
Actinomyces	2.14	4.73	5.44	5.20
Bacteria	6.75	7.39	7.28	6.60
Fluorescent *Pseudomonas*	1.82	2.86	4.29	4.00
Non-fluorescent *Pseudomonas*	6.22	5.49	5.73	5.20
Bacillus	5.26	4.56	5.97	5.66

* Sampling dates are Apr 9, May 27, Jun 27, and Aug 12. Values are means of five fields.

4) 근권환경과 역병 발생정도와의 상관

고추 역병에 걸린 이병주와 건전주와의 미생물상을 비교하여 보면 (Table 6) **진균의 밀도는 건전주 근면에서 현저히 낮고 세균의 밀도는 이병주, 건전주간 비슷하였으나 근권보다는 근면에서 높게 나타나고 있다. 방선균과** *Bacillus***의 밀도는 이병주/건전주, 근권/근면간에 큰 차이가 없었으나 형광성** *Pseudomonas***의 밀도는 이병주보다 건전주 근권에서 현저히 낮은 경향이고 근면에서는 검출되지 않았다. 비형광성** *Pseudomonas***의 밀도는 반대로 건전주에서 현저히 높고 근권보다는 근면에서 높은 경향이었다. 이상의 결과를 보면 앞서의 고추 생육시기별 미생물의 동태변화에 나타나는 바와 같이 발병이 많아지는 생육후기에 비형광성** *Pseudomonas***의 밀도가 감소하는 현상은 비형광성** *Pseudomonas***들에 의하여 고추 역병균이 억제될 수 있다는 가능성을 시사하고 있어 매우 흥미롭다.**

Table 6. Comparison of density of rhizosphere and rhizoplane microorganisms of pepper plants infected and non-infected with Phytophthora blight in fields

Microbe group	Infected		Average	Healthy		Average
	Rhizo-sphere	Rhizo-plane		Rhizo-sphere	Rhizo-plane	
Fungi	5.05	4.88	4.96	5.01	0.10	2.56
Actinomyces	6.80	6.19	6.50	6.79	6.38	6.58
Bacteria	7.31	8.65	7.98	7.39	8.50	7.94
Fluorescent *Pseudomonas*	1.33	0	0.66	0.72	0	0.36
Non-fluorescent *Pseudomonas*	7.25	7.49	7.37	8.81	9.83	9.32
Bacillus	5.91	5.95	5.93	5.71	5.73	5.72

* Values are averages of three samples taken from Euisung, Kyungbuk province in August.

고추 역병균 전염원의 경시적인 동태를 보면(Table 7) 3**개 지역모두 역병 발생초기**(5**월**)**보다 중기**(6**월**)**에 현저히 증가하였다가 발병후기**(8**월**)**에 급격히 다시 감소하는 추세를 보였다**. 8**월의 역병균 전염원이 급격히 감소하는 이유는 정확히 알 수 없으나 그동안 남아있는 토양내** 1**차 전염원이 모두 발아하여 소실되고 후기 감염은 주로 지상부에 새로 생긴 제** 2**차 감염에 의하여 주로 발생하기 때문으로 생각된다**.

지역별로 보면 병발생 초기 밀도는 충북 음성지역에서 다소 높은 경향이나 그후 발병중기에는 비슷하여 졌다가 발병후기에 다소 감소하는 경향이었고 의성지역의 감소폭이 음성이나 임실지역에 비해 적게 나타나고 있다. **이와 같이 고추역병 전염원의 토양내 밀도를 정량할 수 있게 된 것은 고추역병의 토양생태연구에 걸림돌을 제거한 것으로 향후의 고추를 포함한 기타작물의 역병연구에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다**.

Table 7. Temporal change of density of *Phytophthora capsici* in field soil in major production areas

Geographical region	Density (log cfu / g soil)		
	May	Jun	Aug
Umsung	0.278	0.644	0.075
Imsil	0.148	0.525	0.085
Euisung	0.170	0.695	0.300

* Values are averages of 5 fields.

역병 발생정도와 토양 미생물상과의 관계를 보면(Table 8) 역병 발생이 낮은 포장일수록 토양내 역병균의 밀도는 낮게 나타나고 있으며 토양내 역병균의 밀도가 10cfu/g 토양 이상일 때 10% 이상의 높은 발병을 보이고 있다. 진균, 세균, 방선균의 밀도는 역병 발생심도별로 일관성 있는 차이가 없었으나 *Bacillus* 균의 밀도는 발병이 심한 포장에서 다소 증가하는 경향이 있었다. 형광성 *Pseudomonas*의 밀도는 발병이 적은 포장에서 현저히 낮고 비형광성 *Pseudomonas*의 밀도는 높은 경향으로 *Pseudomonas*속 세균의 근권내 증감은 역병 발생정도와 일관성 있는 경향을 보이고 있다.

역병 발생정도와 토양의 이화학적 환경과의 관계를 보면 발병이 심한 포장일수록 양토의 빈도가 높고 사양토의 빈도가 낮게 나타나고 있는데(Table 9) 이것은 토양의 물빠짐 정도와 상관하고 있는 것으로 물빠짐이 나쁜 점질토에서 수생균인 역병균의 활성이 높았기 때문으로 생각된다. pH, 유기물 함량, 인산, 치환성 양이온량 등의 토양화학성은 소발병 포장과 심한 발병을 보이는 포장간에 큰 차이가 없었다.

Table 8. Comparison of biological status of microorganisms in rhizosphere soil of pepper plants with respect to severity of Phytophthora blight

Severity of Phytophthora blight	Density (log cfu / g soil)						
	Phytophthora capsici	Fungi	Bacteria	Actinomyces	Fluorescent *Pseudomonas*	Non-fluorescent *Pseudomonas*	*Bacillus*
< 1%	-0.240	3.47	6.84	4.96	0.11	6.26	5.32
1-5%	0.075	5.40	7.21	4.83	1.00	5.83	5.68
10%≤	1.108	3.24	6.64	4.91	1.26	5.71	5.87

* Values are averages of 3 fields. *Phytophthora capsici* was from non-rhizosphere soil, and others from rhizosphere soil.

Table 9. Physico-chemical properties of rhizosphere soil of hot pepper plants with respect to severity of phytophthora blight in major production areas

Severity of Phytophthora blight	Frequency of soil texture		pH	O.M (%)	P_2O_5 (ppm)	Exchangeable cation(me/100g)			
	Sandy loam	Loam				Ca	Mg	K	Na
≤ 1%	29	47	5.9	2.0	534	4.81	1.74	1.32	0.28
10% ≤	18	60	5.8	2.2	496	5.12	1.72	1.27	0.26

* Values are means of soil samples taken from Namji, Imsil and Euisung areas.

기상요인에 따른 역병 발생추이를 보면 고추역병의 발생은 5**월 초순부터 시작하여 기온이 높고 강우가 많은** 7**월**, 8**월동안 급격히 증가하여** 8**월 중순에 발병주율이** 26.5%**에 달하였다**(Fig. 1). **일일 평균기온이** 15℃ **이상이 되는** 5**월 중하순부터 발생이 증가하기 시작하여 기온의 상승폭이 커지는** 7**월** 8**월에 발병율이 급격히 상승하였다**. 6**월 초순** 7**월 하순의 장마기간동안 많은 강우도 이 기간의 높은 기온과 함께 발병을 증가시키는 주요 요인으로 생각된다**.

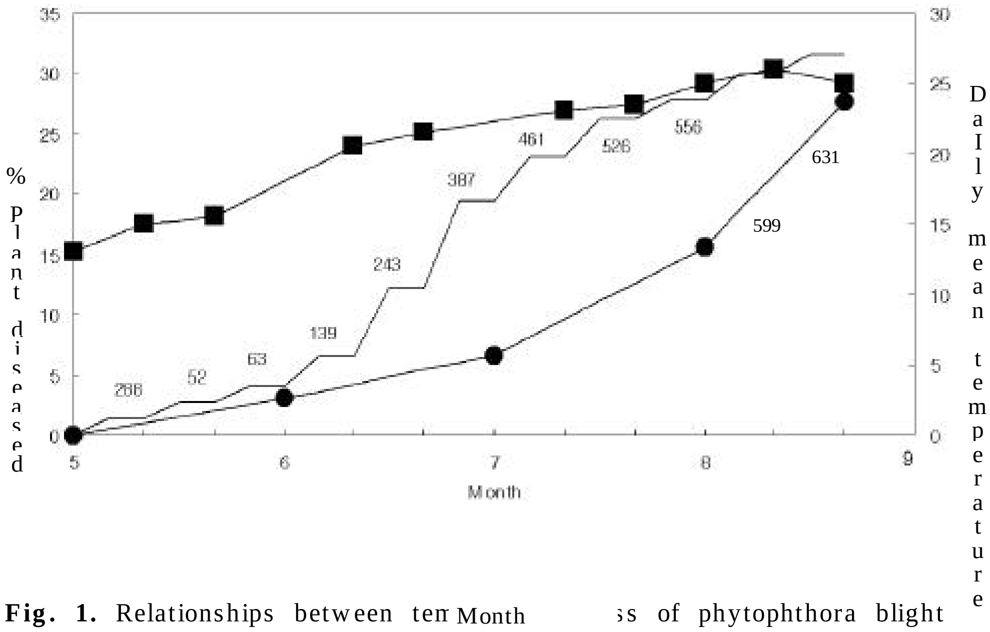


Fig. 1. Relationships between tem Month ss of phytophthora blight on pepper plants and daily average temperature and culmulative rainfall amount during growing seasons.

주산지역 고추 근권에서 분리한 미생물을 그 종류별로 보면 진균이 156 균주 세균 67균주, 방선균 92균주, *Pseudomonas* 364균주, *Bacillus* 180개 균주 등 모두 859균주를 분리하였고 보관하고 있고 지역별로는 177개 균주에서 248 균주를 분리하였다 (Table 10).

Table 10. Number of microorganisms obtained from rhizosphere soil of pepper plants in major production areas

Areas sampled	No. isolates obtained					Total
	Fungi	Bacteria	Actinomyces	*Pseudomonas*	*Bacillus*	
Namji	35	15	14	84	40	188
Umsung	27	18	18	111	72	246
Imsil	41	19	29	75	13	177
Euisung	53	15	31	94	55	248
Total	156	67	92	364	180	859

제 2 절 근권균 생태 및 고추역병의 방제효과 연구

1. 서 론

앞절에서의 자연 토양내 고추역병 발생의 생태연구에서 고추 역병과 가장 관련이 깊은 요인들이 많이 있으나 그 중에서도 근권에 서식하고 있는 *Pseudomonas*속 세균이 고추역병의 발병정도와 지속적인 상관관계를 보이고 있는 것으로 나타나고 있다. *Pseudomonas*속 세균들은 작물의 근권에 살고 있으며 그 종류에 따라 작물의 생육을 억제하거나 병원균의 활동에 참여하여 복합적으로 병을 일으키는데 공헌하는 유해한 종류가 있고 한편으로 병원균의 생존증식을 억제하는 성질과 함께 생리활성물질을 분비하여 작물의 생장을 촉진하는 유익한 균들도 있다. 후자의 균들은 PGPR(작물생육촉진근권세균) 균주들로 최근 미국에서 관심을 가지고 연구되고 있다. PGPR 균들은 모든 환경조건에서 그 활성을 보이는 것이 아니고 환경이 적합할 때 PGPR균이 가진 병원균 억제현상이나 생육촉진현상이 나타나고 있는데 이러한 활성들이 주로 항균물질의 분비나 생육촉진물질의 분비에 의하여 주도되

고 있다.

제 1차년도의 연구결과 얻어진 총 323 *Pseudomonas*속 균주들은 고추역병균이나 고추작물체에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 그 활성이 검정되어 유해균과 PGPR균 또는 그 중간 균주로의 구분이 필요하며 유익한 균들 중에서는 고추 역병균에 대한 억제활성이 가장 높고 고추 근권에서 안정적으로 생존할 수 있는 균이 가장 바람직한 균으로 생각될 수 있을 것이다. 또한 PGPR 균이 그 활성을 계속적으로 발휘할 수 있는 환경을 동정하여 농가포장에서도 가능하면 이러한 포장환경 조건을 만들어 주어야 생물학적 방제방법이 성공할 수 있을 것으로 생각되어 2년차 연구에서는 분리한 *Pseudomonas* 균주들의 고추 역병균과 고추작물의 생장에 대한 활성을 조사하였으며, 활성이 우수한 균주를 대상으로 고추 근권에서의 정착력을 검정하였고 근권 정착력에 미치는 토성, 온도, 토양수분 등의 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

1) 근권균의 고추 역병균에 대한 활성조사

제 1차년도의 연구결과 얻어진 *Pseudomonas*속 세균 323 균주를 대상으로 고추 역병균 *Phytophtora capsici*에 대한 생장억제효과를 조사하기 위하여 공시 균주들을 PDB에 24시간 배양하여 현탁액을 만들었다. 살균 여과지 원반(직경 0.5cm)을 공시균주의 현탁액에 적셔 PDA 배지에 한 샤레(직경 9cm)당 5개씩 가장자리에 배열하고 그 중심에는 고추 역병균의 배양편을 올려놓아 28℃에 3일간 배양한 후 여과지 주변에 생긴 억제반경을 조사하였다. 한 균주당 3반복하였다.

1차 시험에서 고추 역병균에 대해 억제활성이 있다고 인정되는 13개 균주들을 대상으로 2차 시험을 반복 수행하였으며 시험방법은 1차 시험과 동일하였다. 2차 시험에서는 두 번에 걸쳐 시험하였으며 3반복하였다. 13개 균

주들은 Biolog program을 사용하여 종명을 동정하였고 상관도가 낮거나 활성이 저조한 균주들은 더 이상의 종명동정을 진행하지 않았다. 활성의 검정결과 고추 역병균의 생육억제효과가 가장 우수한 3균주를 선발하여 차후 시험에 공시하였다.

2) 근권균의 고추 생육에 대한 활성조사

고추 역병균의 생장억제효과가 뚜렷한 221-5F, 950923-29, PCAC2 등 3균주를 공시하여 고추 생장에 대한 효과를 조사하였다. 공시 3균주는 PDA에 24시간 배양하여 그 농도가 10^7cfu/㎖이 되도록 현탁액을 조제하였으며 고추품종 한별의 종자를 현탁액에 파종하여 온실에 두고 생장을 관찰하였다. 모두 4-5회의 독립된 시험을 반복적으로 실시하였으며 각 시험 균주당 5반복하였다. 파종 30일후 고추를 폿트에서 수거하여 물에 씻어 피트모스를 제거하고 주근길이와 생체중을 조사하였다.

3) 근권균의 고추 역병 방제효과 시험

직경 9cm 높이 12cm의 프라스틱 폿트에 살균된 피트모스를 담고 한별고추 유묘(30일 묘)를 폿트당 1주씩 재식하여 온실에 두고 2차 분지기가 될 때까지 육묘하였다. 역병균(*Phytophthora capsici*)은 PDA 배지에 4일간 배양한 후 기중균사를 긁어 제거한 후 살균수를 채워 4℃ 냉장고에 정치하여 유주자 형성을 유도하였고 24시간후 유주자 농도가 10^3개/㎖이 되도록 접종원 현탁액을 조제하였다. 공시 근권균을 앞서의 방법대로 10^7cfu/㎖이 되도록 2차 분지기에 달한 고추 유묘에 폿트당 10㎖씩 현탁액을 관주하여 시용하였다. 공시 근권균의 예방효과를 보기 위하여 공시균 관주후 2일후 역병균의 현탁액을 폿트당 1㎖씩 접종하여 온실에 두고 발병을 관찰하였다. 두 번에 걸친 독립된 시험에서 1차 시험은 5반복하였고 2차 시험은 균주당 10반

복하였다. 발병은 최초 발병 확인후 일정간격으로 4회 조사하였다. 공시 근권균의 역병에 대한 치료효과를 조사하기 위하여 역병균 현탁액을 앞서의 요령대로 근권균 접종보다 2일 앞서 고추 유묘에 관주하였으며 기타의 사항은 예방효과의 시험과 동일하게 수행하였다.

포장에서의 근권균의 고추 역병 억제효과는 수원에 소재한 농업과학기술원 시험포장에서 조사하였다. 근권균의 접종은 피트모스와 밀기울을 9:1로 섞은 고추 육묘용 상토에 배양하는 방법으로 수행하였으며 고추 품종은 한별을 사용하였고 표준 경종방법에 준하여 고추를 재배하였다. 처리는 근권균 3균주와 대조약제로 리도밀동 처리구를 두었으며 약제는 7월 초순부터 15일 간격으로 3회 처리하였고 근권균은 앞서 설명한 방법으로 1회 시용하였다. 시험구의 크기는 구당 68주로 하였으며 난괴법 3반복으로 시험을 수행하였고 8월 5일, 8월 18일, 9월 18일에 전주를 대상으로 발병주율을 산출하였다. 고추는 온실에서 육묘하여 5월 7일에 포장에 정식하였으며 발병이 저조하여 7월 25일날 역병균의 배양편을 고추의 땅가줄기에 8주당 1주씩 부착하는 방법으로 포장에 병원균을 접종하고 발병을 유도하였다.

4) 근권균의 토양내 정착력 검정

2차 분지기에 달한 한별고추 유묘를 대상으로 공시 근권균 3균주의 고추 근권내 정착력을 온실에서 조사하였다. 공시균의 현탁액은 앞서 설명한대로 조제하였으며 폿트에 재식한 2차 분지기의 고추 유묘에 관주 접종하고 접종시부터 10일 간격으로 60일까지 고추 근권과 근면에서의 밀도변화를 조사하였다. 근권 밀도를 조사하기 위하여 고추뿌리를 1g 채취하여 살균수에 희석하고 선택배지를 사용하여 그 밀도를 조사하였다. 밀도조사를 위해 공시 균주는 Rifampicin 내성균주를 작출하여 사용하였다. 근면밀도는 1g의 고추뿌리를 3회 살균수에 희석한 후에 잔류한 공시균의 밀도를 규정하여 시험하였

다. 각 균주당 5반복하였다.

포장시험중에 배양토에 접종한 공시균의 밀도도 정식시인 5월부터 9월까지 30일 간격으로 조사하였다. 그 조사방법은 온실시험과 동일하였으며 근권 밀도만을 조사하였다.

5) 근권 정착에 미치는 환경요인의 영향 조사

공시한 3개 균주의 고추 근권 정착에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 2차 분지기에 달한 폿트육묘 고추에 공시균의 현탁액을 앞에서 설명한 방법대로 관주 접종하고 20℃, 25℃, 30℃, 35℃의 생육상에 두었다. 공시균의 근권밀도는 접종 10일부터 10일 간격으로 3회 조사하였으며 조사방법은 전항의 방법과 동일하다. 균주당, 온도당 3반복하였다.

근권균의 정착에 미치는 토양수분의 효과를 조사하기 위하여 배수구멍이 없는 50,000분의 1 와그너 폿트에 토양을 담고 그 수분량이 토양의 최대 용수량의 40%, 60%, 80%, 100%가 되도록 조절한 후 한별고추 유묘를 이식하였다. 이식 2일후 공시균의 현탁액을 관주 접종하였으며 토양의 증발을 막기 위하여 폿트의 표면은 검정 비닐 시트로 덮어 햇볕을 차양한 온실에 두었다. 근권균의 밀도는 관주 접종시 10일후부터 10일 간격으로 3회 조사하였으며 시험은 3반복하였다.

근권균의 정착에 영향하는 토양조성의 효과를 조사하기 위하여 모래, 버미큐라이트, 부농상토, 일반토 등 4종의 토양을 공시하였다. 한별고추 30일묘를 14일후 공시균의 현탁액을 관주 접종하고 접종 10일후부터 10일 간격으로 3회 공시균의 밀도를 같은 요령으로 조사하였다.

6) 고추 품종별 근권균의 활성검정

근권균의 고추역병 방제효과가 품종별로 특이성이 있는지의 여부를 조사

하기 위하여 근권균의 접종방법을 달리하여 다복, 한별, 다조아 고추를 공시하여 온실에서 시험하였다. 고추 각 품종들의 유묘는 9cm×12cm 폿트에 이식하여 육묘하였으며 1차 분지기에 달한 고추 묘를 시험에 사용하였다. 근권균 950923-29 균주는 PDB 배지에 24시간 배양하여 10^7cfu/㎖의 농도로 조절하여 접종원으로 사용하여다. 근권균의 접종은 피트모스에 접종하여 30일간 배양한 배양상토의 형태로 근권균과 현탁액을 고추 지제부에 주당 10㎖씩 접종한 관주접종의 형태로 나누어 시험을 수행하였다. 근권균 접종방법별, 품종별로 9반복하였다. 근권의 접종 9일째인 5월 15일부터 5-6일 간격으로 발병주수를 기록하고 발병주의 땅가줄기의 변색부위(병반)의 길이를 조사하여 평균하였다. 대조약제로는 리도밀동수화제 1,000배액을 사용하였으며 근권균의 관주접종의 경우처럼 주당 10㎖를 고추 주원에 관주하였다.

7) 근권균의 활성에 미치는 경종관리 영향조사

토양수분 정도별 근권균의 고추근권에서의 밀도를 조사하기 위하여 1차 분지기에 달한 한별고추를 1/50,000 와그너 폿트에 옮겨 심고 토양수분정도를 최대포장 용수량의 100%, 80%, 60%, 40%로 조종한후 10^7cfu/g 토양 농도의 근권균 현탁액을 고추 주원에 주당 10㎖씩 관주 접종하였다. 폿트의 표면을 검은 비닐로 피복하여 수분의 증발을 가급적 차단하였으며 차양막을 씌운 온실에 두고 접종후 5일부터 5-11일 간격으로 고추 근권토양을 채취하여 도말하여 근권균의 밀도를 측정하였다.

시비수준별 고추 근권내의 정착력을 조사하기 위하여 시비수준을 표준시비, 질소배비, 인산배비, 카리배비, 무시비로 나누어 토양을 조제한 후 1차 분지기에 달한 한별고추를 이식하였다. 근권균 950923-29의 현탁액은 토양수분시험의 경우와 마찬가지로 접종한 후 온실에 두었으며 접종 5일후인 5월 8일부터 5-11일 간격으로 고추 뿌리를 채취하여 근권내 950923-29 균주

의 밀도를 조사하였다.

근권균의 토양내 생존증식에 미치는 경운의 효과를 조사하기 위하여 농업과학기술원 시험포장에서 경운한 토양과 경운하지 않은 토양을 채취하여 폿트에 담고 1차 분지기에 달한 한별고추를 이식하여 온실에 두고 육묘하였다. 근권균은 앞서와 같이 고추지제부에 관주접종하였으며 접종 5일후부터 5-11일 간격으로 고추의 뿌리를 채취하여 근권내 950923-29 균주의 밀도를 조사하였다.

담수한 토양이 근권균에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 토양을 10일간 담수한 후 배수한 토양과 일반토양으로 나누어 폿트에 담고 1차 분지기에 달한 한별고추를 이식하였다. 근권균의 접종은 앞의 요령대로 수행하였으며 접종 5일후부터인 5월 9일, 5월 13일, 6월 2일에 고추의 뿌리를 채취하여 근권내 밀도를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 근권균의 고추역병균에 대한 실내활성

고추 주산지 4개 지역에서 분리한 323 균주의 고추 역병균에 대한 활성은 310 균주가 활성이 전연 없었고 3개 균주가 활성이 매우 높았으며 4개 균주는 중간, 그리고 6개 균주는 억제반경이 5mm 미만으로 낮은 활성을 보였다(Table 11).

고추 역병균에 활성을 보인 13개 균주를 공시하여 두 번의 시험을 거쳐 고추역병에 대한 생육억제효과를 조사한 결과(Table 12) 생육억제반경 10mm 이상으로 탁월한 억제효과를 보인 균주는 PCAC2, 221-5F, 950923-29였고 7-9mm 정도의 활성을 보인 균주는 NH3, NA276, PC1-3118 균주였으며 4-6mm 억제반경을 갖는 균주가 3균주, 기타 균주는 4mm 미만의 낮은 활성을 보였다. 10mm 이상의 억제반경을 갖는 3균주의 동정결과

PCAC2는 *Pseudomonas cepacoa*로 그리고 221-5F와 950923-29는 *P. aeruginosa*로 동정되었다. 활성이 탁월한 상기 3균주는 추후 시험에 공시하였다.

Table 11. Antifungal activity of *Pseudomonas* isolates obtained from rhizosphere soil of pepper plants against *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight

Areas obtained	No. isolates examined	No. isolates with activity of inhibition diameter			
		10㎜ <	5-10㎜	0.1-5㎜	None
Namji	77	1	1	3	72
Umsung	93	1	2	1	89
Imsil	67	0	1	1	65
Euisung	86	1	0	1	84
계	323	3	4	6	310

2) 근권균의 고추생육에 대한 영향

고추 역병균의 생장억제효과가 탁월한 3 균주를 고추 종자에 침지처리하고 고추유묘의 뿌리와 지상부 생장을 비교해 본 결과 뿌리신장에 대해서는 950923-29 균주와 PCAC2는 생장촉진효과가 있어 무침지 비하여 20% 생장이 촉진되었으나 221-5F 균주는 생육촉진효과가 없었다(Table 13). 5회의 별도 시험에서 생체중을 조사한 결과 3균주 모두 무처리에 비해 생체중이 높아 고추의 생육을 촉진하는 능력을 갖는 균으로 평가되었다(Table 14). 이러한 결과를 보면 *Pseudomonas*속 공시 3 균주는 고추의 생육을 촉진시키면서 고추역병균의 생장을 억제하는 능력을 가진 유용한 PGPR 균으로 생각된다.

Table 12. Inhibition of mycelial growth of *Phytophthora capsici* by

Pseudomonas isolates obtained from rhizosphere soil of pepper plants

Isolate	Identification	Inhibition diam. (㎜)		Average
		Experiment 1	Experiment 2	
PCAC2	*P. cepacia*	9.2±1.42	12.6±0.26	10.9
960923-4	〃	5.5±1.13	8.4±2.66	6.95
221-5F	*P. aeruginosa*	7.9±3.59	12.4±1.37	10.2
950923-29	〃	6.3±4.12	14.4±1.48	10.4
PC925A	*P. cepacia*	1.6±1.22	4.7±0.1	3.2
N8	*P.* sp.	1.3±1.01	0	0.6
96074	*P.* sp.	1.3±0.96	0	0.6
NH3	*P. cepacia*	7.1±0.81	8.5±0.26	7.8
NA276	*P.* sp.	5.3±1.37	8.9±0.25	7.1
PCMAR	*P. cepacia*	3.5±2.04	6.4±1.00	5.0
960719	*P.* sp.	0.5±0.35	0	0.2
PC1-3118	*P. cepacia*	6.5±0.93	10.7±0.95	8.6
951101-4	*P.* sp	4.2±2.62	3.8±0.81	4.0

* Values are averages of three replications.

* Isolates PCAC2, 221-5F and 950923-29 were selected for further study.

Table 13. Effects of *Pseudomonas* isolates obtained from rhizosphere soil of pepper plants on root growth of pepper plants when treated with seed- soaking in a greenhouse

Isolate	Length of main root (㎜)				Average
	Exper. 1	Exper. 2	Exper. 3	Exper. 4	
221-5F	60±10.9	80±43.9	60±17.9	80±7.1	70
950923-29	70±18.2	160±99.1	110±30.3	60±10	100
PCAC2	70±25.9	90±32.1	130±71.2	100±15.8	98
Untreated	140±65.0	80±27.5	50± 8.2	50±13.0	80

* Values are averages of 5 replications.

Table 14. Effect of *Pseudomonas* isolates from pepper rhizosphere soil

on seedling growth of pepper plants when treated with seed-soaking in a greenhouse

Isolates	Fresh weight of pepper seedlings (mg)					Average
	Exper. 1	Exper. 2	Exper. 3	Exper. 4	Exper. 5	
221-5F	35±6.1	35±5.2	27±5.9	32±0.9	30±4.1	31.8
950923-29	26±8.8	27±8.2	37±4.6	35±9.1	36±3.6	32.2
PCAC2	36±7.4	24±5.2	34±2.8	32±4.0	33±3.7	31.8
Untreated	37±9.1	37±7.9	39±0.3	35±2.2	37±4.1	37.0

* Values are means of 5 replications.

3) 근권균의 고추역병 억제효과

실내활성이 높은 3 균주를 공시하여 온실과 포장에서 고추 역병의 억제효과를 조사하였다. 먼저 온실에서의 고추역병의 예방효과를 보면(Table 15) 역병균의 접종농도를 달리한 시험에서 3균주 모두 역병발생 억제효과가 인정되었으나 그 효과는 950923-29 > PCAC 2 > 221-5F의 순이었다. 특히 950923-29는 1차 시험에서는 초발이 현저히 억제되었으며 초발이후의 발병도 현격히 줄어드는 효과를 보였다. 그러나 공시 3 균주의 역병발생 억제효과는 접종후 시일이 경과할수록 감소하는 경향이었고 이러한 경향은 공시균의 시용농도와는 큰 상관이 없는 것으로 나타나고 있다.

공시 균주들의 역병균에 대한 치료효과를 보면(Table 16) 3균주 공히 병발생을 초기에 지연시키는 효과가 있으나 그 억제정도는 예방효과보다는 크게 낮아서 역병발생의 억제가 주로 병원균의 침입을 사전에 보호하는 효과로 나타나는 것으로 생각된다. 예방효과에서는 탁월한 효과를 보이던 950923-29 균주도 치료효과는 무처리와 비슷하거나 억제효과가 낮게 나타나고 있다.

공시균을 고추육묘용 상토에 접종하여 배양한 후 이 상토에 고추를 파종

하고 포장에 정식하는 방법으로 공시 3균주의 고추역병 억제효과를 포장에서 조사하였다(Table 17). 그 결과 3 균주 모두 무처리에 비해 역병발생을 현저히 억제하였으나 약제 살포구에 비해서는 방제효과가 훨씬 낮게 나타나고 있으며 3 균주의 역병 방제효과는 950923-29 > 221-5F > PCAC2의 순이었다. 이와 같이 3 균주의 역병발생 억제효과가 낮게 나타난 것은 공시 3 균주를 육묘시 단한번 처리에 의해서는 고추 생육기인 5월-10월 사이의 고추 역병을 효과적으로 억제하는데는 한계가 있는 것으로 생각되며 그 원인으로는 공시균의 밀도가 포장 정식후 점진적으로 감소하는데 그 원인이 있는 것으로 생각된다. 따라서 향후의 시험에서는 시용한 공시균이 토양내에서 지속적으로 밀도를 유지할 수 있도록 환경조건을 만들어 주거나 아니면 주기적으로 공시균을 고추 생육기간동안 재도입하는 방법에 의하여 공시균의 역병 방제효과를 올리는 방안에 대한 연구가 필요하였다.

Table 15. Effect of *Pseudomonas* isolates from pepper rhizosphere soil on the incidence of *Phytophthora* blight of pepper seedlings in a greenhouse when treated before pathogen inoculation

Isolate	Pathogen inoculation	No. plants diseased(/5) Exper. 1 (high inoculum density)				No. plants diseased(/10) Exper. 2 (low inoculum density)			
		2*	3	4	5days	3	6	9	12days
221-5F	+	0	3	4	5	0	8	8	8
950923-29	+	0	0	0	3	0	4	4	7
PCAC2	+	0	1	3	5	0	6	7	8
Untreated check 1	+	0	5	5	5	0	9	9	9
Untreated check 2	-	0	0	0	0	0	0	0	0

* Two days after inoculation.

Table 16. Effect of *Pseudomonas* isolates from rhizosphere soil on phytophthora blight incidence of pepper seedlings when treated after pathogen inoculation in a greenhouse

Isolate	Pathogen inoculation	No. plants diseased(/5)				No. plants diseased(/10)			
		Exper. 1 (high inoculum density)				Exper. 2 (low inoculum density)			
		2	3	4	5days	3	6	9	12days
221-5F	+	2	4	4	5	0	7	8	8
950923-29	+	3	4	5	5	0	4	6	7
PCAC2	+	3	3	4	5	0	8	9	9
Untreated check 1	+	3	5	5	5	0	7	7	9
Untreated check 2	-	0	0	0	0	0	0	0	0

* Isolates were treated 2days after pathogen inoculation.

Table 17. Effect of application of *Pseudomonas* isolates from rhizoshere soil on the severity of phytophthora blight of pepper plants in fields

Isolates	% plants killed								
	Aug 5		Control value	Aug 18		Control value	Sep 18		Control value
	No.plants diseased (/68plants)	% plants diseased		No.plants diseased (/68plants)	% plants diseased		No.plants diseased (/68plants)	% plants diseased	
221-5F	14	20.6	46	35	51.5	22	40	58.8	23
950923-29	14	20.6	46	33	48.5	27	38	55.9	27
PCAC2	21	30.9	19	37	54.4	19	47	69.1	10
Metalaxyl -copper	11	16.2	58	23	33.8	49	30	44.1	42
Untreat control	26	38.2	-	45	66.2	-	52	76.5	-

* Hot-pepper seedlings were transplanted on May 7 after raised in *Pseudomonas* isolates-in corporated seed-bedsoil, and pathogen was inoculated on Jul 25.

4) 근권균의 토양정착력

전항에서의 온실시험시 공시균을 고추유묘에 관주접종후 고추 근권에서의 공시균의 밀도변화를 경시적으로 추적하여 보았을 때 950923-29 균주와 221-5F 균주의 근권과 근면밀도는 접종후 시간이 경과할수록 감소폭이 커지는 경향이나 생육중기에는 그 밀도가 점차 상승하거나 안정화하는 경향을 보였다(Fig. 2). 특히 221-5F의 근면밀도는 이러한 경향이 뚜렷하게 나타나고 있으며 950923-29의 근권밀도가 가장 빠르게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 생육중기에서의 밀도 상승효과는 근권보다는 근면에서 현저하게 나타났다.

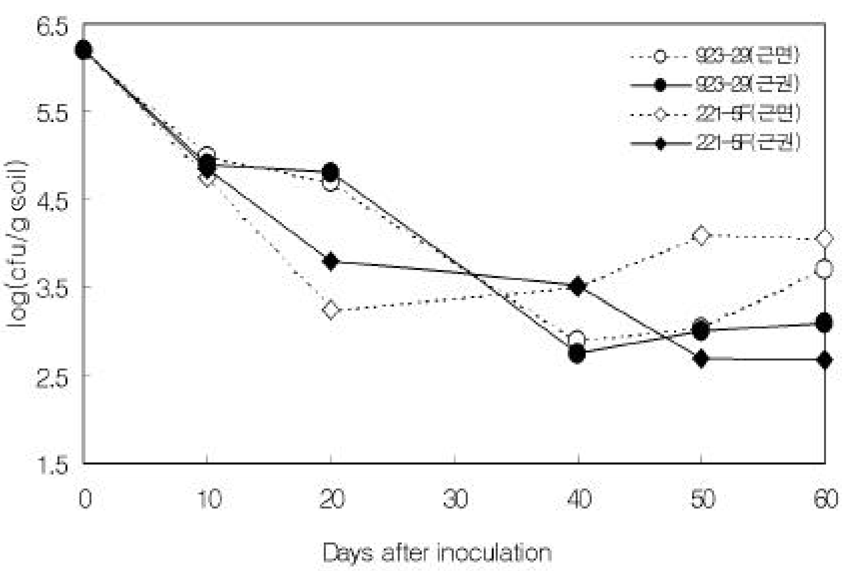
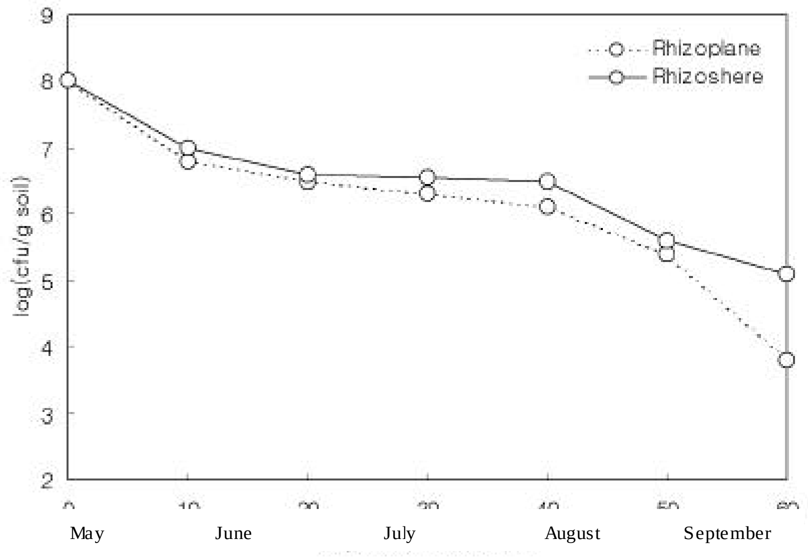


Fig 2. Temporal changes in density of *Pseudomonas* isolates, 950923-29 and 221-5F in rhizosphere and on rhizoplane of pepper plants after inoculation by soil drench in a greenhouse.

Fig. 3. Temporal changes in density of *Pseudomonas* isolate, PCAC2 in



rhizosphere and on rhizoplnae of pepper plants after inoculation by soil drench in a greenhouse.

PCAC2**의 경우는** (Fig. 3) **근권/근면 모두 접종후 시간이 경과할수록 그 밀도가 감소하였으나 그 감소속도는 앞의 두 균주에 비하여 완만하게 나타나고 있다. 포장시험에서 배양토에 시용하여 정식한 시험구에서 공시 균주의 근권밀도를 보면 정식기인** 5**월이후 그 밀도가 급격히 감소하고 있어 초기의** 10^8cfu/g **토양의 밀도가** 8**월에는** 10^3- 10^4cfu/g **토양 정도로** 1/2 **혹은 그 이하로 감소하였다**(Fig. 4). **따라서 공시균이 역병 억제활성을 보이는 한계밀도를** 10^5cfu/g **토양으로 본다면 대개 시용 한달후인** 6**월 이후부터는 한계밀도 이하로 떨어져 고추역병 억제효과를 상실하는 것으로 생각되고 있다. 아무튼 공시** 3 **균주의 근권내 밀도는 생육기가 경과할수록 감소하였고 생육후기인** 9**월의 경우는 균주에 따라 밀도가 안정화하거나 다소 증가하는 경향을 보였다. 근권내 밀도변화는** 3**균주 공히 비슷한 형태를 보이고 있으나 초기 밀도는** PCAC2 > 950923- 29 > 221- 5F**의 순이었다.**

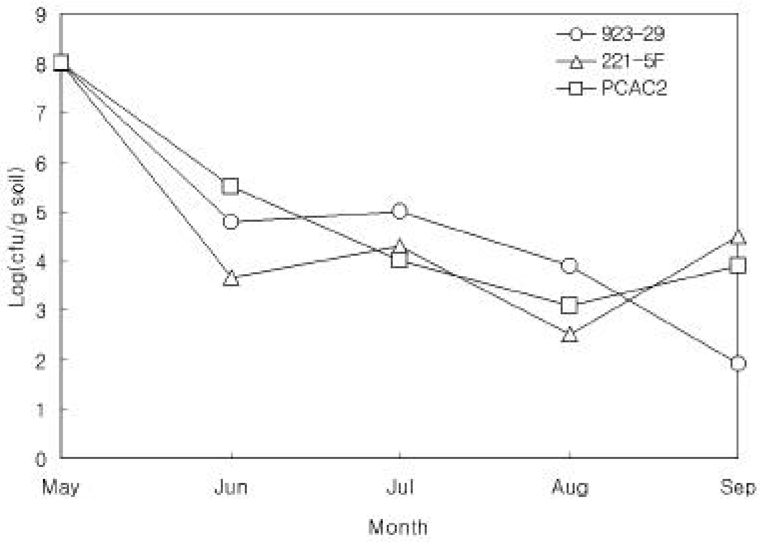


Fig. 4. Temporal changes in density of three *Pseudomonas* isolates in rhizosphere of pepper plants after application in fields.

5) 근권정착에 미치는 환경요인의 영향

3 균주를 공시하여 고추 유묘의 근권정착에 미치는 온도의 영향을 조사하였다 (Table 18). 온도에 대한 반응은 균주에 따라 다소 차이가 있었다. 221-5F 균주는 30℃에서 근권 정착력이 가장 좋아 처리 30일후에도 10^3cfu/g 토양 이상의 밀도를 유지하였으나 35℃로 온도가 높아지면 근권정착밀도는 급격히 감소하였다. 950923-29 균주는 20℃, 25℃, 30℃간에 근권정착력에 큰 차이를 보이지 않고 10^3cfu/g 토양 이상의 밀도를 처리후 30일까지 유지하고 있었으나 35℃에서는 그 밀도가 시간이 경과할수록 낮아지는 경향이었다. PCAC2는 근권 정착력이 시간이 갈수록 타 균주에 비해 급격히 감소하는 것으로 나타났으며 30일 이후에는 어떤 온도에서도 검출이 불가능하였다. 그러나 20℃, 25℃보다는 30℃와 35℃에서 다소 밀도가 높게 나타나고 있어 221-5F와 950923-29 균주보다는 고온성인 균주로 생각된다.

토양수분별 근권 밀도를 보면 균주별 차이가 뚜렷이 나타나고 있다 (Table 19). PCAC2는 토양수분의 많고 적음에 상관없이 처리후 시일이 경과할수록 급속히 감소하였으며 950923-29 균주는 토양수분의 정도와 상관없이 처리후 30일까지 완만한 밀도의 감소를 보였다. 221-5F 균주는 전반적으로 950923-29 균주에 비해 밀도는 떨어지나 처리후 30일이 되면 그 밀도가 약간 상승하는 경향을 보였다. 토양의 종류별로 근권균의 토양내 밀도를 보면 PCAC2의 경우는 영양이 풍부한 부농상토를 제외한 토양에서는 거의 밀도증식이 불가능한 것으로 나타나고 있으며 221-5F 균주와 950923-29 균주도 모래토양에서는 생존력이 급격히 떨어지고 있다. 221-5F 균주의 버미큐라이트에서의 생존력은 초기에는 부농상토와 일반토에 비해 낮았으나 처리후 시간이 경과할수록 그 밀도가 증가하는 경향이었다 950923-29 균주는 부농상토보다는 버미큐라이트에서 후기 생존력이 좋은 것으로 나타나고 있다.

이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 3 균주중 환경에 가장 안정적으로 근권에서 생존할 수 있는 균주는 950923-29 균주로 생각되며 이 균주를 추후의 실용화 시험에 공시하였다.

Table 18. Temporal changes in *Pseudomonas* isolates obtaind from hot pepper rhizosphere soil with respect to texture of soil applied in a greenhouse

Isolate treated	Density (log cfu / g soil)								
	Sandy loam			Loam			Silty loam		
	10*	20	30days	10	20	30days	10	20	30days
221-5F	5.26	4.41	2.00	5.02	3.78	3.41	4.11	3.48	3.48
950923-29	4.63	3.78	3.52	4.95	3.48	3.72	4.11	4.00	2.00
PCAC2	6.34	5.11	3.00	6.20	5.78	5.78	6.56	5.36	4.30

※ Inoculum density : 10^7cfu/㎖, * Ten days after inoculation.

Table 19. Temporal changes of density in *Pseudomonas* isolates in pepper rhizosphere soil with respect to soil moisture content in a greenhouse

Isolate treated	Density (log cfu / g soil)								
	100% SMC			80% SMC			60% SMC		
	10	20	30days	10	20	30days	10	20	30days
221-5F	4.37	4.20	3.04	4.30	3.95	3.27	3.06	2.41	2.48
950923-29	4.90	4.07	3.81	4.47	3.85	3.66	3.79	3.12	2.09
PCAC2	6.38	5.21	4.53	5.93	4.21	4.03	4.24	3.64	3.01

* SMC : Maximum soil moisture capacity.

6) 근권균 활성의 고추품종에 대한 특이성

선발 근권균 950923-29 균주의 고추 품종에 따른 특이적 상호관계 여부를 조사하기 위하여 고추 역병에 대한 저항성 정도가 다른 3품종을 950923-29 균주의 처리방법을 달리하여 시험하였다(Table 20). 근권균의 접종방법에 따른 반응을 보면 근권균의 관주방법보다는 근권균을 상토에 주입시켜 만든 배양토에 고추를 육묘하는 방법이 고추 역병에 대한 억제효과가 높게 나타나고 있다. 무처리에서의 3품종의 발병양상을 보면 다조아 고추가 가장 저항성이었고 한별, 다복의 순서로 이병정도가 높게 나타나고 있다. 대조약제인 리도밀동은 품종과 상관없이 발병을 완벽하게 억제하였다. 저항성 정도가 낮은 다복이나 한별품종에서는 근권균의 고추 역병 억제효과는 약간의 차이가 있는 것으로 생각된다.

Table 20. Temporal changes in inhibition activity of *Pseudomonas* isolate 950923-29 to incidence of phytophthora blight in pepper plants with respect to pepper cultivar and application method in a greenhouse

Treatment	Cultivar	May 15		May 20		May 25		Jun 1	
		No. plants diseased (/9)	Lesion length (㎜)	No. plants diseased (/9)	Lesion length (㎜)	No. plants diseased (/9)	Lesion length (㎜)	No. plants diseased (/9)	Lesion length (㎜)
Incorporated into seed bed soil	Dabok	0	0	5	33.4	7	38.6	9	46.1
	Hanbyul	0	0	4	12.0	4	30.0	8	28.1
	Dazoa	0	0	5	47.0	6	41.7	9	44.4
Soil drench	Dabok	6	16.1	7	39.7	8	42.5	8	59.4
	Hanbyul	2	19.0	4	24.5	6	31.7	9	33.3
	Dazoa	0	0	1	30.0	4	13.8	4	32.5
Metalaxyl-copper	Dabok	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hanbyul	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dazoa	0	0	0	0	0	0	0	0
Untreated control (with pathogen inoculation)	Dabok	6	21.7	9	32.9	9	44.4	9	50.0
	Hanbyul	7	12.6	9	15.3	9	19.4	9	32.8
	Dazoa	0	0	0	0	4	8.8	8	16.2
Untreated control (Without pathogen inoculation)	Dabok	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hanbyul	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dazoa	0	0	0	0	0	0	0	0

7) 근권균의 활성에 미치는 경종관리의 영향

토양수분에 따른 근권균 950923-29 균주의 경시적 밀도를 보면(Fig 5), 토양수분 100% MSC의 경우를 제외하면 접종후 시기가 경과할수록 그 밀도는 점진적으로 감소하기는 하나 10^5cfu/g 토양 이상의 밀도를 유지하여 급격한 감소는 없는 것으로 나타났다. 그러나 토양수분 100% 경우는 접종 10일 후부터 밀도가 급격히 감소하여 접종후 20일에는 거의 검출되지 않았다. 토양수분이 포화상태에서 근권균의 밀도가 일정기간후 급격히 감소하는 원인에 대해서는 아직 불분명하나 포화수분에서 오는 계속적인 혐기상태가 근권

균의 생존에 악영향을 주었을 것으로 생각된다.

토양의 시비수준에 따른 근권균의 경시적인 밀도 변화를 보면 질소, 인산, 카리의 배량시비는 표준시비량에 비하여 근권균의 밀도변화에 큰 영향을 초래하지 않았다(Fig. 6). 시비처리는 근권균의 밀도가 10^6cfu/g 토양 이상으로 접종 20일까지 유지되었으나 그 이후부터 점진적으로 감소하는 경향이었고 이러한 경향을 시비수준과는 별차이가 없었다.

그러나 무시비의 경우는 접종초기 밀도부터 시비처리보다 10배 정도 그 밀도가 낮았으며 그 이후 점차 감소하다가 접종 한달후인 6월 1일에는 그 밀도가 급속히 감소하였다. 이와 같은 결과는 근권균도 다른 미생물과 마찬가지로 생존에 필요한 영양원에 직접적으로 영향을 받고 있어 영양원의 많고 적음에 따라 그 밀도가 크게 달라지고 있는 것으로 나타났다.

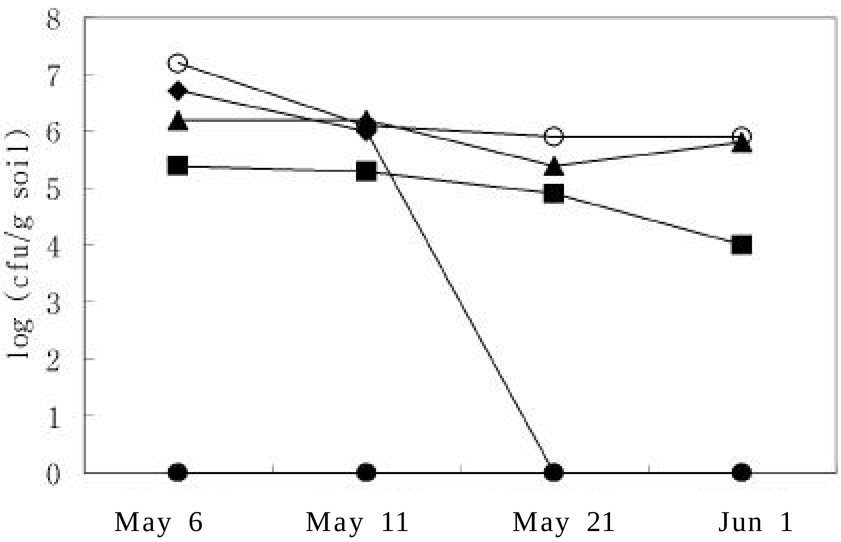


Fig. 5. Temporal changes in *Pseudomonas* isolate 950923-29 in rhizosphere soil of pepper plants with respect to soil moisture levels in a greenhouse (◆:MSC 100%, ■:MSC 80%, ▲:MSC 60%, ○:MSC 40%, ●:MSC 80% untreated check)

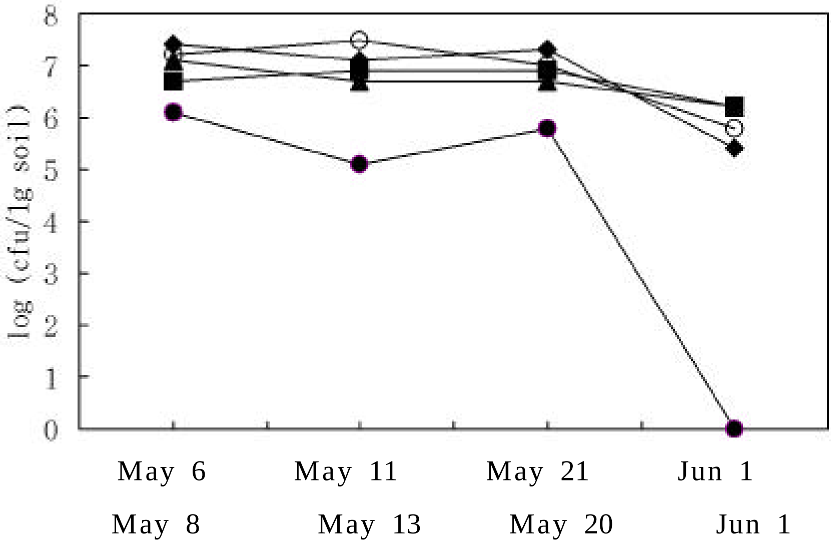


Fig. 6. Temporal changes in *Pseudomonas* isolate 950923-29 in rhizosphere soil of pepper plants with respect to fertilization levels in a greenhouse (◆:standard level N-P-K, ■:2N-P-K, ▲:N-2P-K, ○:N-P-2K, ●:no fertilization)

경운한 토양과 경운하지 않은 토양에서의 근권균의 경시적인 밀도변화를 보면(Fig. 7) 접종후 시일이 경과할수록 밀도가 점차적으로 감소하기 시작하여 접종후 20일부터는 급격히 밀도가 줄어들고 있으나 이러한 경향은 토양의 경운여부와는 상관이 없었다.

근권균과 토양내 생존에 미치는 담수의 영향을 보면 담수한 토양이나 무담수 토양이나 상관없이 접종후 시일이 경과할수록 밀도가 감소하는 경향이나 무담수한 토양의 경우는 접종후 10일 이후부터 그 밀도가 급격히 감소하였다(Fig. 8). 무담수 토양에 있어서 후기에 근권균의 밀도가 급속히 감소한데는 여러 가지 원인이 있을 수 있으나 무담수 토양의 경우보다는 담수토양에서 다른 미생물과의 경합에서 근권균 측이 다소 유리한데에 그 원인이 있을 것으로 생각된다.

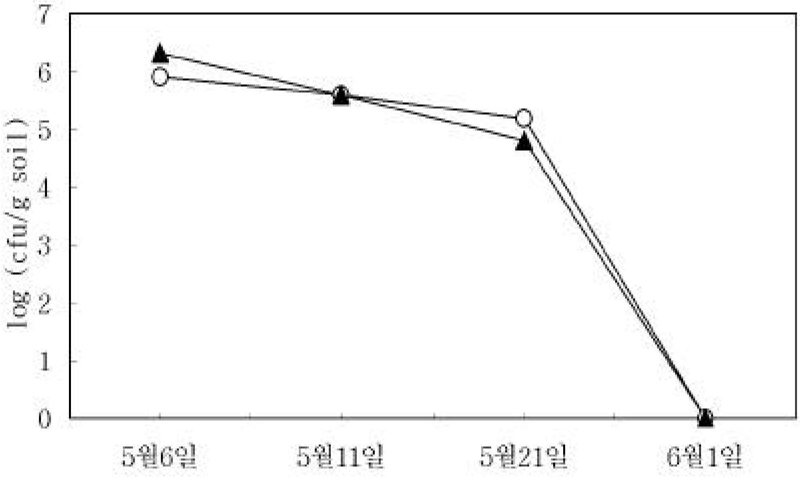


Fig. 7. Temporal changes in density of *Pseudomonas* isolate 950923-29 in rhizosphere soil of pepper plants with respect to tillage in a greenhouse (○:tillage, ▲:No tillage).

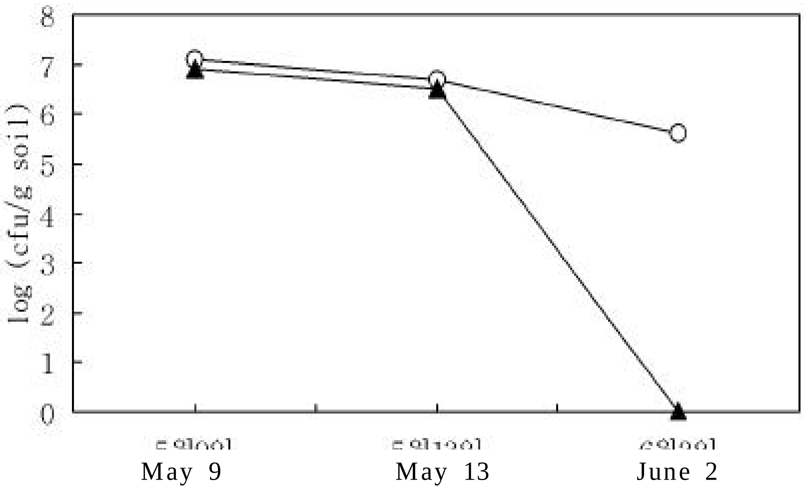


Fig. 8. Temporal changes in density of *Pseudomonas* isolate 950923-29 in rhizosphere soil of pepper plants with respect to flooding in a greenhouse (○:Flooding, ▲:No flooding).

이와 같이 토양의 경종관리는 근권균의 토양내 생존에 많은 영향을 끼치고 있으나 시비수준이나 경운의 효과는 비교적 근권균의 생존에 덜 영향하는 것으로 나타나고 있고 토양내 미생물의 밀도에 큰 영향을 미치고 있는 토양의 부분적 살균(담수처리)이나 과대한 토양습도가 근권균의 생존에 크게 영향을 미치고 있어 여러 환경중에서 실제 농가포장에서의 관수 관리시의 조건에 따라 근권균의 고추역병의 억제활성이 많은 영향을 받을 것으로 생각된다.

제 4 장 유도저항성과 근권미생물을 동시 이용한 역 병 방제시스템 개발

1. 서 론

본 주관연구기관 고려대학교에서는 제1, 2년차 연구년도에서 고추식물에 비살균성 화학물질인 DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)를 고추식물에 처리하여 역병에 대해 저항성을 유도, 효과적으로 역병을 방제할 수 있음이 입증되었다. 온실에서 고추식물의 생육기에 따른 BABA의 저항성 유도 효과, BABA의 처리농도, 잔류기간, 처리방법 등에 따른 역병 방제효과가 심도있게 평가되었다 (제1장, 제1절 실험결과). 또한 고추식물에서 역병에 대한 BABA의 저항성 유도 기작을 생리, 생화학적 방향에서 병저항성 관련 단백질, phytoalexin(capsidiol), salicylic acid 등의 역할에 대해 면밀히 연구되었다 (제1장, 제2절 실험결과).

이러한 BABA 같은 합성화학물질을 식물에 처리하여 식물방어활성제 (plant defense activator)로서 개발 가능성을 구명하기 위하여 포장실험이 필요하다. 현재 전세계적으로 항미생물적 활성이 없으나 몇가지 단자엽, 쌍자엽 식물에서 여러 가지 병원균에 대해 저항성을 유도한다고 밝혀진 CGA245704 화합물이 "Bion"이라는 상품명으로 실용화되고 있다.

본 연구과제의 협동연구기관 농업과학기술원에서는 제 1차, 2차년도의 연구에서 고추 근권에서 생존, 증식력이 좋고 고추 역병을 효과적으로 억제할 수 있는 근권 미생물을 선발하였고 여러 환경에서도 지속적으로 그 활성이 유지되는가를 조사하였다 (제2장 실험결과). 이러한 근권 미생물이 발견되었다 할지라도 이 미생물을 실용적인 생물학적 방제방법으로 응용하기 위해서는 실용화를 위한 여러 단계의 연구를 필요로 한다.

우선 근권 미생물의 대량배양 기술이 확립되어 많은 량을 손쉽게 얻을

수 있어야 하며 또한 미생물을 포장에 시용하기 쉽도록 여러 가지 형태로 제형화하는 기술이 필요하다. 다음으로 제형화한 근권 미생물을 포장에 어떻게 시용해야 하는가에 대한 시용기술이 확립되어야 하고 이 단계의 연구가 모두 끝나면 시제품을 가지고 여러 다른 환경에서 고추 역병에 대한 효과를 검정하는 포장시험이 이루어져야 한다.

지금까지 국내외에서 생물학적인 방제방법에 관한 많은 연구가 이루어져 왔으나 효과적으로 길항 미생물을 분리하고 동정하는 단계에 그치고 있으며 생물학적인 방제방법으로 실용화하기 위한 후속연구가 이루어지지 않았기 때문에 아직까지 실용적으로 쓰이는 사례는 극히 드물다. 실용화를 위한 연구에서 꼭 강조되어야만 하는 것은 앞서 제시한 연구가 모두 성공적으로 이루어졌더라도 생물학적인 방제방법의 효과는 유기합성농약의 방제효과와는 달리 환경에 대하여 영향을 많이 받기 때문에 그 효과는 시기와 장소를 달리하는 여러 환경에서 지속적으로 검토되어야 한다는 것이다. 왜냐하면 한 장소에서 방제효과가 좋았다 할지라도 다른 장소에서 똑같은 방제효과를 기대하기 어렵기 때문이다.

3년차 시험에서는 1, 2년차 시험에서 얻어진 근권균의 활성이 여러 환경에서 어떻게 나타나는가를 조사하였으며 근권균을 여러 형태로 제형화하였고 비닐하우스와 노지포장에서 근권균의 제형을 시용한 후 역병 방제효과를 조사하여 그 실용성을 검토하였다. 또한 저항성을 유도하여 역병에 대해 고추식물을 보호하는 효과를 주는 비살균성 화학물질 BABA를 포장조건에서 처리방법 (엽면살포, 토양관주)을 달리하여 노지포장에서 실용화 가능성을 조사하고져 포장시험을 행하였다. 이러한 관점에서 BABA의 저항성 유도에 의한 역병 억제효과와 BABA, 근권미생물을 단독 또는 함께 처리하였을 때 역병 방제가 어느 정도로 달성될 수 있는지 주관연구기관 고려대학교 덕소농장 포장과 협동연구기관 농업과학기술원 병리과 수원 포장에서 시험방법

을 달리하여 동시에 수행되었다. 이러한 비살균성 화학물질이나 근권길항미생물을 이용한 생물적 방제법은 식물병 방제효과가 장소와 시간을 달리한 여러 포장 환경에 따라 다르게 나타날 수 있으므로 이처럼 상이한 두지역에서 독립적으로 포장시험을 행함으로써 이들 BABA와 근권균의 포장에서 실제 방제효과를 효율적으로 평가할 수 있었다.

2. 재료 및 방법

1) 근권균의 제형화

근권균의 대량배양은 발효조를 이용하였으며 NB배지에 근권균을 접종하고 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양토 제제를 만들기 위해 버미큐라이트 1ℓ 근권균 배양액 10㎖, 밀기울 1%를 잘 섞은후 수분이 최대 용수량의 60%가 되게 물을 가한후 30℃에서 20일간 배양하였으며 하루 2-3번씩 잘 섞어주었다. 배양토를 사용할때에는 일반 고추육묘용 상토와 1:9의 비율로 잘 섞어 이 토양을 고추 육묘시 사용하였다.

근권균의 입제는 대량배양에서 얻어진 현탁액을 사용하여 다음과 같이 조제하였다. 먼저 증류수를 40℃의 열판에 놓고 서서히 저으면서 sodium alginate를 천천히 녹여 1% 액을 만들고 이 용액에 근권균 현탁액과 Kaolin을 넣고 1분간 섞은후 프라스틱 아크릴조에 넣고 직경 2㎜의 실리콘 관을 통하여 0.25M의 CaCl2 용액안으로 점적시킨후 입제로 만들어 사용하였다. 입제의 기본구성은 sodium alginate 10g, Kaolin 200g, 근권균 현탁액 20㎖, 증류수 1ℓ의 비율이었다. 제조된 입제는 포장시험시 고추를 정식할 때 고추 근권에 주당 2-3g씩 시용하여 사용하였다.

2) 근권균 제형의 포장시용효과 검정

포장시험은 경기도 수원시 평동 소재 농업과학기술원 답작포장에서 수행

하였다. 포장은 시설하우스 포장과 일반 노지포장으로 나누어 실시하였다. 고추품종은 다조아고추를 사용하였으며 표준경종방법에 준하여 종자 소독하고 육묘 관리하였다. 처리는 근권균(950923-29) 시용구, 약제 살포구, DL-β-amino-n-butyric acid(BABA) 처리구, 근권+BABA 처리구, 무처리구 등 5처리를 두었으며 난괴법 3반복으로 시험구를 배치하였다. 시설하우스의 처리도 일반 노지포장과 동일하였으나 2반복하였다. 시험구의 크기는 구당 35㎡이었으며 구당 68주가 재식되었다. 고추는 5월 7일에 정식하였다. 근권균 처리는 배양토 육묘, 정식시 입제시용, 생육기 근권균 관주로 나누어 다조아고추를 근권균 배양상토에 육묘한 후 정식하였으며 정식시 근권균 입제를 주당 2-3g씩 근권에 시용하였다. 생육기에는 6월 8일부터 한달 간격으로 3회 근권균의 현탁액을 고추 주원에 주당 10㎖씩 관주 시용하였다. 약제처리는 리도밀동의 1,000배액을 6월 8일부터 한달간격으로 3회 경엽살포하였다. BABA 처리는 5월 7일, 5월 12일, 6월 2일, 7월 2일, 8월 2일에 표준 농토로 5회 경엽살포하였다. 자연발병을 유도하기 위하여 역병균은 인위적으로 접종하지 않았다. 시설하우스의 처리도 노지포장의 경우와 동일하게 수행하였다. 발병은 8월 14일 전주를 대상으로 이병주를 조사하였으며 발병주율을 산출하였다. 시험포장내 근권균의 경시적인 밀도를 조사하기 위하여 5월 16일부터 9월까지 한달간격으로 시험구내의 근권토양에서 표본을 채취하여 그 밀도를 조사하였다.

3) 온실에서 근권미생물과 BABA 처리 효과 시험

관행방법으로 고추식물을 1분지기까지 식물생육실에서 재배하였다. Tryptic soy broth에서 근권길항미생물 *Pseudomonas cepacia* strain N9523 균주를 배양, 3,500g에서 원심분리하여 세균을 수거한 후 일정수의 세균농도로 조정하였다. 역병균(*Phytophthora capsici*)을 접종하기 전 3-5일에 근권

길항미생물과 DL-β-amino-n-butyric acid(BABA)를 토양관주하여 고추식물에 처리하였다. 역병균(10^5 유주자/ml)을 고추줄기에 상처 접종하거나 토양관주하여 접종하였다. 역병균 접종 후 8일에 병피해도를 0-5 scale(0=무감염, 5=식물완전고사)의 간행기준에 따라 조사하였다.

4) 포장에서 근권균과 BABA 처리효과 시험

자연 포장에서 고추를 재배하여 근권균과 BABA를 각각, 또는 함께 처리하였을 때 고추역병의 방제효과를 평가하기 위하여 고려대학교 덕소 부속농장의 답작포장에서 수행하였다. 고추품종은 한별을 사용하였으며 표준 경종방법으로 재배하였다. 1998년 2월 12일 침종하여 최아를 시킨 후 2월15일 파종상자에 파종하였다. 3월11일 이식용 폿트에 1,330주를 이식하여 정식시까지 온실에서 육묘하였다. 본답을 경운, 가레질 및 비닐(흑색)피복을 하여 5월 2일 110평의 포장에 1,122주를 정식하였다. 필요시 살충제(진딧물 방제용 메소밀)와 제초제(그람옥손)를 살포하였으며 고추가 일정크기로 자랐을 때 5월 26일 개개 고추에 대해 지주를 세우고 끈으로 결속하였다.

근권길항세균(*Pseudomonas cepacia* strain N9523, 협동연구기관 농업과학기술원에서 분양된 균주) 처리구, DL-β-amino-n-butyric acid(BABA) 처리구, 근권균+BABA 처리구, 살균제 metalaxyl 처리구, 무처리구 등 5처리를 행하였으며 난괴법 3반복으로 시험구를 배치하였다. 시험구의 크기는 구당 $24m^2$이었으며 구당 75주가 심겨졌다. 6월 10일, 6월 30일, 7월 6일에 근권길항세균(10^9 cells/ml 배지), BABA(1,000μg/ml), 리도밀엠지(50g/20L)를 100 ml씩 고추식물당 토양관주하였다. 이들 처리시기가 장마철이어서 6월 30일 처리 후 즉시 비가 와서 7월 6일 다시 처리하였다. 인위적으로 역병을 발생토록 하기 위하여 역병균(10^5 유주자/ml) 현탁액을 고추식물당 10 ml씩 7월 8일 토양관주하여 접종하였다. 7월 14일 고추식물에 역병이 발생하여 7

월 28일까지 매일 역병 발생정도를 조사하였다. 병발생수율(% disease incidence)로 역병 발생을 산출하여 포장에서 근권길항세균과 BABA의 처리 효과를 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 자연감염 포장에서 고추역병의 방제

1) 근권균 처리와 BABA 처리의 고추생육에 미치는 영향

처리별 고추의 생육상황을 보면 정식 18일후 처리구별 평균 초장은 39-44cm 였으나 근권균과 BABA를 함께 처리한 구가 다른 구에 비해 초장이 3-4cm 적게 나타나고 있고 그 외의 처리구간에는 큰 차이가 없었다 (Table 1). 그러나 정식후 한달뒤의 생육상황을 보면 처리구별로 차이가 뚜렷해져서 근권균의 처리구는 무처리보다 초장이 3cm 가량 큰데 비하여 BABA 처리구와 균권균과 BABA를 동시 처리한 구에서의 초장은 무처리에 비해 초장이6-10cm 적게 나타나고 있다. 대조약제인 메타실동 처리구는 무

Table 1. Effect of antagonistic *Pseudomonas* 950923-29 and BABA application on growth of pepper plants in fields in 1998

Treatment	Plant height(cm)							
	May 25				Jun 8			
	Rep I	II	III	Average	Rep I	II	III	Average
Antagonistic agant(A)	46.4	40.8	43.9	43.7	60.0	57.9	61.4	59.8
BABA(B)	43.1	44.0	42.8	43.3	55.3	45.9	52.5	51.1
(A) + (B)	37.9	38.3	41.8	39.3	42.2	53.6	42.8	46.2
Metalaxyl-copper	41.5	40.4	44.1	42.0	53.2	57.4	60.6	57.1
Untreated control	43.1	42.1	43.7	43.0	60.6	55.3	55.0	57.0

처리와 비슷하였다. 이와 같은 결과는 기주의 저항성 유도물질인 BABA 처리가 고추의 초장을 다소 억제하는 효과가 있는 것으로 생각되어 추후 검토가 필요하다.

2) 근권균 밀도의 고추재배 토양에서 변화

포장시험에서 근권균을 처리한 시험구의 근권균의 토양내 밀도를 5월부터 9월까지 한달간격으로 조사하였다. 근권균의 처리를 보면 근권균 배양토에 육묘한 고추 묘를 5월초에 정식하였으며 정식시 근권균의 입제형을 시용하였고 그 이후 6월초, 7월초, 8월초에 3회 지제부 주위에 근권균의 현탁액을 토양관주하였다. 근권균의 시용구의 밀도를 보면(Fig. 1) 5월 중순의 10^6cfu/g 토양의 밀도에서 점차 감소하는 경향이나 노지포장보다는 시설하우

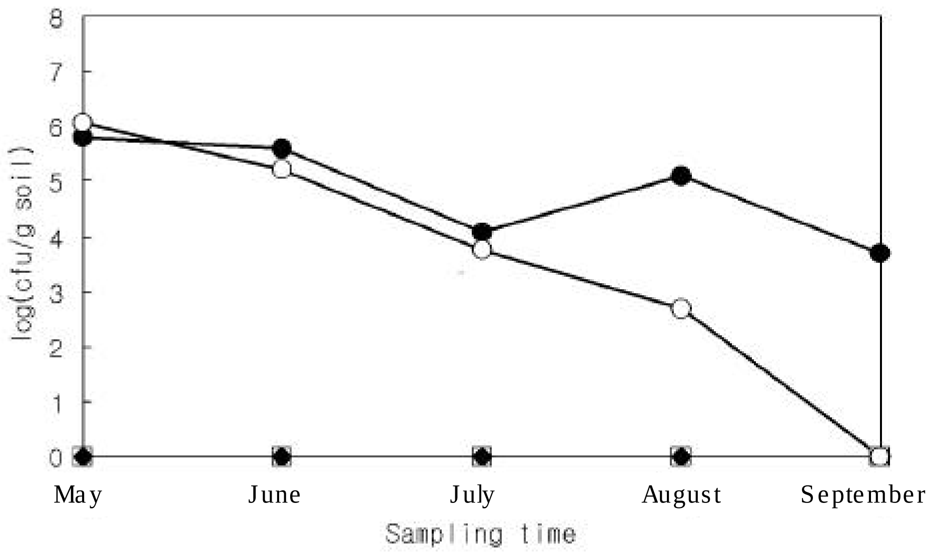


Fig. 1. Temporal changes in density of *Pseudomonas* isolate 950923-29 in rhizosphere soil of pepper plants growing in fields and plastic-film house(□:Untreated check in field, ● : 950923-29 application in field, ◆ : Untreated check in vinyl house, ○ : 950923-29 application in vinyl house).

스 포장에서 밀도의 감소가 급격하였다. 노지포장내 근권균의 밀도변화를 보면 6월까지 거의 밀도의 변동이 없다가 장마철인 7월에 상당폭 감소하여 10^4 10^5cfu/g/ 토양의 밀도에서 그 이후 근권균의 토양관주에 따라 밀도가 증가하였고 9월에는 다시 감소하는 경향이었다. 밀도 조사기간인 고추의 주요 생육기간중 근권균의 밀도가 10^4cfu/g 토양 이하로 떨어지는 경우는 없어서 비교적 안정적인 생존상황을 보였다. 그러나 시설 하우스내 시험구의 근권균 밀도는 토양내 근권균의 주기적 재처리와 상관없이 시기가 경과할수록 급격히 감소하여 7월 이후의 밀도는 10^3cfu/g 토양 이하로 떨어지고 있다. 이같이 노지포장과는 달리 시설하우스 포장에서 처리구내 근권균의 밀도가 떨어지는 것은 시설하우스내의 토양수분의 변동이 심하고 주간의 온도가 40℃ 이상으로 높아져 토양내 근권균의 생존에 악영향을 끼쳤기 때문으로 생각된다.

3) 근권균과 BABA의 동시처리시 포장에서 고추역병 방제효과

노지포장에서 시험구의 근권균 및 저항성 유도 물질인 BABA의 시용효과를 보면(Table 2), 무처리구의 발병율이 40-90%에 달하여 인공접종없이도 고추역병이 심하게 발생하였으나 근권균과 BABA 처리구는 12-25%의 발병을 보여 고추 역병의 방제효과가 뚜렷하였다. 대조약제인 메타실동 3회 살포구는 효과가 가장 좋게 나타나서 평균 발병율이 8.8%에 그쳤다. 다음으로 방제효과가 우수한 처리구는 근권균과 BABA의 동시 처리구로 12%의 발병율을 보였고 근권균과 BABA의 단독 처리구는 각각 18.4%와 25.4%의 발병을 보여 역병에 대한 방제효과가 인정되었다. 이같은 결과로 보면 근권균과 BABA의 동시 처리는 각각의 단독 처리에 비해 방제효과가 증진되는 것으로 나타났으나 약제 처리구에 비해서는 효과가 낮아 한계가 있는 것으로 생각된다. 근권균과 BABA 처리는 Table 2에서 보는 바와 같이 고추 역병의

방제효과는 인정되나 그 처리방법이 매우 복잡하고 처리횟수가 많아 현재 농가포장에서 실용화하기에는 번거로운 문제점이 있어 향후 시용방법에 대해 개선할 필요가 있다고 생각된다. 요약하면 약제처리구와 마찬가지로 3회 처리에 의해 방제효과를 올릴수 있는 방안에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

Table 2. Effects of antagonistic *Pseudomonas aeroginosa* 950923-29 and BABA application on incidence of phytophthora blight of pepper plants in fields in 1998, Suweon, Korea

Treatment	% plants diseased			Average
	Rep Ⅰ	Rep Ⅱ	Rep Ⅲ	
Angtagonistic agent(A)	18.1	17.6	19.4	18.4
BABA(B)	29.2	20.6	26.4	25.4
(A) + (B)	13.9	11.8	9.7	11.8
Metalaxyl-copper	9.7	2.9	13.9	8.8
Untreated control	91.7	41.2	44.4	59.1

시설하우스 포장에서는 발병정도가 노지포장에 비하여 극도로 낮아서 무처리구의 평균 발병주율이 14.3%에 그쳤고 또한 처리구내 반복간에 발병율에 있어서 변이가 심하여 처리효과의 해석에 다소 문제가 있다고 생각된다 (Table 3). 하우스 포장내 처리효과를 보면 근권균과 BABA의 동시처리가 역병방제에 가장 효과가 큰 것으로 나타났고 다음으로 근권균의 단독처리, 메타실동 약제살포, BABA의 단독살포의 순이었다. 그러나 앞서 설명하였듯이 반복간에 차이가 심하고 포장내 발병정도가 낮아 처리효과의 해석이 노지포장에서의 경우와는 달리 명확하지 않은 것이 문제로 생각되며 시설하우스에서의 근권균 시용효과는 차후 촉성재배의 현지 포장에서 다시 검정할 필요가 있다고 사료된다.

Table 3. Effect of antagonistic *Pseudomonas* 950923-29 and BABA application on incidence of phytophthora blight of pepper plants in plastic-film house in 1998, Suweon, Korea

Treatment	% plants diseased		Average
	Rep Ⅰ	Rep Ⅱ	
Angtagonistic agent(A)	0	12.5	6.2
BABA(B)	16.7	4.2	10.4
(A) + (B)	0	4.8	2.4
Metalaxyl-copper	4.2	12.5	8.4
Untreated control	14.3	14.3	14.3

나. 인공접종에서 고추역병의 방제

1) 온실에서 근권균, BABA 처리에 의한 역병 방제효과

여러 가지 농도로 근권길항미생물 *Pseudomonas cepacia* strain N9523, BABA를 단독으로 처리하였을 때 1분지기의 고추식물에서 역병 방제효과를 보았다 (Fig. 2). 역병 접종 전 5일에 108 세균수/ml로 처리하였을 때 역병 방제효과가 뚜렷하였고, BABA는 1,000μg/ml 처리시 역병이 완전히 억제되었다. 역병균의 접종 방법을 달리 하였을 때 근권길항미생물 *Pseudomonas cepacia* strain N9523과 BABA를 단독, 또는 혼합처리하였을 때 역병 방제효과가 달랐다(Fig. 3). 근권길항미생물 N9523 균주의 역병 방제효과가 역병균을 줄기접종하였을 때 거의 나타나지 않았으나 토양관주하였을 때 방제효과가 있었고 6엽기에서보다 1분지기에서 뚜렷하였다. BABA 처리는 역병균의 줄기접종, 토양관주접종 모두의 경우에서 역병 방제효과가 매우 커서 완전히 방제되었다. 그러나 N9523 균주와 BABA 혼합처리 경우에서는 상승효과(synergistic effect)가 관찰되지 않았다.

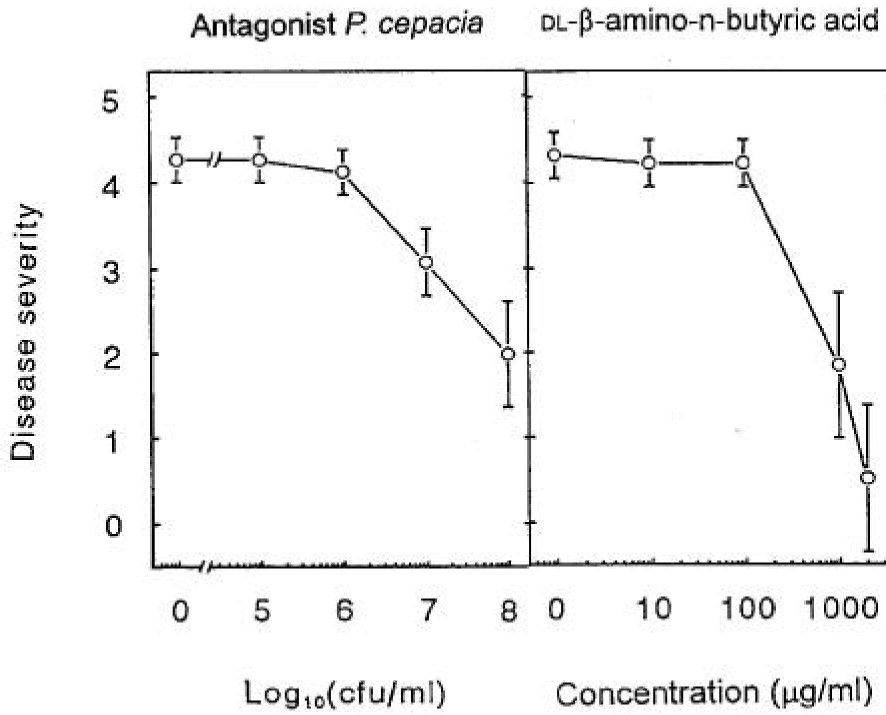


Fig. 2. Effects of concentrations of *Pseudomonas cepacia* strain N9523 and DL-β-amino-n-butyric acid (BABA) on protection of pepper plants (cv. Hanbyul) at the first branch stage from *Phytophthora capsici* infection. *P. cepacia* and BABA at various concentrations were soil-drenched 5 days before inoculation of *P. capsici* (105 zoospores/ml). Disease severity was rated 8 days after inoculatin of *P. capsici* based on a 0-5 scale, where 0 = no visible symptom and 5 = plant dead. Vertical bars represent standard deviations.

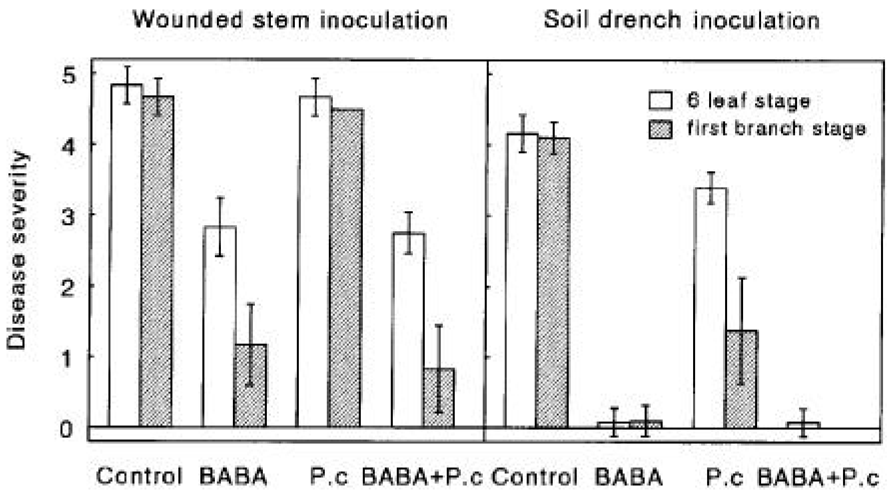


Fig. 3. Effects of *Pseudomonas cepacia* strain N9523 and DL-β-amino-n-butyric acid (BABA) on protection of pepper plants at different growth stages against *Phytophthora capsici* infection using different inoculation methods. Plants at six-leaf and first branch stages were soil-drenched with each combinations of *P. cepacia* (109 cfu/ml) and BABA (1 mg/ml) 3 days before inculation of *P. capsici* (105 zoospores/ml). Disease severity was rated 8 days after inoculatin of *P. capsici* based on a 0-5 scale, where 0 = no visible symptom and 5 = plant dead. Vertical bars represent standard deviations.

2) 인공접종 포장에서 근권균과 BABA 처리시 고추역병 방제효과

고려대학교 덕소농장 포장에서 고추역병균을 인공접종하여 BABA와 근권길항세균 *Pseudomonas cepacia* strain N9523의 역병 방제효과를 평가하였다(Tables 4, 5). 본 시험이 수행된 덕소포장은 고추역병 발생이 자연적으로 관찰되지 않는 지역이므로 역병균을 인공접종하였다. 1998년 고추재배철(5월-9월)에는 매우 장마가 심하여 저항성 유도 화학물질 BABA, 근권길항세균, 살균제 Metalaxyl 등을 처리하는데 어려움이 있었다. 역병균을 접종

Table 4. Ptotective effect of DL-β-amino-n-butyric acid(BABA) and antagonistic bacteria *Pseudomonas cepacia* on Phytophthora blight in the pepper field in Dukso, Korea in 1998

Treatmenta	% disease incidence on the date			
	7/14	7/16	7/20	7/28
Untreated	3.9±3.1b	17.9±7.5	68.8±10.6	99.5±0.9
BABA	1.4±0.1	8.8±7.8	45.3±1.7	100±0.0
P. cepacia	15.9±7.2	38.5±7.3	78.9±9.4	100±0.0
BABA+*P. cepacia*	3.8±3.3	19.7±16.4	55.8±20.7	98.3±2.9
Metalaxyl	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	19.2±5.2

a The antagonistic *P. cepacia* strain N9523(109 cells/ml tryptic soy broth), BABA(1,000 μg/ml), and metalaxyl-mancozeb(50g/20l) were soil-drenched in the pepper field on June 10, June 30, and July 6. The zoospore suspension(105 zoospores/ml) of *P. capsici* was inoculated by soil drench in the field on July 8.

b Disease incidence was rated daily after appearance of phytophthora blight on pepper plants. Values represent means±standard deviations.

Table 5. Disease severity of pepper plants infected with *Phytophthora capsici* after treatment with DL-β-amino-n-butyric acid(BABA) and antagonistic bacteria *Pseudomonas cepacia* in pepper field in Dukso, Korea in 1998

Treatmenta	Disease severity on the date			
	7/14	7/16	7/20	7/28
Untreated	0.1±0.1b	0.4±0.2	2.1±0.3	4.7±0.3
BABA	0.0±0.0	0.2±0.1	1.1±0.5	4.4±0.3
P. cepacia	0.3±0.1	0.8±0.3	2.6±0.5	4.8±0.1
BABA+*P. cepacia*	0.1±0.1	0.4±0.3	1.8±0.9	4.6±0.3
Metalaxyl	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.5±0.2

a All the applications of either antagonistic *P. cepacia* strain N9523, BABA, or metalaxyl-mancozeb were done as described in Table 4.

b Disease severity was rated daily after appearance of phytophthora blight on pepper plants based on a 0-5 scale, where 0 = no visible symptom and 5 = plant dead. Values represent means±standard deviations.

한 후 6일만에 고추식물에서 역병이 발생하여 살균제 Metalaxyl 처리구를 제외하고 역병을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서 사용한 역병균의 인공접종원 농도가 너무 높아서인지 역병 발생이 너무 급속도로 진전되었다. 저항성 유도 물질 BABA를 처리하였을 경우 역병 발생을 크게 억제시켰으나 근권길항세균 *P. cepacia*를 처리하였을 때는 역병발생이 조장되었다. 이것은 근권길항세균을 고추식물에 토양관주시 이 근권길항세균을 배지(tryptic soy broth)와 함께 처리하고 2일 후에 고추역병균 현탁액을 토양관주함에 따라 토양에서 역병균의 생장에 배지성분이 영양원이 되어 역병 발생이 조장되지 않았나 사료된다. 역병 발생 후 10일 동안에는 BABA 처리에 의해 유도되어진 저항성 효과가 지속되어 역병에 대해 고추식물을 보호할 수 있었으나 그 이후 무처리구와 비슷하게 역병이 발생하여 7월 28일 조사시 Metalaxyl 처리구를 제외하고는 모든 고추식물이 역병에 의한 피해로 거의 고사되었다. BABA와 근권길항세균을 동시에 처리했을 경우에도 BABA 처리 효과로 상당한 기간 동안 역병으로부터 고추식물이 보호되었다. 특히 살균제 Metalaxyl의 방제효과는 뚜렷하여 약제의 잔류효과가 약 22일 동안 지속되었으나 7월 28일 조사시 19.2% 병발생수율을 보여 Metalaxyl 처리에서도 토양전염병인 역병을 완벽하게 방제하는데 어려움이 있음을 알 수 있었다. 이들 저항성 유도 물질 BABA와 근권길항세균 *P. cepacia*을 고추포장에 처리하였을 때 병피해도(disease severity)도 병발생수율(% disease incidence)과 비슷한 경향을 보여 고추역병 발생정도를 평가할 수 있었다(Table 5). 병피해도에서도 Metalaxyl 처리 후 역병 방제효과가 뚜렷하였고 저항성 유도 물질 BABA를 단독으로 처리하거나 근권길항세균과 함께 처리할 경우 처리 후 약 20일 정도까지 유의성있게 역병으로부터 고추를 보호할 수 있었다.

본 포장실험 결과를 종합하여 평가하여 볼 때 근권길항미생물을 처리하여 고추역병을 효율적으로 방제하기 위해서는 근권길항미생물의 제형화에

따른 포장시용효과 시험이 반드시 수행되어야함을 알 수 있었다. 본 포장시험에서 사용된 근권길항세균 *P. cepacia* strain N9523은 온실의 폿트시험에서도 어느정도 유의성 있는 역병 방제효과를 보였고 유도저항성 화학물질 BABA의 역병 방제효과는 매우 뚜렷하였다(Fig. 3). 따라서 이러한 비살균성 식물병 방제용 식물보호제를 개발하기 위해서는 여러 가지 방향에서 이들에 대한 효용성, 경제성 등의 실용화 시험이 수행되어야 한다. 그러나 유도저항성 화학물질 BABA는 온실, 포장시험(수원 농업과학기술원, 덕소 고려대)에서 행한 실험 결과에서 고추식물의 역병으로부터 훌륭한 보호효과가 입증되어 미래의 무공해 고추역병 방제제로서 가능성을 제시해 주고 있다.

제 5 장 인용 문헌

Backman, P. A. and Rodrigues-Kabana, R. 1975. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. Phytopathology 65: 819-821.

Baker, K. F. and Cook, R. J. 1974. Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 433pp.

Bol, J. F., inthorst, L H. J. M., and Cornelissen, B. J. C. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Ann. Rev. Phytopathol. 28:114-138

Bossalis, M. G. and Mankau, R. 1965. Parasitism and predation of soil microorganisms. Pages 374-391 in:Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens : Prelude to Biological Control. K. F. Baker and W C. Snyder, eds. Univ. Calif. Press. Berkeley.

Bowles, D.J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. Annu. Rev. Biochem. 59:873-907

Bowen, G. D. and Rovira, A. D. 1976. Microbial colonization of plant roots. Ann. Rev. Phytopathol. 14:121-144.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

Broadbent, P. and Baker, K. F. 1974. Association of bacteria with sporangium formation and breakdown of sporangia in *Phytophthora* spp. Aust. J. Agric. Res. 25:139-135.

Broadbent, P., Baker, K. F. and Waterworth, Y. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Aust. J. Biol. Sci. 24:925-944.

Burbage, D. A. and Sasser, M. 1982. A medium selective for *Pseudomonas cepacia*.(Abstract) Phytopathology 72:706.

Cohen, Y. 1993. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids. Phytopathology 84:55-59

Cohen, Y., Niderman, T., Msinger E., and Fluhr, R. 1994. β-Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. 104:59-66.

Cohen, Y., and Gisi, U. 1994. Systemic translocation of ^{14}C-DL-3-aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*. Physiol Mol Plant Pathol 45:441-456

Cook, R. J. 1977. Management of the associated microbiota. Pages 145-166. in : Plant Disease : An Advanced Treatise. Vol. I. J. G. Horsfall and E. B. Cowling, eds. Academic Press, NY.

Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Science 121:404-427.

De Wit, P.J.G.M., Buurlage, M.B., and Hammond, K.E. 1986. The occurrence of host-, pathogen- and interaction-specific proteins in the apoplast of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) infected tomato leaves. Physiol. Mol, Plant Pathol. 29:159-172.

Duniway, J. M. 1979. Water relations of water molds. Annu. Rev. Phytopathol. 17:431-460.

Fravl, D. R. Marois, J. J., Lumsden, R. D. and Connick. W. J. Jr. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. Phytopathology 75:774-777.

Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M. G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J., Kessmann, H., and Ryals, J. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. Plant J. 10:62-70.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, 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.

Gianinazzi, S., and Kassanis, B. 1974. Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid. J. Gen. Virol. 23:1-9.

Gilpatrick, J. D. 1969. Effect of soil amendments upon inoculum survival and function in Phytophthora root rot of avocado. Phytopathology 59:979-985.

Henis. Y. and Katan. J. 1975. Effect of inorganic amendments and soil reaction on soil-borne plant disease. Pages 100-106 in : Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens. G. W. Bruel, ed. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul. MN.

Hoitink, H. A. J., Schmitthenner, A. F. and Herr, L. J. 1975. Composted bark for control of root rot in ornamentals. Ohio Rep. 60:25-26.

Hwang, B. K. 1995. Effects of age-related resistance and metalaxyl of capsidiol production in pepper plants infected with *Phytophthora capsici* In : Daniel M and Purkayastha RP. eds. Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. New York :Marcel Dekker, 503-523.

Hwang, B. K, and Kim, C. H. 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. Plant Disease 79:221-227.

Hwang, B. K, and Kim, Y. J. 1990. Capsidiol production in pepper plants associated with age-related resistance to *Phytophthora capsici*. Korean J. Plant Pathol. 6:193-200.

Hwang, B. K, and Sung, N. K. 1989. Effect of metalaxyl on capsidiol production in stems of pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. Plant Disease 73:748-751.

Hwang, B. K., and Kim, E. S. 1992. Protection of pepper plants against Phytophthora blight by an avirulent isolate of *Phytophthora capsici*. Korean J. Plant Pathol. 8:1-7.

Jones, R. W., Pettit, R. E. and Taber, R. A. 1984. Lignite and stillage : Carrier and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil. Phytopathology 74:1167-1170

Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., and Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins : Four PR proteins of tobacco have β-1,3-glucanase activity. The EMBO Journal 6:3209-3212.

Kauss, H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. 38:47-72

Keen, N., and Yoshikawa, M. 1983. β-1,3-Endoglucanases from soybean relates elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. Plant Physiology 71:460-465.

Kombrick, E., Schroder, M., and Hahlbrock, K. 1988. Several pathogenesis-related proteins in potato are β-1,3-glucanases and chitinases. Proceedings of National Academy of Sciences U. S. A. 85:782-786.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Legrand, M., Kauffman, S., Geoffroy, P., and Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins : Four tobacco pathogenesis-related proteins are chtinases. Proceedings of National Academy of Sciences U. S. A. 84:6750-6754.

Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. 1984. A new approach to stimulate population proliferation *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. Phytopathology 74:1240-1244.

Linthorst, H.J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. Crit. Rev. Plant Sci. 10:123-150.

Low, P. S., and Merida, J. R. 1996. The oxidative burst in plant defense : function and signal transduction. Physiol. Plant. 96:533-542.

Malajczuk, N. 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*. Pages 197-217 in : Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao, eds. APS. St. Paul.

MN.

Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., and Raskin, I. 1990. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science 250:1002-1004.

Marshall, K. C. and Cruickshank, R. H. 1973. Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces. Arch. Microbiol. 91:29-40.

Mauch, F., Mauch-Mani, B., and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue : 1. Induction of fungal growth by combination of chitinase and β-1,3-glucanase. Plant Physiology 88:936-942.

Mauch, F., and Staehelin, L. A. 1989. Functional implications of subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β-1,3-glucanase in bean leaves. Plant Cell 1:447-457.

Métraux, J. P., Ahl Goy, P., Staub, T., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J., and Ward, E. 1991. Induction of resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. In: Hennecke H and Verma DPS (eds) Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction, Vol. 1 (pp. 432-439) Kluwer, Dordrecht, The Netherlands

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.

Mugnier, J. and Jung, G. 1985. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and solvent. Appl. & Environ. Microbiol. 50:108-114.

Mukerjee, N., and Roy, A. B. 1962. Microbial influence on the formation of oospores in culture by *Phytophthora parasitica* var. *sabdariffae*. Phytopathology 52:583-584.

Neuenschwander, U., Lawton, K., and Ryals, J. 1996. Systemic acquired resistance. In Plant-Microbe Interactions, Vol. 1. G. Stacey and N.T. Keen, eds (New York: Chapman and Hall). pp. 81-106

Papavizas, G. C., and Lumsden, R. D. 1980. biological control of soilborne fungal propagules. Ann. Rev. Phytopathol. 18:389-413.

Park. D. 1967. The importance of antibiotics and inhibiting substance. Pages 435-447 in : Soil Biology. A, Burges and F. Raw, eds. Academic Press, London.

Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:439-463.

Raskin, I., Turner, I. M., and Melander, W. R. 1989. Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 86:2214-2218.

Rasmussen, J. B., Hammerschmidt, R., and Zook, M. N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Physiology 97:1342-1347.

Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., and Williams, D. E. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195:281-283.

Reissig, J. L., Strominger, J. L., and Leloir, L. F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217:959-967.

Ride, J. P., and Barber, M. S. 1990. Purification and characterization of multiple forms of endochitinase from wheat leaves. Plant Science 71:185-197.

Rovira, A. D. 1965. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. Pages 170-186 in : Ecology of Soil-borne Plant Pathogens : Prelude to Biological Control. K. F. Baker and W. C. Snyder, eds. Univ. Calif. press, Berkeley.

Schippers, B., Bakker, A. W. and Bakker, A. H. M. 1987. Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann. Rev. Phytopathol. 25:339-358.

Schroth, N. N. and Hilderbrand, D. C. 1964. Influence of plant exudates on root-infecting fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 2:101-132.

Shea, S. R. and Broadbent, P. 1983. Developments in cultural and biological control of Phytophthora diseases. Pages 335-3350 in : Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Patholgy. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Taso, eds. APS. St. Paul. MN.

Taso, P. H. Bhalla, H. S., and Zentmyer, G. A. 1975. Effects of certain organic amendments on survival and activity of *Phytophthora cinnamomi* in soil.(Abstr.) Proc. Am. Phytopathol. Soc. 2:40.

Trudel, J., and Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 178:362-366.

Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. 1992a. Acquired resistance in *arabidopsis*. Plant Cell 4:645-656.

Uknes, S., Mauch-Mani, B., Ward, E., and Ryals J. 1992b. Acquired resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 4:645-656

Uknes, S., Winter, A., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, G., Potter, S., Ward, E., and Ryals, J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant-Microbe Interaction 6:692-698.

Vaartaja, O., Pitblado, R. E., Buzzell, R. L., and Crawford, L. G. 1979. Chemical and biological control of Phytophthora root and stalk rot of soybean. Can. J. Plant Sci. 59:307-311.

Van Loon, L. C. 1985. Pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. 4:111-116

Van Loon, L. C., and Van Kammen, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun'and 'Samsun NN'II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40:199-211

Vance, C. P., Kirk, T. K., and Sherwood, R. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 18: 259-288.

Vigers, A. J., Roberts, W. K., and Selitrennikoff, C. D. 1991. A new family of antifungal proteins. Molecular Plant-Microbe Interaction 4:315-323.

Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Métraux, J. P., and Ryals, J. A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. Plant Cell 3:1085-1094.

Weste, G. and Vithanage, K. 1977. Microbial populations of three forest soils : seasonal variations and changes associated with *Phytophthora cinnamomi*. Aust. J. Bot. 25:377-383.

White, R. F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99:410-412.

Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M. A., Kleier, D. A., and Raskin, I. 1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. Plant Cell 3:809-818.

Zentmyer, G. A. 1963. Biological control of Phytophthora root rot of avocado with alfalfa meal. Phytopathology 53:1383-1387.