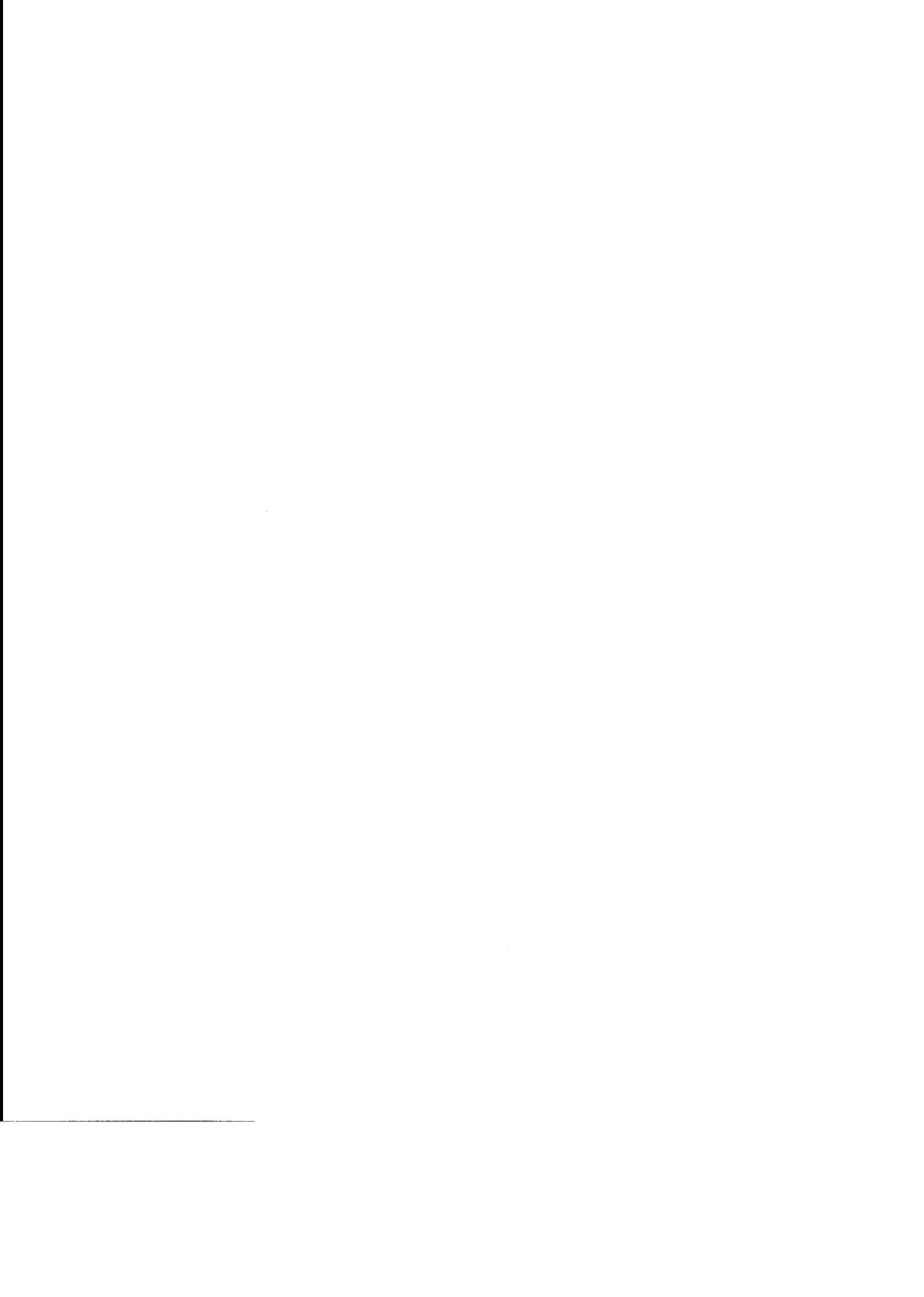


고활성 유도저항성 근권균(EXTN-1)의 실용기술 개발

Development of Induce Systemic Resistance by Plant
Growth-Promoting Rhizobacteria, *Bacillus*
amyloliquefaciens EXTN-1 in Practical Application

연구기관
농업과학기술원

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고활성 유도저항성 근권균 (EXTN-1)의 실용기술 개발”
과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2002년 12월 12일

주관연구기관명 : 농업과학기술원

총괄연구책임자 : 김 충 회

연 구 원 : 박 경 석

이 상 범

배 영 석

남 기 용

전 용 철

박 해 준

안 일 평

김 은 영

곽 민 선

협동연구기관명 : 공주 대 학 교

협동연구책임자 : 문 석 식

협동연구기관명 : 동부한농연구소

협동연구책임자 : 장 성 식



요 약 문

I. 제목

고활성 유도저항성 근권균 (EXTN-1)의 실용기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

유기합성농약의 사용은 환경에 대한 부담이나 농산물에 대한 잔류성 때문에 생물학적 방제와 같은 친환경적 방제방법으로 점차 대체되고 있는 추세이다. 유도저항성은 최근 발견된 생물학적 방제방법의 일환으로 자연 토양 내 살고 있는 근권균을 이용하여 작물체의 각종 병해에 대한 저항성을 유발시켜 병해를 방제하는 방법으로 병 방제뿐만 아니라 수량증진, 숙기단축과 같은 효과도 동시에 기대할 수 있다.

본 연구과제는 총괄연구기관인 농업과학기술원 식물병리과에서 1996년부터 과거 3년간 수행한 근권균에 의한 유도저항성 연구를 수행하여 2,500여 근권균으로부터 유도저항성 능력이 우수한 근권세균 EXTN-1(*Bacillus amyloliquefaciens*) 균를 선발하였다. 이 균주는 유도저항성 생물활성검정 병해인 담배들불병, 오이탄저병, 오이모자익바이러스에 대한 유도저항성 활성을 검정한 결과 식물에 저항성 유도능력이 탁월하였다. 따라서 유도저항성 근권균 EXTN-1의 각종 작물의 종자 coating(분의)이나 Plug 육묘용 상토에 혼합 배양하는 방법으로도 충분한 실용성이 있다고 판단하여 국내의 관련 산업체인 동부한농 및 공주대학교와 공동으로 실용화를 위한 연구를 추진하였다.

유도저항성을 이용한 병 방제방법은 종자나 상토에 간단히 처리함에 의하여 여러 작물에 동시에 적용이 가능하며 그 활성범위가 어떤 특정병해에 그치지 않고 광범위하게 작용하므로 농민들이 사용하기도 대단히 편리한 이점을 가지고 있다. 관련 산업체 측면에서도 종자나 상토 등 처리대상이 부가가치가 높은 물체에 국한하므로 경제성이 높고 기술적으로도 공정개발에 큰 문제가 없으며 또한 여러작물에 동시 적용가능하므로 그 실용화의 가능성은 매우 높다. 국내 유도저항성에 관한 연구는 '90년대 후반부터 시작되어 아직 연구의 초보적 단계에 그치고 있고 실용화를 위한 공정개발 단계에는 이르지 못하고 있다. 외국의 경우는 '90년대 초반 미국 Auburn 대학의 J. W. Kloepper group을 중심으로 많은 연구가 이루어지고 있으며 근권세균이나 내생근권세균(endophytic bacteria)을 중심으로 한 작물체 방어기작의 활성화에 그 초점이 맞추어져 있다. 지금까지의 연구결과를 보면

근권균과 기주식물과의 상호작용에 의하여 기주식물은 저항성 관련 물질 (Chitinase, Beta-1, 3-glucanase) 등을 생산하거나 세포조직의 강화, Phytoalexin 축적, H₂O₂ 등 활성산소 생산에 의하여 저항성이 발현하는 것으로 생각되고 있다. 이와같은 연구를 통하여 최근 다국적 기업인Novartis사에서는 유도저항성을 일으키는 화학물질인 BTH를 개발하여 Actigard 라는 상품명으로 시판하고 있다. BTH는 기존의 농약과는 작용기작이 전혀 달라서 병원균의 성장에는 전혀 영향을 주지 않으며 작물체의 저항성 방어기작만을 활성화시켜 병을 방제하는 효과를 가지며 또한 환경독성을 전혀 일으키지 않으므로 제 3세대 농약이라고도 불리어지고 있다. 그러나 BTH는 저항성 유도 화학물질로서 식물생육을 억제하는 단점으로 인하여 그 사용이 제한적인데 반하여 근권미생물에 의한 유도저항성은 이와 같은 단점이 없어 사용에 훨씬 유리하다. 이와 같은 내용을 종합해 볼 때 유도저항성 근권균에 의한 생물학적방제는 환경친화적일 뿐 만아니라 이에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있어 가까운 장래에 실용화된 상품이 유통될 수 있을 것으로 전망된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구 사업의 내용은 아래와 같다.

- 가. 유도저항성 근권균 EXTN-1의 활성 스펙트럼 검정
- 나. 유도저항성 발현에 미치는 환경영향평가
- 다. 유도저항성균주 EXTN-1의 포장실증실험
- 라. EXTN-1 균주생산 유도저항성 관련 물질의 분리최적화
- 마. 유도저항성 관련활성물질의 화학구조 구명
- 바.유도저항성 물질의 특성 및 기능분석
- 사.EXTN-1 균주의 대량배양기술
- 아. EXTN-1 균주의 종자 및 상토처리기술개발
- 자. 유도저항성 균주 EXTN-1의 산업화공정개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

- 가. 유도저항성 근권균 EXTN-1의 활성 스펙트럼 검정
- 유도저항성 근권균 EXTN-1균주의 토양관주 및 종자(10⁶cfu/ml) 처리는 공

시한 20여종의 식물에 무해하였으며 대부분 종자 발아 및 생육을 촉진시켰다. 또한 일반상토와 점질토에서의 식물생육양상은 서로 달랐으나 대체로 생육을 촉진하며 비의 경우에는 생육이 억제되는 경향이였다.

EXTN-1 처리에 의하여 오이 탄저병(*Colletotrichum orbiculare*), 오이 반점세균병 (*Pseudomonas syringae* pv. *lacrymans*), 도열병 (*Magnaphorte grishia*), 고추시들음병(*Fusarium oxysporum*), 토마토폏마름병 (*Ralstonia solanacearum*), CMV(Cucumber Mosaic Virus), TMV(Tobaco Mosaic Virus), 감자바이러스 (PVY, PVX)등 광범위한 식물병원균이 억제되었다.

나. 유도저항성 발현에 미치는 환경영향평가

EXTN-1 균주의 상추양액에서의 밀도 변이는 양액내의 경우 처음 처리농도에서 차츰감소하여 4주후에는 10배이상 저하되는데 반하여 근권에서는 처음의 처리농도와 같거나 증가하는 경향이였다.

오이의 경우 EXTN-1의 처리는 종자처리와 관주를 병행하는 것이 가장 효율적이었으며 토양처리뿐만아니라 양액재배 조건에서의 처리효과가 우수함을 확인하였다. EXTN-1처리에 의한 초기 저항성 반응이 H₂O₂로부터 기인함을 확인하였으며 EXTN-1 처리에 의해 저항성유전자인PR-1a, HMGR, PAL등 이 발현됨을 확인하였으며 저항성 경로 추적에서 본 균주는 SA 및 JA, Ethylen 경로를 동시에 가동시킬 수 있음을 증명하였다. 또한 본 균에 의하여 저항성이 발현된 오이잎에서 탄저병균의 포자 발아와 부착기형성이 억제되는 반면 Callus 형성은 증가됨을 규명하였다.

다. 유도저항성균주 EXTN-1의 포장실증실험

양액재배의 상추 싹갓에서 생육촉진효과가 우수하게 나타나며 특히 저온기 양액재배농가의 상추 재배에 효율적이다. 토마토양액재배의 경우 *Ralstonia solanacearum*에 의한 토마토 폏마름병을 4주간 효율적으로 방제할 수 있었다. 파프리카에 처리된 EXTN-1은 파프리카의 색깔을 진하게 하여 상품성을 증대시키는 효과가 있었다. 고추의 경우 EXTN-1의 유묘기 처리로 수확기까지 고추 시들음병을 방제할 수 있었다. 오이흰가루병 및 노균병의 발생도 대조구에 비하여 감소하였다. 이와같은 특성 만으로도 본 개발과제의 실용화에는 부족함이 없다.

라. EXTN-1 균주생산 유도저항성 관련 물질의 분리최적화

EXTN-1 균주생산 유도저항성 활성물질을 규명하기 위한 TSA 배지는 효

과적이었으며 Butanol 분획과 Methanol 분획층의 생물검정을 통하여 검정할 수 있었으며 Methanol 분획과 Butanol 분획의 생물활성은 서로 달랐다. 전체 분리정제과정을 볼 때 Butanol 추출법이 가장 안정된 생물검정결과를 나타내었다.

마. 유도저항성 관련활성물질의 화학구조 및 특성규명

Butanol 추출 분획으로부터 오이에 유도저항성을 나타내는 Cyclo dipeptide의 일종인 cyclo(L-tyro-L-pro) 등 6종의 Cyclo dipeptide를 동정하였다. 이중 cyclo(L-tyro-L-pro)은 오이 탄저병에 대한 유도저항성을 나타내며, 저항성 유전자인 PR-1a를 증가시켰다. 또한 이 유도체는 *Pseudomonas* 속균에서 Autoinducer(신호물질)로서 작용하며 이 물질이 *Bacillus* 속에 어떠한 역할을 하는지는 향후 연구되어야 할 과제이다. 이 물질에 대한 용도특허를 준비중이며 나머지 5종의 유도체에 대하여는 충분한 시료가 확보되는 대로 생물검정을 통한 기작을 구명할 예정이다.

사. EXTN-1 균주의 대량배양기술

EXTN-1균주의 산업화 공정을 위하여 대량배양 시스템을 구축하였다.

본 연구는 국내에서 분리한 유도저항성 근권균 *Bacillus amyloliquefaciens* EXTN-1 strain의 실용화를 위한 제형 개발과 그 효과 검정을 실시하였다. 대량 생산을 위하여 Glucose, Yeast Extract, Soybean Powder, CSL의 성분이 함유되는 배지 조건에서 배양액 ml당 5.2×10^9 cfu의 산물이 얻어지는 배양과정을 확립하였으며, 이 배양액을 건조하여 g당 1×10^{11} cfu 수준의 분말을 제제시의 원체로 사용하였다.

아. EXTN-1 균주의 종자 및 상토처리기술개발

종자처리 수화제, 입제 및 미생물 상토 제형의 처방을 확립하였고, 이들을 시험 제제하여 저장안정성과 온실에서 오이 탄저병에 대한 방제 효과를 검정하고, 생육시험을 실시하였다.

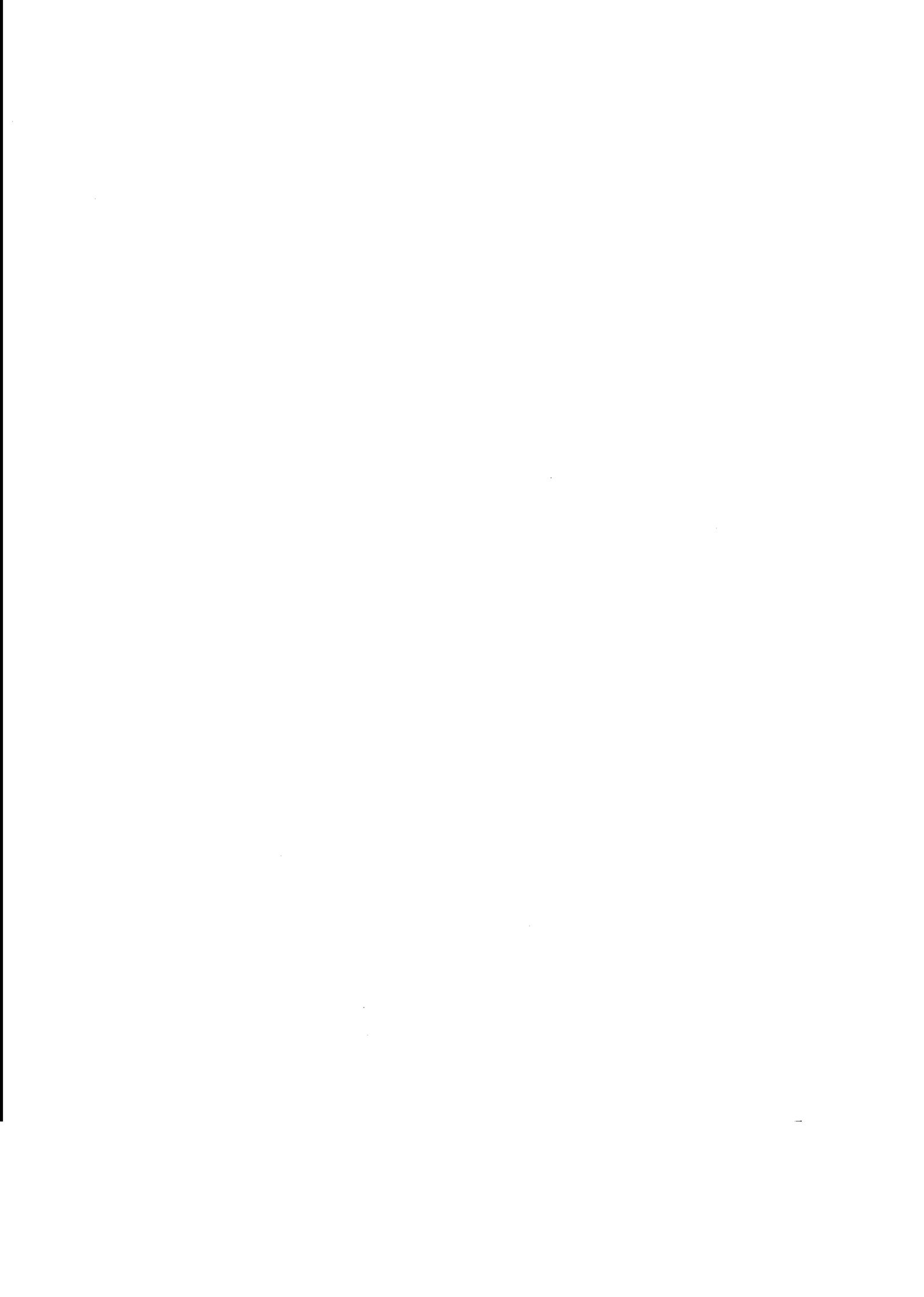
4°C, 30°C, 40°C 온도 조건 하에서 약 12개월간 저장 안정성을 조사한 결과, 입제와 종자처리 수화제 제형의 경우 초기 포자 함량을 비슷한 밀도로 유지하고 있었으며, 미생물 상토 제형의 경우 초기 함량의 1/10 수준으로 밀도가 감소하였다. 각 제형들의 오이 탄저병에 대한 방제 효과를 검정한 결과, 다소 변이가 존재하나 대조 약제의 50% 수준의 방제효과를 보였으며, 미생물 상토에서 작물의 생육시험을 통하여, 기존의 상토와 대등한 수준의 생육을 보임을 확인하였다.

자. 유도저항성 균주 EXTN-1의 산업화공정개발

각 제형의 식물병해에 대한 방제효과를 검증하기 위해 오이 탄저병, 배추 뿌리혹병, 고추바이러스병에 대한 효과를 검증했으며, 근권에서의 EXTN-1의 정착능력을 조사하여 작물체의 근권부에 정착가능한 것을 확인하였다. 입제, 종자처리수화제, 상토 제제에 대한 공정을 확립했으며, 12개월 상온 보관한 시료의 물리화학적 성질을 조사한 결과, 제제직후와 비교하여 보았을 때, 유사한 물리화학적 성질이 유지되어 안정적인 제형임을 확인하였다.

2. 연구개발 결과의 활용계획 및 건의

본 연구를 통하여 개발된 식물근권세균 EXTN-1을 이용한 작물생산은 식물의 저항성유도를 통한 각종 식물병에 대한 저항력증강 뿐 아니라 식물의 생육촉진 및 과채류 및 엽채류의 상품성증강에도 매우 유리하다. 또한 고온기의 칼슘 흡수저해에 의한 토마토 배꼽썩음병 억제효과등 식물생육에 유리한 많은 활성을 보인다. 또한 기작차원에서 본 균주의 처리에 의하여 유도저항성이 활성화된 식물체에서는 진균곰팡이의 포자발아, 부착기형성 등이 억제되며 세포조직의 리그닌화등 저항성반응을 보이며 분자생화학적으로는 병저항성 관련 PR 유전자가 발현됨을 확인하였다. 저항성 경로연구에서도 이 균주에 의한 식물저항성유도는 기존의 학설과는 다르게 Salicylic acid 생성경로인 SAR과 Jasmonic acid, Ethylen 합성 경로를 동시에 가동시킴을 밝혔다. Cyclo peptide의 일종인 유도저항성 물질을 동정하였다. 이와같은 연구로 보아 본 균주를 이용한 산업화는 충분하며 실용화 보완 및 이들 연구로 부터 획득한 유도저항성 활성물질의 대량생산 과 이들 균주 처리시 작용하는 저항성 유전자를 선발하여 저항성 식물을 개발할 가능성이 매우 높다. 따라서 본연구는 생물학적방제제로 실용화되는 것과 더불어 후속 연구를 통한 신 기능성 물질 및 저항성 작물의 개발이 가능하므로 지속적인 관심과 지원이 필요하다.



SUMMARY

Soil drenching or seed priming (10^6 cfu/ml) of *Bacillus amyloliquefaciens* strain EXTN-1 stimulated seed germination and growth of about 20 crops used without any harmful effect. Furthermore, treatment of *B. amyloliquefaciens* strain EXTN-1 showed a broad disease-controlling spectrum to the plant diseases caused by viral, bacterial, and fungal plant pathogens such as cucumber mosaic virus, tobacco mosaic virus, potato virus Y and *Pseudomonas syringae* pv. *lacrymans*, *Ralstonia solanacearum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Magnaphorte grishia*, and *Fusarium oxysporum*.

When *B. amyloliquefaciens* strain EXTN-1 was drenched to lettuce grown in hydroponic system, population of *B. amyloliquefaciens* strain EXTN-1 was similar or increased in the rhizosphere, while the population was gradually decreased up to 10 fold in the hydroponic solution 4 weeks after treatment compared with initially treated population of the bacterium. In case of cucumber, soil drenching after seed coating with EXTN-1 showed best disease protection and plant growth promotion in soil as well as in hydroponic system as method of application for EXTN-1.

Treatment of EXTN-1 increased H_2O_2 amount in early stage and induced the expression of resistance genes, PR-1a, HMGR, PAL. Mechanism involved in induced systemic resistance by EXTN-1 was revealed as simultaneous activation of SA and JA or ethylene metabolic pathways and pre-treatment of EXTN-1 reduced germination and appressorium formation of conidia of *Colletotrichum orbiculare* on the leaf of cucumber with increase of callus formation. Furthermore, treatment of EXTN-1 promoted growth and quality of lettuce grown in cool season with consistency of the effects and inhibited the bacterial wilt on tomato caused by *Ralstonia solanacearum* for 4 weeks after treatment. When EXTN-1 was applied to bell paper grown in hydroponic system, fruit color and quality were improved. In field experiments, treatment of EXTN-1 resulted in controlling of fusarium wilt on pepper until harvesting season with only application to

seedlings, and decreased incidence of powdery mildew and downy mildew on cucumber. Taken all together with above results, *B. amyloliquefaciens* strain EXTN-1 can be considered as a promising agent for commercialization.

Six kinds of Cyclo dipeptide {cyclo(L-tyro-L-pro)} were identified as elicitors inducing systemic resistance, which were purified from butanol extract of EXTN-1 grown on TSA medium. One of them, cyclo(L-tyro-L-Pro) induced systemic resistance on cucumber against *Colletotrichum orbiculare* and also increased expression of PR-1a gene.

For commercialization of *B. amyloliquefaciens* strain EXTN-1, culturing medium was confirmed with addition of glucose, yeast extract, soybean powder, CSL, which produced a cell concentration of 5.2×10^9 cfu/ml. Based on this result, EXTN-1 powder was obtained with the concentration of 1×10^{11} cfu per gram. Population of EXTN-1 in granule or wettable powder type maintained initial population up to 12 months, while population of EXTN-1 in a formulation type for potting soil decreased up to 1/10 level to the initial population of the bacterium at 24 °C. Each formulation types showed a promising effect on the control of cucumber anthracnose up to 50% level when a compared agrochemical was considered as 100% in controlling efficacy.

In conclusion, *B. amyloliquefaciens* strain EXTN-1 selected in this experiment can be used for plant growth promotion and improving product quality of vegetables as well as inducing systemic resistance on vegetables to plant pathogens. Furthermore, treatment of *B. amyloliquefaciens* strain EXTN-1 reduced the incidence of tomato blossom rot caused by calcium deficiency in high temperature season, which indicates that application of EXTN-1 improves physiological status of plants.

CONTENTS

Title : Development of induce systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* EXTN-1 in practical application

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. Biological activities of a selected rhizobacteria which induce sytemic resistance in crops

1. Introduction

2. Materials and Methods

- In vitro expression of ISR by EXTN-1
- Environmental factors to ISR expression
- ISR spactrum by EXTN-1 in major crops
- Application of EXTN-1 in hydroponic culture
- ISR mechanisms by treatment of EXTN-1
- Fractionation and bioassay of ISR inducing substances
- Practical application of EXTN-1
- ISR elicitor fraction from endospore of EXTN-1

3. Results and Discussion

- In vitro expression of ISR by EXTN-1
- Environmental factors to ISR expression
- ISR spactrum by EXTN-1 in major crops
- Application of EXTN-1 in hydroponic culture
- ISR mechanisms by treatment of EXTN-1
- Fractionation and bioassay of ISR inducing substances
- Practical application of EXTN-1
- ISR elicitor fraction from endospore of EXTN-1

Referances

Chapter 3. Identification and purification of ISR substance from EXTN-1

1. Introduction
2. Materials and Methods
 - Isolation of Cyclic despeptide
 - Bioassay of ISR fractions from EXTN-1
 - Isolation of Cyclo dipeptides
 - Identification of isolated compound
 - Physico-chemical characteristic study

References

Chapter 4. Commercialization of *Bacillus amyloliquefaciens* EXTN-1

1. Introduction
2. Materials and Methods
 - Mass production of EXTN-1
 - Development of application for seed coating and soil mixture
 - Preservation and greenhouse test of EXTN-1
3. Results and discussion
 - Mass production of EXTN-1
 - Development of application for seed coating and soil mixture
 - Preservation and greenhouse test of EXTN-1
4. Formulation procedure of EXTN-1
5. Summary

References

목 차

고활성 유도저항성 근권균 (EXTN-1)의 실용기술 개발

제 1 장 서론

제 1 절 서설	3
제 2 절 연구 개발의 목표	5

제 2 장 유도저항성 근권균(EXTN-1)의 생물활성 특성 검정

제 1 절 서 설	6
제 2 절 연구 수행 방법	7
1. EXTN-1의 경시적 발현	7
가. 유도저항성 균주의 활성증진 방안 및 mutant 선발	7
나. 접종원의 양적 차이에 의한 유도저항성의 발현	7
다. 전염원의 양적 차이에 의한 유도저항성의 발현	8
라. EXTN-1에 의한 식물종자 발아 및 유묘기 반응	8
마. EXTN-1의 근권밀도	8
2. 유도저항성 발현의 환경영향 평가	9
가. 오이탄저병 병반형성 및 처리방법	9
3. 유도저항성 근권균 EXTN-1의 주요작물별 활성 스펙트럼 검정	9
가. 오이, 상추, 배추, 쑥갓	9
나. 벼 주요병해 방제효과 검정	9
다. 보리에 대한 EXTN-1 처리효과	9
4. 수경재배에서의 EXTN-1 처리효과	10
5. EXTN-1의 유도저항성 기작	10

가. EXTN-1 근권균주 처리 및 radical scavenger 처리에 의한 오이 조직에서의 활성산소생성	10
나. EXTN-1 균주에 의한 저항성 유전자 발현	10
다. EXTN-1 처리에 의한 오이 표면의 세포학적 관찰	11
라. EXTN-1 처리에 의한 저항성 유전자 발현	11
6. EXTN-1 생산 분획의 생물활성 검정	11
가. 분리 분획별 활성 검정	11
나. 동정된 활성물질의 생물검정	12
7. 유도저항성의 온실 및 포장 검정	12
8. EXTN-1 후막포자 추출액에 의한 식물병 방제효과	13
제 3 절 연구결과	13
1. EXTN-1의 경시적 발현	13
가. 유도저항성 균주의 활성증진 방안 및 mutant 선발	14
나. 접종원의 양적 차이에 의한 유도저항성의 발현	15
다. 전염원의 양적 차이에 의한 유도저항성의 발현	17
라. EXTN-1에 의한 식물종자 발아 및 유묘기 반응	18
마. EXTN-1의 근권밀도	20
2. 유도저항성 발현의 환경영향 평가	22
가. 오이탄저병 병반형성 및 처리방법	22
3. 유도저항성 근권균 EXTN-1의 주요작물별 활성 스펙트럼 검정	24
가. 오이, 상추, 배추, 쪽갓	24
나. 벼 주요병해 방제효과 검정	24
다. 보리에 대한 EXTN-1 처리효과	25
4. 수경재배에서의 EXTN-1 처리효과	27
5. EXTN-1의 유도저항성 기작	34

가. EXTN-1 근권균주 처리 및 radical scavenger 처리에 의한 오이 조직에서의 활성산소생성	34
나. EXTN-1 균주에 의한 저항성 유전자 발현	35
다. EXTN-1 처리에 의한 오이 표면의 세포학적 관찰	36
라. EXTN-1 처리에 의한 저항성 유전자 발현	39
마. 작물 생육 단계가 유도 저항성 발현에 미치는 영향	41
바. EXTN-1에 의한 유도저항성 경로추적	42
6. EXTN-1 생산 분획의 생물활성 검정	43
가. 분리 분획별 활성 검정	43
나. 동정된 활성물질의 생물검정	46
7. 유도저항성의 온실 및 포장 검정	48
8. EXTN-1 후막포자 추출액에 의한 식물병 방제효과	52
참고문헌	54

제 3 장 근권균(EXTN-1)의 유도저항성 활성물질의 동정 및 기능분석

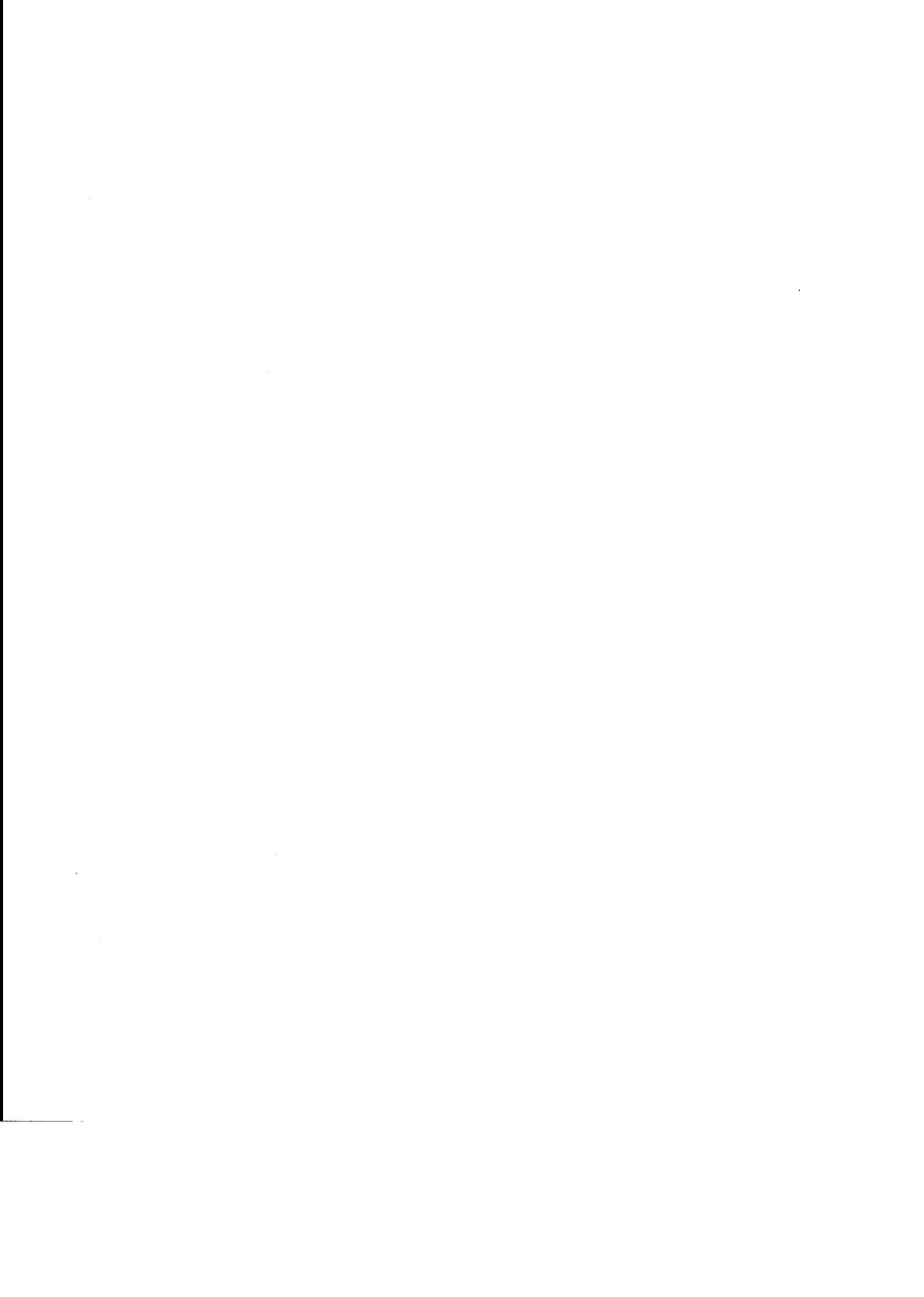
제 1 절 서 설	71
제 2 절 연구방법 및 결과	71
1. Cyclic Dipeptide 의 분리	71
2. EXTN-1 생산 활성분획의 방어유전자 발현 결과	73
3. Cyclic Dipeptide 분리	75
4. Dipeptide의 화학구조 규명	77

5. 화합물들의 물리화학적 성질	78
참고문헌	81

제 4 장 근권균(EXTN-1)의 산업화 공정개발

제 1 절 서설	109
제 2 절 재료 및 방법	111
1. 대량배양을 위한 조건확립시험	111
2. EXTN-1 균주의 종자 및 상토처리 기술개발	112
가. 상토제형 처방확립시험	112
나. 종자처리수화제 처방확립시험	114
다. 미생물 종자펠렛 제형 개발	114
라. 입제제형 기술확립	115
3. 제형들의 온실효과 시험 및 저장안정성, 이화학적 특성조사	115
가. 제형들의 온실효과시험	115
나. 제형들의 저장안정성 조사	117
다. 제형들의 이화학적 특성 조사	118
제 3 절 결과 및 고찰	119
1. 대량배양을 위한 조건 확립시험	119
2. EXTN-1 균주의 종자 및 상토처리 기술개발	122
가. 상토제형 처방확립시험	122
나. 종자처리수화제 처방확립시험	127

다. 미생물 종자펠렛 제형 개발	130
3. 제형들의 온실효과 시험 및 저장안정성, 이화학적 특성조사	132
가. 제형들의 온실효과시험	132
나. 제형들의 저장안정성 조사	137
다. 제형들의 이화학적 특성 조사	137
4. 각 제형의 공정	139
제 4 절 결과요약	140
참고문헌	141



제 1 장 서 론

토양 중에는 식물생육에 관련하여 다양한 기능을 나타내는 많은 종류의 미생물들이 살아가고 있다. 특히 식물근권(rhizosphere)에 살아가는 미생물 군은 토양뿐 아니라 뿌리에서 분비되는 각종 유기물을 취하며 생존하는데 식물이 직접 흡수할 수 없는 성분을 식물이 이용 가능하도록 변환시켜 주거나, 도와주는 역할을 하기도 한다. 즉, 불용성 인산의 가용화, 질소 고정 등을 통해 식물생육촉진 효과를 부여하며 또한 항생물질, HCN, siderophore 등의 생산을 통한 병원균 생육 및 식물 침입 억제 결과 식물 병 방제 효과를 갖게한다.

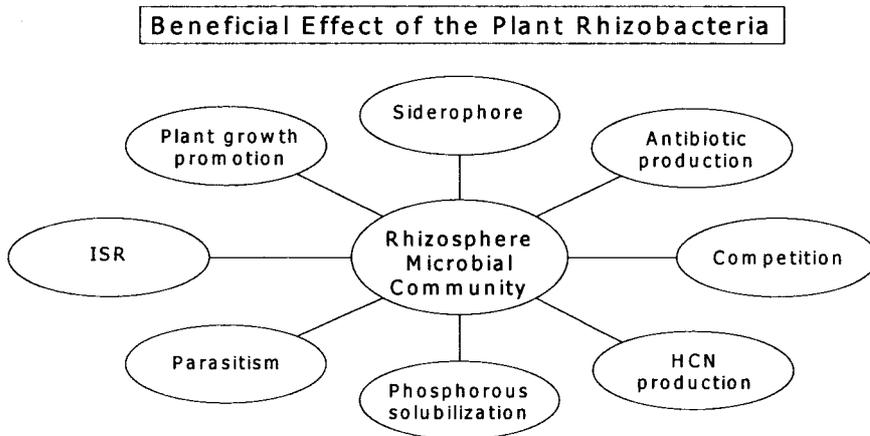


Fig. 1. Effect of rhizobacteria on the plant.

지금까지 각종 식물병의 생물학적 방제는 주로 병원균의 생육을 직접적으로 억제하는 항생기작 및 병원균과의 영양경쟁 등에 이론적 기초를 두었으나 최근에 선발된 생육촉진 근권세균 (plant growth promoting rhizobacteria ; PGPR) 이 특정식물의 근권에 정착하여 저항성을 유도하는 기작 (Induce systemic resistance)이 증명되면서 유도저항성 능력이 우수한 근권미생물을 선발하여 식물병의 생물학적 방제에 이용하기 위한 많은 연구가 수행되고 있다. 특히 유도저항성을 이용한 생물학적방제는 식물체가 가지고 있는 자체방어 시스템을 가동시켜 줌으로서 식물병을 방제할 수 있는 기술로서 일단 식물체에 저항성이 유도되면 곰팡이에 의한 병해뿐 아니라 세균, 바이러스 등 여러 가지 병해에 대한 복합적인 방제가 가능하다. 따라서 근권미생물의 근권정착에 의한 식물의 유도저항성 이용기

술은 최근 농약의 과다사용에 따른 농업생태계의 개선뿐 아니라 저공해 무농약 과채류생산 등의 농업생산에 많은 장점이 있을 것으로 기대된다.

토양중의 식물뿌리 주변에 생존하면서 근권에서 분비되는 영양분을 섭취하며 살아가는 근권미생물이 식물생육에 미치는 영향은 막대하다.

이들이 갖는 많은 유익한 기능(Fig 1) 중에서도 근권미생물이 생산하는 항생물질은 항생기작을 뒷받침하는 주요 방제 원리로 설명되고 있다. *Trichoderma*, *Gliocladium*속의 선발된 항진균성 곰팡이균은 *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora* 등 난 방제성 주요 토양병원균의 생물학적방제에 사용되고 있으며 *Trichodermin*, *Gliotoxin*, *Gliovirin* (Howell 1985) 유도체 등의 항생물질을 생산하는 경우가 대부분이다. 그 외에 *Verticillium*, *Penicillium*, *Chaetomium* spp 등의 균주도 빈번하게 이용된다.

근권세균의 경우에는 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* 속 등을 이용한 생물학적 방제가 주종을 이루고 있으며 주로 특정 병원균에 대한 항생기작을 갖는다. 또한 이들이 분비하는 항생물질을 보면, *Pseudomonas*속 또는 *Burkholderia*속에서 발견되는 Pyrrolnitrin, Pyoluteorin, 2, 4, D-acetyl-Phluroglucinol, Phenazine 유도체를 들 수 있으며 *Bacillus*속의 경우에는 주로 Itulrin 또는 Pimaricin 유도체등의 항생물질이 보고되어져 있다.

근권세균은 식물의 뿌리에서 생산되는 분비물과 분해산물을 영양원으로 살아가며 따라서 뿌리 표면에는 다양한 근권세균들이 존재한다. 이들 균주중 식물 생육촉진근권세균 (plant growth-promoting rhizobacteria) 은 뿌리의 표면이나 내부에 기생하면서 근권내에 서식하는 식물 생육저해균 (deleterious micro-organism)의 생육을 억제할 뿐 아니라 토양전염성 병해의 침입으로부터 식물을 보호한다.

이와같은 PGPR의 유익한 기능으로 식물의 생육촉진현상이 일어나는데 건전한 토양조건보다는 식물 생육조건이 불충분한 조건에서의 식물생육촉진이 두드러지게 나타난다. 이들 균주가 생산하는 siderophore에 의한 기능이 잘 알려져 있는데 토양 내에서의 ion 경쟁, chitinase, beta-1,3-glucanase 등 병원균의 균사체를 용해할 수 있는 효소 생산 증진 및 항생기능을 가져 식물병원균을 억제한다. 또한 병원균의 생육을 억제할 수 있는 항생물질 분비에 의한 식물병의 방제효과는 많은 작물과 다양한 병원균을 대상으로 시험되어져 왔다.

최근의 근권미생물에 의한 기작으로서 Kloepper(1992)는 선발된 몇 가지 근권세균을 종자코팅에 의한 방법으로 근권에 정착시켜 오이탄저병 발병의 현저한 감소를 관찰하였다. 또한 PGPR 균주의 토양내 처리만으로도 방제효과를 높일 수 있었다. 이 균주는 오이탄저병균을 억제할 수 있는 항균물질을 생산하지 않는데도 불구하고 오이탄저병을 효과적으로 방제할 수 있었으며 또한 오이 탄저병 이외 수종의 바이러스 병 및 진균 병에 대해서도 방제효과를 나타내었다. Leeman은 형광성 *Pseudomonas* 길항 세균중 유전적으로 길항력을 없애거나 siderophore를 생산할 수 없는 균주와 정상균주(wild type)의 ISR 비교 연구를 통하여 항생물질이나 siderophore 등의 식물병 방제 관여 물질의 생산 없이도 카네이션의 *Fusarium*에 의한 시들음병을 방제할 수 있음을 증명하였다.

PGPR에 의한 유도저항성은 일차적으로 균체외벽에 존재하는 LPS (lipopolysaccharide)가 elicitor로 작용하여 식물체에 저항성 유도를 위한 신호를 전달하는 것으로 보고되었다. 또한 형광성 *Pseudomonas*에서 생산되는 nanogram 단위의 SA가 ISR의 신호 물질로 작용한다는 연구도 보고되었다. 이와같이 ISP-PGPR에 의하여 식물체에 저항성이 유도되면 식물 조직의 리그닌화에 의한 조직세포 강화가 일어나며, phenol 및 phytoalexin 등의 저항성 관련 방어물질을 증가시켜 차후의 병원균의 침입으로부터의 감염을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 저항성은 ISR(Induced Systemic Resistance)로 칭하며, 병원균-기주 식물과의 관계에서 일어나는 전신획득저항성(SAR)과 매우 유사한 것으로 생각된다.

최근 ISR-PGPR균에 의한 유도저항성은 jasmonic acid 및 ethylene 대사에 의하여 조절되며 그 외 2 - 3가지의 아직 증명되지 않은 방어 기작이 존재하는 것으로 연구되어지고 있는데 이와 같은 방어 기작이 규명될 경우 ISR을 이용한 생물학적방제에 매우 중요한 단서를 제공하게 될 것이다.

ISR-PGPR에 의한 생물학적 방제는 몇 가지 작물에 대하여 집중적으로 연구되어지고 있으며 화분과에도 효과가 있는 것으로 보고되고있다. 생물학적 방제를 위한 ISR-PGPR균주는 보통 대상식물의 종자에 고농도로 코팅되거나 이식 전의 유묘를 ISR-PGPR균주의 현탁액에 침지하여 온실 및 포장시험에 사용된다. 수일 후 ISR-PGPR균주에 의하여 저항성이 유도되면 대상병원균을 접종하여 병 발생을 평가한다. 토양병원균(soil-borne pathogen)의 경우에는 뿌리를 나누어 ISR-PGPR을 접종한 부분과 병원균이 접종된 부분으로 나누어서 접종한 다음 병 발생을 평가한다.

ISR-PGPR에 의한 유도저항성 검정은 토양병원균에서 보다는 엽권 병원균을 통하여 연구되어지는데 이것은 처리된 ISR-PGPR 균주와 격리되어 손쉽게 검정되기 때문이다. 많은 경우 ISR-PGPR균주는 ISR 기능뿐 아니라 2,4-diacetyl-phloroglucinol, phenazine 및 pyrrolnitrin 등의 항균물질과 siderophore, SA등을 동시에 생산되는데 이러한 특성은 ISR-PGPR균주의 생물학적 방제 효율을 상승시키는 요인으로 생각된다.

제 1 절 연구개발의 필요성

유기합성농약의 사용은 환경에 대한 부담이나 농산물에 대한 잔류성 때문에 생물학적 방제와 같은 친환경적 방법으로 점차 대체되고 있는 추세에 있다. 유도저항성 근권균을 이용한 생물학적방제는 자연 토양내에 살고있는 근권균을 이용하여 작물체의 각종 병해에 대한 저항성을 유발시켜 병해를 방제하는 방법으로 일단 고활성 근권균이 선발되면 작물의 종자에 분의 하거나 근권균 현탁액에 종자를 침지하는 방법으로 사용이 가능하므로 그 처리방법이 매우 간단하고 종자나 상토 등 처리대상 물체가 매우 제한적이어서 그 실용성과 경제성이 매우 뚜렷하다. 근권중에는 PGPR균(plant growth-promoting rhizobacteria)처럼 유도저항성 능력 뿐 아니라 작물체

의 성장촉진 능력을 동시에 가진 균도 있어 병 방제와 수량증진, 숙기 단축과 같은 효과도 동시에 기대할 수 있으므로 자연 토양내 수없이 많이 존재하는 근권균을 대상으로 활성이 높은 균주를 검정할 수 있는 시스템 개발이 필요하다. 선발된 고효성 근권균을 대량으로 배양한 gm 종자에 코팅하거나 시판 상토나 플러그용 상토에 배양하는 기술은 유도저항성 근권균의 실용화에 반드시 필요하며 이들 제형시 근권균의 생존활성이 계속 유지되는지에 대한 모니터링이 필요하다.

산업적인 측면에서 유도저항성을 이용한 병 방제방법은 종자나 상토에 간단히 처리함에 의하여 여러 작물에 동시에 적용이 가능하며 그 활성범위가 어떤 특정 병해에 그치지 않고 광범위하게 작용하므로 농업적 이용에 편리성을 더해준다. 관련 산업체 측면에서도 종자나 상토 등 처리대상이 부가가치가 높은 물체에 국한하므로 경제성이 높고 기술적으로도 공정개발에 큰 문제가 없으며 또한 여러 작물에 동시적용이 가능하므로 그 실용화 가능성이 매우 높다 하겠다.

국내의 유도저항성에 관한 연구는 90년대 후반부터 시작되어 아직 초보적 단계에 그치고 있고 실용화를 위한 공정개발 단계에는 이르지 못하고 있다. 외국의 경우에는 90년대 초반 미국 Auburn 대학의 Kloepper 그룹을 중심으로 많은 연구가 수행중이며 근권세균 및 내생근권세균(Bacterial endophyte)를 중심으로 한 작물체 방어기작의 활성화에 그 초점이 맞추어져 있다. 본 연구에서 공시한 EXTN-균주는 근권균과 기주식물과의 상호작용에 의하여 기주식물은 저항성관련 물질(PR proteins)을 생산하거나 조직 세포의 강화 Phytoalexin 축적 및 과산화 수소의 생산에 의하여 저항성이 발현되는 것으로 생각된다. 또한 Pieters 등에 의하면 근권미생물에 의한 식물의 유도저항성은 JA, Ethylen 경로를 통하여 이루어지는 것으로 알려져 있으나 Mahaufer, Park 등의 결과를 보면 Salicylic acid 경로에 의하여도 발현됨을 알 수 있다. 이와 같은 연구를 통하여 최근 Norvartis사에서 유도저항성을 일으키는 화학물질은 BTH를 개발하여 Actiguard라는 상품명으로 시판되고 있다. BTH는 기존의 농약과는 작용기작이 전혀 달라서 병원균의 성장에는 전혀 영향을 주지 않으며 작물체의 저항성 방어기작만을 활성화시켜 병을 방제하는 효과를 가지며 또한 환경독성을 전혀 일으키지 않으므로 제 3세대농약으로 불리고 있다. 이와 같은 특성으로 보아 작물체 저항성을 유도하는 근권균의 실용화는 현재 제품으로 유통되는 것은 아직 없으나 항균효과를 기초로 한 근권균을 이용한 몇몇 제품이 상품화된 것을 감안하면 그 제형기술을 이용한 유도저항성 근권균의 실용제품이

가까운 장래에 출현할 수 있을 것으로 전망된다.

제 2 절 연구개발의 목표

기 선발된 유도저항성 근권균주인 EXTN-1 균주의 주요작물 및 주요병해에 대한 활성 스펙트럼을 검정하고 이들 균주가 생산하는 유도저항성 활성물질의 동정 및 작용기작을 분석한다. 아울러 EXTN-1 균주의 농가 보급을 위한 배양조건, 내생포자형성 및 제형화 기술을 개발하여 식물에 유도저항성 일으키는 근권균 EXTN-1을 산업화하고자 한다.

제 2장 유도저항성 근권균 EXTN-1의 생물활성 특성검정(제1세부과제)

제 1 절 서설

근권미생물을 이용한 생물학적방제는 식물근권에 살아가는 많은 미생물 중 근권내에 생존하면서 식물뿌리 주변의 유해 미생물 생육을 억제하고 식물생육을 촉진하는 기능을 농업적으로 활용하는 기술이라 할 수 있다. 이들 미생물의 주요 기작은 항생(antibiosis), 경쟁(competition) 등의 기작을 주축으로 한 많은 연구가 수행되어져 왔으며 생물학적 방제의 주요 기작이라 할 수 있다. 근권미생물을 공시한 작물에 처리할 경우 병해 방제뿐 아니라 식물의 생육이 촉진되는 현상을 동시에 나타내는 경우가 많다. 그러나 이와같은 현상은 토양환경 및 기주에 따라 발현 정도가 매우 달라진다. 이와 같은 특성이 생물학적 방제에서의 재현성을 결정짓는 중요한 잣대가 된다.

근권에 생존하면서 식물의 자체 방어기작을 활성화 시키는 연구는 비교적 최근에 밝혀진 근권 미생물의 유용기능으로 아직 그 작용기작이 완벽하게 밝혀지지 않았지만 생물학적 방제의 주요기작으로 인식되고 있다. 최근의 연구 결과를 보면 근권세균에 의한 식물의 유도저항성은 식물병원균에 대한 억제효과 뿐아니라 생육을 촉진하고 불량환경에 대한 저항력을 높여주는 효과가 있다.

이런 차원에서 근권미생물에 의한 유도저항성은 기존의 PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) 에서 식물의 생육을 활성화시키는 Plant Health Controlling Rhizobacteria 로서의 개념이 더 합리적일 것이다. 즉 유도저항성이 발현된 식물은 식물 병에 대한 억제력이 높아질 뿐 아니라 뿌리발육촉진, 생육촉진, 세포벽강화 및 체내저항성 물질 축적 등의 현상을 가져온다. 활력이 증진된 식물은 병원균, 곤충 등 생물적 원인에 의한 스트레스 뿐 아니라 외부의 열악한 환경 조건 즉 저온, 고온, 수분 스트레스에 의한 저항력도 강화된다. 이와 같은 근권 미생물의 특성은 최근의 화학농약 및 비료의 과다사용 등에 의한 환경오염문제를 해결 할 수 있는 대안으로서 유력하다. 본 연구는 유도저항성 능력이 우수한 근권세균을 이용하여 실용화에 접근하는 예로서 본 연구팀이 최초의 시도이다.

제 2 절 연구 수행 방법

1. EXTN-1의 경시적 발현

가. 유도저항성 균주의 활성증진방안 및 mutant 선발

EXTN-1균의 근권내 행동 과 토양내 분포등 농업환경 조건에서의 밀도의 경시적 변화를 조사하기 위하여 rifampicin에 내성인 균주를 선발하였다. rifampicin (Sigma Co)를 Acetone 에 녹여 1000 ppm의 stock solution 을 제조한 다음 TSA 기본배지에 rifampicin을 10, 20, 50, 100, 200ppm의 농도가 되도록 한 다음 각각 내경 87.5cm의 패트리디쉬에 분주하였다. 공시균주인 EXTN-1은 -80 °C 로 보존된 균주로 부터 분리되어 TSA 배지에서 28C로 24시간 배양된 균주를 사용하였다. EXTN-1이 접종된 rifampicin 첨가배지는 28C로 3일간 배양한 다음 형성된 콜로니를 rifampicin 100ppm 농도까지 단계적으로 내성을 높여 100ppm에서도 자라나게 하였다.

내성균주의 활성능력을 조사하기 위하여 Wild type 과 주요식물병원균인 *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea* 에 대한 생물활성을 비교하였다. 또한 오이 탄저병에 대한 유도저항성 검정을 위하여 은성백다다기 오이를 피트모스상토에 파종하여 2주 후 식물에 EXTN-1균을 10^6 cfu/ml 농도로 접종하여 저항성을 유도한 다음 파종 3주후 오이탄저병균인 *C. orbiculare*를 10^5 cfu/ml으로 하여 silwet77을 0.001%로 첨가한 다음 분무접종하였다.

바이러스에 대한 억제효과는 담배 모자익 바이러스(PPMoV)를 농과원 식물병리과 바이러스연구실로부터 분양받아 Samsun 유묘에 증식하였으며 파종 4주 후의 담배유묘에 EXTN-1을 접종한 다음 일주 후 증식된 식물로부터 얻어진 Virus 즙액을 접종하였다.

나. 접종원의 양적 차이에 의한 유도저항성의 발현

EXTN-1 균주의 최적 처리 농도를 규명하기 위하여 10^6 및 10^8 cfu/ml을 대조처리인 증류수처리와 함께 3주된 담배(Samsun)묘에 토양관주한 다음 1주 후까지 생육을 조사하였다.

다. 전염원의 양적 차이에 의한 유도저항성 발현

오이 탄저병 발생에 미치는 전염원의 양은 10^4 및 10^6 spore/ml로 하여 대조처리와 함께 시험하였다. 은성 백다다기오이 3주 유묘에 포자현탁액을 각각의 처리별로 접종한 다음 풍건후 25C 접종상에 24시간 정치시킨 후 온실 조건으로 옮겨 1주일 째 병반을 조사하였다.

라. EXTN-1에 의한 식물종자 발아 및 유묘기 반응

EXTN-1 처리에 의한 식물의 발아 및 식물생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 농과원 표준상토와 논토양(clay soil)을 공시하여 20품종을 공시 하여 시험하였다. 종자는 1% sodium hypochlorite solution에 2분간 침지하여 표면살균 하였으며 EXTN-1균주를 10^6 cfu/ml의 농도로 종자별로 각각 2시간 침지한 다음 풍건하였다. 풍건된 각각의 종자는 플라스틱 사각포트(12x15x8cm)에 담겨진 공시토양에 파종하여 발아율과 생육상황을 3주째 조사하였다. 20가지의 곡류, 과채류 및 엽채류의 발아와 생육에 EXTN-1이 미치는 영향을 조사하여 EXTN-1의 식물생육촉진 spectrum을 조사하고자 하였다. EXTN-1 배양체를 수거하여 1×10^6 cfu/ml로 농도를 조절한 다음 종자를 1일간 침지하였다가 상토에 심었다. 대조구는 멸균한 생리식염수에 1일간 침지하였다가 파종하였다. 공시한 작물은 강낭콩, 근대, 녹두, 들깨, 고추(마니파), 메밀, 보리, 수수, 완두(그린), 울무, 조, 쑥갓(중엽), 상추(진자측면), 옥수수(찰옥2호), 참깨, 참밀, 추청벼, 토마토, 팥 등이었으며 화곡류의 경우는 재래시장에서 소량씩 구입하여 공시하였다. 1처리당 3반복하였으며 반복당 8주씩이었으며 완전임의 배치하여 JMP(SAS Co.)로 통계처리 하였다.

마. EXTN-1의 근권밀도

-Rifampicin 내성 표지를 지닌 EXTN-1R을 48시간 동안 암조건, 28°C에서 배양한 후 1×10^6 cfu/ml로 농도를 조절하고 2일간 실온에서 증류수에 담가 최아시킨 담배 품종 Samsun 종자와 최아시키지 않은 담배 종자를 세균현탁액에 1일간 침지하여 파종하였다. 파종 10일, 20일 후 뿌리 조직 1g씩을 채취한 다음 생리식염수 9 ml를 가한 후 마쇄하고 serial dilution 한 다음 100ppm rifampicin을 가한 tryptic soy agar에 도말하여 뿌리조직 g당 cfu를 측정하였다.

-EXTN-1 균주의 토양내 밀도변이를 조사하기 위하여 순환식 양액재배 시스템을 이용하였다. 양액은 토마토용한방 수경액(코실CO)을 상추재배에

맞게 조정하여 사용하였다. 발아후 2주묘(플러그)를 이식한다음 양액에 EXTN-1균의 후막포자를 104 cfu/ml, 106 cfu/ml 및 무처리로 하여 6주까지 생육을 조사하였으며 1주에 한번씩 근권 및 양액의 EXTN-1 균주의 밀도를 조사하였다. 밀도조사는 양액 1cc당 세균수로 하였으며 근권 밀도는 뿌리 1g당 세균수로 계산하였다.

2. 유도저항성 발현의 환경영향평가

가. 오이탄저병 병반형성 및 처리방법

유도저항성 발현을 위한 최적 조건을 구명하고자 오이유묘의 엽위별 탄저병 발병율을 조사하였다. 엽위별로 EXTN-1처리에 의한 효과는 크게 다르지 않았으나 무처리에서의 탄저병 발병율은 2본엽에서 가장 많았다. 또한 유도저항성에 의한 발병율의 차이도 가장 크므로 차후의 유도저항성 평가에는 2본엽을 기초로 하였다.

3. 유도저항성 근권균 EXTN-1의 주요작물별 활성 스펙트럼 검정

가. 오이, 상추 배추, 쪽갓

EXTN-1 (*Bacillus amyloquifaciens*) 현탁액을 10^9 cfu/ml 농도로 오이, 상추, 배추 및 쪽갓에 각각 50 ml 씩 관주하여 성장촉진 여부를 조사하였다. 400ml 용 백색원형포트에 농과원 표준상토를 사용하였으며 6반복 완전임의 배치하였다.

나. 벼 주요병해 방제효과검정

벼 주요병해인 도열병(*Magnaphorte grishia*) 및 벼 깨씨무늬병(*Bipolaris oryzae*) 에 대한 유묘검정을 실시하였다. EXTN-1은 파종후 15일째 토양내로 10^6 cell/g 로 처리하였다. 공시품종은 낙동으로 하였고 공시병원균인 도열병균은 Oatmeal 배지에서 형성된 도열병균의 포자를 50000 포자/ml 로, PDA 배양기에 형성된 벼 깨씨무늬병을 10000포자/ml 로 하여 파종후 20일 묘에 접종하여 습실 처리후 온실에서 7일째 병반 면적율을 IRRI 기준에 의하여 조사하였다.

다. 보리에 대한 EXTN-1 처리효과

주요 보리품종인 진양, 부농, 울보리를 공시하여 10^6 cfu/ml로 조절된

EXTN-1 균의 내생포자를 종자 1g당 1cc씩 무균적으로 침적한 다음 풍건하여 파종하였다. 플라스틱포트(40ml)에 각각 파종된 종자는 25C 전후의 온실조건에서 4주까지 생육상황을 조사하였다.

4. 수경재배에서의 EXTN-1 처리효과

온실에서의 EXTN-1 처리는 1.라와 동일하게 처리하였으며 농가포장(부천, 정선)에서의 상추에 대한 처리효과는 농가자체 조성에 의한 수경액을 사용하였으며 모두 재배관리는 관행에 따랐다. 상추 싹갓은 이식후 4주까지 생육상황을 조사하였다. EXTN-1은 10^6 cfu/ml의 농도로 수경액에 희석되었으며 3월 초순경에 처리하여 4월 20일 및 5월 16일등 수차례 생육을 조사하였다.

유도저항성 근권균인 EXTN-1의 토마토 세균성 풋마름병에 대한 방제효과를 검정하기 위하여 수경액 내에 공시균주인 EXTN-1 균주의 세균현탁액을 10^6 cell/ml의 농도로 접종하였다. 양액은 원시표준 양액조성의 여름용으로 제조하였다. 토마토는 방울토마토인 꼬꼬품종을 파종한 후 4주째 양액재배용 펄라이트배드 및 락울 시스템 재배에 정식함과 동시에 EXTN-1 균주를 투입하였다. 정식후 2주째에 Hara의 선택배지에서 24시간 배양한 풋마름병균인 *Ralstonia solanacearum* 균주를 양액내로 106 cell/ml로 투여하였다. 이때 공시 근권균으로 *Pseudomonas*속 균주인 950816-1, 950816-6, 951228-7, 961111-3, H32-5번 균주와 비교하였다.

5. EXTN-1의 유도저항성 기작

가. EXTN-1 근권균주처리 및 Radical scavenger 처리에 의한 오이 조직에서의 활성산소생산

EXTN-1에 의한 Oxidative burst의 경로추적을 위하여 Radical scavenger로서 Verapamile, Tiron, DPI(diphenyleneiodonium chloride), Catalase를 공시하여 발아후 2주묘의 오이줄기를 3mm disc로 절단하여 radical scavenger와 EXTN-1 및 Luminol substrate를 반응시킨후 X-ray film을 감광시켜 발광량을 검출하여 Oxidative burst 경로를 추적하였다.

나. EXTN-1 균주에 의한 저항성 유전자발현

PR-1a promoter gene 및 GUS reporter gene이 encoding된 재조합 담배품

종(Xnathi nc)을 이용하여 Jefferson(1984)의 GUS 활성 측정법을 조정하여 EXTN-1에 의한 PR-1a promoter gene 발현을 조사하였다.

다. EXTN-1 처리에 의한 오이 표면의 세포학적관찰

EXTN-1균주를 처리하여 저항성을 유도시킨 오이식물에 오이탄저병균인 *C. orbiculare*(10^5 spore/ml)를 접종한 후 잎 표면을 형광성 현미경(Nikon)을 이용하여 관찰하였다. EXTN-1 및 *Bacillus pumilus* INR-7 처리에 의하여 유도저항성이 발현된 오이잎에서의 탄저병균의 행동을 관찰하기 위하여 저항성이 유도된 오이잎에 탄저병균을 접종후 12시간후부터 탄저병균의 발아, 부착기형성, Callus형성 유무와 과민감반응을 형광현미경으로 관찰하였다.

라. EXTN-1 처리에 의한 저항성 유전자발현

EXTN-1에 의한 식물 방어 관련 시스템의 경시적 발현을 조사하기 위하여 방어 관련 유전자인 PR-1a, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 및 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) 유전자를 탐침 유전자(probe)로 이용하여 Northern 혼성화 반응 분석을 시행하였다. Rifampicin 내성 EXTN-1 균주를 1×10^6 cfu/ml 농도로 원예용 상토에 처리한 다음 2주간 육묘한 담배 (품종: Samsun)를 옮겨 심고 24시간 단위로 잎을 수거하여 초저온 (-70°C) 보관하였다. 시료를 액체질소를 가하며 마쇄한 후 총 RNA를 추출하고 membrane에 capillary transfer하여 blot을 완성한 후 전혼성화 반응을 시작하였다. 상기 유전자를 방사성 동위원소 (α - ^{32}P dCTP)를 이용하여 labeling하고 혼성화 반응을 36시간 진행시킨 다음 washing하고 X-ray film에 노출시켰다.

6. EXTN-1 생산분획의 생물활성검정

가. 분리분획 별 활성검정

TSA배지 10리터를 페트리디쉬에 분주하여 EXTN-1균주를 접종하여 1주간 28C로 배양하였다. 배양된 시료를 80% MeOH로 추출하여 여과한 후 균체를 제거하였다. 추출된 시료는 감압농축기로 농축되었으며 500ml의 MeOH에 녹여졌다. 이 시료의 1ml을 분취하여 MeOH를 제거한 다음 물에 녹여 C-18 cartridge 컬럼을 통과하여 MeOH 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100%로 용출하여 생물검정 시험에 공시하였다. 각각의 분획은 농축후 0부

터 -10^7 배까지 희석하여 오이 및 담배식물에 처리한 다음 초장, 줄기내경, PR-1a GUS 활성(5-나참조), 등 식물생육상황을 조사하였다.

나. 동정된 활성물질의 생물활성

동정된 활성물질중 화학구조가 결정된 F2 분획의 생물검정을 수행하였다. 동정된 Cyclo dipeptide를 80, 40, 20, 10, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001ppm 까지 희석하고 대조 처리로서 대조처리인 BTH를 0.01, 0.1, 1.0ppm으로 희석하여 파종3주후 오이유묘의 잎에 0.1ml씩 주입하였다. PR-1a GUS활성은 5-나 항에서와 같이 처리하였으며 오이탄저병에 대한 유도저항성 검정을 위하여 활성물질 주입후 1주째 탄저병균을 살포하여 조사하였다.

7. 유도저항성의 온실 및 포장실증검정

Chemical inducer인 ASA (amino salicylic acid), BABA (Beta-amino butyric acid)와 EXTN-1을 혼용하여 유도저항성이 높아지는지 시험하였다. 경종방법은 시료처리외에는 표준경종법에 따랐으며 공시품종으로는 마니따고추를 사용하였다. 100평의 비닐하우스 포장에 각각의 처리별로 40주씩 이식한 다음 EXTN-1현탁액을 10^8 cfu/ml로 50ml씩, chemical inducer는 1mM ASA, 20mM BABA를 포장 정식 시에 50ml씩 1회 처리하였다.

처리후 초장, 줄기직경, 이병과수를 조사하였다. 영이도 동일한 처리로 실험하였으며 오이노균병 및 흰가루병의 발병률을 처리별로 조사하였다.

고추 노지포장에서도 EXTN-1, Amino salicylic acid, DL-3-Aminobutyric acid, 및 EXTN-1과 Chemical 혼합 처리후 자연적으로 발생한 이병과수율. 각 처리구에서 임의로 5주를 선택하여 전체과수에 대한 이병과수 수를 조사하고 EXTN-1과 Chemical 혼합 처리에 따른 고추식물 초장 및 줄기 굵기를 조사하였다.

노지포장에서의 고추 시들음병에 대한 EXTN-1의 효과는 Fusarium이 자연 발생된 포장에 EXTN-1현탁액 처리, *Burholderia gladioli* 및 923-87(*Burkholderia* sp.) 및 SE34(*Bacillus* sp)균주 와 대조처리로 하여 시험되었으며 1처리당 40주씩 공시하였다. 공시균주(10^6 cell/ml)는 육묘중에 1회 관주처리 되었다.

8. EXTN-1 후막포자 추출액에 의한 식물병 방제효과

EXTN-1 후막화현탁액 (10^{11} cfu/ml) 100ml을 121C로 20분 살균후 1시간 정치하여 침강된 고형분을 제거하여 20ml의 시료를 이용하여 시험하였다. 본 시료를 원액 10, 100, 1000배로 살균증류수와 함께 희석하여 담배-5주-유묘(Xanthi nc)에 0.1ml 씩 infiltration 한다음 1주후 *Erwinia carotovora* SCC1 (10^7 cfu/ml)을 살포한다음 24시간 습실처리하여 병해 정도를 조사하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. EXTN-1의 경시적 발현

유도저항성 근권균 EXTN-1균주(Fig.1A)는 여러 가지작물에 다양한 형태의 생물활성을 나타낸다. 이 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*로서 자연계에 무수히 존재하는 균으로서 주요식품의 하나인 고추장 된장을 만드는 메주의 발효에도 관여하는 균이다. 식물에 저항성을 유도하는 이 균주는 고농도로 사용할 경우 식물에 생육저해를 가져오기도 하지만 대체로 식물체의 생육을 이롭게 하는 기능을 갖는다. 특히 현재 바이러스 병해를 위한 특정한 방법이 제시되지 못하고 있는 현실에서 본 균주 처리에 의한 바이러스병 억제는 매우 괄목할만한 결과이다(Fig.1B). 즉 다양한 식물병원균에 대한(Fig.1B) 식물의 저항력을 높이며 식물의 발근촉진, 발아촉진 및 근 활력증진등 많은 활성을 갖는 것으로 실험되어졌다.

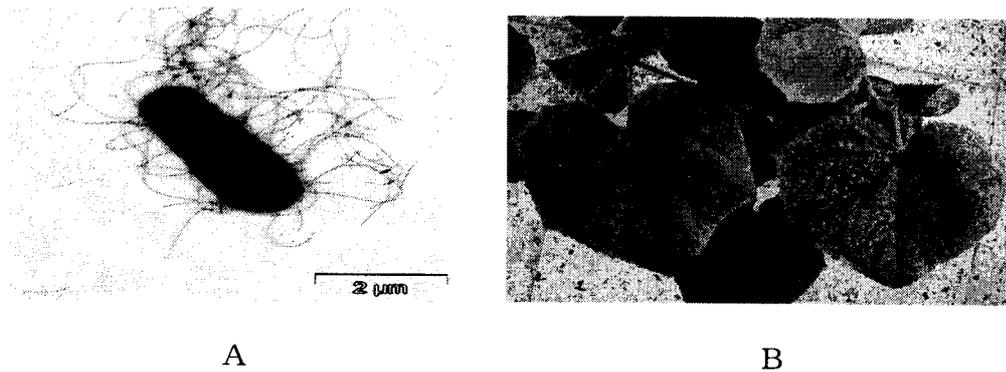


Fig 1. Vegetative cell of EXTN-1 and systemic protection of cucumber plant to CMV by EXTN-1 (A: *Bacillus amyloliquefaciens*, B: CMV suppression)

가. 유도저항성 균주의 활성증진방안 및 mutant 선발

절한 처리 농도에서 적절한 기주에 생육촉진효과를 일으키는 EXTN-1의 근권 정착능을 조사하기 위하여 담배(품종 Samsun)를 1×10^6 cfu/ml의 농도로 원예용 상토에 처리한 다음 5일, 10일 후 근권 토양 및 뿌리 자체에 EXTN-1이 얼마나 정착하고 있는지를 경시적으로 조사하였다. 이 실험을 수행하기 위하여 spontaneous mutation을 거쳐서 EXTN-1에 100 ppm rifampicin에 대한 내성을 부여하였다. Rifampicin 저항성 EXTN-1 (EXTN-1R)은 원 균주가 가지고 있는 저항성 유도 능력과 생육촉진능력을 상실하지 않은 것으로 나타났다.(Table 1,2)

상기의 실험으로 미루어 보아 뿌리조직 g당 10^3 cfu 정도의 EXTN-1이 정착하고 있으면 유도저항성의 효과가 거의 일정하게 유지되었다(Table 2).

Table 1. Comparison of antifungal activities between wild-type and mutant strain of rifampicin resistance

EXTN-1	Inhibition zone					
	F. oxy	C. orb	R. sol	P. cap	P.ult	B. cin
wild Type	+	+	+	-	-	+
Rifampicin mutant	+	+	+	-	-	+

F. oxy: *Fusarium oxysporum*, C. orb: *Colletotrichum orbiculare*, R. sol: *Rhizoctonia solani*, P. cap: *Phytophthora capsici*, P. ult: *Pythium ultimum*, B. cin: *Botrytis cinerea*.

Table 2. Cucumber protection against *C. orbiculare* by EXTN-1 rifampicin mutant

EXTN-1	Lesion No per plant	Fresh weight(g)
Control	45.5±9.7	20.4 ±6.6
Wild type	17.6±6.3	27.5 ±8.3
Rifampicin mutant	16.2±4.1	26.8 ±5.6

a Data were collected 5 days after inoculations and anverage of 10 replications.

b Fresh weights were measured 10days after transplant of cucumber plant.

EXTN-1R (100 ppm rifampicin 내성 EXTN-1)에 의한 바이러스 병 방제를 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun-nn/Pepper mild mottle virus (PMMoV) interaction에서 검사하였다. EXTN-1 처리가 바이러스 병을 방제한다면 기존의 오이 탄저병 방제 효과에 있어서 논점이 되어 왔던, EXTN-1 처리에 의한 병원균 침입능력 저지 가능성이 해소되기 때문이다. 이 실험에 있어 병이 나지 않는 비친화적 조합으로 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc / PMMoV가, 저항성을 유도하는 대조약제로서 benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothionic acid-S-methyl ester (BTH)가 사용되었다.

Table 3. Effect of EXTN-1 and BTH on the control of TMV (PMMoV) in tobacco

Treatment	No. of diseased plant / 10 plants			Average
	Rep 1	Rep II	Rep III	
Control	10	10	10	10.0
BTH(1mM)	1	2	2	1.7
EXTN-1R	0	1	1	0.7
Xanthi-nc	0	0	0	0

Xanthi-nc : resistance variety of tobacco plant

Table 3 에서와 같이 EXTN-1 R이 처리된 담배 식물의 경우 7% 만이 PMMoV에 감염되는데 반하여 EXTN-1이 처리되지않은 대조처리는 100%의 감염율을 나타냈다. 이때 Chemical inducer인 BTH는 17%가 감염되었다. 저항성 품종의 경우에는 전혀 감염되지 않았다 (Table 3).

나. 집종원의 양적 차이에 의한 유도 저항성 발현 변화

상기의 결과로 미루어 보아 EXTN-1은 작물의 종류에 따라서 긍정적, 부정적 영향을 주는 것으로 나타났다. 평가기준 양쪽 모두에서 긍정적 영향을 받는다고 판단되었던 오이의 종자처리 후 포장실험 결과 작물의 생육 및 수량 모두에서 무처리보다 우세하였다. 이러한 영향을 보다 정량화하기

위하여 상기의 실험 중 발아와 생육 모두에서 긍정적 영향을 받는다고 평가되었던 오이와 담배를 이용하여 처리 농도간 차이를 구명하고자 하였다.

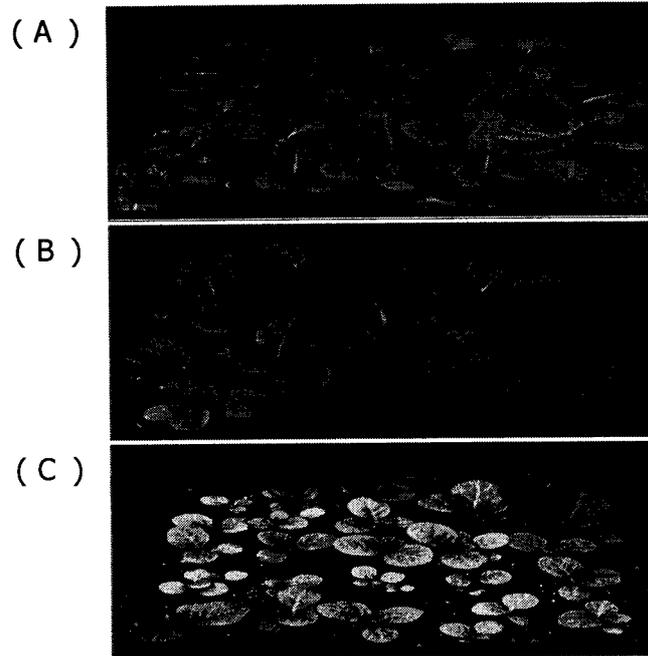


Fig 2. Dosage effect of EXTN-1 on the growth of tobacco plant (A: 10^8 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, control)

EXTN-1 현탁액을 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^8 cfu/ml 농도로 원예용 상토에 처리한 다음 2주간 육묘한 담배(품종: Samsun)와 1주간 육묘한 오이(품종: 은성 백다다기)를 처리 상토에 옮겨 심고 10일 후 미생물의 처리 농도가 식물의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 처리하지 않은 무처리구나 여타의 처리구에 비하여 1×10^6 cfu/ml의 농도로 상토에 EXTN-1을 처리하면 식물의 생육이 촉진되고 그 성장상도 균일하여 가장 적절한 처리 농도로 판단되었다 (그림 2). 이는 전년도의 양액 처리 실험과도 부합하는 결과로 전년도에는 고농도 (1×10^9 cfu/ml)의 세균 현탁액을 대량의 양액에 처리하였기 때문에 최종 처리농도는 역시 10^6 cfu/ml 정도였을 것으로 생각된다. 처리 농도를 1×10^8 cfu/ml로 하면 오히려 두 가지 식물 모두에서 무처리에 비해 생장이 억제되었으며 특히 담배의 경우 잎의 황화나 왜소증이 나타났다. 이는 EXTN-1의 처리에 있어 농도 조절이 매우 중요함을 보이는 것이다.

다. 전염원의 양적 차이에 의한 유도저항성의 발현 변화

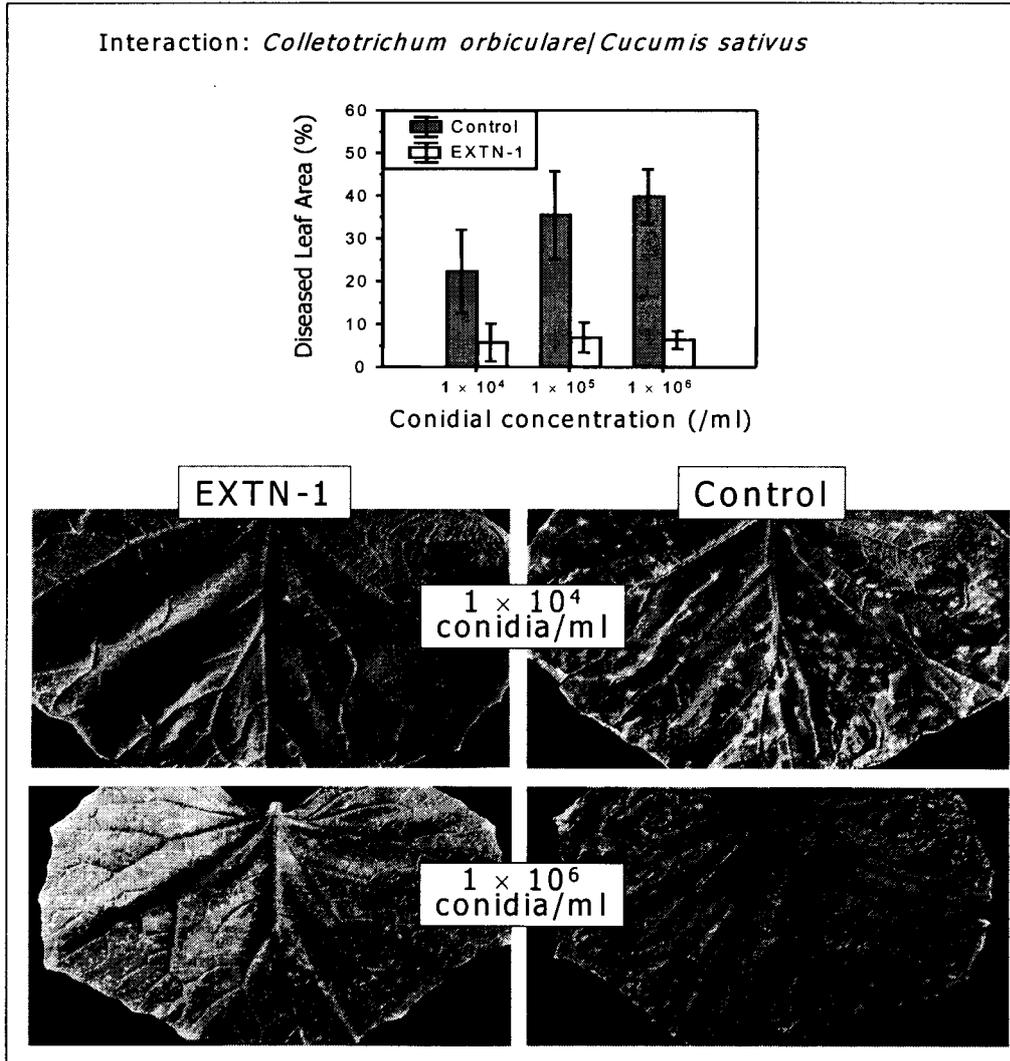


Fig 3. Effect of EXTN-1 on the disease incidence of cucumber anthracnose with treatment of different concentration of conida.

EXTN-1을 10^6 cfu/ml로 오이유묘에 관주처리하여 저항성을 유도한 다음 탄저병균을 10^4 , 10^5 , 10^6 /ml의 농도로 각각 살포하여 유도저항성을 검정한 결과 3처리 모두 대조처리에 비하여 우수한 방제효과를 나타냈으며 10^5 및 10^6 의 경우 거의 동일한 방제효과를 나타낸다. 탄저병균에 의한 탄저병반의 경우에도 포자농도가 높을 경우 병반이 밀집하게 형성되어 발병량의 평

가에는 저농도인 10^4 spore/ml의 농도가 효과적이었다. 따라서 EXTN-1은 10^6 cfu/ml이 적정 사용농도임을 알 수 있었다(Fig.3).

라. EXTN-1에 의한 작물의 발아 및 유묘기 반응

일반 육묘용 상토의 경우 EXTN-1 처리에 의한 생육촉진현상은 참깨, 메밀, 옥수수였으며 논 점질토양에서는 파, 고추, 완두, 참깨, 강남콩, 상추, 옥수수 등 이었다. 대부분의 공시식물은 EXTN-1 처리에 의하여 일반상토 및 논 점질토양에서 생육저해를 일으키지 않았으며 벼의 경우에는 자연토양인 논 점질토양에서 다소 생육이 억제되었다.

이와 같은 결과를 볼 때 EXTN-1의 종자 처리는 식물에 별다른 영향을 주지 않으며 EXTN-1 처리에 의한 생육촉진현상은 토양환경이 우수한 상토 보다는 불량한 환경에서 효과적임을 알 수 있었다.(Table 4, 5)

이와같은 결과를 미루어 볼 때 근권내 토양병원균이 존재하는 이병토양 혹은 연작장해가 나타나는 불량토양에서의 생육촉진 효과는 훨씬 크게 나타날 것으로 생각된다.

Table 4. Plant growth in sandy loam soil and clay soil condition by treatment of EXTN-1

Plant growth	Sandy loam soil	Clay soil
Growth promotion	참깨, 메밀, 옥수수	파, 고추, 완두, 참깨 강남콩, 상추, 옥수수
Normal growth	조, 밀, 보리, 벼, 고추 완두, 동부, 들깨, 토마토 상추, 수수, 울무, 강남콩, 팥, 근대, 녹두,	동부, 토마토, 들깨, 밀, 수수, 보리, 상추, 근대, 녹두, 울무, 조, 메밀
Suppression	-	벼

Table 5. Comparison of plant growth on various crops with treatment EXTN-1

Crop	Plant height (cm)		Fresh weight (g)	
	Control	EXTN-1	Control	EXTN-1
강낭콩	15.2	18.3*	2.6	3.9*
근대	11.3	11.8	1.5	1.8
녹두	17.1	16.3	1.4	1.4
들깨	9.8	11.2	1.2	1.3
마니따 고추	12.2	11.7	1.1	1.1
메밀	11.5	18.8*	0.8	1.7*
보리	17.0	16.7	0.5	0.6
수수	31.0	30.5	1.3	1.2
완두 (그린)	14.5	13.4	2.2	2.5
율무	25.6	28.4	1.7	2.2
조	34.4	33.1	1.5	1.5
중엽쭈갓	9.0	10.5	1.5	2.3
진자축면상추	5.8	7.1*	0.9	1.8*
찰옥 2호	40.2	42.8	3.3	4.0*
참깨	16.6*	14.7	1.6*	1.3
참밀	26.6	26.3	1.7	1.6
추청벼	27.7	27.1	0.8	0.8
토마토	14.2*	12.3	1.1	0.9
팔	14.4	19.6*	1.0	1.4*

Table 6. Effect of EXTN-1 on the seed germination of various crops in a greenhouse

Plant	Germination (%)		Plant	Germination (%)	
	Control	EXTN-1		Control	EXTN-1
강낭콩	88	79	울무	83	96
근대	100	100	조	85	63
녹두	94	96	중엽썩갓	52	65
양파	40	15	상추	19	54
들깨	31	73	찰옥2호	100	100
마니따 고추	92	88	참깨	98	98
메밀	73	67	참밀	75	69
보리	67	75	벼	71	73
수수	98	96	토마토	92	94
완두(그린)	71	58	팥	92	96

EXTN-1 처리에 의한 식물의 발아율도 일반 상토의 경우 무처리와 비교하여 별다른 영향을 미치지 않거나 발아를 촉진하는 기능을 나타낸다. 양파의 경우에는 다소 발아율이 떨어지는 경향이었으나 상추의 경우에는 발아율이 크게 높아 졌다(Table 6). 상추의 경우 EXTN-1과의 특이적인 공생 관계가 추측된다.

마. EXTN-1의 근권 밀도

담배에 처리된 EXTN-1은 20일 까지 근권내 밀도 변이를 조사하였다. EXTN-1의 처리는 종자처리와 발아후 priming처리로 하였는데 종자처리 보다는 발아후 priming 처리시에 근권정착력이 높았다. 이와 같은 결과는

priming 종자의 수분 흡수에 따라 표피조직이 느슨해지고 종자의 호흡에 의한 유기물이 누출되어 spermosphere가 EXTN-1의 정착에 유리하게 작용하기 때문일 것이다(Fig. 4).

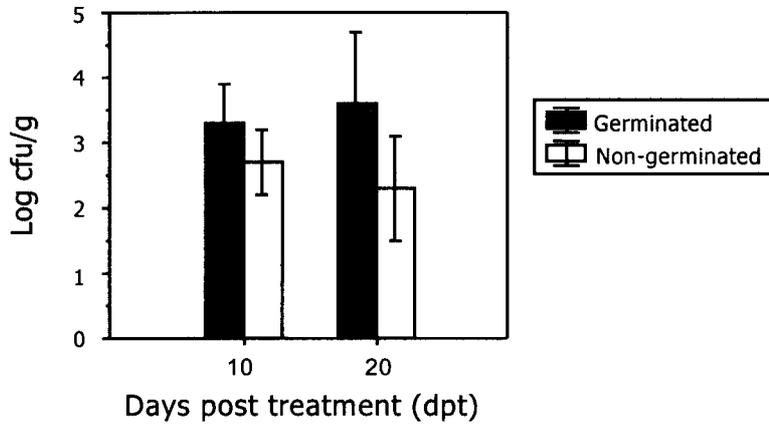


Fig 4. Population of EXTN-1 on the rhizosphere of tobacco plant.

Baker 등에 의하면 생물학적 방제에서 대상세균의 근권정착은 토양조건에 따라 달라지기도 하지만 토양내의 근권에 존재하는 유해미생물 집단으로부터 근권을 보호할 수 있는 주요 수단으로 인식되고 있다. 즉 microflora에서 근권세균이 토양내의 근면에 정착하면서 *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium* 등 주요 토양병원균이 침입 할 수 있는 공간 (microfloral niche)을 적게하여 식물체가 토양병원균에 감염되지 않게 한다. 이와같이 근권정착은 근권세균이 갖는 항생 및 유도저항성 기작 등과 같이 생물학적방제 활성을 평가하는 주요 요인이다. 본 시험은 수경재배 조건에서 EXTN-1을 수경액에 희석하여 4주간 뿌리 및 수경액에서 EXTN-1균의 밀도변이를 조사하였는데 처리농도별 변이는 같았으며 뿌리에서의 밀도 변이는 두 실험 모두에서 초기 처리 농도가 4주까지 지속되었다. 반면 수경액 내의 EXTN-1의 농도는 처리 후 점차 감소하여 4주 후에는 최초 처리밀도보다 10배정도 감소하였다. 이와같은 결과로 보아 근권세균 EXTN-1은 상추 근권정착 능력이 우수하며 이후에 일어나는 생육 촉진 현상도 근권정착에 의한 근 활력증진에 기인하는 것으로 생각된다(Fig. 5).

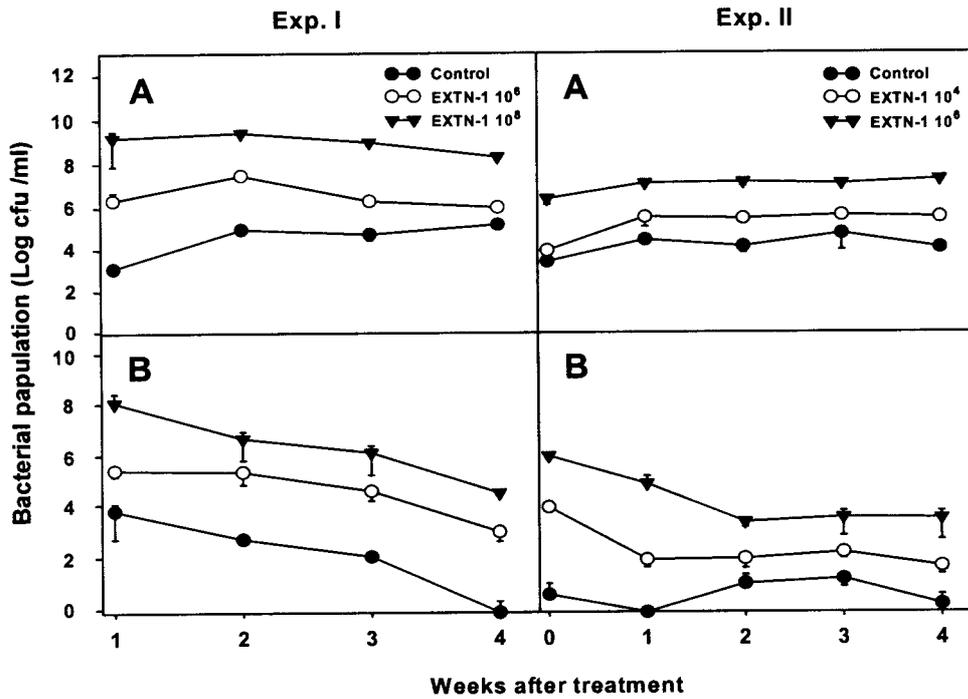


Fig 5. Seasonal change of population density by EXTN-1 in rhizosphere of lettuce plant and hydroponic solution (A: root colonization, B: hydroponic solution).

2. 유도저항성 발현의 환경 영향평가

가. 오이탄저병 병반형성 및 처리방법

유도저항성 발현을 위한 최적 조건을 구명하고자 오이유묘의 엽위별 탄저병 발병율을 조사하였다. 엽위별로 EXTN-1처리에 의한 효과는 크게 다르지 않았으나 무처리에서의 탄저병 발병율은 2분엽에서 가장 많았다. 또한 유도저항성에 의한 발병율의 차이도 가장 크므로 차후의 유도저항성 평가에는 2분엽을 기초로 하였다(Fig. 6).

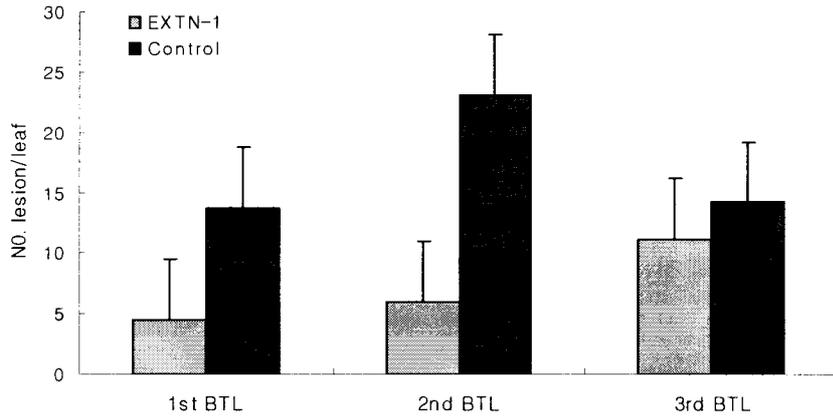


Fig. 6. Disease severity on different leaf of cucumber plant against *C. orbiculare* by treatment of EXTN-1(BTL : bottom leaf)

EXTN-1현탁액을 종자처리, 관주 또는 혼합처리 하였을 때 관주처리 및 혼합처리시 방제효과가 나타남을 알 수 있었다(Fig. 7)). 또한, 방제효과는 EXTN-1의 관주처리시 제2엽에서 가장 높게 나타났다(Fig. 7). 결과적으로 EXTN-1은 처리방법에 따라 다소의 유도저항성 차이가 있으나 오차범위 내에 있어 공시한 처리방법으로는 유도저항성이 크게 다르지 않음을 알 수 있었다.

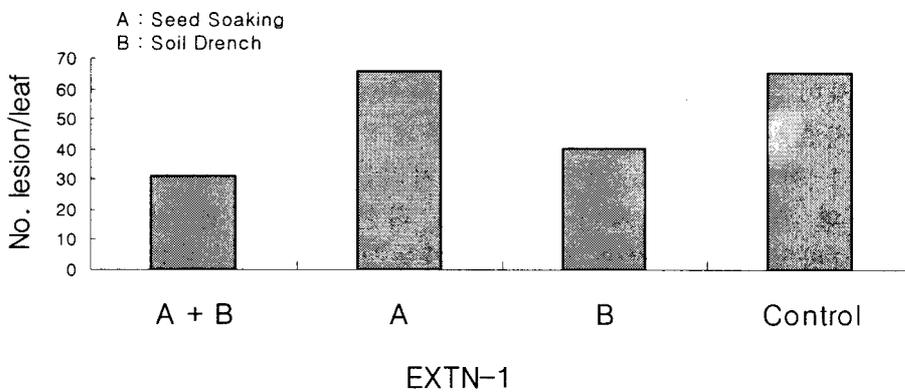


Fig. 7. Effect of application method of EXTN-1 on the control of cucumber anthracnose caused by *C. orbiculare*.

3. 유도저항성 근권균 EXTN-1의 주요작물별 활성스펙트럼 검정

가. 오이, 상추, 배추, 쪽갓

유도저항성 근권균 EXTN-1 작물별 활성 스펙트럼을 검정하고자 오이, 상추, 배추, 쪽갓에 대한 생육촉진효과를 검정하였다. EXTN-1을 관주처리한 모든 식물에서 생육촉진 현상이 관찰되었다(Table 7). 이와같은 결과는 유도저항성 발현에 따른 식물병의 방제 뿐 아니라 열악한 식물생육환경에서의 실용화 가능성을 보여주고 있다.

Table 7. Effect of soil drenching of EXTN-1 on the growth of several vegetables

Treatment	plant height (cm)				Fresh weight (g)		
	Cucumber	Lettuce	Chinese cabbage	Edible chrysanthemi	Lettuce	Chinese cabbage	Edible chrysanthemi
EXTN-1	20.8±3.1 ^a	18.3±2.0	22.1±1.4	10.8±2.2	62.4±0.2	35.1±3.2	35.1±3.2
Control	14.8±2.4	11.2±1.0	19.1±1.1	6.8±2.6	21.8±3.9	24.9±3.5	24.9±3.5

나. 벼 주요병해 방제효과검정

도열병의 경우 무처리가 병반면적을 7.1인 반면 EXTN-1 처리는 3.4%로 발병을 현저히 감소시킬 수 있었으며 화학발현물질인 1mM BTH 처리는 1.5%로 처리효과가 가장 좋았다. 깨씨무늬병의 경우 무처리가 7.8%인 경우 EXTN-1 처리는 6.9% 였고, BTH 처리는 7.5%로 처리 효과가 낮았다. 깨씨무늬병의 경우 기주 특이적 독소에 의한 기작이 잘 알려져 있어 이와 관련하여 저항성 발현기작을 달리 할 가능성도 있다. 또한 포자발아시 내는 독소에 의한 초기 병반 일 수도 있으며 차후의 발병에는 저항성일 것으로 생각된다(Table 8, Fig. 8). 이와같은 저항성의 차이는 다른 연구과제를 통하여 구명하고자 한다.

Table 8. Effect of EXTN-1 on the control of rice blast and brown spot by *Magnaporthe grishia* and *Cochliobolus oryzae*, respectively

Treatment	Rice Blast (% lesion area)	Brown spot (Lesion No.)
Control (Water)	7.1±2.2	7.8±1.4
EXTN-1	3.4±2.5	6.9±2.8
BTH (1mM)	1.5±0.9	7.5±1.6

Rice blast: *Magnaporthe grishia*, Brown spot: *Cochliobolus oryzae*

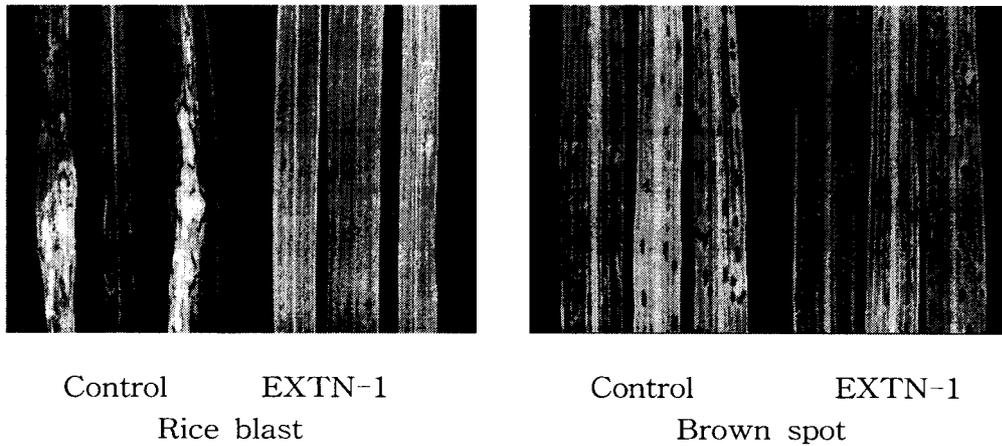


Fig 8. Induce systemic resistance to rice blast and brown spot with treatment of EXTN-1.

다. 보리에 대한 EXTN-1 처리효과

보리는 재배 특성상 생물학적방제를 적용하기에 매우 유리한 작물로 생육 기동안 많은 식물병에 의한 피해 또한 심하다. 특히 우리나라의 경우 지하부의 토양전염성 병해보다는 보리 붉은곰팡이병(*Fusarium graminis*) 등에 의한 피해가 크다. EXTN-1의 종자 침적에 의한 유도저항성을 검정하지는 못했으나 처리시 공시한 3종의 주요 보리품종에 대한 생육이 촉진 되었으며 녹색이 강하게 발현되는 것으로 보아 보리의 생육에 유리할 것으로 생각된다. 대조처리인 2가지 EPS도 보리의 생육을 크게 촉진 시켜다(Fig.9, Table 10).

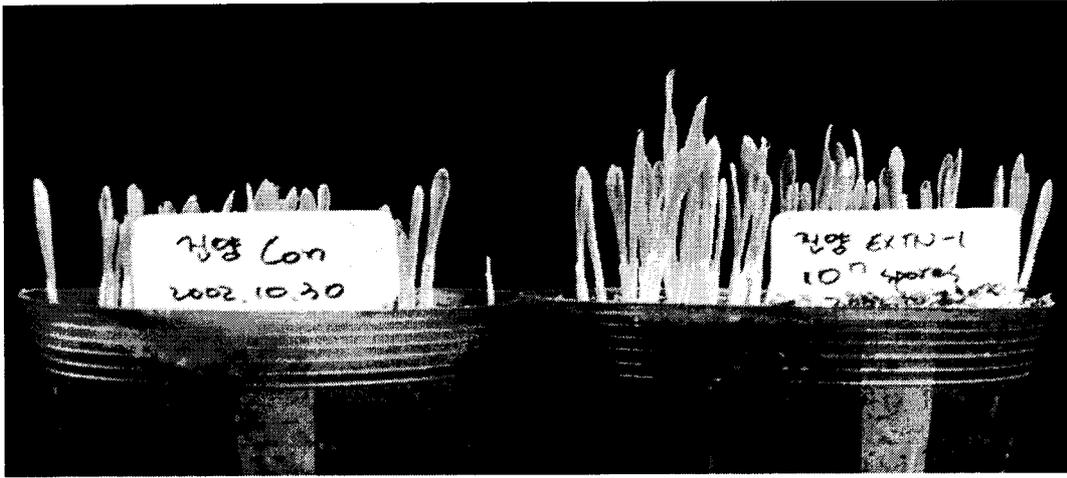


Fig 9. Plant growth promotion of barely with seed priming of EXTN-1.

Table 10. Plant growth promotion of major varieties of barely with treatment of EXTN-1

Treatment	Plant height (cm)			Root development*		
	Jinyang	Bunong	Olbori	Jinyang	Bunong	Olbori
Control	3.9	4.0	2.6	+	+	+
923-87 EPS	5.1*	4.9*	3.3*	+++	+++	++
IN26 EPS	5.5*	4.6*	3.9*	+++	+++	+++
EXTN-1 (10 ⁶)	4.7*	4.4*	3.5*	++	++	++

본 연구에서 공시한 모든 식물은 EXTN-1 처리에 의하여 초장 및 생체중이 뚜렷하게 촉진되었다. 이는 EXTN-1에 의해 식물이 자극을 받아 어떠한 신호체계를 통해 생장이 촉진됨으로 짐작이 된다. 또한 EXTN-1에 의한 생육촉진 반응은 여러 작물에 비특이적으로 나타남을 알 수 있었다. 이와같은 특성은 병해방제 뿐 아니라 작물의 건전생산, 채소류의 수량증대에 요긴하게 이용될 것으로 보여진다.

4. 수경재배에서의 EXTN-1 처리효과

상추

농가실증 검정을 위하여 부천의 한 농가포장에 EXTN-1 균주를 적용하였다. 처리농도는 10^6 cell/ml 이었으며 한 처리의 양액량은 5000L로 처리와 무처리로 구분하였다.

EXTN-1의 처리는 정식과 동시에 양액내로 1회 투입하였는데 EXTN-1이 처리된 상추는 생육초기부터 뿌리의 생육이 왕성하였으며 발근이 촉진되었다 (Fig. 11). 또한 무처리에 비하여 EXTN-1균주처리는 적상추의 색깔을 뚜렷하게 진하게 하였으며 이와같은 결과는 겨울재배형 상추의 품질향상과 관련이 깊다 (Fig.12).

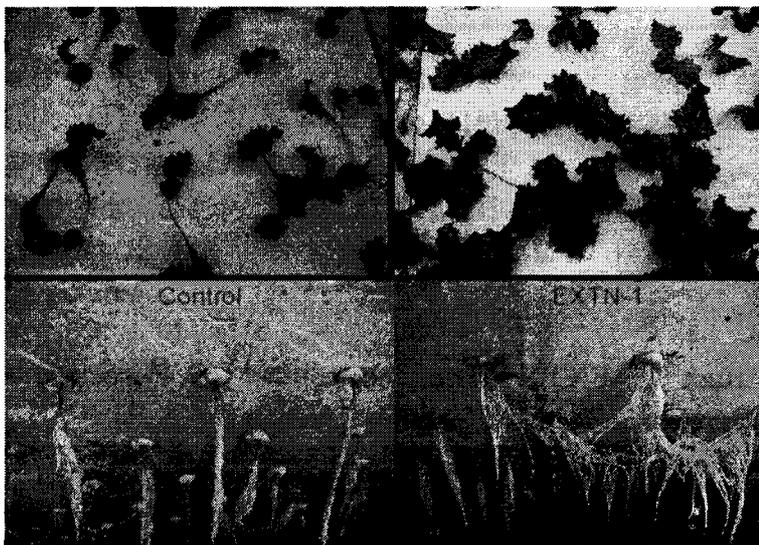
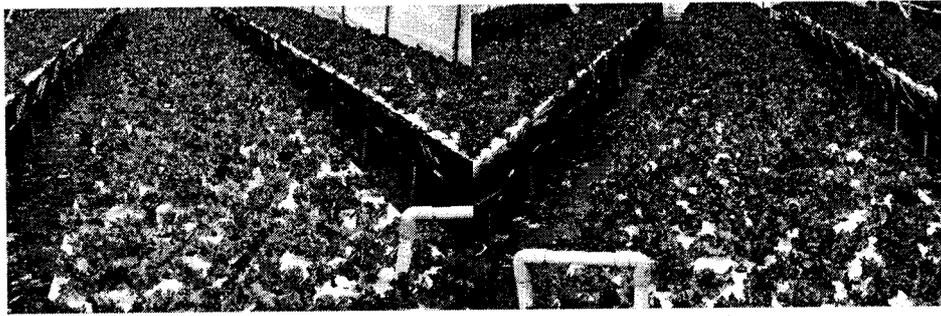


Fig 11. Effect of EXTN-1 on the growth of lettuce plant in a hydroponic farm (Jeongsun)



Control

EXTN-1

Fig 12. Effect of EXTN-1 on the development of Cheokchima lettuce's leaf color in a hydroponic farm (Bucheon)

근권군 EXTN-1의 처리는 겨울동안에 발생하는 조균류 (Pythium sp. Phytophthora sp) 및 Fusarium sp.에 의한 시들음병의 발생을 현저히 감소 시켰다. 특히 동절기의 상추재배는 비닐하우스내부의 응결현상으로 인한 물방울이 떨어지는 지점에 시들음병의 발생이 심하였다. 시들음병 발병 주율은 시간이 지날수록 점차 증가하는 경향이였으며 병 발생도 무처리, EXTN-1 모두에서 증가하였다(Fig. 11). 여름 재배형 상추 (정선) 에서도 무처리 보다 탄저병의 발생이 적었으며 상추의 생육도 촉진되었다 (Data not shown).

Table 11. Effect of EXTN-1 on the control of Fusarium wilt in a hydroponic farm of lettuce (Bucheon)

Treatment	Disease incidence (%)	
	4/20	5/16
Control	5.11 (10.22)	13.38 (26.76)
EXTN-1	2.38 (4.76)	9.76 (19.52)

순환식 수경 재배조건에서의 EXTN-1 처리는 상추 및 쪽갓의 모두 무처리에 비하여 생육이 좋았으며 쪽갓의 경우에는 초장이 2배, 생체중은 3배 가량 증가되었다(Fig. 13 및 Table 12, 13). 특히 수경재배 조건에서의 상추, 쪽갓의 생육은 2000부터 2002년 3년간의 시험에서 모두 균일하게 생육

촉진현상을 나타내어 재현성이 높았다. 특히 하절기보다는 동절기의 저온 조건에서 더 큰 효과를 나타내었다.

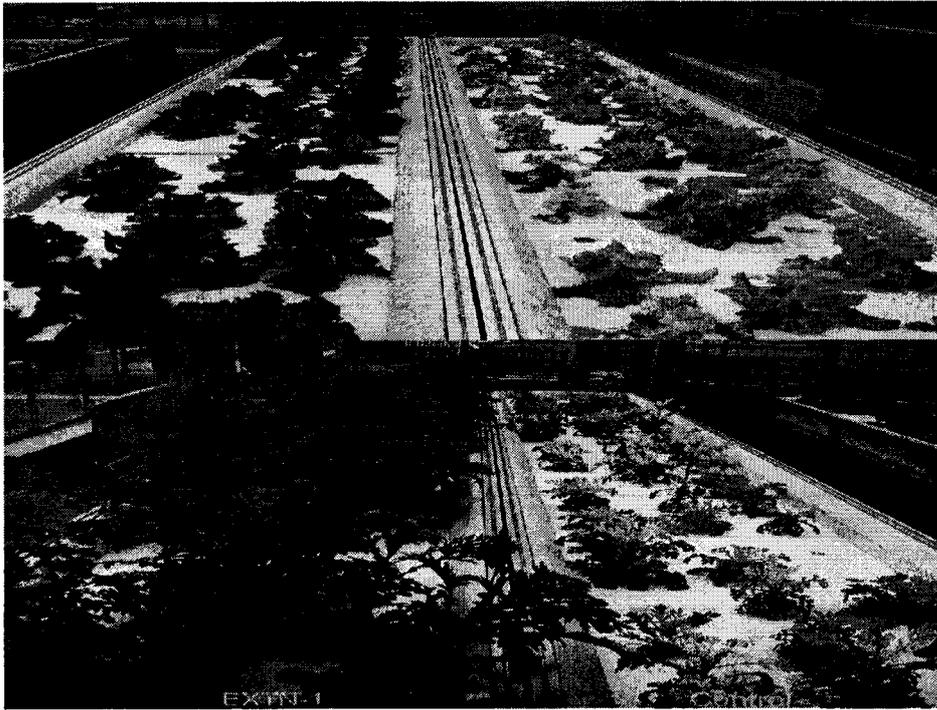


Fig 13. Effect of EXTN-1 on the growth of lettuce and edible chrysanthemum in a hydroponic farm.

또한 순환식 수경재배에서의 EXTN-1 처리후 4주째 수경액을 무처리와 함께 각각 무기원소함량을 분석한 결과 EXTN-1 처리 수경액의 경우 Ca 함량이 무처리에 비하여 감소하는 것으로 보아 Ca 대사에 관여할 것으로 생각된다. 생육촉진현상은 같은 동일한 방법으로 처리되어도 반복시험마다 불균일하게 나타난다. 그러나 수경재배조건외의 경우 이러한 불균일성은 크게 줄어든다.

Table 12. Effect of EXTN-1 on the growth of lettuce in hydroponic culture system

EXP	Control			EXTN-1		
	Plant height (cm)	Fresh weight (g)	Root weight (g)	Plant height (cm)	Fresh weight (g)	Root weight (g)
p1	31.7	79.5	13.9	36.0	153.3	22.3
p2	37.8	109.5	21.0	37.1	164.0	25.3
p3	34.0	110.0	23.3	34.1	140.3	20.3
p4	33.5	90.5	18.0	32.4	127.0	20.5
p5	27.4	69.3	15.5	34.0	133.8	21.0
average	32.9	91.8	18.3	34.7	143.7	21.9

Table 13. Effect of EXTN-1 on the growth of edible chrysanthemi in a hydroponic farm

EXP	Control			EXTN-1		
	Plant height (cm)	Fresh weight (g)	Root weight (g)	Plant height (cm)	Fresh weight (g)	Root weight (g)
p1	8.9	7.5	3.5	15.0	21.0	8.3
p2	8.2	8.0	3.8	16.0	35.3	12.3
p3	7.4	6.3	3.0	19.3	37.0	11.5
p4	8.5	6.3	3.0	15.9	29.0	11.0
p5	7.7	7.0	3.5	13.9	24.0	8.3
average	8.1	7.0	3.4	16.0	29.3	10.3

토마토

펄라이트 재배의 경우 세균성 풋마름병의 발생은 *R. solanacearum* 접종 11일 째부터 발생되기 시작하여 하였으며 EXTN-1 처리의 경우 접종후 20 일째까지 풋마름병을 완전히 방제할 수 있었다. 한편 무처리의 경우에는 55.0%의 감염률을 나타내었다(Table 14 , Fig. 14). EXTN-1 균이 처리된 토마토는 정식 초기부터 활착이 빠르고 뿌리의 발육이 왕성하였다. 또한 뿌리의 갈변화가 무처리보다 늦게 진행된다. 그러나 뿌리의 근권정착밀도는 높지 않은 특성을 나타낸다. 순환식 재배시스템에서도 19일까지 토마토 풋마름병을 완벽하게 방제 할 수 있었으며 951228-7 균주도 우수한 효과를 나타내었다(Table 15).

Table 14. Effect of EXTN-1 on the control of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in perite hydroponic condition

PGPR	Diseased plant (%)				Density of <i>R. solanacearum</i> (cfu/ml)
	11 DAT	20 DAT	30 DAT	40 DAT	
950816-1	0.0 b	5.0 b	5.0 e	75.0 b	3.0×10^4
950816-6	0.0 b	0.0 c	15.0 d	80.0 b	4.5×10^4
951228-7	0.0 b	5.0 b	50.0 b	75.0 b	2.0×10^4
96111-3	0.0 b	0.0 c	5.0 e	90.0 a	9.5×10^4
H 32-5	0.0 b	5.0 b	25.0 c	80.0 b	2.9×10^4
EXTN-1	0.0 b	0.0 c	15.0 d	65.0 c	8.1×10^3
Control	15.0 a	55.0 a	85.0 a	95.0 a	1.5×10^9

Table 15. Effect of rhizobacteria on the control of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in circulating system of hydroponic condition

PGPR	Diseased plant (%)		
	12 DAT	16 DAT	19 DAT
950816-1	0.0 b	8.0 a	8.0 c
950816-6	0.0 b	8.0 a	16.7 a
951228-7	0.0 b	0.0 b	0.0 d
96111-3	0.0 b	8.3 a	14.7 b
H 32-5	8.3 a	8.3 a	8.3 c
EXTN-1	0.0 b	0.0 b	0.0 d
Control	8.3 a	8.3 a	16.7 a



Fig 14. Effect of EXTN-1 on the control of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in perite hydroponic condition.

토마토 수경재배시 chemical inducer인 ASA(1mM) 처리에 의하여 유도저항성 활성을 높이고자 토마토 생육에 미치는 영향을 조사한바 토마토회일 생산에는 EXTN-1 단독처리가 ASA 단독 처리보다 우수하였다. ASA+

EXTN-1의 복합처리는 과일의 크기가 크고 효과적이거나 무처리에 비하여 과일의 숙기를 지연시켰다. 따라서 토마토의 수경재배에는 ASA의 복합처리보다 EXTN-1의 단독처리가 우수하였다(Fig. 15) 또한 EXTN-1의 처리는 여름철 혹서기에 나타나는 토마토 배꼽썩음병의 발생을 현저히 감소시켰다.

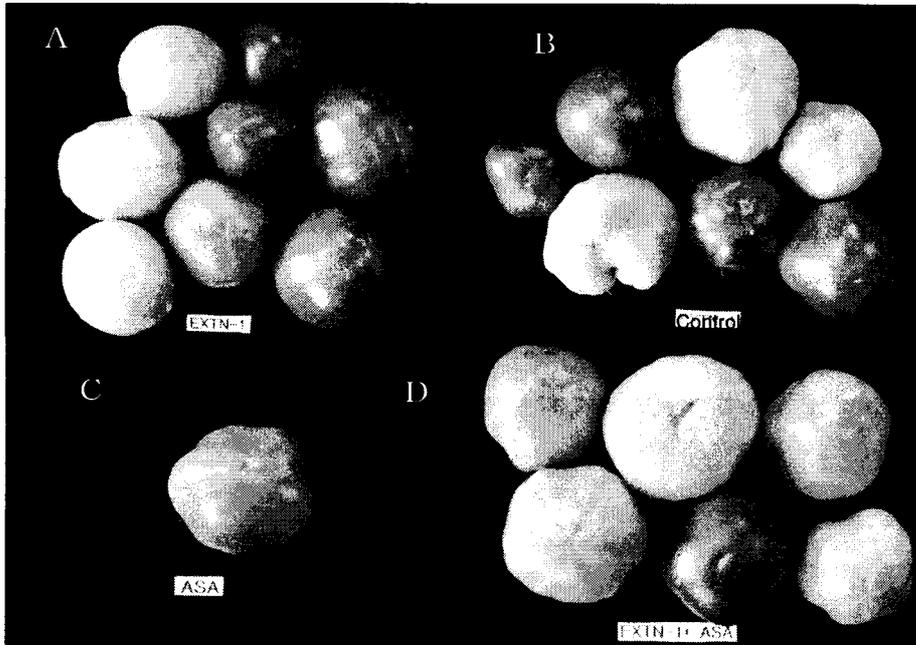


Fig. 15. Effect of EXTN-1 on the productivity of tomato fruits (A: EXTN-1, B: Control, C: Salicylic acid, D: EXTN-1 + ASA)

파프리카

파프리카의 수경재배의 경우 ASA 단독 및 EXTN-1과 ASA의 혼합처리는 무처리에 비하여 모든 처리에서 생육이 억제되었으나 EXTN-1처리는 파프리카 과실의 색깔을 진하게 하며 과실의 크기를 증대 시켰다(Table 16, Fig. 16). 이와 같은 결과로 보아 과채류인 토마토 및 파프리카 재배에서의 chemical inducer의 사용은 상품성 저하 등의 문제를 야기시킬 수 있다.

Table 16. Effect of EXTN-1 on paprika plant growth in circulating hydroponic condition

Treatment	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)
Control	69	12.0	19.9	11.3
IN26	70	11.9	20.3	11.2
EXTN-1	68	11.1*	18.9*	10.6*
ASA	60*	11.1*	19.1*	10.5*
EXTN-1 + ASA	67	11.8	19.6	11.0

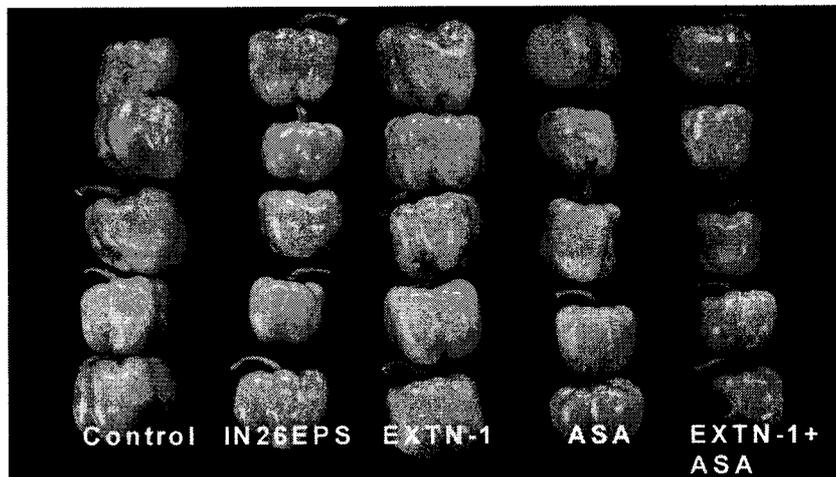


Fig 16. Paprika fruit production by treatment of EXTN-1 and combination of chemical inducer

5. EXTN-1의 유도저항성기작

가. EXTN-1 근권균주 처리 및 Radical scavenger처리에 의한 오이에서의 활성산소반응

활성산소(Active oxgen)의 생성은 스트레스에 의한 식물의 초기 대사과정

에서 잘 알려져 있지만 근권미생물에 의한 유도저항성의 초기발현에 매우 중요한 요인이다. EXTN-1균은 식물조직에서 활성산소를 생성한다. 그러면 이때 형성되는 활성산소는 어떤것인지를 확인하기 위하여 Radical scavenger인 Verapamil, Tiron, DPI, Catalase등을 각각 EXTN-1과 처리하여 반응시킨 결과 DPI 및 catalase에 특이적인 반응을 보이지 않았다. 이와 같은 특성으로보아 EXTN-1에 유도저항성은 활성산소인 Hydrogen peroxide경로를 통하는 것으로 증명되었다(Fig.17).

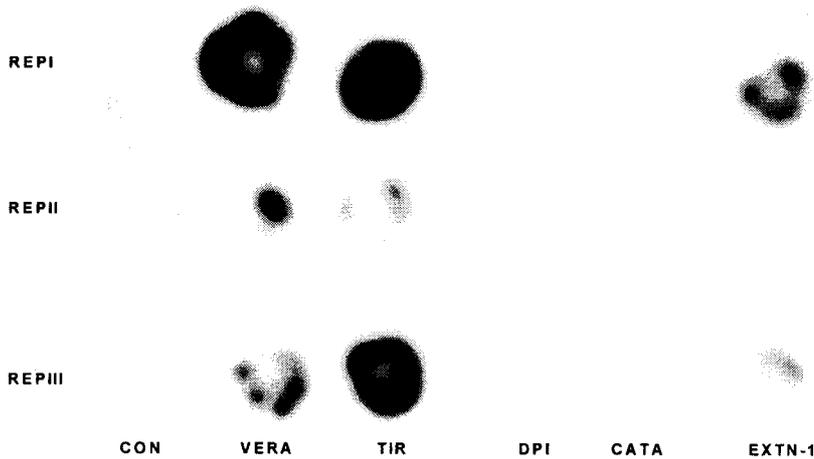


Fig. 17. Oxidative burst of cucumber plant by treatment of EXTN-1 and radical scavenger (VERA: verapamil, TIR: tiron, DPI: diphenyleneiodonium, CATA: catalase) with EXTN-1

나. EXTN-1 균주에 의한 저항성 유전자 발현

EXTN-1이 일으키는 유도 저항성이 작물의 어느 생육 시기에 어느 기간 동안 일어나는지를 확인하는 것은 EXTN-1을 이용한 생물학적 방제의 성공을 가름하는 매우 중요한 사안이다. 이를 확인하기 위하여 Northern blot hybridization analyses와 PR-1a 유전자의 promoter에 β -glucuronidase (GUS) 보고 유전자를 결합한 construct를 도입시킨 담배에서의 GUS 활성을 검사하여 유도 저항성이 어느 시기에 가장 활발하게 발현되는지를 판단하였다.

PR-1a 단백질은 저항성이 유도된 여러 가지 식물에서 발견이 되어 이들 단백질의 유무(有無)가 저항성 발현의 지표로써 사용되고 있다. 그러나

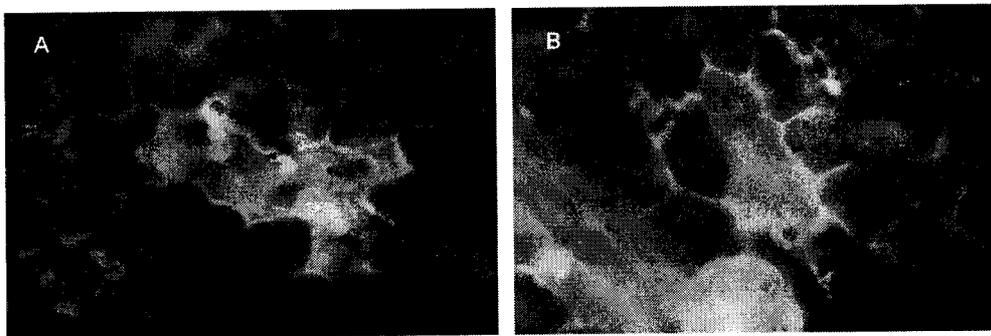
PR-1a 단백질의 생화학적 특성이 아직 밝혀지지 않아 이들 단백질의 생성 여부를 손쉽게 측정하기는 여러 가지 어려움이 많다. 최근 GUS 유전자를 담배 식물에 전환시켜 이들 식물을 이용하면 PR-1a의 발현 여부를 간접적으로 알 수 있다. 즉 식물체에서 GUS의 발현 여부를 화학적 처리를 통해 형광을 나타내게 함으로써 그 발현 여부를 손쉽게 알 수 있다.

EXTN-1을 처리한 GUS 유전자가 도입된 담배 식물에서 GUS 발현을 통해 형광을 나타냄으로 무처리에 비해 PR-1a 단백질의 축적됨을 알 수 있었다 (Table 17). 이는 또한 EXTN-1 처리에 의해 저항성이 발현된다는 것을 간접적으로 알 수 있다.

Table 17. PR-1 promoter gene expression by treatment of EXTN-1

Treatment	PR-1a GUS expression (nM MU/10mg F.W/h)
EXTN-1	1794.5
무처리	49.1

다. 오이 잎에서 EXTN-1에 의한 오이 탄저병에 대한 저항성 발현 및 세포학적 특성



Control

EXTN-1

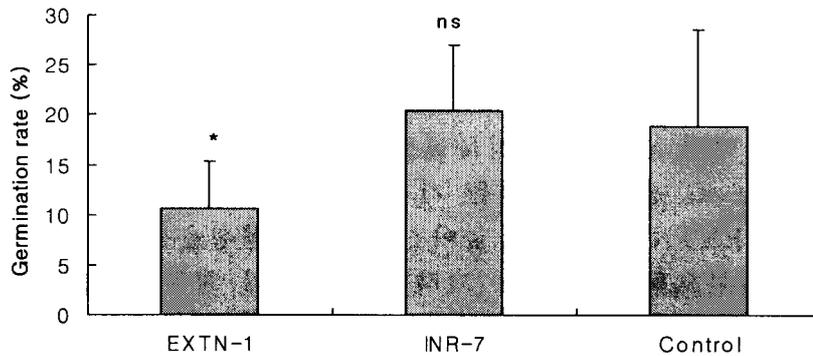
Fig. 18. ISR reaction on cucumber leaf surface by pre-inoculation of EXTN-1 (hr: hypersensitive reaction, a: appressorium, e: epidermal cell)

EXTN-1을 처리한 식물 잎에서는 종종 과민성 반응(hypersensitive reaction; HR)이 나타남이 관찰되었다 (Fig.18). HR은 저항성 반응으로 이미 잘 알려져 있다. 이는 병원균 침입 부위에 식물 세포가 예민하게 반응하여 급사함으로써 병원균의 성장이 식물의 죽은 세포 안에서 저지되는 현상이다. EXTN-1을 처리한 식물에서 HR 빈도수가 무처리한 식물에서 보다 높게 나타나는 것은 저항성 기작이 HR을 통해 나타나는 것을 의미한다.

Table 18. Suppression of anthracnose lesion spot on the cucumber leaf by treatment of EXTN-1

Treatment	Lesion No.	Control value (%) ^b
EXTN-1	71.2 ± 47.3 ^a	33.4
INR7	86.9 ± 39.3	18.7
무처리	106.9 ± 42.1	-

EXTN-1 균주의 병 방제효과 및 방어기작을 다른 종류의 Plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR) 균주 INR-7과 비교하여 관찰하였다. Table 18 에서 보는 바와 같이 EXTN-1의 오이탄저병균에 의한 병반수 억제 효과가 INR-7보다 높았다.



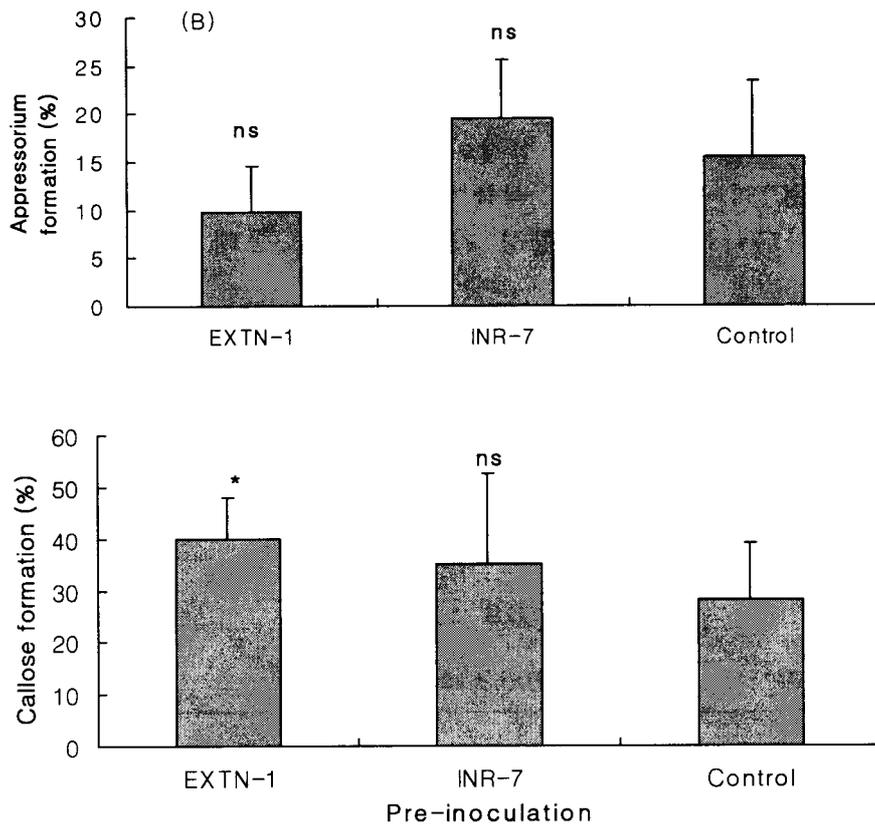


Fig 19. Histopathological characteristics of *Colletotrichum orbiculare* on the cucumber leaf pre-inoculated with EXTN-1.

형광현미경을 이용하여 병 방제 기작을 오이 탄저병균을 접종한 다음 3일 후에 관찰한 결과, 포자 발아율이 EXTN-1을 처리한 식물 표면에서 억제됨이 관찰되었다(Fig.19). 또한 epidermal 세포층에서 callose형성율이 무처리에 비해 높게 나타났다(Fig 19C). Callose는 β -1,3-glucan으로 식물저항성 기작 중 하나인 papilla 구성물질로 알려져 있다. 이들은 병원균 침입 부위에 축적됨으로 병원균 침입을 기계적으로 억제하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 EXTN-1에 의해 높아진 callose 형성율은 탄저병에 대한 저항성 기작의 일환으로 생각된다. 그러나 병원균의 침입구조인 부착기 형성율은 EXTN-1을 처리한 식물 표면에서 무처리와 비교하여 통계적으로 유의차가 없었다(Fig. 19B). 한편 INR-7을 처리한 식물표면에서도 무처리구와 비교하여 병원균 발아율, 부착기 형성율 및 Callose 형성율에 유의차가

없는 것으로 나타났다(Fig. 19).

라. EXTN-1 처리에 의한 저항성유전자 발현

기주의 생육 시기가 EXTN-1에 의한 유도 저항성 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3, 7, 14, 21, 28일 동안 담배 품종 Samsun을 육묘한 다음 상기한 대로 EXTN-1이 처리되어 있는 상태에 옮겨 심고 5일 후 PMMoV를 접종한 다음 1일 뒤 모든 처리에서 접종 상위엽을 채취하여 총 RNA를 추출한 다음 *PR-1a*의 발현을 검사하였다 (Fig. 20). 21일 육묘까지는 EXTN-1의 처리에 의하여 PMMoV에 대한 방어 유전자의 발현 및 전신 저항성의 유도 정도가 대단히 강하였지만 28일 육묘에서는 방어 유전자의 발현이 어느 정도 약화되었다.

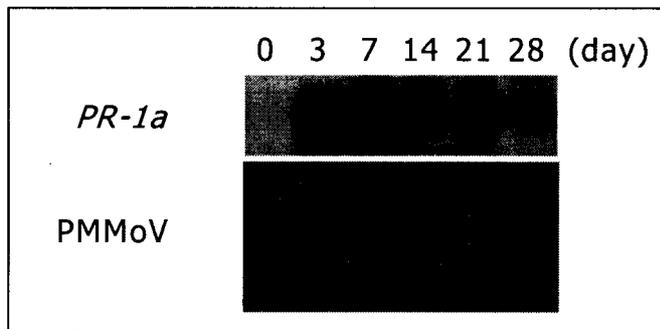


Fig 20. *PR-1a* gene expression and detection of TMV(PMMoV) in tobacco plant by pre-treatment by EXTN-1.

이와 상응하게 각각의 처리 4일 후 채취한 접종 상위엽에서는 PMMoV의 RNA 핵산 축적이 일어나지 않아 전신 저항성이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 이는 EXTN-1이 약 1개월 정도까지는 처리 시기에 무관하게 저항성을 유도시킴을 증명하는 것이다(Fig. 20).

EXTN-1 처리 결과 담배 잎에서 *PR-1a*는 처리 1일 이내, 그리고 *PAL*과 *HMGR*은 처리 2일 이내에 발현되었다 (Fig. 21). 기존의 실험들에서 상기의 세 가지 유전자의 발현은 전신 저항성 발현 여부를 판단하는 지표로 이용되고 있으며 이러한 유전자의 발현은 EXTN-1이 식물에 전신 저항성을 부여함을 증명하는 것이다.

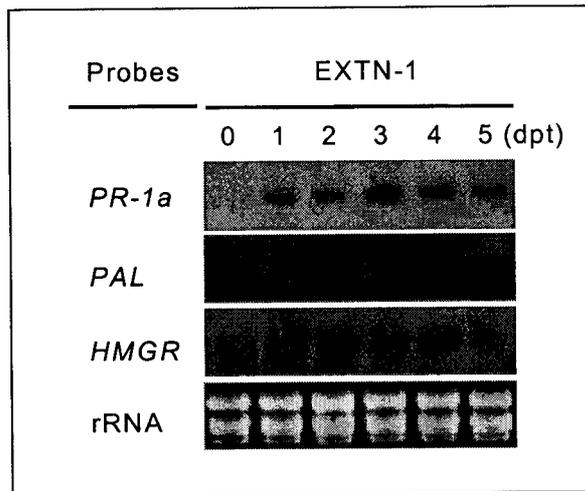


Fig. 21. Defense related-gene expression in tobacco plant by treatment of EXTN-1.

방어 시스템의 활성화가 식물의 병을 어떻게 억제하는지를 조사하기 위하여 담배 품종 Samsun에 EXTN-1을 처리한 5일 후 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)를 접종하고 그 후 4일간 방어 관련 유전자의 발현을 조사하였다. Samsun은 PMMoV에 대하여 감수성이어서 전신 감염 증상을 일으키며 Xanthi-nc는 저항성 유전자 N gene을 가지고 있는 저항성 품종이다. 또한 저항성의 발현이 국부적으로 일어나는지 전신적으로 일어나는지를 관찰하기 위하여 접종하지 않은 상위엽에서의 방어관련 유전자의 발현도 Samsun에서 조사하였다. 이 때 negative control로는 멸균 식염수만을 처리한 후 PMMoV를 접종한 Samsun을, positive control로는 전신 획득 저항성을 유도한다 알려져 있는 BTH (Syngenta)를 1 mM로 관주한 Samsun과 저항성 품종인 Xanthi-nc가 이용되었다(Fig. 22).

Fig. 22에서와 같이 감수성 품종(Samsun), 저항성 품종(Xanthi-nc) 모두 EXTN-1 접종에 의하여 저항성 유전자가 발현되었으며 EXTN-1을 처리하지 않은 BTH 단독 처리에서도 같은 경향이었다. EXTN-1을 처리한 5일 후 PMMoV를 접종한 후 4일째의 시료는 저항성 유전자의 발현이 강하게 나타났다. 이와같은 현상은 Katz(1998), Kauss(1992) 및 van Wees(1999)에 의하여 chemical inducer나 병원균의 감염에 의하여 일어나는 기작으로 잘 알려져 있으며 Potentiation으로 불려지고있다(Fig. 22).

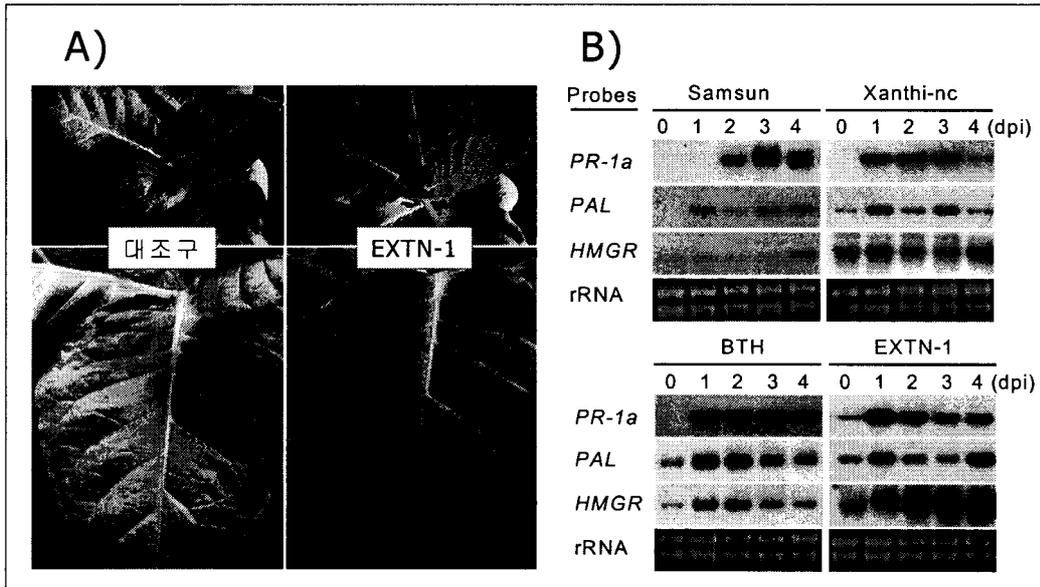


Fig 22. Plant defense related-gene expression and suppression of PPMMoV(TMV) by treatment of EXTN-1.

마. 작물 생육 단계가 유도 저항성 발현에 미치는 영향

-담배 품종 Samsun을 2주간 육묘한 후 지시된 생육 일시별로 EXTN-1을 처리하고 처리 5일 후 TMV(PMMoV)를 접종한 다음 날 시료를 수집하여 PR-1a의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 감수성 반응에서는 방어 유전자 발현이 매우 약하며 발현 시기도 PMMoV 접종 2일 이후였다. 반면, 저항성 반응에서는 방어 유전자 발현이 상대적으로 강했으며 그 시기도 접종 1일 이내였다. BTH나 EXTN-1을 처리한 감수성 담배에 PMMoV를 접종하면 저항성 반응에서의 방어 관련 유전자 발현과 유사한 상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 21). 또한 이러한 저항성 유사 기작은 접종엽에만 한정되지 않고 접종하지 않은 상위엽에서도 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 21). 이 결과들은 EXTN-1 처리가 식물의 전신 저항성을 유도시킴을 증명하는 것이다. EXTN-1이 저항성을 유도시키기는 하지만 생물적, 미생물적, 물리적 환경 요인에 의하여 저항성의 발현 정도나 발현 시기가 많은 영향을 받는 것이 사실이다. 이러한 가변 요인을 제거하고 보다 정확하게 인위적으로 저항성을 유도시키기 위하여 EXTN-1의 처리 시기별 PR-1a 유전자의 발현을 조사하였는데 PR-1a GUS의 발현은 보통 5일후부터 증가하였다. 이

와같은 결과는 EXTN-1균의 처리에 의하여 초기단계의 근권정착을 거쳐 저항성이 유도되는 기간이 5일 이상임을 말해준다(Table 19).

Table 19. PR-1a encoding GUS expression by pre-treatment of EXTN-1

Treatment	PR-1a GUS(nM MU/10mg fresh weight/h)		
	1 DAT	2 DAT	5 DAT
Control	1126.3±116.8	1125.0±208.0	1061.0±59.0
SA(0.5mM)	1307.7±271.3	14003.3±3406.7	12688.3±1261.6
EXTN-1	1124.5±255.5	1098.8±43.3	7182.5±1017.5

바. EXTN-1에 의한 유도저항성 경로추적

유도저항성 근권균에 의한 저항성 경로는 기주 기생체간에 일어나는 획득 저항성(systemic acquired resistance)와 보다 포괄적인 개념의 유도저항성(Induced systemic resistance)으로 설명되고 있다. 이와 같은 특성은 SAR에서 Salicylic acid dependent pathway로 ISR에서는 Jasmonic acid 및 Ethylen pathway로 설명된다. 그러나 최근 Pieterse(1996) 등에 의하여 근권세균에 의한 유도저항성은 JA, Ethylen 경로를 통하는 것으로 이해되고 있다. 반면에 Mauhofer (1994), Park (2000)등의 결과를 보면 PR-1 유전자가 발현하는 것으로 보아 SA 경로에 의존하는 것으로도 보여진다. 따라서 본 연구에서는 PR-1a 와 PDF1.2 등 2종의 molecular probe를 이용하여 야생형 Arabidopsis인 Col-1, SA 기작을 불활성화 시킨 NahG, Ethylen 불활성 etr1, JA 불활성 jar1 및 npr1 arabidopsis mutant를 이용하여 EXTN-1에 의한 저항성 경로를 추적한 결과 EXTN-1은 PR-1a 및 FDF 1.2를 동시에 가동시키는 것으로 시험되어 졌다. 이와 같은 결과로 보아 근권세균에 의한 저항성유도는 JA, Ethylen 경로 및 SA 경로를 모두 거치는 경우와 어느 한쪽의 경로를 거치는 특성 등 균주의 특성에 따라 그 기작을 달리하는 것으로 생각된다(Fig. 23).

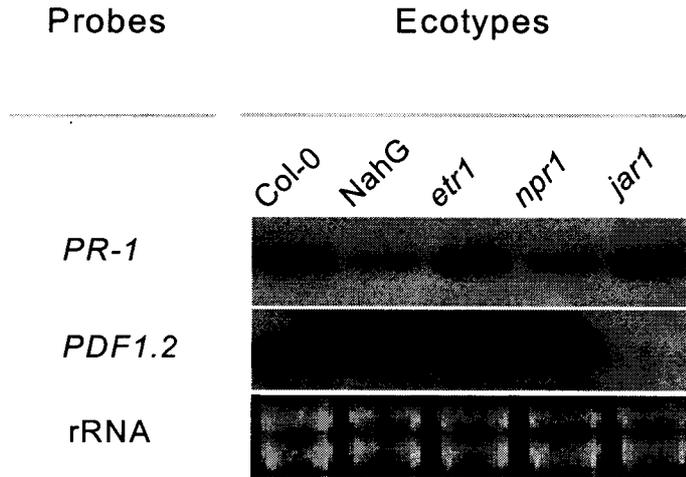


Fig 23. Activation of Arabidopsis PR-1 and PDF 1.2 by pre-treatment with EXTN-1.

6. EXTN-1 생산 분획의 생물활성검정

가. 분리 분획별 활성 검정

EXTN-1이 식물생장을 촉진시키기는 하지만 생물적, 미생물적, 물리적 환경 요인에 의하여 그 효과가 많은 영향을 받는 것이 사실이며 이러한 사례는 EXTN-1 이외의 다른 여러 가지 근권미생물에서도 보고되고 있다. 이러한 가변 요인을 제거하고 보다 정확하게 인위적으로 저항성을 유도시키기 위하여 EXTN-1이 생산하는 대사산물을 분리·정제한 후 최아시킨 오이 종자에 농도별로 처리하여 신장, 엽폭, 줄기 굵기 측면에서 성장 촉진 효과가 있는지를 검사하고자 하였다.

Table 20. PR-1a GUS expression in tobacco plant by pre-treatment of EXTN-1 fractions after C-18 MeOH gradient chromatography

Treatment	PR-1a GUS activity(nM MU/10mg F.W/h)		
	1/10	1/100	1/1000
Control(Water)	1389.3		
S A (0.5mM)	7082.5		
MeOH 0%(A)	1413.2	1484.0	1661.0
MeOH 10%(B)	2390.0	1320.0	1479.8
MeOH 20%(C)	2715.0	1467.0	1327.3
MeOH 40%(D)	2380.0	8755.0	1801.3
MeOH 60%(E)	1609.3	1584.0	2889.0
MeOH 80%(F)	1564.0	2310.0	1549.0
MeOH 100%(G)	1674.5	1559.8	7735.0
LSD(p=0.05)	3715.7	4331.0	5133.7

Table 21. Effect of plant growth on cucumber plant by pre-treatment of EXTN-1 fractions after C-18 MeOH gradient chromatography

Treatment	Plant height(cm)	Stem diameter(mm)
Control(water)	18.0	3.4
S A (0.5mM)	17.8	3.4
MeOH 0%(A)	15.9	2.9*
MeOH 10%(B)	17.3	3.3
MeOH 20%(C)	18.7	3.8
MeOH 40%(D)	17.0	3.7
MeOH 60%(E)	21.3*	4.0*
MeOH 80%(F)	18.0	3.6
MeOH 100%(G)	17.3	3.5
LSD(p=0.05)	1.6	0.5

EXTN-1의 대사산물 중 식물생장촉진효과를 보여주는 물질은 methanol 60% 분획에 있는 것으로 확인되었다 (Table 21). 반면, 방어관련유전자의 발현에 관여하는 물질은 methoanol 100% 분획에 있는 것으로 생각되는데 이유는 이 분획을 처리한 담배에서만 *PR-1a*의 발현이 나타나고 이외의 분획에서는 유의한 발현을 찾아볼 수 없기 때문이다 (Table 20). 이는 EXTN-1이 식물생장을 촉진하는 물질과 저항성을 유도하는 물질을 같이 생산함을 의미한다. GUS 발현에 의한 결과로 보아 EXTN-1처리는 식물의 저항성 반응을 최소한 처리 3일 이후부터 발현시키기 시작하며 이러한 반응은 시일이 지날수록 더 강해지는 것으로 보인다 (표 2, 3). 이는 살아있는 세균을 처리하였을 때 Northern blot hybridization analyses로 볼 수 있는 *PR-1a*의 발현 양상과 거의 일치한다. 다만 Northern blot hybridization analyses시에는 *PR-1a*의 발현이 처리 3일 후 최고조를 보였지만 물질처리 시 *PR-1a*의 발현을 나타내는 GUS 활성은 처리 3일 후보다 처리 5일 후에 더 높았다. 이는 처리 방법 차이 및 translation에 요구되는 시간에 기인한다고 생각된다.

Table 22. Effect on root development of cucumber stem cutting by pre-treatmnet of EXTN-1 fraction after C-18 MeOH gradient chromatography

Treatment	Root No. / stem cutting				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Control(water)	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
SA 1mM	12.3	12.3	12.3	12.3	12.3
SA 50mM	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
MeOH 0(A)	17.5*	17.0*	15.0	16.5	17.2*
MeOH 10(B)	19.0*	14.0	15.0	15.0	14.0
MeOH 20(C)	16.2	20.7*	16.7*	19.7*	20.0*
MeOH 40(D)	29.2*	23.7*	21.7*	21.0*	28.7*
MeOH 60(E)	12.2	18.0*	17.5*	16.5*	15.2
MeOH 80(F)	23.2*	19.7*	19.5*	15.0	20.2*
MeOH 100(G)	8.5	19.0*	16.0	14.7	19.5*
LSD(p=0.05)	6.5	5.7	5.0	5.2	4.8

뿌리 발육에 미치는 효과는 전체적으로 처리농도에 결과가 일치하지 않았지만 EXTN-1 처리분획은 식물생육촉진현상을 나타낸다. 그 중에서도 MeOH 40% 처리는 농도에 관계없이 식물생육촉진효과가 고르게 나타났다 (Table 22).

나. 동정된 활성물질의 생물검정

EXTN-1으로부터 분리된 물질인 cyclo dipeptide 중 정제량이 많은 5번 시료에 대하여 오이 및 담배의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 0.001ppm 처리에서 통계적으로 유의한 생육촉진효과를 나타냈으며 오이탄저병에 대한 방제효과는 25%에서 54%의 방제가 나타내어 비교적 낮은 경향이었으며 농도에 따른 영향도 크지 않았다(Table 23, 24). 담배식물에서의 저항성 유전자발현의 경우 0.001ppm 처리에서 PR-1a발현이 가장 컸으나 탄저병발생과 정확히 일치하지는 않았다. 그러나 같은 분획으로부터 6개의 활성물질이 분리되었고(3장참조) 선행시험에서 유도저항성 활성이 높았던 것에 비추어 좀더 효과가 있는 물질이 선발된 가능성과 혹은 6개의 물질이 모두 함유되었을 때 상승작용을 갖게 되는지에 대한 연구가 필요하다. 또한 이 물질은 Alternaria에서 Maculosin이라는 기주 특이적 독소로도 보고되어있으므로 이에 관련한 문헌검토와 추후의 연구결과에 따라 EXTN-1의 유도저항성 기작을 새롭게 해석할 가능성도 있다.

Table 23. Effect of cyclo dipeptide No 5 from EXTN-1 on plant growth and disease control of cucumber plant against *C. orbiculare*

Treatment	Plant height	Stem diameter	Lesion no./Plant
Control	21.17	3.84	608.67
SA 1ppm	20.72	3.80	441.33*
BTH 1ppm	24.07*	4.33*	34.00*
Cyclo dipeptide 1ppm	20.28	3.59	369.33*
10ppm	20.42	3.85	346.67*
20ppm	20.43	4.06	380.33*
40ppm	21.72	3.99	443.60*
80ppm	21.50	4.08	457.67*
LSD (P=0.05)	1.96	0.31	76.46

Table 24. Expression of ISR and PR-1 promoter in plant by Cyclo dipeptide No 5 isolated from EXTN-1

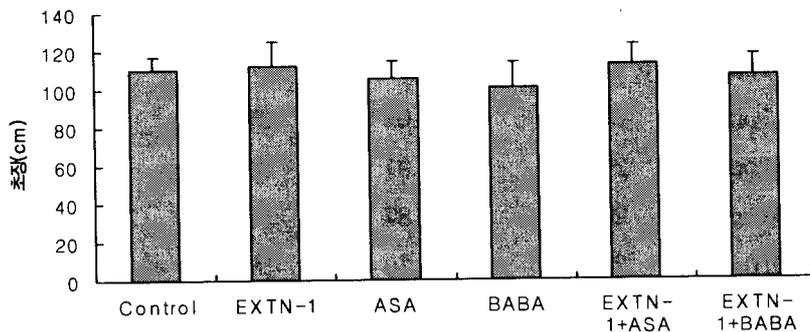
Treatment	Spray			GUS activity (mM MU/10mg F.W/h)
	Plant height	Stem diameter	Lesion no./Plant	
Control	26.18	5.08	240.33	54
BTH 20ppm	27.32*	5.06	197.53	2,101,533*
1ppm	26.94	5.09	58.33*	-
0.1ppm	27.54*	5.18	112.71*	-
0.01ppm	26.11	5.01	166.12*	-
Cyclodipeptide 1ppm	26.27	4.70	153.33*	7,497
0.1ppm	26.68	5.05	157.11*	34,967*
0.01ppm	27.02	4.91	205.67	145
0.001ppm	27.81*	4.87	111.33*	58,167*
0.0001ppm	26.28	5.18	180.22*	-
LSD ($P=0.05$)	1.07	0.20	48.31	33,267

EXTN-1의 유도저항성 발현요인 중에서 2차대사산물에 의한 저항성유도 물질을 밝히려 노력하였다. EXTN-1 TSA 배양액의 MeOH 추출물은 담배 생육촉진 및 오이 절단줄기(stem cutting)의 발근촉진 과 유도저항성 활성 분획으로 나눌 수 있다. 그러나 본 연구에서는 유도저항성 관여 물질에만 초점을 맞추었으며 NMR 분석에 따라 6-3A 물질은 분자량 1043.5538, 분자식은 $C_{48}H_{75}N_{12}O_{14}$ 으로 Bacillus에서 흔히 보고되는 Iturin과 유사한 구조를 가진 물질로서 0.001 ppm의 농도 에서도 PR-1a GUS 활성을 나타낸다. cyclodipeptide의 경우 0.01 ppm에서 PR-1a GUS 활성을 나타내며 오이탄저병에 대한 유도저항성 활성을 나타낸다(Table 23, 24). 따라서 EXTN-1은 2가지의 서로 다른 유도저항성 물질을 생산한다고 할 수 있다. 또한 생태적으로 왜 두가지 물질을 생산하는지에 대한 미생물학적 의문이 있으며 cyclo peptide의 경우 Pseudomonas 의 경우 quorum sensing signaling 기작에서 Autoinducer로 작용하는 것으로 보아 이에 대한 검토가 필요하다.

7. 유도저항성의 온실 및 포장실증시험

EXTN-1 처리는 작물의 생육을 촉진시키기는 하지만 ASA와 혼용하였을 경우 그 발현이 더욱 뚜렷하게 나타났다. 또한 EXTN-1과 ASA의 혼용시 ASA에서는 관찰할 수 없는 왕성한 canopy 전개를 관찰할 수 있었다. 이로 미루어 보아 chemical inducer는 EXTN-1의 작물생육촉진을 더욱 안정시켜줄 것으로 기대할 수 있었다(Fig. 24). Fig. 24A 및 B 에서와 같이 초장이나 줄기굵기의 차이는 chemical inducer의 단독 및 혼합처리에 의하여 크게 다르지 않았다.

A)



B)

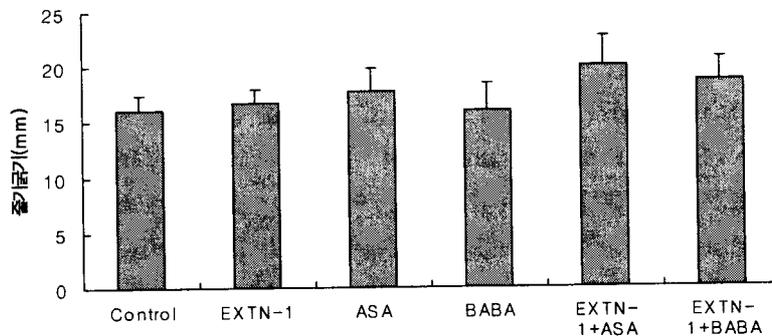


Fig 24. Effect of EXTN-1 combination with chemical inducer on red-pepper plant growth in field condition.(A: plant height, B: stem diameter).

포장에서 자연적으로 발생한 이병과수는 주로 탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)에 의해 피해를 받았고 부분적으로 역병(*Phytophthora capsici*)에 의한 피해도 관찰되었다. EXTN-1, ASA, BABA를 처리한 식물은 무처리에 비해 이병과수가 큰 차이가 나지 않았으나 EXTN-1과 ASA 및 BABA를 혼합처리 하였을 때 방제효과가 우수함을 알 수 있었다(Fig. 25).

그러나 포장에서 EXTN-1에 의한 생육촉진현상은 EXTN-1을 단일처리하였을 때나 ASA 및 BABA와 혼합처리 하였을 때 모두 나타나지 않았다 (Fig. 24). 본 결과를 종합하여 볼 때 Chemical inducer인 ASA 및 BABA 처리는 병해방제에 효과적이거나 식물체의 영양생장에는 비교적 차이가 적은 것을 알 수 있었다(Fig. 24 & 25).

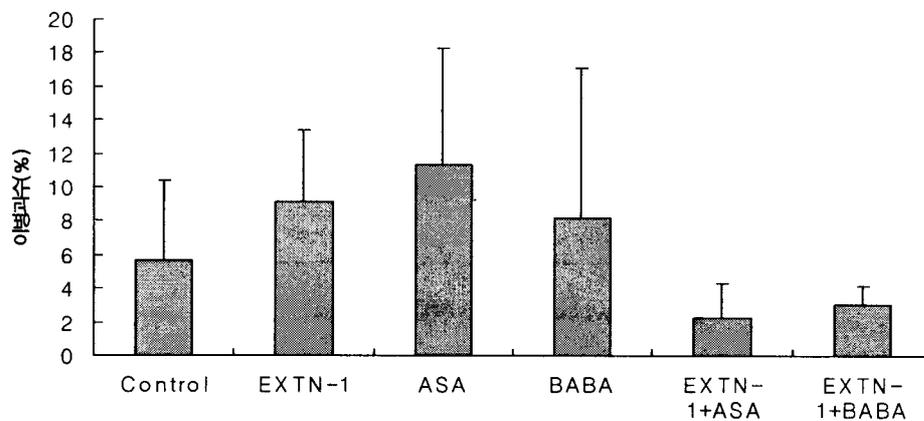


Fig 25. Effect of EXTN-1 combination with chemical inducer on red-pepper production in field condition.

비닐하우스 고추재배의 경우 초장은 초기의 EXTN-1 처리가 초기생육을 증진시키는 것을 알 수 있었으며 시일이 흐를수록 이와 같은 효과는 무처리와 비슷한 경향이였다. Chemical inducer인 ASA와의 혼합처리의 경우에도 생육이 무처리 통계적으로 우수하였다(Table 25). 수량도 chemical inducer인 ASA와의 혼합처리가 EXTN-1 단독처리보다 우수하였다(Table 26).

Table 25. Effect of EXTN-1 on red-pepper growth in plastic farm house

Treatment	10 DAT		24 DAT		38 DAT	
	Plant height(cm)	Stem diameter (mm)	Plant height(cm)	Stem diameter (mm)	Plant height(cm)	Stem diameter (mm)
Control	24.47	4.30	48.13	6.97	95.40	10.26
EXTN-1	28.33*	4.64	51.73*	6.85	95.73	10.34
EXTN-1+ASA	29.87*	4.95*	57.33*	8.08*	96.67	11.33*
ASA 1mM	30.27*	5.43*	60.60*	8.14*	100.67*	11.63*
LSD (p=0.05)	2.69	0.57	4.30	0.75	4.42	1.05

Table 26. Effect of EXTN-1 on the production of red-pepper fruits in plastic farm house

Treatment	Fruit weight (kg/40 plants)			Total
	1st (8/3)	2nd (8/13)	3rd (8/30)	
Control	3.4	14.6	16.7	34.7
EXTN-1	4.5	12.6	17.7	34.8
ASA	4.3	14.6	16.2	35.1
EXTN-1+A SA	2.8	16.5	18.3	37.6

저온기 비닐하우스내에서는 오이노균병 및 흰가루병이 심하게 발생하는데 EXTN-1 처리의 경우 흰가루병과 노균병의 발생을 현저히 억제하였다. 이 때 chemical inducer인 ASA와의 혼합처리는 EXTN-1 단독 처리와 거의

비슷한 수준이었다. 그러나 ASA의 단독 처리는 무처리와 거의 같은 수준이었다. 이와 같은 결과는 병해에 따라 혹은 작물에 따른 저항성 발현이 다르기 때문으로 생각된다(Table 27).

Table 27. Suppression of powdery mildew and downy mildew on cucumber plant by EXTN-1 in plastic farm house

Treatment	Downey mildew (% Lesion area)		Powdery mildew (% Lesion area)
	1st	2nd	
Control	5.9	6.4	8.8
EXTN-1	1.2*	2.1*	1.9*
EXTN-1+ASA	1.7*	4.5	0.5*
ASA	7.4	5.2	10.4
LSD(p=0.05)	2.0	2.1	4.3

2002년 노지포장에서 EXTN-1의 처리는 공시품종인 마니따고추를 육묘시부터 EXTN-1 현탁액을 관주 처리하여 포장으로 이식하였는데 EXTN-1의 처리는 육묘상에서도 고추묘의 초장 및 발근이 왕성하였다. 이식후 고추는 표준경종법에 의하여 재배되었는데 포장에 이식된 고추포장은 후사리움균에 의한 시들음 증상이 심하게 발생하였다. 후사리움병의 발생은 EXTN-1 처리구 대조구 보다 9월17일까지 4.25배 병 발생이 적었으며 수확량은 EXTN-1 처리시 76.5% 증수되었다. 그러나 선행시험에서 고추역병이 심하게 발생한 경우에는 병 방제효과를 기대할 수 없었다. 즉 병원성이 강한 병원균의 경우에는 유도저항성에 의한 방제효율이 감소되며 병원성이 다소 약한 경우에는 Table 28과 같이 우수한 방제효과를 나타내는 것으로 생각된다.

Table 28. Effect of EXTN-1 on the suppression of fusarium wilt and yield of red-pepper fruit in a field

Treatment	Diseased plant(%)		Yield (Kg)		Combined yield (Kg)
	8.16	9.17	8.16	9.17	
Control	42.5	42.5	13.2	9.4	22.6
EXTN-1	2.5	10.0	14.2	15.3	29.5
923-87	22.5	37.5	9.2	11.2	20.4
SE-34	32.5	37.5	10.4	9.2	19.6

8. EXTN-1 후막포자 추출액에 의한 식물병 방제효과

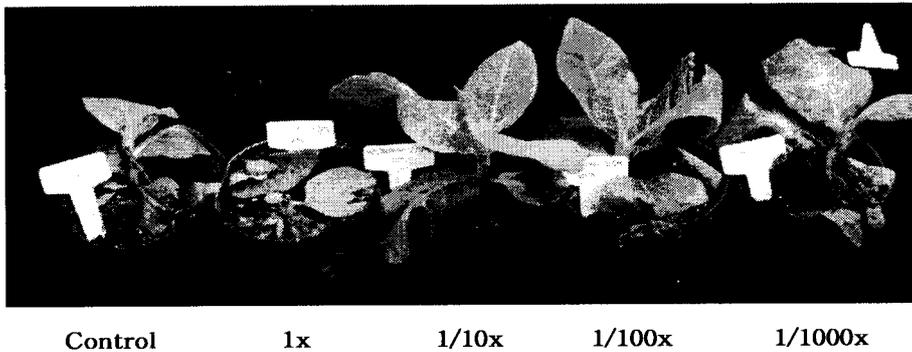


Fig 26. Suppression of soft rot disease caused by *Erwinia carotovora* SCC1 by treatment of EXTN-1 endospore extract.

EXTN-1 균주의 내생포자 현탁액을 살균 처리하던 중 내생포자의 열처리 여액을 원심분리한 결과 강력한 유도저항성 활성물질을 함유하고 있음이 밝혀졌다. 이 분획은 EXTN-1(10^{11} cell/ml) 100ml로 부터 20ml의 상등액을 원액으로 하여 농도별로 원액, 10, 100, 1000배 희석하였다. 희석된 시료는 담배의 최하위엽에 주입하여 병원균인 *Erwinia carotovora* SCC1을 접종하였는데 이균주는 병원성이 매우 강하여 28C 습실상에서 24시간내에 담배유묘를 심하게 무르게하였다. 그러나 10배 및 100배로 처리된 담배유묘의 경우 병진전이 현저히 줄어들었다(Fig. 17, Table 34).

그러나 1000배로 희석된 식물의 경우는 발병이 다소 심하였다. 병 방제기 작과 관련하여 PR-1a 유전자발현 등을 시험 중에 있다.

Table 29. Expression of ISR on tobacco and cucumber plant by infiltration of EXTN-1 endospore extract

Treatment	<i>E. carotovora</i>	<i>C.</i>	Plant height(cm)	Stem diameter (mm)
	SCC1	<i>orbiculare</i>		
	Diseased leaf area (%)	Lesion No. / Plant		
Control	4	202.8	20.3	3.2
BTH	5	0.3*	18.5*	2.9*
SA	3	107.8*	19.1*	3.1
EXTN-1 live cell (10 ⁶ /ml)	NT	72.0*	21.0	3.2
EXTN-1 endospore extract (1 x)	5	Killed	Killed	Killed
(1/10 x)	0	58.8*	14.7*	2.3*
(1/100 x)	1	128.5*	19.9	3.2
(1/1000 x)	4	137.2*	19.4*	3.0*

Original extract was extracted from endospore cell as 0.2ml / EXTN-1 10¹¹cfu/ml, NT: not tested, Diseased leaf area(Grade 0: 0%, 1: 1-10%, 2: 11-20, 3: 21-30, 4: 31-40, 5: 41-100%)

오이는 본 연구에서 수행한 유도저항성 검정방법에 따라 수행하였는데 오이 탄저병에 대한 방제가가 10배 희석액의 경우 71%에 달하였다(Table. 29 and Fig. 26). 이때 EXTN-1 처리의 경우는 65.0%의 방제가를 나타내었다. 또한 본 물질의 처리는 오이 생육을 심하게 억제 시켰으며 원액처리 시에는 전체 식물이 고사되었다. 본 물질은 앞서 기술한 cyclo dipeptide와는 다른 활성을 갖는 것으로 생각된다(Table 29).

참고문헌

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

Deising, H., Heiler, S., Rauscher, M., Xu, H. and Mendgen K. 1996. Cellular aspects of rust infection structure differentiation. Spore adhesion and fungal morphogenesis. In: Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions, M. Nicole and V. Gianinazzi-Person(eds.) pp. 135-156, Kluwer Academic Publishers.

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

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

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

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

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

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

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

754-756.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jetiyanon, K., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. 1997. Lignification, peroxidase and superoxide dismutases as early plant defense reactions associated with PGPR-mediated induced systemic resistance. In : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds. pp. 265-268 Nakanishi Printing, Sapporo.

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

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

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

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

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

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

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

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

Kaus, H., Krause, K. and Jeblick, W. 1992a. Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 304-308.

Kaus, H., Theisinger-Hinkel, E., Mindermann, R. and Conrath, U. 1992b. Dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inducer of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant J.* **2**: 655-660.

Kim, S., Ahn, I. P., Park, C., Park, S. G., Park, S. T., Jwa, N. S. and Lee, Y. H. 2001. Molecular characterization of the cDNA encoding an acidic isoform of PR-1 protein in rice. *Mol. Cells* **11**: 115-121.

Klessig, D. F., Malamy, J., Hennig, J., Sanchez-Casas, P., Indulski, J., Gryniewicz, G. and Chen, Z. 1994. Induction, modification, and perception of the salicylic acid signal in plant defence. *Biochem. Soc. Symp.* **60**: 219-229.

Kloepper, J. W., Zehnder, G. W., Tuzun, S., Murphy, J. F., Wei, G., Yao, C. and Raupach, G. 1996. Toward agricultural implementation of PGPR-mediated induced systemic resistance against crop pests. In : Advances in Biological Control of Plant Diseases, (T. Wenhua, R. J. Cook, and A. Rovira, eds.), pp. 165-174. China Agricultural University Press, Beijing.

Knoester, M., Pieterse, C. M. J., Bol, J. F. and van Loon, L. C. 1999. Systemic resistance in Arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylen-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant-Microbe Interact* **12**: 720-727.

Kogel, K.-H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munch, S. and Romme, Y. 1994. Acquired resistance in barley-The resistance mechanism induced by 2, 6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* **106**: 1269-1277.

Kovats, K., Binder, A. and Hohl, H. R. 1991a. Cytology of induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Planta* **183**: 484-490.

Kovats, K., Binder, A. and Hohl, H. R. 1991b. Cytology of induced systemic resistance of tomato to *Phytophthora infestans*. *Planta* **183**: 491-496.

Kuc, J. A. 1982. Induced immunity to plant disease. *BioScience* **32**: 854-860.

Lawton, K., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K. and Delaney, T. 1996. Bezothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal.* **10**: 71-82.

Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S. and

- Ryals, J. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. plant Microbe Interact.* **8**: 863-870.
- Lee, S., Stenger, D. C., Bisaro, D. M. and Davis, K. R. 1994. Identification of loci in *Arabidopsis* that confer resistance to geminivirus infection. *Plant J.* **6**: 525-535.
- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **85**: 843-847.
- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995b. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **85**: 695-698.
- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995c. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria : duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* **85**: 1064-1068.
- Malamy, J., Carr, J., Klessig, D. and Raskin, I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology* **88**: 936-942.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mettraux, J. P. and Défago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO : influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84**: 139-146.
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sachere, P., Heeb, S., Haas, D. and Défago, G. 1998. Salicylic acid biosynthesis genes expressed in

Pseudomonas fluorescens strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* **88**: 678-684.

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

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

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

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

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

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

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

Park, K. S. and Kloepper, J. W. 2000. Activation of PR-1a promoter by Rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against

Pseudomonas syringae pv. *tabaci*. *Biological control* **18**: 2-9.

Park, K. S., Ahn, I. P. and Kim, C. H. 2001. Systemic resistance and expression of the pathogenesis-related genes mediated by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* EXTN-1 against anthracnose disease in cucumber. *Mycobiology* **29**: 48-53.

Park, K. S., Suh, M. C., Cheong, J. J. and Choi, D. 1999. Isolation of defense-related genes from *Nicotiana glutinosa* infected by tobacco mosaic virus using a modified differential screening. *Plant Pathol. J.* **15**: 295-301.

Peng, Y. L., Shirano, Y., Ohta, H., Hibino, T., Tanaka, K. and Shibata, D. 1994. A novel Lipoxygenase from rice. Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J. Biol. Chem.* **269**: 3755-3761.

Pieterse, C. M. J. and van Loon, L. C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in plant science* **4**: 52-58.

Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., van Pelt, J. A. and van Loon, L. C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225- 1237.

Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. and van Loon, L. C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1571-1580.

Press, C. M., Wilson, M., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. 1997. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 761-768.

Quadt-Hallmann, A. and Kloepper, J. W. 1996. Immunological detection

and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Can. J. Microbiol.* **42**: 1144-1154.

Quadt-Hallmann, A., Hallmann, J. and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in cotton : location and interaction with other plant-associated bacteria. *Can. J. Microbiol.* **43**: 254-259.

Raupach, G. S. and Kloepper, J. W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* **88**: 1158-1164.

Raupach, G. S. and Kloepper, J. W. 2000. Biocontrol of cucumber disease in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* **84**: 1073-1075.

Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR). *Plant Dis.* **80**: 891-894.

Raupach, G. S., Wei, G., Zehnder, G. and Kloepper, J. W. 1997. Potential of PGPR as replacements for methyl bromide fumigation. In : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria- Present Status and Future Prospects. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds. pp. 183-185. Nakanishi Printing, Sapporo.

Ross, A. F. 1961a. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**: 329-339.

Ross, A. F. 1961b. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**: 340-358.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Col Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SAS Institute. 1995. *JMP Statistics and Graphics Guide*. Version 3. Pp. 65-95. Cary, NC.

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

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

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

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

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

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

Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negrotto, D., Williams, S.,

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

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

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

van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1997. Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. In: Ogoshi, A., Kobayashi, Y., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S. eds. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present status and future prospects. Sapporo: OECD, Pp. 50-57.

van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998a. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.

van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998b. Induction and expression of PGPR-mediated induced resistance against pathogens. In: Duffy, B., Rosenberger, U. and Defago, G. eds. Molecular Approaches in Biological Control. Delemont: IOBC/OILB, Pp. 103-110.

van Peer, R., Niemann, G. J. and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology.* 81: 728-734.

van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van loon, L. C. and Pieterse, C. M. J. 1999. Rhizobacteria-mediated induce systemic resistance(ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on

expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* **41**: 537-549.

van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., van't Westende, Y. A. M., Hartog, F. and van Loon, L. C. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 716-724.

Wei, G., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **81**: 1508-1512.

Wei, G., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* **86**: 221-224.

Wilson, K. J., Jefferson, R. A. and Hughes, S. R. 1992. The *Escherichia coli gus* operon : Induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In : GUS Protocols : Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. S. R. Gallagher, Ed. pp. 7-22. Academic Press, New York.

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

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

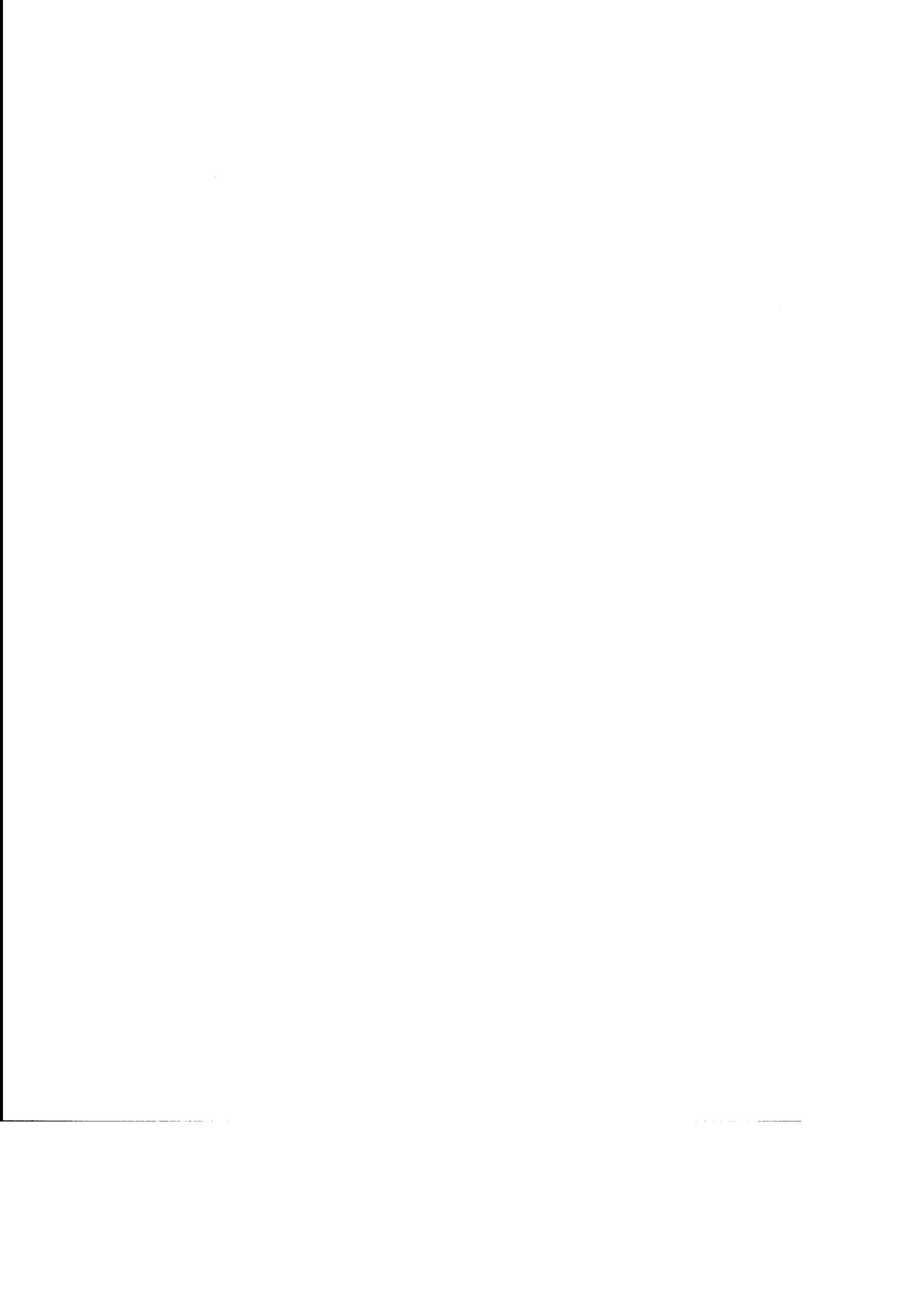
Zehnder, G, Kloepper, J. W., Yao, C. and Wei, G. 1997. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles(*Coleoptera* : *Chrysomelidae*) by plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Econ.*

Entomol. **90**: 391-396.

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

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

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



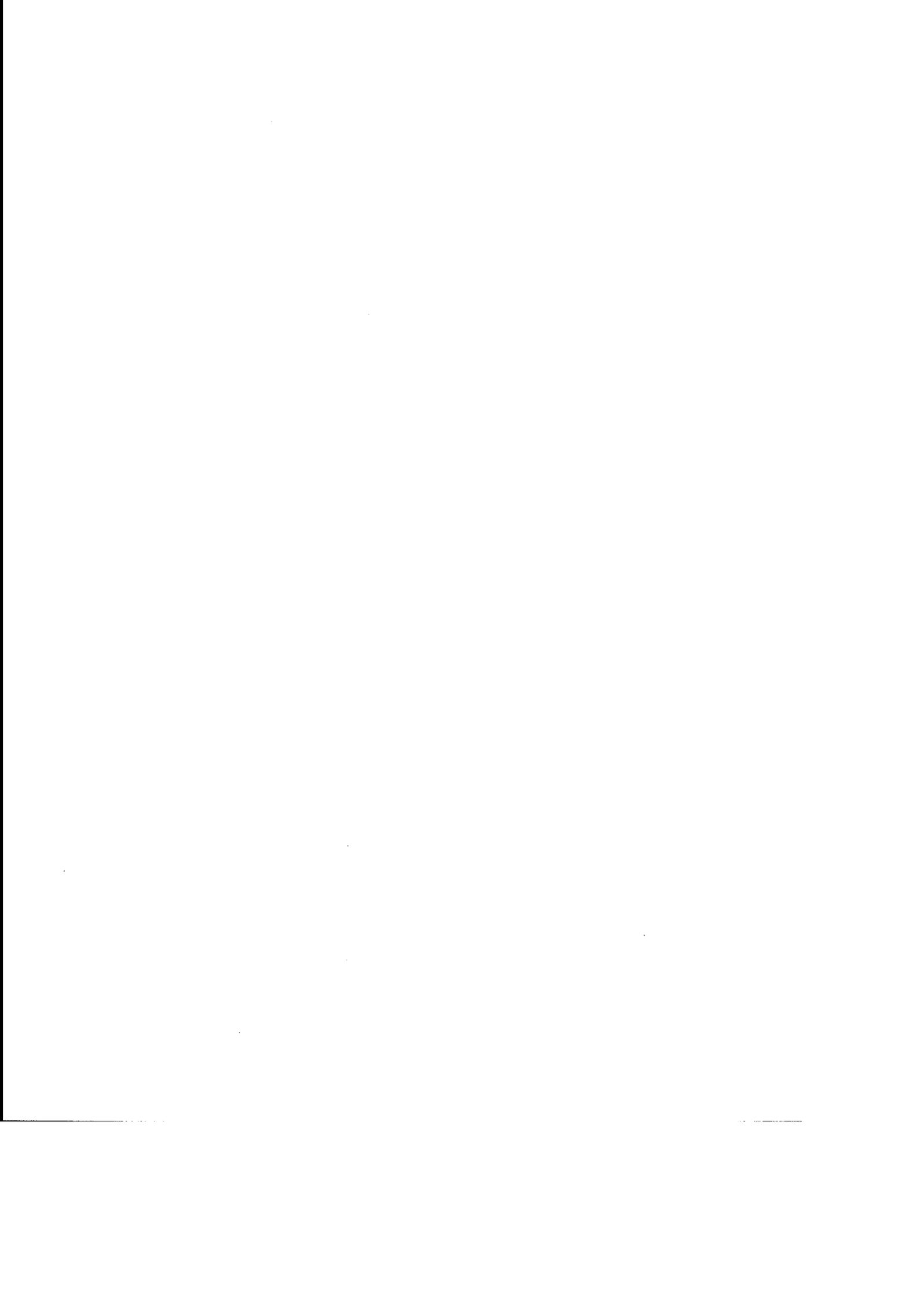
제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “근권균 (EXTN-1)의 유도저항성 활성물질의 동정 및
기능분석” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2002년 12월 12일

주관연구기관명 : 농업과학기술원
협동과제연구책임자 : 문 석 식
연 구 원 : 조 순 장
이 승 은



제3장 근권균(EXTN-1)의 유도저항성 활성물질의 동정 및 기능분석

제 1 절 서설

생물학적방제에 있어 근권미생물이 갖는 기능은 매우 다양하다. 이러한 기능의 다양성은 보통 근권균이 생산하는 항생물질등 각종 대사물질을 생산함으로써 가능하다. *Bacillus subtilis*, *Phenibacillus polymixa*, *Bacillus pumilus* 등 많은 균주들이 식물병방제 및 식물생육촉진을 위하여 생물학적 방제에 응용되고 있다. *Bacillus* 속 세균은 보통 peptide를 갖는 Iturin, Pimaricin 등 매우 다양한 종류의 항균물질을 생산한다. 그러나 유도저항성 활성이 있는 것으로 보고된 물질은 아직 없다. 본 연구에서는 근권균인 *Bacillus amylolequefaciens* EXTN-1이 갖는 유도저항성 활성물질을 분리하여 화학구조를 동정하고 이들 물질의 생리적 특성을 구명하고자 수행하였다.

제 2 절 연구방법 및 결과

1. Cyclic Depsipeptide의 분리

EXTN-1 발효액(배지 1114 medium) 3000 mL을 500 mL이 되도록 농축하였다. 여기에 1300 mL의 ethanol을 넣어서 생긴 고체를 celite로 제거하고 나온 여과액을 농축하였다. 이 추출액을 H₂O, 1:9 MeOH/H₂O, 3:7 MeOH/H₂O, 5:5 MeOH/H₂O, 7:3 MeOH/H₂O, 9:1 MeOH/H₂O, MeOH (3회 사용)를 각각 1 L 씩 용출액으로 사용하여 C-18 flash chromatography (40-63 μ m, 90 x 70 mm)하여 9개의 부분을 받았다. 이것을 *Rhizoctonia solani*의 억제력을 검정하여 활성을 보인 부분은 #6, #7, #8, #9이었다. #6을 농축하였으며, 7, 8, 9는 합하여 농축하였다. fraction #6 농축액을 MeOH 60%부터 100%까지 흘리면서 C-18 MPLC(40-63 μ m, 30 x 300 mm) 하여 각각 37 mL 씩 72개 시험관에 받았다. 활성검정 후 이들의 일부를 합하여 총 6개의 그룹으로 만들었다. 이중에서 강한 활성을 보인 3번째 부분을 농축하여 연한 갈색의 백색 고체 848 mg을 얻었다. 이부분을 #6-3으로 명하였다. fraction #6-3의 일부분을 소량의 methanol에 녹여서 C-18 HPLC (Delta pak, 19 x 300 mm, 5 mL/min, UV225 nm, 7:3 MeOH/H₂O)한 후에 다시 C-18 HPLC (C-18, Shensu, 21 x 250 mm, UV 225, 7 mL/min,

25:25:50 MeCN/MeOH/H₂O to 5:5 MeCN/MeOH, 80 min)하여 순수하게 5개의 화합물을 얻었다. 4개의 활성부분(#6-3A, 6-3B, 6-3C, 6-3D)의 양은 각각 100.2 mg, 23.2 mg, 4.30 mg, 5.4 mg이었다 (그림 1).

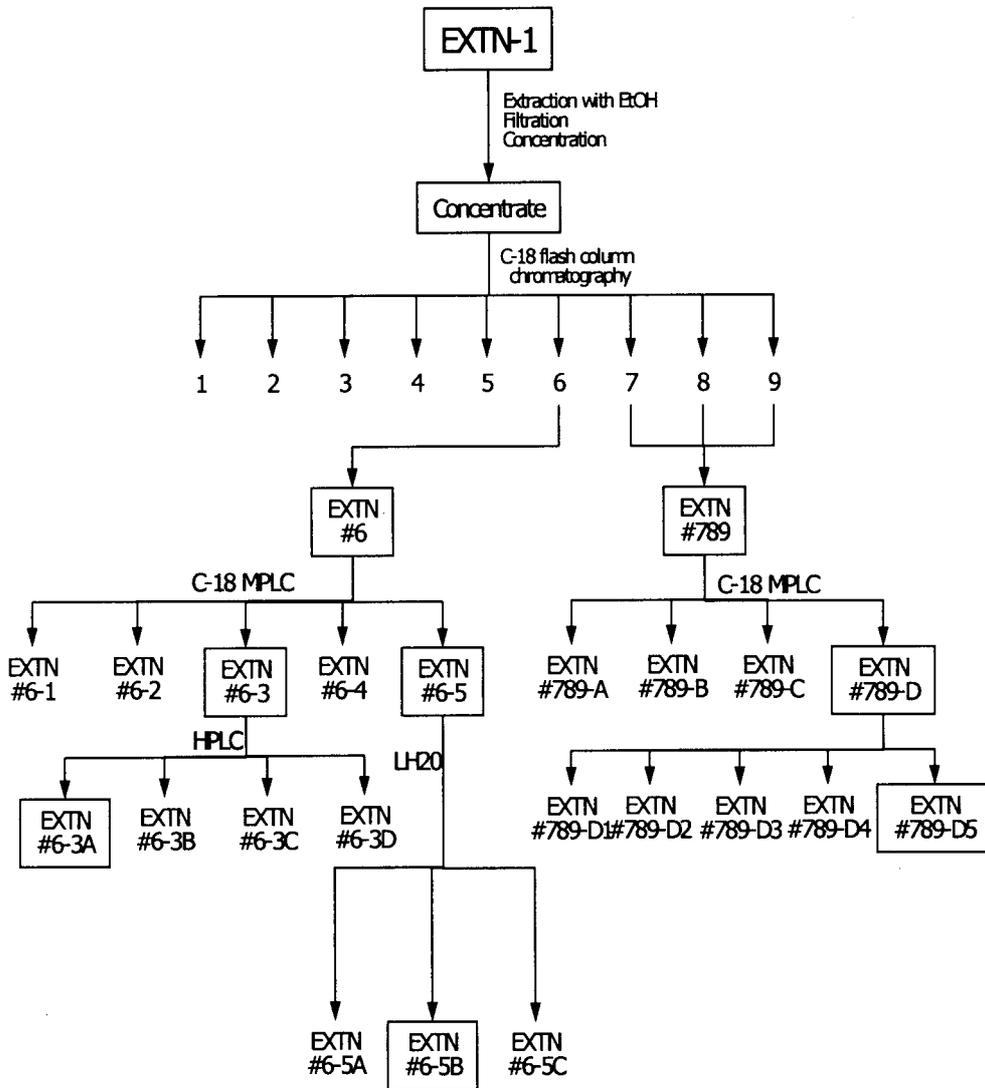


그림 1. EXTN-1 활성물질의 분리 정제도

2. EXTN-1 생산 활성 분석의 방어 유전자 발현 결과

PR-1a 유전자의 promoter에 β -glucuronidase (GUS) reporter 유전자를 결합한 construct를 도입시킨 담배 품종 Xanthi-nc에서의 GUS 활성을 검사하여 위의 물질들의 유도 저항성 실험 결과는 아래 Table 1 (3일 후), Table 2 (5일 후)에 나타나있다. 이 중에서 6-3A의 물질이 가장 활성이 높았다.

Table 1. 각 물질 처리 3일 후 GUS 활성 발현

처리	GUS 활성 (nM MU/10 mgF.W/h)		
	0.1 ppm	0.01 ppm	0.001 ppm
무처리구	878.3		
0.5 mM Salicylic acid	68125.0		
6-3A	1324.8	2699.0	1229.3
6-5B	3171.8	1750.5	906.0
789-D	5397.0	1450.0	1145.5
LSD($P=0.05$)	746.1	6682.3	6614.8

Table 2. 각 물질 처리 5일 후 GUS 활성 발현

처리	GUS 활성 (nM MU/10 mgF.W/h)		
	0.1 ppm	0.01 ppm	0.001 ppm
무처리구	1827.3		
0.5 mM Salicylic acid	23055.0		
6-3A	10932.5*	14635.0*	22530.0*
6-5B	6766.5	7900.0	9475.0
789-D	54848.0	8377.5	7122.5
LSD($P=0.05$)	6746.1	6682.3	6614.8

이 물질 6-3A는 positive HR FAB MS로 알아낸 $[M+H]$ 는 m/z 1043.5538이었다. 따라서 6-3A의 분자식은 $C_{48}H_{75}N_{12}O_{14}$ 이다. 이것은 *Bacillus*에서 주로 발견되는 iturin, bacillomycin과 유사한 형태의 분자이다. 다른 물질들(6-3B, 6-3C, 6-3D)도 6-3A와 $\delta 0.8$ ppm에서 1.5 ppm사이의 peak가 서로 같지 않는 것을 제외하고는 거의 동일하다. 따라서 이들은 6-3A와 peptide 고리가 같으면서 side chain의 모양만 서로 다른 유사체로 생각된다. 이들의 HR FAB MS를 측정한 결과 6-3B, 6-3C, 6-3D는 각각 $[M+H]$ m/z 1057.5686 (분자식 $C_{49}H_{77}N_{12}O_{14}$), $[M+H]$ m/z 1071.5851 (분자식 $C_{50}H_{79}N_{12}O_{14}$) 1071.5856 (분자식 $C_{51}H_{81}N_{12}O_{14}$)를 보였다.

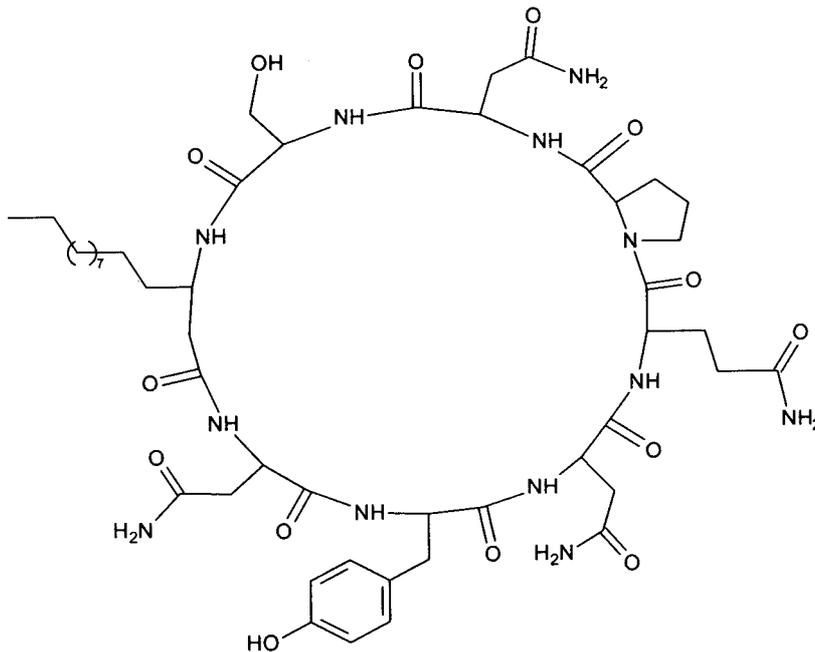


그림 2. EXTN-1으로부터 분리한 물질의 6-3A의 화학구조

3. Cyclic Dipeptide의 분리

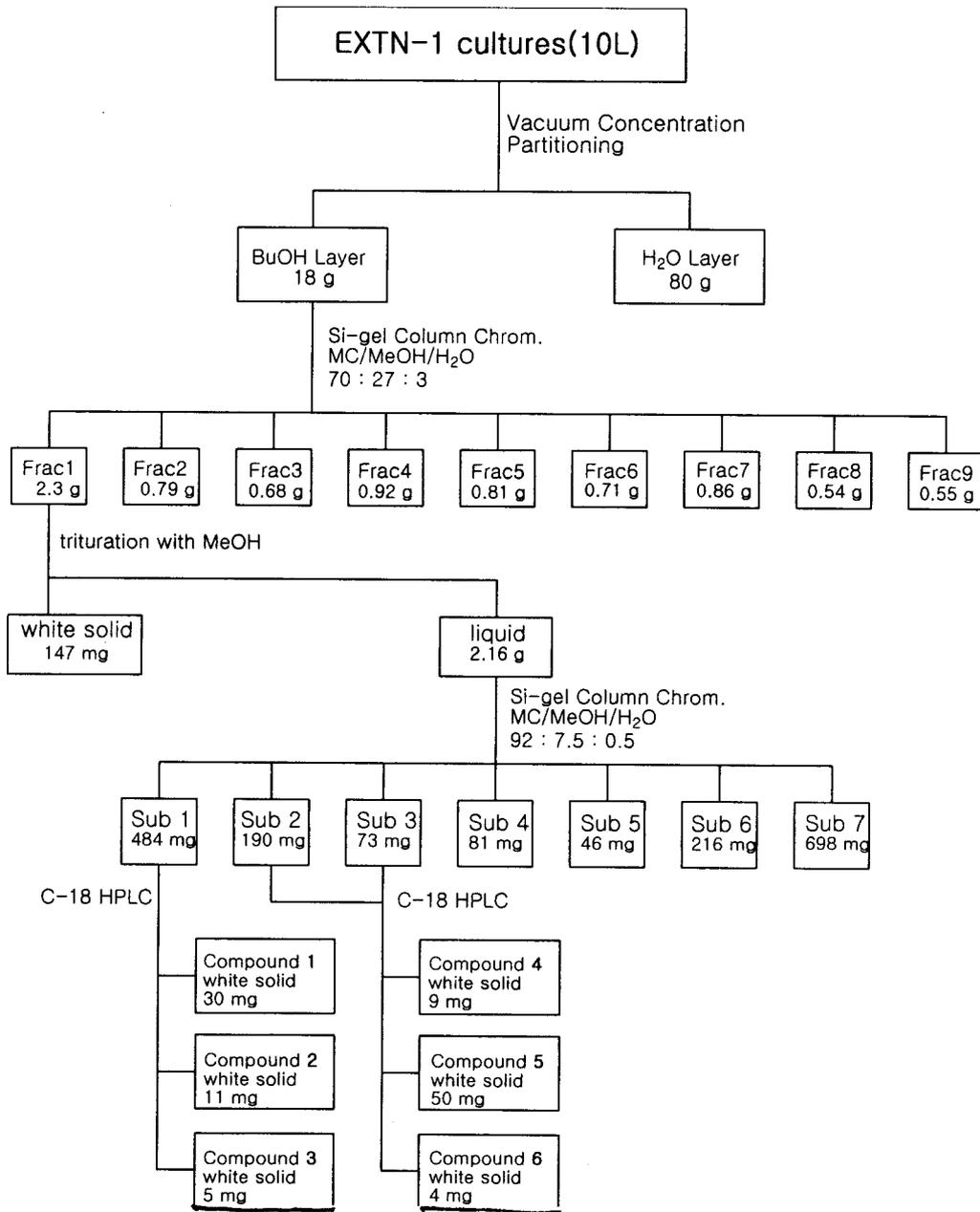


그림 3. EXTN-1로부터의 활성물질 분리정제도

TSA 고체배지에서 배양한 EXTN-1 methanol 추출액을 진공증류 하여 부피가 500 mL이 되게 하였다. 이 용액을 buthanol 2 L로 3번 추출하였다. 이 buthanol 추출액을 농축하여 얻은 18g의 물질을 silica-gel column chromatography하였다 (70~230 mesh, Merck, 30 x 300 mm, 70:27:3, 64:50:10 methylene chloride/methanol/H₂O, 100% methanol). 여기에서 나온 각각의 fraction을 농축하여 얻은 물질을 활성검정한 결과, 첫 번째 fraction이 salicylic acid와 비교하여 유도저항 활성이 강하게 나옴을 알 수 있었다. (Fig 4)

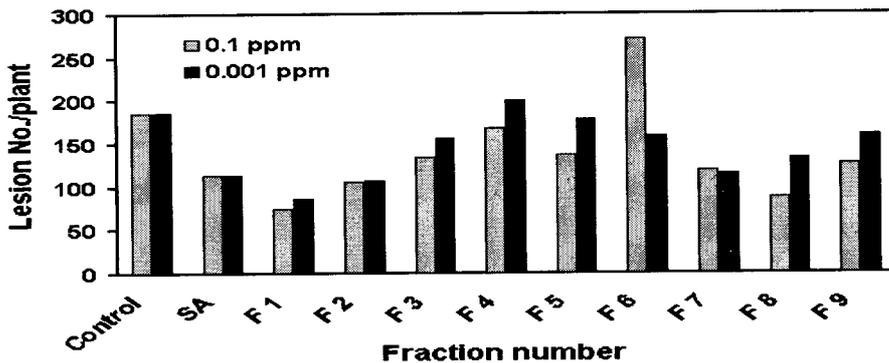


그림 4. Suppression of *C. orbiculare* on cucumber plant by treatment of EXTN-1 butanol fractions.

유도저항성 활성이 강하게 나온 Frac 1 (2.3 g)을 methanol로 trituration 하여 흰색고체(147 mg)와 액체(2.16 g)을 얻었다. 이 액체를 silica-gel column chromatography(230~400 mesh, Merck, 30 x 300 mm, 92:7.5:0.5 ~ 80:16:2 methylene chloride/methanol/H₂O)하여 7개의 subfraction을 얻었다. Sub 1을 C-18 HPLC(C-18 senshu-pak, 20 x 250 mm, 20 : 80 MeOH/H₂O, 용출량 7 mL/min, PDA 225 nm)하여 화합물 1, 2, 3을 각각 30, 11, 5 mg 을 얻었다. Sub 2와 3을 합하여 C-18 HPLC (C-18 senshu-pak, 20 x 250 mm, 20:20:60 ~ 50:50:0 MeOH/MeCN/H₂O, 용출량 7 mL/min, PDA 225 nm)하여 화합물 4, 5, 6을 각각 9.1, 50.3, 4.3 mg 얻었다 (그림 3).

4. Dipeptide의 화학구조 규명

순수한 물질의 화학 구조를 밝히기 위하여 NMR Spectroscopy를 중점적으로 구조 분석에 이용했다. 여기서의 방법으로는 ^1H NMR, gradient COSY, TOCSY spectroscopy 등과, ^{13}C NMR, gradient HSQC, gradient HMBC, NOESY(또는 ROSEY) spectrum 등을 실험했으며, 필요에 따라 1D TOCSY, 1D NOESY 등을 실험하였다.

화합물 5의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR에서 aromatic 그룹으로 예상되는 부분의 수소가 4개, 두개의 carbonyl 그룹, 산소가 붙어있는 aromatic 부분의 탄소가 1개 관찰되었다. 6개의 methylene 및 methine 그룹도 확인되었다. gHSQC로부터 aromatic 부분에 4개의 CH, 60 ppm 부근의 2개의 CH 및 20 ~ 50 ppm 사이에 4개의 CH_2 가 있음이 관찰되었다. gCOSY 실험에서는 aromatic 부분의 proton이 서로 coupling을 하고, 4.35 ppm의 CH proton이 3 ppm 부근의 CH_2 proton 과 coupling을 하며, 4.04 ppm의 CH proton이 2.09, 1.22 ppm의 CH_2 proton과 coupling하여 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. gHMBC 실험으로부터 carbonyl 부분과 alkyl 부분, aromatic 부분의 연결성을 확인한 결과, 화합물 5는 tyrosine과 proline으로 구성된 dipeptide로 추정되었다 (Fig. 5).

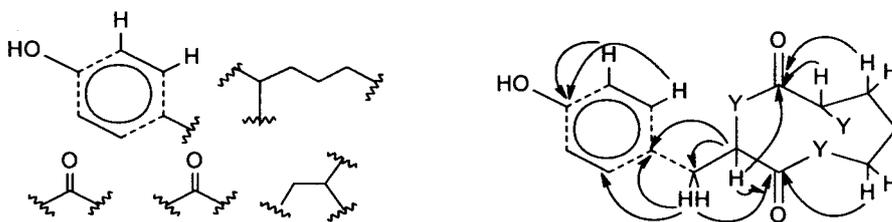


Fig 5. gHMBC correlation of Compound 5

이 물질의 아미노산의 입체구조를 알기 위해서 Chiral TLC를 실시하였다. 화합물 5 (1 mg)를 vial에 넣고, 6N HCl 1 mL을 넣었다. 이 혼합물을 oil bath (100°C) 에서 12시간 동안 가열하였다. 이 가수분해물질을 표준 시료 (L-Tyrosine, D-Tyrosine, L-Proline, D-Proline)와 함께 Chiral TLC plate에서 분석하였다. (methanol/ H_2O /acetonitrile 1 : 1 : 4) 분석한 결과

L- Tyrosine과 L-Proline이 1 : 1로 들어있음을 확인 할 수 있었다. 다른 화합물들도 이 물질과 같은 방법으로 구조를 규명하였다. 이들 물질의 구조는 Fig 6에 나와 있다.

5. 화합물들의 물리 화학적 성질

이들의 물리화학적 성질은 다음과 같다. 이들 화합물의 NMR 스펙트럼은 첨부되어 있다(Fig. 6).

화합물 1: 백색고체; mp 177-179°C, UV λ_{\max} end absorption, ^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ 4.19 (1H, brt, $J = 8.0$ Hz, H5), 4.03 (1H, brs, H2), 3.46~3.59 (2H, m, H8), 2.48 (1H, m, H10), 2.31 (1H, m, H6), 1.95 (1H, m, H6), 1.89~2.04 (2H, m, H7), 1.09 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H11), 0.93 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H12) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, methanol- d_4) δ 171.4 (C4), 166.4 (C1), 60.3 (C2), 58.8 (C5), 45.0 (C8), 28.7 (C10), 28.3 (C6), 22.1 (C7), 17.6 (C11), 15.5 (C12) ppm.

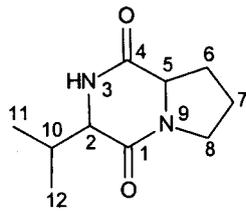
화합물 2: 백색고체; mp 161-163°C; λ_{\max} end absorption; ^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ 4.25 (1H, brt, $J = 8.0$ Hz, H5), 4.12 (1H, m, H2), 3.51 (2H, m, H8), 2.30 (1H, m, H6), 2.01 (1H, m, H6), 1.89~2.01 (2H, m, H7), 1.88 (1H, m, H10), 1.85 (1H, m, H11), 0.96 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H12), 0.95 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H13) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, methanol- d_4) δ 171.6 (C4), 167.7 (C1), 59.1 (C5), 53.4 (C2), 45.2 (C8), 38.2 (C10), 27.9 (C6), 24.6 (C11), 22.5 (C7), 22.1 (C12), 22.0 (C13) ppm.

화합물 3: 백색고체; mp 148-150°C; λ_{\max} end absorption, 257.1 nm; ^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ 7.27 (2H, m, H13), 7.20~7.26 (3H, m, H12 and H14), 4.44 (1H, brt, $J = 5.2$ Hz, H2), 4.05 (1H, dd, $J = 11.2, 6.8$ Hz, H5), 3.53 (1H, m, H8), 3.36 (1H, m, H8), 3.15 (2H, m, H10), 2.08 (1H, m, H6), 1.20 (1H, m, H6), 0.78 (2H, m, H7) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, methanol- d_4) δ 171.6 (C4), 167.0 (C1), 137.4 (C11), 131.2 (C12), 129.6 (C13), 128.2 (C14), 60.2 (C5), 57.8 (C2), 46.1 (C8), 38.4 (C10), 29.5 (C6), 22.9 (C7) ppm.

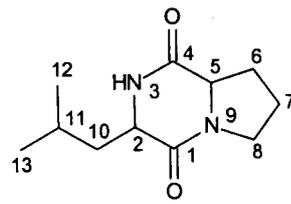
화합물 4: 백색고체; mp 144-146°C; λ_{\max} 229.6, 273.7 nm; ^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ 6.97 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H12), 6.71 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H13), 4.14 (1H, t, $J = 4.4$ Hz, H2), 3.53 (1H, dt, $J = 12.0, 8.4$ Hz, H8), 3.30 (1H, m, H8), 3.10 (1H, dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, H10), 2.87 (1H, dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, H10), 2.60 (1H, dd, $J = 10.4, 6.4$ Hz, H5), 2.05 (1H, m, H6), 1.90 (1H, m, H7), 1.65 (1H, m, H6), 1.64 (1H, m, H7) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, methanol- d_4) δ 170.2 (C4), 166.4 (C1), 157.1 (C14), 131.1 (C12), 125.8 (C11), 115.2 (C13), 58.7 (C2), 58.0 (C5), 44.9 (C8), 39.0 (C10), 28.7 (C6), 21.3 (C7) ppm.

화합물 5: 백색고체, mp 147-149°C; λ_{\max} 221.8, 273.7 nm; ^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ 7.03 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H12), 6.69 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H13), 4.35 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H2), 4.04 (1H, dd, $J = 10.8, 6.4$), 3.54 (1H, dt, $J = 12.0, 8.4$ Hz, H8), 3.35 (1H, quartet, $J = 6.4$ Hz, H8), 3.08 (1H, dd, $J = 14.4, 5.2$ Hz, H10), 3.03 (1H, dd, $J = 14.4, 5.2$ Hz, H10), 2.09 (1H, sextet, $J = 5.4$ Hz, H6), 1.80 (2H, m, H7), 1.22 (1H, quintet, $J = 10.5$ Hz, H6) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, methanol- d_4) δ 169.6 (C4), 165.8 (C1), 156.5 (C14), 130.9 (C12), 126.4 (C11), 115.0 (C13), 58.9 (C5), 56.7 (C2), 44.7 (C8), 36.5 (C10), 28.2 (C6), 21.5 (C7) ppm.

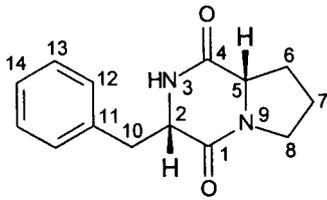
화합물 6: 백색고체; mp 148-151°C; λ_{\max} end absorption, 255.9; ^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ 7.28~7.31 (3H, m, H13 and H14), 7.18 (2H, dd, $J = 7.2, 2.4$ Hz, H12), 4.20 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H2), 3.53 (1H, dt, $J = 12.0, 8.4$ Hz, H8), 3.27~3.33 (1H, m, H8), 3.19 (1H, dd, $J = 14.0, 4.8$ Hz, H10), 2.99 (1H, dd, $J = 14.0, 4.8$ Hz, H10), 2.60 (1H, t, $J = 6.4$ Hz, H5), 2.02 (1H, m, H6), 1.90 (1H, m, H7), 1.67 (1H, m, H6), 1.61 (1H, m, H7) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, methanol- d_4) δ 170.1 (C4), 166.2 (C1), 135.5 (C11), 130.1 (C12), 128.5 (C13), 127.3 (C14), 58.6 (C2), 57.9 (C5), 45.0 (C8), 39.8 (C10), 28.6 (C6), 21.3 (C7) ppm.



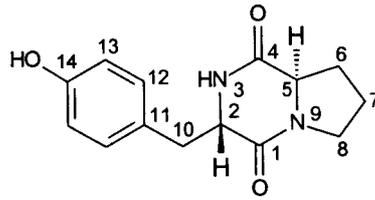
Compound 1



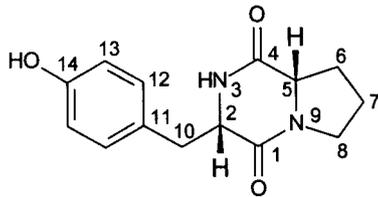
Compound 2



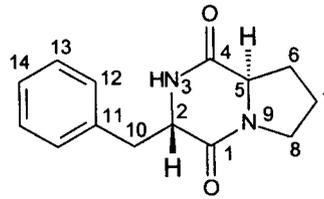
Compound 3



Compound 4



Compound 5



Compound 6

Fig 6. Cyclo dipeptide from EXTN-1

참 고 문 헌

- 1) Masanobu Munekata, and Gakuzo Tamura, (1981) Selective Inhibition of SV 40-transformed Cell Growth by Diketopiperazines, *Agric. Biol. Chem.*, 45 (11), 2613~2618
- 2) Tadao Kamikawa, Fujito Higuchō, Makoto Taniguchi, and Yukihiro Asaka, (1980) Toxic Metabolites of an Unidentified Filamentous Fungus Isolated from *Zinnia* Leaves, *Agric. Biol. Chem.*, 44 (3), 691~692
- 3) Yusuke Sasaki, Yasuyuki Akutsu, Michiko Matsui, Kenji Suzuki, Shinobu Sakurada, Takumi Sato, and Kensuke Kisara, (1982) Studies on Analgesic Oligopeptides. II. Structure-Activity Relationship among Thirty Analogs of a Cyclic Dipeptide, Cyclo(-Tyr-Arg-), *Chem. Pharm. Bull.*, 30(12), 4435~4443
- 4) Takashi Tatsuno, Motomu Sato, Yukio Kubota, Yasuko Kubota, and Hiroshi Tsunoda, (1971) Recherches Toxicologiques des Substances Metaboliques du *Fusarium nivale* La Quatrieme Substance Metabolique de *F. nivale*, *Chem. Pharm. Bull.*, 19(7), 1498~1500
- 5) C. Garbay-Jaureguiberry, B. P. Roques, L. Delcambe, F. Peypoux, and G. Michel, (1978) NMR conformational study of iturin A, an antibiotic from *Bacillus subtilis*, *FEBS Letters*, 93(1), 151-156
- 6) Christine Feignier, Françoise Besson, and Georges Michel, (1995) Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of iturin-, surfactin+ mutants, *FEMS Microbiology Letters*, 127(1-2), 11-15
- 7) G. Y. Yu, J. B. Sinclair, G. L. Hartman, and B. L. Bertagnolli, (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*, *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955-963

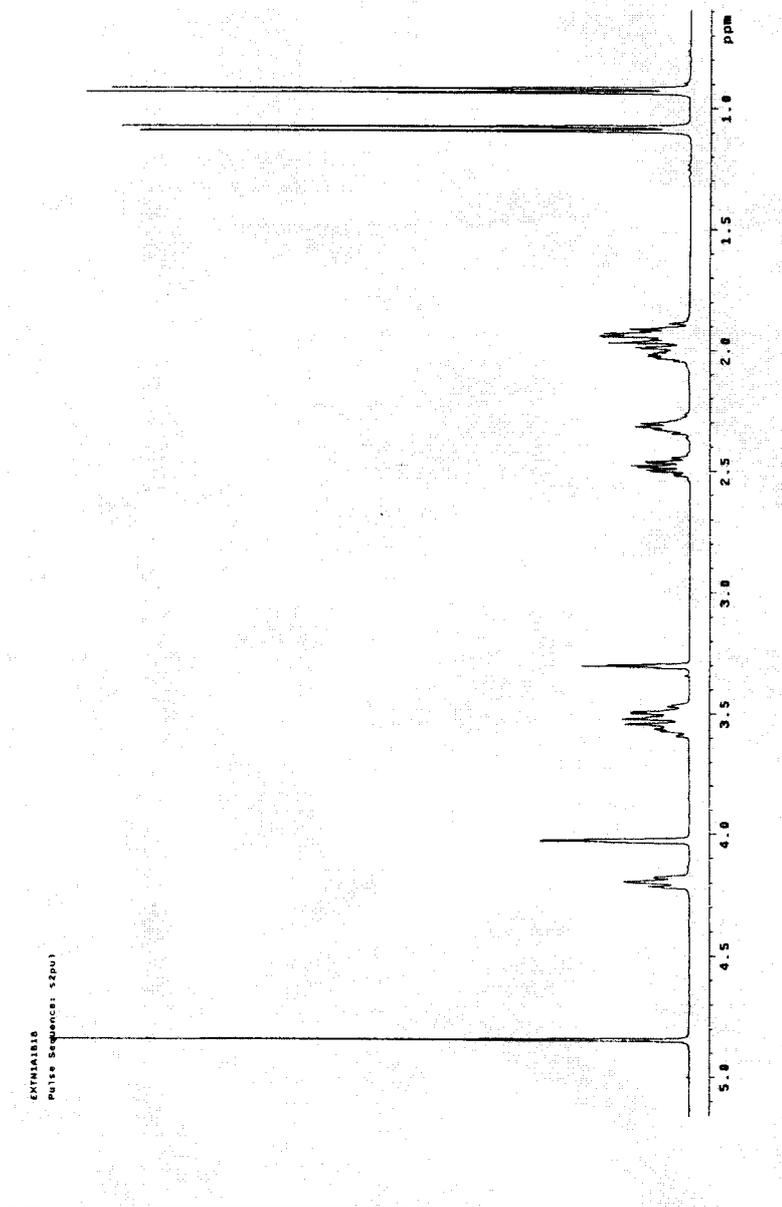


Fig 2. ^1H NMR spectrum of compound 1

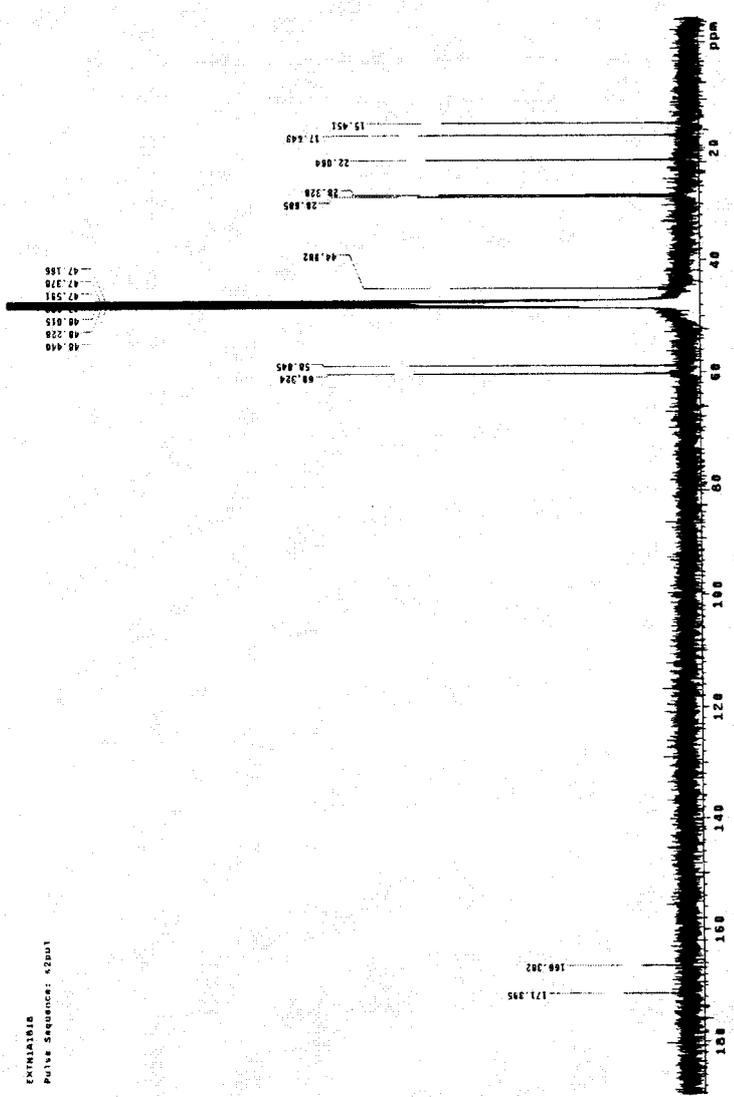


Fig 3. ^{13}C NMR spectrum of compound 1

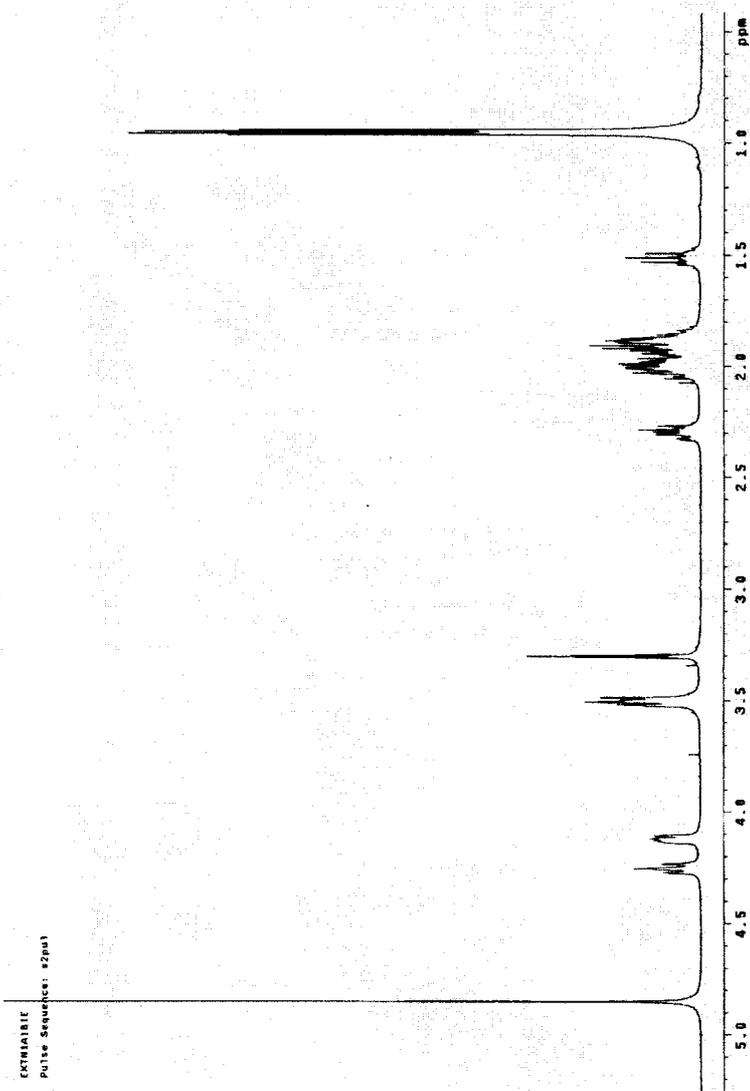


Fig 6. ^1H spectrum of compound 2

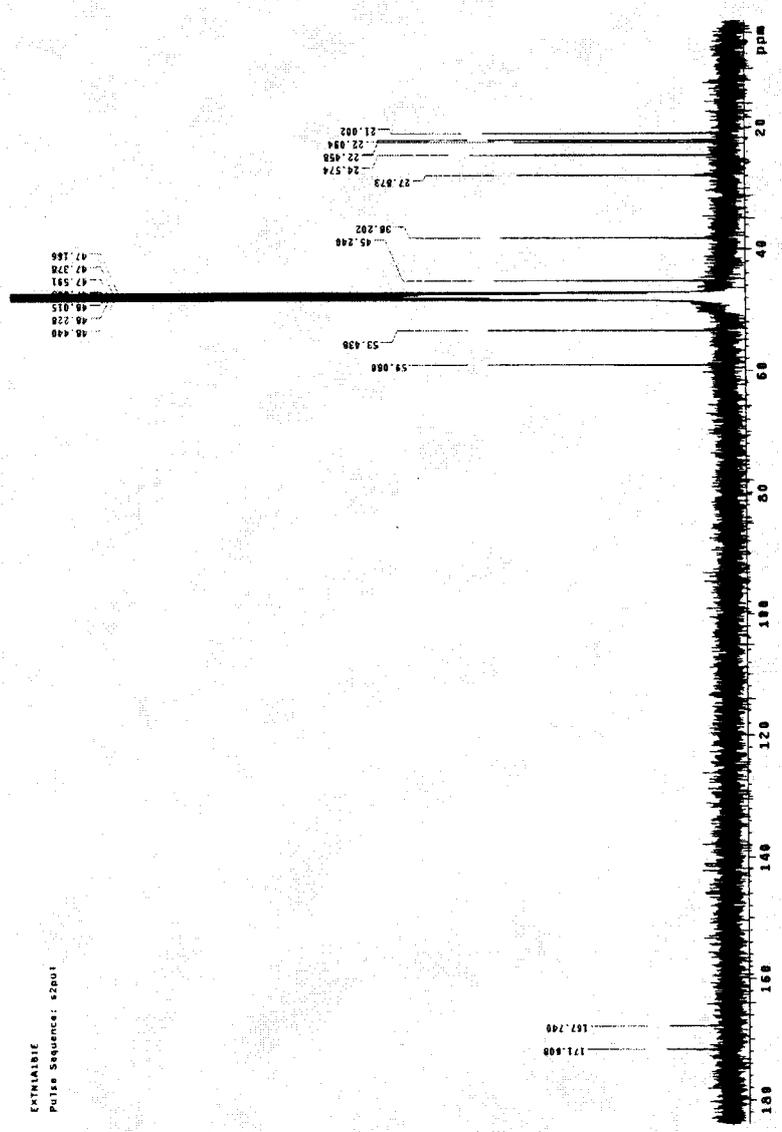


Fig 7. ¹³C spectrum of compound 2

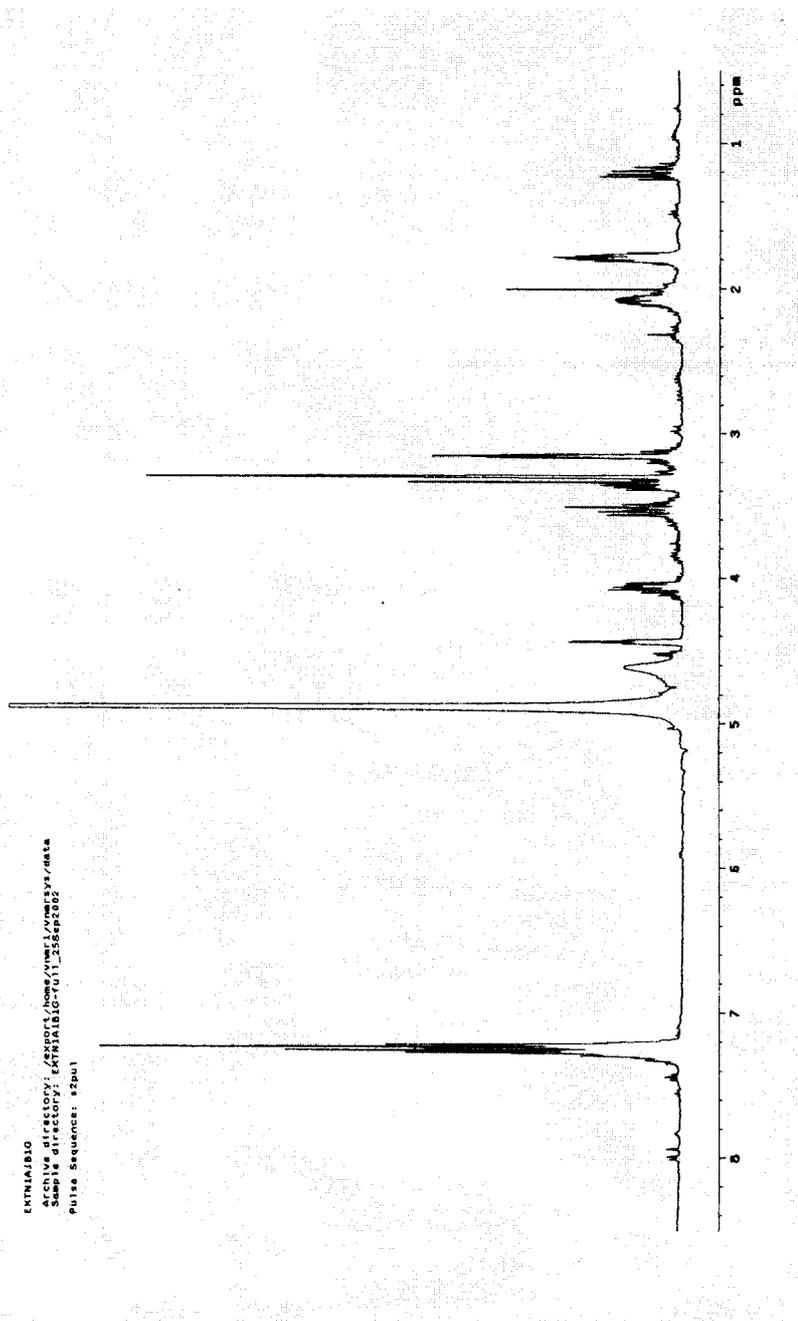


Fig 10. ¹H spectrum of compound 3

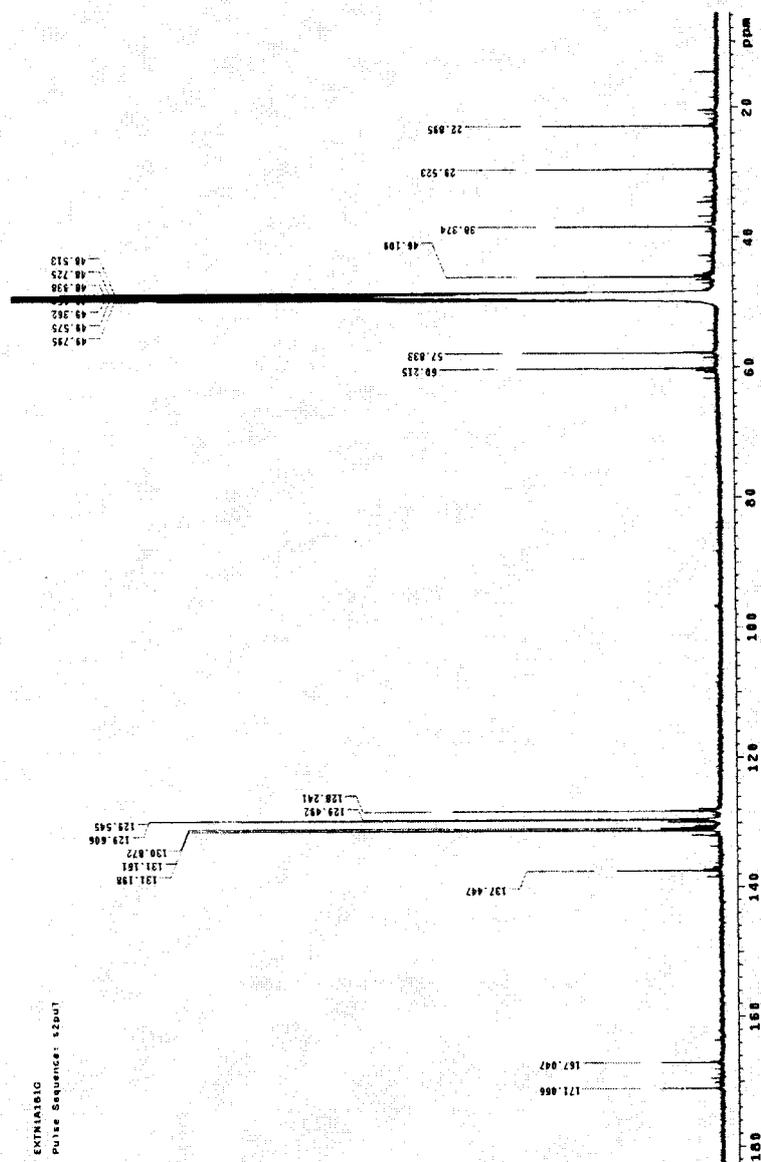
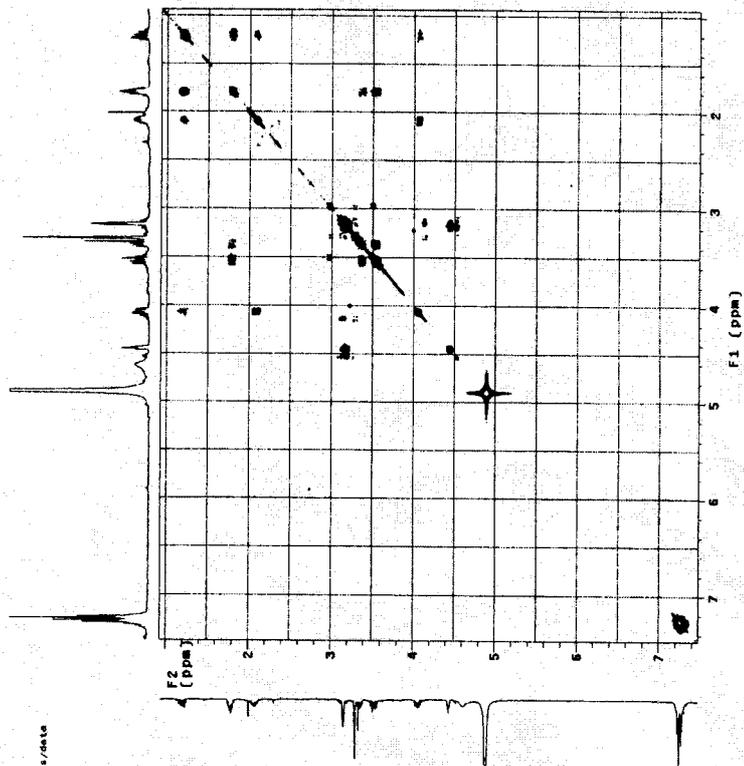


Fig 11. ^{13}C spectrum of compound 3



Archive directory: /export/home/vme1/vme1sys/data
 Sample directory: /DATA/1810-ru11_255-02003
 Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: CD3OD
 File: gCOSY.temperature
 Mercury: 40595 "Klu"
 Relax. delay: 1.000 sec
 2D data: 1600
 2D width: 3200 Hz
 2D height: 1600 Hz
 2D increments: 160
 2D data increment: 20 Hz
 2D F2 range: 0.15000000000000002 MHz
 2D F1 range: 0.15000000000000000 MHz
 2D DATA PROCESSING:
 1. 1D DATA PROCESSING
 2. 1D FT
 3. 1D GFT
 4. 1D GFT
 5. 1D GFT
 6. 1D GFT
 7. 1D GFT
 8. 1D GFT
 9. 1D GFT
 10. 1D GFT
 11. 1D GFT
 12. 1D GFT
 13. 1D GFT
 14. 1D GFT
 15. 1D GFT
 16. 1D GFT
 17. 1D GFT
 18. 1D GFT
 19. 1D GFT
 20. 1D GFT
 21. 1D GFT
 22. 1D GFT
 23. 1D GFT
 24. 1D GFT
 25. 1D GFT
 26. 1D GFT
 27. 1D GFT
 28. 1D GFT
 29. 1D GFT
 30. 1D GFT
 31. 1D GFT
 32. 1D GFT
 33. 1D GFT
 34. 1D GFT
 35. 1D GFT
 36. 1D GFT
 37. 1D GFT
 38. 1D GFT
 39. 1D GFT
 40. 1D GFT
 41. 1D GFT
 42. 1D GFT
 43. 1D GFT
 44. 1D GFT
 45. 1D GFT
 46. 1D GFT
 47. 1D GFT
 48. 1D GFT
 49. 1D GFT
 50. 1D GFT
 51. 1D GFT
 52. 1D GFT
 53. 1D GFT
 54. 1D GFT
 55. 1D GFT
 56. 1D GFT
 57. 1D GFT
 58. 1D GFT
 59. 1D GFT
 60. 1D GFT
 61. 1D GFT
 62. 1D GFT
 63. 1D GFT
 64. 1D GFT
 65. 1D GFT
 66. 1D GFT
 67. 1D GFT
 68. 1D GFT
 69. 1D GFT
 70. 1D GFT
 71. 1D GFT
 72. 1D GFT
 73. 1D GFT
 74. 1D GFT
 75. 1D GFT
 76. 1D GFT
 77. 1D GFT
 78. 1D GFT
 79. 1D GFT
 80. 1D GFT
 81. 1D GFT
 82. 1D GFT
 83. 1D GFT
 84. 1D GFT
 85. 1D GFT
 86. 1D GFT
 87. 1D GFT
 88. 1D GFT
 89. 1D GFT
 90. 1D GFT
 91. 1D GFT
 92. 1D GFT
 93. 1D GFT
 94. 1D GFT
 95. 1D GFT
 96. 1D GFT
 97. 1D GFT
 98. 1D GFT
 99. 1D GFT
 100. 1D GFT
 Total time 12 min, 12 sec

Fig 12. gCOSY spectrum of compound 3

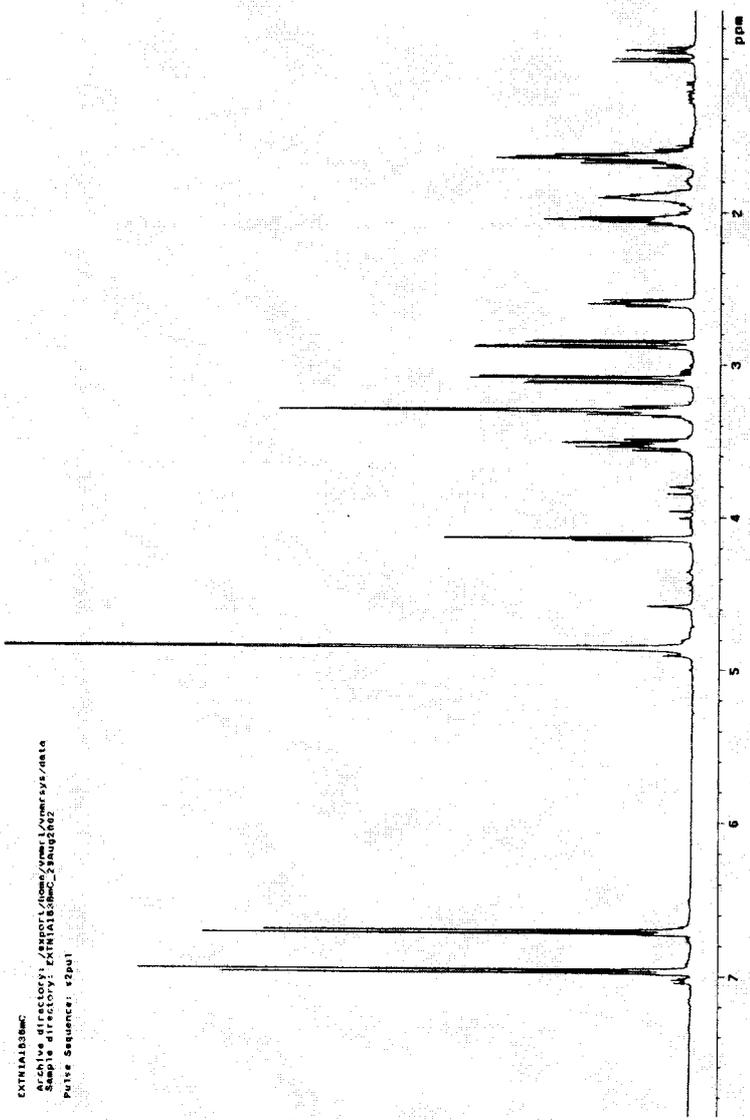


Fig 14. ^1H spectrum of compound 4

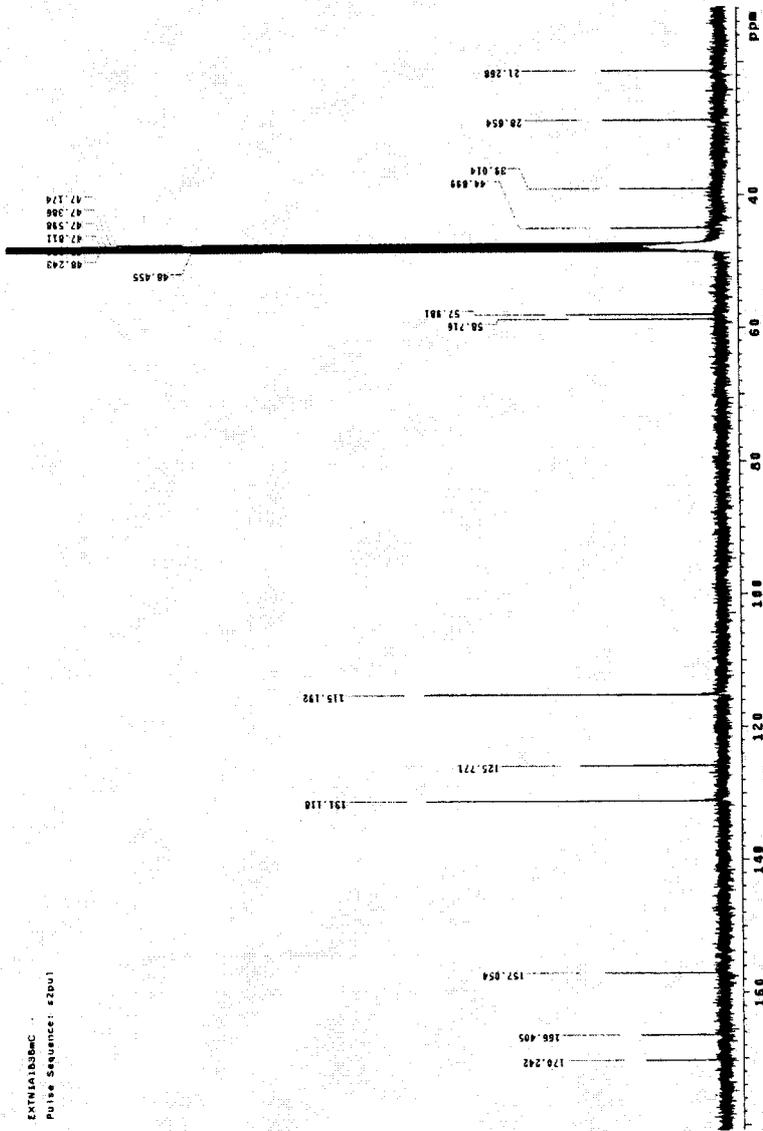


Fig 15. ^{13}C spectrum of compound 4

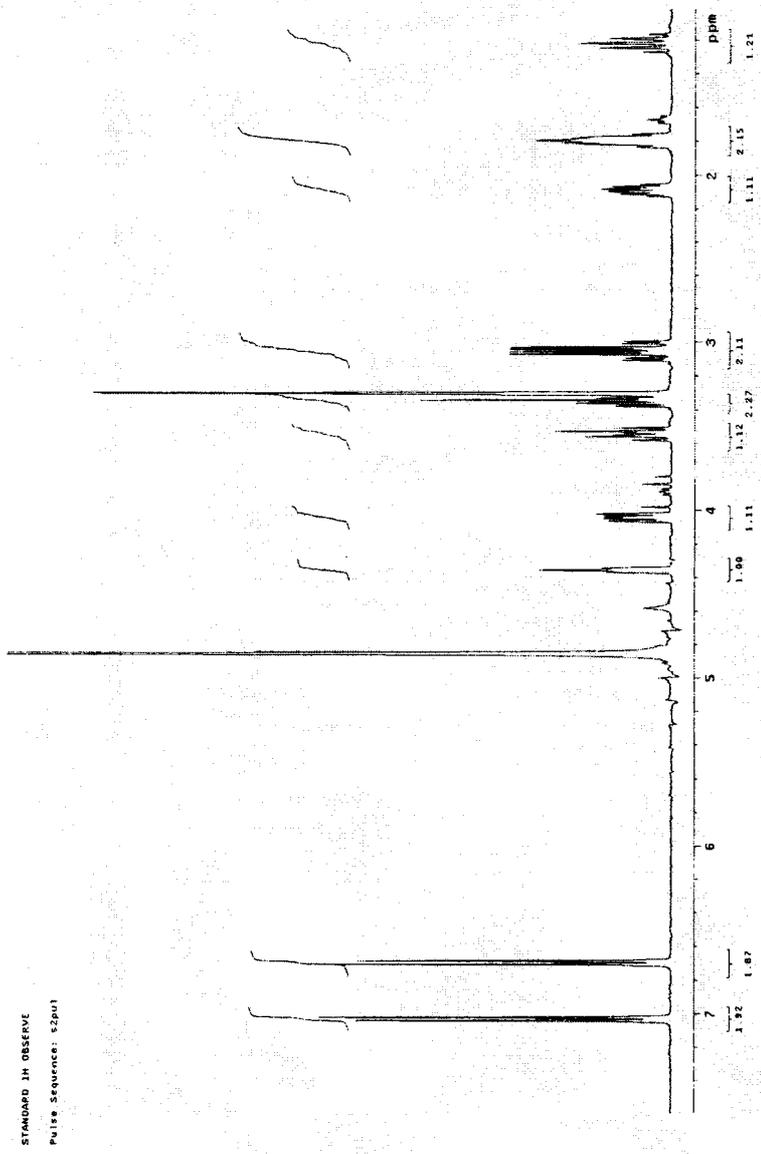


Fig 18. ^1H spectrum of compound 5

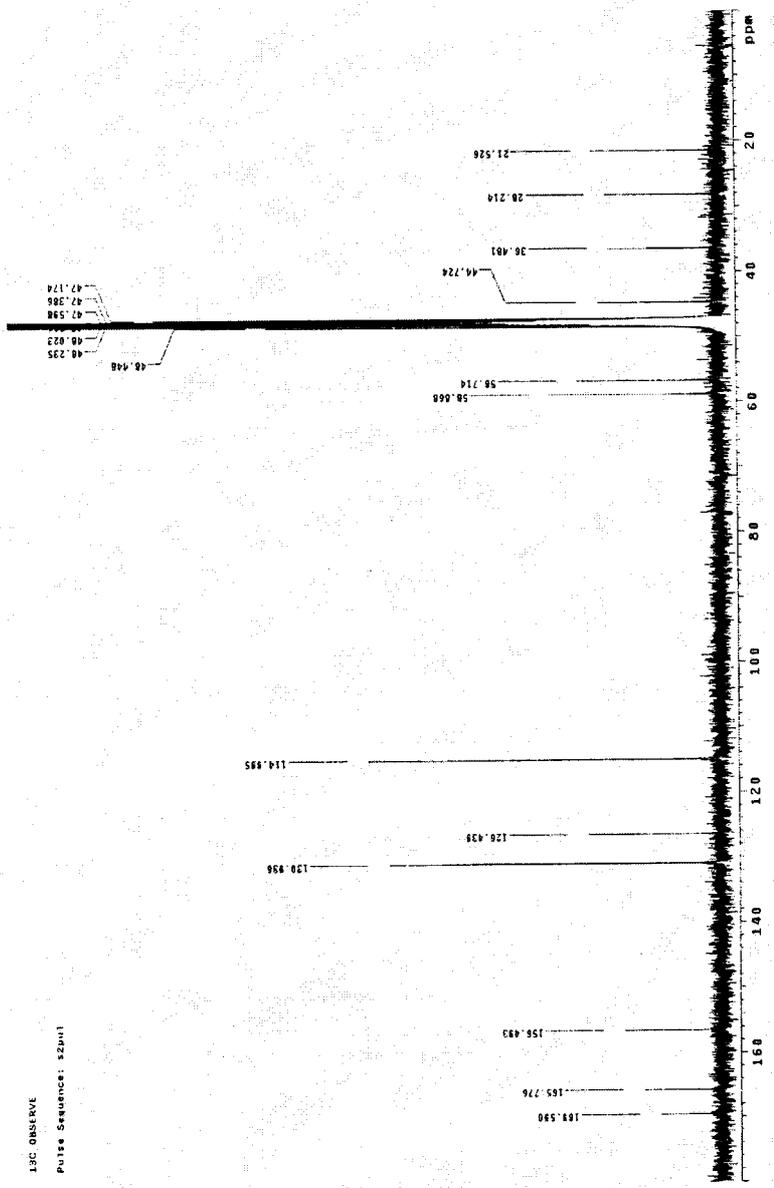


Fig 19. ¹³C spectrum of compound 5

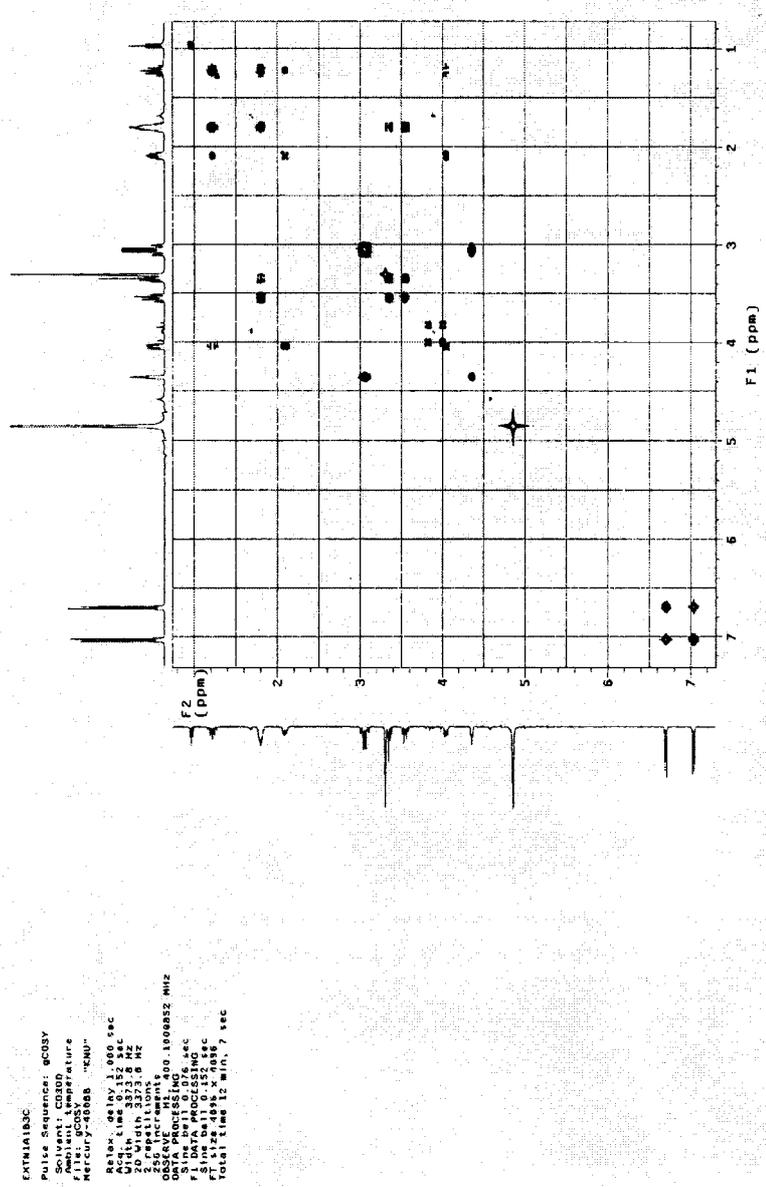


Fig 20. gCOSY spectrum of compound 5

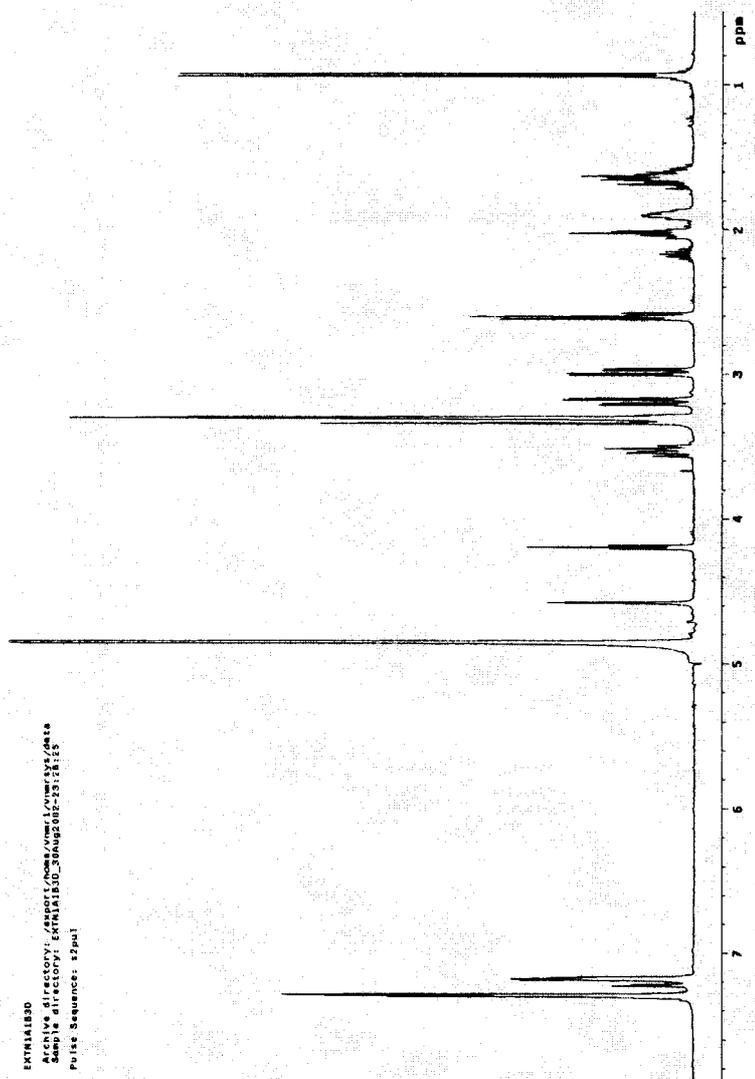


Fig 22. ¹H NMR spectrum of compound 6

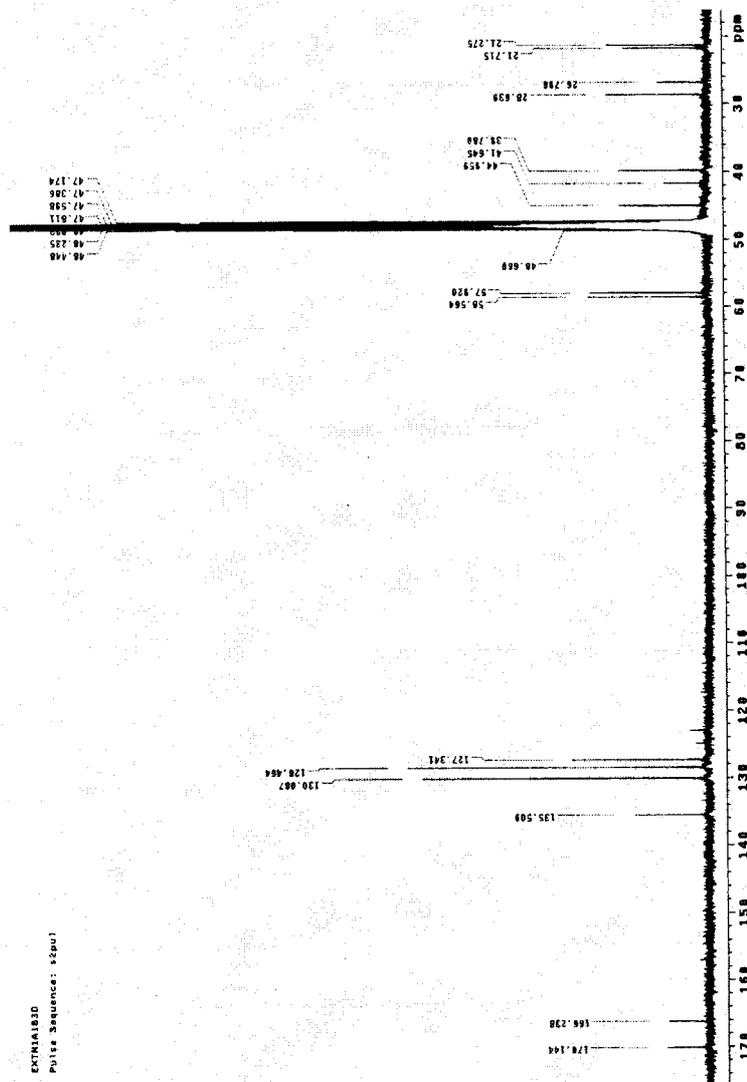


Fig 23. ^{13}C NMR spectrum of compound 6

Archive directory: EXT0010103_00140202-231225
 Sample directory: EXT0010103_00140202-231225
 Pulse sequence: gHSQC
 Solvent: CD3OD
 Ambient temperature
 Reference: 400088 "HMU"
 Relax time: 1.000 sec
 Acquisition time: 120 sec
 Width: 4000.0 Hz
 F2: 100.625 MHz
 16 repetitions
 OBSERVE: H1, 400.1460852 MHz
 DECOUPLE: C13, 100.6127778 MHz
 on during acquisition
 CARRIAGE: 100.6127778 MHz
 DATA PROCESSING
 F1: 100.6127778 MHz
 F2: 100.6127778 MHz
 F3: 100.6127778 MHz
 F4: 100.6127778 MHz
 F5: 100.6127778 MHz
 F6: 100.6127778 MHz
 F7: 100.6127778 MHz
 F8: 100.6127778 MHz
 F9: 100.6127778 MHz
 F10: 100.6127778 MHz
 F11: 100.6127778 MHz
 F12: 100.6127778 MHz
 F13: 100.6127778 MHz
 F14: 100.6127778 MHz
 F15: 100.6127778 MHz
 F16: 100.6127778 MHz
 F17: 100.6127778 MHz
 F18: 100.6127778 MHz
 F19: 100.6127778 MHz
 F20: 100.6127778 MHz
 F21: 100.6127778 MHz
 F22: 100.6127778 MHz
 F23: 100.6127778 MHz
 F24: 100.6127778 MHz
 F25: 100.6127778 MHz
 F26: 100.6127778 MHz
 F27: 100.6127778 MHz
 F28: 100.6127778 MHz
 F29: 100.6127778 MHz
 F30: 100.6127778 MHz
 F31: 100.6127778 MHz
 F32: 100.6127778 MHz
 F33: 100.6127778 MHz
 F34: 100.6127778 MHz
 F35: 100.6127778 MHz
 F36: 100.6127778 MHz
 F37: 100.6127778 MHz
 F38: 100.6127778 MHz
 F39: 100.6127778 MHz
 F40: 100.6127778 MHz
 F41: 100.6127778 MHz
 F42: 100.6127778 MHz
 F43: 100.6127778 MHz
 F44: 100.6127778 MHz
 F45: 100.6127778 MHz
 F46: 100.6127778 MHz
 F47: 100.6127778 MHz
 F48: 100.6127778 MHz
 F49: 100.6127778 MHz
 F50: 100.6127778 MHz
 F51: 100.6127778 MHz
 F52: 100.6127778 MHz
 F53: 100.6127778 MHz
 F54: 100.6127778 MHz
 F55: 100.6127778 MHz
 F56: 100.6127778 MHz
 F57: 100.6127778 MHz
 F58: 100.6127778 MHz
 F59: 100.6127778 MHz
 F60: 100.6127778 MHz
 F61: 100.6127778 MHz
 F62: 100.6127778 MHz
 F63: 100.6127778 MHz
 F64: 100.6127778 MHz
 F65: 100.6127778 MHz
 F66: 100.6127778 MHz
 F67: 100.6127778 MHz
 F68: 100.6127778 MHz
 F69: 100.6127778 MHz
 F70: 100.6127778 MHz
 F71: 100.6127778 MHz
 F72: 100.6127778 MHz
 F73: 100.6127778 MHz
 F74: 100.6127778 MHz
 F75: 100.6127778 MHz
 F76: 100.6127778 MHz
 F77: 100.6127778 MHz
 F78: 100.6127778 MHz
 F79: 100.6127778 MHz
 F80: 100.6127778 MHz
 F81: 100.6127778 MHz
 F82: 100.6127778 MHz
 F83: 100.6127778 MHz
 F84: 100.6127778 MHz
 F85: 100.6127778 MHz
 F86: 100.6127778 MHz
 F87: 100.6127778 MHz
 F88: 100.6127778 MHz
 F89: 100.6127778 MHz
 F90: 100.6127778 MHz
 F91: 100.6127778 MHz
 F92: 100.6127778 MHz
 F93: 100.6127778 MHz
 F94: 100.6127778 MHz
 F95: 100.6127778 MHz
 F96: 100.6127778 MHz
 F97: 100.6127778 MHz
 F98: 100.6127778 MHz
 F99: 100.6127778 MHz
 F100: 100.6127778 MHz
 Total time: 1 hr, 35 min, 31 sec

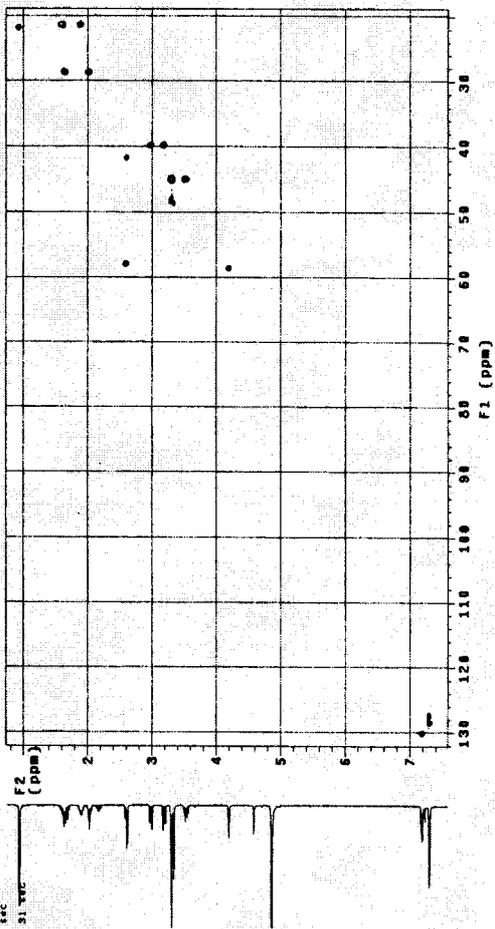


Fig 25. gHSQC spectrum of compound 6

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유도저항성 근권균(EXTN-1)의 산업화 공정개발” 과제의
최종 보고서로 제출합니다.

2002년 12월 12일

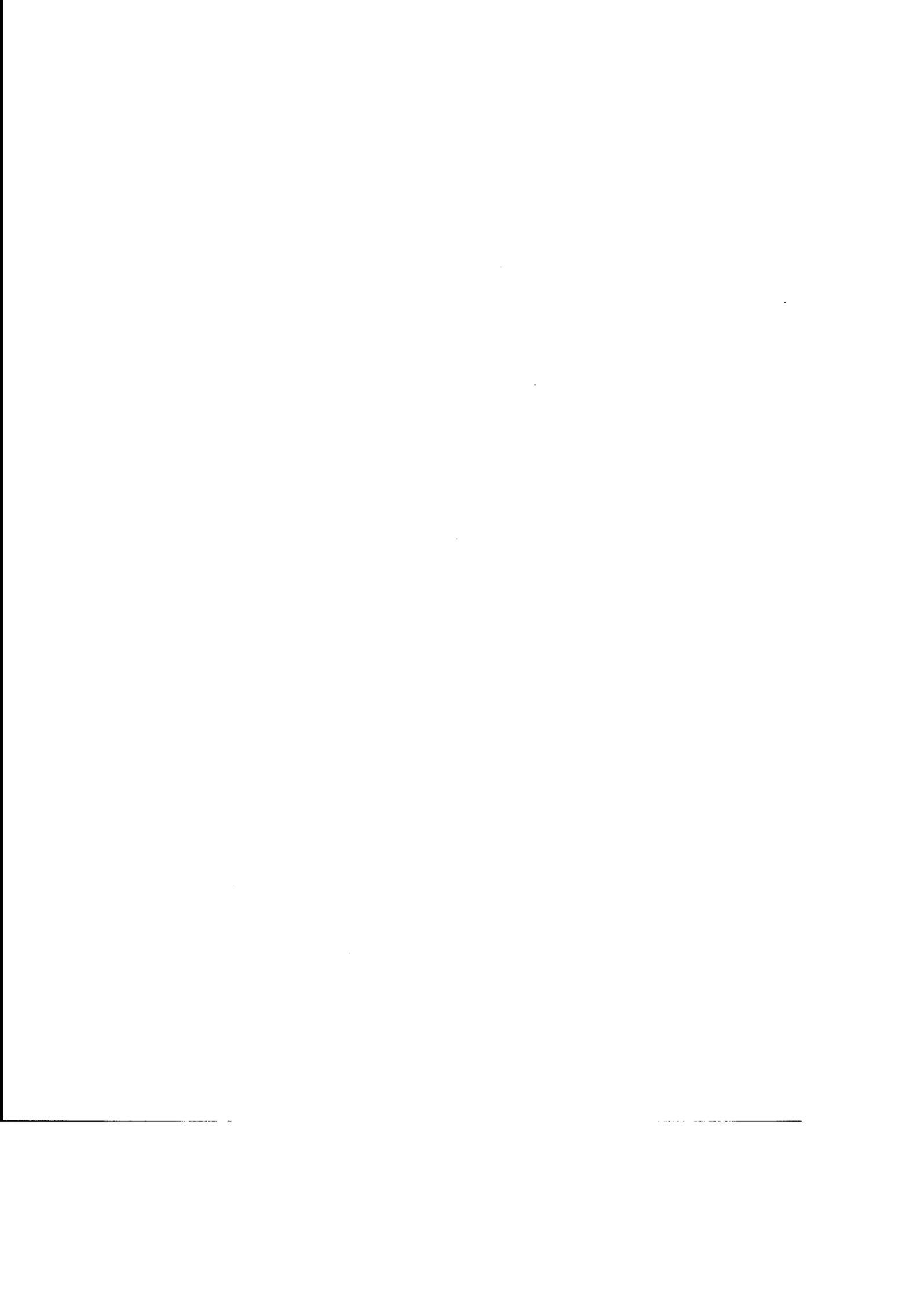
협동연구기관명 : 동부한농연구소

협동연구책임자 : 장 성 식

연 구 원 : 신 세 영

이 한 영

김 재 수



제4장 유도저항성 근권균(EXTN-1)의 산업화 공정 개발

제 1 절 서설

유기 합성 농약의 사용에 의한 환경에 대한 부담이나 농산물에 대한 잔류성 때문에 생물학적 방제와 같은 친환경적 방제 방법이 점점 증가하는 추세이며, 과거의 미생물제의 개발 동향은 미생물을 직접 토양에 처리하여 병해를 방제하고자 하는 시도가 주류를 이루어 왔으나, 미생물과 작물체 간의 상호 작용에 대한 이해가 넓어지면서 유용한 미생물을 작물의 근권에 효과적으로 정착시켜 토양 병해를 효과적으로 방제하고자 하는 시도가 나타나고 있다.

유도저항성은 자연 토양내에 살고 있는 근권균을 이용하여 작물체의 각종 병해에 대한 저항성을 유발시켜 병해를 방제하는 방법으로 여러 작물에 동시에 적용 가능하며 한 작물의 여러 병해에 동시에 효과를 발휘한다는 이점이 있어 최근 이에 대한 연구가 선진 각국에서 활발히 이루어지고 있다. 근권균 중에는 식물생장촉진근권균(PGPR)처럼 유도저항성 능력뿐만 아니라 작물체 생장 촉진 능력을 동시에 가진 균도 있어 병 방제뿐만 아니라, 수량증진, 숙기 단축과 같은 효과도 동시에 기대할 수 있으므로 자연 토양내에 수없이 많이 존재하는 근권균을 대상으로 선별검정하여 우수한 능력을 가진 균주를 확보할 수 있다면 생물학적 방제의 또 한가지의 수단으로 유용할 것으로 기대되고 있다.

본 연구는 병해에 대한 길항효과 및 작물 생육촉진효과가 우수한 유도저항성 균주 EXTN-1의 대량배양 기술을 개발하고, 환경친화적 제제화 기술 개발을 통하여 유도저항성 균주 EXTN-1의 산업화 공정을 개발하고자 하는데 있다.

국내 유도저항성에 관한 연구는 1990년대 후반부터 시작되어 활발히 연구 진행중에 있으며, 실용화를 위한 공정개발 단계는 아직 초보적인 수준에 머물러 있다. 외국의 경우는 '90년대 초반 미국 Auburn 대학의 Kloepper group을 중심으로 많은 연구가 이루어지고 있으며 근권 세균이나 내생근권세균을 중심으로 한 작물체의 방어기작의 활성화에 그 초점이 맞추어져 있다. 근권균과 기주 식물과의 상호 작용에 의하여 기주 식물은 저항성 관련 물질을 생산하며, 최근 유도저항성을 일으키는 화학물질인 BTH가 Actiguard라는 상품명으로 시판되고 있다. BTH는 기존의 농약과는 작용기작이 전혀 달라서 병원균의 생장에 영향을 주지 않으며 작물체의 저항성 방어기작만을 활성화시켜 병을 방제하는 효과를 가지고, 또한 환경독성을

전혀 일으키지 않으므로 제 3세대 농약이라고도 불리워지고 있다. BTH와 같은 저항성 유도 화학 물질 외에도 살아있는 생물체인 근권균을 접종하여 작물체에 유사한 반응을 일으키는 것이 최근 밝혀지고 있어 생물학적 방제의 측면에서 연구가 집중적으로 이루어지고 있으며, 가까운 장래에 실용화된 상품이 유통될 수 있을 것으로 전망하고 있다.

토양전염성 병원균에 대한 유도저항성 관련 유용미생물에 대한 외국의 사례가 다음의 표에 나타나있다.

토양전염성 병원균에 대한 유도저항성 관련 유용미생물(PGPR's)

Plant	PGPR	Plant pathogen	Reference
carnation	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS 417r	<i>Fusarium oxysporum</i>	Van peer(1991)
cucumber	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Pseudomonas putida</i> 89B-27 <i>Serratia marcescens</i> 90-166 <i>Bacillus pumillus</i>	<i>Pythium</i> sp. <i>F. oxysporum</i> <i>F. oxysporum</i> <i>Colletotrichum</i> sp.	Zhouand(1994) Liu(1995) Liu(1996) Raupach(1996)
Radish	<i>Pseudomonas fluorscens</i> WCS 374 <i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Leeman(1995) Hoffland(1995)
Tomato	avirulent <i>Fusarium</i> spp.	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis</i>	Matta(1990)
Tomato	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Wilson(1996)
Tomato	<i>Bacillus pumillus</i>	TMV	Tuzun(1997)

제 2 절 재료 및 방법

1. 대량배양을 위한 조건 확립시험

1) agar plate 배양

Extn-1 균주의 생장특성을 조사하기 위하여 Nutrient agar, Sporulation agar (YE 1.0g, Beef extract 1.0g, Tryptone 1.0g, FeSO₄·7H₂O trace, Glucose 10.0, Agar 15g/L, pH7.2), Czapeck agar, Potato-Dextrose Agar 에 각각 접종하여 30°C에서 배양하였다.

2) 액체배지 배양

표1에 나타난 배지조성으로 액체배지 100mL 을 준비하여 500mL baffled flask 에서 멸균하여 30°C, 150rpm 으로 배양하였다. 모든 배지성분을 함께 멸균하였으며, 멸균전 pH 는 7.0으로 조정하였다. Glucose 잔존량은 glucose analyzer 로 측정하였으며, 배양액을 현미경 관찰하여 포자형성 정도를 육안식별로 측정하였다.

Table 1. Flask 배양실험에 사용된 배지조성

Flask No.	Medium composition (pH 7.0 adjust with NaOH prior to autoclave, baffled flask 100mL/500mL, 30 C, 150rpm shaker)
1	Glucose 2%, YE 0.2%, Bactopeptone 0.2%, K ₂ HPO ₄ 0.05%, CaCO ₃ 0.2%
2	Glucose 2%, YE 0.2%, Bactopeptone 0.2%, Ammonium sulfate 0.1%, Potassium phosphate, dibasic, 0.1%, , CaCO ₃ 0.2%
3	Glucose 2%, YE 0.2%, Ammonium sulfate 0.2%, Potassium phosphate, dibasic, 0.1%, , Soybean Powder 0.5%, Corn steep liquor 0.5%, CaCO ₃ 0.2%
4	Glucose 2%, YE 0.2%, Ammonium sulfate 0.2%, Potassium phosphate, dibasic, 0.2%, , Soybean Powder 0.5%, Corn steep liquor 0.5%, CaCO ₃ 0.2%, Manganese sulfate 0.001%, Zinc sulfate 0.001%

3) 발효조배양

상기의 시험을 통하여 Extn-1 균주를 medium 4 에서 배양하기로 결정하고, 2.5L glass jar (한국발효기, 1998)에서 배양하여 생산성을 알아보고자 하였다. 발효조 배양의 경우 다만 배지준비에 있어 glucose를 따로 멸균하여 첨가하였고 Zn salt는 Mn salt 와 함께 따로 소량의 용액을 멸균한 후 첨가하여, 1.45L 가 되게하였고, 접종원은 YM broth 50mL 에서 18시간 배양한 배양물을 사용하였다. 3N NaOH 를 준비하여 pH 6.2 이상이 되도록 pH를 조정하였고, 30% silicon emulsion 을 사용하여 소포제로 사용하였다. 배양온도는 flask 배양과 마찬가지로 30℃를 유지하였으며, 운전조건은 통기 0.5-1.0L/min, rpm 50-700으로, 용존산소량을 보아가며 용존산소가 20% saturation 이상이 되도록 조정하였다.

시간별로 샘플링하여 현미경을 사용하여 세포의 모양을 관찰하였고, 증류수로 희석하여 OD 600을 측정하여 균의 성장정도를 측정하였다. 배양과정에서 잔존하는 탄소원 (glucose) 의량은 glucose analyzer (YSI, USA) 로 측정하였다. 배양의 종료는 현미경상에서 포자를 형성하고 난 후 더 이상의 포자형성이 증가되지 않는 시점으로부터 5시간 이후를 배양종료 시점으로 선택하였다. 2.5L jar fermenter 조건에서 얻은 배양 결과를 바탕으로 7L jar fermenter(한국발효기, 1988) 에서의 생산성 향상을 위한 배양조건 실험을 실시하였고, 7L jar fermenter 조건에서 얻은 배양 결과를 바탕으로 300L 발효기 (Best korea, 1999)에서의 생산성 향상을 위한 배양조건 실험을 하였다.

2. EXTN-1 균주의 종자 및 상토처리 기술개발

가. 상토제형 처방확립시험

A. 처방확립을 위한 생육시험1

배추와 오이에 대한 생육시험을 통하여 처방을 확립하고자 하였다.

건전한 묘 생산에 적합한 EXTN-1 첨가 원예용 상토를 개발하기 위하여 배추(한여름), 오이(구월반백) 종자에 대해 EXTN-1이 첨가된 상토를 제제하여 생육시험을 실시하였다. 상토의 제제시 첨가된 EXTN의 밀도는 상토 g당 상기 시험 결과를 토대로 하여 10^5 , 10^6 , 10^7 포자 수준이 되도록 하였으며, 기타 첨가된 성분들의 내용은 표2에 나타난 바와 같다.

제제된 상토를 트레이에 적정량을 채우고, 물을 충분히 가한 후 24시간 뒤 트레이 1구당 3립을 파종하여 출아 후 건실한 개체 1개만을 남기고 나머지는 제거하였다. 시험은 3반복 완전임의배치법으로 진행하였으며, 초장, 엽수, SPAD, 달관지수(0-5, 0: 생육양호, 5: 생육불량), 지상부 생체중등을 조사하였다.

Table 2. EXTN-1 함유 상토처방

NO	상토제제처방	EXTN 함량 (cfu/상토 g)	비료성분 (ppm)	기타원소	상토주재료
1	EXTN-01-00	0.0	N 250 P 520 K 320	Mg,Ca, B, S, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo	코코피트, 펠라이트, 버미큘라이트, 지올라이트
2	EXTN-01-01	1 ×10 ¹			
3	EXTN-01-02	1 ×10 ⁰			
4	EXTN-01-03	1 ×10 ⁰			

B. 미생물 상토의 제제 및 배추, 오이에 대한 생육시험 2

1차 제제한 상토를 이용한 생육시험에서 오이에서의 생육이 저조하여 이를 해결하고자 초기의 양분상태를 높여 재제제한하였다. 재제제한 상토 처방은 표3과 같다. 재제제한 상토를 이용하여 오이에서의 육묘시험을 실시하였다. 상토를 트레이에 적정량을 채우고 물을 충분히 가한 후 24시간 뒤에 유근의 길이가 일정한 개체를 선별하여 파종하였다. 완전임의배치 12반복으로 시험을 실시하였으며 10, 31DAS에 초장, 엽수, 자엽장, 제1본엽장, SPAD, 엽연변색유무(○o○,×), 달관평가(0-5), 생체중 등을 조사하였으며 SPAD값은 엽록소 함량을 측정된 값으로 엽색 평가 지표로 사용되었다.

Table 3. EXTN 첨가 상토 처방내역

NO	처방	EXTN 함량 (cfu/상토g)	비료성분(ppm)			상토주재료	비고
			N	P	K		
1	EXTN-01-04	0.2g/L (2.8×10 ⁷ cfu/g)	250	520	320	코코피트, 펠라이트, 버미큘라이트, 지올라이트	EXTN-01-01과 처방동일
2	EXTN-01-05						EXTN-01-04에 채종박,대두박첨가
3	EXTN-01-06						EXTN-01-04에 요소50ppm 첨가
4	대조상토	0.0g/L	250	520	320		-

C. 미생물 상토 처방 확립을 위한 오이 탄저병에 대한 방제효과시험

EXTN-01-04, EXTN-01-05, EXTN-01-06 상토와 대조 상토에 대하여 오이 탄저병 방제효과시험을 실시하였다. 위 상토를 pot에 채운후 오이 종자를 파종하여 본엽 2엽기까지 육묘하고, 오이 탄저병균을 2.0×10⁶ spores/ml 수준으로 경엽처리하여 25℃ 암상태의 Dew chamber에서 24

시간 동안 병원균의 침입을 유도하였다. 후에 25℃ 항온항습실에 두며 발병을 유도하였으며, 대조 상토에 키운 작물을 무처리와 대조 약제 처리구로 사용하였다. 시험은 완전임의 배치, 5반복을 하였으며, 병반면적율을 조사하였다.

나. 종자처리수화제의 처방확립시험

EXTN-1을 1%, 10%, 50% 의 3가지 농도로 첨가하여 계면활성제, Binder, Free Flow agent, 증량제 등의 부제와 혼합한 후 분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄 후, HDPE bag에 넣은 후 재 혼합하여 1차적으로 제제하였다. 3ml 멸균수에 이 약제들을 균밀도가 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} cfu/ml 수준이 되도록 현탁액을 만든 후 오이종자 150립, 배추종자 1g 각각을 침지하여 종자에 고르게 묻도록 한 후 음건하였다. 음건한 종자를 Petridish 에 여과지 2장을 깔고 증류수 5ml씩 분주한 후 16 시간 광조건, 8시간 암조건의 25℃ incubator에서 발아율을 조사하였으며 종피 바깥으로 유근이 나온 것들을 발아된 것으로 하여 조사하였다. 또한, 앞선 실험에서 나타난 생육 저조현상을 개선하기 위하여 처방을 달리한 6가지 EXTN-1 원제 미포함 시료를 제제하였다(WS3, WS4: 계면활성제 제외, WS5: 계면활성제 성분 대체, WS6: WS3의 pH조절, WS7:WS4의 pH조절, WS8: 계면활성제 대체 및 pH 조절). g종자당 약제 0.1g을 분의처리하여 6가지 제형의 차이를 보고자 하였으며, WS3, WS4, WS5의 경우 분의 처리외에 침지 처리를 함으로써 약제 처리방법에 의한 차이 유무를 보고자하였다. 실내에서의 발아 시험을 통해 처방간의 차이를 비교하였으며, 이들을 실제 pot에 파종하여 육묘하면서 생육의 차이를 조사하였다. 발아율 조사시 43시간까지의 발아율은 종피를 뚫고 유근이 나온 것을 모두 발아된 것으로 하여 발아율을 조사하였으며, 이후 64시간, 91시간 경과 후 발아세를 조사하였다.

다. 미생물 종자 pellet 제형개발

미생물 제형을 종자에 처리시 가장 문제가 되는 것은 원제 및 부제가 종자 발아에 영향을 미치는가 여부이다. 종자에 피복시 부제에 의해 부정적인 영향을 받는 것을 최소로 하기위해 부제선발 시험을 실시하였다. 코팅되지 않은 배추의 나종자를 대상으로 하여 시험을 실시하였으며, 각 부제들을 증류수에 현탁하여 종자에 처리한 후 발아율 및 발아세를 3일차까지 조사하였다. CaCO₃, Bentonite, Talc, Microsorb, Attage 150, Pangel, Celite, Galactose, CMC, 목초액, PVP등을 포함한 25가지 부제에 대하여 시험을 실시하였다.

또한, 선발된 부제들을 대상으로 함량 및 성분을 달리하여 5가지 종류를

제제하였다.

이들 제제품들에 대하여 발아율 조사를 통해 펠렛팅 제형에 적합한 처방을 선별하고자 하였다. 나종자 통일사계 배추를 무처리로 하여 Petridish 에 여과지 2장을 깔고 증류수 5ml씩 분주한 후 16시간 광조건, 8시간 암조건 의 25℃ incubator에서 발아율을 조사하였으며 종피 바깥으로 유근이 나온 것들을 발아된 것으로 하여 조사하였다. 60시간 이후의 발아율은 생육 측면을 고려하여 발아세를 조사하였다.

라. 입제제형 기술확립

300L 발효기에서 발효하여 건조한 EXTN 원체 분말을 분상의 부제와 혼합기에서 혼합한 후 액상의 계면활성제와 물을 첨가하여 반죽을 하였다. 반죽한 slurry를 압출식 조립기를 이용하여 조립하며 이때 스크린은 0.7mm를 사용하였다. 조립 후, 유동층 건조기를 이용하여 건조하며 건조 온도는 최고 온도 60℃ 이하로 조절하였다. 건조 후 얻어진 입자를 16~35 mesh로 정선하여 수분 침투를 막기 위해 은박포장지에 포장하여 입제를 제제하였다. 입제에 첨가된 EXTN 원체는 0.1%, 1%, 10%이고, 부제는 분산제 2종류가 각각 2%, 1%, 습윤제 0.5%, 보조제 0.5%, Binder 2종류가 각각 2%, 25%로 첨가되었다.

3. 제형들의 온실효과시험 및 저장안정성, 이화학적 특성조사

가. 제형들의 온실효과시험

A. 경엽처리에 의한 오이잿빛곰팡이병 방제효과 시험

EXTN-1(99) 균주를 배양하여 건조시킨 powder(6.6×10^{11} cfu/g)를 2,000배 희석하여 제1엽 전개시에 오이 경엽에 처리, 음건 후 잿빛곰팡이 병원균의 포자를 수확하여 10^5 spores/ml 수준으로 경엽에 분무접종한 후 20℃의 조건에서 발병을 유도하였다. 대조약제는 Dichron(50% WP, 50ppm 경엽처리)과 길항력이 우수한 *Bacillus* sp.(10% WP, x200 경엽처리)를 사용하였다. 병원균 접종 4, 6일 후 병반면적율을 조사하여 균주의 효과를 비교하였다.

B. EXTN-1 입제(GR) 제형의 오이 탄저병에 대한 효과 확인

EXTN-1 GR은 파종시 혼화처리와 1차 가식시 파구처리의 2가지 방법으로 각각 10^8 cfu/l 상토, 10^9 cfu/l 상토로 처리하였고, 대조약제는 프로피네브 수화제를 경엽처리 하였다. 포트에 오이 종자를 파종하여 본엽 2엽기까지 육묘하고, 오이 탄저병균을 2.0×10^6 spores/ml 수준으로 접종하여 25℃ 암상태의 항온항습기에서 24시간 동안 병원균의 침입을 유도한 후 25℃ 항온항습실에서 발병을 유도하였다. 완전임의배치 4반복으로 시험을 실시하였고, 병반면적율을 조사하여 방제가를 환산하였다.

C. EXTN-1 종자처리 수화제(WS)의 오이 탄저병에 대한 효과 확인

EXTN-1 WS I, II 두가지 제형을 오이종자 1g당 0.3g 습분의처리하여 (3.0×10^7 cfu/종자) 시험하였다. 오이 종자 파종후 본엽 1엽기에 탄저병균을 1.5×10^6 spores/ml 의 농도로 접종하여 발병을 유도하였고, 병원균 접종 1일전 대조약제를 경엽처리하였다. 사용한 오이 종자는 백미백다다기 품종 나종자였고, 대조 약제로는 프로피네브 수화제를 사용하였다. 결과는 오이 잎에 나타나는 병반수를 측정하여 방제가로 환산하였다.

D. 배추 뿌리혹병에 대한 효과 확인시험

EXTN-1이 첨가된 상토, 입제, 종자처리 수화제의 제형에 대해 배추 뿌리혹병에 대한 방제 효과를 확인하고자 하였다. 시험 작물은 배추(흑진주)를 사용하였으며, 전년도 뿌리혹병의 발생이 심했던 포장의 토양을 접종원으로 사용하였다.

처리는 각각의 제형 단독 처리와 종자처리수화제+ 원제 관주처리, 미생물 상토+ 원제 관주처리이고, 대조약제로는 후루실과마이드 분제를 이식시 토양혼화 하였다.

종자처리 수화제의 경우 g종자당 $0.2g(1.3 \times 10^6$ cfu/종자)을 습분의처리하고, 미생물 상토의 경우 g상토당 2.8×10^6 cfu 수준으로 EXTN-1이 처리되었으며, 입제의 경우 포트당 $0.1g(8 \times 10^7$ cfu/주) 처리하였다. 관주처리의 경우 파종 7일후 EXTN-1 밀도 10^7 cfu/ml 수준으로 처리하였고, 효과는 배추 이식 46일 후에 발병도로 평가하였으며, 그 조사 기준은 Table 4와 같다.

Table 4. 배추뿌리혹병 발병도 조사기준

발병지수	발병정도	가중계수
0	뿌리혹 없음	0
1	1~10% 뿌리혹, 비대정도 적고 서로 독립하여 존재함	10
2	11~30% 뿌리혹, 비대정도 비교적 큼	30
3	31~60% 뿌리혹, 서로접합, 비대정도 큼	60
4	61% 이상 뿌리혹, 서로접합, 비대정도 매우큼	90

$$\text{발병도} = \frac{\sum(\text{등급치별 개체수} \times \text{가중계수})}{\text{총조사주수}}$$

E. 고추 바이러스병 방제효과시험

EXTN-1 각 제형들의 바이러스 병해에 대한 방제효과를 확인하고자 고추를 대상으로 바이러스 접종 시험을 실시하였다. 대상 바이러스는 고추에 육묘상에서 많이 발생하는 TMV(Tobacco Mosaic Virus)였으며, 대상 제형은 입제, 종자처리수화제, 미생물 상토였고, Aminosalicylic acid(ASA)를 대조로 사용하였다. 각 제형들의 처리방법은 입제 제형의 경우 이식시 2g/L상토 (1.4×10^9 cfu/L soil) 혼화처리, 종자처리 수화제의 경우 파종시 종자 습분의처리(5.0×10^6 cfu/seed), 미생물 상토는 이식시 사용하였으며, 대조인 ASA(Sigma사)는 1000배 용액을 만들어 바이러스 접종 3일전 주당 20ml씩 관주처리 하였다. 바이러스 접종 10일후 이병주율을 조사하여 방제효과를 측정하였다.

F. 상토제형의 갈록병에 대한 효과시험

미생물 상토 제형의 *Rhizoctonia*에 의한 갈록병 방제 효과를 검증하기 위해 온실에서 접종시험을 실시하였다. 시험에 사용한 병원균은 *Rhizoctonia solani* AG-4였고, 이병토를 만들어 미생물 약제를 처리해 준 후 오이를 파종하였다. 파종 10일후 이병주율을 조사하여 효과를 평가하였다.

G. EXTN-1의 근권정착력 조사

종자처리 수화제와 미생물 상토 제형에 대해 육묘중 미생물의 근권부위 정착 정도를 알아보기 위하여 파종 후 약 40일까지 근권 부위의 토양과 뿌리 내부의 EXTN-1 의 밀도를 조사하였다. 초기 처리 밀도를 조사하고, 파종 후 20일, 30일, 40일에 10포트씩 채취하였고, EXTN-1이 항생제 Rifampicin에 대해 저항성이 있으므로 평판배지에 항생제 Rifampicin을 첨가하여 표지로 삼았다.

근권에서의 밀도는 멸균된 생리식염수에 절단된 뿌리를 넣고, 이를 강하게 vortexing하여 뿌리 표면의 흙을 현탁, 연속 희석한 것을 평판배지에 도말하여 조사하였고, 뿌리 내부의 EXTN의 밀도는 각 조사일차에 샘플링한 작물체를 외부의 흙을 모두 씻어낸 후 표면살균하고, 이들 뿌리 일정량씩을 유발에 마쇄하여, 마쇄한 현탁액을 연속희석하여 평판배지에 도말함으로써 조사하였다.

나. 제형들의 저장안정성 조사

EXTN-1이 함유된 종자처리수화제(W57), 입제(EXTN GR-01-03), 상토(EXTN-01-04) 제형들의 저장 안정성을 조사하기 위해 균주의 최저, 최적, 최고 온도인 4℃, 30℃, 40℃ 조건에 보관하면서 1년동안 2개월 간격으로 EXTN-1 밀도를 조사하였다. 방법은 희석평판배지 도말법을 사용하였다.

다. 제형들의 이화학적 특성조사

입제 제형의 이화학적 성질을 보기위해 pH, 수중붕괴성, 수중확산성을 측정하였다. 시료 10g을 현탁하여 pH meter를 이용해 pH를 측정하였다. 수중붕괴성이란 조립식 입제 또는 과립수화제의 입자가 수중에서 물과 접촉하여 그 제제 형태를 상실하는 성질을 말하며, 그 시점까지의 소요시간을 측정하여 평가하였다. 측정방법은 직경 10cm의 페트리디쉬에 3도 정도 수 50ml를 넣고, 시료 입자 5개를 일정한 간격으로 물속에 빠뜨려 붕괴, 팽창, 미립자의 확산등에 의해 입자의 원상이 소실되는 시점까지의 소요시간을 측정하였다. 5초 이내에 완전히 붕괴시 우수한 것으로 판정하며, 5~30초 양호, 30초~2분 보통, 2분 이상 소요될시 불량한 것으로 보았다. 수중확산성은 조립식 입제의 입자가 수중에서 물과 접촉하여 입상의 형태가 소실되는 형태 및 정도를 측정하여 평가하였다. 입자의 소실 형태는 다음과 같이 A, B, C, D로 구분 판정하며 A, B의 경우에는 낙하직후의 입자 면적과 30분 경과후 붕괴, 팽창에 의한 입자의 점유 면적비를 측정하고, C, D의 경우에는 미립자의 확산 직경을 측정한다.

Table 5. 수중확산성판정기준

유형	형상
A	입상 형태가 붕괴에 의해 소실되고 팽창 또는 미립자의 확산은 일어나지 않음.
B	입상 형태가 붕괴, 팽창에 의해 소실되고 미립자의 확산은 일어나지 않음.
C	입상 형태가 붕괴, 팽창에 의해 소실되면서 동시에 미립자의 확산이 수반됨.
D	입자가 수중에서 붕괴, 확산이 일어나지 않고 입자 말단부위에서 미립자의 확산이 일어남.

종자처리수화제의 이화학적 성질을 보기 위해 pH, 현수성, 수화성, 평균 입경을 측정하였다. pH와 평균 입경은 계측 기기를 이용하여 측정하였고, 현수성은 침전 현수율을 구하여 평가하였다. 현수성이란 약제 사용 농도에서 고형인 유효 성분이 물에 고르게 현탁되어 있는 정도를 측정하기 위한 항목이며, 칼럼의 특정 높이에서의 최고의 분산액 중에 포함된 유효 성분의 비율로 정의한다. 시험 방법은 일정량의 시료를 평량하여 최종 남은 부분 25ml을 취하여 주성분을 분석하고 상층의 0.9 부분의 유효 성분 함량을 산출하여 다음 식에 의해 현수율을 구하였다.

현수율(%) = (유효 성분의 총량 - 최종 0.1 부분의 유효성분량)/0.9부분의 유효성분량 ×100

수화성은 수중분산성 시료 일정량을 특정 높이에서 물이 담겨있는 용기에 떨어뜨렸을 때 완전히 습윤하는 시간을 측정하여 평가하는 항목으로 수면에 유동이 없을때 수면으로부터 10cm 높이에서 덩어리가 지지않은 시료 5g을 일시에 떨어뜨리고, 이때로부터 젖어 가라앉는 시간을 측정하였다.

상토의 이화학적 성질을 보기위해 pH, EC, 가비중을 조사하였으며, 방법은 다음과 같다. pH는 풍건한 상토 20ml에 증류수 100ml을 가하여 마개를 덮고 1시간 진탕 후 No. 2 여과지로 여과하여 pH meter(Metrohm pH meter)로 측정하였다. EC(Electrical conductivity)는 pH와 같은 준비과정을 거친 후 EC meter로 측정하였다. 상토 시료를 메스실린더에 담고 단위 부피당 무게를 측정하여 가비중을 조사하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 대량배양을 위한 조건확립시험

1) agar plate

배양 정해진 온도에서 48시간 배양 후 관찰결과, sporulation agar 에서의 성장속도가 가장 빨랐다. 48시간 후의 성장속도는 각 plate 에서 sporulation agar>nutrient agar>PDA> Czapeck agar 순서였다. Sporulation agar 는 일반적으로 Bacillus 속 균주들의 포자형성능력을 점검하기 위해 사용되는 배지로서, Extn-1 의 경우 현미경관찰결과 약 20-30% 정도가 포자를 형성하였다. 이는 포자형성능력이 큰 것으로 알려진 Bacillus thuringiensis (포자형성을 99%이상)균주들에 비교하면 포자형성능력이 매우 저조하다는 것을 알수 있었다. PDA에서는 포자형성을 30-40% 로서 약간 나은 경향이 있었으나 sporulation agar 에 비하여 성장속도가 다소 느린 점이 관찰되었다. 일반적으로, 항균력 (anti-fungal activity)을 갖는 Bacillus 종류들은 배양에서의 포자형성능력이 우수하지 않으며 또한 배양자체도 self-inhibition으로 인해 고농도로 하는데 어려움이 있는 것으로 알려져있다. Extn-1 균주 또한 이러한 일반적 특성을 보이는 것으로 판단되었다. 포자형성능력은 후에 액체배양에서의 생산성을 좌우하는 가장 중요한 능력이므로 액체배양에서는 이점에 주안점을 두어 배

지를 조성하였다.

2) 액체배지배양 (Flask)

Flask 1의 경우 최대 OD 값은 5.6 수준이었으며 이후 cell 은 급속히 lysis 가 일어나, 40시간 이후 포자형성율은 약 20% 내외로 관찰되었다. 포자형성은 24시간 이후에 관찰되었으며, 초기에 넣어준 glucose 가 효과적으로 생육에 이용되지 못함을 알 수 있었다. 20시간 이후에 Calcium carbonate 는 모두 소진되어, flask 배양에서 pH 저하가 심하게 일어나 생육에 불리한 조건이 형성되는 것으로 판단되었다.

Flask 2의 경우 첨가한 Ammonium sulfate 는 Flask1에 비해 큰 변화를 일으키지는 못하였으며, 여전히 pH 조건 등의 배지 외적인 요소가 크게 작용하는 것으로 생각되었다.

Flask 3 의 경우 Soybean powder와 CSL 의 첨가로 인해 최대 OD 는 약 9.36으로서, 생육이 대폭 개선됨을 알 수 있었다. 포자형성율도 대폭 개선되어, Extn-1 균주의 배양에 soybean powder 와 CSL 이 매우 좋은 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 이들 2가지 성분은 단백질 함량이 높으며 여러가지 growth factor를 함유한 값싼 배지성분으로서, Extn-1 균주의 대량생산에 매우 중요한 배지 성분으로 이용될 것으로 보인다

Flask 4에서는 일반적으로 Bacillus 균주들의 포자형성에 중요한 것으로 알려져있는 금속이온을 공급하여 Extn-1 균주의 포자형성을 유도하고자 하였다. 결과를 보면, trace metal 첨가한 결과 첨가하지 않은 Flask 3 과 비교하여 큰 변화는 찾을 수 없었다. 그러나 부정적인 영향은 나타나지 않았으며, 약간의 생육증진 및 포자형성율 상승 효과가 있었다. Flask 배양에서 이와같은 미미한 차이는 차이로 해석되지 않을 수도 있겠으나, 후에 행할 Fermentor 배양에서는 trace metal을 첨가하기로 결정하였다.

3) 발효조배양

Extn-1 균은 배양 시작 후 12시간이내에 최대 생육을 나타내었으며 이후 40-50% 의 포자형성율을 기록하였다. Flask 배양에 비교하여 fermentor 배양은 배양시간이 단축되고 첨가한 glucose 의 량에 비교한 균체생장이 개선되는 것은 일반적인 사실이다. 특히, 같은 배지 조성이라 할지라도 fermentor 배양의 경우 최대 OD 는 20에 이르러, flask 배양에 비하여 더욱 증가되었다. 이것은 pH 와 용존산소량을 통제한 결과로 보여진다. 그러나 Extn-1 균주의 경우 포자형성율은 오히려 저조하였다. 이의 원인은 여러가지로 해석할 수 있겠으나, 가장 중요한 것은 낮은 수준의 DO 값이 포자형성에 부정적으로 작용한 결과로 짐작되었다. 그러므로

fermentor 에서의 배양조건을 더 시험하여 포자형성율이 60% 이상이 되게 하는 배양조건을 찾는 것이 중요하다고 하겠다. 배양 결과물을 열처리한 후 CFU count 한 결과 1×10^9 CFU/mL 로 나타났다.

7L jar fermenter 조건에서는 Soybean powder를 주 배지성분으로 한 배지조건에서 EXTN-1균은 12시간 이후부터 pH가 감소하면서 균의 sporulation이 일어나기 시작했다. 균의 생육은 배양 12시간후 17.04까지 도달했으며, 포자가 세포밖으로 방출된 후 OD값은 최대 24.27까지 올라갔다. 포자형성율은 100% 에 근접하는 경향을 나타내었다. 이러한 높은 수준의 포자형성율은 sporulation이 진행되는 동안 배양기내의 DO값을 50%이상으로 높게 유지시킨 결과로 판단되어진다. 배양산물을 60°C에서 20min동안 열처리한 후 sonication 과정을 거쳐 CFU count를 한 결과 7.1×10^9 CFU/mL로 나타났다. 이 결과는 2.5L jar fermenter 배양결과인 1.0×10^9 CFU/mL보다 다소 높은 수준이었으며, 배양산물을 5,000rpm에서 10min동안 원심분리하여 건조시킨 powder의 포자수를 조사한 결과 6.6×10^{11} CFU/g로 나타났으며, 수율은 0.59%(23.73g/4L)으로 나타났다.

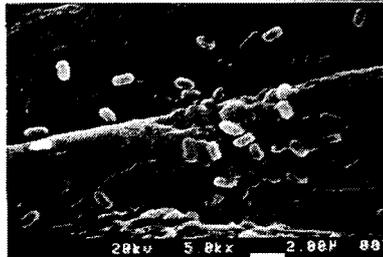
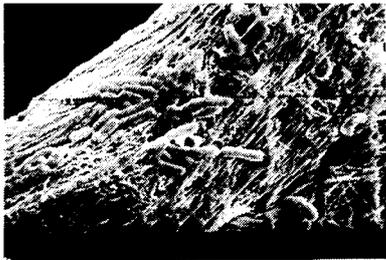


Fig. 1. EXTN-1 Vegetative cell(x5,000) Fig 2. EXTN-1 Endospore (x5,000)

300L 발효조 조건에서는 고농도 배양으로 인한 foam의 발생이 기존 배지 성분보다는 심하였으나, 통기조건 및 소포제를 이용하여 제어가 가능하였다. EXTN-1은 배양 8시간 이후부터 왕성한 증식을 보였으며, 12시간 이후부터 포자형성이 관찰되었다. 배양산물을 60°C에서 20min동안 열처리한 후 sonication 과정을 거쳐 CFU count를 한 결과 5.2×10^9 CFU/mL로 나타났다. 위 결과는 7L jar fermenter 배양결과인 7.1×10^9 CFU/mL와 거의 유사한 수준이었다. 그리고 위 배양산물을 연속원심분리기 (Kansai, 1999)를 이용하여 원심분리하여 건조시킨 powder의 포자수를 조사한 결과 3.8×10^{11} CFU/g로 나타났으며, 1.0×10^{11} CFU/g을 기준으로 powder에 pyrophillite를 첨가하여 원재 3.8kg(수율:2.5%)를 생산하였다.

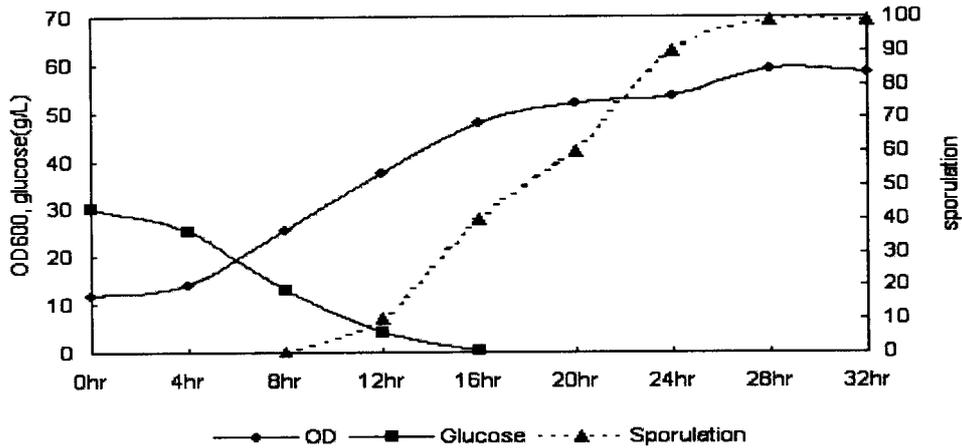


Fig 3. EXTN-1 fermentation in 300L Fermenter(modified medium).

2. EXTN-1 균주의 종자 및 상토처리 기술개발

가. 상토제형 처방확립시험

A. 처방 확립을 위한 생육시험1

배추에 대하여 배추용 상토에 종자를 파종후 15일, 21일, 28일 경과시에 조사한 달관지수변화, 초장변화, 엽수변화, 엽록소 함량 변화 및 최종 생체 중의 결과를 종합해보면, 전반적인 생육이 EXTN-1 무첨가 상토에서 육묘된 배추가 더 양호하게 나타났으며, 육묘전반기보다 후기로 갈수록 그 차이는 더욱 커졌다. EXTN-1 함량 차이에 따른 생육차이는 뚜렷한 경향을 보이지 않았는데, 특히 EXTN-1 함량이 가장 낮은 EXTN-01-03 처방에서 육묘된 배추의 생육이 상대적으로 가장 불량하였다. SPAD값 조사 결과를 보면 EXTN-1 첨가 처방 상토에서 육묘된 배추가 무첨가 상토의 경우보다 상대적으로 낮게 나타났는데, 이것은 작물에 의한 질소질 비료소모 이외의 요인이 작용한 것으로 생각되었다.

Table 6. 상토 제제 처방별 배추 생육

a. 달관조사결과

상토제제처방	달관지수 (0-5)*		
	15DAS*	21DAS	28DAS
EXTN-01-00	0.20 a**	0.00 a	0.60 a
EXTN-01-01	0.67 a	0.00 a	0.60 a
EXTN-01-02	0.37 a	0.27 a	0.37 a
EXTN-01-03	0.60 a	0.43 a	1.00 a

* DAS : Day After Seeding, ** 한열의 같은 문자는 DMRT에 의하여 유의적 차이없음.
(이하동일), *달관지수 (0: 생육양호, 5: 생육불량)

b. 상토제제 처방별 배추의 초장에 의한 생육차이

상토제제처방	초장(cm)		
	15DAS	21DAS	28DAS
EXTN-01-00	7.77 a	11.40 a	13.07 a
EXTN-01-01	7.50 a	10.47 ab	11.90 b
EXTN-01-02	7.67 a	11.10 ab	12.70 ab
EXTN-01-03	7.17 a	10.27 b	11.87 b

c. 배추에서의 엽수변화

상토제제처방	엽수(매/개체)		
	15DAS	21DAS	28DAS
EXTN-01-00	3.33 a	4.27 a	6.43 a
EXTN-01-01	3.07 a	4.30 a	6.10 ab
EXTN-01-02	3.30 a	4.20 a	6.10 ab
EXTN-01-03	3.17 a	4.17 a	5.83 b

d. 배추에서의 엽록소함량(SPAD값) 변화 및 최종 생체중

상토제제처방	SPAD 값		생체중(g/5개체)
	21DAS	28DAS	28DAS
EXTN-01-00	26.27 a	24.80 a	19.23 a
EXTN-01-01	25.60 a	23.30 ab	16.57 bc
EXTN-01-02	25.20 a	23.10 ab	18.10 ab
EXTN-01-03	25.13 a	21.63 b	15.70 c

생육은 EXTN-1 첨가 상토에서 육묘된 오이가 상대적으로 더 양호한 생육을 보였지만, 후기에는 오히려 무첨가처방상토의 경우가 더 나은 생육을 보였다. 특히 육묘후기의 SPAD 값을 보면, EXTN-1 무첨가 상토에 비해 첨가상토의 경우 상대적으로 더 낮게 나타났는데 이것은 오이에 의한 비료 소모 이외의 요인에 의해 비료가 소모된 것으로 생각되었다.

오이에 대하여 배추에서와 동일한 시험을 실시한 결과, 육묘전반기 생이렇게 육묘 과정중 나타나는 비절 현상의 원인이 미생물의 증식에 따른 질소 질의 소모로 추정하였으며, 미생물이 양분으로 이용할 수 있는 타 유기물이나 질소 성분을 더 첨가한 처방을 제제하여 생육 시험을 재실시하였다.

Table 7. 상토제제 처방별 오이에 대한 생육

a. 자엽장 및 제1본엽장(오이)

상토제제처방	자엽장(cm)	제 1 본엽장(cm)
	13DAS*	20DAS
EXTN-01-00	4.07 ab**	7.30 a
EXTN-01-01	3.83 b	7.67 a
EXTN-01-02	4.33 a	8.00 a
EXTN-01-03	4.23 a	7.27 a

b. 달관지수변화(오이)

상토제제처방	달관지수(0-5)			
	13DAS	16DAS	20DAS	28DAS
EXTN-01-00	0.50 a	0.50 a	0.00 c	0.27 b
EXTN-01-01	0.50 a	0.50 a	1.00 a	0.10 b
EXTN-01-02	0.50 a	0.50 a	0.00 c	0.60 a
EXTN-01-03	0.50 a	0.50 a	0.50 b	0.60 a

c. 초장, 엽수, 엽록소 함량(SPAD값) 변화 및 최종생체중(오이)

상토제제처방	초장(cm)		엽수(매/개체)		SPAD값		생체중(g/개체)
	20DAS	28DAS	20DAS	28DAS	20DAS	28DAS	28DAS
EXTN-01-00	16.07 c	32.57a	1.67a	3.67a	42.00ab	44.50 a	15.10 a
EXTN-01-01	17.40ab	30.00ab	1.70a	3.70a	39.63b	37.60a	14.17ab
EXTN-01-02	17.87a	29.83ab	1.50a	3.70a	45.00a	41.33a	14.03ab
EXTN-01-03	16.30bc	28.17b	1.47a	3.73a	46.23 a	40.77 a	12.83 b

B. 미생물 상토의 처방확립을 위한 생육시험 2

EXTN-1 첨가 원예용 상토에 대한 오이 육묘시험결과 10DAS(파종후 10일차)까지는 대조 상토에서 육묘된 오이 생육보다 EXTN-1이 첨가된 상토에서 육묘된 오이가 생육이 저조하였으나, 육묘 후기인 31DAS에는 오히려 EXTN-1 첨가 처방들이 더 양호한 생육을 보였다. EXTN-1 첨가 처방에서 육묘된 오이가 육묘 초기에 저조하였던 것은 EXTN-1의 밀도가 증가하면서 상토내 양분을 소모하였기 때문으로 생각되며 육묘 후기에 생육이 양호하여진 것은 증식한 길항균들이 정착 후 생리활성물질을 분비하였기 때문인 것으로 판단된다.

Table8. 오이에 대한 생육양상

a. 10DAS 생육조사결과

처방	초장(cm)	자엽장 (cm)	엽장(cm)	엽수	달관 (0-5)*
EXTN-01-04	6.9	4.3	2.9	0.9	1.1
EXTN-01-05	6.6	4.7	2.7	0.7	0.8
EXTN-01-06	8.0	5.0	3.6	1.0	0.7
대조상토	9.4	5.3	4.2	1.0	0.3

* 달관평가: 0-상토로 사용시 생육에 문제없음. 5- 전혀 생육되지 않고 발아 되지 않음
1이하- 상토로 사용시 문제없음.

b. 31DAS 생육조사결과

처방	초장(cm)	엽수	SPAD	달관(0-5)	엽연변색	생체중(g/1주)
EXTN-01-04	59.9	7.0	32.9	0.6	O	34.6
EXTN-01-05	62.3	6.6	34.5	0.7	O	35.6
EXTN-01-06	62.5	7.2	33.7	1.0	O	33.1
대조상토	57.9	6.4	31.7	1.6	O	29.2

C. 미생물 상토의 오이 탄저병에 대한 방제효과시험

무처리 병반면적을 19%로 조사하기엔 충분한 발병이었으며, 조사결과 EXTN-01-04 상토를 제외한 다른 처리구에선 무처리에 비해 병의 발생이 더 많았다(Table 9). 길항 미생물만을 포함한 상토의 방제가는 47.4%로 대조약제의 50%이상의 방제가를 보여 미생물 약제로의 활용 가능성은 존재하는 것으로 판단되었다. 약제의 활성을 높여줄 수 있는 부제의 선발이 필요할 것으로 생각된다.

오이 탄저병에 대한 방제효과시험 결과와 생육 비교 시험의 결과를 토대로 하여 미생물 상토의 제형은 EXTN-01-04 처방으로 선택하였다.

Table 9. EXTN-1 첨가 상토의 오이탄저병에 대한 병해방제효과시험

No	처리내용	병반면적율(%)	방제가 (%)
1	EXTN-01-04	10	47.4
2	EXTN-01-05	25.6	0
3	EXTN-01-06	19.6	0
4	propineb(대조약제)	3.3	82.6
5	무처리	19	-

나. 종자처리수화제의 처방확립시험

배추 종자에서의 발아율 조사 결과, 발아율 수치는 무처리와 비슷한 수준으로 발아되는 것으로 나타났으나, 발아된 후의 뿌리나 떡잎의 생육이 무처리에 비해 현저히 떨어지는 현상이 관찰되었다. 특히 뿌리의 생육이 불량하였고, 처리 약량이 늘어날수록 생육의 불량 상태가 더 심해지는 경향이 관찰되었다(Table10). 오이 종자에서의 발아율 조사 결과 또한 배추 종자에서와 비슷한 경향을 보였는데, 처리된 약제의 농도가 진해질수록 발아율 및 녹화율이 저조했으며, 발아는 다 되었으며 녹화 및 뿌리 생육이 저조한 것이 관찰되었다(Table 10). 발아율의 저조 현상은 약량과 계면활성제 성분에 의한 것으로 생각되며, 처리약량 1g/g종자가 과량인 것으로 판단되어 처리 약량을 1g 이하로 조정할 필요가 있을 것으로 판단된다.

Table 10. 발아율 조사 결과

a. 배추종자

No	처리약제	처리농도	발아율(%)			
			24시간 후	41시간 후	48시간 후	63시간 후
1	EXTN 1%WS	3×10 ⁷ cfu/ml	82	90.7	92.7	98
2	EXTN 1%WS	3×10 ⁸ cfu/ml	86	93.3	96	97.3
3	EXTN 10%WS	3×10 ⁹ cfu/ml	82	91.3	94	95.3
4	EXTN 50%WS	3×10 ¹⁰ cfu/ml	74	91.3	94	95.3
5	무처리 (나종자)	-	88	94	96	96

b. 오이 종자에서의 발아율 조사 결과

No	처리약제	처리농도	발아율(%)			
			41시간후	48시간후	63시간후	88시간후
1	EXTN 1%WS	3×10 ⁷ cfu/ml	9.3	12.7	20.7	22.7
2	EXTN 1%WS	3×10 ⁸ cfu/ml	18	19.3	35.3	38
3	EXTN 10%WS	3×10 ⁹ cfu/ml	6.7	8	14	15.3
4	EXTN 50%WS	3×10 ¹⁰ cfu/ml	2	3.3	6.7	8
5	무처리(나종자)	-	49.3	57.3	61.3	66.7

또한, 처방개선을 위한 제제품들의 발아율 조사 결과에 있어서 WS3, WS4, WS5에서 처리방법을 달리 하였을 때, 분의, 침지 등의 처리법에 따른 차이는 크게 보이지 않았으나, 64시간 경과시 무처리 대비 발아세가 분의처리시 약간 더 나아 처리방법은 분의 처리법을 사용하기로 하였다(표11). WS3~WS8의 분의 처리법에 의한 발아율을 조사한 결과, 발아율이 무처리와 대등한 수준으로 나타났으며, 발아 후의 떡잎의 전개나, 녹화 상태가 전 처리구에서 양호하였다(표11, 표12). 또한, WS3, WS4, WS5(pH5.0)와 WS6, WS7, WS8(pH 6.8) 간의 pH 차이에 의한 영향은 실내 발아율 시험시 pH6.8 제제분의 처리구에서 다소 우수하게 나타났으나 실제 포트에 파종하여 육묘한 경우에는 처리간에 pH에 의한 영향은 크게 나타나지 않는 것으로 판단된다(표13). 뿌리의 생육 정도는 모든 처리구에서 무처리의 뿌리 길이에 비해 50%이하 정도의 짧은 뿌리 길이를 보였다(그림4). 반면, 무처리에 비해 잔뿌리가 많이 생성되어 있어, 이렇게 petridish상에서 나타나는 현저한 뿌리 길이의 차이가 실제 육묘 상황에서 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자, 배추 나종자에 약제들을 처리하여, 포트에 파종, 육묘하며 생육의 정도 차이를 알아보고자 하였다. 파종 후 16일과 25일에 초장과 엽수를 조사한 결과, 처리구간에 다소의 차이는 있지만, 무처리와 비교하여 보았을 때 처리 3,4번(WS5,WS6)을 제외한 나머지 처리구들은 대등한 생육을 보였고, 그 중 WS7 처리구가 달관 조사시 전체적으로 고른 생육을 보였다(표13). 실내에서 발아율 조사시 뿌리의 길이가 무처리에 비해 현저히 짧았으나, 이로 인한 실제 생육엔 영향이 없음을 알 수 있었고, 추후 제제의 처방은 WS7로 결정하였다.

Table 11. WS3, WS4, WS5 분의처리와 침지처리 비교

처 방	처리방법	발아율(%) ^a		발아세(%) ^b		비고
		20시간 경과	43시간 경과	64시간 경과	91시간 경과	
1.WS3	분의처리	86.7	88.7	88.7	89.3	pH5.0
2.WS4		84.7	88.0	88.0	94.0	
3.WS5		85.3	89.3	89.3	90.0	
4.WS3	침지처리	84.7	91.3	87.0	88.7	
5.WS4		86.0	91.3	89.0	89.3	
6.WS5		84.7	88.0	86.7	88.7	
7.무처리	-	86.7	97.3	97.3	99.3	

a:발아율: 종피를 뚫고 유근이 나온 것을 모두 발아된 것으로 보고 전체 종자수에 대한 발아율을 조사함.

b:발아세: 무처리와 같은 정도의 생육 양상(잎의 전개양상, 녹화정도등)을 보이는 것을 정상개체로 보고 전체 종자수 대비 정상 생육개체를 조사함.

Table 12. WS6, WS7, WS8 발아율조사결과

처 방	처리방법	발아율(%)		발아세(%)		비고
		16시간 경과	43시간 경과	71시간 경과	111시간 경과	
1.WS6	분의처리	85.3	92.0	92.7	93.3	pH6.8
2.WS7		80.7	93.3	90.7	92.7	
3.WS8		84.7	91.3	92.0	92.7	
4.무처리	-	56.0	94.7	94.0	94.7	

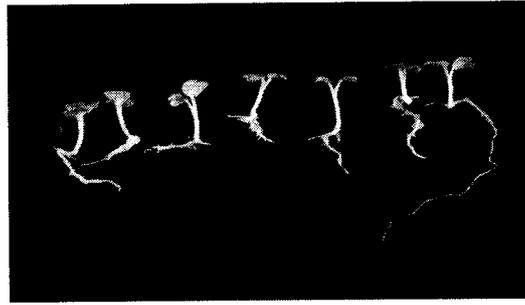


Fig 4.. WS 처리시 뿌리생장모습 (좌측부터 WS3, WS4, WS5, WS6, WS7, WS8, 무처리)

Table 13. pot 파종후 육묘중 일차별 생육조사결과

처리	16 일차		25일차	
	초장(cm)	엽수	초장 (cm)	엽수
1. WS3	9.2	3.3	17.1	7.1
2. WS4	10.3	3.6	17.0	6.9
3. WS5	8.8	3.4	15.6	6.6
4. WS6	8.0	3.3	15.0	6.7
5. WS7	10.5	4.0	16.5	7.1
6. WS8	10.0	3.6	17.1	6.9
7.무처리(나종자)	9.8	3.9	17.2	7.0

다. 미생물 종자 pellet 제형개발

제제시 첨가할 부제를 선별하기 위해 3일차까지 발아 양상을 관찰하여 발아 상태가 가장 양호한 것들을 선별하였다. Celite, Diactive, CMC, 목초액등에선 발아 상태가 매우 불량하였고, CaCO₃, Bentonite, Talc, Microsorb, Attagel50, Pangel, PVP을 처리한 것에서 발아 상태가 양호하여, 이들 부제들을 대상으로 제제를 진행하였으며, EXSP-01, EXSP-02, EXSP-03번 제형에 대해 발아율 시험을 진행한 결과, 무처리에 비해 다소 발아 속도가 늦고, 발아되지 않는 것들이 있어 발아율이 저조하게 나타났다. 발아된 것들에서의 생육 정도는 무처리와 대등하였고, 종자처리 수화제에서 보는 바와 같은 뿌리생육불량 현상은 보이지 않았다(표14)

EXSP-01번과 EXSP-02번에서의 비교를 통해 증량제를 선발하고자 하였으며, 시험결과, EXSP-02번 처방의 발아율 및 발아세가 더 양호하여 이 처방의 증량제를 제제에 이용하기로 하였다.

증량제 선발 후 sticker의 종류를 변경하여 EXSP-04, EXSP-05번을 재처방하고, 발아율을 조사한 결과, EXSP-05번 처방에서 무처리와 대등한 수준의 발아율을 얻을 수 있었다(표15). 또한, 28시간 경과시 EXSP-05 처리구에서 발아율이 90%이상으로 무처리에 비해 우수하여 초기에 발아 촉진 효과가 있는 것으로 판단된다. 따라서 EXSP-05번 처방을 기본으로 하여 펠렛팅 종자 제제에 이용하기로 하였다. 미생물 함량 조사결과, 종자 10립당 유효 미생물은 5.8×10^6 cfu 수준이었으며, 따라서 종자당 미생물 함량은 5.8×10^5 cfu/seed 수준이었다.

Table 14. 증량제 선발위한 펠렛팅 종자 발아율 및 발아세 조사결과

처리	발아율(%) ^a		발아세(%) ^b	
	17시간경과	40시간경과	72시간 경과	92시간 경과
EXSP-01	36.7	73.3	68.3	68.5
EXSP-02	28.3	80	68.3	78.3
EXSP-03	55	80	80	78.3
무처리	61	87	90	94

a:발아율: 종피를 뚫고 유근이 나온 것을 모두 발아된 것으로 보고 전체 종자수에 대한 발아율을 조사함.

b:발아세: 무처리와 같은 정도의 생육 양상(잎의 전개양상, 녹화정도등)을 보이는 것을 정상 개체로 보고 전체 종자수 대비 정상 생육개체를 조사함.

Table 15. sticker 선발을 위한 펠렛팅 종자 발아율 조사결과

처리	발아율(%)		발아세(%)	
	28시간경과	52시간경과	71시간 경과	124시간 경과
EXSP-04	77.8	80	86.3	85.3
EXSP-05	93.2	93.3	93.3	93.3
무처리	70	93.3	93.3	94.4

3. 제형들의 온실 효과시험 및 저장안정성, 이화학적 특성 조사

가. 제형들의 온실 효과시험

A. 경엽처리에 의한 오이잿빛곰팡이병 방제효과 시험

시험결과 병접종 4일 후 EXTN-1(99) powder는 53.3%의 방제효과를 나타내었으며, EXTN-1(99) powder에 synergist를 첨가한 처리는 대조약제인 Dichron과 대등한 수준의 방제효과를 나타내었다. 병 접종 6일 후 EXTN-1(99) powder는 59.6%의 방제효과를 나타내었으며, EXTN-1(99) powder에 synergist를 첨가한 처리는 75.4%로 우수한 방제효과를 나타내었다.

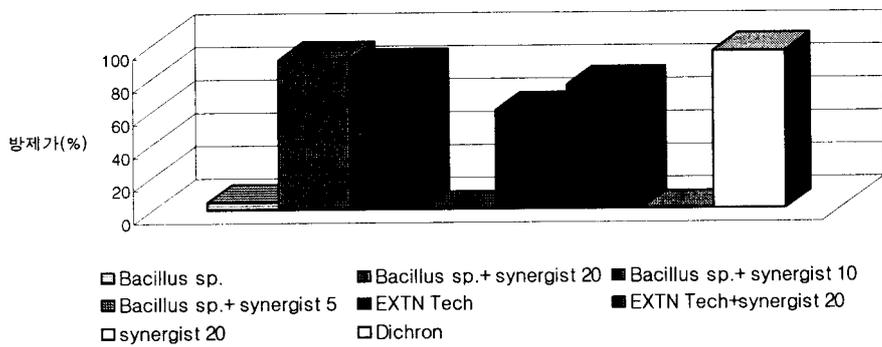


Fig. 5. EXTN-1 powder의 오이잿빛곰팡이병 방제효과 시험(병접종 6일 후)

B. EXTN-1 입제(GR) 제형의 오이 탄저병에 대한 효과 확인

파종시 상토 혼화처리 처리구에서 처리 농도별로 약 40.4% ~ 56.2% 정도의 방제 효과를 보였으며, 10^9 cfu/l 상토 이상의 농도에서 59.6%의 방제 효과를 보였다. 1차 가식시 파구 처리에서는 파종시 상토 혼화처리보다 낮은 방제 효과를 보였다(표16). 육묘 초기 처리하는 방법이 유도저항성 균의 근권 정착에 보다 효과적일 것으로 판단된다.

Table 16. EXTN-1 GR 제형의 오이 탄저병에 대한 시험결과

처리	처리방법	처리밀도 (cfu/ℓ 상토)	병반면적율(%)	방제가(%)
EXTN-1 GR	파종시 상토혼화	10 ⁸	6.5	40.4
		10 ⁹	4.4	59.6
		10 ¹⁰	4.8	56.2
	1차가식시 파구처리	10 ⁸	11	0
			10 ⁹	9.6
프로피네브 수화제	경엽처리	500배	2.1	92.1
무처리	-	-	10.9	-

C. EXTN-1 종자처리 수화제(WS)의 오이 탄저병에 대한 효과 확인

EXTN-1 WS 처방 I의 경우 28.2% 방제 효과를 보였으며 EXTN-1 WS 처방 II(potentiator가 첨가된 제형)에서는 약 66.3%의 방제 효과를 나타내었다. 이는 제제시 첨가된 potentiator가 EXTN-1의 약효 증대에 영향을 나타낸 것으로 판단된다. 이와 같이 상승 효과를 가져올 수 있는 보조제의 탐색 및 첨가는 향후 미생물 약제의 제제시 이용할 만한 가치가 있을 것으로 판단된다.

Table 17. EXTN-1 종자처리 수화제의 오이 탄저병에 대한 효과

처리	처리밀도 (cfu/g종자)	주당병반수	방제가 (%)	비고
EXTN-1 WS I	3.0×10 ⁷	24.5	28.2	-
EXTN-1 WS II		11.5	66.3	potentiator첨가
프로피네브 수화제	500배	0.3	99.1	
무처리	-	34.1		

D. 배추 뿌리혹병에 대한 효과시험

대조 약제 처리구를 제외한 다른 모든 처리구에서 배추 뿌리혹병에 대한 방제 효과는 인정되지 않았다. 병원균의 밀도가 높았고, 종자처리, 상토, 입제를 파종시 처리하고, 효과 판정까지 40여일 이상의 시간이 소요되었으며, 이로 인해 방제 효과가 저조하게 나타난 것으로 판단된다. 실제 포장 조건에서 재배시에 배추 뿌리혹병이 문제가 되는 포장의 경우 병원균의 밀도가 105/g토양으로 높은 경우가 많고, 정식후 40여일경까지 병원균의 침입으로부터 배추를 보호할 수 있어야 작물의 상품성이 존재하는 점을 고려해볼 때, 유도저항성균을 종자처리 또는 생육초기에 처리하여 배추 뿌리혹병을 방제한다는 것은 현실적으로 실용성이 낮은 것으로 판단된다.

Table 18. 배추 뿌리혹병에 대한 시험결과

처리내용	처리농도	발병도(%)
종자처리수화제	1×10 ⁹ cfu/seed	61.3
종자처리수화제+potentiator	1×10 ⁹ cfu/seed	70.7
상토	2.8×10 ⁷ cfu/g soil	76
종자처리수화제+관주처리	1×10 ⁹ cfu/seed +10 ⁷ cfu/ml	56
상토+관주처리	2.8×10 ⁷ cfu/g soil+10 ⁷ cfu/ml	66.7
입제	8×10 ⁷ cfu/pot	60.7
후루설파마이드 분제	20kg/10a	9.3
무처리	-	65

E. 고추 바이러스병 방제효과시험

바이러스 접종 10일후 각 처리구의 이병주를 조사하여 방제 효과를 측정 한 결과, 종자처리 수화제의 처리구가 43%의 방제 효과를 보이는 것으로 나타났다(표6). 작물에 유도 저항성을 일으키는 물질로 알려져 있는 ASA 1000배 희석액 관주처리구의 경우 75%의 우수한 방제효과를 보였고, 입제와 상토 제형의 경우 종자처리 수화제에 못 미치는 방제가를 나타내었다. 생육면을 달관으로 조사한 결과, 상토 처리구가 타 처리구에 비해 생육이 우수한 것을 관찰할 수 있었다.

입제 제형으로 처리 시기를 달리하여 오이 탄저병에 대해 실시한 앞선 시험에서 파종시 처리한 처리구가 이식시 처리구에 비해 방제 효과가 높았고, 이번 시험에서도 종자처리 수화제 처리구에 비해 입제나 상토 처리구가 방제효과가 낮게 나타났는데, 이 또한 입제, 상토 제형의 처리 시기가 이식시여서 EXTN-1 균이 정착할 상대적인 시간 여유가 부족했기 때문으로 생각된다. 처리 시기가 파종시로 동일하다면, 각 제형의 처리구에서 대등한 수준의 방제 효과가 예상된다. EXTN-1을 육묘 초기에 처리하여 근권에 충분히 정착되도록 하는 것이 효과를 발휘하는 최적의 수단이 될 수 있을 것이다. 생육적인 측면과 균의 정착도 면에서 고려해볼때, 미생물 상토 제형의 개발이 실용성이 높을 것으로 판단된다.

Table 19. 고추 TMV에 대한 방제효과

처리내용	처리농도	이병주율(%)	방제가(%)
EXTN-1 입제	1.4×10 ⁹ cfu/L soil	37.5	25.0
EXTN-1 종자처리수화제	5.0×10 ⁹ cfu/seed	28.1	43.8
EXTN-1 상토	1.0×10 ⁷ cfu/g soil	40.6	18.8
AminoSalicylic acid	1000×	12.5	75.0
무처리		50.0	-

F. 상토제형의 잘록병에 대한 효과시험

Rhizoctonia 잘록병에 대한 상토와 액상제형의 효과는 표17과 같다. 무처리 이병주율 33%일때 상토 처리구 60.1% 방제효과를 보였으며, 액상제형의 경우 처리 농도가 높아지면 방제 효과가 높아졌고, 오이에 생육 억제가 관찰되었다. 상토와 액상수화제 제형 모두 개발 가능성을 충분히 가지고 있는 것으로 보이며, 액상수화제의 경우 처방개선이나, 처리농도 조절 등을 통해 생육 억제 경감 방안을 탐색해야 할 것으로 판단된다.

Table 20. 상토제형의 잘록병에 대한 효과

처 리	처리농도	이병주율 (%)	방제가 (%)
EXTN-1 상토	2.8×10 ⁷ cfu/g soil	13.3	60.1
가지란 수화제	1000배	10	70
무처리	-	33.3	-

G. 근권정착력조사

WS와 미생물상토 처리구의 근권 부위의 밀도는 초기 처리한 수준과 비슷하게 유지되는 것으로 보여지며, 토양g당 WS의 경우 $10^5 \sim 10^6$ cfu 수준, 미생물 상토의 경우 10^8 수준으로 존재하는 것으로 나타났다(표21).

또한 EXTN-1의 뿌리 내부 정착도를 보고자 뿌리 외부를 살균, 조직을 마쇄하여 뿌리 내부에 존재하는 리팜피신 저항성 균체의 수를 조사한 결과, 초기 처리 밀도의 약 1/1000 수준으로 뿌리 내부에 존재하는 것으로 조사되어졌다(표21).

상토 제형에서 EXTN-1의 정착이 더 잘 이루어지며, 처리 후 약 40여일 간 일정 수준의 EXTN-1 밀도가 근권 부위에서 유지되는 것으로 생각된다.

Table 21. 근권(A)과 뿌리 내부(B)에서의 EXTN-1의 밀도변화

A.

처리제형	초기 처리 밀도	파종후 일차별 미생물 밀도변화		
		20일차	30일차	40일차
EXTN WS	3.3×10^0 (cfu/seed)	3.7×10^0 (cfu/g soil)	1.2×10^0 (cfu/g soil)	6.4×10^0 (cfu/g soil)
EXTN 상토	4.6×10^8 (cfu/g soil)	3.5×10^8 (cfu/g soil)	8.6×10^8 (cfu/g soil)	6.3×10^8 (cfu/g soil)

B.

처리제형	초기 처리 밀도	파종후 일차별 미생물 밀도변화		
		20일차	30일차	40일차
EXTN WS	3.3×10^0 (cfu/seed)	8.7×10^3 (cfu/g root)	7.8×10^3 (cfu/g root)	1.0×10^3 (cfu/g root)
EXTN 상토	4.6×10^8 (cfu/g soil)	1.2×10^4 (cfu/g root)	4.5×10^3 (cfu/g root)	1.8×10^3 (cfu/g root)

나. 제형들의 저장안정성 조사

입제는 1년이 경과된 후 각각의 보관 온도 조건에서 초기 밀도와 비슷한 수준으로 밀도 유지가 됨을 알 수 있었다. 종자처리 수화제의 경우 또한, 1년 경과 후 40℃에서 밀도가 다소 감소하였으나, 대체로 각 보관온도에서 초기와 비슷한 밀도가 유지되었다.

상토 제형의 경우 4℃에서는 1년 후에도 초기와 비슷한 밀도를 유지하였으나, 30℃와 40℃의 온도 조건에서는 4개월 경과 후 감소하기 시작하여 1년이 경과된 후 약 1/10정도 감소하는 경향을 보였으나, EXTN-1이 효과를 발휘하는 적절한 밀도 수준이 10⁶ cfu 수준 이상임을 고려해볼 때 문제가 될 만한 수준의 밀도 감소가 아니었다. 전체적으로 각 제형들의 상온 저장안정성은 우수한 것으로 사료된다. (Table 22)

Table 22. 제형들의 저장안정성 조사 결과

제형	초기함량 (cfu/g)	저장온도 (℃)	함량(cfu/g)			
			2m	4m	8m	12m
입제	6.9×10 ^y	4	7.7×10 ^y	6.3×10 ^y	5.7×10 ^y	9.0×10 ^y
		30	7.6×10 ^y	7.1×10 ^y	5.7×10 ^y	9.0×10 ^y
		40	7.0×10 ^y	6.8×10 ^y	6.6×10 ^y	7.1×10 ^y
상토	2.8×10 ^f	4	2.1×10 ^f	2.0×10 ^f	2.0×10 ^f	1.7×10 ^f
		30	1.2×10 ^f	9.2×10 ^b	3.4×10 ^b	1.4×10 ^b
		40	4.2×10 ^b	1.7×10 ^b	1.7×10 ^b	1.0×10 ^b
종자처리 수화제	1.24×10 ¹⁰	4	1.2×10 ¹⁰	9.2×10 ^y	1.3×10 ¹⁰	1.4×10 ¹⁰
		30	1.3×10 ¹⁰	9.8×10 ^y	9.6×10 ^y	1.1×10 ¹⁰
		40	1.2×10 ¹⁰	7.2×10 ^y	9.9×10 ^y	4.8×10 ^y

m: month

다. 입제, 종자처리수화제, 상토 제형의 이화학적 특성

입제, 종자처리수화제의 경우 제제 후 1년의 기간이 지난 후의 제제품의 물리화학적 성질은 제제 직후와 비교하였을 때 유의한 차이를 보이지 않았다.

미생물 상토 제형에 대한 제제 직후의 시료와 상온(30℃) 보관기간이 1년 경과한 시료에 대해 pH, EC, 가비중(용적밀도)를 측정 한 결과는 표11과 같았다. 제제 직후와 1년 경과후의 제제품의 이화학적 성질은 큰 변화가 없었다(Table 23).

Table 23. 제형들의 이화학적 특성

A. 입제 제형의 이화학적 성질

	제제직후	30℃ 1년 보관품	4℃ 1년 보관품
수중붕괴성	2초	6초	10초
수중확산성	A2	A2	A2
수소이온농도 (pH)	7.21	6.82	6.90

B. 종자처리수화제의 이화학적 성질

	제제직후	30℃ 1년 보관품	4℃ 1년 보관품
현수성(%)	70%	70%	70%
수화성(초)	60초	50초	60초
평균입경 (μm)	8.2	4.6	8.3
수소이온농도 (pH)	5.41	5.34	5.39

C. 상토제형의 이화학적 성질

	제제직후	상온저장시료
pH(1:5)	5.9	5.6
EC(1:5)	0.65	0.59
용적밀도(g/ml)	0.23	0.23

4. 각 제형의 공정

가. 종자처리제의 공정

종자처리 수화제의 제제 과정은 EXTN-1 원제와 계면활성제, binder, free flow agent,

증량제 등의 부제를 혼합한 후 분쇄기로 분쇄하고, 포장하는 단계를 거치게 된다.

EXTN-1 종자처리 수화제의 제제공정도는 Fig. 6과 같다.

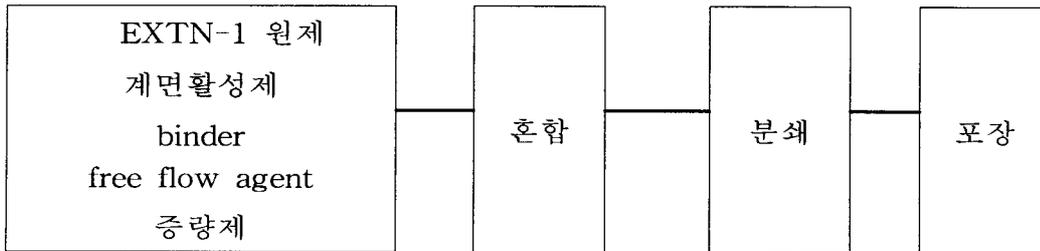


Fig. 6. 종자처리수화제 제제 공정도

나. 토양처리 입제 공정

입제의 제제 과정은 EXTN-1 원제 분말을 분상의 부제와 혼합기에서 혼합한 후 액상의 계면활성제와 물을 첨가하여 반죽하는 과정을 거친다. 반죽한 slurry를 압출식 조립기를 이용하여 조립하며 이때 스크린은 0.7mm를 사용하고, 조립 후 유동층 건조기를 이용하여 건조하며 건조온도는 최고 온도 60℃ 이하로 조절한다. 건조 후 얻어진 입자는 16~35 mesh로 정선하고, 포장하는 단계를 거치게 된다.

EXTN-1 입제의 제제 공정도는 Fig 7과 같다.

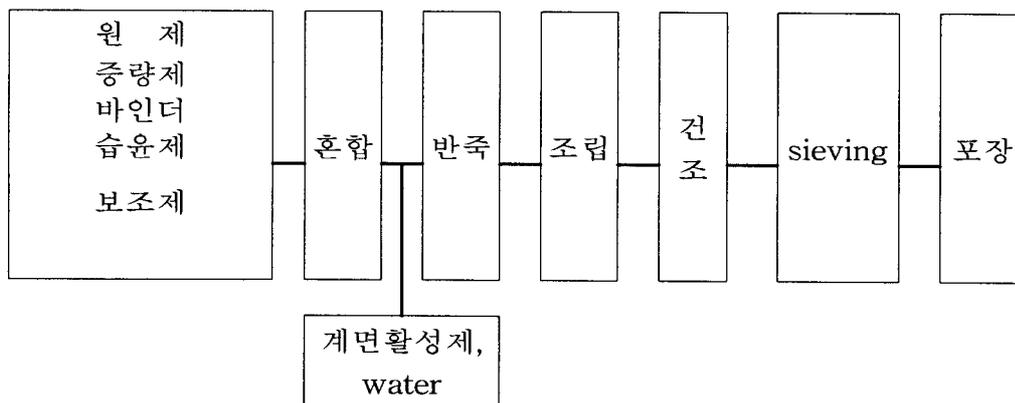


Fig. 7. 입제 제제 공정도

다. 미생물 상토 제형의 공정

압축되어 있는 코코피트(Cocopeat)를 파쇄하고, 파쇄한 코코피트에 펄라이트(Perlite), 질석(Vermiculite), 지올라이트(Zeolite)를 일정 비율대로 투입하여 균일하게 혼합한다. 여기에 비료 성분중 비수용성 성분(용성인비(분말) 등)과 EXTN을 일정량 투입하여 다시 잘 혼합한다. 또한, 비료성분 중 수용성 성분(질산가리 등)은 일정량의 물에 녹여 액비 형태로 제조하여 위의 모재들과 균일하게 잘 섞어 최종 제조품을 제조한다. 제조품의 pH는 5.5~6.5, 수분함량은 40~45%가 되도록 한다.

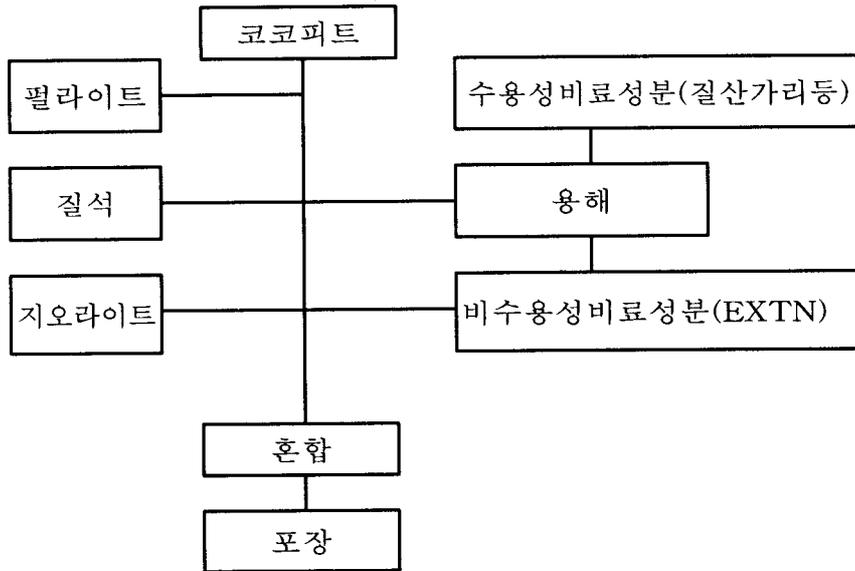


Fig. 8. 미생물 상토 제제공정

제 4 절 결과 요약

결론적으로 최종산물 3.8×10^{11} 포자/g tech, 2.5% 수율을 보이는 생산조건 확립하였고, EXTN-1이 함유된 입제, 종자처리수화제, 상토 제형을 제제하여 각 제형들의 저장안정성, 제형별 식물병해에 대한 효과, 제제 공정등에 관한 연구를 진행하였다.

저장안정성 시험결과, 12개월 동안 입제, 종자처리 수화제에서의 균밀도는 초기와 비교하여 큰 변동없이 안정적으로 유지되었고, 상토 제형의 경우 초기와 비교하여 1/10 수준의 감소가 있었으나, 제품 외적인 방법으로 보완이 가능한 것으로 판단되었다. 각 제형의 식물병해에 대한 방제효과를 검정하기 위해 오이 탄저병, 배추 뿌리혹병, 고추바이러스병에 대한 효과를

검정했으며, 근권에서의 EXTN-1의 정착능력을 조사하여 작물체의 근권부에 정착가능한 것을 확인하였다. 입제, 종자처리수화제, 상토 제제에 대한 공정을 확립했으며, 12개월 상온 보관한 시료의 물리화학적 성질을 조사한 결과, 제제직후와 비교하여 보았을 때, 유사한 물리화학적 성질이 유지되어 안정적인 제형임을 확인하였다. 본 과제를 통하여 연구된 제형 및 작물생육과 식물 병해에 대한 EXTN-1의 효과를 바탕으로 추후 당사 자체적인 포장 및 농가실증시험을 진행할 예정이며, 미생물 상토 제형과 입제, 액상제형을 중심으로 하여 개발가능성을 고려하여 산업화 할 예정이다.

참고문헌

1. Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B. 1995. *Basic Plant Pathology Methods*, 2nd Ed. CRC Press London. 434pp
2. Mukherjee, P.K., Mukhopadhyay, A.N., Sarmah U.K. and Sreshtha S.M. 1995. Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*- its relevance to understanding the mechanism of biocontrol. *J. Phytopathol.* 143:273-279.
3. Weller, D.M. 1998. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
4. H.D. Burges, 1998, Formulation of microbial biopesticides.
5. S.John, Pirt, 1975, Principles of Microbes & Cell cultivation.
6. 진흥기, 공재열, 1999, 미생물공학.
7. Rajesh Singh, B.K. Singh, R.S. Upadhyay, Bharat Rai and Youn Su Lee. 2002. Biological Control of Fusarium wilt Disease of pigeonpea. *Plant Pathol. J.* 18(5): 279-283.
8. Pajand Nejad and Johnson P.A., 2000., Endophytic Bacteria Induce Growth Promotion and Wilt Disease Suppression in oilseed rape and tomato. *Biological control* 18:208-215.
9. Harris A.R. and P. G. Adkins., 1999, Versatility of fungal and bacterial isolates for biological control of damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Biological control* 15: 10-18.
10. Jack A.L and Robert P. L., 1998, Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Biological control* 12: 182-190.

