

최 종
연구보고서

작물생장촉진과 병 방제를 위한 종자 및 근권처리 미생물제의 실용화 연구

Development of Microbial Agent to Enhance the Plant Growth and
Disease Control by Seed Treatment and Rhizosphere Treatment

연 구 기 관

경 상 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “작물생장촉진과 병 방제를 위한 종자 및 근권처리 미생물제의
실용화 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 15 일

주관연구기관명 : 경 상 대 학 교
총괄연구책임자 : 박 창 석
협동연구기관명 : 서 울 대 학 교
협동연구책임자 : 황 인 규
협동연구기관명 : 세미니스코리아
협동연구책임자 : 화 종 국
연 구 원 : 신 순 선
연 구 원 : 최 욱 희
연 구 원 : 이 선 미
연 구 원 : 박 신 효
연 구 원 : 김 진 우
연 구 원 : 김 정 건
연 구 원 : 정 연 화
연 구 원 : 최 세 정
연 구 원 : 김 홍 모

요 약 문

I 제목

작물생장촉진과 병 방제를 위한 종자 및 근권처리 미생물제의
실용화 연구

II 연구개발의 목적 및 필요성

종자 생산과 보급은 작물을 재배하는 농업의 기본이며 가장 기술 집약적 농업이고 또한 가장 부가가치가 높은 농업이다. 생산된 종자의 부가가치를 높이는 기술의 개발은 국가나 회사마다 철저히 가려져 있으며 유용 미생물의 개발에 관한 것도 비슷한 실정이다. 미생물 처리에 의한 작물의 성장촉진과 병 방제는 비료, 농약의 과다 사용으로 인한 각종 부작용을 없애고, 생태계 보호와 환경농업을 실천하는 중요한 기술이다. 또한 이식재배를 기본으로 하는 채소농사에서는 소위 공정육묘, Plug묘 등, 묘 생산이 중요한 사업으로 자리잡고 있다. 미생물에 의한 성장촉진은 전체적인 성장일수를 단축시킬 수 있으며, 묘 소질을 향상시킴으로 생산비 절감과 품질향상에 크게 기여 할 수 있는 중요한 기술이다. 궁극적으로 작물의 성장촉진은 수량증대로 이어지는데, 수량증대는 생산비 절감이라는 의미에서 생산농가에 직접적인 혜택을 주는 것이다. 고추의 역병이나 토마토 시들음병, 무·배추 사마귀 병처럼 결정적인 토양병은 이러한 작물을 재배하는 농민의 입장에서 보면 어떠한 노력이나 비용을 들여서라도 방제해야만 한다. 현재 이들 병을 방제하기 위하여 투입되는 노력과 비용을 통계적으로 종합할 수는 없지만, 적어도 작물생산비의 10%정도를 차지하고 있다고 추측된다. 이 연구과제는 토양병의 방제 방법을 개선하기 위하여 근권처리 미생물을 개발하려는 것에 목표를 두었다. 채소작물에 발생하는 여러 가지 토양병 중에서도 이미 전염원의 농도가 축적되어

전국 어느 곳에서도 해마다 많이 발생하는 고추역병과 최근 들어 문제가 되어 있는 토마토 세균성 시들음병 등은 우선적으로 해결해야 할 과제이다.

종자처리와 근권처리에 의한 토양병의 생물적 방제는 생물적 방제 연구 중에서 가장 먼저 발전시킨 분야이다. 토양병은 지상부에 발생하는 병과는 달리 지금까지 개발된 어떠한 농약으로도 방제가 어렵고 연작에 의해서 누적적으로 증가되기 때문에 고정된 시설에서 같은 작물을 계속 재배해야 하는 시설채소에서는 생산기반을 흔드는 결정적인 피해를 가져온다. 토양병을 방제할 목적으로 길항 미생물의 토양처리에 의한 생물적 방제가 다양하게 시도되었지만 현재까지 확실하게 실용화 된 것은 국내외적으로 많지 않다. 이에 대한 원인으로 길항 미생물을 병원균의 침입부위에 효과적으로 정착시키지 못한 것, 미생물이 병원균의 침입을 억제할 만큼 충분한 밀도를 유지하지 못하는 것 그리고 미생물이 갖고 있는 능력을 충분히 발휘하지 못하는 것 등이 지적되고 있다. 현재까지 종자전염 성병은 거의 모두 살균제에 의한 종자소독에 의존하고 있으며 대부분 1950년대에 개발된 thiram, captan 등의 보호 살균제를 종자에 분의하는 방법을 택하고 있는데, 농약으로 인하여 발생하는 여러 가지 부작용뿐만 아니라, 종자 내부에 있는 병원균은 제거하지 못하며 또한, 종자 살균제는 작물이 병원균에 대하여 가장 취약한 시기인 발아 직후부터 초기 유포기간에 효과적으로 작물을 보호하지 못하고 세균에 대해서는 종자 표면에 있는 것도 없애지 못한다. 일부 침투성 종자 살균제가 있으나 이들은 벼, 보리의 특정한 몇 가지 병을 방제하기 위하여 개발된 것으로 채소종자에는 해당되지 않는다. 또 종자가 발아하여 유근과 자엽 등을 공격해 오는 병원균들에 대해서는 기존의 종자 살균제로서는 효과적으로 방제 할 수 없다. 따라서 종자표면과 내부에 침투하는 미생물 및 진균, 세균 모두에 길항력을 나타내는 것이라면 종자병의 생물적 방제가 가능할 것이며, 더 나아가 발아 후 유근과 자엽으로 이동 정착 할 수 있는 다양한 능력을 나타내는 미생물 처리제의 개발이 필요하다.

최근 우후죽순처럼 전국 각처에서 번창하고 있는 유기 농업이나 무농약 재배법은 대부분 과학적인 근거 없이 경험에 의하거나 보편 타당한 논리를 제시하지 못하는 비법을 내세우고 있다. 이러한 논법은 많은 사람들에게 널리 보급될 수 없을 뿐만 아니라, 지속적으로 그 효과를 나타낼 수 없다. 유기농법이나 무농

약 재배의 약점은 무엇보다도 생산량이 다소 떨어지더라도 감수해야 한다는 것이다. 우리나라의 농산물 수급사정을 감안할 때 받아드리기 어려운 약점이라 아니할 수 없다. 본 연구는 과학적인 근거를 토대로 생물학적으로 병을 방제하는 무공해 농법일 뿐만 아니라, 현재의 수준보다도 수량을 증대시킬 수 있는 농사법을 개발하려는 것이다. 이러한 연구는 농업도 일종의 공해 유발산업이 될 수 있다는 우려와 농산물의 안전성에 대하여 의구심을 갖고 있는 국민들 불안감을 해소하는데 크게 기여할 수 있는 과제라고 생각한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 공정육묘 또는 Plug를 생산하여 노지 또는 시설하우스에 이식재배하는 작물의 생장을 촉진하고 이러한 작물에 발생하는 토양병을 효과적으로 방제하기 위한 미생물제를 개발하려는 연구이다. 이를 위하여 종자의 발아단계에서 육묘를 육성하는 기간에 처리하는 종자처리용 미생물제와 본포에 이식하여 생산물을 얻기까지의 생육 기간에 작물의 생장을 촉진하고 주요 토양병을 방제할 수 있는 근권처리 미생물제로 구분하여 연구를 수행하였다.

1. 종자의 발아촉진과 종자전염성 병 억제 미생물제 개발

채소작물로서 우리나라에서 가장 많이 재배하면서 발아기간이 비교적 긴 고추를 비롯하여 토마토, 싹갓, 당근, 양파, 수박 등의 종자발아를 촉진하는 미생물을 선발하고자 하였으며 선발한 미생물의 종자발아 촉진효과를 최대로 향상시킬 수 있는 Biopriming 방법을 개발하고자 하였으며 Biopriming 처리한 종자와 Chemical priming 또는 SMP처리를 비교 검토하였다. 또한 Biopriming 처리한 종자의 저장기간에 따른 발아촉진 효과를 조사하였고 장기간 저장할 수 있는 처리 미생물의 조건을 조사하였다.

미생물 종자처리에 의한 종자전염성 병원균의 억제효과를 조사하기 위하여 농가에서 채종한 오염된 고추, 양파 종자를 이용하여 실험하였다. 또한 인위적으로 토양병원균을 접종한 토양에 미생물을 처리한 고추, 양파 종자를 심어서 육묘기에 발생하는

토양병을 미생물 종자처리로 억제할 수 있는가를 조사하였다.

2. 미생물처리에 의한 고추역병의 방제

Plug묘로 육성된 고추묘의 근권에 처리하여 고추역병을 방제하기 위한 길항균을 선발하는 과정에 *Serratia plymuthica* A21-4를 선발하였다. 본 연구의 1, 2차년도에서는 A21-4의 세균학적 특성과 근권 정착능력, 역병균 억제 기능 등을 평가하여 *Phytophthora capsici*를 효과적으로 억제할 수 있는 길항균임을 입증하였다. 또한 길항균과 병원균의 상호관계를 규명하기 위하여 근권토양과 고추뿌리에서 A21-4와 *P. capsici*의 밀도변화를 추적 조사하였다.

고추역병을 효율적으로 억제할 수 있는 조건을 규명하기 위하여 온실실험을 통하여 병원균의 농도와 길항균의 최적화 농도를 규명하였고 양액재배조건에서 역병 방제 효과를 조사하기 위하여 Rock wool Block을 이용하여 병 방제효과를 실험하였다. 농가포장에서 역병방제효과를 알아보기 위하여 노지재배와 시설하우스를 구분하여 포장을 선정하였으며 해마다 역병이 심하게 발생하는 충북 영풍의 농가포장과 경기도 화성 천안 등의 농가포장을 이용하였고 시설하우스는 주로 진주시 근교의 대규모 고추 하우스에서 실험하였으며 병 발생은 자연발병상태에서 방제효과를 평가하였다. Plug 육묘시 A21-4균주의 처리는 고추의 성장촉진효과를 나타내었는데 고추뿐만 아니라 주요 채소작물인 오이, 토마토, 배추 등에서도 성장촉진효과를 검정하였다. 특히 비료가 공급되지 않는 무비상토를 이용해서 A21-4에 의한 성장촉진 효과를 검정하였다. 또한 농가 포장에서 이식한 묘에 근권처리한 A21-4의 성장촉진 효과를 조사하였다.

3. 미생물제 처리에 의한 토마토 풋마름병 방제효과

본 연구과정에 선발한 길항균 *Pseudomonas fluorescens* B16균주의 특성을 규명하고 B16이 생산하는 항균성 물질에 의한 가지과 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*)의 억제효과를 조사하였다. 양액재배에서 발생하는 방울토마토와 파프리카의 풋마름병 방제를 위하여 Rock wool Block을 이용한 양액재배 조건에서 B16의 처리효과를 시험하였다. 토마토풋마름병 방제실험은 모두 온실조건에서 실험하였으며 토마토를 이식하기 전 유평기와 이식후 수확기까지의 본포재배기로 나누어 인위적으로 병원균

을 접종한 조건에서 실험하였다.

4. 식물생장촉진 및 토양병 방제 미생물 제제의 기능향상을 위한 연구

본 연구에서는 생장촉진 인자 및 항균력 인자 규명을 위한 *P. fluorescens* B16의 변이체를 선발하고 항균성물질 생합성과 관련된 유전자 및 식물생장촉진 관련 유전자를 분석한다. 선발된 변이체 분석은 변이가 일어난 곳을 cloning한 다음 mapping등을 통하여 분석하며 genomic library로 부터 colony hybridization 방법으로 wild type clone을 얻는다. 얻어진 clone들의 분자 생물학적인 특성 조사를 한다. B16균의 항세균력 물질 생성이 토양 환경에 따라 어떻게 조절되는가를 조사하고 해당하는 유전자를 탐색한다. 유전자조작을 통하여 토양 환경에 따라 조절되는 항생물질 생성이 항상 분비되는 균을 육성한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1절 연구개발 결과

1. 종자의 발아촉진과 종자전염성 병 억제 미생물제 개발

가. 종자의 발아를 촉진하는 미생물 선발

남부지방의 사과, 양파 집단재배지에서 수집한 총 660개의 균주를 대상으로 오이, 벼, 고추종자에 처리하였을 때 이들 종자의 발아율 촉진한다고 판단되는 균주 11개를 선발하였다. 이들은 *Pseudomonas*속 속하는 균주는 A7-10외에 4균주, *Bacillus*속은 B2-13과 B4-11, *Paenibacillus*속 H210, 그리고 속명이 밝혀지지 않은 균주가 3균주였다. 이들의 처리효과는 작물에 따라 다르게 나타났는데 벼에 대해서는 H210과 A7-10이 우수하였고 고추는 B2-13, H210, 토마토는 B2-13과 B16이 다른 균주에 비하여 현저하게 높은 효과를 나타냈다.

이중 *Bacillus* sp. B2-13은 고추, 토마토 뿐 만 아니라 시금치, 썩갓, 수박, 당근 등 거의 모든 채소종자의 발아를 촉진시켰으며 발아 후 초기 생장을 촉진시켰다. 특히 초기 발아율을 현저하게 향상시킴으로 균일한 발아와 발아시간을 단축하는 효과가 있었다.

나. 선발미생물에 의한 Biopriming 효과

종자 Priming 처리는 일반적으로 수분압이 조절된 용액에 일정시간 종자를 침지시켜 종자가 발아할 수 있는 모든 조건을 갖추게 하는 기술로서 무기염이나 PEG같은 고분자 물질을 사용한다. 이 연구에서는 이러한 화학물질 대신에 선발한 미생물의 부유액에 종자를 처리하여 일정시간 배양한 다음 건조하는 처리를 고안하였으며 이 처리를 Biopriming이라 하였다. 선발한 세균 B2-13의 농도를 10^9 cell/ml로 조절하여 처리할 종자를 1시간 정도 침지하였다가 습기 보존되는 용기에서 28°C의 온도로 24시간에서 48시간 까지 배양하였다가 음건하여 보관하였을 때 종자의 발아촉진효과가 가장 좋았다. 이때 배양온도가 낮으면 배양시간이 길어졌고 온도가 높으면 배양시간은 단축되지만 발아촉진효과도 낮았으며 균일한 발아를 기대할 수 없었다. 한편 배양시간은 작물에 따라 달랐는데 고추의 경우 46시간에서 50시간 정도가 적당하였다. Biopriming 처리 효과는 Chemical priming과 비교하였을 때 현저히 발아가 촉진되었고 균일한 발아를 가져왔다. B2-13의 Biopriming 처리는 공시한 작물 고추, 썩갓, 토마토, 당근, 수박, 양파, 파, 시금치에서 모두 PEG8000으로 처리한 priming보다 우수하였다.

B2-13의 Biopriming 처리는 최근 채소종자의 발아촉진을 위하여 폭넓게 활용되고 있는 Solid Matrix Priming(SMP)처리 보다도 현저히 발아속도를 촉진시켰으며 균일한 발아를 가져오는 것으로 나타났다. 또한 SMP처리시 공급하는 물 대신에 B2-13세균부유액을 사용하였을 때 현저하게 발아속도가 빨라지고 발아율이 향상됨을 알 수 있었다.

다. B2-13의 세포형태와 종자발아 촉진

B2-13의 종자발아촉진과 관련된 기작을 알아보기 위하여 생리적으로 활성을 나타내는 세포형태인 증식형세포(Vegetative cell)와 휴지형세포(Dormant cell; Endospore)를 구분하여 세균부유액을 만들어서 비교하였던 결과 초기 발아율을 촉진하는데는 증식형세포를 처리한 것이 휴지형세포를 처리한 것에 비하여 현저하게 발아

율이 높았으나 후기로 갈수록 이러한 차이는 없어졌다. 한편 B2-13의 살아있는 세포와 120℃로 살균한 세균부유액을 각각 사용하여 종자 Priming처리를 하였을 때 Live cell을 처리한 종자가 현저히 빨리 발아하기 시작하였으나 후기에는 이러한 효과가 줄어들었다. 특기할만한 것은 죽은 세포의 세균부유액을 처리한 구에서도 무처리에 비하여 현저하게 발아율이 향상되고 발아속도가 빨라졌다는 것이다.

라. 저장기간에 따른 Biopriming처리한 종자의 발아촉진효과

이 연구를 통하여 개발한 Biopriming종자를 6개월까지 저장하면서 종자의 발아율과 발아속도에 미치는 영향을 비교하였다. 고추종자의 경우 Biopriming한 종자와 PEG8000으로 priming한 종자는 6개월까지 발아율이 거의 변하지 않았으나 SMP처리는 다소 감소되는 경향을 나타내어 발아속도를 나타내는 T50의 경우 Biopriming처리는 6개월까지 거의 변화하지 않은 반면에 PEG8000처리나 SMP처리는 T50이 1일 정도 늘어났다. 특기할만한 것은 SMP처리에 B2-13을 첨가한 경우 SMP 단독 처리한 종자는 실온에서 4개월 저장한 후에 발아촉진 효과가 현저하게 저하된데 비하여 4개월 후 초기의 효과가 다소 감소하기는 하였지만 여전히 무처리에 비하여 월등한 효과를 나타내었다. B2-13을 이용한 Biopriming처리는 종자의 발아력을 향상시킬 뿐 아니라 실온에서 6개월 정도 저장하여도 그 효과가 감퇴되지 않는 것으로 나타났다.

마. 미생물처리에 의한 종자전염성 병원 억제

본 연구를 통하여 선발한 미생물중에서 식물병원균에 대하여 강한 길항력을 나타낸 균주는 *Paenibacillus polymyxa* E681과 H210, *Serratia plymuthica* A21-4등이다. *Bacillus* sp. B2-13은 식물병원균의 생장을 억제하는 능력은 낮았지만 종자의 발아를 촉진하는 효과가 뛰어나 시험에 공시하였다. 반면에 E681과 A21-4는 병원균의 생장 억제 능력은 뛰어나지만 종자의 발아촉진 능력이 낮아서 시험에서 제외하였다. 본 실험에서 주로 사용했던 채소종자들은 세미니스(주) 종묘에서 정선과정을 거친 것이므로 종자전염성 병원균을 거의 검출할 수 없었다. 종자전염성병에 대한 시험은 농가에서 자가채종한 고추와 양파를 사용하였다. 오염된 고추종자를 H210과 B2-13세균 부유액에 2시간 침지하여 한천배지상에서 병원균의 출현율을 조사한 결과 H210은 무처리 61.7%에 비하여 4.8%로서 92%의 방제효율을 나타내었다. 길항력이 낮았던 B2-13

도 25.6%로 58%의 방제가를 나타내었다. 이에 비하여 양파종자의 경우는 미생물에 침지한 종자에서 현저하게 병원균의 출현율이 낮아지는 결과를 나타내었다. 무처리종자가 81.2%에 비하여 B2-13은 12.1%, H210은 전혀 검출이 되지 않았다.

바. 미생물 종자처리에 의한 토양병 방제효과

인위적으로 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium ultimum*을 접종한 토양에서 미생물을 처리한 고추와 양파종자를 심어서 발병억제효과와 건전묘의 출현율을 비교하였다. 고추의 경우 H210처리는 병원균을 접종하지 않은 토양에 고추를 심었을 때 보다도 건전묘의 출현율이 더 높았고 출현속도도 빨랐다. B2-13은 건전토양에 심은 것에 비하여 건전묘 출현율이 현저히 낮았고 출현속도도 느렸다. 그러나 병원균이 접종된 토양에 심겨진 무처리 고추에 비해서는 월등히 높았다.

양파의 경우에는 *Pythium*과 *Rhizoctonia*를 접종한 토양 모두에서 H210과 B2-13으로 Biopriming처리한 종자가 출현속도나 건전묘 출현율이 현저히 높았다. 단순히 이들 세균용액에 침지하였다가 심은 양파종자도 무처리 종자에 비해서는 훨씬 높은 출현율을 나타내었지만 Biopriming처리에 비하면 절반에도 미치지 못하였다. 이는 Biopriming으로 종자의 발아세를 향상시킴으로서 병원균의 침입을 회피하는 효과도 포함된 것으로 추정된다.

2. 미생물처리에 의한 고추역병의 방제

가. 길항미생물의 분리 및 그 특성

고추재배에 가장 큰 피해를 주는 고추역병균에 길항능력이 있는 근권정착미생물을 선별하기 위하여 경남지방의 파와 양파 주요재배단지인 함양과 부산 명지에서 뿌리를 채취하여 미생물을 분리하였다. 분리된 총 531균주 중 A21-4라는 균주를 양파 근권에서 분리하였는데 A21-4균주는 고추역병균인 *Phytophthora capsici*에 강한 길항능력을 나타냈고 또 고추와 다른 여러 가지 작물의 근권에 잘 정착하였다. A21-4균주는 한정된 범위의 길항능력을 나타냈는데 주요 토양전염성병원균 중에서 Chromista에 속하는 *Pythium*과 *Phytophthora* 속 균에만 강한 길항능력을 나타내었을 뿐

Fusarium이나 Rhizoctonia속 균에는 길항력을 나타내지 못하였다.

A21-4균주는 생화학적 및 세포학적 특성 및 16s rRNA sequence 분석을 통하여 *Serratia plymuthica* 로 동정하였다.

나. A21-4균주의 변이체 선발

Serratia plymuthica A21-4균주의 항균능력에 대한 기작을 규명하기 위하여 *Tn* mutagenesis 방법으로 Omegon-Km이 삽입된 3000여개의 변이체를 얻었고 그중 길항능력을 상실한 변이체 SSM1을 선발하였다. 길항능력을 상실한 변이체 SSM1은 고추 역병에 대한 억제능력이 모균주인 A21-4에 비하여 많이 감소되었지만 근권정착능력은 모균주와 별 차이가 없었다.

다. *In vitro*에서 A21-4의 *P. capsici* 에 대한 억제능력

Serratia plymuthica A21-4균주는 *in vitro*에서 *P. capsici*의 군사생장을 억제하였고 zoospore와 zoosporangia의 형성을 억제하였으며 zoosporangia와 cystospore의 발아를 현저하게 억제하였다.

라. A21-4균주와 *P. capsici*의 근권토양과 뿌리에서의 밀도변화

Serratia plymuthica A21-4균주를 고추유묘 뿌리에 침지처리하였을 경우 근권토양과 뿌리에서 길항균 밀도가 고추 이식 후 14일까지 10^6 cfu/ml 이상으로 유지되었다. 특히 A21-4균주를 근권처리한 고추묘를 병원균 *P. capsici*가 접종된 토양에 이식하였을 경우 뿌리에서 길항균밀도가 일정 기간 뒤에 병원균이 없는 토양에 비하여 오히려 증가하는 경향을 나타내었다. A21-4균주를 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml 농도로 고추 근권에 처리하였을 경우 초기에는 뿌리에 정착밀도가 별로 큰 차이를 나타내지 않았지만 시간이 경과함에 따라 10^8 cfu/ml이나 10^7 cfu/ml으로 처리하였을 경우 밀도가 떨어지는 경향을 보였다. 하지만 처리 횟수를 증가하였을 경우 낮은 농도로 처리하였을 때도 일정한 정착밀도를 유지할 수 있을 것으로 기대된다.

고추묘를 길항균에 침지처리하여 병원균 접종된 토양에 이식하였을 때 근권토양과 뿌리에서의 병원균 *P. capsici*의 밀도변화를 조사한 결과 A21-4균주를 고추근권에

처리하였을 경우 근권토양에서 병원균 밀도가 현저하게 줄어들었고 뿌리에서는 이러한 현상이 더욱 두드러지게 나타났다. 그러나 길항력을 상실한 변이체 SSM1처리와 무처리에서는 근권토양에서 병원균의 밀도가 증가하였고 뿌리에서도 병원균의 침입을 억제하지 못하였다.

마. A21-4균주에 의한 고추역병 억제효과

A21-4균주의 병 방제효과를 알아보기 위하여 고추묘를 길항균 현탁액(10^9 cfu/ml)에 침지처리하여 Pot에 옮겨 심고 *P. capsici*의 zoospore현탁액(10^4 sopre/ml)을 접종하였을 경우 무처리와 길항력을 상실한 변이체 SSM1에서는 7일째부터 발병하기 시작하여 14일째에는 각각 83.7%와 66.7%의 발병율을 보인 반면에 A21-4처리에서는 발병하지 않았다. 그리고 A21-4균주를 접종한 고추묘를 고추 역병균이 접종된 비닐하우스에 이식하였을 경우 무처리에서는 74.5%의 발병율을 보였고 A21-4처리에서는 12.6%의 발병율을 보여 75%의 방제효과를 나타내었다. Rock wool 양액재배에서도 A21-4균주 처리에서는 고추 역병의 발생을 현저하게 억제하였다.

바. 농가포장에서의 고추역병 억제효과

실내 Pot실험과 학교비닐하우스 실험의 기초상에서 실제 농가 포장 실증실험을 진행하였다. 2001년과 2002년 2년에 걸쳐 충북, 경기와 경남 등 지역의 13농가에 실험을 진행하였다. 하지만 기대와는 달리 실제 포장 검정실험이 매우 어려웠다. 병 발생이 환경의 변화에 따라 많이 변하기 때문에 장마로 인하여 병이 많이 발생하거나 아예 병이 발생하지 않아 병방제 효과를 검정하는데 많은 어려움이 있었다.

그중 대곡면 한들영농조합 이문기씨 고추 하우스에서는 늦게나마 병이 심하게 발생한 지역의 고추묘를 뽑아내고 그곳에 A21-4균주를 침지처리한 유묘를 이식하고 이식 7일뒤에 A21-4균주 현탁액을 한번 관주처리하였다. 관리는 일반 재배관리와 동일하게 하면서 역병 발생여부를 관찰하였다. 결과 이식 50일 뒤까지도 발병기주를 뽑아내고 바로 이식하였는데도 불구하고 고추가 병 발생 없이 아주 건전하게 자라고 있음을 확인하였다.

2002년 9월에 대곡면 한들영농조합 이성기씨 고추 하우스에서 근 2000주의 고추 유묘에 이식전 근권침지처리하고 이식 7일뒤에 한번 관주처리하였다. 처리 뒤에 발병

올과 생육을 조사를 하였다. 결과 이식 30일 뒤에 화학농약 가디안 처리구에서는 5% 정도가 발병하여 고사하고 A21-4처리구에서는 발병하지 않았고 50일뒤에는 화학농약 가디안 처리에서 13.7%정도 발병하였고 A21-4처리에서는 2.3%의 발병율을 보였다. 고추 생육 역시 A21-4균주를 처리한 고추묘가 이식 후 토양 활착이 좋았고 엽록소 함량도 높았다. 본 포장은 아직까지 그 결과를 지켜봐야 할 것이다.

사. A21-4균주의 성장촉진 효과

A21-4균주의 성장촉진 효과를 검정하기 위하여 주요 채소작물인 오이, 고추, 토마토, 배추를 육묘용 plug에 파종하여 발아한 후 A21-4균주를 처리하였다. 처리7일째 부터 공시된 배추, 오이, 토마토, 고추 모두에서 A21-4처리구에서 무처리에 비하여 잎 색이 짙어지고 생장이 약 120% 촉진되는 것을 확인하였다.

A21-4균주를 여러가지 농도로 처리하였을 경우 성장촉진효과를 검정하기 위하여 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml농도로 고추와 토마토 유묘에 처리하였다. 처리 후 30일 뒤에 생육을 조사하였는데 10^9 cfu/ml농도로 접종하였을 경우 고추와 토마토에서 무처리에 비하여 생장이 각각 146.8%, 119.1% 촉진되었고 10^8 cfu/ml농도에서는 약간의 성장촉진효과를 나타냈고 그보다 낮은 농도에서는 성장촉진효과가 뚜렷하게 나타나지 못하였다. 일반 육묘장에서 보면 양액처리를 적어도 1주일에 한번씩 한다. 그렇다면 A21-4균주도 한번처리로 끝낼 것이 아니라 몇번 처리를 한다면 낮은 농도에서도 성장촉진효과가 나타날 수 있을 것으로 기대한다.

A21-4균주를 고추 육묘시 어느 시기에 처리를 하면 제일 효과적일지를 알아보기 위하여 고추 파종하여 발아한 후 7일 간격으로 A21-4를 처리를 하고 파종 40일째에 그 생육을 조사하였는데 고추가 발아하여 본엽이 나오기 전 혹은 본엽이 나오기 시작할 때 즉 발아하여 7일에서 14일 사이 처리가 유묘 성장촉진에 제일 효과적이었다.

서로 다른 상토에서의 A21-4균주의 성장촉진효과를 알아보기 위하여 육묘장에서 많이 사용되는 상토들인 무비토실이(신안그로), 유비토실이(신안그로), 바이오상토(홍농) 그리고 초록나라상토(보경농산)를 공시하였고 작물은 고추와 토마토를 공시하여 실험을 하였다. 고추와 토마토에서 모두 상토들간에는 다소 차이는 있었지만 모든 상토에서 모두 A21-4처리가 무처리에 비하여 생장이 뚜렷하게 촉진되었고 양액처리 보다도 현저하게 성장촉진 된 것을 확인하였다.

3. 미생물처리에 의한 토마토 풋마름병의 방제

P. fluorescens B16균주는 토마토 풋마름병원균인 *R. solanacearum*를 비롯하여 다른 여러 세균에 대해 길항능력을 가지고 있다. 그리고 식물체에 근권정착능력이 있고 식물의 생장을 촉진시킨다. B16은 영양분이 많은 배지에서는 항균작용이 없었고 영양분이 적은 최소 배지 (minimal media)에 강한 항균작용을 보여 주었다. 이것은 최소배지 조건과 유사한 근권에서 B16이 잘 자랄 수 있고 항균작용을 나타낼 것이라는 것을 말해 주어 B16균주를 양액재배 시스템에 활용시키기 위하여 rock wool 재배 시스템에 적용 실험을 하였다.

가. Rock wool 재배시스템에서의 길항균과 병원균의 밀도변화

B16균주를 종자침지처리하여 키운 토마토와 유묘에 B16균주를 근권침지 처리하여 이식한 후 7일 뒤에 *R. solanacearum* (10^6 cell/ml)를 100ml씩 접종하고 토마토 뿌리와 rock wool에서의 B16과 *R. solanacearum*의 밀도를 조사하였는데 B16균주를 종자처리하였을 경우 토마토 뿌리에서는 처리 후 75일 까지 밀도가 10^5 - 10^6 cfu/g으로 유지되었으나 암면에서는 45일 이후 밀도가 급격히 감소하여 60일 이후에는 B16을 분리할 수가 없었다. 그러나 유묘 근권 처리하였을 때는 뿌리와 암면 모두 처리 후 60일까지 10^7 cfu/g으로 밀도가 유지되다가 그 이후 약간 감소하는 경향을 보였다. 또한 유묘 근권처리가 종자처리보다 근권정착밀도가 10배 높은 밀도로 정착하고 있어 종자처리 방법보다는 유묘 근권처리 방법이 B16 근권 정착하는 데 더 효과적이었다.

B16균주를 근권침지 처리한 후 *R. solanacearum*을 접종하였을 경우와 접종하지 않았을 경우의 토마토 뿌리와 rock wool에서의 밀도를 비교하였는데 *R. solanacearum*을 접종하였을 경우 토마토 뿌리에서 B16 밀도는 5×10^6 cfu/g으로 *R. solanacearum*를 접종하지 않았을 때 (6×10^5 cfu/g)보다 10배 높은 밀도로 정착하고 있었다.

B16을 처리하였을 경우 B16이 분비하는 길항물질에 의해 *R. solanacearum*의 생장이 억제되어 *R. solanacearum*의 밀도는 뿌리에서 3×10^6 cfu/g에서 1×10^4 cfu/g으로 감소하였고, rock wool에서도 1×10^5 cfu/g에서 1×10^3 cfu/g으로 감소하였다.

B16균주를 처리한 후 주변 미생물상을 조사하여 보았는데 B16균주를 처리하였을 경우 주변 세균은 다소 증가되는 경향을 나타냈고 곰팡이는 큰 변화를 주지 않았다.

나. B16균주의 처리 방법에 따른 병 억제효과

B16균주의 처리 방법을 다르게 하였을 경우 병 억제효과를 알아보기 위하여 종자처리, 근권침지, rock wool에 관주처리하는 방법을 공시하여 실험을 진행하였는데 종자처리방법은 발병율이 55%로 *R. solonacearum*을 효과적으로 방제할 수 없었고 근권침지처리 방법은 발병율이 34%로 나타났고, 이식용 rock wool에 관주하는 방법은 발병율이 17%로 가장 효과적으로 병을 방제할 수 있었다. 발병 조사후 처리별로 *R. solonacearum*의 밀도를 조사한 결과 병이 발생한 종자처리와 근권침지처리에는 병원균처리와 비슷한 10^6 cfu/g의 밀도를 나타내는데 비해 관주처리는 10^2 cfu/g으로 아주 낮은 밀도로 정착하고 있음을 확인하였다.

다. B16균주와 그 변이체의 토마토 시들음병에 대한 억제효과

Tn5로 얻은 B16의 변이체 중 항균작용이 강해진 K2-31과 항균작용이 없어진 K1-36을 선발하여 모균주인 B16균주와 함께 실험에 공시하여 토마토 시들음병에 대한 억제효과를 비교하였는데 결과 무처리에선 거의 75%이상 발병한데 비해 B16과 항균작용이 강해진 변이체 K2-31처리에선 10%와 8%밖에 발병하지 않았고 항균작용이 약해진 변이체 K1-36에선 57%정도의 높은 발병율을 나타냈다.

라. 토마토 풋마름병 방제의 온실 및 포장 검정

B16균주를 온실에서 토마토 풋마름병 억제 효과를 검정하기 위하여 B16균주의 현탁액을 토마토 유묘(2-3엽기)에 침지처리한 후 Pot에 이식하고 7일 뒤에 *R. solonacearum*을 접종한 후 풋마름증상을 관찰하였는데 B16을 처리한 토마토의 경우 무처리에 비해 시들음병이 4-10일 늦게 발병하기 시작하였고 병 진전도 늦었다.

B16균주를 포장에서 토마토 풋마름병 방제효과를 검정하기 위하여 B16균주의 현탁액을 정식 하기 전의 토마토(본엽6-8엽기)에 약 30분간 침지 처리한 후 포장에 이식하고 이식 7일 뒤 풋마름병원균인 *R. solonacearum*을 접종하고 병원균 처리 후 7일 뒤 다시 B16균주 현탁액을 관주처리하고 3일 간격으로 풋마름증상을 조사하였는데 온실에서의 결과와 마찬가지로 B16을 처리한 토마토가 무처리에 비해 시들음병이 10일 늦게 발병하기 시작하였고 병 진전도 늦었다.

4. 식물생장촉진 및 토양병 방제 미생물 제제의 기능향상을 위한 연구

1. Transposon을 이용하여 *P. fluorescens* B16의 mutant pool을 만들었다. 이 mutant pool에서 가지과 작물에 시들음병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*에 항균 작용이 없어진 변이체 9개 (K1-36, K1-15, K14, K18, K22, K4, K5, K6, K7)와 항균 작용이 더 강해진 3개 (K2-31, K2, K3)의 변이체를 선발하였다.

2. *Agrobacterium*과 *Ralstonia*에서는 강한 항균활성 B16과 항균활성이 강해진 변이체 K2-31, 항균활성이 없어진 K1-15를 대상으로 몇 가지 식물 병원세균과 근권 세균에 대한 항균 spectrum을 확인하였다. *Erwinia carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. coli*, *Paenibacillus polymyxa*, *P. aeruginosa*, *P. s. phaseolicola*등에는 항균활성을 나타내지 않았고 *A. tumefaciens*, *R. solanacearum*, *P. fluorescens*, *P. putida*등에는 강한 항균활성을 나타내었다.

3. 변이체의 변이가 일어난 부위의 유전자를 cloning하여 염기서열을 분석하였다. K1-15는 *P. syringae*의 cysteine synthase B (90% identity, 94% positives), K4 와 K7는 *Aeropyrum pernix*의 cystathionine gamma lyase (36% identity, 54% positives), K5, K6, K18은 *Thermotoga maritima*의 pyruvate formate-lyase activating enzyme (39% identity, 60% positives), K14은 unknown protein, K2-31은 *P. aeruginosa*의 nitrate/nitrite regulatory protein (36% identity, 59% positive)과 각각 유사성을 보였다.

4. *P. fluorescens* B16의 cosmid genomic library를 만들었다.

5. 항균작용이 없어진 변이체 K5의 변이가 일어난 부위의 DNA 절편을 probe로 해서 B16 genomic library로부터 wild type clone인 pB03, pJWB1 그리고 K1-15의 변이가 일어난 부위의 DNA 절편을 probe로 해서 pB05의 wild type clone을 colony blotting을 통해서 찾았다.

6. pB03, pJWB1, pB05의 cosmid clone을 항균작용이 없어진 변이체와 항균작용이 강해진 변이체에 transformation하여 항균작용의 변화를 확인하였다. pB03와 pJWB1은 항균작용이 없어진 변이체 K1-36, K14, K18, K22, K4, K5, K6, K7의 항균작용을 회복시켰고 변이체 K1-15는 pB05에 의해 항균작용이 회복되었다. 항균작용이 강해진 변이체들의 항균작용은 3가지 cosmid clone에 의해 wild type 수준으로 줄어들지는 않았다.

7. *R. solanacearum*에 항균작용이 없는 *P. fluorescens* 1855.344에 pB03, pJWB1, pB05의 cosmid clone을 transformation하여 항균작용의 변화를 확인하였는데 pJWB1

을 가진 *P. fluorescens* 1855.344에서 항균작용이 확인되었다. 이로써 항균작용의 생합성 유전자는 pJWB1에 모두 배열되어 있다는 것을 확인하였다.

8. Cosmid clone pJWB1로 *Tn3-gus* mutagenesis를 실시하여 plasmid random mutagenesis를 유도한 다음 marker exchange를 통해 *Tn3-gus*가 삽입된 변이체를 만들었고 각 변이체의 항균작용을 검정한 결과 4.3 kb 크기의 *NarI-SaII* DNA절편에 항균성물질 생합성과 관련된 유전자 있는 것을 확인하였다. pJWB1으로 subclone을 만들었고 항균작용이 없는 *P. fluorescens* 1855.344에 transformation하여 이를 증명하였다.

9. 항균성물질 생합성 유전자를 포함하여 주변의 유전자 정보를 염기서열 분석하였다. 분석 결과 항균성물질 생합성에 관여하는 유전자는 4개로 구성되어 있고 이를 각각 ORF1, ORF2, ORF3, ORF4로 명명하였다. *orf1*과 *orf2*는 4개의 염기가 서로 overlap 되어 있고 *orf2*, *orf3*, *orf4*는 각각의 ribosomal binding site를 갖고 있었다. ORF1은 Cystathionine gamma lyase, ORF2는 pyruvate formate-lyase activating enzyme, ORF4는 transcriptional regulator와 각각 36%, 39%, 36%의 similarity를 보였고 ORF3은 unknown protein으로 확인되었다. 각 ORF들의 추측되는 질량은 각각 381, 494, 239, 143 kDa 인 것을 확인하였다.

10. 각 ORF에 *Tn3-gus*가 삽입된 변이체로 β -glucuronidase activity를 측정할 결과 log phase의 생장을 지나서 발현되는 것을 확인하였고 ORF3이 다른 ORF에 비교해서 강하게 발현되는 것을 확인하였다.

11. 항균력이 없어진 변이체의 근권정착력을 조사하였는데 wild type인 B16과 비교해서 큰 차이가 없었고 항균력이 근권정착능력에는 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다.

12. 고추를 이용한 시들음병 방제에서 disease control과 항균성물질을 생성하지 못하는 변이체를 처리한 처리구에서는 85% 이상의 이병주가 발생하였고 B16을 처리한 처리구에서는 병발생이 관찰되지 않았다.

13. 3,000개의 변이체를 보리종자에 처리하여 대규모 screening 방법을 시도하였지만 여러 가지 환경요인에 의해 분석하기가 어려웠다. 특히 2000년도의 봄기온이 이상 기온현상으로 예년에 비해 2-3도 높아 전체적인 보리생육이 왕성하였다.

14. 식물생장촉진 변이체를 선발하기 위해 screen 방법을 자체적으로 개발하였다. Rockwool을 이용한 방법으로 seeding tube에 파종하고 4-5엽기의 식물체 seedling을 각 변이체로 근권처리한 다음 rockwool slab으로 옮겨서 30일간 온실에서 키우는 방

법으로 3,000개 변이체를 screen하였다.

15. 식물생장촉진 효과가 없어진 변이체 2개 (708과 818)를 5번에 걸친 반복실험으로 찾았다. 30일 간의 토마토 생육에서 변이체는 무처리와 비슷하여 토마토생장촉진 효과를 확인 할 수 없었다.

5. 종자 및 근권처리 미생물제의 실용화를 위한 포장평가 및 제형개발 연구

작물재배에 있어서 아무리 우수한 품질의 종자가 공급되더라도 성공적인 농사를 위해서는 무엇보다도 병해충에 대한 방제가 이루어지지 않으면 고품질의 수확물을 수확할 수 없을 것이다. 고품질의 수확이 곧 재배농가의 소득과 직결되기 때문에 사전에 병 발생 억제를 위하여 종자회사는 물론 관련 연구기관에서 많은 시간과 경비 등을 지출하면서 부단한 노력을 하고 있는 실정이다. 이러한 차원에서 수행된 본 연구과제의 시험 수행 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 미생물제의 종자처리가 작물의 병 방제에 목적이 있지만 종자처리로서 종자의 활력을 증진시키고 유묘의 생장에 상당한 효과가 있었다.

2. 작물별 종자처리에 효과가 있는 미생물제로 고추는 A7-10, B2-13, 수박 및 토마토에는 B2-13, 양파는 미생물제 A7-10을 침지처리 하는 것이 가장 효과가 있었다.

3. 미생물제 처리종자의 처리 효과는 보관조건에 따라 달랐지만 15℃에서 처리 후 6개월까지 유지되었다.

4. 미생물제를 고추묘의 근권에 처리하여 본포에 정식할 경우 노지에서는 초기묘의 생장이 촉진되어 발병 속도의 지연에 효과가 있었고, 인위적으로 환경을 조절할 수 있는 하우스 등의 조건에서는 역병균의 발병 방제에 효과가 있었다.

5. 미생물제의 종자처리 방법의 실용화를 위한 시험에서는 종자를 미생물에 침지처리 하는 방법이 가장 효과적이었으며, 근권처리 방법으로는 플러그 묘를 본포에 정식하기 전에 묘의 근권에 관주 도는 침지 처리하는 것이 가장 효과적이었다.

6. 이상의 시험 결과들을 관련산업에서 실용화시키기 위해서는 미생물의 대량생산과 이를 위한 시설 등의 설치문제가 해결되어야 하겠지만 종자의 품질향상과 작물 병 방제를 위한 하나의 방법이 될 것으로 믿는다.

제 2절 활용에 대한 건의

오늘날 우리나라에서 재배하는 채소작물들은 묘를 이식하는 것이 많고 대부분 개별 농가에서 묘를 육성하는 것이 아니고 공정육묘 과정을 통하여 대규모로 육묘하고 있다. 이로 인하여 기계과종이 일반화되어 있으므로 균일하고 빠른 발아를 보이는 종자가 경쟁력을 갖게 되는 것은 당연하다. 본 연구를 통하여 개발된 미생물과 Biopriming 기술은 종전의 화학물질을 이용한 종자 Priming이나 Solid Matrix Priming(SMP) 보다 처리기술이 간단하고 시간이 짧게 걸린다는 유리한 점이 있으므로 손쉽게 산업화에 도입될 것이다. *Bacillus sp.* B2-13 균주는 발아기간이 비교적 길고 균일하게 발아가 되지 않는 고추나 토마토 같은 종자의 발아력을 향상시키는데 활용할 수 있을 것이다. 특히 고추는 현재 plug 묘 생산에서 가장 많은 비중을 차지하는 작물임으로 미생물 종자처리로 인한 부가가치의 향상은 크다고 말할 수 있다. *Paenibacillus polymyxa* H210 은 종자의 발아력을 향상시킬 뿐만 아니라 광범위한 식물 병원균에 대하여 길항력을 나타내므로 종자전염성 병을 막을 수 있고 또 근권에 정착하는 능력이 있으므로 유포기에 발생하는 토양병에 대해서도 효과를 나타낸다. H210은 공정육묘를 통해서 묘를 생산하는 작물보다는 양파나 파 같이 농가에서 생산하여 이식재배하는 작물에 사용하였을 때 발아력도 향상시키고 초기에 발생하는 토양병도 막을 수 있다.

Serratia plymuthica A21-4는 고추에 역병을 일으키는 *Phytophthora capsici*의 유주자 형성과 포자의 발아 균사의 성장을 강하게 억제함으로써 포장상태에서 고추역병을 효과적으로 방제한다. 만일 A21-4를 액상 유지하는 제형을 개발하면 상당히 오래 동안 보존할 수 있으며 간단하게 희석하여 사용할 수 있다는 장점이 있다. 모든 고추는 묘를 본포에 이식하는 방법으로 재배하기 때문에 이식할 때 묘를 세균부유액에 침지하는 처리로서 간단하게 역병을 방제할 수 있으므로 쉽게 산업화할 수 있다고 판단된다. 또 액상의 제형은 이식 후 고추의 뿌리에 관주하는 형태로도 사용할 수 있다. 또한 A21-4는 유포기의 고추, 토마토, 오이, 가지 등의 성장을 현저하게 향상시키는 것으로 나타났는데 이러한 특성을 이용하여 공정육묘과정에서도 이 제형을 활용하거나 육묘용 상토를 생산하는 회사와 A21-4의 산업화를 계획 중이다.

Pseudomonas fluorescens B16 은 토마토, 오이, 고추 등의 성장을 촉진시키고 세

균에 대한 길항력을 나타내는데 특히 가지과에 풋마름병을 일으키는 *Ralstonia solnacearum* 에 대하여 강한 길항력을 나타낸다. B16은 토양재배 보다는 Rock Wool 을 배지로 하여 무기상태의 영양물질을 공급하여 재배하는 양액시스템에서 재배하는 토마토나 파프리카, 고추에 발생하는 청고병 방제에 매우 유용하다. B16도 A21-4와 마찬가지로 대량생산은 쉬우나 건조상태로 보존하는 것이 어려우므로 액상의 제형을 개발하고자 한다.

본 연구과정을 통하여 A21-4의 항생물질 생산과 관련한 유전자를 추적하기 위하여 항생물질을 생산하지 못하는 돌연변이체를 얻었으며 이 항생물질 생산과 관련된 유전자 clone을 가지고 있다. 또한 A21-4는 강력한 Chitinolytic Enzyme을 생산하며, 작물생장촉진 능력을 가지고 있다. 이러한 소재들은 앞으로 국책사업 또는 국가기관에서 공모하는 연구과제에 응모하여 이러한 유전자의 특성을 밝혀내고 생산하는 물질을 동정하고 농업에 활용할 수 있는 기초이론을 개발하는데 활용할 것이다. 특히 A21-4의 작물생장촉진은 병 저항성 유도와 관련되는 것으로 추정됨으로 병 저항성에 관련된 유도물질을 밝혀내는 연구에 중요한 기초자료로 활용될 것이다.

Pseudomonas fluorescens B16은 항생물질을 생산하는 과정이 독특하고 항생물질 또한 기존의 미생물들이 생산하는 것과는 매우 다른 특이성을 보이고 있다. 본 연구과정을 통해서 B16이 항생물질을 생산하는 것과 관련된 유전자는 Cloning 하였고 염기서열을 밝혀 냈으며 다른 세균을 이용하여 이 유전자가 발현되는 것을 확인하였다. 이 유전자를 기존의 다른 유용한 미생물에 형질전환 시키는 방법들을 개발하여 유용한 미생물 균주를 만들어 낼 수 있을 것이며 풋마름병에 저항성인 형질전환 토마토를 만드는데 활용할 수도 있을 것이다. 또 B16이 생산하는 항균성 물질의 특성을 규명하고 이 물질의 구조를 동정하는 연구는 매우 가치가 있을 것이라 생각된다. B16의 작물생장 촉진과 관련된 유전자의 연구도 매우 폭넓게 활용될 수 있다. 이러한 유전자를 통하여 세균이 생산하는 물질들이 작물의 생장을 촉진하는 것과 어떻게 연관되어 있는가를 알아낼 수 있는 매우 중요한 열쇠가 될 것이다. 작물생장 촉진과 관련된 유전자는 다른 세균에 형질 전환시켜 새로운 유망 미생물을 개발하거나 작물에 도입하여 척박한 땅이나 아주 적은 량의 비료를 주고도 작물을 재배할 수 있는 형질전환 식물을 만들어 내는데 활용될 수 있을 것이다.

SUMMARY

The research was aimed to develop the biocontrol agents for seed and root treatments and their formulations for practical use in farmer's fields. Through this research project we tried to select promising bacteria isolates enhancing seed germination and seed vigor as well as suppressing harmful microorganisms associated in seeds. The seed treated bacteria was also expect to suppress the soil borne plant pathogens attacking seeds and young roots of vegetable seeds. Another important object of this research is to develop the promising biocontrol agents to control phytophthora blight of pepper and bacterial wilt of tomato by root treatments. We also aimed to enhance the growth of pepper and tomato by root treatment of biocontrol agents. Genetical studies including mutant selection and gene analysis were carried out to enhance the key function of biocontrol agents related to plant growth promotion and disease suppression. The results obtained from in vitro experiments were conformed through the experiments conducted in green houses and farmer's fields. The results obtained through this study was summarized as follow.

Section 1. Researches on the selection of the microorganism for seed treatment and its utilization

1. Selection of microorganism enhancing seed germination

Total 660 bacterial isolates were collected from the onion and welsh onion roots grown in southern parts of korea. From them, 5 isolates belong to *Pseudomonas*, 2isolates belong to *Bacillus* one isolate of *Paenibacillus* and unidentified 3 isolates were selected for seed treatment. Among the selected isolates, *Bacillus* sp. B2-13 enhanced the seed germination of tomato, pepper, spinach, crowdaisy, carrot and water melon greatly and *paenibacillus polymyxa*

H210 enhanced rice seed germination pronouncedly.

2. Effect of chemical priming and microbial treatment on the seed germination

Seed biopriming with B2-13 was more effective to enhance the germination rate and homogeneous emergence of pepper and tomato seed than chemical seed priming with PEG8000. Biopriming with B2-13 and H210 also showed better results in seed germination in terms of germination speed and total rate than Solid Matrix Priming. The addition of bacterial suspension of B2-13 to SMP treatment enhanced the efficiency of SMP.

3. Cellular form of *Bacillus* sp. B2-13 and enhancement of seed germination

The vegetative cells and endospore form of B2-13 were not greatly different in the efficiency of enhancement of seed germination but the live cell suspension and much efficient than dead cell suspension to enhance the germination ability of pepper seeds.

4. Sustainability of the biopriming seeds

The pepper seeds bioprimered with B2-13 sustained its seed priming effect until 6 months in room temperature condition. The sustain ability of bioprimered seeds last longer than chemical priming or SMP treated seeds. The addition of B2-13 to SMP treatment showed to extend the priming effect of SMP.

5. Control of seed borne fungi by microbial seed treatment

Paenibacillus polymyxa H210 and *Serratia plymuthica* A21-4 successively inhibited the microorganisms associated in pepper and onion seeds. However A21-4 showed adverse effect to seed germination. *Bacillus* sp. B2-13 did not

showed strong inhibitory effect to fungal pathogens in nutrient media but B2-13 was successively control the seed borne fungi associated in onion seeds.

6. Control of seedling diseases by microbial seed treatment

The suppression of soil borne diseases by B2-13 and H210 were evaluated in the pot soils that artificially infested with *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* H210 controlled *pythium* and *Rhizoctonia* effectively when the pepper and onion seeds were submerged in bacterial suspension of H210. H210 also enhanced rapid emergence of pepper and onion seeds. while B2-13 was not effective to control the soil borne pathogens like H210. But it enhanced seed germination and rapid emergence of onion and pepper seeds.

Section 2. Control of Phytophthora blight of pepper by microbial treatment

1. Selection of antagonistic organism and its characterization

A promising biocontrol agent, *serratia plymuthica* A21-4 was selected from this investigation. A21-4 showed exceptionally strong inhibitory effect only to the plant pathogens belong to genera *pythium* and *phytophthora*. A21-4 readily colonized root of cucumber, pepper, and tomato. It produce strong chitinolytic enzyme. A21-4 was identified as *S. plymuthica* through physiological, morphological characteristics and full sequencing of 16s rRNA base.

2. Selection of antibiotic negative mutant of A21-4

Cells of A21-4 were mutated using omegon-km Tn mutagenesis to identify the genes related to antibiotics production. Among the 3000 mutants, we selected SSM1 showing no antibiotic activity to *P. capsici*. The mutant SSM1 was not reduced root colonizing ability.

3. Antagonistic activities of A21-4 on the *Phytophthora capsici* in vitro

A21-4 strongly inhibited mycelial growth of *P. capsici* in PDA medium. The bacteria also greatly inhibited zoosporangia formation and zoospore liberation. A21-4 also significantly suppressed the germination of zoosporangia and cystospores of *P. capsici*.

4. Population dynamics of A21-4 and *P. capsici* on the root of pepper and rhizosphere soil

A21-4 successfully inhibited population density of *P. capsici* in artificially infested soil and sustained population density more than 10^6 cfu/g soil until two weeks after bacterial inoculation. The inhibitory effect of A21-4 to *P. capsici* was more effective in roots of pepper plant. The population density of A21-4 retained more than 10^6 cfu/g root when the inoculum concentration of A21-4 was 10^9 cfu/ml until one month later. The mutant SSM1 was not successfully inhibited the population density of *P. capsici* both in soil and roots. This results might be attributed loss of antibiotics production of SSM1.

5. Suppression of phytophthora blight of pepper by A21-4

When A21-4 inoculated by soaking the bacterial suspension to roots of pepper seedlings and transplanting to pathogen infested soil, the phytophthora blight of pepper was completely controlled in pot experiments. Same experiments carried out in rockwool hydroponic system also showed complete control. When the A21-4 inoculated pepper seedling were transplanter to vinyl house soil and artificially infested with zoospore suspension (10^4 spores/ml) of *P. capsici* after one week. The disease incidence of untreated control was 74.5% while A21-4 treated plot was 12.6% when the final examination was made at 3 months after transplanting.

6. Suppression of phytophthora blight of pepper in farmer's fields

Total 13 farmer's field were employed to evaluate the disease control efficiency of A21-4 throughout the investigation. Most of farmer's field were not proper for evaluation of control efficiency of A21-4. Some fields did not showed any disease symptom until end of season while other fields outbreak too much disease incidence. A21-4 showed successive disease control in one large scale vinyl house that had been continuously cultivated pepper plant for many years. The disease incidence chemical fungicide treated plots was 13.7% while A21-4 treated plots was 2.3% at 50 days after transplanting. Untreated disease control plots were not allowed in farmer's field trials.

7. Plant growth enhancement by A21-4

A21-4 root treatment revealed significant enhancement of growth in cucumber, pepper, tomato, chinese cabbage seedlings. A21-4 treated plants contained more chlorophyll than untreated plots or nutritional solution added plots. Growth promoting effect of A21-4 was more pronounce in the soil mix contains no fertilizer. This phenomenon is suggested that A21-4 might helpful to nutrition uptake of plant or support some nutrients needed for plant growth. The most proper time for the application of A21-4 was between the cotyledons of pepper, cucumber, and tomato were fully expanded and just before the primary leaf emerging.

Section 3. Suppression of bacterial wilt of tomato by microbial treatment

1. Population changes of antagonistic and pathogenic bacteria in rockwool hydroponic system

Pseudomonas fluorescens B16 produced antibacterial substance in minimal

medium condition. This antibiotic substance was effective to *Ralstonia solanacearum*, the bacterial wilt pathogen of solanaceous crops. The minimal condition of media is similar to root and rhizosphere condition that grown in rockwool hydroponic system. B16 readily colonized on the roots of tomato plant which grown in rockwool block. When the tomato roots were inoculated with bacterial suspension of B16(10^8 cell/ml), the population density of B16 on the root sustained 10^7 cfu/g root until 60 days after treatment. The bacterial population of B16 on the tomato root rather increased in the plots that challenged with *R. solanacearum*. The population densities of *R. solanacearum* reduced drastically due to coexistence with B16 both in the root and rockwool block.

2. Disease suppression by B16 with different methods of application

Drenching the bacterial suspension of B16(10^8 cell/ml) to rockwool seeding block at transplanting time was most efficient to control the bacterial wilt of tomato in rockwool hydroponic system. The disease incidence of B16 seed treatment was 55%, drenching after transplanting was 34% but drenching seeding block at transplanting time was 17% while untreated control was 100% disease incidence.

3. Disease suppression by B16 and its mutants

The wild type isolate of B16, Mutant R2-31 enhanced antibacterial activity, and mutant K1-36 antibiotic negative were examined their disease control efficiency. The rates of wilted tomato plant in untreated control was more than 75%, K1-36 antibiotics negative mutant treated plot was 57%, the wilt type of B16 was 10% and antibiosis enhanced mutant K2-31 was 8%. The control efficiency was better than chemical control.

4. Evaluation of disease suppression by B16 in the green house and open field

In field experiments, B16 treatment was not sufficient to control the bacterial

wilt of tomato. One time application of B16 at transplanting time retarded the disease out break and suppressed the disease progress but could not protect the plant from the wilt pathogen in the soil or rockwool block. It needed additional application of B16 cell suspension for further protection.

Section 4. Research on the genetic characteristics of microbial agents related to plant growth promotion and soil borne disease control

Pseudomonas fluorescens B16 is a plant growth-promoting rhizobacterium and produces an antibacterial compound sensitive to plant root pathogens, such as *Agrobacterium tumefaciens* and *Ralstonia solanacearum*. We identified a gene cluster consisting of four genes responsible for the antibacterial compound biosynthesis. Whole biosynthetic genes were resided in a 4.3 kb *SalI-NarI* fragment. When the plasmid clone carrying the fragment were introduced in another *P. fluorescens* strain 1855.344 that does not exhibit any antibacterial activity against *A. tumefaciens* and *R. solanacearum*, the transconjugants gained the antibacterial activity. This indicated that the plasmid clone carries all essential genes responsible for the production of antibacterial compound. DNA sequence analysis of the fragment identified four putative open reading frames (ORFs) from ORF1 through ORF4. Deduced amino acid sequences of ORF1, ORF2, and ORF4 had similarities to cystathionine gamma lyase, pyruvate formate-lyase activating enzyme, and transcriptional regulator, respectively. Amino acid sequences of ORF3 showed no obvious similarities to any other known proteins in the database. We also demonstrated that the antibacterial activity is responsible for biological control of bacterial wilt caused by *R. solanacearum*.

CONTENTS

Chapter 1. Synopsis of the Research Project	36
Chapter 2. Present situation of the research and technical development in home and abroad	41
Chapter 3. Scope of the research and obtained results	45
Section 1. Researches on the selection of the microorganism for seed treatment and its utilization	45
1. Selection of microorganism enhancing seed germination	45
a. Introduction	45
b. Materials and Methods	46
c. Results and Discussion	47
① Selection of useful microorganism for seed treatment	47
② Enhancement of rice seed germination and root growth enhancement by microbial seed treatment	48
2. Enhancement of seed germination of vegetable crops by microbial treatment ...	49
a. Introduction	49
b. Materials and Methods	50
c. Results and Discussion	50
① Enhancement of germination rates of various vegetable seeds	50
② Enhancement of seed germination of tomato by microbial treatment ..	52
③ Enhancement of seed germination of pepper by microbial treatment ...	53
3. Effect of chemical priming and microbial treatment on the seed germination ...	54
a. Introduction	54
b. Materials and Methods	55
c. Results and Discussion	55
① Microbial treatment and enhancement of seed germination	55

② Comparison of chemical seed priming and microbial treatment	57
③ Water priming and Biopriming	58
4. Cellular form of <i>Bacillus sp.</i> B2-13 and enhancement of seed germination	60
a. Introduction	60
b. Materials and Methods	60
c. Results and Discussion	60
5. Effects of Biopriming and Solid Matrix Priming on the germination of seed	62
a. Introduction	62
b. Materials and Methods	63
c. Results and Discussion	64
6. Sustainability of the biopriming seeds	65
a. Introduction	65
b. Materials and Methods	66
c. Results and Discussion	66
7. Control of seedling diseases by microbial seed treatment	71
a. Introduction	71
b. Materials and Methods	71
c. Results and Discussion	72
① Suppression of microbes on the seed surface of pepper and onion by microbial seed treatment	72
② Control of soil borne diseases by microbial seed treatment	75
Section 2 Control of Phytophthora blight of pepper by microbial treatment	79
1. Selection of antagonistic organism and its characterization	79
a. Isolation of antagonistic organism and selection	79
b. Antibiotic activity of <i>Serratia plymuthica</i> A21-4	79
c. Root colonizing ability of A21-4	81
d. Physiological characteristics of A21-4	83
2. Selection of antibiotic negative mutant of A21-4	84
3. Antagonistic activities of A21-4 on the <i>Phytophthora capsici in vitro</i>	86

a. Suppression of cystospore of <i>P. capsici</i> by A21-4	87
b. Suppression of the germination of zoosporangia of <i>P. capsici</i>	87
c. Effect of A21-4 and mutant SSM1 on the zoosporangia formation of <i>P. capsici</i> ...	89
4. Population dynamics of A21-4 and <i>P. capsici</i> on the root of pepper and rhizosphere soil	90
a. Population changes of A21-4 and mutant SSM1 in the pepper rhizosphere soil ..	91
b. Population changes of A21-4 and mutant SSM1 in the pepper root	91
c. Suppression of <i>P. capsici</i> by A21-4 and SSM1 in the pepper rhizosphere soil ...	92
d. Suppression of <i>P. capsici</i> by A21-4 and SSM1 in the pepper roots	93
e. Colonization of A21-4 on pepper root with variation of inoculum densities ...	95
5. Suppression of phytophthora blight of pepper by A21-4	95
a. Pot experiment	97
b. Relation between cell density of A21-4 and disease suppression	98
c. Disease suppression by A21-4 in artificially infested vinyl house soil	99
d. Disease suppression by A21-4 in rockwool hydroponic system	99
6. Suppression of phytophthora blight of pepper in farmer's fields	102
7. Plant growth enhancement by A21-4	104
a. Effect of A21-4 on the plant growth enhancement	105
b. Effects of A21-4 cell density on the plant growth enhancement	105
c. Proper time for application of A21-4 to enhance plant growth	107
e. Effect of A21-4 on the plant growth enhancement at different soil mix	109
Section 3. Suppression of bacterial wilt of tomato by microbial treatment ..	111
1. Population changes of antagonistic and pathogenic bacteria in rockwool hydroponic system	112
2. Disease suppression by B16 with different methods of application	115
3. Disease suppression by B16 and its mutants	117
4. Evaluation of disease suppression by B16 in the green house and open field ...	118
Section 4. Research on the genetic characteristics of microbial agents related to plant growth promotion and soil borne disease control ..	120

1. Genetic analysis of <i>P. fluorescens</i> B16 related to biosynthesis of antibiotics ..	120
a. Selection of mutant of <i>P. fluorescens</i> B16 for identification of genes related to plant growth promotion and antibiosis	120
b. Selection of B16 mutant related to production of antibiotics	120
c. Gene analysis of B16 mutant related to biosynthesis of antibiotics	122
d. Spectrum of antibiotics produced by B16	122
e. Construction of genomic library of B16	123
f. Isolation of wild type clone from genomic library of B16	123
g. Complementation of antibiotics production genes using pB03, pJWB1 and pB05 ..	124
h. Antibiotic activity of B16 genes in heterologous host <i>P. fluorescens</i> 1855.344 ..	126
i. Selection of antibiosis negative mutants through Tn3- <i>gus</i> mutagenesis and maker exchange	129
j. DNA base sequencing of antibiotics production gene	129
k. Subcloning of DNA fragments including all of the genes related to antibiotics production	131
l. Measurement of β -Glucuronidase activity	132
m. Root colonizing abilities of antibiotics negative mutants of B16	132
n. Complementation of B16 mutants using subclone of pJWB1	133
o. Experiments on the control of bacterial wilt of pepper by B16 and mutants	133
2. Selection of mutants of <i>P. fluorescens</i> B16 related to plant growth promotion	136
a. Selection of mutant related to plant growth promotion in barley field ..	136
b. Construction of screening system for selection of mutant related to plant growth promotion	137
c. Selection of mutant related to plant growth promotion in tomato	137

Section 5 Researches on the field appraisal and fomulation of microbial agents for seed and root treatments	140
1. Introduction	140
2. Materials and Methods	141
3. Results and Discussion	143

a. Effects of microbial agents on the germination of vegetable seeds	143
b. Effects of microbial agents on the seed germination in the soil and seedling growth vegetable crops	144
c. Sustainability of microbial treated seeds and reproduce ability	145
e. Control of phytophthora blight of pepper by treatment of microorganism to rhizosphere of pepper seedling in field condition	146
f. Control of phytophthora blight of pepper by treatment of microorganism to rhizosphere of pepper seedling in artificially infested field condition	148
g. Formulation of seed treating microorganism and methods for root treatments	148
 Chapter 4. Attainability of the research goal and contributions to related fields	 151
 Chapter 5. Application of research results	 156
 Chapter 6. Scientific and technical informations obtained from abroad during conduction of the research project	 159
 Chapter 7. References	 162

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요	36
제 2장 국내외 기술개발 현황	41
제 3장 연구개발수행내용 및 결과	45
제 1절 종자의 발아촉진과 종자전염성 병 억제 미생물제 개발	45
1. 종자의 발아를 촉진하는 미생물 선발	45
가. 서언	45
나. 재료 및 방법	46
다. 실험결과 및 고찰	47
1) 종자처리용 유용미생물 선발	47
2) 벼 종자발아 촉진과 뿌리생장	48
2. 미생물 처리에 의한 채소종자의 발아율 향상	49
가. 서언	49
나. 실험재료 및 방법	50
다. 결과 및 고찰	50
1) 각종 채소 종자의 발아율	50
2) 미생물 처리에 의한 토마토 종자의 발아율 향상	52
3) 미생물처리에 의한 고추종자의 발아율 향상	53
3. 종자 Priming 처리와 미생물 처리 효과	54
가. 서언	54
나. 실험재료 및 방법	55
다. 결과 및 고찰	55
1) 미생물 처리 방법에 따른 종자의 발아촉진	55
2) 미생물처리와 화학물질을 이용한 priming 처리 효과	57
3) Water priming 과 Biopriming의 비교	58
4. <i>Bacillus</i> sp B2-13의 세포형태와 종자발아촉진	60

가. 서언	60
나. 실험재료 및 방법	60
다. 실험결과 및 고찰	60
5. Biopriming과 Solid Matrix Priming	62
가. 서언	62
나. 재료 및 방법	63
다. 결과 및 고찰	64
6. Biopriming 한 종자의 보존성	65
가. 서언	65
나. 재료 및 방법	66
다. 결과 및 고찰	66
7. 미생물 종자처리에 의한 유묘기 병 방제	71
가. 서언	71
나. 재료 및 방법	71
다. 결과 및 고찰	72
1) 고추와 양파 종자 표면의 미생물 억제	72
2) 미생물 종자처리에 의한 토양병 방제효과	75
제 2절 미생물처리에 의한 고추역병의 방제	79
1. 길항미생물의 분리 및 그 특성	79
가. 길항미생물의 분리 및 선발	79
나. A21-4균주의 길항능력	79
다. A21-4균주의 근권정착능력	81
라. A21-4균주의 생리적 특성	83
2. A21-4균주의 변이체 선발	84
3. <i>In vitro</i> 에서 A21-4의 <i>P. capsici</i> 에 대한 억제능력	86
가. A21-4균주의 <i>P. capsici</i> 의 피낭포자의 발아에 대한 억제 능력	87
나. A21-4균주의 <i>P. capsici</i> 의 유주자낭의 발아에 대한 억제 능력	87
다. A21-4균주와 SSM1의 <i>P. capsici</i> 유주자낭의 형성에 미치는 영향	89
4. A21-4균주와 <i>P. capsici</i> 의 근권토양과 뿌리에서의 밀도변화	90

가. A21-4균주와 SSM1의 고추 근권토양에서의 밀도변화	91
나. A21-4균주와 SSM1의 고추 뿌리에서의 밀도변화	91
다. A21-4균주와 SSM1의 고추 근권토양에서의 <i>P. capsici</i> 에 대한 억제효과	92
라. A21-4균주와 SSM1의 고추 뿌리에서의 <i>P. capsici</i> 에 대한 억제효과	93
마. A21-4균주의 농도에 따른 근권정착 밀도	95
5. A21-4균주에 의한 고추역병 억제효과	95
가. Pot에서의 고추역병 억제효과	97
나. A21-4균주의 농도에 따른 역병억제 효과	98
다. 비닐하우스에서의 고추역병 억제효과	99
라. Rock wool hydroponic 시스템에서의 고추역병 억제효과	99
6. 농가포장에서의 고추역병 억제효과	102
7. A21-4균주의 성장촉진 효과	104
가. A21-4균주의 성장촉진 효과	105
나. A21-4균주의 처리 농도별 성장촉진 효과	105
다. 처리시기별 A21-4균주의 성장촉진 효과	107
라. 서로 다른 상토에서의 A21-4균주의 성장촉진 효과	109
제 3절 미생물처리에 의한 토마토 풋마름병의 방제	111
1. Rock wool 재배시스템에서의 길항균과 병원균의 밀도변화	112
2. B16균주의 처리 방법에 따른 병 억제효과	115
3. B16균주와 그 변이체의 토마토 시들음병에 대한 억제효과	117
4. 토마토 풋마름병 방제의 온실 및 포장 검정	118
제 4절 식물성장촉진 및 토양병 방제 미생물 제제의 기능향상을 위한 연구	120
1. <i>P. fluorescens</i> B16의 항균성물질 생합성 유전자 분석	120
1) 성장촉진 관련 유전자 및 항균력 인자 규명을 위한 <i>P. fluorescens</i> B16의 변이체 선발	120
2) <i>P. fluorescens</i> B16 항균성물질 생산 관련 변이체 선발	120
3) <i>P. fluorescens</i> B16의 항균성물질 생합성 변이체 유전자 분석	122
4) <i>P. fluorescens</i> B16의 항균 spectrum	122
5) <i>P. fluorescens</i> B16의 genomic library 제작	123
6) <i>P. fluorescens</i> B16의 genomic library로부터 wild type clone의 선발	123

7) pB03, pJWB1, pB05를 이용한 항균성물질 생산 변이체에 대한 complementation	124
8) Heterologous host인 <i>P. fluorescens</i> 1855.344에서의 항균작용	126
9) Tn3-gus mutagenesis와 marker-exchange를 통한 항균성물질생산 변이체 선발	129
10) 항균성물질 생합성 유전자 염기서열 분석	129
11) 항균성물질 생합성 유전자를 모두 포함하는 DNA fragment subcloning.	131
12) β -Glucuronidase activity 측정	132
13) <i>P. fluorescens</i> B16과 항균물질 생성 mutant의 근권 정착능력	132
14) pJWB1의 subclone을 이용한 변이체 complementation	133
15) 고추 시들음병에 대한 병 방제 효과 검증	133
2. 작물 성장촉진 변이체 선발	136
가. 보리에서 작물 성장 촉진 관련 변이체 선발	136
나. 작물 성장 촉진 관련 변이체 선발을 위한 시스템	137
다. 작물 성장촉진 관련 변이체 선발	137
제 5절 종자 및 근권처리 미생물제의 실용화를 위한 포장평가 및 제형개발 연구	140
1. 서언	140
2. 재료 및 방법	141
3. 연구결과 및 고찰	143
가. 미생물제의 처리가 종자 발아에 미치는 영향	143
나. 미생물제의 처리가 종자의 토양발아 및 유묘생장에 미치는 영향	144
다. 미생물제 종자처리의 저장성 및 효과의 재현성	145
라. 미생물제의 고추묘 근권처리에 의한 포장 역병 발생 억제 효과	146
마. 병원균 접종에 따른 미생물제 근권처리 고추묘의 병 발생 방제 시험	148
바. 미생물제 종자처리 제형 및 근권처리 방법 개발	148
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	151
제 5장 연구개발결과의 활용계획	156
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	159
제 7장 참고문헌	162

제 1장 연구개발과제의 개요

종자 생산과 보급은 작물을 재배하는 농업의 기본이며 가장 기술 집약적 농업이고 또한 가장 부가가치가 높은 농업이다. 전 세계적으로 재배되는 중요한 작물에 대하여 우수한 유전자원을 가진 종자를 확보하려는 노력은 선진국에서는 이미 금세기 초부터 시작되었고, 생산된 종자의 부가가치를 높이는 기술의 개발은 유전자원의 개발 못지 않게 중요한 분야로 인식되고 있다. 그러나 이러한 기술은 대부분 국가나 회사마다 철저히 가려져 있으며 유용 미생물의 개발에 관한 것도 비슷한 실정이다. 21세기 한국농업의 우수성을 과시하고 농업 생산성을 높이기 위해서는 종자관련 기술과 미생물 자원활용 기술을 국내 연구진에 의해서 성취되는 것이 매우 중요하다.

미생물 처리에 의한 작물의 성장촉진과 병 방제는 비료, 농약의 과다 사용으로 인한 각종 부작용을 없애고, 생태계 보호와 환경농업을 실천하는 중요한 기술이다. 또한 이식재배를 기본으로 하는 채소농사에서는 소위 공정육묘, Plug묘 등 묘 생산이 중요한 사업으로 자리잡고 있다. 미생물에 의한 성장촉진은 전체적인 성장일수를 단축시킬 수 있으며, 묘 소질을 향상시킴으로 생산비 절감과 품질향상에 크게 기여할 수 있는 중요한 기술이다. 궁극적으로 작물의 성장촉진은 수량증대로 이어지는데, 수량증대는 생산비 절감이라는 의미에서 생산농가에 직접적인 혜택을 주는 것이다. 고추의 역병이나 토마토 시들음병, 무·배추 사마귀 병처럼 결정적인 토양병은 이러한 작물을 재배하는 농민의 입장에서 보면 어떠한 노력이나 비용을 들여서라도 방제해야만 한다. 현재 이들 병을 방제하기 위하여 투입되는 노력과 비용을 통계적으로 종합할 수는 없지만, 적어도 작물생산비의 10%정도를 차지하고 있다고 추측된다. 이 연구과제는 토양병의 방제 방법을 개선하기 위하여 근권처리 미생물을 개발하려는 것에 목표를 두었다.

지금까지 각종 식물 병의 방제는 주로 저항성 품종의 육성과 농약사용에 의한 화학적 방제방법에 크게 의존하여 왔다. 그러나 저항성 품종을 육성하여도 증식속도가 빠른 세균이 바로 적응할 수 있는 능력을 키우게 되어 저항성 품종에 대한 의미가 없게 되었고 농약사용에 의한 화학적 방제는 적용방법이 비교적 쉽고, 경제적이고 효과 또한 빠르다는 장점을 가지고 있지만 지금과 같은 농약의 빈번한 반복사용

으로 인하여 저항성 균들의 출현이 급증하였으며, 더욱이 많은 효과적인 살균제들이 우리의 생활환경을 오염시켜 세계 여러 나라에서 그러한 효과적인 살균제의 사용을 금지하고 있는 실정이다. 최근 들어서 생물적 방제 방법에 많은 사람들의 관심이 높아지고 있다. 생물적 방제의 정의는 일반적으로 미생물의 처리에 의한 식물병원균의 밀도 감소 또는 식물 병의 억제라는 의미의 축소된 의미가 받아들여지고 있다. 병원균에 대한 길항 및 경합 미생물을 분리하여 배양한 후, 토양, 종자, 또는 식물체에 직접 처리하여 그들의 적합한 조건을 조성하여 줌으로써 병원균이 침입할 기회를 낮추거나, 항균물질을 분비하여 병원균의 증식을 억제하게 하는 방법이다. 생물학적 방제방법의 장점은 그 효과가 오랫동안 지속될 수 있고 유기합성 농약이 가지는 환경오염, 약해 및 잔류독성의 문제가 없다는 점에서 매우 바람직한 것으로 받아들여지고 있다. 생물적 방제의 근간은 농업 생태계의 생산성을 어느 정도의 수준으로 유지하면서 생태계 균형을 최대한으로 유지하여 식물 병의 발생을 억제하고자 하는 것이다. 이러한 생물적 방제는 외국에서 오래 전부터 시작되어 왔으나 그 실용성에 대하여는 회의적이었다. 그러나 최근 10년간 유전자 조작기술등의 유전공학기술 개발로 생물적 방제에 대한 방제 방법에 이러한 생명공학 기술이 적용되어 상업적으로도 큰 효과를 거두고 있다. 특히 세균의 경우 항진균성 물질 또는 항세균성 물질을 분비하면서 식물체 뿌리에 정착하여 뿌리가 자랄 때 뿌리에서 증식할 수 있는 능력을 가진 균들이 있다. 이들 세균들은 근권정착세균(root colonizing rhizobacteria)으로 일컬어지고 있고 특히 이들 균들중에는 작물의 성장을 향상 시켜 주는 이른바 작물생장촉진 근권세균(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR)들이 많이 보고되어 있다.

종자처리와 근권처리에 의한 토양병의 생물적 방제는 생물적 방제 연구 중에서 가장 먼저 발전시킨 분야이다. 토양병은 지상부에 발생하는 병과는 달리 지금까지 개발된 어떠한 농약으로도 방제가 어렵고, 병 발생 예찰도 불가능하다. 일단 병이 발생하면 치료가 불가능하므로 작물이 심겨지기 전에 대책을 강구해야 한다. 또한 토양병은 연작에 의해서 누적적으로 증가되기 때문에 고정된 시설에서 같은 작물을 계속 재배해야 하는 시설채소에서는 생산기반을 흔드는 결정적인 피해를 가져온다. 미생물 처리에 의한 토양병의 방제는 이러한 문제점을 극복할 수 있는 대안으로 제시 할 수 있다. 토양병을 방제할 목적으로 길항 미생물의 토양처리에 의한 생물적 방제가 다양하게 시도되었지만 현재까지 확실하게 실용화 된 것은

국내외적으로 많지 않다. 이에 대한 원인으로서는 길항 미생물을 병원균의 침입부위에 효과적으로 정착시키지 못한 것, 미생물이 병원균의 침입을 억제할 만큼 충분한 밀도를 유지하지 못하는 것 그리고 미생물이 갖고 있는 능력을 충분히 발휘하지 못하는 것 등이 지적되고 있다.

현재까지 종자전염성병은 거의 모두 살균제에 의한 종자소독에 의존하고 있으며 대부분 1950년대에 개발된 thiram, captan 등의 보호 살균제를 종자에 분하는 방법을 택하고 있는데, 농약으로 인하여 발생하는 여러 가지 부작용뿐만 아니라, 종자 내부에 있는 병원균은 제거하지 못하며 또한, 종자 살균제는 작물이 병원균에 대하여 가장 취약한 시기인 발아 직후부터 초기 유효기간에 효과적으로 작물을 보호하지 못하고 세균에 대해서는 종자 표면에 있는 것도 없애지 못한다. 일부 침투성 종자 살균제가 있으나 이들은 벼, 보리의 특정한 몇 가지 병을 방제하기 위하여 개발된 것으로 채소종자에는 해당되지 않는다. 또 종자가 발아한 후 유근과 자엽 등을 공격해 오는 병원균들에 대해서는 기존의 종자 살균제로서는 효과적으로 방제 할 수 없다. 따라서 종자표면과 내부에 침투하는 미생물 및 진균, 세균 모두에 길항력을 나타내는 것이라면 종자병의 생물적 방제가 가능할 것이며, 더 나아가 발아 후 유근과 자엽으로 이동 정착 할 수 있는 다양한 능력을 나타내는 미생물 처리제의 개발이 필요하다.

토양병의 생물적 방제가 토양병을 해결하기 위한 중요한 수단이라고 할 때, 병 방제와 관련된 미생물의 능력을 향상시키고 문제점을 제거하여 안정된 방제효과를 거둘 수 있는 미생물 처리기술이 반드시 개발되어야 할 것이다. 채소작물에 발생하는 여러 가지 토양병 중에서도 이미 전염원의 농도가 축적되어 전국 어느 곳에서도 해마다 많이 발생하는 고추역병과 최근 들어 문제가 되고 있는 토마토 세균성 시들음병 등은 우선적으로 해결해야 할 과제이다.

우리나라 농업환경에서는 겨울기간동안 작물을 재배하기 위해 시설투자와 설비가 많이 투입되는데 작물생장촉진 효과가 있는 근권 세균처리로 이러한 재배상의 문제를 보완할 수 있다면 난방비에 사용되는 농가 투자비를 절감할 수 있고 재배 숙기 단축과 생산성증대를 통해 농가 소득증대에 기여 할 수 있으리라 본다. 식물세균병 방제는 과수의 근두암증병(*Agrobacterium tumefaciens*)의 경우 큰 성공을 거두었지만 다른 세균병에 대한 생물적방제는 아직 실용적인 단계에 이르지 못하고 있다. 우

리나라의 경우 최근 생산성을 높이고 토양병에 대한 재배 안전성을 높이기 위해 시설재배 면적이 늘어나고 있고 양액을 이용한 수경재배가 농가에 보급되고 있다. 그러나 오히려 토양병에 대한 오염이 더 심각하게 대두되고 있고 일단 오염되면 전체 면적으로 확대되는 문제점과 오염된 재배시설은 모두 폐기해야 하는 보다 큰 어려움에 직면해 있다. 현재 시설재배에서 문제가 되고 있는 세균병은 가지과 작물에 시들음병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*으로 아직 까지 분명한 방제방법이 없고 유기화학 농약 또한 없는 실정이다. 뿐만아니라, 우리나라에서 세균병은 진균병보다 덜 중요시 취급되어 온 결과 기초적인 연구조차 제대로 진행되어 오지 못 하였다.

작물의 생장을 촉진하는 PGPR에 대해서는 국내외적으로 많은 사례들이 알려져 있으며, PGPR만을 주제로 하는 학회가 결성되어 있어 전 세계의 연구자들이 이에 전념, 학문발전을 꾀하고 있다. PGPR의 처리 기술은 종자처리, 근권처리, 토양처리로 구분되는데 그중 가장 효율적인 방법이 종자처리이다. 그러나 PGPR의 종자처리가 성공을 거두려면 미생물의 근권 정착능력이 반드시 전제되어야 하고, 근권에 정착한 미생물이 일정한 수준이상의 밀도를 유지해야만 한다. 그리고 근권 미생물이 환경에 영향을 많이 받기 때문에 재현성이 낮아 그 기능을 제대로 발휘하지 못하고 있다. 이 세 가지 조건을 모두 만족시키는 종자처리 기술은 아직 개발되지 않고 있다. 한편 미생물의 근권처리는 넓은 포장에 심겨진 작물에 대해서 불가능하지만 유묘를 별도로 길러서 이식 재배하는 채소작물에 대해서는 편리하게 수행할 수 있다. PGPR 균주들을 농업에 활용하기 위해서는 작물의 생장을 촉진하는 우수한 균주의 선발과 함께 다양한 환경에서도 일정한 수준 이상의 효과를 안정적으로 나타나게 하는 미생물 처리 기술이 절실히 필요하다. 이를 위해서는 미생물과 작물(근권)의 상호작용과 기본 원리 연구와 정착기작이 밝혀져야 하며, 재배적 입장에 선 연구자, 그리고 식물 개체의 생물학 수준의 연구자들의 공동연구가 필요하다.

1990년대 후반에 들어서면서부터 유용 미생물을 종자에 처리하여 작물의 생장을 촉진시키거나 작물에 발생하는 병을 방제하려는 연구는 종자 및 작물생산에 대단히 중요한 과제로 부각되고 있다. 환경농업은 수출농업과 함께 국민의 정부가 내세운 중요한 농정지표로서 단순히 생산성의 향상만을 고집할 것이 아니라 후손에게 물려줄 자연과 환경을 잘 보전하고 가꾸어 나가는 농업의 공익적인 기능에

더 강조하고 있다. 한편 OECD 가맹국을 비롯하여 세계무역을 주도하고 있는 나라에서는 농약사용의 범위를 엄격하게 규제하고 있으며 EU 국가들은 2000년 에 가서는 전체적인 농약사용량을 1990년도의 절반 수준으로 제한하는 제안에 합의 하고 있다.

우리가 개발하고 발전시키는 과학기술이 환경과 자연을 가꾸고 보존하는 것 과 반하는 것이라면 그것이 비록 일시적으로는 득이 될지 모르지만, 결과적으로 막대한 손실을 가져온다는 것은 과거의 경험을 통하여 절실히 깨닫고 있다. 미생 물의 종자처리로 농약의 사용량을 줄이고, 안전하면서도 고품질의 농산물을 생산 하는 기술의 개발은 이러한 의미에서 우리시대가 반드시 달성해야 할 중요한 과 제라 하겠다.

최근 우후죽순처럼 전국 각처에서 번창하고 있는 유기 농업이나 무농약 재배 법은 대부분 과학적인 근거 없이 경험에 의하거나 보면 타당한 논리를 제시하지 못하는 비법을 내세우고 있다. 이러한 논법은 많은 사람들에게 널리 보급될 수 없 을 뿐만 아니라, 지속적으로 그 효과를 나타낼 수 없다. 유기농법이나 무농약 재 배의 약점은 무엇보다도 생산량이 다소 떨어지더라도 감수해야 한다는 것이다. 우 리나라의 농산물 수급사정을 감안할 때 받아드리기 어려운 약점이라 아니할 수 없다. 특히 우리나라의 생물적방제는 오랜 기간 연구개발의 성과에 의한 체계적인 방 법에 의해 이루어 지기 보다는 소규모 민간기업의 제품생산 판매형식으로 이루어지고 있어서 앞으로의 지속농업을 위한 노력이 미비한 실정에 있다. 본 연구는 과학적인 근거를 토대로 생물학적으로 병을 방제하는 무공해 농법일 뿐만 아니라, 현재의 수준보다도 수량을 증대시킬 수 있는 농사법을 개발하려는 것이다. 이러한 연구는 농업도 일종의 공해 유발산업이 될 수 있다는 우려와 농산물의 안전성에 대하여 의구심을 갖고 있는 국민들 불안감을 해소하는데 크게 기여할 수 있는 과제라고 생각한다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

식물병을 생물학적으로 방제하려는 연구는 1980년대 들어서면서부터 활발하게 진행되어 왔으며, 그 중에서도 종자나 근권에 미생물을 처리하여 토양병을 방제하고 작물생장을 촉진시키는 연구가 가장 실용화에 접근하고 있다. 특히 1979년 Kloepper 등이 제안한 PGPR(작물생장 근권세균)의 효과가 포장실험을 통하여 효과가 입증되면서부터 우후죽순처럼 각 나라에서 우수한 균주와 처리기술이 개발되고 이를 상품화하기에 이르렀다. 우리나라에서도 몇몇 대학과 연구소에서 토양병의 생물적 방제를 위한 연구가 활발하게 진행되었으나, 대부분 단편적 연구에 그쳤고 실용화 단계까지 가기에는 미흡하였다. 토양처리나 근권처리 보다는 종자처리가 더 기술 집약적이고, 상업화에 유리하기 때문에 생물적 방제는 차츰 종자처리 기술개발에 집중되었다. 그러나 이들은 대부분 밀, 보리, 유채, 목화, 사탕무, 감자 등 대단위 재배작물에 대한 것이고, 채소종자에 처리한 경우는 많지 않다. 그중 Canada의 Germida는 상추, 양배추, 양파 종자에 세균을 처리하여 수경재배에서 생장 촉진됨을 증명하였고, Aino(1993)는 *Ps. putida*를 토마토 종자에 처리하여 토마토 세균성 시들음병을 방제하는데 성공하였다. 종자, 농약, 동물약품을 취급하는 다국적 기업인 스위스의 Novatis는 네덜란드의 Utrecht대학, Leiden대학과 공동으로 *Ps. fluorescens* WCS374를 종자에 처리하여 유채, 양파, 사탕무 등의 생장을 촉진시키고 토양병을 방제하는 기술을 개발하여 Biocoat라는 상품명으로 이를 제품화하였다.

고추의 역병은 고추 재배지에서는 어느 곳이나 발생할 수 있는 병이지만 우리나라처럼 집약적으로 관리하는 재배 형태에서는 피할 수 없는 병이다. 따라서 고추 역병의 방제는 우리나라에서 개발한 방법만이 성공할 수 있다고 할 수 있다. 농업과학기술원 최용철 등은 고추 역병균을 강력하게 억제하는 *Bacillus polymyxa*를 선발하고, 이 세균이 분비하는 항균성 물질을 동정하였으며, 이를 제형화하여 AC-1이라는 이름으로 상품화 단계에 이르고 있다. 그러나 이 제품은 여러 차례 실패해야 하며, 이 경우 다른 농약과 마찬가지로 병원균의 침입 부위에 충분한 미생물이 미치지 못한다는 문제점이 있다. *Ralstonia solanacearum*에 의한 토마토 풋마름병과 무·배추 사마귀병에 대한 실용화 할 수 있는 생물학적 방제

기술은 아직 국내에서 개발된 바가 없다.

생물적 방제가 갖고 있는 결정적인 단점은 처리하는 미생물이 토양이나 근권에서 항상 같은 수준의 방제효과를 나타내지 못한다는 것이다. 생물적 방제 미생물(BCA)이 기주 식물이나 토양 또는 다른 미생물들이 내놓는 Signal에 의해서 유전적 기능이 억제되거나 효과를 나타낼 만큼 충분한 밀도를 유지하지 못하고 있다는 연구 결과들이 생물적방제의 재현성이 낮은 이유를 설명해 주고 있다.

워싱턴 주립대의 Thomashow와 Weller는 밀그루썩음병(Take-all)이 자연적으로 줄어드는 현상(Take-all decline)에 대한 연구에서 이런 현상이 일어나는 토양에는 형광성 *Pseudomonas* spp.의 밀도가 그렇지 않은 토양에 비해 높게 분포되어 있다는 것을 알아냈다. 이는 특히 2,4-diacetylphluoreglucinol (PhI)이라는 광범위한 항균물질을 분비하는 능력을 가진 *Pseudomonas* sp.에 의해서 일어난다는 것을 밝혀냈고, PhI를 생산하는 유전자를 분리하여, PhI를 생산하지 못하는 *Pseudomonas* sp.에 삽입하여 생물적 방제 능력을 향상시키고, 유전자 조작을 통한 길항미생물의 능력을 향상시키려는 연구가 진행중이다.

주로 가지과 작물에 많은 피해를 일으키는 *R. solanacearum*은 토양에서 생활하는 병원균의 생태적 특징으로 인해 이 병원균에 피해를 받은 포장은 기주 범위가 넓은 병원균의 특징 때문에 방제를 하지 않고서는 다른 작물의 재배도 불가능하다. 특히 여름철의 기온 상승과 폭우 등은 병원균들의 증식, 이동을 용이하게 하여 풋마름병의 대 발생을 예상하기도 한다. 이런 성질 때문에 특히 양액 재배지상에서의 피해 상황은 더욱 심각할 수 있다. 현재까지 *R. solanacearum*의 생물학적 방제는 실험실 조건에서 그 효과가 인정되어 온 반면 실제 포장에서의 방제 효과는 인정받지 못하고 있다. 지금까지 보고된 생물학적 방제원으로 사용된 길항균으로는 Anuratha과 Gnanamanickam(1990)에 의해 보고된 *P. fluorescens*와 Fucikovsky(1989)에 의해 보고된 *Bacillus* sp.가 있고 Anaka(1985)는 *Burkholderia cepacia*에서 분비되는 길항물질인 KGA(2-keto-D-gluconic acid)를 사용하여 병원균인 *R. solanacearum*의 밀도 감소를 확인하였다. 우리나라에서는 1994년 고추에 대한 세균성 시들음병의 저항성 품종연구가 보고되어 있으며 각 농약 회사에서도 생물농약을 출시하여 그 효과를 기대하고 있지만 실제 농가에서는 그 방제효과를 기대하지 못하고 있다. 이렇듯 대부분의 가지과 작물의 세균성 세균성 시들음병균에 대한 생물적방제 세균들이 실제 포장

조건에서는 크게 성공을 거두지 못하고 있는 것이 사실이다.

Auburn대학의 Kloepper등은 1980년대 초에 식물의 성장을 촉진시키는 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)의 존재를 발표한 이래 대단위의 포장실험에서 미생물에 의해 작물의 수확량뿐만 아니라 토양 병을 방제할 수 있다고 보고하였다. 특히 다양한 채소종자와 땅콩, 목화종자에 처리하는 *Bacillus substili* GB03을 Kodiak이라는 상품명으로 미국 전역뿐만 아니라, 전 세계적으로 시판되고 있다. 이 약제는 대단위의 포장 실험에서 어느 정도 안정적인 효과를 보인 것으로 보고되고 있다.

토양병의 생물적 방제를 실용화하기 위하여 길항세균과 기주의 상호관계를 해석하려는 연구와 기초적인 이론을 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 세계적으로 많은 연구자들이 이러한 PGPR은 식물체의 표면뿐 아니라 식물체의 조직 속에도 정착한다고 많이 보고하고 있다. Auburn대학의 Kloepper등은 *Pseudomonas fluorescens*와 *Serratia* sp.를 모델 시스템으로 이들 미생물들 (PGPR)이 작물의 조직내부에 들어가는 기작과 생태에 대한 연구를 많이 진행하고 있다. 또한 Arizona대학의 Pierson등은 토양 중에서 밀그루썩음병을 효과적으로 방제하는 *Pseudomonas* 종이 이들의 밀도를 조절하는 autoinducer를 생산하고 이러한 물질이 이들 균주의 항생물질을 생산하는 유전자를 활성화시킨다고 보고를 했다. 이러한 autoinducer를 미리 처리한다면 적은 밀도로도 생물적 방제 효율을 높일 수 있을 것이다.

근권 미생물에 의한 식물성장촉진을 규명하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Thomashow 등은 2,4-diacetylphloroglucinol(DAPG)을 생성하는 *P. fluorescens* Q8r1-96을 이용하여 밀의 take-all 방제효과에 의한 식물의 성장촉진효과를 보여 주었고 근권에서 Q8r1-96이 다른 미생물과 어떻게 경쟁하고 DAPG 생성과 성장촉진과의 관련성을 지속적으로 연구하고 있다. Boruah(2002) 등은 형광성 *Pseudomonas* strain이 생산하는 siderophore가 식물의 성장을 촉진시킨다고 보고하였고 Patten(2002)은 *P. putida* GR12-2가 식물호르몬인 indoleacetic acid(IAA)를 분비하여 식물의 성장을 촉진시킨다고 보고하였다. 현재 PGPR을 이용하여 실용화에 적용하려는 연구도 진행중이다. 과일이나 채소를 재배 할 때 메칠 브로마이드가 토양 훈증제로 사용되고 있으나 오존층 파괴에 영향을 끼친다는 우려 때문에 전 세계적으로 금지가 임박해 있다. 이를 대체할 방법 중 하나로 PGPR을 처리하여 메칠 브로마이드 훈

증이 금지되어 생기는 식물 성장 감소분을 보상할 수 있을 것으로 전망하였다.

세계적으로 이러한 PGPR에 의한 식물체의 성장촉진효과와 병 방제에 대한 연구, PGPR의 유전적인 특성과 그 기작을 밝히려는 시도들은 전 세계적으로 동시에 진행된 예는 드물다. 미생물의 특성만을 연구하는 팀은 실제 농업현장에 적용하기 힘들고, 병 방제와 성장촉진 효과만을 집중적으로 연구하는 팀은 그 기작을 알지 못하기 때문에 안정적인 효과를 기대하기 힘들었다. 따라서 생물적 방제를 성공적으로 농업에 적용하려면 한가지 목적을 두고 세포와 분자생물학 수준에서 병을 억제하는 확실한 mechanism과 이를 바탕으로 미생물과 기주식물의 생물학적 관계를 해석하는 연구 그리고 농가수준의 재배학적 연구자와 협력하여 이루어져야 할 것이다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 종자의 발아촉진과 종자전염성 병 억제 미생물제 개발

1. 종자의 발아를 촉진하는 미생물의 선발

가. 서언

직파하는 작물의 경우 종자의 발아는 작물재배의 성패를 좌우하는 중요한 요인이다. 그러나 직파하는 작물들은 대부분 대량의 종자를 넓은 지역에 파종하는 것들이 많으므로 종자의 발아율을 향상시키기 위한 특별한 처리를 별도로 하지 않는 것이 대부분이다. 그러나 부가가치가 높은 채소작물에 있어서는 채종한 종자의 발아율을 향상시키기 위한 노력이 여러 가지 각도에서 시도되고 있다. 그 중에 가장 대표적인 것이 종자 priming기술이며, 그밖에 식물 성장 촉진 Hormone처리나, 영양제 등을 처리하여 종자의 발아세와 발아율을 향상시키는 시도를 하고 있다. 한편 식물병을 생물학적으로 방제하는 미생물을 종자에 처리하였을 때 종자의 발아율이 향상되는 결과를 종종 보고하고 있다. (Hordar 등 1993, Harman 등 1991, Mathre 등 1999) 이러한 결과들은 종자에 특별한 처리 없이 미생물을 일정한 농도로 희석시킨 용액에 종자를 침지한 후 일정한 시간 후에 건조시켜 파종하여 얻은 것이다. 더욱이 미생물을 처리하여 발아가 촉진된 유묘들은 대부분 초기생장이 현저히 촉진되었으며 유묘기에 발생하는 토양병 방제에도 효과가 있었다. 이러한 결과를 토대로 본 연구에서는 각종 종자의 발아를 향상시키는 미생물을 집중적으로 탐색하여 부가가치가 높은 채소작물의 종자발아를 향상시키는 미생물을 선발하고자 하였다.

벼 직파재배는 심각하게 대두되고 있는 농촌 노동력 부족을 해결하고 쌀 생산비를 줄일 수 있는 매우 효율적인 재배 방법이지만 아직도 우리나라의 전체 벼 재배 면적에 10%도 안 되는 논에서 직파재배가 수행되고 있다. 벼 직파재배가 모든 농가에 절실히 필요한 방법인줄 알면서도 널리 사용되지 않는 이유는 담수직파나 건답직파를 막론하고 파종 후 종자의 발아율이 낮고 발아 후 고른 입모가 되지않아 초기생육이 불량하기 때문에 안정생산을 원하는 대다수의 농민이 도입을 꺼리고 있는 것이다. 본 연구를 통해서 수집하고 선발한 미생물들은 주로 부가가치가 높은 채소작물의 종자발

아를 촉진하기 위한 것이지만 종자에 처리하는 미생물은 아주 적은 양으로도 많은 면적에 파종하는 종자에 처리할 수 있으므로 우리나라에서 가장 중요한 작물인 벼에 대하여 실험 하로 하였다.

나. 실험재료 및 방법

예비실험에서 선행연구를 통하여 본 실험실에서 분리 보존하고 있는 미생물 균주를 종자 발아촉진 효과를 조사하였던 바 몇몇 균주를 제외하고는 발아촉진 효과가 낮았으며 이들은 모두 양파나 사과를 재배하였던 포장에서 분리한 균들이었다. 따라서 남부지방에 사과 양파를 집단적으로 재배하는 지역을 중심으로 주로 사과뿌리에서 미생물 균주를 수집하였다. 사과 재배지역으로 대표적인 곳은 부산시 명지동과 해남군과 진도의 사과 재배단지였으며 그밖에 진주 함양 등지의 사과포장에서는 균주를 채집하였다 (Table 1). 채집한 시료는 뿌리만 잘라서 100ml의 살균수가 담겨있는 250ml flask에 넣어서 Rotary shaker에서 250rpm으로 30분간 진탕하였다.

진탕한 sample은 뿌리의 표면이나 근권 토양에 서식하고 있는 미생물을 분리하기 위하여 남겨두고 뿌리에 밀착하거나 내부에 서식하는 미생물들을 분리하기 위하여 뿌리를 건져내어 막자사발에 갈아서 갈린 뿌리를 0.1M MgSO₄ 용액에 희석하였다. 0.1M MgSO₄ 용액에 희석한 토양시료와 뿌리시료를 각각 0.1ml를 취하여 1/10 Trypticate Soy Agar(TSA)에 평판배양하였다. 3일동안 배양한 1/10 TSA에 나타난 세균코로니 중에서 모양, 크기, 색이 다른 코로니들을 선발하여 독립적으로 배양하여 균주로 유지하면서 종자발아 촉진 검정에 사용하였다. 종자발아 촉진실험은 분리한 세균균주의 농도를 10⁸ cell/ml로 조절하여 각각 50ml씩 준비하여 오이(흑진주)와 벼(대산벼) 종자 20립을 각각의 세균부유액에 3시간씩 침지한 다음 직경 11cm petri-plate에 Filter paper을 깔고 20립의 종자를 치상하였다. 치상한 plate는 30℃ 항온기에서 배양하면서 오이는 2일 후 벼는 4일 후 발아율을 조사하여 두 식물 모두 무처리보다 발아율이 현저하게 향상된 균주를 선발하였다.

종자 발아 촉진실험은 선발한 균주의 세균부유액(10⁸cfu/ml) 30ml에 벼종자 60립을 넣고 상온에서 3시간 동안 침지한 다음 음건하여 직경 9cm플라스틱 petri-plate에 여과지9(Whatman II)를 깔고 20립씩 치상하였다. 각 처리를 3반복으로 하고 치상 2일 후부터 발아율을 조사하였다. 일년차 선발시험에서 벼종자의

발아율을 향상시킨다고 인정된 미생물 균주에 대하여 벼 뿌리 발육 촉진 효과를 조사하였다. 선발한 세균부유액을 10^8 cfu/ml로 조절하고 같은 방법으로 벼 종자를 침지하여 음건한 후 각 균주별로 직경12cm 깊이15cm되는 포트에 10립씩 파종하고 파종 15일 후 한 개체씩 꺼내어 가장 긴 뿌리의 길이를 측정하여 비교하였고 뿌리 수를 조사하였다.

다. 실험결과 및 고찰

1) 종자처리용 유용미생물 선발

오이와 벼 종자 발아를 현저하게 향상시킨 것은 11개 균주였으며 이중 A7-10, B2-13, B8-22등이 우수하였다. 오이는 실험과정에 취급하기가 쉽고 발아하는 과정을 관찰하기 쉽다는 장점 때문에 공시하였으나 균주간의 차이를 확인하는데는 부적당하였다. 시험에 공시한 오이종자는 세미니스 종묘회사에서 선별과정을 끝낸 양질의 종자였으므로 거의 100%에 가까운 발아율을 보였고 발아세도 좋았다. 반면에 벼는 발아가 늦기 때문에 균주간의 차이를 확인하는데 적합하였다.

Table 1. Screening of Bacterial isolates to enhance the germination rate of cucumber and rice seed that collected from the roots of onion and welsh onion grown in souther parts of korea

Collected area	Sampling site	Total Isotates for screening	No. of Selected Isotates
Busan	18	243	1
Masan	3	39	-
Hamyang	16	273	7
Jinju	1	10	-
Haenam	6	32	1
Jindo	12	63	2
Total	56	660	11

2) 벼 종자발아 촉진과 뿌리생장

본 연구과정에서 분리한 균주중에서 11개의 균주가 벼 종자 발아를 촉진시키는 것으로 나타났는데 그중에 8개의 균주를 대상으로 벼 뿌리 성장촉진 실험을 하였다. 처리한 8개 균주 모두 무처리에 비하여 현저하게 뿌리생장을 촉진시켰으나 뿌리의 총 수는 처리간에 큰 차이가 없었다. 처리한 균주 중에 A7-10, B1-9, B2-13 등이 뿌리신장을 뚜렷하게 향상시켰는데 A7-10과 B1-9는 처리할 때마다 결과가 다르게 나와서 항상 일정하게 종자발아와 뿌리신장을 향상시켰던 B2-13을 선발하였다(Table 2).

Table 2. Some bacterial isolates enhancing rice root growth after seed treatment that collected from onion and whelsh onion root

Bacterial Isolate	Genus	Root length (cm)	Total No. of Root
A7-10	<i>Pseudomonas</i>	10.51**	5.2
B1-9	"	10.50**	4.7
B2-13	<i>Bacillus</i>	10.35**	5.1
B4-11	"	9.40**	4.1
B6-1	"	9.49**	5.0
B8-22	<i>Pseudomonas</i>	9.23**	5.2
B10-4	"	9.20**	4.6
B11-11	"	9.60**	5.1
Control	-	7.40	4.8

Means within each column marked with an astrick (**) were significantly higher than untreated control

예비실험을 통하여 선발한 B2-13균주와 선행연구를 통하여 선발된 *Pseudomonas fluorescens* B16, *Paenibacillus polymyxa* H210, E681을 벼 종자에 처리하여 종자 발아율을 날짜별로 조사하였다. 처리한 4개의 균주 모두 벼의 발아율을 현저히 향상시

켰는데 특히 초기 발아율 향상에 두드러지게 나타났다. 처리 후 4일째는 무처리의 발아율은 아직 20%정도에 머물고 있는데 비해 E681, H210등은 60%에 근접하는 발아율을 나타내었다.

새로 선발한 B2-13은 벼 종자 발아에 있어서는 기존에 선발한 E681, H210, B16 등과 비교할 때 약간 못 미치는 것으로 나타났다(Fig. 1).

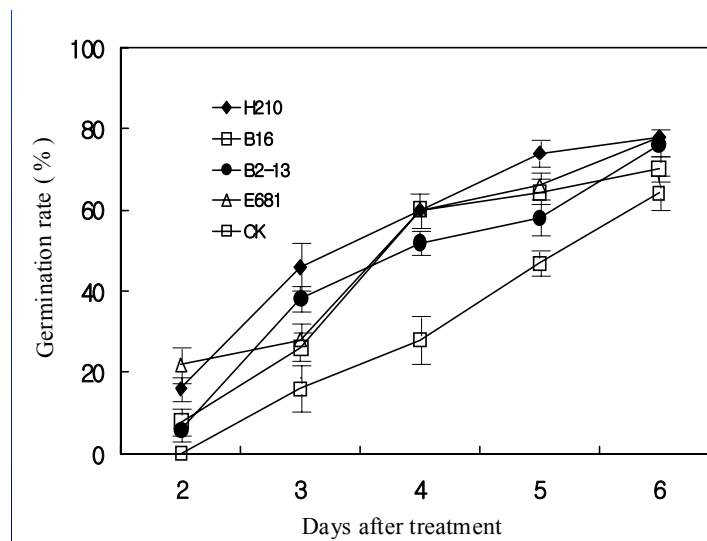


Fig. 1. Enhancement of germination rate of rice by treatment of selected bacterial isolates

2. 미생물 처리에 의한 채소종자의 발아율 향상

가. 서언

경종작물에서 신속하고 균일한 묘 출현은 작물재배에 있어서 가장 중요한 요소이다. 그 중에서도 경제적 가치가 높은 채소작물은 종자의 발아율 높고 균일하며 발아세가 왕성하여 초기생장이 왕성한 종자가 요구되고 있다. 특히 공정육묘 시설을 통해서 묘를 생산하는 회사나 생산자 조합 등에서는 종자의 발아가 묘 생산의 성패를 좌우하는 중요한 요인이다. 따라서 종자를 생산하는 종묘회사에서는 이러한 요구를 충족하는 종자를 생산하기 위하여 여러 가지 새로운 방법을 도입하고 있다. 미생물을

종자에 처리하여 식물병을 방제하거나 유묘의 생장을 촉진하는 연구는 많이 보고되고 있으나 종자발아에 미치는 효과를 조사한 연구는 많지 않다. 종자발아는 종자가 수분을 흡수하고 배 발육이 진행되면서 유근이 돌출하거나 자엽초가 종자 밖으로 나오는 현상으로 종자가 갖고있는 유전적인 특성에 의해서 거의 결정되며 온도와 습도는 물리적 환경에 크게 영향을 받는다. 또 비교적 짧은 기간 안에 발아가 종료됨으로 미생물의 영향을 받을 수 있는 시간이 많지 않다. 본 연구에서는 각종 채소작물의 종자를 공시하여 미생물 처리에 의해 발아율이 향상되는가를 조사하였고 특히 발아 소요기간이 비교적 길고 재배면적이 가장 많은 고추종자를 집중적으로 실험하였고 같은 가지과 작물인 토마토에 대해서도 실험하였다.

나. 실험재료 및 방법

공시종자는 세미니스(주)종묘로부터 제공받은 고추(두배나), 토마토(서광), 상치(청치마), 오이(삼척), 싹갓(중엽), 수박(온세상), 당근(신혹진 5촌당근), 무(신진주), 배추(여름대형가락), 시금치(입추), 양파(천주구형황) 등을 사용하였다. 공시한 미생물은 연구과정에서 분리한 *Bacillus* sp. B2-13과 기존에 선발하였던 *Paenibacillus polymyxa* E681, H210과 *Pseudomonas fluorescens* B16을 이용하였다.

접종할 세균의 농도는 10^8 cfu/ml로 하여 0.1M $MgSO_4$ 용액으로 부유액을 만들었다. 이 세균부유액 30ml를 직경 28mm 시험관에 넣고 공시한 채소종자 50립 씩 넣고 Rotary shaker에서 250rpm으로 30분간 진탕한 다음 2시간동안 침지시켰다.

세균부유액에 침지한 종자는 시험관에서 꺼내어 음건한 다음 페트리 접시에 여과지를 깔고 종자의 크기에 따라 10~25개씩 치상한 다음 28℃ 항온기에서 배양하면서 매일 발아율을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 각종 채소 종자의 발아율

선발한 11개의 균주와 본 실험실에서 선발한 *Paenibacillus polymyxa* E681과 H210을 공시하여 10^8 cell/ml되는 세균부유액을 만들어서 여기에 벼, 고추, 토마토 종자를 2시간정도 침지하여 petri plate 상에서 종자 발아율과 50% 종자가 발아하는 시간

(T50)을 무처리와 비교하였다.

선발한 세균들은 모두 무처리에 비하여 발아율이 높았고 T50이 빨랐다. 각 세균 균주는 처리한 종자에 따라 발아율 향상 효과가 달랐으며 어떤 균주도 모두 종자에 대하여 뛰어난 효과를 나타낸 균주는 없었다. 선발한 균주들 중에서도 벼에 대해서는 H210과 A7-10의 효과가 뛰어났고 고추에는 B2-13과 A7-10 그리고 토마토는 B2-13과 B4-11이 좋았다. A7-10은 반복시험에서 균일한 효과를 나타내지 않았으나 B2-13은 안정적인 효과를 나타냈을 뿐만 아니라 포자를 형성하는 *Bacillus*속 세균임으로 저장과 제형화에 유일할 것으로 판단되어 B2-13을 이용하여 채소종자의 발아력 향상시험을 하였다(Table 3, 4).

Table 3. Enhancement of germinability of rice, pepper and tomato seeds by treatment of selected bacterial isolates

Baeterial Isolates	Germination Rate(%)			T50(Days)		
	Rice	Pepper	Tomato	Rice	Pepper	Tomato
<i>Pseudomonas</i> spp.						
A7-10	98.2	100	98.1	3.5	3.8	3.1
B1-9	85.3	95.0	100	5.1	4.4	3.0
B8-22	90.5	97.2	95.5	4.1	4.8	2.8
B10-4	90.5	96.0	94.0	4.8	5.4	2.8
B11-11	94.0	95.0	92.8	3.9	5.2	3.0
B16	92.5	98.3	98.0	4.2	4.4	2.8
<i>Bacillus</i> spp.						
B2-13	85.8	100	100	4.7	3.7	2.4
B4-11	90.5	90.5	100	4.1	5.3	2.4
<i>Paenibacillus</i> spp.						
E681	92.3	91.3	99.5	3.8	5.0	3.2
H210	95.0	96.8	96.5	3.3	4.3	2.5
Others						
4-10	88.2	90.0	92.5	4.7	5.5	3.1
88-7-2	73.5	89.0	93.5	4.8	5.8	3.4
159-9	87.3	88.5	94.0	4.8	6.2	3.1
Check	72.3	85.5	90.5	5.2	7.2	3.5

Table 4. Effects of bacterial treatment on the germination rates of various vegetable seed at 60h and 75h after treatment

	Germination rate (%)					
	60h			75h		
	Bio	Che	CK	Bio	Che	CK
Tomato	86.0	71.7	68.3	95.3	94.0	92.3
Spinach	70.0	60.5	29.0	86.3	92.3	50.0
Water melon	39.3	30.0	0.7	100.0	94.7	63.7
Hot pepper	69.0	30.3	18.0	92.0	90.0	80.3
Carrot	85.0	57.7	39.7	96.0	85.7	81.7
Welsh onion	40.0	49.3	97.3	61.3	73.0	98.0
Onion	48.0	40.0	76.7	87.3	72.7	93.0
Crowndaisy	61.7	52.7	64.7	68.7	69.3	68.3

Bio : Biopriming with B2-13, Che : Chemical priming with PEG 8000, CK : Untreated control.

2) 미생물 처리에 의한 토마토 종자의 발아율 향상

처리한 미생물 균주 B2-13, H210, B16 모두 무처리에 비하여 초기 발아율이 현저히 향상되는 결과를 나타내었다. 그러나 H210은 다른 두 가지 미생물 균주에 비하여 훨씬 효과가 떨어졌다. 모든 종자가 대부분 발아하는 4일째에는 처리간에 큰 차이가 없었다. 특기할만한 것은 B2-13과 B16을 처리한 토마토 종자는 처리 3일째 되는 날 종자의 80% 이상이 발아하여 무처리 10%와 엄청난 차이를 나타내었다(Fig. 2). 본 실험에서 나타난 결과를 보면 최종 발아율은 미생물 처리한 종자와 무처리 사이에 차이가 없지만 초기 발아율에서는 현저한 차이를 보이고 있다. 이것은 종자의 발아세(seed vigor)가 강하다는 것을 나타내는 것으로 실제 토양에 파종하였을 때 발아가 빠르고 균일하게 출현할 수 있다는 가능성을 나타낸 것으로 판단되며 종자 발아를 향상시키는 중요한 결과라고 사료된다.

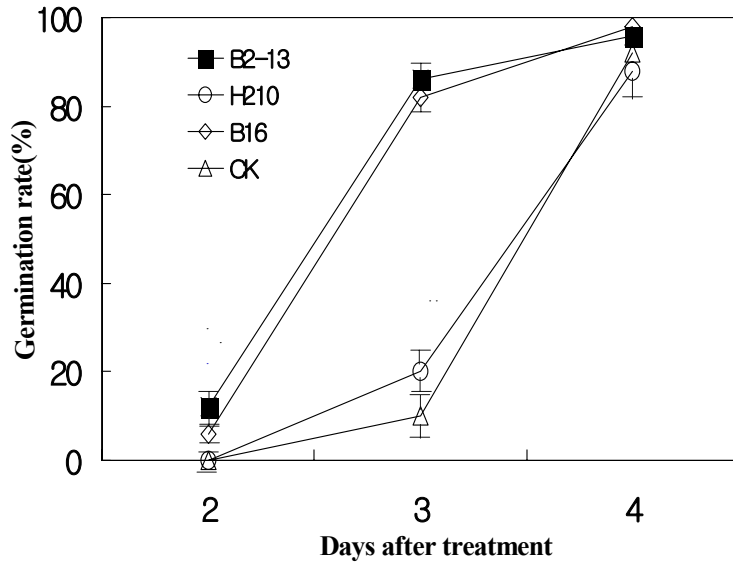


Fig. 2. Enhancement of germination rate of tomato seed by treatment of selected bacterial isolates.

3) 미생물처리에 의한 고추종자의 발아율 향상

고추종자에 선발 미생물을 처리하였을 때 발아속도와 발아율에 있어서 무처리에 비해 현저한 차이를 나타내었다. 미생물을 처리하지 않은 고추종자는 처리 5일 후에 처음 발아하여 조사 7일 후에 50%정도밖에 발아하지 않은 반면 미생물을 처리한 종자들 모두 처리 5일만에 90%이상의 발아율을 나타내었다. 미생물 처리한 종자 중에서도 특히 B2-13은 처리 4일만에 70%에 가까운 발아율을 나타내었고 6일 후에는 100%발아하였다(Fig. 3). 처리 4일 후 70%에 가까운 발아율은 다른 H210이나 B16이 20%내외의 발아율을 나타낸 것에 비하면 엄청난 것이다. 따라서 B2-13을 고추에 처리하는 것 다른 어떤 처리보다 뛰어난 것으로 고추종자 발아 향상에 획기적으로 기여할 것으로 기대된다.

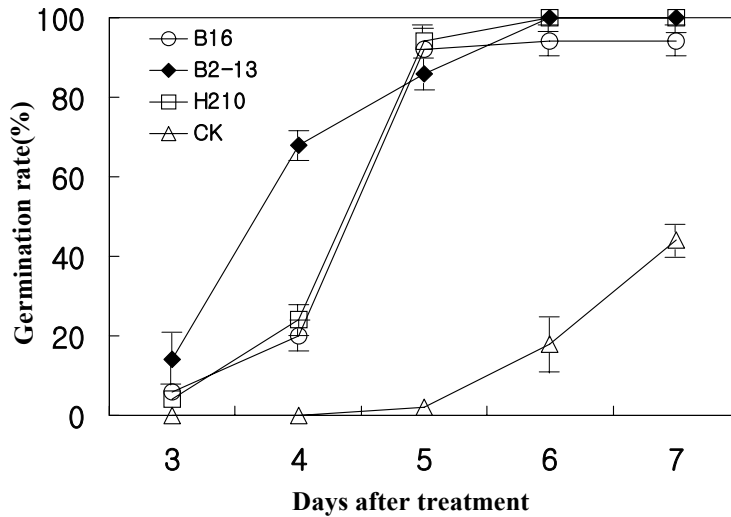


Fig. 3. Enhancement of germination rate of pepper seed by treatment of selected bacterial isolates.

3. 종자 Priming 처리와 미생물 처리 효과

가. 서언

종자 Priming 이란 수분압이 조정된 용액에 종자를 일정한 기간동안 침지시켜 종자가 발아 할 수 있는 모든 조건을 인위적으로 갖추게 하는 기술로서 주로 무기염류를 이용하여 삼투압을 조절하거나 PEG같은 고분자 물질을 이용하여 수분압을 조절한다. 우리나라에서 판매되고 있는 고추, 토마토, 시금치, 수박, 당근과 같은 채소종자들은 대부분 Priming 과정을 거쳐서 발아율과 발아 속도가 가장 높은 상태로 준비하게 한 후 판매하고 있는 것으로 알려지고 있다. 종자 Priming에 관한 기술은 각 종묘회사 마다 산업적 Know how로 가지고 있으므로 비교적 간단한 기술이지만 공개된 것들은 많지 않다. 경상대학교 원예학과에서는 오랫동안 종자 Priming에 관해서 많은 연구를 해오고 있다. 본 연구에서는 화학물질을 이용하여 종자의 발아를 촉진하는 기술과 비교하여 식물의 생장을 촉진하는 미생물로 알려진 PGPR 균주들과 단순한 처리로써 발아율을 향상시킨 미생물 균주들을 이용하여 실질적으로 종자발아를 향상시킬 수 있는 기술을 개발하고자 하였다.

지금까지 Priming처리 동안에 종자 내에서 일어나는 생리적 변화에 대해서는 많은 학자들의 연구가 있으나 대부분 발아에 관여하는 몇 가지 효소의 활성이 증대되는 것, 효소활성에 의한 저장양분의 분해와 이동의 증가, 삼투적으로 활성이 있는 물질의 축적, 세포막 기능의 활성화 등으로 집약된다. 그러나 아직도 미생물에 의한 작물의 성장촉진이나 종자의 발아 향상에 관한 이론들은 정확하게 실험적으로 증명되지 못하고 있다. 본 연구에서는 미생물을 처리한 종자의 생리적 변화나 세포학적인 변화를 실험을 통하여 밝혀내는 것보다는 화학물질을 이용한 Priming 처리와 미생물 종자 처리간에 종자 발아 과정을 경시적으로 관찰하고 발아전후에 있어서 미생물의 밀도 변화에 대하여 조사하고자 하였다. 또한 종자의 발아율을 최대한으로 높일 수 있는 실질적인 미생물 처리 방법을 규명하고자 하였다.

나. 실험재료 및 방법

화학물질을 이용한 Priming 방법은 예비실험에서 가장 효과가 좋았던 polyethyleneglycol (PEG8000)을 사용하였다. 먼저 PEG8000을 증류수에 녹여서 33%수용액을 만들고 이 용액 50ml를 취하여 직경 28mm 시험관에 넣고 여기에 고추종자(두배나) 100립을 침지하여 20℃ Incubator에서 7일간 배양하였다. 배양한 종자를 꺼내서 증류수로 씻어낸 다음 음건하여 보관하면서 실험에 공시하였다.

미생물 처리는 앞에서 언급한 방법과 같은 방법으로 처리하여 음건하여 사용한 것 이외에 음건한 종자를 28℃ Incubator에서 24시간 배양한 처리를 추가하였다. 이때 고추 종자가 마르지 않게 하기 위하여 습기를 제공하는 장치를 실험하였는데 여과지 2장을 넣은 페트리 접시에 4ml의 증류수를 공급한 것과 10g의 살균한 Vermiculite에 10ml의 증류수를 공급한 것을 비교하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 미생물 처리 방법에 따른 종자의 발아촉진

앞에서 나타난 결과와 같이 B2-13균주는 다른 특별한 처리 없이 단순히 세균 부유액에 침지만 한 처리로도 무처리에 비하여 현저하게 채소종자의 발아를 촉진시켰다. 그러나 침지한 종자를 24시간정도 28℃에서 배양한 후 저장해서 파종하면 초기

발아율이 단순히 침종만 한 것에 비하여 현저하게 향상됨을 알 수 있다. 이때에 종자가 수분을 빼앗기지 않는 것이 중요한데 여과지에 습기를 보존하는 것보다는 Vermiculite에서 습기를 보존하는 것이 훨씬 효과적이었다. Vermiculite로 습기를 보존한 처리에서는 고추 종자를 파종한지 2일만에 50%이상이 발아하였으며 3일 후에는 80%이상의 높은 발아율을 나타내었다(Table 5).

이러한 현상이 나타나게 되기까지 종자내부에서 어떠한 생리적인 변화가 있는가에 대해서는 아직 조사한 바 없으며 몇 번의 반복실험에서도 같은 결과를 얻었으므로 미생물에의 종자발아 촉진효과라고 잠정적인 결론을 내리게 되었고 이를 Biopriming 이라고 칭하게 되었다.

Table 5. Germination rate of pepper seeds after treated with *Bacillus* sp. B2-13 with variation of application methods.

Treatment		Germination Rate(%)					
		2	3	4	5	6	7 day
B2-13	Biopriming	30	51	75	95	98	98
B2-13	Filter paper	30	48	82	95	98	98
B2-13	vermiculite	53	82	92	95	98	98
Control		-	-	20	54	82	90

Table 6. Effect of seed soaking period for the biopriming with B2-13 on the germination rates of various vegetable seeds.

	Germination rate (%)			
	46h after		68h after	
	1h soaking	2h soaking	1h soaking	2h soaking
water melon	17.34	16.66	50.00	50.00
Tomato	36.67	18.00	88.00	84.66
Hot pepper	75.34	73.34	97.34	96.66
Rice	36.66	24.00	71.34	56.00
Barley	90.00	90.00	96.00	98.00

2) 미생물처리와 화학물질을 이용한 priming 처리 효과

먼저 종자를 단순히 세균용액에 침지한 처리와 PEG8000으로 priming한 종자의 발아를 페트리 접시 상에서 비교하였을 때 종자에 따라 약간의 차이는 있었으나 대부분의 채소종자가 B2-13에 침지하였을 때 무처리에 비하여 월등히 높은 발아율을 나타내었으며 이는 PEG8000으로 priming처리 한 것보다도 훨씬 좋았다. 특히 고추에 있어서는 초기발아율이 2배이상 높았다. 그러나 이러한 차이는 시간이 지날수록 적어져서 75시간이 지난후에는 화학물질로 priming한 처리와 미생물 침지처리 간에 차이가 거의 없었다(Table 7). 한편 B2-13으로 Bio-priming 처리한 채소종자는 단순히 침지처리만 한 종자에 비하여 현저하게 발아속도가 빨라지는 결과를 나타내었는데 모든 종자에 화학물질로 priming처리한 종자보다 발아율이 빨랐다. 앞에서 나타난 결과처럼 시간이 지날수록 Biopriming과 chemical priming의 차이는 줄어들었으나 처리후 70시간까지는 대부분의 종자에 있어서 Biopriming한 종자의 발아율이 높았다(Table 8).

Table 7. Comparison of B2-13 soaking and chemical priming effects on the germination of various vegetable seeds on the petri-plates.

vegetable crops	Germination rate at 60h			Germination rate at 75h		
	Soaking	Chemical	CK	Soaking	Chemical	CK
Tomato	86.0	71.7	68.3	95.3	94.0	92.3
Spinach	70.0	60.5	29.0	86.3	92.3	50.0
Water melon	39.3	30.0	0.7	100.0	94.7	63.7
Hot pepper	69.0	30.3	18.0	92.0	90.0	80.3
Carrot	85.0	57.7	39.7	96.0	85.7	81.7

미생물 균주 B2-13으로 Biopriming 처리한 고추종자와 PEG8000으로 priming 처리한 고추종자를 실내에서 페트리접시 상에서 발아율을 비교하였다. 먼저 priming 처리한 종자와 하지 않은 종자는 현저하게 발아율에서 차이를 보였다. 모든 종자가

100%발아하는 데는 7일이 걸렸지만 50%의 종자가 발아하는 시간은 B2-13 Biopriming 종자는 120시간이 걸렸다. B2-13으로 Biopriming 한 종자는 72시간 안에 80%이상 발아함으로 화학 priming 처리보다 36시간정도 빨랐다(Fig. 4). 이러한 현상은 지금까지 관행적으로 종자회사에서 실시하고 있는 priming 처리보다 미생물 priming 처리는 발아율과 발아속도를 현저하게 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 균일한 발아를 가져올 수 있는 새로운 종자처리 방법이라고 판단된다.

Table 8. Comparison of biopriming with B2-13 and chemical priming effects on the germination of various vegetable seeds on the petri-plates.

vegetable crops	Germination rate at 46h		Germination rate at 70h	
	Bio-priming	Chemical	Bio-priming	Chemical
Hot pepper	91.33	83.33	96.00	94.00
Crown daisy	62.00	55.67	62.33	64.33
Tomato	91.33	83.67	97.67	95.67
Carrot	86.00	61.67	96.00	73.33
Water melon	45.33	41.00	100	43.00
Onion	52.33	20.33	98.2	51.00
Welsh onion	47.33	9.30	91.00	34.33
Spinach	28.00	-	43.00	48.67

3) Water priming 과 Biopriming의 비교

고추종자를 미생물 없이 증류수에 침지하여 28℃에서 24시간 습도를 보전하면서 배양한 처리를 무처리와 비교하였을 때 월등히 발아율이 향상됨을 알 수 있었다. 이렇게 미생물 없이 증류수만을 처리하여 priming 효과를 나타내는 것을 본 연구에서는 물 priming(Water priming)이라고 하였다. 그러나 물 priming은 B2-13균주를 이용한 Biopriming과 비교하면 현저한 차이를 나타내었다.(Table 9)

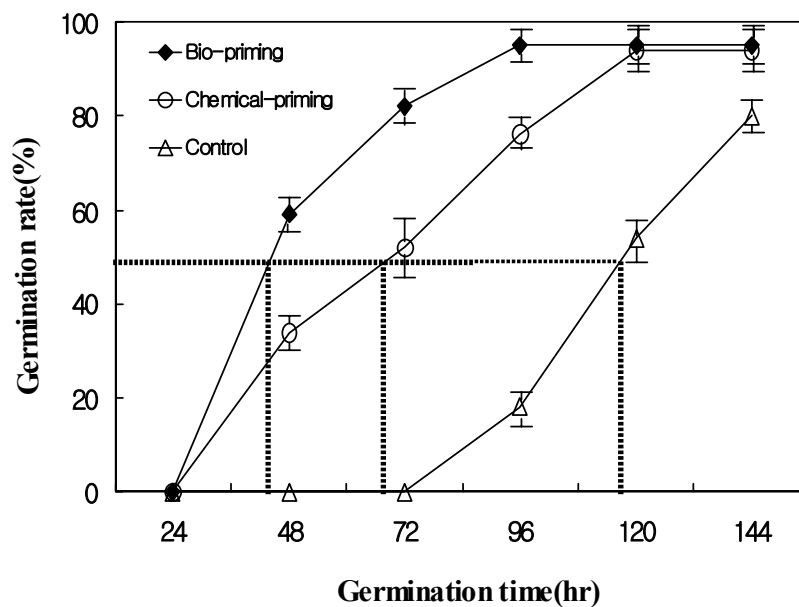


Fig. 4. Acceleration of germination speed of pepper by bio-priming with B2-13 and chemical priming treatment.

Table 9. Enhancement of pepper seed germination by treatment of B2-13 bioprimering and water priming

Day after Treatment	Germination rate(%)		
	B2-13 Bioprimering	water priming	Control
2	58.1	23.2	0
3	85.3	54.1	0
4	95.1	72.5	18.2
5	98.3	92.8	32.4
6	100	93.2	54.8

4. *Bacillus* sp B2-13의 세포형태와 종자발아촉진

가. 서언

본 연구에서는 종자의 발아촉진과 관련된 세포학적인 변화나 생리적 변화를 밝혀내는 데에 목표를 두지 않고 발아를 촉진하는데 미생물 B2-13을 실용적으로 활용하는 필요한 자료를 얻는데 주안점을 두었다.

B2-13은 앞에서 언급한 것처럼 Endospore을 형성하는 Gram양성세균이다. 배양 방법에 따라서는 배양중에 많은 세포가 Endospore로 전환될 수 있으며 세포의 활성도 각각 다를 수 있다. 따라서 처리하고자 하는 세균의 활성에 따라 종자발아 촉진에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 Logphase에 있는 세균과 이를 Autoclave에 살균한 세포를 Biopriming에 처리하였고 전혀 Endospore가 형성되지 않은 세포용액과 Endospore로 구성된 세포용액을 이용하여 Biopriming 하였을 때 종자발아에 어떠한 영향이 미치는가를 조사하고자 하였다.

나. 실험재료 및 방법

B2-13균주를 Tryptic Soy Broth 액체배지에서 12시간정도 배양하여 Logphase에 달한 세균배양액을 100ml 취하여 원심분리하여 Vegetative cell을 모아서 이를 0.1M MgSO₄ 다시 부유시켜 10⁸cell/ml 되는 세균부유액을 얻었다. 같은 방법으로 얻은 세균부유액의 절반은 121℃에서 30분간 멸균 처리하여 생리적으로 활성이 완전히 없어진 세포부유액을 준비하여 Biopriming처리방법으로 종자에 처리하여 발아율을 비교하였다.

B2-13의 포자형성을 위하여 TSA고체배양기에서 3일간 배양하여 90%이상의 세포가 Endospore로 전환된 colony를 살균한 유리봉으로 모아서 10⁸cell/ml되는 세균부유액을 준비하였다. Endospore와 vegetative cell의 효과를 비교하기 위하여 액체배양으로 대수증식기에 있는 세균을 모아서 만든 부유액과 포자로 전환된 세포만으로 만든 부유액을 1:1로 섞어서 만든 세균부유액을 Biopriming처리 방법으로 실험하였다.

다. 실험결과 및 고찰

B2-13의 살아있는 세포와 죽은 세포를 이용하여 각각 Biopriming 처리를 하였을

때 살아있는 세포뿐만 아니라 죽은 세포 부유액을 처리하였을 때에도 상당한 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 처리 3일 후에는 물 priming 처리보다 현저하게 발아율이 높았으며 그 후 양자간의 차이는 줄어들었다. 살아있는 세포와 죽은 세포와의 차이는 초기발아에서 크게 차이가 났다(Table 10).

이러한 현상을 설명할 수 있는 직접적인 증거는 본 연구에서 얻지 못하고 있다. 본 연구에서 얻은 간접적인 자료로 유추할 수 있는 가설은 살아있는 세포가 생성하는 대사산물 이외에도 B2-13을 이루고 있는 세포벽이나 세포막 성분이 가지고 있는 물리적, 화학적 성질이 열에 의해서 크게 손상을 받지 않음으로 말미암아 종자에 priming 효과를 나타낸 것이라고 추정된다. 다만 초기발아율을 향상시키는 효과는 살아있는 세포만 할 수 있는 것으로 판단할 수 있다.

초기 발아율 향상은 종자발아촉진에 매우 중요한 것임으로 활성이 강한 세포로 Biopriming 처리하는 것이 타당하다고 사료된다.

Table 10. Germination rate of pepper seeds after biopriming with live and dead cells of B2-13

Days after Treatment	Germination Rate(%)			
	B2-13 Live cell	B2-13 Dead cell	Water priming	Untreated Control
2	48.1	23.9	18.6	-
3	68.1	58.5	42.3	-
4	85.1	70.4	68.1	12.1
5	97.1	88.2	85.2	24.3
6	97.1	90.6	94.2	48.8
7	98.8	94.8	95.1	60.1

B2-13의 세포 용액중에서 포자를 형성하지 않은 세포와 포자를 형성한 세포로 Biopriming 처리한 것은 포자를 형성하지 않은 정상세포를 가지고 처리한 것이 초기 발아율이 현저하게 높았다. 포자와 활성을 가진 체세포를 1:1로 섞은 세

균용액과 포자만으로 구성된 세균 부유액을 비교하였을 때 초기 발아율 향상 효과는 비슷하였다(Fig. 5). 이러한 결과로 미루어 볼 때 고추종자의 초기 발아율을 향상시키는데는 생리적으로 활성을 지닌 정상세포이어야만 가능하다는 것을 알 수 있었으며 포자상태로 처리한 종자는 일단 포자가 발아하여 활성화되어야만 발아촉진을 시키는 것으로 추정된다.

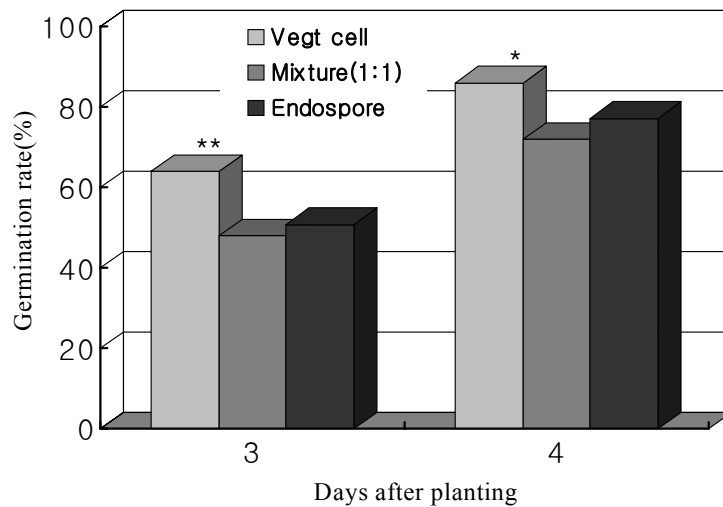


Fig. 5. The effect of Endospore and Mixture cell of B2-13 on the germination of pepper seeds when the seeds were primed with the bacteria. (*Means in columns are separated by DMRT. $P=0.05$)

5. Biopriming과 Solid Matrix Priming

가. 서언

일반적으로 종자의 발아촉진을 위한 priming처리는 무기염류나 PEG같은 액체 삼투용액에 종자를 침지시키는 방법이 주로 사용되어 왔다. 그러나 PEG는 점성이 높아서 용액 중에 용존산소가 부족하게 만들기 때문에 종실의 크기가 큰 종자에 있어서는 발아력 증진에 그다지 큰 효과를 나타내지 못하는 경우가 많다. 또한 처리과정 중 또는 처리 후에 종자가 손상되어 발아력이 오히려 떨어지는 경우도 종종 있다. 더욱이

PEG같은 물질은 비교적 가격이 비싸고 처리된 종자를 안전하게 저장하기 위해서 처리제를 종자와 분리해야 하는데 이때에 폐기되는 염이나 PEG는 환경을 오염시키는 원인이 될 수 있다.

토양의 높은염 농도는 종자의 수분흡수를 억제하여 발아를 원만하게 할 수 없게 만들지만 종자가 발아를 하기 위한 준비를 하고 발아와 관계된 대사가 촉진되어 자연적으로 발아촉진처리가 된다. 이렇게 준비된 종자를 파종하면 신속한 묘 출현이 되는데 이러한 현상을 근거로 개발한 방법이 Solid Matrix Priming(SMP)이다. 종자의 대사변화를 유도하는 삼투용액 대신에 고체 carrier로 처리하여 priming과 같이 발아력 증진을 위한 종자처리 기술이다. 최근 들어 SMP기술은 널리 활용되고 있으며 발아율이 낮은 여러 가지 종자에 SMP를 도입했을 때 발아력을 현저하게 증진시키는 것으로 보고되고 있다.

SMP처리는 삼투용액을 이용한 priming처리보다 유용한 미생물을 도입하기가 용이하고 종자 발아력 향상효과가 크기 때문에 본 연구에서 개발한 미생물 종자처리와 SMP를 비교하고자 하였고 SMP처리 과정중에 B2-13 세균부유액을 첨가시켰을 때 상승효과를 알아보하고자 시험을 수행하였다.

나. 재료 및 방법

실험에 공시한 작물은 고추(품종 두배나)종자로 세미니스 종묘회사에서 당년에 채종하여 모든 검사에 합격하여 상품화되기 직전의 것을 사용하였다. SMP를 위한 Solid carrier로는 미국의 Marville사가 개발하여 널리 보급되고 있는 Microcel-E(합성 calcium silicate)를 사용하였다. SMP처리를 위한 종자 혼합 비율은 종자:carrier:증류수의 비율을 5:3:15로 하였다. 종자와 Microcel-E를 완전히 혼합한 후 페트리 접시에 넣고 더 이상의 수분 변화를 막기 위하여 비닐 테이프로 완전히 밀봉한 다음 25℃에서 2일간 배양한 다음 종자를 꺼내어 증류수로 씻어서 carrier를 제거하고 음건하여 보관하였다. Bioprimng 처리는 B2-13균주를 이용하여 앞에서 언급한 것과 같은 방법으로 처리하였다. SMP방법에 미생물을 추가한 실험은 B2-13 세균부유액(10^8 cell/ml)을 SMP처리 과정에 첨가하는 증류수 대신에 첨가하였다. 각처리로 priming된 고추종자를 육묘용 상토(토질이:신안아그로)에 심고 출현율을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

SMP처리는 무처리에 비하여 발아율이 향상될 뿐만 아니라 발아속도에 있어서 현저한 향상을 나타내었다. 그러나 SMP처리는 B2-13으로 Biopriming 한 처리보다는 발아율이나 발아속도에서 훨씬 뒤졌다. Biopriming처리는 종자 50%가 발아하여 출현하는 시간 5일정도였으나 SMP처리는 7.5일정도 걸렸으며 초기 발아세가 Biopriming 비하여 훨씬 낮았다(Fig. 6). SMP처리에 B2-13을 첨가하였을 때는 SMP단독 처리보다 훨씬 높아서 발아율과 발아속도를 현저하게 향상시키는 것으로 나타났다. 그러나 SMP에 B2-13을 첨가한 처리가 B2-13 단독으로 Biopriming 한 처리를 능가하지는 못했다(Fig. 7).

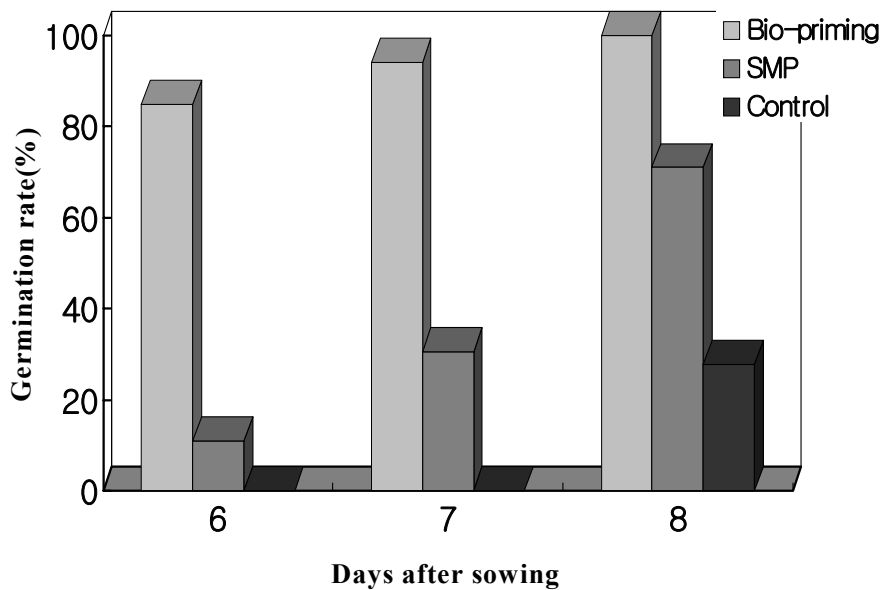


Fig. 6. Germination of pepper seeds after treatments of Bio-priming with *Bacillus* sp. B2-13 and Soil Matrix Priming.

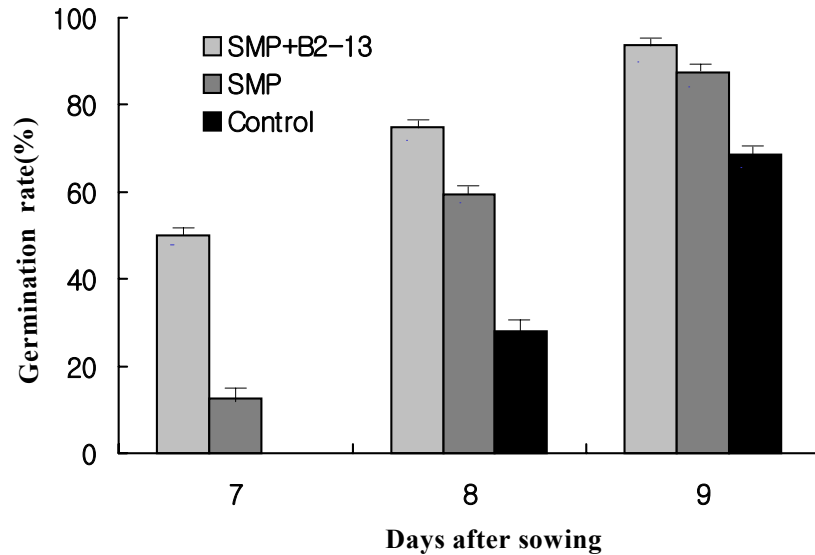


Fig. 7. Effect of *Bacillus* sp. B2-13 on the enhancement of pepper germination when the bacteria were added in Solid Matrix Priming treatment

6. Biopriming 한 종자의 보존성

가. 서언

개별 농가에서는 구입한 종자를 대부분 얼마 안 가서 파종하지만 종자를 생산해서 판매하는 회사 입장에서 보면 생산한 종자를 일괄적으로 처리하여 저장하면서 판매하게 된다. 이때에 priming 처리를 한 종자가 그 효과를 일정기간 이상 유지하지 않으면 안 된다. 지금까지 화학물질로 priming 처리한 종자는 저장온도나 종자의 수분함량에 따라 차이가 있지만 대체로 1년 이상 priming 처리 효과가 유지되는 것으로 알려지고 있다. 삼투용액에 비교적 긴 시간을 침지하는 화학 priming은 처리 기간동안에 생리적 발아가 이루어져 발아의 극대화 단계에 있는 상태이고 종자 내에 발아를 위한 각종 생리작용으로 말미암아 저장양분의 소모를 가져온다. 따라서 저장기간이 길어지면 발아세가 떨어지는 것이 일반적이다. 이에 비하여 미생물을 이용한 종자 priming은 용액에 침지하는 시간이 비교적 짧아서

저장양분의 소모가 적고 활발한 대사가 일어나기 전에 건조함으로 생리적인 퇴화를 가져올 기회가 적다. 본 실험에서는 B2-13으로 priming 처리한 고추종자를 실온에서 저장하였을 때 Biopriming 처리 효과가 어떻게 변화되는가를 조사하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

화학물질에 의한 종자 priming PEG8000 33% 수용액 고추종자(두배나)를 침지하여 20℃에서 7일간 배양한 다음 증류수로 씻어서 음건하였고 SMP처리는 앞에서 언급한 Micro Col-E를 Carrier로 하여 20℃에서 3일간 처리한 고추 종자를 증류수로 씻어서 음건하였고 B2-13을 이용한 Biopriming 처리는 10^8 cell/ml 되는 세균부유액에 고추종자를 2시간동안 침지하였다가 음건하여 실험에 사용하였다. 처리된 종자는 각각 실온에서 30일, 90일, 180일 경과 후 종자의 발아율과 T50을 조사하였으며 발아율을 날자 별로 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

Priming 처리한 종자들은 저장기간에도 크게 발아율이 감소되지 않는 경향이었으나 SMP처리는 실온에서 6개월 간 보존하였을 때 현저하게 발아율이 저하되어 무처리와 비슷한 발아율을 나타내었다. 이러한 현상은 발아속도를 나타내는 T50에서도 비슷한 결과를 나타내었다. Prime처리한 고추종자들은 대체로 저장기간 중에 발아속도가 저하되는 것으로 나타났는데 SMP처리가 PEG8000처리보다 더 낮게 나타났다. 그러나 미생물을 Biopriming한 고추종자는 6개월까지 발아율도 거의 저하되지 않았으며 발아속도가 약간 저하되었으나 다른 처리에 비하면 저장기간 동안에 발아세가 크게 줄지 않는 결과를 나타내었다(Table 11).

B2-13으로 Biopriming처리한 것과 SMP처리 종자를 실온에서 4개월간 보존한 후 pot에 심어서 발아율을 비교한 결과 B2-13을 처리한 고추종자의 출현율은 Prime처리 직전과 거의 변함이 없으며 무처리에 비하여 종자 50%가 출현하는 기간이 3일 이상 빨랐다(Table 12). 이에 비하여 SMP처리는 초기 출현율이 현저히 낮았으며 4개월 후에는 총 출현율도 처리 직후에 비하여 감소하였다(Fig. 8).

Table 11. Comparison of germination rates of pepper seeds primed with PEG8000, B2-13 and SMP after the seeds were stored at room temperature for 30, 90 and 180 days.

Treatment	Germination Rate(%)		
	30	60	180(Days)
PEG8000	95.5	93.5	90.1
B2-13	100	100	98.4
SMP	100	95.4	87.1
Control	87.8	87.2	86.6

Table 12. Comparison of germination speed of pepper seeds primed with PEG8000, B2-13 and SMP after the seeds were stored at room temperature for 30, 90 and 180 days.

Treatment	Duration for 50% germination(day)		
	30	90	180
PEG8000	3.8	4.5	4.8
B2-13	2.8	3.3	3.3
SMP	4.2	4.5	5.2
Control	5.8	6.2	6.8

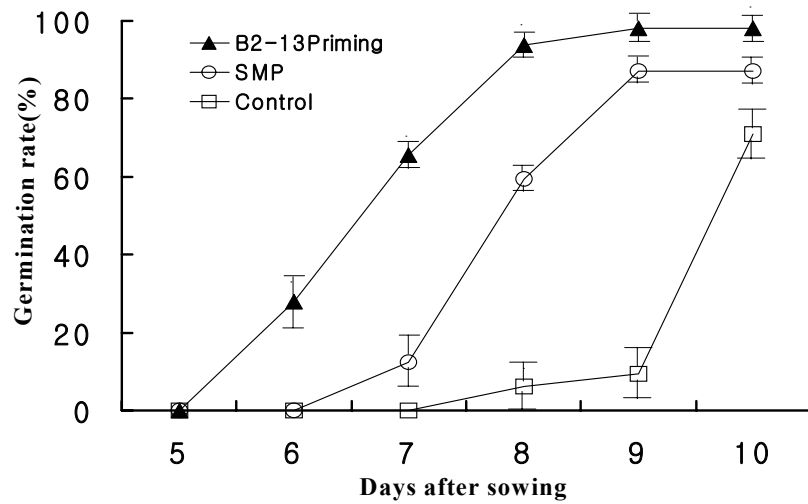


Fig. 8. Changes of accelerating effect on the emergency rate of pepper primed with *Bacillus* sp. B2-13 and SMP after the seeds were stored at room temperature for 4 months.

Table 13. Emergence rate of pepper seed primed by SMP in addition with or without bacillus sp. B2-13 after the seeds were stored at room temperature for 4 month.

Treatment	storage	Emergence Rate(%)			
		7	8	9	10(Days)
SMP+B2-13	0	55	75	95	100
	4 month	45	55	78	95
SMP only	0	18	60	84	100
	4 month	7	22	58	88
Control	0	0	33	70	95
	4 month	0	0	36	70

본 연구에서 얻어진 결과 중에 흥미 있는 사실은 SMP처리를 한 고추종자는 상온에서 시간이 경과될수록 발아율과 발아속도가 감소되는 결과를 나타내었는데 SMP처리 과정에서 B2-13의 세균부유액을 증류수 대신 첨가한 처리에서는 처리직후의 효과를 그대로 유지하고 있음을 알 수 있었다(Table 13).

이러한 현상은 SMP처리와 B2-13처리가 서로 협력작용으로 생긴 상승효과라고 보기보다는 B2-13의 Biopriming 효과가 나타난 것으로 추정된다. SMP처리는 처리직후에는 B2-13의 발아력 상승효과에 미치지 못하였고 저장기간 중에 처리효과가 급속히 감소됨에 비하여 B2-13은 감소 정도가 낮았기 때문이다. 따라서 실용적인 면에서 번거롭고 비용과 시간이 많이 드는 SMP처리 대신에 B2-13를 이용하는 것이 단시간 종자처리를 할 수 있을 뿐 아니라 저장중의 변화도 적게 할 수 있는 유용한 종자처리 방법이라고 판단된다.

본 연구를 통하여 개발한 Biopriming 방법은 처리기간이 짧고 단순한 종자처리방법인데 미생물 대신 물을 사용하였을 때에도 무처리에 비하여 현저히 종자 발아율이 상승되고 발아속도가 빨라지는 결과를 얻었다. 그러나 B2-13을 처리한 것에 비하여 초기 발아율은 현저히 낮았다. 이러한 차이를 나타내는 Biopriming과 water priming 처리한 종자가 저장기간에 따라서 종자발아에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 B2-13처리 종자와 물 priming 종자를 3개월, 6개월 씩 각각 실온에서 보관한 후 상토가 담겨있는 포트에 심어서 출현율을 비교하였다.

Prime처리 후 3개월 된 고추종자는 B2-13이나 물 priming 모두 처리 직후와 대등한 출현율을 보였으며 무처리에 비하여 4일 이상 앞당겨지는 결과를 나타내었다(Fig. 9). 그러나 저장 6개월 후에는 물 priming 한 처리는 발아속도가 현저히 저하되었으며 출현율도 20%이상 낮아졌다(Fig. 10). 이러한 결과가 얻어진 것은 B2-13처리나 물 prime 처리 모두 초기 종자발아를 촉진시키는 상태로 유도하지만 삼투용액에 장시간 침지하는 처리와 같이 종자의 유근이나 자엽초가 돌출하기 직전까지 진행시키는 것이 아니고 생리적으로 활성을 유지하도록 하는 것으로 판단되며 물 prime의 경우는 한번 활성화된 효소나 대사기구가 6개월 후에는 현저히 낮아졌으나 B2-13의 경우 세균의 활성화됨과 함께 다시 종자의 효소나 대사가 활성화되기 때문인 것으로 추정된다.

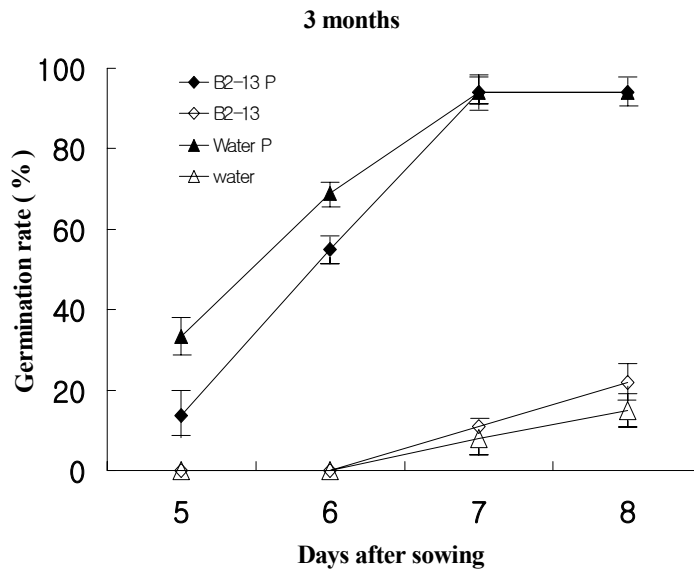


Fig. 9. Change of germination rate of pepper seed as influenced by storage after Bio-priming treatment and Water-priming.

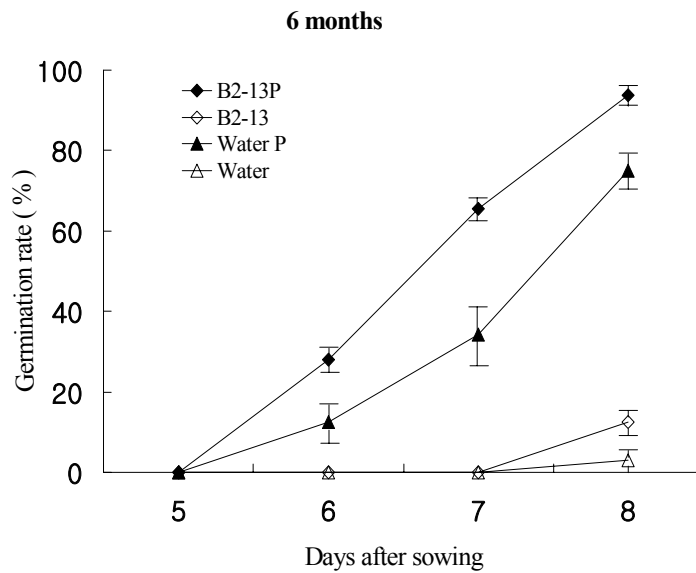


Fig. 10. Change of accelerating effect on the of Bio-priming treatment and Water-priming germination rate of pepper seed as influenced by storage.

7. 미생물 종자처리에 의한 유묘기 병 방제

가. 서언

작물의 유묘기에 발생하는 병들은 종자 전염성인 병원균이 발아와 함께 자엽이 나타나거나 토양중에 있던 병원균이 발아하는 종자나 유근을 침입하여 발생하는 것이 거의 대부분이다. 유묘기에 발생하는 병들은 종자의 발아와 출현속도와 밀접한 관계를 가지게 되는데 종자가 신속하게 발아하여 왕성하게 출현하여 자라기 시작하면 종자병이나 토양병의 발생이 거의 없다. 반대로 종자가 유근을 밖으로 내놓은 상태에서 토양 중에 오래 머물러 있으며 각종 병원균의 침입을 당하는 기회가 그만큼 많아진다.

토양중에는 식물에 침입하여 식물을 죽게 하거나 눈에 보이는 병징을 유발하여 결정적인 피해를 주는 병원균도 있지만 직접 병증을 나타내지 않으면서 작물의 생장을 억제하거나 둔화시키는 유해한 미생물들이 많이 있다. 이 경우 종자의 발아속도와 함께 이러한 미생물을 억제하는 미생물들은 유묘기에 발생할 수 있는 토양병을 방제하는데 매우 유용하다. 본 연구에서는 종자의 발아를 촉진하는 미생물과 여러 가지 토양병균에 대하여 길항력을 나타내는 미생물들을 공시하여 유묘기의 병을 방제하는 효과를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험에 공시한 토양병균은 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium ultimum*이다. 병원균은 월동 중 피해가 나타난 보리밭에서 분리한 것으로 고추, 토마토, 양파, 오이등의 작물에 모잘록병을 일으킨다. *Rhizoctonia solani*와 *Pythium ultimum*균을 PDA배지 상에서 28℃로 3일간 배양한 후 직경 10mm Cork Borer로 균사 절편을 만들어서 접종원의 seed를 준비하였다. 접종원을 위한 배양토는 모래 1kg에 corn meal 300g, 물 150 ml의 비율로 잘 혼합하여 1ℓ 들이 과일 주스병에 300g씩 넣고 121℃에 30분씩 2일 간격으로 2회 간헐 살균하였다. 준비된 배양토에 접종된 seed 균사 절편을 10개씩 접종하여 상온에서 30일간 배양하여 자연 상태에 가까운 접종원을 얻었다. 이렇게 얻어진 접종원을 상토(토실이, 신안아그로) 100g당 3g씩 넣고 잘 섞은 후 고추종자와 양파종자를 파종하여 발아율과 병든 식물을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 고추와 양파 종자 표면의 미생물 억제

실험에 공시한 미생물 중에 E681, H210은 식물병원 세균을 포함해서 광범위한 곰팡이 병원균을 억제하였다. 또한 A21-4는 *Pythium*과 *Phytophthora*등의 Chromistae균에 강력한 길항력을 나타내었다. 이에 비하여 B2-13균은 종자의 발아를 촉진하는 효과는 아주 탁월하였으나 병원균에 대한 길항력은 약하였다(Table 14).

Table 14. Antibiotic activities of selected bacterial isolates to the major plant pathogens when the bacterial isolated coinoculated on TSA

Pathogen	E681	H210	A21-4	B2-13
<i>Pythium</i>	++	++	++++	+
<i>Phytophthora</i>	+++	+++	++++	+
<i>Rhizoctonia</i>	+++	+++	+	+
<i>Fusarium</i>	+++	+++	+	+
<i>Alternaria</i>	+++	+++	+	-
<i>Coleosporium</i>	++	++	+	-
<i>Colletotrichum</i>	++	++	+	-
<i>Botrytis</i>	++	++	+++	-
<i>Penicillium</i>	++	++	+	-
<i>Xanthomonas</i>	+	+	-	-
<i>Agrobacterium</i>	+	+	-	-
<i>Erwinia</i>	+	+	-	-

+ : clean zone less than 2mm, ++ : clean zone between 2mm and 5mm, +++ : clean zone larger than 5mm

Table 15. Frequency of bacterial and fungal colonies grown on water agar plates originated from pepper seeds that produced by local farmer

Genera of Organisms	Frequency of detected colonies(%)		
	H210	B2-13	Control
<i>Alternaria</i>	1.3	11.2	22.3
<i>Cladosporium</i>		2.1	8.4
<i>Penicillium</i>	0.9	3.4	5.6
<i>Aspergillus</i>	0	4.3	4.5
<i>Botrytis</i>		0	0
<i>Collectotrichum</i>	0	2.0	5.5
<i>Phoma</i>	0	0	3.3
Unidentified	2.6	2.6	12.1
Total	4.8	25.6	61.7

본 연구에서 공시하였던 채소종자들은 세미니스 종묘회사에서 이미 선정과정을 거친 종자들이므로 종자 점염성 병원균에 대한 효과를 검정하기에는 부적당하였다. 따라서 농가에서 자가 채종한 고추종자와 양파종자를 공시하여 미생물에 의한 종자 전염성 병원균의 억제효과를 검정하였다.

한편 E681, A21-4 등은 병원균 억제능력은 뛰어났으나 종자 발아 촉진 능력은 비교적 낮을 뿐만 아니라 종자에 따라서는 해를 받는 경우가 있어서 H210과, B2-13을 공시하여 시험하였다.

농가에서 수집한 고추종자는 무처리에서 61%가 넘는 종자가 각종 미생물에 오염된 것으로 나타났는데 B2-13은 25.6%, H210은 4.8%로서 미생물의 발육을 현저하게

억제하였으나 완벽하게 억제하지는 못하였다(Table 15). 시판되는 종자 소독제를 처리하였을 때 완벽하게 미생물을 억제하는 것에 비하면 미생물로서 종자 소독제를 대치하는 것은 무리한 일이라 생각된다. 그러나 양파에 있어서는 무처리에 종자 81% 이상이 미생물에 오염된데 비하여 B2-13처리는 12.1%로 대폭 감소시켰고 H210에서는 오염된 종자를 찾을 수 없었다(Table 16). 이러한 결과는 양파종자를 세균을 이용해서 종자소독을 할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

종자를 세균용액에 담아서 세균이 종자표면에 정착하는 동안 분비하는 항생물질에 의해서 표면에 오염된 미생물의 성장을 억제하는 것으로 추정된다.

Table 16. Frequency of bacterial and fungal colonies grown on water agar plates originated from onion seeds that produced by from local farmer.

Genera of Organisms	Frequency of detected colonies (%)		
	H210	B2-13	Control
<i>Alternaria</i>	0	2.1	12.4
<i>Cladosporium</i>	0	3.3	14.3
<i>Penicillium</i>	0	0	6.5
<i>Aspergillus</i>	0	3.3	11.3
<i>Botrytis</i>	0	0	6.4
<i>Phoma</i>	0	0	7.6
Bacteria	0	3.2	8.3
Unidentified	0	4.2	16.4
Total	0	12.1	81.2

2) 미생물 종자처리에 의한 토양병 방제효과

가) 고추의 토양병 방제 시험

*Rhizoctonia solani*가 접종된 토양에 H210과 B2-13으로 처리한 고추종자를 심었을 때 H210은 다른 처리에 비하여 현저하게 발아율이 빨랐을 뿐만 아니라 병에 걸리지 않고 출현하는 묘수가 현저하게 많았다(Fig. 11). 이에 비하여 B2-13을 처리한 고추는 무처리에 비해서는 발아속도나 건전묘 출현율이 현저히 높았지만 병원균을 접종하지 않은 토양에 무처리 종자를 심었던 처리보다는 병든 개체가 훨씬 많았다(Fig. 12).

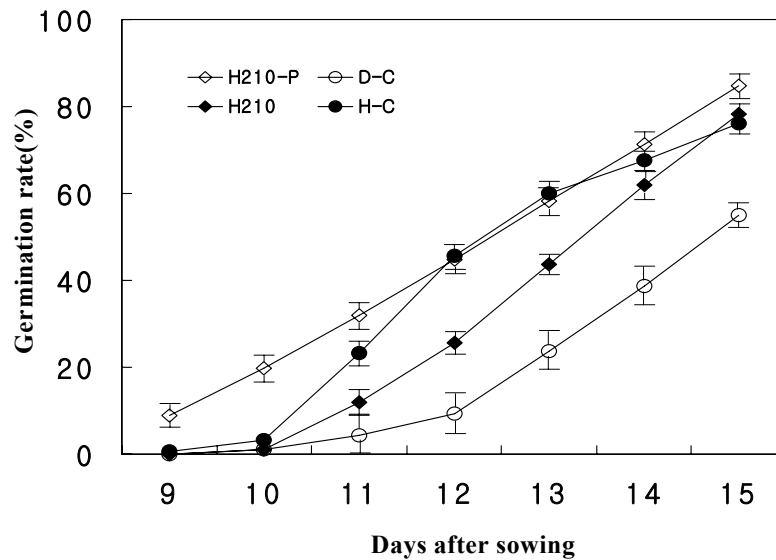


Fig. 11. Effect of H210 treatment to pepper seeds on the emergence rate of healthy stands in *Rhizoctonia solani* inoculated soil.

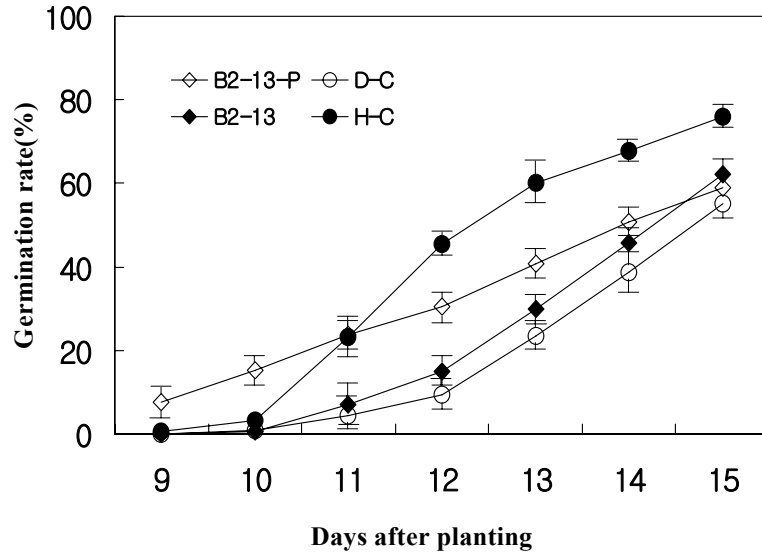


Fig. 12. Effect of B2-13 treatment to pepper seeds on the emergence rate of healthy stands in *Rhizoctonia solani* inoculated soil.

나) 양파의 토양병 방제시험

양파의 종자 발아와 초기생장에 영향을 주는 *Rhizoctonia*와 *Pythium*을 접종한 토양에서 B2-13과 H210을 처리한 종자로 시험하였다. *Pythium*을 접종한 토양에서 B2-13과 H210을 Priming처리한 종자는 다른 처리에 비하여 월등히 높은 발아속도를 보였으며 건전묘의 출현율도 거의 100%에 달함으로서 무처리 15%에 비하여 현저하게 향상됨을 알 수 있다(Fig. 13, 15). 이러한 현상은 *Rhizoctonia*을 접종한 토양에서도 나타났는데 B2-13처리가 오히려 더 높은 출현율을 나타내었다(Fig. 14, 16). 이러한 현상은 B2-13의 Priming처리가 종자의 발아능력을 현저하게 향상시킴으로 인하여 병원균의 침입을 받기 이전에 지상부로 종자가 출현함으로써 병의 침입을 회피하였던 것으로 추정된다.

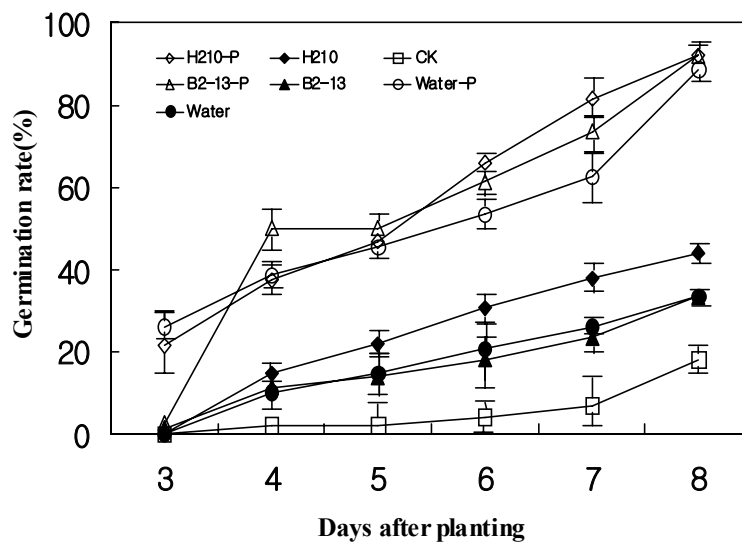


Fig. 13. Effect of bio-priming B2-13 and H210 on the emergence rate of onion in *Pythium ultimum* inoculated soil.

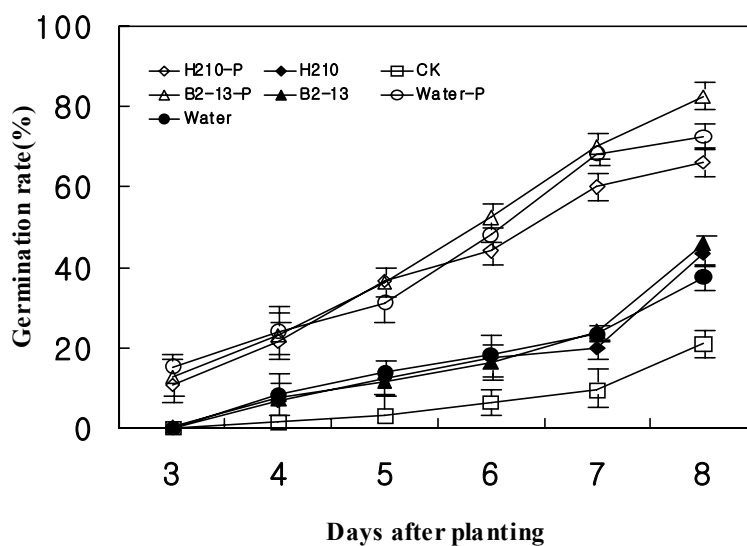


Fig. 14. Effect of bio-priming with B2-13 and H210 on the emergence rate of onion in *Rhizoctonia solani* inoculated soil.

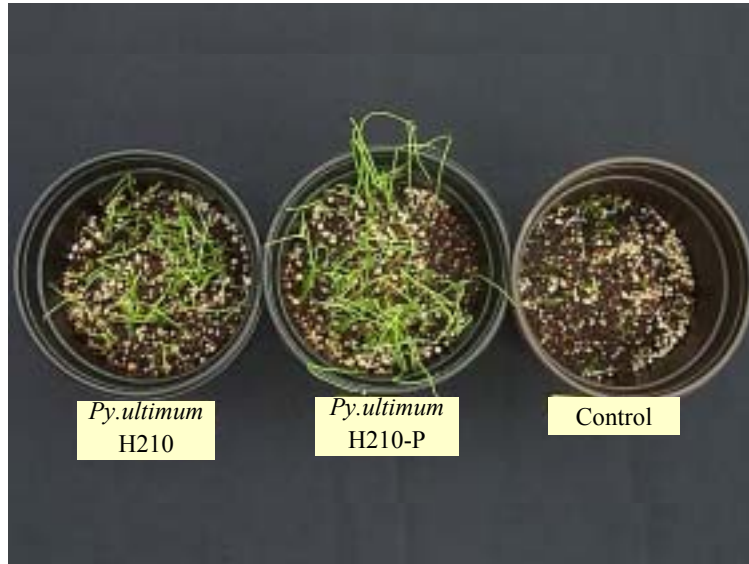


Fig. 15. Effect treatment of H210 to onion seed on the emergence rate of onion in *Pythium ultimum* inoculated soil.

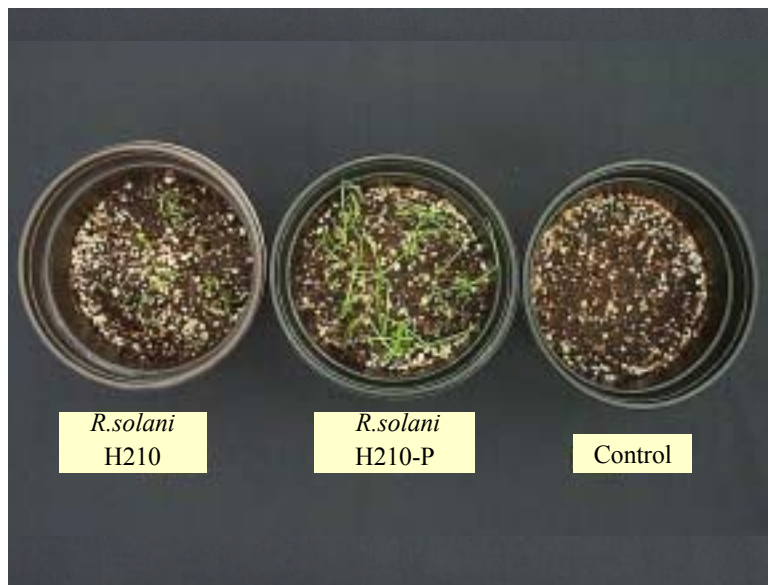


Fig. 16. Effect treatment of H210 to onion seed on the emergence rate in *Rhizoctonia solani* inoculated soil.

제2절 미생물처리에 의한 고추역병의 방제

1. 길항미생물의 분리 및 그 특성

가. 길항미생물의 분리 및 선발

양파와 파의 근권에는 독특한 물질이 분비되어 다른 작물과 사뭇 다른 근권 미생물상을 유지하고 많은 길항 미생물이 존재하는 것으로 알려져 있다. 부산광역시 명지 지역의 10년간 파를 재배한 곳과 경남 함양군 일대의 양파재배단지의 양파 그리고 마산 진주 등지에서 양파와 파를 채집하여 근권에 존재하는 미생물을 분리하였다. 채집한 양파나 파의 뿌리만 택하여 흙을 털어낸 다음 막자사발에 갈아서 완전히 마쇄하여 0.1M MgSO₄용액 30ml에 희석하여 1/10 Trypticase Soy Agar(TSA)배지에 도말하여 28℃에서 3일정도 배양하여 단일 colony를 형성시켰다. 분리된 미생물들은 주요 토양병원균과 대치배양하여 분리된 미생물들의 길항능력을 검정하였다. 많은 균주들을 효과적으로 검정하기 위하여 중심에 *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*의 직경 1cm되는 균사질편을 접종하여 병원균의 균사와 미생물들 사이에 형성되는 저지대(阻止帶)를 측정하여 각 균주에 대한 길항력을 측정하여 1차적으로 미생물을 선발하였다.

경남과 부산지역 26곳에서 총 351개 균주를 분리하였는데 그 중에서 49개의 길항 미생물을 선발하였다(Table 17).

나. A21-4균주의 길항능력

선발된 49개의 길항미생물들중 *Pythium*과 *Phytophthora*에 강한 길항력을 가진 A21-4균주를 선발하였다. A21-4균주는 양파뿌리에서 분리되었는데 아주 특이한 길항능력을 나타냈다. 기존에 실험실에서 선발되었던 *Pseudomonas fluorescens* MC07, *Pseudomonas fluorescens* M45, *Paenibacillus polymyxa* E681, *Paenibacillus polymyxa* G157 같은 균주들은 모두 넓은 범위의 길항능력을 나타내어 토양전염성병원균인 *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*과 *Rhizoctonia*속 균에 모두 길항력을 나타냈는데 A21-4균주는 *Pythium*이나 *Phytophthora* 속균에는 강한 길항력을 나타낸 반면 *Fusarium*이나 *Rhizoctonia*속균에는 길항력을 나타내지 않았다(Table 18, Fig. 17) .

Table 17. Isolation of antagonistic bacteria from the Welsh onion and Onion root samples collected from massively cultivated area in Gyeongnam.

Sample collected from	No. of samples collected	No. of isolates obtained	No. of antagonistic bacterial isolates
Myengji	20	266	28
Jinsung	1	16	3
Munsan	2	12	2
Hamyang	3	57	16
Total	26	351	49

Table 18. Antifungal activities of strain *S. plymuthica* A21-4 and previously selected biocontrol agents against fungal root pathogens.

Name of Strains		Inhibition zone (mm)			
		<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Serratia plymuthica</i>	A21-4	14.0	15.3	1.1	1.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MC07 ^a	6.5	7.2	7.0	6.8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M45	4.0	7.1	6.5	6.5
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	E681	7.8	7.9	10.5	11.0
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	G157	7.6	7.8	10.6	10.9

^b : biocontrol agents which have been selected in this laboratory

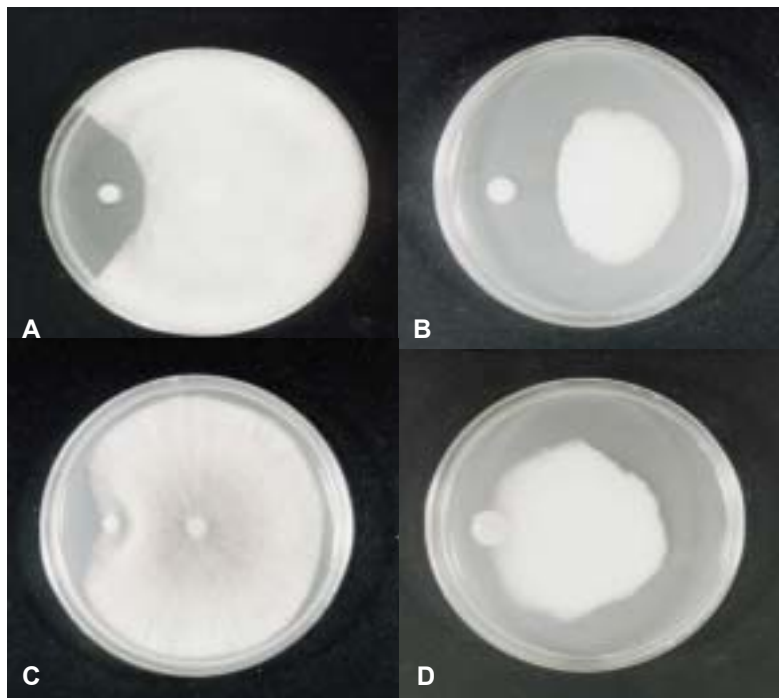


Fig. 17. Antifungal activity of *Serratia plymuthica* A21-4 against fungal root pathogens. A : *Pythium ultimum*; B : *Phytophthora capsici*; C : *Rhizoctonia solani*; D : *Fusarium oxysporum*.

다. A21-4균주의 근권정착능력

토양병을 생물학적으로 방제하는데 가장 중요한 조건중의 하나는 토양에 처리한 미생물이 근권토양이나 식물 뿌리에서 병원체를 억제할 수 있을 만큼의 밀도를 얼마나 오랫동안 유지하느냐 하는 것이다. 실내 포트 실험에서 우수한 길항력을 나타내던 미생물이 농가포장에서는 별로 효과를 보이지 못하는 경우가 많고, 미생물을 처리한 직후에는 방제 효과를 나타냈지만 시간이 지나감에 따라 전혀 병 발생을 억제하지 못하는 경우도 종종 있다. 길항미생물의 밀도를 오랫동안 유지하기 위하여 여러 가지 첨가제를 사용하거나 다양한 제형을 개발하기도 하며 많은 양의 유기물을 공급하기도 한다. 비록 안정성을 유지하는 제형이나 유기물과 함께 길항미생물을 처리한다 하더라도 토양의 정균작용이나 토양미생물 간에 평형을 유지하려는 생태적 항상성 때문에 외부에서 도입된 미생물이 밀도를 일정한 수준 이상으로 유지하기란 대단히 어렵다. 이에 비하여 처리하려는 작물의 뿌

리에 잘 정착하는 미생물을 종자에 처리하면 그 종자가 발아할 때 분비되는 종자분비물을 이용하여 증식하기 시작하여 새로 생겨나는 유근을 따라 근분비물질을 영양원으로 증식하여 계속해서 새로운 뿌리로 이동하여 뿌리 전체에 골고루 확산될 수 있으므로 Pythium과 같은 토양병원균의 침입부위를 효과적으로 보호하고 또 직접적으로 종자의 발아와 뿌리 발육을 향상시켜 식물의 생장을 촉진시킬 수 있다.

선발된 미생물의 근권정착능력을 검정하기 위하여 Double Layer Filter Paper (DLF)법을 이용하였다. 살균한 petri plate에 Filter paper 한 장을 깔고 살균수 4.5ml를 첨가한 후 그 위에 미생물 현탁액(10^8 cfu/ml)에 한시간 침지시킨 종자를 올려놓고 위에 Filter paper를 덮은 후 28℃의 암조건에서 배양하여 자라난 뿌리 끝부분 1cm를 잘라내어 분쇄하여 9ml의 0.1M $MgSO_4$ 용액에 희석하여 1/5 TSA배지에 도말한 후 28℃ 항온배양기에서 2일정도 배양하여 형성된 colony수로 뿌리에 정착한 미생물의 밀도를 조사하였다. 일차 선발에 의해서 근권 정착능력이 인정된 균주에 대해서는 개량된 Ahmad & Baker(토양내 검정)법으로 근권정착능력을 검정하였다.

A21-4균주는 DLF방법과 Ahmad & Baker법 모두에서 오이, 수박, 보리, 벼, 배추, 고추와 토마토 등 여러 가지 작물의 근권에 잘 정착하였다. DLF방법으로 측정하였을 경우 공시한 모든 작물의 뿌리마다 10^4 cfu/cm이상 정착하였고 Ahmad & Baker법으로 측정하였을 경우는 공시한 모든 작물의 뿌리마다 10^5 cfu/g이상의 밀도로 정착하여 근권정착능력이 있음을 확인하였다(Table 19).

Table 19. Population density of *S. plymuthica* A21-4 on the root segment of each crops plant analyzed by Filter Paper and Soil Medium.

Tested plant	Population Density	
	Filter Paper (Log cfu/cm root)	Soil Medium (Log cfu/g roots)
Cucumber	4.00	5.60
Watermelon	4.89	5.00
Barley	4.00	6.26
Rice	4.00	5.89
Chinese cabbage	4.92	5.02
Tomato	4.37	5.25
Pepper	4.56	5.95

라. A21-4균주의 생리적 특성

A21-4균주의 동정에 필요한 생리적 특성들은 Bergey's manual of Systematic Bacteriology 를 기준으로 하였고 그 특성들을 ATCC(American Type Culture Collection)에서 *Serratia plymuthica*(ATCC No. 6109D01)균주를 분양받아서 비교하였다. 더욱 확실히 하기 위하여 A21-4의 16S rRNA의 sequence를 분석하여 NCBI BLAST search법을 이용하여 분석하였다.

A21-4균주의 chromosomal DNA는 Wilson(1987)방법으로 추출하였다. PCR은 ologonucleotide primer를 사용하였다. 이때 denaturation, annealing 그리고 extension 온도는 92℃, 55℃ 그리고 72℃로 하였다. Sequencing vector는 pBluescript II SK(+), 그리고 compliment bacteria는 DH5를 사용하였다.

A21-4균주의 16S rRNA sequence 분석결과 *Serratia plymuthica*와 98%의 상동성을 나타냈고 그 생리화적인 특성들이 ATCC에서 분양받은 *Serratia plymuthica* 6109D01(ATCC number 53858)균주와 일치하였다(Table 20). 16S rRNA sequence (Fig. 18) 분석과 생리적 특성에 의하여 A21-4균주를 *Serratia plymuthica*로 동정하였다.

Table 20. Comparison of the characteristics of antagonistic bacterial isolate A21-4 with the *S. plymuthica* 6109D01

	<i>S. plymuthica</i>	A21-4	6109D01
Gram reaction	—	—	—
Cell morphology	straight rod,	straight rod	straight rod
flagella	peritrichous flagella	peritrichous flagella	peritrichous flagella
Cell size	0.6-1 μ m, 1.2-3 μ m	0.7-1 μ m, 1.4-2.5 μ m	0.7-1 μ m, 1.5-2.5 μ m
Anaerobic growth	+	+	+
Pigment	—	—	—
Catalase	+	+	+
Methyl Red	—	—	—
Gelatinase	+	+	+
Urease	—	—	—
Arginine dihydrolase	—	—	—
Starch hydrolysis		+	+
Chitinase	+	+	+

```

GGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCANGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTA
ATAGGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTNTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAG
TGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTAGAGTTTGATCACGGCTCAGATTGAACGC
TGCGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAAAGAGAGCTTGCTCTCTGG
GTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAA
CTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAAATGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTC
GGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCT
CACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAG
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAG
CGAGGAGGAAGGGTTCAAGTGTAAATAGCACTGTGTCATTGACGTTACTCGCAGAAGAA
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCG
CGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGT
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA
GGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATAACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGA
GGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACCTTCCAGAGAT
GGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
TGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCG
ATTCCGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATA
CAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGA
TTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAA
TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGT
GGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTC
ATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCAA

```

Fig. 18. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene of A21-4

2. A21-4균주의 변이체 선발

현재 밝혀진 생물학적 방제의 기작은 길항균이 생성하는 항생물질에 의한 항생작용 (antibiosis), 세포벽 분해효소에 의한 기생(parasitism), 영양분과 공간 경쟁(nutrient and space competition), 그리고 기주식물의 저항성 유도(induced resistance) 등으로 알려져 있다. A21-4 균주의 항균능력에 대한 기작을 해명하기 위하여 길항력을 상실한 mutant를 선발하였다.

A21-4균주의 mutagenesis는 Fellay *et al* (1989)방법을 이용하였다. Kanamycin (Km)저항성 유전자를 가지고있는 ΩKm을 지닌 *E. coli* S17-1 pJFF350(Fig. 19)과 A21-4균주의 cell을 같은 볼륨으로 혼합하여 0.2μm membrane filters 위에 접종하여 filter를 LA배지위에 올려 30℃에서 16시간 배양하였다. 배양한 cell을 0.9%의 NaCl에 희석하여 Rifampicin과 Kanamycin을 각각 50μg/ml씩 첨가한 LA배지에 도말하여 배양하였다. Transconjugants되어 형성된 mutant들만 Rifampicin과 Kanamycin을 첨가한 배지에서 자라날수 있다. 이렇게 얻어진 mutant들을 *Pythium ultimum*과 대치배양하여 길항력을 상실한 mutant를 선발하였다.

약 3000여개의 mutant를 *Pythium*과 대치배양하여 길항력을 상실한 mutant SSM1을 선발하였다. A21-4균주의 길항력을 상실한 mutant SSM1을 *Phytophthora capsici*에 대한 길항력도 상실하였다(Fig. 20) . SSM1의 근권정착능력을 DLF방법과 Ahmad & Baker법으로 조사하였을 경우 모균주인 A21-4균주와 별 차이 없이 근권정착능력을 보였다(Table 21).

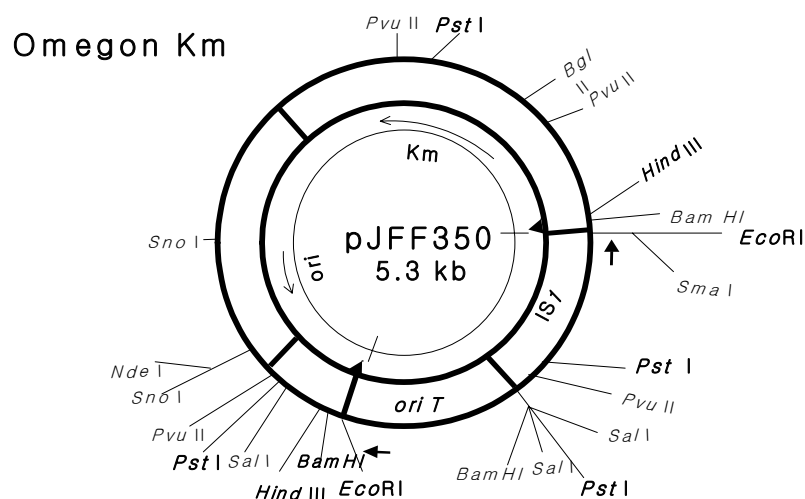


Fig. 19. Genetic map of plasmid pJFF350. Thin arrows represent the direction of transcription, heavy arrows indicate the 28-bp inverted repeats of Omegon-Km, black triangles denote the triple translation stop signals. Hairpin symbols are the T4 gene 32 transcription stop signals.

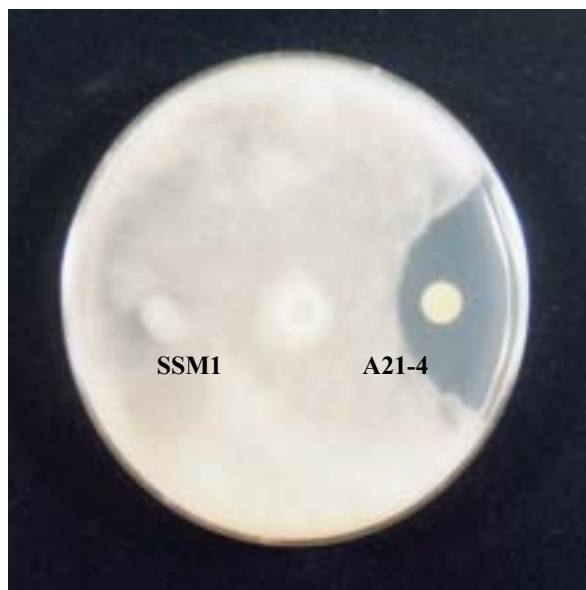


Fig. 20. Antifungal activity of *Serratia plymuthica* A21-4 and the antifungal defective mutant SSM1 against *Phytophthora capsici*.

Table 21. Population densities of *Serratia plymuthica* A21-4 and the mutant SSM1 colonized on the root of pepper.

strains	Population density	
	DLF (Log cfu/cm root)	Soil Medium (Log cfu/g roots)
A21-4	4.56 ^a	5.45a
SSM1	4.78a	5.26a

^a : Values followed by the same letter in each column were not significantly different by Duncan's multiple range test (P=0.01).

3. *In vitro*에서 A21-4의 *P. capsici* 에 대한 억제능력

고추역병균은 균사나 난포자 상태로 토양중에서 월동하여 다음 작기의 전염원이 되는데 난포자는 발아하여 유주자낭을 형성하고 유주자낭은 직접 발아하거나 유주자를

형성하여 토양수분을 따라 능동적으로 이동하여 기주체에 도달하여 식물체에 침입하는 1차 전염원이 된다. 병환부에서는 수많은 유주자낭이 형성되어 제2차 전염원의 역할을 하며 빗물에 씻겨 내려와 토양표면에 있던 유주자들은 강우시 튀겨올라 지상부 전 부위에 전파된다. 생육기의 주요 전염원은 유주자낭과 유주자이다. 하기에 처리된 길항미생물이 역병균 전염원의 발아나 형성을 억제할 수 있다면 병 발생을 효과적으로 방제할 수 있다. A21-4균주가 유주자낭과 유주자의 발아에 미치는 영향을 조사하였다.

가. A21-4균주의 *P. capsici*의 피낭포자의 발아에 대한 억제 능력

A21-4균주의 *P. capsici*의 cystospore의 발아에 대한 억제능력은 slide glass를 이용하여 실험하였다. *P. capsici*의 cystospore 현탁액(10^4 spore/ml)과 A21-4균주의 현탁액(10^8 cfu/ml)을 1:1로 섞어서 slide glass 위에 떨어뜨린 후 일정한 습도를 유지한 petri plate에 넣어서 30℃ 항온배양기에서 배양하였다. 배양 2시간 뒤부터 두시간에 한번씩 cystospore의 발아율을 현미경하에서 조사하였다. 대조구로 살균수를 사용하였다.

대조구인 살균수 처리에서는 cystospore가 배양 2시간만에 50%이상 발아하였고 8시간만에 85%이상이 발아하였다. 하지만 A21-4처리에서는 8시간만에도 겨우 8%도 안되게 발아하였다. A21-4균주가 *P. capsici*의 cystospore의 발아를 현저하게 억제하는 것을 알 수 있다(Fig. 21, 23).

나. A21-4균주의 *P. capsici*의 유주자낭의 발아에 대한 억제 능력

A21-4균주의 *P. capsici*의 zoosporangia의 발아에 대한 억제능력 역시 slide glass를 이용하여 실험하였다. *P. capsici*의 zoosporangia 현탁액(10^4 spore/ml)과 A21-4균주의 현탁액(10^8 cfu/ml)을 1:1로 섞어서 slide glass 위에 떨어뜨린 후 일정한 습도를 유지한 petri plate에 넣어서 30℃ 항온배양기에서 배양하였다. 배양 2시간 뒤부터 두시간에 한번씩 zoosporangia의 발아율을 현미경하에서 조사하였다. 대조구로 살균수를 사용하였다.

대조구인 살균수 처리에서는 zoosporangia가 배양 2시간만에 근 80% 정도 발아하였고 8시간만에 98%이상이 발아하였다. 하지만 A21-4처리에서는 8시간만에도 겨우 10%정도 발아하였다. A21-4균주가 *P. capsici*의 zoosporangia의 발아를 현저하게 억제하는 것을 알 수 있다(Fig. 22, 23).

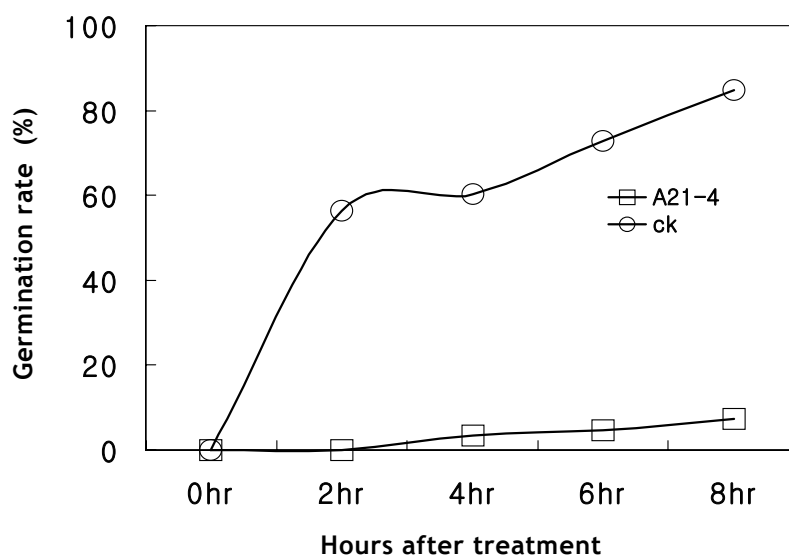


Fig. 21. Effect of inoculation of *Serratia plymuthica* A21-4 on the germination of cystospores of *Phytophthora capsici*.

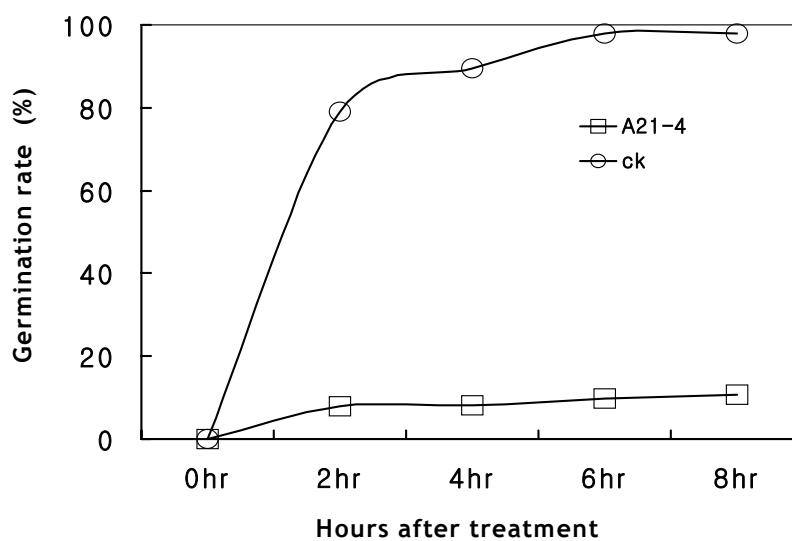


Fig. 22. Effect of inoculation of *Serratia plymuthica* A21-4 on the germination of zoosporangia of *Phytophthora capsici*.

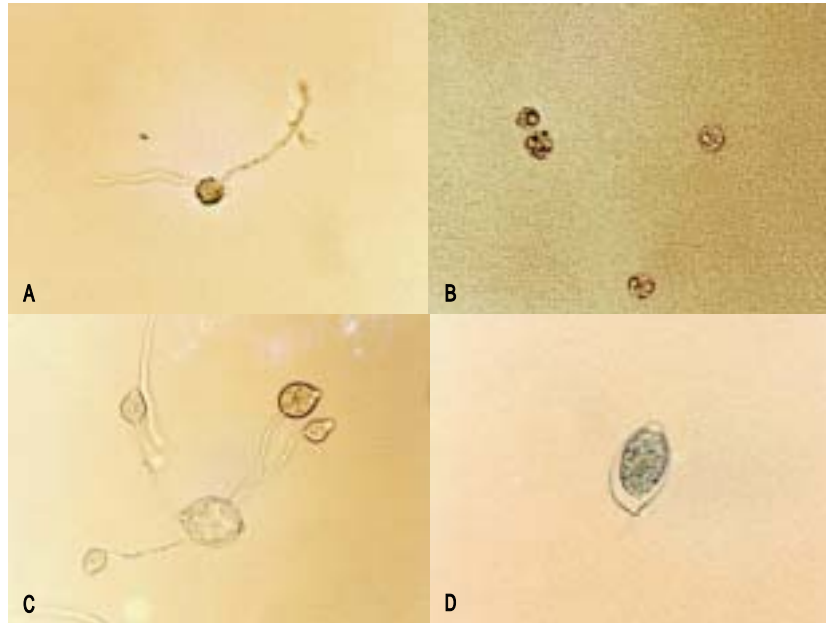


Fig. 23. Inhibition of growth and germination of cystospores a zoosporangia of *Phytophthora capsici* by *Serratia plymuthica* A21-4. Normal germination of cystospore(A); and suppressed germination of cystospore(B); Normal germination of zoosporangia(C); and suppressed germination of zoosporangia(D).

다. A21-4균주와 SSM1의 *P. capsici* 유주자낭의 형성에 미치는 영향

모균주 A21-4균주와 그 길항력을 상실한 mutant인 SSM1의 *P. capsici*의 유주자낭의 형성에 미치는 영향을 petri plate를 이용하여 실험하였다. V8쥬스 Agar 배지에서 자란 *P. capsici*의 균사체의 가장자리에서 균사절편(직경 0.8cm)을 새로운 petri plate에 옮겨 놓고 일정한양의 살균수 혹은 균현탁액(10^8 cfu/ml)을 넣고 20-25°C조건에서 형광등 불빛을 16시간 쬐인 후 유주자낭의 형성여부를 현미경하에서 관찰하였다.

살균수 와 길항력을 상실한 mutant SSM1을 처리하였을 경우 많은 양의 유주자낭이 형성되었지만 A21-4를 처리하였을 경우 유주자낭이 아예 형성되지 않았다. 역시 A21-4균주는 *P. capsici*의 균사생장, 피낭포자의 발아와 유주자낭의 발아를 억제 할 뿐 아니라 유주자낭의 형성자체를 현저하게 억제함을 알 수 있다(Fig. 24).

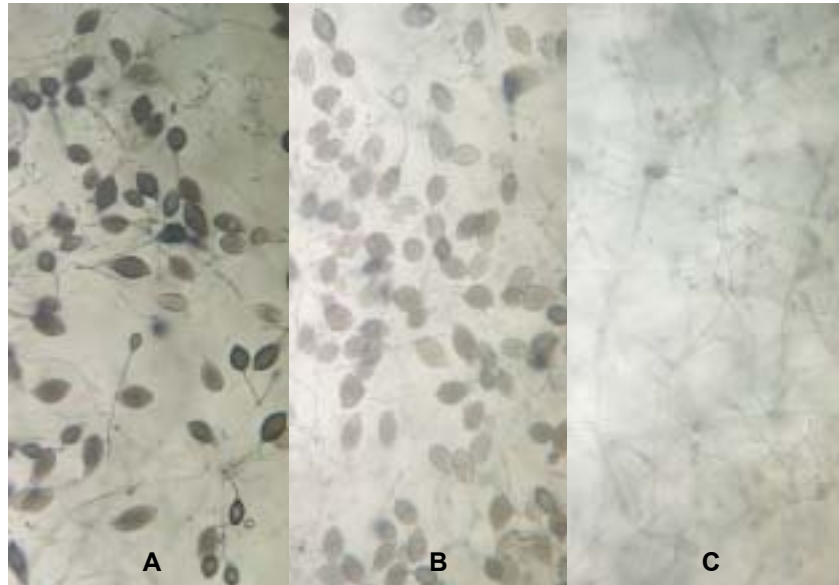


Fig. 24. Inhibition of zoosporangia formation of *Phytophthora capsici* by *Serratia plymuthica* A21-4 and the mutant SSM1. A : Treatment of sterilized distilled water; B : Treatment of antibiotics defective mutant SSM1 cell suspension; C : Treatment of *S. plymuthica* A21-4 cell suspension.

4. A21-4균주와 *P. capsici*의 근권토양과 뿌리에서의 밀도변화

토양전염성병인 고추 역병의 생물적방제에 있어서 처리한 길항미생물이 고추의 근권토양과 뿌리에서 역병균을 억제할 수 있을 만큼의 밀도를 얼마나 오랫동안 유지하느냐 하는 것은 매우 중요하다. petri plate상에서 우수한 길항능력을 나타냈던 A21-4균주가 실제 고추 뿌리와 근권토양에서 잘 정착하여 주변의 *P. capsici*의 밀도를 효과적으로 억제하느냐는 고추역병을 생물적 방제하는데 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 A21-4균주를 고추 근권에 침지처리하여 이식하였을 경우 고추뿌리와 근권토양에서의 길항균의 밀도와 *P. capsici*의 밀도변화를 조사하였다.

50일 된 고추유묘(품종 녹광)를 길항균 현탁액(10^9 cfu/ml)에 한시간 정도 침지시킨 후 *P. capsici*가 접종된 토양과 무병토양에 이식하였다. 이식한 후 7일째부터 일주일 간격으로 근권토양과 고추뿌리에서의 길항균의 밀도와 *P. capsici*의 밀도 변화를 조사하였다.

가. A21-4균주와 SSM1의 고추 근권토양에서의 밀도변화

A21-4균주와 SSM1의 고추 근권토양에서의 밀도변화는 근권토양 1g을 취하여 살균한 1M MgSO₄용액으로 희석하여 50 μ g/ml Rifampicin을 첨가한 1/10TSA 배지에 도말하여 형성된 colony수를 세어 그 정착 밀도를 조사하였다.

근권토양에서의 A21-4와 SSM1의 정착밀도는 *P. capsici*가 접종된 토양이나 접종되지 않은 토양이나 모두 비슷한 경향을 보였는데 접종 7일째에는 모두 10⁷cfu/ml 정도의 밀도로 정착하였고 시간이 경과함에 따라 그 밀도가 떨어지는 경향을 보였다 (Fig. 25).

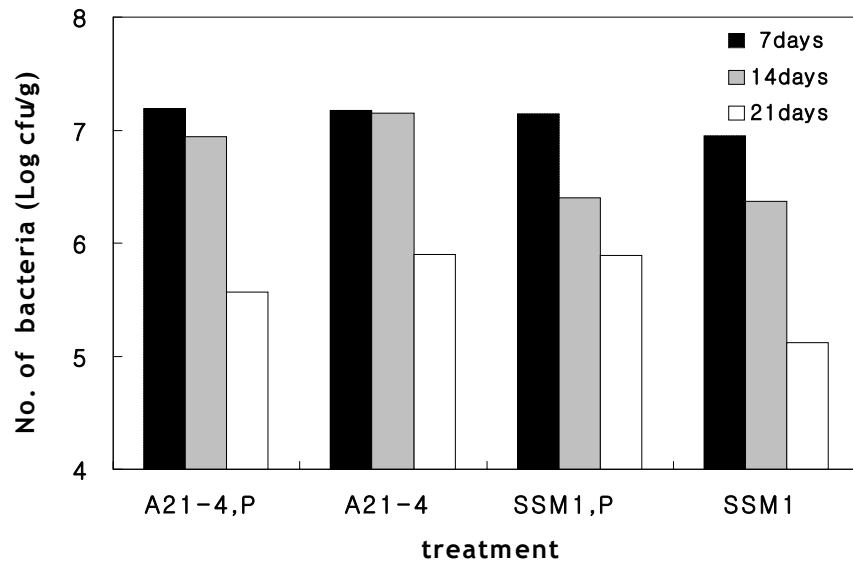


Fig. 25. Population changes of *Serratia plymuthica* A21-4 and the mutant SSM1 in pepper planted soils with presence or absent of *Phytophthora capsici*.

나. A21-4균주와 SSM1의 고추 뿌리에서의 밀도변화

A21-4균주와 SSM1의 고추 뿌리에서의 밀도변화는 고추뿌리 1g을 취하여 흐르는 수돗물에 뿌리를 깨끗하게 씻은 후 막자사발로 뿌리를 잘 마쇄한 후 살균한 0.1M MgSO₄용액으로 희석하여 50 μ g/ml Rifampicin을 첨가한 1/10TSA 배지에 도말하여 형성된 colony수를 세어 그 정착 밀도를 조사하였다.

고추뿌리에서의 A21-4와 SSM1의 밀도는 근권토양과 달리 *P. capsici*를 접종한 처리에서 7일째에는 *P. capsici*를 접종하지 않은 토양에 비하여 정착밀도가 조금 적었고 14일째에는 모든 처리구에서 정착밀도가 감소하는 경향을 보이다가 21일째에는 *P. capsici*를 접종하지 않은 처리구에서는 계속 감소하는 경향을 보인 반면에 *P. capsici*를 접종한 처리구에서 오히려 정착밀도가 증가하였다(Fig. 26). 이는 처리한 길항미생물과 *P. capsici* 간에 그 어떤 상호관계가 있지 않을까 생각되어진다.

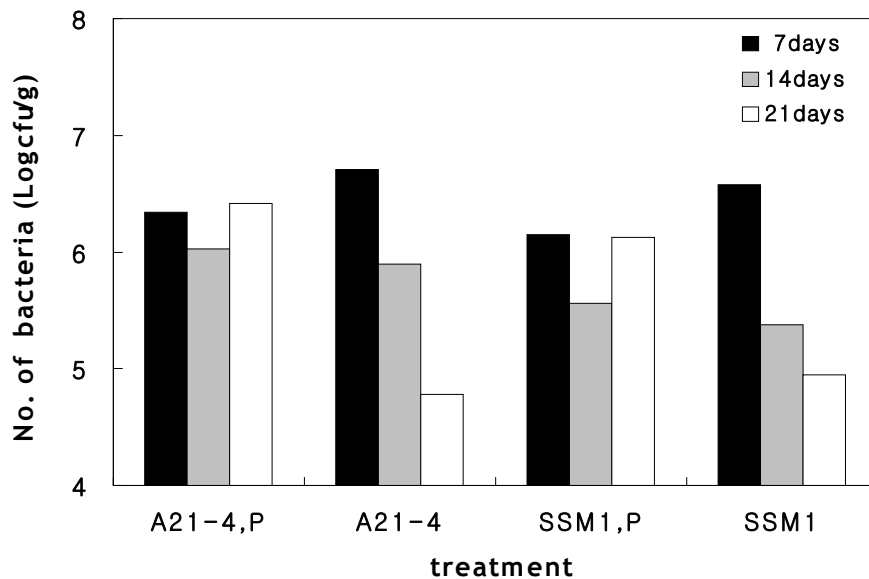


Fig. 26. Population changes of *Serratia plymuthica* A21-4 and the mutant SSM1 in pepper roots with presence or absence of *Phytophthora capsici*.

다. A21-4균주와 SSM1의 고추 근권토양에서의 *P. capsici*에 대한 억제효과

토양에서의 *P. capsici*의 밀도를 측정하기 위하여 토양 1g을 취하여 *P. capsici*의 선택배지인 Jee 배지(CMA 17g, Agar 3g, 증류수 1000ml, Pimaricin 0.4ml, Rifampicin 10mg, Ampicilin 100mg, Hymexazol 50mg, PCNB 100mg)위에 놓은 후 살균수 10ml, Pimaricin 4 μ l와 J-AMS(Rifampicin 30mg, Ampicilin 300mg,

Hymexazol 150mg, PCNB 300mg, 증류수 30ml) 100 μ l 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 흐르는 물에 배지표면에 있는 흙을 씻어낸 후 다시 살균수 10ml, Pimaricin 4 μ l와 J-AMS 100 μ l를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 배지표면을 잘 말려서 그 위에 형성된 colony수를 세어 토양 1g에 존재하는 *P. capsici*의 밀도를 조사하였다.

길항균을 처리하지 않은 무처리구에서는 고추 이식 7일째부터 *P. capsici*의 밀도가 증가하기 시작하여 21일째에는 토양 1g에 100spore/g soil 정도로 증가하였지만 A21-4처리구에서는 근권토양에서의 *P. capsici*의 밀도가 점차적으로 감소되는 것을 알 수 있다. A21-4균주의 길항력을 상실한 mutant SSM1 처리구에서는 초기에 조금 감소되었지만 결국에는 *P. capsici*의 밀도가 증가하였다(Fig. 27).

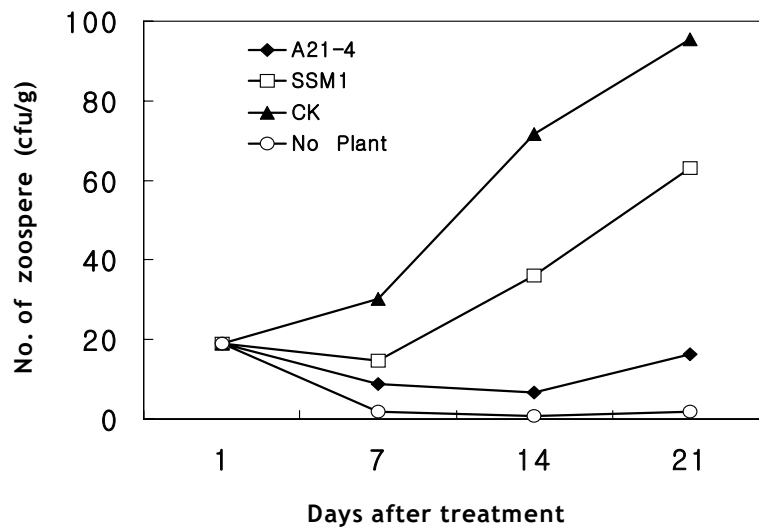


Fig. 27. Effect of inoculation of *Serratia plymuthica* A21-4 strain and the mutant SSM1 to pepper roots on the population changes of *Phytophthora capsici* around root growing soil.

라. A21-4균주와 SSM1의 고추 뿌리에서의 *P. capsici*에 대한 억제효과
 고추뿌리에서의 *P. capsici*의 밀도를 측정하기 위하여 고추뿌리 1g을 취하여 흐르

는 물에 뿌리를 깨끗하게 씻은 뒤 막자사발로 잘 마쇄하여 *P. capsici*의 선택배지인 Jee 배지(CMA 17g, Agar 3g, 증류수 1000ml, Pimaricin 0.4ml, Rifampicin 10mg, Ampicilin 100mg, Hymexazol 50mg, PCNB 100mg)위에 놓은 후 살균수 10ml, Pimaricin 4 μ l와 J-AMS(Rifampicin 30mg, Ampicilin 300mg, Hymexazol 150mg, PCNB 300mg, 증류수 30ml) 100 μ l 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 흐르는 물에 배지표면에 있는 뿌리를 씻어낸 후 다시 살균수 10ml, Pimaricin 4 μ l와 J-AMS 100 μ l를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 배지표면을 잘 말려서 그 위에 형성된 colony수를 세어 뿌리에 존재하는 *P. capsici*의 밀도를 조사하였다.

고추 뿌리에서도 근권토양과 비슷한 경향을 보였는데 길항균을 처리하지 않은 무처리구에서는 이식 7일째부터 *P. capsici*의 밀도가 측정되었고 21일째에는 *P. capsici*의 밀도가 현저하게 증가되었지만 A21-4를 처리한 고추 뿌리에서는 14일째에 밀도가 조금 측정되었고 21일째에도 아주 적은 양의 밀도를 측정할 수 있었다. SSM1처리에서는 무처리보다는 밀도가 적게 증가하였지만 A21-4처리에 비하여 밀도가 많이 증가하였다(Fig. 28).

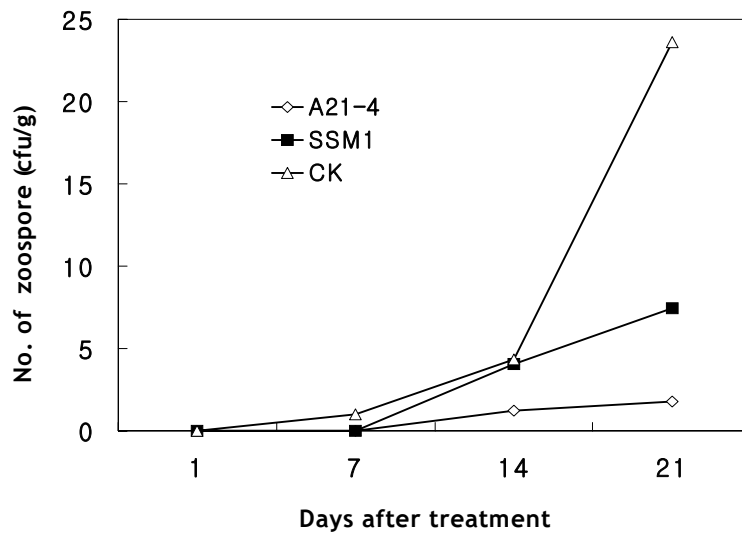


Fig. 28. Effect of inoculation of *Serratia plymuthica* strain A21-4 and the mutant SSM1 to pepper roots on population changes of *Phytophthora capsici* in pepper roots.

마. A21-4균주의 농도에 따른 근권정착 밀도

A21-4균주를 10^9 cfu/ml의 농도로 고추 근권에 침지처리하였을 경우 A21-4균주는 고추 근권토양과 뿌리에 잘 정착하여 *P. capsici*의 밀도를 억제하여 역병을 효과적으로 억제할 수 있었다. 그렇다면 A21-4의 농도를 달리 하였을 경우 고추 근권토양과 뿌리에서의 정착밀도와 병 억제능력을 검정하기 위하여 A21-4균주를 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml 농도로 접종한 후 *P. capsici*의 유주자(10^4 spore/ml)를 접종하고 근권토양과 뿌리에서의 A21-4균주의 정착밀도를 조사하였다.

A21-4균주를 서로 다른 농도로 접종하였을 경우 고추 뿌리에서는 7일째에는 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml 모두 10^6 cfu/g root 이상으로 거의 비슷한 농도로 정착하였으나 14일째부터는 밀도가 조금 줄어드는 추세를 보였는데 특히 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml 농도로 접종한 처리에서는 그 정착 밀도가 10^9 cfu/ml 처리구에 비하여 현저하게 줄어들었다(Fig. 29). 근권토양에서도 뿌리와 거의 비슷한 경향을 보였는데 7일째에는 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml 모두 10^7 cfu/g soil 이상 농도로 정착하였으나 14일째부터는 점차적으로 줄어드는 추세를 보였다(Fig. 30).

A21-4균주를 10^9 cfu/ml 농도로 처리하였을 경우에는 고추의 근권토양과 뿌리에서 모두 역병균을 억제할 수 있을 만큼의 밀도로 정착하였지만 그 이하의 농도로 처리하였을 경우에는 초기에는 10^9 cfu/ml 농도와 비슷하게 정착하였지만 시간이 경과함에 따라 정착밀도가 떨어지는 경향을 보였는데 이를 보완하기 위하여 낮은 농도라도 처리 횟수를 늘려 7일 간격으로 2차 혹은 3차 처리하면 정착밀도를 일정한 수준 이상으로 계속 유지할 수 있을 것으로 기대한다.

5. A21-4균주에 의한 고추역병 억제효과

A21-4균주는 *in vitro*에서 *P. capsici*의 균사생장을 현저하게 억제하고 유주자낭의 형성과 발아 그리고 피낭포자의 발아를 현저하게 억제 할 뿐 아니라 고추 근권에 침지처리하였을 경우 고추뿌리와 근권토양에 잘 정착하여 *P. capsici*의 밀도를 현저하게 억제하였다. 그렇다면 고추 근권에 침지처리하였을 경우 실제 고추역병에 대한 억제효과를 조사하였다.

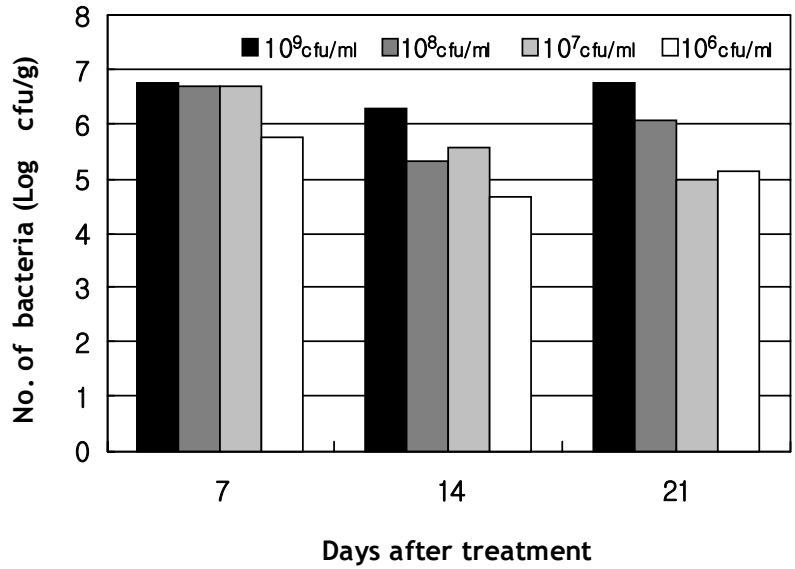


Fig. 29. Population changes of *Serratia plymuthica* A21-4 in pepper roots treated with different population of A21-4.

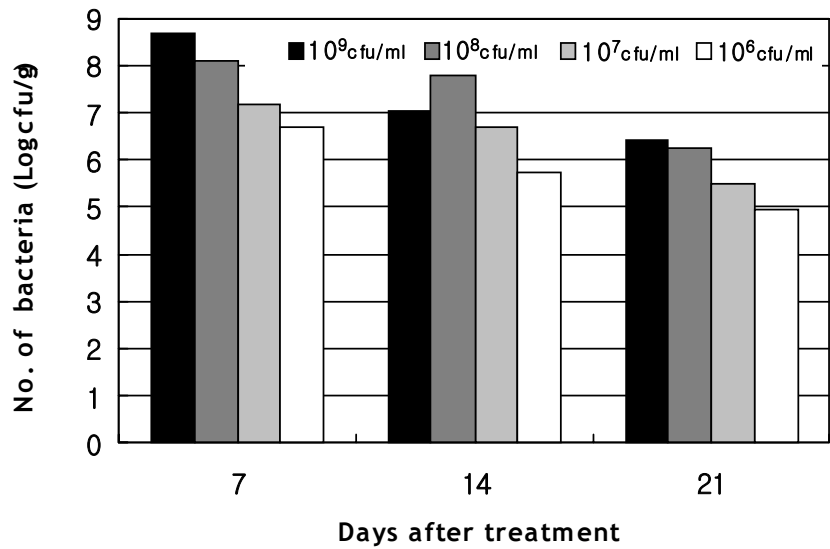


Fig. 30. Population changes of *Serratia plymuthica* A21-4 in pepper planted soils treated with different population of A21-4.

가. Pot에서의 고추역병 억제효과

50일 된 고추유묘(품종 녹광)를 길항균 현탁액(10^9 cfu/ml)에 한시간 정도 침지시킨 후 *P. capsici*가 접종된 토양에 이식하였다. 이식한 후 10일째에 발병율을 조사하였다.

이식후 10일째에 무처리에서는 80%이상의 발병율을 보인 반면에 A21-4처리에서는 전혀 발병을 하지 않았고 SSM1처리에서도 약 70%의 발병율을 나타냈다 (Fig. 31, 32).

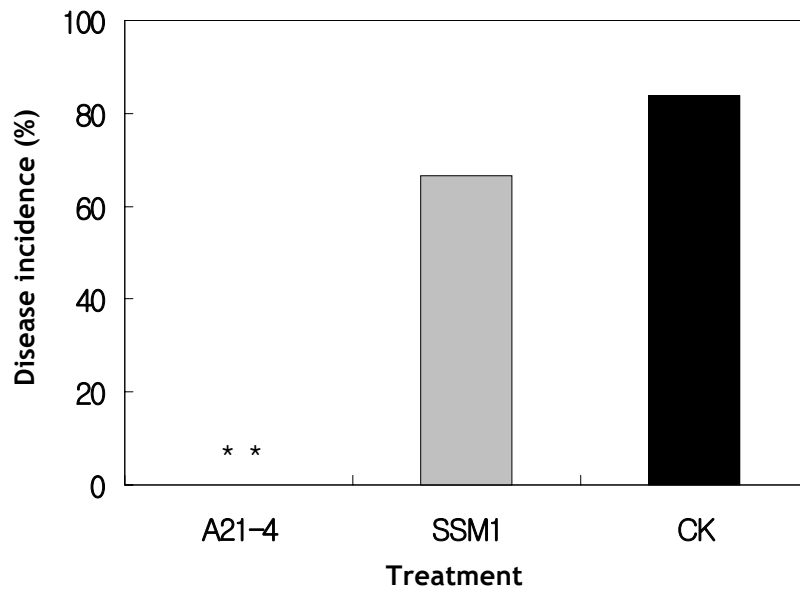


Fig. 31. Suppression of Phytophthora blight of pepper treated with *Serratia plymuthica* A21-4 and antifungal defective mutant SSM1 after 10days of inoculation, the diseased plants were recorded in the pot. The letters on top of bars indicate significant difference range of Duncan's multiple range test, same letters do not differ significantly ($p=0.01$). CK : untreated control.



Fig. 32. Suppression of Phytophthora blight of pepper by treatment of *Serratia plymuthica* A21-4 and antifungal defective mutant SSM1. CK : untreated control.

나. A21-4균주의 농도에 따른 역병억제 효과

A21-4균주를 10^9 cfu/ml의 농도로 고추 근권에 침지처리하였을 경우 A21-4균주는 역병을 효과적으로 억제할 수 있었다. 그렇다면 A21-4의 농도를 달리 하였을 경우 병 억제능력을 검증하기 위하여 A21-4균주를 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml 농도로 접종한 후 *P. capsici*의 유주자(10^4 spore/ml)를 접종하고 발병율을 조사하였다.

A21-4균주를 서로 다른 농도로 접종하였을 경우 역병 발병율을 조사한 결과 높은 농도인 10^9 cfu/ml 농도로 처리하였을 경우 병 억제효과가 확실하게 나타났지만 그보다 낮은 농도인 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml 농도로 처리하였을 경우 초기에는 다소 병 억제효과가 나타났지만 시간이 경과함에 따라 병 억제효과가 떨어지는 것을 알 수 있는데 낮은 농도에서도 병 억제 효과를 얻기 위해서는 처리 횟수를 늘려서 7일 간격으로 2차 혹은 3차 처리를 하면 그 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대한다.(Fig. 33).

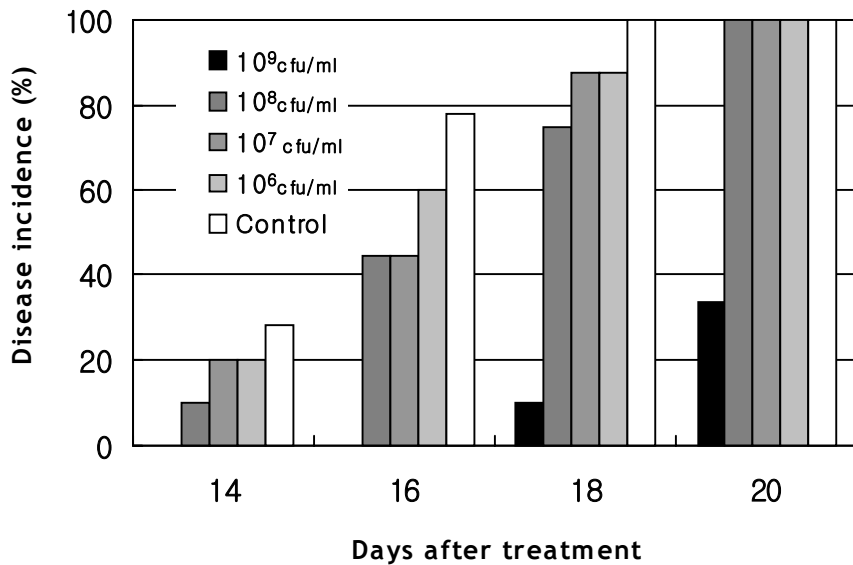


Fig. 33. Suppression of Phytophthora blight of pepper by treatment with different population of *Serratia plymuthica* A21-4

다. 비닐하우스에서의 고추역병 억제효과

50일 된 고추유묘(품종 녹광)를 길항균 현탁액(10^9 cfu/ml)에 한시간 정도 침지시킨 후 학교 비닐하우스에 이식한 후 진주지역의 재배농가들의 관리방법대로 관리하였다.

비닐하우스 실험에서 A21-4처리구에서는 12.6%의 발병율을 보였고 무처리구에서는 74.5%의 발병율을 보여 75%의 방제효과를 얻을 수 있었다. A21-4균주는 Pot에서 뿐 아니라 실제 비닐하우스에서도 고추 역병을 현저하게 억제할 수 있음을 알 수 있다(Fig. 34, 35).

라. Rock wool hydroponic 시스템에서의 고추역병 억제효과

최근들어 양액재배 시스템이 많이 도입되어 많은 농가들에 보급되고 있다. 양액재배에서도 토양재배와 마찬가지로 역병에 의한 피해가 심하여 그 피해가 20%정도에 달한다고 한다. A21-4균주가 양액재배 시스템에서도 역병억제효과가 있는지를 알아보기 rock wool에서 실험을 하였다. 20일된 고추 유묘를 A21-4균주 현탁액(10^9 cfu/ml)에 침지시킨 후 rock wool에 이식하였다. 이식한 후 *P. capsici*의 유주자(10^4 spore/ml)를 5ml씩 접종하고 15일 뒤에 발병율을 조사하였다.

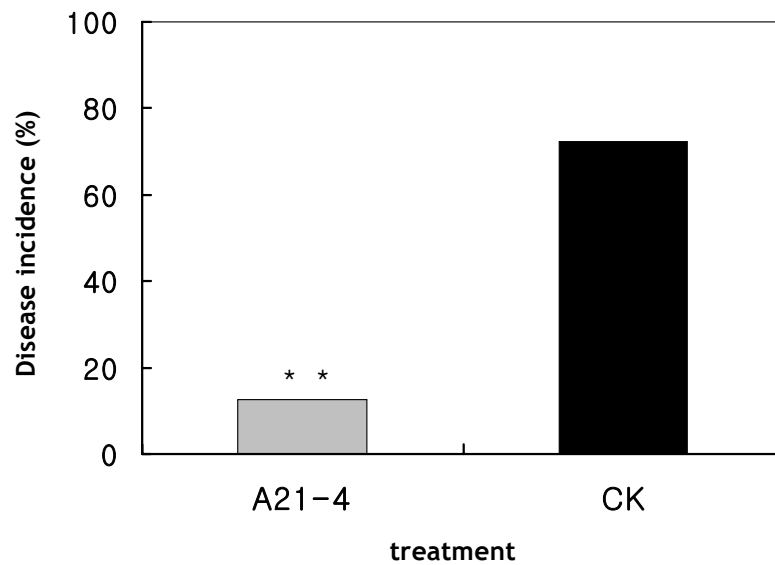


Fig. 34. Suppression of Phytophthora blight by treatment of *Serratia plymuthica* A21-4 in the vinyl house after 14days of inoculation, the diseased plants were recorded. The letters on top of bars indicate significant difference range of Duncan’s multiple range test, same letters do not differ significantly (p=0.01). CK : untreated control.



Fig. 35. Over all view of vinyl house experiments healthy looking plants on the left hand side are A21-4 treated plot and drooped and wilted plants on right hand side are control plot.

무처리구와 SSM1처리구에서는 15일 뒤에 모두 발병하여 고사하였지만 A21-4처리구에서는 전혀 발병하지 않았고 고추 역시 무처리에 비하여 왕성하게 자랐다(Fig. 36). A21-4처리가 양액재배 시스템에서도 고추역병을 효과적으로 방제 할 수 있을 것으로 생각되어지며 앞으로 이에 대한 실제 농가 포장실험을 더 진행하여야 할 것이다.

양액재배 환경에서 처리한 길항균의 생존력을 향상시켜 역병 억제능력을 높이기 위하여 길항균 처리방법을 종자처리, 유묘의 근권침지처리와 근권관주처리 등 방법을 공시하여 처리 14일 뒤에 근권에서의 정착밀도를 조사하였다. 뿌리에서의 A21-4균주의 밀도는 근권침지처리와 근권관주처리에서 종자처리에 비하여 훨씬 높은 밀도로 정착하였고 Rock wool에서 역시 종자처리가 다른 두가지 처리에 비하여 낮은 밀도로 정착하여 종자처리만으로는 역병방제가 어려우며 근권 침지처리와 근권관주처리가 더욱 효과적으로 역병을 방제할 수 있을 것으로 판단된다.



Fig. 36. Suppression of incidence of *Phytophthora* blight in pepper plants by treatment of *Serratia plymuthica* A21-4 and the mutant SSM1 in rock wool system.

6. 농가포장에서의 고추역병 억제효과

실내 Pot실험과 학교 비닐하우스 실험의 기초상에서 농가 포장 실험을 진행하였다. 실제 작물재배를 통한 역병 방제 효과를 검증하기 위하여 2001년도에 고추 역병 발생지인 충북 연풍과 경기 진위에서 포장을 임대하여 실험을 진행하였다. 처리는 무처리와 역병방제에 효과가 있다는 아인산을 대조구로 사용하였으며 정식 후의 관리는 농민으로 하여금 일반 고추 재배와 동일하게 관리하도록 하였다. 실험결과 충북 연풍포장에서는 각 처리 반복간에 큰 차이 없이 거의 모든 시험구에서 역병이 심하게 발생하여 data를 얻을 수 없었고 경기 진위포장에서는 병이 발생하지 않아 data를 얻지 못하였다.

2002년도에는 실제 포장에서의 검증을 위하여 더욱 많은 포장을 선택하여 실험을 진행하였다(Table 22). 하지만 기대와는 달리 실제 포장 검증실험이 매우 어려웠다. 병 발생이 환경의 변화에 따라 많이 변하기 때문에 장마로 인하여 병이 많이 발생하거나 아예 병이 발생하지 않아 많은 결과를 얻지 못하였다. 충북 연풍포장은 고추역병 다발 포장으로 2002년에도 장마로 인하여 침수되면서 모든 처리구에서 모두 병이 심하게 발생하여 결과를 얻지 못하였고 다른 몇몇 포장에서는 병이 발생하지 않아서 결과를 얻는데 많은 어려움이 있었다.

대곡면 한들영농조합 이문기씨 고추 하우스에서는 늦게나마 병이 심하게 발생한 지역의 고추묘를 뽑아내고 그곳에 A21-4균주를 침지처리한 유묘를 이식하고 이식 7일뒤에 A21-4균주 현탁액을 한번 관주처리하였다. 관리는 일반 재배관리와 동일하게 하면서 역병 발생여부를 관찰하였다. 처리결과 이식 50일 뒤까지도 발병기주를 뽑아내고 바로 이식하였는데도 불구하고 고추가 병 발생 없이 아주 건전하게 자라고 있음을 확인하였다(Fig. 37).

2002년 9월에 대곡면 한들영농조합 이성기씨 고추 하우스에서 근 2000주의 고추 유묘에 이식전 근권침지처리하고 이식 7일 뒤에 한번 관주처리하였다. 처리 뒤에 발병율과 생육을 조사를 하였다. 처리결과 이식 30일 뒤에 화학농약(가디안)처리구에서는 5%정도가 발병하여 고사하고 A21-4처리구에서는 발병하지 않았고 50일 뒤에는 화학농약(가디안)처리에서 13.7%정도 발병하였고 A21-4처리에서는 2.3%의 발병율을 보였다. 고추 생육 역시 A21-4균주를 처리한 고추묘가 이식 후 토양 활착이 좋았고 엽록소 함량도 높았다(Table 23, Fig. 38). 본 포장은 아직까지 그 결과를 지켜봐야 할 것이다.

Table 22. 고추역병 방제 실험 농가포장

시 험 장 소	시 험 기 간
충북 괴산군 연풍면 행촌리	2001. 5 ~ 2001. 8
경기 평택시 선탄면	2001. 5 ~ 2001. 8
경상대학교 농장	2001. 5 ~ 2001. 8
밀양시 초동면	2001. 11 ~ 2002. 3
진주시 진성면 (박성기)	2002. 1 ~ 2002. 5
진주시 대곡면 한들영농조합 (차영근)	2002. 3 ~ 2002. 7
진주시 대곡면 한들영농조합 (김여생)	2002. 3 ~ 2002. 7
진주시 대곡면 한들영농조합 (이문기)	2002. 3 ~ 2002. 7
충북 괴산군 연풍면 행촌리	2002. 5 ~ 2002. 9
진주시 문산면 (허성달)	2002. 5 ~ 2002. 9
진주시 대곡면 한들영농조합(이성기)	2002. 4 ~ 2002. 8
경상대학교 농장	2002. 5 ~ 2002. 9
진주시 대곡면 한들영농조합 (이성기)	2002. 9 ~ 현 재



Fig. 37. Suppression of Phytophthora blight of pepper by treatment with *Serratia plymuthica* A21-4(한들영농조합 이문기택).

Table 23. 한들영농조합 고추 포장 생육조사 및 병역제효과

처리	엽록소합량	분지수	경직경	발병율(%)	
				30일째	50일째
A 21-4	67.58	3.78	0.62	0	2.3
무처리	62.13	3.49	0.61	5	13.7



Fig. 38. Suppression of Phytophthora blight of pepper by treatment with *Serratia plymuthica* A21-4 in vinyl house at 50days after transplanting.

7. A21-4균주의 성장촉진 효과

토양미생물 중에는 식물 뿌리의 대사작용이나 양분흡수를 직접, 간접으로 도와서 활력을 증진시키는 유익한 미생물이 많이 있다. 유용한 근권미생물로 식물과 공생하면서 질소를 고정하는 근류균들과 근권에 단순히 부착하거나 또는 자유생활을 하면서 질소를 고정하는 세균들은 일찍부터 유익한 토양미생물로 알려졌고 뿌리의 영양 흡수를 도와 주고 연약한 뿌리 조직을 감싸서 보호하는 균근도 유익한 미생물로 많이 연

구되어 왔다. 최근 들어 국내외를 막론하고 근권에 잘 정착하면서 작물의 생장을 촉진시키거나 토양병을 억제하는 식물생장촉진근권세균(PGPR, plant growth promoting rhizobacteria)에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 이와 관련된 우수한 균주들이 많이 선발되고 있다. 이러한 PGPR세균들은 식물병원균을 억제하는 항균성 물질을 생성하는 것이 많고, 뿌리에 잘 정착하여 뿌리와 주변의 유해한 미생물들의 밀도를 감소시키고 활동을 억제하여 뿌리의 기능을 향상시킨다.

토양중에는 작물의 생장에 큰 피해는 끼치지 않더라도 작물의 생육 전반에 걸쳐 생육을 저하시키는 *Pythium*과 같은 토양병원균들이 많이 존재하고 있다. 본 연구에서는 *Pythium*에 강한 길항력을 가지고 있는 A21-4균주가 작물의 성장촉진 여부를 확인하고 그 원인을 밝히고자 시도하였다.

가. A21-4균주의 성장촉진 효과

A21-4균주의 성장촉진 효과를 검증하기 위하여 주요 채소작물인 오이, 고추, 토마토, 배추를 육묘용 plug에 과종하여 발아한 후 A21-4균주를 처리하였다. 부근 육묘공장에서 많이 사용하는 양액을 대조구로 설치하고 처리된 plug는 일반 육묘장과 같은 방법으로 관리하였다. 처리 7일째부터 공시된 배추, 오이, 토마토 고추 모두에서 A21-4처리구에서 무처리에 비하여 잎색이 짙어지고 생장이 뚜렷하게 촉진되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 39).

나. A21-4균주의 처리 농도별 성장촉진 효과

A21-4균주를 여러 가지 농도로 처리하였을 경우 성장촉진효과를 검증하기 위하여 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml 농도로 고추와 토마토 유묘에 처리하였다. plug는 72공을 사용하였고 상토는 무비토실이(신안그로) 상토를 사용하였고 주당 20ml씩 처리하였다. 처리 후 30일 뒤에 생육을 조사하였다. 10^9 cfu/ml 농도로 접종하였을 경우 고추와 토마토에서 다른 양액처리나 무처리에 비하여 현저하게 생장이 촉진되었고 10^8 cfu/ml 농도에서는 약간의 성장촉진효과를 나타냈고 그보다 낮은 농도에서는 성장촉진효과가 뚜렷하게 나타나지 않았다(Table 24, 25, Fig. 40). 일반 육묘장에서 보면 양액처리를 적어도 1주일에 한번씩 한다. 그렇다면 A21-4균주도 한번처리로 끝낼 것이 아니라 몇번 처리를 한다면 낮은 농도에서도 성장촉진효과가 나타날 수 있을 것으로 기대한다.



Fig. 39. The effect of plant growth promoting by treated with *Serratia plymuthica* A21-4

Table 24. A21-4의 여러 가지 농도 처리에 의한 토마토 유묘의 성장촉진효과

처리	엽수 (개)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	초장 (cm)	절간장 (cm)	경직경 (mm)	지상부 생체중(g)	지하부 생체중(g)	엽록소 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
$\times 10^9$	5.8	4.5	2.5	11.6	5.5	2.0	0.9	0.4	27.0
$\times 10^8$	3.7	2.6	1.3	5.8	2.6	1.2	0.2	0.3	19.2
$\times 10^7$	3.5	2.4	1.3	5.6	2.5	1.2	0.2	0.3	18.3
$\times 10^6$	2.2	1.6	0.8	3.9	1.4	0.9	0.1	0.1	17.3
양액	4.0	3.1	1.7	7.0	3.3	1.4	0.3	0.3	20.4
무처리	2.5	1.9	1.0	4.7	1.9	1.1	0.1	0.2	17.6

Table 25. A21-4의 여러 가지 농도 처리에 의한 토마토 유묘의 성장촉진효과

처 리	엽수(개)	초장(cm)	절간장(cm)	경직경(mm)	지상부 생체중(g)	지하부 생체중(g)
$\times 10^9$	4.7	13.8	5.7	3.1	1.9	0.3
$\times 10^8$	2.3	6.1	1.8	1.5	0.3	0.2
$\times 10^7$	2.5	5.7	1.7	1.6	0.6	0.1
양액	3.0	8.2	3.1	1.9	0.7	0.2
무처리	2.3	6.3	2.0	1.5	0.4	0.2

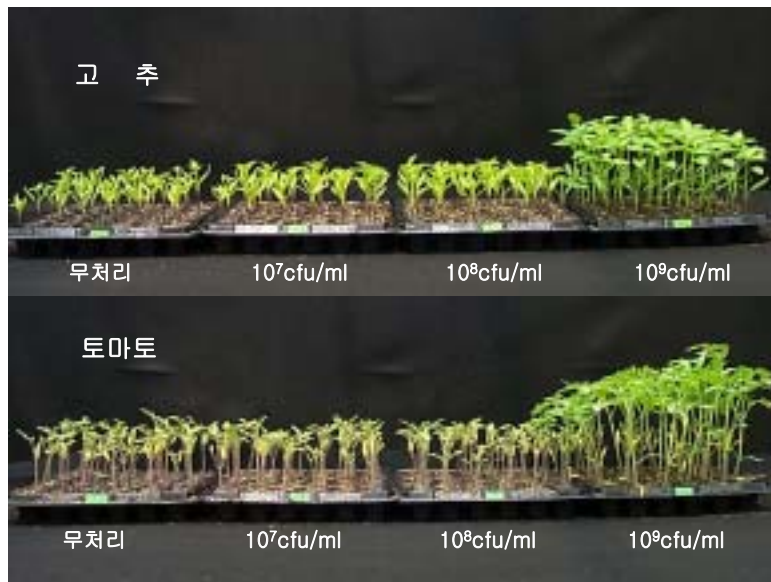


Fig. 40. The effect of plant growth promoting by treated with different population of *Serratia plymuthica* A21-4

다. 처리시기별 A21-4균주의 성장촉진 효과

A21-4균주를 고추 육묘시 어느 시기에 처리를 하면 제일 효과적일지를 알아보기 위하여 고추를 파종하여 발아한 후 7일 간격으로 A21-4를 처리를 하고 파종 40일째에 그 생육을 조사하였다.

고추가 발아하여 본엽이 나오기 전 혹은 본엽이 나오기 시작할 때 즉 발아하여 7일에서 14일 사이 처리구에서 전체적인 생육이 그 뒤에 처리한 처리구보다 우월한 것을 알 수 있다(Table 26, Fig. 41). 처리시기는 발아하여 본엽이 나오기 시작할 때가 제일 효과적이었다.

Table 26. A21-4균주의 처리시기에 따른 고추 유묘의 성장촉진효과

처 리	초장(cm)	엽장(cm)	엽폭(cm)	경직경(cm)	지상부 생체중(g)	지하부 생체중(g)	엽록소 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
7일째	14.90	4.08	2.36	0.25	0.93	0.53	36.68
14일째	14.04	3.68	2.06	0.21	0.65	0.35	36.18
21일째	10.58	3.24	1.86	0.18	0.41	0.10	34.66
28일째	5.78	2.14	1.06	0.13	0.13	0.09	35.42
무처리	6.06	1.82	0.90	0.17	0.14	0.17	22.02



Fig. 41. The effect of pepper growth promoting by treated with *Serratia plymuthica* A21-4 in different stage of pepper

라. 서로 다른 상토에서의 A21-4균주의 성장촉진 효과

서로 다른 상토에서의 A21-4균주의 성장촉진효과를 알아보기 위하여 육묘장에서 많이 사용되는 상토들인 무비토실(신안그로), 유비토실(신안그로), 바이오상토(홍농) 그리고 초록나라상토(보경농산)를 공시하였고 작물은 고추와 토마토를 공시하였다. 그리고 육묘공장에서 많이 사용하는 양액을 대조구로 하였다.

고추와 토마토에서 모두 상토들사이에는 다소 차이는 있었지만 모든 상토에서 A21-4처리(무처리)에 비하여 생장이 뚜렷하게 촉진되었고 양액처리보다도 현저하게 성장촉진된 것을 볼 수 있다(Table 27, 28, Fig. 42).

Table 27. 여러가지 상토에서의 A21-4균주의 고추 유묘에 대한 성장촉진 효과

상토	처 리	엽수 (개)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	초장 (cm)	절간장 (cm)	경직경 (mm)	지상부 생체중(g)	지하부 생체중(g)	엽록소 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
무 비	A21-4	5.8	4.5	2.5	11.6	5.5	2.0	0.9	0.4	27.0
	양 액	4.0	3.1	1.7	7.0	3.3	1.4	0.3	0.3	20.4
	무처리	2.5	1.9	1.0	4.7	1.9	1.1	0.1	0.2	17.6
유 비	A21-4	7.5	5.6	3.2	14.4	5.7	2.4	1.6	0.7	33.1
	양 액	5.6	5.0	2.6	11.0	5.4	2.1	1.0	0.5	31.0
	무처리	6.0	5.3	2.8	13.9	6.3	2.3	1.2	0.6	26.0
바이오	A21-4	6.8	5.7	3.4	16.9	7.5	2.6	1.7	0.5	30.6
	양 액	5.8	5.0	2.7	15.4	7.2	2.3	1.2	0.5	30.5
	무처리	5.7	4.4	2.4	12.9	5.9	2.0	0.9	0.5	24.6
초 록	A21-4	6.8	4.7	2.9	11.2	5.1	2.4	1.2	0.5	32.8
	양 액	5.0	3.9	2.1	10.3	5.0	1.8	0.6	0.5	24.9
	무처리	4.2	3.2	1.8	7.4	3.5	1.5	0.3	0.3	19.6

Table 28. 여러가지 상토에서의 A21-4균주의 토마토 유묘에 대한 성장촉진 효과

상 토	처 리	엽수(개)	초장(cm)	절간장(cm)	경직경(mm)	지상부 생체중(g)	지하부 생체중(g)
무 비	A21-4	4.7	13.8	5.7	3.1	1.9	0.3
	양 액	3.0	8.2	3.1	1.9	0.7	0.2
	무처리	2.3	6.3	2.0	1.5	0.4	0.2
유 비	A21-4	5.0	17.4	6.9	3.7	3.2	0.6
	양 액	4.2	15.8	7.2	3.1	2.0	0.4
	무처리	4.5	16.8	8.3	3.3	2.6	0.5
바이오	A21-4	5.3	15.9	7.0	3.7	3.2	0.6
	양 액	4.5	15.7	7.3	3.2	2.5	0.6
	무처리	4.0	14.5	7.1	3.0	1.8	0.4
초 록	A21-4	4.7	13.5	5.9	3.9	2.4	0.6
	양 액	3.7	10.7	4.3	2.6	1.2	0.4
	무처리	3.2	7.6	2.7	1.8	0.5	0.2

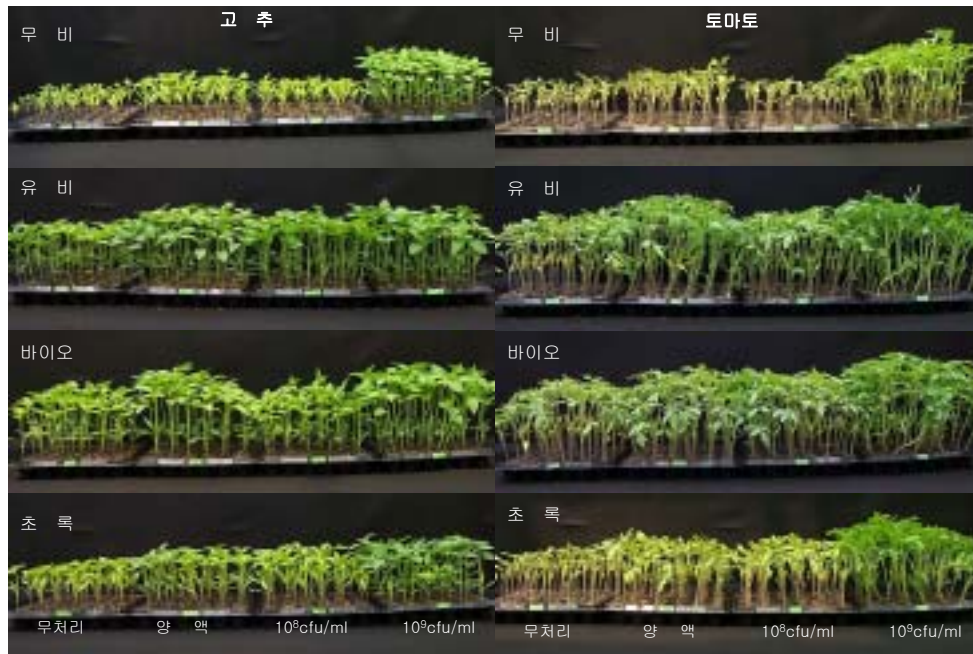


Fig. 42. The effect of pepper and tomato growth promoting by treated with *Serratia plymuthica* A21-4 in different soil media.

제3절 미생물처리에 의한 토마토 풋마름병의 방제

P. fluorescens B16균주는 토마토 풋마름병원균인 *R. solanacearum*를 비롯하여 다른 여러 세균에 대해 길항능력을 가지고 있다 (Table 29). 그리고 식물체에 근권 정착능력이 있고 식물의 성장을 촉진시킨다. B16은 영양분이 많은 배지에서는 항균작용이 없었고 영양분이 적은 최소 배지(minimal media)에서 강한 항균작용을 보여 주었다 (Fig. 43). 이것은 최소배지 조건과 유사한 근권에서 B16이 잘 자랄 수 있고 항균작용을 나타낼 수 있다는 것을 말해 준다. B16균주를 양액재배 시스템에 활용시키기 위하여 rock wool 재배 시스템에 적용 실험을 하였다.

Table 29. Antibacterial activity of *Pseudomonas fluorescens* B16 against several bacterial pathogens and rhizobacteria

Tested bacteria	Antibacterial activity	
Plant pathogenic bacteria	<i>Pseudomonas syringae</i> Cit7	- ^a
	<i>P. s. phasealical</i>	-
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	++
	<i>Erwinia carotovora</i> SR29	-
	<i>E. chrysanthemi</i> EC873	-
Plant root-associated bacteria	<i>P. fluorescens</i> 2-79	+
	<i>P. aureofaciens</i> 30-84	+
	<i>P. fluorescens</i> Cha 94	++
	<i>P. fluorescens</i> P1	+
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> E681	-
	<i>Bacillus cereus</i> UW85	+

^a The degree inhibition was divided by the range of the inhibition zone; -, inactive; +, 5-10 mm; ++, 10-15 mm.



Fig. 43. Antibacterial activities of *P. fluorescens* B16 (wild type), mutant K2-31 (antibiosis enhanced) and K1-36 (antibiosis defected) against *R. solanacearum* in LB media and minimal media (AB).

1. Rock wool 재배시스템에서의 길항균과 병원균의 밀도변화

B16처리 방법을 종자침지처리와 유묘근권침지처리 두가지 방법을 사용하였다. 종자침지처리는 토마토종자를 B16균주의 현탁액 (10^9 cfu/ml)에 1시간 침지시킨 후 파종하였고 유묘의 근권침지처리는 30일된 토마토 유묘를 B16현탁액(10^9 cfu/ml)에 침지시킨 후 rock wool slabs ($10 \times 10 \times 6.5$ cm)에 이식하였다 (Fig. 44). 이식 7일 뒤에 *R. solanacearum* (10^6 cell/ml)를 100ml씩 접종하고 토마토 뿌리와 rock wool에서의 B16과 *R. solanacearum*의 밀도를 조사하였다.

종자처리 방법으로 B16을 처리하였을 경우 토마토 뿌리에서는 처리 후 75일 까지 밀도가 10^5 - 10^6 cfu/g으로 유지되었으나 암면에서는 45일 이후 밀도가 급격히 감소하여 60일 이후에는 B16을 분리할 수가 없었다. 그러나 유묘근권처리 방법으로 처리하였을 때는 뿌리와 암면 모두 처리 후 60일까지는 10^7 cfu/g으로 밀도가 유지되다가 그 이후 약간 감소하는 경향을 보였다. 또한 유묘근권처리가 종자처리보다 근권정착밀도가 10배 높은 밀도로 정착하고 있었다 (Fig. 45). 이 결과를 볼 때 종자처리 방법보다는 유묘근권처리 방법이 B16균주가 근권 정착하는 데 더 효과적이라 할 수 있다.

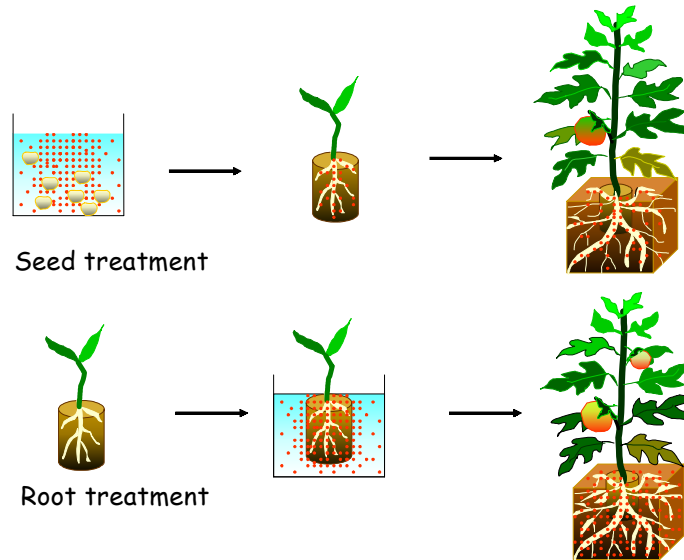


Fig. 44. The method of root treatment of *P. fluorescens* B16

B16균주를 토마토 근권에 침지 처리한 후 *R. solanacearum*을 접종하였을 경우와 접종하지 않았을 경우의 토마토 뿌리와 rock wool에서의 B16균주의 정착밀도를 비교하였을 경우 전체적으로 시간이 지남에 따라 B16의 밀도가 점차적으로 감소하는 경향을 나타냈는데 특히 *R. solanacearum*을 접종하였을 경우 토마토 뿌리에서 B16 밀도는 5×10^6 cfu/g으로 *R. solanacearum*를 접종하지 않았을 때 (6×10^5 cfu/g)보다 10배 높은 밀도로 정착하고 있었다(Fig. 46).

B16을 처리하였을 경우 *R. solanacearum*의 밀도는 뿌리에서 3×10^6 cfu/g에서 1×10^4 cfu/g으로 감소하였고, rock wool에서도 1×10^5 cfu/g에서 1×10^3 cfu/g으로 감소하였다. 이는 B16이 분비하는 길항물질에 의해 *R. solanacearum*의 생장이 억제된 것으로 보여 진다 (Fig. 47).

B16균주를 처리한 후 주변 미생물상을 조사하여 보았는데 B16균주를 처리하였을 경우 주변 세균은 다소 증가되는 경향을 나타냈고 곰팡이는 큰 변화를 주지 않았다 (Table 30).

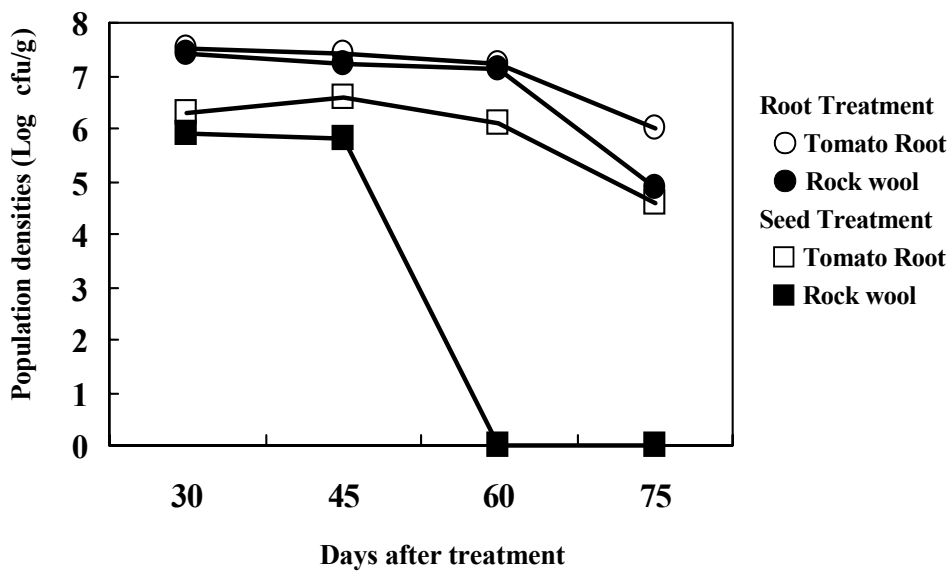


Fig. 45. Population changes of *P. fluorescens* B16 in tomato root and rock wool when the bacteria were introduced by means of seed treatment and root treatment.

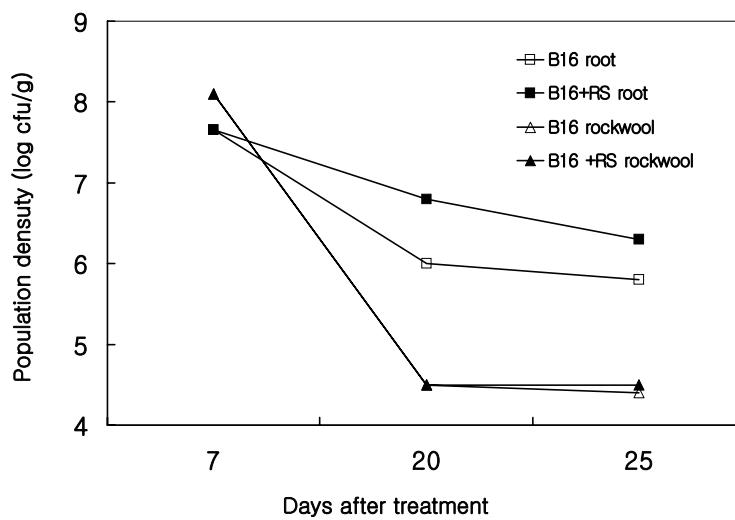


Fig. 46. The changes of population densities of *P. fluorescens* B16 on the root of tomato with or without inoculation *R. solanacearum*.

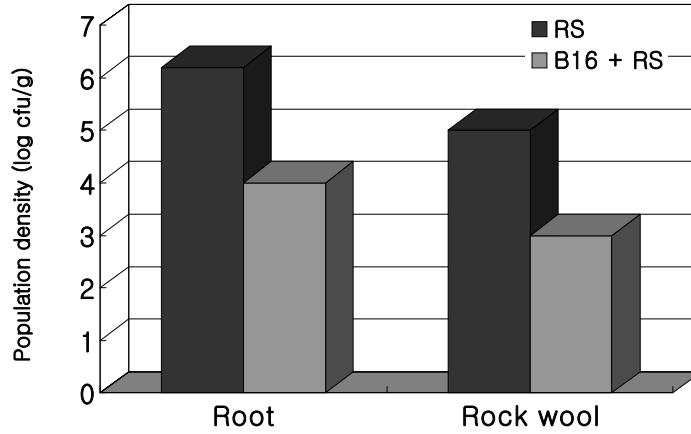


Fig. 47. Population densities of *R. solanacearum* on root of tomato and in rock wool at 45 days of seedling growth with or without inoculation of B16.

Table 30. Number of total bacteria or fungi after disease occurrence on root of tomato in rock wool system

		Treatment		
		B16	K2-13	CK
Bacteria	Only	4.42	3.89	4.20
	plus RS	3.84	3.18	
Fungi	Only	6.91	6.96	6.94
	plus RS	6.62	6.73	

2. B16균주의 처리 방법에 따른 병 억제효과

B16균주의 처리 방법을 다르게 하였을 경우 병 억제효과를 알아보기 위하여 종자처리, 근권침지, rock wool에 관주처리하는 방법을 공시하여 실험을 진행하였다.

B16처리 방법별로 시들음 증상을 조사하였을 때 종자처리방법은 발병율이 55%로 *R. solanacearum*을 효과적으로 방제할 수 없었다. 근권침지처리 방법은 발병율이

34%로 나타났고, 이식용 rock wool에 관주하는 방법은 발병율이 17%로 가장 효과적으로 병을 방제할 수 있었다 (Fig. 48). 발병 조사 후 처리별로 *R. solanacearum*의 밀도를 조사한 결과 병이 발생한 종자처리와 근권침지처리에는 병원균처리와 비슷한 10^6 cfu/g의 밀도를 나타낸데 비해 관주처리는 10^2 cfu/g으로 아주 낮은 밀도로 정착하고 있음을 확인하였다 (Fig. 49).

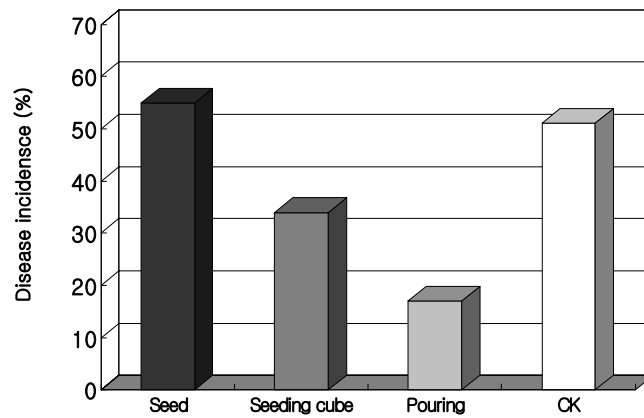


Fig. 48. suppression of tomato bacterial wilt by treatment with *Pseudomonas fluorescens* B16.

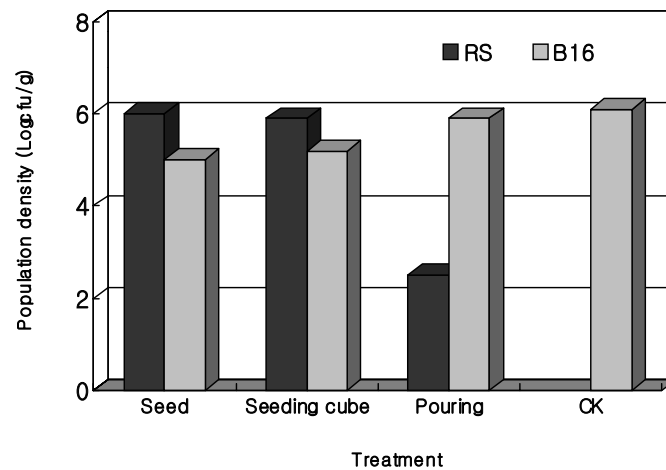


Fig. 49. Population densities of *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas fluorescens* B16.

3. B16균주와 그 변이체의 토마토 시들음병에 대한 억제효과

Tn5로 얻은 B16의 변이체 중 항균작용이 강해진 K2-31과 항균작용이 다소 적어진 K1-36을 선발하여 실험에 공시하였다. 실험은 rock wool 재배 시스템에서 하였고 30일된 토마토유묘를 rock wool에 이식한 후 B16과 그 변이체인 K2-31, K1-36 (10^9 cfu/ml) 현탁액을 rock wool에 관주처리하였다. 처리 15일 뒤에 발병율을 조사하였다.

실험결과 무처리에선 거의 75%이상 발병한데 비해 B16과 항균작용이 강해진 변이체 K2-31처리에선 10%와 8%밖에 발병하지 않았고 항균작용이 약해진 변이체 1-36에선 57%정도의 높은 발병율을 나타냈다 (Fig. 50, Fig. 51).

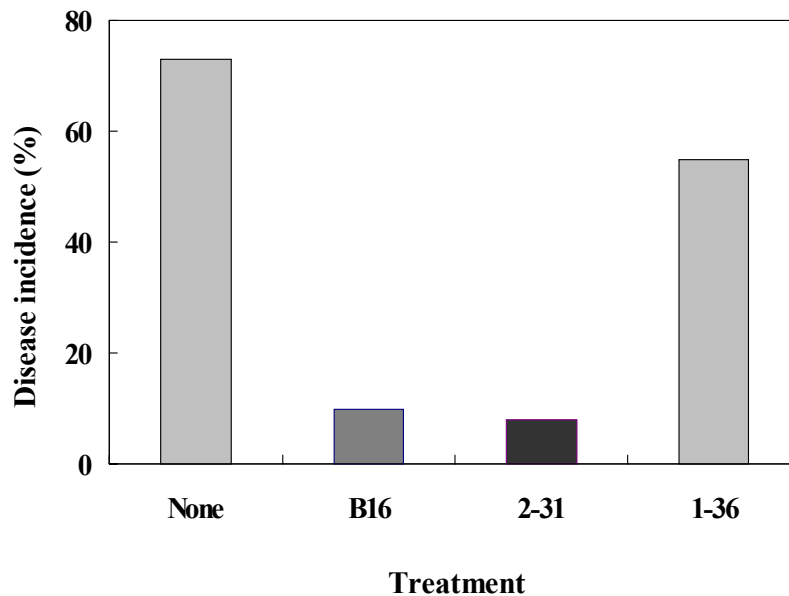


Fig. 50. Suppression of tomato bacterial wilt by biocontrol agent *P. fluorescens* B16, mutant K2-31 (enhanced) and K1-36 (defective).

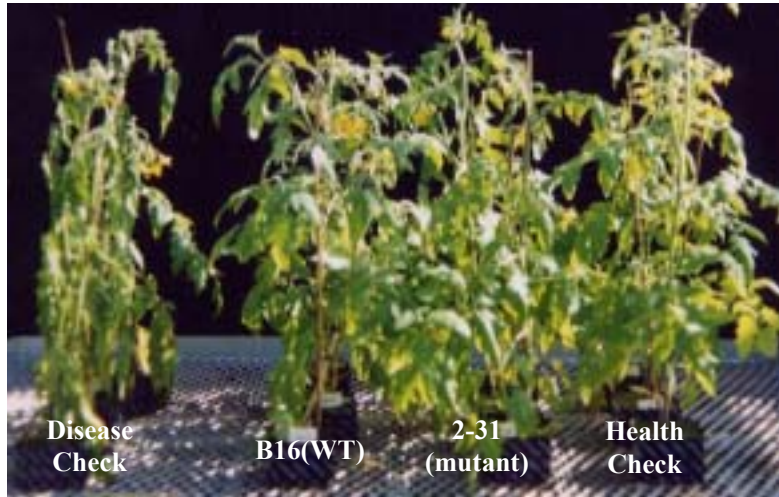


Fig. 51. Suppression of tomato bacterial wilt by *P. fluorescens* B16 and antibiosis enhanced mutant in rockwool hydroponic system.

4. 토마토 풋마름병 방제의 온실 및 포장 검정

가. 온실 검정

B16균주를 AB배지에서 약 48시간 배양시킨 후 0.1M MgSO₄ 용액에 현탁하여 본엽 2-3엽기에 이른 토마토 (품종: 광수)를 약 30분간 침지 한 후 pot에서 3반복 재배하였다. 그리고 일주일 뒤 토마토가 활착된 뒤에 토마토에 병원성이 강한 *R. solanacearum* 1870균주를 각 토마토에 20ml씩 접종하고 풋마름증상을 매일 관찰, 조사하였다.

B16을 처리한 토마토의 경우 무처리에 비해 시들음병이 4-10일 늦게 발병하기 시작하였고 병 진전도 늦었다 (Table 31).

나. 포장 검정

포장으로 정식 하기 전의 토마토 (본엽6-8엽기)를 AB broth에서 약 48시간 배양시킨 B16균주의 배양액에 약 30분간 침지 시킨 후 포장 한 구당 10주씩 4반복 재배하였고 일주일 뒤 풋마름병원균인 *R. solanacearum* 1870균주 현탁액을 토마토 한 주

당 200ml씩 분주한 뒤 3일 간격으로 풋마름증상을 조사하였다. 그리고 병원균 처리 후 일주일 뒤 다시 AB broth에서 약 48시간 배양시킨 B16균주 배양액을 토마토 한 주당 100ml씩 다시 분주하였다.

온실에서의 결과와 마찬가지로 B16을 처리한 토마토가 무처리에 비해 시들음병이 10일 늦게 발병하기 시작하였고 병 진전도 늦었다 (Table 32).

Table 31. Biological control test in greenhouse.

Strain	Days after treatment																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
B16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	50	50	50	100	100	100	100
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	75	75	100
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100
CK	0	0	0	0	0	25	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0	0	0	0	0	0	25	25	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0	0	0	0	0	0	50	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100

※조사한 수치는 이병주 수

Table 32. Biological control test in greenhouse

Strain	Days after treatment						
	1	4	7	11	14	17	20
B16	0	0	3	4	9	9	10
	0	0	3	3	8	10	10
	0	0	4	4	8	8	10
	0	0	4	4	9	10	10
CK	0	8	10	10	10	10	10
	0	6	9	10	10	10	10
	0	1	10	10	10	10	10
	0	2	5	8	9	10	10

※조사한 수치는 이병주 수

제 4절 식물생장촉진 및 토양병 방제 미생물 제제의 기능 향상을 위한 연구

1. *P. fluorescens* B16의 항균성물질 생합성 유전자 분석

1) 생장촉진 관련 유전자 및 항균력 인자 규명을 위한 *P. fluorescens* B16의 변이체 선발

P. fluorescens B16은 전형적인 Gram-negative 균임과 동시에 이미 알려진 Tn5 등 transposable elements를 이용한 변이체 유도는 용이하게 이루어질 수 있었다. 본 실험에서는 변이체 유도를 위해 두 종류의 transposon을 사용하였다. 한 종류는 Ω Km으로 크기가 비교적 작고 자체 내에 replication origin을 가지고 있어 변이체 clone을 확보하기가 용이하다는 큰 장점이 있다. 두 번째는 소위 유전자 발현정도나 발현조건 등을 연구하기 위한 reporter fusion을 만들 수 있는 Tn5lacZ 계통의 transposon을 사용하였다. Ω Km을 지닌 *E. coli* S17-1 pJFF350과 Tn5lacZ 계통의 transposon인 *E. coli* S17-1 pSUP102-Cm::Tn5-B20를 *P. fluorescens* B16과 각각 접합을 시켜 *P. fluorescens* B16에 Ω Km과 Tn5lacZ가 무작위적으로 삽입된 변이체를 각각 1,500여 균주 씩 모두 약 3,000균주를 확보하였다 (Table 33).

2) *P. fluorescens* B16 항균성물질 생산 관련 변이체 선발

Table 33과 같이 확보된 변이체 균주 중, Ω Km이 삽입된 1,500여개의 균주로부터 항균성물질 생산 관련 변이체를 선발하기 위하여 최소영양배지인 AB (NaH₂PO₄ 1.0g, K₂HPO₄ 3.0g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3g, KCl 0.15g, NH₄Cl 1.0g, CaCl₂ · 2H₂O 0.01g, FeSO₄ · 7H₂O 2.5mg/liter, glucose는 따로 살균해서 0.2%되게 사용)배지 상에서 피검 균인 *Ralstonia solanacearum*에 대하여 clear zone을 형성하지 못하는 변이체들을 선발하였다. 살균된 배지를 42℃까지 충분히 식힌 다음 24시간 동안 배양한 *R. solanacearum*균을 넣고 plate에 20ml씩 나누어 담아 굳혔다. B16의 변이체들의 균체

일부를 agar 배지에 치상하여 28℃ 배양기에 24시간 두고 clear zone을 관찰하였다. 선발된 변이체는 모두 12개였으며, 이들 중 K2-31, K2, K3는 wild type인 *P. fluorescens* B16보다 *R. solanacearum* 에 대한 항균성물질을 더 많이 분비하는 변이체였으며, K1-36, K1-15, K14, K18, K22, K4, K5, K6, K7은 항균성물질을 분비하지 못하거나 약하게 분비하는 변이체였다 (Fig. 52).

Table 33. Mutant pool of *P. fluorescens* B16

Transposon	Ω Km	Tn5 <i>lacZ</i>
No. of mutant	1,500	1,500



Fig. 52. Antibacterial activity of *P. fluorescens* B16 and its mutants against *R. solanacearum* on AB agar medium. 1, B16; 2, K4; 3, K5; 4, K6; 5, K7; 6, K14; 7, K18; 8, K1-15; 9, K2-31.

3) *P. fluorescens* B16의 항균성물질 생합성 변이체 유전자 분석

Transposon이 삽입되어 변이가 일어난 유전자가 무엇인지를 확인하기 위하여 이들 12개의 변이체로 부터 변이가 일어난 부위를 cloning하였다. 변이체로 부터 standard 방법 (Sambrook et al.) chromosomal DNA를 추출하였다. Chromosomal DNA를 *EcoRI* 제한효소로 처리한 후 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation하였고 *E.coli* DH5a에 transformation하여 kanamycin이 들어있는 LB 배지에 살아나는 colony를 분리하였다. *E.coli*로 부터 plasmid DNA를 추출하여 *EcoRI* 제한효소에 의해 agarose gel상에서 single band로 나타나는 plasmid를 선별하였다. Genetic mapping을 통해 변이가 일어난 B16의 chromosomal DNA를 pBluescript II SK(+) cloning vector에 cloning하였다. 염기서열 분석을 위한 PCR 반응은 standard 방법에 따랐고 사용한 primer는 cloning vector의 Universe와 Reverse primer를 사용하였다. ΩKm이 삽입된 부위의 유전정보를 알기 위해 HR primer (5'-TGCTTCAATCAATCACCGG-3')를 사용하여 sequencing하였다. 이렇게 해서 얻은 유전자정보는 BLAST program (National Center for Biotechnology Institute), MEGALIGN software (DNASTAR), GENETYX-WIN software (Software Development Inc.)으로 분석하였다. DNA sequencer를 이용한 BLAST Search 분석결과 K1-15는 *P. syringae*의 cysteine synthase B (90% identity, 94% positives), K4와 K7는 *Aeropyrum pernix*의 cystathionine gamma lyase (36% identity, 54% positives), K5, K6, K18은 *Thermotoga maritima*의 pyruvate formate-lyase activating enzyme (39% identity, 60% positives), K14은 unknown protein, K2-31은 *P. aeruginosa*의 nitrate/nitrite regulatory protein (36% identity, 59% positive)과 각각 유사성을 보였다 (Table 34).

4) *P. fluorescens* B16의 항균 spectrum

B16과 항균활성이 강해진 변이체 K2-31, 항균활성이 없어진 K1-15를 대상으로 몇 가지 식물 병원세균과 근권세균에 대한 항균 spectrum을 Table 3에 제시하였다. 항균작용 검정 방법은 위에서 설명한 검정방법을 따랐다. *Erwinia carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. coli*, *Paenibacillus polymyxa*, *P. aeruginosa*, *P. s. phaseolicola*등에는 항균활성을 나타내지 않았고 *Agrobacterium tumefaciens*, *R. solanacearum*, *P.*

fluorescens, *P. putida*등에는 강한 항균활성을 나타내었다. 항균 spectrum 결과, B16은 근권세균에 대한 강한 항균작용을 보였다. B16의 항균물질 분비는 근권에서의 경쟁에서 보다 나은 위치를 확보하기 위한 중요한 하나의 무기로 작용하고 있는 것으로 생각되어 진다 (Table 35).

5) *P. fluorescens* B16의 genomic library 제작

각각의 변이체에서 변이가 일어난 부위를 지니는 wild type clone을 얻기 위하여 genomic library를 제작하였다 (Fig. 53). Alkaline lysis 방법 (Sambrook et al.)에 의해 *P. fluorescens* B16으로부터 chromosomal DNA를 추출하였다. 제한효소 *Sau3AI*으로 partial digestion하여 22-28 kb 크기의 DNA 절편을 10-40%의 sucrose gradient에 의한 centrifugation하여 insert DNA를 얻었다. Vector는 *BamHI*으로 절단하여 calf intestinal alkaline phosphatase를 처리하여 dephosphorylation하여 준비하였다. Insert와 vector DNA 적당한 양으로 혼합하여 T4 DNA ligase로 접합하였다. Gaigapack packaging kit를 사용하여 *E. coli* HB101에 transformation하여 tetracycline을 넣은 LB 배지에서 키워 자란 *E. coli*로 *P. fluorescens* B16의 genomic library 제작하였다. 20개 colony를 임의로 선택하여 plasmid DNA를 추출하였고 *EcoRI*을 처리하여 얼마나 다양한 B16의 chromosomal DNA 절편으로 genomic library가 만들어 졌는가를 확인하였고 90% 이상 서로 다른 clone임을 알 수 있었다.

6) *P. fluorescens* B16의 genomic library로부터 wild type clone의 선발

Mutant K5의 변이가 일어난 부위의 3.2 kb의 DNA를 probe로 하여 genomic library로부터 colony hybridization 방법으로 wild type clone인 pB03와 pJWB1를 각각 얻을 수 있었다 (Fig. 54). *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*등의 제한효소로 physical map을 작성한 결과 pB03와 pJWB1은 17 kb 정도 overlap되어 있었다. Mutant K1-15의 변이가 일어난 부위의 DNA를 probe로 하여 genomic library로부터 wild type clone pB05를 얻었다. pB05는 pB03와 pJWB1과 제한효소 physical map에서 공통된 부분은 없었다 (Fig. 55). 결국, 세가지 종류의 cosmid clone에 항균성물질 생합성과 관련된 유전자가 배열되어 있고 chromosome상에서 서로 떨어져 존재하고 있음을 알 수 있었다.

Table 34. Mutated genes by the transposon insertions in *P. fluorescens* B16

Mutants	Gene	Similarity ^a to:
K2	<i>ntrB</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> (48%)
K3	hemolysin-coregulated protein	<i>Vibrio cholerae</i> (20%)
K4	cystathionine gamma-synthase/beta-lyase	<i>Aeropyrum pernix</i> (36%)
K5	pyruvate-formate-lyase activating enzyme	<i>Thermotoga maritime</i> (39%)
K6	pyruvate-formate-lyase activating enzyme	<i>Thermotoga maritime</i> (39%)
K7	cystathionine gamma-synthase/beta-lyase	<i>Aeropyrum pernix</i> (36%)
K14	ferrous iron transport protein B	unknown protein
K18	pyruvate-formate-lyase activating enzyme	<i>Thermotoga maritime</i> (39%)
K1-15	cysteine synthase B	<i>P. syringae</i> (90%)
K2-31	nitrate/nitrite regulatory protein, <i>narL</i>	<i>P. aeruginosa</i> (36%)
K1-36	putative aminotransferase	<i>Streptomyces coelicolor</i> (35%)

^a Identity was determined based upon predicted amino acid sequence.

7) pB03, pJWB1, pB05를 이용한 항균성물질 생산 변이체에 대한 complementation

Helper plasmid인 pRK2013을 사용하여 triparental mating 방법으로 pB03, pJWB1, pB05를 12개의 변이체에 각각 transformation하였다. pB03를 transformation한 결과, K1-36, K14, K18, K4, K5, K6, K7의 경우는 모두 *P. fluorescens* B16의 수준으로 항생물질 생성이 회복되었다. K1-15의 경우는 회복되지 못하였다. K1-15의 mutation이 일어난 부위를 probe로 해서 얻은 pB05는 K1-15의 항균활성을 wild type 수준으로 회복하였다. 그리고, K2-31, K2, K3와 같이 항생물질 생성이 더 증가했던 경우는 pB03, pJWB1, pB05에 의해 wild type의 수준으로 줄어들지는 않았다 (Table 36). 결국, 항균성물질 생합성 유전자들과 또 다른 위치에 항균물질 생성과 관련된 유전자들이 존재하며 이들의 변이가 일

어난 부위의 유전자정보를 연결하여 생각해 볼 때 질소영양원에 대한 반응이 관여하고 있음을 짐작할 수 있었다. K1-15의 항균작용을 회복시킨 pB05는 항균성물질 생합성 직접적으로 관여하지 않고 항균성물질의 생합성 과정의 upstream에 존재하는 대사과정에 관여하는 유전자를 포함하는 clone으로 생각되어진다. 특히, K1-15의 변이가 일어난 부위의 유전자가 cyteine synthase B 와 homology를 갖는 것과 항균작용이 더 강해진 변이체 K2-31의 변이가 일어난 부위의 유전자가 nitrate/nitrite regulator protein과 homology를 갖는 것은 이러한 추측을 더 강하게 암시해 주었다.

Table 35. Antibiotic spectrum of the antibacterial substance produced by *P. fluorescens* B16 and its mutants

Strains	B16	K2-31	K1-15
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	++ ^a	+++	-
<i>Erwinia carotovora</i>	-	-	-
<i>E. chrysanthemi</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>P. aureofaciens</i> 30-84	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> 2-79	++	+++	-
<i>P. fluorescens</i> Cha94	++	+++	-
<i>P. fluorescens</i> 1855.344	-	-	-
<i>P. putida</i> PI	+	++	-
<i>P. syringae</i> Cit7	+	++	-
<i>P. s. phaseolicola</i>	-	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	++	+++	-

^a The degree inhibition was divided by the range of the inhibition zone. +++, strong (>15mm); ++, moderate (15-11mm); +, weak (10-5mm); -, inactive (<5mm).

8) Heterologous host인 *P. fluorescens* 1855.344에서의 항균작용

Triparental mating 방법으로 pB03, pB05, pJWB1을 항균물질을 생성하지 못하는 *P. fluorescens* 1855.344에 transformation하여 피검균인 *R. solanaceum*에 대한 항균작용을 확인하였다 (Fig. 56). pB03와 pB05를 각각 가진 *P. fluorescens* 1855.344은 항균작용을 보이지 않았고 pJWB1을 가진 *P. fluorescens* 1855.344는 항균작용을 나타내었다. 이로써 항균물질 생합성에 관련된 유전자는 pJWB1에 모두 배열되어 있으며 pB03에 일부 포함되어 있는 것을 확인하였다.

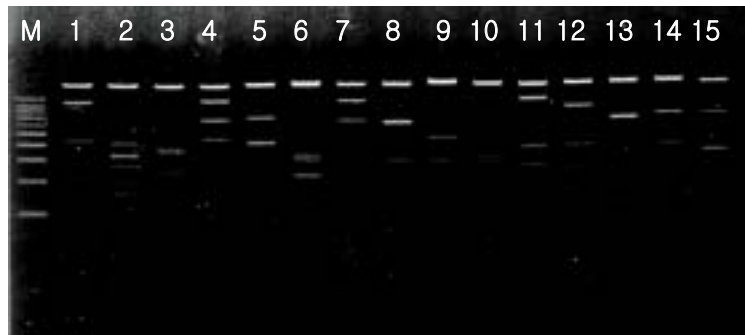


Fig. 53. Genomic library clones of *P. fluorescens* B16. M, kb marker; 1 to 15, *Eco*RI digested cosmid clones.

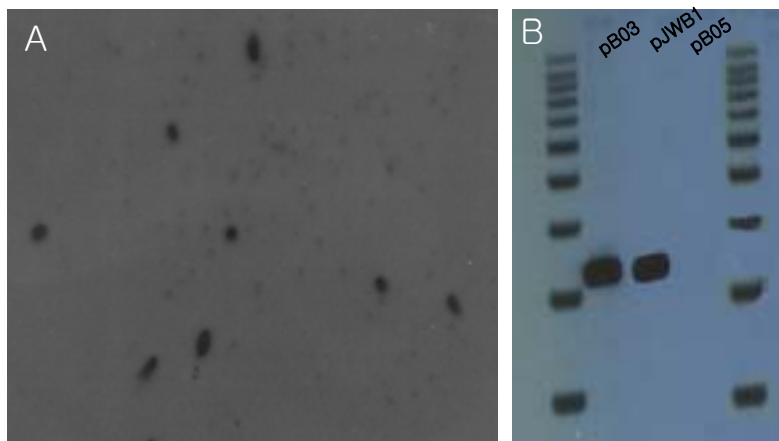


Fig. 54. Wild type cosmid clones of *P. fluorescens* B16. Colony hybridization (A), southern blotting (B). Probe DNA : 3.2 kb *Hind*III fragment of pOK5 (7.0 kb self-ligated *Eco*RI clone from K5).

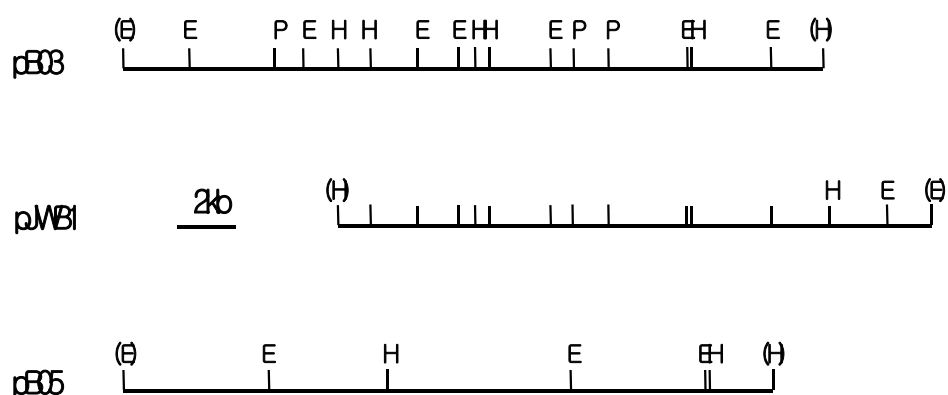


Fig. 55. Restriction enzyme maps of cosmid clones of *P. fluorescens* B16. Enzyme abbreviations: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I

Table 36. Complementation of the antibacterial activity-deficient mutants by cosmid clones

Mutants	Cosmid clones		
	pB03	pJWB1	pB05
K4	+++ ^a	++	-
K5	++	++	-
K6	++	++	-
K7	++	++	-
K14	++	++	-
K18	++	++	-
K1-15	-	-	++
K1-36	++	++	-
K2-31	+++	+++	-

^a The degree inhibition was divided by the range of the inhibition zone. +++, strong (>15mm); ++, moderate (15-11mm); +, weak (10-5mm); -, inactive (<5mm).

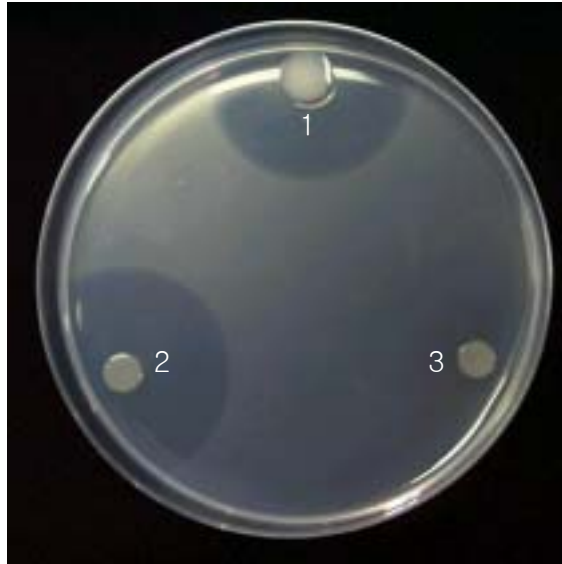


Fig. 56. Antibacterial activity of heterologous host *P. fluorescens* 1855.344 containing wild type cosmid clone. 1, *P. fluorescens* B16; 2, *P. fluorescens* 1855.344(pJWB1); 3, *P. fluorescens* 1855.344(pB03).

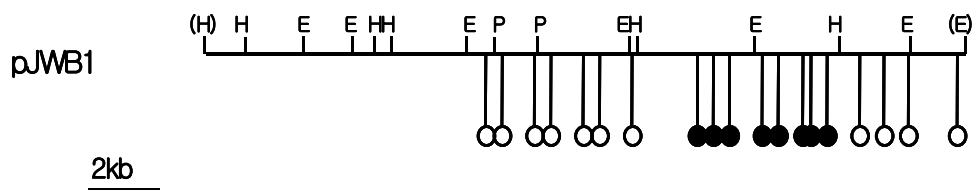


Fig. 57. Physical maps of cosmid clone pJWB1, the DNA region from *P. fluorescens* B16 encoding genes involved in the production of antibacterial compound. Insertions of Tn3-*gus* that interfered with antibacterial compound production are marked on the map of pJWB1 as filled lollipop. Enzyme abbreviations: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I.

9) Tn3-gus mutagenesis와 marker-exchange를 통한 항균성물질생산 변이체 선발

Cosmid clone pJWB1으로 Tn3-gus에 의한 plasmid mutagenesis를 실시하였다. pJWB1을 transposon donor strain인 *E. coli* S17-1(pHoHo1, pSShe)에 transformation하였다. 이렇게 해서 얻은 transconjugant를 *E. coli* C2110와 mating하였고 kanamycin, nalidixic acid, tetracycline을 넣은 LB배지에 도말하였다. Tn3-gus가 삽입된 plasmid를 alkaline lysis 방법으로 추출하였고 *E. coli* DH5a에 transformation하였다. Tn3-gus가 삽입된 부위와 transcription 방향을 알기 위해 제한효소로 처리하여 mapping하고 Tn3-gus가 삽입된 부위를 direct sequencing하였다. Direct sequencing은 Tn3gus primer(5'-CCGGTCATCTGAGACCATTAAG-3')를 사용하여 분석하였다. 변이 plasmid를 helper plasmid를 이용한 triparental mating 방법으로 B16에 transformation한 후 tetracycline과 kanamycin에서 자라는 colony를 *E. coli* 2174(pPH1JI)와 mating하였다. Mating한 mixture를 gentamycin, kanamycin, rifampicin이 들어간 LB 배지에 도말하여 kanamycin에 자라고 tetracycline에 자라지 못하는 colony를 분리하였고 southern hybridization으로 marker exchange가 제대로 이루어 졌는지 확인하였다. Marker exchange가 제대로 이루어진 mutant의 항균활성을 조사하였다 (Fig. 57). 분석 결과 pB03와 pJWB1과 overlap되는 약 5 kb 크기의 DNA fragment와 overlap 되지 않는 약 1 kb 크기의 DNA fragment에 항균활성에 중요한 부분인 것을 알 수 있었다.

10) 항균성물질 생합성 유전자 염기서열 분석

Figure 5에서 확인된 항균성 물질 생합성과 관련이 있다고 판단되는 유전자 부위를 포함하여 주변 부분의 염기서열을 sequencing하였다. 먼저, pJWB1으로 부터 *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* fragment의 subclone을 각각 7, 5, 3개 확보하였고 pBluescript II SK(+)에 cloning하였다. 해당하는 primer를 제작하여 염기서열을 분석하였다. pJWB1의 유전자중 생합성 유전자를 포함하는 15kb 크기의 염기를 해독하였다. pJWB1의 유전자중 생합성과 관련이 있는 15kb 염기를 NCBI Blast search와 유전자 분석 program을 통해 11개의 유전자를 확인하였고 Tn3-gus mutagenesis를 통해 각각의 유전자에 Tn3-gus를 삽입한 mutant clone을 얻어 wild type 인 B16에 marker exchange하여 B16의 항생물질의 생합성과 직접적으

로 관련이 있는 4개 유전자를 알아냈다. 이들 유전자를 각각 ORF1, ORF2, ORF3, ORF4로 명명하였다. ORF1은 Cystathionine gamma lyase, ORF2는 pyruvate formate-lyase activating enzyme, ORF4는 transcriptional regulator와 각각 36%, 39%, 36%의 similarity를 보였고 ORF3은 unknown protein으로 확인되었다 (Table 37). 그리고 Tn3-*gus*가 삽입된 부위를 direct sequencing 방법과 southern hybridization 방법으로 확인하였다 (Fig. 58). ORF1, ORF2, ORF3은 오른쪽에서 왼쪽으로 transcription이 일어나면 ORF4는 왼쪽에서 오른쪽으로 transcription이 진행되는 것으로 확인되었다. *orf1*과 *orf2*는 4개의 base로 overlap되어 있고 *orf2*와 *orf3*은 200개의 염기 그리고 *orf3*과 *orf4*는 100개의 염기로 각각 떨어져 있었다. ORF1, ORF2, ORF3, ORF4는 각각 381, 494, 239, 143개의 아미노산을 coding하고 있었다.

Table 37. Characteristics of antibacterial compound biosynthetic genes and products

Gene	Base range ^a	Size(bp)	%GC	Amino acids(<i>n</i>)	Similarity ^b to:
<i>orf1</i>	176-1321	1146	48.79	381	cystathionine gamma lyase from <i>Aeropyrum pernix</i> (36%) ^c
<i>orf2</i>	1318-2802	1485	47.75	494	pyruvate formate-lyase activating enzyme from <i>Thermotoga maritime</i> (39%)
<i>orf3</i>	2903-3622	720	43.40	239	unknown
<i>orf4</i>	3823-4254	432	49.47	143	transcriptional regulator from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (36%)

^a Nucleotide range within the 4.3 kb *SalI*-*NarI* fragment.

^b Gene product in the database with the highest amino acid similarity.

^c Identity was determined based upon predicted amino sequence.

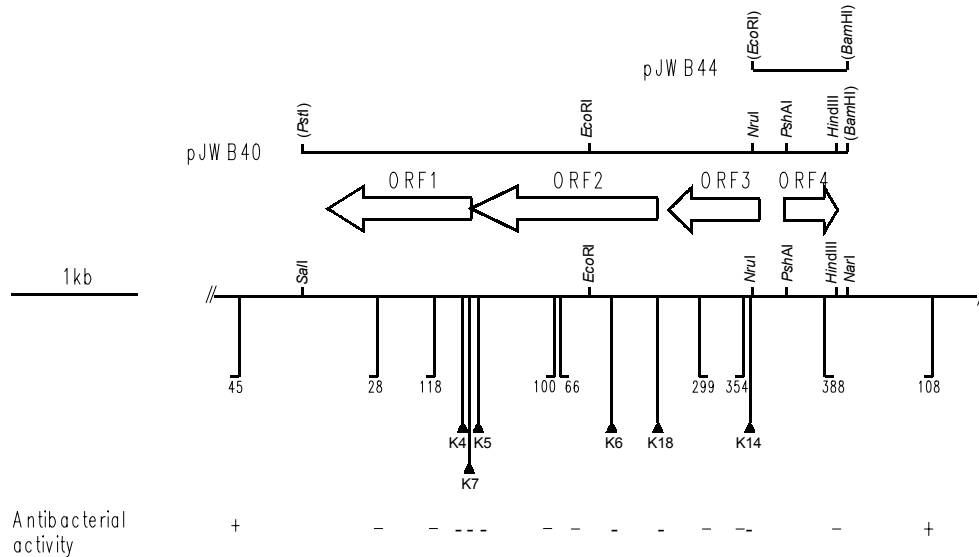


Fig. 58. Genetic organization and restriction map of antibacterial compound biosynthetic gene locus of *P. fluorescens* B16. Open arrows indicate the positions and orientations of antibacterial compound biosynthetic genes. Vertical bars in the map indicate the positions and orientations of the Tn3-gus insertions, and the antibacterial activities of the mutants are represented below the restriction map. Vertical bars with arrowhead indicate the positions of Ω Km insertions.

11) 항균성물질 생합성 유전자를 모두 포함하는 DNA fragment subcloning.

pJWB1으로 부터 *Pst*I fragment deletion에 의해 subclone pJWB4를 얻었다. ORF1부터 ORF4까지 항균성 물질 생합성에 직접적으로 관련이 있는 부분을 cloning 하기 위해 pJWB4로부터 *Sal*I-*Nar*I DNA fragment를 cloning하여 pJWB40를 얻었다. ORF4가 없는 clone을 얻기 위해 *Psh*AI으로 pJWB40로부터 DNA fragment를 잘라 내어 pJWB42 clone을 얻었다. 그리고 ORF4만 독립적으로 존재하는 pJWB44 subclone을 얻었다. 이렇게 얻은 subclone을 heterologous host인 *P. fluorescens* 1855.344에 transformation하여 항균작용을 확인하였다. pJWB1, pJWB4, pJWB40 clone을 가진 *P. fluorescens* 1855.344 strain에서 항균작용을 보였고 결국, subclone

pJWB40 내에 B16의 항균성물질 생합성 유전자가 모두 포함된 것으로 판단되었고 크기는 4.3 kb인 것을 확인하였다 (Fig. 59).

12) β -Glucuronidase activity 측정

B16에 Tn3-gus가 fusion된 변이체를 대상으로 4-MUG(4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide)를 기질로 β -glucuronidase activity를 측정하였다. 항균작용이 가장 강하게 나타났던 AB 최소영양배지에 B16을 16시간, 24시간, 56시간, 120시간대로 나누어 28°C shaking incubator에서 배양하여 cell을 회수하여 실험에 사용하였다. 세균 수는 serial dilution하여 직접 계수하여 확인하였다. 1 ml의 bacterial culture를 0.5 ml의 Gus extraction buffer (50 mM NaH₂PO₄ [pH 7.0], 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM β -Mercaptoethanol)에 현탁한 후 sonicator를 사용하여 cell을 깨고 centrifuge로 cell debris를 없앤 상등액을 얻었다. Enzyme 반응은 37°C에서 수행하였고 1 mM 4-MUG가 들어 있는 gus assay buffer로 하였다. 그 결과 β -glucuronidase activity가 bacterial growth phase에 의해 영향을 받는데 16시간 24시간 배양한 것에는 β -glucuronidase activity가 거의 나타나지 않았고 56시간부터 120시간대로 진행되면서 특이적으로 bacterial growth가 stationary phase에 진입 후부터 β -glucuronidase activity가 점차적으로 증가함을 알 수 있었다. 이러한 점들을 미루어 볼 때 *P. fluorescens* B16이 항균성물질을 stationary phase이 후부터 점차적으로 생성하기 시작한다는 것을 알 수 있었다 (Table 38).

13) *P. fluorescens* B16과 항균물질 생성 mutant의 근권정착능력

Wild type B16과 항균성물질을 생성하지 못하는 Tn3-gus 변이체 JWB118, JWB100, JWB354, JWB388의 근권정착 능력을 검정하기 위하여 이중여과지법(DLF)을 이용하였다. 각 균주당 5개의 오이종자에 세균을 접종하여 이중 여과지가 깔린 Petri plate에 치상하여 4일 후 오이뿌리 끝에 정착한 세균의 밀도를 조사하였다. 항균성물질을 생성하지 못하는 변이체의 근권정착능력을 wild type과 비교할 때 크게 차이가 없었다. 항균성물질 생성이 근권정착능력에는 아무런 영향을 미치지 못하는 것으로 판단되었다 (Table 39).

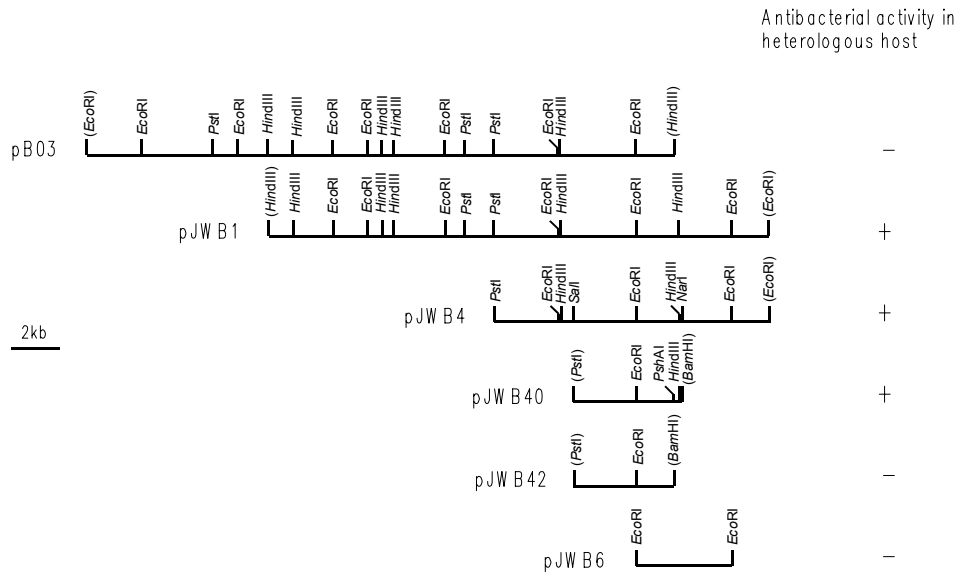


Fig. 59. Restriction enzyme maps of cosmids and subclones that show antibacterial activity in heterologous host *P. fluorescens* 1855.344. Enzymes site of pLAFR3 vector marked in parenthesis.

14) pJWB1의 subclone을 이용한 변이체 complementation

항균성물질 생합성 유전자 *orf1/orf2/orf3/orf4*에 각각 *Tn3-gus*가 삽입된 변이체에 pJWB40, pJWB42, pJWB44를 각각 transformation하였다. *orf1/orf2/orf3/orf4*를 모두 포함하는 pJWB40은 *Tn3-gus* 변이체 JWB118, JWB100, JWB66, JWB354, JWB299, JWB388 모두 항균작용을 회복시켰고 *orf4*가 없는 pJWB42는 JWB118, JWB100, JWB66, JWB354, JWB299의 항균작용은 회복시켰지만 *orf4*에 fusion된 JWB388 변이체의 항균작용을 회복시키지 못하였다. 반면, *orf4*를 가진 pJWB44는 JWB388의 항균작용을 회복시켰다 (Fig. 60).

15) 고추 시들음병에 대한 병 방제 효과 검정

P. fluorescens B16의 항균물질 생성과 세균성 시들음병에 대한 생물적방제 효과

를 알아보기 위해 4-5엽기의 고추 (두배나, 중앙종묘) 유묘를 wild type strain B16, Ω Km 변이체인 K5, K5(pB03:항균작용을 회복시킨 cosmid clone), K5(pLAFR3:cloning vector)의 균현탁액에 침지하는 방법으로 근권 처리하였다. 직경 11cm의 pot에 이식하고 유리온실에 3일간 키운 후 시들음병을 일으키는 *R. solanacearum*의 균 현탁액(10^8 cfu/ml)을 10ml 씩 관주하였다. 온실에 두고 관리하면서 10일 이후 부터 병 발생율을 조사하였다. B16과 K5(pB03)를 처리한 처리구에서는 병발생이 확인되지 않았고 항균 작용이 상실된 변이체 K5와 K5(pLAFR3)처리구에서 처리 10일 이후 병 발생이 확인되었다 (Fig. 61). 이로써 B16의 항균성물질 생성은 세균성 시들음병의 병 억제효과에 가장 중요한 요인임을 확인할 수 있었다.

Table 38. β -Glucuronidase activities of *orf1/orf2/orf3/orf4::Tn3-gus* fusions in *P. fluorescens* B16 after growth in AB minimal medium for 120h

Strains	Tn3-gus insertion site	β -Glucuronidase activity (10^{-8} U/CFU) ^a
B16		4.25
JWB118	<i>orf1</i>	31.25
JWB100	<i>orf2</i>	144.33
JWB66	<i>orf2</i>	3.81
JWB354	<i>orf3</i>	662.24
JWB299	<i>orf3</i>	3.66
JWB388	<i>orf4</i>	20.56

^a One unit of β -glucuronidase was defined as one nmole of 4-methylumbelliferon released per bacterium per minute.

Table 39. Root-colonizing population of *P. fluorescens* B16 and antibacterial activity-defective mutants in cucumber

Strains	Root-colonizing population on root (cfu/1-cm segment of root tip) ^a
B16	2.6×10^3
K2-31	2.0×10^3
K5	5.0×10^3
JWB118	2.0×10^3
JWB100	4.0×10^3
JWB354	2.6×10^3
JWB388	3.7×10^3

^a The colonizing populations on the last 1-cm of cucumber root segments. The cucumber was grown using DLF methods for 4 days.



Fig. 60. Antibacterial activities of *P. fluorescens* B16 and Tn3-*gus* inserted mutants. 1, *P. fluorescens* B16; 2, JWB118; 3, JWB100; 4, JWB354; 5, JWB388; 6, JWB118(pJWB42); 7, JWB100(pJWB42); 8, JWB354(pJWB42); 9, JWB388(pJWB42); 10, JWB118(pJWB44); 11, JWB100(pJWB44); 12, JWB354(pJWB44); 13, JWB388(pJWB44); 14, JWB118(pLAFR3); 15, JWB100(pLAFR3); 16, JWB354(pLAFR3); 17, JWB388(pLAFR3).



Fig. 61. Suppression of bacterial wilt by the treatment with *P. fluorescens* B16. 1, Healthy control; 2, disease control; 3, *P. fluorescens* B16 treated plant; 4, antibacterial activity-defective mutant K5 treated plant; 5, mutant K5 harboring cosmid clone, pB03, treated plant; 6, mutant K5 harboring pLAFR3 treated plant. The photograph was taken 10 days after treatment.

2. 작물 생장촉진 변이체 선발

가. 보리에서 작물 생장 촉진 관련 변이체 선발

위에서 확보된 *P. fluorescens* B16의 변이체 3,000균주로 작물 생장 촉진 변이체 선발 시험을 1999년에 실시하였다. 3,000개의 변이체를 각각 배양 후, 각 균주당 약 100립의 보리 종자(남향)에 종자 처리하였으며, 처리된 종자를 경상남도 진주시 소재 경남 농업과학기술센터 관내 시험 포장에 일정간격으로 파종하였다. 종자를 파종한지 약 4개월이 지난 후 생육상태를 조사하였다. 보리 싹이 자란 정도가 대조구인 *P. fluorescens* B16 wild type을 처리한 경우보다 생육이 부진하거나 또는 생육이 왕성하게 보이는 처리구 들을 선발하였다. 이와 같이 일차적으로 선발된 균주는 모두 151개 였으며, 이들 균주에 대하여 실험실 내에서 근권정착능력 등을 조사해본 결과 wild type인 *P. fluorescens* B16과 큰 차이를 나타내는 변이체를 선발할 수 없었다.

나. 작물 성장 촉진 관련 변이체 선발을 위한 시스템

보리에서 1차로 선발된 작물성장촉진 변이체 151개를 토마토를 이용하여 온실에서 검정한 결과 wild type과 비교해 큰 차이를 확인 할 수 없었다. 결국, 대규모 포장에서는 한 번에 많은 수의 변이체를 screening 할 수 있는 장점이 있었지만 여러 가지 환경요인에 많은 영향을 받기 때문에 많은 애로 사항이 있었다. 특히, 이듬해 2000년 남부 지방의 봄 기온 이상 기온 현상으로 평년 보다 2-3도 높아져 보리생육이 전반적으로 빨라서 제대로 된 검정을 할 수 없었던 것으로 판단되었다. 이러한 환경 문제를 해결하기 위해 우선 작물 성장 촉진 관련 변이체 선발을 위한 시스템 개발이 불가피하게 되었고 본 연구를 지속하기 위해 다음과 같은 변이체 선발 기준을 개발하였다. 상업적으로 개발되어 양액재배 농가에 판매되고 있는 rockwool slab을 사용하였다. 먼저 seeding cube (1.5×3cm)에 토마토 종자를 파종하여 15일 동안 길러서 토마토 유묘를 확보하였다. 근권에 처리할 균주를 minimal medium에 배양 후 10^8 cfu/ml 농도로 현탁하고 15일 동안 기른 토마토 유묘를 침지하여 균처리하였다. Seeding cube를 rockwool slab (10×10×6cm)에 이식하고 20일 동안 온실에 두면서 토마토 생장을 조사하였다 (Fig. 62).

다. 작물 성장촉진 관련 변이체 선발

이미 초기 연구결과에서 얻어진 3,000여개의 변이체 균주를 본 연구실에서 개발한 식물성장촉진 변이체 선발 방법으로 screening 하였다. AB 최소영양배지에서 36시간 배양하여 agar plate로부터 균체를 회수하였고 살균수에 10^8 cfu/ml의 농도로 현탁하여 균체를 준비하였다. Rockwool seeding cube로 15일 동안 기른 토마토 유묘 (광수, 중앙종묘)를 균 현탁액에 30분간 침종하여 근권처리하였다. Seeding cube를 rockwool slab에 이식하고 30일간 온실에 두면서 토마토의 생육 상태를 조사하였다. 3,000여개 변이체중 1차적으로 선발된 식물성장촉진 변이체 190균주를 5차례 반복 및 재현실험을 걸쳐 최종 2균주 (708, 818)를 확보하였다 (Table 40). 708과 818은 B16에 의한 토마토 성장촉진 효과와 비교해서 통계적으로 유의차를 인정할 수 있었고 무처리와 비슷한 생육상태를 보이면서 wild type에서 보인 성장촉진 효과를 기대할 수 없었다 (Fig. 63). 또한 708과 818의 근권정착 밀도도 B16과 차이가 없었다 (Fig. 64).

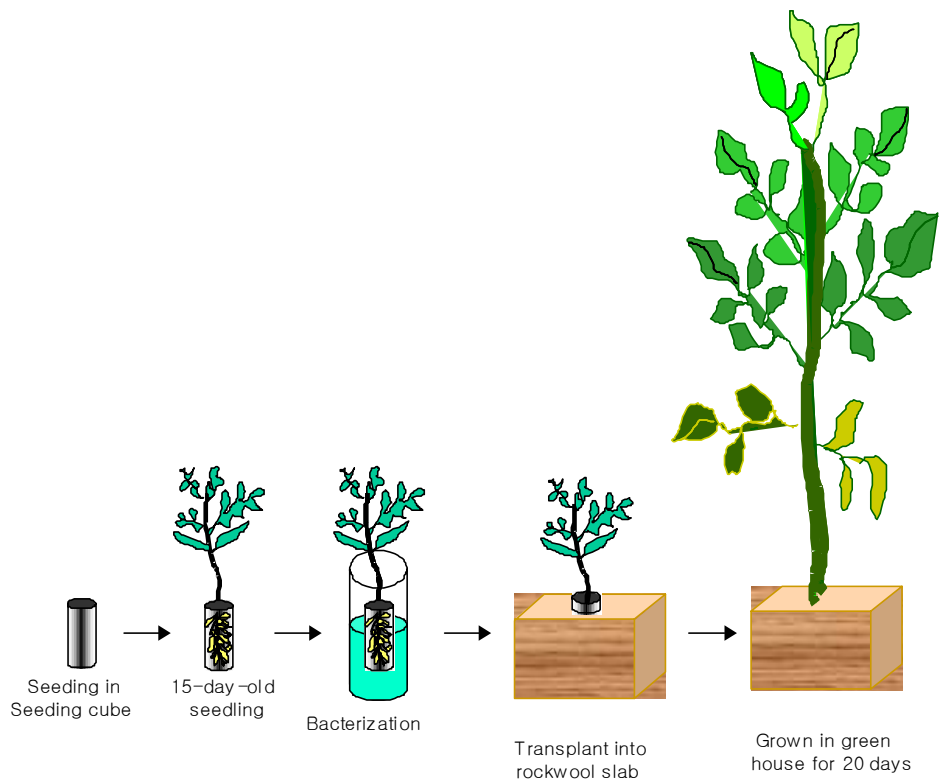


Fig. 62. Screening for plant growth promoting effect-defective mutant of *P. fluorescens* B16 in hydroponic culture system.

Table 40. Number of plant growth promoting effect-defective mutants of *P. fluorescens* B16

Times of screening	1st screening	2nd screening	3rd screening	4th screening	5th screening
No. of mutants	3,000	190	15	5	2

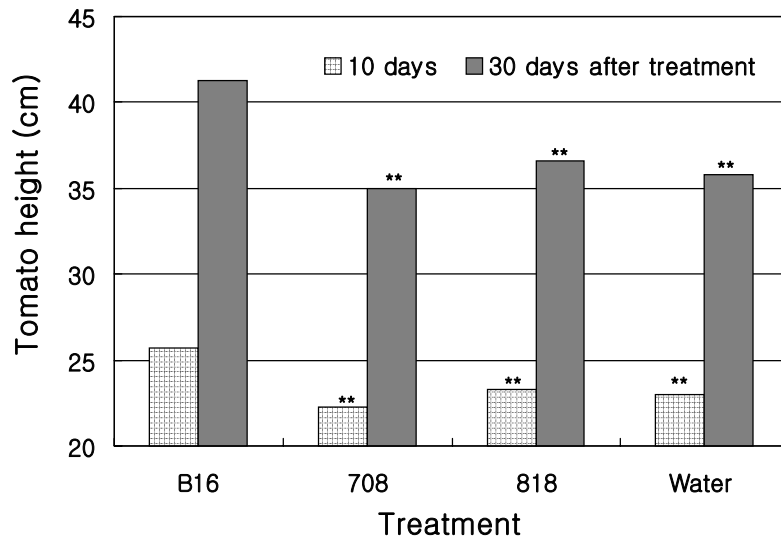


Fig. 63. The tomato growth treated with *P. fluorescens* B16 and plant growth promoting effect-defective mutants 708 and 818. Tomato growth was recorded every 10 days after treatment. ** indicates significant difference from the treatment of B16 ($P=0.01$).

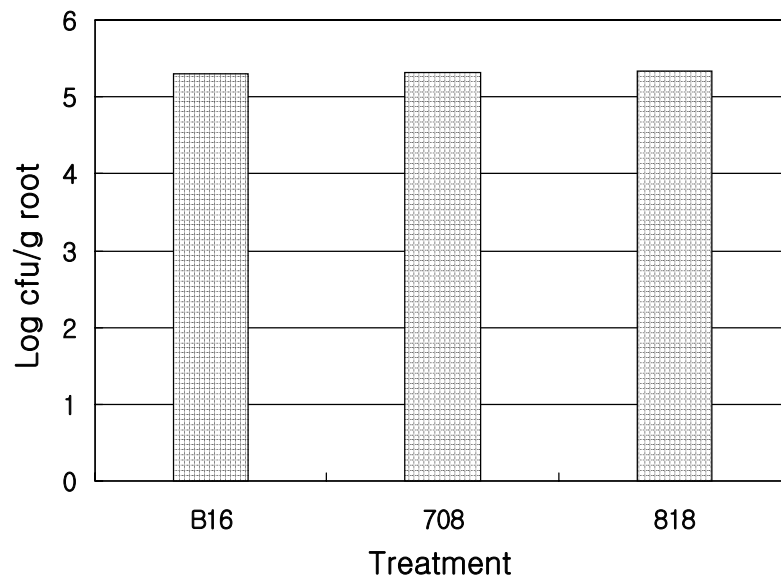


Fig. 64. Root-colonizing populations of *P. fluorescens* B16 and plant growth promoting effect-defective mutant 708 and 818. The root samples were collected 30 days after treatment.

제 5절 종자 및 근권처리 미생물제의 실용화를 위한 포장평가 및 제형개발 연구

1. 서언

본 연구과제는 주관연구기관인 경상대학교에서 연구목표를 달성하기 위해서 지난 10여년간 축적된 연구 기술을 바탕으로 보다 우수한 미생물 균주를 개발하여 미생물에 의한 종자와 근권정착 병원균의 억제에 관한 시험을 수행하고, 협동연구기관인 생명공학 연구소에서 미생물과 기주식물의 상호 메카니즘을 연구하여 개발된 미생물과 관련 정보를 제공받아 산업체이자 협동연구기관인 세미니스코리아(구 중앙종묘)에서 1차로 미생물 처리된 종자가 발아에 미치는 영향, 재현성 및 저장성 시험을 실내에서 실시하고, 2차로 미생물 처리에 의한 병 발생 억제 효과 및 작물의 성장과 수량에 미치는 영향을 검정하기 위하여 포장시험을 실시하여 그 시험 결과를 바탕으로 미생물을 이용한 종자처리 기술의 개발과 상업적 실용화를 위한 방법을 개발하기 위한 연구를 수행하였다.

가. 1차년도 : 미생물제 처리 종자의 활용에 따른 효과와 타당성 검정을 위한 기본적인 시험 수행

- 1) 미생물제의 종자처리와 유묘의 근권처리 방법 개발
- 2) 미생물제의 처리가 종자 발아에 미치는 영향 검정
- 3) 미생물제의 유묘 근권처리시 작물생장에 미치는 영향 검정
- 4) 미생물제 처리종자의 정장성과 효과의 재현성 검정

나. 2차년도 : 미생물제 처리 식물체의 포장시험을 통한 작물생장 및 병 발생 억제 효과 검정시험 수행

- 1) 미생물제의 종자처리에 의한 플러그 육묘의 향상 효과 검정
- 2) 미생물제 처리 묘에 대한 비닐하우스와 노지에서 고추 역병 방제 효과 검정
- 3) 병원균 배양을 통한 미생물제 처리 종자의 병 발생억제 효과 검정시험 수행
- 4) 작물별 미생물제 처리에 의한 발아와 생육촉진 효과 검정

다. 3차년도 : 종자 및 근권처리 미생물제의 실용화를 위한 포장 평가 및 제형개발 연구

- 1) 실내시험 - 미생물제 처리제에 따른 효과 검정
- 2) 하우스 시험 - 배양 병원균 집중에 의한 병 발생억제 효과 검정
- 3) 포장시험 - 미생물제 처리 고추 묘의 노지 재배에 따른 병 발생억제 효과 검정
- 4) 활용방안 모색 - 실용화를 위한 미생물제 제형개발에 따른 처리방법 확립
- 실용화 방안 모색

2. 재료 및 방법

본 과제는 주 연구기관인 경상대학교와 협동연구기관인 서울대학교에서 작물 병 발생억제를 위하여 미생물 균주를 개발하고 미생물과 기주 식물간의 상호 관계를 연구하여 개발된 미생물제로 세미니스코리아(구 중앙종묘)의 여러 가지 작물의 종자를 처리하여 미생물제 처리가 종자의 발아에 미치는 영향, 유묘 및 작물의 생장과 병 발생 억제 효과를 검정하여 산업적 실용화를 위한 시험이 수행되었는데 내용은 다음과 같다.

가. 공시재료 :

본 연구의 공시 재료로는 경상대학에서 개발된 미생물제로는 A21-4, B2-13이 사용되었고, 종자는 세미니스코리아(구 중앙종묘)의 고추종자(두배나, 명품, 올, 온세상), 광수 토마토 종자를 사용하였는데, 모두 1999년에 생산된 종자로 고추 및 토마토 종자는 미생물제 처리에 따른 발아 및 포장시험용으로, 나머지 종자는 미생물제의 처리가 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사용되었다.

나. 시험방법 :

경상대학에서 공시종자를 대상으로 각각의 미생물제 처리를 실시하고, 그 처리된 종자를 공급받아 발아시험, 포장시험 등을 수행하였고, 미생물제 제형개발과 효과적인 근권처리 방법의 개발 및 실용화를 위한 시험은 공동으로 실시하였다.

1) 발아시험 : 실내 발아시험은 ISTA rule에 근거하여 4"×4"의 사각 petri dish에 각각 50립씩 4반복으로 치상하여 20~30℃의 Incubator 내에서 발아시험을 실시하였다.

2) 토양발아시험 : 토양발아시험은 일반 육묘장 등에서 관행적으로 실시하는 방법과 같이 105구 연결 pot에 시판용 상토를 사용하여 파종한 다음 온도를 조절할 수 있

는 전열 온상 내에서 온도를 주간 25~30℃, 야간 16~20℃로 조절하여 실시하였다.

3) 저장성 및 효과 재현성 시험 : 미생물제 처리종자의 저장기간 경과에 따른 처리효과의 검정을 위하여 각각의 처리종자를 실온(실험실 내)과 저온(저온창고-15℃, RH35%)에 보관하면서 매 3개월마다 4회에 걸쳐 발아검사를 실시하였다.

4) 포장시험 : 포장시험은 일반 농가의 역병다발지역 두 곳과 비닐하우스 한 곳을 임대하여 육묘장에서 토양발아를 시킨 고추 묘를 정식시기까지 육묘하여 정식 하루 전에 기본시험 수행에서 병 발생 억제에 가장 효과가 있었던 미생물 A21-4를 10^9 cfu/ml 농도로 조절한 용액을 근권에 침지 처리하여 본 포에 정식한 다음 정식 후 2주 간격으로 2회에 걸쳐 미생물제를 추가로 근권에 처리하였으며,

5) 병원균 접종시험 : 하우스 내에서의 역병균 접종시험은 25구 연결 pot에 종자를 과중하여 본엽 4~5매 출현시기에 농가 포장에서 분리한 역병균을 배양하여 10^4 spore/ml으로 희석한 다음 과중 구당 각각 5ml씩 처리하여 시험을 수행하였다.

6) 미생물제 종자처리 제형 및 근권처리 방법 개발 : 미생물제의 종자처리 제형의 개발과 근권처리 방법의 확립을 위하여 미생물제 10^9 cfu/ml의 용액에 1시간 침지 처리에 의한 biopriming과 과립화를 위하여 biopriming 처리된 종자를 과립화 기계에 talc powder와 접착제 PVA 용액을 사용하여 pelleting을 실시하였고, 미생물제의 육묘 근권처리 방법을 모색하기 위하여 미생물을 플리그묘에 직접 주입하는 방법과 묘 자체를 미생물 용액에 침지 처리하여 비교 시험하였다.

그리고 실내발아시험과 토양발아시험의 대비로는 무처리, KNO_3 1.0% 용액에 1일간 priming 처리한 종자를 사용하였고, 포장시험과 병원균 접종시험의 대조로는 각각 무처리와 아인산 1,000ppm을 처리하여 비교 시험을 실시하였으며, 미생물제 처리 제형개발 시험을 위해서는 무처리, 물에 침지 처리한 종자를 사용하였다.

7) 조사방법 : 작물별 실내 발아시험의 조사는 치상 후 2일째부터 14일까지 각각 최아율과 발아율을 조사하였고, 토양발아는 작물별로 과중 후 6일째부터 2주까지 정상적으로 출현한 묘를 각각 조사하였다. 그리고 비닐하우스내의 역병균 접종시험의 발병 정도는 접종 후 최초로 역병 증상이 나타나는 시기부터 1~2주 간격으로 4회에 걸쳐 역병 증상 단계에 따라 4단계(3, 2, 1, 0)로 구분하여 조사하였으며, 노지 포장시험의 조사는 정식 후 2개월경부터 역병 증상이 나타나기 시작하여 1~2주 간격으로 4회에 걸쳐 역시 발병 정도에 따라 4단계(3, 2, 1, 0)로 구분하여 조사하였다.

3. 연구결과 및 고찰

가. 미생물제의 처리가 종자 발아에 미치는 영향

본과제의 목적이 종자나 정식 전 어린 묘의 근권에 미생물제를 처리하여 종자의 발아, 유묘의 생장촉진에 미치는 영향 및 병 발생을 억제시키는데 있고, 또한 이것을 산업적으로 실용화시키는데 있으므로 먼저 미생물제 처리가 종자의 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실내 발아검사를 실시하였는데, 시험결과 표 1에서 보는바와 같이 미생물제 A7-10, B2-13과 Priming 처리한 것이 무처리에 비하여 발아속도와 균일도를 나타내는 T50에서 고추 2.5일, 토마토 1.5일로 무처리의 4.5일과 2.5일에 비하여 훨씬 짧았고, 종자의 활력의 지표인 발아세가 고추는 치상 후 5일째에 미생물제 처리는 94.5%, Priming 처리 95.5%로 무처리 78.0%에 비하여 월등히 높았고, 토마토는 치상 후 3일째에 미생물제 처리는 93.5%, Priming 처리 91.0%로 미생물제 처리한 것이 무처리 83.5%에 비하여 월등히 높았다. 따라서 미생물제의 처리가 고추와 토마토 종자의 발아 향상에도 효과가 있는 것으로 나타났다.

고추 종자의 경우 priming 처리를 하였을 경우 발아세의 향상에 효과가 있어 일부 종자회사에서 실용적으로 활용하고 있기는 하나 병 발생억제를 위한 미생물제의 처리가 고추와 토마토 종자의 활력증진에 효과가 크게 나타났다는 것은 바람직한 현상이라고 할 수 있겠다.

Table 1. 미생물제의 처리가 고추 및 토마토 종자의 발아에 미치는 영향

	Germination (%)				T50 (day)			
	Control	A7-10	B2-13	Priming	Control	A7-10	B2-13	Priming
Pepper								
All	77.0	95.5	93.0	94.5	4.4	2.7	2.7	2.5
Myeongpum	80.0	96.5	96.0	95.5	4.2	2.3	2.3	2.4
Doobena	78.0	94.5	94.0	96.5	4.6	2.5	2.6	2.5
Onsesang	77.0	93.5	93.0	95.5	4.8	2.6	2.5	2.6
Mean	78.0	95.0	94.0	95.5	4.5	2.4	2.4	2.5
Tomoto								
Kwangsoo	83.5	94.0	93.0	91.0	2.5	1.4	1.6	1.6

나. 미생물제의 처리가 종자의 토양발아 및 유묘 생장에 미치는 영향

미생물제 처리 종자를 하우스 내에서 연결 포트에 파종하여 유묘의 출현율과 유묘 출현 후 초기 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 고추는 파종 후 8일째에 A7-10 처리가 83%, B2-13 처리가 82%로 무처리 62%에 비하여 초기 출현율과 균일도에서 월등히 높았으며, 대조구인 priming 처리의 84%와도 차이가 없었다. 토마토는 파종 후 6일째 A7-10 처리가 90%, B2-13 처리가 87%로 무처리 72%에 비하여 고추와 마찬가지로 출현율 및 균일도에 있어 월등한 향상 효과가 있었고, 대조구인 priming 처리의 84%보다도 효과가 있었다. 그리고 파종 후 4주가 경과할 때까지 묘의 생육상태도 훨씬 양호하였다.

따라서 이상의 결과를 미루어보아 미생물제의 종자처리가 고추와 토마토 종자의 초기 발아와 출현묘의 생육촉진에도 상당히 효과가 있는 것으로 판단되어 priming 처리와 마찬가지로 종자의 발아 및 활력향상을 위한 처리방법으로서 실용화하기 위하여 그 효과의 재현성과 저장성 시험이 필요한 것으로 판단되었고, 또한 실제 대량처리를 위한 처리방법의 개발이 필요할 것으로 판단되었다.

Table 2. 미생물제의 처리가 고추 및 토마토 종자의 유묘 출현에 미치는 영향

Parameters	Emergence (%)			
	Control	A7-10	B2-13	Priming
Pepper				
All	62.0	81.0	80.0	82.0
Myeongpum	66.0	87.0	90.0	89.0
Doobena	58.0	80.0	80.0	82.0
Onsesang	62.0	84.0	82.0	83.0
Tomato				
Kwangsoo	72.0	90.0	87.0	84.0

다. 미생물제 종자처리의 저장성 및 효과의 재현성

미생물제에 처리된 종자를 실험실내의 실온과 저온창고(15℃, RH35%)에 보관하여 매 3개월마다 실내 발아검사 및 토양발아검사를 실시하여 보관장소와 저장기간의 경과에 따른 효과를 검정하였는데, 실온에 보관한 것은 처리 후 6개월이 경과하면서 품종과 미생물제의 종류에 관계없이 발아세 즉, 활력이 급격히 감소하는 경향을 보였고, 저온창고에 보관한 것은 보관 후 6개월 쯤부터 서서히 감소하여 1년경과 후에는 초기에 비하여 약 10%정도 발아세가 떨어진 것으로 나타났다. 반면에 대조구인 무처리와 priming 처리 종자는 보관장소와 저장기간에 관계없이 비슷한 경향을 보여 비교가 되었다, 토양발아검사 결과 역시 실내발아 검사결과와 비슷한 경향을 보였다 (Table 3, 4). 이상의 결과로 보아 미생물제의 종자처리는 공시 작물인 고추, 토마토 종자의 초기 발아와 유묘 출현 및 생육촉진에 효과는 있었지만 보관장소와 저장기간의 경과에 따라 그 효과가 감소한 것으로 보아 실제 종자회사에서 활용하기 위해서는 최소 6개월에서 1년 이상의 처리효과 지속이 요구되므로 이를 위한 저장조건과 장기 저장에 대비한 연구가 더 보장되어야 할 것으로 보여진다.

Table. 3 미생물제 처리종자의 보관장소, 저장기간에 따른 발아율

crops	month	germination (%)							
		amb				15℃			
		control	A7-10	B2-13	priming	control	A7-10	B2-13	priming
pepper	0	78	94	95	96	78	94	95	96
	3	79	93	93	95	79	94	94	95
	6	81	91	92	95	81	92	93	96
	9	78	87	88	93	78	90	91	93
	12	79	83	86	92	79	88	88	94
tomato	0	83	94	93	91	83	94	93	91
	3	80	91	90	92	80	93	92	94
	6	81	92	91	90	81	93	91	92
	9	83	88	87	88	83	90	87	90
	12	80	83	82	90	80	88	82	88

Table. 4 미생물제 처리종자의 보관장소, 저장기간에 따른 유묘 출현율

		emergence (%)							
crops	month	amb				15°C			
		control	A7-10	B2-13	priming	control	A7-10	B2-13	priming
pepper	0	62	83	83	84	62	83	83	84
	3	65	84	83	87	65	82	84	85
	6	67	80	81	86	67	81	82	88
	9	66	78	79	86	66	82	80	83
	12	66	71	77	85	66	79	78	84
tomato	0	72	90	87	84	72	90	87	84
	3	71	91	86	83	71	89	88	82
	6	77	89	86	84	77	90	87	85
	9	70	87	85	82	70	88	83	82
	12	73	80	80	83	73	85	77	81

라. 미생물제의 고추 묘 근권처리에 의한 포장 역병 발생 억제 효과

본 연구과제의 주된 목적이 미생물제의 처리에 의한 포장 병 발생 방제 있으므로 이를 위한 시험으로 1차적으로 미생물제가 처리된 고추종자 두 품종에 대해서 일반 육묘장에서 상토에 파종하여 육묘한 다음 정식 하루 전에 고추 묘의 근권에 미생물제를 처리하여 정식 하였다. 시험포장은 상습적인 역병 다발지역을 두 곳 선택하였고, 하우스 재배를 고려하여 일반하우스 한 곳을 선택하여 3년간 포장시험을 실시하였다. 그리고 역병 방제에 효과가 있다는 아인산을 근권처리한 것을 대비구로 사용하였으며, 정식 후의 관리는 농민으로 하여금 일반적인 재배와 동일하게 관리하도록 하였으며, 역병이 발생하기 전에 미생물제와 아인산을 추가로 2회 간주처리 하였다. 역병발생 조사는 최초로 역병 증상이 나타나는 시기부터 1~2주 간격으로 4회에 걸쳐 역병의 증상에 따라 4단계(발병정도 0 : 건전, 1-2 : 발병, 3 : 고사)로 구분하여 조사하였다.

포장시험 수행 결과 상습적 역병 다발지역인 충북 연풍군의 포장에서는 해마다 각 처리, 품종, 반복간에 큰 차이 없이 거의 모든 시험 구에서 역병이 발생하여 조사 data로는 역병 방제 효과를 판정하기에 무리가 있었지만 미생물 처리 구와 아인산 처

리구의 발병 정도가 약간 낮은 경향을 보였고, 발병 속도도 역시 약간 늦은 경향은 있었다. 3년차 포장시험에서는 반복간 차이를 고려하여 별도로 시험 구에 인위적으로 역병균을 처리하여 시험을 수행하였는데, 그 결과는 3회 조사 때 모든 시험 구에서 100% 발병하여 기대하였던 결과를 얻지 못하였으나 발병 속도에 있어서 무처리 구는 2회 조사 때 100% 발병하였고 미생물과 아인산을 처리한 구에서는 발병 속도가 약 1주 정도 늦은 3회 조사 때 100% 발병하였다.

Table 5. 노지 포장에서의 고추 역병 방제에 대한 미생물제의 처리 효과

처리내용		발병지수(%)	
		올고추	두배나고추
종자 무처리	대조구	63.3	48.3
	+미생물 근권처리	49.5	38.9
	+아인산 근권처리	53.6	35.0
미생물 A21-4 종자처리	대조구	58.1	32.8
	+미생물 근권처리	47.6	28.9
	+아인산 근권처리	64.3	36.7
미생물 B2-13 종자처리	대조구	67.8	39.4
	+미생물 근권처리	65.0	48.3
	+아인산 근권처리	66.1	34.4

그리고 경기도 진위면 포장에서 시험 결과는 역병 발생이 심하지 않았지만 1, 2년차 시험에서 국부적으로 발병 증상을 보여 정확한 시험을 결과를 얻기가 어려웠다. 충남 천안의 임대하우스 시험에서는 역병 발생은 없었으나 정식 후 한 달이 경과할 때까지 미생물 처리 구의 고추 묘 생육 상태가 다른 처리 구에 비하여 좋았다(Table 5). 이상의 시험 결과로 볼 때, 노지 포장의 경우에는 포장 상태가 균일하지 않을 뿐만 아니라 고추 재배시기의 환경조건이 고온건조 상태의 극단적인 경우가 많아 병 발생 억제를 위하여 처리한 미생물이 적당한 포장수분상태에서 제대로 근권에 정착하여 정상적인 개체의 번식과 활동을 하기가 어렵기 때문에 기대효과를 얻을 수 없었던 것으로 보여진다. 이 사실은 실제로 시험포장의 수분을 인위적으로 충분히 조절할 수

있는 경상대학교 비닐하우스 내에서 수행된 시험 결과에서 미생물제를 처리한 고추 묘의 역병 방제에 효과가 있었음이 뒷받침하고 있다.

마. 병원균 접종에 따른 미생물제 근권 처리 고추 묘의 병 발생 방제 시험

미생물제의 근권 처리가 고추 묘의 역병 발생 방제 효과를 검증하기 위하여 1차로 미생물제에 처리된 종자를 육묘한 다음 역병균을 인위적으로 접종하여 시험을 수행하였는데 1,2차 년도는 두 가지 미생물제가 종자에 처리된 고추 4품종과 대비구로 무처리와 priming처리 종자를 육묘한 다음 인위적으로 역병균을 접종하여 시험을 수행하였는데 품종, 미생물제 종자처리 및 대비구 모두에서 역병균 방제 효과는 기대할 수 없었다. 다만 묘의 제1본엽이 전개된 후부터 본엽3매가 전개될 때까지는 미생물제를 처리한 묘의 생장 상태가 약간 좋았으나 기간이 경과할수록 차이가 없었다. 따라서 미생물제의 종자처리는 초기 유묘의 출현과 균일도의 향상에 효과는 있으나 역병의 방제에는 거의 효과가 없었으므로 병 방제다는 종자처리만으로는 불가능하고 근권 처리 혹은 이식후 관주처리가 필요하다고 판단되었다.

그리고 3년차 시험에서는 미생물제 처리 고추종자를 육묘하여 유묘의 근권에 미생물제를 처리하여 역병균에 대한 저항성 시험을 수행하였으며, 대비구로 아인산을 사용하여 미생물, 아인산, 역병균을 각각 단독 및 복합처리를 실시하여 시험을 수행하였는데 무처리와 미생물단독, 아인산 단독 처리구에서는 100% 건전하였고, 역병단독 처리와 미생물+아인산+역병균 처리구에서는 100% 발병되어 고사하였으며, 미생물과 아인산을 근권 처리한 묘에 역병 균을 접종한 시험 구에서는 약 30~45%의 건전 수가 남아 미생물제를 종자에만 처리한 것보다는 근권 처리한 것이 병 방제에 훨씬 효과가 있었다(Table 6).

바. 미생물제 종자처리 제형 및 근권처리 방법 개발

다년간에 걸쳐 작물의 병 방제와 종자의 활력 증진을 위하여 개발된 미생물제를 실용화 하고자 여러 가지 시험에서 얻어진 결과들을 바탕으로 그 제형을 개발하고 또한 미생물제의 근권처리 방법을 개발하여 모형화하기 위한 시험으로 먼저 미생물제의 종자처리 제형을 개발하고자 경상대학에서 작물별로 최적의 효과가 있는 미생물제의 종류, 농도, 처리시간, 처리방법 등의 biopriming 처리조건 규명시험과 미생물제의 농

도를 높여 처리 효과를 극대화시키기 위한 방안으로 매개물질을 사용한 과립화 (pelleting) 시험을 수행하고 협동연구기관인 세미니스 코리아에서는 그 효과 검증시험을 실시하였다. 고추종자의 활력과 묘의 생장 촉진을 위한 처리로는 미생물제 A7-10, B2-13, 수박 및 토마토는 미생물제 B2-13, 양파는 미생물제 A7-10을 침지 처리하는 것이 가장 효과가 있었다.

Table 6. 미생물제의 근권 처리 고추 묘에 대한 역병균 접종시험

처리	발병지수	비고
무처리	0	
미생물	0	생육촉진
아인산	0	
무처리 + 역병	100	
미생물 + 역병	59.8	
아인산 + 역병	44.8	

Table 7. 작물별 미생물제 종자처리 제형에 따른 효과

Parameters	Control	Water		A7-10		B2-13	
		Priming (%)	SMP (%)	Priming (%)	SMP (%)	Priming (%)	SMP (%)
Pepper	69	91	82	96	92	98	83
Tomato	74	75	74	86	76	85	76
Onion	77	88	74	92	74	91	71
Water melon	82	70	-	-	-	93	-

그리고 미생물제를 talac powder에 처리하여 건조시킨 다음 다시 미세한 분말로 만들어 접착물질인 PVA를 사용하여 과립화(pelleting)한 처리에서는 다소 문제점이 있었는데, 먼저 과립화에 사용된 미생물제 A21-4와 B2-13 중에서 A21-4를 사용한 것은 배추와 고추의 발아에 장애를 주어 묘의 뿌리가 제대로 신장하지 못하는 현상이

있었고 B2-13을 사용한 것은 그 상태가 덜하였지만 역시 침지 처리한 것보다는 못하였다. 따라서 미생물제를 이용한 종자의 과립화를 위해서는 별도의 연구가 선행되어야 할 것으로 판단되는데 이를 위해서는 먼저 적절한 매개물질의 선택 및 최적의 처리조건의 설정과 접착제의 농도, 처리 후의 수분흡수 상태, 과립이 부서지지 않을 정도의 적당한 경도의 유지 등 제반 조건을 위한 시험이 병행되어야 하므로 이 과제와는 별개의 연구가 필요할 것이다.

또한 작물의 병 발생 방제를 위한 처리로 다소의 효과가 인정되는 미생물의 근권 처리 방법으로서 최근 들어 고추등 대부분의 과채류 작물이 직파 보다는 모종을 육묘하여 plug묘를 본포에 정식을 하므로 정식전의 플러그 묘에 미생물제를 충분히 관주하거나 침지 처리하여 본포에 정식하는 것이 본 연구 과제를 수행하면서 경험한 가장 효과적인 방법일 것으로 판단되었다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구목표1 : 우수한 종자처 및 근권 미생물 자질 규명

1. 우수한 미생물 균주의 개발

종자처리 미생물로 종자의 발아율을 향상시키고 고르고 빠른 발아를 유도하는 미생물 *Bacillus sp.* B2-13.을 개발하였고 종자전염성 병원균을 억제하고 유묘기 토양병을 방제할수 있는 미생물 *Paenibacillus polymyxa* H210을 개발하였다. 근권 처리로서 고추 역병을 효과적으로 방제하고 유묘의 생장을 촉진하는 *Serratia plymutica* A21-4를 개발하였고 토마토의 세균성 시들음병(청고병)을 방제하고 생육을 촉진하는 *Pseudomonas fluorescens* B16을 개발하였다.

2. 근권에 정착하는 미생물의 특성 규명

온실 실험을 통하여 고추뿌리에 정착하는 A21-4의 밀도변화와 처리 농도별 정착 밀도를 알아보았으며 재배기간 중 뿌리에 정착하는 밀도 변화를 추적하였다. 또한 토마토 뿌리에 정착하는 B16의 밀도 변화를 추적하였으며 형광현미경과 항생제 Maker를 이용하여 토마토 뿌리와 Rockwool에서 B16의 생존율을 조사하였다.

3. 길항 미생물의 토양병원균 억제 원리 규명

역병균 *Phytophthora capsici*의 균사 생장과 유주자 형성, 피낭포자의 발아를 억제하는 A21-4의 특성을 조사하였으며 병원균의 생장을 억제하지 못하는 Mutant를 선발하여 병원균의 억제와 관련된 물질과 유전자를 추적할 수 있는 기반을 마련하였다. 항균성 물질을 생산 못하는 돌연변이체를 이용하여 A21-4의 역병 발생 억제는 항균성 물질 생산에 의한 것임을 확인하였다.

P. fluorescens B16의 Transposon을 이용하여 만든 돌연변이체를 이용하여 B16이 병원균 *Ralstonia solanacearum*을 억제하는 것이 항균성 물질임을 확인하였다. 돌연변이체에 Ω km이 삽입되어 변이가 일어난 유전자의 clone을 확보하여 B16의 병원

균 억제 원리를 규명하였다.

4. 미생물에 의한 작물 성장 촉진 평가 기준 설정

A21-4에 의한 작물 성장 촉진 효과는 작물의 생육단계와 토양 조건에 따라 매우 다르게 나타났다. 가장 확실하게 성장차이를 나타낼 수 있는 조건은 토실(신안 아그로) 무비상토에 과중한 오이, 고추, 토마토 등의 채소 종자가 발아하여 본엽이 나오기 직전에 세균 부유액(10^9 cell/ml)로 20ml씩 관주하고 2주 후 측정하였을 때이다. 이때 초장과 엽록소 농도, 지상부 무게, 엽수 등을 비교하여 판정하였다.

B16은 토마토를 Rockwool seeding piece에 심고 본엽이 완전히 전개된 후 Rockwool cube에 옮겨 심고 나서 Minimal 배지에서 24시간 배양한 B16을 세균과 배양액을 모두 20ml씩 관주하고 2주 후 성장을 비교하였다.

이렇듯 토양과 Rockwool에 짧은 기간 안에 작물의 성장촉진을 확실하게 판정할 수 있는 방법을 개발함으로써 차후에 미생물에 의한 작물촉진 현상을 규명하거나 우수한 작물 성장 촉진 미생물을 선발하고자 할 때 이 방법이 매우 요긴하게 사용될 것으로 기대된다.

연구목표2 : 미생물의 효능을 안정적으로 발휘하기 위한 처리기술 개발

1. 작물 근권에서 처리한 미생물과 병원균의 정착 경합 규명

고추 역병에 대한 길항균 A21-4와 *P. capsici*을 각각 토양과 근권에 농도별로 접종하여 경시적으로 밀도 변화를 추적함으로써 이들의 고추 뿌리에 정착 경합을 조사하였다. 길항균 A21-4는 토양보다는 고추 뿌리에서 더 정착 능력이 높았으며 *P. capsici*는 A21-4에 의해서 그 밀도가 현저히 억제됨을 알 수 있었고 이러한 현상은 고추 뿌리에서는 확실하게 나타났지만 토양에서는 효과적으로 억제하지 못하였다.

토마토 풋마름병을 억제하는 B16은 Rockwool과 토마토 뿌리 모두에서 *Ralstonia* 보다 정착능력이 높았으며 B16의 밀도는 병원균 *R. solanacearum*이 없을 때보다도 오히려 병원균이 있을 때 더욱 높은 밀도로 정착하고 있음을 알 수 있었다.

2. 종자처리 미생물의 장기보존과 재활성화 방법 개발

종자 처리용으로 개발한 B2-13과 H210은 모두 Endospore를 형성하는 세균으로 대량 배양시 배양기간을 연장시켜 포자 상태로 수확하면 장기 보존에는 문제가 없다. 또 한 종자에 처리된 B2-13과 H210이 건조한 상태로 상온에 보관하였을 때 1년이 지나도 재활성에는 아무런 문제가 없었다.

미생물을 처리한 종자가 Priming 효과를 오랫동안 유지하기 위하여 본 연구과정에서 Biopriming 방법을 개발하였다. 연구과정을 통하여 접종 미생물의 농도, 침지시간, 후배양 온도, 시간 등을 채소종자마다 최적 조건을 찾았다. 그 결과 실온에서 6개월 간 방치한 종자의 Priming 효과가 크게 변하지 않았다. 또한 SMP 처리시 미생물을 첨가함으로 발아력 향상을 더 높일 수 있었고 종자의 저장 기간도 향상시킬 수 있었다.

3. 변이체를 이용한 작물 성장 원리 규명

Transposon Mutagenesis를 이용하여 A21-4의 성장촉진 능력에 없어진 돌연변이체는 찾는 실험이 현재까지 약 4000개의 변이체에 대하여 실험하였으나 아직 찾지 못하고 있다.

B16에 대해서는 3600여개의 Mutant 중에서 확실히 성장촉진 능력이 없어진 Mutant를 찾았고, wild type clone과 비교하여 Tn이 삽입된 유전자를 알아냈다. 이 부분 연구는 초기단계인 Mutant screening에 너무 많은 시간을 소비하여 아직 미생물에 의한 작물 성장 촉진 원리를 규명하는데는 미치지 못하고 있다. 그러나 Screening system이 확립되고 또 일부 유전자 clone을 확보하고 있으므로 후속 연구를 위한 기본은 마련된 셈이다.

4. 재배 유형별 토양병 억제 능력을 향상시키는 방법 개발

고추역병의 방제를 위하여 연구기간 중 모두 13번의 포장시험을 하였다. 이들 중 경성대학교 연구 농장의 비닐하우스 시험을 제외하고는 모두 자연 발병에 의존하여 미생물의 방제능력을 평가하였다. 자연 발병에 의존할 경우 전혀 역병이 발생하지 않아서 평가를 못할 수 있고, 충북 연풍군의 경우는 2년 모두 폭우로 침수되어 너무 심한 역병 발생으로 방제효과를 평가할 수 없었다. 방제 효과를 평가 할수 있을 만한

발병 수준에서 고추 역병을 막기 위해서는 A21-4 세균 부유액(10^9 cell/ml)에 고추묘를 침지하여 이식하는 방법으로 병원균의 밀도가 낮은 지역에서는 해결할 수 있으나 병 발생이 심한 지역은 이식 후 1달 지난 후 같은 농도의 세균 부유액을 1회 관주하고 주변에 역병이 계속해서 발생할 경우 1달 후 다시 관주 처리한다.

A21-4의 농도를 줄이고 다른 첨가물을 처리함으로써 병 방제 효율을 높이기 위한 시험을 여러 가지로 시도하였으나 현재까지 눈에 띄게 향상시키는 방법은 개발하지 못하였다.

A21-4의 항생물질 생산과 관련된 유전정보가 밝혀지면 이 문제를 해결할 수 있는 방안이 나올 것으로 기대한다.

연구목표3 : 미생물의 실용화를 위한 제품 개발 및 효과 검증

1. 종자처리제의 제형화 및 coating 기술 개발

종자처리 기술에서 coating 기술은 종자를 생산 판매하는 회사에서 오랫동안 개발해 왔고, 기계화로 대량 생산할 수 있는 시설을 갖추고 있다. 본 연구과정에서는 대량으로 코팅 처리하는 기계화에는 접근하지 못하고 수동식으로 제조한 종자 coating을 이용하여 몇 가지 광물질에 B2-13과 H210을 흡착시켜 고추, 토마토, 오이 종자 등에 코팅 처리하였으나 발아율이 오히려 떨어지고 발아기간도 길어져서 실용화에는 문제가 있는 것으로 나타났다. 이보다는 간단히 세균 용액에 침지하여 Biopriming하는 처리로서 모든 것을 해결할 수 있었으므로 coating 기술에 관한 시험은 더 이상 진행시키지 않았다.

2. 근권 처리제의 제형화 기술 개발

실용화 할 수 있는 미생물의 제형은 개발하지 못하였다. 본 연구에서 근권 처리로 고추역병을 방제하고 유묘기 성장을 촉진시키는 A21-4와 토마토의 풋마름병을 방제하고 성장을 촉진하는 B16은 모두 포자를 형성하지 못하고 건조에 매우 취약하여 분말 상태나 과립 상태로 만들었을 때 생존력이 처리 3일 후 1/10로 떨어지고, 30일 후 1/100로 감소되고, 그 후 지속적으로 감소된다. 지금까지 밀기울 미강, peatmoss 등

유기물 재료와 Bentonite, perlite, Talc, Vermiculite 등과 같은 광물질을 사용해 보았으나 크게 향상되는 자료는 발견되지 않았다. A21-4나 B16 모두 대량 배양에는 문제가 없어서 pilot scale Fermentor에서 10^{11} cell/ml에 접근하는 배양을 쉽게 할 수 있다. 이것을 액체상태로 제형을 만들 수 있는 방안을 모색하고 있다.

3. 개발한 미생물의 유전적 특성 규명

A21-4의 16s rRNA 전체를 sequencing하여 염기서열을 확인하였고 항생물질을 생산 못하는 Mutant를 얻어서 이와 관련된 유전자 clone을 확보하고 있다. 그러나 생장속진과 관련된 결과는 아직 없다.

P. fluorescens B16은 항균성 물질을 생합성하는 유전자를 분리하였고, 염기분석을 통하여 그 특성을 조사하였다. 또한 항균성 물질 생산능력이 향상된 변이체를 개발하였으며 항균성 물질의 생성은 근권 정착 능력과 상관이 없음을 확인하였다. 또한 작물생장 촉진 능력이 없어진 Mutant를 선발하였고 이와 관련된 유전자의 clone을 확보하였다. B16의 gene tagging을 위하여 chromosomal DNA에 삽입된 Transposon을 확인하였고, 유전적 변이성과 지속성 및 안정성 검정을 위해 식물체에 접종한 후 다시 회수하여 항생제 Marker를 확인하였다.

4. 시작품 미생물 제제의 포장평가 방법 개발

현재까지 실용적으로 활용할 수 있는 시작품이 개발되지 못했으므로 실험실에서 액체 배양한 세균 부유액을 원심분리하여 모은 세균을 희석하여 농가포장에서 역병 방제를 평가하였다.

현재까지 농가포장에서 평가한 A21-4의 효과는 같은 장소에 처리한 화학농약(가디안)에 비하여 더 높은 방제 효과를 나타내고 있다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

1 종자처리 미생물의 활용계획

부가가치가 높은 채소종자는 안정된 발아율과 왕성한 발아세를 나타내는 것이 매우 중요하다. 이러한 종자들은 개별 농가에서 묘를 육성하는 것이 아니고 공정육묘 과정을 통하여 대규모로 육묘되고 이로 인하여 기계과종이 일반화되어 있으므로 균일하고 빠른 발아를 보이는 종자가 경쟁력을 갖게 되는 것은 당연하다. 따라서 종자를 생산 판매하는 세미니스(주)종묘(참여기업)에서는 자사에서 생산하는 종자의 발아능력을 향상시키는데 많은 노력을 들이고 있다. 본 연구를 통하여 개발된 미생물과 Biopriming 기술은 종전의 화학물질을 이용한 종자 Priming이나 Solid Matrix Priming(SMP) 보다 처리기술이 간단하고 시간이 짧게 걸린다는 유리한 점이 있으므로 손쉽게 산업화에 도입될 것이다. *Bacillus sp.* B2-13 균주는 종자전염성 병에 대한 억제능력은 낮지만 고추, 토마토, 수박, 축갓, 시금치 등 채소작물의 발아를 현저하게 촉진시키는 것으로 나타났다. B2-13은 발아기간이 비교적 길고 균일하게 발아가 되지 않는 고추나 토마토 같은 종자의 발아력을 향상시키는데 활용할 수 있을 것이다. 특히 고추는 현재 plug 묘 생산에서 가장 많은 비중을 차지하는 작물임으로 미생물 종자처리로 인한 부가가치의 향상은 크다고 말할 수 있다.

Paenibacillus polymyxa H210 은 종자의 발아력을 향상시킬 뿐만 아니라 광범위한 식물 병원균에 대하여 길항력을 나타내므로 종자전염성병을 막을 수 있고 또 근권에 정착하는 능력이 있으므로 유효기에 발생하는 토양병에 대해서도 효과를 나타낸다. H210은 공정육묘를 통해서 묘를 생산하는 작물보다는 양파나 파 같이 농가에서 생산하여 이식재배하는 작물에 사용하였을 때 발아력도 향상시키고 초기에 발생하는 토양병도 막을 수 있다. 이러한 종자를 생산하는 회사에서 H210으로 Biopriming한 종자를 보급하도록 산업화한다.

2. 근권처리 미생물의 활용계획

Serratia plymuthica A21-4는 고추에 역병을 일으키는 *Phytophthora capsici* 의 유주자 형성과 포자의 발아 그리고 균사의 성장을 강하게 억제함으로써 포장상태에서

고추역병을 효과적으로 방제한다. 현재까지 A21-4를 실용화할 수 있는 제형은 개발하지 못하였지만 실험실에서 생산한 세균부유액을 농가포장에 처리하였을 경우 역병방제 효과가 기존의 다른 미생물들의 효과에 비하여 월등하게 높다. A21-4는 대량으로 배양하는데는 아무 문제가 없으나 건조에 약하므로 분말이나 과립으로 만들었을 때 보존성이 아주 낮다. 그러나 액체상태로 보존하면 보존기간도 상당히 길고 방법도 간편하다. 만일 A21-4로 액상 유지하는 제형을 개발하면 상당히 오래 동안 보존할 수 있으며 간단하게 희석하여 사용할 수 있다는 장점이 있다. 모든 고추는 묘를 본포에 이식하는 방법으로 재배하기 때문에 이식할 때 묘를 세균부유액에 침지하는 처리로서 간단하게 역병을 방제할 수 있으므로 쉽게 산업화할 수 있다고 판단된다. 또 액상의 제형은 이식 후 고추의 뿌리에 관주하는 형태로도 사용할 수 있다. 현재 생물농약 개발과 판매를 주 사업으로 정하고 2001년에 설립된 에코팜이라는 회사와 A21-4의 제형화와 산업화를 협의 중이다. 또한 A21-4는 유묘기의 고추, 토마토, 오이, 가지 등의 생장을 현저하게 향상시키는 것으로 나타났는데 이러한 특성을 이용하여 공정육묘과정에서 이 제형을 활용하거나 육묘용 상토를 생산하는 회사와 A21-4의 산업화를 계획 중이다.

Pseudomonas fluorescens B16 은 토마토, 오이, 고추 등의 생장을 촉진시키고 식물병원세균에 대한 길항력을 나타내는데 특히 가지과에 풋마름병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum* 에 대하여 강한 길항력을 나타낸다. 이러한 특성을 이용하여 토마토, 고추 등에 발생하는 가지과 풋마름병(靑枯病)을 방제하는 근권처리제로 활용하고자 한다. B16은 유기물이 많거나 영양물질이 많은 조건에서는 항균성 물질을 생산하지 않고 Minimal Medium 조건에서 항균성 물질을 생산하는 특성이 있다. 이는 유기물을 많이 넣고 재배하는 토양재배 보다는 Rock Wool을 배지로 하여 무기상태의 영양물질을 공급하여 재배하는 양액재배시스템에서 토마토나 파프리카, 고추에 발생하는 청고병 방제에 매우 유용하다. B16도 A21-4와 마찬가지로 대량생산은 쉬우나 건조상태로 보존하는 것이 어려우므로 액상의 제형을 개발하고자 한다. B16도 에코팜(주)과 제형과 산업화를 협의 중이다.

3. 연구정보와 지식의 활용계획

본 연구과정을 통하여 A21-4의 항생물질 생산과 관련한 유전자를 추적하기 위하여 Tn Mutagenesis 방법으로 항생물질을 생산하지 못하는 돌연변이체를 얻었으며 이

항생물질 생산과 관련된 유전자 clone을 가지고 있다. 또한 A21-4는 강력한 Chitinolytic Enzyme을 생산하며, 작물생장촉진 능력을 가지고 있다. 본 연구 과정을 통하여 이러한 형질을 지배하는 유전자를 분리하거나 확인하지는 못하였으나 돌연변이체를 얻는다거나 Bioassay를 하는 과정에서 많은 Knowhow를 얻었다. 이러한 소재들은 앞으로 국책사업 또는 국가기관에서 공모하는 연구과제에 응모하여 이러한 유전자의 특성을 밝혀내고 생산하는 물질을 동정하고 농업에 활용할 수 있는 기초이론을 개발하는데 활용할 것이다. 특히 A21-4의 작물생장촉진은 병 저항성 유도와 관련되는 것으로 추정됨으로 병 저항성에 관련된 유도물질을 밝혀내는 연구에 중요한 기초자료로 활용될 것이다.

Pseudomonas fluorescens B16은 항생물질을 생산하는 과정이 독특하고 항생물질 또한 기존의 미생물들이 생산하는 것과는 매우 다른 특이성을 보이고 있다. 본 연구 과정을 통해서 이 물질을 밝혀 내려는 연구를 시도하였으나 기존에 알려진 물질과 같이 몇몇 전문가의 도움을 받아 쉽게 구조를 결정할 수 없었다. B16이 항생물질을 생산하는 것과 관련된 유전자는 Cloning 하였고 염기서열을 밝혀 냈으며 근연종인 다른 세균을 이용하여 이 유전자가 발현되는 것을 확인하였다. 이 유전자를 기존의 다른 유용한 미생물에 형질전환 시키는 방법들을 개발하여 다양한 균주를 만들어 낼 수 있을 것이며 작물에 도입하여 풋마름병에 저항성인 형질전환 토마토를 만드는데 활용할 수도 있을 것이다. 또 B16이 생산하는 항균성 물질의 특성을 규명하고 이 물질의 구조를 동정하는 연구는 매우 가치가 있을 것이라 생각된다. 이 물질이 선도물질로 판명된다면 이 분야에 새로운 지평이 열리는 것이다.

B16의 작물생장 촉진과 관련된 유전자의 연구도 매우 폭넓게 활용될 수 있다. 본 연구를 통하여 작물의 생장을 촉진하지 못하는 Mutant를 분리하였는데 후속 연구를 통하여 그리 어렵지 않게 작물생장촉진과 관련된 유전자를 밝혀낼 수 있을 것으로 예상되며 그렇게 되면 이 유전자가 생산하는 물질들이 작물의 생장을 촉진하는 것과 어떻게 연관되어 있는가를 알아낼 수 있는 매우 중요한 열쇠가 될 것이다. 작물생장 촉진과 관련된 유전자는 다른 세균에 형질 전환시켜 새로운 유망 미생물을 개발하거나 작물에 도입하여 척박한 땅이나 아주 적은 량의 비료를 주고도 작물을 재배할 수 있는 형질전환 식물을 만들어 내는데 활용될 수 있을 것이다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

Kloepper J. W 등(2000)은 그동안 개발해오던 PGPR 균주들 중에서 식물병원균에 대한 항균력이 뛰어나 토양병 발생을 억제하는 균주와 지상부에 발생하는 병들에 대한 유도저항성(ISR) 우수한 균주를 선발하고 여기에 선충을 방제할 목적으로 Chitosan을 혼합하여 Biological Preparation 이라는 제품을 만들었다. 이 제품을 담배, 오이, 토마토, 등과 같이 plug 묘를 생산하여 이식 재배하는 작물의 상토에 처리하였을 때 파종한 작물의 육묘기간 동안에 생장을 촉진함은 물론 본 포에 이식 후 수주일 동안 병억제 능력과 성장촉진 능력이 나타났으며 지상부에 발생하는 오이 세균성 반점병, 담배 노균병, 토마토 궤양병 등을 방제할 수 있다고 하였다. 결과적으로 작물의 생산성을 높이고 농약 사용을 대폭적으로 줄일 수 있는 이상적인 생물적 방제 방법이라고 제안하고 있다.

미국의 Reddy M. S. 등은 지금까지 작물생장 촉진과 토양병 방제를 위하여 주로 PGPR 균주들을 토양에 처리하였던 것을 액상으로 만들어 지상부에 살포하여 동일한 효과를 얻으려는 시도를 하였다. PGPR 균주 중에서 특히 포자를 형성하는 *Bacillus* 속 세균 중에서 작물의 성장촉진효과나 뚜렷한 균주와 지상부 병에 대하여 유도저항성을 만들어내는 균주를 선발하여 완전히 포자로 전환된 세균 부유액을 몇가지 안정제를 처리하여 액상 제품을 만들었다. 이를 어린묘의 줄기나 잎에 처리하였을 때 토양처리와 동일한 성장촉진 효과와 오이 세균성 반점병, 담배 노균병, 토마토 궤양병과 같은 지상부 병을 효과적으로 억제하였다고 하였다. 이러한 결과는 토양에 혼합하는 번거로운 과정을 거치지 않고도 PGPR 균주에 의 ISR효과를 얻을 수 있는 새로운 가능성을 제시한 연구라 할 수 있다.

2000년 12월 아르헨티나에서 개최된 제5차 국제 PGPR Workshop 에서는 PGPR를 주제로 생산하는 제품들이 국제적으로 유통되거나 이와 관련된 산업이 활성화되기 위해서는 몇가지 전제 조건이 따라한다고 결론 내리고 참석한 회원들과 회원국들이 적극적으로 협력하여 PGPR 제품들이 실용화 될 수 있도록 여건들 조성하는데 노력할 것을 합의하였다. 이를 위하여 내세운 전제 조건은 첫째 미생물제제를 활용하기 위한 환경규제의 완화, 둘째 국제적인 지적재산권 보호장치, 셋째 제품에 대한 시장의

거부감 완화와 효능에 대한 예외 적용, 넷째 각 지역별 협력자 다섯째 제품개발 성공에 대한 기대감 공유하는 것 등이었다

네덜란드의 Bloemberg, G. V 등은 *Pseudomonas* 속 세균들이 식물의 뿌리에 정착하기 위하여 가지고 있는 기능이 어떠한 유전자들에 의해서 지배되는가를 분자생물학적 수준에서 검토하였는데 지금까지 근권 정착과 관련이 있다고 제안된 형질들을 지배하는 유전자를 전환시킨 *Pseudomonas*를 가지고 실험하였다. 이중에서 pilin 생성을 coding 하는 *pilA* 유전자와 기능성 pilus 유전자 *pilT*, 그리고 O-Antigen 생성과 관련된 *nd* 유전자의 발현이 토마토의 근권에 정착하는 *Pseudomonas*에서 증명되었다.

미국 Arburn 대학의 Yan, Z 등은 PGPR 균주들이 토양이나 근권에 처리되었을 때 작물의 생장을 촉진하거나 지상부 병에 대한 저항성을 유도하는데 필요한 접종원의 농도에 대한 시험 결과를 발표하였다. 세균의 접종농도와 유도저항성 발현 또는 생장촉진은 고도의 정의 상관관계가 있으면 외관으로 감지할 수 있는 생장촉진이나 저항성을 나타내려면 *Pseudomonas*의 경우 $10^8/ml$ 이상의 농도가 필요하였다.

유용미생물의 종자처리와 관련하여 종자의 발아를 촉진하는 세균을 토양이나 근권으로부터 많이 분리한 결과들이 발표되고 있는데 McInroy, J. A(2000) 등은 토양으로부터 분리한 *Bacillus* 속 세균들 중에 옥수수 종자의 발아를 촉진하는 세균들을 보고하였는데 특히 Solid Matrix Priming(SMP) 처리시 이러한 세균을 첨가하면 SMP 단독처리 보다 50% 이상 발아가 촉진된다는 것을 보고하였다.

독일의 Gabriele Berg 등(2001)은 *Serratia plymuthica* C48를 이용하여 딸기에 발생하는 *Phytophthora*(역병)과 *Verticillium*(시들음병)을 아주 효과적으로 방제할 수 있음을 보고하면서 포장에서 생물적 방제 실험은 토성이나 온도 습도 등 무생물적인 환경조건과 함께 딸기 근권의 세균집단 구성에 의해서 성패가 좌우된다고 하였다. 딸기 근권의 세균상을 파악하기 위하여 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE) 방법을 이용하여 전체 세균을 분리한 후 세균집단의 16S rRNA 단편을 PCR로 증폭하여 조사하였다.

Merav Kamensky 등(2001) 등은 생물적 방제 미생물로 *Serratia plymuthica*

IC14의 유용성을 증명하면서 이 균은 항균성 물질로 pyrrolnitrin 과 siderophores를 생산하고 각종 단백질 분해효소와 chitin 분해효소를 분비하며 IAA 같은 식물생장 조절물질을 생산한다고 하였다. 이러한 능력을 가진 이 세균을 온실에서 재배하는 오이의 지상부에 처리하였을 때 *Botrytis* (잿빛 곰팡이병)와 균핵병을 효과적으로 방제하였다고 하였다.

제 7장 참고문헌

Ahn, S. J., and Hwang, B. K. 1992. Isolation of antibiotic-producing actinomycetes antagonistic to *Phytophthora capsici* from pepper-growing soils. Korean J. Mycol. 20:259-268.

Anuratha, C. S. and S. S. Gnanamanickam. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. Plant and soil. 124: 109-116.

Argerich, C. A, and K. J. Bradford. 1989. The effect of priming and ageing on seed vigour in tomato. J. Exp. Bot. 40:599-607.

Argerich, C. A., K. J. Bradford, and A. M. Tarquis. 1989. The effects of priming and ageing on resistance to deterioration of tomato seeds. J. Exp. Bot. 40:593-598.

Bae, Y. S. 1990. Assessment of rhizosphere competence of *Gliocladium virens* and *Pseudomonas putida*, their synergistic effects on the Fusarium wilt suppression and growth enhancement of cucumber. M. S. Thesis. to Gyeongsang Natl. Univ.

Bae, Y. S., Kim, H. K., Park, C. S. 1990. An improved methods for rapid screening and analysis of root colonizing biocontrol agents. Korean J. Plant Pathology. 6:325-332.

Bakker, P. A.H. M., A. W. Bakker, J. D. Marugg, P. J. Weisbeek, and B. Schippers. 1987. Bioassay for studying the role of siderophores and in potato growth stimulation by *Pseudomonas* spp. in short potato rotations. Soil Biol. Biochem. 19: 443-449.

Barksdale, T. H., Papavizas, G. C. and Johnston, S. A. 1984. Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora capsici*. Plant Disease 68:506-509.

Bennett, M. A., and Waters, V, Jr. 1987. Germination and emergence of high-sugar sweet corn is improved by presowing hydration of seed. Hort Science 22:1105-1112.

Bloemberg, G. V., Camacho-Carvajal, M. M., Thomas, F. C., Chin-A-Woeng, Dekkers, L. C., Cees, A. M., van den Hondel, J. J., Kuiper, I., Lagopodi, A.

L., Lamers, G. E. M., Mulders, I., Ram, A. F. J., de Weert, S., Wijfjes, A. H. M., and Lugtenberg, B. J. J. (2000) Rhizosphere colonisation by biocontrol *pseudomonas* SPP. 6th International PGPR workshop held in Argentina

Bonas, U., R. E. Stall, and B. J. Staskawicz. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Gen. Genet. 218: 127-136.

Bowers, J. H., and Parke, J. L. 1993. Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. Phytopathology 83:1466-1473.

Bradford, K. J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. Hort Science 21:1105-1112.

Bradford, K. J. Steiner, J. J., and Trawatha, S. E. 1990. Seed priming influence on germination and emergence of pepper seed lots. Crop. Sci. 30:718-721.

Caesar, A. J., and Burr, T. J. 1991. Effect of conditioning, betaine and sucros on survival of rhizobacteria in power formulations. Appl. and Environ. Microbiol. 57:168-172.

Callan, N. W. and Mathre, D. E. 2000. Bio-priming seed treatment. Encyclopedia of Plant Pathology, John Wiley and Sons.

Callan, N. W., Mathre, D. E., and Miller, J. B. 1990. Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* pre-emergence damping-off in *sh-2* sweet corn. Plant Disease 74:368-372.

Callan, N. W. Mathre, D. E., and Miller, J. B. 1991. Field performance of sweet corm seed bio-primed and coated with *Pseudomonas fluorescens* AB254. Hort Science 26:1163-1165.

Callan, N. W. and Mathre, D. E., Miller, J. B., and Vavrina, C. S. 1997. Biological seed treatments: factors affecting their efficacy. Hort Science 32:179-183.

Callan, N. W., Miller, J. B., Mathre, D. E. and Mohan, S. K. 1996. Soil moisture and temperature effects on *shrunken2* sweet corn seed decay and seedling blight caused by *Penicillium oxalicum*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:38-90.

Carletti, S.(2000) Use of plant growth-promoting Rhizobacteria in plant

micropropagation. 6th International PGPR workshop held in Argentina

Chanway, C. P., and Holl, F. B., Turkington, R. 1988a. Genotypic coadaptation in growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. Plant Soil, 106:281-284.

Chao, W. L., Nelson, E. B., Harman, G. E., and Hoch, H. C. 1986. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. Phytopathology 76:60-65.

Chilton, M. D., T. C. Currier, S. K. Farrand, A. J. Bendrich, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* and PSB bacteriophage DNA not detected in crown gall tumor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3672-3676.

Choi, O. H. 1999. Colonization of Biocontrol Agents *Pseudomonas fluorescens* L22, *Paenibacillus polymyxa* E681 and their Population Changes in seeds and Roots. Ms. D. Thesis. Gyeongsang National Uni. Korea.

Cook, R. J., Brucart, W. L., Coulson, J. R., Goettel, M. S., Humber, R. A., Lumsden, R. D., Maddox, J. V., McManus, M. L., Moore, L., Meyer, S. F., Quimbym P. C., Stack, J. P. and Vaughn, J. L. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: Framework for scientific evaluation. Biol. Control 7: 333-351.

Fellay R., Kresch H. M., Prentki P., and Frey J. 1989. Omegon-Km: a transposable element designed for in vivo insertional mutagenesis and cloning of genes in Gram-negative bacteria. Gene 76: 215-226.

Figurski, D. H. and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1648-1652.

Fu, J. R., X. H. Lu, R. Z. Chen, B. Z. Zhang, Z. S. Liu, Z. S. Li and D. Y. Cai. 1988. Osmoconditioning of peanut (*Arachis hypogea* L.) seeds with PEG to improve vigour and some biochemical activities. Seed Sci.&Tech. 16:197-212.

Gabriele Berg, Stefan Kurze, Jens Frankowski, Irina Richter, Robert Dahl (2002) Biological control agent *Serratia plymuthica* strain C48 : Performance in relation to environmental factors. IOBC EFPP

Gish, W. and D. J. States. 1993. Identification of protein coding regions by

database similarity search. *Nat. Genet.* 3: 266-272.

Ham, J. H., Hwang, B. K., Kim, Y. J. and Kim, C. H. 1991. Differential sensitivity to metalaxyl of isolates of *Phytophthora capsici* from different geographic areas. *Korean J. Plant Pathol.* 7:212-220.

Hardegree, S. P. 1994. Germination enhancement of perennial grasses native to the intermountain region. In: Proc. Symp. on the Ecology, Management and Restoration of Intermountain Annual Rangelands, Boise, Ida., 18-22 May 1992. (In Press).

Hardegree Stuart P. 1994. Drying and storage effects on germination of priming grass seeds. *Journal of range management* 47(3):196-199

Harman, G. E. 1991. Seed treatments for biological control of plant disease. *Crop Prot.* 10:166-171.

Harman, G. E. and Taylor, A. G. 1988. Improved seedling performance by integration of biological control agents at favorable pH levels with solid matrix priming. *Phytopathology.* 78:520-525.

Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65-89.

Heydecker, W. 1974 Germination of an idea: the priming of seeds. University of Nottingham School of Agriculture Report 1973/1974.50-67.

Hiroshi Okamoto, Mamoru Sato, Zenji Sato. 1998. Biocontrol of *Phytophthora capsici* by *Serratia marcescens* F-1-1 and Analysis of Biocontrol Mechanisms Using Transposon-insertion Mutants. *Ann. Phytopathol. soc. Jpn.* 64:287-293.

Holl, F. B., and Chanway, C. P. 1992. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.* 38:303-308.

Hong, S. S., Nam, K. W. and Kim, C. H. 1991. Performance of antagonist's peat formulation to *Phytophthora* blight of redpepper in field. *Korean J. Plant Pathol.* 7(3):147-152.

Hong, S. S., Park, K. S., Kim, C. H. and Lee, E. J. 1990. Granule formulation of *Pseudomonas cepacia* Antagonistic to *Phytophthora capsici* and its Viability on Red-pepper. *Korean J. Plant Pathol.* 6(4):434-439.

Hood, M. A., van Diik, K. V., and Nelson, E. B. 1998. Factor affecting attachment of *Entrobacter cloacae* to germinating cotton seed. *Microb Ecol.* 36:101-110.

Hur, J. M., Lee, Y. S., Kim, B. S. and Cho, C. H. 1990. Evaluation and Inheritance of Resistance to Phytophthora blight in Pepper. *Kor. J. Plant Pathol.* 6(4):447-451.

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

Hwang, B. K. and Kim, S. E. 1992. Protection of Pepper Plants Against Phytophthora Blight by an Avirulent Isolate of *Phytophthora capsici*. *Korean J. Plant Pathol.* 8(1):1-7.

Hwang, B. K., de Cock, A. W. A. M., Bahnweg, G., Prell, H. H., and Heitefuss, R. 1991. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among *Pythophthora capsici* isolates from pepper (*Capsicum annuum*). *Syst. Appl. Microbiol.* 14:111-116.

Jee, H. J., Cho, W. D. and Choi, Y. C. 1998. Utilization of Domestic Vegetable Juices as a Medium for Growth and Reproduction of Phytophthora species. 1998. *Kor. J. Plant Pathol.* 14(4):299-302.

Jee, H. J., Nam, C. G., Kim, C. H. 1988. Studies on Biological Control of Phytophthora Blight of Red-pepper I. Isolation of Antagonists and Evaluation of Antagonistic Activity *in vitro* and in Greenhouse. *Korean J. Plant pathol.* 4(4):305-312.

Kaiser, W. J., Hannan, R. M., and Weller, K. M. 1989. Biological control of seed rot and pre-emergence damping-off of chickpea with fluorescent pseudomonads. *Soil. Biol. Biochem.* 21:269-273.

Kang, J. H. 1995. Comparison of root colonizing abilities of fluorescent pseudomonas and observation of their existing patterns on the cucumber rhizoplane. Ms. D. Thesis. Gyeongsang National Uni. Korea.

Kang, J. H. and C. S. Park. 1997. Colonizing pattern of fluorescens pseudomonads on the cucumber seed and rhizoplane. *Korean J. Plant Pathol.* 13: 160-166.

Kang, J. S. 1996. Physiomorphological changes and promotion of germination

under unfavorable conditions by priming of tomato(*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. Dr. D. Thesis. Gyeongsang National Uni. Korea.

Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, U. Burger, P. Wirthner, D. Haas, and G. Defago. 1992. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetyl phloroglucinol. Mol. Plant-Microbe Interact. 5: 4-13.

Kim, B. S., and Hwang, B. K. 1992. Isolation of antibiotic-producing bacteria antagonistic to *Phytophthora capsici* from pepper-growing soils and evaluation of their antibiotic activity. Korea J. Plant Pathol. 8:241-248.

Kim, C. H. 1989. Phytophthora blight and other diseases of red pepper in Korea. Disease and pest problems from continuous cropping. II. Soilborne diseases. FFTC Ext. Bull. 302:10-17.

Kim, C. H. 1993. Current status of gungal and bacterial disease of hot pepper and their control measures. J. Korean Capsicum Res. Coop. 2:1-11.

Kim, C. H., Kim, K. D. and Jee, H. J. 1991. Enhanced suppression of red-pepper Phytophthora blight by combined application of antagonist and fungicide. Korean J. Plant Pathol 7(4):221-225.

Kim, H. K., Park, J. H. and Choi, S. L. 1989. Influence of Various *In Vitro* Conditions on Growth of *Phytophthora capsici*, Pathogen of Pepper Crown and Root Rot. Kor. J. Plant Pathol. 5(3):230-238.

Kim, J. W. 2000. Biological of Antibiotics-Producing *Pseudomonas fluorescens* and Suppression of Soil-Borne Diseases. Ms. D. Thesis. Gyeongsang National Uni. Korea.

Kim, Y. G. 1995. Biological Control of Phytophthora Blight of Redpepper by Antagonistic *Bacillus Polymyxa* 'AC-1'. Dr. D. Thesis. Seoul National Uni. Korea.

Kloepper J. W. 1991. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as biological control agents of soilborn disease. Pages 142-152 in : The Biological control of Plant Disease. J. Bay-Peterson, ed. Food and Fertilizer Technology Center, Taiwan

Kloepper, J. W., and Schroth, M. N. 1981. Development of powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology* 71:590-592.

Kloepper J. W. and Schroth M. N. (1981) Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71:642-644.

Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth. 1980. Enhancement plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.

Kloppper, J. W., Reddy, M. S., Rodriguez-kabana. R., Kenny, D. S., Martinez-Ochoa, N., Kokalis- Burelle, N., and Arthur, K. (2000) Development of an integrated biological preparation for growth enhancement of various vegetable transplant plugs suppressive to plant diseases. 6th International PGPR workshop held in Argentina

Kloepper J. W, Schroth M. N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: *Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie*, ed. *Proceedings of the 4th inernaional conference on plant pathogenic bacteria II*. Tours: Gilbert-Clary, 879-882.

Kloepper, J. W., Scchroth, M. N., and Miller, T. D. 1980. Effects if rhizosphere colonization by plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.

Kloepper, J. W., Zaboltoiwiz, R. M., Tipping, E. M., and Lifshitz, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *In* *The rhizosphere and plant growth*, Edited by D. L. Keister and P. B. Cregan. Kluwer Academic Publishers, Cordrecht. the Netherlands. pp. 315-326.

Kwok, O. C. H., Fahy, P. C. Hoitink, H. A. J., and Kuter, G. A. 1987 Interactions between bacteria and *Trichodermatum hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology* 77:1206-1212.

Lee, E. J., Jee, H. J., Park, K. S. and Kim, C. H. 1990. Studies on Biological control of Phytophthora blight of redpepper IV. Performance of antagonistic agents in field under polyethylene filmhouse. *Korean J. Plant Pathol.* 6(1):58-64.

Lee, H. U., Kim, C. H., and Lee, E. J. 1990. Effect of pre-and Mixid Cropping

with Non-host Plants on Incidence of Phytophthora Blight of Red-pepper. Korean J. Plant Pathol. 6(4):440-446.

Lee, H. U., Kim, C. H. and Nam, K. W. 1991. Suppression of Phytophthora blight incidence of red pepper by cropping system. Korean J. Plant Pathol. 7:140-146.

Lee, J. H., Kwon, T. R., Moon, J. D. and Lee, J. T. 1998. Effect of Acidic Electrolyte Water on Growth and Infection of *Phytophthora capsici*. Kor. J. Plant Pathol. 14(5):440-444.

Lee, J. Y., Kim, B. S., Lim, S. W., Lee, B. K., Kim, C. H. and Hwang, B. K. 1999. Field Control of Phytophthora Blight of Pepper Plants with Antagonistic Rhizobacteria and DL- β -Amino-n-Butyric Acid. Korean J. Plant Pathol. 15(4):217-222.

Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 24: 187-209.

Leonian, L. H. 1992. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. Phytopathology 12:401-408.

Mathre, D. E., Callan, N. W., Johnston, R. H., and Schewend, A. 1994. Factors influencing the control of *Pythium ultimum*-induced seed decay by seed treatment with *Pseudomonas aureofaciens* AB254. Crop Protection 13:301-307.

Mathre, D. E., Cook, R. J. and Callan, N. W. 1999. From discovery to use: traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. Plant Disease 83:972-983.

Mathre, D. E., Johnston, R. H., Callan, N. W., Mohan, S. K., Martin, J. M., and Miller, J. B. 1995. Combined biological and chemical seed treatments for control of two seedling diseases of sh2 sweet corn. Plant Dis. 79:1145-1148.

McInroy, J., Conner, B. M., and Klopper, J. W. (2000) Emergence promotion in maize by soil, Rhizosphere and endophytic bacilli in conjunction with solid matrix priming. 6th International PGPR workshop held in Argentina

Merav Kamensky, Marianna Ovadis, Ilan Chet, Leonid Chernin (2002) Biological control of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* in the greenhouse by a *Serratia plymuthica* strain with multiple mechanisms of antifungal activity. IOBC EFPP

Moon, B. J., Schneider, R. W. and Park, H. C. 1996. Biological control of seed and seedling rot caused by *Pythium arrhenomanes* in water-seeded rice. Korean J. Plant Pathol. 12:407-414.

Nam, C. G., Jee, H. J. and Kim, C. H. 1988. Studies on Biological Control of Phytophthora Blight of Red-pepper II. Enhancement of Antagonistic Activity by soil Amendment with Organic Materials. Korean J. Plant Pathol. 4(4):313-318.

O'Brien, J. B. and Kenny, D. S. (2000) International considerations for the development of PGPR products. 6th International PGPR workshop held in Argentina

Oh, J. S. and Kim, C. H. 1992. Varying sensitivity to metalaxyl of Korean isolates of *Phytophthora capsici* from red pepper fields. Korean J. Plant Pathol. 8:29-33.

Pal, K. K., Dye, R., Bhatt, D. M. and Chauhan, S. M. (2000) Plant Growth promoting fluorescent Pseudomonads enhanced peanut growth, yield and nutrient uptake. 6th International PGPR workshop held in Argentina

Park, C. S. 1994 Impact of rhizosphere competence of biocontrol agent upon the disease suppression and plant growth promotion Pro., Int. Symp. on biological control of Plant Diseases. pp. 27-49, Suwon Korea.

Park, C. S. 1995. Development of biocontrol agents and useful low temperature growing rhizosphere microorganism. RDA. J. Sci. 37:119-129.

Park, C. S., Kim, J. W., Choi, O. H. 2000. Attributes of some Root Colonizing Bacterial Strains Associated with Biological Control of Soil Borne Disease. Pro., Int. Symp. on biological control. pp. 67-85, Suwon Korea.

Park, J. H. and Kim, H. K. 1989. Biological control of Phytophthora crown and root rot of greenhouse pepper with *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter agglomerans* by improved method of application. Korean J. Plant Pathol. 5(1):1-12.

Park, K. S., Jang, S. W., Kim, C. H. and Lee, E. J. 1989. Studies on Biological Control of Phytophthora Blight of Red-pepper III. Formulations of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas cepacia* Antagonistic to *Phytophthora capsici* and Their Preservation. Korean J. Plant pathol. 5(2):131-138.

Park, J. L., Rand, R. E., Joy, A. E., and King, E. B. 1991. Biological control of Pythium damping-off and Aphanomyces root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. Plant Dis. 75:987-992.

Plucknett, D. L.(1971). Use of pelleted seed in crop and pasture establishment. Hawaii agric. Ext. Circ. 446,15.

Ryu, C. M. 1998. Nature of root colonizing *Bacillus polymyxa* E681 and its effects on the growth of barley and sesame. Ms. D. Thesis. Gyeongsang National Uni. Korea.

Ryu, G. H. 1988. Biological Control of Several Soil-borne Diseases of Vegetables by *Pseudomonas fluorescens*. Dr. D. Thesis. Seoul uni. Korea.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.

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

Shah-smith, D. A., and Burns, R. G. 1996. Biological control of damping-off of sugar beet by *Pseudomonas putida* applied to seed pellets. Plant pathology 45: 572-582.

Shen, S. S., Kim, J. W. and Park C. S. 2002. *Serratia plymuthica* strain A21-4 : A Potential Biocontrol Agent Against *Phytophthora* Blight of pepper. Kor. J. Plant pathol.18:138-141

Shen, S. S., Ok-Hee Choi, Sun-Mi Lee and Chang-Seuk Park. 2002. *In vitro* and *In vivo* Activities of a Biocontrol Agent, *Serratia plymuthica* A21-4, Against *Phytophthora capsici*. Plant Pathol. J. 18(4):221-224

Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Bio/Technology 1: 784-791.

Stachel, S. E., G. An, C. Flores, and E. W. Nester. 1985. A Tn3 *lacZ* transposon for the random generation of b-galactosidase gene fusions:

application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. EMBO J. 4: 891-898.

Sung, N. K. and Hwang, B. K. 1988. Comparative efficacy and in vitro activity of metalaxyl and metalaxyl-copper oxychloride mixture for control of *Phytophthora* blight of pepper plants. Korean J. Plant Pathol. 4:185-196.

Suslow, T. V., and Schroth, M. N. 1982. Rhizobacteria of sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. Phytopathology 72:199-206.

Thomashow L. S. and Weller D. M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. J. Bacteriol. 179: 3499-3508.

Thomashow L. S. and Weller D. M. 1990. Application of fluorescent *Pseudomonas* to root diseases of wheat and some mechanisms of disease suppression. In : *Biological control of soil-borne plant pathogens*, ed. by D. Hornby, pp. 109-122. C.A.B, International, Wallingford.

Trigalet, A., D. Trigalet-Demery, and P. Prior. 1998. Elements of biocontrol of tomato bacterial wilt. Springer-Verlag, Berlin.

Tsutomu Arie, Shigetou Namba, Shuichi Yamashita, Yoji Doi, and Toshio Kijima. 1987. Biological Control of Fusarium Wilt of Bottle Gourd by Mix-Cropping with Welsh Onion or Chinese Chive Inoculated with *Pseudomonas gladioli*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53:531-539.

Van Overbeek, L. S., M. Cassidy, J. Kozdroj, J. T. Trevors, and J. D. v. Elsas. 2002. A polyphasic approach for studying the interaction between *Ralstonia solanacearum* and potential control agents in the tomato phytosphere. J. Microbiol. Methods 48: 69-86.

Weber, G. F. 1932. Blight of pepper in Florida caused by *Phytophthora capsici* Phytopathology 22:775-780.

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

Weller, D. M., Zhang, B. X. and Cook, R. J. 1985. Application of a rapid

screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Dis.* 69:710-713.

Wilson, A. M. 1972. Measurement of seed responses to environment. *J. Range Manage.* 26:482-483.

Wilson, A. M. 1973. Responses of crested wheatgrass seeds to environment. *J. Range Manage.* 26:43-46.

Wilson, A. M., D. E. Wondercheck, and C. J. Goebel. 1974. Responses of range grass weeds to winter environments. *J. Range Manage.* 27:120-122.

Wurr, D. C. E. and J. R. Fellows. 1983. The effect of the time of seedling emergence of crisp lettuce on the time of maturity and head weight at maturity. *J. Hort. Sci.* 58(4):561-566.

Wuthrich B. 1991. Biologische bekämpfung der schwarzbeinigkeit des weizens durch einsetz von *Pseudomonas fluorescens* sramm CHA0 in field und mechnismen der knakheitsunterdrückung. Ph. D. thesis, No. 9447. Swiss Federal Institute of Technoloy, Zurich, Switzerland.

Yang, S. S., Sung, N. K., Choi, D. I. and Kim, C. H. 1989. Pathogenic Variation of *Phytophthora capsici* Leonian on Red-pepper in Korea. *Kor. J. Plant Pathol.* 5(4):370-376.

Yan, Z., Ryu, C. M., McInroy, J., Reddy, M. S., and Klopper, J. W. (2000) Effect of PGPR dosage on plant growth promotion and induced systemic resistance. 6th International PGPR workshop held in Argentina

Zablotowicz, R. M., Press, C. M. Lyng, N., Brown, G. L., and Klopper, J. W. 1992. Compatibility of plant growth promoting rhizobacterial strains with agrichemicals applied to seed. *Can. J. Microbiol.* 38:45-50.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

