

토양 분리 방선균 *Streptomyces griseofuscus* 200401의 고추 생육 촉진과 역병 발생 억제 효과

임태현 · 권순열 · 김진호^{1*}

상주대학교 지역기술혁신센터, ¹상주대학교 생명자원과학대학 식물자원학과

Effects of *Streptomyces griseofuscus* 200401 on Growth of Pepper Plants and Phytophthora Blight by *Phytophthora capsici*

Tae Heon Lim, Kwon Soon Youl and Kim Jin Ho^{1*}

Technology Innovation Center, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

¹Department of Plant Resources, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

(Received on February 9, 2006)

The microorganisms with the antifungal activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum acutatum* and the plant growth-promoting activity were screened from a forest and natural fields of Gajang-Dong, Sangju-city. One of the isolates, *Streptomyces griseofuscus* 200401, was selected as a good plant growth-promoting strain in this study. In greenhouse test, the number of leaf, fresh weight, and dry weight of pepper plants, that were grown with treatment of culture suspension or powder containing *S. griseofuscus* 200401, were higher than those without the bacterial cells. Cultivation of *S. griseofuscus* 200401 strain for 7 days in a nutrient rich medium produced ammonium chloride up to 0.13 µg/ml in the culture solution of *S. griseofuscus*. Treatment of the selected strain significantly reduced the severity of the late blight of pepper plants to show the equivalent disease control activity to chemical fungicide. This study suggests that *S. griseofuscus* 200401 strain could be a potential biological agent with the biocontrol activity and the plant growth-promoting activity.

Keywords: Antifungal, Phytophthora blight, Plant growth-promoting, *Streptomyces griseofuscus*

고추는 국내 재배되는 채소면적의 20% 이상을 차지하는 주요 경제작물 중 하나이다. 고추 재배에 있어 발생하는 주요 병은 *Phytophthora capsici*와 *Colletotrichum* spp.에 의한 역병과 탄저병을 들 수 있다. 역병에 의한 생산 손실정도는 연 평균 5% 정도로 추정되고 있다(Jee 등, 2000). 역병에 의한 피해는 협소한 경지면적에 의한 연작과 수량 증대를 위한 다비 및 밀식재배 등의 재배방법, *P. capsici*가 가지고 있는 생리적 특성에 의한 방제의 어려움에 기인한다(Agrios, 1997; Jee 등, 2000).

현재의 역병 방제는 metalaxyl를 포함한 화학적 살균제에 의존하고 있으나 균의 생리적 특성, 재배조건 및 살균제 연용에 따른 저항성 균 출현에 의한 약효 저하 등으

로 인해 어려운 실정이다(Bus 등, 1996; Delp, 1988). 이러한 합성농약의 문제점을 극복하고 안정적인 농산물 생산을 위한 방제수단으로 저항성 품종의 이용, 재배방법의 개선, 미생물을 이용한 생물적 방제 및 천연물 이용 방법 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Baker 등, 1983; Becker, 1993; Chet와 Inbar, 1994; Joo 등, 2002; Lee 등, 1995). 특히 식물 추출물과 미생물 대사산물 등의 천연물질은 활성성분의 직접적인 이용뿐만 아니라 신농약 개발을 위한 선도물질과 신규 작용점 연구 분야에 이용가치가 높다(Katz와 Demain, 1977; Lange 등, 1993).

따라서 본 연구에서는 산림토양으로부터 분리된 방선균을 활용하기 위한 기초 자료를 확보하고자 역병균에 대한 길항력과 고추의 초기 생육에 미치는 영향 등을 조사하였다.

*Corresponding author

Phone)+82-54-530-5202, Fax)+82-54-530-5202

E-mail) kimjh@sangju.ac.kr

재료 및 방법

미생물의 분리, 보관 및 동정. 균원 시료로는 작물의 재배과정 중에 투여되는 미생물을 배제하기 위하여 상주 일원의 비경작 산림 토양을 채집하여 사용하였다. 미생물은 시료를 70°C에서 3시간 건조 후 살균수로 3단 희석한 후 200 µl를 취하여 방선균 분리용 배지(Difco™ Actinomycete Isolation Agar)에 도말하여 28°C의 배양기에 배양하면서 전형적인 방선균의 균층을 형성하는 균을 분리하여 4°C의 냉장고에 보관하며 사용하였다. 분리 균주의 *P. capsici*와 *C. acutatum*에 대한 기내 항 진균력 및 동정에 관한 내용은 본 연구팀에 의하여 보고된 바 있다 (Lim, 2005).

식물생육촉진 효과. *S. griseofuscus* 200401 식물생육 촉진 효과는 YMB(Yeast extract 3.0 g, Malt extract 3.0 g, Peptone 5.0 g, Dextrose 10.0 g, dH₂O 1 l)를 이용하여 28°C, 150 rpm/min 및 pH 6.8의 조건으로 7일간 배양한 배양액의 엽면살포 처리와 같은 조건으로 배양 후 동결 건조하여 제조한 미생물제제(10⁸ cfu/g)의 토양 및 엽면살포 처리구로 구분하여 실시하였다. 미생물 제제는 규조토(40%), 제올라이트(39.95%), 침강억제제(0.05%) 및 동결 미생물 분말(20%)을 혼합하여 제조하였다. 미생물 배양액 100배와 500배 희석액의 엽면살포, 100배(w/w) 희석 미생물제제의 상토 처리 및 미생물제제 500배와 1,000배 희석액의 엽면살포로 나누어 처리하였다. 고추 재배는 2005년 02월 01일에 최아시킨 고추(청풍명월)를 파종하여 실시하였다. 2005년 04월 15일까지 75일간 재배 후 총 엽수, 전체 생물 중, 지상부 생물 중, 지하부 생물중, 지상부 건물 중 및 지하부 건물 중 등의 초기 생육정도를 조

사하였다. 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 하였다.

배양액의 유리아미노산 분석. 배양 후 배양액내의 식물체 생육을 촉진시키는 유리아미노산 중 염화암모늄(ammonium chloride)의 농도를 측정하기 위한 미생물은 YMB배지를 이용하여 28°C, 150 rpm 및 pH 6.8의 조건으로 7일간 배양하였다. 배양 후 여과하여 비 배양 배지를 대조구하여 분석하였다. 분석 조건은 Table 1과 같다.

고추역병방제 효과. *S. griseofuscus* 200401의 *P. capsici*에 의한 역병발생 억제 효과는 30일간 육묘한 고추(청풍명월) 묘를 사용하여 확인하였다. 고추 묘는 직경 15 cm의 pot에 원예용 상토(부농)와 피트모스를 1:1의 혼합하여 제조한 시험용 토양을 사용하여 식재하였다. V-8배지에서 병원균을 7일간 배양 후 살균수를 분주하여 4°C 냉장고에서 1~2시간 동안 유주자낭 형성과 유주자 유출을 유도한 후 유주자의 농도를 10⁴ m/로 조절하여 접종원으로 사용하였다. 식재 1일 후 100 ml/주씩 관주하여 접종하였으며, 시험용 미생물은 YMB배지를 이용하여 28°C, 150 rpm/min 및 pH 6.8의 조건으로 7일간 배양 후 10⁸ cfu/m/로 농도를 조절하여 사용하였다. 미생물은 ① 병원균과 동시 1회 처리 ② 병원균 접종 후 7일 간격으로 3회 처리 ③ 병원균 접종 후 15일 간격 2회 처리로 구분하여 접종하였다. 역병 발생은 처리 3 처리 7일 후 7일 간격 4회 조사하였다. 모든 처리는 3반복으로 실시하였으며 30주/반복으로 하였다. Metalaxyl를 대조약제로 선정 실시하였다. 대조약제의 처리는 식재 7일 후 1회 관주 처리하였다. 방제가는 아래 공식에 의해서 구했다.

역병발생 억제율(%) =

{(대조구의 역병 발생 식물체 수-처리구의 역병 발생 식물체수)÷대조구의 역병 발생 식물체 수}×100

Table 1. Operation conditions of amino acid analyzer for analysis of free amino acids in culture suspension of *Streptomyces griseofuscus* 200401

Amino acid analyzer	Biochrom 30, Biochrom Ltd., UK		
Column	U-1631	4.6 × 200 mm	Biochrom Ltd.
Sample processor	MIDAS, Spark Holland BV., Netherlands Loop volume 200 µl		
Injection volume	40 µl		
Buffer	Buffer 1 Lithium Citrate Buffer A pH 2.8 0.2M Buffer 2 Lithium Citrate Buffer B pH 3.0 0.3M Buffer 3 Lithium Citrate Buffer CII pH 3.15 0.5M Buffer 4 Lithium Citrate Buffer DII pH 3.5 0.9M Buffer 5 Lithium Citrate Buffer pH 3.55 1.65M Buffer 6 Lithium Hydroxide solution 0.3M		
Reagent	Ultra Ninhydrin Reagent Kit (Biochrom Ltd.)		
Flow rate (ml/h)	Buffer; 20	Ninhydrin; 20	

결과 및 고찰

식물생육 촉진 효과. *S. griseofuscus* 200401의 배양액 및 제제의 처리가 고추 초기 생육에 미치는 영향은 엽면살포와 상토처리로 구분하여 온실에서 75일간 고추 플러그묘를 재배하여 조사하였다. 엽수는 미생물을 포함한 powder 100배 토양 처리구에서 식물체당 18개로 대조구에 비하여 30% 정도 많았다(Table 2). 지상부 생물중의 경우 미생물 첨가 powder의 1,000배 처리구를 제외하고 다른 처리구는 대조구에 비하여 15.9~38.4%의 증가율을 보였다(Table 2). 지하부(뿌리) 생물중의 경우 미생물 제제의 500배 엽면살포 처리구가 가장 높았고 대조구에 비하여 처리구에 따라 40%~76% 정도의 증가율을 보였다

Table 2. Growth-promoting effects of *Streptomyces griseofuscus* 200401 and powder with the bacterial cells on the growth of pepper plants in pot experiments

Treatment	Method of treatment	Dilution	No. of leaf	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
				Shoot	Root	Shoot	Root
Control	-	-	13.8 c	7.55 d	4.95 d	1.44 d	0.61 c
Culture solution with bacterial cells (10 ⁸ cfu/ml)	Foliar spray	×100	16.4 ab	9.02 bc	6.97 bc	1.92 ab	0.80 abc
Culture solution with bacterial cells (10 ⁸ cfu/ml)	Foliar spray	×500	16.0 abc	8.75 bc	6.98 bc	1.73 bc	0.81 abc
Powder with bacterial cells (10 ⁸ cfu/ml)	Soil	×100	18.0 a	10.45 a	7.75 ab	2.11 a	0.88 ab
Powder with bacterial cells (10 ⁸ cfu/ml)	Foliar spray	×500	16.8 ab	9.80 ab	8.70 a	1.90 ab	0.95 a
Powder with bacterial cells (10 ⁸ cfu/ml)	Foliar spray	×1,000	14.8 bc	7.61 d	6.91 bc	1.44 d	0.71 bc

Means with the same letter in the columns are not significantly different at P = 0.05 in Duncan's multiple range test.

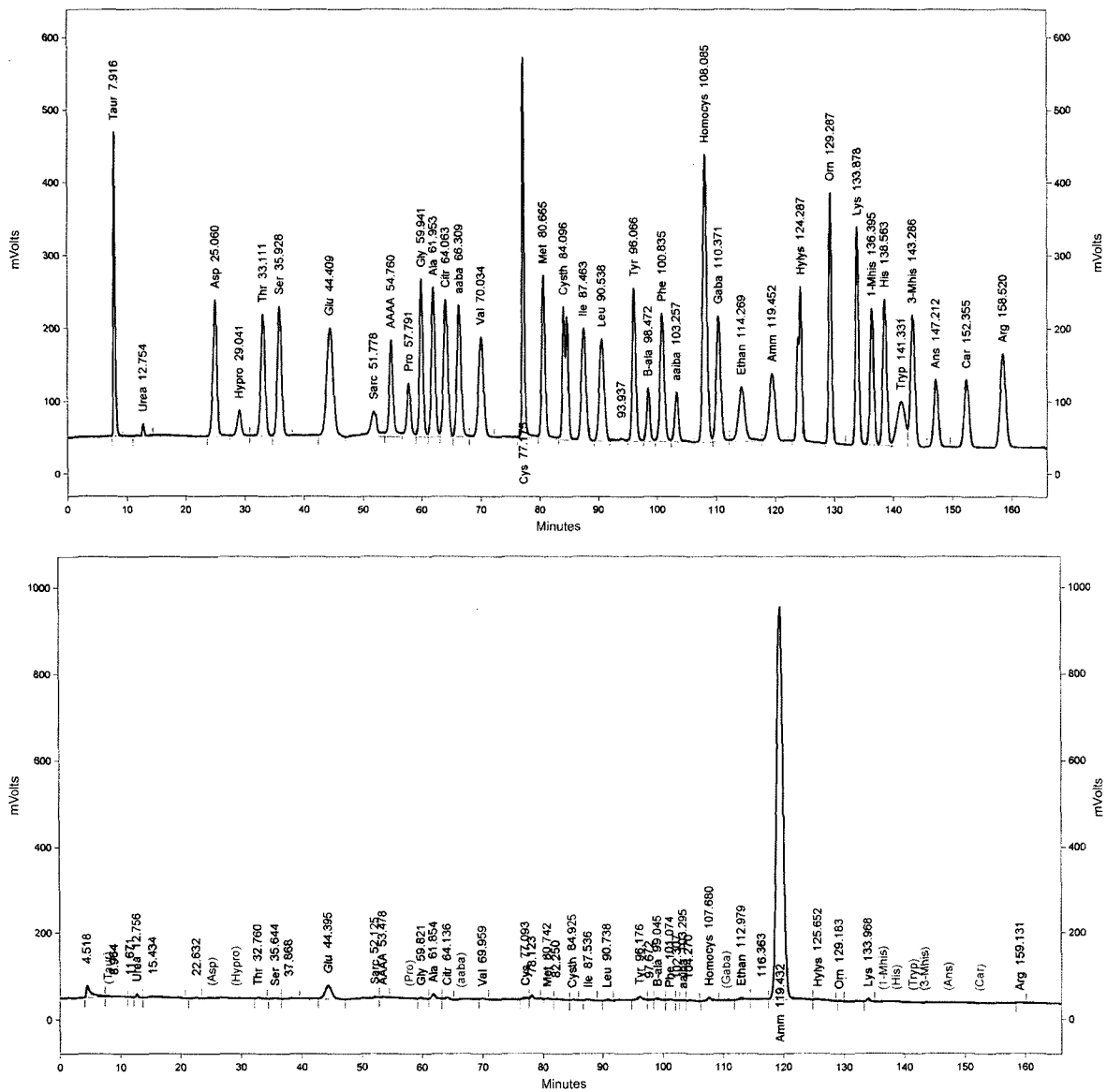


Fig. 1. Comparison of free amino acids between culture suspension after incubation of *Streptomyces griseofuscus* 200401 for 7 days at 30°C. Incubation without bacterial cells (**top**) and incubation with bacterial cells (**Bottom**).

(Table 2). 이러한 고추 식물체에 대한 생육촉진 효과는 *S. griseofuscus* 200401의 2차 대사산물 또는 미생물에 의한 식재 토양내 유기질소원의 분해에 따른 ammonium chloride와 같은 질소원 공급에 기인하는 것으로 생각된다(Fig. 1) (Joo 등, 2002; Katz와 Demain, 1977; Lifschitz 등, 1987).

배양액의 유리아미노산 분석. YMB 배지를 이용하여 7일간 진탕배양 후 배양액의 유리아미노산을 분석한 결과, *S. griseofuscus* 200401 배양 후 식물의 생육을 촉진시킬 수 있는 ammonium chloride는 0.13 µg/ml의 농도로 검출되었다(Fig. 1). 선발 미생물이 분비하는 항진균성 물질과 ammonium chloride의 최적 생산조건 확립을 위한 연구를 통하여 다기능 친환경 작물 보호제 개발이 가능할 것으로 생각된다.

역병발생억제 효과. 미생물의 *P. capsici*에 의한 역병 발생 억제효과를 대조약제 metalaxyl과 비교하여 조사한 결과, *S. griseofuscus* 200401의 7일 간격 3회 처리구의 방제가는 14일 후 91.1%, 21일 후 61.5% 및 28일 후 37.3%로 나타나 대조약제의 방제가 100%, 57.8% 및 40.5%와 유사한 경향을 보였다(Table 3). 병원균과 동시 1회 처리의 경우 조사개시 14일 후의 방제가가 61.2%로 다른 처리구에 비하여 낮게 나타났다. 2주 간격으로 2회 처리구의 경우 조사개시 14일 후 방제가가 70.3%로 나타났으나 28일 후에는 32.1%로 나타났다(Table 3). 본 연구를 통하여 선발된 *S. griseofuscus* 200401의 처리에 의한 역병발

생 억제 효과는 1차 항균활성 검정에서 나타난 항생물질에 의한 것으로 생각되며 높은 억제효과를 얻기 위해서는 식물체 식재시 동시처리와 7일 간격 처리가 병행되어야 할 것으로 생각된다(Powel과 Fox, 1993). 현재 미생물에 의해 생산되는 항균물질의 동정에 관한 연구가 진행 중이다.

요 약

비경작 산림 토양으로부터 고추역병 억제와 초기생육 촉진 효과를 보이는 방선균을 분리하였다. 분리된 *Streptomyces griseofuscus* 200401은 역병균 뿐만 아니라 탄저병에 대하여 항균활성을 보였다. 분리 미생물 배양액과 그 제제의 생육초기단계 처리로 식물체의 엽수, 생물중 및 건물 중 등이 대조구에 비해 증가하였다. 공시균주 배양액 중 유기질소원의 분해에 의한 ammonium chloride의 농도는 배양 후 0.13 µg/ml로 나타났다. 분리균주의 온실에서 고추역병 발생억제 효과를 검정한 결과, 1주일 간격으로 3회 처리한 경우 최종방제가가 37.3%로 대조약제와 유사하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 기술혁신센터사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*, Academic Press, Inc., New York. 635 pp.

Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, C. A., Saser, M. and MacFall, J. S. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* 73: 1148-1152.

Becker, J. O. 1993. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pestic. Sci.* 37: 355-363.

Bus, V. G., Bongers, A. J. and Risse, L. A. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazail on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Dis.* 75: 1098-1100.

Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.

Delp, C. J. 1988. *Fungicide resistance in North America*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 133 pp.

Jee, H. J., Cho, W. D. and Kim, C. H. 2000. Phytophthora disease in Korea. RDA. 226 pp.

Table 3. Effects of *Streptomyces griseofuscus* 200401 on late blight by *P. capsici* of pepper plants in the pot experiment

Treatment	Control value (%) ^a			
	7 days	14 days	21 days	28 days
Control	ND ^b	-	-	-
Metalaxyl	ND	ND	57.8 ± 2.35	40.5 ± 2.21
Treatment 1 ^c	ND	61.2 ± 1.43	40.3 ± 3.12	32.1 ± 2.30
Treatment 2 ^d	ND	91.1 ± 2.12	61.5 ± 2.13	37.3 ± 3.23
Treatment 3 ^e	ND	70.3 ± 1.86	30.2 ± 1.89	20.1 ± 1.25

^aControl value = {(the number of infected plants of control - the number of infected plants of treatment) ÷ the number of infected plant of control} × 100.

^bND = Non-detection of pepper plants with symptom.

^cThe culture suspension (10⁸ cfu/ml) of *S. griseofuscus* 200401 was treated only once together with pathogens.

^dPots with pepper plants were treated with the culture suspension (10⁸ cfu/ml) of *S. griseofuscus* 200401 three times at an interval 7 days after inoculation of pathogens.

^ePots with pepper plants were treated with the culture suspension (10⁸ cfu/ml) of *S. griseofuscus* 200401 twice at an intervals 15 days after inoculation of pathogens.

The number of infected plants was investigated up to 3 times at an interval 7 days after final treatment.

- Joo, G. J., Lee, I. H. and Kim, J. H. 2002. Chitinase production and Isolation of *Serratia plymuthica* AL-1 antagonistic to white rot fungi from *Allium fistulosum* roots. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 135-141.
- Katz, E. and Demain, A. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41: 449-474.
- Lange, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicide-the natural choice. *Pestic. Sci.* 39: 155-160.
- Lim, T. H. 2005. Antifungal activity of *Streptomyces griseofuscus* 200401 against pathogens causing late blight and anthracnose on pepper. *Korean J. Pestic. Sci.* 9: 102-107.
- Lifschitz, R., Kleopfer, J. W., Kozlowski, M., Simonson, C., Carlson, J. and Tipping, E. M. 1987. Growth promotion of canola seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* 51: 251-255.
- Powel, K. A. and Fox, F. M. 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic. Sci.* 37: 315-321.