

Bacillus spp. 엽면살포에 의한 가로수 및 고추의 병 방제**Disease Management in Road Trees and Pepper Plants by Foliar Application of *Bacillus* spp.**정준휘^{1,2} · 류충민^{1,2*}¹한국생명공학연구원 분자식물세균실험실, ²과학기술연합대학원대학교 시스템생명공학전공**Joon-hui Chung^{1,2} and Choong-Min Ryu^{1,2*}**¹Molecular Phytobacteriology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 34141, Korea²Biosystems and Bioengineering Program, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Korea***Corresponding author**

Tel: +82-42-879-8229

Fax: +82-42-860-4488

E-mail: cmryu@kribb.re.kr

Out of plant-associated bacteria, certain plant growth-promoting bacteria (PGPB) have been reported to increase plant growth and productivity and to elicit induced resistance against plant pathogens. In this study, our objective was to broaden the range of applications of leaf-colonizing PGPB for foliar parts of road trees and pepper. Total 1,056 isolates of endospore-forming bacteria from tree phylloplanes were collected and evaluated for the enzymatic activities including protease, lipase, and chitinase and antifungal capacities against two fungal pathogens, *Colletotrichum graminicola* and *Botrytis cinerea*. Fourteen isolates classified as members of the bacilli group displayed the capacity to colonize pepper leaves after spraying inoculation. Three strains, 5B6, 8D4, and 8G12, and the mixtures were employed to evaluate growth promotion, yield increase and defence responses under field condition. Additionally, foliar application of bacterial preparation was applied to the road trees in Yuseong, Daejeon, South Korea, resulted in increase of chlorophyll contents and leaf thickness, compared with non-treated control. The foliar application of microbial preparation reduced brown shot-hole disease of *Prunus serrulata* L. and advanced leaf abscission in *Ginkgo biloba* L. Collectively, our results suggest that leaf-colonizing bacteria provide potential microbial agents to increase the performance of woody plants such as tree and pepper through spray application.

Keywords: Brown shot-hole disease, Foliar application, Phyllosphere, Plant growth-promoting bacteria, Woody plant

Received March 15, 2016

Revised May 27, 2016

Accepted June 8, 2016

서 론

식물은 지구 상에서 성공적으로 정착한 생물종이고, 식물의 지상부는 지표면의 2배 이상을 차지할 만큼 넓은 표면적을 갖고 있다(Lindow와 Brandl, 2003; Lindow와 Leveau,

2002). 식물은 잎, 뿌리, 꽃, 종자, 열매와 같이 미생물이 정착할 수 있는 표면을 제공하고, 많은 경우 식물이 표면정착 세균과 상호작용을 하는 것으로 보고되었다(Lugtenberg 등, 2002). 식물은 구조상 크게 지상부와 지하부로 구분할 수 있는데, 표면정착세균의 정착 장소에 따라 각각 지상부의 엽권과 지하부의 근권으로 크게 나눌 수 있다(Leveau, 2015). 최근 연구동향을 보면 근권에 정착하는 미생물에 대한 연구는 활발하게 이루어졌으나 엽권에 정착하는 미

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

©The Korean Society of Plant Pathology

©This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

생물에 대한 연구는 상대적으로 미진한 상황이다(Cirvilleri 등, 2008; Delmotte 등, 2009; Knief 등, 2012). 엽권정착세균(phylllobacteria)은 표면정착세균 중에서 엽권에 정착하여 살아가는 세균을 총칭하며, 성장촉진과 같이 식물에 긍정적인 영향을 주거나 또는 지상부에 병을 일으키는 것과 같은 부정적인 영향도 주며 엽권에 정착하여 살아간다(Glick, 2012; Lindow와 Brandl, 2003; Vorholt, 2012). 식물의 표면에 정착하여 식물에 긍정적인 영향을 주는 세균 군집 중에서 식물의 성장을 촉진시키는 세균을 총칭하여 식물성장촉진세균(plant growth-promoting bacteria, PGPB)으로 명명하였다(Glick, 2012; Glick과 Bashan, 1997; Vorholt, 2012). PGPB가 직·간접적으로 유해한 미생물을 저해하고 식물의 유도전신저항성(induced systemic resistance, ISR)을 일으키는 효과가 보고되면서, PGPB를 식물에 처리하여 화학농약의 단점을 극복하는 친환경적인 병 방제방법으로 인식하게 되었다(Bashan과 Holguin, 1998; Compant 등, 2005; Whipps, 2001). 방법론적으로는 PGPB로 알려진 *Bacillus*속이나 *Pseudomonas*속을 근권에서 분리하여 식물의 뿌리에 처리하는 방법이 주로 시도되었다(Bhattacharyya와 Jha, 2012; Kishore와 Pande, 2007; Kloepper 등, 1980). 최근에는 PGPB의 적용방법을 확대하기 위해서 PGPB를 작물이나 목본식물의 엽면에 살포하는 방식도 시도되었다(Baker 등, 1983; Chung 등, 2008; Jiang 등, 2006; Korsten 등, 1997; Lee 등, 2008; Obradovic 등, 2004; Pusey, 1989; Raupach와 Kloepper, 1998; Silva 등, 2004). 토양에서 분리한 *P. fluorescens*와 *P. putida*를 수목에 엽면살포한 결과 사과와 감은 별무늬병을 방제하였으며(Ganeshan과 Manoj Kumar, 2005; Kinkel, 1997; Kucheryava 등, 1999; Planchamp 등, 2015), 사과나무 근권에서 분리한 PGPB를 사과나무에 엽면살포한 결과 수목의 생장이 촉진되고 수확량이 증대하는 사례도 보고되었다(Ryu 등, 2011). 또한, 토양에서 분리한 *Bacillus subtilis* Osu-142 균주를 살구수목에 살포하였을 때 살구나무의 성장과 수확량이 증진되는 효과와 진균병인 *Wilsonomyces carpophilus*에 대한 방제 효과도 보고되었다(Altindag 등, 2006; Çakmakçı 등, 2001; Eşitken 등, 2002; Eşitken 등, 2006). 과실수, 조경수로 널리 이용되는 벚나무속(*Prunus* spp.)의 경우, PGPB인 *Pseudomonas* BA-8와 *Bacillus* OSU-142를 엽면에 살포하여 성장촉진과 수확량 증대효과를 확인했지만(Eşitken 등, 2006), 벚나무속의 주된 병인 벚나무 진균성 갈색무늬구멍병(*Blumeriella jappii*)에 대해서는 항진균제인 sterol demethylation inhibitor를 이용한 화학적 방제가 추가되었고, PGPB를 이용한 생물적 방제는 거의 시도되지 않았다(Eşitken 등, 2002; Ma 등, 2006).

본 연구에서는 수목의 지상부 병을 방제하기 위한 방법으로 엽권에 정착하는 PGPB 처리에 의한 수목의 성장촉진 효과와 병저항성 반응을 연구하였다. 엽권정착능이 뛰어난 bacilli 계열 균주가 내생포자를 형성한다는 특성을 이용하여 생물적 방제제로서 장기보관과 운반이 용이하다는 장점을 확보하였다. 분리한 엽권정착세균의 가로수에서의 활성을 확인하기 앞서, 가로수와 유사하게 목질부를 형성하는 특징을 가지고 있는 고추(*Capsicum annuum* L.)를 목본식물의 모델로 선정하여(Zhigila 등, 2014), 선발된 PGPB의 효과를 확인하였다. 또한 PGPB에 의한 은행나무 낙엽생성에 대한 연구도 진행하여 종합적인 가로수 관리의 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

엽권정착 내생포자세균의 분리. 수목의 엽권에 정착하는 내생포자생성 세균만을 분리하기 위해서 대한민국 대전광역시 유성구 일대의 벚나무(*Prunus serrulata* L.) (위도: 36.3616656°, 경도: 127.3565759°), 은행나무(*Ginkgo biloba* L.) (위도: 36.3766593°, 경도: 127.3613144°), 이팝나무(*Chionanthus retusus*) (위도: 36.3627869°, 경도: 127.3448559°) 잎을 무작위로 채취했다. 코르크보리(cork borer, 직경 10 mm)를 이용하여 무작위로 수거한 나뭇잎에서 지름 10 mm의 잎조각을 얻었다. 획득한 잎조각을 멸균된 1.0 ml phosphate buffered saline (PBS)가 담긴 1.5 ml 튜브에 넣은 후, 플라스틱 막자로 잎조각을 갈아주었다. 내생포자를 형성하는 세균만을 분리하기 위하여 80°C water bath에 30분간 증탕 처리를 하였다. 증탕된 잎조각이 포함된 PBS 완충액을 1/10 tryptic soy agar (TSA) 배지에 도말한 후 30°C 배양기에서 12시간 배양을 한 후에, 배양되어 나온 단일 세균 집락을 형태학적 형질 및 표현형에 따라 분리하였다. 분리된 1,056개 균주는 96-well plates로 -80°C 극저온냉동고에 보관하였다.

엽권정착 내생포자생성 균주의 생물학적 활성 분석 및 균주 동정. 분리된 1,056개 균주는 생물학적 활성을 측정하기 위해서 protease, chitinase, lipase 활성을 측정하였다. Protease 활성은 배지(1% skim milk, 0.02% sodium azide, 2.0% agar)에서 측정하였고(Chantawannakul 등, 2002), chitinase 활성은 배지(5% v/v chitin, 0.7 g K₂HPO₄, 0.3 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ · 5H₂O, 0.01 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.001 g ZnSO₄, 0.001 g MnCl₂, 1.5% agar)에서 측정하였고(Hsu와 Lockwood, 1975), lipase 활성은 배지(1.0 g yeast extract, 5.0 ml corn oil, 2.0 g NaCl, 0.4 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.7 g MgCl₂ · 6H₂O, 0.5 g CaCl₂ · 2H₂O, 0.3

g KH_2PO_4 , 0.3 g K_2HPO_4 , 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 ml vitamin solution [DSM catalogue No. 141], 1.0 ml trace element solution [DSM catalogue No. 141], 1.5% agar)에서 측정하였다(Lee 등, 1999). 각 효소의 활성을 대량 스크리닝으로 확인하기 위해 96 well plate 상태로 보관된 엽권정착 균주를 96-well microplates stamp를 이용해 $250 \times 250 \times 11 \text{ mm}^2$ 크기의 사각 플레이트 (square dish; SPL, Suwon, Korea)에 찍어서 접종하였다. 이후 30°C 배양기에서 12시간 배양을 한 후에 각 배지의 기질이 분해되면서 생기는 환의 생성 유무를 측정하여 생물학적 활성을 결정하였다.

효소활성 측정 방식과 동일한 방법으로 엽권에서 분리한 균주를 potato dextrose agar (24 g/l potato dextrose broth [Difco™, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA], 2.0% agar)에 접종한 후에 30°C 에서 배양한 식물병원균 *Botrytis cinerea* (KACC accession No. 40573; Han 등, 2012), *Collectotricum graminicola* (Behr 등, 2010)의 배양액을 $250 \times 250 \times 11 \text{ mm}^2$ 크기의 사각 플레이트에 각각 1 ml씩 도말하였다. 이후 30°C 배양기에서 1-2일 동안 배양한 후에, 엽권정착 균주에 의해 발생한 환의 생성 유무를 통해 길항작용의 유무를 판단하였다.

분리된 PGPB 균주의 엽권정착능 측정. 분리된 14개의 엽권정착 균주를 항생제인 리팜피신(Rifampicin $\geq 97\%$ [HPLC] powder; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 농도 $50 \mu\text{g/ml}$ 가 포함된 TSA 배지에서 키워 리팜피신 저항성을 획득하도록 유도하였다. TSB 배지에 30°C 에서 8시간 동안 배양한 후, 4엽까지 성장한 고추의 엽권에 $\text{OD}_{600}=1$ 로 세균 집락의 농도를 맞춰준 후, 분무기를 이용하여 고추 엽권에 배양액을 살포하였다. 7일째와 10일째 균주를 살포한 고추의 잎을 3개씩 다시 수거하여 코르크보리를 이용하여 10 mm 직경의 잎조각을 각 균주 처리군별로 3개씩 3반복을 얻는다. 얻은 잎조각을 0.1 M MgCl_2 가 담긴 1.5 ml tube에 넣고 호모지나이저(homogenizer)를 이용하여 갈아준 후, 리팜피신이 포함된 TSA 배지에 농도에 따라 순차적으로 도말(serial dilution)한 후 세균 집락의 개수를 측정하였다.

선발된 PGPB를 이용한 고추의 생물학적 활성 측정을 위한 포장 실험. 고추 포장실험은 충청북도 청원군 소재(위도: 36.353227° , 경도: 127.303475°) 고추밭에서 행해졌다. 13개의 분리된 균주 중 복수 활성을 보이는 3개 균주를 TSA 배지에 배양한 후에, 10^7 cfu/ml 의 농도로 고추 엽면에 처리군(5B6, 8D4, 8G12, 혼합처리), 0.1 mM BTH, 대조군별로 완전임의화설계(30개체씩 4반복)를 하였으며, 10일 간격

으로 2회, 1개체당 25 ml씩 살포하였다. 이후 20일 간격으로 고추의 길이를 60일까지 측정하였고, 동시에 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Yi 등, 2012)에 대한 병저항성을 측정하기 위해서 $\text{OD}_{600}=1$ 농도의 균주를 PGPB 처리 20일 후 고추의 한 개체, 처리일 기준으로 각 3개의 잎에 주사기로 접종하였다. 이후 20일 간격으로 80일까지 병발생정도(0, 병징 없음; 1, 물기를 머금은 듯한 병징; 2, 잎표면에 작은 점무늬 병반 발생; 3, 많은 점무늬 병반의 발생과 시듦병 증세의 시작; 4, 점무늬 병반이 잎표면을 뒤덮고, 접종한 잎의 시듦이 본격화됨; 5, 접종한 잎의 완전 괴사)를 측정하였다(Sahin과 Miller, 1998). 고추의 수확량 측정을 위해서 PGPB를 살포한 날짜를 기준으로 64일(1차)과 80일(2차)에 고추의 열매를 수확하여 처리군별로 수확한 고추 개수를 무게로 나눈 평균값과 누적 평균값을 측정하였다.

분리된 PGPB 균주의 가로수 적용 실험 및 생물학적 활성 검증. 분리된 3균주의 벧나무, 은행나무, 이팝나무에서의 활성을 측정하기 위해 3균주를 기반으로 한 미생물제제를 제작하였다. 3균주(5B6, 8D4, 8G12)의 내생포자 분말을 공업적으로 대량배양한 후, 정착능을 높이기 위해서 전착제인 실루엣(20L; Agrotech, Seoul, Korea)을 균액 20 l당 6.7 ml 첨가하여 준비하였다(Ryu 등, 2011). 대전광역시 일대의 벧나무, 은행나무, 이팝나무에 대량 배양한 3균주 총 $240 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$ 를 2010년(1년차) 6월 23일, 8월 31일과 2011년(2년차) 4월 18일, 6월 21일에 각각 2번씩 살포하였다. 생장촉진 효과를 측정하고자 20일 간격으로 총 10번 샘플을 채취하였다. 처리군과 대조군 100그루에서 잎을 1,000개씩 임의로 수거하여 엽록소 함량을 엽록소측정기(SPAD 502 PLUS Chlorophyll Meter; Konica, Tokyo, Japan)로 측정하고(Coste 등, 2010; Ling 등, 2011; Uddling 등, 2007), 버니어캘리퍼스(Electronic Digital Micrometer; Chicago Brand, Chicago, IL, USA)를 이용하여 잎의 두께를 측정하였다(Ryu 등, 2011).

엽권정착 PGPB 균주의 혼합제제에 의한 생물적 방제효과를 측정하기 위해서 수거한 벧나무 잎의 진균성갈색무늬구멍병 개수를 평가하였다. 은행나무의 낙엽 정도를 측정하고자 총 구획을 3군데로 나눈 후 전체 개체 중에 낙엽이 든 개체를 측정하여 비율을 계산하였다(은행나무 낙엽수 비율 = 낙엽이 든 은행나무 개체수/구간 내 전체 은행나무 개체수).

통계분석. 본 실험에 이용된 통계분석은 JMPIN4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)에서 제공되는 ANOVA (analysis of variance)와 Student's t-test를 이용하여 분석하였다.

결 과

분리 균주의 생물학적 활성 분석 및 균주 동정. 수목의 엽권에서 내생포자를 만드는 1,056개의 세균 균주를 분리하였다. 분리한 균주의 생물적 활성을 확인하기 위해서 protease, chitinase, lipase 효소 활성을 측정하였다. 분리한 총 1,056균주 중에서 915개 균주가 protease 활성을, 161개 균주가 chitinase 활성을, 27개 균주가 lipase 활성을 보였다(Fig. 1). 길항능력 검정에서 *B. cinerea*에 대하여 85개 균주, *C. graminicola*에 대하여 106개 균주가 선발되었다. 3가지 효소와 2가지 진균에 대한 길항능력을 하나라도 보이는 1,022개 균주 중에서, 4개 이상의 복수활성을 가지는 13개 균주와 *B. cinerea*와 *C. graminicola* 모두에 대한 활성만 가지는 1개 균주(8G12)를 포함하여 총 14개 균주를 대상으로 16s rDNA 분석을 통하여 각 균주를 동정하였다. 선발된 14개 균주 중에서 3G7, 4B9, 4C1, 5B4, 5B6, 8D4, 8D9, 8D11, 8E1, 8E11, 8F3, 8G1은 *B. subtilis* 균주로 판명되었고, 8F6와 8G12는 *Paenibacillus polymyxa*로 동정되었다(Table 1). 이 중 5B6의 경우 추후의 유전체 분석을 통해서 *B. amyloliquefaciens* 5B6으로 동정되었다(Kim 등, 2012). 각 균주의 엽권정착능을 확인하기 위하여 각 균주의 10^7 cfu/ml의 배양액을 고추의 잎에 살포하고 1주일

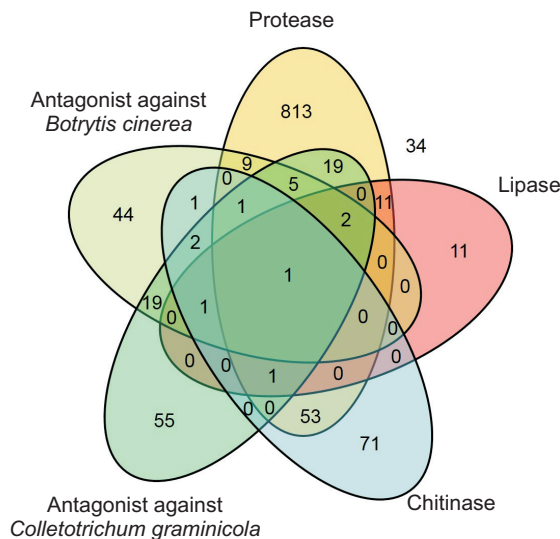


Fig. 1. Enzymatic and antagonistic activities against *Botrytis cinerea* and *Collectotricum graminicola* of leaf-associated bacteria isolated from tree species. The Venn diagram presented classification of 1,056 bacterial isolates from leaf surface of tree based on enzymatic activities such as protease, chitinase, and lipase assay and antifungal activities against *B. cinerea* and *C. graminicola*. To distinguish endospore-forming leaf-colonizing bacterial isolates from tree phyllosphere, leaf disk samples were soaked in 80°C water bath during 30 minutes.

후에 엽권 내 세균 집락수를 측정하였다(Table 1). 최종적으로 엽권정착 능력이 탁월한 3균주 5B6, 8D4, 8G12를 선발하였다. 8G12균주의 경우 2가지 진균에 대해서만 길항작용을 보이면서 엽권정착능을 보였기에 처리할 PGPB 균주로 최종 선발하였다(Table 1).

선발된 엽권정착 PGPB 균주의 고추 포장실험. 최종 선발된 3개 균주가 포장에서도 효과가 있는지 확인하기 위하여, 모델식물인 고추의 포장실험을 통해 고추의 성장과 병저항성, 수확량을 2010년과 2011년, 2년에 걸쳐 평가하였다. 3개 균주와 혼합처리군을 고추에 살포한 후 식물체의 길이를 측정한 결과, 1년차인 2010년에는 처리 후 20일에 3개 균주(5B6은 62.11 cm, 8D4는 64.15 cm, 8G12는 69.23 cm)는 대조군의 57.24 cm와 비교하였을 때 식물체의 길이가 증가하였다. 1년차 40일에는 5B6이 93.54 cm, 혼합처리군에서 94.79 cm로 대조군의 85.97 cm에 비해 성장촉진 효과를 보였고, 8D4와 8G12는 각각 31.12 cm와 89.71 cm로 대조군보다 길이는 증가하였으나 통계적으로 차이를 보이지 않았다. 1년차 60일에서는 3개 균주와 혼합처리군 모두 대조군의 96.18 cm와 비교하여 각각 5B6에서 123.18 cm, 8D4에서 112.85 cm, 8G12에서 107.55 cm, 혼합처리군에서 105.46 cm로 고추 식물체의 길이가 촉진되는 효과를 보였다. 2년차인 2011년에는 처리 후 20일째 5B6은 63.71 cm와 8D4는 62.32 cm로 대조군의 58.76 cm보다 생장이 촉진되었다. 2년차 60일째에는 3개 균주가 각각 5B6에서 123.16 cm로, 8D4는 119.54 cm로, 8G12는 121.46 cm로 대조군의 115.18 cm와 비교하여 활성을 보였다. 5B6 균주는 1년차 20일에서 8.52%, 40일에서 8.81%, 60일에서 28.08% 증가폭을 보였고, 2년차 20일에서 8.44%, 60일에서 6.93%의 성장 촉진 효과를 보였다(Fig. 2A).

고추의 병 저항성 반응을 확인하기 위해 세균 배양액을 엽면에 살포한 후에 고추에 세균성점무늬병을 일으키는 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*를 잎에 접종하여 엽권정착 PGPB 균주에 의한 병저항성 반응을 살펴보았다. 2010년도 고추 점무늬병의 발생정도는 PGPB 처리 후 20일에는 병 감소효과를 보이지 않았지만, 40일째 5B6은 병발생정도 1.72, 8D4는 1.86, 8G12는 1.31로 대조군 2.92 대비 55.0% 병이 감소하였다. 처리 후 60일과 80일은 3균주와 혼합처리군 모두 대조군과 비교해 병발생정도가 감소하였다. 처리 후 60일에는 5B6을 처리했을 때 병발생정도가 1.20, 8D4의 경우 2.04, 8G12 처리 시 1.38, 혼합처리군에서 2.04로 대조군의 3.38과 비교하였을 때 통계적으로 병이 감소하였다. 처리 후 80일에는 5B6에서 1.07로, 대조군의 병발생정도 3.33 대비 68.0%의 병 감소세를,

Table 1. Identification and evaluation of leaf-colonizing ability of 14 isolates that have multiple enzymatic and antagonistic activities

| Strain | Enzymatic activities* | | | Antagonist against [†] | | The closest species based on 16S rRNA gene sequence (%) [‡] | Leaf-colonization [§] (log cfu/leaf disk) |
|---------|-----------------------|-----------|--------|---------------------------------|-----------------------|--|--|
| | Protease | Chitinase | Lipase | <i>B. cinerea</i> | <i>C. graminicola</i> | | |
| 3G7 | O | - | O | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 4.89 cd |
| 4B9 | O | - | O | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 5.34 bc |
| 4C1 | O | O | - | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 5.39 bc |
| 5B4 | O | O | O | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> strain AsK18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 4.94 cd |
| 5B6 | O | O | O | - | O | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99.9%) | 5.89 a |
| 8D4 | O | - | O | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> strain DmB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 5.64 b |
| 8D9 | O | O | O | O | - | <i>Bacillus subtilis</i> strain MZA75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 4.72 c |
| 8D11 | O | - | O | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> strain AsK18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 5.16 c |
| 8E1 | O | - | O | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> strain MZA75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 5.25 c |
| 8E11 | O | O | O | - | O | <i>Bacillus subtilis</i> strain AsK18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 4.83 cd |
| 8F3 | O | O | O | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100%) | 5.43 bc |
| 8F6 | - | - | - | O | O | <i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2, complete genome (100%) | 5.20 c |
| 8G1 | O | O | O | O | O | <i>Bacillus subtilis</i> strain MZA75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99.9%) | 5.33 c |
| 8G12 | - | - | - | O | O | <i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99.9%) | 5.71 ab |
| Control | - | - | - | - | - | - | 5.10 c |

'O' and '-' means having activities or having not activities, respectively.

*Enzymatic activities were evaluated using protease, chitinase, and lipase assays.

[†]Antagonistic activities were tested against two fungal pathogens including *Botrytis cinerea* and *Collectotricum graminicola*.

[‡]Taxonomical identification of 14 selected bacteria were checked using 16s rDNA sequence alignment based on National Center for Biotechnology Information databases.

[§]Leaf colonization means remaining population of each 14 isolates after spraying on 4-week-old pepper leaves. Different letters mean different significance among 14 isolates.

혼합처리 시 병발생정도가 2.61로 대조군의 3.38과 비교하여 병이 줄어들었다. 2011년도 2년차 포장검정에서는 5B6의 경우 20일에 1.03으로 대조군의 1.56과 비교하여 33.90%의 병 감소를 보였으며, 40일에는 5B6은 1.56, 8D4는 1.32로 대조군의 2.45보다 병이 감소하였다. 60일에는 5B6에서 1.96, 8D4는 2.44, 8G12는 2.53, 혼합처리 시 1.68로 대조군의 병발생정도 3.52보다 최대 46.20%만큼 병이 감소하였고, 처리 후 80일에는 5B6에서 2.02, 8D4에서 2.24, 8G12에서 2.74, 혼합처리군에서 2.45로 최대 49.30% 병이 감소하였다. 처리 후 60일과 80일에서 3균주와 혼합처리군 모두 병 발병이 감소하는 현상

을 보였다(Fig. 2B).

마지막으로 고추를 2010년(1년차)과 2011년(2년차) 각각 2차 수확하여 PGPB의 엽면살포가 고추의 수확량 증대에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 그 결과, 1-2년차 모두 2차 수확 시 고추의 무게를 측정했을 때, 2년차 8G12를 제외한 모든 처리군에서 대조군과 비교하여 더 높은 수확량을 보였다. 1년차 2차 수확 시, 대조군의 1.01 kg과 비교하여, 5B6에서 1.7 kg으로 58.14%, 8D4에서 1.42 kg으로 32.56%, 8G12에서 1.525 kg으로 41.86%, 혼합처리군에서 1.5 kg으로 39.53%의 수확량 증대를 보였고, 2년차 2차 수확 시에도 대조군의

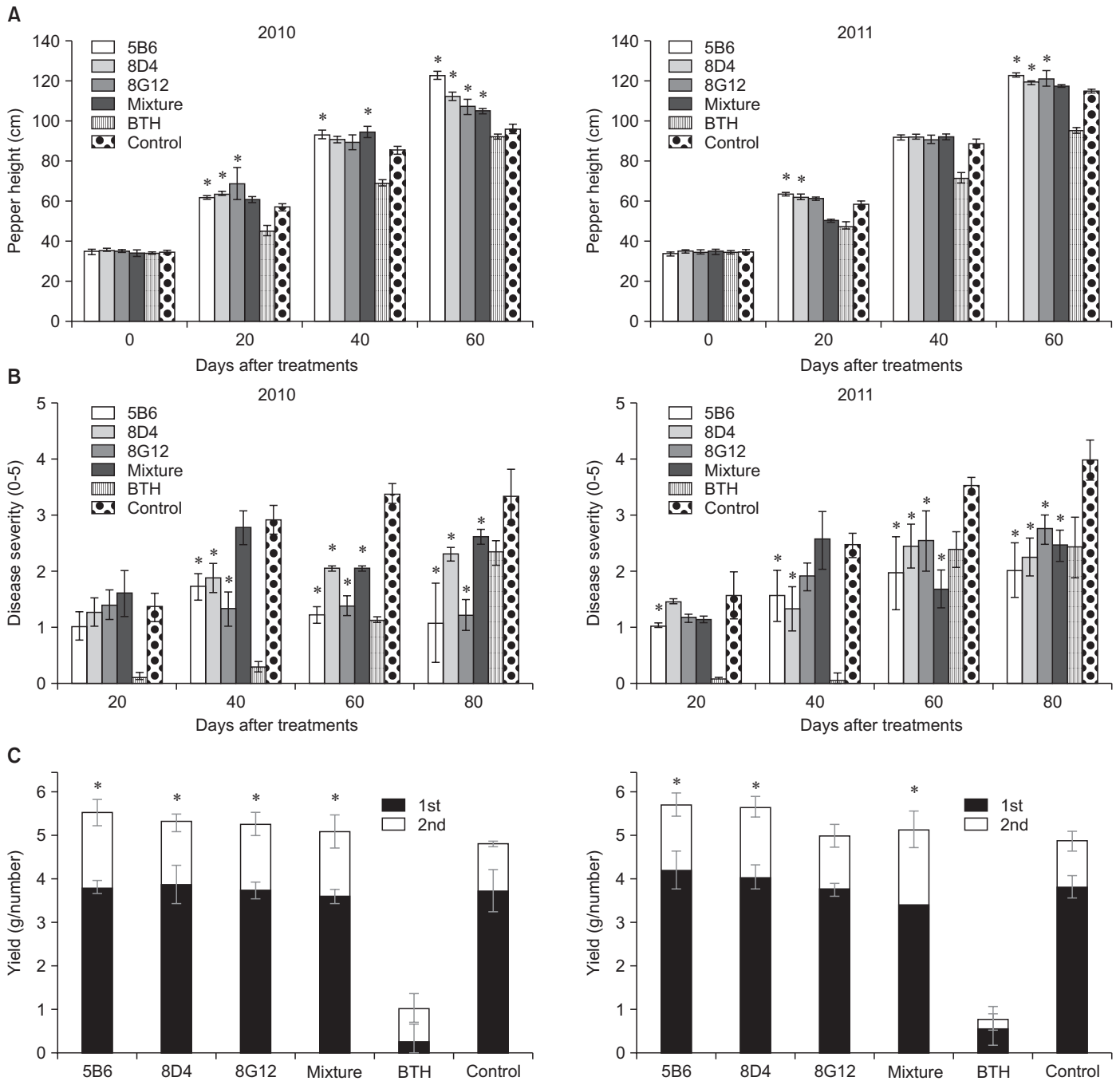


Fig. 2. Effect of leaf-colonizing bacteria on pepper growth, disease severity, and yield for 2 years. Bacterial preparations from three selected isolates 5B6, 8D4, and 8G12 at 1.0×10^7 cfu/ml were sprayed on pepper leaves twice within 20 days. Pepper height (A) and disease severity (B) by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* were evaluated every 20 days after microbial preparation treatments started from March 2010 and March 2011. (C) Pepper yield was estimated at 64 days (1st) and 80 days (2nd) after treatments. Black and white bars mean 1st and 2nd harvest, respectively. Asterisks display statistically significant differences compared to untreated control at $P=0.05$ (least significant difference).

1.05 kg과 비교하여 5B6에서 1.5 kg으로 42.31%, 8D4에서 1.63 kg으로 54.17%, 혼합처리군에서 1.75 kg으로 66.03%의 수확량 증대 효과를 보였다(Fig. 2C).

선발된 엽권정착 PGPB 균주에 의한 가로수의 성장활성 검정. 선발된 PGPB 균주를 대전광역시 유성구 인근에 위치한 은행나무, 벚나무, 이팝나무에 처리하여 고추에서 확인한 엽권정착 PGPB 균주의 활성을 가로수에서도 확인

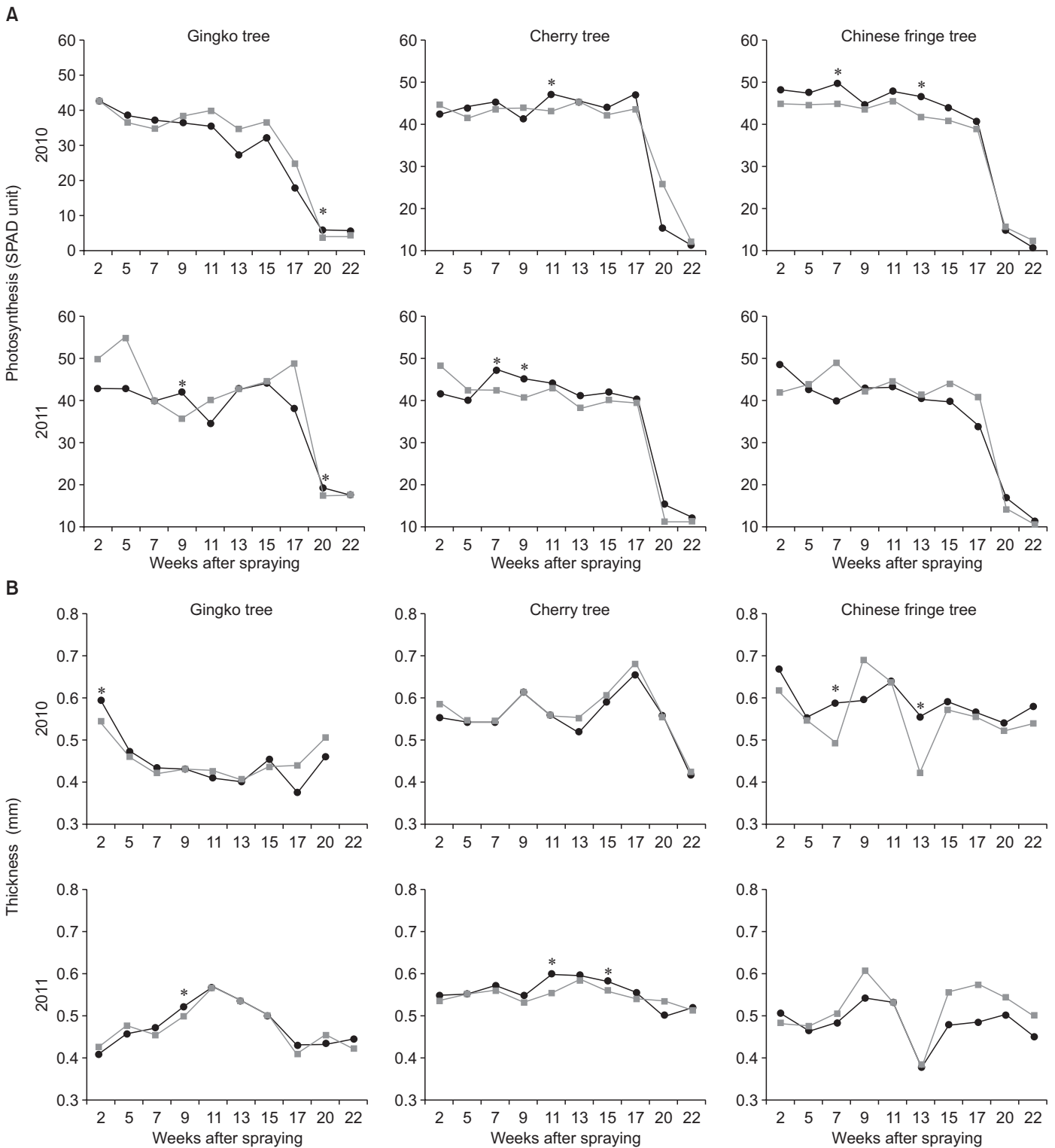


Fig. 3. Effect of leaf-colonizing bacteria on tree photosynthesis and leaf thickness for 2 years. Microbial preparation from three selected isolates 5B6, 8D4, and 8G12 at 1.0×10^7 cfu/ml was sprayed on leaves of gingko trees, cherry trees and Chinese fringe trees at three times a year. (A) Photosynthesis rates of leaf from gingko trees, cherry trees, and Chinese fringetrees were evaluated by SPAD 502 PLUS Chlorophyll Meter at 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 20, and 22 weeks after spraying. (B) Leaf thickness of gingko trees, cherry trees, and Chinese fringetrees were measured by Electronic Digital Micrometer at 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 20, and 22 weeks. Black and gray lines indicate treated trees and untreated control, respectively. Filled black dot, microbial preparation; filled gray square, control. Asterisks display statistically significant differences compared to untreated control at $P=0.05$ (least significant difference).

하였다. 가로수의 성장촉진을 확인하기 위해 엽록소 함량과 잎의 두께를 측정하였다. 은행나무의 경우 2010년(1년차) 균주 엽면 처리 20주 후에 67%, 2011년(2년차) 균주 엽면 처리 9주 후 17.41%, 20주차에서 9.71%가 대조군과 비교하여 처리군에서 더 높은 광합성 효율을 보였다. 은행나무 20주차의 경우 은행나무의 낙엽이 지는 20주차 시점에서 상대적으로 더 높은 광합성 효율을 보였다. 벚나무는 1년차 11주차에서 9.47%, 2년차 7주차에서 11.23%, 9주차에서 10.76%로 엽록소 함량이 증가하였다. 이팝나무의 경우에는 1년차 7주차에서 10.46%, 13주차에서 11.56%로 더 높은 엽록소 함량을 보였고 2년차에서는 7주차에서 22.42%로, 17주차에서는 21.25%로 대조군과 비교하여 더 높은 엽록소 함량을 보였다(Fig. 3A).

나뭇잎의 두께는 은행나무의 경우 2010년(1년차) 검정

서 균주 엽면 처리 2주 후에 9.18%, 2011년(2년차) 균주 엽면 처리 9주 후에 4.76%로 대조군과 비교하여 두께가 통계적으로 증가하였다. 벚나무의 잎 두께는 2010년 검정에서 통계적으로 차이를 보이지 않았지만, 2011년에서 균주 엽면 처리 11주 후 8.44%, 15주 후 4.68%로 두께가 증가하였다. 이팝나무의 경우, 1년 균주 엽면 처리 7주 후 19.52%, 13주 후 31.42%로 대조군과 비교하여 두께가 증가하였다. 2년차에 수목 잎의 두께를 측정했을 때 대조군과 다른 처리군에서 통계적으로 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3B).

선발된 엽권정착 PGPB 균주의 벚나무 진균성갈색 무늬구멍병 감소효과와 은행나무 낙엽 생성 촉진 효과. 벚나무 진균성갈색무늬구멍병은 진균인 *B. jaapii*에 의

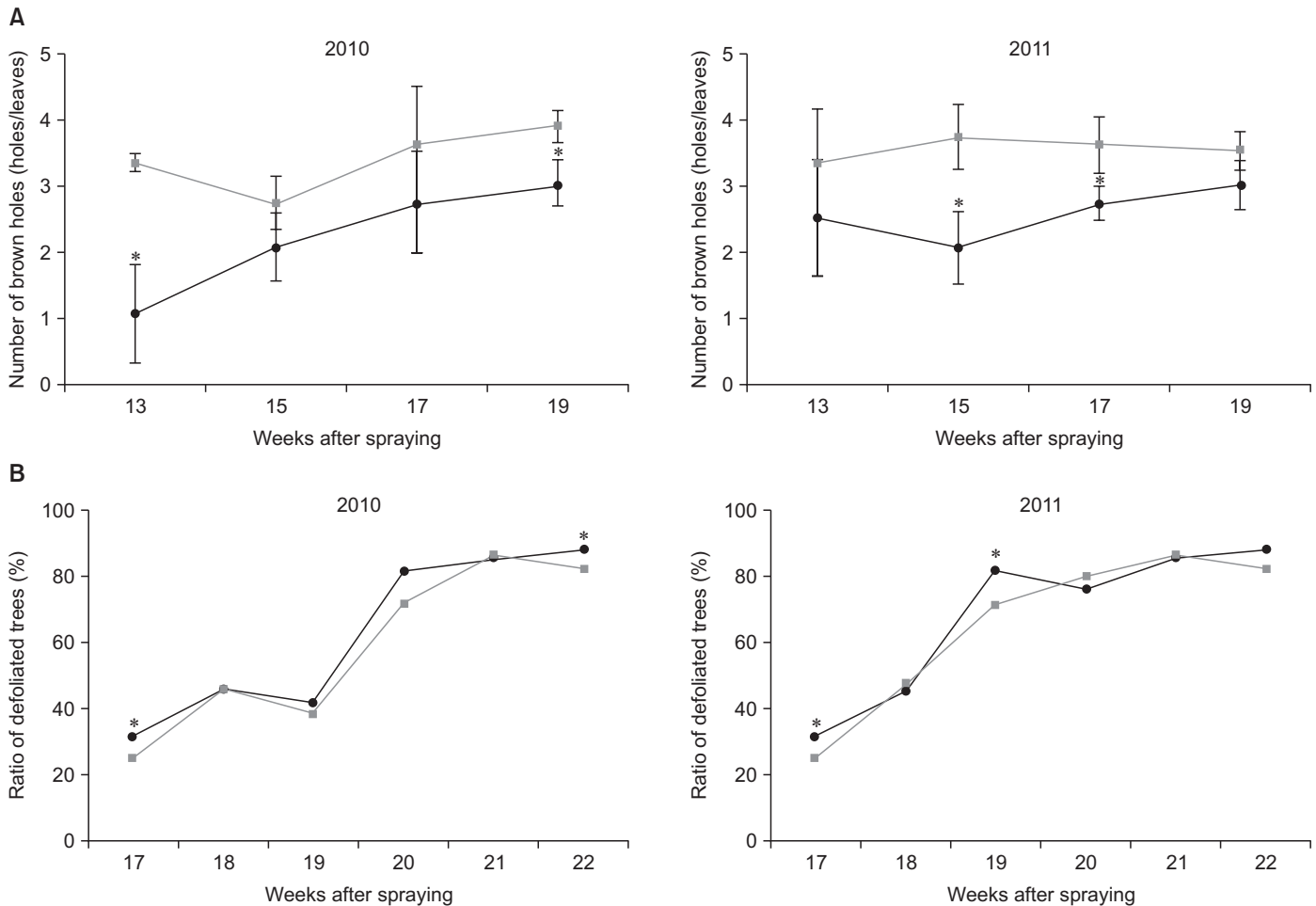


Fig. 4. Decrease of brown shot-hole disease severity in cherry trees and increase of ratio of defoliated trees in ginkgo trees for 2 years. Microbial biopreparation from three selected isolates 1.0×10^7 cfu/ml was sprayed on leaves of cherry trees and ginkgo trees at two times per year. (A) Disease severity of brown shot-hole was measured by counting lesion holes per leaves of cherry trees. (B) Ratio of defoliated ginkgo trees were evaluated as defoliated as the ratio of defoliated trees per total trees from each three sections (%). Black and gray lines indicate treated trees and untreated control, respectively. Filled black dot, microbial preparation; filled gray square, control. Asterisks display statistically significant differences compared to untreated control at $P=0.05$ (least significant difference).

해 자연발생하는 것으로 알려져 있다(Agrios, 1997; Ma 등, 2006). 선발된 PGPB 균주를 수목에 처리한 후에 벗나무상에 서 발생하는 진균성갈색무늬구멍병의 수목 잎당 개수의 평균을 측정하였다. 그 결과, 2010년(1년차) 균주 처리 13주 후 67.70%, 19주 후 21.97%로 진균성갈색무늬구멍병 개수가 대조군에 비해 줄어들었다. 또한 2011년(2년차) 균주 처리 15주 후 진균성갈색무늬구멍병 발생이 44.44%, 17주 후 24.14%로 감소하였다(Fig. 4A).

또한 PGPB에 의해 은행나무의 낙엽이 지는 정도를 측정하였다. 혼합제제 처리 17-22주까지의 기간은 은행나무의 낙엽이 지는 시기였기에, 엽권정착세균이 나무 엽권에 정착할 때 나무의 생리적인 활성, 낙엽 형성에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다. 또한 광합성 효율 측정에서 2010년(1년차), 2011년(2년차) 모두 균주 처리 20주 후에 엽록소 함량이 증가하였기에 엽록소 함량의 증대와 낙엽생성과의 상관관계를 측정하였다. PGPB 균주를 처리한 후 1년차에서는 17주에서 25.60%, 22주에서 7.14%, 2년차에서는 17주에서 37.10%, 19주에서 14.32%로 대조군과 비교하여 유의미하게 혼합제제 처리군에서 낙엽이 더 많이 발생하는 효과를 확인하였다(Fig. 4B).

고 찰

본 연구는 수목의 엽권에 정착하는 내생포자 생성 세균을 분리해 생물학적 활성을 기반으로 분리한 PGPB를 고추와 가로수에 적용하여, 성장촉진효과와 지상부 병을 방제 효과를 확인한 연구이다. 가로수의 엽권에 정착하는 PGPB를 분리한 후, 효소활성 검정을 통해 최종적으로 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *P. polymyxa*의 3개 종을 PGPB 균주로 선발하였다. 선발된 PGPB 균주를 목본식물의 모델로 이용한 고추에 처리하여 세균성점무늬병 감소와 성장촉진 효과를 확인하였다. 모델식물로 고추에서의 결과를 바탕으로, PGPB를 가로수에 처리했을 때 성장촉진 효과를 확인하였다. 또한 벗나무의 진균성갈색무늬구멍병의 감소와 은행나무의 낙엽이 탈리되는 시기가 앞당겨지는 효과를 확인할 수 있었다. 여기에서는 엽권정착 PGPB를 수목의 엽면에 처리하여 가로수의 종합적이고, 친환경적인 방제 기술을 확립하고자 하였다.

엽권에서 분리한 PGPB를 고추에 살포 시, 고추의 세균성점무늬병과 벗나무의 진균성 갈색무늬구멍병이 대조군에 비해 통계적으로 감소하였다(Fig. 2B, 4A). PGPB에 의한 식물병 방제기작은 경쟁, 길항작용, 식물의 면역을 증진

시키는 유도저항성이 알려져 있다(Compant 등, 2005; Glick, 2012; Lee 등, 2015; Saraf 등, 2014). 본 연구에서는 PGPB를 엽면 살포하여 엽면에 발생한 식물병의 발생이 감소하는 결과를 설명하기 위해 식물병에 대한 PGPB의 직접적인 길항작용을 살펴보았다. 본 연구에서 분리한 PGPB 중, *B. amyloliquefaciens* 5B6 균주의 유전체를 분석한 결과, 다른 미생물을 저해하기 위한 항생물질을 생산하는 nonribosomal peptide-synthetase (NRPS), polyketide synthase (PKS) 유전자 클러스터를 확인하였고, 식물 병원균의 세포벽을 용해하는 데 기여하는 surfactin (*srf*), bacillomycin (*bmy*), fengycin (*fen*) 등의 유전자의 존재도 확인하였다(Kim 등, 2012; Koumoutsi 등, 2004). 또한 5B6 균주의 경우 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*와 대치배양했을 경우, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*의 성장을 억제하였다(data not shown). 이는 PGPB가 생산하는 항생물질에 의해 고추의 세균성점무늬병이 방제된 결과를 설명할 수 있다.

PGPB는 protease, chitinase, lipase와 같은 식물 병원성 진균의 세포벽 구성요소를 분해하는 활성을 갖고 있다(Chernin과 Chet, 2002; Saraf 등, 2014). 벗나무 진균성갈색무늬구멍병은 병원성 진균인 *B. jaapii*에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며(Agrios, 1997; Ma 등, 2006), PGPB에 의한 효소 활성으로 인하여 벗나무 진균성갈색무늬구멍병이 감소한 것으로 생각된다. 계통상으로 자낭균문(phylum: Ascomycota)에 속하는 *C. graminicola*, *B. cinerea*와 벗나무 진균성갈색무늬구멍병(*B. jaapii*)에 대하여 선발된 PGPB가 길항효과가 있는 것으로 보아, 선발된 PGPB는 자낭균문에 속하는 진균의 공통적인 세포벽 구성성분인 키틴을 분해(chitinase)하거나 세포벽에 부착된 단백질(protease) 혹은 지질이중층(lipase)을 분해함으로써 벗나무 진균성갈색무늬구멍병을 저해한다고 생각할 수 있다(Donmez 등, 2011; Hariprasad 등, 2011; Lee 등, 2012; Maksimov 등, 2011; Neeraja 등, 2010; Planchamp 등, 2015; Tortora 등, 2011).

PGPB는 직접적인 길항작용 외에도, 식물의 유도저항성(induced resistance)을 일으키는 것이 알려져 있다(Choudhary 등, 2007; Compant 등, 2005; Glick, 2012; Glick and Bashan, 1997; Zehnder 등, 2001). 본 실험에서는 선발된 PGPB를 식물체에 엽면살포한 후 엽면에 발생하는 식물병의 발병세를 확인했기 때문에, 선발된 PGPB에 의한 유도저항성 효과를 직접적으로 확인할 수 없었다. 하지만 PGPB인 *Bacillus pumilus* SE34를 테다소나무(*Taeda tree*, *Pinus taeda* L.)에 파종 시 토양에 함께 처리하여, 증진된 ISR에 의해 *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*가 일으키는 소나무의 흑 녹병을 방제한 사례가 보고되었다. 이를 비추어보았을 때, 선발된 PGPB에 의

한 유도저항성 효과도 기대할 수 있다(Bashan과 Holguin, 1998; Compant 등, 2005; Enebak과 Carey, 2000; Eyles 등, 2010; Whipps, 2001).

본 연구에서 선발된 PGPB를 가로수에 처리했을 때 은행나무, 벚나무, 이팝나무에서 엽록소 함량과 잎 두께가 증가하고 고추에서는 길이와 수확량이 증가하였다(Fig. 2, 3). 기존 연구결과에서 기존의 PGPB를 나무에 처리했을 때, 식물 잎의 두께 증가 및 잎의 엽록소의 함량이 증가하였다는 것이 확인되었다(Esitken 등, 2006; Ryu 등, 2011; Stefan 등, 2013). 또한 PGPB 중에서도 엽권에서 분리한 세균이 식물의 성장을 촉진시키고 수확량을 증대시키는 사례도 확인되었다(Dawwam 등, 2013; Esitken 등, 2006; Jacobsen, 1997; Jacobsen 등, 2004; Sahin과 Miller, 1998). 따라서 선발된 PGPB가 수목의 성장에 기여하였음을 확인할 수 있었다.

은행나무에 선발된 PGPB 처리 후 2010년, 2011년 9월에서 11월까지(처리 후 17-22주) 은행나무의 잎의 탈색이 대조군과 비교하여 빨리 일어났다(Fig. 4A). 식물의 낙엽 생성은 일종의 노화반응으로 식물이 외부의 온도와 일조량 변화를 감지하여 광합성 효율이 낮아지면서 잎의 탈색과 탈리 현상이 일어난다(Reid, 1985; Sakamoto 등, 2008b). 식물의 노화는 식물의 예정세포사(programmed cell death)에 의해 일어나는 현상으로 식물 호르몬인 에틸렌과 앱시스산에 의해 조절된다(Gomez-Cadenas 등, 1996; Reid, 1985). 식물 호르몬인 에틸렌에 의한 신호전달기작을 조절하는 *ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2)* 유전자가 낙엽 생성에 관여한다는 것을 확인하였다(Bishop, 2009; Kim 등, 2009). PGPB에 의한 식물체의 신호전달 기작을 살펴본 결과, PGPB를 식물체에 처리하였을 때 식물체 내의 자스몬산/에틸렌 관련 신호작용에 영향을 주는 것이 확인되었다(Brock 등, 2013; Fujita 등, 2006; Sakamoto 등, 2008a). 선발된 PGPB 처리 시 에틸렌 신호전달 기작과 관련된 유전자 발현이 증가되는 것으로 미루어 볼 때, PGPB의 작용이 에틸렌을 통해 낙엽의 생성을 촉진하는 것으로 볼 수 있다(Hossain 등, 2011; Pieterse 등, 1998; Wang 등, 2005). PGPB인 *Azospirillum*을 애기장대와 옥수수에 처리하였을 때 식물체의 노화에 관여하는 다른 식물호르몬인 앱시스산이 축적되었다(Cohen 등, 2008, 2009). 이를 미루어 보았을 때, PGPB에 의한 앱시스산 축적이 수목의 빠른 낙엽을 유도하고, 앱시스산의 축적으로 인해 수목이 겨울철의 저온환경에서도 생존할 수 있게 되는 것으로 생각할 수 있다(Xue-Xuan 등, 2010). 실제로 PGPB인 *P. putida*를 카놀라에 처리 시 냉해에 견디는 효과가 보고되었다(Sun 등, 1995). 그러므로 PGPB에 의한 에틸렌 관련 유전자 발현량 증가와 앱시스산의 축적은

은행나무에서의 낙엽생성 촉진을 유도하고, 탈색된 잎에 의한 비효율적인 광합성을 제한하고, 저온에 대한 저항성을 획득하게 하여, 겨울철 수목의 생존에 기여할 것이다(Smart, 1994; Xue-Xuan 등, 2010).

본 연구는 수목의 엽권에 정착하는 PGPB를 가로수에 처리함으로써, 기존의 PGPB를 이용한 생물적 방제법을 확장하면서 PGPB의 성공적인 엽권정착을 고려한 가로수의 지속적인 관리방법을 제시하였다. 본 연구에서 실행했던 가로수를 대상으로 한 검정실험에서도 벚나무 병의 방제와 성장촉진 효과를 확인할 수 있었기에, 이전의 수목을 대상으로 한 실험 연구결과를 뒷받침하면서 실질적인 가로수 관리 방법도 도입하였다(Ryu 등, 2011). 따라서, 수목의 엽권에서 분리한 PGPB를 수목의 엽권에 정착시킴으로써 PGPB의 엽권정착을 고려한 수목의 새로운 생물적 방제법을 제시하였다.

요 약

식물성장촉진세균은 식물의 성장과 수확량을 촉진하고, 식물병에 대한 유도저항성을 유도하는 것으로 보고되었다. 본 논문에서 연구의 목적은 가로수와 고추의 엽면에 엽권정착 식물성장촉진세균을 처리하여, 식물성장촉진세균의 적용 범위를 확장하였다. 수목의 엽권에서 내생포자 형성 세균 1,056개 균주를 분리하여, protease, chitinase, lipase를 포함한 효소활성과 진균병인 *C. graminicola*와 *B. cinerea*에 대한 길항작용을 측정하였다. 1차 선발된 bacilli 14개 균주를 고추의 잎에 살포하여 엽권정착능을 시험하였다. 5B6, 8D4, 8G12 단독처리와 그 혼합처리균을 고추 엽면에 살포하여 성장촉진, 수확량증진, 병방제 효과를 고추 포장에서 관찰하였다. 대량배양을 통하여 선발된 균주를 대한민국 대전광역시 유성구 일대의 가로수에 살포하였을 때, 대조군과 비교하여 엽록소함량과 잎 두께가 증가하였다. 선발된 3개 균주를 수목에 엽면살포했을 때, 벚나무 진균성갈색무늬구멍병을 저해하였고 은행나무의 낙엽생성을 촉진하였다. 종합적으로 본 연구는 엽권정착세균의 엽면살포를 통하여 가로수와 고추의 성장을 촉진시키고, 식물병을 방제하는 엽권정착세균의 적용 가능성을 제시한다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgement

This research was supported by grants from the Industrial Source Technology Development Program of the Ministry of Knowledge Economy (10044909) of Korea, the cooperative Research Program for Agriculture and Technology Development (Agenda Project No. PJ011707), Rural Development Administration, Republic of Korea, and the KRIBB initiative program, South Korea.

References

- Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4th ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Altindag, M., Sahin, M., Esitken, A., Ercisli, S., Guleryuz, M., Donmez, M. F. and Sahin, F. 2006. Biological control of brown rot (*Monilinia laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloğlu) by *Bacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* application under in vitro and in vivo conditions. *Biol. Control* 38: 369-372.
- Baker, C. J., Stavelly, J. R., Thomas, C. A., Sasser, 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.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1225-1228.
- Behr, M., Humbeck, K., Hause, G., Deising, H. B. and Wirsal, S. G. 2010. The hemibiotroph *Colletotrichum graminicola* locally induces photosynthetically active green islands but globally accelerates senescence on aging maize leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23: 879-892.
- Bhattacharyya, P. N. and Jha, D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.
- Bishop, S. 2009. Plant cell biology: when autumn falls. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 238-239.
- Brock, A. K., Berger, B., Mewis, I. and Ruppel, S. 2013. Impact of the PGPB *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 on growth, glucosinolate profile, and immune responses of *Arabidopsis thaliana*. *Microb. Ecol.* 65: 661-670.
- Çakmakçı, R., Kantar, F. and Sahin, F. 2001. Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164: 527-531.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E. and Lumyong, S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Sci. Asia* 28: 241-245.
- Chernin, L. and Chet, I. R. 2002. Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In: Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications, eds. by R. G. Burns and R. P. Dick, pp. 171-226. CRC Press, New York, NY, USA.
- Choudhary, D. K., Prakash, A. and Johri, B. N. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* 47: 289-297.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J. S., Lakshman, D. K., Lydon, J., Kim, S. D. and Roberts, D. P. 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 115-123.
- Cirvilleri, G., Spina, S., Iacona, C., Catara, A. and Muleo, R. 2008. Study of rhizosphere and phyllosphere bacterial community and resistance to bacterial canker in genetically engineered phytochrome A cherry plants. *J. Plant Physiol.* 165: 1107-1119.
- Cohen, A. C., Bottini, R. and Piccoli, P. N. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regul.* 54: 97-103.
- Cohen, A. C., Travaglia, C. N., Bottini, R. and Piccoli, P. N. 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany* 87: 455-462.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *App. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.
- Coste, S., Baraloto, C., Leroy, C., Marcon, É., Renaud, A., Richardson, A. D., Roggy, J. C., Schimann, H., Uddling, J. and Hérault, B. 2010. Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. *Ann. Forest Sci.* 67: 607.
- Dawwam, G. E., Elbeltagy, A., Emara, H. M., Abbas, I. H. and Hassan, M. M. 2013. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Ann. Agric. Sci.* 58: 195-201.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C. and Vorholt, J. A. 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 16428-16433.
- Donmez, M. F., Esitken, A., Yildiz, H. and Ercisli, S. 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *J. Anim. Plant Sci.* 21: 758-763.
- Enebak, S. A. and Carey, W. A. 2000. Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Dis.* 84: 306-308.
- Eşitken, A., Karlidağ, H., Ercişli, S. and Şahin, F. 2002. Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu-142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (coryneum blight) of apricot. *Gartenbauwissenschaft* 67: 139-142.
- Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M. and Sahin, F. 2006. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Sci. Hort.* 110: 324-327.
- Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R. and Mohammed, C. 2010. Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytol.* 185:

- 893-908.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 436-442.
- Ganeshan, G. and Manoj Kumar, A. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *J. Plant Interact.* 1: 123-134.
- Glick, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* Online publication. doi: 10.6064/2012/963401.
- Glick, B. R. and Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* 15: 353-378.
- Gomez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Talon, M. and Primo-Millo, E. 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112: 401-408.
- Han, S. H., Kang, B. R., Lee, J. H., Kim, H. J., Park, J. Y., Kim, J. J. and Kim, Y. C. 2012. Isolation and characterization of oligotrophic bacteria possessing induced systemic disease resistance against plant pathogens. *Plant Pathol. J.* 28: 68-74.
- Hariprasad, P., Divakara, S. T. and Niranjana, S. R. 2011. Isolation and characterization of chitinolytic rhizobacteria for the management of Fusarium wilt in tomato. *Crop Prot.* 30: 1606-1612.
- Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I. C. and Murata, Y. 2011. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156: 430-438.
- Hsu, S. C. and Lockwood, J. L. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* 29: 422-426.
- Jacobsen, B. J. 1997. Role of plant pathology in integrated pest management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 373-391.
- Jacobsen, B. J., Zidack, N. K. and Larson, B. J. 2004. The role of bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology* 94: 1272-1275.
- Jiang, Z. Q., Guo, Y. H., Li, S. M., Qi, H. Y. and Guo, J. H. 2006. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against Phytophthora blight of bell pepper. *Biol. Control* 36: 216-223.
- Kim, B. K., Chung, J. H., Kim, S. Y., Jeong, H., Kang, S. G., Kwon, S. K., Lee, C. H., Song, J. Y., Yu, D. S., Ryu, C. M. and Kim, J. F. 2012. Genome sequence of the leaf-colonizing Bacterium *Bacillus* sp. strain 5B6, isolated from a cherry tree. *J. Bacteriol.* 194: 3758-3759.
- Kim, J. H., Woo, H. R., Kim, J., Lim, P. O., Lee, I. C., Choi, S. H., Hwang, D. and Nam, H. G. 2009. Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science* 323: 1053-1057.
- Kinkel, L. L. 1997. Microbial population dynamics on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 327-347.
- Kishore, G. K. and Pande, S. 2007. Chitin-supplemented foliar application of chitinolytic *Bacillus cereus* reduces severity of Botrytis gray mold disease in chickpea under controlled conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 98-105.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wasmann, R., von Mering, C. and Vorholt, J. A. 2012. Metaproteomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J.* 6: 1378-1390.
- Korsten, L., De Villiers, E. E., Wehner, F. C. and Kotzé, J. M. 1997. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of pre-harvest fruit diseases of avocado in South Africa. *Plant Dis.* 81: 455-459.
- Koumoutsis, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J. and Borriss, R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186: 1084-1096.
- Kucheryava, N., Fiss, M., Auling, G. and Kroppenstedt, R. M. 1999. Isolation and characterization of epiphytic bacteria from the phyllosphere of apple, antagonistic in vitro to *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 472-478.
- Lee, D. W., Koh, Y. S., Kim, K. J., Kim, B. C., Choi, H. J., Kim, D. S., Suhartono, M. T. and Pyun, Y. R. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 393-400.
- Lee, H. J., Kim, J. S., Yoo, S. J., Kang, E. Y., Han, S. H., Yang, K. Y., Kim, Y. C., McSpadden Gardener, B. and Kang, H. 2012. Different roles of glycine-rich RNA-binding protein7 in plant defense against *Pectobacterium carotovorum*, *Botrytis cinerea*, and tobacco mosaic viruses. *Plant Physiol. Biochem.* 60: 46-52.
- Lee, K. J., Kamala-Kannan, S., Sub, H. S., Seong, C. K. and Lee, G. W. 2008. Biological control of Phytophthora blight in red pepper (*Capsicum annum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1139-1145.
- Lee, S. M., Chung, J. h. and Ryu, C. M. 2015. Augmenting plant immune responses and biological control by microbial determinants. *Res. Plant Dis.* 21: 161-179.
- Leveau, J. J. H. 2015. Life of microbes on aerial plant parts. In: Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture, ed. by B. Lugtenberg, pp. 17-24. Springer International Publishing, Cham, Germany.
- Lindow, S. E. and Brandl, M. T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1875-1883.
- Lindow, S. E. and Leveau, J. H. 2002. Phyllosphere microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 238-243.
- Ling, Q., Huang, W. and Jarvis, P. 2011. Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.* 107: 209-214.
- Lugtenberg, B. J., Chin-A-Woeng, T. F. and Bloemberg, G. V. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Anton. Leeuw.* 81: 373-383.
- Ma, Z., Proffer, T. J., Jacobs, J. L. and Sundin, G. W. 2006. Overex-

- pression of the 14 α -demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2581-2585.
- Maksimov, I. V., Abizgil'dina, R. R. and Pusenkova, L. I. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 47: 333-345.
- Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P., Moerschbacher, B. M. and Podile, A. R. 2010. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 231-241.
- Obradovic, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Balogh, B. and Olson, S. M. 2004. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Dis.* 88: 736-740.
- Pieterse, C. M., van Wees, S. C., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. and van Loon, L. C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1571-1580.
- Planchamp, C., Glauser, G. and Mauch-Mani, B. 2015. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. *Front. Plant Sci.* 5: 719.
- Pusey, P. L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pestic. Sci.* 27: 133-140.
- Raupach, G. S. and Kloepper, J. W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88: 1158-1164.
- Reid, M. S. 1985. Ethylene and abscission. *HortScience* 20: 45-50.
- Ryu, C. M., Shin, J. N., Qi, W., Ruhong, M., Kim, E. J. and Pan, J. G. 2011. Potential for augmentation of fruit quality by foliar application of bacilli spores on apple tree. *Plant Pathol. J.* 27: 164-169.
- Sahin, F. and Miller, S. 1998. Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper race 6. *Plant Dis.* 82: 794-799.
- Sakamoto, M., Munemura, I., Tomita, R. and Kobayashi, K. 2008a. Involvement of hydrogen peroxide in leaf abscission signaling, revealed by analysis with an in vitro abscission system in *Capsicum* plants. *Plant J.* 56: 13-27.
- Sakamoto, M., Munemura, I., Tomita, R. and Kobayashi, K. 2008b. Reactive oxygen species in leaf abscission signaling. *Plant Signal. Behav.* 3: 1014-1015.
- Saraf, M., Pandya, U. and Thakkar, A. 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol. Res.* 169: 18-29.
- Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G. and Munteer, A. 2004. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *J. Phytopathol.* 152: 371-375.
- Smart, C. M. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126: 419-448.
- Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V. and Mihasan, M. 2013. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. *Rom. Biotech. Lett.* 18: 8132-8143.
- Sun, X., Griffith, M., Pasternak, J. J. and Glick, B. R. 1995. Low temperature growth, freezing survival, and production of anti-freeze protein by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can. J. Microbiol.* 41: 776-784.
- Tortora, M. L., Diaz-Ricci, J. C. and Pedraza, R. O. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch. Microbiol.* 193: 275-286.
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K. and Pleijel, H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynth. Res.* 91: 37-46.
- Vorholt, J. A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 828-840.
- Wang, Y., Ohara, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. 2005. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 385-396.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.
- Xue-Xuan, X., Hong-Bo, S., Yuan-Yuan, M., Gang, X., Jun-Na, S., Dong-Gang, G. and Cheng-Jiang, R. 2010. Biotechnological implications from abscisic acid (ABA) roles in cold stress and leaf senescence as an important signal for improving plant sustainable survival under abiotic-stressed conditions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 222-230.
- Yi, H. S., Yang, J. W., Choi, H. K., Ghim, S. Y. and Ryu, C. M. 2012. Benzothiadiazole-elicited defense priming and systemic acquired resistance against bacterial and viral pathogens of pepper under field conditions. *Plant Biotechnol. Rep.* 6: 373-380.
- Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J. and Kloepper, J. W. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 39-50.
- Zhigila, D. A., AbdulRahaman, A. A., Kolawole, O. S. and Oladele, F. A. 2014. Fruit morphology as taxonomic features in five varieties of *Capsicum annum* L. Solanaceae. *J. Bot.* 2014. doi: 10.1155/2014/540868.