

## 토끼풀(*Trifolium repens* L.)에 제초활성을 나타내는 *Penicillium* sp.의 탐색

김관경 · 박동진 · 최순용<sup>1</sup> · 김창진\*

KIST 생명공학연구소, <sup>1</sup>한남대학교 미생물학과

**초록** : 잔디밭 및 초지에서 많이 발생하는 다년생 포복성 잡초인 토끼풀을 효과적으로 방제할 수 있는 새로운 미생물제초제를 개발하기 위하여 토끼풀 및 유사 잡초의 병반으로부터 980여주의 곰팡이 균주를 분리하고 각 균주에 대한 제초활성 검정을 통하여 토끼풀에 대한 제초활성이 우수한 F40362, F40496 및 F40497 3균주를 선발하였다. 선발된 3 균주는 동정한 결과 모두 *Penicillium*속에 속하는 균주이었다. 각 균주의 포자현탁액을 사용하여 토끼풀에 대한 활성을 검정하였을 때  $1 \times 10^7$  포자수/ml 농도에서 제초활성이 나타났으며 포자현탁액으로서는 멸균수보다 이들 각 균주의 배양액을 사용하는 것이 효과적이었다. 한편 동일 농도에서 대조식물인 한국 들잔디에 대하여 병해는 없었다.(1996년 9월 9일 접수, 1996년 10월 11일 수리)

### 서 론

현대적인 농업 생산에 있어서는 생산성 향상을 위한 농약 사용이 중요한 요소로 인식되고 있으며 잡초를 비롯한 병해충을 방제하기 위하여 지금까지 유기합성 농약이 많이 개발되어 사용되어져 왔다. 그러나 유기합성 농약의 경우 독성, 저항성 병해충의 빈번한 출현, 환경오염 등이 큰 문제점으로 지적되고 있다.<sup>1-3)</sup> 따라서 세계 각국에서는 저공해성인 미생물제초제를 개발하기 위하여 잡초에 대하여 병원성을 나타내는 미생물을 이용한 생물학적 방제방법이 많이 시도되고 있는데 이 방법은 잡초에 대한 선택성이 뛰어나고 유기합성 농약에 비해 환경오염이 적을 뿐만 아니라 개발비용이 적게 든다는 장점이 있다.<sup>4-7)</sup>

현재 전 세계적으로 상품화되거나 등록 시험중인 미생물제초제는 미국 Florida의 감귤농장에 많이 발생하는 stanger vine(Milkweed vine, *Morrenia odorata*)의 방제용으로 개발된 것으로는 *Phytophthora palmivora*의 액체 제제인 DeVine,<sup>8)</sup> 벼와 콩등의 경작지에 발생하는 자귀풀의 방제용으로 개발된 것으로는 *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* 포자의 분쇄 제제인 Collego,<sup>9-11)</sup> 콩 경작지에 발생하는 기생 식물인 새삼(dodder, *Cuscuta* sp.)의 방제용으로 개발된 것으로는 *Colletotrichum gloeosporioides*을 이용한 Lubao<sup>12)</sup>가 있다. 미국과 캐나다의 아마와 밀 경작지에 많이 발생하는 원형잎 mallow(*Malva pusilla*)의 방제용으로 개발된 것으로는 *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*의 포자를 분말화하여 제제로 만든 Biomal<sup>13)</sup>이 있고, 호주에서의 문제잡초인 spiny cocklebur(*Xanthium spinosum*)를 방제하기 위하여 개발된 것으로는 *Colletotrichum orbiculare*라는 병원균을 이용한 Bur Anthracnose<sup>14)</sup>

가 있다. 그리고 콩과 잡초인 sicklepod(*Cassia obtusifolia*)와 coffee senna(*C. occidentalis*)의 방제를 위하여 개발된 것으로는 *Alternaria cassiae*를 이용한 Casst<sup>15)</sup> 등이 보고되어 있다. 이와 같이 세계 각국에서는 잡초병원균을 이용한 미생물 제초제가 이미 개발되어 사용되거나 현재 개발 연구 중에 있다.<sup>16,17)</sup>

한편 국내에서도 골프장에서의 유기합성 농약의 과다 사용이 환경오염과 관련하여 사회적으로 문제시 되고 있어 농약의 사용을 줄일 수 있는 효과적인 방법의 하나로서 잡초에 병원성이 있는 미생물을 이용한 생물학적 방제의 개발이 많이 요구되나 이와 관련한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 잔디밭이나 초지에 가장 문제가 되고 있는 다년생 잡초 가운데 하나인 토끼풀을 생물학적인 방법으로 방제해 보고자 잡초 병원성 곰팡이를 분리 탐색하여 제초활성을 검정하였다.

### 재료 및 방법

#### 균 분리원

1994년 4월 경 대전광역시 및 충북 청원군 일원에서 잔디밭이나 초지에 자생하는 토끼풀과 기타 잡초 중 잎, 줄기, 포복지와 뿌리부위에 병반이 나타나 있는 식물재료를 채집하여 균 분리원으로 사용하였다.

#### 사용 배지

곰팡이 균주의 분리 및 보존용 배지로서는 PDA(potato dextrose agar) 배지 (potatoes infusion 200 g, bacto-dextrose 20 g, bacto-agar 15 g, 증류수 1 l)와 WA(water agar) 배지 (agar 1.5%, 증류수 1 l)를 사용하였다. 액체 배양용 배

찾는말 : 미생물제초제, 토끼풀, 한국 들잔디, *Penicillium* sp.

\*연락처

지로는 YM(yeast malt extract) 배지 (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, tryptone 0.5%, glucose 1.0%, 증류수 1 l)를 사용하였다. 균 동정용 배지로서는 Czapek's agar (sucrose 3%, NaNO<sub>3</sub> 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, KCl 0.05%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001%, agar 1.5%)와 MEA(malt extract agar) 배지 (glucose 2.0%, malt extract 2.0%, peptone 0.1%, agar 2.0%) 등을 사용하였다.

#### 공시 식물

방제대상 잡초로서는 토끼풀(*Trifolium repens* L.)을, 대조식물로서는 한국 들잔디(*Zoysia japonica*)를 사용하였다. 토끼풀은 수원 축산시험장으로 부터 종자를 분양받았으며 직경 6.5 cm, 높이 7 cm의 polyvinyl 컵에 미리 준비한 토양 150 g씩을 충전하여 종자를 파종한 후 2~4주 성장시켜 1차 선발실험 및 포자 처리실험, 제초 활성실험에 사용하였다. 잔디는 유성컨트리클럽으로 부터 골프장용 잔디로 사용하고 있는 한국 들잔디(*Zoysia japonica*)를 분양받았으며 polyvinyl pot(40 cm<sup>2</sup>) 상에 일정한 크기씩 옮겨 심어 선발된 균주의 잔디에 대한 약해를 조사하였다.

#### 균 분리

잡초에 형성된 병반으로부터 병원균을 분리하기 위해서 정 등<sup>18)</sup>의 방법을 이용하였다. 즉 채집한 토끼풀을 비롯한 여러 잡초의 이병 부위를 흐르는 수돗물로 30분간 씻어 이물질을 제거한 후 종이수건으로 덮어 물기를 제거하고, 약 1 cm 크기로 잘라 1% NaOCl 용액에서 1분간 표면 살균하였다. 이것을 여지상에서 3~4초 간 풍건한 후 1.5% WA 배지 또는 PDA 배지에 몇 개씩 올려 놓고 온도 25°C에서 일정 기간 배양하였다. 이병 조직에서 자란 곰팡이 균사를 PDA 배지상에 옮기고 여러번 반복하여 계대 배양하면서 순수 분리하였다.

#### 균 동정

선발된 균주를 Czapek's agar 배지와 MEA 배지등에 접종하여 25°C에서 10일간 배양하면서 균주의 형태학적인 특징을 LWD(long working distance) 대물렌즈가 장착된 광학 현미경(Nikon, Labophoto-2)과 육안으로 관찰하였으며 R. Samson 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 각 균주를 동정하였다.

#### 제초활성 스크리닝

제초활성 스크리닝으로서는 각 균주 배양액을 처리하는 스크리닝 실험을 통하여 토끼풀에 대하여 제초활성을 나타내는 균주를 1차 선발하고 이들 균주를 대상으로 포자현탁액을 처리하여 토끼풀에 대하여 제초활성이 우수한 균주를 2차로 선발하였다. 1차 선발 실험에서는 순수 분리된 각 균

주를 YM 액체배지상에 접종하여 28°C에서 10일간 진탕 배양하고, homogenizer를 사용하여 균사체 pellet이 분쇄된 전 배양액을 4 ml씩 취하여 0.1%의 Tween 80과 혼합하였다. 각 배양액 시료를 미리 준비된 공시식물에 고르게 분무 처리하여 상대습도가 80% 이상 유지되는 온실내에서 일정 기간 배양하면서 발병에 따른 제초활성을 조사하였다. 2차 선발 실험에서는 1차적으로 선발된 각 균주를 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 14일간 배양한 후 배지 표면상의 포자를 긁어내어 최종농도 1~2×10<sup>7</sup> 포자수/ml 농도로 포자현탁액을 준비하였다. 이 때 현탁액으로서는 YM 액체 배지상에서 25°C에서 10일간 배양하여 얻어진 각 균주의 배양상징액과 순수 멸균수를 각각 사용하였다. 준비된 포자현탁액을 공시 식물인 토끼풀과 한국 들잔디에 처리하고 약 14일 후에 제초활성 여부를 조사하였다. 이 때 제초활성 평가는 한국화학연구소에서 사용하는 평가 방법<sup>20)</sup>에 의하였으며 형태 및 생리학적 관찰 결과를 근거로하여 달관 조사하였다. 0; no effect, 10~30: slight effect, 40~60; moderate effect, 70~90; severe effect, 100; complete death를 기준으로 하여 11등급으로 각각의 제초활성 정도를 평가하였는데 70점 이상의 활성이 나타나면 제초활성이 비교적 강한 것으로 인정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 스크리닝

채집한 토끼풀을 비롯한 잡초의 병반 시료로부터 총 980주의 곰팡이 균주를 순수 분리하였다. 분리한 균주들은 액체 배양한 후 그 배양액을 처리하는 1차 선발실험에서 토끼풀에 대하여 제초활성을 나타내는 57균주를 선발하였다. 1차 스크리닝 과정에서는 균사체와 배양액을 함께 처리하여 선발하였으므로 균주의 대사산물에 의하여 제초활성을 나타내는 것도 동시에 선발되었을 것으로 판단된다. 그래서 대사산물이 아닌 곰팡이 균체의 발병력에 의한 미생물제초제를 중점적으로 스크리닝하고자 포자현탁액을 처리한 2차 선발실험을 실시하여 Table 1과 같이 제초활성을 나타내는 F30156, F30171, F40034, F40308, F40362, F40429, F40496, F40497 8균주를 선발하였다. 이 중에서 제초활성이 우수한 F40362, F40496, F40497 3균주를 최종 선발하고 균주의 동정, 제초활성의 평가 실험을 실시하였다.

#### 균 동정

Czapek's agar, MEA 등의 배지에 접종하여 25°C에서 10일간 배양하면서 균주의 형태학적인 특징을 육안 및 광학현미경으로 관찰하였다. 선발된 F40362, F40496, F40497 3균주 모두 사용한 배지상에서 빠른 성장을 보였

Table 1. A list of fungal strains possessing a herbicidal activity against clover (*Trifolium repens* L.)

Fungal strains	F30156	F30171	F40034	F40308	F40362	F40429	F40496	F40497
Mortality*	10	20	10	10	80	20	60	50

\*0; no effect, 10~30: slight effect, 40~60; moderate effect, 70~90; severe effect, 100; complete death



Table 3. Mycoherbicidal activity on plants tested by spore suspension method (Number of spores/pot)

Strains	<i>Zoysia japonica</i>		<i>Trifolium repens</i> L.			
	S*	F**	S*	F**		
	2×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>7</sup>
F40362	0***	0	30	40	80	90
F40496	0	0	10	20	50	50
F40497	0	0	10	10	30	30

\*Spore suspension in sterilized water \*\*Spore suspension in broth filtrate \*\*\*0; no effect, 10~30: slight effect, 40~60; moderate effect, 70~90; severe effect, 100; complete death

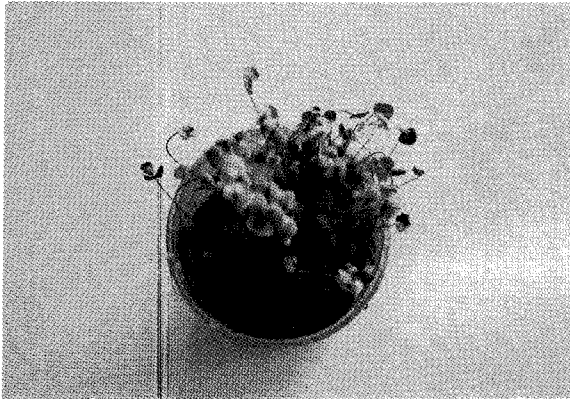


Fig. 2. Mycoherbicidal activity on *Trifolium repens* L. 10 days after treatment with F40362 strain.

나타내는 병징의 특징을 관찰한 결과는 다음과 같다. 즉 식물 병원균의 포자 현탁액을 2~3엽기의 공시식물의 표면에 살포하면 Fig. 2와 같이 시료 처리후 3일 이내에 주로 엽면에서부터 포자가 발아하기 시작하여 암녹색의 균사를 형성하고 점차 엽병과 줄기로 퍼지면서 식물체 전체가 연화, 도복되는 현상을 나타내었다. 그리고 대체로 1주일이 경과하면 완전히 고사되는 것이 관찰되었다. 차후 보다 자세한 작용기작은 계속적으로 연구하여야 할 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌

- Ames, B. N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **204**, 587-593.
- Delp, C. J. (1988) *Fungicide resistance in North America*. APS press, 133pp.
- Staub, T. and D. Sozzi (1984) Fungicide resistance: A continuing challenge. *Plant Dis.* **68**, 1026-1031.
- Charudattan, R. and S. H. L. Walker (1982) Biological control of weeds with plant pathogen. John Wiley & Sons, Inc., New York, 293pp.
- Cutler, H. G. (1988) Perspectives on discovery of microbial phytotoxins with herbicidal activity. *Weed Tech.* **2**, 525-532.
- Hodgson, R. H., L. A. Wymore, A. K. Watson, R. H. Snyder and A. Collette (1988) Efficacy of *Colletotrichum coccodes* and Thidiazuron for velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) control in soybean (*Glycine max*). *Weed Tech.* **2**,

- 473-480.
- Kenfield, D., G. Bunkers, G. A. Strobel and F. Sugawara (1988) Potential new herbicides-phytotoxins from plant pathogens. *Weed Tech.* **2**, 519-524.
- Kenney, D. S. (1986) DeVine-The way it was developed-an industrialist's views. *Weed Sci.* **34**, (suppl.1) 15-16.
- Te Beest, D. O., X. B. Yang and R. Smith (1992) The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 637-657.
- Templeton, G. E., D. O. Te Beest and R. J. Smith (1984) Biological weed control in rice with a strain of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. used as a mycoherbicide. *Crop Prot.* **3**, 409-422.
- Te Beest, D. O. (1988) Addition to the host range of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynme*. L. *Plant Dis.* **72**, 16-18.
- Watson, A. K. (1992) Biological and other alternative control measures. In Proceedings of the First International Weed Control Congress, ed. by L. H. Combellack, K. J. Levick, J. Parsons and R. G. Richardson, *Weed Sci. Soc. Victoria Inc.*, Melbourne, 64-73.
- Mortensen, K. (1988) The potential of an endemic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, for biological control of round-leaved mallow (*Malva pusilla*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Sci.* **36**, 473-478.
- Auld, B. A., M. M. Say, H. I. Ridings and J. Andrews (1990) Field applications of *Colletotrichum orbiculare* to control *Xanthium spinosum*. *Agric. Ecosyst. Environ.* **32**, 315-323.
- Boyette, C. D. (1988) Biocontrol of three leguminous weed species with *Alternaria cassiae*. *Weed Technol.* **2**, 414-417.
- Baldwin, F. L. and J. W. Boyd (1989) Recommended chemicals for weed and brush control. MP-44 Arkansas, Cooper. Ext. Service, Univ. of Arkansas, and USDA. 103pp.
- Sharad, C., R. Donala, D. Homer, K. Durham and C. Norman (1982) Biological control of yellow nutsedge with the indigogenous rust fungus *Puccinia canaliculata*. *Science* **219**, 1446-1447.
- Chung, Y. R., H. T. Kim, T. J. Kim and K. Y. Cho, (1991) Cultural characteristic and pathogenicity of *Rhizoctonia* species isolated from Zoysiagrass and Bentgrass. *Korean J. Plant Pathol.* **4**, 230-235.
- Samson, R. S., E. S. Hoekstra, and C. A. N. Vanoorschot. (1981) In Introduction to food-borne fungi. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts & Sciences.
- 조광연, 김진석, 홍경식, 황인택, 김병섭, 유주현, 김길하등 (1994) 농약스크리닝(I, II, III) 과학기술처.
- Boyette, C. D., Abbas, H. K. and Connick, W. J. (1993) Evaluation of *Fusarium oxysporum* as a potential bioherbicide for sicklepod (*Cassia obtusifolia*), coffee senna (*C. occidentalis*), and hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). *Weed Sci.* **41**, 678-681.
- Gohhara, M. (1994) Researches into the biological control of weeds. PSJ Biocont. Rept. **4**, 50-59.
- Yamada, M. (1994) The present status in bioherbicide development. PSJ Biocont. Rept. **4**, 60-69.

---

Screening of *Penicillium* sp. Showing Herbicidal Activity on *Trifolium repens* L.

Pan-Kyung Kim, Dong-Jin Park, Soon-Yong Choi<sup>1</sup> and Chang-Jin Kim\* (*Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea; <sup>1</sup>Department of Microbiology, Hannam University, Taejeon 300-791, Korea*)

**Abstract :** Nine hundred and eighty fungal strains were isolated from lesions of *Trifolium repens* L. and various weeds. Among them, F40362, F40496, F40497 strains were selected by the screening of herbicidal activity on *Trifolium repens* L. and *Zoysia japonica*. Selected three strains showed selective activity between *Trifolium repens* L. and *Zoysia japonica*, and were identified as *Penicillium* sp.

---

\*Corresponding author