

고추疫病菌(병원균: *Phytophthora capsici*)의 生物學的 防除

I. 고추疫病拮抗菌의 選拔

張胤喜* · 張相文* · 李東勳* · 崔 炆*

Biological Control of *Phytophthora* Blight of Red-pepper Caused by *Phytophthora capsici*

I. Selection of a Bacterial Antagonist against *Phytophthora capsici*

Yoon-Hee Chang*, Sang-Moon Chang*, Dong-Hoon Lee* and Jyung Choi*

Abstract

This study was attempted to select an antagonist against *Phytophthora* blight of red-pepper caused by *Phytophthora capsici*.

The three strains, A-35, A-67 and A-183 were isolated from the rhizosphere in soil where red-pepper had been cultivated continuously for a long time, and the strain A-83 was estimated to be the strongest antagonist against *P. capsici*.

The A-183 strain was identified as a strain of *Pseudomonas* sp., showing the maximum antifungal activity, when cultured at 30°C for 5 days in the potato extract medium(pH 6.5) containing 2.0% mannitol and 0.3% peptone.

緒 論

고추는 우리나라에서 他作物에 비하여 收益性이 높은 作物이므로 농민들이 栽培하기를 선호하며 그 栽培面積을 全菜蔬類 栽培面積의 약 30%정도를 차지한다. 그러나 대부분의 農家에서는 고추를 同一圃

場에서 계속해서 連作하고 있는 實情이다. 이와같은 고추의 連作은 고추病原菌의 發生量과 發生頻度を 증가케 하는 原因이 되었다. 따라서 이를 退治하기 위하여 有機合成의 毒性이 강한 農藥의 使用量이 증가하게 되었고 이로 인하여 土壤中 有用微生物이 減少하고 반면에 農藥의 殘留量은 증가하게끔 되

*慶北大學校 農科大學 農化學科(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea)

었다. 이런 결과로 自然環境의 汚染은 물론 二次的으로 食品까지 汚染되어 人間의 健康을 위협하기에 이르렀다.

고추(*Capsicum annuum* L.) 栽培에 가장 큰 被害를 주고 있는 疫病의 病原균은 眞菌인 *Phytophthora capsici*이며, 이는 土壤傳染性으로서 고추를 連作하면 土壤中 疫病菌의 密度가 점차 높아진다.^{1,2,3)} 이러한 疫病菌을 防除하기 위하여 適正量의 浸透性 殺菌劑를 撒布하여도 그 效果가 떨어지는 경우가 적지 않다. 그러므로 疫病菌의 效果의인 防除를 위하여 農藥의 使用量을 增加시키게 되었다. 이와같은 農藥使用量의 增加는 그 農藥에 대한 耐性菌의 發生을 誘導하고 또한 環境汚染이란 社會的 問題를 야기시키게 되었다.

따라서 現在까지 고추의 疫病防除를 完全하게 解決하지 못하고 있는 實情이며, 더욱이 고추는 풋고추를 生果로 食用하거나 붉은고추의 경우도 加熱 殺菌치 않고 食用하는 경우가 많기 때문에 고추 果實에 殘留하는 農藥은 熱分解과정도 거치지 않기 때문에 잔류농약의 問題는 심각한 것이다. 그러므로 고추의 疫病을 防除하기 위하여 맹독성 農藥을 使用하거나 農藥의 使用量을 增加하는 간편한 수단을 利用하기 보다 生物學的 防除수단이 절실히 필요하게 되었다. 따라서 최근에는 疫病防除를 위하여 拮抗菌을 利用하는 연구를 많이 遂行하고 있다.^{4~10)}

이런 이유로 土壤傳染性 病原菌에 대해서 抗菌性 物質의 探索 研究가 廣範圍하게 이루어지고 있으며^{11,12)}, 특히 土壤微生物로부터 低毒性 生物農藥인 抗生物質의 開發研究가 활발히 展開되고 있다.^{13,14)} 이러한 일련의 研究 中에서 고추 疫病菌에 拮抗性이 있는 抗生物質에 대한 研究들도 報告되어 있으나¹⁵⁾ 대부분은 단편적인 研究이며 體系的이고 綜合的인 研究는 많지 않은 實情이다.

따라서 本 研究에서는 고추 疫病을 效果的으로 防除할 수 있는 生物農藥을 開發하기 위해 疫病菌에 대하여 優秀한 抗菌作用을 보여주는 拮抗菌을 選拔하여 同定하고 이들이 抗菌活性物質을 生産할 수 있는 培養條件을 調査하였다.

材料 및 方法

1. 使用菌株 및 培養條件

고추栽培地 土壤을 菌原試料로 하여 Nutrient agar(Peptone 10g, Meat extract 10g, NaCl 5g, Agar 15g, pH 7.0) 培地에서 拮抗菌 選拔에 使用할 菌을 1次로 純粹分離하였다. 고추 疫病菌인 *P. capsici*는 農業科學技術院에서 分讓받았다. 分離菌株와 疫病菌들은 PDA培地(Potato extract(200g/l) 1l, Dextrose 20g, Agar 20g, pH 6.5)에서 對峙培養하였으며, 分離菌株들은 24시간 培養한 培養液을 20ml 또는 400ml의 液體培地에 2% 水準으로 接種하고 왕복진탕기(80 strokes/min.)에서 5일 동안 培養하여 抗菌性物質의 生産量을 調査하였다.

2. 拮抗性 및 抗菌活性 調査

고추 疫病菌에 대한 拮抗性 및 抗菌活性에 관한 調査는 Dual culture¹⁷⁾, Dendroid test¹⁸⁾ 및 Paper disk法¹⁹⁾에 따라 實施하였으며 顯微鏡 觀察을 併行하였다.

3. 고추種子の 發芽率 調査

사레(직경 9cm)에 vermiculite를 넣고 sodium hypochlorite로 소독한 고추種子(청홍고추)를 各各 20粒씩 播種한 後 5일 동안 培養한 拮抗菌의 培養液을 2ml씩 가하여 매일 水分을 보충하면서 30°C로 維持시켰다. 10日 後 發芽率을 調査하여 백분율로 나타내었다.

4. 選拔菌株의 同定

선발된 균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology²⁰⁾ 및 Laboratory manual of general bacteriology²¹⁾의 方法에 準하였다.

結果 및 考察

1. *Phytophthora capsici*에 대한拮抗性

고추 栽培土壤으로 부터 200餘 菌株를 分離하여 그 中 고추 疫病菌에 대하여 強한 拮抗性을 보이는 3菌株를 1次로 選拔하여 그들의 拮抗性을 調査한 結果는 Fig. 1 및 Table 1과 같았다.

Fig. 1은 A-67菌株와 A-183菌株의 *P. capsici*에 대한 對峙培養의 樣相을 보여주고 있다. 분리된 균주

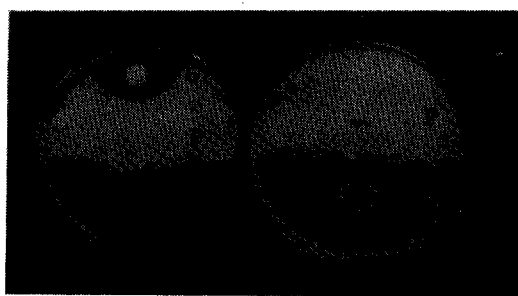


Fig. 1. Antagonistic effects of the isolates A-67 and A-183 against *P. capsici* on the dual culture.

P: mycelia of *P. capsici*.

Table 1. Antagonistic activities of the microbial strains isolated from rhizosphere against *P. capsici*.

Strains	Width of inhibition zone(mm)*	Inhibition(%) of <i>P. capsici</i> growth	
		Filtrate**	Heat-treated**
A-67	9	60.0	3.5
A-183	13	78.5	55.4
A-35	5	44.3	3.5

*Width of inhibition zone was determined on dual culture(see Material and Method)

**The culture broth was filtered through a 0.45 μm membrane filter and one of the filtrate was heat-treated at 120 for 15min. Each one was mixed with PDA medium in 2:8 ratio and mycelial disk was incubated at 28°C for 5days.

들의 항균활성은 Table 1과 같으며, A-67菌株와 A-35菌株에 의한 阻止帶의 長이가 各各 9mm와 5mm 이나 A-183菌株에 의한 것은 13mm로서 *P. capsici*에 대한 抗菌活性이 가장 높았다. A-183菌株의 경우 培養液의 membrane濾液에 의한 抗菌活性도 가장 높게 나타났다. 培養液 中の 抗菌活性과 相關된 成分이 熱處理로 失活되는지를 알기 위해 培養液을 120°C에서 15分 동안 熱處理하여 Dendroid法²⁰⁾에 의해 生育阻害度를 調査한 結果 3.5%의 낮은 抗菌活性을 나타내는 반면에 A-183菌株는 55.4%의 높은 抗菌活性을 유지하고 있다.

이와같은 結果로 볼 때 A-183菌株가 다른 두 菌株에 비하여 拮抗能力이 優秀하고 이 菌株의 培養液을 membrane濾過하거나 熱處理(120°C, 15min.)하여도 높은 抗菌活性을 維持한 것으로 나타났으므로 A-183菌株에 의하여 培地 中에 耐熱性的 抗菌物質이 生産되는 것으로 추정되었다.

2. 培養液의 고추種子의 發芽에 미치는 影響

고추種子의 發芽에 미치는 拮抗菌의 影響을 調査하기 위하여 分離한 拮抗菌을 培養한 培養液을 處理하여 6일과 10일후에 發芽率을 조사하였다.

A-67菌株의 培養液을 處理한 結果 고추種子의 發

Table 2. Effect of antagonists's filtrates on germination of red pepper seeds.

strains**	germination(%)*	
	6 days	10 days
A-67(filtrate)	25	87
A-183(filtrate)	52	96
A-183(heat treated)	64	100
A-35(filtrate)	83	100
Control(H ₂ O)	36	100

*Twenty Pepper seeds(Chunghong pepper) were sown and 2ml culture broth of antagonists was drenched to the pot.

**The culture broth was filtered and some filtrate was heat-treated at 120°C for 15min.

芽率이 낮아졌으나 A-35菌株의 培養液을 處理하면 오히려 初期發芽를 促進시키는 結果를 보여 주었다. A-183菌株는 培養液을 120°C에서 15분 동안 處理한 結果 熱處理하지 않는 것을 接種하는 것보다 약간 發芽를 促進하는 效果를 보여 주었다. 10일째에는 A-67菌株를 除外하고는 모든 處理區에서 거의 동일한 發芽率을 나타내었다.

이상의 結果로 부터 *P. capsici*에 대한 抗菌活性이 높고 高種子의 發芽에 泐害作用을 보이지 않았던 A-183菌株를 抗菌性物質의 生産을 위한 分離菌株로 選定하였다.

3. 培養液의 濃度와 熱處理가 抗菌活性에 미치는 影響

A-183菌株를 PDA培地에서 5일 동안 培養한 後 生成된 抗菌性物質의 溫度에 대한 安定性을 조사하기 위하여 遠心分離하여 上清液을 80°C에서는 1시간, 120°C에서는 15분 동안 熱處理한 後, 5~30%濃度로 PDA培地에 混合하여 Dendroid test法²⁰⁾에 따라서 抗菌活性을 調査하였다.

拮抗菌 培養液의 혼합비율이 增加할수록 *P. capsici*의 生育泐害率도 增加하였으며 80°C에서 1시간 處理한 培養液의 경우에는 10%이상 添加하고, 120

Table 3. Effects of concentrations and heat treatment of culture filtrate of the antagonist, A-183 on antifungal activity to *P. capsici*

Conc.(%)	Inhibition(%) of <i>P. capsici</i> growth	
	80°C, 1hr	120°C, 15min.
5	38.5	1.9
10	51.9	26.9
15	59.6	50.0
20	76.9	51.9
25	86.5	59.6
30	90.4	63.5

°에 15분 동안 處理한 培養液의 경우에는 15%이상 添加해야 *P. capsici*에 대한 生育泐害가 50%이상 나타났다. 80°C에서 1시간 處理한 培養液을 30% 添加하면 *P. capsici*의 生育이 90%이상 泐害되었으나 120°C에서 15분 동안 處理한 培養液의 경우에는 63%의 泐害率을 보여 耐熱性 抗菌物質이 生成된 것으로 추정되었다.

4. 選拔菌株 A-183의 同定

*P. capsici*에 대하여 拮抗性 및 抗菌活性이 가장 優秀한 A-183菌株를 同定하기 위하여 形態的 및 生理學的 特性을 調査한 結果는 Table 4와 같았다.

A-183菌株는 gram 陰性을 나타내며 運動性을 가지는 短桿菌이었다.

또한 casein과 urea는 分解하나 starch는 分解하지 못하였으며 gelatin液化能力과 glucose의 醱酵能

Table 4. Biological and physiological characteristics of the antagonist A-183 strain.

Gram staining	negative
Cell shape	short rod
Motility	positive
Fermentation	
Glucose	positive
Suscrose	negative
Lactose	negative
Starch hydrolysis	negative
Casein hydrolysis	positive
Urea hydrolysis	positive
Gelatin liquefaction	positive
Cimon's citrate	positive
Catalase	Positive
Oxidase	positive
MR	negative
VP	negative
Kovacs	negative
Denitrification	positive
NaCl tolerance 5%	positive
7%	negative

및 citrate利用性이 있었다. 또한 이 菌은 catalase와 oxidase를 生産하였으며 nitrate를 脫窒시켰다. Bergey,s manual²⁰⁾에 따라 相應하는 菌을 검색한 結果 A-183菌株는 *Pseudomonas* sp. A-183으로 同定되었다.

5. 抗菌物質 生産用 培地組成

Pseudomonas sp. A-183이 生産하는 *P. capsici*에 대한 抗菌物質 生産을 위한 培養條件을 調査하였다. 먼저 PDA培地の pH를 4~8로 조절하여 *P. capsici*에 대한 汎害率을 調査한 結果 培地の 初期 pH가 6~7일 때 가장 높았으며, 培養期間에 따른 汎害率은 培養 2일 부터 抗菌活性이 나타나기 시작하여 5일이 지나면서 最大에 達하였다.

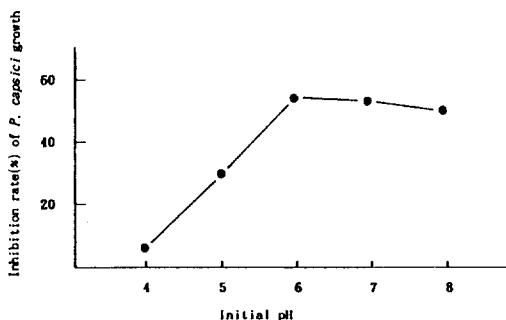


Fig. 2. Effect of initial pH on the production of antifungal agents by *Pseudomonas* sp. A-183.

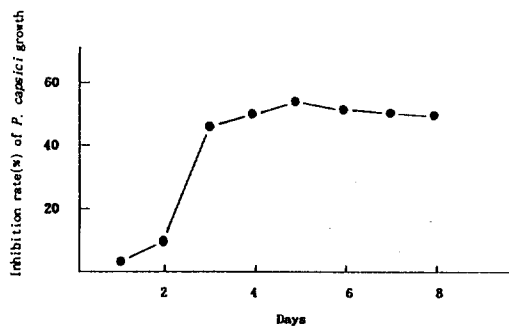


Fig. 3. Effect of culture time on the production of antifungal agents by *Pseudomonas* sp. A-183.

抗菌物質의 生産에 미치는 炭素源 및 窒素源의 影響을 調査한 結果는 Table 5와 같았다.

Pseudomonas sp. A-183의 抗菌物質生産에 炭素源으로는 mannitol, 窒素源으로는 peptone이 가장 優秀한 것으로 나타났으므로 이들의 濃度를 달리하여 抗菌成物質의 生産에 미치는 影響을 調査하였다.

즉 potato extract배지에 mannitol을 2% 添加하고

Table 5. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of the antifungal substance by *Pseudomonas* sp. A-183.

	Final pH	Growth of <i>P. capsici</i> A-183	Inhibition(%) of <i>P. capsici</i> growth*
Carbon sourced(2%)			
Mannitol	8.0	++	80.7
Sucrose	9.3	+	44.4
Glycerol	7.8	++	38.1
Ethanol	5.3	++	3.3
Gluconate	9.2	+	57.1
Sorbitol	9.1	+	64.3
Xylose	4.0	+	22.2
Lactose	9.1	+	50.0
Citrate	9.0	+	5.0
Glucose	4.2	++	53.6
Nitrogen sources(0.3%)			
KNO ₃	4.2	++	83.0
Ca(NO ₃) ₂	4.0	+	74.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.4	++	63.0
NH ₄ Cl	4.0	++	42.3
Mg(NO ₃) ₂	4.1	++	76.0
Soy meal	9.0	+	62.1
Yeast extract	4.3	++	65.5
Peptone	4.4	++	92.6
Control	4.2	++	53.6

++: good growth, +: moderate growth.

*: Culture filtrates mixed with PDA at 2:8 ratio in a dendroid test.

Table 6. Effect of concentration of mannitol and peptone on the production of antifungal substances by *Pseudomonas* sp. A-183.

	Conc. (%)	Inhibition(%) of <i>P. capsici</i> growth*
Mannitol conc.(%)	0.0	93
(Peptone 0.3%)	1.0	98
	2.0	100
Peptone conc.(%)	0.0	80
(Mannitol 2.0%)	0.1	100
	0.3	100

*Each culture filtrate was mixed with PDA at 2:8 ratio in a dendroid test.

peptone을 0.1%만 添加하여 培養한 培養液은 *P. capsici*의 生育을 거의 100% 阻害하였다. 이상의 結果에서 potato extract(200g/l) 1l, mannitol 20g, peptone 3g 및 pH 6.5의 배지조성이 抗菌性物質 生産에 가장 적합한 것으로 나타났다.

要 約

고추 疫病菌인 *Phytophthora capsici*의 防除를 위한 生物農藥을 開發하기 위하여 고추栽培地土壤에서 菌源試料을 採取하여 優秀한 抗菌活性을 가지는 物質을 生産하는 菌株을 純粹分離하고 同定하였다. 對峙培養에서 A-183菌株가 A-35와 A-67보다 *P. capsici*의 生育을 크게 阻害하였으며 培養液을 membrane여과 및 熱處理(120°C, 15min.)하여도 높은 活性을 나타내었다. A-67菌株는 고추種子의 發芽를 阻害하였으나 A-183과 A-45菌株는 阻害하지 않았다. A-183菌株가 拮抗性 및 抗菌物質 生産能이 가장 優秀한 것으로 나타났으며, *Pseudomonas* sp.으로 同定되었다. 抗菌活性物質의 生産을 위한 最適 培地組成은 potato extract 1l, mannitol 2%, peptone 0.3%, pH 6.5이었다.

參考文獻

1. Tsuyumi, S., S. Tsuchida, T. Nakano and Y. Takikawa(1989): Antifungal activity in cell free culture fluid of *Pseudomonas solanacearum*, 日植病報, **55**, 9-15.
2. Jonston, S. A. and J. K. Springer(1978): Pepper *Phytophthora* blight-chemical and biological control, Plant Pathol. Leaflet 105, Rutgers-The State University of New Brunswick, pp. 23.
3. Barksdale, T. H., G.C. Papavizas and S. A. Jonston(1984): Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora capsici*, Plant Dis., **68**, 506-509.
4. Gupta, V. K. and R. S. Utkede(1987): Nutritional requirement for production of antifungal substance by *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis* antagonists of *Phytophthora cactorum*, J. Phytopathol., **120**, 143-153.
5. Utkede R. S. and A. P. Gaunce(1984): Inhibition of *Phytophthora cactorum* by a bacterial antagonist. Can. J. Bot., **61**, 3343-3348.
6. Filonow, A. B. and J. L. Lockwood(1985): Evaluation of several actinomycetes and the fungus *hyphochytricum catenoids* as biocontrol agents for *Phytophthora* root of soybean, Plant Dis., **69**, 1033-1036.
7. Sutherland, E. D. and G. C. Papavizas(1991): Evaluation of oospore hyperparasites for the control of *Phytophthora* crown rot of pepper, J. Phytopathol., **131**, 33-39.
8. Turhan G. and F. Grossmann(1988): Antagonistic activity of *Neocosmospora vasinfecta* var. *africana*(von Arx) Cann and Hawksworth against soil-borne fungi, J. Phytopathol., **123**, 199-206.
9. 황병국, 김은수(1992): 非病原性 *Phytophthora capsici*菌株에 의한 고추疫病的 抑制, 韓國植物病理學會誌, **8**, 1-7.
10. 洪性烈, 俞泰武, 尹相弘, 朴承熙, 柳震彰(1991): 土壤病害 拮抗菌의 生成物質特性에 관한 研究, 農試論文集, **32**, 53-58.
11. Omura, S., Y. Tanaka, K. Hisatome, S. Miura, Y. Takahashi and A. Nakagawa(1988): Phtho-

- ramycin, a new antibiotic, active against a plant pathogen, *Phytophthora* sp., J. Antibiotics, **41**: 1910-1912.
12. Aizawa, N. and N. Otake (1982): Recent progress in research of agricultural antibiotics in Japan, The Fifth International Congress of Pesticide Chemistry(IUPAC), Kyoto.
 13. 裴 武, 高永熹(1982): *Streptomyces* sp.가 生産하는 抗眞菌性 抗生物質에 관한 研究, (第2報) 抗眞菌性 抗生物質 trans-cinnamamide의 生成, 韓國應用微生物學會誌, **10**, 39-43.
 14. 李啓瑚, 徐民宰(1989): 放線菌을 利用한 生物農藥 및 低毒性 農藥開發을 위한 基礎研究, 農試論文集, **32**: 59-74.
 15. 이인경, 김창진, 김신덕, 유익동(1990): *Streptomyces parvullus*菌株가 生産하는 抗고추疫病性 抗生物質, 韓國應用微生物學會誌, **18**, 142-147.
 16. 김창진, 이인경, 윤봉식, 유익동(1993): *Streptomyces neyagawaensis* 38D10菌株가 生産하는 concanamycin B의 抗고추疫病活性, 韓國應用微生物學會誌, **21**, 322-328.
 17. 몬크야스오, 노 요시니(1988): 키야하츠의 委黃病에 對する拮抗性放射線菌의 利用, 植物防疫, **42**, 246-250.
 18. 裴 武, 高永熹(1982): *Streptomyces* sp. 가 生産하는 抗眞菌性 抗生物質에 관한 研究, (第1報) 生産菌株의 選別과 抗眞菌性 抗生物質의 分離精製, 韓國應用微生物學會誌, **10**, 33-37.
 19. Victor Lorian, M.D.(1991): Antibiotics in laboratory medicine(3rd ed.), Williams and Wilkins, Baltimore.
 20. Krieg, N. P. and J. C. Holtz(1984): Bergey's Manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 21. Gerhardt, P. (1980): Manual of methods for general bacteriology, Am. Soc. Microbiol., Washington.