

고추역병의 생물학적 방제를 위한 길항진균의 분리*

이용세¹⁾ · 전하준²⁾ · 김상달³⁾

대구대학교 자연자원대학 자연자원학부¹⁾ · 영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과²⁾

Isolation of Antagonistic Fungi to *Phytophthora Capsici* for Biological Control of *Phytophthora* Blight of Red-Pepper

Lee Yong-Se¹⁾, Jun Ha-Jun²⁾ and Kim Sang-Dal³⁾

Department of Natural Resources, Taegu University, Kyongsan 712-714, Korea¹⁾

Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources,

Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea²⁾

ABSTRACT

For isolation of antagonistic fungi antagonistic to *Phytophthora capsici*, a total of 157 isolates of fungi were screened from soil. Among the 157 isolates further screened by the dual culture test on potato dextrose agar and V-8 juice agar, 16 isolates were tested to show their antagonistic activity against *P. capsici* and *Fusarium oxysporum*. Fungal culture filtrates of screened 16 isolates were shown to inhibit germination of zoospores of *P. capsici* entirely and conidia of *F. oxysporum* considerably. Antagonistic fungi were shown to suppress of *P. capsici* infection of red-pepper plants maintained in the green house. Four isolates, 27 J5, 37 J10, 36 J13 and 31 K10, with the reduced disease incidence 53.3~60.0% were identified as *Fusarium* sp. (27 J5), *Trichoderma* sp. (37 J10, 36 J13) and *Penicillium* sp. (31 K10).

* 본 연구는 농림부 자원의 농업 특정연구 개발사업의 일환으로 수행한 결과 이에 감사드립니다.

I. 서 론

*Phytophthora capsici*에 의한 고추 역병은 고추 생산 및 재배에 있어서 가장 큰 제한 요인이 되고 있는 병해로서 연작장해의 주원인이 되고 있다(김 등, 1982; 양 등, 1986). 특히 *P. capsici*는 토양 속에서 장기간 생존하면서 병을 일으키는 토양전염성병원균으로 농약사용에 의한 방제가 매우 어려우며, 저항성품종의 육성에 의한 역병의 방제가 현 단계에서는 미흡하기 때문에 이에 대한 효과적인 방제대책의 확립이 요구되고 있다.

길항미생물을 이용하는 생물학적 방제는 자연 생태계 내에서 서로 다른 두 종간에 일어날 수 있는 경쟁, 기생, 포식관계 또는 항생작용 등의 상호작용을 인위적으로 조절하여 이용하는 것으로서, 1970년대 억제토양이 토양내 미생물들의 상호작용에 의한 것으로 보고된 이후 종합적방제법의 일환으로서 활발히 수행되어져 왔으며, 많은 종류의 actinomycetes, bacteria 및 fungi에 속하는 길항미생물들이 분리되어 생물적방제에 연구되어져 왔다(Cook, 1990). 특히 토양전염성병은 농약으로도 방제가 매우 어려우며, 병 발생 이후에는 치료가 거의 불가능하기 때문에 각종 토양전염성 병원균에 대한 생물학적 방제에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다(Handelsman and Stabb, 1996; Kim *et. al.*, 1997; Smith *et. al.*, 1997). 이와 같은 방법이 도입될 경우 방제효과가 오랜 기간 동안 지속될 수 있으며, 농약사용에 따른 생태계 파괴, 환경오염, 약해 및 잔류독성의 문제를 줄일 수 있기 때문에 종합적 방제법의 일환으로서 매우 바람직하다 할 수 있다.

고추 역병에 대한 생물학적 방제에 관한 연구는 1980년대 중반 이후 농업기술연구소 병리과와 농약 연구소 생물농약 연구팀을 중심으로 활발히 수행되어 *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus polymyxa* 및 *Trichoderma harzianum* 등의 길항미생물(남 등, 1988; 박 등, 1989; 지 등, 1988; 홍 등, 1990; Kim *et. al.*, 1991; Lee *et. al.*, 1990; Park and Kim, 1989; Park *et. al.*, 1993)과 비병원성 *Phytopathora capsici*(Hwang and Kim, 1992)를 분리하여 생물적방제를 위한 제형개발에 이르기 까지 상당한 진전이 이루어져 있으나 실용화 단계에는 이르지 못하고 있다.

길항미생물을 이용하는 생물학적 방제의 연구 추세는 정착능력이 우수한 길항미생물을 재배지 토양에 직접 처리하여 병의 발생을 억제시키는 방법의 확립이라 할 수 있다. 따라서 대상 병원균에 대한 길항효과가 우수하면서 정착능력이 있는 균주의 분리, 선발은 매우 중요하다.

본 연구에서는 고추 역병의 생물학적 방제 방법을 확립하기 위한 실험의 일환으로서 고추 역병균에 대한 길항효과가 우수한 토착 길항진균을 환경친화형 유기농업이 행해지고 있는 토양에서 선발하기 위해 실시하였다.

II. 재료 및 방법

공시토양 : 토착 길항진균을 선별하기 위해 경북 경주시 서면 지역의 일반 경작지 토양 및 대나무밭과 낙엽이 부식된 참나무가 주종을 이루고 있는 산 토양을 채집하였다. 토양표면 10~15cm 깊이에서 약 50g의 토양을 채집하였으며, 진균의 분리는 채집 즉시 또는 저온실(8℃)에 보관하면서 실시하였다.

길항진균의 순수분리 : 채취한 토양시료 5g을 50ml의 멸균 생리식염수가 담긴 100ml 삼각 flask에 현탁한 다음 1ml를 취하여 9ml의 멸균수에 희석하고 계속 10배수로 10⁴까지 희석하였다. 10², 10³ 및 10⁴의 각 희석액에서 200ul씩을 취하여 tetracycline이 첨가된(25ug/ml) potato dextrose agar(PDA, Difco Co.) 15ml를 부어 굳힌 petri dish에 분주한 다음 유리봉을 사용하여 도말 후 27℃에서 배양하였다. 24~48시간 배양 후 단일 colony를 순수분리하여 PDA에 3~5일간 배양하였다. 길항효과가 우수한 균주의 선별은 대칭배양방법(dual culture)에 의해 실시하였다. 순수분리 후 배양한 각 균주의 균총(직경 5mm)을 PDA 및 V-8 평판배지의 한 쪽에 접종한 다음 다른 한 쪽에 4일간 PDA에 전배양한 *Phytophthora capsici*와 *Fusarium oxysporum*의 균총(5mm)을 각각 접종하여 27℃에서 4~5일간 배양 후 *F. oxysporum*과 *P. capsici*의 균사생장을 억제시키는 균주를 1차 길항진균으로 선별하였다.

길항진균의 병원균 유주자낭 발아 억제효과 조사 : 각 길항진균의 배양여액은 50ml의 potato dextrose broth(PDB)가 담긴 100ml 삼각 flask에 길항진균을 접종하여 5~7일간 진탕액체배양(27℃, 120 rpm) 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음 membrane filter(0.45μm, Millipore)로 여과하여 만들었다. 배양여액 10ml를 100ml 삼각 플라스크에 넣고 고추 역병균의 현탁액(5×10⁵ zoospore/ml)과 시들음병균의 분생포자 현탁액(5×10⁵ spore/ml)을 각각 1.0ml를 접종하여 27℃에서 100 rpm으로 24시간 진탕 배양 후 광학현미경하(200×)에서 유주자의 발아율을 조사하였다. 공시 역병균은 경북대학교 김병수 박사가 밀양 고추 재배지의 이병주에서 분리한 균주를 분양 받아 사용하였으며, 역병균의 유주자낭 형성은 V-8 주스 한천 배지에서 하였다(지 등, 1988). 각 처리는 모두 3 반복하였다.

길항진균의 고추 역병 억제효과 조사 : 선별한 길항진균의 고추 역병 발생 억제효과 조사는 pot 실험에 의해 실시하였다. 식물재료는 서울종묘에서 연구용으로 사용하고 있는 오륜고추를 분양 받아 사용하였다. 건진 고추묘의 육묘는 원예용 상토(Fisons, Canada)를 사용하여 자연광하의 온실에서 수행하였다. 길항진균의 배양토 100g을 900g의 상토(원예용상토 : 경작지토양 : 모래 = 1:1:1, V/V/V)와 혼합한 다음 비닐포트(직경 17cm, 높이 16cm)에 담고 묘령이 30일된 고추묘를 포트당 5주씩 길항 균주당 3반복으로 이식하였다. 이식 후 포트당 50ml의 역병균 유주자현탁액(6×10² zoosporangia/ml)을 관주 처리하였다. 관주처리 후 24시간 습실 처리한 다음 온실에서 계속 재배하면서 경시적으로 발병률을 조사하여 길항진균의 역병 억제효과를 조사하였다. 길항진균의 배양토는 원예용

상토(Fisons, Canada), 경작지 토양 및 모래를 1 : 1 : 1(V/V/V)로 혼합한 후 corn meal을 0.3%(w/w) 첨가하고 1차 증류수와 혼합하여 1liter 삼각 플라스크에 600ml (Volume, 약 500g)를 담은 후 121 C에서 60분간 고압증기살균한 다음 4일간 PDA에 전 배양한 길항진균의 균총(직경, 1.0cm) 5개를 접종하여 27 C에서 14일간 배양하여 만들었다. 각 처리는 모두 3반복을 실시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 고추 역병균에 대한 길항진균의 선발

토착 길항진균을 선발하기 위해 경주시 서면 일대의 10개 지역에서 채취한 공시토양재료에서 단일 colony로 157개의 진균을 순수분리하였다. 157개 균주 중 고추 역병균 (*Phytophthora capsici*) 및 시들음병균(*Fusarium oxysporum*)과 대칭배양하여 역병균과 시들음병균의 균사생장을 억제시켜 clear zone을 형성하거나, 균사 생장을 억제시키면서 중복생장(Fig. 1)을 하는 16개 균주를 1차 길항진균으로 선발하였다.

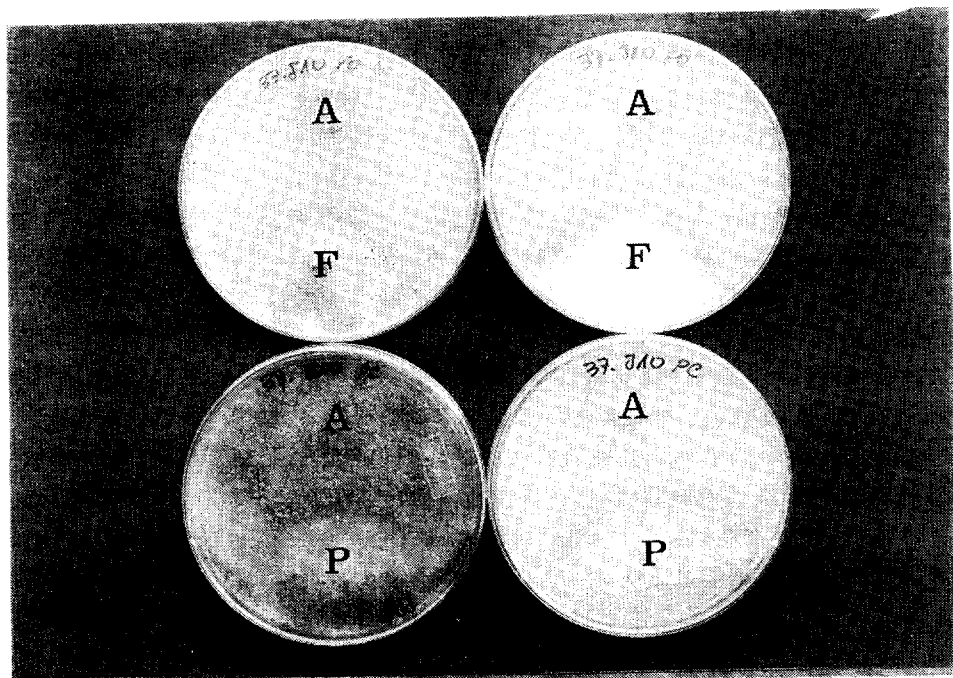


Fig. 1. Inhibition effect of antagonistic fungi 37 J10(A) against *Phytophthora capsici*(P) and *Fusarium oxysporum*(F) on potato dextrose agar(left) and V-8 juice agar(right) plate for 5 days after incubation at 27°C.

2. 길항진균의 병원균 유주자낭 발아 억제효과 조사

1차 선발한 16개 길항진균의 배양여액에 역병균의 유주자와 시들음병균의 분생포자를 접종하여 24시간 후에 발아율을 조사한 결과 모든 균주의 배양여액에서 고추 역병균의 유주자낭의 발아는 완전히 억제되었으며, 시들음병균의 분생포자 발아도 현저히 억제되었다 (Table 1). 이러한 결과는 대칭배양에서 균사생장을 억제하여 clear zone을 형성하거나, 공시 병원균에 대해 중복생장을 하여 선발한 모든 길항진균이 항진균성 물질을 분비한다고 할 수 있었으며, 지 등(1988)이 분리한 *Trichoderma harzianum*의 배양여액의 효과와 유사하였다.

Table. 1. Antagonistic effect of cell-free culture filtrates of antagonistic fungi isolated from soils on germination of the zoosporangia of *Phytophthora capsici* and the conidia of *Fusarium oxysporum*

Antagonistic fungi	Germination(%) ^a	
	Zoosporangia of <i>P. capsici</i>	Conidia of <i>F. oxysporum</i>
25 J1	0	0
27 J5	0	3.1
37 J10	0	0
36 J13	0	1.4
19 J15	0	2.5
35 J15	0	0
23 J16	0	0
28 J16	0	3.4
21 K2	0	4.2
24 K5	0	5.2
22 K7	0	3.7
20 K9	0	5.1
31 K10	0	1.9
38 K10	0	0
27 K12	0	1.4
PDB	91.5	94.2

The antagonistic fungi were grown in PDB for 3~5 days at 27°C and their cell-free filtrates were collected by centrifugation followed by aseptic 0.45 μ m-filtration. a: Values are averages of 3-replications.

3. 길항진균의 고추 역병 억제효과

길항진균의 배양토에 건전 고추묘를 이식 후 고추 역병균의 유주자낭을 관주처리하여 접종한 결과 접종 4일 후부터 이병주를 관찰할 수 있었으며 (Fig. 2), 14일 까지 경시적으로 이병률을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 접종 4일 후부터 이병주를 관찰 할 수 있었으며, 6일 후에는 멸균수를 처리한 대조구에서는 모든 식물이 발병되었으나, 길항진균을 처리한 구에서는 병의 발생이 억제되는 경향을 보였다. 접종 8일 후에는 길항진균의 처리구에서도

병이 발생되기 시작하여 27 J5, 37 J10, 36 J13 및 31 K10 균주의 처리에서는 각각 20.0%, 26.7%, 20.0% 및 33.3%의 이병률을 보였으며 35 J15와 21 K2 균주의 처리구에서는 100%의 이병률을 보여 균주간 차이가 현저하였다. 접종 14일 후에는 병든 식물이 완전히 고사하는 현상을 보였으며, 접종 8일 후에 낮은 이병률을 보였던 27 J5, 37 J10, 36 J13 및 31 K10 균주의 처리에서는 53.3~66.7%의 이병률을 보여 고추 역병발생에 대한 억제효과가 높음을 알 수 있었다.

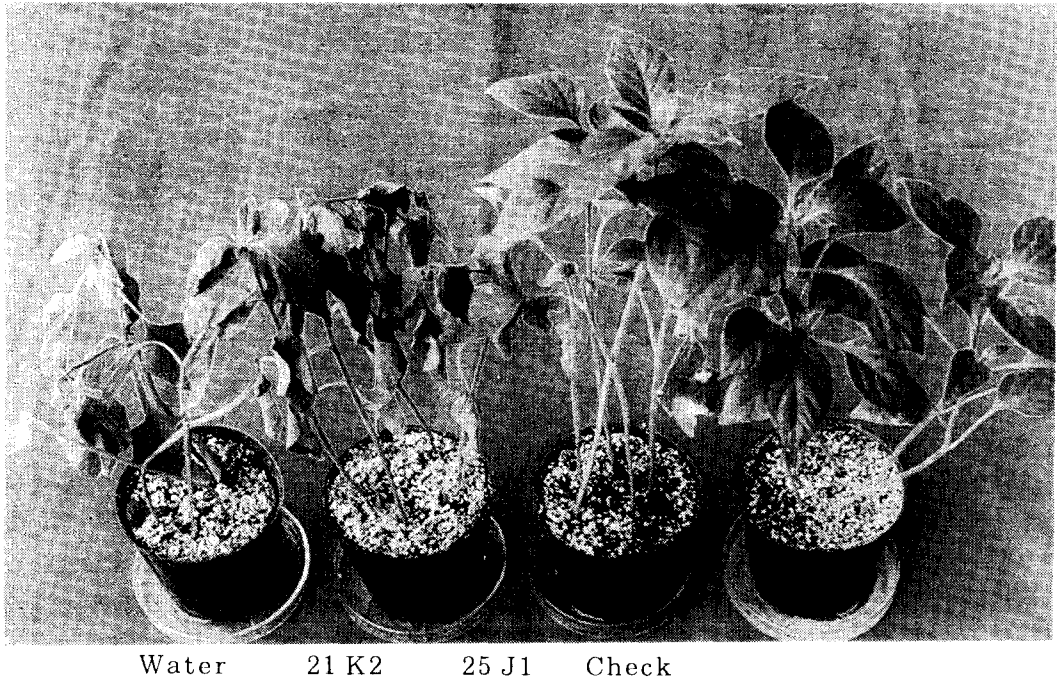


Fig. 2. Effect of antagonistic fungi on disease development of Phytophthora blight of red-pepper plants in infested soil(3×10^4 zoosporangia/600g pot soil) in the green house. Six days after inoculation.

고추 역병 발생의 최적조건에서 실험한 이상의 결과에서 모든 공시 길항진균의 배양토에서 역병의 발생이 대조구에 비하여 지연되었거나 억제됨을 알 수 있었다. 특히 접종 8일 후까지 역병발생의 억제효과가 50% 이상 되었던 균주들은 길항 미생물을 이용한 고추역병의 생물적 방제에 관한 다른 연구보고(남 등, 1988; 박 등, 1989; 지 등, 1988)와 비교할 때 월등히 높은 병 발생 억제효과를 보이지는 않았지만 역병의 최적발생조건에서 비교적 높은 효과를 나타내었으므로 이들 균주의 생리, 생태적 특성을 구명하여 적정 처리 방법 등을 개발할 경우 고추역병을 생물학적으로 방제할 수 있는 가능성을 보였다.

Table. 2. Effect of selected antagonistic fungi on incidence of Phytophthora blight of red pepper plants in infested soil(3×10^4 zoospangia/600g pot soil) in the green house

	Number of diseased plants(/15)					
	4days ^a	6	8	10	12	14
25 J1	0	0	7	8	15	15(100%)
27 J5	0	2	3	3	7	9(60.0%)
37 J10	2	4	4	5	8	8(53.3%)
36 J13	0	3	3	5	9	10(66.7)
19 J15	0	6	9	14	15	-(100%)
35 J15	2	13	15	-	-	-(100%)
23 J16	2	5	10	14	15	-(100%)
28 J16	1	4	9	15	-	-(100%)
21 K2	3	12	15	-	-	-(100%)
24 K5	3	5	8	13	15	-(100%)
22 K7	2	3	8	10	13	13(86.6%)
20 K9	0	8	13	15	-	-(100%)
31 K10	0	3	5	6	8	8(53.3%)
38 K10	0	0	12	15	-	-(100%)
27 K12	0	4	9	13	14	14(87.5%)
Water	4	15	-	-	-	-(100%)

a : days after inoculation.

4. 길항진균의 동정

1차 선발한 길항진균 중 배양토를 사용하였을 때 고추 역병에 대해 억제효과가 높은 37 J10과 36 J13 균주는 PDA에서 투명(hyaline)한 균사의 성장속도가 매우 빠르고 배양 시간이 경과함에 따라 녹색(green)을 띄며, branched 상태의 conidiophore가 관찰되고 플라스크모양의 phialides와 구형의 phialides spore가 관찰되어 *Trichoderma* sp.로 동정하였다. 27 J5 균주는 균사가 밀집된 상태에서 자라며 배양시간이 경과함에 따라 노란(yellow)색을 띄고, conidiophore에서 conidia가 생성되며, macroconidia와 microconidia가 관찰되어 *Fusarium* sp.로 동정하였다. 31 K10 균주는 conidiophore의 형태와 conidia의 형태에 의해 *Penicillium* sp.로 동정하였다.

IV. 적 요

본 실험은 고추 역병의 생물학적 방제 방법을 확립하기 위한 실험의 일환으로서 고추 역병균에 대한 길항효과가 우수한 토착 길항진균을 환경친화형 유기농업이 행해지고 있는 토양에서 선발하기 위해 실시하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 경주시 서면 일대의 10개 지역에서 채취한 공시토양재료에서 단일 colony로 157개

의 진균을 순수분리하였으며, 157개 균주 중 고추 역병균 및 시들음병균에 대해 *in vitro* 에서 길항효과가 있는 16개 균주를 1차 길항진균으로 선발하였다.

2. 1차 선발한 길항진균의 배양여액은 고추 역병균의 유주자낭의 발아를 완전히 억제시켰으며, 시들음병균의 분생포자 발아도 현저히 억제되었다.

3. 길항진균의 배양토에 건전 고추묘를 이식 후 고추 역병균의 유주자낭을 관주처리하여 접종한 결과 접종 4일 후부터 이병주를 관찰할 수 있었으며, 6일 후에는 멸균수를 처리한 대조구에서는 모든 식물이 발병되었으나, 길항진균을 처리한 구에서는 병의 발생이 억제되는 경향을 보였다.

4. 접종 14일 후에는 병든 식물이 완전히 고사하는 현상을 보였으며, 27 J5, 37 J10, 36 J13 및 31 K10 균주의 처리에서는 53.3~66.7%의 이병률을 보여 고추 역병발생에 대한 억제효과가 높음을 나타내었다.

5. 고추 역병에 대해 억제효과가 높은 37 J10과 36 J13 균주는 *Trichoderma* sp., 27 J5 균주는 *Fusarium* sp. 및 31 K10 균주는 *Penicillium* sp. 로 각각 배양적특과 및 형태적 특성에 의해 동정하였다.

인 용 문 헌

1. 김충희·조원대·김승철, 1982. 고추역병의 방제에 관한 연구, 농시보고(토비·작보·균이·농가), 46-50.
2. 남윤구·지형진·김충희, 1988. 고추역병에 대한 생물학적 방제연구 II. 유기물 토양 첨가에 의한 길항균 활성증대 효과, 한국식물병리학회지, 4(4) : 313-318.
3. 박경석·장성완·김충희·이은종, 1989. 고추역병에 대한 생물학적 방제연구 III. *Phytophthora capsici*의 길항균 *Trichoderma harzianum*과 *Pseudomonas cepacia*의 제형 및 그 보존, 한국식물병리학회지, 5(2) : 131-138.
4. 양성석·조의규·이은종, 1986. 고추 연작지 실태 현지조사, 농기연시험연구보고서(생물부 편), 273-279.
5. 지형진·남윤구·김충희, 1988. 고추역병에 대한 생물학적 방제연구 I. 길항균 분리 및 실내와 온실에서의 역가검정, 한국식물병리학회지, 4(4) : 305-312.
6. 홍순성·박경석·김충희·이은종, 1990. 고추역병균 길항균 *Pseudomonas cepacia*의 입제 제형 및 활성, 한국식물병리학회지, 6(4) : 434-439.
7. Cook, R. J. 1990. Twenty-five years of progress towards biological control. p1-4. In D. hornby(ed.), Biological control of soil-borne plant pathogens. CAB International, Wallingford, UK.
8. Handelsman J., and Stabb, E. V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. Plant Cell, 8 : 1855-1869.

9. Hwang, B. K. and Kim, E. S. 1992. Protection of pepper plants against *Phytophthora* blight by an avirulent isolate of *Phytophthora capsici*. Korean J. Plant Pathol., 8(1) : 1-7.
10. Kim, D. S., Cook, R. J., and Weller, D. M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87 : 551-558.
11. Kim, C. H., Kim, K. D., and Jee, H. J. 1991. Enhanced suppression of red-pepper *Phytophthora* blight by combined applications of antagonist and fungicide. Korean J. Plant Pathol., 7(4) : 221-225.
12. Lee, E. J., Jee, H. J., Park, K. S., and Kim, C. H. 1990. Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red-pepper IV. Performance of antagonistic agents in field under polyethylene filmhouse. Korean J. Plant Pathol., 6(1) : 58-64.
13. Park, H. 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.
14. Park, K. S., Hagiwara, H., and Kim, C. H. 1993. Isolation of an antibiotic substance from *Pseudomonas cepacia* antagonistic to *Phytophthora capsici*. Korean J. Plant Pathol., 9(1) : 1-6.
15. Smith, K. P., Handelsman, J., and Goodman R. M. 1997. Modeling dose-response relationships in biological control: Partitioning host responses to the pathogen and biological agent. Phytopathology, 87(7) : 720-729.