

오이 지상부의 주요 곰팡이 병해의 생물적 방제용 유용미생물의 선발

이상엽* · 이영기¹ · 박경석 · 김용기²

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물팀, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과,

²농촌진흥청 국립농업과학원 유기농업과

(2010년 11월 1일 접수, 2010년 12월 9일 수리)

Selection of Beneficial Microbial Agents for Control of Fungal Diseases in the Phyllosphere of Cucumber Plant

Sang-Yeob Lee*, Young-Kee Lee¹, Kyungseok Park, and Yong-Ki Kim²

Agricultural Microbiology Team, National Academy of Agricultural Science (NAAS), Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea, ¹Crop Protection Division, National Academy of Agricultural Science (NAAS), Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea, ²Organic Agriculture Division, National Academy of Agricultural Science (NAAS), Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea

Abstract

Bacillus subtilis B29, *B. subtilis* M10 and *Streptomyces* sp. CC19 obtained from phyllosphere of cucumber plants were selected for biological control of fungal air-borne diseases. For the downy mildew, diseased area of *B. subtilis* B29, *B. subtilis* M10 and *Streptomyces* sp. CC19 showed 0.5%, 20.2% and 42.0%, but that of control was 82.0% respectively, in cucumber seedling test. Incidence of powdery mildew by once application of *B. subtilis* B29, *B. subtilis* M10 and *Streptomyces* sp. CC19 was 2.8%, 3.6% and 12.3%, respectively, whereas that of control was 65.6%. On the gray mold, diseased area of *B. subtilis* B29, *B. subtilis* M10 and *Streptomyces* sp. CC19 was 8.0%, 30.8% and 5.2%, respectively, compared to 81.2% for the control. Therefore, *B. subtilis* B29 could be a prospective antagonist for biological control of powdery mildew, downy mildew and gray mold of cucumber plant.

Key words *Bacillus subtilis*, biocontrol, cucumber, downy mildew, gray mold, powdery mildew, *Streptomyces*

서 론

오이 지상부에 발생하는 주요 곰팡이병은 노균병, 흰가루병, 잿빛곰팡이병 등 8종이 보고되어 있으며(한국식물병리학회, 2009), 그 중에서 다른 병보다도 노균병, 흰가루병 및 잿빛곰팡이병은 발생이 심하여 큰 피해를 주고 있다(농업과학기술원, 2000).

공기전염성 병원균으로 노균병을 일으키는 *Pseudoperonospora cubensis*는 오이를 비롯한 박과채소에서 막대한 손실을 일으

키는 병원균이며, 병원균은 주로 잎에 감염되어 진전되어 결국은 식물체를 죽이며 심각한 경제적인 손실을 야기하여 화학농약에 전적으로 의존하여 방제하고 있다(Cohen, 1981). 국내에서 오이 재배시 노균병 방제를 위하여 다른 병해보다도 가장 많은 약제살포가 횟수가 많을 정도로 피해가 크다는 것을 간접적으로 알 수 있다(이 등, 2001). 잿은 농약의 연용 살포로 인하여 오이 노균병의 방제약제 페닐아미드계통농약은 역병균과 노균병 등의 난균류에 특이적으로 예방과 치료효과가 우수한 농약이지만, 오이 노균병에 사용을 시작한 지 2~3년 후에 유럽에서 내성균이 출현하였다고 보고한 바 있다(中澤靖彦 등, 1994).

*연락처 : Tel. +82-31-290-0483, Fax. +82-31-290-0406

E-mail: lsy1111@korea.kr

흰가루병균(*Podosphaera fusca*)은 식물체의 표면에 기생하는 균으로 흡기를 통해서 식물체내의 영양분을 이용하여 생장하며 다양한 식물체에 기생하여, 식물의 광합성과 호흡을 저해하여 동화작용과 증산작용을 감소시킨다(Wright 등, 1990). 오이를 비롯한 박과채소 등 가장 기주범위가 넓은 뿐만 아니라, 발생이 심각한 정도로 피해를 주고 있다(한국식물병리학회, 2009). 오이 흰가루병에 대한 피해는 주당 평균 흰가루병의 병반 면적율이 20%일 때 경제적 손실이 발생한다고 보고되었으나(Verhaar 등, 1993), 네덜란드에서는 흰가루병의 병반 면적율이 50%일 때 오이수량이 35% 감소된다고 하였다(Belanger 등, 1998). 또한 하루에 주당 흰가루병 병반 면적율이 1%일 때에는 대략 0.02%의 수량이 감소된다는 보고가 있다(Belanger 등, 1998).

잣빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea*는 많은 과채류, 식용작물에서 막대한 손실을 일으키는 병원균이며(Schwinn, 1992), 특히 온실에서 재배하는 작물에서 중요하다(Jarvis, 1980). 병원균은 잎과 줄기, 과일 등의 모든 부위에 감염되어 식물체를 죽이며 심각한 경제적인 손실을 야기한다(Jarvis, 1989; Yunis, Elad and Mahrer, 1990).

그리고 최근에 소비자의 안전 농산물에 대한 사회적 욕구가 증가되어 저농약 또는 무농약 농법으로 재배한 고상품가치의 채소류가 높은 가격으로 시중에서 거래되고 있는 실정으로 이에 대한 욕구충족으로 유용미생물을 이용한 환경친화적인 생물학적 방제법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 결과로서 전 세계적으로 병해충과 잡초방제에 사용하는 미생물농약은 114종의 상품이 등록되어 사용되고 있으며(Copping, L. G. 2004), 미생물농약의 사용량은 유기화합물농약의 판매량의 단지 1%에 불과하여 화학농약 보다 다른 작용기작을 이용하는 병해관리를 대체할 수 있는 미생물 방제제의 역할이 기대되고 있다(Fravel, D. R., 2005).

본 연구에서는 안전 농산물 생산을 목적으로 오이에 발생하는 주요 공기전염성 병해 대한 생물적 방제제를 개발하기 위하여 오이 식물체에서 분리한 미생물의 오이 발생하는 노균병, 흰가루병 및 잣빛곰팡이병에 대한 방제 효과를 검정하였다.

재료 및 방법

시험 병원균

오이 노균병균(*P. cubensis*)은 국립농업과학원 오이재배포장에서 채집한 SW-51균주를 분리하여 실내에서 오이잎에 계

대배양하면서 실험에 이용하였다. 오이 흰가루병균(*P. fusca*)은 국립농업과학원 온실에서 오이를 재배하면서 발생한 흰가루병균을 온실내에서 계대하면서 실험에 이용하였다. 잣빛곰팡이병균(*B. cinera*)은 오이에서 분리한 DJ-B1균주를 potato dextrose agar 배지(PDA, Difco)에 이식하여 시험균주로 이용하였다.

시험 유용미생물

오이 재배 단지에서 오이의 잎, 꽃에서 분리하여 동정한 *Bacillus subtilis* B29, *B. subtilis* M10, *Streptomyces* sp. CC19 균주를 이용하였으며, *Bacillus* 속균은 tryptic soy agar 배지(TSA, Difco)에 28°C에서 2일간 배양한 후 균체를 20% glycerin 용액에 담아서 -70°C 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다. *Streptomyces* sp. CC19 균주는 soil-extract agar 배지(soil-extract 500 ml/l, agar 15 g/l, cycloheximide 50 mg/l)에 25°C에서 10일간 배양한 후 5°C에 보관하면서 사용하였다. *B. subtilis* B29와 *B. subtilis* M10의 배양은 tryptic soy broth 배지(TSB, Difco)를 이용하여 28°C에서 120 rpm으로 24시간 배양하였으며, *Streptomyces* sp. CC19 균주는 GSSB 배지(soluble starch 10 g, glucose 20 g, soybean meal 25 g, beef extract 1 g, Yeast extract 4 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ 0.25 g, Caco3 2 g, pH 7.2)를 이용하여 25°C에서 120 rpm으로 5일간 배양하였다.

오이 노균병 발생 억제 효과 조사(유묘검정)

원예용 장기육묘용 상토(부농)와 바로커상토(서울바이오)를 1:1로 비율로 혼합하여 직경 7 cm 비닐포트에 담아 은성백다다기 오이(홍농종묘)를 파종하여 온실에서 재배한 2엽기의 오이를 사용하였다. 오이 2엽기의 유묘에 배양한 미생물의 배양액을 분무처리하고 5시간 후에 배양한 노균병균을 붓을 사용하여 유주자낭을 수거하여 유주자낭 5×10^4 ml⁻¹로 조절하여 상온에 2시간 방치하였다. 노균병균을 2엽기의 오이 식물체에 처리당 6반복으로 분무접종하여 20°C의 12시간 형광등이 조사되는 접종상에 넣어 7일후에 병반면적율을 조사하였다.

B. subtilis B29의 배지별 오이 노균병 발생 억제 효과 조사

배지종류별 오이노균병에 대한 오이잎절편 이용한 생물검정을 위하여 원예용 장기육묘용상토와 바로커상토를 1:1로 비율로 혼합하여 직경 7 cm 비닐포트에 담아 은성백다다기

오이를 파종하여 28℃로 조절하고 14시간 동안 형광등이 조사되는 생육상에서 재배하면서 2엽기의 오이를 사용하였다. *B. subtilis* B29균주를 TSB, LB(Luria-Bertani, Difco), KB (King's B broth, Difco)와 NB(Nutrient broth, Difco)배지 별로 28℃에서 120 rpm으로 24시간 배양하였다. 2엽기의 오이 유묘에 배양액을 분무처리하고 5시간 후에 직경 25 mm 코르크 보리로 잎 절편을 떼어내서 24×24 cm 사각플레이트에 멸균수에 젖힌 키턴타올을 깔아서 플레이트내 습도를 유지시킨 후에 그 안에 20×20 cm 플라스틱을 깔고 그 위에 오이 잎 절편을 일정한 간격으로 배열한다. 노균병균은 붓을 사용하여 유주자낭을 수거하여 유주자낭 5×10⁴ ml⁻¹로 조절하여 상온에 2시간 방치한 다음, 오이 잎 절편의 중앙에 노균병균의 현탁액을 10 μl씩 점적중하여, 20℃의 12시간 형광등이 조사되는 항온기에 넣어 6일후에 병반면적율을 조사하였다.

***B. subtilis* B29의 TSB배지에서 배양한 처리형태별 오이 노균병 발생 억제 효과 조사**

선발된 TSB배지를 이용하여 *B. subtilis* B29균주를 28℃에서 120 rpm으로 24시간 배양한 배양액을 원액, 2배, 4배, 10배로 희석하였으며, 배양한 균체를 원심분리기로 수거하여 10배 및 20배로 희석하였다. 오이 노균병에 생물검정방법은 기존의 방법과 동일하게 처리하여 처리 7일후에 노균병 병반면적율을 조사하였다.

오이 흰가루병 발생억제 효과 조사

오이 흰가루병에 대한 실험은 국립농업과학원 비닐하우스

포장에서 은성백다다기 오이를 재배하면서 흰가루병이 발생 초기에 시험 유용미생물을 배양하여 균주당 6주씩 3반복으로 오이 경엽에 분무처리하였다. 대조로 화학농약 fenarimol 유제(3,000배)를 사용하였다. 미생물을 처리하고 14일 후에 발생한 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다.

오이 잿빛곰팡이병 발생억제 효과 조사

오이 육묘는 TKS2 상토(한국원예자재)와 원예용 장기육 묘상토를 1:1(V:V)로 혼합하여 오이(은성백다다기)종자를 파종하여, 유묘 2엽기에 배양한 시험미생물을 분무처리 4시간 후에 잿빛곰팡이병균의 포자현탁액에 영양원으로 V8 juice 10%액과 0.1M KH₂PO₄를 첨가하였다. 영양원이 첨가된 잿빛곰팡이균의 포자현탁액(1×10⁶ spores ml⁻¹)을 오이유묘에 점적중하여 20℃ 습실상에 넣고 24시간 후에 꺼낸 다음 6일 후에 병반면적율을 조사하였다.

결과 및 고찰

오이 노균병 발생 억제 효과 조사

오이 노균병에 대하여 유묘검정을 한 결과에서 *B. subtilis* B29균주가 0.5%, *Streptomyces* sp. CC19균주가 20.2%, *B. subtilis* M10균주가 42.0%, 무처리는 82.0%로 각각의 노균병이 발생하였다(Table 1, Fig. 1). *B. subtilis* B29균주가 오이 노균병 방제에 다른 균주 보다 매우 효과적이었다.

국내에서는 목욕공시 친환경 유기농자재 제품으로 오이 노균병 방제에 *Streptomyces lydicus* WYEC108균주를 이용한 제

Table 1. Preventive effect of three effective isolates against downy mildew of cucumber caused by *P. cubensis* in seedling stage

% diseased leaf area			
<i>Bacillus subtilis</i> B29	<i>Bacillus subtilis</i> M10	<i>Streptomyces</i> sp. CC19	Control
0.5 a	42.0 c	20.2 b	82.0 d

a) In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by DMRT.

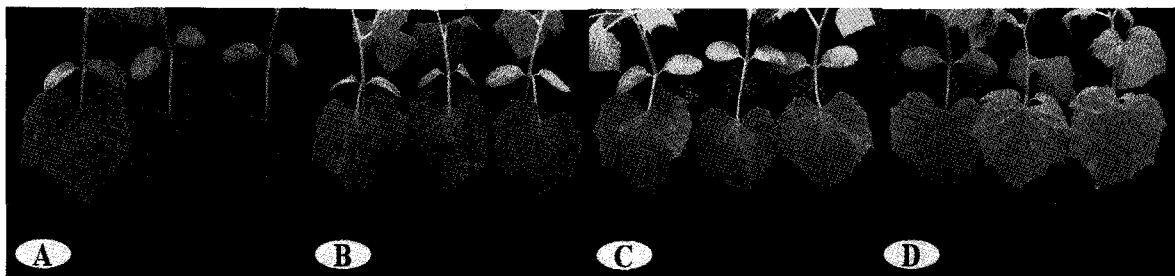


Fig. 1. Suppression of downy mildew in the cucumber seedling treated with three effective isolates. A, *B. subtilis* B29; B, *B. subtilis* M10; C, *Streptomyces* sp. CC19, D, Control.

품이 등록되었다(농촌진흥청, 2008). 외국에서는 노균병의 생물적 방제연구는 이스라엘에서 포도 노균병에 대한 생물적 방제 곰팡이 *Fusarium proliferatum*을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐이다(Stuart et al., 1996; Shlomo et al., 2001).

B. subtilis B29의 배지별 오이 노균병 발생 억제 효과
오이 노균병 방제에 매우 효과적이었던 *B. subtilis* B29균

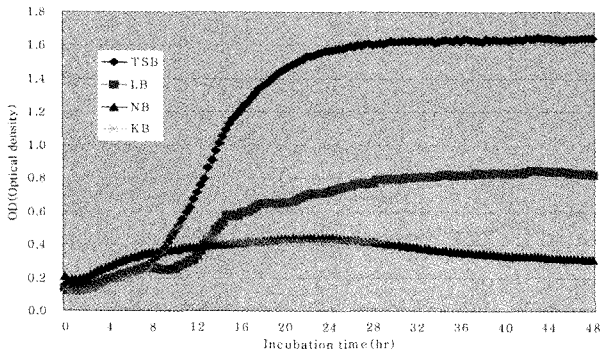


Fig. 2. Growth curve of *B. subtilis* B29 in the several media using Bioscreen C for 48 hr at 30°C.

주에 대하여 효과적인 배지를 선발하기 위하여 TSB배지를 비롯한 4종 배지에서 배양한 배양액을 오이 잎절편에 처리하여 발병을 유도시킨 7일 후에 TSB배지와 LB배지가 오이 노균병이 전혀 발생하지 않았으나, NB배지는 1.8%, KB배지에서는 1.4%의 노균병이 발생하였다(Table 2). 이 결과에서 *B. subtilis* B29균주를 배양한 TSB배지와 LB배지가 가장 오이 노균병 방제에 효과적이었다. 그리고 TSB 배지 등 배지 종류에 따른 *B. subtilis* B29 성장곡선을 조사한 결과에서 TSB배지가 LB배지 등 다른 배지에 비하여 OD(optical density)가 높았으며, 특히 TSB배지는 LB배지에 비하여 2배 이상 OD 값을 나타내어서 *B. subtilis* B29균주 배양에 가장 좋은 배지로 선발되었다(Fig. 2).

B. subtilis B29의 TSB배지에서 배양한 처리형태별 오이 노균병 발생 억제 효과

B. subtilis B29균주의 배양에 선발한 TSB배지를 이용하여 배양액과 균체를 수거하여 다양하게 희석하여 오이잎절편 생물검정법을 통하여 실험한 결과에서 배양액을 원액, 2배

Table 2. Suppression of downy mildew in the cucumber leaf disk treated with various media cultured of *B. subtilis* B29

% diseased leaf area at 7 days after treatment				
TSB	LB	NB	KB	Control
0	0	1.8	1.4	8.0

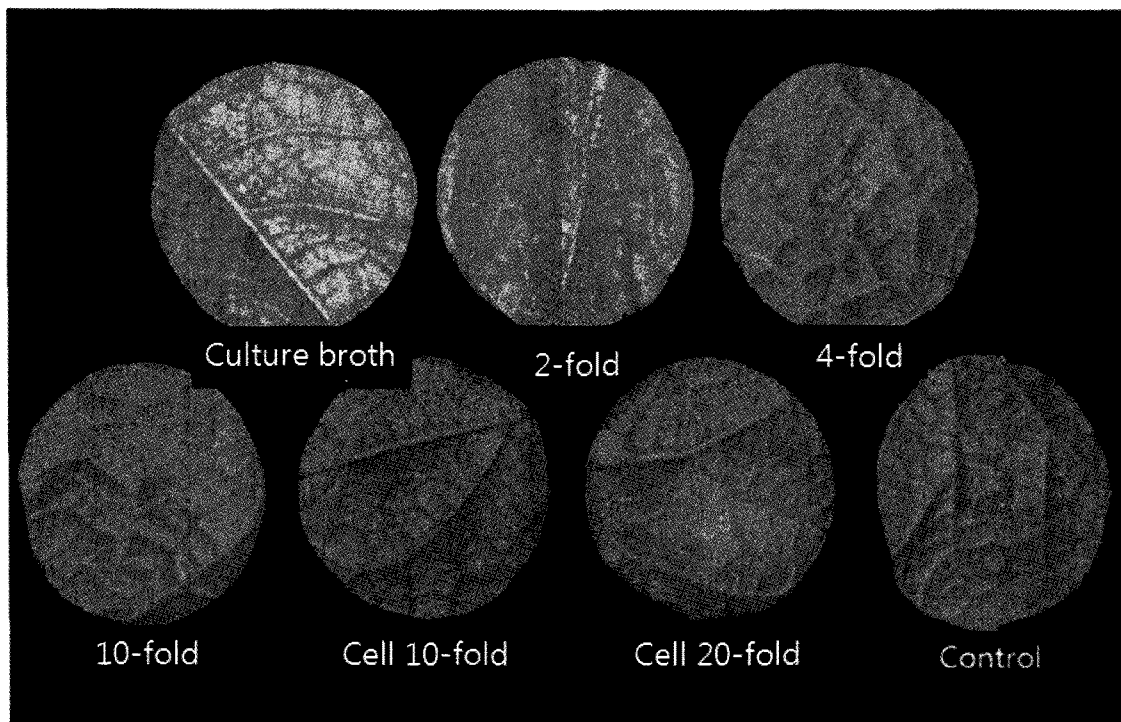


Fig. 3. Preventive effect of various cultured broth and cells of *B. subtilis* B29 against downy mildew on cucumber leaf disk.

Table 3. Suppression of downy mildew in the cucumber leaf disk treated by treatment with various cultured liquid and cells in TSB of *B. subtilis* B29

% diseased leaf area at 7 days after treatment						
culture broth (dilution)				cell (dilution)		Control
1	2-fold	4-fold	10-fold	10-fold	20-fold	
0	0	0	0.5	0	5.0	6.0

희석액과 4배 희석액에서는 전혀 노균병이 발생하지 않았지만 10배 희석액에서 0.5% 발생하였으며, 배양액에서 균체만 수거하여 10배로 희석하여 처리한 구에서 병 발생이 없었지만 20배로 희석한 균체처리구에서는 무처리와 유사한 정도의 노균병이 발생하였다(Table 2, Fig. 3). 그러므로 *B. subtilis* B29균주를 TSB배지에서 배양액을 4배 희석하거나 균체를

10배 희석하여도 오이 노균병의 발생을 억제할 수 있다고 사료된다.

오이 흰가루병 발생억제 효과 조사

오이 재배 비닐하우스 포장에서 오이 흰가루병이 발생하는 초기에 시험미생물 3종을 배양하여 오이 경엽에 고루 살포한 결과, *B. subtilis* B29균주가 2.8%, *B. subtilis* M10균주가 3.6%, *Streptomyces* sp. CC19균주가 12.3%, 화학약제 fenarimol 유제가 4.9%, 무처리가 65.6%로 나타나어 *B. subtilis* B29균주가 다른 시험미생물 처리구와 화학농약 fenarimol 유제보다도 매우 방제 효과가 우수하였다(Fig. 4).

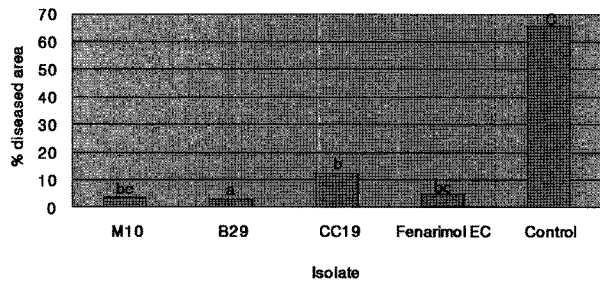


Fig. 4. Suppressive effect of three isolates against cucumber powdery mildew in the greenhouse.

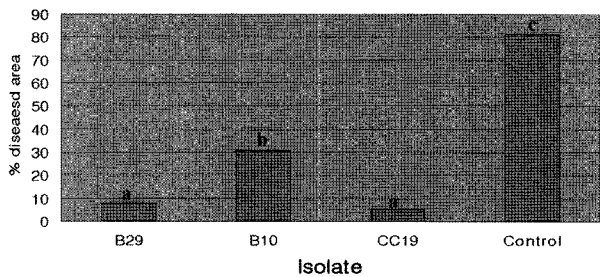


Fig. 5. Preventive effect of three isolates against gray mold on cucumber seedlings.

오이 잿빛곰팡이병 발생억제 효과 조사

3종 시험미생물의 오이 잿빛곰팡이병에 대하여 미생물을 처리하고 난후에 잿빛곰팡이병균을 접종하는 예방적 효과를 검정한 결과에서 *B. subtilis* B29균주가 8.0%, *B. subtilis* M10균주가 30.8%, *Streptomyces* sp. CC19균주가 5.2%, 무처리가 81.2%로 나타나어 *B. subtilis* B29와 *Streptomyces* sp. CC19균주는 오이 잿빛곰팡이병 발생 억제 효과가 우수하였다(Fig. 5, Fig. 6).

이상의 실험결과에서 *B. subtilis* B29 균주는 오이 지상부에 발생하는 노균병, 흰가루병 및 잿빛곰팡이병에 대하여 효과적인 방제효과를, *B. subtilis* M10 균주는 오이 노균병과 흰가루병에 대하여, 그리고 *Streptomyces* sp. CC19 균주는 특히 오이 잿빛곰팡이병에 대한 우수한 방제효과를 보였다.



Fig. 6. Suppression of gray mold in the cucumber seedling treated with three isolates. A, *B. subtilis* B29; B, *B. subtilis* M10; C, *Streptomyces* sp. CC19; D, Control.

물론 이들 균주는 노균병과 잿빛곰팡이병에 대한 포장실험이 보완되어야 하며, 병원균에 대한 작용기작에 대한 연구도 필요하다고 생각된다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Belanger, R. R., Dik, A. J. and Menzies, J. M. (1998) Powdery mildews recent Advances toward integrated control. In : Plant-microbe Interactions and Biological Control, ed. by Boland, G. J. and Kuykendall, D. L. pp. 89~126. Marcel Dekker, New York, USA.

Copping, L. G. (2004) The manual of biocontrol agents. The third edition of the biopesticide manual. BCPC. UK. 702pp.

Fravel, D. R. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 43:337~359.

Jarvis, W. R. (1980) Epidemiology. In: The Biology of *Botrytis* (Ed. By J. R. Coley-Smmith, K. Verhoeff and W.R. Jarvis P.). Academic Press, London, pp. 219~250.

中澤靖彦, 黒沢美保子, 大塚範夫 (1994) キュウリべと病菌. 植物防疫 第 48卷 第 2号: 86~89.

Schwinn, F. J. (1992) Significance of fungal pathogens in crop production. Pestic. Outlook1 3:18.

Shlomo, B., Abraham, S., and Oded, Y. (2001) Isolation and characterization of a cold-tolerant strain of *Fusarium proliferatum*, a biocontrol agent of grape downy mildew. Phytopathology. 91(10):1062~1068.

Stuart, P. F., Roger, C. P., David, M. G., Robert, C. S., and Abraham, S. (1996) *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. Phytopathology. 86(10): 1010~1017.

Cohen, Y. (1981) Downy mildew of cucurbits. pages 341~353. in : The downy mildew. Spencer. D. M.. Academic Press. New York.

Yunis, H., Elad, Y. and Marher, Y. (1990) Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on grey mould of cucumbers in unheated greenhouse. Phytoparasitca 18: 203~215.

Verhaar, M. A. and Hijwegen, T. (1993) Efficient Production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew *Sphaerotheca fuliginica*. Neth. J. Path. 99: 101~103.

Wright, D. P., Scholes, D., Horton, p., Baldwin, B. C., and Sheppard, M. C. (1990) The relationship between the development of houstori of *Erysiphe graminis* and the energy status of leaves. pp. 223~226. In Current Reaserch in Photosynthesis, vol. 4. M. Baltscheffsky, ed. kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands.

농촌진흥청 (2000) 채소병해충 진단과 방제. 아카데미서적 331pp.

농촌진흥청 (2008) 목록공시 친환경 유기농자재 제품 자료집. 상록사 293pp.

이상엽, 이상범, 김용기 (2001) 시설채소 병해 종합관리를 위한 기반기술 개발연구. 593~605. 2000 작물보호연구. 농촌진흥청 농업과학기술원.

한국식물병리학회 (2009) 한국식물병명목록(제5판). 한국식물병리학회. 도서출판 제이와이 853pp.

오이 지상부의 주요 곰팡이 병해의 생물적 방제용 유용미생물의 선발

이상엽* · 이영기¹ · 박경석 · 김용기²

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물팀, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 유기농업과

요 약 오이 지상부에 발생하는 주요 곰팡이병인 노균병, 흰가루병 및 잿빛곰팡이병에 대한 생물적 방제를 위하여 오이 식물체로부터 *Bacillus subtilis* B29, *B. subtilis* M10 and *Streptomyces* sp. CC19균주를 분리하였다. 오이 노균병에 대한 유도검정에서 *B. subtilis* B29, *B. subtilis* M10과 *Streptomyces* sp. CC19균주는 0.5%, 20.2% 및 42.0%의 병반면적율을 나타내었지만, 무처리에서는 82.0% 발생하였다. 오이 흰가루병에 대한 비닐하우스 포장실험에서 *B. subtilis* B29, *B. subtilis* M10과 *Streptomyces* sp. CC19균주는 2.8%, 3.6%와 12.3% 발생하였지만 무처리에서 65.6% 발생면적을 나타내었다. 오이 잿빛곰팡이병에 대한 *B. subtilis* B29, *B. subtilis* M10과 *Streptomyces* sp. CC19균주는 8.0%, 30.8% 및 5.2%를 각각 나타내었고 무처리에서는 81.2%의 병반면적율을 나타내었다. 그러므로 *B. subtilis* B29균주는 오이에 발생하는 흰가루병, 노균병과 잿빛곰팡이병의 생물적 방제에 유망한 균주로 선발하였다.

색인어 *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, 노균병, 잿빛곰팡이병, 생물학적 방제, 오이, 흰가루병