

독도의 벼과식물로부터 분리된 *Enterobacter* spp.에 의한 고추의 흰별무늬병에 대한 전신유도저항성

손진수¹ · 마릴린 수마요¹ · 강현욱¹ · 김병수² · 권덕기³ · 김사열^{1*}

¹경북대학교 생명과학부 미생물연구소, ²경북대학교 원예과학과, ³경북대학교 생물교육과

Received : March 5, 2012 / Revised : May 24, 2012 / Accepted : June 6, 2012

Induced of Systemic Resistance against Gray Leaf Spot in Pepper by *Enterobacter* Species Isolated from Family Gramineae Plants in Dok-do. Son, Jin-Soo¹, Marilyn Sumayo¹, Hyun-Uk Kang¹, Byung-Soo Kim², Duck-Kee Kwon³, and Sa-Youl Ghim^{1*}. ¹School of Life Sciences and Institute for Microorganisms, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ²Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ³Department of Biology Education, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea – This study's aim is to isolate and characterize plant growth promoting *Enterobacter* species for the biological control of gray leaf spot in pepper. Screening was carried out from the rhizosphere of *Agropyron tsukushiensi* var. *transiens* (Hack.) Ohwi in Dok-do. Rhizobacterial isolates were partially identified by 16S rDNA sequencing and *Enterobacter* species were tested for plant growth promoting capabilities and the induction of systemic resistance in pepper against gray leaf spot caused by *Stemphylium solani*. Isolates were tested for production of indole-acetic acid and siderophore, and for phosphate solubilization. The application of isolates was effective in controlling gray leaf spot in pepper with *E. asburiae* (KNUC5007) and *E. cancerogenes* (KNUC5008 and KNUC5010) having the highest efficacy in reducing gray leaf spot severity. This is the first report of the biological control of gray leaf spot in pepper using rhizobacteria and it is hoped that this study will increase the utilization of *Enterobacter* species as plant growth promoters and biocontrol agents.

Keywords: Dok-do, *Enterobacter*, *Stemphylium solani*, gray leaf spot, induced systemic resistance

서 론

*Stemphylium solani*에 의해 발생하는 흰별무늬병은 잘 알려지지 않은 질병으로 기온이 낮은 산간 지방의 고추에 흔히 발생하는 것으로 알려져 있다. 이 식물병은 미국의 Sinclair[26]와 Blazquez[4]에 의해 처음 보고되었으며, 국내에서는 2001년 Cho[5]에 의해 처음 보고되었다. 고추 유묘의 흰별무늬병은 주로 잎과 과경 및 과탁에 발생한다. 보통 직경 3 mm 이하 갈색의 원형 반점이 형성되고 점차 흰색이 되면서 중심부분이 가라앉게 되며 오목해지는 증상을 보인다. 병에 걸린 식물은 생육이 억제되고 잎의 노화가 촉진된다. 그로 인해 조기낙엽증상이 나타나게 되고, 고추의 초기 생장을 저해하여 수확을 감소시키는 것으로 알려져 있다[5, 9].

흰별무늬병에 대한 생물학적 저항성 소재의 탐색 및 연구

는 거의 이루어지지 않았으며, 화학적 또는 생물학적 공시농약이 아직까지 고시되지 않고 있어 다른 진균병과 연관된 화학합성농약에 의존하여 병을 방제하고 있는 실정이다. 하지만 합성농약은 인축에 대한 독성을 가지고 있으며 잔류농약으로 인한 환경오염과 저항성균주의 출현 및 생태계 교란 등의 2차 오염을 야기할 수 있는 문제점을 가지고 있다[10]. 최근 화학제재를 쓰지 않는 친환경 유기농업의 움직임에 힘입어 화학합성농약에 대한 대안으로 생물농약의 연구가 활발히 진행되고 있다[15, 24].

식물생장촉진근류세균(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)은 식물의 근권에 존재하는 세균으로 auxin, gibberellins, cytokinin 등과 같은 식물호르몬의 합성, 불용성 인의 가용화, 휘발성 물질의 생산 등을 통해 식물의 생장을 이롭게 하는 역할을 한다[1, 13, 22]. 또한 siderophore의 생산 및 항생물질과 같은 2차 대사산물과 식물에 전신유도저항성(induced systemic resistance, ISR)과 전신획득저항성(systemic acquired resistance, SAR)을 유발하여 식물 병원성 진균, 세균, 바이러스 등의 확산을 저해한다[11, 13]. 이런 식물에 이로운 영향을 주는 세균에는 *Acetobacter*, *Acine-*

*Corresponding author

Tel: +82-53-950-5374, Fax: +82-53-955-5522

E-mail: ghimsa@knu.ac.kr

tobacter, *Azobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* 속 등이 알려져 있다[1].

독도는 화산분화에 의해 형성된 섬으로, 부족한 유기양분, 높은 요산농도, 고농도의 토양염분도, 강한 해풍 등과 같은 다양한 환경스트레스에도 불구하고 총 48 분류군의 식물군이 건강한 생태계를 이루고 있는 것으로 보고 되었다[21]. 식물은 불리한 환경의 극복을 위하여 다양한 종류의 스트레스에 저항성을 유도하는 근권미생물과 상호작용을 통하여 식물의 성장촉진 및 다양한 스트레스에 대한 저항성을 증가시킬 수 있다는 연구결과가 발표된 바 있다[30].

본 연구는 독도의 벼과식물인 개밀 야생근락지의 근권으로부터 분리한 세균 중 식물의 성장을 촉진시키고[25], 식물에 유도저항을 유도시키는 것으로 알려진[3, 27] 세균이나 아직 그 특성에 대해 연구가 잘 이루어지지 않은 *Enterobacter* 속 세균에 초점을 맞추어 그 특성에 대해 알아보았다. 또한 그것을 대표적 원예작물인 고추에 적용하여 식물 성장촉진 효과를 검증하였다. 나아가 *Enterobacter* 속 세균에 의해 유도되는 전신유도저항(ISR)의 활성 여부를 조사하여 고추 유묘의 흰별무늬병에 대한 친환경 생물학적 방제제로서의 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

Enterobacter 속 세균의 분리

*Enterobacter*균의 분리를 위하여, 독도 동도의 야생 개밀 근락지의 근권토양을 채취하였다. 채취한 토양 1 g을 고압 멸균한 0.85% NaCl 9 ml에 첨가하여 1시간 동안 50 rpm으로 교반하였다. 교반된 토양 용액은 단계적 희석평판법으로 희석한 뒤, 1/10 tryptic soy agar (TSA) 배지로 옮겨 도말하였다. 세균의 순수분리를 위하여 30°C에서 24시간 배양한 후, 배지 상에 나타난 집락을 형태학적으로 선별하여 TSA 배지에 획선 도말하였다. 선별된 균들은 장기간의 보존을 위하여 15% glycerol에 현탁하여 -70°C에 동결 보관하였다. 세균의 부분동정은 배양된 균체에서 DNA를 분리하여 16S rDNA sequence 부분을 증폭하였으며, 프라이머는 518F(5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3')와 800R(5'-TACCAGGGT-ATCTAATCC-3')을 사용하였다. 얻어진 서열은 Eztaxon server를 이용하여 기준균주(type strain)와 상동성이 가장 높은 것을 비교하여 판별하였으며, 그 중 *Enterobacter* 속 세균을 분리, 선별하여 실험에 사용하였다.

병원균의 배양

고추의 흰별무늬병을 야기하는 *Stemphylium solani*(KACC 40966)는 농촌진흥청 농업유전자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 계대배양 한 것을 분양 받았다. 병원균의 배양은 포자형성 유도를 위해 20% V8-juice agar 배지 [V8 juice(Campbell, USA) 200 ml, CaCO₃

3 g, 한천 20 g, 증류수 800 ml]에 20°C, 12시간 명조건과 15°C, 12 시간 암조건으로 배양하였다[9]. 병원균의 장기간 보존을 위하여 병원균을 potato dextrose agar(PDA) 사면 배지에 접종배양 후 4°C에 보관하였다.

식물생장호르몬(IAA) 생산능 조사

분리된 *Enterobacter* 속 세균에 의한 식물생장촉진호르몬인 옥신(auxin)의 생산능력은 salkowski reagent를 이용한 발색반응으로 확인하였다[7]. 분리된 *Enterobacter* 속 세균은 5 ml King's B broth에 24시간, 30°C, 180 rpm으로 전 배양한 뒤, 600 nm에서 OD(optical density)값을 1.0으로 농도를 보정하였다. 전배양된 균의 옥신 생산 유도를 위해, 전구체인 L-tryptophan 0.1%가 첨가된 5 mL의 King's B 배지에 전배양된 균 20 µL를 접종하여 30°C에서 24시간, 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액은 5,000 g의 속도로 4°C에서 10분간 원심분리하여 균체를 침강시킨 뒤, 96-well plate에 80 µL의 상등액을 회수하여 25분간 상온, 암조건에서 salkowski 용액(35% HClO₄ 50 mL, 0.5 M FeCl₃ 1 mL)과 1:2 비율로 혼합 반응하였다[20]. 반응된 혼합물은 Sensident Scan(Labsystems, Helsinki, Finland)을 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 옥신의 정량은 옥신 표준물질(Sigma, USA)과 비교하여 옥신의 농도를 측정하였다.

인산 가용성 조사

분리된 *Enterobacter* 속 세균들의 난용성 인산염인 tricalcium phosphate의 가용 능력을 실험하기 위해 NBRIP (national botanical research institute's phosphate growth) 한천 배지[glucose 10 g, Ca₃(PO₄)₂ 5 g, MgCl₂ · 6H₂O 5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, 한천 15 g, 증류수 1 L]를 이용한 plate assay method를 사용하였다[16]. NBRIP 배지에 *Enterobacter*균을 멸균된 toothpick을 이용한 spot inoculation method로 접종하였으며, 30°C에서 7일 이상 배양하여, 배지에 clear zone 형성 유무를 관찰하였다.

Siderophore 생산능 조사

분리된 *Enterobacter*균들의 siderophore 생산성 여부는 Schwyn과 Neilands의 siderophore detection 방법인 CAS (chrome azurol S) blue 한천 배지에 각 균주를 획선 도말하였으며, 30°C에서 2일간 배양하여 orange halo zone 형성 유무를 관찰하였다[23].

고추에서 식물생장촉진 효과 검증

독도에서 분리된 *Enterobacter*균의 식물생장촉진효과의 검증을 위하여, 대표적인 식용원예작물인 고추에 적용하여 실험을 수행하였다. 고추육묘는 정[8]의 방법에 따라, 고추종자(따따블고추, 아시아종묘)를 1.2% NaOCl용액에 30분간

살균한 다음 tap water를 사용하여 30분간 행군 뒤, 50구 플러그 묘판에 옮겨 심었다. 고추 재배에 사용된 상토는 121°C에서 15분간 멸균시켰으며, 고추는 12시간 간격으로 빛을 조사하여 25°C에서 재배하였다. 균현탁액의 준비는 UV-Visible spectrophotometer(Simadzu, Japan)를 이용하여 농도를 측정 한 후, 농도가 10⁸~10⁹ CFU/ml가 되도록 조정하였다. 준비된 균현탁액은 본엽이 3~4엽인 고추 각 개체마다 10 mL씩 뿌리에 관주 접종하였다.

고추생장실험의 양성대조군으로 식물에 전신획득저항성(SAR)을 야기하는 화학물질인 0.5 mM benzothiadiazole (BTH) 용액[18]을 사용하였다. 음성대조군으로 멸균된 증류수(sterilized distilled water, SDW)를 개체마다 각각 10 mL씩 분주하였다. 각 처리구는 5개체씩 3회 반복실험 하였다. 실험구와 대조구는 동일하게 25°C, 12시간 주기로 빛을 조사하여 2주간 생육하였다. 2주간 생육한 고추는 수확하여 고추 뿌리의 흙을 물로 깨끗이 제거한 다음 고추의 길이와 생체중량을 줄기와 뿌리부분으로 나누어 측정하였다. 좀 더 자세한 비교를 위해 5일간 80°C에서 건조한 뒤 건조중량을 뿌리와 줄기부분으로 나누어 측정하였다[30]. 실험으로 얻어진 결과는 SPSS version 19.0을 이용하여 일원배치분산분석(ANOVA)을 통하여 기술 통계값을 확인하였고, 사후검정은 Duncan's multiple range test(DMRT)의 방법을 사용하여 유의확률 p<0.05 수준에서 비교 분석하였다.

고추에서 전신유도저항성(ISR) 효과 검증

독도에서 분리한 *Enterobacter* 속 세균들이 간접적으로 고추의 내병성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ISR 활성 테스트를 수행하였다. 실험은 앞의 식물생장촉진효과 검증실험과 동일한 방법으로 균현탁액을 관주 처리하여 1주일간 생육하여 ISR 활성을 유도하였다. *S. solani*의 처리는, 20% V8-juice 평판 배지에 5일간 배양하여 포자형성을 유도하고 5 ml 멸균수를 넣어 루프로 긁어 내 3겹의 cheesecloth로 여과하여 수확하였다. 포자는 1×10⁴의 농도로 조절하여 잎의 표면에 분무접종하였으며 1주일간 배양하여 증상을 판별하였다. *S. solani*에 의해 발생하는 흰별무늬병의 증상 정도는 Metha 방법[14]에 따라 측정하였으며, 발병지수는 Falloon 방법[6]에 따라 DSI(disease severity index) = Σ(disease category × no.leaves in that category) × 100/(total leaves × 9)의 방법으로 계산하였다.

결과 및 고찰

***Enterobacter* 속 세균의 분리**

독도 내 동도의 벼과식물인 개밀의 근권으로부터 크기, 형태, 색깔 등에 차이를 보이는 총 124종의 분리균을 얻었다. 이들 분리균의 16S rDNA sequence 부분을 증폭하여 부분 동정한 결과, 총 13종의 *Enterobacter* 속 세균을 부분 동정

Table 1. 16s rDNA sequence similarity of strains to the closest homology.

Strain	Homologous microorganism (percentage identity) ^a	GenBank Assession no. of 16S rDNA sequence ^b
KNUC5001	<i>Enterobacter aerogenes</i>	JQ682628
KNUC5002	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JQ682629
KNUC5003	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	JQ682632
KNUC5004	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	JQ682633
KNUC5005	<i>Enterobacter amnigenus</i>	JQ682637
KNUC5006	<i>Enterobacter soli</i>	JQ682636
KNUC5007	<i>Enterobacter asburiae</i>	JQ682630
KNUC5008	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	JQ682631
KNUC5009	<i>Enterobacter aerogenes</i>	JQ682634
KNUC5010	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	JQ682635
KNUC5011	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	JQ682639
KNUC5012	<i>Enterobacter aerogenes</i>	JQ682638
KNUC5013	<i>Enterobacter soli</i>	JQ711142

^aThe multiple alignments for the 16S rDNA sequence of *Enterobacter* spp. were performed using the NCBI GenBank search.

^bThe sequences for the 16S rRNA genes of thirteen *Enterobacter* strains have been deposited in the GenBank database.

할 수 있었다(Table 1). 동정된 *Enterobacter* 속 세균은 NCBI에 등록된 16S rDNA sequence들과 상호 비교하고 분리군주들의 계통분석을 통하여 기준으로 알려진 *Enterobacter* 속 세균간의 유연관계를 확인 하였다(Fig. 1).

식물생장호르몬(IAA) 생산능 조사

분리된 13종의 *Enterobacter* 속 세균들의 PGPR로서의 특성에 대해 알아보기 위해 대표적인 식물생장호르몬인 옥신 생산능을 조사하였다. 옥신은 식물체 내 전체에 분포하며, 특히 생장중인 줄기의 끝 눈, 발아 중인 종자나 뿌리의 끝과 같은 생장부위나 분열부위에 주로 존재한다. 뿌리 발생, 관다발 분화, 굴성 반응 및 결눈, 꽃 열매의 발달 등을 포함한 식물의 다양한 발달반응을 촉진하는 식물호르몬으로 알려져 있다[28]. 옥신의 합성은 식물의 체내에서 가능하지만 PGPR에 의해 외부로부터 옥신을 공급받아 생리적 활성을 나타낼 수도 있다[2].

총 13종의 *Enterobacter* 속 세균에서 20 µg/mL 이상의 옥신을 생산하는 균주는 12 종으로, 대부분의 균주에서 옥신 생산능이 관찰되었으며, 옥신의 생산량은 최소 20.92 µg/mL에서 최대 45.02 µg/mL로 확인되었다(Table 2). 이는 독도로부터 분리된 *Enterobacter* 속 세균들이 옥신을 생산함으로써 식물의 생장과 발달을 촉진시키는 것으로 사료된다.

인산 가용성 조사

분리된 *Enterobacter* 속 세균들이 난분해성인 Ca₃(PO₄)₂를 분해할 수 있는지를 조사하기 위하여 인 가용성 조사를 실시하였다. NBRIP 한천 배지를 사용한 결과, 총 13종의 분리균 중 12종의 세균에서 clear zone을 형성하는 것을 확인

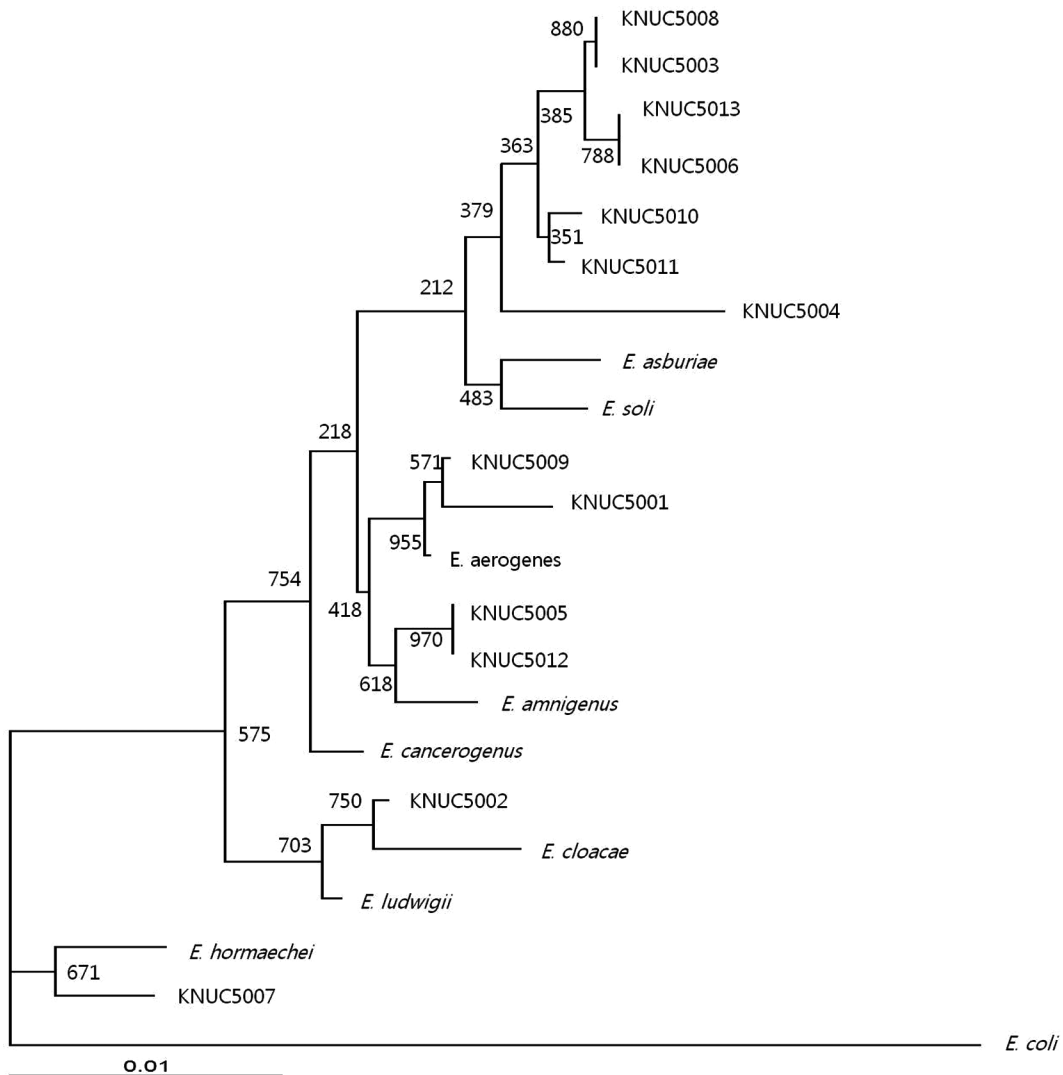


Fig. 1. Phylogenetic analysis of *Enterobacter* spp. with 16S rDNA sequence. Neighbour joining tree was constructed using 22 taxa (9 reference sequences and 13 *Enterobacter* spp.). *Escherichia coli* was used as the outgroup.

할 수 있었다(Table 2). 인은 식물의 성장 및 발달에 필수적인 다량원소로 주로 식물의 DNA와 RNA를 구성하는 핵산의 구성성분 또는 ATP, ADP 등 식물의 에너지대사에 관여하는 중요한 요소이다[28]. 많은 양의 무기인산염들이 비료를 통하여 토양에 공급되고 있다. 그러나 인산은 철(Fe^{3+}), 알루미늄(Al^{3+}), 칼슘 이온(Ca^{2+})과 결합하여 토양 속에서 빠른 속도로 난용성의 복합체 형태로 바뀌기 때문에 실제 식물이 이용 가능한 인은 생태계에서 제한적인 영양분이다[19]. 이러한 인을 가용할 수 있는 균들은 식물이 이용하기 어려운 난용성인을 가용화시켜 식물의 성장에 도움을 줄 것으로 보인다[29].

Siderophore 생산 능력

분리된 *Enterobacter* 속 세균들의 식물병원균의 억제작용 중 하나인 siderophore생산 유무에 대해 알아보았다. 총 13

종의 *Enterobacter* 중, 11종의 균주에서 CAS blue 한천 배지의 색이 오렌지색으로 변하는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). siderophore는 토양 중 철이온(Fe^{3+})과 높은 친화성이 높은 2차 대사산물이다. 많은 미생물들이 이 물질을 생산하여 토양환경 내에서 제한된 철이온(Fe^{3+})을 철수송계를 통해 흡수하며, 그에 따라 병원균의 철이온 흡수를 방해하여 병원균을 사멸시키는 것으로 알려져 있다[12, 17].

고추에서 식물생장촉진 효과 검증

분리된 *Enterobacter* 속 세균을 우리나라의 대표적 식용원예작물 중 하나인 고추에 적용하여 식물생장 촉진효과를 확인하는 실험을 수행하였다. 식물생장촉진 효과의 비교는 고추의 길이와 생체 중량을 줄기와 뿌리로 나누어 비교 측정하였으며, 5일간 dry oven에서 건조한 뒤, 건조 중량을 같은 방법으로 측정하였다. 총 13종의 *Enterobacter* 속 세균현탁

Table 2. Plant growth promoting capabilities of the isolated *Enterobacter* spp.

Strain	Phosphate solubilization ^a	Siderophore production ^b	IAA concentration (µg/mL) ^c
KNUC5001	+	-	31.56±0.20
KNUC5002	+	+	9.48±0.62
KNUC5003	+	+	43.89±0.33
KNUC5004	+	+	42.30±0.34
KNUC5005	+	+	30.48±0.32
KNUC5006	+	+	44.15±0.25
KNUC5007	+	+	31.33±0.29
KNUC5008	+	+	44.15±0.23
KNUC5009	+	+	20.92±0.42
KNUC5010	+	+	40.84±0.06
KNUC5011	+	+	45.02±0.54
KNUC5012	+	+	25.44±0.12
KNUC5013	-	-	37.11±0.23

^aPhosphate solubilization by the isolates was tested on NBRIP plates. Strains that were able to solubilize phosphate (+); strains unable to solubilize phosphate (-).

^bStrains were inoculated in CAS agar plate at 30°C for 48 hours. Siderophore producer (+); non-siderophore producer (-).

^cQuantitative analysis of IAA was carried out using King's B medium supplemented with 0.1% tryptophan.

액 처리구와 멸균수 처리구에서 고추의 길이를 비교했을 때, 고추 줄기 길이의 경우 총 6종(KNUC5001, KNUC5002, KNUC5008, KNUC5010, KNUC5012, KNUC5013)의 처리구에서 멸균수에 비해 평균 값에 대비하여 조금 높은 값을 보이는 것으로 관찰되었다. 하지만 사후검정인 DMRT를 유의확률 $p < 0.05$ 수준에서 분석하여 이용한 결과, 통계적으로 같은 그룹으로 포함되어 고추의 줄기 생장에는 큰 영향을 미치지 못한 것으로 밝혀졌다(Table 3). 고추 전체의 길이의 비교에서는 총 5종(KNUC5001, KNUC5002, KNUC5008, KNUC5012, KNUC5013)의 처리구에서 멸균수에 비해 평균 값에서 조금 높은 값을 보였으나, 통계적 분석 결과 KNUC5013 처리구만이 식물의 전체 길이를 생장시키는 것으로 밝혀졌다. 고추의 생체 중량은 Least Significant Difference (LSD) 유의확률 $p = 0.05$ 수준을 사용하여 통계적으로 분석하였다. 그 결과 분리된 *Enterobacter* 속 세균 중 KNUC5002 과, KNUC5013를 처리한 고추에서 Control과 비교하여 높은 생체 중량을 보인 것으로 나타났다(Fig. 2).

Enterobacter 속 세균에 의한 고추의 생장촉진효과를 자세히 살펴보기 위해, 고추의 건조 중량을 측정하였다. 건조 중량의 측정결과 멸균수와 비교하여 총 4종(KNUC5001, KNUC5002, KNUC5011, KNUC5013)에서 평균값에 비해 높은 생장촉진효과를 확인할 수 있었으나(Fig. 2), $p = 0.05$ 수준에서 LSD 검정을 사용하여 통계적으로 분석한 결과 역시 KNUC5002와 KNUC5013만이 고추의 생체 중량과 건조 중량 모두 생장촉진 활성을 나타내었다. 그 중 KNUC5013은 생체 중량과 건조 중량 그리고 고추의 길이생장 모두 높은

Table 3. Effect of bacterial treatments on pepper height.

Strain	Shoot height (cm)	Plant height (cm)
Control (SDW)	14.6 a-c	23.3 b-f
BTH	11.8 f	18.8 i
KNUC5001	15.2 ab	24.2 a-c
KNUC5002	15.4 a	24.4 ab
KNUC5003	14.4 a-c	23.1 c-f
KNUC5004	12.8 e	21.3 gh
KNUC5005	14.2 bc	22.6 ef
KNUC5006	13.2 de	22.3 fg
KNUC5007	14.4 a-c	22.9 d-f
KNUC5008	14.8 ab	23.6 a-e
KNUC5009	13.8 cd	21.5 gh
KNUC5010	14.8 ab	23.2 c-f
KNUC5011	14.4 a-c	21.1 h
KNUC5012	15.0 ab	23.8 a-d
KNUC5013	15.4 a	24.6 a

The values indicate the mean of three replicated experiments. Mean values of the same letter within each column are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($p = 0.05$).

생장촉진 활성을 보이는 것으로 나타나 실제 농업에 적용하여 고추 유묘의 초세를 강하게 하는 생물비료로서의 역할이 기대된다.

고추에서 전신유도저항성 효과 검정

고추의 흰별무늬병은 *S. solani*에 의해 감염되어 잎에 갈색 원형반점을 형성시키고 점차 흰색이 되면서 잎의 탈리를 야기시켜 고추의 유묘를 고사시키는 식물병으로 알려져 있다. 분리된 *Enterobacter* 속 세균들을 고추 유묘에 직접 적용하여, 고추의 내병성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ISR 활성 검정을 실시하였다. 양성대조군인 BTH의 경우 병징이 거의 나타나지 않거나 매우 약한 수준의 반점만을 보였다(Fig. 3). 음성 대조군인 SDW의 경우 *S. solani*에 의해 잎의 70% 정도가 증상이 나타난 것으로 관찰되었다. *Enterobacter* 속 세균의 처리구에서는, KUDC5007, KUDC5008, 및 KUDC5010에서 식물의 저항성 유도로 인해 높은 병 억제 증상을 보이는 것으로 확인할 수 있었다. 음성대조군인 SDW와 비교하였을 때, ISR 활성으로 각각 41.3%, 37.5%, 31.0%가량 증상이 각각 감소한 것으로 나타났다(Fig. 4). 고추 유묘의 흰별무늬병은 잎에 반점을 야기함에 따라 광합성을 억제하며, 더 나아가 식물에 잎을 탈리시키는 질병으로 알려져 있다. 이번 실험을 통해 총 3종의 *Enterobacter* 속 세균이 식물의 고유한 면역기작을 활성화시켜 병의 진전과 그에 따른 잎의 탈리를 억제하여 식물에 광합성을 유지하여 식물의 생육에 도움을 주는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 산간지역의 고추 유묘의 잎에서 흔히 발생하는 흰별무늬병에 대한 생물학적 저해제를 독도에 자생하는 개미 근근세균 중 *Enterobacter* 속 세균에 초점을 맞추어 그 특성의 규명과 식물생장촉진효과 및 ISR 유발에 대한 연구를 수행하였다. PGPR로서의 특성을 규명하기 위해 분리

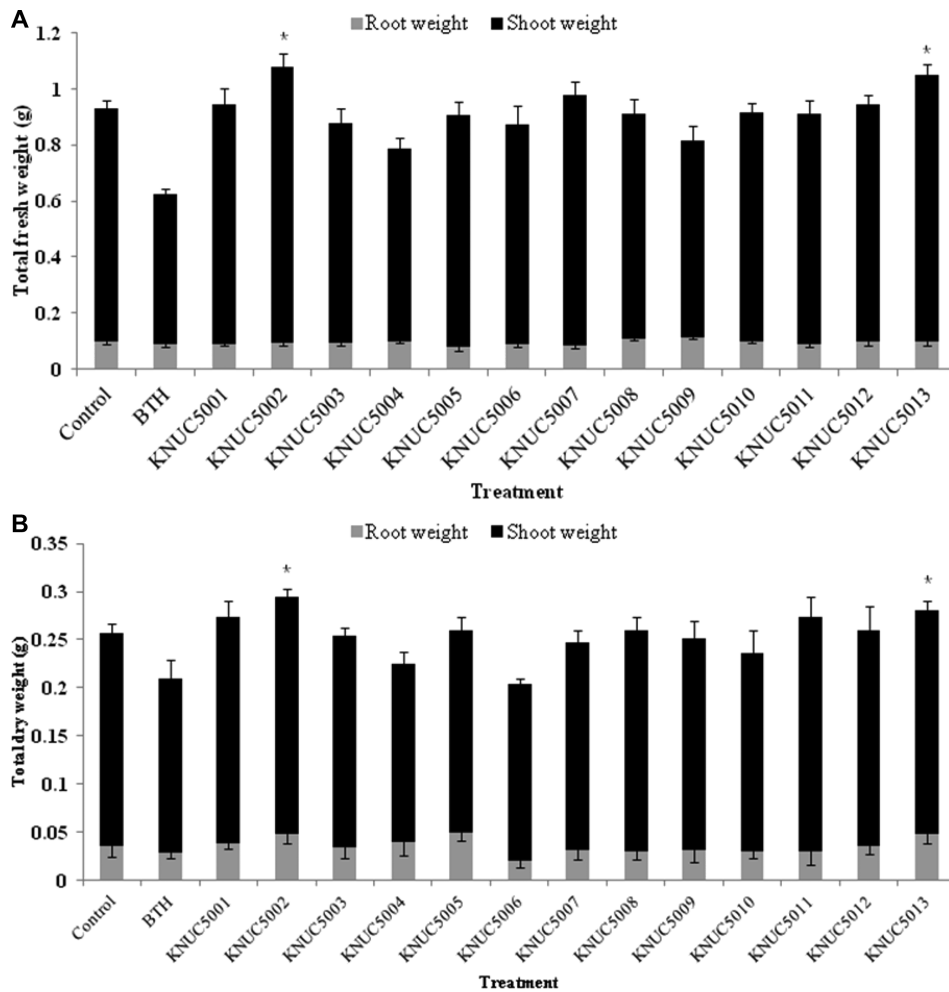


Fig. 2. Plant growth promoting effect of isolates on pepper. (A) Fresh weight. (B) Dry weight. Peppers were dried at 80°C for five days until weight become constant. Numbers represent mean values of 3 replications per treatment with 5 pepper seedlings per replicate. Bar represents standard errors. *Indicates significant difference according to Least Significant Difference (p=0.05).

된 *Enterobacter* 속 세균의 인산가용능, siderophore 생산능, IAA 생산능을 조사한 결과, 총 12종의 균주에서 난용성 인산을 가용화 할 수 있었으며, 11종의 균주에서 siderophore를 생산하였고 12종의 균주에서 20 µg/mL 이상의 IAA생산을 보여 대부분의 균주에서 식물생장촉진과 관련된 특성에 높은 반응을 나타내었다. 하지만 식물생장촉진실험의 결과 KNUC5002와 KNUC5008의 2종의 균주만이 식물의 생장을 촉진하는 것으로 나타났는데, 이는 토양 내의 다양한 환경 요인이 식물의 생장에 영향을 미친 결과라고 생각된다. 특히 KNUC5002의 경우 낮은 IAA 활성에도 불구하고 높은 식물생장촉진활성을 나타낸 것은 IAA외에 균에 의해 생산되는 다른 물질에 의해 식물의 생장이 영향을 받은 것으로 생각된다.

지금까지 생물농약으로 산업화된 대부분의 생물학적 제제는 미생물에 의해 생산되는 항생기작을 기초로 한 방법이 대부분이었다. 하지만 식물의 근권에 존재하는 식물생장촉진 근류세균이 식물의 뿌리에 정착하여 식물의 병에 대한 저항

성을 일으킨다는 사실이 밝혀졌다[1, 3, 13, 20, 30]. 식물생장촉진근류세균은 기주의 자체 방어시스템을 활성화함으로써 방제효과가 전신적이라는 점에서 기존 생물농약의 한계를 극복할 수 있는 대안이 되고 있다. 고추의 경우 역시 세균병 및 대표적 진균병인 역병과 탄저병에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으며 그에 대한 생물학적·화학적 제재 역시 다수 보고되고 있으나, 대다수의 경우 미생물의 고유한 항생기작에 근거한 연구가 대부분이었다. 또한 식물생장촉진근류세균에 의해 유발되는 ISR활성에 의한 방제 역시 세균병에 대한 실험은 많이 이루어 졌으나, 진균병에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 특히 고추 유묘의 잎에 피해를 입히는 흰별무늬병에 관한 저항성 제재에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다. 이번 연구를 통해 그 동안 고시된 방제대책이 없어 어려움을 겪고 있던 고추 유묘의 흰별무늬병에 식물생장촉진근류세균인 *Enterobacter* 속 세균을 도입하여 새로운 생물학적 방제제로의 가능성이 기대된다. 또한 앞으로 지속적인 연구를 통하여 *Enterobacter* 속 세균에 의

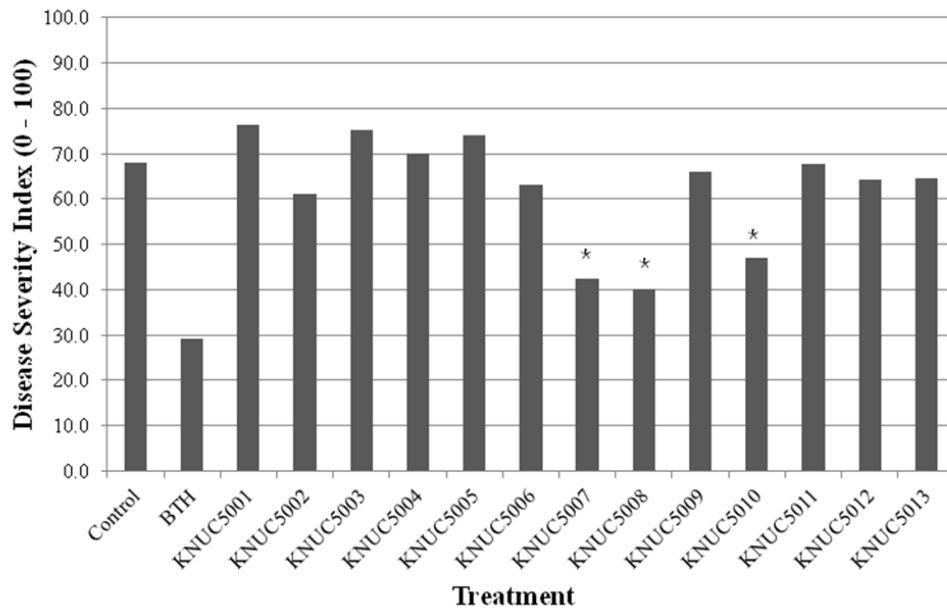


Fig. 3. Induced systemic resistance against *Stemphylium solani* by *Enterobacter* spp.. The *Enterobacter* species were inoculated on pepper roots. After 1 week, *S. solani* spore suspension was sprayed on abaxial and adaxial leaf surfaces and symptoms on every plant was measured on a scale of 0 to 9: 0 = no symptom, 1 = minute white spots, less than 5% tissue diseased; 3=small white to reddish purple lesions, 5-25% diseased; 5=dark purple necrotic lesions with chlorosis, 26-50% diseased; 7=necrotic lesions > 10 cm long, 50-75% diseased; 9=lesions coalescing, 76-100% disease. Sterile distilled water (SDW, negative control); Benzothiadiazole (BTH, positive control). The experiment was repeated three times with 5 replications. *Indicates significant different according to Least Significant Difference ($p=0.05$).

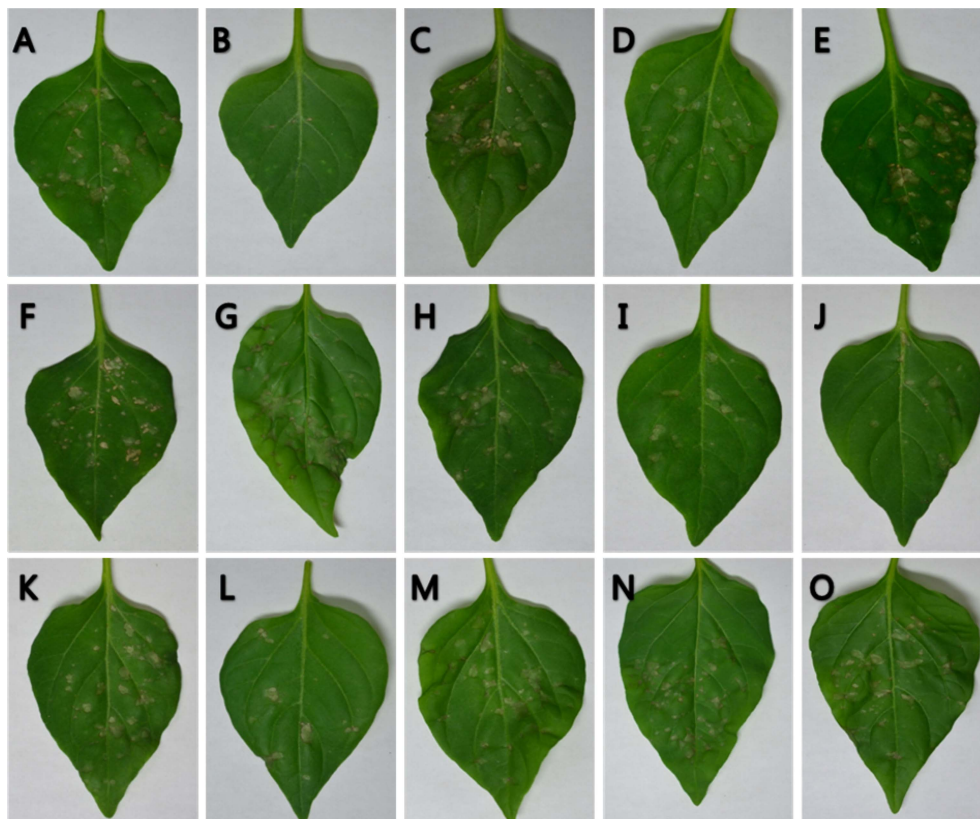


Fig. 4. Photos of representative leaves from each treatment after pepper plants were challenged with *S. solani*. (A) SDW (negative control), (B) 0.5 mM BTH (positive control), (C) KNUC5001 (D) KNUC5002 (E) KNUC5003 (F) KNUC5004 (G) KNUC5005 (H) KNUC5006 (I) KNUC5007 (J) KNUC5008 (K) KNUC5009 (L) KNUC5010 (M) KNUC5011 (N) KNUC5012 (O) KNUC5013.

해 유발되는 ISR의 결정인자를 탐색하여 동정한다면, 대량 생산을 통하여 고추의 흰별무늬병의 효율적인 방제에 대한 농업적 또는 산업적 가치가 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 독도에 자생하는 개밀의 야생근락지의 근권으로부터 분리된 균 중 식물의 생장을 촉진하고, 식물의 병원균을 억제하는 것으로 알려져 있는 *Enterobacter* 속 세균에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다. 개밀 근권으로부터 총 124종의 세균을 분리하였으며 16S rDNA sequence를 이용하여 부분동정한 결과, 13종의 *Enterobacter* 속 세균을 확인할 수 있었다. 분리된 *Enterobacter* 속 세균들의 식물생장촉진 근권세균으로서의 특징을 밝히기 위해 식물의 생장호르몬인 auxin의 생산능력과 난용성인의 가용성, siderophore 생산능을 측정하였다. 식물생장호르몬인 auxin을 형성하는 균주 12종, 난용성 인을 분해할 수 있는 균주 12종, siderophore를 형성할 수 있는 균주 11종이 각각 확인되었다. 분리된 균주들은 대표적인 식용작물인 고추에 직접 적용하여 식물의 생장촉진 효과와 병원균에 대한 전신유도저항성을 확인하였다. 그 중 KUDC5002와 KUDC5013의 경우 식물의 생장을 촉진시키는 균주로 확인되었다. 특히 KUDC5007, KUDC5008 및 KUDC5010의 경우, 지금까지 보고된 바 없었던 고추 유묘의 흰별무늬병에 대한 식물의 저항성을 증가시키는 것으로 확인되어 새로운 생물학적 제재로서 매우 가치 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgement

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (No. 2011-0011565).

REFERENCES

- Babalola, O. O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* **32**: 1559-1570.
- Barazani, O., and J. Friendman. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria?. *J. Chem. Ecol.* **25**: 2397-2406.
- Bharathkumar, S., J. W. Park, J. H. Han, and K. S. Park. 2009. Root colonization and ISR-mediated anthracnose disease control in cucumber by strain *Enterobacter asburiae* B1. *Plant Pathol. J.* **25**: 333-343.
- Blazquez, C. H. 1969. Occurrence of gray leaf spot on peppers in Florida. *Plant Dis. Rep.* **53**: 756.
- Cho, H. J., B. S. Kim, and H. S. Hwang. 2001. Resistance to gray leaf spot in *Capsicum* pepper. *HortScience* **36**: 753-754.
- Falloon, P. G., L. M. Falloon, and R. G. Grogan. 1987. Etiology and epidemiology of *Stemphylium* leaf spot and purple spot of asparagus in California. *Phytopathology* **77**: 407-413.
- Glickmann, E., and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 793-796.
- Jeong, J. H., D. E. Jeong, S. J. Lee, K. J. Seu, C. M. Ryu, S. H. Park, and S. Y. Ghim. 2007. The effects of wood vinegar on growth and resistance of peppers. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 41-44.
- Kim, B. S., S. H. Yu, H. J. Cho, and H. S. Hwang. 2004. Gray leaf spot in peppers caused by *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*. *Plant Pathol. J.* **20**: 85-91.
- Lee, K. S. 1997. Evaluation on the effects of pesticide residues to agroecosystem in Korea. *Kor. J. Environ. Agric.* **16**: 80-93.
- Lee, S. J., S. E. Lee, K. J. Seul, S. H. Park, and S. Y. Ghim. 2006. Plant growth-promoting capabilities of diazotrophs from wild *gramineous* crops. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 78-82.
- Loper, J. E., and J. S. Buyer. 1991. Siderophore in microbial interactions on plant surfaces. *MPMI.* **4**: 5-13.
- Lugtenberg, B., and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541-556.
- Mehta, Y. R. 1998. Severe outbreak of *Stemphylium* leaf blight, a new disease of cotton in Brazil. *Plant Dis.* **82**: 333-336.
- Mena violante, H. G., and V. Olalde Protugal. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* **113**: 103-106.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 265-270.
- O'Sullivan, D. J., and F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogen. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676.
- Padidam, M. 2003. Chemically regulated gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 169-177.
- Paul, E. A., and F. E. Clark. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press New York, USA.
- Phi, Q. T., Y. M. Park, K. J. Seul, C. M. Ryu, S. H. Park, J. G. Kim, and S. Y. Ghim. 2010. Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1605-1613.
- Research Institute for Ullengdo & Dokdo Islands. 2008. The plant of Dokdo island. pp 161-221. In Nature of Dokdo island. Kyungpook National University Press. Daegu. Korea.
- Ryu, C. M., M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, H. X. Wei, P. W. Par, and J. W. Kloepper. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 4927-4932.
- Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. University chemical

- assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 46-52.
24. Shen, S. S., O. H. Choi, S. H. Park, and C. S. Park. 2005. Root colonizing and biocontrol competency of *Serratia plymuthica* A21-4 against *Phytophthora Blight* of Pepper. *Plant Pathol. J.* **21**: 64-67.
25. Shoebitz, M., C. M. Ribaudó, M. A. Pardo, M. L. Cantore, L. Ciampi, and J. A. Cura. 2009. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **41**: 1768-1774.
26. Sinclair, J. B., N. L. Horn, and E. C. Time. 1958. Unusual occurrence of certain diseases in Louisiana. *Plant Dis. Rep.* **42**: 984-985.
27. Slininger, P. J., K. D. Burkhead, and D. A. Schisler. 2004. Antifungal and sprout regulatory bioactivities of phenylacetic acid, indole-3-acetic acid, and tyrosol isolated from the potato dry rot suppressive bacterium *Enterobacter cloacae* S11:T:07. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 517-524.
28. Taiz, L., and E. Zeiger. 1998. *Plant physiology*, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
29. Hameeda B. G, O. P. Rupela, S. P. Wani, and G. Reddy. 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from compost and macro-fauna. *Microbiol. Res.* **163**: 234-242.
30. Ham, M. S., Y. M. Park, H. R. Sung, M. Sumayo, C. M. Ryu, S. H. Park, and S. Y. Ghim. 2009. Characterization of rhizobacteria isolated from family *Solanaceae* plants in Dokdo Island. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 110-117.