

Bacillus amyloliquefaciens M27과 식물천연물 혼합제에 의한 오이 흰가루병의 방제 효과

이상엽* · 원항연 · 김정준 · 한지희 · 김완규

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Control effect of the Mixture of *Bacillus amyloliquefaciens* M27 and Plant Extract against Cucumber Powdery Mildew

Sang Yeob Lee*, Hang Yeon Weon, Jeong Jun Kim, Ji Hee Han and Wan Gyu Kim

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science (NAAS),
Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea

(Received on November 11, 2013. Revised on November 29, 2013. Accepted on December 13, 2013)

Abstract *Bacillus amyloliquefaciens* M27 was selected as a control agent for the biological control of cucumber powdery mildew. The new mixture of *B. amyloliquefaciens* M27 and plant (Eucalyptus) extract was developed to improve the control activity of *B. amyloliquefaciens* M27 against cucumber powdery mildew. The mixed formulation showed the high preventive and curative control effect against cucumber powdery mildew when it was diluted at 500 times and foliar-sprayed. Its control effect was higher in preventive spraying than curative spraying. When 500-fold diluted solution of the formulation was sprayed preventively four times at five-day intervals, three times at seven-day intervals and twice at ten-day intervals, the diseased leaf area was shown to be 4.4%, 8.0%, 27.9%, respectively; Whereas the diseased leaf area in the control plot was 45.4%. When the 500-fold diluted formulation was sprayed curatively four times at five-day intervals, three times at seven-day intervals and twice at ten-day intervals after occurred cucumber powdery mildew, the diseases leaf area was 11.5%, 25.2%, 51.8%, respectively; whereas in the control plot, the diseases leaf area was 64.3%. When the 500-fold diluted formulation was treated four times at five-day intervals in the plastic house, its control effect was higher than that treated three times at seven-day intervals and twice at ten-day intervals. As the results, the mixed formulation of *B. amyloliquefaciens* M27 and plant extract could be a promising candidate of bio-fungicides for the environment-friendly control of powdery mildew of cucumber.

Key words *Bacillus amyloliquefaciens* M27, Cucumber Powdery mildew, Plant Extract

서 론

작물에 발생하는 흰가루병균은 식물체의 표면에 기생하는 활물기생균으로 오이, 멜론, 참외, 호박 등 가장 기주범위가 넓은 다범성 식물병원균 중 하나이다(The Korean Society of plant pathology, 2009). 오이 시설재배 포장에서 작물이 연중 재배되고 있어 분생포자세대의 생활사만을 볼 수 있으며 분생포자가 5일 내지 6일이면 한 세대가 경과하는 병으

로 균체가 식물체 표면을 덮고 흡기로 영양분 탈취하여 생활환을 유지하면서(Endo, 1989), 식물의 광합성과 호흡을 저해하여 동화작용과 증산작용을 감소시킨다(Wright *et al.*, 1990). 그리고 오이 흰가루병에 대한 피해는 주당 평균 흰가루병의 병반면적율이 20%일 때 경제적 손실이 발생한다고 하며(Verhaar *et al.*, 1993), 흰가루병의 병 발생이 50%이상 일 경우에는 오이의 수량이 35%나 감소한다(Belanger *et al.*, 1998). 이러한 수량 손실을 억제하기 위한 화학농약의 지속적 사용하여 왔으며, 이 결과 흰가루병 방제 약제에 대하여 저항성을 가진 식물병원균의 출현으로 유기합성농약의 약효의 저하(Erickson *et al.*, 1997)와 농산물에서 유기합성

*Corresponding author

Tel: +82-31-290-8480, Fax: +82-31-290-8488

E-mail: lsy1111@korea.kr

농약의 잔류 우려가 대두 되었다.

전 세계적으로 미생물농약은 149종이 등록되어 병해충과 잡초방제에 사용되고 있으며, 최근 흰가루병을 비롯한 잣빛 곰팡이병 방제용으로 *Bacillus subtilis* QST 713 (Rhapsody^R, Serenade^R)과 *Bacillus pumilus* QST 2808 (Sonata^R)이 개발되어 여러 나라에서 친환경자재로 사용되고 있다(Copping, 2004; Helene *et al.*, 2011). 하지만 미생물 단독으로는 충분한 식물병 방제효과를 얻기가 어렵기 때문에 식물추출물 또는 기존의 살균제와 미생물농약을 같이 사용하고자 하는 노력이 전개되고 있다.

따라서 본 연구에서도 친환경 안전 농산물 생산하기 위하여 오이 흰가루병 발생을 억제하는 *Bacillus amyloliquefaciens* M27 균주와 식물추출 천연물을 같이 사용하여 방제 효과를 상승 시키고자 희석배수, 처리간격 및 처리횟수, 예방 및 치료효과 등과 비닐하우스에서 방제효과 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

미생물 혼합제

버섯 재배 폐면에서 분리한 *Bacillus* 균주는 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*으로 동정한 바 있다((Lee *et al.*, 2012). 오이 흰가루병 방제 미생물로 선발한 *Bacillus amyloliquefaciens* M27의 배양액에 흰가루병 방제효과를 증진하기 위하여 식물천연물인 유칼립투스 추출물을 혼합하여 사용하였다. 제조한 미생물과 천연물 혼합한 시제품의 *B. amyloliquefaciens* M27의 균수는 1.0×10^8 cfu/ml이었다.

혼합제의 희석배수별 오이 흰가루병 예방효과 검증

오이(싱싱백다다기 품종) 종자를 바로커상토(서울바이오)가 담아 있는 직경 7 cm 포트에 파종하여 2엽기까지 재배한 후, 다시 직경 27 cm 포트에 이식하여 비닐하우스에서 5엽기까지 재배한 후 실험에 사용하였다. 미생물과 천연물을 혼합한 혼합제의 희석배수를 50배, 100배, 250배, 500배와 1,000배로 하여 7일 간격 2회 처리하고 7일 후에 오이 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다.

혼합제의 희석배수별 오이 흰가루병 치료 효과 검증

오이 흰가루병이 발생하기 시작한 5엽기 오이 식물체를 이용하였다. 혼합제의 희석배수를 125배, 250배, 500배와 1,000배로 하여 7일 간격 2회 처리하고 7일 후에 오이 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다.

혼합제의 처리간격 및 처리횟수별 오이 흰가루병 예방 및 치료효과 검증

온실에서 재배한 5엽기의 오이 식물체에 혼합제를 500배로 희석하여 5일 간격 4회, 7일 간격 3회 그리고 10일 간격

2회로 각각 분무 처리하고 최종 처리 6일 후에 오이 잎에 발생한 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다.

비닐하우스 포 오이 포장에서 혼합제의 처리 간격 및 처리 횟수별 오이 흰가루병 방제 효과 검증

온실에서 육묘한 본엽 3엽기의 오이(싱싱백다다기)를 국립농업과학원 비닐하우스 포장에 정식하여 재배하면서 오이 흰가루병이 발생하기 시작하였을 때 실험에 사용한 혼합제를 500배로 희석하여 5일 간격 4회, 7일 간격 3회 그리고 10일 간격 2회로 각각 오이 경엽에 분무 처리하고 최종 처리 6일 후에 오이 잎에 발생한 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다. 포장 실험은 난괴법 3반복으로 실험하였으며, 대조 약제로 페나리몰 유제 4,000배를 사용하였다.

결과 및 고찰

혼합제의 희석배수별 오이 흰가루병 예방효과

혼합제를 각각의 희석배수로 희석하여 7일 간격 2회 처리하고 7일 후에 오이 흰가루병 발생을 병반면적율로 조사한 결과, 0.4%, 17.5%, 26.9%, 35.7%, 59.4%의 병 발생을 보였으며, 무처리구에서는 95.0%의 병반면적율을 나타냈다(Table 1). 혼합제를 250배로 희석하여 처리한 구에서 71.7%, 500배는 62.4% 예방효과를 얻을 수 있었으며, 이는 친환경유기농자재 인증제의 약효 등록 기준인 60%이상으로 희석배수 500배가 이 혼합제의 적정 사용배수로 판단되었다.

Table 1. Preventive effect of the mixture of *B. amyloliquefaciens* M27 and plant extract at different dilution fold

Dilution (times) ^{a)}	Lesion area (%)	Control value (%)
50	0.4 a ^{b)}	99.6
100	17.5 b	81.6
250	26.9 c	71.7
500	35.7 d	62.4
1,000	59.4 e	37.5
Control	95.0 f	-

^{a)} The mixture was applied twice with 7-day interval.

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

혼합제의 희석배수별 오이 흰가루병 치료효과

비닐하우스에서 포트 재배하면서 오이 식물체에 흰가루병이 발생하기 시작한 5엽기 오이 식물체에 혼합제를 125배, 250배, 500배와 1,000배로 희석하여 7일 간격 3회 처리하여 7일 후에 오이 흰가루병 발생을 조사한 결과, 125배 희석처리 시 2.6%, 250배 희석처리 시 1.1%, 500배 희석처리 시 26.0%, 1,000배 희석처리 시 33.9%의 병반면적율을 보였으

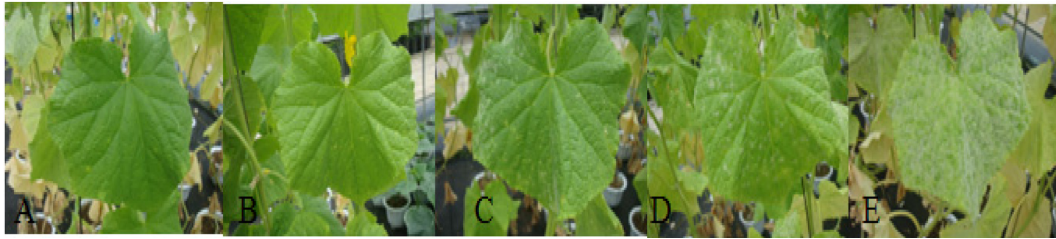


Fig. 1. Effect of the mixture of *B. amyloliquefaciens* M27 and plant extract at different dilution fold. The mixture was applied three times with seven-day interval in the plastic house, where cucumber plants were cultivated. A; 125×, B; 250×, C; 500×, D; 1,000×, E; control.

Table 2. Curative effect of the mixture of *B. amyloliquefaciens* M27 and plant extract at different dilution fold

Dilution (times) ^{a)}	Lesion area (%) ^{a)}	Control value (%)
125	2.6 a ^{b)}	96.0
250	1.1 a	98.3
500	26.0 b	60.1
1,000	33.9 b	47.9
Control	65.1 c	-

^{a)} The mixture was applied twice with seven-day interval after powdery mildew was developed on leaves of cucumber.

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

며, 무처리의 병반면적율은 65.1%로 오이 흰가루병이 심하게 발생하였다(Table 2, Fig. 1). 미생물 혼합제를 250배로 희석하여 처리한 구에서 98.3%, 500배 희석하여 처리한 구에서 60.1%의 치료효과를 얻었다. 250배 처리구에서 예방위주 약제처리에 비해 치료 위주로 처리했을 때 높은 방제효과를 나타내었지만, 500배 처리구에서는 예방 및 치료효과가 비슷한 방제효과를 나타내었다.

혼합제의 처리간격 및 처리횟수가 오이 흰가루병 방제에 미치는 효과

비닐하우스에서 오이 식물체에 혼합제를 500배로 희석하

여 5일 간격 4회, 7일 간격 3회와 10일 간격 2회로 각각 경엽 분무 처리하고 최종 처리 6일 후에 오이 흰가루병의 병반면적율(%)을 조사한 결과, 오이 흰가루병 발생 전에 처리한 5일 간격 4회 처리구가 4.4%, 7일 간격 3회 처리구가 8.0%, 10일 간격 2회 처리구가 27.9%, 무처리구에서는 45.4% 발병율을 보였다(Table 3). 오이 흰가루병이 발생한 초기에 5일 간격 4회 처리구에서는 11.5%, 7일 간격 3회 처리구에서 25.2%, 10일 간격 2회 처리구에서 51.9%, 무처리구에서는 오이 흰가루병이 64.3% 발생하였다(Table 3). 이상의 결과를 분석하면 7일 간격 3회 처리구를 비교하면 오이 흰가루병이 발생 전에 예방위주로 살포시 82.3% 방제효과를 보인 반면에 발병 후에 처리하였을 때는 60.8% 방제효과를 나타내어 약제 처리 시기에 따라서 혼합제의 효과에 차이가 보였다. 따라서 실험에 사용한 혼합제를 500배로 희석하여 7일 간격으로 흰가루병이 발생하기 전부터 예방위주로 처리하여야 본 혼합제의 효과를 높일 수 있을 것으로 생각하였다.

포장에서 시제 포장에서 혼합제의 처리간격 및 처리횟수가 오이 흰가루병 방제에 미치는 영향

비닐하우스 포장에 오이(싱싱백다다기)를 정식하여 오이 흰가루병이 발생하기 시작하였을 때 시제품을 500배로 희석하여 5일 간격 4회, 7일 간격 3회와 10일 간격 2회 처리

Table 3. Preventive and curative effect of the mixture of *B. amyloliquefaciens* M27 and plant extract at different application times and intervals on the development of cucumber powdery mildew in the plastic house

Application time	Application interval (day)	Application times	Lesion area (%)	Control value (%)
Preventive treatment ^{a)}	5	4	4.4 a ^{c)}	90.3
	7	3	8.0 a	82.3
	10	2	27.9 b	38.6
	Control	-	45.4 c	-
Curative treatment ^{b)}	5	4	11.5 a	82.1
	7	3	25.2 b	60.8
	10	2	51.8 c	19.4
	Control	-	64.3 d	-

^{a)} Preventive : first application date, Sep. 17, 2013; disease investigation date, Oct. 7, 2013.

^{b)} Curative : first application date, Sep. 23, 2013; disease investigation date, Oct. 14, 2013.

^{c)} In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 4. Control effect of the 500-fold diluted mixture of *B. amyloliquefaciens* M27 and plant extract at different application times and intervals on the development of cucumber powdery mildew in September

Application interval (day)	Application times	Lesion area (%)	Control value (%)
5	4	11.2 a ^{a)}	81.9
7	3	24.7 b	60.0
10	2	48.8 c	21.8
Fenarimol EW (4,000×)	3	6.2 a	90.0
Control	-	61.8 d	-

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

한 결과, 5일 간격 4회 처리구에서 11.2%, 7일 간격 3회 처리구에서 24.7%와 10일 간격 2회 처리구에서 48.8%, 대조 화학약제 페나리몰 유제(4,000배)처리구가 6.2%, 그리고 무 처리구에서 오이 흰가루병이 61.8% 발생하였다(Table 4). 미생물 혼합제를 오이 흰가루병이 가장 심하게 발생하는 9월에 처리하였을 때, 5일 간격 4회 처리구에서 81.9%, 7일 간격 3회 처리구에서 60%, 10일 간격 2회 처리구에서 21.8% 방제효과를 나타내었고, 페나리몰 유제를 7일 간격 3회 처리한 시험구에서는 90.0%의 방제효과를 나타냈다. 이 미생물 혼합제는 500배로 희석하여 최소한 7일 간격 3회 처리하거나 5일 간격 4회 처리하여야만 오이 흰가루병을 60% 이상 방제할 수 있는 것으로 나타났다.

Bacillus spp. 균주는 7시간 배양하는 것 보다 48시간 배양하여 사용할 경우 흰가루병균(*Podosphaera fusca*)의 포자 발아를 억제하며 병 발생량을 크게 감소시켰다. *Bacillus subtilis*를 직접 처리해서 멜론 흰가루병을 방제할 수 있었을 뿐만 아니라(Romero *et al.*, 2004; 2007b), *B. subtilis*가 생성하는 항균물질 이투린과 펜기신도 흰가루병균(*Podosphaera fusca*)에 대하여 길항력을 보였다(Romero *et al.*, 2007a). 미국, 캐나다, 유럽 등에서는 *Bacillus pumilus*와 *Bacillus subtilis* 균주를 흰가루병 등 방제제로 등록하여 화학농약 대체제로 사용 가능성을 높이고 있다(Helene *et al.*, 2011). 국내에서는 *B. subtilis* B29, *B. subtilis* M10과 *Streptomyces* sp. CC19 균주를 오이 흰가루병에 방제에 이용하기도 하였으며(Lee *et al.*, 2010), *Bacillus* sp. BS061 균주의 MH배지에서 20배 희석한 배양여액은 오이 흰가루병이 발생 초기에 처리하여 62.4% 방제효과를 얻었다(Kim *et al.*, 2013). 그리고 *B. subtilis* KB-401을 이용한 미생물 제제는 오이 흰가루병에 발병전이나 발생초기에 처리할 때 우수한 방제효과를 나타내었다고 하였다(Nam *et al.*, 2010). 본 연구 결과에서 미생물과 식물추출물을 혼합한 혼합제는 흰가루병이 발생한 후 보다는 발생 전에 처리하는 것이 매우 효과적으로 흰가루병을 방제 할 수 있으며, 포장에서 살균제의 일부를 대체함으로써 친환경 농업에 이용할 수 있는 농자재로 개발이 가능할 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ00897602)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사 드립니다.

Literature Cited

- Belanger, R. R., A. J. Dik and J. M. Menzies (1998) Powdery mildews recent advances toward integrated control. In: Plant-microbe Interactions and Biological Control, Eds; Marcel Dekker, New York, USA. pp. 89-126.
- Borriss, R. (2011) Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents, In Maheshwari DK. Eds; Bacteria in agrobiolgy: plant growth response. Springer Heidelberg, Heidelberg, Germany, pp. 41-76.
- Borriss, R., X. H. Chen, C. Rueckert, J. Blom, A. Becker, B. Baumgarth, B. Fan, R. Pukall, P. Schumann, C. Spröer, H. Junge, J. Vater, A. Pühler and H. Klenk (2011) Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1786-1801.
- Copping, L. G. (2004) The manual of biocontrol agents. 3th edition, BCPC. UK. pp. 702.
- Endo, T. (1989) Studies on the life-cycle of cucurbit powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea* (schlecht) Poll. Spec. Bull. Fukushima Pref. Agr. Exp. Stn. 5:1-106.
- Erickson, E. O. and W. F. Wilcox (1997) Distributions of sensitivities to three sterol demethylation inhibitor fungicides among populations of *Uncinula necator* sensitive and resistant to triadimefon. Phytopathology 87:784-791.
- Helene, C., B. Wagner, F. Patrick and O. Marc (2011) 13. *Bacillus*-based biological control of plant diseases in pesticides in the modern world - pesticides use and management. pp. 273-302. <http://www.intechopen.com>. Accessed 14 October 2013.

- Kim, Y. S., J. G. Song, I. K. Lee, W. H. Yeo and B. S. Yun (2013) *Bacillus* sp. BS061 Suppresses powdery mildew and gray mold. *Mycobiology*. 41(2):108-111.
- Lee, S. Y., B. Y. Kim, J. H. Ahn, J. Song, Y. J. Seol, W. G. Kim and H. Y. Weon (2012) Draft genome sequence of the biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain M27. *J. Bacteriol.* 194:6934-6935.
- Lee, S. Y., Y. K. Lee, K. Park and Y. K. Kim (2010) Selection of beneficial microbial agents for control of fungal diseases in the phyllosphere of cucumber plant. *Korean J. Pestic. Sci.* 14(4):326-331 (in Korea).
- Nam, M., J. Choi, H. J. Kim, J. Lee, K. Lim, Y. G. Kim, H. T. Kim and Y. C. Jeun (2010) Controlling activity of *Bacillus subtilis* KB-401 against cucumber powdery mildew Caused by *Sphaerotheca fusca*. *Kor. J. Pestic. Sci.* 14(1):49-53.
- Romero, D., A. Pérez-García, M. E. Rivera, F. M. Cazorla and A. De Vicente (2004) Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:263-269.
- Romero, D., A. de Vicente, R. H. Rakotoaly, S. E. Dufour, J. W. Veening, E. Arrebola, F. M. Cazorla, O. P. Kuipers, M. Paquot, and A. Pérez-García (2007a) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20(4):430-440.
- Romero, D., A. de Vicente, H. Zerouh, M. Cazorla, D. J. Fernández-Ortuño, A. Torés and A. Pérez-García, (2007b) Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. *Plant Path.* 56:976-986.
- The Korean Society of Plant Pathology (2009) List of Plant Diseases in Korea, 5th edition, Eds; JK press, Anyang, Korea, pp. 853.
- Verhaar, M. A. and T. Hijwegen (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., D. Scholes, P. Horton, B. C. Baldwin and M. C. Sheppard (1990) The relationship between the development of hostori of *Erysiphe graminis* and the energy status of leaves. In *Current Research in Photosynthesis*, vol. 4. M. Baltscheffsky, Eds; kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 223-226.

● ●

***Bacillus amyloliquefaciens* M27과 식물천연물 혼합제에 의한 오이 흰가루병의 방제 효과**

이상엽* · 원항연 · 김정준 · 한지희 · 김완규

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

요 약 오이 흰가루병 방제를 위하여 길항세균 *B. amyloliquefaciens* M27 균주의 배양액과 식물추출물(유카립투스)을 혼합한 새로운 혼합제를 만들어 실험하였다. 오이 흰가루병 방제를 위하여 병 발생 전과 직후부터 농도별로 처리한 효과를 조사한 결과, 500배의 희석배수로 처리할 경우가 우수한 효과를 보였다. 혼합제는 병 발생 후보다는 병 발생 전부터 예방위주로 처리하였을 때 방제효과가 높게 나타났다. 오이 흰가루병이 발생하기 전부터 5일 간격 4회, 7일 간격 3회, 10일 간격 2회 처리하였을 때 흰가루병이 각각 4.4%, 8.0%, 27.9% 발생하였고, 무처리구에서는 45.4% 발생하였다. 흰가루병 발생 후에는 5일 간격 4회, 7일 간격 3회, 10일 간격 2회 처리구에서 흰가루병이 각각 11.5%, 25.2%, 51.8% 발생하였고, 무처리구에서는 64.3% 발생하였다. 비닐하우스 포장에서 미생물 혼합제를 500배로 희석하여 5일 간격 2회 처리하였을 때가 7일 간격 3회 처리와 10일 간격 2회 처리하였을 때 보다 높은 방제효과를 나타내었다. 이상의 결과에서 M27균주와 유카립투스 추출물을 혼합한 혼합제는 오이 흰가루병 방제용 미생물제의 유망한 후보가 될 수 있을 것으로 생각한다.

색인어 바실루스 아밀로리퀴페션스, 식물추출물, 오이흰가루병

● ●