

Bacillus vallismortis BS07M 제형의 고추 성장촉진과 병저항성 유도

Plant Growth Promotion and Induced Resistance by the Formulated *Bacillus vallismortis* BS07M in Pepper

이용호 · 송재경 · 원항연 · 박경석 · 상미경*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과

Yong Ho Lee, Jaekyeong Song, Hang-Yeon Weon, Kyungseok Park, and Mee Kyung Sang*

Division of Agricultural Microbiology, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

***Corresponding author**

Tel: +82-63-238-3055

Fax: +82-63-238-3834

E-mail: mksang@korea.kr

A plant growth promoting rhizobacterium, *Bacillus vallismortis* BS07M, was formulated as a clay pellet (CP) to evaluate its pepper growth promotion and induced resistance against various diseases under field and storage conditions. Peppers were grown in 50-hole tray containing potting mixture with CP in seedling raising stage, and then it was transplanted into a field. After transplanting, pepper plants treated with CP in seedling raising stage increased shoot growth and reduced disease severity caused by *Phytophthora capsici* in detached pepper leaves compared to untreated control. Moreover, treatment with CP in seedling raising stage increased fruit weight per plant; after harvesting, pepper fruits shown reduced diameter of lesions by *Colletotrichum acutatum*, and occurrence of soft rot in storage condition. These results indicated that CP could affect plant growth and induced resistance in pepper plants under field condition, and maintenance of fruit during storage.

Keywords: Biocontrol, Induced systemic resistance, Plant growth promotion

Received September 19, 2016

Revised September 22, 2016

Accepted September 30, 2016

고추(*Capsicum annuum*)는 국내에서 가장 많이 소비되는 대표적인 작물이다. 하지만 고추역병, 탄저병 등이 발생하며, 고추를 수확한 후 보관 중에는 꼭지썩음병, 무름증상 등이 발생하여 피해를 주기도 한다(Sharma 등, 2009; Stommel 등, 1996). 이러한 병원균의 발생을 막고, 수량 증대를 위하여 화학살균제와 비료, 저온저장 방법 등을 사용하지만, 최근의 안전농산물 소비 증가 추세에 따라 미생물을 이용한 생물방제에 관한 연구가 많이 진행되고 있다(Lee 등, 2008; Sang 등, 2008). 식물 성장촉진근권세균(plant growth-promoting rhizobacteria)은 토양 내 식물 근권에 서식하면서 식물과

상호작용하여 식물의 생장에 영향을 주며, 많은 식물 성장촉진근권세균이 식물병을 생물적으로 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다. 식물에 필요한 당, 유기산을 분비하거나 질소고정, 인산가용화를 통해 식물의 양분 흡수를 용이하게 하며, 옥신, 지베렐린, 에틸렌 등과 같은 식물 호르몬을 분비하여 발달 과정에 영향을 주며(Glick, 2012), 병원균에 대한 항균물질을 분비하거나 철 포획체를 분비하여 경쟁적으로 자원을 포획함으로써 병원균보다 경쟁적으로 우점하여 식물 병원균에 대한 억제 효과를 가질 수 있다(Haas와 Défago, 2005).

식물 성장촉진세균을 식물에 처리하기 위하여 배양한 세균 현탁액을 종자처리(Liu 등, 2016), 토양에 관주 또는 침지처리(Sang 등, 2008), 식물체에 살포하는 등의 방법(Jiang 등,

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

©The Korean Society of Plant Pathology

©This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2006)을 사용하였으며, 보다 더 효과적인 처리를 위해 카오린(kaolin), 갈조류(alginate), 탈크(talc), 점토(clay) 등을 이용하여 제제화하여(Fravel, 2005), 미생물의 효과를 유지하고자 하였다(Fravel, 2005; Fravel 등, 1998). Sabaratnam과 Traquair (2002)의 연구에 따르면 *Rhizoctonia*에 의한 모잘록병 억제 효과가 있는 *Streptomyces* sp.는 talc powder와 전분 입체로 제제화하였을 때 10-14주 동안 개체군 밀도를 유지하여 효과를 지속할 수 있었다.

본 연구에서는 이전의 연구를 통해 고추와 배추의 생육을 촉진하고 배추의 세균성 무름병 발생을 감소시키는 효과가 있는 *Bacillus vallismortis* BS07M (Park 등, 2013; Sang 등, 2015)을 제형화하여 고추 육묘상토에 혼합한 후 포장에서 고추 생육과 병억제 효과가 지속되는지 평가하였다. 또한, 육묘기 때 처리한 것이 고추 수확 후 열매의 저장성 유지에 영향을 주는지 평가함으로써 BS07M 제형화의 효과 지속성을 검증하였다.

생육 촉진과 병억제 효과 포장 검증. 식물 성장촉진 근권세균 *B. vallismortis* BS07M은 tryptic soy broth (TSB; Difco Inc., Heidelberg, Germany) 100 ml에서 48시간 동안 28°C, 160 rpm에서 진탕배양한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 10 mM MgSO₄ 용액으로 점토펠렛(clay pellet, CP)을 현탁하였다. 세균현탁액은 흡광광도계(UV-2501PC; Shimadzu, Kyoto, Japan)로 OD₆₀₀=0.5 (10⁸ cfu/ml)로 맞춘 후 10⁷ cfu/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. BS07M CP 제형(점토 96%, BS07M

4%)은 NAPRO Biotec (Gongju, Korea)에서 만든 시제품을 사용하였다. 포장검정을 위한 상토는 TKS2 (Floragard, Oldenburg, Germany):vermiculite=9:1 (v/v)을 사용하였고, 고추 육묘는 50 구 육묘 트레이에 1) 무처리구, 2) benzothiadiazole (BTH, 0.1 mM): 상토+BTH 관주, 3) cell suspension (CS): 상토+BS07M 세균 현탁액(최종 농도=10⁷ cfu/g of potting soil) 관주, 4) CP: 상토+BS07M CP 제형(최종 농도=10⁷ cfu/g of potting soil) 혼합 처리한 후 고추종자(cv. 마니파; Nongwoobio, Suwon, Korea)를 2016년 2월 23일 파종하였다. 파종한 육묘 트레이는 하우스에서 재배하였으며, 2016년 4월 25일 국립농업과학원 내 시험포장에 정식하였다. 포장은 완전 임의화 블록 설계(completely randomized block design)로 4블록, 블록 내 각 처리구는 20주씩 정식하였고 식물 간 재식간격은 45 cm, 이랑 간 간격은 110 cm로 배치하였으며, 포장 비닐멀칭하기 30일 전에 가축분퇴비(부농퇴비; Punong, Wanju, Korea)로 사용면적 대비 기비처리 한 후 재배 기간 중에는 농약 또는 기타 농자재를 사용하지 않았다. 정식한 후 6월 9일 시험 포장의 고추 전체를 뜯기부터 마지막 분지까지 길이를 측정하고 결과 CP를 육묘 상토에 혼합하였을 때 대조구에 비하여 생장이 증가하였다(Fig. 1A). 고추 역병에 대한 유도저항성 효과를 평가하기 위하여, 고추 역병균(*Phytophthora capsici*)은 V8배지에서 28°C, 3일 동안 배양한 후 배양된 균사 가장자리를 코르크 보러(직경 5 mm)로 균일하게 절단하여 인위 접종원으로 사용하였다. 고추 마지막 분지의 첫 번째 잎을 전수 샘플링하여 고추 역병균 균사조각을 잎 가운데에 올려둔 후 습실

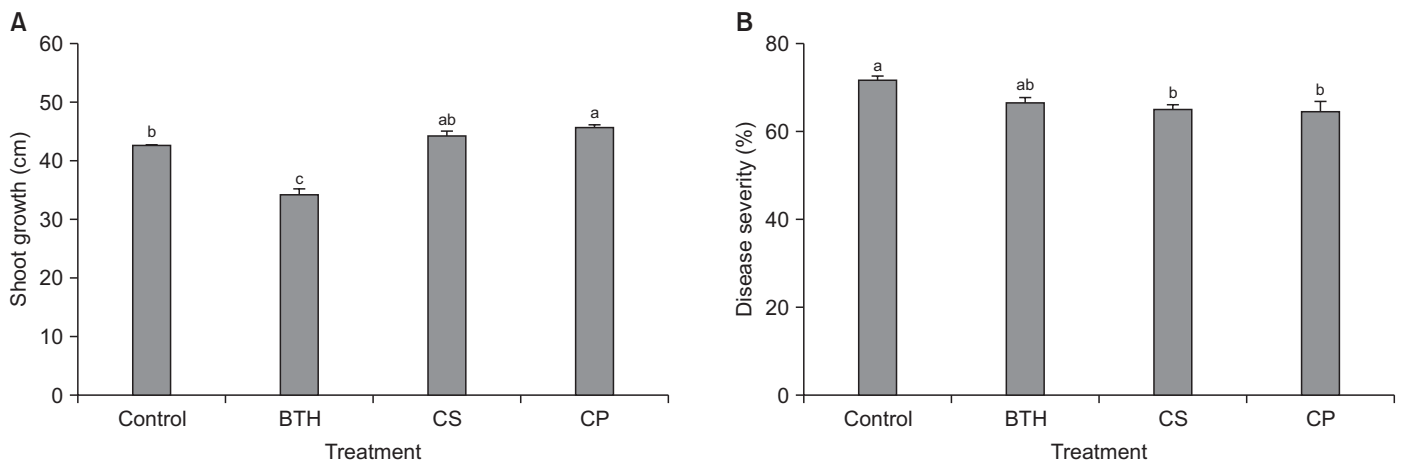


Fig. 1. Shoot length (A) and disease severity (B) by *Phytophthora capsici* in leaves of pepper plants. Pepper seeds were sown in 50-hole tray containing potting soil mixed with CP (clay based formulation of BS07M) or drench-treated with control (10 mM MgSO₄ solution), BTH (0.1 mM), or CS (bacterial cell suspension) on February 23, 2016. The plants were transplanted into the beds on April 25, 2016. Measurement of shoot length and artificial inoculation of *P. capsici* on detached leaf were performed at June 9, 2016. Disease severity was evaluated two days after inoculation. Each letter on the bars indicates significant difference by least significant difference test at $P < 0.05$. The experiment was conducted with four replications of 20 plants each. BTH, benzothiadiazole; CS, cell suspension; CP, clay pellet.

생장실(상대습도 약 100%, 28°C)에서 48시간 동안 배양한 후, 병반면적을 Kwack 등 (2005)의 방법에 따라 평가하였다. CS와 CP는 대조구에 비하여 고추 잎에서 역병에 의한 병반면적을 감소시키는 효과가 있었다(Fig. 1B).

고추 수량 증가 효과를 평가하기 위해 고추 열매(8 cm 이상)를 2회(2016년 7월 14일, 8월 31일) 수확하여 측정된 결과, 첫 번째 수확(7월 14일)에서 고추 한 주당 열린 고추 열매의 총 무게는 CS와 CP에서 대조구보다 증가하는 경향은 있었으나 통계적 차이는 없었으며, BTH 처리구를 제외하고 대조구와 유사하였다. 고추 열매당 무게는 CS와 CP에서 대조구보다 증가하였으나, 두 번째 수확에서는 증가하는 경향은 있지만 통계적으로 처리 간 차이가 없었다(Table 1). 고추의 개화 적정 온도는 18°C–23°C이며, 30°C 이상에서는 꽃눈 분화가 불량하거나 분화가 되더라도 착화 및 착과율이 낮아질 수 있는데(Kim 등, 2013), 농업기상정보서비스(<http://weather.rda.go.kr>)에 의하면 시험포장의 6–8월 최고기온이 각각 25.0°C, 30.4°C, 31.8°C로 2015년 동일 기간에 각각 26.8°C, 28.5°C, 29.0°C였던 것에 비해 7–8월 최고 기온이 30°C 이상이 되었다. 이에 1차 수확기(7월 14일) 전후에 고추의 개화와 수분, 수정에 영향을 받아 2차 수확기(8월 31일) 때까지 이어졌을 가능성이 있다. 또한, 2016년 6–8월 강수량이 각각 58.5, 255.0, 22.5 mm로 2015년 132.5, 94.0, 47.0 mm였던 데 비하여

7월에 집중된 것도 영향을 주었을 수 있다. 1차 수확기 때 CS와 CP처리에 의해서 고추 열매당 무게를 증가시킨 것과 유사한 경향이 이후에도 CP처리에서 관찰되는 것은 CP처리가 개화된 이후에 과실의 발육을 향상시킨 것으로 예상된다. CP의 제형을 만드는 데 사용한 점토는 수분을 흡수하여 미생물이 서식하는 데 일정한 습도를 유지시켜 미생물 생존 환경을 안정적으로 유지하여 미생물의 활성을 유지시켜주는 데 중요한 역할을 했을 수 있다(Fravel, 2005). 반면, BTH의 경우 고추 잎에서 역병을 인위적 접종했을 때 병을 감소시켜 병 억제 효과가 있었지만 고추 초장의 길이와 수확량을 감소시키는 것이 관찰되었다(Fig. 1, Table 1). 이와 유사한 현상이 밑에서 보고되었으며(Stadnik과 Buchenauer, 1999) 이러한 현상은 병저항성과 생육과 관련된 대사적 경쟁에 의해 수확량이 감소하는 것으로 생각된다(Heil 등, 2000).

고추 열매에서 탄저병에 대한 억제 효과를 검정하기 위하여, 고추 탄저병원균(*Colletotrichum acutatum*, KACC40042)을 potato dextrose agar (PDA; Difco Inc.)에 28°C에서 5일간 배양한 후, 코르크 보리(직경 5 mm)로 균사 가장자리를 균일한 조각으로 준비하여 접종원으로 사용하였다. 고추 열매는 포장에서 각 블록당 임의 추출(10개)하여 사용하였으며, 고추 열매에 탄저병원균을 균사 접종한 후 습실생장실(상대습도 약 100%, 28°C)에서 2일간 배양하고, 28°C 16시간 광, 8시간 암조건에서 8일간 배양한 후 병반 길이를 측정하였다. BTH와 CP의 경우 대조구에 비하여 병반 길이가 감소하였으며, CS의 경우 탄저병 감소 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 2).

Table 1. Fruit production of pepper plants under field condition in 2016

Treatment*	First harvest [†]		Second harvest	
	Fruit weight (g)/ plant	Fresh weight (g)/ fruit	Fruit weight (g)/ plant	Fresh weight (g)/ fruit
Control	634.2±48.9 a	11.0±0.5 b	376.3±62.9 a	5.1±0.1 a
BTH	486.2±40.6 b	10.3±0.7 b	377.4±83.4 a	5.8±1.2 a
CS	685.6±71.1 a	12.9±0.6 a	399.5±70.2 a	5.7±0.3 a
CP	675.2±56.1 a	12.8±0.9 a	365.2±47.2 a	6.2±0.3 a

Values are presented as mean±standard deviations within a column followed by the same letter are not significantly different when tested with least significant difference at $P<0.05$.

BTH, benzothiadiazole; CS, cell suspension; CP, clay pellet.

*Pepper seeds were sown in 50-hole tray containing potting soil mixed with CP (clay based formulation of BS07M) or drench-treated with control (10 mM MgSO₄ solution), BTH (0.1 mM), or CS (bacterial cell suspension) on February 23, 2016. The plants were transplanted into the beds on April 25, 2016.

[†]Fruit weight per plant and fresh weights (g) per fruit were determined from two harvests on July 14, 2016 and August 31, 2016. At the first harvest, only unripe (green) pepper fruits were collected and at the second harvest, ripe (red) fruits were collected. The experiment was conducted with four replications of 20 plants each.

고추 열매의 수확 후 저장성 검정. 고추 열매는 탄저병 접종시험과 동일하게 각 블록당 임의 추출하여 사용하였으며, 고추 10개를 지퍼백(18×20 cm)에 담아 3주 동안 4°C에 냉장보관한 후 자연 발생한 꼭지썩음병과 무름증상 병징을 발생률(%)로 평가하였다. CS처리에 의해 꼭지썩음병이 감소되는 경향은 있지만 통계적으로 대조구와 유의성은 없었으며, 고추 열매의 무름 증상은 CS와 CP처리의 경우 대조구에 비해 감소되었다(Fig. 3). 고추 열매의 큐티클 왁스층이 병원균 침입으로부터 보호하는 데 중요한 역할을 하는 것(Oh 등, 1999)으로 보아 이러한 현상은 CS와 CP에 의해 고추 한 주당 열매의 무게가 증가한 것과 관련하여 이들 처리에 의해 과피의 두께를 비롯한 과실의 발달이 향상되어 고추 무름 증상이 감소된 것으로 생각된다. 또한 미생물에 의해 기주 식물의 세포벽이 화학적으로 변화하여 병저항성 유도와 관련이 있을 수 있다는 보고가 있으므로(Droby 등, 2002; Jabaji-Hare 등, 1999) 열매의 화학적 변화 유도에 의한 병 억제 현상

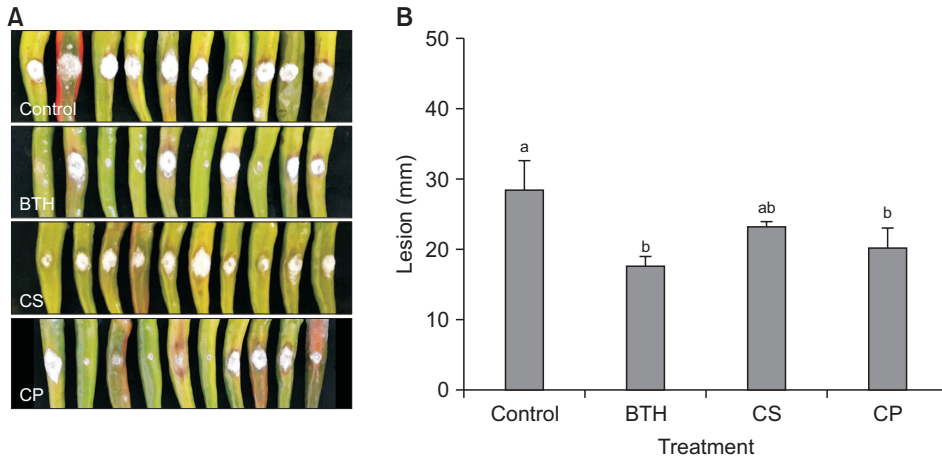


Fig. 2. Symptoms (A) and lesion diameter (B) on fruits artificially inoculated with mycelia of *Colletotrichum acutatum*. Tested pepper fruits were randomly collected at first harvest, July 14, 2016. Each letter on the bars indicates significant difference by least significant difference test at $P < 0.05$. The experiment was conducted with four replications of 10 fruits each. Pepper seeds were sown in 50-hole tray containing potting soil mixed with CP (clay based formulation of BS07M) or drench-treated with control (10 mM $MgSO_4$ solution), BTH (0.1 mM), or CS (bacterial cell suspension). BTH, benzothiadiazole; CS, cell suspension; CP, clay pellet.

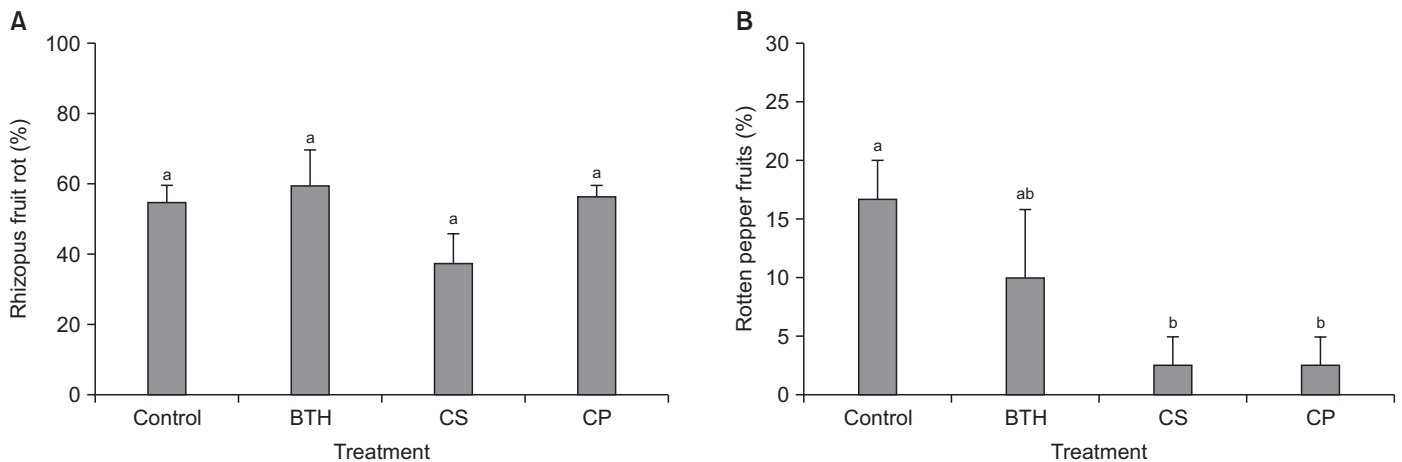


Fig. 3. Rhizopus fruit rot (A) and rotten pepper fruits (B) of pepper plants. Tested pepper fruits were randomly collected at first harvest, July 14, 2016. Collected pepper fruits were packed into plastic bag (18x20 cm) and stored in 4°C for three weeks. Rhizopus fruit rot and rotten fruit were naturally occurred. Each letter on the bars indicates significant difference by least significant difference test at $P < 0.05$. The experiments were conducted with four replications of 10 fruits each. Pepper seeds were sown in 50-hole tray containing potting soil mixed with CP (clay based formulation of BS07M) or drench-treated with control (10 mM $MgSO_4$ solution), BTH (0.1 mM), or CS (bacterial cell suspension). BTH, benzothiadiazole; CS, cell suspension; CP, clay pellet.

에 대해서는 추후에 연구가 더 필요할 것이다. 이상과 같이, CP를 육묘상토에 혼합하여 고추를 육묘하면 정식 이후 포장에서도 효과가 지속되어 고추 열매의 질적 생산을 향상시키고, 수확 후 고추의 무름증상을 완화하여 유통 중 또는 고추를 냉장보관할 때 보관 기간을 늘리는 이점을 줄 수 있을 것이라 생각된다.

요 약

식물 성장촉진근권세균 *B. vallismortis* BS07M을 점토로 제형화한 제제(CP)는 고추의 생육촉진 및 병저항성 유도 효과를 보였다. CP를 육묘 상토에 혼합하는 것은 기존의 세균 현탁액을 육묘 또는 포장에서 재배 중에 관주·살포하는 방법

에 비해 비교적 사용하기 쉽고, 그 효과가 포장에서도 지속됨으로써 고추의 열매 개당 무게를 증가시켰으며, 수확 후 저장 중에 자연적으로 발생하는 무름 증상을 감소시킴으로써 보관기간을 늘리는 효과가 있을 것이다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

This research was supported by a research grant (Project No.

PJ009991) from Rural Development Administration, Republic of Korea. We would like to thank S.K. Lee, J.I. Youn, J.Y. Nam., S.J. Yoo, and J.E. Mun for their help in conducting field test.

References

- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E. and Porat, R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology* 92: 393-399.
- Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 337-359.
- Fravel, D. R., Connick Jr, W. J. and Lewis, J. A. 1998. Formulation of microorganisms to control plant disease. In: Formulation of Microbial Biopesticides, ed. by H. D. Burges, pp. 187-202. Kluwer Academic Publishers, London, UK.
- Glick, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)* 2012: 963401.
- Haas, D. and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307-319.
- Heil, M., Hilpert, A., Kaiser, W. and Linsenmair, K. E. 2000. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *J. Ecol.* 88: 645-654.
- Jabaji-Hare, S., Chamberland, H. and Charest, P. M. 1999. Cell wall alterations in hypocotyls of bean seedlings protected from *Rhizoctonia* stem canker by a binucleate *Rhizoctonia* isolate. *Mycol. Res.* 103: 1035-1043.
- Jiang, Z. Q., Guo, Y. H., Li, S. M., Qi, H. Y. and Guo, J. H. 2006. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against Phytophthora blight of bell pepper. *Biol. Control* 36: 216-223.
- Kim, S. H., Heo, Y., Park, E. G., Son, B. G., Choi, Y. W., Lee, Y. J., Park, Y. H., Suh, J. M., Cho, J. H., Hong, C. O., Lee, S. G. and Kang, J. S. 2013. The influence of temperature, amino acid and polyamine on pollen germination of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Life Sci.* 47: 1-8. (In Korean)
- Kwack, M. S., Kim, E. N., Lee, H., Kim, J. W., Chun, S. C. and Kim, K. D. 2005. Digital image analysis to measure lesion area of cucumber anthracnose by *Colletotrichum orbiculare*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 418-421.
- Lee, K. J., Kamala-Kannan, S., Sub, H. S., Seong, C. K. and Lee, G. W. 2008. Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1139-1145.
- Liu, K., Garrett, C., Fadamiro, H. and Kloepper, J. W. 2016. Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 99: 8-13.
- Oh, B. J., Kim, K. D. and Kim, Y. S. 1999. Effect of cuticular wax layers of green and red pepper fruits on infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Phytopathol.* 147: 547-552.
- Park, J. W., Balaraju, K., Kim, J. W., Lee, S. W. and Park, K. 2013. Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. *Biol. Control* 65: 246-257.
- Sabaratham, S. and Traquair, J. A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. Control* 23: 245-253.
- Sang, M. K., Chun, S. C. and Kim, K. D. 2008. Biological control of Phytophthora blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biol. Control* 46: 424-433.
- Sang, M. K., Dutta, S. and Park, K. 2015. Influence of commercial antibiotics on biocontrol of soft rot and plant growth promotion in Chinese cabbages by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 and BS07M. *Res. Plant Dis.* 21: 255-260.
- Sharma, R. R., Singh, D. and Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol. Control* 50: 205-221.
- Stadnik, M. J. and Buchenauer, H. 1999. Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivative and modern fungicides. *J. Plant Dis. Prot.* 106: 466-475.
- Stommel, J. R., Goth, R. W., Haynes, K. G. and Kim, S. H. 1996. Pepper (*Capsicum annuum*) soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Dis.* 80: 1109-1112.