

GOVP1199414620

疫病菌에 對한 拮抗菌 利用 研究

**Studies on Utilization of  
Antagonists to Pathogens of  
Phytophthora Diseases**

研 究 機 關

農村振興廳 農業技術研究所

科 學 技 術 處

# 提 出 文

科 學 技 術 處 長 官 貴 下

本 報 告 書 를 “ 疫 病 菌 에 對 한 拮 抗 菌 利 用 研 究 ”  
課 題 的 1 次 年 度 報 告 書 로 提 出 합 니 다 .

1987. 5. 28

主 管 研 究 機 關 名 : 農 村 振 興 廳 農 業 技 術 研 究 所

總 括 研 究 責 任 者 : 李 銀 鍾

研 究 員 : 趙 義 奎

芮 完 海

金 政 洙

梁 成 錫

朴 涇 錫

池 亨 鎮

金 炳 燮

孫 瑞 圭

崔 容 壽

여 백

# 要 約 文

## I. 題 目

疫病菌에 對한 拮抗菌 利用研究

## II. 研究開發의 目的 및 重要性

現在 우리나라의 農家所得에 크게 기여를 하고 있는 고추, 참깨栽培에서 가장 被害를 많이 주는 病害는 疫病으로써 農藥 등에 의한 防除에 의하여 일부 被害를 輕減시키고 있으나 病原菌이 土壤傳染되는 微生物이므로 매년 문제가 되고 있음. 특히 우리나라에서는 경지면적의 零細化로 인하여 連作이 불가피한 實情이며 이에 따른 土壤傳染病害가 계속 增加하고 있다. 따라서 본 研究에서는 連作地 土壤中에서 疫病菌에 대하여 拮抗作用이 있는 微生物을 分離同定하여 生物學的 防除技術을 確立할 目的으로 수행 되었다.

本 研究는 連作障害의 解決과 無公害 防除技術 開發에 의한 經濟作物 安定생산에 기여할 수 있는 것으로 반드시 수행되어야 할 尖端研究라고 할 수 있다.

## III. 研究開發의 內容 및 範圍

本 研究는 고추, 참깨 疫病을 防除하기 위하여 土壤中에 있는 微生物中에 疫病을 抑制할 수 있는 拮抗菌을 分離同定하고 이 拮抗菌을 大量增殖할 수 있는 製型을 開發하여 이들을 被害地域에서 직접 實用化할 수 있는 生物學的 防除體系를 樹立하고자 함.

區 分	研究開發의 內容	研究開發範圍
1 次年度 (1986 ~ '87)	拮抗菌의 純粹分離	拮抗菌 同定, 力價, 病原性, 利用效率 檢定
2 次年度 (1987 ~ '88)	拮抗菌 增量製型開發	拮抗菌 增量材 選拔, 拮抗菌 製型開發, 密度變化, 防除價調查
3 次年度 (1988 ~ '89)	生物學的 防除技術 確立	製品別 圃場處理方法 및 防 除價 究明

#### IV. 研究開發 結果 및 活用に 對한 建議

고추疫病菌 (*Phytophthora capsici*)에 대한拮抗菌 20점, 참깨疫病菌 (*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*)에 대한拮抗菌 22種이 分離되었으며 그중에서 가장 유망시 되는 단일菌株를 利用하여 拮抗菌 製品研究에 供試하고자 함.

## SUMMARY

Production of the major economic crops, hot pepper (*Capsicum annum* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.) have been hampered due to severe incidence of Phytophthora diseases. The Phytophthora blight in pepper is caused by *Phytophthora capsici* Leonian and the Phytophthora blight in sesame is caused by *P. nicotianae* var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse. Since both of the pathogens are soilborne, incidence of the diseases has been increased gradually as the cultivation of both crops has been increased widely. Because of limitation of cultivation area, continuous cropping with hot pepper or sesame brought to severe yield losses by the diseases.

Chemicals spraying did not give satisfactory effects because of nature of the pathogens that are soilborne. In natural habitat of soil, microorganisms thrive in natural balance, which compete each other, are antagonistic and of exploitation relationship. However, continuous monocropping with hot pepper or sesame might break the natural balance leading to dominance of pathogens. In order to revert the natural community in soil under continuous cropping system the studies aimed to investigate a biological agent from the soil. Twenty isolates and twenty two isolates obtained from soil was found to be antagonistic to *Phytophthora capsici* and *P. nicotianae* var. *parasitica*, respectively. Some of them showed significant suppressive effects on development of both diseases.

여 백

## CONTENTS

Chapter I. Introduction.....	13
Section 1. Principle of biological control.....	13
Section 2. Characteristics of Phytophthora blight in pepper	16
Section 3. Characteristics of Phytophthora blight in sesame .....	22
Section 4. Literature review .....	26
Chapter II. Materials and Methods .....	32
Section 1. Isolation of antagonistic microorganisms to <i>Phytophthora capsici</i> .....	32
1. Test soil samples and materials .....	32
2. Pure culture of isolates .....	33
3. Selection of antagonists	
a) Experiments <i>in vitro</i> .....	35
b) Experiments in the greenhouse .....	37
Section 2. Isolation of antagonistic microorganisms to <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> .....	38
1. Test soil samples and materials .....	38
2. Pure culture of isolates .....	38
3. Selection of antagonists .....	39
a) Experiments <i>in vitro</i> .....	39
b) Experiments in the greenhouse .....	40
Section 3. Identification of antagonists .....	40
1. Cultural characteristics .....	40
2. Electron microscopy .....	40
3. Morphological and physiological characteristics .....	40



Chapter III. Results and Discussion .....	44
Section 1. Selection of antagonists to <i>Phytophthora</i>	
<u>capsici</u> .....	44
1. Pure isolation of microorganisms from soil ....	44
2. Selection of antagonists .....	44
a) Experiments <i>in vitro</i> .....	44
b) Experiments <i>in vivo</i> .....	49
Section 2. Selection of antagonists to <i>P. nicotianae</i> var.	
<i>parasitica</i> .....	53
1. Pure isolation of microorganisms from soil .....	53
2. Selection of antagonists .....	53
a) Experiments <i>in vitro</i> .....	53
b) Experiments <i>in vivo</i> .....	59
Section 3. Identification of antagonists to <i>Phytophthora</i>	
spp. ....	62
1. Cultural characteristics .....	62
2. Electron microscopy .....	65
3. Identification results .....	65
Chapter IV. References .....	70

Color plates	
Photo 1. Severe incidence of Phytophthora blight in pepper caused by <i>Phytophthora capsici</i> -----	23
Photo 2. <i>Phytophthora capsici</i> -----	23
Photo 3. Severe incidence of Phytophthora blight in sesame -----	24
Photo 4. Symptoms of Phytophthora blight in sesame caused by <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> -----	24
Photo 5. Suppressive effects on development of Phytophthora blight in pepper -----	57
Photo 6. Suppressive effects on development of Phytophthora blight in sesame -----	57
Photo 7. Antagonistic inhibition of mycelial growth in <i>Phyto-</i> <i>phthora</i> spp. ....	58
Photo 8. Cultural characteristics of antagonistic bacteria on potato dextrose agar -----	58

여 백

# 目 次

第 1 章 序 論 .....	13
第 1 節 生物學的 防除原理 .....	13
第 2 節 고추疫病的 特性 및 發生狀況 .....	16
第 3 節 참깨疫病的 特性 및 被害狀況 .....	22
第 4 節 文獻的 考察 .....	26
第 2 章 材料 및 方法 .....	32
第 1 節 高추疫病菌에 對한 拮抗菌 分離 .....	32
1. 供試土壤 및 材料 .....	32
2. 土壤微生物 純粹分離 .....	33
3. 土壤微生物中 拮抗菌 選拔 .....	35
가. 室內試驗 .....	35
나. 溫室 Pot 試驗 .....	37
第 2 節 참깨 疫病菌에 對한 拮抗菌 分離 .....	38
1. 供試土壤 및 材料 .....	38
2. 土壤微生物의 純粹分離 .....	38
3. 土壤微生物中 拮抗菌 選拔 .....	39
가. 室內試驗 .....	39
나. 溫室 Pot 試驗 .....	40
第 3 節 疫病菌에 對한 拮抗菌의 分類 同定 .....	40
1. 培養的 特性 .....	40

2. 電子顯微鏡 觀察 .....	40
3. 形態的 및 生理的 特性 調查 .....	40
<b>第 3 章 試驗結果 및 考察 .....</b>	<b>44</b>
第 1 節 고추 疫病菌에 對한 拮抗菌 分離 .....	44
1. 土壤微生物의 純粹分離 .....	44
2. 土壤微生物中 拮抗菌 選拔 .....	44
가. 室內試驗 .....	44
나. 溫室 Pot 試驗 .....	49
第 2 節 참깨 疫病菌에 對한 拮抗菌 分離 .....	53
1. 土壤微生物의 純粹分離 .....	53
2. 土壤微生物中 拮抗菌 選拔 .....	53
가. 室內試驗 .....	53
나. 溫室 Pot 試驗 .....	59
第 3 節 疫病菌에 對한 拮抗菌의 分類 同定 .....	62
1. 培養的 特性 .....	62
2. 電子顯微鏡 觀察 .....	65
3. 分類同定 結果 .....	65
<b>第 4 章 參考文獻 .....</b>	<b>70</b>

# 第1章 序 論

## 第1節 生物學的 防除原理

生物學的 農作物 病虫害防除란 拮抗 (Antibiosis), 競爭 (Competition) 또는 利用 (Exploitation) 관계에 있는 自然生態界의 原理에 따라 農作物에 被害를 주는 病原微生物 또는 害虫을 生物로서 防除하는 것이다. 따라서 土壤傳染性病의 生物學的 防除란 土壤속에 있는 生物을 人爲적으로 조절함으로써 病害의 大發生을 防除하는 것이라고 할 수 있다.

作物을 栽培하는 土壤속에는 病原菌뿐만 아니라 真菌, 細菌, 線虫, 原生動物 등 많은 微生物이 있으며 이들간에는 서로 自然的 均衡 (Natural Balance) 을 이루고 있다. 그러나 同一 作物을 連作하게 되면 이러한 自然均衡狀態가 깨어지게 되고 土壤化學性 및 物理性 변화에 따른 連作障害까지 유발하게 된다. 土壤傳染性病의 측면에서 보면 土壤微生物中에서 病原菌만이 土壤內에 優點種이 되어 連作을 하면 할수록 土壤傳染性病害는 증가하기 마련이다. 土壤傳染性病害를 防除하기 위하여 農약을 사용하는 土壤消毒도 생각할 수 있으나 現實적으로 非經濟的이고 토양혼중 이외에는 뚜렷한 效果를 보기 어렵다

### 1. 拮抗菌의 種類와 實用化 條件

植物病을 防除하는데 이용되었거나 이용가능성이 있는 微生物에는 *Agrobacterium* 등 31種이 있으며 *Hansforda*, *Penicillium* 등의 5種은 일부 실용화 되고 있다. 이러한 拮抗菌이란 植物病原菌이 病害를 유발시키는 과정중 傳染源을 파괴하거나 密度 또는 活力

을 감소시키는 機作을 가지고 있는 微生物이다. 그러나 土壤傳染性病原菌을 억제하기 위하여 拮抗菌을 이용하고자 할 때에는 다음과 같은 菌의 특성이 우선적으로 고려되어야 할 것이다.

첫째, 人畜에 대하여 病原성이 없어야 함은 물론 알레르기 등의 부작용이 없어야 한다. 둘째, 대상작물에 대하여 病原성이 없고 土壤에 大量投入된 후에 다른 작물에도 영향이 없어야 한다. 셋째, 토양내의 排水不良 등 病이 多發할 環境變化時에도 拮抗菌의 活性은 유지되어야 한다. 넷째, 拮抗菌이 토양속에 投入되었을 때 土壤生態界에 적응되어야 한다. 다섯째, 拮抗菌 活性 增大로 또다른 病害를 誘發하지 않아야 한다.

## 2. 拮抗菌에 관한 研究結果

農技研 病理科 真菌生理研究室에서는 '84년부터 우리나라 經濟作物 病害中 農藥으로 방제하기 어려운 土壤傳染性病을 生物學的으로 방제하기 위한 研究가 시작되었다. 研究對象病害는 참깨 및 채소류에서 종자발아를 나쁘게 하고 발아후에도 모잘록을 일으키는 잘록병 (立枯病) 이었다. 일반적으로 拮抗菌은 抑制土壤 (Suppressive soil) 에서 病發生이 억제되는 원인을 구명하기 위하여 연구하는 과정에서 분리되어 왔다. 그러나 반대로 病이 발생한 토양속에서도 비록 病原菌을 억제할 수 있는 拮抗菌의 活性은 떨어진다고 하더라도 토양내의 微生物 自然均衡을 이룰 수 있는 拮抗菌이 存在한다고 볼 수 있으므로 잘록병이 발생한 토양에서 拮抗菌 分離를 시도하였다. 그 결과 8種의 細菌이 純粹分離되어 이들 각각이 잘록병을 일으키는 病原菌인 *Rhizoctonia solani* 에 대한 拮抗菌으로서의 適否를 조사하게 되었다.

8種의 細菌 (A……H) 중 5種이 잘록病菌의 生長을 억제하는 것으로 判明되었으며 E菌 (*Bacillus subtilis*로 同定되었음)의 抑制 效果가 가장 좋았다. 또한 이들 각각의 土壤分離菌이 배추에 病原性이 있는지 그리고 발아에 어떠한 영향을 미치는가를 究明하기 위하여 殺菌土壤에 接種하고 또는 濕室處理하여 종자의 발아율을 조사하였다. 8種의 細菌중 拮抗作用이 가장 높았던 E菌 (*Bacillus subtilis*) 이 사례에서는 殺菌水로 濕室處理한것 보다도 배추의 발아율이 높았고 토양에 처리하였을 때에도 100%의 발아율을 나타내어 이 拮抗菌이 발아율을 촉진시키는 유리한 특성이 있음이 밝혀졌다. 그러나 拮抗作用이 있던 一部 菌株은 배추종자 發芽를 阻害하여 잘록病菌에 대한 拮抗菌으로서는 적합하지 않은 것으로 나타났다. 토양에서 분리한 8種의 細菌을 잘록病菌과 混合 接種하였을 때 E菌은 濕紙處理에서는 발아율이 97.3%로서 잘록病菌 單獨處理時의 2.7%보다 월등한 效果를 나타내었으나 土壤處理時에는 56%로서 效果는 인정되었으나 방제 효과는 저조하였다. 따라서 拮抗菌의 效果를 증진시키기 위하여 混合比率를 잘록병 : 拮抗菌 (*Bacillus subtilis*) 를 1 : 2 比率로 처리한 결과 94.6%의 우수한 방제 효과를 얻을 수 있었다.

### 3. 拮抗菌 研究 方向

室內試驗과 Pot 試驗으로 拮抗菌이 選拔되었고 잘록病 방제 효과가 인정되었지만 拮抗菌을 이용한 土壤病害防除를 어떻게 실용화할 수 있는지가 가장 큰 문제점으로 남게 된다. 또한 拮抗菌을 이용한 토양병해 방제란 室內試驗에서만 가능하고 실용화란 불가능한 것이 아니냐는 의문점이 남아있는 것은 사실이다. 그러나 拮抗菌을 利用한 土壤病害 防除는 이미 農家에서 실용화되고 있다고 할 수 있다. 예



를 들면 퇴비를 많이 쓴다든지 계분 등을 施用하는 것, 그밖에 土壤改良을 하여줄 때 土壤病害의 發生이 줄어들는 것 등이다. 다만 拮抗菌의 活性을 자연에 맡겨놓은 상태이기 때문에 어떤 경우에는 拮抗菌의 活性이 높아져서 病防除效果가 나타나고 어떤 경우에는 拮抗菌의 活性이 미미하여 방제효과를 보기 어려운 것이다. 따라서 拮抗菌을 이용한 土壤病害의 방제란 특정한 病原菌에 대한 拮抗菌을 찾아내어 土壤改良處理材料에 添加하여 줌으로써 그 效果를 安定的으로 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 土壤傳染性病害도 2次的으로는 空氣傳染도 되기 때문에 농약을 이용한 化學的 防除도 加味되어야 충분한 방제효과가 나타날 것이다. 또한 지금까지의 研究結果는 잘록병에 한정되었지만 앞으로는 경제작물 土壤病害中 가장 被害가 심한 고추, 참깨 疫病에 대한 生物學的 防除法 연구로 擴大되어야 할 必要가 있으므로 본 研究를 수행하게 되었다.

## 第 2 節 고추疫病的 特性 및 發生狀況

### 1. 疫病的 種類

안톤 디 바리가 1876년 감자와 토마토에서 疫病을 일으키는 감자疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 을 처음 보고한 이래 1979년 현재 疫病菌의 種類가 44種에 이르고 있다. 그중에서 한국에서 공식적으로 기록된 疫病菌의 種類는 고추疫病菌 (*Phytophthora capsici* Leonian) 등 13種類가 있다. 疫病에 피해를 받는 식물을 보면 파, 호박, 인삼, 사과, 밤나무, 굴, 토란, 메밀, 감자, 토마토, 오이, 담배, 가지, 참외, 팔, 콩, 참깨와 고추가 있다.

고추에서 疫病을 일으키는 病原菌은 한국에서는 고추와 호박에서

피해를 주는 것으로 보고되어 있다. 그러나 病原菌의 寄主範圍 특성으로 보아 토마토, 가지, 오이, 참외, 수박에서도 피해를 줄 수 있다. 그러나 고추에서는 특징적인 피해가 뿌리와 줄기썩음 증상으로 나타나지만 호박 등 기타 채소類에서는 포기자체를 말라죽게 하기보다는 열매에 피해를 준다. 고추 疫病 피해가 많았던 밭에 호박을 栽培하여 장마후에 피해를 받았던 사례가 '86년 경기도 여주에서 있었다. (사진 1 참조)

## 2. 고추 疫病菌의 特性

고추 疫病菌은 菌絲에 隔膜이 없고 유주자낭을 볼 수 있는 藻菌에 속하는 菌이다. 土壤中에서 오랫동안 生存할 수 있는 形態는 藏精器와 藏卵器가 결합하여 생기는 卵胞子이다. 따라서 고추 連作地에서 疫病이 土壤傳染되는 것은 卵胞子が 越冬하여 습도 및 온도가 적합할 때 유주자낭을 형성, 역병을 일으키게 된다. 卵胞子が 발아하는데에는 15 ~ 30 °C 범위가 가능한 온도이며, 난포자에서 유주자낭이 형성될 수 있는 온도범위는 21 ~ 33 °C이다.

일반적으로 역병이 발생하기에 알맞은 온도는 24 ~ 27 °C로 알려져 있다. 그러나 疫病發生에 가장 영향을 미치는 요인을 병원균 특성으로 볼 때 感染形態인 유주자낭이 어떤 조건에서 많이 形成되는가에 따라 좌우된다.

'86년 農技研 病理科에서 試驗한 결과를 보면 27 °C에 계속 培養하였을 때 보다도 培養溫度를 다르게 하였을 때 유주자낭이 더 많이 形成되었다.

고추 疫病菌의 生活史를 보면 고추를 栽培하고 있는 여름에는 無性生殖에 의하여 유주자낭이 형성되고 遊走子가 분출되어 疫病을 일

으키고 다시 병든 부위에서 遊走子낭이 형성되어 비바람에 의하여 전파되고 감염을 일으키게 된다. 겨울과 같이 고추가 栽培되지 않을 때에는 休眠體인 卵胞子를 形成하여 生存하였다가 다시 발아하여 生活史가 연결된다. (사진 2 참조)

### 3. 고추疫病 被害現況

'86년 疫病發生은 전국적으로 볼 때 피해가 많다고 할 수는 없었으나 밭에 따라서는 100% 피해를 받은 곳도 많았다. 고추 주산단지인 충북 증원군, 경북 의성군, 전북 임실군에서 連作障害 원인 구명 조사시에 疫病被害를 調査한 결과 平均疫病罹病株率이 36.2%였다. 時期別 疫病發生을 후기에 피해가 많았던 圃場을 중심으로 보면 5월 20일경에 發生하기 시작하여 6월하순에 罹病株率이 10% 이상이 되었을 때 疫病被害가 급속히 증가되는 것을 알 수 있었다. 즉 生育初期에 10%이상 되어 生育後期에 역병의 傳染源이 많아졌기 때문에 50%이상 피해를 받은 농가는 全調査 農家圃場 60個 圃場 중 20%에 달하는 12개 圃場이었다.

반면에 疫病罹病株가 생육초기에 전혀 발견되지 않았거나 10% 미만의 罹病株率을 나타낸 포장에서는 生育後期인 9월 하순까지도 疫病發生이 전혀 없거나 10%미만의 피해를 받은 것으로 나타났다. 이러한 圃場比率은 60개 조사포장중 23개 포장으로 38%에 해당되었다. 그러나 초기에는 疫病罹病株가 없었으나 경사진 밭에서 위에 있는 밭에 疫病이 發生하였거나 경사진 밭의 上位地點에 疫病이 發生하여 생육후기에 50%이상 피해를 받은 포장은 8개 圃場으로 13.3%의 比率을 나타냈다.

전조사포장에서의 疫病被害株率로 볼 때 1%미만의 疫病發生 圃場은 21.7

%, 10%미만의 역병피해를 받은圃場比率은 15.0%, 10%에서 30%까지 역병이 발생한圃場比率은 25.0%, 31~57%의 역병피해주율을 나타낸 포장비율은 5.0%, 60%이상 疫病이 발생하여 피해가 많았던 농가의 비율은 33.3%이었다. 調査圃場中 特記할 사항은 疫病發生初期에 농약을 灌注하여 역병의 피해를 적게 받은 농가도 지역에 따라 1~2개의 포장이 있었다는 것이었다.

#### 4. 고추疫病的 發生環境

고추를 栽培할 때 매년 疫病이 發生하고 피해를 주는 까닭은 크게 두가지 原因으로 나누어 생각하여 볼 수 있다. 첫째는 傳染源이 많다는 것이고 둘째는 傳染源으로부터 病原菌이 쉽게 전파될 수 있는 발생환경 때문이라고 할 수 있다. 노지에서 5월까지 고추를 재배하지 않는 우리나라에서는 고추 역병의 제 1차 전염원은 토양전염되는 疫病菌이다. 越冬形態인 고추 역병균의 卵胞子는 土壤속에서 2~3년간 生存할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 고추를 連作한다는 것은 自然的으로 병원균의 密度를 높여 傳染源을 증가시키는 결과가 된다고 볼 수 있다.

고추疫病的 전파에 가장 영향을 많이 미치는 環境條件은 물이라고 할 수 있다. 따라서 여름기간동안 장마가 지거나 집중호우가 내리는 우리나라 기후 조건으로 보아 疫病은 每年 被害를 가져오는 고질적인 病害라고 할 수 있다. '86년 고추連作地의 連作障害 조사결과 病理學的 側面에서 문제점을 구분하여 보면 다음과 같다. 첫째, 고추 育苗時에 病原菌이 없는 흙을 床土로 사용할 必要가 있는데 대부분은 고추를 連作한 밭의 흙을 그대로 床土로 이용하고 있다. 둘째, 고추밭에 石灰를 10a 당 100~150 kg, 퇴비의 2,500 kg이상 사용하여

야 함에도 불구하고 퇴비나 석회를 충분히 사용하고 있지 않았다. 세째, 一部 農家에서는 고추를 쓰러지지 않도록 하는 方法으로 아랫줄기까지 흙속에 묻힐 정도로 깊게 심고 있다. 네째, 이랑높이를 20 cm이하로 얇게 만들기 때문에 비가 많이 오거나 집중호우가 내렸을 때에는 고추포기가 일시적으로 침수가 되는 결과가 되어 病原菌이 쉽게 전파되어 病害가 發生하기 쉽다. 다섯째, 밭주위에 排水路를 깊게 파지않고 이웃밭과 연결되어 있으므로 이웃밭에 역병이 발생하였을 때에는 쉽게 전파되고 있다. 여섯째, 고추밭에 역병에 걸린 포기가 한, 두포기 발견되었을 때 즉 疫病發生 初期에 防除를 소홀히 하고 있다. 일곱째, 罹病物을 밭에 그대로 내버려 두고 있다. 그리고 무엇보다도 疫病常習地에도 계속 고추를 連作하고 있는 것이 가장 중요한 문제점이었다.

##### 5. 生物學的 防除 研究

고추疫病菌을 防除하기 위해서는 위에서 지적한 바와 같이 지금까지의 고추栽培方法 중에서 역병이 발생하기 쉬운 조건들을 改善할 必要가 있다. 또한 근본적인 疫病 防除對策을 樹立하기 위해서는 두가지 側面에서 이를 해결하기 위한 연구가 必要하다고 하겠다. 첫째는 역병의 傳染源을 最大限度로 줄일 수 있는 對策이라고 할 수 있고, 둘째는 역병의 전파를 최대한도로 억제하는 방법이다.

고추역病菌은 土壤傳染되는 病原菌이다. 따라서 疫病菌의 生活史에 가장 영향을 미치는 것은 土壤環境이라고 할 수 있다. 이에 관한 연구가 최근에 주목을 받게 된 것은 토양에 따라 병해의 발생을 억제하는 토양 (Suppressive soil) 이 있다는 것이 알려졌기 때문이다. 물론 이러한 병해발생은 세계적으로 특정한 地域에만 分布되어

있는 특수한 예에 지나지 않을 가능성이 많다. 그러나 우리나라에서도 밭에 따라 또는 같은 밭에서도 地點에 따라 疫病이 발생하지 않는 곳도 있다는 것을 경험적으로 알 수 있다. 같은 圃場內에서 病害가 發生하지 않은 곳은 病理學的으로 볼 때 병의 회피 (escape)에 따른 결과라고는 할 수 있지만 어떤 토양환경이 病害發生을 억제할 수 있는가를 明確히 究明할 必要가 있을 것으로 생각된다.

토양환경중에서 疫病菌과 같은 土壤微生物間에는 相互 競爭, 利用, 拮抗作用이 있다. 病原菌은 寄主植物을 利用할 수 있다는 특징은 있으나 부생적 토양환경에서는 경쟁, 이용, 길항작용의 優點種이 될 수 없다. 이러한 가정은 곧 부생적 미생물을 活性化시킴으로써 疫病菌의 土壤微生物중 優點化를 예방하고 이러한 기술을 개발함으로써 역병의 피해를 예방하고자 하는 연구가 곧 길항균을 이용한 疫病的 生物學的 防除法이라고 할 수 있다.

### 第3節 참깨 疫病的 特性 및 被害狀況

참깨 疫病은 우리나라 南部地方의 참깨 主産團地인 전북 고창, 전남 영광, 경남 진양, 경북 달성 등의 일부 포장에서 '81년 많이 發生되었던 病害이다.

發病程度는 調査地域 內에서도 圃場에 따라 차이가 많았으나 發病이 심했던 포장에서는 發病株率이 61%에 이르렀다. 疫病에 걸린 植物體는 大部分 줄기가 썩어서 枯死하게 됨으로 發病率이 높다고 하는 것은 收量減少도 그만큼 많다고 할 수 있다.

참깨 疫病은 1918년 인도에서 처음으로 보고되었고, 일본에서는 1938년 보고되었으나 우리나라에서는 '81년까지 잘 알려지지 않았던 主要 病害中의 하나이다. 따라서, 참깨역병의 病徵, 發生地域, 發生時期, 發生量, 被害程度 등에 대하여 구체적으로 전국에 걸쳐 조사한 성적은 없으나 그동안 농기연 병리과에서 病原菌의 分離, 同定, 病原性檢定, 被害調査, 品種抵抗性 究明試驗을 한 결과를 중심으로 하여 참깨 疫病的 發生과 이에 따른 防除對策을 論하고자 한다.

#### 1. 참깨 疫病的 病徵

참깨 疫病은 참깨의 全生育期間中에 언제나 발생할 수 있으며 幼苗期에는 立枯, 生育中期에는 잎마름(葉枯) 및 줄기썩음(莖腐)의 病徵을 일으킨다. (사진 3, 4 참조)

感染初期에는 잎 위에 水浸狀의 斑點이 나타나고 病徵이 심해지면 斑點이 擴大되고 잎 전체가 말라서 早期落葉이 된다. 줄기에는 感染된 부위로부터 흑갈색 줄무늬가 생기며 罹病部位가 점차 흑색으로 變色, 부패되어 줄기가 꺾어지게 된다.

특히 줄기에 나타나는 病徵은 進展이 빠르며 感染後 1주일 이내에



Photo 1. Severe incidence of *Phytophthora* blight in pepper caused by *Phytophthora capsici*.



Photo 2. *Phytophthora capsici*.



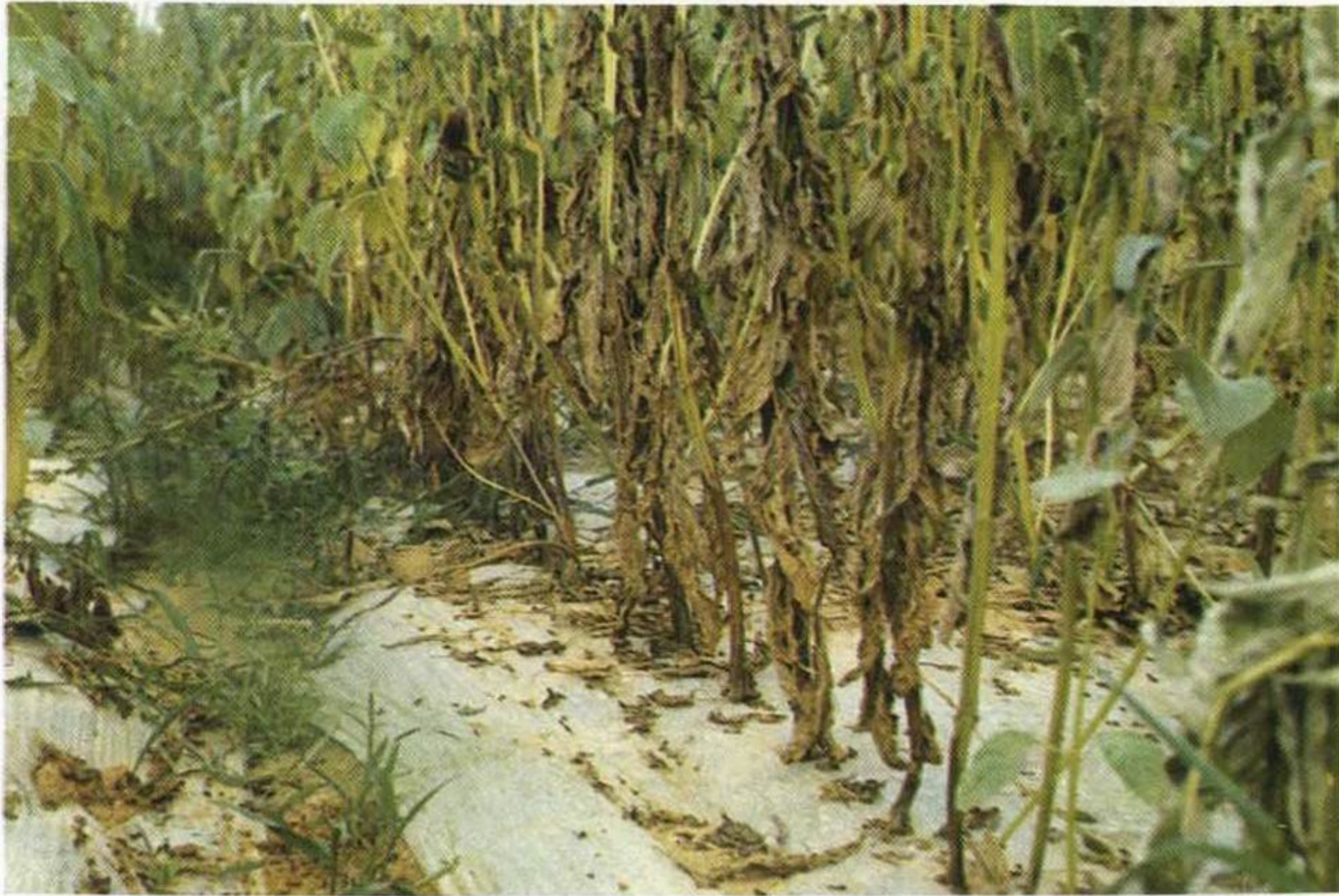


Photo 3. Severe incidence of *Phytophthora* blight in sesame



Photo 4. Symptoms of *Phytophthora* blight in sesame caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.

植物體가 枯死한다. 줄기에서는 보통 地際部에서부터 發病이 시작된다. 生育後期에 감염된 株에서는 꼬투리 生成이 불량해지고 종자가 충실하여지지 못하며 갈색으로 變色되기도 한다. 高溫多濕한 기후가 계속되면 罹病된 꼬투리에서 솜과 같은 곰팡이의 자람을 볼 수 있다.

참깨疫病과 유사한 疫徵을 일으키는 病에는 잎마름병 (葉枯病), 검은점무늬병과 점무늬병 (斑點病)이 있다. 특히 잎마름병은 生育中期에 많이 발생하며 잎이 마르고 줄기에는 갈색의 줄무늬를 형성하지만 疫病에 의한 피해처럼 줄기가 썩어서 식물체가 枯死하기 보다는 早期落葉과 부분적인 줄기의 變色을 볼 수 있는 것이 특징이다. 지금까지 역병에 대해서는 잘 알려지지 않았던 반면 잎마름병은 많이 알려져 있었으므로 역병에 의한 피해도 잎마름병으로 誤診되었을 가능성이 높다고 하겠다.

## 2. 참깨疫病菌의 特性

참깨疫病菌을 일으키는 病原菌은 *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*이며 寄主範圍가 넓은 病原菌으로서 58科 72屬의 식물에서 병을 일으킨다.

참깨이외에 이 病原菌에 의해서 피해를 받는 作物로서는 오이, 호박, 가지, 토마토, 딸기, 참외, 자두, 담배, 아주까리, 카네이션 등이 있다. 그러나 참깨에서 분리된 역병균은 병원성 검정결과 토마토, 담배, 고추 등에서는 병을 일으키지 않았다. 이와같은 참깨역병균의 참깨에 대한 特異한 병원성은 병원균의 寄主適應과 特異的인 生理型이 출현한 데 기인한 것으로 생각된다. 病原菌은 쉽게 分離되고 감자한천배지 (PDA) 나 귀리한천배지 (OA) 에서 培養이 가능하며 培養適溫은 30 ~ 32 ℃의 高溫이다. 포자낭 (Sporangium) 의 모양은 球型 내지는

타원형으로 포자낭 윗부분에 뚜렷한 乳頭돌기를 볼 수 있다.

### 3. 發生環境 및 被害

참깨疫病菌은 土壤에 常存하는 菌 (Inhabitant) 으로서 卵孢子의 형으로 땅속에서 월동하여 제 1 차 感染을 일으키는데 植物體에 侵入하기 위해서는 습기가 절대적으로 必要하다. 제 2 차 感染 및 病原菌의 傳播는 分生孢子가 비바람이 불 때에 함께 飛散되어 일어난다.

참깨역병은 고온다습한 기후에 많이 발생한다. 특히 비가 많이 온 후에 장기간 침수되었거나 排水가 不良한 포장에서는 30℃ 이상의 고온이 계속되면 發病이 급격히 증가된다. 우리나라 南部地方에서 7월 하순과 8월초에 역병의 발생이 많았던 것은 이와같은 역병의 發生條件과 거의 일치하기 때문인 것으로 생각된다.

참깨역병에 의한 피해는 罹病葉이 早期落葉되어 수량감소를 초래하는 것도 무시할 수는 없으나 성숙기에 罹病株가 고사함으로써 發病株率이 높을수록 피해가 더욱 심하며 참깨 品種에 따라 피해정도가 다르지만 罹病性品種인 경우 64%의 수량감소가 보고된 바 있다.

## 第 4 節 文獻的 考察

植物病原菌의 生物學的 防除를 위한 첫 시도는 Hartley (1921) 가 *Pythium debaryanum*에 의한 소나무 苗木의 猝倒病 防除를 위하여 *Trichoderma* 등 13개種의 微生物을 利用함으로써 비롯되었다. Kerr (1980) 는 果樹뿌리혹病의 防除에 bacteriocin인 Agriocin 84 를 分泌하는 Strain을 利用하여 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 뿌리혹病의 防除에 成功하였으며 Kempel (1983) 은 *Pseudomonas so-*

*lanacearum*에 의한 시들음병防除에 非病原性 Strain을 利用한 生物學的 防除를 試圖하였으며 Chen(1984)은 담배의 細菌性시들음병 防除에 非病原性이면서 bacteriocin을 생산하는 *Pseudomonas solanacearum* 菌株를 利用하여 그 效果를 立證하였다. Baker(1974)는 發病抑制形 土壤에 對하여 病原菌의 定着이 어렵고 病發生이 적은 土壤, 病原菌의 定着이 쉽고 病發生이 많은 土壤과 病原菌의 定着이 初期에는 甚한 發病을 보이거나 寄主作物의 連作에 따라 發病이 줄어들어 드는 土壤으로 分類하였다. 發病抑制形 土壤은 토양중에 存在하는 特定無機成分 (Al, Fe, Cu) 등이 직접 病原菌의 行動을 沮害하는 Residual fungistasis (Ko, 1983)와 토양중의 營養源이 病原菌 이외의 다른 微生物에 의해 先取되어 病原菌의 活動을 沮害하는 경우 (Scher and Baker, 1980)와 特定微生物이 特定病原菌의 生育을 沮害하는 抗菌作用 (Swith, 1977)으로 說明되고 있다. 金은 拮抗菌의 分泌 酵素중 Protease나 Laminarinase가 病原菌의 細胞壁을 分解시키며 soluble starch, Casamino acid, Peptone 등의 添加로 土壤內 拮抗菌의 定着 및 增殖을 促進한다고 했다. 放線菌은 土壤중에 廣範圍하게 分布하는데, Alexander (1962)는 土壤중의 放線菌중 70%가 抗生物質을 分泌하며 Cellulose, Chitin, Protein 등을 分解시킬 수 있다고 하였고 Mitchell (1962)는 Chitin質을 施用할 경우 土壤內 微生物의 增殖이 促進되어 *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *conglutinous*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*와 *Rhizoctonia solani*에 대해 拮抗效果가 있음을 立證하였다. Scher (1982)는 *Fusarium*에 對한 시들음病 防除에 *Pseudomonas putida*를 適用한 結果  $Fe^{+3}$  이온을 chelate하는 siderophore를 形成 分泌하여 拮抗效果를 나타냄을 밝혔다. Kloepper와 Schroth (1981)

는 PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) 를 種子에 處理한 結果 植物의 生育促進 效果를 立證하였다.

Zentmyer (1969) 는 Alfalfa 粉末을 2.8 ~ 7.1 %로 多量施用하면 土壤中の 細菌 및 絲狀菌이 顯著히 增加하여 *Phytophthora cinnamomi* 에 의한 Avocado 腐敗病을 顯著히 輕減시킬 수 있음을 證明하였다. Gilpatrick (1969) 은 Alfalfa meal 을 5 %水準으로 土壤施用할 경우 토양 1 g 당 60 ~ 197 mg의 Ammonia gas 가 發生하며 이것은 疫病菌의 菌絲體와 遊走子の 生育沮害에 關與한다고 하였으며 Tsao 와 Oster (1981) 는 토양에 鷄糞과 尿素 등의 有機物을 施用한 結果 NH<sub>3</sub> 와 HNO<sub>2</sub> 가 蓄積됨을 밝혔다. 그러나 많은 研究들이 發病抑制型 土壤을 50 ~ 60 °C로 30 分間 消毒할 경우 그 抑制效果는 消失됨을 報告하고 있다. 토양중에서 疫病菌의 遊走子낭 形成과 遊走子 發芽에는 土壤有機物 含量 (Tsao and Zentmyer 1979) , 微量元素 (Halsall 1977) , Sterols (Hendrix 1964) , 植物體의 뿌리로부터 삼출되는 化合物 (Whitfield et al 1981) 이 關여한다 하며, Gilpatrick (1969), Tsao (1981), Zentmyer (1969) 등은 遊走子낭 發芽와 形性에 關여하는 가장 重要한 要因은 土壤中の 窒素源의 濃度와 形態라고 言及하였다. Broadbent와 Baker (1974) 는 土壤內 拮抗微生物은 *Phytophthora* sp. 의 遊走子낭 形成을 沮害하거나 遊走子낭의 破壞 또는 原形質 溶解에 關여하는 物質에 對하여 言及하였다.

*Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp와 螢光 *Pseudomonas* 등은 여러가지 植物 病原菌에 對한 Competition과 antibiosis로 拮抗作用을 나타내며 (Broadbent, 1977. Scher, 1982, Sneh 1984)

*Trichoderma*, *Gliocladium*과 *Penicillium* 은 가장 널리 알려진 拮抗 絲狀菌으로 broad spectrum의 抗生物質을 分泌하며, hyperpara-

sitism, Competition에 의한拮抗機作으로病原菌의生育을抑制한다.(Chang 1981, Cook 1983, Kaiser 1984). Komnedahl과 Windels는완두의根圈과種子에서41種의絲狀菌과59種의細菌을分離해본結果이들중*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*에對한拮抗菌으로써潛在力이있는39種을報告하였다. Yuen(1985)는*Fusarium wilt*에對하여拮抗菌인*Pseudomonas putida*와*Alcaligenes* sp.의密度變異를調査한結果土壤PH가낮은Sandy loam soil보다土壤酸도가中性인Clay loam soil에서의密度가높다고하였으며, Marshall(1982)은Snap bean의*R. solani*防除를위하여*Trichoderma hazianum*을種子에分衣處理한結果PH5.6에서는65%의被害率을나타냈으나PH3.5에서는35%減少를나타냈다고했다. Chang(1986)은*Trichoderma hazianum*을 $10^5$  c.f.u/g soil로처리했을때效果的이었고, Howie는螢光*Pseudomonas*를밀種子에適用할경우에는 $10^7$  c.f.u/g soil이適切하다고했다. Kao(1985)는*Pythium splendens*에 의한오이잘록병防除에 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 와알팔파밀을混合處理할때效果的이었으며, Ca는植物組織의Pectin을Ca pectate로轉換시켜病原菌이分泌하는Polygalacturonase에 의한分解로拮抗性을갖게된다고하였다. Lewis와Papavizas(1984)는拮抗菌의土壤內密度유지및保存方法으로밀기울과Kaolin clay를Pelleting하여拮抗菌인*Trichoderma* spp를適用했을때分生孢子보다厚膜孢子的形成이 많았고6個月이상拮抗菌의活力을維持함을밝혔다. Merriman(1975)은*Bacillus subtilis*를귀리, 당근, 옥수수種子에處理할경우baeterial suspension에담그는것보다種자와함께Pelleting하는것이效果的이었다. Chao(1986)는種子粉依에適切的인螢光

*Pseudomonas* sp. 등 9種의拮抗菌이有用하다했고 Al-Hamdani (1983) 등은 *Pythium oligandrum*을 Cress 종자에 분의한 후 파종하였을 경우 *Pythium ultimum*에 의한 잘록병을 效果的으로 防除할 수 있었다.

土壤이나罹病組織으로부터疫病菌을純粹하게分離하기 위한 노력으로 Eckert와 Tsao (1960, 1962)는抗生物質의選擇性を利用하여疫病菌에對한選擇培養基를考案해 냈으나 그効率は 오히려 *Pythium*의分離에 더適切하였다. 그 후 Masago 등 (1970)은 Hymexazol을 도입함으로써疫病分離를 위한選擇培養의効률을 크게增大시켰고 Papavizas는 자신이改良한選擇培養基로土壤중의 *Phytophthora capsici*의密度를測定하였으나,疫病菌은生長이 늦고繁殖體가土壤중에休勉狀態로存在하기 때문에疫病菌을 순수하게分離하기에는 어려움이 따르며 또한 실제포장에서의密度變化를正確하게測定하는데도 어려움이 따른다고 했다.

Ko (1985)는特殊한粒子構造를 갖는 Silt, loam, sand 등으로 구성된土壤이 *Phytophthora capsici*의遊走子낭發芽를抑制하며, 이土壤은 500℃이상加熱하여도抑制效果가消失되지 않음을 밝혔다. Shou-Kung Sun (1985)은 몇가지無機成分과有機物로 구성된 S-H mixture를土壤施用할 경우 *Fusarium*에 의한오이시들음病을 效果的으로 防除할 수 있었고 Benomyl과 함께處理한 경우에는疫病防除에도 效果的임을 밝혔다. 趙 (1985) 등은 *R. solani*에 의한배추잘록병 防除에 *Bacillus subtilis*를適用할 경우 배추묘의 건전주율이 94.6%에 이른다고 하였다. Weinhold와 Bowman (1964)는감자포장에콩을被服作物로 재배하거나 푸른콩의植物體를施用한結果 *Bacillus subtilis*의生育을 증진시켜 *Streptomyces scabies*에

의한 감자 더뎡이病을 防除할 수 있었다. 또 다른 研究로 Carrie (1986) 는 마늘등 32科 57種의 식물뿌리 抽出液을 生物檢定한 結果 이들중 6種이 疫病沮止 効果가 뚜렷함을 보고하였다.



## 第2章 材 料 및 方 法

### 第1節 高추疫病菌에 대한 拮抗菌分離

#### 1. 供試土壤 및 材料

고추疫病菌에 대하여 拮抗作用이 있는 微生物을 分離하기 위하여 고추를 栽培하지 않은 特殊圃場 또는 고추를 連作한 圃場중 고추疫病이 發生하지 않은 지점과 疫病이 發生한 지점의 土壤을 채집하여 微生物을 分離하기 위한 試料로 供試하였다.

강원도 삼척군 이포리에서 土壤母材가 石灰岩沖積崩積土이며 土壤 PH가 7.8인 土壤, 강원도 명주군 산대월리에서 土壤母材가 有機物殘積土이며 有機物含量이 4.2%이고 現在 논으로 利用되고 있는 土壤, 강원도 평창군 도암면 수하리에서 土壤母材가 山性岩崩積土이고, 有機物含量이 2.7%인 土壤이며 고추를 전혀 재배하지 않은 圃場에서 土壤試料를 채집하였다. 土壤試料 채취는 土壤表面 5~15 cm 깊이에서 地域當 20 kg씩 토양을 채취하여 殘材物과 자갈 등을 골라낸 다음 비닐마대에 담아 채취 즉시 微生物을 分離하였으며 使用하고 남은 토양시료는 저온항온기에서 20일간 보관하였다가 다시 微生物을 分離하였다.

고추連作地 土壤試料는 고추主産團地인 충북 중원군 가금면, 소태면 경북 의성군 단촌면, 전북 임실군 임실읍, 관촌면 등에서 土壤을 채집 하였다. 土壤시료 採集方法과 試料點數는 고추疫病이 많이 發生된 地域 또는 疫病이 전혀 發生하지 않은 地域으로 區分하여 根圈土壤과 非根圈土壤에서 각각 土壤表面 5~15 cm 깊이에서 殘滓物과 함께

地域別로 500 g씩 20 점을 채집하여 微生物을 分離하는데 供試하였으며 微生物分離는 채집 즉시 그리고 低溫抗溫器에 20 일간 보관하였다가 2 회에 걸쳐서 微生物을 分離하였다.

## 2. 土壤 微生物 純粹分離

供試 土壤으로부터 疫病菌에 대한 拮抗微生物을 分離하기 위하여 使用된 培地는 다음과 같다.

### 가. 拮抗細菌 分離用 培地

#### ① Nutrient Agar

Peptone .....	3 g
Beef extract .....	5 g
Agar .....	20 g
Distilled Water .....	1.0 l

#### ② 523 Media

Sucrose .....	10.0 g
Casein acid hydrolyzate .....	8.0 g
Yeast extract .....	4.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0.3 g
Agar .....	20.0 g
Distilled Water .....	1.0 g

### 나. 곰팡이 分離用 培地

#### Peptone Dextrose Rose-bengal Agar

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0.5 g

Dextrose .....	10.0 g
Rose-bengal (1%) .....	3.3 ml
Agar .....	20.0 g
Distilled water .....	1.0 l
Streptomycin .....	30.0 mg

다. 放線菌 分離用 培地

① Starch Casein Agar

Starch.....	10.0 g
Casein .....	0.3 g
KNO <sub>3</sub> .....	2.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0.5 g
CaCO <sub>3</sub> .....	0.02 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0.01 g
Agar .....	20.0 g
Distilled water .....	1.0 l

② Egg Albumine Agar

Dextrose .....	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0.2 g
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .....	Trace
Egg Albumin .....	0.25 g
Agar .....	20.0 g
Distilled water .....	1.0 l

拮抗微生物 分離 方法은 정량평판법 (10-fold dilution plating method) 을 이용하였다. 각 供試土壤 20 g 을 살균수 180 ml 에 添加하여 30 분간 잘 흔들어 섞은 다음 10 ml 를 취하여 90 ml 의 殺菌水에 다시 稀釋하고, 계속 10 倍數로  $10^{-7}$  까지 稀釋하여  $10^{-4} \sim 10^{-7}$  의 각 稀釋液 0.25 ml 를 각각의 菌分離用 培地에 分注하여 멸균된 유리막대기로 全面에 골고루 펴고,  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  의 恒溫器 (Incubator) 에서 細菌은 2~3 日, 곰팡이는 5~7 일, 放線菌은 7~14 일간 培養하였다. 배양기 表面에 자란 각 菌의 Single colony 를 채취하여 NA 및 PDA (Potato; 200 g, Dextrose; 15 g, Agar; 20 g Distilled water; 1 l) 斜面培地에 分離培養 하였다.

### 3. 土壤微生物中 拮抗菌選拔

#### 가. 室內試驗

##### 1) 疫病菌과 微生物의 培地上에서 拮抗力檢定

供試한 疫病菌은 '85 年 충북 음성군 疫病 發生圃場에서 罹病株를 채집하여 病原菌을 分離한 후 培養하여 고추幼苗 80 일 모에 재접종하여 發病된 幼苗에서 病原性を 確認한 후 純粹分離하여 使用하였다.

경북 의성등의 土壤으로부터 分離한 곰팡이 96, 放線菌 174, 細菌 576 개 菌株를 사용하여 拮抗力을 檢定하였으며 檢定方法은 9 cm 의 Petri plate 에 Potato Dextrose Agar 를 부어 굳힌 다음 곰팡이와 放線菌은 고추疫病菌과 동시에 接種하여  $28^\circ\text{C}$  恒溫器에서 5 일간 培養하여 저지대를 형성하는 菌株를 拮抗菌으로 選拔하였고 細菌은 疫病菌을 사례에 接種하여  $28^\circ\text{C}$  에서 48 시간 培養後 土壤에서 分離한 細菌을 接種하여 細菌接種 72 시간 후 細菌과 고추疫病菌

사이 阻止帶 형성 여부를 調査하여 拮抗菌으로 選拔 하였다.

2) 液體培地에서 疫病菌의 菌絲生長 및 Sporangium에 미치는 拮抗力 檢定

고추疫病菌에 대하여 土壤에서 分離하여 培地上에서 拮抗作用이 크게 나타난 3種의 細菌의 拮抗力을 알아보기 위하여 疫病菌과 細菌을 液體培養하여 試驗을 실시하였다. 細菌은 Potato Dextrose broth에 30℃에서 3일간 진탕배양 하였고, 고추 역병균은 Oat meal agar에 28℃에서 2주간 培養하여 殺菌수를 붓으로 적셔 菌絲를 긁어준 후 28℃光條件하에서 3일간 배양하여 孢子形成을 시켜 使用하였다. 疫病菌 현탁액과 細菌培養液의 處理는 8 ml 殺菌수가 들어있는 test tube에 疫病菌 孢子濃도를  $5 \times 10^4/ml$ 로 조절하여 1 ml를 넣고, 拮抗細菌은  $5 \sim 7.8 \times 10^7 \text{ Cells/ml}$ 의 濃도로 調節하여 1 ml을 넣었다. 대조구는 9 ml의 殺菌수에 1 ml의 疫病菌 孢子현탁액만 넣었다. 이들은 28℃항온기에서 24시간 培養後 疫病菌 選擇培地 (Papavizas 1981)에 0.1 ml을 취해서 도말봉으로 도말접종하여 28℃恒溫器에서 72시간 배양후 形成된 疫病菌의 Colony 수를 조사하였다.

3) 고추幼苗를 利用한 拮抗細菌의 拮抗力 檢定

Oat meal agar에서 2주간 배양후 孢자를 形成시켜 얻은 疫病菌 孢子현탁액을 살균수 8 ml이 들어있는 test tube에 1 ml을 넣고 P.D. broth에서 3일간 培養한 세균현탁액 1 ml을 混合하여 28℃에서 24시간, 48시간 배양후 한별고추 40 일모를 넣고 4일후 病發生을 각각 調査하였다. 이때 사용한 孢子濃도  $1.5 \times 10^5/ml$ 였고 拮抗細菌은  $4.5 \sim 8 \times 10^8 \text{ Cells/ml}$ 였다.

4) 培養濾液을 利用한 疫病菌 孢子發芽 試驗



## 第 2 節 참깨 疫病菌에 對한 拮抗菌分離

### 1. 供試土壤 및 材料

참깨 疫病菌에 對하여 拮抗作用이 있는 土壤微生物을 分離하기 위하여 忠北 淸原郡, 忠南 아산군, 京畿道 화성군, 京畿道 평택군, 慶北 예천군, 濟州道の 農家圃場과 水原市 農業技術研究所 病理科 試驗圃場에서 土壤을 採集하였다. 採集한 土壤의 種類는 正確히 區分하지 않았으나 一般的으로 참깨를 栽培할 수 있는 圃場의 土壤과 참깨를 栽培하고 있는 圃場中에는 疫病이 發生한 地點 또는 疫病이 發生한 것으로 알려진 圃場의 土壤을 採集하였다. 一般的인 참깨 栽培地의 土壤外에도 最近 참깨를 栽培하기 시작한 제주도의 火山灰土와 경기도 평택지역의 土炭 等の 有機物 含有量이 높은 壤土도 試料로 採集하였다.

土壤試料의 採取는 表面의 흙을 除去하고 5~10 cm의 깊이의 土壤을 選擇하였으며 참깨 疫病이 發生한 地點에서는 根圈을 中心으로 土壤試料를 採取하였다. 採集한 土壤은 試料別로 約 1 kg씩 비닐봉지에 넣어 運搬하였으며 採集한 試料는 低溫저장고에 보관, 可能的한 試料採取直後 微生物을 分離하였고 一定期間 건조한 試料에서 微生物을 分離하였다. 地域別 土壤試料 點數는 一定하지 않았으나 約 300여점의 土壤試料를 供試하였다.

### 2. 土壤 微生物의 純粹分離

고추拮抗菌과 같은 方法으로 分離하였다.

### 3. 참깨 疫病菌의 增殖

試驗에 供試한 참깨 疫病菌 (*P. nicotianae* var. *parasitica*) 의

增殖用 培地는 V-8 juice agar (V-8 juice : 200 ml, CaCO<sub>3</sub> : 2 g, Agar:20 g, Distilled water:1.0 l) 와 OMA培地 (Oatmeal : 50g, Sugar:15 g, Agar 20 g Distilled water:1.0 l), 그리고 PDA배지를 주로 利用하였으며, 病原菌의 遊走子囊을 形成시키기 爲한 方法으로는 27 ± 2 °C에서 위의 培養基에 接種한 病原菌을 5일간 培養한후 滅菌된 甌으로 氣中菌絲 (Aerial Mycelia) 를 除去하고 다시 Cool white Fluorescent light 下에서 3日間 培養하였다. 그다음 이를 各 Petri-dish當 滅菌水 15 ml을 부어 滅菌된 甌으로 形成된 病原菌의 遊走子囊 (Sporangia) 을 긁어 모았다. 위의 方法으로 採集한 病原菌의 孢子 懸탁액은 血球計 (Haemocytometer) 로 그 濃度を 計算하여 4 °C 냉장고에 30分間 保管한 後 試驗에 利用하였다.

#### 4. 土壤微生物中 拮抗菌 選拔

##### 가. 室內實驗 (in vitro)

앞의 方法으로 分離된 土壤微生物中 참깨疫病菌에 對한 拮抗效果가 있는 菌을 選拔하기 爲한 一次的인 檢定方法으로 PDA (감자寒天培地) 에서 病原菌과 土壤微生物을 對置培養하여 病原菌의 菌絲生育을 抑制하는 菌株를 選別 하였다. 이와같이 選拔된 拮抗細菌들의 참깨種子 發芽에 미치는 影響을 究明하기 爲하여 各 細菌들을 Nutrient Broth에서 3日間 진탕배양하여 遠心分離機를 利用 5,000 rpm에서 30分間 遠心分離하고 다시 蒸溜水로 1 ml當 約 10<sup>9</sup> cfu/ml 되게 調節하였다. 各 拮抗細菌의 懸탁액 5 ml과 참깨 疫病菌의 孢子 2 × 10<sup>3</sup> Sporangia/ml 懸탁액 5 ml을 混合하여 27 ± 2 °C 恒溫에서 24時間 培養하고 다시 이 混合液을 濾過紙를 두겹으로 깔은 滅菌된 샤레에 붓고 그 위에 各 샤레당 참깨 種子 30粒씩을 얹어서 다



시  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  恒溫器에 넣고 이틀후 참깨種子の 發芽率을 調査하였다. 對照區로서 참깨疫病菌의 懸液 5 ml과 殺菌水 5 ml를 混合하여 위와같은 方法으로 참깨種子の 發芽率을 調査하였다.

#### 나. 溫室 포트試驗

원예용 사각 pot ( $16 \times 7 \times 7\text{cm}$ )에 床土를 담고 各 拮抗 細菌을 土壤 1 g當  $10^7\text{ cfu/gram soil}$ 이 되게 混合한 다음 四葉期의 참깨幼苗를 pot當 3株씩 移植하여 5日後에 疫病菌의 孢子 懸液 ( $2 \times 10^3/\text{ml}$ )을 포트당  $2 \times 10^3\text{ sporangia/pot}$ 가 되게 接種하였고 病原菌 接種 3日後부터 2日 間隔으로 發病率을 調査하였다.

### 第3節 疫病菌에 對한 拮抗菌 分類同定

#### 1. 培養的 特性

고추 疫病菌에 對한 拮抗菌 22個 菌株와 참깨疫病菌에 對한 拮抗菌 20個 菌株中 寄主植物에 나쁜 影響을 미치지 않고 室內實驗과 溫室 pot 試驗結果 가장 有望한 利用 價値가 높은 10個 細菌을 選別하여 Nutrient agar 培地上에서 자라는 細菌의 Colony의 色과 形態의 特性을 10倍의 解剖顯微鏡으로 觀察하였다.

#### 2. 電子顯微鏡 觀察

選別된 10個 拮抗細菌들의 細胞 모양과 크기 및 鞭毛 (Flagella)의 有無 및 配烈을 農業技術研究所 病理科에 所在한 電子顯微鏡을 利用하여 2% PTA (Phospho tungustic acid)로 Negative 染色後 觀察하였다.

#### 3. 形態的 및 生理的 特性 調査

### 1) 그람染色

固體와 液體狀態의 두가지 Nutrient 培養器上에서 48時間 以內에 培養된 細菌을 生理食鹽水에 懸탁시켜 슬라이드 글라스 위에 얹게 편후 風乾시키고 알콜램프로 3~4回 通過시켜 固定시킨 다음 Jensen 法으로 染色한後 1,000 倍에서 顯微鏡으로 觀察하였다.

### 2) 耐性 孢子 形成 試驗

Nutrient 培地에서 일주간에 培養된 拮抗細菌을 Slide glass에 殺菌水로 도말, 風乾시킨 뒤 알콜램프로 固定하여 그위에 Malachite green 溶液을 떨어뜨린뒤 끓지않게 Alcohol lamp로 約 5分間 染色시켰다. 물로 2~3초간 洗滌한뒤 Safranin 溶液으로 다시 30초간 染色하고 다시 흐르는 물로 洗滌하고 濕氣를 除去한 다음 光學顯微鏡의 1,000 倍下에서 油浸하여 檢鏡하였다. 耐性 孢子는 Malachite green에 染色되어 透明한 靑안빛을 나타내며 耐性 孢자를 形成하지 못한 細菌은 Safranin에 染色되어 붉은빛을 나타내었다.

### 3) 運動性

試驗管에 0.5% 寒天이 添加된 半固形 Nutrient 培地를 10 ml씩 分注하고 白金線으로 細菌을 Stab culture하여 72時間 培養後 細菌의 자라는 모양을 보고 鞭毛에 依한 運動性 有無를 判斷하였다.

### 4) 細菌의 모양과 크기

電子顯微鏡 사진 (사진) 으로 細菌의 크기와 모양 그리고 鞭毛 (Flagella) 등을 觀察 하였다.

### 5) 酸素 要求度

半 固形培地 (Glucose: 5 g, Beef extract: 5 g, Agar: 5 g, Brom cresol purple: 0.014 g, Distilled water: 1.0 l) 를 菌當 2個의

試驗管에 10 ml씩 분注하여 殺菌하고 45 °C로 식혀 각 細菌別 1個의 試驗管은 液體 파라핀을 2 ml씩 添加하여 嫌氣的 條件을 만들어 28 °C ± 2 °C 恒溫器에서 培養한 후 2日, 4日, 6日 後에 細菌의 增殖 有無를 培養器의 脫色으로 判斷하였다.

#### 6) Catalase

48時間以內에 培養된 細菌을 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液에서 O<sub>2</sub> gas를 發生시켜 氣胞形成 有無로서 判斷하였다.

#### 7) Oxidase

滅菌된 濾過紙를 1% N-Dimethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride 溶液에 적시고 試驗管에 培養된 細菌을 白金耳로 묻혀 線을 濾紙에 긋고 30초以內에 분홍색을 나타내는지의 與否로 判斷하였다.

#### 8) 色素 形成

YDC培地 (Yeast extract: 10 g, Dextrose: 5 g, Calcium Carbonate: 20 g, Agar: 20 g, Distilled water: 1.0 l) 와 King's B培地 (MgSO<sub>4</sub>: 1.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O: 1.5 g, Glycerol: 10 g, Proteose peptone: 20 g, Agar: 20 g, Distilled water: 1.0 l) 에 細菌을 培養하여 色素形成을 調査하였다.

#### 9) 糖 分解 및 利用

基礎培地 (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.0 g, KCl: 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.2 g, Agar: 20 g, 0.005% Bromthymol Blue solution: 1.0 l, Carbohydrate: 10.0 g) 의 pH를 7.2 ~ 7.4 되게 調節하고 試驗管에 分注된 10 ml의 培地에 0.1% Bromthymol Blue 0.3 ml와 Milipore 濾過器로 濾過시킨 糖溶液을 1%되게 添加한 후 細菌을 培養하여 糖이 分解되어 生成되는 酸에 依해서 BTB의 變色 與否로 糖分解利

用性を 判別 하였다.

#### 10) Gelatin 分解

Nutrient agar 培地に 젤라틴을 0.4% 含有시켜 平版 培地를 만들고 中央에 拮抗菌을 넣어 3日間 培養한 다음 Mearic Chloride 15 g을 C-HCl 20 ml에 녹인 다음 蒸溜水 100 ml과 混合한 液 8~10 ml을 平版 培地に 흘려 觀察하였다. Gelatin을 分解한 菌은 平版 中央에 透明臺 (Clear zone) 를 形成한다.

#### 11) 生育 溫度 試驗

Nutrient 平版 培地에서 48時間 자란 各 拮抗 細菌의 Single Colony 를 殺菌水에 稀釋하여 定量 平版法으로 適定 稀釋濃度 ( $10^{-7} - 10^{-9}$ ) 의 Suspension 0.25 ml을 Nutrient 平版 培地に 골고루 편 다음 各各 10 °C와 40 °C의 恒溫器에서 培養하여 Colony 形成 有無를 肉眼으로 判斷하였다.

# 第3章 試驗結果 및 考察

## 第1節 고추疫病菌에 對한 拮抗菌 分離

### 1. 土壤微生物의 純粹分離

慶北 義城郡 等 6個 地域에서 採集한 土壤試料로부터 眞菌 96個 菌株, 細菌 576個 菌株, 放線菌 174個 菌株 모두 846個 菌株를 純粹分離 하였다. (表 1)

### 2. 土壤微生物中 拮抗菌 選拔

#### 가. 室內試驗

供試한 846個 菌株中에서 高추疫病菌에 대하여 拮抗作用이 있는 菌株를 選拔하기 위하여 PDA 培養基上에 對置培養을 한 結果 眞菌中에서는 高추疫病菌에 대하여 拮抗性, 즉 疫病菌의 菌絲生長을 抑制하는 菌株가 發見되지 않았다. 그러나 分離된 細菌中에서 5個 菌株가 疫病菌의 菌絲生長을 抑制하는 것으로 나타나 拮抗菌으로 選拔되었다. 放線菌中에서도 17個 菌株가 疫病菌의 菌絲生長을 抑制하여 拮抗菌으로 선발되어 供試菌 846個 菌株中에서 모두 22個 菌株가 선발되어 約 2.6%의 選拔效率을 나타내었다.

高추疫病菌 (*Phytophthora capsici*) 拮抗菌으로 選拔된 22個 菌株의 菌株別 拮抗作用을 對置培養時에 疫病菌의 生育阻止 거리별로 比較하였을 때 菌株間에 差異가 많았다. (表 2) 細菌중에서는 S-9 菌株가 35 mm로서 가장 效果的인 疫病菌 菌絲生長 抑制菌으로 나타났고 放線菌 中에서는 At-4 菌株가 3.6 mm의 疫病菌 菌絲生長 抑制를 나타냈다. 拮抗菌으로 選拔된 菌株 中에는 疫病菌과 拮抗菌이

Table 1. Isolation of soil microorganisms and selection of antagonists to *Phytophthora capsici*

Soil samples from	Number of isolates				Number of antagonistic isolates			
	Fungi	Bacteria	Actino .	Total	Fungi	Bacteria	Actino .	Total
Kyungpuk , Euseong	0	204	0	204	0	1	1	2
Kangweon , Kangreung	30	84	51	165	0	1	3	4
Kangweon , Samcheok	15	87	39	141	0	1	4	5
Kangweon , Jinbu	18	114	51	183	0	1	3	4
Chungnam , Cheonan	18	18	3	39	0	0	3	3
Chunbuk , Imsil	15	87	39	141	0	1	3	4
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>576</b>	<b>174</b>	<b>846</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>17</b>	<b>22</b>

Table 2 . A list of microorganism isolated from soil showing antagonistic effect on the growth of *Phytophthora capsici*

Microorganism	Isolates	Inhibition of growth <sup>a/</sup> ( mm )
Bacteria	JC-4	3.2
"	S-9	3.5
"	LH-3	2.8
"	UB-7	2.2
"	KB-7	0.7
Actinomyces	AT-4	3.6
"	BD-1	1.8
"	AD-7	1.5
"	KB-11	1.2
"	BC-1	1.2
"	JB-2	1.0
"	AC-4	0.8
"	DC-2	0.7
"	DC-12	0.5
"	DC-13	0.6
"	UA-2	0.4
"	AC-3	0.3
"	At-2	0.3
"	UB-3	0.2
"	Y-5	0.8
"	MC-2	0.8
"	MB-4	0.7

a/ Inhibition of mycelial growth of *P. capsici* in PDA

近接할 때에만 生長抑制를 나타내는 菌株도 있었다. 拮抗菌으로 選拔되지 않은 菌株들은 疫病菌이 對置培養한 分離菌 위로 계속 菌絲가 生長하는 것을 볼 수 있거나 菌絲生長 抑制效果가 인정되지 않는 菌株들이었다. (Photo 7)

對置培養 結果 選拔된 拮抗菌들이 高추疫病菌의 菌絲生長을 抑制하는 機作은 一般的으로 微生物이 分泌하는 抗菌性 物質에 의한 것으로 생각된다. 따라서 이러한 抗菌性 物質을 分泌하는 菌을 土壤에 투여하여 疫病菌의 生長을 抑制할 수 있다면 高추를 連作할 때 문제가 되는 疫病의 發生을 抑制할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 土壤微生物이 抗菌性 物質을 分泌하는 것은 實驗室內的 條件, 즉 供試된 對置培養 條件에서만 이루어 질 수도 있는 현상으로 생각될 수 있으므로 抗菌性 物質을 分泌하는 拮抗菌을 疫病의 生物學的 防除에 利用할 수 있는 충분히 만족할만한 菌株라고 단정하기는 어렵다고 하겠다. 특히 高추疫病菌은 우리나라에서는 장마나 호우에 의하여 高추밭이 침수되거나 배수가 불량하여졌을 때 活性이 增加되어 피해를 초래하므로 浸水狀態에서도 選拔된 拮抗菌이 高추역병菌의 生長을 抑制하여 疫病의 發生을 抑制하여야 될 必要性이 있다.

선발된 拮抗菌이 懸濁液 (Suspension) 狀態에서도 疫病菌에 影響을 미치는가를 究明하기 위하여 疫病菌 Sporangium 懸濁液과 拮抗菌 培養懸濁液을 24時間 混合한 후 疫病菌 選擇培地로 재분리를 시도하였다. 그 결과 JC-4 등 3個菌株중에서 JC-4 菌株는 疫病菌의 Survival에 影響을 미치는 것으로 되었지만 UB-7과 같은 菌株는 Survival에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. (表 3) 그러나 疫病菌 單獨處理區에比해서는 다소 疫病菌의 生存에 影響을 미칠 수 있는 可能性을 나타냈다.



Table 3 . Recovery of *Phytophthora capsici* after mixed incubation of *P. capsici* with each of antagonistic bacterial culture suspension 24 hrs after mixing and incubation

Mixed incubation <u>a/</u> with	Number of <i>P. capsici</i> colony by <u>b/</u>		
	1/100 dil	1/10 dil	Original
<i>P. capsici</i> + JC-4	0	0	0
<i>P. capsici</i> + S-9	0	0	1
<i>P. capsici</i> + UB-7	0	3	11
<i>P. capsici</i> only	1	8	27

a/ Mixed inoculum was prepared by mixing one ml of *P. capsici* and one ml of bacterial suspension with 8 ml of sterilized distilled water . Dilution was made with sterilied water .

b/ The selective media for *Phytophthora* spp. were used .

拮抗菌과 疫病菌의 混合懸濁液의 상태에서 拮抗菌이 疫病菌의 生長을 抑制하고 이 懸濁液을 土壤에 처리하였을 때 疫病菌의 發病能力을 喪失하게 하여야만 生物學的 防除菌으로 使用될 수 있을 것이다 따라서 選擇培地에 의한 再分離와 한별고추 (40 일 모) 를 懸濁液에 담근 후 24 시간, 48 시간 후 발병유무를 조사한 결과 선택배지에서 얻어진 결과와 유사하게 UB-7 菌을 처리하였을 때에는 역병의 병징이 나타났으나 JC-4 와 S-9 菌株를 疫病菌과 混合하였을 때에는 역병의 병징이 나타나지 않음을 알 수 있었다. (표 4)

이러한 拮抗菌의 效果가 拮抗菌 自體 濃度와 疫病菌 sporangium 과의 競爭에서 비롯되는 것인지 아니면 拮抗菌이 分泌하는 어떤 抗菌性 物質의 蓄積에 의한 것인지는 분명히 알 수 없었다. 따라서 拮抗菌 배양액 중에서 cell 을 완전히 제거한 濾過液만으로 처리하여 보았다. 그 결과 JC-4 菌株는 濾過液自體가 疫病菌의 sporangium 發芽를 抑制하였으나 다른 菌株들은 뚜렷한 발아 억제 效果를 볼 수 없었다. (표 5)

拮抗菌과 疫病菌의 懸탁액을 혼합한 것을 紗袋상에 고추를 發芽시킨 후 처리하였을 때에도 選拔된 拮抗菌에 따라 種子腐敗率의 變異가 많았다. (表 6) 이 경우에는 拮抗菌과 疫病菌을 混合한 후 즉시 處理하였으므로 拮抗效果가 충분히 나타나지 않은 것으로 생각된다.

#### 나. 溫室 pot 試驗

溫室에서 40 일 모에 拮抗菌과 疫病菌을 混合하여 2日間 25℃에 방치한 후 이를 土壤에 灌注 接種하였을 때에는 16個 拮抗菌中 Y-5 等 4個 菌株가 疫病의 發生을 抑制하는 것으로 나타났다. 反面에 DC-12 菌株 等 3個 菌株는 疫病發生 抑制效果를 볼

Table 4 . Development of symptoms in pepper seedlings caused by *Phytophthora capsici* suspension after incubation mixed with each antagonistic bacterium culture suspension

<i>P. capsici</i> culture suspension mixed with suspension <sup>a/</sup>	Symptom(+) and no symptom (-) development after incubation	
	24hr	48hr
JC-4	-	-
S-9	-	-
UB-7	+	-
KB-7	+	-
LH-3	+	+
<i>P. capsici</i> only	+	+

<sup>a/</sup> The *P. capsici* suspension was prepared by washing the mycelium off grown on oatmeal agar for 2 weeks at 28 C and by incubation under light conditions for three days to induce sporangium formation . The bacterium was cultured for three days in potato dextrose broth . Mixed suspension was prepared by mixing one ml of *P. capsici* , 8ml of sterilized distilled water , and one ml of bacterial suspension . Pathogenicity test was conducted in 10 ml test tube by putting one 40 -day old seedling in a test tube . The experiments were three replicated .

Table 5 . Effects of culture filtrate of antagonistic bacteria on germination of sporangium of *Phytophthora capsici*

Source of culture filtrate <sup>b/</sup>	% of germination after incubation for <sup>a/</sup>		
	15hr	24hr	30hr
JC-4	0	0	0
S-9	34	48	61
UB-7	27	33	57
KB-7	29	54	58
distilled water	22	53	58

a/ The suspension of *P. capsici* sporangium was prepared by brushing off mycelium cultured for two weeks and incubated under light conditions for three days .

b/ The culture filtrate of each antagonistic bacterium was prepared by centrifuging the 3-day old culture in potato dextrose broth . One ml of *P. capsici* suspension was added to 9 ml of bacterial culture filtrate .

Table 6 . Effects of antagonists suspension on germination of pepper seeds when each suspension was mixed with suspension of *Phytophthora capsici*

Suspension of <i>Phytophthora</i> with suspension <sup>a/</sup>	Number of rotten pepper seeds <sup>b/</sup> after treatments(day)				% of infection
	2	4	6	8	
S-9	1	2	2	2	20
UB-7	2	3	6	6	60
KB-7	3	4	5	6	60
UB-3	0	0	7	7	70
JB-2	1	3	7	7	70
DC-13	0	3	8	8	80
DC-2	5	7	8	8	80
AT-4	1	4	9	9	90
AT-2	2	2	9	9	90
KB-11	2	4	7	9	90
BC-1	9	9	9	9	90
UA-2	2	2	9	9	90
DC-12	3	4	10	10	100
LH-3	2	6	10	10	100
AC-4	0	10	10	10	100
AC-3	3	4	10	10	100
BD-1	0	7	9	10	100
AD-7	3	10	10	10	100
<i>Phytophthora</i> <sup>c/</sup> only	5	10	10	10	100

<sup>a/</sup> The mixed suspension was prepared by mixing 5 ml of *P. capsici* sporangium suspension and 5 ml of each bacterial suspension.

<sup>b/</sup> Ten seeds of pepper cultivar Hanbyul was used for tests.

<sup>c/</sup> The suspension of *P. capsici* sporangium was diluted as that of mixed inoculum by adding 5 ml of distilled water.

수 없었다. (表 7) 室內對置培養 結果 選拔된 拮抗菌이 水溶液 狀態에서 疫病菌의 生長抑制 또는 發病抑制 效果가 없다고 하는 것은 이러한 拮抗菌들이 水浸狀態에서는 活性이 떨어지는 것으로 생각되며 浸水狀態에서 疫病이 많이 發生하는 生態的 條件으로 보아 高추疫病的 生物學的 防除菌으로 利用할 수 없을 것으로 생각된다.

## 第 2 節 참깨 疫病菌에 대한 拮抗菌分離

### 1. 土壤微生物 純粹分離

忠北 清原郡 等 全國 7 個地域에서 採集한 土壤 試料를 供試된 微生物 培養基를 利用하여 真菌類 246 個 菌株, 細菌 188 個 菌株, 放線菌 33 個 菌株 等 總 487 個 土壤微生物을 分離하였다. (表 8)

### 2. 土壤 微生物中 拮抗菌 選拔

#### 가. 室內 試驗

純粹 分離된 土壤棲息 微生物들을 참깨 疫病菌과 감자 한천배지에 對置培養 하였을 때 病原菌의 菌絲 生育을 抑制하는 菌으로서 真菌類가 6 個 菌株, 細菌이 14 個 菌株가 選拔되어 모두 20 個 菌株가 拮抗菌으로 選拔되었으며 (表 8), 放線菌中에서는 拮抗作用을 나타내는 菌株는 없었다. 拮抗菌의 참깨 疫病菌 菌絲 生育 抑制 程度는 서로 다르게 나타났다. 細菌中에는 JB-2 菌株가 生育 阻止帶의 길이가 9.3 mm로서 가장 效果的이었으며 真菌中에서는 2 個 菌株가 生育 阻止帶를 形成하였고 나머지 6 個 菌株는 競爭的인 菌絲 生長을 나타내었다. (表 9)

이와같이 培養基上에서 참깨 疫病菌의 菌絲 生育을 抑制하는 菌을 拮抗菌으로 選拔하여 이들의 참깨 種子 發芽에 미치는 影響과 참깨

Table 7. Suppressive effects on the *Phytophthora* blight in pepper caused by *Phytophthora capsici* when three 40-day old seedlings were planted in mixed suspension of *P. capsici* and each antagonistic bacterium

Inoculum mixed with suspension <sup>a/</sup>	Number of diseased plants after inoculation time (hr)			% of infection
	24	48	96	
Y-5	0	0	0	0
KB-11	0	0	0	0
LH-3	0	0	0	0
KB-7	0	0	0	0
S-9	0	0	1	33
AT-2	0	0	1	33
DC-13	0	0	1	33
UB-7	0	0	1	33
BC-1	0	0	1	33
BD-1	0	1	1	66
AT-4	0	1	2	66
AC-3	0	0	2	66
UA-2	0	0	2	66
DC-12	0	1	3	100
UB-3	0	0	3	100
AD-7	0	2	3	100
<i>Phytophthora</i> only	1	1	3	100

A Mixed suspensions were incubated for two days around 25 C. Then pepper seedlings, cultivar Hanbyul were placed in the test tub.

Table 8. Isolation of soil microorganisms and selection of antagonists to *Phytophthora nicotinae* var. *parasitica*

Soil Samples from	Number of isolates				Number of antagonistic isolates			
	Fungi	Bacteria	Actino.	Total	Fungi	Bacteria	Action.	Total
Chungbuk, Cheongweon	30	9	6	45	2	0	0	2
Chungnam, Asan	51	68	0	119	0	0	0	0
Kyunggi, Hwaseong	35	21	0	56	0	1	0	1
Kyunggi, Pyungtaek	10	5	0	15	0	0	0	0
Kyunggi, Suweon	49	24	0	73	0	1	0	1
Kyungbuk, Yecheon	46	40	0	106	0	0	0	0
Jeju	25	21	27	73	4	12	0	16
Total	246	188	33	487	6	14	0	20



Table 9 . Antagonistic effects of microorganisms isolated from soil on the growth of *Phytophthora nicotianae* Var . *parasitica*

Microorganism	Isolate	Inhibition of growth(mm)
Bacterium	JA - 1	5 . 3
"	JA - 2	6 . 3
"	JA - 3	5 . 6
"	JA - 4	5 . 3
"	JA - 5	3 . 6
"	JA - 6	3 . 0
"	JB - 1	4 . 6
"	JB - 2	9 . 3
"	JB - 3	5 . 0
"	JB - 4	4 . 6
"	JB - 5	3 . 0
"	JB - 6	3 . 6
"	B - 2 - 3	5 . 0
"	HI 10 - 3	2 . 0
Fungus	CF - 4	5 . 6
"	CF - 7	5 . 0



Photo 5. Suppressive effects on development of Phytophthora blight in pepper (The left was inoculated with *P. capsici*, the center and the right were inoculated with a mixture of *P. capsici* and antagonists).



Photo 6. Suppressive effects on development of Phytophthora blight in sesame (The left and the 2nd were inoculated with a mixture of *P. nicotianae* var. *parasitica* and antagonists. The 3rd was inoculated with *Phytophthora* only. The 4th was uninoculated).



Photo 7. Antagonistic inhibition of *Phytophthora* mycelial growth. The round circles are antagonistic bacteria.



Photo 8. Cultural characteristics of antagonistic bacteria on potato dextrose agar.

疫病菌의 遊走子囊과의 混合한 Suspension 狀態下에서 拮抗效果를 究明하기 위한 試驗結果 表 10 에서와 같이 다소 참깨種子 發芽를 抑制하는 菌과 오히려 發芽를 促進하는 菌株가 있었다. 對置培養의 結果에서 拮抗菌으로 選拔된 菌의 Suspension만으로 참깨 種子 發芽試驗을 한 結果 JA-1, JA-3, JA-4, JA-6, JB-4 등의 菌株는 참깨 種子의 發芽率을 현저하게 抑制시키는 것으로 판단되어 對置培養에서 疫病菌의 菌絲 生育을 강력하게 抑制시켰지만 拮抗菌으로서 가치가 없는 것으로 판단하였으며, JB-1, JB-2, JB-3, JB-6, B-2-3, HI 10-3 등의 菌株는 참깨 種子 發芽에 전혀 나쁜 影響을 주지 않은 것으로 나타났으며, 특히 B-2-3 菌株는 發芽率을 增進시켰다. JB-2, JB-5, HI 10-3 등은 疫病菌의 孢子 懸탁액과 混合한 Suspension에서도 참깨 種子를 각각 77.8%, 81.8%, 90%發芽시켜 참깨 疫病菌에 대한 拮抗菌으로서 利用可能性이 높은 우수한 菌으로 생각된다.

#### 나. 溫室 팻트 試驗

室內 試驗中 對置 培養과 참깨 種子 發芽 試驗에서 우수한 拮抗菌으로 選拔된 拮抗細菌 4 菌株를 溫室에서  $10^7$  cfu/g pot soil 이 되게 接種하고 참깨 疫病菌을 pot 당  $2 \times 10^3$  sporangia씩 接種한 後 病發生率을 조사한 結果 表 11 과 같은 結果를 얻었다. 拮抗菌을 處理하지 않은 對照區에서 97.2%의 發病率을 보인 반면 HI 10-3 와 JB-5 接種區에서는 發病率이 각각 16.7%, 52.8%로서 상당히 疫病發生을 抑制하는 것으로 나타났으며 JB-1 과 JB-2 處理區는 對照區와 차이가 없어 土壤內에서 참깨 疫病菌에 대한 拮抗 效果가 없는 것으로 생각된다.

Table 10 .    Suppressive effect of soil microorganism on pathogenicity in sesame by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica*

Test isolates	Germination of sesame seeds ( % )	
	without pathogen	with pathogen
JA-1	50 . 0	8 . 3
JA-2	81 . 8	0 . 0
JA-3	50 . 0	0 . 0
JA-4	54 . 5	0 . 0
JA-5	70 . 0	0 . 0
JA-6	45 . 5	0 . 0
JB-1	90 . 0	33 . 3
JB-2	90 . 0	77 . 8
JB-3	90 . 0	0 . 0
JB-4	70 . 0	18 . 2
JB-5	81 . 8	81 . 8
JB-6	91 . 7	0 . 0
B-2-3	00 . 0	0 . 0
HI-10-3	90 . 9	90 . 0
Control (Water)	90 . 0	0 . 0

Table 11. Effect on disease suppression of sesame *Phytophthora* blight when inoculated with antagonistic bacteria isolated from soil

Treatment with the pathogen	Diseased plant(%)	Treatment antagonist only	Diseased plant(%)
<i>Phytophthora</i>	97.2	Water control	0
HI 10-3	16.7	HI 10-3	0
JB-1	100.0	JB-1	0
JB-2	92.0	JB-2	0
JB-5	52.8	JB-3	0

### 3. 참깨 疫病菌의 培養的 特性

참깨 疫病菌의 生長과 孢子形成에 적합한 培養器를 選別하기 위하여 V-8 juice agar 培地와 감자한천배지 (Potato Dextrose Agar) 및 Oat meal agar 배지를 供試하여 각각 다른 光條件하에서 疫病菌을 培養하였던 바 表 12 와 같은 結果를 얻었다. 세가지 培養基 모두 暗條件下에서 疫病菌의 菌絲生育은 왕성한 것으로 나타났으나 遊走子囊形成은 가장 미흡 하였고 자외선을 照射한 處理區에서는 孢子 形成은 우수하였으나 菌絲의 生育이 가장 不良 하였다. 반면 60 watts Cool white 형광등하에서는 菌絲의 生育도 왕성 할뿐 아니라 遊走子囊 形成이 우수한 편으로 나타났다.

세가지 培養基中 V-8 juice agar 배지가 참깨 疫病菌의 菌絲 生長과 遊走子囊 形成에 가장 우수한 것으로 나타났으며 Oat meal agar 培地는 菌絲의 生育은 빨랐으나 氣中菌絲 (Aerial mycelia) 가 많고 菌絲體 (Mycelial mat) 가 미약하고 孢子 형성이 불량 하였다. 이 結果로서 참깨 疫病菌의 培養에 가장 적합한 培養基는 V-8 juice agar 培地로 생각되며 疫病菌을 培養한지 약 5日後에 氣中菌絲를 제거하고 光 條件下에 2~3日 培養하는 것이 孢子 形成에 가장 우수한 것으로 생각된다.

## 第 3 節 拮抗菌의 分類 同定

### 1. 培養的 特性

고추 疫病菌 및 참깨 疫病菌에 대한 拮抗菌으로 選拔된 細菌 10個 菌株의 Nutrient Agar 培養基上的 Colony 모양과 색깔, 크기, 가장자리의 形態 (表 13) 등은 서로 相異하였으며 培養基의 種

Table 12. Mycelial growth and sporangium formation of *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* on media under different light conditions at  $27 \pm 2C$

Culture media	Days after incubation	Colony diameter (cm)			Degree of sporangium abundance		
		light	dark	UV	light	dark	UV
V-8 juice	3	7.0	7.2	3.5	b	c	b
agar	5	9.0	9.0	7.3	a	c	b
PDA	3	5.0	5.2	3.5	d	d	c
	5	7.7	7.2	5.5	d	d	c
OMA	3	6.8	7.0	4.6	d	d	c
	5	9.0	9.0	8.0	d	d	c

- a/ The colony size represents the average cm of five replicates .
- b/ The light was under 60 watts cool white fluorescens bulbs .
- c/ The symbol of sporangium abundance signifies from abundant to never sporulated ( a----- d )



Table 13 Cultural characteristics of the selected antagonistic bacteria to *Phytophthora capsici* and *P. nicotianae* var. *parasitica* on nutrient agar media after 48 hrs incubation at  $28 \pm 2$  °C

Isolates	Origin	Colour	Colony form	Elevation	Margin	Colony size(mm)
JC-1	No disease field	Milky white	Punctiform	Convex	Undulative	0.5-1.5
JC-4-2	No disease field	Light yellow Milky	Punctiform	Convex	Undulative	0.5-1.5
UB7-1	Organic soil	Yellow white	Circular	Flat	Entire	2.5-3.5
UB7-2	Organic soil	White	Irregular	Flat	Undulate	3.0-5.0
LH-3	No disease field soil	Yellowish	Circular	Convex	Entire	1.5-2.0
KB7-1	Rhizosphere	Yellow white	Circular	Flat	Entire	2.5-3.5
KB7-2	Rhizosphere	Yellow	Irregular	Raised	Curled	3.0-5.0
KB7-3	Rhizosphere	White	Irregular	Umbonate	Lobate	5.0-10.0
S-9	Lime soil	Hyaloid	Irregular	Umbonate	Undulate	1.5-2.0
HI10-3	No disease field soil	Yellowish green	Circular	Convex	Entire	1.5-2.0

類에 따라 Colony의 形態的 特性은 매우 달랐다 (Photo 8)

## 2. 電子 顯微鏡 觀察

각 拮抗細菌들을 5,000 ~ 20,000 倍率의 電子 顯微鏡으로 觀察한 결과 사진과 같이 10個 菌株 모두 桿狀 (Rod shape) 이었으며 鞭毛 (Flagella) 를 가지고 있었다. S-9 菌株의 細胞는  $4.0\mu \times 1.3\mu$  로 그 중 가장 컸으며 周毛 (Peritrichous flagella) 를 가지고 있었다. LH-3 菌株는 세포의 크기가  $1.2\mu \times 0.8\mu$  로서 가장 작았으며 極毛 (Polar flagella) 를 가지고 있었다. (Photo A-D).

## 3. 拮抗 細菌의 分類 同定 結果

앞의 試驗 結果 그람 陽性이면서 耐性胞子 (Endospore) 를 形成하는 桿菌 (Rod shape) 의 Group 과, 그람 陽性菌이며 규칙적인 桿狀의 胞子を 形成하지 않는 菌의 Group (表 13), 그리고 그람 陰性이며 桿狀의 純好氣性菌 (表 14) 의 세 Group 으로 區分되었다.

그람 陽性菌이면서 耐性胞子を 形成하는 桿菌인 UB7-2, KB 7-3 JC4-1, JC4-2, S-9 등은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2의 Section 13에 속하는 菌들로서 Catalase를 生成하는 特性으로 보아 *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* 菌 Group에서 제외되며, 任意 嫌氣性으로 역시 *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* 菌 Group과 性質이 다를 뿐 아니라 수행된 試驗의 모든 결과가 *Bacillus* 屬菌의 諸 特性과 一致하는 경향이였다. 그러나 이들 細菌의 Species name을 究明하기 위해서는 細部的인 生理的 試驗이 遂行되어야 할 것이다.

그람 陽性이며 規則적인 桿狀의 非胞子 形成菌인 UB7-1과 KB7

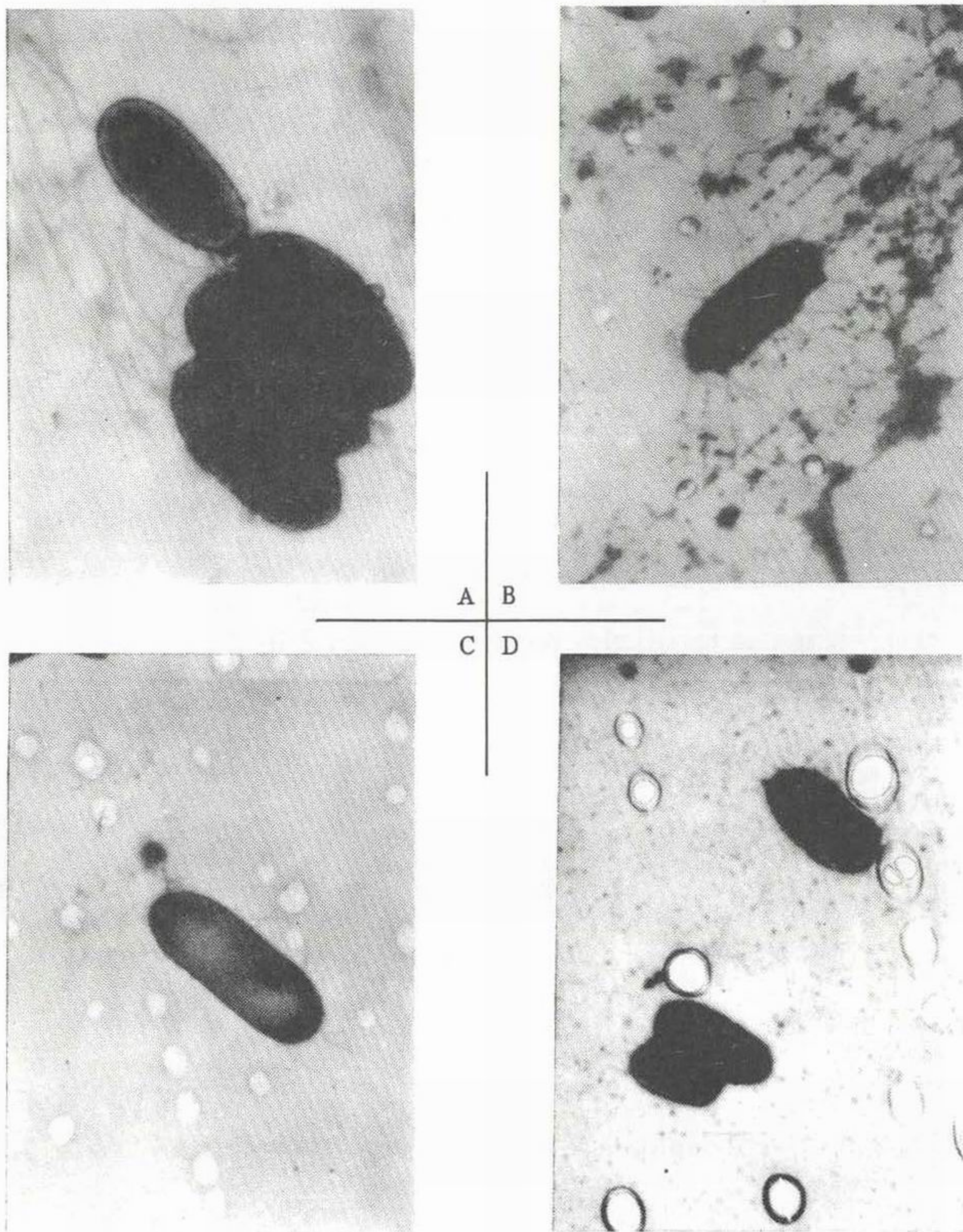


Photo A-D. Electron microscopical morphology of antagonistic bacteria to *Phytophthora capsici* and *P. nicotianae* var. *parasitica*.

A ; LH-3 at 15,000 magnification  
 B ; S-9 at 5,000                    "  
 C ; JC4-2 at 7,000                "  
 D ; HI10-3 at 7,000               "

Table 14. Physiological and morphological characteristics of antagonistic bacteria to *Phytophthora capsici* and *P. nicotianae* var. *parasitica*

Characteristics	Endospore-forming rods					Regular, nonsporing rods	
	UB7-2	KB7-3	JC4-1	JC4-2	S-9	UB7-1	KB7-1
Gram reaction	+	+	+	+	V*	+	+
Endospore	+	+	+	+	+	-	-
Cell shape	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
length( $\mu$ m)	3-7	2-3	2-4	2-4	3-6	2-3	2-3
Motility	W*	+	+	+	+	+	+
Oxygen requirement	F*	F	F	F	F	F	F
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	+	-	-	-	-	-
Urease	-	+	-	-	-	-	+
Hydrolysis of casein	+	+	+	+	+	+	+
starch	W	W	+	+	-	W	W
gelatin	-	+	+	+	-	-	-
Acid from glucose	-	-	-	+	-	+	-
lactose	-	+	+	+	+	-	-
sucrose	-	-	-	-	-	-	-

\* V : Variable, W:weak, and F: facultative anaerobic

-1 菌株는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 의 Section 14 에 속하는 菌으로서 Catalase 를 生成하고 任意嫌氣性이며 運動性이 있는 特性으로 보아 *Listeria* 屬에 포함되는 菌으로 생각되나 이들의 正確한 同定을 爲해서는 좀 더 많은 試驗으로 生理的 性質을 究明해야 할 것이다.

그람 陰性이며 純好氣性 桿菌인 LH-3, KB7-2, HI10-3 菌株는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 의 Section 4 에 속하는 細菌들로서 細胞의 크기와 모양 및 運動性, 培養基上에서의 색소 형성, 糖 利用 能力 等으로 비교 검토한 결과 *Pseudo-monadaceae* 에 포함된다고 할 수 있으나, 試驗 技術上의 問題와 試驗 結果의 解釋 및 菌株의 中間的 性質 等으로 正確한 同定이 어려웠다.

Table 15. Physiological and morphological characteristics of the selected gram-negative aerobic rods antagonistic to *Phytophthora capsici* and *P. nicotianae* var. *parasitica*

Characteristics	Reactions of antagonistic bacterium			
	LH-3	KB7-2	HI10-3	NIR 2112
Gram reaction	—	—	—	—
Cell shape size	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	+	+
Strictly aerobic	+	+	+	+
Anaerobic growth	—	—	—	—
Catalase	W	W	W	+
Oxidase	—	+	—	+
Pigment	+	+	+	—
Fluorescent on KB	—	—	—	+
Denitrification	—	+	+	—
Hydrolysis of				
starch	+	—	+	+
gelatin	—	—	—	—
casesin	+	—	—	—
Fermentation of				
sucrose	+	—	+	—
glucose	+	—	+	+
lactose	—	—	+	—
Growth at				
10 C	+	+	+	+
40 C	+	+	+	+

## 第4章 参 考 文 献

1. AHMAD, J.S., BAKER, R. 1985. Induction of rhizosphere competence in *Trichoderma harzianum* (Abstr.)  
Phytopathology 75:1302.
2. ALCONERO, R. 1980. Crown gall of peaches from Maryland, South Carolina, and Tennessee and problems with biological control. Plant Dis. 64:835-838.
3. ALEXANDER, M. 1977. Introduction to soil Microbiology. John Wiley & Sons, New York, 467pp.
4. AL-HAMDANI, A.M., LUTCHMEAH, R.S., and COOKE, 1983. Biological control of *Pythium ultimum* induced damping-off by treating cress seed with the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Plant Pathology 32, 449-454.
5. AGERS, W.A. 1971. Induction of sporangia in *Phytophthora*. In *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 61:1188-1193.
6. ABD-EL MOITY, T.H., PAPANIZAS, G.C., AND SHATLA, M.N. 1982. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. Phytopathology 72:396-400.
7. BACKMANN, P.A. AND RODRIGUEZ-KABAND, R. 1965. A system for the growth and delivery of biocontrol agents to the soil. Phytopathology 65:819-821.
8. BAKER, R. 1968. Mechanisms of biological control of soilborne pathogens. Annu. Rev. Phytopath. 6:263-294.

9. BAKER, R. AND I. CHET. 1982. Induction of suppressiveness. page 35-50 in P.W. Schneider (ed.) "Suppressive soils and Plant diseases". Am. Phytopath. Soc., St. Paul. 88pp.
10. BAKER, K.F., AND W.C. SNYDER, Eds. 1965. Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control. Univ. Calif. Press, Berkeley. 571pp
11. BATTENFIELD, S.L. 1981. Proceedings of the national Interdisciplinary biological control conference, 15-17 Feb. 1983, Las Vegas, NV. CSRS/USDA, Washington, D.C.
12. BENNETT, R.A. AND LYNCH, J.M. 1981. Bacterial growth and development in the rhizosphere of notobiotic cereal plants. J. Gen. Microbiol. 125:95-102.
13. BOUGHTON, T.J., MALAJCZUK, N., AND ROBSON, A.D. 1978. Suppression of the infection of jarrah roots by *Phytophthora cinnamomi*. with application of calcium carbonate. Aust. J. Bot. 26:611-615.
14. BROADBENT, P., AND BAKER, K.F. 1974. Association of bacteria with sporangium formation and breakdown of sporangia in *Phytophthora* spp. Aust. J. Agric. Res. 25:139-145.
15. CHAKRABARTI, D.K., AND BASU CHAUDHARY, K.C. 1980. Correlation between virulence and fusaric acid production in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cartbarni*. Phytopath. Z. 99:43-46.
16. CHNAG, Y.C., CHANG, Y., BAKER, R., KLEIFELD, O., AND CHET, I. 1966. Increased growth of plant induced by the biological control agent. Plant Dis. 70:145-148.



17. CHAO, W.L., NELSON, E.B., HARMAN, G.E., AND HOCH, H.C. 1986. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology* 76:60-65.
18. CHET, I., HADAR, Y., KATAN, J., AND HENIS, Y. 1979. Biological control of soil-borne plant pathogens by *Trichoderma harzianum*. Pages. 585-591. in: *Soil-borne Plant Pathogens*, B. Schippers and W. Gams, eds. Academic press, New York.
19. CHET, I., AND Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol Potential of *Trichoderma harzianum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71:286-290.
20. CHET, I., HARMAN, G.E., AND BAKER, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium spp.* *Microbiol. Ecol.* 7:29-38.
21. COOK, R.J. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology* 75:25-29.
22. DENNIS, L., AND WEBSEER, J, 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans, Br. Mycol. Soc.* 57:25-29.
23. DEVASH, Y., OKON, Y., AND HENIS, Y. 1980. Survival of *Pseudomonas tomatos* in soil and seeds. *Phytopath. Z.* 99. 175-185.
24. ELAD, Y., CHET, I., AND HENIS, Y. 1981. Biological control of *Rhizoctonia solani* in strawberry fields by *Trichoderma harzianum*. *Plant soil.* 60:245-254.

25. ELAD, Y., HADAR, Y., CHET, I., AND HENIS, Y. 1982. Prevention with *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. of infestation by *Sclerotium rolfsii* sacc. and *Rhizoctonia solani* Kühn of soil fumigated with methyl bromide and improvement of disease control in tomatoes and peanuts. Crop Prot. 1:199-211.
26. ELAD, Y., CHET, I., AND KATAN, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70:119-121.
27. ELAD, Y., CHET, I., AND HENIS, Y. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of spp. from soil. Phytoparasitica 9:59-67.
28. EL-SAMRA, I.A., EL FAHAM, Y.M., AND KAMAPA, A.M. 1981. Selective Induction of Infection cushions by *Rhizoctonia solani* in relation to host responses. Phytopath. Z. 102:122-126.
29. ELLIS, J.G. KERR, A., VAN MONTAGU, M., AND SCHELL, J. 1979. Agrobacterium: Genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. Physiol. Plant Pathol. 15:215-223.
30. ERWIN, D.C., AND KATZNELSON, H. 1961. Suppression and stimulation of mycelial growth of *Phytophthora cryptogea* by certain thiamine requiring and thiamin-synthesizing bacteria. Can.J. Microbiol. 7:945-950.
31. GRABSKI, B.C., AND MENDGEN, K. 1985. Einsatz von *V. lecanii* als biologisches schadlings bekämpfung smittel gegenden bohnenro stpilz. *U. appendiculatus* var. *appendiculatus* im feld und im gewachaus. Phytopath. Z. 113:243-251.

32. GILPATRICK, J.D. 1969. Role of ammonia in the control of avocado root rot with alfalfa meal soil amendment. *Phytopathology*. 59:973-978.
33. GILPATRIC, J.D. 1969. Effect of soil amendments upon inoculum survival and function in *Phytophthora* root rot of avocado. *Phytopathology*. 59:979-985.
34. HADAR, Y., CHET, I., AND HENIS, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69:64-68.
35. HALE, M.G., MOORE, L.D., AND GRIFFIN, G.J. 1978. Root exudates and exudation, Pages 163-203 in: *Interactions Between Non-pathogenic Microorganisms and Plant roots*. V.R. Dommergues and S.V.Krupa, eds, Elsevier, Amsterdam.
36. HARMAN, G.E., AND HADAT, Y. 1983. Biological control of *Pythium* spp. *Seed Sce. Technol.* 11:893-906.
37. HARMAN, G.E., CHET, I., AND BAKER, R. 1980. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 70:1167-1172.
38. HONEY, D. 1983. Suppressive soil. *Ann. Rev. Phytopath.* 21:65-83.
39. HOITINK, H. A. J., VANDOREN, D. M., SCHMITTHENNEZ, A.F. 1977. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in a composted hardwood bark potting medium. *Phytopathology* 67:561-565.

40. HOWELL, C. R., AND R.D.STIPANOVIC. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, pyolutechin. *Phytopathology*. 70:712-715.
41. HUS, S.C., AND LOCKWOOD, J.L. 1984. Biological control of Phytophthora root rot of soybean by *Hyphochytrium catenoides* in green house tests. *Phytopath. Z.* 109:139-146.
42. HTAY, K., AND KERR, A. 1974. Biological control of crown gall: seed and root inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* 37:525-530.
43. ISENBECK, M., AND SCHULA, F.A. 1985. Biological control of firebright(*Erwinia amylovora*) on ornamentals. *Phytopath. Z.* 113:324-323.
44. JACKSON, R. M. 1965. Antibiotics and fungistasis of soil microorganisms. Page 363-373 in; *Ecology of soil borne plant pathogen; Prelude to biological control*. K.F. Baker and W.C.Snyder, eds. Univ. Calif. Press, Berkeley.
45. KERR, A., AND HTAY, K. 1974. Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol. Plant Pathol.* 4:37-44.
46. KELLY, W.D., AND RODRIGUEZ-KABANA, R. 1976. Competition between *Phytophthora cinnamomi* and *Trichoderma* spp. in autoclaved soil. *Can. J. Microbiol.* 22:1120-1127.
47. KO. W. H., AND W.C. HO. 1983. Screening soils for suppressiveness to *Rhizoctonia solani* and *Pythium splendens* *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 49:1-9.

48. KO, W. H. 1971. Biological control of seedling root rot of papaya caused by *Phytophthora palmivora*. Phytopathology 61:780-782.
49. LEWIS, J. A., AND PAPAIVIZAS, G.C.1985. Characteristics of alginate Pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. Plant pathology. 34:571-577.
50. LIU, S., AND BAKER, R. 180. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70:404-412.
51. MADDEN, L.V., KNOKE, J.K., AND LOUIE, R. 1982. Consideration for the use of multiple comparison procedures in phytological investigations. Phytopathology 72:1015-1017.
52. MENDEZ-CASTRO, F.A., AND ALEXANDER, M. 1983. Method of establishing a bacterial inoculum on corn roots. Appl. Environ. Microbil. 45:248-254.
53. MORRIS, M. J.1983. Evaluation of field trials with *Colletotrichum gloeosporioides* for the biological control of hakea disease Phytophylactica. 15:13-16.
54. MOORE, L.W., AND WARREN, G. 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. Ann. Rev. Phytopathol. 17:163-179.
55. NEWMAN. E.I., AND BOWEN, G.D. 1974. Patterns of distribution of bacteria on root surfaces. Soil Biol. Biochem. 6:205-209.
56. NESBITT, H.J.,MALAJACZUK,N., AND GLENN, A. R. 1981. Bacterial colonization and lysis of *Phytophthora cinnamomi*. Trans. Br. Mycol. Soc. 77:47-54.

57. PAPAIVIZAS, G.C. 1967. Survival of root infecting fungi in soil, I.A. quantitative propagule assay method of observation. *Phytopathology* 57:1242-1246.
58. PAPAIVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Glucadium*, Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopath.* 23:23-24.
59. PAPAIVIZAS, G. C. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizosphere. *Phytopathology* 71:121-125.
60. PAPAIVIZAS, G.C., LEWIS, J.A., AND ABD-EL MOITY, T. H. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capability. *Phytopathology* 72:126-132.
61. PARK, CHANG-SEUK. 1984. Bacteria associated with soils suppressive to cucumber wilt caused by *Fusarium oxysporium* sp. *cucumerium*. Ph. D. thesis, Seoul Nat'l Univ. 87pp.
62. PANAGOPOULOS, C.G., PSALLIDAS. P.G., AND STYLIANIDIS, D.C. 1983. Current work on the effectiveness of biocontrol of crown gall, International workshop on crown gall: *Agrobacterium tumefaciens*. 67-78.
63. PANOGOPOULOS, C.G., PSALLIDAS, P.G., AND ALIVIZATOS, A.S. 1979. Evidence of a breakdown in the effectiveness of biological control of crown gall. *Soil-borne Plant.* 569-578.
64. ROVIRA, A.D. 1959. Plant root exudations in relation to the rhizosphere effect, IV. Influence of Plant species, age of plants, light, temperature and calcium nutrition on exudation. *Plant Soil.* 11:53-64.

65. ROBERT, W.P., AND KERR, A. 1974. Crown gall induction; Serological reactions, isozyme patterns, and to bacteriocin of pathogenic and non-pathogenic strains of *Agrobacterium radiobacter*. *Physiol. Plant Pathol.* 4:81-92.
66. ROSE, S.L., LI, C.Y., AND HUTCHINS, A.S. 1980. A streptomycetes antagonistic to *Phellinus weirii*, *Fomes annosus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Can. J. Microbiol.* 26:583-587.
67. ROVIRA, A.D. 1973. Zones of exudation along Plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. *Pestic. Sci.* 4:361-366.
68. RUPPEL, E.G., BAKER, R., HARMAN, G.E., HUBBARD, J.P., HECKETR, R.J., AND CHET, I. 1983. Field tests of *Trichoderma hazianum* Rifai aggr. as a biocontrol agent of seedling disease in several crops and Rhizoctonia root rot of sugar beet. *Crop Prot.* 2:399-480.
69. SCHER, F. M., ZIEGLE, J.M., AND KLOEPPER, J.W. 1983. A method of assessing the root colonizing capacity of bacteria maize. *Can. J. Microbiol.* 51:151-157.
70. SCHER, F. M., AND R. BAKER. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelater on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt. *Phytopathology* 72:1567-1573.
71. SCHORIELD, R.K., AND TAYLOR, A.W. 1955. The measurement of soil pH. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 19:164-167.

72. SNEH, B., HUMBLE, S.J., AND LOCKWOOD, J.L. 1977. Parasitism of oospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, *P. cactorum*, *Pythium* spp., and *Aphanomyces euteiches* in soil by Oomycetes, Chytridiomycetes, Hyphomycetes, Actinomycetes and Bacteria. *Phytopathology* 67:502-510
73. SNEH, B. 1981. Use of Rhizosphere chitinolytic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporium* f. sp. *dianthi* in carnation. *Phytopath. Z.* 100:251-256.
74. SCHMIDT, E.L. 1979. Initiation of plant root microbe interactions. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:355-379.
75. SCHROTH, M.N., AND HILCEBRAND, D.C. 1964. Influence of plant exudates on root-infecting fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2:389-393.
76. SMITH, S.N. 1977. Comparison of germination of pathogenic *Fusarium oxysporium* chlamydospores in host rhizosphere soils conducive and suppressive to wilt. *Phytopathology* 67:502-510.
77. STRASHNOW, Y., ELAD, Y., SIVAN, A., AND CHET, I, 1985. Integrated control of *Rhizoctonia solani* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology* 34:146-151.
78. SUNDHEIM, L. 1982. Control of cucumber powdery mildew by the hyperparasite *Ampelomyces* and fungicides. *Plant Pathology* 31:209-214.
79. WELLS, H.D., BELL, D.K., AND JAWORSKI, C.A. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62:442-447.



80. WINCHAM, M., ELAD, Y., AND BAKER, R. 1986. A mechanism of increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76:518-521.
81. WELLER, D.M., AND R.J. COOK. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*. *Phytopathology* 73:463-469.
82. ZENTMYER, G.A. 1963. Biological control of Phytophthora root rot of avocado with alfalfa meal. *Phytopathology* 53:1368-1387.