



Bacillus amyloliquefaciens PPL과 식물추출물의 혼합 제형과 유효성분 Fengycin에 의한 토마토 시들음병 방제

강범용* · 정우진¹ · 박준성²전남대학교 친환경농업연구소, ¹전남대학교 농업생명과학대학 농화학과, ²국제분석연구원

Effect of Fengycin-type Lipopeptides in the Biocontrol Potential of the Formulation with *Bacillus amyloliquefaciens* PPL and Plant Extract

Beom Ryong Kang*, Woo-Jin Jung¹, Joon Seong Park²

Institute of Environmentally-Friendly Agriculture, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

¹Department of Agricultural Chemistry, Institute of Environmentally-Friendly Agriculture (IEFA),

College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

²International Analysis Institute, Naju 58325, Republic of Korea

(Received on June 1, 2020. Revised on June 10, 2020. Accepted on June 11, 2020)

Abstract *Bacillus amyloliquefaciens* PPL was evaluated the effectiveness of formulations with plant extracts for the biological control of tomato Fusarium wilt. The formulated mixture of plant (*Azadirachta indica* and *Derris elliptica*) and antagonistic strain PPL strongly inhibited the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The control efficiency for the tomato Fusarium wilt was more effective the NR formulation in the field test. When the 250-folds diluted formulation was applied 3 times or more at 7 day intervals, it showed the control value of 60% or more compared to the control. Strain PPL in the formulation showed control efficiency at a ratio of 15% or more of the total content. *B. amyloliquefaciens* PPL produces several cyclic lipopeptides (CLPs) including iturin A, fengycin, and surfactin. Fengycin lipopeptides were the main active ingredient against sporulation suppression and tomato Fusarium wilt. Therefore, the formulation with *B. amyloliquefaciens* PPL was found to improve the control for Fusarium wilt as well as the suppression of fungal pathogens. These results of this study indicate that the formulations could be used as an available biocontrol agent for controlling Fusarium wilt disease.

Key words *Bacillus amyloliquefaciens* PPL, Lipopeptides, Plant extracts, Tomato Fusarium wilt

서 론

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL)에 의해 발생하는 토마토 시들음병(Fusarium wilt)은 전 세계적으로 토마토(*Solanum lycopersicum*) 재배지에서 가장 발병이 심하며 오래 전부터 고질적으로 발생하는 병해이다(Gale et al., 2003; Huang et al., 2016). FOL 병원균에 의한 감염된 어린 유묘는 아랫잎부터 황화되고 도관부의 갈변증상이 뚜렷하다

(Huang et al., 2016). 병징이 진전되어 감염된 식물체는 개화기부터 수확기까지 증상이 전체적으로 나타나며 부분적으로 잎이 황변되기도 하지만, 전체적으로 전염되고 위쪽으로 진행되어 시들음 증상이 나타나 결국 고사하게 된다(Jones et al., 2014). 도관부의 갈변증상은 뿌리에서부터 시작되는 Fusarium wilt의 전형적인 증상이며, 일부 열매에서도 발생하여 부패와 낙과를 일으킨다. 토마토 줄기에 감염된 FOL은 분생포자 형태로 공기중 전파되어 전염시키며, 종자전염, 토양전염 및 감염된 유묘 등을 통해 전염된다(Jones et al., 2014; Huang et al., 2016).

토마토 시들음병을 방제하기 위한 가장 효과적인 화학적

*Corresponding author
E-mail: brkang@jnu.ac.kr

방제 방법은 메틸브로마이드를 이용한 토양소독법이 있으나, 환경 및 인축에 대한 안전문제로 사용이 제한되면서 전 세계적으로 어려움에 직면해 있다(Huang et al., 2016). 이러한 문제점을 해결하고자 현재 다양한 방법으로 FOL의 밀도를 낮추기 위한 대안들이 이용되고 있는데, 석회시용, 태양소독, 윤작 등의 방법들을 이용하지만 토양 내 존재하는 FOL을 제거하기 위한 근본적인 방법으로는 매우 제한적이다(Chellemi et al., 1997; Jones et al., 2014). 메틸브로마이드를 대체할만한 토양 혼중제들이 토마토 시들음병 발생을 효과적으로 감소시키는 보고가 있었지만(Yucel et al., 2007), 식물 줄기에 존재하는 FOL의 포자가 혼중된 토양 내에 발아하면서 다시 정착하여 식물체에 발생하였다(Katan et al., 1997). 또한 화학물질을 이용한 토양 혼중은 방제비용이 높으며, 사회적 및 환경적인 규제로 인해 반대 의견이 높다(Gamliel et al., 2000). 최근에는 유용미생물 등을 이용한 생물학적 방제로 토마토 시들음병을 관리하는 방법들이 연구되고 있지만(Larkin and Fravel, 1998; Larena et al., 2002; Son et al., 2009; Kang, 2011), 대부분 실내검정과 유묘검정에 국한(De Cal et al., 1995; Son et al., 2009; Kang et al., 2019) 되어 있기 때문에 추가적인 농가현장 기반 연구가 필요하다. FOL 관리를 위한 대체 전략 중 생물적 방제법의 지속가능하고 신뢰할 수 있는 연구로 발전시키기 위해 주요 방제물질과 그 유효성분 분석은 FOL에 대한 억제 기준을 설정하고, 병 방제에 대한 관리 전략의 영향을 평가하는 연구를 크게 촉진시킬 수 있다(Medeot et al., 2017).

앞선 내용에서 유용미생물과 천연자원 등을 이용한 토마토 시들음병에 대한 생물적 방제들이 보고가 있었다. 특히, *Bacillus*는 강력한 항균활성물질 생산과 더불어 환경 스트레스 등에 대한 저항성이 잘 알려져 있기 때문에 효과적인 생물적 방제 수단으로 이용되고 있다(Nagórska et al., 2007; Ongena and Jacques, 2008). 최근에 *Bacillus* 균주에 의해 생산되는 다양한 구조를 갖춘 lipopeptide들이 식물바이러스, 세균, 곰팡이, 효모, 선충 등에 대한 길항물질로서 역할을 하고 있으며(Zihalirwa Kulimushi et al., 2017; Yáñez-Mendizábal and Falconí, 2018), 그 중 iturin A, fengycin, surfactin 등 cyclic lipopeptides (CLPs)가 잘 알려져 있다. 일반적으로 Iturin 계열은 효모와 곰팡이 등에 대한 강력한 항진균활성을 나타내고 있는 반면에, fengycin 계열은 사상균류 등 곰팡이에 대한 다범적으로 항진균활성을 나타내면서 식물체에 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다(Vanittanakom et al., 1986; Moyne et al., 2001; Yu et al., 2002). Surfactin 계열은 주로 생물적 계면활성제로 biofilm을 생성하고 식물체에 저항을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다(Ongena and Jacques, 2008).

화학농약과 미생물을 함께 사용한 경우 충분한 식물병해충 방제효과를 얻기가 어렵기 때문에 식물추출물 또는 기존

의 살균제와 미생물농약을 함께 사용한 연구가 보고되었다(Kang et al., 2019). 식물추출물로부터 얻어진 천연물질인 니코틴 계열, 로테논 계열, 님 계열과 미생물 단백질 계열들은 주요 합성농약의 유효성분과 동일하거나 화학적인 가공을 위해 응용되었다. 님(*Azadirachta indica*) 씨앗에서 추출한 님, 담배(*Nicotiana tabacum*, *N. rustica*) 잎의 니코틴, 데리스(*Derris elliptica*) 뿌리에서 추출한 로테논 등은 주로 살충성분으로 해충의 섭식작용과 탈피작용 억제, 접촉독성, 식독성 및 기피제 특성으로 잘 알려져 있으며, 주로 *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) 균주와 혼합하여 사용되어져 왔다(Dayan et al., 2009; Kim and Kim, 2009; Han et al., 2015). 균주들은 대부분 병해충 방제에 국한되어 있으며, 배양조건에 의해 생산되는 대사물질의 양이나 농도에 의한 식물병원균의 항균능력에 대한 연구가 이루어져 왔다(Li et al., 2016).

현재까지 FOL 제어를 위한 *Bacillus* 균주의 효과는 주로 배양액과 배양상등액을 사용하여 평가되었으나(Kang, 2011), 현장에서 *Bacillus* 균주 기반 제형을 사용하여 수행된 연구는 거의 없었다. 또한 생물적 대사물질과 그 유효성분 분석에 의한 현장 연구는 첫 연구보고이다. 앞선 보고에서 fengycin, iturin A와 surfactin 등의 CLPs를 생산하는 생물적 방제균주인 *B. amyloliquefaciens* PPL은 토마토 시들음병원균, 고추 탄저병원균, 벼 잎집무늬마름병원균에 대해서 높은 항균활성을 나타냈다(Kang et al., 2019). 또한 본 연구와 같은 방법으로 균주 PPL과 식물추출물을 혼합한 제형은 해충방제 효과검정에서 식물추출물의 주요 작용으로 높은 방제효과를 나타냈다(Kang et al., 2019). 따라서 본 연구의 목적은 CLPs를 생산하는 *B. amyloliquefaciens* PPL과 식물추출 천연물질을 혼합한 제형의 식물병에 대한 방제효과 검정과 그 유효성분 등을 분석하고 현장에서 적용하여 처리방법 등을 결정하는 것이다.

재료 및 방법

B. amyloliquefaciens PPL과 식물추출물의 혼합제 제조 및 항균활성 검정

식물병 방제제로 사용할 혼합제형물은 *B. amyloliquefaciens* PPL 배양상등액과 식물추출 농자제들을 이용하여 제조하였다(Kang et al., 2019). MBP 배지(5% peptone, 5% casamino acid, 1% mung bean extract, 0.1% yeast extract, 0.3% vegetable oil, 0.1% NaCl, 0.1% egg yolk, w/v)에서 28°C, 120 rpm으로 5일 진탕 배양한 *B. amyloliquefaciens* PPL (1×10^7 cfu/ml)은 0.2 µm membrane filter (Millipore Filter Corp., Bedford, MA, USA)로 여과하여 균을 제거하고 사용하였다. 식물추출물은 님(azadirachtin 0.75%) 오일, 데리스(rotenone 0.05%), 담배 잎 추출물(nicotine 2.2%)의

원재를 구입(그린포커스, 화성, 경기) 사용하였다. 미생물 상등액과 님:테리스 혼합물(NR) 또는 담배 잎 추출 혼합물(TB) 2종을 이용하여 생물 검정에 사용하였다. 각 제형물의 혼합 농도와 살포농도는 미생물 상등액 10~30% (v/v)를 기본함유량으로 사용하면서 님과 테리스 2% (v/v)를 혼합한 NR과 담배 잎 추출물(nicotine) 2% (v/v)를 혼합한 TB를 각각 혼합한 제형을 각 농도별로 희석하여 살포하였다.

각 혼합제형물의 항균활성을 측정하기 위해서 Potato Dextrose Agar (PDA, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany; Potato, Infusion from (solids) 4 g, Dextrose 20 g, Agar 15 g per liter)에서 5일간 배양한 공시 병원균의 균사 선단에서 직경 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 각 제형 함유별로 조제된 PDA 혼합 배지 위에 치상 3일 후 균사 생육을 관찰하였다. 각 처리는 독립적으로 3회 수행하였고, 3반복으로 진행하였다. 본 연구에 사용된 토마토 시들음병균 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* KACC 40043 (FOL43)과 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* KACC 40046 (FOL46)은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원정보센터(Korean Agricultural Culture Collection (KACC), National Agrobiodiversity Center, Jeon-ju, Korea)에서 분양 받아 사용하였다.

혼합제형물의 토마토 시들음병 방제효과 검증

각 혼합제형물에 대한 토마토 시들음병원균의 포자발아억제 조사를 위한 시험은 병원성 곰팡이균 FOL을 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후 20 ml 멸균수를 넣어 포자를 수집하고, 멸균된 cheese cloths를 이용하여 포자현탁액을 회수하였다. 포자는 hemacytometer (Paul Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Konigshofen, Germany)에서 포자 현탁액 농도를 조절하여 사용하였다. 포자발아억제능력 조사는 12 well plate (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에 각 혼합제형물 1%와 PDB (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) 10%를 혼합하고 200 μ l의 포자현탁액(1×10^4 spores/ml)을 제조하여 25°C에서 20시간 동안 120 rpm으로 배양하면서 포자발아억제율을 조사하였다. 광학현미경하에서 발아관의 길이가 포자 장경의 1/2 이상인 것을 발아한 것으로 계산하여 각 반복별 100개의 포자에 대한 발아 유무를 관찰하였으며 3반복으로 조사하였다. 대조구는 멸균된 10% PDB 배지를 사용하였다.

유묘검정은 각 혼합제형물을 200배로 희석하여 4엽기 토마토(*Solanum lycopersicum* L. cv. TenTen) 유묘에 3일 간격으로 2회 20 ml씩 관주한 후 3일 후에 병원균을 접종한 후 생육실 및 온실(25 \pm 3°C, 16L : 8D, RH 50~60%)에서 실시하였다. 병원균 접종은 토마토 유묘에 지체부에서 1 cm 떨어진 곳에서 45°로 2 cm 깊이의 뿌리에 상처를 주고 FOL 포자 현탁액(1×10^6 conidia/ml)을 관주한 후 4주 후에 병조사를 하였으며, 처리당 5주씩 4반복 수행하였다. 토마토 시

들음병 병조사는 발병지수에 의해 도관부의 갈변 여부와 생육 상태로 발병 정도를 조사하였다. 발병 지수는 0 = 건전, 1 = 도관이 갈변되거나 지상부의 생육은 정상인 것, 2 = 도관이 갈변되고 지상부의 생육이 약간 억제된 것, 3 = 도관이 갈변되고 지상부는 생육이 억제되고 약간 황화한 것, 4 = 생육이 심하게 억제 되고 황화하여 시들고 낙엽된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였다.

온실포장검정은 전남대학교 농생물관리단의 비닐하우스에서 공시된 토마토 품종(텐텐)을 과종하여 6주된 유묘를 40 \times 35 cm 간격으로 두 줄로 토경재배 하였다. 혼합제형물은 각 처리구역(200 \times 40 cm)에 정식 후 30일차에 농도별, 살포회수별로 처리하였고, 각 처리구는 10주씩 3반복 난괴법으로 실시하였다. 시들음 병원균검정은 혼합제형물을 처리하기 5일 전에 이병토(FOL 2.1×10^5 conidia/g of soil)를 지면에서 5 cm 깊이에 100 g씩 접종하였다. 처리농도별 처리는 7일 간격으로 100, 250, 500, 750, 1000배로 희석하여 5회 처리하였고, 살포회수별 처리는 250배 희석된 각 혼합제형물을 7일 간격으로 1, 3, 5회 처리한 후 병 발생율을 조사하였다. 병 발생조사는 제형 혼합물 최종 처리 30일 후에 발병 지수를 기준으로 발병율($(\sum(\text{발병지수} \times \text{평가된 식물수}) / \text{총 식물수} \times 5) \times 100$)을 조사하였다. 본 연구에서 사용한 모든 방제가(%)는 발병지수에 따른 무처리 대비 발병율로 도출하였다.

균주 배양액의 유효성분 분석 및 항균활성

혼합제형물에 혼합된 PPL 균주가 생성한 주요 유효성분을 분석하기 위해 *n*-butanol을 이용하여 유기용매 층을 분리하였다. 부탄올에 의해 추출된 유기용매 분획층은 진공농축 장치로 완전 농축하여 메탄올로 녹인 후 0.2 μ m syringe filter (Whatman, PTFE, Florham Park, NJ, USA)로 여과한 후 얇은막 크로마토그래피(TLC, 27.0 cm \times 26.5 cm \times 7.0 cm, Sigma-Aldrich) 및 LC-MS/MS (API-3200, AB SCIEX, Framingham, MA, USA) 분석을 위해 사용하였다. MBP 배지에서 28°C, 5일 배양한 상등액에서 추출한 농축액을 TLC plate (silica gel 60, Merck, Germany)에 전개시킨 후 (mobile phase; chloroform - methanol - H₂O = 65 : 25 : 4, v/v/v) 물로 발색시켜 나타난 각 부분을 표준물질의 R_f 값과 비교하면서 획득하였다(Kang et al., 2019). 회수된 각 5곳의 (T1~T5) 부탄올추출물(10 μ g/ml)은 FOL43 (1×10^6 conidia/ml) 포자현탁액이 포함된 PDA 배지 위의 paper disc에 10 μ l를 떨어뜨린 후 포자생육억제율을 측정하였다. 또한 FOL에 대한 균사생육억제 및 유묘검정 조사는 위의 재료 및 방법에서 언급한 방법으로 수행하였다. 각 부탄올추출물의 LC-MS/MS 분석에 사용된 컬럼은 Capcell Core C₁₈ (2.1 mm I.D \times 150 mm, 2.7 μ m)이며, 분리용매는 A (0.1% formic acid in distilled water)와 B (0.1% formic acid in

Table 1. The MRM transition parameters of the analytes in LC-MS/MS

Compound	Precursor ion (Da)	Product ion (Da)	DP ^{b)} (volts)	EP ^{c)} (volts)	CE ^{d)} (volts)	Ionization mode
Iturin A	1043.1	702 ^{a)}	86.0	12.0	125.0	Positive ESI ^{e)}
		184.2	86.0	12.0	93.0	
Surfactin	1036.3	86.1 ^{a)}	86.0	11.0	121.0	Positive ESI
		685.1	86.0	11.0	39.0	
Fengycin	731.9	70.2 ^{a)}	56.0	8.5	127.0	Positive ESI
		84.2	56.0	8.5	95.0	

^{a)}Quantitation ion, ^{b)}Declustering potential, ^{c)}Entrance potential, ^{d)}Collision energy ^{e)}Electrospray ionization.

methanol)를 사용하였다. 모든 화합물은 ESI (electro spray ionization) 및 positive mode에서 이온화 하였고 MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode로 분석하였다(Table 1). 각 표준액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정 한 후 얻어진 크로마토그램상의 peak 면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. 분석을 위한 각 표준용액 fengycin (CAS Number 102577-03-7), surfactin (CAS Number 24730-31-2), iturin A (CAS Number 52229-90-0)는 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)에서 구입하였다:

통계분석

각 처리 평균간의 차이에 의한 유의성 검정은 통계분석은 SPSS 23.0 software (IBM Corporation, Somers, New York, USA)를 사용하여 일원배치 분산분석을 한 후 Duncan의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)으로 유의수준 0.05에서 통계적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

***B. amyloliquefaciens* PPL과 식물추출물이 포함된 혼합제형물의 항균활성 검정**

혼합제형물의 토마토 시들음병원균에 대한 균사생육 및 포자발아 억제 능력을 조사한 결과, PDB 배지 대조구와 미생물 및 식물추출물 단독 처리보다 억제효과가 높았다(Fig. 1A, 1B). 특히, NR 처리는 TB 처리보다 병원균의 포자발아를 27.3% 더 억제하였으며, 미생물(PPL)과 식물추출물(To, Ro:Ne) 단독 처리보다 33~77.1% 높았다. 단독 처리된 각 식물추출물들은 FOL의 포자발아억제에 영향을 미치지 못했으며, 균주 PPL은 대조구보다 유의적으로 39.6% 더 억제하였다. 혼합제형물의 토마토 유묘에서 시들음병에 대한 방제효과를 검정한 결과, 병원균 포자억제능력과 유사한 경향의 결과를 나타냈다(Fig. 1C, 1D). 두 혼합제형물 모두 PPL 균주 처리를 제외하고 유의적 차이가 있었으며, NR은 미생물 및 식물추출물 단독 처리구와도 통계적으로 유의하였다. 200배 농도로 3일 간격, 2회 처리한 혼합제형물 중 NR 처리구의 토마토 유묘는 도관부가 일부 갈변되는 현상이 나타

났지만, 지상부의 생육은 전체적으로 정상적이었다. TB 처리구도 일부 도관부에서 갈변현상이 나타나면서 아랫잎이 황화현상이 나타났다. 그러나 식물추출물 단독처리구에서는 물 처리구(대조구)와 같이 생육이 심하게 억제되고 황화되어 시들고 낙엽지는 현상이 나타났다. 토마토 유묘검정 결과에서도 식물추출물은 병원균의 식물체 도관부 침입 저지에서 큰 역할을 하지 못하였다. *B. amyloliquefaciens*는 합성 배지 TSB에서 배양된 상등액에서 *F. oxysporum*, *R. solani*와 *C. gloeosporioides*에 대한 항균활성이 75.3~89.7%로 높은 억제능력을 나타낸 것으로 보고 되었다(Kang et al., 2019). 균주가 생산하는 biosurfactant들과 식물추출물의 항균활성 작용은 상승작용을 나타내는 결과를 가져왔으며, 토마토 시들음병에 대해서 TB보다는 NR 혼합제형물에서 그 길항능력이 더 우수하였다. 혼합제형물의 상승작용이 해충에 대한 방제능력면에서는 52.6~21.5% 더 우수한 기존 결과가 있다(Kang et al., 2019). 구성성분이 유사한 혼합제형물간에서 나타난 식물병원균과 해충에 대한 상승효과의 차이는 님, 로테논과 니코틴 등 식물추출물 성분은 주로 해충에 대한 섭식 저해, 탈피 억제, 접촉 독성 및 기피제로 잘 알려진 물질들이기 때문에 방제효과면에서 식물병원균보다는 해충에서 효과가 더 높았다(Dayan et al., 2009; Kim and Kim, 2009). 또한 님 추출물의 경우 Bt와 혼용할 경우 파밤나방 유충에 대한 살충율이 50~37% 이상 증가한 보고도 식물추출물의 해충에 대한 직접적인 저해 특성으로 상승효과를 나타냈다(Han et al., 2015). 또한 식물추출물은 대부분 약제 특성상 직접 접촉에 의한 독성효과가 높지만 잔효성이 낮아 살포 후 새로운 개체수 증가 시 살충효과가 낮아지기 때문에 다른 화합물 또는 미생물과 혼용하여 사용할 경우 효과가 극대화되는 것으로 나타났다(Han et al., 2015). 특히, 미생물 Bt 독소단백질은 곤충 장내 수용체로의 접근과 결합에 관여하여 살충효과를 극대화시키기 때문에 Bt 균주들과 주로 혼합하여 사용하였다(Moar and Trumble, 1987; Singh et al., 2007). 그러나 식물병원균에 대한 식물추출물과 Bt 또는 미생물과의 혼용살포효과는 뚜렷한 보고가 없으며, 그 방제 효과도 살균제 및 살충제의 효과만큼 높지 않았다. 본 결과에서도 유사한 경향을 나타냈으며, 병원균에 대한 항균활성

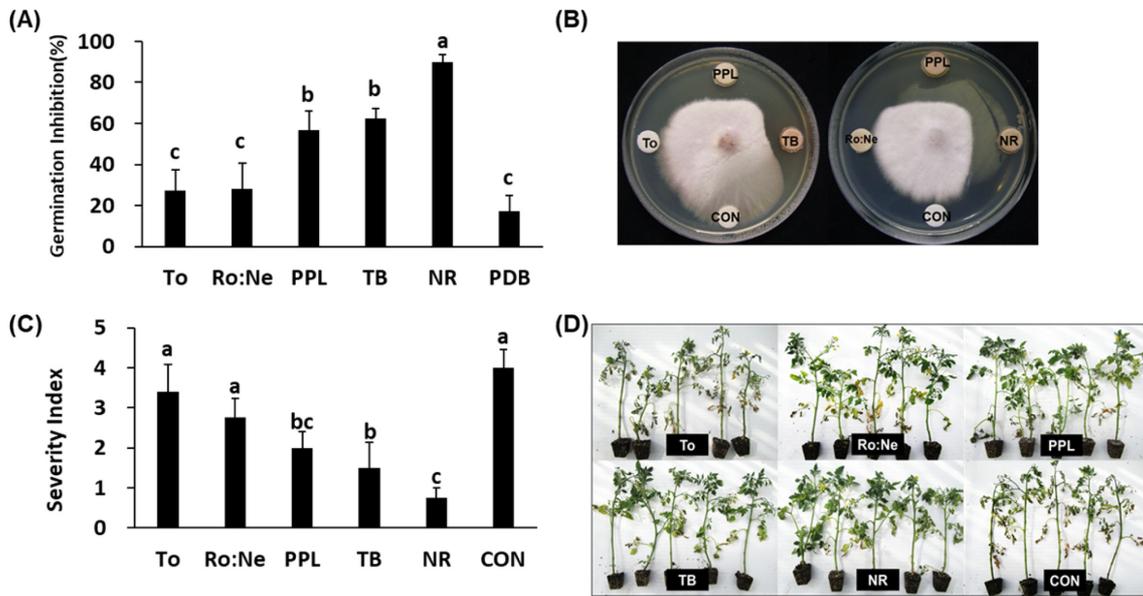


Fig. 1. Effects of the TB (*B. amyloliquefaciens* PPL 30% + Nicotine 2%) and NR (*B. amyloliquefaciens* PPL 30% + Azadirachtin & Rotenone 2%) formulations on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) and on the control of tomato Fusarium wilt on tomato plants (A-D). (A). Suppression of spores against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* KACC 40043, (B). Inhibition of fungal mycelia growth, (C). Disease control efficacy of against tomato Fusarium wilt. (D). Photo taken 4 weeks post inoculation. To, Tobacco leaf extract (Nicotine 2.2%); Ro:Ne, Mixtures of neem and rotenone 0.75% + 0.05%; PPL, Cell free supernatant of *B. amyloliquefaciens* PPL; TB, *B. amyloliquefaciens* PPL 30% + Nicotine 2%; NR, *B. amyloliquefaciens* PPL 30% + Azadirachtin & Rotenone 2%. Data are means ± SD with three replicates. The values followed by a different letter in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

효과는 식물추출물의 유효성분보다는 미생물의 대사산물에 의한 효과임을 확인하는 결과를 얻었다.

LC/MS에 의한 유효성분 CLPs의 검출 및 토마토 시들음 병 방제효과 검정

앞선 결과에서 혼합제형물의 식물병원균에 대한 항균활성을 나타내는 주요 유효성분은 *B. amyloliquefaciens* PPL가 생산하는 biosurfactant가 주요 물질임을 확인하였다(Kang et al., 2019). 균주 PPL이 생산하는 항균활성 물질은 iturin A, surfactin, fengycin 등이 있으며, 이 물질 중에 토마토 시들음병에 대한 효과가 있는 특정한 surfactant를 조사하기 위해 각각의 분획된 CLPs의 항균활성 분석을 수행하였다(Fig. 2). 부탄올 용매에 의해 추출된 CLPs는 TLC에 전개한 후 각 분획물을 얻었다. TLC상의 분리된 분획은 표준물질의 R_f 값과 비교하여 총 5개 부분(T1~T5)을 얻었으며, 각 CLPs 정량분석은 LC-MS/MS에 의해 분석하였다. 분리된 T1~T5 물질들의 FOL에 대한 항진균활성을 조사한 결과, T1 분획물에서 포자 생육과 균사생장을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). LC-MS/MS 분석에서 표준물질 피크에 의한 T1 분획물의 크로마토그램 피크면적 함량을 비교 분석한 결과 유효성분 fengycin CLPs가 81.1 mg/L으로 가장 높게 검출되었고, iturin A (0.1 mg/L), surfactin (미검출) 순으로 검출되었다(Fig. 2B). T3과 T5는 각각 iturin A (62.5

mg/L)과 surfactin (306.6 mg/L)으로 가장 높게 검출되었으며, T2와 T4에서 CLPs 함량은 대부분 극히 소량 검출되거나 검출되지 않았다. 5엽기의 토마토 유묘(품종: 텐텐)에 각 분획물(60 mg/ml)과 FOL43 포자 현탁액(1×10^5 conidia/ml)을 접종한 후 14일 후에 발병지수에 의해 토마토 시들음병 방제효과를 검정하였다(Fig. 2C, 2D). Fengycin 함량이 가장 높았던 T1 처리구는 1.3의 발병지수로 대조구 대비 68.8%의 방제효과가 있었으며, T2 처리구는 2.8의 발병지수를 나타냈다. 그 외 처리구는 대조구 대비 방제가 16.6% 이하의 방제효과를 나타냈다. Fig. 2B의 각 분획구 CLPs 함량 분석결과를 근거로 fengycin 함량이 높을수록 토마토 시들음병에 대한 방제효과가 높았으며, 특히 T1 처리구는 FOL 포자 및 균사생육 억제 결과처럼 토마토 유묘에서도 방제효과가 높았다. T1 분획물 다음으로 fengycin 함량이 높은 T2 (0.6 mg/L)는 포자와 균사생육 억제에서 직접적인 효과는 미비하였지만, 토마토 유묘검정 결과 대조구 대비 31.3%의 방제효과를 나타냈다. Fengycin은 매우 낮은 수 uM 범위에서 특정 곰팡이에 대한 최소억제농도의 항균활성을 나타낸다(Zihalirwa Kulimushi et al., 2017). Fengycin이 낮은 농도로 일부 식물 진균성 병원균에 대해 항진균활성으로 작용하지만 이에 대한 분자 메커니즘은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않고 병원균의 종류에 따라 달라질 수 있다. 일부 경우에, fengycin은 포자의 막 투과성에 의해 발아를 억제하며,

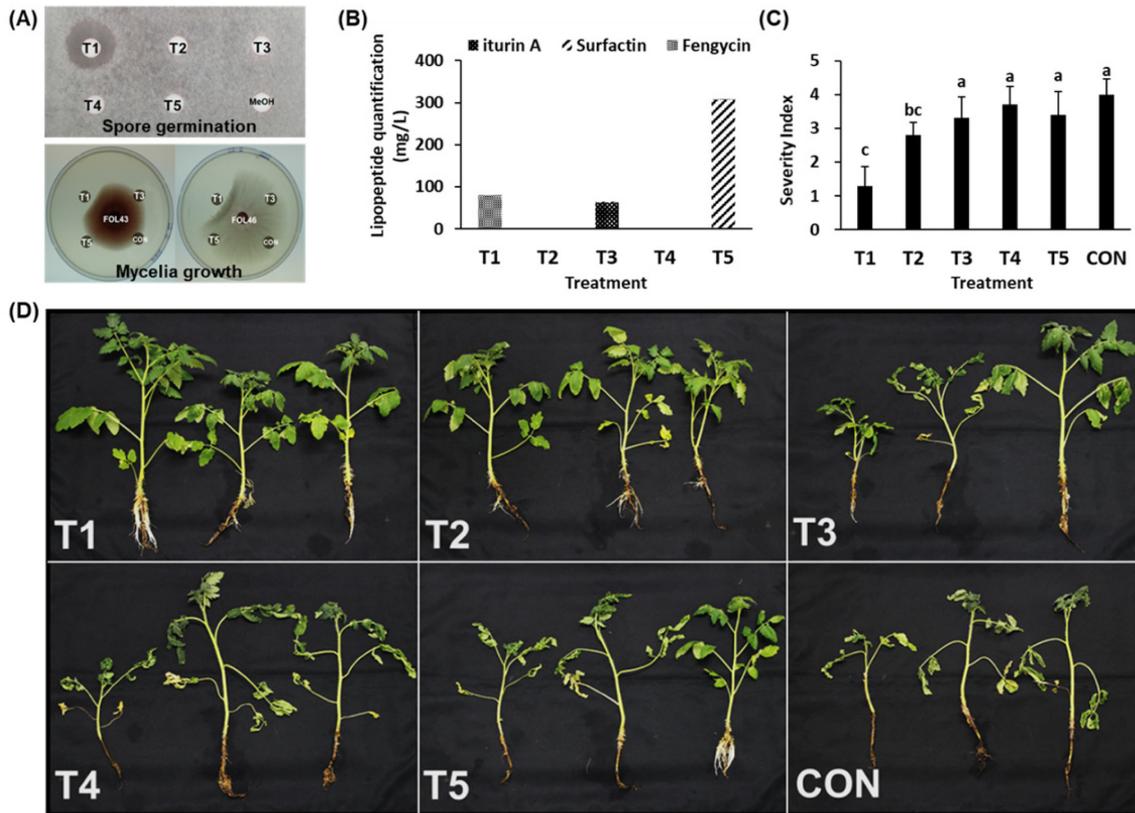


Fig. 2. Effect of butanolic extracts of cell-free culture filtrates of *B. amyloliquefaciens* PPL on tomato Fusarium wilt. (A). Inhibition of sporulation and mycelia growth of butanolic extracts, (B). Lipopeptides quantification (mg/L) obtained from butanolic extracts. (C). Disease control efficacy of butanolic extracts (60 mg/ml) on tomato Fusarium wilt. (D). Photo taken 4 weeks post inoculation. The butanolic extract of MBP culture was separated by preparative TLC (Prep TLC; 20 × 20 cm, 0.5 mm, Merck) and 5 regions (T1, T2, T3, T4 and T5) were scraped from the prep TLC and then fractionated with methanol. Data are means ± SD with three replicates. The values followed by a different letter in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

낮은 농도에서 DNA 합성을 억제하여 균사 세포 생합성을 교란시켜 억제하는 것으로 알려져 있다(Wise et al., 2014). Fengycin과 iturin A를 생산하는 균주에서 대부분 강력한 항진균 활성이 관찰되었으며, 이는 이전의 보고와 일치한다(Cho et al., 2003; Hu et al., 2007; Romero et al., 2007; Medeot et al., 2017; Yáñez-Mendizábal and Falconí, 2018). 그러나 surfactin은 세포 표면 소수성이 더 높고 surface tension의 활성이 높아 biofilm 형성에 중요한 역할을 하며(Aleti et al., 2016; Al-Ali et al., 2018; Liu et al., 2019), 일부 항미생물 활성을 나타내지만, 단독으로 항진균 활성은 다른 CLPs에 비해 약한 편이다. 또한 최근에 surfactin은 iturin A (Souto et al., 2004; Joshi et al., 2008) 또는 fengycin (Koumoutsi et al., 2004; Ongena et al., 2007; Romero et al., 2007)과 일부 시너지 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 토마토 시들음병에 대한 PPL 균주의 fengycin의 효과 이외에 다른 리포펩타이드들의 직접적인 효과는 미비하였지만, surfactin 등과의 시너지 효과로서 식물체 면역반응 유도 등의 간접적인 효과에 의한

방제효과도 있을 수 있을 것으로 사료된다(Ongena et al., 2007).

토마토 시들음병 방제를 위한 혼합제형물의 *B. amyloliquefaciens* PPL 최소함유비율 결정

균주 PPL의 CLPs 유효성분과 식물추출물 혼합물을 이용한 토마토 시들음병 방제를 위한 제형물과 그 제어조건을 설정하기 위하여 유효성분이 있는 미생물의 함량에 따른 혼합비율별 방제효과를 검정하였다(Fig. 3). NR 혼합제에 함유된 미생물 상등추출물을 10~30% 비율로 혼합한 결과 30%로 혼합할 경우 77.2%로 FOL43에 대한 포자발아를 억제하였다(Fig. 3A). 또한 미생물 함유량에 따라 NR 혼합제의 토마토 시들음 유묘검정 결과에서도 200배 희석하여 3일간격으로 2회 관주한 결과, 대조구 대비 모든 처리구는 78.4~37.8%의 방제가를 나타냈으며, 30~15% 함유량별 처리구에서 통계적으로 유의하게 나타났다(Fig. 3C, 3D). FOL 포자 발아억제효과 결과와 같이 PPL 균주 배양 상등추출액의 함량이 높을수록 그 방제효과는 높은 정의 상관관계를

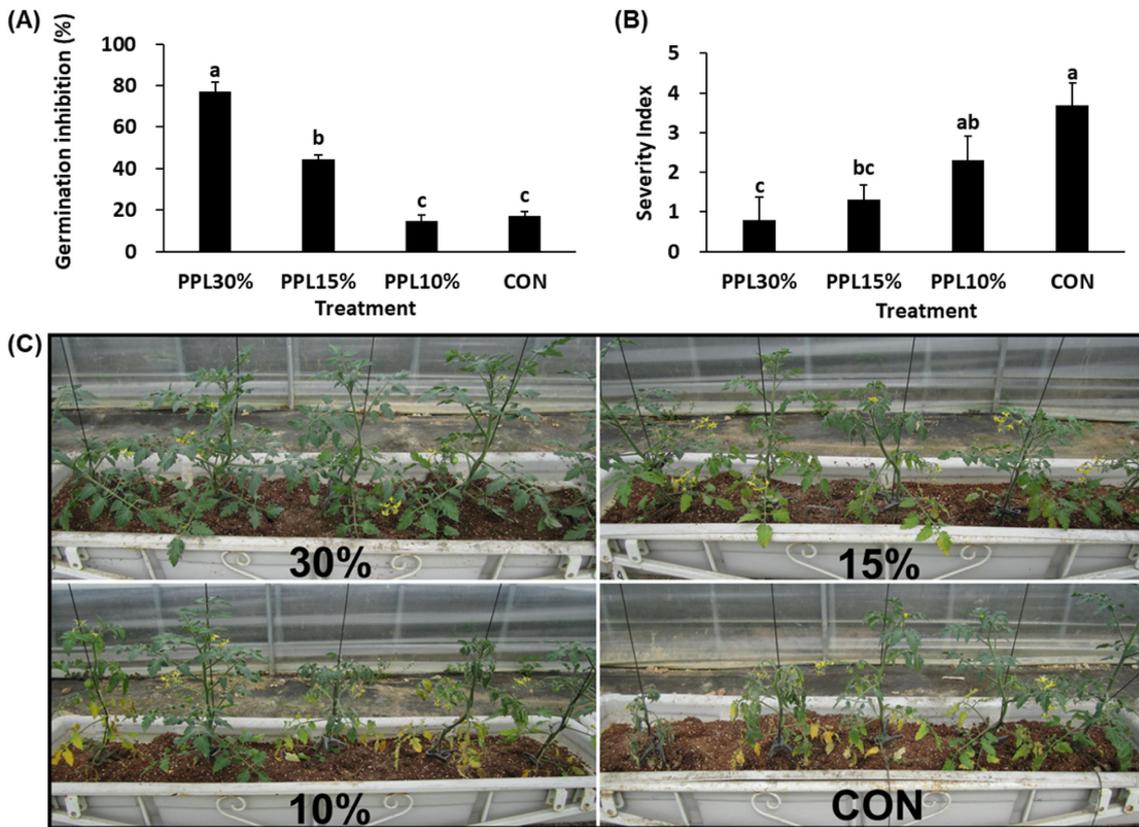


Fig. 3. Effect of the mixing ratio of *B. amyloliquefaciens* PPL on the NR (*B. amyloliquefaciens* PPL 30% + Azadirachtin & Rotenone 2%) formulations. (A). Spores germination suppression of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* KACC 40043, (B). Disease control efficacy on tomato Fusarium wilt. (C). Photo taken 4 weeks post inoculation. The microbial equivalent extract contained in the NR mixture was mixed at a ratio of 10 to 30%. 30%, *B. amyloliquefaciens* PPL 30% + Ro:Ne (Azadirachtin & Rotenone 2%); 15%, *B. amyloliquefaciens* PPL 15% + Ro:Ne; 10%, *B. amyloliquefaciens* PPL 10% + Ro:Ne; CON, water treatment. Data are means \pm SD with three replicates. The values followed by a different letter in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

나타냈다. 대조구 대비 30% 함유 혼합물의 처리구에서는 시들음병 병징이 거의 나타나지 않았으며, 그 발병도도 0.8로 정상적인 생육을 보였다. 15% 처리구에서는 도관부는 약간 갈변되면서 아랫잎에서 황화현상이 일부 나타나기는 하였지만 1.3 발병도로 65%의 방제가를 나타냈다. 하지만 10%의 처리구는 FOL 포자발아억제 결과와 같이 38% 이하의 방제가로 토마토 유묘에서는 대부분 아랫잎의 황화현상과 도관부 갈변현상이 나타나 지상부 생육이 억제되는 병징을 나타냈다. 따라서 균주 배양상등추출액의 최소함유비율은 전체 함량 대비 15% 함유비율의 결과를 얻었다. 이와 같이 토마토 시들음병에 대한 PPL 균주의 최소함유비율 설정으로 향후 다른 혼합물과 제형할 경우 방제할 수 있는 비율을 설정함으로써 방제효율을 높일 수 있는 근거를 제시할 수 있을 것이다. 또한 그 유효성분인 fengycin의 최소억제농도 설정시 본 연구결과가 기초자료로 사용될 것으로 사료된다.

토마토 시들음병에 대한 온실 토양에서의 혼합제형물 효과 검증

혼합제형물 2종을 대상으로 살포농도별 및 살포회수별로 처리한 후 토마토 시들음병 발병율을 조사하였다(Fig. 4). 온실포장에서 토마토 생육상태는 최종 약제처리 후 10일까지는 모든 처리구에서 시들음병 증상의 발병도 편차가 크지 않았으나, 20일후부터는 무처리 대비 일부 처리구에서는 병 발생이 심해지면서 시들음 증상의 발병도가 높아졌다.

처리농도별로 최종약제 처리 30일 후에 병 발생율을 조사한 결과 NR 처리구는 250배까지 뿌리 일부가 갈변되는 현상은 있었으나, 생육은 정상으로 16~20%의 발병율로 80~75% 이상의 방제가를 나타냈고, 그 이상의 희석농도에서는 50% 이하의 방제효과가 있었다. TB 처리구에서는 100배 처리구에서만 60% 이상의 방제를 나타냈고, 그 이상의 희석농도에서는 도관부가 갈변되면서 지상부까지 시들음현상이 나타나 50% 이하의 방제효과가 있었다. 액상 혼합제형에서 250배 희석된 처리구에서 높은 방제효과를 나타낸 것은

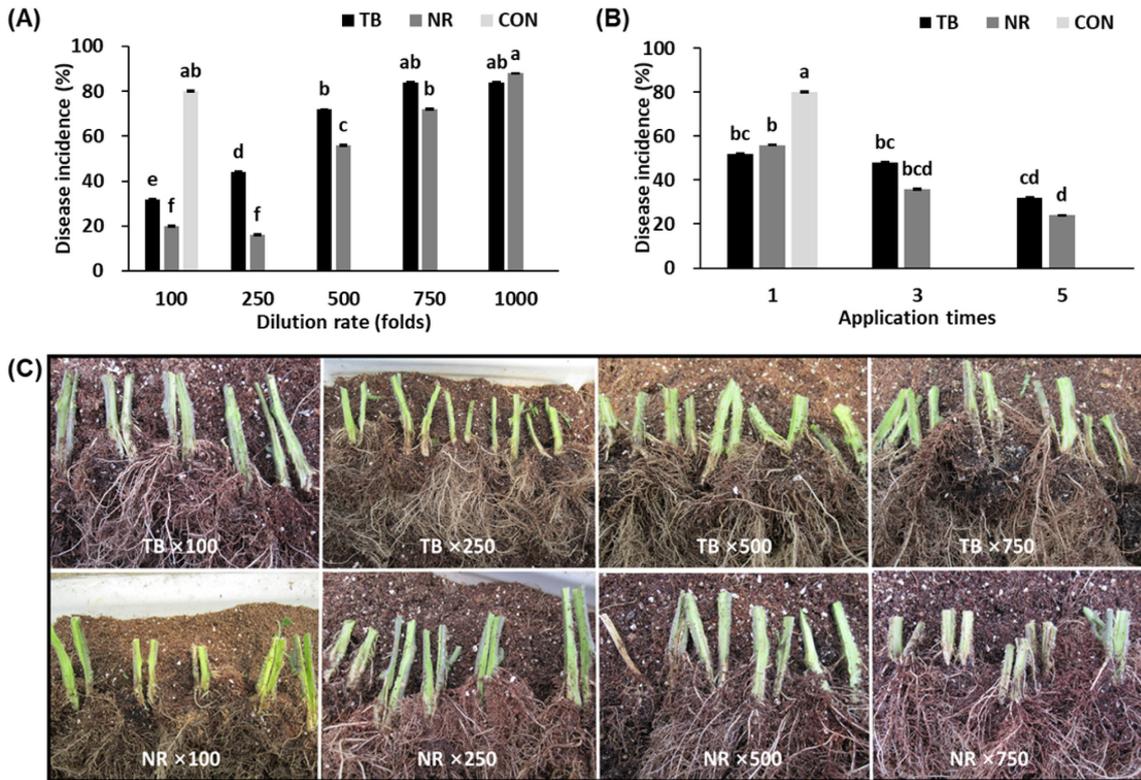


Fig. 4. Effect of the TB (*B. amyloliquefaciens* PPL 30% + Nicotine 2%) and NR (*B. amyloliquefaciens* PPL 30% + Azadirachtin & Rotenone 2%) formulations at application methods under the greenhouse. (A). Disease control efficacy at the different folds on tomato Fusarium wilt. The formulation was applied five times with seven-day interval in the plastic house, where tomato plants were cultivated. (B). Disease control efficacy at the different application times on tomato Fusarium wilt. The formulation was applied 250-folds dilution with seven-day interval. (C). Photo taken 4 weeks post inoculation. Data are means ± SD with three replicates. The values followed by a different letter in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

B. amyloliquefaciens PPL 균주가 fengycin, iturin, surfactin 등과 같은 식물병원성 곰팡이에 대한 강한 길항작용 물질이 제형화 후에도 유지되고 있음을 의미한다.

하지만 앞선 보고와 다르게 본 연구의 혼합제형물에 2% 함유된 식물추출물인 님+테리스(azadiracchitin 0.75% + rotenone 0.05%) 및 담배(nicotine 2.2%) 잎 추출물은 해충 방제에서는 효과가 우수하였으나(Park et al., 2019), 토마토 시들음병에 대한 온실포장방제효과에서는 PPL 균주의 유효 성분인 fengycin의 효과가 주요한 것으로 사료된다. 또한 처리회수별 발생율은 모든 처리구에서 무처리구 대비 7일 간격으로 5회 처리한 경우 24~32% 발생하였으며 60% 이상의 방제효율을 나타냈다. NR 제형의 3회 처리구도 36%의 병발생율로 55%의 방제효과가 있었지만, TB 처리구에서는 시들음 증상이 48% 보였으며 40%의 방제효과를 나타냈다. 종합적으로 본 연구에서 사용한 미생물과 식물추출물 혼합제형물 2종에 대한 토마토 시들음병 방제에서 NR과 TB 제형물은 토마토에 7일 간격으로 250배의 희석농도로 3회 이상 관주하는 제어조건으로 결정하였다.

따라서 본 연구는 식물추출물과 *B. amyloliquefaciens*

PPL의 혼합제형물의 토양병해에 대한 방제효과에서 가능성이 충분히 있는 것으로 나타났다. 대부분의 병해충 방제약제의 경우 약제 살포시기를 놓쳐 방제효과가 떨어져 이를 극복하기 위해 고농도의 약제를 자주 살포하는 경우 약해가 발생하는 경우가 있기에 주의하여야 한다. 그러나 지상부 병해와 달리 토마토 시들음병은 주변 환경조건이 불리할 경우 토마토 시들음병원균은 후막포자를 생성하여 장기간 토양에서 존재하기 때문에 예방적인 살포가 매우 중요하다. 더군다나 가지과류 작물 중에서도 작물에 따라서 병발생 특이성을 나타내므로 방제약제도 적절한 선택에 의한 살포가 중요하다. 최근 토양병해에 대한 우수한 화학농약의 개발 및 연구가 활발히 진행되고 있으며, 미생물 및 천연물질의 작물보호제를 작물 정식전부터 병행하여 꾸준히 사용할 경우 개발 상용화된 화학농약의 치료효과의 방제수준만큼은 아닐지라도 예방적인 방제효과는 기대할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 농림식품기술기획평가원 사

업(118025-3)과 한국연구재단 이공분야기초연구사업(2018 R1D1A3B07051266)의 지원에 의해 수행되었습니다.

Literature Cited

- Al-Ali A, Deravel J, Krier F, Béchet M, Ongena M, et al., 2018. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25(30):29910-29920.
- Aleti G, Lehner S, Bacher M, Compant S, Nikolic B, et al., 2016. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environ. Microbiol.* 18(8):2634-2645.
- Chellemi DO, Olson SM, Mitchell DJ, Secker I, McSorley R, 1997. Adaptation of soil solarization to the integrated management of soilborne pests of tomato under humid conditions. *Phytopathology* 87(3):250-258.
- Cho S-J, Lee SK, Cha BJ, Kim YH, Shin K-S, 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* 223(1):47-51.
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO, 2009. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17(12):4022-4034.
- De Cal A, Pascual S, Larena I, Melgarejo P, 1995. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Pathol.* 44(5):909-917.
- Gamliel A, Austerweil M, Kritzman G, 2000. Non-chemical approach to soilborne pest management-organic amendments. *Crop Protect.* 19(8-9):847-853.
- Han JH, Yoon J, Son S, Kim JJ, Lee S, 2015. Combination effects of organic materials and *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua*. *Korean J. Pestic. Sci.* 19(4):411-417.
- Hu LB, Shi ZQ, Zhang T, Yang ZM, 2007. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. *FEMS Microbiol. Lett.* 272(1):91-98.
- Jones JB, Zitter TA, Momol TM, Miller SA, 2014. Compendium of tomato diseases and pests. The American Phytopathological Society.
- Joshi S, Bharucha C, Desai AJ, 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresour. Technol.* 99(11):4603-4608.
- Kang BR, 2011. Mannitol amendment as a carbon source in a bean-based formulation enhances biocontrol efficacy of a 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* sp. NJ134 against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathol. J.* 27(4):390-395.
- Kang BR, Kim SA, Park JS, Kim YC, 2019. Effect of simultaneous control of the formulations of *Bacillus amyloliquefaciens* PPL and plant extract against plant disease (Tomato *Fusarium* Wilt, Pepper Anthracnose, Rice Sheath Blight) and sucking pest (Two Spotted Spider Mite, Green Peach Aphid) in laboratory. *Korean J. Pestic. Sci.* 23(2):102-110.
- Katan T, Shlevin E, Katan J, 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology* 87(7):712-719.
- Kim IS, Kim IS, 2009. Status and future prospects of pest control agents in environmentally-friendly agriculture, and importance of their commercialization. *Korean J. Environ. Agric.* 28(3):301-309.
- Koumoutsis A, Chen X-H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, et al., 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186(4):1084-1096.
- Larena I, Melgarejo P, De Cal A, 2002. Production, survival, and evaluation of solid-substrate inocula of *Penicillium oxalicum*, a biocontrol agent against *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 92(8):863-869.
- Larkin RP, Fravel DR, 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis.* 82(9):1022-1028.
- Li X, Zhang Y, Wei Z, Guan Z, Cai Y, et al., 2016. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PloS* 11(9):e0162125.
- Liu J, Li W, Zhu X, Zhao H, Lu Y, et al., 2019. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:4565-4574.
- Medeot DB, Bertorello-Cuenca M, Liaudat JP, Alvarez F, Flores-Cáceres ML, et al., 2017. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media. *Biol. Control* 115:119-128.
- Moar WJ, Trumble JT, 1987. Toxicity, joint action, and mean time of mortality of Dipel 2X, Avermectin B1, Neem, and Thuringiensin against Beet Armyworms (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 80(3):588-592.
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, Tuzun S, 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* 90(4):622-629.
- Nagórska K, Bikowski M, Obuchowski M, 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochim. Pol.* 54(3):495-508.
- Ongena M, Jacques P, 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16(3):115-125.
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, et al., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus*

subtilis as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol. 9(4):1084-1090.

Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening J-W, et al., 2007. 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.

Singh G, Rup PJ, Koul O, 2007. Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Bull. Entomol. Res. 97(4):351-357.

Son SH, Khan Z, Kim SG, Kim YH, 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbis* suppress disease complex caused by root-knot nematode and Fusarium wilt fungus. J. Appl. Microbiol. 107(2):524-532.

Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, et al., 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. J. Appl. Microbiol. 97(6):1247-1256.

Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, Jung G, 1986. Fengycin- a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Antibiot. 39(7):888-901.

Wise C, Falardeau J, Hagberg I, Avis TJ, 2014. Cellular lipid composition affects sensitivity of plant pathogens to fengycin, an antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* strain CU12. Phytopathology 104(10):1036-1041.

Yáñez-Mendizábal V, Falconí CE, 2018. Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on *Andean lupin* seeds by lipopeptide production. Biol. Control 122:67-75.

Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, Bertagnolli BL, 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biol. Biochem. 34(7):955-963.

Yucel S, Ozarslandan A, Colak A, Ay T, 2007. Methyl bromide alternatives for controlling Fusarium wilt and root knot nematodes in tomatoes in Turkey. In: II International Symposium on Tomato Diseases 808. pp: 381-386.

Zihahirwa Kulimushi P, Argüelles Arias A, Franzil L, Steels S, Ongena M, 2017. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. Front Microbiol. 8:850.

***Bacillus amyloliquefaciens* PPL과 식물추출물의 혼합 제형과 유효성분 Fengycin에 의한 토마토 시들음병 방제**

강범용* · 정우진¹ · 박준성²

전남대학교 친환경농업연구소, ¹전남대학교 농업생명과학대학 농화학과, ²국제분석연구원

요 약 *Bacillus amyloliquefaciens* PPL을 이용하여 토마토 시들음병을 방제하기 위해 식물추출물과 혼합한 제형 효과를 조사하였다. 녹두 추출물과 레시틴 영양원을 이용한 *B. amyloliquefaciens* PPL과 혼합한 식물추출 제형들은 토마토 시들음병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 병원균에 대해 항균활성을 나타냈다. NR 제형(*B. amyloliquefaciens* PPL + *Azadirachta indica*와 *Derris elliptica* 추출혼합물)의 토마토 시들음병에 대한 유묘 및 포장방제효과가 가장 높았다. 처리농도별 방제효과는 250배 농도까지 효과가 우수하였고, 7일 간격으로 3회 이상 처리할 경우 60% 이상의 방제효과가 있었다. 혼합제형물의 방제물질 중 주요 유효성분은 cyclic lipopeptides 중 fengycin이었고, 구성성분 중 *B. amyloliquefaciens* PPL 균주는 전체함량 대비 15% 이상의 비율로 혼합할 경우 방제효과가 65% 이상 높아졌다. 따라서 *B. amyloliquefaciens* PPL을 이용한 식물추출물과 혼합한 제형물은 충분한 실용 가능성이 있는 결과를 얻었다. 이런 결과들은 지금까지의 고질적인 토양 병해에 대한 병원균의 밀도와 병발생율을 감소시킬 수 있는 것에 그 가능성을 제시하는 결과이다.

색인어 바실러스 아밀로리퀘시엔스 PPL, 리포펩타이드, 식물추출물, 토마토 시들음병