

사과 주요 병해 방제를 위한 길항미생물 분리 및 동정*

박흥섭** · 조정일***

전남대학교 농과대학 원예학과**, 생물공학연구소***

Isolation and Identification of Antagonistic Microorganisms
for Biological Control to Major Diseases of Apple Tree
(*Malus domestica* Borkh)

Park Heung-Sub** · Cho Jung-Il***

Dept. of Horticulture**, Institute of Biotechnology,**
Chonnam Nat'l Univ., Kwangju 500-757, Korea

SUMMARY

For the purpose of acquiring microbial agents that can be utilized to biologically control the major airborne diseases to apple trees, such as canker(*Botryosphaeria dothidea*), bitter rot(*Glomerella cingulata*), alternaria leaf spot(*Alternaria mali*), root rot(*Rosellinia necatrix*), canker(*Valsa ceratosperma*) and gray mold rot(*Botrytis cinerea*), the effective microorganisms were isolated, tested for antagonistic activity to the pathogens causing major diseases to apple trees and identified. Screening of more than 5,000 species of microorganisms collected in nature for their antagonistic action to the pathogens causing 5 major diseases to apple trees resulted in selection of effective species. Out of the 11 species, one species designated as CAP134 demonstrated outstanding activity. The bacterial strain, CAP134 exerted antagonistic efficiency of 57% on an isolated strain and 40% on a donated strain of *Botryosphaeria dothidea*, 52% on an isolated strain and 46% on a purchased strain of *Alternaria mali*, 60% on *Valsa ceratosperma* 25% on *Glomerella cingulata*, and 64% *Rosellinia necatrix*. The CAP134 was identified as a bacterial strain to

* 본 연구는 1996년도 농림수산부 특정연구과제(현장애로기술과제)의 연구비로 수행된 연구의 일부임.

Bacillus subtilis ATCC 6633 based on morphology, culture conditions, and physio-biochemical characteristics.

Key words : antagonistic microorganisms, biological control, apple tree, *Malus domestica* Borkh, apple pathogens.

I. 緒 言

현재 국내외에서 이용되고 있는 미생물제제를 크게 분류하면, 발효·퇴비의 부숙 또는 사료효율을 촉진시키는 미생물제제와 생물농약으로 사용되는 살충·살균·상해방제용 미생물제 등으로 구분할 수 있다. 이 중에서 생물농약으로 이용되는 길항성 미생물의 병해 방제에 관련된 메카니즘을 보면 병원성 미생물에 대한 항균성물질의 생산, 병원성 미생물과의 경합작용, 병원성 미생물에 대한 기생, 비병원성 미생물을 이용한 교차방제 및 약독바이러스에 의한 간섭작용 등이 있으며, 실제적인 병해방제를 보면 이러한 메카니즘이 복합적으로 작용하여 생물학적 방제가 이루어지는 것으로 보고되고 있다¹⁾. 현재, 길항미생물은 세균, 진균, 방선균 및 바이러스 등이 이용되고 있으며, 이러한 미생물제제의 실용화 및 연구개발이 가장 활발한 국가는 미국, 일본 등이며, 그 외에도 현재 20여개 국가에서 실용화가 이루어지고 있다²⁾.

현재 개발되어 이용되고 있는 미생물 농약이 화학농약에 대하여 갖는 장점은 다음과 같다³⁾. 첫째, 선택성이 높고, 표적외생물에 대한 영향이 크며, 둘째, 병해충의 저항성 발달이 거의 없다. 셋째, 미생물제제 개발에 소요되는 경비가 적으며, 넷째, 미생물농약의 개발이 발달된 선진제국에서는 미생물 농약의 등록에 필요한 안전성 시험이 간소하다는 점 등이다.

지금까지 우리나라에서 농업분야의 항균성 미생물에 관한 연구는 공기전염성 병해보다는 주로 토양전염성 병해를 대상으로 수행되어 왔고, 작물은 과수류보다는 노지 및 시설 채소류에 관한 연구를 중심으로 진행되어 왔으며, 노지 및 시설과수류의 병해를 대상으로 실시한 생물학적 방제에 관한 연구는 아직도 부족한 실정이다⁴⁾.

농업기술연구소의 '92~93년의 조사에 따르면 과수주산단지 및 재배관리가 소홀한 과수원을 대상으로 사과나무와 배나무 등 18종의 과수를 중심으로 167종의 병발생원을 조사한 결과 곰팡이 148종, 세균 11종, 바이러스 5종, 기타 3종 등으로 나타났다. 과종별로 피해가 심하여 방제를 요하는 병해 종류를 보면 사과는 부란병, 겹무늬썩음병, 갈색무늬병, 점무늬낙엽병 및 붉은별무늬병 등으로 나타났고, 배에서는 검은별무늬병, 유사검은무늬병, 검은무늬병, 붉은별무늬병 등의 발생이 심각한 것으로 나타났다. 그러므로 본 연구는 사과에서 발생하는 겹무늬 썩음병(부패병), 탄저병, 점무늬 낙엽병, 날개 무늬병 및 부란병 등의 병원균을 분리 및 수집하고, 이러한 병원균에 대해 길항력이 우수한 항균성

세균을 자연계로부터 분리 및 동정하여, 향후 유용미생물을 이용하여 유기농업을 할 수 있는 무농약, 저공해 및 고품질 사과생산의 기초자료로써 활용하고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 자연계로부터 미생물의 분리

영암, 장성 등의 과수원 및 농경지 토양의 지표로부터 5~20cm 토양을 채취하여 회석 평판법 및 토양평판법⁵⁾을 이용하여 단일 균주를 분리하였다. 또한 사과 병원균에 대한 엽면길항균을 분리하기 위하여 병에 걸리지 않은 깨끗한 과실의 잎으로부터 미생물을 분리하였다. 유용미생물 분리방법⁵⁾은 채취한 시료를 tris-Cl buffer solution(pH 7.5) 100ml 에 넣고 진탕배양을 10분 정도 실시한 후 배지내에 들어있는 미생물을 생리식염수(0.85% NaCl)로 회석하여 영양한천배지[nutrient agar(NA) plates]에 회석하여 농도별로 도말하였다. NA plates는 30℃ 항온배양기(incubator SW-901)에서 24~36시간 정도 배양한 후 균주를 분리하여 사면배지에 보관하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하고 배양하여 단일 colony를 형성시켜 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

2. 사과 병원미생물의 분리 및 수집

사과의 주요 지상부 병해인 겹무늬 썩음병(부패병), 탄저병, 점무늬 낙엽병(반점낙엽병), 날개무늬병(문우병) 및 부란병 등으로부터 병원균을 분리하기 위하여 전남지방의 주요 사과재배단지중에서 영암군 신북면 갈곡리 평안농장을 중심으로 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 병원균을 분리하였다⁶⁾. 또한 농촌진흥청 농업과학기술원(NASTI ; National Agricultural Science and Technology Institute) 및 원예연구소(HI : Horticultural Crop Institute of Research and Development)로 부터 사과병원균을 분양 받아 본 실험실에서 분리한 병원균과 비교 및 검토하였다.

병원균을 분리하기 위하여 채집된 병반을 20℃, 상대습도 90% 이상의 항온항습실에서 3일간 습실처리후 이병조직을 70% ethanol 및 5% sodium hypochlorite(NaOCl)로서 표면살균하고 병원균 선택용배지[potato dextrose agar(PDA) medium + streptomycine 200 μ l/ml, pH 3.0]에 병반조직을 올려 놓고 25℃ 항온배양기에서 2~3일간 배양하여 균총(colony)을 형성시켜 겹무늬 썩음병균, 탄저병균 및 점무늬 낙엽병균 등을 분리하였다. 병원성 검정은 분리된 균을 감자한천배지(PDA)에서 배양하여 분생포자를 형성시킨 후, 포자현탁액을 사과과실 및 사과나무에 접종하여 검정하였다.

3. 길항미생물 선발 및 동정

PDA 평판배지 중앙에 병원균을 접종하여 25°C 내외의 배양기에서 24시간 정도 배양한 후 그 주변에 분리한 균주를 양쪽에 접종하여 25°C 내외의 온도에서 7일 정도 배양하면서 저지대(inhibition zone)를 형성하는 균주를 길항균으로 선발하였다. PDA 평판배지에서 병원균과 7일간 대치배양하면서 각각 성장한 병원균 균총(colony)의 직경을 측정하여 무처리구와 비교하여 성장저지율을 백분율로 나타내어 길항력을 비교하였다. 길항력 실험은 병원성 사상균의 생육에 좋은 PDA 배지를 이용하였고, incubator내의 배양온도 역시 25°C 정도로 곰팡이의 생장에 양호한 온도로 배양하여 병원성 사상균의 생육에 적합한 환경조건에서 병원균에 대한 길항력이 우수한 세균성 균주를 분리하였다.

길항미생물의 동정은 사과병원균에대해서 길항력이 우수한 CAP134을 동정하기 위하여, Bergey's manual of systematic bacteriology⁷⁾, Microbiological method⁸⁾, The procaryotes⁹⁾ 등의 방법에 의하여 미생물의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리 생화학적 성질 등을 검토하였다. 공시 대조균주로서 *Bacillus subtilis*는 ATCC 6633을 American Type Culture Collection (ATCC)(Rockville, Maryland, USA)에서 분양받았다.

1) 형태적 특성

Doetch법¹⁰⁾에 의해서 Gram 염색 및 형태를 관찰하였고, 미생물의 편모염색 및 운동성은 Gray법과 현적슬라이드법으로 하였다. 미생물의 포자는 malachite green으로 염색하여 내생포자형성 유무와 포자위치를 현미경을 이용하여 관찰하였다.

2) 배양적 성질

완전배지(CM ; complate medium)배지에서 각 온도별 균의 성질을 관찰하였고, YDC배지에 균을 접종하여 colony의 색을 관찰하였다. 또한 KB배지에 kanamycin, tetracycline 및 chloramphenicol 등을 첨가하여 미생물의 항생제에 대한 저항성을 관찰하였다.

3) 생리적 성질

Oxidase test, gelatin 가수분해, starch hydrolysis, arginin dihydrolase, urease, Tween 80 hydrolysis, catechol ortho cleavage, PHB accumulation, 탈질작용, sucrose로 부터 levan형성 및 탄소원 자화성 등을 조사하였다.

III. 結果 및 考察

1. 자연계로부터 미생물의 분리

유효 길항미생물을 자연계로부터 분리하기 위하여 전국각지에서 수집된 시료를 실험방법에서와 같이 처리하여 단일균주를 5,000여종 분리하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하여 균총을 형성시킨 후 냉장보관하면서 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

2. 사과 병원미생물 분리 및 수집

전남지방의 주요 사과단지인 영암군 신북면 갈곡리 평안농장을 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 사과의 주요 병해인 겹무늬썩음병(부패병), 탄저병, 점무늬낙엽병(반점낙엽병), 날개무늬병(문우병), 부란병 및 잿빛곰팡이병 등의 병원균을 분리하였다.<표 1>

Table 1. List of pathogens isolated from infected apple trees.

| Pathogens | Korean name | Common name | Source |
|-------------------------------------|-------------|--------------------------|--------------|
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> Var. | 겹무늬 썩음병균 | canker, die-back | this study |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> | 겹무늬 썩음병균 | canker, die-back | NASTI*, HI** |
| <i>Glomerella cingulata</i> | 탄저병균 | bitter rot, anathracnose | this study |
| <i>Alternaria mali</i> Var. | 점무늬낙엽병균 | alternaria leaf spot | this study |
| <i>Alternaria mali</i> | 점무늬낙엽병균 | alternaria leaf spot | NASTI |
| <i>Rosellinia necatrix</i> | 날개 무늬병균 | root rot | NASTI |
| <i>Valsa ceratosperma</i> | 부란병균 | canker | NASTI*, HI** |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 잿빛곰팡이병 | gray mold rot | HI** |

NASTI* : National Agricultural Science and Technology Institute

HI** : Horticultural Crop Institute of Research and Development

3. 주요 사과병해에 대한 길항미생물의 선발

전남 영암군의 사과 생산단지를 중심으로 토양이나 잎에서 분리한 미생물 5,000여종 가운데 주요 사과병원균에 대한 길항미생물을 선발한 결과는 표 2와 같다.

Table 2. Zone of inhibition*(%) of the each antagonists against various apple pathogens on PDA media for 7 days at 28°C.

| Pathogens | Isolated microorganisms | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
| | CAP 130 | CAP 131 | CAP 132 | CAP 133 | CAP 134 | CAP 135 | CAP 135 | CAP 137 | CAP 138 | CAP 139 | CAP 140 | |
| <i>B.dothidea</i> Var. | 20 | 35 | 15 | 31 | 57 | 30 | 31 | 39 | 48 | 37 | 45 | |
| <i>B.dothidea</i> | 30 | 31 | 24 | 32 | 40 | 26 | 26 | 30 | 26 | 29 | 30 | |
| <i>A.mali</i> Var. | 12 | 21 | 27 | 26 | 52 | 31 | 20 | 41 | 34 | 31 | 22 | |
| <i>A.mali</i> | 24 | 28 | 15 | 29 | 46 | 23 | 18 | 34 | 35 | 18 | 34 | |
| <i>V. ceratosperma</i> | 13 | 27 | 40 | 30 | 60 | 41 | 14 | 40 | 49 | 27 | 45 | |
| <i>G.cingulata</i> | 29 | 23 | 26 | 21 | 25 | 15 | 11 | 19 | 21 | 10 | 21 | |
| <i>R.necatrix</i> | 19 | 29 | 22 | 19 | 64 | 34 | 22 | 38 | 44 | 54 | 59 | |

$$\text{Zone of inhibition}^*(\%) = \frac{T-NT}{T} \times 100$$

NT : colony diameter of no treatment(mm), T : colony diameter of treatment(mm).

표 2에서 보는 바와 같이 CAP134는 사과 병원균에 대한 저지율이 *B. dothidea* Var에 57%, *B. dothidea*에 40%, *A. mali* Var.에 52%, *A. mali*에 46%, *V. ceratosperma*에 60%, *G. cingulata*에 25% 및 *R.necatrix*에 64%로 나타났다. CAP134는 본 실험에서 분리한 사과병원균에 대해 길항력이 가장 우수한 미생물인 것으로 나타났다. 특히, CAP134는 문우병과 부란병에 대하여 길항력이 우수한 것으로 나타났다. 김등¹¹⁾은 사과나무 문우병을 *Pseudomonas spp*, *Enterobacter spp*, *Promicromonospora spp* 등의 미생물을 이용하여 생물학적으로 방제하였다. 본연구에서는 이들 세균과는 다른 *Bacillus* 계통에서 길항균을 분리하였다. 그림 1과 2는 길항력이 우수한 CAP134를 공시하여 사과병원균에 대한 길항력을 2차적으로 실시한 결과이다.

Fig. 1 . Inhibition effects of antifungal bacteria CAP 134 against apple pathogens on PDA plate for 7 days at 28°C. A, B and C represent *Valsa ceratosperma*, *Alternaria mali* and *Alternaria mali* Var.

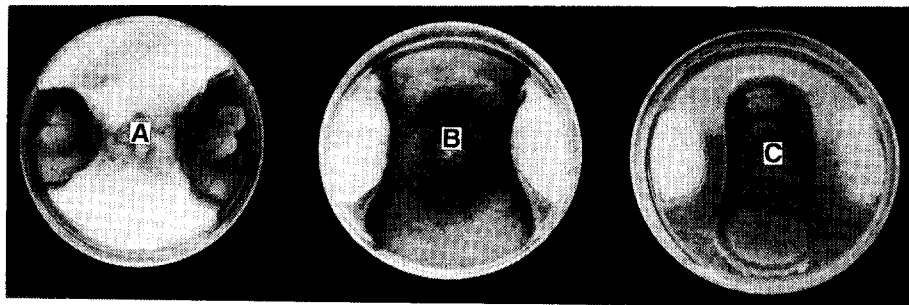
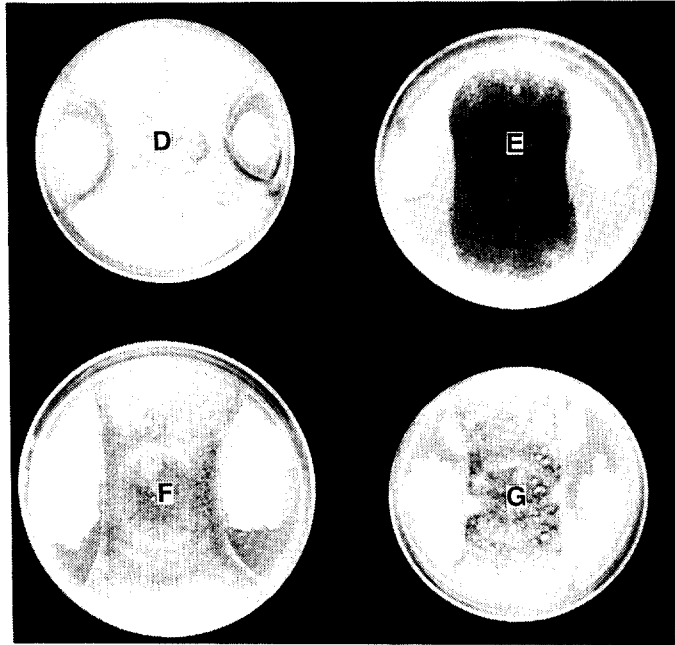


Fig. 2 . Inhibition effects of antifungal bacteria CAP 134 against apple pathogens on PDA plates for 7 days at 28°C. D, E, F and G represent *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria dothidea* Var., *Glomerella cingulata* and *Glomerella cingulata* Var.



4. 길항균의 동정

사과병원균에 대해서 길항력이 가장 우수한 균주인 CAP 134을 동정하기 위하여 미생물의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리화학적 성질 등을 검토한 결과는 표 3, 4와 같으며, 길항미생물의 동정을 실시한 결과 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

Bacillus subtilis CAP 134은 약간의 운동성을 갖는 호기성 및 혐기성 단간균으로 4°C와 42°C에서 생육하지 않고 포자를 형성하는 Gram 양성균으로서 젤라틴 액화능과 starch 분해능은 있었고, catalase가 양성, citrate는 양성, nitrate reduction은 양성, indole 검사는 음성이었다. Methyl red 반응은 음성, VP반응은 약하게 나타났으며, H₂S생성은 K/A이었고 당 분해능은 포도당, xylose, mannitol arabinose가 양성으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 균주와 비교 균주인 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 비교 검토한 결과 형태학적, 생리적 및 생화학적 특성이 거의 동일한 것으로 보였다.

이러한 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology, microbiological method 등에 기술된 분류 기준에 따라 CAP 134 균주는 *Bacillus subtilis* 또는 그 유연군으로 추정되었다.

Table 3. Characteristics of antifungal bacteria CAP 134

| Characteristics | Strain <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | CAP 134 |
|---|---|----------------------|
| Cell diameter > 1.0 μ m | - | - |
| Spores round | - | - |
| Endospore | + | + |
| Gram stain | + | + |
| Form | rod | rod |
| Sporangium swollen | - | d(+/-) |
| Parasporal crystals | - | - |
| Catalase | + | + |
| Voges-Proskauer test | + | + |
| pH in V-P broth < 6 > 7 | d(+/-) - | d(+/-) - |
| Acis from D-Glucose L-Arabinose D-Xylose D-Mannitol | + + + + | + + + + |
| Gas from glucose | - | - |
| Hydrolysis of Casein Gelatin Starch | + + + | + + + |

Symbols : -, 90% or more are negative ; +, 90% or more are positive ; d, 11~89% are positive

Table 4. Characteristics of antifungal bacteria CAP 134.

| Characteristics | Strain | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | CAP 134 |
|--|--------|---------------------------------------|---------|
| Utilization of Citrate Propionate | | + | + |
| | | - | - |
| Degradation of tyrosine | | - | - |
| Deamination of phenylalanine | | - | - |
| Egg-yolk lecithinase | | - | d(+/-) |
| Formation of Indole Dihydroxyacetone | | - | - |
| | | ND | ND |
| NaCl and KCl required | | - | - |
| Allantoin or urate required | | - | - |
| Growth at pH 6.8, nutrient broth 5.7 | | + | + |
| | | + | + |
| Growth in NaCl 2% 5% 7% 10% | | + | + |
| | | + | + |
| | | + | d(+/-) |
| | | ND | ND |
| Growth at 5°C 10°C 30°C 40°C 50°C 55°C 65°C | | - | - |
| | | d | d |
| | | + | + |
| | | + | + |
| | | d | d |
| | | - | - |
| | | - | - |
| Growth with lysozyme present | | d | d |

Symbols : -, 90% or more are negative ; +, 90% or more are positive ; d, 11~89% are positive ; ND, no data available.

IV. 摘 要

사과나무에서 발생하는 겹무늬 썩음병, 탄저병, 점무늬 낙엽병, 날개 무늬병 및 부란병 등 주요 공기전염성 병해에 대한 길항미생물을 찾기위하여 자연계로부터 유용미생물을 분리하고 사과나무 병원균에 대한 길항력 검정과 균주를 동정한 결과는 다음과 같다. 자연계로부터 얻은 5,000여종의 미생물중에서 주요 사과나무 병원균 5종에 대하여 길항력이 우수한 미생물을 1차적으로 11종 선발하였으며, 이중에서 가장 길항력이 뛰어난 미생물을 최종적으로 CAP 134을 선발하였다. CAP 134는 본 실험에서 분리한 겹무늬썩음병균에 대해서는 57%, 분양받은 병원균에 대해서는 40%의 길항력을 보였다. 또한, 본 실험에서 분리한 점무늬낙엽병에 대해서는 52%, 분양받은 점무늬낙엽병에 대해서는 46%의 억제력이 있었으며, 부란병은 60%, 탄저병은 25%, 그리고 날개무늬병에 대해서는 64%의 높은 생장억제력을 보였다. 길항력이 우수한 CAP 134의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리 생화학적 성질 등을 조사하여 비교 검토한 결과 *Bacillus subtilis* ATCC 6633과 유사한 균으로 동정되었다.

주요어 : 사과나무, 병원균, *Bacillus subtilis*, 길항미생물 분리 동정

引用文獻

1. Phae, C.G., M. Shoda and N. Kita. 1992. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Ann. Phytopath, Soc. 58:329-339.
2. Freeman, S., Szejtjberg, A. and Chet, I. 1986. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. Plant and Soil. 94:163~170.
3. Suzui, T. 1992. Biological control of soil-borne diseases with an antagonistic microbes. Proc. '92 Agric. BioTech. Symp. on New Bio Pesticides. pp.55~76.
4. Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69:480~482.
5. 古俗航平等. 微生物の探索・分離・育種. 1985. 第1章 珍しい微生物の探索と應用(分離法 利用). CMC. pp.1~24.
6. Fox, R.T.V., 1993. Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology. Chapter 3. Isolation of Pathogens and Their Preliminary Identification. CAB International. pp.37-66.
7. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore.
8. Collins, C.H. and P.M. Lyne. 1984. Microbiological method(5th ed), Butterworths, London.
9. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper and H.G. Schlegel. 1981. The prokaryotes : A handbook and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
10. Doetch, R.I. 1987. Determinative methods of light microscopy in manual of methods for general bacteriology ed. by Gerhardt etc., American Society for Microbiology. 30p.
11. 김성일, 이상범, 최용문. 1995. 사과나무 날개무늬병의 생물학적 방제를 위한 길항균 분리 동정. RDA J. Agri. Sci.('94 Post Doc.) 37:29-42.