

포도 잿빛곰팡이병의 생물적 방제를 위한 길항세균 선발

서상태* · 박종한 · 한경숙 · 정승룡

원예연구소 원예환경과

Selection of Antagonistic Bacteria for Biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing Gray Mold on *Vitis* spp.

Sang-Tae Seo*, Jong-Han Park, Kyoung-Suk Han and Seung-Ryong Cheong

Horticultural Environment Division, National Horticultural Research Institute,

Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

(Received on November 7, 2006)

Botrytis cinerea Pers. was found to be highly virulent to the grapevine plant, especially in greenhouse condition. *Pseudomonas* species play key roles for the biocontrol of many plant diseases especially in soil. Of the 83 isolates of *Pseudomonas* spp., a bacterial strain P84, isolated from tomato rhizosphere, was shown to suppress a wide range of phytopathogenic fungi *in vitro*. The isolate was identified as *Pseudomonas putida* on the basis of its bacteriological and genetic characteristics. The *P. putida* P84 strain carry the *phlD* gene for 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis and may produce the antibiotics as an antagonistic mechanism involved in biocontrol. The antagonistic activity of the bacterium has a promising implication for its use as a biocontrol agent to control grapevine gray mold.

Keywords : Biocontrol, *Botrytis cinerea*, Grapevine gray mold, *Pseudomonas putida*

잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea* Pers.)은 전세계 포도재배지에서 심각한 문제를 주는 병으로 잘 알려져 있으며(Elad, 1994), 지난 50년동안 잿빛곰팡이병의 방제는 합성농약에 크게 의존하고 있다(Rosslensbroich와 Stuelber, 2000). 그러나, 포도 잿빛곰팡이병 방제를 위한 지속적인 합성농약의 사용은 저항성균을 유발하여 방제효과를 크게 기대하지 못하는 실정에 이르고 있다(Latorre 등, 2002). 또한, 합성농약의 인축에 대한 독성, 잔류농약에 의한 환경오염 등이 문제점으로 대두되고 있어 화학적 방제의 대체수단으로 생물적 방제가 시도되고 있다.

식물근권에 서식하는 어떤 미생물은 항생물질을 포함한 많은 2차 대사산물을 생산하며, 식물에 전신획득저항성(ISR)을 유발하여 식물병원진균 및 세균을 저해한다(De La Fuente 등, 2004; Kloepper 등, 1980). 이런 식물근권 미생물중 가장 잘 알려져 있고 중요한 미생물 중 하나가 형광성 *Pseudomonas*속 세균이다. *Pseudomonas*속 세균은

다양한 대사작용(항생물질 및 세포벽 분해효소 생산, ISR 유도 등)을 통해 식물병원균의 성장을 저해한다(Winding 등, 2004). 잿빛곰팡이병의 생물적 방제 인자로는 *Bacillus pumilus*(Mari 등, 1996), *Pseudomonas fluorescens*(Gould 등, 1996), *Trichoderma harzianum*(Latorre 등, 1997) 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 포도 잿빛곰팡이병의 생물적 방제를 위하여 여러 지역과 작물의 근권토양으로부터 형광성 *Pseudomonas* 세균을 분리하여, 항균력 및 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

형광성 *Pseudomonas* 세균 분리. 2004년부터 2006년까지 포도를 포함한 13작물의 근권토양을 채집하였다. 토양 10 g을 100 ml 멸균수가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 넣고 1시간 동안 진탕배양한 후 KB 배지(King 등, 1954)에 평판희석법으로 배양하였다. 28°C에서 2일간 배양 후 UV를 조사하여 형광을 발현하는 균들을 순수분리

*Corresponding author

Phone)+82-31-290-6242, Fax) +82-31-290-6259

E-mail) abiwoo@rda.go.kr

하였다. 분리된 균들은 동결 보존용 배지(10% skimmed milk, 1.5% sodium glutamate)에 현탁하여 -30°C 에 보관하면서 시험에 이용하였다.

항균력 검정. Potato dextrose agar(PDA) 배지에서 자란 포도 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)과 본 연구에서 분리한 형광성 *Pseudomonas* 균들을 접종하고 20°C 에서 5일간 배양하여 형성되는 저지대(inhibition zone)의 크기에 의해서 항균력을 검정하였다.

실내 항균력 조사에서 우수한 항균력을 나타낸 P84 균주는 호박 역병균(*Phytophthora capsici*), 포도 균핵병균(*Sclerotium* spp.), 배 겹무늬병균(*Botryosphaeria dothidea*), 멜론 덩굴조끼병균(*Fusarium* spp.)에 대해서도 위와 동일한 방법으로 항균효과를 검정하였다. 또한, 포도송이(깬벨얼리)를 이용해서 포도 잿빛곰팡이병 방제효과를 검정하였다. P84 균주는 KB배지에서 28°C , 2일 동안 배양하여 멸균수로 2×10^8 cfu/ml 농도로 현탁하여 포도송이에 분무하였다. 분무 4시간 후 PDA에서 20°C , 5일 자란 포도 잿빛곰팡이병균을 멸균수에 현탁시켜(1×10^5 conidia/ml) 분무 접종하고 20°C 에서 10일간 배양 후 육안으로 보이는 균사생장여부를 조사하였다.

유전적 특성조사. 실험에 이용된 형광성 *Pseudomonas* 균주들의 DNA는 InstaGene matrix(Bio-Rad)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 분리하였고, -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다. PCR 반응은 Takara PCR thermal cycler MP(Takara, Japan)를 이용하였다. PCR 반응액은 $2 \mu\text{l}$ 의 DNA, 2.5U *Taq* polymerase (Takara, Japan), 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 각각의 dNTP 0.2 mM, primer 50 pmol을 넣고 멸균수로 최종 반응용액의 부피를 $25 \mu\text{l}$ 로 조절하였다. 분리된 세균의 속 동정을 위해 Widmer 등(1998)이 보고한 *Pseudomonas* 속 특이적 primer(Ps-for, Ps-rev)를 이용하였고, *P. fluorescens*를 동정하기 위하여 Scarpellini 등(2004)이 보고한 종 특이적 primer(16SPSEfluF, 16SPSER)를 이용하여 PCR을 실시한 후 증폭산물의 유무를 조사하였다.

또한, 분리된 모든 균주에 대한 항생물질(2,4-diacetylphloroglucinol) 생산 관련 유전자(*phlD*)의 유무를 조사하기 위해 Raaijmakers 등(1997)이 보고한 primer(Phl2a, Phl2b)를 이용해 증폭산물을 조사하였다.

P84 균주의 동정. Schaad 등(2001)의 방법에 따라 생리적 특성을 조사하였다. 세균을 동정하기 위해 그람염색, KB 배지에서의 형광유무, NBY 배지에서의 색소 형성 여부 등을 조사하였다. 위의 속 특이적 PCR 반응결과 얻어진 증폭산물은 Ultra clean kit(Mobio Co.)로 정제하였다. 염기서열 분석은 ALF-Express automatic sequencer

(Pharmacia Biotech, Lyon, France)를 이용하였고, 염기서열 비교분석은 NCBI BLAST search 프로그램을 활용하였다.

P84 균주의 지방산 분석은 Miller(1982)와 Lee 등(2005)이 보고한 방법에 준하여 실행하였고, 지방산 양산은 MIDI Library version, TSBA 5.0과 Library generation system software version 5.0을 이용해 분석하였다. 또한, P84 균주의 전자현미경 관찰을 위해서 KB배지에서 48시간 배양한 콜로니를 0.5% potassium phosphotungstate로 염색 후 투과전자현미경(LEO 906E)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

포도 잿빛곰팡이병의 생물적 방제 기술 개발을 위한 기초 연구로서 2004년부터 2006년까지 여러 지역에서 재배되는 13개 작물의 근권토양으로부터 형광성 *Pseudomonas* 세균을 총 83균주 분리하였다. 이 균주들은 모두 KB배지에서 형광을 발현하였고, *Pseudomonas*속 특이적인 primer(Widmer 등, 1998)에 의해서 1,018 bp의 증폭산물이 검출되어 *Pseudomonas* spp.로 동정하였다(Table 1). 또한, *P. fluorescens* 종 특이적인 PCR(Scarpellini 등, 2004)을 실시한 결과 83균주 중 25균주에서 850 bp의 증폭산물이 검출되어 이들 균주들을 *P. fluorescens*로 임의 동정하였다(Table 1).

분리한 모든 형광성 *Pseudomonas* spp. 균주를 이용하여 포도 잿빛곰팡이병원균(*B. cinerea*)에 대한 실내 항균효과를 검정한 결과 13개 균주가 10 mm 이하의 저지원을 형성하였고, 10-20 mm의 저지원과 20 mm 이상의 저지원을 형성한 균주가 각각 1균주씩이었다(Table 1, Fig. 1A). 놀랍게도 가장 큰 항균효과를 나타낸 P84 균주에서는 750 bp의 항생물질 2,4-diacetylphloroglucinol(2,4-DAPG) 생산 관련 유전자(*phlD*)가 증폭되었다(Table 1). 이는 이 균주가 나타내는 항균력이 항생물질 생산과 관련이 있을 가능성이 높을 것으로 사료되었다. 항균력을 나타내는 *Pseudomonas*속 세균은 pyoluteorin, pyrrolnitrin, phenazine-1-carboxylic acid, 2,4-DAPG 등의 다양한 항생물질을 생산한다(De La Fuente 등, 2004). 그중 2,4-DAPG가 가장 항균효과와 밀접한 관련이 있다(Picard 등, 2000). Raaijmakers 등(1997)의 보고에 의하면 밀 재배지에서 전체 형광성 *Pseudomonas* 중 약 10% 정도가 2,4-DAPG 생산력을 가지고 있었다고 보고하였다. 이번 실험의 경우 83 균주 중 단 1균주에서만 이 항생물질이 발견되어 매우 적은 빈도로 존재함을 알 수 있었는데, 이는 토양환경, 기후, 작물체에서 분비되는 호르몬 등이 영향을 주었

Table 1. Strains of *Pseudomonas* spp. used in this study

Isolates	Host	Year	Geographical origin	Sensu stricto ^a	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>phlD</i> ^a	Anti-fungal ^b
P1	Watermelon	2004	Haman	+	+	-	-
P2	Watermelon	2004	Haman	+	-	-	-
P3	Radish	2004	Gimpo	+	+	-	-
P4	Garlic	2004	Suwon	+	-	-	-
P5, P8	Garlic	2004	Suwon	+	+	-	w
P6, P7	Garlic	2004	Suwon	+	+	-	-
P9	Pear	2005	Suwon	+	-	-	w
P10-P16, P21, P22	Grapevine	2005	Suwon	+	-	-	-
P17-P20	Grapevine	2005	Suwon	+	+	-	-
P23, P24, P26, P27	Tomato	2005	Chunchon	+	+	-	-
P25, P28-P30	Tomato	2005	Chunchon	+	-	-	-
P31	Cucumber	2005	Suwon	+	+	-	-
P32	Cucumber	2005	Suwon	+	-	-	-
P33	Tomato	2005	Yeoju	+	-	-	-
P34	Pepper	2005	Yeoju	+	-	-	-
P35	Pepper	2005	Yeoju	+	+	-	-
P36	Pepper	2005	Suwon	+	-	-	-
P37	Pepper	2005	Suwon	+	+	-	-
P39, P40	Applemint	2005	Seoul	+	-	-	-
P41-P43	Grapevine	2006	Hwanggan	+	-	-	-
P44	Grapevine	2006	-	+	-	-	w
P45, P50-P52	Grapevine	2006	Ansung	+	-	-	-
P46	Grapevine	2006	-	+	-	-	-
P47	Grapevine	2006	-	+	+	-	-
P48	Grapevine	2006	Cheonan	+	-	-	-
P49	Grapevine	2006	Cheonan	+	+	-	-
P53	Grapevine	2006	Gochang	+	-	-	-
P54-P56, P58	Ginseng	2006	Hongchon	+	+	-	-
P57, P59	Ginseng	2006	Hongchon	+	+	-	w
P60	Peanut	2006	Hongchon	+	-	-	w
P61	Peanut	2006	Hongchon	+	-	-	-
P62, P63	Grapevine	2006	Hongchon	+	-	-	-
P64, P65	Lance Asia bell	2006	Hongchon	+	-	-	w
P66	Grapevine	2006	Damyang	+	-	-	+
P67, P68, P70, P72	Grapevine	2006	Damyang	+	-	-	w
P69, P71	Grapevine	2006	Damyang	+	-	-	-
P73	Forest	2006	Chunchon	+	-	-	-
P74-P80	Grapevine	2006	Miryang	+	-	-	-
P81, P82	Pepper	2006	Miryang	+	-	-	-
P84	Tomato	2006	Suwon	+	-	+	++
P85	Pumpkin	2006	-	+	-	-	-

^aPCR detection of the 16S rDNA (Sensu stricto), *P. fluorescens* specific loci and *phlD* (2,4-DAPG).

^bAntagonism toward *Botrytis cinerea*. -, indicates no zone of inhibition; w, represents until 10 mm wide zone of inhibition; +, represents until 10-20 mm wide zone of inhibition; ++, represents >20 mm wide zone of inhibition.

을 것으로 생각된다.

잿빛곰팡이병원균에 대해 가장 큰 항균효과를 나타낸

P84 균주를 이용해 호박 역병균(*Phytophthora capsici*), 멜론 덩굴쪄김병균(*Fusarium* spp.), 배 접무늬썩음병균

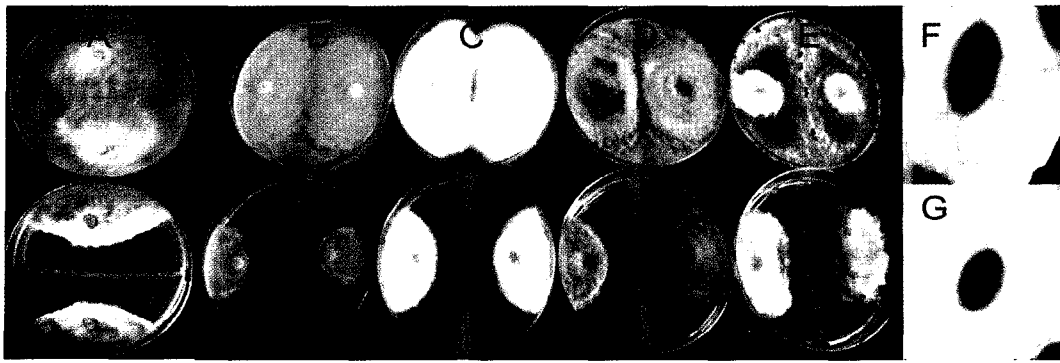


Fig. 1. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by *Pseudomonas putida* P84 strain on PDA medium. Upper plates represent the negative control for antagonism. A, *Botrytis cinerea*; B, *Phytophthora capsici*; C, *Fusarium* spp.; D, *Botryosphaeria dothidea*; E, *Sclerotium* spp.; F and G, Electron micrograph of the P84 strain.



Fig. 2. Control of *Botrytis* gray mold of grapevine by the antagonistic bacterial isolate *P. putida* P84. A, Treatment of P84; B, Pathogen only.

(*Botryosphaeria dothidea*), 포도 균핵병균(*Sclerotium* spp.)에 대해 추가적인 실내 항균활성 검정 결과 위의 모든 식물병원 진균에 대해 큰 항균효과를 나타내었다(Fig. 1B-E). 또한, 포도송이(캠벨얼리)를 이용한 잿빛곰팡이병 방

Table 2. Identification of the P84 isolated from tomato rhizosphere

Characteristics	P84	<i>Pseudomonas</i> ^a
Gram stain	- ^b	-
Aerobic growth	+	+
Yellow or orange colonies on NBY	-	-
Fluorescent pigment on KB	+	+
Growth on D1M	-	-
Aerial mycelium	-	-
16S rDNA sequence identity ^c	98%	
MIDI SI ^d	0.271	

^aDetails of the genus *Pseudomonas* are described by Schaad *et al.* (2001).

^b+, positive; -, negative.

^cP84 strain showed 98% homology to 16S rDNA of *P. putida* (NCBI no. AY491973).

^dSI (Similarity Index), similarity with *P. putida* biotype A. MIDI SI was determined through analysis with the MIDI Library version, TSBA 5.0.

제 실내실험에서는 P84 균주를 처리한 포도송이에서는 잿빛곰팡이병 균사가 거의 성장하지 못하였으나, P84 균주를 처리하지 않고 병원균만 처리한 구에서는 포도송이 전체에서 균사생장이 왕성하였다(Fig. 2). 정확한 병방제 효과를 검정하기 위해서 추후 포장에서의 추가 실험이 필요하다고 생각된다.

P84 균주의 종 동정을 위해 생리·생화학적 특성을 조사한 결과 Schaad 등(2001)이 기술한 *Pseudomonas*속과 일치함을 알 수 있었다(Table 2). P84 균주를 전자현미경으로 관찰한 결과 크기가 약 0.4-0.7×1.5-2.50 μm였으며, 2-3개의 속모를 가지고 있었다(Fig. 1F, G). MIDI를 이용한 지방산 분석결과 *P. putida* biotype A와 유사도 0.271을 나타내었고, 16S rDNA의 sequence 분석결과 *P. putida* (NCBI no. AY491973)와 98%의 유사도를 나타내어 P84

균주를 *P. putida*로 동정하였다.

Pseudomonas spp.에 의한 식물병의 방제는 항생물질 분비, siderophore에 의한 철분 및 영양분 경쟁, 세포벽 분해효소 분비, 작물의 저항성 유도 등의 작용으로 가능한 것으로 알려져 있다(Winding 등, 2004). 본 연구에서는 *P. putida* P84 균주의 항균작용 기작을 구명하지는 못하였으나, 항생물질(2,4-DAPG) 생산 관련 유전자(*phlD*)가 PCR 결과 증폭된 점을 본다면 이 물질이 *P. putida* P84 균주가 나타내는 항균력에 관여하고 있다고 사료된다.

요 약

*Botrytis cinerea*에 의한 포도 잿빛곰팡이병은 특히 하우스 재배시 큰 피해를 주는 병원 진균이다. *Pseudomonas* 속 세균들은 토양 미생물중 가장 잘 연구되어 있고, 토양 내에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 근권토양에서 분리한 형광성 *Pseudomonas*속 세균 83균주 중 P84 균주는 실내 항균력 실험결과 다양한 식물병원진균(*Phytophthora capsici*, *Sclerotium* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium* spp.)에 대해 항균효과를 나타내었다. 생리적 실험과 유전적 실험결과 P84균주는 *P. putida*로 동정되었다. 이 세균의 항균력은 항생물질(2,4-diacetylphloroglucinol)의 생산과 관련되어 있는 것으로 사료되며, 이 세균이 포도 잿빛곰팡이병의 생물적 방제에 이용될 수 있는 가능성이 시사되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 프로젝트연구과제 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- De La Fuente, L., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bajsa, N., Quagliotto, L., Chernin, L. and Arias, A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 671-681.
- Elad, Y. 1994. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protect.* 13: 35-38.
- Gould, A. B., Kobayashi, D. Y. and Bergen, M. S. 1996. Identification of bacteria for biological control of *Botrytis cinerea* on petunia using a petal disk assay. *Plant Dis.* 80: 1029-1033.
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. N. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soil. *Curr. Microbiol.* 4: 317-320.
- Latorre, B. A., Agosin, E., San Martin, R. and Vasquez, G. S. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protect.* 16: 209-214.
- Latorre, B. A., Spadaro, I. and Rioja, M. E. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protect.* 21: 957-961.
- Lee, S., Lee, J., Kim, Y. K., Heu, S. and Ra, D. S. 2005. Bacterial blight of sesame caused by *Xanthomonas campestris* pv. *seamsi*. *Res. Plant Dis.* 11: 146-151.
- Mari, M., Guizzardi, M. and Pratella, G. C. 1996. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biol. Control.* 7: 30-37.
- Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16: 584-586.
- Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A. 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 948-955.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 881-887.
- Rosslensbroich, H. J. and Stuelber, D. 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protect.* 19: 557-561.
- Scarpellini, M., Franzetti, L. and Galli, A. 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 257-260.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Plant pathogenic bacteria*. 3rd ed. APS Press, Minnesota, USA.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S. and Di Giovanni, G. D. 1998. A highly selective PCR protocol for detection 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2545-2553.
- Winding, A., Binnerup, S. J. and Pritchard, H. 2004. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 129-141.