

참다래의 친환경재배를 위한 과속썩음병원균에 대한 길항성 방선균 #120의 선발 및 분리

조정일¹ · 조자용² · 박용서³ · 손동모⁴ · 허복구^{5*} · 김철수⁶

¹조선이공대학 식품공학과, ²남도대학 약용자원원예개발과, ³목포대학교 응용생명과학부, ⁴순천대학교 식물생산과학부, ⁵(재)나주시천연염색문화재단, ⁶원광대학교 원예·애완동물학부

Screening and Isolation of Antagonistic Actinomyces #120 against the Kiwi Fruit Rot for the Environment-Friendly Culture of Kiwifruits

Jung Il Cho¹, Ja Yong Cho², Yong Seo Park³, Dong Mo Son⁴, Buk Gu Heo^{5*}, and Chul Soo Kim⁶

¹Dept. of Food Technology, Chosun College of Science and Technology, Gwangju 501-744, Korea

²Dept. of Medicinal Resources & Horticulture Development, Jeonnam Provincial College, Damyang 517-802, Korea

³Division of Applied Bioscience, Mokpo National Univ., Muan 534-729, Korea

⁴Jeonnam Agricultural Research & Extension Services, Naju 520-715, Korea

⁵Naju Foundation of Natural Dyeing Culture, Naju 520-330 Korea

⁶Division of Horticulture and Pet Animal-Plant Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract. This study was carried out to clarify the effects of antifungal *Streptomyces* sp. isolated from the soil grown kiwifruit on the growth inhibition of fruit rot (*Botryosphaeria dothidea*) infected in kiwi fruit plants in the southwestern districts of Jeonnam. Two hundred and fifty microorganisms were isolated and examined into the antifungal activity against *Botryosphaeria dothidea*. We screened and isolated six bacterial strains which have a strong inhibition against *Botryosphaeria dothidea*. And the best antifungal strain designated as the strain #120 showing 96.0% antifungal activity against *Botryosphaeria dothidea* was finally selected. The strain #120 was identified as *Streptomyces* sp. #120 based on its morphological, physiological, biochemical and chemotaxonomic characteristics.

Key words : antagonistic microorganism, *Botryosphaeria dothidea*, kiwifruit, fruit rot, *Streptomyces* sp.

*Corresponding author

서 언

최근, 정부는 환경농업의 중요성을 인식하고 농업의 환경오염을 줄이기 위해서 농약의 50%, 화학비료의 40% 절감을 목표로 2000년까지 환경농업의 기초기반 확립단계, 2005년까지는 보급단계를 거쳐 2010년까지 완전 정착시킬 계획으로 친환경 농업정책을 추진하고 있다.

참다래의 전국 생산량 중 약 52%를 점유하고 있는 전라남도도 전체 농가의 30%를 친환경농산물 생산농가로 육성할 장기 계획 하에 친환경농업의 구축과 인식 확산을 위해 노력하고 있다. 참다래의 친환경적 생산기반을 조성하기 위해서는 기존의 화학비료와 농약

등을 대체할 수 있으며, 농가에서 손쉽게 구입하고 안전하게 사용할 수 있는 친환경농업자재의 개발과 이용법에 대한 정착과 보급이 필요하다. 특히 병해충을 친환경적으로 방제할 수 있는 생물 제제의 개발이 절실한 실정이다(Thomashow와 Weller, 1996). 외국의 경우 *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. 및 *Agrobacterium* sp. 등 약 20여종의 생물방제용 세균성 균주가 개발되어 시판되고 있다(Bloemberg과 Lugtenberg, 2001; Lahdenperä 등, 1991; Sabaratnam 등, 2002). 또한, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Mesorhizobium loti*, *Bacillus subtilis* 및 *Streptomyces coelicolor* 등을 대상으로 균주의 활성을 높이는 유전자 단위의 연구가 수행되고 있다(Kaneko 등,

참다래의 친환경재배를 위한 과속썩음병원균에 대한 길항성 방선균 #120의 선발 및 분리

2000; Kunst 등, 1997; Stohl 등, 1999; Stover 등, 2000). 이들이 생산하는 대표적인 항균물질로는 viscosinamide(Nielsen 등, 1999), lipopeptide(Nielsen 등, 2000), pyoluteorin(Nowak, 등, 1999), 2,4-diacetylphloroglucinol(Bangera와 Thomashow, 1999) 및 2-hydroxylated phenazine 화합물(Delany 등, 2000) 등이 보고되고 있다.

한편, 처음에는 과실 표면의 일부가 오목하게 함몰된 다음 과실속이 연부중상이 보이면서 과육 심부까지 부패하는 참다래 과속썩음병은 농가에게 큰 피해를 입히고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 참다래의 친환경 재배를 위한 기초자료 확보차원에서 참다래 과실에서 발생하는 과속썩음병원균에 대한 길항균으로서 방선균을 선발하고 동정하였다.

재료 및 방법

1. 과속썩음병원균의 분리

해남, 장흥 및 고흥 등의 전남 서남부지역에서 참다래 재배단지과 저장고를 현지 답사하면서 진균류 병원균인 과속썩음병원균(*Botryosphaeria dothidea*)에 감염된 병반을 채집하여 Agrios (1997)의 방법에 의해 병징 및 표징별로 병원균 포자를 분리하여 공시하였다.

과속썩음병원균의 분리는 과실의 병반 부위를 3일간 습실 처리한 후, 70% 에탄올 및 5% NaOCl로서 이 병조직을 표면 살균한 후 0.85% 생리식염수로 세척하여 병원균 분리용 선택 배지에 병반조직을 올려놓고 25°C와 상대습도 90% 이상의 항온배양기에서 2~3일간 배양하여 균총(colony)을 형성한 병원균을 분리하였

다. 분리된 과속썩음병원균을 참다래 과실에 재접종하여 참다래과속썩음병과 동일한 병징(Agrios, 1997)이 발현되었고, 순천대학교 식물병리학 실험실로부터 분양 받은 참다래 과실 과속썩음병원균(*Botryosphaeria dothidea*)과 동일한 병징을 나타냄을 확인한 후시험병원균으로 사용하였다.

2. 유효미생물 분리

유효미생물들의 분리는 전남 서남부지역의 참다래 과수원 지표로부터 5~20 cm 부위에서 채취한 토양 시료를 tris-HCl buffer solution(pH 7.5) 100 mL에 넣고, 10분 정도 진탕배양을 실시한 후 배지 내에 들어있는 토양 현탁액을 생리식염수(0.85%, NaCl)로 10^3 ~ 10^6 배 희석하였으며, 이 중에서 200 mL를 채취하여 영양한천배지[nutrient agar (NA) plate]에 농도별로 도말 접종하였다. 도말 접종된 영양한천배지는 30°C 항온배양기에서 30~36시간 정도 배양한 후 형성된 단일균주를 콜로니의 색과 형태 등을 기초로 균주의 종류별로 분리하여 사면배지에 보관하였다. 분리된 단일 미생물은 병원균과의 항균작용 실험에 사용하였다.

3. 길항균 선발

길항균의 선발은 Fig. 1과 같이 참다래 과실의 과속썩음병원균(*Botryosphaeria dothidea*)과 유효미생물의 대치배양을 통해 저지대(inhibition zone)를 크게 형성하는 균주들을 길항균으로 선발하였다. 병원균에 대한 성장저지율은 병원균 균총(colony)에 대하여 형성된 길항균의 저지대를 측정한 후 무처리구와 비교하여 백분율로 나타내었다.

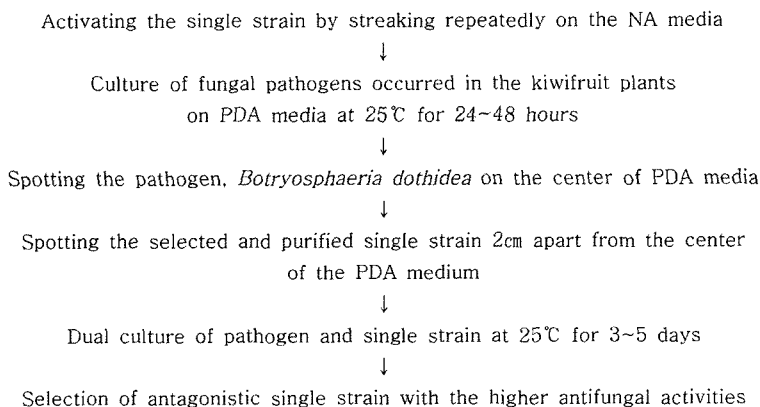


Fig. 1. Selection of antagonistic strain against the fungal pathogen, *Botryosphaeria dothidea*.

4. 분리된 길항균의 배양, 형태학적 및 생리학적 특성

미생물의 형태, 배양 및 생리생화학적 특성을 Krieg와 Holt(1984)의 방법에 따라 검토하여 전남 남부지역의 참다래 과실에서 발생하는 과숙썩음병원균에 대하여 길항작용이 우수한 길항균의 동정을 실시하였다.

Shirling과 Gottlieb(1966)의 방법에 의하여 glucose asparagine agar, Czapek sucrose agar, bennett's agar 및 international Streptomyces project(ISP) medium 등과 같은 배지종류별로 길항균 #120을 14~21일간 배양시키면서 균주의 성장 정도, 기균사와 배면의 색깔 및 멜라닌(melanine) 색소를 포함한 가용성 색소 생성 여부 등을 조사하였다. 또한, Booth(1971), Harrigan과 McCance(1966) 등과 같이 inorganic salt starch agar medium (ISP medium 4)에서 균사의 분지 형태와 포자의 모양, 크기 및 배여 상태 등을 inclined cover-slip method로 30°C에서 21일 동안 배양하면서 일정 시간별로 위상차 현미경과 주사현미경으로 검경하였다.

분리된 길항균의 생리학적 특성은 과숙썩음병원균(*Botryosphaeria dothidea*)에 대하여 최종적으로 선발된 길항균의 탄소원 이용성을 조사하였으며, Gottlieb와 Pridham(1948)의 방법으로 젤라틴 액화력, 전분 분해력 및 질산염 환원력 등을 관찰하였다.

6. 분리된 길항균의 화학적 동정 및 특성 분석

Goodfellow와 David(1985) 및 Lechevalier와 Lechevalier 등(1970)의 방법에 따라 최종적으로 분리된

길항균의 세포벽내 diaminopimelic acid(DAP) isomers와 세포벽 아미노산을 분석하였다. 즉, 건조한 균체를 6N HCl로 100°C에서 18시간 가수분해 한 다음 filter paper로 거른 여액을 분석용 시료로 사용하여 cellulose thin layer chromatography를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 과숙썩음병원균의 분리

고흥, 순천, 장흥 및 해남 등 전남 서남부지역에서 생산되는 참다래의 과실에서 발생하는 과숙썩음병원균을 분리하기 위하여 이 지역의 참다래 과수원과 저장고를 현지 답사하면서 병징과 표징별로 병반을 채집하여 참다래에서 과숙썩음병을 유발시키는 병원균인 *Botryosphaeria dothidea*를 분리하였다. 분리된 과숙썩음병원균을 참다래에 재 접종한 결과 참다래 과숙썩음병과 동일한 병징(Agrios, 1997)을 보였다. 즉, 과실에서 처음에는 과실 표면의 일부가 오목하게 함몰되고, 그 이후 점차 진전됨에 따라 중앙은 유백색 내지 유황색으로 변했으며, 주변은 진한 농록색을 띠었다. 병원균에 감염된 과실을 잘라서 속을 보면 연녹색의 연부증상이 보이고, 과육 심부까지 부패하였다.

2. 병원균과 길항균의 대치배양과 길항균 선발

참다래의 과실에서 발생하는 과숙썩음병원균(*Botryosphaeria dothidea*)에 대한 길항성 균주를 Fig. 1과 같은 방법으로 선발한 균주는 세균류와 방선균류의 2가지 군(group)이었다. 방선균으로 생각되는 길항

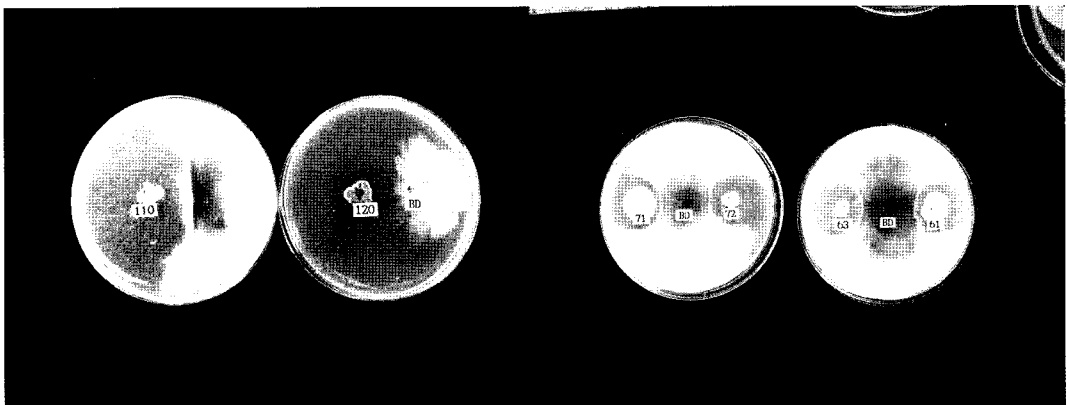


Fig. 2. Antifungal activities of antifungal bacterial strains (#110, #120, #71, #72, #63 and #61) against fruit rot, *Botryosphaeria dothidea* (BD) infected in kiwifruits, on potato dextrose agar (PDA) plate at 28°C for 5 days.

참다래의 친환경재배를 위한 과숙썩음병원균에 대한 길항성 방선균 #120의 선발 및 분리

Table 1. The inhibition effects* of each antifungal strains against the growth of fruit rot, *Botryosphaeria dothidea* which was infected in kiwifruits.

Antifungal strains	Fruit rot (<i>Botryosphaeria dothidea</i>) (%)
#61	68.0 c ²
#63	71.3 bc
#71	68.5 c
#72	73.2 b
#120	96.0 a
#110	91.5 a

²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

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

[NT; colony diameter of no treatment (mm), T; colony diameter of treatment (mm)]

균 #110과 #120은 90% 이상의 높은 길항력을 보였는데, 특히, 길항균 #120은 길항력이 96% 정도로 가장 좋았고, 세균성 길항균인 #71, #72, #63 및 #61 등도 전반적으로 65% 이상의 높은 길항력을 보였다 (Fig. 2 및 Table 1).

3. 배양 및 형태학적 특성

참다래 과실의 과숙썩음병에 대하여 길항력이 우수한 균주인 #120의 배양학적 특성을 조사한 결과 Tyrosine agar(ISP medium 7) 배지를 제외한 대부분의 배지에서 균주의 생육은 양호하였으며, yeast

extract-malt extract agar(ISP medium 2)를 포함하여 oatmeal agar(ISP medium 3) 및 inorganic salts-starch agar(ISP medium 4) 등에서 균사의 생육 및 포자 형성이 좋았다(Table 2). 균사의 색은 ISP medium 4 상에서 대부분 회색 계통을 띄었으며, 배면 색깔은 glycerol-asparagine agar(ISP medium 5) 배지에서 grayish yellow 계통이었고, 멜라닌색소 생성 판정은 ISP medium 6에서만 관찰되었으며, soluble pigment 생성은 ISP medium 5에서만 관찰되어 음성인 것으로 조사되었다.

Inorganic salt starch agar 배지에서 참다래 과실의 과숙썩음병원균에 대하여 길항성이 높은 #120을 14일간 배양한 후 주사형 전자현미경과 위상차 현미경으로 관찰한 결과 크기가 약 0.58×0.91 μm 정도로서 cylindrical 형 포자였으며 그 표면은 smooth형이었고, 포자시슬은 rectiflexible 하게 배열되어 있었다(Table 3).

4. 생리 생화학적 특성

참다래 과실의 과숙썩음병원균에 대하여 길항성이 높은 균주인 #120의 탄소원 이용성을 조사한 결과 xylose, cellobiose, rhamnose 및 arabinose 등의 이용성이 우수하였으며, fructose, raffinose, meso-inositol, sucrose 및 mannitol 등의 당 이용성은 부족한 것으로 나타났다(Table 4). 또 자료상에는 나타내지 않

Table 2. Cultural characteristics of the isolated strain #120 cultured at 30°C for 2 weeks.

Medium	Growth	Sporulation	Aerial mycelium (Aerial mass color)	Substrate mycelium (Reverse color)	Soluble pigment
Yeast extract-malt (ISP No. 2)	Good	Good	Gray	Brown	None
Oatmeal agar (ISP No. 3)	Good	Good	White	Brown	None
Inorganic salts-starch agar (ISP No. 4)	Moderate	Poor	Whitish gray	Grayish yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)	Good	Moderate	Whitish gray	Yellow	None
Peptone-yeast extract-iron agar (ISP No. 6)	Moderate	Poor	Yellowish gray	Yellowish white	None
Tyrosine agar (ISP No. 7)	Poor	Poor	Gray	Yellowish white	None
Arginine-glycerine agar	Good	Good	White	Yellowish white	None
Nutrient agar	Moderate	Poor	Whitish gray	Yellowish white	None
Peptone-beef extract agar	Good	Moderate	White	Yellowish white	None
Glucose-asparagine agar	Moderate	Moderate	Whitish gray	Grayish yellow	None
Czapek sucrose agar	Good	Good	White	White	None
Bennett's agar	Good	Good	White	Grayish yellow	None

*Good > moderate > poor.

Table 3. Morphological characteristics of the isolated strain #120.

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp.	Strain #120
Colony surface	Powdery	Powdery
Colony shape	Convex	Convex
Spore shape	Cylindrical	Cylindrical
Sporulation	Poor	Poor
Color of aerial spore mass	Whitish gray	Gray
Reverse side color	Brown, grayish yellow	Brown, grayish yellow
Spore chain morphology	<i>Rectiflexibiles</i> , 20~25 ea	<i>Rectiflexibiles</i> , 20~25 ea
Spore surface	Smooth	Smooth
Spore size	About 0.58 × 0.91 μm	About 0.61 × 0.88 μm

Table 4. Taxonomic characteristics of the isolated strain #120.

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp.	Strain #120
Spore chain	<i>Rectiflexibiles</i>	<i>Rectiflexibiles</i>
Spore surface	Smooth	Smooth
Sporulation	Poor	Poor
Aerial mass color	Whitish	Whitish
Reverse side color	Brown, grayish yellow	Brown, grayish yellow
Cell wall constituent	LL-DAP	LL-DAP
Soluble pigment	-	-
Melanin pigment	+	+
Fragmentation of mycelium	-	-
Hydrolysis of casein	+	+
Degradation of aesculin	+	+
Degradation of urea	+	+
Carbon utilization		
Fructose	-	+
Xylose	+	+
Sucrose	-	+
Cellobiose	+	+
Arabinose	+	+
Rhamnose	-	-
Raffinose	-	-
Adonitol	-	-
meso-Inositol	-	-
Mannitol	-	-

았지만 길항균 #120은 pH 4~11 정도의 배양액내 광범위한 pH 범위에서 생육이 가능한 것으로 조사되었으며, 15~35°C의 배양 온도에서 잘 생육하는 것으로

나타났다. Casein hydrolysis, aesculin urea 및 전분 분해능 등은 양성으로, melanine 색소 생성은 음성으로, 가용성 색소의 생산은 없는 것으로 나타났다.

Shirling과 Gottlieb(1966)의 International Streptomyces Project 자료에 기초해서 균주의 배양형태생리 생화학적 특성 등을 검토한 결과 본 연구에서 참다래 과속썩음병원균에 대하여 길항균으로 분리한 균주 #120은 *Streptomyces* 속의 균주인 것으로 판단되었다. 또한, 균주 #120의 포자형태, 각종 배지에서의 생육상태 및 균주 색과 생리적 특성 등의 관점에서 International Streptomyces Project에 수록된 *Streptomyces* 속의 균주들과 비슷한 것으로 판단되어 최종적으로 길항균 #120을 *Streptomyces* sp. #120으로 명명하였다.

적 요

전남 서남부지역의 참다래 과수원에서 발생하는 과속썩음병원균(fruit rot, *Botryosphaeria dothidea*)에 대한 항균작용이 우수한 세균성 균주를 선별하기 위하여 참다래 과수원 토양으로부터 단일균주를 분리하였으며, 과속썩음병원균(*Botryosphaeria dothidea*)에 대한 생물적 제어 능력을 검증하고 균주 동정을 실시하였다. 참다래 과수원에서 분리한 총 250여종의 단일균주 중에서 참다래에서 발생하는 과속썩음병원균에 대하여 길항작용이 우수한 균주를 1차적으로 6종 선별하였고, 이 중에서 참다래 과속썩음병원균에 대하여 길항작용이 96.0% 정도로 우수한 Strain #120을 최종적으로 선별하였다. 길항균 #120의 포자배열은 *rectiflexibles* 하였고, 포자표면은 *smooth*형이었으며, 분리균 세포벽내 LL-type이 DAP를 갖는 wall chemotype I 이었다. 길항균 #120의 균주 형태학적 특성, 생리 생화학적 그리고 화학 분류학적 특성 등을 종합하여 볼 때 길항균 #120은 *Streptomyces* sp. #120으로 동정되었다.

주제어 : 참다래, 과속썩음병원균, *Botryosphaeria dothidea*, 길항균, 방선균

사 사

이 연구는 전라남도 참다래 특성화사업단에 대한 농

촌진흥청 지역연구개발과제 지원(Code 구분: LS 0207)에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. Academic Press, San Diego.
2. Bangera, M.G. and L.S. Thomashow. 1999. Identification and characterization of agene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2, diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. Environ Microbiol. 181:3155-3163.
3. Bloemberg, G.V. and B.J.J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Current Opinion in Plant Biology. 4: 343-350.
4. Booth, C. 1971. Methods in microbiology. Academic Press, London.
5. Delany, I., M.M. Sheehan, A. Fenton, S. Bardin, S. Aarons, and F.O. Gara. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113. Microbiology. 146:537-546.
6. Goodfellow, M. and E.M. David. 1985. Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, London & New York.
7. Gottlieb, D. and T.G. Pridham. 1948. The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetes* as an aid for species determination. J. Bacteriol. 56:101.
8. Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1966. Laboratory method in microbiology. Academic Press, New York & London.
9. Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, and K. Kawashima. 2000. Complete genome structure of the nitrogen fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7:331-338.
10. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.
11. Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M.G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, and S. Borchert. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390:249-256.
12. Lahdenper, M.L., E. Simon, and J. Uoti. 1991. Mycostop-a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria. Elsevier, Amsterdam.
13. Lechevalier, M.P. and H. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic Actinomycetes. J. Syst. Bacteriol. 20:435-443.
14. Nielsen, T.H., C. Christophersen, U. Anthoni, and J. Sorensen. 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR 54. J. Appl. Microbiol. 87:80-90.
15. Nielsen, T.H., C. Thrane, C. Christophersen, U. Anthoni, and J. Sorensen. 2000. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin-a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain. J. Appl. Microbiol. 89:992-1001.
16. Nowak, T., N.N. Chaney, J.S. Wing, S.J. Gould, and J.E. Loper. 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. J. Bacteriol. 181:2166-2174.
17. Sabaratnam, S., A. James, and E. Traquair. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. Biol. Control. 23:245-253.
18. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340.
19. Stohl, E.A., J.L. Milner, and J. Handelsman. 1999. Zwittermicin a biosynthetic cluster. Gene. 237:403-411.
20. Stover, C.K., X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrenner, M.J. Hickey, F.S. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature. 406:959-964.
21. Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological control: mechanisms and antifungal metabolites. Chapman and Hall, New York.