

감귤 검은점무늬병균의 생육을 저해하는 근권 세균의 분리 및 동정

남명흔^{1,2*} · 신진호² · 최재필¹ · 홍석일¹ · 김영권¹ · 김흥태²

¹고려바이오(주), ²충북대학교 농업생명과학대학 식물위학과

(2009년 12월 7일 접수, 2009년 12월 14일 수리)

Identification of Rhizo-bacterium Inhibiting *Diaporthe citri* Causing Citrus Melanose

Myunghyeun Nnam^{1,2*}, Jin Ho Shin², Jaepill Choi¹, Suckil Hong¹, Young-Gwon Kim¹, and Heung Tae Kim²

¹KOREABIO.Co., LTD, ²Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Chungbuk, Korea

Abstract

Rhizo-bacteria were isolated from organic-farming soils to select antagonistic agent for controlling citrus melanose disease. Among several antagonistic bacteria, KB-401 effectively inhibited mycelial growth of several plant fungal pathogens, including the pathogen of citrus melanose, *Diaporthe citri*. KB-401 also inhibited spore germination of the fungal pathogen. The tip of germ tube was swollen when conidia of *D. citri* were co-culture with KB-401 in PD broth amended 1% glucose. KB-401 was identified as *Bacillus subtilis* through the investigation for physiological characters and the analysis of nucleotide sequences of 16S rDNA.

Key words biological control agent, *Bacillus subtilis*, *Diaporthe citri*

제주도 감귤산업은 1968년 이후부터 성장하여 현재 약 25,000 ha 재배면적에서 60여만톤이 생산되어 우리나라 제2의 과수로 부상하였고, 제주도 농업 소득의 40% 이상을 차지하는 기간사업으로 발전하였다(권 등, 2003). 감귤에서는 35가지 이상의 병해가 발생하는 것으로 보고되어 있는데, 이들 중에서 주로 문제가 되는 병해로는 검은점무늬병, 더텡이병, 궤양병 등이 보고되어 있으며, 그 중에서도 *Diaporthe citri*에 의한 검은점무늬병의 피해가 크다. 최근에는 *D. citri*가 감귤의 검은점무늬병뿐만 아니라, 부지화 감귤 품종에서 꼭지 썩음의 주된 원인균이라고 보고되기도 하였다(현 등, 2004). 1980년대에 들어오면서 감귤나무가 성목이 되고, 점점 밀식화되면서 검은점무늬병에 대한 방제의 필요성도 증가하고 있다. 검은점무늬병균은 주로 마른 가지에서 분생포자각으로

월동하며 분생포자를 형성하는데, 이 분생포자는 강우 시에 빗방울에 섞여서 잎, 가지, 과실 등으로 전파되어 기주식물을 감염하기 때문에 과실의 상품성이 크게 떨어져 많은 피해를 입게 된다(Agostini 등, 2003a). 병의 전반 자체가 강우량과 강우 일수에 큰 영향을 받게 되기 때문에 매년 검은점무늬병의 발생 양상이 다를 수가 있는데, 전염원인 분생포자를 만들 수 있는 마른 가지와 전반에 큰 영향을 미치는 강우가 병의 발생에 큰 영향을 미치고 있다(허와 박, 2005a). 온실 실험 결과에서 감귤 검은점무늬병은 24~28°C에서 발병도가 가장 심하였으며, 병원균이 기주식물을 침입하기 위해서는 최소한 4시간 정도는 잎 위에 수분이 존재하여야 하고, 감염의 정도가 최고 수준에 도달하기 위해서는 24시간 이상 수분이 존재하여야 한다(Agostini 등, 2003b). 포장에서도 검은점무늬병의 발병도가 급격하게 증가하는 원인은 강우와 잎 상의 수분 상태가 크게 영향을 미친다. 검은점무늬병을 방제하기 위해

*연락처 : Tel. +82-43-261-2556, Fax. +82-43-271-4414

E-mail: pigfood72@hanmail.net

서는 1차 전염원의 밀도를 감소시키는 것이 중요하기 때문에 월동 장소가 되는 마른 가지나 병든 가지를 소각하여 제거해야 한다(허와 박, 2005b). 살균제를 사용하는 화학적인 방제 방법의 성공 가능성을 조사하기 위하여 Bushong과 Timmer (2000)는 azoxystrobin과 benomyl, fenbuconazole을 가지고서 방제 실험을 수행하였다. 그 결과, azoxystrobin을 예방적으로 처리하였을 때, 우수한 효과를 보인 반면에, 병원균을 접종한 후에 약제를 처리한 경우에는 치료 효과를 보지 못하였으며, azoxystrobin 이외의 다른 두 살균제는 검은점무늬병에 대한 방제 효과를 보이지 않았다. 또한 Dhingra 등(2003)은 *Chaetomium globosum*을 토양과 식물의 잔재물에 처리하여, 두과류에서 줄기 궤양을 일으키는 *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*가 포장에서 월동하기 위하여 만드는 분생포자각의 형성을 억제한다는 결과를 얻었고, 이를 바탕으로 생물적 방제의 가능성을 보고하였다. 최근 제주 감귤의 친환경 재배에 대한 관심도가 높아지면서 구리제를 포함한 친환경 방제제에 대한 실험과 더불어(현 등, 2005), 재배 현장에서 사용할 수 있는 다양한 친환경 농자제의 개발이 필요하게 되었다. 따라서 본 논문에서는 감귤 검은점무늬병의 생물적 방제에 사용할 수 있는 후보미생물을 분리, 동정하고, 생물활성을 검정하였다.

후보 미생물 선발을 위하여 전국에서 유기농 인증을 받아 3년 이상이 경과한 농가의 토양을 수집하였다. 수집한 토양 시료는 0.85%의 멸균생리식염수를 가지고 10배 희석법으로 연속적으로 희석한 다음, 희석액 100 µL를 취하여 TSA(tryptic soy agar; Becton, Dickinson and Co., MD 21152 USA) 배지에 도말한 후, 30°C에서 48시간 배양하였다. 배지 상에 나타난 세균의 독립된 콜로니 하나를 새로운 배지에 접종하여 배양한 후, 단콜로니 분리를 실시함으로써 토양 미생물을 순수 분리하였다. 이상과 같이 분리하여 획득한 세균의 균주를 가지고서, 주요한 18종의 식물병원균에 대한 항균활성을 조사하였다. 항균활성검정은 PDA(potato dextrose agar; Becton, Dickinson and Co., MD 21152 USA) 배지에 식물병원균과 분리한 세균 균주를 각각 접종하고, 25°C에서 5~7일간 대치배양하여 식물병원균과 세균 균주 사이에 형성된 생육저지대의 크기에 따라 항균활성 수준을 결정하였다. 토양으로부터 분리한 450개의 세균 균주의 항균 활성을 검정한 결과, KB-401이라는 균주를 선발하였다. KB-401 균주는 실험에 사용한 18종의 식물병원균 모두에 항균활성을 보였는데, 그 중에서도 *D. citri*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* 등에 우수한 활성을 보였다(Table 1). 특히 감귤 재배 시 가장 크게 문제가 되고 있는 *D. citri* 분생포자의 발아율을

현저히 저하시킬 뿐만 아니라, 발아한 분생 포자의 발아관 역시 선단 부위가 팽윤되는 기형을 유발하였다(Fig. 1). KB-401 균주를 동정하기 위하여 16S rDNA의 염기서열을 분석하였다. PCR을 통하여 분석하고자 하는 유전자를 증폭하기 위하여 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG C-3') primer를 사용하였다(Johnson, 1994; Lane, 1991). 이 때 PCR의 조건은 94°C에서 5분간 반응한 다음, 94°C에서 denaturation을 1분, 55°C에서 annealing을 1분, 72°C에서 extension을 1분간 진행하는 반응을 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension을 실시하는 조건으로 조절하였다. PCR 증폭산물은 전기영동기(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)를 사용하여 100 V에서 20분간 전기영동하여 확인한 후, 염기서열을 결정하고 세균의 종 동정에 이용하였다. KB-401 균주의 16S rDNA를 증폭하여 1,419 bp의 증폭산물을 얻었으며, NCBI GenBank의 database에 등록되어있는 염기서열과 비교한 결과, *Bacillus subtilis* NCDO 1769T(X60646)

Table 1. Effect of *Bacillus subtilis* KB-401 on mycelium growth of 18 plant pathogenic fungi on potat dextrose agar

Pathogens	Inhibition zone ^a
<i>Alternaria kikuchiana</i> KACC40629	+
<i>Diaporthe citri</i> KACC40303	+++
<i>Venturia nashicola</i> KCTC6484	+
<i>Venturia inaequalis</i> KACC40301	+
<i>Botrytis cinerea</i> KACC40963	++
<i>Cladosporium fulvum</i> KCTC6171	+
<i>Colletotrichum coccodes</i> KACC40011	++
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> KACC40804	++
<i>Colletotrichum acutatum</i> KACC41028	++
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC40037	++
<i>Fusarium solani</i> KACC41093	++
<i>Fusarium moniliforme</i> KACC41031	++
<i>Phytophthora capsici</i> KACC40177	++
<i>Phytophthora melonis</i> KACC40486	+
<i>Pythium ultimum</i> KACC40705	+
<i>Pythium</i> sp. KACC40156	+++
<i>Sclerotinia</i> sp. KACC41068	+
<i>Rhizoctonia solani</i> KACC40132	+++

^aSymbols of inhibition zone indicated as follows; +, less than 2 mm of inhibition zone; ++, inhibition zone between 2 mm and 5 mm; +++, more than 5 mm.

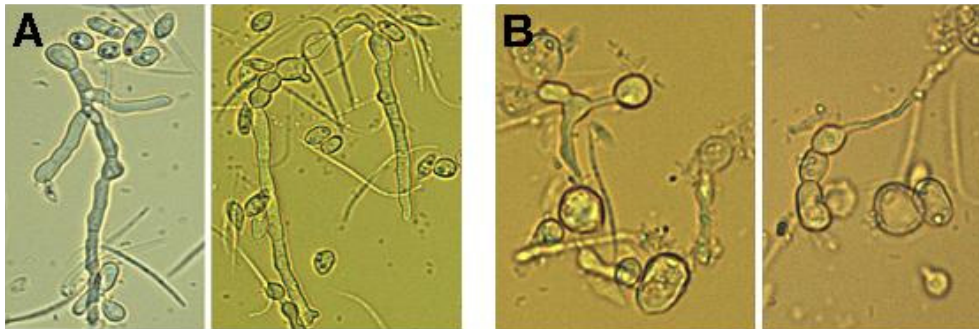


Fig. 1. Conidia of *Diaporthe citri* germinating in potato dextrose broth with only 1% glycerol (A) and with both 1% glycerol and *Bacillus subtilis* KB-401 adjusted to 1×10^6 CFU mL⁻¹ as a cell density (B).

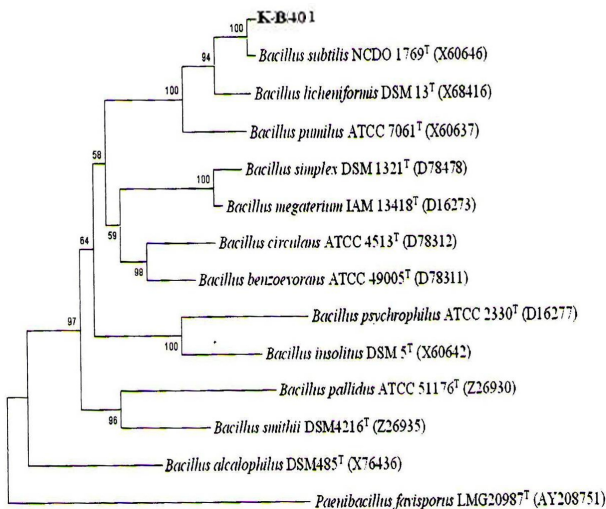


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of strain KB-401 within closely related strains of genus *Bacillus*. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

와 99.56%의 높은 상동성을 나타내어 *Bacillus subtilis* KB-401로 동정하였다(Fig. 2).

*Bacillus subtilis*는 식물병을 방제하는 후보 미생물로 많은 연구가 진행되고 있는 세균으로, 감귤류에서는 *Penicillium digitatum*, *Geotrichum candidum*, *Phomopsis citri* 등을 방제하기 위해서 사용되었다(Singh과 Deverall, 1984; Sharma 등, 2009). 국내에서도 *B. subtilis*는 잔디의 갈색퍼짐병(병원균: *R. solani*)과 피시움마름병(병원균: *Pythium aphanidermatum*), 딸기 잿빛곰팡이병(병원균: *Botrytis cinerea*), 결구상추 균핵병(병원균: *Sclerotinia sclerotiorum*), 그리고 차나무 겹등근 무늬병(병원균: *Pestalotiopsis longiseta*)의 생물적 방제에도 사용되었다(정 등, 2008; 정 등, 2006; Hang 등, 2005; 김 등, 2004; 김 등, 2008). 특히 Hang 등(2005)은 *B. subtilis* S1-0210을 *B. cinerea*에 처리하였을 때 *B. cinerea*의 군사

가 만족되고 선단이 팽윤되며 생장이 억제되는 것을 보고하였다. 본 연구에서도 *B. subtilis* KB-401을 처리한 *D. citri*에서는 분생포자의 발아가 억제되었고, 발아관 선단이 팽윤되며 생장이 크게 억제되었다. *B. subtilis*는 여러 가지 식물병을 방제하기 위한 생물적 방제제로 많이 사용하고 있는데, 병원균의 생육과 병 발생 억제에 대한 기작으로 항균성 2차 대사산물의 생성, 휘발성 항균물질의 생성 그리고 식물에서 병 저항성 반응의 유도 등 다양한 기작이 보고되어 있다(Leelasuphakul 등, 2008; Arrebola 등, 2009; Agostini 등, 2003b). 아직까지 *B. subtilis* KB-401의 정확한 작용기작을 규명하지는 못하였지만, *D. citri*의 포자발아를 억제하며, 군사 선단의 생장에 영향을 주어 군사 생장을 억제하는 것으로 생각되어진다. 감귤 검은점무늬병의 발생 특성을 보면 초기 전염원인 병포자의 생성과 전반을 억제하는 것이 중요하다(허와 박, 2005a; 허와 박 2005b). 따라서 *D. citri*의 포자발아와 군사 선단의 생장을 억제할 수 있는 *B. subtilis* KB-401은 감귤 검은점무늬병을 방제하는데 유용한 생물 방제제로 사용할 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부에서 시행한 공통핵심기술개발사업 (401004)과 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업 (5060032-03-1-CG000)의 지원에 의해 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Agostini, J. P., P. M. Bushong, A. Bhatia and L. W. Timmer (2003a) Influence of environmental factors on severity of

- citrus scab and melanose. *Plant Dis.* 87:1102~1106.
- Agostini, J. P., P. M. Bushong and L. W. Timmer (2003b) Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of scab, melanose, and *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Dis.* 87:69~74.
- Arrebola, E., D. Sivakumar and L. Korsten (2010) Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *in press*.
- Bushong, P. M. and L. W. Timmer (2000) Evaluation of postinfection control of citrus scab and melanose with benomyl, fenbuconazole, and azoxystrobin. *Plant Dis.* 84:1246~1249.
- Dhingra, O. D., E. S. G. Mizubuti and F. M. Santana (2003) *Chaetomium globosum* for reducing primary inoculum of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* in soil-surface soybean stubble in field conditions. *Biological Control* 26: 302~310.
- Hang, N. T. T., S-O. Oh, G. H. Kim, J-S. Hur and Y. J. Koh (2005) *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathol. J.* 21:59~63.
- Johnson, J. L. (1994) Similarity analysis of rRNAs. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (eds.). *Methods for general and molecular bacteriology*, p. 683-700. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115-175. John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Leelasaphakul, W., P. Hemmanee and S. Chuenchitt (2008) Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 31:1~8.
- Sharma, R. R., D. Singh and R. Singh (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50:205~221.
- Singh, V. and B. J. Deverall (1984) *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Tran. Br. Mycol. Soc.* 83:487~490.
- 권혁모, 남기웅, 김광식, 김동환, 이성찬, 현재욱 (2003) 감귤나무 가지에서 분리한 검은점무늬병균 *Diaporthe citri*의 균학적 특징. *식물병연구* 8:153~158.
- 김경희, 임명택, 허재선, 염규진, 고영진 (2008) 미생물제제를 이용한 차나무 겹등근무늬병의 방제. *식물병연구* 14:37~42.
- 김한모, 이광렬, 백정우, 김현주, 박종영, 이진우, 정순재, 문병주 (2004) 결구상추(*Sclerotinia sclerotiorum*)에 대한 길항세균의 분리 및 동정. *식물병연구* 10:331~336.
- 정우철, 신태수, 김봉수, 임재성, 이재호, 김진원 (2008) 잔디 갈색피짐병(Large patch)의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물의 선발 및 효력 검증. *식물병연구* 14:43~50.
- 정우철, 신태수, 도기석, 김원극, 이재호, 최기현 (2006) 잔디 피시움마름병(Pythium blight)의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물의 선발과 효력 검증. *식물병연구* 12:260~266.
- 허길현, 박서기 (2005a) 전남지역 유자과원에서의 검은점무늬병 발생 양상. *식물병연구* 11:10~15.
- 허길현, 박서기 (2005b) 전남 지역 유자과원의 검은점무늬병균 포자형성과 비산. *식물병연구* 11:16~20.
- 현재욱, 고상욱, 김동환, 한승갑, 김광식, 권혁모, 임한철 (2005) 친환경적 감귤 병 방제를 위한 구리제의 효율적 사용. *식물병연구* 11:115~121.
- 현재욱, 김동환, 김광식, 이성찬, 고상욱, 임한철 (2004) 최근 부지화 감귤 품종에 발생하는 식물병의 종류 및 그 증상. *식물병연구* 10:94~99.

감귤 검은점무늬병균의 생육을 저해하는 근권 세균의 분리 및 동정

남명흔^{1,2*} · 신진호² · 최재필¹ · 홍석일¹ · 김영권¹ · 김흥태²

¹고려바이오(주), ²충북대학교 농업생명과학대학 식물미학과

요약 유기농 인증을 받아서 3년 이상이 경과한 농가의 토양을 수집하여 근권 세균을 450균주 분리하였고, 여러 가지 식물병원균의 균사 생장을 억제하는 세균 KB-401 균주를 선발하였다. KB-401 균주는 특히 감귤 검은점무늬병균(*Diaporthe citri*)의 균사 생장과 포자 발아를 억제하며, 발아하는 포자에 처리하였을 때 발아관의 선단이 팽윤되는 현상을 관찰할 수 있었다. 본 균주는 생리적인 특성과 16S rDNA의 염기서열을 분석한 결과, *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

색인어 생물적 방제제, *Bacillus subtilis*, *Diaporthe citri*