한 국 균 학 회 지 The Korean Journal of Mycology Research Article

Bacillus amyloliquefaciens M27에 의한 오이 흰가루병의 생물적 방제

이상엽* · 원항연 · 김정준 · 한지희 · 김완규

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Biological Control of Cucumber Powdery Mildew by *Bacillus amyloliquefaciens* M27

Sang Yeob Lee*, Hang Yeon Weon, Jeong Jun Kim, Ji Hee Han and Wan Gyu Kim

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science (NAAS), Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT : *Bacillus amyloliquefaciens* M27 was isolated from the cotton-waste compost for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *B. amyloliquefaciens* M27 is a biocontrol agent with antagonistic activities against a wide range of fungal pathogens. The aim of this work was to evaluate the possibility of exploiting antagonistic bacteria, *B. amyloliquefaciens* M27, in the biological control of the cucumber powdery mildew fungus, *Podosphaera fusca*. In greenhouse tests, the isolate was found to be very effective to control powdery mildew on cucumber leaves showing 4.0% diseased area, whereas diseased area in the control was 80.5%. The filtrate of the isolate cultured on MH and LB media were more effective for control of the disease than those cultured on TSB, NB, and KB media. When two, five, ten, 20, 50 and 100-fold diluted culture broth of isolate on LB media were treated, disease areas were 0%, 0%, 0%, 1.3%, 3.1% and 5.0%, respectively, whereas diseased area in the control was 60.0%. The filtrate of the isolate cultured on LB media was treated to cucumber plants on July, October and December just before the outbreak of the powdery mildew occurred. When 10-fold diluted filtrate of the isolate was treated, control efficacy was 88.9~98.9% in the treated seasons. The results showed that the culture filtrate of *B. amyloliquefaciens* M27 was very effective to control powdery mildew of cucumber.

KEYWORDS : *Bacillus amyloliquefaciens*, Biological control, Cucumber, Powdery mildew

서 론

흰가루병균(*Podosphaera fusca*)은 전세계에서 가장 널리 분포하여 파괴적인 중요한 식물병원균 중에 하나이다(Braun *et al.*, 2002). 식물체의 표면에 존재하면서 흡기를 통해서 식물체 내의 영양분을 이용하여 기생하면서 오이를 비롯한 박과채소, 우엉, 머위, 곰취 등 기주범위가 매우 넓어서 노지와 비닐하우스에서 재배하는 박과채소에 수량감소와 중대하게 경제적 손실을 야기시킨다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009; Jarvis *et al.*, 2002). 오이 재배시에 포장 주변에 자라는 깨풀이나 백일홍 등과 같은 잡초나 화훼류의 흰가루병균(*P. fusca*)으로부터 분생포자가 바람에 의하여 비산되어 오이식물체에 흰가루병을 일으키기도 한다(Endo, 1989). 흰가루병은 유성세대(자낭포자세대)와 불완전세대(분생포자세대)가 있으며 최근 시설재배로 작물이 연중 재배되고 있어 흔히 분생포자세대의 생활사만을 볼 수 있다. 흰가루병균의 분생포자는 식물체에 부착하여 발아가 시작하여 5일 내지 6일이면 한 세대가 경과하여 다시 분생포자가 형성되어 매우 빠른 속도로 분생포자세대를 유지하면서 식물체에 피해를 준다(Endo, 1989).

식물체에 발병하여 결국에는 수량 손실을 막기 위하여 화학농약의 지속적 사용으로 농업생태계의 파괴와 저항성

Kor. J. Mycol. 2013 December, **41**(4): 268-273
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.4.268
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

***Corresponding author**
E-mail: lsy1111@korea.kr

Received November 13, 2013
Revised December 5, 2013
Accepted December 11, 2013

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 가진 식물병원균의 출현에 따라서 새로운 작물보호제 개발에 대한 노력(Tanaka and Omura, 1993; Russell *et al.*, 1995)과 소비자의 안전 농산물에 대한 요구가 중대되어 화학농약을 대체할 유용미생물을 이용한 친환경적인 방제법 연구가 활발히 시도되고 있다(Hornby, 1990). 전 세계적으로 미생물농약은 149종이 등록되어 병해충과 잡초방제에 사용되고 있으며(Copping, 2009), 이는 농업생태계의 오염과 병원균의 저항성 발생 억제 대책으로서의 역할이 기대되고 있다(Fravel, 2005). 국내 시설채소재배지에서 피해를 일으키는 공기전염성병해 중의 하나인 흰가루병은 시설재배지에서 연작 재배로 인한 병원균 밀도가 증가하여 작물 재배의 전생육시기에 발생할 수 있을 정도로 매우 방제가 필요한 병해이다.

따라서 본 연구에서는 환경 친화적인 안전 농산물 생산하기 위하여 오이 흰가루병균을 억제하는 특성을 가진 *Bacillus amyloliquefaciens* M27 균주를 이용하여 오이 흰가루병 생물적 방제를 위한 배지종류, 희석배수, 배양시간과 오이 재배시기에 따른 흰가루병 방제실험을 실시하였다.

재료 및 방법

시험 병원균

오이 식물체는 바로커상토(서울바이오)를 직경 7 cm 비닐포트에 담아 싱싱백다다기 오이(동부한농)를 파종하여 온실에서 재배한 오이 식물체를 사용하였다. 국립농업과학원 오이재배 비닐하우스와 유리온실에서 자연 발생한 오이 흰가루병균(*P. fusca*)을 대상으로 실험을 실시하였다.

시험 미생물 보관

버섯 재배 폐면에서 분리하여 동정한 *Bacillus amyloliquefaciens* M27 균주는 BLAST에 의하여 뉴클레오타이드 상동성 분석한 결과 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 라고 동정한 바 있다(Lee *et al.*, 2012). M27 균주를 20% glycerol 용액에 담아서 -70°C 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

분리 균주의 오이흰가루병 방제 효과 검정

오이 식물체는 바로커상토(서울바이오)를 직경 7 cm 비닐포트에 담아 싱싱백다다기 오이(동부한농)를 파종하여 온실에서 재배한 2엽기의 오이식물체를 사용하였다. 분리한 균주를 TSA(Trytic Soy Agar) 배지에 26°C에서 150 rpm으로 24시간 배양하였다. 분리 균주의 배양액을 7일 간격으로 2회 처리한 다음 7일 후에 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다.

선발 균주의 오이 흰가루병 발생 억제 배지 선발

배지종류별 오이 흰가루병에 대한 생물검정을 위하여 바로커상토를 직경 7 cm 비닐포트에 담아 싱싱백다다기 오이를 파종하여 2엽기의 식물체를 사용하였다. 선발균주를 TSB, LB(Luria-Bertani), KB(King's B broth), MHB(Mueller hinton broth, Difco)와 NB(nutrient broth, Difco) 배지별로 26°C에서 150 rpm으로 7일간 진탕배양하면서 매일 배지종류별로 배양한 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 30분)한 배양여액을 2배 희석한 다음 후 7일 간격 2회 살포하고 최종 살포 7일 후 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다.

선발 배지의 희석배수별 오이 흰가루병 방제 효과 검정

선발 균주를 TSB, LB(Luria-Bertani)와 MHB(Mueller hinton broth, Difco) 배지별로 26°C에서 150 rpm으로 3일간 진탕배양하면서 배지종류별로 배양한 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 30분)한 배양여액을 10배와 20배로 희석하여 2엽기 오이 식물체에 7일 간격 2회 살포하고, 최종 살포 7일 후 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다. 대조 화학약제로 페나리몰 유제 4,000배를 사용하였다.

선발 배지의 희석배수별 오이 흰가루병 방제 효과 검정

선발 균주를 LB(Luria-Bertani)액체배지에서 26°C에서 150 rpm으로 3일간 진탕배양하면서 배양한 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 30분)한 배양여액을 2배, 5배, 10배, 20배, 50배와 100배로 희석하여 2엽기 오이 식물체에 7일 간격 2회 살포하고 최종 살포 7일 후 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다. 대조 화학약제로 페나리몰 유제 4,000배를 사용하였다.

오이 재배시기에 따른 선발 균주의 오이 흰가루병 방제 효과 검정

비닐하우스에서 오이를 7월, 10월과 12월에 재배하면서 흰가루병이 발생하였을 때 선발균주의 처리시기별로 방제효과의 차이가 있는지를 조사하기 위하여 선발균주를 LB (Luria-Bertani) 액체배지에서 26°C에서 150 rpm으로 3일간 진탕배양하면서 배양한 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 30분)한 배양여액을 10배와 20배로 희석하여 2엽기 오이식물체에 7일 간격 2회 살포하고 최종살포 7일 후 흰가루병의 병반면적율을 조사하였다. 대조 화학약제로 페나리몰 유제 4,000배를 사용하였다.

결과 및 고찰

분리 균주의 오이 흰가루병 방제 효과

M27균주 등 4균주에 대하여 처리한 결과 오이 흰가루병이 M27균주와 CC178균주가 4.0%와 4.8%로 무처리는 80.5% 발생하여 두 균주 모두 유의성을 나타내었다. 두 균주 중에서 오이 흰가루병 발생이 적은 M27균주를 선발하였다(Table 1, Fig 1).

Fig. 1. Preventive effect of selected isolates against cucumber powdery mildew in the greenhouse. A, 434; B, M27; C, CC178; D, control.

Table 1. Preventive effect by the TSB culture liquids of several isolates including *B. amyloliquefaciens* M27 against cucumber powdery mildew

% diseased leaf area				
434	435	M27	CC178	Control
13.0 b[a)]	64.0 c	4.0 a	4.8 a	80.5 d

[a)]In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by DMRT.

Table 2. Suppression of cucumber powdery mildew by treatment with different concentrations of LB broth culture filtrate of *B. amyloliquefaciens* M27

Dilution (×)[a)]	Diseased area (%)	Control efficacy (%)
2	0.0± 0.0	100
5	0.0±0.0	100
10	0.0±0.0	100
20	1.3±0.81	97.8
50	5.0±1.31	91.7
100	40.0±6.54	33.3
Fenarimol EC (×4,000)	12.5±3.78	79.2
Control	60.0±5.34	-

[a)]Sample were sprayed onto whole surface of leaves of cucumber seedlings. Data were obtained 7 days after the final treatment and five seedlings were tested in each treatment with two replications. - ± : represent the standard deviation of ten replications.

선발 균주의 오이 흰가루병 발생 억제 배지 선발

선발한 M27균주의 배지종류와 배양기간에 따른 오이 흰가루병의 발생 억제 효과를 검정한 결과에서 M27균주는 MH배지와 LB배지에서 배양한 2배 희석한 배양여액이 TSB, NB와 KB배지에서 배양한 여액 보다 오이 흰가루병 발생량이 적었다(Fig. 2). 또한 배양기간이 증가하면서 NB 배지를 제외한 배지에서 오이흰가루병의 발생은 감소되었다. MH배지와 LB배지를 배양 2일부터는 전혀 오이흰가루병이 발생하지 않을 정도로 방제 효과가 우수하였다.

M27균주의 선발 배지에서 오이 흰가루병 방제효과

선발한 M27균주를 MH배지, LB배지와 TSB배지에서 배양한 10배와 20배로 희석한 배양여액을 7일 간격 2회 처리하여 7일 후 조사한 결과에서 배지별로 10배 희석 처리구가 20배 처리구보다 오이 흰가루병 방제효과가 우수하였고, 배지별로는 LB배지가 MH와 TSB배지에서 배양한 여액보다 오이 흰가루병 발생량이 적어서 선발 M27균주의 오이 흰가루병 방제에 가장 효과적인 LB배지를 선발하였다(Fig. 3).

LB배지에서 배양한 M27균주의 배양여액의 희석배수별 오이 흰가루병 방제 효과

B. amyloliquefaciens M27 균주를 26°C에서 150 rpm으로 3일간 진탕배양하면서 배양한 배양액을 원심분리(8,000

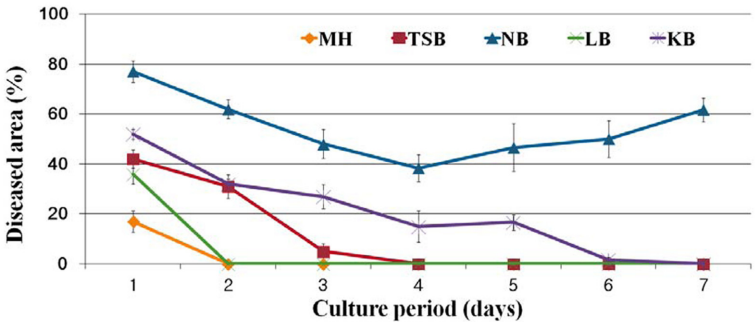

Fig. 2. Control effect of cucumber powdery mildew by treatment with culture filtrate at different media and culture period of *B. amyloliquefaciens* M27.

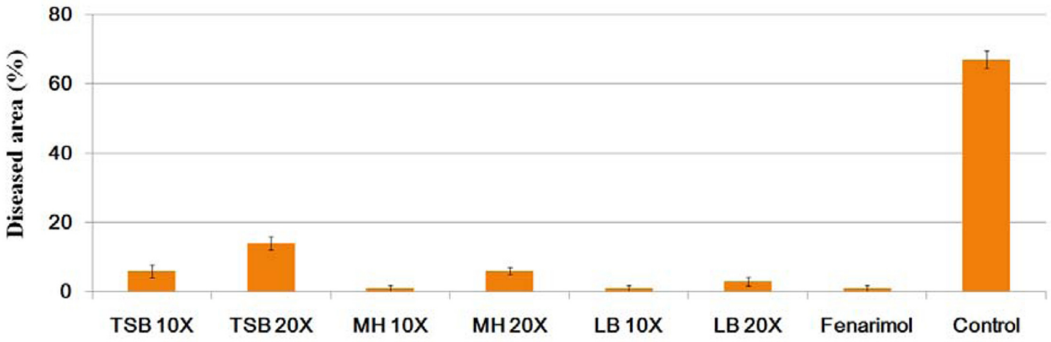

Fig. 3. The comparison of suppressive effect of cucumber powdery mildew at different culture media and dilution of *B. amyloliquefaciens* M27 against cucumber powdery mildew.

rpm, 30분)한 배양여액을 2배, 5배, 10배, 20배, 50배와 100배로 희석하여 2엽기 오이식물체에 7일 간격 2회 살포하고 최종 살포 7일 후 흰가루병의 병반면적율을 조사한 결과, 2배 처리구와 10배 처리구에서 전혀 흰가루병이 발생하지 않았으며, 20배와 50배에서 90%이상의 방제효과를 나타내었고, 페나리몰 유제는 79.2%의 방제효과를 나타내어 M27 배양여액의 50배 처리구가 오이 흰가루병 방제 효과가 우수하였다(Table 2).

오이 재배시기에 따른 선발 균주의 오이 흰가루병 방제 효과 검정

B. amyloliquefaciens M27 균주를 LB(Luria-Bertani) 액체 배지에서 26°C에서 150 rpm으로 3일간 배양한 배양여액을 10배와 20배로 희석하여 7월, 10월과 12월에 재배한 2엽기 오이 식물체에 7일 간격 2회 경엽 처리하고 최종 처리 7일 후 흰가루병의 병반면적율을 조사한 결과에서 7월에 재배한 시기에 가장 흰가루병 발생이 적었으며, 12월 재배에서 가장 오이 흰가루병의 발생이 많았지만 *B. amyloliquefaciens* M27 균주의 10배액이 20배액보다 흰가루병 발생량이 적었으며, 오이 흰가루병에 대한 방제효과는 88.9~98.9%로 나타내었다(Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6).

외국에서 *Bacillus subtilis*은 오이식물체 표면에 잘 정착하여 오이 흰가루병을 화학농약 아족시트로빈과 같은 유사한 방제효과를 나타내었고(Romero *et al.*, 2004, 2007b), 길항균 *Bacillus subtilis*은 이투린과 펜기신과 같은 리포펩타이드를 생성하여 식물병원균의 생장을 억제한다고 하였다(Romero *et al.*, 2005, 2007a). *Bacillus pumilus*와 *Bacillus subtilis* 균주의 효과가 인정되어 미국의 아그라퀘스트사에서 흰가루병 등 방제제로 개발하여 세레나데, 랩쏘디와 쏘나타라는 미생물농약 제품으로 등록하여, 미국, 독일, 스위스, 페루, 캐나다 이태리와 프랑스 등에서 사용되고 있다(Helene *et al.*, 2011). 국내에서는 *B. subtilis* B29, *B. subtilis* M10과 *Streptomyces* sp. CC19 균주를 유묘검정을 통하여 오이 흰가루병에 방제에 효과적인 균주로서 선발한 바 있으며(Lee *et al.*, 2010), 그리고 *Bacillus* sp. BS061 균주의 20배 희석한 배양여액은 오이 흰가루병을 62.4% 방제하였으며, 딸기 흰가루병을 80.3% 방제효과를 나타내었다(Kim *et al.*, 2013). 그리고 *B. subtilis*가 생성한 항균물질 이투린과 펜기신이 흰가루병균(*Podosphaera fusca*)에 대한 길항력에 큰 주요 역할을 한다고 보고하였다(Romero *et al.*, 2007a). 본 실험에 사용한 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* M27 균주는 게놈 분석하여 cyclic lipopeptides(bacillomycin D, fengycin, iturin, surfactin), dipeptide(bacilysin), siderophore(bacillibactin)와 polyketides (bacillaene,

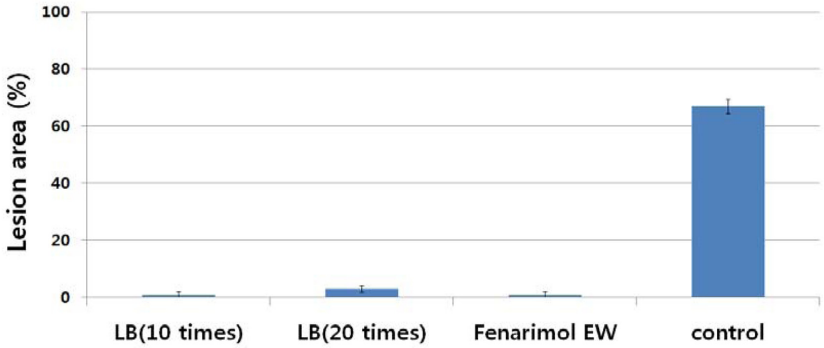

Fig. 4. Control effect of cucumber powdery mildew by treatment with *B. amyloliquefaciens* M27 in the greenhouse on July in 2012.

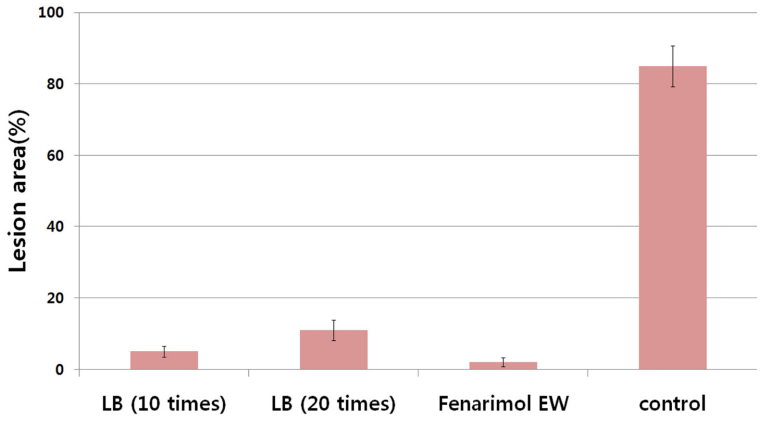

Fig. 5. Control effect of cucumber powdery mildew by treatment with *B. amyloliquefaciens* M27 in the greenhouse on October in 2012.

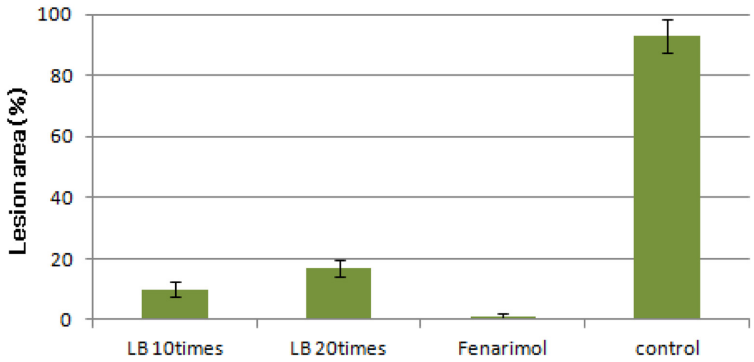

Fig. 6. Control effect of cucumber powdery mildew by treatment with *B. amyloliquefaciens* M27 in the greenhouse on December in 2012.

difficidin, macrolactin)의 유전자가 발견되어 식물병원균에 대하여 항균력과 식물 생육 촉진 효과가 있어 미생물농약과 미생물비료로서 사용이 가능하다고 하였다(Borriss, 2011; Borriss *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012).

이상의 *B. amyloliquefaciens* M27 균주를 이용하여 오이 흰가루병에 대한 생물적 방제 연구결과에서와 같이 M27 균주는 방제효과가 우수하여 화학농약을 대체할 수 있는 친환경미생물제로서 개발할 필요가 있다고 사료된다.

적 요

흰가루병균(*Podosphaera fusca*)에 의한 오이 흰가루병의 생물적 방제를 위하여 검정한 길항세균 *B. amyloliquefaciens* M27 균주는 4.0% 흰가루병이 발생하였고 무처리는 80.5% 발생하였다. MH와 LB배지에서 배양한 *B. amyloliquefaciens* M27 균주의 배양여액은 TSB, NB와 KB배지에서 배양한 배양여액보다 오이 흰가루병 방제효과가 우수하였다. M27 균주를 LB배지에서 배양한 배양여액 2, 5, 10, 20, 50배와 100배 처리한 경우 오이 흰가루병이 0%, 0%, 0%, 1.3%, 3.1%, 5.0%와 33.3%를 나타낸 반면에 무처리는 60.0%를 나타내었다. 7월, 10월과 12월에 오이 흰가루병이 발생할 때 LB배지에서 배양한 M27균주의 배양여액를 10배로 처리한 결과 88.9~98.9% 방제효과를 나타났다. 이와 같은 결과에서 *B. amyloliquefaciens* M27 균주의 배양여액은 오이 흰가루병에 방제에 매우 효과적이었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ00897602)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Borriss, R. 2011. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents, pp. 41-76. In: Maheshwari DK. Eds, Bacteria in agrobiology: Plant growth response. Springer Heidelberg, Heidelberg, Germany.

Borriss, R., Chen, X. H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Spröer, C., Junge, H., Vater, J., Pühler, A. and Klenk, H. P. 2011. Relationship of

Bacillus amyloliquefaciens clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: A proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 1786-1801.

Braun, U., Cook, T. A. Inman, A. J. and Shin, H. D. 2002. The taxonomy of the powdery mildew fungi, In: The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise, pp. 13-55. Eds. Bélanger, R. R., Bushnell, W. R., Dik, A. J., Carver, T. L. W., APS Press, St. Paul, MN, USA.

Copping. L. G. 2009. The manual of biocontrol agents. 3th edition, pp. 702. Eds. BCPC. UK.

Endo, T. 1989. Studies on the life-cycle of cucurbit powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea* (schlecht) Poll. *Spec. Bull. Fukushima Pref. Agr. Exp. Stn.* 5:1-106.

Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:337-359.

Helene, C., Wagner, B. Patrick, F. and Marc, O. 2011. 13. *Bacillus*-based biological control of plant diseases in pesticides in the modern world - pesticides use and management. pp. 273-302. www.intechopen.com

Hornby, D. 1990. Biological control of soilborne plant pathogens. pp. 479. Eds. C.A.B International, Wallingford, Oxon, UK.

Jarvis, W. R., Gubler, W. D. and Grove, G. G. 2002. Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems, In: The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise, pp. 169-199. Eds. Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, APS Press, St. Paul, MN, USA.

Kim, Y. S., Song, J. G. Lee, I. K. Yeo, W. H. and Yun, B. S. 2013. *Bacillus* sp. BS061 suppresses powdery mildew and gray mold. *Mycobiology.* 41(2):108-111.

Lee, S. Y., Kim, B. Y. Ahn, J. H. Song, J. Seol, Y. J. Kim, W. G. and Weon, H. Y. 2012. Draft Genome Sequence of the Biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* Strain M27. *Journal of Bacteriology.* 194:6934-6935.

Lee, S. Y., Lee, Y. K. Park, K. and Kim, Y. K. 2010. Selection of beneficial microbial agents for control of fungal diseases in the phyllosphere of cucumber plant. *Kor. J. Pesti. Sci.* 14(4): 326-331. (in Korean).

Romero, D., Pérez-García, A. Rivera, M. E. Cazorla, F. M. and De Vicente, A. 2004. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:263-269.

Romero, D., de Vicente A. Rakotoaly, R. H. Dufour, S. E. Veening, J. W. Arrebola, E. Cazorla, F. M. Kuipers, O. P. Paquot, M. and Pérez-García1, A. 2007a. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca. MPMI*. 20(4):430-440.

Romero, D., de Vicente A. Zeriouh, H. Cazorla, F. M. Fernández-Ortuño, D. J. Torés, A. and Pérez-García, A. 2007b. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. *Plant Pathol.* 56: 976-986.

Tanaka, Y. T. and Omura, S. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:57-87.

The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea, 5th edition, pp. 853. JY press, Anyang. (in Korean).