

멜론 분홍빛씩음병과 포도 흰얼룩병의 원인균인 *Trichothecium Roseum*에 대한 *Bacillus Subtilis* HK2의 항균활성

오소영¹, 이은영², 남기웅², 윤덕훈^{1*}

¹국립한경대학교 국제농업기술정보연구소, ²국립한경대학교 원예학과

Antifungal Activity of *Bacillus Subtilis* HK2 against *Trichothecium Roseum* Causing Pink Rot of Melon and White Stain Symptom on Grape

Soh-Young Oh¹, En-Young Lee², Ki-Woong Nam² and Deok-Hoon Yoon^{1*}

¹Research Institute of International Agriculture, Technology and Information,
Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

²Department of Horticulture, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

Abstract - Pink Rot on melon and White Stain Symptom on grape are caused by *Trichothecium roseum*, one of the most important diseases of grape and melon. These diseases have been occurred in national-wide in Korea and causes irreversible damage on the grape and the melon at harvest season. This research presents the evaluation of the capacity of *Bacillus subtilis* HK2 to protect both melon and grape against *T. roseum* and establishes its role as a biocontrol agent. In this study, we isolated a *Bacillus* strain HK2 from rhizosphere soil, identified it as *Bacillus subtilis* by 16S rRNA analysis and demonstrated its antifungal activity against *T. roseum*. Under I-plate assay it was observed that the effect of hyphal growth inhibition was not due to production of volatile compounds. The optimum culture condition of HK2 was found at 30 °C and initial pH of 7.0. Application of HK2 culture suspension reduced 90.2% of white stain symptom on grape as compared to control, resulting in greater protection to grape against *T. roseum* infestation. Butanol extract of HK2 culture purified using flash column chromatography. The antifungal material was a polar substance as it showed antifungal activity in polar elute. Therefore, our results indicated a clear potential of *B. subtilis* HK2 to be used for biocontrol of Pink rot in melon and white stain symptom on grape caused by *T. roseum*.

Key words - *Bacillus subtilis*, Grape, Melon, Pink rot, *Trichothecium roseum*, White stain symptom

서 언

수확 후 저장 중에 발생하는 저장병원균 중의 하나로 잘 알려져 있는 *Trichothecium*속 곰팡이는 Ascomycota 문(phylum)의 Soridariomycetes 강(class)에 속하는 균이다(Bello, 2008; Inácio *et al.*, 2011; Welch *et al.*, 1975). 국내에서 *Trichothecium roseum*에 의한 병해로는 사과 분홍빛열매씩음병(Kwon *et al.*, 2014), 배 붉은빛씩음병(Park, 1961), 멜론 분홍빛열매씩음병(Kwon *et al.*, 1998), 딸기 분홍빛열매씩음병(Kwon *et al.*, 2010), 배 분홍빛곰팡이병(Kwon *et al.*, 2013), 감귤 분홍빛열매씩음

병(Kwon *et al.*, 2013), 토마토 분홍빛씩음병(Han *et al.*, 2013) 포도흰얼룩병(Oh *et al.*, 2014a) 등이 보고된 바 있다.

멜론 분홍빛씩음병은 멜론의 네트가 형성된 후 수확기에 이르러 과일에 병을 일으키며, 저장 중에도 발생하는 것으로 보고되어 있다(Kwon *et al.*, 1998). 포도흰얼룩병은 과실의 당도가 높아지는 착색기부터 발병하기 시작하여 수확기에 급속히 진전되어 상품성을 저하시켜 농가에 큰 피해를 주고 있는 병이다. 이전의 연구에서 포도흰얼룩병의 병반으로부터 병원균을 분리, 동정한 결과 *Acremonium acutatum*과 *Trichothecium roseum*로 보고하였으며, 병명은 포도흰얼룩병으로 명명하였다(Oh *et al.*, 2014a). 포도흰얼룩병은 식물체의 조직을 침입하지는 않으며 과실 표면위에서만 기생하는 것으로 관찰되었으며, 습도가

*교신저자: tropagri@hknu.ac.kr

Tel. +82-31-678-4643

높거나, 환기가 불량한 과원에서 발생이 더 심하였다(Oh *et al.*, 2014b).

*T. roseum*에 의한 병해는 주로 수확기에 이르러 발생하므로 화학농약을 사용한 방제에 어려움이 있으며, 최근 소득증가에 따른 소비자들의 건강에 대한 관심이 높아지면서 화학적 방제제로부터 안전한 농산물에 대한 관심이 증대 되어 친환경, 유기농업에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 토착미생물을 이용한 미생물 제제는 화학농약에 비해 약효가 낮고, 환경에 따른 효과의 변동이 심한 문제점이 있으나, 화학적으로 안전하고 농업 생태계에 미치는 영향 또한 낮다는 이점이 있어 생물학적 방제의 한 방법으로 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구는 수확기에 발생하여 여러 과실의 상품성저하를 유발하는 *T. roseum*을 제어하기 위한 길항균을 선발, 동정하여 보고한다.

재료 및 방법

Trichothecium roseum 생장 억제 우수 균주 선발

2012년부터 2013년에 걸쳐 전국 12개 지역의 잡초 근권과 비근권 토양을 수집하여 4°C의 저온실에 보관하고 실험에 이용하였다. 길항균을 분리하기 위해 채집한 토양 1g을 멸균증류수 9ml에 첨가하여 이 중 1 ml을 취하여 10⁻⁵ 배까지 희석하였다. 혼합한 희석액을 미리 준비한 NA (Nutrient broth, MCell) 배지에 0.1 ml씩 도말하여 25°C의 인큐베이터(Eyela, JP/LTI-1001ED)에서 3일간 배양하였다. 평판배지에 형성된 세균 균총의 색과 형태적 특징에 따라 선발된 세균의 single colony를 백금이로 순수 분리한 782개 균주를 tryptic soy agar (TSA)배지와 PDA (patato dextrose agar)배지에서 *T. roseum*과 대치배양(dual culture)을 통한 억제환 생성법(inhibition zone method)으로 길항균을 선발하였다. 길항균 선발을 위한 후보 균주 colony들을 병원균의 가장자리로부터 1 cm 떨어진 위치에 접종하고 25°C, 암조건에서 7일간 배양한 후 두 병원균의 생장을 억제하는 생육 억제환이 10 mm~20 mm 이상 보이는 균주들을 최종적으로 선발하였다. 최종 선발된 길항균주는 0.2 ml의 살균된 75% glycerol 과 nutrient broth (NB) 액체배지에서 28°C, 24시간 배양한 세균배양액을 혼합하여 60°C 저온배양기에 보관하였다.

*Trichothecium roseum*과 길항세균 액체 배양 후 균체량 측정

길항균주가 *T. roseum* 생육을 억제하는 길항 효과를 측정하기 위해 선발된 길항미생물 배양액과 *T. roseum* 균주를 액체 배

양하여 사용하였다. 먼저 길항세균은 Nutrient broth 배지에서 28°C, 48시간 미리 배양하여 2.4% Potato dextrose broth (PDB)에 10% vol로 첨가하고 *T. roseum*의 균사체를 접종하여 28°C에서 72시간 진탕 배양하였다. 건조 중량은 미리 무게를 측정해 놓은 Whatman No. 2 filter paper에 병원균의 균체 발육량으로 측정하여 항진균 활성을 조사하였다.

Trichothecium roseum 생장 억제 균주의 동정

최종 선발된 균주는 다양한 생화학적 및 분자생물학적 방법에 의해 균주 동정을 하였다. 생화학적 동정으로는 API 50 CHB® Kit (BioMerieux, France)를 이용하여 균의 탄소원 이용능을 분석하였고, 분자생물학적 동정으로는 균의 16S rDNA의 염기서열을 비교하였다. HK2 균주를 TSA (Tryptic soy agar) 배지에 도말 후 single colony를 nutrient broth (NB) 배지에서 접종하여 24시간동안 배양한 배양액을 API 50 CHB에 접종하여 48시간 이후의 반응결과를 관찰하였다. 16S rDNA 증폭을 위해 universal primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-AGG GAG GTG ATC CAG CCG C-3') primer를 사용하였다(Min, 2011). PCR 반응조건은 predenaturation을 94°C에서 5분, denaturation을 94°C에서 30초, annealing을 58°C에서 40초, elongation을 72°C에서 90초간 진행하여 30회 반복한 후 final extension을 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, GG-Bio Co, Ltd에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다.

I-plate 밀폐 배양

길항세균 배양액에 함유된 항진균물질이 휘발성물질에 의한 균사생장 억제 효과인지 판단하기 위해 I-plate petri-dish를 사용하여 실험하였다. I-plate petri-dish 한 쪽에는 Potato dextrose agar (PDA)배지를 분주하여 *T. roseum*의 균총 조각을 치상하고 다른 한 쪽에는 멸균한 거즈에 길항세균을 NB배지에서 배양한 현탁액 1 ml을 분주한 후 25°C의 인큐베이터(Eyela, JP/LTI-1001ED)에서 7일간 배양하였다.

항진균성 항생물질 정제

HK2 균주의 항진균 물질 분리는 먼저 조추출물에 증류수와 methanol을 첨가하여 고체상추출 cartridge를 이용한 추출과정을 수행하였다. 추출을 위해 Strata C18-E (55µm, 70A, Phenomenex) cartridge를 Methanol과 증류수를 각각 10 ml로 활성화하고 시료를 5~6 ml/min의 유속으로 용출시켰다. Cartridge에 흡착된

대상물질은 methanol 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100%로 조정된 용액을 10 ml씩 순차적으로 주입하여 용출시켰다. 용출액은 speed vaccum evaporator (CVE-100D, EYELA, Japan)로 농축한 다음 시료의 무게를 잰 후 각각의 농도별 Methanol로 10,000 ppm이 되도록 농도를 조정하였다. 용출액은 0.2 μ m filter로 filtering을 한 후 *T. roseum*를 대상으로 항진균 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

Trichothecium roseum 성장 억제 우수 균주 선발

*T. roseum*과 분리균들을 대치배양한 결과 몇몇 균의 경우 저지원이 형성되었다. 저지원이 형성된 부분의 *T. roseum* 균사를 광학현미경으로 관찰한 결과 무처리 대조구의 정상적인 균사의 형태와 비교해 세포 내 공포화가 진행되고 부풀어 오르는 등의 기형적인 형태를 띠는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이와 같은 저지

원 주변 균사의 기형적인 형태는 길항미생물의 다양한 길항물질에 의한 전형적인 증상으로 알려져 있다(Sang *et al.*, 2011).

*Trichothecium roseum*과 길항세균 액체 배양 후 균체량 측정

HK2 균주와 병원균을 NB배지에서 액체배양 한 결과 88%이상의 균사 생육 억제효과를 보였다(Table 1). 액체배지 상에서

Table 1. Growth inhibition of *Trichothecium roseum* by HK2 strains on PDB

Bacterial strains	Dry weight PDB (g)
	<i>Trichothecium roseum</i>
HK2	0.5 \pm 0.1
Untreated	8.9 \pm 0.5

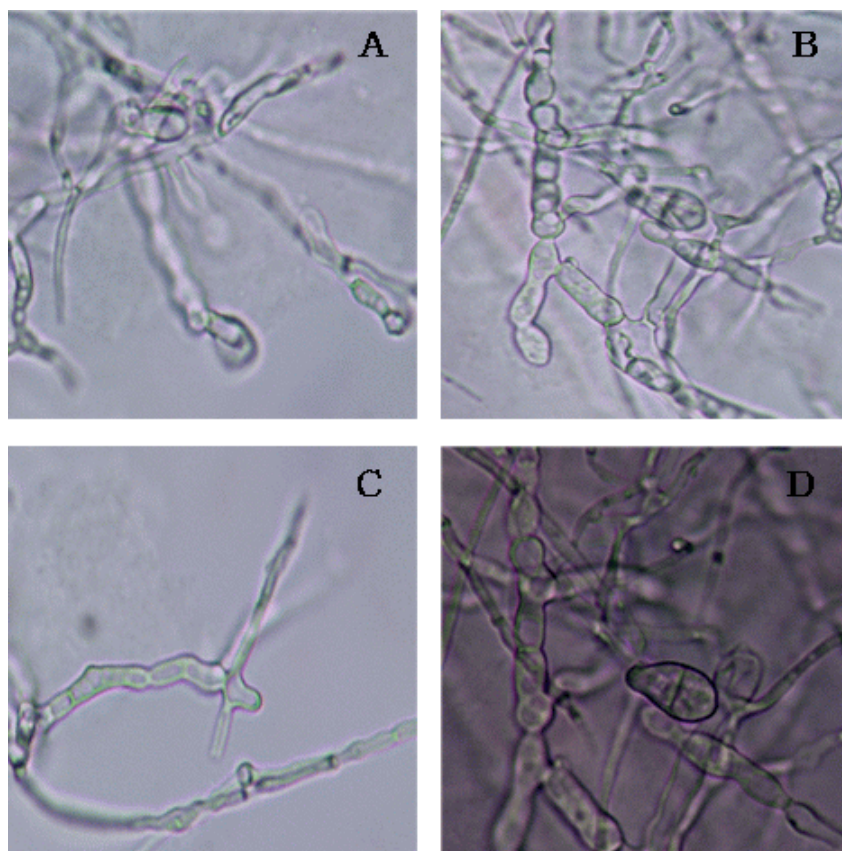


Fig. 1. Photographs of mycelial morphology of *Trichothecium roseum* isolate affected by antagonistic bacterial strains 7 days after inoculation on tryptic soy agar by dual culture test. Each bacterial strain was cultured on tryptic soy agar on the center of the plate, and *T. roseum* was cultured on the side of the plate at the same time. In all, each bacterial suspension was smeared on the center of the plates while 5-day-old mycelial plugs (5 mm in diameter) of *T. roseum* was inoculated on the side of the plates. A, C; Normal hyphae of *T. roseum*, B, D; Swollen hyphae and conidiophore of *T. roseum* by HK2 strain.

Table 2. Comparison of physiological and biochemical characteristics of HK2 compared with *B. subtilis* described by Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

Characteristics	HK2	<i>B. subtilis</i>
Morphological	rod	rod
Gram stain	+ ^z	+
Mobility	- ^y	-
Aerobic growth	+	+
Spore	+	+
Physiological		
Control	-	-
Glycerol	-	+
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
Ribose	-	+
D-Xylose	+	+
L-Xylose	+	+
Adonitol	-	-
b-Methyl-D-Xyloside	-	-
Galactose	-	-
Glucose	-	-
Fructose	+	+
Mannose	+	+
Sorbose	+	+
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	+
a-Methyl-D-Mannoside	+	+
a-Methyl-D-Glucoside	-	-
N-Acetyl-Glucosamine	+	+
Amygdalin	-	-
Arbutin	+	+
Esculin	+	+
Salicin	+	+
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	-	-
Sucrose	-	-

균사가 자라지 못하고 배지가 현탁되어 뿌옇게 되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 현상은 분리균주의 항균성 물질 생성에 의한 것으로 생각되었다. *Bacillus* spp.는 진균에 대해 길항작용을 나타내는 여러 독성물질을 세포 밖으로 분비하는 것으로 알려져 있다(Baker *et al.*, 1983; Zuber *et al.*, 1993). 진균의 세포벽을 분해하는 효소인 cellulase, amylase, glucanase를 생산할 뿐만 아니라(Grau *et al.*, 2001; Phister *et al.*, 2004) inturin, sufractin과 bacillomycin 등의 항진균성 이차대사산물도 생산한다(Vanittanakam *et al.*, 1986; Hiraoka *et al.*, 1992; Tsuge *et al.*, 1996; Roongsawang *et al.*, 2002; Spadaro *et al.*, 2005).

Trichothecium roseum 생장 억제 균주의 동정

최종 선발한 HK2 균주에 대한 생화학적 및 분자생물학적 동정을 하였다. 먼저 API kit (BioMerieux, France)를 이용한 당 기질에 대한 이용능 시험(Table 2)과 이에 대한 API 분석프로그램(BioMerieux, France)의 동정 결과, HK2 균주는 *Bacillus* 속 에 속하는 균주로 확인되었다. 선발 세균을 16S rDNA의 염기서열을 비교 분석한 결과 HK2 균주는 그람양성 세균 중 *Bacillus* 속 에 속하는 *Bacillus subtilis*와 99.9%의 유사성을 갖는 것으로

Table 2. Continued

Characteristics	HK2	<i>B. subtilis</i>
Trehalose	+	+
Inulin	+	+
Melezitose	-	+
Raffinose	-	-
Starch	+	+
Glycogen	+	+
Xylitol	+	+
Gentiobiose	-	-
D-Turanose	+	+
D-Lyxose	+	+
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
Gluconate	-	-
2-Keto-Gluconate	-	-
5-Keto-Gluconate	-	-

^z+, positive, ^y-; negative.



Fig. 2. Phylogenetic position of HK2 within the genus *Bacillus*. The branching pattern was generated by neighbor-joining tree method. The Gene bank accession numbers of the 16S rDNA nucleotide sequences are indicated in brackets. The number of each branch indicates the bootstrap values. The bar indicates a Jukes-Cantor distance of 0.2.

나타났다. 한편, 균주들의 16S rDNA 염기서열을 기준으로 균주들 간의 유연관계를 조사한 결과 HK2 균은 *B. subtilis*에 속하는 균주들 외에 *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* 등의 균주들과도 매우 가까운 유연관계에 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

I-plate 밀폐 배양

대치배양결과 *T. roseum*의 균사 생장을 억제한 물질이 휘발성인지 알아보기 위하여 I-plate Petri-dish를 사용하여 배양한 결과 억제 기작을 보이지 않았다. 따라서 HK2 균주가 생성하는 항균물질의 특성이 휘발성 물질은 아닌 것임을 확인하였다(Table 3).

항진균성 항생물질 정제

Bacillus subtilis HK2의 항균 물질 추출을 위해 Strata C18-E

Table 3. Effects of volatiles produced by HK2 strains on mycelial growth of *Trichothecium roseum*

Bacterial strain	Growth on PDA (mm)
	<i>Trichothecium roseum</i>
HK2	67
Untreated	73

(55 μ m, 70A, Phenomenex) cartridge를 methanol과 증류수 각 10 ml로 활성화하고 시료를 5~6 ml/min의 유속으로 용출시켰다. Cartridge에 흡착된 대상물질은 methanol 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100%로 조정된 용액을 10 ml씩 순차적으로 주입하여 용출시켰다. 용출액은 speed vac (CVE-100D, EYELA, Japan)으로 농축한 다음 시료의 무게를 잰 후 각각의 농도별 methanol로 10000 ppm이 되도록 농도를 조정하였다. 용출액은 0.2 μ m filter

로 filtering을 한 후 *T. roseum*을 대상으로 항진균 활성을 조사하였다. 실험 결과 80~100%의 methanol 용출분획이 높은 항진균 활성을 나타내었다. *T. roseum*은 포도의 흰얼룩병, 멜론의 분홍빛썩음병 등 여러 과실의 수확 후 병을 일으켜 상품성 저해 및 경제적 손실을 유발하고 있다. 따라서 본 결과는 여러 농산물에서 문제가 되는 *T. roseum*을 생물학적 방법으로 제어하기 위한 기초자료로 활용 될 수 있을 것이다.

적 요

2012년부터 2013년에 걸쳐 식물체 근권과 비근권 토양을 수집하였다. 수집한 토양을 희석평판법을 이용하여 총 782개의 세균을 분리하였고, 분리한 세균을 실험실내에서 *Trichothecium roseum*과의 대치배양을 통해 균사생장억제율이 80% 내외로 우수한 길항력을 나타내는 균주를 선발하였다. I-plate에서 HK2균주와 *T. roseum* 두 균을 격리하여 밀폐배양 시 모두 균사생장억제 효과는 없기 때문에 휘발 물질은 아닌 것으로 판단되었다. NB배지에 길항균주와 *T. roseum*을 액체배양 한 결과 88% 이상 균사생장억제 효과를 보였다. HK2균주를 동정하기 위해 16S rDNA 염기서열분석과 API 50 CHB Kit (BioMerieux, France)를 이용하여 생화학적 특성을 분석한 결과 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. HK2 균주가 생산한 항진균물질을 butanol로 추출한 후 flash column chromatography를 이용하여 항진균물질을 정제한 결과 methanol 80%의 조건에서 잘 분리되었으며 향후 분리 순화를 통한 화학구조분석이 필요하다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01050707)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Baker, C.J., J. Stavely, R. Tomas, C.A. Myron, S. Janet and S. Macfall. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phasoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *J. Phytopathology* 73:1148-1152.

Bello, G.D. 2008. First report of *Trichothecium roseum* causing postharvest fruit rot of tomato in Argentina. *Australasian Plant Dis. Notes* 3:103-104.

Grau, A., C. Juan, J.C. Gomez-Fernandez, F. Peypoux and A. Ortiz. 2001. Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin. *A. Peptides* 22 :1-5.

Han, K.S., S.C. Lee, J.S., Lee and J.W. Soh. 2013. First report of pink mold rot on tomato fruit caused by *Trichothecium roseum* in Korea. *Res. Plant Dis.* 18:396-398.

Hiraokr, H., O. Asaka, T. Ano and M. Shoda. 1992. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38:635-640.

Inácio, C.A., R.C. Pereira-Carvalho and F.G.A. Morgado. 2011. A tomato fruit rot caused by *Trichothecium roseum* in Brazil. *Plant Dis.* 95:1318.

Kwon, J.H., S.W. Kang, J.T. Lee, H.K. Kim and C.S. Park. 1998. Matured fruit Cucumis melo caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray in Korea. *Plant Pathology J.* 14:642-645 (in Korean).

Kwon, J.H., S.S. Shen and J.W. Kim. 2010. Occurrence of pink mold rot of strawberry caused by *Trichothecium roseum* in Korea. *Plant Pathology J.* 26:296 (in Korean).

Kwon, J.H., D.W. Kang, O.H. Choi and H.S. Shim. 2013. Pink mold rot on Unishiu Orange (*Citrus unshiu* Mac.) caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray in Korea. *Res. Plant Dis.* 19(3):226-228.

Kwon, J.H., M.J. Kim, C.K. Shim, H.J. Jee and S.D. Lee. 2014. Pink mold rot on Apple (*Malus pumila* var. *dulcissima* Koidz.) caused by *Trichothecium resuem* (Pers.) Link ex Gray in Korea. *The Korean Journal of Pesticide Science* 18(4):429-433.

Min, T.W. 2011. Literature review on bacterial identification by 16S rDNA sequencing. M.S. Thesis, Jeonnam National Univ., Korea.

Oh, S.Y., K.W. Nam and D.H. Yoon. 2014a. Identification of *Acremonium acutatum* and *Trichothecium roseum* isolated from grape with white stain symptom in Korea. *Mycobiology* 42(3):269-273.

Oh, S.Y., K.W. Nam and D.H. Yoon. 2014b. Ecological characteristics of white stain symptom on the grape in Korea. *Korean J. Environ. Agric.* 33:149-154.

Phister, T.G., D.J. O'Sullivan and L.L. McKay. 2004. Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from Pozol, a Mexican fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:631-634.

Park, J.S. 1961. *Fungous Diseases of Plants in Korea* (2). Bulletin No. 2, p. 12. College of Agriculture, Chungnam

- National University, Daejeon, Korea.
- Roongsawang, T., T. Kameyama, M. Haruki and M. Morikawa. 2002. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles* 6:499-506.
- Sang, M.K., J.D. Kim, B.S. Kim and K.D. Kim. 2011. Root treatment with rhizobacteria antagonistic to hytophthora blight affects antlu-acnose occurrence, ripening, and yield of pepper fruit in the plastic house and field. *Phytopathology* 101:666-678.
- Spadaro, D. and M. Gullino. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 24:601-613.
- Tsuge, K., T. Ano and M. Shoda. 1996. Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YM8. *Arch. Microbiol.* 165:243-251.
- Vanittanakam, N. and W. Loeffler. 1986. Fengycin a novel antifungal lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J. Antibiotics (Tokyo)* 39:888-901.
- Welch, A.W., S.F. Jr. Jenkins and C.W. Averre. 1975. *Trichothecium* fruit rot on greenhouse tomatoes in North Carolina. *Plant Dis. Rep.* 59:255-257.
- Zuber, P., M.M. Nakano and M.A. Marahicl. 1993. Peptide antibiotics: *In* Sonenshein, A.L. *et. al.* (eds.), *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (USA). 897-916.

(Received 10 September 2015 ; Revised 18 February 2016 ; Accepted 22 February 2016)