

세포융합에 의한 신 길항미생물 육종에 관한 연구

— 목초병해의 생물학적 방제 —

최기춘 · 이영환 · 전우복

Studies on Development of Antagonistic Microorganism by Cell Fusion

— Biological control of forage disease —

Ki Chun Choi, Young Hwan Rhee and Woo Bock Chum

Summary

This study was to investigate an effective biological control of forage diseases and provide a basic data and a model in improving variety of antagonistic bacteria, with growth promoting effect on forage, through cell fusion. The results obtained were summarized as follows;

1. The antagonistic rhizobacterium against soil-borne pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* was isolated from continuous cropping rhizosphere soil of forage, and its biological and physiological characteristics were investigated. This bacterium was identified as *Bacillus subtilis* and named *BS 101*. Another strain for cell fusion was *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* *HD-1* (*BT 37669*) with insecticidal crystal.
2. The auxotrophic mutants of *BS 101* and *BT 37669* were derived after mutagenesis using N-methyl-N'-nitro-Nitrosoguanidine(NTG) to give amino acid requirement marker. These auxotrophic mutants of *BS 101* and *BT 37669* were named *BS 1013*(his-) and *BT 69*(asp-), respectively.
3. The best protoplast requirement was obtained using DM 3 medium, containing 5% casamino acid, 1 M MgCl₂ and 2% bovine serum albumin, to give *Fusant 3*, 7 and 8. BT toxin gene was not identified with fusants by Southern blotting. However, SDS-PAGE analysis of strains showed various protein patterns among fusants.
4. From the dark culture experiment, growth of forage in inoculated soil with antagonistic bacteria was delayed than that of non-inoculated soil with antagonistic bacteria in each continuous cropping soil and in each sterilized soil. On the other hand, growth duration of forage was different between continuous cropping soil and sterilized soil.
5. Seed germination of Alfalfa, Italian ryegrass and Orchardgrass were significantly improved by inoculation of antagonistic bacteria($p < 0.05$).

I. 서 론

최근 우리나라의 농축산업은 농업선진국의 수입 개방압력으로 인하여 농축산업에 대한 기피현상과 수입 개방의 불안으로 인하여 많은 어려움에 직면해 있으며, 농민들도 농업에 대한 장래 불투명 및 수입 개방등의 불안이 가중되어 농업을 포기하거나 다른 소

득작물로 전환이 이루어지고 있는 실정이다. 그러나 이렇게 불리한 상황에서도 축산업을 발전시키기 위하여 모든 축산관련 단체가 수입 개방에 대처하기 위한 구체적인 방안을 모색하고 있다.

초식가축을 사육하는데 있어서 중요한 사료자원이 풀사료라는 사실은 이미 많은 축산업자가 인정하고 있으나 양질의 풀사료를 생산하는데 많은 어려움을

가지고 있다. 한편 금(1993)은 연간 300 ton 이상의 조사료가 부족하다고 보고하면서 조사료 수입의 필요성을 언급하여 매년 증가되고 있는 농촌의 휴경지에 사료작물을 재배할 경우 585Ton의 수입 농후사료를 절감하여 생산비 감축 효과를 기대할 수 있다고 하였다. 오늘날 사료작물에 대한 재배기술의 발달과 화학비료의 사용은 조사료 증수를 가져왔으나 사료작물의 연작과 비료의 과사용은 토양을 황폐화 시키고 토양전염성 병원균의 발생을 증가시켜 사료작물에 많은 병해를 일으키고 있다. 이러한 병원균을 억제하기 위해서 유기합성농약의 사용이 불가피하게 되었으나 사료작물은 다른작물과는 달리 초식가축이 직접 섭취하기 때문에 병원균방제를 목적으로 과다사용하게 되면 농약이 사료작물에 잔류하게 되어 초식가축에게 직접적인 피해를 줄 뿐 아니라 초식가축이 생산하는 2차산물인 축산물에 농약성분이 잔류하게 되어 사회문제를 야기시킬 것이다. 따라서 각종 병원균의 생육을 저해시키는 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제, 즉 무공해 생물농약에 관한 연구가 수행되고 있으며(Handelsman 등, 1990; Baker와 Scher, 1987; Cook 등, 1987; Weller, 1988; Cook, 1985; 鈴木, 1986; Rothrock와 Gottlieb, 1981) 특히 토양전염성 병원균은 토양에 장기간 생존하여 방제가 대단히 어려우므로 효율적인 방제수단이 절실히 요구되고 있다.

생물학적 방제를 위한 근권미생물로는 *Bacillus*속, *Pseudomonas*속, *Tricoderma*속 등이 있으며(Phae, 1992; Kim 등, 1993; Park과 Kim, 1989), 또한 유해곤충을 방제하기 위한 대표적인 미생물로는 *B. thur ingiensis*, *B. sphaericus*, *B. propilliae*, *C. bifementans* 등이 있다(Chang 등, 1992; Baumann 등, 1991; Charles 등, 1990; Bulla 등, 1978). 특히 식물생육을 촉진할 뿐 아니라 토양병원균에 길항력이 우수하고 환경 적응성이 뛰어난 *B. subtilis*와 포자형성시기에 살충성독소를 생성하여 나비목, 파리목등의 곤충에 살충력이 있는 *B. thur ingiensis*는 많은 연구의 대상이 되고 있다. 그러나 *B. thur ingiensis*의 살충성 독소는 빛에 민감하게 분해되고 자연상태에서 그 독성이 오래동안 지속하지 못하다는 단점을 가지고 있으므로 이를 극복하기 위한 노력이 이루어 지고 있다.

따라서 본 연구는 목초병해를 일으키는 병원성사상균에 길항력이 우수한 *B. subtilis*를 목초근권에서 분리동정한 후, 유전물질 교환계가 알려져 있지 않은

세균에 대해서 널리 이용되고 있는 원형질체 융합방법에 의하여 *B. thur ingiensis*와 숙주 융합을 시도하여 목초생장을 촉진시키며 병원성 사상균에 길항력을 가지는 보다 우수한 균주를 유도하고 이들 융합균주가 목초의 암배양 및 발아에 미치는 영향을 검증하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주의 분리

목초연작지의 근권토양 1g을 0.01M tris 완충용액(pH 7.2) 9ml에 넣어 30분간 왕복진탕(130회/min)한 후 이 현탁액 0.2ml를 *Bacillus*속 선택배지(加藤, 1987)인 B-2 agar plate에도말 접종하고 50℃에서 24시간 배양하여 모양이 원형인 백색 single colony를 1차 선발하였다.

2. 병원성 사상균에 대한 길항세균의 선발

목초의 뿌리썩음병, 관부썩음병 및 줄기마름병 등을 일으키는 병원성 사상균인 *Rhizoctonia solani*(R. solani)와 *Fusarium oxysporum*(F. oxysporum)을 potato dextrose agar(PDA)에서 27℃, 5~6일간 배양한 후 1cm간격으로 1차 선발된 근권균을 접종하고 27℃에서 5~7일간 배양한 후 사상균의 저지력(길항력)을 관찰하여 저지력이 우수한 균주를 공시균주로 최종 선발하였다.

3. 선발균주의 동정

선발 균주를 The prokaryotes (Starr 등, 1981), Bergey's manual of systematic bacteriology(Krieg와 Holt, 1984) 및 Microbiological Method(Collins와 Lyne, 1984)의 방법에 따라 starch 및 gelatin 가수분해력, voges proskauere반응, catalase, oxidase, urease 등의 효소활성, manitol, sorbitol, lactose등의 탄소원 소화성등을 조사한 후 동정하였다.

4. 아미노산 요구성 균주 유도

Luria Bertani(LB) broth에서 대수증식기 말기까지 증식한 다음 원심분리하여 Tris-maleate buffer(Tris 0.25M, Maleate 0.25M, pH 6.0)로 세척하고 현탁한 후 NTG를 가하여 37℃에서 정지 배양 하였다. 이때

NTG 농도와 배양시간은 각각 조사하여 이중 가장 적절한 농도와 시간을 선택 하였다. 정치 배양된 균체를 여러가지 아미노산 조합에 따라 다른 아미노산이 첨가된 여러 종류의 최소배지에 접종하여 아미노산 요구성을 검정한 후 선발하였다. 선발된 아미노산 요구성 변이주는 30회 이상 계대배양하여 안정성을 확인하였다.

5. 원형질체 나출 및 재생

원형질체의 형성 및 재생은 Akamatsu와 Sekiguchi(1981)의 방법에 따라 A-3 액체배지에 공시균주를 배양한 후(OD_{600nm} 1.0) 원심분리하여 균체를 회수하였다. 이 균체는 SMM 완충용액(0.5M sucrose, 0.02 M MgCl₂, 0.02 M Maleate, pH 6.5)으로 세척, 현탁하여 적정량의 lysozyme을 첨가한 후 37℃에서 정치배양하여 원형질체를 형성시켰다. 형성된 원형질체는 액체 재생배지에 현탁한 다음 고체 재생배지에 도말 배양하였다.

원형질체 용합은 Schaeffer 등(1986)와 Garbor와 Hotchkiss(1979)의 방법에 준해서 실시하였다. 즉, 원형질체가 형성된 두 균주를 각각 0.1ml을 plastic tube에 옮기고 즉시 40% polyethylene glycol(w/v, in SMM 완충용액) 1.8ml를 첨가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 3분간 정치 배양하고 다시 여기에 액체 재생배지 5ml를 첨가하여 혼합한 후 원심분리 하였다. 회수된 균체는 액체 재생 배지로 현탁하여 DM 3 재생배지에 도말하여 3~5일 동안 배양한 후 나타난 colony중에서 최소배지에서 자란 균주만을 선발하였다. 선발된 용합균주는 수 회 계대 배양하여 안정성을 확인하였다.

6. DNA추출, Southern blotting 및 SDS-PAGE

LB broth에 공시균주를 대수증식기 중기까지 배양한 후 원심분리한 후 일정농도의 lysozyme을 처리하여 37℃에서 30분 동안 정치 한 후, 50~100ul의 Proteinase K(10mg/ml)를 첨가하여 다시 37℃에서 60분간 배양하고, sarkosyl을 최종농도가 1%가 되게 하여 25℃에서 30~50분 동안 invert mixing한 다음 phenol/chloroform으로 정제 하였다. 추출된 DNA는 1% agarose gel 전기영동을 이용하여 DNA를 확인한 후 molecular cloning(Maniatis 등, 1989)에 기술된 방법에 따라 nitrocellulose paper로 이동시켜 Southern blotting

를 실시하였다. Southern blotting에 필요한 probe는 primer extension방법(Maniatis 등, 1989)으로 p³² isotope과 plasmid DNA를 사용하여 조제하였다. 그리고 공시균주가 생산하는 단백질 분석은 Laemmli(1971)와 Annapur 등(1986)의 방법을 변형하여 실시하였다.

7. 목초의 암소배양 및 발아율

1) 암소배양

목초의 연작 및 연작멸균토양에서 공시세균이 목초의 생장에 미치는 영향력을 검토하고자 領木 등(1971)의 방법에 따라 목초를 암소배양 하였다. 500ml tall beaker에 연작 및 연작 멸균토양 30g을 각각 넣고 공시세균을 1 × 10⁸ CFU/g dry soil 수준으로 접종한 후 수분함량이 최대 용수량의 45%로 조절한 다음 살균 처리한 목초종자 30립씩을 파종하고 25℃의 incubator에서 암소배양하여 고사주수를 경시적으로 관찰하였다.

2) 발아율

공시세균과 식물 병원성 사상균인 *F. oxysporum*, *R. solani*를 각각 액체 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수한 다음 증류수로 공시세균은 1 × 10⁸ CFU/ml수준, 사상균은 1 × 10⁷ CFU/ml수준으로 현탁액을 조제하고, 직경 9cm의 petri dish에 멸균된 filter paper 2겹을 깔고 여기에 공시세균과 사상균현탁액을 4ml 씩 각각 접종한 다음 살균된 목초종자 50~100립씩을 파종하여 30℃에서 9~15일간 배양하여 공시세균과 병원성 사상균이 목초의 발아율에 미치는 영향을 조사 하였다.

8. 통계분석

모든 자료의 통계처리는 SPSS/PC[™]를 이용하여 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 근권세균의 분리 및 선발

목초 근권토양에서 *Bacillus*속 선택배지인 加藤(1987)의 B-2배지에 도말접종 한 다음 모양이 원형이고 선명한 백색 colony를 근권세균으로 1차로 선발하였다. 1차 선발된 근권세균의 길항력을 조사하기 위

하여 PDA에 *R. solani*와 *F. oxysporum*을 각각 접종한 후 근권세균과 병원성 사상균의 균사 사이에 형성된 저지력(길항력)을 관찰하여 저지력이 가장 우수한 균주를 최종선발하였다. 선발된 근권세균의 생리·생

화학적 성질을 조사한 결과는 표 1에서 보는 바와 같이 gram양성간균으로 내생포자를 형성하였으며 catalase와 oxidase 효소활성검정, starch와 gelatin 가수분해성, Voges proskauer 반응을 조사한 결과 모두 양성

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of the isolated bacteria used in this study

Factor Examined	Strain			Marker strain		Fusant		
	A	B	C	D	E	F	G	H
Form	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Endospore	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram-stain	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
V-P Test	+	+	-	+	-	-	-	+
Hydrolysis of								
starch	+	+	+	+	+	+	-	+
gelatin	+	+	+	+	+	+	-	+
Utilization of								
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
arabinose	+	+	-	-	-	-	+	-
rhamnose	*	+	-	-	-	-	*	-
sucrose	+	+	+	-	-	+	+	+
fructose	+	+	-	-	-	+	*	-
lactose	+	+	-	-	-	+	+	+
mannitol	+	+	-	-	-	+	+	+
maltose	+	+	-	+	-	+	+	+
sorbitol	*	+	*	-	-	+	+	+
Na-citrate	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecithinase	-	-	+	-	-	-	+	-
Arginine-dihydrolase	-	-	+	-	-	-	-	-
Esculin-hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	+	-	+	-	+	-
Indole test	-	-	-	-	-	-	+	-
Methyl red	+	+	-	+	-	-	+	-

+ : positive - : negative * : Not determined.

A : *B. subtilis*(BS 6633; ATCC) B : *B. subtilis*(BS 101).

C : *B. thur ingiensis*(BT 37669; ATCC) D : *B. subtilis*(BS 1013).

E : *B. thur ingiensis*(BT 69) F : Fusant 3 G : Fusant 7 H : Fusant 8.

반응을 보였으며 혐기적 상태에서는 전혀 생육하지 못하여 호기성균임을 알 수 있었다. 또한 탄소원 자화성 실험에서 glucose, arabinose, rhamnose, sucrose, fructose, lactose, mannitol, maltose, sorbitol 및 N-citrate의 탄소원을 이용하였으며 그밖에 lecithinase(-), arginine dihydrolase활성(-), urease(-), indole test(-), esculin 가수분해성(+) 및 methyl red(+)의 성질을 가지고 있었다.

이러한 성질과 The prokaryotes(Starr 등, 1981), Bergey's manual of systematic bacteriology(Krieg와 Holt,

1984) 및 Microbiological method(Collins와 Lyne, 1984)의 분류기준에 의해 목초근권에서 선발된 공시균주는 *Bacillus subtilis*로 분류 동정하고 *BS 101*이라 명명하였다. *BS 101*과 병원성 사상균의 균사사이에 형성된 저지력은 그림 1과 같다.

한편 *BS 101*과 융합을 위한 공시균주인 *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-1(BT 37669)은 나비목, 파리목등의 곤충을 치사시키는 살충성 독소단백질을 가지고 있는 살충성세균으로 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다.

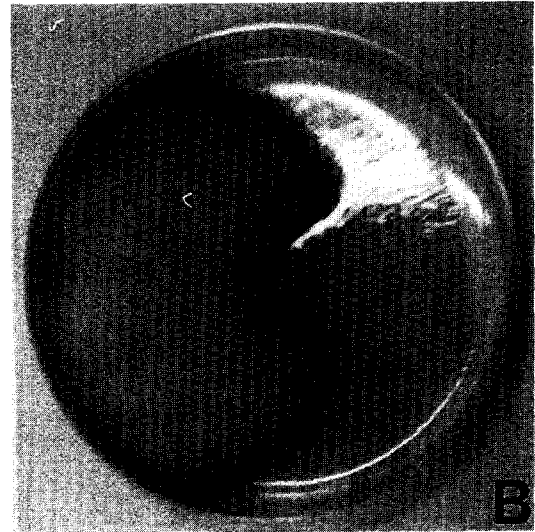
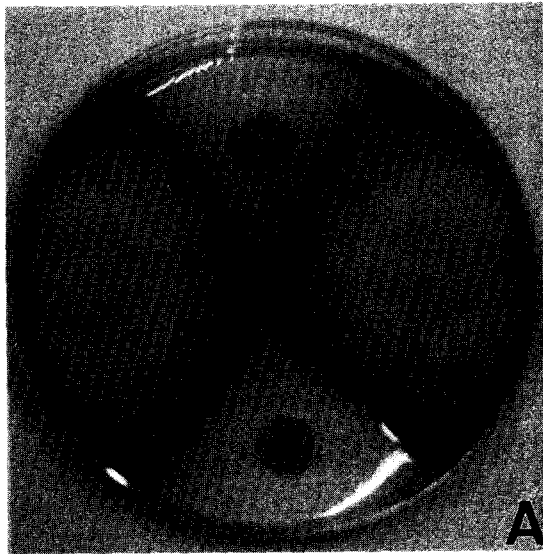


Fig. 1. Inhibition zones formed by antagonistic bacteria *Bacillus subtilis* 101 against *Rhizoctonia solani*(A) and *Fusarium oxysporum*(B)

2. 융합균주의 유도

원형질체 융합에 필요한 아미노산 요구성 변이 균주를 얻기 위해서 돌연변이 유도물질인 NTG농도와 처리시간을 각각 달리하여 돌연변이를 유도한 결과 *BS 101*은 NTG 농도 300ug/ml와 40분, BT 37669은 NTG농도 40ug/ml와 30분을 각각 처리했을때 아미노산 요구성 변이주의 출현율이 가장 양호하였다. 이러한 조건에서 NTG로 처리된 균주를 각각 틀린 아미노산이 포함되어 있는 최소배지에 접종하여 아미노산 요구성 변이주를 선발한 후 안정성을 확인하고 *R. solani*와 *F. oxysporum*s과 대치 배양하여 길항력이 가장 우수한 균주를 선발한 결과 *B. subtilis*(*BS 101*)에

서 유도된 histidine 요구성 변이주는 *BS 1013* 명명하고, *B. thuringiensis*(BT 37669)에서 유도된 aspartate 요구성 변이주는 *BT 69* 명명하여 세포융합을 위한 공시균주로 사용하였다.

최적의 원형질체를 얻기 위해서 본 시험에서는 대수증식기 중기의 세포를 회수하여 세포벽 용해에 널리 이용되고 있는 난백 lysozyme의 농도, 배양온도 및 배양시간을 각각 달리하여 원형질체 형성 및 재생을 위한 조건을 조사한 결과 *BS 1013*은 37℃에서 40분간 배양시 300ug/ml의 lysozyme 농도를, *BT 69*는 37℃에서 60분간 배양시 9mg/ml의 lysozyme 농도를 최적조건으로 확립하였다.

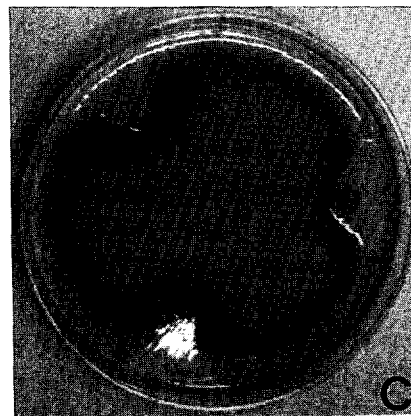
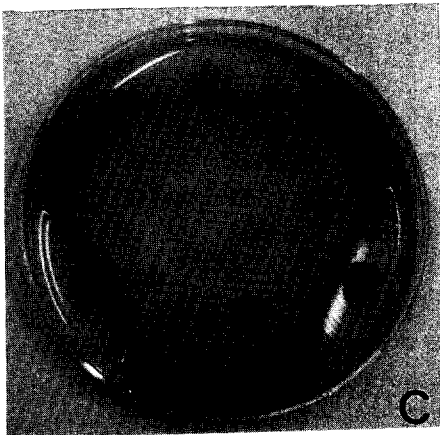
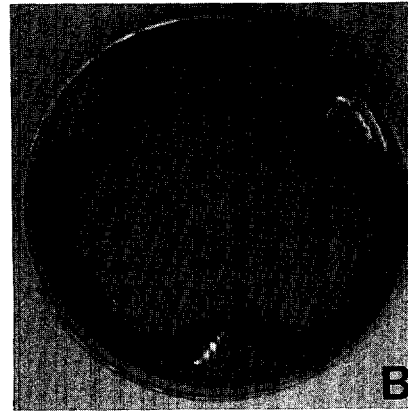
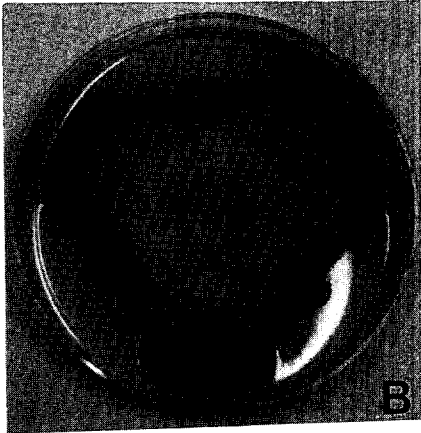
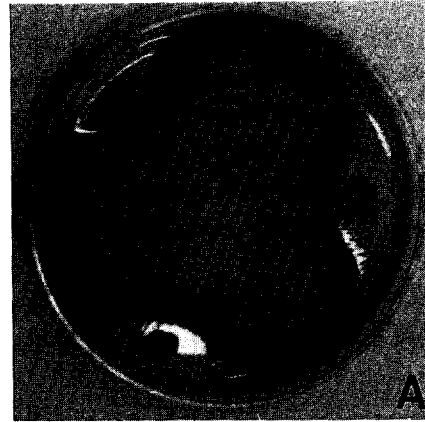
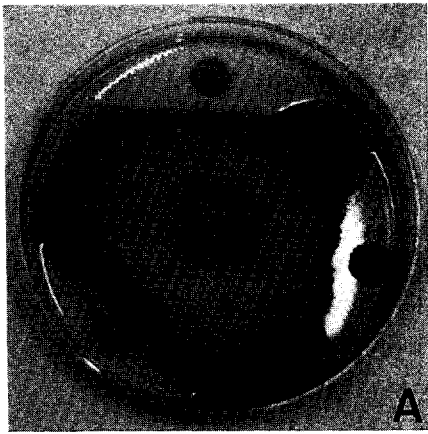


Fig. 2. Inhibition zones formed by antagonistic bacteria *Fusant* 3(A), 7(B) and 8(C) against *Rhizoctonia solani* [A] and *Fusarium oxysporum* [B]

BS 1013과 BT 69의 원형질체를 이용하여 식물병원성 사상균에 길항력이 우수하고 목초생장을 촉진시키며 유해곤충에 살충력을 갖는 복합적인 장점을 가진 새로운 미생물을 육종하고자 원형질체 융합을 실시하였다.

두 균주에 대한 원형질체 형성 및 재생의 최적조건을 기초로 하여 BS 1013과 BT 69의 원형질체를 1:1로 혼합한 다음 융합유도제인 40% polyethylene glycol를 즉시 첨가하여 순간융합을 실시한 후 histidine과 aspartate의 아미노산 최소배지에 도말집중한다음 이배지에 자라는 prototroph로 전환된 세포 융합균주를 선발하였다. 선발된 세포 융합균주는 30회 이상 계대배양하여 안정성을 확인한 다음 병원성 사상균인 *R. solani* 및 *F. oxysporum*에 길항력이 가장 우수한 균주를 선발하여 *Fusant 3, 7* 및 *8*이라 명명하였다. 그림 2는 세포융합균주와 사상균의 균사사이에 형성된 저지력을 보여준 것으로 모균주인 BS 101과 동일한 저지력을 나타내는 것을 알 수 있었다.

3. 모균주와 융합균주의 생리·생화학적 성질

표 1은 본 시험에 사용된 모균주의 생리·생화학적 성질을 나타낸 것으로 BS 1013은 모균주 BS 101과 동일한 성질을 가지고 있었으나 탄소원 이용성에서 모균주와 약간 다른 경향을 보임을 알 수 있었으며 또한 BS 1013과 BT 69를 이용하여 유도된 융합인 *Fusant 3*은 gram양성 간균이고 내생포자를 형성하는 호기성균으로 catalase test(+), oxidase test(+), Voges proskauer(-), starch와 gelatin 가수분해성(+) 그리고 탄소원 자화성으로 glucose(+), arabinose(-), rhamnose(-), sucrose(+), fructose(+), lactose(+), mannitol(+), maltose(+), sorbitol(+), Na-citrate(+) 그밖에 lecithinase(-), arginine dihydrolase활성(-), esculin 가수분해성(+), urease(-), indole test(-), 및 methyl red(-)의 성질을, *Fusant 7*은 gram양성 간균이고 내생포자를 형성하는 호기성균으로 catalase test(+), oxidase test(+), Voges proskauer(-), starch와 gelatin 가수분해성(-) 그리고 탄소원 자화성으로 glucose(+), arabinose(+), sucrose(+), lactose(+), mannitol(+), maltose(+), sorbitol(+), Na-citrate(+) 그밖에 lecithinase(+), arginine dihydrolase활성(-), esculin 가수분해성(+), urease(+), indole test(+), 및 methyl red(+), *Fusant 8*은 gram양성 간균이

고 내생포자를 형성하는 호기성균으로 catalase test(+), oxidase test(+), Voges proskauer(+), starch와 gelatin 가수분해성(+) 그리고 탄소원 자화성으로 glucose(+), arabinose(-), rhamnose(-), sucrose(+), fructose(-), lactose(+), mannitol(+), maltose(+), sorbitol(+), 및 Na-citrate(+) 그밖에 lecithinase(-), arginine dihydrolase활성(-), esculin 가수분해성(+), urease(-), indole test(-), 및 methyl red(-)의 성질을 가지고 있었으나 아미노산 요구성균주와 세포융합균주는 각기 다른 생리·생화학적 성질을 나타내고 있으며 또한 세포융합 균주간에도 다른 양상의 생리·생화학적 성질을 나타냄을 알 수 있었다. 이상의 결과를 요약해 보면 세포융합균주인 *Fusant 3, 7* 및 *8*은 각기 독특한 특성을 가진균주로써 병원성사상균에 대하여 길항력이 상실되지 않고 모균주와 다소 비슷하거나 향상됨을 확인할 수 있었다.

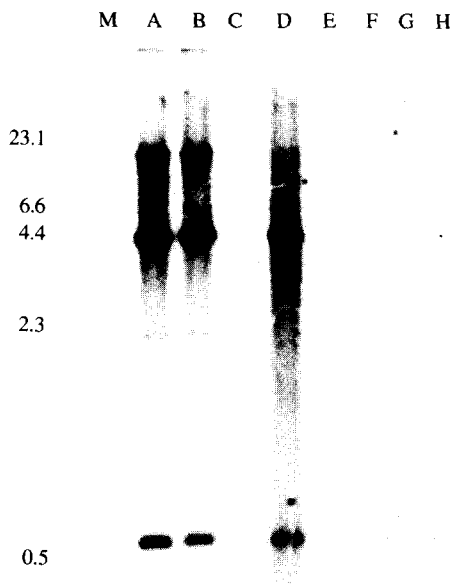


Fig. 3. Southern analysis of strains

The chromosomal DNAs of strains were digested with *Pvu* II. Blot was probed with ^{32}P -labelled pES 1 plasmid which was digested with *Eco*r I

M : λ -DNA digested *Hind* III A : BT 37669 (ATCC) B : BT 69 C : BS 101 D : BT 37669 E : BS 1013 F : *Fusant 3* G : *Fusant 7* H : *Fusant 8*

4. 융합균주의 DNA 및 SDS-PAGE

아미노산 요구성 변이주 *BS 1013*와 *BT 69*로부터 얻어진 phenotype이 안정하고 길항력이 우수한 세포융합균주 *Fusant 3*, 7 및 8에 *BT 69*의 살충성 독소유전자가 존재하는 가를 확인하기 위해서 plasmid pES1내에 들어있는 *EcoR I* 6kb의 *BT*독소유전자를 probe로 하여 Southern blotting을 실시한 결과 그림 3에서 보는 바와 같이 세포융합균주내에 살충성 독소유전자가 확인되지 않았다.

모균주와 세포융합균주가 생성하는 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 모균주, 아미노산 요구성균주 및 대조균주의 단백질 양상은 그림 4에서 보는 바와 같이 *BT 37669(A)*와 변이균주 *BT 69(B)*는 살충성 독소유전자에 의해 생성된 135kda의 살

충성 독소단백질 band가 존재함을 알 수 있었으며 이 단백질은 나비목, 파리목등의 곤충에 살충력을 갖는다고 알려져 있다. 또한 64kda의 독소단백질이 확인되었는데 이는 135kda의 독소단백질이 SDS-PAGE의 과정중에 알칼리 pH 의한 분해와 SDS에 의한 S-S결합의 절단으로 생성된다고 한 Bulla 등(1981)의 보고와 비슷한 경향을 나타냈다. *BS 101(C)*, 변이균주 *BS 1013(D)* 및 대조균주 *BS 6633(E)*은 단백질생성이 각기 다른 특성을 보여주었으며 세포융합균주 *Fusant 3*, 7 및 8의 단백질 양상도 그림 5에서 보는 바와 같이 각각의 융합균주가 독특한 단백질 양상을 보여주고 있는데 이는 삽입된 일부 유전자가 다른 유전자와 함께 발현되어 특이 단백질을 생성하는 것이라 생각된다.

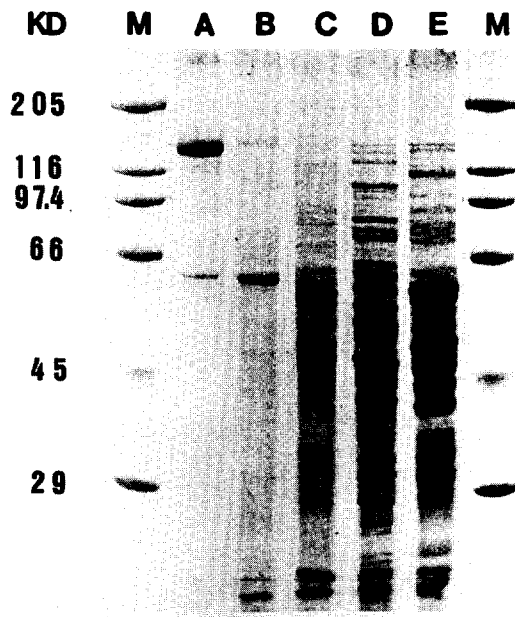


Fig. 4. SDS-PAGE of strains
M : Marker A : *BT 37669(ATCC)* B : *BT 69* C : *BS 101* D : *BS 1013* E : *BS 6633(ATCC)*

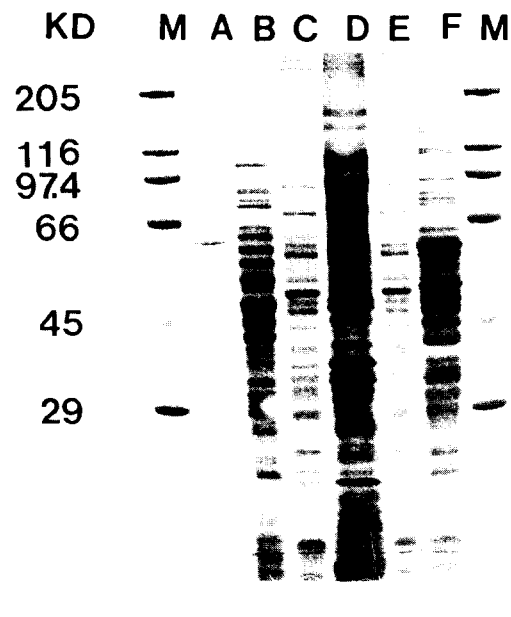


Fig. 5. SDS-PAGE of fusants
M : Marker A : *BT 69* B : *BS 1013* C : *Fusant 3* D : *Fusant 7* E : *Fusant 8* F : *BS 6633(ATCC)*

5. 목초의 암소배양 및 발아율

목초의 연작장해에 미치는 영향을 조사하기 위해서 領木 등(1971)의 방법에 따라 목초연작토양 및 목초연작멸균토양에 공시균주를 접종하여 암소배양

을 한 후 고사주수를 경시적으로 관찰하였다.

표 2는 Alfalfa, Italian ryegrass 및 Orchardgrass의 암소배양의 결과를 나타낸 것으로 목초연작 및 목초연작 멸균토양에서 각각의 공시균주 접종구가 무접종구에 비하여 전반적으로 생육기간이 연장되었으며

특히 목초연작토양의 무접종구에서는 시험 초기부터 목초의 고사주수의 발생빈도가 현저하게 관찰되었다. 따라서 목초연작토양에서는 공시균주접종구가 무접종구보다 생육이 연장되는 경향을 보였으며 파종후 시간이 경과됨에 따라 공시균주접종구는 무접종구보다 고사주수의 발생빈도가 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 공시균주간에는 생육연장효과를 나

타나지 않았다. 한편 목초연작 면근토양에서는 목초연작토양과는 달리 모든 접종구에서 비슷한 생육현상을 보였으며 공시균주접종구와 무접종구 및 공시균주처리간에도 특별한 생육연장 효과는 나타나지 않았으나 공시균주접종구가 무접종구에 비하여 시간이 경과됨에 따라 고사주수의 발생빈도가 낮아지는 경향을 보였다.

Table 2. Inoculation effects of strains on autolysis of forage in dark culture

Bacteria treatment	Percentage of autolyzed plant on days after sowing																	
	Continuous cropping soil									Sterilized soil								
	A*			B*			C*			A			B			C		
	6	8	10	14	16	18	18	20	22	32	34	36	24	26	28	32	34	36
Control	83	100		80	90	100	83	96	100	69	76	88	69	82	92	68	76	88
BS 101	68	78	98	55	76	90	69	82	90	45	63	83	43	63	80	59	69	83
BS 1013	72	98	100	60	76	92	72	90	90	45	73	83	42	70	88	54	70	88
BT 37669	78	88	100	70	83	93	73	87	94	60	69	82	63	76	86	59	69	86
BT 69	60	90	100	65	86	90	60	90	94	65	70	85	52	68	90	60	72	86
Fusant 3	53	74	95	67	77	87	60	73	93	57	66	83	53	75	89	64	68	79
Fusant 7	77	82	97	53	77	93	71	82	94	52	69	86	52	62	79	52	64	82
Fusant 8	64	83	96	47	77	90	70	82	90	36	59	77	59	74	88	52	70	86
BS 6633	75	81	96	53	83	100	68	88	93	46	58	83	67	82	92	58	83	100

* A : Alfalfa B : Italian ryegrass C : Orchardgrass.

토양처리간 목초의 생육기간을 비교해 보면 목초연작토양보다 목초연작면근토양에서 생육기간 연장효과가 높게 나타났는데, 이러한 현상은 토양전염성 병원균 및 유해물질이 목초연작토양에 존재하여 목초생육에 나쁜 영향을 미친데 기인된 것으로 생각된다.

표 3은 길항미생물을 주구, 병원성사상균을 세구로 하여 발아율을 조사한 것으로 모든 시험구에서 3초종 모두 병원성 사상균 단독접종구는 무접종 대조구보다 발아율이 현저하게 감소되는 경향을 나타냈

다($p < 0.05$). 그리고 사상균과 공시균주를 동시접종하여 목초의 발아율에 미치는 영향을 조사한 결과 사상균 단독접종구에 비해 사상균과 공시균주를 동시접종구한 구가 3초종 모두 발아율이 향상되는 경향을 보였으며 BS 101과 세포융합균주는 목초병원성 사상균에 길항력 우수하고 목초발아 증진효과가 나타났다. 따라서 BS 101과 세포융합균주는 목초 병원균에 의한 생물학적 방제제로써 가치가 있는 것으로 생각된다.

Table 3. Inoculation effects of antagonistic microorganisms and fungi on seed germination of Italian ryegrass, Orchardgrass and Alfalfa

Strains	Fungi inoculated	Germination(%)		
		Italian ryegrass	Orchardgrass	Alfalfa
Control	None	95.28 ± 0.86 ^a	86.01 ± 0.91 ^a	97.39 ± 0.85 ^a
	<i>R. solani</i>	46.44 ± 3.70 ^b	50.65 ± 1.67 ^c	68.90 ± 4.53 ^b
	<i>F. oxysporum</i>	47.02 ± 4.51 ^b	57.12 ± 2.54 ^b	77.38 ± 3.32 ^b
BS 101 ^{a)}	None	95.12 ± 1.56 ^a	86.62 ± 1.48 ^a	95.68 ± 0.27 ^a
	<i>R. solani</i>	66.48 ± 1.54 ^b	65.48 ± 0.56 ^b	92.17 ± 0.99 ^a
	<i>F. oxysporum</i>	71.76 ± 3.20 ^b	65.46 ± 1.16 ^b	93.17 ± 1.71 ^a
BS 101 ^{b)}	None	93.04 ± 1.10 ^a	83.03 ± 0.73 ^a	94.27 ± 1.01 ^a
	<i>R. solani</i>	63.98 ± 2.41 ^b	62.26 ± 2.37 ^b	91.73 ± 0.44 ^b
	<i>F. oxysporum</i>	69.25 ± 1.71 ^b	67.00 ± 1.60 ^b	91.40 ± 0.62 ^b
BT 37669 ^{c)}	None	91.99 ± 0.89 ^a	81.69 ± 1.26 ^c	94.09 ± 0.72 ^a
	<i>R. solani</i>	54.10 ± 1.52 ^b	57.80 ± 1.94 ^c	90.02 ± 0.79 ^b
	<i>F. oxysporum</i>	65.33 ± 6.85 ^b	62.85 ± 0.77 ^b	90.45 ± 0.62 ^b
BT 69 ^{d)}	None	91.58 ± 0.76 ^a	80.27 ± 0.72 ^a	93.58 ± 0.54 ^a
	<i>R. solani</i>	59.28 ± 6.08 ^b	62.41 ± 5.00 ^b	87.21 ± 0.49 ^b
	<i>F. oxysporum</i>	59.65 ± 4.70 ^b	68.68 ± 5.77 ^b	85.71 ± 0.69 ^b
Fusant 3 ^{e)}	None	94.84 ± 0.20 ^a	81.27 ± 1.04 ^a	94.90 ± 0.18 ^a
	<i>R. solani</i>	74.74 ± 7.15 ^b	61.30 ± 2.42 ^b	89.92 ± 0.53 ^b
	<i>F. oxysporum</i>	74.48 ± 4.86 ^b	76.60 ± 2.34 ^a	85.08 ± 0.46 ^c
Fusant 7 ^{e)}	None	94.89 ± 1.11 ^a	81.70 ± 0.85 ^a	95.49 ± 0.38 ^a
	<i>R. solani</i>	69.12 ± 6.29 ^b	65.02 ± 2.63 ^b	84.73 ± 1.20 ^b
	<i>F. oxysporum</i>	67.81 ± 8.88 ^b	67.47 ± 3.74 ^b	91.59 ± 1.72 ^a
Fusant 8 ^{e)}	None	93.81 ± 2.75 ^a	82.11 ± 0.29 ^a	97.33 ± 1.54 ^a
	<i>R. solani</i>	71.83 ± 2.80 ^b	62.79 ± 6.00 ^b	91.40 ± 0.72 ^{ab}
	<i>F. oxysporum</i>	74.37 ± 1.07 ^b	66.60 ± 2.76 ^b	86.25 ± 2.52 ^b

^{a)} *Bacillus subtilis*.

^{b)} Auxotrophic mutant of *Bacillus subtilis*.

^{c)} *Bacillus thuringiensis*.

^{d)} Auxotrophic mutant of *Bacillus thuringiensis*.

^{e)} Fusant(Protoplast fusion between BS 101 and BT 69).

• Means ± SE.

• Means with different superscripts in the same column are significantly different(p<0.05).

IV. 적 요

본 연구는 목초의 병충해에 대한 효과적인 생물학

적 방제제와 생산성 향상을 위해 목초병해를 발생시키는 토양병원성 사상균인 *R. solani*와 *F. oxysporum*에 길항력이 우수하고 목초 생육촉진효과가 있는

*Bacillus subtilis*를 목초근권에서 분리동정한 다음 나비목 파리목등의 곤충에 살충성독소를 생성하는 BT 37669와 속간융합하여 토양병원균에 길항력과 유해 곤충에 살충력을 갖는 새로운 융합균주를 조제하고자 하였으며 또한 목초의 암소배양 및 발아율에 미치는 영향을 검정하고자 하였다.

1. 목초연작지에서 목초의 병해를 일으키는 *R. solani*와 *F. oxysporum*에 길항력이 가장 우수한 목초 근권세균을 선발하여 생리·생화학적 성질을 조사한 결과 *Bacillus subtilis*로 분리 동정하고 BS 101로 명명하였다.

2. 돌연변이 유도제인 NTG를 공시균주인 BS 101과 BT 37669에 처리하여 아미노산 요구성 변이주를 각각 얻었는데 BS 101에서 histidine 요구성 변이주(BS 1013)와 BT 37669에서 aspartate 요구성 변이주 BT 69를 유도하여 세포융합을 위한 표지균주로 준비하였다.

3. BS 1013과 BT 69를 세포융합 시킨 후 길항력이 가장 우수한 3 균주를 선발하여 *Fusant* 3, 7 및 8이라 명명하였으며, Southern blotting을 실시한 결과 융합균주에 BT 유전자의 삽입을 발견할 수 없었다. 그러나 융합균주는 두 모균주의 성질을 가지고 있으며 또한 SDS-PAGE에 의한 단백질 pattern에서 모균주와 융합균주는 각기 독자적인 단백질 pattern을 보여 주었다.

4. Alfalfa, Italian ryegrass 및 Orchardgrass의 암소배양에서 공시균주 접종구는 무접종구보다 생육 일수의 연장효과가 나타났으나, 공시균주간에는 생육 일수의 연장 효과가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 한편 목초연작 멸균토양과 목초연작 토양간 목초의 생육 일수는 차이가 발생하였다.

5. Alfalfa, Italian ryegrass 및 Orchardgrass의 발아율에 미치는 영향을 조사한 결과 공시균주 접종구는 병원성 사상균인 *R. solani*와 *F. oxysporum* 접종구보다 발아율이 향상 되었으나($p < 0.05$), 공시균주간에는 뚜렷한 증가현상이 나타나지 않았다.

사 사

본 연구는 1991년도 한국학술진흥재단의 연구비(91-02-0341) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

V. 인용 문헌

1. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi. 1981. Studies on re-generation media for *Bacillus subtilis* protoplast. Agric. Biol. Chem. 45(12):2887-2894.
2. Annapur, G.S., G.J. Gundling, T.A. Benson and B.B. Spear. 1986. Vegetative expression of the δ -endotoxin genes of *Bacillus thur ingiensis* subsp. *Kurstaki* in *B. subtilis*. J. Bacteriol. 166:194-204.
3. Baker, K.F. and R.J. Cook. 1982. Biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Soc., St., Paul. Minnesota. 433 p.
4. Baumann, P., M.A. Clark, L. Baumann and A.H. Broadwell. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: Properties of the organism and its toxins. Microbiol. Rev. 55:425-436.
5. Bulla, Jr., L.A., R.N. Costilow and E.S. Sharpe. 1978. Biology of *Bacillus popilliae*. Adv. Appl. Microbiol. 23:1-18.
6. Bulla, Jr., L.A., K.J. Krammer, D.M. Cox, B.S. Jones, S.I. Davidson and G.L. Lockhart. 1981. Purification and characterization of the entomocidal protein of *Bacillus thur ingiensis*. J. Biol. Chem. 256:3000-3004.
7. Chang, C., S.M. Dai, R. Frutos, B.I. Federici and S. S. Gill. 1992. Properties of a 72kd mosquitocidal protein from *B. thur ingiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 expressed in *B. thur ingiensis* subsp. *kurstaki* by using the shuttle vector pHT3101. Appl. Environ. Microbiol. 58(2):507-12.
8. Charles, J.F., L. Nicolas, M. Sébald and H. deBarjac. 1990. *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia*: Sporulation, biogenesis of inclusion bodies and larvicidal effect on mosquitos. Res. Microbiol. 141:721-733.
9. Collins, C.H. and P.M. Lyne. 1984. Microbiological method(5th ed), Butterworths, London.
10. Cook, R.J., D.M. Weller and L.S. Thomashow. 1987. Enhancement of root health and plant growth by rhizobacteria. Molecular strategies for crop protection. Alan Liss Inc. pp 125-134.
11. Cook. R.J. 1985. Biological control of plant patho-

- gens: Theory to application. *Phytopathology*. 75 (1):25-29.
12. Garbor, M.H. and R.D. Hotchkiss. 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplast. *J. Bacteriol.* 137:1346-1353.
 13. Handelsman, J., S. Raffel, E.H. Mester, L. Wunderlich and C.R. Grau. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seeding with *Bacillus cereus* UW85. *Appl. environ. Microbiol.* 56(3):713-718.
 14. Kim, K.S., Y.W. Kim, J.W. Park and Y.Y. Kim. 1993. Studies on the use of microbial formulations for growth and yield of horticulture crops. *RDA. J. Agri. Sci(Agri. Inst. Cooperation)*. 35:129-140.
 15. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore.
 16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
 17. Maniatis, T., J. Sambrook and E.F. Fritsch. 1982. *Molecular cloning*. Cold spring Harbor Laboratory.
 18. Martin, J.K. 1971. Influence of plant species and plant age on the rhizosphere microflora. *Aust. J. Biol. Sci.* 24:1143-1150.
 19. Murray, R.E.C., N.R. Krieg and J.G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 20. Park, J.H. and H.K. Kim. 1989. Biological control of phytophthora crown and root rot of greenhouse pepper with *T. harzianum* and *Enterobacter agglomerans* by improved method of application. *Kor. J. Plant Pathol.* 5(1):1-12.
 21. Phae, C.G., M. Shoda and N. Kita. 1992. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. *Ann. Phytopath. Soc.* 58:329-339.
 22. Rothrock, C.S. and D. Gottlieb. 1981. Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. *J. Antibiot.* 34:830-835.
 23. Schaeffer, P., B. Cami and R.D. Hotchkiss. 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(6):2151-2155.
 24. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper and H.G. Schlegel. 1981. *The prokaryotes: A handbook and identification of bacteria*. Springer-Verag, Berlin, Heidelberg, New York.
 25. Weller, D.M. 1988. Biological Control of soil borne pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology.* 26:379-409.
 26. 加藤邦彦. 1987. *Bacillus subtilis* 選擇培地. Abstract of the Japanes society of soil science and plant nutrition. 33:45.
 27. 鈴正孝仁. 1986. 微生物による土壤病害の抑制. 研究シヤ-ナル. 9:17-21.
 28. 領木達彦, 久保田勝. 1971. 暗所培養による連作障害の判定法. *日本土壤肥料學會誌.* 42:126-127.
 29. 金종성. 1993. 낙농조사료생산과 이용체계의 생력화 방안. 월간 낙농육우. 9:72-81.