사과 부란병 방제를 위한 길항미생물 분리 및 동정[1]

박흥섭* · 조정일
*전남대학교 농과대학 원예학과
조선대학교 공업전문대학 식품공업과

Isolation and Identification of Antagonistic Microorganisms for Biological Control to Apple Tree Diseases, Canker(*Valsa ceratosperma*)

Park Heung-Sub* · Cho Jeong-Il
Dept. of Horticulture, Chonnam Nat'l Univ., Kwangju 500-757, Korea
Dept. of Food Technology, Technical College,
Chosun University, Kwangju 501-759, Korea*

Summary

For the purpose of acquiring microbial agents that can be utilized to biologically control the major airborne disease to apple trees, such as canker(*Valsa ceratosperma*), the effective microorgaisms were isolated, tested for antagonistic activity to the pathogen causing major disease to apple trees and identifed. Screening of more than 3,000 species of microorganisms collected in nature for them antagonistic action to the pathogen, *Valsa ceratosperma* causing disease to apple tree resulted in selection of effective species. Out of the 11 species, one species designated as CAP141 demonstrated outstanding activity. The bacterial strain, CAP141 exerted antagonistic efficiency of 65% on *Valsa ceratosperma*. The CAP141 was identified as a bacterial strain to *Bacillus subtilis* based on morphology, culture conditions, and physio-biochemical characteristics.

Keywords : *Valsa ceratosperma*, antagonistic microorganism, CAP141, biological control, apple tree,

[1] 본연구는 1996년도 농림수산부 특정연구과제(현장애로기술과제)의 연구비로 수행된 연구의 일부임.

Ⅰ. 緖 言

사과 부란병(canker, *Valsa ceratosperma)*은 사과나무와 사과속 식물에서 피해가 보고되고 있으며, 사과나무 줄기 및 가지에 발생되어 가지 또는 나무 전체를 죽이거나 세력을 약하게하여 과실수량에 큰 영향을 미친다. 이 병해에 감염되면 나무껍질이 갈색으로 변하며, 환부가 약간 부풀어오르고 쉽게 벗겨진다. 병반은 4~5월에 습도가 높은 환경에서 급속히 전염하며 5월 하순~6월에는 병에 감염된 부위가 까만 소형돌기가 형성되고 노란색 실 모양의 포자퇴가 나오는데 바람 및 강우시 많은 포자가 주위로 분산된다[1].

현재 국내외에서 이용되고 있는 미생물제제를 크게 분류하면, 발효·퇴비의 부숙 또는 사료효율을 촉진시키는 미생물제제와 생물농약으로 사용되는 살충·살균·상해방제용 미생물제 등으로 구분할 수 있다. 이 중에서 생물농약으로 이용되는 길항성 미생물의 병해방제에 관련된 메카니즘을 보면 병원성 미생물에 대한 항균성물질의 생산, 병원성 미생물과의 경합작용, 병원성 미생물에 대한 기생, 비병원성 미생물을 이용한 교차방제 및 약독바이러스에 의한 간섭작용 등이 있으며, 실제적인 병해방제를 보면 이러한 메카니즘이 복합적으로 작용하여 생물학적 방제가 이루어지는 것으로 보고되고 있다[2]. 현재, 길항미생물은 세균, 진균, 방선균 및 바이러스 등이 이용되고 있으며, 이러한 미생물제제의 실용화 및 연구개발이 가장 활발한 국가는 미국, 일본 등이며, 그 외에도 현재 20여개 국가에서 실용화가 이루어지고 있다[3].

지금까지 우리나라에서 농업분야의 항균성 미생물에 관한 연구는 공기전염성 병해보다는 주로 토양전염성 병해를 대상으로 수행되어 왔고, 작물은 과수류보다는 노지 및 시설채소류에 관한 연구를 중심으로 진행되어 왔으며, 노지 및 시설과수류의 병해를 대상으로 실시한 생물학적 방제에 관한 연구는 아직도 부족한 실정이다[4]. 본 연구는 사과에서 발생하는 부란병의 병원균을 분리 및 수집하고, 분리된 사과 부란병원균에 대해 길항력이 우수한 항균성 세균을 자연계로부터 분리하고자 하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 자연계로부터 길항미생물의 분리

전남지방의 영암, 장성 등의 과수원 및 농경지 토양의 지표로부터 5~20cm 토양을 채취하여 희석평판법 및 토양평판법[5]을 이용하여 단일 균주를 분리하였다. 또한 사과 병원균에 대한 엽면길항균을 분리하기 위하여 병에 걸리지 않은 깨끗한 과실의 잎으로부터 미생물을 분리하였다. 유용미생물 분리방법[5]은 채취한 시료를 tris-Cl buffer solution(pH 7.5) 100ml에 넣고 진탕배양을 10분 정도 실시한 후 배지내에 들어있는 미생물을 생리식염수(0.85%, NaCl)로 희석하여 영양한천배지[nutrient agar(NA) plate]에 희석하여 농도별로 도말하였다. NA plates는 30℃ 항온배양기(incubator SW-901)에서 24~36시간 정

도 배양한 후 균주를 분리하여 사면배지에 보관하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하고 배양하여 단일 colony를 형성시켜 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

2. 사과 부란병균의 분리 및 수집

사과 부란병 병반으로부터 병원균을 분리하기 위하여 전남지방의 주요 사과재배단지를 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 병원균을 분리하였다[6]. 또한 농촌진흥청 농업과학기술원(NASTI; National Agricultural Science and Technology Institute) 및 원예연구소(HI; Horticultural Crop Institute of Research and Development)로 부터 사과병원균을 분양받아 본 실험실에서 분리한 병원균과 비교 및 검토하였다.

병원균을 분리하기 위하여 채집된 병반을 20℃, 상대습도 90% 이상의 항온항습실에서 3일간 습실처리후 이병조직을 70% ethanol 및 5% sodium hypochlorite(NaOCl)로서 표면살균하고 병원균 선택용배지[potato dextrose agar(PDA) medium + streptomycine 200 μl/ml, pH 3.0]에 병반조직을 올려 놓고 25℃ 항온배양기에서 2~3일간 배양하여 균총(colony)을 형성시켜 병원균을 분리하였다(Fig. 1).

Wash and surface-sterilization
(70% ethanol, 5% NaOCl)
↓
Rinse in saline solution (0.85% NaCl)
↓
Place on fungi selection medium
(PDA+streptomycine 200 μl/ml, pH 3.0)
↓
Sporulation and pure culture

Fig. 1. Isolation of fungal apple pathogen from apple tree

3. 길항미생물 선발 및 동정

PDA 평판배지 중앙에 병원균을 접종하여 25℃ 내외의 배양기에서 24시간 정도 배양한 후 그 주변에 분리한 균주를 양쪽에 접종하여 25℃ 내외의 온도에서 7일 정도 배양하면서 저지대(inhibition zone)를 형성하는 균주를 길항균으로 선발하였다. PDA 평판배지에서 병원균과 7일간 대치배양하면서 각각 생장한 병원균 균총(colony)의 직경을 측정하여 무처리구와 비교하여 생장저지율을 백분율로 나타내어 길항력을 비교하였다. 길항력 실험은 병원성 사상균의 생육에 좋은 PDA 배지를 이용하였고, incubator내의 배양온도 역시 25℃ 정도로 곰팡이의 생장에 양호한 온도로 배양하여 병원성 사상균의 생육에 적

합한 환경조건에서 병원균에 대한 길항력이 우수한 세균성 균주를 분리하였다.

길항미생물의 동정은 사과병원균에대해서 길항력이 우수한 CAP141을 동정하기 위하여, Bergey's mannual of systematic bacteriology[7], Microbiological method[8], The procaryotes[9] 등의 방법에 의하여 미생물의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리 생화학적 성질 등을 검토하였다. 공시 대조균주로서 *Bacillus subtilis*는 American Type Culture Collection (ATCC)(Rockville, Maryland, USA)에서 분양받았다.

① 형태적 특성

Doetch법[10]에 의해서 Gram 염색 및 형태를 관찰하였고, 미생물의 편모염색 및 운동성은 Gray법과 현적슬라이드법으로 하였다. 미생물의 포자는 malachite green으로 염색하여 내생포자형성 유무와 포자위치를 현미경을 이용하여 관찰하였다.

② 배양적 성질

완전배지(CM; complate medium)배지에서 각 온도별 균의 성질을 관찰하였고, YDC배지에 균을 접종하여 colony의 색을 관찰하였다. 또한 KB배지에 kanamycin, tetracycine 및 chloramphenicol 등을 첨가하여 미생물의 항생제에 대한 저항성을 관찰하였다.

③ 생리적 성질

Oxidase test, gelatin 가수분해, starch hydrolysis, arginin dihydrolase, urease, Tween 80 hydrolysis, catechol ortho cleavage, PHB accumulation, 탈질작용, sucrose로 부터 levan형성 및 탄소원 자화성 등을 조사하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 자연계로부터 미생물의 분리

유효 길항미생물을 자연계로부터 분리하기 위하여 전국각지에서 수집된 시료를 실험방법에서와 같이 처리하여 단일균주를 3,000여종 분리하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하여 균총을 형성시킨 후 냉장보관하면서 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

2. 사과 병원미생물 분리 및 수집

전남지방의 주요 사과단지인 영암군 신북면 갈곡리 평안농장을 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 사과의 병해인 부란병의 병원균을 분리하였다(표 1).

Table 1. List of pathogen isolated from infected apple tree.

Pathogen	Korean name	Common name	Source
Valsa ceratosperma	부란병균	canker	this study, NASTI*, HI**

NASTI* : National Agricultural Science and Technology Institute.
HI** : Horticultural Crop Institute of Research and Development.

3. 부란병에 대한 길항미생물의 선발

전남 장성과 영암군의 사과 생산단지를 중심으로 토양이나 잎에서 분리한 미생물 3,000여종 가운데 사과 부란병원균에 대한 길항미생물을 선발한 결과는 그림 2에 나타내었다. 그림에서 보는 바와같이 길항균 CAP141의 길항력이 가장 우수한 것으로 나타났으며 다른 길항균들도 어느정도의 길항력을 보여주었다.

Fig. 2. Inhibition effects of antifungal bacteria CAP 141(A) against apple pathogen, *Valsa ceratosperma*(VC) on Potato Dextrose Agar plate for 7 days at 28℃.

Table 2 에서 보는 바와 같이 CAP141는 사과 부란병원균에 대한 저지율이 65%로 나타났다. CP141는 본 실험에서 분리한 사과부란병원균에 대해 길항력이 가장 우수한 미생물인 것으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 CAP141는 다른 식물병원균에 대하여도 길항력이 있을 것으로 생각된다. 따라서 더우더 이 연구를 진행시켜 CAP141가 분비하는 길항물질을 분리 정제하여 길항물질 본체를 구명하는 연구를 하여할 것으로 사료된다.

Table 2. Zone of inhibition*(%) of the each antagonists against apple pathogen, *Valsa ceratosperma* on PDA media for 7 days at 28℃.

Isolated microoganisms / Pathogen	CAP 130	CAP 132	CAP 135	CAP 140	CAP 141	CAP 142	CAP 145	CAP 147	CAP 150	CAP 152	CAP 155
V. ceratosperma	13	27	40	30	65	41	14	40	49	27	45

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

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

4. 길항균의 동정

사과병원균에 대해서 길항력이 가장 우수한 균주인 CAP 141을 동정하기 위하여 미생물의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리화학적 성질 등을 검토한 결과는 표 3, 4 와 같으며, 길항미생물의 동정을 실시한 결과 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

Bacillus subtilis CAP 141은 약간의 운동성을 갖는 호기성 및 협기성 단간균으로 4℃와 42℃에서 생육하지 않고 포자를 형성하는 Gram 양성균으로서 젤라틴 액화능과 starch 분해능은 있었고, catalase가 양성, citrate는 양성, nitrate reduction은 양성, indole 검사는 음성이었다. Methyl red 반응은 음성, VP반응은 약하게 나타났으며, H_2S생성은 K/A이었고 당 분해능은 포도당, xylose, mannitol arabinose가 양성으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 균주와 비교 균주인 *Bacillus subtilis*을 비교 검토한 결과 형태학적, 생리적 및 생화학적 특성이 거의 동일한 것으로 보였다.

이러한 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology, microbiological method 등에 기술된 분류 기준에 따라 CAP 141 균주는 *Bacillus subtilis* 또는 그 유연균으로 추정되었다.

Table 3. Characteristics of antifungal bacteria CAP 141

Characteristics \ Strain	*Bacillus subtilis*	CAP 141
Cell diameter > 1.0μm	-	-
Spores round	-	-
Endospore	+	+
Gram stain	+	+
Form	rod	rod
Sporangium swollen	-	d(+/-)
Parasporal crystals	-	-
Catalase	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
pH in V-P broth		
< 6	d(+/-)	d(+/-)
> 7	-	-
Acis from		
D-Glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	-
D-Mannitol	+	+
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of		
Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+

Symbols : -, 90% or more are negative ; +, 90% or more are positive ; d, 11~89% are positive

Table 4. Characteristics of antifungal bacteria CAP 141.

Characteristics \ Strain	*Bacillus subtilis*	CAP 141
Utilization of		
Citrate	+	+
Propionate	-	-
Degradation of tyrosine	-	-
Deamination of phenylalanine	-	+
Egg-yolk lecithinase	-	d(+/-)
Formation of		
Indole	-	-
Dihydroxyacetone	ND	ND
NaCl and KCl required	-	-
Allantoin or urate required	-	-
Growth at pH		
6.8, nutrient broth	+	+
5.7	+	+
Growth in NaCl		
2%	+	+
5%	+	+
7%	+	d(+/-)
10%	ND	ND
Growth at		
5℃	-	-
10℃	d	d
30℃	+	+
40℃	+	+
50℃	d	d
55℃	-	-
65℃	-	-
Growth with lysozyme present	d	d

Symbols : -, 90% or more are negative ; +, 90% or more are positive ; d, 11~89% are positive ; ND, no data available

Ⅳ. 摘 要

사과나무에서 발생하는 부란병에 대한 길항미생물을 찾기위하여 자연계로부터 유용미생물을 분리하고 사과나무 병원균에 대한 길항력 검정과 균주를 동정한 결과는 다음과 같다. 자연계로부터 얻은 3,000여종의 미생물중에서 부란병원균에 대하여 길항력이 우수

한 미생물을 1차적으로 11종 선발하였으며, 이중에서 가장 길항력이 뛰어난 미생물을 최종적으로 CAP 141을 선발하였다. 또한, 본 실험에서 분리한 부란병에 대한 65%의 높은 생장억제력을 보였다. 길항력이 우수한 CAP 141의 형태적 성질, 배양적 특성 및 생리생화학적 성질 등을 조사하여 비교 검토한 결과 *Bacillus subtilis*와 유사한 균으로 동정되었다.

주요어 : 사과나무, *Valsa ceratosperma*, *Bacillus subtilis*, 길항미생물, CAP131

引 用 文 獻

1. 박종성, 1996, 제2장 진균병, 향문사, pp.342-344.
2. 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.
3. Freeman, S., Sztejiberg, A. and Chet, I. 1986. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. Plant and Soil. 94 : 163~170.
4. Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton seedings with *Pseudomonas fluoresacens* and with an antibiotic produced by the bactrium. Phytopathology 69 : pp.480~482.
5. 古俗航平 等, 微生物の探索・分離・育種. 1985. 第1章 珍しい 微生物の探索と應用(分離法 利用), CMC, pp.1-24.
6. Fox. R.T.V., 1993. Principles of Diagonistic Techniques in Plant Pathology. Chapter 3. Isolation of Pathologens and Their Preliminary Identification. CAB International, pp.37-66.
7. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriolgy, Williams and Wilkins, Baltimor.
8. Collins, C.H. and P.M. Lyne. 1984. Microbiological method(5th ed), Butterworths, London.
9. 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.
10. Doetch, R.I. 1987. Determinative methods of light microscopy in manual of mothods for general bacterilogy ed. by Gerhardt etc., American Society for Microbiology, p.30.
11. 김성일・이상범・최용문. 1995. 사과나무 날개무늬병의 생물학적 방제를 위한 길항균 분리 동정. RDA *J. Agri. Sci.*('94 Post Doc.) 37:29-42.