

결구상추 균핵병균 (*Sclerotinia sclerotiorum*)에 대한 길항세균의 분리 및 동정

김한우 · 이광렬¹ · 백정우¹ · 김현주¹ · 박종영¹ · 이진우¹ · 정순재¹ · 문병주^{1*}

동아대학교 농업생명연구소, ¹동아대학교 생명자원과학대학

Isolation and Identification of Antagonistic Bacterium Active against *Sclerotinia sclerotiorum* Causing Sclerotinia Rot on Crisphead Lettuce

Han-Woo Kim, Kwang-Youll Lee¹, Jung-Woo Baek¹, Hyun-Ju Kim¹, Jong-Young Park¹, Jin-Woo Lee¹, Soon-Je Jung¹ and Byung-Ju Moon^{1*}

Center for Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

¹College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

(Received on November 22, 2004)

The fungus genus *Sclerotinia* contains a number of important plant pathogens. Vegetable growers in our country are probably most familiar with *Sclerotinia sclerotiorum*, the causes of sclerotinia rot on crisphead lettuce. *S. sclerotiorum* has a wide host range which can include lettuce as well as crops such as broccoli, cabbage, carrots, celery, beans, peppers, potatoes, stocks, and tomato. Some fungicides, including benomyl, are effective in some crops, but not all. So, we isolated a antagonistic bacteria that are active on sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* and that can be used to control it. About 702 strains had been isolated from soil around plant roots in the field. Ten strains showed strong antifungal activity against *S. sclerotiorum*. In pot test for antagonistic activity, A-7 strain showed high control value against the pathogen when compared with others. The strain was, therefore, selected as a biocontrol candidate against sclerotinia rot and its biochemical properties and 16S rDNA sequence was analyzed. The A-7 strain was highly related to *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*. To confirm precise identification, we had performed *gyr A* gene sequences analysis. Its sequence had 96% similarity with *B. amyloliquefaciens*. Consequently, the isolate was identified as *B. amyloliquefaciens* A-7.

Keywords : Antagonistic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*, Biocontrol, Crisphead lettuce, *Sclerotinia sclerotiorum*

*Sclerotinia sclerotiorum*에 의한 균핵병은 다범성균으로 64과 225속 383종의 식물을 침해하고 있는데(Puddy, 1979; Adams와 Ayers, 1979), 국내에서는 결구상추에도 균핵병이 발생되고 있음을 보고한 바 있다(Baek 등, 2004, in press).

지금까지 결구상추 균핵병의 방제를 위한 농약은 품목 고시된 바가 없으며, 농가에서는 주로 프로파, 베노밀 등의 농약을 이용하여 살포하고 있으나 그 효과가 매우 미미한 상태이다. 한편 농약의 인축에 대한 독성, 잔류농약에 의한 환경오염 및 약제내성균 출현으로 인한 농약 효

과의 감소등을 배경으로 인한 화학적 방제의 대체수단으로 생물학적 방제가 시도되고 있다. 최근 식물병의 생물학적 방제 연구가 활기를 띠고 있으며, 미생물 제제의 실용화 가능성이 부각되어 외국에서는 길항 진균과 세균을 이용한 미생물 농약에 대하여 많은 개발이 이루어지고 있다(Cook과 Baker, 1983; Kim 등, 1990; Dandurand 등, 2000; Jack과 Robert, 1998, 2001). 균핵병의 생물학적 방제 인자로서 *Coniothyrium minitans*(Whipps와 Gerlagh, 1992), *Serratia plymuthica*(Merav 등, 2003), *Ulocladium atrum*(Li 등, 2003), *Pseudomonas fluorescens*(Pedras 등, 2003), *Bacillus megaterium* N4(이 등, 2002), *Nostoc* strain ATCC 53789(Biondi 등, 2004) 등이 보고된 바 있다.

따라서, 본 연구에서는 *S. sclerotiorum*에 대한 우수 길

*Corresponding author

Phone)+82-51-200-7554, Fax)+82-51-200-6993

E-mail)bjmoon@daunet.donga.ac.kr

항균을 근권토양으로부터 분리하고 동정하여 결구상추 균핵병의 생물적 방제 인자로 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

길항세균의 분리. 경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 포장에서 건전 결구상추를 채집하여 밑동부위 및 근경토양 10 g을 살균수 50 ml과 각각 혼합하고, 블랜더(Warning, USA)에 10~30초간 간 다음 Nutrient agar(NA) 배지에 평판희석법으로 배양하였다. 각 시료를 30°C에서 배양하고 48시간 이후에 생성된 다양한 세균 콜로니에서 약 600 균주를 분리하였다. 또한, 유용미생물의 확보를 위하여 근권토양에서 추가적으로 약 102개 균주들을 지속적으로 분리하였다.

분리한 702 균주들을 각각 결구상추 균핵병균, *S. sclerotiorum* YR-1 균주와 7일간 25°C 대치배양하여 공시 세균과 YR-1 균주 사이에 형성되는 저지대(inhibition zone)의 크기를 조사하여 항균활성이 높은 세균을 길항세균으로 1차 선별하였다.

생육실내 방제효과 검증 및 우수 길항균 선별. 1차 선별된 길항세균을 생육실내 방제효과 검정을 실시하여 균핵병 방제에 우수한 길항세균을 최종 선별하였다. 방제효과 검증은 NB 배지에 24시간 배양한 1차 길항세균의 부유액을 각각 1 pot당 100 ml씩 결구상추 잎에 고르게 분무살포하였다. 이것을 25°C의 생육실에 보관 후 24시간 뒤에 PDB배지에서 진탕 배양한 *S. sclerotiorum* YR-1 균주의 균사조각부유액($A_{550}=0.6$), 40 ml을 길항세균 처리한 결구상추 잎에 처리하고 25°C 생육실에 7일간 보관하면서 24시간 간격으로 발병도를 조사하여 방제가를 환산하였다.

TEM을 이용한 형태 관찰. 선별 길항세균을 1일간 NA배지에서 배양한 후에 세균부유액을 3차 증류수에 1/2, 1/4, 1/16, 1/32의 순으로 희석하고, grid를 각각의 부유액에 가한 후, 1% aqueous uranyl acetate를 떨어뜨려 1~2분 방치한 다음 TEM에서 세균의 형태와 내생포자의 유무, 편모를 관찰하였다.

배양, 생리 및 생화학적 특성 조사. 선별 길항세균의 배양, 생리 및 생화학적 특성을 Bergey's manual을 기초로 하여 그람염색, 혐기성생장, 증식온도 조사, catalase, protease의 활성, starch의 분해능 등을 조사하였다. 그리고 API 50CHB(bioMerieux, France)을 이용하여 동정하였다.

16S rDNA 및 gyrA 유전자 염기서열 분석. LB(Luria broth) 배지에서 1일간 배양한 선별길항세균의 chromosomal

DNA를 promega genomic DNA purification kit (Promega, U.S.A.)를 사용하여 genomic DNA를 준비하였다. 16S rDNA 유전자 증폭을 위해 Universal primer 27mF(5'-AGA GTT TGA TCM)와 1492R(5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였으며, gyrase A 유전자 증폭을 위해 p-gyrA-f(5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3')와 p-gyrA-r(5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3')을 사용하였다. PCR 반응은 My Genie32 Thermal Block(Bioneer, Korea)를 이용하여 증폭시켰다. 반응조건은 predenaturation(95°C, 3분)시킨 후, denaturation(94°C, 1분), annealing(45°C, 30초), elongation(72°C, 1분 30초)단계를 30회 반복하였다. 증폭된 PCR product를 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Inc., Germany)를 이용하여 정제한 후, pGEM-T vector (Promega, U.S.A.)에 cloning하였다. DNA sequence는 ABI 310 automated DNA sequencer (Perkin Elmer)로 분석하였고, 이 염기서열을 BLASTN에서 분석하였다.

결과 및 고찰

길항세균의 분리 및 선별. 건전 결구상추의 밑동부위 및 근권토양으로부터 분리한 세균 약 702 균주의 결구상추 균핵병원균 *S. sclerotiorum* YR-1에 대한 균사생육저지효과를 PDA평판배지에서 조사하였다. 그 결과 10 균주가 매우 높은 저지대를 나타내어, 1차로 길항세균으로 선별하였다(Table 1, Fig. 1).

과중한 뒤 30일된 결구상추에 1차 선별 길항세균 10 균주를 각각 처리하여 균핵병균에 대한 방제효과를 검증하였다. 그 결과, 10 균주 중 A-2, A-7, RH-4 균주의 방

Table 1. Inhibitory effect of 10 antagonistic bacteria selected among 702 bacteria from health crisphead lettuce against mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on PDA medium

Antagonistic bacteria	Inhibition zone (mm) ^a
A-2	9.6
A-7	9.8
RH-1	7.1
RH-2	7.2
RH-3	7.4
RH-4	9.6
R-13	7.2
R-26	8.5
R-39	8.2
S-8	7.2

^aGrowth inhibition was determined after 7 days of incubation at 25°C.

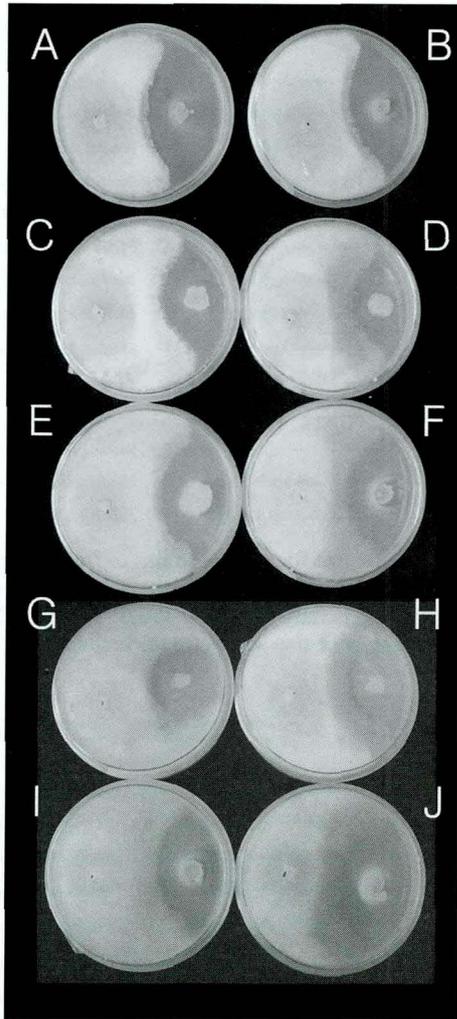


Fig. 1. Growth inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 by 10 antagonistic bacteria on PDA medium. **A**, A-2; **B**, A-7; **C**, RH-1; **D**, RH-2; **E**, RH-3; **F**, RH-4; **G**, S-8; **H**, R-13; **I**, R-26; **J**, R-39.

제가가 각각 73%, 85%, 80%이었다(Table 2). 유의적인 차이는 없으나 이들 중 A-7 균주에 의한 방제가가 가장 높았다. 따라서, 균핵병 방제용 우수 길항세균으로 A-7 균주를 최종선발하였다.

선발 길항세균의 배양, 생리 및 생화학적 특성. 길항세균 A-7 균주의 동정을 위하여 생리학적, 생화학적 특성 및 투사형 전자현미경을 이용한 형태학적 특성을 조사하였다. 그 결과, A-7 균주는 주모성 편모를 가지는 간상형의 형태였으며(Fig. 2), API kit를 이용한 생화학적 특성을 바탕으로 database에 의해 분석한 결과, *Bacillus subtilis*와 73.2%의 유사도를 나타내었다. 그러나 다른 생리학적 특성인 10% NaCl 농도에서 생육이 가능하였고 D-glucose와 L-arabinose는 탄소원으로 잘 이용하였으나 D-xylose와 D-mannitol에서는 유기산을 생성하지 못했다. 이

Table 2. Suppressive effects of 10 antagonistic bacteria on disease incidence of sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber

Treatment ^a	6 days after	
	Disease incidence (%)	Control value (%)
A-2 + Pa	27.0	73.0 b ^b
A-7 + Pa	15.0	85.0 ab
RH-1 + Pa	50.0	50.0 de
RH-2 + Pa	40.0	60.0 cde
RH-3 + Pa	30.0	70.0 bc
RH-4 + Pa	20.0	80.0 ab
R-13 + Pa	55.0	45.0 e
R-26 + Pa	30.0	70.0 bc
R-39 + Pa	40.0	60.0 cde
S-8 + Pa	30.0	70.0 bcd
Pa alone	100.0	0.0 f

^aCrisphead lettuce plants were treated with both antagonistic bacteria and *S. sclerotiorum* YR-1 (Pa). Plants inoculated with *S. sclerotiorum* YR-1 (Pa alone) served as a check.

^bMeans with the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple test (p=0.05).



Fig. 2. Transmission electron micrograph of antagonistic bacterium, A-7 strain isolated from roots and rhizosphere of crisphead lettuce against *Sclerotinia sclerotiorum* YR-1 (×30,000 Magnification).

러한 특성들을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 *Bacillus* 동정기준에 의해 동정된 결과 *B. amyloliquefaciens*와 가장 높은 유사도를 보였다(Table 3).

Table 3. Cultural, physiological and biochemical characteristics of antagonistic bacterium, A-7 strain, against *S. sclerotiorum* YR-1 compared with *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*

Characteristics	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	A-7
Gram stain	+ ^a	+	+
Endospore	+	+	+
Cell diameter > 1.0 µm	-	+	+
Motility	+	+	+
Voges-Proskauer test	+	+	+
Catalase test	+	+	+
Acid from D-glucose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
D-Xylose	+	-	-
D-Mannitol	+	d	-
Gas from glucose	+	-	-
Hydrolysis of Casein	+	+	+
Gelatin	+	+	+
Starch	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	+
Nitrate reduced of nitrite	+	+	+
Growth at pH 6.8 NB	+	+	+
5.7	+	+	+
Growth at NaCl 2%	+	+	+
5%	+	+	+
7%	+	+	+
10%	ND	+	+
Growth at 5°C	-	-	-
10°C	d	+	+
30°C	+	+	+
40°C	+	+	+
50°C	d	-	-

^aSymbol: +, 90% or more positive; -, 10% or less positive; d, 11-89% positive; ND, no data available.

16S rDNA와 gyrase 유전자의 염기서열 분석. A-7 균주의 16s rDNA PCR 증폭에 의해 약 1.5 kb의 유전자를 확보하였으며, 이 PCR fragment의 염기서열을 분석하여 GeneBank의 database에서 검색한 결과 *Bacillus* sp.와 99.7%, *B. amyloliquefaciens*와는 99.4%의 유사성을 보였다(Fig. 3). 이와 같이 세균의 동정을 위한 생화학적 특성 및 16S rDNA 염기서열 분석실험만으로는 A-7 균주의 동정에 있어서 확실한 결론을 내릴 수가 없었다. 특히 *Bacillus* 종의 경우 종래의 생화학적 특성에 따른 분류방법으로 정확하게 구분하기가 어려운 것으로 알려져 있다. 세균의 분류에 가장 많이 사용되어지는 16S rDNA 분석법의 경우 근접한 종에서의 염기서열의 유사도(99.2~99.6% 염기

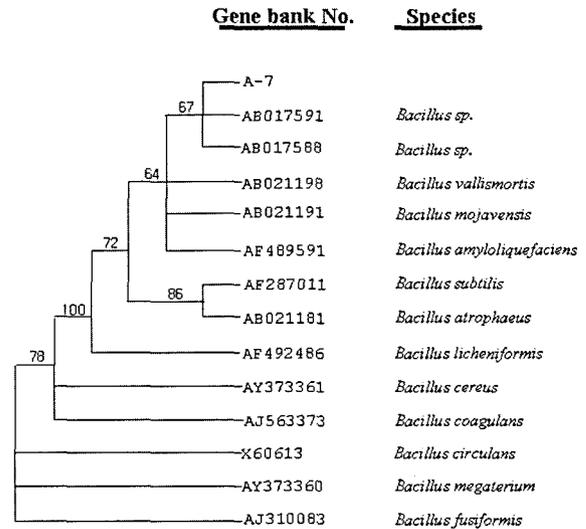


Fig. 3. Phylogenetic tree for various strains of *Bacillus* species on the basis of 16S rDNA sequence similarity. Maximum parsimony phylogenetic tree generated by using PAUP program. Numbers indicate parsimony bootstrap scores for the branch.

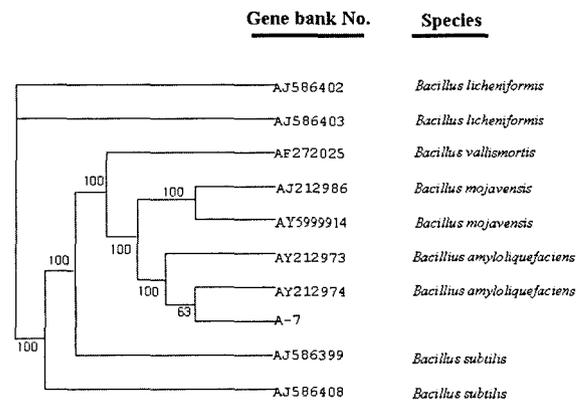


Fig. 4. Phylogenetic tree for various strains of *Bacillus* species on the basis of *gyrA* sequence similarity. Maximum parsimony phylogenetic tree generated by using PAUP program. Numbers indicate parsimony bootstrap scores for the branch.

서열 유사도)가 거의 비슷한 실정이다. 최근에는 높은 유전자 변이율을 가지는 단백질 유전자를 분석하여 세균의 분류에 응용하는 방법들이 개발되었다(Ash 등, 1991; Nakamura, 1999) 이러한 방법 중에서 Chun과 Bae(2000)은 *gyrase A* 유전자의 염기서열분석에 의해 *Bacillus* 종의 동정을 위한 분류법을 보고한 바 있다. 따라서, 길항 세균 A-7 균주의 정확한 동정을 위하여 *gyrase A* 유전자의 염기서열을 분석하였다. A-7 균주의 *gyrase A* 유전자를 PCR 증폭한 후 PCR fragment를 partial sequence 한 결과를 GeneBank에서 BLAST를 이용하여 검색한 결과, *B. amyloliquefaciens*와 96%의 유사도를 보였다(Fig. 4).

이에 반해, 두 번째로 높은 상동성은 가진 세균은 *B. subtilis*로서 82%의 유사도를 보였다. 결론적으로 A-7 균주의 동정을 위한 세 가지 실험결과에 의해 최종적으로 *B. amyloliquefaciens*로 동정되었으며, 본 균주를 *B. amyloliquefaciens* A-7으로 명명하였다.

식물 병원균에 대한 생물학적 방제를 위한 길항세균의 이용은 최근 광범위하게 연구되어지고 있다(Expert와 Digat, 1995; Asaka와 Shoda, 1996; Podile과 Prakash, 1996; Kim 등, 1997; de Vrije 등, 2001). 특히, 포자 형성 그람양성 세균은 내열성과 내건성의 특성을 가지므로 안정적인 생물학적 제제의 제형화에 있어서 많은 장점을 가지고 있으며(Handelsman과 Stabb, 1996), 대표적인 내열성 포자형성세균으로 알려진 *Bacillus* 종은 fungicine, iturin, bacillomycin 등과 같은 다양한 항진균성 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다(Katz와 Demain, 1977; Zuber 등, 1993; Eshita 등, 1995; Kajimura 등, 1995; Yakimov 등, 1995; Cho 등, 2003). Souto 등(2004)은 *B. amyloliquefaciens* 와 아주 근접한 세균으로 동정된 *Bacillus* sp.에서 항진균성 물질로서 iturin-like compounds를 생산하는 것으로 보고하였다. 또한 Kim과 Chung(2004)는 수박 재배에서 심각한 문제를 일으키는 탄저병(Anthracnose)의 원인균인 *Colletotrichum lagenarium*에 대한 길항균으로서 분리 동정된 *B. amyloliquefaciens* MET0908에서 항진균성 물질로 분리 정제된 β -1,3-glucanase가 다양한 식물 병원성진균에 대하여도 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 *B. amyloliquefaciens*의 길항능에 대한 보고에 의하면 항진균성 물질뿐만 아니라 식물병원진균의 세포벽 성분의 분해에 관여하는 효소들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 진균의 세포벽 주성분인 chitin을 분해하는 chitinase에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다(한 등, 2001; Wang 등, 2002). 그러나 본 연구에서 분리된 A-7균주의 경우는 chitinase 생산능이 없는 것으로 확인됨(미발표)에 따라 세균에서 생산되어지는 강력한 항진균성 항생물질만으로도 높은 길항능을 발휘하는 것으로 생각되어진다. 따라서 본 연구팀은 식물병원균의 세포벽에 활성이 높은 chitinase를 개발하여 항생물질 생산능이 우수한 A-7균주에서 유전자를 대량발현시킴으로써 보다 우수한 길항능을 가진 새로운 균주를 육종 중에 있다.

요 약

결구상추에 심각한 피해를 일으키는 균핵병의 생물학적 방제를 위한 기초연구로서 균핵병원균 *S. sclerotium* YR-1 대한 우수 길항세균을 선발하고 동정하였다. 건전

결구상추에서 분리한 세균들 중 균핵병원균의 균사생육 저지 효과가 큰 10 균주를 길항세균으로 1차 선발하고 이들 일차 길항세균에 의한 방제효과를 생육실내 포트검정한 결과, A-2, A-7 및 RH-4 균주의 방제가가 각각 73.0%, 85.0%, 80.0%이었으며, 이 중 가장 높은 방제가를 보인 A-7 균주를 우수 길항균으로 최종선발하였다. A-7 균주의 생화학적 특성 및 16S rDNA와 *gyrA* 염기서열을 분석한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었으며, *B. amyloliquefaciens* A-7으로 명명하였다.

감사의 글

이 논문은 농림부 농림기술개발연구과제(2002-2004)의 연구개발비에 의하여 수행된 결과의 일부임.

참고문헌

- Adams, P. B. and Ayers, W. A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathol.* 69: 896-899.
- Asaka, O. and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4081-4085.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. and Collins, M. D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 202-206.
- Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M. C., Rodolfi, L., Smith, G. D. and Tredici, M. R. 2004. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(6): 3313-3320.
- Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H. and Shin, K. S. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 47-51.
- Chun, J. S. and Bae, K. S. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 123-127.
- Cook, R. J. and Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS. St. Paul, Minnesota. 539pp.
- Dandurand, L. M., Mosher, R. D. and Knudsen, G. R. 2000. Combined effects of Brassica napus seed meal and *Trichoderma harzianum* on two soilborne plant pathogens. *Can. J. Microbiol.* 46(11): 1051-1057.
- de Vrije, T., Antoine, N., Buitelaar, R. M., Bruckner, S., Dissevelet, M., Durand, A., Gerlagh, M. and Jones, E. E. et. 2001. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and

- marketing. *Appl. Microbiol. Biotech.* 56: 58-68.
- Eshita, S. M., Roberto, N. H., Beale, J. M., Mamiya, B. M. and Workman, R. F. 1995. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of iturin group: isolation, structures and antifungal activities of the congeners. *Journal of Antibiotics* 48: 1240-1247.
- Expert, J. M. and Digat, B. 1995. Biocontrol of Sclerotinia wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains. *Can. J. Microbiol.* 41: 685-691.
- Handelsman, J. and Stabb, E. V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8: 1855-1186.
- 한옥경, 이은탁, 김상달. 2001. 식물병원균을 길항하는 chitinase 생산성 생물방제균 *Bacillus amyloliquefaciens* 7079의 선발과 chitinase 생산조건. *산업미생물학회지*. 29(3): 142-148.
- Jack, A. L. and Robert P. L. 1998. Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce Damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Biological Control*. 12(3): 182-190.
- Jack, A. L. and Robert, P. L. 2001. Biological control of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Protectio.* 20: 49-56.
- Kajimura, Y., Sugiyama, M. and Kaneda, M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *Journal of Antibiotics* 48: 1095-1110.
- Katz, E. and Demain, A. L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Review* 41: 449-474.
- Kim, C. H., Jee, H. J., Park, K. S. and Lee, E. J. 1990. Studies on biological control of phytophthora blight of red-pepper V. Performance of antagonistic agents in fields. *Korean J. Plant Pathol.* 6(2): 201-206.
- Kim, D., Cook, R. J. and Weller, D. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.
- Kim, P. I. and Chung, K. C. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol Lett.* 234(1): 177-183.
- 이재필, 손지희, 노성환, 손영준, 문병주. 2000. *Bacillus megaterium* N4를 이용한 들깨 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)의 생물학적 방제. *균학회소식* 12(1): 73p.
- Li, G. Q., Huang, H. C. and Acharya, S. N. 2003. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 28: 11-18.
- Merav, K., Marianna, O., Ilan C. and Leonid, C. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 323-331.
- Nakamura, L. K. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. subtilis subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. spizisenii subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1211-1215.
- Pedras, M. S., Ismail, N., Quail, J. W. and Boyetchko, S. M. 2003. Structure, chemistry, and biological activity of pseudophomins A and B, new cyclic lipodepsipeptides isolated from the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry* 62(7): 1105-1114.
- Podile, A. R. and Prakash, A. P. 1996. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. *Can. J. Microbiol.* 42: 533-538.
- Purdy, L. H. 1955. A broader concept of the species *Sclerotinia sclerotiorum* based on variability. *Phytopathology*. 45: 421-427.
- Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M. and Garcia, A. F. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1247-1256.
- Wang, S. L., Shih, I. L., Liang, T. W. and Wang, C. H. 2002. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *J. Agric Food Chem.* 10(50): 2241-2248.
- Whipps, J. M. and Gerlagh, M. 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycol. Res.* 96: 897-907.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91: 181-187.
- Zuber, P., Nakano, M. and Marahiel, M. A. 1993. Peptide antibiotics: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. In : *Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics* ed. by Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R. pp. 897-916. Washington, DC: American Society of Microbiology.