

Bacillus megaterium N4에 의한 들깨 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)의 생물학적 방제

문병주* · 김현주 · 송주희 · 이광열 · 백정우 · 정순재

동아대학교 생명자원과학부

Received July 24, 2004 / Accepted September 14, 2004

Biological Control of Perilla Sclerotinia Rot Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* Using *Bacillus megaterium* N4. Byung-Ju Moon*, Hyun-Ju Kim, Ju-Hee Song, Kwang-Youll Lee, Joung Woo Baek and Soon-Je Chung. Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea — This study was investigated the occurrence of sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* at the major perilla cultivating area, Gangdong-dong, Gangseo-gu, Busan in 1998. The incidence of this disease ranged from 8.1 to 28.3% at Gangdong-dong area during the growing seasons. Symptoms of the disease initially appeared damping-off of infected stems and soft-rot on the leaves of perilla. Under the relatively high humidity, abundant white mycelia of the pathogen formed on the lesion developed into black sclerotia later and the infected leaves were finally fell down. Sixteen isolates, S1-S16, isolated from diseased lesions showing typical symptoms, and pathogenicity was tested using mycelial disks. Among them, S2 isolate showing the most strong pathogenicity was selected and identified as *Sclerotinia sclerotiorum* on the basis of morphological and cultural characteristics. For biological control, an antagonistic bacteria, N4 isolate which effectively inhibited not only mycelial growth of S2 isolate but also suppress sclerotinia rot on the pot assay, was selected and identified as *Bacillus megaterium* according to Bergey's manual and API system., Wettable powder type, N4 formulation using *B. megaterium* N4 isolate was developed and estimated its control effect on perilla crops in a plastic house. As a results, N4 formulation which applied before 3 days inoculation of pathogen was effectually controlled Sclerotinia rot as the control value of 98.0%, was more effective than chemical fungicide, benomyl showing the control value of 78.0%. This is the first report of wettable powder formulation as a biocontrol agent using *B. megaterium* N4 against Sclerotinia rot caused by *S. sclerotiorum* on perilla.

Key words — *Bacillus megaterium*, Biological control, Formulation, Sclerotinia rot of perilla, *Sclerotinia sclerotiorum* S2

들깨(*Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara)는 꿀풀과에 속하는 유리작물로서 동부 아시아 지역이 원산지이며 [23] 예로부터 우리나라를 비롯하여 인도, 일본, 중국 등지에서 재배되고 있다. 들깨 종실은 주로 강정, 차, 제과, 건강식품 제조에 쓰이며, 기름은 튀김용과 사라다용으로, 공업용으로는 페인트, 잉크, 칠감, 가루비누, 방수용구 등에 활용된다.

최근 육류의 소비 증가와 건강식에 대한 관심 증대로 신선 잎채소의 들깨의 소비가 증가하여, 전국 잎들깨의 시설하우스와 노지재배 면적은 각각 약 900 ha와 약 300 ha로 경상남도 밀양, 부산, 경상북도 경산 등 영남권이 전국 잎들깨 면적의 65%를 차지하고 있다[8]. 그러나, 들깨 수요 증가에 따른 생산량의 증대로 농가에서는 농약과 화학비료를 과다 시비하여 농산물품질관리원의 농약잔류 허용치 초과 작물로 분류되었으며, 약제 저항성균도 출현하였다[8]. 또한, 하우스내의 고온다습한 환경조건과 연작으로 인해 새로운 병해가 출현하여 들깨 수량 및 품질이 저하되는 등 농가에서는 많은

경제적 피해를 입고 있다[7,19~21,24].

들깨의 주요 병으로서 1994년 조[7] 등에 의해 들깨 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)이 신병해로 보고된 후, 문 등[6,19]에 의해 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)과 잎마름병(*Alternaria*)이 국내에서는 처음 보고되었다. 앞서 보고한 두 병해 이외에도 점무늬병(*Cercospora perillae*) 녹병(*Puccinia* spp.) 등이 있으며, 최근에는 탄저병(*Colletotrichum perillae*) 등의 새로운 병해가 국내에서 발생하고 있다. 이외에도 외국의 경우, *Corynespora cassicola*에 의한 점무늬병과 *Ralstonia solanacearum*에 의한 풋마름병도 보고된 바 있다[9,10].

들깨는 생체를 주로 이용하는 경우가 많아 농약의 사용이 매우 까다롭고 사용할 수 있는 농약 또한 제한적이어서 현재 품목고시된 화학농약조차 보고된 바가 없고, 대부분 들깨에 관한 연구들은 종실과 유지 함량 및 품종 개량에 관한 것들로 들깨 병에 관한 기초 연구 및 방제에 관한 연구가 전무하여 본 병의 방제대책은 시급한 실정에 있다. 지금까지 들깨 균핵병 방제에 이용된 미생물은 *Bacillus subtilis*, *Burkholderia* sp. 등의 균주가 보고되었으나[8], 이를 이용한 미생물체제의 제형화는 보고된 바가 없다. 현재까지 생물농약 개발에 이용된 균주는 *Pseudomonas* spp. *Trichoderma harzianum*, *B. subtilis*

***Corresponding author**

Tel : +82-51-200-7554, Fax : +82-51-200-6993

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

등이 있으며, 선진외국에서는 Trichodex, Kodiak, Mycostop 등의 상품명으로 생물농약이 시판되고 있다. 생물농약의 불안전성과 비경제성 등으로 많은 어려움이 있으나 생물농약의 개발은 필수적이다.

따라서, 본 연구에서는 부산시 강동동 지역에 발생한 들깨 균핵병의 발생정도를 조사하고, 이의 생물학적 방제를 위해 우수길항균으로 확인된 *B. megaterium* N4 균주를 미생물제제로 제형화하여 이들의 방제효과를 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

병징 및 발병을 조사

1997년 1월부터 1998년 5월 중순까지 부산시 강서구 강동동 지역의 들깨 재배 플라스틱하우스 내에서 들깨에 나타나는 균핵병의 병징을 수시로 관찰하였다. 발병율은 들깨잎 수확시기인 1998년 5월에 강동동 지역내의 2개 하우스 재배지에서 1하우스당 6개 구역, 구당 120×100 cm를 임의 선정하고 구역내의 총 들깨 조사 주수(약 230주×12구역)에 대한 이 병주율을 조사하였다.

병원균의 분리

들깨 재배 하우스내에서 잎무름 증상 및 줄기썩음 증상을 띄고 있는 병든 들깨를 채집하고 각 발병부위로부터 병원균을 분리하였다. 병든 조직 절편을 5.25% sodium hypochloride에 약 1분간 표면살균 후 멸균수로 3회 세척하여 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, USA) 평판배지 위에 놓아 25℃, 암조건하에서 2일간 배양하였다. 신장한 균사절편을 PDA 평판배지에 이식하고 3회 반복하여 순수분리하였다. 잎무름 증상 및 줄기썩음 증상을 띄는 병반으로부터 병원균 S1 등 16 균주를 분리하여 4℃ 저온 배양기에 보존하면서 실험에 사용하였다.

병원성 검정 및 동정

분리된 16 균주의 들깨에 대한 병원성을 검정하기 위해, PDA 평판배지에 1주일간 배양 후 직경 8 mm의 균사절편을 포트내 재식한 들깨 잎과 줄기에 접종하여 상대습도 90% 이상, 20±2℃ 생육상에 보관하면서 접종 1일 후에 균사절편을 떼어내고 2일째부터 발병율을 조사하였다. 이때, 5포트씩 5반복으로 3회 실시하였다. 병원성 검정 결과, 병원성이 가장 강한 균주의 형태적, 배양적 특성 등을 조사하여 이를 동정하고 이하의 모든 실험에 공시 균주로 이용하였다.

길항균 선발

부산시 강동동 지역의 들깨 플라스틱 하우스내 들깨잎과 근권토양에서 분리하여 이미 들깨 갯빛곰팡이병균 및 잎마름병균에 대해 균사생장 억제효과가 우수한 것으로 보고 [20,24]된 N1 균주 등 6균주를 공시하여 PDA 평판배지 상에

서 균핵병원균과 대치배양 후 병원균의 균사생육 저지대를 조사하여 가장 효과적인 공시 두 균주를 일차로 선발하였다.

일차로 선발한 두 균주를 생육상내 포트 검정을 통해 방제효과가 가장 높은 균주를 우수길항균으로 최종선발하였다. 이때, 방제효과 검정은 NB (Nutrient Broth, Difco, USA) 배지에서 1일간 진탕배양하여 10⁷ cfu/ml로 조정된 세균부유액을 들깨 잎의 앞, 뒷면에 끌고루 분무접종하고, 접종 1일 후 PDA 평판배지에서 1주일간 배양한 직경 8 mm의 공시 병원균의 균사절편을 잎의 뒷면에 부착하여 상대습도 90% 이상, 20±2℃의 생육상에서 보관하면서 접종 1일 후 균사절편을 떼어내고 2일 후부터 발병도를 조사하였다. 각 처리구는 5포트씩 5반복으로 3회 조사되었으며, 이하의 모든 실험에서 방제가는 다음과 같이 환산하였다[17].

$$\text{방제가(\%)} = \frac{\text{병원균 단독 배양 시의 발병도} - \text{병원균과 길항세균(미생물 제제) 등 조합처리의 발병도}}{\text{병원균 단독처리의 발병도}} \times 100$$

선발 길항균에 의한 발병예방 및 치료효과 검정

우수 길항균으로 최종 선발되어 병원균에 대해 발병 억제효과가 가장 큰 것으로 확인된 N4 균주의 예방효과 및 치료효과를 규명하였는데, 먼저 길항균 N4 균주의 세균부유액을 병원균 접종 3일, 2일, 1일, 0일 전에 각각 포트에 재식한 들깨 잎의 앞, 뒷면에 끌고루 분무접종하고, 병원균의 균사절편을 부착하여 접종한 후 발병도를 조사하여 예방효과를 검정하였다. 반면, 치료효과는 병원균 접종 후 0일, 1일, 2일, 3일 후에 각각 세균부유액을 처리하여 발병도를 조사하였다. 접종방법은 앞서의 생육상내 포트검정과 동일하게 수행하였다.

길항균 동정

선발된 길항세균을 동정하기 위해 배양, 생리 및 생화학적 특성을 Bergey's manual에 따라 조사하였고, 형태는 1% PTA Negative staining하여 투과전자현미경(Transmission electron microscopy, TEM)으로 관찰하였으며, 아울러 API 20E와 50CHB kit를 동정에 이용하였다.

공시 길항세균의 제제화

선발된 길항세균의 제제화를 위해서 7 L 발효기에 NB배지 4 L을 넣고 종균배양된 N4 균주 400 ml를 접종하여 3일간 배양(30℃ 300 rpm)하였다. 배양액 1 L당 예비실험에서 선발된 옥수수전분, 밀가루, 콩가루, 쌀가루 등의 고분자 재료 중 방제효과가 확인된 옥수수전분 200 g, 밀가루 200 g, dextrose 4.0 g, CaCO₃ 2.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, MnCl₂ · 4H₂O 0.02 g을 첨가하여 잘 섞은 다음, 철판에 얇게 깔고 55℃에서 48시간 동안 건조 후 블라인더로 분쇄하여, 수화제형 미생물농약인 N4제제를 제조하였다.

미생물제제의 방제효과 검증

N4 균주의 N4제제에 의한 들깨 균핵병의 방제효과를 플라스틱 하우스내의 포트검정을 통하여 화학농약과 비교하였다. 이때, 수화제형 미생물농약인 N4제제는 수돗물로 100배 희석(4×10^8 cells/ml)하였고, 대조구인 농약은 상추균핵병의 방제약제로 품목고시된 벤지미다졸제의 베노밀수화제 2000 배 희석액을 공시하여, 앞서의 예방 및 치료효과 검증과 동일한 방법으로 검증하였으며, 5포트씩 5반복으로 3회 평균하였다.

결 과

발병율 및 병징 조사

1997년 1월부터 1998년 5월 중순까지 부산시 강서구 강동동 지역의 들깨 플라스틱 하우스 내에 자연발생한 균핵병의 피해정도를 조사하기 위해, 2개의 플라스틱 하우스(강동I, 강동II)를 임의 선정하여 각 6구(A, B, C, D, E, F)씩 총 12구를 대상으로 발병율을 조사하였다. 그 결과, 최소 8.1%에서 최대 28.3%까지 평균 13.9%의 발병율이 조사되었다(Table 1). 들깨 균핵병의 병징을 관찰한 결과, 처음에는 들깨 어린 줄기의 지제부와 잎에 수침상의 병반이 형성되어 차츰 갈색 내지 흑갈색으로 변하다가, 습도가 높아지면서 잎의 무름 증상과 줄기 갈록 현상이 심해져 병반이 차츰 확대되었고, 병반부는 흰색의 균사로 뒤덮혀 결국 주 전체가 고사하였다. 오래된 병든 줄기에는 흑색 균핵이 다수 형성하여 병든 잎이 탈락되거나 줄기가 꺾여 쓰러지면서 부근의 건전한 들깨와 접촉하여 감염되었다(Fig. 1A).

병원성 검증 및 동정

분리된 병원균 16균주의 들깨에 대한 병원성 검증에서 균사절편을 들깨 잎에 치상한 뒤 접종 1일 후부터 발병되기 시작하여 접종 7일 후에는 공시한 16 균주 모두 80% 이상의 발

Table 1. Disease incidence of Sclerotinia rot of perilla caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in two different plastic house at Gangdong-dong, Gangseo-gu, Busan in 1998

Location	Plactic house ^a	Disease incidence (%)
Gangdong-dong (I)	A	28.3
	B	15.8
	C	20.3
	D	12.8
	E	10.3
	F	8.1
Gangdong-dong (II)	A	14.8
	B	11.4
	C	10.1
	D	12.3
	E	9.1
	F	13.9
Average		13.9

^a230 plants in each section of plastic house were investigated.

병을 나타내었으며(Fig. 2), 이들 중 S2 균주가 병진전이 가장 빠르고 병원성이 강하였으며, 자연발병에서와 동일한 병징을 나타내었다(Fig. 1B). 또한, 이들 각 병반으로부터 동일한 병원균이 재분리되었는데, 이들의 형태적, 배양적 특성을 조사한 결과, 조 등[7]에 의해 이미 보고된 들깨 균핵병균 *Sclerotinia sclerotiorum*으로 동정되었다. 따라서, 이하의 모든 실험에 *S. sclerotiorum* S2 균주를 공시 병원균으로 이용하였다.

길항균 선발

공시 길항균인 N1 균주 등 6균주의 본 병원균에 대한 균사생육 억제효과를 대치배양을 통해 검증한 결과, N1과 N4 균주에 의한 저지대가 각각 22.0 mm와 28.0 mm로 가장 높아 이들 두 균주를 길항균으로 일차 선발하였다(Table 2, Fig. 3). 일차 선발된 이 두 균주의 생육상내 포트에서 방제효과

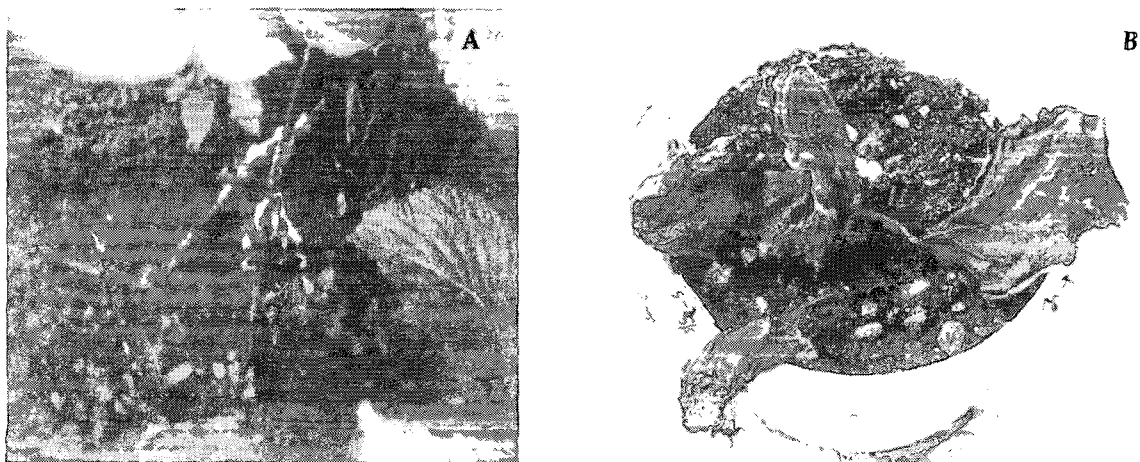


Fig. 1. Symptom of Sclerotinia rot of perilla caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on the naturally infected leaves and stems of perilla in the field (A). Symptom on the artificially inoculated leaves and stem of perilla by *Sclerotinia sclerotiorum* S2 (B).

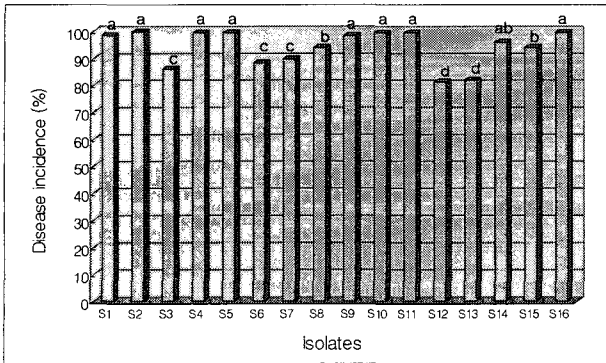


Fig. 2. Disease incidence of *Sclerotinia* rot on the leaves and stems of perilla caused by S1~S6 isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* after 7 days of incubation at 20±2°C. Means with the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple test (P=0.05).

Table 2. Inhibitory effects of six antagonistic bacteria against the mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* S2 on PDA

Antagonistic bacteria	Inhibition zone (mm) ^a
N1	22.0
N2	16.0
N3	21.0
N4	28.0
N5	11.0
N6	17.0

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

검정 결과, N4 균주의 방제가가 89.5%로 N1 균주의 방제가 55.5% 보다 월등히 우수하여, N4 균주를 본 들깨 균핵병원균 S2 균주에 대한 우수길항균으로 최종 선발하였다(Fig. 4).

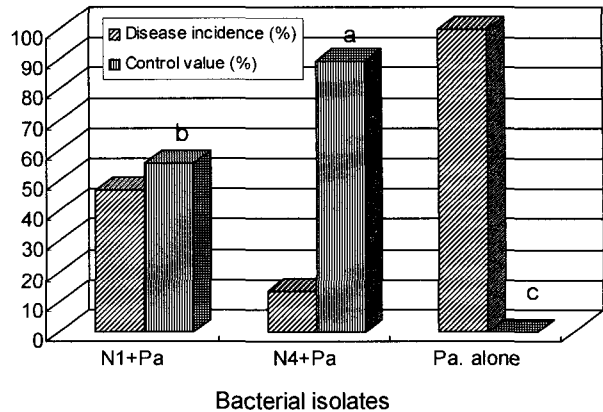


Fig. 4. Suppressive effects of two antagonistic bacteria, N1 and N4 isolates against the incidence of *Sclerotinia* rot on perilla caused by *Sclerotinia sclerotiorum* S2 after 7 days of inoculation in a growth chamber. Perilla seedling was treated with each bacterial isolate plus *Sclerotinia sclerotiorum* S2 (N1+Pa, N4+Pa) or treated with *S. sclerotiorum* S2 alone (Pa. alone) respectively. Means with the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple test (P=0.05).

선발 길항균에 의한 발병예방 및 치료효과

생육상내 포트검정에서 높은 발병억제 효과가 확인된 N4 균주에 의한 발병예방 및 치료효과를 검정한 결과, 길항균과 병원균을 동시 접종하거나 길항균을 병원균보다 1일~3일 전처리할 경우 88.4~91.5%로 모두 80.0% 이상의 방제가를 보여 발병 예방효과가 높았다. 하지만, 길항균을 후처리할 경우 0~14.7%로 매우 낮은 방제가를 보여 선발 길항균에 의한 본 병원균의 치료효과는 나타나지 않았다(Table 3).

길항균 동정

병원균과의 대치배양 및 생육상내 포트 검정을 통해 최종

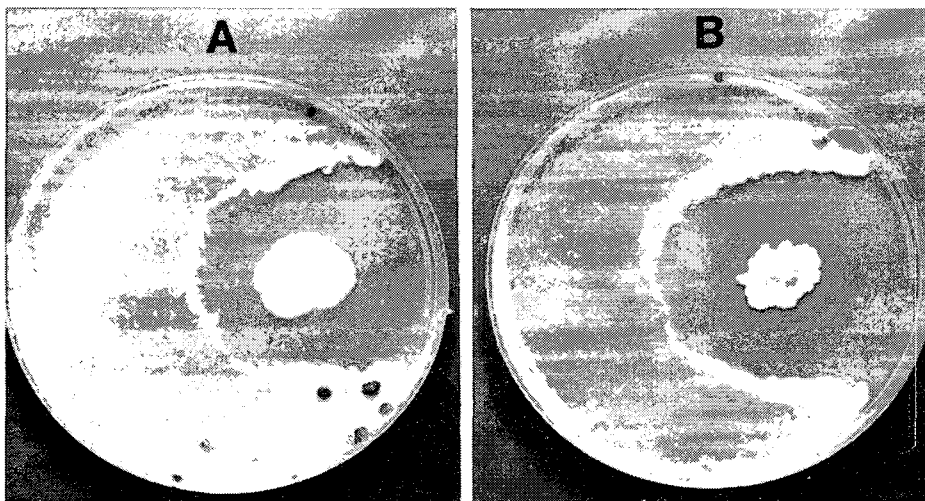


Fig. 3. Mycelial growth inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* S2 by two antagonistic bacteria, N1 (A) and N 4 isolated (B) on PDA.

선발된 우수길항균인 N4 균주를 배양, 생리 및 생화학적 특성 조사 및 투과전자현미경(TEM) 하에서의 형태의 관찰을 통해 Bergey's manual에 따라 동정한 결과, N4 균주는 *Bacillus megaterium*으로 동정되었다(Table 4, Fig. 5). 동정의 정확성을 기하기 위해 API system으로 동정한 결과, 역시 유사도 83.3%로 Bergey's manual의 결과와 일치하였다.

미생물제제의 방제효과 검증

예비실험을 통해 *B. megaterium* N4 균주의 길항력 제고에

Table 3. Preventive and curative effects of antagonistic bacterium, N4 isolate on the incidence of Sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* S2 on perilla in a growth chamber

Time of bacterial inoculation	Disease incidence (%) ^a		Control value (%)
	N4 + Pa	Pa. alone ^b	N4 + Pa
3days before	8.5		91.5 ^c
2days before	10.7		89.3 ^x
1day before	11.6		88.4 ^x
co-inoculated	11.6	100.0	88.4 ^x
1day after	85.3		14.7 ^y
2days after	100.0		0.0 ^z
3days after	100.0		0.0 ^z

^aPercentage of infected leaves after 7 days of inoculation.

^b*Sclerotinia sclerotiorum* S2 alone.

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

Table 4. Biochemical, physiological, and cultural characteristics of antagonistic bacterium, N4 isolate compared with *Bacillus megaterium*^a

Test	N4	<i>Bacillus megaterium</i> ^a
Gram stain	+	+ ^c
Morphology ^b	rod	rod
Endospore	+	+
Cell diameter > 1.0 μ m	+	+
Anaerobic growth	-	-
Growth in NaCl 2%	+	ND
5%	+	ND
7%	+	d
Growth at 5 $^{\circ}$ C	-	d
10 $^{\circ}$ C	+	+
30 $^{\circ}$ C	+	+
40 $^{\circ}$ C	+	d
50 $^{\circ}$ C	-	-
Hydrolysis of Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+
Nitrate reduction	+	d
Utilization of Citrate	+	+
Voges-prosakauer test	+	-

^aData from Bergey's manual of Systematic Bacteriology. 1986. Williams & Wilkins.

^bObservation with transmission electron microscopy (TEM).

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

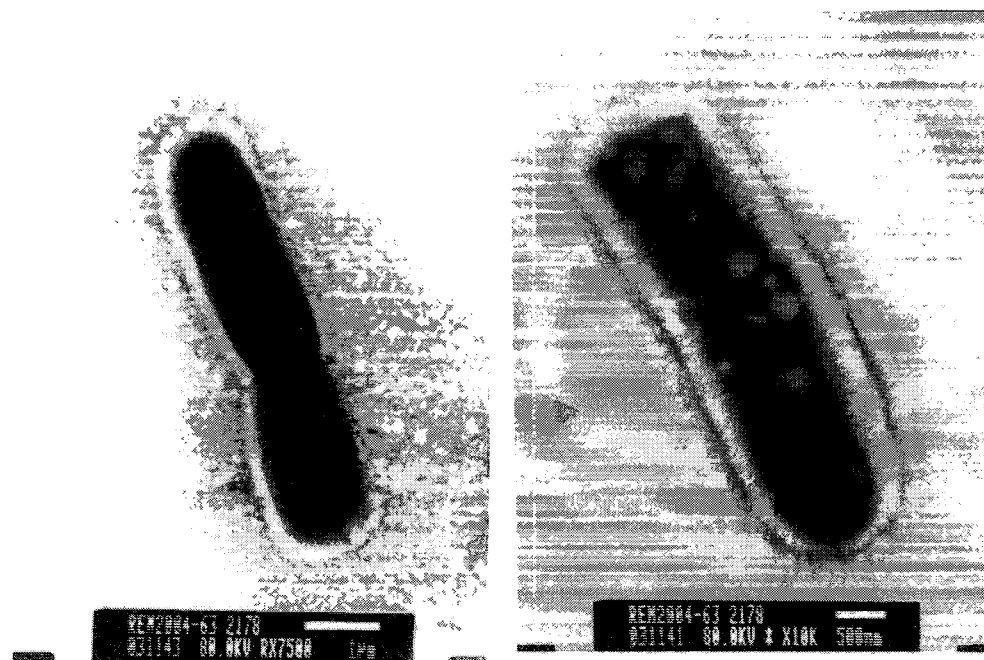


Fig. 5. TEM (Transmission electron microscopy) photographs showing antifungal action mode of antifungal bacterium, *Bacillus megaterium* N4 against *Sclerotinia sclerotiorum* S2. Scale bar represents 1 μ m.

효과가 확인된 옥수수전분 등을 첨가하여 수화제형 N4제제로 제제화하고 본 병원균에 대한 방제효과를 생육상내 포트 검정을 실시하였는데, 유기합성 농약인 베노밀수화제 처리와 비교한 결과, 앞서의 발병예방 및 치료효과에서와 마찬가지로 치료효과는 높지 않았으나, N4 제제의 3일 전처리에서는 98.0%로 높은 방제가를 보여 베노밀수화제 처리보다 효과적이고 예방효과가 전반적으로 높았다(Table 5, Fig. 6).

고 찰

들깨 균핵병을 일으키는 *S. sclerotiorum*은 매우 다양한 기주작물에 침입하며, 비교적 저온이고 습도가 높을 때 많이 발생한다. 보통 병환부에 형성된 균핵이 땅으로 떨어져 토양

표면에서 월동하는데 환경이 적합하면 균핵은 균사로 직접 발아하여 줄기의 지체부나 과실 혹은 배추 등의 밑둥을 직접 침입하거나 자낭반을 만들어 그 안에 형성된 자낭포자가 비바람에 날려 식물체의 지상부를 침입하여 1차 전염을 한다. 이 병원균은 분생포자를 형성하지 않기 때문에 주로 균사에 의해 2차 전염을 하는데, 2차 전염은 타 병해와 같이 대발생되는 경우가 적고 주로 1차 전염원인 자낭포자의 비산에 의해 생기는 경우가 많다. 또한, 감염된 기주의 종류나 기주의 감염부위 그리고 환경조건에 따라 솜털썩음병(cottony rot), 흰곰팡이병(white mold), 물렁썩음병(watery soft rot), 줄기썩음병(stem rot), 초관썩음병(crown rot), 꽃마름병(blossom blight) 등의 다양한 병징을 나타낸다[2]. 전형적인 균핵병의 초기 병징은 하얀 솜털 균사가 나타나고 시간이 지나면 여기

Table 5. Preventive and curative effects of N4 formulation using *Bacillus megaterium* N4 isolate and chemical fungicide, benomyl against *Sclerotinia* rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* S2 on perilla in a growth chamber

Time of inoculation	Disease incidence (%) ^a			Control value (%)	
	N4 Formulation ^b	Benomyl	Pa. alone ^c	N4 Formulation	Benomyl
3days before	2.0	22.0		98.0w	78.0z ^d
2days before	12.0	18.0		88.0v	82.0z
1day before	26.0	20.0		74.0x	80.0z
co-inoculated	40.0	8.0	100.0	60.0x	92.0y
1day after	46.0	12.0		54.0y	88.0y
2days after	50.0	12.0		50.0y	88.0y
3days after	56.0	20.0		44.0z	80.0z

^aPercentage of infected leaves after 7 days of inoculation.

^bWettable powder type formulation containing *Bacillus megaterium* N4 (10^7 cfu/ml).

^c*Sclerotinia sclerotiorum* S2 alone.

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

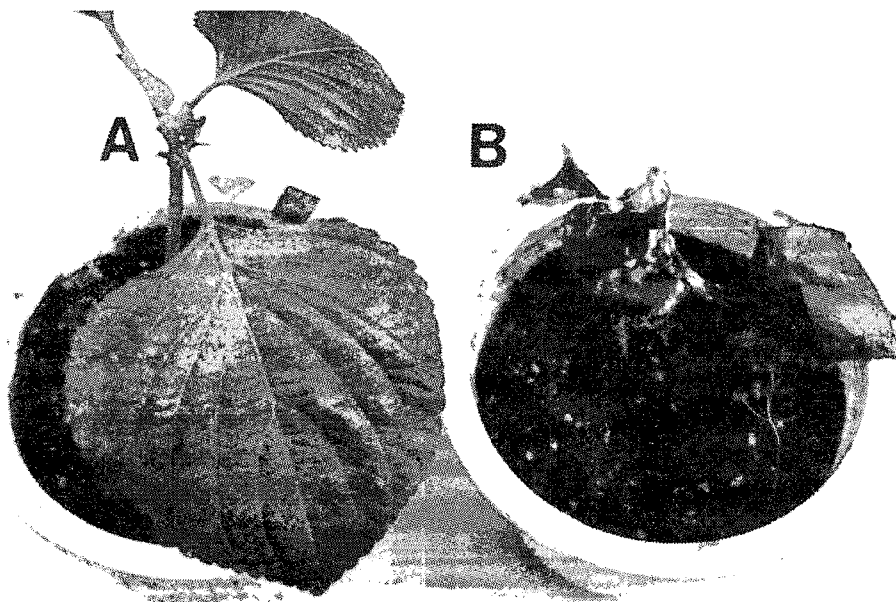


Fig. 6. Suppressive effects of N4 formulation made with *Bacillus megaterium* N4 against *Sclerotinia* rot of perilla caused by *Sclerotinia sclerotiorum* S2. N4 formulation plus *S. sclerotiorum* S2 (A) and *S. sclerotiorum* S2 alone (B).

에 크고 단단한 휴면체인 균핵이 나타나며, 다즙성 식물의 줄기가 감염되면 초기에는 기부에 담갈색 또는 암갈색 병반이 나타나다가 흰 솜털 같은 균사로 뒤덮히며, 만연하면 줄기가 썩고 병반 위쪽의 잎이 빠르게 말라죽는데, 어떤 경우는 잎이 먼저 감염된 후 줄기로 이동하기도 한다[11]. 본 연구에서 조사된 들깨 균핵병의 병징 역시 잎과 줄기에 갈색의 수침상 병반이 형성되고 무름증상과 썩음증상이 나타나며 흰색의 균사로 덮히는 등 전형적인 균핵병 증상을 보였다.

Kohn[14]은 *S. sclerotiorum*을 60과 360종의 넓은 기주 범위를 가지는 다범성균으로 보고하였으나 들깨는 이 기주 범위에 포함되지 않았다. 또한, *Sclerotinia*속 균의 동정에 있어서 *Sclerotinia*속 분류에 관한 기존의 동정기준을 수정하여 과거의 *Sclerotinia*속이었던 많은 종들을 다른 속으로 개명하고, 식물 병원성인 *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* 3종만을 기록하고 있다[14]. 이들 3종을 결정하는데에는 자낭포자의 길이와 폭의 비, 자낭포자내의 핵수, 동일 자낭내 자낭포자 크기 차이의 유무, 균핵의 내외부 형태 등에 따라 구분하였다[14,16,23,25]. 본 연구에서도 공시균인 S2 균주의 유성세대인 자낭을 형성시켜 자낭과 자낭포자 등의 특징을 관찰한 결과, 자낭내에 8개의 자낭포자가 형성되고 자낭포자의 핵수는 2핵이었으며 자낭포자의 길이와 폭의 비는 2.2였고, 8개 자낭포자의 크기가 모두 동일하였다. 이 결과를 *Sclerotinia*속 3종의 특징과 비교해 보면[14], 자낭포자의 길이와 폭의 비가 *S. sclerotiorum*은 2.1~2.4로서 2.0 보다 크고, *S. minor*는 2.0 보다 작거나 크며, *S. trifoliorum*은 2.0 보다 작다. 자낭내 핵수는 *S. minor*와 *S. trifoliorum*은 4핵인데 반해 *S. sclerotiorum*은 2핵이었으며, 자낭내 8개 자낭포자의 크기에 대해서도 *S. trifoliorum*은 자낭포자 크기가 대, 소 2종이 4:4의 비로 나타난 반면, *S. minor*와 *S. sclerotiorum*은 모두 동일하다고 기술하였는데, 이상의 모든 특징들을 종합하여 보면, 본 공시균인 S2 균주는 *S. sclerotiorum*으로 동정되었으며 이미 보고된 들깨 균핵병균과 동일하였다[7].

들깨 잎과 근권 토양에서 분리한 세균 균주 중 병원균과의 대치배양 및 생육상내 포트검정을 통해 균사생육 억제효과와 방제효과가 우수한 공시 길항균 *B. megaterium* N4 균주를 선발하여 발병예방효과와 치료효과를 검정하였는데 이 경우, 병원균 처리 1~3일 전에 길항균을 처리한 예방효과가 치료효과보다 우수하였다. 이는 *B. megaterium*에 의한 항진균활성 물질 분비 및 siderophore에 의한 Fe^{3+} 에 대한 경쟁과 외막가수분해효소 등에 의한 기작과 관련이 있을 것으로 추정되며[12], 그밖에도 *B. subtilis*와 마찬가지로 내생포자를 형성하여 불리한 환경조건에서도 잘 생육하며 유기영양세균으로서 광합성 세균의 질소고정작용을 촉진하는 등, 유기인의 유효도를 증가시켜 작물생장을 촉진한다는 보고[3,5] 등과도 일치할 것으로 사료된다. 그러나, siderophore나 외막가수분해효소에 의한 기작은 항생물질에 비해 방제효과가 다소 낮으므로 실제 N4균주의 예방효과는 병원균과의 영양물질 경쟁 및 항균

물질의 다량 분비에 의해 높은 방제효과를 보인 것으로 생각된다.

균핵병의 방제는 경종적 방법과 약제 살포에 의존하며, 이 병원균에 대해 강한 저항성을 보이는 품종은 거의 없으므로 온실에서는 훈증법으로 병원균을 제거하고, 감수성 작물의 재식 밀도를 낮추어 심고 잡초 관리를 잘 해야 한다[22]. 특히, 온실의 투광도를 높이고 질소비료 과용을 삼가야 하는데 토양을 전면 멀칭하고 점적관수하는 방법은 균핵병 뿐만 아니라 갯빛곰팡이의 발생을 억제하는 수단도 된다. 균핵은 최소 3년 동안 생존하므로 감염된 포장에서 감수성 작물을 다시 식재하기 위해서는 최소 3년 동안은 화곡류 같은 비감수성 작물을 키워야 한다[1]. 또한, 화학적 방제로는 유기합성 농약인 benomyl, dickloran, thiophanate-methyl 등을 이용하나 만족할만한 효과를 보지 못하고 있으며, 들깨는 잎을 식용으로 하기 때문에 유기합성 농약 사용에 큰 어려움이 따르므로 결국 환경친화적 방제 방법이 요구된다.

본 연구에서는 제제화를 위한 bio-gel을 천연고분자 재료인 옥수수전분과 밀가루를 사용하였는데, 이는 전착제로서의 기능 뿐만 아니라 약효증진 및 길항균 생존에 필요한 영양원으로도 작용하여 방제에 매우 효과적이었다고 생각된다. 본 연구자에 의해 기보고된 들깨갯빛곰팡이병 방제용 soy 제제에서는 콩가루와 쌀가루를 이용하여 높은 방제효과를 검정하였으며[15], 가지갯빛곰팡이병 방제용 미생물농약 제조에서는 콩가루, 밀가루, 비지가루, 옥수수전분, 쌀가루, 찹쌀가루 등을 다양하게 이용하여 이들의 우수함을 보고하였다[21]. 타연구자들에 의하면, 복[4]은 전착제로 콩가루와 쌀전분을 이용하였는데 이는 높은 고정화와 수분흡착도를 나타낸다고 하였으며, 이 등[18]도 콩가루와 전분을 전착제로 선발하여 그 효과를 증명하였다. 본 연구에서 사용한 옥수수전분은 일반적으로 시중에 판매되는 옥수수전분과는 달리 옥수수에서 배아, 옥피, 글루텐 등을 고도로 정제한 비매품을 사용한 것이므로 타연구자와 다른 점이라고 할 수 있다. 일반적으로 옥수수전분은 식품이나 공업용으로 증량제 및 제지용 사이즈제와 점착제 등으로 많이 이용되어 왔으나, 본 연구에서는 미생물농약의 제제화에 응용하여 우수한 천연고분자 물질로 선발하게 되었다. 본 연구자는 지속적인 미생물농약의 개발로 토마토, 딸기 및 결구상추 갯빛곰팡이병 방제용, 결구상추 균핵병과 밀등썩음병 방제용 및 토마토 잎곰팡이병 방제용 미생물농약을 제제화하여 그들의 방제효과를 검정 중에 있다(미발표).

이 외에 첨가된 dextrose는 병원균보다 길항균에 유용하게 작용하는 영양원이며, 미량원소인 $CaCO_3$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 는 길항균의 생장에 필요한 무기영양 염류로 효력증진제 역할을 하는데, 이는 정 등[13]의 미생물농약 개발과 복[4]의 무공해 생물농약 개발 그리고 이 등[18]에 의한 연구에서와 동일한 결과이다.

미생물 농약을 상품화하고 실용화되기 위해서는 반드시

보관상의 안정성과 안전성 등에 관한 조사가 수반되어야 하는데, 장기간 보존을 위한 보조제 사용에 관한 실험과 약효·약해 검정 등이 추후 보완되어야 할 것이다.

요 약

부산시 강서구 강동동 지역의 들깨 하우스내에서 들깨의 잎에 갈색내지 흑갈색의 병반이 형성되고 습도가 높을 시에는 잎에 무름증상과 줄기에 잘록증상이 나타나며, 심하면 주전체가 고사하여 흰색의 균사로 뒤덮히고 균핵이 형성되는 병해가 발생하여 1998년 5월에 자연발생된 균핵병 발병율을 조사한 결과 약 8.1~28.3%로서 평균 13.9%였다. 이러한 증상을 띄는 병반으로부터 분리된 16 균주를 균사절편 접종법으로 병원성 검정한 결과, 접종 1일 후부터 발병되기 시작하여 자연발생된 병징과 동일한 증상을 나타내었으며 16 균주 모두 80.0% 이상의 발병율을 나타내었다. 그 중 병원성이 가장 강한 S2 균주를 공시선발하고, 형태적 및 배양적 특성을 조사하여 동정한 결과, 들깨 균핵병균 *Sclerotinia sclerotiorum* 으로 동정되었다. 생물학적 방제를 위해 길항세균인 N1 등 6균주를 공시하고 병원균 S2균주와 균사생육 억제효과 및 생육상내 포트검정을 통해 방제효과를 검정한 결과, N4 균주에 의한 균사생육 억제효과와 방제효과가 가장 우수하였으며, 발병예방 및 치료효과 검정시 길항균을 병원균처리 1~3일 전에 처리할 경우 80.0% 이상의 방제효과를 보여 치료효과보다는 발병예방효과가 효과적인 것으로 확인되었다. 길항균 N4 균주를 Bergey's manual과 API system을 이용하여 동정한 결과, *Bacillus megaterium*으로 동정되었으며, 이를 수화제형인 미생물농약 N4제제로 제조하여 유기합성 농약인 베노밀수화제와 발병예방 및 치료효과를 비교하였다. 그 결과, 병원균처리 3일 전에 처리할 경우 N4 수화제형 제제의 방제효과가 98.0%로 베노밀수화제에 의한 78.0%보다 방제효과가 높았다.

감사의 글

이 연구는 2003학년도 동아대학교 학술연구비(자유공모과제) 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Adams, P. B. 1975. Factors affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Plant Dis. Repr.* **59**, 599-603.
- Adams, P. B. and W. A. Ayers. 1982. Biological control of sclerotia lettuce drop in the field by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology* **72**, 485-488.
- Agriose, G. N. 1997. *Plant pathology*. pp. 635, 4th eds., Academic press Inc., New York.
- Bok, S. H. 1993. Non-Toxic Biopesticide, Process optimization for production, delivery and formulation of microbial fungicide GEF-1. pp. 62, Ministry of Science & Technology Research Transaction, Seoul, Korea.
- Burr, T. J., M. N. Schroth and T. Suslow. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* **68**: 1377-1383.
- Cha, W. J., C. S. Kim, J. H. Song, H. J. Kim, Y. B. Lee and B. J. Moon. 2002. Leaf blight of perilla caused by *Alternaria alternata*. *Korean J. of Life Science*. **12(6)**, 708-714.
- Cho, C. T. and B. J. Moon. 1994. Sclerotinia rot of perilla caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and its new host. *Res. Bull. Inst. Agr. Reso. Dong-A Univ.* **3**, 11-24.
- Choi, Y. H. 2002. Development of labor saving - and environment friendly-cultivation methods for the production of high quality perilla leaf in Miryang area. pp. 480, Ministry of Science & Technology Research Transaction, Seoul, Korea.
- Hong, W. F., S. T. Hsu and K. C. Tzeng, 1993. Bacterial wilt of perilla crispa : new host and new transmission method. *ACIAR proceeding Australian Center for International Agriculture Research* **45**, 373-375.
- Hsu, S. T., W. F. Hong and K. C. Tzeng, 1993. Bacterial wilt of perilla caused by *Pseudomonas solanacearum* and its transmission. *Plant disease* **77**, 674.
- Huang, H. C. and G. C. Kozub. 1993. Survival of mycelia of *Sclerotinia sclerotiorum* in infected stems of dry bean, sunflower and canola. *Phytopathology* **83**, 937-940.
- Jung, H. K. and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red-papper. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31(3)**, 235-241.
- Jung, Y. R., W. K. Sin and S. W. Kang. 1993. Development of the microbial pesticide for controlling gray mold rot of greenhouse crops. pp. 24, Gyeongnam Rural Development Administration Research Transaction, Gyeongsangnam-do, Korea.
- Kohn, L. M. 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69(8)**, 881-886.
- Kim, C. S., J. P. Lee, J. H. Song, E. K. Lim, S. J. Chung, S. Y. Ha and B. J. Moon. 2001. Development of biofungicide for control of gray mold rot of eggplant caused by *Botrytis cinerea* and bioassay in the greenhouse condition. *Korean J. of Life Science* **11(3)**, 235-241.
- Koike, S. T., R. F. Smith, L. E. Jackson, L. J. Wyland, J. I. Inman and W. E. Chaney. 1996. Phacelia, Lana woollypod vetch, and Austrian winter pea: Three new cover crop hosts of *Sclerotinia minor* in California. *Plant Dis.* **80**, 1409-1412.
- Korea crop protection association. 2001. A statute book to be connected with chemicals. pp. 69, Korean Agricultural Chemical Industrial Association, Seoul, Korea.
- Lee, G. S., G. A. Kim and T. S. Kang. 1998. Industrial development of microbial fungicide for biological control and environmental conservation. pp. 113, Ministry of

- Science & Technology Research Transaction, Seoul, Korea.
19. Moon, B. J., S. H. Roh, Y. J. Son, H. S. Kang, J. P. Lee, B. S. Kim and D. S. Chung. 1998. Occurrence of gray mold rot of perilla caused by *Botrytis cinerea*. *Korean J. Plant Pathol.* **14(5)**, 467-472.
 20. Moon, B. J. 1999. Development for quality, high yield production and labor saving culture of leaf perilla around Nakdong River. Occurrence, isolation and identification of several diseases of perilla and biological control by antagonistic bacteria. pp. 277, Ministry of Science & Technology Research Transaction, Seoul, Korea.
 21. Moon, B. J., C. S. Kim, J. H. Song, H. J. Kim, J. P. Lee, H. C. Park and D. B. Shin. 2002. Biological control of gray mold rot of perilla caused by *Botrytis cinerea* II. Formulation of antagonistic bacteria and its control effect. *Res. Plant Dis.* **8(3)**, 184-188.
 22. Olaya, G., G. S. Abawi and J. Barnard. 1996. Influence of water potential on survival of sclerotia in soil and on colonization of bean stem segments by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Dis.* **80**, 1351-1354.
 23. Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum* : History, disease and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* **69**, 875-880.
 24. Son, Y. J., J. P. Lee, C. S. Kim, J. H. Song, H. J. Kim, J. W. Kim, D. H. Kim, H. C. Park and B. J. Moon. 2002. Biological control of gray mold rot of perilla caused by *Botrytis cinerea* I. Resistance of perilla cultivars and selection of antagonistic bacteria. *Plant Pathol. J.* **18(1)**, 36-42.
 25. Wong, A. L. and H. J. Willetts. 1975. A taxonomic study of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. *J. Gen. Microbiology.* **88**, 339-334.