

## 벼 잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*)의 균핵에서 분리한 *Bacillus subtilis* SJ-2의 식물 병원 곰팡이에 대한 항균 활성 및 항균 물질의 특성

김병섭\* · 조광연  
한국화학연구소 스크리닝연구부

### Antifungal Effects on Plant Pathogenic Fungi and Characteristics of Antifungal Substances Produced by *Bacillus subtilis* SJ-2 Isolated from Sclerotia of *Rhizoctonia solani*

Byung Sup Kim\* and Kwang Yun Cho

Pesticide Screening Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

**ABSTRACT :** A bacterial isolate SJ-2 isolated from sclerotia of *Rhizoctonia solani* showed antifungal activities against *Pyricularia oryzae*, *R. solani*, *Botrytis cinerea*, and *Bipolaris maydis*, but did not against *Phytophthora infestans* and *Pythium ultimum*. The bacterium was identified as *Bacillus subtilis* based on morphological and physiological characteristics. Crude antifungal substances were extracted from AM1 (antibiotic medium 1) broth of *B. subtilis* SJ-2 by butyl alcohol extraction. Production of antifungal substances was peaked at 2 days after incubation. The antifungal activity of the extracted substances was evaluated on potato dextrose agar (PDA) plates incorporated with crude antifungal substances against 16 phytopathogenic fungi by measuring growth inhibition. The substances inhibited completely the growth of *P. oryzae*, *R. solani*, *B. maydis*, and *Cochliobolus sativus*, and showed over 80% growth inhibition on *Cochliobolus miyabeanus*, *Alternaria alternata*, *B. cinerea*, *Cladosporium fulvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, and *F. oxysporum*. However, they showed weak inhibition activities against *Phytophthora* spp. and *Pythium ultimum*. Antifungal substances of *B. subtilis* SJ-2 were purified and identified as iturins by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. These compounds caused inhibition of spore germination and germ tube swelling of *P. oryzae* as well as lysis of *R. solani* hyphae.

**Key words :** antifungal substances, *Bacillus subtilis*, iturins, phytopathogenic fungi.

농약을 사용하지 않고는 농사를 지을 수 없을 정도로 병해충에 의한 손실은 크다고 할 수 있다. Fujita(9)는 농약을 사용하지 않을 경우의 수량 및 출하 금액의 감소를 조사하였는데 벼 및 맥류는 20~30%의 감소를 나타냈으며, 사과, 복숭아는 전혀 수확할 수 없다고 하였고, 다른 작물도 막대한 피해를 보임을 보고하였다. 병해의 피해는 단순히 수량 감소뿐만 아니라 병원균이 생산하는 2차 대사 산물에 의해 인축이 강한 독성 피해를 받는 것으로도 알려져 있다(1, 23). 직접 간접적으로 막대한 피해를 끼치는 식물 병원균의 방제를

위하여 유기합성 농약을 널리 사용하고 있으나 계속적이고 광범위한 사용으로 인하여 환경오염, 저항성 출현, 인축독성 등의 많은 문제가 야기되었다(1, 5, 20). 이러한 유기합성 농약의 문제를 극복하기 위하여 환경과 조화를 이루는 방제 수단으로 저항성 품종의 이용, 경종적 방제, 생물학적 방제, 천연물 농약의 이용 등이 이용되고 있으며, 특히 천연물 농약은 그 활성 성분 자체 뿐 아니라 그 골격을 이용하여 새로운 합성 농약을 만들 수 있기 때문에 이 분야의 연구는 널리 수행되고 있다(3, 11, 12, 17).

식물병 방제를 위한 길항 미생물로는 *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Agro-*

\*Corresponding author.

*bacterium* spp., *Bacillus* spp. 등이 널리 이용되고 연구가 진행되고 있다(2, 3, 12, 17). 이러한 길항 미생물 자체를 병방제에 이용하는 것은 아직 미미한 수준이지만 'Mycostop'(Kemira/S. *griseoviridis*), 'Kodiak'(Gustafson/*B. subtilis*), 'Binab T'(T. *viride* Fries)가 상품화되었다(12, 17). 이들 미생물이 분비하는 대사 물질이 항균 활성을 가지는 경우 병해 방제에 이용된다. *Bacillus* spp.의 경우는 식물병 방제 및 식물 성장 효과가 알려져 있으며, 이 균은 내생 포자(endospore)를 형성하므로 균 자체를 이용한 분제, 수화제, 유제 등의 여러 가지 제형으로 이용할 수 있다(2, 6, 7, 8, 15, 16, 18, 19, 22). 균 자체뿐만 아니라 이 균은 최소 66개 이상의 항균 물질을 생산하는 것으로 알려져 있기 때문에 본 균이 분비하는 항균 물질의 효과적 이용을 통하여 방제제로의 개발이 가능할 것이다(6, 10, 11, 13, 14, 15, 21).

본 실험에서는 천연물에서 유래한 새로운 항균 물질을 찾기 위하여 토양 및 여러 분리원으로부터 항균 활성을 가지는 길항균을 찾던 중 벼 잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*)의 균핵에서 분리한 세균이 높은 항균 활성을 보여 이 균을 동정하였으며, 분비하는 항균 물질을 분리정제하여 동정하고 항균 물질의 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

**길항세균의 분리 및 동정.** 실험에 사용한 균주는 경남 상주, 강원 인제, 충남 논산, 대전 등 여러 지방에서 채취한 논 토양에 벼 잎집무늬마름병균(*R. solani*)의 균핵을 넣어 25°C 항온실에 30일간 침지한 후 균핵을 회수하여 흐르는 물에 흙을 제거하고 물기를 제거한 후 감자천배지(PDA)에 치상한 후 발아가 억제되고 이웃의 발아된 균핵의 성장을 억제하는 균핵 주변에 성장한 균을 순수 분리하여 본 실험에 이용하였다. 동정을 위하여는 *Bergey's manual*(4)에 따라 여러 가지 생리 생화학 실험을 수행하였다.

**항균 활성 조사.** 분리된 길항균들 중 벼 잎집무늬마름병균(*R. solani*) 및 벼 도열병균(*Pyricularia oryzae*)에 대하여 대치 배양하였을 때 높은 항균 활성을 나타내는 경남 상주지방의 논 토양에서 분리한 SJ-2균을 선발하여 이 균의 항균 스펙트럼을 조사하였다. 조사 방법은 PDA plate에 길항세균 SJ-2균과 벼 도열병균(*P. oryzae*)의 6종의 식물 병원 곰팡이를 함께 접종하여 25°C 배양기에서 7일간 대치 배양한 후 억제 정도(inhibition zone)를 조사하였다.

**항균 물질의 생산 및 추출.** 항균 물질 생산을 위하여 길항세균 SJ-2를 AM1(antibiotic medium 1; beef extract 1.5 g, yeast extract 3.0 g, casitone 4.0 g, peptone 6.0 g, glucose 1.0 g, 증류수 1 L) 액체 배지에 접종하여 28°C 진탕 배양기에서 7일간 배양한 후 배양액을 13,000 rpm으로 40분간 원심 분리한 후 배양여액을 얻었다. 배양여액은 n-hexane과 물(1:1)로 한번 분획하고 물층을 다시 butyl alcohol과 물(1:1)로 두번 분획한 후 butyl alcohol 층을 얻어 증류한 조추출물의 항균 활성의 조사에 사용하였다(Fig. 1). 조추출한 항균 물질의 항균 spectrum을 조사하기 위하여 조추출물을 100 µg/ml가 되게 PDA 배지에 넣은 후 벼 도열병균(*P. oryzae*)의 15균에 대한 항균 활성을 조사하였으며, 항균 물질 생산을 위한 최적 배양 일수를 조사하기 위하여 AM1 액체 배지에서 1~8일간 배양한 후 매일 배양액을 위의 방법(Fig. 1)으로 조추출하여 벼 도열병균(*P. oryzae*)에 대한 억제 효과를 조사하였다. 억제 효과조사 방법은 도열병균의 포자 현탁액을 넣고 plate에 분주하여 굳힌 PDA에 일별로 조추출한 항균 물질을 20 µl을 넣어 용매를 건조시킨 paper disk(8 mm thick, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)를 올려놓고 25°C 배양기에서 3일간 배양한 후 곰팡이 생장의 억제 정도(inhibition zone)를 조사하였다.

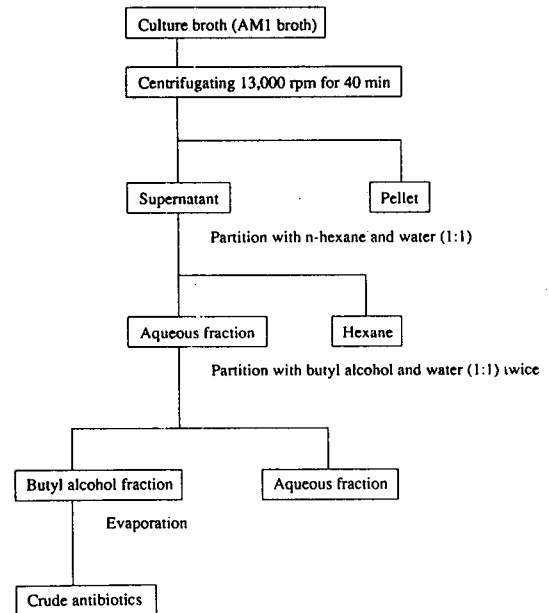


Fig. 1. Extraction procedure of crude antibiotics of *Bacillus subtilis* SJ-2.

항균 물질의 분리 정제 및 동정. 항균 활성이 확인된 butyl alcohol 추출물을 methyl alcohol에 녹여 불용성인 물질은 제거하고 XAD-2 column chromatography(100 g, Φ 2.4×20 cm), Silica gel column chromatography(Kiesel gel 60, 70~230 mesh, 80 g), medium pressure liquid chromatography[MPLC, LiChrorep Si60 25-40 μm, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(6.5 : 3.5 : 1) with fraction collector(7 ml/tube)]를 하여 각 활성 분획을 얻었다(Fig. 2). MPLC를 하여 얻은 활성 sample과 유전공학연구소로부터 분양받은 standard chemical을 thin layer chromatography(TLC) (Silica gel GF 254, Merck) 및 high performance liquid chromatography(HPLC) [μBondapak RCM cartridge(0.8×10 cm)]를 하여 활성 물질을 비교 동정하였는데, TLC를 위한 전개용매는 butyl alcohol : acetone : water를 4 : 6 : 1(v/v)로 조제한 용매를 이용하였으며, HPLC는 μBondapak RCM cartridge(0.8×10 cm)를 이용하여 50% MeCN을 1 ml/min의 속도로 흘려 UV-207 nm에서 검출했다.

항균 활성 물질의 작용 특성. 항균 활성의 작용 메커니즘을 조사하기 위하여 항균 물질이 들어 있는 PDA배지에 벼 도열병균(*P. oryzae*)의 포자 현탁액 (5×10<sup>5</sup>/ml)을 접종하여 26°C 항온기에서 24시간 배양한 후 포자 발아 및 항균 물질에 의하여 균사 생육이 억제된 벼 잎집무늬마름병균(*R. solani*)의 균총주변을

광학현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

항균 활성을 나타내는 균주의 선발. 벼 잎집마름병균(*R. solani*)의 균핵을 경남 상주 지방의 논흙에 침지하였다가 PDA배지에 발아 조사를 하였을 때 균핵의 발아를 억제하고 이웃의 발아된 균핵의 군사 생장을 억제하는 세균을 순수 분리하였다. 이 균의 항균 spectrum을 조사하기 위하여 벼 도열병균(*P. oryzae*)와 6종의 식물 병원 곰팡이와 대치 배양한 결과 벼 잎집무늬마름병균(*R. solani*) 뿐 아니라 벼 도열병균, 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 생육을 크게 억제하였으며, 보리 반점병균(*Cochliobolus sativus*) 및 옥수수 깨씨무늬병균(*Bipolaris maydis*)도 군사 생장을 억제하였지만 감자 역병균(*Phytophthora infestans*) 및 모잘록병균(*Pythium ultimum*)의 생장은 억제하지 못하였다 (Table 1).

길항세균 SJ-2의 동정. 동정을 위하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(4)에 따라 여러 가지 생리 생화학적 실험을 하였다. 이 균은 Gram 양성의 간상으로 내생 포자(endospore)를 형성하였으며, catalase, VP test, casein, gelatin, starch, citrate 등의 실험에서 positive로, anaerobic growth, propionate, tyrosine, phenylalanine 등의 실험에서 negative로 나타났다(Table 2). 이 균의 생리 생화학적 특성이 *Bacillus subtilis*와 일치하므로 길항세균 SJ-2를 *Bacillus subtilis*로 동정하였다.

항균 물질의 생산 및 추출. *B. subtilis* SJ-2균이 분리하는 항균 물질은 AM1 broth에 접종하여 배양한 후 배양여액을 얻어 butyl alcohol로 추출한 후 *B. subtilis* 항균 물질의 활성을 조사한 결과 이 항균 물질은 *P. oryzae*의 생장을 크게 억제하였다(Fig. 3). 조추출물을

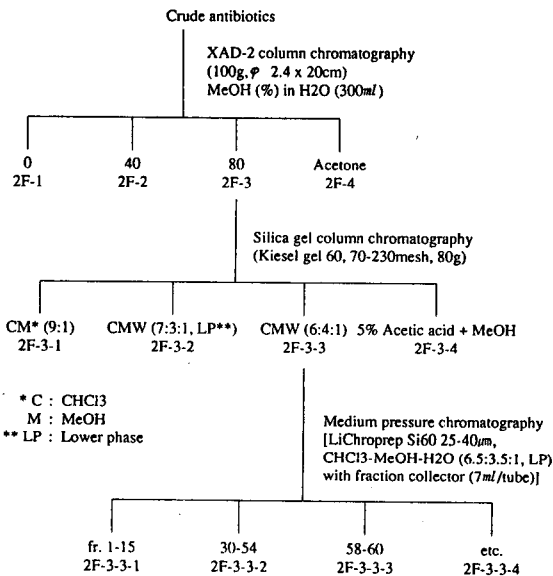


Fig. 2. Procedure of purification of antibiotics produced by *Bacillus subtilis* SJ-2.

Table 1. Growth inhibition of several plant pathogens by *Bacillus subtilis* SJ-2 in dual culture on PDA

Pathogen	Inhibition rate <sup>a</sup>
<i>Pyricularia oryzae</i>	+++
<i>Rhizoctonia solani</i>	+++
<i>Botrytis cinerea</i>	+++
<i>Bipolaris maydis</i>	+++
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	++
<i>Pythium ultimum</i>	-
<i>Phytophthora infestans</i>	-

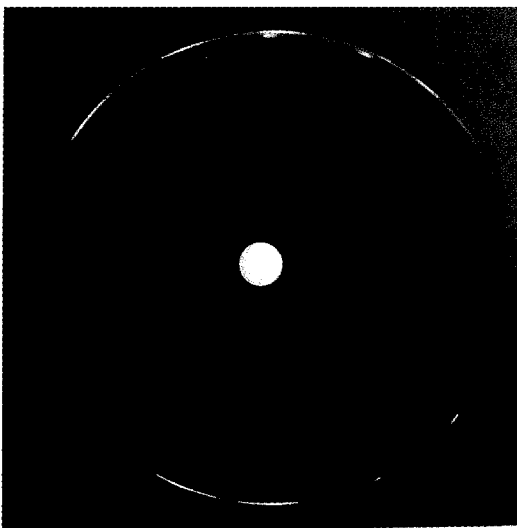
<sup>a</sup> - : no inhibition, + : 0-5 mm, ++ : 5-10 mm, +++ : > 10 mm inhibition of mycelial growth.

**Table 2.** Differential characteristics of antagonistic bacterium SJ-2 and *Bacillus subtilis*

Characteristic	SJ-2	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>a</sup>
Gram staining	+ <sup>b</sup>	+
Rod-shaped	+	+
Endospore production	+	+
Catalase	+	+
Anaerobic growth	-	-
Voges-Proskauer	+	+
pH in V-P broth <6	-	d
>7	-	-
Acid from D-glucose, L-arabinose, D-xylose and D-mannitol	+	+
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of casein, gelatin, and starch	-	-
Utilization of Citrate	+	+
Propionate	-	-
Degradation of tyrosine	-	-
Deamination of phenylalanine	-	-
Egg-yolk lecithinase	-	-
Nitrate reduced to nitrite	+	+
Formation of Indole	-	-
Dihydroxyacetone	-	ND
Growth at pH 6.8 and 5.7 nutrient broth	+	+
Growth in 2, 5, 7 and 10% NaCl	+	+
Growth at 5°C	-	-
10°C	-	d
30°C	+	+

<sup>a</sup> Data from the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (4).

<sup>b</sup> symbols; + : positive, - : negative, d : 11~89% of *Bacillus subtilis* strains are positive, and ND : no data available.



**Fig. 3.** Inhibition zone formed on the lawn of *Pyricularia oryzae* by the crude antifungal substances produced from *Bacillus subtilis* SJ-2.

100 µl/mg의 농도로 PDA배지에 넣고 *P. oryzae*의 15개 균을 접종하여 균사 생장 억제를 조사하였다. *P. oryzae*, *R. solani*, *B. maydis*, *C. sativus*는 100% 생육을 억제하였으며, *C. miyabeanus*, *Alternaria alternata*, *B. cinerea*, *Cladosporium fulvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*은 80% 이상의 균사 생장을 억제하였으나 난균강에 속하는 *Phytophthora* spp., *Pythium ultimum*에 대한 억제 효과는 낮게 나타났다(Table 3).

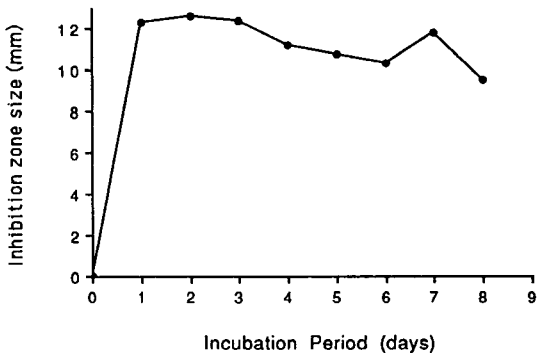
AM1 액체 배지에서 배양 일수별로 *P. oryzae*에 대한 항균 물질의 분비를 조사한 결과 1일간 배양한 후 배양액으로부터 추출한 추출물은 12.1 mm의 inhibition zone을 나타냈으며, 2일 후는 12.4 mm로 가장 크게 억제하였으며 그 후에는 다소 감소했다(Fig. 4).

항균 물질의 분리 정제 및 동정. Butyl alcohol로 추출된 조추출물을 분리 정제하기 위하여 XAD-2 column chromatography, silica gel column chromatography, MPLC를 하여 얻은 활성 물질을 TLC로 조사

**Table 3.** Antifungal spectra of the crude antibiotics extracted from *Bacillus subtilis* SJ-2 to various fungal pathogens

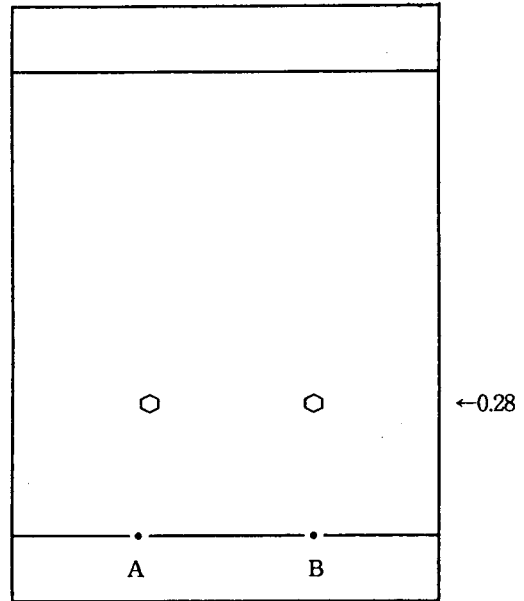
Pathogen	Mycelial growth inhibition(%) <sup>a</sup>
<i>Pyricularia oryzae</i>	100
<i>Rhizoctonia solani</i>	100
<i>Bipolaris maydis</i>	100
<i>Cochliobolus sativus</i>	100
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	76.8
<i>Botrytis cinerea</i>	93.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	90.0
<i>Alternaria alternata</i>	80.2
<i>Cladosporium fulvum</i>	86.0
<i>Fusarium moniliforme</i>	98.9
<i>F. oxysporum</i> fs. <i>cucumerium</i>	91.2
<i>F. oxysporum</i> fs. <i>raphani</i>	88.5
<i>Phytophthora capsici</i>	47.1
<i>P. cactorum</i>	0.0
<i>P. infestans</i>	0.0
<i>Pythium ultimum</i>	23.1

<sup>a</sup> The activity of extracted substances was evaluated on PDA plates incorporated with crude antifungal substances (100 µg/ml). Mycelial growth inhibition was the inhibition degree relative to the untreated control.



**Fig. 4.** Inhibition effect of the crude antibiotics extracted from *Bacillus subtilis* SJ-2 on the growth of *Pyricularia oryzae* according to the incubation period of the bacterium on AM1 medium.

하였다. 이때 이 균이 생산하는 항균 물질로 알려져 있는 iturins을 대조로 하여 전개 용매(butyl alcohol : acetone : water=4 : 6 : 1)로 전개시킨 결과 Rf치가 0.28로 동일한 위치에 band가 나타났다(Fig. 5). 이 물질을 HPLC를 이용하여 조사한 결과 7개의 활성 물질로 나타났다으며 그중 31분 때에 나타난 활성 물질은 대조로 사용한 iturin과 동일 물질로 밝혀졌다(Fig. 6).

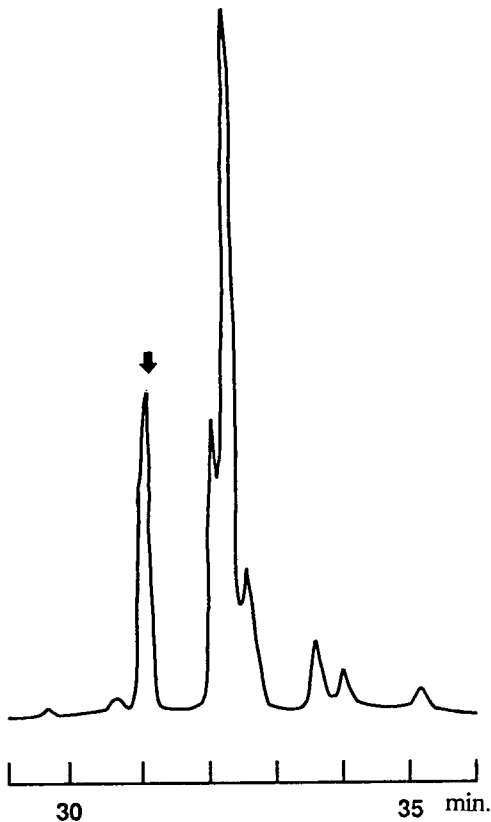


**Fig. 5.** Thin layer chromatogram of the antifungal substances from *Bacillus subtilis* SJ-2 and the standard chemical. A : antibiotics from SJ-2, B : standard chemical; iturin, Plate : silica gel GF254 (Merck), Developing solution : butyl alcohol : acetone : water=4 : 6 : 1 (v/v).

*Bacillus subtilis* SJ-2 항균 물질의 작용 특성. 벼 도열병균(*P. oryzae*)에 대한 작용 특성을 조사하기 위하여 약제가 첨가된 배지에서 포자 발아를 조사한 결과 포자 발아가 억제되었으며 발아된 포자에서는 발아관의 팽윤현상(swelling)을 관찰할 수 있었으며, 정상적으로 발아한 포자에서는 없는 액포(vacuoles)가 세포 내에서 관찰되었다(Fig. 7-A). 벼 잎집무늬마름병균(*R. solani*)의 경우 약제와 접촉된 균사의 용균(lysis) 현상이 관찰되었다(Fig. 7-B).

## 고 찰

식물병 방제를 위한 미생물의 이용 범주는 크게 세 영역으로 나눌 수 있다. 첫째는 미생물 자체를 직접 또는 제형화해서 생물 농약으로 이용하는 것이고, 둘째는 생화학적 살균제로서 대사 산물을 이용하는 것으로 *Streptomyces* spp.가 분비하는 항균 물질로 blasticidin, kasugamycin, validamycin, polyoxin, miltiomycin 등이 상품화되어 이용되고 있다. 마지막으로는 새로운 합성 살균제 합성을 위한 선도 화합물로 이용하는 것으로 담자균류가 분비하는 strobilurins와



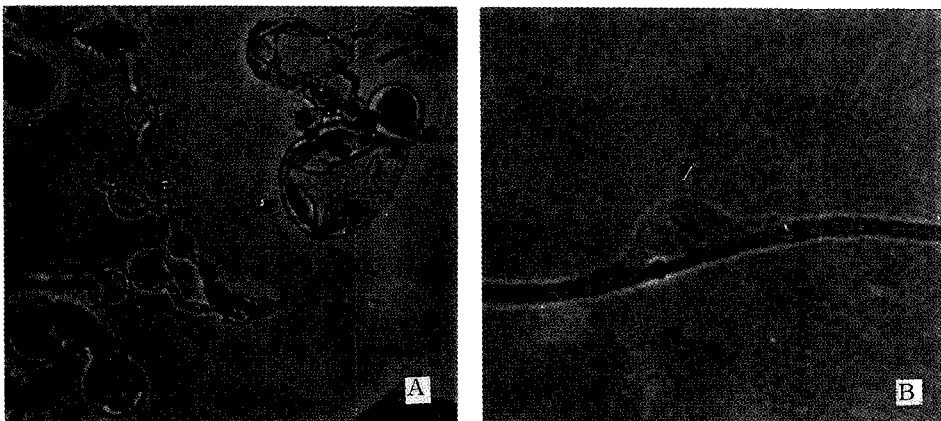
**Fig. 6.** HPLC separation pattern of the antifungal substances produced by the antagonistic bacterium SJ-2. Arrow indicates the same fraction to the standard chemical. Solvent : 50% MeCN, Column: Bondapak RCM cartridge(0.8×10 cm), Flow rate : 1 ml/min, Detection : UV 207 nm.

*Pseudomonas pyrocinia*가 분비하는 pyrrolnitrin이 잘 알려져 있는데 pyrrolnitrin은 UV에 불안정하므로 안정성을 증가시켜 상품화하였으며 현재 phenylpyrroles로 사용되고 있다(12, 17).

환경과 보다 조화를 이루는 새로운 방제 방법에 대한 관심으로 여러 지역에서 토양을 채집하여 *R. solani*의 균핵 발아 및 생장을 억제하는 것 중의 하나의 길항세균(SJ-2)을 분리하였는데 이 균은 벼 도열병균(*P. oryzae*)을 포함한 여러 가지 곰팡이의 생육을 억제하였다(Table 2). 외국에서는 이와 유사한 특성을 보이는 *Bacillus subtilis* 균주로 현재 'Kodiak'(Gustafson/*B. subtilis*)으로 상품화하여 이용되고 있다(12, 18).

*B. subtilis* SJ-2는 AM1액체 배양을 통하여 항균 물질이 여러 병원균에 대한 항균 활성을 나타냈으나 난균강(Oomycetes)에 속하는 병원균에 대하여는 항균 활성이 낮게 나타났다(Table 3).

분리 정제된 항균물질은 polypeptide계의 항균 물질로 *B. subtilis*가 분비하는 항균 물질로 알려진 iturins로 동정되었는데, *B. subtilis* SJ-2는 HPLC 결과 7개 활성 물질로 구성되어 있었다(Figs. 6~7). Iturins은 열 및 산과 알칼리에 안정한 물질로 식물 병원 곰팡이 및 세균에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(10, 11, 13, 15, 16, 21). Iturins로 동정된 항균 물질은 벼 도열병균(*P. oryzae*)의 분생포자 발아억제 및 발아관의 팽대(swelling)와 벼 잎집무늬마름병균(*R. solani*) 균사의 용균현상이 관찰되었는데(Fig. 7), 이러한 결과는 Ferreira 등(8)이 *B. subtilis*가 포도나무 가지마름병(dieback)을 일으키는 *Eutypa lata* 자낭 포자의 발아를 억제하며 포자의 팽대(swelling) 및 포자 안에 액포



**Fig. 7.** Ungerminated, swollen conidia of *Pyricularia oryzae* and lysed hyphae of *Rhizoctonia solani* in the presence of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis* SJ-2. A : ungerminated, swollen conidia and germ tube of *P. oryzae* (arrows), B : lysed hyphae of *R. solani* (arrow).

(vacuoles)를 형성하게 하는 것을 관찰한 결과와 일치하였다.

## 요 약

벼 잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*)의 균핵에서 분리한 길항세균 SJ-2를 대치 배양 방법에 의해 벼 도열병균(*Pyricularia oryzae*)의 6종의 식물 병원균에 대한 억제 효과를 조사하였다. 형태 및 생리적 특성을 조사한 결과, 이 균은 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 이 균은 AM 1(antibiotic medium 1) 액체 배지에서 항균 물질을 분비하였으며, 배양 2일째 가장 항균 활성이 높았다. Butyl alcohol로 배양액에서 항균 물질을 추출하여 100 µg/ml의 농도로 조제한 감자 한천 배지에서 *P. oryzae*의 15개균에 대한 생육을 조사한 결과 *P. oryzae*, *R. solani*, *B. maydis*, *Cochliobolus sativus*에 대해서는 100% 생장을 억제하였으며, *C. miyabeanus*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium fulvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*에는 80% 이상의 억제 효과를 보인 반면 난균강에 속하는 병원균에 대한 효과는 낮게 나타났다. 활성물질을 분리 정제하여 동정한 결과 *B. subtilis*가 분비하는 항균 물질로 알려진 polypeptides계의 iturins로 밝혀졌다. 이러한 항균 물질은 벼 도열병균(*P. oryzae*)의 포자 발아 및 발아관의 팽대(swelling)를 야기했으며, 벼 잎집무늬마름병균(*R. solani*)에는 균사의 용균(lysis)현상을 일으켰다.

## 참고문헌

- Ames, B. N. 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204 : 587-593.
- Baker, C. J., Stavelly, J. R., Thomas, C. A., Sasser, M. and MacFall, J. S. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* 73 : 1148-1152.
- Becker, J. O. 1993. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pestic. Sci.* 37 : 355-363.
- Claus, D. and Berkeley, R. C. W. 1986. Genus *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, ed. by H. A. S. Peter, N. S. Mair, and E. Sharp, pp. 1105-1139. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Delp, C. J. 1988. *Fungicide resistance in North America*. APS Press, 133 pp.
- Debao, L. 1994. Biological control of plant diseases with *Bacillus* species. In: *Proc. of Int. Symp. on Biological Control of Plant Diseases*, pp. 75-85. Kor. Soc. of Plant Pathol.
- El-Goorani, M. A. and Hassanein, F. M. 1991. The effect of *Bacillus subtilis* on *in vitro* growth and pathogenicity of *Erwinia amylovora*. *J. Phytopathology* 133 : 134-138.
- Ferreira, J. H. S., Mathee, F. N. and Thomas, A. C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81 : 283-287.
- 藤田俊一. 1993. 農藥を 使用しないで 栽培した 場合の 病害蟲 等の 被害. *農藥春秋* 66 : 24-26.
- Gueldner, R. C., Reilly, C. C., Pusey, P. L. and Costello, C. E. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *Agric. Food Chem.* 36 : 366-370.
- Katz, E. and Demain, A. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41 : 449-474.
- Lange, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W., and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicides - the natural choice. *Pestic. Sci.* 39 : 155-160.
- McKeen, C. D., Reilly, C. C. and Pusey, P. L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76 : 136-139.
- Paulus, H. and Gray E. 1964. The biosynthesis of polymyxin B by growing cultures of *Bacillus polymyxa*. *J. Biological Chemistry* 239 : 865-871.
- Phae, C. G., Shoda, M. and Kubota, H. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J. Ferment. and Bioeng.* 69 : 1-7.
- Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M. and Ushiyama, K. 1992. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58 : 329-339.
- Powel, K. A. and Jutsum, A. R. 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic. Sci.* 37 : 315-321.
- Pusey, P. L., Hotchkiss, M. W., Dulmage, H. T., Baumgardner, R. A., Zehr, E. I., Reilly, C. C. and Wilson, C. L. 1988. Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis*(B-3) for postharvest control of peach brown rot. *Plant Dis.* 72 : 622-626.
- Rytter, J., Lukezic, F. L., Craig, R. and Moorman, G. W. 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 79 : 367-370.
- Staub, T. and Sozzi, D. 1984. Fungicide resistance :

- A continuing challenge. *Plant Dis.* 68 : 1026-1031.
21. Swinburne, T. R., Barr, J. G. and Brown, A. E. 1975. Production of antibiotics by *Bacillus subtilis* and their effect on fungal colonists of apple leaf scars. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65 : 211-217.
22. Turner, J. T. and Backman, P. A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 75 : 347-353.
23. Vesonder, R. F. and Golinski, P. 1989. Metabolites of *Fusarium*. In : *Fusarium-mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*, ed. by J. Chelkowski, pp. 1-39. Amsterdam, Elsevier.