

## 사과 부란병의 미생물학적 제어<sup>1)</sup>

박홍섭\* · 박진형\* · 안병렬\*\* · 한철주\*\*\* · 조정일\*\*\*

전남대학교 농과대학 원예학과\* · 농촌진흥청 농업경영관실\*\* · 조선이공대학 식품공업과\*\*\*

### Microbial Control of Canker in Apple

Park Heung-Sub\* · Park Jin-Hyung\* · Ahn Pyong-Ryol\*\* · Hahn Cheol-Joo\*\*\* · Cho Jung-Il\*\*\*

Dept. of Horticulture, Chonnam University Kwangju 500-757, Korea\*

Farm Management Bureau, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea\*\*

Dept. of Food Technology, Chosun College of Science and Technology, Kwangju 501-759, Korea\*\*\*

### SUMMARY

Three antagonistic bacterial strains against *Valsa ceratosperma*, one of the apple tree pathogens, were isolated from the nature and investigated. Out of the about 3,000 species of microorganisms which was isolated from the nature, the 3 strains designated as CH219, CH220 and CH245 were selected through the test of their antagonistic activity. The antagonists showed over 50% of antifungal activity against the growth of *Valsa ceratosperma* on PDA plates and, by the treatment of the culture broth and the heat-treated culture filtrate of it, showed over 95% of antifungal activity. When we tested on the medium which contained their culture filtrate or heat-treated culture filtrate, the antagonists strongly inhibited *Valsa ceratosperma*. In bioassay on the apple trees, the antagonists also showed their antifungal activity.

Keywords : Apple, *Valsa ceratosperma*, Antagonist, Biological control

1) 본 연구는 1996년도 농림수산부 특정연구과제(현장애로기술과제)의 연구비로 수행된 연구의 일부임.

## I. 서론

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

현재 국내외에서 이용되고 있는 미생물제제를 크게 분류하면, 발효·퇴비의 부숙 또는 사료 효율을 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 간접작용 등이 있으며, 실제적인 병해방제를 보면 이러한 메카니즘이 복합적으로 작용하여 생물학적 방제가 이루어지는 것으로 보고되고 있다.<sup>2)</sup> 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.<sup>3)</sup>

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.<sup>4)</sup>

본 연구는 사과에서 발생하는 부란병의 병원균을 분리 및 수집하고, 분리된 사과 부란병원균에 대해 길항력이 우수한 항균성 세균을 자연계로부터 분리하여 생물학적으로 부란병을 방제하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 부란병원균 분리 및 병원성 검정

사과 과실 저장 중 부란병 증상을 나타내는 과실을 수집하여 병환부로부터 병원균 포자를 분리하여 공시하였다. 사과 부란병 병반으로부터 푸른곰팡이를 분리하기 위하여 전남지방의 주요 사과재배단지를 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 병원균을 분리하였다.<sup>5)</sup> 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 습식처리후 이병조직을 70% ethanol 및 5% sodium hypochlorite(NaOCl)로서 표면살균하고 병원균 선택용 배지[potato dextrose agar(PDA) medium + streptomycine 200 $\mu$  l/ml, pH 3.0]에 병반 조직을 올려 놓고 25℃ 항온배양기에서 2~3일간 배양하여 균총(colony)을 형성시켜 병원균을 분리하였다(Fig. 1).

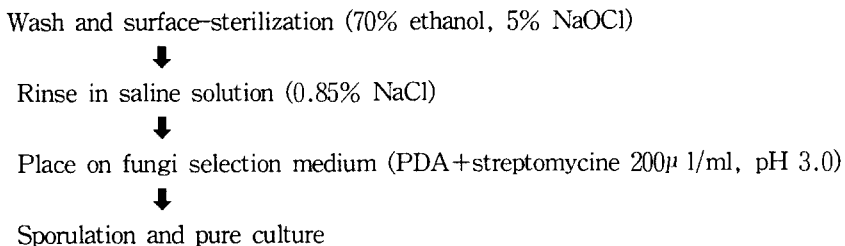


Fig. 1. Isolation of fungal apple pathogen from apple tree

## 2. 자연계로부터 유효미생물분리

자연계로부터 미생물을 분리하기 위하여, 사과 과실을 수집하고 그 표면을 살균수로 세척하여 그 세척한 액을 희석평판법에 의해 plate count agar(PCA)배지에 도말하고, 25℃에서 48시간 배양한 후 나타난 colony를 현미경하에서 검경하여 미생물을 분리한다. 또한 토양으로부터 미생물 분리를 위해, 지표로부터 5~20cm 토양을 채취하고 희석평판법 및 토양평판법을 이용하여 단일 균주를 분리한다. 길항미생물 분리방법<sup>5)</sup>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 정도 배양한 후 균주를 분리하여 사면배지에 보관하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하고 배양하여 단일 colony를 형성시켜 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

## 3. 곰팡이 배양방법

공시균주를 GPA 사면배지에서 28℃, 8일간 3회 연속 계대배양시켜 충분히 활성화 시킨 후 0.1% tween 80 용액 1ml와 멸균수 5ml를 가한 다음 충분히 진탕하여 포자를 씻어내어 포자현탁액을 조제한다.<sup>7)</sup> 여기에 적당량의 멸균수를 첨가하여 현미경으로 곰팡이 포자수를 10<sup>8</sup>~10<sup>7</sup>/ml로 조정하여 각 배지에서 0.5ml씩 접종한다.

#### 4. 길항균 살포에 의한 부란병 병원균의 억제효과

길항균을 살포하였을 때 부란병 병원균에 대한 길항력을 검토하기 위해, PDA배지에 *V. ceratosperma*를 접종하여 24시간 배양한 후 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 24시간 배양한 길항균을 0.5ml 살포하였다.<sup>8)</sup> 길항균이 살포된 *V. ceratosperma*를 25℃ 배양기에서 7일간 배양하여 길항균을 무처리한 대조구와 비교하였다.

#### 5. 길항균 배양액을 이용한 억제효과

길항균을 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 48시간 배양 한 후 균체를 제거하기 위하여 원심분리하여 상정액을 얻은 후 0.22 $\mu$ m nitrocellulose membrane filter(Micron Separations Inc.)에 통과시켜 무균처리하였다(Fig. 2). 길항균의 배양액을 이용하여 고체배지를 제조하고 곰팡이를 접종하여 곰팡이의 증식여부를 관찰한다.

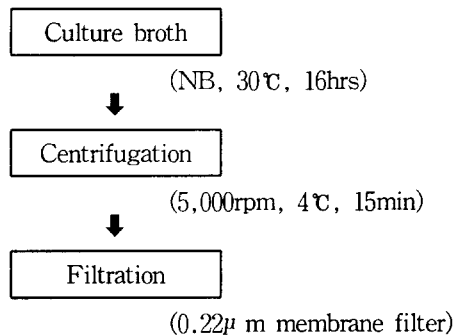


Fig. 2. Preparation of cell-free culture broth

#### 6. 열처리한 길항균 배양액이 부란병 병원균의 억제효과

열처리한 길항균 배양액이 부란병 병원균에 대한 길항력이 있는지를 확인하기 위해 먼저, 길항균을 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 24시간 배양한 후 균체를 제거하기 위해 원심분리(12,000rpm, 10min, 4℃)하여 상정액을 얻은 후 121℃(1.3기압)에서 15분간 고압멸균하였다. 부란병 곰팡이는 PDA배지에 24시간 배양한 후 배양된 *V. ceratosperma*에 열처리한 길항균 배양액 0.5ml를 직접 살포하여 곰팡이의 생육정도를 살펴보았다. 열처리한 길항균 배양액 배지는 PDA 배지에 증류수 대신에 길항균 배양액을 첨가하여 배지를 제조하였다. 부란병 병원균배양은 25℃ 배양기에서 7일간 배양하여 길항균을 무처리한 대조구와의 억제 정도를 비교하였다.

## 7. 풋트재배 사과에서 부란병 발병 억제 효과

사과나무의 생육이 왕성한 7월 3일에 사과의 30cm 지상부로부터 20cm 간격으로 주당 2지점(1년생, 2년생 가지)을 70% ethanol 및 5% sodium hypochlorite(NaOCl)로서 표면살균하고 멸균수로 깨끗이 닦아낸다. 멸균한 해부용 메스로 목질부에 상처를 내어서  $5 \times 10^4$ 개 병포자/ml의 부란병의 병원균 포자를 탈지면에 묻혀 사과나무가지의 상처부위에 처리하였다. 병포자 현탁액은 가로 3cm, 세로 2cm, 두께 0.2cm 크기의 탈지면을 담가 포자가 균일하게 흡수되게 한 후 상처를 낸 부위에 감고 그 위에 스킨테이프를 감아 고정하였다. 병원균을 접종한 식물체는 포화습실상에 48시간 처리후 노지에서 풋트재배하여 발병을 유인하였다. 사과나무의 양수분은 두상살수로 공급하였으며, 길항미생물 처리는 배양액을  $10^8$  cell/ml로 조제하여 병원균 처리전과 처리후에 7일 간격으로 엽면에 분무살포하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 자연계로부터 미생물의 분리

유효 길항미생물을 자연계로부터 분리하기 위하여 전국각지에서 수집된 시료를 실험방법에서와 같이 처리하여 단일 균주를 3,000여종 분리하였다. 분리된 미생물은 영양한천배지에 접종하여 colony를 형성시킨 후 냉장 보관하면서 병원균과의 길항력 실험에 사용하였다.

### 2. 푸른곰팡이 병원균 분리 및 수집

전남지방의 주요 사과단지인 영암군 신북면 갈곡리 평안농장을 현지 답사하면서 병징 및 표징별로 병반을 채집하여 사과의 병해인 부란병원균인 *Valsa ceratosperma*를 분리하였다. 또한 분리한 곰팡이는 사과에서 푸른곰팡이의 전형적인 병증을 보여줘 본 실험의 공시균으로 하였다.

### 3. 부란병균에 대한 길항미생물의 선발

전남 장성과 영암군의 사과 생산단지를 중심으로 토양이나 잎에서 분리한 미생물 2,500여종 가운데 사과 부란병 곰팡이에 대한 길항미생물을 선발한 결과는 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 보는 바와 같이 CH219는 사과 부란병원균에 대한 저지율이 60%로 가장 우수한 미생물인 것으로 나타났으며, 그 다음으로 CH220(57%), CH245(54%), CH242(28%)순서로 길항력이 좋았다. 본 연구에서 분리한 길항미생물 중 CH219, CH220, CH245에 대하여 길항균의 배양산물이 길항력이 있는지 혹은 열에 강한 물질인지를 알아보았다. 분리한 길항균이 다른 곰팡이나 식물병원균에 대하여도 길항력이 있을 것으로 생각된다.

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

Pathogen \ Isolated microorganisms	CH242	CH219	CH245	CH220
<i>Valsa ceratosperma</i>	28	60	54	57

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

NT : colony diameter of no treatment(mm)

T : colony diameter of treatment(mm)

#### 4. 길항균 살포에 의한 부란곰팡이의 억제효과

길항균을 살포하였을 때 부란곰팡이에 대한 길항력을 검토하기 위해, PDA배지에 *V. ceratosperma*를 접종하여 24시간 배양한 후 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 24시간 배양한 길항균을 0.5ml 살포하였다. 길항균이 살포된 *V. ceratosperma*를 25°C 배양기에서 7일간 배양하여 길항균을 무처리한 대조구와 비교하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 부란병원균에 본 연구에서 분리한 길항균 CH219, CH220, CH245의 배양액을 살포하여 25°C에서 일주일간 배양하였을 때 부란병 병원균인 *V. ceratosperma*의 생육이 95%이상 억제되었다. 따라서 본 연구에서 분리한 길항균을 이용하여 사과 가지에서 발생하는 부란병을 방지 할 수 있을 것으로 기대된다.

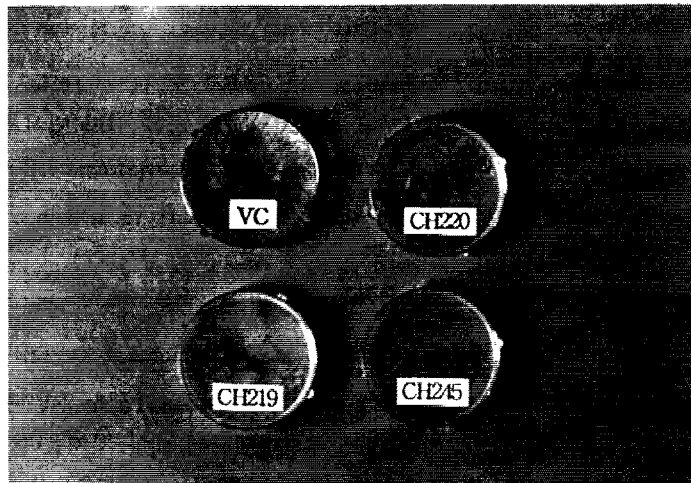


Fig.3. Growth inhibition of *Valsa ceratosperma* by antagonistic bacteria. *V. ceratosperma* were grown on PDA at 24hrs and treated by antagonist, isolated antagonist CH219, CH220, CH245.

### 5. 열처리 길항균 배양액을 이용한 억제효과

분리한 길항균 CH219, CH220, CH245를 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 48시간 배양한 후 균체를 제거하기 위하여 원심분리하여 상정액을 얻은 후 121℃(1.3기압)에서 15분간 고압습열멸균하였다. 부란병 곰팡이는 PDA배지에 24시간 배양한 후 배양된 *V. ceratosperma*에 열처리한 길항균 배양액 0.5ml을 직접 살포하여 곰팡이의 생육정도를 살펴보았다(Fig.4). Fig.4에서 보는 바와 같이 3가지 길항균 모두 부란병 곰팡이에 대하여 거의 95%이상 억제하여 길항균이 분비하는 길항물질이 121℃(1.3기압)에서 15분간 고압습열멸균처리 하여도 길항력이 인정되었다.

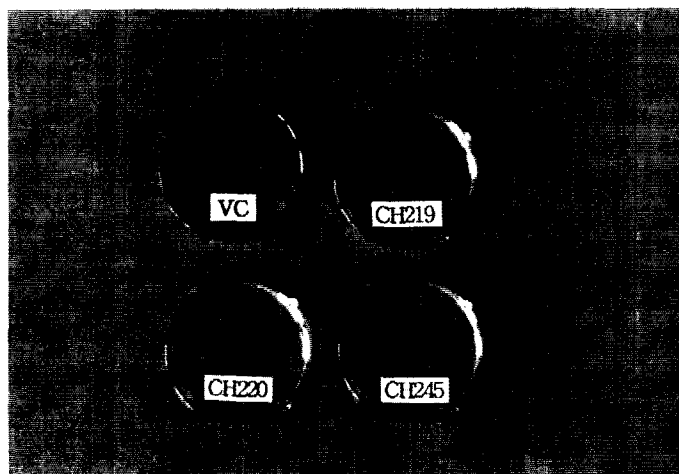


Fig.4. Growth inhibition of *Valsa ceratosperma* by heat treat culture broth of antagonistic bacteria. *V. ceratosperma* were grown on PDA at 25℃ for 24hrs and treated by heat treat(121℃, 15min) culture broth of antagonist, CH219, CH220, CH245.

### 6. 길항균 배양액이 부란병 곰팡이의 억제효과

길항균을 완전영양배지(nutrient broth; NB)에서 배양한 후 균체를 원심분리법으로 제거하고 상정액을 열처리(121℃, 1.3기압, 15분) 하거나 배양액을 여과(0.22μm nitrocellulose membrane filter)하여 이 두가지 배양액을 이용하여 NA배지에 증류수 대신에 첨가하여 고체배지를 만들어 부란병원균인 *V. ceratosperma*를 접종하였다. Fig. 5는 부란병원균을 접종하여 25℃에서 7일간 배양한 결과이다. 실험에서 분리한 3가지 길항균 모두 비슷한 길항력을 나타냈으며, 열처리한 것과 열처리 안한 것과의 길항력의 차이는 비슷하여 길항균이 분비하는 길항물질이 어느 정도 열 안정성이 있는 것으로 생각된다. 따라서 길항균이 분비하는 길항물질을 분리 정제하여 길항물질 본체를 구명하는 연구가 필요하다고 생각된다.

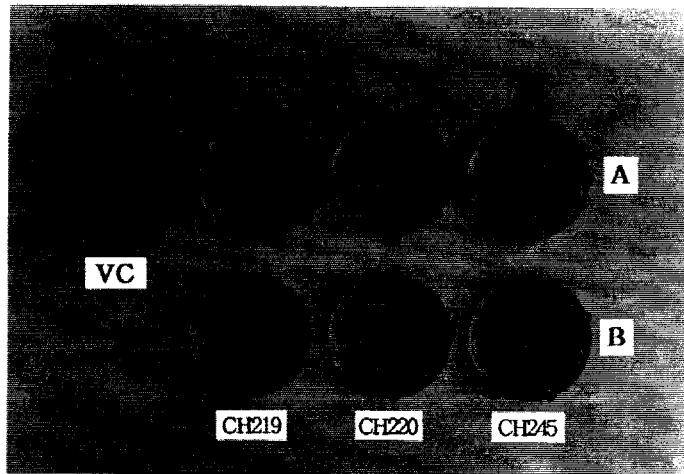


Fig. 5. Growth inhibition of *Valsa ceratosperma* by heat treat culture broth of antagonistic bacteria. *V. ceratosperma* were grown on PDA at 25°C for 24hrs and treated by heat treat(121°C, 15min) culture broth of antagonist, CH219, CH220, CH245.

### 7. 풋트 재배 사과에서 분리 길항균을 이용한 부란병 방제 효과

사과나무의 생육이 왕성한 7월 3일에 사과의 30cm 지상부로부터 20cm 간격으로 주당 2지점(1년생, 2년생)을 멸균수로 깨끗이 닦아내고, 멸균한 해부용 메스로 목질부에 상처를 내어서 병포자를 처리하였다. *Valsa ceratosperma*(부란병균)을 접종한 식물체는 포화습실상에 48시간 처리 후 노지에 풋트를 두어 발병을 유인하였다. 길항균 처리는 방법은 병원균 처리전과 병원균 처리 후에 길항균을 7일간격으로 엽면살포하였다.

Fig. 6에서보는 바와같이 *Valsa ceratosperma*(부란병균)만 처리한 대조구에서는 사과나무줄기에 병반이 발생 고사되었으나 본 연구에서 분리한 길항균 CH219, CH220을 처리한 사과나무에서는 병이 발생되지 않았다. 따라서 본 연구에서 분리한 길항미생물을 이용하여 부란병의 방제가 가능하였다.



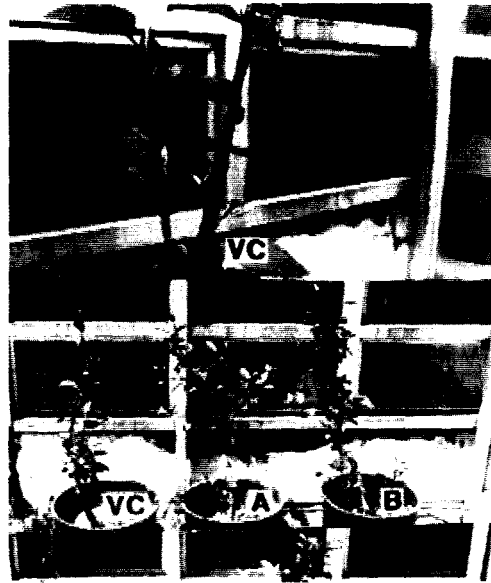


Fig.6. *In vivo* suppressive effect by culture broth of isolated antagonist, CH219(A), CH220(B), against pathogenic *Valsa ceratosperma*(VC).

#### IV. 摘 要

사과나무 가지에 발생하는 부란병 곰팡이, *Valsa ceratosperma*에 대한 길항미생물을 찾기 위하여 자연계로부터 미생물을 분리하여 길항력이 우수한 미생물을 선발하고자 하였다. 자연계로부터 분리한 3,000여종의 미생물 중에서 부란병원균에 대하여 길항력이 우수한 미생물을 1차 선발하였으며, 이중에서 길항능력이 뛰어난 CH219, CH220, CH245의 3종류의 미생물을 최종적으로 선발하였다. 분리한 길항균 CH219, CH220, CH245는 부란병에 대한 50%이상의 높은 생장억제력을 보였으며, 한천배지에서 *Valsa ceratosperma* 접종 후 길항균처리와 열처리한 길항균 배양액을 처리하였을 때 95%이상의 길항력을 보여주었다. 또한 길항균 배양액 여과와 열처리하여 고체배지를 만들었을 때에도 높은 길항력을 보여주었다. 분리한 길항균을 이용한 사과나무 접종 실험에서도 부란병원균에 대한 길항력을 보여 주었다.

주요어 : 사과나무, 길항미생물, *Valsa ceratosperma*, CH219, CH220, CH245

## 參考文獻

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., Szejiberg, 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 fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69:pp.480-482.
5. Wisniewski, M. E., and Wilson, C. L. 1992. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: Recent advances. Hortscience 27:94-98.
6. Wilson, C. L., and Wisniewski, M, E. 1989. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: an emerging technology. Annu. Rev. Phytopathol. 27:425-441.
7. Gullino, M. L., 1992. Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. In Biological control of plant Diseases, Plenum press, NY. pp.125-132.
8. Janisiewicz, W. J. 1994. Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. Appl. Environ. Microbiol. 60:2671-2676.