

토마토시들음병의 생물학적 방제를 위한 토착길항세균 *Bacillus thuringiensis* BK4의 선발과 길항기작

정희경 · 김진락 · 김보금 · 유대식¹ · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과, ¹계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Selection and Antagonistic Mechanism of *Bacillus thuringiensis* BK4 against Fusarium Wilt Disease of Tomato. Jung, Hee-Kyoung, Jin-Rack Kim, Bo-Kum Kim, Tae-Shik Yu¹, and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea. ¹Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 701-704, Korea – In order to select an antifungal substance-producing antagonistic bacterium against *Fusarium oxysporum* causing fusarium wilt on tomato, strain BK4 was isolated from local soil of Gyeongbuk and was identified as *Bacillus thuringiensis* by 16S rDNA analysis, biochemical test, and Mcirolog TM 3.0 System. The antibiotic of *B. thuringiensis* BK 4 was highly produced at 30°C in nutrient broth (pH 9.0). The crude antibiotic was even stable at 121°C and more stable at slight alkalic condition than acid condition. It was also remained 50% activity at pH 3.0. *B. thuringiensis* BK4 showed the inhibition of spore germination and the biocontrol ability against *F. oxysporum* causing fusarium wilt of tomato *in vivo* test. According to these results, *B. thuringiensis* BK4 was enough to use with a microbial agent for biocontrol against fusarium wilt.

Key words: Biocontrol, antifungal antibiotic, *Fusarium oxysporum*, *Bacillus thuringiensis*

국민소득 향상과 웰빙식품 소비증가에 따라 국내의 토마토 소비량이 계속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 토마토의 작형은 다양화 되었고 토마토 재배면적과 생산량도 계속 증가 하고 있는 추세에 있다. 특히, 경북지역의 토마토 재배면적은 전남, 경남, 충남 다음으로 넓으나 환경관리가 미흡하여 병충해 피해가 많고 농약의 안전사용 기준을 준수하지 않아 농약잔류에 대한 인체독성으로 인한 소비자 보호 문제가 제기되고 있다. 경북지역 토마토 재배지역에서 발생하는 주요 병해충으로는 시들음병(위조병), 잎곰팡이병, 갯빛곰팡이병, 역병, 윤문병 등이 있으며, 이들 중에서 특히 토마토시들음병은 시설재배의 연작장해로 인한 토마토의 대표적인 토양전염성 병해로 그 원인균은 *Fusarium oxysporum* 이다[12]. *Fusarium* 속 들은 토마토시들음병 이외에도 많은 경제작물에게 병을 일으키는 것으로 알려져 왔으며, 이를 생물학적으로 방제하려는 시도도 있었다. 김 등은 *Fusarium* 속의 세포벽에 대한 가수분해 효소를 생산하는 길항미생물을 이용한 생물학적 방제를 시도했으며[1, 8, 10], 이외에도 *Pseudomonas fluorescens* WCS374를 이용하여 무 품종의 시들음병인 *Fusarium*속에 대한 저항성을 증가시켜 방제효과를 조사하기도 하였다[9]. 그 외에도 오이 덩굴쪼김병균 *Fusarium oxysporum* 대한 방제를 위해서 무기성분과 2종의

길항균으로 구성된 토양첨가제에 의한 생물학적 방제법 시도도 있었으며[2], siderophore 또는 항생물질 생산성 길항미생물을 이용하는 방법도[4, 5, 7] 있었다. 그러나 토마토시들음병균인 *F. oxysporum*에 대한 생물학적 방제는 교차방어에 사용할 비병원성 *Fusarium* 속을 분리한 보고[13] 외에는 토마토 시들음병의 발병율과 피해에 비하여 생물학적 방제의 연구가 부진하다.

따라서 본 연구에서는 발병된 후에는 방제법이 사실상 없는 토마토시들음병의 예방 및 방제를 위해 토마토시들음병의 원인균인 *F. oxysporum*을 강력히 길항하는 지역의 토착 길항미생물 *Bacillus thuringiensis* BK4를 분리하고 미생물 농약의 산업화 자원으로 활용 가능성을 조사하여 이를 보고하는 바이다. 추후 *B. thuringiensis* BK4의 살충성 결정단백의 생산성을 확인하여 살균성 및 살충성의 겸용의 미생물 제제화 가능성을 타진하고자 한다.

재료 및 방법

토착길항미생물의 분리 및 선발

경북 지역의 저병해 경작지에서 분리된 균주 중 *F. oxysporum*에 대하여 강력한 길항능을 가지는 균주를 선발하기 위하여 Potato dextrose agar(PDA) 배지 중간에 직경 15 mm disc 모양의 *F. oxysporum*를 접종하고 이로부터 3 cm 떨어진 곳에 분리된 균주들을 접종하여 28°C에서 4일간 배양한 후 *F. oxysporum*의 생육이 억제된 거리를 측정하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-53-810-2395, Fax: 82-53-810-4663

E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

길항균주를 field에 적용 후 균주의 monitoring하기 위하여 일반균주와 다른 항생물질에 내성을 가지는 균주를 선발하고자 하였으며, 길항균주들의 항생물질에 대한 내성 조사는 ampicillin(50 µg/ml), tetracycline(10 µg/ml), chloramphenicol (50µg/ml), kanamycin(10µg/ml) 등을 첨가한 Nutrient agar에 획선을 그어 접종하고 30°C에서 배양시키면서 생육 유무를 관찰하였다. 또한 광범위한 pH 범위에서 생육이 가능한 길항세균들을 선발하기 위하여 pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 9.0, pH 10.0으로 적정한 Nutrient broth에 길항세균을 접종하고 24시간 배양 후 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 길항균주들의 생육정도를 조사하였다.

토착길항미생물의 동정

토착길항미생물의 분류학적 동정은 형태와 생화학적 성상 검사를 바탕으로 primer 8F(5'-AGT TGA TCC CTC AG-3')와 1492R(5'-ACC TTG TTA CGA CTT-3')을 이용하여 PCR로 증폭된 길항균주의 16S rDNA의 analysis 및 Biolog사의 동정시스템(MicroLogTM3.0)을 이용하여 동정하였고 이들의 모든 결과를 바탕으로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[3] 색인을 이용하여 최종 동정하였다.

길항균주의 항생물질 생산성 조사

항생물질과 같은 저분자 길항물질을 생산하는 토착길항균주의 선발을 위해 선발된 길항세균을 Nutrient broth에 접종하고 3일간 진탕배양한 후 길항세균의 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 길항세균 원침상등액을 회수하고 Amicon® Centriprep(MW 10,000)을 이용하여 길항세균의 원침상등액으로부터 저분자물질만을 수집한 후 80°C에서 30분간 열처리하거나 동량의 butanol을 첨가하여 15분간 교반하여 추출한 후 잔존활성을 대상 균주에 대한 균체량 측정법(cell mass test)으로 측정하였다[6]. 즉, 45 ml Potato dextrose broth에 세균여과필터(0.2 µm)로 잔존 세균을 제거한 길항세균 저분자 원침상등액 또는 열처리된 저분자 원침상등액을 5 ml와 10 mm disc 크기의 *F. oxysporum*을 접종하고 28°C에서 3일간 진탕배양 하였다. 배양액을 Whatman paper No2.에 여과하고 80°C에서 건조한 후 중량을 측정하였다. 이때 대조구는 길항물질 원침상등액 대신 멸균 증류수를 5 ml 첨가하여 *F. oxysporum*을 배양 한 것으로 하였다.

토마토시들음병균 생육을 길항하는 항생물질 생산성 조사

배양온도에 따른 길항균주의 생육과 항생물질의 생산성을 조사하기 위해 선발된 길항균주를 Nutrient broth에 접종하고 30°C에서 하루 동안 배양 후 이를 전배양액으로 하여 50 ml Nutrient broth에 각각 0.1% 농도가 되게 접종하고 10°C~50°C 온도 범위에서 3일간 배양 후 길항균주의 생육

은 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였으며, *F. oxysporum*에 대한 항진균 활성은 길항균주 배양액의 원침상등액을 회수하여 균체량 측정법으로 조사하였다. pH에 따른 길항균주의 항생물질 생산성과 생육은 5 N NaOH와 5 N HCl을 이용하여 pH 4.0~11.0의 범위로 적정된 Nutrient broth에 길항균주의 전배양액을 0.1%되게 접종하여 3일간 키운 후 위의 방법과 같이 길항균주의 생육과 항생물질 생산성을 조사하였다.

길항균주가 생산하는 항생물질의 열, pH 안정성 조사

길항균주가 생산하는 항생물질이 열과 pH 처리에 대한 안정성이 어떠한가를 조사하기 위하여 길항균주의 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 원침상등액을 회수하고 이를 40°C~100°C까지 30분간, 121°C에서는 15분간 열처리 후 *F. oxysporum*에 대한 잔존 항진균활성을 균체량 측정법으로 조사하였다. 또한 pH에 대한 항생물질의 안전성은 5 N NaOH 또는 5 N HCl을 이용하여 pH 3.0~12.0로 적정한 길항균주의 배양액을 4°C에서 24시간 방치 후 잔존 항진균활성을 균체량측정법으로 조사하였다.

길항미생물의 in vivo 방제력 검증

선발된 토착길항미생물의 in vivo 검증은 토마토를 기주식물로 하여 조사하였다. 우선 토마토 육묘를 pot(20 cm × 10 cm × 10 cm)에 121°C, 20분간 멸균된 실험토양(발효 : 모래 : 퇴비 = 2 : 1 : 1)을 사용하여 심고 28°C, 70% 습도를 유지한 항온 항습실에서 12시간 주기로 광을 조사하여 시험식물인 토마토의 뿌리를 정착시키고 토마토의 생육이 비슷한 것만을 선별하여 실험에 이용하였다. *F. oxysporum* 포자는 PDB에 *F. oxysporum*를 접종하고 28°C 배양실에서 5일간 진탕배양 후 배양액을 8겹의 거즈로 여과하여 회수하였으며, 이를 관주 접종한 후 1일간 습실(28°C, 습도 70%) 처리하고 여기에 선발된 방제균을 6.0×10⁶ CFU/ml의 균수로 5 ml 처리하여 하루 동안 더 습실 배양하였다. 이를 28°C, 70% 항온항습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인하였으며, 이때 대조구로 방제균만을 처리하거나 무처리한 pot와 비교하여 토마토시들음병의 발병억제력을 확인하였다.

결과 및 고찰

식물병원성 진균에 대한 길항미생물의 선발

*F. oxysporum*과 경북 지역의 저병해 경작지에서 분리된 균주들을 대치 배양한 결과, 토마토시들음병균인 *F. oxysporum*에 길항능을 나타내는 균주 19종을 분리할 수 있었으며, 이들을 field에 적용 후 항생제 내성을 이용하여 monitoring하고자 분리한 균주 19종을 대상으로 항생제 내성을 조사한 결과, BK18을 제외하고 모든 길항균주들이 ampicillin(50 µg/ml), tetracycline(10 µg/ml), chloramphenicol

Table 1. Selected indigenous antagonistic microorganisms against *F. oxysporum* and their resistances against several antibiotics.

Strain	Inhibition rate (%)		Resistance against antibiotics ¹⁾		
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ampicillin	Tetracycline	Kanamycin	Chloram phenicol
BK1	42	-	+	-	-
BK3A	42	-	+	-	+
BK3B	31	-	+	-	+
BK4	56	+	+	-	+
BK5	29	+	+	-	+
BK6	10	-	+	-	+
BK9	35	+	+	-	+
BK11	20	-	+	-	+
BK18	33	-	-	-	-
BK18A	36	+	+	+	+
BK18B	33	+	+	+	+
BK22A	24	+	+	+	-
BK22B	36	+	-	+	+
BK27	23	-	+	+	+
BK321	45	+	+	+	-
BK322	15	+	-	-	-
BKE	6	+	+	+	+
BKK11	37	-	+	-	-

1) +; resistance, -; susceptibility.

(50 µg/ml), kanamycin(10 µg/ml) 중 적어도 한개 이상의 항생제에 대하여 저항성을 가지고 있었다(Table 1). 이들을 대상으로 환경적응력이 강한 길항미생물을 다시 선발하고자 pH 4.0, pH 5.0, pH 7.0, pH 9.0, pH 10.0 등에서 길항균주들의 생육 정도를 조사하고 그 결과를 바탕으로 pH 4.0과 pH 10.0에서도 전혀 생육 감소를 보이지 않는 길항세균 BK321과 pH 4.0에서 다소 생육이 부진하나 비교적 pH 생육 범위가 넓은 길항세균 BK4, BK5를 선발하였다(Fig. 1).

토마토 시들음병균 생육을 길항하는 항생물질 생산성 조사
 선발된 길항균주 BK5, BK4, BK321를 대상으로 토마토 시들음병의 원인균인 *F. oxysporum*에 대한 길항기작으로 항진균성 항생물질의 생산성을 조사한 결과, 길항균주 BK4

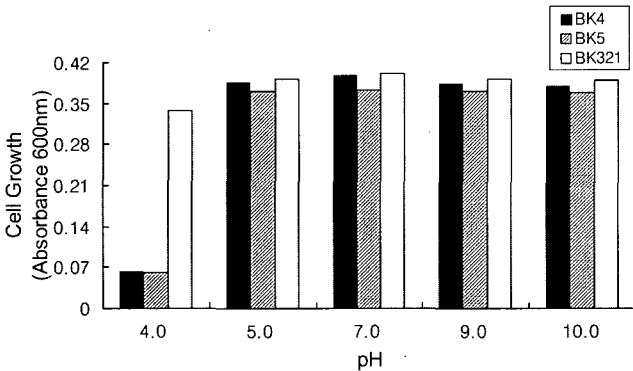


Fig. 1. Cell growth of the antibiotic-producing antagonistic bacteria on various pH value.

의 저분자 원침상등액은 80°C에서 30분간 열처리 후에도 항진균활성의 변화가 거의 없었으며, 부탄을 전이시에도 항진균활성이 유지되는 것으로 보아 길항균주 BK4의 *F. oxysporum* 길항기작은 저분자 항진균성 항생물질에 의한 것임을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 2). 그러나 길항균주 BK321와 BK5의 *F. oxysporum* 길항기작은 그들의 원침상등액을 열처리시에 잔존활성이 실활되는 것으로 보아 항생물질 생산성이 아닌 다른 길항기작에 의한 것임을 알 수 있었다(Table 2). 선발된 3개의 길항세균 BK4, BK321, BK5 중 길항세균의 생육범위와 길항기작에 대한 결과를 종합적으로 검토하여 바탕으로 환경적응력이 우수하며, 안정성이 강한 항생물질만을 생산하는 BK4를 최종 선발하였다. 따라서 선발된 균주로부터 항진균성 항생물질을 정제하여 생물농약으로 활용하거나 아니면 길항균주 BK4 그 자체를 미생물제제로 제조해서 활용할 수 있을 것으로 생각되어 진다.

Table 2. Production of the antifungal antibiotics by antagonistic bacterium BK4 and BK5.

Strain	Test	Inhibition rate (%)
BK4	Heat treatment ¹⁾	42
	No treatment	51
BK5	Heat treatment	2
	No treatment	20
BK321	Heat treatment	1
	No treatment	18

1) Heat treatment: for 30 min at 80°C.

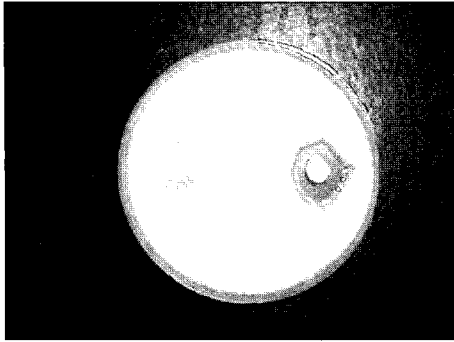


Fig. 2. Inhibition of spore germination of *F. oxysporum* by n-butanol extract from culture broth of the antagonistic bacterium BK4. Left: Control (n-butanol), Right: Extract from culture broth of antagonistic bacterium BK4 with n-butanol.

토착길항균주 BK4의 동정

길항균주 BK4의 genomic DNA로부터 약 1.5 kb 크기의 16S rDNA를 PCR 증폭하여 pGEMT Easy vector(Proemega)에 ligation 후 *E. coli* DH5α에 transformation 하고 이를 plasmid 정제하여 SP6 promoter primer와 T7 promoter primer를 이용하여 각각 sequencing 후 Blast search 한 결과, 본 균주는 *Bacillus thuringiensis*의 16srDNA와 97% 상동성을 보였으며, 최종적으로 생화학적 검사와 Biolog 동정 시스템(Micorolog™ 4.0)을 이용하여 *Bacillus thuringiensis* BK4로 동정하였다.

배양 온도와 pH에 따른 항생물질 생산 조건

B. thuringiensis BK4의 배양온도와 pH에 따른 균주 생육과 항생물질 생산성을 조사한 결과, *B. thuringiensis* BK4는 20°C에서 가장 잘 생육하였으나 항생물질은 오히려 30°C에서 그 생산능이 우수하였다(Fig. 3). 40°C 이상에서 본 길항세균은 생육이 급격히 감소하였다. pH에 따른 길항균주의 항생물질 생산은 pH 9.0에서 가장 우수하였으며 산성쪽보다는 알칼리쪽으로 갈수록 그 활성이 증가하였다(Fig. 4). 토

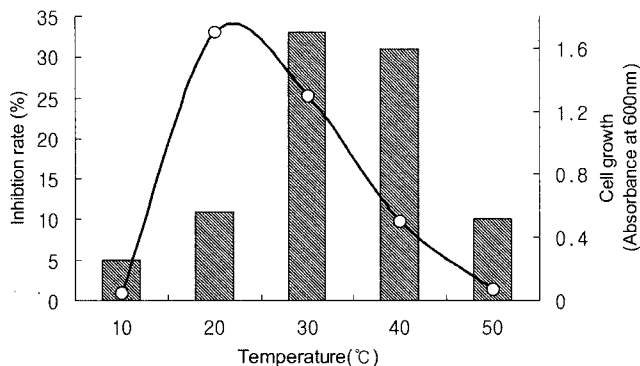


Fig. 3. Temperature effect on the cell growth and antifungal activity of *B. thuringiensis* BK4. -○- : Cell growth, ▨ : Inhibition rate.

마토는 아열대성식물로서 생육적온은 25-27°C이므로 본 길항미생물을 경작지 토양에 관주처리시에 *B. thuringiensis* BK4는 충분히 생육하여 토마토 시들음병에 대한 방제능을 나타 낼 것이라 생각된다. 또한 항생물질 생산능이 알칼리 쪽에서 더 우수함을 이용하여, 알칼리성 농자재와 *B. thuringiensis* BK4를 병용처리하여 산성화된 토양을 개량하여 병원균의 생육을 억제시키는 동시에 *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항생물질에 의하여 토마토 시들음병에 대한 방제 효율을 높일 수 있을 것이다.

항진균성 항생물질의 열, pH 안정성 조사

B. thuringiensis BK4가 생산하는 항생물질을 40°C~100°C까지 30분간, 121°C에서는 15분간 열처리 후 항생물질의 잔존 활성을 조사 해 본 결과, 121°C에서 본 항생물질을 열처리하여도 40°C에서 활성의 80%가 잔존하고 있어 상당히 열에 안정한 항생물질임을 알 수 있었다(Fig. 5). 또한 본 항생물질을 pH 3.0~12.0의 범위에서 활성의 변화를 조사한 결과, pH 8에서 가장 안정적이었으며, 산성보다는 알칼리성에서 다소 더 안정적이었다. 특히 pH 3.0에서는 pH 8.0과 비교하여 50% 이상의 잔존 활성을 가지고 있었으며 pH 12.0

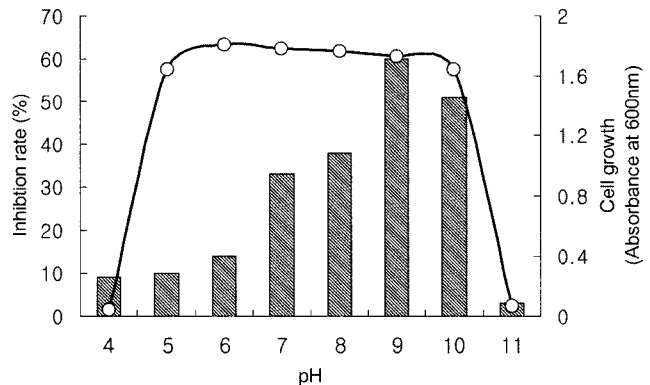


Fig. 4. pH effect on the cell growth and antifungal activity of *B. thuringiensis* BK4. -○- : Cell growth, ▨ : Inhibition rate.

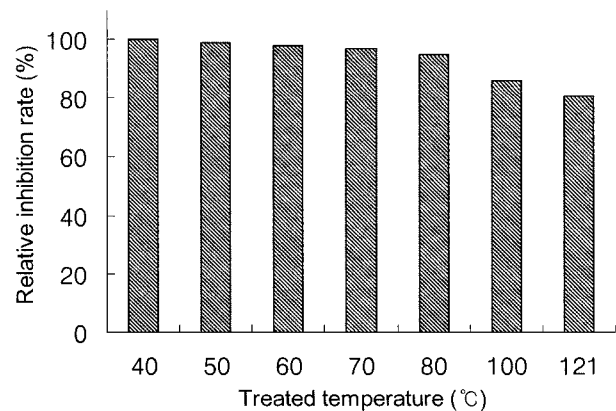


Fig. 5. Thermal stability of the antifungal antibiotic produced from *B. thuringiensis* BK4.

에서도 활성의 소실이 거의 없었다(Fig. 6). 식물병원균의 방제용 미생물제제 개발을 위해 연구되어진 항생물질 생산성 길항미생물의 항생물질 안정성을 비교 해 본 결과, *B. thuringiensis* BK4는 pH 및 온도에 대한 충분한 안전성을 가지고 있어 생물농약용 미생물제제화에 효과적으로 이용할 수 있을 것이다[6].

Pot 실험을 통한 식물질병에 대한 방제력 검증

선발된 길항균주의 실제 토양내의 식물병 방제력을 효과적으로 발휘하는지 여부를 검증하기 위하여 토마토를 대상 기주식물로 식물방제실험을 3회 반복하여 실시하였으며, 28°C, 습도 70%, 12시간주기의 광처리를 유지하는 항온항습이 가능한 식물배양실에서 토마토가 이식되어 있는 pot에 토마토시들음병인 *F. oxysporum*을 관주접종하고 1일간 습실(28°C, 습도 70%) 처리 후 여기에 길항방제균 *B. thuringiensis* BK4을 처리하여 발병억제 효과를 확인해 본 결과 Fig. 7에서 보는 것처럼 *B. thuringiensis* BK4는 *in vitro*에서만 아니라 *in vivo*에서도 *F. oxysporum*에 의한 토마토시들음병을 충분히 방제 할 수 있음을 확인하였다. 따라서 시설재배든 노지재배든 토마토 경작에 이용될 우수한 시들음병 방제용 미생물제제의 개발이 가능하게 되었다고 생각된다. 또 추후 살충성 결정단백의 생산이 확인되면 살충 및 살균의 병용 미생물제제 개발이 될 것으로 생각되어 진다.

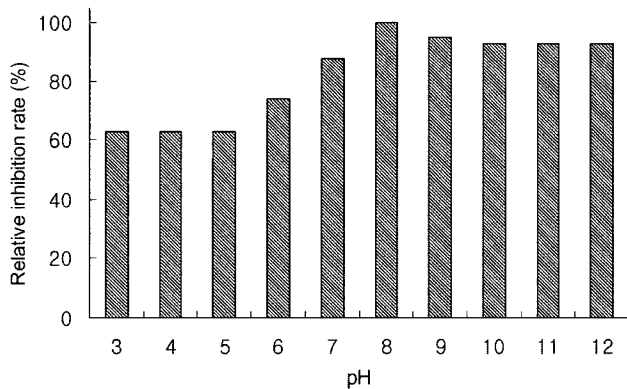


Fig. 6. pH stability of the antifungal antibiotic produced from *B. thuringiensis* BK4.



Fig. 7. *In vivo* antifungal activity of *B. thuringiensis* BK4 on the growth of the tomato infected by *F. oxysporum*. Left: only *F. oxysporum* (Fusarium wilt by *F. oxysporum*), Right: *F. oxysporum* and *B. thuringiensis* BK4.

요 약

토마토시들음병의 원인균인 *Fusarium oxysporum*의 생물학적 방제를 위해 경북지역의 저병해경작지로부터 항진균성 항생물질 생산성 길항미생물인 BK4 균주를 선발하였으며, 길항균주 BK4의 16s rDNA 분석 및 생화학적 특성 조사 후 최종적으로 Biolog사 동정시스템인 MicroLog™ 3.0을 이용하여 선발 길항균주 BK4를 *Bacillus thuringiensis* BK4로 동정하였다. *B. thuringiensis* BK4는 pH 9.0로 적정한 Nutrient broth를 이용하여 30°C에서 배양할 경우 항생물질의 생산은 최대였다. *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항생물질은 121°C에서 열처리시에도 80% 잔존활성을 유지한 내열성 항생물질이었으며, pH 3.0~12.0의 범위에서 활성의 변화를 조사한 결과 산성보다는 알칼리성에서 다소 안정적이었으나 pH 3.0에서도 50% 이상의 잔존 활성을 가지고 있다. *B. thuringiensis* BK4는 *F. oxysporum*에 의한 토마토시들음병에 대하여 *in vivo* pot상에서도 충분한 방제력을 나타내었으므로 토마토시들음병을 위시한 *Fusarium*속 균주가 원인이 되는 질병을 방제할 수 있는 미생물제제의 개발이 가능하게 되었다.

감사의 글

본 연구는 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터(TMR 센터, 과제번호 RRC02407)의 연구비지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Chung, B. K. and K. S. Hong. 1991. Biological control with *Streptomyces* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum and *Phytophthora nicotianae* var. parasitica causing sesame wilt and blight. *The Kor. J. Mycol.* **19**: 231-238.
2. Chung, B. K. and N. Y. Ryou. 1996. Effect of a soil amendment for controlling fusarium wilt of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. *The Kor. J. Mycol.* **24**: 93-104.
3. Holt, J. G., N. R. Krieg, H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th, Williams & Wilkins, U.S.A.
4. Jung, H. K. and S. D. Kim. 2004. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 312-316.
5. Kang, S. C., Y. G. Bark, D. G. Lee, and Y. H. Kim. 1996. Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria solani*. *The Kor. J. Mycol.* **24**: 49-55.
6. Kim, Y. S. and S. D. Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus*

- subtilis* YB-70 as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 296-304.
7. Lee, E. J., K. S. Kim, S. H. Hong, and J. H. Ha. 1995. The mechanism of biological control of *Pseudomonas* spp. against *Fusarium solani* causing plant root - rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 91-98.
 8. Lee, E. T. and S. D. Kim. 1999. Isolation and antifungal activity of the chitinase producing bacterium *Serratia* sp. 3095 as antagonistic bacterium against *Fusarium* sp. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**: 181-187.
 9. Lee, M. W. 1997. Root colonization by beneficial *Pseudomonas* spp. and bioassay of suppression of fusarium wilt of radish. *The Kor. J. Mycol.* **25**: 10-20.
 10. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1995. The role and characterization of *B* -1,3-glucanase in biocontrol of *Fusarium solani* by *Pseudomonas stutzeri* YPL-1. *Kor. J. Microbiol.* **33**: 295-301.
 11. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1994. The Production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 134-140.
 12. Nam, K. W. 1994. Developmental ecology and control of fusarium wilt in Tomato. *Kor. Res. Soc. Protected Hort.* **7**: 56-76.
 13. Ruo, S. J., M. S. Lee, Y. T. Kim, H. K. Kim, and J. S. Park. 1993. Selection of non-pathogen *Fusarium oxysporum* for biocontrol against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *KSM Newsletter* **5**: 31.

(Received Jul. 5, 2005/Accepted Sep. 15, 2005)