

## *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주를 이용한 마늘 흑색썩음균핵병의 생물학적 방제

한광섭<sup>1\*</sup> · 김병련<sup>1</sup> · 김종태<sup>1</sup> · 함수상<sup>1</sup> · 흥기흥<sup>1</sup> · 정창국<sup>2</sup> · 남윤규<sup>1</sup> · 유승현<sup>3</sup> · 최재을<sup>3</sup>

<sup>1</sup>충청남도농업기술원, <sup>2</sup>한국삼공(주) 생산본부, <sup>3</sup>충남대학교 응용생물학과

### Biological Control of White Rot in Garlic Using *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4

Kwang Seop Han<sup>1</sup>, Buyng Ryun Kim<sup>1</sup>, Jong Tae Kim<sup>1</sup>, Soo Sang Hahm<sup>1</sup>, Ki Heung Hong<sup>1</sup>, Chang Kook Chung<sup>2</sup>, Yun Gyu Nam<sup>1</sup>, Seung Hun Yu<sup>3</sup> and Jae Eul Choi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Chungcheongnam-do Agricultural Research and Extension Services, Yesan 340-861, Korea

<sup>2</sup>Production Department, Hankook Samgong Co. Ltd., Suwon 443-803, Korea

<sup>3</sup>Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received on January 25, 2013; Revised on March 19, 2013; Accepted on March 20, 2013)

White rot caused by *Sclerotium cepivorum* was reported to be severe soil-born disease on garlic. Disease progress of white rot of garlic (*Allium sativum* L.) was investigated during the growing season of 2009 to 2011 at Taean and Seosan areas. The white rot disease on bulb began to occur from late April and peaked in late May. The antifungal bacteria, *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 was tested in field bioassay for suppression of white rot disease. As a result of the nucleotide sequence of the gene 16S rRNA, CAB08106-4 strain used in this study has been identified as *B. pyrrocinia*. *B. pyrrocinia* CAB08106-4 isolate suppressed the white rot with 69.6% control efficacy in field test. These results suggested that *B. pyrrocinia* CAB08106-4 isolate could be an effective biological control agent against white rot of garlic.

**Keywords :** *Allium sativum*, Biological control, *Sclerotium cepivorum*, Soil-born disease

## 서 론

우리나라 마늘 재배면적은 1975년에 13,561 ha에서 1990년 49,160 ha로 증가하다가 2008년에는 26,986 ha로 감소하였으며(Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, 2008), 충남서산, 경북의성, 전남해남 등에는 대규모 마늘 재배단지가 형성되어 지방특화작목으로 자리 잡고 있다. 그러나 최근에는 마늘 주산단지를 중심으로 연작에 의한 흑색썩음균핵병의 발생이 증가하고 있어 농가에서는 이 병에 의한 피해가 점점 늘어나고 있는 추세이다. 재배기간 중 마늘에 발생되고 있는 주요 병해충은 흑색썩음균핵병, 잎마름병, 뿌리응애, 고자리파리 등이 대

표적으로 보고되어 있다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 이와같은 생육기간 중 또는 수확 후 발생하는 병해충 피해로 고품질 안정생산이 어려워 적절한 방제체계 확립이 시급한 실정이며(Kim 등, 2003) 그 중에서도 특히 흑색썩음균핵병은 토양전염성 병해로 환경이 불리하게 되면 휴면상태로 토양 중에 장기간 생존이 가능하기 때문에(Coley-Smith 등, 1990; Crowe, 1996) 방제가 매우 어렵다. 마늘 흑색썩음균핵병은 국내에서 1989년 전남 고흥지방에서 처음 보고된 이후, 마늘, 양파, 파, 쪽파 등 백합과 작물의 주산단지를 중심으로 피해면적이 매년 확대되고 있으며(Cho 등, 1996; Kim, 2003), 농가에서 퇴화 등의 이유로 다른 지역에서 생산한 종구를 구입하여 재배하므로 발병 면적 및 지역이 확대될 수 있다(Kim 등, 2005). 이 병은 발마늘 재배에서 발생이 심하며, 한지형 마늘보다는 난지형 마늘에서 피해가 크다(Kim 등, 2002).

국내에서는 *Trichoderma harzianum* 23 WP와 *Bacillus*

\*Corresponding author

Phone) +82-41-330-6111, Fax) +82-41-330-6290

Email) hks081@korea.kr

*subtilis* 122 WP를 이용한 마늘 흑색썩음균핵병의 생물학적 방제 연구(Lee 등, 2006) 외에는 전무한 실정이다. 외국에서의 흑색썩음균핵병에 대한 생물학적 방제 연구로는 길항균으로 *Cheatonium globosum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*의 미생물을 이용하는 방법 등이 시도 되었으며(Clakon 등, 2002; Mclean 등, 2000), 길항세균으로는 *B. subtilis* QST 만이 균핵병(*Sclerotinia minor*)에 적용병해로 되어 있을 뿐 흑색썩음균핵병에 대하여 외국에서 등록되어 사용되는 생물농약은 없는 실정이다(Copping, 2004). 또한 흑색썩음균핵병의 적용약제로 등록되어 있는 화학농약조차 방제효과가 그다지 높지 않아 재배농가에서는 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다.

따라서 본 시험은 마늘의 안정적인 생산과 상품성을 높이기 위하여 2008년에 분리 선발한 *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 균주를 이용한 흑색썩음균핵병의 생물적방제 효과를 검토하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

**흑색썩음균핵병 발생 모니터링.** 흑색썩음균핵병의 발생 조사는 충남의 서산시(부석면, 인지면) 및 태안군(근흥면, 원북면) 농가포장을 중심으로 한지형 마늘과 난지형 마늘로 각각 구분하여 조사하였고, 조사규모는 시군당 20 필지 이상씩 조사하였다. 또한 조사시기 및 간격은 마늘 재배기간중 3월 하순부터 5월 하순까지 2주 간격으로 실시하였으며 조사방법은 발생면적률로 조사하였다.

**길항미생물 선발 및 특성조사.** 길항미생물의 분리를 위한 토양시료는 주로 야산의 부엽토를 채집하여 사용하였고, 길항미생물의 분리는 NA(Nutrient Agar) 배지와 PSA(Potato Sucrose Agar) 배지에서 희석평판배양법에 의하여 분리하였으며 분리된 미생물은 흑색썩음균핵병균(*Sclerotium cepivorum*)과의 대치배양에 의한 길항력 정도에 의하여 선발하였다. 또한 선발된 길항미생물의 항균활성 범위를 확인하기 위하여 생강 근경썩음병균(*Pythium myriotylum*), 상추 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 상추 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*) 및 고추 탄저병균(*Colletotrichum dematium*), 고추 역병균(*Phytophthora capsici*) 등에 대하여 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에서 병원균과 길항미생물의 대치배양에 의한 길항력 정도를 측정하여 길항력 검정을 실시하였다. 길항미생물의 동정은 16S rRNA gene의 계통학적 위치로 확인하였고, 길항미생물은 Cellobiose, Trehalose, D-Pratinose, Mannitol, Sorbitol, Sucrose 및 Glucose 등에 대한 당 이용성을 조사하였으며 길항미생물의 항생제 내성검정은 Streptomycin sulfate를 5, 10,

20 µg/ml 농도로 조절하여 수행하였다.

**생물적 방제 효과시험.** 생물적방제 효과를 검증하기 위하여 포장시험은 발병토양을 만들기 위하여 호밀 곡립 배지에 흑색썩음균핵병균을 접종하여 균핵 형성 후 토양에 균일한 비율로 혼합처리(5 kg/10 a)하여 발병토양을 조성한 후 시험수행을 하였다. 토양내 길항미생물의 투입은 1차로 피종전 *B. pyrrocinia* CAB008106-4 균주를  $10^9$  cells/ml 이상으로 배양하여 처리된 혼합유기담체(탈지강 85%, 피마자박 10%, 제올라이트 5%)를 250 kg/10 a을 토양혼화 처리하였고, 2차로 3월 하순경(출현 후)에 *B. pyrrocinia* CAB008106-4 균주를  $10^9$  cells/ml 이상으로 배양하여 300배로 희석한 후 토양관주(3 l/m<sup>2</sup>)하여 생물적 방제효과를 검토하였다. 시험에 사용된 마늘은 한지형 마늘(서산재래종)을 사용하였고, 생물적 방제효과 시험은 *B. pyrrocinia* CAB008106-4균주 처리구, 대조약제 처리구, 무처리구 등 3처리를 난피법 3반복 배치하여 수행하였고, 시험구당 면적은 36 m<sup>2</sup>로 배치하여 수행하였으며 발병률 조사는 발병주율로 조사하였다.

## 결과 및 고찰

**흑색썩음균핵병 발생 모니터링.** 충남의 서산시 및 태안군의 흑색썩음균핵병은 4월 하순경 부터 발병되기 시작하여 5월 중순 부터는 발병률이 급격히 증가하는 경향을 보였고, 또한 5월 하순에는 한지형마늘은 10%, 난지형마늘은 15.3%로 한지형마늘 보다는 난지형 마늘이 흑색썩음균핵병의 발병률이 높은 것으로 조사되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 한지형마늘 및 난지형마늘 모두 흑색썩음균핵병의 발병이 시작되는 4월 중·하순경에 예방적 차원의 방제를 실시하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

**길항미생물 선발 및 특성조사.** 선발된 *B. pyrrocinia*

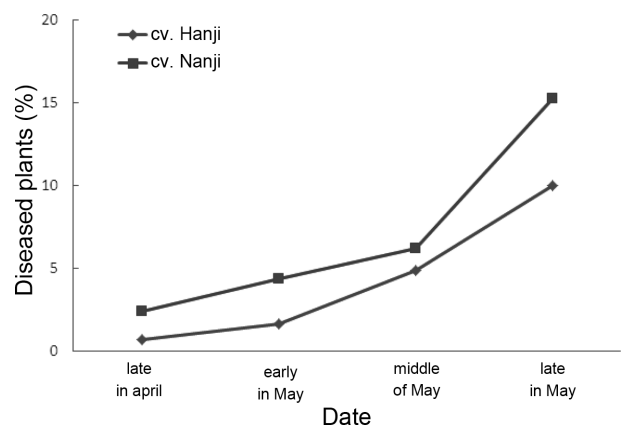
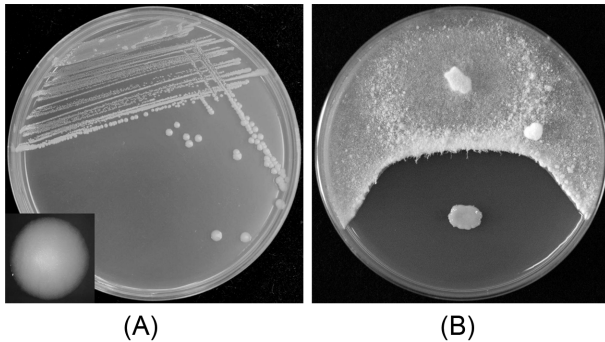


Fig. 1. Seasonal prevalence of of white rot disease on garlic plant.

**Table 1.** Inhibition of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 to the mycelial growth of fungal phytopathogens

Tested isolate	Diameter of clear zone formed to indicator strains <sup>a</sup>					
	<i>Sclerotium cepivorum</i>	<i>Pythium myriotylum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Colletotrichum dematium</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
CAB08106-4	32	42	30	40	34	0

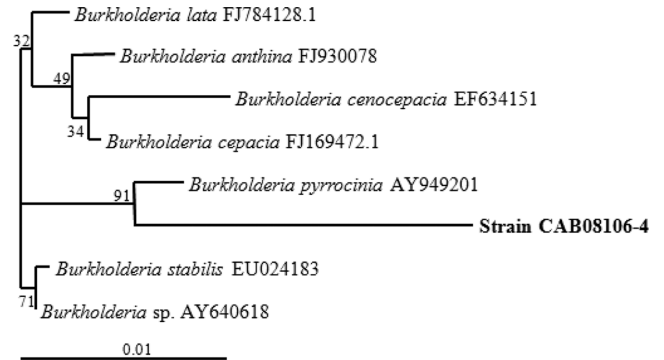
<sup>a</sup>A diameter of inhibition zone of mycelial growth.



**Fig. 2.** Colony color and antifungal activity of *B. pyrrocinia* CAB08106-4. Circular and umbonate colony (A), antifungal activity to *Sclerotium cepivorum* (B).

CAB008106-4 균주를 흑색썩음균핵병균과 대치배양하여 길항력을 측정 한 결과 균사생육 저지원 직경 32 mm의 우수한 길항력을 나타냈고(Fig. 2), 이러한 길항력은 장시간 유지되는 것으로 조사되었다. 또한 *B. pyrrocinia* CAB008106-4의 다른 병원균에 대한 항균활성 검정 결과 고추 역병균을 제외한 상추 갯빛곰팡이병균, 상추 균핵병균, 고추 탄저병균, 생강 근경썩음병균 등 여러 병원균에 대해서도 우수한 길항력을 나타내었고(Table 1), 항균활성 범위가 매우 넓은 것으로 조사되어 본 시험에 사용된 *B. pyrrocinia* CAB008106-4 균주는 적용확대를 통한 다른 작물병의 생물적 방제에 활용하여도 좋은 결과가 있을 것으로 기대된다.

한편, 선발된 *B. pyrrocinia* CAB008106-4 균주를 NA 배지에 28°C에서 2일간 배양한 후 콜로니 형태를 관찰한 결과 원형(circular)의 유백색 균층을 형성하였고(Fig. 2), 16S rRNA gene의 계통학적 위치로 확인한 결과, *Burkholderia* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *B. pyrrocinia*(AY949201)과 98%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인하였다(Fig. 3). 따라서 본 균주는 KACC에 기탁하여(기탁번호 KACC91479P) *B. pyrrocinia* CAB008106-4로 명명하였다. *B. pyrrocinia* CAB008106-4 균주의 당 이용성 시험결과 Cellobiose, Trehalose, D-Pratinose, Mannitol, Sorbitol, Sucrose 및 Glucose 등을 이용하여 증식하는 것으로 보아 본 시험에 사용된 *B. pyrrocinia* CAB008106-4



**Fig. 3.** Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA sequence indicating the position of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1,000 replications, are given at branching points. Bar shows two nucleotide substitution per 1,000 nucleotides.

**Table 2.** Control efficacy of *Burkholderia pyrrocinia* CAB08106-4 against white rot on garlic fields in 2011

Treatment	Diseased plants (%) <sup>y</sup>	Control efficacy (%) <sup>w</sup>
<i>B. pyrrocinia</i> CAB08106-4 <sup>x</sup>	5.4 ± 2.7 b <sup>z</sup>	69.6
Tebuconazole EC	9.6 ± 1.4 b	25.3
Untreated	17.7 ± 3.5 a	–

<sup>y</sup>Values represent means ± standard deviation of diseased plants from three separate experiments.

<sup>w</sup>Control efficacy (%) =  $1 - \frac{\text{diseased plant of treated plot}}{\text{diseased plant of untreated plot}} \times 100$

<sup>x</sup>*B. pyrrocinia* CAB08106-4: Complex treatment (incorporate antagonistic pellets with the soil and soil drench).

<sup>z</sup>Values designated by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ ).

는 영양요구도가 까다롭지 않은 것으로 확인되었다. 항생제 내성시험 결과 Streptomycin sulfate 5, 10, 20 µg/ml 등 모든 농도에서 내성을 확인할 수 있었다.

**생물적 방제 효과시험.** *B. pyrrocinia* CAB008106-4을 처리한 시험구의 마늘 생육은 출현률, 초장, 경수 등이 무처리보다 약간 양호한 것으로 조사되었고, 흑색썩음균핵병 방제효과는 69.6%였다(Table 2). 아직까지 마늘 흑색썩음균핵병의 화학적 방제는 토양훈증, 중구 침지소독 또

는 파종 후 토양 분무처리하는 약제만이 등록되어 있다. 따라서 마늘 생육기 중의 방제가 불가능하기 때문에 병의 확산을 막을 수 있는 방법이 없었다. 하지만, *B. pyrrocinia* CAB008106-4는 마늘 생육기 중에도 토양관주처리 하여 병의 진전을 억제할 수 있었다. 이러한 결과는 앞으로 *B. pyrrocinia* CAB008106-4에 대한 다양한 제형화 기술이 개발되어 농가에 보급된다면 방제효과는 더욱 높아질 것으로 판단된다. 또한 국내에서는 *T. harzianum* 23 WP와 *B. subtilis* 122 WP를 이용한 마늘 흑색썩음균핵병의 생물학적 방제 연구(Lee 등, 2006)외에는 전무한 실정으로 본 연구에서 개발한 미생물이 농가에 실용화 된다면 마늘 흑색썩음균핵병 생물적 방제제로 선택의 폭이 더욱 넓어질 것으로 전망된다.

## 요 약

*Sclerotium cepivorum*에 의한 흑색썩음균핵병은 마늘에 큰 피해를 주는 중요한 토양병이다. 충남 서산 및 태안의 마늘 재배농가 포장을 중심으로 2009년부터 3년간 조사한 결과, 흑색썩음균핵병은 4월 하순부터 발생을 시작하고, 5월 중순에 발병이 급격히 증가하여 5월 하순에는 최고 발병률을 나타내었다. 본 시험에 사용된 길항미생물 CAB008106-4 균주는 16S rRNA gene의 염기서열 분석결과 *Burkholderia pyrrocinia*로 확인되었다. *B. pyrrocinia* CAB008106-4 균주는 흑색썩음균핵병에 대하여 69.6%의 포장방제효과를 보였다. 이러한 결과로 *B. pyrrocinia* CAB008106-4는 마늘에 발생하는 흑색썩음균핵병에 대하여 효과적인 생물적 방제제로 활용이 가능함을 확인할 수 있었다.

## Acknowledgement

This research was supported iPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries for which this work was funded under grant no: 111045-03-1-HD110), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

## References

- Clarkon, J. P., Payne, T., Mead, A. and Whipps, J. M. 2002. Selectin of fungal biological control agents for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathol.* 51: 735-745.
- Copping, L. G. 2004. *The Manual of Biocontrol Agents*. third edition, BCPC. UK. 702 pp.
- Cho, W. D. and Kim, W. G. 1996. Qccurrence of white rot on Alliaceous vegetable crops. *Korean J. Plant Pathol.* 12: 251-254. (In Korean)
- Coley-Smith, J. R., Mitchel, C. M. and Sanford, C. E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromtinia gladioli*. *Plant Pathol.* 39: 58-69.
- Crowe, F. 1996. White rot. In: *Compendium of onion and garlic diseases*, ed. by H. F. Schwartz and S. K. Mohaned. The APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Han, K. S., Kim, B. R., Hahm, S. S., Yang, E. S., Kwon, K. H. and Choi, J. E. 2011. Biological control of soilborn disease on garlic by antifungal bacteria *Burkholderia pyrrocinia*. *Res. Plant Dis.* 17: 423.
- Kim, C. H. 2003. Review of disease incidence of major crops in 2002. *Res. Plant Dis.* 9: 10-17. (In Korean)
- Kim, C. H. and Kim, Y. K. 2002. Present status of soilborne disease incidence and scheme for its intergrated management in Korea. *Res. Plant Dis.* 8: 146-161. (In Korean)
- Kim, Y. K., Kwon, M. K., Shim, H. S., Kim, T. S., Yeh, W. H., Cho, W. D., Choi, I. H., Lee, S. C., Ko, S. J., Lee, Y. H. and Lee, C. J. 2005. Various cultural factors associated with disease development of garlic white rot caused by two species of *Sclerotium*. *Res. Plant Dis.* 11: 28-34. (In Korean)
- Lee, S. Y., Lee, S. B., Kim, Y. K. and Hawang, S. J. 2006. Biological control of white rot accused by *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotium* sp. using *Bacillus subtilis* 122 and *Trichoderma harzianum* 23. *Res. Plant Dis.* 12: 81-84. (In Korean)
- McClean, K. L. and Stewart, A. 2000. Infection site of *Sclerotium cepivorum* on onion roots. *N. Z. Plant Prot.* 53: 118-121.
- Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries Republic of Korea. 2008. *Food, Agriculture, Forestry and Fisheries Statistical Yearbook*.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. *List of Plant Diseases in Korea* 5: 95-98.