

상추균핵병의 생물적 방제를 위한 *Bacillus amyloliquefaciens* M27 선발

이상엽* · 원항연 · 김원규 · 김정준 · 한지희

국립농업과학원 농업미생물과

Selection of *Bacillus amyloliquefaciens* M27 for Biocontrol on Lettuce Sclerotinia Rot

Sang Yeob Lee*, Hang Yeon Weon, Wan Gyu Kim, Jeong Jun Kim and Ji Hee Han

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, Wanju 55365, Korea

ABSTRACT : For selection of effective antagonists for control Sclerotinia rot of lettuce, 29 bacteria were isolated from soil in Korea. The bacterial isolates M27 and RM43 identified as *Bacillus* sp, were selected as prospective agents for inhibiting mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. Among the selected isolates, *Bacillus amyloliquefaciens* M27 effectively suppressed incidence of Sclerotinia rot by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor* in the lettuce nursery.

KEYWORDS : *Bacillus amyloliquefaciens*, Biological control, Sclerotinia rot, Lettuce

서 론

*Sclerotinia sclerotiorum*에 의한 균핵병은 국외에서 식물 75과에서 408종에서 발생하며 [1], 국내에서는 상추를 비롯한 70여종 작물에서 발생하고 있다[2]. 시설채소작물의 재배중에 발생하는 토양병해의 병원균 *Sclerotinia*속 균에 의한 균핵병은 전 세계의 온대와 아온대지역에서 널리 분포하여 작물의 손실로 수백만달러에 이를 정도로 해마다 많은 피해를 주고 있는 실정이다[3]. 이들 토양병원균에 의한 병해는 유풀기 뿐만 아니라 수확기까지도 발생한다. 토양병해의 대발생 원인은 연작으로 인한 토양내 병원균 밀도의 증가, 그리고 대부분의 토양병원균은 불리한 환경에

서도 장기간 생존할 수 있는 균핵을 형성한다는 점을 들 수 있으며, 따라서 토양병이 한번 발생한 포장에서는 방제가 매우 어려운 실정이다[2, 4]. *S. sclerotiorum*의 균핵은 내구체로서 토양에서 오랜 기간 동안 생존이 가능하며, 균사로 발아하여 직접 식물체의 잎이나 줄기에 침입하여 썩음을 일으킨다[5]. 그리고 온실에서 습도가 높을 때 균핵이 수많은 자낭포자를 형성한 다음 온실 전체로 비산하여 식물체를 감염시킬 수 있어 방제가 매우 어렵다[6].

국내외에서 발생하고 있는 주요 토양전염성 병원균으로는 *S. sclerotiorum*와 *Sclerotinia minor*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp. 등이 알려져 있고 이들 병원균은 경제적 큰 피해를 입히는 주요 병원균들이다[7, 8]. 토양 병해 발생을 억제하는 생물적 요인으로는 여러 가지가 알려져 있으나 주로 근권미생물 또는 토양미생물인 *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Chromobacterium* spp., *Trichoderma* spp. 등을 이용한 토양병해 방제연구가 많이 보고되었다[9, 10].

시설상추 재배시에 균핵병은 주로 저온기에 발생하여 피해를 나타내며, 국내에서 상추 균핵병에 방제적용약제는 베노밀수화제 등 2종 약제가 등록되어 있으나, 친환경 재배 농가에서 방제법이 없어서 환경 친화적 방제법 개발이 절실히 요구되는 실정이다.

본 연구에서는 안전 농산물 생산을 목적으로 균핵병에 대한 생물적 방제제를 개발하기 위하여 식물체와 토양 등

Kor. J. Mycol. 2015 September, 43(3): 180-184
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.3.180>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: lsy2014@korea.kr

Received September 2, 2015
 Revised September 12, 2015
 Accepted September 15, 2015

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에서 길항미생물을 분리, 생물검정을 통하여 우수한 세균 균주를 선발 등에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균핵병균 보관 및 배양

국립농업과학기술원 농업미생물과에 10°C 항온기에 보관하고 있는 균핵병균(*S. sclerotiorum*, *S. minor*)을 사용하였으며, 병원균은 PDA 배지(potato dextrose agar; Difco, Detroit, MI, USA)를 이용하여 20°C에서 배양하면서 사용하였다.

분리 세균 분리 및 보관

시설 상추재배 근권토양과 버섯 폐배지에서 균 분리를 위하여 희석평판법을 이용하였으며, 일련의 희석현탁액(10¹~10⁶)을 만든 후 0.1 mL을 배지에 도말하였다. 전세균용 배양배지로 trypticase soy agar (BBL Microbiology Systems, trypticase peptone 17 g, phytone peptone 3 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 2.5 g, glucose 2.5 g, agar 20 g, distilled water 1 liter, pH 7.3)을 사용하였다.

*Bacillus*속은 희석액을 열수 80°C에서 10분간 처리 후 trypticase soy agar에 도말한 후 2일과 4일에 계수하였다. 모든 배양은 30°C로 조절된 항온기에서 진행되었으며 각 시료 당 미생물수는 3개의 평판배지상에 나타난 콜로니를 각각 계수한 후 평균한 값을 콜로니 형성수(colony forming unit, cfu)로 표시하였다.

M27 균주 등을 20% glycerol 용액에 담아서 -70°C 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 버섯 재배 폐면에서 분리하여 동정한 *Bacillus amyloliquefaciens* M27 균주는 BLAST에 의하여 뉴클레오타이드 상동성 분석한 결과 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*라고 동정하여 균주 특성을 밝힌 바 있다[12].

분리균주의 균핵병균에 대한 항균활성 검정

분리균의 균핵병에 대한 저지원검정법은 균핵병균(*S. sclerotiorum*와 *S. minor*)을 PDA 배지에 이식하여 20°C 항온기에서 7일간 배양한 후 PDA 배지가 분주된 직경 88 mm 일회용 페트리디쉬의 중앙에 직경 5 mm 균핵병균(*S. sclerotiorum*와 *S. minor*)의 균총을 코르크보러로 떼어내서 치상하였다. 분리세균은 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지에 28°C, 120 rpm으로 24시간 진탕배양하여, 균핵병균이 치상한 페트리디쉬에 일정한 간격으로 3반복으로 점적중하여 20°C 항온기에서 5일간 배양한 다음, 균핵병균의 균사생육을 저지원의 직경을 조사하였다.

상추잎 이용한 생물검정

상추육묘는 바로크상토(Seoul Bio, Eumseong, Korea)와 원예용장기육묘상토(Punong Co., Gyeongju, Korea)를 1:1 (V:V)로 혼합하여 직경 7 cm 비닐포트에 넣어서 청치마상

추(Nongwoo Bio, Suwon, Korea)종자를 파종하여, 온실에서 20일간 재배한 육묘를 사용하였다. 상추육묘에 TSB배지에서 배양한 분리 세균의 배양액을 분무처리 5시간 후에 균핵병균 *S. sclerotiorum*와 *S. minor*을 PDA배지에 20°C에 4일간 배양한 균핵병균의 균총을 직경 5 mm 코르크보러로 떼어내서 상추잎의 중앙에 접종하고 22°C, 100% 습도로 조절된 접종상에 넣은 24시간 후 꺼낸 다음 조사일수별로 병반직경을 조사하였다. 대조 화학농약으로 베노밀수화제(HanKook SamGong, Seoul, Korea) 1,500배를 사용하였다.

상추 육묘 이용한 생물검정

상추재배는 위와 같은 상토를 사용하여 50공 연결포트에 넣어서 상추(청치마)종자를 파종하여, 4엽기 육묘를 사용하였다. 균핵병균(*S. sclerotiorum*와 *S. minor*)의 배양은 PDA 배지에 20°C에 4일간 배양한 균핵병균의 균총을 직경 5 mm 코르크보러로 5개씩 떼어내서 보리배지에 접종하여 20°C에 5일간 배양한 보리를 사용하였다. 4엽기 상추의 상토에 균핵병균은 주당 1알을 접종하고, 상추잎을 이용한 생물검정법에서 2종의 균핵병균에 억제효과가 좋은 M27균주와 RM43균주를 선발하여 위와 같은 방법으로 배양하여 배양원액과 10배 희석액을 주당 3 mL씩 관주처리하여 3반복으로 실시한 후 발병주수를 조사하였다.

상추 육묘 검정에서 상토의 미생물상 조사

미생물을 처리한 상토의 균 밀도를 조사하기 위하여 희석평판법을 이용하였으며, 일련의 희석현탁액(10¹~10⁶)을 만든 후 0.1 mL을 배지에 도말하였다. *Bacillus*속은 희석액을 열수 80°C에서 10분간 처리 후 trypticase soy agar에 도말한 후 2일과 4일에 계수하였다. 모든 배양은 30°C로 조절된 항온기에서 진행되었으며 각 시료 당 미생물수는 3개의 평판배지상에 나타난 콜로니를 각각 계수한 후 평균한 값을 콜로니 형성수(colony forming unit, cfu)로 표시하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 균핵병균에 대한 항균활성

분리한 세균에서 길항균주를 선발하기 위하여 균핵병균(*S. sclerotiorum*)에 대하여 저지원검정법을 이용하여 균사생육저지효과를 조사한 결과, 5균주를 1차 선발한 균핵병균 *S. sclerotiorum*와 *S. minor*에 대하여 대치배양을 한 결과에서 RM43, M55, M27균주 순으로 균핵병균의 균사생육 억제효과가 우수하였다(Table 1, Fig. 1).

상추잎을 이용한 생물검정

분리세균에 대한 상추잎에서 균핵병 발생 억제 효과를 접종 3일 후에 조사한 결과, 균핵병균 *S. sclerotiorum*의 병반 직경이 M55균주가 18.3 mm, M27균주가 39.2 mm로

Table 1. Inhibition of mycelial growth of *Sclerotinia rot* pathogens by bacterial antagonists on potato dextrose agar

Isolate	Inhibition of mycelial growth (mm) ^a	
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Sclerotinia minor</i>
M27	19.8 b ^b	22.0 c ^b
M49	8.2 d	9.3 d
M55	21.3 ab	27.4 ab
RM29	11.8 c	13.3 d
RM43	23.3 a	30.1 a

^aMeasurement was made 7 days after inoculation of *S. sclerotiorum* and *S. minor*.

^bIn a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by Duncan's multiple range test.

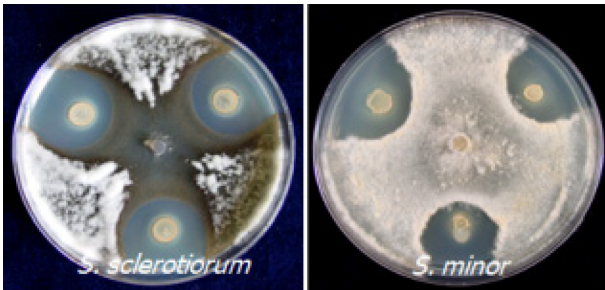


Fig. 1. Inhibition of mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor* by *Bacillus amyloliquefaciens* M27 on potato dextrose agar media.

처리효과가 우수하였으며, 대조 화학농약인 베노밀수화제 처리구는 17.3 mm로 병반직경은 차이가 있었지만 처리간의 유의성은 없었다(Table 2).

그리고 균핵병균 *S. minor* 경우에는 균총 접종 4일 후에 병반직경이 M27균주가 11.6 mm로 가장 발병 억제 효과를 나타냈고, RM43균주가 39.6 mm, M55균주가 54.7 mm이었으며, 대조 화학농약 베노밀수화제는 43.9 mm로 통계적으로 유의차가 인정되었다(Table 3). 이상의 결과로서 두 균핵병균에 대하여 방제효과가 우수한 M27균주와 RM43균주를 선발하였다.

상추 유묘를 이용한 생물검정

상추잎을 이용한 생물검정법에서 2종의 균핵병균에 억제효과가 좋은 M27균주와 RM43균주에 대하여 청치마상추 유묘 검정을 한 결과에서 처리 13일 후에 두 균주 모두 배양 원액처리가 10배 희석액과 20배 희석액 처리보다 두 균핵병균에 대하여 발병 억제 효과가 좋았으며, M27균주가 RM43균주보다 발병 억제 효과가 우수하였다(Table 4, Fig. 2). M27균주는 균핵병균 *S. sclerotiorum*에서 *S. minor*보다 높은 방제 효과를 나타냈다.

상추 유묘를 이용한 검정에서 상토의 미생물상

Table 2. Suppressive effect of bacterial antagonists on lettuce *Sclerotinia rot* (*Sclerotinia sclerotiorum*)

Isolate	Lesion diameter (mm) ^a		
	1 day	2 day	3 day
M27	1.9 a ^b	19.3 a ^b	39.2 a ^b
M49	12.6 c	74.0 b	105.7 bc
M55	1.1 a	7.9 a	18.3 a
RM29	9.2 bc	55.2 b	93.1 bc
RM43	3.5 a	30.1 a	75.0 b
Benomyl WP (×1,500)	4.3 ab	10.1 a	17.3 a
Control	11.3 c	67.7 b	108.5 c

^a*Sclerotinia sclerotiorum* was inoculated to the leaves for the test. Measurement was made 1 to 3 days after incubation at 22 in 100% of RH.

^bIn a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by Duncan's multiple range test.

Table 3. Suppressive effect of bacterial isolates on lettuce *Sclerotinia rot* (*Sclerotinia minor*)

Isolate	Lesion diameter (mm) ^a		
	2 day	3 day	4 day
M27	0.8a ^b	6.3a ^b	11.6a ^b
M49	23.7cd	53.1cd	76.5cd
M55	8.1 ab	23.1ab	54.7bcd
RM29	12.4abc	35.0bc	75.6cd
RM43	5.5a	20.8ab	39.6ab
Benomyl WP	19.4bc	34.7bc	43.9bcd
Control	34.4d	65.1d	80.9d

^a*Sclerotinia minor* was inoculated to the leaves for the test. Measurement was made 2 to 4 days after incubation at 22 in 100% of RH.

^bIn a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by Duncan's multiple range test.

미생물을 처리한 상토의 *Bacillus*속 균 밀도를 조사한 결과에서 M27균주와 RM43균주의 원액처리구가 10배 희석액 처리보다 약 2배 정도의 높은 균밀도를 나타내었다. M27균주를 처리한 상토에서 *S. sclerotiorum* 접종구가 *S. minor* 접종구보다 약 10배 이상 균밀도가 높았다. 이는 상토에서 정착능력이 좋아서 방제효과가 높은 것으로 생각된다. 그러나 RM43균주에서는 두 균핵병균에 대하여 거의 유사한 균밀도를 나타내었다(Table 5). 균핵병균 *S. sclerotiorum* 접종구에 대하여 M27균주 처리 상토에서 균밀도가 RM43균주보다 높아서 균핵병 발생 억제 효과가 우수하다고 생각된다.

상추균핵병에 대한 생물적 방제는 버섯폐배지에서 분리한 *Brevibacillus brevis* B23와 *Bacillus stearothermophilus* B42균주를 식물병원균과 대치배양, 유묘검정을 통하여 선발하여 보조제와 혼용 사용하여 방제 효과가 상승하였다고

Table 4. Control effect of Sclerotinia rot on lettuce seedling by treatment with two selected bacterial isolates after inoculation of a barely seed colonized by pathogens per a seedling plant in seedling bioassay

Treatment	No. of infected plants ^a						
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			<i>Sclerotinia minor</i>			
	7 day	11 day	13 day	7 day	11 day	13 day	
M27	0	1	4	7	4	9	17
	× 10	4	27	35	7	20	25
	× 20	3	19	25	5	29	31
RM43	0	1	10	13	2	10	18
	× 10	2	9	14	8	23	35
	× 20	1	8	12	22	45	49
Control		2	11	21	18	44	49

^aFifty plants of lettuce were used for the test.

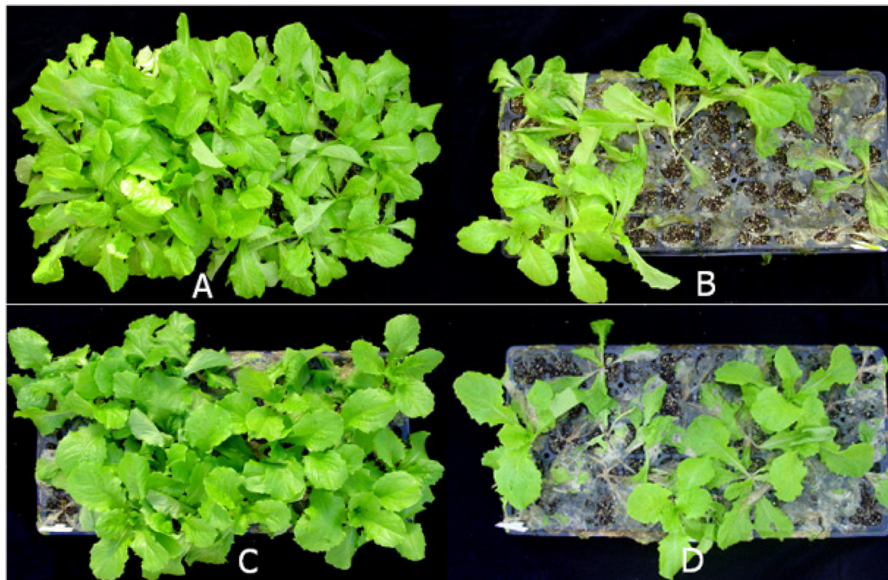


Fig. 2. Suppressive effect of *Bacillus amyloliquefaciens* M27 on lettuce Sclerotinia rot. A, Treatment of *Bacillus amyloliquefaciens* M27 against *Sclerotinia sclerotiorum*; B, Inoculation of *Sclerotinia sclerotiorum*; C, Treatment of *Bacillus amyloliquefaciens* M27 against *Sclerotinia minor*; D, Inoculation of *Sclerotinia minor*.

Table 5. Density of total bacteria and *Bacillus* species isolates in the nursery soil of lettuce after treatment of each antagonistic bacterial suspension with different dilution times

Isolate	Dilution times (x)	Density in the pot soil inoculated with pathogens			
		Bacteria ($\times 10^6$ /g soil)		<i>Bacillus</i> sp. ($\times 10^4$ /g soil)	
		Sm	Ss	Sm	Ss
M27	0	120.0	144.3	4.7	51.0
	10	74.3	58.3	2.0	18.3
RM43	0	102.3	99.7	11.3	11.0
	10	74.7	45.5	6.3	6.3
Control	-	49.3	29.7	17.5	8.3

Soil samples were collected from the nursery 30 days after inoculation of antagonists.

Sm: *Sclerotinia minor*, Ss: *S. sclerotiorum*.

보고하였다[13]. 토양에서 세균을 분리하여 대치배양과 포트실험에서 9개의 균주를 선발하였으며[14], 포장에서 88% 방제효과를 보인 *Bacillus subtilis* GG95균주가 선발된 바 있다[15]. 국외에서는 *B. amyloliquefaciens* NJZJSB3는 산림 토양에서 분리하여 항균활성, 휘발성 물질 생성 등의 특성으로 카놀라 균핵병에 대한 생물적 방제 가능성을 제기한 바 있다[16]. 또한 M27균주가 외국에서 시판하는 미생물제 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42와 97.7%, *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* DSM 7은 93.3%의 평균 핵산 상동성을 나타내었으며, M27균주의 계분분석에 의하여 항균물질 생성에 관여하는 유전자로서 cyclic lipopeptide인 bacillomycin D, fengycin, iturin과 surfactin을, dipeptide인 bacilysin, siderophore인 bacillibactin, polyketide인 bacillaene, difficidin과 macrolactin 생성 유전자 등을 가지고 있어 식물병 방제 후보 균주로 제시한 바 있다[12].

본 연구에서도 *B. amyloliquefaciens* M27균주를 이용하여 상추 균핵병에 대한 항균활성, 두 균핵병균에 대한 유묘에 대한 생물검정과 상토에서의 정착성이 우수한 결과를 나타내어 선발한 M27 균주는 상추 균핵병 친환경미생물제로서 개발 가능성을 나타내었다.

적 요

시설재배작물 상추의 *Sclerotinia sclerotiorum*와 *Sclerotinia minor*에 의한 균핵병을 생물적으로 방제하기 위하여 분리한 수원을 비롯한 6개 지역에서 토양 등에서 29균주의 세균을 분리하였다. 분리세균에 대하여 군사생육저지원법과 생물검정법을 통하여 세균 M27와 RM43균주가 선발되었다. 이 선발균주에서 *Bacillus amyloliquefaciens* M27균주가 균핵병균을 가장 효과적으로 억제하였다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (Project No. PJ01004901) from National Academy of Agricultural Science, Republic of Korea.

REFERENCES

- Farr DF, Bills GF, Chamuris GP, Rossman, AY. Fungi on plants and plant products in the United States. St. Paul: APS Press; 1989.
- The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Suwon : JY; 2009.
- Zhou T, Boland GJ. Biological control strategies for *Sclerotinia* Diseases. In: Boland GJ, Kuykendall LD, editors. Plant-microbe interactions and biological control. New York: M. Dekker; 1998; p. 127-56.
- Purdy LH. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathology 1979;69:875-80.
- Tu, JC. Modes of primary infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in navy bean. Microbios 1989;57:85-91.
- Young CS, Clarkson JP, Smith JA, Watling M, Phelps K, Whipps JM. Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. Plant Pathol 2004;53:387-97.
- Fravel DR. Commercialization and implementation of bio-control. Annu Rev Phytopathol 2005;43:337-59.
- Parker CA, Rovira AD, Moore KJ, Wong PT, Kollmorgen JE. Ecology and management of soilborne plant pathogens. St. Paul: APS Press; 1985.
- Copping LG. The manual of biocontrol agents. 4th ed. Alton: BCPC; 2009.
- Hornby D. Biological control of soilborne plant pathogens. Oxon: CAB International; 1990.
- Russell PE, Milling RJ, Wright K. Control of fungi pathogenic to plants. In : Hunter PA, Darby GK, Russell NJ, editors. Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends. New York: Cambridge University Press; 1959. p. 85-110.
- Lee SY, Kim BY, Ahn JH, Song J, Seol YJ, Kim WG, Weon HY. Draft genome sequence of the biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain M27. J Bacteriol 2012;194:6934-5.
- Hwang JY, Shim CK, Ryu KY, Choi DH, Jee HJ. Selection of *Brevibacillus brevis* B23 and *Bacillus stearothermophilus* B42 as biological control agents against *Sclerotinia* rot of lettuce. Res Plant Dis 2006;12:254-9.
- Lee HJ, Kim JY, Lee JG, Hong SS. Biological control of lettuce *Sclerotinia* rot by *Bacillus subtilis* GG95. Kor J Mycol 2014;42: 225-30.
- Chon BG, Park SJ, Kim JW. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce using antagonistic bacteria. Res Plant Dis 2013;19:12-20.
- Wu Y, Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. J Microbiol. Biotechnol 2014;24:1327-36.