

최 종  
연구보고서

GOVP1200608864

고질적 토양전염성 병해인 딸기 시들음병 방제를  
위한 미생물살균제의 개발과 상용화

Development and commercialization of microbial fungicide to  
control a serious soil-borne disease of  
Fusarium wilt of strawberry

연구기관  
(주)바이오셀드

협동연구기관  
충남대학교  
충남 농업기술원 논산딸기시험장

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고질적 토양전염성 병해인 딸기 시들음병 방제를 위한 미생물살균제의 개발과 상용화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 14일

주관연구기관명 : (주)바이오셀드

총괄연구책임자 : 유 성 준

세부연구책임자 : 유 성 준

연 구 원 : 김 정 선

연 구 원 : 곽 두 원

연 구 원 : 김 진 희

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 김 홍 기

협동연구기관명 : 충남 농업기술원

논산 딸기시험장

협동연구책임자 : 남 명 현

# 요 약 문

## I. 제 목

고질적 토양전염성 병해인 딸기 시들음병 방제를 위한 미생물살균제의 개발과 상용화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 재배되고 있는 딸기(*Fragaria × ananassa* Duch.)의 국내의 생산액은 연간 7,000억 원 정도로 고추, 마늘, 수박, 배추, 참외, 풋고추 다음으로 중요한 작물이다. 2004년도 국내의 딸기 재배면적은 7,600ha의 210,000M/T의 생산량으로 세계 8위를 차지하고 있다. *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*에 의해 발생하는 딸기 시들음병은 국내의 토양병해 중 가장 피해가 큰 병해이다. 최근에는 국내에서 육종된 '매향' 품종과 일본에서 육종된 '도치오도메' 품종은 시들음병에 감수성으로 재배농가에서 30%의 큰 피해를 나타내고 있다.

한국농촌경제연구원에 따르면 국내에서 재배되는 딸기는 레드펠 52.5%, 아끼히메 31.7%, 사치노카 1.8% 등 일본 품종이 90%이상을 점유하고 있다. 국산 품종 점유비는 매향 8.3%, 조홍 0.8% 등 10% 미만이다. 딸기농가는 앞으로 일본품종을 재배할 때는 한주당 로열티를 내야하는 부담이 생기게 된다. 이를 극복하기 위해 정부에서는 8개 정도의 딸기 품종을 육종하였으나, 농가들로부터 경제성을 인정받는 품종은 2002년 육성한 매향이 유일하다. 매향의 단점 중의 하나가 딸기 시들음병에 약하다는 것이다. 농약을 최대한 줄여서 재배하고자 하는 시점에서 미생물제는 필수적이다. 길항미생물을 이용한 생물학적 방제는 환경친화적이며 지속적으로 방제효과를 줄 수 있을 뿐만 아니라 안전한 먹거리를 생산할 수 있도록 도와줌으로서, 생산자의 소득증대 및 well-being 시대에 소비자의 욕구를 충족시켜 줄 수 있을 것으로 판단된다. 또한 앞으로 로열티의 부담을 줄이기 위해 농가에서는 국내품종인 매향을 선호할 것이며, 딸기 시들음병을 방제하기 위해 농약 대신 미생물제를 많이 찾게 될 것으로 예상된다.

본 연구는 딸기의 난방제중에 하나인 시들음병균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*에 억제 효과를 갖는 길항미생물들을 다양한 형태로 혼합하여 식물체의 생육촉진과 기타 병균도 억제할 수 있는 다기능 딸기 토양병 방제용 미생물살균제를 개발하며 품질과 가격 경쟁력을 갖는 제형화 및 대량생산 공정을 통하여 미생물살균제를 실용화하는데 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 주관연구기관

- 가. 딸기시들음병 방제용 길항미생물의 제제화 및 포장활성 검증
- 나. 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화
- 다. 제품가공기술 및 관리기술확립

#### 2. 제1협동기관

- 가. 수집된 시들음병균의 병원성 및 유전적 특성조사
- 나. 길항미생물의 토양내 지속성 및 길항물질 분석을 통한 효과 검정
- 다. 미생물제의 효과증진을 위한 가공기술 개발

#### 3. 제2협동기관

- 가. 시들음병 발생조사 및 길항미생물의 온실 및 포장에서 효과검정
- 나. 길항미생물제제의 온실 및 포장효과검정
- 다. 최적 미생물제형의 선발

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

## 1) 연구개발 결과

### 가. 주관연구기관

#### (1) 딸기시들음병 방제용 길항미생물의 제제화 및 포장활성 검증

딸기 시들음병의 생물학적 방제를 목적으로 선발된 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia pyrrocinia* BS36 및 *Bacillus amyloliquefaciens* RK1 균주를 이용하여 다양한 조건으로 미생물제제를 만든 후 포장활성 검증을 한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 *Bacillus amyloliquefaciens* RK1의 두 균주가 적정비율로 섞인 제제에서 딸기생육 촉진효과를 나타내었다. 또한 시들음병에 대한 병방제가가 72.6%로 생물농약으로의 가능성을 확인할 수 있었다.

#### (2) 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화

*Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia pyrrocinia* BS36 및 *Bacillus amyloliquefaciens* RK1 균주가 서로 다른 농도의 Soy milk를 첨가한 배지에서 가장 높은 농도로 배양되었다. 7일간 배양한 균주를 이용하여 제형화를 했을 경우, 가장 안정적인 균 농도를 얻어 낼 수 있었다.

#### (3) 제품가공기술 및 관리기술확립

제품내에 살아있는 미생물을 포함시켜야 하기 때문에, 제형화시 많은 제한요건이 따른다. 길항미생물이 안정적으로 최종제품으로 나오기 위해서는 공정상의 온도 및 제형화 재료가 길항미생물에 영향을 미쳐서는 안된다. 본 연구결과에서 나온 제형화 기술은 길항균에 어떠한 영향도 주지 않을 뿐만 아니라 장기간 동안 길항균이 안정적으로 존재할 수 있게 하며, 다른 미생물에 의한 오염도 일어나지 않는 장점을 갖고 있다.

### 나. 제1협동기관

#### (1) 수집된 시들음병균의 병원성 및 유전적 특성조사

Akihime는 조사된 22개 딸기 시들음병 균주들에 대해 공시균주들에 대해 가장 저항성인 것으로 나타났으나 Dochiodome는 가장 감수성을 나타냈다. 한편, 조사된 개별적인 병원균들 중 4균주만이 공시된 모든 품종에 병을 일으켰으며 저항성 품종으로 판단되는 아키히메는 모든 공시 균주들에 대해 저항성을 나타내지는 못했다.

ITS의 영역을 증폭한 후 각각의 제한 효소를 처리한 비교에서는 유전적인 차이를 식별할 수 없었으나 IGS 영역을 증폭한 후 조사된 제한양상은 다양하게 나타나 국내에 분포하는 병원균들이 유전적으로 변이를 가지며 분포하고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 기존의 식물병원균 및 각종 식물들에 대한 유전적 다양성 및 유연관계 분석에 활용되었던 URP, OPA primer를 이용한 유전적 차이 및 유연관계 분석은 국내에 분포하는 딸기 시들음병균 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 균주들의 집단내에 유전적인 다양성이 존재하고 있다는 것을 밝혔다

## (2) 길항미생물의 토양내 지속성 및 길항물질 분석을 통한 효과 검증

토양에서 길항미생물의 생존율은 처리 직후 토양내 길항미생물 밀도가  $\log 10^{6-7}$ cfu/g rhizosphere soil 였으며, 처리 4주 후의 밀도는  $\log 10^{5-7}$ cfu/g였다. 그중 BS36은 토양에서 4주정도 생존하였고 14주에서는 분리되지 않은 반면 BS87과 RK1은 14주 후에도  $\log 10^{4-6}$ cfu/g를 나타내어 높은 생존율을 보였다.

세 길항세균에 의한 저해 형태는 균사벽의 분해, 세포막의 분해, 균사 팽윤, 균사 말단의 생육저해 등 여러 가지로 나타났다. 일반적으로 길항균에 의한 식물병원균의 억제 기작은 항균물질에 의한 항생작용, 세포벽 분해, 세포막 분해, 양분의 경쟁 등으로 설명되는데 본 연구에서 사용한 길항세균은 다양한 항균 기작들을 고루 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

## (3) 미생물체의 효과증진을 위한 가공기술 개발

*Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1을 배양한 후  $MnSO_4(10mg/L)$ 를 첨가함으로써 두 균주를 포자형태로 유도할 수 있었다. 또한 두 균주의 배양액을 동결건조 방법으로 처리함으로써 안정적으로 균체만을 수거할 수 있었다.

다. 제2협동기관

## (1) 시들음병 발생조사 및 길항미생물의 온실 및 포장에서 효과검정

2001년에서 2003년까지 국내 딸기주산단지에서 딸기 시들음병 발생 실태조사를 실시한 결과 병 발생은 주로 육묘기인 6월부터 8월, 정식기인 9월부터 10월, 수확기인 1월부터 3월까지 발생되었다. 병징은 뿌리가 갈변되며 크라운의 도관을 따라 갈변되었고 짝잎을 형성하였다. 시들음병 발생은 214개 포장 중 37개 포장에서 최대 30%까지 발생되었다. 딸기 시들음병은 'Dochiodome', '매향', 'Redpearl', 'Samaberry', 'Akihime' 품종 등 조사된 모든 품종에서 발생하였으나, 특히 'Samaberry', '매향', 'Dochiodome'에서 많이 발생하였다. 시들음병 발생토양은 무발병토양보다 전기전도도, 질소, 인산농도가 높았고 pH는 낮게 나타났다. 'Dochiodome'와 'Samaberry' 품종에서 분리된 Fo47, Fo79균주는 공시된 4품종에 대해 병원성이 강했으며 특히 'Dochiodome', 'Redpearl', '매향' 품종은 더 감수성이었다.

## (2) 길항미생물제제의 온실 및 포장효과검정

선발된 길항미생물 *Burkholderia cepacia* BS36, *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, RK1의 최적 처리밀도는 BS36, BS87, RK1 각각  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU/ml으로 미생물간 큰 차이를 보였으며, 길항미생물을 토양 관주하는 것보다 정식 전 뿌리부위를 30분 침지하는 것이 방제효과가 높게 나타났고 포트시험에서 선발된 길항미생물의 예방효과는 모두 무처리에 비해 낮은 이병율을 나타내었으나 치료효과는 낮게 나타났다.

## (3) 최적 미생물제형의 선발

선발된 길항미생물을 제형화하여 포트 및 포장시험 결과 모든 길항미생물제형은 무처리에 비해 낮은 시들음병 이병율을 나타냈고 *Burkholderia cepacia* BS36과 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 혼용처리는 단용처리보다 낮은 방제효과를 나타내었다. 딸기 생육에서는 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87이 다른 길항미생물제형보다 생육촉진효과가 우수하였다. 위의 결과, 최적의 미생물살균제로 *Burkholderia cepacia* BS36은 인체유해성 제기로 제외하고 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1이 딸기 시들음병에 대한 미생물살균제로서의 가능성을 나타내었다.

## 2) 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 개발된 미생물제제는 딸기 시들음병에 대한 방제가가 72.6%일 뿐만 아

나라 딸기의 생육촉진에도 큰 효과를 보이고 있다. 이를 농민에게 널리 홍보하고 사용하게 하기 위해서는 미생물농약 등록은 필수적이다. 하지만 미생물농약을 등록하기 위해서는 고가의 비용과 복잡한 절차, 긴 시간이 필요하다. 정부차원에서 연구개발결과가 우수한 제품에 한해서는 미생물농약 등록비용의 일부를 지원해 주고, 절차를 간소화하여 연구개발결과가 빠른 시간 안에 산업화가 될 수 있도록 적극적인 지원을 해 주었으면 한다.

## SUMMARY

### I. Title

Development and commercialization of microbial fungicide to control a serious soil-borne disease of Fusarium wilt of strawberry

### II. Objectives and Necessities of Research

The total amount of yield of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) is about 700 billion Won in Korea, and which is 7th great amount of yield followed after red pepper, garlic, water mellon, cabbage, unripe (green) redpepper. The total cultivation area at 2004 was 7,600 ha (210,000 M/T) which was the 8th largest area in the world. The Fusarium wilt of strawberry by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* was the most serious soil-borne disease in Korea. Recently, Fusarium wilt susceptible domestic cultivar of Maehyang and Japanese cultivar of Dochiodome damaged around 30% in farms.

According to Korea Rural Economic Institute, 90% of strawberries cultivated in Korea are mostly Japanese cultivars such as 52.5 % of Redpearl, 31.7% of Akihime, and 1.8% of Sachinoka. Meanwhile, domestic cultivars are less than 10% such as 8.3% of Maehyang and 0.8% of Johong. In future, farmers cultivating Japanese cultivars has to pay a plant-bases royalty to Japan. To overcome the royalty problem, the government breed around 8 varieties, but only one variety of Maehyang recognized economic efficiency by farmers at 2002. One of demerits of Maehyang is susceptible of Fusarium wilt. Microbial fungicide is necessary to cultivate the strawberry with less agricultural fungicide. The biological control using antagonistic bacteria is an environmental friendly control and has continuous control effective as well as it helps

to product safe food and increase incomes to farmers, and should satisfy consumers well-being demand. Also, to reduce royalty load, farmers will prefer a domestic variety of Maehyang, and will use microbial fungicide instead of agricultural fungicide to control *Fusarium* wilt of strawberry.

Objectives of this research is to develop a multi-functional microbial fungicide to control soil-borne strawberry diseases and to promote growth of strawberry by mixing antagonistic bacteria are with various type which have inhibition effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, to commercialize the microbial fungicide, that has quality and price competitiveness through a formulation and mass production process.

### III. Contents and extents of research

#### 1. Supervisory organization

A. Pharmaceutical formulation and field activation evaluation of antagonistic bacteria for control of the *Fusarium* wilt

B. Mass production biological fermentation medium and optimization of biological fermentation process

C. Establishment of product processing and management technology

#### 2. The first cooperative organization

A. Investigation of pathogenic and genetic characteristics of collected *Fusarium oxysporum*.

B. Examination of durability of antagonistic bacteria in soil and examination of effectiveness through analysis of antagonistic material

C. Development of a processing technology for upgrading effectiveness of microbial fungicide

### 3. The second cooperative organization

- A. Investigation of *Fusarium* wilt occurrence and examination of effect of antagonistic bacteria at the greenhouse and field trials
- B. Examination of effect of antagonistic bacteria formulation at greenhouse and field trials
- C. Selection of optimum microbial formulation

## IV. Results of research and suggestions of application

### 1) Results of research development

#### A. Supervisory research organization

#### (1) Pharmaceutical formulation and field activation evaluation of antagonistic bacteria for control of the *Fusarium* wilt

Microbial fungicide developed by selected *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia cepacia* BS36, and *Bacillus amyloliquefaciens* RK1 with various conditions for biological control of *Fusarium* wilt of strawberry, a microbial fungicide which is mixture of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 and *Bacillus amyloliquefaciens* RK1 with proper ratio showed a promotion of growth of strawberry. Also, this research confirmed a possibility as a biological fungicide which showed 72.6% control effect against the *Fusarium* wilt.

#### (2) Mass production biological fermentation medium and optimization of biological fermentation process

*Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia cepacia* BS36, and *Bacillus amyloliquefaciens* RK1 fermented with the highest concentration at a medium added various concentrations of soy milk. In a case of formulation using strains cultivated seven days, obtained the most stable strain concentration.

(3) Establishment of product processing and management technology

The formulation accompanied many restrictions to implicate live micro organism into a production. The processing temperature and formulation materials should not affect resistance bacteria for final end product of resistant bacteria. Results of formulation from this research has a merit which does not affect to the resistant bacteria, allows the resistant bacteria stable existence for a long time, and dose not polluted from other micro organisms.

B. The first cooperative organization

(1) Investigation of pathogenic and genetic characteristics of collected *Fusarium oxysporum*.

Strawberry cultivar Akihime showed the most resistance to the 22 *Fusarium* wilt strains, but Dochiodome showed the most sensitivity. Meanwhile, four strains among investigated individual pathogens propagated disease to all cultivars, and Akihime which was considered to be resistive cultivar showed no resistance to all sample strains.

Even though this research could not discriminate the genetic difference in a comparison of a treatment of constraint ferment after amplification of ITS region, the constraint aspect appeared variously after amplification of IGS region. This result lead to a fact that pathogens distributed in the Korea distributed with genetical variation. Also, results from analysis of genetic variation and affinity relation using URP and OPA primer which were applied to an analysis of genetic variation and affinity relation for various plants and plant pathogens verified the existence of genetic variation in *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* group.

(2) Examination of durability of antagonistic bacteria in soil and examination of effectiveness through analysis of antagonistic material

The survival rate of antagonistic bacteria in soil, the concentration of the antagonistic bacteria was  $10^{6-7}$  cfu/g rhizosphere soil right after treatment, and was  $10^{5-7}$  cfu/g after four weeks. BS36 survived around four weeks in soil, and was not discriminated at 14 weeks. BS87 and RK1 showed a high survival rate as  $10^{4-6}$  cfu/g even after 14 weeks.

The inhibition type by three antagonistic bacteria showed various type such as a disintegration of spawn wall, disintegration of cell membrane, spawn swelling, and growth decline at the end of spawn. In general, growth inhibition of plant pathogens by antagonistic strains explained as antibiotic action by the antibiotic substance, disintegration of cell wall, disintegration of cell membrane, and nutrition competitiveness. This research confirmed that antagonistic bacteria used for the research had various antagonistic inhibition.

(3) Development of a processing technology for upgrading effectiveness of microbial fungicide

This could induced the two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 and RK1 as a spore type by cultivating the two strains and add  $MnSO_4$ (10mg/L). Also, this research collected fungus body stably by freeze-drying treatment of cultivated liquid of the two strains.

### C. The second cooperative organization

(1) Investigation of *Fusarium* wilt occurrence and examination of effect of antagonistic bacteria at the greenhouse and field

The occurrence of *Fusarium* wilt in strawberry fields in Korea was assessed from 2001 to 2003. *Fusarium* wilt was found from June to August in nursery beds, from September to October after planting in production beds, and from January to March during harvesting period. The symptoms were root rots, discolored vascular tissue in

the crown and deformation and yellowing of central leaflets. The disease occurred in up to 30% of plants in 37 of 214 fields surveyed. Fusarium wilt occurred from cvs. 'Dochiodome', 'Maehyang', 'Redpearl', 'Samaberry' and 'Akihime' and more severe from cvs. 'Samaberry', 'Maehyang' and 'Dochiodome'. Infested soils had high salt concentrations, high nitrogen, phosphate concentrations and low pH.

(2) Examination of effect of antagonistic microbial fungicide at greenhouse and field

The optimum treatment concentration of BS36, BS87, and RK1 selected from antagonistic bacteria of *Burkholderia cepacia* BS36, *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, and RK1 was  $10^7$ ,  $10^5$ , and  $10^6$  CFU/ml, respectively, and showed significant differences. The control effect was higher by dipping roots around 30 minutes before transplanting than by soil irrigation. The control effect of selected antagonistic bacteria from the pot experiment showed lower diseased plants rate compare to the none-treatment, but showed lower curative effect.

(3) Selection of optimum microbial formulation

All antagonistic microbial formulation showed lower diseased plants rate compared to none-treatment in pot and field experiments, and the mixed treatment of *Burkholderia cepacia* BS36 and *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 showed lower control effect than single treatment. In growth of strawberry, *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 showed the highest growth promotion among other antagonistic bacteria formulations. Results discussed above, except the *Burkholderia cepacia* BS36 due to human risk, the *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 and RK1 showed a possibility of microbial fungicide against the Fusarium wilt of strawberry.

2) Suggestions of application

The control effect of the microbial fungicide developed from this research was 72.6%, and the microbial fungicide showed significant effect on promotion of growth of

strawberry. The registration of the microbial fungicide is necessary to publicize and use by farmers. The registration, however, required high cost of expense, complicated procedure, and long-term of time. The support of government level should be considered for a superior product from results of the research to support a portion of the registration expenses and to simplify the registration procedure to industrialize a developed results within a short period of time.

## CONTENTS

Chapter 1. Backgrounds of research and development .....	31
Chapter 2. The current status of research and development in domestic and foreign countries .....	33
Chapter 3. Contents and results of research and development .....	35
Section 1. Pharmaceutical formulation and field activation evaluation of antagonistic bacteria for control of the Fusarium wilt (Supervisory Organization).....	35
1. Methods of research .....	35
A. Fermentation and production of antagonistic bacteria for suppressive <i>Fusarium oxysporum</i> .....	35
1) Temperature .....	35
2) Culture time .....	35
B. Evaluation of activation of inhibition and of metabolites contents of antagonistic bacteria of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	35
C. Optimization of application through the evaluation of activation of formulation of antifungal bacteria at pot .....	36
1) Formulation of antifungal bacteria .....	36
2) Effect examination against the Fusarium wilt .....	37
2. Contents and results of research .....	38
A. Pharmaceutical formulation and field activation evaluation of antagonistic bacteria for control of the Fusarium wilt .....	38
1) Fermentation and production of antagonistic bacteria for suppressive <i>Fusarium oxysporum</i> .....	38
A) Temperature .....	38

B) Culture time .....	40
B. Evaluation of activation of inhibition and of metabolites contents of antagonistic bacteria of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	42
C. Optimization of application through the evaluation of activation of formulation of antagonistic bacteria at pot .....	44
 Section 2. Investigation of pathogenic and genetic characteristics of collected <i>Fusarium oxysporum</i> for effective control plan establishment .....	45
1. Methods of research .....	45
A. Examination of pathogenic of <i>Fusarium oxysporum</i> for each cultivar .....	45
B. RAPD analysis of <i>Fusarium oxysporum</i> using primers .....	46
C. rDNA RFLP analysis .....	46
2. Contents and results of research .....	48
A. Investigation of pathogenic and genetic characteristics of collected <i>Fusarium oxysporum</i> for effective control plan establishment .....	48
 Section 3. Investigation of <i>Fusarium</i> wilt and effect examination of antagonistic bacteria at the greenhouse and field .....	57
1. Methods of research .....	57
A. Investigation of Fusarium wilt occurrence .....	57
B. Investigation of soil environment at the infested and none-infested fields .....	57
C. Investigation of Fusarium wilt according to nitrogen fertilization .....	58
D. Pathogenicity test of the isolates of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	58
2. Contents and results of research .....	58

A. Investigation of Fusarium wilt occurrence .....	58
B. Investigation of soil environment at the infested and none-infested fields .....	61
C. Investigation of Fusarium wilt according to nitrogen fertilization .....	62
D. Pathogenicity test of the isolates of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	64
Section 4. Optimization of mass production of biological fermentation medium and biological fermentation process .....	66
1. Methods of research .....	66
A. Development of mass production biological fermentation medium for commercialization .....	66
1) Culture concentration and amount of sporulation for each medium .....	66
2) Variation according to small-amount element concentration .....	66
B. Optimization of mass amount fermentation condition of antifungal bacteria ...	67
C. Optimization of fermentation process of antagonistic bacteria .....	67
D. Manufacturing of prototype of liquid and solid micro organism fungicide .....	68
2. Contents and results of research .....	68
A. Development of mass production biological fermentation medium for commercialization .....	68
B. Optimization of mass amount fermentation condition of antagonistic bacteria ...	70
1) Density of cultivation and spore germination ratio of BS87 according to concentration of medium and glucose addition .....	70
2) Concentration of cultivation of RK1 according to concentration of soy milk medium and cultivation days .....	72
3) Concentration of cultivation of BS36 according to concentration of soy milk medium and cultivation days .....	73
C. Optimization of fermentation process of antagonistic bacteria .....	74

1) Formulation of BS87 .....	74
2) Formulation of BS36 .....	74
3) Formulation of RK1 .....	75
D. Manufacturing of prototype of liquid and solid micro organism fungicide .....	76
Section 5. Examination of durability of antagonistic bacteria in soil and examination of effectiveness through analysis of antagonistic material (the first cooperative organization) .....	76
1. Methods of research .....	76
A. Selection of resistant bacteria against antibiotics for investigation of ecological movement of antifungal bacteria .....	77
1) Determination of resistant spectrum of antagonistic bacteria against antibiotics .....	77
2) Inducement of mutant for acquisition of antibiotic tolerance of antibiotic sensitive strains .....	77
3) Examination of antibacterial activity of strains acquired resistant against antibiotics .....	77
4) Examination of multi resistant of selected antibiotic resistant strains against different antibiotics .....	78
B. Investigation of durability of micro organism fungicide in soil .....	78
1) Investigation of density of treated micro organism within rhizosphere of strawberry .....	78
2) Investigation of density of resistant bacteria according to soil depth .....	78
C. Separation and analysis of antibiotic material of resistant bacteria .....	79
1) Type of inhibition of plant pathogens by antagonistic bacteria .....	79
2) Analysis of extractability of solvent .....	79
3) Temporal stability of activation material .....	79
4) Silica gel open column chromatography .....	79
5) Thin layer chromatography .....	79

2. Contents and results of research .....	80
A. Selection of resistant bacteria against antibiotics for investigation of ecological movement of antagonistic bacteria .....	80
1) Determination of resistant spectrum of antagonistic bacteria against antibiotics .....	80
2) Inducement of mutant for acquisition of antibiotic tolerance of antibiotic sensitive strains .....	81
3) Examination of antibacterial activity of strains acquired resistant against antibiotics .....	83
4) Examination of cross resistant of selected antibiotic resistant strains against different antibiotics .....	83
B. Investigation of durability of micro organism fungicide in soil .....	84
1) Investigation of density of treated micro organism within rhizosphere of strawberry .....	84
2) Investigation of density of resistant bacteria according to soil depth .....	86
C. Separation and analysis of antibiotic material of resistant bacteria .....	86
1) Type of inhibition of plant pathogens by antagonistic bacteria .....	86
2) Analysis of extractability of solvent .....	87
3) Temporal stability of activation material .....	88
4) Silica gel open column chromatography and Thin layer chromatography .....	89
 Section 6. Examination of effect of resistant bacteria at greenhouse and field (the second cooperative organization) .....	 90
1. Methods of research .....	90
A. Examination of pre-treatment effect of antagonistic bacteria according to amount and treatment distance .....	90
1) Examination of Fusarium wilt according to treatment density of antagonistic bacteria formulation .....	90

2) Examination of Fusarium wilt according to treatment methods of antagonistic bacteria .....	91
B. Investigation of optimum treatment frequency of micro organism fungicide and examination of curative effects after prior treatment of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	92
C. Investigation of possibility of cross or mixed application of existing synthetic agricultural fungicides for IPM .....	92
2. Contents and results of research .....	93
A. Examination of pre-treatment effect of micro organism fungicide according to amount and treatment interval .....	93
1) Examination of Fusarium wilt according to treatment density of antagonistic bacteria .....	93
2) Examination of Fusarium wilt according to treatment methods of antagonistic bacteria .....	94
B. Investigation of optimum treatment frequency of micro organism fungicide and examination of curative effects after prior treatment of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	95
1) Investigation of treatment effects of micro organism fungicide after prior treatment of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	95
C. Investigation of possibility of cross or mixed application of existing synthetic agricultural fungicides for IPM .....	96
Section 7. Establishment of product processing and management technology .....	97
1. Methods of research .....	97
A. Quantitative experiment of effective components, product package and long-term storage methods establishment .....	97
1) Quantitative experiment of effective components .....	97
2) Product package and long-term storage methods establishment .....	98

B. Registration of new functional micro organism formulation controlling <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	98
C. Advertising through product explanation and evaluation of prototype through farmers .....	98
2. Contents and results of research .....	98
A. Examination of pre-treatment effect of micro organism fungicide according to amount and treatment interval .....	98
1) Quantitative experiment of effective components .....	98
2) Product package and long-term storage methods establishment .....	99
B. Registration of new functional micro organism formulation controlling <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> .....	99
C. Advertising through product explanation and evaluation of prototype by farmers .....	99
Section 8. Development of process technology for upgrading effectiveness of micro organism .....	101
1. Methods of research .....	101
A. Selection of sub-material for conservation and selective propagation resistant bacteria .....	101
B. Development of separation process of resistant bacteria strains and fermentation liquid .....	101
2. Contents and results of research .....	101
A. Selection of sub-material for conservation and selective propagation antagonistic bacteria .....	102
B. Development of separation process of resistant bacteria strains and fermentation liquid .....	104

Section 9. Selection of most effective microbial formulation (The second cooperative organization) .....	105
1. Methods of research .....	105
A. Selection of most effective microbial formulation .....	105
1) Effect of antagonistic bacteria on growth characteristics of strawberry .....	105
2) Selection of most effective microbial fungicide .....	105
3) Effects of storage viability and antagonism of granular formulations of microbial fungicide .....	106
2. Contents and results of research .....	106
A. Selection of most effective microbial formulation .....	106
1) Effect of antagonistic bacteria on growth characteristics of strawberry .....	106
2) Selection of most effective microbial fungicide .....	107
3) Effects of storage viability and antagonism of granular formulations of microbial fungicide .....	108
 Chapter 4. Attainability of the research goal and contributions to related fields .....	 110
Section 1. Attainability of the research goal and contributions to related fields ...	110
1. The first year .....	110
2. The second year .....	111
3. The third year .....	112
 Chapter 5. Application plan of results .....	 113
Section 1. Promotion plan of industrialization .....	113

Section 2. Necessity of future study .....	113
Chapter 6. Scientific and technical informations obtained from abroad during research .....	115
Chapter 7. Reference .....	116

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	31
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	33
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	35
제 1 절 딸기시들음병 방제용 길항미생물의 제제화 및 포장활성 검증(주관기관)...	35
1. 연구수행방법 .....	35
가. <i>Fusarium oxysporum</i> 억제 길항미생물의 발효생산 .....	35
1) 온도 .....	35
2) 배양시간 .....	35
나. 길항미생물의 딸기시들음병균 억제 활성 및 대사산물 함유제형의 활성 검증 ...	35
다. 길항미생물의 균체 제형의 포트 활성 검증을 통한 사용방법의 최적화 .....	36
1) 길항미생물의 제형화 .....	36
2) 딸기 시들음병에 대한 방제 효과 검증 .....	37
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	38
가. 딸기시들음병 방제용 길항미생물의 제제화 및 포장활성 검증 .....	38
1) <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> 억제 길항미생물 및 대사산물의 발효생산 · 38	
가) 온도 .....	38
나) 배양 시간 .....	38
나. 길항미생물의 딸기시들음병균 억제 활성 및 대사산물 함유 제형의 활성 검증 ...	42
다. 길항미생물의 균체 제형의 포트 활성 검증을 통한 사용 방법의 최적화 .....	44
제 2 절 효과적인 방제대책 수립을 위한 수집된 시들음병균의 병원성 및 유전적 특성	

<b>조사 (제1협동기관)</b> .....	45
1. 연구수행방법 .....	45
가. 딸기 품종별 시들음병균의 병원성 검정 .....	45
나. Primer를 이용한 시들음병균의 RAPD 분석 .....	46
다. rDNA RFLP analysis .....	46
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	48
가. 효과적인 방제대책 수립을 위한 수집된 시들음병균의 병원성 및 유전적 특성 조사 .....	48
 <b>제 3 절 시들음병 발생조사 및 길항미생물의 온실 및 포장에서 효과검정 (제2협동기관)</b> .....	57
1. 연구수행방법 .....	57
가. 병 발생상황 조사 .....	57
나. 발병지와 무발병지 토양의 토양환경 실태 조사 .....	57
다. 질소시비에 따른 위황병 발생조사 .....	58
라. 분리균주에 대한 병원성 검정 .....	58
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	58
가. 병 발생상황 조사 .....	58
나. 발병지와 무발병지 토양의 토양환경 실태 조사 .....	61
다. 질소시비에 따른 위황병 발생조사 .....	62
라. 분리균주에 대한 병원성 검정 .....	64
 <b>제 4 절 대량생산 생물발효배지 및 생물 발효공정의 최적화(주관기관)</b> .....	66
1. 연구수행방법 .....	66
가. 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지 개발 .....	66

1) 배지별 배양농도 및 포자생성량 .....	66
2) 미량요소 농도에 따른 변화 .....	66
나. 길항미생물의 대량 발효조건 최적화 .....	67
다. 길항미생물 발효공정의 최적화 .....	67
라. 액상 및 고체 미생물살균제의 시제품 제작 .....	68
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	68
가. 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지 개발 .....	68
나. 길항미생물의 대량 발효조건 최적화 .....	70
1) BS87균주의 배지 농도별, Glucose 첨가에 따른 배양균 밀도 및 포자형성을 ...	70
2) RK1균주의 Soy milk배지 농도별, 배양일수별 배양 농도 .....	72
3) BS36균주의 Soy milk배지 농도별, 배양일수별 배양균 밀도 .....	73
다. 길항미생물 발효공정의 최적화 .....	74
1) BS87균주의 제형화 .....	74
2) BS36균주의 제형화 .....	74
3) RK1균주의 제형화 .....	75
라. 액상 및 고체 미생물살균제의 시제품 제작 .....	76

**제 5 절 길항미생물의 토양내 지속성 및 길항물질 분석을 통한 효과 검증(제1협동기관)**  
..... 76

1. 연구수행방법 .....	76
가. 길항미생물들의 생태학적 통태 관찰을 위해 항생제 내성균 선발 .....	77
1) 길항미생물의 각 항생제별 내성 Spectrum 검증 .....	77
2) 항생제에 감수성인 균주들의 항생제 저항성 획득을 위한 Mutant 유도 .....	77
3) 각 항생제 별로 저항성이 획득된 균주들의 항균활성능 검증 .....	77
4) 선발된 항생제 저항성 균주들의 다른 항생제에 대한 다중 저항성 검증 .....	78
나. 토양내 미생물 살균제의 지속성 조사 .....	78
1) 딸기 근권내 처리미생물 밀도 조사 .....	78

2) 토양 깊이별 길항미생물 밀도 조사 .....	78
다. 길항미생물의 항생물질 분리 및 분석 .....	79
1) 길항세균에 의한 식물병원균류의 저해 형태 .....	79
2) 용매추출성의 검토 .....	79
3) 활성물질의 경시적인 안정성 .....	79
4) Silica gel open column chromatography .....	79
5) Thin layer chromatography .....	79
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	80
가. 길항미생물들의 생태학적 동태 관찰을 위해 항생제 내성균 선발 .....	80
1) 길항 미생물들의 각 항생제별 저항성 Spectrum 검정 .....	80
2) 항생제에 감수성인 균주들의 항생제 저항성 획득을 위한 Mutant 유도 .....	81
3) 각 항생제 별로 저항성이 획득된 균주들의 항균활성능 검정 .....	83
4) 선발된 항생제 저항성 균주들의 다른 항생제에 대한 교차저항성 검정 .....	83
나. 토양내 미생물 살균제의 지속성 조사 .....	84
1) 딸기 근권내 처리미생물 밀도 조사 .....	84
2) 토양 깊이별 길항미생물 밀도 조사 .....	86
다. 길항미생물의 항생물질 분리 및 분석 .....	86
1) 길항세균에 의한 식물 병원균류의 저해 양상 .....	86
2) 용매 추출성 .....	87
3) 활성물질의 경시적인 안정성 .....	88
4) Silica gel open column chromatography와 Thin layer chromatography .....	89
<b>제 6 절 길항미생물제제의 운실 및 포장 효과 검정 (제2협동기관) .....</b>	<b>90</b>
1. 연구수행방법 .....	90
가. 미생물살균제의 처리량과 처리간격에 따른 전처리 효과 검정 .....	90
1) 길항미생물 제형의 처리밀도에 따른 딸기 시들음병 검정 .....	90
2) 길항미생물 처리방법에 따른 딸기 시들음병 검정 .....	91
나. 시들음병균의 선처리 후 미생물살균제의 최적 처리횟수 조사와 치료효과 검정 ...	92

다. IPM을 위한 기존 합성농약과의 혼용 또는 교차사용 가능 조사 .....	92
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	93
가. 미생물살균제의 처리량과 처리간격에 따른 전처리 효과 검정 .....	93
1) 길항미생물 제형의 처리밀도에 따른 딸기 시들음병 검정 .....	93
2) 길항 미생물 제형의 처리방법에 따른 딸기 시들음병 검정 .....	94
나. 시들음병균의 선처리 후 미생물살균제의 최적처리횟수 조사와 치료효과 검정 ..	95
1) 시들음병균의 선처리 후 미생물살균제 처리에 의한 치료 효과 검정 .....	95
다. IPM을 위한 기존 합성농약과의 혼용 또는 교차사용 가능 조사 .....	96
<b>제 7 절 제품가공기술 및 관리기술 확립 (주관기관) .....</b>	<b>97</b>
1. 연구수행방법 .....	97
가. 유효성분의 정량실험 및 제품포장과 장기 보관방법 확립 .....	97
1) 유효성분의 정량실험 .....	97
2) 제품포장과 장기 보관방법 확립 .....	98
나. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> 제어 신기능 미생물제제 등록 .....	98
다. 제품설명회를 통한 홍보 및 대농민 시제품 평가 .....	98
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	98
가. 미생물살균제의 처리량과 처리간격에 따른 전처리 효과 검정 .....	98
1) 유효성분의 정량실험 .....	98
2) 제품포장과 장기 보관방법 확립 .....	99
나. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> 제어 신기능 미생물제제 등록 .....	99
다. 제품설명회를 통한 홍보 및 대농민 시제품 평가 .....	99
<b>제 8 절 미생물제의 효과증진을 위한 가공기술 개발 (제1협동기관) .....</b>	<b>101</b>
1. 연구수행방법 .....	101
가. 길항미생물 보존과 선택적 증식을 위한 부재료 선발 .....	101

나. 길항미생물 균체와 배양액의 분리공정 개발 .....	101
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	101
가. 길항미생물 보존과 선택적 증식을 위한 부재료 선발 .....	102
나. 길항미생물 균체와 배양액의 분리공정 개발 .....	104
<b>제 9 절 최적 미생물제형의 선발 (제2협동기관) .....</b>	<b>105</b>
1. 연구수행방법 .....	105
가. 최적 미생물 제형의 선발 .....	105
1) 미생물살균제가 딸기의 생육에 미치는 효과 .....	105
2) 최적 길항미생물제제 선발 .....	105
3) 미생물살균제의 유효기간 및 보존성 검정 .....	106
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	106
가. 최적 미생물 제형의 선발 .....	106
1) 길항미생물제제가 딸기의 생육에 미치는 효과 .....	106
2) 최적 길항미생물제제 선발 .....	107
3) 미생물살균제의 유효기간 및 보존성 검정 .....	108
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>110</b>
<b>제 1 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>110</b>
1. 1차년도 .....	110
2. 2차년도 .....	111
3. 3차년도 .....	112
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>113</b>
<b>제 1 절 기업화 추진방안 .....</b>	<b>113</b>

제 2 절 추가연구의 필요성 .....	113
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	115
제 7 장 참고문헌 .....	116

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

현재 재배되고 있는 딸기(*Fragaria × ananassa* Duch.)의 국내의 생산액은 연간 7,000억 원으로 전체 채소생산액의 9%를 차지하는 중요한 작물이다. 2004년도 국내의 딸기 재배면적은 7,600ha, 생산량은 210,000M/T으로 세계 8위를 차지하고 있다(FAO, 2005).

딸기에 발생하는 시들음병균은 *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *fragariae* Winks and Williams로 호주에서 최초로 보고되었으며(Winks and Williams, 1965), 국내에서도 조와 문(1984)에 의해 처음 보고된 이래 VCG(Hyun 등, 1996)와 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석(Hyun 과 Park, 1996) 및 rDNA restriction fragment length polymorphisms(RFLPs) 분석을 통한 유전적 다양성이 보고되었다(Nagarajan 등, 2004). 딸기의 각종 병해 발생은 재배양식에 따른 품종과 관련이 깊은데 국내에서는 1970-80년대 'Hokowase' 품종에서 시들음병 발생으로 큰 피해가 있었으나(김 등, 1982; 조와 문, 1984) 그 후 시들음병에 강한 'Nyoho', 'Akihime' 품종의 도입으로 한동안 문제가 되지 않았다. 그러나 최근 국내에서 육종된 '매향' 품종과 일본에서 육종된 'Dochiodome' 품종은 시들음병에 감수성으로 재배농가에서 30%의 큰 피해를 나타내고 있다(Nam 등, 2005).

*Fusarium*병의 발생은 토양환경과 밀접한 관련이 있고, 토마토와 박과의 경우 사양토에서 발생이 심하며(양 등, 2000), 사질토양이 식질 토양에 비해 *Fusarium oxysporum*의 증식이 용이하다고 한다(Stover, 1956). 또한 양(2000) 등에 의하면 pH는 관계없고 유기물, 인산, 양이온 함량이 높을 때 발생이 많다고 한다.

딸기 시들음병은 전염원인 후막포자가 토양 속에 생존하여 전염하는 토양전염성병해이며, 또한 이병모주로부터 발생하는 런너를 통해 자묘로 침입하여 발병시키는 영양번식전염도 한다(Matuo 등, 1980) 따라서 토양 병 방제를 위해 토양 훈증이나 약제 살포 방법을 사용할 경우 토양 미생물상의 파괴와 환경에 큰 영향으로 사용이 쉽지 않은 실정이다. 또한 무병묘를 확보하기 위해서는 조직배양을 통한 건전묘 육성이 되어야 하는데 이에 따른 많은 시간과 노력이 투입되어야 하는 문제점이 있다. 시들음병에 대한 생물학적 방제 연구는 오랜 역사를 가지고 있지만 실용화된 방제방법은 효과적이지 않거나, 처리하기 쉽지 않은 문제점이 있다(Alabouvette, 1998). 그러나 환경보존을 위한 관점에서 생물학적 방제연구가 큰 관심을 가지고 진행되고 있다. 그중 길항 미생물 (Schisler 등, 2002; de Boer 등, 2003), 중북기생균(Moon 등, 1995; Reid 등, 2002), 비병원성 *Fusarium*균(Tezuka 와

Makino, 1991; Horimoto, 1993; Fravel 등, 2003), vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) 균(Datnoff 등, 1995)을 이용한 생물학적 방제가 시도되고 있다. 또한 *Bacillus* spp.균을 이용한 제품들로 *B. subtilis* QST 713을 이용한 Serenade<sup>®</sup>, *B. amyloliquefaciens* GB 99+*B. subtilis* GB 122으로 만든 BioYield<sup>®</sup> 등이 사용되고 있다(Schisler 등, 2004). 생물학적 방제제의 병 억제작용은 철에 대한 siderophore-mediated competition(Bakker 등, 1988), competition for substrate(Couteaudir와 Alabouvette, 1990), induction of systemic resistance(Leeman 등, 1995; Fuchs 등, 1997; Van Loon 등, 1998), 항생물질 생산(Anjaiah 등, 1998), chitinolytic 효소의 생산(Singh, 등, 1999) 등이 보고되어 있다.

본 연구는 딸기시들음병균을 억제할 수 있고, 딸기의 생육촉진효과가 있는 미생물들을 이용하여 제품화하는데 그 목적이 있으며, 이를 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

### 1. 주관연구기관

- 가. 딸기시들음병 방제용 길항미생물의 제제화 및 포장활성 검증
- 나. 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화
- 다. 제품가공기술 및 관리기술확립

### 2. 제1협동기관

- 가. 수집된 시들음병균의 병원성 및 유전적 특성조사
- 나. 길항미생물의 토양내 지속성 및 길항물질 분석을 통한 효과 검증
- 다. 미생물제의 효과증진을 위한 가공기술 개발

### 3. 제2협동기관

- 가. 시들음병 발생조사 및 길항미생물의 온실 및 포장에서 효과검정
- 나. 길항미생물제제의 온실 및 포장효과검정
- 다. 최적 미생물제형의 선발

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에서는 2001년도에 친환경농업육성 5개년('01~'05)계획을 수립하여 향후 5년간 친환경농업을 체계적으로 육성하기 위한 정책목표와 방향이 설정되어 있으며 2005년까지 농약·화학비료를 원제 기준으로 30% 감축, 친환경 농산물 생산량이 5%로 확대될 것으로 예상된다.

현재 국내에는 57여종(1999년 기준)의 토양 미생물제제가 사용되고 있으나 탁월한 효과를 나타내지 못했고 병 방제 기능보다는 효소제나 유용 미생물제제의 역할이 증가되고 있다.

미생물 살균제의 필요성 증가로 외국으로부터 많은 수입이 이루어질 것으로 판단되며 이에 발맞추어 병방제에 효과적이며 경쟁력 있는 미생물 살균제의 개발이 시급한 실정이다.

현재 국내 일부 농약회사는 미생물농약의 필요성을 인식하고 개발에 관심을 갖고 있지만 전문인력이 부족한 상태에서 기술 집약적인 신기술을 필요로 하는 환경친화적인 미생물살균제의 개발에 어려움을 겪고 있다. 이는 신기능 미생물제제의 실용화가 새로운 미생물 소재의 선별과 선별한 미생물원제를 대량 생산하고 제제화 하는데 섬세하고 높은 수준의 기술을 요하기 때문이다.

또한 환경보존에 대한 관심이 높아져 미생물 농약 시장의 신장이 예상되는 상황에서 방제대상 병원균에 대한 활성이 우수한 미생물살균제의 생산은 본 기술의 개발과 실용화는 산업적, 학술적으로 가치가 크며 선진국 미생물농약 시장진출에 필수적이라 사료된다.

미국을 비롯한 일본 등의 선진국에서는 독성 화학농약을 회피하기 위해 30년 전부터 생물농약 개발을 지속적으로 연구해 왔으며 현재 수십 종의 생물 농약이 등록되고 실용화가 빠른 속도로 진행되고 있음.

영국의 CPL사의 조사보고를 인용하면 세계 생물농약시장은 2000년에 1억 5천만 달러로 예상하며 그 중 미생물농약이 4천만달러로 점차 증가할 것으로 예상하고 있다.

국내 미생물 시장은 세계시장과 마찬가지로 BT제가 주이지만 최근 미생물살균제의 판매액이 3배 이상 증가해 추후 지속적인 시장규모가 커질 것으로 판단된다.

생물농약은 생산비가 높고 약효발현이 늦는 단점이 있으며 저장기간이 짧고 기주 특이적이라 방제대상 범위가 좁은 단점이 있지만 환경친화적이다.

생태계에 축적되지 않아 수확기까지 사용할 수 있고 저항성병해충을 효과적으로 방제할

수 있고 적용대상이외에는 동식물에 피해가 없다는 점이 생물 농약 시장의 추후 확대 가능 요소이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 딸기시들음병 방제용 길항미생물의 제제화 및 포장활성 검증 (주관기관)

#### 1. 연구수행방법

가. *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 억제 길항미생물의 발효생산

##### 1) 온도

선발된 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia pyrrocinia* BS36 및 *Bacillus* sp. RK1 균주의 성장 적온 조사를 위해 300ml의 삼각플라스크에 King's B broth(KB; proteose peptone 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g, glycerol 15 g, distilled water 1 l)를 100ml씩 넣고 각각의 길항미생물 균주의 균배양액 1ml를 접종하여 온도별로 20℃~40℃까지 5℃ 간격으로 조정하여 진탕배양(48시간, 180rpm) 하였다. 길항미생물의 성장 조사는 48 시간 배양 후 세균 배양액을 멸균수로 10<sup>10</sup>까지 10배단위로 희석한 후에 30℃ incubator에서 2일간 배양하여 세균수 측정을 하였다.

##### 2) 배양시간

선발된 3 균주의 최적 배양 시간을 조사하기 위해 300ml의 삼각플라스크에 King's B broth(KB)를 100ml씩 넣고 각각의 길항미생물 균주의 균배양액 1ml를 접종하여 시간별로 72시간까지 6시간 간격으로 조정하여 진탕배양(30℃, 180rpm) 하였다. 길항미생물의 성장 조사는 6시간 단위로 조사하였고, 세균 배양액을 멸균수로 10<sup>10</sup>까지 10배단위로 희석한 후에 30℃ incubator에서 2일간 배양하여 세균수 측정을 하였다.

나. 길항미생물의 딸기 시들음병균 억제 활성 및 대사산물 함유제형의 활성 검증

선발된 3 균주는 딸기 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)과 PDA 평판배

지 위에 대치배양하고 1주 후에 Inhibition zone을 측정하여 병원균의 억제 효과를 검증하였다. 또한 길항미생물의 대사산물에 의한 균사생장 억제에 미치는 영향을 조사하기 위해, 세균배양액을 원심분리하고 상등액을 취하여 0.2 $\mu$ m milipore filter로 여과한 후 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 검정배지(assay media)상의 0.8cm paper disk에 50  $\mu$ l씩을 치상하고 25 $^{\circ}$ C에서 배양 후 병원균의 발아 및 균사생육억제효과를 검증하였다.

다. 길항미생물의 균체 제형의 포트 활성 검증을 통한 사용방법의 최적화

#### 1) 길항미생물의 제형화

효과적인 길항균을 실용화시키려면 제형화가 요구된다. 처리한 길항균이 토양에서 생존하고 유지 될 수 있어야 하며, 길항균의 효능이 근권 토양내에서 효과적으로 발휘될 수 있어야한다. 또한 제형에 함유된 성분들이 작물에 해로운 영향을 미치지 않아야 길항균을 제형화하여 생물학적방제에 이용하였을 때 효과를 얻을 수 있게 된다. 위와 같은 여러 가지 요인들을 고려하여 공시 길항세균의 고정화 방법(배양합성형, 수화제형, Zeolite 흡착형), 흡착제 선정(쌀겨, 왕겨, 보리겨, 탈지강, 톱밥, 제올라이트, 전분, Cellulose, PVA, kaoline 등), 세균흡착증강제 선정(단일 또는 복합적 계면활성제 등), 영양 보조제의 선정, 기타 미량원소의 첨가 등을 통해 딸기에 해로운 영향을 미치지 않으면서 딸기 시들음병을 효과적으로 방제할 수 있는 제형을 개발하였다.

딸기 근권내에서의 선발된 유용 길항미생물의 효과를 안정적으로 지속시키기 위한 처리 방법 등을 조사하고, 생존력을 지속시키기 위한 방법으로 길항균을 동일한 조건에서 육묘한 딸기 유묘에 침지처리 방법을 조사하였다.

길항세균의 효능 증진 및 딸기 근면의 접착성을 높이기 위하여 수화제 타입 제형을 새롭게 개발하였다. 수화제 타입 제형은 미세한 분말형태의 흡습제를 사용하였고, 코팅제와 딸기뿌리에 길항세균의 흡착율을 높여줄 수 있는 흡착증강제와 제형을 물에 희석하였을 때 현탁성을 높여주는 분산제를 사용하였다. 영양원으로 질소원 및 탄소원을 사용하였는데 모두 물에 잘 녹는 성분으로 딸기에 스트레스는 적게 주고 비료효과도 줄 수 있는 성분을 선택하여 사용하였다. 제형간의 비율은 확실한 결과가 도출될 때까지 비공개하기로 하였다.

수화제 타입 제형은 담체역활을 해주는 흡습제에 배양합성 타입에서와 동일한 방법으로 길항세균을 배양한 배양액을 4 $^{\circ}$ C, 3500rpm으로 15분간 원심분리하여 10<sup>10</sup> CFU/ml (cell

suspension)으로 농축한 길항세균 농축액을 섞어준 후 mixer를 사용하여 혼합하여준다. 농축된 길항세균과 흡습제 혼합물에 코팅제, 분산제, 흡착증강제, 질소원, 탄소원 등을 일정 비율로 충분히 혼합해주면 최종산물로  $10^9$  CFU/ml (길항세균 농도)의 제형이 완성된다. 수화제 타입 제형의 특징으로는 물에 현탁이 잘 되고 30분 이상 현탁이 지속된다는 것이고, 또한 딸기 근면에 길항세균의 흡착이 뛰어나며, 고체상의 제형보다는 토양입자 속으로 길항세균의 투입이 훨씬 용이하다는 장점이 있다.

2) 딸기 시들음병에 대한 방제 효과 검증

길항미생물 함유 제형의 딸기 시들음병에 대한 방제 효과 검정을 위해 병원균을 V-8 broth에서 5일간 진탕배양 후  $1 \sim 2 \times 10^6$  포자의 농도로 포자현탁액을 만들었다. 또한 동일한 조건에서 육묘한 도치오도메 품종의 자묘를 동시에 채묘하였다. 2003년 7월 고온기에 채묘한 자묘를 흙을 털고 뿌리 끝부분은 자른 후 각 처리구당 10주씩 제형의 희석액에 침지 처리한 직후 무처리구와 동일하게 모든 처리구에 딸기 시들음 병원균 포자현탁액 (20ml,  $1 \sim 2 \times 10^6$ cfu/ml)을 뿌리에 관주처리 하였다. 그후 논산딸기시험장의 비가림하우스에서 재배하면서 15일 간격으로 이병지수를 조사하였다. 이병지수는 0~5의 범위로 a = 무발병 b = 1-2잎이 휘어지고 신엽이 황색, c = 모든 잎이 휘어지고 짙은, d = 잎이 황화되고 1/2 시들음, e = 전체 시들음, f = 고사이다. 조사된 이병지수를 이용하여 Scott 등의 방법을 기본으로 각각의 이병율을 조사하였고, 무처리구에 대비해서 각 제형별 딸기 시들음병에 대한 방제가를 도출하였다.

$$\text{이병율 (\%)} = \frac{(a \times 0) + (b \times 1) + (c \times 2) + (d \times 3) + (e \times 4) + (f \times 5)}{a + b + c + d + e + f} \times \frac{100}{3}$$

방제가 (%) = (처리구 이병율 - 무처리구 이병율)/무처리구 이병율

처리구

- ① Control (무처리구)
- ② 대조구 [약제처리구;(코사이드; copper hydroxide 77%, 수화제, 동부한농) 관주]
- ③ BS87 균체 함유 제형
- ④ BS36 균체 함유 제형

⑤ RK1 균체 함유 제형

⑥ BS87 + BS36 + RK1 균체 함유 제형

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 딸기시들음병 방제용 길항미생물의 제제화 및 포장활성 검증

#### 1) *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 억제 길항미생물 및 대사산물의 발효생산

딸기 시들음병의 생물학적 방제를 목적으로 선발된 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia pyrrocinia* BS36 및 *Bacillus* sp. RK1 균주의 발효생산 조건을 조사하기 위해서 온도 및 배양시간별 길항미생물의 배양 밀도를 조사하였다. 3 균주 모두 30℃에서 배양이 가장 잘 되었다. 배양 시간은 3 균주 모두 30시간 이후에 최고밀도로 배양되었으며, BS36의 경우에는 최고 밀도로 배양된 후에도 밀도가 어느 정도 유지되었으나 BS87 균주와 RK1 균주의 경우에는 최고밀도로 배양된 후부터는 균의 밀도가 감소되었다.

#### 가) 온도

선발된 3 균주 모두 48 시간 배양에서는 30℃에서 세균수는 최고밀도가 되었다. BS36의 경우에는 25℃~30℃가 가장 생육이 좋았고, BS87와 RK1 균주는 30℃~35℃가 생육이 좋았다. 길항미생물의 밀도 조사를 위한 세균수 측정은 48 시간 배양 후 세균 배양액을 멸균수로 10<sup>10</sup>까지 10배단위로 희석한 후에 30℃ incubator에서 2일간 배양 후 측정을 하였다(Fig.3-1-1, 2, 3).

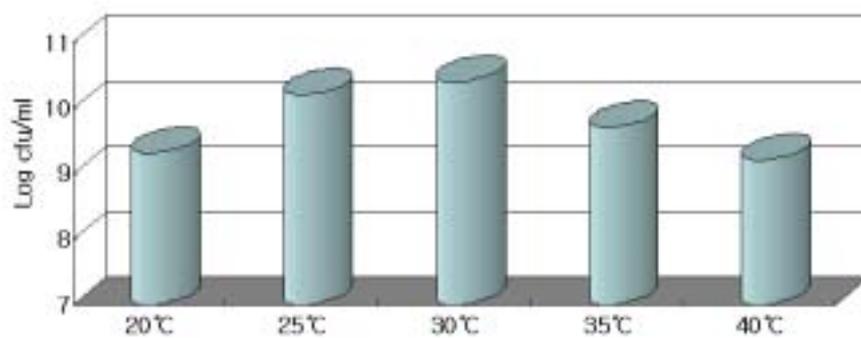


Fig.3-1-1. Effect of temperature(°C) for cell growth of *Burkholderia pyrrocinia* BS36 strain in KB medium.

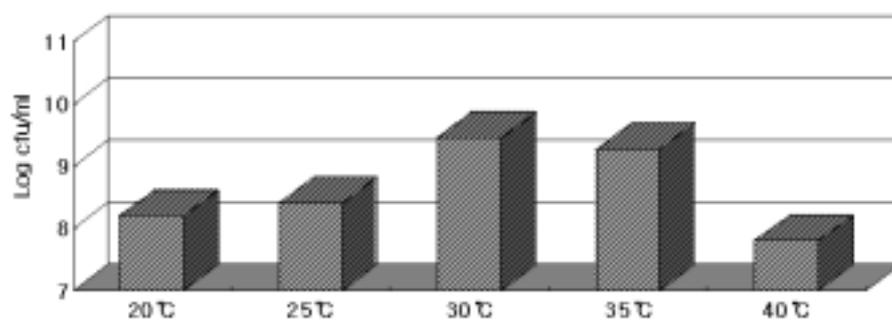


Fig.3-1-2. Effect of temperature(°C) for cell growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 strain in KB medium.

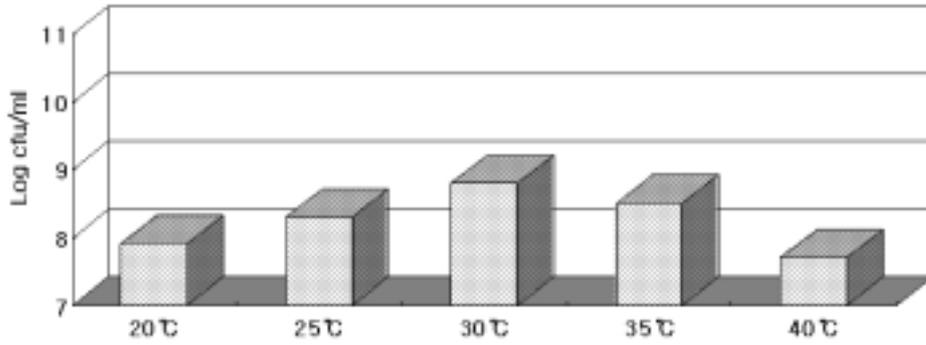


Fig.3-1-3. Effect of temperature(°C) for cell growth of *Bacillus* sp. RK1 strain in KB medium.

나) 배양 시간

*Burkholderia pyrrocinia* BS36 균주는 배양 18 시간 후부터 30 시간까지 세균밀도가 급격히 증가하였으나 그 이후부터는 증가 뿐만 아니라 감소도 하지 않는 것으로 보아 BS36 균주는 30시간 후부터 최고 밀도로 배양된 후부터 일정한 밀도를 안정적으로 유지하고 있었다. 세균의 밀도 조사는 세균 배양액을 멸균수로  $10^{10}$ 까지 10배단위로 희석한 후에 30°C incubator에서 2일간 배양 후 세균수 측정을 하였다(Fig.3-1-4, 5, 6).

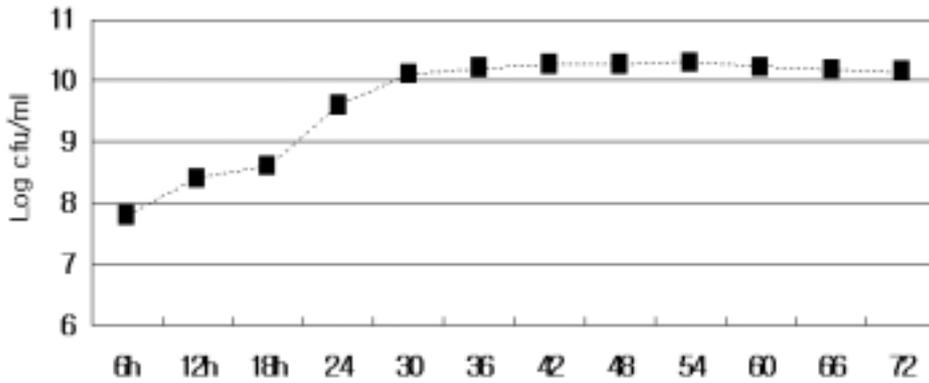


Fig.3-1-4. Cell growth of *Burkholderia pyrrocinia* BS36 in KB medium.

*Bacillus amyloliquefaciens* BS87 균주는 배양 6 시간 후부터 36 시간까지 세균밀도가 원만히 증가하였으나 36 시간 이후부터는 점점 밀도가 감소하는 것으로 보아 BS87 균주는 36시간 에서 최고 밀도로 배양된 후부터 균수가 조금씩 줄어들다가 60 시간 이후부터는 급격히 밀도가 감소하고 있었다. 세균의 밀도 조사는 세균 배양액을 멸균수로  $10^{10}$ 까지 10 배단위로 희석한 후에 30℃ incubator에서 2일간 배양 후 세균수 측정을 하였다.

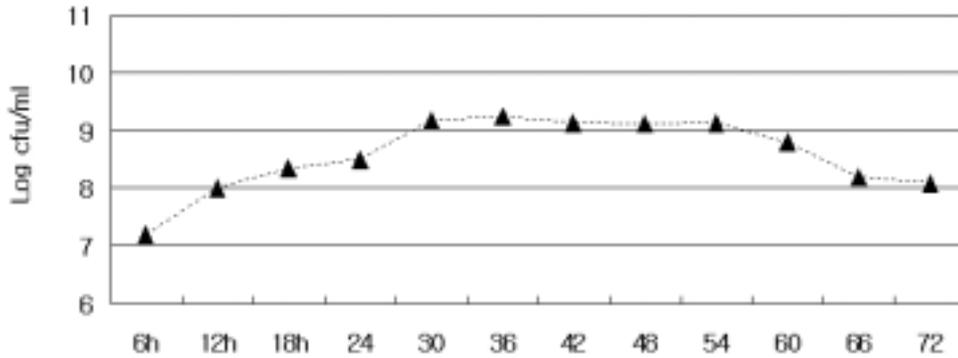


Fig.3-1-5. Cell growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 in KB medium.

*Bacillus* sp. RK1균주의 배양 6 시간 후부터 18 시간까지 세균밀도가 급속히 증가하면서 30 시간 이후에 최고 밀도로 배양된 후에 42 시간 이후부터는 점점 밀도가 감소하는 것으로 보아 RK1 균주는 배양 30시간 이후에서 최고 밀도로 배양된 후부터 균수가 조금씩 줄어들다가 42 시간 이후부터는 급격히 밀도가 감소하다가 어느 정도 균수 밀도가 줄어들면 더 이상 줄어들지 않는 것으로 조사되었다. 세균의 밀도 조사는 세균 배양액을 멸균수로  $10^{10}$ 까지 10배단위로 희석한 후에 30℃ incubator에서 2일간 배양 후 세균수 측정을 하였다.

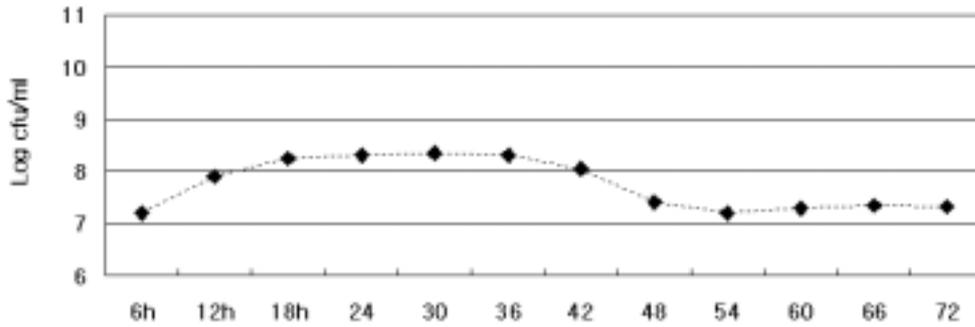


Fig. 3-1-6. Cell growth of *Bacillus* sp. RK1 in KB medium.

나. 길항미생물의 딸기시들음병균 억제 활성 및 대사산물 함유 제형의 활성 검증

딸기시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)들에 대한 길항 미생물의 길항작용을 조사하기 위해 PDA 평판배지 위에 대치배양하고 1주 후에 Inhibition zone을 측정하였으며, 길항미생물의 대사산물에 의한 균사생장 억제에 미치는 영향을 조사하기 위해, 세균배양액을 원심분리하여 병원균의 발아 및 균사생육억제효과를 검증하였다.

조사결과 RK1과 BS36, BS87 균주들은 모두 딸기 시들음병균 들에 대해 높은 균사 생장 억제효과를 보였으며, 이들 길항미생물의 대사산물 또한 높은 항균활성을 나타냈다 (Fig.3-1-7, Table 3-1-1). 특히 딸기 시들음병균 들의 대치배양에서도 강력한 균사생육효과를 나타냈던 *Bacillus* sp.인 RK1 균주의 경우에서 나타난 대사산물의 강력한 병원균 저해효과는 길항미생물이 갖는 길항작용 특성의 대부분이 대사산물에서 비롯된다는 것을 말해 주고 있으며 생물학적 방제에 매우 유용하게 사용될 수 있는 길항미생물의 기본요건을 충족시키고 있다 할 수 있다. 그러므로 이러한 딸기 시들음병균에 억제효과가 좋은 길항미생물을 이용하여 적절한 제형화를 시킨 후 생물학적 방제를 시도했을 경우 높은 방제효과를 기대할 수 있을 것이다

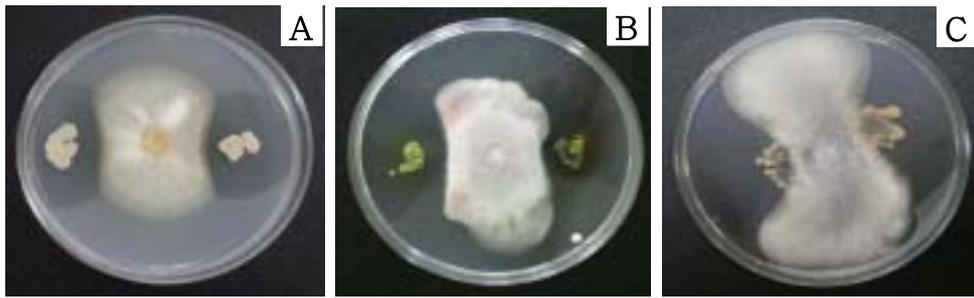


Fig.3-1-7. Growth inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* by three antagonistic bacteria, *Bacillus* sp. RK1 (A), *Burkholderia pyrrocinia* BS36 (B), *Bacillus amyloliquefaciens* BS87(C) on PDA medium.

Table 3-1-1. Inhibitory effects of three antagonistic bacteria against the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* on PDA medium

Antagonistic bacteria	Inhibition zone(mm) <sup>a</sup>
<i>Bacillus</i> sp. RK1	36
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> BS36 (B)	30
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BS87(C)	22

a Growth inhibition was determined after 7 days of incubation at 25°C.

RK1과 BS36, BS87 균주 모두 높은 균사 성장 억제효과를 보였으며, 이들 길항미생물의 대사산물 또한 높은 항균활성이 있음을 알 수 있었다(Fig.3-1-8). 그러므로 이러한 딸기 시들음병균에 억제효과가 좋은 길항미생물을 이용하여 생물학적 방제를 했을 경우 높은 방제 효과를 기대할 수 있다.

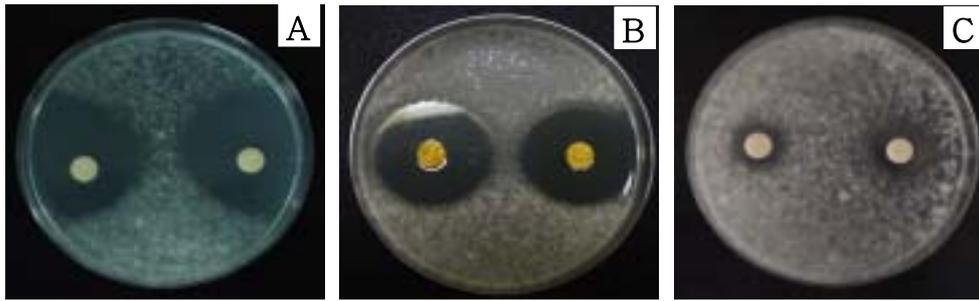


Fig.3-1-8. Antifungal activity of antifungal compound produced from three antagonistic bacteria, *Bacillus* sp. RK1 (A), *Burkholderia pyrrocinia* BS36 (B), *Bacillus amyloliquefaciens* BS87(C)

다. 길항미생물의 균체 제형의 포트 활성 검증을 통한 사용방법의 최적화

다양한 길항미생물의 조합으로 미생물 균체 제형의 딸기 시들음병에 대한 방제 효과 검정을 위해 도치오도메 품종에 대해 병원균을 침지 처리한 후 이병지수를 조사하였다.

그 결과 병원균의 균사생육효과가 뛰어났던 RK1 균주의 단독제형과 BS87 + BS36 + RK1 균체 함유 제형의 처리구가 100%의 방제가를 나타내며 가장 좋은 효과를 나타냈으며, 각각의 BS87과 BS36 균체 함유 제형도 만족할만한 방제효과를 얻었다. 또한 Table 3-1-2와 Fig.3-1-9의 병원균을 접종한지 3주째 되는 날 조사한 결과에서 알 수 있듯이 뚜렷한 방제효과와 더불어 딸기의 생육에 있어서도 상당한 촉진효과를 나타냄을 알 수 있다.

추후 지속적인 조사가 이루어질 예정이며 딸기 시들음병의 발병이 좀더 진전되면 처리구간에 더욱 뚜렷한 차이가 날 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서 선발되어 사용되어지는 길항미생물들은 병 방제 효과는 물론 작물의 생육촉진에도 커다란 영향을 미치는 것으로 미루어 추후 이어지는 미생물 살균제의 개발에 있어서 주요 재료로써 사용되어질 수 있을 것이다.

Table 3-1-2. Control effects of four formulations using *Bacillus* sp. RK1, *Burkholderia pyrrocinia* BS36, *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 to *Fusarium* wilt of strawberry at pots in a vinylhouse

Antagonistic bacteria	DI (%)*	CV (%)*
Control	14	-
Copper hydroxide (77%)	0	100
BS87	2	85.7
RK1	0	100
BS36	6	57.1
BS87+BS36+RK1	0	100

\*DI ; Disease incidence rate, CV ; Control value



Fig.3-1-9. Control effect of RK1, BS36 and BS87 formulations to *Fusarium* wilt of strawberry at pots in a vinyl house.

## 제 2 절 효과적인 방제대책 수립을 위한 수집된 시들음병균들의 병원성 및 유전적 특성 조사 (제1협동기관)

### 1. 연구수행방법

#### 가. 딸기 품종별 시들음병균들의 병원성 검정

딸기에서 분리된 각 균주들의 딸기 품종에 대한 병원성을 조사하기 위해 병원균을 v-8 액체 배지에서 5일간 진탕배양한 후  $1-2 \times 10^6$  농도의 포자현탁액을 만들었다. 또한 동일한 조건에서 육묘한 도치오도메, 레드필, 매향, 아끼히메 품종의 자묘를 동시에 채묘 하였

다. 2003년 7월 고온 기에 채묘한 자묘를 흙을 털고 뿌리 끝부분을 자른 후 각 균주 당 품종별 4주씩 포자현탁액에 10분간 뿌리를 침지 후 화분에 심었다. 그 후 15일 간격으로 이병지수를 조사하였다. 이병지수는 0-5범위로 0=무발생, 1= 1-2 잎이 휘어지고 신엽이 황색, 2= 모든 잎이 휘어지고 짙은, 3= 잎이 황화되고 1/2 시들음, 4 = 전체 시들음, 4 = 전체 시들음, 5 = 고사이다.

#### 나. Primer를 이용한 시들음병균의 RAPD 분석

Operon primer kit(Operon Technology Inc, Alameda, Canada, USA)에서 임의로 선택한 9개의 decamer(Table 1)와 서린생명과학연구소의 SRILS Uniprimer™ kit를 사용하였으며 12종의 Uniprimer 중에서 5, 12 URP primer들을 사용하여 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* DNA의 PCR 증폭하였다. PCR reaction mixture 내의 성분들의 최적 농도를 결정하기 위해 예비 실험을 실행하였으며, PCR 증폭은 total volume을 20 $\mu$ l로 하고, genomic DNA를 20ng, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris HCl(pH8.3), 200 $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 picomoles의 primer, 그리고 1 unit의 Taq polymerase(Promega Corp. Madison, WI)를 첨가하였다. 각각의 반응에 mineral oil을 투여하였다. OPA primer를 이용한 PCR은 PTC 100 programmable thermal cycler(MJ Research, WaterTown, MA)로 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 initial denaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C/2분, 34 $^{\circ}$ C/1분, 72 $^{\circ}$ C/2분으로 하고, final extension은 72 $^{\circ}$ C 15분간 실행하였다. 한편, URP를 사용한 실험에서는 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 initial denaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C/2분, 55 $^{\circ}$ C/1분, 72 $^{\circ}$ C/2분으로 하고, final extension은 72 $^{\circ}$ C 15분간 실행하였으며 36cycle을 실시하였다. Template DNA가 첨가되지 않은 Negative control이 nonspecific reaction 여부를 판별하기 위해 사용되었다. 모든 실험은 적어도 세 번이상 반복하여 결과를 도출하였다. PCR product는 0.5  $\times$  TBE buffer와 1.2% Agarose gel 상에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색 후 UV transilluminator에서 밴드를 확인하였다.

#### 다. rDNA RFLP analysis

rDNA의 IGS 영역은 primer CNL12=5'-CTHGAACGCCTCTAAGTCAG-3'과 CNS1=5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3'(Appel & Gordon 1996)에 의해 증폭되었다. PCR 증폭은 total volume을 30 $\mu$ l로 하였고, 20ng genomic DNA, 50mM KCl, 2.5mM MgCl, 10mM Tris HCl(pH8.3), 200 $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 $\mu$ M씩의 primer와

1unit의 Taq DNA polymerase(ProgmaCorp. Madison, WI)을 첨가하였고, 각 반응에 mineral oil 한 방울씩 투여되었다. 증폭은 PTC 100 programmable thermal cycler (MJ Research, Water Town, MA)로 실행되었고 94°C에서 3분간 initial denaturation 시킨 후, 35 cycle동안 denaturation, annealing, extension을 반복하였다. 첫 13 cycle은 95°C/35초, 58°C/55초, 72°C/45초로 하였고, 14~26cycle과 27~35cycle은 72°C extension step을 각각 2분, 3분간 실행하였다. 35cycle 후 72°C에서 추가로 10분 동안 incubation되었다.

IGS 증폭 산물은 Pst I 으로 digestion 된 DNA에 의해 측정되었다. Negative control이 nonspecific reaction여분 판별을 위해 사용되었고, 이 실험은 적어도 세 번 이상 반복하였다. 10 $\mu$ l씩의 IGS PCR product에 AvaII, Hinf I, EcoR I 그리고 EcoRV(Boehringer Mannheim)를 처리하였고, 그 산물은 0.5 $\times$ TBE와 2% Agarose gel 상에서 전기영동 하였다. gel은 ethidium bromide 염색 후 UV transilluminator로 확인하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 효과적인 방제대책 수립을 위한 수집된 시들음병균의 병원성 및 유전적 특성 조사

Table. 3-2-1. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* isolates from wilted strawberry plants to four strawberry cultivars

Isolate	Origin		Disease index <sup>a</sup>				Average
	Cultivar	Location	Dochiodome	Redpearl	Maehyang	Akihime	
Fo1	Nyoho	Nonsan	0.0	0.5	0.0	0.0	0.12
Fo3	Nyoho	Nonsan	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
Fo4	Nyoho	Buyeo	3.0	1.0	0.5	0.0	1.12
Fo6	Hokowase	Gongju	1.2	1.7	1.0	0.0	0.97
Fo11	Hokowase	Hongsung	0.0	0.0	0.2	0.0	0.05
FF801	Hokowase	Naju	2.0	0.5	0.0	0.2	0.67
FF802	Hokowase	Naju	0.0	0.2	0.0	0.0	0.05
FF406	Hokowase	Naju	0.0	0.2	0.0	0.0	0.05
FF408	Hokowase	Nonsan	0.0	1.5	0.0	0.0	0.37
FF409	Hokowase	Nonsan	0.0	0.2	0.0	0.0	0.05
Fo13	Hokowase	Hongsung	0.7	0.2	0.0	0.2	0.27
Fo23	Reiko	Nonsan	0.5	0.0	0.0	0.0	0.12
Fo30	Nyoho	Nonsan	2.0	0.7	0.0	0.0	0.67
Fo40	Redpearl	Iksan	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
Fo41	Redpearl	Iksan	0.2	0.2	0.0	0.0	0.10
Fo42	Akihime	Nonsan	0.2	0.0	0.0	0.0	0.05
Fo45	Akihime	Daejeon	0.0	0.5	0.0	0.0	0.12
Fo47	Dochiodome	Nonsan	0.7	1.2	2.2	0.7	1.20
Fo48	Dochiodome	Nonsan	0.2	0.2	0.0	0.2	0.15
Fo50	Johong	Busan	2.2	0.5	0.0	0.2	0.72
Fo54	Dochiodome	Gongju	2.5	1.5	0.7	0.7	1.35
Fo56	Akihime	Yeongi	3.5	0.7	1.2	1.2	1.65
Fo79	Samaberry	Nonsan	0.7	0.5	0.2	0.2	0.40
Fo82	Dochiodome	Nonsan	1.5	0.2	0.0	0.0	0.42
Average			0.8	0.5	0.3	0.2	0.44

각 딸기품종별 시들음병원균들에 대한 병원성 정도를 조사하기 위해 전국의 대단위 딸기 재배 농가로부터 병원균을 분리하여 본 실험에 공시하였다(Table. 3-2-1). 실험결과 Akihime는 조사된 22개 딸기시들음병 균주들에 대해 공시균주들에 대해 가장 저항성인 것으로 나타났으나 Dochiodome는 가장 감수성을 나타냈다. 한편, 조사된 개별적인 병원균들 중 4균주만이 공시된 모든 품종에 병을 일으켰으며 저항성 품종으로 판단되는 아키히메는 모든 공시 균주들에 대해 저항성을 나타내지는 못했다. 따라서 국내에 분포하는 딸기시들음병원균들은 재배되고 있는 딸기 품종들에 대해 다양한 병원성 변이를 나타내는 것으로 이들의 제반 유전적인 특성들도 다양하게 나타날 것으로 판단된다.

*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*로부터 분리된 GenomicDNA가 RAPD-PCR분석에 사용되었다. 15개의 random decamer primer가 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*의 22균주의 genomic DNA를 주축으로 하여 test되었다. 그 중에 9개 primer가 뚜렷한 밴드 패턴을 보였고, 2개 primer를 선발하여 한국의 다양한 지역에서 분리한 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*의 22균주를 비교, 분석하는데 사용하였다. OPA 07, 11와 URP 5, 12를 이용한 PCR 증폭에 있어서 모든 균주들은 뚜렷한 밴드 패턴을 보였으며 또한 균주들 간에 다양한 양상을 나타냈다(Fig.3-2-1).

증폭된 밴드는 150bp에서 2.4kb까지 나타났고, 22균주의 RAPD분석에서 175밴드가 기록되었으며 그 중 160 polymorphic(91% 유사도)을 보였다(Fig.3-2-3). 각 균주 당 증폭된 DNA 밴드는 2~8개이다. 이들 Data는 RAPD가 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*의 isolate를 구별하는데 용이하다고 생각되어지며, 균주간의 유전적 다양성이 크다는 것을 보여주었다.

CNS1과 CNL12 primer를 이용하여, *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*의 22균주로부터 약 2.6kb 증폭산물을 얻을 수 있었다(Fig.3-2-4). 증폭된 IGS산물에 4개의 endonuclease(*Ava* II, *Hinf* I, *EcoR* I 그리고 *EcoRV*)를 처리하였다(Fig.3-2-5). *Ava* II와 *Hinf* I를 처리한 IGS영역 산물에서 확연한 밴드양상을 보였으나 *EcoR* I과 *EcoRV*의 처리결과에 있어서는 뚜렷한 양상을 보이지 않았다. 그러나 *Ava* II와 *Hinf* I를 처리한 IGS영역 산물은 뚜렷한 밴드 패턴을 산출하였고 균주 간에 상호 관련성은 나타나지 않았다. restriction pattern 분석은 200bp에서 1.2kb까지 특이적인 밴드패턴을 산출하였다. 그러므로 IGS영역의 restriction pattern은 균주들 간의 다양성을 나타낸다. 한편 ITS 영역에 대한 유전적 차이를 조사하기 위해 ITS1, 4 primer를 이용해 증폭을 실시한 후 각 균주들 간의 제한양상을 비교 조사한 결과에서는 차이를 식별할 수 없었다(data not shown).

URP, OPA primer를 이용한 증폭산물과 IGS 제한양상의 결과를 종합하여 도식화한 결과 크게 3그룹으로 나뉘어졌다(Fig.3-2-6). 전체적으로는 77%의 유전적 차이를 나타냈으며 동일한 분리지역의 균주들 간은 물론 분리기주의 품종이 동일해도 형성된 그룹들간에 다양하게 분포했다. 따라서 국내에 분포하는 딸기 시들음병균 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*은 기주 품종에 따른 병원성의 다양성은 물론 DNA 상의 변이가 각 병원균들 간에 존재하고 있음을 알 수 있었다.

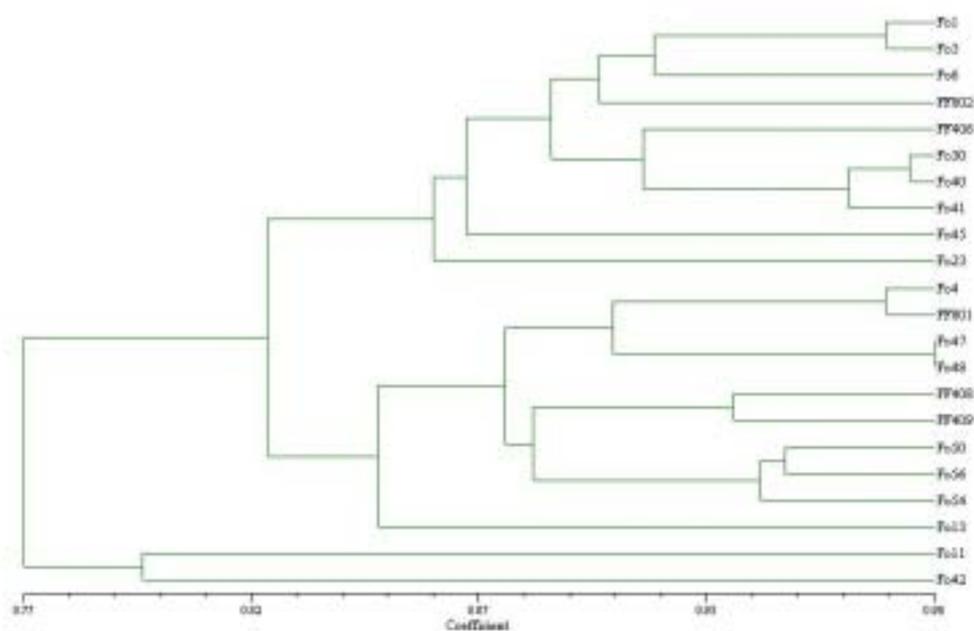


Fig.3-2-1. Dendrogram showing relationship among the 22 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*. Genetic similarities were obtained by RAPD using primer OPA7 and OPA11.

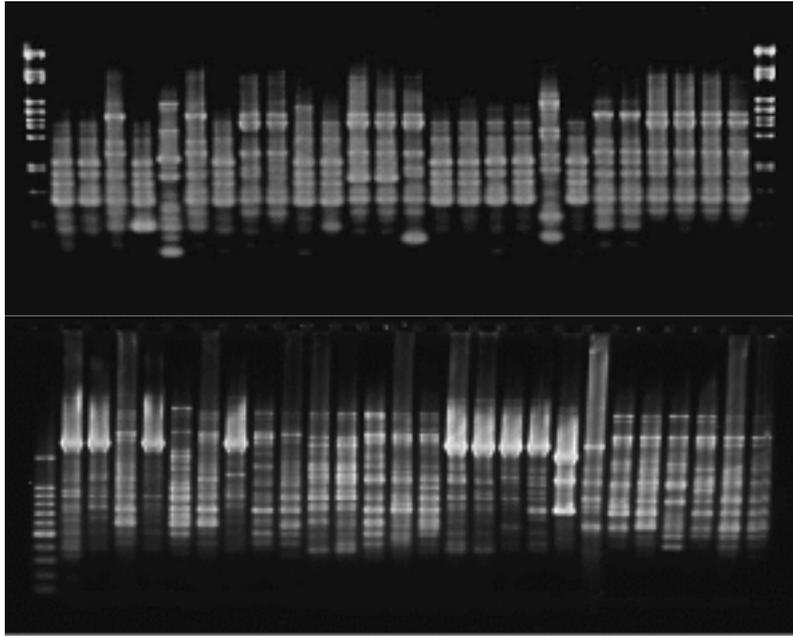


Fig.3-2-2. RAPD patterns on 1.2% agarose gel of amplified fragment generated from 22 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* with random primer (Upper) URP 5 and (Below) URP-12. Lane M, DNA marker ( DNA digested with *Pst*I), lane 1, Fo1; 2, Fo3; 3, Fo4; 4, Fo6; 5, Fo11; 6, FF801; 7, FF802; 8, FF406; 9, FF408; 10, FF409; 11, Fo13; 12, Fo23; 13, Fo30; 14, Fo40; 15, Fo41; 16, Fo42; 17, Fo45; 18, Fo47; 19, Fo48; 20, Fo50; 21, Fo54; and 22, Fo56.

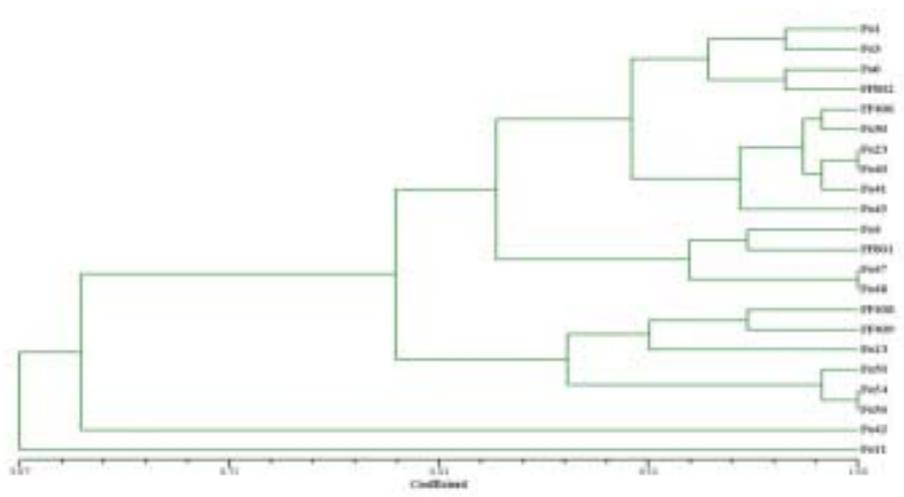


Fig.3-2-3. Dendrogram showing relationship among the 22 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*. Genetic similarities were obtained by RAPD using primer URP5 and URP12.

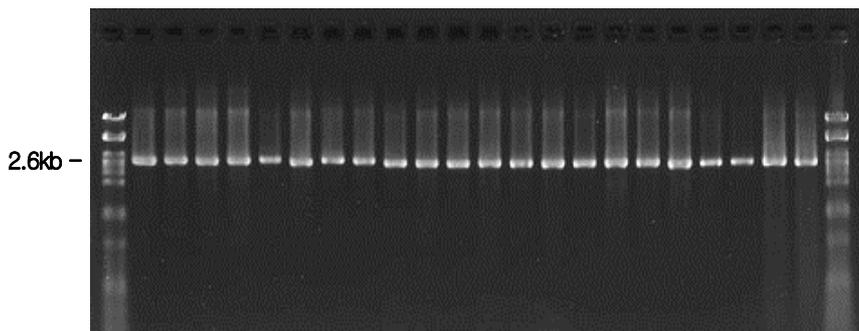


Fig.3-2-4. PCR amplification of various isolates of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, using primers CNS12, CNL1. Lane M, DNA marker ( DNA digested with *Pst*I), lane 1, Fo1; 2, Fo3; 3, Fo4; 4, Fo6; 5, Fo11; 6, FF801; 7, FF802; 8, FF406; 9, FF408; 10, FF409; 11, Fo13; 12, Fo23; 13, Fo30; 14, Fo40; 15, Fo41; 16, Fo42; 17, Fo45; 18, Fo47; 19, Fo48; 20, Fo50; 21, Fo54; and 22, Fo56.

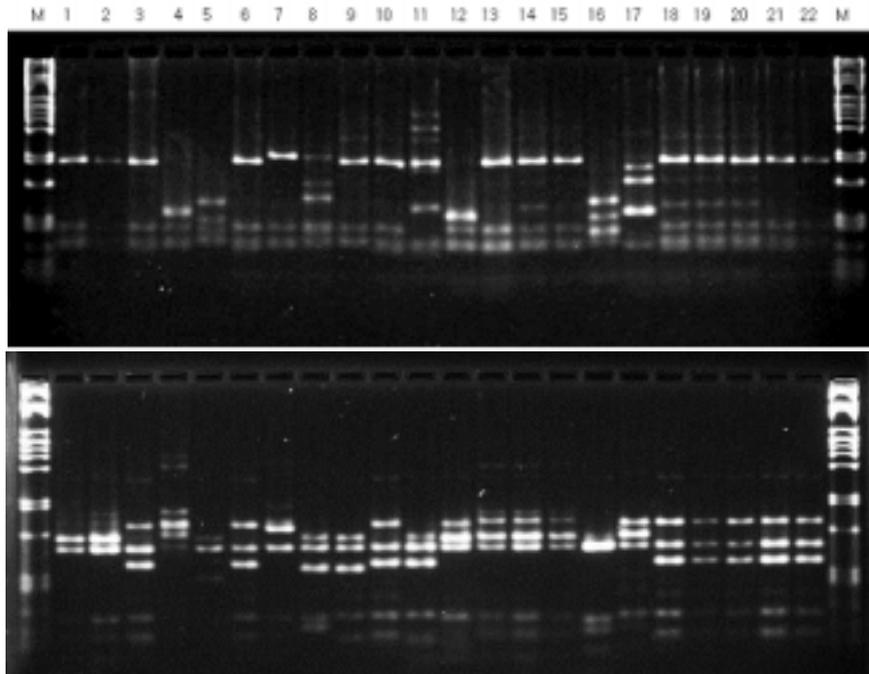


Fig.3-2-5. Electrophoretic patterns on 2% agarose gel RFLPs of the amplified intergenic spacer (IGS) region from 22 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* digested with (a) *Ava*II and (b) *Hinf*I. Lane M, DNA marker (DNA digested with *Pst*I), lane 1, Fo1; 2, Fo3; 3, Fo4; 4, Fo6; 5, Fo11; 6, FF801; 7, FF802; 8, FF406; 9, FF408; 10, FF409; 11, Fo13; 12, Fo23; 13, Fo30; 14, Fo40; 15, Fo41; 16, Fo42; 17, Fo45; 18, Fo47; 19, Fo48; 20, Fo50; 21, Fo54; and 22, Fo56.

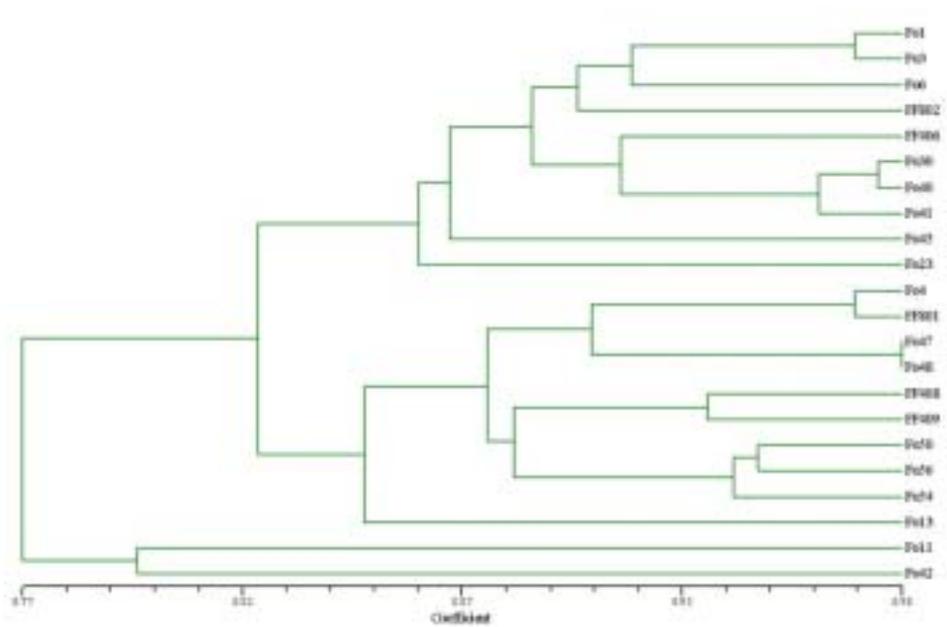


Fig.3-2-6. Dendrogram showing relationship among the 22 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*. Genetic similarities were obtained by RFLPs of IGS of rDNA.

*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*의 유전적 특성의 조사는 딸기의 저항성 품종을 통해 시들음병을 효과적으로 관리하는데 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서는 rDNA IGS 영역의 RAPD-PCR과 RFLP 분석을 통해 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 사이에서 유전적 차이와 그 정도에 대한 귀중한 정보를 제공해주고 있다. Kim et. al(1982)이 한국의 딸기 시들음을 발생을 보고했다. 또한 32균주의 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*를 VCGs분석 즉 isozyme 다형성과 병원성에 기초하여 2개의 그룹으로 나누었다.(Hyun, Kim&Park 1996). Hyun과 Park(1996)은 RAPD분석에 있어서 24균주의 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*를 두 개의 그룹으로 나누었다. 이런 연구들은 RAPD분석에 추가한 이런 formae specialis 사이의 다양성을 구분해줄 rDNA RFLP 분석에는 초점을 맞추지 않았다. 일부 연구자들은 rDNA의 RFLP 분석 또한 *F. oxysporum*의 formae specialis 다양성 조사에 있어서 유용하다고 말하고 있다. 효과적이고 효율적인 병관리를 위해서는 그런 병원적 다양성의 관계와 분포 및 발병의 이해가 선행되어야 한다. 그러나 단지 몇몇 조사에서만 이런 연구를 수행하고 있으며 formae specialis 사이의 유전적 관계는 아직도 명확히 이해되지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 rDNA IGS영역의 RAPD와 RFLP 분석을 이런 분리균들의 유전

적 다양성을 평가하는데 이용하였다. 이러한 RAPD 분석은 *F. oxysporum* formae speciales 간 그룹을 짓는데 있어서 유용하게 사용되었는데 *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*에서는 f. sp. *dianthi*에서는 두 그룹 그리고 f. sp. *pisii*에서는 2~3그룹으로 구분지어 놓았다. 본 연구에서는 RAPD와 RFLP분석으로 한국의 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 분리군들 사이에서 높은 수준의 유전적 다양성이 있는 것으로 드러났다. Cluster 분석으로 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 분리군들을 8개 그룹으로 구분지었다. 그러나 RAPD와 RFLP로 구분된 그룹내 분리군들 사이에서는 어떤 상관관계도 없었다. Paavanen-Huhtala et al.(1999)는 RAPD-PCR과 isozyme data로 *F. oxysporum* 계통이 유전적으로 다양하며 7개 그룹으로 그룹 지어진다는 것을 발견하였다. 또한 보리에서 수집된 분리군들 사이의 계통 발생학적 관계와 지리적 기원 사이에서 일부 상관관계를 밝혀내었다. Kelly et al.(1994)는 이집트 콩에 위황변 및 시들음병을 야기하는 63균주의 *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*를 두 병원성 type에 관련하여 두 그룹으로 구분지었다. 이전 연구에서는 RAPD분석으로 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*을 race A, 3 그리고 4에 해당하는 3개 유전적 그룹으로 구분 지었다. 이런 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*의 3 race는 병원성에 기초하여 3개의 다른 목화종으로 구분된다. 따라서 race의 유전적 다양성은 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*의 넓은 기주범위와 race들의 지리적 분포에 기인한다고 할 수 있다. Mes et al.은 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 RAPD 자료분석 비교로 VCGs간 및 race 사이에서 높은 수준의 유전적 다양성을 보여 주었으며 RAPD 분석으로 얻은 밴드양상에서 차이점들을 관찰하였다. Nelson et al.(1997)은 RAPD분석으로 *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli*의 분리군들을 다른 formae speciales와 명확히 구분해 내었다. 왜냐하면 *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli*와 실험한 다른 formae speciales 간에 구분가는 밴드양상이 관찰되었기 때문이다. Namiki et al.(1998)은 RAPD분석은 일부 일본의 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*에서 높은 유전적 유사도를 보인다고 보고하였다.

보다 다양한 DNA 영역의 비교는 같은 종으로 구분 지어지는 formae speciales를 구별해 준다. 예를 들면 일부 미토콘드리아 DNA뿐만 아니라 핵 rDNA 반복 유닛을 구별해주는 ITS 영역은 밀접히 관계된 *Fusarium* 계통을 구별짓는 데 충분할 정도로 다양성을 보여주고 있다. 본 연구에서는 IGS 영역의 RFLP를 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 분리군들 사이의 유전적 관계를 시험하는데 사용하였다. *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*의 모든 분리군들로부터 증폭된 rDNA의 IGS 영역 크기는 대략 2.6kb이다. Cai et al.(2003)은 CNS12 와 CNS1으로 증폭시킨 60균주의 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 단일 절편도

대략 2.6kb라 보고하였다. Yli-Mattila et al.은 *F. oxysporum* f. sp. *avenaceum*, *F. arthrosporioides*, *F. tricinctum*의 분리균들은 IGS 영역길이가 거의 2.6kb라는 것을 보여주었다. 또한 유사한 결과가 56균주의 병원성과 비병원성 *F. oxysporum* 분리균주에서 보고 되었다. 이런 결과들이 우리의 발견을 뒷받침해 주고 있다. Kistler et al.은 증폭 IGS 영역 크기에서 나타난 차이는(2.3~3.1kb) rDNA 영역 상에서 결실 또는 추가 변이가 일어났을 수 있다고 보여준다. 한편, *F. oxysporum*의 다른 formae speciales와 비교하여도 rDNA RFLPs 에서는 어떤 다양성도 관찰되지 않았다. 본 연구에서는 IGS 영역에 있어서의 RFLP 분석이 조사된 22개 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 균주들 간에 변이를 보여주고 있다. 핵 DNA와 미토콘드리아 DNA의 RFLP는 *F. oxysporum*의 formae speciales 사이와 사이에 유전적 다양성을 특징짓는데 사용되어 왔다. 대부분의 연구들은 병원적 변이와 DNA 다형성 사이의 상관관계를 보여주는데는 실패하였다. Woo et al.(1996)은 20균주의 *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* 병원성 계통사이에서 RFLP와 RAPD 밴드양상에서 일치하는 사실을 보고하였다. 그리고 이런 결과는 VCG와 관련 있으며 유전적으로 분리균들이 유사하다는 것을 보여준다.

본 연구에서는 rDNA ITS 영역의 RFLP와 RAPD는 명확히 구분되는 밴드양상을 보였지만 분리균 간에는 어떤 상관관계도 존재하지 않았고 그들 간에는 차이점만이 관찰되었다. 게다가 EcoRI 과 EcoRV에서는 어떤 제한 절편 양상도 관찰되지 않았고 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*내 제한양상의 차이를 관찰하는 데도 실패하였다. 유사한 결과가 *F. oxysporum* f. sp. *canatiensis*와 *F. oxysporum* f. sp. *cubens* 증폭산물을 제한 효소 AflII로 처리했을 때도 보고 되었다. 본 연구는 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*내 높은 수준의 유전적 다양성을 나타내주며, 한국 내 다른 지역에서 분리한 이런 병원균들 사이의 유전적 차이점을 잘 설명해 주 있다. 또한 rDNA의 RFLP와 RAPD가 이 개체군의 지리적 분포로 여겨지는 의문에 대한 신뢰성 있는 도구로 쓰일 수 있다는 것을 논증해주고 있으며 또한 모든 수준에서 그들의 유전적 특성에 대한 분석마커를 제공해 준다고 할 수 있다. 이런 소견은 심각한 병원균에 대한 딸기 저항성 품종육종에 도움이 될 것이다.

Table 3-2-2. Primers used in this study

Prmer Code	Nucleotide Sequence ('5 to 3')
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-14	TCTGTGCTGG

Primers were obtained from Operon Technology Inc. Alameda, CA, USA.

### 제 3 절 딸기시들음병 발생조사 및 길항미생물의 온실 및 포장에서 효과검정 (제2협동기관)

#### 1. 연구수행방법

##### 가. 병 발생상황 조사

2001년~2003년 딸기주산단지를 중심으로 병 발생상황을 조사하였다. 조사포장 214개중에서 발병포장수를 조사하고 발병포장의 전체식물을 대상으로 발병주율을 조사하였다. 또한 월별 시들음병 발생정도 조사를 위해 2001년~2003년까지 214개 포장에서 조사된 월별 시들음병 발생포장수를 조사하였다.

##### 나. 발병지와 무발병지 토양의 토양환경 실태 조사

시들음병 발생 4포장, 무발생 8개 포장에서 토양 150g씩 포장 당 5개 지점에서 표토 깊이(0-5cm)를 채취하여 이화학성 분석에 사용되었다. 토양의 이화학성 분석은 농촌진흥청 조사 분석법에 준하여 토성은 토양조사편람(농촌진흥청, 1973)에 의거 hydrometer법으로 조사하였다. 토양 화학성은 토양화학분석법(농촌진흥청, 1988)에 준하여 토양과 증류수를 1:5의 비율로 혼합하여 30분간 진탕한 후, pH는 유리전극법으로 전기전도도(EC)는 EC메타로 측정하였다. 유기물 함량은 Tyurin법을, 질소는 황(2002)의 방법, 유효인산은 Lancaster법, 양이온(K, Ca, Mg)은 원자흡광광도계를 이용하여 정량하였다.

#### 다. 질소시비에 따른 시들음병 발생조사

딸기정식포장의 기비로 무질소시비구(N:P:K=0:4.9:9.7)과 관행시비구(N:P:K=15.7:4.9:9.7)로 구분한 후 공시품종으로 “도치오도메”를 처리당 180주씩 정식하여 시들음병 발생을 조사하였다. 질소형태에 따른 시들음병 발병조사를 위해 Hoagland 용액(Hoagland & Arnon, 1950)을 기본으로 질산태질소 10, 20mM, 암모늄태 질소 10, 20mM 처리구를 만들었다. 시험구는 각 처리당 9반복으로 완전 임의배치하여 2일 간격으로 1개월 동안 공급한 후 생육조사를 실시하였다. 그 후 병원균을 접종하였고, 50일 후 시들음율을 조사하였다.

#### 라. 분리균주에 대한 병원성 검증

딸기에서 분리한 각 균주의 병원성 검증을 위해 병원균을 V-8 broth에서 5일간 진탕배양 후  $1\sim 2 \times 10^6$  포자의 농도로 포자현탁액을 만들었다. 또한 동일한 조건에서 육묘한 아끼히메, 도치오도메, 레드필, 매향 품종의 자묘를 동시에 채묘하였다. 2003년 7월 고온기에 채묘한 자묘를 흙을 털고 뿌리 끝부분은 자른 후 각 균주 당 품종별 4주씩 포자현탁액에 10분간 뿌리를 침지 후 화분에 심었다. 그 후 논산딸기시험장의 비가림하우스에서 재배하면서 15일 간격으로 이병지수를 조사하였다. 이병지수는 0~5의 범위로 0 = 무발병 1 = 1-2잎이 휘어지고 신엽이 황색, 2 = 모든 잎이 휘어지고 짙은, 3 = 잎이 황화되고 1/2 시들음, 4 = 전체 시들음, 5 = 고사이다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 병 발생상황 조사



Fig.3-3-1. Symptoms of *Fusarium* wilt of strawberry in the field. A) deforming and yellowing of central leaflets of strawberry; B) root discoloration; C) a longitudinal section of the diseased strawberry crown showing vascular discoloration; D) a transverse section of the diseased strawberry root showing vascular discoloration.

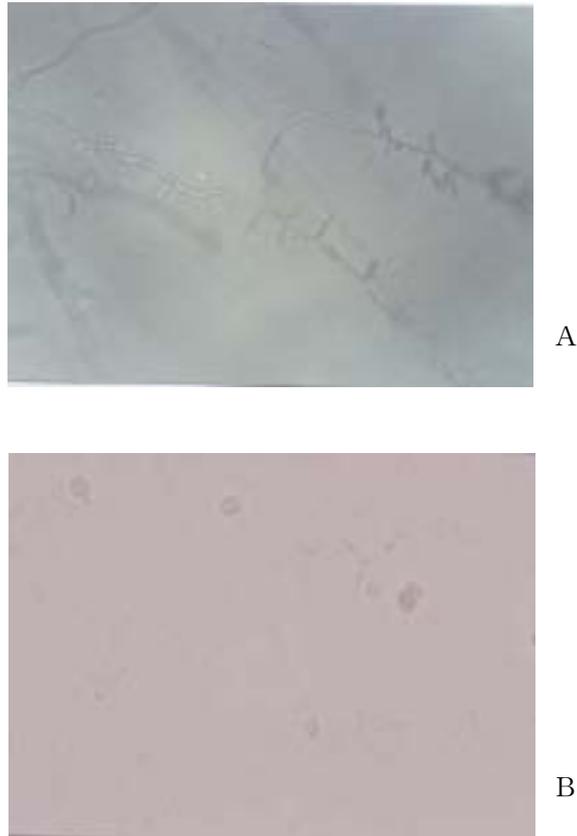


Fig.3-3-2. Morphological and cultural features of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* isolated from strawberry. A) microconidia borne on monophialides; B) chlamydospores

딸기 주산지 214개 포장 중 37개 포장에서 시들음병이 발생되었다. 주 발생시기는 품종마다 약간의 차이가 있는데 주로 12-3월, 6-8월 사이였으며 발병범위는 0~30%이었다. 품종별로는 도치오도메, 레드필, 매향, 썸머베리, 아끼히메 품종에서 발생되었으며 그 중 썸머베리와 도치오도메 품종이 100%와 46.9%로 가장 많이 발생되었다(Table 3-3-1).

Table 3-3-1. Incidence of *Fusarium* wilt of strawberry under major cultivation areas in Korea during 2001~2003

Cultivar	No. of field surveyed	No. of field diased	Range of incidenci(%)	Disease out break peak
Dochiodome	32	15	10-15	Jul.
Redpearl	111	9	5-10	Dec.~Mar., Aug.
Akihime	48	7	0- 5	Aug.~Oct.
Maehyang	14	5	11-30	Mar.
Samaberry	1	1	30	Jun.

2001년에서 2003년까지 월별 시들음병 발생포장을 조사한 결과 육묘기인 6-8월, 본포 정식기인 9-10월, 수확기인 1-3월에 발생이 조사되었다(Table 3-3-2). 딸기 시들음병은 주로 고온기에 발생이 심하였고 수확 중후기인 1-3월에도 발생이 되었다. 수확기에 발생하는 것은 주로 뿌리가 갈변되는 증상이 많은데(unpublished), 이것은 수확 중후기에 염류집적 및 양분의 불균형으로 작물의 뿌리가 장애를 받기 쉬워 병 발생이 많다고 한 결과(嶋田, 1969)로 추정된다.

Table 3-3-2. Frequency of occurrence of *Fusarium* wilt on strawberry in Korea from 2001 to 2003

Year	No. of field surveyed	No. of field infected per month											
		Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.
2001	93	1	0	0	0	0	4	0	4	3	6	1	0
2002	54	1	1	0	0	0	4	0	1	0	0	0	1
2003	67	3	0	3	0	0	2	2	0	-	-	-	-
Total	214	5	1	3	0	0	10	2	5	3	6	1	1

#### 나. 발병지와 무발병지 토양의 토양환경 실태 조사

딸기시들음병 발생포장과 무발병포장의 토성을 비교 조사한 결과 딸기재배포장은 90%이상 미사질양토였으며 시들음병 발생포장의 모래함량이 무발병 토양보다 높게 나타났다. 토마토와 박과의 *Fusarium*병은 사양토에서 발생이 심하며(양, 2000), 사질토양이 식질토양에 비해 *Fusarium oxysporum*의 증식이 용이하고(Stover, 1956), 사질토양은 지온상승이 쉽고, 토양수분의 변화가 급격하여 작물의 뿌리손상이 쉽다고 한 결과(竹内, 1982)로 미루

어 볼 때 모래함량이 시들음병 발생과도 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한, 이화학성 조사 결과 토양염류농도는 무발생 포장보다 높게 나타났다(Table 3-3-3). 염류농도는 육묘 포장보다 수확 포장에서 높게 나타났으며 수확기 과잉시비에 의해 토양의 염류농도가 높아져 작물 뿌리에 장해가 발생하기 때문인 것 같다(松口, 1986). 또한 pH도 시들음병 발생 포장이 무발생포장보다 낮게 나타났으며 유기물, 인산, 양이온 함량도 낮게 나타났다. 양(2000) 등에 의하면 pH는 관계없고 유기물, 인산, 양이온 함량이 높을 때 발생이 많다고 하였는데 본 결과와는 다르게 나타났는데 딸기 시들음병 발생은 다른 *Fusarium*병과 다르게 양분이 부족한 경우에 발생이 증가하였다. 이상으로 딸기 시들음병 발생에 관여하는 토양 내 주된 요인으로 pH가 낮고, EC가 높은 것은 질소농도의 증가가 직접적인 요인으로 사료되며 유기물, 인산, 양이온 등은 큰 관련이 없는 것으로 사료된다(Table 3-3-4, 5).

Table 3-3-3. Relationships between soil contents and occurrence of *Fusarium* wilt on cultivating strawberry harvest and nursery field

Field condition		Content %		
		Clay	Sand	Silt
Harvest stage	Diseased field	14	23	62
	Non-diseased field	18	12	69
Nursery stage	Diseased field	9	25	66
	Non-diseased field	19	19	62

Table 3-3-4. Disease field and chemical properties in the soils of the surveyed cultivating strawberry harvest field

	pH (1:5)	OM (%)	Av. P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Exchangeable(me/100g)			EC (ds/m)
				K	Ca	Mg	
Diseased field	5.84	2.2	514	0.62	6.46	1.85	1.92
Non-diseased field	6.44	3.5	809	1.04	8.63	2.71	1.12

Table 3-3-5. Disease field and chemical properites in the soils of the surveried cultivating strawberry nersery field

	pH (1:5)	OM (%)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Exchangeable(me/100g)			EC (ds/m)
				K	Ca	Mg	
Diseased field	4.87	2.8	594	0.71	4.29	0.97	1.19
Non-diseased field	6.90	3.8	396	1.08	8.46	2.47	0.69

다. 질소시비에 따른 시들음병 발생조사

질소시비에 따른 시들음병 발생을 조사한 결과 농가포장에서 기비조건에 따른 시비 시들음병 발생율을 포장에서 조사한 결과 무질소시비는 농촌진흥청 관행시비에 비해 시들음병 발생이 적게 나타났다. 또한 질소형태에 따른 시들음병 발생율을 조사한 결과 암모늄태 질소를 처리한구가 질산태 질소처리 구보다 시들음병 발생이 높게 나타났다(Table 3-3-6). 각 처리간 생육조사에서는 NO<sub>3</sub>-20이 가장 좋은 생육을 나타냈으며 같은 농도에서는 암모늄태 질소 처리의 생육이 우수하였다. 그러나 NH<sub>4</sub>-20은 생육이 저조하였는데 이것은 암모늄태 질소의 과잉에 의한 독성이 나타난 것으로 사료된다(Table 3-3-7, 8). 이것으로 딸기시들음병 발생에 관여하는 요인으로 토양 내 질소농도 그중 암모늄태 질소가 직접적인 것으로 사료된다.

Table 3-3-6. Incidence of *Fusarium* wilt of strawberry(cv. Dochiodome) according to nitrogen concentration of basal fertilization

Treatment	Wilt(%) <sup>a)</sup>
Conventional culture N:P:K (15.7:4.9:9.7)	10.5±6.9
Control N:P:K ( 0:4.9:9.7)	8.3±5.9

a) Mean±SE

Table 3-3-7. Growth characteristics of "Dochiodome" strawberry as affected by nitrogen type at 30 days after planting

Treatment (mM)	Plant height(cm)	leaf length(cm)	Leaf width(cm)	Number of leaf	Diameter of crown(mm)	Chlorophyll
NO <sub>3</sub> -10	10.7	6.3	4.7	6.0	10.7	43.9
NO <sub>3</sub> -20	11.0	6.3	5.6	6.0	11.5	49.3
NH <sub>4</sub> -10	12.5	7.5	6.1	5.3	9.0	48.8
NH <sub>4</sub> -20	9.3	5.6	4.5	6.0	10.3	44.0

Table 3-3-8. *Fusarium* wilt according to nitrogen type on strawberry plant(cv. Dochiodome)

Concentration of nitrogen type	Wilt(%) <sup>a)</sup>
NO <sub>3</sub> -10	0
NO <sub>3</sub> -20	11.1
NH <sub>4</sub> -10	44.4
NH <sub>4</sub> -20	44.4

<sup>a)</sup> Nine plants per treatment were inoculated and rating 50 days after inoculation.

#### 라. 분리균주에 대한 병원성 검정

분리된 시들음병균 24균주에 대한 병원성 검정을 실시한 결과 병원성이 강한 균주와 약한 균주로 구분되었으며 그중 Fo4, Fo47, Fo54, Fo56의 4균주는 병원성이 강하게 나타났으나 Fo3, Fo40균주는 4품종에 대해서 병원성을 나타내지 않았다. 품종별로는 도치오도메, 레드필 품종이 이병지수가 높았고 매향과 아끼히메 품종은 낮게 나타났다. 이상의 결과로 최근에 많이 재배되고 있는 4품종에 대한 병원성이 강한 균주로 Fo4, Fo47, Fo54, Fo56의 4균주를 선발하였다(Table. 3-3-9).

Table. 3-3-9. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* isolates from wilted strawberry plants to four strawberry cultivars

Isolate	Origin		Disease index <sup>a</sup>				
	Cultivar	Location	Dochiodome	Redpearl	Maehyang	Akihime	Average
Fo1	Nyoho	Nonsan	0.0	0.5	0.0	0.0	0.12
Fo3	Nyoho	Nonsan	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
Fo4	Nyoho	Buyeo	3.0	1.0	0.5	0.0	1.12
Fo6	Hokowase	Gongju	1.2	1.7	1.0	0.0	0.97
Fo11	Hokowase	Hongsung	0.0	0.0	0.2	0.0	0.05
FF801	Hokowase	Naju	2.0	0.5	0.0	0.2	0.67
FF802	Hokowase	Naju	0.0	0.2	0.0	0.0	0.05
FF406	Hokowase	Naju	0.0	0.2	0.0	0.0	0.05
FF408	Hokowase	Nonsan	0.0	1.5	0.0	0.0	0.37
FF409	Hokowase	Nonsan	0.0	0.2	0.0	0.0	0.05
Fo13	Hokowase	Hongsung	0.7	0.2	0.0	0.2	0.27
Fo23	Reiko	Nonsan	0.5	0.0	0.0	0.0	0.12
Fo30	Nyoho	Nonsan	2.0	0.7	0.0	0.0	0.67
Fo40	Redpearl	Iksan	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
Fo41	Redpearl	Iksan	0.2	0.2	0.0	0.0	0.10
Fo42	Akihime	Nonsan	0.2	0.0	0.0	0.0	0.05
Fo45	Akihime	Daejeon	0.0	0.5	0.0	0.0	0.12
Fo47	Dochiodome	Nonsan	0.7	1.2	2.2	0.7	1.20
Fo48	Dochiodome	Nonsan	0.2	0.2	0.0	0.2	0.15
Fo50	Johong	Busan	2.2	0.5	0.0	0.2	0.72
Fo54	Dochiodome	Gongju	2.5	1.5	0.7	0.7	1.35
Fo56	Akihime	Yeongi	3.5	0.7	1.2	1.2	1.65
Fo79	Samaberry	Nonsan	0.7	0.5	0.2	0.2	0.40
Fo82	Dochiodome	Nonsan	1.5	0.2	0.0	0.0	0.42

a Disease index: 0 = no symptom, 1 = 1-2 leaf rolled and yellowed leaf, 2 = all leaf rolled and deformed leaf, 3 = chlorosis and wilting, 4 = wilting, 5 = death. Rating of 25 days after inoculation.

## 제 4 절 대량생산 생물발효배지 및 생물 발효공정의 최적화(주관기관)

### 1. 연구수행방법

#### 가. 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지 개발

##### 1) 배지별 배양농도 및 포자생성량

BS87균주의 발효에 적절한 배지를 개발하기 위하여 기존의 세균배양 배지 및 Soy milk, 비지 등 일반적으로 구할 수 있는 배지를 각각 30℃에서 3일간 배양한 후 배양균밀도 및 포자형성율을 조사하여 대량생산을 위한 최적배지로 활용하였다. 각각의 배지는 NB, NYB, PDB, PPDB, PYG, Soy milk, 건조비지, KB 배지를 시험에 적용하였다. 시험에 사용된 배지의 조성은 다음과 같다(Table 3-4-1).

Table 3-4-1. Media used in this studies

media	ingredient	remark
NB	Nutrient broth 0.8%	difco
NYB	NB+yeast extract 0.5%	-
PDB	potato dextrose broth 2.4%	difco
PPDB	PDB+polypeptone 0.5%	-
	peptone 0.5%	
	yeast extract 0.5%	
PYG	glucose 1%	-
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1%	
soy milk	50%	-
Biji	powder of residue in the preparation of bean curd(4%)	-
KB	King's medium B	difco

##### 2) 미량요소 농도에 따른 변화

NYB 배지를 기본배지로 하여 포자형성율을 증가시키는 것으로 보고 된 미량요소를 농도별로 첨가하여 균주의 배양균밀도 및 포자형성율을 조사하였다. 본 실험에 사용된 미량요소는 dipicolinic acid와  $Mg^{2+}$  그리고 Soy milk를 농도별로 실험에 사용하였다. Dipicolinic acid는 영양형 세포와는 달리 일반적으로 포자체에서 최고 12%까지 고농도로 존재하며  $Ca^{2+}$ 과 염을 형성하여 주로 포자의 내열성에 관여하는 물질이다. dipicolinic acid는  $10^{-3}\sim 10^{-7}M$  농도로,  $Mg^{2+}$ 는  $1M\sim 10^{-4}M$  농도로 실험하였다. Soy milk배지는 10%, 30%, 50% 농도로 실험하였다.

#### 나. 길항미생물의 대량 발효조건 최적화

BS87균주의 배양실험을 통해 Soy milk를 발효배지로 선택하였으며, Soy milk는 주변에서 쉽게 구할 수 있는 국산 콩을 사용하였고 가격도 저렴하기 때문에 대량배양 배지로 활용가치가 높다. 따라서 길항미생물 BS87, BS36, RK1 균주의 대량배양에 활용하기 위하여 배지농도별, 배양일수별 각 균주의 배양균밀도 및 포자형성율을 조사하였다. 각 균주는 King's medium B (KB; proteose peptone 20 g,  $K_2HPO_4$  1.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5 g, glycerol 15 g, distilled water 1 l) agar 배지를 만들어 배양액을 0.85% 생리식염수로 10배 단위로 희석한 후에 30°C incubator에서 2일간 배양하여 생균수를 측정하였다.

#### 다. 길항미생물 발효공정의 최적화

1차년도 실험에 이어서 2차년도 실험에서도 길항미생물제제의 보존에 있어서 제형화 과정이 중요하기 때문에 이에 대한 보충실험을 실시하였다. 흡착제 선정(쌀겨, 왕겨, 보리겨, 탈지강, 톱밥, 제올라이트, 전분, Cellulose, 질석, 탄화왕겨, 분당, 맥반석, 방해석, kaoline 등), 흡착증강제 선정(단일 또는 복합적 계면활성제, 오일류 등), 영양 보조제의 선정, 기타 미량원소의 첨가 등을 통해 딸기에 해로운 영향을 미치지 않으면서 딸기 시들음병을 효과적으로 방제할 수 있는 제형을 개발하기 위하여 노력하였다.

길항세균의 효능 증진 및 딸기 근면의 접착성을 높이기 위하여 수화제 타입 제형을 새롭게 개발하였다. 수화제 타입 제형의 특징으로는 물에 현탁이 잘 되고 30분 이상 현탁이 지속된다는 것이고, 또한 딸기 근면에 길항세균의 흡착이 뛰어나며, 고체상의 제형보다는 토양입자 속으로 길항세균의 투입이 훨씬 용이하다는 점이다. 각 균주의 배양액은

White Carbon에 먼저 흡착한 후 롤밀러로 잘게 부순 후에 이를 첨가해 주었다. 3개의 길항미생물을 단체 및 혼합제제로 만들어 포장실험에 사용하였다.

라. 액상 및 고체 미생물살균제의 시제품 제작

담체와 흡착증강제, 영양보조제 등을 반복적으로 실험하면서 미생물에 적합한 제형을 확립하였으며, 최종적으로 수화제형 미생물제제 시제품을 생산하였다. 생산된 시제품을 딸기 시험장 및 일부 농가를 대상으로 포장실험을 실시하였다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

가. 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지 개발

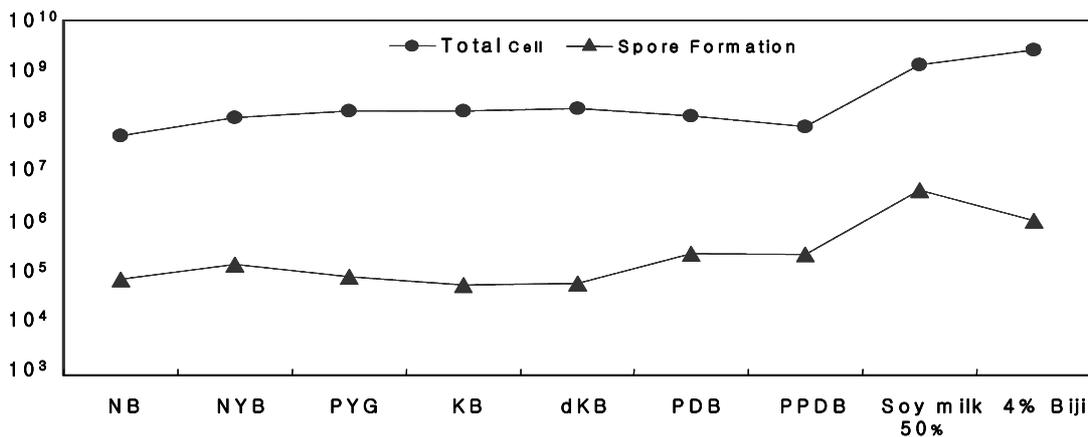


Fig.3-4-1. Comparison of the growth and spore formation of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 in various medium. NB(Nutrient broth 0.8%), NYB(NB+yeast extract 0.5%), PDB(potato dextrose broth 2.4%) KB(King's medium B), dKB(dipicolinic acid + KB medium), PPDB(PDB + polypeptone 0.5%), PYG(peptone 0.5% + yeast extract 0.5% + glucose 1% + K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%), Biji(powder of residue in the preparation of bean curd(4%).

선발된 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia pyrrocinea* BS36 및 *Bacillus* sp. RK1 균주의 대량생산을 위한 최적배지를 개발하기 위하여 각각의 배지에서 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87균주를 30℃에서 3일간 배양한 후 배양균밀도 및 포자형성율을 조사하였다. 대부분의 배지에서  $10^8$  정도의 배양균밀도를 보였으나, Soy milk와 비지에서는  $10^9$  이상의 배양균밀도로 잘 자랐으며, 포자형성에 있어서는 Soy milk배지를 사용한 경우가  $10^6$  이상의 농도로 가장 높은 포자형성율을 보여 주었다(Fig.3-4-1).

Dipicolinic acid 를 첨가한 NYB 배지는 3일 배양의 경우 와 7일 배양한 경우 모두  $10^7 \sim 10^8$  cfu/ml 농도의 배양 효과를 나타냈으나(Fig.3-4-2),  $Mg^{2+}$ 를 첨가한 NYB배지는 농도가 약할수록 배양효율이 상승하였다(Fig.3-4-3). Soy milk는 3일 배양한 경우 10% Soy milk배지에서  $10^9$  cfu/ml 이상의 농도를 나타내 가장 효율적이었고, 7일 배양에서는 30% Soy milk에서 가장 생균수가 증가하였다.

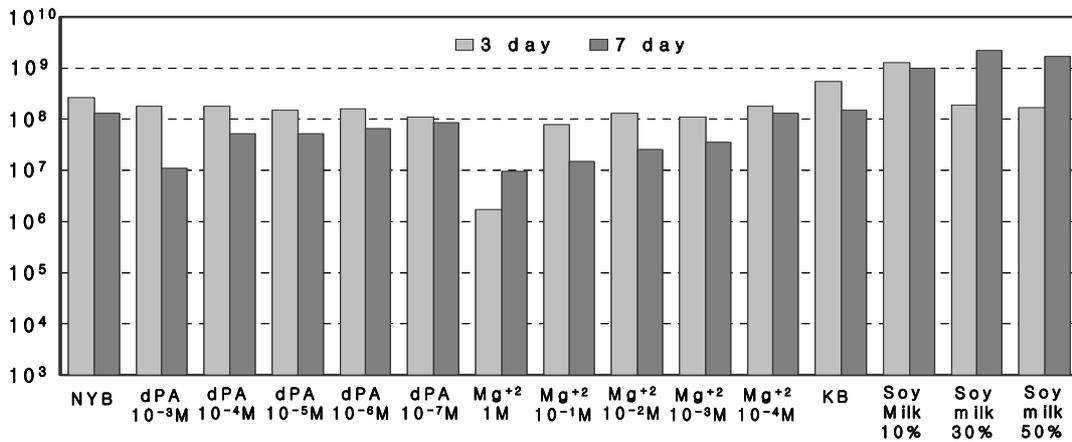


Fig.3-4-2. Comparison of the population density of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 in NYB medium amended with dipicolinic acid, NYB medium amended with  $Mg^{2+}$  ion and soymilk broth. dPA $10^{-3}$  : NYB(NB+yeast extract 0.5%) + dipicolinic acid  $10^{-3}$  M,  $Mg^{2+}$  1M : NYB(NB+yeast extract 0.5%) +  $Mg^{2+}$  ion 1M, Soymilk 10 : Soymilk 10% broth.

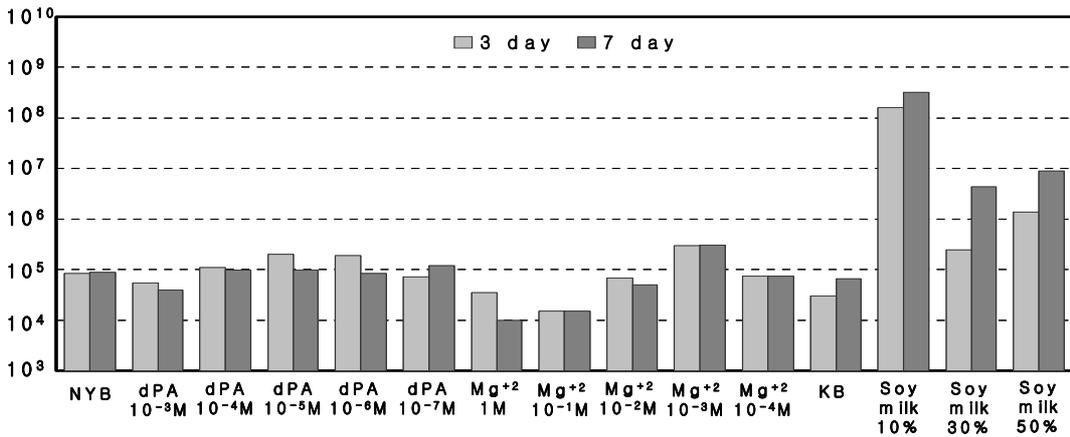


Fig.3-4-3. Comparison of the spore formation of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 in NYB medium amended with dipicolinic acid, NYB medium amended with Mg<sup>2+</sup> ion and soymilk broth. dPA10<sup>-3</sup> : NYB(NB+yeast extract 0.5%) + dipicolinic acid 10<sup>-3</sup> M, Mg<sup>2+</sup> 1M : NYB(NB+yeast extract 0.5%) + Mg<sup>2+</sup> ion 1M, Soymilk 10 : Soymilk 10% broth.

지금까지 알려진 Bacillus속 균주의 포자생성율을 증강시킬 수 있는 배지는 주로 crystal toxin protein의 생성력 증가나 항생물질의 생산 증가 등 2차 대사산물의 생산 증가를 위한 포자형성율을 높이기 위한 배지가 대부분이고 건조포자체를 만들기 위한 배지는 전무한 상태이다. Dipicolinic acid는 영양형 세포와는 달리 일반적으로 포자체에서 최고 12%까지 고농도로 존재하며 Ca<sup>2+</sup>과 염을 형성하여 주로 포자의 내열성에 관여하는 물질이다. 따라서 BS87균주의 경우에도 dipicolinic acid가 포자형성에 영향을 미치는가 알아본 결과 포자형성율에 큰 영향을 주기 않는 것으로 나타났다. 포자형성율에 있어서는 dipicolinic acid와 Mg<sup>2+</sup>를 첨가한 NYB 배지는 10<sup>5</sup> cfu/ml 내외로 현저하게 감소하는 경향을 보였으나, Soy milk배지에서는 3일 배양과 7일 배양 모두 10% Soy milk에서 10<sup>8</sup> cfu/ml 이상으로 가장 많은 포자를 생성하였다. 그러나 30% 이상의 농도에서는 3일과 7일 모두 10<sup>7</sup> cfu/ml 이하의 포자형성율을 나타내 전반적으로 배지농도가 높을수록 포자형성율이 감소하는 경향을 나타냈다.

나. 길항미생물의 대량 발효조건 최적화

- 1) BS87균주의 배지 농도별, Glucose 첨가에 따른 배양균 밀도 및 포자형성율

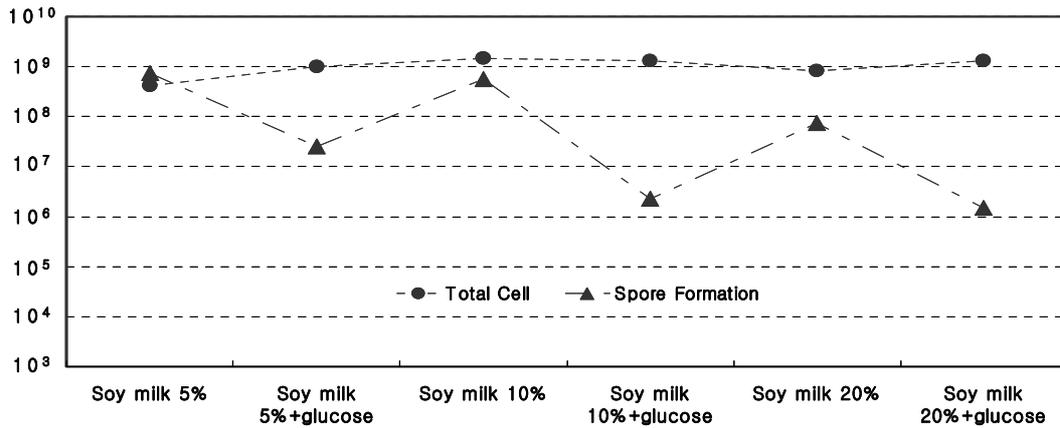


Fig.3-4-4. The effect of the glucose on the growth and spore formation of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 in soymilk medium.

*Bacillus amyloliquefaciens* BS87 균주의 배양과정에 5%, 10%, 20% 농도의 Soy milk배지에 glucose를 첨가하여 배양균 밀도와 포자형성율에 미치는 영향을 알아보았다. Glucose 첨가시 총 생균수에는 별 영향이 없으나, 포자형성율이 오히려 줄어드는 결과를 초래하였다. 5%와 10%의 Soy milk배지에서 10<sup>9</sup>cfu/ml 에 가까운 포자형성율을 보였으나 glucose를 첨가한 경우 10<sup>8</sup> cfu/ml 이하의 밀도로 떨어졌으며 전반적으로 Soy milk의 농도가 높을수록 포자형성율이 줄어드는 경향을 보였다(Fig.3-4-4).

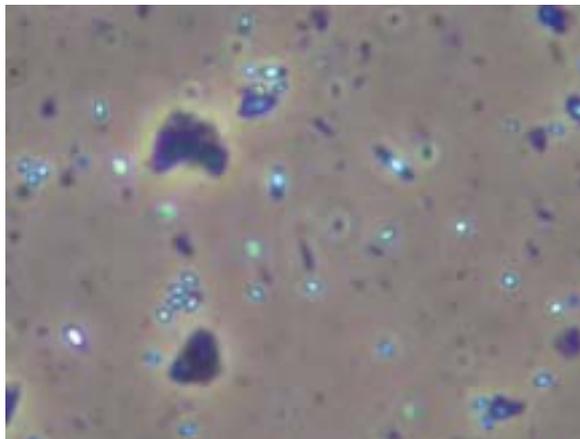


Fig.3-4-5. Photograph of endospore of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 in soy milk

medium.

2) RK1균주의 Soy milk배지 농도별, 배양일수별 배양 농도

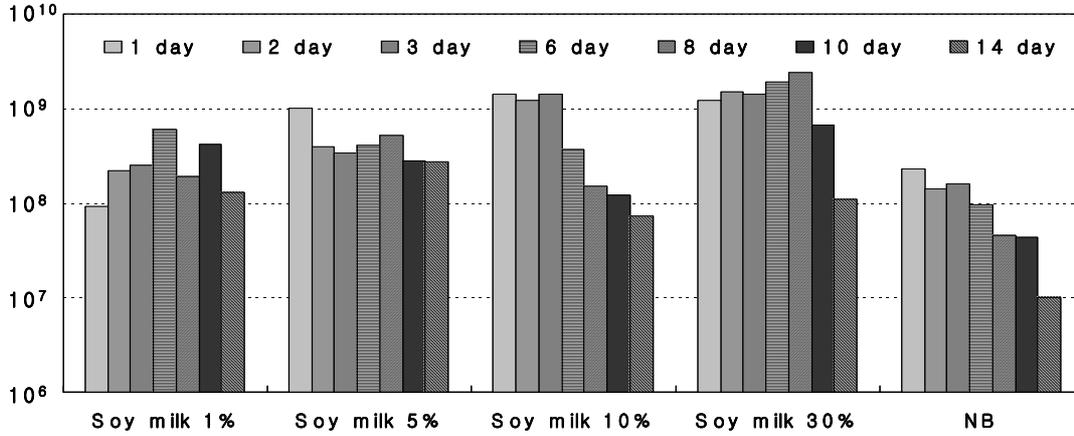


Fig.3-4-6. Comparison of the population density of *Bacillus* sp. RK1 with different concentration and times(days) in soy milk medium.

RK1 균주의 Soy milk배지에서의 배양균밀도를 조사한 결과 30% Soy milk배지에서는 8일간 배양한 경우 가장 효과가 좋았으나, 1일~8일까지 10<sup>9</sup> cfu/ml이상의 농도를 나타내었고 10% Soy milk배지에서는 1일~ 3일간 배양한 경우도 10<sup>9</sup> cfu/ml이상의 생균수가 확인되었다. 5%의 Soy milk배지에서는 1일 배양한 경우가 가장 높은 효율을 나타냈으며 2일 이후로는 오히려 감소하는 경향을 보였다(Fig.3-4-6).

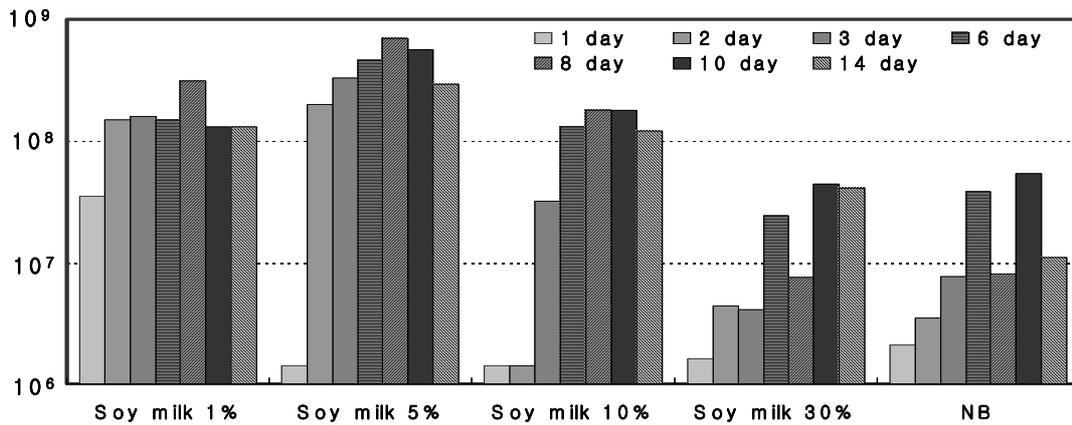


Fig.3-4-7. Comparison of the spore formation of *Bacillus* sp. RK1 with different concentration and times(days) in soy milk medium.

RK1균주의 포자형성율을 살펴보면 5%의 Soy milk배지에서 8일간 배양할 경우 가장 높은 포자생성율을 보였고 1%농도와 10%농도는 감소하는 경향을 보였다(Fig.3-4-7). 본 실험에서는 RK1균주를 5%배지에서 8일간 배양하여 실험에 사용하였다. 전반적으로 배양균 밀도와 포자 형성율에 있어서 대조구로 사용된 NB 배지보다 효율적으로 나타났고, 가격이 저렴하며 구입이 편리해서 미생물배양에 있어서 유용한 배지로서 다양한 분야에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

3) BS36균주의 Soy milk배지 농도별, 배양일수별 배양균 밀도

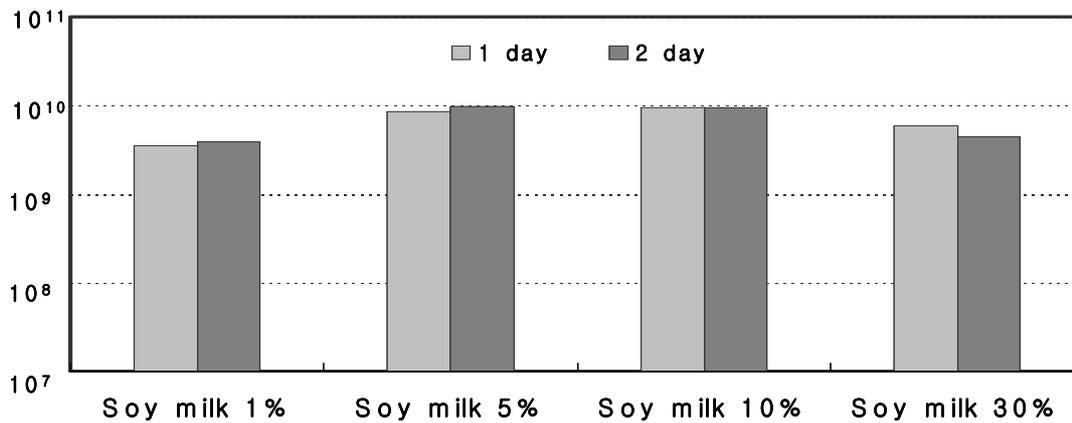


Fig.3-4-8. Comparison of the population density of *Burkholderia pyrrocinea* BS36 in soymilk broth adjusted in various concentration.

BS36균주는 5%와 10% Soy milk배지에서 1일과 2일 배양한 결과가  $10^{10}$  cfu/ml 내외의 농도로 비슷하게 나타났다. 본 실험에서는 5% Soy milk배지에서 2일간 배양하여 사용하였다. 전반적으로 *Burkholderia pyrrocinea* BS36 균주는 Soy milk배지에서 생육이 왕성하였다(Fig.3-4-8).

다. 길항미생물 발효공정의 최적화

1) BS87균주의 제형화

지금까지 배양한 균주를 보존하고 제품화하기 위하여 화이트카본에 흡착하여 생존율을 확인한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87균주는 Soy milk배지 10%농도에서 배양하여 화이트카본에 흡착한 경우 생균수가  $10^9$  cfu/g 이상으로 가장 좋았으나, 제형화한 경우에는 5%농도의 Soy milk 배지에서 가장 높은 생존율을 보여 주었다(Fig.3-4-9).

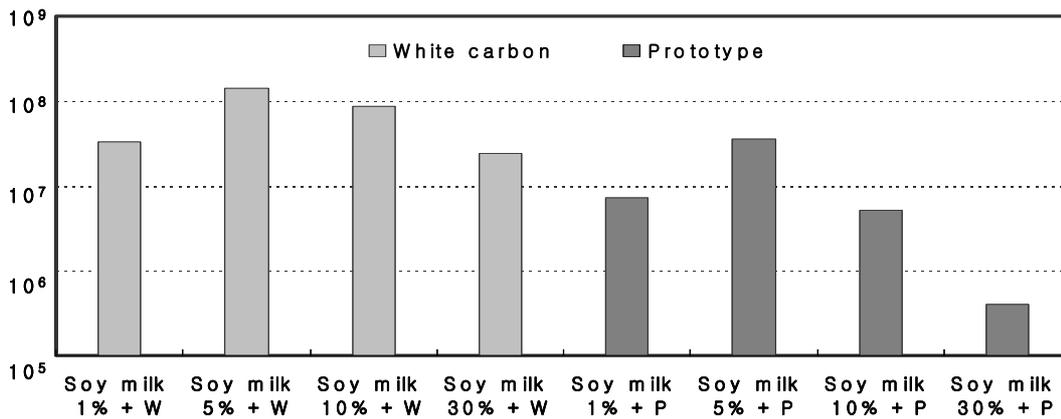


Fig.3-4-9. Comparison of the population density of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 in soymilk broth amended with white carbon and in prototype formulation.

2) BS36균주의 제형화

Table 3-4-2. Comparison of the population density of *Bacillus* sp. RK1 in soymilk broth

amended with white carbon and in prototype formulation

prototype formulation	No. Cell (cfu/g)
Culture broth population density	$5.9 \times 10^{11}$
BS36 + VS-325 (1:3)	$3.7 \times 10^8$
[BS36 + VS-325] + prototype formulation (1:9)	$10^5$ under
[BS36 + VS-325] + prototype formulation (1:1)	$10^5$ under

VS-325 : one of the vermiculite

BS36균주의 배양액 농도는  $10^{11}$ cfu/ml 농도로 배양은 매우 양호한 편이나, 포자(아포)를 생성하지 못하기 때문에 배양 후 담체에 흡착하거나 제제화 할 경우 생균수가 급격히 감소하는 경향이 있으므로 관리에 주의를 요한다. 본 실험에서도 VS-325 담체에 흡착 후 제형화한 경우  $10^{8-9}$ cfu/g 정도를 유지하였으나, 그 후에 수화제 제형을 만들어 균수를 측정하였으나  $10^5$ cfu/g 이하로 생균수가 급격히 감소하였다(Table 3-4-2).

### 3) RK1균주의 제형화

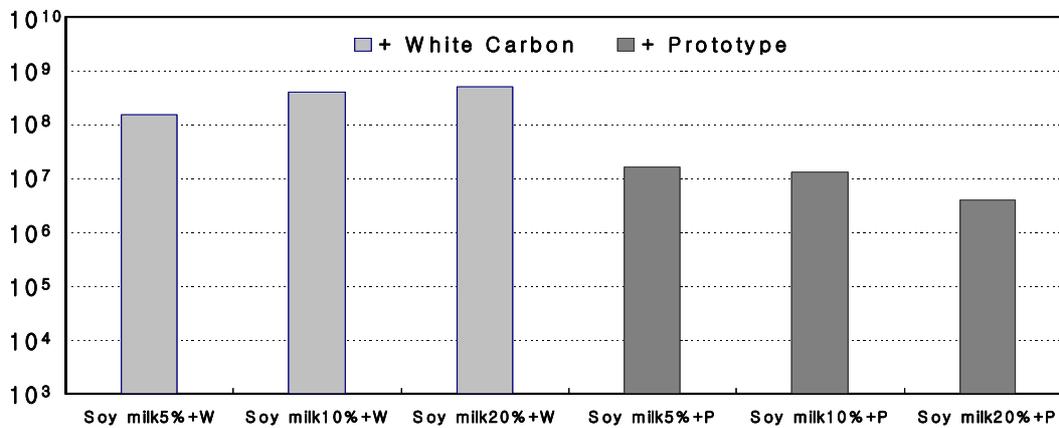


Fig.3-4-10. Comparison of the population density of *Bacillus* sp. RK1 in soymilk broth amended with white carbon and prototype formulation.

RK1 균주의 경우 5% Soy milk 배지에서 배양한 균주가 화이트카본 흡착( $10^8$ cfu/g 이상)후나 수화제 제형( $10^7$ cfu/g 이상)을 만들었을 때 가장 높은 생균율을 나타내었다. 그러나 배지 농도를 10%, 30%로 증가시킬 경우 카본에 흡착시킨 경우나 제형을 만들 경우 모두 생균수가 줄어드는 경향이 있다(Fig.3-4-10).

라. 액상 및 고체 미생물살균제의 시제품 제작

Table 3-4-3. Comparison of the population density after prototype formulation

Formulation	Isolates	The population density after prototype formulation
BS36+BS87	BS 36	$3.4 \times 10^8$
mixing type	BS 87	$8.4 \times 10^8$
BS 36 type	BS 36	$3.8 \times 10^9$
BS 87 type	BS 87	$4.3 \times 10^9$
RK1 type	RK1	$1.6 \times 10^8$

각각의 균주를 배양하여 단일제품 및 혼합제로 제형화한 후 시제품을 제작하여 딸기시험장 포장시험과 농가 포장시험에 사용하였다. 각 제형의 길항미생물은  $10^{8-9}$ cfu/g 생존율을 보여 대체로 생균수가 높게 나타났다(Table 3-4-3).

## 제 5 절 길항미생물의 토양내 지속성 및 길항물질 분석을 통한 효과 검정(제1협동기관)

### 1. 연구수행방법

가. 길항미생물들의 생태학적 통태 관찰을 위해 항생제 내성균 선발

1) 길항미생물의 각 항생제별 내성 Spectrum 검정

길항 미생물로 선발된 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia pyrrocinea* BS36 및 *Bacillus* sp. RK1 균주의 각 항생제별 내성 Spectrum을 검정하기 위하여 King's medium B broth(KB)에서 30시간 배양한 각 균주를  $10^5 \text{ml}^{-1}$ 의 농도로 희석하고 Ampicillin(Ampicillin sodium salt, Sigma)과 Streptomycin(Streptomycin sulfate salt, Sigma)은 10ppm, 60ppm, 100ppm 씩, Rifampicin(Rifampicin, Sigma)은 2ppm, 6ppm, 10ppm이 함유된 King's medium B Agar(KBA) 배지에 도말한 뒤 30°C 항온기에서 24시간 배양하고 생육여부를 확인하였다. 이미 항생제 내성균으로 선발된 *Burkholderia pyrrocinea* BS36은 추가적으로 Ampicillin 5,000ppm, Streptomycin 1,000ppm, Rifampicin 500ppm을 함유한 KBA에서의 항생제 내성 Spectrum을 같은 방법으로 검정하였다.

2) 항생제에 감수성인 균주들의 항생제 저항성 획득을 위한 Mutant 유도

앞선 실험에 의해 각 항생제에 감수성인 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Bacillus* sp. RK1 균주들의 항생제 저항성 획득을 유도하기 위하여 300ml의 삼각플라스크 6개에 King's medium B broth(KB)를 100ml씩 넣고 3개의 삼각플라스크에는 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87의 균배양액 5ml을 접종하고 다른 삼각플라스크에는 *Bacillus* sp. RK1의 균배양액 5ml을 접종한 뒤 삼각 플라스크를 UV Transilluminators(wavelength 312nm, STX 20M, uvitec) 위에 올려놓고 UV light(wavelength 312nm)를 3분간 조사하고 30°C 진탕 배양기에서 3시간 배양하였다. 그리고 각 균주별 3개의 삼각플라스크에 각각 Ampicillin 10ppm, Streptomycin 10ppm, Rifampicin 10ppm을 넣은 뒤 30°C 진탕 배양기에서 24시간 배양하고 상기와 같은 농도의 항생제가 함유된 KBA 배지에 streaking 하여 저항성 획득 여부를 확인 하고 저항성을 획득한 균주를 위와 같은 방법으로 각 항생제 20ppm, 30ppm, 50ppm, 100ppm, 150ppm 까지 순차적으로 실시하였다.

3) 각 항생제 별로 저항성이 획득된 균주들의 항균활성능 검정

앞선 실험에 의해 각 항생제 별로 저항성이 획득된 균주들의 항균활성능 보유 여부를 검정하기 위하여 PDA 배지에서 10일간 배양된 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*를 PDA 배지 중앙에 접종한 뒤 2cm 간격을 두고 원균주와 저항성 획득 균주를 접종하여 대

치배양 시키고 균사생장 억제 능을 비교하였다.

#### 4) 선발된 항생제 저항성 균주들의 다른 항생제에 대한 다중 저항성 검정

앞선 실험에 의해 선발된 항생제 저항성 균주들의 다른 항생제에 대한 다중 저항성 획득 여부를 검정하기 위하여 Ampicillin 50ppm, 100ppm, 150ppm, Streptomycin 50ppm, 100ppm, 150ppm, Rifampicin 50ppm, 100ppm, 150ppm을 함유한 KBA 배지를 만들고 선발된 항생제 저항성 균주들을 접종하고 30°C 항온기에서 3일간 배양시킨 후 성장 여부를 확인하였다.

#### 나. 토양 내 미생물 살균제의 지속성 조사

본 실험을 위하여 딸기 시들음병균을 토양에 처리한 후 3일 뒤에 미생물제제를 침지 처리한 딸기를 정식하였다. 1주일 후에 미생물제제를 관주한 후 딸기 근권에서의 기간별, 깊이별 밀도를 조사하였다.

##### 1) 딸기 근권내 처리미생물 밀도 조사

딸기 묘를 뿌리 끝까지 조심스럽게 캐내어 뿌리를 살짝 흔들어 굵은 토양 덩어리들을 털어낸다. 근면에 붙어 있는 흙은 그대로 놔둔 채로(영문 표기;plant roots with adhering soil taken...) 지퍼백에 담아 실험실로 가져온다. 뿌리에 흙이 붙은 채로 10g을 절단하여 멸균수 90ml이 담겨있는 삼각플라스크에 넣고 190rpm으로 30분 동안 진탕배양한다. 희석배수에 따라 희석하여 KBA에 평판 도말한다.

28°C incubater에서 3일간 배양 후에  $10^4$  농도의 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 포자 현탁액을 스프레이한 후 25°C incubater에서 3일간 배양한 후 길항미생물의 생균수를 측정하였다.

##### 2) 토양 깊이별 길항미생물 밀도 조사

토양을 깊이별로 채취할 수 있는 도구(이름)를 사용하여 표면에서부터 5cm, 10cm, 15cm 깊이로 각각 토양을 채취하여 지퍼백에 담아 실험실로 가져온다. 토양을 1g씩 재서 9ml의 멸균수가 들어있는 test tube에 넣고 vortexing해준다. 이후 실험은 위와 같다.

## 다. 길항미생물의 항생물질 분리 및 분석

### 1) 길항세균에 의한 식물병원균류의 저해 형태

두 근권길항세균에 의한 딸기시들음병 병원균의 저해 형태는 PDA 배지에 식물병원균과 길항세균을 대치배양한 다음 25°C에서 1주일간 배양한 후에 저지원이 형성된 곳의 균사의 형태를 광학현미경으로 관찰하였다.

### 2) 용매추출성의 검토

용매추출성의 검토는 두 근권길항세균의 배양액을 1,000ml 취하여 2배량의 hexane, chloroform, ethylacetate, buthanol를 가하여 overnight 시킨 후 2회 반복 추출하고 유기용매 층과 물층을 분리하여 각각의 용매별 활성을 측정하였다. 항균활성의 측정은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* ( $10^4$  spores/ml)를 접종한 검정배지 위에 용매추출액을 묻힌 paper disk를 올려놓는 방법으로 수행하였다.

### 3) 활성물질의 경시적인 안정성

물질의 경시적인 안정성은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* ( $10^4$  spores/ml)를 접종한 검정배지에 각 용매추출액을 묻힌 paper disk를 올려놓은 후 4일이 경과후에 활성이 감소된 정도로 측정하였다.

### 4) Silica gel open column chromatography

길항세균 배양액을 용매 추출한 ethylacetate층을 sodium sulfate로 탈수시키고 여과한 다음 감압농축하여 소량의 용매(chloroform : methanol = 100:15)에 녹여 silica gel open column chromatography용 시료로 사용하였다. 120ml의 silica gel 60을 chloroform으로 녹인 후에 3×30 cm column에 채우고 위의 시료를 충전하여 chloroform : methanol의 비율을 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 0:10으로 조절한 용매를 이용하여 순차적으로 용출하였다. 활성의 측정은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* ( $10^4$  spore/ml)를 접종한 검정배지를 조제하여 paper disk를 이용해서 실험하였다.

### 5) Thin layer chromatography

Silica gel open column chromatography 분석에서 활성이 있는 분획을 다시 모아서 감

압축하여 thin layer chromatography 분석용 시료로 사용하였다. 10×20 cm의 분석용 TLC를 사용하여 적합한 용매조건을 찾아낸 후에 10×20 cm의 Prep. TLC를 사용하여 전개시킨 다음 각각의 분획을 수거하여 소량의 용매(chloroform : methanol = 100:15)로 용출한 후에 각각의 활성을 측정하였다. 활성의 측정은 Silica gel open column chromatography 분석 때와 동일하게 실시하였다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 길항미생물들의 생태학적 동태 관찰을 위해 항생제 내성균 선발

#### 1) 길항 미생물들의 각 항생제별 저항성 Spectrum 검정

길항미생물로 선발된 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Burkholderia pyrrocinea* BS36 및 *Bacillus* sp. RK1 균주의 각 항생제별 저항성 Spectrum을 검정한 결과 *Burkholderia pyrrocinea* BS36 균주를 제외한 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Bacillus* sp. RK1 균주에서 항생제에 대한 저항성이 없음을 확인하였다(Table. 3-5-1). Ampicillin, Streptomycin, Rifampicin 세 가지 항생제 모두에서 저항성을 가지고 있는 *Burkholderia pyrrocinea* BS36 균주의 항생제의 농도별 저항성 Spectrum을 검정한 결과 Ampicillin 5,000ppm에서 대조구와 같은 정도로 전혀 영향을 받지 않았고, Streptomycin 1000ppm, Rifampicin 500ppm에서는 항생제에 영향을 받아 대조구보다 적은 성장률을 보였지만 역시 상당한 저항성을 갖고 있음을 알 수 있었고 그중 Ampicillin에 대한 저항성이 가장 강한 것을 알 수 있었다(Fig.3-5-1).

Table. 3-5-1. The antibiotic-resistance test of three antagonistic bacteria

Concentration of antibiotics(ppm)		<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. pyrrocinea</i>	<i>Bacillus</i> sp.
		BS87	BS36	RK1
Ampicillin	10	-	+	-
	60	-	+	-
	100	-	+	-
Streptomycin	10	-	+	-
	60	-	+	-
	100	-	+	-
Rifampicin	2	-	+	-
	6	-	+	-
	10	-	+	-
Control		+	+	+

+ : growth, - : non growth

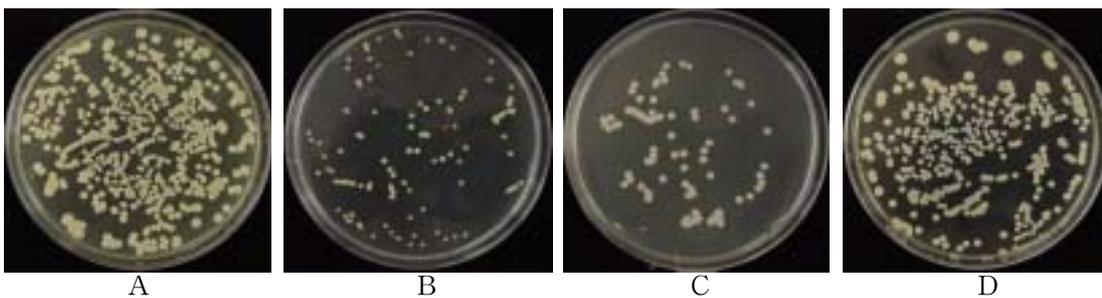


Fig.3-5-1. The maximal resistance concentration of each antibiotic for *Burkholderia pyrrocinea* BS36. A: ampicillin 5,000ppm, B: Streptomycin 1,000ppm, C: Rifampicin 500ppm, D: control

2) 항생제에 감수성인 균주들의 항생제 저항성 획득을 위한 Mutant 유도

앞선 실험에 의해 각 항생제에 감수성인 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Bacillus* sp. RK1 균주의 각 항생제에 대한 저항성 획득을 위한 Mutant 유도 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Bacillus* sp. RK1 두 균주 모두 Ampicillin 150ppm에서의 저항성은 획득되지 않았고 Streptomycin, Rifampicin 150ppm에 대한 저항성은 획득되었음이 확

인되었다(Table. 3-5-2, Fig.3-5-2). Ampicillin에 대한 저항성이 매우 약하게 획득된 듯 하였으나 고농도의 Ampicillin에서 저항성 획득이 되지 않았음을 알 수 있었다.

Table. 3-5-2. Mutagenesis-inducing test for acquire of antibiotic-resistant isolates

Concentration of antibiotics(ppm)	BS87		RK1	
	Wild type	Mutant	Wild type	Mutant
Ampicillin 150ppm	-	-	-	-
Streptomycin 150ppm	-	+	-	+
Rifampicin 150ppm	-	+	-	+

+ : growth, - : non growth

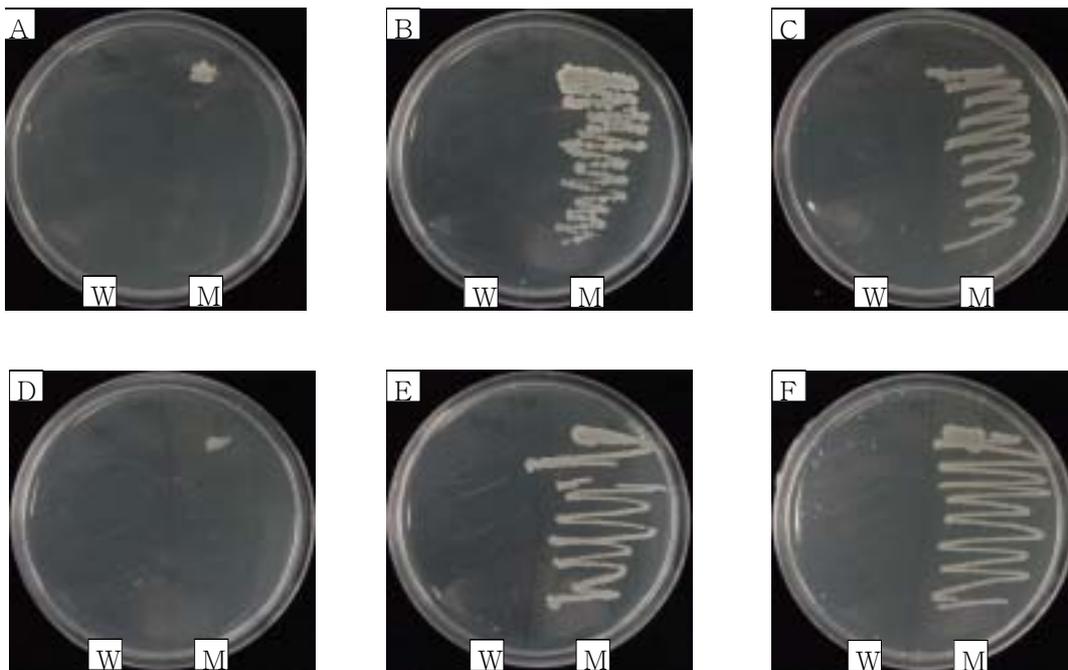


Fig.3-5-2. The growth of two antagonistic bacteria by acquired resistant against each antibiotic in King's B Agar media amended with each antibiotic. A : BS87 ampicillin

150ppm, B : BS87 streptomycin 150ppm, C : BS87 rifampicin 150ppm, D : RK1 ampicillin 150ppm, E : RK1 streptomycin 150ppm, F : RK1 rifampicin 150ppm, W : wild type, M : mutant

3) 각 항생제 별로 저항성이 획득된 균주들의 항균활성능 검정

앞선 실험에 의해 각 항생제 별로 저항성이 획득된 균주들의 항균활성능 보유 여부를 검정한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Bacillus* sp. RK1 의 원균주와 약제저항성 균 모두 항균활성능이 있음을 확인하였다(Fig.3-5-3).

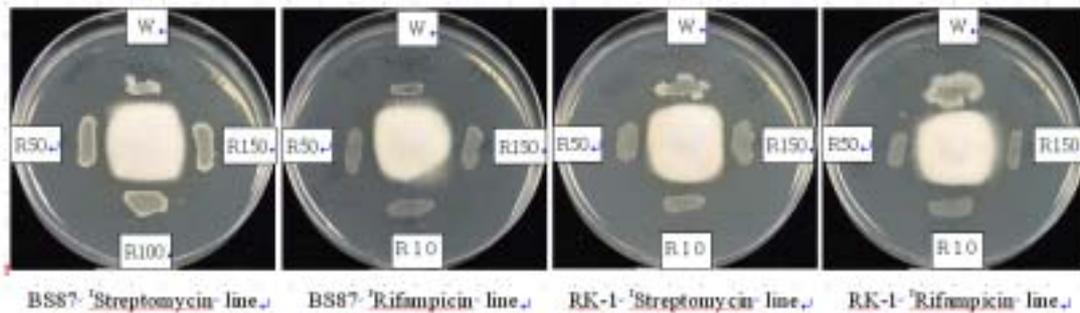


Fig.3-5-3. Comparison of antifungal activity with wild type and antibiotic-resistance lines against *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* on PDA.

4) 선발된 항생제 저항성 균주들의 다른 항생제에 대한 교차저항성 검정

선발된 항생제 저항성 균주들의 다른 항생제에 대한 다중 저항성 획득 여부를 검정한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87, *Bacillus* sp. RK1 두 균주 모두다 각 항생제별로 획득한 저항성만을 갖고 있고 다른 항생제에 대한 교차저항성은 획득하고 있지 않음을 확인하였다(Table 3-5-3). 또한 50ppm의 항생제에서 저항성을 획득한 균주들도 150ppm에서도 생육에 별다른 영향이 없이 잘 생육함을 알 수 있었다.

Table 3-5-3. The test of multi-resistant spectrum of resistant lines

		Concentration of antibiotics (ppm)	Ampicillin			Streptomycin			Rifampicin		
			50	100	150	50	100	150	50	100	150
Resistant lines											
BS87	<sup>r</sup> Ampicillin	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		150	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>r</sup> Streptomycin	50	-	-	-	+	+	+	-	-	-
		100	-	-	-	+	+	+	-	-	-
		150	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	<sup>r</sup> Rifampicin	50	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		100	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		150	-	-	-	-	-	-	+	+	+
RK1	<sup>r</sup> Ampicillin	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		150	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>r</sup> Streptomycin	50	-	-	-	+	+	+	-	-	-
		100	-	-	-	+	+	+	-	-	-
		150	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	<sup>r</sup> Rifampicin	50	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		100	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		150	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+ : growth, - : non growth

#### 나. 토양내 미생물 살균제의 지속성 조사

##### 1) 딸기 근권내 처리미생물 밀도 조사

제형화 초기의 길항미생물의 생존율은  $10^{8-9}$ cfu/g 이었으며 침지처리시의 생존율은  $10^{6-7}$ cfu/g로 나타났다(Table 3-5-4). 또한 토양관주시의 생존율은  $10^{5-6}$ cfu/g 로 딸기에 처리한 후 근권에서의 길항미생물의 초기 생존율은 비슷한 경향을 보이고 있다.

Table 3-5-4. Comparison of the population density of prototype for formulation, dipping and drenching

Prototype formulation	Isolates	Population density after prototype formulation	Population density after dipping	Population density after drenching
BS36+BS87	BS 36	$3.4 \times 10^8$	$6.8 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$
	BS 87	$8.4 \times 10^8$	$1.7 \times 10^7$	$4.4 \times 10^5$
BS 36	BS 36	$3.8 \times 10^9$	$7.6 \times 10^7$	$6.7 \times 10^6$
BS 87	BS 87	$4.3 \times 10^9$	$8.6 \times 10^7$	$5.8 \times 10^6$
RK1	RK1	$1.6 \times 10^8$	$3.2 \times 10^6$	$6.3 \times 10^5$

Table 3-5-5. Population densities of antagonistic bacteria in the rhizosphere of strawberry at different intervals after dipping of BS36, BS87 and RK1 into field

Treatment	Antagonistic bacteria	Log cfu/g rhizosphere soil		
		1day	4 week	14 week
BS36+BS87	BS36	$6.5 \times 10^6$	$3.5 \times 10^5$	-
	BS87	$1.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^5$	$6.5 \times 10^5$
BS36	BS36	$5.5 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$	-
BS87	BS87	$1.7 \times 10^7$	$5.7 \times 10^7$	$1.4 \times 10^6$
RK1	RK1	$5.0 \times 10^6$	$6.5 \times 10^5$	$7.0 \times 10^4$

토양에서 길항미생물의 생존율은 처리 직후 토양내 길항미생물 밀도가  $\log 10^{6-7}$ cfu/g rhizosphere soil 였으며, 처리 4주 후의 밀도는  $\log 10^{5-7}$ cfu/g였다. 그중 BS36은 토양에서 4주정도 생존하였고 14주에서는 분리되지 않은 반면 BS87과 RK1은 14주 후에도  $\log 10^{4-6}$ cfu/g를 나타내어 높은 생존율을 보였다(Table 3-5-5).

2) 토양 깊이별 길항미생물 밀도 조사

토양깊이별 길항미생물의 생존율을 조사한 결과, 토양 5cm 와 10cm에서는  $\log 10^{5\sim 6}$ cfu/g 으로 비슷한 분리밀도를 나타냈고 15cm에서도  $\log 10^{4\sim 5}$ cfu/g의 분리밀도를 나타냈다(Table 3-5-6).

Table 3-5-6. Population densities of antagonistic bacteria in the rhizosphere of strawberry at different soil depth after dipping of BS36, BS87 and RK1 into field

Treatment	Antagonistic bacteria	Log cfu/g rhizosphere soil		
		5 cm	10 cm	15 cm
BS36+BS87	BS36	-	-	-
	BS87	$1.4 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
BS36	BS36	-	-	-
BS87	BS87	$2.5 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5$
RK1	RK1	$1.8 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$

다. 길항미생물의 항생물질 분리 및 분석

1) 길항세균에 의한 식물 병원균류의 저해 양상

대부분의 식물병원균류에 항균활성을 보이는 *Burkholderia pyrrocinia* (BS36)와 *Bacillus amylool iquefaciens* (BS87), *Bacilus* spp. (RK1) 균주들이 딸기 시들음병원균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)에 미치는 영향을 조사하기 위해서 고체배지 상에 대치 배양하여 저지원이 형성된 곳의 균사 형태를 광학현미경으로 조사하였다. 병원균과 길항세균을 PDA 배지에 접종한 후 25°C에서 1 주일간 배양한 후에 관찰하였다.

세 길항세균에 의한 저해 형태는 균사벽의 분해, 세포막의 분해, 균사 팽윤, 균사 말단의 생육저해 등 여러 가지로 나타났다(Fig.3-5-4). 일반적으로 길항균에 의한 식물병원균의 억제 기작은 항균물질에 의한 항생작용, 세포벽 분해, 세포막 분해, 양분의 경쟁 등으로 설명되는데 본 연구에서 사용한 길항세균은 다양한 항균 기작들을 고루 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

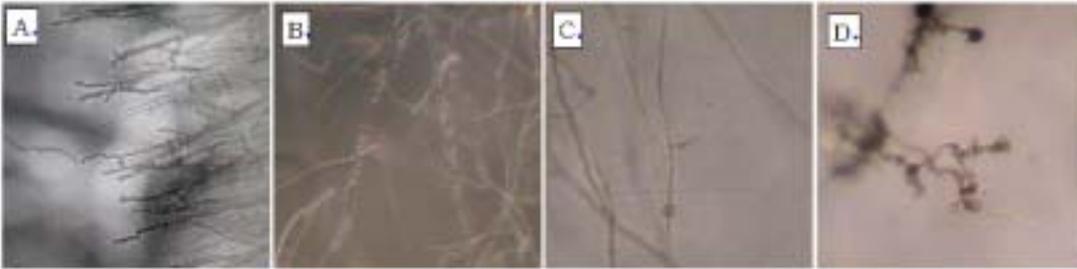


Fig.3-5-4. Irregular mycelial shapes on inhibition zone of pathogens were treated with three antagonistic bacteria on PDA plates (A; Inhibition of mycelial growth by *Burkholderia pyrrocinia* (BS36) B; lysis of cell membrane by *Bacillus amyloliquefaciens* (BS87), C; Lysis of cell wall by *Bacillus amyloliquefaciens* (BS87), D; mycelial swelling by *Bacillus* spp. (RK1).

## 2) 용매 추출성

두 길항세균들의 배양여액을 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol을 사용해 각각 2회 반복 추출하여 나온 각각의 유기용매층을 물층과 분리한 후 항균 활성을 측정하였다 (Fig.3-5-5). 활성 측정은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* ( $10^4$  spore/ml)를 접종한 검정배지에 paper disk를 활성물질을 묻힌 후 올려놓아 실험하였으며, 그 결과 *Burkholderia pyrrocinia* (BS36)와 *Bacillus amyloliquefaciens* (BS87)는 Ethylacetate fraction에 활성이 있고, *Bacillus* spp. (RK1)는 Ethylacetate와 BuOH에서 활성이 존재하였다. 특히, RK1의 BuOH fraction의 활성은 딸기 시들음병균의 균사 성장을 저해하지만 완전 치사시키지 않는 특징도 보였다.

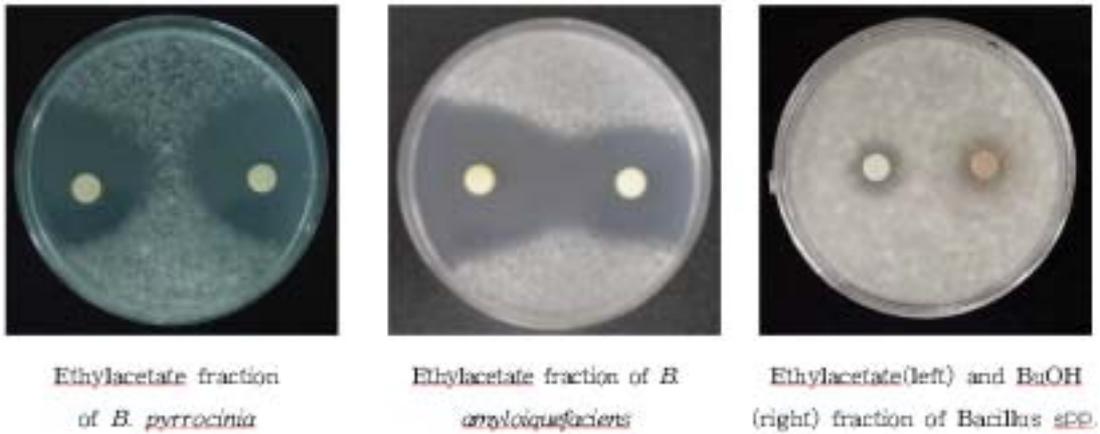


Fig.3-5-5. Antifungal activities of each solvents fractions from the culture filtrate of three antagonistic bacteria.

### 3) 활성물질의 경시적인 안정성

활성물질의 시간에 따른 안정성을 검토한 결과 *Burkholderia pyrrocinia* (BS36)와 *Bacillus* spp. (RK1)는 1개월 후 까지 활성이 유지되는 반면에 *Bacillus amyloliquefaciens* (BS87)는 5일이 경과하면 활성이 거의 소멸되어 불안정한 물질임을 알 수 있었다(Table. 3-5-7). 그러나 *B. amyloliquefaciens*는 토양 중에서 아주 오랜 기간을 생존하면서 지속적으로 이 항균물질을 분비하므로 항균작용을 수행하는데 아무런 문제가 없다고 판단된다.

Table. 3-5-7. Stability of antifungal substance from *Burkholderia pyrrocinia*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus* spp. with time.

Bacteria	days
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> (BS36)	60
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BS87)	4
<i>Bacillus</i> spp. (RK1)	20

4) Silica gel open column chromatography와 Thin layer chromatography

BS36 균주의 용매 추출액을 ethyl acetate 층을 sodium sulfate로 탈수시키고 여과한 다음 감압 농축하여 silica gel column chromatography를 하기 위한 시료로 사용하였다. 120 ml의 silica gel (silica gel 60, MERCK)을 3×30cm column에 채우고 위의 시료를 loading 하여 chloroform-methanol의 비율을 변화시켜가면서 용매를 이용하여 용출하였을 때 Chloroform : Methanol = 9 : 1과 8 : 2 분획에서 항균 활성이 나타났다. 뚜렷한 밴드를 중심으로 총 8개의 분획으로 나누어서 재용출하여 활성 측정을 하였을 때 3개의 다른 분획에서 항균 활성이 나타났으므로 BS36에는 적어도 3개 이상의 활성물질이 존재할 것으로 예상할 수 있었다(Fig.3-5-6).

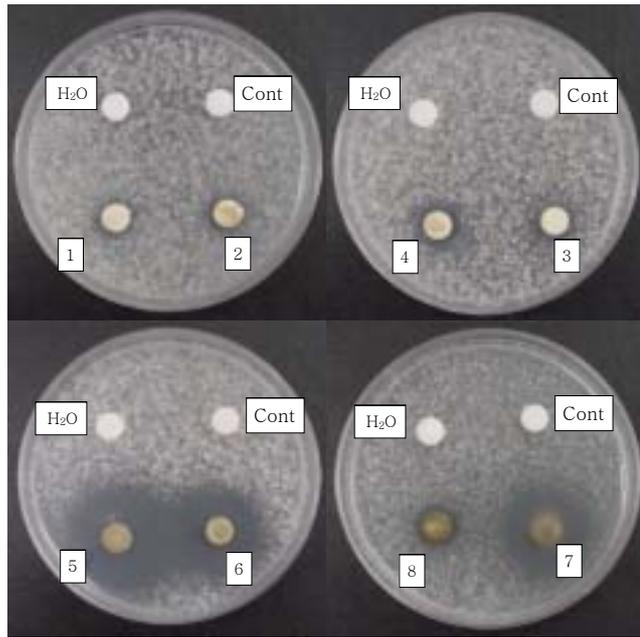


Fig.3-5-6. Inhibition zone of eight fractions on assay media plates, 1~8; fraction number, Control; C:M=100:15.

## 제 6 절 길항미생물제제의 온실 및 포장 효과 검정 (제2협동기관)

### 1. 연구수행방법

#### 가. 미생물살균제의 처리량과 처리간격에 따른 전처리 효과 검정

##### 1) 길항미생물 제형의 처리밀도에 따른 딸기시들음병 검정.

상토(Seoul Agricultural Materials Co., Ltd.; cocopeat : peatmoss : vermiculite : perlite : zeolite = 68-73 : 10-14 : 6-8 : 7-10 : 2-4)에 딸기 시들음병균 Fo47균주를 MS배지에서 200rpm으로 1주일 배양한 후 상토에 병원균 포자가  $\log^{5-6}$  포자/ml가 되게 접종하여 이병토를 만들었다. 딸기유묘의 뿌리를 털고 길항미생물 BS36, BS87, RK1의 제형을 각각  $\log^5$ ,

$\log^6$ ,  $\log^7$  cfu/ml 농도별로 뿌리 침지 후 포트(16cm×13cm)에 이병토를 담아 식재하였다. 또한 대조약제로 코사이드 500배 관주 처리하였다. 시험구 배치는 완전임의배치법으로 처리당 12주를 시험하였다. 정식 55일에 나타나는 병징은 다음의 방법(Fig.3-6-1)으로 disease index를 조사하였다.

Disease index: 0 = no symptom, 1 = 1-2 leaf rolled and yellowed leaf, 2 = all leaf rolled and deformed leaf, 3 = chlorosis and wilting, 4 = wilting, 5 = death. Rating of 25 days after inoculation.

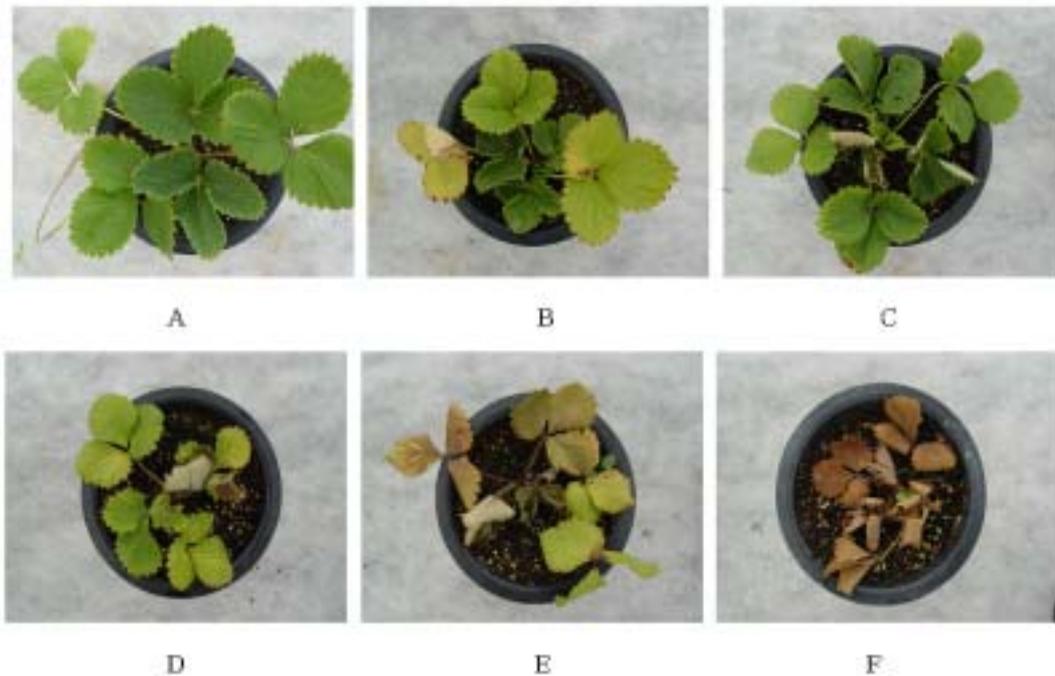


Fig.3-6-1. This picture represent disease index scale (0-5) on strawberry plants. 0 = no symptom (A), 1 = 1-2 leaf rolled and yellowed leaf (B), 2 = all leaf rolled and deformed leaf (C), 3 = chlorosis and wilting (D), 4 = wilting (E), 5 = death (F).

2) 길항미생물 처리방법에 따른 딸기시들음병 검정.

상토에 딸기 시들음병균 Fo47균주를 MS배지에서 200rpm으로 1주일 배양한 후 상토에 병원균 포자가  $\log^{5-6}$ 포자/ml가 되게 접종하여 이병토를 만들었다. 딸기유묘의 뿌리를 털고

길항미생물 BS36, BS87, RK1의 제형을 각각  $\log^6$ cfu/ml농도별 뿌리 침지와  $5 \times \log^4$ cfu/ml농도별 관주처리로 나누어 처리하였다. 시험구 배치는 완전임의배치법으로 처리 당 12주를 시험하였다. 정식 55일에 나타나는 Fig.3-6-1의 방법으로 disease index를 조사하였다.

#### 나. 시들음병균의 선처리 후 미생물살균제의 최적 처리횟수 조사와 치료효과 검증

각각의 길항미생물은 딸기시들음병 방제를 위해 시설하우스 조건에서 평가하였다. 처리포장에 시들음병균 Fo47의  $1 \times 10^{5-6}$ 포자/ml을 토양에 처리하여 이병토양을 만들었다. 각 군주 제형의 침지처리농도는  $3.2-8.6 \times 10^{6-7}$ cfu/g soil이고 딸기유묘(도치오도메)를 10월 27일 정식 전 미생물제에 각각의 농도별로 10분간 뿌리 침지 후 정식한 다음 11월 3일 각각의 길항미생물을  $2.9-6.7 \times 10^{5-6}$ cfu/g soil 관주 처리하였다. 이병주율은 이병주수/전체주수  $\times 100$ 으로 계산하였으며 조사는 11월 25일과 1월 5일에 실시하였다. 근권토양 내 처리 미생물의 밀도 변화를 조사하기 위해 처리직후, 침지처리 4주, 14주에 토양 내 길항미생물의 밀도를 조사하였다. 또한 관주 시 토양 깊이별 처리 미생물의 밀도변화를 조사하기 위해 관주 2주 후 토양시료채취기(soil sampler)를 이용하여 토양 깊이별로 토양을 채취하여 길항미생물의 밀도를 조사하였으며 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 하였다.

#### 다. IPM을 위한 기존 합성농약과의 혼용 또는 교차사용 가능 조사

딸기 병해충 종합관리(IPM)는 병해충의 예방을 위하여 농약사용을 최소한으로 제한하는 대신 유전학적, 작물경종적, 생물학적, 물리적 방법 등의 다양한 병해충 조절방법을 종합적으로 사용하는 것으로 병해충의 진멸을 목표로 하기보다는 일정수준의 병해충의 존재와 병해충의 피해 하에서도 수익성이 있고 질 좋은 상품생산을 가능하게 하는데 있다.

병해충 종합관리의 성패 여부는 병해충에 대한 정보의 정확성과 시기 적절성으로 주어진 병해충의 문제 해결을 위해 알맞은 조절방법과 조치를 취하는 것이다. 이러한 병해충 종합관리의 장점은 농약사용량의 감소와 생산비 절감, 병해충 문제의 조기 식별과 안전한 농산물의 생산과 섭취, 환경보전, 유익충의 보호 등을 들 수 있다. 딸기의 경우는 시설에 따른 하우스의 기상조건, 토양상태, 비료수준, 병해충 예찰, 병해충 발생량, 경제성 분석 등이 유기적으로 맞물려야 하는 어려움이 있다.

본 실험에서는 IPM을 위한 농약과의 혼용여부를 알아보기 위하여 딸기로 고시된 약제

11종을 사용농도에 맞게 투입하여 고체상의 배지를 만들었다. 이 배지에 미생물 살균제에 사용되는 미생물을 접종하여 3일간 배양하여 생육여부를 살펴보았다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 미생물살균제의 처리량과 처리간격에 따른 전처리 효과 검증

#### 1) 길항미생물 제형의 처리밀도에 따른 딸기시들음병 검증

길항미생물 제형의 처리밀도에 따른 딸기시들음병에 대한 포트에서의 효과 검증 결과, 모든 길항미생물은 무처리보다 낮은 발병도를 나타내었고 적정농도에서는 약제인 코사이드와 비슷한 방제효과를 나타냈다. BS36은 농도가 증가함에 따라 발병도는 감소하여  $10^7\text{cfu/ml}$ 에서 가장 효과가 좋았다. 반면 BS87의 경우는 농도가 증가함에 따라 발병도는 증가하여 다른 양상을 나타내었으며  $10^5\text{cfu/ml}$ 이 가장 좋은 방제효과를 나타내었다. RK1은  $10^6\text{cfu/ml}$ 가 가장 좋은 방제효과를 나타내었다(Fig.3-6-2).

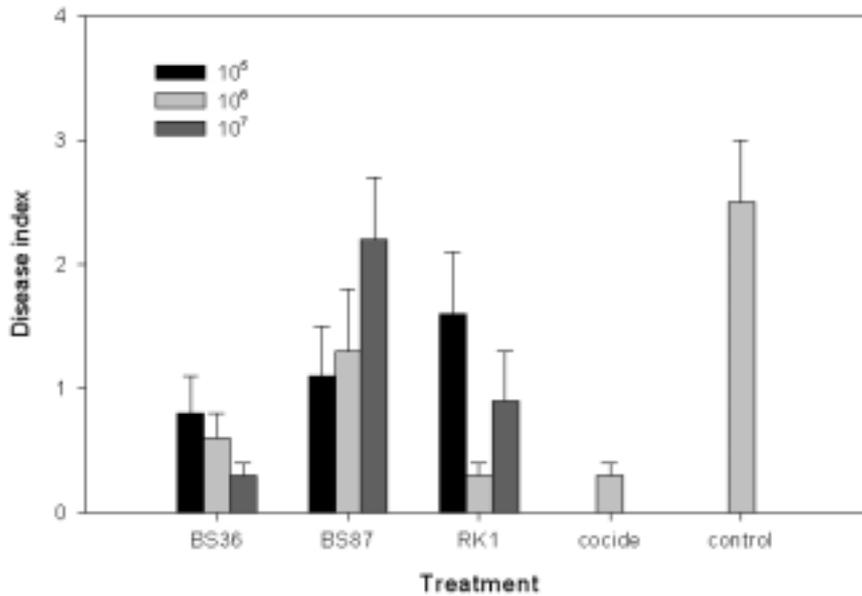


Fig.3-6-2. Disease severity according to treatment concentration of five formulations using *Bacillus* sp. RK1, *Burkholderia pyrrocinia* BS36 and *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 to Fusarium wilt of strawberry in the greenhouse. Disease index: 0 = no symptom, 1 = 1-2 leaf rolled and yellowed leaf, 2 = all leaf rolled and deformed leaf, 3 = chlorosis and wilting, 4 = wilting, 5 = death. Rating of 55 days after inoculation.

2)길항 미생물 제형의 처리방법에 따른 딸기 시들음병 검정

길항미생물 제형의 처리방법에 따른 딸기 시들음병에 대한 포트에서의 효과 검정 결과, 모든 길항 미생물처리에서 유묘의 뿌리 침지가 관주처리보다 높은 방제효과를 나타내었다. 특히 BS87은 다른 처리보다 높은 방제효과를 나타내었으며 관주처리에서도 다른 길항 미생물보다 낮은 발병도를 나타내었다(Fig.3-6-3).

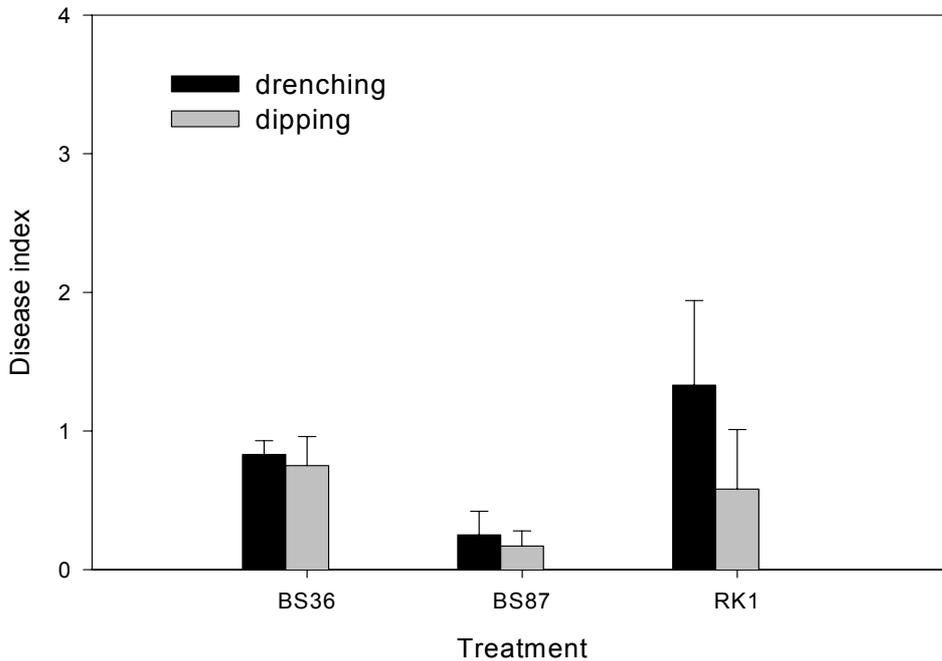


Fig.3-6-3. Disease severity according to treatment method of five formulations using *Bacillus* sp. RK1, *Burkholderia pyrrocinia* S36 and *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 to *Fusarium* wilt of strawberry in the greenhouse. Disease index: 0 = no symptom, 1 = 1-2 leaf rolled and yellowed leaf, 2 = all leaf rolled and deformed leaf, 3 = chlorosis and wilting, 4 = wilting, 5 = death. Rating of 55 days after inoculation.

나. 시들음병균의 선처리후 미생물살균제의 최적처리횟수 조사와 치료효과 검정

1) 시들음병균의 선처리 후 미생물살균제 처리에 의한 치료 효과 검정

각각의 길항 미생물 제형에 10분간 유묘 침지 후 정식하여 29일과 70일 후 이병주율을 조사한 결과 길항 미생물 RK1, BS36 BS87은 무처리 대비 88.7%, 77.8%, 77.8%의 방제가를 나타내었고 대조약제인 copper hydroxide(77%)의 88.7%였다. 그중 RK1이 가장 좋은 방제효과를 나타내었으며 BS36과 BS87은 비슷한 방제효과를 나타내었고 두 균의 혼용처리는 단용 처리보다 방제효과가 적게 나타났다(Fig.3-6-4).

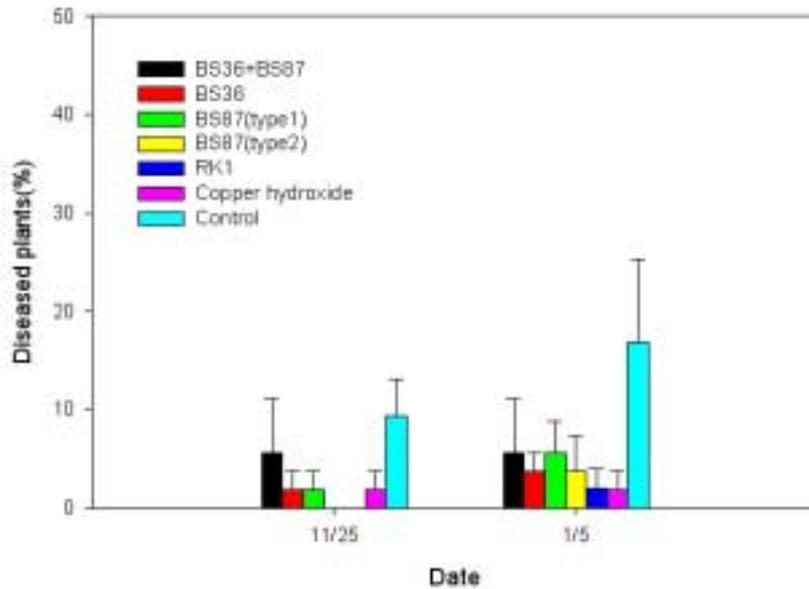


Fig.3-6-4. Control effects of five formulations using *Bacillus* sp. RK1. *Burkholderia pyrrocinia* S36, *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 to Fusarium wilt of strawberry in the greenhouse.

다. IPM을 위한 기존 합성농약과의 혼용 또는 교차사용 가능 조사

딸기로 고시된 약제 11종에 대한 길항미생물과의 반응을 조사한 결과 RK1, BS87, BS36은 Copper hydroxide WP와 Oxadixyl+copper hydroxide WP에서 모두 생존하지 못했고 RK1과 BS87은 Dichlofluanid WP과 Flutolanil EC에도 생존하지 못했다. 그 외 처리된 약제에서는 길항미생물 모두 생존하여 혼용가능성이 파악되었다(Table 3-6-1).

Table 3-6-1. fungicide screening on the in vitro growth of antagonistic bacteria

Control target	Fungicide	Antagonistic bacteria		
		RK1	BS87	BS36
Fusarium wilt	Copper hydroxide WP	-	-	-
Bud rot	Dichlofluanid WP	-	-	-(+)
	Thifluzamide SC	+	+	+
	Tolclofos-methyl WP	+	+	+
	Pencycuron SC	+	+	+
	Flutolanil EC	-	-	+
Anthracnose	Azoxystrobin SC	+	+	+
	Difenoconazole G	+	+	+
Phytophthora rot	Dimethomorph WP	+	+	+
	Metalaxyl WP	+	+	+
	Oxadixyl+copper hydroxide WP	-	-	-

+: very growth; -: not growth; -(+): weekly growth

## 제 7 절 제품가공기술 및 관리기술 확립 (주관기관)

### 1. 연구수행방법

#### 가. 유효성분의 정량실험 및 제품포장과 장기 보관방법 확립

##### 1) 유효성분의 정량실험

미생물제품에 있어서 무엇보다도 중요한 것이 안정적으로 길항미생물이 존재하는가의 여부이다. 현재 수많은 미생물 제품이 시중에서 농민들에게 판매되고 있지만, 연구되지 않고, 검증되지 않은 제품들이 난립되어 있어 미생물제제에 대한 농민들의 불신을 만들어 내고 있다.

본 연구를 통해 제형화된 시제품의 경우 유효성분의 정량을 알아보기 위해 희석평판배양법을 이용하였다.

## 2) 제품포장과 장기 보관방법 확립

제품 포장의 경우 제형화에 따라 다양하게 제작이 가능하며, 종류와 가격이 다양하다. 제품을 장기보관을 하기 위해서는 외부환경변화에 적절히 대처가 가능한 포장방법을 선택하여야 한다. 본 제품이 살아있는 미생물이기 때문에 자외선과 습기, 빗물 등의 유입을 차단할 수 있는 재질을 선택하여야 한다. 대표적으로 불투명 플라스틱 통과 OPP+알루미늄으로 제작된 포장지 등을 많이 사용하고 있는데, 이들을 이용하여 제형화가 완성된 미생물 시제품을 포장한 후 온도에 따른 포장의 외형상 변화 및 길항미생물의 농도변화 여부를 확인하여 보았으며, 자외선 및 습기 빗물 등의 유입을 차단할 수 있는지를 알아보았다.

### 나. *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 제어 신기능 미생물제제 등록

현재 미생물제제의 경우 부산물비료로 등록되어 판매되고 있다. 비료의 경우 제품을 선전할 때 병에 대한 억제기능에 대해 전혀 언급을 할 수 없도록 되어 있는 실정이다. 정부에서는 미생물농약 등록을 권장하고 있다. 하지만 미생물농약으로 등록하기 위해서는 고가의 비용(2~3억)이 소요된다.

### 다. 제품설명회를 통한 홍보 및 대농민 시제품 평가

딸기로 유명한 논산에서 다양한 주제의 세미나를 통해 농림부 과제의 연구결과를 바탕으로 시제품의 홍보를 마친 상태이며, 딸기를 대량으로 재배하는 충남 부여의 농민에게 시제품을 이용한 딸기재배를 의뢰하였다. 처리구와 무처리구의 초장, 근장, 근중, 생체중을 측정함으로써 결과를 비교하여 보았다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 미생물살균제의 처리량과 처리간격에 따른 전처리 효과 검증

#### 1) 유효성분의 정량실험

최종 제품의 길항미생물 농도를  $10^7$ 으로 맞추어 제형화하였다. 제품 내에 살아있는 미생물을 포함시켜야 하기 때문에, 제형화시 많은 제한요건이 따른다. 길항미생물이 안정적으로 최종제품으로 나오기 위해서는 공정상의 온도 및 제형화 재료가 길항미생물에 영향을 미쳐서는 안된다. 제형화 재료에 길항미생물을 흡착한 후 부재료 등을 혼합기에 넣고 골고루 잘 섞었다. 이를 1g 채취한 후 희석평판배양법을 이용하여 조사한 결과, 최종 제품의 균 농도인  $10^7$ 의 안정적인 균 농도를 확인해 볼 수 있었다. 따라서 현재의 공정으로 제품을 제작할 시 Q.C에는 아무런 문제가 없을 것으로 사료된다.

## 2) 제품포장과 장기 보관방법 확립

시제품을 각각 불투명 플라스틱통과 OPP+알루미늄 포장지를 이용하여 온도에 따른 외관상의 변화여부 및 길항미생물의 농도변화를 확인해 본 결과 Table .에서 보는바와 같이 두 종류 모두 외관상의 변화 및 균농도에 변화를 주지 않았다. 또한 불투명 플라스틱통과 OPP+알루미늄 포장지 모두 자외선 및 습기, 빗물 등이 제품으로 유입되지 않았으므로 제품내의 길항미생물이 안정적으로 오래 지속될 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 가격이 훨씬 저렴하고 공정상 편리한 OPP+알루미늄 포장지를 시제품의 최종 포장지로 결정하였다.

## 나. *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 제어 신기능 미생물제제 등록

본 연구결과를 통해 나온 제품은 현재 국내의 모 농약회사와 MOU를 체결하고, 미생물 농약으로 등록하기 위해 특허 및 원제등록 등 일련의 과정을 거치고 있는 상황이다. 미생물농약 등록은 장기간의 시간이 소요될 뿐만 아니라 고가의 비용이 소요되는 만큼 본 최종보고서에서는 언급을 하지 않겠다.

## 다. 제품설명회를 통한 홍보 및 대농민 시제품 평가

충남의 부여의 딸기하우스에 최종 시제품을 평가해본 결과, Table .와 Figure 에서 보는바와 같이 처리구가 무처리구보다 초장 16.1%, 근장 8.8%, 근중 40.3%, 생체중 35.4%의 높은 생육촉진효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Table 3-7-1, Fig.3-7-1).

Table 3-7-1. Effect of final formulated product of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 and RK1 controlling strawberry wilt and growth characteristics of strawberry "Maehyag"

in the field of 2004-2005 seasons

Item	Leaf length (cm)	root length(cm)	root weight(g)	Plant weight (cm)
Final formulated product	28.6	19.4	11.9	31.1
Control	24	17.7	7.1	20.1



Fig.3-7-1. Effect of final formulated product of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 and RK1 controlling root growth characteristics of strawberry "Maehyag" in the field of

## 제 8 절 미생물제의 효과증진을 위한 가공기술 개발 (제1협동기관)

### 1. 연구수행방법

#### 가. 길항미생물 보존과 선택적 증식을 위한 부재료 선별

미생물제제를 만들때 가장 중요한 요건 중의 하나가 길항미생물이 안정적으로 오랫동안 제형 안에서 존재하는가의 여부이다. 이를 위해 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1을 각각 Soy milk를 첨가한 배지를 이용하여 3일간 배양한 후, 배양액 안에 *Bacillus* 균의 포자형성을 유도하는  $MnSO_4$ (5mg/L, 10mg/L)를 넣고 두개의 길항미생물이 포자형태로 변화하는지의 여부를 위상차현미경을 통해서 육안으로 관찰하여 보았다.

또한 '*Bacillus amyloliquefaciens* 배양배지에 Calcium hydroxide (0.1%)를 첨가한 뒤 배양할 경우 *Bacillus amyloliquefaciens*의 생장을 돕고, 배양액으로 제형화를 할 경우 젓빛 곰팡이병 방제에 효과적임'(A. L. Chiou and W. S. Wu, 2002)을 인용하여, 본 연구에 사용한 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1을 배양할 때 Calcium hydroxide (0.1%)를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서의 최종 배양농도를 확인하여 보았다.

#### 나. 길항미생물 균체와 배양액의 분리공정 개발

최적화한 대량 생산 발효공정을 통해 얻어진 길항미생물 배양액을 제형화할 때 균체만 따로 분리할 수 있다면, 제조공정이 간단해지고, 사용하기 쉽고 경제적인 제품을 생산할 수 있다. 따라서 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1을 Jar fermenter를 이용하여 6L 씩 배양한 후 동결건조 방법과 Spray Dryer 방법을 이용하여 최종 균체의 농도를 확인하여 보았다.

### 2. 연구수행 내용 및 결과

가. 길항미생물 보존과 선택적 증식을 위한 부재료 선발

*Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1이 포자형태에서 제형화를 할 경우 22개월 후에도 균의 농도 및 활성에 변화 없음을 확인하였었다.  $MnSO_4$ 를 첨가함으로써 쉽게 포자형성을 유도한다면 제품의 안정성 및 유통기한을 늘릴 수 있는 방법을 확보할 수 있게 된다.

*Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1을 3일간 배양한 후, 배양액 안에 *Bacillus* 균의 포자형성을 유도하는  $MnSO_4$ (5mg/L, 10mg/L)를 넣고 두개의 길항미생물이 포자형태로 변화하는지의 여부를 위상차현미경을 통해서 육안으로 관찰하여 본 결과, *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1 모두  $MnSO_4$ 를 10mg/L를 넣고 60분이 지난 후에 포자를 형성하는 것을 확인할 수 있었다(Fig.3-8-2, 3). 하지만  $MnSO_4$ 를 5mg/L를 넣은 곳에서는 120분 이상이 지났어도 포자형성을 관찰할 수 없었다(Fig.3-8-1).

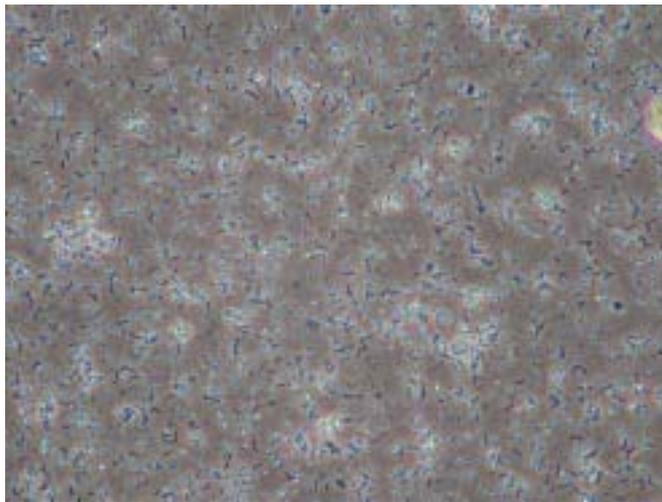


Fig.3-8-1. Phase contrast microscopic photograph of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 on the culturing medium amended with  $MnSO_4$  5mg/L after 120 minutes in the light-field illumination.



Fig.3-8-2. Phase contrast microscopic photograph of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 on the culturing medium amended with  $\text{MnSO}_4$  10 mg/L after 60 minutes in the light-field illumination.

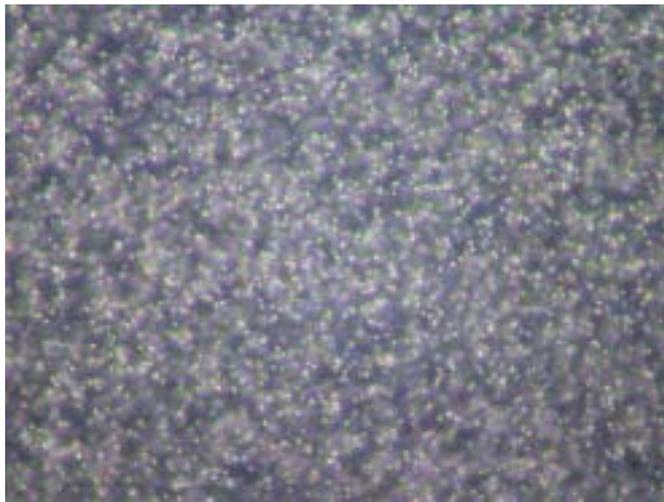


Fig.3-8-3. Phase contrast microscopic photograph of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 on the culturing medium amended with  $\text{MnSO}_4$  10 mg/L after 60 minutes in the dark-field illumination.

또한 *Bacillus amyloliquefaciens* 배양 시 calcium hydroxide 0.1%를 첨가하면 생육효과가

높다는 문헌 결과[Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for Control of Lily Grey Mould(*Botrytis elliptica*) J. Phytopathology 151, 13-18(2003) A.L. Chiou and W. S. Wu]에 준하여 실험을 하였다. *Bacillus myloliquefaciens* BS87과 RK1을 배양할 때 calcium hydroxide (0.1%)를 첨가한 후 최종 배양농도를 확인하여 본 결과 Table 3-8-1에서 보는 바와 같이 본 연구에 사용된 두 가지 길항미생물을 배양할 때에는 오히려 calcium hydroxide (0.1%)를 첨가하지 않은 배양배지에서 높은 농도로 배양되었다. 따라서 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1은 calcium hydroxide (0.1%)에 의해 생장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

Table 3-8-1. Effect of calcium hydroxide on the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 and RK1 on the shaking culture

Item	antagonistic bacterial concentration (cfu/mL)
BS87 + Calcium hydroxide (0.1%)	$2.7 \times 10^6$
BS87 control	$3.8 \times 10^9$
RK1 + Calcium hydroxide (0.1%)	$5.8 \times 10^5$
RK1 control	$6.2 \times 10^8$

나. 길항미생물 균체와 배양액의 분리공정 개발

*Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1의 균체만을 따로 얻기 위한 실험에서는 Spray dryer를 이용하는 것보다 동결건조 방법을 이용하는 것이 균체 수거에 더욱 효과적이었다. Spray dryer의 높은 열에 의해 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1의 균 농도가 줄어든 것으로 판단된다(Table 3-8-2).

Table 3-8-2. Comparison of yield of bacterial cell using the Deep freezing dryer and Spray dryer

Item	BS87 (cfu/g)	RK1 (cfu/g)
Freeze dring	$3.5 \times 10^{10}$	$2.8 \times 10^{10}$
Spray dring	$6.7 \times 10^7$	$3.8 \times 10^7$

## 제 9 절 최적 미생물제형의 선발 (제2협동기관)

### 1. 연구수행방법

#### 가. 최적 미생물 제형의 선발

##### 1) 미생물살균제가 딸기의 생육에 미치는 효과

“매향” 품종을 공시하여 2004년 10월 27일 정식 후 축성으로 재배하였다. 길항 미생물 제제 처리는 2005년 1월 8일부터 1주일 간격으로 3회 관주 처리 후 2월 11일에 초장, 엽병장, 엽폭, 잎수, 관부직경, 엽록소 함량(SPAD, Milota Co. Ltd.), 생체중을 조사하였고 수량은 2005년 3월 22일부터 5월 15일 까지 3-5일 간격으로 조사하였다. 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 실시하였다. 데이터는 Fisher's least significant difference test( $P < 0.05$ )를 이용하여 analyzed using standard of variance (ANOVA)분석을 실시하였다. 처리 평균간 비교분석은 SAS(SAS Institute, Inc., Cary, NC) 프로그램을 이용하여 실시하였다.

##### 2) 최적 길항미생물제제 선발

2005년에는 2004년에 방제효과가 높은 RK1과 생육을 촉진시키는 BS87을 혼용하여 제형을 만든 후 육묘포장에서 매향품종을 시험품종으로 시들음병 방제효과를 조사하였다. 처리는 8월 18일부터 10일 간격으로 3회 토양 관주(100ml/1주) 후 9월 10일에 이병주율을 조사하였으며 대조약제로 copper hydroxide(77%)를 공시하였다.

### 3) 미생물살균제의 유효기간 및 보존성 검증

2차년도 초기에 만들어진 제형화 제품을 1개월, 2개월, 6개월, 12개월, 22개월 순으로 길항미생물이 안정적으로 존재하고 있는지의 여부와 길항력을 그대로 유지하고 있는지를 알아보기 위해 각 개월 수 마다 1g을 채취해 희석평판배양법을 이용, 길항미생물의 농도를 알아보았다. 길항력 test는 희석평판배양법에서 나온 길항미생물의 colony를 멸균된 KB broth 배지에 접종한 후 30°C 180rpm shaking incubator에서 3일간 배양한 배양액을 이용하였다. control로 제품에 쓰인 길항미생물의 보관균주를 같은 방법으로 broth배양한 후 이용하였다. PDA 배지를 이용하여 딸기 시들음병균의 plug를 중앙에 놓고 각각의 배양액과 control 배양액을 딸기 시들음병균의 plug 양 옆에 10 $\mu$ l씩 떨어뜨리고, 27°C incubator에 놓고 inhibition zone을 확인하였다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 최적 미생물 제형의 선발

#### 1) 길항미생물제제가 딸기의 생육에 미치는 효과

2005년 딸기 수확 포장에서 각각의 길항미생물제제를 10일 간격 3회 관주처리 후 딸기의 생육을 조사한 결과 각각의 길항 미생물제제 처리에서 초장, 엽장, 엽폭, 잎수, 크라운 직경, 엽록소 함량 등의 지상부 생육은 Fisher's LSD( $P \leq 0.05$ )에서 유의성이 없게 나타났으나 생체중은 모든 처리에서 무처리보다 높았고 특히 BS87의 생체중이 높게 나타났다(Table 3-9-1). 수량조사에서 1화방의 수량은 BS36과 BS87이 가장 좋았고 BS36과 BS87을 혼용한 처리와 RK1처리에서는 무처리와 비슷하였으며 2화방의 수량과 전체수량에서도 비슷한 결과를 나타냈다(Table 3-9-2).

Table 3-9-1. Effect of antagonistic bacteria on growth characteristics of strawberry "Maehyag" in the 2004-2005 seasons

Treatment	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Number of leaves	Diameter of crown (mm)	Chlorophyll (SPAD)	Fresh weight (g/plant)
BS36+BS87	18.7a	11.0a	5.4a	5.6a	16.6a	53.5a	22.6 ab
BS36	20.5a	11.9a	5.8a	5.7a	12.6a	52.8a	22.7 ab
BS87	21.9a	12.9a	6.1a	6.2a	12.3a	51.8a	26.0 a
RK1	18.9a	11.3a	5.2a	5.1a	11.7a	53.3a	22.2 ab
Control	18.6a	11.1a	5.3a	5.4a	12.8a	54.1a	20.6 b
LSD0.05	4.834	3.112	0.989	1.144	2.575	4.123	4.502

Table 3-9-2. Effect of antagonistic bacteria and marketable yield in annual strawberry during the 2004-2005 seasons

Treatment	Yield (kg/10a)		
	early period <sup>x</sup>	late period <sup>y</sup>	whole season <sup>z</sup>
BS36+BS87	571.5b	266.6b	838.1b
BS36	900.6a	407.1ab	1,307.7a
BS87	983.9a	362.7ab	1,346.7a
RK1	539.9b	236.6b	776.5b
Control	403.7b	279.8ab	683.5b
<i>P&gt;F</i>	0.0053	0.1233	0.0077

<sup>w</sup> Number's followed by the same letter within each column are not significantly different according to Fisher's LSD ( $P \leq 0.05$ ). *P*=probability values associated with the *F* tests.

<sup>x</sup> Early period represents fruit harvested from the first peak bloom; harvest weeks 6 in 2004-05.

<sup>y</sup> late period represents fruit harvested from the second peak bloom; harvest weeks 3 in 2004-05.

<sup>z</sup> Whole-season period is the combined harvests from both the early and the late periods.

## 2) 최적 길항미생물제제 선발

포트와 포장시험에서 BS36이 딸기 시들음병 방제에 효과가 우수하였지만 최근 외국에서

*Burkholderia cepacia*는 인체에 영향을 줄 수 있다고 보고(Parke와 Gurian-Sherman, 2001)되어 길항미생물제제 선발에서 제외하였다. 그리고 인체와 환경에 영향이 없는 *Bacillus amyloliquefaciens* BS87과 RK1을 최적제형으로 이 두 균을 혼합하여 제형을 만든 후 방제효과를 조사하였다. 2005년 육묘포장에서 BS87과 RK1 혼합제형의 시들음병 이병주율은 3.2%로 대조약제인 코퍼수화제와 비슷한 방제효과를 나타내었으며 72.6%의 방제가를 나타내어(Table 3-9-3) 추후 딸기 시들음병 방제용 미생물제제로서의 가능성이 높았다.

Table 3-9-3. Control effects of formulation using *Burkholderia cepacia* BS36, *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 and RK1 to Fusarium wilt of strawberry in the greenhouse.

Treatment	Disease severity (%)	Control value
BS87+RK1	3.2a	72.6
Copper hydroxide	3.7a	68.4
Control	11.7b	

### 3) 미생물살균제의 유효기간 및 보존성 검정

1개월, 2개월, 6개월, 12개월, 22개월이 지난 제형화 제품내의 길항미생물의 농도는 Table 3-9-4에서 보는바와 같이 큰 변화가 없었다. 또한 figure 에서 보는 것처럼 control구와 inhibition zone의 크기에서도 차이가 없었다.

본 연구를 통해 개발된 미생물살균제의 유효기간은 최소 22개월 이상이 될 것으로 보이며, 22개월 경과한 후에도 전혀 미생물의 농도 및 길항력이 변화하지 않은 것으로 보아 길항미생물이 안정적으로 존재할 수 있는 최적의 제형화가 이루어진 것으로 판단된다.

Table 3-9-4. Longlasting viable and antagonistic effects of final formulated product of *Bacillus amyloliquefaciens* BS87 and RK1 controlling strawberry wilt

Item	after 1 month	after 2 month	after 6 month	after 12 month	after 22 month	control
antagonistic bacteria concentration (cfu/g)	$3.5 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$	$3.6 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$
inhibition zone(mm)	8	8	8	8	8	8

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

#### 1. 1차년도

연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	목표달성도 (%)
○ 딸기시들음병 방제용 길항미생물의 제제화 및 포장활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Fusarium oxysporum</i> 억제 길항미생물의 발효생산</li> <li>- <i>F. oxysporum</i> 억제 길항미생물이 생산하는 활성 대사산물 발효 생산</li> <li>- 길항미생물의 대사산물 함유제형의 활성 검증</li> <li>- 길항미생물의 균체 제형의 포장 활성 검증을 통한 사용 방법 최적화</li> </ul>	100
○ 효과적인 방제대책 수립을 위한 수집된 시들음병균의 병원성 및 유전적 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 딸기 품종별 시들음병균의 병원성 검정 및 Primer를 이용한 시들음병균의 RAPD 분석</li> <li>- 수집된 시들음병균의 RFLP 분석</li> </ul>	100
○ 시들음병 발생조사 및 길항미생물의 온실 및 포장에서 효과 검정	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 딸기 주산지의 시들음병 발생조사 및 병원성이 강한 시들음병 균주(<i>Fusarium oxysporum</i>) 확보</li> <li>- 길항미생물의 처리시 시들음병이 억제되는 최적, 최저 처리 밀도 조사</li> <li>- 길항미생물의 병 예방 및 치료 효과 검정</li> </ul>	100
관련분야에의 기여도		
<p>- 딸기 시들음병균의 유전적 특성을 밝히고, 이를 억제할 수 있는 길항미생물의 발효 생산 기술을 확보함으로써, 미생물농약으로서의 가능성 확인.</p>		

2. 2차년도

연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	목표달성도 (%)
○ 대량생산 생물발효배지 및 생물 발효공정의 최적화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지 개발</li> <li>- 길항미생물의 대량 발효조건 최적화</li> <li>- 길항미생물 발효공정의 최적화</li> <li>- 액상 및 고체 미생물살균제의 시제품제작</li> </ul>	100
○ 길항미생물의 토양내 지속성 및 길항물질 분석을 통한 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 길항미생물들의 생태학적 동태 관찰을 위해 항생제 내성균 선발</li> <li>- 토양내 미생물 살균제의 지속성 조사</li> <li>- 길항미생물의 항생물질 분리 및 분석</li> </ul>	100
○ 길항미생물제제의 온실 및 포장 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물살균제의 처리량과 처리간격에 따른 선처리 예방 효과 검증</li> <li>- 시들음병균의 선처리후 미생물살균제의 최적처리 횟수 조사와 치료효과 검증</li> <li>- IPM을 위한 기존 합성농약과의 혼용 또는 교차사용 가능 여부조사</li> </ul>	100
관련분야에의 기여도		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 길항미생물의 대량생산 발효배지 및 배양조건을 확립함으로써 저렴한 비용으로 대량생산이 가능함으로써 제품의 가격경쟁력을 확보할 수 있게 되었다.</li> <li>- 미생물살균제의 처리량 및 처리간격을 확립함으로써 농가에서 보다 효율적으로 딸기 시들음병을 방제할 수 있는 방안을 마련할 수 있게 되었다.</li> </ul>		

3. 3차년도

연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	목표달성도 (%)
○ 제품가공기술 및 관리기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유효성분의 정량실험 및 제품포장과 장기 보관방법 확립</li> <li>- <i>F. oxysporum</i> 제어 신기능 미생물제제 등록</li> <li>- 제품설명회를 통한 홍보 및 대농민 시제품 평가</li> </ul>	100
○ 미생물제의 효과증진을 위한 가공기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 길항미생물 보존과 선택적 증식을 위한 부재료 선발</li> <li>- 길항미생물 균체와 배양액의 분리공정 개발</li> </ul>	100
○ 최적 미생물제형의 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물 살균제가 작물의 생육에 미치는 효과 조사</li> <li>- 미생물 살균제 제형별 시들음병 발병억제 효과 및 유효기간 조사</li> </ul>	100
관련분야에의 기여도		
<p>- 길항미생물을 이용한 시제품이 딸기의 생육 및 병억제 효과가 탁월함으로서, 농가에 생산비 절감 및 소득증대에 기여할 수 있게 되었다. 또한 생물농약으로의 등록 가능성을 확인할 수 있었다.</p>		

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 기업화 추진방안

1. 본 연구개발결과로 나온 시제품을 농가에 보급하기 위해 상표출원(출원번호 40-2005-0047761)을 하였다.
2. 국내의 대기업인 모 농약회사와 MOU를 체결하고, 이에 관련된 시제품의 효과검증이 끝났고, 계약체결을 남겨두고 있다.
3. 학회 및 세미나, 전시회, 발표회에 참가함으로써 연구결과를 널리 알리고, 간접적으로 시제품을 홍보하였다.
4. 농민세미나를 통한 미생물제제에 대한 편견 및 인식을 변화시키고, 제품을 홍보하고 대기업 농약회사의 영업라인을 통한 안정적인 시장점유율을 확보할 계획이다.
5. 생물농약등록을 통하여 소비자에게 신뢰를 주고, 해외에 원제를 판매할 수 있는 기틀을 마련할 계획이다.
6. 논산딸기시험장과의 지속적인 연구협력을 통하여 지속적으로 제품을 업그레이드함으로써 유사제품 및 경쟁제품과의 차별화를 도모할 예정이다.

### 제 2 절 추가연구의 필요성

1. 시제품의 적용범위를 넓히기 위해 다른 작물에 적용함으로써 생육촉진 및 병역제효과가 있는지를 확인할 수 있는 연구가 필요하다.

2. 좀 더 다양한 화학농약과의 혼용 가능성 여부를 알 수 있는 정확한 연구가 이루어져야 한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Horimoto, K., 1993. Biological control of Fusarium wilt of strawberry by non-pathogenic Fusarium and bacteria associated with the mycelia. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59(3), 278.
2. Alabouvette, C., Schippers, B., Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., 1998. Biological control of Fusarium wilts. In: Boland, G.J., Kuykendall, L.D. (Eds.), *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Marcel Dekker, New York, USA. pp.15-36.
3. Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 16.1-16.23.

## 제 7 장 참고문헌

김충희, 김용기. 2002. 국내 토양병해 발생현황과 종합 관리방안. (식물병연구)Res. Plant Dis. 8:146-161.

박창석. 1990. 난방제 토양전염성병의 발생생태와방제방안. 농진청 심포지엄 6:23-35.

김충희, 조원대, 김승철. 1982. 고추역병의 방제에 관한 연구. 농시보고(토비,작보,균이,농가), 46-50.

유성준, 라재범, 김선익, 김홍기,. Biocontrol effects of formulated antagonistic rhizobacteria for root rot disease (*Cylindrocarpon destructans*) in natural infested soil. 한국식물병리학회 초록집, 2001.10, The Korean Society of Plant Pathology p54.

홍순성, 박경석, 김충희, 이은중. 1990. 고추역병균 길항균 *Pseudomonas cepacia*의 입제제형 및 활성. 한국식물병리학회지 6:434-439.

Mao, W., Lewis, J. A., Hebbar, P. K., and Lumsden, R. D. 1997. Seed treatment with a fungal or bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. Plant Disease 81:450-454.

라재범, 장창순, 광두원, 유성준, 김홍기,. 2002. Biocontrol to root rot disease and growth promoting effect of ginseng by formulations with *Burkholderia pyrrocinia* and *Bacillus amyloliquefaciens*. The Korean Society of Plant Pathology p51.

Shen, S. S., Choi, O. H., Lee, S. M. and Park, C. S. 2002. In vitro and In vivo activity of a biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. J. Plant Pathology 18:221-224.

신관철, 임길조, 유승현, 박종성. 1987. 참깨토양전염성의 생물학적방제. 한국식물보호학회지. 26:229-237.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinooor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91:621-627.

Hwang, J., and Benson, D. M. 2002. Biocontrol of Rhizobacteria stem and root rot of poinsettia with *Burkholderia cepacia* and binucleate Rhizoctonia. Plant Disease 86:47-53.

Heungens, K., and Parke, J. L. 2001. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology* 91:383-391.

Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91:181-187.

Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluferin, *Phytopathology*. 70:712-715.

Cook, R. J. 1990. Twenty-five years of progress towards biological control. In: *Biological control of soil-borne plant pathogens*. edited by D. Hornby. C · A · B International Wallingford, UK. pp.1-14.

김선익, 유성준 김홍기, 1997. 인삼병의 생물학적 방제를 위한 길항균의 선발, *한국식물병리학회지*, 13:342-348.

Scott, P. R. and Hollins, T. W. 1974. Effect of eyespot on the yield of winter wheat. *Annals of Applied Biology*, 78, 269-279.

Abdul Baki, A. A. and Anderson, J. D. 1973. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science* 13: 630-633.

Appel, D. J. & Gordon, T. R. (1995). Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental Mycology* 19: 120-128.

Appel, D. J. & Gordon, T. R. (1996). Local and regional variation in populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Molecular Plant Microbe Interactions* 9: 125-138.

Armstrong, G.. M. & Armstrong, J. K. (1981). *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt disease*. In *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*(P. E. Nelson, T. A. Toussoun & R. J. Cook, eds): 391-399. Pennsylvania State University Press: University Park.

Assigbetse, K. B., Fernandez, D., Dubois, M. P. & Geiger, J. P. (1994). Differentiation of

*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* 84: 622–626.

Cai, G., Rosewich Gale, L., Schneider, R. W., Kistler, H. C., Davis, R. M., Elias, K. S. and Miyao, E. M. (2003). Origin of Race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology* 93: 1014–1022.

Grajal-Martin, M. J., Simon, C. J. & Muehlbauer, F. J. (1993). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* 83: 612–614

Hyun, J. W. & Park, W. M. (1996). Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Korean Journal of Plant Pathology* 12: 41–46.

Hyun, J. W., Kim, S. O. & Park, W. M. (1996). Vegetative compatibility, Isozyme polymorphism and pathogenicity of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Korean Journal of Plant Pathology* 12: 33–40.

Kim, C. H., Seo, H. D., Cho, W. D. & Kim, S. B. (1982). Studies on varietal resistance and chemical control to the wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum*. *Korean Journal of Plant Protection* 21: 61–67.

Kistler, H. C., Momol, E. A. & Brnny, U. (1991). Repetitive genomic sequences for determining relatedness among strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 331–336.

Kistler, H. C., Bosland, P. W., Benny, U., Leong, S. & Williams, P. H. (1987). Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology* 77: 1289–1293.

McDonald, B. A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448–453.

Namiki, F., Shiomi, T., Nishi, K., Kayamura, T. & Tsuge, T. (1998). Pathogenic and Genetic Variation in the Japanese strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 88: 804–810.

Paavanen-Huhtala, S., Hyvonen, J. and Bulat, S. A. & Yli-Mattila, T. (1999). RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analysis in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates. Mycological Research 103: 625-634.

Plyler, T. R., Simone, G. W., Fernandez, D. & Kistler, H. C. (1999). Rapid detection of the *Fusarium oxysporum* lineage containing the Canary Island date palm wilt pathogen. Phytopathology 89: 407-413.

Rohlf, F. J. (1990). NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, State University of New York: Stony Brook.

Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Bulat, S. A., Alekhina, I. A. & Nirenberg, H. I. (2002). Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex—a polyphasic approach. Mycological Research 106: 655-669.

조종탁, 문병주. 1984. 딸기시들음병에 관한 연구. 한국식물보호학회지 23(2):74-81.

Duffy, B. K. and Defago, G. 1999. Macro- and microelement fertilizers influence the severity of *Fusarium* crown and root of tomato in a soilless production system. Hortiscience 34:287-291.

松口龍修. 1986. 根圏微生物の機能と作物の生育. 農業技術 41:451-457.

Hoagland, D. R., and Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. of Calif. Ag. Exp. Sta. Circular 347.

농촌진흥청. 1973. 토양조사편람. 제2권. 농업기술연구소 간행. 257pp.

농촌진흥청. 1988. 토양화학분석법, 토양·식물체·토양미생물. 농업기술연구소 간행. 15-239

嶋田典司. 1969. 作物に對する類の濃度障害に關する基礎的研究(第1報) 單類溶液における根の活性の化について. 日本土壤肥料學雜誌 40:26-31.

Stover, R. H. 1956. Behavior of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* in different soils and extract. Phytopathol. 46:27-28.

竹内昭士郎. 1982. いわゆる赤土と黒持土における Fusarium 萎黄病の罹病差に関する研究. 野菜試験場報告 A10:81-116.

Parke, J. L., and Gurian-Sherman, D. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains Ann. Rev. Phytopathol., vol. 39, pp. 225 - 258

Schisler, D.A., Khan, N.I., Boehm, M.J., Slininger, P.J., 2002. Greenhouse and field evaluation of biological control of Fusarium head blight on durum wheat. Plant Dis. 86, 1350-1356.

Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W., Jackson, M.A., 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. Phytopathology 94, 1267-1271.

Scott, P.R., Hollins, T.W., 1974. Effect of eyespot on the yield of winter wheat. Annals of Applied Biology 78, 269-279.

Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., Chung, Y.R., 1999. Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology 89, 92-99.

Stover, R. H. 1956. Behavior of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different soils and extract. Phytopathol. 46: 27-28.

Tezuka, N. Makino, T., 1991. Biological control of Fusarium wilt of strawberry by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolated from strawberry. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57, 506-511.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A. H.M., Pirtense, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36, 453-483.

Winks, B.L., Williams, Y.N., 1965. A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. Queensland J. Agric. Animal Sci. 22, 475-479.

양성석, 김충희, 남기웅, 송요성. 2000. 시설과채류 Fusarium병의 발생생태에 관한 연구.

1. 토마토와 박과작물 Fusarium병 발생상황과 발생포장의 토양환경 실태. 식물병 연구 6(2): 59-64.

Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukanoto, T., Hatakeda, K., Shirata, A., 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. Phytopathology 91, 181-187.

Zhang, S., Reddy, M.S., Kokalis-Burelle, N., Wells, L.W., Nightengale, S.P., Kloepper, J.W., 2001. Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors. Plant Dis. 85, 879-884.