

발간등록번호

11-1543000-002587-01

# 프로바이오틱 바실러스균을 이용한 포도흰얼룩병 방제제 개발 최종보고서

2018. 12. 27.

주관연구기관 / 한경대학교 산학협력단

농림축산식품부

발간 등록 번호

11-1543000-002587-01

**프로바이오틱 바실러스균을 이용한  
포도흰얼룩병 방제제 개발  
최종보고서**

2018. 12. 27.

주관연구기관 / 한경대학교

**농림축산식품부**  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “프로바이오틱 바실러스균을 이용한 포도흰얼룩병 방제제 개발” (개발기간 : 2017. 12.28 ~ 2018. 12. 27)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 12. 27.

주관연구기관명 : 한경대학교 산학협력단 (김용태) (인)

주관연구책임자 : 박 경 석

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라  
보고서 열람에 동의 합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	117121-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.12.28. - 2018. 12.27 (1년)	단 계 구 분	(최종/ (1 단 계 )
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	프로바이오틱 바실러스균을 이용한 포도흰얼룩병 방제제 개발			
연구책임자	박경석	해당단계 참여연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 49,175천원 민간: 0천원 계: 49,175천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 49,175천원 민간: 0천원 계: 49,175천원
연구기관명 및 소속부서명	한경대학교 산학협력단			참여기업명 : 해당 없음	
국제공동연구	상대국명 : 해당 없음			상대국 연구기관명 : 해당 없음	
위탁연구	연구기관명 : 해당 없음			연구책임자 : 해당 없음	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제임
-------------------------	-------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호	ISSN 1226-61 83	10-2018 -015736 9	11-1543 000-002 587-01					KACC 81077	NCBI MK208 682		

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

*B. velezensis* MWS 28 균주는 식물병의 생물학적 방제제로 빈번하게 사용되는 유용미생물로 분리균주간의 균학적 특성이 매우 유사하여 복잡한 분류체계를 가진다. 최근에는 많은 균주가 *Bacillus velezensis*로 통합되어 분류되고 있다. MWS 28 균주는 포도 흰얼룩병에 대하여 우수한 항균 활성을 가지며 주 발생기에 포도에 살포하였을 경우 방제가 60-70% 이상의 효과를 나타내어 기존의 생물학적 방제제 보다 우수한 방제 효과를 나타내며 계면 활성제와 본 연구에서 개발한 알긴산염을 추가 할 경우 방제 효율은 20%이상 증가하였다.

본 균주는 포도 흰 얼룩병의 생물방제제로 특허 출원(2018) 되었으며 최근 비비코리아에 기술 이전하여 산업화 하였다. MWS28균주는 내구성을 가진 내성포자를 형성하므로 제제화 할 경우 상온 보존기간이 길어 산업화를 위한 우수한 보존성을 가지고 있어 제품개발에 유리한 특성을 가진다. MWS28 균주를 살포한 포도는 포도흰얼룩병의 방제효과가 우수할 뿐만 아니라 포도의 당도증가와 숙기촉진 등의 부가적인 효과도 관찰되었다.

보고서면수  
47p

## <요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기 선발한 프로바이오틱 바실러스균(<i>Bacillus velezensis</i> MWS28)을 이용한 포도흰얼룩병균의 친환경 방제제를 개발하고자 연구를 수행하였다. 포도흰얼룩병 (<i>Acremonium acutatum</i>, <i>Trichothecium roseum</i>)은 수확기에 시설하우스포장에 대발생하여 피해를 주는 곰팡이균으로 화학농약 사용이 매우 제한적이므로 인축에 무해한 친환경 생물방제제의 개발이 요구된다. 본 연구에서는 기 선발된 바실러스 균주를 이용하여 포도 흰얼룩병의 방제기술 최적화를 위한 제품화 효능 검정과 작용스펙트럼 구명을 통한 농가포장 실증검정을 수행하고 고효성의 포도흰얼룩병 방제용 수화제 개발을 목표로 하였다.</li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. velezensis</i> MWS 28 균주는 식물병의 생물학적 방제제로 빈번하게 사용되는 유용미생물로 분리균주간의 균학적 특성이 매우 유사하여 복잡한 분류체계를 가진다. 최근에는 많은 균주가 <i>Bacillus velezensis</i>로 통합되어 분류되고 있다. MWS 28 균주는 포도 흰얼룩병에 대하여 우수한 항균 활성을 가지며 주 발생기에 포도에 살포하였을 경우 방제가 60-70% 이상의 효과를 나타내어 기존의 생물학적 방제제 보다 우수한 방제 효과를 나타내며 계면 활성제와 본 연구에서 개발한 알긴산염을 추가 할 경우 방제 효율은 20%이상 증가하였다.</li> <li>• 본 균주는 포도 흰 얼룩병의 생물방제제로 특허 출원(2018) 되었으며 최근 비비코리아에 기술 이전하여 산업화 하였다.</li> <li>• MWS28균주는 내구성을 가진 내성포자를 형성하므로 제제화 할 경우 상온 보존기간이 길어 산업화를 위한 우수한 보존성을 가지고 있어 제품개발에 유리한 특성을 가진다.</li> <li>• MWS28 균주를 살포한 포도는 포도흰얼룩병의 방제효과가 우수할 뿐만 아니라 포도의 당도증가와 숙기촉진 등의 부가적인 효과도 관찰되었다.</li> </ul>

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최근 들어 안성 등 포도 주산단지에 발생하고 있는 <i>Acremonium</i> 과 <i>Trichothecium</i> 균에 의한 포도 흰 얼룩병 방제용 미생물제로 활용 될 것이다.</li> <li>• 포도과실에서의 점착성을 높일 수 있는 친환경 보조제를 첨가한 복합제형의 개발로 기존 미생물제의 단점을 극복 시킬 수 있었다.</li> <li>• 또한 본 미생물 제제의 다양한 농작물의 종자 코팅이 가능하고 생육 촉진 등 유용세균의 종자 coating에 의한 숙기단축, 수량증진에도 사용 가능 할 것이다.</li> <li>• 농가 실증 시험을 거쳐 제조된 고효성 미생물제제의 특허 출원과 기업체 기술이전을 통하여 포도 흰얼룩병 방제제로 산업화 될 것이다.</li> <li>• 포도 수확철에 과실표면에 대발생하여 포도의 당도감소 및 상품 가치를 떨어뜨리는 포도 흰얼룩병의 친환경방제제 개발로 포도 재배 농가의 생산성 증대와 농가 소득 증대에 기여한다.</li> <li>• 포도 수확기에 발생하는 포도얼룩병을 미생물 제제로 친환경적으로 방제하므로 생식용 포도의 품질향상과 농산물안전성을 증대함.</li> <li>• 농가 활용을 위한 포도 흰얼룩병 친환경 미생물제로 산업화하여 농가 활용될 것임.</li> </ul>
------------------------------------	--

국문핵심어	바실러스	포도흰얼룩병	생물적방제	포도	알긴산염
영문핵심어	Bacillus	MWS28	Biological control	Grape white stain symptom	Alginate

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	7
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	9
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	41
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	43
참고 문헌 .....	44



# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

본 연구는 포도(*Vitis vinifera* L.) 흰얼룩병균에 대한 항균력을 갖는 바실러스균 중에서 항균력이 우수한 MWS 28균주를 선발하여 동정하고 농가 포장 사용을 위한 포자발아억제, 포도 잎 절편 검정을 통한 방제효과 증진연구와 포도흰얼룩병균의 포자발아억제 효과검정 및 알진염 첨가 등의 실내검정을 기초로 MWS28 균주의 방제효율 증진을 위한 농가포장실증검정을 수행하여 산업화를 통한 포도흰얼룩병의 생물적 방제제 개발을 목표로 하였다.

## 1-2. 연구개발의 필요성

포도는 강수량이 적고 온난한 기후에서 재배하는 과수로 여름철 습도가 높고 강우가 집중되는 우리나라의 경우 병해충에 의한 피해가 많다. 또한, 포도는 와인 제조용 보다는 주로 생식용으로 소비되는 특성상 과실의 당도와 외관은 포도품질과 등급을 결정한다. Oh *et al.*(2014)의 결과를 보면 포도흰얼룩병은 *Tricothecium roseum* 과 *Acremonium acutatum*에 의하여 주로 발생하는 것으로 밝혀졌으며 주로 습도가 높거나 환기가 불량한 시설 재배에서 발생하고, 가지, 잎, 줄기, 포도송이 등에서 발병하며 수확기에 접어들면 포도의 표면에 급격하게 증가하여 경제적 손실을 초래한다. *A. acutatum* 은 Oh *et al.*(2014a)에 의하여 포도흰얼룩병의 원인균으로 최초로 보고되었으며 *T. roseum* 균과 혼합 감염되는 특징이 있다. 특히 노지에서 병원균이 감염되면 수확 후 저온저장 시설에서도 발생이 지속되어 포도의 품질이 현저히 저하된다. 본 병해는 국내의 경우 관리가 불량한 노지 및 시설하우스 포도농가에 피해가 많으며 수확기가 임박한 8월 중순 이후부터 발병이 크게 증가하는 것으로 알려져 있다 (Oh *et al.*, 2014b). 그러나 포도 흰얼룩병의 방제를 위한 등록약제는 아직 없으며 병 발생도 수확기에 임박하여 발생하게 되므로 화학약제의 사용은 권장되지 않으므로 방제가 어렵다. 따라서 본 연구개발과제에서 수행한 포도 흰얼룩병균에 대한

고활성 친환경 미생물제의 개발은 화학농약 절감을 통한 농산물 안전성 확보와 미생물제의 산업화를 통한 국내 산업발전에 매우 필요하다.

### 1-3. 연구개발의 범위

#### 가. 바실러스 MWS 28균주 및 유화제 PEMS 등 선발

- Bacillus MWS28, PEMS, Steaker

#### 나. 방제가 증진 시험 및 포장 실증시험

- 대상병원균: *Acremonium acutatum*, *Trichothetium roseum*
- 공시품종 : 거봉, 캠벨얼리 등
- 조사내용 : 시기별 밀도변이, 처리균주 생존율, 최적처리농도, 약해, 처리회수

#### 다. 제제화 및 대량생산체계구축

- 배지선발, 대두박 등
- 포자형성 조건

#### 라. 산업화를 위한 미생물제 등록

- 방제가, 균체수, 포자형성
- 특허출원

## 2. 연구수행 내용 및 결과

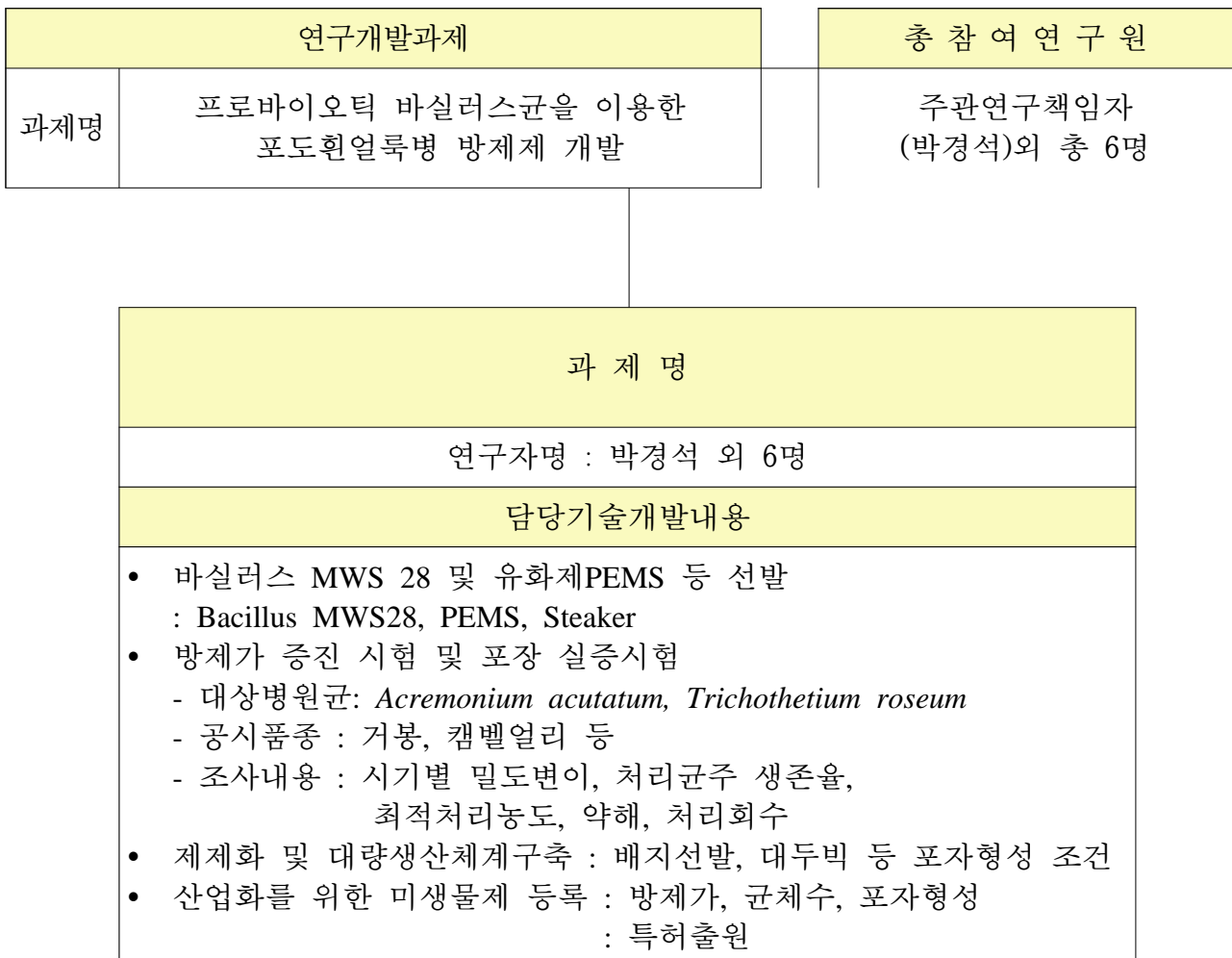
### 2-1. 연구수행내용

#### 가. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

##### ○ 연구개발 추진전략·방법

- 기 선발된 바실러스 MWS 28 균주의 지상부 생존력 증진을 위한 친환경 첨가제 선발과 효능 검정
- 국내외 전문가를 통한 친환경 첨가제의 기능과 활성 수집
- 농가를 통한 최종 제품의 농가 실증 검정 및 실내 검정 수행

##### ○ 연구개발 추진체계



○ 추진 일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	계획수립 및 자료조사	■													박경석 (한경대)
2	바실러스 MWS28 생리시험		■	■	■										박경석 (한경대)
3	첨가제 선발				■	■	■								박경석 (한경대)
4	실내 및 온실검정						■	■	■	■					박경석 (한경대)
5	1차시제품 제작					■	■								박경석 (한경대)
6	포도농가실증시험							■	■	■					박경석 (한경대)
7	대량생산체계구축									■	■				박경석 (한경대)
8	제제화시험									■	■				박경석 (한경대)
9	특허출원 및 산업화											■	■		박경석 (한경대)

2-2. 연구내용

포도(*Vitis vinifera* L.)는 강수량이 적고 온난한 기후에서 재배하는 과수로 여름철 습도가 높고 강우가 집중되는 우리나라의 경우 병해충에 의한 피해가 많다. 또한 포도는 와인 제조용 보다는 주로 생식용으로 소비되는 특성상 과실의 당도와 외관은 포도품질과 등급을 결정한다. Oh *et al.*(2014a)의 결과를 보면 포도흰얼룩병은 *Tricothecium roseum* 과 *Acremonium acutatum* 에 의하여 주로 발생하는 것으로 밝혀졌으며 주로 습도가 높거나 환기가 불량한 시설 재배에서 발생하고, 가지, 잎, 줄기, 포도송이 등에서 발병하며 수확기에 접어들면 포도의 표면에 급격하게 증가하여 경제적 손실을 초래한다. *T. roseum* 의 경우 멜론(*Cucumis melo* L.), 감귤(*Citrus unshiu*), 배(*Pyrus serotina* Rehder), 토마토(*Solanum lycopersicum*)등의 과실에서 분홍빛썩음병(Pink mold rot)을 일으키는 것으로 보고된 바 있다 (Kwon *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2013a;

Kwon *et al.*, 2013b; Han *et al.*, 2012). *A. acutatum* 은 Oh *et al.*(2014a)에 의하여 포도 흰얼룩병의 원인균으로 최초로 보고되었으며 *T. roseum* 균과 혼합 감염되는 특징이 있다. 특히 노지에서 병원균이 감염되면 수확 후 저온저장 시설에서도 발생이 지속되어 포도의 품질이 현저히 저하된다. 본 병해는 국내의 경우 관리가 불량한 노지 및 시설하우스 포도농가에 피해가 많으며 수확기가 임박한 8월 중순 이후부터 발병이 크게 증가하는 것으로 알려져 있다 (Oh *et al.*, 2014b). 아직 등록된 약제가 없으며 수확기에 임박하여 발생하게 되므로 화학약제의 사용은 권장되지 않으며 방제도 어려운 실정이다.

과수의 경우 생물적 방제는 *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 등의 *Bacillus* 속 미생물을 이용한 포도 노균병, 복숭아(*Prunus persica*) 잿빛무늬병 등 다양한 병해에 대한 생물방제가 시도되었다 (Zhang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2008). 포도 흰얼룩병의 경우 2014년 보고(Oh *et al.*, 2014a)된 포도 신종병해로 국내외적으로 연구된바 없다. 특히 식물병의 생물방제용으로 다양한 작물에 실용화되고 있는 *Bacillus*속의 많은 종들이 농업적으로 활용되며 그 기작 연구도 다양하게 연구되고 있는데 농작물에 사용되는 대부분의 *Bacillus* 균주는 cyclic lipopeptides(CLP)인 surfactin, iturin, fengycin 등의 항균 활성물질을 생산하는 것으로 유명하며 이들 물질의 유도체 다양성에 따라 병해의 억제활성이 달라지며, 분류체계도 최근 유전적 특성에 따라 *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. siamensis* 로 분류되고 있다 (Ongena *et al.*,; 2009, Fan *et al.*, 2017). 이들이 생산하는 CLP 유도체는 항진균, 항세균 효과 뿐 아니라 식물의 면역기능을 활성화시켜 식물의 생물적 및 비생물적 요인에 스트레스 경감효과를 갖게한다고 하며 대체로 식물의 수량증대, 품질개선 및 작물보호활성에 대한 연구가 많다 (Guo *et al.* , 2015, Borris *et al.*, 2018).

본 연구에서는 포도흰얼룩병균에 대한 항진균 활성이 우수한 *Bacillus*속 M28 균주를 선발하여 동정하고 농가포장 적용을 위한 포자발아억제, 포도잎 절편검정 및 포도흰얼룩병 방제를 위한 포장 시험을 수행하였다.

## 가. 길항미생물의 분리 및 동정

본 연구에서 사용한 균주는 4월 중순경 경기도 안성시 한경대학교 부속농장

포도원에서 생육이 우수한 포도나무의 근권 10-15cm 깊이에서 토양을 채취하여 균을 분리하였다. 총 230개 균주 중 포도 흰얼룩병균 2종에 균사저지효과가 가장 우수한 MWS28 균주를 선발하여 시험에 공시하였다. 선발된 MWS28 균주는 16s RNA 분석을 통하여 동정하였다. 길항미생물의 chromosomal DNA 추출은 3ml의 LB 배지에서 16시간 동안 배양시킨 배양액으로 InstaGene<sub>tm</sub> Matrix(BIO\_RAD)을 이용하여 추출하였다. 16s rRNA 부분의 증폭을 위하여 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하였다. PCR은 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, UK)를 사용하여 98°C에서 10초의 denaturation 후 98°C에서 10초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 과정을 35회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 1×TAE(Tris-acetate-EDTA) buffer를 이용하여 1% agarose gel에서 30분간 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV-trans illuminator에서 밴드를 확인하였다. 확인된 밴드는 MEGA-spin<sup>TM</sup> Agarose Gel Extraction Kit(Intron, Korea)의 방법에 따라 정제한 후, 염기서열 분석을 위해 시퀀싱 분석 서비스(Macrogen, South Korea)를 이용하였다. 분석된 염기서열의 homology는 천랩의 BLAST 프로그램(EzTaxon-e)을 이용하여 비교 분석하였으며, MEGA X의 Clustal W를 이용하여 계통 분류도를 작성하였다. 계통도 작성은 neighbor-joining 알고리즘(Saitou and Nei,1987)을 사용하였고 1,000회 반복으로 bootstrapping(Felsenstein, 1985)을 이용하여 계통도를 완성하였다. 분석된 MWS28 16s 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 등록하였다(Accession no: MK208682). *B. amyloliquefaciens* 그룹의 정확한 동정을 위해 API50CHB kit(BioMérieux, France)를 이용하여 생화학 검정을 실시하였다.

#### 나. 흰얼룩병 병원균

공시병원균인 포도흰얼룩병균은 환경대 원예학과 과수학 실험실에 보존 중인 *Tricothecium roseum*과 *Acremonium acutatum* 균주를 분양 받아 PDA petridish에서 28°C로 1주간 배양하여 형성된 분생 포자를 Hemocytometer로 포자수를 계측하여  $1.0 \times 10^6$  spores/mL 농도로 시험하였다.

#### 다. MWS28균주의 항균력 검정

선발된 MWS28 균주의 항균력 측정은 배양여액을 이용하였다. 병원균은 PDA배지에 25°C 배양기에서 7일간 배양된 *T.roseum*과 *A.acutatum*의 포자현탁액을  $1 \times 10^5$  spores/mL로 조절한 후, PDA plate에 각각 100 $\mu$ l를 도말하였다. MWS28균의 배양여액은 TSB(Tryptic Soy Broth)에 24시간 배양한 길항균을 8,000rpm으로 5분간 원심분리(CT15RE, Hitachi Koki Co.,Ltd., Japan) 후, 상등액 1ml를 0.25 $\mu$ m syringe filter (AD. 13CP045AS, Advantec, Houston, TX, USA)를 이용하여 여과한 후, 직경 8mm의 paper disc(Tokyo Co., Japan)에 50 $\mu$ l로 분주하여 1분간 완전히 흡수시켰다. paper disc를 병원균을 도말한 PDA plate의 정가운데를 기준으로 3cm 떨어진 3지점에 치상하여 28°C incubator(DS-14MC, Dasol Scientific Co., Ltd., Hwaseong, Korea)에서 3일간 배양 후 paper disc 둘레에 나타난 성장 저지대 (inhibition zone)의 직경을 디지털 밀림자 (Digimetic caliper, Mitutoyo Co., Tokyo, japan)을 이용하여 측정하였다.

#### 라. MWS28 균주 배양액 처리에 의한 포도 흰얼룩병균 포자 발아억제

길항균 MWS28의 포도 흰얼룩병원균에 대한 항진균 활성을 알아보기 위해, TSB에서 배양한 길항균 MWS28 균주 배양액을 10,000G로 10분간 원심분리하여 얻어진 MWS28 균체를 멸균수에  $1 \times 10^6$  cell/ml,  $1 \times 10^7$  cell/ml,  $1 \times 10^8$  cell/ml 농도로 희석하였다. 원심분리로 얻어진 배양 상등액은 배양원액, 10배, 100배, 1000배로 희석하였다. PDA에 7일간 배양된 공시균주인 *A. acutatum* 과 *T. roseum*의 균사체로부터 얻은 분생포자를  $1 \times 10^5$  spores/ml가 되도록 각각 첨가하였다. 처리 총량은 1ml로 하였으며 24well plate를 이용하였고 암조건으로 28°C 항온기에 배양하였다. 포자발아율은 24시간, 48시간, 72시간 간격으로 hemocytometer를 이용하여 측정하였다. 포자발아율(%)은 (발아한 포자수/전체 포자수) \* 100 으로 하였다.

#### 마. 포도 잎을 이용한 포도 흰얼룩병 억제효과

한경대학교 부속농장 포도원 노지포장의 '캠벨얼리' 품종의 직경 7-8cm의 어린

포도 잎을 채취하였다. 포도 잎은 세척 후, 4℃에서 12시간 안정화 시킨 다음, 22.5mm 코르크보러를 사용하여 잎을 원형 디스크로 절취하였다. 잎의 절편은 5000ppm 차아염소산을 이용하여 1분간 표면 살균하여 실험에 사용하였다. 길항균은 TSA배지에서 접종한 후, 30℃ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양한 균주의 colony를 채취하여 멸균수와 희석하고 spectrophotometer(Optizen POP, Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 길항균의 농도를  $1 \times 10^8$  cell/ml로 조절하여 이용하였다. 처리방법은 길항균 현탁액에 포도 잎 절편을 30초간 침지하였다. 그 후, 200 x 200 x 15.00mm 크기의 플라스틱 사각 플레이트에 습실처리 한 다음 처리당 6개의 잎 디스크를 정렬하여 PDA에서 1주간 배양된 *A. acutatum*과 *T. roseum* 균의 콜로니 디스크(Ø 5.0mm)를 어린잎 디스크 절편 가운데에 접종하였고 암 조건으로 27℃ 인큐베이터에서 5일간 배양하였다. 처리 별 3반복하였으며 반복당 6개 잎의 디스크 당 병반면적을 조사하였다.

#### 바. MWS28 처리 농도에 따른 포도 잎의 약해검정

잎에 길항균 처리 시 나타날 수 있는 갈변현상 등 길항균의 농도에 따른 잎의 생리적 특성 규명하기 위하여 ‘캠벨얼리’ 포도의 어린 잎을 22.5mm 코르크보러를 이용하여 원형 디스크를 절취하였다. 포도 잎은 표면소독을 하였고 MWS28은 TSA배지에 배양하고 멸균수로 세균 현탁액을 만들어 사용하였다. 세균현탁액은 Spectrophotometer를 이용하여 길항균의 농도를  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  cell/ml로 맞춘 후, 처리별 잎 시료를 30초간씩 침지하였다. 시료를 풍건한 다음 243 x 243 x 27.3mm 크기의 플라스틱 사각 플레이트내에 여과지를 상하에 부착한 다음 멸균증류수를 첨가하여 습도가 유지되도록 처리한 다음 준비한 시료를 치상하여 상온(25C)에서 24시간 관찰하였다.

#### 사. 길항균 MWS28과 증량제 혼용처리에 의한 포도 흰얼룩병 억제효과 증진

수확한 포도송이를 이용한 생물검정 실험에서 포도 흰얼룩병에 대한 MWS28 균주의 길항효과를 증진시키기 위해 계면활성제인 PEMS(Polyoxy Ethylene Methylpoly



Siloxane, Makupica SL, Hankook Samgong Co., Ltd.) 0.02%를 사용하였고, 길항균 세포의 포도 표면 부착성 증진을 위하여 0.3% 알긴산염(Sodium alginate, Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 병 발생을 위하여 PDA에 접종하여 28°C 항온기에서 1주간 배양시킨 *A. acutatum*과 *T. roseum*을 멸균수로 희석하여 각각의 농도가  $1 \times 10^5$  spores/ml가 되도록 조정하였다. 준비된 길항균을 처리별로 분무 살포한 다음 24시간 풍건한 다음 병원균을 분무 접종하였다. 각각의 시료는 습도 90%, 온도 27°C 인 incubator에 보관하였으며, 7일 후에 처리구 당 10알(과)을 채취하여 병반수를 조사하였다.

#### 아. 알긴산염 농도별 MWS28 부착량과 균 밀도

포도 알을 70% 에탄올, 5000ppm 차아염소산, 멸균수 순서로 30초씩 표면 소독 후 완전히 건조하여 한알 씩 무게를 측정하였다. 처리는 Table 1 과 같으며 각각의 처리 농도 별로 표면살균한 포도알을 60초간 침종하였다. 침종 후 MWS28 균주의 부착량을 조사하기 위해 각각의 포도알의 무게를 측정한 다음 완전히 건조하였다. 완전히 건조한 포도 알은 10ml 멸균수에 넣고 1분간 세척 후 100배 희석한 용액을 TSA배지에 평판 도말한 다음 28°C 배양기에서 24시간 배양하여 형성된 MWS28 균주의 균체를 계측하여 알긴산농도 처리 별 Mws28균주의 밀도변이를 계측하였다.

**Table 1. Different concentration of sodium alginate with MWS28 and 0.02% PEMS**

$1 \times 10^8$ cell/ml MWS28	+	0.02% PEMS	+	0% Sodium alginate
				0.05% Sodium alginate
				0.1% Sodium alginate
				0.2% Sodium alginate
				0.3% Sodium alginate

#### 자. MWS28의 농가실증시험

안성시 소재의 포도흰얼룩병 상습발생 농가포장의 포도송이에 공시 길항균인 MWS28균주의 최적화 처리조건을 고려하여 분무 살포하였다. MWS28은 TSA배지에

24시간 동안 30°C incubator에서 배양된 균주를 멸균수에  $1 \times 10^8$  cell/ml로 희석하여 사용하였으며, 0.02% PEMS와 0.3% 알긴산염을 혼합하여 처리구 당 2L를 분무 살포하였다. 대조 약제로는 Difenoconazole(푸르젠, 경농)을 2000배로 희석하여 살포하였다. 처리 7일 후, 발병율 및 방제가를 조사하였다.

#### 차. 농가 내 MWS28 처리 후 시기별 균밀도 조사

‘거봉’ 포도 1주에  $1 \times 10^8$  cell/ml MWS28 균 현탁액과 0.02% PEMS와 0.3% 알긴산염을 혼합하여 분무 살포하였다. 포도송이 위주로 7일 간격으로 3회 처리 후, 7일 간격으로 4회 시료를 채취하여 포도 5알을 100ml 멸균수에 세척한 용액을 100배 희석하여 TSA배지에 100 $\mu$ l씩 평판도말 하였다. 28°C 배양기에 24시간 배양 후 형성된 균체 수를 계측 하였다.

#### 카. MWS28 처리시 포도 특성 조사

안성시 서운면에 위치한 ‘거봉’ 품종의 포도 농가에 MWS28을 분무 살포와 토양 관주 하였다. 처리 조건은 Table 2 와 같고 7일 간격으로 3회 처리하였다.

**Table 2. Treatment condition of ‘Kyoho’ grape**

Treatment	Contents	Amount(L)
Control	Water control	
Soil drench	$1 \times 10^8$ MWS28 + 0.02% PEMS + 0.3% Sodium alginate	20L
Spray	$1 \times 10^8$ MWS28 + 0.02% PEMS + 0.3% Sodium alginate	2L

포도 특성 조사는 당도, 직경, 안토시아닌 함량을 조사하였다. 당도는 디지털당도계(PAL-1, ATAGO, Japan)를 이용해 조사하였고 직경은 캘리퍼스(CD-20CPX, Mitutoyo, Japan)를 이용해 조사하였다. 안토시아닌 함량은 과피 1g에 추출용매(Etanol : 증류수 : HCl = 85 : 13 : 2) 20mL를 넣고 25°C에서 24시간 침적추출 후 추출액을 여과지로 걸렀다. 여과액 2ml를 추출용매 10ml로 희석하여 25°C의 암실에서 1시간 정치한 다음 spectrophotometer로 530nm에서 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 공식은

다음과 같다.

$$[\text{총 안토시아닌 함량} = \text{O.D값} \times 10/1\text{g (시료량)} \times 100 \times 1/65.1 ]$$

**타. MWS28의 대두박 액상배지 조성분 최적선택**

MWS28균주의 대량배양을 위한 최적 조건 구명을 위하여 길항균 MWS28은 TSB배지에서 치상한 후 30°C incubator에서 24시간 동안 배양한 균주의 Colony를 멸균수에 희석하고, spectrophotometer를 이용하여  $1 \times 10^8$  cell/ml의 농도로 조절하여 100 $\mu$ l씩 조성분을 조절한 대두박 액상배지(100ml)에 분주하여 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 36시간 간격으로 spectrophotometer로 600nm로 측정하였다. Blank는 각각의 처리구와 같은 대두박 액상배지를 사용하였다. 대두박 액상배지의 조성비율은 다음과 같다.

**Table 3. Media composition for cultivation of *B. velezensis* MWS 28 according to the different ratio of yeast extract in one liter volumn with water**

Soybean flour 0.3% K phosphate 0.2% Glucose 2% Molasses 1.7%	+	Yeast extract	0.0%
			0.4%
			0.84%
			1.7%
			3.4%

**Table 4. Media composition for cultivation of *B. velezensis* MWS 28 according to the different ratio of glucose in one liter volumn with water**

Soybean flour 0.3% K phosphate 0.2% Yeast extract 1.7% Molasses 1.7%	+	Glucose	0.0%
			0.4%
			1.0%
			2.0%
			4.0%

**Table 5. Media composition for cultivation of *B. velezensis* MWS 28 according to the different ratio of molasses in one liter volumn with water**

Soybean flour 0.3% K phosphate 0.2% Yeast extract 1.7% Glucose 2%	+	Molasses	0.0%
			0.4%
			0.82%
			1.7%
			3.4%

**Table 6. Media composition for cultivation of *B. velezensis* MWS 28 according to the different ratio of soybean flour in one liter volumn with water**

K phosphate 0.2% Yeast extract 0.4% Glucose 1% Molasses 3.4%	+	Soybean flour	0.0%
			0.3%
			0.6%
			1.2%

**Table 7. Media composition for cultivation of *B. velezensis* MWS 28 according to the different ratio of K phosphate in one liter volumn with water**

Soybean flour 0.3% Yeast extract 0.4% Glucose 1% Molasses 3.4%	+	K phosphate	0.0%
			0.2%
			0.4%
			0.6%

Table 3, 4, 5.의 조성 성분으로 시험하여 최적의 농도를 선발하고 Table 6, 7.의 시험을 통해 나머지 조성을 선발하였다.

#### 파. 통계분석

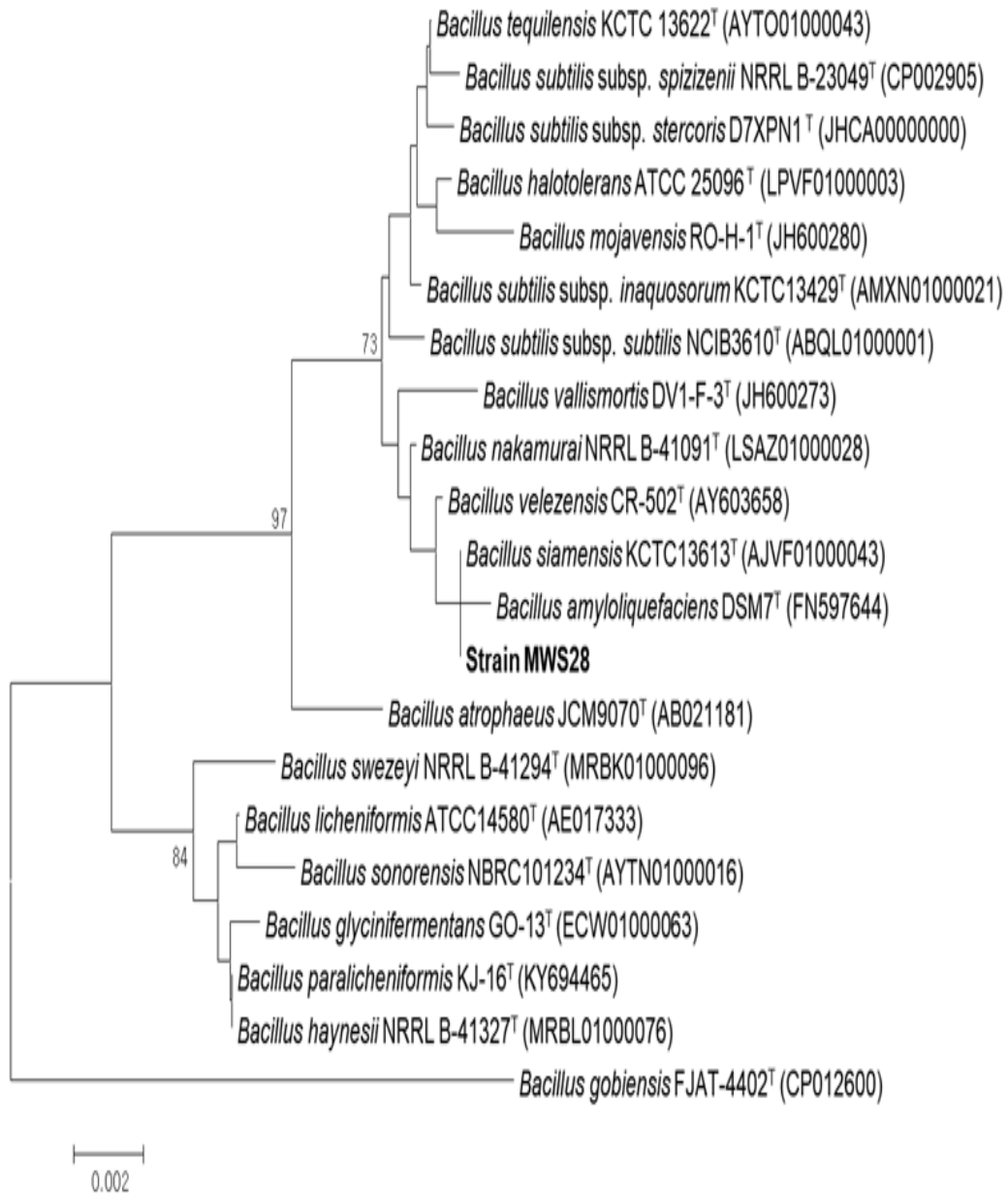
길항미생물 처리를 통한 병원균의 군사생장, 발아율, 포도 잎 및 과실을 이용한 처리구 간의 유의성 검정은 SAS 9.3(SAS Institute Inc, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

### 2-3. 연구수행 결과

#### 가. 길항미생물의 분리 및 동정

선발된 길항균 MWS28은 16s rRNA염기서열 분석결과, *Bacillus velezensis* CR-502<sup>T</sup>와 99.93%, *Bacillus velezensis* NCIB3610<sup>T</sup>와 99.78%, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7<sup>T</sup>와 99.70%의 매우 높은 유사성을 보였다. 계통도 분석 결과, *B. amyloliquefaciens* group과 같은 계통인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). *B. amyloliquefaciens* group은 16S rRNA염기서열의 유사성이 매우 높은 group으로 이를 통해 정확한 동정이 불가능하며 유전체 분석을 통해 구별할 수 있다(Dunlap *et al.*, 2016). 그러나 최근 연구에서 이들

group이 대사 경로에서 차이가 있음을 비교 유전체 분석을 통해 확인하였으며, Table 8에서와 같이 L-arabinose, D-xylose, mannose, trehalose 이용성을 통해 확인한 바가 있다 (Chun *et al.*, 2019). 따라서 특허 분석 결과 본 균주는 아직 포도흰얼룩병에 대한 특허 출원이 되지 않았으므로 본 시험 결과를 기초로 국내특허 출원하였다.



**Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain MWS28 and the closely related species. Numbers at nodes are bootstrap values (percentages of 1000 replications); only values more than 70 % are shown.**

**Bar, 0.002 substitutions per nucleotide position (NCBI accession number of MWS28: MK208682).**

MWS28의 API50CHB의 생화학적 검정 결과, MWS28균주는 공시한 L-arabinose, D-xylose, Mannose, Trehalose 등의 탄소원을 모두 활용하는데 반하여 *B. amyloliquefaciens*과 *B. siamensis* 는 Trehalose 를 활성화하지 못하는 특성으로 구분할 수 있었으며 MWS28 균주는 *B. amyloliquefaciens*와는 다르게 *B. velezensis* 와 더 높은 유사성을 보이므로(Table 8.) 선발길항균을 *Bacillus velezensis* MWS28로 동정하였고 NCBI에 accession NO: MK208682로 등록하였다.

**Table 8. Phenotypic differences among strain MWS28 and type strains of *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. siamensis* KCTC13613, *B. velezensis* LMG22478**

Assimilation	DSM7 <sup>T</sup>	KCTC 13613 <sup>T</sup>	LMG 22478 <sup>T</sup>	MWS28
L-Arabinose	w <sup>a)</sup>	+ <sup>b)</sup>	+	+
D-Xylose	w	+	+	+
Mannose	+	w	+	+
Trehalose	- <sup>c)</sup>	-	+	+

a) week growth, b) growth, c) no growth

#### 나. *B. velezensis* MWS28균주의 항균력 검정

MWS28 균주의 배양여액을 이용하여 *A.acutatum*과 *T.roseum*의 항균력 검정을 진행한 결과는 Fig.2 및 표9와 같다.

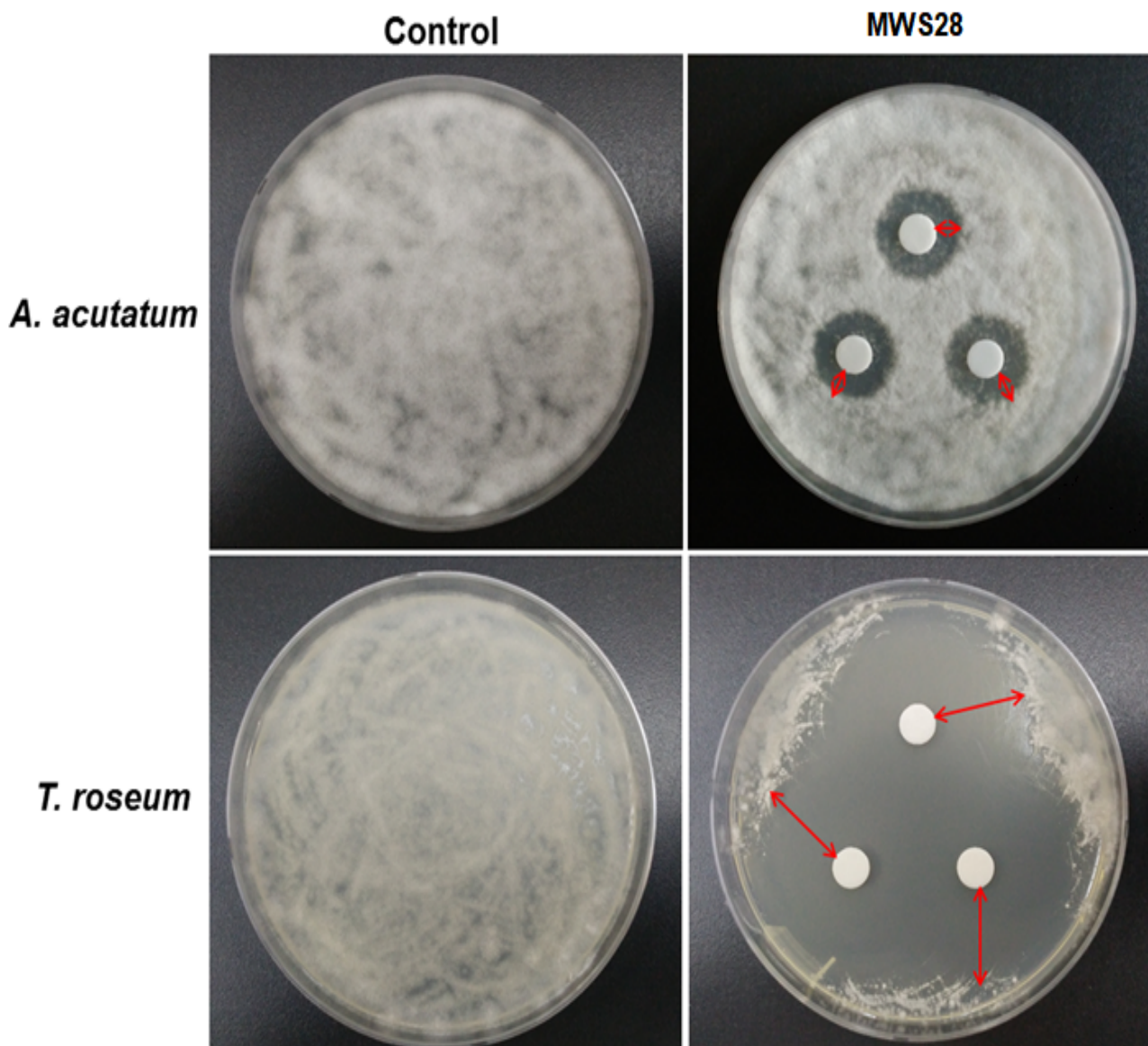


Fig. 2. Antifungal activity against two casual organisms of *A. acremonium* and *T. roseum* by treatment of *B. velezensis* MWS28. (Arrow : size of inhibition zone against two casual organisms respectively)

Table 9. Suppression of mycelial growth against *A. acutatum* and *T. roseum* by *B. velezensis* MWS28

Treatment	Inhibition zone (mm)	
	<i>A. acutatum</i>	<i>T. roseum</i>
<i>B. velezensis</i> MWS28	15.6 ± 0.6	40.8 ± 1.6

*A. acutatum*과 *T. roseum*의 저지원은 각각  $15.6 \pm 0.6$ ,  $40.8 \pm 1.6$ mm로, 길항균에 의해 두 병원균 모두 억제되었으며 *A. acutatum*보다 *T. roseum* 균에 강한 항균 활성을 나타내었다. 농업용으로 쓰이는 *Bacillus*균 속은 보통 bacillomycin D, fengycin, iturin A, surfactin과 같은 cyclic lipopeptide를 생산하여 항균활성을 나타낸다 (Hiradate et al, 2002; Kloepper et al, 2004; Chen et al, 2009). Maget 등(1992)의 연구결과에 의하면 iturin A, surfactin는 동시에 존재할 때, 항진균 활성을 높이는 것으로 알려져 있다. 또한, *B. amyloliquefaciens* 는 IAA, 2,3-butanediol등의 식물생육 호르몬에 관여하는 물질을 생산하여 식물에 영향을 준다 (Yang 등, 2011; Ramirez 와 Kloepper, 2010). 이와 같은 특성에 비추어 본 시험에 공시한 MWS28 균주의 항균활성도 CLP 그룹에 속하는 활성물질에 의한 것으로 생각되며 추후 항균활성 규명을 위한 연구가 필요하다.

#### 다. *B. velezensis* MWS28 균주 배양액 처리에 의한 포도 흰얼룩병균의 포자 발아억제

MWS28 균주 배양액에 대한 *A. acutatum* 포자 발아 억제는 원심분리하여 Bacterial cell을 제거 후 0.25um(pore size)의 membrane filter를 통과시킨 배양 원액(상등액) 처리에 가장 좋았다. 24시간 후에는 포자 발아가 거의 이루어지지 않았다가, 48시간, 72시간 후에 점차 발아율이 증가하였다 (Table 10).

**Table 10. Inhibition of conidia germination to *A. acutatum* by bacterial cell and supernatant of *B. velezensis* MWS28**

Treatment	Conidia germination(%) <sup>a)</sup>		
	24h	48h	72h
Control	97.2 a	99.1 a	100.0 a
Live cell of MWS28 ( $1 \times 10^8$ cell/mL)	6.3 d	8.2 c	10.2 d
Cell-free supernatant (x1)	8.2 d	11.1 c	25.5 c
Cell-free supernatant (x10)	56.8 c	57.8 b	77.7 b
Cell-free supernatant (x100)	80.5 b	90.3 a	93.2 a
Cell-free supernatant (x1000)	93.4 a	98.2 a	99.1 a

<sup>a)</sup> Values followed by the same letter were not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test (DMRT).



한편 배양액을 제거한 bacterial live cell 처리에서는 길항균 배양원액 처리와 동일하게 매우 낮은 발아율을 나타내었으며 72시간 후에도 발아율 10% 정도의 우수한 발아억제력을 나타내었다(Table 11).

**Table 11. Suppression of conidia germination of *A. acutatum* by bacterial suspension of *B. velezensis* MWS28**

Treatment (Bacterial cell concentration)	Germination(%) <sup>a)</sup>		
	24h	48h	72h
Control (Sterile distilled water)	97.2 a	99.1 a	100.0 a
Live cell of MWS28 (1x10 <sup>8</sup> cell/mL)	6.3 de	8.2 d	10.2 d
Live cell of MWS28 (1x10 <sup>7</sup> cell/mL)	9.0 d	22.4 c	29.1 c
Live cell of MWS28 (1x10 <sup>6</sup> cell/mL)	61.1 c	67.3 b	68.3 b
Live cell of MWS28 (1x10 <sup>5</sup> cell/mL)	71.2 b	96.2 a	99.1 a

<sup>a)</sup>Values followed by the same letter were not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test (DMRT).

이와 같은 결과를 보아 MWS28 균의 포자발아억제는 배양액에 포함된 항균 활성물질 뿐만 아니라 MWS28균체가 병원균의 포자접촉에 의한 균사체 용해효소의 생산 혹은 미 동정 억제물질이 작용 할 것으로 생각된다. 길항균 MWS28의 밀도는 높을수록 *A. acutatum* 균주의 포자발아가 억제되는 것으로 보아 1x10<sup>8</sup> cfu/ml 이상의 밀도 유지가 포도 흰얼룩병 생물방제에 중요한 요인임을 알 수 있다. *T. roseum* 처리의 경우에도 *A. acutatum*의 포자억제 양상과 비슷한 경향을 나타냈으며 *T. roseum* 균 무처리의 포자 발아율은 *A. acutatum* 보다 매우 낮았다 (Table 12, 13). Lee et al.(2013)의 결과에 따르면, *B. amyloliquifaciens* subsp. *plantarum* CC110 배양액과 bacterial cell 처리가 오이 노균병을 동일하게 억제하였다는 연구 결과를 발표하였는데 포자 발아억제에는 길항균배양액에 포함된 항균 활성물질 뿐만 아니라 증류수에 Bacterial cell만 희석하여 처리한 병원균의 포자발아억제 활성도 동일한 억제 활성을 나타낸다고 할 수 있다. 따라서 길항균이 갖는 식물병원균에 대한 생물방제효과는 항균활성 뿐 아니라 길항균이 직접 병원균에 접촉하여 포자발아 억제물질을 내거나 균사체 분해효소의 생산 등의 작용기전이 있을 것으로 생각된다.

**Table 12. Inhibition of conidia germination to *T. roseum* by bacterial cell and supernatant of *B. velezensis* MWS28**

Treatment	Conidia germination(%) <sup>a)</sup>		
	24h	48h	72h
Control	11.4 a	20.1 b	41.2 a
Live cell of MWS28 (1x10 <sup>8</sup> cell/mL)	0.0 b	9.1 c	16.3 b
Cell-free supernatant (x1)	0.0 b	11.2 c	21.3 b
Cell-free supernatant (x10)	0.0 b	17.1 b	32.3 a
Cell-free supernatant (x100)	0.0 b	22.2 b	34.2 a
Cell-free supernatant (x1000)	0.0 b	32.2 a	39.6 a

<sup>a)</sup> Values followed by the same letter were not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test (DMRT).

**Table 13. Suppression of conidia germination of *T. roseum* by bacterial suspension of *B. velezensis* MWS28**

Treatment	Germination(%) <sup>a)</sup>		
	24h	48h	72h
Control (Sterile distilled water)	11.4 a	20.1 b	41.2 a
Live cell of MWS28(1x10 <sup>8</sup> cell/mL)	0.0 b	9.1 c	16.3 b
Live cell of MWS28 (1x10 <sup>7</sup> cell/mL)	0.0 b	20.2 b	36.2 a
Live cell of MWS28 (1x10 <sup>6</sup> cell/mL)	0.0 b	26.3 b	38.2 a
Live cell of MWS28 (1x10 <sup>5</sup> cell/mL)	0.0 b	32.2 a	41.1 a

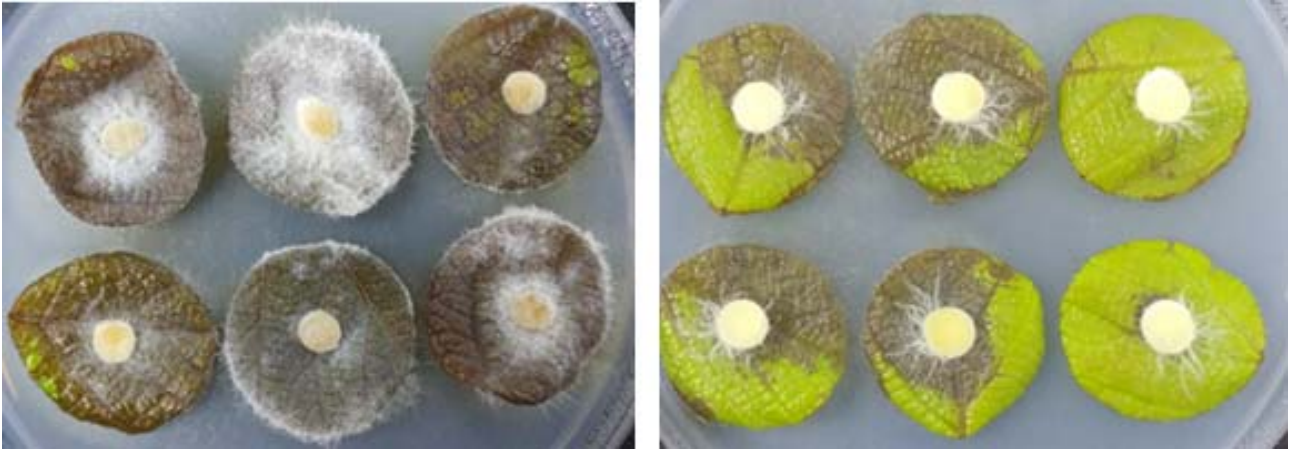
<sup>a)</sup> Values followed by the same letter were not significantly different ( $P = 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test (DMRT).

#### 라. 포도 잎을 이용한 포도 흰얼룩병 억제효과

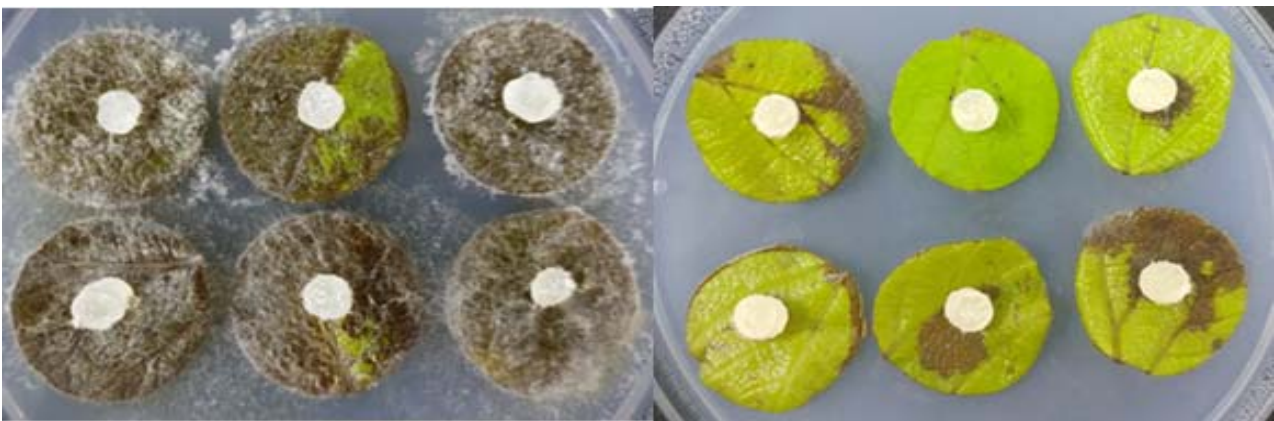
잎 절편을 이용한 생물검정 결과, 무처리구에서는 병반 면적율이 96.0% 였으며 *B. velezensis* MWS28 처리구에서는 38.3%로 MWS28균의 처리로 병반 면적율이 대폭 감소하였다 (Fig.3, Table 14).

*T. roseum* 균에 의한 무처리구의 병 발생은 89.1%인 반면, 길항균인 MWS28 처리한 포도 잎에서는 20.0%의 병반 면적율을 나타내었다 (Table 15). 포도 흰얼룩병균인 *A. acuatum* 과 *T. roseum* 에 대한 길항균 MWS28 균주의 처리효과를 방제가로 환산해보면 각각 60%, 78%로 MWS28 처리가 포도 흰얼룩병의 포도 잎 절편

검정에서도 효과적이었으며 항균활성 검정에서의 결과와도 일치하는 경향을 보였다(Fig. 4, Table 14).



**Fig. 3. Decreased lesion area to *A. acutatum* by treatment of bacterial cell of MWS28 in young leaf disc assay (Left: Control, Right: MWS28)**



**Fig. 4. Decreased lesion area to *T. roseum* by bacterial cell of MWS28 in young leaf disc assay (Left: Control, Right: MWS28)**

**Table 14. Decreased lesion area against two pathogens of white stain symptom by treatment of bacterial cell of MWS28 for young leaf disc assay**

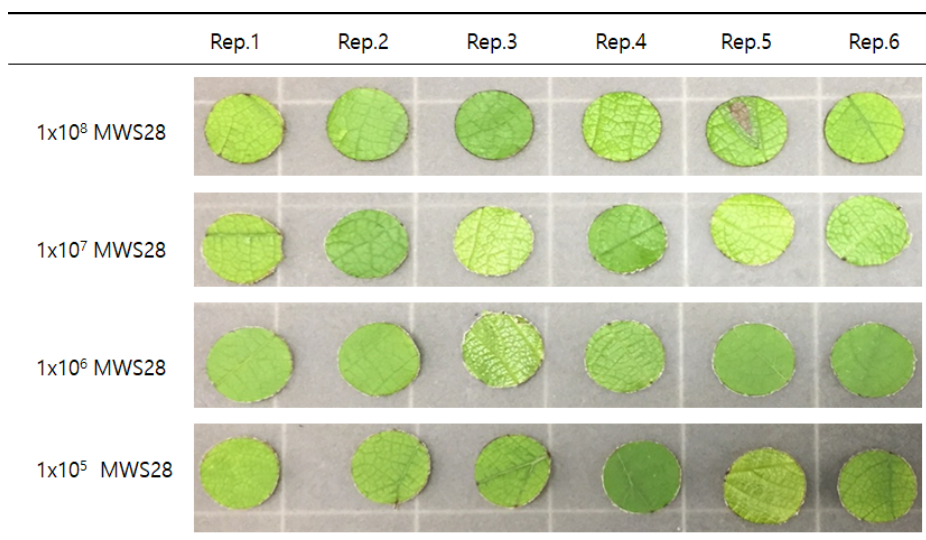
Treatment	Lesion area (%) <sup>a)</sup>	
	<i>A. acutatum</i>	<i>T. roseum</i>
Control	96.0 ± 8.20	89.1 ± 7.20
<i>B. velezensis</i> MWS28	38.3 ± 9.70	20.0 ± 6.10

<sup>a)</sup> Lesion area (%) are measured 5 days after treatment. The experiment was six replications per treatment and standard error

포도와 관련된 연구결과, 포도 잎에 *B. subtilis* B27과 B29를 처리하였을 때, 잿빛곰팡이병 (*Botrytis cinerea*)를 억제하였으며, *B. subtilis* KS1 균주도 잿빛곰팡이병을 억제한다고 보고되었다 (Furuya et al., 2011; Maachia et al., 2015). Pretorius et al.(2015)에 의하면 *B. amyloliquefaciens*의 항진균 활성 비교 연구에서 *Botrytis cinerea*를 억제하는 항균물질의 생산이 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. spizizenii* 등의 바실러스균에 비해 월등히 높다고 평가하고 있다 (Pretorius et al., 2015). 이와 같은 길항균의 특성을 비교해보면 포도 흰얼룩병에 대한 *B. amyloliquefaciens* 항진균 활성도 다른 종에 비해 훨씬 높을 것으로 사료된다. 또한 포도 흰얼룩병은 노지포장의 어린잎에 발병되지는 않으나 포도과실이 없어 시험할 수 없는 경우 포도 흰얼룩병의 농약평가, 길항균의 역가 검정 등에 유용하게 활용 될 수 있을 것으로 생각된다.

**마. *B. velezensis* MWS28 처리 농도에 따른 포도 잎의 약해 검정**

$1 \times 10^8$  cell/ml 농도로 처리한 잎에서 미약한 갈변현상이 보여지나 상처부위를 중심으로 갈변화가 보여지며 실제로 상처가 없는 포도잎에 처리할 경우 아무런 억제 효과는 나타나지 않았다(Fig.5). 따라서 MWS28 처리 후 병원균의 균사생장 억제에 가장 효과적이었던  $1 \times 10^8$  cell/ml의 농도로 분무 살포하여도 잎의 약해 증상없이 병원균을 억제 할 수 있을 것으로 생각된다.



**Fig. 5. Test of leaf damage by different cell density of MWS28 on grape leaf disk**

바. 길항균 *B. velezensis* MWS28과 증량제 혼용처리에 의한 포도 흰얼룩병 억제효과 증진

포도 과실을 이용한 기내실험에서 MWS28균주 처리효과는 *A. acutatum*에 의한 포도 흰얼룩병의 억제는 0.02% PEMS와 0.3%의 sodium alginate를 혼합한 처리가 병 발생률이 19.6%로 가장 낮았다 (Fig. 6).

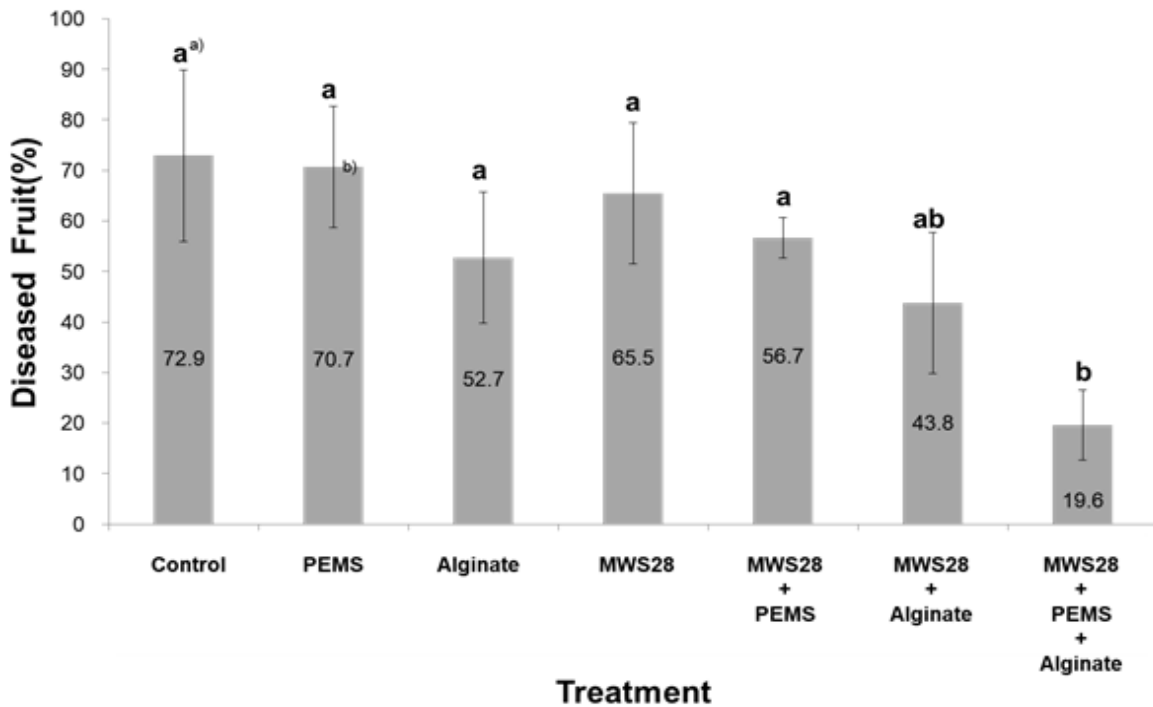
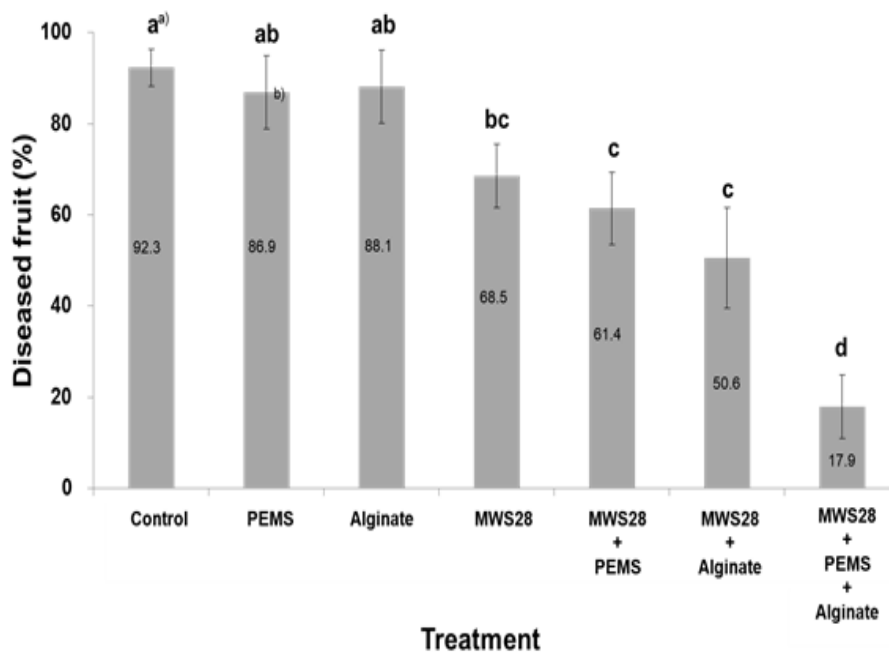


Fig. 6. Suppression of white stain symptoms causing *A. acutatum* by combined treatment of *B. velezensis* MWS28 on postharvest grapes ‘Campbell early’. Treatment of bacterial and conidial suspension was adjusted as  $1 \times 10^8$  cells/ml and  $1 \times 10^5$  spores/ml respectively. The final treatment was added as 0.02% of PEMS and 0.3% of sodium alginate. <sup>a)</sup> Means followed by a same letter(s) in the column are not significantly different by Duncan’s multiple range test (DMRT) at  $p=0.05$ , <sup>b)</sup> Values are means standard errors( $\pm$ ).

한편, MWS28를 단독 살포한 경우에는 65.5%의 발병률을 나타낸 것으로 보아 MWS28 균주는 0.02% PEMS와 0.3% sodium alginate의 혼합처리 할 경우 방제효율이 크게 상승됨을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 *T. roseum*에 의한 포도 흰얼룩병 방제 시험에서도 동일한 패턴을 보여 매우 고무적이었다(Fig. 7).



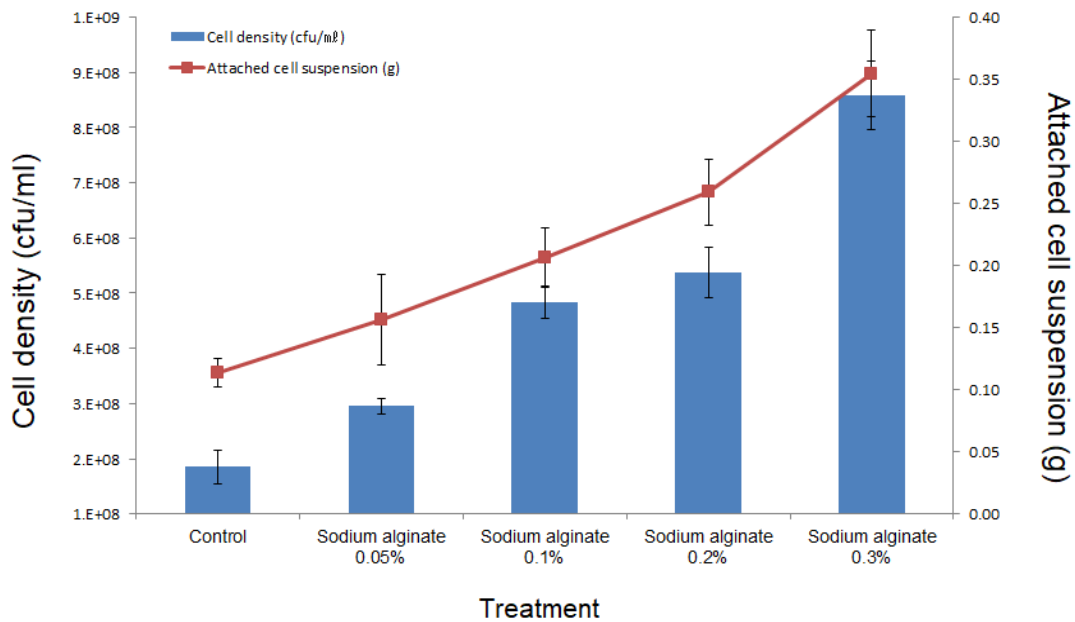
**Fig. 7. Suppression of White stain symptoms causing *T.roseum* by combined treatment of *B. velezensis* MWS28 on postharvest grapes ‘Campbell early’. Bacterial and fungal spore suspension was adjusted as  $1 \times 10^8$  cells/ml and  $1 \times 10^5$  spores/ml respectively. The final treatments were added with 0.02% of PEMS and 0.3% of sodium alginate.<sup>a)</sup> Means followed by a same letter(s) in the column are not significantly different by Duncan’s multiple range test (DMRT) at  $p=0.05$  <sup>b)</sup> Values are means standard errors ( $\pm$ ).**

사용된 PEMS는 유기실리콘계열의 전착제로 국내 농약 허용 기준에서 면제 되는 유효성분으로 화학 농약의 전착제로 사용되고 있다. Sodium alginate는 해초류에서 분리한 천연 성분으로 물리화학적으로 안정적일 뿐만 아니라 인체에 해가 없어 고착성 증진을 위한 농식품류의 원료로 빈번하게 사용 된다 (Bashan Y.; 1987). 수확기에 가까운 포도의 과실 표면은 분상의 효모로 덮여있고 또한 포도표면이 매끄러워 전착제인 PMPS를 사용하여도 표면에 미생물을 다량부착 시키기 어려웠다. 따라서 포도 표면에 고착성을 증가시키기 위한 sodium alginate의 사용은 길항세균의 포도 표면 고착성 증대에 효과적 이었으며 sodium alginate 의 경우 농도가 높아질수록 길항균의 부착밀도도 높았다. Sodium alginate는 길항곰팡이 또는, 유용 세균 세포의 담체화(encapsulation) 제제용으로도 빈번하게 사용되며, 길항균인 *Gliocladium virens* G17 과 G20에 Sodium alginate 처리 시에는 혼용처리하지 않은 처리구에 비해 모잘록병의 생물학적 방제효과를 증진시키며, *Alternaria* 와 alginate를 혼용 처리하였을 때는 미생물

제초제로서의 효과를 증진시켰다 (Gent *et al.*,2003; Lumsden and Locke, 1989; Walker *et al.*, 1983). Mclaughlin 등(1992)은 Yeast와 alginate를 혼용 살포한 처리가 대조구 처리보다 사과 잿빛곰팡이병의 억제를 증진시킨다고 보고하였다. 이러한 결과로 보아 선발 길항균 MWS28 균을 이용한 포도 흰얼룩병의 생물방제 효율 증대에는 PEMS와 sodium alginate의 복합처리가 매우 유용함을 알 수 있다 (Fig. 6.7).

**사. 알긴산염 농도별 *B. velezensis* MWS28 부착량과 균 밀도**

Sodium alginate를 농도별로 처리한 결과 부착량에서는 Control에 비해 0.3%로 처리했을 때, 부착량이 3배 증가했으며 Sodium alginate의 농도가 높아질수록 부착량도 정비례하게 높아지는 것을 보였다. 이와 비슷하게 균밀도에서도 농도가 높아질수록 포도에 붙어있는 균 밀도가 증가되었다(Fig. 8).



**Fig. 8. Bacterial attachment on grape surface by treatment of *Bacillus velezensis* MWS28 In the condition of alginate gradient**

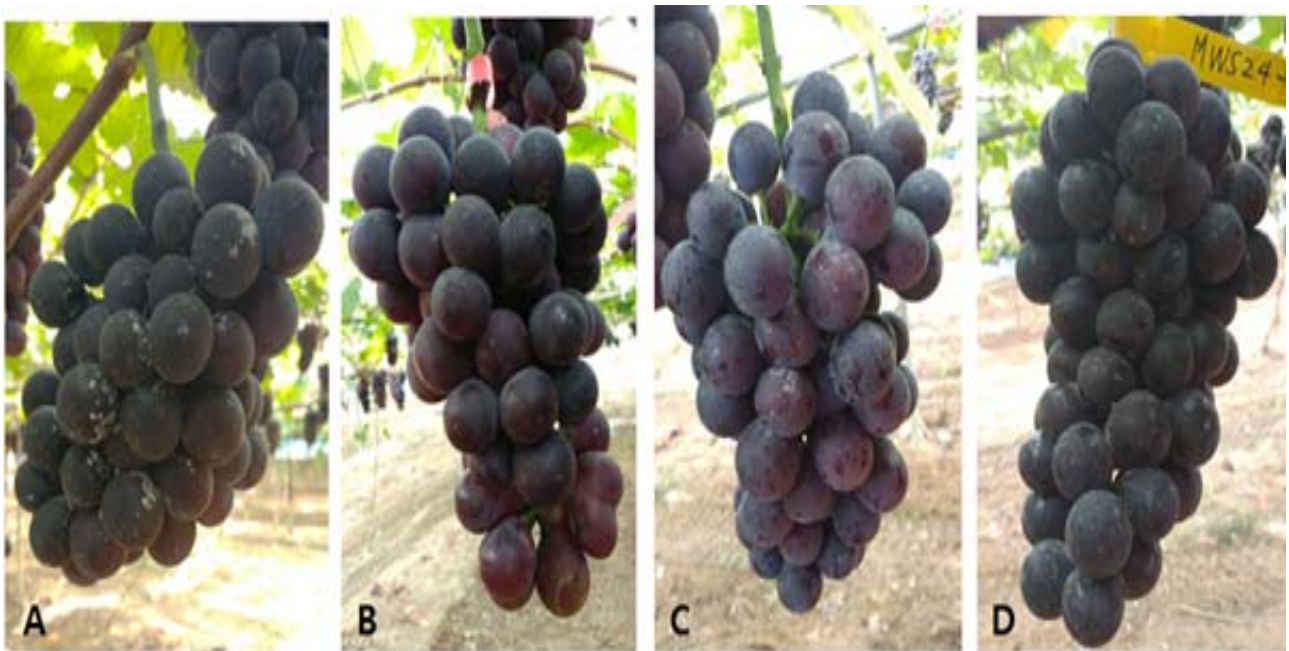
따라서 Sodium alginate의 농도는 MWS28균의 부착량을 증가시키는데 매우 중요하며 이와 같은 효과가 *A. acutatum* 과 *T. roseum* 균에 의한 포도얼룩병의 생물방제 효율을 증폭 시키는 직접적인 원인으로 규명되었다. 더불어 제품의



대량생산을 위하여는 알진염의 사용이 원가에 많은 부분을 차지하여 생산성악화의 한 원인 일 수 있으므로 차후 대체제의 개발도 필수적이라 할 수 있다.

#### 아. *B. velezensis* MWS28 처리의 농가실증시험

포도 흰얼룩병이 자연 발생하는 포도 농장에서 길항균 MWS28을 실험한 결과, 무처리의 병 발생은 71%였으며 대조약제인 Difenoconazole 처리는 15.3%로 억제 효과가 처리구 중 가장 우수하였으며 길항균 단독처리는 35%, MWS28과 0.02% PEMS 및 0.3% sodium alginate를 복합살포한 처리는 20%로 화학농약인 Difenoconazole과 유사한 포도 흰얼룩병균 방제 효과를 나타내었다(Fig.9., Table 15).



**Fig. 9.** Suppression of White stain symptoms on grapes ‘Kyoho’ by *B. velezensis* MWS28 treatment. Diseased grape (%) examined treatment after 7 days. (A) Control treatment (B) Chemical spray of Difenoconazole (C) Cell suspension of *B. velezensis* MWS28 (D): Cell suspension of *B. velezensis* MWS28 with 0.02% PEMS and 0.3% sodium alginate.



**Table 15. Suppression of White stain symptom on grapes 'Kyoho' by treatment of *B. velezensis* MWS28**

Treatment	Diseased berry(%) <sup>a)</sup> per grape bunch	No. of white stain symptom per each berry
Control	71±4.50a	15±1.50a
Difenoconazole	15±2.20c	2±0.30c
<i>B. velezensis</i> MWS28	35±7.60b	8±1.00b
<i>B. velezensis</i> MWS28 with 0.3% sodium alginate <sup>y)</sup>	20±2.90c	2±0.50c
LSD( <i>p</i> =0.05)	15.1	1.9

<sup>y)</sup>Values followed by the same letter were not significantly different (*P* = 0.05) according to Duncan's multiple range test (DMRT). The experiment was six replications per treatment. The experiment was conducted twice. Grape fruits were sprayed with *B. velezensis* MWS28 cell suspension (1x10<sup>8</sup>CFU/ml) according to the different treatment in the condition of natural disease-infesting field. The diseased berry of each treatment was determined by rating the number of diseased lesion per each grape bunch and per each berry respectively.

#### 자. 농가 내 *B. velezensis* MWS28 처리 후 시기별 균 밀도 조사

MWS28 길항균 현탁액을 과실에 살포하고 시기별로 균의 밀도가 얼마나 감소했는지 시험한 결과는 Fig.10과 같다.

분무 살포한 직후 포도 알에 부착된 균 밀도는 5.2x10<sup>7</sup>cfu/ml였으며 7일 후 까지 1.8x10<sup>7</sup>cfu/ml 의 유효한 밀도를 유지하다가 2주 후에는 5.6x10<sup>6</sup>cfu/ml로 감소하였다. 일반적으로 10<sup>6</sup>cfu/ml 이하의 농도가 될 경우 길항균의 항균 효과를 기대 할 수 없으므로 MWS28균주의 효과를 지속시키기 위하여는 최소한 2주에 한번씩 살포하는 것이 필요하다. 보통 포장에서의 포도 흰얼룩병의 발생은 수확기가 임박한 8월 초순부터 이므로 수확말기인 9월말까지 4차례 정도 살포해 주면 포도 흰얼룩병의 친환경 방제가 가능 할 것으로 생각된다.

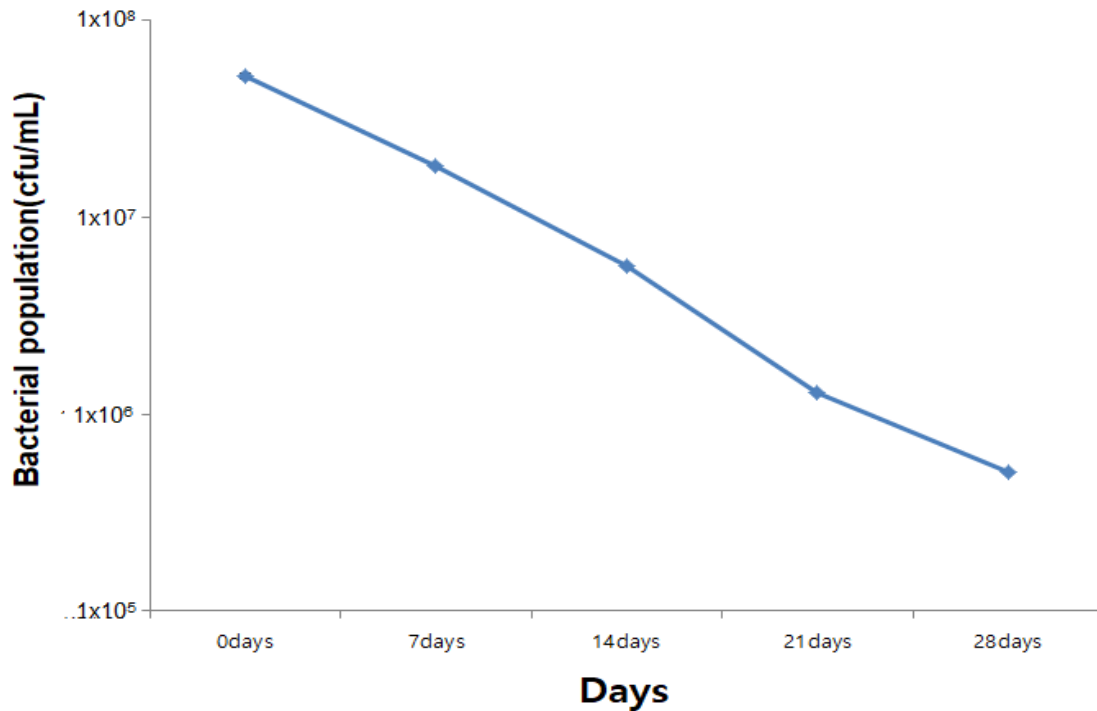


Fig. 10. Seasonal change of bacterial population of *Bacillus velezensis* MWS28 on 'Kyoho' grape fruit.

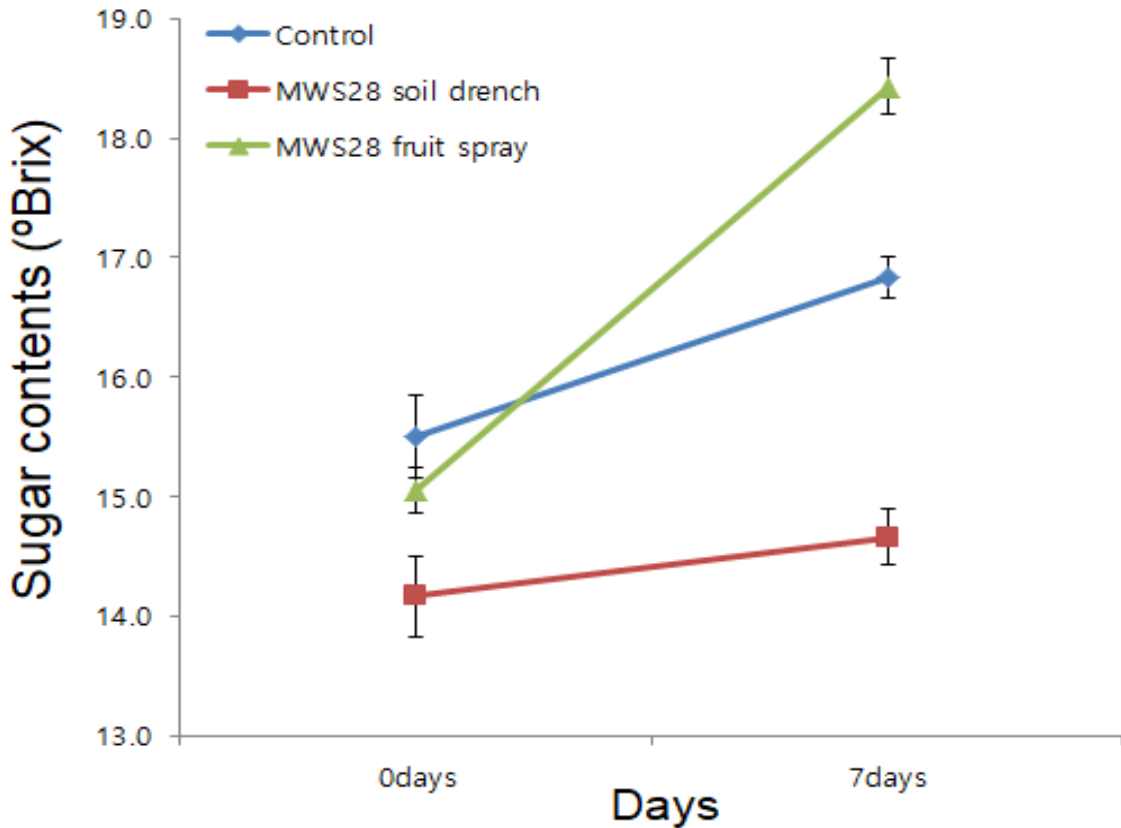
#### 차. *B. velezensis* MWS28 처리 시 포도 특성 조사

MWS28을 토양 관주와 과실 살포를 하고 7일 후에 품질 조사를 한 결과 과실의 직경은 Control에 비해 토양관주를 한 경우 4.2mm, 과실 분무살포를 한 경우 3.4mm가 더 컸다. 안토시아닌 함량은 Control에 비해 MWS28 분무살포가 2.5g% 높았지만, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 당도는 토양 관주가 가장 낮았고 분무살포가 무처리에 비해 1.6°Brix 정도 더 높았다(Table 16).

Table 16. Grape fruit promotion by treatment of a probiotic bacteria, *B. velezensis* MWS28 on 'Kyoho' variety in farm house(2018. Aug. 20)

Treatment	Berry diameter (mm)	Sugar contents (°Brix)	Anthocyanin (g%)
Control	23.0b	16.8b	3.3a
MWS28 Soil drench	27.2a	14.7c	3.6a
MWS28 Fruit spray	26.4a	18.4a	5.8a

특히 당도의 경우 처리 전과 처리 7일 후 조사한 결과 무처리는 1.3°Brix, 토양관주는 0.5°Brix, 과실 직접 분무살포는 3.3°Brix의 차이를 보였다(Fig. 11). 특이한 사항으로 MWS28 균주의 토양관주처리와 과실 직접살포는 포도의 크기를 3-4mm이상 증대시키는데 반하여 1주 후 당함량은 MWS28 균주의 관주처리가 14.7 브릭스로 무처리인 16.8 브릭스 보다 현저히 낮았다.

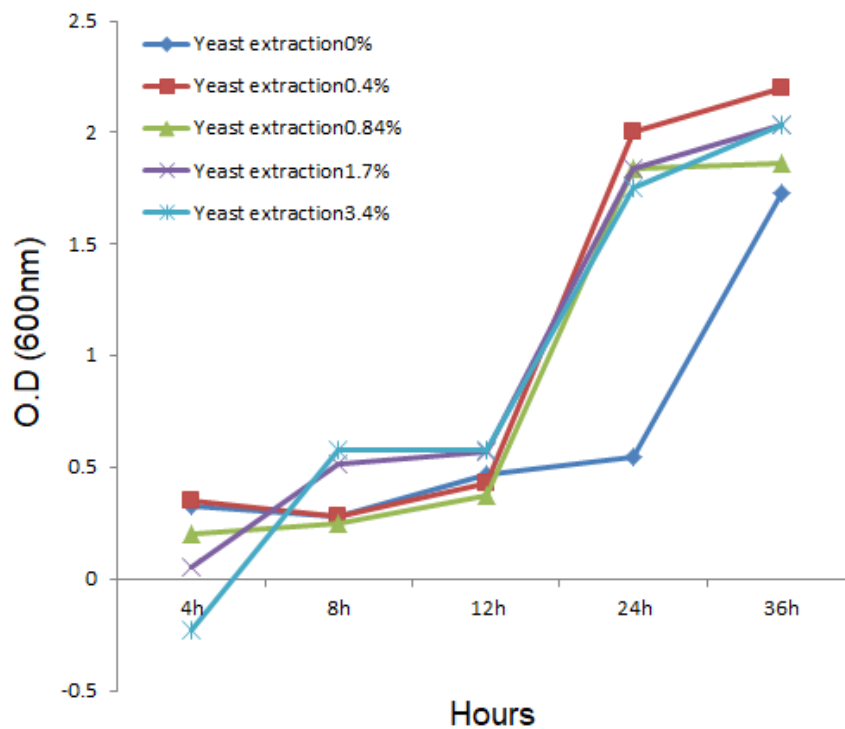


**Fig. 11. Seasonal change of sugar content in grape fruit by different application of a selective strain of *B. velezensis* MWS28**

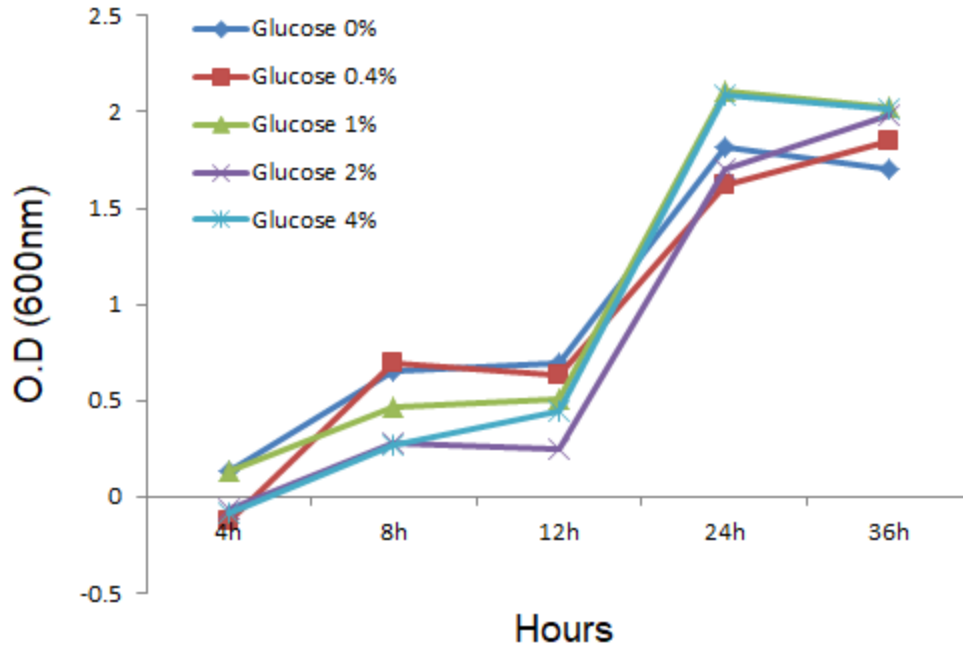
이와 같은 수치의 변화는 MWS28 균주가 토양 내 포도근권에 정착하여 면역 활성을 일으키기 때문으로 추정되며 실제로 MWS28 균주를 토양관주 후 조사시기를 조정하여 조사하면 토양관주 처리가 수량 면에서 월등 할 것으로 생각된다. 따라서 MWS28균주는 포도 흰 얼룩병의 방제효과 뿐 만 아니라 포도의 수량 및 품질 증대에도 영향을 끼칠 것으로 기대되며 효과 규명과 적용확대를 위한 후속 연구가 필요하다 (Fig. 11, Table 16).

### 카. *B. velezensis* MWS28의 대두박 액상배지 조성분 최적선발

Yeast extract 농도에 처리된 각각의 처리는 시간대 별로 spectrophotometer로 측정한 결과 36시간 째에는 0.4%에서 MWS28의 세포 농도가 가장 높았고 1.7%, 3.4%에서 비슷한 농도의 양상을 보였다. Yeast extract 0%에서는 가장 낮은 세균밀도를 나타내었다(Fig.12.). 따라서 MWS28 균주의 액상배양에는 0.4%의 yeast extract 첨가를 추천할 수 있다( Fig. 13).

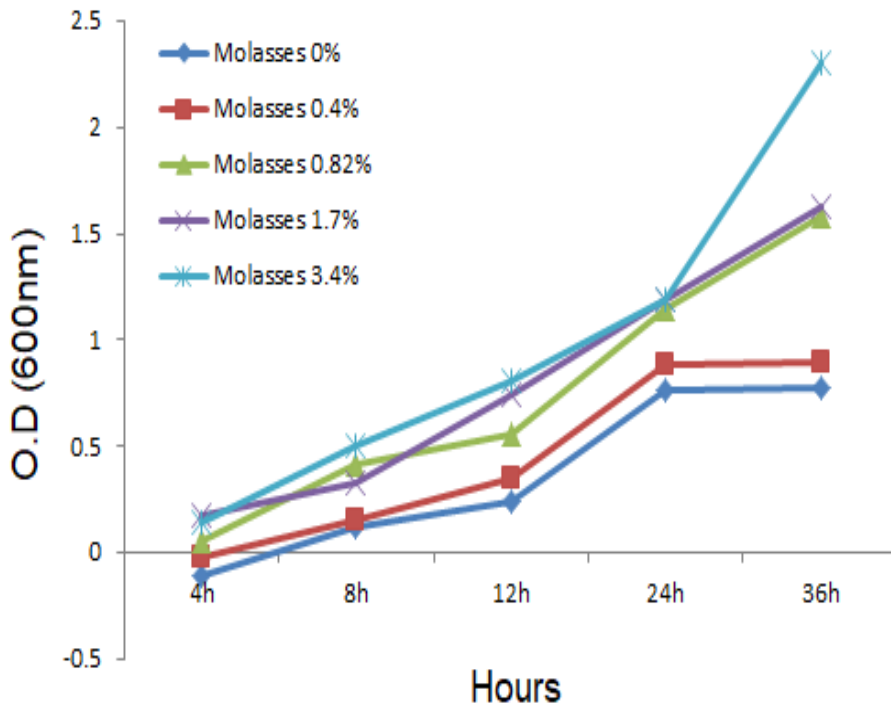


**Fig.12. Bacterial growth of MWS28 by different composition of yeast extracts in basal media**



**Fig.13. Bacterial growth of MWS28 by different composition of glucose in basal media**

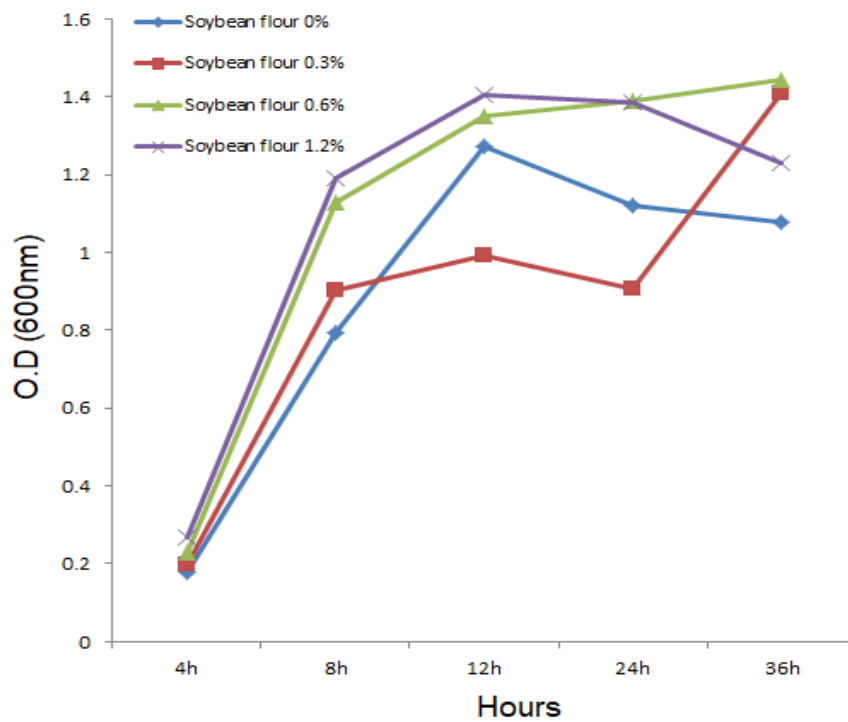
Glucose는 1%, 4%가 비슷한 성장을 보였고 36시간에서 1%에서 가장 높았다. 따라서 MWS28 균주의 탄소원으로서의 glucose 함량은 1%로 추천된다 (Fig 13).



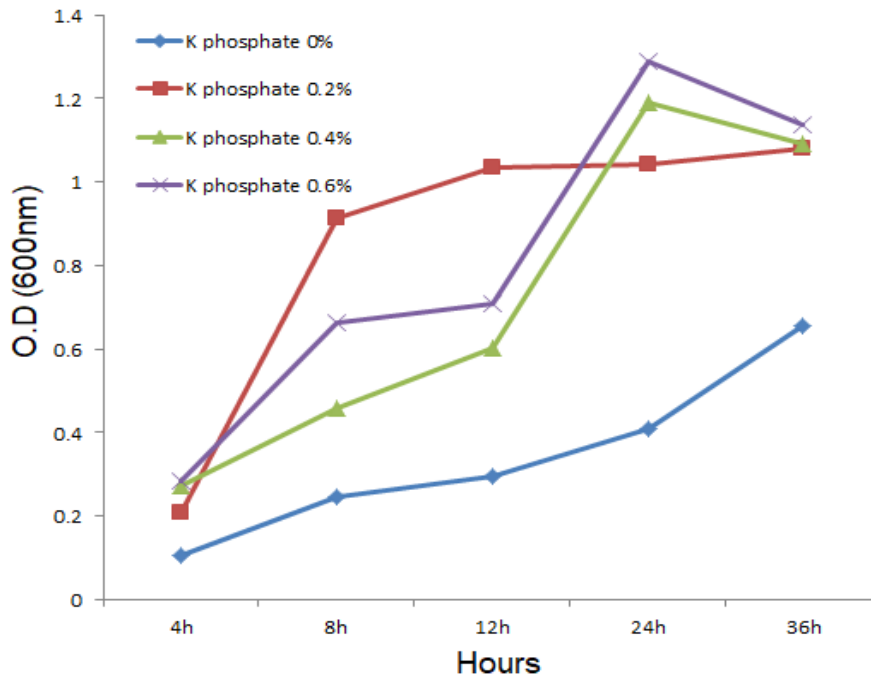
**Fig.14. Bacterial growth of MWS28 by different composition of molasses in basal media**

Molasses 조건에서 36시간에 spectrophotometer를 측정한 결과 0%에서 O.D값이 0.776이 나온 것에 비해 3.4%에서 2.297 값이 나온 것으로 보아 Molasses 3.4%, Yeast extract 0.4%, Glucose 1%가 대두박 액상배지 조성분으로 알맞은 것으로 보인다(Fig. 14).

Fig 12,13,14의 시험 결과를 토대로 Soybean flour와 K phosphate의 조성분을 최적화하여 배양 후 측정한 O.D값은 Fig.15 과 Fig.16 이다.



**Fig.15. Bacterial growth of MWS28 by different composition of soybean flours in basal media**



**Fig.16. Bacterial growth of MWS28 by different composition of K phosphate in basal media**

Soybean flour에서는 0.6%, 1.2%가 비슷한 O.D값을 보이 36시간에서 0.6%가 가장 높았으며 K phosphate에서는 0.6%가 가장 높은 O.D값을 나타냈다. 모든 조성분 시험에서 K phosphate가 0%일 때 O.D값이 가장 낮은 것으로 보아 *B. velezensis* MWS28의 생장에 가장 필요한 성분으로 생각된다.

포도 흰얼룩병은 주로 수확기 때 포도송이 표면에 발생하는 병으로 포도품질의 저하의 원인이 되나 수확기에 임박하여 발생하므로 화학약제의 사용이 어렵다. 따라서 본 연구는 선발된 MWS28를 이용하여 포도 흰얼룩병을 생물학적으로 방제하고자 하였다. MWS28 균주는 포도 흰얼룩병균인 *A. acutatum*과 *T. roseum*에 강력한 항균력을 보이며 16s rRNA 염기서열 분석 결과 *Bacillus velezensis* MWS28로 동정되었다. 어린 잎을 이용한 이들 두 원인균에 대한 MWS28 균주의 생물검정 결과는 포도송이를 이용한 포도 흰얼룩병 실험 결과와도 일치하여 간이검정법으로 활용 가능하였다. MWS28 균주와 0.02% PEMS 및 0.3% sodium alginate 복합처리는 MWS28 단독 처리보다 흰얼룩병 방제효과가 크게 증진되었다. 흰얼룩병 자연발생 포장에서의 MWS28 균주 복합처리제의 처리 효과는 방제가 72%였으며 이와 같은 결과는 생물학적 방제제로서는 매우 우수한 방제효율이었다. MWS28 균주의 포도과실처리

포도 흰얼룩병 방제 뿐만아니라 포도과실의 과육크기증대, 당도개선 및 숙기촉진등의 부가적인 효과가 검증되어 이에 대한 적용확대 연구가 필요한 실정이며 대량배양을 위한 배양시험 결과 yeast extract 0.4%, glucose 1%, molasses 3.4% 농도가 적정했으며 통합배지에서는 soybean flour 0.3-1.0% al K phosphate 0.6% 처리가 MWS28 균주의 세포수 증가에 유효하였다. 따라서, 본 연구에서 수행한 길항균 MWS28을 이용한 포도 흰얼룩병의 생물학적 방제제는 산업화하여 친환경 농업에서 성공적으로 쓰여질 수 있음을 의미한다.

## 2-3. 연구개발 성과

### ○ 논문게제 성과

- 게재년도: 2018
- 논문명: *Bacillus velezensis* MWS28을 이용한 포도 흰얼룩병의 생물학적 방제
- 저자명: 진소라, 이혜민, 남기웅, 박경석
- 학술지명 : 농약과학회지 Vol 22: 345-355, 비SCI

### ○ 특허 성과

- 출원: 2018
- 특허명: 신규한 바실러스 벨라젠시스 MWS28와 이를 포함하는 미생물 방제제 및 이를 생산하는 방법
- 출원인: 박경석, 남기웅, 진소라, 이혜민
- 출원국: 대한민국
- 기탁번호(출원번호): 10-2018-0157369

### ○ 기술요약 정보

- 연도: 2018
- 기술명: 신규한 바실러스 벨라젠시스 MWS28을 이용한 포도흰얼룩병을 친환경적으로 방제하는 방법 및 이를 제제화 생산하는 방법
- 기술의 완성도 : 특허출원(10-2018-0157369) 및 기술 이전하여 제품개발 중

### ○ 보고서원문:

- 연도: 2018



- 보고서 구분: 최종
- 발간일 : 2019. 3. 25
- 발간등록번호 : 11-1543000-002587-01

○ 생명정보

- 균주기탁: 2018, KACC 81077
- 유전정보등록 : 2018. NCBI MK208682

## 2-4. 연구결과

○ 기술적 성과

- 바실러스 균을 이용한 친환경 미생물제는 주로 토양병해용으로 개발되었으나 지상부 병의 방제용으로는 아직 충분히 효과있는 제제가 개발되지 못하고 있는 실정에 있다. 더구나 과수용 생물적방제제로 개발된 예는 매우 드물고 효과도 미흡한 실정에 있다. 본 제제는 내생포자를 형성하여 장기간 생존하는 바실러스 벨레젠시스 MWS28균주로 새로이 특허 출원되었으며 포도 흰얼룩병에 대한 항균력이 우수하고 농가포장에 처리 하였을 경우 화학약제와 유사한 방제효과를 나타낸다. 본 제제는 기존의 미생물제의 단점을 첨가제의 복합기술을 통하여 방제가를 증강시켜 농가 활용이 가능 할 수 있도록 기술경쟁력을 높였다.

○ 경제적 성과

- 포도는 국내의 경우 주로 생식용으로 소비되는 과실로 수확기에 주로 발생하는 포도 흰얼룩병방제를 위하여 화학약제를 사용해야하는 문제점이 있으나 본 병해방제효율을 증폭시킨 MWS28균주 복합처리제의 개발로 포도 생식과의 농산물 안정성에 기여하며 안전한 먹거리 생산을 위한 다른 농작물에의 적용 시험도 필수적이다. 이와 같은 효과로 포도농가에 사용되는 친환경방제 농약의 수입 대체효과 뿐 아니라 차후 수출도 가능 할 것으로 생각된다. 또한 비비코리아(주)에 기술이전하여 포도흰얼룩병 방제제로 시판 할 예정이다.

## 2-5. 사업화성과 및 매출실적

### ○ 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	역원
			향후 3년간 매출	역원
		관련제품	개발후 현재까지	역원
			향후 3년간 매출	역원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

### ○ 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간 (년)		1년		
	소요예산 (백만원)		5천만원		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			없음		
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	500,000천	1,000,000천
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		액상수화제, 분말수화제 입제제형 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체 (내수)				
	수 출				

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

기 선발된 바실러스 균주를 이용하여 포도 흰얼룩병의 방제기술 최적화를 위한 제품화 효능 검정과 작용스펙트럼 구명을 통한 농가포장 실증검정을 수행하고 고효성의 포도흰얼룩병 방제용 수화제 개발을 목표로 하였다.

#### 3-2. 목표 달성여부

선발된 MWS28 균주는 16s RNA 분석결과 *Bacillus velezensis*로 동정되었으며 포도 흰얼룩병에 대한 탁월한 방제효과로 특허출원 (출원번호:10-2018-0157369) 하였다. 개발된 MWS28균주는 알진염 복합제제로 기존의 제제보다 탁월한 방제효율을 높일 수 있었으며 포도 흰얼룩병에 대한 방제효율은 70%이상의 효율을 나타내었다. MWS28 제제는 포도 흰얼룩병 방제효과 뿐만 아니라 부가적으로 포도과실의 비대생육촉진과 당도증가 등의 품질개선과 수량증대 효과도 확인 할 수 있었다. 성과목표인 특허출원 1건, 제품화 1건(기술이전포함), 비 SCI 1건과 학술발표 2건 등이 계획대로 완료되었으며 학술발표1건과 유전정보 및 자원각1건씩을 초과 달성하였다. 성과목표별 가중치로서 기 선발 고효성 *B. amyloliquefaciens* MWS28균주와 방제가 증진용 스티커 등을 첨가한 고효성미생물 복합제를 선발하여 포도흰얼룩병 (*Acremonium acutatum*, *Trichothecium roseum*)에 대한 친환경 생물방제제 개발은 가중치 30%로 무리 없이 수행되어졌으며 가중치 40%로 본 연구의 핵심 목표인 포도 흰얼룩병 방제기술 최적화를 위한 제품화 효능 검정과 작용스펙트럼 구명을 통한 농가포장 실증검정도 원활히 수행되어 졌다. 또한 고효성의 포도흰얼룩병 방제용 복합 액상수화제 개발 연구를 기반으로 한 1건의 산업재산권이 출원되었으며 동시에 민간기업에 기술이전하였으며 토양미생물제 등록은 3월 말까지 허가취득 예정이다.

#### 3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

기술이전 된 MWS28 제제의 토양미생물제로의 제품허가를 추진 중이며 허가와 동시에 농가보급을 추진 할 예정에 있다. 본 연구를 통하여 도출된 MWS의 부수적 효과는 농업생산에 매우 유효 할 것으로 생각되므로 MWS28 균주 처리에 의한 포도의 수량증대 및 품질개선의 효과를 극대화하기 위한 처리시기 및 처리횟수 등의 농가 실증검정이 필요하며 예상되는 MWS28균주 처리에 의한 식물면역활성 규명을 통한 방제효율의 극대화 연구가 필요하다.

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

포도 흰얼룩병은 주로 수확기 때 포도송이 표면에 발생하는 병으로 포도품질의 저하의 원인이 되나 수확기에 임박하여 발생하므로 화학약제의 사용이 어렵다. 기 선발된 MWS28 균주는 포도 흰얼룩병균인 *A. acutatum*과 *T. roseum*에 강력한 항균력을 보이며 16s rRNA 염기서열 분석 결과 *Bacillus velezensis* MWS28로 동정되었다. 어린잎을 이용한 이들 두 원인균에 대한 MWS28 균주의 생물검정 결과는 포도송이를 이용한 포도 흰얼룩병 실험 결과와도 일치하여 간이검정법으로 활용 가능하였다. MWS28 균주와 0.02% PEMS 및 0.3% sodium alginate 복합처리는 MWS28 단독 처리보다 흰얼룩병 방제효과가 크게 증진되었다. 흰얼룩병 자연발생 포장에서의 MWS28 균주 복합처리제의 처리 효과는 방제가 72%였으며 이와 같은 결과는 생물학적 방제제로서는 매우 우수한 방제효율이었다. MWS28 균주의 포도과실처리는 포도흰얼룩병 방제 뿐만아니라 포도과실의 과육크기증대, 당도개선 및 숙기축진등의 부가적인 효과가 검증되어 이에 대한 적용확대 연구가 필요한 실정이며 대량배양을 위한 배양시험 결과 yeast extract 0.4%, glucose 1%, molasses 3.4% 농도가 적정했으며 통합배지에서는 soybean flour 0.3-1.0% 와 K phosphate 0.6% 처리가 MWS28 균주의 세포수 증가에 유효하였다. 따라서, 본 연구에서 수행한 길항균 MWS28을 이용한 포도 흰얼룩병의 생물학적 방제제는 산업화하여 친환경 농업에서 성공적으로 쓰여질 수 있음을 의미한다. 농가 실증 시험을 거쳐 제조된 고효성 미생물제제의 특허출원(10-2018-0157369)과 기업체 기술이전(비비코리아)을 완료하여 시제품 출시와 제품화를 추진 중이다. 연구결과는 2018년 한국농약과학회지에 게재하였으며 균주기탁 및 유전정보도 생물자원 정보로 등재하였다.

포도과실에서의 점착성을 높일 수 있는 친환경 보조제를 첨가한 복합제형의 개발로 기존 미생물제의 단점을 극복 시킬 수 있었다. 포도 수확철에 과실표면에 대발생하여 포도의 당도감소 및 상품가치를 떨어뜨리는 포도 흰얼룩병의 친환경방제제 개발로 포도재배 농가의 생산성 증대와 농가 소득 증대에 기여할 것이다. 또한 포도 수확기에 발생하는 포도얼룩병을 미생물 제제로 친환경적으로 방제하므로 생식용 포도의 품질향상과 농산물안전성을 확보하였다.

## 참고문헌

- Bashan, Y. (1987) Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* 51(5):1089-1098.
- Borriss, R., A. Danchin, C. R. Harwood, C. Medigue, P. C. Eduardo, P.C. Sekowska, and D. Vallenet (2018) *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement. *Microbial Biotechnology* 11(1):3-17.
- Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, and R. Sussmuth (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.* 140: 27-37
- Chenna R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.G. Higgins and J.D. Thompson (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.*31(13):3497-3500.
- Chun, J., J.H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim and Y.W. Lim (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:2259-2261.
- Chun, B. H., K.H. Kim, S.E. Jeong, and C.O. Jeon (2019). Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group—*B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*—revealed by pan-genome analysis. *Food microbiology*, 77:146-157.
- Dunlap, C. A., Kim, S. J., Kwon, S. W., & Rooney, A. P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzaicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3):1212-1217.
- Fan, B., J. Blom, H-P. Klenk, R. Borriss (2017) *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology* 22(8):1-18.

- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4):783-791.
- Furuya, S., M. Mochizuki, Y. Aoki, H. Kobayashi, S. Suzuki, T. Takayanagi, and M. Shimizu (2011) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. *Biocontrol Science and Technology* 21:705-720.
- Gent, D. H., H. F. Schwartz and S. J. Nissen (2003) Effect of commercial adjuvants on vegetable crop fungicide coverage, absorption and efficacy. *Plant Dis.* 87:591-597.
- Guo J. H., C. H. Jiang, P. Xie, Z. Y. Huang and Z. H. Fa (2015) The plant healthy and safety guards plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Transcriptomics* 3: 109.
- Han, K. S., S. C. Lee, J. S. Lee, and J. W. Soh (2012) First report of pink mold rot on Tomato fruit caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) in Korea. *Res. Plant Dis.* 18:396-398.
- Hiradate, S., S. Yoshida, H. Sugie, H. Yada, and Y. Fujii (2002) Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry* 61:693-698.
- Kloepper, J. W., C.M. Ryu and S. Zhang (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.
- Kwon, J. H., S. W. Kang, J. T. Lee, H. K. Kim, and C. S. Park (1998) First report of pink mold rot on matured fruit of *Cucumis melo* caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) link ex gray in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 14:642-645.
- Kwon, J. H., H. S. Lee, S. L. Choi, C. Y. Cho, O. H. Choi, H. S. Cho, and C. K. Shim (2013a) Pink mold rot on Asian pear (*Pyrus serotina* Rehder) caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) link ex gray in Korea. *Korean J. Organic Agric.* 21:373-380.
- Kwon, J. H., D. W. Kang, O. H. Choi, and H. S. Shim (2013b) Pink mold rot on Unshiu orange (*Citrus unshiu* Mac.) caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) link ex gray in Korea. *Res. Plant Dis.* 19:226-228.
- Lee S. Y., H. Y. Weon, J. J. Kim, J. H. Han, and W. G. Kim 2013a. *Biological Control*

- of cucumber powdery mildew by *Bacillus amyloliquefaciens* M27. The Korean Journal of Mycology. 41(4):268-273.
- Lee S. Y., H. Y. Weon, J. J. Kim, and J. H. Han 2013b, Cultural characteristics and mechanism of *Bacillus amyloliquefacien* subsp. *plantarum* CC110 for biological control of cucumber downy mildew. The Korean Society of Pesticide Science 17(4):428-434.
- Lumsden, R. D. and J. C. Locke (1989). Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless Mix. Phytopathological Society 79:361-366.
- Maget, D. R., L. Thimon, F. Peypoux, and M. Ptak (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. Biochimie. 74:1047-1051.
- Maachia, B., E. Rafik, M. Chérif, P. Nandal, T. Mohapatra, and P. Bernard (2015) Biological control of the grapevine diseases 'grey mold' and 'powdery mildew' by *Bacillus* B27 and B29 strains. Indian Journal Experimental Biology 53:109-115.
- Mclaughlin, R. J., C.L. Wilson, S. Droby, R. Ben-Aie and E. Chalutz (1992) Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. Plant Disease 76:470-473.
- Oh, S. Y., K. W. Nam and D. H. Yoon (2014a) Identification of *Acremonium acutatum* and *Trichothecium roseum* isolated from grape with white stain symptom in Korea. Mycobiology 42:269-273.
- Oh, S. Y., K.W. Nam and D. H. Yoon (2014b) Ecological characteristics of white stain symptom on the grape in Korea. Korean Journal of Environmental Agriculture 33:178-183.
- Ongena, M., and P. Jacques (2009) *Bacillus lipopeptides*: Versatile wapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16(3):115-25.
- Pretorius, D., J.V. Rooyen and K.G. Clarke (2015) Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. New Biotechnology 32:243-252.
- Ramirez, C. A., and J. W. Kloepper (2010) Plant growth promotion by *Bacillus*



- amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils* 46:835-844.
- Saitou N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol.* 4(4):406-25
- Tanaka, K., Y. Amaki, A. Ishihara and H. Nakajima (2015) Synergistic effects of [Ile<sup>7</sup>]surfactin homologues with Bacillomycin D in suppression of gray mold disease by *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol strain SD-32. *J. Agric. Food Chem.* 63:5344-5353.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731-9.
- Yang, T., Z. Rao, X. Zhang, Q. Lin, H. Xia, Z. Xu, and S. Yang (2011) Production of 2,3-butanediol from glucose by GRAS microorganism *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Basic Microbiol.* 51:650-658.
- Yu, G. Y., J. B. Sinclair, G. L. Hartman and B .L. Bertagnolli (2002) Production of Iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* 34:955-963.
- Zhou, T., K. E. Schneider and X .Z. Li (2008) Development of biocontrol agents from food microbial isolates for controlling post-harvest peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*, *International Journal of Food Microbiology* 126:180-185.
- Zhang, X., Y. Zhou, Y. Li, X. Fu and Q. Wang, Q.(2017) Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection* 96:173-179.