

GOVP1200102574 581.2  
L2937

최 중  
연구보고서

길항균을 이용한 심비디움속 난의 시들음병 방제에 관한 연구  
Control of Fusarium wilt on *Cymbidium* genus orchids  
by using the antagonistic isolates

제주대학교

농 립 부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “길항균을 이용한 심비디움속 난의 시들음병 방제에 관한 연구”

과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 . . . .

주관연구기관명 : 제주대학교

총괄연구책임자 : 소 인 섭

연 구 원 : 고 태 신

연 구 원 : 현 재 욱

연 구 원 : 최 성 원

위탁연구기관명 : 그린바이오텍

위탁연구책임자 : 최 기 현

# 요 약 문

## I. 제 목

### 길항균을 이용한 심비디움속 난의 시들음병 방제에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리 나라에서 사용되는 새로운 농약은 대부분이 외국에서 수입되고 있으며 우리나라에 1989년 물질특허제도가 도입됨에 따라 유용한 신물질에 또는 미생물 사용에 대해 막대한 기술료를 지불해야만 사용할 수 있다. 그러나 현재 세계적 추세로 볼 때 유기 합성농약의 개발보다는 생활 환경 보전 측면에서의 생물적 방제 즉 천연 산물의 추출액 혹은 천적을 이용한 병충해 방제에 연구의 초점이 모아지고 있다. 따라서 우리 농업 환경 주변에서 가장 많이 발생하는 시들음병(*Fusarium oxysporum* 혹은 *Erwinia carotova*)은 난류 재배에도 치명적인 손실을 초래하므로 이들 균에 길항하는 자연 존재의 유익균류를 자연에서 채취하여 효과적인 방제를 한다는 것은 앞으로 제주도 혹은 우리 나라 난 산업 발전에 지대한 성과를 이룰 수 있겠다. 따라서 우수한 길항 미생물을 선발하여 실제 농업 생산에 이용하기 위해서는 미생물 동정 과 특성 연구를 기초로 하여 이와 관련된 기반 기술을 습득 할 수 있다. 분리된 우수 균주를 실제 농업에 사용하기 위해 배양기술과 우수 균주 선별, 최적 살포시기 및 식물재배 형태나 생육시기별 적용방법을 연구하여야 할 것이다. 또한 개발된 미생물 자체가 저

렴하고, 간편하게 사용할 수 있게 하기 위해 생산 방법 개선, 안정성 높은 포장 및 방법 등을 개발하여야겠다.

우리 나라 난 농가가 일년에 부패병에 의하여 폐기하는 재료 식물의 피해액은 100억 정도이며 아직까지 유효 적절한 농약이 없으므로 만약 길항 미생물을 이용하여 부패병을 방제할 수 있다면, 또한 미생물 배양액을 시비할 경우 난의 생장은 우수하리라 사료된다. 이와 같이 개발된 길항 미생물은 시설 고급 재배형 작물에 다양하게 이용될 수 있다. 더불어 선진국의 기술보호 정책 때문에 이제 기술 도입비는 막대하여 필요한 부분에 대한 연구는 각국마다 독자적으로 개발하여야 한다.

난은 품종이 다양하고 단일 품종 시장이 거대하지 못해 내병성 품종이나 유기합성 농약의 개발이 제한되어 있지만, 길항 미생물을 사용했을 때에는 저렴하고 간편하며 안전하게 사용할 수 있다. 또한 지금까지 우리 국내의 몇몇 연구는 일반 발작물을 대상으로 수행되었기 때문에 균주 살포 혹은 주입 후의 활성 저하로 인하여 실효성이 인정 될 수 없었지만 난류의 경우에는 우선 고소득 작목으로서 하우스 내에서 재배되어야 하며 심지어는 식재 매질도 인위적으로 조절된 인공 토양을 사용하여야 하므로 균주의 사용시 미생물의 활성 저하 혹은 퇴화를 방지할 수 있는 방안이 타 작물과 달리 근본적으로 다르다는 이점이 있다.

길항 미생물을 이용한 방제 방법은 유기 화학 농약에 비해 인체에 아주 안전하다. 더욱이 난은 밀폐된 온실에서 재배되기 때문에 많은 유기합성 농약은 사용시 중독 위험성이 아주 높다. 또한 우리 나라 농부에게서 가장 많이 발생하는 질병이 온실에서 무기력 증세로 보고된 바 있어 온실에서의 합성농약 살포는 상당히 위험하다. 문화수준의 향상과 환경적 관심의 고조로 무공해 농약의 출현이 절실히 요구되고 있다. 생활 수준의 향상으로 고가의 난이 많은 애란인들에 의해 소장되고 있으며 부패병의 피해로 많은 피해가 따르고 있고 고액의 부패병 치료제가 일본 상품으로 수입되어 일부 사용되는 실정인 바 만약 우리 기술과 연구진에 의한 효과적 부패병 방제 체계가 우리 나라에 토착될 수 있다면 국내 애란인들에 대한 우리 기능의 우위성이 확인되어 앞으로 국민적 우월감을 고취시킬 수 있는 한가지 사례로서 작용 할 수 있음을 확신한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 심비디움 속 난에 치명적으로 상해를 입히는 시들음병에 길항하는 균을 개발하여 생물학적 방제의 가능성과 실례를 제시하고자 한다.

난 부패병 방제에 효과가 우수하고 인체와 환경에 무해하며 *in vitro* 및 실제 난 재배 온실에서도 효과가 뛰어난 자연 존재의 유익 미생물을 토양에서 채취하고 동정하여 병원성균에 대한 길항력이 높은 균주를 종류별로 선별한다. 선별된 길항미생물은 심비디움속 난들에 대한 포장 시험을 통하여 항균 효과가 높은 균주를 이차 선별하고 미생물을 직접 농업용으로 개발하든지 또는 배양후 배양액에서 2차대사 산물인 항균제를 추출하여 분리한다.

(1) 길항균의 부패병 원인균이 *Fusarium oxysporum*인지 *Erwinia carotova*인지 정확한 기작을 밝히고 원인 병원균에 적합한 길항 미생물을 선별한다.

(2) 선별된 길항 미생물을 저렴하게 생산하기 위한 배지 개발 및 안정된 활성을 나타내기 위한 조건을 개발한다.

(3) 길항균별 도포처리 방법 및 방제가를 연구한다.

(4) 단일 길항균 및 여러 효과높은 균을 혼합하여 길항 효과를 검토하고 활성이 높은 길항균배합 조건을 확립한다.

(5) 선별된 길항균을 동정하여 고효성 신종 미생물로 확인되는 경우에는 물질 특허를 출원하여 벤처기업의 창업을 도모한다.

※ 연차별 연구개발목표와 내용

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (1997)	길항균의 순수 분리, 부패병 활성검정 및 바이러스 병해조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 길항균의 분리 및 동정(한라산 자생지 토양)</li> <li>0 재배 난에서 병원균 분리 및 동정</li> <li>0 길항균의 선별 및 양균 활성화 측정법 확립</li> <li>0 분리된 길항균에 대한 식물적용도 검사(포장시험 확대)</li> <li>0 부패병과 바이러스병에 강한 품종 조사 및 피해조</li> </ul> <p>사(연중)</p>
2차년도 (1998)	부패병을 일으키는 기 작연구, 길항균의 실 험실내 활성 검증 및 바이러스병 분리동정 과 간이 식별법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 길항미생물의 최적 배양조건 확립</li> <li>0 실험실내 검정법 확립 및 병원균의 발병기작 구명</li> <li>0 난에 유해한 바이러스 동정 및 tissue blotting법 개발</li> <li>0 들연변이 유발원에 의한 균주개발</li> <li>0 길항균을 첨가한 화분식재매질 개발(포장시험)</li> </ul>
3차년도 (1999)	부패병 방제 기술의 확립, 대량배양 조건, 포장화 및 바이러스 병 종합방제 대책 확 립	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 혼합 길항균을 이용한 검정 실험</li> <li>0 대량배양 조건 확립 및 포장화</li> <li>0 균주별 포장처리 방법 및 방제가 연구</li> <li>0 타종 식물종에 대한 적용성 및 처리 기술 개발</li> <li>0 바이러스병에 의한 품질저하 대책 및 방제 대책 수립</li> </ul>

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 실험은 난재배에 있어서 가장 큰 장애요인인 난 썩음병균을 분리, 동정하고 이들에 대해 항균활성을 보이는 길항균을 분리하며, 분리된 길항균을 이용하여 난 썩음병을 방제하고자 실시하였다.

이병된 잎과 별브로부터 2가지 병원균이 분리되었으며 이들을 분리 동정한 결과 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae*와 *Erwinia carotova*로 동정되었다. Perfusion chamber를 이용하여 병원성을 검정해본 결과 *F. oxysporum* f. sp. *cattleya* 가

*Erwinia carotova* 훨씬 병원력이 강하였으며 2종의 병원균의 혼합처리는 더 강한 병원력을 가졌다.

제주도내 난 자생지 및 재배토양의 총 125개 토양시료로부터 시들음병균 (*F. oxysporum* f. sp. *cattaleya*)에 길항효과가 있는 방선균과 세균을 각각 15개 씩 분리하였으며 TSA배지에서 난시들음병균에 대한 균사생장 억제정도를 조사한 결과 억제율이 25 %에서 65 %이었으나 난 무름병균(*Erwinia carotova*)에 대한 생장 억제율은 미미하였다. 이들 길항균들을 동양계, 그리고 서양계통의 심비디움에 처리하였을 때 아무런 해가 없었으며, 이들중 특히 톱밥-유채박-미강(4.5:4.5:1, w/w/w)배지에 배양하여 코코넛 피트에 10%로 첨가된 길항균 A-12 균주는 시들음병에 대해서 뚜렷한 방제 효과가 있었으며 난의 생장을 촉진시켰다.

또한 선발된 길항균 SS-4 와 GBB-55균주들의 타 작물에 대한 적용성 검토를 위하여 정식된 지 1주일 후에 길항균들을 살포한 결과 오이의 잎마름병에 대해서는 길항균 SS-4와 GBB-55가 각각 93.8%와 90%의 방제가를 보였으며 이 두가지 길항균을 혼용하였을 경우에는 100%의 방제가를 보였다. 또한 잣빛곰팡이병에 대해서는 길항균 SS-4와 GBB-55가 각각 92.9% 와 85.7%의 방제가를 보였으며 혼용인 경우는 97.2%의 방제가를 보였다.

이들 길항균 GBB-55균주와 SS-4균주에 대해서 Bergey's manual 과 ISP (International Streptomyces Projects) 방법에 따라 동정을 실시해본 결과 각각 *Bacillus subtilis* 와 *Streptomyces* sp.로 동정되었다.

*B. subtilis* GBB-55의 제제화를 위한 최적 배양 조건을 알아본 결과 탄소원과 질소원으로 글라이세롤과 콩가루(soybean meal)를 가장 잘 이용하였으며, 또한 안정적인 내성포자 형성을 유도하기 위하여 10mM의  $Ca^{2+}$  첨가와 배양개시 12-14시간 후에 50  $\mu$ M의 DPA첨가가 효과적이었다.

*Streptomyces* sp. SS-4 균주는 PDB (감자 200g, Dextrose 20 g)배지에서 가장 항균활성이 우수하였으며 84시간 이상 배양해야만 최대의 항균 활성물질이 생성되었다. 또한 항균물질의 생산에는 질소원으로 yeast extract, 탄소원으로 starch 그리고 미량 원소로는 Co가 가장 효과적이었다.

*B. subtilis* GBB-55의 제제화를 위해서 콩비지의 이용을 검토하였으며, *Streptomyces* sp. SS-4균주의 경우는 안정성을 유지하기 위하여 보존재로 propionic acid를 첨가하였고 vermiculite를 담체로한 고체 배양법을 고안하였다. *Streptomyces* sp. SS-55가 생산하는 항균물질은 pH 3.0에서 부탄올로 추출하고 각종 크로마토그래피를 이용하여 구조를 분석하였다.

난 재배에 있어서의 또 하나의 커다란 장애물인 바이러스병의 보다 효율적인 진단을 위해서 tissue blotting법을 개발하였으며 이방법으로 난 재배농가로부터 바이러스 증상을 보이는 시료들을 진단해 본 결과 50%가 ORSV와 CyMV로 복합 감염되었으



며 40%가 이들중 하나에 의해 감염된 것으로 밝혀졌다.

따라서 난 재배에 있어서 가장 큰 장애 요인들인 썩음병과 바이러스병은 본 실험에서 개발된 길항균을 이용한 생물적 방제와 tissue blotting을 이용한 바이러스병의 정확한 진단을 실시하여 바이러스 이병주를 조기에 제거한다면 난재배 농가에 커다란 도움이 될 것으로 생각된다.

또한 식물 virus병의 주요매개인 진딧물의 동계철 월동기주 식물이 조록나무인 것을 확인하였으며 이들에 대한 해충의 생활사를 파악하므로써 앞으로 진딧물 발생을 근본적으로 차단할 수 있는 방제책을 마련할 기초 자료를 조사 완료하였다.

따라서 본 연구의 결과에서 확인한 바와 같이 심비디움속 난의 시들음병 방제는 물론 실내재배시 해악을 미치는 오이 흑성병 방제에도 탁월한 효과가 있으므로 앞으로의 활용도는 클것으로 기대되며 본 연구의 최종결과로 얻어진 *Streptomyces Kasugaensis* GBA-0927 SS-4 균주는 현재 대한민국 특허청에 특허를 출원중에 있으므로 앞으로 생물학적 방제제로서 상품의 개발이 기대된다. 따라서 현재 특허출원중에 있을 정도로 역가가 높은 균을 찾아낸 바 이들을 이용한 상품개발은 필수적이다 (협동연구기관 : 그린바이오텍 주관).

## SUMMARY

### (영문요약문)

These studies were carried out to isolate and identify the pathogens caused to the rot of orchid plants, and control the orchid plant wilt with antagonistic microorganisms isolated from soil.

It was proven that the rot of orchid plant was caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae* and *Erwinia carotovora* by isolation from diseased leaves and bulbs and identification. In pathogenicity test by using perfusion chamber, *F. oxysporum* f. sp. *cattleyae* had stronger pathogenicity, and co-inoculation with *F. oxysporum* f. sp. *cattleyae* and *Erwinia carotovora* showed far stronger.

Each of fifteen isolates of actinomycetes and bacteria were selected from 125 soil samples of orchid grown soils, wild or cultural condition in Jeju Island. Percent inhibition of these isolates against mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *cattleyae* were 25 % to 65 % on TSA medium but it was a few against *Erwinia carotovora*.

The wilt of orchid plants was clearly protected by treatment with antagonistic microorganism 'A12' cultivated in sawdust-rape waste-rice bran (4.5:4.5:1, w/w/w) medium and the isolate promoted plant growth.

And antagonistic microorganism *Bacillus subtilis* GBB-55 and *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 showed protective effect against leaf blight and gray mold of cucumber plant. The protective value was 93.8 %, 90.0% and 100% in leaf blight of cucumber plant by treatment of antagonist *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 , *Bacillus subtilis* GBB-55 and mixed with two, respectively. In gray mold of cucumber, 92.9 %, 85.7 % and 97.2 % of the protective value showed by treatment of antagonist *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 , *Bacillus subtilis* GBB-55 and mixed with two, respectively.

Antagonistic microorganism *Bacillus subtilis* GBB-55 and *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 with high antagonistic effect were identified to *Bacillus*

*subtilis* and *Streptomyces* sp. according to Bergey's manual and ISP (International *Streptomyces* Projects), respectively. Optimum growth of *Bacillus subtilis* GBB-55 was obtained in a medium with glycerol and soybean meal as a source of carbon and nitrogen. And the medium added with 10 mM Ca<sup>2+</sup> or addition of 50 μM DPA 12-14 hr after culture stably induced the endospores.

The *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 showed highly antifungal effect in PDB medium (peeled potato 200g, dextrose 20g) and its maximum production of antifungal substances needed culture of 84 hr or more. And yeast extract, starch and cobalt were selected as the most productive source of carbon, nitrogen and mineral ingredient, respectively.

For the practical use of the *Bacillus subtilis* GBB-55, bean-curd refuse was used and solid culture using the vermiculate and propionic acid for the preservative was developed for *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927.

The structure of the antifungal substances from *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 extracted with butanol at pH3.0 is analyzing by using various type of chromatography.

We developed the tissue blotting method for the effective diagnosis of orchid viruses and applied this technique to field samples showing virus symptom. As a results, it was elucidated that 50 % were infected with ORSV and CyMV, 40 % ORSV or CyMV among samples showing virus symptom collected from field.

Therefore, we think that the fusarium-wilt and virus diseases of orchid plants can be controlled by biological control with antagonists developed in this study and diagnosis by tissue blotting method.

## (국문요약)

본 실험은 난재배에 있어서 가장 큰 장애요인인 난 썩음병균을 분리, 동정하고 이들에 대해 항균활성을 보이는 길항균을 분리하며, 분리된 길항균을 이용하여 난 썩음병을 방제하고자 실시하였다.

이병된 잎과 벌브로부터 2가지 병원균이 분리되었으며 이들을 분리 동정한 결과 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae*와 *Erwinia carotovora*로 동정되었다. Perfusion chamber를 이용하여 병원성을 검정해본 결과 *F. oxysporum* f. sp. *cattleya*가 훨씬 병원력이 강하였으며 2종의 병원균의 혼합처리는 더 강한 병원력을 가졌다.

제주도내 난 자생지 및 재배토양의 총 125개 토양시료로부터 시들음병균 (*F. oxysporum* f. sp. *cattleya*)에 길항효과가 있는 방선균과 세균을 각각 15개 씩 분리하였으며 TSA배지에서 난시들음병균에 대한 군사생장 억제정도를 조사한 결과 억제율이 25 %에서 65 %이었으나 난 무름병균(*Erwinia carotovora*)에 대한 생장 억제율은 미미하였다. 이들 길항균들을 동양계, 그리고 서양계통의 심비디움에 처리하였을 때 아무런 해가 없었으며, 이들중 특히 톱밥-유채박-미강(4.5:4.5:1, w/w/w)배지에 배양하여 코코넛 피트에 10%로 첨가된 길항균 A-12 균주는 시들음병에 대해서 뚜렷한 방제 효과가 있었으며 난의 생장을 촉진시켰다.

또한 선발된 길항균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 와 *Bacillus subtilis* GBB-55균주들의 타 작물에 대한 적용성 검토를 위하여 정식된 지 1주일 후에 길항균들을 살포한 결과 오이의 잎마름병에 대해서는 길항균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927과 *Bacillus subtilis* GBB-55가 각각 93.8%와 90%의 방제가를 보였으며 이 두가지 길항균을 혼용하였을 경우에는 100%의 방제가를 보였다. 또한 잣빛곰팡이병에 대해서는 길항균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927과 *Bacillus subtilis* GBB-55가 각각 92.9% 와 85.7%의 방제가를 보였으며 혼용인 경우는 97.2%의 방제가를 보였다.

이들 길항균 *Bacillus subtilis* GBB-55균주와 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927균주에 대해서 Bergey's manual 과 ISP (International *Streptomyces* Projects) 방법에 따라 동정을 실시해본 결과 각각 *Bacillus subtilis* 와 *Streptomyces* sp.로 동정되었

다.

*Bacillus subtilis* GBB-55의 제제화를 위한 최적 배양 조건을 알아본 결과 탄소원과 질소원으로 글라이세롤과 콩가루(soybean meal)를 가장 잘 이용하였으며, 또한 안정적인 내성포자 형성을 유도하기 위하여 10mM의  $Ca^{2+}$ 첨가와 배양개시 12-14시간 후에 50  $\mu$ M의 DPA첨가가 효과적이었다.

*Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 균주는 PDB (감자 200g, Dextrose 20 g)배지에서 가장 항균활성이 우수하였으며 84시간 이상 배양해야만 최대의 항균 활성물질이 생성되었다. 또한 항균물질의 생산에는 질소원으로 yeast extract, 탄소원으로 starch 그리고 미량원소로는 Co가 가장 효과적이었다.

*Bacillus subtilis* GBB-55의 제제화를 위해서 콩비지의 이용을 검토하였으며, *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927균주의 경우는 안정성을 유지하기 위하여 보존제로 propionic acid를 첨가하였고 vermiculite를 담체로한 고체 배양법을 고안하였다. *Streptomyces* sp. SS-55가 생산하는 항균물질은 pH 3.0에서 부탄올로 추출하고 각종 크로마토그래피를 이용하여 구조를 분석중에 있다.

난 재배에 있어서의 또 하나의 커다란 장애물인 바이러스병의 보다 효율적인 진단을 위해서 tissue blotting법을 개발하였으며 이방법으로 난 재배농가로부터 바이러스 증상을 보이는 시료들을 진단해 본 결과 50%가 ORSV와 CyMV로 복합 감염되었으며 40%가 이들중 하나에 의해 감염된 것으로 밝혀졌다.

따라서 난 재배에 있어서 가장 큰 장애 요인들인 썩음병과 바이러스병은 본 실험에서 개발된 길항균을 이용한 생물적 방제와 tissue blotting을 이용한 바이러스병의 정확한 진단을 실시하여 바이러스 이병주를 조기에 제거한다면 난재배 농가에 커다란 도움이 될 것으로 생각된다.

## 영 문 목 차

Chapter I.	Introduction-----	14
Chapter II.	Isolation and identification of Fusarium Wilt pathogen on the <i>Cymbidium</i> genus-----	17
Chapter III.	Isolation of antagonistic micro-organisms on the <i>Cymbidium</i> genus and test of antagonistic effect-----	31
Chapter IV.	Isolation and protective value of antagonistic isolates by using the antagonistic micro-organisms-----	54
Chapter V.	Identification and development of diagnostic methods of virus on the genus-----	83

# 목 차

제 1 장 서 론-----	14
제1절 연구개발의 목적과 범위	
제 2 장 난 시들음 병의 분리 및 동정-----	17
제1절 서 설	
제 3 장 난 시들음병균에 대한 길항미생물의 분리 및 길항효과 검정-----	31
제1절 서 설	
제 4 장 길항 미생물을 이용한 방제 및 길항 물질의 분리-----	54
제1절 서 설	
제 5 장 심비디움난속 바이러스의 동정 및 효율적인 진단 방법 개발-----	83
제1절 서설	

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 목 적

우리나라 화훼시장은 생활 수준의 향상과 더불어 급격히 증대되고 있다. 화훼시장 중에서 난이 차지하는 시장점유율은 10%에 해당하는데, 생산물량으로는 4500억에 해당하고 있다. 특히 제주도의 경우 우리나라 난 시장의 30%를 점유하고 있으며 많은 농가가 동서양난을 재배하고 있다. 그러나 매년 난 생산량의 상당 부분이 병충해로 인해 손실되고 있다. 이러한 병충해를 예방하기 위해 다양한 시도가 이루어지고 있다.

1. 육종학적 방법에 의한 내병성 품종육성
2. 유기합성 농약의 개발
3. 미생물을 이용한 생물학적 방제
4. 유전자 조작에 의한 내병성 품종 개발 등으로 나눌 수 있다.

여기서 육종학적 방법은 많은 시간과 노동력이 소요될 뿐 아니라 고품질 위주의 육종 목적 일변도의 선발 과정에서 야기되는 내병, 내충성 저하품종 작출과 유기합성 농약의 경우 잔류독성 및 생태계 파괴가 중요한 문제점으로 지적되고 있으며, 또한 농약의 부작용으로 인한 인체에 직접적인 독성 문제가 지적되고 있다(제주도 → 농약의 지하수 침투). 특히 제주도는 응용수가 전량 지하수에 의존하므로 농약 사용에 의한 지하침투에 따라 생존권이 위협받는 농약사용을 가급적 피할 수 있는 대책이 여타 지역에 비하여 절실히 요망되는 실정이다.

유전공학 방법은 일부 유전자에서 성공적으로 형질 전환 된 식물체가 보고되고 있을 뿐 실용화 하기에는 아직 해결 되어야 할 부분들이 산적한 실정이다.

우리나라의 경우 벼나 보리, 고추 등과 같이 수요가 많은 식물체에서는 저병성 육종이나 농약의 개발에 약간의 관심과 투자에 의한 연구 결과가 도출되어 실제 농업상 응용 차원까지 시도되고 있지만 난과 식물은 다양한 품종 때문에 각 품종이 차지하는 시장성이 적어서 육종보다는 새로운 농약 또는 길항 미생물을 이용하여 병충해를 예방하는 생물학적 방제 방법이 유리하리라 사료된다. 특히 난의 질병 중에서도 치명적인 타격을 입히는 연부병은 많은 난 농가가 여름에 10% 이상의 난 손실을 입고 있는데, 이들을 제어할 수 있는 유용 농약의 개발이 아직까지 없고 또한 상당수의 난이 고가이기 때문에 엄청난 경제적 손실을 입고 있는 실정이다. 또한 최근 농업 개방화에 따른 우리나라 난의 경쟁력 약화는 날로 심화되고 있다. 따라서 세계경쟁력 속에



서 독창적 기술 우위 농업 기술의 독자적 보유가 필요하고 경쟁력이 있는 농산물을 생산하기 위한 저독성 우수 농약 개발이 필수적이라 할 수 있으므로 새로운 분야의 개척이라는 측면과 환경 친화적인 병해 방제에 대한 이용성과 적용성의 효율적 이용 방법을 개발함은 꼭 필요한 작업이라 할 수 있다.

이와 같이 개발된 미생물의 다양한 개발과 이용방법의 간편화 작업은 난 이외의 다른 고급시설 농작물보다 손쉽고 보다 효과적인 병 방제의 기초 자료로 활용될 수 있겠다.

## 제 2 절 범 위

따라서 본 연구는 심비디움속 난에 치명적으로 상해를 입히는 시들음병에 길항하는 균을 개발하여 생물학적 방제의 가능성과 실예를 제시하고자 한다.

난 부패병 방제에 효과가 우수하고 인체와 환경에 무해하며 *in vitro* 및 실제 난 재배 온실에서도 효과가 뛰어난 자연 존재의 유익 미생물을 토양에서 채취하고 동정하여 병원성균에 대한 길항력이 높은 균주를 종류별로 선별한다. 선별된 길항미생물은 각종 들연변이원을 처리하여 항균 효과가 높은 균주를 이차 선별하고 미생물을 직접 농업용으로 개발하든지 또는 배양후 배양액에서 2차대사 사물인 항균제를 추출하여 분리한다.

1. 길항균의 부패병 원인균이 *Fusarium oxysporium*인지 *Erwinia carotova*인지 정확한 기작을 밝히고 원인 병원균에 적합한 길항 미생물을 선별한다.
2. 선별된 길항 미생물을 저렴하게 생산하기 위한 배지 개발 및 안정된 활성을 나타내기 위한 조건을 개발한다.
3. 길항균별 도포처리 방법 및 방제가를 연구한다.
4. 단일 길항균 및 여러 효과높은 균을 혼합하여 길항 효과를 검토하고 활성이 높은 길항균배합 조건을 확립한다.
5. 선별된 길항균을 동정하여 고효성 신종 미생물로 확인되는 경우에는 물질특허를 출원한다.
6. 심비디움속난에 발생하는 주요 바이러스의 분리동정과 바이러스병 종합방제 대책을 확립한다.

※ 연차별 연구개발목표와 내용

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (1997)	길항균의 순수 분리, 부패병 활성검정 및 바이러스 병해조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 길항균의 분리 및 동정(한라산 자생지 토양)</li> <li>○ 재배 난에서 병원균 분리 및 동정</li> <li>○ 길항균의 선별 및 양균 활성화 측정법 확립</li> <li>○ 분리된 길항균에 대한 식물적응도 검사(포장시험 확대)</li> <li>○ 부패병과 바이러스병에 강한 품종 조사 및 피해조사(연중)</li> </ul>
2차년도 (1998)	부패병을 일으키는 기작연구, 길항균의 실험실내 활성 검증 및 바이러스 병 분리동정과 간이 식별법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 길항미생물의 최적 배양조건 확립</li> <li>○ 실험실내 검정법 확립 및 병원균의 발병기작 구명</li> <li>○ 난에 유해한 바이러스 동정 및 tissue blotting 법 개발</li> <li>○ 돌연변이 유발원에 의한 균주개발</li> <li>○ 길항균을 첨가한 화분식재매질 개발(포장시험)</li> </ul>
3차년도 (1999)	부패병 방제 기술의 확립, 대량배양 조건, 포장화 및 바이러스 병 종합 방제 대책 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 혼합 길항균을 이용한 검정 실험</li> <li>○ 대량배양 조건 확립 및 포장화</li> <li>○ 균주별 포장처리 방법 및 방제가 연구</li> <li>○ 타종 식물종에 대한 적용성 및 처리 기술 개발</li> <li>○ 바이러스병에 의한 품질저하 대책 및 방제 대책 수립</li> </ul>

## 제 2 장 난 시들음병균의 분리 및 동정

### 제 1 절 서론

난에는 100여종 이상의 병이 보고되어지고 있는데 이중에서도 특히 *Phytophthora cactorum*과 *Phythium ultimum*에 의한 검은썩음병, *Pseudomonas cattleyae*에 의한 갈변병, *Rhizoctonia solani*에 의한 뿌리썩음병, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae*에 의한 시들음병은 뚜렷한 병징이 나올 때까지 감염여부를 확인하기가 어렵고 병징을 확인하여 농약을 처리하더라도 감염전과 같은 외성한 성장을 재개하는데는 몇 년이 소요되기 때문에 부패병을 일으키는 곰팡이류들이 난재배에 있어서 가장 큰 문제들중의 하나이다.

특히 시들음병과 *Erwinia carotova*에 의한 연부병은 제주도내 난 재배농가에 있어서 커다란 장애요인으로써 감수성 품종인 경우 50%이상이 부패되어 버려지고 있는 실정이다. 시들음병의 증상은 식물체가 황변하고 가늘어지며 주로 벌브에 많이 발생되어 뿌리 부패의 원인이 되기도 한다. 따라서 신엽은 시들며 시간이 경과하면 새잎은 벌브로부터 이탈한다. 이 시기 벌브는 표피만 남고 내부는 부패한다. 이 병은 분주할 때 생긴 상처나 뿌리를 통해서 감염된다. 연부병은 상처부위를 통해서 식물체 조직내로 침입하며 수침상으로 부패되면서 독특한 냄새를 풍긴다. 병징은 잎과 뿌리로 급속히 지니전되나 근경과 위구경에 있어서는 진전 속도가 느리고 부패벌브는 용탈되고 미이라형으로 마른다. 주로 고온 다습한 여름 장마기에 발생한다 (백기엽 등, 1995).

본실험은 제주도 난 재배농가에서 크게 문제가 되고 있는 난 부패병균을 분리하고 동정함으로써 난부패병균의 원인을 밝히고자 실시하였다.

### 제 2 절 재료 및 방법

#### 1. 제주 난재배지로부터 심비디움속의 시들음병의 원인균의 분리 및 동정

##### 1) *Fusarium oxysporum*의 분리 및 동정

심비디움 (*Cymbidium*) 屬의 시들음병원균을 분리하기 위해, 이병주 엽조각을 0.5~1cm 정도로 절단한 다음, 10% Ethanol을 함유하는 5% NaOCl 용액에 10분간 침지하고, 멸균수로 수 회에 걸쳐 수세한 다음, Paper Towel 상에서 풍건하여, 소독된 엽조각을 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 올려놓고 25℃ 항온기에서 5일간 배양한 다음, Water Agar (WA)를 이용하여 단포자를 분리하였다. 분리된 균주는 Nelson 등의 방법에 따라, Carnation Leaf Agar (CLA) 배지와 PDA 배지를 이용하여, 배양학적 특성, Macroconidia, Microconida, Conidiophores, Chlamydoconidia의 형태학적 특성을 걸경을 통해 관찰하였다.

## 2) *Erwinia carotovora*의 분리 및 동정

### 가. *Erwinia carotovora*의 분리법

*Erwinia carotovora*를 분리하기 위해 제주도 난원에서 부패병이 발생한 춘란과 한란으로부터 총 10개의 난분에서 병이 발생한 벌브부분을 채취한 후, 증류수로 세척하고 벌브를 여러 조각으로 자른 다음 100 ml 삼각 플라스크에서 30분간 진탕후 10-1~10-8까지 희석하여 희석배수 별로 Nutrient broth배지에 100  $\mu$ l씩 도말하여 30℃의 항온기에서 1일간 배양하였다. 세균의 선발은 색깔이 없는 집락을 취하고다시 멸균수로 희석하여 희석배수별로 Nutrient agar배지에 도말함으로써 완전히 독립된 집락만을 순수분리하였으며, 순수분리된 30개의 균을 현미경 관찰과 Gram 염색에 의해 선별하였다.

### 나. 현미경 관찰 및 Gram 염색에 의한 선별

*Erwinia carotovora*의 형태는 straight rod이며 운동성이 있고, Gram negative 균에 속하므로 agar plate에서 순수 분리된 colony를 선별하여 현미경하에서 운동성이 있는 간균을 선발하고 Gram 염색을 하였다.

Gram 염색은 세균집락을 백금으로 적당량 취하여 slide 유리판에 불꽃 고정하여 식힌 다음 Hucker crystal violet (Crystal violet 2 g in EtOH, Ammonium oxalate 0.8 g, in 80 ml H<sub>2</sub>O)로 1분 동안 염색 후에 수돗물로 세척하고, 다시 Gram's iodine

(Iodine crystal 1 g, potassium iodide 2 g in 300 ml H<sub>2</sub>O) 으로 1분간 염색하였다. 이어서 수돗물로 세척하고 나서 95% ethanol로 20-30초 정도 탈색시키고 다시 증류수로 세척하였다. 다음은 0.25% safranin (Safranin O, 0.25 g, 95% ethanol 10 ml, 90 ml H<sub>2</sub>O)을 사용하여 20초 동안 염색시키고 다시 수돗물을 이용하여 세척하고 자연 상태에서 건조시켜서 현미경으로 검경하였다.

#### 다. 생화학적 및 생리학적 동정

Bergey's manual에 기초하여 *Erwinia carotova*의 생화학적 동정을 수행하였다. 시험 사항은 당과 산의 이용 여부 및 *Erwinia carotova*의 생리적인 특징을 기초로 동정하였다.

#### 라. 병리학적 활성검정

분리, 동정된 *Erwinia carotova*가 난에서 부패병을 일으키는지 확인하기 위해서 한란에서 분리된 균을 Nutrient broth에서 배양한 후, 이미 완성된 춘란 및 한란 배양병에 10 ml/병 씩 접종한 후 일주일간 관찰하였다.

#### 마. 실험실내 검정법 확립 및 병원균의 발병기작 구명

병원균의 발병기작을 구명하기 위하여 perfusion chamber(Fig. 1)을 사용하였으며, 병발생에 비교적 민감한 춘란(*Cymbidium goeringii*)의 신엽을 벌브의 기부로부터 cross section 하여(Fig. 2) *Erwinia*와 *Fusarium* 현탁액 ( $5 \times 10^7$  cfu/ml)을 각각 peristaltic pump와 연결된 perfusion chamber에 서서히 흘려 보내면서 1시간 간격으로 6시간 동안 도관의 괴저현상 발생 상황을 관찰하였다.

심비디움 주요 재배 품종별 부패병 민감도를 조사하기 위하여 동, 서양난을 2계통으로 구분하여 각각 5종씩을 선정하여 재배 1년차의 유묘를 대상으로 병원성균인 *Fusarium*과 *Erwinia*를 산포한 1개월 후의 병발생 정도와 생존율을 조사하였다.

1년차 예비시험의 결과로 확인된 조직배양묘의 기내처리 방법을 구체적으로 시험한 바, GBB-55균과 SS-4균의 현탁액을 제조하여 꺼내기 15일전 기내에 처리한 후 균의 밀도와 종

류 및 주요 난류에 대한 길항력을 검정하였다.

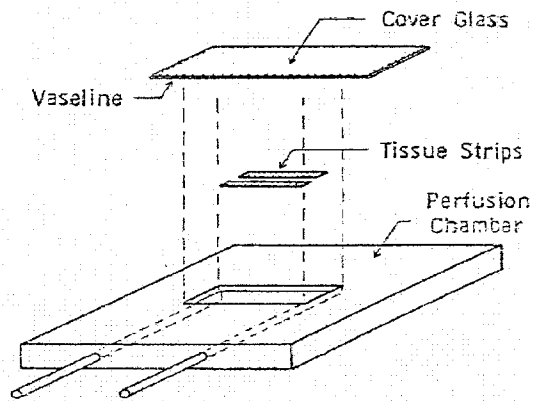


Fig. 1. Exploded view of tissue strips in the perfusion chamber.

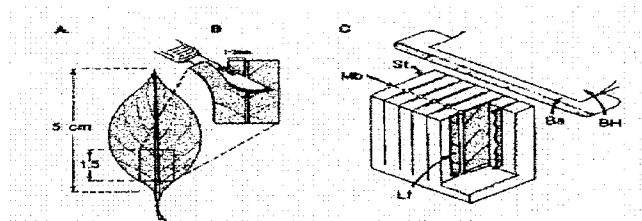


Fig. 2. Procedures for microsectioning using a vibratome: (A) Leaf segments ( $1.5 \times 1.0$  cm) from the basal portion of the leaf, 1 cm above the petiole attachment point with the lamina; (B) lamina on both sides of the midvein removed except for 1-2 mm remnant; (C) leaf segments placed into incisions of the styrofoam block ( $2 \times 2$  cm), with the alignment of the midveins (Mb) in the center of the block. Total of six leaf sections in the block in sectional view near the midveins (Mb) showing the placement of the leaf segments inside the styrofoam block. Lf, leaf segments; St, styrofoam block; Mb, midvein; BH, blade holder; Ba, blade.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 제주 난재배지로부터 심비디움속의 시들음병의 원인균의 분리 및 동정

##### 1) *Fusarium oxysporum*의 분리 및 동정

심비디움 (*Cymbidium*) 屬의 시들음병원균을 분리하기 위해, 이병주 엽조각을 0.5~1cm 정도로 절단한 다음, 10% Ethanol을 함유하는 5% NaOCl 용액에 10분간 침지하고, 멸균수로 수 회에 걸쳐 수세한 다음, Paper Towel 상에서 풍건하여, 소독된 엽조각을 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 올려놓고 25°C 항온기에서 5일간 배양한 다음, Water Agar (WA)를 이용하여 단포자를 분리하였다. 분리된 균주는 Nelson 등의 방법에 따라, Carnation Leaf Agar (CLA) 배지와 PDA 배지를 이용하여, 배양학적 특성, Macroconidia, Microconida, Conidiophores, Chlamydo-spores의 형태학적 특성을 검경을 통해 관찰하였다.

PDA 사면배지 상에서 10일간 배양하였을 때, 콜로니는 사면배지 전체를 덮을 정도로 생육이 빨랐으며, PDA 평판배지 및 CLA 평판배지 상에 풍부한 기균사가 펠트상으로 형성되었고, 기균사의 색은 옅은 보라색을 나타내었다. 그리고 콜로니 하의 배지는 배양의 경과에 따라 진한 보라색 색소가 한천으로 확산되는 것을 관찰하였다.

PDA 및 CLA 배지 상에서 풍부한 Macroconidia(대분생자)가 생성되었으며, 대부분 3-5개의 격막을 형성하고 있었으며, Macroconidia의 모양은 phialo type의 분생자로, 초생달 모양을 나타내며, 양단이 뾰족하였다. 대개 다분지의 Tubercularia-like 분생자좌상에 형성되었다(Fig. 3).

PDA 및 CLA 배지 상에서 기균사로부터 난원형의 Microconidia(분생자)가 많이 관찰되었고, 대개 만곡을 형성하며, 사슬모양은 관찰되지 않았다. 분생자병(Conidiophores)은 monophialide type만이 관찰되었으며 원통형이었다.

CLA 배지 상에서 풍부한 Chlamydo-spore(후막포자)가 정생 또는 간생으로 형성되어 있었으며, 종종 쌍을 이루고 있었다(Fig. 4.)

이상의 결과로부터, 분리주는 Nelson 등에 따라 Elegans Section의 *Fusarium*

*oxysporum*에 속하는 것으로 판단되었다.

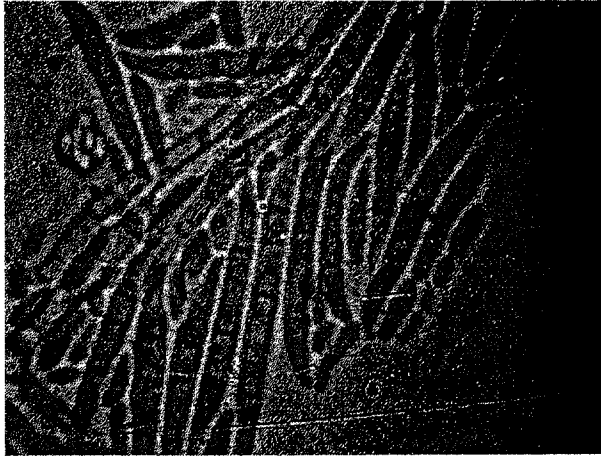


Fig. 3. Macroconidia of *Fusarium oxysporum*(X1000)

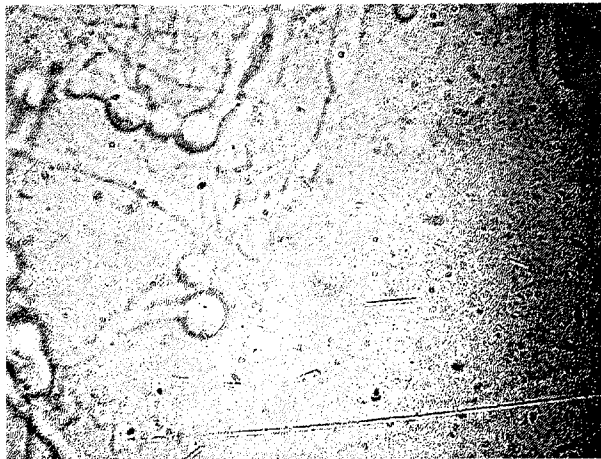


Fig. 4. Chlamydospores of *Fusarium oxysporum*(X1000)



## 2) *Erwinia carotova*의 분리 및 동정

### 가. *Erwinia carotova*의 분리법

*Erwinia carotova*를 분리하기 위해 제주도 난원에서 부패병이 발생한 춘란과 한란으로부터 총 10개의 난분에서 병이 발생한 벌브부분을 채취한 후, 증류수로 세척하고 벌브를 여러 조각으로 자른 다음 100 ml 삼각 플라스크에서 30분간 진탕후 10-1~10-8까지 희석하여 희석배수 별로 Nutrient broth배지에 100  $\mu$ l씩 도말하여 30°C의 항온기에서 1일간 배양하였다. 세균의 선발은 색깔이 없는 집락을 취하고 다시 멸균수로 희석하여 희석배수별로 Nutrient agar배지에 도말함으로써 완전히 독립된 집락만을 순수분리하였으며, 순수분리된 30개의 균을 현미경 관찰과 Gram 염색에 의해 선별하였다.

### 나. 현미경 관찰 및 Gram 염색에 의한 선별

*Erwinia carotova*의 형태는 straight rod이며 운동성이 있고, Gram negative 균에 속하므로 agar plate에서 순수 분리된 colony를 선별하여 현미경하에서 운동성이 있는 간균을 선발하고 Gram 염색을 하였다.

Gram 염색은 세균집락을 백금이로 적당량 취하여 slide 유리판에 불꽃 고정하여 식힌 다음 Hucker crystal violet (Crystal violet 2 g in EtOH, Ammonium oxalate 0.8 g, in 80 ml H<sub>2</sub>O)로 1분 동안 염색 후에 수돗물로 세척하고, 다시 Gram's iodine (Iodine crystal 1 g, potassium iodide 2 g in 300 ml H<sub>2</sub>O) 으로 1분간 염색하였다. 이어서 수돗물로 세척하고 나서 95% ethanol로 20-30초 정도 탈색시키고 다시 증류수로 세척하였다. 다음은 0.25% safranin (Safranin O, 0.25 g, 95% ethanol 10 ml, 90 ml H<sub>2</sub>O)을 사용하여 20초 동안 염색시키고 다시 수돗물을 이용하여 세척하고 자연상태에서 건조시켜서 현미경으로 검경하였다.

Gram 염색에 의해 10개의 Gram-negative 균주를 선별하여 생화학적 동정을 하였다.

### 다. 생화학적 및 생리학적 동정

Bergey's manual에 기초하여 *Erwinia carotova*의 생화학적 동정을 수행하였다. 시험 사항은 당과 산의 이용 여부 및 *Erwinia carotova*의 생리적인 특징을 기초로 동정하였다.

이상의 배양조건을 변화시켜 배지의 이용여부, 생리조건에 따른 변화를 주어 균을 동정한 결과, 난의 부패병 균인 4개의 *Erwinia carotova*를 동정할 수 있었으며 부패병이 발생한 춘란 및 한란 벌브 모두에서 *Erwinia carotova*를 분리할 수 있었다.

#### 라. 병리학적 활성검정

분리, 동정된 *Erwinia carotova*가 난에서 부패병을 일으키는지 확인하기 위해서 한란에서 분리된 균을 Nutrient broth에서 배양한 후, 이미 완성된 춘란 및 한란 배양병에 10 ml/병 씩 접종한 후 일주일간 관찰하였을 때 모든 배양묘에서 부패병에 의하여 벌브가 부패되어 난이 죽는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).



Fig. 5. Status of *in vitro* infection on *Fusarium* (left) and *Erwinia* (right)

## 2. 실험실내 검정법 확립 및 병원균의 발병기작 구명

### 1) 병원균의 발병기작 구명

Perfusion chamber를 이용한 춘란의 엽절편의 병원성균 처리 효과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 2종의 병원성 원인균 현탁액을 통과시킨 엽절편은 엽맥을 구성하는 유관속부터 서서히 갈변하여 시간이 경과할수록 괴저현상이 뚜렷하여 6시간이 경과하면 *Fusarium*의 경우 85% 가량이 파괴되었음을 볼 수 있었다(Fig. 6). 그러나 *Erwinia*의 경우에는 처리후 5시간이 경과하고서야 5%, 6시간째가 20%의 괴저반응을 나타내므로 심비디움 난의 경우에는 특히 *Fusarium*의 독성이 강하고 빠르게 세포를 파괴하고있는 것으로 나타났다. 한편, 공시 2종의 병원성 원인균을 혼합처리 한 것은 *Fusarium* 단독처리의 괴저현상 발생 시간과 같이 처리후 3시간부터 갈변하며 *Fusarium* 단독처리보다 2배의 피해율을 나타내었으며, 6시간 경과 후에는 거의 모든 유관속이 괴사하였음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Time course response of *Cymbidium goeringii* affected by pathogenic isolates in perfusion chamber.

Flowing time		1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr
Decay of vascular bundle (%)	<i>Fusarium</i>	-	-	-	5	30	85
	<i>Erwinia</i>	-	-	-	-	5	20
	Both of above	-	-	-	20	60	95

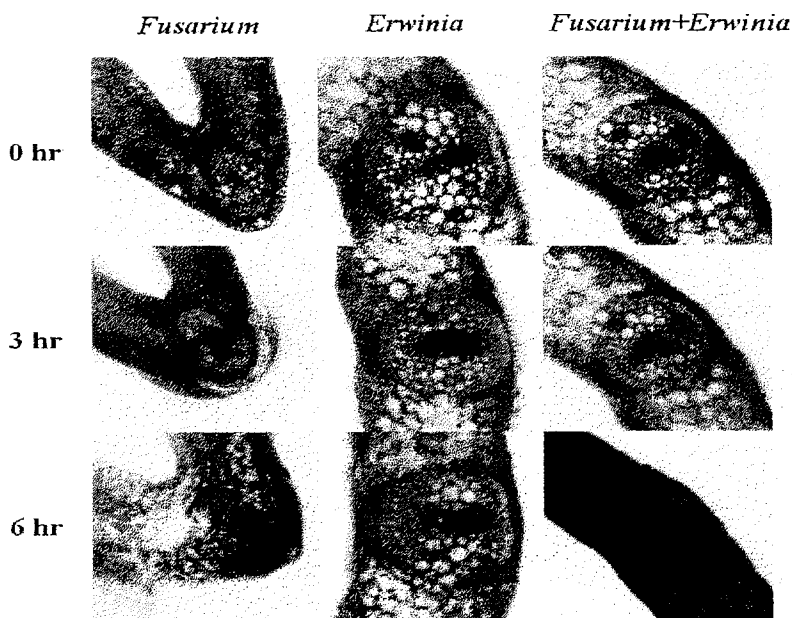


Fig. 6. Changes on the time course of 3 pathogenic isolate treatments at leaf midvein section of *Cymbidium goeringii*.

## 2) 실험실내 검정법 확립

우선 공시한 10종의 심비디움에서 병원균을 접종함으로써 고사율이 2배 혹은 수배 이상이나 증가하였고, 등양판계가 부패병에 민감하게 발병하고 있음을 알 수 있었다(Table 2).

서양판계 심비디움의 경우에는 무처리외의 경우 등양판계에 비하여 절반 가량의 이병율과 고사율을 가지므로 부패병에 대한 저항성이 비교적 많음을 나타내고 있으나 품종에 따라서 'Jungfrau'와 'Ballerina'의 경우에는 부패병의 발생 빈도 혹은 감수성이 예민한 것으로 나타났다. 한편 *Fusarium*과 *Erwinia* 산포에 따른 발병 빈도를 보면 *Erwinia* 처리구에서 대체로 절반 이하의 발병율을 보이는 것으로 보아 *Erwinia*가 단독으로 부패병을 유발하는 것이 아니고 *Fusarium* 감염 후에 복합 발병하고 있음을 간접적으로 시사하는 결과라고 생각된다.

난 품종의 부패병에 대한 실험실적 민감도를 구명하기 위해서는 우선 공시되는 식물체가 무균상태로 유지되어야만 단일의 병원균 감수성을 정확히 조사할 수 있으므로 본 시험은 조직배양되어 경화단계에 도달한 유묘에 대하여 우수 균주로 선발된 길항균(*Bacillus subtilis* GBB-55

와 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927)을 접종하고 15일이 경과된 유묘를 무처리와 비교하여 부패병 발생률과 성장반응을 조사하였다.

배양묘의 경화 이전에 길항균을 접종시켜 유묘 자체가 저항력을 갖도록 하는 처리에서 발병율을 낮추었고 성장반응도 양호한 것으로 나타났다. 본 시험은 하절기의 혹서기간(7-9월)을 경과하여야만 보다 더 정확한 결과를 종료할 수 있지만 본 시험의 결과만으로도 처리의 효과가 인정되었다.

한편, 선발된 2종의 길항균에 대한 항생역가는 *Bacillus*(*Bacillus subtilis* GBB-55) 균보다는 방선균(*Streptomyces kasugaensis* GBA-0927)이 공시한 심비디움에서 약간 우수한 방제력을 갖는 것으로 나타났다(Table 3, 4).

Table 2. Susceptibility and survival rate on two pathogen spray in 10 *Cymbidium* cultivars after treatment of 1 month.

Cultivar ( <i>Cymbidium</i> )	Inoculation	Survival rate (%)		Susceptibility	
		<i>Fusarium</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Erwinia</i>
<i>kanran</i>	No	65	65	+++	++
	Yes	15	40		
<i>goeringii</i>	No	60	60	+++	++
	Yes	10	30		
<i>sinense</i>	No	75	75	+++	+
	Yes	25	50		
<i>ensifolium</i>	No	80	80	+++	+
	Yes	45	65		
<i>lancifolium</i>	No	70	70	+++	+
	Yes	35	60		
'Saint Lapine'	No	85	85	+++	+
	Yes	35	65		
'Ballerina'	No	75	75	+++	++
	Yes	15	60		
'Jungfrau'	No	80	80	+++	++
	Yes	25	55		
'Murasaki Gengi'	No	85	85	++	+
	Yes	50	75		
'Lapine Hat'	No	85	85	++	+
	Yes	40	75		

20 replicates per treatment

+ : rare, ++ : medium, +++ : severe

Table 3. The effect of in vitro inoculation on antagonist isolate treatment (*Bacillus subtilis* GBB-55) before hardening in 10 *Cymbidium* cultivars be tested.

Cultivar ( <i>Cymbidium</i> )	Inoculation of antagonist ( <i>Bacillus subtilis</i> GBB-55)	Survival rate (%)	Growth pattern	
			Leaf	Root
<i>kanran</i>	No	65	+	++
	Yes	80	++	+++
<i>goeringii</i>	No	60	+	+++
	Yes	80	++	+++
<i>sinense</i>	No	75	++	+++
	Yes	85	+++	++
<i>ensifolium</i>	No	80	++	++
	Yes	90	+++	+++
<i>lancifolium</i>	No	70	+++	+++
	Yes	90	+++	+++
'Saint Lapine'	No	85	++	+++
	Yes	90	+++	+++
'Ballerina'	No	75	++	+++
	Yes	90	+++	+++
'Jungfrau'	No	80	++	+++
	Yes	90	+++	+++
'Murasaki Gengi'	No	85	+++	+++
	Yes	95	+++	+++
'Lapine Hat'	No	85	++	+++
	Yes	95	+++	+++

20 replicates per treatment

+ : bad, ++ : medium, +++ : good

Table 4. The effect of in vitro inoculation on antagonist isolate treatment (*Streptomyces kasugaensis* GBA-0927) before hardening in 10 *Cymbidium* cultivars be tested.

Cultivar ( <i>Cymbidium</i> )	Inoculation of antagonist ( <i>Streptomyces</i> <i>kasugaensis</i> GBA-0927)	Survival rate (%)	Growth pattern	
			Leaf	Root
<i>kanran</i>	No	65	+	++
	Yes	85	++	+++
<i>goeringii</i>	No	60	+	+++
	Yes	85	++	+++
<i>sinense</i>	No	75	++	+++
	Yes	90	+++	++
<i>ensifolium</i>	No	80	++	++
	Yes	95	+++	+++
<i>lancifolium</i>	No	70	+++	+++
	Yes	95	+++	+++
'Saint Lapine'	No	85	++	+++
	Yes	95	+++	+++
'Ballerina'	No	75	++	+++
	Yes	95	+++	+++
'Jungfrau'	No	80	++	+++
	Yes	95	+++	+++
'Murasaki Gengi'	No	85	+++	+++
	Yes	95	+++	+++
'Lapine Hat'	No	85	++	+++
	Yes	95	+++	+++

20 replicates per treatment

+ : bad, ++ : medium, +++ : good



# 제 3 장 난 시들음병원균에 대한 길항미생물의 분리 및 길항효과 검정

## 제 1 절 서론

토양병원균에 대해 최 일선 방어선인 근권에 서식하는 미생물들이 토양병해에 대한 생물학적 방제의 매개체로 종종 사용되어져 왔다 (Weller, 1988). 하지만 아직도 근권의 미생물 활성화에 영향을 주는 여러 요인들을 이해하고 결정하는데는 아직도 미흡한 실정이며 이로 인해 생물적 방제의 실용화에도 크게 진전되지 못하는 실정이다.

우리가 길항균을 선발하기 위하여 1차적으로 사용하는 *in vitro*에서의 길항균의 길항 능력과 실제 포장조건에서의 생물적 방제 능력간에는 서로 관련이 있다는 보고들이 있으며 (Cullen and Andrew, 1984; Colyer and Mount, 1984; Di Pietro, 1992), 특히 항생물질 생산과 포장에서의 병억제 능력 간에는 밀접한 연관이 있다는 보고들이 있다 (). 또한 Cook(1985) 과 Kloepper and Schroth (1981) 등은 항균작용이 생물적방제에 있어서 가장 중요한 기작이라고 보고하였다. 반면에 *in vitro*에서의 길항균 선발과 *in vivo* 조건에서의 병방제 능력간에는 연관이 적다는 보고들도 많이 있다. Utkhede (1983)는 길항균에 의한 사과 유묘의 역병방제와 실내에서의 길항균에 의한 역병균의 군사 성장 억제 능력간에는 아무런 연관이 없다고 보고하였으며, Howell (1983), Kloepper (1981) 그리고 Yuen(1986) 들은 항생물질이나 siderophore를 분비하는 길항균들을 이런 물질들을 생성하지 못하는 균주로 돌연변이 시켜 처리하여도 동일한 병억제 능력을 가졌다고 보고하였다. 또한 Papavizas and Lewis (1983), O'Brien 등(1984), Suslow and Schroth (1982) 들도 실내에서의 항균작용과 포장조건에서의 생물적방제 능력간에는 연관이 없다고 보고하였다.

길항 미생물들에 의한 항생물질과 같은 2차 대사산물의 생산에는 여러 환경요인, 특히 영양분과 같은 요인들이 커다란 영향을 준다는 보고들이 많다. Vidaver 등 (1972)은 박테리오신의 생산은 고체배지에 있어서 배지의 두께, 접종원의 양, 온도등에 영향을 받는다고 보고하였고, Rothrock and Gottlieb (1981) 그리고 김 과 황 (1992)들은 배지 종류에 따라서, Howie and Suslow (1987) 등은 당이나 아미노산 종류에 따라 항생물질 생산량이 달라진다고 보고하였다.

본실험에서도 제주도의 난 자생지의 토양이나 난이 건전하게 자라고 있는 재배지 토양으로부터 난의 부패병을 방제하기 위한 길항균을 분리하고 이들에 대한 *in vitro* 와 *in vivo* 조건에서의 항균활성을 조사함으로써 생물적방제의 가능성을 검토하고자 실시하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 난 자생지와 재배지로부터 난 시들음병원균에 대한 길항미생물의 분리 및 길항 효과 검정

제주지역의 난 자생지 32군데 및 토양재배지 15군데로부터 난 시들음병원균 (*Fusarium oxysporum*)에 대해 Hebbbar's methods를 이용하여 길항력이 있는 미생물을 분리하였다.

토양시료를 1g를 멸균 생리식염수에 현탁하고 일련의 희석액( $10^{-4} \sim 10^{-6}$ )을 만들고, 이 희석액 1ml를 상법에 따라 제조한 Soil Extract Agar 배지 10 ml에 혼합하고, Petri dish에 분주하여 평판배지를 만든다. 여기에 다시 Water Agar 5 ml를 균일하게 분주하여 2중층 평판배지를 만들고, 분리 목적에 따라 YM 한천배지(0.5% Peptone, 0.3% Yeast extract, 0.5% Malt extract, 1.5% Agar) 또는 Tryptic Soy Agar (Difco Co.) 등의 배지 10 ml에 난 시들음병원균 포자현탁액( $10^{-6}$  cfu/ml) 1 ml를 혼합하여 상기 2중층 평판배지에 균일하게 증충하여, 검색용 3중층 평판배지를 만들었다. 이 평판배지를 통상 30°C의 항온기에서 배양하면서, 난 시들음병원균을 저해하여 투명환을 형성하는 콜로니 부위를 조심스럽게 취하여, 동일 배지를 이용하여 도말법에 의해 순수분리하였다.

순수분리한 미생물에 대해 통상의 대칭배양법을 이용하여 길항력을 검정하였다. TSA 및 YMA 평판배지상의 중앙부로부터 약 2cm 떨어진 곳에 단일 획선접종에 의해 분리균주를 접종하고, 통상 30°C에서 2-3일간 배양한 다음, Potato Dextrose Agar 상에서 생육시킨 난 시들음병 원인균의 배양물을 borer(직경 약 8mm)를 이용하여 배양물을 천공하고, 이를 상기 접종배양물로부터 반대 반향으로 약 4cm 떨어진 곳에 spot 접종한 다음, 통상 25°C의 항온기에서 배양하면서 길항미생물 또는 이들의 산물에 의해 균사의 생육저해를 관찰하였다.

### 2. 분리 동정된 길항균의 선별 및 양균 활성화도 측정법 확립

내륙지역의 토양시료로부터 세균류를 분리하기 위해, Nutrient broth (1% meat extract, 1% peptone, 0.2% NaCl, 10ppm Amical 48) 배지를, 방선균류를 분리하기 위해 Glucose-Asparagine 배지(1% glucose, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, asparagine 0.05%, 10ppm Amical 48)와 Glycerine-Czapek 배지(1% glycerol, 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10ppm Amical 48)를, 그리고 진균류를 분리하기 위해 Glucose-Czapek 배지(1.2% glucose, 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50ppm streptomycin)를 사용하였다. 풍건한 동일 시료를 각각의 배지를 10ml씩 함유하는 대형 시험관(50ml 용량)에 넣고, 30℃에서 진탕배양한다. 배양물을 원심분리(10,000xg)한 다음, 상등액을 시들음병원균에 대해 길항력을 시험하였다. 길항력은 TSA(tryptic soy agar, Difco Co.) 배지, YMA (0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, 2% agar) 그리고 Czapek agar 배지를 이용하여 통상의 대칭배양법이나 투명환 시험에 따라 수행하였다.

또한 길항효과가 높은 isolate를 대상으로 *F. oxysporum* f. *cattleya*와 *E. carotovora*의 길항효과를 조사하였다. 길항 %는 길항거리/병원균과 길항균의 접종거리 × 100으로 환산하였다.

### 3. 선발된 길항균의 식물적응도 및 방제력 검정

우선 분리주의 병원성을 검정하기 위해, PDA 배지에서 생육된 배양물로부터 *Fusarium* 포자 현탁액(5×10<sup>7</sup> cfu/ml)을 준비하였다. 또한 조직배양하여 생육이 왕성한 *Cym. kanran*의 배양병에 *Fusarium* 현탁액을 처리한 것과 병원균을 처리전 15일에 우수 길항균으로 분리된 GB-55균을 처리하고 식물체 고사 여부를 관찰하였다. 또한 45g 톱밥, 45g 유채박 그리고 10g 미강으로 구성되는 식재용 매질과 코코넛피트를 1:10의 중량비로 혼합하여 식재용토를 사용하여 트레이(30cm×22cm)에 담고, 여기에 조직배양된 4종의 심비디움(*Cym. nevo-marginatum*, *Cym. kanran*, *Cym. goeringii*, *Cym. lancifolium*) 유묘를 10반복으로 식재하고, 준비된 포자현탁액 10ml를 관수하고 통상의 방법으로 3개월간 생육시키면서 생존율을 관찰하였다.

한편, 이들 선발미생물에 의한 소규모의 길항균 적응도 및 방제력 검정이 이루어

졌다. 이를 위해, 방선균 A-12는 Tryptic Soy Broth 배지 (Difco Co.)를 이용하여 30℃에서 대수증식기 말기까지 진탕배양하였으며, 세균류는 YM 배지 (Difco Co.)를 이용하여 동일 조건에서 대수증식기 말기까지 진탕배양하였다. 전배양물을 45g 톱밥, 45g 유채박 및 10g 미강으로 구성되는 식재용 매질에 5%(v/v)가 되도록 접종하고, 상온에서 15일간 간헐적으로 교반하면서 정치배양하였다. 접종배양물과 코코넛피트를 1:10의 중량비로 혼합하여 최종적인 동양란 식재용토로 사용하였다.

한편, 3% Corn Steep Liquor (CSL)과 2% Soybean Flour로 구성된 배지(pH6.5)에 상기의 전배양물을 5%(v/v) 접종하여 30℃조건에서 대수증식기 말기에 이를 때까지 진탕배양하였다. 이 배양물을 임의로 희석하여 살포용 액제로 하였다. 또한, 전배양물을 상기의 식재용 매질 45g에 2 ml 접종하고 상온에서 4일간 배양하였다. 이 접종배양물을 코코넛피트만으로 구성된 식재용 상토 5g에 혼합하여 사용하였다. 또한 화학약제와의 비교를 위해 시들음병 방제에 일반적으로 많이 사용되고 있는 benlate 제제를 처리하여 길항균 효과를 비교 검토하였다. 식물재료로는 양란계 심비디움인 *Cym. 'Anmitu Hime'*, *Cym. 'Marirorencia'*, 그리고 Kawano mericlone에서 새로이 개발한 미등록 품종 중 특히 부패병에 약한 것으로 알려진 2 품종의 1년생 CP묘를 4치 플라스틱분에 식재한 후 시험에 임하였다. 각각의 처리구에 대하여는 1 주일간 상온에서 정치한 다음, PDA에서 배양하여 시들음병원균 포자현탁액( $5 \times 10^7$ )을 트레이당 10ml씩 토양관주하고, 생육에 따른 생존율, 엽장, 근수 등을 조사하였다. 관리는 일반재배에 준하였다. 이를 연구로부터 얻어진 결과를 Table 7에서 보는 바와 같다.

이들 결과로부터, 동양란 처리구에서는 방선균 A-12가 길항력이 가장 좋았으며, 시들음병원균의 억제에 의해 생육상태도 우수하였다.

#### 4. 선발된 길항균의 타 작물 적용성 검정

선발된 길항균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927과 GBS-55를 이용하여 오이의 잎마름병과 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과를 검정하였다.

오이 잎마름병에 대한 시험은 제주도 북제주군 하귀리 소재 문상철씨의 비닐하우스 오이 재배온실에서 수행하였고 잿빛곰팡이병은 제주시 삼양동 소재 감수 수경재배온실에

서 수행하였는데 각각의 길항균을 정식된지 1주일 후에 단용 혹은 혼용으로 식물체에 살포하여 각각의 방제가를 조사하였다.

## 5. 길항미생물의 동정

### 1) 난 시들음병원균에 대한 길항미생물의 동정

#### 가. 길항세균의 동정

균주의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology, Microbiological methods, Manual of methods for general bacteriology, Microbiology-a laboratory manual, Bergey's manual of systematic bacteriology 및 식품공학실험 등에 수록되어 있는 일반적인 세균동정법에 따라 행하였다.

#### 나. 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927균주의 동정

##### 가) 형태학적 특성 분석

최종 선발된 길항방선균에 대한 형태학적 특성을 조사하기 위해 inorganic salt-starch agar(ISP No.4) 평판배지에 분리균주를 접종하여 30℃에서 7 - 10일간 배양한 후 포자생성이 활발히 일어난 부위의 배지에 흡을 파고 8% glutaraldehyde 용액으로 채워 10-12시간 고정하였다. 고정이 끝나면 원하는 부위를 잘라낸 후 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>가 들어있는 기밀용기에 넣고 -20℃에서 완전히 건조시켜 전자현미경 관찰을 통해 포자의 형태와 크기, 표면상태 등을 조사하였다.

##### 나) 배양학적 특성 분석

ISP(International *Streptomyces* Projects)방법에 따라서 Shirting과 Gottlieb가 개발한 여러 배지상에서 배양학적 특성을 검토하였다. 선별된 각 방선균주를 yeast extract- malt extract agar(ISP No.2), oatmeal agar(ISP No.3), inorganic salt-starch agar(ISP No.4), glycerol-asparagine agar(ISP No.5), tyrosine agar(ISP No.7) 및 Benedict's agar 등의 배지상에서 배양하면서 성장의 정도, 기균사의 색깔, 형성된 집락의 상면과 이면의 색깔 및 가용성 색소의 생성여부 등의 특성을 관찰하였다.

##### 다) 세포벽 성분의 특성 분석

균주의 chemo-type을 알아보기 위한 균사의 세포벽성분 분석은 배양된 균체를 원

심분리하여 회수하고 증류수로 세척한 다음, sonication하고 차등원심분리를 통하여 세포벽을 분리하고 동결건조하여 분석시료로 사용하였다. 또한 세포벽의 amino acid 성분분석은 동결건조한 세포벽 20 mg과 6N HCl 5 ml를 ampoule에 넣어 밀봉하고 110°C oven에서 18시간 가수분해하여 얻은 분해액을 filter paper(Whatman No.1)로 여과하고 탈염산 및 농축하였으며, 가수분해물과 표준물질을 각각 microcrystalline cellulose TLC plate (Merck Co.)에 spotting하고 methanol-water-5 NHCl-pyridine(80:15:5:10)으로 7-8시간 전개시킨 다음 0.2% acetonic ninhydrin을 분무하고 100 °C에서 2분간 가열하여 발색시켜 olive green spot를 확인하였다. 이때 표준물질로는 LL-DAP와 meso-DAP가 혼합된 제품(Sigma Chem. Co.)과 alanine, glycine, glutamine을 사용하였다 .

## 6. 길항 미생물의 종류별 최적 배양 조건 확립

우수 길항균으로 확인된 방선균 (*Streptomyces* A-12: 이하 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 로 칭함)과 *Bacillus*속의 세균 (*B. subtilis*: 이하 *Bacillus subtilis* GBB-55로 칭함)의 2종의 길항균을 선정하였다. 이들 균들에 대한 최적 배양 조건을 확립하고자 1차로 질소원과 탄소원의 변화에 따른 길항력을 검정하고 *Bacillus subtilis* GBB-55의 경우 안정된 내생포자의 형성을 위한 cortex형성에 중요하게 작용하는 것으로 알려진  $Ca^{2+}$ 와 dipicolinic acid(DPA)이 첨가량과 시기 및 열처리에 의한 내생포자 유도 추이를 검토하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 난 자생지와 재배지로부터 난 시들음병원균에 대한 길항미생물의 분리 및 길항효과 검정

제주지역의 난 자생지 32군데 및 토양재배지 15군데로부터 난 시들음병원균 (*Fusarium oxysporum*)에 대해 Hebbar's methods를 이용하여 길항력이 있는 미생물을 분리하였다(Table 5).

토양시료를 1g를 멸균 생리식염수에 현탁하고 일련의 희석액( $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$ )을 만들고, 이 희석액 1ml를 상법에 따라 제조한 Soil Extract Agar 배지 10 ml에 혼합하고,

Petri dish에 분주하여 평판배지를 만든다. 여기에 다시 Water Agar 5 ml를 균일하게 분주하여 2중층 평판배지를 만들고, 분리 목적에 따라 YM 한천배지(0.5% Peptone, 0.3% Yeast extract, 0.5% Malt extract, 1.5% Agar) 또는 Tryptic Soy Agar (Difco Co.) 등의 배지 10 ml에 난 시들음병원균 포자현탁액(10-6 cfu/ml) 1 ml를 혼합하여 상기 2중층 평판배지에 균일하게 증층하여, 검색용 3중층 평판배지를 만들었다. 이 평판배지를 통상 30℃의 항온기에서 배양하면서, 난 시들음병원균을 저해하여 투명환을 형성하는 콜로니 부위를 조심스럽게 취하여, 동일 배지를 이용하여 도말법에 의해 순수분리하였다.

순수분리한 미생물에 대해 통상의 대칭배양법을 이용하여 길항력을 검정하였다. TSA 및 YMA 평판배지상의 중앙부로부터 약 2cm 떨어진 곳에 단일 획선접종에 의해 분리균주를 접종하고, 통상 30℃에서 2-3일간 배양한 다음, Potato Dextrose Agar 상에서 생육시킨 난 시들음병 원인균의 배양물을 borer(직경 약 8mm)를 이용하여 배양물을 천공하고, 이를 상기 접종배양물로부터 반대 반향으로 약 4cm 떨어진 곳에 spot 접종한 다음, 통상 25℃의 항온기에서 배양하면서 길항미생물 또는 이들의 산물에 의해 균사의 생육저해를 관찰하였다. 상기의 결과로부터, 동양란 처리구에서는 방선균 A-12이 길항력이 가장 좋았으며, 시들음병원균의 억제에 의해 생육상태도 우수하였다. 반면, 액제의 경우 분리주 B-10의 처리구가 가장 효과적이었다. 앞으로도 지금까지 진행된 결과를 바탕으로 시들음병원균에 대한 길항미생물 검색을 계속하면서, 이들의 배양조건을 최적화하고, 이들 길항균이 식재용토 내에서 안정적으로 지속할 수 있도록 식재용 매질의 개발을 검토하고자 한다. 일차적으로 제주지역에서 채취한 47종의 토양으로부터 15종의 미생물이 분리되었다(Table 5).

Table 5. Soil samples collected and number of antagonists screened from the habitat area of *Cymbidium* to examine for *Fusarium oxysporum* f. *cattleya* growth.

Soil sample		Used soil for cymbidium culture	Soil from the <i>Cymbidium</i> habitat	Total
No. of soil sample		15	32	47
No. of soil samples/isolates screened	1st screening <sup>z</sup>	9/34	10/91	19/125
	2nd screening <sup>y</sup>	8/12	7/18	15/30

<sup>z</sup> Screening by modified Herr's and Hebbar's method from soil.

<sup>y</sup> Screening by the dual culture on YMA and TSA from 1st screened isolates.

## 2. 분리 동정된 길항균의 선별 및 양균 활성화도 측정법 확립

내륙지역의 토양시료로부터 세균류를 분리하기 위해, Nutrient broth (1% meat extract, 1% peptone, 0.2% NaCl, 10ppm Amical 48) 배지를, 방선균류를 분리하기 위해 Glucose-Asparagine 배지(1% glucose, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, asparagine 0.05%, 10ppm Amical 48)와 Glycerine-Czapek 배지(1% glycerol, 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10ppm Amical 48)를, 그리고 진균류를 분리하기 위해 Glucose-Czapek 배지(1.2% glucose, 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50ppm streptomycin)를 사용하였다. 풍건한 동일 시료를 각각의 배지를 10ml씩 함유하는 대형 시험관(50ml 용량)에 넣고, 30°C에서 진탕배양한다. 배양물을 원심분리(10,000xg)한 다음, 상등액을 시들음병원균에 대해 길항력을 시험하였다. 길항력은 TSA(tryptic soy agar, Difco Co.) 배지, YMA (0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, 2% agar) 그리고 Czapek agar 배지를 이용하여 통상의 대칭배양법이나 투명한 시험에 따라 수행하였다(Table 6.).

또한 길항효과가 높은 isolate를 대상으로 *F. oxysporum* f. *cattleya*와 *E.*



*carotovora*의 길항효과를 조사하였다. 길항 %는 길항거리/병원균과 길항균의 접종거리  $\times 100$ 으로 환산하였다.

내륙지역에서 채취한 토양시료로부터 27종의 미생물이 시들음병원균에 대해 길항력을 갖는 미생물로 스크리닝되었으며, 이들 미생물과 일차적으로 검색한 미생물중 비교적 길항력이 높은 방선균 A-12 및 세균 B-10주를 포함하여 *Fusarium oxysporum*에 대해 길항력을 조사한 결과가 Table 7과 같았다.

선발된 각종 길항균의 양균 활성도를 측정하기 위하여 방선균에서는 isolate A2, 5, 12를 Bacteira에서내륙지역에서 채취한 토양시료로부터 27종의 미생물이 시들음병원균에 대해 길항력을 갖는 미생물로 스크리닝되었으며, 이들 미생물과 일차적으로 검색한 미생물중 비교적 길항력이 높은 방선균 A-12 및 세균 B-10주를 포함하여 *Fusarium oxysporum*에 대해 길항력을 조사한 결과가 Table 8과 같았다. 이들 결과와 앞의 결과로부터 일차적으로 제주지역에서 분리된 미생물중 방선균 A-12와 세균 B-10이 높은 길항력을 나타내었다(Fig. 7.).

Table 6. Antagonistic activities on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* by the micorbes isolated from soils.

Isolates	Zone inhibited in length (mm)	
	TSA	YMA
A-1	15	14
A-2	17	15
A-3	15	7
A-4	13	8
A-5	17	2
A-6	11	0
A-7	11	12
A-8	14	9
A-9	9	12
A-10	7	14
A-11	13	6
A-12	22	1
A-13	16	12
A-14	19	13
A-15	13	8
B-1	17	0
B-2	18	0
B-3	8	14
B-4	12	14
B-5	19	2
B-6	11	5
B-7	15	2
B-8	16	6
B-9	10	13
B-10	24	0
B-11	15	2
B-12	12	0
B-13	10	7
B-14	11	4
B-15	14	8

Each of the isolate was streaked at a distance of 2cm from the center of Petri dish containig the TSA or YMA and cultured for 2 days, and a mycelial disk of *Fusarium oxysporum* f. *cattleyae* was placed on the opposite side at a distance of 4cm.

Table 7. Antagonistic activities of isolates on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum*

Isolates	Media	TSA	PDA
GBB-11		20*	22
GBB-14		18	16
GBB-14-1		15	24
GBB-14-2		22	25
GBB-15		17	17
GBB-17		25	28
GBB-18-1		25	22
GBB-18-5		17	18
GBB-19		19	25
GBB-20		22	28
GBB-21		23	29
GBB-21-1		24	15
GBB-22		16	18
GBB-24		15	14
GBB-25		19	18
GBB-25-1		17	17
GBB-27		18	22
GBB-28		21	17
GBB-29		14	20
GBB-30		18	30
GBB-32		22	20
GBB-42-1		22	18
GBB-43		20	15
GBB-47		17	21
GBB-52		18	19
<i>Bacillus subtilis</i>		26	35
GBB-55			
GBB-OOK		20	30
A-12		22	25
B-5		19	22
B-7		15	23
B-10		24	13

\* Clear Zone Diameter in mm.

Table 8. Percent of mycelial growth inhibition with *Fusarium oxysporum* f. *cattleya* and *Erwinia carotovora* on the TSA medium in the presence of various antagonists.

Antagonistic isolates	% of inhibition to the plant pathogen	
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cattleya</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
A-2	25	0
A-3	40	10
A-5	30	0
A-12	60	3
B-2	45	5
B-5	65	0
B-7	50	2
B-10	60	0
B-11	40	0

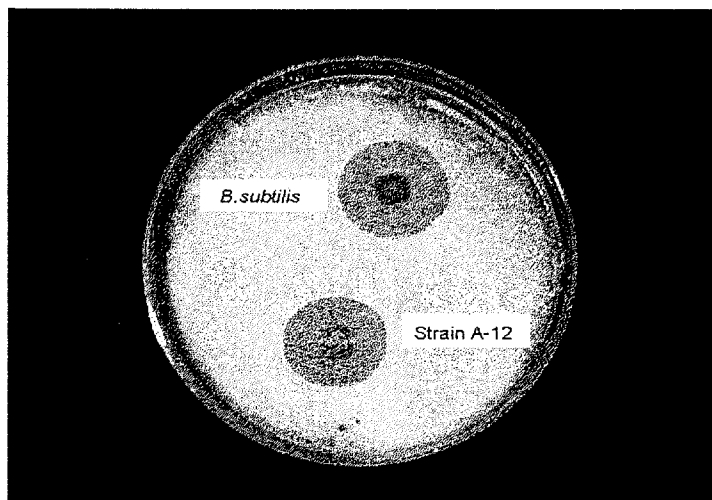


Fig 7. Clearzone test using paper disc method exhibited against *Fusarium oxysporum* f. *cattleya* antagonistic isolates, indicating the inhibited circle for *Fusarium* mycelial growth on TSA media.

### 3. 선발된 길항균의 식물적응도 및 방제력 검정

우선 분리주의 병원성을 검정하기 위해, PDA 배지에서 생육된 배양물로부터 *Fusarium* 포자 현탁액( $5 \times 10^7$  cfu/ml)을 준비하였다. 또한 조직배양하여 생육이 왕성한 *Cym. kanran*의 배양병에 *Fusarium* 현탁액을 처리한 것과 병원균을 처리전 15일에 우수 길항균으로 분리된 GB-55균을 처리한 후의 식물체 고사 여부를 관찰한 결과, 길항균 처리구는 80% 이상이 생존하는 것으로 나타났으나 길항균 처리없이 *Fusarium* 처리한 구는 90% 이상이 고사한 것으로 관찰되었다(Fig. 8).

45g 톱밥, 45g 유채박 그리고 10g 미강으로 구성되는 식재용 매질과 코코넛피트를 1:10의 중량비로 혼합하여 식재용토를 사용하여 트레이(30cm×22cm)에 담고, 여기에 조직배양된 4종의 심비디움(*Cym. nevo-marginatum*, *Cym. kanran*, *Cym. goeringii*, *Cym. lancifolium*) 유묘를 10반복으로 식재하고, 준비된 포자현탁액 10ml를 관수하고 통상의 방법으로 3개월간 생육시키면서 생존율을 관찰하였다. 생존율은 30-50%로 나타났으며, 특히 *Cym. goeringii*가 분리된 시들음병원균에 대해 가장 민감한 것으로 관찰되었다 (Table 9).

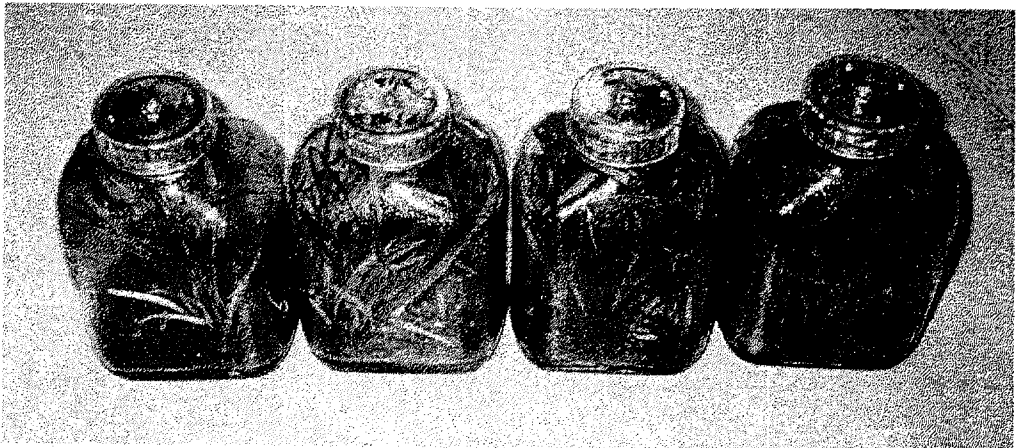


Fig. 8. *In vitro* inoculation of *Fusarium* (left) and antagonistic isolates (GBB-55) treatment of 15 days before *Fusarium* inoculation (right).

한편, 이들 선발미생물에 의한 소규모의 길항균 적응도 및 방제력 검정이 이루어졌다. 이를 위해, 방선균 A-12는 Tryptic Soy Broth 배지 (Difco Co.)를 이용하여 30°C에서 대수증식기 말기까지 진탕배양하였으며, 세균류는 YM 배지 (Difco Co.)를 이용하여 동일 조건에서 대수증식기 말기까지 진탕배양하였다. 전배양물을 45g 톱밥, 45g 유채박 및 10g 미강으로 구성되는 식재용 매질에 5%(v/v)가 되도록 접종하고, 상온에서 15일간 간헐적으로 교반하면서 정치배양하였다. 접종배양물과 코코넛피트를 1:10의 중량비로 혼합하여 최종적인 동양란 식재용토로 사용하였다.

한편, 3% Corn Steep Liquor (CSL)과 2% Soybean Flour로 구성된 배지(pH6.5)에 상기의 전배양물을 5%(v/v) 접종하여 30°C 조건에서 대수증식기 말기에 이를 때까지 진탕배양하였다. 이 배양물을 임의로 희석하여 살포용 액제로 하였다. 또한, 전배양물을 상기의 식재용 매질 45g에 2 ml 접종하고 상온에서 4일간 배양하였다. 이 접종 배양물을 코코넛피트로만 구성된 식재용 상토 5g에 혼합하여 사용하였다. 또한 화학 약제와의 비교를 위해 시들음병 방제에 일반적으로 많이 사용되고 있는 benlate 제제를 처리하여 길항균 효과를 비교 검토하였다. 식물재료로는 양란계 심비디움인 *Cym. 'Anmitu Hime'*, *Cym. 'Marirorencin'*, 그리고 Kawano mericlone에서 새로이 개발한 미등록 품종 중 특히 부패병에 약한 것으로 알려진 2 품종의 1년생 CP묘를 4치 플라 스틱분에 식재한 후 시험에 임하였다. 각각의 처리구에 대하여는 1 주일간 상온에서 정치한 다음, PDA에서 배양하여 시들음병원균 포자현탁액( $5 \times 10^7$ )을 트레이당 10ml씩 토양관주하고, 생육에 따른 생존율, 엽장, 근수 등을 조사하였다. 관리는 일반재배에 준하였다.

이를 연구로부터 얻어진 결과를 Table 10에서 보는 바와 같다.

이들 결과로부터, 동양란 처리구에서는 방선균 A-12가 길항력이 가장 좋았으며 (Fig. 9, 10), 시들음병원균의 억제에 의해 생육상태도 우수하였다.

Table 9. Antagonistic and growth-promoting effects of the isolates on *Fusarium* wilt pathogenicity in oriental *Cymbidium* cultivars after treatment of 3 months.

Isolates	Cultivar <sup>z</sup>	Survival rate(%)				Leaf length (cm)				Root number (ea)			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Control		50	40	3	40	19c <sup>y</sup>	6d	12.5d	14.2b	5.3b	4.3c	9.4c	5.9d
Benlate		70	60	6	70	16.6d	6.5c	8.7e	13.1c	5.0c	4.2c	8.3d	6.1d
B5	10 0	80	7	70	22.5b	8.4c	15c	18b	7.4bc	6.8bc	11b	7.4b	
B7		90	50	6	50	24.2b	7.5b c	14.5c d	18.9a	7.5b	9.8c	14.5b	11.5a
B10		80	60	5	50	20b	6.9b	13.5b	15.8a	6.5a	5.5ab	8.4a	6.9bc
A12	10 0	10 0	9	100	24.6a	8.7a	15.4a	16.9a	8.6a	7.4a	12.5b	10.5b c	

<sup>z</sup> 1) *Cym. nevo-marginatum*, 2) *Cym. kanran*, 3) *Cym. goeringii*, 4) *Cym. lancifolium*

<sup>y</sup> Mean separation by Duncan's multiple range test at the 5% level

Table 10. Antagonistic and growth-promoting effects of the isolates on *Fusarium* wilt pathogenicity in western *Cymbidium* cultivars after treatment of 3 months.

Isolates	Cultivar <sup>z</sup>	Survival rate(%)				Leaf length (cm)				Root number (ea)			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Control		80	60	60	40	13.6 <sup>d</sup> <sub>y</sub>	7.7c	9.0c	4.7e	6.0d	5.7e	9.5c	6.2d
Benlate		10 0	50	40	60	12.5d	8.0c	9.5c	4.2e	6.0c	4.2d	5.8d	1.9c
B5		10 0	80	10 0	80	12.0b	8.8c	9.2c	5.7b	6.5c	4.1c	3.5c	4.2b
B7		80	60	60	40	15.2c	8.8 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	11.2a	5.8d	8.0a	4.5b	6.0a	4.8a
B10		10 0	90	90	100	16.4a	9.9a	10.8a	6.4a	6.9a	4.2a	5.8a	3.3b
A12		10 0	80	90	90	17.2c	11.0 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	13.7a	7.5c	6.6a	4.0b	5.3b	5.8b

<sup>z</sup> 1) and 4) *Cym.* new varieties from Kawano mericlone Co., Ltd. 2) *Cym.* 'Anmitu Hime', 3) *Cym.* 'Marirorencin'.

<sup>y</sup> Mean separation by Duncan's multiple range test at the 5% level





Fig. 9. The influence of the effective antagonistic isolate (lower) on the growth of 4 different oriental cymbidium species as compared to the control without the isolate (upper).

A K G M A K G M

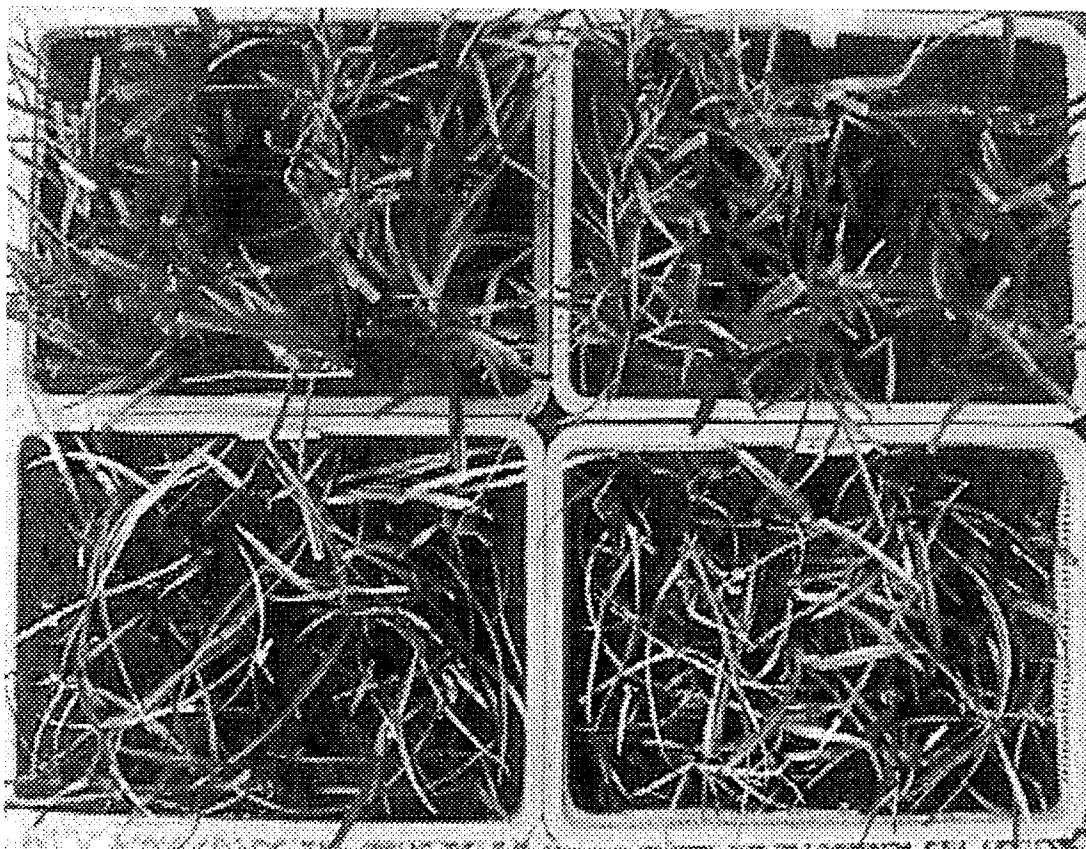


Fig. 10. The influence of antagonistic microbes (supposedly *Streptomyces* spp. involved) on cymbidium after inoculation with *Fusarium* and *Erwinia* (7 days after introduction of the antagonist)

A - *Cym.* 'Anmitsu Hime', K - *Cym. kanran*, G - *Cym. goeringii*,  
M - *Cym.* 'Mary Laurencia'

#### 4. 선발된 길항균의 타 작물 적용성 검토

오이의 잎마름병에 대한 길항균들의 방제 효과를 검정한 결과 길항균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927을 살포한 구에서는 방제가가 93.8%, *Bacillus subtilis* GBB-55에서는 90.0%, 그리고 길항균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 와 길항균 *Bacillus subtilis* GBB-55를 혼용하여 처리한 구에서는 100%의 방제가를 보였다 (Table 11). 또한 오이의 잿빛곰팡이병에 대해서도 길항균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927을 처리한 구에서는 92.9%의 방제가를 보였으며, 길항균 *Bacillus subtilis* GBB-55의 처리구에서는 85.7%, 그리고 이 두가지 길항균을 혼용처리한 구에서는 97.2%의 높은 방제가를 보였다 (Table 12).

이들 결과들로부터 선발된 2가지 길항균들은 난의 부패병 뿐만 아니라 다른 원예작물의 병해에도 적용이 가능 할 것으로 여겨진다.

Table 11. Protective effect of antagonists *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 and *Bacillus subtilis* GBB-55 against leaf blight of cucumber in vinyl house

Treatment	Cotyledone		Leaf	
	Protective value (%)	Infected area (%)	Protective value (%)	Infected area (%)
Control	-	48.5	-	40.0
<i>Streptomyces kasugaensis</i> GBA-0927	90.5	4.5	93.8	2.5
<i>Bacillus subtilis</i> GBB-55	83.5	8.0	90.0	4.0
<i>Streptomyces kasugaensis</i> GBA-0927 + <i>Bacillus subtilis</i> GBB-55	95.5	2.0	100.0	0

Table 12. Protective effect of antagonists *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 and *Bacillus subtilis* GBB-55 against gray mold of cucumber cultivated by hydroponic method

Treatment	Infected area (%)	Protective value(%)
Control	35.0	-
<i>Bacillus subtilis</i> GBB-55	5.0	85.7
<i>Streptomyces kasugaensis</i> GBA-0927	2.5	92.9
<i>Bacillus subtilis</i> GBB-55 + <i>Streptomyces kasugaensis</i> GBA-0927	1.0	97.2

## 5. 길항미생물의 동정

### 1) 길항미생물 *Bacillus subtilis* GBB-55의 동정

균주의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology, Microbiological methods, Manual of methods for general bacteriology, Microbiology - a laboratory manual, Bergey's manual of systematic bacteriology 및 식품공학실험 등에 수록되어 있는 일반적인 세균동정법에 따라 행하였다.

선별된 길항미생물중 세균으로 가장 길항력이 우수한 *Bacillus subtilis* GBB-55에 대하여 형태적 관찰, 세포지방산 분석 그리고 생화학적 시험을 수행하였으며, 그 결과를 Table 13에 정리하였다.

이들 결과로부터 분리주 *Bacillus subtilis* GBB-55는 형태학적으로 Gram 양성, 간상이며, 내생포자를 형성하는 것으로 관찰되었으며, 생화학적 및 생리학적 성질은 Table 13와 같았다. 따라서 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며, *Bacillus subtilis* GBB-55로 명명하였다.

Table 13. Identification of the isolated bacteria *Bacillus subtilis* GBB-55

Morphological characteristics	Gram positive		
	Rod shape (0.5-1.0 $\mu$ m width x 1.5-3.0 $\mu$ m length)		
	Sporangium not swollen		
	Spore shape ellisoidal		
	Spore shape central to subterminal		
Major cellular fatty acids	C15:0 antesio	43.8%	C15:0 iso 26.1%
	C17:0 anteiso	7.6%	C17:0 iso 6.8%
	C16:0 iso	4.5%	C16:0 4.1%
	C14:0 iso	2.5%	
Biochemical test	Characteristics		Result
	Catalase		+
	Anaerobic growth		-
	Voges-Proskauer Test		-
	Acid from	D-Glucose	+
		L-Arabinose	+
		D-Xylose	-
		D-Mannitol	+
	Hydrolysis of Casein		+
	Hydrolysis of Starch		+
	Utilization of Citrate		+
	Nitrate reduced to nitrate		+
	Formation of Indole		-
	Growth at pH	6.8 (NB)	+
		5.7 (SDA)	+
Growth in NaCl	2%	+	
	5%	+	
	7%	+	
	10%	+	
Growth at	30 $^{\circ}$ C	+	
	37 $^{\circ}$ C	+	
	50 $^{\circ}$ C	+	
	55 $^{\circ}$ C	-	

2) Fusarium wilt에 대한 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 균주의 동정

가. 형태학적 특성 분석

선발된 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 형태학적 특성을 검토하기 위하여 inorganic salt starch agar 평판배지(ISP No.4)상에서 30℃, 7-10일 정도 배양한 후 주사전자현미경으로 관찰한 결과 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 spore chain은 spiral한 형태를 나타내었고 spore chain이 분절되어있음을 볼 수 있었다 (Fig. 11, Table 14).

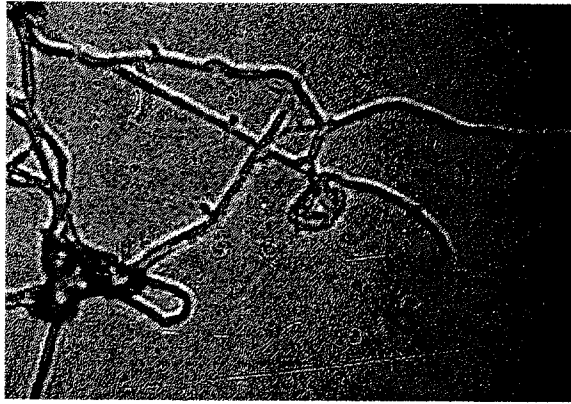


Fig. 11. Morphological feature of isolate A-12 on slide culture( $\times 1000$ )

Table 14. Morphological characteristics of the isolated strain *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927

Morphological characteristics	<i>Streptomyces kasugaensis</i> GBA-0927
Spore chain	Spiral
Spore size	1.2-1.4 X 2.0 $\mu$ m
Spore surface	Smooth
Color of sporulated	Grey
DAP	LL-type

나. 배양학적 특성 분석

선발된 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927을 각종 ISP배지 상에서 3주 동안 배양하면서 생육정도와 기균사의 색깔, 균락의 상면과 이면의 색, 가용성 색소의 여부 등을 관찰한 결과 균의 생육은 양호하였으며 기균사의 색깔은 회색 또는 옅은 노란색을 나타내었으며 후면색깔은 노란색 또는 갈색 계통을 나타내었다(Table 15).

Table 15. Cultural characteristics of the isolated strain A6261 on various media

Media	Growth	Aerial mycellium	Reverse color	Soluble pigment
Yeast-malt extract agar (ISP No.2)	good	Grey	Brown	None
Oatmeal agar (ISP No.3)	good	Grey	Brown	None
Inorganic salt starch agar (ISP No. 4)	good	Yellow	Yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)	good	Yellow	Yellow	None
Tyrosine agar (ISP No. 7)	good	Yellow	Yellow	None
Glucose-asparagine agar	good	Yellow	Yellow	None
Sucrose-nitrate agar	good	Yellow	Brown	None
Nutrient agar	good	Yellow	Brown	None
Carbon utilization agar	good	Brown	Yellow	None

다. 세포벽 성분의 특성 분석

세포벽중의 diaminopimelic acid(DAP)와 아미노산의 성분구성을 연구한 결과는 다음과 같았다. 선별균주 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 세포벽의 가수분해물을 cellulose TLC plate상에서 methanol-water-5NHCl- pyridine(16:3:1:2)으로 전개하고 표준물질과 비교한 결과 LL-type과 동일한 위치에서 spot을 확인할 수 있었으며, 아미노산 성분으로 glutamine, alanine, glycine 등이 존재함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 선별균주 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927은 *Streptomyces*속으로 추정되었다. 따라서 선별균주 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 는 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927로 명명하였다.

# 제 4 장 길항미생물을 이용한 방제 및 길항물질의 분리

## 제 1절 서론

식물의 토양병해는 식물의 토양내 조직이나 지재부에 발생하는 병으로써 그 병원균이 토양내에 존재하며 외부 병징도 발병이 한참 경과된 후에야 외부 병징이 나타나기 때문에 방제 시기를 정확히 알 수 없고 화학적 방제로는 방제에 한계가 있다. 특히 난 시들음병을 방제하기 위하여 농가에서 주로 톱신같은 벤지미다졸계의 약제를 사용하고 있으나 거의 효과는 없는 실정이다. 이러한 실정에서 환경이나 인축에 해가 없으며 효과가 지속될 수 있는 생물적 방제법으로 난 시들음병을 방제하고자 시도하였다.

생물적 방제의 기작에는 기생(parasitism), 포식 (predation), 경쟁 (competition), 항생작용 (antibiosis), 발병억제토양 (suppressive soil), 식물생장 촉진 근권 미생물(PGPR), 유도저항성 (induced resistance)등이 있지만 대부분의 경우에 두가지 이상의 기작이 복합적으로 작용하며 여러개의 작용기작을 가질수록 더 좋은 효과를 발휘 할수 있다.

여러 작물에서 Fusarium wilt 나 Fusarium crown rot를 방제하기 위하여 여러 가지 미생물들이 생물적 방제 매개체로 사용되고 있는데 대표적인 것들이 비병원성 *Fusarium oxysporum* (Rothrock and Gottlieb, 1981; Schneider, 1984; Shin and Takehara, 1998; Yang and Kim, 1996) *Pseudomonas* spp.(Elad and baker, 1985), *Arthrobacter* spp.(Sneth, 1981), *Alcaligenes* spp.(Yeun and Scroth, 1986), *Trichoderma* spp.(Moon 등, 1995; Ordentlich 등, 1991), *Penicillium* spp.(Lin and Cook, 1983), *Bacillus* spp.(Yeun 등, 1985), *Sterptomyces* spp.(Chung 등, 1989), *Serratia* sp(Sneth 등, 1984)등이 있다.

또한 미생물 유래 항생물질들을 식물병 방제를 위한 농약으로 개발되는 경우가 많은데 이들 미생물 유래 항생물질들은 유기 합성 농약에 비해 몇가지 장점을 가지고 있다. 첫째는 구조와 그 활성이 매우 다양하여 저항성 개체 유발이 쉽지 않으며, 또한 자연계에서 분해가 잘되기 때문에 환경에 안전한 장점들을 가지고 있다 (Tanaka and Omura, 1993). 실제 농약으로 상품화 된 것들을 몇가지 예를 들면 방선균으로부터 분리된 Blasticidine S (Larsen, 1989), Polyoxin (Tomlin, 1994), Ksaugamycin (Suhara 등, 1972), Validamycin (Kaneda, 1988), Mildiomycin (Tashiro, 1984), 그리고 담자균으로부터 분리된 Strobilurin (Leroux, 1996)등이 있다.



따라서 본 연구에서는 자연에서 분리하여 난류의 시들음병에 대한 방제효과가 인정되어 선발된 *Bacillus subtilis* 계의 GBB-55균주와 *Streptomyces kasugaesis* GBA-0927 균주를 대상으로 최적배양조건 확립과 응용적매질개발 및 항생물질의 분리와 정제를 수행하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 길항 미생물의 종류별 최적 배양 조건 확립

#### 1) *Bacillus subtilis* GBB-55의 배양최적화

*B. subtilis*의 최적 배양조건을 검토하기 위해 기본배지로서 사용한 배지의 조성은 다음의 Table 16와 같다.

Table 16의 기본배지를 사용하여 30℃, 250rpm의 조건에서 진탕배양하면서, 질소원 및 탄소원의 변화에 따른 대사산물활성과 균생육을 조사하였다. 대사산물활성은 시들음병 원인균에 대해 실시하였으나 원인균인 *Fusarium*의 생육이 느린 단점이 있었으므로, 실험의 보다 원활한 진행을 위해 병원성세균을 포함한 42 종류의 세균에 대해 항균성을 조사한 결과, *Achromobacter aceris* IF03166이 *Bacillus subtilis* GBB-55 대사산물에 가장 민감한 것으로 판단되어 지속적인 실험에 사용하였고, 항균활성은 배양 세균에 대한 투명환의 크기로 측정하였으며, 균의 생육은 희석평판배양법을 사용한 생균수 및 분광광도계를 이용한 흡광도(O.D. at 600nm) 측정을 병행하였다. 질소원으로는 meat extract, peptone, corn steep liquor, soybean meal, casamino acid, tryptone, urea, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, yeast extract, polypeptone에 대해 조사하였으며, 이 때 탄소원으로는 glucose를 이용하였다. 탄소원으로는 glucose, sucrose, starch, xylose, glycerol, molasses, dextran(M.W. 70,000, 8,000, 40,000)에 대해 조사하였으며, 이 때 질소원으로는 soybean meal를 이용하였다. 전배양배지는 LB broth(tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)를 이용하였으며, 접종물량은 1(v/v)%로 하였다.

한편 *Bacillus subtilis*(*Bacillus subtilis* GBB-55)는 내생포자를 형성하는 특징이 있으며, 배양시간의 경과에 따라 autolysis에 의한 영양세포수의 급격한 감소가 이뤄지는 현상이

관찰되었으며, 안정적인 미생물원제의 공급면에서 이 문제점을 개선할 필요가 있는 것으로 판단되어 안정적인 내생포자의 형성을 유도하였다.

안정한 내생포자의 형성을 위해, 내생포자의 cortex 형성에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있는 금속이온( $Ca^{2+}$ )과 dipicolinic acid(DPA)의 첨가 효과 그리고 열처리에 의한 내생포자 유도를 검토하였다.

Table 16. Composition of the basal medium

Carbon source	0.8%
Nitrogen source	0.8%
Minimal salt soln.	200ml
0.1M $MgSO \cdot 7H_2O$	10ml
Distilled water	to 1L
Minimal salts solution (per 1L)	
$Na_2HPO \cdot 12H_2O$	85g
$KH_2PO_4$	15g
NaCl	2.5g
$NH_4Cl$	5.0g

## 2) 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 배양

배지의 종류가 방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 활성대사산물의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해, 일반적으로 방선균용 배지로 다용하고 있는 Table 17과 같은 조성의 배지를 이용하여 배양에 따른 활성대사산물을 통상의 대칭배양법을 이용하여 조사하였다. 前培養은 Modified Bennet 배지(yeast extract 0.1(w/v)%, Bacto peptone 0.2%, beef extract 0.1%)를 이용하였고, 통상 50ml용 광구시험관에 glass beads(직경 5mm) 30개를 넣고 배양하여 균질한 균체현탁액이 얻어지도록 하였다. 이 배양물을 접종원으로 2%(v/v)를 사용하였다.

Table 17. Comparison of antifungal activity by Strain *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 on the various media.

Ingredients(per liter)	P medium	D medium	G medium	K medium	F medium	ISP No.4 medium
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>						2g
Beef extract		10g	1g		1g	
CaCO <sub>3</sub>		2g	2g	4g		2g
Fish meal					12.5g	
Glucose	20g	15g	20g		20g	
Glycerol		10g				
Infused Potato	200g					
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			0.25g		0.25g	1g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O						1g
NaCl			2g			1g
Polypeptone		10g				
Soluble starch			10g	25g	10g	10g
Soybean meal			25g	15g	12.5g	
Trace element <sup>z</sup>						1ml
Yeast extract			4g	2g	4g	
pH			7.2		7.2	
Antifungal activity <sup>y</sup>	19mm	12mm	10mm	10mm	12mm	13mm
Sporulation	NO	NO	NO	NO	NO	Yes(white)

<sup>z</sup> Trace element per liter : FeSO<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1g, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1g

<sup>y</sup> Diameter of clear zone against the *Fusarium* wilt isolated

## 2. 길항균을 첨가한 화분식재 매질 개발 및 제제화

본 시험의 결과에서 우수 길항균으로 선발된 길항 방성균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 와 *Bacillus subtilis*계의 *Bacillus subtilis* GBB-55를 배양하여 액제와 고형제 두가지 형태의 제제화를 위한 시험을 수행하였다.

우선 안정적인 미생물의 공급을 고려하고 높은 균밀도와 대사산물 활성의 유지를 위한 제제를 제조하기 위하여 액제로는 보존성을 높일 수 있는 방안을 모색하였고, 고형제의 경우에는 값싸고 입수가 용이한 재료를 이용하여 제제를 생산하기 위한 시험을 수행하였다.

또한 이들 길항균으로부터 만들어지는 액상 및 입상제제를 현장에서 사용할 때 기존 약제의 혼용, 또는 병용 여부 가능성을 타진코자 수종의 농약에 대한 내성 검정도 실시하였다.

## 3. *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927에서 생산되는 활성물질의 분리·정제

### 1) 활성물질의 분포

길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927에서 생산되는 활성물질의 분포 측정배양액 중에 활성물질이 균체 내와 외에 어느 정도 존재하는지의 여부를 알기 위해서 우선 8,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액과 균체를 분리하였다. 증류수로 3회 세척 및 원심분리하여 얻은 균체에 동량의 acetone을 첨가하여 하룻밤 침적시킨 후 여과하여 acetone 추출액을 얻고 이를 농축하여 acetone을 제거하고 균체 추출액을 얻었다. 균체를 분리한 상등액과 함께 이 여액의 활성 측정을 통하여 활성물질의 존재 여부를 확인하였다.

### 2) 활성물질의 pH 및 온도에 따른 안정성

활성물질 시료를 각각의 pH로 조절하고 4°C에서 24시간 방치한 후 이를 다시 pH 7로 조절하여 활성을 각각 측정하였다.

열안정성의 검토는 해양시료액을 각 온도에서 일정 시간동안 열처리한 시료를 이용하여 활성이 감소된 정도를 조사하여 온도 안정성을 살펴보았다.

### 3) 이온교환과 흡착수지 column chromatography

활성물질 시료를 pH 3, 7 그리고 10으로 조절한 후 여러 종류의 양-음이온교환수지 및 흡착수지를 사용하여 활성물질의 이온교환 및 흡착 여부를 검토하였다. 강이온교환 수지의 경우에 있어서는 pH를 3, 7 그리고 10으로 각기 나누어 행하였으며 약이

온교환수지의 경우는 수지의 pH범위에 맞춰 pH 3, 7, 10중에서 선택하여 사용하였다. SA20AP(OH<sup>-</sup>), SA20AP(Cl<sup>-</sup>), Amberlite IRA 45(OH<sup>-</sup>), WK-10(H<sup>+</sup>), WK-10(Na<sup>+</sup>), SK1B(H<sup>+</sup>) 등의 이온교환수지 20 ml를 1x32 cm column에 충전한 다음 전처리한 배양액을 pH 3, 7, 10으로 조절하여 통과시켰다. 수지에 흡착된 물질을 이온교환법에 의하여 교환처리하기 전에, 물로 수지용량의 5배 가량을 통과시켜 이온교환이 되지않은 물질들을 충분히 세척·용출시킨 후 각각을 acetic acid, NH<sub>4</sub>OH등의 용매를 사용하여 탈착시켰다. 흡착 수지의 경우 HP-20수지를 사용하여 pH를 3, 7 그리고 10으로 나누어 위와 같은 방법으로 행하였으며 100% 2-propanol (IPA)로 탈착하여 활성물질의 용리 정도를 측정하였다.

#### 4) 용매추출성의 검토

*Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 균주 배양액에서 배양여액을 모아 100 ml씩 취하여 pH를 3, 7, 10으로 조정 한 뒤 동량의 hexane, chloroform, ethyl acetate, 1-butanol를 가하여 1시간 간격으로 3회에 걸쳐 반복 추출한 후 유기용매층과 물층을 분리하여 감압농축하여 활성을 측정하였다.

#### 5) Silica gel column chromatography

Buthanol층을 sodium sulfate로 탈수시키고 여과한 다음 감압농축하여 소량의 methanol에 녹여 silica gel column chromatography를 하기 위한 시료로 사용하였다 Silica gel 400 mi를 4x30 cm column에 채우고 위의 시료를 충전하여 chloroform-methanol의 조성이 1:4로 조합된 용매를 이용하여 용리하였다.

#### 6) Prep-HPLC

Silica gel column chromatography에서 얻어진 활성분획을 감압농축하여 40% methanol에 녹인 후 Prep-HPLC column(Water Delta pak C18, 7.8 x 300 mm)에 injection하고 40% methanol을 이동상으로하여 얻어진 활성분획을 분리하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 길항 미생물의 종류별 최적 배양 조건 확립

##### 1) *Bacillus subtilis* GBB-55의 배양최적화

*B. subtilis*의 최적 배양조건을 검토하기 위해 기본배지로서 사용한 배지의 조성은 위의 Table 16와 같다.

Table 16의 기본배지를 사용하여 30℃, 250rpm의 조건에서 진탕배양하면서, 질소원 및 탄소원의 변화에 따른 대사산물활성과 균생육을 조사하였다. 대사산물활성은 시들음병 원인균에 대해 실시하였으나 원인균인 *Fusarium*의 생육이 느린 단점이 있었으므로, 실험의 보다 원활한 진행을 위해 병원성세균을 포함한 42 종류의 세균에 대해 항균성을 조사한 결과, *Achromobacter aceris* IF03166이 *Bacillus subtilis* GBB-55 대사산물에 가장 민감한 것으로 판단되어 계속적인 실험에 사용하였고, 항균활성은 배양 세균에 대한 투명환의 크기로 측정하였으며, 균의 생육은 희석평판배양법을 사용한 생균수 및 분광광도계를 이용한 흡광도(O.D. at 600nm) 측정을 병행하였다. 탄소원으로는 meat extract, peptone, corn steep liquor, soybean meal, casamino acid, tryptone, urea, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, yeast extract, polypeptone에 대해 조사하였으며, 이 때 탄소원으로는 glucose를 이용하였다. 탄소원으로는 glucose, sucrose, starch, xylose, glycerol, molasses, dextran(M.W. 70,000, 8,000, 40,000)에 대해 조사하였으며, 이 때 질소원으로는 soybean meal를 이용하였다. 전배양배지는 LB broth(tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)를 이용하였으며, 접종물량은 1(v/v)%로 하였다. 이상의 결과로부터 glycerol과 soybean meal이 탄소원과 질소원으로 적합하다고 판단되었다(Table 18, 19).

한편 *Bacillus subtilis*(*Bacillus subtilis* GBB-55)는 내생포자를 형성하는 특징이 있으며, 배양시간의 경과에 따라 autolysis에 의한 영양세포수의 급격한 감소가 이뤄지는 현상이 관찰되었으며, 안정적인 미생물원제의 공급면에서 이 문제점을 개선할 필요가 있는 것으로 판단되어 안정적인 내생포자의 형성을 유도하였다.

안정한 내생포자의 형성을 위해, 내생포자의 cortex 형성에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있는 금속이온(Ca<sup>2+</sup>)과 dipicolinic acid(DPA)의 첨가 효과 그리고 열처리에 의한 내생포자 유도를 검토하였다. 배양 종료후에 열처리(60℃에서 30분간 처리 또는 80℃에서 10분간 처리)한 경우에는 배지 내의 대사산물활성이 급격히 감소하는 현상을 나타내었기 때문에 적용이 불가능한 것으로 판단되었고, 금속이온 및 DPA의 첨가에 의한 포자형성을 유도하였다. Ca<sup>2+</sup> 이온은 배양 초기 또는 배양 중간에 첨가하여도 균의 생육과 대사산물형성에 큰 영향을 주지 않았으나,

DAP의 경우에는 배양초기에 배지에 첨가하면 대사산물형성을 크게 저해하였으므로 배양 과정 중에 첨가하여 대사산물활성과 안정적 내생포자를 유도하였다.

Ca<sup>2+</sup> 이온 농도가 포자형성에 미치는 영향은 다음의 Table 20과 같았다.

상기의 결과로부터 Ca<sup>2+</sup> 이온은 농도의 증가에 따라 균의 생육도 증가되는 경향을 보이다 20mM 이상에서 다소 감소하는 경향을 나타내었으며, 형성된 포자를 볼 때 포자형성율이 다소 떨어지나 포자수가 가장 많은 10mM이 최적인 농도로 사료되었으며, 지속적인 실험에 이 농도를 사용하였다.

한편, DPA 농도가 포자형성에 미치는 영향은, DPA를 배양 초기에 배지에 함께 첨가하면 균의 생육과 대사산물형성이 크게 억제되는 현상이 관찰되었으므로(Table 21), DPA의 첨가시기를 결정하였으며, 그 결과는 다음의 Table 22와 같다.

위의 결과로부터 최종적으로 얻어지는 포자수는 배양 개시후 12~14시간째에 첨가하는 것이 가장 적합한 것으로 판단되었으며, 무첨가의 경우에는 항균활성은 유지되나 내생포자수가 감소함을 알 수 있었다. 활성물질은 배양 개시후 4시간째부터 생성되나 6시간째와 8시간째와 같이 일찍 첨가하면 활성물질형성과 생육에 큰 부정적 효과를 미침을 알 수 있었다.

한편, 첨가하는 DPA의 농도를 결정하기 위해 배양후 10시간째에 다음의 Table 22과 같은 농도로 첨가하고 20시간째에 생균수와 포자수를 조사하였다. 위의 결과로부터 DPA 농도에 증가에 따라 영양세포수는 다소 감소하는 경향이 보였으나 포자형성율은 증가하는 경향을 나타내었다. 이 때 대사산물활성의 변화는 거의 무시할 수준이었고, 따라서 대사산물활성과 생균수 모두 양호한 50 μM을 첨가농도로 결정하였다.

한편, 앞의 결과들을 정리하여 기본배지에 탄소원으로 glycerol, 질소원으로 soybean meal, Ca<sup>2+</sup> 10mM을 첨가하고 접종물 5(v/v)%를 이용한 30L 배양에 있어서의 경시적 변화를 다음의 Table 23에 정리하였다.

위의 결과로부터 균의 생육에 따라 대사활성물질이 증가하나 pH는 다소 감소하다 포자형성유도에 증가되는 경향을 나타내었다. 배양 10시간째 DPA를 첨가하였을 때, 용존산소가 증가하는 경향을 나타내는데, 이는 영양증식세포의 활동이 DPA의 첨가에 의해 중단됨으로써 영양증식세포

에 의한 용존산소의 소비가 이뤄지지 않음을 의미하며, 흡광도의 증가는 영양증식세포가 내생포 자로의 전환에 따른 것으로 판단되었다. 포자형성은 통상 DPA 첨가후 6-10시간내에 완성되는 것으로 판단되었다.

Table 18. Effect of nitrogen sources on the antifungal activity of *B. subtilis* (*Bacillus subtilis* GBB-55).

Nitrogen sources	Antifungal activity*
Meat extract	18
Peptone	16
Corn steep liquor	15
Soybean meal	19
Casamino acid	15
Tryptone	12
Urea	18
Ammonium sulfate	18
Ammonium nitrate	15
Yeast extract	16
Polypeptone	16
Control	14

\* Diameter of clear zone(mm)



Table 19. Effect of carbon sources on the antifungal activity of *B. subtilis*

Carbon sources	Antifungal activity*
Glucose	19
Dextran (MW=70,000)	16
Dextran (MW=8,000)	20
Dextran (MW=40,000)	15
Xylose	12
Sucrose	20
Starch	19
Glycerol	24
Molasses	17

\* Diameter of clear zone(mm)

Table 20. Effect of the concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  ion on the sporulation of *B. subtilis* (*Bacillus subtilis* GBB-55).

Concentration of $\text{Ca}^{2+}$ ion	Vegetable cells	Spores	% of spore formation	Antifungal activity <sup>z</sup>
0 mM	$4.5 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$	22	19
5 mM	$5.3 \times 10^9$	$1.6 \times 10^9$	30	19
10 mM	$7.2 \times 10^9$	$3.4 \times 10^9$	47	19
20 mM	$4.9 \times 10^9$	$2.7 \times 10^9$	55	19
50 mM	$2.4 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$	62	17

<sup>z</sup> Diameter of clear zone(mm)

Table 21. Effect of addition time of DPA<sup>z</sup> on the sporulation of *B. subtilis* (*Bacillus subtilis* GBB-55).

Feed time		at 6hr	at 8hr	at 10hr	at 12hr	at 14hr	Control
	pH	6.5	6.8	7.0	7.1	7.2	
	Vegetative cells	8.0 x 10 <sup>7</sup>	5.0 x 10 <sup>8</sup>	8.0 x 10 <sup>8</sup>	1.0 x 10 <sup>9</sup>	2.0 x 10 <sup>9</sup>	
	Spores <sup>y</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	2.0 x 10 <sup>7</sup>	4.0 x 10 <sup>7</sup>	2.0 x 10 <sup>8</sup>	2.0 x 10 <sup>8</sup>	
	pH	7.4	7.4	7.5	7.6	7.5	7.5
After 24hr	Vegetative cells	2.0 x 10 <sup>9</sup>	2.0 x 10 <sup>9</sup>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	3.0 x 10 <sup>9</sup>	2.0 x 10 <sup>9</sup>
	Spores	1.6 x 10 <sup>9</sup>	1.5 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>9</sup>	2.5 x 10 <sup>9</sup>	2.5 x 10 <sup>9</sup>	9.0 x 10 <sup>8</sup>
	Fungal Activity <sup>x</sup>	11	13	18	18	18	18

<sup>z</sup> The concentration of dipicolinic acid added : 50ppm(30 μM)

<sup>y</sup> Sporulation was induced by heat treatment at 80°C for 10min

<sup>x</sup> Diameter of clear zone(mm)

Table 22. Effect of the concentrations of DPA on the sporulation of *B. subtilis* (*Bacillus subtilis* GBB-55).

Concentration of DPA	Vegetable cells	Spore s <sup>z</sup>	% of spore fromation	Fungal activity <sup>y</sup>
0 μM	5.2 x 10 <sup>y</sup>	2.2 x 10 <sup>9</sup>	42	18
12.5 μM	2.5 x 10 <sup>y</sup>	1.1 x 10 <sup>9</sup>	44	18
25 μM	1.7 x 10 <sup>y</sup>	1.2 x 10 <sup>9</sup>	65	18
50 μM	1.5 x 10 <sup>y</sup>	1.3 x 10 <sup>9</sup>	87	18
100 μM	1.4 x 10 <sup>y</sup>	1.1 x 10 <sup>9</sup>	78	18

<sup>z</sup> Sporulation was induced by heat treatment at 80°C for 10min

<sup>y</sup> Diameter of clear zone(mm)

Table 23. Time course of the *B. subtilis* on 30L jar fermenter.

Time	0hr	4hr	6hr	9hr	10hr	11hr	15hr	20hr	24hr
pH <sup>z</sup>	6.86	6.6 8	6.7 4	6.86		7.01	7.09	7.19	7.23
OD <sub>600nm</sub>	4.7	6.7	7.1	8.2		8.3	12.1	15.6	14.2
D.O	39.1	15. 7	1.5	0.1	DAP <sup>y</sup> of additio n	0.4	2.1	25.4	24.6
Vegetative cell				9.1x10 <sub>8</sub>		1.2x10 <sup>y</sup>	3.8x10 <sup>y</sup>	4.2x10 <sub>9</sub>	2.0x10 <sup>y</sup>
Spores <sup>y</sup>				9.0x10 <sub>7</sub>		9.5x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>y</sup>	3.4x10 <sub>9</sub>	1.2x10 <sup>y</sup>
Funga l activity <sup>x</sup>	0	12	16	19		19	19	19	19

<sup>z</sup> The concentration of dipicolinic acid added : 50 μM

<sup>y</sup> Sporulation was induced by heat treatment at 80°C for 10min

<sup>x</sup> Diameter of clear zone(mm)

## 2) 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 배양

배지의 종류가 방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 활성대사산물의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해, 일반적으로 방선균용 배지로 다용하고 있는 Table 17와 같은 조성의 배지를 이용하여 배양에 따른 활성대사산물을 통상의 대칭배양법을 이용하여 조사하였다. 前培養은 Modified Bennet 배지(yeast extract 0.1(w/v)%, Bacto peptone 0.2%, beef extract 0.1%)를 이용하였고, 통상 50ml용 광구시험관에 glass beads(직경 5mm) 30개를 넣고 배양하여 균질한 균체현탁액이 얻어지도록 하였다. 이 배양물을 접종원으로 2%(v/v)를 사용하였다.

실험결과로부터 활성대사산물의 생성은 P 배지가 우수하였으며, 포자형성배지로는 ISP No. 4 배지가 우수하였다. 따라서 P 배지는 액체배양용 배지로 이용하였으며, ISP No. 4 배지는 내구성이 강한 포자를 얻기 위한 포자생산용 배지로 이용하였다. 그리고 항균활성분석의 신속성을 올리기 위하여 본 연구실에서 보관중인 52종의 culture collection에서 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927이 생산하는 활성대사산물에 가장 민감한 균주 *Enterobacter aeruginosa*를 test organism으로 병행하였다.

실험실에서 제조한 P 배지(껍질을 제거한 감자 100g을 세절하고 121℃에서 1시간 autoclave하고 거즈를 이용하여 거른 다음, 여과액에 포도당 20g을 첨가하고 최종부피를 1L로 조정한다)를 이용하여 배양시간에 따른 대사산물의 생성을 관찰한 결과는 다음의 Table 24과 같다.

배양에 따른 급격한 pH의 변화는 관찰되지 않았으며, 활성대사산물은 배양 60시간째부터 형성되기 시작하여 배양 4일째에 포화되는 경향을 나타내었다. 그리고 배양경과에 따른 배양물 내의 포자형성은 관찰되지 않았다. 따라서 액체 배양을 통한 활성대사산물의 제제(액제)는 배양시간이 긴 단점을 가질 수 있을 것으로 판단되었으나, 배지의 최적화를 통해 활성대사산물의 생산량을 높이고자 다음과 같은 배양조건을 검토하였다. 액체배양을 위한 기본배지로는 Table 25와 같은 조성의 배지를 기본배지로 이용하였다. 이 배지를 이용하여 탄소원, 질소원, 금속이온 등이 활성대사산물이 미치는 영향을 검토하였다.

Table 24. Time course of the strain *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927 on 5L jar fermenter

Time	12hr	24hr	36hr	48hr	60hr	72hr	84hr	96hr
Fungal activity*	-	-	-	-	11	13	14	14

\* Diameter of clear zone

Table 25. Basal medium for sunmerged cultures of Strain *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927

Ingredients	Concentrations(w/v,%)	
Carbon sources	1.0%	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1%	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1%	0.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2%	0.2
CaCO <sub>3</sub>	0.2%	0.2
Trace solution*	1 ml/L	

\* Trace solution contains 0.1%(w/v) FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1% MnCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O and 0.1% ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

우선 기본배지를 이용하여 질소원이 방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 생육과 활성대사산물 생산에 미치는 영향을 비교검토한 결과 다음의 Table 26와 같았다.

상기의 결과로부터 yeast extract가 활성대사산물의 생산에 가장 좋은 질소원으로 관찰되었으며, peptone, gelatin hydrolyaste, soybean flour, corn steep liqour 등도 활성대사산물의 생산을 촉진하는 것으로 판단되었다. 따라서 계속적인 실험에는 질소원으로 기본배지에

yeast extract를 추가하기로 하였다.

다음으로 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 생육과 활성대사산물의 생산에 미치는 탄소원에 대해 검토하였다. 결과는 다음의 Table 27과 같았다.

Table 26. Effects of nitrogen sources on the growth and metabolite production of strain *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927.

Nitrogens sources	Biomass	Activity*	
		<i>Fusarium</i> sp.	<i>E. aeruginosa</i>
Urea	0.54	--mm	--mm
Beef extract	0.68	12mm	13mm
Gelatin hydrolysate	0.81	20mm	13mm
Polypeptone	0.85	12mm	11mm
Soybean flour	1.15	20mm	14mm
Casamino acid	1.00	18mm	14mm
Yeast extract	0.90	22mm	15mm
Peptone	0.93	21mm	14mm
Corn steep liquor	1.04	20mm	14mm
Soytone	0.80	19mm	14mm
Tryptone	0.98	18mm	13mm
None	0.53	13mm	8mm

Inoculum size was 2v/v(%). The cultivations were conducted at 30°C and 200rpm for 4 days. Biomass means the g dry cell mass per 100ml of cultures. Nitrogen source was 1%(w/v). Carbon source was 1%(w/v) of starch.

\* Activities : diameter of clear zone



Table 27. Effects of carbon sources on the growth and metabolite production of strain *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927

C a r b o n sources	Biomass	Activities	
		<i>Fusarium</i> sp.	<i>E. aeruginosa</i>
None	0.42	10mm	15mm
Xylose	0.48	10mm	15mm
Sucrose	0.80	20mm	16mm
Starch	0.81	23mm	18mm
Molasses	0.76	21mm	16mm
Glucose	0.82	18mm	11mm
Lactose	0.47	10mm	12mm
Glycerol	0.82	18mm	14mm

상기의 결과로부터 탄소원에 따른 균의 생육은 큰 차이가 없었으나, 활성대사산물의 생산은 탄소원으로 starch를 이용하였을 때 가장 좋았고, sucrose와 molasses도 효과적인 탄소원으로 판단되었다. xylose와 lactose는 방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927에 의해 이용되지 못하므로 균의 생육도 매우 낮고 대사활성산물은 질소원으로 사용한 yeast extract에 기원함을 알 수 있었다. 활성대사산물에 탄소원보다는 질소원이 더 많은 영향을 주는 것으로 판단되었다.

다음으로 기본배지에 질소원과 탄소원으로 yeast extract와 starch이 첨가된 배지를 이용하여, 아래의 Table 28과 같은 금속이온이 방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 생육과 활성대사산물에 미치는 영향을 조사하였다. 첨가되는 금속이온의 농도는 1mM이었으며, 모두 염화물이었다.

Table 28. Effects of metal ions on the growth and metabolite production of strain *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927

Metal ions	Biomass	Activities <sup>z</sup>	
		<i>Fusarium</i> sp.	<i>E. aeruginosa</i>
Ni	0.93	23	18
Mo	0.90	21	17
Cu	0.97	22	18
Fe(III)	0.99	22	17
Mn	0.93	23	18
Co	0.94	29	22
Zn	0.98	25	20
Fe(II)	0.90	22	18
Control	0.96	23	18
Control(B) <sup>y</sup>	0.85	18	14

Inoculum size was 2v/v(%). The cultivations were conducted at 30°C and 200rpm for 4 days. Biomass means the g dry cell mass per 100mℓ of cultures. Carbon source and nitrogen source were 1%(w/v) of starch and yeast extract. The concentration of additive metal ions was 1mM.

<sup>z</sup> Activity : diameter of clear zone

<sup>y</sup> Basal medium except for trace solution

기본배지에서 금속이온을 제외한 대조구에서는 그렇지 않은 대조구에 비하여 균체량이 다소 감소하는 영향을 보여, 기본배지로 첨가되는 금속이온이 균의 생육과 활성대사산물의 형성에 다소 영향을 주는 것으로 관찰되었으며, 부가적으로 첨가된 금속이온 중 코발트(Co) 2가 이온은 활성대사산물에 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 아연(Zn)도 활성대사물질의 생산에 높은 효과가 있었다. 또한 조사된 금속이온중 활성대사산물의 생산을 저해하는 이온은 없는 것으로 판단되었다.

이상의 결과로부터 기본배지를 이용하여 질소원, 탄소원, 금속이온이 방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 생육 및 활성대사산물 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 질소원은 yeast extract, 탄소원은 starch, 금속이온은 코발트( $\text{Co}^{2+}$ )이 가장 최적인 요인으로 관찰되었다.

## 2. 길항균을 첨가한 화분식재 매질 개발 및 제제화

### 1) *Bacillus subtilis*(*Bacillus subtilis* GBB-55)의 제제화

길항미생물을 생물제제로서 제제화하기 위한 안정적인 미생물원제의 공급면에서 높은 균밀도와 대사산물활성을 유지하는데 앞선 배양 최적화의 결과들이 매우 유익하다고 판단되었으며, 상기 배양물을 이용하여 다음의 Table 29과 같이 formulation하여, 지속적인 실험을 실시하였다. 한편, 미생물제제(액제)의 보전성을 시험 중에 있으며, 결과는 다음의 Table 30와 같다.

위의 결과로부터 포자형성유도가 불안정하거나 열처리에 의해 포자형성유도가 이뤄지면, 균수의 감소와 대사산물활성이 매우 저하됨을 알 수 있고, DPA와  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의한 포자형성유도가 안정적이며, formulation에 사용된 부형제들도 제제에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

한편, 본 실험에 사용된 *B. subtilis*(*Bacillus subtilis* GBB-55)는 단백질 분해능과 전분 분해능이 우수한 특징이 있으므로, 이를 활용하고자 우리의 식생활과 밀접한 관계가 있는 두부

공장에서 폐기물로 나오는 비지(통상 C/N ratio가 10~12:1로 알려져 있음)를 배양배지로 이용하여 고체배양하고, 이 배양물을 토양개량제로 오래전부터 사용되어 온 zeolite에 흡착하여 입제 형태의 미생물제제를 만들어보고자 시도하였다.

우선 두부공장에서 공급받은 비지 30g를 통상의 Petri dish에 고루 펼쳐지도록 한 다음, 30분간 autoclave하고 전배양물을 106/ml의 농도로 희석한 다음, 5ml 정도씩을 배지표면에 고루 묻도록 접종하고, 30℃에서 36시간 배양한 다음, 멸균증류수를 이용하여 현탁한 다음, 콩비지 단위 g당 생균수를 측정하였다. 반면 비교구로서 전기의 액체배양용 배지와 콩비지 30%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%로 구성되는 액체배지를 이용하여 고체배양과 액체배양의 장단점을 검토하고자 하였다. 그리고 콩비지 배지를 이용하여 배양한 배양물을 1 중량과 zeolite 10 중량을 혼합·흡착·풍건하여 입제상 미생물제제를 만들었다. 이들에 대해 결과는 다음의 Table 31과 같다.

상기 결과로부터 *B. subtilis*(*Bacillus subtilis* GBB-55)를 입상으로 제제화할 경우에 값싼 콩비지를 이용한 고체배양이 액체배양에 비하여 보다 균밀도가 높은 미생물원제를 공급할 수 있다는 면에서 경제성이 있을 것으로 판단되었다.

Table 29. Formulation compositions.

Ingredients	Percent	Functions
Cultures	87	Active ingredient
Glycerol	5	Thickner
Sodium chloride	5	Preservative
Potassium propionate	0.3	Preservative
Sodium sorbate	0.2	Preservative
Methyl parabenzoate	0.1	Preservative
Tween 80	1.5	Dispersant
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	pH4.5	pH adjustant
Final volume with H <sub>2</sub> O	to 1L	

Table 30. Stability of the formulated microbial preparations.

Preparation Date	Sample	Initial/observed cell numbers	Observed date	Fungal activity (initial/observed)	
98/10/31	Sporulation induction	No	9x10 <sup>9</sup> /7x10 <sup>7</sup>	98/12/30	18/17mm
		Heat	1x10 <sup>9</sup> /5x10 <sup>8</sup>	98/12/30	18/12mm
		DPA + Ca <sup>2+</sup>	1x10 <sup>9</sup> /1x10 <sup>9</sup>	98/12/30	18/18mm
99/01/25	Formulation I		5x10 <sup>9</sup> /5x10 <sup>9</sup>	99/02/02	18/18mm
			5x10 <sup>9</sup> /3x10 <sup>9</sup>	99/03/20	18/17mm
			5x10 <sup>9</sup> /8x10 <sup>8</sup>	99/05/07	18/16mm

Table 31. Comparison of the submerged and solid culture

	Solid cultures	Submerged cultures		Solid preparation
		Basal production medium	Bean-curd refuse medium	
Cell number	2.5x10 <sup>10</sup> /g	5.4x10 <sup>9</sup> /ml	4.0x10 <sup>9</sup> /ml	2.4x10 <sup>9</sup>
Antifungal activity <sup>1)</sup>	17mm*	18ml	19mm	ND

1) Diameter of clear zone

2) ND : not determined

3) Cultures was diluted with sterilized water into the equal volume of Bean-curd refuse medium

## 2) 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 제제화

앞선 길항방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 최적배양조건에서 배양된 배양물을 장기간 보존하면서 이용할 수 있도록 액상으로 제제화하기 위해, 다음의 Table 32과 같이 보존제를 이용한 보존성(가스발생과 오염여부)을 조사하였다.

상기 결과로부터 보존제로 propionic acid를 첨가하는 것이 제품의 안정성을 유지하는데 도움이 되며, Propionic acid에 lactic acid와 ethanol를 첨가한 시험구에서도 좋은 결과가 얻어졌다.

한편, 대사산물보다 내구성이 강한 포자의 생성을 검토하고자 고체배양법을 검토하였다. 토양개량성과 미생물의 서식공간을 제공할 수 있는 vermiculite(직경 3~5mm)를 담체로 사용하여 통기성을 높이는 간이고체배양법을 고안하여 보았다. 질석, 미강 그리고 물을 1: 1의 중량비로 혼합한 다음, 상기의 ISP No. 4 배지의 성분들을 0.4 중량비의 물에 용해하여 첨가하였다. 그리고 혼합물 150g를 멸균할 수 있는 2ℓ 플라스틱 용기에 분주한 다음, 121℃에서 30분간 autoclave한 다음, 상기 P 배지를 이용하여 배양한 배양액을 1000로 희석한 다음, 10ml씩 접종하였다. 접종된 배지를 30℃에서 상대습도 90-95%의 조건을 유지할 수 있는 항온항습기를 이용하여 1일 1회 흔들어 주면서 1주일간 정치배양하였다. 배양물을 풍건하여 수분함량을 5% 이하로 조정한 후, 분쇄하여 고체배양에 의한 입상 제제로 하였으며, 계속적인 실험에 제공하였다. 배양 후의 길항방선균의 농도는  $10^9$  cfu/g이었다.

한편, *B. subtilis*(*Bacillus subtilis* GBB-55)와 방선균 *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 배양물로부터 만들어지는 액상 및 입상 제제를 현장에서 사용할 때, 기존의 약제와의 병용 또는 혼용의 여부 가능성을 조사하기 위해 아래의 Table 33과 같은 농약에 대한 내성테스트를 실시하였다. 농약공업협회의 농약사용지침서 상에 권장하는 농도보다 2배 높은 농도에 대하여 농약내성을 실시하였다. 각각의 농약을 함유하는 PDA 또는 LB 배지 상에서의 생육유무를 농약내성의 기준으로 하였다. 조사된 살충제와 제초제에서는 그로메(유)를 제외하고는 병용이 가능할 것으로 판단되며, 살균제의 경우에는, 혼용 또는 병용 시에 주의할 필요가 있을 것으로 판단되며, 특히 치람계 농약에는 매우 민감성이 높은 것으로 판단되었다.

Table 32. Effect of the preservatives on the liquid micorbial preparations

Presevatives	Concentrations	Observations <sup>z</sup>		
		Gas production <sup>y</sup>	Contaminations	Result
Acetic acid	0.1%	+	+	
	0.5%	+	+	
Lactic acid	0.1%	+	+	
	0.5%	+	+	
Propionic acid	0.1%	+	+	
	0.5%	-	-	Good
Ethanol	1.0%	-	-	
	5.0%	+	+	
m- <i>p</i> -methyl- benzoate	0.1%	+	+	
	0.5%	+	+	
Acetic acid 0.1% + Ethanol 1.0% Lactic acid 0.1% + propionic acid 0.1% + Ethanol 1.0%		+	+	
		-	-	Good
Control		+	+	

<sup>z</sup> Liquid micorbial preparations were preserved at 30°C and observed after 1 month.

The initial pH and the activity of the liquid microbial preparations were 4.5 and 25mm.

<sup>y</sup> + : positive; - : negative

Table 33. Compatibility with some chemical

용도	농약명	Strains	
		<i>Bacillus subtilis</i>	Actinomycetes <i>Streptomyces</i> kasugaensis GBA-0927
살균제	메로닐(수)		
	사프롤(수)	×	
	에디졸(유)		
	이프로(수)		×
	이프로·치람(수)	×	×
	치람(수)	×	×
	카프로(수)	×	×
	펜시쿠론(수)		
	펜시쿠론·터부코나졸(액)		×
	포리옥신디·치람(수)	×	
	헥사코나졸(액)		
훼나리			
살충제	그로메(유)	×	
	나크·포사론(수)		
	에토펜플록스(수)		
	트랄로메스린(수)		
제초제	트리클로피르(유)		
	파미드(유)		
	펜디(수)		
	피라조선티론·에칠(수)		
	피리부티카브(수)		



### 3. *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927에서 생산되는 활성물질의 분리·정제

#### 1) *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927에서 생산되는 활성물질의 분포측정

균체를 분리한 상등액과 함께 이 여액의 활성 측정을 통하여 활성물질의 존재 여부를 확인한 결과 균체 내에 30% 가량 존재하였으며 균체 외에 나머지 70%가 존재하였다. 이들의 추출물을 농축하여 TLC로 분석하였을 때 활성물질이 균체내·외에 모두 분포하고 있었으나, 균체내의 시료의 경우 활성물질외의 다른 물질들을 다량함유하고 있어 원심분리 상등액만을 모아 다음 실험에 이용하였다.

#### 2) *Streptomyces kasugaensis* GBA-0927에서 생산되는 활성물질의 pH 및 온도에 따른 안정성

활성물질의 pH에 대한 안전성을 검토한 결과 산성과 약알칼리성 영역에서 비교적 안정한 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 60, 80, 100℃에서 시간별로 온도 안정성을 관찰한 결과 100℃에서는 1시간까지는 초기활성과 비교하여 90%이상의 활성을 나타내었으며 60, 80℃에서 방치한 경우는 1시간까지 측정하여도 활성의 감소를 보이지 않는 결과를 나타내어 본 물질은 비교적 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다.

#### 3) *Streptomyces* GBA-0927에서 생산되는 활성물질의 용매추출성

*Streptomyces kasugaensis* GBA-0927의 배양여액을 pH 3.0, 7.0 그리고 10.0으로 조정된 뒤 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 사용해 각각 3회 반복 추출하여 나온 유기용매층과 물층에 잔존하는 활성물질의 활성을 측정한 결과 활성물질이 pH 3.0에서 butanol 층에 많이 존재하는 결과를 보였다.

#### 4) Ion exchange and adsorption column chromatography

이온교환 수지 및 흡착 수지에 대해서는 다음과 같이 진행하였다.

강이온교환 수지의 경우에 있어서는 pH를 3, 7 그리고 10으로 각기 나누어 행하였으며 약이온교환수지의 경우는 수지의 pH범위에 맞춰 pH 3, 7, 10 중에서 선택하여 사용하였다. SA20AP(OH<sup>-</sup>), SA20AP(Cl<sup>-</sup>), Amberlite IRA 45(OH<sup>-</sup>), WK-10(H<sup>+</sup>), WK-10(Na<sup>+</sup>), SK1B(H<sup>+</sup>) 등의 이온교환수지 20 ml를 1 × 32 cm column에 충전한 다음 전처리한 배양액을 pH 3.0, 7.0, 10.0으로 조절하여 통과시켰다. 수지에 이온교환된 물질을 이온교환법에 의하여 교환처리하기 전에, 물로 수지용량의 5배 가량을 통과시켜 이온교환이 되지 않은 물질들을 충분히 세척·용출시킨 후 각각을 acetic acid, NH<sub>4</sub>OH등의 용매를 사용하여 탈착시켰다. 흡착 수지의 경우 HP-20 수지를 사용하여 pH를 3.0, 7.0 그리고 10.0으로 나누어 위와 같은 방법으로 행하였으며 100% IPA로 탈착하였다.

활성물질은 SA20AP(OH<sup>-</sup>)을 사용하였을 때 pH 3.0에서 이온교환이 일어나고 용리되었고 pH 7.0과 pH 10.0에서는 이온교환이 일어나지 않았다. SA20AP(Cl<sup>-</sup>)의 경우에는 pH 3.0에서 활성물질의 일부가 이온교환이 되었으나 pH 7.0과 pH 10.0에서는 대부분이 통과하였다. Amberlite IRA 45(OH<sup>-</sup>)는 활성물질의 대부분이 이온교환되었으나, 용리되어 나오지 않았다. WK-10(H<sup>+</sup>)은 pH 7.0에서 활성물질은 전혀 이온교환이 일어나지 않았으며, pH 10.0에서는 일부만 교환이 일어났다. WK-10(Na<sup>+</sup>)에서는 pH 7.0, 10.0에서 활성물질의 일부만이 교환되었다. SK1B(H<sup>+</sup>)의 경우는 활성물질의 일부가 교환되고 용리되었다. HP-20의 경우는 pH 3.0에서 흡착율이 높고 100% IPA로 용리하였을 때 탈착율도 높았다. 그러나, pH 7.0에서도 흡착율이 높았으나 탈착율이 pH 3.0보다 낮았고 pH 10.0의 경우는 흡착과 탈착이 잘 되지 않았다.

이상의 결과로부터 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 후, pH 3.0으로 조절하여 HP-20에 활성물질을 흡착시킨 후 IPA로 용리하므로서 효율적으로 불순물을 제거하고 농축할 수 있을 것으로 생각되었다.

##### 5) HP-20 adsorption column chromatography

HP-20 흡착 수지 pH 3.0에서 활성물질이 흡착되었기 때문에 HP-20 흡착 수지를 채운 컬럼에 원심분리 상등액을 pH 3.0으로 조정한 후에 통과하였다. 먼저 증류수로 A<sub>254nm</sub>에서 흡광되는 물질이 흘러나오지 않을 때까지 용리하여 불순물을 제거하고 흡착

된 물질을 용리하기 위하여 30, 50, 100% IPA로 순차적으로 극성을 변화시키면서 탈착시켰다. 대부분의 활성물질은 수지에 흡착되었으며 50%IPA로 용리하였을 때 활성물질의 대부분이 용출되었다. 50% IPA에서 탈착된 활성분획을 모아 다음 정제 과정을 진행하였다.

#### 6) 유기용매 추출성

HP-20 흡착수지 column에서 50% IPA로 탈착시킨 활성분획을 rotary evaporator로 감압농축하여 IPA을 증발시킨 후에 그 여액의 pH를 3.0, 7.0 그리고 10.0으로 조정하고 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 사용해 각각 3회 반복 추출하여 나온 유기용매층과 물층에 잔존하는 활성물질의 활성을 측정한 결과 활성물질이 pH 3.0에서 butanol 층에 많이 존재하는 결과를 보였다. 따라서 활성물질은 산성물질임을 알 수 있었다. HP-20 adsorption column chromatography에서의 활성분획은 감압농축하여 IPA을 제거한 후 pH를 3.0으로 조절하여 동량의 butanol로 3회 추출하였다. 분액여두상에서 진탕추출시 처음에는 매우 천천히 진탕하여 emulsion이 생기지 않도록 한 다음 강하게 진탕하였으며, 적당량의 NaCl을 가하여 층의 분리를 원활하게 하였다.

#### 7) Silica gel column chromatography

Butanol층을 sodium sulfate로 탈수시키고 여과한 다음 감압농축하여 silica gel column chromatography를 하기 위한 시료로 사용하였다 Silica gel 400 ml를 4 × 30 cm column에 채우고 위의 시료를 충전하여 chloroform-methanol의 조성이 1:4로 조합된 용매를 이용하여 용리하였다. 용출된 활성분획에 대하여 분리정제 과정을 진행하였다.

#### 8) Prep-HPLC

Silica gel column chromatography에서 얻어진 활성분획을 감압농축하여 40% methanol에 녹인 후 Prep-HPLC column(Water Delta pak C18, 7.8 ×300 mm)에 injection하고 40% methanol을 이동상으로하여 활성분획을 분리하였으며 현재 구조분석을 위하여 기기분석을 진행하고 있다.

# 제 5 장 난바이러스의 동정 및 효율적인 진단법 개발

## 제 1 절 서론

최근 국민들의 문화수준의 향상과 조직배양에 의한 우량품종의 대량 증식에 의한 난의 보급증가로 인해 각종 난바이러스병에 의한 피해가 급증하는 추세이다. 이들 난바이러스는 난 고유의 관상가치를 떨어뜨리는 직접적인 원인이 되는 것은 물론 품종 퇴화와 조직배양으로 대량 증식된 후대에까지 전염되어 경제적으로 커다란 손실을 초래하게 된다. 현재까지 분리 동정되어진 난바이러스는 약 30여 종으로써 (Zettler 등, 1990), 이중에서 오돈토글로섬 윤문 바이러스 (odontoglossum ringspot virus; ORSV)와 심비디움 모자이크 바이러스 (cymbidium mosaic virus; CymMV)이다 (Bodnaruk and Hennen, 1979; Hu 등, 1994; Ryu 등, 1995; 박 등 1990; Pearson and Cole, 1986).

바이러스병은 화학적방제가 거의 불가능하고, 따라서 피해를 줄이는 방법은 크게 4가지가 알려져 있다 (Matthews, 1993). 첫째는 바이러스 저항성 식물을 육종하는 것이며 둘째는 바이러스를 매개하는 곤충을 방제함으로써 바이러스 피해를 감소시키는 것이다. 세 번째는 열처리나 생장점을 조직배양함으로써 무병주를 생산, 재배하는 것이며, 네 번째는 정확한 진단을 통해 이병주를 제거함으로써 전염원을 조기에 제거하는 방법이다. 바이러스는 극히 적은 양이 모본에 존재하더라도 후대를 거치면서 바이러스 양이 증가되어 피해를 일으킬 수 있으므로 보다 정확하고 효율적인 진단방법이 개발되어야 할 것이다. 현재 난에서 CymMV와 ORSV의 진단에는 여러 가지 혈청학적인 방법과 RT-PCR에 의한 진단법이 주로 사용되고 있는데 (박 등, 1998; 정 등, 1996) 본 실험에서는 보다 효율적인 tissue blotting을 개발하고 이를 이용하여 제주지역에서 재배되는 나으로부터 위 2가지 바이러스의 감염정도를 알아보려고 실시하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 난에 유해한 바이러스 동정 및 tissue blotting법 개발

#### 1) 난에 유해한 바이러스 동정

#### 가. 공시식물

제주도의 일반 농가에서 입수한 식물 중 외견상 바이러스 감염으로 보이는 심비디움속 3종과 조직배양을 통해 나온 한란 강건묘를 대조구로 두어 1차 검정 공시식물로 사용하였다. 각 시료를 0.5g씩 최해 잘게 썰어 유발에 넣은 후, 0.1% sodium sulfate 가 함유된 phosphate buffered saline (PBS) 1.5 ml를 첨가하고 마쇄한 즙액을 microcentrifuge (Eppendorf 5415C, Germany I로 원심분리하여 (12,000 rpm, 5분) 상층액을 취하고, 클로로포름과 1:1(V/V)로 혼합한 후 다시 원심분리하여 (12,000 rpm, 5분) 상층액을 취하여 실험의 재료로 사용하였다.

#### 나. 바이러스에 대한 특이항체

자체제작한 항혈청(in house antiserum)은 가토에 면역시켜 제조 중이므로 각각의 바이러스에 대한 항혈청은 ATCC로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

이차항체와 효소의 접합체 제조 : 가토의 혈청 immunoglobulin을 염소(goat)에 과 면역시켜 얻은 항혈청을 Protein G-Sepharose Gel (Pharmacia, Sweden) column을 사용한 친화성 크로마토그래피 방법으로 순수 분리하여 2차항체로 사용할 Goat anti-Rabbit IgG를 얻었다. Coat anti-Rabbit IgG는 Nakane와 Kawaoi(1974)의 방법으로 Horseradish peroxidase (HRP, RZ=3.0, Sigma, USA)와 접합시켰다.

#### 다. 전자현미경 검경

전자현미경 검경은 Lesemann (1984)의 방법을 응용하여 실시하였다. 즉, parapin 에 시료를 50 $\mu$ l 떨어뜨린 후 foam var로 colloidion막을 제작한 200 mesh phosphor bronze grid에 침적시킨 다음 2% phosphotungstic acid를 같은 양으로 섞어 3분 동안 염색하고 filter paper상에서 건조시킨 다음 전자현미경에서 검경하였다 (JEM 1200EX-II (80KV), JEOL, Japan). 염색된 grid는 적당한 배수 (x 10,000)로 검경하고 바이러스 특유의 형태를 보이는 시야를 택하여 촬영하였다.

#### 2) Nitro-cellulose(NC) paper를 이용한 면역블롯팅

ELISA법을 응용한 것으로 NC paper등에 검사 식물의 즙액을 점적하고 항혈청 및 효소접합체로 반응시켜 발색되는 정도로 바이러스 감염 여부를 판단할 수 있는 간단한 방법이며 일선농가에서도 간편히 실시할 수 있다. 검사법의 순서는 다음과 같이 확립하였다.

#### 가. 바이러스의 흡착

NC paper에 시료를 2 $\mu$ l씩 점적하고 실온에서 16시간 자연건조시켜 바이러스를 흡

착시킨 다음 blocking buffer (0.5% BSA PBS)를 가하여 실온에서 20-30분간 침지시켜 흡착되지 않은 부위를 봉쇄하였다. 이후 여액을 제거하고 NC paper를 실온의 여과시상에서 5분간 건조시켰다.

#### 나. 측정법

일반적인 ELISA 조건(임과 이, 1988)을 기본으로 다소 변형시켜 실시하였다. 공시 식물의 엽액이 흡착된 NC paper를 실온에서 항체희석액 (ORSV: x 500, CyMV: x 500)에 담귀 1시간 동안 반응시킨 후, washing buffer (0.05% PBS Tween 20)를 사용하여 5분간 서서히 흔들며 3회 세척하였다. 2차 항체로는 Goat anti-Rabbit IgG-biotin (SIGMA, USA)를 500배 희석하여 사용하였으며, 반응은 실온에서 1시간 동안 실시하였다. 세척은 washing buffer를 사용하여 5분간 서서히 흔들며 3회 세척하였다. 효소표지액으로는 Horseradish peroxidase (HRP)가 표지된 Avidin접합체 (SIGMA, USA)를 500배 희석하여 37°C에서 1시간 반응시키고 washing buffer로 3회 세척하였다. 발색제로는 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 사용하였다. 즉 발색제 용해액 (0.2M Trizma-HCl, pH 7.2)에 DAB 10mg을 용해하고 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60 $\mu$ l 첨가한 액에 NC paper를 침지시켜 반응시켰으며, 적당한 발색반응이 이루어지는 것이 확인되는 즉시 꺼내어 PBS로 세척하고 건조시켰다.

#### 다. 바이러스 감염의 판정

바이러스가 감염되지 않았음이 확인된 식물의 즙액을 대조로 하여 spot의 발색정도를 비교하여 감염을 판단하였다.

### 3. 조직배양난과 수입 혹은 자생난에 대한 바이러스병 조사

#### 1) 재료 및 방법

현재 蘭의 우해 바이러스의 종류와 피해현황 및 감염경로를 파악하기 위하여 본 연구자가 연구하여 발표한 시험결과를 토대로 하고 이에 후속한 방제대책에 대한 연구 결과는 다음과 같다.

供試植物 : 제주도 및 서울근교의 蘭 재배지역 등에서 自生春蘭(*Cymbidium goeringii*), 寒蘭(*C. kanran*), 惠蘭(*C. ensifolium*) 등의 東洋蘭과 洋蘭심비디움(*Cymbidium spp*)등을 채집하여 供試植物로 사용하였다.

또한 *Cymbidium spp.*, *Cattleya spp.*, *Dendrobium spp.*, *Epidendrum spp.*, *Miltonia spp.*, *Odontoglossum spp.* 및 *Phalaenopsis spp.* 등을 供試植物로 사용하여 이들 蘭에서 *cymbidium mosaic virus* 및 *odontoglossum ringspot virus*의 感染相을 조사하였다.

#### 4. 바이러스병 종합방제를 위한 월동 기주식물로부터의 진딧물 생활사 조사

##### 1) 재료 및 방법

연구기간 : 1999. 5. ~ 2000. 5.

연구재료 : 조천 초등학교 신흥분교장 부근 조록나무(10년생) 10구루를 선정함.

연구기기 : 실체현미경 (20~80배)

광학현미경 (Olympus B071)

생체절단기 (Vibratome)

연구 방법 : 외형적으로 산란 흔적이 있는 조록나무 잎을 1개월 간격으로 채취하여 실체 현미경, 광학 현미경 및 생체 절단기를 이용하여 충영의 발달과정을 관찰하였으며 충영내의 진딧물의 암, 구분을 하였고 계절별로 단성생식과 양성생식하는 진딧물의 습성을 파악하였다.

### 제 3 장 결과 및 고찰

#### 1. 부패병과 바이러스 병 피해와 재배 품종 조사

제주도 내에는 대규모로 운영되는 난 농장(2,000평 이상)이 많다. 본 연구는 우선 제주도에서 재배의 주종을 이루고 있는 양란과 동양란을 대상으로 바이러스병과 부패병 발생과 피해정도를 20농가를 선정하여 자료 조사하였다.

Table 34에서 보는 바와 같이 부패병은 품종에 따라 피해정도가 다르게 나타나며 특히 발레리나 품종은 부패병에 극히 약한 것으로 조사되었다. 양란은 개화의 조만에 따라 조생, 중생, 만생종으로 구분되는데 만생종은 비교적 부패병 발생이 적고 조생, 즉 하절기를 고비로 개화하는 품종들이 부패병에 민감함을 나타내고 있다.

또한 농장주와의 면담과정에서 밝혀진 사실로 실내의 통풍이 불량한 장소에서 부패병 발생이 많은 것으로 나타나 재배환경의 개선 즉 환풍기에 의한 강제 송풍을 관수 후에 적절히 해줌으로써 병 퇴치 효과를 얻었다고 한다. 농용 약제로는 벤레이트나 다이센, 농용 마이신제제로 약간의 효과가 있을 뿐 방제의 근본적 대책이 없으므로 길항균과 같은 환경친화적 생물약제가 개발될 것을 크게 기대하고 있었다.



한편, 동양란의 경우에는 부패병의 발생이 많은데, 특히 춘란의 경우 피해가 극심하여 연간 생육 비율이 양란보다 훨씬 못 미치므로 동양란 자체가 갖는 계통적 특이성으로 풀이할 수 있다 (Table 34).

바이러스병 발생 조사에서는 양란의 경우 거의 피해를 볼수 없었음이 본 조사 결과나 재배자의 말과 일치함을 알수 있다. 원인을 분석해 볼 때 양란은 자연산을 채취하여 재배하지 않고 생장점을 재료로 한 조직배양법으로 번식되어 최고 3년 내에는 출하되는 소모성 난식물이기 때문에 바이러스병에 비록 감염되었다 하더라도 병징이 외부적으로 나타나는 극심한 정도가 없어서 피해를 우려하거나 대책을 세울 정도가 아닌 것으로 조사되었다. 바이러스 병을 옮기는 주요 매체는 진딧물, 토양선충을 꼽을수 있는데 난식물은 우선 토양매질 자체가 소위 인공토양으로 분류되는 바아크, 경석, 스페그넘모스 등을 사용 하므로 토양선충이 없고, 온실내에서 재배되므로 외부에서 유입되는 진딧물 또한 차단되는 조건이고 보면 바이러스병의 감염은 타 식물에 비해 구조적으로 경미함을 알수 있다. 또한 다른 희귀란과 같이 증식을 위하여 분주를 하지 않고 오직 분갈이 만을 하는 특수성 때문으로도 바이러스병의 이병에 대한 염려는 없다.

한편, 동양란의 경우 (Fig. 12) 바이러스 증상이 ORSV와 CyMV 등 외견상 확연히 구별되는 난들이 많았다.

이는 거의가 중국으로부터 산채되어 곧바로 수입된 난들로써 자생지에서 수십년 동안을 자생하였으므로 바이러스병에 이미 이병되었기 때문에 재배의 이전과 채집, 수송 등의 원인에 인하여 외견상의 병징이 출현된 것으로 사료된다. 이러한 난 바이러스 병이 앞으로 국내의 건전 재배란에 이병될 소지가 많으므로 차년도에 수행할 항체여과진단법 (tissue blotting)이 개발되어 검역소에 기술 이전된다면 바이러스병의 근본적 차단이라는 차원에서 꼭 필요한 시험이 될 것이다.

Table 34. Viral and soft-rot disease of major *Cymbidium* cultivars cultivated in Cheju.

Cultivar	Plant size	Flower		Susceptibility	
		Blooming time	Color	Virus	Soft-rot
Summer Queen 'New Yasuko'	Small	Early	Green	+	+
'Mizunomaru'	Small	Early	Green	+	+
Great Sour 'A One'	Small	Early	Green	+	+
Lucky Rainbow 'Lapine Hat'	Small	Mid	Pink	+	++
'Lapine Pallas'	Middle	Mid	Pink	+	++
'Saint Lapine'	Middle	Mid	Pink	+	++
'Lapine Rendezvous'	Middle	Mid	Pink	+	++
'Lapine Dancer'	Middle	Mid	White	+	++
'Lapine Curl'	Middle	Late	Pink	+	++
'Ballerina'	Middle	Mid	Pink	+	+++
'Jung Frau'	Large	Late	White	+	+++
All Star 'Bio-Cinderella'	Large	Late	Dark Pink	+	+
'Bio-Cleopatra'	Large	Late	Light Pink	+	+
'La vie en rose'	Large	Early	Light Pink	+	++
'Odoriko'	Large	Late	Dark Red	+	+
'Papillio'	Large	Mid	Dark Red	+	++
'Spring Dance'	Large	Late	Pink	+	++
'Madonna'	Large	Late	Pink	+	++
'Chorus Girl'	Large	Late	Dark Pink	+	+
'Pink Clash'	Large	Late	Yellow	+	+
'Snow Drop'	Large	Late	White	+	+++

+ : rare, ++ : medium, +++ : severe

Table 35 . The susceptibility on virus and soft-rot disease of favorable cultivars originated from temperate zone *Cymbidium*.

Species	Plant size	Flower		Susceptibility	
		Blooming time	Color	Virus	Soft-rot
<i>Cym. kanran</i>	Middle	Early	Green	++	+++
<i>virescens</i>	Small	Late	Green	++	+++
<i>sinensis</i>	Middle	Late	Dark red	+++	+++
<i>tekkotsu-sosin</i>	Middle	Early	Light green	+++	++
<i>encifolium</i>	Middle	Early	Light green	+++	++
<i>misericors</i>	Middle	Early	Light green	+++	++
<i>gracilius</i>	Middle	Late	Light green	+++	++
<i>dumilum</i>	Middle	Late	Light green	+++	++
<i>hakuran</i>	Middle	Late	Light green	+++	++
<i>forrestii</i>	Small	Late	Light green	++	+++
<i>formosanum</i>	Small	Late	Light green	++	++
<i>faberi</i>	Middle	Late	Light green	++	++

+ : rare, ++ : medium, +++ : severe



Fig. 12. Symptoms of Cymbidium Mosaic Virus (right) and Odontoglossum Ring Spot Virus (left) on some oriental cymbidiums.

## 2. 난에 유해한 바이러스 동정 및 tissue blotting 법 개발

### 1) 난에 유해한 바이러스 동정

공시식물로 사용한 4종의 심비디움속 난 중에서 육안으로 병변이 뚜렷하여 바이러스 감염으로 높게 의심되는 시료를 취하여 전자현미경에서 검정한 결과 2종의 바이러스성의 물체를 확인할 수 있었다 (Fig. 13). 형태적으로 다형성의 섬유상으로 보이고 있어 ORSV 혹은 CyMV와 유사

한 형태를 나타내고 있었다. 한편 4번 시료는 조직배양을 통해서 나온 1년생 한란 강건묘를 대조구로 사용한 것으로 전자현미경 검경에서 어떠한 바이러스상의 물체도 검경되지 않았다.

## 2) Nitro-cellulose(NC) paper를 이용한 면역블롯팅

전자현미경 검경에 사용한 시료를 그대로 사용하여 검경한 결과, 4종의 공시식물로부터 CyMV(왼쪽 항체반응)에 양성반응을 보인 것은 2번 시료(한국 춘란)에서만 나타났다(Fig. 14). 한편 ORSV(오른쪽 항체반응)에 대하여는 1, 2, 3번 시료 모두에서 나타났고 4번 대조구, 즉 조직배양에서 나온 한란 강건묘에서는 발색 반응이 없었다. 따라서 심비디움속 난에 치명적으로 가해할 수 있는 바이러스는 ORSV가 대부분이었음을 알 수 있었다.

본 연구에서 비교한 상기두 가지 방법을 비교하여 보면, immunoblotting 방법에서 뚜렷하게 양성으로 나타난 CyMV와 ORSV의 경우도 전자현미경상의 관찰로는 겨우 수 개의 바이러스 입자의 관찰로만 만족해야 했으며, 여타의 다른 시야를 확보하지 못하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 바이러스 감염의 확진 및 정량적인 진단을 위해서 전자현미경 검경법을 권장하기는 어렵다는 결론에 도달하였다.

Fig. 13에서는 동양란계 심비디움인 *Cymbidium goerigii*, *C. kanran*, *C. ensifolium*, *C. sinense*와 서양란계인 *C. 'Saint Lapine'*, *C. 'Ballerina'*, *C. 'Jungfrau'*, *C. 'Lapin Hat'*를 공시하여 재배 증 병징이 나타난 잎의 즙액을 NC paper에 묻혀서 발색 반응을 본 것이다. 2매의 NC paper에 각각 ORSV와 CyMV 항체에 대한 발색 반응을 본 것인데, NC paper 2매에 대해 각각의 시료를 번호별로 똑같은 식물종 3개체씩을 위치가 동일하게 처리한 것이다. ORSV와 CyMV가 동시에 발색된 것이 전체적으로 50%를 차지하고 있는데, 이는 2종의 바이러스에 복합 감염되어있음을 나타낸다. 또한 ORSV나 CyMV 한쪽에만 40% 정도 발색 반응이 나타난 것은 조사 대상 식물이 각각 단일 바이러스에 감염되어 있음을 나타내고 있으며, 나머지 10%는 외형적인 병징이 있는데 반하여 NC paper를 감지할 수 없는 정도의 경증이거나 본 시험상의 오차 혹은 검정법의 기본적 오차를 의미한다고 할 수 있겠다.

따라서 면역학적인 검사법은 시스템을 처음 확립하고 소요시약을 제조하기 위한 노력과 비용이 소요되지만, 일단 검사시약의 제조와 시스템이 확립된 후에는 일선 농가에서도 능히 실시가 가능하다. 본 연구에서 증명된 immunoblotting 법은 일선 농가에서도 간편하게 실시할 수 있는 간이 검사법으로서 원예농가의 애로점의 해결에 도움이 될 것으로 생각된다.

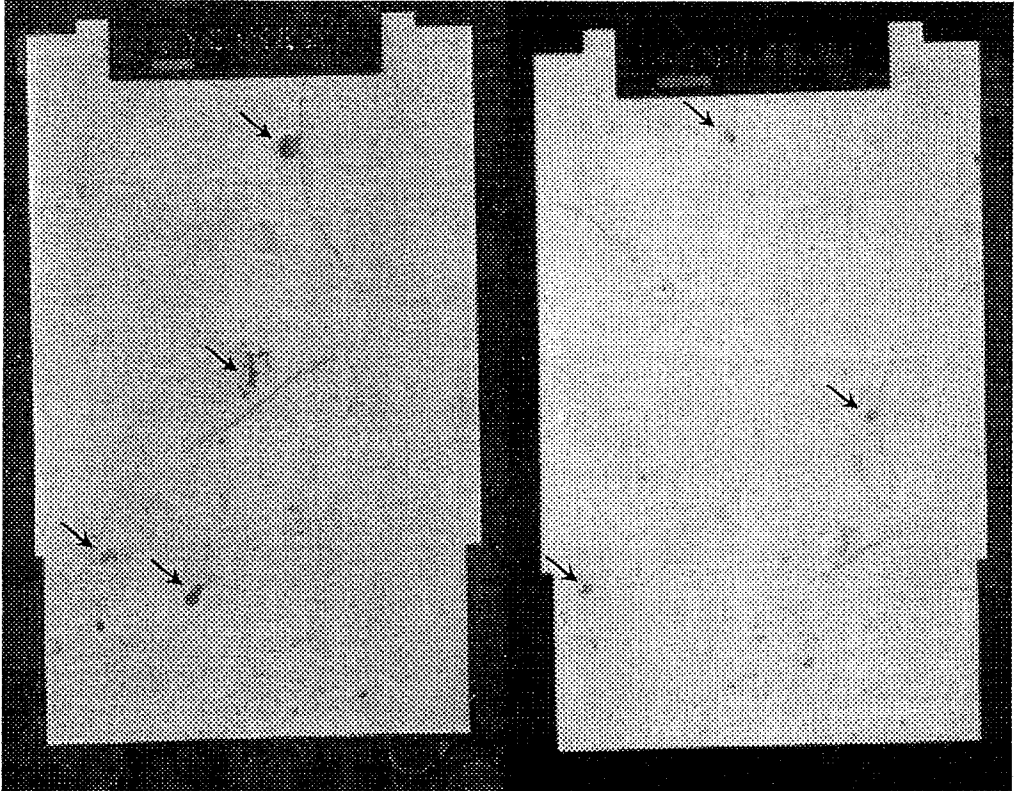


Fig. 13. Scanning electron micrographs of CyMV (linear type) and ORSV (round spot type, arrow), x10,000.

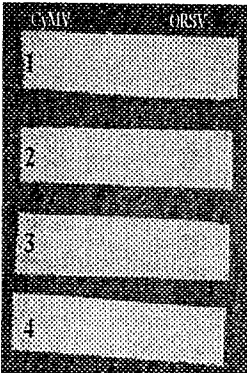


Fig. 14. Detection of CyMV and ORSV by immunoblotting method.

1. *Cymbidium kanran*
2. *Cymbidium goeringii*
3. *Cymbidium* 'Grace Kelly'
4. *Cymbidium kanran* (used as control, vigorous seedlings obtained from plant tissue culture)

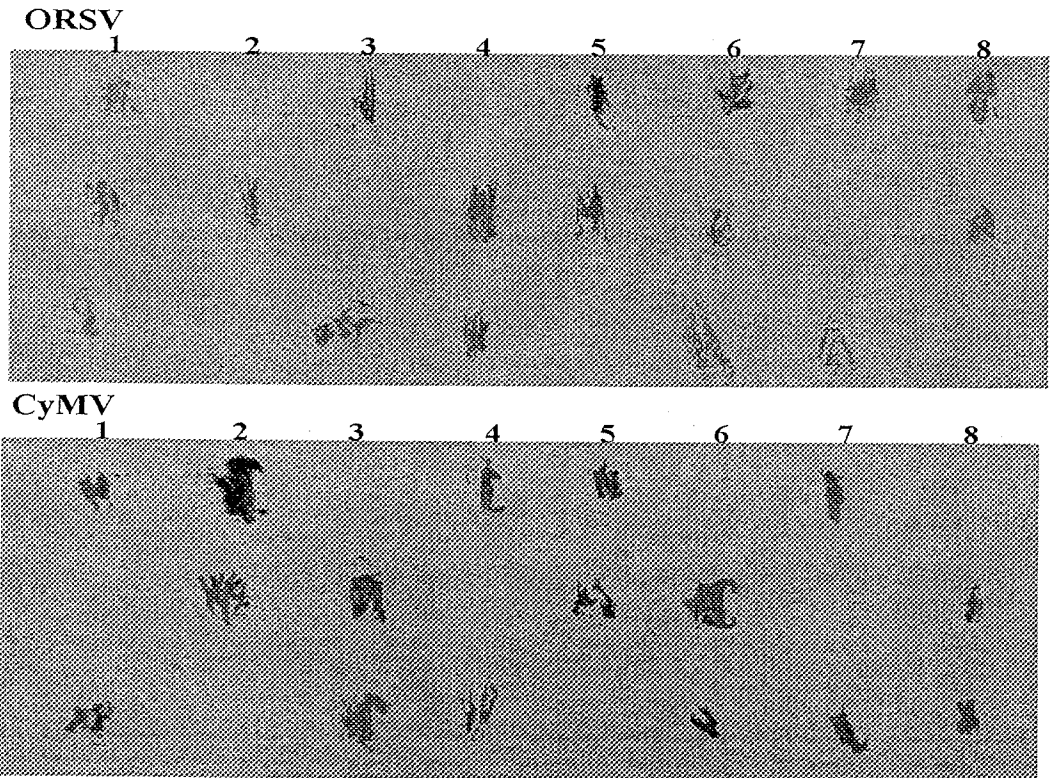


Fig. 15. Virus detection on *Cymbidium goeringii* by use of nitroso-cellulose paper (NC paper).

1. *Cymbidium goeringii*
2. *C. kanran*
3. *C. ensifolium*
4. *C. sinense*
5. *C. 'Saint Lapine'*
6. *C. 'Ballerina'*
7. *C. 'Jungfrau'*
8. *C. 'Lapin Hat'*

### 3. 조직배양난과 수입 혹은 자생난에 대한 바이러스병 조사

괴집된 蘭에서 ORSV 및 CyMV 감염상을 면역전자현미경으로 조사한 바 우리 국내재 배면적 순위별로 Cymbidium란을 최고치로 하여 밀토니아와 온시디움은 무감염을 나타내고 있어 재배연한이 긴 심비디움속란 들이 감염도가 높은 것으로 나타났다 (Table 36).

Table 36. Occurrence of odontoglossum ringspot virus and cymbidium mosaic virus as indexed by immunosorbent electron microscopy (ISEM) for certain tropical orchids.

Genus	No. of Plants indexed	No. of plants infected with			Total Infection (%)
		ORSV	CyMV	Both viruses ORSV+CyMV	
<i>Cattleya</i>	25	0	4	5	36
<i>Cymbidium</i>	52	43	1	0	85
<i>Epidendrum</i>	5	0	0	2	40
<i>Kingianum</i>	4	1	0	0	25
<i>Miltonia</i>	3	0	0	0	0
<i>Odontoglossum</i>	4	2	0	0	50
<i>Oncidium</i>	4	0	0	0	0
<i>Phalaenopsis</i>	3	1	0	0	33
Total	100	47	5	7	59

한편 바이러스병을 육안으로 검정함에 있어 모자익 무늬와 줄무늬를 나타내는 것은 ORSV가 우점적으로 나타났으며, 괴저현상을 보이는 것은 CyMV에 의해서 발현됨을 알 수 있었다 (Table 37.).



Table 37. Symptoms on orchid plants collected, and incidence of ORSV and CyMV as determined by ISEM test.

Symptom types	No. of plants infected with			Total tested	Total Infection(%)
	ORSV only	CyMV only	Both viruses		
Mosaic	28	0	0	33	85
Stripe	12	0	0	19	63
Chlorosis	3	1	0	6	66
Necrosis	0	5	5	12	83
Necrotic spot	2	0	2	5	90

모든 심비디움란의 경우 조직배양기술을 이용한 종자의 무균발아로부터 얻어진 개체 즉 재배연한이 3년정도 경과한 蘭에서는 바이러스 증상이 전혀 발견되지 않았다 (Table 38).

Table 38. Seed transmission of ORSV and CyMV from diseased *Cymbidium goeringii*<sup>z</sup>.

No. of plants tested (seedlings)	No. of plants infected with		Percentage of seed transmission
	ORSV	CyMV	
10	0	0	0

<sup>z</sup> It was naturally mixed infected with ORSV and CyMV.

Table 39. Incidence of ORSV and CyMV from randomly collected native, and cultivated, meristem cultured *Cymbidium spp.* as determined by ISEM.

	No. of plants indexed	No. of plants infected with		Percentage of seed transmission
		ORSV	CyMV	
Native <sup>z</sup>	15	1	0	6%
Cultivatd <sup>y</sup>	15	4	0	27%
Meristem cultured	10	0	0	0%

<sup>z</sup> Plants collected from their native habitats or Maintained less than 1 year in cultivation after being collected.

<sup>y</sup> Mainly imported from foreign countries.

본 조사의 가장 중요한 사안으로써 우리 국내 자연산 심비디움의 경우는 생장점 배양으로 생산된 蘭과같이 바이러스가 검출되지 않았으나 (Table 39.) 외국 특히 중국으로부터 수입된 蘭에서는 거의 30%에 가까운 바이러스 감염율을 보이고 있어 무분별한 수입으로 인하여 우리 국내의 건전묘로의 이병 가능성을 높일 우려가 있으므로 식물

검역소는 이러한 근거자료를 참고하여 방역에 철저히 기해야 할 것이다. 한편 양란으로 알려진 열대나 아열대 원산 심비디움란들은 품종이 고정되어 있기 때문에 시장성에 따라 생장점 배양을 통한 번식방법에 의하여 번식 보급되므로 재배자의 입장에서 볼 때 바이러스 감염 여부에 대한 부담이 전혀 없다. 또한 그러한 유묘를 재배하여 상품으로 출하하기까지의 기간이 하우스시설내에서 최장 36개월로 충족되므로 재배기간 중에 바이러스가 감염될 가능성이 희박하기 때문에 바이러스 오염으로 알려진 진딧물이나 토양선충의 유입을 근본적으로 차단 할 수 있는 시설내의 화분재배조건에서는 바이러스 감염에 대한 문제가 이제껏 대두된 바 없다.

따라서 바이러스 감염식물 즉 외래 도입된 난류들과 같은 공간에서 재배하지 않는 한 바이러스 오염을 최소화 할 수 있고 지금까지 알려진 대로 전정가위 같은 절단기구들에 대한 소독에 철저히 기한다면 바이러스에 대한 방제 대책은 자연적으로 정착될 수 있다고 확신하는 바이다.

라. 바이러스병 종합방제를 위한 월동 기주식물로 부터의 진딧물 생활사 조사

조록나무의 잎이나 줄기에 발생하는 혹을 충영이라고 하는데 본 연구자가 관찰한 충영내의 진딧물의 경우 *Aphididae* 科에 속하며 *Phylloxeridae*라는 속명을 가지며 우리 나라에서는 조팝나무 진딧물 종으로 불리며 2종이 확인되었다. 그림2와 같이 날개가 있는 것과 없는 것을 볼수 있는데 이는 암컷(날개가 없는 것)과 수컷(날개가 있는 것)이다. 문헌을 살펴보면 진딧물의 1년간의 생활사에서 볼 때 암수 즉 양성세대를 갖는 시기는 늦가을 기주식물에 부화되는 알들이 정상적인 생식능력을 갖도록 암·수 개체가 발생하며 봄에 탈각하여 밖으로 출현한 1세대를 지나면 단성생식 즉 무성번식으로 인하여 암컷만이 번식되어 일반 농작물에 치명적인 해를 입힌다.

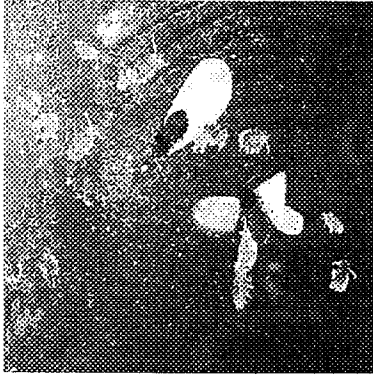
그러나 환경적 변화 특히 기온이 하강하는 늦가을이 되면 기주식물에 산란하여 월동하게 되는데 이때 암, 수가 구별되는 양성세대로 전환한다고 한다. 본 연구자의 관찰결과에서도 3월~5월에 출현하는 성충이나 충영내에서 성장하고 있는 유형의 경우 암수 2종이 확인되었다. 또한 5월 이후에는 거이 암컷만이 충영속에서 관찰되었는바 이때가 단성생식기로 추정할 수 있다. 산란은 대체로 엽맥을 대상으로 하고 있으며 잎의 성숙도와 비례하여 충영의 크기도 비대한다.

한편 유충이 성숙하기에 적합한 하계절에는 잎 뒷면에 알을 까놓고 그곳에서 부화한 유충이 엽내로 파고 들어가서 성숙하는 형태도 관찰되었다. 충영이 생긴다는 자체는 잎에 진딧물이 알을 까는 순간에 벌레의 침에 함유된 특수성분 즉 식물의 세포분열을 촉진하는 오옥신이 분비되어서 나타나는 현상인지 혹은 특수 성분이 식물의 생장호르몬 합성을 촉진하여 식물체 자체의 호르몬 내분비 현상인지에 관하여는 앞으로 후속된 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

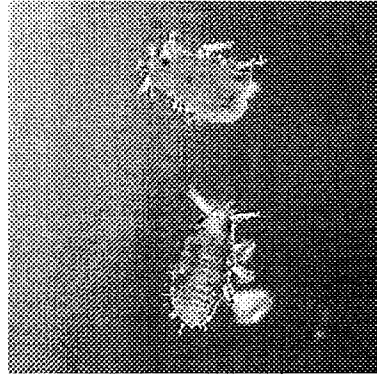
진딧물은 식물체에 기생하여 영양소를 빨아먹어 식물생장에 위해한 것 이외에도 일명 식물성 흑사병으로 알려진 바이러스 병을 매개하므로 구제대상 중에서도 악질적인 해충이다. 이러한 해충이 동계절 월동의 기주식물로 조록나무를 대상으로 은신하

는 것이 본 연구의 결과로 밝혀진 바 재배작물 이전의 구제책을 조록나무에서 먼저 찾아야 할 것이다. 즉 이들이 유성생식기능이 있는 늦가을에 조록나무 잎에 알을 까 놓는다는 사실이 밝혀진바 이시기에 조록나무에 집약적으로 살충제를 살포함으로써 월동을 사전에 방지할 수 있다. 살충제를 집약 살포하여 앞으로 무성생식하되 다량으로 급속히 증식되는 해충을 근본적으로 구제할 수 있는 방책이 성립된다 하겠다.

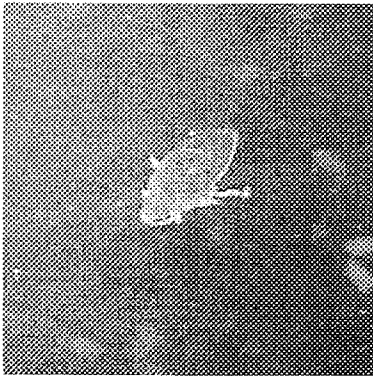
따라서 난과 식물에 유해한 바이러스의 주 매개 곤충인 진딧물을 구제함에 있어 이들이 월동기주로 택하는 조록나무에 대하여 이상의 결과에서 밝혀진 사실을 토대로 한 구제 대책을 세우므로써 바이러스 병에 대한 근본적인 방제 효과를 얻을 수 있음을 밝혀낸바 앞으로 이에 대한 보다 세밀하고 확실한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.



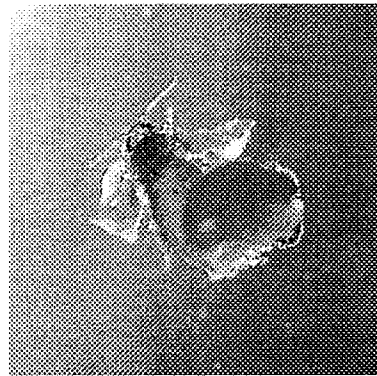
충영내의 진딧물의 혼합 (♂)



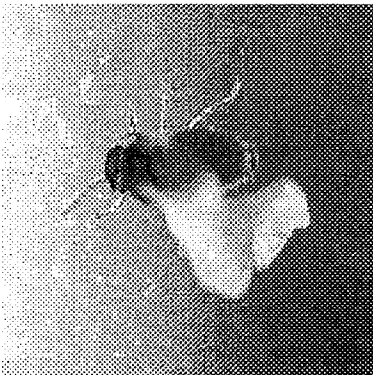
간모 (♀)



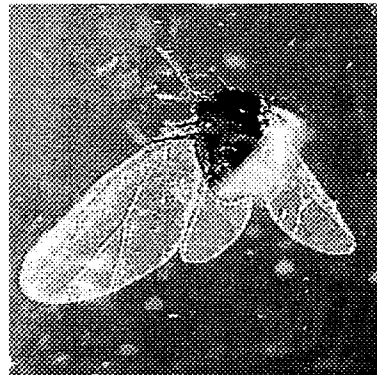
유시형의 시작 2



유시형의 시작 2



유시형의 시작 2

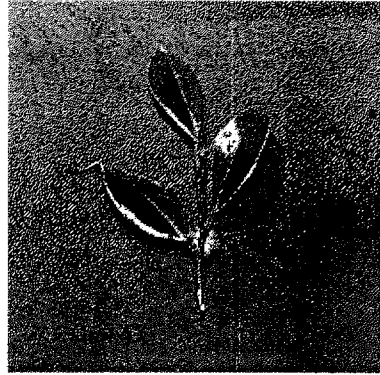


유시형의 시작 3

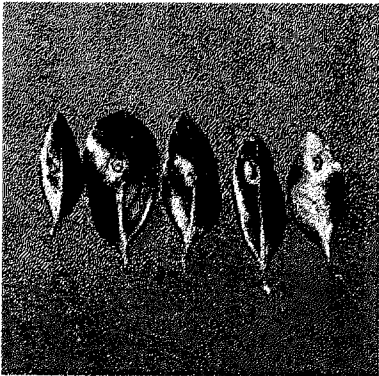
그림 16. 충영내의 진딧물의 형태 (비율:10x8)



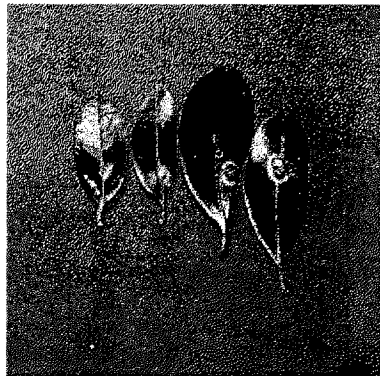
조록나무



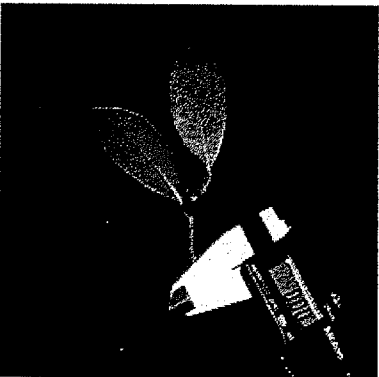
충영 1



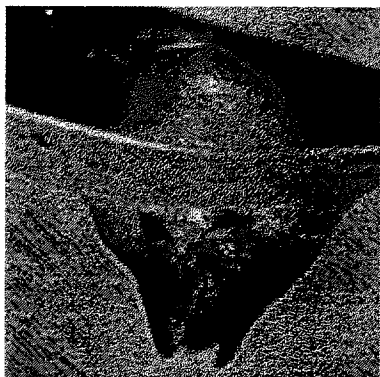
충영 2



충영 3

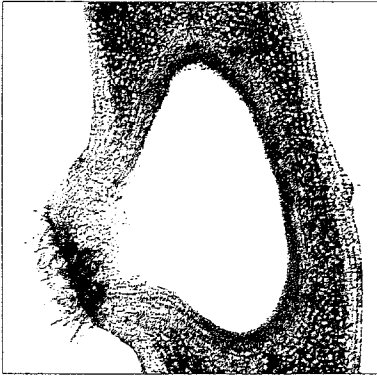


충영 4



충영탈각

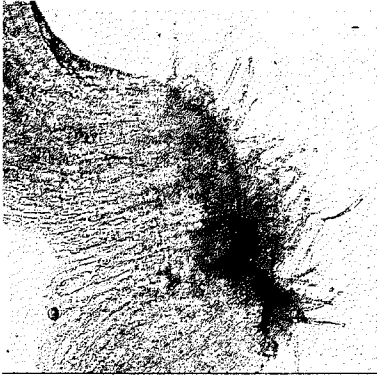
그림 17. 충영의 성숙



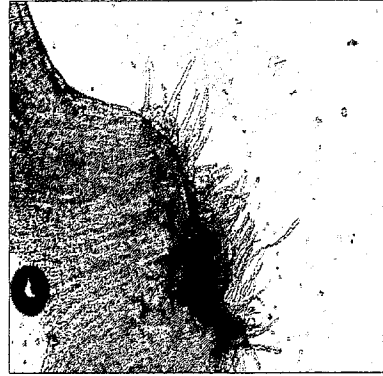
충영



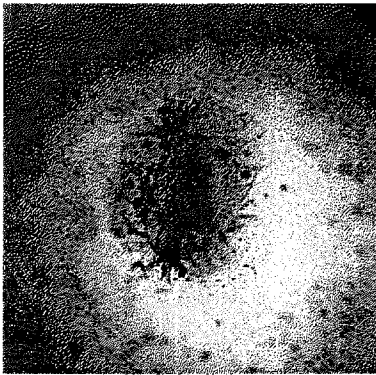
충영내부 및 아랫부분



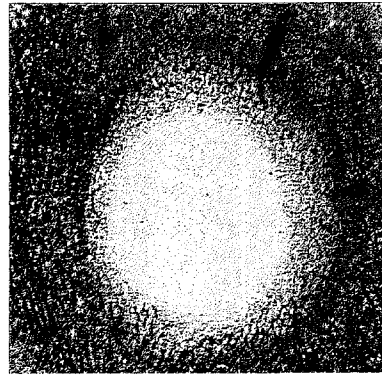
충영의 아랫부분 확대



충영의 아랫부분 확대



충영의 아랫부분



충영내부 (공동)

그림 18. 충영의 구조 (비율:10x20)



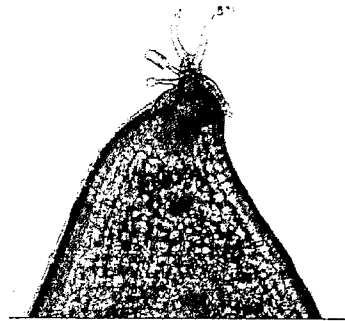
엽내로의 이동(증영의 시작)



엽내로의 이동



엽내로의 이동



엽내로의 이동 (순줄, 엽 가장자리)

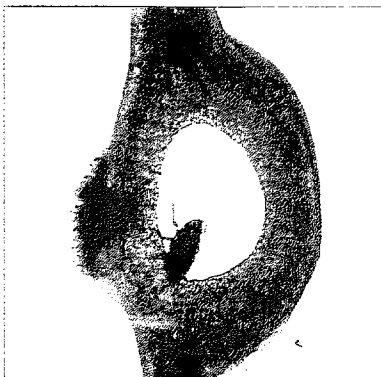


증영의 시작



증영의 시작 (확대)

그림 19. 엽내로의 이동



간모 3



간모 4



간모 1



간모 2



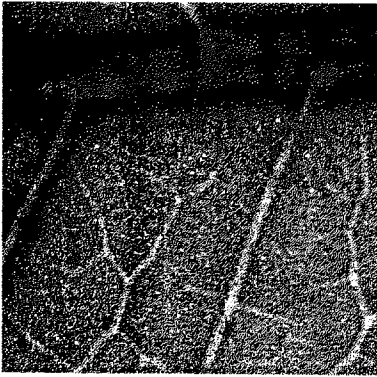
간모 (충영내)



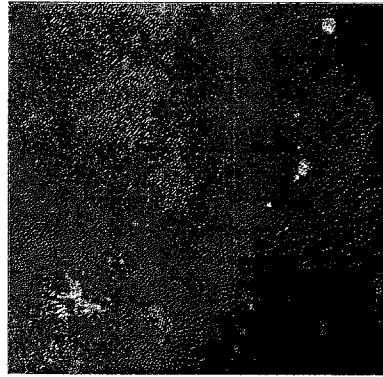
간모 (충영내) 확대

그림 20. 충영내 간모

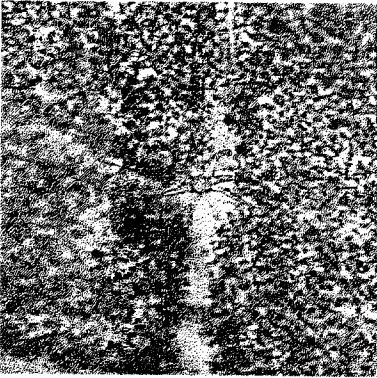




산란과 탈각



부화와 알



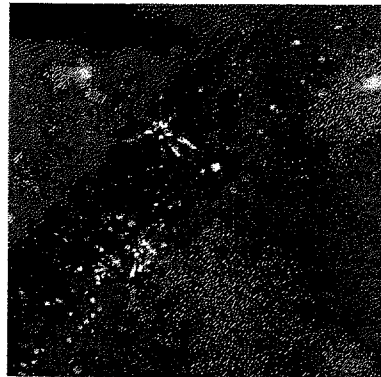
산란과 탈각 1



산란과 탈각 2

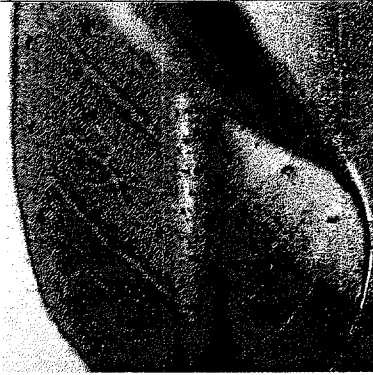


부화와 탈각 (주맥부근 축소)

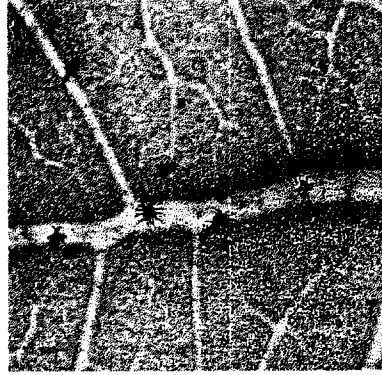


부화와 탈각

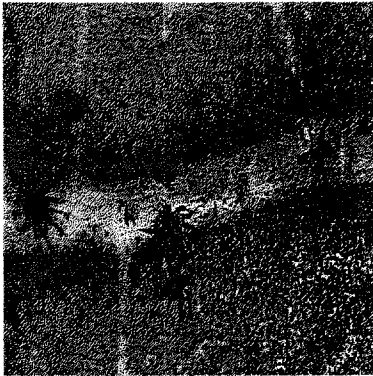
그림 21. 산란과 부화의 형태(1)



탈각의 흔적



산란과 탈각



부화와 탈각



산란과 탈각 (갈색과 무색)



산란과 탈각 1



산란과 탈각 2

그림 22. 산란과 부화의 형태(2)

## 제 5 장 참고문헌

백기엽, 김홍렬, 김태중, 박상규, 손기철, 서재환, 박은수. 1995. 양란 초보기  
술부터 전문 경영 까지, 91-101페이지. 농민신문사.

Baker, K. F., and Cook, R. J. 1974. Biological control of plant  
pathogens. W. H. Freeman & Co., San Francisco.

Bodnaruk, W. H. and Hennen, G. R. 1979. Incidence of cymbidium mosaic and  
odontoglossum ringspot viruses in wild and cultivated orchids of the *Cattleya*  
alliance surveyed in Florida. *American Orchid Soc. Bull.* 48 : 26-27.

Chung, Y. R., Ohh, S. H., and Chung, H. S. 1989. Antagonistic activity of  
*Streptomyces* species against *Fusarium solani* causing ginseng root rot. *Kor. J.*  
*Microbiol.* 27: 56-62.

Colyer, P.D., and Mount, M.S. 1984. Bacterization of potatoes with  
*Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot disease. *Plant*  
*Dis.* 68:703-7-6.

Cook, R.J. 1985. Biological control of plant pathogen : Theory to  
application. *Phytopathology* 75:25-29.

Cullen, D., and Andrews, J.H. 1984. Evidence for the role of antibiosis in  
the antagonism of *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen *Venturia*  
*inaequalis*. *Can. J. Bot.* 62:1819-1823.

Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Pachlatko, J.P., and Schwinn, F.J. 1992. Role  
of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium*  
*ultimum*, a casual agent of damping-off. *Phytopathology* 82:131-135.

Elad, Y., and Baker, R. 1985. The role of competition of iron and carbon in  
suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp.  
*Phytopathology* 75:1053 - 1059.

Frowd, J. A. and Tremaine, J. H. 1977. Physical, chemical, and serological properties of cymbidium mosaic virus. *Phytopathology* 67:43-49.

Howell, C.R., and Stipanovic, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69:480-482.

Howie, W., and Suslow, T. 1987. The effect of carbon and nitrogen sources, pH, and temperature on the expression of gene(s) involved in antifungal compound biosynthesis by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 77.

Hu, J. S., Ferreira, S., Xu, M. Q., Lu, M., Iha, M., Pflum, W. and Wang, M. 1994. Transmission, movement, and inactivation of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses. *Plant Dis.* 78:633-636.

Kameda, Y. 1988. Structure of minor components of the Validamycin complex. *J. Antibiotics* 41:1488-1492.

Kim, B. S., and Hwang, B. K. 1992. Isolation of antibiotic-producing bacteria antagonistic to *Phytophthora capsici* from pepper-growing soils and evaluation of their antibiotic activity. *Korean J. Plant Pathol.* 8:245-248.

Kloepper, J.W., and Schroth, M.N. 1981. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71:1020-1024.

Larsen, S. H. 1989. 5-Hydroxymethyl blasticidin S and blasticidin S from *Streptomyces setonii* culture A83094. *J. Antibiotics* 42:470-471.

Leroux, P. 1996. Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticides Science* 47:191-197.

Lin, Y. S., and Cook, R. J. 1983. Suppression of *Fusarium roseum* 'Avenaceum' by soil microorganisms. *Phytopathology* 69:384-388.

Matthews, R. E. F. 1993. *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, CRC press, Florida.

Moon, B. J., Chung, H. S., and Park, H. C. 1995. Studies on antagonism of *Trichoderma* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. V. Biological control of Fusarium wilt of strawberry by a mycoparasite, *Trichoderma harzianum*. *Korean J. Plant Pathol.* 11:298-303.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium Species. An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University Press, London.

O'Brien, J.G., Blanchette, R.A., and Sutherland, J.B. 1984. Assessment of *Streptomyces* spp. from elms for biological control of Dutch elm disease. *Plant Dis.* 68:104-106.

Ordentlich, A., Migheli, Q., and Chet, I. 1991. Biological control activity of three *Trichoderma* isolates against Fusarium wilts of corron and muskmelon and lack of correlation with their lytic enzymes. *J. Phytopathology* 133:177-186.

Papavizas, G.C., and Lewis, J.A. 1983. Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. *Phytopathology* 73:407-411.

박원목, 심결보, 김수중, 류기현. 1998. ELISA와 RT-PCR에 의한 국내 재배난에서 심비디움 모자이크 바이러스와 오돈토글로섬 운문 바이러스의 검정. *한국식물병리학회지* 14:130-135.

박원목, 윤경은, 정소영, 류기현. 1990. 한국 자생춘란(*Cymbidium goeringii* Reichenbach)에서 분리한 odontoglossum ringspot virus의 동정. *한국식물병리학회지* 6:387-392.

Pearson, M. N. and Cole, J. S. 1986. The effect of cymbidium mosaic virus and

odontoglossum ringspot virus on the growth of *Cymbidium* orchids. *J. Phytopathol.* 117:193-197.

Rothrock, C.S., and Gottlieb, D. 1981. Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. *J. Antibiot.* 34:830-835.

Ryu, K. H., Park, W. M., Chung, S. Y., and Yoon, K. E. 1995. Occurrence of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in Korea. *Plant Dis.* 79:321.

Schneider, R. W. 1984. Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the Lineweaver-Burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology* 74:646-653.

Shin, G. C., Im, G. J., and Park, J. S. 1987. Biological control of sesame soil-borne disease by antifungal microorganisms. *Korean J. Plant Prot.* 26(4):229-237.

Shin, D. B., and Takehara, T. 1998. Biological control of *Fusarium* wilt of spinach by nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Korean J. Plant Pathol.* 14 : 145-149.

Sneh, B. 1981. Use of chitinolytic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *diathi* in carnation. *Phytopathol. Z.* 100:251-256.

Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y., and Baker, R. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology* 74:1115-1124.

Suhara, Y., Sasaki, F., Koyama, G., Maeda, K., Umezawa, H. and Ohno, M. 1972. The total synthesis of kasugamycin. *J. Am. Chem. Soc.* 94:6501-6507.

Suslow, T.V., and Schroth, M.N. 1982. Rhizobacterium of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72:239-244.

Tanaka, Y. and Omura, S. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:57-87.

Tashiro, S. 1984. Structure of Mildiomycin D. *Agric. Biol. Chem.* 48:881-885.

Tomlin, C. 1994. Polyoxins. Pages 824-826 in: A WORLD COMPENDIUM "The Pesticide Manual" Incorporating The Agrochemicals Handbook, TENTH EDITION. Crop Protection Publications Press, United Kingdom.

Uthkhede, R.S., et A.P.Gaunce. 1983. Inhibition of *Phytophthora cactorum* by a bacterial antagonist. *Can. J. Bot.* 61:3343-3348.

Vidaver, A.K., Mathys, M.L., Thomas, M.E., and Schuster, M.L. 1972. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycine* and *P. phaseolicola*. *Can. J. Microbiol.* 18:705-713.

Xu, G.-W., and Gross, D.C. 1986. Selection of fluorescent *Pseudomonads* antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathology* 76:414-422.

Yang, S. S. and Kim, C. H. 1996. Studies on cross protection of Fusarium wilt of cucumber IV. Protection effect by a nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* in a greenhouse and field. *Korean J. Plant Pathol.* 12:137-141.

Yeun, G. Y., and Schroth, M. N. 1986. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* by iron competition with an *Alcaligenes* sp. *Phytopathology* 76:171-176.

Yuen, G. Y., Schroth, M. N., and McCain, A. H. 1985. Reduction of Fusarium wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteria. *Plant Dis.* 69:1071-1075.

Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S. and Wong, S. M.  
1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74:621-626.