

RESEARCH ARTICLE

국내 배나무 꽃에서 분리한 *Aureobasidium pullulans* MHAU2101의 화상병 발생 억제 효과

오현석^{1,2}, 최효원¹, 이용환¹, 이승엽¹, 이미현^{1,*}, 오상근^{2,*}¹농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과, ²충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Inhibitory Effects of *Aureobasidium pullulans* MHAU2101 Isolated from Domestic Pear Blossom Against Fire Blight

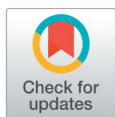
Hyeonseok Oh^{1,2}, Hyo-Won Choi¹, Yong Hwan Lee¹, Seung Yeup Lee¹, Mi-Hyun Lee^{1,*}, and Sang-Keun Oh^{2,*}¹Crop Protection Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea²Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

*Corresponding authors: mihyun798@korea.kr, sangkeun@cnu.ac.kr

ABSTRACT

This study was conducted to identify yeast species isolated from domestic pear blossom through gene sequencing and analysis of morphological characteristics, and to confirm specific yeast species inhibitory effects toward fire blight in immature apples, pears, and crab apple blossoms. Yeast morphological characteristics were consistent with the known characteristics of *Aureobasidium pullulans*. Nucleotide sequencing of the D1/D2 region of large-subunit (LSU) 26S ribosomal DNA and the internal transcribed spacer (ITS) region confirmed its identity as *A. pullulans* (MHAU2101). Inoculation of immature fruits with *A. pullulans* MHAU2101 before exposure to *Erwinia amylovora* prevented fire blight symptoms in apples and pears. *A. pullulans* MHAU2101 treated crab apple blossoms had a significantly lower flower infection rate than untreated blossoms, revealing 64% of the potency of streptomycin. The *A. pullulans* MHAU2101 treated group also displayed lower *E. amylovora* density in both pistil and hypanthium compared to the untreated group, especially in the hypanthium. This study confirms that *A. pullulans* MHAU2101 isolated from domestic pear blossom can effectively suppress the onset of fire blight.

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, Biological control, *Erwinia amylovora*, Fire blight, Yeast



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2022 December, 50(4): 331-341
<https://doi.org/10.4489/KJM.20220035>

Received: November 09, 2022

Revised: December 07, 2022

Accepted: December 09, 2022

© 2022 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

과수화상병은 식물병원세균 *Erwinia amylovora*에 의해 발생하는 병해로 세계적으로 사과와 배 재배 지역에 막대한 피해를 입히고 있는 중요한 병이다[1]. *E. amylovora*는 검역상 금지병원균으로 지정되어 있으며, 국내에서는 2015년 경기도 안성시 배나무 과원에서 처음으로 발생이 보고된 이후 매년

지속적으로 발병되고 있다[2]. 현재 화상병 발생지역에서 병이 발생한 과원은 발생주율이 5% 이상 일 경우 해당 과원의 기주식물을 전체 매몰하는 공적 방제를 시행하고 있어[3], 국내에서 재배, 생산하고 있는 사과와 배 산업에 피해가 누적되고 있는 실정이다.

화상병 방제를 위해서는 동절기에 형성된 궤양의 제거 및 동제(구리제) 처리 등을 통해 과원 내 전염원을 줄이고, 개화기에 적절한 약제를 처리하여 감염을 방지해야 한다[4]. 특히 적절한 개화 시점에 항생제를 처리할 경우 방제 효과가 높기 때문에 개화기 약제 살포는 화상병 방제에서 매우 중요하다. 하지만 지속적으로 많은 양의 항생제를 살포하면 항생제 저항성 균주가 발생하게 되어 방제 효과가 크게 감소할 수 있다는 점이 우려되고 있다[5,6]. 이러한 이유로 기존 항생제를 이용한 화학적 방제의 대안으로서 생물적 방제 방법이 제시되고 있다.

현재 세계적으로 화상병 방제에 이용되고 있는 미생물 제제로는 *Bacillus subtilis* strain QST713, *Pseudomonas fluorescens* strain A506, *Pantoea agglomerans* strain E325, *P. vagans* strain C9-1, *Aureobasidium pullulans* strain DSM14940, strain DSM14941 등이 알려져 있다[1,7]. 특히 *A. pullulans*는 멜라닌을 생성하여 검은색의 균총을 형성하는 특징을 가지는 흑효모로, 토양과 식물체 표면에 흔히 부생하며 다양한 식물병원균에 길항 능력이 있는 것으로 알려져 있다[8,9]. *A. pullulans*는 주로 사과 수확 후 저장 중 *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* 등의 진균에 의해 발생하는 부패병을 억제하기 위해 이용되어 왔다[10]. 최근 해외에서 사과 과실로부터 분리된 2종의 *A. pullulans* 균주(DSM14940, DSM14941)가 사과 꽃에서 화상병 감염을 억제하는 효과가 확인되었고, 현재 Blossom protect™ (bio-ferm, Tulln, Austria)라는 제품으로 상용화되어 화상병 방제에 이용되고 있다[11]. 그러나 국내에서는 아직 화상병 꽃 감염에 대해 방제효과를 나타내는 *A. pullulans* 균주가 분리되었다는 보고는 없다.

현재 국내 화상병 방제용으로 등록된 미생물제제는 *Bacillus* 속의 3개의 균주와 박테리오파지가 있으며 대부분이 원제를 해외에서 수입하는 실정이다. 따라서 특정 종류의 길항 세균에 치중된 화상병 방제용 미생물제제의 다양화가 필요하며, 국내에서 분리된 균주를 활용한 미생물제제의 제품화에 대한 요구가 대두되고 있다.

본 연구는 국내 배나무 꽃에서 분리한 효모의 형태적 특성 및 유전자 염기서열 분석을 통해 종을 동정하고, 사과와 배의 미숙과와 꽃사과의 꽃을 대상으로 화상병 발병 억제효과를 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

배나무 꽃에서 효모 균주 분리 및 동정

2021년 3월에 전북 완주군 국립원예특작과학원 내 배나무 포장에서 효모균의 분리 및 동정을 위해 꽃이 달린 배나무 가지를 100점 수집하였다. 효모균 분리는 배나무 꽃을 70% 알코올에 30초간 침지 한 후 1% NaOCl에 5분 침지하여 표면 소독을 실시하였고, 표면 소독 후 멸균수에 3번 세척하고 건조하여 시료를 준비하였다. 배나무 꽃의 암술머리 시료를 멸균수 100 µL에 담가 마쇄한 후, 그 중 10 µL를 YPD (yeast extract-peptone-dextrose; BD Difco™, Sparks, MD, USA) 배지에 희석도말하여 2일간 27°C에서 배양한 후 효모균을 분리하였다. 분리된 효모균은 PDA (potato dextrose agar; BD Difco™, Sparks, MD, USA) 배지 중앙에 치상하여 14일간 배양하였고, 현미경상에서 효

모균의 단포자를 분리하여 PDA 사면배지에 희선도말한 후 10°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 분리한 효모균의 동정을 위하여 PDA 배지에 치상한 후 25°C에서 14일간 배양한 균총으로부터 균사와 포자의 형태 및 크기를 현미경으로 조사하였다.

***Aureobasidium*속 효모의 분자계통학적 분석**

효모균의 유전적 동정을 위해 효모균의 핵산(전체 genomic DNA)을 추출한 후 바이오닉스(Bionics, Seoul, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 핵산 추출은 효모균이 자란 배지 절편을 20 mL의 PDB (potato dextrose broth; BD Difco™, Sparks, MD, USA) 배지에 넣어 25°C에서 14일간 배양하였고, 균사체를 회수하여 동결건조한 후 잘게 마쇄하였다. 이후 DNA 추출 키트(Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit, Promega AS1600, Madison, Wisconsin, USA)를 사용하여 DNA를 분리하였다. Large-subunit (LSU) 26S ribosomal DNA의 D1/D2 영역과 internal transcribed spacer (ITS) 영역을 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'), NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 프라이머와[12] ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머[13]를 이용하여 PCR 증폭하고 염기서열을 확보하였다. 이후 MEGA version 7.0.26에서 maximum likelihood tree로 bootstrap 횟수를 1,000반복으로 설정하고 Juke-Cantor model로 선택하여 계통수를 작성하였다.

***Aureobasidium pullulans* MHAU2101의 *E. amylovora*에 대한 생육 억제 효과 검증**

A. pullulans MHAU2101를 14일간 PDA에서 배양한 후 멸균수를 붓고, scraper로 긁어 OD₆₀₀에서 0.5로 조정하여 현탁액을 제조하였다. *E. amylovora* TS3128은 TSA 배지에서 단일 콜로니를 분리한 후 10 mM MgSO₄에 OD₆₀₀에서 0.5로 조정하여 접종원(세포현탁액)을 제조하였다.

사과와 배의 미숙과는 표면을 70% 알코올로 소독하고 멸균수로 3회 세척한 후, 상처 접종을 위해 멸균된 200 µL 파이펫 팁으로 1 cm 깊이로 찢러 2-3개의 구멍을 내었다. 그중 1-2개의 구멍에는 *A. pullulans* MHAU2101, 다른 하나의 구멍에는 멸균수를 각각 2 µL씩 넣어 25°C에서 2일간 배양하였다. 그 후, *E. amylovora* 접종원을 미숙과의 모든 구멍에 2 µL씩 접종한 뒤 접종한 미숙과는 플라스틱 상자에 넣고 뚜껑을 닫아 25°C에서 7일간 배양하여 접종 부위 주변의 수침상 및 갈변화 정도와 세균분출액 생성 여부를 확인하였다.

***Aureobasidium pullulans* MHAU2101의 화상병 꽃 감염 방제 효과 검증 및 꽃에서 *E. amylovora*의 밀도 변화 조사**

꽃사과 꽃에서 효모균의 화상병 방제 효과를 확인하기 위해 미숙과 검증 실험과 같은 방법으로 효모균 현탁액(OD₆₀₀=0.5)을 제조하여, *E. amylovora* 접종 2일 전 꽃사과 한주 당 20 mL씩 분무 처리하였다. 대조 약제로 스트렙토마이신 수화제는 희석배수 2,000배로 물에 희석하여 *E. amylovora* 접종 1일 후 꽃사과에 한주 당 20 mL씩 분무 처리하였으며, 처리 효과를 비교하기 위해 *E. amylovora* 접종 2일 전 동일한 양의 멸균수를 분무한 꽃사과를 무처리구로 설정하였다.

E. amylovora TS3128 접종원은 10 mM MgSO₄에 1×10^6 cfu/mL 농도로 현탁하여 꽃이 만개한 꽃 사과에 한주 당 20 mL씩 분무 접종하였고, 접종 후 꽃사과는 25°C로 유지되는 생장실에서 5일간 보관하며 병 발생을 유도하였다. 접종 5일 후 처리구당 100개 이상의 꽃에서 수침상 및 갈변, 세균 분출액 생성 여부를 기준으로 꽃 감염률을 조사하였고, 방제가는 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{방제가}(\%) = (1 - \text{처리구 꽃 감염률} / \text{무처리구 꽃 감염률}) \times 100$$

효모균 처리에 따른 꽃 부위별 *E. amylovora*의 밀도를 조사하기 위해 효모균 처리구와 무처리구에서 암술머리를 포함한 암술대와 화통을 채집하였다. 이후 시료에서 핵산을 추출(Plant DNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany)한 후 과수화상병 진단 키트(HelixDtec™ EAEP-T100, NanoHelix, Daejeon, Korea)로 real time PCR 검정을 수행하였다. 실험 방법은 제조사의 실험방법에 따라 수행하였다.

통계분석

A. pullulans MHAU2101의 화상병 꽃 감염 방제 효과 검정 시 처리구와 대조구는 완전임의배치법으로 배치하였고, 처리구는 5반복으로, 대조구는 3반복으로 수행되었다. 통계분석은 R 4.0.4 패키지(R Core Team, 2021)와 RStudio 1.4 (Rstudio, 2021)를 사용하여 수행되었다. 꽃 감염률은 평균 값에 대한 표준편차를 표시하였고, 평균 간 비교는 Duncan's multiple range test (DMRT)로 수행하였다($p \leq 0.05$).

결과 및 고찰

배나무 꽃에서 분리된 효모균의 동정

배나무 꽃에서 분리된 효모균의 PDA 배지에서의 형태적 특성을 조사한 결과, 배양 초기에는 크림색 내지 옅은 분홍색으로 자라다가 시간이 지나면 어두운 색소를 형성하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 또한 현미경상에서 어두운 색소를 가진 군사와 swollen cell에서 출아포자(blastospore)를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B and 1C). 분리된 효모 균주의 동정을 위해 large-subunit (LSU) 26S ribosomal DNA의 D1/D2 영역의 염기서열을 분석한 결과, *A. pullulans*와 같은 그룹을 형성하였고, 같은 그룹 내 99.8-100%의 상동성을 나타내었다(Fig. 2). ITS영역의 염기서열을 분석한 결과 역시 *A. pullulans*와 동일한 그룹으로 나타났으며, 같은 그룹 내 99.6-100%의 상동성을 보였다(데이터 미제시). *Aureobasidium*속 균은 배양 초기에 크림색, 옅은 분홍색 내지 연갈색을 띠는 균총의 형태를 보이다가 후기로 갈수록 멜라닌을 형성하면서 점차 어두운 색의 균총을 형성하는 것으로 알려져 있다[14]. 이전 연구에서 *A. pullulans*는 PDA나 MEA (malt extract agar) 배지에서 3주 이내에 분홍빛을 띤 균총이 점차 검게 변한다고 하였는데[15], 본 연구에서 분리한 균주도 2주 정도에 균총이 검게 변한 것을 볼 수 있었다. 그러나 Kim 등[16]은 국내 전라도 지역의 꽃에서 분리한 *A. pullulans*균주 중에는 7일내에 이미 검은색을 띠는 균주가 있는 것으로 보아 변종이 많은 *Aureobasidium*속은 형태적 특성과 생리적 특성 및 LSU, ITS 영역의 유전자 분석 등 다각적인 방법을 통해 동정해야 한다고 하였다. 본 연구에서 *A. pullulans*로 동정된 균주는 국립농업과학원 미생물은행(<http://genebank.rda.go.kr>)에 *A. pullulans* MHAU21 (KACC 93372P)로 기탁하였다.



Fig. 1. Morphological characteristics of *Aureobasidium pullulans* MHAU2101. Colony of the yeast isolate grown for 14 days on potato dextrose agar medium (A), melanised hyphae and conidia, scale bar=50 μ m (B), production of blastospores from the swollen cell, scale bar=10 μ m (C).

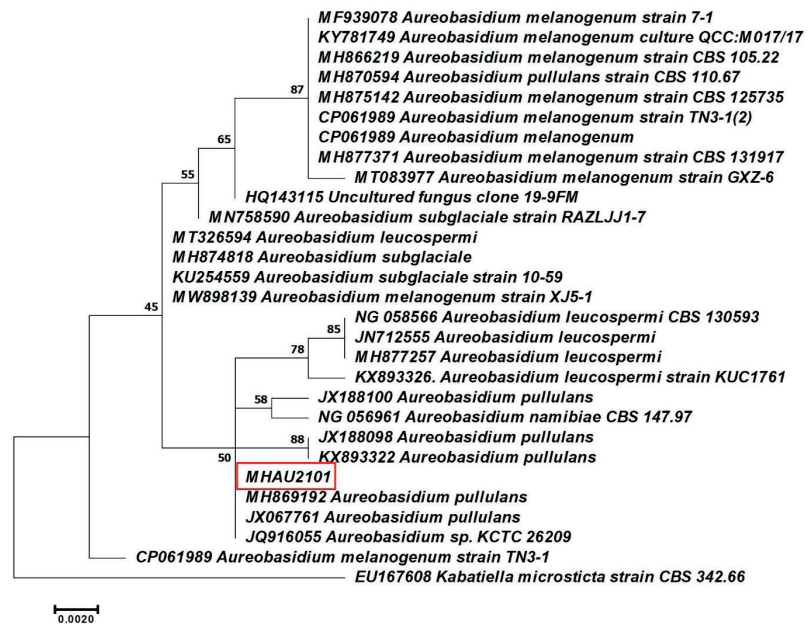


Fig. 2. Phylogenetic tree of yeast isolated from domestic pear blossom, based on the nucleotide sequences of large-subunit 26S ribosomal DNA D1/D2 region. The tree was generated by the Maximum-likelihood method, using MEGA. Red box: *Aureobasidium pullulans* MHAU2101.

Aureobasidium pullulans MHAU2101의 *E. amylovora*에 대한 생육 억제 효과 검증

A. pullulans MHAU2101 또는 멸균수 처리 2일 후 *E. amylovora*를 접종하여 7일간 배양한 결과, 사과와 배의 미숙과 모두 멸균수를 처리한 접종 부위 주변에서 수침상이 형성되고 갈색 또는 검은색의 병반이 나타나며 세균분출액이 관찰되었다. 그러나 *A. pullulans* MHAU2101을 처리한 경우에는 접종 부위 주변에 수침상 및 갈변 증상이 나타나지 않았고 세균분출액 또한 관찰되지 않았다. *A. pullulans* MHAU2101이 *E. amylovora*에 대해 생육 억제 효과가 있음이 확인되었다(Fig. 3).

생물적 방제 시 처리 미생물제제가 병원균보다 선제적으로 감염 부위에 정착하여 제한된 양분과 서식 장소에 대해 경쟁하는 것이 병원균을 억제하는 주 요인으로 알려져 있다[17,18]. Bencheqroun 등[19]의 연구에 따르면 *A. pullulans*가 사과 저장 중 *P. expansum*에 의해 발생하는 부패병을 방제하는 기작은 사과 표면의 양분, 특히 아미노산에 대해 경쟁하여 *P. expansum*의 분생

포자 발아를 억제하는 것으로 보고하였다. 또한 *A. pullulans*는 *E. amylovora*보다 기주 식물 표면에 빠르게 증식하여 양분과 서식 장소를 선점함으로써 *E. amylovora*의 성장을 억제하며, *A. pullulans*에 의해 조성되는 산성 환경은 이를 더욱 촉진한다고 알려져 있다[20].

본 실험 결과 역시 사과와 배의 미숙과에 처리된 *A. pullulans* MHAU2101이 과실의 상처 부위에 선제적으로 정착하여 증식하였고, 이후 접종된 *E. amylovora*와 서식 장소 또는 양분에 대해 경쟁하여 *E. amylovora*의 생육을 억제하였기 때문에 병 발생이 억제된 것으로 사료된다.

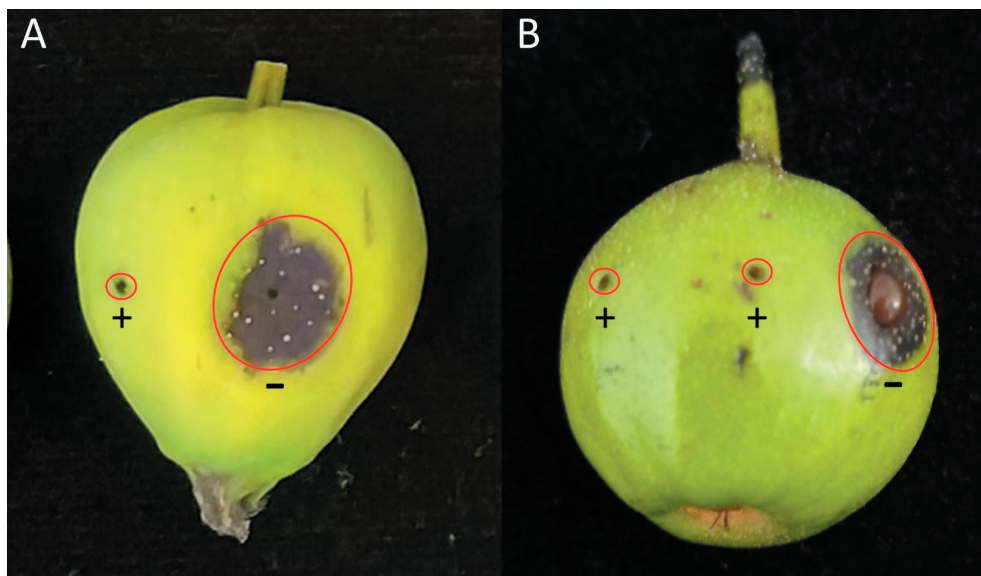


Fig. 3. Symptoms of fire blight in immature fruits 7 days after inoculation of *Erwinia amylovora* TS3128. Apple (A), pear (B), hole treated with *Aureobasidium pullulans* MHAU2101 (+) or distilled water (-) 2 days before inoculation of *Erwinia amylovora*.

Aureobasidium pullulans MHAU2101의 화상병 꽃 감염 방제 효과 검정

E. amylovora 접종 5일 후 꽃사과 꽃을 관찰한 결과, 암술, 씨방, 꽃받침이 갈변되어 마르고 세균액이 분출되는 화상병 병징이 나타났으며, *A. pullulans* MHAU2101 처리구는 무처리구에 비해 꽃 감염률이 유의하게 낮았다(Fig. 4; Table 1). *A. pullulans* MHAU2101의 화상병 꽃 감염 방제효과를 검정하기 위해 처리별 꽃 감염률을 방제가로 산출한 결과, *A. pullulans* MHAU2101을 처리하였을 때 방제가는 52.0%이고 대조 약제인 항생제 스트렙토마이신 수화제를 처리하였을 때 방제가는 80.5%였다(Table 1). *A. pullulans* MHAU2101은 스트렙토마이신 대비 64%의 방제효과를 보여 국내 배 꽃에서 분리한 *A. pullulans* MHAU2101이 화상병 방제에 효과가 있음을 확인하였다. 이는 사과 과실에서 분리된 2종의 *A. pullulans* 균주(strain CF10, CF40)를 *E. amylovora* 접종 24시간 전 사과 꽃에 처리 할 경우 스트렙토마이신과 유사한 수준의 방제 효과가 있다고 보고한 Kunz [11]의 연구결과와, 사과나무 과원에서 사과 꽃에 적화제를 처리한 후 *A. pullulans*를 처리할 경우 스트렙토마이신에 준하는 방제 효과가 있다고 보고한 Johnson과 Temple [21]의 연구결과와 유사한 경향의 결과였다. 그러나 Duffy 등[22]은 같은 농도의 *A. pullulans* 현탁액을 처리하더라도 사과나무 품종에 따라 화상병 방제효과가 차이가 있음을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 꽃사과 외에도, 국내에서 주로 재배되고 있는 사과 또는 배 품종에 대한 *A. pullulans*의 화상병 방제 효과 연구가 추가로 요구된다.

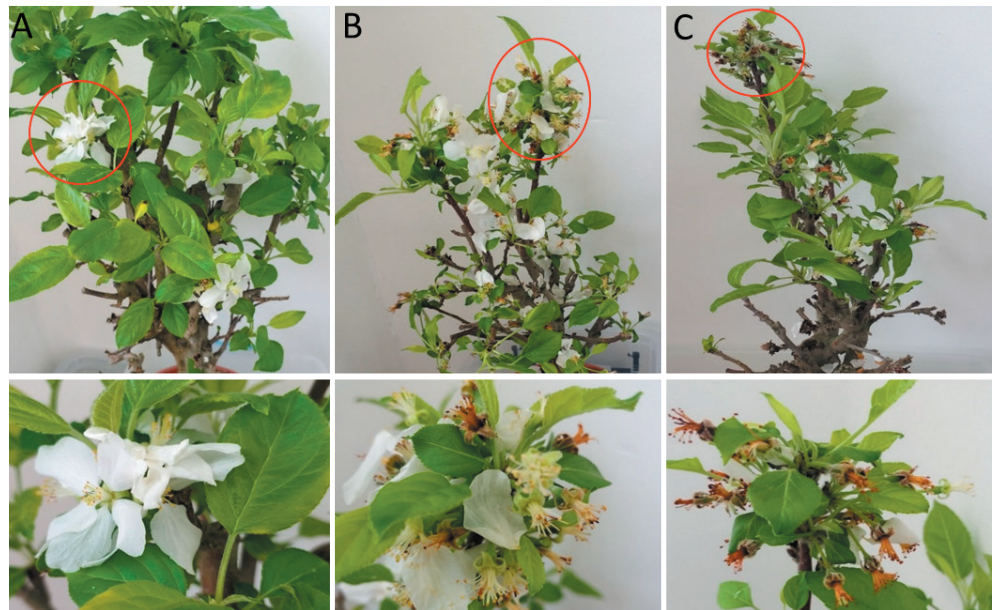


Fig. 4. Symptoms of blossom blight in crab apple 5 days after inoculation of *Erwinia amylovora* TS3128. Treatment of streptomycin on blossoms 1 day after inoculation of *Erwinia amylovora* TS3128 (A), treatment of *Aureobasidium pullulans* MHAU2101 on blossoms 2 days before inoculation of *Erwinia amylovora* TS3128 (B), water control (C).

Table 1. Control effect of *Aureobasidium pullulans* MHAU2101 and streptomycin for flower infection of crab apple caused by *Erwinia amylovora* TS3128.

Treatments	Flower infection rate (%)	Control value (%)
<i>Aureobasidium pullulans</i> MHAU2101	36.0±1.7b	52.0
Streptomycin WP	14.6±4.1c	80.5
Water control	75.0±1.0a	-

WP: wettable powder.

a-c: Mean separation within columns by Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).

외국에서는 두 종류의 *A. pullulans* 균주(strain DSM14940, DSM14941)가 화상병 방제제로 상용화된 Blossom protect™ (bio-ferm, Tulln, Austria) 제품의 경우 수화제로 개발되었으며, 방제효과를 높이기 위해 산성 버퍼인 Buffer protect™ (bio-ferm, Tulln, Austria) 제품과 함께 사용하도록 권장된다[11,23]. 국내에서 분리한 *A. pullulans* MHAU2101 역시 화상병 방제제로 상용화되기 위해서는 포장 환경에서의 건조 및 자외선에 견딜 수 있고, 방제효과를 극대화할 수 있는 제형화 개발이 필요하다. 또한 *A. pullulans* MHAU2101의 적절한 처리 농도 및 처리 시기, 포장 환경에서의 방제 효과에 관한 연구가 추가로 요구된다.

Aureobasidium pullulans MHAU2101 처리에 따른 꽃에서의 *E. amylovora*의 밀도 변화

꽃은 화상병의 주요 감염 부위로, *E. amylovora*는 암술머리에서 암술대를 통해 화통의 화밀공으로 이동하여 식물체 내로 침입하는 것으로 알려져 있다[21]. 본 실험은 *E. amylovora*가 접종된 *A. pullulans* MHAU2101 처리구와 무처리구 꽃사과의 꽃 부위별 *E. amylovora*의 밀도 변화를 조사하여 *A. pullulans* MHAU2101의 화상병 방제 효과를 확인하고자 수행하였다. 최근에는 *E. amylovora*

를 신속하게 검출하기 위해서 다양한 real time PCR 검사법이 개발되어 화상병 진단 및 정량 분석에 활용되고 있다[24]. 국내에서 시판 중인 과수화상병 진단 키트를 활용하여 꽃 부위별 *E. amylovora*의 밀도를 조사하였으며, 시판 중인 진단 키트의 *E. amylovora* 검출 한계는 2.4×10^5 cfu/mL이고 Ct (cycle threshold)값은 35.36이었다(Table 2).

꽃사과 꽃에 *E. amylovora*만 접종한 무처리구의 경우 접종 5일 후 암술에서의 Ct값은 19.07, 화통에서의 Ct값은 21.63으로 꽃에서 *E. amylovora*가 2.4×10^8 cfu/mL 이상의 높은 밀도로 유지됨을 확인할 수 있었다(Table 2 and 3). *A. pullulans* MHAU2101 처리구의 경우 접종 5일 후 암술에서의 Ct값은 22.52, 화통에서의 Ct값은 28.11로 암술과 화통 모두 *E. amylovora*의 밀도가 무처리구에 비해 낮았으며 특히 화통에서 2.4×10^7 cfu/mL로 밀도가 더 낮은 특징이 있었다(Table 2 and 3). 이는 Blossom protect™ (*A. pullulans* DSM14940, DSM14941)를 처리하였을 시 무처리구 대비 사과 꽃에서의 *E. amylovora* 밀도가 감소한 Lee 등[25]의 연구결과와 유사하였고, *A. pullulans*를 처리하였을 때 암술머리에서의 *E. amylovora* 밀도가 무처리에 비해 1,000배 감소한 Duffy 등[22]의 연구결과와 유사하였다. *A. pullulans*는 *E. amylovora*가 증식하는 암술머리와 침입하는 화통의 화밀공 부위에서 서식 장소와 양분에 대해 경쟁함으로써 화상병 발생을 억제한다고 알려져 있다[26]. 특히 *A. pullulans*는 다른 길항 세균과 비교하여 암술머리뿐만 아니라 화통에서도 잘 증식하며, 이는 *A. pullulans*가 꽃에서 화상병 감염을 예방하는 주 요인으로 여겨지고 있다[21]. 본 실험에서 *A. pullulans* MHAU2101 처리구가 무처리구에 비해 암술과 화통에서 *E. amylovora*의 밀도가 낮았던 이유 또한 *A. pullulans* MHAU2101가 사전 처리되어 암술머리와 화통을 선점하여 증식함으로써 *E. amylovora*와 서식 장소와 양분에 대해 경쟁하여 *E. amylovora*의 증식 및 감염을 억제하였기 때문으로 사료된다.

Table 2. The mean cycle threshold (Ct) end-point fluorescence of 10-fold serial dilutions of *Erwinia amylovora* TS3128 with real time PCR assay.

Bacterial strain	CFU/mL	Ct±SD (n=3)
<i>Erwinia amylovora</i> TS3128	2.4×10^8	24.92±0.04
	2.4×10^7	28.21±0.05
	2.4×10^6	31.85±0.10
	2.4×10^5	35.36±0.15

CFU: colony-forming units; SD: Three reactions standard deviation.

Table 3. In real time PCR assay, A cycle threshold (Ct) of *Erwinia amylovora* TS3128 by flower part according to the treatment of *Aureobasidium pullulans* MH2101.

Treatments	Flower parts	Ct±SD (n=3)
Water control	Stigma+style	19.07±0.13
	Hypanthium	21.63±0.03
<i>Aureobasidium pullulans</i> MH2101	Stigma+style	22.52±0.10
	Hypanthium	28.11±0.05

SD: Three reactions standard deviation.

적요

본 연구는 국내 배나무 꽃에서 분리한 효모의 형태학적 특성 및 유전자 염기서열 분석을 통해 종을 동정하고, 사과와 배의 미숙과와 꽃사과의 꽃을 대상으로 화상병 발병 억제효과를 확인하고자 수행하였다. 효모의 형태적 특성을 조사한 결과 기존 *A. pullulans*의 특성과 일치하였으며, large-subunit (LSU) 26S ribosomal DNA의 D1/D2 영역과 internal transcribed spacer (ITS) 영역의 염기서열을 분석한 결과 *A. pullulans* (MHAU2101)로 동정되었다. *E. amylovora*를 미숙과에 접종하기 전에 *A. pullulans* MHAU2101을 처리할 경우 사과와 배의 미숙과에서 모두 화상병 병징이 나타나지 않았다. 꽃사과 꽃에서 화상병 방제 효과를 검정한 결과, *A. pullulans* MHAU2101 처리구는 무처리구에 비해 꽃 감염률이 유의하게 낮았으며, 스트렙토마이신 수화제 대비 64%의 방제 효과를 보였다. 또한 *A. pullulans* MHAU2101 처리구는 무처리구와 비교하여 암술과 화통 모두 *E. amylovora*의 밀도가 낮았으며 특히 화통에서 밀도가 낮은 특징이 있었다. 따라서 본 연구 결과를 통해 국내 배나무 꽃에서 분리한 *A. pullulans* MHAU2101이 화상병 발병을 억제하는데 효과가 있음을 확인하였다.

CONFLICT OF INTERESTS

No Potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out with the support of Cooperative Research Programs (Project No. PJ01530202) from Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Sundin GW, Werner NA, Yoder KS, Aldwinckle HS. Field evaluation of biological control of fire blight in the eastern United States. *Plant Dis* 2009;93:386-94.
2. Park DH, Yu JG, Oh EJ, Han KS, Yea MC, Lee SJ, Myung IS, Shim HS, Oh CS. First report of fire blight disease on Asian pear caused by *Erwinia amylovora* in Korea. *Plant Dis* 2016;100:1946.
3. Ham HH, Lee KJ, Hong SJ, Kong HG, Lee MH, Kim HR, Lee YH. Outbreak of fire blight of apple and pear and its characteristics in Korea in 2019. *Res Plant Dis* 2020;26:239-49.
4. Norelli JL, Jones AL, Aldwinckle HS. Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Dis* 2003;87:756-65.
5. Jones AL, Schnabel EL. Streptomycin and oxytetracycline resistance determinants detected among bacteria from Michigan apple orchards and their potential importance. VIII International Workshop on Fire Blight 1998;489:673-76.
6. Vidaver AK. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin Infect Dis* 2002;34:S107-10.
7. Slack SM, Outwater CA, Grieshop MJ, Sundin GW. Evaluation of a contact sterilant as a niche-clearing method to enhance the colonization of apple flowers and efficacy of *Aureobasidium pullulans* in the biological control of fire blight. *Biol Control* 2019;139:104073.

8. Chi Z, Wang F, Chi Z, Yue L, Liu G, Zhang T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;82:793-804.
9. Loncaric I, Donat C, Antlinger B, Oberlerchner JT, Heissenberger B, Moosbeckhofer R. Strain-specific detection of two *Aureobasidium pullulans* strains, fungal biocontrol agents of fire blight by new, developed multiplex-PCR. *J Appl Microbiol* 2008;104:1433-41.
10. Leibinger W, Breuker B, Hahn M, Mendgen K. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 1997;87:1103-10.
11. Kunz S. Development of "Blossom-protect"-a yeast preparation for the reduction of blossom infections by fire blight. 11th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing; 2004 February 3-5. Weinsberg: Ecofruit; 2004. p. 108-12.
12. Kurtzman CP, Robnett C. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 1997;35:1216-23.
13. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press; 1990. p. 315-22.
14. Li Y, Chi Z, Wang GY, Wang ZP, Liu GL, Lee CF, Ma ZC, Chi ZM. Taxonomy of *Aureobasidium* spp. and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers. *Crit Rev Microbiol* 2015;41:228-37.
15. Zalar P, Gostinčar C, de Hoog GS, Uršič V, Sudhaham M, Gunde-Cimerman N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol* 2008;61:21-38.
16. Kim JS, Lee M, Song MY, Kwon SW, Kim SJ, Hong SB, Park BY, Yun BS. Isolation and identification of *Aureobasidium* spp. from flowers of the jeolla-do province in Korea. *Kor J Mycol* 2018;46:415-25.
17. Joshi NK, Ngugi HK, Biddinger DJ. Bee vectoring: development of the Japanese orchard bee as a targeted delivery system of biological control agents for fire blight management. *Pathogens* 2020;9:41.
18. Mari M, Martini C, Spadoni A, Rouissi W, Bertolini P. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol Technol* 2012;73:56-62.
19. Bencheqroun SK, Bajji M, Massart S, Labhilili M, Jaafari SE, Jijakli MH. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biol Technol* 2007;46:128-35.
20. EFSA (European Food Safety Authority). Potential inclusion of the microorganism *Aureobasidium pullulans* strains DSM 14940 and DSM 14941 in annex IV of Regulation (EC) No 369/2005. *EFSA Journal* 2011;9:2435.
21. Johnson KB, Temple TN. Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. *Plant Dis* 2013;97:402-9.
22. Duffy B, Vogelsanger J, Schoch B, Holliger E. Biocontrol of *Erwinia amylovora* using a commercial yeast strain mixture. *Acta Hort* 2006;704:363.
23. Temple TN, Thompson EC, Uppala S, Granatstein D, Johnson KB. Floral colonization dynamics and specificity of *Aureobasidium pullulans* strains used to suppress fire blight of pome fruit. *Plant Dis* 2020;104:121-8.

24. Dreo T, Pirc M, Ravnikar M. Real-time PCR, a method fit for detection and quantification of *Erwinia amylovora*. *Trees* 2012;26:165-78.
25. Lee MS, Lee I, Kim SK, Oh CS, Park DH. *In vitro* screening of antibacterial agents for suppression of fire blight disease in Korea. *Res Plant Dis* 2018;24:41-51.
26. Pusey PL, Stockwell VO, Mazzola M. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 2009;99:571-81.