

잔디 뿌리병 병원균인 *Rhizoctonia solani*의 성장을 저해하는 미생물 선발

이재화¹ · 이은열*

경성대학교 공과대학 식품공학과
¹신라대학교 공과대학 생명공학과

Screening of Potent Biofungicide for the Growth Inhibition of Soilborne Pathogenic Fungi, *Rhizoctonia solani*

Jae-Hwa Lee¹ and Eun Yeol Lee*

Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea
¹Department of Biotechnology, College of Engineering, Busan 617-736, Korea

Abstract

Various *Trichoderma* spp. were evaluated for the development of biofungicides to control soilborne pathogen, *Rhizotonia solani*. Various *Trichoderma* spp. were initially tested for their ability to inhibit growth of *R. solani* by inhibition zone test. Inhibition zones of 3~5 mm toward *R. solani* were detected on PDA agar plates. The parasitic activity of strains, the activities of cell-wall-degrading enzymes such as glucanases and chitinases, were also evaluated. Highest activities of glucanase and chitinase were 3.5 U/ml and 0.9 U/ml, respectively. Isolated *Trichoderma* spp. also exhibited good growth with currently used agrochemicals, which represents that the isolated biofungicides can be mutually used with agrochemicals.

Key words – biofungicide, soilborne pathogen, *Rhizoctonia solani*, parasitic activity, *Trichoderma* spp.

서 론

토양 전염 병원성 진균으로는 *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Verticillium* 등이 있으며, 이들 식물 병원성 진균들은 작물의 안정적 생산에 제한요인이 되고 있다[7]. 이러한 식물 병원성 진균들의 방제를 위해 여러 종류의 농약이 사용되고 있으나, 특히 토양 전염 병원균들이 눈에 잘 보이지 않는 땅 속의 뿌리 또는 괴경 등이 침입부위이므로 효과적인 방제가 어렵다. 또한, 독성

농약의 과다 사용으로 인한 환경 오염이 문제가 되고 있어 효과적이면서 자연 친화적인 방제 방법의 개발이 요구되고 있다.

환경 친화적인 방제 방법으로는 식물 병원성 진균에 대한 길항균을 이용한 미생물 농약이 있다[3,6,10]. 미생물 농약은 1970년대 초반부터 많은 연구가 진행되어왔으며, 최근에는 몇 종류의 미생물 농약들이 상품화되었다. 미생물 농약 개발이 실험실 수준에서는 활발히 진행되어 온 것에 비하여 실용화가 미흡한 가장 큰 이유로는 합성 농약에 비하여 일반적으로 방제 효과가 낮다는 점이다. 따라서, 합성 농약으로 방제가 어려운 벼 잎집 무늬 마름병, 채소작물의 모잘록병, 잔디의 갈색화병, 황색 마름병 등을 일으키는

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-620-4716, Fax : 82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ks.ac.kr

*Rhizoctonia solani*의 방제 분야 등 미생물 농약의 장점이 부각될 수 있는 분야에서의 상품화 가능성은 상대적으로 높다고 할 수 있다[2,4,5,11].

본 연구에서는 잔디 뿌리병 병원 진균인 *R. solani*의 성장을 저해하는 능력이 우수한 길항균을 선별하고자 하였다. 병원성 진균의 세포벽 구성물질인 glucan, chitin 등을 용해시킬 수 있는 chitinase, β -1,3-glucanase 등의 extracellular enzyme 활성이 높은 균주들을 스크리닝하였으며, 현재 사용되고 있는 농약에 대한 내성을 평가하여 합성 농약의 사용량을 줄여 같이 사용할 수 있는 미생물 균주들을 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양조건

본 실험실의 culture collection 및 유전자은행(KCTC, Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받은 *Trichoderma* 균주 50 여종을 실험에 사용하였다. Malt extract 20 g/L, peptone 5 g/L으로 구성된 배지를 사용하였으며, 30°C, 250 rpm 조건에서 배양하였다.

Inhibition zone 실험

PDA(potato dextrose agar) 평판 배지 중앙에 *R. solani* 균사가 있는 직경 5 mm정도의 디스크를 옮겨놓고, 이 디스크를 중심으로 일정한 거리를 유지하여 배지 가장자리에 백금이를 사용하여 길항작용이 있는 균주들을 도말하였다. 도말 후 30°C 항온기에서 일주일 정도 배양하면서 길항균에 의해 형성된 균사 생장 억제거리를 측정하였다.

Glucanase 활성 분석

세포 배양액 3 mL를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 상동액 1 mL와 기질용액(laminarin, 20 mg/mL) 100 μ L를 섞은 다음 40°C 항온조에서 1시간 반응시켰다. 반응액 300 μ L와 DNS용액 1 mL를 혼합하고, 끓는 물에서 5분간 중탕한 다음 상온에서 식히고, 550 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 환원당량을 표준곡선을 이용하여 측정하다. 이 때, 각 세포 배양액에 존재하는 포도당 양을 제외시키기 위하여 각각의 균주 배양액에 기질 대신 증류수 1 mL를 넣은 것과, 기질에 있는 포도당 양을 측정하기 위해서 증류수에

기질을 넣은 것을 각각 대조구로 사용하였다.

Chitinase 활성 분석

10 mM Sodium phosphate buffer (pH 5.8)에 25 mg의 colloidal chitin을 혼탁시킨 기질용액 1 mL와 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 세포 배양액 1 mL를 혼합하여 50°C에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액을 끓는 물에서 15분간 중탕한 다음, 남아있는 기질을 제거하기 위하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 반응 상등액 0.5 mL와 potassium borate buffer (pH 9.1) 0.1 mL를 혼합하여 다시 끓는 물에서 3분정도 중탕하고 식혔다. 이 반응액에 3 mL DMAB (ρ -dimethylaminobenzaldehyde)용액을 혼합하고 37°C 항온조에서 20 분간 발색시킨 다음 식혔다. 585 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 N-acetylglucosamin (NAGA)양을 표준곡선을 이용하여 측정하였다. 이 때, 세포배양액에 포함된 NAGA양을 측정하기 위하여 기질 대신 증류수를 넣은 대조구과 기질에 들어있는 NAGA양을 측정하기 위하여 세포 배양액 대신 증류수를 넣은 것을 각각 대조구로 사용하였다. 효소 활성 1 unit는 1시간 동안 1 μ mol의 NAGA를 생성시키는 효소량으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Inhibition zone 평가

미생물농약은 환경친화적인 장점이 있지만, 일반적으로 합성 농약에 비하여 방제 효과가 미비하여 상업화에 애로사항이 있다. 따라서, 합성 농약 대비 미생물 농약의 특성이 부각될 수 있는 특정 분야에 대한 미생물 농약 개발이 의미가 있는데, 현재 합성 농약으로 방제 효과가 약한 진균병에 대한 미생물 농약 개발은 중요한 분야이다. 특히 채소 작물의 모잘록병, 벼 잎집 무늬 마름병, 황색 마름병, 잔디의 갈색화 등 여러 가지의 병을 유발하는 *Rhizoctonia solani*의 방제를 위한 길항균 개발은 중요한 연구분야이다. *R. solani*에 대한 길항작용이 우수한 균주로는 *Trichoderma spp.*로 알려져 있는데, 실험실에서 분리한 *Trichoderma* 계열의 균주들과 공시균주 등을 포함한 50여종의 균주에 대한 *R. solani*에 대한 성장저해능을 inhibition zone 분석을 통해 평가해보았다.

T. viride (6427), *T. hamatum* (6521), *T. polysporum* (6511), *T. harzianum* (6426), *T. harxianum* (6385), *T. koningi* (16777),

잔디 뿌리병 병원균인 *Rhizotonia solani*의 성장을 저해하는 미생물 선발

T. harzianum (11279), *T. reesei* (35516), *Trichoderma* sp. UK-1, UK-2, UK-3, HH-2의 *R. solani*에 대한 성장저해능을 평가를 위해 malt extract 20 g/L, peptone 5 g/L으로 구성된 배지 20 mL에 접종하고 배양한 다음 PDA 평판에서의 공동 배양을 통해 inhibition zone을 측정하였다. Table 1에서와 같이 *Trichoderma* sp. UK-3를 포함하여 1차로 선정된 대부분의 균주들이 *R. solani*에 대하여 성장저해능을 보여 1~5 mm 수준의 inhibition zone을 보여주었다. 특히, *Trichoderma* sp. UK-3와 *T. viride*가 각각 4 그리고 5 mm의 inhibition zone을 보여주어 가장 높은 길항능을 보여주었다.

Glucanase 및 chitinase 활성 평가

*R. solani*에 대한 *Trichoderma* 균주들의 길항능은 주로 *Trichoderma*가 분비하는 세포외 효소인 β -1,3-glucanase와 chitinase 등에 의한 세포벽 용해작용이 주된 요인이 된다 [1,8,9]. 최근에는 *R. solani* 세포벽을 유일 탄소원으로 하여 *T. harzianum*을 배양하였을 때 serine protease가 특이적으로 생성됨이 밝혀져 다양한 분해효소에 의한 용해작용이 있음이 밝혀졌다[8,9]. 세포벽 분해 효소 이외에도 몇 가지의 진균 성장 억제물질을 생성하여 세포외 효소와 상승적 길항작용을 하는것으로도 밝혀졌다. 따라서, *R. solani*에 대해 inhibition zone을 보여준 균주들에 대한 세포외 glucanase 와 chitinase 효소 활성을 측정해 보았다.

Table 2에서와 같이 대부분의 균주들이 glucanase 활성

Table 2. Analysis of glucanase and chitinase activity

Strains	Glucanase (U/ml)*	Chitinase (U/ml)*
<i>Trichoderma</i> sp.		
UK-1	1.6	-
UK-2	1.7	0.3
UK-3	2.8	0.9
HH-2	1.7	-
<i>T. koningi</i>	0.8	-
<i>T. harzianum</i>	3.5	0.3
<i>T. harzianum</i>	0.9	0.4
<i>T. harzianum</i>	-	-
<i>T. viride</i>	0.4	0.5
<i>T. hamatum</i>	-	-
<i>T. reesei</i>	0.6	-

*One unit represents the amounts of enzymes for the formation of 1 μ mol products in 1 hr.

을 보여주었고, *Trichoderma* sp. UK-3, *T. harzianum* 등은 chitinase 활성도 우수한 것으로 나타났다. 이 결과에서와 같이 glucanase와 chitinase 활성이 높은 경우 inhibition zone 분석 실험에서도 좋은 결과가 나왔으나, *T. viride*의 경우 glucanase 및 chitinase 활성이 낮음에도 불구하고 inhibition halo가 크게 나온 것은 세포외 용해 효소 이외에 항진균성 물질 분비능이 우수한 것으로 예상할 수 있다.

R. solani 길항균의 농약에 대한 저항성 평가

*R. solani*를 포함한 식물 병원성 진균들에 대한 미생물 농약 개발 연구가 활발히 진행되었음에도 불구하고 실용화가 지연되는 이유로는 사용장소 및 사용시기에 따른 미생물 농약의 낮은 방제 효과를 들 수 있다. 이러한 문제점을 극복할 수 있는 현실적 접근방법 중 한가지로 합성 농약 살포와 동시에 미생물 농약을 사용하는 방법을 고려할 수 있다. 합성 농약의 사용에 의한 단기간 방제 효과와 미생물 농약에 의한 장기간 방제 효과 및 합성 농약의 사용양을 줄일 수 있다는 장점도 기대할 수 있다. 현재, 우리나라에서는 *R. solani*에 의한 벼잎집무늬 마름병 방제용 농약으로 *flutolanil*, *pencycuron*, *validamycin* 등을 사용하고 있다.

Inhibition zone 평가, glucanase 및 chitinase 활성이 우수한 균주들에 대한 농약 저항성을 평가해보기 위하여 합성농약 존재하에서 세포 성장성을 평가해 보았다 (Table 3). *R. solani*에 대한 성장저해능이 있는 합성 농약에 대하여

Table 1. Inhibition zone test

Strains	Inhibition zone (mm)
<i>Trichoderma</i> sp.	
UK-1	1
UK-2	1
UK-3	4
HH-2	1
<i>T. koningi</i>	1
<i>T. harzianum</i>	3
<i>T. harzianum</i>	1
<i>T. harzianum</i>	1
<i>T. viride</i>	5
<i>T. hamatum</i>	1
<i>T. reesei</i>	1

Table 3. Growth test on the PDA agar plates containing agrochemicals

Conc.($\mu\text{l}/\text{cm}^2$)	<i>Trichoderma</i> sp. UK-3	<i>Trichoderma</i> sp. HH-2	<i>T. harzianum</i>	<i>T. viride</i>	<i>R. solani</i>
0.15	++*	+++	++	+++	+
0.30	+	+++	++	+++	-
0.75	+	+	++	+++	-
1.50	+	+	+	+++	-
1.80	+	-	+	+	-

*Symbols represent as follows: -, bad; +, little; ++, moderate; +++, good.

0.15~1.80 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 의 다양한 사용 농도에서 *Trichoderma*의 성장성을 평가해보았다. Table 3에서와 같이 *R. solani*에 대한 성장저해능이 있는 합성농약에 대하여 *R. solani* 대비 상대적으로 우수한 성장성을 보여줄 수 있었다. 특히, glucanase 및 chitinase 활성이 우수했던 *Trichoderma* sp. UK-3과 가장 큰 inhibition zone을 형성했던 *T. viride*가 가장 좋은 성장을 보여주었다. 이를 두 균주는 *R. solani*에 대한 성장 저해능이 좋으며, 농약에 대한 저항성도 상대적으로 우수하여 향후 식물 병원성 진균에 대한 미생물 농약용 균주로 사용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

요 약

식물 병원성 진균인 *Rhizoctonia solani*에 대한 길항능이 있는 *Trichoderma* 계열의 미생물 균주를 선별하였다. *R. solani*의 성장을 저해하는 능력이 우수한 균주를 선별하기 위하여 일차적으로 PDA 평판에서 inhibition zone을 측정하였고, 병원성 진균의 세포벽을 용해시킬 수 있는 세포외 효소인 glucanase 및 chitinase 활성을 분석하였다. 4~5 mm 이상의 inhibition zone을 보여주었고, glucanase 및 chitinase 활성이 우수한 *Trichoderma* sp. UK-3와 *T. viride* 균주들을 선별할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Broglie, K., R. Broglie, N. Benhamou and I. Chet. 1994. The role of cell wall degrading enzymes in fungal disease resistance, pp. 211-235, In Chet, I. (eds.), *Biotechnology in Plant Disease Control*, Wiley-Liss, New York.
2. Chet, I. and R. Baker. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma Hamatum* from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **71**, 286-290.
3. Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 53-80.
4. Elad, Y., G. Zimand, Y. Zaqs, S. Zuriel and I. Chet. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or conditions alternation with fungicides to control cucumber gray mold(*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathol.* **42**, 324-332.
5. Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Henis. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**, 85-88.
6. Harman, G. E. and A. G. Taylor. 1990. Development of an effective biological seed treatment system, pp. 415-426, In Hornby, D. (eds.), *Biological control of Soil-Borne Plant Pathogens*, C. A. B. International, Wallingford.
7. Lockwood, J. L. 1988. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**, 93-121.
8. Lorito, M., A. Di Pietro, C. K. Hayes, S. L. Woo and G. E. Harman. 1993. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* **83**, 721-728.
9. Lorito, M., G. E. Harman, C. K. Hayes, R. M. Broadway, A. Tronsmo, S. L. Woo and A. Di Pietro. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* **83**, 302-307.
10. O'Neill, T. M., A. Niv, Y. Elad and D. Shtienberg. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum* in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**, 635-643.
11. Zimand, G., Y. Elad and I. Chet. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* **86**, 1255-1260.

(Received March 10, 2003; Accepted June 19, 2003)