

## 감자 더듬이병원균에 대해 길항활성을 갖는 방선균 탐색 및 항균 활성물질의 분리

이항범 · 조종운 · 임치환<sup>1</sup> · 김창진\*

한국생명공학연구원, <sup>1</sup>충남대학교 응용생물화학식품학부

(2003년 12월 8일 접수, 2004년 2월 25일 수리)

감자더듬이병 방제용 생물제제(biocontrol agent, BCA)를 개발하기 위하여 국내 토양으로부터 분리된 5,000여 방선균 균주를 대상으로 더듬이병 관련 병원균(*Streptomyces scabiei* 및 *S. turgidiscabies*)에 대한 *in vitro* 또는 *in vivo* 활성검정을 실시하였다. 활성검정 결과 길항력이 우수한 균주로서 9균주가 선발되었으며 실제 재배포장에서 사용되고 있는 dazomet 및 mancozeb 등 농약에 대한 감수성 시험을 실시하여 A020645 균주가 길항활성 뿐만 아니라 약제저항성이 가장 높음을 확인하고 더듬이병 방제용 BCA 균주로 선발하였다. 본 균주로부터 항균활성 물질을 분리하기 위하여 액체배양액으로부터 음이온교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography), solid phase(ODS) extraction, TLC, 역상 HPLC 등을 실시하여 최종적으로 compound A와 B를 순수분리하였다. Compound A와 B는 NMR 분석 결과 nucleoside계 화합물로 판단된다.

**Key words:** 감자, 더듬이병원균, BCA, *Streptomyces scabiei*, *Streptomyces turgidiscabies*, 항균활성물질

### 서 론

감자(*Solanum tuberosum*)는 가지과에 속하는 다년초본성 식물로 총생산량에 있어 세계 4위의 중요한 식량자원이다. 우리나라에는 1824년에 도입되었는데 오늘날 식품의 소비경향이 서구화 하면서 감자의 생산 및 소비량이 점차 증가하여 1999년 국내의 총생산량이 67만 8천 톤에 이르고 있다.<sup>1)</sup> 감자 주 생산지의 하나인 제주도의 감자재배 면적은 2000년 현재 6,696 ha로 급속히 증가하여 감귤 다음가는 소득 작물로 부상하였다.<sup>2)</sup> 우리나라에서 감자에 발생하는 병은 16종이며 이중 무름병, 역병과 함께 더듬이병이 주요 병으로 보고되었다.<sup>3)</sup> 특히, 최근 수년동안 대지(Daejima) 품종을 씨감자로 사용하는 제주도 지역에서는 심한 경우 90%의 발병율을 기록한 바 있다.<sup>1)</sup>

감자더듬이병은 방선균의 일종인 *S. scabiei*(*S. scabiei*) Thaxter에 의해 발생하는 토양병으로 토양내 분포가 광범위하고 잔류기간이 길어 경종적 방제법만으로는 방제가 어렵고, 공시된 약제가 거의 없는 실정이다.<sup>4)</sup> 특히, 우리나라에서는 더듬이병원균에 감수성으로 알려진 대지품종이 2기작이 가능하다는 이유로 많이 경작되고 있으며, 현재 대지 품종을 대체할 수 있는 품종도 보급되어 있지 않은 실정이어서 그 피해도 막대한 실정이다.

더듬이병은 괴경 표면의 병징에 따라 russet, netted, turtle back, deep-pitted scab 등으로 나뉜다.<sup>5-7)</sup> Lambert와 Loria<sup>8)</sup>는 *S. scabiei*가 감자 더듬이병을 일으키는 병원균으로서 가장 우점종이며, 새로운 종으로 발견된 산성 조건에서도 잘 견디는 *S. acidiscabies*와 유사하다고 하였다. 최근에는 더듬이병과 관련한

새로운 종으로 *S. turgidiscabies*가 보고된 바 있으며,<sup>9)</sup> 기타 *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* 및 *S. reticuliscabiei* 균주도 감자재배 토양에서 분리되는 것으로 보고되고 있다.<sup>10,11)</sup> 최근에 국내의 감자 재배지역에서도 더듬이병과 관련하여 *S. acidiscabies* 및 *S. turgidiscabies*가 자주 분리되는 것으로 보고된 바 있다.<sup>12)</sup>

오늘날 생물농약(biocontrol agent, BCA)은 자연계에 존재하는 미생물을 이용한 환경친화적 작물보호제로서 합성농약을 대신하거나 합성농약으로 방제하기 어려운 병을 효과적으로 방제하여 작물의 생산량을 증대시키고 동시에 합성농약의 문제점인 생태계 교란, 토양 및 지하수 오염, 잔류 독성 등의 문제점을 해결할 수 있는 방안으로 부각되고 있다. 외국에서는 미생물의 길항력을 이용한 더듬이병 방제에 관한 연구가 일부 이루어져 왔다. 특히, 더듬이병 발생이 적은 토양으로부터 다양한 길항미생물을 분리하여 감자포장에 적용하거나, 또는 비병원성 *Streptomyces*의 길항력을 이용한 더듬이병 방제용 생물제제 개발을 위한 다양한 연구가 시도되고 있다.<sup>13-18)</sup>

국내의 미생물농약에 대한 연구는 2001년에 “미생물농약 등록을 위한 guideline”이 제정되었으나, 이전에는 미생물농약이 아닌 비료로 등록되어 미생물제제로서 판매되었으며, 1999년 12월 현재 국내에서는 34개의 회사에서 57개의 품목이 미생물제제로 등록되었는데, 실제로 유통되고 있는 미생물제제는 90여종 이상으로 추정되고 있다. 한편, 국내에서는 더듬이병균의 방제를 위해서 주로 화학적, 재배적 방법을 활용하고 있고 일부 생물학적 방제법 개발 연구가 이루어지고 있으나 실용화 연구는 크게 미흡한 편이다.<sup>19,20)</sup>

본 연구는 국내 토양으로부터 분리된 5,000여 방선균 균주를 대상으로 주요 감자 더듬이병원균인 *S. scabiei* 및 *S. turgidiscabies*에 대한 *in vitro* 또는 *in vivo* 항균활성을 검정하고, 생물제제 후보 미생물로 선정하여 실용화 가능성을 검토하

\*연락처

Phone: 82-42-860-4332, Fax: 82-42-860-4595

E-mail: changjin@kribb.re.kr

고, 이들로부터 더듬이병원균 억제 활성대사산물을 분리하고 활성물질을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**균주.** 감자재배 토양을 포함하는 다양한 국내 토양시료로부터 5,000 여 방선균 균주를 희석평판배양법으로 분리하였다. 활성검정에 사용된 감자 더듬이병원성 균주는 *Streptomyces scabiei*(*S. scabiei*) DSMZ 40962, *S. acidiscabies* ATCC 49004, *S. scabiei* S-67(병원성, 국내균주), *S. turgidiscabies* S-27(병원성, 국내균주)이었으며 국내균주는 강원대학교로부터 분양받아 사용하였다. 항균활성검정 결과 *S. scabiei*에 대해 높은 활성을 보여 BCA 후보미생물로 선발된 균주는 A020645를 포함하여 9균주이었다. 이들 균주의 동정은 International Streptomyces project(ISP) 기준 및 16S rRNA sequence 분석에 기초하여 이루어 졌다. 공시균주들은 동결건조하거나 20% glycerol stock으로 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

**활성균주의 동정.** 활성균주의 동정을 위해 ISP(International Streptomyces Project) 규정에 따라 28°C에서 14일간 배양하고, 광학현미경 및 전자현미경 하에서 형태적 특성을 조사하였다. 각종 ISP 배지조건에서 28°C에서 14일간 배양한 후 선발 균주의 배양 생리적 특성을 조사하였다. 선발 균주의 생리적 특성을 조사하기 위하여 쉐링-거트리브 한천 배지를 사용하여 28°C에서 14일간 배양한 후 멜라닌색소 생성능, 젤라틴액화능, 수용성색소 생성능, 밀크응집력, 전분 가수분해능, 스킴밀크 가수분해능 등을 조사하였다. 선발 균주의 균체 세포벽 성분을 박층크로마토그래피 방법에 따라 조사하였다. 16S ribosomal DNA를 대상으로 염기서열을 분석하고 이를 이용하여 RDP(Ribosomal Database Project)데이터 베이스를 이용하여 유사도(similarity index)를 분석하였다.

**배지의 조제 및 균주 배양.** 방선균의 선택적 분리와 보존을 위한 배지로는 각각 Humic acid-vitamin agar(HV 배지)와 Bennett's agar(B 배지)를 사용하였다. HV 배지(g/l)는 humic acid(0.2 N NaOH에 용해), 1.0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; KCl, 1.7; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01; CaCO<sub>3</sub>, 0.02; agar, 20; 각 thimine-HCl, riboflavin, niacin, pyridoxin-HCl, inositol, Ca-pantothenate, aminobenzoic acid, 0.5 및 biotin, 0.25 mg (vitamin); cycloheximide, 50 ppm; nalidixic acid, 10 ppm(pH 7.2)이었다. B 배지(g/l)는 glucose, 10; yeast extract, 1; Bacto-peptone, 2; beef extract, 1; agar, vitamin 및 항생제(HV 배지와 동량)이었다. 또한 방선균 균주의 액체배양은 100 ml 플라스크에 수용성 전분, 10; glucose, 20; soybean meal, 25; beef extract, 1; yeast extract, 4; NaCl, 2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25 및 CaCO<sub>3</sub>, 2(g/l)와 같이 분리탐색배지 성분은 포함된 배지(20 ml)에 전배양액(1 ml)을 각각 넣고, 28°C에서 5일간 진탕배양(144 rpm)하였다.

**시약.** 본 실험에 사용된 시약 중 배지조제용 시약인 경우, beef extract, yeast extract는 Difco사 제품을, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub>, 그리고, sodium hydroxide는 Junsei Chem. (Japan)사의 특급시약을, bacto peptone은 BD사의 제품을, glucose는 (주)

신동방의 함수결정포도당을, 그리고 hydrochloric acid는 Yakuri Pure Chem(Japan)사의 특급시약을 각각 사용하였다. HPLC용 메탄올은 국내산 공업용 시약(삼전순약제품)을 정제하여 사용하였고, 증류수는 18 MΩ 이상의 3차 증류수를 사용하였다. 그리고, Anion exchanger는 Sigma사의 Dowex 1(Cl<sup>-</sup> form, 1×4-100, 500 g)을, solid phase extraction용 ODS는 Waters사의 Sep-Pak® Vac 35 cc(C<sub>18</sub>)를 각각 사용하였다. 그리고, TLC plate(5×20 cm)는 Merck사의 DC-Fertiplatten RP-18 F<sub>254</sub>s 제품을 사용하였다. Dazomet, mancozeb, neomycin 등의 농약 또는 항생물질은 Sigma사로부터 구입하거나 한국화학연구원에서 분양받아 사용하였다.

**활성검정.** 1) *In vitro* 항균활성: 주요 감자더듬이병원균 (*S. scabiei* 및 *S. turgidiscabies*)의 고체배양체로부터 loop를 이용하여 소량의 균체를 떼어 stock 용액을 만든 후 용액 1 ml을 Bennett's agar 배지에 넣고 잘 흔든 후 분주하여 활성검정용 배지로 사용하였다. 항균활성은 액체배양체 및 고체배양체를 이용하여 paper disc(직경 8 mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) 및 획선점종(streak-inoculation)법으로 실시하였다. 액체배양체는 paper disc에 50 μl를 처리한 후 약 1시간 동안 50°C에서 건조시킨 후 더듬이병원균 접종배지상에 처리하였으며, 고체배양체의 항균활성은 loop를 이용하여 균체를 더듬이병원균 접종 배지상에 획선점종 후 병원균에 대한 저해환(단위: mm)의 크기를 통해 활성수준을 판단하였다.

2) 약제감수성: 선발된 활성균주 및 더듬이병 관련 병원균을 대상으로 dazomet, mancozeb 약제에 대한 감수성 검정을 실시하였다. 본 실험은 길항을 나타내는 균주가 포장에서 높은 생존력을 유지할 수 있는지, 또한 기존약제와 혼용이 가능한지등을 사전에 판단하기 위하여 실시하였다. 약제에 대한 감수성 검정은 상기 공시 약제를 수용액 상태로 만들어 100 μl를 Bennett's agar 배지에 도말하고 그 위에 1-10,000 ppm의 농도로 처리된 paper disc를 올려놓고 48시간 배양한 후 colony 생장저해 여부를 통해 MIC(minimal inhibition concentration)를 결정하였다.

3) *In vivo* pot 실험: *In vitro* 실험에서 높은 항균활성을 보인 방선균 9 균주에 대해 *in vivo* pot실험을 실시하였다. 본 실험에 사용한 pot의 크기는 350 cm<sup>2</sup>×8 cm이었으며, 토양내 길항균의 처리를 위해 액체배양체를 동결건조시켰다. 동결건조된 균체를 배양액 200 ml 기준으로 zeolite 30, bentonite 10, glucose 2, soybean meal 2, chitin 2 g과 혼합하여 분말체형을 만든 후 씨감자(Daejima 품종) 파종시에 길항균과 동일하게 제형화된 더듬이병원균(*S. scabiei*)과 함께 토양 내부(10 cm 정도 깊이) 및 표면에 1차 처리한 후 2차 및 3차 처리는 3주 간격으로 표면에만 처리하였다. 균주당 3-6반복으로 실시하였으며 방제지수(control value)는 감자 수확 후 더듬이병이 발생한 괴경 수 및 더듬이 병반수 등을 종합적으로 분석하여, 0-100의 범위에서 지수값(10% 이상 병반 관찰, 0; 5% 병반 관찰, 20%; 다소의 병반 관찰, 40%; 낮은 병반 관찰, 60%; 매우 드문 병반 관찰, 80%; 병반 미관찰, 100% 점수)을 산출하고 그 평균값으로 표시하였다.

**분석기기.** 활성물질을 분리하기 위해 사용한 HPLC는

JASCO 모델(일본)의 LC900 시리즈를 사용하였다. 감압 농축기는 EYELA A-3s(EYELA Tokyo Rikaikai Co. Ltd., 일본)를, pH meter는 Meller Delta 450 series를, 그리고, autoclave는 선일인수트루먼트사의 제품을 각각 사용하였다.

**결 과**

**항균활성.** 분리균주의 더닝이병원균(*S. scabiei* 및 *S. turgidiscabiei*)에 대한 항균활성 검정결과 Table 1에서 보는 바와 같이 A020645균주를 비롯한 방선균 9 균주가 선발되었으며 이들 길항미생물은 *S. scabiei* 및 *S. turgidiscabiei* 균주에 따라서는 활성에 약간의 차이를 나타내었다. 이들 균주의 dazomet 및 mancozeb에 대한 약제저항성 수준을 알아본 결과 A020645, A021194 및 A000309 균주가 높은 저항성을 나타냈으며 A020413 균주는 매우 낮은 저항성을 나타냈다. 한편, *in vivo* pot 조건에서의 더닝이병 방제가를 조사한 결과 A020645, A010564 균주가 매우 높은 방제가(65%)를 나타냈으며, A010321 균주는 대체로 높은 방제가(50%)를 보였다(Table 1). 따라서 본 연구에서는 높은 방제가를 보인 A020645 균주가 생산하는 항균활성물질을 먼저 분리하고자 하였다.

**활성균주의 동정.** 높은 방제가를 보인 A020645 균주에 대한 동정을 실시한 결과 본 균주는 공시한 11 종류의 탄소원 중 글루코스, 만니톨, 람노스를 잘 이용하였고, 아라비노스, 프럭토스, 셀룰로스를 잘 이용하지 못하였다. A020645 균주의 생육정도는 오토밀 한천, 무기염·전분 한천, 글루코스·아스파라긴 한천, 벤트 한천 등에서는 양호한 생육정도를 나타내었고 효모·맥아 한천, 글리세롤·아스파라긴 한천, 타이로신 한천, 펩톤·효모·철 한천 및 영양 한천 등에서는 보통이었다. 또한, 기균사의 색상은 대부분의 배지에서 백색 내지는 연한 핑크색을 나타내었으며 수용성 색소는 타이로신 한천, 펩톤·효모·철 한천 배지상에서 갈색 색소를 분비하였다(표 미제시). A020645 균주의 포자 연쇄형태는 나선상의 형태를 나타내었



Fig. 1. Scanning electron micrograph of an active strain, A020645.

며 체인 당 포자의 수는 보통 20개 이상이었고, 포자의 표면은 매끄럽고 원통형으로 크기는 각각 0.5-0.7×0.9-1.1 μm와 0.5-0.6×1.0-1.2 μm이었다(Fig. 1). 선발 균주의 균체 세포벽 성분을 박층크로마토그래피 방법에 따라 조사한 결과, 두 균주 모두 균체 가수분해 성분인 디아미노피메린산(diaminopimelic acid)은 LL형이었다. 16S rDNA를 대상으로 염기서열을 분석한 후 알디피(RDP, Ribosomal Database Project)데이터 베이스를 이용하여 유사도(similarity index)를 조사한 결과, A020645 균주는 *Streptomyces* So54 균주와 유사도가 99%로서 *Streptomyces*속 균주로 동정되었다.

**활성물질의 분리.** 항균활성검정에서 높은 길항활성을 보이고, 약제저항성을 보인 A020645로부터 항균활성물질을 분리하고자 하였다. A020645 액체배양액(3 l)을 guz를 사용하여 pellet과 배양액으로 분리하였으며, 배양액을 감압농축하여 48 g의 배양액 추출물을 얻었다. 분리과정은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 추출물을 음이온교환 크로마토그래피(anion exchange

Table 1. Profiles of actinomycete BCA candidates for potato common scab control

Isolate	Susceptibility to pesticides <sup>a</sup> (ppm)		Antagonistic activity against <sup>b</sup> ( <i>in vitro</i> )		Control index <sup>c</sup> ( <i>in vivo</i> pot)
	Daz	Man	<i>S. scabiei</i>	<i>S. turgidiscabiei</i>	
A020645	>5,000	>5,000	+++	++	65
A010321	1,000	1,000	+++	++++	60
A010564	1,000	100	++++	NE	60
A020973	1,000	100	++	++++	55
A020069	1,000	500	++	++++	20
A020447	1,000	100	++++	++++	30
A020413	100	100	NA	+++++	40
A021194	1,000	5,000	+++++	+	30
A000309	1,000	>5,000	+	+	40
S-67 <sup>d</sup>	1,000	>5,000	NE	NE	NE

<sup>a</sup>Susceptibility of antagonistic microbes to dazomet (Daz) and mancozeb (Man) using paper disc method. <sup>b</sup>Inhibition zone (mm) using paper disc method (+, ≤10; ++, 11-15; +++, 16-20; ++++, 21-25; +++++, >26 mm). <sup>c</sup>Control values were evaluated by the following mean percent score of inhibition based on the number of scab and lesion area formed on potato tuber (cultivar, Daejima) in pots 4 months after treatment. >10% scab lesion area observed (no inhibition, score 0); 5% scab lesion area observed (=very slight inhibition, score 20); more or less scab observed (slight inhibition, score 40); small number of scab observed(somewhat inhibition, score 60); just a few scab observed (very considerable inhibition, score 80); no scab observed (complete inhibition, score 100). Control values below mean score 40 were omitted in this table. <sup>d</sup>*S. scabiei* (pathogenic, Korean isolate). NE, not examined. NA, not active.

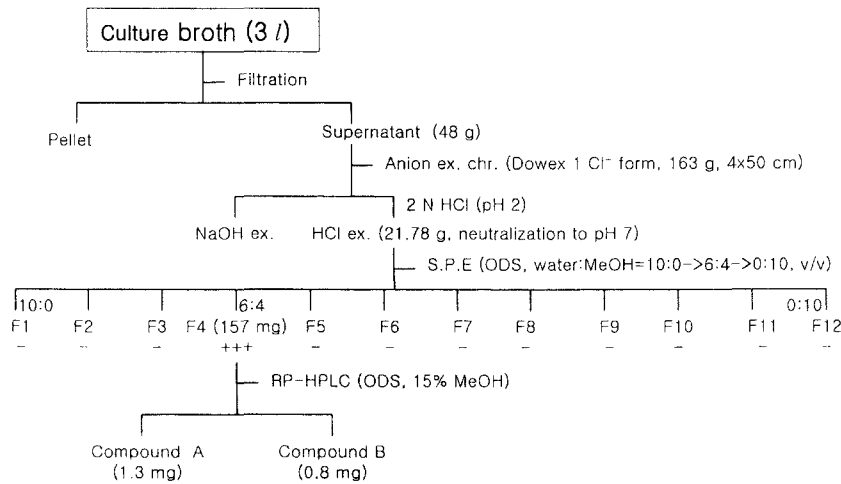


Fig. 2. Isolation procedure of bioactive compounds against *S. scabiei* S67 from A020645 culture broth.

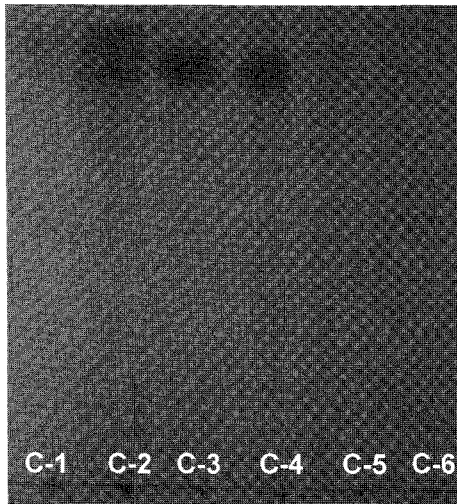


Fig. 3. TLC photography (UV 254 nm) of bioactive compounds against *S. scabiei* S67 from A020645 culture broth. TLC analysis condition: stationary phase, DC-Fertiplatten RP-18 F<sub>254</sub>S (5 × 20 cm, Merck); mobile phase, 60% MeOH; samples: F4-F4 subfraction (C-1, compound 1; C-2, compound 2; C-3, compound A; C-4-compound B; C-5, compound 5; C-6, compound 6).

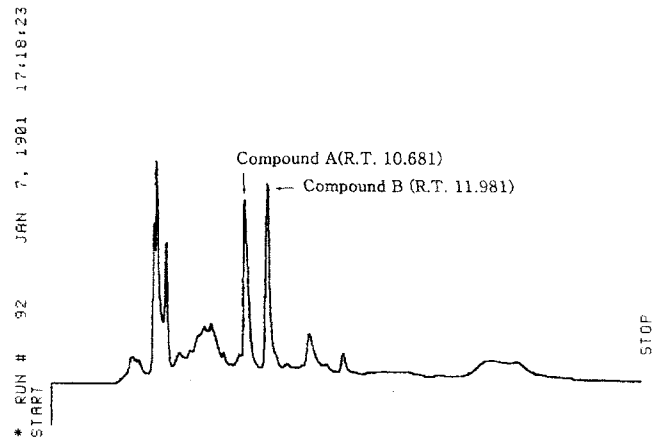


Fig. 4. HPLC chromatogram of F4 subfraction purified from A020645 culture broth. Analysis condition: column, Dynamax 250 × 10 mm (Microsorb 100-5 C<sub>18</sub>, Varian); mobile phase, 15 : 85 = MeOH : water (v/v); flow rate, 2 ml/min; sample injection, 100 μl; UV detection, 254 nm.

고찰

chromatography, Dowex 1, Cl<sup>-</sup> form, 163 g, 4 × 50 cm, i.d.)를 실시하여 NaOH층과 HCl층을 얻었다. 이들 두 층에 대해 감자 더듬이병원균(*S. scabiei* S67)에 대한 항균활성 측정 결과 HCl 층에서 활성이 있음을 확인하였다. 항균활성을 나타낸 HCl 추출물(21.89 g)을 감압농축하고 총 6회에 걸쳐 solid phase extraction(ODS, 10 g)을 실시하여 각각을 TLC로 분석하였다 (Fig. 3). 그 결과, 총 12층의 subfraction을 얻었다. 이중 항균활성을 나타낸 F4층(157 mg)으로부터 역상 HPLC(Dynamax 250 × 10 mm, Microsorb 100-5 C<sub>18</sub>, Varian)를 실시하여 최종적으로 compound A(1.3 mg)와 compound B(0.8 mg)를 분리하였다 (Fig. 4). 활성물질의 구조규명을 위하여 <sup>1</sup>H-NMR을 실시한 결과(Fig. 5), nucleoside계 화합물로 분석되었으며 앞으로 완전한 구조 규명을 위해 <sup>13</sup>C-NMR, HMQC, HMBC 등의 분석을 실시할 예정이다.

오늘날 화학농약의 대안으로 환경친화적인 생물제제(BCA)의 개발에 대한 관심이 점차 높아지고 있다. 본 연구는 순수분리한 5,000여 방선균 균주를 대상으로 감자 더듬이병원균인 *Streptomyces scabiei*에 대한 *in vitro* 항균활성을 검정하고, 여기에서 선발된 균주의 약제내성 수준 및 *in vivo* pot 활성을 종합적으로 분석하여 BCA제로서의 개발가능성을 판단하였다. 일차 활성 균주들의 특성을 조사한 바 공시한 더듬이병 관련 병원균에 대한 활성에 있어서 균주간에 다소 차이를 나타내었다 (Table 1). 또한 약제 내성에 대한 수준도 균주간 차이가 있었는데 수종의 항생제에 대하여는 100 ppm 수준에서도 억제되는 결과를 보인 반면 5,000 ppm에서도 저항성을 갖는 균주도 발견되었다 (Table 1). 더듬이병 방제용 BCA 균주선발시 dazomet 및 mancozeb와 같이 감자 재배 포장에서 현재 사용중인 농약과 neomycin, streptomycin 등 몇가지 농용항생제에 대해서도 저항성을 나타내는 균주를 선발하였다(부분자료 제시). 이와같

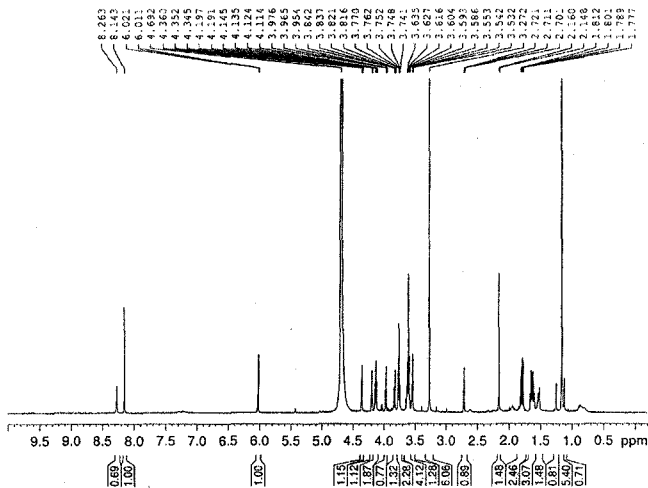


Fig. 5.  $^1\text{H-NMR}$  profile of compound A.

이 현재 감자 재배 포장에서 사용중인 농약이나 사용가능성이 있는 항생물질에 대해 높은 내성을 나타내는 균주는 기존 농약과의 혼용 가능성이 있을 뿐만 아니라, 토양잔류 농약이나 이웃 농가 포장에서 오염에 의한 활성 저하를 미연에 방지하며, 나아가 차후 포장에서 처리한 후에 처리 균주의 궤적을 추적하는 데에도 유리하기 때문에 BCA개발시 유리하다고 하겠다. 이러한 관점에서 A020645 균주가 최종 우수 균주로 선발되었으며, 이 균주는 감자 더듬이 병원균 가운데 *S. turgidiscabies*에 대해서 보다는 *S. scabiei*에 더 높은 저해활성을 나타냈으며 *in vivo* pot 시험에서도 높은 방제기를 나타내었으며, 배양여액에 대한 활성검정 결과 항균활성 물질을 생산하는 것으로 확인되었다. 현재 활성 화합물의 구조분석을 위해  $^1\text{H-NMR}$  data base를 활용하여 일차 검색한 결과 nucleoside계통으로 판단되었으므로 현재 이와 관련 유도체들을 대상으로 길항활성 및 상승효과 등을 검토할 필요가 있을 것으로 판단된다. Isono 등(1984)은 *Streptomyces* sp.균주로부터 새로운 nucleoside계통의 항생물질인 ascamycin [2-chloro-9-beta-[5-O-(N-L-alanyl)sulfamoyl-D-ribofuranosyl]-adenine]과 관련 dealanyl 유도체를 분리하여 이들의 생물활성을 보고한바 있으나 더듬이병원균에 대한 활성은 아직 보고된 바 없다. 감자더듬이병은 토양병으로 토양내 분포가 광범위하고 잔류기간이 길어 경종적 방제법만으로는 방제가 어렵고, 공시된 약제가 거의 없는 실정이다. 따라서 무병종자를 사용하거나 pentachloronitrobenzene(PCNB) 또는 maneb-zinc dust가 일반적으로 사용되고 있고,<sup>4)</sup> mancozeb이 감자 중서 표면처리제로서, 그리고 토양훈증제인 dazomet(Basamid)는 항균, 살충, 제초 및 살선충 활성 뿐만 아니라 더듬이병 방제를 위한 토양소독제로 사용되어지고 있다. 본 연구에서는 이들 약제에 대한 *in vitro* 저해활성을 조사한 바 dazomet 및 mancozeb은 *S. scabiei* DSMZ 40962 균주를 제외한 국내에서 분리된 더듬이 관련 병원균(*S. scabiei*, *S. turgidiscabies*) 및 *S. acidiscabies* ATCC 49004에 대해서 낮은 저해활성을 나타냄으로써 차후 감자 재배 포장에서의 실제적 효과도 재 검토되어야 할 것으로 보인다(부분자료 제시). 한편, aminoglycoside계 항생제인 neomycin은 대부분의 방선균 균주에 대해 저해활성을 나타냄

으로써 천연물농약으로서의 활용가능성을 나타내었다(자료 미제시).

앞으로 본 연구에서 선발되어 감자 더듬이병원균에 대해 높은 방제효과를 나타내는 BCA 후보균주들을 대상으로 다양한 제형에 따른 활성을 비교하고 이들의 토양에서의 정착력 및 길항력 향상을 포함하는 실용화 연구를 계속 진행할 예정이다.

## 감사의 글

본 연구는 제주도가 지원하는 한국생명공학연구원-제주(KRIBB-Cheju) 연구프로그램(KJM0020211)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 감자더듬이병원균을 분양해주신 강원대학교 임춘근 교수에게 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Ham, Y. I. (2000) Development of integrated control methods of potato common scab. *Res. Rept. Agric. R&D Project. Nat'l. Alp. Agric. Exper. Stat* (Korean).
2. Kim, S. M. (2000) Overview and role regarding of change of cultivation area for main crops in Jeju island. *New Agriculture in Cheju* **45**, 29-32 (Korean).
3. Hong, S. Y., Kim, S. H., Song, J. H., Lee, K. S., Jin, S. C., Hur, T. H., Lim, S. O. and Kim, Y. H. (2000) Survey of pathogen and pest occurring on main crops in Jeju island. *Res. Rept. Nat'l. Cheju Agric. Exper. Stat.* 389-403 (Korean).
4. Agrios, G. N. (1997). Common scab of potato. In: *Plant Pathology*: (4th ed.), Academic Press, CA, USA. pp. 449-451.
5. Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A. and King, R. R. (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* **81**, 836-846.
6. Scholte, K. and Labryere, R. E. (1985) Netted scab: A new name for an old disease in Europe. *Potato Res.* **28**, 443-448.
7. Archuleta, J. G. and Easton, G. D. (1981) The cause of deep-pitted scab of potatoes. *Am. Potato J.* **58**, 385-392.
8. Lambert, D. H. and Loria, R. (1989) *Streptomyces acidiscabies* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 387-392.
9. Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T. and Kuninaga, S. (1998) *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 495-502.
10. Bouček-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P. and Jouan, B. (2000) DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Int. J. Evol. Microbiol.* **50**, 91-99.
11. Takeuchi, T., Sawada, H., tanaka, F. and Matsuda, I. (1996) Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 476-479.
12. Park, D. H., Kim, J. S., Cho, J. M., Kwon, S. O., Hur, J. H. and Lim, C. K. (2002) Characterization of *Streptomyces* of potato scab in Korea: Distribution, Taxonomy, and Pathogenicity. *Proceedings of the 5th Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions*, KRIBB, Korea. pp. 58-70.

13. Liu, D., Anderson, N. A. and Kinkel, L. L. (1995) Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathol.* **85**, 827-832.
14. Liu, D., Anderson, N. A. and Kinkel, L. L. (1996) Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. *Can. J. Microbiol.* **42**, 487-502.
15. Menzies, J. D. (1959) Occurrence and transfer of a biological factor in soil that suppresses potato scab. *Phytopathol.* **49**, 648-653.
16. Paulsrud, B. E. (1996) Characterization of antagonistic *Streptomyces* spp. from potato scab-suppressive soils and evaluation of their biocontrol potential against potato and non-potato pathogens. M.S. Thesis, Univ. of Minnesota, St. Paul, MN.
17. Schottel, J. L., Shimizu, S. and Kinkel, L. (2001) Relationships of *in vitro* pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biological Control* **20**, 102-112.
18. Weinhold, A. R. and Bowman, T. (1968) Selective inhibition of the potato scab pathogen by antagonistic bacteria and substrate influence on antibiotic production. *Plant Soil* **28**, 12-24.
19. Hong, S. Y. (2001) Characterization and control of potato common scab in Jeju island. Ph.D. Thesis, Cheju National Univ. (Korean).
20. Park, Y. B., Yiem, M. S. and Cho, J. L. (2002) Development of integrated control system based on fertilizer, mulching, crop rotation, pH control on potato common scab (*Streptomyces scabies*) of 'Daejima' potatoes. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **143**, 710-715.
21. Isono, K., Uramoto, M., Osada, H., Ubukata, M., Kusakabe, H., Koyama, T., Miyata, N., Sethi, S. K., McCloskey, J. A. (1984) Structure and biological activity of ascamycin, a new nucleoside antibiotic. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **15**, 65-67.

---

#### Screening of Antagonistic Actinomycetes for Potato Scab Control and Isolation of Antibiotic Compound

Hyang Burm Lee, Jong-Wun Cho, Chi-Hwan Lim<sup>1</sup> and Chang-Jin Kim\* (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Yusong, Daejeon 305-600, Korea; <sup>1</sup>College of Agricultural Life Science, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea)

**Abstract:** In the course of our screening for biocontrol agent (BCA) against *Streptomyces scabiei* and *S. turgidiscabies* causing potato scab using 5,000 actinomycete isolates, 9 antagonistic strains were selected as BCA candidates through *in vitro* and *in vivo* assay. An antagonistic strain, A020645 was highly resistant to some pesticides and antibiotics such as dazomet and mancozeb and showed high control value *in vivo*. Two bioactive compounds (compound A, B) were purified by anion exchange chromatography, solid phase (ODS) extraction, TLC and reverse phase HPLC. Their chemical structures are now thought to be nucleoside derivative as determined by <sup>1</sup>H-NMR data analysis. Their full chemical structures would be elucidated through <sup>13</sup>C-NMR, HMQC and HMBC analyses. Further studies will be focused on fitness in soil and formulation of the BCA candidates.

---

Key words: potato, potato common scab, BCA, *Streptomyces scabiei*, *Streptomyces turgidiscabies*, bioactive compounds

\*Corresponding author