

*Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밑동썩음병 방제균주 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13의 분리 및 동정

김한우 · 박종영¹ · 김현주¹ · 이광렬¹ · 이진우¹ · 최우봉² · 이선우¹ · 문병주^{1*}

동아대학교 농업생명연구소, ¹동아대학교 응용생물공학부, ²동의대학교 생명공학과

Isolation and Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 Active Against *Rhizoctonia solani* Causing Crisphead Lettuce Bottom Rot

Han-Woo Kim, Jong-Young Park¹, Hyun-Ju Kim¹, Kwang-Youll Lee¹, Jin-Woo Lee¹,
Woobong Choi², Seon-Woo Lee¹ and Byung-Ju Moon^{1*}

Center for Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

¹Division of Applied Biology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Dept. Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

(Received on May 6, 2005)

In a course of searching for biofungicide to control crisphead lettuce bottom rot caused by *Rhizoctonia solani*, we have isolated an antagonistic bacterium from lettuce rhizosphere soil. A total of 702 bacterial isolates were isolated and tested for *in vitro* growth inhibition of *R. solani*. Seven strains appeared to have strong antagonistic effect against *R. solani* in *in vitro* growth inhibition assay. In the pot experiments, a strain BW-13 showed the most potent disease control effect on the both lettuce seedlings and adults plants. Therefore, the BW-13 was selected as a biocontrol candidate against crisphead lettuce bottom rot. Based on its morphology, physiological characteristics, and 16S rRNA gene analysis, the BW-13 was finally identified as *Stenotrophomonas maltophilia*. This study indicated that *S. maltophilia* BW-13 could be used as a biocontrol agent to control crisphead lettuce bottom rot.

Keywords : Antagonistic bacteria, Bottom rot, *Rhizoctonia solani*, *Stenotrophomonas maltophilia*

우리나라의 시설재배는 대부분 소규모이고 영세하며 지역특성에 맞는 작형이나 작기 선택재배로 생산비 절감과 고품질을 위한 생산보다는 단경기에 높은 가격을 목표로 한 생산에 비중을 두고 있으며, 겨울철 난방비의 지출을 극도로 제한하기 때문에 시설내의 과습은 피할 수 없는 실정이다. 이러한 다습조건은 토양병해인 밑동썩음병(bottom rot)과 균핵병(sclerotinia rot)을 발생시켜 매년 결구상추 농가에 큰 경제적 어려움을 야기하고 있다. 특히, 경상남도 결구상추 재배지역인 의령군에서는 2003년 11월에 밑동썩음병이 발생되어 11월 평균 5.3%의 발병율이 조사되었으며, 이로 인해 2차적으로 균핵병과 잿빛곰팡이병이

유발되어서 경제적인 피해가 큰 것으로 조사되었다(Kim 등, 2004).

밑동썩음병을 일으키는 병원균인 *Rhizoctonia solani*는 토양전염성 병원균으로서 전세계적으로 폭넓은 기주를 가지고 있는 다범성균이며, 밑동썩음병 이외에도 모잘록병(damping off), 뿌리썩음병(root rot), 줄기썩음병(basal stem rot), 줄기궤양병(stem canker) 등을 유발한다(김, 1995). 또한, 토양병원균이므로 습한 토양에서 발생이 더 심하며, 어린 식물체에서의 감염은 부적당한 환경으로 인해 식물체 생장이 느린 경우 더욱 심하게 된다. 1차적으로 *R. solani*에 감염되면 2차적으로 균핵병이나 잿빛곰팡이병이 발생하여 그 피해가 더 확산된다. 이러한 2차적인 병의 방제를 위해서는 1차 감염원인 *Rhizoctonia* 균의 방제를 필수적이다. 그러나, 지금까지 결구상추 밑동썩음병 방제를 위한 화학약제는 농약품목등록된 바가 없으며, 농가에

*Corresponding author

Phone) +82-51-200-7554, Fax) +82-51-200-6993

E-mail) bjmoon@dau.ac.kr

서는 주로 프로파, 베노밀 등의 약제를 이용하여 살포하고 있으나 그 효과가 매우 미미한 뿐만 아니라, 이러한 화학약제에 의한 방제는 잔류독성 및 환경오염이 우려되고 있다. 이와 관련하여 친환경농업에 부합되는 생물학적 방제는 식물병의 대체 방제법으로 많은 주목을 받고 있다(Mathre 등, 1999).

최근에는 생물학적 방제의 일환으로 식물 병원균의 방제를 위한 길항균에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있다. *R. solani*에 대해 균사생장억제능력을 가진 균들로는 *Pseudomonas fluorescens*(Nielsen 등, 1998), *Pseudomonas* spp.(Pall 등, 2000), *Streptomyces* sp.(Cao 등, 2004), *Bacillus subtilis* ATCC 6633(Kugler 등, 1990) 등이 보고된 바 있으며, 식물병 방제용으로 개발되었거나 개발중인 미생물 농약은 주로 *Bacillus*속, *Pseudomonas*속, 그리고 *Trichoderma*속 균 등을 이용하는 것으로 알려져 있다(Mentesinos, 2003).

본 연구에서는 결구상추 밀둥썩음병을 생물적으로 방제하기 위해 길항력이 높고 지금까지 보고된 바가 없는 새로운 길항세균을 분리하여 동정하였다. 또한 생물적 방제의 실용화를 위해 분리균주의 결구상추 밀둥썩음병의 생물적 방제 활성을 검토하였다.

재료 및 방법

길항세균의 분리 및 선발. 경상남도 의령군 부림면 신반리의 결구상추 재배 포장에서 건전 결구상추의 밀둥부위, 뿌리 및 근권토양 10 g을 살균수 50 ml과 각각 혼합한 후, 마쇄기(Warning, USA)에 10~30초간 분쇄한 다음 nutrient agar 배지에 평판희석법으로 배양하였다. 각 시료를 30°C에서 48시간 배양한 후 세균균총을 분리하여 순수배양하고, 각 균주별로 *R. solani*에 대한 길항능을 조사하였다. 실험에 사용된 병원균은 결구상추로부터 분리한 *R. solani* PY-1을 사용하였으며(Kim 등, 2004), potato dextrose agar (PDA)배지에서 배양하였다. 분리균주에서 길항 미생물을 선발하기 위하여, PDA배지상에서 분리균주별로 병원균 PY-1 균주와 25°C에서 5~7일간 대치배양하여 균사생장 저지대(inhibition zone)를 조사하여 저지대가 큰 세균을 길항세균으로 1차 선발하였다. 1차 선발된 길항세균을 결구상추에 접종하여 비병원성균임을 확인하였다. 1차 선발된 길항세균의 밀둥썩음병에 대한 발병억제 효과를 보기위해 유묘 및 성체식물의 생육상내 포트검정을 실시하였다.

유묘 및 성체식물의 생육상내 포트검정. 1차 선발된 균주들을 nutrient broth 배지에서 30°C, 1일간 진탕배양한 후 세균부유액(1×10^6 CFU/ml)을 결구상추의 유묘 및

과중 후 30일된 성체식물에 각각 50 ml, 100 ml씩 골고루 분무접종하였다. 이것을 25°C 생육실에 보관 24시간 후에 Yeast extract-glucose broth(YGB 배지)에서 진탕 배양한 병원균 PY-1 균주의 균사조각 부유액($A_{550}=1.0$) 40 ml을 길항세균 처리한 결구상추 잎에 골고루 분무 접종하고(Kim 등, 2004), 3일 후 플라스틱 하우스에 옮겨서 7일 이후의 방제가를 측정하여 가장 높은 방제가를 나타낸 균주를 길항균으로 최종 선발하였다. 각 처리구는 5포트로 하여 3반복으로 시행하였다. 길항균에 의한 식물병의 방제가는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{\text{병원균 단독 처리구 발병율} - \text{길항균 처리구의 발병율}}{\text{병원균 단독 처리구 발병율}} \times 100$$

길항 세균의 동정. 최종 선발된 길항 미생물의 동정을 위하여 투과전자현미경(TEM)을 이용한 형태 관찰 및 API system(API 20E kit, bioMerieux, France)를 이용한 생리학적 특성을 조사하였으며, 기타 생화학적 특성을 Bergey's manual을 기초로 하여 조사하였다. 16S rDNA sequence 분석을 위하여 Genomic DNA purification kit (Promega, U.S.A)를 사용하여 chromosomal DNA를 준비하였으며, 16S rDNA의 증폭을 위한 primer는 universal primer 27mF (5'-AGA GTT TGA TCH)와 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다. PCR 반응은 초기 변성화 반응(95°C, 3분), 30회의 증폭반응(94°C, 1분; 45°C, 30초; 72°C, 1분 30초) 그리고 최종 확장반응(72°C, 5분) 조건으로 수행되었다. PCR 반응물은 최종 50 µl 부피에 약 40 ng의 DNA, 1×Taq DNA polymerase 완충액, 0.2 mM의 각 dNTPs, 2 mM의 MgSO₄, 그리고 0.25 µM의 primer, 2.5 units의 Taq DNA polymerase가 혼합되었다. PCR product는 pGEM-T vector (Promega, U.S.A)에 cloning 하였으며, 유전자의 염기서열은 GenBank에서 BLASTN으로 분석하였다. 최종선발된 길항세균 BW-13 균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하고 PAUP 프로그램의 default setting으로 Maximum parsimony 분석을 통해 계통분류적 위치를 확인하였으며, 계통분류 tree의 신뢰를 위해 200 회 반복으로 Bootstrap 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

길항세균의 선발 및 항균활성 검정. 토착 생육력이 강한 길항세균을 분리하기 위하여 재배 포장내의 결구상추의 밀둥부위, 뿌리 및 근권토양에서 토양세균을 분리한

Table 1. Effect of 7 antagonistic bacterial isolates on the *in vitro* growth of *Rhizoctonia solani* PY-1 in growth inhibition assays

Antagonistic bacteria	Inhibition zone
R-13	+ ^a
R-26	++
R-39	++
RH-1	+
RH-4	++
CAA-2	++
BW-13	+++

^aSymbols: +, inhibition zone less than 2 mm; ++, inhibition zone between 2 mm and 5 mm; +++, inhibition zone more than 5 mm.

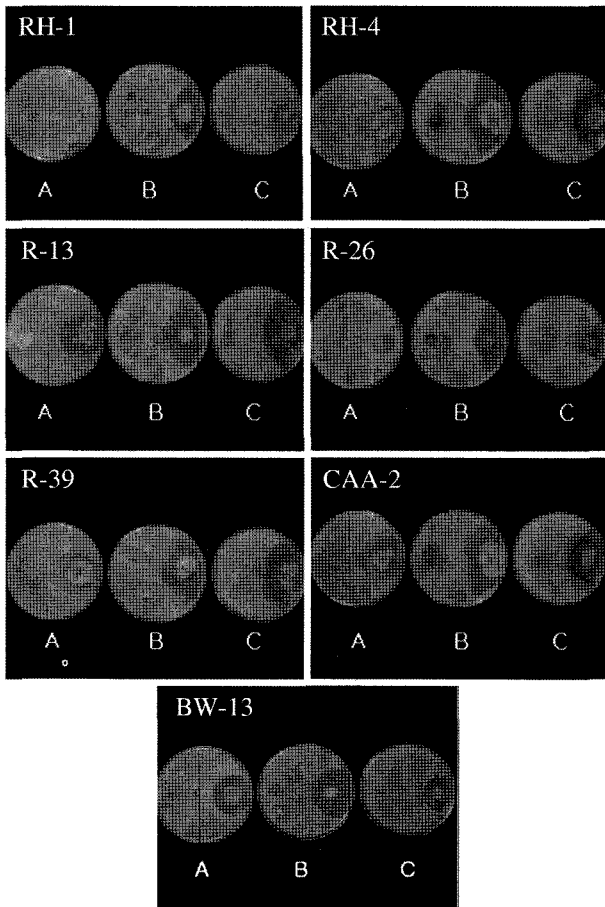


Fig. 1. Growth inhibition of three *Rhizoctonia solani* strains by 7 bacterial isolates on PDA medium. *R. solani* strains were isolated from diseased crisphead lettuce obtained in plastic house at Uiryong-Gun, Gyeong Sang Nam-Do. A, *R. solani* PY-1; B, *R. solani* AG 2-1; C, *R. solani* AG-4.

결과 총 702균주를 분리하였다. 분리된 균주 중에서 밀 등썩음병의 병원균인 *R. solani* PY-1에 대한 길항능을 가진 균주를 분리, 선발하기 위하여 대치배양한 결과 강한

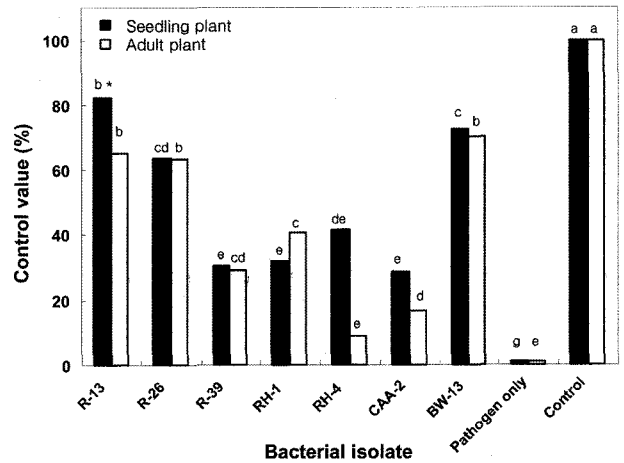


Fig. 2. Effects of bacterial antagonists on seedling and adult plant of crisphead lettuce infected with *Rhizoctonia solani* in the growth chamber evaluations. Disease control value (%) was calculated by estimating the percent (%) of non-infected leaf area on each plant by *R. solani* PY-1.

*Mean separation by Duncan's multiple range test at 5% level.

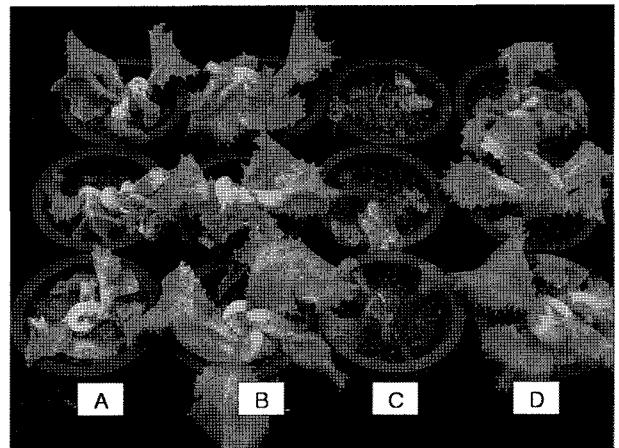


Fig. 3. Control of *Rhizoctonia* bottom rot of crisphead lettuce by the antagonistic bacterial isolates in a dew chamber. A: Treatment of the RH-1, B: Treatment of the BW-13, C: Pathogen only, D: Control.

항균활성을 나타낸 7균주를 1차 선발하였다(Table 1, Fig. 1). 1차 선발된 각 길항세균에 의한 발병억제 효과를 유묘와 성체식물에서 포트검정한 결과, 유묘에서의 방제가는 길항세균 R-13 처리구에서 82.4%로 가장 높은 방제가를 보였으며, BW-13, R-26순으로 각각 72.4%, 63.7%의 방제가를 나타내었다. 이에 반해 성체식물에서는 BW-13 균주가 70.3%의 가장 높은 방제가를 보인 반면, R-13과 R-26은 각각 65.1%, 63.4%의 방제가를 보였다. 따라서, 결구상추의 유묘와 성체의 포트검정을 통하여 BW-13 균주가 다른 길항세균에 비하여 *R. solani*에 대한 발병억



Fig. 4. Transmission electron microscopic (TEM) images of the BW-13 isolated from soil (Magnification: $\times 30,000$).

제 효과가 우수하여 길항세균으로 최종선발하였다(Fig. 2, 3).

길항세균의 동정. 최종 선발된 길항세균 BW-13 균주를 그람 염색 및 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 그람 음성 간균의 형태였으며(Fig. 4), 편모가 있어 운동성이 있는 것으로 조사되었다. 생화학적 특성을 조사한 결과, catalase, protease의 활성 그리고 starch 분해능이 있었으며, citrate와 glucose를 이용하였고, oxidase에 양성반응을 나타냈다. 또한 진균의 세포벽을 가수분해할 수 있는 chitinase 활성은 나타났지만 미미한 수준이었고, 식물에 대한 병원성은 나타나지 않았다(Table 2). 이상의 생리·생화학적 및 형태학적 특성을 Bergey's manual과 비교한 결과 *Stenotrophomonas maltophilia*와 가장 유사하였으며, API system의 분석과 16S rDNA sequence 분석결과 각각 98.8%와 99%의 유사도를 보였다. 또한, 계통분류적 분석 결과 BW-13이 database의 *S. maltophilia*와 가장 유사한 것으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 본 균주를 *S. maltophilia* BW-13으로 최종 동정하고 명명하였다.

길항균 *S. maltophilia*는 *Pseudomonas maltophilia* 또는 *Xanthomonas maltophilia*로 알려져 있었으나 Palleronid와 Bradbury(1993)에 의해 *S. maltophilia*로 분류되어졌다. 이 세균은 토양에서 주로 많이 발견되며, 식물 병원성 진균에 대하여 길항능을 가진 중요한 근권세균으로 보고되어 있다(Dunne 등, 1997; Giesler와 Yuen, 1998; Lambert 등,

Table 2. Comparison of the cultural, physiological and biochemical characteristics of an antagonistic bacterium, BW-13 compared with *Stenotrophomonas maltophilia* type strain described in Bergey's manual

Characteristics	BW-13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^a
Gram strain	-	-
No. of flagella	>1	>1
Endospore formation	-	-
Cell diameter > 1.0 μ m	-	-
Anaerobic growth	+	+
Growth in NaCl 2%	+	+
5%	+	+
7%	-	+
Growth at 20°C	+	+
25°C	+	+
30°C	+	+
35°C	+	+
37°C	-	+
Growth at pH 6.0	+	+
pH 7.0	+	+
pH 8.0	+	+
Activity of Catalase	+	+
Protease	+	+
Chitinase	\pm^b	-
Starch Hydrolysis	+	+
Nitrate reduction	+	+
Utilization of Citrate	+	+
Glucose	+	+
Sorbitol	-	+
Oxidase reaction	+	+
Plant pathogenicity	-	-

^aRefer to Bergey's manual.

^bThe BW-13 strain exhibited a very low chitinase activity in chitin agar plate assay.

1987; Lambert 등, 1990; Mazzola 등, 1995). Giesler와 Yuen(1998)는 잔디(Kentucky bluegrass)로부터 분리한 *S. maltophilia* C3균주를 이용하여 목초(tall fescue)에 서식하는 *R. solani*와 *Bipolaris sorokiniana*에 대하여 우수한 방제효과를 보고한 바 있다. 또한 Dunne 등(1997)은 모잘록병을 일으키는 것으로 흔히 알려진 *Pythium ultimum*의 길항세균으로서 *S. maltophilia* W18을 분리하였으며, Kobayashi 등(1995)은 *Magnaporthe poae*에 의해 발생되어지는 잔디(Kentucky bluegrass)의 패치병(summer patch disease)에 대한 생물학적 방제원으로서 *S. maltophilia* 34S1

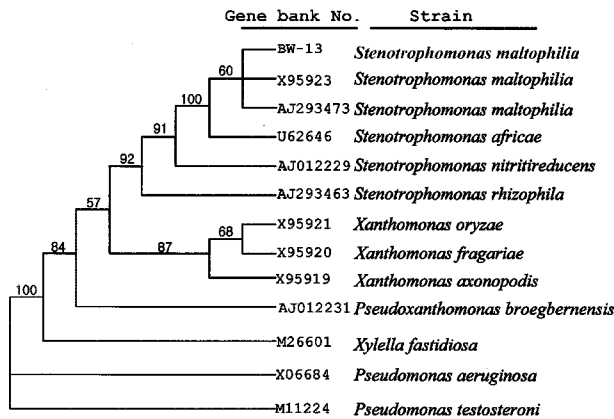


Fig. 5. Phylogenetic tree by rRNA gene analysis of the isolate BW-13 and other related bacteria. The tree was generated by the Maximum Parsimony Analysis of PAUP program. Bootstrap values are shown for each node that had >50% support in a bootstrap analysis of 200 replicates.

을 분리하였다. *S. maltophilia*의 식물 병원균에 대한 길항능의 작용기작은 protease, chitinase, β -1,3-glucanase 등과 같은 진균의 세포벽 분해능과 관련된 효소의 분비, maltophilin, xanthobactin과 같은 항진균성 활성을 가진 항생물질의 생산, 그리고 근권에서의 정착성 등이 보고되어 있다(Dunne 등, 1997; Elliott Juhnke 등, 1987; Lambert 등, 1987; Lambert 등, 1990; O'Brien와 Davis, 1982; Zhang와 Yuen, 2000). 그러나 본 연구에서 BW-13 균주의 chitinase 활성은 미미한 것으로 확인되었으므로, *S. maltophilia* BW-13 균주의 결구상추 밀둥썩음병균 *R. solani* PY-1에 대한 생물학적 방제효과의 작용기작은 항생물질에 의한 항생작용인 것으로 생각된다.

요 약

결구상추 밀둥썩음병의 병원균 *Rhizoctonia solani*에 대한 길항세균을 분리하기 위하여 결구상추 재배 포장에서 결구상추의 밀둥부위, 뿌리조직 그리고 근권토양에서 세균 702균주를 분리하였다. 분리균주 중에서 대치배양에 의해 길항능을 나타낸 7균주를 선발하였으며, 그 중 포트검정 실험에서 유묘와 성체식물에서 발병억제효과가 우수한 BW-13균주를 길항균으로 최종선발하였다. 최종선발된 BW-13균주의 동정을 위하여 생리·생화학적 특성, API test 및 16S rDNA sequence를 분석한 결과 *Stenotrophomonas maltophilia*로 동정되었으며, 본 균주를 *S. maltophilia* BW-13으로 명명하였다. 본 연구의 결과는 *S. maltophilia* BW-13이 결구상추 밀둥썩음병의 생물학적 방제원으로 이용될 수 있음을 보여준다.

감사의 글

이 논문은 농림부 농림기술개발연구과제(2002-2005)의 연구개발비에 의하여 수행된 결과의 일부임.

참고문헌

- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Let. Appl. Microbiol.* 39: 425-30.
- Dunne, C., Crowley, J. J., Monne-Loccoz, Y., Dowling, D. N., de Bruijn, F. J. and O'Gara, F. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* 143: 3921-3931.
- Elliott Juhnke, M. Mathre, D. E. and Sands, D. C. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2793-2799.
- Giesler, L. J. and Yuen, G. Y. 1998. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease. *Crop Prot.* 17: 509-51.
- 김완규. 1995. 작물 라이족토니아병 진단 및 방제. 농업과학기술원 작물보호부 병리과. 167 pp.
- Kim, H. J., Park, J. Y., Back, J. W., Lee, J. W., Jung, S. J. and Moon, B. J. 2004. Occurrence of bottom rot of crisphead lettuce caused by *Rhizoctonia solani* and its pathogenicity. *J. Life Science* 14: 689-695.
- Kobayashi, D. Y., Guglielmoni, M. and Clarke, B. B. 1995. Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* as biological control agents for summer patch disease of turfgrass. *Soil Biol. Biochem.* 27: 1479-1487.
- Kugler, M., Loeffler, W., Rapp, C., Kern, A. and Jung, G. 1990. Rhizocitricin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Arch. Microbiol.* 153: 276-281.
- Lambert, B., Leyns, F., Van Rooyen, L., Gossel, F., Papon, Y. and Swings, J. 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1866-1871.
- Lambert, B., Meire, P., Joos, H., Lens, P. and Swings, J. 1990. Fast-growing, heterotrophic bacteria from the rhizosphere of young sugar beet plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3375-3381.
- Mathre, D. E., Cook, R. J. and Callan, N. W. 1999. From discovery to use: Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Dis.* 83: 972-983.
- Mazzola, M., Stahlman, P. W. and Leach, J. E. 1995. Application method affects the distribution and efficacy of rhizobacteria

- suppressive of downy brome (*Bromus tectorum*). *Soil Biol. Biochem.* 27: 1271-2178.
- Monterinos, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 6: 245-252.
- Nielsen, M., Sørensen, J., Fels, J. and Pedersen, H. C. 1998. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563-3569.
- O'Brien, M. and Davis, G. H. G. 1982. Enzymatic profile of *Pseudomonas maltophilia*. *J. Clin. Microbiol.* 16: 417-421.
- Pall, K. K., Tilak, K. V., Saxena, A. K., Dey, R. and Singh, C. S. 2000. Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. *Microbiol. Res.* 155: 233-242.
- Palleroni, N. J. and Bradbury, J. F. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 606-609.
- Zhang, Z. and Yuen, G. Y. 2000. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology* 90: 384-389.