

인삼 주요병에 대한 길항미생물 선발

정기채*† · 김창배* · 김동기** · 김복진***

*경북농업기술원 풍기인삼시험장, **(주)엔비텍, ***영남대학교

Isolation of Antagonistic Bacteria against Major Diseases in *Panax ginseng* C. A. Meyer

Ki Chae Chung*†, Chang Bae Kim*, Dong Ki Kim**, and Bok Jin Kim***

*Poongki Ginseng Experiment Station, Gyongbuk Provincial ATA, Korea.

**Envitech, (Songdo Techno Park), 994-41 Dongchun-dong, Yeonsu-gu, Incheon, Korea.

***Department of Agriculture, Youngnam University, Daegu, Korea.

ABSTRACT : Ginseng is major medicinal plant in Korea. Because of its long cultivation period the yield losses of 5 years of ginseng is 50% due to various diseases. The objective of this study is to select potential biocontrol agents. As the result of research so far achieved to contribute to rational prevention of ginseng plant disease for the stable cultivation of ginseng, three bacterial strains, *Streptomyces lauretii* strain B8180, *Bacillus subtilis* strain 8856, and *Burkholderia cepacia* strain 7944 were isolated from oak leaf compost. The strains showed antagonistic activities against five ginseng pathogenic fungi (*Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* f. sp. *panacis*) and control effects on *Phytophthora* blight.

Key Word : *Streptomyces lauretii*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Phytophthora cactorum*.

서 언

인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 한국과 중국을 비롯한 동양에서 수천 년 동안 보혈강장제로 이용하여 온 신비의 약초로서 생약 중에 왕좌의 자리를 지키고 있다. 인삼속 식물 은 대부분 북반구 온대 이북의 밀림내 부식토에서 자생하고 있는 것으로 건조하고 냉랭한 기후조건하에서 잘 자라므로, 재배적으로는 북향 또는 동북향의 완경사지로서 지대가 높아 배수가 양호한 토양에서 생육이 양호한 것으로 알려져 있다 (宮澤 등 1975).

인삼재배역사는 고려 말부터 산삼의 수요가 급증하면서 산삼이 희귀하게 되자 고려 말 인종 때부터 깊은 산 숲속에서 산양삼 재배법을 실시하였다고 전해지고 있으나, 인삼재배는 명나라 이시진 (李時珍, 1518~1593)이 저술한 본초강목 (本草綱目)부터 기록되기 시작하였다. 그 후 조선 정조 원년 (1724년)부터 논과 밭에서 이식재배와 직파재배법을 병행하여 재배하게 되었다고 기록되어있다. 인삼의 본격적인 인공재배의 시원지는 북한의 개성을 중심으로 한 지역이었으며, 그 뒤 일제 강점기 하에서는 개성 외에 남한의 금산, 부여에 재배지를 확대시켰

고, 1953년 휴전이 협정되자 개성 삼농인들이 강화, 김포, 파주, 연천, 포천, 용인, 이천, 안성 등 경기도 지역으로 내려와 인삼재배를 시작하여 오늘에 이르게 되었다 (한국인삼사 2001).

지금까지 연작장해의 생물학적 방제연구에서 인삼재배의 불량포 (유발토양)는 모래함량이 많은 사양토가 많았으며, 우량포에 비해 *Fusarium*속 곰팡이의 밀도가 높고 병원균에 대한 용균성 길항미생물의 밀도가 낮은 반면 항균작용도 매우 낮았다고 김 등 (1985)이 보고 한 바 있다. 이와 같이 인삼의 병 발생은 토양의 물리성과 토양비옥도와도 밀접한 관계가 있다.

박 (1999)에 의하면 미생물을 이용하여 시설 연작지의 염류를 경감시킬 수도 있다고 하였으며, 염류에 대한 내성과 근권 정착능력이 큰 미생물 21종을 보고 한 바 있으나, 염류농도가 1.5 ds m⁻¹ 이상에서는 효과가 없어 실효성이 낮다고 하였다. 하지만 생산자와 소비자 모두 살균제를 줄이는데 관심을 가지고 있다. 이러한 이유 때문에 생물학적인 병 방제 전략이 계속하여 탐구되고 있다. Joy와 Parke (1995)은 인삼의 잎점무늬병에 대하여 *Burkholderia cepacia* strain AMMD의 생물학적 방제가능성을 발표한 바 있다. *Cylindrocarpon destructans*에 의하여 발생하는 근부병과 *Phytophthora cactorum*에 의한

†Corresponding author: (Phone) +82-54-632-1250 (E-mail) jkc085@gba.go.kr

Received February 9, 2006 / Accepted July 28, 2006

뿌리썩음과 잎무름 증상 (Ohh *et al.*, 1992)의 역병 그리고 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병 등은 인삼에 발생하는 심각한 병원균들이다. 특히 *Cylindrocarpon destructans*은 한국에서 (Ohh *et al.*, 1992) 연작장해의 주요 원인균으로 알려져 있다. 이와 같이 뿌리썩음 증상을 나타내는 토양병원균은 발생후에는 화학적인 방제가 거의 불가능한 실정이므로 길항 미생물을 이용한 친환경적인 병방제 및 연작 장애피해 경감 대책을 위한 지속적인 연구가 시급하다.

한편, 효과적인 병방제 전략으로는 병저항성 품종의 육성이 가장 좋은 한 가지 접근방법이 될 수 있다. 인삼의 단위면적당 수량을 증가시키기 위하여 한국인삼연초연구소를 중심으로 품종육성, 재배기술개발 및 토양환경개선 등에 관한 연구가 다양하게 수행되어 품종육성, 재배방법 등 많은 변화가 이루어졌다 (김 등, 1981, 1982; 목 등, 1984; 오, 1980; 박 등, 1983). 그러나 지금까지는 고려인삼 중에서 토양병원균에 강한 병저항성 계통이 알려져 있지 않다.

본 연구는 인삼 재배 중 주요 병인 *Cylindrocarpon destructans*, *Phytophthora cactorum*, *Botrytis cinerea*, 등의 병원균에 대한 길항 미생물을 선발하여, 친환경적 인삼재배를 위한 병방제를 위하여 방제효과를 시험하고 인삼의 고품질 안전생산 기술체계를 확립할 수 있는 기본 자료를 제공할 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

1. 인삼 주요 병에 대한 길항미생물 선발

가. 길항미생물의 항균력 조사

풍기인삼시험장에서 4년간 발효된 갈잎부숙퇴비 (약토)에서 300 g씩 4점의 시료를 채취하였다. 채취한 약토는 2.0 mm 체로 친 후 500 ml 삼각플라스크에 멸균수 270 ml을 채우고 30 g의 약토를 넣어 2일 동안 진탕배양하였다. 배양액 1 ml을 취하여 1/2 tryptic soy agar (TSA : bacto tryptone 17 g, bacto soytone 3 g, bacto dextrose 2.5 g, sodium chloride 5 g, dipotassium phosphate 2.5 g, bacto agar 15 g) 배지에 도말 접종하여 30°C 항온기에서 2일간 배양하였다. 형성된 콜로니는 TSA 배지에서 다시 2일간 순수배양한 후, -70°C에 보관하였다. 이 미생물의 인삼 병원균 7종 (*Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria panax*, *Fusarium solani*, *Pythium ultimum*)에 대한 항균력을 대치배양법에 의해 조사하였다. 즉, 1/2 potato dextrose agar (PDA)에 cork borer (Ø 6 mm)로 구멍을 낸 후 배지 중앙에 인삼병원균을 치상하고, 구멍 속에 분리된 미생물 현탁액 (1×10^9 cfu ml⁻¹)을 50 µl씩 접종하여 병원균에 대한 생육억제원의 직경을 측정하였다. 인삼병원균 7종은 농촌진흥청 농업과학기술원에서 분양받아 사용하였다.

나. 길항미생물을 이용한 역병방제 효과

1년근 인삼을 포트 (65 cm × 25 cm)에 27주씩 심고, 온실에서 50일간 재배하였다. 위 실험 (가)에서 분리된 길항균주들을 TSA배지에 2일간 30°C 항온기에서 배양한 후, 현탁액 (1×10^9 cfu ml⁻¹)을 만들어 각 균주 당 9주씩 3반복으로 분무접종하였다. 역병균을 접종하기 5일전에 인삼 줄기와 잎에 흐르도록 듬뿍 살포하였다.

역병균 (*P. cactorum*)의 유주자 현탁액을 만들기 위하여, 역병균을 당근쥬스배지(CaCO₃ 0.5 g, bacto agar 20 g, V8쥬스 100 ml)에서 5일간 배양하였다. 이 역병균의 균총 절편들을 당근쥬스배지에서 3일간 배양하였다. 배양된 역병균을 멸균수로 3회 세척한 후 형광등 아래에서 25°C에 2일간 배양한 후, 유주자를 탈출시키기 위하여 1시간동안 4°C에 보존하고, 다시 25°C의 인큐베이터에서 1시간 동안 보존하였다.

이 유주자액을 거즈로 거른 뒤, hemacytometer를 이용하여 4×10^4 zoospores ml⁻¹의 현탁액을 조제하였다. 이 현탁액을 인삼에 분무접종하였고, 접종 후 3, 5, 10일에 역병 발생정도를 조사하였다.

2. 길항미생물의 염기서열

가) DNA 추출

미생물의 total genomic DNA는 Tsai & Olsen (1991)의 방법에 따라 Wizard Genomic DNA Purification (Promega Co., Madison, Wis., USA)을 이용하여 분리·정제하였다.

나) 16S rRNA 유전자의 PCR과 Purification

PCR (Polymerase Chain Reaction) 반응물 50 µl의 최종 조성은 template DNA 1 µl, 50 mM tris (pH 8.3), bovine serum albumin 2.5 µg, 2.5 mM MgCl₂, 200 nM deoxynucleoside triphosphates, 200 nM의 각 universal SSU rRNA primer (Weisburg *et al.*, 1991), 그리고 3 U의 *Taq* DNA polymerase이다. 반응물을 섞어 95°C에서 5분간 열처리한 후, 95°C에서 1분, 50°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1분 동안 30회 증폭시켰다. 이후 잔여 시슬 연장을 위해 72°C에서 10분 동안 반응시켰다. PCR 산물은 Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega)을 이용하여 정제하였다.

다) 16S rRNA 염기서열 분석

증폭된 단편은 pGEM-T easy vector (Promega)에 클로닝하였다. 정제된 plasmid는 DNA sequencer (Applied Biosystems 3,100, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석을 위한 primer는 5'-GCC AACTGGAAGTGGACAC-3' (nucleotides 311-330), 5'-TGTAGC GGTGAAATGCGTG-3' (nucleotides 684-703), 5'-GGAGCATGTGGT TTAATTCG-3' (nucleotides 944-963), 5'-CTACACACGTGCTACAA TGG-3'

Table 1. Antifungal activity of three isolates obtained from oak leaf compost against ginseng pathogens.

| Pathogen | Antifungal activity [†] | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|-------|-------|
| | B8856 | B8180 | B7944 |
| <i>Cylindrocarpon destructans</i> | ++ [‡] | + | + |
| <i>Rhizotonia solani</i> | + | ++ | + |
| <i>Phytophthora cactorum</i> | +++ | ++ | ++ |
| <i>Botrytis cinerea</i> | + | + | + |
| <i>Fusarium solani</i> | + | ++ | + |
| <i>Pythium ultimum</i> | - | - | - |

[†] The pathogenic fungal mycelium disks (6 mm diameter) were inoculated on the center of potato dextrose agar plates, then each antagonistic bacterial suspension (10^9 cfu ml^{-1}) was poured around the fungal disk separately. The microorganisms were cultured at 30°C for seven or fifteen days depending on the growth of microorganisms. [‡]Symbol means diameter of inhibition zones against pathogenic fungi -; no activity, +; 1~3 mm, ++; 4~6 mm, +++; more than 7 mm.

(nucleotides 1228-1247)을 이용하였다. NCBI (National Centers for Biological Information) genbank를 통해 염기서열의 상동성을 추적하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼 주요 병원균에 대한 길항미생물 선발

가. 길항미생물의 항균력 조사

풍기인삼시험장에서 4년간 발효된 갈잎부숙퇴비에서 총 10종의 세균을 분리하였다. 그 중 5종류의 인삼병원균 (*Cylindrocarpon destructans*, *Rhizotonia solani*, *Phytophthora cactorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*)과의 대치배양으로 길항력을 보이는 3종의 세균 (B8856, B8180, B7944)을 선발하였다. B8856은 *C. destructans*와 *P. cactorum*, *R. solani*에 대하여, B8180은 *R. solani*, *P. cactorum*, *Fusarium solani*에 대하여 강한 항균력을 보였으며, B7944는 *P. cactorum*, *C. destructans*, *R. solani*에 대하여 항균력을 보였다 (Table 1).

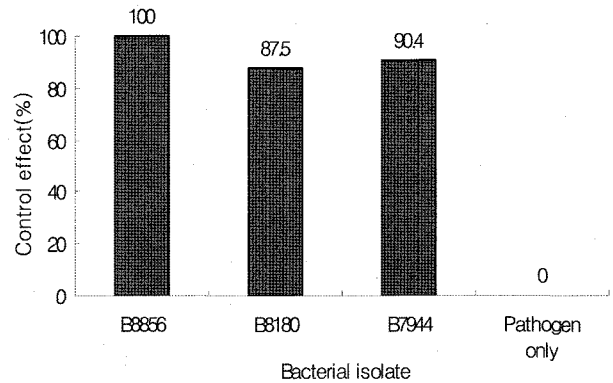


Fig. 1. Control effect of three antagonistic microorganisms obtained from oak leaf compost on *Phytophthora* blight of ginseng plants. The antagonistic bacterial suspension (10^9 cfu ml^{-1}) was sprayed on the leaf of 1-year-old ginseng plants and 5 days later the pathogenic fungal suspension (4×10^4 zoospores ml^{-1}) was sprayed. Disease severities were observed at 10 days after inoculation with the pathogen.

나. 길항미생물을 이용한 역병 방제 효과

인삼의 주요 병원균에 대해 항균력이 인정된 3개 길항균주의 현탁액을 1년근 인삼의 잎과 줄기에 분무한 후 5일 뒤 역병균 (*P. cactorum*)의 유주자를 분무 접종하였다. 길항균주를 처리하지 않은 인삼에서는 역병균을 접종한 3일 후부터 병반이 나타나기 시작하여 10일 후에는 약 95%의 인삼이 말라죽었다. 그러나 길항균을 접종한 인삼에서는 역병균을 접종한 10일 후까지 88~100%의 역병 방제효과를 보였다 (Fig. 1). 또한 앞으로 수행할 뿌리썩음병 (*Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium solani*)과 갈록병 (*Rhizotonia solani*, *Pythium ultimum*), 잿빛곰팡이병 (*Botrytis cinerea*)에 대한 포트실험은 대치배양에서의 결과로 보아 각 병원균에 대한 방제력이 충분히 있으리라 사료된다.

다. 길항미생물의 염기서열

인삼 역병에 대해 방제효과가 인정된 세 길항균주의 형태를 전자현미경으로 관찰한 결과, B8180 균주는 진균의 균사모양

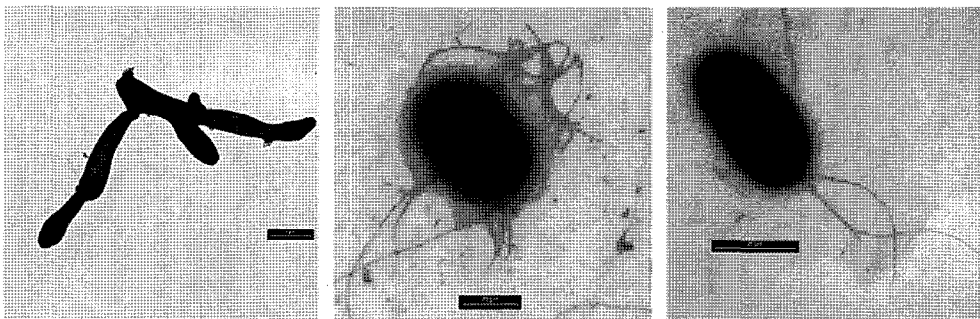


Fig. 2. Electron-microscopic photographs of antagonistic micro-organisms. *Streptomyces lauretii*(left), *Bacillus subtilis* (center), and *Burkholderia cepacia* (right) showing a filamentous-shaped bacterial cell with atrichous, peritrichous or lophotrichous flagella, respectively.

Table 2. 16S rRNA sequence homologies of three bacterial isolates with known bacteria species, in which the comparisons were performed by NCBI search program.

| Bacterial isolate | Highest homology species | Homology (%) | E value |
|-------------------|------------------------------|--------------|---------|
| B8180 | <i>Streptomyces lauretii</i> | 99.1 | 0.0 |
| B8856 | <i>Bacillus subtilis</i> | 100.0 | 0.0 |
| B7944 | <i>Burkholderia cepacia</i> | 99.6 | 0.0 |

이었으며, B8856 균주와 B7944 균주는 각각 사방에 편모가 부착된 주모균과 한쪽에 편모가 부착된 속모균이었다 (Fig. 2).

세 길항균주의 동정을 위하여 각 세균의 16S ribosomal RNA gene의 염기서열을 분석한 결과 B8180 균주는 *Streptomyces lauretii*와 99% (1375/1387 bp)의 상동성을 나타내었고, B8856 균주는 *Bacillus subtilis*와 100%의 상동성을 나타내었다. 그리고 B7944 균주는 *Burkholderia cepacia*와 99% (1397/1403 bp) 이상의 상동성을 나타내었다 (Table 2). 이상의 결과를 토대로 B8180 균주는 *Streptomyces lauretii*, B8856 균주는 *Bacillus subtilis*, B7944 균주는 *Burkholderia cepacia*로 고려된다. 이 중 *Bacillus subtilis* B8856 균주는 구근류에 병원성을 나타내는 종이기 때문에 인삼에 있어서도 다른 두 균주와 함께 병원성 검정이 요구된다.

적 요

인삼의 안정적인 생산 및 합리적인 병해방제에 기여하기 위하여 연구를 실시한 결과 갈잎 퇴비에서 분리된 *Streptomyces lauretii* B8180과 *Bacillus subtilis* B8856, *Burkholderia cepacia* B7944 세 균주의 인삼병원균 5종에 대한 항균력이 인정되었으며, 특히 실내실험을 통하여 높은 역병 방제효과가 인정되었다. 그러나 이 실험에서와 같이 식물의 지상부에 길항균을 살포하는 방법을 통하여 역병 방제효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다. 이 길항균들은 갈잎 퇴비에서 분리되었기 때문에, 갈잎퇴비에서 증식시켜 인삼재배 예정지에 투입하면, 억제형 토양 (suppressive soil) 조성을 통한 주요병해 방제가능성도 클 것으로 생각된다.

LITERATURE CITED

Bae YS, Park KS, Kim CB (2004) *Bacillus* spp. as Biocontrol

Agents of Root Rot and Phytophthora Blight on Ginseng. plant pathol. J. 20(1):63-66.

Chung YR, Chung HS, Oh SH (1989) Antagonistic Effects of *Streptomyces* Species against *Fusarium solani* Causing Ginseng Root Rot. Kor. J. Microbiol. 27(1):56-62.

Joy AE, Parke JL (1995) Biocontrol of Alternaria leaf blight on America ginseng by *Burkholderia cepacia* AMMD. in: *Processing of International Ginseng Conference*. W.G.Bailey, C. Whitehead, J.T.A. Proctor and J.T. Kyle (eds), Vancouver, Canada. p. 93-100.

Jung HK, Kim SD (2003) Purification and Characterization of an Antifungal Antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a Biocontrol Agent of Red-Pepper Phytophthora Blight Disease. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol 31(3):235-241.

Lee ET, Kim SD (2000) Selection and Antifungal Activity of Antagonistic Bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against Red-Pepper Rotting *Phytophthora capsici*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol 28(6):334-340.

Mork SK, Son SY, Park H (1981) Root and Top Growth of *Panax ginseng* at Various Soil Moisture Regime. Korea J. Crop Sci. 26(1):115-120.

Ohh SH, Yu YH, Kim KH, Cho DH (1992) Studies on control of soil-borne diseases and insects of ginseng and development of antifungal compound. In: *Ginseng Cultivation Bul.* Korean Ginseng and Tobacco Research Inst. p. 121-184.

Park H, Choi BJ (1983) Effect of Soil Moisture on Partition of Mineral Nutrients in *Panax ginseng*. Korea J. Ginseng Sci. 7(1):74-79.

Tsai YL, Olsen BH (1991) Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1070-1074.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16Sribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, p. 173.

官澤洋一 (1975) 약용인삼의 재배기술, 농업과학 50(1):117-122.

김홍진, 이순구, 박규진, 박동욱 (1985) 인삼의 연작장해 방제연구. p. 5-102. 시험 연구보서 (재배분야). 한국인삼연구연구소.

김요태, 양덕도, 천성기 (1981) 일복개량시험. p. 394-364. 연구보고서 (재배분야). 한국인삼연구연구소.

김요태, 천성기, 박훈, 이종철, 이장은 (1982) 일복재 개량시험. p. 81-98. 인삼연구보고서. 한국인삼연구연구소.

박창석 (1989) 미생물에 의한 연작지 염류장해 경감연구. 농사시험연구논문집(산학협동편) 32:101-108.

오승환, 정영윤, 김상석, 이일호, 김기홍, 조대휘, 이장호 (1984) 인삼 주요 병해충 방제연구. p. 103-214. 인삼연구보고서 (재배분야). 한국인삼연구연구소.

유연현, 오승환, 김기홍, 조대휘 (1993) 인삼 토양 병해충방제 및 농약개발연구. p. 123-158. 인삼연구보고서 (재배분야). 한국인삼연구연구소.

한국인삼 편찬위원회 (2001) 한국인삼사.