

## 인삼 뿌리썩음병에 길항력이 있는 *Bacillus* 균의 분리 동정 및 특성 조사

김병용<sup>1\*</sup> · 안재형<sup>1</sup> · 원항연<sup>1</sup> · 송재경<sup>1</sup> · 김성일<sup>2</sup> · 김완규<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과, <sup>2</sup>강원도 농업기술원 인삼약초연구소

(Received on November 3, 2012. Revised on November 25, 2012. Accepted on December 10, 2012)

### Isolation and Characterization of *Bacillus* Species Possessing Antifungal Activity against Ginseng Root Rot Pathogens

Byung-Yong Kim<sup>1\*</sup>, Jae-Hyung Ahn<sup>1</sup>, Hang-Yeon Weon<sup>1</sup>, Jaekyeong Song<sup>1</sup>, Sung-Il Kim<sup>2</sup> and Wan-Gyu Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Institute of Ginseng and Medicinal Plants Research, Gangwon Agricultural Research and Extension Services, Cheolwon 200-822, Korea

**Abstract** Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) is an economically important crop in Korea. While the consumption of the crop is gradually increasing, the yield is decreasing due to the injury of continuous cultivation or infection of soil-borne fungal pathogens such as *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia nivalis*. In order to find promising biocontrol agents, we have isolated 439 soil bacteria from ginseng cultivated soil and tested their antifungal activities against ginseng rot pathogens. Among them, 3 strains were finally selected and tested for the elucidation of their genetic and biochemical properties. They were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. Moreover, all selected strains showed positive reaction for PCR detection targeting biosynthetic gene sequences of iturin A and surfactin. The results provided promising evidences that the bacterial strains isolated from ginseng cultivated soil can be novel biocontrol agents for ginseng cultivation.

**Key words** Antifungal activity, *Bacillus*, Ginseng rot

## 서 론

최근 화학농약과 화학비료의 과다사용으로 친환경 농업에 대한 관심이 높아지고, 소비자들도 안전한 유기농 식품과 친환경 농산물에 대한 요구가 점차 커지고 있다. 이런 사회적 관심과 요구로 인해 잔류의 위험성이 없으며 환경에 대한 피해가 적은 미생물제제를 이용한 생물학적 방제의 연구가 다양하게 이루어지고 있다(Jang and Kim, 2011).

경제적 가치가 매우 높은 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 경우는 오랫동안 동일 토양에서 4~6년 동안 재배하는 작물이라 연작장해가 매우 크다. 인삼 연작장해의 주

요 요인으로는 토양 내 독소물질의 축적이나 미량원소의 결핍과 같은 토양 물리화학적 특성과 더불어 토양병원균의 점진적인 밀도 증가와 같은 토양 미생물학적 특성이 주원인으로 파악되고 있다(Jang et al., 2005). 인삼의 뿌리를 썩게 하는 병원체는 세균, 선충, 곰팡이 등이 다양하게 보고되어 있는데, 특히 곰팡이 병원균이 가장 많은 피해를 입히는 것으로 알려져 있다(Seifert et al., 2003). 인삼에 피해를 주는 곰팡이 병원균으로는 *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia nivalis* 등의 여러 병원균들이 보고되어 있다(Lee, 2004). 이들 병원균은 토양 내에 장기간 서식하면서 뿌리부위를 침해하므로 공기전염성 병해의 국부적인 병반과는 달리 식물 전체를 죽게 하는 전신감염성의 병해를 초래한다(Lee, 2004). 토양전염병의 경우는 진행속도가 느려서 조기 발견이 어렵고, 시들음 증상

\*Corresponding author

Tel: +82-31-290-8476, Fax: +82-31-290-8488

E-mail: kimby@rda.go.kr

이 발견되었을 때는 이미 병 진행이 만연되어 방제가 늦은 경우가 대부분이다. 따라서 최근 분자생물학적 방법을 이용한 이들 토양병원균에 대한 조기 검출법에 대한 연구도 다양하게 수행되고 있다(Jang et al., 2010; Fu et al., 2012).

토양병원균의 효과적인 방제를 위해서 오랫동안 화학 살균제를 사용하고 있지만, 그로 인해 잔류 농약 등의 농산물 안전성에 대한 문제와 살균제 저항성 병원균의 출현과 같은 우려도 동시에 커지고 있다. 이러한 우려를 해소하기 위한 대안은 친환경 생물학적 방제를 확대하는 것이며, 이를 위해 더욱 효과적인 미생물제제를 만들기 위한 후보 미생물의 선별과 적용이다(Guo et al., 2009).

본 연구에서는 인삼 뿌리썩음병을 억제하는 항균 활성 미생물제제를 개발하고자, 이들 병원균에 길항 효과를 갖는 유용미생물을 인삼토양에서 분리하여 동정하였고, 생화학적 특성 및 2차 대사산물에 관여하는 유전자를 PCR로 검출하여 분리 미생물들의 길항 메커니즘을 구명하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 분리

인삼 뿌리썩음병을 일으키는 주요 병원균에 대한 길항력을 갖는 미생물을 분리하기 위해서 2012년 5월 강원도 철원군 소재 강원도 농업기술원 인삼포장에서 토양을 채취하였다. 채취된 토양은 4년생의 인삼을 재배한 사질토 토양이다. 토양 시료 2 g을 멸균 생리식염수로 희석하여 희석현탁액( $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ )을 만든 후 0.1 mL을 선택배지에 분주하여 도말하였다. 선택배지로는 TSA (trypticase soy agar; BBL)와 R2A (Difco) 배지를 이용하였다. 도말한 배지는 30°C 항온기에서 5일간 배양하였으며 형태적 차이를 보이는 집락을 대상으로 선별 분리하였다.

### 분리 균주의 선별 및 항균 활성 검정

분리한 균주를 일차적으로 *Rhizoctonia solani* KACC 40123과 *Sclerotinia nivalis* KACC 45152 균주를 대상으로 길항력을 검정하였으며, 이 중 길항력이 가장 큰 균주들을 최종적으로 선별하여 주요 인삼 뿌리썩음병원균 5종 (*Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia nivalis*)과 대치 배양하여 균사 성장 억제능력을 조사하였다. 공시 시험 균주들 (*C. destructans* KACC 44656, *C. destructans* KACC 41077, *F. oxysporum* KACC 40037, *F. solani* KACC 44891, *R. solani* KACC 40123, *S. nivalis* KACC 45152)은 농촌진흥청 농업미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)으로부터 분양 받아 사용하였다. 공시한 각각의 병원균 균층을 8 mm cork borer 를 이용하여 절단한 후 PDA (Potato Dextrose Agar; Difco) 배지 중앙에 치상한

후에 분리 균주와 대치 배양하였다. 대치 배양된 각각의 병원균을 최적 생장온도(*C. destructans*, *S. nivalis*는 21°C, *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*는 25°C)에서 4-5일간 배양한 후 선별 균주들의 균사 성장 억제 능력을 조사하였다.

### 선발 균주의 DNA 추출 및 16S rRNA 유전자 분석

선발 균주를 동정하기 위해서 16S rRNA 유전자를 분석하였다. 균주들을 NB(Nutrient Broth; Difco)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양 후 원심 분리하여 균체를 수확하였다. G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)를 사용하여 수확한 균체에서 DNA를 분리하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해서 universal primer인 27F와 1492R을 사용하여, Kim et al. (2012)의 방법대로 PCR반응을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)를 사용하여 정제하였다. 염기서열분석은 Genotech Co. (Korea)에 의뢰하였으며, Seqman (DNASTAR, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 비교 표준균주의 염기서열은 EzTaxon-e 서버(<http://www.eztaxon.org>)를 통해서 다운로드 받아, Clustal W 프로그램으로 염기서열의 정렬을 수행하였다(Chenna et al., 2003). 정렬된 염기서열은 MEGA 3.0 프로그램(Kumar et al., 2004)을 사용하여 계통도를 작성하였다. 계통도 작성은 Neighbor-joining 알고리즘(Saitou and Nei, 1987)을 사용하였고, 1000회 반복으로 bootstrapping (Felsenstein, 1985)을 수행하여 계통도의 견고성을 확인하였다. 분석된 염기서열은 GenBank 온라인 데이터베이스에 등록하였다.

### 선발 균주의 2차 대사물질 유전자 확인

선발 균주들이 생산하는 2차 대사 산물의 생합성에 관여하는 유전자를 확인하기 위해서 PCR 검출법을 활용하였다. Athukorala et al. (2009)의 방법대로 bacillomycin D (875bp, *bmyA*), fengycin (964bp, *fenD*), iturin A (647bp, *ituA*), surfactin (441bp, *sufA*), zwittermicin A (779bp, *zwiA*) 생합성 유전자를 각각의 특이 프라이머(Table 1)를 사용하여 검출하였다. PCR 반응은 전체 부피 20 µL의 reaction mixture (2X TOPsimple™ DyeMIX-Tenuto; Enzyomics Co., Korea)를 사용하였다. 1 µL의 genomic DNA(50 ng)와 10 pmol primer들을 넣었다. PCR 반응 온도는 제조사의 사용 안내서에 따라서 initial denaturation (95°C, 2분), 30회 반복으로 denaturation (95°C, 30초), annealing (55°C, 45초), elongation (72°C, 1분)을 하였으며, 최종 elongation 반응은 72°C에서 5분간 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 전기영동을 통해서 예상된 크기의 산물임을 확인하였다.

### 선발 균주의 생화학적 특성 조사

선발한 균주들의 생화학적 활성 능력을 조사하기 위해서

**Table 1.** Specific primer sequences used for the detection of the bacillomycin D, fengycin, iturin A, surfactin and zwittermicin A in this study

Antibiotic	Primer name	Primer sequence (5'-3')
Bacillomycin D	BACC1F	GAA GGA CAC GGC AGA GAG TC
	BACC1R	CGC TGA TGA CTG TTC ATG CT
Fengycin	FEND1F	TTT GGC AGC AGG AGA AGT TT
	FEND1R	GCT GTC CGT TCT GCT TTT TC
Iturin A	ITUD1F	GAT GCG ATC TCC TTG GAT GT
	ITUD1R	ATC GTC ATG TGC TGC TTG AG
Surfactin	SUR3F	ACA GTA TGG AGG CAT GGT C
	SUR3R	TTC CGC CAC TTT TTC AGT TT
Zwittermicin A	ZWTF2	TTG GGA GAA TAT ACA GCT CT
	ZWTR1	GAC CTT TTG AAA TGG GCG TA

각각의 시험배지에 분리한 세균을 접종한 후 투명환(clear zone)의 크기를 조사하였다. 단백질 분해능(protease activity)을 확인하기 위해서 0.5%(w/v) skim milk (Difco)를 첨가한 LB (Luria-Bertani) 배지를 사용하였다. 섬유소 분해(cellulase activity)을 확인하기 위해서 0.5% (w/v) carboxymethyl-cellulose를 첨가한 LB (Luria-Bertani) 배지를 사용하였다. 섬유소 분해능 투명환은 0.5% Congo red solution 에서 30 분간 반응 후, 멸균 증류수로 세척하고, 1 M NaCl 용액에서 15분간 반응하여 투명환의 존재를 확인하였다. 키틴 분해능(chitinase activity)을 확인하기 위해서는 chitin 1% (w/v)를 첨가한 R2A 배지(Difco)에 배양하여 투명환을 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

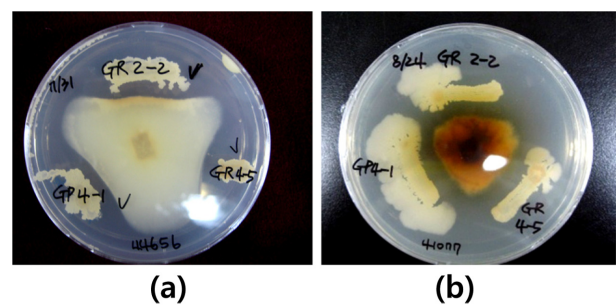
### 균주 분리

인삼 재배 토양에서 인삼의 뿌리썩음병에 방제효과를 갖는 토양 미생물을 선별하기 위해서 고영양 선택배지(TSA)와 저영양 선택배지(R2A)를 사용하였다. TSA배지와 R2A 배지 각각에서 228 균주와 211균주를 분리하여 총 439균주를 대상으로 1차 항균성 능력을 조사하였다. 1차 시험 균주는 길항미생물에 대해 비교적 감수성이 크게 나타나는 *R. solani* KACC 40123으로 실시하였으며, 선별 균주 중 총 31 균주가 병원균의 균사 성장을 억제하는 것을 관찰하였다. 1차 선별된 균주는 *S. nivalis* KACC 45152 를 대상으로 병원균의 균사 성장 억제를 추가로 확인하였다. 2차 시험에서

총 6 균주가 균사성장 억제 정도를 보였으며, 이 중에서 가장 큰 활성을 보이는 3 균주(GP4-1, GR2-2, GR4-5)를 최종 선별하였다. 최종 선별한 균주들에 대하여 항균 활성에 대한 생화학 및 유전학적 특성을 조사하였다.

### 선별 균주의 항균활성 검정

최종 선별한 3 균주에 대해서 인삼 뿌리썩음 병원균 5종(*C. destructans*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *S. nivalis*) 과 대치 배양하여 균사 성장 억제능력을 조사한 결과, Table 2 와 같이 모든 균주가 시험한 모든 병원균에 대해서 항균활성을 보였다. 3 균주가 비교적 동일한 유형의 항균성을 보이고 있지만, GR4-5 균주가 다른 두 균주에 비해 약간 더 강한 활성을 보였다. 특히, 인삼 뿌리썩음병의 주원인균인



**Fig. 1.** Inhibition of mycelium growth of *Cylindrocarpon destructans* KACC 44656 (a) and *C. destructans* KACC 41077 (b) by tested strains GP4-1, GR2-2 and GR4-5.

**Table 2.** Antifungal inhibitory activity against the phytopathogens by selected strains isolated from ginseng cultivated soil

Strain	<i>C. destructans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. nivalis</i>
GP4-1	++ <sup>a)</sup>	++	++	+++	++
GR2-2	++	++	++	+++	+++
GR4-5	+++	+++	+++	+++	+++

<sup>a)</sup>A degree of inhibition of fungal growth by tested strains: +, inhibition zone of 1~3 mm; ++, 4~10 mm; +++, > 10 mm.

*C. destructans* KACC 44656과 *C. destructans* KACC 41077에 대한 뚜렷한 길항력은, 이들 균주가 인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 미생물제제로서의 잠재적 우수성이 크다는 것을 증명한다(Fig. 1). 추후 실제 야외 생물검정을 통해 생물적 방제제로서의 가능성을 추가적으로 확인해야 할 것으로 판단된다.

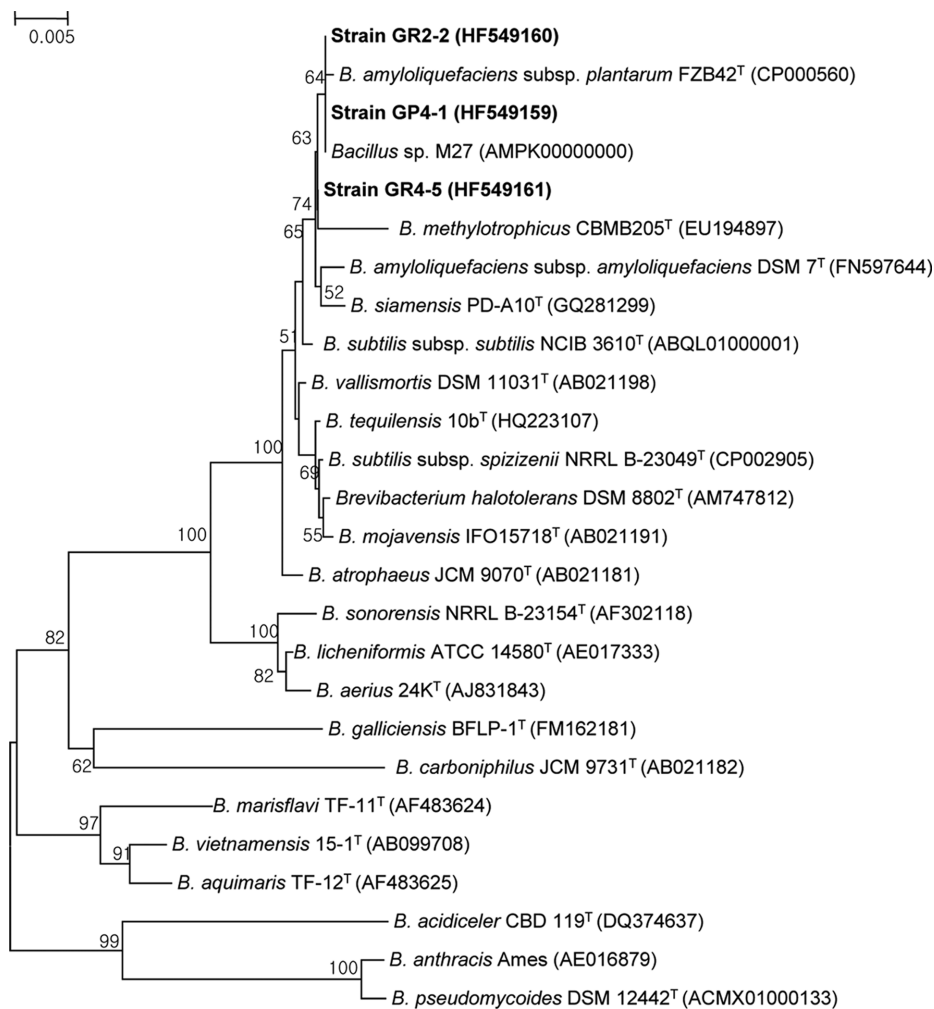
### 선발 균주의 동정

최종 선발한 3 균주의 정확한 동정을 위해서, 각각의 16S rRNA 유전자 염기서열을 바탕으로 분자계통도를 작성하였다(Fig. 2). 선발 균주 모두가 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42<sup>T</sup>과 가장 높은 상동성(99.9%)을 보였다. 또한 본 연구진이 분리해서 전체 유전체 염기서열을 보고한 *Bacillus* sp. M27 (GenBank No. AMPK00000000) 균주와도 매우 높은 상동성을 보였다. 계통도의 안정성을 확인하기 위한 Bootstrap 값도 64%로 비교적 높은 수치를 보

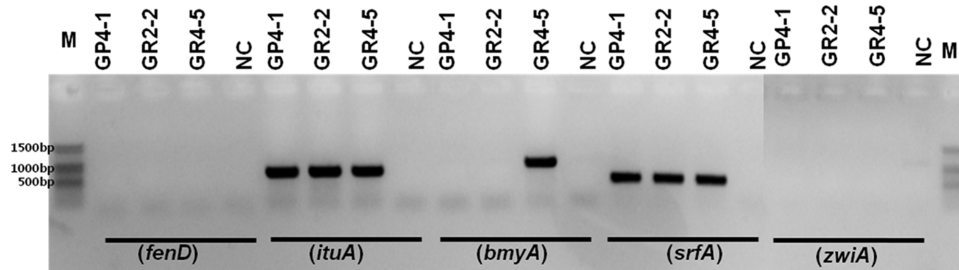
이고 있어, 이 균주는 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*에 속하는 균주인 것으로 추정되나, 정확한 종 동정을 위해서는 여러 가지 생리 생화학적 검사와 근연종의 표준균주와의 DNA-DNA 상동성 검사가 필요하다(Wayne et al., 1987). 실제로 가장 가까운 근연관계에 속하는 *B. amyloliquefaciens* 그룹의 균주들은 식물체의 근권이나 식물체내에서 흔하게 서식하는 것으로 보고되어 있으며, 항균 효과 및 식물생장 촉진효과도 매우 우수한 것으로 기존의 연구자들에 의해 확인된 바 있다(Borriss et al., 2011; Alvarez et al., 2012). 선발 균주들의 이러한 분류학적 위치는 계통유전학적으로도 이들 균주들이 매우 높은 항균활성을 보유하고 있음을 뒷받침하고 있다.

### 2차 대사산물 생합성 유전자의 PCR 검출

*Bacillus* 균주들은 다양한 2차 대사물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Béchet et al., 2012). PCR을 통한 생합성



**Fig. 2.** Phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences (>1,400bp) showing relationships between strains GP4-1, GR2-2 and GR4-5, and the type strains of related *Bacillus* species. Numbers at the nodes are percentage bootstrap values based on 1,000 resampled data sets; only values above 50% are given. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.



**Fig. 3.** PCR detection of biosynthetic genes corresponding to fengycin (*fenD*), iturin A (*ituA*), bacillomycin D (*bmyA*), surfactin (*srfA*) and zwittermicin A (*zwiA*), respectively. NC, negative control; M, 100bp ladder.

유전자의 검출은 실제 대사물질들을 화학적으로 분석하지 않아도 쉽게 유전적 특성을 확인할 수 있는 좋은 방법이다 (Tapi et al., 2010; Abderrahmani et al., 2011). 본 연구에서는 *Bacillus* 균주들이 일반적으로 생산하는 것으로 알려진 bacillomycin D, fengycin, iturin A, surfactin, zwittermicin A의 검출을 위해서 각각 *bmyA* (875bp), *fenD* (964bp), *ituA* (647bp), *srfA* (441bp), *zwiA* (779bp)에 특이적인 PCR 프라이머를 사용하였다. 모든 선발 균주에서 iturin A와 surfactin 생합성 유전자가 검출되었으며, fengycin과 zwittermicin A의 생합성 유전자는 검출되지 않았다. 그러나, bacillomycin D 생합성 유전자는 GR4-5 균주에서만 검출되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 GR4-5 균주가 bacillomycin D를 추가적으로 생산한다는 가능성을 제시하며, 실제로 항균 활성 검정에서 이 균주가 다른 두 균주에 비해서 약간 더 높은 활성을 보이는 것과 일치하는 결과이다(Table 2). 따라서, 선발 균주들이 보이는 인삼 뿌리썩음병에 대한 길항 작용은 iturin A나 surfactin과 같은 nonribosomal lipopeptide 계열의 항균 물질들에서 의해서 발생하는 것으로 추정할 수 있다. 그러나, 선발 균주들이 보유하는 2차 대사 물질들의 정확한 구조와 구체적인 작용 기작은 적절한 생산배지와 배양조건하에서 항균활성에 미치는 영향에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

### 선발 균주의 생화학적 특성

선발된 균주들의 세포벽 분해 특성을 확인하기 위해서 섬유소 분해능(cellulase), 키틴 분해능(chitinase), 단백질 분해능(protease) 등을 조사하였다. 모든 균주에서 섬유소 분해능과 단백질 분해능이 있음을 확인하였고, 키틴 분해능은 확인되지 않았다(Table 3). 이러한 효소적 특징은 선발 균주들이 유사한 생화학적 대사기작을 보유하고 있으며, 분류학적 위치가 유사한 것과 일치하고 있다. 또한, 작물이나 병원균의 침투에도 이러한 생화학적 특성들이 관여할 것으로 추정된다. 한편, 토양 내 불용 상태로 있는 인산 가용화능을 확인하기 위해서 phosphatase 활성을 조사한 결과, 모든 균주들이 음성인 결과를 보였다. 인산 가용화능은 토양 내 가

**Table 3.** Characterization of the degrading enzyme activities of selected strains.

Strain	Cellulase	Chitinase	Protease	Phosphatase
GP4-1	++ <sup>a)</sup>	-	++	-
GR2-2	++	-	++	-
GR4-5	++	-	++	-

<sup>a)</sup>A degree of enzyme activity: +, clear zone of 1~3 mm; ++, 4~10 mm; +++, > 10 mm.

용 인산 함량을 높여서 식물생장을 촉진시킬 수 있는 특징이다. 선발 균주들의 식물생장 촉진능에 대해서는 옥신(auxin)이나 siderophore 생성능과 같은 추가적인 생화학적 실험들이 필요할 것으로 판단된다.

따라서, 본 연구 결과는 인삼 재배 토양에서 선발한 *Bacillus* 균주들이 강한 길항력과 이에 관여하는 2차 대사물질이 존재하는 것을 분자생물학적 방법으로 증명하였고, 향후 인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 미생물제제로서 활용 가치가 충분함을 제시하였다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008987) 지원에 의해 수행되었습니다. 미생물 배양과 분자생물학적 실험을 도와준 최혜영, 한지유에게 감사드립니다.

### Literature Cited

- Abderrahmani, A., A. Tapi, F. Nateche, M. Chollet, V. Leclre, B. Wathelet, H. Hacene and P. Jacques (2011) Bioinformatics and molecular approaches to detect nrps genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92(3):571~581.
- Alvarez, F., M. Castro, A. Pncipe, G. Borioli, S. Fischer, G. Mori and E. Jofr (2012) The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP<sub>2</sub>18 and ARP<sub>2</sub>3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and

- fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 112:159~174.
- Athukorala, S. N. P., W. G. D. Fernando and K. Y. Rashid (2009) Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Can. J. Microbiol.* 55(9):1021~1032.
- Béchet, M., T. Caradec, W. Hussein, A. Abderrahmani, M. Chollet, V. Leclre, T. Dubois, D. Lereclus, M. Pupin and P. Jacques (2012) Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:593~600.
- Borriss, R., X. H. Chen, C. Rueckert, J. Blom, A. Becker, B. Baumgarth, B. Fan, R. Pukall, P. Schumann and C. Sprer (2011) Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7<sup>T</sup> and FZB42<sup>T</sup>: A proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(8):1786~1801.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins and J. D. Thompson (2003) Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3497~3500.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783~791.
- Fu, J., J. Sun, R. Zhou and X. Yan (2012) Molecular detection of *Cylindrocarpon destructans* in infected chinese ginseng roots and soil. *Afr. J. Biotechnol.* 11(42):9955~9960.
- Guo, R., X. Liu, S. Li and Z. Miao (2009) In vitro inhibition of fungal root-rot pathogens of *Panax notoginseng* by rhizobacteria. *Plant Pathol. J.* 25(1):70~76.
- Jang, C.-S., J. Lee, S. Kim, J. Song, S. Yoo and H. Kim (2005) Specific detection of root rot pathogen, *Cylindrocarpon destructans*, using nested PCR from ginseng seedlings. *Res. Plant Dis.* 11(1):48~55.
- Jang, C. S., J. H. Lim, M. W. Seo, J. Y. Song and H. G. Kim (2010) Direct detection of *Cylindrocarpon destructans*, root rot pathogen of ginseng by nested PCR from soil samples. *Mycobiology* 38(1):33~38.
- Jang, Y. L. and Y. H. Kim (2011) Biocontrol efficacies of *Bacillus* species against *Cylindrocarpon destructans* causing ginseng root rot. *Plant Pathol. J.* 27(4):333~341.
- Kim, B.-Y., T. D. Zucchi, H.-P. Fiedler and M. Goodfellow (2012) *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62(2): 279~283.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 5(2):150~163.
- Lee, S.-G. (2004) *Fusarium* species associated with ginseng (*Panax ginseng*) and their role in the root-rot of ginseng plant. *Res. Plant Dis.* 10(4):248~259.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406~425.
- Seifert, K., C. McMullen, D. Yee, R. Reeleder and K. Dobinson (2003) Molecular differentiation and detection of ginseng-adapted isolates of the root rot fungus *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology* 93(12):1533~1542.
- Tapi, A., M. Chollet-Imbert, B. Scherens and P. Jacques (2010) New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85(5):1521-1531.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr and H. G. Trueper (1987) Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463~464.

## 인삼 뿌리썩음병에 길항력이 있는 *Bacillus* 균의 분리 동정 및 특성 조사

김병용<sup>1\*</sup> · 안재형<sup>1</sup> · 원항연<sup>1</sup> · 송재경<sup>1</sup> · 김성일<sup>2</sup> · 김완규<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과, <sup>2</sup>강원도 농업기술원 인삼약초연구소

요 약 인삼 뿌리썩음병을 일으키는 병원균의 생물적 방제를 위해서 토양에서 유용미생물을 분리하여 항균 활성과 생화학적 특성을 조사하였다. 이를 위해 강원도 인삼재배 토양에서 총 439균주의 세균을 분리하여 이 중에서 항균 활성이 가장 우수한 3균주(GP4-1, GR2-2, GR4-5)의 미생물을 최종 선발하였다. 주요 인삼 뿌리 썩음병원균인 5종(*Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia nivalis*)에 대한 성장 억제능을 조사한 결과, 선발 균주들이 매우 높은 항균 활성을 갖는 것을 확인하였다. 최종 선발 균주들의 정확한 동정을 위해서 16S rRNA 유전자 염기 서열로 계통 유전학적 분석을 하였고, 모든 균주들이 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42<sup>T</sup>과 가장 높은 상동성(99.9%)이 있음을 보였다. 선발 균주들이 생산하는 2차 대사물질 구명을 위해 주요 *Bacillus* 대사산물의 생합성 유전자를 PCR 반응으로 검정하였다. 모든 선발 균주들에서 iturin A와 surfactin의 생합성 유전자가 검출되었으며, GR4-5 균주에서는 bacillomycin D의 생합성 유전자도 추가로 검출되었다. 생화학적 특성 조사에서는 선발 균주들이 섬유소 분해 효소와 단백질 분해 효소의 활성이 있음을 확인하였다. 본 연구를 통해 인삼재배 토양에서 분리한 토양 미생물들이 인삼 뿌리썩음병의 생물적 방제를 위한 미생물제제로서의 활용가치가 높음을 제시하였다.

색인어 인삼 뿌리썩음병, 항균 활성, *Bacillus*