

인삼뿌리썩음병 방제에 유효한 길항미생물의 탐색

김영숙 · 이명석 · 염지희 · 송자경 · 이인경 · 여운형¹ · 윤봉식*

전북대학교 생명공학부, ¹KT&G R&D 본부 기술연구소

Screening of Antagonistic Bacteria for Biological control of Ginseng Root Rot

Young-Sook Kim, Myeong-Seok Lee, Ji-Hee Yeom, Ja-Gyeong Song, In-Kyoung Lee, Woon-Hyung Yeo¹
and Bong-Sik Yun*

Division of Biotechnology, Chonbuk National University
¹Technology Research Center, KT&G R&D Headquarters

(Received November 28, 2011. Revised January 12, 2012. Accepted January 26, 2012)

ABSTRACT : Ginseng (*Panax ginseng*) is one of the most widely cultivated medicinal herb in Korea. However, yield losses reached up to 30~60 % due to various diseases during 3 or 5 years of ginseng cultivation. Therefore, successful production of ginseng roots depends primarily on the control of diseases. The objective of this study is to select potential multifunctional biocontrol agents from actinomycetes for the control of multiple ginseng diseases as an alternative to fungicides. Ninety three *Streptomyces* strains were selected and their ability to produce antibiotics, siderophore and lytic enzymes such as protease and cellulase were investigated. Eight of the isolates, strains A75, A501, 515, 523, A704, A1444, A3265 and A3283 produced cellulase and protease. These strains also produced siderophore and showed potent antifungal activity against *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Collectotricum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani* causing ginseng root rot.

KEYWORDS : Antifungal activity, Biological control, Ginseng root rot, *Streptomyces* sp.

서 론

인삼(*panax ginseng*)은 가장 중요한 한약재 중의 하나로 매년 그 수요가 증가하고 있으나, 긴 생육기간 동안 재배환경 및 병해 등의 다양한 요인에 의하여 매년 30~60% 정도가 손실되고 있다. 특히 인삼재배 중 50%의 결주를 가져오는 인삼뿌리썩음병에 대한 대책이 시급하다.

인삼의 뿌리썩음병 방제를 위한 합성농약의 사용은 인삼 생산성 개선에 크게 기여해왔으나 그 과용은 잔류 독성에 의한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 부작용을 유발하고 있다. 이와 같은 문제점의 해결 방안으로서 환경 친화적 방제 기술의 개발이 제시되어져 왔다. 자연상태에서 쉽게 분해되고 대상 병원균에 대하여 선택성을 지닌 농약으로서 미생물의 이차 대사산물을 개발하려는 노력은 이러한 대안의 하나라고 할 수 있다. 미생물을 이용하여 식물병을 방제하는 생물방제 기작은 크게 다섯가지로 구분되는데, 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 용균작용, *Bacillus*속 (Kim *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 2007), *Penicillium*속 (Imamura *et al.*, 2000), *Pseudomonas*속 (Jung and Kim, 2004), *Streptomyces*속 (Jeong *et al.*,

2004; Lee *et al.*, 1990) 등이 생산하는 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용, 식물병원균에 기생하면서 식물에 대한 진균의 병원성을 억제하는 기생작용 (Lee *et al.*, 2004), 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필요한 인자를 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 경쟁적 길항작용(Jung *et al.*, 2006; Neilands, 1984; Paulitz and Loper, 1991; Scher and Baker, 1982), 그리고 미생물이 생산하는 exopolysaccharide(EPS), lipopolysaccharide(LPS), salicylic acid(SA), hydrogen cyanide(HCN), 2,3-butanediol 등의 물질들에 의해서 식물의 면역기능을 활성화하여 병에 대한 저항성을 유도하는 유도 저항성(Lee, 1997; Liu *et al.*, 1995; Ping and Boland, 2004) 등이다. 미생물 유래의 천연 항생물질은 활성성분의 직접적인 이용뿐만 아니라 신농약 개발을 위한 선도물질을 제공하고 항균활성 기전연구 분야에 이용가치가 높다(Lange *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 2007).

인삼뿌리썩음병의 생물학적 방제에 대한 연구는 주로 근권 세균을 이용한 연구로서 *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*에 의해 발생하는 뿌리썩음병 방제를 위하여 *Bacillus* sp.를 이용한 연구들이 보고되어 있으나 방선균을 이용한 생물적 방제에 관한 연구는

*Corresponding author <E-mail : bsyun@jbnu.ac.kr>

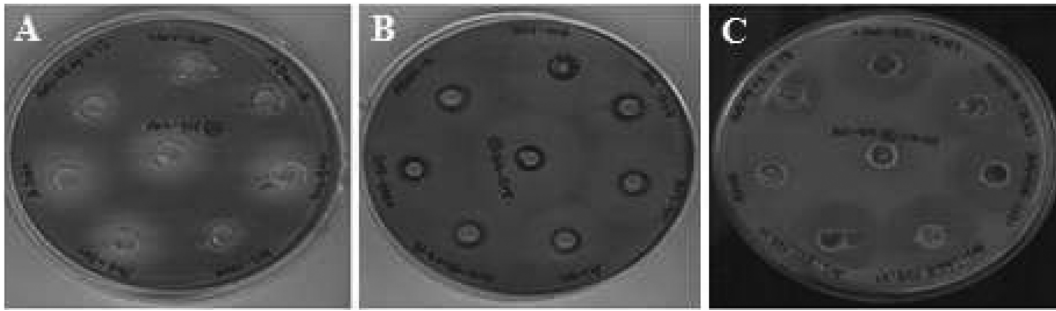


Fig. 1. Biochemical parameters showing biological activities of the *Streptomyces* strains isolated. A, siderophore production; B, cellulase activity; C, protease activity.

미미한 실정이다.

따라서 식물근권 토양으로부터 분리한 방선균의 인삼 뿌리썩음병균에 대한 길항력을 조사하고 이들의 효소활성 및 siderophore 생성능 등을 조사하여 인삼뿌리썩음병 방제에 유효한 미생물을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리 및 배양

본 연구에서 사용한 방선균은 토양으로부터 임의로 분리한 것으로, 채취한 토양 시료는 60°C에서 3시간 건조 후 멸균 증류수로 희석한 후 200 μ l를 취하여 방선균 분리용 배지(Difco™ Actinomycete Isolation Agar)에 도말하고 28°C의 배양기에 배양하면서 전형적인 방선균의 균층을 형성하는 균을 분리하였다. 분리 방선균은 백금이를 이용하여 Modified bennett's agar(MBA) 평판배지에 도말한 후 27°C에서 5일간 배양하였다. 분리된 방선균의 생물활성을 조사하기 위하여, 방선균 콜로니를 GS(Glucose 20 g, Soluble starch 10 g, Meat extract 1 g, Yeast extract 4 g, Sodium chloride 2 g, Dipotassium hydrogen phosphate 0.05 g, Soybean flour 25 g/L, pH 7) 배지에 접종한 후 27°C에서 7일간 배양한 다음 8000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체와 배양여액으로 나눈 후 사용하였다.

Siderophore 생성능 검정

Siderophore 생산균주를 Schwyn과 Neilands의 siderophore 검출 방법인 Chrome Azurol Sulfonate(CAS, Sigma) assay로 선별하였다. 증류수 50 ml에 CAS 60.5 mg을 넣고

천천히 저으면서 72.9 mg의 HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide)를 증류수 40 ml에 녹인 용액을 첨가시켜 고압 멸균하여 진한 청색염료 용액을 준비한 다음 H₂O 750 ml, 10X MM9 salt 100 ml, agar 15 g, Pipes 30.24 g, 10% casamino acid 용액 30 ml, carbon source와 vitamin 등을 혼합한 용액(pH 6.8)을 고압 멸균하여 50°C로 식힌 후 준비해 둔 CAS 염료용액을 거품이 나지 않도록 첨가하여 plate에 분주하여 제조한 CAS 평판배지에 배양액 20 μ l를 점적하고 30°C에서 2일간 배양한 후 주위에 orange halo zone의 생성을 확인하였다(Fig. 1). 또한 탈철화 배지인 King's B 배지에서 배양한 후 형광성 여부를 확인하였다.

항진균 활성 검정

항진균능은 검정용 potato dextrose agar(PDA) plate를 이용한 paper disk법으로 확인하였다. 먼저 식물병원성 진균인 *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Collectotricum gloeosporioides*, *Cylindrocarpon destructans*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*는 PDA배지에 접종하여 각각의 생육적온에서 7일간 배양하였다. 고체배지에서 자란 균사체는 homogenizer를 이용하여 균질화하고 PDA배지를 첨가하여 검정용 중층배지를 제작하였다. 선발균의 배양여액을 50 μ l씩 paper disk에 점적하여 풍건한 후 각각의 검정균 plate에 치상하고 배양하면서 형성되는 생육저지대를 조사하였다.

Lytic enzyme 생성능 조사

선발된 균주들의 lytic enzyme 생산을 확인하기 위해

Table 1. Production of siderophore by the *Streptomyces* strains isolated

Treatment	Orange halo zone diameter (mm)							
	A75	A501	A515	A523	A704	A1444	A3265	A3283
Mycelia	11.9	19.6	22.1	10.9	20.6	11.0	11.4	18.2
Broth filtrate	12.3	11.9	11.4	-	11.9	-	-	-

- : No formation of orange halo zone.

각각의 선별배지를 사용하였다. 먼저 cellulase 생산능은 Nutrient agar에 1% carboxylmethyl-cellulose(CMC)를 함유한 CMC agar 배지에 각 선발 균주를 이쑤시게로 점적 접종하여 2일간 30°C에서 배양한 후 Congo red plate방법(Teather and Wood, 1982)으로 cellulase의 생산을 확인하였다(Fig. 1). 또한, 다른 식물병원성 진균 세포성분 분해 효소인 protease의 활성은 표준방법(Gerhardt *et al.*, 1981)에 의하여 분석하였다.

결과 및 고찰

분리 균주의 siderophore 생성능

다양한 근권에서 채취한 토양시료로부터 콜로니 형태

및 균총의 색이 상이한 93주의 방선균을 분리하였으며, 분리 방선균은 각각 배양한 후 원심분리하여 상등액과 균체로 나누어 siderophore 생성능을 조사하였다. Siderophore를 생산하는 균주의 선발은 CAS를 사용한 정성적인 chromogenic assay로 수행하였다. CAS agar plate에 well을 만들어 배양액과 균 현탁액을 넣고 30°C에서 2일간 배양하면 siderophore 생산 균주는 강한 착화합물을 형성하는 siderophore가 CAS 용액의 Fe(III)과 결합하여 well주위에 orange zone을 형성하는 것을 확인할 수 있다. 분리한 93 균주 중 많은 균주들이 균체 처리 시 siderophore 생성능을 보였으며 A75, A501, A515, A704의 네 균주는 균체뿐만 아니라 배양여액 처리 시에도 CAS plate에서 orange halo zone을 형성하여 siderophore 생산 균주로 확

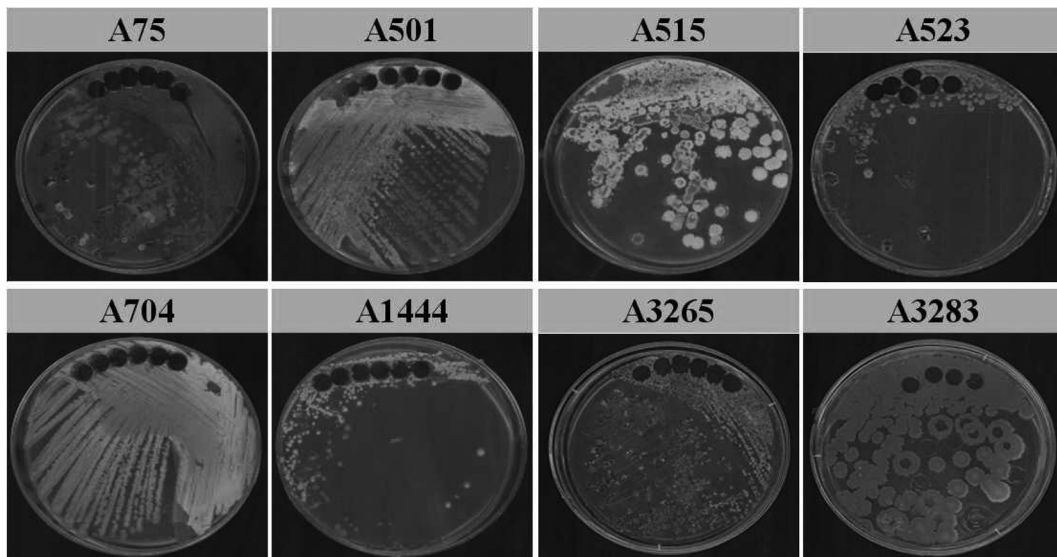


Fig. 2. Colony appearances of the *Streptomyces* strains isolated.

Table 2. Antifungal activity of the *Streptomyces* strains isolated against phytopathogenic fungi

Fungi	Clear zone diameter (mm)							
	A75	A501	A515	A523	A704	A1444	A3265	A3283
<i>Botrytis cinerea</i>	12.3	16.8	-	22.2	14.9	22.6	12.0	28.0
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	9.6	14.0	11.1	17.7	11.4	14.5	13.4	15.2
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	16.9	9.2	23.2	25.3	25.2	-	10.5
<i>Phytophthora capsici</i>	14.0	21.7	12.0	16.0	20.3	-	-	-
<i>Alternaria panax</i>	17.1	23.1	13.9	27.0	17.0	29.1	22.0	10.3
<i>Magnaporthe grisea</i>	13.8	23.1	19.6	21.9	19.9	24.2	17.6	21.5
<i>Collectotricum gloeosporioides</i>	12.1	16.7	13.5	15.6	15.2	17.8	11.5	21.1

- : No formation of clear zone.

인되었다(Table 1). 활성이 우수한 균주의 콜로니 형태를 Fig. 2에 나타내었다. Siderophore는 철이온 특이 결합물질로서 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용을 함과 동시에 식물이 이용할 수 없는 철을 가용화시킴으로써 식물 성장에 도움이 되는 것으로 알려져 있다 (Gerhardt *et al.*, 1981). Siderophore는 구조상 hydroxamate와 catechol 종류로 분류 할 수 있으며, catechol 구조의 siderophore가 항진균성 효과를 나타내는 주된 물질로 알려져 있다. 이 종류에 포함된 또 다른 siderophore로는 *Pseudomonas* 속 이 생산하는 pyochelone, pseudobactins과 pyoverdines이 있으며, 식물의 병원체의 성장을 저해시키는 siderophore-positive 균주들이 이미 농업 환경에서 미생물 농약으로서의 역할을 수행하고 있다.

분리 균주의 항진균 활성

선발 방선균의 항진균 활성을 알아보기 위하여 PDA 배지를 이용하여 분리균주에 의한 식물병원성 곰팡이의 생장저해 여부를 조사하였다. 그 결과, 선발된 분리 균주들은 인삼뿌리썩음병의 원인균인 *C. destructans*를 비롯한 식물병원성 곰팡이에 항진균활성을 나타내었다. 그 중 A523균과 A1444균은 *R. solani*와 *A. panax*에 대해 높은 항진균 활성을 나타내었으며, A704균은 *R. solani*와 *P. capsici*에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내었다. 또한, A3283균은 *B. cinerea*에 대하여 특히 높은 항진균 활성을 나타내었다(Table 2).

분리 균주의 lytic enzyme 생성능

방선균은 항생물질 이외에도 chitinase, β -1,3-glucanase, protease, cellulase, amylase, lipase 등 여러 종류의 세포 외 효소들을 생성하며, 이들 효소에 의하여 특정 식물병원성 곰팡이의 생장을 저해할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 분리한 방선균 균주들에 대하여 cellulase와 protease 생성능을 조사하였다. 특히 본 연구

에서 선발한 8개의 활성방선균의 경우 A3265균을 제외한 모든 균이 cellulase를 세포 밖으로 분비하는 것으로 확인되었으며, A75균을 제외한 경우엔 protease 생성능이 매우 우수한 것으로 확인되었다(Table 3). 이는 식물병원성 곰팡이의 세포벽이 cellulose로 구성되어 있음을 감안할 때 이들 균들이 생산하는 cellulase의 작용으로 세포벽의 용해작용이 일어날 수 있고, 이를 통하여 식물병원성 곰팡이의 생장을 저해할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과로부터 토양으로부터 분리한 다수의 방선균들이 인삼뿌리썩음병균을 비롯한 다양한 식물병원균에 대하여 강력한 길항작용을 나타내는 것을 알 수 있으며, 이는 siderophore 생성, hydrolytic enzyme의 분비와 항균활성물질과 같은 길항물질의 생산에 기인하는 것으로 조사되었다. 본 연구는 식물병원성 곰팡이, 특히 인삼 뿌리썩음병을 유발하는 병원성 진균에 대한 미생물 제제로서 방선균류의 이용 가능성을 파악하기 위하여 실시한 것으로, 선발된 방선균의 배양 조건 확립 및 포장에서의 병 방제 효능 검증 등의 부가적인 연구를 수행할 경우 충분한 산업적 가치가 있음을 제시하고 있다.

적요

인삼의 뿌리썩음병 방제를 위하여 다양한 식물 근권 토양으로부터 유용방선균을 분리하였으며 이들의 생물활성을 조사하였다. 93종의 분리 방선균 중 콜로니가 상이하고 항진균활성이 우수한 방선균 8종을 선발하였다. 이들 방선균(A75, A501, A515, A523, A704, A03-1444, A3265, A3283)은 siderophore를 생산하며 cellulase와 protease와 같은 곰팡이 세포벽 분해효소를 생산하였다. 또한 인삼뿌리썩음의 주요 원인균인 *C. destructans*, *B. cinerea*, *R. solani* 등에 대하여 강한 길항 활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업 및 농촌진흥청 어젠다프로젝트의 재원에 의해 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Choi, G. J., Kim, J. C., Jang, K. S., Nam, M. H., Lee, S. W. and Kim, H. T. 2009. Biocontrol activity of *Acremonium strictum* BCP against *Botrytis* disease. *Plant Pathol. J.* 25: 165-171
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Han, K. H., Lee, C. U. and Kim, S. D. 1999. Antagonistic role of chitinase and antibiotic produced by *Promicromonospora* sp. KH-28 toward *F. oxysporum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 349-353.

Table 3. Enzyme production of the culture filtrate of the *Streptomyces* strains isolated

Strains	Clear zone diameter (mm)	
	Cellulase	Protease
A75	27.0	-
A501	13.6	23.9
A515	14.6	15.0
A523	25.3	26.0
A704	19.0	26.6
A1444	17.7	26.3
A3265	-	20.1
A3283	18.4	24.5

- : No formation of clear zone.

- Imamura, N., Ishikawa, T., Ohtsuka, T., Yamamoto, K., Dekura, M., Fukami, H. and Nishida, R. 2000. An antibiotic from *Penicillium* sp. covering the cocoon of the leaf-rolling moth, dactyloglyphatona. *Biotechnol. Biochem. Bioch.* 64: 2216-2217.
- Jeong, D. H., Park, K. D., Kim, S. H., Kim, K. R., Choi, S. W., Kim, J. T., Choi, K. H. and Kim, J. H. 2004. Identification of *Streptomyces* sp. producing antibiotics against phytopathogenic fungi, and its structure. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 212-215.
- Jung, H. K. and Kim, S. D. 2004. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 312-316.
- Jung, H. K., Kim, J. R., Woo, S. M. and Kim, S. D. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-Producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 94-100.
- Kim, K. Y. and Kim, S. D. 1997. Biological control of *Pyricularia aryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 396-402.
- Lang, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicide-the natural choice. *Pestic Sci.* 39: 155-160.
- Lee, I. K., Kim, C. J., Kim, S. D. and Yoo, I. D. 1990. Antifungal antibiotic against fruit rot disease of red pepper from *Streptomyces parvullus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 142-147.
- Lee, M. W. 1997. Root colonization by beneficial *Pseudomonas* spp. and bioassay of suppression of *Fusarium wilt* of radish. *Kor. J. Mycol.* 25: 10-20.
- Lee S. Y., Lee, S. B., Kim, Y. K. and Kim, H. G. 2004. Effect of agrochemicals on mycelial growth and spore germination of a hyperparasite, *Ampelomyces quisqualis* 94013 for controlling cucumber powdery mildew. *Kor. J. Pesti. Sci.* 8: 71-78.
- Lim, H. S. and Kim, S. D. 1995. The role and characterization of β -1,3-glucanase in biocontrol of *Fusarium solani* by *Pseudomonas stutzeri*. *J. Microbiol.* 33: 295-304.
- Lim, T. H., Cho, S. H. and Kim, J. H. 2007. Effects of *Streptomyces* sp. MG121 on growth of pepper plants and antifungal activity. *Res. Plant. Dis.* 13: 93-97
- Liu, L., Kloeppe, J. W. and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85: 1064-1068.
- Neilands, J. B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* 1: 9-14.
- Paulitz, T. C. and Loper, J. E. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* 81: 930-935.
- Ping, L. and Boland, W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sic.* 9: 263-266.
- Scher, F. M. and Baker, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wilt* pathogens. *Phytopathology* 72: 1567-1573.
- Schwyn, B. and Neiland, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56
- Teather, R. and Wood, P. J. 1982. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.
- Woo, S. M., Woo, J. U. and Kim, S. D. 2007. Purification and characterization of the siderophore from *Bacillus licheniformis* K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35:128-134.
- Yun, G. H., Lee, E. T. and Kim, S. D. 2001. Identification and antifungal antagonism of *Chryseomonas luteola* 5042 against *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 186-193.