J Plant Biotechnol (2016) 43:99–103
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2016.43.1.99

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

BTH 처리한 배배양 인삼에서 주요 진균병 저항성 증진 효과

류호진

Enhancing resistance to major fungal pathogens of *Panax ginseng*, by BTH-induced systemic resistance

Hojin Ryu

Received: 12 March 2016 / Revised: 22 March 2016 / Accepted: 23 March 2016
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In perennial ginseng plantations, the effective control of various diseases is one of the most critical factors for increasing yields. Enhancing the resistance to disease through induced systemic resistance (ISR) and anti-microbial activity of beneficial soil bacteria, is currently considered to be a potential promising approach to integrate pathogen management for sustainable agriculture. However, the effective *in vitro* culture systems for testing ISR in ginseng plants have been rarely reported. In this study, I have successfully developed an *in vitro* germ-free culture system of *Panax ginseng* seedling for diverse purposes. With this useful system, we also tested BTH-induced priming effects against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum panacicola*. Compared to the drain method for enhancing ISR effects to ginseng seedlings, the direct method of spraying leaves somewhat increased the defense activity to these major fungal pathogens. Consistently, the expression of pathogen related *PgPR10* and *PgCAT* were greatly and rapidly enhanced in the BTH-treated ginseng seedlings by treatment with *C. panacicola*. Our results revealed that the *in vitro* culture system can be used for developing eco-friendly and versatile bio-control agents for harmful diseases in ginseng cultivation.

Keywords *Panax ginseng*, Induced systemic resistance, Beneficial soil bacteria, BTH, Bio-control

H. Ryu (✉)
충북대학교 자연과학대학 생물학과
(Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)
e-mail: hjryu96@chungbuk.ac.kr

서 론

고려인삼은 사포닌 등 기능성 물질을 많이 함유하고 있는 약용작물로서 약효 및 생리 활성물질 면에서 우수성을 세계적으로 인정받고 있다(Kaneko and Nakanishi 2004; Baeg and So 2013). 국내 인삼재배 면적은 점차 증가되고 있는 추세이며, 농가소득이 가장 높은 작물로 알려져 있다. 그러나 연작장해에 의한 피해가 너무 심해, 같은 장소에서 4~6년 이상 재배하지 않는다(Yu and Ohh 1993). 연작장해요인으로 뿌리썩음병, 잘록병, 잿빛곰팡이병, 탄저병 등이 가장 큰 문제로 대두되고 있다(Liu et al. 2014). 이와 같은 병해를 일으키는 병원균은 종 및 race 등은 잘 알려져 있으며, 방제를 위해 많은 양의 농약이 사용되며, 농약잔류 및 환경오염 등의 문제를 야기하고 있는 실정이다. 최근 들어 well-being 개념과 함께 친환경 농산물에 대한 소비자들의 요구도가 점차 증가되고 있는 시점에서 친환경 인삼 재배기술개발에 많은 연구가 진행되고 있으며, 향후 인삼의 시장성에 매우 큰 이슈로 부각될 것으로 여겨진다.

최근 식물 근권에 존재하는 유용미생물들에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Ongena and Jacques 2008; Ryu et al. 2014; Song et al. 2014). 특히 이러한 미생물들을 식물과 함께 배양하였을 경우 식물의 생육이 증가되는 현상이 발견되면서 이러한 미생물들을 통틀어 PGPR (plant growth promoting rhizobia)이라고 명명한다 (Garbeva et al. 2004; Lugtenberg and Kamilova 2009). 이러한 PGPR을 이용한 다양한 병원균에 대한 방제효과에 관한 연구들이 최근 활발히 진행되고 있으며, 특히 PGPR들에 의해 배출되는 다양한 대사체에 의한 식물의 면역력 증대 효과들이 보고되고 있다(Lugtenberg and Kamilova 2009; Myresiotis et al. 2015; Xun et al. 2015). 식물의 면역력 증대 효과는 priming

또는 유도저항성(induced systemic resistance, ISR)이라는 용어로 해석되고 있으며, 기작은 정확하게 밝혀지지 않은 상태이다(Ongena and Jacques 2008). Priming은 식물의 근권에서 유용미생물들에 의한 면역력 증대 효과가 식물체의 전신에 나타나는 현상으로, 이를 유도하는 대사체들 중에는 cyclic lipo polypeptide (환형 구조의 지질 함유 펩타이드 단백질) 및 다양한 형태의 유기화합물들로 알려져 있다(Ongena and Jacques 2008). 또한 Iturin, surfactin 등이 대표적인 식물근권 유용미생물들이 배출하는 면역력 증대 및 병원균의 생장을 억제하는 물질로 잘 알려져 있다(Ongena and Jacques 2008). 최근 들어 국내외에서 근권 유용미생물들을 제재화 하여 토양개선을 위해 사용되고 있으며, 많은 회사에서 제품화 되어 산업화가 이뤄지고 있다(Ryu et al. 2014; Song et al. 2014). 미생물을 이용한 제재화의 특성상 포자를 형성하여 장기보관이 가능한 gram positive 균들이 주로 이용되고 있으며, *Bacillus*속의 미생물들이 주로 제재화되고 있다(Song et al. 2014).

최근 연구에서 국내 자생 산삼의 근권에서 약 80여 종류의 *Bacillus*속 미생물을 분리하여 인삼 역병 저항성 검정 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* HK34를 선발하여 그 특성을 보고하였다(Lee et al. 2015). 이와 같이 국내 인삼경작지의 인삼 뿌리 주변에 존재하는 미생물들의 생태학적 연구는 연작장해를 경감기술개발과 이들에 의해 매개되는 유도저항성의 효과를 구명에 매우 중요할 것으로 사료된다.

본 논문에서는 기내배양을 통해 인삼 무병주 생산과 유도저항성을 일으키는 BTH 처리를 통해 인삼의 잿빛곰팡이병과 탄저병 방제효과에 대해 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배배양

본 연구에 인삼 품종 “천풍”은 농촌진흥청 원예특작과학원 인삼특작부로부터 분양 받아 사용하였다. 배배양을 위해 개갑 된 인삼종자의 갑피를 제거하고, 나출된 배를 70% EtOH으로 1 min 동안 표면 소독한 후, 1% (v/v) 차염소산나트륨 용액으로 7 min 살균하였다. 그 후, 살균된 배는 멸균수로 5회 세척한 후, 1% agar medium (Duchefa, Netherlands)에 치상하여 16h/8h (명/암조건), 20°C 생장상에서 배양하였다. 4주 후, 유식물체는 멸균한 인삼전용 상토를 이용하여 사각플라스틱박스(마젠다 박스, SPL, South Korea)어 옮겨 2개월 동안 생장시켰다.

BTH 처리 및 유도저항성 형성

배배양 하여 2개월 동안 생장시킨 인삼 유묘는 100 μM 농도의 BTH (benzothiadiazole, Syngenta, Swiss)를 뿌리에 관주 처리 또는 잎에 엽면 시비하여 유도저항성을 일으켰다. 유도저항성을 충분히 일으키기 위해 BTH 처리 7일 후 병원균 접종을 하였다. 유도저항성의 발현양을 조사하기 위해 멸균수에서 14일간 배양한 인삼유묘에 BTH를 처리하고 3일간 유도저항성을 발현시킨 유묘로부터 RNA를 추출하여 관련 저항성유전자의 real time PCR에의해 정량적으로 분석하였다.

병원균 접종

본 연구에 사용된 병원균은 ㈜허브킹의 미생물연구소에서 분양을 받아 사용하였다. 인삼 탄저병을 유도하는 곰팡이 병원균 *Colletotrichum panacicola* (Ryu et al. 2014)과 잿빛곰팡이병을 유도하는 *Botrytis cinerea* (Van Minh et al. 2015)의 배양은 PDA 고체배지에서 7일 배양하였다. 식물체에 접종은 균사가 포함된 PDA조각을 이용하여 BTH에 의해 유도저항성이 유도된 인삼 잎 윗면에 올려놓았다. 접종한 인삼유묘는 4각 플라스틱 상자에 넣고, 습기를 유지하였고, 25°C 암조건에서 7일간 배양하였다.

Real time PCR 분석

인삼 잎 유래 RNA 추출은 Total RNA extraction kit (Introne Biotech, South Korea)에 의해 분리하였고, cDNA 합성 kit (Enzynomics, South Korea)를 통해 cDNA 합성을 수행하였다. 인삼의 병원균에 대한 방어에 관련된 유전자 *PgPR10* (Forward: 5’-GGCAGAAAA GCT GTTCAA GG-3’, Reverse: 5’-TTGCATCTATCCGGG TCTTC-3’)과 *PgCAT* (Forward: 5’-CAA GGATGGGAAAGCACACT-3’, Reverse: 5’-TGGTTACATCGA GTGGGTCA-3’)를 이용하여 qRT-PCR (Step-One Plus, Applied Biosystems, USA)을 수행하였다(Sathiyaraj et al. 2011). PCR의 반응조건은 95°C 10 mim (Pre-incubation), 95°C 20 sec., 58°C 30 sec., 72°C 20 sec., 총 45 cycle으로 증폭하였다. 상대적인 유전자의 발현양은 인삼의 Actin (Forward: 5’-CGT GATCTTACAGATAGCTTGATGA-3’, Reverse: 5’-AGAGAA GCTAAGATTGATCCTCC-3’) 유전자의 발현양으로 보정한 타겟 유전자들의 발현양을 조사하였다.

결과 및 고찰

배배양 인삼 육성

배배양 인삼을 육성하기위해 개갑된 종자를 차염소산나트륨에의해 소독하여 증류수 및 agar 배지에서 기내배양한 결과 Figure 1A와 같이 하배축 및 상배축이 출현하는

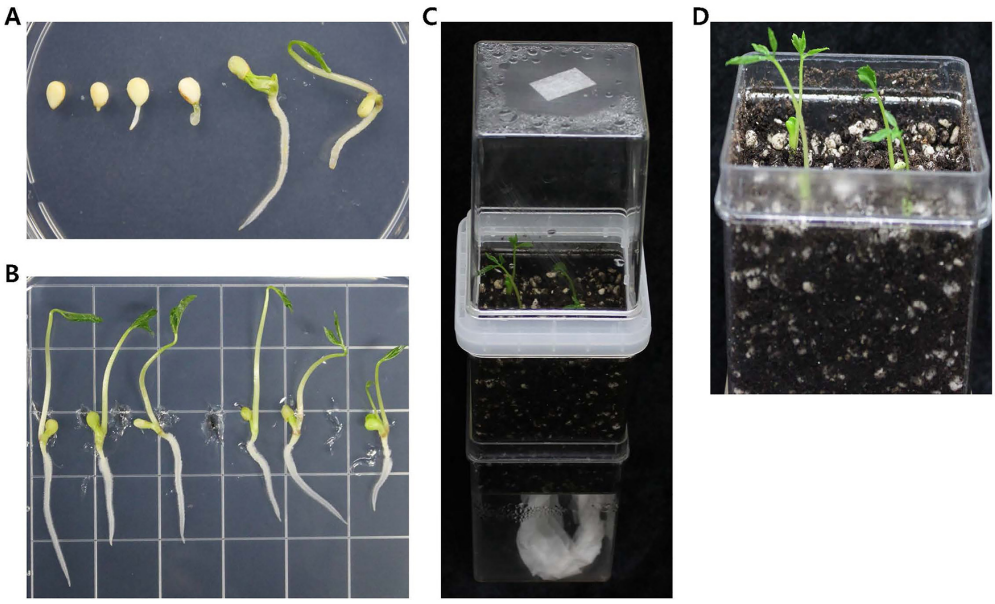

Fig. 1 Development of *in vitro* germ free culture system of *Panax ginseng*. (A) The ginseng seedlings were developed on agar plates for four weeks. (B) Complete development phenotype of four weeks old ginseng seedlings. (C) Transplantation of four weeks old ginseng seedlings onto *in vitro* germ free culture system. (D) Larger image of the ginseng plantations seen in Fig. 1C

것을 볼 수가 있었다. 약 4주 후, 이들 기내에서 발아된 유묘는 정상적인 인삼으로 생육하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1B). 이렇게 자란 무병주 인삼 유묘는 살균된 인삼전용 배양토가 포함된 플라스틱 사각상자에 이식하여 생육 시켰다(Fig. 1C). 인삼 생장은 적절한 수분이 공급될 수 있도록 2개의 사각 상자를 연결하였고, 휴지조각을 이용하여 상토에 수분이 공급될 수 있도록 제작하였다(Fig. 1C). 배배양 인삼은 발아 후 3 개월 이상 생육 할 수 있었으며, 이들 인삼 유식물들을 이용하여 면역활성을 유도할 것으로 예상되는 유용미생물 또는 다양한 물질들과 공배양을 통해 면역에 관여하는 유전자들의 발현 패턴을 분석할 수 있는 재료로 사용할 수 있음을 확인하였다(Fig. 1C, D). 또한 마젠다 박스를 이용하여 인삼 재배용 상토를 살균하여 무균상태를 만들고, 이 무균 실내 배양시스템에서 인삼을 재배할 수 있음을 확인하였다(Fig. 1C, D). 이러한 기내배양 인삼은 유용 근권 유용미생물에 의한 면역력 증대뿐만 아니라 다양한 물질 관련 생리기작 연구가 가능한 소재로 판단된다.

BTH의 관주처리에 의한 배배양 인삼의 유도저항성 효과

식물의 priming을 유도하는 물질로 상용화된 BTH (Kohler et al. 2002)를 배배양 인삼을 이용하여 관주 처리하여 1주일간 ISR을 유도하였다. 이후 인삼의 잎을 분리하여 잿빛곰팡이병을 유도하는 *Botrytis cinerea* 균(Fig. 2A)과 탄저병을 유도하는 *Colletotrichum panacicola*균(Fig. 2B)를 인삼의 잎에 접종하였다. 접종 결과 BTH 처리한 인삼에서

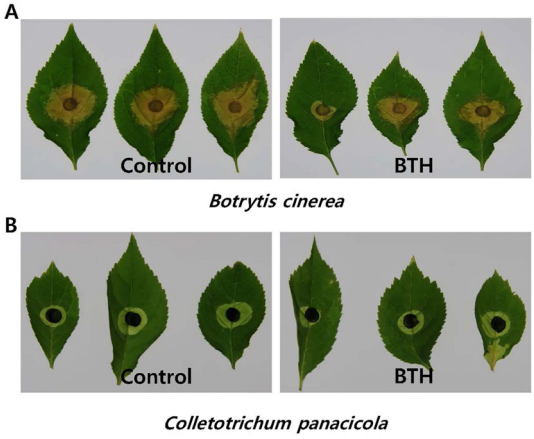

Fig. 2 Effect of drain treatment of BTH on the induction of systemic resistance against *Botrytis cinerea* (A) and *Colletotrichum panacicola* (B) in leaves obtained from three-month old ginseng plants. Leaves are from plants treated with sterile distilled water (Control) or 100 μM of benzothiadiazole (BTH)

잿빛곰팡이병에 대한 저항성이 증진되었다(Fig. 2A). 그러나 탄저병에 대한 저항성효과는 나타나지 않았다(Fig. 2B). 탄저병 저항성증진 효과를 보이지 않은 것은 배배양 인삼유묘에 BTH의 관주 처리에 따라 유도저항성이 뿌리에서부터 형성되어 전체 식물체로 이동이 느리기 때문으로 생각된다.

BTH의 엽면시비 처리에 의한 인삼유묘의 병원균 방제 효과 검정

BTH에 의한 식물의 면역력 증대효과를 알아보기위해 배

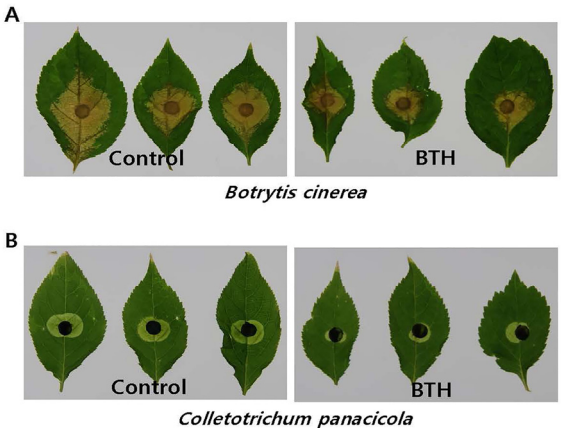

Fig. 3 Effect of direct spray treatment of BTH on the induction of systemic resistance against *Botrytis cinerea* (A) and *Colletotrichum panacicola* (B) in leaves obtained from three months old ginseng plants. Leaves are from plants treated with sterile distilled water (Control) or 100 μM of benzothiadiazole (BTH)

배양후 2개월된 인삼유묘에 엽면시비에 의해 BTH를 처리하고 3일 동안 priming을 유도하였다. 이후 잿빛곰팡이병(Fig. 3A)과 탄저병(Fig. 3B)을 일으키는 곰팡이 병원균을 접종하여, 실험구와 유도저항성이 일어난 인삼의 잎에서 병증을 비교한 결과 병저항성이 증진되었음을 확인하였다. 이러한 연구결과는 최근 인삼에서 ISR에 의한 병원균 방제효과의 결과와도 상충됨을 알 수 있다. Ryu et al. (2014)과 Lee et al. (2015) 등이 연구한 논문에서는 인삼 또는 산삼근권에서 분리한 *Bacillus* 균주를 엽면시비 하였을 경우 병원균에 대한 방제효과가 높게 나타남을 보고하고 있다(Ryu et al. 2014; Lee et al. 2015). 이러한 효과는 직접적인 ISR이 강하게 일어남으로써 병원균에 대한 방어효과가 식물에서 나타나기 때문으로 판단된다. 또한 이와 같이 배배양 인삼을 실험에 이용하면 토양에 존재하는 근권 미생물에 의한 효과를 차단 할 수 있어 면역력 증대를 유도하는 다양한 유용 미생물을 동정하는데 매우 유용하게 사용 될 수 있으리라 기대된다.

BTH 처리에 의한 인삼유묘의 ISR 분자기전 검정

BTH 처리에 의한 인삼의 priming 효과를 확인하기 위해 병원균 침입에 의해 빠르게 발현이 증가되는 것으로 보고된 *PgPR10* (Lee et al. 2012)과 *PgCAT* (Purev et al. 2010) 유전자의 real time quantitative PCR 방법에 의해 실시간 정량을 분석하였다. *PgPR10*과 *PgCAT* 유전자들은 병원균이 세포내에 침입할 때 발현량이 증가하는 것으로 잘 알려져 있다(Lee et al. 2012). Figure 4에서 확인해 볼 수 있듯이 병원균 *C. panacicola* 처리에 의해 *PgPR10* 유전자의 발현양이 2.5배(Fig. 4A)과 *PgCAT* 유전자는 약 20% 정도(Fig. 4B) 유전자의 발현양이 많은 것을 확인 할 수 있었다.

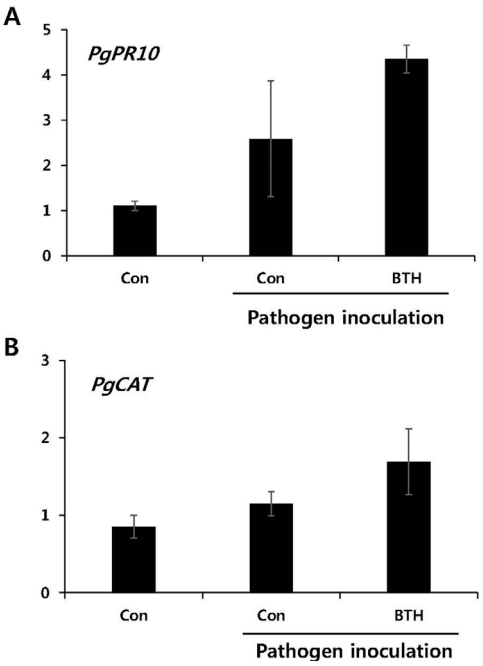

Fig. 4 Differential expression of defense-related marker genes in *Panax ginseng* plants treated with BTH, analyzed through real time qRT-PCR. The relative expression levels of *PgPR10* (A) and *PgCAT* (B) on the treatment of *Colletotrichum panacicola*

BTH 처리에 의해 priming이 일어난 유묘에서는 *PgPR10, PgCAT* 유전자들이 발현양이 각각 4.5배, 2배 증가됨을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 BTH 처리에 의한 인삼의 ISR이 일어나고 있음을 보여주고 있다.

BTH는 식물방어호르몬 살리실산의 유도체로 다양한 식물의 ISR을 유도하는 것으로 보고되고 있다(Lee et al. 2015). 본 논문에서 확인한 BTH의 인삼에서의 효과는 애기장대, 벼, 밀, 토마토 등과 같은 작물에서 보고된 ISR효과와 같은 기작으로 이뤄지고 있음을 유전자들의 발현양을 측정함으로써 확인이 되었다. 하지만 BTH 처리에 따른 식물의 생육저하, 생산량 감소 등과 같은 부작용이 발견되기도 하여 상업적으로 이용이 제한되고 있는 실정이다(Kohler et al. 2012). 본 연구에서는 BTH 처리에 의한 인삼의 주요 곰팡이성 병원균 잿빛곰팡이병과 탄저병의 방제효과를 보여주고 있다. 하지만 다른 작물에서 보고되고 있는 생육저하 등과 같은 부작용에 대해서는 본 연구에서는 확인하지 않았다. 본 논문에서 개발한 인삼의 무병주 배배양 생육시스템을 통한 다양한 유용미생물의 효과 및 BTH를 통한 주요 진균의 방제효과를 극대화 하기 위해서는 좀더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

고려인삼은 다년생 약용작물로써 재배 특성상 인삼에서

다양한 질병들의 효과적인 방제시스템의 개발은 인삼의 생산량 증대에 매우 중요한 요소이다. 최근 지속가능한 농업의 실현을 위한 식물의 유도저항성(ISR)과 유용미생물의 항생제 효과를 이용한 친환경 생물학적 방제 기법이 주목을 받고 있다. 하지만 인삼의 유도정항성을 정확하게 판단할 수 있는 기법은 아직까지 거의 연구되어 있지 않다. 본 논문에서는 인삼의 유묘를 이용한 무병주 기내배양 시스템을 개발하였고, BTH에 의해 유도되는 인삼의 유도저항성을 통한 잿빛곰팡이병과 탄저병에 대한 방제효과를 검증하였다. 인삼유묘에 유도저항성을 위해 뿌리에 직접적으로 BTH를 처리하는 관주처리 방법에 비해, 잎에 직접적으로 살포하는 엽면시비 방법이 효과적으로 두 곰팡이성 병원균에 대한 방제효과가 높게 나타났다. BTH처리 인삼유묘에 탄저병원균을 처리하였을 때 인삼의 병원균 침입에 의해 급격히 발현이 증대되는 *PgPR10*과 *PgCAT* 유전자의 발현이 급속하게 증대되는 현상을 확인하였다. 본 연구를 통해 개발된 시스템은 향후 친환경적으로 이용될 수 있는 다양한 생물학적 방제제의 효과를 검정하고 활용하는데 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 2015년도 충북대학교 기성회 교내 연구비 지원(연구기간: 2015.10.01 ~ 2016.09.30)과 한국연구재단 기초연구실 지원사업(NRF-2015R1A4A1041869)에 의해 이루어진 것임. 인삼 재배 및 병원균 접종에 큰 도움을 주신 ㈜ 허브킹 이병대 연구원에게 깊은 감사를 표합니다.

References

Baeg IH, So SH (2013) The world ginseng market and the ginseng (Korea). J Ginseng Res 37(1):1-7

Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD (2004) Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annu Rev Phytopathol 42:243-70

Kaneko H, Nakanishi K (2004) Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: clinical effects of medical ginseng, korean red ginseng: specifically, its anti-stress action for prevention of disease. J Pharmacol Sci 95:158-62

Kohler A, Schwindling S, Conrath U (2002) Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. Plant Physiol 128:1046-56

Lee BD, Dutta S, Ryu H, Yoo SJ, Suh DS, Park K (2015) Induction of systemic resistance in Panax ginseng against Phytophthora cactorum by native Bacillus amyloliquefaciens HK34. J Ginseng Res 39:213-20

Lee OR, Pulla RK, Kim YJ, Balusamy SR, Yang DC (2012) Expression and stress tolerance of PR10 genes from Panax ginseng C. A. Meyer. Mol Biol Rep 39:2365-74

Liu M, Ding WL, Gao Y, Li Y (2014) Identification of bacterial strain ge15 and its controlling effect on ginseng diseases. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 39:4754-8

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol 63:541-56

Myresiotis CK, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E (2015) Effect of specific plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*Zea mays* L.) seedlings. Pest Manag Sci 71:1258-66

Ongena M, Jacques P (2008) Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol 16:115-25

Purev M, Kim YJ, Kim MK, Pulla RK, Yang DC (2010) Isolation of a novel catalase (Cat1) gene from Panax ginseng and analysis of the response of this gene to various stresses. Plant Physiol Biochem 48:451-60

Ryu H, Park H, Suh DS, Jung GH, Park K, Lee BD. 2014. Biological control of Colletotrichum panacicola on Panax ginseng by Bacillus subtilis HK-CSM-1. J Ginseng Res 38:215-9

Sathiyaraj G, Lee OR, Parvin S, Khorolragchaa A, Kim YJ, Yang DC (2011) Transcript profiling of antioxidant genes during biotic and abiotic stresses in Panax ginseng C. A. Meyer. Mol Biol Rep 38:2761-9

Song M, Yun HY, Kim YH (2014) Antagonistic Bacillus species as a biological control of ginseng root rot caused by Fusarium cf. incarnatum. J Ginseng Res 38:136-45

Van Minh N, Woo EE, Kim JY, Kim DW, Hwang BS, Lee YJ, Lee IK, Yun BS (2015). Antifungal Substances from Streptomyces sp. A3265 Antagonistic to Plant Pathogenic Fungi. Mycobiology 43:333-8

Xun F, Xie B, Liu S, Guo C (2015) Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. Environ Sci Pollut Res Int 22:598-608

Yu YH, Ohh SH (1993) Research on ginseng diseases in Korea. Kor J Ginseng Sci 17: 61e8