

## Plant Growth Promotion and Antagonistic Activities Against Anthracnose of *Burkholderia* sp. LPN-2 Strain

WonChan Kim, SangHyun Seo<sup>1</sup>, ChangHee Lee, JunHong Park<sup>2</sup>, and SangJae Kang\*

School of Applied of Life Science, Kyungpook National University, Daegu, 41566, Korea

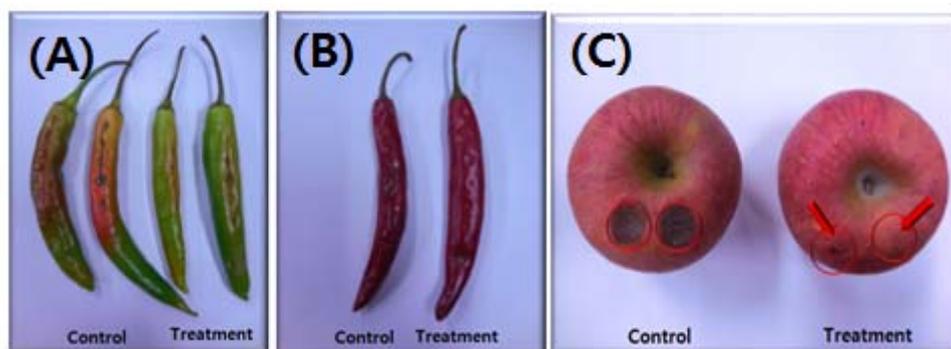
<sup>1</sup>Research institute, DaeWon Chemical Inc., Kyungpook, 39849, Korea

<sup>2</sup>Gyeongsangbuk-Do Agricultural Research and Extension Services, Daegu, 41404, Korea

(Received: April 1 2016, Revised: June 13 2016, Accepted: June 14 2016)

A rhizobacterium LPN-2, which showed strong antifungal activity and auxin producing ability, was isolated from a farmland in North Gyeongsang Province, South Korea. Based on analysis of the 16S rDNA sequence, strain LPN-2 was identified as a novel strain of *Burkholderia* and was designated as *Burkholderia* sp. LPN-2. In vitro experiments showed that the isolated strain LPN-2 significantly produced auxin within 48 hr incubation. In order to check for PGPR function we performed in vivo growth promoting test in different crops, including mung bean, pea and cabbage. Application of *Burkholderia* sp. LPN-2 showed dramatic growth promoting effect on all the tested plants. We also confirmed siderophore and cellulase productions by *Burkholderia* sp. LPN-2 using CAS blue agar and CMC plate test. Further treatment with LPN-2 and the crude culture broth was effective in suppressing anthracnose in vitro test and also reduced incidence and severity of anthracnose in apple and pepper. Taken together, we conclude that *Burkholderia* sp. LPN-2 might be used as organic fertilizer for effective crop production in organic farming.

**Key words:** Antagonistic microorganism, Anthracnose, Auxin, Biological control, PGPRs, Rhizobacterial



*Burkholderia* sp. LPN-2 was effective in biological control for anthracnose in pepper and apple caused by *Colletotrichum gloeosporioides*.

\*Corresponding author: Phone: +82539505715, Fax: +82539537233, E-mail: kangsj@knu.ac.kr

§Acknowledgement: This research was supported by Kyungpook National University Research Fund, 2015.

## Introduction

토양에 서식하는 미생물들 중 일부는 직·간접적으로 식물의 생장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Schroth and Hancock, 1982; Gross and Parthier, 1994). 이런 토양 미생물 중 식물의 생육을 촉진시키는 미생물을 “Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)”로 구분하고 있으며 (Kloepper, 1993) 이러한 PGPR은 뿌리삼출액에 의한 주화성, 무기원소와 수분의 흡수개선, 식물호르몬의 분비 등의 방법으로 식물의 생육 촉진에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Glick, 1995).

식물 병해에 대해 생물적 방제는 항생물질을 생산하는 미생물을 이용하는 것이 일반적이지만 식물병원성 진균의 외벽을 가수분해할 수 있는 효소 ( $\beta$ -1, 3-glucanase, chitinase, cellulase)를 생산하거나 (Pozom et al., 1999), 식물병원성 진균의 포자발아를 억제하는 철 이온과 특이적으로 결합하는 siderophore를 생산하는 미생물 (Vandana and Goel, 2004)을 이용한 제제의 개발이 주로 진행되고 있다. 또한 PGPR이나 식물 병원성 진균에 길항성을 가지는 미생물에 의해 식물의 저항성을 유도하여 식물병원성을 방제하는 연구들이 보고되고 있다 (Vanpinder and Deverall, 1984). 이 중 PGPR의 경우 식물 성장촉진 및 조절 등에 관여하는 식물 호르몬 (GA, IAA, cytokinin 등)을 생산하는 미생물들이 많이 보고되어 있으며 대부분이 식물의 근권 (Rhizosphere) 주위에서 생육하는 미생물로 식물의 성장 촉진과 식물병원성 진균의 방제에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 (Lee et al., 2005; Ryu et al., 2005). 현재 국내에서는 주로 근권 미생물을 이용한 식물병의 생물적 방제에 연구들이 집중되고 있으며, 근권 미생물을 이용하여 식물의 성장을 촉진시키는 미생물비료로의 이용에 관한 연구는 아직도 미흡한 실정이다.

최근 친환경농업에 대한 관심과 요구가 집중되면서 유용 미생물을 이용하여 작물의 생육을 촉진시킬 수 있거나 또는 작물병해를 생물학적으로 방제할 수 있는 미생물제제나 미생물비료에 대한 요구가 증가하고 있는 실정이다. 이와 같은 미생물 자원을 활용하여 식물병해를 방제하는 기능과 농작물 생산성을 높일 수 있는 복합기능성을 가진 미생물제제 (미생물비료)를 개발하기 위한 기초적인 자료의 확보가 필요한 시점이다. 복합기능성을 나타내는 유용미생물의 이용성 증대와 친환경적 농자재의 개발을 목표로 유용한 미생물을 선발하고 이를 잘 이용한다면, 궁극적으로 화학비료의 사용을 경감시키고 이를 통하여 생산된 농산물에 대한 안전성도 증진시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

본 연구는 식물의 생육 촉진과 생물적 병해 예방 또는 방제 효과를 동시에 나타내는 미생물 균주를 경북지역의 경작지 토양으로부터 분리 선발하여 그 특성을 조사하여 작물의

생육을 촉진시키고 동시에 탄저병에 대한 생물학적 방제에 필요한 친환경적 제제의 개발 등에 이용하기 위한 유용미생물 자원을 확보하기 위해 실시하였다.

## Materials and Methods

**균주의 분리 및 동정** 토양 미생물을 분리 선발하기 위하여 경북 상주지역 콩 재배지에서 채취한 토양 1 g을 멸균한 생리식염수로 연속 희석하여 NA (Nutrient agar) 배지에 100  $\mu$ L씩 도말한 후 28°C에서 배양하였다. 형성된 독립 colony를 분리하고 auxin 생성능이 가장 높은 균주를 선발하고 순수 분리하여 LPN-2라 명명하였다. LPN-2균주의 분류학적 동정을 위하여 16S rDNA를 PCR 증폭 후 sequence를 NCBI에 등록된 염기서열과 비교하여 상동성을 조사한 후 최종 동정하였다. 16S rDNA sequence는 분리한 미생물의 염색체 DNA를 추출한 후 PCR primer 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492r (5'-TAC CTG GTT ACG ACT T-3')를 이용하여 PCR을 실시하여 동정하였다.

**오옥신 생산성** 분리한 미생물의 Auxin 생산성은 Jung et al.의 방법 (2006)을 변형하여 수행하였다. 순수 분리한 균주를 PDA (Potato dextrose agar)배지에 접종하여 28°C에서 배양한 후 형성된 단일 콜로니를 0.1% L-Tryptophan을 첨가한 King's B (Proteose peptone No.3 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15%, Glycerol 1.5%, pH 7.2) broth 배지에 접종하고 28°C에서 48 시간 동안 배양하였다. 배양액을 10 분간 원심분리한 상청액에 2배 부피의 Salkowski 용액 (35% HClO<sub>4</sub> 50 mL + 0.5M FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mL)을 첨가하여 25°C 암조건에서 30 분간 반응시킨 후 535 nm에서 흡광도를 측정하고 IAA (Indole-3-acetic acid, Sigma-Aldrich Co, Ltd)를 표준물질로 하여 총 오옥신을 정량하였다.

**Siderophore와 cellulase 생산성** 선발된 균주의 siderophore 생산성을 확인하기 위하여 선별 배지인 CAS (chorme azulol S)가 함유된 CAS blue agar 배지에 균주를 접종하여 28°C에서 배양하면서 orange halo zone의 형성 유무를 확인하였다 (Brian et al., 2011; Alexander and Zuberer, 1991). Cellulase 생산성은 NA 배지에 1% carboxymethyl-cellulose (CMC)를 함유한 CMC agar 배지를 선별배지로 사용하였다. CMC agar 배지에 배양한 선발균주를 접종하여 28°C에서 배양하면서 congo red plate 방법 (Jung et al., 2007)으로 cellulase의 생산성을 확인하였다.

**오옥신 생성의 생물검정** 선발균주의 auxin 생성에 대한 생물검정은 녹두 발근 생검법으로 수행하였다 (Jung et

al., 2006). 녹두 종자를 0.3% Sodium hypochlorite 용액에 3 분간 침지하여 소독한 후 무균토양에 파종하여 성장상 (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 16 h/8 h, 28°C/22°C, day/night)에서 발아시켰다. 제 1 본엽이 전개된 후 3번째 소엽이 발생된 균일한 크기의 유묘를 선택하여 2차 뿌리가 생성되는 주근의 부위를 예리하게 절단하고 지상부를 각 처리구에 침지하여 생성된 뿌리의 수를 조사하였다. 대조구는 멸균 증류수와 0.4  $\mu\text{M}$  표준 IAA 용액으로 설정하였으며, 처리구는 선발균주가 생성한 총 오옥신의 농도를 0.4  $\mu\text{M}$ 이 되도록 멸균수로 희석하여 설정하였다.

**식물 성장촉진 효과** Auxin 생산성 선발균주의 식물 성장촉진 효과를 조사하기 위하여 녹두와 완두, 배추 등 세 가지 식물을 사용하여 검정하였다. 멸균 상태에 침지한 각각의 종자를 파종한 후 48 시간 배양한 배양액을  $1.0 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>로 관주 접종한 처리구와 처리 하지 않은 대조구로 각각 설정하였다. 식물의 생육은 동일한 조건 (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 16 h/8 h, 28°C/22°C, day/night)에서 10 일간 생육시킨 후 굴취하여 상태를 완전히 제거하고 지상부와 지하부로 분리하고 생체중과 건조중을 각각 측정하였다.

**탄저병균에 대한 항균활성** 병원균에 대한 *in vitro*에서 항균활성 조사를 위해 경북대학교 응용생명과학부 식물병리학 연구실에서 보유 중인 탄저병원균 *Colletotrichum gloeosporioides*를 분양 받아 사용하였다. PDA (Potato dextrose agar) 배지 중앙에 탄저병 병원균을 직경 5 mm 정도의 크기로 치상하고 좌우로 3 cm 떨어진 위치에 분리한 미생물을 접종하고 28°C에서 대치 배양하여 탄저병원균의 생육억제 거리를 측정하였다. 또한 선발균주의 대사산물의 항균활성을 확인하기 위하여 PDB 배지에 6 시간, 12 시간, 24 시간 및 48 시간 배양한 후 배양액을 12,000 rpm에서 10 분 간 원심분리 후 상정액을 회수하여 탄저병원균에 대한 길항력을 위와 동일한 방법으로 확인하였다.

**생물적 방제력 시험** 선발된 균주의 *in vivo* 조건에서 탄저병균에 대한 항균활성을 조사하기 위하여 고추와 사과 과실을

을 대상으로 Kim et al.의 방법 (2008)을 변형하여 각각 실시하였다. 고추와 사과 과실에 대한 생물적 방제력은 *C. gloeosporioides* 균주를 PDA (potato dextrose agar, Difco) 배지에 배양하여 포자를 분리한 후  $1.0 \times 10^5$  conidia·mL<sup>-1</sup> 농도로 인공접종하였다. 탄저병원균의 인공접종은 예리한 핀으로 과실 표면에 상처를 내고 현탁액 5  $\mu\text{L}$ 를 접종하였으며 여기에 선발된 균주 배양액을  $1.0 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>를 표면에 3 mL 씩 살포하여 30°C에서 배양하면서 발병의 진행정도를 관찰하였다. 또한, 고추 유식물에서 탄저병에 대한 균주 배양액처리 시 생물적 방제력 시험은 농촌진흥청 미생물은행에서 분양받은 *Colletotrichum coccodes* 균주 배양액을  $1.0 \times 10^5$  conidia·mL<sup>-1</sup>의 농도로 조정된 배양액 10 mL를 골고루 묻도록 인공 접종하였다. 증류수만을 처리한 대조구와 탄저병균만을 처리한 처리구 및 탄저병균과 균주배양액을 동시에 처리한 처리구로 각각 설정하여 시험을 수행하였다.

## Results and Discussion

**균주의 분리 및 선발** 식물의 근권으로부터 식물의 생육 촉진과 생물적 방제 효과를 동시에 나타내는 유용미생물을 분리하기 위하여 경북 상주지역 콩 재배지에서 채취한 근권 토양 시료로부터 균주를 일차적으로 선발 하였다. 이중 오옥신 생산성이 있는 균주를 선발하기 위하여 일차 선발된 균주들을 각각 일정 기간 배양한 후 원심분리한 상정액에서 Salkowski test로 오옥신류의 생산성을 간접적으로 검증하여 생산성이 가장 높은 균주를 선발하여 LPN-2라 명명하였다. 가장 높은 오옥신 생산성이 확인된 선발균주 (LPN-2)에 대해 배양 시간별 오옥신류의 생성량을 확인한 결과 48시간 배양하였을 때 경우 약  $40.3 \pm 0.61 \mu\text{M}$ 로 기존 보고된 균주들보다 상당히 높은 옥신 생성량을 나타내었다 (Table 1). PGPR은 IAA, 지베렐린, 사이토키닌 등의 물질을 생산하여 식물의 성장을 촉진하며 (Kloepper et al., 2007), 자유생활 미생물들은 주로 IAA와 지베렐린을 생산하는 것으로 알려져 있고, 여러 작물에서 뿌리 표면적과 뿌리선단의 수를 증가시키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Han et al., 2005). 최근의 보고 (Spaepen et al., 2007)

**Table 1. Effect of the incubation time on auxin production by isolated strain.**

Strain	Incubation time (h)	Auxin production ( $\mu\text{M}$ IAA)
LPN-2	6	$11.32 \pm 0.44^a$
	12	$11.32 \pm 0.29^\dagger$
	24	$16.83 \pm 0.59^\dagger$
	48	$40.31 \pm 0.16^\dagger$

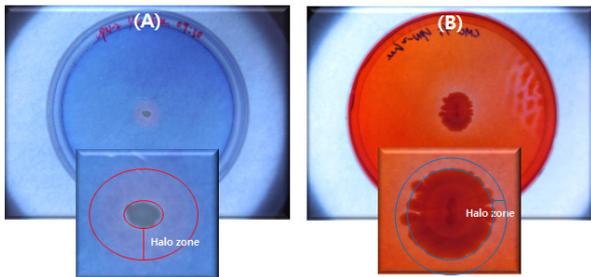
<sup>a</sup>STD: Standard deviation (three biological replicates)

<sup>†</sup>Means are significantly different at  $p < 0.001$

에 의하면 옥신 생산 미생물들은 주로 트립토판으로부터 IAA를 생산할 수 있으며, IAA를 생산하는 미생물은 주로 *Bacillus*속 (Swain et al., 2007)과 아조토박터와 슈도모나스 속 (Ahmad et al., 2005) 미생물이 알려져 있다. 본 실험에서 분리 선발된 *Burkholderia* 속 유용미생물 균주는 옥신류의 생산성이 높아 식물의 생장 촉진용 미생물제제의 제조뿐만 아니라 다른 기능을 가지는 농업용 자재의 제조 원료로 사용할 수 있어 이용 가치가 매우 높을 것으로 판단된다.

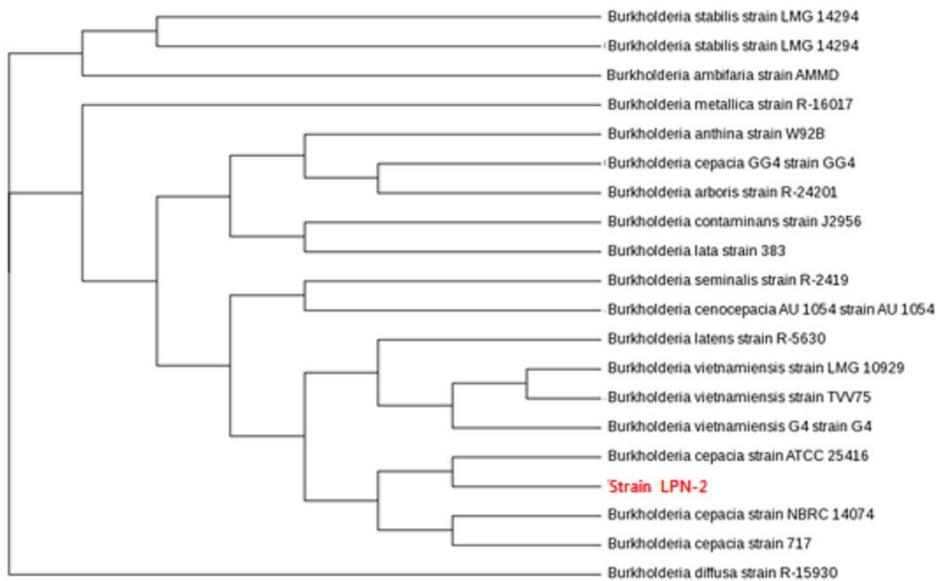
**Siderophore와 cellulase 생산성** 옥신의 생성능이 가장 높은 것으로 확인된 LPN-2 균주의 병원성균에 대한 항균활성을 나타낼 수 있을지를 확인하기 위하여 CAS blue agar와 CMC agar 배지를 이용하여 식물병원성 진균의 포자 발아를 억제하는 siderophore와 식물병원성 진균의 세포벽 섬유소를 분해하는 cellulase의 생산성을 확인하였다. 그 결과, CAS blue agar 배지에서 선발균주의 접종 부위 주변

으로 orange halo zone이 형성되는 것과 CMC agar 배지에서 선발균주를 접종한 부위 주변으로 halo zone이 형성되는 것으로 보아 선발 균주인 LPN-2는 siderophore와 cellulase를 모두 생산할 수 있는 것으로 확인 되었다 (Fig. 1). 식물 병해 방제용 미생물의 활용은 siderophore를 생산하여 철 이온과 복합체를 형성하여 진균의 철 흡수를 방해하여 포자 발아를 억제하는 특성을 활용하며, siderophore를 생산하는 미생물은 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속 미생물이 알려져 있으며 (Jung et al., 2007; Vandana and Goel, 2004), 또한 진균의 세포벽을 분해하는 cellulase를 생산하는 미생물을 활용하기도 한다 (Jung et al., 2007; Pozom et al., 1999). *Burkholderia* LPN-2 균주가 옥신류의 생성능이 높은 PRGR이며 siderophore 및 cellulase를 생성하는 특성을 가지는 것을 확인할 수 있었으므로 (Fig. 1) 이 미생물을 이용한 생물적 병해 예방 또는 방제 기능을 추가로 가지는 농자재의 제조 등에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.



**Fig. 1.** Production of the siderophore and cellulase by strain *Burkholderia* sp. LPN-2 in selection medium. (A), CAS (chrome azurol S) blue agar; (B), Congo-red staining of nutrient agar plates containing CMC.

**선발균주의 동정** 옥신의 생성능이 높고 siderophore와 cellulase 생산성을 가지는 다기능성인 균주 LPN-2의 효과적인 활용과 이용성 등의 증대를 위하여 동정을 실시하였다. 선발된 LPN-2 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행한 결과 약 1,400 bp의 PCR 산물을 획득하였고 염기서열을 결정하였다. 결정된 LPN-2 균주의 16S rDNA의 염기서열을 Ribosomal Database, NCBI에서 운영하는 BLAST 및 EBI에서 운영하는 Fasta 3을 통해서 상동성을 검색한 결과, *Burkholderia* sp.의 16S rDNA 염기서열과 99%의 상동성을 나타내었으므로 선발된 균주 LPN-2는 *Burkholderia* sp.



**Fig. 2.** Phylogenetic trees estimated from 16s rDNA comparison and Biology analysis of the strain LPN-2. 16S rDNA phylogenetic tree showing the relationship between strain LPN-2 and other *Burkholderia* sp.

**Table 2. Effect of the culture broth from isolated strain on the induction of Mung bean root.**

Treatment	Formed roots (no · plant <sup>-1</sup> )
Control	8.2 ± 0.8 <sup>†</sup>
IAA (indole-3-acetic acid)	20.2 ± 1.3 <sup>†</sup>
LPN-2 culture broth	25.4 ± 1.8 <sup>†</sup>

Control: sterilized water

IAA (indole-3-acetic acid): 40µM IAA 50 µL in sterilized water 5mL (final conc. 0.4 µM of IAA)

LPN-2 culture broth: LPN-2 culture broth 50 µL in sterilized water 5mL (final conc. 0.4 µM of IAA)

<sup>†</sup> Means are significantly different at  $p < 0.001$

**Table 3. The effect of auxin-producing *Burkholderia* sp. LPN-2 on growth of various plants.**

		Control <sup>†</sup> (g fw · plant <sup>-1</sup> )	Treatment <sup>‡</sup> (g fw · plant <sup>-1</sup> )	Growth rate (%)
Mung bean	Shoot	7.6 ± 0.3 <sup>§</sup>	10.9 ± 0.7	143
	Root	1.7 ± 0.1	3.8 ± 0.2	219
Pea	Shoot	4.7 ± 0.2	9.8 ± 0.5	207
	Root	7.8 ± 0.2	8.8 ± 0.1	113
Cabbage	Shoot	5.0 ± 0.2	6.2 ± 0.1	124
	Root	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.0	140

<sup>†</sup> Control: Sterilized water

<sup>‡</sup> Test: Inoculation of LPN-2 (10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) in soil

<sup>§</sup> STD: Standard deviation (three biological replicates)

LPN-2로 최종 동정하였다 (Fig. 2).

**발근 촉진 효과 검증** *Burkholderia* sp. LPN-2 균주가 생성하는 오옥신류가 식물 생장촉진에 어느 정도 영향을 미치는지 확인하기 위하여 동일한 농도 (0.4 µM 표준 IAA)로 처리하여 녹두 발근 생검법을 실시한 결과 (Table 2), LPN-2 배양액을 처리한 처리구의 평균 발근 수는 25.4개, IAA 단독으로 처리한 처리구는 20.2개로 균주 배양액을 첨가했을 경우가 발근 촉진 효과가 26% 더 높았고 물만 처리한 대조구와 비교 시에는 200% 이상의 효과를 나타내었다. 이 결과는 *Burkholderia* LPN-2의 배양액 중에 *in vivo*에서 식물의 발근을 촉진하는 auxin류를 생산함을 확인할 수 있는 결과이다 (Fig. 2). 또한 동일한 IAA의 농도로 제조한 균주 배양액의 처리가 IAA 단독으로 처리한 경우보다 발근 촉진 효과가 더 높게 나타나는 것은 선발된 유용미생물이 생성하는 오옥신류는 IAA 이외에 다른 오옥신류가 존재하기 때문인 것으로 추정할 수 있다. *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속 미생물이 생산하는 오옥신류는 주로 indole 화합물임이 알려져 있으나 미생물의 종류에 따라 IAA 또는 유사화합물들이 존재할 수 있으므로(Jung et al., 2007) *Burkholderia* LPN-2가 생산하는 오옥신류의 구조 확인이 필요할 것으로 생각된다.

**식물 생육촉진 효과시험** *Burkholderia* sp. LPN-2 균주에 의한 녹두 발근 촉진 이외에 다른 작물에서의 생육촉진 효과를 확인하기 위하여 녹두, 완두 및 배추를 대상으로 트 시험을 통해 식물생장 촉진 활성을 조사하였다. 균주 배양액을 처리한 녹두의 뿌리 생육은 대조구에 비해 약 219%, 완두는 113%, 배추는 140%의 높은 생육 촉진을 나타내었다. 또한 균주 배양액을 처리한 녹두의 지상부 생육은 대조구에 비해 약 143%, 완두는 207%, 배추는 140%의 높은 생육 촉진 효과를 나타내었다 (Table 3). 균주 배양액을 처리한 토양에서 생육된 녹두의 경우 외형적으로 볼 때 대조구에 비해 절간의 신장이 촉진되고 뿌리의 신장 및 발근이 촉진되었음을 시각적으로 확인할 수 있었으며 (Fig. 3), 뿐만 아니라 완두와 배추의 경우에도 대조구에 비해 지상부의 생육 상태가 촉진되었으며 뿌리의 생육이 현저히 촉진되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 오옥신 생산성이 높은 미생물에 의한 식물 생장 촉진 효과는 *Bacillus*속 (Jung et al., 2007)과 *Pseudomonas*속 (Vanada et al., 2004) 미생물 등의 효과가 알려져 있다. Martinez-Viveros et al.(2010)은 PGPR을 근권 미생물과 식물 뿌리 세포사이의 관계 정도에 따라 intracellular plant growth promoting rhizobacteria(iPGPR)과 extracellular plant growth promoting rhizobacteria(ePGPR)로 분류하였는데 *Burkholderia* sp.는 extracellular plant growth promoting rhizobacteria (ePGPR)에 분류되어 식물 생육을

촉진시키는 미생물로 보고되어 있다. 본 연구에서 분리 선발한 *Burkholderia* sp. LPN-2는 식물 성장촉진용 미생물 비료의 제조에 활용 가치가 충분할 것으로 판단된다.

**탄저균에 대한 항균활성** *Burkholderia* sp. LPN-2의 작물에 대한 생육촉진과 동시에 생물적 병해 예방효과를 검증하기 위하여 *C. gloeosporioides*에 대한 길항능을 조사하였다. 선발균주에 의한 탄저병균의 발육 억제거리를 측정한



Fig. 3. Effect of *Burkholderia* sp. LPN-2 on growth and root elongation. (A), Mung bean; (B), Pea; (C), Cabbage.

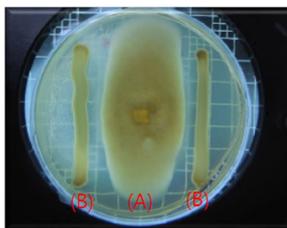


Fig. 4. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* by auxin-producing antagonistic *Burkholderia* sp. LPN-2. (A), *Colletotrichum gloeosporioides*; (B), *Burkholderia* sp. LPN-2.

결과 탄저병 병원균의 균사 생장을 약 56.9%의 저해시킴을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 또한 선발균주 LPN-2가 생산하는 대사산물의 *C. gloeosporioides*에 대한 항균활성을 조사하기 위해 LPN-2의 배양 상정액을 이용하여 길항력 시험을 수행하였다. 그 결과, 12시간 배양한 배양액과 24시간 배양한 배양액에서 *C. gloeosporioides*의 균사 생장을 저해함을 확인할 수 있었으며, 각각 47.3%와 42.8%의 저해율을 나타내었다 (Table 4). 이러한 결과는 Sopheareth et al. (2006)이 보고한 *Burkholderia* sp.의 *Phytophthora capsici*에 대한 항균 활성을 가지는 것과 유사한 결과이며, 본 연구에서 분리한 균주는 탄저병 방제용 미생물제제의 제조에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

**생물 방제효과 시험** *Burkholderia* sp. LPN-2의 탄저병원균 (*C. gloeosporioides*)에 대한 항균활성을 *in vivo* 조건에서 조사하기 위하여 사과와 고추 과실을 기주 식물로 하여 고추와 사과 과실 표면에 탄저병원균을 접종한 후 선발균주를 접종하여 발병 양상을 관찰한 결과 선발균주를 처리한 경우에 병반이 현저히 작게 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 이 결과는 선발균주가 *C. gloeosporioides*에 항균활성을 가지므로 현장에 대한 적용 가능성이 있을 것으로 판단된다. 또한 고추 유묘에 발병하여 작물의 생육에 문제를 발생시키는 탄저병원균 (*C. coccodes*)에 대한 선발균주의 항균활성을 조사하기 위하여 고추 식물을 기주식물로 하여 고추 유묘에 탄저병원균을 접종하여 동일한 조건에서 재배하면서 관찰한 결과 탄저병원균만을 접종한 처리구에서 잎이 황화되면서 낙엽이 되는 현상이 나타나는 반면 선발균주 LNP-2를 같이 처리한 구에서는 무처리구와 같이 탄저병의 발생이 관찰되지 않았다 (Fig. 6).

*Burkholderia*속 미생물은 토양 중 넓게 분포하고 있는 미생물이며 생물적 방제, 생물적 복원, 식물생장 촉진 등을 목적으로 활용하기 위한 연구가 진행되고 있다 (Coenye and Vandamme, 2003). 오옥신 생산성과 항균활성을 동시에 가지는 유용미생물을 활용하기 위한 연구가 진행되고 있으며 본 연구에서 선발된

Table 4. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* by metabolites of auxin-producing antagonistic *Burkholderia* sp. LPN-2.

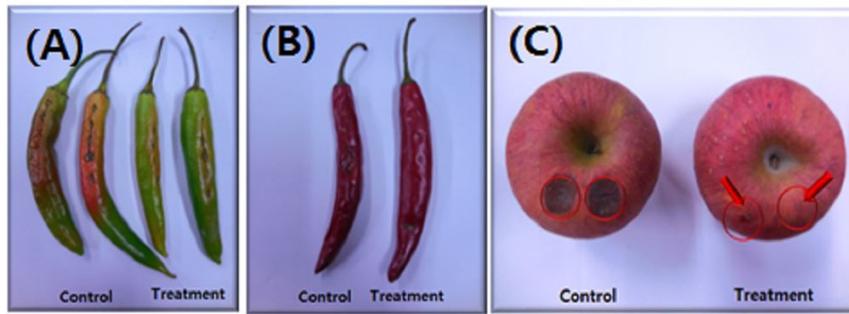
Incubation time (day) <sup>†</sup>	Inhibition rate (%) <sup>‡</sup>	
	12h <sup>§</sup>	24h <sup>§</sup>
5	21.0 ± 1.5	0.0 ± 0.0
6	32.9 ± 1.8	28.1 ± 0.9
7	41.2 ± 2.2	37.3 ± 0.6
8	46.1 ± 1.8	42.5 ± 1.7
9	47.3 ± 2.1	42.8 ± 2.0

<sup>†</sup>Incubation time (day): incubation time after cultural supernatant was treated on PDA medium

<sup>‡</sup>Inhibition rate (%) = {1-mycelium growth of treatment (cm) / mycelium growth control (cm)} × 100

<sup>§</sup>12h: paper disc treated 12h-incubated broth culture supernatant.

24h: paper disc treated 24h-incubated broth culture supernatant.



**Fig. 5.** Effect of *Burkholderia* sp. LPN-2 on pepper and apple anthracnose. Severe anthracnose symptoms in control but significant reduction in disease symptoms in the *Burkholderia* sp. LPN-2 treatment categories seven days after inoculation with *Colletotrichum gloeosporioides*. (A), Young pepper; (B), Matured pepper; (C), Apple.



**Fig. 6.** *In vivo* antifungal activity against *Colletotrichum coccodes* by *Burkholderia* sp. LPN-2 in chili pepper seedling. Control, treated with distilled water; Treat-1, treated with *C. coccodes* + LPN-2; Treat-2, treated with *C. coccodes* alone.

*Burkholderia* LPN-2 균주의 고추 탄저병에 대한 현장 적용 가능성을 확인할 수 있었다.

### Conclusion

토양에 서식하는 근권 미생물 또는 이들로부터 생산되는 이차대사산물을 이용하여 작물의 생육촉진 및 병원균에 대한 생물학적 병해예방에 사용할 수 있는 농자재의 제조에 사용하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 경작지 토양으로부터 미생물을 분리하여 작물의 생육촉진 및 탄저병원균에 대한 항균활성을 조사하였다. 선발균주는 16S rDNA 염기서열 분석 결과 *Burkholderia* sp. LPN-2로 동정되었고, 배양 48시간 만에  $40.3 \pm 0.61 \mu\text{M}$ 의 오옥신 생산하였다. 녹두를 이용한 발근 촉진 효과를 시험한 결과 무처리구에 비해 약 3배 가량, 동일한 농도의 IAA (indole-3-acetic acid)를 단독으로 처리한 처리구에 비해 26%의 발근을 촉진시켰다. 또한 녹두, 완두 및 배추에 대한 식물생장 촉진 활성을 조사한 결과 선발균주 배양액을 처리한 녹두의 뿌리 생육은 대조구에

비해 약 219%, 완두는 113%, 배추는 140%의 높은 생육 촉진을 나타내었다. 선발균주 LPN-2의 *C. gloeosporioides*에 대한 항균활성을 조사한 결과 탄저병원균의 균사 생장을 약 60% 억제시킴을 확인할 수 있었다. 또한 LPN-2의 이차대사산물에 의한 *C. gloeosporioides* 항균활성은 12시간, 24시간 배양한 LPN-2의 배양액에서 *C. gloeosporioides*의 균사 생장을 각각 47.3%와 42.8%의 저해율을 나타내었다. 선발균주 LPN-2은 식물병원성 진균의 포자 발아를 억제하는 siderophore와 식물병원성 진균의 세포벽 섬유소를 분해하는 항진균성 cellulase의 생산도 할 수 있는 것으로 확인되어 병원균에 대한 생물학적 방제제로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 선발균주 LPN-2의 *in vivo* test를 위하여 사과 및 고추의 과실 표면에 *C. gloeosporioides*를 인위적으로 접종한 결과 LPN-2에 의해 사과 및 고추의 과실 표면의 탄저균 병반이 현저히 작게 나타나는 것을 확인하였고, *C. coccodes*을 인위적으로 접종한 고추 유묘에서는 탄저병원균만을 접종한 고추 유묘에서 잎이 황화되면서 낙엽이 되는 반면 선발균주 LPN-2를 동시 접종한 처리구에서는 탄

저병이 전혀 발생하지 않았다. *Burkholderia* sp. LPN-2 균주 및 배양액은 식물 성장촉진 효과와 탄저병원균에 대한 항균활성을 동시에 나타내므로 다기능 미생물비료의 제조나 다른 농자재의 제조 등 농업 현장에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

## References

- Ahmad, F., I. Ahmad, and M.S. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J. Biol.* 29:29-34.
- Alexander, D.B. and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils.* 12:39-45.
- Brian, C.L., H. Daniel, and M.L. Aaron. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *J. Microbiol. Biol. Rduc.* 12(1):51-53.
- Coenye, T. and P. Vandamme. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 5:719-729.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Gross, D. and B. Parthier. 1994. Novel natural substances acting in plant growth regulation. *J. Plant Growth Regul.* 13:94-114.
- Han, J., X. Dong, Z. Cai, X. Sun, H. Yang, Y. Wang, and W. Song. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl. Microbiol.*, 28:66-76.
- Jung, H.K., J.R. Kim, S.M. Woo, and S.D. Kim. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 34:94-100.
- Jung, H.K., J.R. Kim, S.M. Woo, and S.D. Kim. 2007. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(1):23-28.
- Kim, S., K.T. Kim, Y. Chae, A. Jamal, and D.G. Oh. 2008. A survey of genes differently expressed in response to *Colletotrichum* infection on chili pepper fruit. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26(SUPPL.II):1-8.
- Kloepper, J.W. 1993. In Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. F. B. J. Metting (ed), *Soil Microbial Ecology*, Marcel Dekker, New York, NY. pp. 255-274
- Kloepper, J.W., A. Gutierrez-Estrada, and J.A. McInroy. 2007. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.*, 53:159-167.
- Lee, S.E., H.S. Yi, S.H. Park, and S.Y. Kim. 2005. Characterization of a rhizobacterium promoting early growth in maize. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 33:70-73.
- Martinez-Viveros, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo, and M.L. Mora. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J Soil Plant Nutr* 10:293-319
- Pozom, M.J., C. Azcon-Aguilar, C. Dumas-Gaudot, and J.M. Barea. 1999. 1, 3-g-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and *photophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Sci.* 141:149-157.
- Ryu, C.M., J.W. Kim, O.H. Choi, S.Y. Park, S.H. Park, and C.S. Park. 2005. Nature of a root-associated *Paenibacillus polymyxa* from field-grown winter barely in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15:984-991.
- Schroth, M.N. and J.G. Hancock. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science.* 216:1367-1381.
- Sopheareth, Mao, S. J. Lee, H. Hwangbo, Y. W. Kim, K. H. Park, G. S. Cha, R.D. Park, and K. Y. Kim. 2006. Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. *Curr. Microbiol.* 53:358-364.
- Swain M.R., S.K. Naskar, and R.C. Ray. 2007. Indole-3-acetic acid production and effect of sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Pol J Microbiol* 56:103-110.
- Vandana, K. and R. Goel. 2004. Improved plant growth from seed bacterization using siderophore overproducing cold resistant mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Micro. Biotech.* 4:653-657.
- Vanpinder, S. and B.J. Deverall. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83:487-490.