

ORIGINAL ARTICLE

Burkholderia pyrrocinia LA101 선발

나정우 · 장명준 · 안승원¹⁾ · 박윤진²⁾ · 조용구*

공주대학교 식물자원학과, ¹⁾공주대학교 원예학과, ²⁾공주대학교 두과농비자원연구센터

Selection of *Burkholderia pyrrocinia* LA101

Jeong-Woo Na, Myoung-Jun Jang, Seoung-Won Ann¹⁾, Youn-Jin Park²⁾, Yong-Koo Cho*

Department of plant Resources, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

¹⁾Department of Horticultural Science, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

²⁾Green Manure and Legumes Resource Center, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate eco-friendly measures to manage major diseases which cause heavy economic damages to ginseng. Morphological, physicochemical, and molecular biological species identification was carried out after isolating useful antagonistic bacteria from ginseng fields. In addition, optimal conditions for mass culture were established, and the efficacy of the bacteria in the prevention of the diseases was verified in the field. The results showed that about 150 bacteria were extracted from 150 ginseng fields in the whole county. Among them, *B. pyrrocinia* LA101 was finally selected, which had a strong antagonistic potency against *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, and *Cylindrocarpon destructans* on agar media. The *B. pyrrocinia* LA101 is a baculiform gram-negative bacterium identified as *Burkholderia pyrrocinia* according to results from an API (Analytical Profile Index) kit, 16S rRNA, and gyrase gene sequencing analysis. It was donated to the microbe bank of the Agricultural Genetic Resources Center at the National Academy of Agriculture Science under the Rural Development Administration on September 28, 2011 (Donation No. KACC91663P). A patent for the mass culture technology was granted in August 2012 (Patent No. 10-1175532).

Key words : Antagonistic microorganism, Biological control, Ginseng pathogenic fungi, *Burkholderia pyrrocinia*

1. 서론

인삼은 한곳에서 장기간 재배하므로 토양에서 오는 생리장해와 병해충의 피해도 받기가 쉽다. 인삼에 많이 발생하는 병중 지상부 병에는 잎과 줄기에 발생하는 점무늬병(*Alternaria panax*), 탄저병(*Collectotrichum* sp.),

잘록병(*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*) 등이 있으며, 인삼의 모든 부위에 피해를 줄 수 있는 병으로는 역병(*Phytophthora cactorum*), 잣빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*) 등이 있고, 뿌리에 발생하는 병으로는 균핵병(*Sclerotinia* spp.) 뿌리끝썩음병(*Fusarium oxysporum*) 등이 피해를 주고 있으며, 인삼의 재작이나 연작 재배시 발생

Received 14 March, 2019; Revised 11 April, 2020;

Accepted 4 May, 2020

*Corresponding author: Yong-Ko Cho, Department of Plant Resources, Kongju National University, Yesan 32439, Korea
Phone: +82-41-330-1200
E-mail: choyk09@kongju.ac.kr

※ 본 논문은 2016년도 공주대학교 박사 학위논문의 일부입니다.

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되는 병으로는 뿌리썩음병(*Cylindrocarpon destructans*) 이 발생하고 있다(Chung, 1975, Cho et al., 1995).

이에 본 연구는 전국에서 재배되고 있는 인삼의 재배 토양으로부터 수집한 *Burkholderia* 속 세균을 분리하여, 특히 인삼재배 시 각종 병해를 일으키는 주요 병원균에 대한 항진균 효과와 생육에 미치는 효과를 조사하여 이를 인삼재배 농가에 적용할 필요가 있다고 생각되어 *Burkholderia* 속 균주에 대한 분리 동정과 생리적 특성을 규명하고, 특히 인삼 재배 시, 각종 병해를 일으키는 인삼의 주요 병원균에 대한 항진균 효과 검정과 배양조건을 확립하여 이를 기초로 농업현장에서 실용화 할 수 있는 자료와 정보구축을 위하여 본 연구를 수행하게 되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. *Burkholderia* 속 균주의 분리 및 선발

본 실험에서는 인삼에 병을 일으키는 곰팡이병원균에 대하여 길항력을 가지며, 인삼생장에 도움을 주는 토양미생물의 일종이고, 그람음성의 진정세균인 *Burkholderia* 속 세균을 분리하고자 하였다. 2008년부터 2009년까지 2년간 우리나라에서 인삼재배가 가능한 금산군, 대전시, 공주시, 세종시, 익산시, 영광군, 남원시, 고창군, 무주군, 진안군, 당진시, 논산시 등 전국 28개 시·도 지역에서 2년생에서 6년생의 인삼 근권 토양으로 부터 2008년 90개, 2009년 60개 총 150개의 토양 시료들을 수집하였다.

토양시료의 채취는 인삼재배 년생별로 인삼의 근권 토양을 시료 당 500 g씩 토양 채취 도구를 이용하여 채취하였으며, 채취한 토양은 5±1℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

유용한 길항미생물을 분리하기 위하여 근권에서 채취한 토양을 10 g을 멸균수 90 ml가 들어있는 시험관에 넣고 1시간 동안 30±1℃로 shaking incubator에서 진탕하였다. 진탕한 다음 30분간 정제 후 상등액을 1 ml를 취하여 멸균수에 10⁷cfu/ml로 정량하였다. 이후 희석액의 0.2 ml를 NA배지에 도말하여 30±1℃ incubator에서 72시간 배양하였다. 배양 후 형성된 세균의 균총을 순수 분리하여 길항균 선발의 대상 균주로 활용하였다. 선발한 미생물은 LA001~LA150까지 균주번호를 부여하였으며, 총 150균주를 분리하였다. 분리한 균주들의 길항력은 인

삼 병원균들에 대한 군사생장억제 효과를 조사하여 평가하였는데 2차 선발은 인삼의 주요 병원균 중 군사생장이 가장 빠른 *B. cinerea* 균과 대치 배양하여 군사생장억제 효과가 높은 균주들을 선발하였으며, 이들을 대상으로 인삼의 주요 병원균인 *A. panax*, *B. cinerea*, *R. solani*, *C. destructans* 등을 대상으로 군사생장억제 효과를 조사하여 최종 선발하였고, 2차 선발시 효과가 없는 균주는 시험 대상에서 제외하였으며, 공시된 인삼 병원균들은 충남대학교 응용생물학과 병리학실험실에서 보관중인 균주를 분양받아 사용하였다.

길항력의 조사는 PDA배지 상에서 선발된 세균들과 인삼 병원균의 대치 배양을 통하여 군사 생장 억제력을 조사하였다. 대치배양은 PDA가 분주된 페트리디쉬에서 *C. destructans* 균은 20±1℃에서 14일간 *A. panax*, *B. cinerea*, *R. solani* 등은 25±1℃에서 7일간 배양된 병원균들의 균총을 4 mm Cork borer를 이용하여 배지 측면에 접종한 후 3 cm 거리를 두고 길항균을 접종하여 *C. destructans* 균은 20±1℃에서 14일간 배양하였으며, 그 외 다른 병원균들은 25±1℃에서 10일간 배양을 하였다.

병원균에 대한 군사 생장 억제력은 길항균에 의해 억제된 병원균의 군사생장 저지원의 길이를 조사하여 평가하였다. 또한 선발된 길항균이 병원균의 생장을 억제시 병원균의 군사를 형태를 알아보고자 저지원을 형성하는 부분의 병원균 선단의 군사를 현미경을 이용하여 관찰하였다.

선발된 길항세균들은 NB배지에서 25±1℃ 3일간 순수 배양한 후 배양액의 0.75 ml과 멸균된 75% glycerol 0.2 ml과 혼합하여 Deep Freezer(-70±2℃)에서 보관하였다. 또한 시험을 위해 보관 균주의 사용은 저장중인 길항균을 상온에서 녹인 후 NA배지에 도말하여 25±1℃에서 72시간 배양 후 자란 균을 이용하였다.

2.2. 인삼 병해 억제용 균주의 종 동정

선발된 *B. pyrrocinia* LA101을 30±1℃의 조건에서 NA배지 상에서 24시간 동안 배양한 후 균총 형태를 관찰하였고, 그람 염색법을 이용하여 그람 음성과 양성으로 구분하였으며, 균의 형태도 관찰하였다. 그람 염색은 슬라이드 글라스 상에서 crystal violet으로 1분간 염색 후 증류수로 세척하고, 루골고정용액을 1분 동안 처리 후 95% EtOH로 30초간 탈수를 시켰으며, safranin을

이용한 30초 염색 후 증류수로 세척하여 400배 광학현미경으로 관찰하였다.

세균의 미세구조와 형태를 관찰하기 위해 0.2 μ m membrane filter와 배지표면, 두 종류의 시료를 만들어 관찰하였다. 세포의 구조와 내용물을 최대한 살아있을 때의 상태로 보존하기 위해 5% glutaraldehyde와 5% paraformaldehyde을 이용하여 1차 고정하였다. 이후 증류수로 2회, 5분씩 세척한 다음, ethanol series를 이용하여 조직 내에 있는 모든 수분을 제거하였다. 30%, 50%, 70%, 80%, 100%의 농도로 각 단계별 10분씩 탈수과정을 거치는데, 100%는 2회 실시한다. 이후 isoamyl acetate를 이용하여 2회, 10분씩 치환한 후, 건조시킬 때의 형태를 최소한으로 줄이기 위해 CO₂를 이용하여 임계점 건조 하였다. 건조된 시료는 Aluminum stub에 carbon tape을 이용해 부착시키고, Osmium coating (K850, Emitech, Japan)을 한 후, 가속전압 15~18 kV, WD 10 mm에서 주사전자현미경(SEM)(S-4800, Hitachi, Japan)으로 세균의 입체적인 모습을 관찰하였다.

B. pyrrocinia LA101의 생화학적 분석은 API kit(BioMerieux, France)을 이용하였으며, 형태학적 특징을 토대로 그람염색 간균의 동정에 사용되는 API 20 NE kit을 이용하여 생화학적 특성, 탄소원 이용성 등을 분석하여 API홈페이지(<http://apiweb.biomerieux.com>)에서 확인하였다.

24시간 농화 배양한 *B. pyrrocinia* LA101 균주의 균액 10 ml을 6,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 원심 분리한 균체에 TE buffer(pH 8.0) 100 μ l를 넣고 균체를 진탕하여 잘 풀은 다음 라이소자임(lysozyme, sigma, Ltd) 50 mg을 넣어 처리한 후 37 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 overnight 시켰다. 여기에 chloroform-isoamyl alcohol(25/1, V/V)와 반응시킨 후 원심 분리하여 상층 액으로 DNA를 추출하고 cold isopropanol에 넣어 침전시켜 DNA를 회수하고 70% ethanol로 세척하고 진공 건조하였다. 여기에 TE buffer 90 μ l를 첨가하고 10 μ l의 Rnase A(10 mg/ml)를 첨가한 후 37 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응 후 phenol/chloroform을 처리하여 상층의 DNA 용액 층을 추출하여 0.8M lithium chloride가 포함된 ethanol을 부피의 3배로 첨가하여 침전시킨 후 70% ethanol로 세척 후 건조하여 DNA 염기서열 분석에 사용하였다.

선발된 *B. pyrrocinia* LA101 균주의 분자생물학적인

동정을 위해 16S rDNA와 gyrB 유전자의 염기서열 분석을 수행하였다. 16S 염기서열 분석은 다음과 같이 진행하였다.

항 진균력이 우수한 분리 균주 *B. pyrrocinia* LA101의 chromosomal DNA를 분리한 다음 16S rRNA 염기서열에 사용하는 universal primer인 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5' GGA TAC CTT GTT ACG ACT T 3')를 사용하여 initial denaturation 94 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하고 denaturation 94 $^{\circ}$ C/40초, annealing 55 $^{\circ}$ C/40초, extension 72 $^{\circ}$ C/1분의 조건으로 35회 반응시킨 후, 최종증폭을 72 $^{\circ}$ C/10분간 수행하기 위하여, 30회 PCR로 증폭하였다(Solgent Co., Korea).

또한 *recA* 유전자 증폭을 위하여 BCRG81(5'-TAC GGTCCGGAATCGTCG-3')와 BCRG82(5'-CGCA CCGACGCATAGAAT-3') primer를 사용하였으며, (Vandamme et al., 2002), initial denaturation을 94 $^{\circ}$ C에서 300초(5분)간하고 denaturation 94 $^{\circ}$ C/45초, annealing 61 $^{\circ}$ C/45초, extension 72 $^{\circ}$ C/60초(1분)의 조건으로 30 cycles 반응시킨 다음 final extension을 72 $^{\circ}$ C/420초(7분간) PCR을 수행하였다.

증폭된 PCR 결과물을 0.8% agarose 전기영동을 수행하여 확인 후 (주)마크로젠에 sequencing을 의뢰하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 DNA 데이터베이스와 유사한 염기서열을 비교하였다.

또한 염기서열은 PHYDIT program을 이용하여 정렬하였고 불분명하게 정렬된 부분은 분석에서 제외시켰다. Phylogenetic tree는 PHYLIP 3.57c를 사용하여 Kimura's 2-parameter model에 의해 작성하였으며, 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였다.

유연관계 분석을 통한 종동정을 위해서 NCBI site로부터 얻어진 *Burkholderia* 속 유사 종들의 16S rDNA의 유전자 염기서열 정보는 다음과 같다. *B. stabilis* LMG 14294(AF097533), *B. diffusa* R-15930(AM747629), *B. vietnamiensis* AMMD(AF043302), *B. metallica* R-16017(AM747632), *B. cepacia* ATCC 25416 (U96927), *B. seminalis* DSM 23518(AM747631), *B. arboris* R-24201(AM747630), *B. cenocepacia* LMG

Table 1. Inhibition of mycelial growth of *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* and *Cylindrocarpon destructans* by antagonistic bacteria on agar plates

Isolate	Pathogen			
	<i>A. panax</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>C. destructans</i>
LA099	+++ ^a	++	+	++
LA002	+++	++++	++	++
LA003	+++	+++	+++	++
LA033	++	++	++	+++
LA060	++	++	+++	++
LA066	+++	+++	+++	+++
LA070	++++	+++	+	+
LA077	++	++	+++	++
LA078	++	++	++	++
LA080	+++	+++	++	++
LA088	+++	++	+	++
LA097	++	++	++	+++
LA098	++	+	++	++
LA101	++++	++++	+++	+++
LA107	+++	+++	++	+
LA108	+++	+++	+++	+++
LA109	+++	+++	-	++
LA124	++	++	+++	+
LA125	++	+++	++	+++
LA130	+++	++	++	++
LA132	+++	++	-	+
LA133	+++	+	++	++
LA135	++	+	+	++
LA136	++	++	++	++
LA141	+++	++	++	++
LA143	+++	++	+	+
LA144	++	+	++	++
LA145	++	+++	+++	++
LA146	++	+	++	+
LA148	++	+	+	++

^a- : not, + : 1-5 mm, ++ : 6-10 mm, +++ : 11-15 mm, and ++++ : 16-20 mm tested were determined by size of inhibition zone.

16656(AF148556), *B. vietnamiensis* LMG 10929 (AF097534), *B. multivorans* ATCC BAA-247(Y18703), *B. ubonensis* GTC-P3-415(AB030584), *B. latens* R-5630(AM747628), *B. glumae* LMG 2196(U96931), *B. plantarii* LMG9035(U96933), *B. oklahomensis*

C678(DQ108388), *B. thailandensis* E264(U91838), *B. pseudomallei* ATCC 23343(DQ108392), *B. mallei* ATCC 23344(AF110188).

또한 *Burkholderia* 속 내 종들 간에 더 정확한 균 동정을 위해 *recA* 유전자의 염기서열 분석을 실시한 후

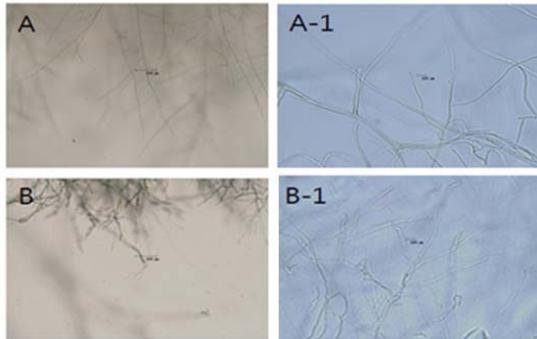


Fig. 1. Antifungal activities of *Burkholderia pyrrocinia* LA101 against *Alternaria panax* on agar media (A and A-1 : normal mycelia (×100 and ×400), B and B-1 : inhibited mycelia (×100 and ×400)).

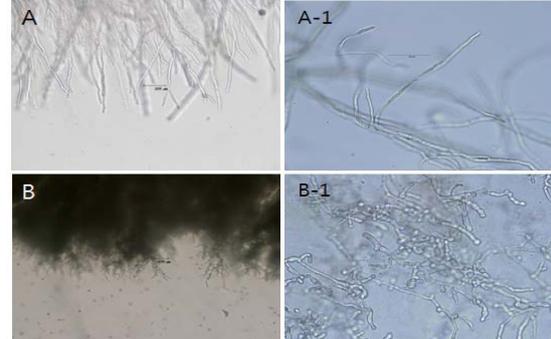


Fig. 2. Antifungal activities of *Burkholderia pyrrocinia* LA101 against *Botrytis cinerea* on agar media (A and A-1 : normal mycelia (×100 and ×400), B and B-1 : inhibited mycelia (×100 and ×400)).

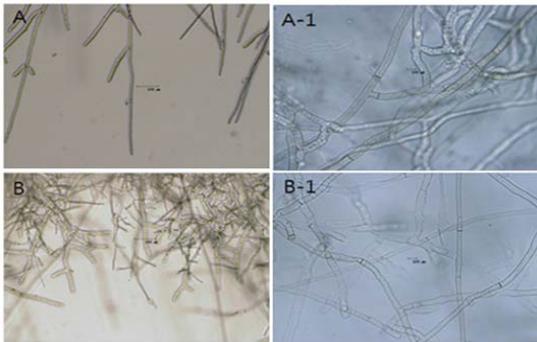


Fig. 3. Antifungal activities of *Burkholderia pyrrocinia* LA101 against *Rhizoctonia solani* on agar media (A and A-1 : normal mycelia (×100 and ×400), B and B-1 : inhibited mycelia (×100 and ×400)).

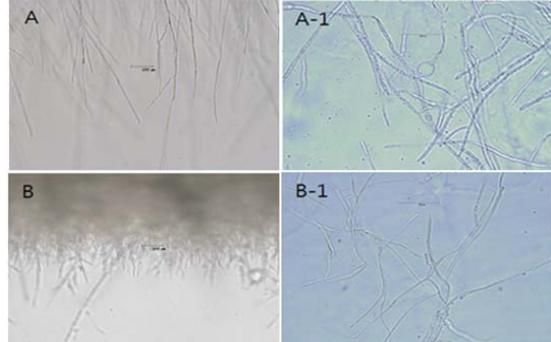


Fig. 4. Antifungal activities of *Burkholderia pyrrocinia* LA101 against *Cylindrocarpon destructans* on agar media (A and A-1 : normal mycelia (×100 and ×400), B and B-1 : inhibited mycelia (×100 and ×400)).

얻어진 *B. pyrrocinia* LA101의 DNA 염기서열은 NCBI site에서 유사 종들과의 비교를 통한 유연관계를 분석을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *B. pyrrocinia* LA101의 균주분리 및 선발

인삼 병 억제용 길항세균을 선발하고자 금산을 비롯한 전국 인삼 150개 근권 토양으로부터 *Burkholderia* 속 균으로 추정되는 150개의 세균을 임의적으로 분리하였다. 이어 인삼 병원균 중 저온에서 생장이 가장 빠른 *B. cinerea*와 PDA 배지에서 대치배양을 실시한 후 *B.*

cinerea 군사생장 억제를 보이는 34개 균주들을 2차 선발하였다.

분리 균주 대부분 *B. cinerea* 외에 다른 병원균들에 대해서도 강한 군사생장억제 효과를 나타내는 균주들이 많았으며, 병원균들 간 길항력의 차이를 보였다(Table 1). 2차 분리한 균들 중 조사대상 인삼 병원균들에 대해 군사생장억제(Fig. 1, 2, 3, 4) 효과가 가장 뛰어난 균주 *B. pyrrocinia* LA101을 본 연구에 사용하기 위해 최종 선발하였다.

선발된 길항미생물 *B. pyrrocinia* LA101이 병원균의 생장을 억제시 병원균의 군사를 형태를 알아보고자 저지원을 형성하는 부분의 병원균 선단의 군사를 현미경을

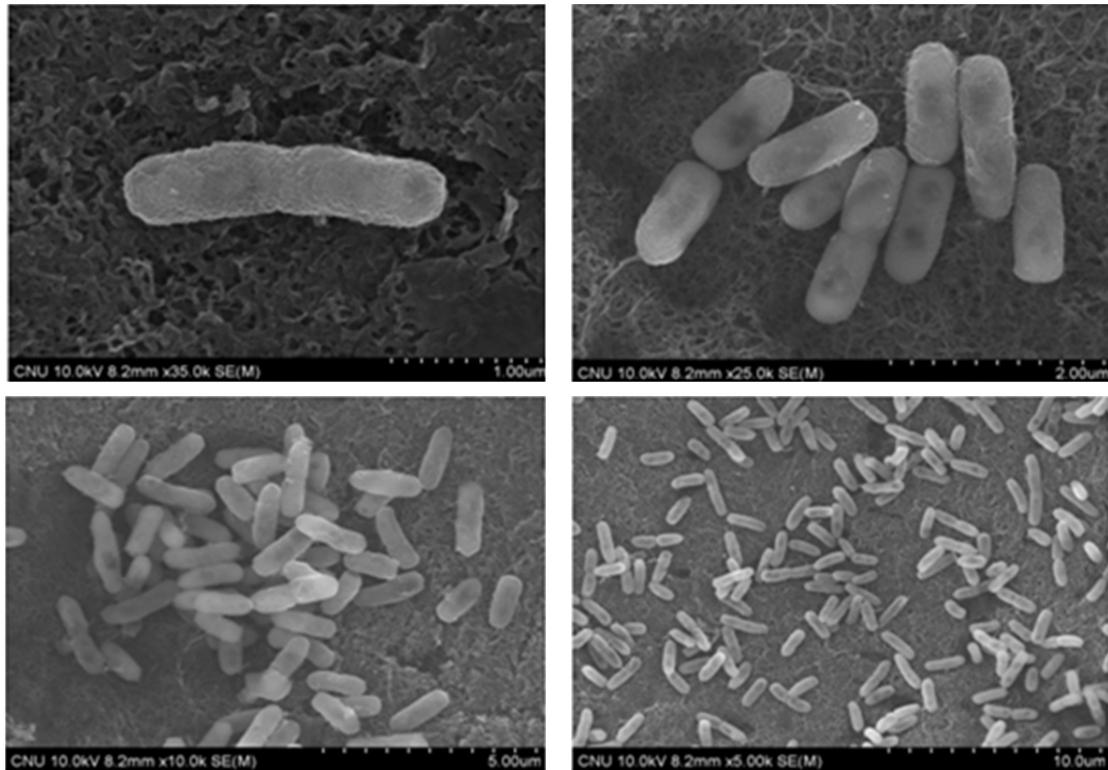


Fig. 5. Morphological features through electron microscope of the *Burkholderia pyrrocinia* LA101.

이용하여 관찰하였다.

B. pyrrocinia LA101과 대치 배양시킨 *A. panax*의 균총은 저지원이 형성되는 부분의 균사 선단이 굽어지고 휘어지고 팽윤되는 형태변화를 보였다(Fig. 1). 이런 균사의 형태변화는 *B. cinerea*, *C. destructans*도 동일한 균사의 결과를 보였다(Fig. 2, 4). *B. pyrrocinia* LA101과 *R. solani* 대치배양시 균사 선단이 생장이 멈추고 빗자루모양과 같이 선단이 짧아졌으며, 균사의 일부는 함몰되는 것이 관찰되었으며, 이후 세포벽만 투명하게 되는 증상을 보였다(Fig. 3). 이는 일반 길항미생물이 식물 병원성 진균의 생장을 억제하는 여러 방법 중 하나로 본 시험에서도 확인할 수 있었으며, 억제에 대한 기작은 항균활성물질의 동정 및 길항미생물이 내는 각종 효소들에 대한 시험을 수행하여야 할 것이다.

3.2. *B. pyrrocinia* LA101의 종 동정

Burkholderia 속 세균은 모양은 간균으로, 편모가 없

거나 운동성이 결핍된 *B. mallei* 균주를 제외하고 *Burkholderia* 속의 세균들은 하나 이상의 극성편모를 가지며 이것을 운동수단으로 한다(Redfearn et al., 1966). *B. pyrrocinia* LA101 균주는 *Burkholderia* 속 세균에서 볼 수 있는 전형적인 특징인 등근 모양의 균총 형태와 그람염색 후 광학현미경 하에서의 그람 음성의 간균 형태가 관찰되었다. 또한 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 0.5-1.0 μm의 간상형의 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

B. pyrrocinia LA101에 대해 API 20 NE kit (BioMerieux, France)을 이용하여 생화학적 특성을 분석한 결과 길항세균 *Burkholderia* 속과 유사한 생리학적, 생화학적 특성, 탄소원이용성 등을 API홈페이지(<http://apiweb.biomerieux.com>)에서 확인하였다(Table 2). 하지만 조금 더 정확한 종 동정을 위해 분자생물학적인 방법을 수행하였다.

16S rRNA gene sequencing의 염기서열에 기초한

Table 2. Biochemical and physiological characteristics using API 20 NE kit for *Burkholderia pyrrocinia* LA101

No.	Characteristic	Reaction
1	Reduction of nitrates to nitrites	- ^a
2	Indole production	-
3	Glucose acidification	-
4	Arginine dihydrolase	-
5	Urease	-
6	β -glucosidase	-
7	Protease	+
8	β -galactosidase	-
9	Glucose assimilation	+
10	Arabinose assimilation	+
11	Mannose assimilation	+
12	Mannitol assimilation	+
13	N-acetyl-glucosamine assimilation	+
14	Maltose assimilation	+
15	Gluconate assimilation	+
16	Caprate assimilation	+
17	Adipate assimilation	+
18	Malate assimilation	+
19	Citrate assimilation	+
20	Phenyle-acetate assimilation	+
21	Cytochrome oxidase	+

^a+ : Positive, - : negative.

분자계통학적 분석결과, *Burkholderia* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *B. pyrrocinia* LA101 균주와 *B. pyrrocinia* A12(JQ283970)번 균주는 같은 그룹으로 조사되었다(Fig. 6).

*B. pyrrocinia*는 전통적으로는 *P. pyrrocinia*에 위치하였으나 최근의 16S rRNA gene sequencing 비교를 통해 *Burkholderia* 속으로 분류학적 위치가 바뀌었는데 본 연구에서의 결과에서 볼 수 있듯이 *B. pyrrocinia* LA101은 표준균주인 *B. pyrrocinia* A12(JQ283970)와 유전적으로 정확히 100% 일치하는 것으로 확인되었지만 유사종인 *B. cepacia* ATCC 53933(AY741357)와도 비교된 1369개 염기와 거의 유사하였다.

추가적으로 *Burkholderia* 속 내 종들 간에 더 정확한 균 동정이 가능한 *recA* 유전자의 염기서열 분석을 실시하였다. 본 연구에서 얻어진 431bp의 *B. pyrrocinia*

LA101에 대한 DNA 염기서열을 이용해 NCBI site를 통해 유사종들과 비교분석한 결과 이미 보고된 *B. pyrrocinia* A12(JQ658434)와 가장 높은 유사도를 나타냈으며 유전적으로 가장 가까운 종인 표준균주 *B. cepacia* ATCC 25416(CP012981)와도 염기서열 약간 다른 유전적 차이를 나타냈다(Fig. 8).

따라서 기타 형태학적, 생화학적 특성에서 *Burkholderia cepacia* complex으로 추정되었으며, 분자생물학적 분석결과를 통해 유전적으로 *B. pyrrocinia*와 가장 유사하게 나타났으므로 길항미생물 *B. pyrrocinia* LA101을 *B. pyrrocinia*로 동정하였다.

Burkholderia 속의 세균들 중 일부는 인체 병원균으로 알려져 있지만 인체에 무해한 일부 균주들은 매우 높은 잠재성을 가진 유용미생물로 농업분야에서 주목받고 있다. 특히 *B. cepacia*의 경우 미생물 살균제로서 개발

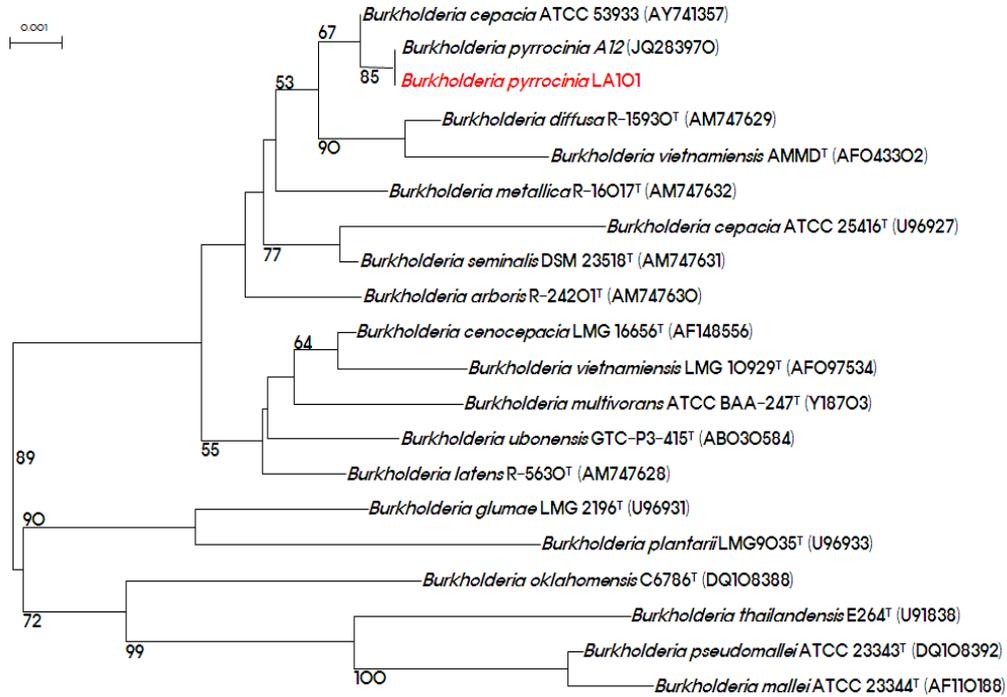


Fig. 6. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of *Burkholderia pyrrocinia* LA101 closely related species of the genus *Burkholderia*.

5'-GGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGAT
 AGCCCCGGCGAAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCT
 ATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT
 CTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATT
 TTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT
 TGTCCGAAAAGAAATCCTTGGTTCTAATATAGCCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAAC
 TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCACA
 GGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGA
 GTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCG
 AAGGCAGCCCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
 GTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAAACGTAGCTAACCGGTGAA
 GTTGACCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG
 ATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGG
 TGGGAGTGCTCGAAAAGAGAACC GGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTTGG
 GTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAA
 TGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCA
 CTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
 GGGTCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAA-3'

Fig. 7. 16S rRNA gene sequences of *Burkholderia pyrrocinia* LA101.

5'-TACGGTCCGGAATCGTCCGGTAAAACCACGCTCACGCTGCAGGTGATCGCCGAAGTGCAGAAGATCGGGCGG
CACGGCCGCGTTCATCGACGCCGAGCACGCGCTCGACGTCCAGTACGCGGCGAAGCTCGGGCGTGAACGTGCC
GGAAGTGTGATCTCGACGCCGACACCGCGGAGCAGGCGCTGAAAATCACCGATGCGCTGGTGCCTCGGG
CTCGATCGACATGATCGTCATCGACTCGGTGCGGGCGCTCGTGCCGAAGGCCGAAAATCGAAGCGGAGATGGG
CGATTGCTGCCGGGCTGCAGGCCCGCCTGATGTCGAGGCGTGCAGCAAGCTGACCGGCACGATCAAGCGC
ACGAACTGCCTCGTATCTTCATCAACCAGATTCGATGAAGATCGGGCGTGTGTTTCGGCAACCCGGAAAC-3'

Fig. 8. *recA* gene sequences of *Burkholderia pyrrocinia* LA101.

되어 시판되고 있다. 상기의 결과에 따라, 본 연구의 길항 미생물은 *B. pyrrocinia*로 동정되고 2011년 8월 12일 제P11-046호로 기탁하여 2011년 9월 28일 농촌진흥청 소속 국립농업과학원 농업유전자원센터 미생물은행에 미생물 수탁번호 KACC91663P로 기탁하였으며, 이를 특허출원을 하였다(관련특허 : 2012년 8월 14일자 특허 번호: 제 10-1175532호, 발명의 명칭 “신규한 버크홀더리아 균주, 버크홀더리아 균주의 항진균성을 증가시키는 효과가 있는 미생물 대량생산용 배지 및 이 배지를 이용한 대량생산방법”).

4. 결론

본 연구는 인삼 재배시 발생하여 경제적으로 큰 피해를 주는 주요 병해에 대해 친환경적인 방제수단을 강구하고자 인삼포장으로 부터 유용한 길항세균을 분리하여 형태학적, 생리화학적 그리고 분자생물학적인 중 동정을 수행하였다. 또한 대량 배양을 위한 최적의 배양 조건을 확립하였으며, 실제적인 병방제 활용 가능성 여부를 확인하고자 인삼 포장에서의 병발생 억제 효과를 확인하였다. 그 결과는 다음과 같다.

전국의 150개 인삼포장들로부터 총 150개의 세균을 분리하였으며, 이들로부터 점무늬병균(*Alternaria panax*), 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 질록병균(*Rhizoctonia solani*), 뿌리썩음병균(*Cylindrocarpon destructans*) 등 에 대해서 배지상 높은 길항력을 나타내는 *Burkholderia pyrrocinia* LA101 균주를 최종 선발하였다.

B. pyrrocinia LA101 균주는 간상형의 그람 음성 세균으로 API kit test 결과와 16S rRNA 및 *recA* 유전자 염기서열 분석결과를 종합하여 *Burkholderia pyrrocinia*

로 동정되었다. 농촌진흥청산하 국립농업과학원 농업유전자원센터 미생물은행(기탁번호 KACC91663P, 2011년 9월 28일)에 기탁하였으며, 2012년 8월 대량배양 기술에 대해 특허출원 취득하였다(특허 제 10-1175532호).

REFERENCES

- Cho, D. H., Park, K. J., Yu, Y. H., Ohh, S. H., Lee, H. S., 1995, Root rot development of 2-year old ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) caused by *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm) Scholten in the continuous cultivation field. Korean J. Ginseng Sci., 19, 175-180.
- Chung, H. S., 1975, Studies on *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten causing root rot of ginseng. Rept. Tottori Mycol. Inst. Japan, 12, 127-138.
- Redfean, M. S., Palleroni, N. J., Stanier, R. Y., 1966, A Comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. J. Gen. Microbiol., 43, 293-313.

- Ph.D. Jeong-Woo Na
Department of Plant Resources, kongju National University
sk851408@daum.net
- Professor. Myoung-Jun Jang
Department of Plant Resources, kongju National University
plant119@kongju.ac.kr
- Professor. Seoung-Won Ann
Department of Horticultural Science, kongju National University
annsw@kongju.ac.kr
- Research professor. Youn-Jin Park
Green manure and Legumes Resource Center, kongju National University
cocono@naver.com
- Ph.D. Yong-Koo Cho
Department of Plant Resources, kongju National University
choyk09@kongju.ac.kr