GOVP1200505114

최 종
연구보고서

유용미생물을 이용한 인삼의 병해방제 및 생육촉진 기술 개발

Technology Development for Disease Control and Growth Promotion of Ginseng Using Effective Microorganisms

연 구 기 관

(주) 허 브 킹

농 림 부

자료출처 : 유용미생물을 이용한 인삼의 병해방제 및 생육촉진 기술 개발 / 농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 **“유용미생물을 이용한 인삼의 병해방제 및 생육촉진 기술 개발”** 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 1월 20일

주관연구기관명 : (주)허브킹
총괄연구책임자 : 밝 훈
협동연구기관명 : 작물과학원
협동연구책임자 : 배 영 석
협동연구기관명 : 경상대학교
협동연구책임자 : 강 규 영
연 구 원 : 이 병 대
연 구 원 : 성 낙 술
연 구 원 : 강 승 원
연 구 원 : 연 병 열
연 구 원 : 안 태 진
연 구 원 : 이 선 미
연 구 원 : 임 승 하
연 구 원 : 박 창 석
연 구 원 : 이 성 환
연 구 원 : 이 진 우
연 구 원 : 박 신 효
연 구 원 : 김 창 국

요 약 문

Ⅰ. 제 목

유용미생물을 이용한 인삼의 병해방제 및 생육촉진 기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

미생물을 이용하여 인삼의 뿌리썩음병을 억제하고 수량을 증대시킬 수 있는 종합 근권생물환경 개선제를 개발하고자 한다.

고려인삼은 6년간 재배하고 50%의 뿌리가 썩어 수량감소와 품질저하(대편삼이 적고 천지급 삼이 적음)를 가져올 뿐만 아니라 재작이 불가능하여 깨끗한 예정지가 극히 적다. 이는 국내가격의 상승으로 수출저하의 주요인이 되고 있고 중국산 수입이 국내 생산량의 10%를 초과하고 있다. 인삼 뿌리 썩음병 때문에 농약을 많이 사용하여 잔류량이 수출저해요인이 되고 있다. 14억의 중국소비자들이 해마다 소득향상이 되고 있으며 이들의 가장 귀한 약재(천삼과 지삼을 처방에 씀)와 보약인 고려삼의 수출확대는 청정 고려삼의 저가 공급에 있다. 현재 인삼재배에 등록된 30여개의 농약 중 본포 근부방제농약은 없고 잔류안전농약은 1개에 불과하다. 금년부터 안정성과 관련하여 폐기처분 또는 이에 불응하는 경우 1년 이하의 징역 또는 1천만원 이하의 벌금을 부과하도록 되어있어 청정 다수확을 보장하는 안전 미생물제제가 시급히 개발되어야 한다. 경작자들은 미생물제제에 관심이 높아지고 있으나 근거가 불확실한 많은 미생물제에 혼란을 느끼고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 인삼 근부병 억제용 우수 길항균과 생육촉진성 유용균의 선발(*in vitro*, seedling test 및 pot 재배)

2. 병해억제기작 조사(seedling test, 조직검사)
3. 선발균주들 간 친화성 및 최적조합 선정
4. 근권정착 조사 및 최적배지 선발(rifampicin 내성유기 또는 fluorescent protein gene cloning, pot 시험, 포장시험)
5. 선발길항균들의 항균물질 분리 동정(culture, column chromatography, preparative TLC, activity guided bioassay, UV, IR, NMR)
6. 길항균처리 토양에서 항균물질의 경시변이(접종, 유기용매추출, TLC)
7. 유용균주의 포장효과 조사(완전임의 배치 및 임의완전구 배치)
8. 유용균주의 액제 및 분제 개발 시제품 생산

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1절 연구개발 결과

1. 유용 미생물의 선발

인삼 근부병원균(*Cylindrocarpon destructans, Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Fusarium solani, Phytophthora cactorum, Pythium ultimum, Sclerotinia sclerotiorum*)에 억제력을 갖는 *Bacillus* spp. B4228, B1141, B1142, *Burkholderia cepacia* A100, AB101, *Burkholderia* sp. AB21, *Pseudomonas* sp., AB62, *Streptomyces* sp. A8 외 5종을 선발하였다. 생장촉진효과에서는 *Pseudomonas fluorescens* B16, *Bacillus* sp. B6와 C8을 선발하였다.

항균성이 높은 *Bacillus subtilis* B4228과 *Burholderia cepacia* AB100을 각각 특허출원하였다.(특허출원번호 : 제2002-67963호, 제2002-10918호)

2. 병해억제기작 조사

Bacillus spp. B1141, B1142는 인삼 병원균들과의 대치배양에서 직접 항균효과는 없었으며 역병균 종자처리와 조직검사로부터 유도저항성 발병억제효과를 나타냈다.

Burkholderia spp. AB 100, AB101, AB21, *Pseudomonas* sp. AB62 들은 항생물질 생산에 의한 병원균 생육을 억제하였다.

3. 선발균들간 친화성 및 최적조합선정

Burkholderia spp. AB100, AB101, AB21과 *Pseudomonas* sp. AB62 생장촉진균

Bacillus spp. B6, B16, C8은 상호억제작용이 없었으며 혼합시 항균력이 감소되지 않았다. 길항균 *Burholderia* sp. AB21과 생장촉진균 *Bacillus* sp. B6의 혼합처리는 묘삼의 발병억제에 의한 근중증대효과 43%, 생장촉진효과 12%를 보였다.

유도저항성인 *Bacillus* spp. B1141, B1142, *Burkholderia* AB100간에 상호친화성이 있으나 혼합액의 *Cylindrocarpon destructans*의 근부억제효과는 유의성있게 감소하였다.

4. 근권정착 조사 및 최적배지 선발

B. cepacia AB100과 *Bacillus* spp. B1141, B1142는 묘삼침지 후 (10^7cfu/ml) 30일까지 급격히 감소하고 그 후 60일까지 미미하게 감소하여 4~5×10^3cfu/g뿌리의 밀도가 되었다. *B. cepacia* AB100은 10일까지는 약간 밀도가 높아졌다. TSA, NA, KB, SEA, TDA, Talc, bentonite 등 10가지의 기존배지 또는 물질을 혼합한 조사에서 포장시험에 적합한 가장 경제적인 영양배지를 선정하였다. 유기물배지로서는 pH조절 peat와 coir를 사용하여 10^7cfu/g까지 하우스내 접종에서 가능하였다.

5. 선발길항균들의 항균물질 분리동정 및 항균력 조사

8균주로부터 14개 항생물질을 분리동정 하였으며 모두 인삼병원균에 대하여 각기 다른 항균력을 가지고 있으나 가장 강한 것은 *Burkholderia cepacia* AB100이 생산하는 pyrrolnitrin으로 ED_{50}는 *Cylindrocarpon destructans*에 22㎍/ml였고, *Rhizoctonia solani*에 0.05, *Botrytis cinerea*에 0.02였다. *Streptomyces* sp. A8이 생산하는 phthoramycin은 *Pythium ultimum*에 0.03, *Phytophthora cactorum*에 0.05, *Cylindrocarpon destructans* 12.9였다.

Pyrrolnitrin은 *Burkholderia cepacia* AB21이 가장 생산량이 많고 10~15℃에서도 생장이 왕성하여 전구체들을 다량 생산하였다.

6. 길항균처리 토양에서 항균물질의 경시변화

Burkholderia cepacia AB21을 10^9cfu/g soil로 자연토양(비멸균토양) 접종처리 후 10일, 15일에 pyrrolnitrin이 검출되고 25일 후에는 다소 감소하였다. 생균처리의 결과로서는 극히 드문 현상이다.

7. 유용균주의 포장효과조사

가. 길항균인 *B. subtilis* B4228 액제 및 *B. cepacia* AB100 액제 (10^7cfu/ml)의 이식시 묘삼 침지처리(기준량 및 배량) 본 포 시험 3년근에서 유의성(5% 수준)있는 병삼수량 억제로 수량증대 및 품질향상 결과를 보였다.

나. 유도저항성균인 *Bacillus* spp. B1141, B1142의 혼합 액제는 직파 및 이식 3년

근 포장의 관주시험에서 각기 유의성(5%수준)있는 병삼수량 억제로 수량증대 효과를 보였다.

다. coir와 peat moss를 사용한 유기물+미생물제는 포장조건에 따라서 결과의 변이가 컸으며 작반 전에 시용하여 근권에 균일하게 혼합치 못한 것이 주요인으로 보인다.

라. 직파 3년포에서 무농약 미생물관주구(*B. subtilis* B4228 및 *Bacillus* spp. B1141+B1142, *B. cepacia* AB100)가 관행 농약처리구보다 건전근수 및 수량이 증가하거나 이병근수량 및 이병근수를 감소시켰다($p=0.05$)..

마. 반양직 묘포에서 *B. subtilis* B4228의 종자침지처리가 대부분의 포장에서 완전실패 하였으나 리조렉스 처리 관행구의 80%효과를 보이는 포장도 있었다.

바. 2개 포장에서 *B. subtilis* B4228의 효과는 토양 중 방선균밀도의 증가를 가져왔다. 방선균밀도는 건전근수량 또는 무적변근수와 유의직선상관($p=0.01$)이었다.

8. 유용균주의 액제 및 분제 개발 및 시제품 생산

B. subtilis B4228은 6개월 후에도 유효밀도(10^7cfu/ml)를 유지하는 액제를 개발하여 시제품을 만들었다. Talc외 1종의 물질을 사용하여 5개월 후까지 유효밀도(10^9cfu/g)를 유지하는 분제를 개발하여 시제품을 만들었다.

제 2절 활용에 대한 건의

가. 포장효과를 보인 미생물제를 농약사용량절감 또는 안전농약만의 사용체계의 일환으로 적극 보급하여야한다.

나. 유도저항성(induced systemic resistance)인 *Bacillus* spp. B1141, B1142 등은 길항성인 미생물보다 방제효과가 월등할 것이므로 이들은 물론 이런 미생물제제의 개발 연구에 적극 투자해야한다.

다. *Bacillus* sp. B6는 인삼 근생육을 촉진하므로 이 균주 및 유사균주의 실용화연구도 중요하다. 인삼 근중의 변이는 근권생육촉진균들의 서식과 관련 될 수 있다.

라. *B. cepacia* AB21은 강력한 병원균 항균물질인 pyrrolnitrin을 토양 중에 분비

하므로 이의 포장 실용화 또는 항균물질 대량생산 방향으로 연구할 가치가 있다.

마. 근권물리성 개선과 생물성 개선을 위하여 본 과제에서 검정된 미생물+안전유기물 근권개선제 개발은 바람직하다.

바. 인삼의 포장시험은 경작자의 도움 없이는 불가능하므로 포장조성비를 별도항목으로 설정하여야한다(재료비로서는 불가능).

사. 인삼 포장시험은 한 작기가 6년이므로 연구기간을 6년으로 하고 2년마다 결과를 평가하여 정지 또는 진행시킬 것.

아. 인삼 포장시험은 토양이 불균일하여 처리포장수, 처리면적과 반복수가 많아야 하므로 연구비를 현실에 맞게 증액해야한다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Technology development for disease control and growth promotion of ginseng using effective microorganisms.

Ⅱ. Purpose and necessity

Research aim is to make new product that can control root rot disease and increase yield of ginseng by using microbes. Root rot in the ginseng fields would reach 50% of missing plants and result in low yield and poor quality due to long crop year(4~6 years).

Land resource for ginseng cultivation becomes more limited because ginseng can not stand for replanting. Soil quality of ginseng fields is decreasing with the years passing. Such factors increase the dependency on chemical pesticides for ginseng production and finally ginseng price and consequently resist not only export but also increase the import of Chinese ginsgeng by 10% of national production in despite of increasing chance of export.

The economic status of 1.4billion Chinese is increasing year by year and the chances are increasing for Chinese to purchase Korean ginseng that has long been one of most important herb for traditional Chinese medicinal recipes.

Most ginseng growers eager to seek certified biological pesticide in market where many biological pesticide make them in confusion.

Ⅲ. Scope of the research and obtained results

1. Isolation and characterization of antagonists against root rot pathogens of ginseng and plant growth promoting rhizobacteria(PGPR).

2. Principles of antibiosis(seedling test and anatomical investigation).
3. Compatibility and optimal combinations of antagonists and PGPR.
4. Investigation of rhizosphere in habitation and optimal medium.
5. Isolation and structural identification of antifungal compounds.
6. Time course production of antifungal compounds in natural soil.
7. Field efficacy test of effective strains.
8. Formulation of bioactive agents.

Ⅳ. Research results and application

Section 1. Results

1. Selection of potential biocontrol agents

Total 13 promising biocontrol agents (*Bacillus* spp. B4228, B1141, B1142, *Burkholderia cepacia* A100, AB101, *Burkholderia* sp. AB21, *Pseudomonas* sp., AB62, *Streptomyces* sp. A8 and other 5 were selected by bioassay of biocontrol activity against ginseng root rot pathogens such as *Cylindrocarpon destructans, Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Fusarium solani, Phytophthora cactorum, Pythium ultimum, Sclerotinia sclerotiorum. Pseudomonas fluorescens* B16, *Bacillus* sp. B6 and C8 were selected for the growth promoting agents of ginseng root. *Bacillus subtilis* B4228 and *Burkholderia cepacia* AB100 having strong inhibitory activity to ginseng pathogens were applied to the Patent Office(Patent No. 2002-67963, 2002-10918).

2. Mode of action of selected biocontrol agents

Application of *Bacillus* spp. B1141 and B1142 were revealed to induce systemic resistance of ginseng plants with challenging of *Phytophthora cactorum*. The isolates did not have any direct antifungal activity against ginseng pathogens and stimulated lignification in the root tissue of ginseng.

3. Compatibility and optimal inoculation mix.

There was no adverse activity among *Burkholderia* spp. AB100, AB101, AB21 and *Pseudomonas* sp. AB62, *Bacillus* spp. B6, B16, C8 which showed ginseng

growth promoting activity. Furthermore, the combination of those agents showed the same antifungal activity as each isolate did. Combination of biocontrol agent *Burkholderia* sp. AB21 and growth promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. B6 showed 43% of root growth promotion by control of root rot, and 12% of real growth promotion of ginseng. Combination of biocontrol agent *B. cepacia* AB100 and ISR agent *Bacillus* sp. B1141 or B1142 showed no in vitro interaction on culture medium but resulted in lower control efficacy against ginseng root rot in vivo bioassay($p=0.05$).

4. Rhizosphere inhabitation density and optimum-culturing medium

Dipping of 1-year-old ginseng roots in the suspension of *Burkholderia cepacia* AB100, *Bacillus* sp. B1141 or B1142, showed approx. 10^7 cfu/g · root in population density. The population density rapidly decreased up to $6\text{-}9\times10^3$ cfu/g · root in the rhizosphere 30 days after transplanting in a field which had an harvest of ginseng 7 years ago, sustaining similar population density at 60 days.

Optimum-culturing medium was selected by bioassay with several culturing media and ingredients, which is economically suitable for field application in this study.

5. Isolation and structural identification of antifungal compounds and their activities

Fourteen antifungal compounds from 8 antagonists were identified by spectroscopic methods and tested their antifungal activities that bioassayed through ED_{50}-probit analysis. Pyrrolnitrin produced by *B. cepacia* AB 100 has strong activities against *C. destructans*, *R. solani*, and *B. cinerea* exhibiting each ED_{50} value of 22, 0.05, 0.02 ug/ml, respectively. Streptomyces produced phthoramycin which has potent activities on *P. ultimum*, *P. cactorum* and *C. destructans.* Newly isolated antagonist *B. cepacia* AB21, produced copious amount of pyrrolnitrin and its precursors even at lower temperature, 10~15℃.

6. Time course production of antifungal compound in natural soil

Burkholderia sp. AB21 treated in a natural soil at concentration of 10^9cfu/g soil produced enough antifungal compound pyrrolnitrin to be detected on a TLC plate and kept producing up to 25 days after inoculation.

7. Field experiments of potential microbes.

A. Dipping of ginseng seedlings at transplanting with liquid formulation of *B. subtilis* B4228 or *B. cepacia* AB100(10^8cfu/ml) significantly increased yield(p=0.05) and quality of 3 years root.

B. Drenching on 3rd year field of liquid mixture of induced systemic resistance microbes, *Bacillus* spp. B1141, B1142 significantly increased healthy root yield and decreased diseased root yield(p=0.05).

C. Drenching of *B. subtilis* B4228 or *Bacillus* spp. B1141+B1142 or *B. cepacia* AB100 on 3rd year field of direct sowing ginseng significantly increased yield or number of healthy root or decreased yield or number of diseased root in comparison with pesticide treatment.

D. Antimicrobial organic matter formulations(10^7cfu/g) from coir or peat moss showed great variation from field to field except effective case of peat moss+*B. cepacia* AB100 probably due to poor mixing with soil.

E. In the self-soil nursery dipping of *B. subtilis* B4228 showed 80% stand of pesticide plot only in one field.

F. In two fields *B. subtilis* B4228 increased Actinomycetes population in soil that was significant(p=0.01) linear correlation with healthy root yield and number of root without red skin.

G. Production of liquid or powder formulation of selected microbes : A liquid formulation of *B. subtilis* B4228 was developed and that can keep effective population (10^7cfu/ml) for 6 months in a sealed plastic container. By using talc and other one compound a powder formulation was developed and that can keep effective population(10^9cfu/g) for 5 months in a tight plastic container.

Section 2. Recommendation for Application

1. The selected microbial formulations proofed through field experiments should be forced to use in relation to a system to decrease chemical pesticide use or a system only with safety pesticide.

2. Research on induced systemic resistance microbes such as *Bacillus* spp. B1141 and B1142 should be intensified for practical use.

3. Root growth promotion microbe *Bacillus* sp. B6 must be studied for decreasing root weight variation.

4. Strong producer *Burkholderia cepacia* AB21 of antibiotics(pyrrolnitrin) in soil must be studied for field experiment and mass production of pyrrolnitrin.

5. Microbes+organic matter formulation must be continued for field experiment for the development multi-purpose rhizosphere improver.

6. Field experiments of ginseng are expensive due to shade house and budget item must be established separately from material item.

7. Since ginseng crop takes 6 years one research project for field test must be 6 years and report every 2 years.

8. Ginseng field experiments require large plot and many replications due to stand variation and thus research fund must cover this expense.

CONTENTS

Chapter 1. Synopsis of the research project.....19

Chapter 2. Present situation of research and technical development in home and abroad......21

Chapter 3. Scope of the research and results......23

Section 1. Field experiment for prevention of ginseng disease and growth promotion using potential microbes......23

1. Materials and methods.....23
 a. Inhibition activity test of potential microbes against pathogens.....23
 b. Formulation of selected microbes.....24
 c. Field experiments of selected microbes.....25
 d. Microbial population in rhizosphere and soil physicochemical analysis.....26

2. Results and discussion.....26
 a. Field test of *Bacillus subtilis* B4228.....26
 b. Field test of *Burkholderia cepacia* AB100.....43
 c. Field test of *Bacillus* spp. B1141+B1142(Induced systemic microbes).....49
 d. Development of mass culture and formulation.....55

Section 2. Development of inhabitation technology of antagonistic microbes in ginseng rhizosphere......58

1. Materials and methods.....59
 a. Selected microbes and their characteristics.....59
 b. Preparation of marker in microbes for rhizosphere inhabitation.....60
 c. Selection of potential antagonists for ginseng disease prevention.....60
 d. Mode of action of selected biocontrol agents.....61

e. Combination of selected agents.....62
f. Optimum culturing medium.....62
g. Population of selected agents in rhizosphere.....63
h. Optimum application method for field condition.....63
i. Formulation composition for effective control.....64

2. Results and discussion.....65
a. Physiological characteristics of selected agents.....65
b. Marker preparation for checking rhizosphere inhabitation.....65
c. Selection of potential biocontrol agents.....67
d. Mode of disease suppression.....69
e. Effective combination of antagonistic bacteria.....73
f. Selection of culture medium to accelerate rhizosphere inhabitation.....75
g. Population density of selected agents in rhizosphere.....78
h. The best application method under field condition.....80
i. Determination of nutritive media composition.....85

Section 3. Isolation identification and selection of antibiotic compounds against ginseng pathogens......90
1. materials and methods.....90
a. Isolation of potential antagonist and test of antagonistic power.....90
b. Isolation and identification of molecular structure and test for inhibitory effect to ginseng pathogens.....90
c. Isolation and identification of inhibitory compound from new antagonists....90
d. Isolation and identification of ginseng growth promotion compounds from growth promotion microbes.....91
e. Investigation of compatibility of microbes.....91
f. Development of mass production of antimicrobial compounds.....91
g. Analysis of antimicrobial compounds in soil of antagonistic microbes.....91
h. Development of microbe-mixture.....92

2. Results.....93
a. Inhibitory activity of antagonistic microbes to ginseng pathogens.....93
b. Activity of inhibitory compounds to ginseng pathogens.....93
c. Isolation of inhibitory compounds from new active microbes.....96

d. Isolation and identification of ginseng growth promotion compounds from active microbes.....100
e. Compatibility among antibiotic microbes.....103
f. Change of inhibitory compounds in soil.....105
g. Mass production of potential active compounds.....108
h. Effect of inhibitory compounds from AB21 to ginseng pathogens.....109
i. Effect of active microbes mixture.....110

Chapter 4. Attainability of the research and contributions to related fields. 118
Chapter 5. Application of research results......121

Chapter 6. Scientific technical informations obtained from abroad during conduction of the research project......122

Chapter 7. References......123

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요.....19

제 2장 국내외 기술개발 현황.....21

제 3장 연구개발수행내용 및 결과.....23

제 1절 유용미생물을 이용한 인삼의 병해방제 및 생장촉진 미생물제의 포장시험(세부과제).....23

1. 연구수행방법.....23

가. 유용균주의 인삼 병원균에 대한 항균활성 검정.....23

1) 유용균주 및 인삼병원균.....23

2) 유용균주의 항균활성 검정.....23

3) 유묘 pot 실험.....23

나. 유용균주의 제형화.....24

1) 액제.....24

2) 분제.....24

3) 유기물제제.....24

다. 포장시험.....25

1) 묘포시험.....25

2) 본포시험.....25

3) 길항균+유기물제제(peat moss 및 coir) 시험.....26

라. 공시 유용균처리 근권 토양의 미생물상 조사 및 토양 이화학성 조사.....26

1) 토양 미생물상 조사.....26

2) 토양 이화학성 조사.....26

2. 결과 및 고찰.....26

가. 공시 유용균주 *Bacillus subtilis* B4228(하야미)의 효과 검정.....26

1) 인삼 병원균에 대한 항균활성.....26

2) 유묘 pot 시험.....28

3) 포장 시험.....29

가) 식양토 포장(화성 발안 수촌4리 2003년 7월).....29
나) 미사질 식양토포장(평택 오송면 양교 6리 2003년 7월).....33
다) 미사 식양토 우량 포장(안성 보개면 기좌리, 2004년).....36
라) 직파 3년근에서의 B4228 하야미 1호 관주시험(안성 일죽면 고목동).....38
마) *Bacillus subtilis* B4228의 유기물제제 포장시험.....39
(1) 식양토(안성 일죽면 가리)포장에서 peat moss 제제시험.....39
(2) 사양토(안성 일죽면 산북리)에서 peat moss제제 시험.....41
(3) 사양토(안성 일죽면 산북리)에서 coir제제 포장시험.....42
나. *Burkholderia cepacia* AB100의 포장시험.....43
1) 식양토에서 AB100 액제의 포장시험(안성 일죽면 기좌리).....43
2) 직파 3년근에 대한 관주효과 포장시험(안성 일죽면 고목동).....45
3) AB100의 유기물제제 효과 포장 시험.....47
가) 식양토에서 AB100 peat제제 시험(안성 일죽면 가리).....47
다. 유도저항성 *Bacillus* spp. B1141+B1142 혼합제제의 포장시험.....49
1) 식양토에서 혼합액제의 관주시험(안성 일죽면 화봉리).....49
2) 직파 포장에서의 B1141+B1142 혼합액제의 포장시험.....51
라. 묘포시험.....54
마. 대량배양법 및 제제개발.....55
1) 대량배양법.....55
가) 액제.....55
나) 분제.....56
다) 유기물제제.....57
제 2절 길항균의 인삼 근권정착 기술개발(제1협동과제).....58
1. 서설.....58
2. 연구수행방법.....59
가. 공시 균주 및 길항균의 특성.....59
1) 길항미생물 및 인삼 병원균.....59
2) 길항균의 생리적 특성조사.....59
나. 근권정착 확인을 위한 표식인자 작성.....60
다. 인삼 병해 방제용 우수 길항균 선발.....60
1) 종자실험.....60
2) 묘삼실험.....61
라. 병해억제 기작연구.....61
1) 길항균의 항균활성 검정.....61
2) 역병방제효과.....61

3) 인삼뿌리의 조직변화.....61
4) 인삼뿌리의 무기성분 흡수.....62
마. 선발 길항균의 복합처리 가능 조합선발.....62
1) 길항균의 친화성 조사.....62
2) 길항균의 혼합처리효과 검정.....62
바. 배양배지 선발.....62
사. 선발균의 근권밀도.....63
1) 선발균의 근권 밀도변화.....63
2) 토성에 따른 근권밀도 변화.....63
아. 최적 처리방법 확립.....63
1) 2003년 포장실험.....63
2) 2004년 포장실험.....63
자. 방제효과 증진을 위한 영양원 선발.....64
3. 연구결과 및 고찰.....65
가. 길항균의 생리적 특성.....65
나. 근권정착 확인을 위한 표식인자 작성.....65
다. 인삼 병해 방제용 우수 길항균 선발.....67
1) 인삼종자 실험.....67
2) 묘삼실험.....68
라. 병해억제기작.....69
1) 길항균의 항균활성.....69
2) 역병방제효과.....70
3) 인삼뿌리의 조직변화.....71
마. 인삼뿌리 무기성분 흡수.....72
바. 선발 길항균의 복합처리 가능 조합선발.....73
사. 선발균의 근권정착 촉진을 위한 배양배지 선발.....75
아. 선발균의 근권밀도.....78
1) 선발균의 근권밀도 변화.....78
2) 토성에 따른 근권밀도.....79
자. 최적 처리방법 확립.....80
1) 2003년 포장실험.....84
2) 2004년 포장실험.....85
차. 방제효과 증진을 위한 영양원 선발.....85
4. 결과요약.....88
제 3절 길항성 물질분리 동정 및 인삼병균 억제 물질 선발(제 2협동과제).....90

1. 연구 수행 방법.....90
가. 우수 길항균의 분리 및 길항력 검정.....90
나. 길항물질의 분리·구조 동정 및 인삼병원균에 대한 억제능 조사.....90
다. 새로운 활성균에서 인삼 병원균 억제물질 분리 동정.....90
라. 활성 미생물 인삼 생장 촉진 물질 분리 동정.....91
마. 길항균 상호작용 구명.....91
바. 유망 신물질 다량 생산 방법 개발.....91
사. 길항균이 생산하는 항생물질의 토양 내 생산 소장 연구.....91
아. 복합 접종원 개발.....92
2. 연구결과 및 고찰.....93
가. 활성 미생물의 인삼 병원균에 대한 생육 저해 활성.....93
나. 활성 물질의 인삼병균에 대한 억제능 조사.....93
다. 활성균에서 인삼병원균 억제물질 분리.....96
라. 활성 미생물에서 인삼 생장 촉진 물질 분리 동정.....100
마. 길항균 상호 작용 구명.....103
1) 병원균 생육저해 효과.....103
2) 길항균 및 생장촉진 균주 상호간 생육 저해력 검정.....103
3) 복합 처리균의 인삼 병원균에 대한 길항력 검정.....104
바. 생육 배지별 길항 물질 생산-소장 연구.....105
사. 길항균의 토양 중 길항 물질 생산 소장 구명.....108
아. 길항균 AB21이 생산한 길항물질의 주요 병원균에 대한 효과검정.....109
자. 복합 접종원 개발.....110
3. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....114
4. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보.....117

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....118

제 5장 연구개발결과의 활용계획.....121

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....122

제 7장 참고문헌.....123

제 1장 연구개발과제의 개요

고려인삼은 중국에서 백초왕이라 불리는 가장 귀중한 약재이다. 중국 전통중의 약처방에는 고려삼의 천삼과 지삼을 사용하는 것이 최고이고 최소한 고려백삼도 사용할 수 있기를 바라고 있다. 천삼의 최고품은 600g(10뿌리)에 340만원이며 수요에 미달이다. 한약재는 최적지 개념이 있어 고려인삼은 한반도가 그 최적지이다. 바로 이웃에 수 천년동안 대대로 내려오는 14억의 고객인 중국의 경제사정이 해마다 좋아져 기회가 이미 와있는데 고려삼 종주국은 국내가격이 수출의 최대 저해요인임에도 불구하고 홍보만 필요하다고 주장하고 있는 실정이어서 생산기술개발이 황폐된 채 생산자는 농약에 의존하여 잔류량으로 인한 수출저해요인을 만들고 있다. 가공업자들은 국내삼의 10%에 해당하는 중국삼을 수입하여 수천년 고객이 이 땅에 와도 진품 고려삼을 의심하게 하고 있는 현실이다. 그러므로 이러한 현실을 타개하기 위해서는 청정 고품질 원료삼을 저렴하게 생산해야하고 이를 위해 생산기술을 높여야 함에도 정부는 농약에 의존할 수밖에 없는 인삼 생산 행위를 중벌로 막으려만 하고 있다. 이렇게 뒤틀린 모순을 풀고 천혜의 농업자원을 고객이 만족하는 값있는 자원으로 회복하는 길은 청정고품질 인삼 재배여건의 조성이며 그중 가장 시급한 것이 50%의 결주를 가져오는 인삼근부병을 막는 근환경개선제의 실용화이다. 30여종의 인삼농약이 있으나 근부병 방제농약은 없다. 본 연구는 인삼근부병균들을 억제하고 생장을 촉진하는 미생물과 유기물을 사용하여 종합 근권개선제를 개발하고 실용화단계로 제제화 하는데 있으며 근부병 억제미생물의 기작구명 및 근권정착 활성화 기술개발분야(제 1협동과제), 길항성물질 분리동정 및 유효성의 평가(제 2협동과제) 그리고 이들 정보를 바탕으로 포장시험과 제제 개발(세부과제)을 수행하는 3개팀으로 대략 아래와 같은 실험들을 수행하였다.

1. 제 1협동과제

가. 인삼 근부병 억제용 우수 길항균과 생육촉진성 유용균의 선발(in vitro, seedling test 및 pot 재배)

나. 병해억제기작 조사(seedling test, 조직검사)

다. 선발균주들 간 친화성 및 최적조합 선정

라. 근권정착 조사 및 최적배지 선발(rifampicin 내성유기 또는 fluorescent protein gene cloning, pot 시험, 포장시험)

2. 제 2협동과제

가. 선발길항균들의 항균물질 분리 동정(culture, column chromatography, preparative TLC, activity guided bioassay, UV, IR, NMR)
나. 길항균처리 토양에서 항균물질의 경시변이(접종, 유기용매추출, TLC)

3. 세부과제

가. 유용균주의 포장효과 조사
나. 유용균주의 액제 및 분제 개발 시제품 생산

제 2장 국내외 기술개발 현황

화학농약의 작물체내 잔류는 물론 환경에의 잔류문제를 해결하기 위하여 국제적으로 생물농약(Biopesticide)의 개발연구가 활발하며 제품이 출시 된지도 여러 해가 되었다(Biopesticide 12. 1999). 타작물에 대하여는 국내에도 상품화된 미생물농약이 7개가 있으나 토양유래 인삼 근부병방제 미생물농약은 아직 없다(2004. 농과원).

인삼 병방제 연구는 세계적으로 우리나라가 가장 활발하며 인삼 병에 대한 생물학적 방제도 1978년도에 토양중 길항균을 증식시키는 방법을 발표하여(정과김 1978) 세계적으로 가장 빨리 시작하였다. 인삼병해의 생물학적 방제에 관한 본격적 연구는 한국인삼연초연구소에서 1980년에 5년 과제로 착수하였으며 1991년에 3개의 사상균과 2개의 세균을 혼합한 동결건조제품을 상품화하였으나 출시하지 아니하였다. 시중에 여러 작물에 사용하는 미생물제를 인삼에 사용하도록 권장한 제품이 수종 있으며 인삼 전용으로 표시된 분제“바이코나”가 1991년에 민간기업에서 출시하였다. 그러나 학계에 효과를 공개한 제제는 인삼 전용 뿌리썩음병 방제약으로 2002년에 출시한 수화제(진메이트)가 최초의 것이다.

인삼생육촉진균은 한국인삼연초연구소에서 1991년에 연구를 시작하여 생육촉진물질들을 분리동정하고 포장시험을 하였으며 1999년도에 특허출원을 하였으나 상품화하지 아니하였다. 천연 방어물질 면에서는 *Cylindrocarpon destructans*를 인삼에 접종하고 방어물질을 분리동정하고 농약화가능성을 시도한바 있다(Kum H.K. et al 2000). 인삼은 생산량이 최고인 중국에서는 생물학적방제에 *Cylindrocarpon destructans*에 대하여만 연구하고 있는데 1998년 길림에서 처음 *Trichoderma* sp.의 효과를 보고 하였다. *Bacillus* sp.를 사용해 60%의 *Cylindrocarpon destructans*억제효과를 보고하였고, 2002년 *Streptomyces* sp. 계통이 선발되었으나 아직 실용화된 것이 없는 것으로 보인다(Liyu 2004).

호주에서 청정 고려삼을 재배할 목적으로 1994년부터 타스마니아에서 고려삼 재배를 연구하기 시작하였고 2002년에 청정고려삼 재배를 목적으로 민간회사가 설립되어 대규모재배를 하고 있으며 호주에서 유기농에 사용하는 천연물 농약을 사용하고 있는데 구입하여 시험해본 결과 효과가 인정되지 아니하였다.

미국이나 캐나다에서 재배하는 서양삼도 종은 다르나 병원균들은 같다[1]. 2002년도 캐나다 토론토와 뱅쿠버 지역의 삼농가를 5개소 방문했으나 생물농약정보는 없었다.

이상의 결과들로 볼 때 초작지자원이 적은 우리나라가 가장 인삼병해가 심하며 인삼생산의 제1제한요인이 되고 따라서 화학 농약사용종류도 많아지고 생산자들은 화학

1) 캐나다에서 *Burkholderia cepacia* AMMD를 반점병 방제용 생물농약으로 개발하였으나(Joy and Parke 1995) 이 균이 분무시 흡입할 때 서양사람들에게만 특이적으로 호흡계 장애를 유발 할 우려가 있어서 실용화가 안된 것 같다.

농약의존도가 높아질 수밖에 없는 것 같다. 그런 관계로 생물농약의 필요성이 가장 높고 따라서 인삼용 생물농약개발의 욕구와 기대가 세계적으로 가장 앞서가고 있는 것 같다. 그러나 아직 생산자들이 믿어주는 제품이 없는데 제품의 품질에도 문제가 있을 수 있고, 효과를 경험하기까지의 시간적 문제도 있을 수 있다.

본 연구 개발결과는 “하야미”에서 단일균주로 광범위 병원균 억제력을 갖는다는 점과 배지의 경제성과 기능성에서 탁월한 것이 장점이라고 볼 수 있다. 제품화 준비 중인 B1141+B1142 복합균제는 유도저항성(induced systemic resistance)균을 이용한 인삼용 미생물 제품이란 점에서 최초의 사례가 되며 유도저항성효과를 보이므로 항균성보다 공간적 시간적으로 더 높은 효과를 보일 것이고 생육촉진효과까지 있어 일반 작물에서 생육촉진균들이 유도저항성을 갖는 경우가 여러 병을 방제하면서 생육촉진을 동시에 달성할 수 있는 미생물제제의 개발 연구가 세계적 추세이다.(Jetiayan and kloepper 2002)효과가 가장 높은 제품으로 기대된다.

제 3장 연구개발수행내용 및 결과

제 1절 유용미생물을 이용한 인삼의 병해방제 및 생장 촉진 미생물제의 포장시험(세부과제)

1. 연구수행방법

가. 유용균주의 인삼 병원균에 대한 항균활성 검정

1) 유용균주 및 인삼병원균

본 실험에 사용된 공시균주 *Bacillus subtilis* B4228은 충청남도 금산의 인삼재배토양으로부터 분리 동정하였으며 포장시험을 통해 인삼 적변 억제효과가 확인되어 특허출원된 것으로 생명공학연구소로부터 분양받아 공시하였다. 또한 경상대학교로부터 *Burkholderia cepacia* AB100과 *Pseudomonas* sp. AB62, 작물과학원으로부터 *Bacillus* spp. B1141, B1142를 분양받아 공시균주로 사용하였다. 공시균주들은 TSA(Triptic Soy Agar)에 배양한 다음 10% glycerol로 현탁액을 조제하여 -70℃ 초저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험에 쓰인 인삼병원균은 인삼으로부터 분리 동정하여 병원성이 확인된 것들로서 KT&G 원료연구소(수원)와 농업과학기술원 식물병리과로부터 분양받아(*Cylindrocarpon destructans, Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Phytophthora cactorum, Alternaria panax, Pythium ultimum*) 공시 인삼병원성 균주로 사용하였다.

2) 유용균주의 항균활성 검정

인삼 병원균을 PDA(Potato Dextrose Agar)에 7일간 배양한 다음 직경 6mm의 Cork Borer를 이용하여 균사절편을 잘라낸 다음 PDA에 올려두었다. 대치배양을 위한 길항균은 TSA에 2일간 배양 후 멸균증류수를 사용하여 세균현탁액(1×10^8cfu/ml)을 조제하였다. 멸균된 paper disc(직경8mm)에 세균현탁액 70ul를 주입한 다음 병원균과 대치하여 올려놓았다. 27℃ 항온기에 7일간 배양 후 병원균의 생육저해정도를 관찰하였다.

3) 유묘 pot 실험

유묘 pot 실험을 통한 공시길항균들의 길항효과 검정을 위해 인삼 병원균

(*Cylindrocarpon destructans*)으로 폐포된 인삼포의 토양을 채취하여 오염되지 않은 건전한 원야토와 혼합(이병토:원야토, 1:1 w/w)한 다음 이병토양으로 사용하였다. 공시 길항균을 TSA배지에 도말하여 2일간 배양한 다음 spatula를 이용하여 수거 후 멸균수증류수로 희석하여 현탁액(1×10^9 cfu/ml)을 조제하였다. 실험에 사용된 묘삼은 파종 후 1년 동안 자란 건전한 것을 사용하였다. 준비된 현탁액에 묘삼을 1시간 침지 후 20분간 음건한 다음 각 pot(15cm×20cm)에 10주씩 이식하였다. 처리에 대한 대조구 처리로 멸균증류수에 동일시간 침지 이식하였으며 각 처리는 3반복으로 실시하였다. 이식 후 25℃의 실온에서 45일간 재배한 다음 병에 걸리지 않은 인삼의 뿌리수를 세어 건전근율을 측정하고, 개체 인삼별 전체뿌리부위에 대한 뿌리썩음비율을 측정하여 근부병 이병율을 조사하였다.

나. 유용균주의 제형화

유용균주의 산업화를 위해서는 공시균주가 항균활성을 유지함과 동시에 장기간의 보존에도 유효생존밀도를 유지하는 안정성을 구비하고 또한 대량생산이 용이하여야 한다. 따라서 공시 유용균주의 액제, 분제 및 유기물배지를 이용한 제형화 실험을 실시하였다.

1) 액제

본 실험에서 상기의 조건을 충족할 수 있는 MB배지를 선발하였고 인삼병원균에 대한 항균활성을 확인한 다음 온도와 시간에 따른 생존율을 조사하기 위하여 4℃와 상온에 각각 보관하면서 2주, 4주, 8주, 12주의 간격으로 생균밀도를 조사하였다.

2) 분제

공시 유용균주 *Bacillus subtilis* B4228을 이용한 분제 조제시 안정성을 조사하기 위해 Talc, Zeolite, Vermiculite, 활성탄을 사용하여 1차 실험에 대한 조사를 한 결과(자료생략), 이들 중 안정성이 가장 좋은 Talc제제와 비교적 안정성이 인정되는 활성탄을 혼합제제의 실험재료로 선택하였다. 공시 유용균주를 TSA배지에 배양하여 현탁액(5.0×10^9cfu/ml)을 조제하였고 Talc(10㎛)제제 40g, Talc와 활성탄(20mesh)혼합제제(Talc:활성탄, 1:1 v/v) 100ml를 현탁액 200ml와 각각 혼합하여 clean bench에서 3일간 건조하였다. 건조된 제제는 유발을 이용하여 마쇄한 다음 생균밀도를 조사하였고 4℃ 냉장고에 보관하면서 1개월, 2개월, 5개월 주기로 생균밀도를 조사하였다.

3) 유기물제제

유기물제제인 peat moss와 coir에 공시 유용균주 *Bacillus subtilis* B4228와

Burkholderia cepacia AB100를 각각 배양 후 균밀도를 조사하였다. 1ℓ의 삼각플라스크에 peat moss와 coir를 500ml씩 넣고 증류수 100ml과 150ml를 각각 넣은 후 멸균한 다음 각각의 제제에 세균현탁액 5ml씩을 혼합하였다. 28℃에서 7일간 배양한 다음 균의 배양밀도를 측정하였다. 유기물제제의 포장시험을 위해 대량배양을 실시하였다. 배양은 25℃~30℃를 유지하는 비닐하우스를 이용하였다. 균배양액(10^8 cfu/ml)을 50배 희석하여 준비한 다음 peat moss와 coir 1개 pack(107ℓ)당 20ℓ와 5ℓ씩을 각각 뿌린 뒤 잘 섞어주었다. 균접종을 마친 유기물제제는 균의 배양기간 동안 적정 수분을 유지하도록 비닐을 덮어 주었으며 매일 1회 골고루 섞어주었다. 7일간 배양 후 균배양 밀도를 측정하였다.

다. 포장시험

항균활성 검정 및 묘삼 pot 실험을 통해 인삼병억제 및 생육촉진효과가 확인된 공시 유용균주 *Bacillus subtilis* B4228, *Burkholderia cepacia* AB100, *Bacillus* spp. B1141, B1142 4개 공시 유용균주에 대한 포장시험을 수행하였다. 2002년부터 2004년까지 총 15개 포장에 유묘침지처리 16개 포장, 종자침지처리 2개 포장, 본포 관주처리 2개 포장, 유기물제제 처리 6개 포장에 실험을 수행하였다.

1) 묘포시험

공시 유용균주를 배양하여 1×10^8cfu/ml의 세균배양액을 준비하였으며 종자의 침지처리로서 파종 전 1시간동안 침지처리 하였으며 대조구로서 멸균수에 동일 시간동안 침지처리 하였다. 각 반복 간의 처리면적은 1칸(90cm×180cm)으로 하였으며 3반복으로 실시하였다. 파종 시기는 가을이었으므로 발아시기인 이듬해 4월경부터 시작하여 전 생육시기를 두고 입모율 및 이병율을 조사하였다.

관주시험으로는 세균배양액에 멸균수를 10배로 혼합하여 희석한 다음 6ℓ/칸씩을 관주처리 하였으며 대조구로 멸균수를 동량 처리 하였다.

2) 본포시험

묘삼 정식 전 세균배양액에 묘삼을 1시간동안 침지 후 이식하였으며 각 반복 간의 처리면적은 1칸(90cm×180cm)으로 하였으며 각 처리당 3반복으로 실시하였다. 길항균의 초기 처리밀도에 따른 효과를 검증하기위하여 희석세균배양액(세균배양액:무균배양액 1:1, v/v)을 기준량으로, 세균배양원액을 배량으로 간주하여 각각 처리하였으며 또한 균배양에 쓰인 배지의 영향을 검증하기 위해 배지를 멸균처리 후 동일한 방법으로 처리 하였고 대조구로는 멸균수를 처리하였다. 처리 후 이듬해 발아시기인 4월경부터 입모율 및 결주율을 관찰 조사하였으며 가을에 지하부를 채굴하여 이병율과 결주율

및 수확량을 조사하였다.

관주실험은 묘포와 동일한 방법으로 실시하였다.

3) 길항균+유기물제제(peat moss 및 coir) 시험

공시 유용균 *Bacillus subtilis* B4228와 *Burkholderia cepacia* AB100를 접종 배양한 peat moss와 coir(30ℓ/칸)를 토양상면에 뿌리고 잘 혼합한 다음 묘삼을 정식하였다. 각 반복 간의 처리면적은 1칸(90cm×180cm)으로 하였으며 각 처리는 3반복으로 실시하였다. 길항균의 초기 처리밀도에 따른 효과를 검증하기위하여 희석 배지(배양배지:무배양배지, 1:1 v/v)를 기준량으로, 희석하지 않은 상태를 배량으로 간주하여 각각 처리하였다. 또한 peat moss와 coir가 결과에 미치는 영향을 검증하기 위해 무배양배지를 동량 처리 하였다.

라. 공시 유용균처리 근권 토양의 미생물상 조사 및 토양 이화학성 조사

1) 토양 미생물상 조사

각 처리구에 대한 근권 미생물상을 조사하기 위하여 근권 토양을 처리별로 채취한 다음 1/10 TSA(Triptic Soy Agar), AIA(Actinomycete Isolation Agar), 1/10 PDA(Potato Dextrose Agar)를 사용하여 세균, 방선균, 진균의 토양 밀도를 각각 조사하였다.

2) 토양 이화학성 조사

토양분석은 농촌진흥청 농업기술연구소 토양 화학 분석법(1998. 12)을 따랐다. 유기물은 Tyurin법 인산은 Lancaster법, 치환성양이온은 원자흡광분광법에 의하였다. 산도와 염류농도는 1 : 5 희석액에 산도측정기와 전기전도도계로 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 공시 유용균주 *Bacillus subtilis* B4228(하야미)의 효과 검정

1) 인삼 병원균에 대한 항균활성

공시 유용균주 *Bacillus subtilis* B4228의 인삼 병원균에 대한 항균활성을 조사한 결과(Table 1-1) *A. panax*에 가장 강한 항균활성을 보였으며 *P. cactorum*과 *C.*

*destructans*에도 강한 항균활성을 나타냈다. 또한 *B. cinerea*와 *R. solani*에도 항균활성을 보여 인삼 병원균에 폭넓은 항균활성을 나타냄을 확인하였으나 *P. ultimum*에는 항균활성을 나타내지 않았다. 또한 50일 이상의 조사에서도 항균활성을 지속하는 것으로 나타났다.

Table 1-1. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* B4228 against fungal pathogens isolated from ginseng plants grown in fields.

Antagonist / Pathogen	*Bacillus subtilis* B4228
Cylindrocarpon destructans	++
Phytophthora cactorum	++
Alternaria panax	++
Botrytis cinerea	++
Rhizoctonia solani	+
Pythium ultimum	-

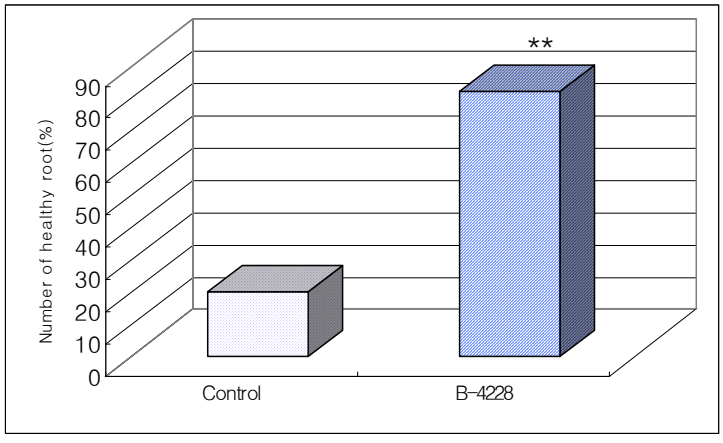
Inhibitory activity: +; 1-5mm, ++; > 6mm inhibition zone. -: no inhibition

Fig. 1-1. Growth inhibition of various ginseng fungal pathogens by *Bacillus subtilis* B4228.

2) 유묘 pot 시험

인삼 근부병 발병토양을 이용한 유묘 pot 실험결과 무처리구에서는 흑갈색의 전형적인 뿌리썩음병 증상이 거의 모든 뿌리에서 확인되었으며 뿌리의 일부 혹은 전체가 완전히 부패되기도 하였다. B4228의 처리구에서는 무처리구와 비교해서 경미한 뿌리썩음 증상이 나타나거나 뿌리전체가 건전한 상태를 유지하여서 뛰어난 근부병억제효과가 확인되었다(Fig. 1-2). 건전근율(근부병에 걸리지 않은 뿌리수의 비율)을 조사한 결과, 무처리구의 경우는 20%였으나 B4228 처리구는 82%로 높게 나타났고, 이병율(개체 인삼에 대한 뿌리썩음 이병정도의 총합비율)은 무처리의 경우 50.4%였으나 B4228의 처리구는 6.0%로 낮게 나타났다(Fig. 1-3).

Fig. 1-2. Effect of *Bacillus subtilis* B4228 on the control of ginseng root rot.



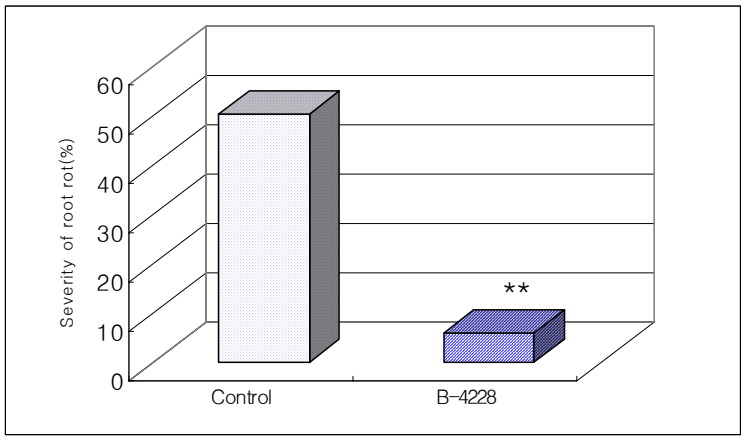


Fig. 1-3. Effect of *Bacillus subtilis* B4228 on the control of ginseng root rot caused by *C. destructans*. Untreated or treated one-year-ginseng roots with *Bacillus subtilis* B4228 were planted in an infested field soil with *C. destructans*. Data were collected 45 days after treatment(**: significant at P= 0.01).

3) 포장 시험

가) 식양토 포장(화성 발안 수촌4리 2003년 7월)

3년근에서의 칸당 근수량은 Table 1-2와 같다. B4228 묘삼처리 2년 후 기준량처리구와 배량처리구는 무처리구나 대조구(무균구)보다 유의성(5%수준)있는 증수를 보였다. 지상부의 생장량(생중)도 기준량구가 유의성(5%수준)의 차이를 보였다(Table 1-2). 뿌리수량의 지수로 보면(Fig. 1-4) 길항균처리가 무처리구보다 33%, 무균구에 비하여 28% 증수하였고, 지상부생육량은 무처리구보다 33%, 무균구보다는 27%가 증가하였다.

Table 1-2. Effect of B4228 on 3 year ginseng yield(g/3.3㎡).

	Control	Medium	Level 1	Level 2
1	375	410	489	500
2	385	393	509	495
3	437	454	590	560
Mean	399a	419a	529b	515b
Index	100	105	133	129

No significant difference between means with same letter by DMRT.

Table 1-3. Effect of B4228 on fresh weight of ginseng shoot(g/3.3㎡).

	Control	Medium	Level 1	Level 2
1	369	380	495	392
2	337	367	435	472
3	350	361	459	441
Mean	352a	369a	463b	435a
Index	100	105	132	124

No significant difference between means with same letter by DMRT.

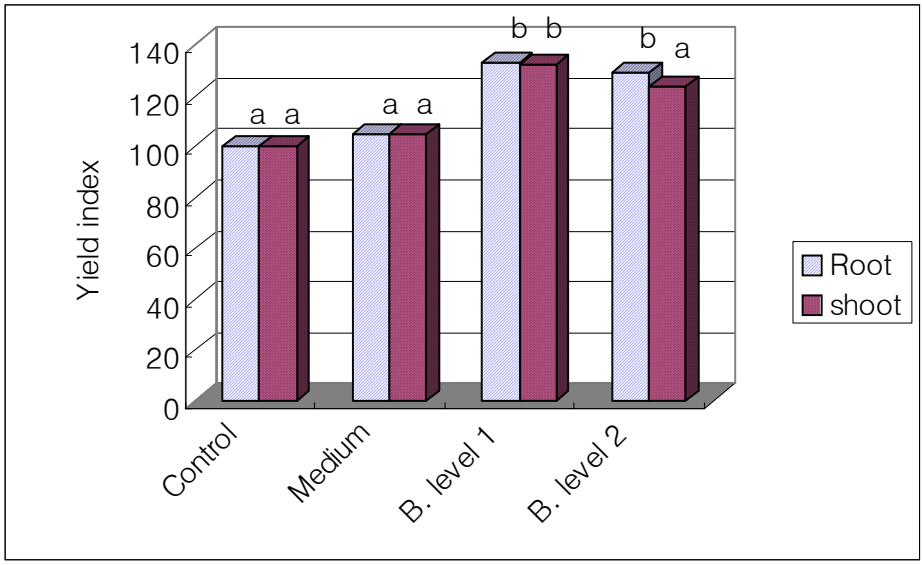


Fig. 1-4. Effect of B4228 on the yields of root and shoot.

이러한 지하부나 지상부의 생산량증대는 뿌리썩음병에 의한 수량손실이 줄어든 결과에서 왔다고 볼 수 있다. B4228 처리는 Table 1-4에서 보는바와 같이 근부가 없는 근수를 무처리에 비하여 10%수준에서 유의성있게 증대시켰다. 또한 근부병방제 보다 효과는 적게 나타났으나 무적피근수를 경감시키는 효과도 10%수준의 유의성을 보였다.

Table 1-4. Effect of B4228 on the number of without-rot root and without-red skin root of ginseng.

	Control	Medium	Level 1	Level 2
Without-rot (root/3.3㎡)	33a	36a	54b	33a
Index	100	109	164	100
Without-red skin (root/3.3㎡)	36a	42ab	51b	30a
Index	100	116	142	83

No significant difference between means with same letter by DMRT.

B4228은 적피를 방제하는 효과가 있는 것으로 농가포장에서 조사되어('신규의 바실러스 서브틸리스 균주를 인삼 적변의 방지에 사용하는 용도', 특허출원 제99-46543호, 1999.) 포장시험을 시작하였고, 중앙대학교 인삼산업연구센터에서 3개월간의 포장시험으로 근부 정밀조사 결과, 효과가 있는 것으로 나타났다. 통계적 유의성이 없었지만 장기 시험에서는 효과가 있을 것으로 기대하였다('바실러스 서브틸리스 이종균(B4228)의 인삼근 표피적변에 대한 개선효과' 시험, 중앙대학교 인삼산업연구센터, 2002.).

적피는 미부숙 유기물에 의한 미생물의 이상 발효 또는 침수에 의한 토양 환원 즉, 산소 결핍으로 보고 있다. B4228의 처리는 근권미생물의 활동에 영향을 주는 것으로 생각된다. 뿌리의 품질요인 즉 7cm이상의 동체장과 9g이상의 근중을 갖는 근수량에 있어서 통계유의성은 없으나 증가시키는 경향이다(Table 1-5).

Table 1-5. Effect of B4228 on quality of ginseng in Hwaseong Suchonri(root/3.3㎡).

	Control	Medium	Level 1	Level 2
Good main body (>7cm)	39	30	45	39
Good weight (>9g)	3	6	9	30

B4228의 처리가 토양미생물상에 미치는 영향은 Table 1-6과 같다.

Table1-6 . Effect of B4228 on the population of soil microbes(10^4cfu/g)

	Control	Medium	Level 1	Level 2
Bacteria	136	123	186	189
Fungi	29.7	26.7	26.3	25.3
Actinomycetes	39.7	38.7	78.7	77.3

무처리구나 대조구보다 기준량처리구에서 방선균 밀도가 두배가 되고 세균밀도가 30% 높고 곰팡이밀도는 약간 적은 경향이다. 인삼근수량은 방선균밀도와 유의정상관(r=0.99)을 보였다(Fig. 1-5). 본 포장의 토양화학성은(Table 1-7) 비교적 좋은 편이었다.

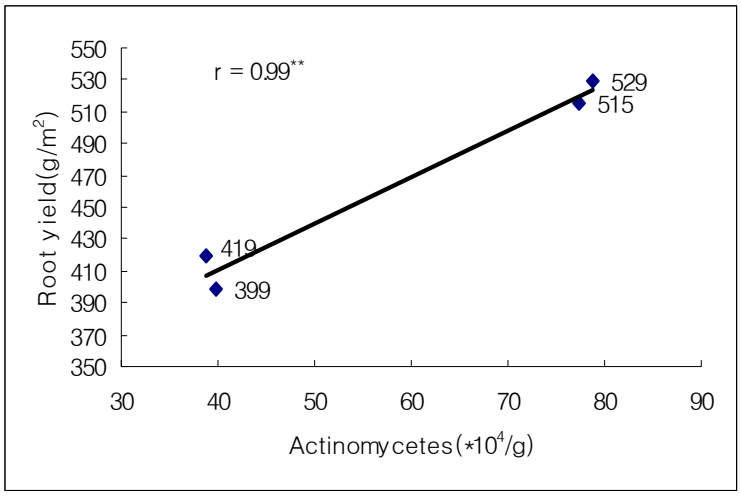


Fig. 1-5. Relationship between ginseng root yield and population density of actinomycetes in soil.

Table 1-7. Physicochemical property of field soil.

pH	EC	OM	Av.P2O5	Ex.Cation(me/100g)		
1:5	ds/m	%	mg/kg	K	Ca	Mg
4.9	0.4	2.9	229	2.2	5.4	2.9

나) 미사질 식양토포장(평택 오송면 양교 6리 2003년 7월)

B4228의 묘삼 처리구 3년근의 뿌리수량은 무처리나 무균구에 비하여 유의성있는 증가(1%수준)를 보였다(Table 1-8). 지상부 생산량도 5%수준에서 증가하였다(Table 1-9). 지수로 보면 뿌리나 지상부 모두 무처리구나 대조구에 비해 기준량처리구는 25~30%의 증수를 보였다(Fig. 1-6).

Table 1-8. Effect of B4228 on root yield of 3 year ginseng(g/3.3㎡).

	Control	Medium	Level 1	Level 2
1	285	305	418	347
2	315	330	377	370
3	352	365	444	370
Mean	317a	333a	413c	362b
Index	100	105	130	114

No significant difference between means with same letter by DMRT.

Table 1-9. Effect of B4228 on 3 year ginseng yield(g/3.3㎡).

	Control	Medium	Level 1	Level 2
1	348	315	519	388
2	357	387	436	352
3	391	380	458	415
Mean	365a	361a	474b	385a
Index	101	100	131	107

No significant difference between means with same letter by DMRT.

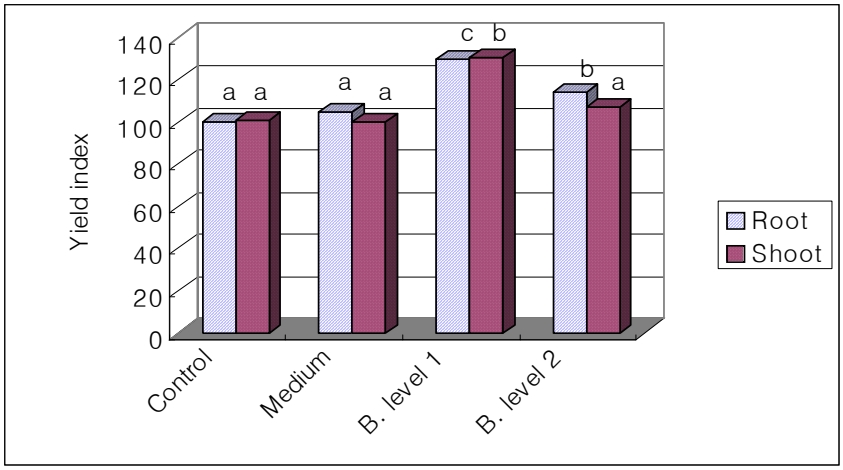


Fig. 1-6. Effect of B4228 on yields of root and shoot of 3 year ginseng.

그러나 근부수가 없는 무근부근수가 처리구에서 높은 경향은 있으나 통계적 유의성이 없었고 무적피근수는 무근부근수보다 처리한 효과가 큰 경향을 보이나 통계유의성이 없었다(Table 1-10).

Table 1-10. Effect of B4228 on number of root without rot or red skin of 3 year ginseng(root/3.3㎡).

	Control	Medium	Level 1	Level 2
Without-rot	46.0	39.0	42.0	46.5
Without-red skin	41.0	39.0	52.5	46.5

미사질식양토에서도 유의성은 없었으나 고품질요인 즉 7cm이상의 동체장과 9g이상의 근중을 갖는 근수가 무처리나 무균구에 비하여 처리구들이 높은 경향이다(Table 1-11).

Table 1-11. Effect of B4228 on quality or root in Pyeongteak yangyori(root/3.3㎡).

	Control	Medium	Level 1	Level 2
Good main body(>7cm)	20	17	21	18
Good weight(>9g)	18	19	32	32

포장의 토양화학성은(Table 1-12)비교적 양호하다. 앞 포장은 pH가 4.9로 낮고 이 포장은 6.1로 높다. 토양염도가 좀 높은 편이다. 인산도 인삼에 대하여는 높지만 현재 밭토양 중에서는 낮은 편이다. 유기물이 앞 포장보다는 적지만 적정범위에 있다.

Table 1-12. Physicochemical properties of soil.

pH	EC	OM	Av.P2O5	Ex.Cation(me/100g)		
1:5	ds/m	%	mg/kg	K	Ca	Mg
6.1	0.5	2.3	215	1.9	5.3	2.4

수량조사시의 토양 미생물 밀도를 보면(Table 1-13) 세균밀도가 가장 높고 방선균 밀도 그리고 곰팡이밀도가 가장 낮으며 이는 앞서 식양토와 같은 경향인데 방선균밀도가 앞 포장보다 배가 되고 곰팡이는 약1/2로 적어서 앞의 식양토보다 좋다고 볼 수 있다. 식양토에서와 같이 이 포장에서도 인삼수량과 토양 방선균 밀도와는 5%수준에서 정상관 관계를 보였다(Fig. 1-7).

Table 1-13. Effect of B4228 on the population of soil microbes(10^4cfu/g).

	Control	Medium	Level 1	Level 2
Bacteria	269	209	212	237
Fungi	14	15	15	10
Actinomycetes	77	73	125	98

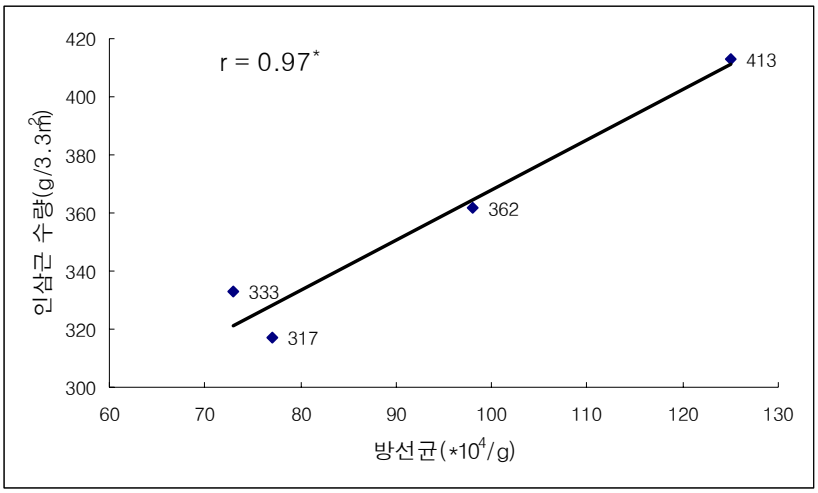


Fig. 1-7. Relationship between ginseng root yield and population density of actinomycetes.

적피삼근수와 1%수준에서 정상관 관계에 있어 방선균이 병원균이외의 토양미생물들의 생육을 억제하여 토양환원이 되는 것을 막는 것으로 보인다. 토양방선균의 밀도 상승을 위하여 광합성세균을 일본회사에서 제공받아 시용한 pot 시험에서 유의성있는 결과를 얻었었다(미발표 1988). 6년근 삼포 72개소에서 토양미생물밀도를 조사한 결과 방선균밀도는 *Fusarium*밀도와 1%에서 역상관을 보였으며 토양에서 분리한 방선균은 *Fusarium*의 포자발아를 억제하였다(오승환 들, 1980). 이병뿌리에서는 *Fusarium*종이 가장 많이 발견되어 총 11개종이 보고 되었고 이들 중 병원성 *Fusarium*종으로 *F. solani*와 *F. oxysporum*을 보고하였다(이순구, 2004).

본 시험에서의 B4228 시용에 의한 방선균밀도의 증가기전은 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

다) 미사 식양토 우량 포장(안성 보개면 기좌리, 2004년)

토양 인산이 최적수준에 있는 포장(Table 1-14)에서 2002년 가을에 침지 처리하여 추식하고 2004년도 8월말에 수량이 앞의 포장들보다 배가되는 고수량포 이다(Table 1-15).

Table 1-14. Physicochemical properties of soil.

	pH	EC	OM	Av.P2O5	Ex.Cation(me/100g)		
	1:5	ds/m	%	mg/kg	K	Ca	Mg
Gijuari	5.6	2.92	1.9	79	0.27	4.3	2.5
Sanbugri	6.1	2.95	1.8	32	0.14	7.0	1.6
Gari	5.6	0.52	1.6	26	0.38	5.6	3.1
Hwabongri	6.8	1.58	1.8	37	1.01	9.0	3.3
Bangchori	5.9	2.24	1.6	77	0.65	3.3	1.8

무처리나 무균구(대조구)는 수량에 유의차가 없고 처리구의 수량은 이들 구에 비하여

5%수준에서 유의성있는 증가를 보였다.

Table 1-15. Effect of *B. subtilis* B4228 on ginseng yield of a good soil(g/3.3m^2).

	I	II	III	Mean	DMRT (P=0.05)
Control	681	822	739	747	a
Medium	687	883	794	788	a
Level 1	748	1203	1079	1010	b
Level 2	879	1084	1049	1004	b
LSD				153	

이 포장은 결주는 있으나 수확근중 이병근은 거의 없었으며 B4228 처리는 Table 1-16에서와 같이 생존주수를 유의성(10%수준)있게 21% 증가시켰다. B4228 처리는 5%수준에서 무처리구 보다 35%의 수량증가를 가져왔다(Fig. 1-8). B4228의 효과는 근부균들을 억제하여 결주를 감소시키는 것으로 해석된다.

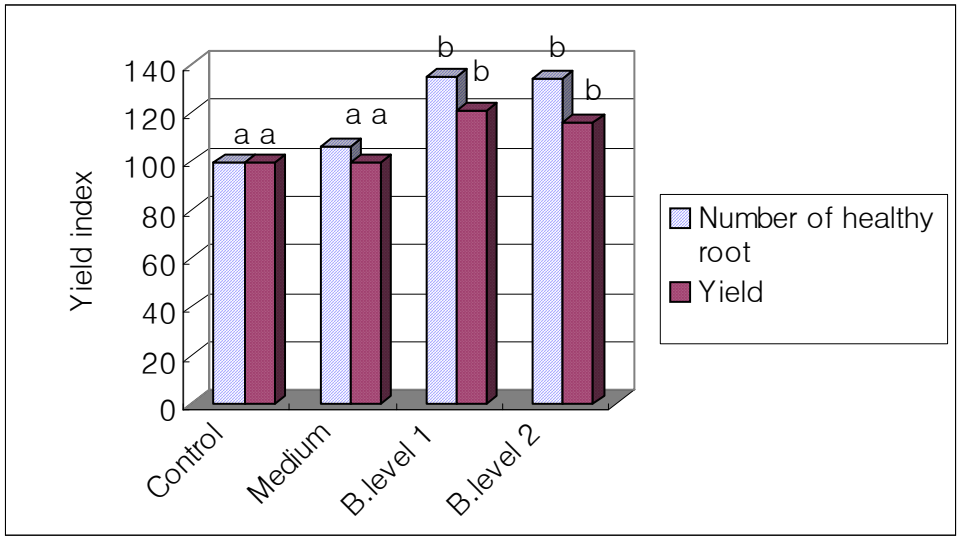


Fig. 1-8. Effect of B4228 on number and yield of 3 year ginseng.
Means followed by the same letter are not different significantly as determined by Duncan's multiple range tests(Number of healthy root : p=0.1, yield : p=0.05)

Table 1-16. Effect of *B. subtilis* B4228 on number of harvest root(root/3.3㎡).

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Mean	DMRT (P=0.1)
Control	50	45	36	44	a
Medium	45	41	45	44	a
Level 1	53	53	53	53	b
Level 2	45	54	53	51	b
LSD				6.79	

라) 직파 3년근에서의 B4228 하야미 1호 관주시험(안성 일죽면 고목동)

사양토에 직파 한 것으로 3년차에서 3회의 관주를 하였다. 건전삼 수량과 병삼 수량은 Table 1-17과 같다.

Table 1-17. Drenching effect of *B. subtilis* B4228 on root yield of 3 year ginseng(g/3.3㎡).

	Ⅰ		Ⅱ		Ⅲ		Mean			
	H	D	H	D	H	D	H	D	DMRT (0.01)	Sum
Control	365	84	500	204	429	82	431	123	a	554
Pesticide	492	109	520	157	124	435	482	130	a	612
Medium	529	133	519	230	503	134	517	166	a	683
B4228	442	0	557	109	499	60	499	56	b	555
LSD									72.9	

H : healthy root, D : diseased root

B4228의 관주는 무처리구 보다는 높은 건전삼 수량을 보이나 무균구나 관행구 즉 관행농약처리구와는 큰 차이가 없으며 무처리를 포함하여 처리간 차이는 유의성이 없다. 그러나 이병근수량은 다른 처리와 유사한데 B4228처리구만 약 1/2로 1%수준의 유의성을 보였다(Table 1-17의 DMRT). 직파포장에서 B4228의 관주가 건전근수, 이병근수 그리고 결근수에 미친 영향은 Table 1-18과 같다.

Table 1-18. Drenching effect of *B. subtilis* B4228 on number of healthy diseased and missing root(root/3.3㎡).

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			Mean			
	H	D	M	H	D	M	H	D	M	H	D	DMRT (0.01)	M
Control	50	10	20	45	20	15	55	15	10	50	15a	a	15
Pesticide	50	10	20	70	10	0	44	13	23	55	11a	a	14
Medium	60	10	10	60	20	0	45	15	20	55	15a	a	10
B4228	65	0	15	65	10	5	65	5	10	65	5b	b	10
LSD												5.24	

H : healthy, D : diseased, M : missing

건전근수에서 B4228 처리가 가장 많으며 3반복간 변이가 없어 안정하다는 것을 나타내고 있으나 처리간 유의차가 없다. 이병근수는 B4228 처리구에서 가장 적고 기타처리는 B4228 처리구의 2배 또는 3배로서 B4228의 이병근수 차이는 1%수준에서 유의성을 갖는다. 3년차 초부터 관주한 것으로 이 결과는 당년의 뿌리썩음 이병주를 줄이고 뿌리썩음 진행을 억제하는 등 현저히 억제하고 있었음을 나타내는 것이다. 해가 경과하면 건전근수량이 현저히 증가할 것으로 보인다. 관행농약 재배구보다도 현저히 감소했다는 것은 지금 사용하는 농약이 이식 후에 뿌리썩음을 막는 약은 없기 때문이다.

마) *Bacillus subtilis* B4228의 유기물제제 포장시험

(1) 식양토(안성 일죽면 가리)포장에서 peat moss 제제시험

산도를 조정한 peat moss에 B4228을 배양(10^8cfu/g)하여 이식직전에 상토에 칸당 30ℓ씩 혼합하고 3년차에서 수량을 조사한 결과는 Table 1-19와 같다.

Table 1-19. Effect of peat+B4228 on yield of 3 year ginseng(g/3.3㎡)

	Ⅰ		Ⅱ		Ⅲ		Mean	
	H	D	H	D	H	D	H	D
Control	831	171	402	107	906	207	713	162
Medium	576	62	580	311	570	414	575	262
B. level 1	543	198	393	349	630	28	523	192
B. level 2	525	145	558	74	968	110	684	110

H : healthy, D : diseased

수량이 처리간 차이가 없다. 이는 구별 건전수량이나 이병수량에 있어 모든 처리에서 구별변이가 너무 크다.

7월 28일에 조사한 지상부 생주율에 있어서도(Table 1-20) 처리내에서 변이폭이 크고 따라서 처리간 뚜렷한 차이가 없었다.

Table 1-20. Effect of peat+B4228 on ginseng stand (plant/3.3㎡, July. 28).

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Mean
Control	54	49	66	56
Medium	54	47	74	58
B. level 1	65	53	65	61
B. level 2	49	49	68	55

수확시의 건전근수, 이병근수와 결주수에서도(Table 1-21) 처리간 뚜렷한 차이를 보이지 아니한다.

Table 1-21. Effect of peat+B4228 on number of healthy diseased and missing root of 3 year ginseng at harvest.

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			Mean		
	H	D	M	H	D	M	H	D	M	H	D	M
Control	42	12	27	27	9	45	63	15	3	44	12	25
Medium	48	6	27	36	21	24	57	24	0	47	17	17
B. level 1	42	9	30	36	27	18	60	3	18	46	13	22
B. level 2	33	12	36	42	6	33	63	6	12	46	8	27

H : healthy, D : diseased, M : missing

(2) 사양토(안성 일죽면 산북리)에서 peat moss제제 시험

3년근 수량조사시의 건전근수량, 적피, 이병근 수량을 보면(Table 1-22) 처리내 변이가 심하여 처리간 유의성이 없다.

Table 1-22. Effect of peat+B4228 on yield of 3 year ginseng(g/3.3㎡).

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			Mean		
	H	R	D	H	R	D	H	R	D	H	R	D
Control	218	149	28	315	269	0	568	0	3	367	139	10
Medium	395	164	0	559	39	0	535	76	0	496	92	12
B. level 1	424	158	0	435	178	0	400	124	0	420	153	0
B. level 2	422	304	0	427	262	0	342	46	12	397	204	4

H : healthy, R : red skin, D : diseased

수확시 건전, 황병 및 근부균의 근수에서도 처리간 일정한 경향이 없다(Table 1-23). 7월 28일자 지상부 생존주수에 있어서도(Table 1-24) 처리간 차이가 없었다.

Table 1-23. Effect of peat+B4228 on number of healthy, red skin or diseased root in sady loam soil.

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			Mean		
	H	R	D	H	R	D	H	R	D	H	R	D
Control	33	19	3	25	33	0	61	0	3	40	17	2
Medium	39	17	0	55	11	0	50	14	0	48	14	0
B. level 1	44	19	0	36	30	0	39	14	0	40	21	0
B. level 2	50	17	0	44	22	0	52	3	6	49	14	2

H : healthy, R : red skin, D : diseased

Table 1-24. Effect of peat+B4228 on ginseng stand in sandy loam soil(plant/3.3 ㎡).

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Mean
Control	54	36	78	56
Medium	54	57	81	64
B. level 1	63	48	81	64
B. level 2	66	69	81	72

(3) 사양토(안성 일죽면 산북리)에서 coir제제 포장시험

토양인산이 부족한 편이고 염류가 약간 높은 편이다(Table 1-13). coir는 야자 과피를 부숙시키고 남은 섬유를 집적하여 우수로 염류를 씻겨내린 것으로 일반 원예용으로 수입이 많이 되고 있다. 여기에 B4228을 접종시켜 칸당 30ℓ씩 이식전 상토에 혼합하였다.

비둘기에 의한 피해가 심한 1반복을 삭제하였다. 3년근에서 건전삼 및 이병삼의 수량 평균치는 B-4228처리가 높으나(Table 1-25) 유의성은 없었다. 수확시의 건전근수와 이병근수에서도 처리간 차이가 없었으며 7월 28일에 조사한 생존주수도 처리간

차이가 없다(표생략).

식양토에 누수차광망 해가림으로 수분과다의 피해가 주원인이다. 구간 큰 차이는 peat가 이식직전에 수작업으로 처리하게 되므로 상토와 고루 섞이지 못한 때문이라고 볼 수 있다. 작반전 경운시 로타리로 고루 섞일 수 있게 하여야 할 것이다. 칸당 30ℓ는 유기물자체의 근권 토양물리성 개선효과도 기대했던 것이다.

Table 1-25. Effect of coir+B4228 on yield of 3year ginseng in sandy loam soil(g/3.3㎡).

	Ⅰ		Ⅱ		Mean	
	H	D	H	D	H	D
Control	504	10	469	79	487	45
Medium	505	23	404	48	455	36
B. level 1	458	56	532	161	495	109
B. level 2	606	51	484	38	545	45

H : healthy, D : diseased

나. *Burkholderia cepacia* AB100의 포장시험

1) 식양토에서 AB100 액제의 포장시험(안성 일죽면 기좌리)

이식묘삼에 AB100액제를 침지하고 2년간 생육한 3년근에서 조사하였다. 3년근 수량은 Table 1-26과 같다. AB100처리의 수량 증대효과는 무처리구와 무균구에 비하여 5%수준에서 유의성있게 증가하였다. AB100의 기본량과 2배량 간에는 유의차가 없었다.

Table 1-26. Effect of AB100 on yield of 3 year ginseng(g/3.3㎡).

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Mean	DMRT (p=0.05)
Control	681	822	739	747	a
Medium	883	794	687	788	ab
AB. level 1	909	1030	1028	989	c
AB. level 2	994	1050	815	953	b
LSD				175	

수확시 건전근수(Table 1-27) 분산분석결과 10%수준에서는 AB100의 기준량과 배량이 무처리구와 무균구간에 차이가 있고 5%수준에서는 기준량 처리구 근수만 무처리구나 무균구 근수와 차이가 있었다.

Table 1-27. Effect of AB100 on number healthy root of 3 year ginseng(root/3.3 ㎡).

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Mean	DMRT	
					p=0.1	p=0.05
Control	50	45	36	44	a	a
Medium	45	41	45	44	a	a
AB. level 1	54	53	53	53	b	b
AB. level 2	53	50	50	51	b	ab
LSD					5.83	7.23

AB100처리가 근수량이 control 보다 32%나 증대시키는 것은(Fig. 1-9) 근부병을 막아서 21%의 건전수확근수를 증대시킨(Fig. 1-9) 때문이라고 볼 수 있다.

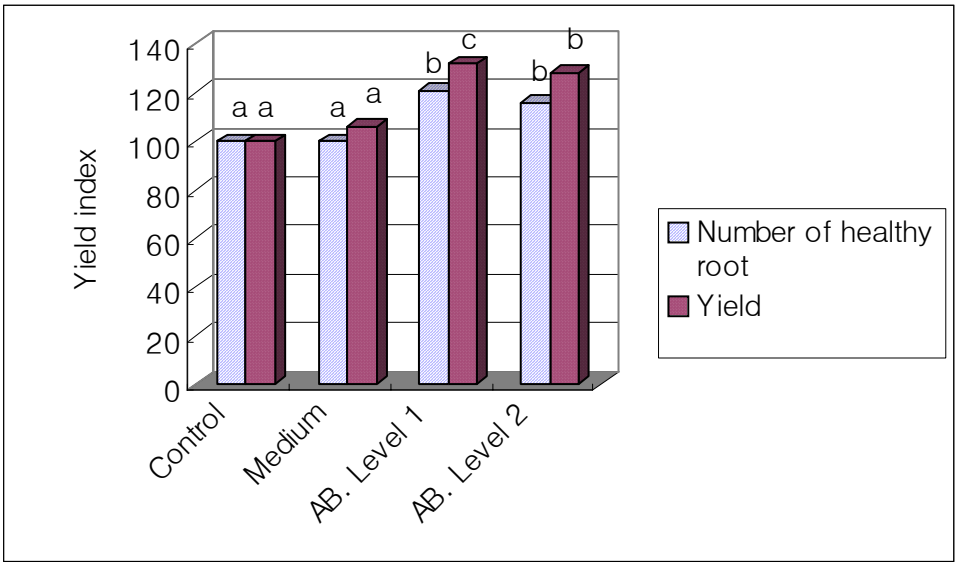


Fig. 1-9. Effect of AB100 on yield and number of healthy root of 3 year ginseng.

이 포장의 무처리 수량이 상당히 높은 고수량포 임에도 미생물제 효과가 큰 것은 뿌리의 생육속도가 커서 이병정도를 조금만 줄여도 생산량 증대효과가 크기 때문일 것이다. 미생물제제는 토양이 좋은 조건일수록 더 효과가 클 것은 당연한 논리이다.

2) 직파 3년근에 대한 관주효과 포장시험(안성 일죽면 고목동)

고목동 토양은 인산함량이 적정선에 있고 특별한 문제점이 없다(Table 1-13). 사양토인 직파 3년근에 대한 당년 3회의 AB100액제 관주처리가 수량에 있어서의 효과는 Table 1-28과 같다.

Table 1-28. Effect of AB100 on yield of 3 year direct sowing ginseng(g/3.3㎡).

	Ⅰ		Ⅱ		Ⅲ		Mean			
	H	D	H	D	H	D	H	DMRT (0.05)	D	DMRT (0.05)
Control	365	84	500	204	429	82	431	b	123	ab
Pesticide	492	109	520	157	124	435	482	b	130	b
Medium	529	133	519	230	503	134	517	b	166	b
AB100	556	62	694	32	606	53	619	a	49	a
LSD							101		75.8	

H : healthy, D : diseased

AB100 처리구에서 수량이 가장 높으며 5%수준에서 유의성이 있다(LSD 100.9). 무처리구, 관행농약처리구와 무균구의 수량 간에는 수량에 유의성이 없다. 이병근수량에 있어서도 AB100처리구가 가장 적으며 5%수준에서 대조구를 제외한 처리와 차이가 있고(LSD 75.8) 기타 처리 간에는 차이가 없다.

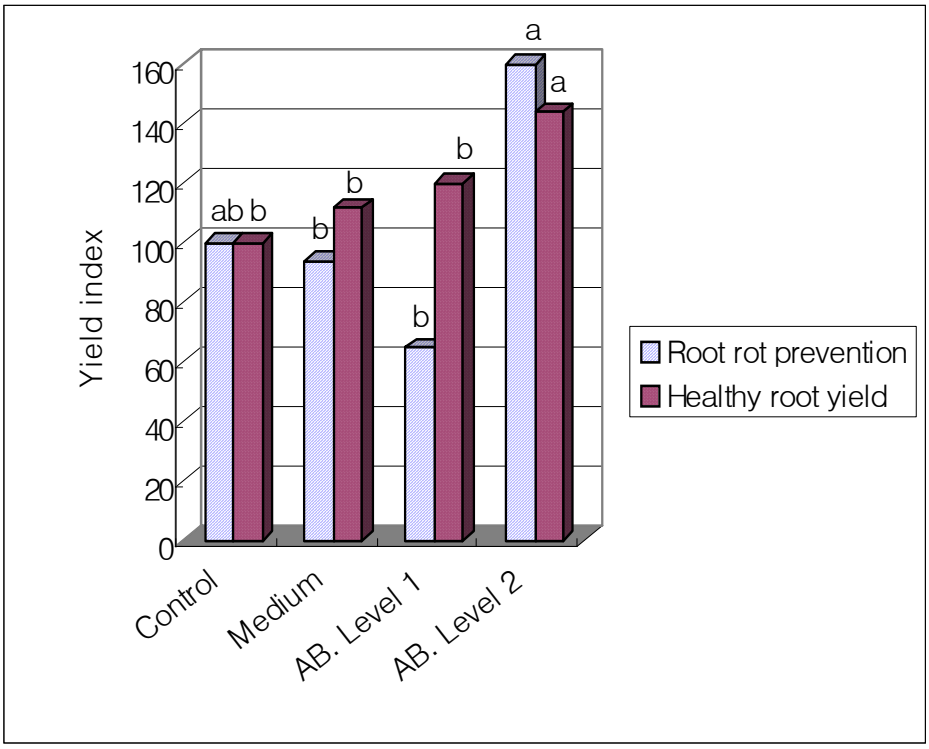


Fig. 1-10. Effect of AB100 on root rot prevention and healthy root yield.

AB100처리는 무처리구에 비해 44%의 건전근 수량증대를 가져왔으며 160%의 근부방지효과에 기인한다(Fig. 1-10). AB100의 관주단용이 농약관행구보다도 28%가 증수되었음은 특히 주의를 두어야 할 결과이다.

수확시 건전근수와 이병근수를 처리별로 보면(Table 1-29) 건전근수가 AB100처리에서는 반복간 변이가 다른 처리구에 비하여 적고 최고의 평균치를 보였다. 그러나 다른 처리들에서 변이가 너무 커서 건전근수는 처리간 유의성이 없다. 결주수에 있어서도 그러하다. 이병근수도 AB100처리구에서 가장 적고 분산분석결과, 5%수준에서 차이가 인정된다. 즉 무처리, 농약관행, 무균구간에는 차이가 있으나 AB100처리는 이들보다 유의성있게 적다. AB100 관주처리는 이병근수량을 줄여서 건전근수량을 높이고 있다. 일반적으로 직파재배는 이식을 하지 않기 때문에 이식삼보다도 이병율이 낮은 것으로 보고 있다. 그러나 토양의 병균밀도가 크거나 병원균증식속도가 클수 있는 조건이라면 숙주가 일년간 더 있게 되므로 고년근에 가서 이병율이 더 커질 수도 있다.

Table 1-29. Effect of AB100 drenching on number of healthy root of 3 year direct sowing ginseng(plant/3.3㎡).

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			Mean			
	H	D	M	H	D	M	H	D	M	H	D	DMRT (0.05)	M
Control	50	10	20	45	20	15	55	15	10	50	15	a	15
Pesticide	50	10	20	70	10	0	44	13	23	55	11	a	14
Medium	60	10	10	60	20	0	45	15	20	55	15	a	10
AB100	55	0	20	60	5	15	65	5	10	60	5	b	15
LSD											6.79		

H : healthy, D : diseased, M : missing

직파포장에서 뿌리상처가 적어서 이병기회가 적은 것이 이점이라면 이는 고수량포와 같이 병원균억제가 수량에 미치는 효과가 클 것이다. 관행 농약처리구에서 이병근주가 무처리구나 무균구에 비하여 적지만 유의성이 없는 점은 농약의 효과가 근부병 방지에 기여하지 못하는 것임을 알 수 있다. 또한 관행농약처리구가 건전근수량에 있어서 무처리, 무균구와 차이가 없는 것은 근부병에 의하여 수량이 가장 크게 영향 받고 있음을 나타내는 것이다.

3) AB100의 유기물제제 효과 포장 시험

가) 식양토에서 AB100 peat제제 시험(안성 일죽면 가리)

AB100을 pH만 조정된 peat moss에 10^8cfu/g으로 배양한 것을 이식직전에 상토에 칸당 30ℓ를 수작업으로 혼합하였다. 2년의 생장기간후인 3년근차에서 근수량을 조사한 것은 Table 1-30과 같다.

Table 1-30. Effect of peat+AB100 on yield of 3 year ginseng(g/3.3㎡).

	Ⅰ		Ⅱ		Ⅲ		Mean	
	H	D	H	D	H	D	H	D
Control	831	171	402	107	906	207	713	162
Medium	576	62	580	311	570	414	575	262
AB. level 1	971	44	650	92	942	51	854	62
AB. level 2	771	174	636	339	990	94	799	202

H : healthy, D : diseased

평균수량은 AB100 기준량구가 제일 높고 다음이 배량처리구이나 유의성이 없었다. 처리내에서 반복간 수량변이가 크기 때문이다. AB100+peat 처리가 3년근 수확시 건전근수, 이병근수 및 결주에 미치는 영향은 Table 1-31과 같다.

Table 1-31. Effect of peat+AB100 on number of healthy root of 3 year ginseng.

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			Mean			
	H	D	M	H	D	M	H	D	M	H	DMRT (0.01)	D	M
Control	42	12	27	27	9	45	63	15	3	44	a	12	25
Medium	48	6	27	36	21	24	57	24	0	47	ab	17	17
AB. level 1	60	3	18	42	6	33	75	6	0	59	c	5	17
AB. level 2	54	12	15	45	24	12	72	9	0	57	bc	15	9
LSD										11.4			

H : healthy, D : diseased, M : missing

수확근수(건전근수+이병근수)는 처리간 유의차가 없었다. 그러나 건전근수는 AB100 처리구가 무처리구나 무균구보다 높았으며 이 차이는 1%수준(LSD 11.42)에서 유의성이 있다. AB100 기준량구는 무처리구보다 34%의 건전근수를 증가시키고 배량구는 30%를 증가시켰다(Fig. 1-11).

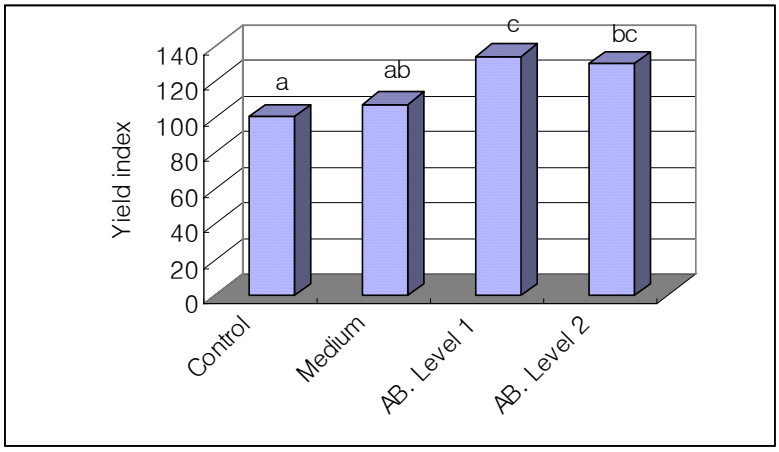


Fig. 1-11. Effect of peat+AB100 on number of healthy root of 3 year ginseng.

건전근수를 증대시켰다는 것은 반대로 이병근과 결주를 합한 즉 수확할 수가 없거나 가치가 없는 근수를 감소시켰다는 것을 말한다. 이병근수는 처리간 유의성이 없으므로 이병근+결주의 합에만 유의성이 있으며 이는 이 포장에서 결주의 주요원인이 뿌리썩음으로 진행되고 있음을 의미한다. AB100 처리는 뿌리썩음을 확실히 방제하지만 수량에서 처리간 유의성이 없다는 것은 이 포장의 각 뿌리의 생육이 불균일하여 수확뿌리수와 수량이 일치하지 않는다는 것을 의미한다. 이 토양본래의 토양 불균질도 있겠으나 peat의 혼합이 불균일하여 이에서 오는 이유도 있을 수 있다. 무처리구와 무균구사이에 유의성은 없지만 무균구 즉 peat만의 효과차이가 7%이므로 AB100의 건전근증대 효과는 27%로 볼 수 있다. 사양토에서 AB100+coir제제의 포장시험을 수행하였으나 비둘기피해로 결과를 정확히 얻지 못하였다. AB100은 근부병방제 효과가 있으며 근권개선유기물제는 작반전에 기계로 혼합하여 균질도를 높임에 따라 AB100의 효과가 제고될 것으로 보인다.

다. 유도저항성 *Bacillus* spp. B1141+B1142 혼합제제의 포장시험

1) 식양토에서 혼합액제의 관주시험(안성 일죽면 화봉리)

혼합균액제의 3년차 1회 관주에 의한 수량조사결과는 Table 1-32와 같다.

Table 1-32. Drenching effect of B1141+B1142 on yield of 3 year ginseng.

	I		II		III		Mean				
	H	D	H	D	H	D	H	DMRT (0.1)	D	Sum	DMRT (0.01)
Control	359	87	248	77	289	156	299	a	106	405	a
Medium	306	73	221	201	307	162	278	ab	145	423	ab
B. mix level 1	347	190	433	44	323	168	368	bc	134	502	bc
B. mix level 2	368	184	450	82	364	145	394	c	137	531	c
LSD							80.7			82.5	

H : healthy, D : diseased

건전근수량이나 총수량이 모두 무처리구나 무균구보다 혼합제제처리에서 높았고 건전근수량은 10%수준에서 총수량은 1%수준에서 유의성을 보였다. 이 포장은 근부병이 심한 포장이어서 처리내에 근부근수의 변이가 심하다(Table 1-32). 본 혼합액제는 3년차 당년에 처리하였으므로 이병근수는 이미 2년근차의 영향이 더 클 것이다. 따라서 3년차 당년의 관주처리 효과는 이미 병든 뿌리의 속도를 늦추어 결주를 줄이는 효과가 클 것으로 보인다. 그렇기 때문에 건전근수량 보다는 총수량에 더 높은 효과를 보이는 것이다(Table 1-32).

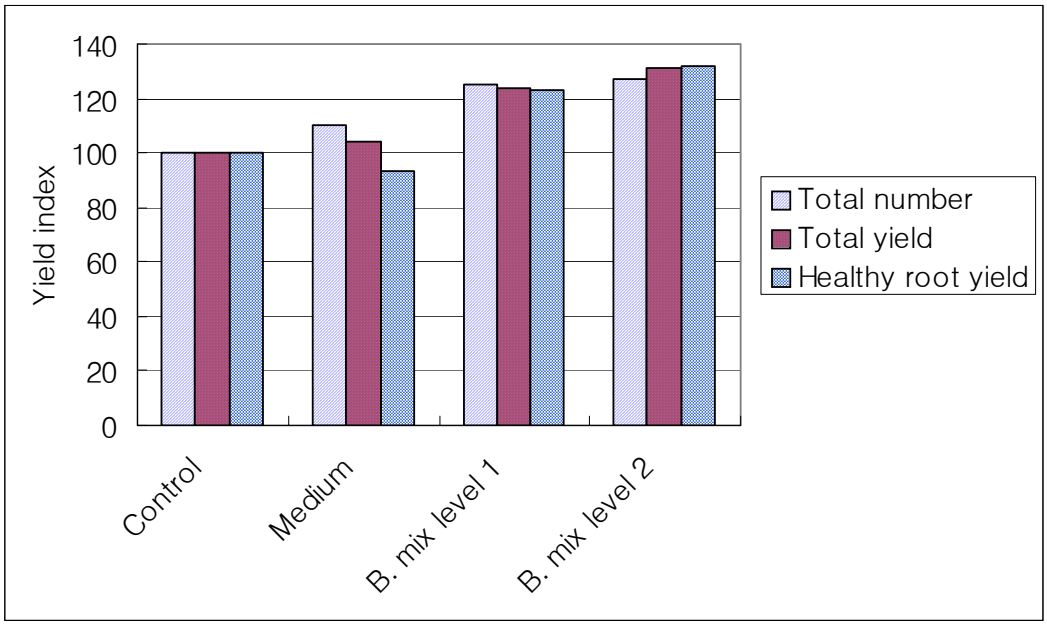


Fig. 1-12. Drenching effect of B1141+B1142 on number of harvested root, total root yield and healthy root yield of 3 year ginseng.

근수에 미치는 효과에 있어서도 건전근수가 혼합제 처리구가 높지만 유의성이 없고 총 수확근수에서 1%수준에서 유의성이 있는 것은(Table 1-32) 근부균들의 근부진행을 억제하는 효과를 뚜렷이 나타내는 것이다. 건전한 뿌리를 건전하게 지키는 효과가 물론 있겠지만 수확된 총 근수에 유의성이 있다는 것은 결주의 억제에 동등한 효과를 보인다는 것과 같기 때문이다. 혼합균제제의 기준량이 1회관주임에도 총 수확근수에서 처리구보다 25% 증가를 가져왔으며(Fig. 1-12) 총 수량 24% , 건전근 수량은 23%가 증가되었다는 것은 유도저항성이기 때문일 수 있다. 특히 길항미생물제제에서 배량구가 기준량보다 약간 효과가 떨어지는 경향이었는데 본 혼합 미생물제는 배량구에서 모두 기준량구보다 높은 효과를 보이는 것은 유도저항성(ISR)의 특성 때문이라고 볼 수 있다. 병이 비교적 심한 포장임에도 효과가 좋은 것 또한 유도저항효과 때

문이라고 볼 수 있다.

Table 1-33. Drenching effect of B1141+B1142 on number of harvested root of 3 year ginseng(root/3.3㎡).

	Ⅰ		Ⅱ		Ⅲ		mean			
	H	D	H	D	H	D	H	D	Sum	DMRT (0.01)
Control	41	9	36	9	32	18	36	12	48	a
Medium	36	9	32	23	36	23	35	18	53	a
B. mix level 1	36	23	59	4	39	18	45	15	60	b
B. mix level 2	45	18	54	9	45	13	48	13	61	b
LSD									6.52	

H : healthy, D : diseased

이 포장은 병이 심한 편인데 토양산도가 6.8로 너무 높고 Ca도 너무 높은 것과 관련되는 것 같다. 인산함량은 적은편이다(Table 1-14).

2) 직파 포장에서의 B1141+B1142 혼합액제의 포장시험

사양토 직파 3년근포장(안성 일죽면 고목동)에서 3년차 당년에 혼합균액제를 3회 관주하였다. 건전삼과 이병삼의 수량은 Table 1-34와 같다.

Table 1-34. Drenching effect of B1141+B1142 on yield of direct sowing 3 year ginseng(g/3.3㎡).

	Ⅰ		Ⅱ		Ⅲ		Mean				
	H	D	H	D	H	D	H	DMRT (0.05)	D	DMRT (0.05)	Sum
Control	365	84	500	204	429	82	431	a	123	a	554
Pesticide	492	109	520	157	435	124	482	a	130	a	612
Medium	529	133	519	230	503	134	517	a	166	a	683
B. mix level 1	551	0	666	29	590	26	602	b	18	b	620
B. mix level 2	513	44	676	0	644	48	611	b	31	b	642
LSD							83.8		79.3		

H : healthy, D : diseased

건전근수량은 혼합미생물제의 기준량처리구가 무처리구나 무균구보다 높았으며 5%수준에서 무처리와 무균구는 기준량과 배량구와 차이가 있다. 무처리와 기준량구간에는 1%수준에서도 차이가 인정된다. 이병근수량도 5%수준에서 무처리와 무균구는 기준량과 배량구와 차이가 있고 무균구와 기준량사이는 1%수준에서도 차이가 있다(Table 1-34). 관행구 즉 현행 농약처리구(Pesticide)는 무처리구와 무균구사이에 위치하여 농약을 주지 않은 혼합미생물제 처리에 따라오지 못하고 있다. 총 수량에서 처리간 유의성이 없고 혼합미생물제의 관주처리가 무처리구 보다 40%의 건전근수량을 증대시킨 것은 무처리에 비해 75~85%의 이병근수량을 감소시킨 데서 온 것으로 해석된다(Fig. 1-13).

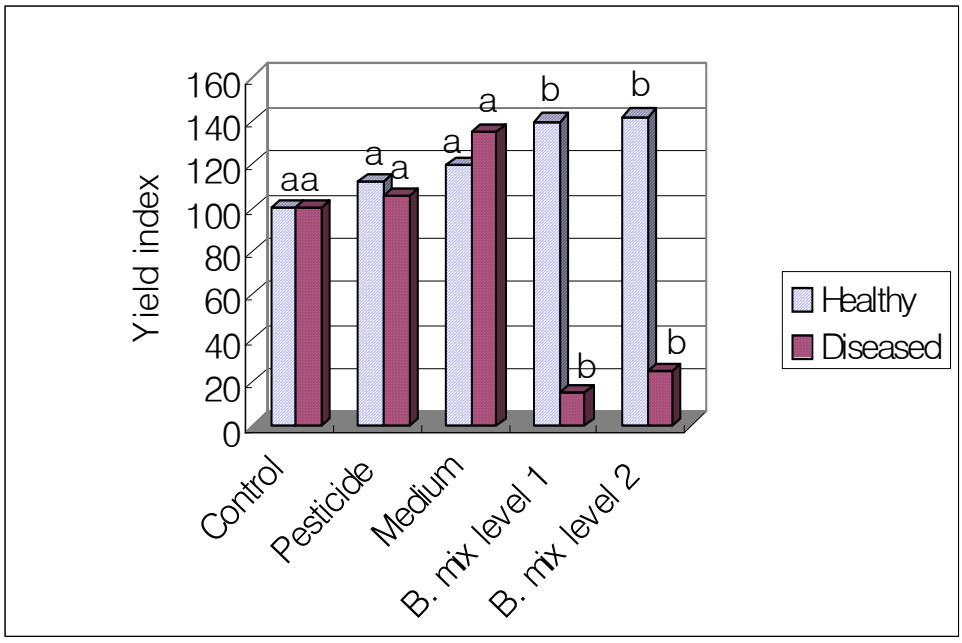


Fig. 1-13. Drenching effect of ISR B. mix42 on yield of healthy and diseased root of 3 year ginseng with direct sowing.

이병근은 이병의 정도에 관계없이 이병된 뿌리는 이병근으로 분류되므로 이병근수량을 감소시켰다는 것은 3년차 당년에 진행되는 이병주의 수를 감소시켰다는 것을 의미한다.

수확시의 건전근수와 이병근수를 보면(Table 1-35) 혼합균제처리에서 무처리나 무균구 보다 월등히 높고 건전근수가 무처리나 무균구 보다 혼합 미생물제처리구에서 높고 5%수준에서 유의성을 갖는다.

Table 1-35. Drenching effect of ISR-B mix 42 on number of 3 year ginseng with direct sowing(root/3.3㎡).

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			mean					
	H	D	M	H	D	M	H	D	M	H	DMRT (0.05)	D	DMRT (0.05)	M	DMRT (0.10)
Control	50	10	20	45	20	15	55	15	10	50	a	15	a	15	a
Pesticide	50	10	20	70	10	0	44	13	23	55	a	11	b	14	a
Medium	60	10	10	60	20	0	45	15	20	55	a	15	a	10	ab
B. mix level 1	75	0	5	75	5	0	70	5	5	72	b	3	b	5	b
B. mix level 2	70	5	5	80	0	0	65	5	10	74	b	3	b	3	b
LSD										13.7		8.25		8.27	

H : healthy, D : diseased, M : missing

건전근수가 무처리나 무균구보다 혼합미생물제 처리구에서 높고 5%수준에서 유의성을 보였다. 이병근수에서는 무처리나 무균구 보다 적고 5%수준에서 유의성을 갖는다. 이 두 사실은 이병근수를 저하시키기 때문에 건전근수가 증가된 것으로 3년근 당년에 이병될 근을 이병이 안 되도록 했음을 알 수 있다. 총 수확근수는 물론 미생물처리구에서 높지만 무처리나 무균구와 유의성은 없었다. 그러나 식부주수에서 수확근수를 뺀 결주수에는 낮은 수준(10%수준)에서 유의성을 보였다. 미생물제가 이미 이병된 근부를 지연시켜서 결주율을 감소시키는 효과도 있었음을 알 수 있다. 이 포장은 전반적으로 3년근포 로서는 결주가 적은 편인데 직파포장이기 때문인 것 같다. 직파포장은 이식에 의한 상처노출이 없으므로 적피는 물론 이병율도 적은 것으로 알려져 있다. 특히 미생물제 처리구의 적은 이병근수와 결주율은 이 포장에서는 3년차에 심하게 병이 시작되는 것으로 보이며 이것이 직파포장의 보편적 경향인지는 더 조사해 봐야 할 것이다. 혼합 미생물제 시용이 무처리구에 비하여 건전근수에서 46%증가되고 이병근수를 무처리구의 22%수준으로 감소시킨 것은(Fig. 1-14) 유도저항성이기 때문에 이와 같은 큰 효과를 나타낸 것으로 보인다.

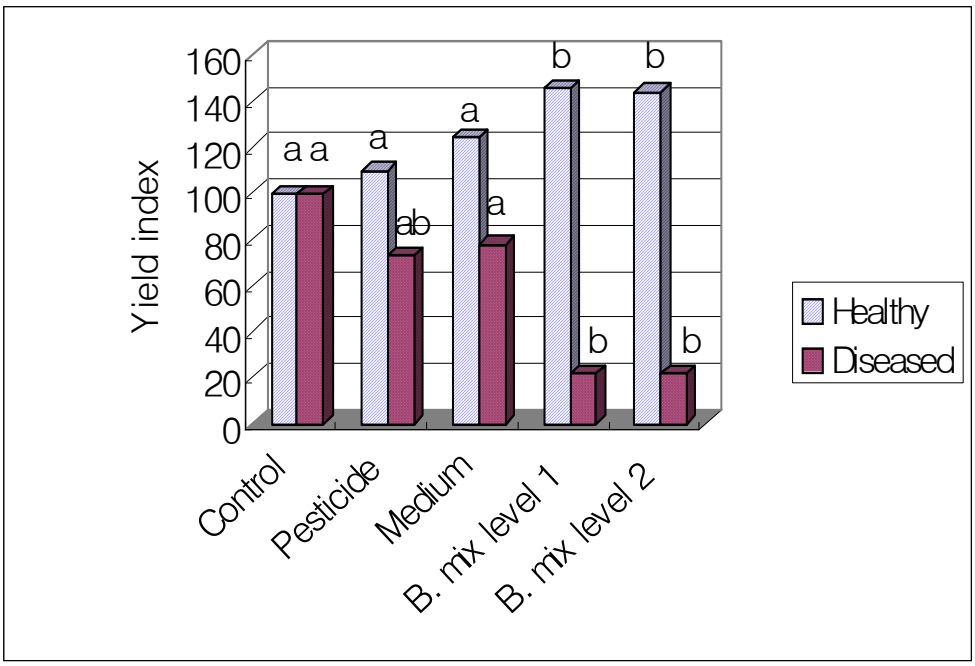


Fig. 1-14. Drenching effect on number of healthy and diseased root of 3 year ginseng with direct sowing.

이상의 결과로 공시 혼합 길항미생물제를 해마다 시용하여 관주횟수를 늘린다면 누적효과가 있어 예정지관리효과를 최대로 발휘할 수 있게 할 것이다. 농약관행구보다도 혼합 미생물제가 건전주수를 증가시키고 근부근수를 줄여 건전근수량을 높이고 있다는 점은 청정 인삼재배에 본 혼합 미생물제가 크게 기여 할 것으로 기대된다.

라. 묘포시험

반양직 묘포에서 *B. subtilis* B4228의 종자침지처리가 대부분의 포장에서 완전실패하였으나 리조렉스 처리 관행구의 80%효과를 보이는 포장(안성시 신소현동 2003년 5월)도 있었다(자료생략). 시험초기에 길항균을 배양하기 위해 사용한 TSB(Triptic soy broth)의 토양잔류가 인삼의 유묘 생육에 좋지 않게 작용한 것으로 생각된다. 따라서 본 실험의 수행을 통해 적정배지로 MA배지를 선발하였고 인삼의 유묘에 해가 되지 않는 것을 확인하였다. 이를 사용하여 묘포시험을 1개 포장 처리(2004년 11월 일죽면)한 상태이며 2005년 4월 결과를 조사할 예정이다.

마. 대량배양법 및 제제개발

1) 대량배양법

기존에 사용되고 있는 대량배양용 fermenter는 고가의 장비일 뿐만 아니라 공간적 제약을 받는 단점을 가지고 있다. 본 과제의 수행을 통해 이러한 단점을 보완하면서도 유효 배양밀도(10^8cfu/ml)이상으로 배양이 가능한 생산방법을 개발하였다(Fig. 1-15). 본 생산방법을 이용, 상기 개발된 MB배지를 사용하여 공시 유용균의 유효배양밀도까지 대량 배양이 가능하였다. 배양기는 2평(약 6.6m^2)이하의 좁은 공간에서도 설치가 용이하며 최소면적을 이용하여 1회 배양으로 약 360ℓ의 생산이 가능하다.

Fig. 1-15. Picture of mass culture system of microbes.

가) 액제

공시 유용균 *B. subtilis* B4228, *B. cepacia* AB100, *Bacillus* spp. B1141, B1142를 MB배지에 액체배양 후 장기 저장시 안정성을 조사하기위하여 4℃와 상온상태로 나누어 보존하면서 2주, 4주, 8주, 12주 간격으로 조사하였다(Fig. 1-16). 4℃와 상온보존 모두 8주째까지는 생균밀도가 감소하다가 이후로는 일정한 밀도(10^7cfu/ml)를 유지하는 경향을 보였다. B1142를 제외한 모든 공시 유용균이 상온보다 4℃ 보존시 더 높은 생균밀도를 유지하는 것으로 나타났으나 처리 간의 차이는 경미하였다. 위의 결과로

부터 공시 유용균을 배양 후 장기간 보존시 4℃에 보존하는 것이 균의 활성유지에 유리하며 1, 2개월 이내의 단기 상온보관은 균의 활성유지에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

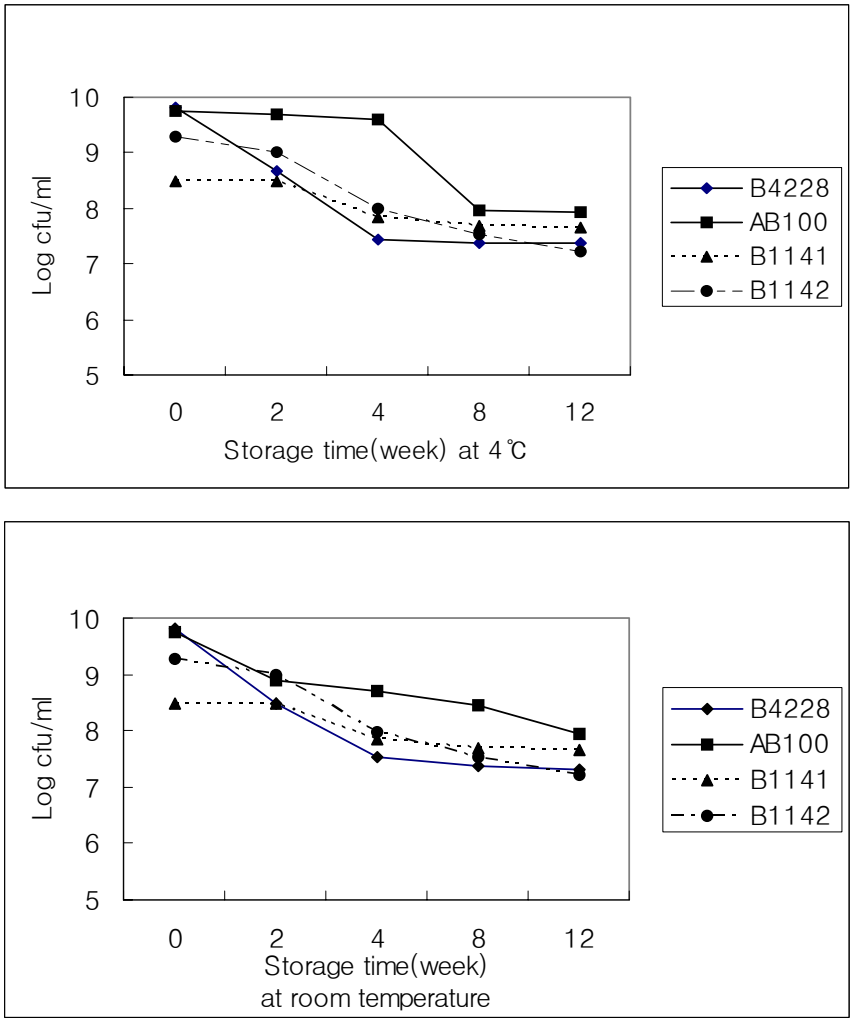


Fig. 1-16. Changes in population densities of *B. subtilis* B4228, *B. cepacia* AB100, *Bacillus* spp. B1141, B1142 at the room temperature and 4℃.

나) 분제

공시 유용균주 *B. subtilis* B4228의 분제 조제 후 4℃에 보관하면서 1개월, 2개월, 5개월 주기로 생균밀도를 조사하였다. Talc제제, Talc+활성탄 혼합제제 2개 처리 모두

5개월 저장기간 동안 최초 밀도(10^9cfu/g)에서 크게 감소하지 않는 경향이었다. 본 실험을 위한 예비실험의 결과에서 활성탄제제가 Talc제제에 비해 생균밀도가 다소 떨어지는 경향이었으나 두 제제의 혼합 조제시 차이가 없는 것으로 나타났다(자료생략).

다) 유기물제제

길항균의 처리효과를 높이기 위해 유기물을 이용한 제제화 실험을 수행하였다. 공시 유용균 *B. subtilis* B4228과 *B. cepacia* AB100을 각각 peat moss와 coir에 배양 후 균밀도를 조사한 결과, 공시 유용균이 peat moss와 coir제제에서 10^7cfu/g이상의 균밀도를 나타냈다. 결과를 통해 공시 유용균주가 peat moss와 coir를 이용한 유기물 제제에 잘 정착하는 것을 확인하였고 본 제제를 토양 혼합처리시 토양물리성 개선과 동시에 공시 유용균주의 처리효과를 극대화할 수 있을 것으로 생각된다.

제 2절 길항균의 인삼 근권정착 기술개발(제1 협동과제)

1. 서설

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 다년생의 반음지 식물로 생육적온은 20℃ 전후로 30℃ 이상에서는 생리장해를 일으켜 금산, 풍기와 경기북부 지역에서 많이 재배되고 있다. 인삼은 한 장소에서 4-6년간 재배되어 연작장해가 발생하여 농가에서는 주로 초작지를 찾아 재배하는 유랑재배에 의존하고 있는 실정이다. 연작장해의 원인으로는 *Cylindrocarpon destructans, Fusarium solani*가 알려져 있고, 특히 *C. destructans*는 연작장해의 원인으로 경제적 큰 피해를 입히는 병원균으로 밝혀졌다. 또한 연작지 이외의 6년생 인삼 재배포장에서 지하부의 평균 결주율은 50% 내외로 결주에 관여하는 주 병원균은 상기의 병원균에 의한 뿌리썩음병뿐만 아니라 *Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea* 등이 관여하기도 한다. 인삼뿌리썩음병(*Alternaria panax, Phytophthora cactorum, Pythium ultimum*)에 의한 지하부 결주는 인삼의 생산성 감소 및 품질 저하의 주 원인이다.

식물의 토양전염성 병해를 방제하기 위한 방법은 크게 화학적 방제, 경종적 방제, 생물적 방제로 구분할 수 있는데 화학적 방제의 경우 재배기간 중 뿌리썩음병을 방제할 수 있는 약제는 개발되어 있지 않고 토양훈증제는 예방차원에서 예정지 관리 시 처리해야 하는 제한이 있고 재배기간 중 토양병원균에 의한 재감염의 문제점도 있다. 경종적 방제로 논재배와 포장관리 방법 개선 등이 알려져 있으나 뿌리썩음병을 방제하기는 미흡한 실정이다. 유용미생물을 이용한 생물적 방제는 일반적으로 화학적 방제에 비해 독성이 없고 생태계에 미치는 영향이 적으며 처리방법에 있어서도 처리시기 및 면적에 대한 제한이 없다는 장점이 있으나 방제 효과면에서 화학적 방제에 비해 떨어지고 처리 토양환경에 따라 효과 변이가 심한 것이 단점이다. 그러나 유기합성 농약사용에 따른 고려인삼의 잔류농약은 수출을 저해하는 최대요인으로 되어있으며 환경오염에 대한 부담 및 농작물의 농약잔류 문제 등이 사회문제로 대두됨에 따라 최근 친환경적 병해방제 방법인 생물적 방제에 관한 관심이 점점 증가하고 있는 추세이다.

생물학적 방제균으로 많이 이용되는 근권에 서식하는 미생물들은 식물의 뿌리에서 분비되는 각종 유기물을 섭취하면서 생존하는데 식물이 직접 흡수할 수 없는 무기물을 식물이 이용 가능하도록 변환시켜주거나 흡수를 도와주는 역할을 하기도 한다. 예를 들면 근권에 서식하는 *Pseudomonas* spp.는 토양 중에 존재하는 인산을 효과적으로 chelating하는 물질(siderophore)을 생성하여 흡착함으로 식물체가 이용할 수 있게 한다. 또한 근권미생물들이 갖는 유익한 기능을 살펴보면 생물적 방제의 주요 기작으

로 알려져 있는 항생물질의 병원균에 대한 항균기작(antibiosis), HCN 생산, 토양 및 식물 뿌리에서 분비되는 영양원에 대한 병원균과의 경쟁(competition), 병원균에 직접 기생(parasitism), 식물의 저항성 증진(induced systemic resistance) 등의 기작을 통해 병원균의 침입 또는 근권에 존재하는 식물생장 저해균(deleterious microorganisms)을 방제하여 식물의 생장을 촉진한다.

최근 길항균을 이용한 토양전염성 병해의 생물적 방제는 미생물을 직접 토양에 처리하여 병을 방제하고자 하는 시도가 주류를 이루어 왔으나, 미생물과 식물체간 상호작용에 관한 이해가 넓어지면서 유용한 미생물을 식물의 근권에 효과적으로 정착시켜 토양 병원균의 침입을 효과적으로 방어함으로 병 발생을 억제하려는 연구가 많이 이루어지고 있다. Kloepper(1992) 등은 선발한 근권균을 종자에 코팅하여 종자가 발아하면서 근권균이 뿌리에 우점할 수 있게 함으로 병 발생을 현저히 감소시켰으며 이와 같은 연구는 최근 근권균의 일종인 *Pseudomonas* sp.의 유전자 중 식물 근권정착에 관련한 유전자가 밝혀짐으로 생물적 방제균의 근권정착능을 증가시키려는 연구는 증가할 것으로 생각된다. 본 연구는 타 작물의 병원균에 대한 방제효과가 인정된 길항균을 이용하여 인삼 뿌리썩음병의 방제뿐만 아니라 뿌리생장촉진을 위한 선발 유용미생물의 처리방법 및 인삼의 근권정착 활성화 기술을 개발코자 수행하였다.

2. 연구수행방법

가. 공시 균주 및 길항균의 특성

1) 길항미생물 및 인삼 병원균

인삼뿌리썩음병 방제를 위한 유용 생물적 방제제를 선발하기 위해 경상대학교로부터 분양받은 *Pseudomonas fluorescens* B16, AB62 및 *Burkholderia cepacia* AB100, *Pseudomonas* sp. AB101과 2002년 본 과제를 수행 중 인삼 및 타작물의 근권으로부터 분리한 *Bacillus*속 세균 106균주를 1차 screening에 공시하였다. 모든 균주들은 Tryptic soy agar(TSA)에 배양 후 초저온냉동고(-80℃)에 보관하면서 사용 시 새로운 TSA배지에 배양하여 사용하였다. 인삼의 병원균인 *Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani* AG2-2, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cactorum*, *Alternaria panax*, *Pythium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* 등은 농업과학기술원 식물병리과에서 보유하고 있는 균주를 사용하였다.

2) 길항균의 생리적 특성조사

길항 미생물의 생리적 특성은 hydrogen cyanide, proteolytic activity, cellulolytic activity, pectinolytic activity, glucanolytic activity, IAA 생산여부를 조사하였으며 hydrogen cyanide는 glycine(4.4 g/ℓ)이 첨가된 TSA에 검정 미생물을 plating하고 picric acid 용액을 적신 filter paper (Whatman No.1 or 2) strip을 petridish 두껑에 붙여 28℃ 배양기에 2-4일간 배양하면서 filter paper의 색깔변화로 HCN 생산여부를 조사하였다. Proteolytic activity는 skimmed milk배지(skimmed milk 100g, yeast extract 1.5g, bacto agar 15g, DW 1ℓ)에 검정균을 접종하여 48시간 후 형성한 clear zone으로 판정하였다. Cellulolytic activity는 Teather and Wood(1982) 방법으로 LB broth에 24시간 배양한 검정균의 현탁액 10ul를 조제한 배지에 점적하여 25℃에서 48시간 배양한 후 congo red(1mg/ml)용액을 추가하고 15분간 배양하여 판정하였다. Pectinolytic activity는 apple pectin이 함유한 배지에 검정균을 배양하여 1% hexadecyl trimethyl ammonium bromide 용액을 plate에 추가하고 10분간 방치한 후 clearing zone을 관찰하였다. IAA 생산여부는 TSA에 5mM l-tryptophan을 첨가하고 nitrocellulose membrane disk를 배지 위에 올려놓고 검정균을 접종 후 28℃에서 3일 배양하여 Salkowski reagent와 반응시켜 생산여부를 판정하였다.

나. 근권정착 확인을 위한 표식인자 작성

경상대학교에서 분양한 *Pseudomonas* sp. 3균주와 *Burkholderia cepacia* 1균주 그리고2002년 1차 screen에서 선발한 *Bacillus* 3종의 근권정착 연구를 위한 표식인자 작성을 위해 2가지의 방법을 사용하였다. 첫째는 TSA배지에 rifampicin을 농도별(50, 100, 150, 200ppm)로 첨가하여 1차 선발 균주에 대하여 내성유도를 하였다. 형성된 내성균주는 생리적 특성을 조사하여 변이 유무를 판정하였다. 또한 해파리로부터 cloning한 green fluorescent protein gene과 cyan fluorescent protein gene, red shift fluorescent protein gene, yellow fluorescent protein gene 등을 1차 선발 균주에 도입하기 위하여 electroporation을 시도하여 변이주를 선발하였다.

다. 인삼 병해 방제용 우수 길항균 선발

1) 종자실험

인삼뿌리썩음병의 생물검정을 위하여 사용한 토양은 수원에 소재한 KT&G소속 원료연구소의 이병포장으로부터 이병토양을 채집하여 2mm 채로 친 후 4℃에 보관하면서 사용하였다. Plastic pot(20×30×20cm, W×L×D)에 멸균한 peat moss를 15cm까지 채운 다음 이병토양 1cm를 덮고 멸균한 peat moss를 20cm까지 채웠다. 생물검정에 공시한 *Pseudomonas* spp.와 *Bacillus* 106균주는 TSA배지에 2일간 배양하여 세균현

탁액(1×10^8cfu/ml)을 조제하고 개갑 처리한 인삼종자를 1시간 세균현탁액에 침지하였다. 침지한 인삼종자는 준비한 pot에 파종하고 멸균수가 든 plastic 용기에 넣어 물을 주었다. 이때 수분이 pot 하단부로부터 토양표면에 도달한 후 인삼종자가 파종된 pot를 꺼내어 실내(약 20℃)에 위치하였는데 물은 일주일마다 같은 방법으로 물주기를 하였다. 인삼종자 파종 30일 후 건전주 및 뿌리생장을 조사하고 1회 이상 재 실험을 수행하여 뿌리썩음병 방제효과가 있는 길항미생물을 1차적으로 선발하였다.

2) 묘삼실험

저온 보관 중이던 이병토양을 peat moss와 혼합(이병토:peat moss, 1:3 w/w)하여 원형 plastic pot(20×20cm)에 담아 준비하였다. 1차 선발한 길항미생물은 TSA배지에서 2일간 배양하여 세균현탁액(1×10^8cfu/ml)을 조제하고 1년생 묘삼을 1시간 동안 세균현탁액에 침지하였다. 침지한 묘삼은 준비된 pot에 10주씩 이식하고 growth room에서 재배하였다. 물주기는 pot 하단으로부터 물이 스며들게 plastic 용기에 물을 채우고 묘삼이 이식된 pot를 담그어 물주기를 하였고 일주일에 한번씩 물주기를 하였다. 출아율과 뿌리썩음병 이병율은 처리 30일 후에 육안으로 조사하였다.

라. 병해억제 기작연구

1) 길항균의 항균활성 검정

Potato dextrose agar(PDA)에서 7일간 자란 인삼병원균의 균사를 7mm cork bore로 mycelium disc를 만들어 새로운 PDA의 한쪽에 올려놓고 반대쪽에 검정하고자하는 길항균의 현탁액(100ul)을 점적하여 건조시킨 후 27℃ 배양하면서 길항균과 병원균 사이에 형성한 clearing zone의 거리를 조사하였다.

2) 역병방제효과

Peat moss가 든 원형의 소형 plastic pot(10×10cm)에 인삼종자를 파종하여 실내에서 2달간 재배한 유묘에 세균현탁액(1×10^8cfu/ml) 5ml를 관주하고 5일 후 인삼역병균(*Phytophthora cactorum*)의 유주포자(3×10^4zoospores/ml)를 분무 접종하였다. 접종한 인삼 유묘는 12시간 정도 습실 처리하여 역병 발생을 유도하였고 역병 처리 10일 후 발병율을 조사하였다.

3) 인삼뿌리의 조직변화

인삼 뿌리썩음병 억제 기작 조사는 위의 묘삼실험과 같이 처리된 인삼뿌리를 채집하여 처리별 뿌리 cell wall에 lignin축적 여부를 조사하였다. 먼저 처리 후 30일된 인삼뿌리를 얇게 잘라 formalin-acetic acid-alchol fixative를 한 다음 ethanol과 tertiary

butyl alcohol로 dehydration을 하고 뿌리조직을 phloroglucinol-hydrochloric acid 용액으로 1분간 염색하여 현미경하에서 뿌리조직에 축적된 lignin을 관찰하였다.

4) 인삼뿌리의 무기성분 흡수

선발 길항균의 bentonite 제형을 묘삼 이식시 분의하여 작물과학원 증평포장(수확 7년 경과지)에 이식하고 약 7개월 후 뿌리가 흡수한 무기성분 N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Na, Zn의 총 함량을 토양 및 식물체분석법(2000, 농업과학기술원)에 따라 분석 조사하였다

마. 선발 길항균의 복합처리 가능 조합선발

1) 길항균의 친화성 조사

인삼 종자 및 묘삼실험 결과 뿌리썩음병 또는 역병 방제효과가 인정된 *Burkholderia cepacia* AB100과 *Bacillus* sp. B1141, B1142의 상호 친화성을 실내에서 조사하였다. 먼저 이들 균주를 TSA배지에 2일간 배양 후 세균현탁액을 조제하여 세균현탁액 1ml를 petri dish에 분주하고 새로운 TSA배지를 15ml 분주하여 잘 혼합하고 배지가 고체화된 후 각각의 세균현탁액 50ul를 배지위에 점적하였다. 각 petri dish의 배지표면에 위치한 세균현탁액이 건조된 후 28℃ 배양기에서 2일간 배양하면서 clear zone 형성 유무를 조사하였다.

2) 길항균의 혼합처리효과 검정

혼합처리 효과 검정은 *Burkholderia cepacia* AB100, B543와 *Bacillus* sp. B1141, B1142, B1146을 사용하였다. 먼저 저온에 보관 중인 인삼 뿌리썩음병 이병토양과 peat moss를 잘 혼합(1:3, w/w)하여 원형 plastic pot(20×20cm)에 담아 이병토양을 준비하였다. 공시한 길항균은 TSA에 2일간 배양하여 세균현탁액(1×10^8cfu/ml)을 조제하여 1년생 묘삼을 현탁액에 침지하고 1시간 정도 방치 후 pot당 묘삼 10뿌리씩을 이식하여 growth room에서 재배하였다. 물주기는 위와 같은 방법으로 일주일에 1회씩 주었고 출아율과 뿌리썩음병 이병율은 처리 30일 후에 육안으로 조사하였다.

바. 배양배지 선발

배양배지 선발을 위한 실험에서는 *Burkholderia cepacia* AB100 균주를 이용하였으며 사용한 배지는 TSA, KB, nutrient agar, soil extract agar로 선발균을 각각의 배지에 20회 이상 계대배양하고 각 균주를 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 각각의 배지에 계대 배양한 medium dependent isolate는 해당배지에 각각 배양하여

세균현탁액을 조제하고 1년생 묘삼을 1시간 동안 침지하였다. 침지한 묘삼은 재작 토양인 농가 포장에 이식하여 재배하였다. 이식 30일 후 출아율은 육안으로 조사하였으며 수확율과 뿌리썩음병 발생율은 이식 약 7개월 후 조사하였으며 근권에 서식하는 세균의 밀도 조사를 위하여 뿌리 gram당 fluorescent pseudomonads는 KB배지를 이용하여, *Bacillus* 는 시료를 80℃에서 10분간 처리 후 1/10 TSA를 이용하여 조사하였다.

사. 선발균의 근권밀도

1) 선발균의 근권 밀도변화

항생제 rifampicin(100ppm)에 내성인 선발 길항균 *Burkholderia cepacia* AB100, *Bacillus* sp. B1141과 B1142의 근권에서의 경시적 밀도변화를 조사하기 위하여 KB배지에서 2일간 자란 AB100과 TSA배지에서 2일간 자란 B1141 및 B1142를 멸균수에 현탁시켜 현탁액 농도를 각각 약 1×10^{9}cfu/ml로 조절하여 1년생 묘삼을 1시간 동안 침지하였다. 침지한 묘삼은 식양토와 peat moss가 혼합(3:1, w/w)된 토양에 이식하고 근권에서의 밀도는 이식시, 10일, 20, 30, 60일 후 뿌리 gram당 처리균의 밀도를 rifampicin이 첨가된 KB 또는 1/10 TSA배지에서 조사하였다.

2) 토성에 따른 근권밀도 변화

토성에 따른 근권밀도 변화는 포장실험을 통하여 조사를 하였으며 1년생 묘삼을 AB100 세균현탁액에 침지하여 사양토 계통인 포천의 한농가 포장과 식양토 계통인 일죽의 한농가 포장에 이식(2003년 4월초)하여 수확시(2003년 10월말) 뿌리 gram당 근권밀도를 조사하였다.

아. 최적 처리방법 확립

1) 2003년 포장실험

초저온냉동고에 보관 중이던 KB-dependent AB100는 KB배지에, B1141 및 B1142 균주는 TSA배지에 2일간 배양하여 본 시험에 사용하였다. KB에 배양한 AB100 균주는 멸균수에 현탁시켜 세균밀도를 1×10^{8}cfu/ml로 조절하고 1년생 묘삼을 이식하기 전 1시간 동안 세균현탁액에 침지 후 재작 토양인 농가 포장(일죽면)에 2003년 4월 4일에 식재하였다. 식재 후 처리구별로 30일 간격으로 새롭게 준비한 세균현탁액을 토양관주 1회, 토양관주 2회, 토양관주 3회로 구분 처리하였다. *Bacillus* sp. B1141과 B1142는 TSA배지에 배양하여 세균현탁액(약 1×10^{8}cfu/ml) 및 Talc와 혼합 건조한 제형(약 1.2×10^{8}cfu/g・talc)을 조제하여 묘삼 이식 전 침지 및 분의 처리하여 2003년 4

월 4일 식재하였다. 입모율은 이식 90일 후에 조사하였으며, 수확율과 뿌리썩음병 이병율, 평균 뿌리무게, 근권 미생물의 밀도는 2003년 10월 29일 수확시 조사하였다.

2) 2004년 포장실험

본 실험은 충북 증평읍에 위치한 작물과학원 인삼 연작포장(인삼 수확 후 7년 경과지)에서 수행하였다. *Burkholderia cepacia* AB100은 전년도 결과에서 나타난 문제점을 보완하여 묘삼 이식시(2004년 4월 12일) 세균현탁액에 묘삼을 침지하고 이식 30일 후 1회만 세균현탁액을 토양 관주하였으며, *Bacillus* sp. B1141의 경우 bentonite와 혼합한 제형을 조제하여 묘삼 이식시 분의 처리하였고 이식 30일 후 B1141을 1회 토양 관주하였다. 수확율과 뿌리썩음병 이병율, 평균 뿌리생장율은 2004년 11월 3일 수확시 조사하였다.

자. 방제효과 증진을 위한 영양원 선발

초저온냉동고에 보관 중이던 KB-dependent AB100을 KB배지에서, B1141은 TSA 배지에 2일간 배양하여 각각의 세균현탁액(약 1×10^9cfu/ml)을 조제하고 각 세균현탁액 40ml에 bentonite 100g을 잘 혼합하고 MgO 2mg와 CaO 4mg, chitin 2g, lactose 2g을 단독 또는 복합처리하고 clean bench에서 overnight하여 건조시켰다. 건조된 각각의 제형은 마쇄 후 사용 전까지 4℃ 냉장고에 보관하였다. 본 실험에 사용한 포장은 인삼 수확 후 7년이 경과한 연작지(작물과학원 증평포장)로 총처리구는 16처리(Table 2-1)로 처리당 3반복(1반복은 1칸, 1.8m^2)으로 2004년 4월 12일 이식하였다. 수확율, 건전율 및 뿌리생장율은 수확시(2004년 11월 3일) 조사하였다.

Table 2-1. Composition of the formulation of selected isolates

Control	*Burkholderia cepacia* AB100	*B. pumilus* B1141
Untreated control	−	−
Bentonite	Yes	Yes
Bentonite+basic ingredient (MgO+CaO)	Yes	Yes
Bentonite+Basic ingredient+chitin	Yes	Yes
Bentonite+Basic ingredient+lactose	Yes	Yes
Bentonite+Basic ingredient+chitin+lactose	Yes	Yes

3. 연구결과 및 고찰

가. 길항균의 생리적 특성

생물적 방제기작으로 알려져 있는 HCN생성 및 각종 효소활성을 조사한 결과 (Table 2-2), *Pseudomonas* sp. AB62균주는 HCN 활성을 강하게 나타내었고 AB100과 AB101균주는 proteinase활성을 강하게 나타내었다. 반면 그람 양성세균인 B1141, B1142 및 B1146은 검정한 모든 활성을 나타내지 않았다.

Table 2-2. Physiological characteristics of antagonistic bacteria used in this study

Reaction	Activity						
	B16*	AB62	AB100	AB101	B1141	B1142	B1146
Hydrogen cyanide	−	+++	−	−	−	−	−
Proteinase	+	+	+++	+++	−	−	−
Cellulase	−	−	−	−	−	−	−
Pectinase	−	−	−	−	−	−	−
Gluconase	−	−	+	+	−	−	−
IAA	+	−	−	+/−	−	−	−

**Isolate: B16; *Pseudomonas fluorescens*, AB62, AB100, AB101; *Pseudomonas* sp., B1141; *Bacillus* sp., B1142; *B. megaterium*, B1146; *B. lentimorbus*.

나. 근권정착 확인을 위한 표식인자 작성

선발한 모든 균주의 근권정착 확인을 위한 표식인자를 삽입하고자 먼저 항생물질 rifampicin에 내성인 변이주를 유도한 결과 rifampicin 100ppm에서 안정적으로 생장하였으며, 변이주들의 생리적 특성을 조사한 결과(Table 2-3) 모균주와 같은 활성을 나타내어 생물활성의 변화는 없는 것으로 판단하였다.

또한 해파리로부터 cloning된 green fluorescent protein 유전자와 변형인 cyan fluorescent protein, yellow fluorescent protein, red shift fluorescent protein 유전자를 이용하여 선발균에 도입한 결과 *Pseudomonas* sp. AB62균주에만 CFP를 도입할 수 있었으나(Fig. 2-1) 1차년도 실험 결과 AB62균주는 뿌리썩음병 방제효과가 인정되

지 않아 본 연구에 활용하지는 않았다. 따라서 본 연구에서는 rifampicin 100ppm에 내성인 *Burkholderia cepacia* AB100과 *Bacillus* sp. B1141 및 B1142를 이용하였다.

Table 2-3. Physiological characteristics of antagonistic bacteria resistant to 100 ppm of rifampicin

Reaction	Activity						
	B16*	AB62	AB100	AB101	B1141	B1142	B1146
Hydrogen cyanide	−	+++	−	−	−	−	−
Proteinase	+	++	+++	+++	−	−	−
Cellulase	−	−	−	−	−	−	−
Pectinase	−	−	−	−	−	−	−
Gluconase	−	−	+	+	−	−	−
IAA	+	−	−	+/−	−	−	−

**Isolate: B16; *Pseudomonas fluorescens*, AB62, AB100, AB101; *Pseudomonas* sp., B1141; *Bacillus* sp., B1142; *B. megaterium*, B1146; *B. lentimorbus*.

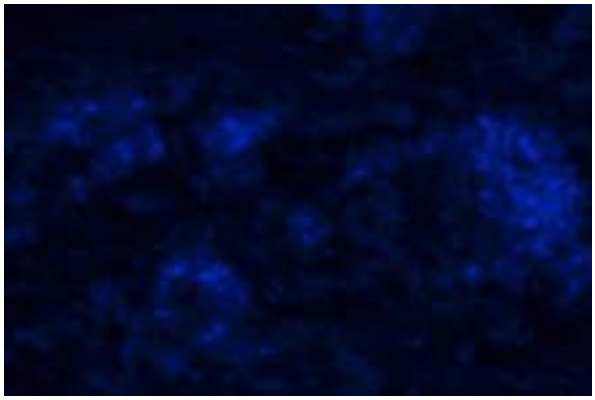


Fig. 2-1. Expression of cyan fluorescent protein gene in *Pseudomonas* sp. isolate AB62 on tryptic soy agar.

다. 인삼 병해 방제용 우수 길항균 선발

1) 인삼종자 실험

인삼 뿌리썩음병의 생물적 방제효과를 검정하기 위하여 먼저 생물검정법을 고안한 결과 20cm 높이의 plastic pot에 peat moss를 15cm 가량 넣고 그위에 뿌리썩음병 이병토를 1cm 정도 덮고 다시 peat moss를 덮은 후 종자를 파종하면 종자가 발아하여 뿌리가 2-3cm 자라 이병토에 도달하면서 뿌리썩음병에 감염되어 전형적인 병징 또는

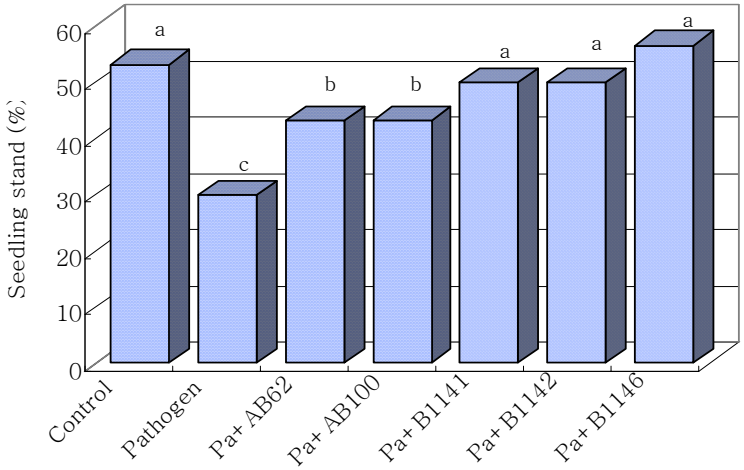


Fig. 2-2. Effect of antagonistic bacteria on the stand of ginseng seedling.

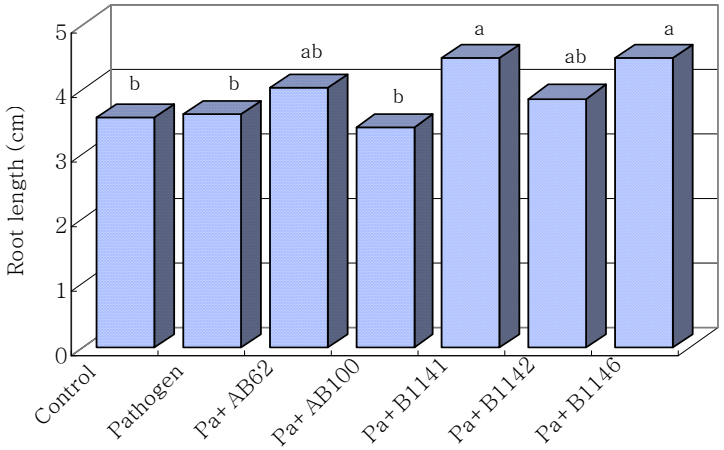


Fig. 2-3. Effect of antagonistic bacteria on the development of ginseng seedling root.

시들음 증상을 나타내어 본 연구에서는 1차 screen 방법으로 사용하였다. 분양균주 및 각종 작물의 근권에서 분리한 균주들을 TSA에 2일간 배양하고 세균현탁액을 조제한 후 인삼 종자를 1시간 침지하여 위와 같이 준비한 토양에 파종하고 20℃ 실온에 재배한 결과 처리 30일 후 입묘율을 살펴보면 병원균을 처리하지 않은 무처리구에서 약 52%로 개갑된 종자의 발아력이 다소 낮은 것을 알 수 있었다(Fig. 2-2). 이와 같은 결과는 인삼은 타 작물과 다르게 종피가 두텁고 단단하여 종피를 깨기 위한 전처리를 하게 되는데 본 연구에 공시한 종자의 전처리가 잘 못되어 종피의 개갑율이 낮은 것에 기인한 것으로 사료된다. 처리균의 효과를 살펴보면 *Bacillus* sp. B1141, B1142, B1146은 무처리와 유사한 입모율을 나타내었고 *Pseudomonas* sp. AB62, AB100은 병원균만 처리한 처리구보다는 높은 입모율을 나타내었으나 무처리에 비해서는 다소 낮은 입모율을 나타내었다(Fig. 2-2). 처리 30일 후 인삼 종자로부터 발달한 뿌리의 생장을 조사한 결과 무처리의 경우 평균 3.5cm였으며 병원균 및 AB100 처리구에서는 무처리와 유사한 생장을 보였고 AB62, B1141, B1146, B1146 처리구는 병원균 처리구뿐만 아니라 무처리구의 생장보다 높은 뿌리신장을 나타내어 뿌리썩음병 방제 효과뿐만 아니라 인삼생장촉진 효과도 있는 것으로 판단된다(Fig. 2-3).

2) 묘삼실험

Peat moss에 이병토양을 3:1(w/w)로 혼합하여 묘삼을 이식하였을 때 이식 30일 후 충분한 이병율을 나타내어 1차 인삼종자 실험에서 선발한 길항균을 본실험에서 검정하였다. 선발 길항균의 현탁액에 1년생 묘삼을 침지하고 이병토양에 이식하였을 때 지상부 입묘율은 병원균 처리구에서 22%였으며 길항균 처리구 모두 대조구인 병원균 처리구보다 높은 입모율을 나타내었고 특히 B1142는 무처리구와 유사한 입모율을 나타내었다(Fig. 2-4).

뿌리썩음병 이병율을 살펴보면 병원균 처리구에서 50%이상의 이병율을 나타내었고 병원균 처리구보다 높은 입모율을 나타내었던 AB62는 60%이상의 이병율을 나타내었다. 또한 B1141은 뿌리썩음병 이병율이 약 11%로 가장 낮은 이병율을 보였고 B1142와 AB100 처리구가 그다음으로 이병율이 낮아 비교적 높은 뿌리썩음병 방제효과를 나타내었다(Fig. 2-5). 이와 같이 입모율과 뿌리썩음병 방제효과가 다르게 나타나는 원인은 뿌리썩음병에 이병되어 뿌리가 절반이상 썩어도 지상부의 생장은 건전함으로 나타난 결과이다.

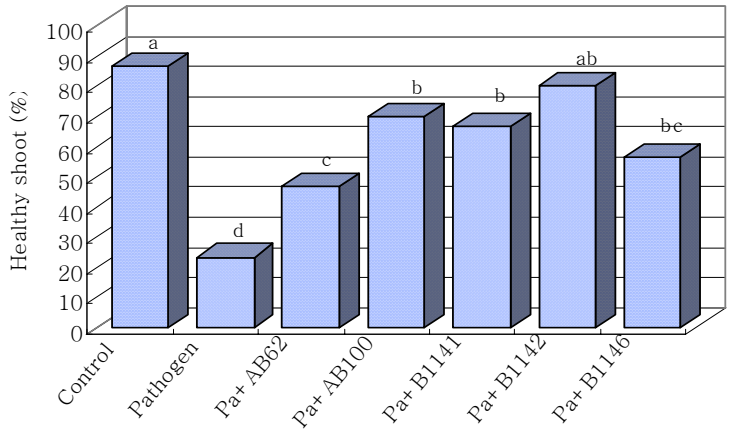


Fig. 2-4. Effect of antagonistic bacteria on shoot development of 1-year-old ginseng.

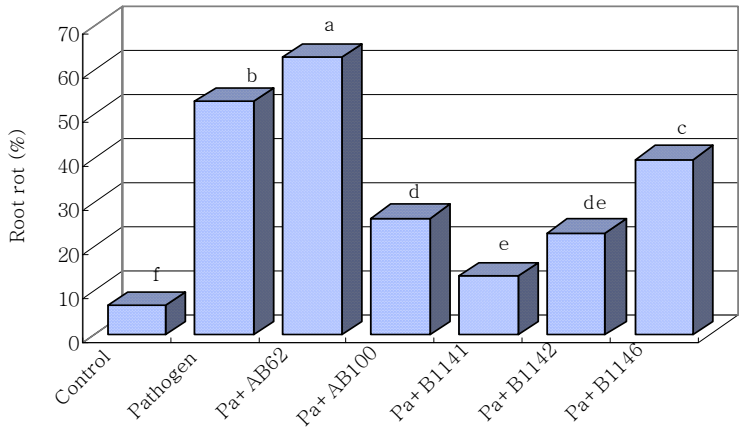


Fig. 2-5. Effect of antagonistic bacteria on the control of root rot of 1-year-old ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*.

라. 병해억제기작

1) 길항균의 항균활성

타 작물의 병해에 대한 생물적 방제제로 경상대학교에서 분양받은 그람 음성세균 *Pseudomonas* sp. B16 등 4균주의 항균활성을 조사한 결과(Table 2-4), isolate B16은 인삼 역병균에 대한 항균활성을 조금 나타냈고, AB62와 AB101은 *S. sclerotiorum*, *Fusarium* sp., *B. cinerea*, *A. panax* 등에 강력한 항균활성을 나타내었다. 반면

isolate AB100은 *P. ultimum*을 제외한 검정한 모든 병원균에 강한 항균활성을 나타내어 spectrum이 넓은 항생물질을 생성함을 알 수 있었다.

본 연구를 수행하던 중 분리한 *Bacillus* 106균주 중 1차 screen을 통해 선발한 *Bacillus* sp. B1141, B1142, B1146의 항균활성을 조사한 결과(Table 2-4), B1141과 B1142는 검정한 모든 균주에 대한 항균활성이 전혀 없었으며 B1146의 경우 *C. destructans*, *S. sclerotiorum, Fusarium sp., B. cinerea, P. cactorum* 등에 비교적 강한 항균활성을 나타내었다.

Table 2-4. Antifungal activity of antagonistic bacteria against fungal pathogens isolated from ginseng plants grown in fields

Pathogen	Inhibitory activity*						
	B16**	AB62	AB100	AB101	B1141	B1142	B1146
Cylindrocarpon destructans	−	−	+++	+	−	−	++
Rhizoctonia solani	−	+	+++	+	−	−	+
Sclerotinia sclerotiorum	−	+++	++	+++	−	−	++
Fusarium sp.	−	+++	++	+++	−	−	++
Botrytis cinerea	−	+++	+++	+++	−	−	++
Phytophthora cactorum	+	++	++	++	−	−	++
Pythium ultimum	−	++	−	++	−	−	−
Alternaria panax	−	+++	++	+++	−	−	+

* Inhibitory activity: +; <5, ++; 5-10, +++;>10mm inhibition zone.

**Isolate: B16; *Pseudomonas fluorescens*, AB62, AB100, AB101; *Pseudomonas* sp., B1141; *Bacillus* sp., B1142; *B. megaterium*, B1146; *Paenibacillus lentimorbus*.

2) 역병방제효과

인삼 유묘에 역병의 유주포자를 잎에 살포 접종하였을 때 전형적인 병징을 관찰할 수 있었는데 잎에 발생시 뜨거운 물에 데친 증상으로 진전하면서 말라 죽었고 줄기에 발생시 줄기가 잘록해지면서 고사하였다. 따라서 본 연구에서는 기존 생물적 방제 기

작의 일종인 induced systemic resistance에 관한 선발 길항균의 방제 기작을 알아보기 위하여 역병에 대한 방제효과를 조사하였다. 선발 길항균의 현탁액을 인삼 유묘 줄기 주위의 토양에 관주하고 지상부에 역병의 유주포자를 접종하여 길항균과 병원균이 직접적으로 접촉하지 않게 처리하였다. 처리 10일 후 건전주를 조사한 결과(Fig. 2-6) 역병 병원균만 처리한 처리구에서는 평균 건전주수가 0.8 정도인 반면 AB100 처리구를 제외한 모든 처리구에서 건전주수가 1.5 이상으로 통계학적으로 유의성이 인정되었으며 특히 B1142의 경우 가장 우수한 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 병원균이 침입시 근권 미생물이 직접 또는 간접적으로 식물의 defense 관련 유전자의 발현을 유도하여 나타나는 효과로 본 연구에서 선발한 길항균은 토양병해뿐 아니라 처리시 지상부에 발생하는 병해도 발생을 억제시킬 수 있음을 알 수 있었다.

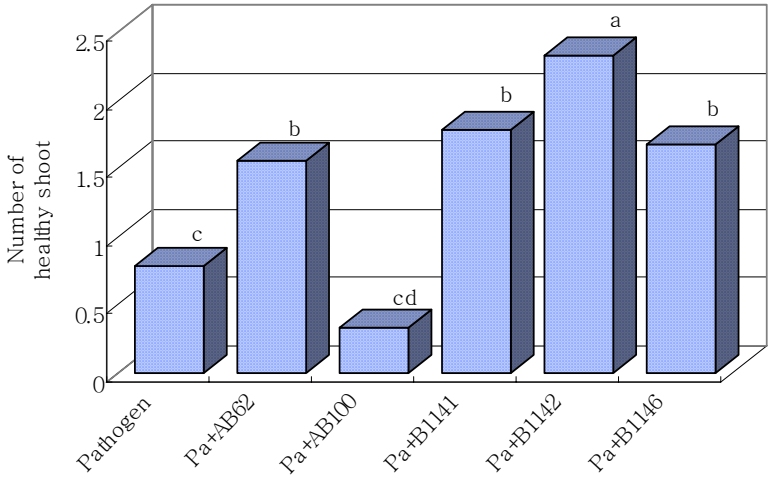


Fig. 2-6. Effect of antagonistic bacteria on the control of *Phytophthora* blight caused by *P. cactorum*.

3) 인삼뿌리의 조직변화

길항균의 식물병원균 억제기작으로는 antibiosis, nutrient competition, HCN, ISR 등이 알려져 있고 본 연구에서 선발한 길항균의 특성을 살펴보면 B1141과 B1142는 항균활성이나 HCN생산 등이 없고 생물검정에서 나타난바와 같이 근권에 처리시에도 지상부 역병을 억제하여 ISR에 관련한 억제기작으로 판단하였다. 따라서 선발 길항균의 근권처리 시 뿌리조직의 lignin 집적여부를 살펴보았다. 무처리 및 병원균처리, AB62, B1146 처리구의 뿌리를 검정시 lignification 반응은 나타나지 않았고, AB100은 표피 조직의 일부에서 약간의 반응을 보였다. B1141과 B1142의 경우 표피조직 세포의 세포벽에 뚜렷이 lignin집적을 보여 이들 길항균의 생물활성 기작이 induced systemic

resistance와 관련이 있는 것으로 판단된다(Fig. 2-7). 따라서 인삼종자 실험 및 묘삼 실험 등의 결과를 토대로 최종적으로 AB100, B1141, B1142를 선발하여 본 연구에 사용하였다.

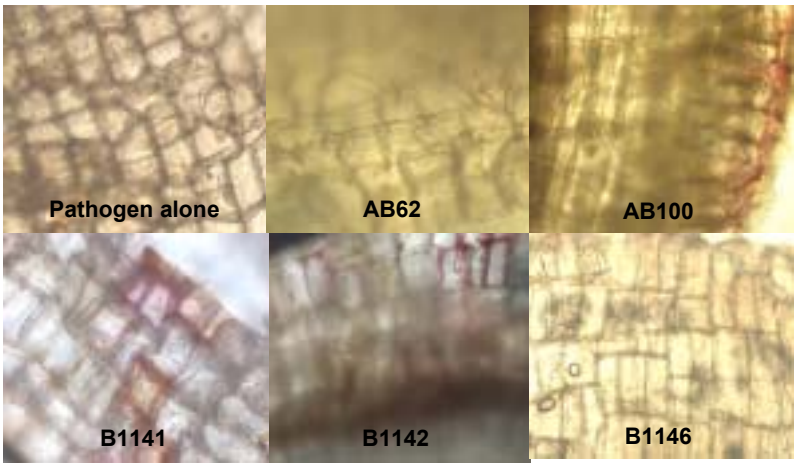


Fig. 2-7. Effect of antagonistic bacteria on the lignification of 1-year-old ginseng root when challenged by *Cylindrocarpon destructans* after treatment of bacteria.

마. 인삼뿌리 무기성분 흡수

선발 길항균 처리시 인삼뿌리의 무기성분 흡수량을 조사한 결과 *Burkholderia cepacia* AB100은 P, Ca, Zn 성분 함량이 무처리보다 높았고, *Bacillus* sp. B1141은 Mg, Fe, Zn 함량이 높은 경향이었다. 또한 *Burkholderia cepacia* AB100 처리시 P, K, Ca, Na, Zn 함량이 *Bacillus* sp. B1141 처리보다 높은 경향이었고, *Bacillus* 처리시 Mg, Fe, Mn 함량이 *Burkholderia cepacia* AB100 처리보다 높은 경향이었다(Table 2-5). 이상의 결과를 살펴볼 때 길항균의 처리가 인삼뿌리의 nutrient 흡수에도 영향을 미치는 것으로 판단되며, 특히 길항균의 종류에 따라 인삼뿌리가 흡수하는 영양분 종류도 다른 것으로 생각된다.

Table 2-5. Effect of *Burkholderia cepacia* AB100 and *Bacillus* sp. B1141 on take-up of inorganic nutrient by ginseng root in a field

Treatment	Inorganic nutrient (ppm)									
	N	P_2O_5	K_2O	CaO	MgO	Cu	Fe	Mn	Na_2O	Zn
Control	1.55	0.79	1.83	0.35	0.34	17.09	160.9	43.27	0.043	33.31
	(0.09)	(0.02)	(0.04)	(0.008)	(0.006)	(0.13)	(18.93)	(1.94)	(0.006)	(1.86)
Bentonite	1.45	0.89	1.89	0.39	0.34	17.33	228.2	26.90	0.083	34.83
alone	(0.08)	(0.04)	(0.05)	(0.029)	(0.017)	(0.58)	(24.78)	(0.56)	(0.006)	(1.86)
Bentonite	1.56	0.96	1.91	0.42	0.34	16.84	196.7	34.42	0.063	39.54
+ AB100	(0.02)	(0.03)	(0.07)	(0.003)	(0.006)	(0.35)	(31.89)	(2.23)	(0.003)	(3.01)
Bentonite	1.48	0.79	1.84	0.39	0.37	16.85	294.2	44.55	0.047	37.01
+ B1141	(0.03)	(0.06)	(0.07)	(0.020)	(0.017)	(0.88)	(55.32)	(4.49)	(0.003)	(1.49)

*( ): standard error.

바. 선발 길항균의 복합처리 가능 조합선발

생물학적 방제기작으로 알려진 기작 중 antibiosis나 nutrient competition은 일반적인 기작으로 보고되어 있고 생물적 방제제의 혼합처리 시 길항균 상호간에도 이러한 기작이 작용하여 방제효과에 영향을 미칠 수가 있다. 따라서 본 연구에서는 선발 길항균의 혼합처리 시 뿌리썩음병 억제에 미치는 영향과 혼합처리가 가능한 조합을 선발코자 하였다. 선발 길항균의 배양여액을 각각 TSA배지와 혼합하여 준비하고 그 위에 각각의 길항균 현탁액을 점적하여 배양시 상호 억제력을 살펴본 바 선발 길항균은 혼합처리 시 상호억제 효과를 나타내지 않아 상호친화성이 있는 것으로 판단하였다 (Table 2-6).

선발 길항균의 단독 또는 혼합처리 시 뿌리썩음병 방제효과를 검정하기 위하여 각각의 세균 현탁액을 동량씩 혼합하여 1년생 묘삼을 1시간 동안 침지하여 이병토양에 이식한 결과 단독 및 복합처리구에서 병원균 단독처리보다 뚜렷한 지상부 입모율을 나타내었으나 단독처리와 복합처리간에는 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2-8). 반면 뿌리썩음병 발생율을 살펴보면 단독처리구보다 복합처리구에서 높은 병 발생율을 나타내었다(Fig. 2-9).

Table 2-6. Interaction between antagonistic bacteria on tryptic soy agar medium

Lawn	Dropping		
	AB100	B1141	B1142
AB100	–	–	–
B1141	–	–	–
B1142	–	–	–

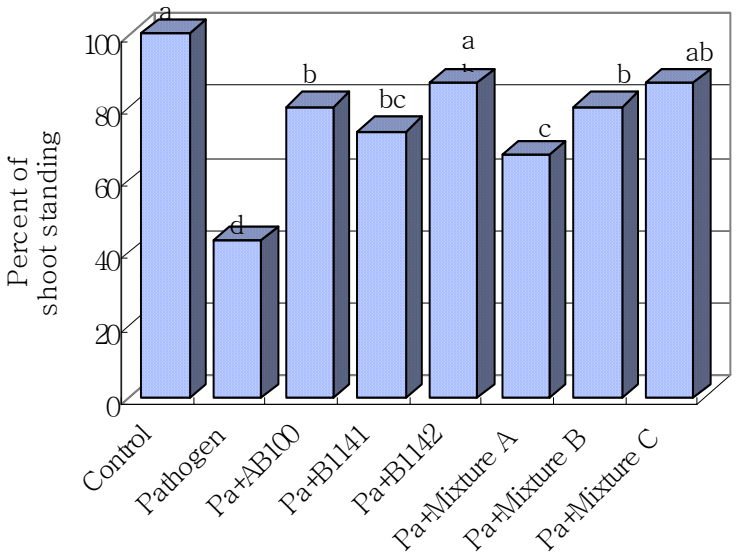


Fig. 2-8. Effect of bacterial combination on the shoot standing of 1-year-old ginseng plant. Mixture A; *Burkholderia cepacia* AB100 + B543, mixture B; *Bacillus* sp. B1141 + B1142 + B1146, mixture C; *Burkholderia cepacia* AB100 + B542 + *Bacillus* sp. B1141 + B1142 + B1146.

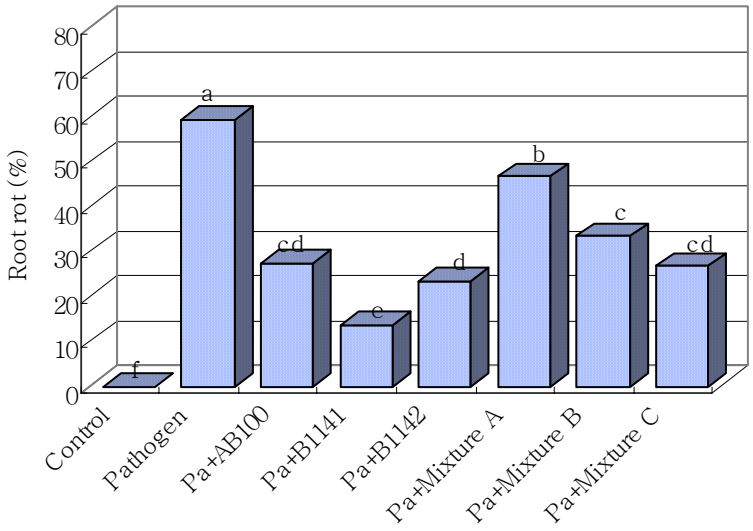


Fig. 2-9. Effect of bacterial conbination on the control of ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans*. Mixture A; *Burkholderia cepacia* AB100 AB100 + B543, mixture B; *Bacillus* sp. B1141 + B1142 + B1146, mixture C; *Burkholderia cepacia* AB100 + B542 + *Bacillus* sp. B1141 + B1142 + B1146.

사. 선발균의 근권정착 촉진을 위한 배양배지 선발

일반적으로 생물적 방제제는 실내 배양배지에 장기간 계대배양 시 길항균의 병해 방제력이 낮아지는 것으로 알려져 있어 실험실 계대배양시 길항균의 배양배지 선발은 필수적이라 하겠다. 본 연구에서는 *Burkholderia cepacia* AB100를 이용하여 gram 음성세균에 적합한 배양배지를 선발하였다. TSA배지에 계대배양하던 AB100을 TSA 및 nutrient agar, King′s B medium, soil extract agar 등에 각각 연속적으로 20회 이상 계대배양하고 세균현탁액을 조제한 후 1년생 묘삼을 침지 처리하였다. 침지한 묘삼은 재작지인 농가포장(일죽)에 이식하여 입모율, 수확율, 이병율, 인삼뿌리 무게 등을 조사하였다. 이식 60일 후 입모율을 살펴보면 SEA-dependent AB100 처리구에서 무처리보다 낮은 경향이었고 나머지 처리는 무처리와 같거나 높은 출아율을 나타내었다 (Fig. 2-10).

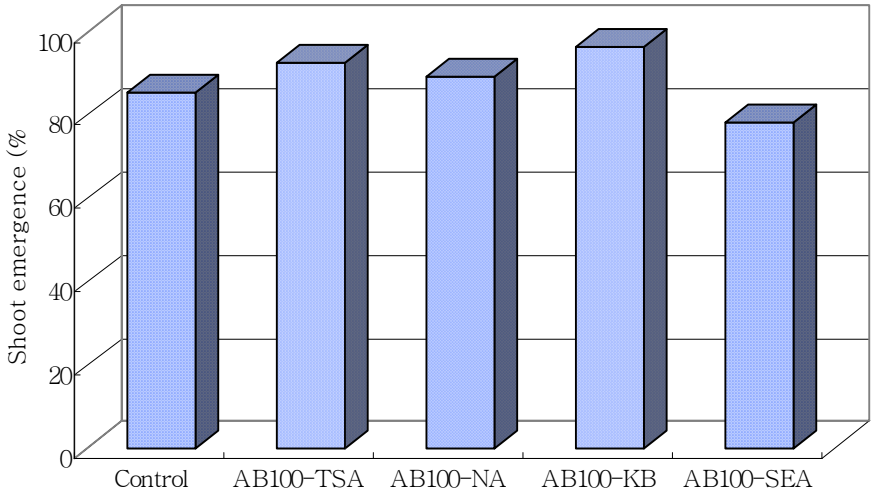


Fig. 2-10. Effect of medium dependent *Burkholderia cepacia* AB100 on the emergence of shoot of ginseng plant 60 days after transplanting of 1-year-old ginseng root in a field.

처리구의 인삼 수확은 이식 약 6개월 후에 조사하였으며 뿌리썩음병이 일부 진행되고 있는 뿌리를 포함한 수확가능한 모든 인삼을 포함하여 수확율을 조사한 바 모든 처리구에서 무처리와 같거나 약간 높은 수확율을 나타내었다(Fig. 2-11, 12). 그러나 뿌리썩음병 이병율을 살펴보면 KB-dependent AB100을 제외한 모든 처리구에서 무처리보다 높은 뿌리썩음병 발생율을 나타내었으며 KB-dependent AB100은 병원균 처리구보다 낮은 발병율을 보여 안정적인 병해 억제효과를 나타내었다(Fig. 2-12).

Fig. 2-11. Effect of medium-dependent isolates of *Burkholderia cepacia* AB100 on the yield of ginseng root.

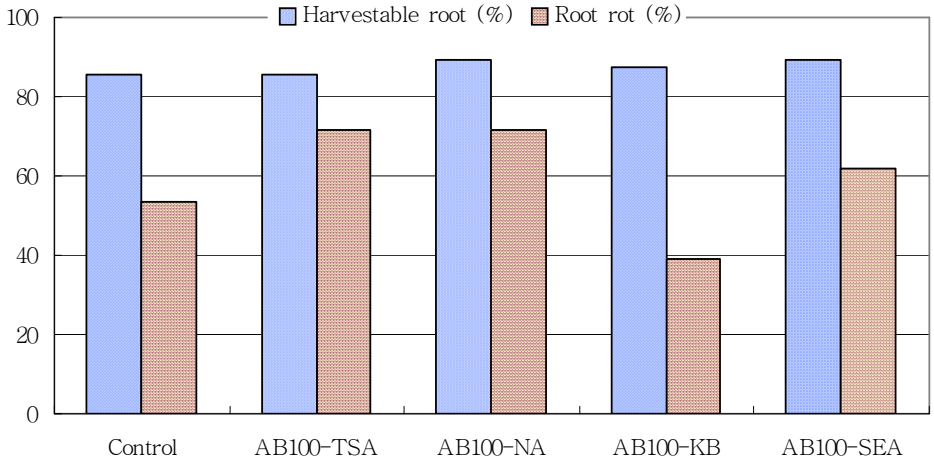


Fig. 2-12. Effect of medium dependent isolates on the yield of 2 year old ginseng root and disease incidence of root rot in a field. One-year-old ginseng roots treated with or without medium dependent AB100 were transplanted on April 4 and harvested on Oct. 29, 2003.

수확한 건전 인삼의 평균개체의 무게를 조사한 결과 TSA 및 KB에서 연속계대 배양한 AB100 처리구에서 현저히 높은 개체무게를 나타내었으며(Fig. 2-13), 이와 같은 결과는 처리 길항균의 뿌리썩음병 억제뿐만 아니라 길항균의 뿌리 생장촉진 효과에도 기인한 것으로 생각된다. 이들 medium-dependent AB100을 처리시 수확시 인삼 근권에서의 형광성 pseudomonads와 *Bacillus* 밀도를 조사한 결과(Table 2-7), 형광성 pseudomonads의 밀도는 KB-dependent AB100 처리구에서 가장 높은 밀도를 나타내었고, *Bacillus*의 근권 밀도는 처리구 모두에서 무처리보다 높은 밀도를 유지하였다.

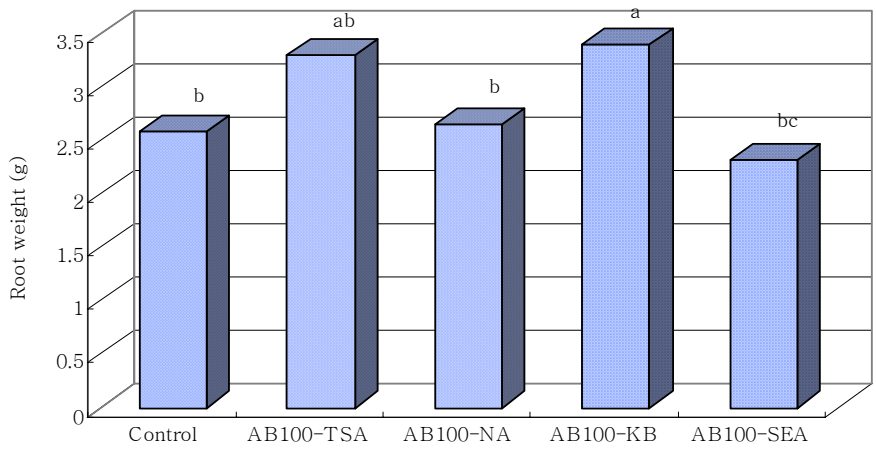


Fig. 2-13. Effect of medium dependent *Burkholderia cepacia* AB100 on the growth of ginseng root. The isolate was continuously cultured on each medium over 20 times. One-year-old ginseng roots treated with or without medium dependent AB100 were transplanted on April 4 and harvested on Oct. 29, 2003.

Table 2-7. Population density of fluorescent pseudomonads and *Bacillus* on the rhizosphere of ginseng plant when medium dependant isolates were applied to 1-year-old ginseng root

Treatment	Population density ($\times 10^3$ cfu/g · root)	
	Fluorescent pseudomonads	*Bacillus* spp.
Control	31.02(10.87)*	1.91(0.54)
TSA dependent AB100	29.22(11.52)	2.10(0.27)
NA dependent AB100	19.21(4.53)	5.60(1.89)
KB dependent AB100	37.3(15.28)	3.58(0.51)
SEA dependent AB100	25.99(2.93)	2.05(0.49)

*( ); standard error.

아. 선발균의 근권밀도

1) 선발균의 근권밀도 변화

선발균의 세균현탁액에 1년생 묘삼을 침지 후 이식하였을 때 근권에서의 밀도변화를 살펴본 바 *Burkholderia cepacia* AB100의 경우 이식 10일 후까지는 처리시 밀도보다 약간 높은 밀도를 유지하다가 20일 이후부터는 점차 밀도가 감소하여 2달 이후

에는 뿌리 gram당 2.2×10^3 colony forming unit였으며, *Bacillus* sp. B1141 및 B1142는 유사한 경향을 보였는데 이식 30일까지 근권밀도가 급격히 감소하다가 2개월 후에는 다소 밀도감소가 적어 뿌리 gram당 4.4 및 5.1×10^3을 나타내었다(Fig. 2-14).

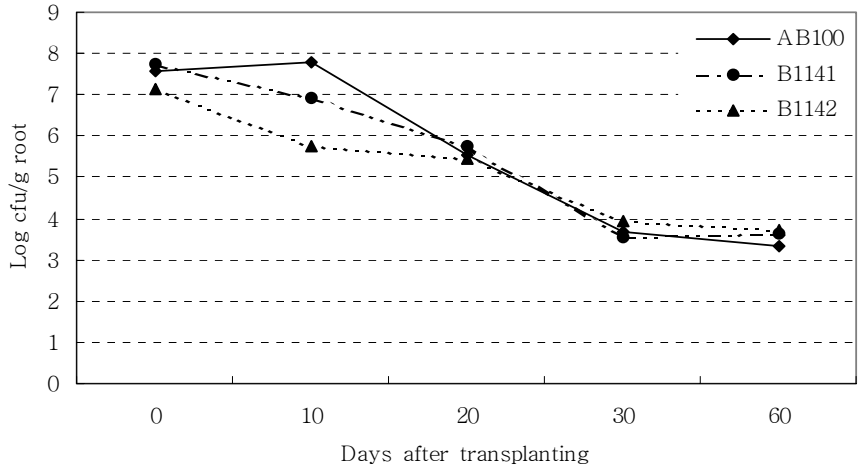


Fig. 2-14. Population changes of selected bacteria in the rhizosphere of ginseng plant. *Burkholderia cepacia* AB100, *Bacillus* sp. B1141 & B1142 resistant to rifampicin were used in this study and detected on KB and 1/10 TSA containing 100 ppm of rifampicin.

2) 토성에 따른 근권밀도

본 실험에 사용한 *Burkholderia cepacia* AB100는 KB에 자란 wild type을 이용하였으며 세균현탁액에 침지한 1년생 묘삼을 토성이 다른 두 재배포장에 이식하여 수확시 근권에 서식하는 형광성 pseudomonads 밀도를 조사한 결과 무처리의 경우 sandy loam soil에서 높은 밀도를 유지하였고, *Burkholderia cepacia* AB100 처리구는 silty loam soil에서 조금 높았다(Table 2-8).

Table 2-8. Population density of *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of ginseng in two different types of soil

Treatment	Population density ($\times10^4$ cfu/g · root)	
	Sandy loam soil	Silty loam soil
Control	5.53	2.15
Burkholderia cepacia AB100	5.64	6.12

*Population density was examined 7 months after transplanting of 1-year-old ginseng root in fields.

sandy loam soil에서는 *Burkholderia cepacia* AB100 처리시 무처리의 밀도와 차이가 없었으나 silty loam soil에서는 무처리에 비해 AB100 처리시 높은 밀도를 유지하였다.

자. 최적 처리방법 확립

1) 2003년 포장실험

Burkholderia cepacia AB100의 세균현탁액에 1년생 묘삼을 침지하여 재작지인 농가 포장에 이식하고 1개월 간격으로 1회에서 최고 3회에 걸쳐 세균현탁액을 토양 관주하였는데 본 연구의 처리구 구성은 무처리, 묘삼침지, 묘삼침지와 1회 토양관주, 묘삼침지와 2회 토양관주, 묘삼침지와 3회 토양관주 등이었다. 처리 90일 후 입모율을 조사한 결과(Fig. 2-15) 모든 처리에서 무처리와 같거나 높은 입모율을 나타내었다.

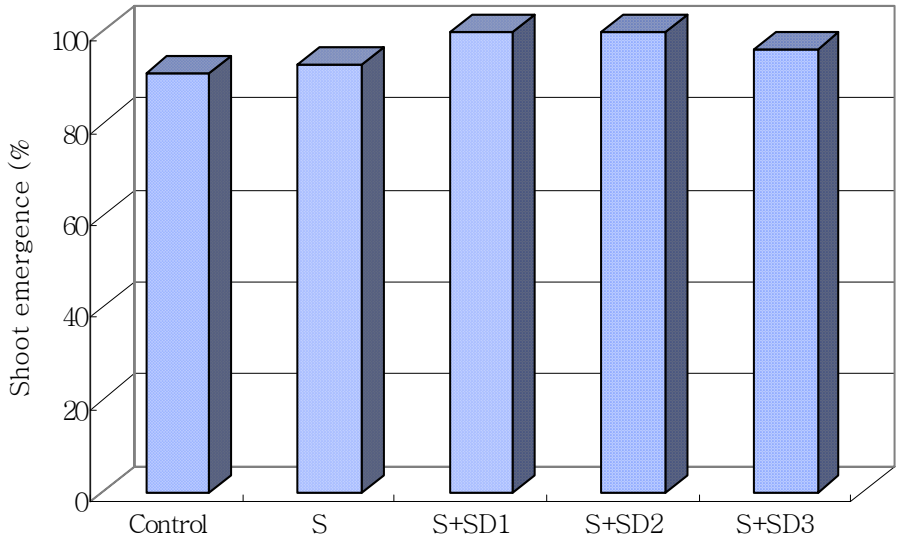


Fig. 2-15. Effect of application method of *Burkholderia cepacia* AB100 on the shoot emergence of ginseng plant 90 days after transplanting in a field. S; soak of ginseng root, SD1, SD2, and SD3; soil drenching of bacterial suspension at 1 time, 2 times, 3 times at 30-day intervals after transplanting.

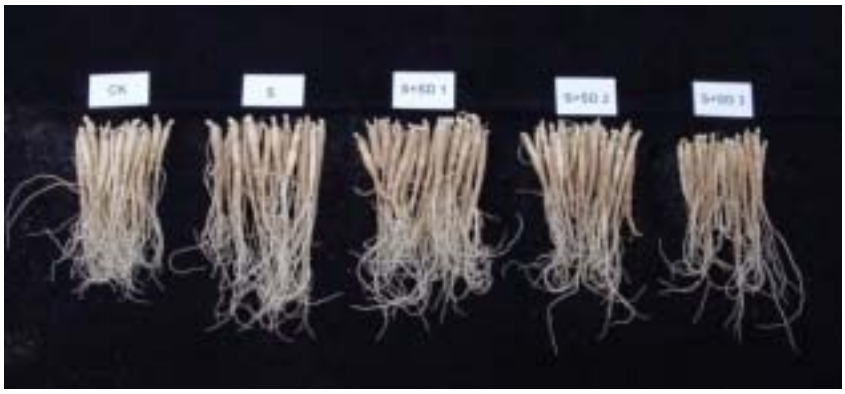


Fig. 2-16. Effect of application method of *Burkholderia cepacia* AB100 on the yield of ginseng root.

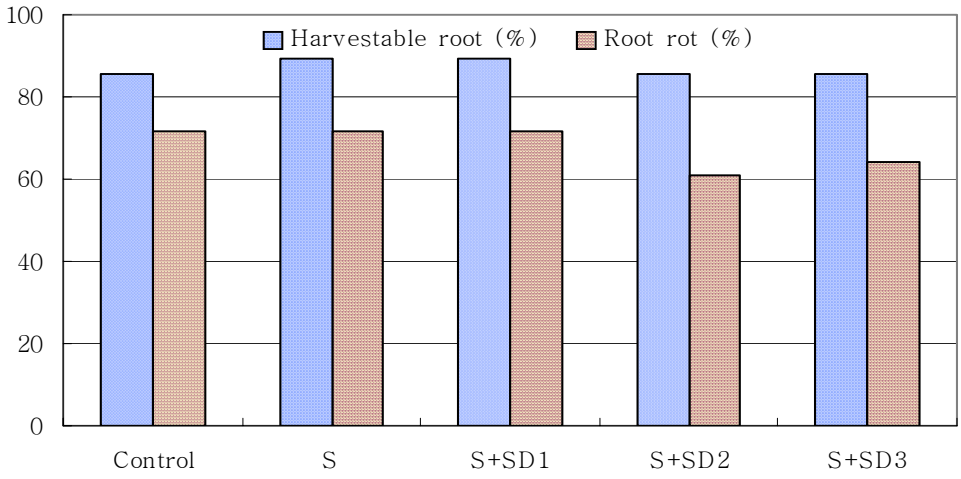


Fig. 2-17. Effect of application method of *Burkholderia cepacia* AB100 on the yield of 2 year old ginseng root and disease incidence of root rot in a field. S; soak of ginseng root in bacterial suspension for 1 hr., SD1, SD2, and SD3; soil drenching of bacterial suspension at 1 time, 2 times, 3 times at 30-day intervals after transplanting. One-year-old ginseng roots treated with or without AB100 were transplanted on April 4 and harvested on Oct. 29, 2003.

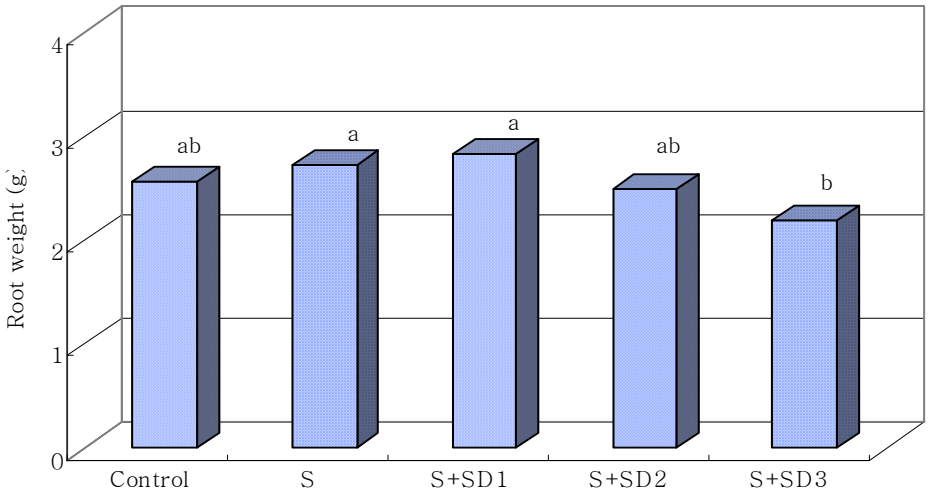


Fig. 2-18. Effect of application method of *Burkholderia cepacia* AB100 on average weight of ginseng roots in a field trial.

처리별 수확율은 무처리와 비슷하거나 높은 경향(Fig. 2-16, 17)이었으며, 뿌리썩음병 이병율은 무처리에 비해 묘삼침지 후 1달 간격으로 2회에 걸쳐 세균현탁액을 토양관주시 낮았다(Fig. 2-17). 그러나 수확 인삼의 개체무게를 살펴보면 묘삼을 침지한 처리구와 묘삼침지와 1개월 후 1회 토양관주한 처리구에서 무처리에 비해 평균무게가 높았으며, 2회 이상 토양관주한 처리구는 오히려 평균무게가 낮게 나타났다(Fig. 2-18). 이와 같은 결과는 세균 현탁액을 2회 이상 토양관주 시 토양의 물리성이 악화되어 인삼 뿌리의 생장에 영향을 미친 것으로 판단된다.

Fig. 2-19. Effect of application method of *Bacillus* sp B1141 and B1142 on the yield of ginseng root.

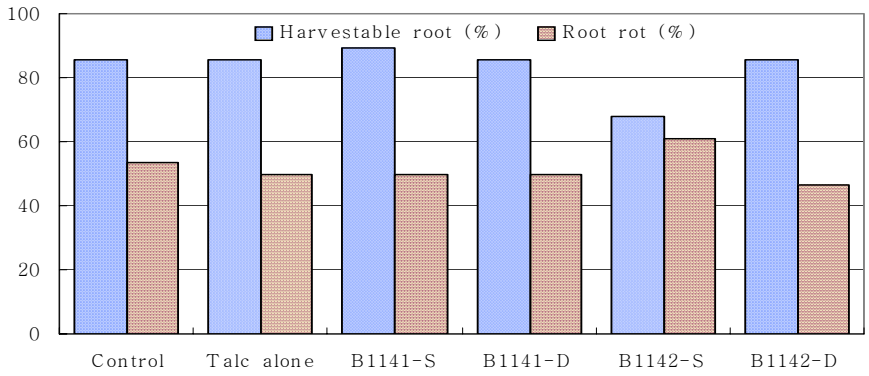


Fig. 2-20. Effect of application method of *Bacillus* spp. on the yield of 2 year old ginseng root and disease incidence of root rot in a field. B1141; *Bacillus pumilus*, B1142; *Bacillus megaterium*, S; soak of 1-year-old ginseng roots in bacterial suspension for 1 hr., D; dusting of ginseng roots with formulated isolate. One-year-old ginseng roots were transplanted on April 4 and harvested on Oct. 29, 2003.

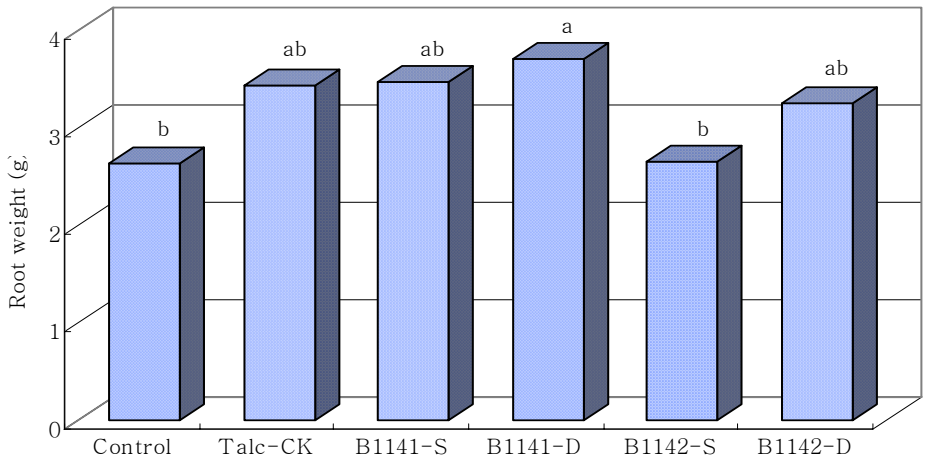


Fig. 2-21. Effect of application method of *Bacillus* sp. B1141 and B1142 on average weight of ginseng roots in a field trial. B1141; *Bacillus pumilus*, B1142; *Bacillus megaterium*, S; soak of 1-year-old ginseng roots in bacterial suspension for 1 hr., D; dusting of ginseng roots with formulated isolate. One-year-old ginseng roots were transplanted on April 4 and harvested on Oct. 29, 2003.

*Bacillus*의 경우는 묘삼을 세균현탁액에 침지하거나 Talc제형을 분의하여 이식하였는데 60일 후 입모율을 살펴본 결과 무처리와 처리간 차이가 없었으며 수확율은 B1141의 침지에서, B1142는 분의 처리에서 무처리와 같거나 높은 수확율을 나타내었다(Fig. 2-19, 20). 뿌리썩음병 이병율과 평균 뿌리무게는 B1142 침지 처리구를 제외한 모든 처리구에서 무처리보다 낮은 발병율(Fig. 2-20)과 높은 뿌리무게(Fig. 2-21)를 나타내었다.

2) 2004년 포장실험

2003년도의 처리방법의 확인을 위하여 *Burkholderia cepacia* AB100의 경우 세균현탁액에 묘삼을 침지하거나 침지와 1개월 후 1회 토양 관주하였고, *Bacillus*의 경우는 bentonite제형을 묘삼분의하거나 분의와 토양관주 1회를 1개월 후 처리하였다.

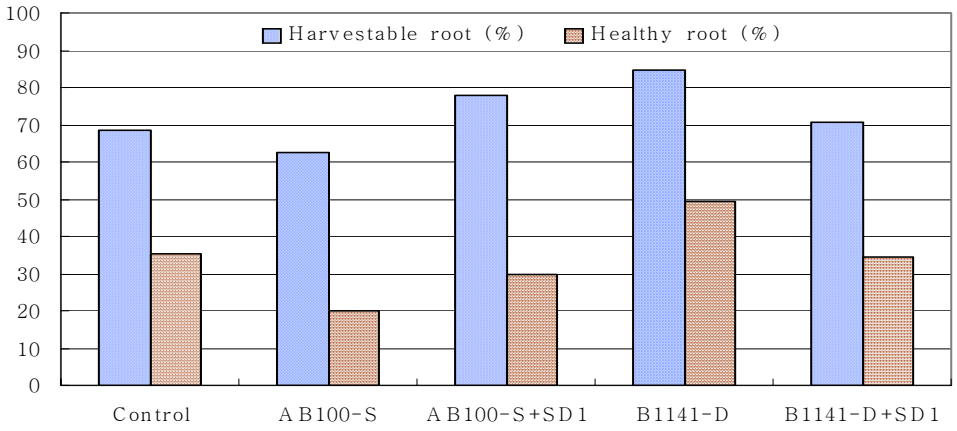


Fig. 2-22. Effect of application method of antagonistic bacteria on percent of harvestable root and healthy root in a field in 2004. S; soaking of 1-year-old ginseng roots in bacterial suspension for 1 hr., D; dusting of ginseng roots with formulated isolate, SD1; soil drenching of bacterial suspension around ginseng plants 30 days after transplanting.

Burkholderia cepacia AB100의 경우 침지와 1개월 후 토양관주한 처리구에서 수확율및 뿌리의 건전율이 높았으며, *Bacillus* sp. B1141의 경우는 묘삼이식시 bentonite 제형의 분의처리에서 수확율 및 건전율이 무처리보다 현저히 높았다(Fig. 2-22).

처리별 뿌리생장율을 살펴보면 무처리의 경우 생장율이 379%였으며 *Burkholderia cepacia* AB100의 경우 묘삼침지 시 385%, 침지후 1회 토양관주 시 454%의 뿌리 생

장율을 나타내었다(Table 2-9). *Bacillus*의 경우 뿌리 생장율은 묘삼분의 처리시 541%, 분의와 1회 토양 관주시 429%로 무처리보다 현저한 생장율을 나타내었다 (Table 2-9).

Table 2-9. Effect of application method of antagonistic bacteria on the growth of ginseng root in a field in 2004

Treatment‡	Average weight before transplanting	Average weight after harvesting	Increase rate (%)
Control	1.055(0.048)	4.024(0.465)	379
AB100-S	1.167(0.015)	4.487(0.277)	385
AB100-S+SD1	1.011(0.005)	4.599(0.435)	454*
B1141-D	0.856(0.022)	4.634(0.268)	541*
B1141-D+SD1	1.038(0.015)	4.451(0.072)	429*

‡ S; soaking of 1-year-old ginseng roots in bacterial suspension for 1 hr., D; dusting of ginseng roots with formulated isolate, SD1; soil drenching of bacterial suspension around ginseng plants 30 days after transplanting. One-year-old ginseng roots were transplanted on April 12 and harvested on Nov. 3, 2004.

*Symbol represents for significant difference at 95%.

차. 방제효과 증진을 위한 영양원 선발

본 연구에서는 bentonite를 매체로 하여 MgO 및 CaO, chitin, lactose, 또는 전체를 혼합한 제형을 각각 조제하여 묘삼 이식시 분의 처리하고 인삼 수확후 7년이 경과한 포장에 이식하였다. 재배 중 지상부 병해 방제를 위해 2004년 7월경 점무늬병 방제 약제를 1회 살포하였다. 처리별 수확율 및 뿌리 건전율, 뿌리생장율은 이식 약 7개월 후 조사하였는데 AB100의 경우 benotnite 단독 및 bentonite에 MgO, CaO, chitin, lactose 등을 첨가한 제형에서 무처리에 비해 높은 수확율 및 건전율을 나타내었다 (Fig. 2-23). *Bacillus*의 경우는 bentonite 단독 또는 bentonite에 MgO, CaO를 첨가한 제형에서 무처리보다 높은 수확율과 건전율을 나타내었다(Fig. 2-19). 길항균이 첨가되지 않은 제형에서는 bentonite에 MgO, CaO, lactose를 첨가한 처리구를 제외한 모든 처리구에서 무처리보다 높은 수확율과 건전율을 나타내었다.

인삼 뿌리의 생장율을 조사한 결과 무처리구에서는 357%의 생장율을 나타낸 반면 *Burkholderia cepacia* AB100은 bentonite에 영양원 모두를 첨가한 제형을 제외한 모든 처리구에서 높은 생장율을 나타내었다(Table 2-9). *Bacillus*의 경우 bentonite에

MgO 및 CaO를 첨가한 제형과 chitin 또는 lactose를 첨가한 제형에서 무처리보다 높은 뿌리 생장율을 나타내었다(Table 2-10).

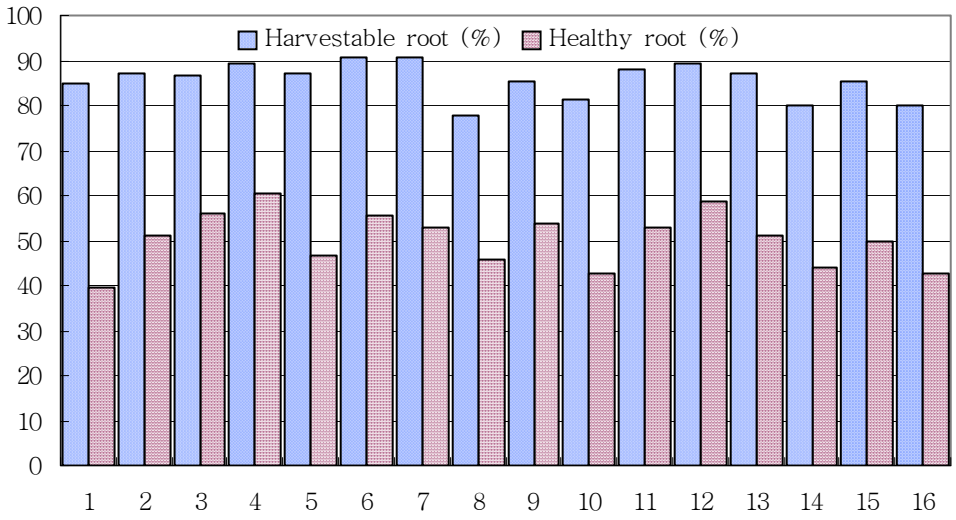


Fig. 2-23. Effect of *Burkholderia cepacia* AB100 and *Bacillus* sp. B1141 on percent of harvestable root and healthy root at harvesting time when each isolates with or without formulation were applied to 1-year-old ginseng roots in 2004. No.1; untreated control, No.2; bentonite, N0.3; bentonite+MgO+CaO, No.4; bentonite+ MgO+CaO+chitin, No.5; bentonite+MgO+CaO+lactose, No.6; bentonite+ MgO+CaO +chitin+lactose, No.7; AB100+bentonite, No.8; AB100+bentonite+MgO+CaO, No.9; AB100+bentonite+MgO+CaO+chitin, No.10; AB100+bentonite+MgO+CaO+lactose, No.11;AB100+bentonite+MgO+CaO+chitin+lactose, No.12; B1141+bentonite, No.13; B1141+bentonite+MgO+CaO, No.14; B1141+bentonite+MgO+CaO+chitin, No.15; B1141+bentonite+MgO+CaO+lactose, No.16; B1141+bentonite+MgO+CaO+chitin+ lactose. One-year-old ginseng roots were transplanted on April 12 and harvested on Nov. 3, 2004.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 *Burkholderia cepacia* AB100의 경우 묘삼을 이식시 세균현탁액에 침지한 후 이식하고 1개월 후 1회 토양관주 처리할 경우와 제형을 조제시는 영양원을 첨가하지 않고 bentonite와 현탁액을 혼합한 제형을 분의처리시 가장 우수한 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되며, bentonite 제형을 조제 시는 건조

분말내의 AB100의 균밀도가 현저히 감소할 수 있으므로 균 생존율을 높일 수 있는 첨가제의 개발이 선행되어야 할 것으로 생각된다. *Bacillus*의 경우는 Talc 또는 bentonite 단독 또는 MgO와 CaO, lactose 등을 첨가한 제형을 묘삼 분의처리시 가장 우수한 효과를 발휘할 것으로 사료된다.

Table 2-10. Effect of *Burkholderia cepacia* AB100 and *Bacillus* sp. B1141 on the growth of ginseng root when the isolates formulated with various ingredients were applied to 1-year-old roots.

Treatment‡	Average weight before transplanting	Average weight after harvesting	Increase rate (%)
No.1	1.060(0.116)	3.724(0.162)	357
No.2	1.161(0.035)	4.639(0.227)	399*
No.3	1.003(0.055)	4.840(0.306)	482*
No.4	1.130(0.094)	5.755(0.304)	511*
No.5	1.069(0.100)	5.355(0.151)	507*
No.6	1.095(0.064)	5.407(0.083)	496*
No.7	1.119(0.021)	5.447(0.253)	486*
No.8	1.033(0.065)	4.955(0.515)	477*
No.9	1.150(0.055)	5.152(0.393)	447*
No.10	1.000(0.056)	4.612(0.247)	461*
No.11	1.194(0.030)	4.621(0.411)	385
No.12	1.197(0.179)	3.924(0.394)	332
No.13	1.146(0.030)	4.613(0.489)	400*
No.14	1.070(0.020)	4.587(0.390)	427*
No.15	1.159(0.048)	4.593(0.394)	395*
No.16	1.225(0.127)	4.201(0.151)	347

‡ No.1; untreated control, No.2; bentonite, N0.3; bentonite+MgO+CaO, No.4; bentonite+MgO+CaO+chitin, No.5; bentonite+MgO+CaO+lactose, No.6; bentonite+MgO+CaO+chitin+lactose, No.7; AB100+bentonite, No.8; AB100+bentonite+MgO+CaO, No.9; AB100+bentonite+MgO+CaO+chitin, No.10; AB100+bentonite+MgO+CaO+lactose, No.11;AB100+bentonite+MgO+CaO+chitin+lactose, No.12; B1141+bentonite, No.13; B1141+bentonite+MgO+CaO, No.14; B1141+bentonite+MgO+CaO+ chitin, No.15; B1141+bentonite+MgO+CaO+lactose, No.16; B1141+bentonite+MgO+ CaO+chitin+lactose.

4. 결과요약

1차년에 경상대학교로부터 분양받은 4균주와 본 연구를 수행중에 분리한 106균주를 공시하여 실내 및 온실 생물검정을 통하여 최종적으로 인삼 뿌리썩음병의 방제효과가 있는 *Burkholderia cepacia* AB100와 *Bacillus pumilus* B1141, *B. megaterium* B1142를 선발하였다. 선발균의 생리적 특성을 조사한 결과 AB100은 proteinase활성만 나타내었으며 B1141과 B1142는 조사한 활성이 전혀 없었다. 근권정착 확인을 위한 표식인자 작성은 *Pseudomonas* sp. AB62에 CFP 유전자 도입에 성공하였으나 뿌리썩음병 방제효과가 없어 본 연구에서는 공시하지 않았으며, AB100, B1141 및 B1142는 rifampicin에 내성인 변이체를 유기하여 본 연구에 사용하였다. 선발균을 인삼 종자에 처리시 무처리에 비해 입모율이 증가하였고 B1141과 B1142는 뿌리생장 촉진효과도 인정되었다. 또한 선발균의 세균현탁액에 묘삼을 침지하여 이식하였을 때 지상부 입모율과 뿌리썩음병 억제효과가 뚜렷하였다. 인삼 뿌리썩음병 억제 기작을 조사한 결과 *Burkholderia cepacia* AB100은 대부분 인삼 병원균에 대한 항균활성이 높아 antibiosis에 의한 뿌리썩음병 억제효과인 것으로 판단되며, *Bacillus* sp. B1141과 B1142는 인삼 병원균에 대한 항균활성 또는 HCN 활성이 없고 현탁액을 지하부에 처리하고 지상부 병해인 역병을 접종시 병 발생 억제효과를 나타내어 induced systenic resistance에 의한 억제효과로 생각된다. 또한 선발 길항균을 처리시 인삼뿌리의 무기성분 함량에 차이를 나타내었고, 특히 *Burkholderia cepacia* AB100의 경우는 P, K, Ca, Na, Zn 함량이 무처리보다 높게 나타났으며, *Bacillus* sp. B1141의 경우는 Mg, Fe, Mn, Zn 함량이 무처리보다 높게 나타났다. 그리고 처리균주에 따른 무기성분 함량도 다르게 나타났는데 AB100은 N, P, K, Ca, Na, Zn 함량이 B1141보다 높았고, B1141 처리는 Mg, Fe, Mn의 함량이 AB100 처리보다 현저히 높게 나타났다. 현탁액을 묘삼에 처리하고 뿌리썩음병 이병토에 이식 시 뿌리조직에 lignin이 축척되는 것을 볼 때 유도저항성에 의한 억제기작으로 확신된다. 선발균의 복합 가능 조합을 선발하기 위하여 실내 친화성을 조사한 결과 상호억제효과가 없어 혼합처리가 가능한 것으로 판단되었으나 묘삼실험 결과 단독 처리보다 복합처리시 입모율과 뿌리썩음병 억제효과가 현저히 낮았다. *Burkholderia cepacia* AB100의 배양을 위한 최적 배지를 선발한 결과 King′s B 배지에 계대 배양하였을 때 입모율, 수확율, 뿌리썩음병 방제, 뿌리생장 등에 우수한 효과를 나타내었다. 선발 길항균들의 인삼뿌리에서의 경시적인 밀도변화를 조사한 결과 처리 후 30일까지는 급속한 밀도 감소를 나타내었으며 60일에는 뿌리 gram당 10^3 colony forming unit 이상을 유지하였다. 토양 특성에 따른 근권 밀도는 처리 7개월까지 사양토에서 5.64×10^4 cfu/g・root, 식양토에서 5.64×10^4 cfu/g・root를 유지하였다. 2003년과 2004년에 걸쳐 최적 처리방법을 조사한 결과

Burkholderia cepacia AB100은 묘삼을 이식시 침지하고 1개월 후 1회 관주처리가 입모율 및 수확율, 뿌리생장 촉진 효과가 우수하였으며, *Bacillus* sp. B1141와 B1142는 분말제형을 묘삼에 분의 처리시 우수한 효과를 나타내었다. 선발균의 효과증진을 위한 영양원 선발에서는 *Burkholderia cepacia* AB100은 bentonite에 MgO, CaO, chitin, lactose를 첨가시 우수한 효과를 나타내었고, *Bacillus* sp. B1141은 bentonite 단독 또는 MgO와 CaO만 첨가시 우수한 효과를 나타내었다.

제 3절 길항성 물질분리 동정 및 인삼병균 억제 물질 선발(제 2협동과제)

1. 연구 수행 방법

가. 우수 길항균의 분리 및 길항력 검정

주요작물의 병 발생지역의 토양, 근권 또는 식물체를 멸균증류수에 serial dilution 법으로 배지에 배양시킨 후 인접한 균에 서로 길항력을 갖는 fungi, bacteria, streptomyces등의 균을 순수 분리한다. 이렇게 분리된 기존의 길항균(*Burkholderia cepacia* AB100, *Burkholderia cepacia* AB101, *Pseudomonas* sp. AB62, *Burkholderia* sp. AB125, *Chaetomium cochliodes* AF1, 그리고 *Aspergillus terrus* AF2)을 인삼병원균(*Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria panax* *Phytophthora cactorum*)과의 대치 배양에 의해 길항력을 test 하였다 (Stevenson and Rouatt. 1987, Kim et al. 1998, Jae et al. 1999-1).

나. 길항물질의 분리·구조 동정 및 인삼병원균에 대한 억제능 조사

분리한 길항균이 fungi일 경우 CDM(Czapex-Dox Media)이나 PD broth에서 bacteria의 경우 LB broth나 Nutrient broth에서 방선균일 경우 Bennet 배지에서 37일간 배양하여 단계적인 용매추출 → column chromatography → preparative TLC 방법들을 activity guided bioassay(AGB)법과 병행하여 그 활성물질을 순수 분리하였다. 이렇게 순수 분리한 항균물질의 구조를 동정하기 위하여 UV, IR, EI/MS, 1H-NMR, 13C-NMR 등의 기기분석을 통해 구조를 동정한다. 이러한 길항물질을 PDA(Potato Dextrose Agar)배지에 0, 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 ppm 되게 처리하여 상기 인삼병원균을 접종한 후 in vitro 생육억제 정도를 ED_{50}-probit analysis의 통계적 data 처리로 그 활성을 측정하였다(Jae et al. 1999-1, Keun et al. 2000, Howell and Stipanovic 1979, Jae et al. 1999-2).

다. 새로운 활성균에서 인삼 병원균 억제물질 분리 동정

시설원예지역 토양으로부터 새로 분리한 길항균 Streptomyces sp. A8과 *Burkholderia cepacia* AB21의 항균력은 병원균 *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* 및

*Cylindrocarpon destructans, Alternaria panax Phytophthora cactorum*에 대치배양으로 조사했으며 이들로부터 새로운 길항물질을 분리하여 그 구조를 상기 2)의 방법으로 동정했다(Keun et al. 2000; Howell and Stipanovic 1979, Jae et al. 1999-2, Berdy 1974, Betina 1994).

라. 활성 미생물 인삼 생장 촉진 물질 분리 동정

우선 생장 촉진 균주 B6, C8, B6균을 개갑 종자나 1년생 인삼 유묘 뿌리에 10^8CFU/ml 이상 되게 처리한 후 발아력이나 생장 촉진 효과 검정 했다. 또는 매월 10^8CFU/ml 되게 추가접종을 실시했다. 생장 촉진이 확인된 균 B6으로부터 LB 생육배지에서 hexane, chloroform, EtOAc 용매로 추출하여 우선 토마토의 유묘에 처리한 후 EtOAc fraction에서 생육 촉진 효과 확인 후 column chromatography, TLC로 순수분리 하여 단리된 spot 확인, 각각의 분리된 물질로 생육촉진 효과 검정하였다(Betina 1994).

마. 길항균 상호작용 구명

AB100(pyrrolnitrin), AB101(phenylacetyl salicylic acid), AB62(diacetylphloroglucinol) 균주-항생물질 조합에서 AB100 보다 pyrrolnitrin 생산이 우수한 AB21 균을 대체하여 단독 또는 복합처리 시 병원균 억제효과를 in vitro 실험으로 확인 하였다. 또한 이들 2개 이상 길항균 또는 생육촉진 혼합균주들의 복합 접종원 조합을 찾기위해 각각의 균주(길항균 상호 또는 촉진 세균 간)간 생육억제 여부를 검정한 후 상호 길항력이 없는 복합 균주 조합을 선발하였다(Stevenson and Rouatt 1987).

바. 유망 신물질 다량 생산 방법 개발

AB62 균이 생산하는 diacetylphloroglucinol과 AB21 균이 생산하는 pyrrolnitrin 및 그 유도체들과 같은 항생물질은 배지 상에서도 상당히 생산하지만 토양 중에서는 10^5~10^9 CFU/g 으로 접종해도 항생물질 생산량이 극미량이거나 생산 하여도 토양에 흡착되어 biological activity limit에 미치지 못하므로 토양 환경에서 enrichment 시킬 수 있는 방법을 강구한다.

사. 길항균이 생산하는 항생물질의 토양 내 생산 소장 연구

인삼 유묘 생육이나 개갑종자 발아를 억제하는 병원균의 생육 억제 여부 조사를

위해 길항균을(10^5~10^9/g) 토양에 처리한 후 10, 15, 25일 이 지난 뒤 MeOH로 토양을 추출하였다. 이를 농축 후 H_2O에 희석하고, saturated NaCl용액 50ml 첨가한 뒤 Hexane으로 재추출하여 TLC로 분리 하고 항생물질 생산소장여부를 확인한다.

특히 AB21 균의 경우 pyrrolnitrin은 nutrient broth에서도 많이 생산하므로 여러 배지 조합에서의 생산량을 측정한 후 토양 중에서도 가능한 생산 환경을 조성할 수 있는 조건을 확립한다.

아. 복합 접종원 개발

상기 길항균 상호간, 길항균과 생장 촉진균 상호작용 확인 후 3종의 길항균과 3종의 생육 촉진균주 조합을 구성하여 인삼 유묘의 생장 촉진 및 병원균 방제에 대한 시험을 2개 이상 균주 조합에서 확인 조사하고 이들과 항균 및 식물생장 촉진과의 연관성도 조사하여 좋은 접종원 조합을 인삼 유묘로부터 선발 검정한다.

2. 연구결과 및 고찰

가. 활성 미생물의 인삼 병원균에 대한 생육 저해 활성

길항균 *Burkholderia cepacia* AB100, *Burkholderia cepacia* AB101, *Pseudomonas* sp. AB62, 그리고 *Burkholderia* sp. AB125, *Burkholderia* sp. AB2, *Chaetomium cochliodes* AF1, *Aspergillus terrus* AF2는 기존의 주요 식물 병원균에 우수한 활성을 보임으로써 인삼병원균에 대한 biological agent로써 그 사용이 가능하리라 생각된다. 인삼병원균에 대한 기존 미생물의 억제력을 petri-dish 대치배양 시험으로 측정한 결과는 Table 3-1과 같다.

Table 3-1. Antifungal activity of several antagonists

	Cylindrocarpon destructans	*Rhizoctonia solani*	*Botrytis cinerea*	*Alternaria panax*	*Phytophthora cactorum*
Burkholderia cepacia AB100	+++[1]	++++	++++	++	+++
Burkholderia cepacia AB101	++	+++	+++	++	+++
Pseudomonas sp. AB62	+++	++++	+++	++	++++
Burkholderia sp. AB125	+	+++	+	+++	++
Chaetomium cochliodes AF1	+++	++	++++	++	++++
Aspergillus terrus AF2	+	+++	+	+	++

[1]. Inhibition distance ++++: >15mm, +++: 10-15mm, ++: 5-10mm, +: < 5mm

상기 표에서 보는 바와 같이 AB100, AB62, *Chaetomium*균 등이 대치배양에서 공히 주요 인삼 병원균의 생육을 강하게 억제하였다.

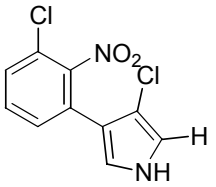
나. 활성 물질의 인삼병균에 대한 억제능 조사

본 연구진은 기존의 2종의 곰팡이와 4종의 세균으로부터 항균물질 Butylrolacton I,

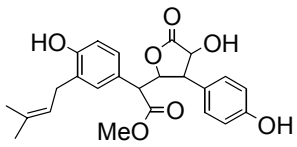
Chaetoglobosin A, N-butylbenzenesulfonamide, phenylacetic acid, phenylacetyl salicylic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, 2,4-diacetylphloroglucinol 그리고, pyrrolnitrin 의 8종의 항균물질을 분리하였다(Table 3-2), (Fig. 3-1), (Kim et al. 1998, Jae et al. 1999-1, Keun et al. 2000, Jae et al. 1999-2).

Table 3-2. Antifungal compounds isolated from antagonists.

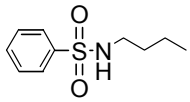
antagonist	antifungal compound
Burkholderia cepacia AB100	Pyrrolnitrin
Burkholderia cepacia AB101	Phenylacetyl salicylic acid, Phenylacetic acid
Pseudomonas sp. AB62	2,4-diacetylphloroglucinol
Burkholderia sp. AB2	N-butylbenzenesulfonamide
Chaetomium cochliodes AF1	Chaetoglobosin A
Aspergillus terrus AF2	Butylrolacton I
Penicillum sp. AF5	*p*-hydroxybenzoic acid



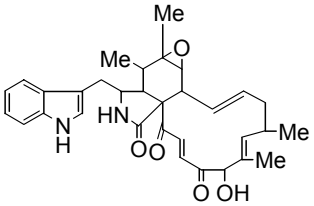
i) Pyrrolnitrin



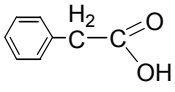
ii) Butylrolacton I



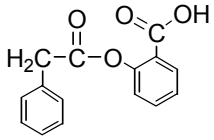
iii) N-butylbenzenesulfonamide



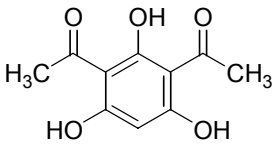
iv) Chaetoglobosin A



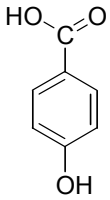
v) Phenylacetic acid



vi) Phenylacetyl salicylic acid



vii) 2,4-Diacetylphloroglucinol



viii) *p*-Hydroxybenzoic acid

Fig. 3-1. Chemical structure of antifungal compounds isolated from antagonists.

이들 8개의 항균물질을 인삼병원균 (*Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria panax* 그리고, *Phytophthora cactorum*)에 대한 억제능을 조사하였다.

항균물질 Butylrolacton I, Chaetoglobosin A, N-butylbenzenesulfonamide, Phenylacetic acid, Phenylacetylsalicylic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid, 2,4-Diacetylphloroglucinol, Pyrrolnitrin을 각각 MeOH에 녹여 PDA (Potato Dextrose Agar)배지에 0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 ppm 되게 처리하여 상기 인삼병원균을 접종하여 그 생육억제 정도를 ED_{50}-probit analysis의 통계적 data 처리로 그 활성을 측정한 결과는 표3과 같다.

Table 3-3. Growth inhibition of ginseng's pathogenic fungi by antifungal compound.

ED_{50} (ppm)

	Cylindrocarpon destructans	*Rhizoctonia solani*	*Botrytis cinerea*	*Alternaria panax*	*Phytophthora cactorum*
Butylrolacton I	>100	49	55	>100	56
Chaetoglobosin A	28	24	1.7	1.2	2.1
N-butylbenzene-sulfonamide	72	>100	83	42	>100
2,4-diacetylphloro-glucinol	47	16	25	17	11
pyrrolnitrin	22	0.05	0.02	26	2.5
p-hydroxybenzoic acid	> 100	> 100	> 100	41	87
phenylacetic acid	> 100	> 100	> 100	57	24
phenylacetyl salicylic acid	> 100	> 100	> 100	29	34

측정에 사용된 8종류의 항균물질중 Chaetoglobosin A, 2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin은 *Cylindrocarpon destructans, Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea, Alternaria panax*, *Phytophthora cactorum*에 대해 좋은 활성을 보였고, 이중 Chaetoglobosin A는 *Botrytis cinerea, Alternaria panax*, *Phytophthora cactorum*에, 그리고 pyrrolnitrin는 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*에 대하여 아주 우수한 항균력을 나타내었다.

다. 활성균에서 인삼병원균 억제물질 분리

기존에 분리했던 길항균 이외에 인삼병원균들에 대해 활성이 좋은 길항균을 시설원예지역 토양으로부터 분리하였다. 그 중 하나를 을 A8로 명명하고, morphological features, chemotaxonomic identification 그리고, 16S rDNA와 같은 동정실험을 통해 길항균 A8을 *Streptomyces* sp.로 동정하였다.

분리한 길항균 A8은 *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, 그리고 *Fusarium oxysporum*에 대치배양한 결과 항균력을 보였다 (Fig. 3-2).

Fig. 3-2. Growth inhibition of phytopathogens by antagonistic *Streptomyces* sp. A8.
Py; *Pythium ultimum*, Ph; *Phytophthora capsici*,
Rh; *Rhizoctonia solani*, Bo; *Botrytis cinerea*, Fu; *Fusarium oxysporum*

길항균 *Streptomyces* A8로부터 항균물질을 분리하기 위해 Bennet 배지에서 20℃에서 5일간 배양한 후 배양액을 원심분리 하여 균체를 제거하고 그 배양여액을 유기용매(chloroform)로 추출하고 $CHCl_3$/MeOH gradient로 1, 2차 column chromatography, prep. TLC를 activity guided bioassay법과 병행하여 2종류의 항균활성물질을 순수 분리하였다(A8AC1, A8C3), (Okami and Hotta 1998).

순수 분리한 항균물질 A8C3의 구조를 동정하기 위하여 UV, IR, EI/MS, 1H-NMR, 13C-NMR 등의 기기분석을 실시하였고, 분광학적 자료와 참고문헌을 비교해본 결과 항균물질 A8C3는 Phthoramycin (=Kaimonolide A)로 확인되었다.(Fig. 3-3)

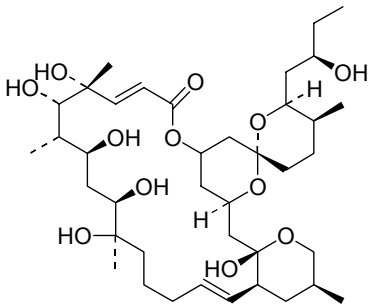


Fig. 3-3. Chemical structure of antifungal compound, Phthoramycin.

또 다른 항균물질 A8AC1은 기존에 *Burkholderia cepacia* AB101에서 분리한 Phenylacetic acid와 같은 물질로 밝혀졌다.
항균물질 Phthoramycin의 병원균에 대한 ED_{50}값을 조사한 결과는 Table 3-4와 같다.

Table 3-4. Growth Inhibition of phytopathogenic fungi by antifungal compound, Phthoramycin.

	ED_{50}	Probit regression line		95% Limits	
		Slope	intercept		
Pythium ultimum	0.03	7.03	1.33	0.02	0.04
Phytophthora capsici	0.02	6.89	1.11	0.01	0.03
Rhizoctonia solani	35.95	3.75	0.81	26.06	53.89
Botrytis cinerea	59.00	3.04	1.11	44.98	85.88
Fusarium oxysprum	14.02	3.59	1.23	10.57	17.80
Cylindrocarpon destructans	12.85	4.73	1.28	9.16	16.54
Alternaria panax	7.68	5.37	1.46	4.79	13.42
Phytophthora cactorum	0.05	5.46	1.75	0.03	0.05

Table 3-4에서 보는바와 같이 phthoramycin은 시험한 모든 균주에 대하여 우수한 활성을 보였으며, 특히, *Pythium ultimum*과 *Phytophthora capsici, Phytophthora cactorum*에 대하여서는 아주 우수한 활성을 보였다. 그러나 아쉽게도 이 항균물질은 고추등 작물에 약해를 나타냈다.

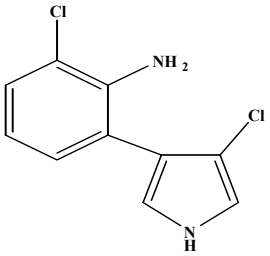
토양에서 분리한 미생물 중 인삼 병원균에 길항력이 우수한 또 하나의 균을 순수분리 했고 이를 AB21로 명명하였다. 이 길항균의 morphological features, chemotaxonomic identification 그리고, 16S rDNA와 같은 동정실험을 한 결과 *Burkholderia cepacia*로 동정하였다. 이 길항균의 주요 식물병원균에 대한 대치 배양은 Fig. 3-4와 같다.

Fig. 3-4. Growth Inhibition of phytopathogens by antagonistic *Burkholderia* sp. AB21.

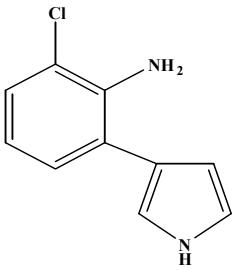
Fu; *Fusarium oxysporum*, Ph; *Phytophthora capsici*,
Rh; *Rhizoctonia solani*, Bo; *Botrytis cinerea*

길항균 *Burkholderia cepacia* AB21로부터 항균물질을 분리하기 위해 Nutrient broth 에서 10℃~15℃에서 3일, 7일간 배양하거나 또는 28℃에서 7일간 배양하였다. 배양액을 원심분리 하여 균체를 제거하고 그 배양여액을 유기용매 (Hexane, Ethylacetate)로 추출하고 Ethylacetate/Hexane gradient로 1,2차 column chromatography, TLC 를 activity guided bioassay법과 병행하여 5종류의 항균활성 물질을 순수 분리 하였다.

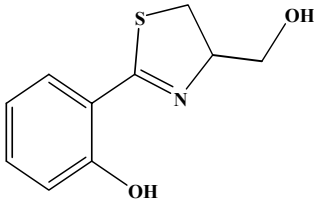
순수 분리한 항균물질들의 구조를 동정하기 위해 UV, IR, EI/MS, 1H-NMR, 13C-NMR 등의 기기분석을 실시 하였고, 분광학적 자료와 참고문헌을 비교해 본 결과 항균 물질들은 각각 Pyrrolnitrin, aminopyrrolnitrin, monodechloroaminopyrrolnitrin, aerugine, and 2-[2-hydroxyphenyl]-4-thiazolecarboxaldehyde 들로 확인 되었다(Fig. 3-5), (Martin et al. 1972, Jung et al. 2003).



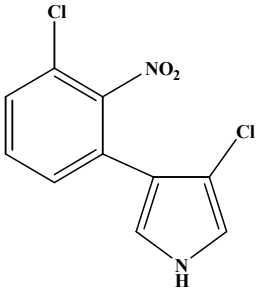
i) monodechloro-aminopyrrolnitrin



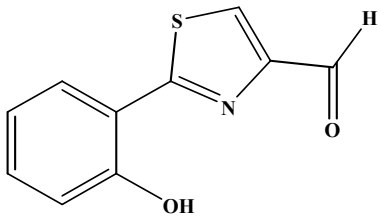
ii) aminopyrrolnitrin



iii) aerugine



iv) pyrrolnitrin



v) 2-[2-hydroxyphenyl]-4-thiazolecarboxaldehyde

Fig. 3-5. Chemical structure of antifungal compounds, pyrrolnitrin, aminopyrrolnitrin, aerugine, 2-[2-hydroxyphenyl]-4-thiazolecarboxaldehyde, monodechloroaminopyrrolnitrin..

Burkholderia cepacia AB21로부터 분리한 항균물질 5가지를 여러 가지 식물 병원성 곰팡이에 대하여 ED50 값을 조사한 결과는 Table 3-5와 같다.

Table 3-5에서 보는바와 같이 AB21로부터 분리 동정한 항생물질들은 test한 모든 균주에 대하여 대부준 뛰어난 활성을 보였으며, 특히, Pyrrolnitrinm, APRN 화합물은 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*에 대하여서는 아주 우수한 활성을 보였다(Yoshihisa et al. 1989, Jolanta et al. 2003).

Table 3-5. Growth Inhibition of phytopathogenic fungi by antifungal compounds,pyrrolnitrin (PRN), aminopyrrolnitrin (APRN), Monodechloroaminopyrrolnitrin(MPRN), aerugine(ARG), 2-[2-hydroxyphenyl]-4-thiazolecarboxaldehyde.

Phytopathogens	ED_{50}(ug/ml)				
Antibiotics	*Py*	*Phy*	*Fu*	*Rhi*	*Bo*
Pyrrolnitrin	12.6	17.5	20.9	0.05	0.02
APRN	10.92	9.8	13.7	0.1	0.1
MCAP	>100	>100	>100	0.4	0.6
Aerugine	43	32	>100	>100	90
TCA	34	29	>100	9.3	18

(MCAP : monodechloroaminopyrrolnitrin, PRN : pyrrolnitrin, APRN : aminopyrrolnitrin)

라. 활성 미생물에서 인삼 생장 촉진 물질 분리 동정

채소(오이, 고추, 토마토)의 유묘에 생장촉진 효과를 보이는 *Pseudomonas fluorescens* B16, *Bacillus* sp. B6과 B*acillus* sp. C8 세균주의 생장촉진 효과는 Table 3-6과 같고 이를 인삼에서도 생장촉진효과가 있는지를 확인하기 위해 1년생 인삼유묘의 뿌리에 각각($1x10^8$/g)되게 접종하고 매달 1회씩 생장촉진균을 추가 접종하였다.

그중 인삼 생장촉진 효과 실험에서 *Bacillus* sp. B6, *Pseudomonas fluorescence* B16균주에서 약간 생장 촉진 효과를 보였다(Fig. 3-6).

인삼 생장 촉진 효과를 보이는 *Pseudomonas fluorescense* B16균으로부터 인삼 생장촉진 물질을 분리하기 위해 LB배지에서 30℃에서 5일간 배양한 후 배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 그 배양액을 유기용매(ethylacetate)로 추출하고 Hexane/EtOAc gradient로 1, 2차 column chromatography, prep. TLC로 8종류(B16A1B16A4, B16B1B16B4)의 분리된 spot들을 확인하였다(Fig. 3-7).

Table 3-6. Effect of microbes on the growth promotion of vegetables.

Microbe	Growth promotion(% control)		
	Cucumber	Red pepper	Tomato
Bacillus sp. B6	123	138	136
Bacillus sp. C8	180	163	169

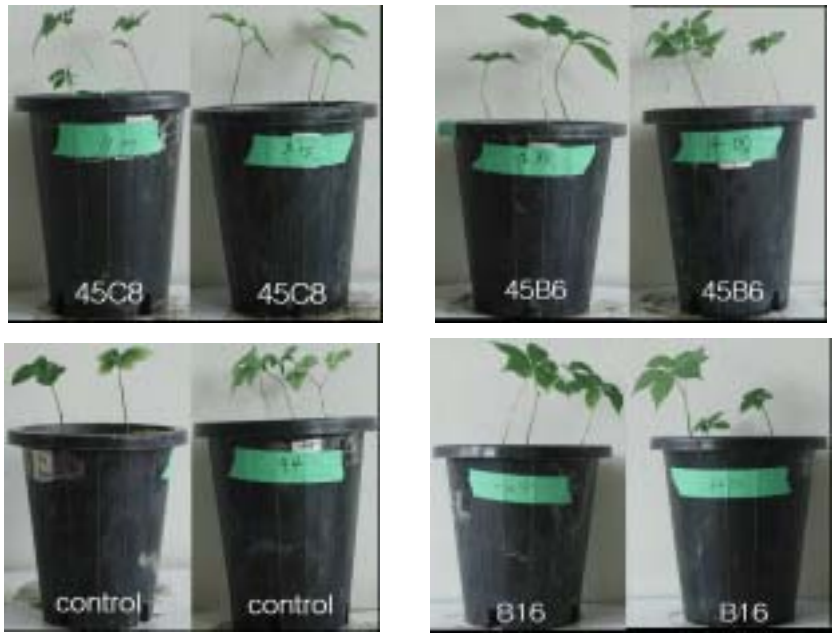
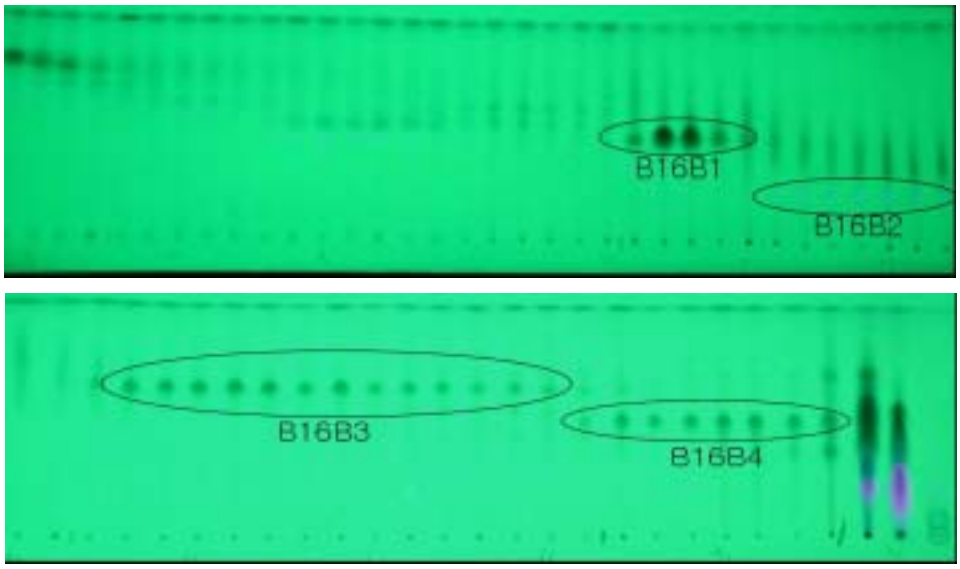


Fig. 3-6. Plant growth promoting bacterial treatment on ginseng seedling growth in pot.

(A)



(B)

(C)

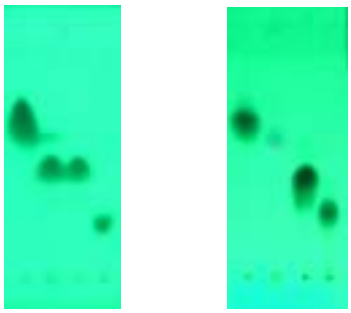


Fig. 3-7. TLC patterns of column eluants of EtOAc extract and purified compound from *Pseudomonas fluorescense* B16. Developing solvent; A) Hexane / EtOAc=20/1, B) Hexane / EtOAc=1/5, C) purified compound (B16A1, B16A4, B16B1B16B4).

그러나 분리 분석했던 물질을 인삼 유묘에 처리한 결과 아쉽게도 유의성이 있을만한 성장 효과를 찾아내지 못했다.

마. 길항균 상호 작용 구명

1) 병원균 생육저해 효과

인삼병원균에 대한 기존 세균(3종)의 억제력을 petri-dish test로 측정하였다. 길항균 *Burkholderia cepacia* AB100은 *Rhizoctonia solani*와 *Botrytis cinerea*에 그리고, *Pseudomonas* sp. AB62는 *Rhizoctonia solani*와 *Phytophthora cactrorum*에 우수한 활성을 보임으로써 인삼병원균에 대한 biological agent로 선정 실험을 수행했다.

Burkholderia cepacia AB100이 생산하는 pyrrolnitrin의 생산력보다 더 우수한 *Burkholderia* sp. AB21을 새로 분리하여 인삼병원균에 대한 biological agent로 사용했다.

Burkholderia sp. AB21는 *Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea,*에 우수한 항균력을 보였다.

2) 길항균 및 생장촉진 균주 상호간 생육 저해력 검정

인삼 병원균에 길항력을 지닌 *Burkholderia cepacia* AB101, *Pseudomonas* sp. AB62, *Burkholderia* sp. AB21 세균주와 생장촉진효과가 있는 *Pseudomonas fluorescense* B16, *Bacillus* sp. B6과 B*acillus* sp. C8 세균주를 서로 섞은 복합 접종원으로 사용 가능성 검정을 위해 균주 상호간 길항력을 검정했다.

인삼 생육 촉진균에 대한 길항균 *Burkholderia cepacia* AB100, *Pseudomonas* sp. AB62, *Burkholderia* sp. AB21의 상호 생육 억제도를 조사한 결과 인삼 생육 촉진균에 대해 세 길항균이 억제하는 clear zone이 관찰되지 않았다(Fig. 3-8).

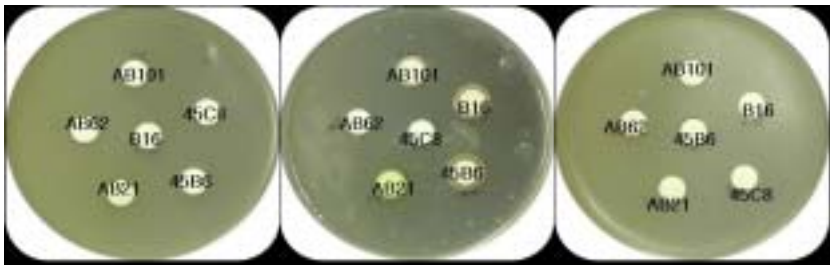


Fig. 3-8. Petri-plate assay for antagonistic effect between antagonists and plant growth promoting bacteria.

3) 복합 처리균의 인삼 병원균에 대한 길항력 검정

길항력이 우수한 *Burkholderia cepacia* AB101, *Pseudomonas* sp. AB62, *Burkholderia* sp. AB21 세 균주와 생장 촉진 효과 가있는 *Pseudomonas fluorescense* B16, *Bacillus* sp. B6과 B*acillus* sp. C8 세 균주를 섞어 복합 접종미생물로 사용하고자 그 길항력을 인삼 병원균과 대치배양 하였다(Table 3-7).

Table 3-7. Antifungal activity of several antagonistic bacteria and antagonistic baterial mixture.

Pathogen / Antagonist	*Cylindrocarpon destructans*	*Alternaria panax*	*Phytophthora cactorum*	*Rhizoctonia solani*
AB101+AB62	++	+	++	++++
AB101+AB21	++	+	++	++++
AB101+C8	++	+	+++	++++
AB101+B6	++	+	+++	++++
AB101+B16	++	+	+++	++++

Inhibition distance ++++: >15mm, +++: 10-15mm, ++: 5-10mm, +: < 5mm, -: no inhibition

Pathogen / Antagonist	*Cylindrocarpon destructans*	*Alternaria panax*	*Phytophthora cactorum*	*Rhizoctonia solani*
AB62+AB21	++	++	+++	++++
AB62+C8	+	+	++	++++
AB62+B6	+	+	+++	++++
AB62+B16	+	+	++	++++

Inhibition distance ++++: >15mm, +++: 10-15mm, ++: 5-10mm, +: < 5mm

Pathogen / Antagonist	*Cylindrocarpon destructans*	*Alternaria panax*	*Phytophthora cactorum*	*Rhizoctonia solani*
AB21+C8	+	+	+++	++++
AB21+B6	+	+	+++	++++
AB21+B16	+	++	++	++++
AB101+AB62 +AB21	+	+	+++	++++

Inhibition distance ++++: >15mm, +++: 10-15mm, ++: 5-10mm, +: < 5mm

Fig. 3-8에서 보는 바와 같이 길항균 상호간 또는 길항균과 생장 촉진균 상호간의 인삼 병원균에 대한 in vitro 항균력은 상호간 저해 효과가 없었기 때문에 복합처리에서도 우수한 항균효과를 얻을 수 있었다.

바. 생육 배지별 길항 물질 생산-소장 연구

pyrrolnitrin은 tryptophan으로 생합성 된다는 보고가 있어(James et al. 2000, Sabine et al. 1998) 이 길항물질의 대량 생산 방법을 강구할 기초 연구로 서로 다른 생육 배지별 pyrrolnitrin과 monochloroamino- pyrrolnitrin, aminopyrrolnitrin 생산량을 비교한 결과는 Fig. 3-9와 같다.

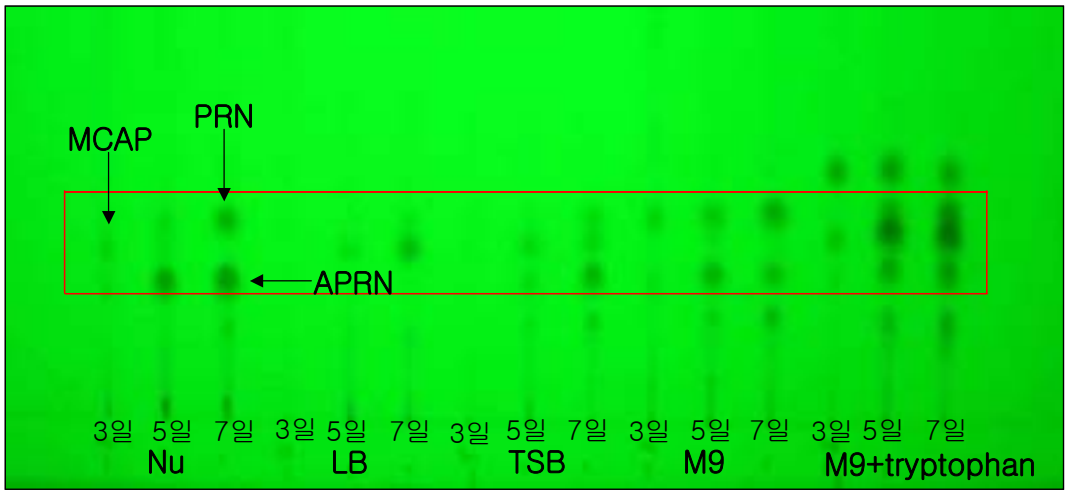


Fig. 3-9. TLC pattern of pyrrole derivative antifungal compounds produced in various growth media.
(MCAP : monodechloroaminopyrrolnitrin, PRN : pyrrolnitrin, PRN : aminopyrrolnitrin) Nu : nutrient broth, LB : Luria-Bertanibroth, TSB : Tryptic soy broth, M9 : minimal medium

상기 그림에서와 같이 nutrient 배지, 최소 배지인 M9 배지에서 pyrrolnitrin을 상당량 생산 했고, 특히 M9 배지에 tryptophan을 첨가한 배지에서 더 많이 생산 했다. 그러나 LB 배지나 TSB배지에서는 생산량이 미약하였다. 아울러 생육기간을 pyrrole 계통의 항균물질 생산 소장을 TLC pattern으로 볼 수 있는데 즉 nutrient 배지에서 볼 수 있는 것처럼 MCAP → APRN → PRN 순서로 생산 하고 있음을 확인했다.

좀더 구체적으로 이들 길항 물질의 생산소장을 알아보기 위해 균을 Nutrient broth에서 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃등 온도별로 생육 시킨 후 pyrrole계통의 3가지 길항물질 생산 소장 관계를 조사했다. 저온 (5℃, 10℃)에서는 생육이 많이 저해되었고, 상온이상 (20℃, 25℃, 30℃)에서는 중간체 물질인 MCAP와 APRN생성을 찾기가 쉽지 않았는데 이는 곧장 최종산물인 PRN으로 전환되기 때문이었다. 따라서 생육 적온보다 낮은 15℃에서 3, 5, 7일간 배양 후 일정량의 배양 여액을 분취하여 HPLC로 각각의 화합물을 분석한 결과는 Fig. 3-10과 같다.

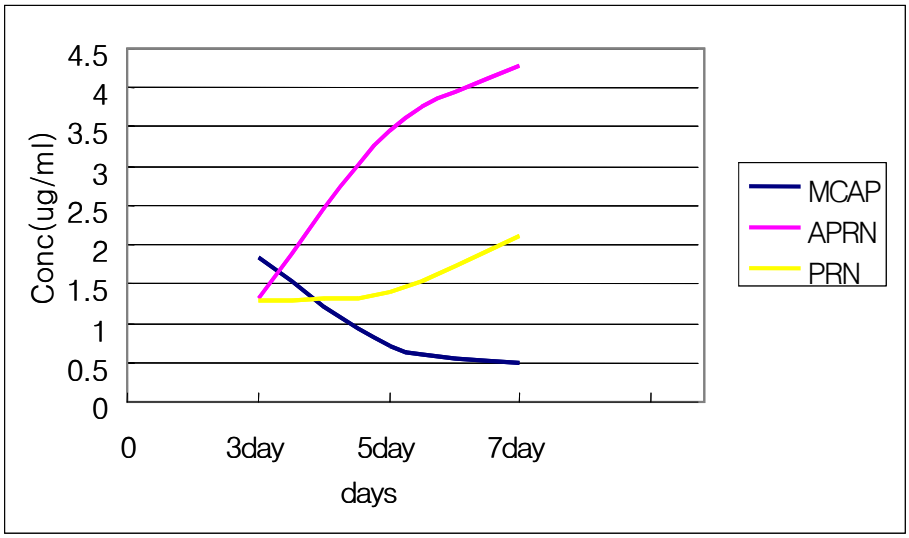


Fig. 3-10. Production profiles of antifungal compounds produced by AB21.

TLC pattern(Fig. 3-9)과 같이 MCAP는 배양 3일 후 그 양이 급격히 감소함을 볼 수 있었고, APRN 생성이 증가하다가 감소하는 추세이며 최종산물인 pyrrolnitrin은 꾸준히 증가함을 보여 그들의 생합성 경로를 확인하였다(Fig. 3-11).

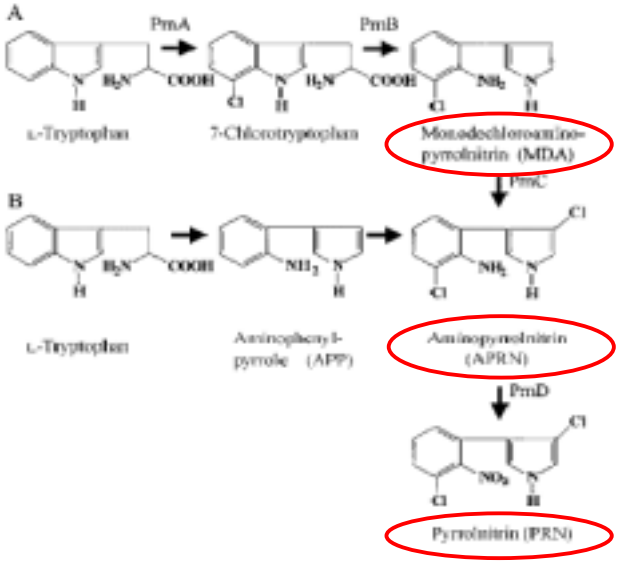


Fig. 3-11. The biosynthetic pathway of pyrrolnitrin production.

상기 연구 결과 중 특히 주목할만 하고 중요한 2가지 사실은 첫째로 생육배지 중 유기성분이 포함되지 않고 무기 영양성분 만으로 구성된 basal minimum 배지인 M9 배지에서 생산된다는 사실은 영양분이 충분하지 못한 자연 토양 내에서나 또는 root exudate가 있는 뿌리근권에서도 생육하면서 항생물질을 생산할 수 있다는 가능성을 제시해 주고 있다. 두 번째로는 저온인 15℃에서 pyrrolnitrin의 전구물질인 MCAP나 APRN을 생산함으로써 비록 모화합물인 PRN보다는 항균활성이 1/10정도 떨어져도 여전히 ED_{50} 값이1 ppm 이하이므로 자연계에서 항균력 유지의 큰 의미가 있을 수 있다고 판단된다. 이는 이 균이 자연계 토양에서 분리된 균으로 다양한 환경조건에서 잘 적응하고 있는 균임을 증명해 준다.

사. 길항균의 토양 중 길항 물질 생산 소장 구명

인삼 종자 및 유묘의 병 방제 가능성을 조사하기 위해 길항균을(10^5~10^9/g) 토양에서 처리한 후 10, 15, 25일 이 지난 뒤 MeOH로 토양을 추출하였다. 이를 농축 후 H_2O에 희석하고, saturated NaCl용액 50ml 첨가한 뒤 Hexane으로 추출하여 TLC로 분리 생산 소장여부를 확인하였다. TLC 확인 결과 에서는 pyrrolnitrin만 확인이 가능하였고, 각각 10일, 15일, 25일 추출물에서 10^5~10^7을 제외한 10^9 에서만 확인 가능 하였다. (Fig. 3-12)

Burkholderia cepacia AB21 균의 경우 10^9 cfu/g soil 처리 후 10일 15일된 토양추출물에서 TLC 확인 가능했다. 접종 25일 후 토양 중 pyrrolnitrin 축적은 다소 감소되었다. 아직까지 길항균 접종으로 토양 내 더욱이 비 멸균상태의 토양에서 항생물질을 확인한 결과는 아주 드문 현상인데 저희가 분리했던 Pyrrolnitrin의 항균활성이 *Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea*에 특히 강한(LD_{50} <0.1ppm) 것을 감안하면 토양 중 이들 균의 항균 활성을 확인 할 수 있는 우수한 결과를 얻었다.

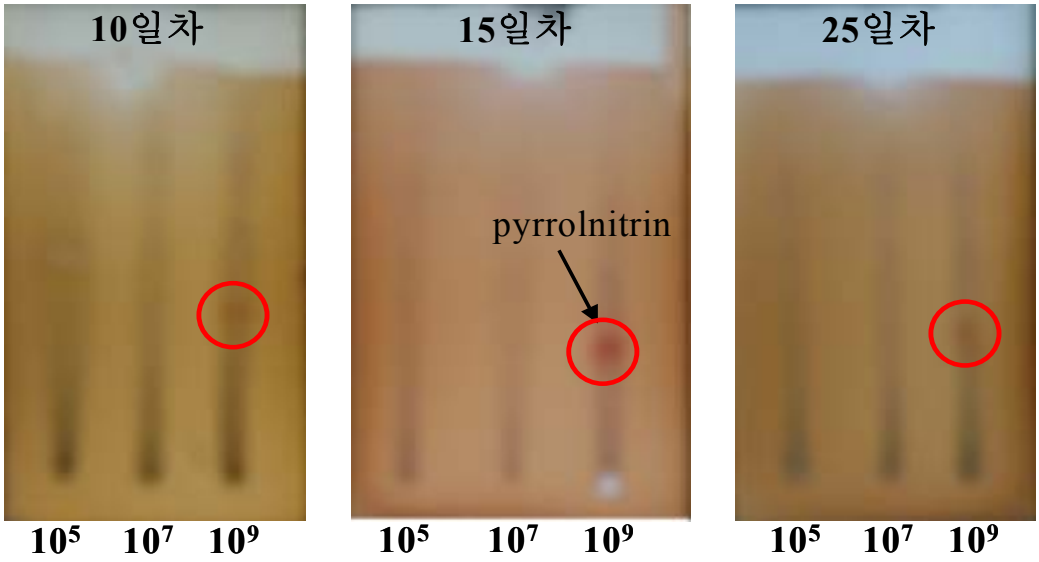


Fig. 3-12. Production of an antifungal compound pyrrolnitrin in soil ammended by different numbers of bacterial colonies of *B.cepacia* AB21. Soil were inoculated with 10^5, 10^7, 10^9/g soil and incubated 20℃ for 10, 15,25 days. The soil sample was extracted with MeOH and concentrated in vacuo followed by hexane extraction(dye reagent : ninhydrin, developing solvent (hexane : EtOAC =3:1)).

아. 길항균 AB21이 생산한 길항물질의 주요 병원균에 대한 효과검정

AB21균이 생산하는 5가지 화합물 즉 Pyrrolnitrin, aminopyrrolnitrin, aerugine, monodechloroaminopyrrolnitrin, and 2-[2-hydroxyphenyl]-4-thiazolecarboxaldehyde을 대량 배양 한 후 순수분리하여 약 50mg 이상을 얻은 후 화학연구소 농약 screening 연구부에 의뢰하여 주요 식물 병원균에 대한 방제 효과 검정을 실시했다 (Table 3-8).

Table 3-8. The effect of antifungal compounds produced from B*urkholderia cepacia* strain AB21 against plant disease.

Compound	Conc. (ug/ml)	RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
PRN	6.25	85	85	17	20	0	0
	25	100	85	25	50	60	8
	100	100	100	86	65	88	69
MCAP	25	69	10	0	60	33	23
	100	94	85	8	50	27	0
	400	100	95	58	88	97	77
APRN	25	13	0	0	30	0	31
	100	56	10	25	83	0	46
	400	100	50	50	96	95	38
ARG	25	10	5	0	0	0	0
	100	10	0	0	10	0	31
	400	50	0	0	75	0	84
TCA	25	0	0	0	10	0	0
	100	0	0	0	20	0	0
	400	85	35	0	65	0	0

BPM : barley powdery mildew TLB : tomato late blight WLR : wheat leaf rust
TGM : tomato grey mold RSB : rice sheath blight RCB : rice blight

표에서 보는 바와 같이 pyrrolnitrin은 in vitro 시험결과와 유사하게 100ppm 처리에서 도열병(*P. oryzae*), 잎집무늬마름병(*R. solani*), 토마토 잿빛 곰팡이병(*B. cinerea*)에 85%이상 방제가를 보이는 아주 우수한 활성을 가졌다. 이같이 AB21균은 1) 토양 내 접종함으로써 분리, 분석이 가능할 정도의 길항물질을 생산하고, 2) 이들 길항물질들이 in vitro 활성은 물론이요, in vivo test에서도 활력을 보여 아주 우수한 길항 능력을 가진 길항균 임을 다시 한 번 더 입증했다.

자. 복합 접종원 개발

인삼 병원균에 대한 길항미생물과 생장 촉진 미생물들의 조합으로 인삼 유묘의 생장 촉진 및 병원균 방제에 대한 pot 실험을 실시하였다. 건전한 묘삼을 선정하여 일정한 길이로 분포 시킨 후, 병원성 곰팡이로 오염된 토양에 심고, 길항 미생물 및 생장

촉진 미생물을 복합 시용하여 그 효과를 알아보았다(Fig. 3-12).

Control (Treated with mixed pathogens)

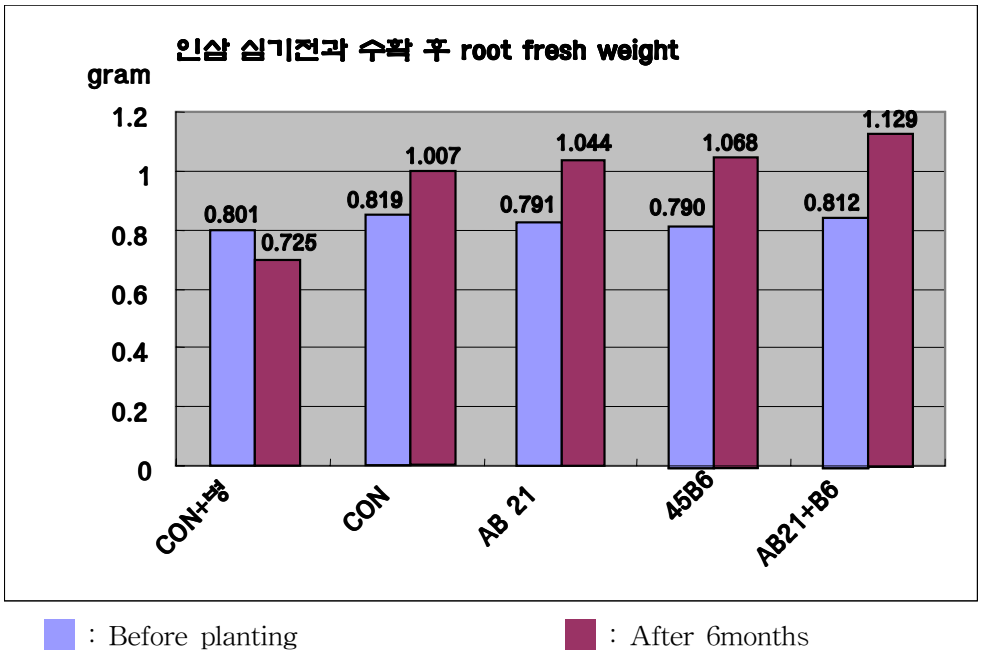
Treatment of AB21 on infested soil

Treatment of B6 on infested soil

Treatment of antagonist AB21 and PGPR B6 on infested soil

Fig. 3-13. The effect of antifungal bacteria AB21 and plant growth promoting rhizobacteria B6 by using complex inoculum.

위 실험 결과는 병원성 곰팡이 만을 처리 하였을 때는 뿌리 중간부분의 절단과 썩음으로 인해서 성장하지 못하고 죽는 개체들이 생길뿐더러 약하고 느린 성장을 보였고, 길항미생물 및 성장 촉진균을 따로 시용하였을 때는 좀 더 나은 성장을 보였다. 또한 길항미생물과 성장 촉진 균주를 복합 시용하였을 때는 가장 좋은 성장을 보였다. 그리고 이를 인삼을 심기전과 6개월 후 root fresh weight를 비교 분석 하였고, 또한 6개월 후 각각의 root length를 비교하였다(Fig. 3-13).



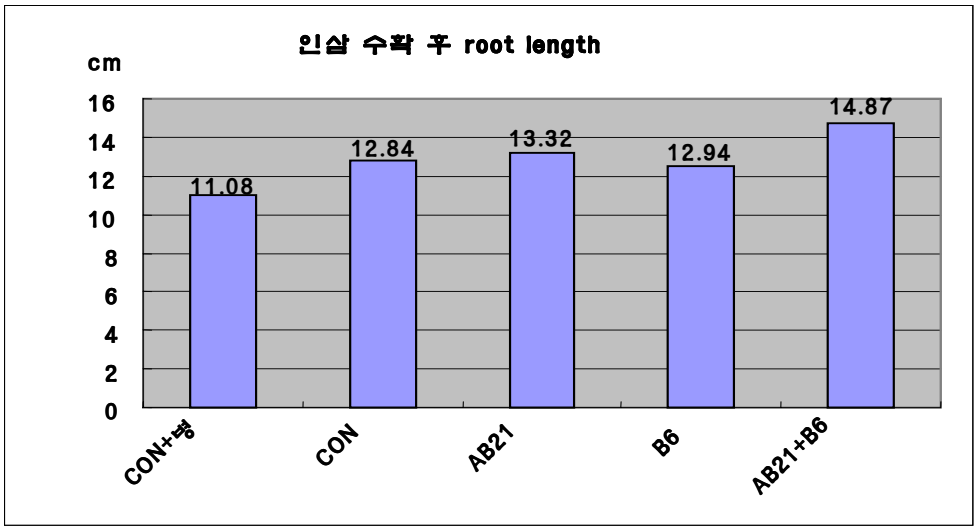


Fig 3-14. The effect of antifungal bacteria AB21 and plant growth promoting rhizobacteria B6 by using complex inoculum. The comparisons were made on root fresh weight and root length, respectively. The data were obtained from average of 5 plant/pot for 5 replicate pots.

상기 그림에서 보는 바와 같이 길항균 AB21균과 생장 촉진균 B6과의 복합 접종원으로 사용한 경우 뿌리 생육 및 길이에서 병원균만을 접종한 pot나 완전 무처리 pot보다 각각 root fresh weight는 155%, 112% 증가하였고, root length는 134%, 110% 증가 하였다.

3. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	제 2협동과제 1차년도 (2001-2002)
연구개발 목표	1. 활성 미생물과 5가지 인삼병원균에 대한 직접 억제기능 조사 2. 기존 활성 신물질의 인삼병균에 대한 억제능 조사, 유망한 길항 물질 선발 3. 새로운 항균 활성균 에서 인삼병원균 억제 물질 분리 동정
달성도	1. 기 분리한 길항균(*Burkholderia cepacia* AB100, *Burkholderia cepacia* AB101, *Pseudomonas* sp. AB62, *Burkholderia* sp. AB125, *Chaetomium cochliodes* AF1, *Phenycillum* sp. AF5 그리고 *Aspergillus terrus* AF2)에 대한 인삼 병원균 (*Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria panax* 그리고 *Phytophthora cactorum*)생육억 제력 조사 (100%) 2. 길항물질(Butylrolacton I, Cheatoglobosin A, N-butylbenzene sulfonamide, phenylacetic acid, phenylacetyl salicylic acid, *p*-hydroxy benzoic acid, 2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin)의 인삼 병원균에 대한 in vitro 생육 억제 정도를 ED_{50}-probit analysis의 통계적 data 처리로 그 활성을 측정 (100%) 3. *Streptomyces* sp.로부터 phthoramycin, phenylacetic acid 분리·구조 동정 및 길항력 조사 (100%)
관련 분야의 기여도	여러 가지 항균 활성 미생물에 의한 인삼 병원균의 억제능을 조사하고, 유망한 길항 물질을 선발하여 활성 기작을 밝히고, 미생물이 포함된 생물 농약의 개발가능성 확인

구분	제 2협동과제 2차년도 (2002-2003)
연구 개발 목표	1. 활성 미생물에서 인삼 생장 촉진 물질 분리 동정 2. 길항균 상호작용 기작 구명 3. 복합 길항균의 근권 안정성 및 길항 물질 생산 소장 구명
달성도	1.활성 미생물의 인삼 생장 촉진물질 분리 동정 -생장촉진 미생물 B6와 C8균은 오이, 고추, 토마토 생육촉진 효과가 120180% -B6와 B16균주는 인삼 유묘의 생육 촉진 확인 -B16 배양여액 EtoAc 추출물 토마토 유묘 생장 촉진 효과 구명 -B16 배양여액 중 8 fraction을 분리, 정제하여 생장촉진 효과 검정 (100%) 2. 길항균 상호 작용기작 구명 - 길항균 3종(AB101, AB62, AB100)균 및 신규 AB21 균에 의한 길항력 확인 - 신규 길항균 AB21 균의 pyrrolnitrin 생산량 증가 및 2종류 길항물 질 분리 동정 - 길항균 및 생장 촉진균 상호간 길항력이 없음을 확인하고 복합 접종 원 조합 구성, 길항력 검정 (100%) 3. 복합 길항균의 근권 안정성 및 길항 물질 생산 소장 규명 - *Burkholderia cepacia* strain AB21에서 생산되는 여러 가지 항균활 성물질의 토양 중 생산 여부와 그 과정에 관한 연구 (100%)
관련 분야의 기여도	인삼 생장 촉진 미생물과 길항균 상호간 길항력 유무를 확인하고, 길항균에서 생산되는 항균활성 물질의 토양 중 생산 여부를 알아본 결과 미생물 시용으로 인삼 생육에 좋은 효과가 있을 것으로 기대된다.

구분	제 2협동과제 3차년도 (2003-2004)
연구 개발 목표	1. 유망 신물질 다량 생산 방법 개발 2. 복합 inocula 개발
달성도	1.유망 신물질 다량 생산 방법 개발 - AB21 균이 생산하는 pyrrolnitrin, aminopyrrolnitrin, monodechloro amino- pyrrolnitrin, aerugine, and 2-[2-hydroxyphenyl] -4-thiazolecarboxaldehyde을 최대로 생산 하는 최적 배지 조성 - AB21 균주의 토양 접종시 항균활성 물질의 생산량 검정 (100%) 2. 복합 inocula 개발 - 3종류의 길항균과 3종의 생육촉진균주 조합에서 인삼 유묘의 생장 촉진 및 병원균 방제력 조사 (100%)
관련 분야의 기여도	복합 접종원을 개발하여 pot test를 실시 한 결과 병 억제능력 및 생장 촉진 효과가 있음을 확인함으로써 이러한 미생물로 만든 생물농약의 가능성 확인.

4. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

길항균 *Burkholderia cepacia* AB21균은 *Rhizoctonia* 와 *Botrytis*에 아주 강력한 활성 (ED_{50} < 0.05ppm) 갖는 pyrrolnitrin을 자연토양에서 추출 할 수 있을 만큼 그것도 접종 후 25일 이후까지도 생산 할 수 있다는 것은 아주 획기적인 발견이다. 이 화합물을 기초로 한 화학적 합성을 유기 합성 전문가와 상의 해 본 결과 아주 어려운 화학적 구조로 밝혀졌다. 그러나 최근 이를 근간으로 하는(구조는 상이하지만) fludioxanil 이라는 새로운 농약이 개발되어 현재 잿빛곰팡이병 (Gray mold) 전문약으로 등록되어 있다. 이는 천연 길항물질로부터 천연물을 근간으로 하는 lead compound 생산 가능성을 열어 주었고 차후 학제간 연구를 통해 이런 분야의 연구를 확대 보급할 수 있었으면 한다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 목표달성도

1. 제품개발단계

가. 길항균 *B. subtilis* B4228 근부병방제 및 적피억제 액제 및 분제의 개발
특허출원(출원번호:제2002-67963호)을 하였으며 제조허가(등록번호:제10-(21)-나-12-4호)를 얻어 출시 시제품을 만들었음.

나. 길항균 *B. cepacia* AB100을 이용하여 근부방제제 특허출원(출원번호:제2002-10918호) 하였으며 제품허가와 제조허가 준비중.

다. 유도저항성 세균 *Bacillus* spp. B1141+B1142 근부병방제제의 개발.
특허출원, 제품허가 및 제조허가 단계까지 자료가 완결되어 준비중.

라. 근권개선 유기물+유용미생물제제 개발.
유효수준(10^8cfu/g)의 길항균을 갖는 유기물제를 경제적으로 제조할 수 있고 포장 효과까지 보았으므로 포장시험만으로 제제화 가능.

2. 특정목표용 유망균주선발

가. 생육촉진성 세균 *Bacillus* sp. B6+길항성균 *Burkholderia cepacia* AB21 혼합제제의 개발.
균선발 혼합 안정성 pot 시험이 완료되었으며 AB21은 저온기간에 도 길항물질을 분비하므로 월동기 잿빛곰팡이병균에 의한 뇌두썩이병 방제효과가 기대됨. 포장시험만 남아있어 1~2년내 제품화가 가능함.

나. 강력 길항성 *Streptomyces* sp. A8의 선발.
강력한 항생제 phthoramycin이 근권에 서서히 퍼지도록 할 수 있는 제제로 pot 및 포장시험이 필요. 최근 *Pythium*균이 문제가 되는 곳이 많은데 이 균은 특히 *Pythium*에 특효할 것으로 기대.

3. 경제적 배지 및 대량배양 방법개발

경작자들의 생산비 절감에는 모든 자재가 저렴해야한다. 미생물제제도 냉동건조 등 고비용생산 방식을 가능한 한 피하여 본 연구에서 저렴한 배지를 선발하였다. 액

체배양도 간단한 시설로 생산할 수 있는 방법을 개발하여 인삼 경작농가에 부담이 적은 저가의 미생물제제를 출시할 수 있도록 하였다.

4. 선발 균주들(B4228, AB100, B1141+B1142)의 관주가 현행 농약처리구보다 이병주 감소와 수량증대를 가져온 포장결과를 얻음.

5. 연중 인삼 Bioassay(종자 또는 유묘검정) 기술 개발.
   본 과제 수행을 진행중 개발되었음.

6. 길항균으로부터 인삼병원균 저해물질 분리동정 기술 개발 및 대량생산 기술 확립 강력 항생제 phthoramycin 등 천연물 인삼농약개발의 기반조성

7. 길항균분비 길항물질의 토양중 농도 분석 기술 개발.
   활성물질의 토양중 미량 정량 기술은 미생물 기능해석, 근권 정착 해석과 천연 살균물질 농약화에 필수 기술임.

제 2절 관련분야에의 기여도

1. 원료삼의 청정화 및 품질, 수량증대와 수출증대.
   개발 미생물제 처리와 현행 농약구보다 이병근수감소와 수량증대를 가져왔음으로 새로운 근부 방제약으로 인식되어 잔류성 농약을 기피할 것임.

2. 인삼생산에서 농약비 절감.

3. 생물농약개발 촉진.
   연중 bioassay 기술은 특히 인삼 생물농약개발에 활용 될 것이며 유도저항성 검정기술, 길항성 또는 생육촉진물질 분리동정 기술은 모든 생물농약개발에 적용 될 수 있다.

4. 개발 미생물제의 타작물에의 이용.

현재 우리나라의 작부체계상 연작에 의한 토양병 발생은 인삼뿐만 아니라 거의 모든 밭작물에서 나타나고 있는 양상이다. 본 과제를 통해 개발된 미생물제제는 토양병

원균에 대한 항균활성이 폭넓게 작용하므로 각종 작물의 유묘기 잘록병 및 요즘 빈번한 발병으로 문제시 되고 있는 고추역병 등 타 작물의 토양병에 대한 방제효과가 있을 것으로 생각되며 인삼에 비하여 단기간 재배되는 타 작물에 있어서의 생장촉진효과는 수확량 증대에 기여할 것으로 기대되어 추후 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 기업화 추진방안

1. 2005년도에 하야미를 출시하고자 한다. 12개 인삼농협을 통하여 일괄구매 또는 환원사업(지방자치단체의 50%보조) 대상으로 판매하고, 생산자 개인의 직접구매 방식을 통하여 판매하고자 한다.
2. 유도저항성 제제는 금년도에 특허출원 및 제품허가를 얻어서 2006년부터 출시하고자 한다.
3. 개발된 미생물제제를 사용하는 농가들에게는 잔류농약 사용억제와 연관시키고 본 사는 인삼제품용 원료 구입 대상으로 할 것이다.

제 2절 추가연구

1. 이들 제품들이 현행 화학농약 감량 또는 쓰지 않는 방향으로 적용하는 농가 공동시험이 필요하다.
2. 유도저항성 제품에 대하여는 2005년도에 제제화 연구가 필요하다.
3. 길항균 AB100+ 생육촉진균 B6 혼합제의 제품화를 위하여 2004~2005년의 포장시험과 제제화 연구가 필요하다.
4. 길항균 AB100+AB62 혼합제의 제품화를 위하여 배지개발 및 포장시험이 필요하다.
5. *Burkholderia cepacia* AB100은 유도저항 유기물질인 Phenylacetyl salicylic acid를 생산하므로 활용성 검토가 필요.
6. 근권 유용미생물의 밀도를 조사하기 위해 rifampicin 내성유기 또는 fluorescent protein gene cloning 하여 실험에 사용하였으나 포장시험에서 생물학적 오염 등의 제약요인으로 작용하였다. 추후 이에 대한 기술 연구가 필요하다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 중국에서의 인삼병 생물적 방제 연구 논문

가. Yang Yang, et al. Shaker flask fermentation experiment of *Streptomyces* of anti-fungal disease of ginseng used in ginseng production. JOURNAL OF MICROBIOLOGY. 2002. 22(3):56-58.

나. Ma Fengru, et al. Control of disease of ginseng. Special Wild Economic Animal and Plant Research. 1988. (3):46-47.

다. Wu Lianju, et al. Studies on the control of Cylindrocarpon destructans of ginseng by soil antagonistic microbes. Chinese Journal of Biological Control. 1999. 15(4):166-168.

제 7장 참고문헌

Bae, Y. S., Shim, C. K., Park, C. S., and Kim, H. K. 1995. Synergistic effect of *Gliocladium virens* and *Pseudomonas putida* in the cucumber rhizosphere on the suppression of cucumber Fusarium wilt. Kor. J. Plant Pathol. 11(4): 287-291.

Bae, Y.-S, H. K. Kim, and C. S. Park. 1990. An Improved method for rapid screening and analysis of root colonizing ability of biocontrol agent. K. J. of Plant Pathology 6: 325-332.

Bae, Y.-S., S. S. Jang, C. K. Park, and H. K. Kim. 1995. In vitro and greenhouse evaluation of cucumber growth enhanced by rhizosphere microorganisms. K. J. of Plant Pathology 11: 292-297.

Benhaumu, N., Kloepper, J. W., Quadt-Hallman, A., and Tuzun, S. 1996. Induction of disease-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiol. 112:919-929.
Berdy, J. 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbio.* 18:309-406.

Betina, V. 1994. Bioactive secondary metabolites of microorganisms. Elservier, Amsterdam.

Biopesticides Vol.(1). CPL Scientific Information Services Limited June 1999. pp 195.

Biopesticides Vol.(2). CPL Scientific Information Services Limited June 1999. Induced plant defenses against pathogens and herbivores. 1999. Ed. by A. A. Agrawal, S. Tuzun, and E. Bent. pp390.

Franklin R. H. and Julius J. M. 1999. Biopesticides. Humana Press.

Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* with an antibiotic produced by the

bacterium. *Phytopathology* 69: 480-482.

Jack, A. L. and Lobert, P. L. 1998. Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. Biological Control 12: 182-190.

Jae Gon Kang, Keun Ki Kim, and Kyu Young Kang. 1999. Antagonism and structural identification of antifungal compound from *Chaetomium cochliodes* against Phytopathogenic fungi *Agric. Chem. Biotechnol*. 42 :146-150.

Jae Gon Kang, Sun Tae Kim, and Kyu Young Kang. 1999. Production of the antifungal compound Phenylacetic acid by antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. *Agric. Chem. Biotechnol.* 42: 197-201.

James M. Ligon., Dwight s. Hill., Philip E. Hammer., Nancy R. Torkewitz., Dirk. Hofmann., Hans-Joachim. Kempf. and Karl-Heinz. Pee. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest manag. Sci.* 56: 688-695.

Jetiyanon, K. and Kloepper, J. W. 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological Control 24:285-291.

Jolanta J. Levenforsa, Rikard Hedmana, Christian Thaningb, Berndt Gerhardsonb, Christopher J. Welcha. 2003. Broad-spectrum antifungal metabolites produced by the soil bacterium *Serratia plymuthica* A 153. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 677-685.

Joy, A. E. and Parke, J. L. 1995. Biocontrol of Alternaria leaf blight on America ginseng by *Burkholderia cepacia* AMMD. In: Proceeding of International Ginseng Conference. W. G. Bailey, C. Whitehead, J. T. A. Proctor and J. T. Kyle (eds), Vancouver, Canada. pp. 93-100.

Jung Yeop Lee, Surk Sik Moon, and Byung Kook Hwang. 2003. Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas*

fluorescens strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 2023-2031.

Kang, J. G., K. K. Kim and K. Y. Kang. 1999. Antagonism and Structural Identification of Antifungal Compound from *Chaetomium cochliodes* against Phytopathogenic Fungi. Agricultural Chemistry and Biotechnology 42(3): 146-150.

Kang, J. G., S. T. Kim and K. Y. Kang. 1999. Production of the Antifungal Compound Phenylacetic Acid by Antagonistic Bacterium *Pseudomonas* sp. Agricultural Chemistry and Biotechnology 42(4): 197-201.

Kang, J. H. and Park, C. S. 1997. Colonizing pattern of fluoresent pseudomonads
on the cucumber seed and rhizoplane. Korean J. Plant Pathology. 13(3): 160-166.

Keun Ki Kim, Jae Gon Kang, Suk Sik Moon, and Kyu Young Kang. 2000. Isolation and identification of antifungal *N*-Butylbenzenesulphonamide
produced by Pseudomonas sp. AB2. *Journal of Antibiotics.* 53: 131-136.

Khetan, S. K. 2001. Microbial pest control. Marcel Dekker, New York. 300 pp.

Kim, H. K., Kim, C. Y., Kim, S. H., Yu, Y. H. and Huh, H. 2000. Production of Antibacterial 2,5-Dimethoxy-1,4-Benzoquinone in suspension cultures of *Panax ginseng*. 논문초록(추계). 17-18. 고려인삼학회.

Kim, J. W., B. K. Par, Ingyu Hwang, C. S. Park. 1998. Antifungal activity of root colonizing *Peudomonas fluorecsens* MCO7 is responsible for its disease suppression ability. Korean J. Plant Pathology 14(6): 1-9.

Kim, J. W., O. H. CHoi, J. H. Kang, C. M. Ryu, M. M. Jeong, J. W. Kim and C. S. Park. 1998. Tracing of Some root colonizing *Pseudomonas* in the rhizosphere using *lux* gene introduced bacteria. Korean. J. Plant Pathology 14(1): 13-18.

Kim, K. K., J. G. Kang, S. S. Moon and K. Y. Kang. Isolation and Identification of Antifungal *N*-Butylbenzenesulphonamide Produced by

Pseudomonas sp. AB2. 2000. J. Antibiotics 53(2): pp. 131-136, 2000.

Kim, K. K., Kang, J. G., Choi, Y. L., Yun, H. D., Ha, H. S. and Kang, K. 1998. Characterization of an antifungal compound isolated from an antagonistic fungus *Aspergillus terreus* against phytopathogenic fungi. *Kor. J. Pesti. Sci.* 2: 40-45.

Kim, K. K., Y. L, Choi, H. D. Yun, H. S. Ha and K. Y. Kang. 1998. Characterization of an antifungal compound isolated from an antagonistic fungus *Aspergillus terreus* against phytopathogenic fungi. 농약과학회지 2(1): 40-45.

Leeman, M., Van Pelt, J. A., Den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M. and Schippers, B. (1995). Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology 85, 1021-1027.

Park. C. S. 1995. Impact of rhizosphere competence of biocontrol agents upon diseases suppression and plant growth promotion Proc. Int. Symp. on biological Control of Plant Diseases held in Suweon pp.27-49.

Yeom J. R. and C. S. Park. 1995. Enhancement of plant growth and suppression of damping off of cucumber by low temperature growing Pseudomonas *fluorescens isolates*. J. Korean Plant Pathology. 11(3): 151-157.

Park. C. S. and J. H. kang. 1996. Colonization pattern of seed treated fluorescent Pseudomonas on the cucumber rhizosphere at early growth stage. Advances in Biological control of Plant Diseases, China Agricultural University Press, Beijing China 288-294.

Ryu, C. M. and Park. C. S. 1997. Enhancement of Plant growth induced by endospore forming PGPR strain, *Bacillus polymyxa* E681. In Proceeing of the fourth international workshop on plant growth-promoting rhizobactreia. Japan-OECD Joint workshop. pp 186-190.

Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in

cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 85:695-698.

Liyu, Advance in Diseases of Ginseng of China jilin Agriculture University, China, pp.77-97.

Martin, L. L., Chang, C. J., floss, H. G., Mabe, J. A., Hagaman, E. W. and Wenkert, E. 1972. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study on the biosynthesis of pyrrolnitrin from tryptophan by Pseudomonas. *J. Am. Chem. Soc.* 94: 8942-8944.

Nejad, P. and Johnson, P. A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion in oilseed rape and tomato. Biological Control 18:208-215.

Ohh, S. H. 1986. Diseases of ginseng: Environmental and host effect on disease outbreak and growth of pathogens. Korean J. Ginseng Sci. 5:73-84.

Ohh, S. H., Yu, Y. H., Kim, K. H. and Cho, D. H. 1992. Studies on control of soilborne diseases and insects of ginseng and development of antifungal compound. In: Ginseng Cultivation Bul. Korean Ginseng and Tobacco Research Inst. pp. 121-184.

Okami, Y. and Hotta, K. 1988. Search and discovery of new antibiotics. In Actinomycetes in Biotechnology (Goodfellow, M., Williams, S. T. and Mordarski, M.). Academic Press, 33-67.

Park, C. S., Jin W., Kim and O. H. Choi, 2000. Attributes of some root colonizing bacterial strains associated with biological control of soil borne disease. Proceedings of International Symposium on "Biological Control for Crop Protection" held in Suwon Korea 67-86.

Park, K., Min, J. Y., Kim, C. H. and Kloepper, J. W. 2000. Induction of systemic in cucumber and tobacco plants by a bacterial cell surface fraction of *Burkholderia cepacia* strain 923-87. Proceeding of 5th International workshop on PGPR in Argentina.

Sabine Kirner, Philip E. Hammer, D. Steven Hill, Annett Altmann, Ilona Fischer, Laura J. Weislo, Mike Lanahan, Karl-Heinz van Pee, and James M. Ligon. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*. 180: 1939-1943.

Stevenson, I. L. and Rouatt, J. W.1987. Qualitative studies of soil microorganisms. *Can. J Botany* 31: 438-447.

Teather, R.M. and Wood, P.J. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and charaterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. App. Environ. Microbiol. 43:777-780.

Thomashow, L. S. and Weller, D. M. 1990. Role of antibiotics and siderophores in biological control of take-all disease of wheat. Plant Soil 129:93-99.

Tuzun, S. and Bent, E. 1999. The role of hydrolytic enzymes in multigenic and microbially-induced resistance in plants. pages 95-115. In Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture. Ed. Agrawal, A. A., Tuzun, S., and Bent, E. APS Press, pp. 390.

Van Loon, L. C., Bakker, P., and Pieterse, C. M. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Ann. Rev. Phytophathol 36:453-83

Wei, G., Kloepper J. W., and Tuzun, S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseased plant growth bty plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. Phytopathology 86:221-224.

Weller, D. M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407.

Yoshihisa Homma, Zenji Sato, Fukushi Hirayama, Katsuhiro Konno, Haruhisa Shirahama and Takahito Suzui. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 723-728.

김홍진, 정영륜, 이순구, 오승환, 김요태. 1982. 인삼토양 병해의 생물학적 방제연구(재배분야). pp.46-63.

김혜, 허영화. 2004. 중국 인삼산업 발전 전략. 고품질 인삼생산을 위한 기술적 접근 전략(2004년 학술심포지엄). 농촌진흥청 작물과학원. pp.5-18.

농림부(농산물유통국). 2000. 인삼산업 중장기 발전대책안(공청회 자료). p.3.

농업과학기술원. 2000. 토양 및 식물체 분석법. pp.202.

박 창 석. 1995. 저온성 근권미생물과 생물적 방제 미생물 자원개발 연구. 농업논문집('94농업산학협동). 37: 119-129.

박 훈. 인삼생육활성 미생물에 의한 고품질인삼 증대방법. 1999. 발명신고서 특허청-특허출원(번호)66543.

오승환, 박창석, 정영륜. 1980. 경작지 미생물생태 및 생물적 방제연구. 인삼연구보고서(재배분야). pp.23-46.

유성준. 2004. 인삼 뿌리썩음병(*Cylindrocarpon destructans*)의 미생물살균제 개발 및 상용화. 환경 친화적 식물병방제 대응기술개발(2004 학술 심포지엄), 농업과학기술원. pp.105-148.

이순구. 2004. 인삼 뿌리썩음병 관련 *Fusarium* species와 그 병원성. 식물병연구 10(4); 248-259.

인삼 농약 안전사용지침. 2004. 농림부 국립농산물 품질관리원. pp.6.