

317007  
-3

인삼뿌리썩음병  
길항미생물  
제재 및  
방제기술개발

최종보고서

2020  
농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )  
농생명산업기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003163-01

# 인삼뿌리썩음병 길항미생물 제재 및 방제기술개발

최종보고서

2020. 07. 10.

주관연구기관 / 경희대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 경기도농업기술원  
농업회사법인 투엠바이오(주)  
위탁연구기관 / (주)코젠바이오텍

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

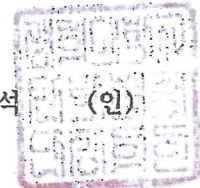
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “인삼뿌리썩음병 길항미생물제제 및 방제기술개발”(개발기간 : 2017. 04. 21 ~ 2019. 12. 30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 10.

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

이범석 (인)



협동연구기관명 : 경기도농업기술원

김석철 (인)

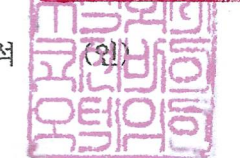


농업회사법인 투엠바이오(주) 남명훈



참여기관명 : (주)코젠바이오텍

남용석 (인)



주관연구책임자 : 양덕춘

협동연구책임자 : 박건환, 남명훈

참여기관책임자 : 홍성원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	317007-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 04. 21 ~ 2019. 12. 31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	인삼뿌리썩음병 길항미생물제제 및 방제기술개발			
	세부 과제명	1) 고병원성 뿌리썩음병 억제 길항미생물개발 및 실리카나노 파티클의 인삼 병저항성 증진 메커니즘 구명 2) 인삼뿌리썩음병 최적방제기술 및 현장적용 기술개발 3) 인삼뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 미생물 제제 개발 및 종합 방제체계 확립			
연구책임자	양덕춘	해당단계 참여연구원 수	총: 24명 내부: 24명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 75,000 천원 계: 375,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 42명 내부: 42명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 825,000 천원 민간: 206,250 천원 계: 1,031,250천원
연구기관명 및 소속부서명	경희대학교 산학협력단[주관] 경기도농업기술원소득자원연구소[협동1] 농업회사법인 투엠바이오(주)[협동2]			참여기업명 농업회사법인 투엠바이오(주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: (주)코젠바이오텍			연구책임자: 홍성원	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 따른 분류로 일반과제에 해당함
-------------------------	---

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 장비	기술 요약 정보	소 프 트 웨 어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정 보	실 물
등록·기탁 번호	12편 (등록기탁 번호없음)	출원 10-2018-0159770 10-2018-0159639 10-2018-0160839 10-2018-0164593 10-2019-0158959 10-2019-0166875 10-2019-0177631 10-2019-0177630 10-2019-0178255 10-2019-0177629 등록 10-1762495						<i>Paenibacillus</i> <i>panacihumi</i>	JCM 32073		
			<i>Paenibacillus</i> <i>panacihumi</i>	KCTC 33915							
			<i>Paraburkholderia</i> <i>panacihumi</i>	JCM 32099							
			<i>Paraburkholderia</i> <i>panacihumi</i>	KCTC 52952							
			<i>Lysobacter</i> <i>panacihumi</i>	JCM 32168							
			<i>Lysobacter</i> <i>panacihumi</i>	KCTC 62019							
			<i>Rhizobium</i> <i>panacihumi</i>	JCM 32251							
			<i>Rhizobium</i> <i>panacihumi</i>	KCTC 62017							
			<i>Ornithinimicrobium</i> <i>panacihumi</i>	JCM 32156							
			<i>Ornithinimicrobium</i> <i>panacihumi</i>	KCTC 39962							

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수 303

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1) 연구개발목표</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농가 실증시험을 통한 인삼 뿌리썩음병의 최적 방제기술 개발을 통해 인삼 안정생산 기술 확립</li> </ul> <p>2) 연구개발내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 인삼뿌리썩음병의 발생현황, 피해분석 및 기존의 저감 기술 분석             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인삼의 생육단계별, 지역별, 재배방식(노지, 시설, 친환경 등) 발생 현황 분석</li> <li>- 뿌리썩음병균의 토양밀도에 따른 인삼의 피해 분석</li> <li>- 국내외 인삼 뿌리썩음병 연구현황 조사·분석</li> <li>- 현장에서 활용되고 있는 방제방법(농약, 미생물, 물리적 등)별 효과 분석</li> </ul> </li> <li>○ 인삼근권으로부터 분리된 고병원성 인삼뿌리썩음병에 대한 길항효과 구명             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식물 성장 촉진 미생물 분리 및 인삼뿌리썩음병원균에 대한 길항효과 생물검증</li> <li>- 실리카나노파티클을 이용한 인삼뿌리썩음병의 방제효과 검증</li> </ul> </li> <li>○ <i>C. destructans</i> 와 <i>Fusarium sp.</i> 동시 밀도판별기술 정립             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>C. destructans</i> 와 <i>Fusarium sp.</i> 동시 밀도진단 프라이머 개발</li> <li>- 인삼밭 토양에 적용 가능한 진단 kit제품 개발</li> </ul> </li> <li>○ 바실러스 속 계통 미생물의 산업용 배양조건 확립 및 제형화 기술 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산업용 복합 미생물제제의 제형소재 선별 및 최적 제형화 공정개발</li> </ul> </li> <li>○ 인삼 예정지 및 본포 관리를 위한 제품 용도별 현장적용 기술 연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 현장적용(예정지 및 본밭) 시기별 적합 제형 선별 : 토양 기비제 및 관수제품 등</li> <li>- 적용시기에 따른 제품 적정 처리량 및 살포주기 설정</li> </ul> </li> <li>○ 인삼 뿌리썩음병 최적 방제기술 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 다조맷 입제를 능가하는 방제가를 보유한 농약 선별 및 효과 분석</li> <li>- 친환경 재배를 위한 미생물 제제 개발 및 기존 제제와의 비교실험을 통한 효과 분석</li> <li>- 시설재배 시 확산할 수 있는 저비용의 고효율 친환경 방제 기술 개발</li> </ul> </li> <li>○ 개발된 최적 방제기술 현장 확산 모델 개발 및 매뉴얼 제작             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 경기도농업기술원 기술보급 조직, 지역인삼농협, 시군별 인삼연구회 등 활용 모델</li> <li>- 인삼뿌리썩음병 최적방제기술 현장적용 매뉴얼 제작</li> </ul> </li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<p>&lt;핵심성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 특허출원 10건, 특허등록 1건, 기술이전 2건, 확산모델 3건, 제품화2건</li> <li>○ 논문게재 : SCI급 12 등 총 12편, 학술발표 : 국내외 15건</li> </ul> <p>&lt;진략성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신규 기능성 소재 발굴 : 2건, ○ 실제 농가 사용자 매뉴얼 제작 : 1건</li> </ul> <p>&lt;활용계획&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 연구결과로 도출된 길항미생물과 제형소재를 기반으로 인삼뿌리썩음병 길항미생물 제제화 추진</li> <li>○ 제품을 현장적용 검증을 거쳐 기존 제품보다 인삼뿌리썩음병에 길항력이 강한 제품 개발 추진</li> </ul>				
<p>연구개발 성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>&lt;기대효과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사업이 완료되어 개발된 제품이 인삼 재배현장 보급 후에는 인삼재배적지 진단과 처방기술이 동시에 보급</li> <li>○ 인삼 안정생산기술이 가능한 인삼뿌리썩음병 최적방제기술 확립</li> <li>○ 인삼 뿌리 썩음병 진단센터 설립으로 인한 일자리 창출 효과</li> <li>○ 인삼재배적지 진단과 처방기술의 보급으로 인삼농가의 인삼 생산의 안정성 확보와 재배 체계 구축</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>인삼뿌리썩음병</p>	<p>천연물소재</p>	<p>천연식물보호제</p>	<p>제형화</p>	<p>사용매뉴얼</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Root rot of ginseng</p>	<p>Natural bio-resources</p>	<p>Biopesticide,</p>	<p>Formulation,</p>	<p>Manual for indication</p>

\* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제 1장 연구개발과제의 개요 .....	6
제 1절 연구개발 목적 .....	6
제 2절 연구개발의 필요성 .....	7
제 3절 연구개발 범위 .....	8
제 2장 연구수행 내용 및 결과 .....	10
제 1절 연구수행내용 및 결과 .....	10
제 2절 결론 및 고찰 .....	251
제 3절 연구개발 성과 .....	254
제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	265
제 1절 목표 및 달성여부 .....	265
제 2절 목표 미달성 시 원인 및 차후대책 .....	268
제 4장 연구결과의 활용 계획 등 .....	269
제 1절 연구 종료 후 성과 창출 계획 .....	269
제 2절 연구개발결과를 통한 사업화 계획 .....	270
제 3절 재배적지 및 병원체 진단을 위한 진단센터 운영 .....	282
붙임. 참고 문헌 .....	287

- <별첨 1> 연구개발보고서 초록
- <별첨 2> 자체평가의견서
- <별첨 3> 연구성과 활용계획서

# 제 1장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발 목적

### 1. 연구개발의 개요

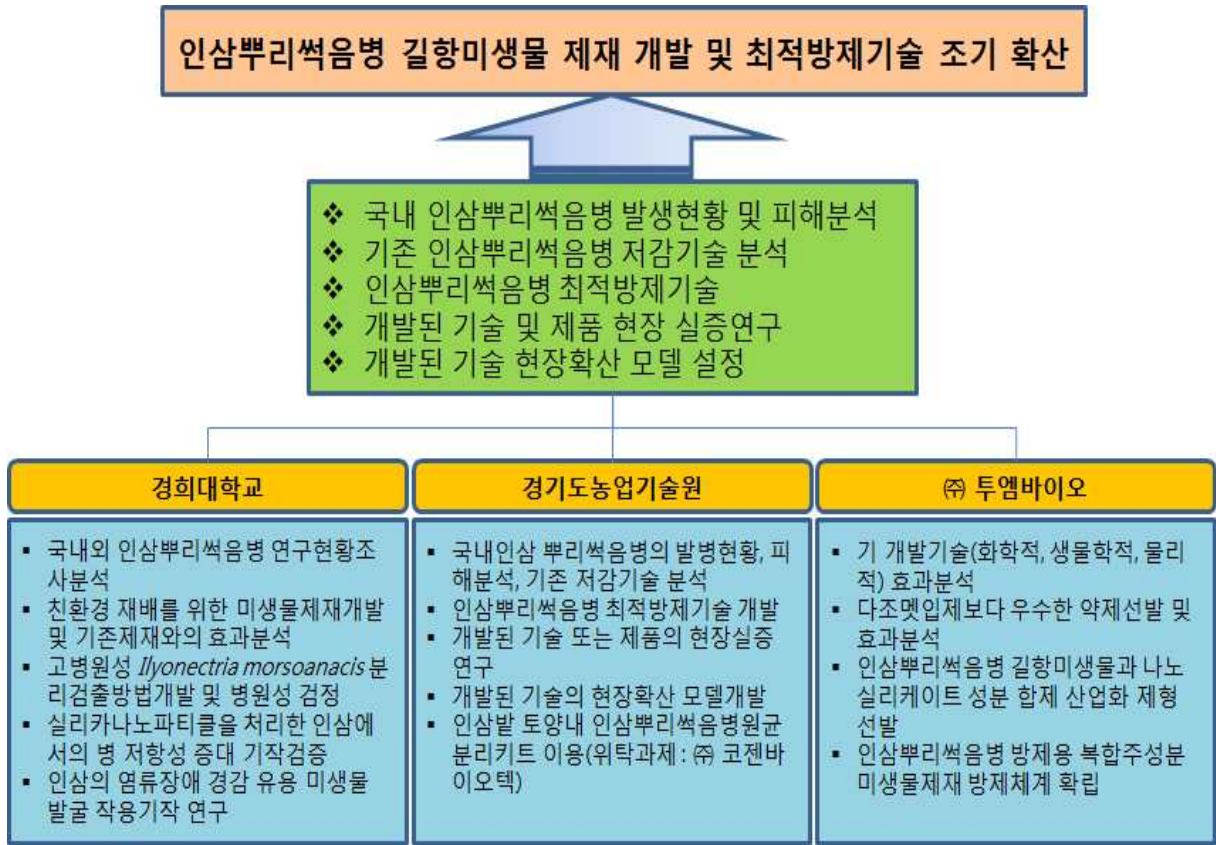


그림 1. 연구개발의 목표 개요도

### 2. 연구개발의 목표

인삼재배농가 현장에서 가장 애로기술로 여기는 연작(재작)장애로 가장 극복하기 어려운 기술인 『인삼뿌리썩음병(뿌리썩음병)』 발병현황과 피해분석 및 기 개발된 저감기술의 분석을 통해 인삼뿌리썩음병 최적방제기술을 위한 제품을 개발하고 이를 현장적용연구를 통해 실증된 기술을 확산하여 「인삼재배현장에서 인삼 안정생산기술 확립」 하고자 함

## 제 2절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 필요성

- 가. 인삼은 우리역사와 함께 해온 민족의 의약품이며 건강식품임
- 나. 인삼은 2000년 이전부터 한약재로 사용되었고, 중국에서 사용된 인삼은 모두 고구려, 백제, 신라에서 생산된 것으로 역사적으로 가장 우수한 약제로 후손에 물려줘야 할 한 민족의 자산임
- 다. 인삼 재배가 안정적으로 이루어질 수 있도록 유량경작이 정착경작으로 자리 잡을 수 있는 최적의 연작장해 해소기술 개발·정착이 필요함

### 2. 연구개발의 중요성

#### 가. 기존의 연구방식

- (1) 기존의 연구방식은 대부분 *in vitro*에서 수행되거나 소규모의 실험실에서 연구가 실시됨
- (2) 인삼뿌리썩음병에 대한 방제기술 연구는 길항 미생물 단독 또는 복합 균을 제오라이트나 식물호르몬이나 다공성 소재를 혼합한 액상제품 위주로 개발되었음
- (3) 대부분이 생물검증을 통해 효과를 검증하였고 실제 인삼밭에 적용한 사례는 매우 드문 상황

#### 나. 기존연구와의 차별성

- (1) 기존의 연구방식을 탈피하여 소재는 유기소재로 전환할 계획임
- (2) 길항미생물이 선호하는 먹이소재 선발
- (3) 현장에서 토양환경에 쉽게 적응하기 위해 배지에서 배양을 하던 것을 유기소재에 배양하고 인삼뿌리썩음병원균인 실린드로카폰 속, 후사리움 속의 길항력을 보이는 미생물이 선호하는 먹이를 선발하여 퇴비제품으로 개발할 계획임
- (4) 현재까지는 본밭에서 고년근에서 사용이 가능한 제품 위주로 개발하였으나, 예정지 관리용과 고년근 본밭에서 사용이 가능한 두 가지 제품으로 개발할 계획임

#### 다. 중요성

##### (1) 기술적 측면

- (가) 인삼 재배적지 판단기준이 토양화학성 기준으로 되어 있으나, 이 기준으로는 인삼 재배 대상 밭에 대한 적합여부를 판단할 수 있는 연작장해 원인균에 대한 정보 제공이 매우 중요함
- (나) 인삼 연작장해 저감을 위한 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 방법을 개발하였으나, 이를 체계화 하지 못함 실정임
- (다) 국내외 인삼 소비자들이 신뢰 할 수 있는 친환경 종합방제시스템 구축 시급함

##### (2) 경제 산업적 측면

- (가) 인삼 재배농가는 재배적지 부족으로 원거리에 위치한 초작지 확보, 또는 재작이 가능한 밭이나 논을 확보하기 위해 비싼 임대료와 관리비용을 지출로 농가소득이 낮아지고 있음
- (나) 초작지에서도 연작장해의 원인인 인삼뿌리썩음병 다발생으로 수량이 낮아져 인삼 재배농가 수가 매년 감소함에 따라 인삼산업이 붕괴위기에 있음



(3) 사회문화적측면

(가) 소비자들은 인삼재배시 다량의 농약을 살포함에 따라 농약잔류에 대한 신뢰가 매우 낮은 상황임

(나) 인삼은 대한민국의 대표 농산물로 국내외적으로 알려져 있으나, 현실적으로는 대한민국의 대표 농산물로서의 지위가 상실될 지경임

### 제 3절 연구개발 범위

1. 국내외 인삼 뿌리썩음병 연구현황 조사·분석

가. 국내외 인삼 연작장해 원인 및 방제기술에 대한 자료수집 및 분석

나. 실험실단계에 머물렀던 우수연구결과 발굴하여 현장에 접목방안 제시

2. 친환경 재배를 위한 미생물 제제개발 및 기존제제와의 효과 비교분석

가. 개발된 미생물 제제는 현장에서 무용론에 대한 원인분석

나. 미생물이 선호하는 유기자원을 발굴하여 제제화하여 실용화 추진

3. 고병원성 *Ilyonecteria morspanacis* 분리 검출방법 개발 및 병원성 검증

4. 실리카 나노파티클을 처리한 인삼에서의 병 저항성증대 메커니즘 검증

5. 인삼의 염류 장애 경감 유용 미생물 발굴 작용기작 조사

6. 국내인삼 뿌리썩음병의 발생현황, 피해분석 및 기존 저감기술 분석

가. 인삼 생육단계별, 지역별, 재배방식별 발생현황 분석

나. 인삼뿌리썩음병 발병밀도 구멍을 통해 재배적지 진단기준 설정

7. 인삼뿌리썩음병 최적방제기술 개발

가. 기존의 해가림시설과 새로 개발 중인 비가림시설, 광폭해가림 시설 등 인삼 정착재배를 위한 저비용의 고효율 친환경 방제기술 개발 : 시설 기 확보

8. 개발된 기술 또는 제품의 현장실증연구

가. 예정지관리단계와 5~6년근의 생육후기 관리용 길항균제품 현장적용 : 4년근, 6년근

나. 6년근, 4년근 주산지를 대상으로 각 2개소 3농가 현장실증 추진

9. 개발된 기술의 현장 확산 : 모델개발

가. 농업기술센터, 인삼연구회, 인삼산학협력단 등의 사업단체와 연계한 기술 확산 모델 제시

10. 인삼밭 병원균 진단을 위한 병원균 분리키트 개발

11. 인삼 뿌리썩음병 길항 미생물과 나노실리케이이트(규산) 성분 합제의 기초 제형화

가. 선발 길항균 2종의 산업화 대량 배양 구축

나. 길항미생물과 나노실리케이이트 최적 처리 농도 산정 및 배합비 확정

다. 기비 및 관주제 제형별 첨가제 선발 : 보조제, 안정제, 증량제 선발 및 안정적, 효과적 최적의 배합비 산정

12. 인삼 뿌리썩음병 방제용 복합 주성분 산업화 제형 개발 및 효과 규명

가. 시제품의 뿌리썩음병원균 항균활성 효과 검증

나. 시제품의 경시적 품질 안전성 평가

- 다. 시제품의 인삼 작물 약해 및 생장 효과 검증
- 라. Small scale에서의 제형화 안정성 확인
- 마. 대량 배양 및 대량 생산조건에서의 제품 생산성 확인
- 13. 기 개발 방제기술(화학약제, 미생물제제)과 개발기술(시제품)과의 효과 분석
  - 가. 기 개발된 화학약제(다조멧 입제), 타사 미생물제제, 개발 시제품의 방제 효과 비교 분석
- 14. 기 등록된 화학약제(다조멧 입제)보다 우수한 약제 탐색 및 효과 분석
  - 가. 기 등록된 뿌리썩음병 방제용 화학약제(액상제, 분말수화제) 대상 인삼 뿌리썩음병 적용 효과 분석 및 약제 선발
  - 나. 기 등록된 화학약제(다조멧 훈증제)와 선발 화학약제(액상제, 분말수화제)와의 비교 분석을 통한 효과 평가

# 제 2장 연구수행 내용 및 결과

## 제 1절 연구수행내용 및 결과

### 1. 국내 인삼뿌리썩음병 발생현황, 피해분석 및 기존의 저감 기술 분석

인삼뿌리썩음병 발생현황을 생육단계별, 지역별, 재배방식별로 논문자료를 통해 발생현황을 분석하기 위해 경기도와 인천시, 충남지역의 농가 50호를 대상으로 인삼포 예정지와 본포 4년 근과 5년근에 대한 발병실태와 토양화학성을 검정한 결과에 기초하여 발병현황과 피해분석 및 경감정도를 분석하였다.

#### 가. 인삼의 생육단계별, 지역별, 재배방식(노지, 시설, 친환경 등) 발생 현황 분석

##### (1) 연근별 토양 화학성 변화

생육단계별 인삼포의 토양화학성 특성을 파악하고자 경기도내 234개 필지를 대상으로 pH, OM, Av. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 치환성 양이온인 K, Ca, Mg, Na 및 NO<sub>3</sub>-N를 분석한 결과는 표 1과 같다.

연근이 높아질수록 EC와 NO<sub>3</sub>-N함량은 증가하는 경향을 보였는데, EC는 2년근부터, NO<sub>3</sub>-N은 3년근부터 기준을 초과한 것으로 분석되었다. 그 외의 pH, OM과 치환성 양이온인 K, Ca, Mg, Na 등은 연근이 높아지더라도 큰 변화가 없었다. 인삼에 적합한 토양 화학성 범위를 초과하지 않은 성분은 pH, OM과 치환성 양이온인 K, Mg 등이었다. 인삼재배과정에서 토양화학성 중 주요 관리대상으로 해야 하는 성분은 NO<sub>3</sub>-N였고, NO<sub>3</sub>-N성분의 증가를 억제시켜 EC 상승을 낮춰야 할 것으로 생각된다.

표 1. 생육단계별 토양화학성 변화

생육 단계	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex.cations(cmol/Kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)
					K	Ca	Mg	Na	
예정지 (30필지)	5.9±0.5 (4.4~6.8)	0.3±0.1 (0.2~0.7)	17.0±4.3 (5.7~27.5)	77.1±64.1 (27.0~309.0)	0.4±0.2 (0.1~1.3)	4.8±1.4 (1.8~10.6)	1.5±0.6 (0.6~3.3)	0.2±0.1 (0.0~0.5)	12.9±13.9 <sup>†</sup> (4.0~67.1)
2년근 (52필지)	5.6±0.6 (4.8~7.2)	1.0±0.6 (0.4~3.3)	13.6±5.0 (5.0~25.5)	68.3±63.8 (13.0~336.0)	0.4±0.1 (0.1~0.7)	5.3±2.3 (1.6~10.7)	2.0±1.1 (0.6~4.2)	0.2±0.1 (0.1~0.5)	71.6±77.6 (5.0~363.0)
3년근 (50필지)	5.3±0.5 (4.3~6.0)	1.3±1.0 (0.2~5.0)	14.7±6.1 (4.0~37.4)	80.5±67.6 (17.0~294.0)	0.4±0.2 (0.2~1.1)	5.5±2.6 (1.4~14.0)	1.6±0.7 (0.6~3.8)	0.2±0.1 (0.1~0.5)	115.8±104.6 (5.1~359.0)
4년근 (52필지)	5.3±0.5 (4.0~6.3)	1.4±0.8 (0.3~4.1)	15.9±6.2 (7.0~37.2)	110.0±151.9 (11.0~808.0)	0.5±0.2 (0.2~1.3)	5.0±1.9 (0.7~8.7)	1.8±0.8 (0.4~4.0)	0.2±0.2 (0.1~0.6)	124.1±93.0 (6.6~481.0)
5년근 (50필지)	5.4±0.5 (4.5~6.3)	1.4±1.1 (0.4~5.3)	12.7±3.0 (6.7~20.8)	71.6±76.5 (22.0~476.0)	0.4±0.1 (0.1~0.8)	5.4±1.3 (1.8~9.4)	1.8±0.7 (0.6~3.5)	0.3±0.2 (0.1~0.8)	118.7±127.1 (5.8~605.0)
발 기준 논	5.0~6.0	0.5이하	10~20	100~250 50~150	0.30~0.70 0.20~0.60	3.0~5.0	1.0~2.0	0.05~0.15	50이하

<sup>†</sup> 는 평균값±표준편차, ( )는 분석 값의 범위, 평균값은 연근별 조사 필지의 평균임

(2) 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 검출 필지수

연근별 토양 내 인삼뿌리썩음병의 원인균인 *C. destructans*와 *Fusarium solani*의 밀도를 연근별로 파악하기 위해 분석하였다. 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도검정을 위한 DNA추출은 연근별 인삼포에서 채취된 토양시료에서 (주) 코젠바이오텍에 위탁하여 개발한 Kit를 사용하여 이 분리된 DNA에 *C. destructans*와 *F. solani* 동시 진단 특이 프라이머와 혼합하여 Real-time PCR를 이용하여 분석하였다. 발병주율은 2년근부터 5년근까지의 인삼뿌리썩음병 발병주율을 조사하였는데 *C. destructans*와 *F. solani*에 의해 발병된 개체의 수를 조사한 후 발병주율을 산출하였다. 그 결과는 표 2와 같다.

토양 내 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*와 *F. solani*의 밀도는 연근이 경과하여도 큰 변화는 없었지만 발병주율은 2년생에서 36.8±26.4% 정도였고 연근이 높아질수록 증가하여 5년근에서는 73.3±25.6%로 나타났다. 발병주율이 연근이 높아질수록 증가한 원인은 인삼뿌리썩음병 원인균의 밀도보다는 인삼의 성장에 의한 뿌리밀도의 증가로 접촉면적이 증가됨에 따른 것으로 판단된다.

표 2. 연근별 토양내 인삼뿌리썩음병 밀도 및 발병주율

생육단계	조사필지수 (필지)	원인균 밀도(cfu/g)		발병주율(%)
		<i>C. destructans</i>	<i>F. solani</i>	
예정지	30	0.8± 2.2 (0.0~8.1)	0.3± 1.5 <sup>†</sup> (0.0~8.3)	-
2년근	52	0.5± 1.8 (0.0~10.0)	0.9± 3.4 (0.0~16.0)	36.8± 26.4 (1.9~92.5)
3년근	50	0.8± 2.3 (0.0~11.0)	0.4± 2.3 (0.0~16.0)	53.1± 33.2 (2.6~100.0)
4년근	52	1.2± 4.8 (0.0~33.0)	0.6± 2.9 (0.0~19.0)	59.3± 32.9 (0.0~100.0)
5년근	50	0.5±1.8 (0.0~9.5)	0.7± 3.1 (0.0~19.5)	73.3± 25.6 (16.7~100.0)

<sup>†</sup> 는 평균값±표준편차, ( )는 분석 값의 범위, 평균값은 연근별 조사 필지의 평균임

연근별 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*와 *F. solani*에 오염된 필지를 파악하고자 경기도내 6년근 인삼포 234개 필지를 대상으로 분석한 결과는 표 3과 같다.

연근별 토양내 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*와 *F. solani*이 검출된 필지수는 연근 간에 뚜렷한 경향은 없었다. 당초에 생각하기에는 연근이 높아질수록 오염필지수가 증가할 것으로 예상하였으나 실제로는 그렇지 않았다. 이런 결과는 인삼재배기간 중에 오염이 되기 보다는 그 발의 재배이력에 의해 오염된 것으로 보인다. 하지만 이 연구에서 제시한 조사 값은 인삼포 전체를 설명하기에는 한계가 있어 보다 광범위한 조사가 필요한 것으로 판단되었다.

표 3. 연근별 토양내 인삼뿌리썩음병 검출 필지수

생육단계	조사필지수 (필지)	병원균검출필지수(필지)			
		<i>C.destructans</i>		<i>Fusarium solani</i>	
		검출	미검출	검출	미검출
예정지	30	4	26	1	29
2년근	52	5	47	4	48
3년근	50	6	44	2	48
4년근	52	7	45	3	49
5년근	50	4	46	3	47

(3) 지역별 인삼포의 토양 화학성과 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도

경기도내 전통적인 6년근 재배지역인 연천, 파주, 양주 3개 지역의 2~4년근 인삼포 204필지를 대상으로 토양화학성, 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 발병주율을 분석한 결과는 표 4와 같다.

토양화학성 분석대상인 pH, EC, OM, NO<sub>3</sub>-N는 양주에서 가장 안정적으로 기준범위 내였으나, 연천과 파주는 평균값을 기준하였을 때에는 EC와 NO<sub>3</sub>-N은 적합수준을 초과하고, pH와 OM은 적합수준이었으나, 표준편차와 범위로 보았을 때에는 상당한 필지가 적합수준을 초과했음을 알 수 있다.

인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*와 *F. solani* 는 양주에서는 검출되지 않았지만 연천과 파주에서는 병원균 밀도가 *C. destructans* 0.2~1.2cfu/g, *F. solani* 0.4~0.8cfu/g였다. 인삼뿌리썩음병 발병주율은 양주에서 26.9±9.0%, 연천 62.0±32.3%, 파주 47.4±30.9%로 조사되어 연천에서 가장 높은 발병주율을 보였다. 이와 같이 인삼뿌리썩음병 원인균의 밀도가 낮음에도 불구하고 발병주율이 높은 것은 병원균 단독효과라기 보다는 인삼포 예정지관리 중 미숙퇴비나 축분의 이용으로 인해 미소곤충이나 선충의 밀도가 높아짐에 따른 것으로 추정된다.

표 4. 지역별 인삼포 토양화학성 및 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도

지역	pH (1:5)	EC (dS/cm)	OM (g/Kg)	NO <sub>3</sub> -N (mg/Kg)	인삼뿌리썩음병원균 밀도(cfu/g)		발병주율 (%)
					<i>C. destructans</i>	<i>F. solani</i>	
양주	7.0±0.1 (6.9~7.0)	0.7±0.0 (0.7~0.8)	10.5±9.8 (9.8~11.2)	29.7±6.1 <sup>†</sup> (26.9~34.0)	0.0±0.0 (0.0~0.0)	0.0±0.0 (0.0~0.0)	26.9±9.0 (26.9~39.6)
연천	5.5±0.5 (4.5~7.2)	1.0±0.7 (0.2~4.6)	12.9±4.6 (4.0~37.2)	68.8±67.4 (5.0~508.5)	1.2±3.8 (0~33.0)	0.8±3.2 (0.0~19.0)	62.0±32.3 (0.0~100)
파주	5.2±0.5 (3.9~6.2)	1.7±1.0 (0.3~5.3)	16.1±5.7 (7.6~37.4)	161.2±119.4 (6.6~605.0)	0.2±0.9 (0~6.0)	0.4±2.5 (0.0~19.5)	47.4±30.9 (0~100)
기준	5.0~6.0	0.5이하	10~20	50이하	-	-	-

<sup>†</sup> 는 평균값±표준편차, ( )는 분석 값의 범위, 평균값은 조사 필지의 평균임

(4) 초작지와 재작지의 토양화학성, 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도 및 발병주율

초작지와 재작지의 토양화학성, 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 발병율을 파악하고자 논과 밭으로 나누어 토양화학적 요소인 pH, EC, OM, NO<sub>3</sub>-N 등과 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*와 *F. solani*의 밀도, 발병주율을 4년근 인삼포 204필지를 대상으로 조사한 결과는 표 5와 같다.

표 5. 초작지와 재작지의 토양 화학성, 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도 및 발병주율

재배방식	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)	병원균 밀도(cfu/g)		발병주율 (%)	
					<i>C. destructans</i>	<i>F. solani</i>		
초작지	논 (n=87)	5.5±0.6 (4.3~7.0)	1.3±0.9 (0.2~5.0)	14.5±5.4 (4.0~37.4)	104.8±97.3 <sup>†</sup> (5.1~508.0)	0.8±2.3 (0~11.0)	0.9±3.6 (0.0~19.0)	56.6±33.2 (1.9~100)
	밭 (n=38)	5.2±0.6 (3.9~7.2)	1.6±1.2 (0.3~5.3)	15.7±5.5 (6.3~37.3)	165.0±147.0 (6.6~605.0)	0.3±1.3 (0~6.0)	0.1±0.3 (0.0~1.8)	35.5±28.3 (0.0~100)
재작지	논 (n=63)	5.4±0.5 (4.5~6.3)	1.0±0.6 (0.4~3.0)	12.4±3.7 (5.0~21.9)	65.0±56.3 (5.0~255.0)	1.1±4.5 (0~33.0)	0.6±2.6 (0.0~16.0)	63.2±31.3 (0~100)
	밭 (n=16)	5.3±0.4 (4.8~6.0)	1.6±0.6 (0.8~3.0)	16.2±7.7 (10.0~35.7)	154.7±71.3 (61.5~294.0)	0.0±0.0 (0.0~0.0)	1.2±4.9 (0.0~19.5)	64.1±24.7 (13.7~94.7)
기준	5.0~6.0	0.5이하	10~20	50이하	-	-	-	

<sup>†</sup>는 평균값±표준편차, ( )는 분석 값의 범위, 평균값은 조사 필지의 평균임

토양 화학적 요인인 pH는 초작지 5.2~5.5(3.9~7.2)와 재작지 5.3~5.4(4.5~6.3), EC는 초작지 1.3~1.6(0.2~5.3)dS/m, 재작지 1.0~1.6(0.4~3.0)dS/m, OM은 초작지 14.5~15.7(4.0~37.4)g/kg, 재작지 12.4~16.2(5.0~35.7)g/kg, NO<sub>3</sub>-N은 초작지 104.8~165.0(5.1~605.0)mg/kg, 재작지 65.0~154.7(5.0~294.0)mg/kg으로 나누어 분석한 결과 평균값의 차이가 없었으나 범위는 재작지가 초작지보다 좁아 균일한 특성을 보였다. 초작지 논과 밭에서도 평균값의 차이가 없었고 범위도 차이가 없었으나, NO<sub>3</sub>-N은 밭 조건에서 표준편차 오차 범위 이내이지만 밭에서 높은 경향이였다. 재작지의 논과 밭에서 pH, EC와 OM은 초작지와 같은 경향이였으나, NO<sub>3</sub>-N은 논과 밭 간에 평균값은 유의한 차이를 보였으나, 범위 폭은 밭이 더 좁았다.

나. 뿌리썩음병균의 토양밀도에 따른 인삼의 피해 분석

토양 내 인삼뿌리썩음 원인균의 밀도 분석을 위해 경기도, 인천시, 충남지역의 인삼농가를 대상으로 2018~2019년에 각각 51농가, 50농가를 대상으로 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*와 *Fusarium* sp.의 토양내 밀도를 (주)코젠바이오텍에 위탁하여 개발한 *C. destructans*와 *Fusarium* sp. 동시진단프라이머와 토양내 병원균 DNA 추출kit를 사용하였으며, 정량은 Real time PCR을 이용하였고, 여기서 얻어진 데이터를 근거로 하여 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 인삼뿌리썩음병 발병율과 발병도를 분석하였다.

(1) 토양해충과 화학성과 인삼뿌리썩음병 발병도와의 상관관계

인삼재배에 있어서 뿌리썩음병 발병관련 인자를 파악하여 인삼뿌리썩음병 경감기술을 개발하고자 토양에서 서식하는 미소해충과 미생물의 서식 그리고 인삼 생육에 영향을 미치는 토양화학성과의 관련성을 분석하기 위해 경기도와 충청남도 내 인삼포 51개 필지 102개 지점을 대상으로 조사하였으며 그 결과를 토대로 하여 상관관계를 분석한 결과는 표 6과 같다.

인삼의 연작장해 주원인으로 알려진 *C. destructans*는 미소곤충과는 정의 상관을, 선충은 부의 상관을 보였고, *Fusarium. sp.*는 미소곤충과는 고도의 정의 상관을, EC와 NO<sub>3</sub>-N과는 정의 상관을 보였다.

이러한 결과로 볼 때 인삼 재배에서 미소곤충과 선충의 밀도를 낮추어야 하고, 유기자원을 시비할 때 질소성분함량이 높은 축분이나 다비성 작물의 재배이력이 없는 밭을 선정하여 NO<sub>3</sub>-N의 농도를 낮추어 하고 EC도 낮추어야만 인삼의 안전다수확이 가능할 것이라는 결론에 이르렀다.

표 6. 미소곤충 피해율, 토양화학성과 인삼뿌리썩음병 발병도와의 상관관계(2018~2019년)

	피해율(%)		토양 화학성							
	미소곤충	선충	pH (1:5)	EC (ds/m)	OM (mg/kg)	Av. P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	K (cmol <sub>c</sub> /kg)	Ca (cmol <sub>c</sub> /kg)	Mg (cmol <sub>c</sub> /kg)	NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)
<i>Fusarium. sp.</i> 발병도	0.3612	-0.0186	0.1700	0.2495	0.0879	-0.1690	-0.0282	-0.0753	-0.1600	0.2507
	0.0002	0.8529	0.0876	0.0114	0.3798	0.0896	0.7786	0.4520	0.1082	0.0110
<i>C.destructans</i> 발병도	0.1957	-0.2051	0.1165	-0.0163	0.1037	0.0653	0.0345	0.0277	-0.0438	0.0335
	0.0487	0.0387	0.2434	0.8707	0.2996	0.5146	0.731	0.7826	0.662	0.7379

(2) 시군별 토양화학성과 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 발병도

시군별 인삼포의 토양화학성을 검정하여 인삼뿌리썩음병 경감기술 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 경기도와 충청남도 4년인 인삼포를 대상으로 토양화학성을 분석한 결과는 표 7과 같다.

pH는 모든 조사 대상지역에서 5.6±0.6~6.2±0.3 정도로 적합수준은 벗어나지만 가능수준 내에 분포하였다. pH는 양분의 유효도와 관련됨으로 적합수준인 6.0으로 교정해야 한다. EC는 양분의 흡수나 생리장해의 발생요인으로 NO<sub>3</sub>-N와 함께 적합수준의 농도로 조절해야 하는 인자이다. OM은 안성에서만 부족한 수준이었으나 그 외 지역은 적합수준 또는 적합수준을 크게 초과하지 않는 범위였다. Av. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>는 천안과 화성이 과다수준 이상이었으나 그 외의 지역은 적합수준이었다. 치환성양이온의 농도는 K, Ca, Mg, Na 모두 적합수준을 초과한 양이었다. NO<sub>3</sub>-N도 치환성 양이온과 마찬가지로 적합수준을 초과하였다. 표 7과 표 8에서 살펴본 바와 같이 NO<sub>3</sub>-N과 EC는 동반상승하는 관계에 있다. 이 두 요인은 인삼의 뿌리썩음병이나 생리장해 유발에 영향을 주는 요인으로 관심을 갖고 예정지관리 때 시비계획을 세워야 한다는 것을 의미한다.

표 7. 시군별 인삼포의 토양 화학성

지역	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex.cations(cmol/kg)				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/kg)
					K	Ca	Mg	Na	
김포	5.9±0.6	1.17±0.68	11.1±4.9	106±81	0.71±0.4	6.03±1.69	2.48±0.7	0.18±0.08	71±54
안성	5.9±0.4	1.19±0.67	8.5±4.0	130±53	0.77±0.58	5.25±1.92	2.02±0.8	0.16±0.09	68±56
연천	5.9±0.8	1.22±0.67	15.9±8.8	132±72	0.49±0.22	7.05±3.68	2.04±1.17	0.18±0.09	105±83
이천	6.2±0.3	1.03±0.5	13.3±4.2	99±33	0.58±0.27	7.15±1.47	2.29±0.76	0.22±0.11	60±51
천안	5.7±0.7	4.95±1.19	17.4±8.2	561±96	1.31±0.69	9±2.64	3.46±0.79	0.31±0.06	384±91
파주	5.6±0.6	0.81±0.27	13.5±4.2	54±78	0.52±0.18	6.13±1.93	2.42±1.3	0.23±0.13	59±31
화성	5.8±0.5	1.42±0.87	11.2±5.1	309±286	0.82±0.61	6.74±3.51	4.03±5.07	0.18±0.06	104±71
기준	밭 논	5.0~6.0 0.5이하	10~20	100~250 50~150	0.30~0.70 0.20~0.60	3.0~5.0	1.0~2.0	0.05~0.15	50이하

\*는 평균값±표준편차, 평균값은 조사 필지의 평균임

표 8은 시군별 인삼포 토양 내 존재하는 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 발병도를 분석한 결과이다.

*C. destructans*는 천안을 제외한 모든 지역에서 2.2±3.1~11.2±13.9cfu/g으로 분석되어 연천이 다른 지역에 비해 *C. destructans*에 많이 노출된 것으로 나타났다. *F. solani*는 1.2~12.8cfu/g으로 분석되었는데, 상대적으로 병원성이 낮은 *F. solani*이지만 토양환경에 따라 차이를 상기고 대책을 수립할 필요가 있다. 발병도는 *C. destructans*와 *F. solani*에 의한 뿌리썩음병과 함께 피해정도를 고려하여 조사한 결과이다. 2.1~4.1의 발병도 분포를 보여 발병도의 차이가 있는 것으로 나타났다.

표 8. 시군별 인삼포 토양 내 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 발병도

지역	밀도(cfu/g)		발병도
	<i>C. destructans</i>	<i>F. solani</i>	
김포	2.2± 3.1	2.2± 3.8	3.8±2.6
안성	7.5±19.8	7.0±18.1	2.3±2.3
연천	11.2±13.9	12.6±20.0	2.1±0.8
이천	9.7±15.9	12.8±16.3	4.1±1.3
천안	nd	1.4± 2.8	3.0±1.7
파주	5.3± 7.3	5.6± 7.9	2.9±1.6
화성	2.8± 3.9	1.2± 3.6	3.1±1.8

주) nd : 검출한계 미만임, 평균±표준편차

발병도(DSI) : (X1×0)+(X2×1)+(X3×2)+(X4×3)...(X10×9)/(X1+X2+X3+X4+...X10)



다. 인삼뿌리썩음병 발병원인 분석

인삼뿌리썩음병 발병원인을 분석하기 위해 2019년에 경기도내 5년근 인삼포 50개 필지 99개 지점을 분석한 *C. destructans*와 *F. solani*, *Erwinia* sp., Soft root rot, Gray mold 등을 대상으로 병원균 밀도, 발병률, 발병도를 분석하였다. *C. destructans*와 *F. solani*는 발병률과 발병도를, *Erwinia* sp., Soft root rot, Gray mold은 발병률을 조사하였다. 조사기준은 농청진흥청 작물 연구조사기준에 준하였다. *C. destructans*와 *F. solani*의 발병밀도는 경기도농업기술원과 (주)코젠 바이오텍이 공동 개발한 DNA 분리 Kit와 프라이머를 사용하여 분석하였다.

(1) *C. destructans*

연작장해의 가장 방제가 어려운 병은 *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병을 유발하는 것으로 알려져 있다. *C. destructans*와 연작장해간에 관련성을 명확히 밝혀진 바가 없다. 5년근 인삼포 50개 필지 99개 지점의 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도, 발병률과 발병도를 분석하여 인삼뿌리썩음병의 발병원인을 밝히고자 조사분석한 결과는 표 9, 10, 11과 같다.

*C. destructans*의 밀도는 99개 지점중 83개 지점이  $\leq 0.0$ 이었고,  $0.0 <$ 이상이 16개 지점이었다. 그리고 발병율과 발병도는 *C. destructans*의 밀도와 달리  $\leq 0.00$ 인 지점이 56개 지점으로 적었다. 이는 뿌리썩음병 원인균이 토양내에 존재한다고 반드시 뿌리썩음병이 발병되지 않음을 의미하는 것이다. 즉 병원균의 밀도를 관리하면 발병률을 경감할 수 있다는 의미로 생각된다.

표 9. *C. destructans*의 토양 내 밀도분포

범위	밀도(cfu/g)					
	$\leq 0.0$	$0.0 < \sim \leq 10.0$	$10.0 < \sim \leq 20.0$	$20.0 < \sim \leq 30.0$	$30.0 < \sim \leq 40.0$	$40.0 <$
빈도수	83	4	11	1	0	0

표 10. *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병률 분포

범위	발병률(%)					
	$\leq 0.00$	$0.00 < \sim \leq 1.00$	$1.00 < \sim \leq 2.00$	$2.00 < \sim \leq 3.00$	$3.00 < \sim \leq 4.00$	$4.00 <$
빈도수	56	39	4	0	0	0

표 11. *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병도 분포

범위	발병도(0-9)					
	$\leq 0.00$	$0.00 < \sim \leq 0.50$	$0.50 < \sim \leq 1.00$	$1.00 < \sim \leq 1.50$	$1.50 < \sim \leq 2.00$	$2.00 <$
빈도수	56	31	8	1	3	0

(2) *F. solani*

*F. solani*는 인삼뿌리썩음병을 유발하는 병원균이나 *C. destructans* 보다 비중이 낮게 인식되는 병원균이다. *F. solani*는 상처를 통해 잘 감염되는 것으로 알려져 있다(Reeleder and Brammall, 1994; Kim *et al.*, 2006). 특히 최근에 축산분뇨 해양투기가 금지된 이후 불량퇴비가 밭이나 논에 사용되면서 선충이나 미소곤충의 밀도가 증가하고 있고 실제 현장에서도 *C. destructans*보다 *F. solani*에 의한 뿌리썩음 증상이 많아졌다. 초기의 인삼뿌리썩음병 연구자들은 *C. destructans*보다 *Fusarium* sp.에 더 주목했었다는 것만 보아도 의미있는 일이다(Kim, 1966). 도내 5년근 인삼포 토양 내 *F. solani*의 밀도, 발병율과 발병지수를 분석한 결과는 표 12, 13, 14와 같다.

인삼포 토양 내 *F. solani*의 밀도는 99개 조사지점 중 72개 지점에서  $\leq 0.0$ 이었고,  $0.0 <$  인 지점은 22개 지점이었다. *F. solani*에 의한 뿌리썩음병 발병률은 모든 조사지점에서 발병하였고 심지어  $80 <$  인 지점도 24개 지점이었다. *F. solani*에 의한 뿌리썩음병 발병지수는 조사지점 모두  $0.0 <$  이었고,  $4.0 <$  인 지점도 20개 지점이나 되었다. *F. solani*에 의한 뿌리썩음병은 균에 의한 발병보다는 선충이나 해충의 상처를 통해 감염되는 것으로 Kim *et al.*(2006)이 보고한 바 있다.

표 12. *F. solani*의 밀도

범위	밀도(cfu/g)					
	$\leq 0.0$	$0.0 < \sim \leq 10.0$	$10.0 < \sim \leq 20.0$	$20.0 < \sim \leq 30.0$	$30.0 < \sim \leq 40.0$	$40.0 <$
빈도수	72	5	2	9	6	5

표 13. *F. solan*에 의한 뿌리썩음병 발병률

범위	발병률(%)					
	$\leq 0.0$	$0.0 < \sim \leq 20.0$	$20.0 < \sim \leq 40.0$	$40.0 < \sim \leq 60.0$	$60.0 < \sim \leq 80.0$	$80.0 <$
빈도수	0	7	19	22	27	24

표 14. *F. solani*에 의한 뿌리썩음병 발병지수

범위	발병지수(0~9)					
	$\leq 0.0$	$0.0 < \sim \leq 1.0$	$1.0 < \sim \leq 2.0$	$2.0 < \sim \leq 3.0$	$3.0 < \sim \leq 4.0$	$4.0 <$
빈도수	0	31	21	14	15	20

이 연구결과로만 보면 *C. destructans*와 *F. solan*의 밀도 분포와 달리 인삼뿌리썩음병 방병율이나 발병지수의 분포가 높은 편이다. 이런 결과는 인삼뿌리썩음병 원인균으로 여겨왔던 병원균보다 다른 요인 즉 선충이나 미소곤충에 의한 상처를 통해 병원균이 침투하여 발병한다는 Kim *et al.*,(2006) 보고를 고려할 때 차후 이런 부분에 대한 연구과제의 수행을 통해 보다 명확한 결론을 도출도 필요할 것으로 생각된다.

(3) 토양 내 인삼 뿌리썩음병 원인균의 밀도에 따른 발병밀도

인삼뿌리썩음병 원인균별 발병밀도를 구명하기 위해 유기물 17g/kg으로 예정지관리가 완료된 토양에 4.5톤/10a에 해당하는 벚짚퇴비를 혼합기를 이용하여 교반한 후에 70℃로 조절된 열풍건조기에서 24시간 열소독을 한 후에 귀리배지에 배양된 *C. destructans*와 *F. solani* 균주를 각각  $10^3 \sim 10^{-1}$ cfu/g,  $10^4 \sim 10^{-1}$ cfu/g 밀도에 해당 량의 귀리 배지를 소독된 토양과 혼합기에 넣고 교반하였다. 이렇게 조성된 토양을 플라스틱 박스에 20kg을 충전한 후 2년생 묘삼을 박스당 32본씩 이식한 후 60일에 발병률을 조사한 결과는 표 15와 그림 2과 그림 3과 같다.

발병률은 *C. destructans*에 오염된 밀도가 높을수록 높았다. *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병은  $10^2$ cfu/g에서 시작되었다. *F. solani* 는 오염밀도 간에 발병률 차이가 없었다. 따라서 인삼뿌리썩음병 발병의 주 원인균은 *C. destructans* 임을 확인하였다. 그러나 *F. solani* 는 오염밀도 간에 차이가 없어 직접적으로 인삼뿌리썩음병을 발병시키는 병원균이라기보다 부생성균으로 판단되었다(이순구, 2004). Rahman M과 Punja ZK(2005)는 “*C. destructans* 는 상처가 없어도 토양 내 밀도 이상이면 발병이 된다”고 보고한 것과 일치하였다.

표 15. 인삼 뿌리썩음병원균별, 밀도별 발병정도

처리밀도 (cfu/g)	<i>C. destructans</i>				<i>F. solani</i>			
	출아 주수	출아율 (%)	발병개체수 (본)	발병률 (%)	출아 주수	출아율 (%)	발병개체수 (본)	발병률 (%)
$10^4$	-	-	-	-	30.0	93.8	2.8	9.3
$10^3$	23.6	73.8	22.2	94.0	29.8	93.1	1.8	6.1
$10^2$	29.0	90.6	7.8	26.9	27.3	85.3	2.8	10.3
$10^1$	30.8	96.3	0.8	3.2	28.8	90.0	1.6	5.6
$10^0$	30.6	95.6	1.0	3.3	28.6	89.4	1.4	4.9
$10^{-1}$	31.0	96.9	0	0	31.0	96.9	0.5	1.6

※ 32주/상자, 5반복

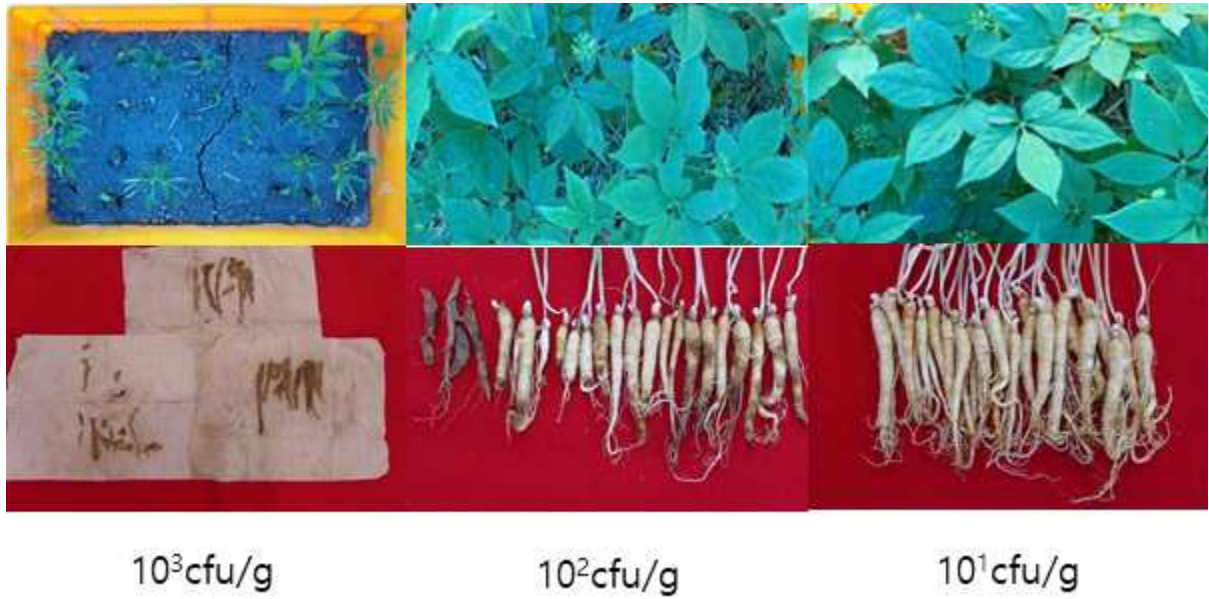


그림 2. *C. destructans* 균주 밀도별 생육상황

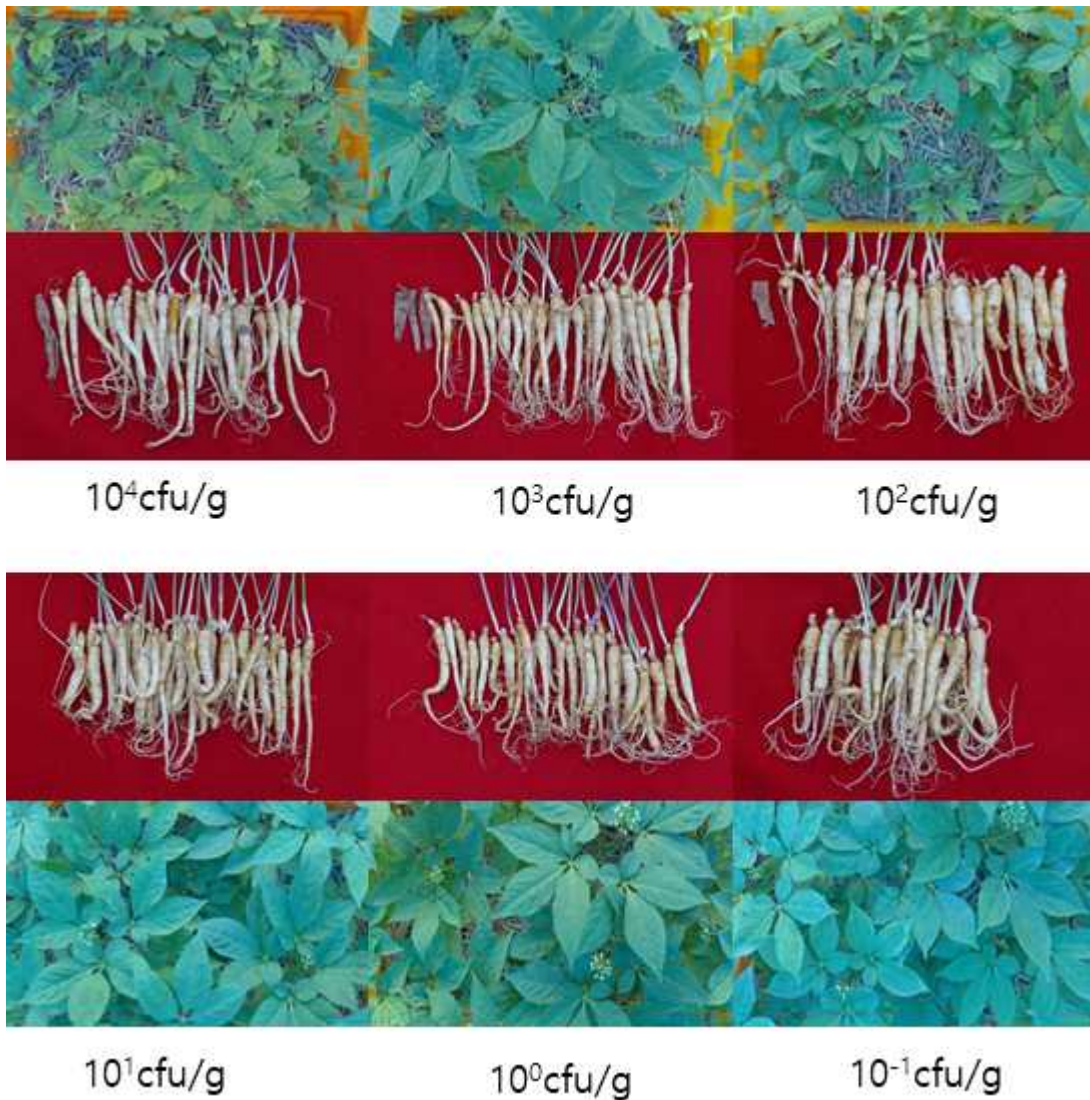


그림 3. *F. solani* 균주 밀도별 생육상황

(4) 해충피해

해충은 크게 나누어 굽뱅이류와 미소곤충, 선충류로 나누어 설명하고자 한다.

해충은 토양 속에서 부화하여 유충기에 인삼의 뿌리를 가해하는데, 미소곤충은 주로 세근을 굽뱅이류와 선충은 동체나 굽은 뿌리를 가해한다. 이 상처를 통해 *C. destructans*와 *Fusarium* sp.의 균사가 침투하여 뿌리썩음병을 일으킨다(Kim *et al.*, 2006). 해충에 의한 상처를 통해 분비되는 삼출물에 함유된 화학물질에 의한 주화성이 있는 병원균들이 침투하는 것으로 허 등(2016)이 보고한 바 있다.

조사대상 인삼포에서 채굴한 인삼의 가해한 굽뱅이류, 미소곤충, 선충, 흑선충 등 해충에 의한 피해율을 조사한 결과는 표 15, 16, 17, 18과 같다.

굽뱅이류에 의한 피해율은 99개 지점 중 23개 지점에서는 피해 흔적이 없었다, 특히, 굽뱅이류는 미숙퇴비를 살포하였을 때 많이 서식한다. 미소곤충의 피해는 심한 편이었는데, 피해를 본 지점은 총 99개 지점 중 57개 지점이었다. 선충의 피해도 심하여 총 99개 지점 중 90개 지점에서 피해가 있어 인삼 재배에 심각한 장애요인으로 판단되었다. 흑 선충은 총 99개 지점 중 22개 지점에서만 피해가 있었는데, 이 선충은 주로 세근에 혹을 형성하여 상품성을 저하시키는 것이 문제이다. 흑선충도 80% 이상인 지점도 4개 지점이었다.

굽뱅이류, 미소곤충과 선충류의 피해를 줄이는 것은 인삼의 상품성과 수량성을 높이는 지름길이다. 따라서 인삼뿌리썩음병을 경감하기 위해서는 병원균의 침투로를 확보해 주는 굽뱅이류, 미소곤충과 선충류 등의 밀도를 낮추어야 한다. 인삼 재배에 알맞은 토양환경을 조성하기 위해서는 잘 부숙된 퇴비나 규격화된 퇴비를 사용하는 것이라고 판단된다.

표 15. 굽뱅이류에 의한 피해율

범위	피해율(%)					
	≤0.0	0.0<~≤5.0	5.0<~≤10.0	10.0<~≤15.0	15.0<~≤20.0	20.0<
빈도수	76	17	5	1	0	0

표 16. 미소곤충에 의한 피해율

범위	피해율(%)					
	≤0.0	0.0<~≤10.0	10.0<~≤20.0	20.0<~≤30.0	30.0<~≤40.0	40.0<
빈도수	42	7	3	1	1	45

표 17. 선충에 의한 피해율

범위	피해율(%)					
	≤0.0	0.0<~≤20.0	20.0<~≤40.0	40.0<~≤60.0	60.0<~≤80.0	80.0<
빈도수	9	1	0	2	0	87

표 18. 흑선충에 의한 피해율

범위	피해율(%)					
	≤0.0	0.0<~≤20.0	20.0<~≤40.0	40.0<~≤60.0	60.0<~≤80.0	80.0<
빈도수	77	12	1	4	1	4

## 라. 국내외 인삼 뿌리썩음병 연구현황 조사, 분석

인삼뿌리썩음병에 대한 연구현황 분석을 통해 새로운 인삼뿌리썩음병 피해경감기술개발을 위해 국내 관련 학회와 인터넷 google 검색을 통해 자료를 수집하였고 인삼뿌리썩음병 원인균, 발병환경, 길항미생물, 화학적 방제, 물리적인 방제 등의 연구보고서와 논문을 분석하였다.

지금과 같은 인삼 재배는 조선 인조 3년(1625년)의 기록에 근거하여 추정하면 약 400여 년의 역사를 가지고 있다.(조선왕조실록 인조실록 9권. 인조 3년 6월 15일, 신묘 4번째 기사). 이후 조선전역에서 가삼재배가 시작되었고 현재에 이르러 초작지는 찾기 매우 어려운 실정이다. 지금으로서는 재배이력과 예정지관리 단계에서 토양검증에 의한 토양 화학성을 교정하고 양질의 유기물을 시용하여 토양환경을 인삼에 적합하게 조성하는 것이라고 생각한다.

과거의 선행연구 결과를 고찰하여 인삼 연작장해 요인으로 인식되어 온 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*와 *F. solani*에 대한 병원균 분리 동정, 병원균의 생리생태, 방제기술 등의 연구현황을 조사 분석하여 기존의 방제기술을 한계를 극복하기 위한 대책을 제시하고자 한다.

그간 국내외적으로 병원균 분리 동정, 병징, 발병양상, 발병예측, 생리장해, 선충피해, 병원균특성, 연작장해, 진단기술, 정량기술, 품종육성, 길항기작, 길항균 분리, 길항균 생리생태, 생물방제, 화학적 방제, 경종적방제, 물리적 방제, 유기자재, 토양 환경 및 개선 등의 다양한 분야에 대해 연구가 이루어졌는데, 그 자료를 정리한 내용은 표 19와 같다.

여기서 자상부 병해충 방제에 대한 자료는 수집분석을 하지 않았지만 지하부 병해충에 대한 연구는 그리 많은 편은 아니다. 특히 뿌리썩음병에 대한 연구는 생각보다 연구 자료가 제한적이었다.

인삼뿌리썩음병 원인균은 주로 *C. destructans*와 *Fusarium* sp.로 알려졌다. 그 외에도 연부병과 역병, 균핵병이 있기는 하지만 병에 대한 특성이나 생리생태에 관한 연구 자료는 거의 없었다. 인삼뿌리썩음병에 대한 방제방법에 대한 연구는 다수 이루어져 있으나, 대부분 *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Streptomyces* sp. 등을 포함한 생물학적 방제, 바사미드를 활용한 토양훈증, 그리고 경종적 방제, 태양열소독 등을 이용한 물리적 방제를 적용해 왔으나 의미 있는 성과는 없는 상황이다.

그 이유를 살펴보면, 토양의 환경을 길항미생물이나 인삼인 대상작물에 대한 생육환경에 대해 고려를 못한 이유도 있다. 그 중 하나가 인삼은 기본적으로 질소성분을 꺼리는데, 유기물 공급원으로 질소성분이 많은 축분이나 해충이 좋아하는 미숙퇴비를 시비하는 것이다. 토양환경도 사양토나 미사질양토를 선호하는데도 불구하고 토성이 고려 대상에서 빠지는 경우도 많다. 또한 길항미생물 제품은 많은 농가들이 시용을 하는데 대부분의 농가가 예정지 단계에서 사용을 한다. 그리고 본밭에서 사용하는 농가는 상대적으로 적다, 그리고 사용을 해도 단일균주 제품을 사용하고 있다. 이러한 제품의 상용화가 문제이라고 생각된다.

해서 본 연구에서 선행연구 문헌을 고찰하여 얻은 결론은 예정지 선정전에 토양 화학성과 인삼뿌리썩음병 밀도를 기초로 한 재배적합여부를 진단받은 후에 예정지 관리를 하고 인삼뿌리썩음병에 대해 길항능력이 우수한 길항제품과 완숙퇴비시용하고 본밭에서는 3년근부터 인삼뿌리병해 발생여부를 진단받은 후 길항미생물과 Salicylic acid나 Methyl jasmonate와 같이 균사생장억제능력이 강하고 상처발생이 항산화물질인 페놀화합물을 생성을 유도하여 길항력을 발휘할 수 있게 유기산 화합물을 도입한 체계적인 방제를 수립해야 한다는 것이다. 향후 인삼뿌리썩음병을 보다 효율적으로 방제를 하기 위해서는 인삼포 예정지 선정단계부터 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 토양화학성 검정을 통한 관리진단 결과에 따라야 하고 본밭에서의 인삼뿌리썩음병 방제는 유도저항성을 갖게 하는 길항미생물 복합제제와 유도저항성을 보이는 유기산인 Salicylic acid나 Methyl jasmonate 등을 조합한 체계적인 방제조합을 구성할 수 있는 제품을 개발하는 방향으로 방제기술을 개발할 필요가 있다고 계획이다.

표 19. 분야별 연구현황 분석

분야	연구내용
분리 동 정	적부병은 "Rust"로 명명되었고 우리나라와 일본산 인삼뿌리에서 적부병을 동정한 결과, <i>Bacillus Araliavorus</i> (UYEDA)하고 명명하였으나 후에 <i>Erwinia Araliavora</i> (UYEDA)로 명칭을 변경. 上田次郎(農試研報 35, 1909)
	인삼뿌리썩음병원균은 <i>Ramularia destructans</i> 로 명명. Zessmeister CL.(Phytopathology 8 : 557-571, 1918)
	캐나다 온타리오주에서 인삼뿌리썩음병에서 분리한 균류는 불완전성의 <i>Ramularia</i> 속 곰팡이이며 유형은 3유형이 발생하였는데 그중 하나는 <i>Ramularia panacicola</i> Zins로 식별되었으며 다른 두 가지는 <i>Ramularia mors-panacis</i> 및 <i>Ramularia robusta</i> 로 제안. Hildebrand A. A(Canadian Journal of Research. 12(1) : 82-114, 1935)
	인삼뿌리썩음병 중 부패작용을 일으키는 균은 <i>Fusarium</i> sp.로 보고. Kim, C. H.(Plant Protection(Eleventh Pacific Sci. Congress guide book 23, 1966), 이 등 (문교부 연구보고 농학계 1:1-54, 1968), 정후섭(문교부 연구보고 농학계. 1:1-25, 1969)
	인삼뿌리썩음병 중 부패작용을 일으키는 균은 <i>Fusarium solani</i> f. sp. Pisi 로 보고. Matuo, T., and Synder, W. C.(Phytopathology 62:731-735, 1972; 63 : 562-565, 1973)
	우리나라에서는 강화와 금산 등지의 인삼밭에서 인삼뿌리썩음병을 일으킨 균을 분리 동정한 결과, 모두 <i>Fusarium solani</i> f. sp. Pisi(Jones) Synd. Et Hans로 보고. 김 등(KOR. JOUR. MICROBIO. 12:94-98, 1974)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype II가 인삼뿌리썩음병의 원인균으로 동정. 이민웅(KOR. JOUR. MICROBIO. 13:143-156, 1975)
	인삼의 적부병 원인균은 <i>Erwinia carotovora</i> 으로 밝혀짐. 이민웅(KOR. JOUR. MICROBIO. 17(4) : 179-186, 1979)
	일본삼에서 분리된 인삼뿌리썩음병 원인균이 <i>C. destructans</i> (Zins.) Scholten f. sp. Panacis Matuo et Miyazawa F. sp. Nov. 로 보고. Matuo, Takken and Moiyazawa, Yoichi(Ann. Phytopath. Soc. Japan. 50 : 649-652, 1984)
	중국의 전칠삼에 발병하는 검은뿌리썩음병의 원인균은 <i>C. destructans</i> var. <i>destructans</i> 으로 보고. Mao 등(Plant disease 98(1) : 162, 2014)
	중국에서 인삼의 뿌리썩음병 원인균은 <i>Fusarium redolens</i> 으로 보고. Guan 등 (Plant disease 98(6) : 844, 2014)
	중국에서 재배되는 <i>Panax ginseng</i> 에 발병하는 뿌리썩음병 원인균이 <i>F. cerealis</i> 로 보고. Gao 등(Plant Disease. 98(10) : 1433, 2014)
	중국에서 <i>Panax ginseng</i> 에 발병하는 뿌리썩음병 주 원인균은 <i>Fusarium</i> sp.라고 하였고, <i>Fusarium</i> sp. 중 <i>F. acuminatum</i> 이라고 보고. Wang 등(Plant Disease. 100(2) : 525, 2016)
캐나다 British columbia에서 발생한 곰팡이 병원균에 감염되어 시들거나 쓰러진 1-2년생 유묘와 성숙된 부패한 뿌리에서 분리한 균들은 <i>Pythium ultimum</i> (총 분리된 것중 35.6%), <i>Fusarium spp.</i> (30.5%, 주로 <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. avenaceum</i> , and <i>F. equiseti</i> ), <i>Rhizoctonia solani</i> AG 4 (19.6%), <i>C. destructans</i> (9.8%) 였고, <i>in vitro</i> 실험에서 <i>P. ultimum</i> 과 <i>F. solani</i> 는 유묘뿌리에서 가장 많은 병원성 곰팡이고 다음은 <i>R. solani</i> 와 <i>P. cactorum</i> 이였음. Punja	

	Zamir K.(Canadian Journal of Plant Pathology. 19(3) : 301-306, 1997)
	작약뿌리썩음병에 걸린 병반에서 분리한 균인 <i>C. destructans</i> KACC44663는 <i>I. robusta</i> 로 동정되었고, 이 병원균은 인삼에서 뿌리썩음병을 일으킴을 확인하였음. Seo <i>et al.</i> (The Korean Journal of Mycology. 45(2) : 132-138, 2017)
	인삼뿌리썩음병은 검은뿌리썩음병과 적변(rusty root=rusty spots)으로 분류되는데, 2년생 인삼에 접종하였을 때 강병원성을 보인 Cy 9801, 병원성이 없는 Cy0001로 분류되었음.Kim <i>et al.</i> (The Plant Pathology Journal 25(1) : 1-5, 2009)
	<i>C. destructans</i> 에 의한 인삼뿌리썩음병 원인균은 <i>Ilyonectria radicolica</i> 와 <i>Cylindrocarpon</i> -like 불완전세대형이며 일반적으로 다양한 범위의 숙주에서 뿌리썩음병 증상과 관련된 종 복합체를 나타냈다.Ana <i>et al.</i> ,(Mycol Progress.11(3) : 655-688, 2011)
	<i>C. destructans</i> 는 인삼보다는 다른 기주에서 비롯된 것과 비슷했다. 인삼뿌리썩음병 원인균인 한국계통인 <i>C. destructans</i> 는 약병원성이며 다른 기주에서 온 외국계통과 매우 유사했다. <i>C. destructans</i> 는 유전적인 다양성과 병원성의 차이에 따라 강병원성과 약병원성 두 부류로 나눌 수 있다. Song <i>et al.</i> ,(Mycobiology. 42(2):174-180, 2014)
	인삼뿌리썩음병은 가장 널리 퍼져 있는 난균류와 곰팡이류에 의한 것임을 알 수 있다. 난균류는 <i>Aphanomyces</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp. 가 보고됨. 곰팡이류는 <i>Rhizoctonia</i> spp, <i>Fusarium</i> spp. And <i>Phoma</i> spp., <i>Aphanomyces euteiches</i> and <i>Thielaviosis basicola</i> 등이 뿌리썩음병원인균이다. Bodah, Eliane thaines.(Agri Res & Tech.5(3) : 1-8, 2017)
	인삼뿌리에 발생하는 부패병중에는 균류로 심한 부패작용을 일으키는 균은 <i>Fusarium sp.</i> 라고 보고.中田賞五郎 & 瀧元清透.(勸模報.5:76-77, 1922)
	인삼근권에서 56개의 길항세균능 분리하였는데, 고년근 일수록 인삼근권토양에서 길항세균의 분리빈도가 적었다. 작물에는 비병원성이며 저온, 저영양조건에서 <i>Botrytis cetrutis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>C. destructans</i> , <i>Alternaria panax</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora cactorum</i> 그리고 <i>Pythium</i> sp. 균에 항균활성을 보이는 S2116P5 균주를 유용한 길항세균으로 선발하였는데, 우수 길항세균은 <i>Burkholderia pyrrocinia</i> (S21), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (16P15)로 동정. Byoun <i>et al.</i> (농진청.충남대학교 연구과제 완결보고서, 2002)
병징	<i>C. destructans</i> (Zinssm.) Scholten에 의한 뿌리썩음병은 초기에는 지근에서 발생하여 동체부위에서 진행되며 황갈색의 병반 나타남. 조 등(Korean J. Ginseng Sci.. 19(2) : 175-180, 1995)
	<i>Fusarium spp.</i> 에 의한 인삼뿌리썩음병의 발병도는 25%이상인 주요 인삼병이다. 감염된 인삼의 잎은 초기단계에서는 붉은 색으로 변하고 최종적으로는 시들거나 마른다. 감염부위는 동체와 잔뿌리를 포함한 모든 부분이 감염될 수 있다. 갈색의 병징은 주로 표면에 형성되고 점진적으로 확산된다. 최종적으로 여러 개의 병징이 덮고 뿌리 썩음의 원인이다. Guan <i>et al.</i> (Plant disease. 98(6) : 844, 2014)
	<i>C. destructans/Ilyonectria radicolica</i> 는 rusty 증상과 뿌리썩음병 모두의 원인으로 생각. 뿌리썩음병은 rusty 증상보다 인삼뿌리썩음을 더 심각하게 제기하였음. Rusty 증상은 병원균 공격에 대한 식물방어반응의 결과를 여기짐. 뿌리썩음병 원인 계통은 일반적으로 일명 <i>I. mors-panacis</i> 의 종으로 고려하였고, rusty증상과 인삼뿌리썩음병 간에 이런 것들보다 약하거나 강하게 공격적인 종간에 생리적이



	<p>고 생화학적 차이 있음을 주장. <i>I. mors-panacis</i>의 감염에 의해 뿌리썩음병은 진행된다. 썩음은 가용성 철의 작용에 의해 균의 병원성 성장을 자극함에 따라 식물 방어벽이 파괴되도록 가수분해와 산화적인 곰팡이 효소를 다량 생산으로 이루어짐 Rusty 증상은 <i>Ilyonectria</i>의 공격적인 종과 양립할 수 없는 상호작용이 Iron-phenolic 복합화합물에 의해 원인이 되어 발생한다. Fath <i>et al.</i>(J. Ginseng Res. 42(1) : 9-15, 2018)</p>
발병양상	<p>발병부위는 뇌두에서 6cm이내에서 61.2%, 6cm 이하에서 38.3% 분포. 조 등 (Korean J. Ginseng Sci. 19(2) : 175-180, 1995)</p>
	<p>실내 시험을 통해 인삼 종자를 이용한 뿌리썩음병 전염원 능력 추정 검증 가능성 제시.(Park <i>et al.</i>(Korean J. Plant Pathol. 13(1) : 37-45, 1997)</p>
	<p>중국에서 <i>Panax ginseng</i>에서 <i>Fusarium</i> sp.에 의해 발병하는 인삼뿌리썩음병의 병징은 수침상의 부정형의 병징이 뿌리의 표면에서 나타나고 점진적으로 중심으로 확대되고, 식물전체가 위조되거나 죽는다. 지상부의 증상은 잎의 기부에서 시작되어 정단엽으로 진행되며 황백화와 단풍이므로 변한다고 하였음. Wang <i>et al.</i>(Plant disease 100(2) : 525, 2016)</p>
	<p>곰팡이 <i>C. destructans</i>는 근계의 썩음에 의해 특정된 뿌리 썩음의 원인균이다. <i>C. destructans</i>는 일반적으로 어린뿌리에 국한되지만 나머지는 근계의 오래된 부분을 공격하는 능력이 있다.Shin <i>et al.</i>(Korean J. Soil. Sci. Fert. 45(3) : 370-376, 2012)</p>
	<p>질은 갈색의 뚜렷한 인삼뿌리썩음병 병징을 보이는 뿌리조직에서 <i>C. destructans</i> 57균주 분리하였는데, 연근이 높아질수록 병원균 분리율은 감소, 1-4년생 55%, 1-2년생 65%, 3-4년생 35% 이었음. <i>C. destructans</i>의 분리과정 중 대다수 병반에서 <i>Fusarium</i> spp.가 공존, <i>Fusarium</i> spp.의 생산속도보다 <i>C. destructans</i> spp.보다 빠른 특성을 나타냄. 분리된 <i>C. destructans</i> 57균주중 61%(34균주)는 병원성이 낮았으나 37%는 무상처 접종에서도 병반을 형성할 정도로 강한 병원성을 나타냄. Lee <i>et al.</i>(Res. Plant Dis. 20(2) : 87-94)</p>
	<p>인삼 재작의 실패원인은 인삼뿌리썩음병 원인균인 <i>Ilyonectria destructans</i>와 관련이 있음. 인삼뿌리썩음병의 발병은 산도(pH5.0)와 상처가 기여함. 증상은 이병된 인삼은 봄에 출아하지 못하고 생육기간에 급속히 시들고 조기에 성숙된 잎색으로 변하고 스트레스 증상이 회복되지 않는다. 증상은 뿌리 표면에서 발생하여 속으로 깊이 진행된다. 병징은 뿌리의 횡단면을 통해 확대되는데, 뿌리끝에서 시작하여 관근쪽으로 진행되면서 명확한 썩음증상을 보인다. 가장 심한 형태의 병 진행은 연약한 껍질만 남기고 내부가 완전히 썩어 버림 M. Putnam.(pacific northwest plant disease management handbook. <a href="https://pnwhandbooks.org/node/2742">https://pnwhandbooks.org/node/2742</a>, 2017.</p>
	<p>飴色연화병에 의해 3-4년근 인삼포가 상당한 피해를 받았음을 보고. 中田賞五郎 &amp; 瀧元清透.(勸模報.5:76-77, 1922)</p>
	<p>토양병해가 심하게 발생할 경우, 적부병(<i>Erwinia araliavora</i>)에 의하여 재배인삼의 8할 정도가 부패되었음.中田賞五郎.(作物病害圖篇,養賢堂. 237, 1934)</p>
	<p>부여와 금산지방 등지에서 적부원병에 의해 47% 및 79%까지 피해발생.李康澈, 鄭夏元.(농진 식환연보.8 : 487-500, 1965)</p>
	<p>경기도 김포군 일대의 5년근 인삼 포지를 대상으로 현지조사한 결과 세균병(병징 사색연화병)에 의한 피해임을 파악, 병해가 발생한 포장은 거의 80~90%가 인삼이 부패하게 된 것을 관찰.Kim, Jong Hee, and Lee, Min Woong.(과학과 기술.25-28,</p>

	<p>1975)</p> <p>적변 발생률은 3~4년생, 뿌리썩음병 발생률은 5~6년근 밭에서 다발생, 폐포된 인삼밭 61개중 평균 결주율은 42.9%로 적변율은 34.4%, 근부율은 3.3%. 폐포지의 병해충 조사에서 반점병 50% 이상 발병포장이 18개소, 근부증상이 있는 포장 19개소 중 균핵병에 의한 근부 2개소, 감자썩이선충에 의한 근부 5개소, 나머지 12개 포장은 원인불명. 인삼 포장의 두둑이 높을수록 적변율은 유의성 있는 감소를 보였으며 벗짚으로 부초를 한 포장이 무부초 포장보다 결주율이 현저히 낮음. 토양 화학성은 인삼의 결주보다 적변과 더욱 상관관계가 높음. 적변율 50% 이상 리 포장이 우높은 18, 점무늬병이 50%이상 감염, 뿌리썩음병 19, 균핵병 2, 감자썩이선충 5, 병원성이 밝혀지지 않은 량 포장보다 질산태 질소, 인삼 및 칼슘함량이 높았음. 토양 미생물중 <i>Erwinia</i> 밀도가 인삼의 결주율과 유의성있는 상관관계가 있음.Kim <i>et al.</i>(Korean J. Ginseng Sci.17(1) : 45-51, 1993)</p> <p><i>C. destructans</i>에 감염된 인삼은 뿌리 끝에서 주근의 윗부분으로 주로 썩어서 올라증상을 보임. <i>C. destructans</i>에 의한 뿌리썩음병은 연근에 관계없이 이병되고 잎에 증상은 뿌리의 대부분이 썩어들어 갈 때 나타난다. <i>Fusarium</i> spp. 근계와 몸통에서 감염되며 <i>Fusarium</i> spp.에 의한 뿌리썩음병에 감염된 인삼은 잎이 시들고 뿌리를 절단해보면 뚜렷하게 유관속다발이 변색되어 있다.Jesse A. Randall &amp; Jarett Cook.(http : www. Extention.iastae.edu/forestry/publications/PDF-files/Ginseng%20publication%20-20disease%20 and 20pest%20%20F 402PDF. 2013)</p>
발병예측	<p>유묘 이병율에 의한 발병예측 모형식은 인삼뿌리썩음병에 대한 토양검증 차원에 적용할 경우 재배예정지의 적지여부를 판정할 수 있고 인삼 생육기간 중 적용할 경우 고년생 포장에서의 병 진전을 예측할 수 있어 조기 수확 여부를 판정할 수 있을 것으로 예측. Park Kyu Jin(Res. Plant Dis.7(1) : 20-24, 2001)</p>
생리생태	<p><i>C. destructans</i> 균사체를 초음파 처리하여 분리된 후막포자를 20℃에서 배양했을 때 후막포자 세포의 발아율은 55.8%, 총 후막포자사슬균의 발아율은 73.4%로 었음. Cho and Yu(J. Ginseng Res.24(2) : 53-57)</p> <p><i>C. destructans</i> 후막포자의 적정발아온도는 CSA배지의 경우 15~30℃에서 53.2%~62.7%였고 PDA배지의 경우 10~20℃에서 43.6~47.9%였고 <i>C.destructans</i> 후막포자의 발아 적정 pH는 CSA배지의 경우 pH 6.4~8.1이고 PDA배지의 경우 pH5.2~6.0이었음.</p> <p><i>C.destructans</i> 후막포자를 21일간 배양한 후 생성된 균총의 색상을 pH별로 조사한 결과, CSA배지에서는 pH 5.2~6.0에서 연갈색, pH 6.4~8.1에서 백색 균총형성, PDA 배지에서는 pH 5.2~7.1에서 암갈색 균총을, pH7.2에서 갈색균총을 형성하였음.Cho and Yu(J. Ginseng Res.25(3) : 136-140)</p> <p><i>C.destructans</i> 후막포자의 생리특성을 밝히고자 조절된 pH조건하에서 Czapek Dox broth에서 20℃에서, 12일간 배양하였을 때는 소형분생포자가 미성숙한 후막포자 유사세포로 변형되었고 PDA 및 V-8 Juice agar 그리고 질소원이 결제된 Czapek Dox broth배지에서 20℃에서 16~20일에 후막포자가 생성되었는데, 생성된 후막포자는 황갈색 혹은 적갈색을 띠었으며 균사의 중간이나 말단부위에서 한개 혹은 여러개의 사슬형태로 존재. 후막포자의 크기는 직경 11.3~11.9um이었으며 외부에 1.5~1.8um 길이의 혹 같은 돌기가 여러 개 형성되어 표면이 울퉁불퉁하였음. Cho <i>et al.</i>(J. Ginseng Res.27(4) : 195-201, 2003)</p> <p><i>C.destructans</i>에 이병된 인삼개체는 종종 지상부에는 증상이 나타나지 않지만, 병이 진전되면 인삼엽이 적색, 오렌지색, 노란색으로 변색되고 이병은 뿌리 끝에서 발</p>

<p>병하여 동체로 진행된다. 부패된 부분은 적갈색이고 마르거나 코르크화 되지만 조직이 끈죽같이 연화되지는 않음. Brian hudelson (UW-Madison plant pathology. Revised Apr. 25. 2004)</p>
<p><i>Fusarium solani</i> 균은 34균주 중 1개 균주만이 병원성을 보였으나, <i>C. destructans</i>는 12 접종균주 모두 인삼뿌리썩음에 높은 병원성을 나타내었음. <i>Fusarium solani</i> 및 <i>C. destructans</i>는 전형적인 기주-위주의 인삼 토양병원균으로 추정.Lee Soon Gu.(Res. Plant Dis.10(4) : 248-259, 2004)</p>
<p>2002~2004년에 캐나다 브리티시 컬럼비아 지역의 인삼포에서 <i>C. destrutans</i>에 이 병된 뿌리 총 80 주를 채취하였는데, 이 중 49%는 고병원성(상처가 없는 뿌리에서도 병징이 나타남)으로, 51%는 약 병원성(상처가 있는 뿌리에만 병징 나타남)으로 분류되었다. 강병원성 균은 18℃에서, 약병원성 균은 21℃에서 가장 잘 성장되었고 35℃에서는 거의 성장하지 않았다. 뿌리썩음병의 발병도는 유의하게 토양 내 균 밀도가 <math>3.45 \times 10^{-2}</math> cfu/g ~ <math>1.86 \times 10^{-3}</math>cfu/g에서 오염밀도가 높을수록 증가하였다. 병발생도는 15℃나 25℃보다 20℃에서, 토양수분은 -0.005~-0.001Mpa보다 -0.002Mpa에서 높았다. 뿌리썩음병 발병도는 토양수분과 토양온도와의 상호효과가 관찰되었다. Rahman &amp; Punja (Phytopathology 95 : 1381-1390, 2005)</p>
<p>Fe는 병원균의 성장, 포자형성, PPO 효소 활성을 통해 <i>Cylindrocarpon</i>에 의한 뿌리썩음은 촉진된다. 상처조직에서 생성된 Phenolic 화합물에 의해 격리된 Fe는 감염된 위치에서 Fe의 수준이 상승하는 것으로 보아 <i>C. destrutans</i>는 감염된 부위의 Fe를 격리시킬 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 추정.Rahman &amp; Punja (Phytopathology 96 : 1179-1187, 2006)</p>
<p><i>C. destructans</i>의 유기온도는 강병원성 13~23℃에서, 병원성이 없는 것 18~28℃였고 외상에 의해 형성되는 주피는 Cy 9801는 28℃에서, Cy 0001는 18~28℃에서 적변의 spot증상을 가진 뿌리조직이 형성되었고 <i>C. destructans</i>에 의한 뿌리썩음병은 저온에서는 형성되지 않았고 고온에서는 외상에 의해 형성되는 주피는 감소되고 인삼적변의 <i>C. destructans</i>에 의해 억제, 반대의 조건하에서 진행됨을 제시하였다.Kim <i>et al.</i>(The Plant Pathology Journal 25(1) : 1-5, 2009)</p>
<p><i>C. destructans</i>의 균사 생장은 5-35℃에 배양한 결과, 강병원성과 약병원성 모두 20℃가 생육적온이었고, 5℃에서는 생장이 낮았고, 35℃에서는 성장하지 못했음. pH변화는 pH 7.0보다 pH 5.0에서 균사생장이 양호하였다. 뿌리에서의 상처는 pH 변화와 관계없이 발병도를 더욱 증가시켰다. 인위적으로 조성한 발병토양에 1년 생과 4년생 인삼뿌리를 이식하여 재배한 결과 2년생 뿌리에서 가장 감수성이었음. 발병률도 79.5%로 가장 높았음. 뿌리썩음병 발병정도는 <math>3.5 \times 10^2</math>cfu/g처리구보다 <math>2.0 \times 10^3</math>cfu/g에서 높았음. Lee <i>et al.</i>,(Res. Plant Dis.20(2) : 87-94, 2014)</p>
<p>화학적인 유인성분을 함유한 인삼뿌리 삼출물은 <i>C. destructans</i>이 인삼뿌리에 균체형성을 돕고, 균을 유인하는 신호 또는 영양원으로 역할을 한다. pH 6, 배양온도 20℃에서 배양된 <i>C. destructans</i>는 인삼뿌리삼출물 aqueous phase 2mg/l, butanol phase 20mg/l, petroleum ether 0.2mg/l에서 강한 양적인 주화성 반응을 나타냈다. Xu <i>et al.</i>(Korean J. Medicinal Crop Sci.24(5) : 360-369, 2016)</p>
<p>잿빛곰팡이병은 전국적이며 묘포와 5-6년생 밭에서 그 피해가 심하며 실제로 고년생 포장에서의 결주는 대부분 잿빛곰팡이병의 피해가 심하지만 약제방제효과가 뚜렷하지 못한 이유는 병원균을 충분히 이해하지 못하고 일반적으로 다른 병과 같은 방법으로 방제하기 때문으로 판단됨. 잿빛곰팡이병균은 저온성의 순사물기생균으로 살아 있는 조직은 침입하지 못하고 반드시 죽은 조직을 통하여 침입하</p>

	<p>는 특성이 있으므로 정상적으로 성장하는 인삼에서는 거의 발병하지 않는 반면 장기 저장중인 인삼이나 다른 원인에 의하여 생긴 뇌두부위 또는 땅과 접한 줄기의 상처를 통해 2차적으로 발병하여 뇌두부위로부터 아래쪽으로 뿌리를 연부시킨다. 인삼에서의 잿빛곰팡이병균은 부생성균이므로 상처만 있으면 항상 침입이 가능하므로 약제살포에 의한 방제는 거의 불가능한 반면에 원인을 제거하여 방제하여야 함. 잿빛곰팡이병의 침입경로 : 입고병균에 의한 땅과 줄기의 병반부위, 이상저온에 의한 발괴된 인삼의 동해부위, 토양표면의 염류집적에 의한 뇌두 또는 발괴시 줄기의 상처, 월동전 말라 죽은 잎과 줄기.Ryu <i>et al.</i>(J. Ginseng Res. 춘계 학술발표. 1998).</p>
	<p><i>Rhizoctonia</i>, <i>Pythium</i> 및 <i>Phytophthora</i>에 의한 입고병, 회색곰팡이병, 균핵병 등은 20℃내외인 비교적 저온에서 발병이 심하고 탄저병, 반점병, 세균성 연부병 등은 25℃이상인 생육후기에 다발생. 균핵병은 토양산도가 산성인 pH 4.7내외에서, 적변삼과 뿌리썩음병은 중성내지 약산성인 pH 6.5~7.0에서 많이 발생하고, <i>Fusarium</i>균의 성장도 좋았음. 뿌리썩음병 원인균인 <i>Fusarium</i>균총수와 근부 및 결주와의 정의 상관을 보였고 총세균수와도 같은 경향임 <i>Streptomyces</i>균이 많은 토양에서는 <i>Fusarium</i>수도 감소하고 결주도 적었음. 입고병, 뿌리썩음병, 역병 등은 묘삼 및 저년근에서, 균핵병, 회색미병, 반점병, 탄저병 등은 4년근 이상에서 많이 발생, 뿌리썩음병은 인삼근에 상처가 있으면 연근에 관계없이 증가.Ohh Seung Hwan.(Korean J. Ginseng Sci. 5(1) : 73-84, 1981)</p>
생리장해	<p>적변삼 발생이 심했던 토양은 건전토양에 비해 환원정도가 심했고, 경시적으로 칼리함량이 급격히 떨어지는 특성임. Kim <i>et al.</i>(경상북도농업기술원 2007년도 시험연구보고서, 2008)</p> <p>인삼 뿌리의 적변현상은 토양의 무기이온 분포, pH, 토양수분함량 등의 변화에 따라 뿌리와 근권 미생물 간의 양분의 이용과 흡수기작과 보호작용의 상호 경쟁 또는 길항작용과 Fe의 산화환원과 밀접한 관련이 있음을 확인. Yang <i>et al.</i>(Plant Physiology and Biochemistry. 43 : 1103-1114, 1997)</p> <p>인삼뿌리에 나타난 녹을 띤 증상은 표피 및 기저 피질 세포에서 숙주 방어 반응이다. 특히 페놀 생산의 유도에 의해 발생하는 것으로 추정된다. 페놀의 생성 유도는 많은 병든 세포에 아직 특성이 알려지지 않은 키틴을 함유한 곰팡이가 침입하지 못한데 기인. 페놀성 화합물의 후속 산화 및 금속 이온, 특히 Fe의 격리는 관찰된 증상과 관련이 있음.Rahman Mahfuzur and Punja Zamir K.(Plant Physiology and Biochemistry.43 : 1103-1114, 2005)</p>
선충피해	<p>강원도 철원군 동송읍 일대의 인삼뿌리썩음병을 조사한 결과 감자썩이선충 (<i>Ditylenchus destructor</i>)을 분리 동정. 선충의 피해를 입은 인삼은 주근의 피층이 갈변되고 스폰지화 되며 피층내부에 코르크 조직이 발달하여 뿌리가 잘 부러진다. 표피가 잘 벗겨져 심한 경우에는 뿌리에 내공이 생기거나 뿌리전체가 썩어 없어지며 줄기와 잎은 급격히 푸른 채로 시들어 죽음. 인삼 재식지 조사면적중 약 36%에서 선충으로 인한 피해 발생. 잎이 시드는 병징이 있는 포장에는 감자썩이선충의 밀도가 8.5~222마리/30g, 병징이 나타나지 않은 포장에서는 7마리 이하였음. Ohhet <i>al.</i>(Korean J. Plant. Prot. 22(3) : 181-185, 1983)</p> <p>감자썩이선충이 인삼의 생육에 직접적으로 영향을 주는 것으로 생각됨.Ohh Seung,Hwan.(Korean J. Plant. Prot.22(3) : 181-185, 1983)</p> <p>선충 피해로 색이 변하는 것은 곰팡이나 세균의 이차 침입에 주원인이다. D. dipsaci로 감염된 감자의 표피는 일반적으로 갈라지지 않으며 썩음은 피경 내부를</p>

	검게 한다. 선충의 생육온도는 15~20℃임. <a href="http://www.cabi.org/isc/datasheet/19286">http://www.cabi.org/isc/datasheet/19286</a>
균 특성	강한 병원성 <i>C.destructans</i> 균주들은 2주간 배양했을 때 표면이 짙은 갈색으로 변하였고 병원성이 낮은 균주들은 베이지색이나 옅은 갈색을 나타냄. Lee <i>et al.</i> ,(Res. Plant Dis.20(2) : 87-94, 2014)
병원균 특성	<i>C.destructans</i> 는 주로 침엽수림토양에 존재. 증상 : 식물의 지하부에 영향을 미치고, 이병된 개체는 봄에 출아를 못하거나 반복적으로 시들었다 회복되었다를 반복함. 지상부는 보통 고사한다. 옅은 적색으로 변색되고 뿌리는 금색에서 갈색이 감염초기에 뿌리표면에 나타남. 병징은 처음에는 얇고 급속하게 퍼지고 표피층 아래에 적갈색이며 흐물흐물하게 썩고 측근이 영향을 받고 동체는 기형이 됨. 썩음은 관근과 줄기로 진행됨. 이병된 인삼을 채굴하면 뿌리에서 줄기가 분리된다. 마지막 단계에서는 뿌리 표피의 조각과 도관 조직만 남는다. 근계의 피해는 일방적으로 지상부를 시들게 함. 대부분 이병된 인삼을 수확하게 되면 부분적으로 썩은 뿌리만 남는다. 병원균 사이클 : 뿌리썩음병은 인삼밭에서 시들거나 죽은 식물의 부분이 동심원적으로 확장하는 것을 특징이 있음. 병원균 감염은 썩은 뿌리의 표면에 형성되는 분생 포자에 의해 전염 될 수 있으며 인삼밭이나 인삼밭에 걸쳐 있는 의류나 기계류에 묻어 기계나 작업자에 의해 토양에 감염시킴. 인삼이 밀집된 밭에서는 뿌리 접촉 지점에서 질병 원인균이 직접적인 식물 간 확산시킬 수 있음. 곰팡이는 감염된 식물 잔유물이나 토양에 후막포자로 월동을 하는 것으로 알려짐. 이병은 다양한 토양형에서 발생함. pH 6.5이하인 토양에서 덜 심한 것으로 보고되었다. 관리 : 고밀도 재배에서는 병의 확산이 급속함. pH 6.5 이하인 토양에서는 뿌리썩음병 발생이 제한된다. 방제 : <i>C.destructans</i> 의 오염 수준을 낮추기 위해서는 이식 전에 토양훈증을 해야 한다. R A Bramall(Phytopathca>DPVCC-chapter-20-ginseng) 뿌리썩음병은 뿌리의 말단부위에서 병반이 진전되어 14주 경과된 9월 25일에는 완전 고사. Kim <i>et al.</i> (경상북도농업기술원 2007년도 시험연구보고서, 2008)
연작장해	우리나라에서 발생하는 인삼 근부관련 병해로는 균핵병( <i>Sclerotinia sp.</i> ), 역병( <i>Phytophthora cactorum</i> ), 반점병( <i>Alternaria panax</i> ), 잿빛곰팡이병( <i>Botryiss sp.</i> ) 및 인삼뿌리썩음병( <i>C. destructans</i> ) 등으로 보고. 뿌리썩음병은 기술할 연작장해의 원인으로서 연작지(또는 재작지) 포장에서 주로 문제가 되고 있음. Ryu <i>et al.</i> (J. Ginseng Res.춘계학술발표. 1998)
	인삼의 연작에 의한 기지현상은 인삼뿌리에서 분비되는 삼출물과 근권내의 미생물상 활력간의 상관성이 있는 것으로 추측. 인삼 경작을 통한 유기물의 증가와 그에 따른 양이온 교환용량의 상승을 볼 수 있음. Lee <i>et al.</i> (Korean J. Ginseng Sci.1(1) 51-58, 1976)
	연작장해 원인은 뿌리썩음병원균( <i>C. destructans</i> ), 병원균 이동 : 원거리 --> 이병묘삼, 포장내 --> 병든 뿌리와 접촉. Ryu. <i>et al.</i> (고려인삼학회. 춘계학술발표. 1998)
	인삼 수확경과연수와 예정지 관리 유무에 따른 토양 화학성과 뿌리썩음병 발생율은 1. 수확경과연수가 짧을 수록 생존율이 낮아지며 2-4년 경과구에서는 81~95%의 뿌리썩음병 발병률을 보임. 수확경과연수가 10년 이상 연작지에서도 연작장해를 일으키는 병원균은 <i>C. destructans</i> 였음.Kang <i>et al.</i> (Korean J. Medicinal Crop Sci.15(3) : 157-161, 2007)
진단기술	뿌리썩음병에 이병된 <i>pseudo-ginseng</i> (var. notoginseng)의 뿌리조직과 건전한 뿌리조직과의 protein profile 분석 비교한 결과 이병된 뿌리조직이 건전한 뿌리조직보다 단백질 밴드수가 적었음. Cai <i>et al.</i> (Promoting global innovation of

	agricultural science and technology and sustainable agriculture development session 4 : Ari-biotechnology Proceeding : International Conference on Agricultural Science and Technology : 200-204
정량기술	인삼뿌리썩음병균인 <i>C. destructans</i> 와 <i>fusarium sp.</i> 를 사전에 유전자지문 및 증폭기술을 이용 확인됨에 따라 인삼포장의 연작장해여부를 사전에 판단 가능. 새로 개발된 T-RFLP기술을 이용하면 더 많은 정보를 지역별로 수집된다면 사전에 인삼 재배적지를 확보할 수 있음. Yang <i>et al.</i> (농진청, 경희대학교 연구과제 완결보고서, 2007)
	Real-time PCR를 이용한 토양내 <i>C. destructans</i> f. sp. Panacis의 밀도를 정량기술 개발. 측정가능한 농도는 건조토양 1g당 0~1.48ng범위임. 인삼 재배 후 토양에서 현재의 CDP를 정량화하여 향후 작물의 질병의 심각도를 예측할 수 있음. 작물의 뿌리병에 일반적으로 적용이 가능하다.Kernaghan(Plant Pathology. 56 : 508-516, 2007)
	곰팡이의 분포는 PCR-ELISA와 Real Time PCR과 같은 분자기법을 이용추적 가능. 곰팡이 병원균의 정량을 위한 병원분자기법 이용은 병원균 검출 민감도와 정밀도가 향상되어 기존의 전통적인 회석하여 도말하는 방법보다 우수하다. Crosby <i>et al.</i> (USDA Forest Proceeding, RMRS-P-62. 32-34, 2010)
	토양에서 병원균을 검출하기 위해 PCR 분석기법을 사용, Internal transcribed spacer (ITS) 1,4 프라이머세트와 Nest 1,4 프라이머 세트를 이용한 nested PCR 분석은 다양한 미생물이 포함된 토양에서 특이성을 유지했다. 토양 DNA 추출 방법을 위해, several cell wall disrupting method으로 시험했을 때 거의 모든 후막포자 파괴할 수 있는 동결건조와 유리비드로 충격을 주어 추출하는 조합이 가장 강력하였다. Nested PCR 분석은 인삼밭에서 <i>C. destructans</i> 를 모니터링하고 검출하기 위한 믿을만하고 신속한 도구로 이용 가능. Jang <i>et al.</i> (Mycobiology. 38(1) : 33-38, 2010)
	<i>C. destructans</i> 에 이병된 인삼이나 토양에서 특이적 프라이머 CD-E와 CD-R을 이용해 <i>C. destructans</i> DNA에서 450bp만 증폭되었고, 그 외의 병원균이나 Negative control에서는 증폭되지 않는 프라이머 개발. 이 프라이머 CD-E와 CD-R의 검출 민감도는 PCR volume 25ul당 1pg이었음. 인삼뿌리썩음병의 모니터링이나 진단을 위한 신속하고 신뢰할 수 있는 기구로 이용. Fu <i>et al.</i> (Africa Journal of Biotechnology.11(42) : 9955-9960, 2012)
	토양전염병원균인 <i>C. destructans</i> 는 인삼뿌리썩음병 원인균이고 brefedin A와 radicicol 과 같은 2차대사물질을 생성하는데, 이중 라디시콜은 <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> 와 <i>Alternaria panax</i> 를 포함한 곰팡이의 균사 생육을 억제하는 물질임. 이런 특성을 이용 라디시콜 50mg/ml를 함유한 배지를 tool로 이용하여 <i>C. destructans</i> 만 분리 증식할 수 있음. Kang <i>et al.</i> (Plant pathol. J.30(4) : 432-436, 2014)
	인삼뿌리썩음병원균을 라디시콜(Radicicol) 선택배지로 증식시켜 인삼뿌리썩음병원균의 DNA를 추출한 후 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 효과적으로 정량하는 방법. Lee seung ho and Kim Mi Lan.(대한민국특허청, 특허번호 : 1017800950000, 2017)
	실린드로카폰 디스트릭탄스에 특이적인 프로브 및 프라이머를 이용한 식물조직를 직접 이용한 진단방법. Jo Hye Seon and Kim Jae Hyun.(대한민국특허청, 특허번호 : 1017660560000, 2017)

<p>품종육성</p>	<p>인삼뿌리썩음병 원인균 중 하나인 <i>Fusarium sp.</i>에 대한 저항성 계통 육성을 위한 병 저항성 검증 시도  뿌리썩음병에 대한 저항성이 있는 품종 개량이 가장 효과적인 대안임을 제시. Bodah, Eliane thaines.(Agri Res &amp; Tech.5(3) : 1-8, 2017)</p>
<p>길항기작</p>	<p>인삼의 뿌리썩음병 증상을 억제시킨 토양의 근권에서 분리한 식물 뿌리썩음병을 유발하는 <i>F. solani</i>에 대한 <i>P. aeruginosa</i> (KGM-100)의 생물학적 방제기작 구명, 2. 이 계통의 생물학적 방어기작은 pseudobactin으로 추정된 sideropore였음.Lee <i>et al.</i>(Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23(1) : 91-97, 1995)  <i>Streptomyces alboniger</i> ST 59는 병원균 <i>F. solani</i>의 분생포자, 균사분만아니라 분해되기 어려운 후막포자까지도 분해하였다. <i>Streptomyces</i>에 의한 <i>F. solani</i>에 대한 억제작용은 항생물질에 의한 영향을 받은 병원균이 Chitinase에 의해 분해되는 것으로 추정됨.Chung <i>et al.</i>(KOR. JOUR. MICROBIO. 27(1) : 56-62, 1989)  식물의 뿌리썩음병 원인균인 <i>F. solani</i>에 대한 <i>P. stutzeri</i> YPL-1의 항균기작은 항균물질보다 용해작용에 의존한다. 즉 용해기작이 약한 laminarinase 와 강한 키틴나아제의 가수분해효소에 의해 <i>F. solani</i>의 세포벽물질을 효소적인 분해를 하는 것으로 나타났다.Lim Ho Seong and Kim Sang Dal,(Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18(1) : 81-88, 1990)  <i>P. stutzeri</i> YPL-1의 배양 여과액을 이용한 다양한 생화학 적 test와 결함이 있는 돌연변이 체 또는 보강된 항진균 활성에 대한 돌연변이 분석에서 박테리아의 anti-<i>Fusarium</i> 기작은 독성 물질에 의한 것이 아닌 용해성 효소나 항생물질과 관련이 있음을 발견. <i>P. stutzeri</i> YPL-1은 Chitinm, laminarin 또는 <i>F. solani</i> 균사와 같은 다른 Polymers가 성장할 때 세포 외 Chitinase와 laminarinase를 생성. 이들 용해성 세포 외 효소는 포자 발아보다는 균사체 성장을 현저하게 억제하였고 또한 <i>F. solani</i>의 균사체와 생식관을 용해시킴.Lim <i>et al.</i>(Applied and environmental microbiology. 57(2) : 510-516, 1991)  토양에서 인삼뿌리썩음병 원인균인 <i>F. solani</i>의 균사생장 억제능력을 가진 42개 strain 분리하였는데 이중 균사생장 억제능력이 우수한 strain은 <i>Promicromonospora sp.</i>(CHA 1) 와 <i>pseudomonas psedoacaligenes</i>(S-PFHR 6)였다. CHA 1과 S-PFHR 6의 번식체로 개선된 토양은 균류생장저지작용을 증가하였고 대분생자의 발아율도 감소하였다. Kim Seong Il and Lee Min Woong.(The KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY. 22(1) : 50-61, 1994)  <i>Serratia plymuthica</i>는 살선충물질인 Zeamine을 생성하여 생물학적 살충기작을 가짐. <i>Alcaligenus xylosexidans</i>, <i>Aeromonas hydrophila</i> SBK1과 <i>Pseudomonas fluorescens</i> PB27 등은 <i>Rhizoctonia bataticola</i>, <i>Fusarium sp.</i> 와 <i>Aspergillus flavus</i> 등의 식물병원균 생육억제. <i>Serratia</i> 속종 <i>S. marcescens</i>는 주로 엽권에서 분리 <i>R. solani</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>Botrytis cinerea</i> 등의 토양병과 지상부병을 억제. <i>Chromobacterium sp.</i>, <i>Lysobacter sp.</i>, <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Serratia plymuthica</i>등은 주로 살선충 효과 보고, <i>Globodera rostochiensis</i>는 알의 부화를 억제하고, <i>Pseudomonas sp.</i>는 <i>Trichodorus primitivus</i>에 대한살충효과. 식물병원균 키틴분해세균을 첨가해서 배양하면 식물병, 선충, 해충 모두 방제할 수 있는 생물학적 방제원이 될 수 있음.Kim <i>et al.</i>(Res. Plant Dis.23(1) : 19-34, 2017)</p>
<p>길항균 분리</p>	<p>인삼뿌리썩음병에 이병된 인삼이 있는 밭 토양에서 분리된 9개의 <i>Streptomyces</i> 균주는 모두 키틴나아제를 생성하고 균사를 분해시킬 수 있는 특성을 보임. Chung <i>et al.</i> (Kor. J. Mycol.9(3) : 163, 1981)</p>

	<p>인삼의 뿌리에 번식하는 부패균에서 섬유소분해능력이 있는 효소를 생성하는 <i>Rhizopus</i>속 균주를 분리하였고 균주가 생성하는 cellulase에 대한 효소의 특성 조사.Noh <i>et al.</i>(Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng..10(1) : 1-7, 1982)</p> <p>인삼뿌리썩음병 병발생 억제토양에서 방선균 110 isolates를 분리하였는데, 이중 인삼뿌리썩음병 원인균인 <i>F. solani</i>와 <i>C. destructans</i> 효율적인 방제효과를 보인 방선균은 <i>S. variabilis</i>, <i>S. virginiae</i>, and <i>S. griseolus</i> 등 3종이었음. Shin <i>et al.</i>(Kor. J. Mycol.19(1) : 66-73, 1991)</p> <p>각지에서 수집한 토양에서 동정된 뿌리썩음병에 길항성을 보이는 균주 <i>Nocardia</i>(B8)속과 <i>Pseudomonas</i>(B14) 속 2종 선발. Lee <i>et al.</i>(연구과제 최종보고서), 1992)</p> <p>인삼근권토양에서 56개의 길항세균을 분리하였는데, 길항세균의 분리빈도는 고년 근일수록 감소하였음. 작물에 비병원성이며 저온, 저영양조건에서 <i>Botrytis cetrytis</i>, <i>F. solani</i>, <i>C. destructans</i>, <i>Alternaria panax</i>, <i>Rhizoctonia solani</i>, <i>Phytophthora cactorum</i> 그리고 <i>Pythium</i> sp. 균에 항균활성을 보이는 S2116P5 균주가 유용한 길항세균 선발, Kim Seon Ik.( Chungnam National University Master's Thesis. 1996)</p> <p>뿌리썩음병 항균력이 있는 미생물에 16s rRNA의 염기서열 검증 결과, <i>Paenibacillus polymyxa</i>(ac05-2), <i>Bacillus subtilis</i>(4185), 미동정(AC06-6) 등 3종 선발하였는데 이들 미생물은 뿌리썩음병 외에도 균핵병균, 역병균, 잣빛곰팡이병균, 라이족토니아병균에 대한 강한 항균활성 가졌음.Kim ea al. (Gyeongsangbuk-do Agricultural Research Institute, 2007 research report, 2008)</p> <p>인삼 밭에서 최종적으로 분리한 3종을 16SrRNA sequences를 기반한 계통 발생 분석한 결과 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>로 확인..Kim <i>et al.</i>(The Korean Journal of Pesticide Science. 16(4) : 357-363, 2014)</p> <p>인삼뿌리썩음병에 길항력이 있는 <i>B. amyloliquefaciens</i> GR4-5 균주의 밀도를 q-PCR을 이용하여 분석. Kim <i>et al.</i>(Korean J. Org. Agric.23(4) : 847-858, 2012)</p>
길항균 생체	<p>Streptomyces ST 59의 키틴나아제와 균사분해효소의 생성은 배양 온도와 배지조성에 영향을 받았는데, 일반배지에서는 40℃에서 배양된 여액에서 가장 키틴나아제 활성이 컸으며, 균사 분해율도 높았으며. 무기염류를 함유한 배양액에서는 30℃에서 6일간 동시에 배양하였을 때 <i>F. solani</i>의 균사, 대형분생포자 및 후막포자를 분해하였음. Chung <i>et al.</i> (Kor. J. Mycol.9(3) : 163, 1981)</p> <p>인삼 포장에서의 토양미생물의 분포와 환경을 조사한 결과 방선균류는 대체로 9~11월인 가을철에 비교적 증가하였고 <i>Trichoderma</i> spp. 는 여름철부터 가을철에 증가하였고 수적분포도 재작지보다 초작지에서 높았음. <i>Trichoderma</i> spp./방선균은 초작지에 많이 분포하였음.Shin <i>et al.</i>(KOR. JOUR. MICROBIOL.24(2) : 184-193, 1986)</p> <p><i>Trichoderma</i> spp.는 <i>R. solani</i>에 기생성을 띄고 기주균사에 Supercoiling 을 형성하고 균사가 생육말기에 용해, B8과 B14균주는 배양여액에서 병원균의 성장을 억제하는 물질생성. Lee <i>et al.</i>(연구과제 최종보고서), 1992)</p> <p>인삼유묘에 S21 R20, S300 균주를 1.8×10<sup>8</sup>cfu/g로 Bacterization하여 처리한 후 6개월 후에 근권에 정착하였고 정착된 균 밀도는 2.7×10<sup>6</sup>cfu/g로 우수한 근권정착능을 갖고 있으며 기질로서는 0.5% Methyl cellulose가 좋았음. Kim Seon Ik.( Chungnam National University Master's Thesis. 1996)</p> <p>전남지역 인삼재배포장의 AMF포자의 전체 평균 밀도는 건토 1g당 3.4~5.9의 분</p>



	<p>포하여 자연상태 토양 중의 AMF 포자밀도는 건토 1g당 6.3~14.7개로 인삼재배지보다 포자 밀도가 높았음. 근권토양 중 AMF 외생균사의 길이는 건토 1g당 0.5~4.3m 범위로서 인삼의 재배연수가 증가함에 따라 외생균사의 양이 많아졌음. Sohn <i>et al.</i>(Korea J. Soil Sci. Fert. 41(3) : 214-222, 2008)</p>
	<p>Glomalin 함량은 작물을 재배한 포장에 재배하지 않은 포장보다 높았고, AMF의 외생균사 길이는 겨울에 보리를 재배한 후 이어 콩 재배한 작부체계에서 건토 1g당 1.7mg으로 가장 높았음.Sohn <i>et al.</i>(Korea J. Soil Sci. Fert. 41(3) : 170-176, 2008)</p>
	<p><i>F. cf. incarnatum</i>에 의해 발생하는 인삼 뿌리썩음병에 대한 생물학적 방제용 미생물제로서 잠재성을 가지고 있는 <i>Bacillus species</i> 중 <i>Bacillus isolate B2-5</i>는 25C 까지 온도를 상승하였도 병원균 균사 성장에 대해 억제력이 높아지는 것으로 나타났다. <i>Bacillus isolate B2-5</i>의 농도 10<sup>6</sup>cfu/ml과 10<sup>8</sup>cfu/ml에서 비관적인 썩음 증상과 펙틴아제의 생성이 없었음. Song <i>et al.</i>(J of Ginseng Res.38 : 136-145, 2014)</p>
	<p>실외 매몰시험과 포장시험에서 <i>B. amyloliquefaciens</i> GR4-5와 <i>B. subtilis</i> group 유전자수가 비슷한 수준으로 되는데 소요되는 시간은 7일 내외였음. 토양내 미생물의 종은 환경요인이 큰 영향을 미치는데, 온도와 미생물의 격리정도가 가장 큰 인자로 추정. <i>B. amyloliquefaciens</i> GR4-5 균주의 생존은 토양수분함량 변화보다 균주 처리방법에 의한 영향이 더 크게 작용하는 것으로 보였고 식물병원균 억제 및 근권 정착에 유리한 환경을 조성하기 위해서는 관주처리 간격은 7일 간격으로 판단.Kim ea al.(Korean J. Org. Agric.,23(4) : 847-858, 2015)</p>
	<p>토양온도는 전체 토양미생물 밀도 변화에 영향을 미치지 않지만 방선균만은 온도의 증가로 감소하였기 때문에 미생물 군집집단이 온도 변화에 부분적으로만 영향을 받았음. 토양온도는 미생물의 밀도뿐만 아니라 군집구성에 영향을 미치기 때문에 식물의 대사활동에도 간접적으로 영향을 미침. Eo Et al. (Korean J. Environ Agric.,35(1) : 32-38, 2016)</p>
	<p><i>B. velezensis</i>, <i>B. amyloliquefaciens</i>, <i>B. plantarum</i>과 <i>B. oryzaicola</i>는 최종적으로 계통유전체학을 기반으로 분류할 때 <i>B. velezensis</i>의 이형의 유사동의어로 분류. Dunlap <i>et al.</i>(International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.66 : 1212-1217, 2016)</p>
생물방제	<p>B8과 B14 균주를 동시에 접종한 경우에는 길항균 접종구에서 단독처리구 보다 뿌리썩음병 방제효과가 있었고, 포장에서도 같은 효과를 보였음. 캐리어로는 이탄, 톱밥, 알팔파 등이었음. Lee <i>et al.</i>(연구과제 최종보고서), 1992)</p>
	<p>인삼재배토양에서 분리된 길항미생물 <i>B. subtilis</i> B-4228을 사용하여 방제효과를 검증한 결과, B-4228과 <i>C. destructans</i>와의 대치배양결과, <i>C. destructans</i>의 균사가 비정상적인 형태로 팽창하였고, 강한 성장억제력을 보였음. <i>C. destructans</i>에 오염된 이병토에 <i>B. subtilis</i> B-4228를 처리한 결과, 건전률이 무처리 20% 대비 82%로 높게 나타났고, 이병율은 무처리 50.4% 대비 6.0%로 나타났다. Lee Byung Dae and Park Hoon.(J. Ginseng Res. 28(1) : 67-70, 2004)</p>
	<p><i>P. polymyxa</i>(ac05-2), <i>B. subtilis</i>(4185), 미동정(AC06-6) 등 3종을 혼합하여 관주하였을 경우 인삼생육 촉진과 뿌리썩음병과 적변삼의 발생을 억제하였음. Kim ea al. (Gyeongsangbuk-do Agricultural Research Institute, 2007 research report, 2008)</p>
	<p><i>Bacillus</i> 속 세균은 1.0×10<sup>8</sup>의 8승에서 보다 1.0×10<sup>6</sup>의 6승의 농도로 처리하였을때</p>

	<p>뿌리썩음 증상이 효과적으로 감소하였음. 1.0×10의 6승 처리에서는 병원균 감염에 대한 구조적인 방어와 관련하여 주피에 두드러진 상처형성이 된다. 세균 길항균은 상대적으로 <i>C. destructans</i>의 낮은 감염농도에서 인삼뿌리썩음병에 대한 생물학적 방제로써 높은 잠재력을 가진 것으로 추정. Jang <i>et al.</i>(Plant pathol. J.27(4) : 333-341, 2011)</p> <p>다양한 식물근권토양에서 분리된 유용한 방선균 8종의 항균기작은 siderophore를 생산하며, cellulase와 protease와 같은 곰팡이 세포벽 분해효소를 생성. 인삼뿌리썩음병 주요 원인균인 <i>C. destructans</i>, <i>B. cinerea</i>, <i>R. solani</i> 등에 대한 강한 길항 활성을 나타내었음. Kim <i>et al.</i>(The Korean Journal of Mycology.40(1) : 44-48, 2012)</p> <p>실외 매몰시험과 포장시험에서 <i>B. amyloliquefaciens</i> GR4-5와 <i>Bacillus subtilis</i> group 유전자수가 비슷한 수준으로 되는데 소요되는 시간은 7일 내외였음. 토양내 미생물의 종은 환경요인이 큰 영향을 미치는데, 온도와 미생물의 격리정도가 가장 큰 인자로 추정. <i>B. amyloliquefaciens</i> GR4-5 균주의 생존은 토양수분함량 변화보다 균주 처리방법에 의한 영향이 더 크게 작용하는 것으로 보였고 식물병원균 억제 및 근권 정착에 유리한 환경을 조성하기 위해서는 관주처리 간격은 7일 간격으로 판단. Kim <i>et al.</i>(Korean J. Org. Agric.23(4) : 847-858, 2015)</p> <p>인삼 곰팡이병에 항균효과가 있는 <i>B. amyloliquefaciens</i> AK-0는 <i>C. destructans</i>에 의한 뿌리썩음병에 억제효과 발현. <i>B. amyloliquefaciens</i> AK-0는 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>, <i>A. panax</i>, <i>B. cineria</i>, <i>F. solani</i>, <i>C. destructans</i> 등에 각각 31.8%, 59.6%, 80.1%, 42.1%, 75.96%의 방제가를 보여 <i>Botrytis cineria</i>, <i>C. destructans</i>에서 방제가 우수. Kim <i>et al.</i> (Journal of Applied microbiology.122(1) : 166-179, 2016)</p>
<p>화학적 방제</p>	<p>석회질소에 의한 토양소독효과를 분석한 결과, 중국제 석회질소는 추천량인 60kg/10a의 배량에서도 인삼의 입고병인 <i>Rhizoctonia</i>와 <i>Pythium</i>에 멸균효과가 없었고 유효수준은 10,000ppm이었음. 토양미생물에 대해서는 250ppm에서 곰팡이 밀도 50%를 감소, 방선균은 50%이상 증가하였으나 세균은 변화가 없었음. 살균력은 분체가 입체보다 우수. Lee, Byung Dae, and Park Hoon(J Ginseng Res. 33(2) : 139-142,, 2009)</p>
	<p><i>Cylindrocarpon</i>으로 오염 수준을 낮추기 위해서는 이식 전에 토양훈증을 해야 한다. R. A. Brammall(Phytoppath.ca&gt;DPVCC-chapter-20-ginseng)</p>
	<p>해소 방안 : 토양내 병원균 밀도 감소(토양훈증, 담수), 건전묘삼 이식, 확산억제(발병부위로부터 차단거리 확보). Ryu. <i>et al.</i>(고려인삼학회. 춘계학술발표. 1998)</p>
	<p>인삼 뿌리썩음병중 하나인 역병의 효과적인 방제대책은 침투성 살균제가 이용가능하고 토양훈증제 이용도 좋은 대책으로 판단됨. Ohh, Seung Hwan, and Park, Chang Suck.(Korean J. Ginseng Sci.4(2) : 186-193, 1980)</p>
	<p>Cylone과 Basamid 처리구는 무처리구에 비하여 생육이 양호하였으며, 특히 Cylone처리구는 초작지 무처리구의 생육과 비슷하였고 수량성은 Cylone처리구가 가장 양호하였으며 초작지와 비슷하였다. 부패율에 있어서 Cylone 처리구에서 23.3%로 방제가가 가장 좋았음. 적변을 발생에 있어서는 Cylone과 Basamid 처리구가 각각 8%, 9%로 현저히 낮았음. Ahn <i>et al.</i> (Korean J. Ginseng Sci.6(1) : 46-55, 1982)</p>
<p>인삼 뿌리썩음병 진전에 따른 생화학적 변화를 구명하고자 효소활성과 관련성분을 분석한 결과, 병삼은 생삼보다 α-amylase, β-amylase, invertase, catalase,</p>	

	<p>cellulase 등의 활성이 높았고 병삼에서 분리한 균주의 효소활성과 인삼부패력은 비례하였음. 인삼부패병이 진전됨에 따라 효소활성이 계속 증가되며, 초기부터 cellulase, <math>\beta</math>-amylase, catalase 등의 활성이 증가되었음. 인삼부패병이 진전되면서 환원당이 현저히 증가되었고, 가용성 단백질도 다소 증가되었으나, 총산능은 감소. 병삼의 효소활성에 미치는 금속이온의 영향은 catalase, cellulase 및 <math>\alpha</math>-amylase 에 현저한 저해효과를 나타내었고, Ca, Cu, Mn 등의 2가이온이 높은 저해효과를 나타내었다. 병삼의 효소활성에 미치는 유기약품의 영향은 에탄올, 메탄올, 페놀 등의 -OH기를 가진 물질이 현저한 저해효과를 나타내었으며 특히 cellulase활성을 저해하였음. Kim <i>et al.</i>(Korean J. Ginseng Sci.6(1) : 75-83, 1982)</p>
	<p>근권길항세균의 근권 토양내 정착을 위하여 개발한 배양합성형 제형은 Sawdust 형과 Wettable 형이 효과적이었다. 제형의 인삼뿌리썩음병 방제효과 증대를 위해 개발한 수화제(wettable powder type)는 인삼뿌리썩음병에 대한 방제효과뿐만 아니라 인삼의 생육촉진에도 탁월한 효과가 있음. Byoun <i>et al.</i>(농진청.충남대학교 연구과제 완결보고서, 2002)</p>
	<p>MJ와 SA는 phenolic synthesis enzymes 의 변환으로 인삼뿌리에 phenolic 화합물의 축적을 유도하였다. 고려인삼 뿌리에 처리된 MJ와 SA는 항산화력을 높이고 상처로부터 식물을 보호하는데 유용. Mohamed <i>et al.</i>(Molecules.12 : 607-621, 2007)</p>
	<p>개갑된 종자에서는 배유와 종피에서 <i>F. oxysporum</i>의 감염이 80%까지 나타났음. 균사의 생장은 살균제 benomyl, propiconazole, fludioxonil과 thiophanate-methyl 의 10ug/ mL에서 유의하게 감소하였음. 종자감염과 함께 인삼밭의 토양과 벚짚거치에서 유래된 <i>F. oxysporum</i>의 오염은 유묘 뿌리의 제1차 오염원일 수 있음. Punja <i>et al.</i>(Canadian Journal of Plant Pathology.30(4) : 565-574, 2010)</p>
	<p>인삼뿌리썩음병에 감염된 밭에서 작업한 후에는 10% 표백액으로 신발과 기구, 그 밖의 장비를 소독하면 건전한 인삼에 뿌리썩음병을 전파되는 것을 방지할 수 있음. Jesse A. Randall &amp; Jarett Cook.(<a href="http://www.Extention.iastae.edu/forestry/publications/PDF-files/Ginseng%20publication%20-20disease%20and%20pest%20%20F402PDF">http://www.Extention.iastae.edu/forestry/publications/PDF-files/Ginseng%20publication%20-20disease%20and%20pest%20%20F402PDF</a>. 2013)</p>
	<p>선충은 잡식성이므로 잡초방제를 잘 해야 한다. 선충의 밀도는 클로버, 루체른과 같은 작물을 재배할 때 증가함. (<a href="http://www.cabi.org/isc/datasheet/19286">http://www.cabi.org/isc/datasheet/19286</a>)</p>
	<p>훈증지에서는 일부 생물군의 회복에 시간이 걸리며 유기물 시용을 통해 복원과정이 조절 필요함. Park Ki Chun &amp; Eo Jinu.(국립원예특작과학원 연구보고서, 2012)</p>
경종적 방제	<p>예정지 작물로 주로 근권에 국화과 계작물을 재배할 경우, 인삼뿌리썩음병 방제에 효과적이었음. Lee <i>et al.</i>(Korean J. Medicinal Crop Sci.25(1) : 1-9, 2017)</p>
	<p>인삼수확후 윤작에 따른 토양화학성의 변화를 조사한 결과, 염류농도와 K와 Na의 농도는 점진적으로 감소하였고, 유기물함량은 증가하였다. 그러나 인산과 Ca, Mg 함량은 변화없었다. 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도는 윤작횟수가 많을수록 감소하였고, 인삼뿌리썩음병 발병도도 윤작횟수가 많을수록 감소하는 경향임. 3년동안 단기성 작물 윤작은 인삼 생육을 촉진하였지만 뿌리썩음병 감염을 유의하게 억제하지는 못했지만 어느정도 뿌리썩음병 밀도를 낮추는데 효율적이었음. Lee <i>et al.</i>(Korean J. Medicinal Crop Sci. 25(4) : 244-251, 2017)</p>
	<p>클로르피크린을 처리한 토양에 바로 인삼을 재배하면 토양내의 질소량과 그 형태</p>

	에 변화를 일으켜 생육장애를 초래하므로 흡비성이 큰 옥수수 등을 심은 후 파종 또는 이식해야 효과적이라고 한다. 宮澤洋一.(農業及園藝,42:1851-1855, 1967)
물리적 방제	감염된 식물과 건전한 식물간에 1 피트 넓이의 완충대가 만들어주면 뿌리 썩음의 퍼짐을 방지할 수 있음. Jesse A. Randall & Jarett Cook.(http : www. Extention.iastae.edu/forestry/publications/PDF-files/Ginseng%20publication% 20-20disease%20and 20pest% 20%20F 402PDF. 2013)
	전자빔 강도 20kGy 조사시 인삼토양의 연작장애를 가져오는 주 병원균인 <i>C. destructans</i> (30-50 $\mu$ m)의 후막포자가 파괴되어 밀도가 낮아짐 확인. 전자빔 강도 20kGy에서 <i>Phytophthora spp.</i> , <i>R. solani</i> , <i>Pythium sp</i> , <i>F. solani</i> , <i>Cylindrocarpon spp.</i> 토양균들이 살균되었음을 DNA와 PCR분석을 하여 밀도가 낮아지는 효과를 확인하였음. 전자빔 15kGy에서 살균효과 가장 우수. 전자빔 처리시 탄저병, 점무늬병, 역병도 1%내외로 발병률이 감소하였음. 인삼의 생육은 15~25kGy에서 가장 양호하였음. Sim Cheul-Muu.(Deartment of agricultural biology, graduate school chungnam national university, Master's Thesis)
	<i>C. destructans</i> 의 균사체와 분생자 사멸 조건 : 40℃에서 15시간, 40℃에서 2시간씩 9일간 유지, 45℃에서는 8일, 녹비를 투입하고 태양열 소독을 할 경우, 최대 토양온도는 깊이 5cm 55.4℃, 10cm 48.7℃, 15cm 44.7℃, 20cm 42.5℃, 30cm 31.9℃ 였음. 녹비와 CalciumCyanamide(CC)를 투입한 후 태양열 소독을 하였을 때 토양전염 병원균 소독에 가장 효과적이었음.Lee <i>et al.</i> (Korean J. Medicinal Crop Sci.24(2) : 136-142, 2016)
길항물질	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 균주는 항균물질인 Iturin A와 surfactin의 생합성 유전자 서열을 PCR Detection한 결과 양의 반응을 보였음. 인삼을 재배한 토양에서 분리한 박테리아 균주는 인삼재배를 위한 우수한 생물방제 제제로 유망함을 증명. 인삼뿌리썩음병에 대한 길항작용은 iturin A나 surfactin과 같은 nonribosomal lipopeptide 계열의 항균물질들에 의한 것으로 추정. 선발된 3종의 균주중 GR4-5 균주에서는 bacillomycin D 생합성유전자도 추가로 검출.Kim <i>et al.</i> (The Korean Journal of Pesticide Science. 16(4) : 357-363, 2014)
	인삼 곰팡이병에 항균효과가 있는 <i>B. amyloliquefaciens</i> AK-0는 <i>C. destructans</i> 에 의한 뿌리썩음병에 억제효과 발현. <i>B. amyloliquefaciens</i> AK-0는 항균 화합물의 생합성에 관여하는 유전자를 보유하고 있는데, ituD, ituA, surfactin, bacillane, macrolatin, bacilysin, bacillomycin difficidin 등 8종의 항생물질 합성 유전자임. Kim <i>et al.</i> (Journal of Applied microbiology. 122(1) : 166-179, 2016)
	장수풍뎅이 유충의 장내세포에서 분리된 <i>B. amyloliquefaciens</i> LM11은 Surfactin, iturin, fengycin같은 biosurfactants lipopeptide를 생산하며 식물병원성 곰팡이의 성장을 강하게 억제. 항균물질인 Surfactin, iturin, fengycin의 생합성 유전자는 장수풍뎅이 유충이 정지기에 도달하면서 집중적으로 발현되고 그량도 많았다. 최소 surface tension 수준은 38.5mN/m였다(R=0.951-0.977, P<0.001).Kang <i>et al.</i> (Res. Plant Dis. 23(2) : 177-185, 2017)
	<i>C. detructans</i> 의 포자 발아와 균사 성장은 cinnamic acid에 의해 억제되었음. Cinnamic acid는 식물병원성 효소(펙티나아제, 셀룰라제, 아밀라아제, 프로티아제)의 활성을 크게 자극하였음. Cinnamic acid의 고농도(1600ug/ml)에서 <i>C. destructans</i> 의 코로니 직경은 100% 감소하였음. Cinnamic acid는 <i>C. destructans</i> 와 인삼의 성장을 억제하였으나, <i>C. destructans</i> 가수분해효소의 활성을 자극하였음.Sun <i>et al.</i> (www.efpp.net IPM2 Abstracts P26),

	Salinic acid 처리는 방어효소와 관련된 이런 저항성의 활성을 증가되었고, ginseng rusty root rot에 대한 저항성을 개선시킴. Sun <i>et al.</i> (Acta phytopathologica Sinica.42(2) : 6-0, 2012)
	Methyl jasmonate는 <i>C. destructans</i> 의 군사성장, 포자발아를 억제하였지만, 보다 높은 농도에서는 <i>C. destructans</i> 의 가수분해 효소의 활성을 자극하였음. Sun <i>et al.</i> (Bulgarian Journal of Agricultural Science. 19(3) : 530-535, 2013)
유기자재	정균현상에 영향을 준 유기물은 마늘대, 분쇄콩, 인삼잎 등이고, 정화작용을 해소시킨 물질은 밀짚, 보리짚 등 임. Lee <i>et al.</i> (Korean J. Plant pathol.1(3) : 157-164, 1985)
	순개승마에서 ethyl aceate와 n-butanol로 분획한 분획물은 높은 항산화 활성을 가지고 있으며, Chloroform 분획물은 높은 항균력이 있어 식품첨가물 및 식품보존제로 활용 가능. Kim <i>et al.</i> (한국식품영양과학회지. 40(1) : 47-55, 2011)
	18종의 식물을 토양에 첨가하여 개량한 인삼근부변원에 하나인 <i>F. solani</i> 의 후막포자 접종하고 지표식물인 완두를 심어 이병정도를 조사한 결과 이병율은 마늘뿌리처리한 토양에서 가장 낮았고, 파, 양배추, 들깨대, 밀짚 순이었고, 총균수는 파, 콩, 분쇄밀, 배추 등에서 다수였고, 밀, 마늘뿌리, 보리짚에서는 감소, 세균수는 보리, 담배뿌리, 인삼대, 밀짚에서 감소, 방선균은 콩처리구에서만 증가, <i>Fusarium spp.</i> 의 분포수는 배추, 무, 무우줄기, 분쇄밀, 고구마줄기 등에서 증가하였고, 밀짚, 이삼잎, 양배추 등의 처리구에서는 대조구보다 감소하였음. Son <i>et al.</i> (Kor. J. Mycol.13(1) : 41-47, 1985)
토양환경	미생물에 대한 PLFA지수나 미소동물의 밀도는 개간밭보다 논전환 밭에서 높았음. 논 전환전에서는 퇴비 40Mg/ha 처리구에서 날개응애 밀도가 증가하였고 날개응애 밀도의 증가는 PLFA와 양의 상관관계가 있음. 개간밭에서 유기물함량이나 토양생물의 밀도가 낮은 심토로 개간하면 유기물을 투입하여도 토양생물에 대한 효과가 적을 수 있음.. 논 전환 밭에서는 유기물에 대한 토양생물들의 반응이 다르며 토양의 물리화학적 토양생태계에 영향을 미칠 수 있고 논 전환과 개간 밭에서는 유기물에 대한 토양생물의 반응이 다르므로 투입된 유기물의 분해나 이에 따른 양분의 순환이 다를 수 있기 때문에 두 토양에서 시비방법을 다르게 할 필요성이 있음. Eo <i>et al.</i> (Korean J. Soil Sci. Fert.44(5) : 872-877, 2011)
	인삼의 생육이 양호하고 수량이 1.8kg/3.3m <sup>2</sup> 이상인 우량포지는 식양토~양토인 반천, 연곡, 원곡통 등이고 불량포지는 사양토인 지곡통, 상주통과 양토이면서 자갈함량이 높은 석천통임. 토양의 물리성은 우량포지가 불량포지보다 점토, 미사, 수분, 공극율이 높았고, 이들과 인삼의 경장, 경직경 및 수량과는 유의성있는 정의상관을, 결주율과는 부의상관을 나타냈으며 이들중 토양수분의 상관계수가 가장 높았음. 우량포지의 토양 적정삼상분포는 표토에서 고상 40~50%, 액상 22~35%, 기상 25~35%, 심토에서는 각각 45~55%, 28~38%, 15~20%이었음. Lee <i>et al.</i> (Korean J. Ginseng Sci.4(2) : 175-185, 1980)
	인삼뿌리썩음병 유발토양과 억제토양으로 나누어 병원균인 <i>F. solani</i> 에 대한 길항균의 밀도를 분석한 결과, 길항균의 밀도는 억제토양에서 유발토양보다 훨씬 높았고 반대로 <i>Fusarium spp.</i> 의 밀도는 더 낮았음. <i>F. solani</i> 의 후막포자 형성과 군사성장도 뿌리썩음병 억제토양에서 더 적었음. 억제토양을 물 추출하여 관주처리 4시간 후 대형분생포자와 발아관이 길항미생물에 의해 분해된 것을 확인. 억제토양과 유발토양간의 이화학적인 성질은 유의한 차이는 없었으나 억제토양이 유발토양보다 점토함량이 조금 높은 경향임. Chung <i>et al.</i> (Korean J. Plant

<p>Prot.22(3) : 203-207, 1983)</p> <p>인삼토양병을 유발하는 <i>F. solani</i>, <i>R. solani</i>, <i>P. cactorum</i>, <i>Sclerotinia sp.</i>의 균사 성장과 이에 영향을 미치는 억제토양과 유방토양의 환경을 비교한 결과, 병원균 모두 유발토양보다 억제토양에 추출한 추출액 배지에서 생장이 억제되었음.. 두 토양의 근권미생물의 밀도는 <i>Fusarium</i> 속의 균수는 유의한 차이는 없었으나 총 세균과 진균은 모두 억제토양에서 높았으며 점토함량은 억제토양에서 모래함량은 유발토양에서 더 높았고, 화학적성분 중 Mg, Na 함량은 유발토양에서 더 많았으며, Ca, Fe, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 함량은 유의성을 없었으나 유발토양에서 높은 경향을 보임.</p> <p>Chung <i>et al.</i>(Korean J. Plant Prot.22(3) : 142-146, 1983)</p>
<p>2년생 지상부의 결주율은 점토함량이 높을수록 낮았고, 공극율과 초산태질소함량은 높았고, 암모니아태질소함량은 감소. 예정지관리방법에 따른 2년근의 지상부 결주율과 토양특성은 유의한 차이는 없었으나 초산태질소함량과 <i>Fusarium sp.</i>의 밀도는 경운횟수가 많을 수록 감소하는 경향이고 청초를 많이 사용한 포지일수록 질소함량은 증가하는 경향임. 점토함량이 15%이하보다 20%이상인 포지에서 공극율, 가밀도, 전질소, 유기물과 인삼함량이 유의하게 높았음. 지상부의 결주율은 점토함량, 토양수분, 유기물함량과 부의상관을, 초산태질소와는 정의상관을 보였음.</p> <p>Lee <i>et al.</i>(Korean J. Ginseng Sci.9(1) : 36-41, 1985)</p>
<p>인삼밭 예정지 관리 전후 토양화학성 및 병원균 밀도의 변화를 조사한 결과, 토양공극율과 입단율은 증가하였고, 암모니아태질소함량과 가밀도는 감소되었고, 인산과 가리는 약간 증가. 입단화율은 점토, 유기물, 수분, Ca와는 정의 상관을, K와는 부의 상관을 보였고, 입단화에 영향을 미치는 요인은 청초보다는 경운횟수가 컸음. NH<sub>4</sub>-N함량은 55% 감소하였고, 점토함량이 적을 수록 심하였음. 예정지관리 전후 병원균의 밀도는 유의한 차이가 없었으나, 경운횟수가 증가할 수록 감소하는 경향임 5. 전작물간의 병원균 밀도는 유의한 차이가 없었고 화분과와 두과 모두 낮았고 토성간에는 일정한 경향이 없었음. Lee <i>et al.</i>(Korean J. Ginseng Sci.9(1) : 15-23, 1985)</p>
<p>인삼뿌리썩음병 유발토양과 억제토양간의 토양화학성을 비교한 결과, K, Ca, Mg, Na의 평균함량은 억제토양이 낮았고 유기물함량은 억제토양이 2배이상 높았으며, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 함량은 <i>F. solani</i>와 <i>R. solani</i>의 억제토양에서 낮은 반면, <i>C. destructans</i>의 억제토양에서 2배가량 높았다. pH는 억제토양이 낮은 수준이었다. 물리적인 특성은 모래함량은 억제토양이 2배정도 높은 반면 미사토와 점토는 낮았음. Shim, Jae Ouk and Lee Min Woong.(Kor. J. Mycol.18(3) : 164-177, 1990)</p>
<p>생리장애는 토양성분 절대량이 부족하여 발생하는 생리장애보다 토양내 특정성분이 과다로 인한 상호간의 양분 흡수 불균형에서 오는 생리장애가 많다. 나트륨 함량이 높으면 뿌리가 적변 증상을 보이면서 동시에 지상부에서 황색반점 생리장애가 나타났으며, 나트륨, 칼슘과 마그네슘 세종류의 성분이 높은 재배지는 생리장애가 복합적으로 나타나는 현상을 보여 이성분은 생육과 밀접한 관계가 있음.</p> <p>Hyun <i>et al.</i>(Korean J. Medicinal Crop Sci.17(6) : 439-444, 2009)</p>
<p>수량성이 3.3m<sup>2</sup>당 3.0kg이상인 조건은 1. 모암은 천매암, 적색혈암, 화강암, 편마암, 편암, 토성은 사양토, 양토, 미사질양토, 자갈이 있거나 많으며 배수가 양호한 저구릉지였음. 지형은 산록경사지, 선상지, 곡간지였고, 경사에서는 15%이하였으며, 토성은 사양토, 양토, 미사질 양토였다. 밭토양 유형에서는 고원전, 사질밭, 보통밭에서, 논에서는 미숙답이었음. Hyun <i>et al.</i>(Korean J. Medicinal Crop Sci.17(6) : 421-426, 2009)</p>

	<p>유기물 시용에 따른 토양미생물과 미소동물 분포변화를 조사하기 위해 Phospholipid fatty acids 분석결과, 세균, 곰팡이와 방선균의 상대적인 양은 유의하게 다르지 않았다. 호기성균과 혐기성균의 비율은 분해속도가 느린 것으로 알려진 부엽토로 개량된 토양에서 가장 낮았다. 토양에 부엽토를 추가했을 때 환경스트레스의 지표인 포화지방산과 불포화지방산의 비율과 cyclopropyl 지방산과 전구체 비율을 높였다. 돈분퇴비를 시용했을 때 선충의 밀도는 증가하고 날개응애의 밀도는 감소효과를 보였다. 부엽토와 돈분퇴비를 시용하였을 때 선충과 절지동물의 밀도는 상대적으로 낮게 유지되었다. 생물학적인 분해효율을 나타내는 예정지관리는 초작지에서 토양 생물활성을 높이는 기간이 오래 지속되었다. Eo <i>et al.</i> (Korean J Environ Agric.35(1) : 39-45, 2016)</p> <p>부엽토나 토양중의 철 성분의 가용성이 높아지면 포자형성이나 균사 성장촉진에 의해 병 발생이 조장되는 것으로 확인되었으나 습한 토양이 발병의 주요 요인으로는 확인되지 않았음.</p> <p>부엽토나 토양중의 철 성분의 가용성이 높아지면 포자형성이나 균사 성장촉진에 의해 병 발생이 조장되는 것으로 확인되었으나 습한 토양이 발병의 주요 요인으로는 확인되지 않았음. M. Putnam.(Pacific northwest plant disease management handbook. <a href="https://pnwhandbooks.org/node/2742">https://pnwhandbooks.org/node/2742</a>, 2017)</p> <p>2년근 인삼의 생존율은 토양 산도와는 유의한 정의 상관관, NO<sub>3</sub>와 EC와는 부의 상관관을 보였다. Lee <i>et al.</i>(Korean J. Medicinal Crop Sci.25(1) : 1-9, 2017)</p>
토양환경 개선	<p>답전윤환지에서는 pH와 EC 를 낮추는 것이 필요하다. 인삼 재배재에서의 식물성 유기물의 시용이 뿌리썩음병 억제에 효과적이며 녹비작물인 네마장황은 양분이 적은 개간지 토양의 개량에 적합. Park Ki Chun and Eo Jinu. 국립원예특작과학원 연구보고서, 2012)</p> <p>고밀도 재배에서는 병의 확산이 급속함. pH 6.5 이하인 토양에서는 뿌리썩음병 발생이 제한된다. R. A. Brammall(Phytpath.ca&gt;DPVCC-chapter-20-ginseng)</p> <p>인삼 재배 예정지 토양관리를 위한 작부체계는 겨울작물의 보리를 재배한 다음 여름작물의 수단그라스를 재배하는 유형이 AMF 포장 밀도 향상과 토양 물리성 개선에 효과적으로 밝혀짐. Sohn. <i>et al.</i>(Korea J. Soil Sci. Fert.41(3) : 170-176, 2008)</p>

마. 현장에서 활용되고 있는 방제 방법(농약, 미생물, 물리적 등)별 효과 분석

현장에서 활용되고 있는 방제방법별 효과에 대해 설문조사를 통해 2017년 12월에 경기도인삼연구회원을 50명을 대상으로 직접 면접방식을 통해 조사를 실시하였다. 조사내용은 인삼재배경력, 인삼예정지관리기간, 초작여부, 재배규모, 예정지와 본밭 병해충 관리방법, 실제효과 등을 조사하여 분석하였다.

인삼뿌리썩음병에 대해 농가현장에서의 어떻게 방제하는지와 이에 대한 인식을 파악하여 본 연구의 방향을 설정하기 위해 기초조사로 거주지역과 연령, 재배경력, 재배면적 등을, 세부조사 내용으로는 칸당 목표수량, 달성여부, 달성을 못한 이유, 인삼뿌리썩음병 경감을 위한 노력, 길항미생물의 사용여부, 길항미생물 사용 시기, 제품사용 여부 등에 대한 조사하였다. 그 결과는 표 20과 같다.

조사대상은 경기도내 거주하는 인삼재배농가 49농가, 인천시에 거주하는 인삼농가 1농가 등 50농가를 대상으로 조사하였다.

거주지는 김포시 6농가, 안성시 7농가, 양주시 6농가, 연천군 9농가, 양평군 1농가, 이천시 6농가, 파주시 4농가, 포천시 6농가, 화성시 4농가, 인천시 1농가 등 50농가였다. 연령은 40대 미만 8%, 40~50대 10%, 50~60대 30%, 60~70대 44%, 70대 이후 8%로 나타나 50~70대가 74%로 주를 이루었다. 특히 새로운 지식정보 수용에 민감한 연령층인 60대 미만이 48%로 낮은 것은 아쉬움이 있다. 그리고 70대 이후가 8%인 점은 인삼 재배농가가 급격히 감소할 가능성이 적다는 면에서 다소의 희망을 볼 수 있었다. 인삼재배경력은 10년 미만 0%, 10~20년 40%, 20~30년 16%, 30년 이상 44%로 나타났는데, 이는 20년 이상 재배경력이 있는 농가는 새로운 기술에 대한 수용의사가 있어도 실천으로 이행이 어렵다는 면에서 다소 어려움도 예상된다. 인삼경작면적은 5,000칸미만 6%, 5,000~7,000칸 4%, 7,000~10,000칸 20%, 10,000~20,000칸 32%, 20,000~30,000칸 22%, 30,000칸 이상 16%를 차지하였다. 10,000칸 이상의 경작면적을 가진 농가의 비율이 70%이상인 것으로 보아 어느 정도 규모화가 이루어졌음을 알 수 있다. 향후 연작장해 경감기술 과정에서 연구대상을 소농보다는 규모화된 농가를 대상으로 연구를 수행해야 할 것으로 판단되었다.

세부조사에서는 인삼 경작을 하면서 칸 당 목표수량은 어느 정도이셨는지요? 라는 질문에는 98%가 3차 이상으로 답해 인삼농가가 소득안정화를 위해서는 3차 이상 생산해야 경제적으로 안정화가 됨을 의미한다. 인삼 경작을 하시면서 칸당 수량을 달성하셨는지요? 라는 질문에는 매년 도달한다고 응답한 농가가 24%였고 2년에 한번 도달한다고 답한 농가는 40%로 60% 이상은 2년에 한번 정도는 목표수량을 도달한다고 판단되었다. 한 번도 도달하지 못했다고 응답한 농가도 6%였는데, 이들은 목표수량이 높았거나 관리방법에 문제가 있었을 것으로 보인다. 만약 목표달성을 매년 하지 못했다면 그 이유는 무엇 때문이라고 생각하시는지요? 라는 질문에 인삼밭을 잘못 선정했다고 응답한 농가가 42%, 기후 환경, 재작, 토양환경, 축분이용 등으로 답한 농가도 38%나 되어 예상했던 축분이나 미숙퇴비 시용이라고 답한 농가는 2% 밖에 없었다. 결국, **농가에서 원하는 기술은 인삼밭 선정과 기후환경 등에 대한 대처할 수 있는 기술 개발 보급이 필요한 것으로 나타났다.** 예정지 관리 시 인삼뿌리썩음병 경감을 위해 어떤 노력을 하셨는지요? 라는 질문에는 예정지관리단계에서 길항미생물 제품을 사용한다는 농가가 76%로 상당히 높게 나타났다. 다음으로 예정지관리는 2년간 하며 수단그라스와 호밀을 재배하고 경운작업을 15회 이상 하였다고 답한 농가도 72%여서 나름대로 정부에서 제시해준 기준을 따르려고 노력한다고 생각된다. 이러한 설문 결과들을 보면 보다 **효과적인 제품과 처리기술의 개발 보급이 필요**하다고 생각된다. 예정지 단계에서 인삼뿌리썩음병 경감을 위해 길항미생물을 사용하셨다면 어느 시기에 하셨나요? 라는 질문에 예정지 관리단계에서 90%가 길항미생물 제품을 사용하는 것으로 조사되었고, 이식 직전에 사용하는 농가도 10%정도였다. 길항미생물 제품을 사용하셨다면 어떤 종류의 제품을 사용하셨는지요? 라는 질문에는 인삼뿌리썩음병 관련 제품을 사용했다고 답한 농가가 54%로 높았고 선충관련 제품도 40%의 농가에서 사용한다고 답해 농가에서도 선충이 인삼뿌리썩음병과 관련이 있다고 생각하는 것으로 판단되었다. 본밭에서 인삼뿌리썩음병 길항미생물 제품을 사용하셨는지요? 라는 질문에 48%가 있다고 답을 해 많은 농가에서 길항미생물 제품을 사용하지만 2-8번의 질문에 답한 것을 보면 54.1%로 만족하지 못함을 표시했다. 이는 두 가지의 이유라고 생각된다. 하나는 제품 선택의 적정성과 사용시기라는 생각이 든다. 인삼뿌리썩음병 길항미생물 제품을 사용한 적이 없다면 그 이유는? 이라는 질문에는 '주변으로부터 효과가 없다고 하셔서' 라고 80.8%가 답을 해 **아직은 길항미생물 제품을 이용한 친환경 방제는 제품 개발하는 연구자와 판매업체의 꾸준한 노력이 필요**하다고 생각했다.

이상의 결과를 조합해 보면, 인삼 재배농가도 연작장해라고 여기는 인삼뿌리썩음병에 대해 많은 관심을 가지고 해결하려고 노력하고 있다. 하지만 아직 우리 농업환경에 적합한 길항미생물



자원을 선별하지 못했고 농가에서도 길항미생물 제품의 사용보다 양질의 유기물을 시용하려는 노력이 필요하다. 그리고 인삼뿌리썩음병을 경감하기 위해서는 양질의 퇴비를 이용을 통한 토양 물리성 개선과 토양 동·생물상의 안정화를 통해 유익한 미생물이 우점할 수 있게 될 때 가능할 것으로 추론된다.

표 20. 농가현장에서 연작장해 해결을 위한 경감노력 설문조사 결과

구분	설문조사 내용 및 응답결과
조사대상	경기도 연천 등 9개 시군, 50농가
1. 기초조사	
1-1	거주지역 김포시 6농가, 안성시 7농가, 양주시 6농가, 연천군 9농가, 양평군 1농가, 이천시 6농가, 파주시 4농가, 포천시 6농가, 화성시 4농가, 인천시 1농가,
1-2	연령 1. 40대 미만( 8%), 2. 40~50대(10%), 3. 50~60대(30%), 5. 60~70대(44%), 6. 70대 이후(8%)
1-3	인삼 재배경력 1. 10년미만( 0%), 2. 10~20년(40%), 3. 20~30년(16%), 4. 30년이상(44%)
1-4	인삼경작면적(칸) 1. 5000칸미만(6%), 2. 5000~7000칸(4%), 3. 7000~10000칸(20%), 4. 10000~20000 칸 (32%), 5. 20000~30000칸(22%), 6. 30000칸 이상(16%)
2. 세부조사	
2-1	인삼경작을 하시면서 칸당 목표수량은 어느 정도이셨는지요? 가. 2차(2%), 나. 3차(46%), 다. 4차(34%), 라. 5차이상(18%)
2-2	인삼 경작을 하시면서 칸당 목표량은 달성하셨는지요? 가. 매년 도달한다.(24%) 나. 2년에 한번은 도달한다.(40%) 다. 3년에 한번은 도달한다.(30%) 라. 한 번도 도달하지 못했다.(6%)
2-3	만약 목표달성을 매년 하지 못했다면 그 이유는 무엇 때문이라고 생각하시는지요?(중복체크) 가. 인삼밭을 잘 못 선정했기 때문이다.(42%) 나. 예정지 관리를 잘 못했기 때문이다.(22%) 다. 유기물 즉 미숙퇴비나 축분퇴비를 사용했기 때문이다.(2%) 라. 재배기술이 부족했기 때문이다.(6%) 마. 그 외 다른 이유가 있다.(38%)(기후환경, 제작, 토양환경, 축분이용 등)
2-4	예정지과정에서 인삼뿌리썩음병을 경감을 위해 어떤 노력을 하셨는지요?(중복체크) 가. 예정지 관리시 농업기술센터로부터 토양검증에 의한 시비진단을 받고 추천한 대로 예정지 관리를 한다.(28%) 나. 토양살충제 또는 살선충제를 살포한다.(30%) 다. 예정지 관리는 2년간 하며 수단그라스와 호밀을 재배하고 경운작업을 15회 이상 하였다.(72%) 라. 예정지관리단계에서 길항생물제품을 사용한다.(76%) → 9번, 10번 항목으로

2-5	예정지 단계에서 인삼뿌리썩음병 경감을 위해 길항미생물을 사용하셨다면 어느 시기에 하셨나요? 가. 1년차 예정지 관리할 때(54%) 나. 2년차 예정지 관리할 때(36%) 다. 이식하기 전 즉 작관을 할 때(10%)
2-6	길항미생물 제품을 사용하셨다면 어떤 종류의 제품을 사용하셨는지요?(중복체크) 가. 인삼뿌리썩음병 관련 제품(54%) 나. 선충 관련 제품(40%) 다. 살충 관련 제품(16%)
2-7	본발에서는 인삼뿌리썩음병 길항미생물 제품을 사용하셨는지요? 가. 있다.(48%) → 12번 항목으로 나. 없다.(52%) → 13번 항목으로
2-8	2-7)번에서 인삼뿌리썩음병 길항미생물 제품을 사용하셨는데 효과에 만족하셨는지요? 가. 매우 만족했다.(8.3%) 나. 약간 만족했다.(20.8%) 다. 만족했다.(16.7%) 라. 만족하지 못 했다.(45.8%) 마. 매우 만족하지 못했다.(8.3%)
2-9	인삼뿌리썩음병 길항미생물 제품을 사용한 적이 없다면 그 이유는? 가. 주변으로부터 효과가 없다고 하여서(80.8%) 나. 알고 있는 제품이 없어서(19.2%)

## 2. 인삼근권으로부터 분리된 고병원성 인삼뿌리썩음병에 대한 길항효과 구명

가. 고병원성 인삼뿌리썩음병원균 *Ilyonectria mors-panacis*의 분리 및 병원성 검증

(1) 고병원성 인삼뿌리 썩음병원균 *I. mors-panacis*의 분리

(가) 병원체의 분류 : Single species to species complex

*Cylindrocarpon* 속은 원래 Entwicklungsgänge and Pilze (1913)에 의해 Nectria section Willkommiales Wollenw의 유성생식형 상태(teleomorphic state)의 anamorph(무성생식체)로 제안되었으며 후막포자(Chlamydospore)를 생성 할 수 없다는 특징이 있었다.

몇 년 후, *C. destructans*를 포함한 후막포자(Chlamydospore)를 생성 할 수 있는 종을 포함하도록 일반 명칭이 확장되었다. 그런 다음, Booth (1966)는 미세분생자(microconidia) 및 후막포자(chlamydospore)의 존재 또는 부재에 기반하여 속을 4 개의 다른 그룹으로 나누었는데, *C. magnusianum* (Sacc.) Wollenw., *Cylindrocarpon* 속 중 유형인 *C. cylindroides* Wollenw., Nectria mammoidea의 anamorph로 여겨지는 *Cylindrocarpon* 종의 그룹 및 *N. radicolica*의 무성생식체(anamorph) 인 *C. destructans*로 나누었다. *C. destructans*는 microconidia와 chlamydospores의 존재를 특징으로 합니다. 나중에, *C. destructans* 균주들 간에 형태학적 변화가 관찰되었고, 그들의 Teleomorph(유성생식체)는 종에 따라 나뉘어 졌다.

인삼을 감염시키는 종들은 *C. destructans* var. *destruntans*로 나뉘었고 유성생식체 (teleomorph)는 *N. radicola* var. *radicola* 로 명명되었다 (Samuels and Brayford, 1990).

이때까지 anamorph *Cylindrocarpon*을 가진 모든 *Nectria* 종은 *Neonectria* 속에 포함되었다 (Brayford *et al.*, 2004; Mantiri *et al.*, 2001; Rossman *et al.*, 1999). *Cylindrocarpon* 속의 teleomorph의 형태학적 특성에 기초하여, 그들은 5 개의 비공식 그룹으로 나누어졌으며 그 그룹은 (1) *Neonectria coccinea* / *galligena*-group (*Neonectria sensu stricto*) (Booth, 1959); (2) *N. mammoidea* 그룹 (Booth, 1959); (3) *N. rugulosa*-group (Samuels and Brayford, 1994); (4) *N. radicola* 그룹 (Booth, 1959); 및 (5) *N. veuillotiana*- 그룹 (Brayford and Samuels, 1993)으로 나누어 졌다. 이 분류는 미토콘드리아 DNA 데이터를 세 가지 다른 계통 분기(clade)로 분석 한 결과에 따라 수정되었다. *C. destructans* / *N. radicola* 그룹은 계통분기(clade) III을 형성 하였다 (Mantiri *et al.*, 2001). *Cylindrocarpon*과 그것의 teleomorph *Neonectria*에서 발견 된 형태학적 및 분자적 변이는 *Cylindrocarpon* / *Neonectria* 속 내에 여러 속들(genera)이 존재함을 시사했다. 다중 위치 분석(Multilocus analysis) (ACT, ITS, LSU, RPB1, TEF-1- $\alpha$ , TUB)은 Booth (1966)와 Mantiri 등 (2001)의 분류와 겹치는 5 개의 다른 그룹의 존재를 보여주었다. 계통 발생 학적 분석은 관찰 된 형태 학적 차이, 특히 대분생자의 중격형성(macroconidial septation)과 자낭각 구조(perithecia anatomy)와 상관 관계가 있었다. 따라서, 각각의 그룹은 별개의 속으로 간주되었고, *N. radicola* 그룹은 *Ilyonectria*로 일반명칭 되었다. 이에따라, *N. radicola* var. *radicola* (*C. destructans* var. *destruntans*의 teleomorph)는 *I. radicola*로 명명되었다 (Chaverri *et al.*, 2011). 이 연구에서 *I. radicola*에 대한 설명은 Booth (1966, 1967)와 Samuels and Brayford (1990)의 수정 된 설명을 기반으로 한다 : 자낭각(perithecium)은 일반적으로 1개의 평탄한 자낭포자 격벽을 포함하며 젓꼭지모양 또는 월뿔 모양의 꼭대기와 부드러운 다소 거친 표면의 단독 자낭각(perithecium)이며; anamorph는 둥근 끝과 눈에 띄는 꼭지(hilum)와 눈에 띄는 hilum의 유무에 관계없이 타원형 소분생자를 가진 직선 원통 모양의 대분생자를 생성한다. 후막포자(chlamydospore)는 중간, 단일 또는 사슬 형태로 있으며 노화 후 갈색이 된다. 몇 달 후, *I. radicola*의 anamorph는 중 복합체라고 제안되었다; 많은 숙주로부터 분리된 *I. radicola* anamorphs의 다중 유전자 분석 (TUB, HIS H3, TEF-1- $\alpha$  및 nrRNA-ITS)은 그 속의 구성원이 단일 계통이 아님을 입증하였다. 오히려 여러 그룹으로 묶여 있었으며, 각 그룹은 별도의 종으로 간주되었다. 이 연구에서, 다른 다형태의 곰팡이에 관해서는 teleomorph와 anamorph 상태가 단일의 일반명칭으로 지칭 되었다(Crous *et al.*, 2009; Crous *et al.*, 2006; Gräfenhan *et al.*, 2011; Lombard *et al.*, 2010; Schroers *et al.*, 2011). 많은 숙주로부터 얻은 68개의 분리주(isolate)가 *I. mors-panacis*, *I. robusta*, *I. panacis* 및 *I. crassa*의 4가지 다른 *Ilyonectria* 종으로 분류되어다 (표 21) (Cabral *et al.*, 2012a). 4 개의 분리된 *Ilyonectria* 종들 사이의 높은 형태학적 유사성에도 불구하고, 25 °C에서의 colony 직경 외에, 특히 분생자(conidia)의 형태 및 크기에서 약간의 차이가 관찰되었다 (표 22).

☒ 21. Previously reported *C. destructans* var. *destructans* strains associated with American and Korean ginseng (Seifert *et al.*, 2003) with the new generic and species name (Cabral *et al.*, 2012a)

Isolate	New name	Ginseng plant	Geographic origin	Collected by, year	Aggressiveness
265 (CCFC 221059)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1989	Aggressive
842	ND	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1991	Aggressive
999	ND	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1994	Non-aggressive
1287	ND	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1930	Aggressive
1557 (CBS 308.35; CCFC 226729)	<i>I. robusta</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1996	Non-aggressive
1561 (CBS 120359)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1996	Aggressive
1567 (CBS 120360)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1996	Aggressive
1570 (CCFC 226727)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1996	Aggressive
1596 (CBS 120361)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1996	Aggressive
1598 (CBS 120362)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1997	Aggressive
1634 (CCFC 226728)	ND	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1997	Aggressive
1635 (CBS 120363)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1997	Aggressive
1636 (CBS 120364)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1997	Aggressive
1639 (CBS 120366)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1997	Aggressive
1640 (CBS 120367)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1997	Aggressive
1641 (CBS 120368)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1997	Aggressive
1642 (CBS 120369)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Ontario	R. D. Reeleder, 1997	Aggressive
1666	<i>I. robusta</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Nova Scotia	R. D. Reeleder, 1998	Non-aggressive
CDC-N-9A (CBS 129079)	<i>I. panacis</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Alberta	K. F. Chang, 1998	Non-aggressive
NSAC-SH-1 (CBS 129083)	<i>I. crassa</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Nova Scotia	S. Hong, 1998	Non-aggressive
NSAC-SH-2	<i>I. crassa</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Nova Scotia	S. Hong, 1998	Non-aggressive
NSAC-SH-2.5	<i>I. crassa</i>	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, Nova Scotia	S. Hong, 1998	Non-aggressive
2000-M-15	ND	<i>P. quinquefolius</i>	Canada, British Columbia	M. Walker, 1999	Non-aggressive
CY9207	ND	<i>P. ginseng</i>	Korea, Jeungpyung	Y.-H. Yu, 1992	Aggressive
CY9801	ND	<i>P. ginseng</i>	Korea, Suwon	Y.-H. Yu, 1998	Aggressive
CY9802	ND	<i>P. ginseng</i>	Korea, Suwon	Y.-H. Yu, 1998	Aggressive
IFO 31881 (CBS 124662)	<i>I. mors-panacis</i>	<i>P. ginseng</i>	Japan	IFO, 1969	Aggressive
IFO 31882	ND	<i>P. ginseng</i>	Japan	IFO, 1969	Aggressive

☒ 22. Summary of the morphological differences between *I. radicola*-species complex infecting American and Korean ginseng (Cabral *et al.*, 2012a)

Characteristics/species	<i>I. crassa</i>	<i>I. robusta</i>	<i>I. panacis</i>	<i>I. mors-panacis</i>
	Predominant, on SNA formed in flat domes of slimy masses, 1-3-septate			
<b>Macroconidia</b>	Produced on both kind of conidiophores, both ends are rounded but sometime narrowing at the tip, hilum exist, mean size of 1-, 2-, 3-septate conidia are 26.5×5.1 μm, 29.4×5.4 μm, and 35.1×5.7 μm, respectively	Produced only on the simple conidiophores, both ends are rounded but sometime narrowing at the tip, no hilum exist, mean size of 1-, 2-, 3-septate conidia are 23.7×6.5 μm, 27.2×7.0 μm, and 33.5×7.4 μm, respectively	Produced on both kind of conidiophores, both ends are rounded, hilum exist, mean size of 1-, 2-, 3-septate conidia are 24.8×4.8 μm, 28.7×5.2 μm, and 33.1×5.6 μm, respectively	Produced only on the simple conidiophores, both ends are rounded, no hilum exist, mean size of 1-, 2-, 3-septate conidia are 29.9×6.1 μm, 34.4×6.4 μm, and 41.0×7.2 μm, respectively
<b>Microconidia</b>	0-1-septate, ellipsoid to subcylindrical, more or less straight, Conidia formed in heads on simple conidiophores or as white (OA) or unpigmented (SNA) masses			
	Hilum exist, , mean size of 0- and 1-septate conidia are 10.3×3.5 μm and 14.7×4.0 μm respectively	No hilum exist, mean size of 0- and 1-septate conidia are 8.7×3.8 μm and 14.1×4.9 μm respectively	Hilum exist, mean size of 0- and 1-septate conidia are 8.9×3.8 μm and 12.5×4.0 μm respectively	No hilum exist, mean size of 0- and 1-septate conidia are 9.6×3.8 μm and 13.3×4.6 μm respectively
<b>Growth rate at temp. (25°C)</b>	19-34 mm	35-48 mm	15 mm mm	31-40 mm

(나) *I. radiciticola* - species complex의 분류

한국의 고려 인삼 뿌리에서 분리한 *I. radiciticola* 종 복합체(species complex)의 7 가지 분리주(isolate)를 한국의 Korean Agricultural Culture Collection(KACC)에서 얻었다. 균주 *I. mors-panacis* NBRC 31881은 동정 및 병원성 실험에서 양성 대조군으로 사용하기 위해 일본 NITI Biological Resource Center(NBRC)로부터 입수하였다. 대한민국 용인시(37 ° 14'43"N; 127 ° 04'56"E), 고창군(35 ° 23'56"N; 126 ° 33'26"E) 및 연천군 (38 ° 05'48 "N; 127 ° 04'30"E)에서 채취 한 감염된 4년생 재배 인삼에서 추가로 6개의 분리주(isolate)를 직접 분리하였다. Rahman 및 Punja (2005b)에 의해 기술 된 바와 같이 분리가 수행하였다. 비병원성 곰팡이, *Trichoderma* spp. (ITS 수탁 번호 KU238148)을 인삼 rhizosphere로부터 분리하고 병원성 분석을 위한 대조군으로 사용하였다. 모든 분리 균주를 -70 °C에서 10 % 글리세롤이 보충된 Synthetic nutrient broth (Nirenberg, 1976)의 vial에 장기간 보관 하였다. 이 연구에 사용된 *I. radiciticola* 종 복합 분리주에 대한 모든 정보는 표 23에 요약되어있다.

표 23. *I. radiciticola*-species complex isolates used in this study. All were obtained from infected Korean ginseng roots

Name	Isolate number	Collection date	Location	Genbank accession numbers
HIS H3				
<i>I. robusta</i>	HB 1	In this study	Yeoncheon, Korea	KP761762
	HB 2	In this study	Yongin, Korea	KP761766
	HB 3	In this study	Yeoncheon, Korea	KP761763
	HB 4	In this study	Gochung, Korea	KP761764
	HB 5	In this study	Gochung, Korea	KP761765
<i>I. leucospermi</i>	HB 6 (KACC 44655)	SG Lee 2004	Yecheon, Gyeongbuk, Korea	KP761772
	HB 7 (KACC 44656)	SG Lee 2009	Punggi, Yeongju, Gyeongbuk, Korea	KP761773
	HB 8 (KACC 44657)	SG Lee 2004	Gamcheon, Yecheon, Gyeongbuk, Korea	KP761774
<i>I. mors-panacis</i>	HB 9 (KACC 44658)	SG Lee 2002	Suwon, Gyeonggi, Korea	KP761767
	HB 10 (KACC 44659)	SG Lee 2000	Suwon, Gyeonggi, Korea	KP761768
	HB 11 (KACC 44660)	SG Lee 1998	Suwon, Gyeonggi, Korea	KP761769
	HB 12 (KACC 41077)	YS Bae 2002	Anseong, Gyeonggi, Korea	KP761775
	HB 13 (NBRC 31881) (+control)	Y Miyazawa 1969	Kitasaku-gun, Nagano Pref., Japan	KP761770
	HB 14	In this study	Yeoncheon, South Korea	KP761771

### ① Genomic DNA의 추출 및 분리

곰팡이 균주의 Genomic DNA를 DNeasy plant mini DNA extraction kit (Qiagen Inc., Germany)를 사용하여 추출하고 정제하였다.

### ② *I. radicicola* 종 복합체 분리주의 분자 특성

각 분리 물의 동결 건조 된 균사체 20mg을 플라스틱 pestle로 분쇄하고 제조사의 지시에 따라 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. HIS H3의 PCR 증폭 및 sequencing은 다음과 같이 수행되었다 : 1  $\mu$ l의 게놈 DNA를 7.5  $\mu$ l의 green mix(Genotech, 대한민국), 5  $\mu$ mol의 각 프라이머 및 5.5  $\mu$ l의 물과 혼합하여 최종 부피 15  $\mu$ l를 제조하였다. 다음 조건에서 MyCycler TM thermal cycler(BioRad, USA)를 사용하여 PCR 반응을 수행 하였다.(95  $^{\circ}$ C, 5min; 94  $^{\circ}$ C, 30sec; 64  $^{\circ}$ C, 30sec 및 72  $^{\circ}$ C, 80sec;40 cycle, 그리고 72  $^{\circ}$ C에서 10 분 동안의 final elongation). Forward and reverse primers는 CYLH3F (5'-AGG TCC ACT GGT GGC AAG-3 ') 및 CYLH3R (5'-AGC TGG ATG TCC TTG GAC TG-3') (Crous *et al.*, 2004)를 사용하였다. 목표 밴드의 순도는 전기영동에 의해 확인하였다. 시판되는 Gel purification kit(Genotech, Korea)를 사용하여 PCR산물을 정제하고 Genotech(대전, 대한민국)에서 증폭에 사용 된 것과 동일한 프라이머 세트를 사용하여 염기서열을 분석했다. Lasergene software package (DNASar, USA, Madison)의 SeqMan module을 사용하여 서열을 보정하고, 식별을 위해 GenBank 데이터베이스 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 blast를 수행했다. 밀접하게 관련된 *Ilyonectria* 종에 따라 분리 된 균주들의 결과 서열은 CLASTAL\_X를 사용하여 정렬되었다 (Thompson *et al.*, 1997). 계통 발생 수는 MEGA 5 프로그램 (Tamura *et al.*, 2011)을 사용하여 Neighbor Neighbor Joining(NJ) 방법 (Saitou and Nei, 1987)에 의해 구성되었다. Bootstrap values는 1000 replication을 기초로 결정되었다 (Felsenstein, 1985).

이 연구에 사용 된 *I. radicicola* 종 복합체에 속하는 13개의 분리주를 Histone H3(HIS H3) 서열에 기초하여 계통 발생적으로 동정하였다. HIS H3의 계통발생학적 분석은 각각의 종을 별개의 단일 계통의 분기군(clade)로 분석되었다. 따라서, 이들 분리주 중 5 개는 양성 대조군 균주, NBRC 31881과 균주 CBS 307.35 및 CBS 120359의 NCBI의 서열로 클러스터링 됨에 따라 공격적인 종 *I. mors-panacis*로 확인되었다. 나머지 분리주들은 두 개의 다른 종으로 분리되었으며, 5 개의 분리 주가 2주는 *I. robusta*로 그리고 3주는 *I. leucospermi*로 확인되었다 (그림 3.1). 이는 Cabral *et al.* (2012a)의 연구와 일치하였다. 이 저자들은 미국 인삼에서 분리 된 *I. radicicola* 종 복합체 22 개의 분리 물을 4 종으로 재분류했다. 그중 16 개 분리 주가 *I. mors-panacis*로 구명되었고, 나머지는 *I. robusta*를 포함한 다른 3 가지 종으로 분해되었다. 중국 고려 인삼에 대한 *I. robusta*의 첫 번째 보고서가 최근에 발표되었다 (Lu *et al.*, 2015). *I. leucospermi*는 이전에 *Protea*와 *Leucospermum*의 vegetative cuttings(삼목)에서 검출되었지만 (Lombard *et al.*, 2013) *Panax* 종에 대해서는 보고 된 바 없다. 따라서 본 연구는 인삼으로부터 분리 한 *I. leucospermi*의 첫 번째 보고이다.

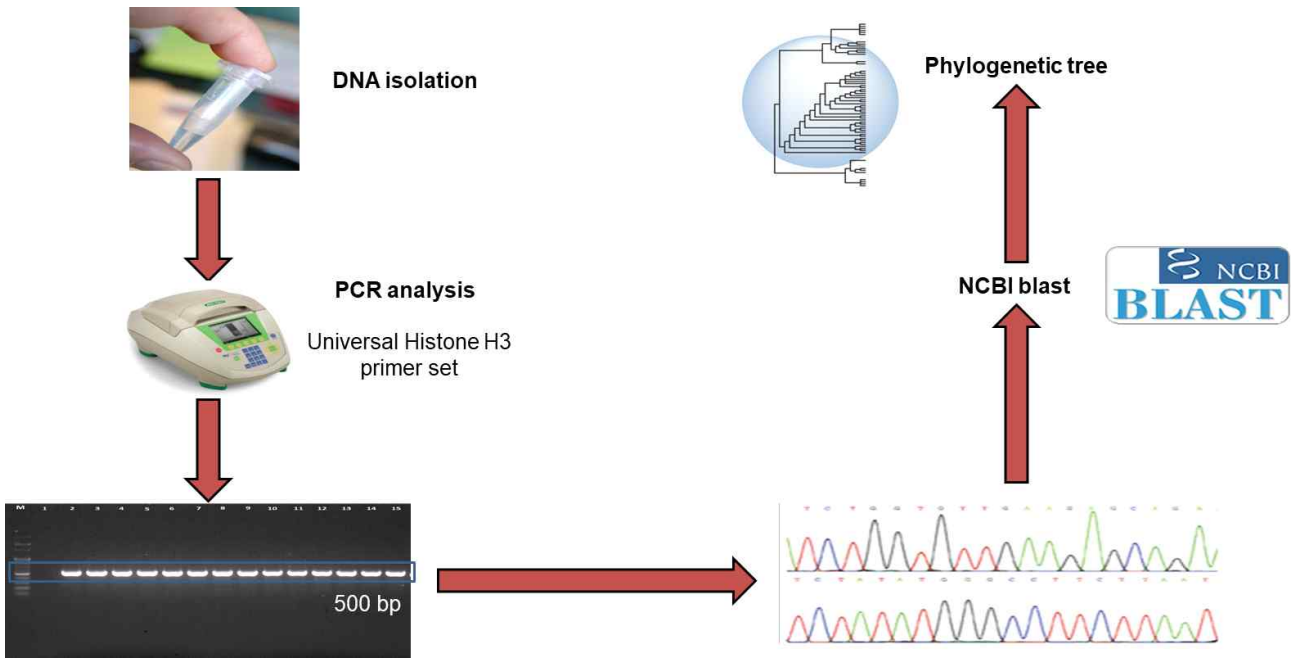


그림 4. Histone H3 region을 이용한 *I. radicola*- species complex의 분자적 특성 구명 모식도

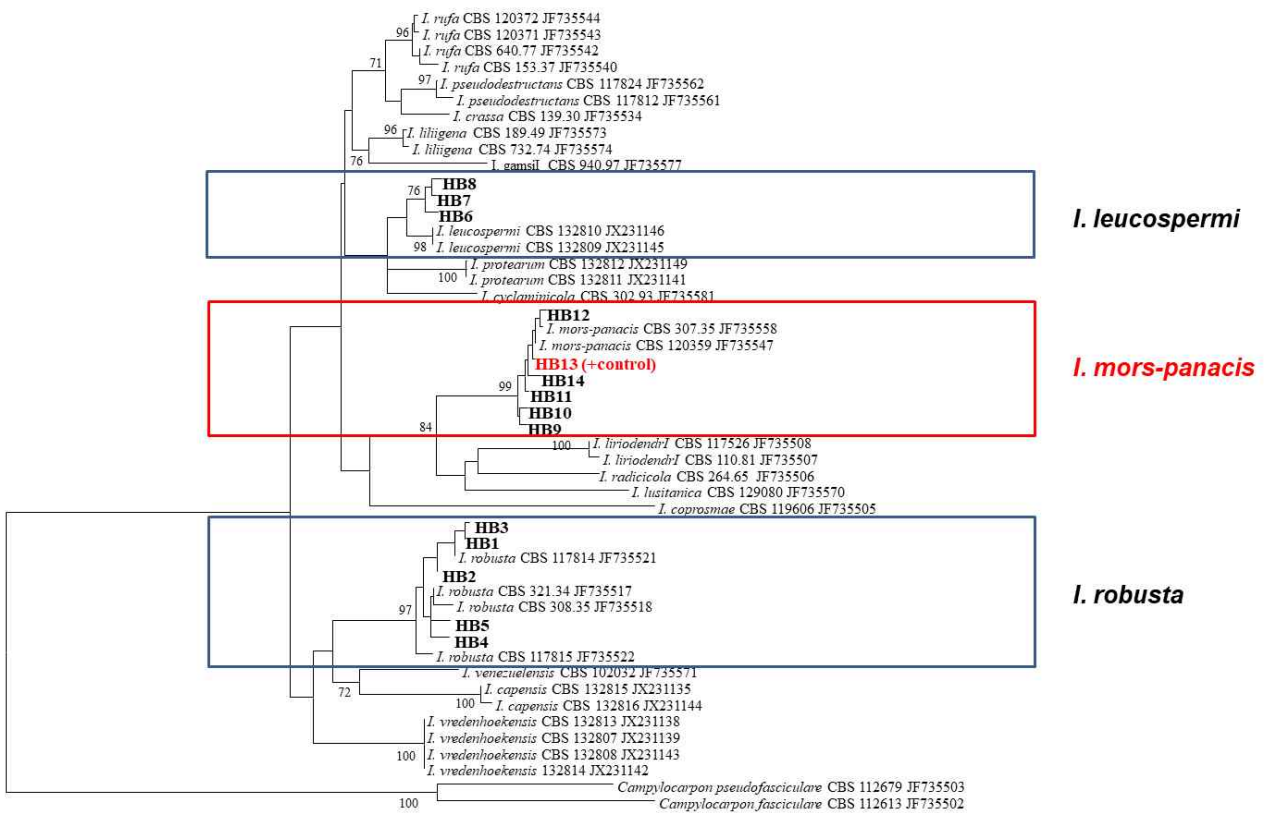


그림 5. Histone H3 region을 이용한 *I. radicola* 종 복합체로부터 분리한 13종의 분리 균주의 분자 특성 구명을 통한 발생계통학적 위치.



③ *I. radicicola* 중 복합체 분리주의 병원성 검증

모든 확인된 *Ilyonectria* 종 균주 균주의 병원성은 (Kernaghan *et al.*, 2007)에 보고된 방법을 약간 수정하여 평가하였다. 각각의 분리 균주를 25 일 동안 어두운 곳에서 10 일 동안 PDA에서 배양시킨 다음, 25 °C에서 2 주 동안 shaking(150 rpm)하면서 V8 broth에서 배양하였다. V8 Broth media의 제조는 V8 juice를 원심분리하여 얻은 상층액을 5배 희석한 후 Chloramphenicol을 100mg/l의 양을 첨가하여 250 삼각플라스크에 150ml씩 배지를 분주 후, 멸균하여 각 병원체를 접종하여 배양하였다. 각 균사체를 여과하여 V8 broth를 제거하고, 50 ml의 멸균수와 균사체를 블렌딩(Blending)하여, 멸균된 인공 토양과 10 %의 최종 농도로 혼합하였다. 건전 토양은 멸균수만 혼합하고 균주 NBRC 31881의 균사체와 *Trichoderma* spp.도 동일한 농도에서 각각 control, positive control 및 negative control으로서 제조하였다. 감염된 토양 샘플을 내경 10cm 및 높이 10cm 화분으로 옮긴 다음 비슷한 길이, 너비 및 무게 (6 뿌리 / pot)를 가진 1 년생 묘삼 뿌리를 재배했다. 화분을 온실 (25 ± 1 ° C, 50% 습도, 12 시간 광주기)에서 4 주 동안 배양하였다.

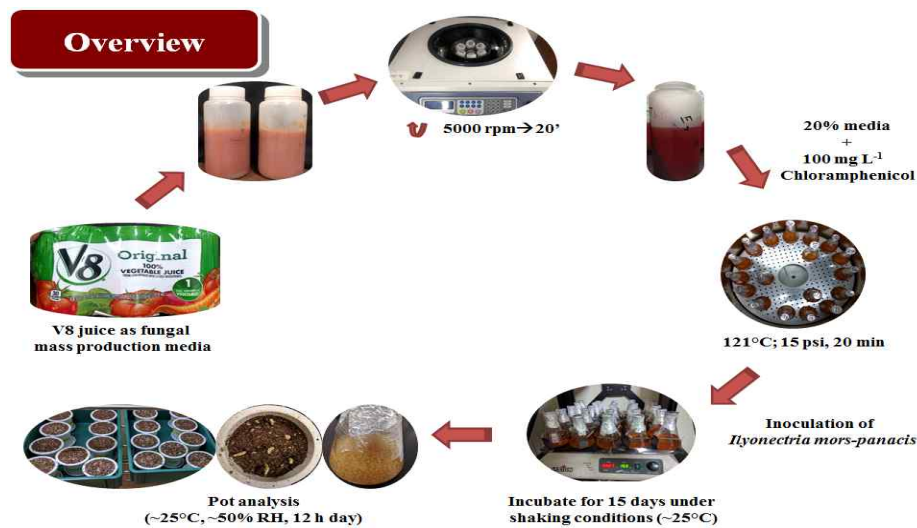


그림6. 병원체 배양을 위한 배지 제조 및 배양 모식도.

Disease severity index(DS)I를 결정하기 위해 감염된 뿌리를 표 23에 설명된 척도를 사용하여 평가했다.  $DSI = [(X1 \times 1) + (X2 \times 2) + (X3 \times 3) + (X4 \times 4) + (X5 \times 5) + (X6 \times 6)] / (X1 + X2 + X3 + X4 + X5 + X6)$ ,를 사용하여 각 분리에 대해 DSI를 계산하였다. X1, X2, X3, X4, X5 및 X6은 각각 썩음 심각도가 각 1, 2, 3, 4, 5 및 6에 해당하는 뿌리의 개수이다.

1년생 묘삼에서 *I. mors-panacis*로 식별된 균주는 주문한 양성 대조균(HB 13, NBRC 31881)과 마찬가지로 일부 뿌리에 완전한 파괴를 유발하는 반면, 다른 종의 균주는 음성 대조균 (*Trich. ..*)에 대해 관찰된 바와 같이 묘목에 대한 감염을 거의 또는 전혀 발생시키지 않았다. 특히 본 연구에서 연천군에서 분리한 *I. mors-panacis*(HB14)는 가장 강력한 병원성을 나타내었다(표24, 그림7). 따라서 향후 실험실 내 뿌리썩음병 방제 및 분석에 HB14 균주를 활용하여 고병원성 인삼뿌리썩음병에 대한 방제 연구를 계속 진행하였다.

☒ 24. DSI scale used for estimation of pathogenicity of *I. radicola*-species complex

<b>Disease severity</b>	<b>Symptoms</b>
1	-Seedlings germinated -leaves are green and large and not wilted -Stems are turgid (not damped off) -Roots are turgid and whitish with no discoloration
2	-Seedlings germinated -leaves are green and small and not wilted -Stems are turgid (not damped off) -Roots are turgid and whitish with no discoloration
3	-Seedlings germinated -leaves are green and small and not wilted -Stems are soft but not damped off -Less than half of root length are soft and discolored
4	-Seedlings germinated -leaves are green and small and not wilted -Stems are soft but not damped off -More than half of root length are soft and discolored
5	-Seedlings germinated -leaves are wilted -Stems are soft and damped off -The whole root are soft and discolored
6	-Seedlings not germinated -The whole root are soft and discolored

표 25. DSI recorded on infected roots by strains of *I. radicioloa*-species complex compared to the positive control, *I. mors-panacis* NBRC 31881, negative control, *Trichoderma* spp., and mock infected roots

Treatment	DSI	
	Individual	Average
Control (non-infected)	1.61±0.068	1.61±0.068c
<i>Trichoderma</i> spp. (-control)	1.50±0.117	1.50±0.117c
<b>HB13 (+control)</b>	<b>4.72±0.0680</b>	<b>4.72±0.0680a</b>
HB1	2.27±0.0681	
HB2	1.77±0.1360	
HB3	1.50±0.0253	1.95±0.013b
HB4	2.11±0.2721	
HB5	2.11±0.1360	
HB6	0.27±0.1360	
HB7	2.16±0.1666	1.85±0.098b
HB8	1.57±0.0874	
<b>HB9</b>	<b>4.09±0.1166</b>	
<b>HB10</b>	<b>4.88±0.0680</b>	
<b>HB11</b>	<b>5.22±0.0680</b>	4.99±0.064a
<b>HB12</b>	<b>5.72±0.0680</b>	
<b>HB14</b>	<b>5.33±0.0377</b>	

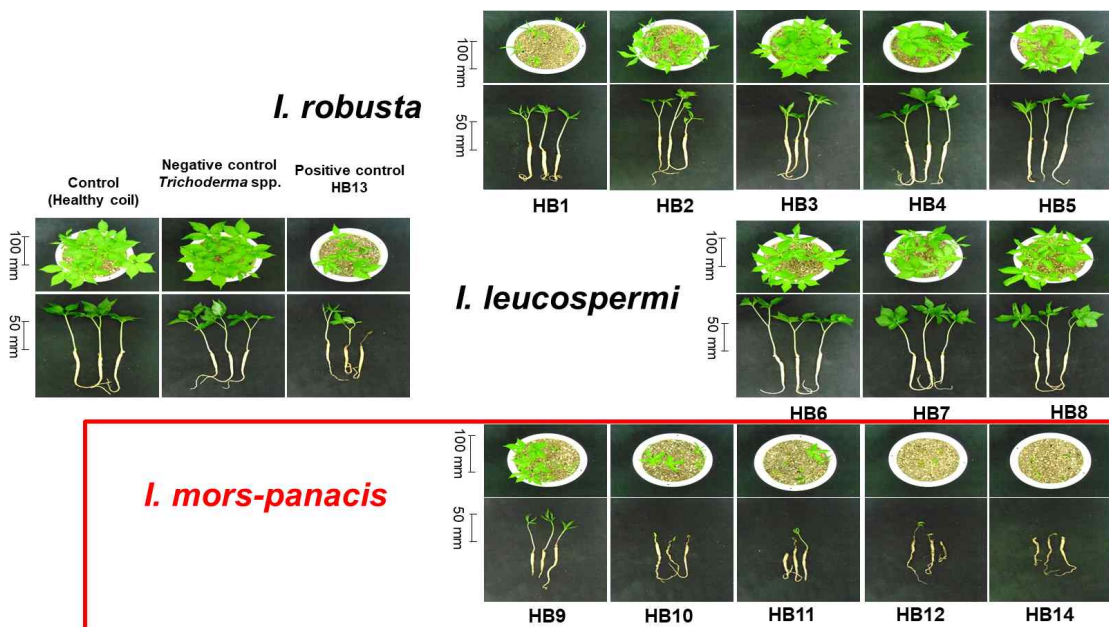


그림 7. 1년생 묘삼에서 *I. radicioloa* 종 복합체로부터 분리된 균주 감염 시 병원성 비교

나. 식물 성장 촉진 미생물 분리 및 인삼뿌리썩음병원균에 대한 길항효과 생물검증

(1) 인삼근권으로부터 분리된 유용 미생물의 고병원성 인삼뿌리썩음병에 대한 길항 효과 구명

(가) 인삼의 염류 장애 및 뿌리썩음병 경감 유용 미생물 분리 및 동정

인삼은 4 ~ 6년 재배 후에 수확되어지는데, 이러한 장기간 경작은 다양한 biotic 그리고 abiotic 스트레스에 노출되어 인삼의 질을 떨어트리고 수확량 감소를 일으킨다(Ohh, 1986; Ohh 등, 1992). 식물생육촉진근권세균 (PGPR)은 직접적 또는 간접적인 방법으로 식물이 자라는 것을 촉진시키고 유익한 도움을 줄 수 있다 (Forchetti 등, 2007). 이러한 PGPR의 활용은 여러 스트레스에 대해 내성을 증가시켜 토양에서 많은 작물들을 잘 자라게 도와주는 새로운 방법으로써 고려되고 있다(Souza 등, 2015). 따라서, 이 연구의 목표는 토양에서 인삼의 생육에 긍정적인 영향을 미치고, 염류 장애, 뿌리썩음병 경감에 유용한 새로운 균주를 분리 동정하는 것이다.

① 유용한 새로운 균주 분리

고창군 (35°26' 89" N 126°42' 740" E)과 경기도 (37°14' 45" N 127°05' 00.6" E) 인삼 경작지에서 인삼 근권으로부터 유용 균주 분리를 시도하였다. 균주 분리 방법으로는 그림8 과 같이 인삼근권 토양 1g을 5~6번 연속희석법을 사용하였다. 배지로는 Nutrient agar (NA; Difco), Reasonerfs 2A (R2A; MB cell) agar, Trypticase soy agar (TSA; MB cell)를 사용하였다.

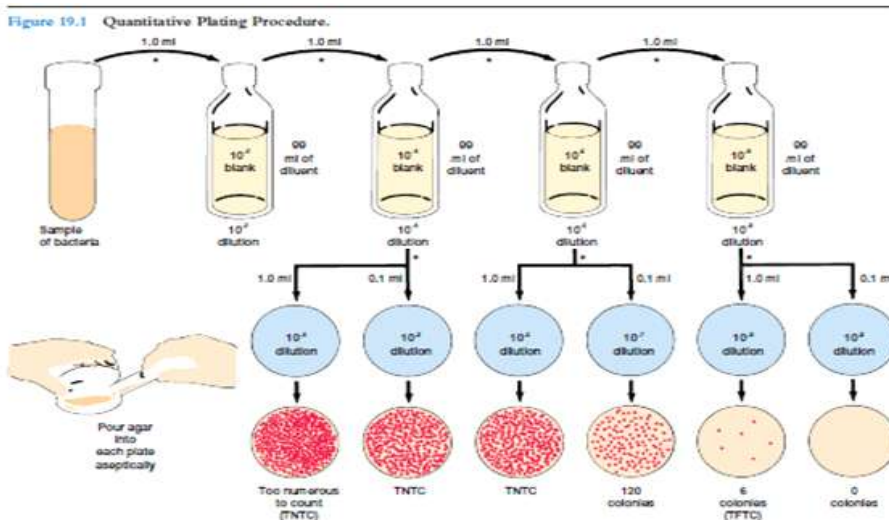


그림 8 . 연속희석법을 이용한 균주 분리방법.

② 유용한 새로운 균주 동정

분리된 새로운 균주의 16S rRNA gene sequence를 미국국립생물공학정보센터 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록하여 accession number를 받았고, 새로운 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)와 일본생물자원센터 Japan Collection of Microorganisms (JCM)에 기탁하여 기탁증을 받게 되었다. 표26에 유전자의 NCBI accession number, 균주의 기탁기관과 기탁번호를 정리하였다. 균주 동정은 그림9의 모식도에 나온 실험 방법으로 동정을 실시하였다.

표 26. 인삼근권에서 분리된 새로운 균주의 기탁번호

새로운 균주	NCBI accession number	KCTC 기탁번호	JCM 기탁번호
<i>Rhodanobacte ginsengiterrae</i> DCY112	KY694397	KCTC 62018	JCM 32167
<i>Paraburkholderia panacisoli</i> DCY113	KY694398	KCTC 52951	JCM 32098
<i>Paenibacillus panacihumi</i> DCY114	KY694399	KCTC 33915	JCM 32073
<i>Paraburkholderia panacihumi</i> DCY115	KY694400	KCTC 52952	JCM 32099
<i>Rhizobium panacihumi</i> DCY116	KY996486	KCTC 62017	JCM 32251
<i>Lysobacter panacihumi</i> DCY117	KY996487	KCTC 62019	JCM 32168
<i>Ornithinimicrobium panacihumi</i> DCY118	KY996488	KCTC 39962	JCM 32156
<i>Mesorhizobium panacihumi</i> DCY119	MG560822	KCTC 62017	JCM 32251

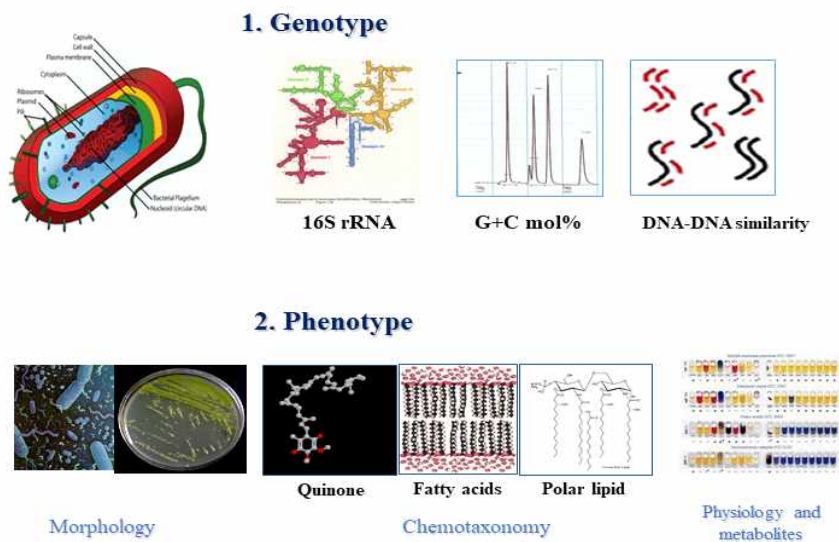


그림 9. 미생물 분리동정에 대한 모식도

㉔ 유전자형(Genotypic)을 이용한 동정

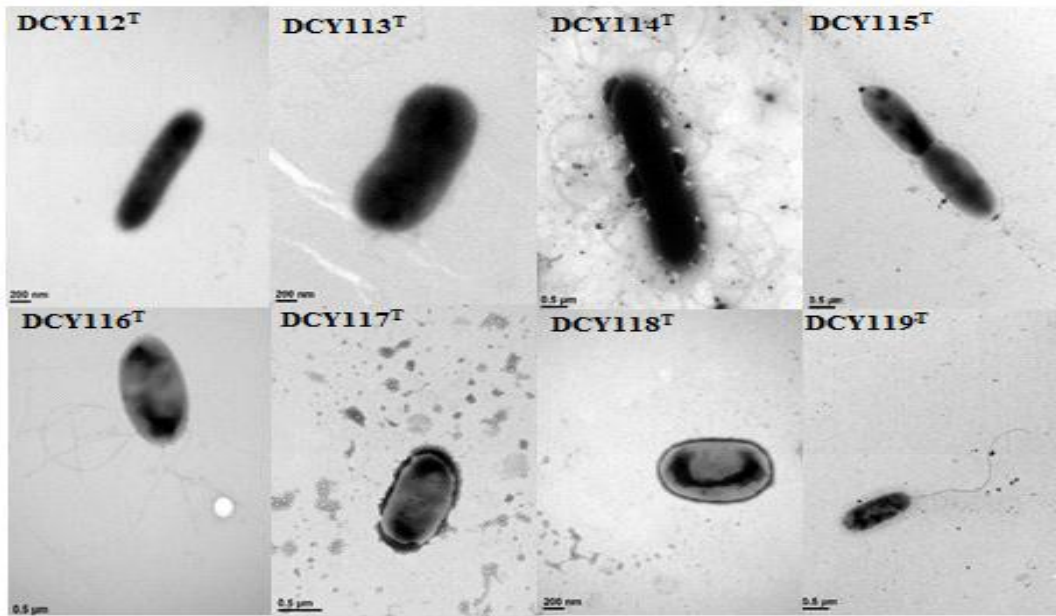
각 분리된 새로운 균주들의 genomic DNA를 DNA isolation kit (Gene All Biotechnology)를 이용하여 분리하였고 (주)제노텍을 통해 16S rRNA gene sequence을 분석하였다. 이 염기서열들은 EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>) 과 NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 통해 새로운 균주임을 확인하였다. 각 새로운 균주들의 명명은 표26에서 정리하였다. 또한, 분리된 각 균주의 genomic DNA로 G+C mol(%)과 DNA-DNA 혼성화 실험을 통해 새로운 균주임을 다시 한 번 확인할 수 있었고 표27에 결과를 정리하였다.

표 27. 새로운 균주의 유전자를 이용한 동정

No.	Isolation source	Name	G+C mol (%)	DNA-DNA with reference strain (%)
1	고창군	<i>Rhodanobacte ginsengiterrae</i> DCY112	65.0	< 55.0
2	고창군	<i>Paraburkholderia panacisoli</i> DCY113	61.3	< 47.6
3	고창군	<i>Paenibacillus panacihumi</i> DCY114	46.0	< 43.0
4	고창군	<i>Paraburkholderia panacihumi</i> DCY115	61.3	< 51.1
5	고창군	<i>Rhizobium panacihumi</i> DCY116	57.2	< 35.0
6	고창군	<i>Lysobacter panacihumi</i> DCY117	58.8	< 22.6
7	고창군	<i>Ornithinimicrobium panacihumi</i> DCY118	71.1	< 58.8
8	경기도	<i>Mesorhizobium panacihumi</i> DCY119	62.5	< 43.0

㉔ 표현형(Phnotype)을 이용한 동정

새로운 균주의 형태(morphology)는 transmission electron microscopy (TEM)을 이용해 분석하였고, 생리적인 특징 또한 확인하였다 (그림11). 새로운 균주의 화학적 특성을 검증하기 위한 목적으로 어떠한 Main Quinone, Major Fatty acid, Major polylipid들을 함유하고 있는지 나타내며, 각가 분리된 균주들의 chemotaxonomy의 특성은 표28에 명시하였다. 또한, Phenotype에 대한 특성 확인으로 항생제감수성에 대해서 평가를 하였고, 사용된 항생제와 감수성 정도는 표29에 명시하였다



<p><b>DCY112<sup>T</sup></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-negative</li> <li>• Circular</li> <li>• Brownish-yellow</li> <li>• Optimum: R2A medium 30°C pH 7.0 2% NaCl</li> </ul>	<p><b>DCY113<sup>T</sup></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-negative</li> <li>• Circular</li> <li>• Slightly yellow</li> <li>• Optimum: TSA medium 30°C pH 7.0 0.0 % NaCl</li> </ul>	<p><b>DCY114<sup>T</sup></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-positive</li> <li>• Circular</li> <li>• Cream color</li> <li>• Optimum: TSA medium 30°C pH 8.5 0.0% NaCl</li> </ul>	<p><b>DCY115<sup>T</sup></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-negative</li> <li>• Circular</li> <li>• Slightly yellow</li> <li>• Optimum: TSA medium 30°C pH 6.5 0.5% NaCl</li> </ul>
<p><b>DCY116<sup>T</sup></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-negative</li> <li>• Circular</li> <li>• White</li> <li>• Optimum: YMA medium 30°C pH 8.0 1.5% NaCl</li> </ul>	<p><b>DCY117<sup>T</sup></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-negative</li> <li>• Circular</li> <li>• Yellow</li> <li>• Optimum: R2A medium 30°C pH 8.0 0.5% NaCl</li> </ul>	<p><b>DCY118<sup>T</sup></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-positive</li> <li>• Circular</li> <li>• Buff-yellow</li> <li>• Optimum: TSA medium 30°C pH 8.5 1.5% NaCl</li> </ul>	<p><b>DCY119<sup>T</sup></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-negative</li> <li>• Circular</li> <li>• White</li> <li>• Optimum: YMA medium 30°C pH 7.0 1.0% NaCl</li> </ul>

그림 11. 새로운 균주의 형태와 생리특성

표 28. 새로운 균주의 Chemotaxonomy 분석결과

Strain name	Main Quinone	Major Fatty acids	Major Polarlipids
DCY112 <sup>T</sup>	ubiquinone Q-8	iso-C15:0, iso-C17:0, summed feature 9 (iso-C17:1 $\omega$ 9c and/or 10-methyl-C16:0)	phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), an unknown amino lipid (AL1)
DCY113 <sup>T</sup>	Ubiquinone Q-8	C16:0, cyclo-C17:0, summed feature 8 (C18:1 $\omega$ 7c and/or C18:1 $\omega$ 6c)	diphosphatidylglycerol (DPG) phosphatidylglycerol(PG) phosphatidylethanolamine (PE) unknown amino lipid (AL1)
DCY114 <sup>T</sup>	Menaquinone MK-7	anteiso-C15:0, C16:0, and C18:0	diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), unknown amino lipid (AL1,2)
DCY115 <sup>T</sup>	ubiquinone Q-8	C16:0, cyclo-C17:0, cyclo-C19:0 $\omega$ 8c, summed feature 3 (C16:1 $\omega$ 7c and/or C16:1 $\omega$ 6c) summed feature 8 (C18:1 $\omega$ 7c and/or C18:1 $\omega$ 6c)	diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), an unknown amino lipid (AL1)
DCY116 <sup>T</sup>	Ubiquinone Q-10	C16:0, summed feature 8 (C18:1 $\omega$ 7c and/or C18:1 $\omega$ 6c)	diphosphatidylglycerol (DPG) phosphatidylethanolamine (PE) unknown lipid (L1-3)
DCY117 <sup>T</sup>	ubiquinone Q-8	iso-C15:0, iso-C16:0, summed feature 9 (iso-C17:1 $\omega$ 9c and/or 10-methyl-C16:0)	diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE)
DCY118 <sup>T</sup>	Menaquinone MK-8	iso-C15:0, anteiso-C15:0, C16:0	diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG)
DCY119 <sup>T</sup>	ubiquinone Q-10	C16:0, 11-methyl-C18:1 $\omega$ 7c, cyclo-C19:0 $\omega$ 8c, summed feature 8 (C18:1 $\omega$ 7c and/or C18:1 $\omega$ 6c)	diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidyl choline (PC), phosphatidylmonomethylethanolamine (PME)



표29. 새로운 균주의 항생물질감수성 평가. Antibiotic susceptible test by placing Oxoid antibiotic paper discs on Mueller-Hinton (Difco) agar spread with novel strains. The diameter of the inhibition zone (x, unit: mm) :  $x \leq 10$  (resistant);  $10 < x \leq 12$  (intermediate);  $x > 13$  (susceptible).

Antibiotic	Strain								
	Code. ( $\mu\text{g}/\text{discs}$ )	DCY112 <sup>T</sup>	DCY113 <sup>T</sup>	DCY114 <sup>T</sup>	DCY115 <sup>T</sup>	DCY116 <sup>T</sup>	DCY117 <sup>T</sup>	DCY118 <sup>T</sup>	DCY119 <sup>T</sup>
Neomycin	N30	S	S	S	I	S	S	S	S
Penicillin G.	P10 (U)	R	S	R	I	S	S	S	R
Erythromycin	E15	I	S	I	S	S	S	R	I
Cefazolin	KZ30	R	R	R	S	R	I	S	I
Vancomycin	VA30	S	R	S	R	S	S	S	S
Tetracycline	TE 30	S	S	S	S	S	S	I	S
Oleandomycin	OL5	I	I	I	R	I	I	I	I
Ceftazidime	CAZ30	S	S	S	S	S	S	S	S
Carbamicillin	CAR100	R	R	R	S	R	S	S	I
Rifampicin	RD5	S	I	S	I	S	S	S	S
Novobiocin	NV30	S	S	S	I	S	I	I	I
Lincomycin	MY15	I	R	I	R	I	R	R	R

(나) 유용 균주들의 *In vitro* 상에서 식물생장촉진활성, 항진균, 중금속 내성 평가

새롭게 분리된 균주들과 같은 Genus(속명)을 가진 균주들은 이미 식물생장촉진활성, 항진균, 중금속 내성 평가 등 여러 유용성이 평가되었고 보고되어져있다 (Paudyal 등, 2007; Weber 등, 2017). 그러므로 새롭게 분리된 균주들과 주관기관이 보유한 균주들이 어떠한 유용성이 있는지 *In vitro* 상에서 여러 실험을 통해 확인하였다.

① 식물생장촉진활성 평가

식물생장촉진활성을 평가하기 위해 IAA 생성능력, Siderophore 생성능력, Phosphate 수용화 능력을 그림12와 같은 방법에 의해 진행하였다.

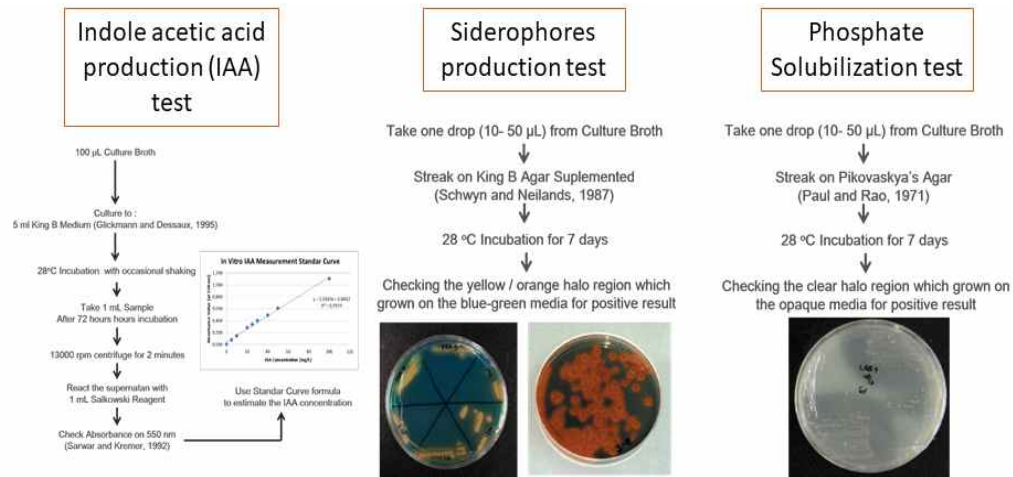


그림 12. 분리된 균주의 식물생장촉진활성과 관련된 평가를 위한 3가지 실험 메뉴얼

DCY87, 114, 116 균주들은 특히 IAA의 전구체인 L-Tryptophan 부재하에서도 IAA 생성활성이 높았으며, DCY 113, 115, 117, 119 균주는 철분을 Chelation하여 철분이 많은 토양에서 인삼의 적변 현상을 경감시킬 수 있는 Siderophore를 생성할 수 있는 능력이 높았다(표30). 특히, IAA 생성활성이 높은 DCY116과 Siderophore 생성활성이 높은 DCY119 균주는 *In planta* 상에서 인삼의 중금속 오염에서의 유용성을 평가하였다.

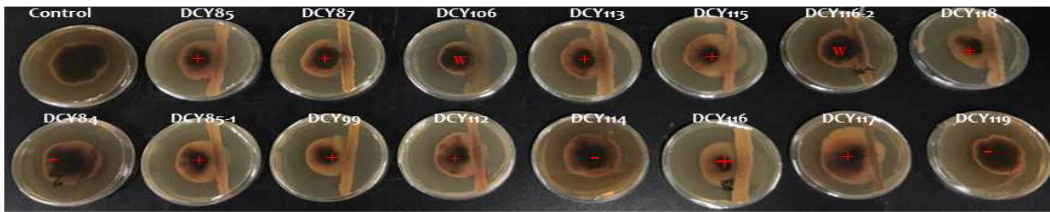
표30. 균주의 식물생장촉진 활성평가

Stain	Siderophore Production	Phosphate Solubilization	IAA Concentration (µg/mL)	
			Without L-tryptophan	With L-tryptophan
DCY87 <sup>T</sup>	+	+	23.30 ± 1.25	24.71 ± 2.66
DCY104 <sup>T</sup>	+	-	-	0.12 ± 1.79
DCY112 <sup>T</sup>	+	-	1.5 ± 0.08	1.6 ± 0.04
DCY113 <sup>T</sup>	++	++	-	0.36 ± 3.66
DCY114 <sup>T</sup>	+	-	27.11 ± 2.55	42.44 ± 2.55
DCY115 <sup>T</sup>	++	++	-	-
DCY116 <sup>T</sup>	+	++	28.02 ± 1.54	56.57 ± 1.56
DCY117 <sup>T</sup>	++	-	-	-
DCY118 <sup>T</sup>	W	-	-	3.0 ± 0.14
DCY119 <sup>T</sup>	+++	++	4.7 ± 0.74	17.6 ± 1.63

② 뿌리썩음병에 원인이 되는 *C. destructans*와 *F. solani*에 대한 항진균 평가

항진균 평가를 위해, *C. destructans* (KACC 44660<sup>T</sup>)와 *F. solani* (KACC 44891<sup>T</sup>)는 국립농업과학원 (Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양을 받아 진행 하였다 (Farh 등, 2015). 뿌리썩음병경감 효능평가에 사용된 균주와 평가결과는 그림13와 표31에 정리 하였다.

*Ilyonectria mors-panacis* HB11 KACC 44660<sup>T</sup>



*Fusarium solani* KACC44891<sup>T</sup>

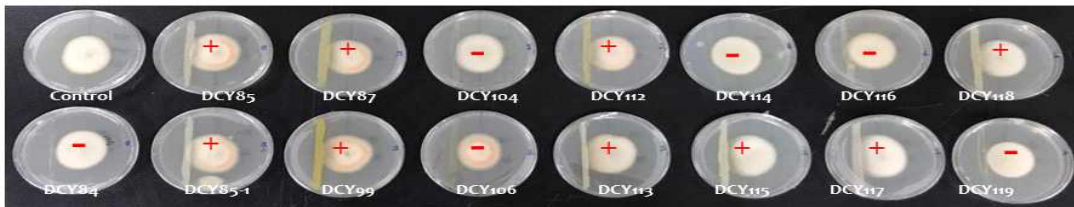


그림 13. *In vitro* 뿌리썩음병원균 생장억제력 평가.

표31. *In vitro* 뿌리썩음병원균 생장억제력 평가 결과

No	Test Strains		<i>I. mors-panacis</i> KACC 44660 <sup>T</sup>	<i>F. solani</i> KACC44891 <sup>T</sup>
1	DCY84 <sup>T</sup>	<i>Paenibacillus yonginensis</i>	-	-
2	DCY85 <sup>T</sup>	<i>Burkholderia ginsengiterrae</i>	+++	+++
3	DCY85-1 <sup>T</sup>	<i>Burkholderia panaciterrae</i>	+	+
4	DCY87 <sup>T</sup>	<i>Phycoccus ginsengisoli</i>	+	+
5	DCY99 <sup>T</sup>	<i>Sphingomonas panacis</i>	+++	+++
6	DCY104 <sup>T</sup>	<i>Paracaligenes ginsengisoli</i>	-	-
7	DCY106 <sup>T</sup>	<i>Flavobacterium panacis</i>	+	-
8	DCY112 <sup>T</sup>	<i>Rhodanobacter ginsengiterrae</i>	++	+
9	DCY113 <sup>T</sup>	<i>Paraburkholderia panacisoli</i>	+	+
10	DCY114 <sup>T</sup>	<i>Paenibacillus panacihumi</i>	-	-
11	DCY115 <sup>T</sup>	<i>Paraburkholderia panacihumi</i>	+	+
12	DCY116 <sup>T</sup>	<i>Rhizobium panacihumi</i>	+	-
13	DCY117 <sup>T</sup>	<i>Lysobacter panacihumi</i>	+	+
14	DCY118 <sup>T</sup>	<i>Ornithinimicrobium panacihumi</i>	+	+
15	DCY119 <sup>T</sup>	<i>Mesorhizobium sp. nov.</i>	-	-

*In vitro* 상에서 뿌리썩음병원균에 대해 생장억제 활성을 가지는 균주를 스크리닝한 결과 DCY85와 99의 균주가 뿌리썩음병 경감 효능이 좋을 것으로 사료되었다.

### ③ *In vitro* 상에서 균주의 중금속 내성 평가

중금속의 독성은 사람, 동물, 식물과 미생물에 위험을 끼치는 abiotic stresses 중 하나로, 중금속의 농도는 그 토양의 pH에 영향을 받게 된다(Ghnaya 등, 2010). 낮은 농도의 중금속은 식물의 영양소로서 사용되며 여러 대사작용을 일으켜 식물을 잘 자라게 도와주지만 중금속의 농도가 시간이 지날수록 여러 요인에 의해 증가하게 되어 식물의 생장에 큰 위험을 끼치게 된다(Bojórquez-Quintal 등, 2017). 여기에 PGPR은 중금속 독성을 완화해주는 하나의 방법으로 연구되고 있으며, 특히 PGPR이 생산하는 Siderophore와 연관이 있다고 보고되어있다(Farh 등, 2017). 그러므로, 새롭게 분리된 균주들과 주관기관이 보유한 균주들이 중금속에 존재하에서도 잘 자랄 수 있는지 *In vitro* 상에서 중금속 내성에 대해 평가하였고, 실험방법은 **그림14**과 같이 진행하였다. 각 균주의 중금속 내성 평가 결과는 **그림15, 16**에 정리하였다.

*In vitro* 상에서 중금속 내성에 대해 평가 결과, 대체로  $Fe > Al > Cu > Cd > Co > Hg$  순으로 균주들이 중금속 내성을 보였으며, DCY116와 119 균주가 중금속 내에서 다른 균주들보다 강한 내성을 보인 것을 확인하였다. 이것은 앞서 식물생장촉진 연구를 통해 이 두 균주가 IAA, Siderophore 생산능력이 우수한 것을 확인하였고, 보고된 중금속과 PGPR 관계에서 이 두 생산능력이 중금속 내성에 영향을 미쳤을 것으로 보인다. 특히 균주가 내는 Siderophore는 토양내에서 병원성 진균의 영양소 섭취를 방해하여 병원성 진균의 생장을 막는 역할을 한다고 보고되어 있어, 본 연구 과제의 인삼 뿌리썩음병의 방제기술 개발에 좋은 소재가 될 것으로 확인하였다.

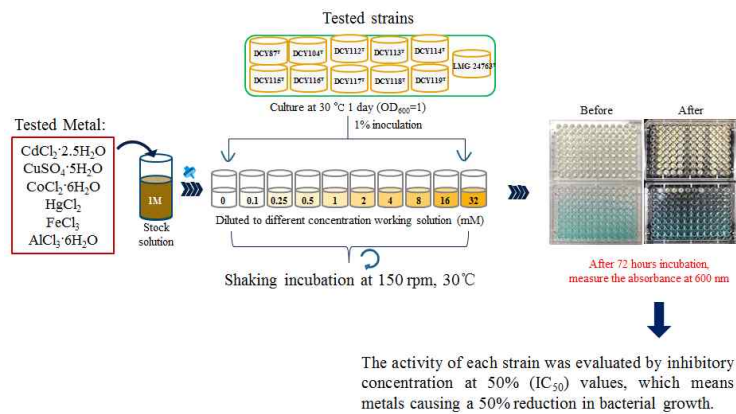


그림 14. *In vitro* 중금속 내성 평가 실험 메뉴얼.

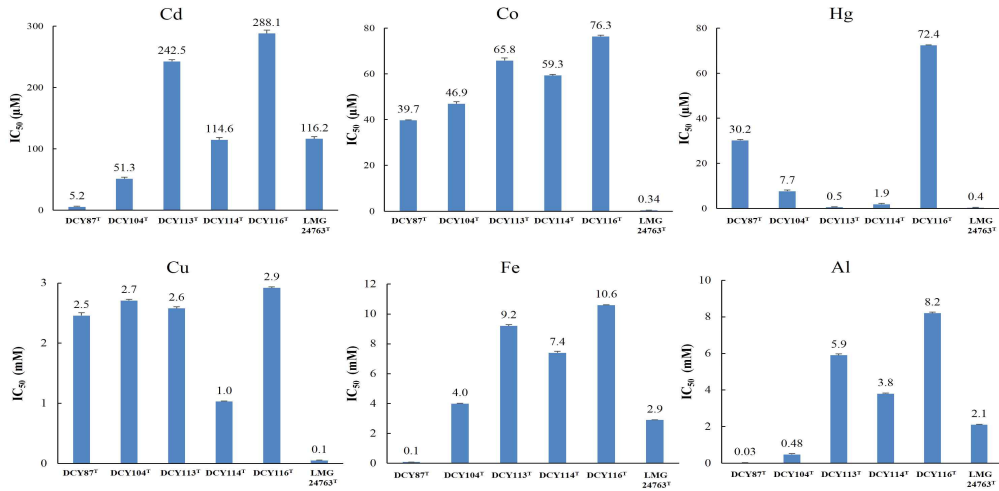


그림 15. *In vitro* 중금속 내성 평가 결과1

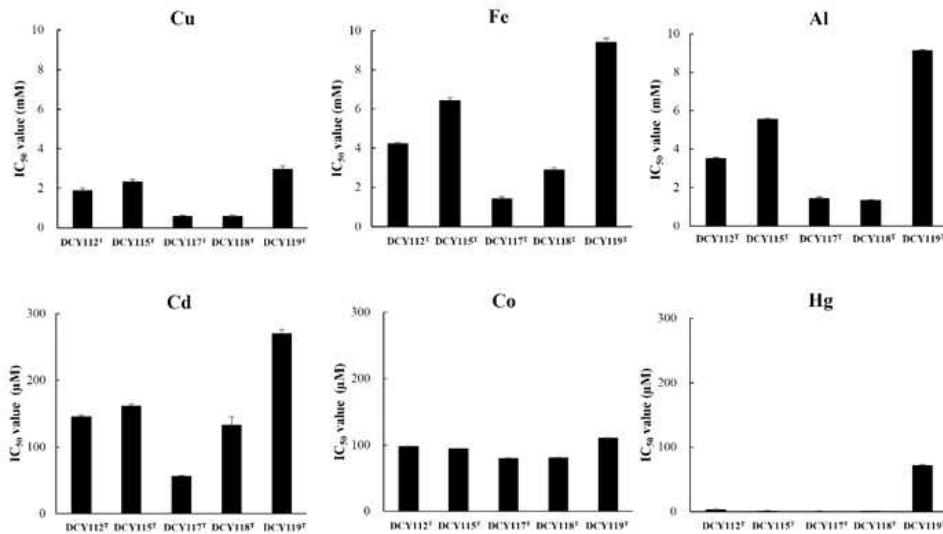


그림 16. *In vitro* 중금속 내성 평가 결과2.

(다) *In planta* pot 상에서 중금속 내성 균주를 이용한 인삼의 중금속 내성 증진 평가

인삼은 아시아 여러 나라에서 약리효능을 가진 중요한 약용작물이며, 한국에서는 4~6년 재배 후에 수확되어지는데, 이러한 장기간 경작은 다양한 biotic 그리고 abiotic 스트레스에 노출되어 인삼의 질을 떨어트리고 뿌리썩음병을 발생시켜 수확량 감소를 일으킨다 (Ohh 등, 1992). 다양한 스트레스 중 알루미늄(Al), 철(Fe) 중금속 축적이 있다(Ezaki 등, 2004). 식물생육촉진근권세균(PGPR) 같은 미생물 접종제의 활용은 식물에서 abiotic 스트레스를 방어하는 하나의 방법이 될 수 있다. 게다가, PGPR은 직접적 또는 간접적인 방법으로 식물이 자라는 것을 촉진시키고 유익한 도움을 줄 수 있으며, 토양내에 병원성 진균의 생장을 억제하여 뿌리썩음병의 방제 소재로서 고려되고 있다(Mantelin & Touraine, 2004). 따라서, 이 연구는 인삼의 Al, Fe 중금속 스트레스 내성을 크게 유도하는 PGPR의 유용성을 평가하였다.

① 인삼의 알루미늄 내성을 증진시키는 *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup>의 평가

㉞ *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup>와 인삼의 적합성(Compatibility)

*Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup>의 생균수에 따른 묘삼에 미치는 영향을 평가하였고(그림 17),reference 균주로 DCY116<sup>T</sup>와 같은 속(Genus)명을 가진 *Rhizobium alkalisoli* LMG 24763<sup>T</sup>을 사용하였다.

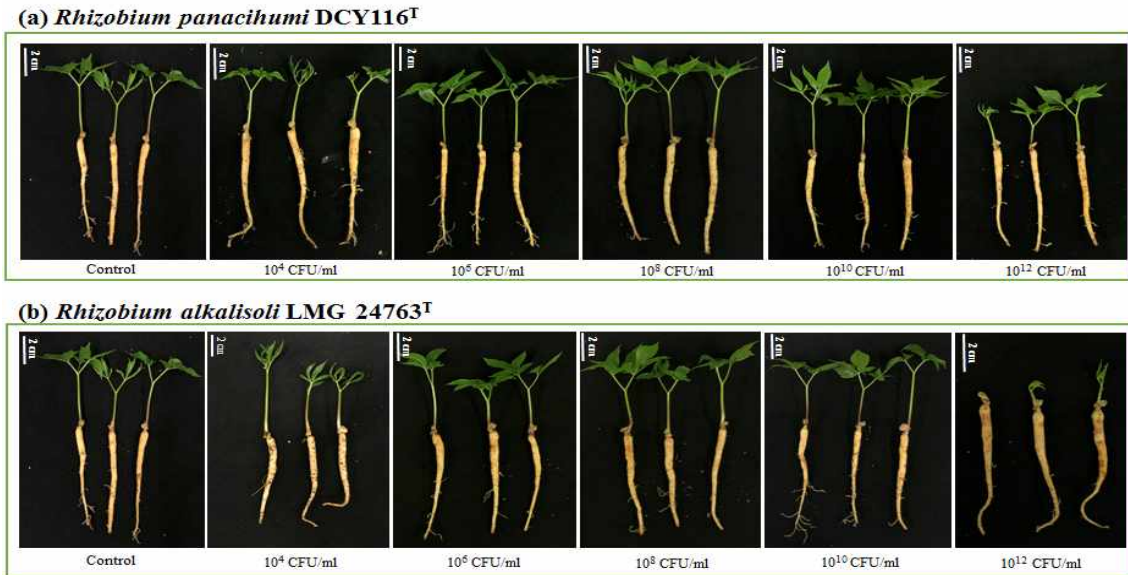


그림 17. *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup>와 인삼의 적합성(Compatibility) 평가.

*Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup>와 인삼의 적합성 평가결과 10<sup>8</sup>CFU/mL DCY116<sup>T</sup> 균주 처리시 묘삼의 biomass가 가장 높았고 잘 자란 것을 확인할 수 있었다. 따라서 다음 인삼의 중금속 내성 증진 연구에 10<sup>8</sup>CFU/mL DCY116<sup>T</sup> 균주를 처리하기로 하였다.

㉔ 인삼의 알루미늄 내성 평가

인삼이 알루미늄의 어느 농도에서 영향을 받는지를 확인하기 위해, 알루미늄 스트레스 농도를 0, 250, 500, 1000 mM 각각 묘삼에 처리하여 확인하였다(그림18).



그림 18. 인삼의 알루미늄 농도에 따른 형태적 평가

인삼의 알루미늄 농도에 따른 형태적 평가결과 1000 mM 알루미늄 스트레스에서는 뿌리가 물러지며, 죽은 것을 확인하였다. 500 mM 알루미늄 스트레스를 받았을 때 인삼에 데미지를 입히는 것을 확인하였고, 이 결과를 바탕으로 인삼의 중금속 내성 증진 연구에 500 mM 알루미늄 스트레스를 처리하기로 하였다.

㉕ 중금속 내성 균주를 이용한 인삼의 알루미늄 내성 증진 평가

앞서 연구에서 인삼과 균주의 적합성 평가와 인삼의 알루미늄 내성 평가 결과를 바탕으로 본 연구를 디자인하였다. 균주의 생균수는  $10^8$ CFU/mL, 알루미늄 스트레스 농도는 500 mM를 인삼에 처리하여 균주를 이용한 인삼의 알루미늄 내성 증진 결과를 확인하였다(그림19).



그림 19. 중금속 내성 균주를 이용한 인삼의 알루미늄 내성 증진 평가

㉔ Disease Severity Index (DSI)를 이용한 형태적 평가

형태적 평가결과는 Disease Severity Index (DSI)를 이용하여 확인하였다. DSI는 표32에 증상에 따라 질병정도를 나타냈고, 형태적 평가결과를 그림20, 21에 정리하였다.

표 32. Description of scaling for Disease Severity Index (DSI) by Al-stress treatment

Symptoms	Disease severity
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ leaves are unfolded and no wilted</li> <li>✓ Stems are healthy and no damped off</li> <li>✓ Roots are healthy with fine roots</li> </ul>	1
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Leaves are unfolded and no wilted</li> <li>✓ Stems are healthy and no damped off</li> <li>✓ Roots are healthy</li> </ul>	2
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Leaves are slight curled but no wilted</li> <li>✓ Stems are healthy and no damped off</li> <li>✓ Roots slightly appeared rusty spots</li> </ul>	3
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Leaves are slight stunting</li> <li>✓ Stems are slight wilted</li> <li>✓ Root rusty spots are extended</li> </ul>	4
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Leaves are stunting</li> <li>✓ Stems are wilted</li> <li>✓ Roots appeared several rusty spots</li> </ul>	5
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Leaves are wilted and dry</li> <li>✓ Stems are damped off</li> <li>✓ Roots are severe rusty</li> </ul>	6



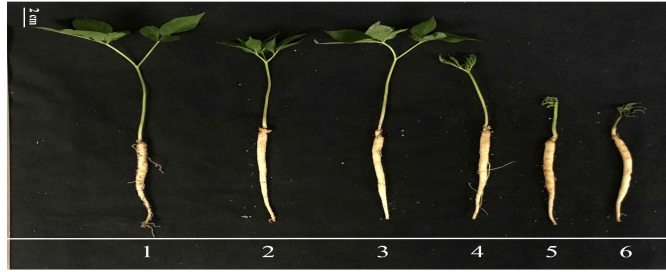


그림 20. Disease Severity Index (DSI) Scale

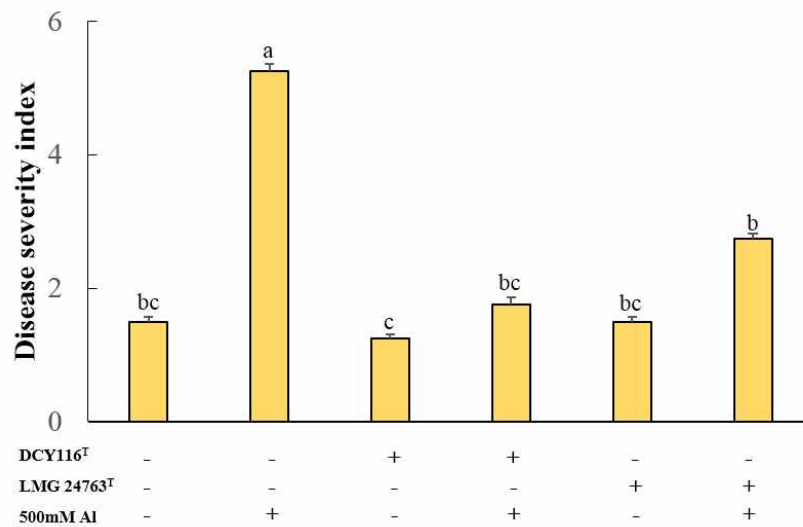


그림 21. Disease Severity Index (DSI)를 이용한 처리군에 따른 질병정도 평가. Values represent the means  $\pm$  SDs from three independent experiments. Bars with the same letters are not significantly different at  $P < 0.05$ .

500 mM 알루미늄 스트레스를 받은 묘삼은 형태적으로 DSI 6가까이의 질병정도를 보였지만, 500 mM 알루미늄 스트레스와 *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup> 균주처리시 DSI 2밑으로의 질병정도를 보여 Control과 비슷한 질병정도를 보였다. 이것은 *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup> 균주가 인삼의 알루미늄 내성 증진에 영향을 미친 것으로 확인할 수 있었다.

㉞ ROS scavenging system 관련 마커를 이용한 인삼의 알루미늄 내성 증진 평가

알루미늄 스트레스는 식물에 과한 ROS (Reactive Oxygen species) 생산을 유도하여 식물이 자라는 것을 방해한다(Pereira 등, 2010). ROS scavenging system에서 catalase (CAT), ascorbate peroxide (APX), proline이 식물에서 과한 ROS 독성으로부터 보호하는 역할을 할 수 있다고 보고되었다(Ali & Alqurainy, 2006; Sami 등, 2016). 따라서 중금속 내성 균주를 이용한 인삼의 알루미늄 내성 증진 평가에 ROS scavenging system 관련 마커들을 확인하였다.

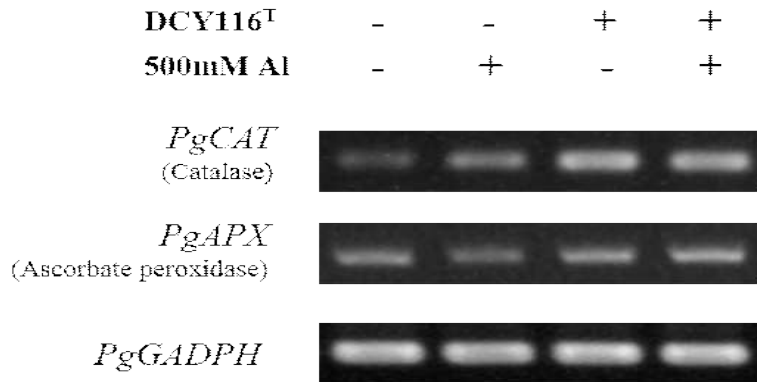


그림 22 . Expression of their ROS scavenging system related genes.

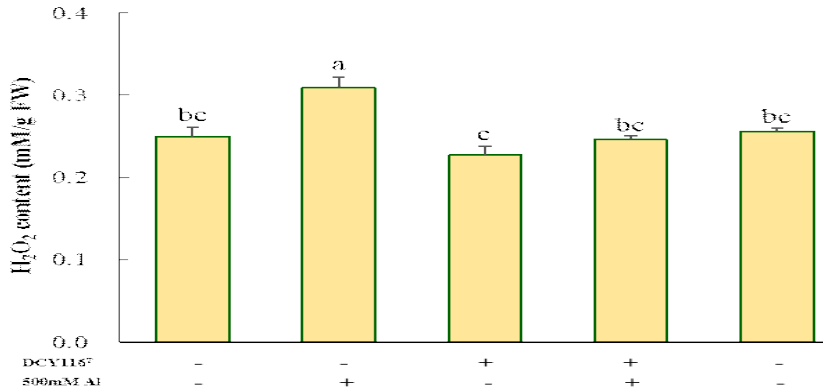


그림 23 . H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in fresh samples of each group. Values represent the means± SDs from three independent experiments. Bars with the same letters are not significantly different at  $P<0.05$ . FW, fresh weight.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 ROS중에 하나로, 인삼이 알루미늄 스트레스를 받으면 그림22, 23의 결과와 같이 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup> 균주 처리시 인삼의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량이 Control과 비슷한 수준을 보였다. 또한 ROS scavenging system 관련 항산화 유전자 분석 결과 *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup> 균주 처리시 인삼의 *PgAPX* 와 *PgCAT* 유전자 발현이 높아졌고 이것은 묘삼이 알루미늄 스트레스에 대한 항산화 활성을 보인 것을 확인할 수 있었다.

Proline은 세포내의 중금속 해독작용과 항산화 활성을 보인다고 알려져 있다(Zengin & Munzuroglu, 2005). 묘삼의 Proline 함량 분석과 Proline합성관련 유전자 분석을 통해 알루미늄 스트레스에서 *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup> 균주의 유용성을 그림24, 25에서 확인하였다. 그 결과, 알루미늄 스트레스를 받은 묘삼은 Control과 비교하여 식물체의 방어 시스템으로 Proline 함량이 약간 증가한 것을 보였고, *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup> 균주 처리시 묘삼의 Proline 함량이 크게 증가한 결과를 확인하였다. Proline 합성관련 유전자 *PgP5CS* 역시 같은 패턴을 보였다. 이것으로 *Rhizobium panacihumi* DCY116<sup>T</sup> 균주 처리시 인삼의 *PgP5CS* 유전자 발현과 Proline 함량이 높아졌고, 이것은 묘삼이 알루미늄 스트레스에 대한 중금속 해독작용과 항산화 활성을 보여 내성 증진에 영향을 미친 것으로 보인다.

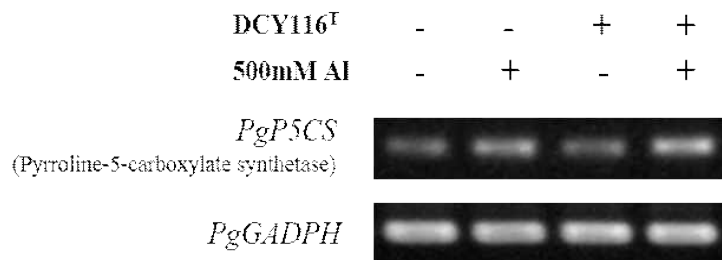


그림 24 . Expression of proline synthesis related gene.

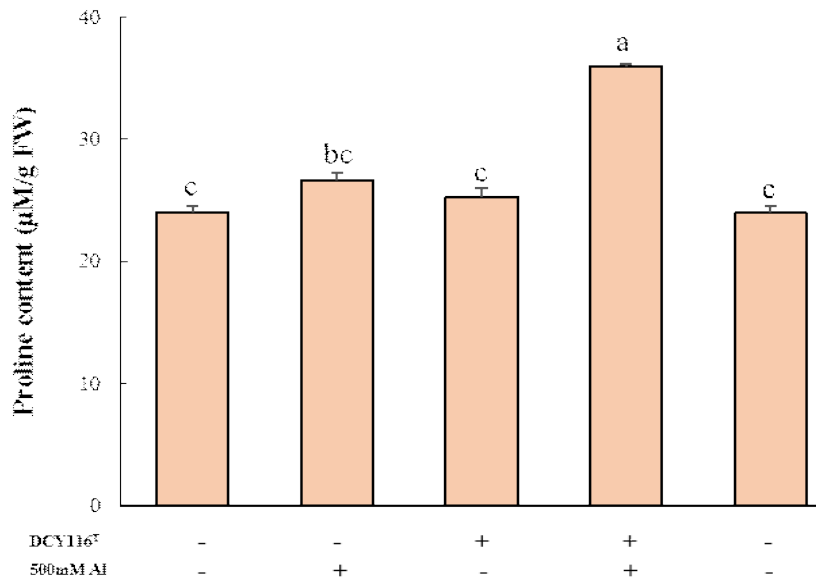


그림 25 . Proline content in fresh samples of each group. Values represent the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Bars with the same letters are not significantly different at  $P < 0.05$ . FW, fresh weight.

② 인삼의 iron 내성을 증진시키는 *Mesorhizobium panacihumi* DCY119<sup>T</sup>의 평가

㉞ *Mesorhizobium panacihumi* DCY119<sup>T</sup>와 인삼의 적합성(Compatibility)

*Mesorhizobium panacihumi* DCY119<sup>T</sup>의 생균수에 따른 묘삼에 미치는 영향을 평가하였다 (그림26).

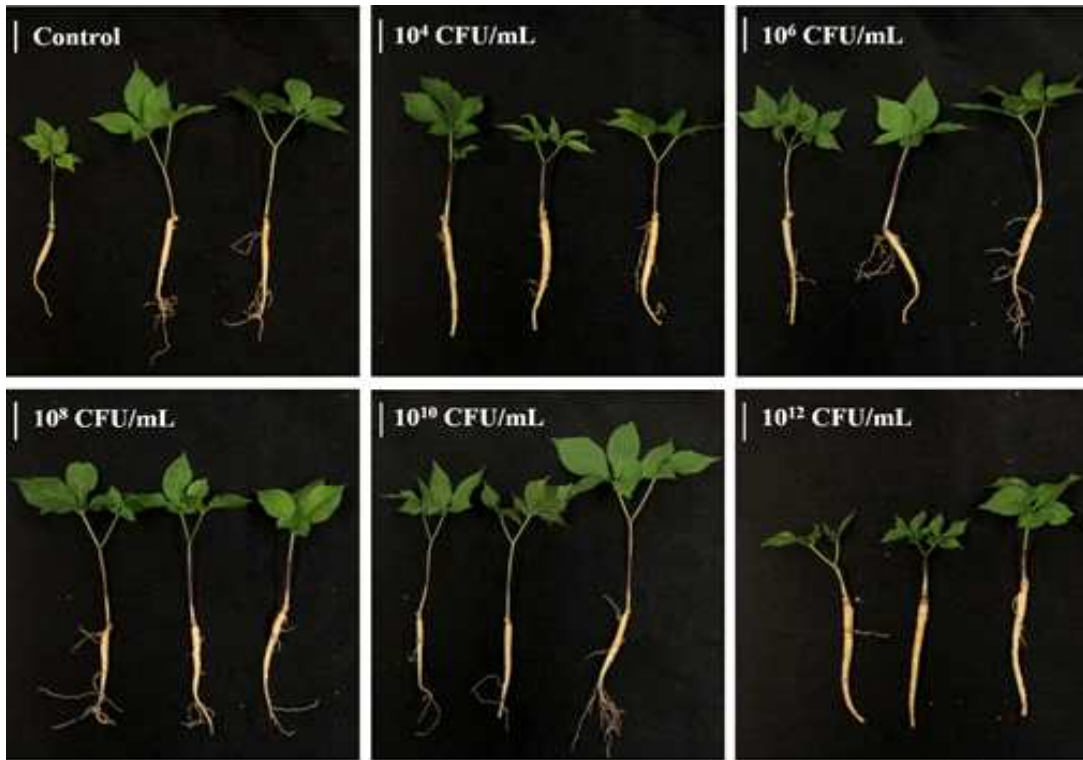


그림 26. *Mesorhizobium panacihumi* DCY119<sup>T</sup>와 인삼의 적합성(Compatibility) 평가

*Mesorhizobium panacihumi* DCY119<sup>T</sup>와 인삼의 적합성 평가결과 10<sup>8</sup>CFU/mL DCY119<sup>T</sup> 균주 처리시 묘삼의 biomass가 가장 높았고 잘 자란 것을 확인할 수 있었다. 따라서 다음 인삼의 중금속 내성 증진 연구에 10<sup>8</sup>CFU/mL DCY119<sup>T</sup> 균주를 처리 하였다.

㉔ 인삼의 iron 내성 평가

인삼이 iron의 어느 농도에서 영향을 받는지를 확인하기 위해, iron 스트레스 농도를 0, 250, 500, 1000 mM 각각 묘삼에 처리하여 확인하였다(그림27).



그림 27 . 인삼의 iron 농도에 따른 형태적 평가. Each group included three pots with five seedlings per pot. Bar, 2 cm.

인삼의 iron 농도에 따른 형태적 평가결과 1000 mM iron 스트레스에서는 뿌리가 물러지며, 죽은 것을 확인하였다. 500 mM iron 스트레스를 받았을 때 인삼에 데미지를 입히는 것을 확인하였고. 이 결과를 바탕으로 인삼의 iron 내성 증진 연구에 500 mM iron 스트레스를 처리하기로 하였다.

㉕ 중금속 내성 균주를 이용한 인삼의 iron 내성 증진 평가

앞서 연구에서 인삼과 균주의 적합성 평가와 인삼의 iron 내성 평가 결과로 본 연구를 디자인하였다. 균주의 생균수는  $10^8$ CFU/mL, iron 스트레스 농도는 500 mM를 인삼에 처리하여 균주를 이용한 인삼의 iron 내성 증진 결과를 확인하였다(그림28).

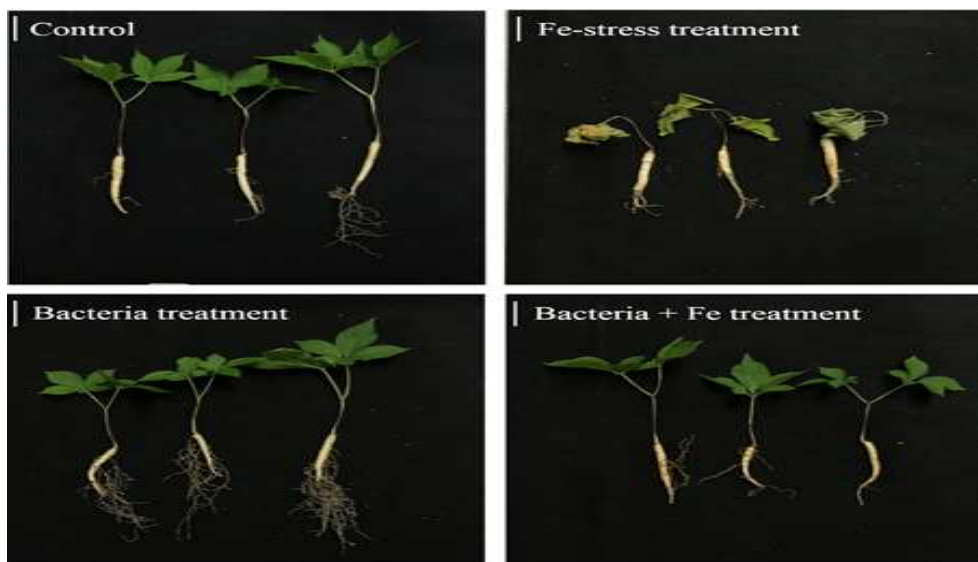


그림 28 . 중금속 내성 균주를 이용한 인삼의 iron 내성 증진 평가. Each group included five pots with five seedlings per pot. Bar, 2 cm.

㉔ Disease Severity Index (DSI)를 이용한 형태적 평가

형태적 평가결과는 Disease Severity Index (DSI)를 이용하여 확인하였다. DSI는 표32에 증상에 따라 질병정도를 나타냈고, 형태적 평가결과를 그림29에 정리하였다.

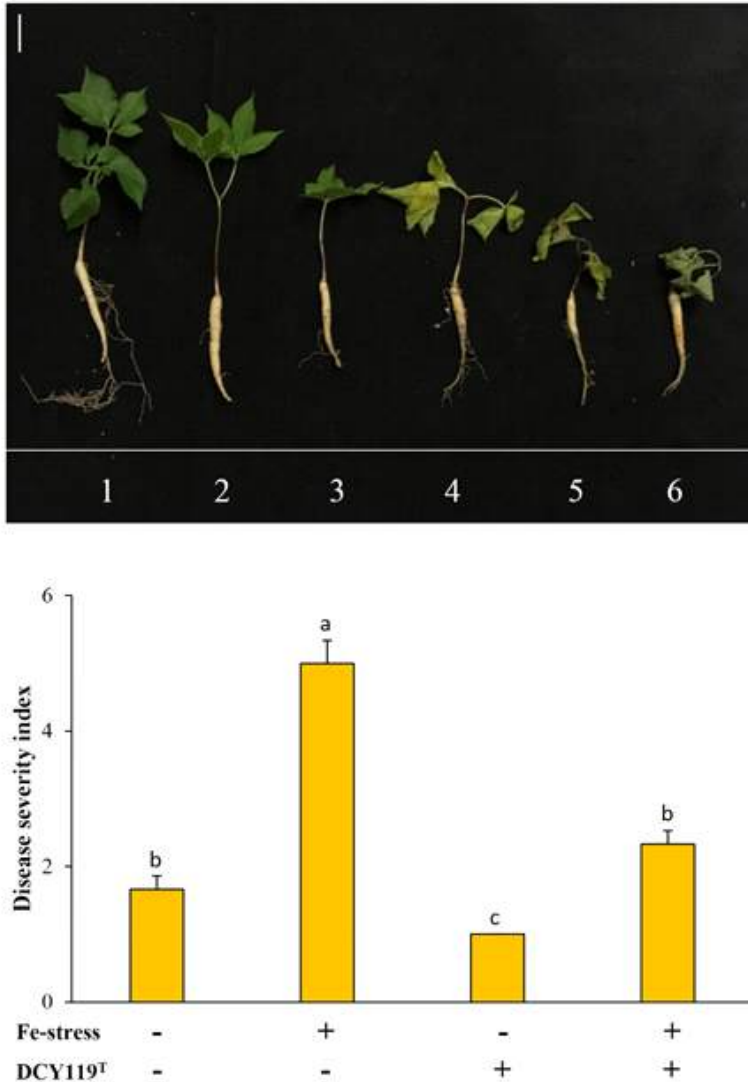


그림 29. Disease Severity Index (DSI)를 이용한 처리군에 따른 질병정도 평가. Values represent mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Bars with the same letters are not significantly different at  $P < 0.05$ . Scale bar: 2 cm

500 mM iron 스트레스를 받은 묘삼은 형태적으로 DSI 5가까이의 질병정도를 보였지만, 500 mM iron 스트레스와 DCY119<sup>T</sup> 균주처리시 DSI 2정도의 질병정도를 보였다. 이것은 DCY119<sup>T</sup> 균주가 인삼의 iron 내성 증진에 영향을 미친 것으로 확인할 수 있었다.

㉞ ROS system 관련 마커를 이용한 인삼의 iron 내성 증진 평가

iron 스트레스는 식물에 과한 ROS (Reactive Oxygen species) 생산을 유도하여 식물이 자라는 것을 방해한다(de Oliveira 등, 2013). 그러므로 중금속 내성 균주를 이용한 인삼의 iron 내성 증진 평가에 ROS system 관련 마커들을 확인하였다.

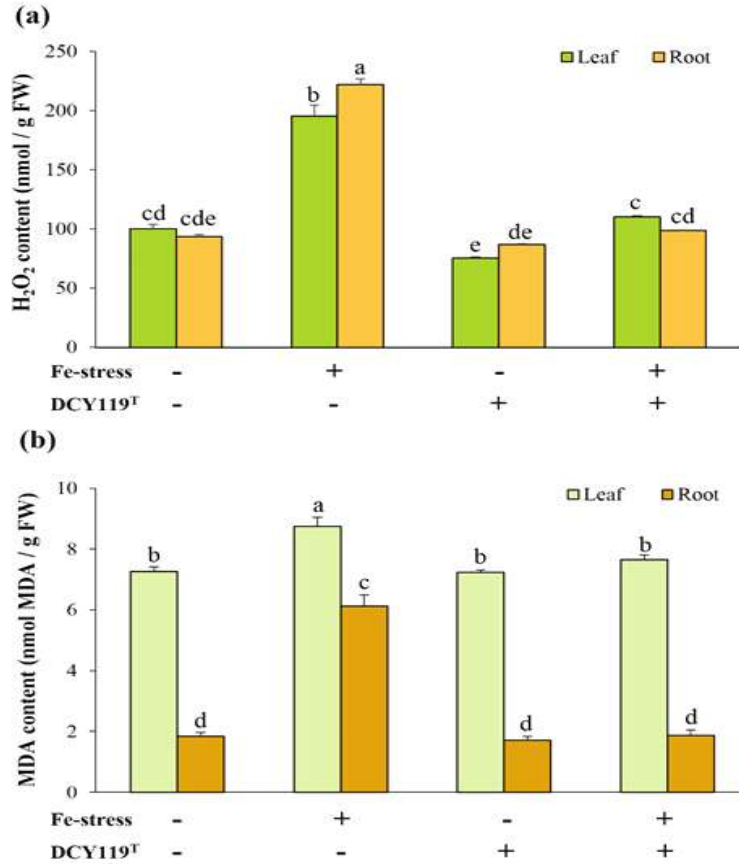


그림 30. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA contents of each group seedlings. Values represent mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Bars with the same letters are not significantly different at  $P < 0.05$ . FW, fresh weight.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 ROS중에 하나로, 묘삼이 iron 스트레스를 받으면 그림30의 결과와 같이 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 DCY119<sup>T</sup> 균주 처리시 묘삼의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량이 Control과 비슷한 수준을 보였다. Malondialdehyde (MDA)는 산화 스트레스의 마커로, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량과 같은 패턴을 보였다. 이것은 DCY119<sup>T</sup> 균주 처리시 묘삼이 iron 스트레스에 대한 높은 항산화 활성을 보인 것을 확인할 수 있었다.

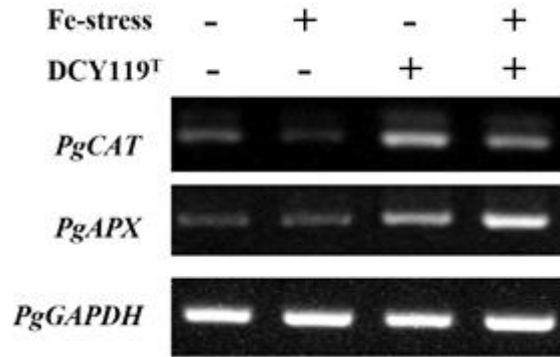


그림 31. Expression of ROS scavenging related genes and a housekeeping gene. CAT, catalase; APX, ascorbate peroxidase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

인삼의 ROS scavenging system에서 *PgAPX* 와 *PgCAT* 유전자 발현은 식물에서 항산화 활성을 내는 마커로, 그림31에서 iron 스트레스를 받은 묘삼과 비교하여 DCY119<sup>T</sup> 균주 처리 시 두 유전자 모두 발현이 높은 것을 확인하였다. 이것은 묘삼이 iron 스트레스에 대한 항산화 활성을 보인 것을 확인할 수 있었다.

(라) 인삼뿌리썩음병 길항미생물인 *Bacillus velezensis* ARRI17의 선발 및 검증

① *B. velezensis* ARRI17 분리·동정

인삼뿌리썩음병원균의 방제에 효과적인 길항균을 분리하기 위하여, 과주시 적성면에서 채집한 2년근 인삼으로부터 시료를 채집하였으며, 이로부터 33개의 균을 분리하였다. 먼저, 인삼 뿌리를 1% NaOCl에 10분 간 표면 소독하고 멸균 증류수로 2회 세척하고 무균작업대에서 20분 간 표면을 충분히 건조하였다. 멸균된 칼을 이용하여 인삼뿌리를 가로로 절단하고 인삼 조각을 King'B 배지 위에 올려놓고 배양기에서 25℃ 온도 조건에서 1주일간 배양 하였다. King'B 배지 위로 자라나온 콜로니의 형태상의 차이를 보이는 집락을 대상으로, 순수 분리하였다. 그 다음으로 30℃ 온도 조건에서 LB 배지에 2일간 배양하면서 형태적인 특징을 확인하였다. 순수 분리한 균주를 LB 배지에 접종하여 30℃, 200rpm에서 1일간 배양한 다음 균주 배양액에 멸균된 20% 글리세롤(glycerol)을 첨가하여 보관균주를 제작한 다음 실험에 사용하였다. Paper disk법으로 저지대를 형성하는 선발 과정을 거쳐, 인삼뿌리썩음병을 유발하는 일로넥트리아 모르스파나시스(*I. mors - panacis*)에 대해 항균활성을 갖는 바실러스 벨레젠시스(*B. velezensis*) 균주인 ARRI17을 선별하였다.



선별한 *B. velezensis* ARRI17 균주 분자생물학적 방법으로 동정하기 위해 NA(nutrient agar) 배지에 접종하여 28°C에서 2일간 배양한 후 균주를 순수 분리하였고 *gyrB* 유전자 부위를 증폭하기 위하여 표 36의 프라이머를 이용하여 direct colony PCR을 수행하였다. PCR 산물은 PCR product purification kit(Qiagen)를 이용하여 정제한 후, 염기서열을 분석하였으며, 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI)에서 블라스트 서치(Blast search)를 통해 균주를 동정하였다. 선별한 균주의 동정을 위하여 *gyrB* 유전자를 분석한 결과, ARRI17균주의 *gyrB* 유전자의 DNA의 염기서열을 확인하였다(표 34). NCBI 웹에서 상동성 분석을 한 결과, 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) BCRC 17467T(DQ903176)와 98.7%의 상동성을 보임을 확인하였으며, 유연관계를 분석하였고 ARRI17 균주는 바실러스 벨레젠시스 중에 해당함을 확인하였다(그림 32). Dunlap CA 등(2015)은 *B. velezensis*을 *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*와 *B. oryzicola*을 포함한 strain으로 재분류하였다. ARRI17는 재분류되기 전 체계에 따르면 *B. methylotrophicus*에 해당한다. 한국미생물보존센터(KFCC)에 기탁하여(기탁번호 KFCC11778P) *B. velezensis* ARRI17로 명명하였으며 인삼뿌리썩음병에 대한 길항력을 가지는 미생물로 특허출원(특허출원번호 제 10-2018-0164593)하였다.

표 33. *B. velezensis* ARRI17 균주 *gyrB* 유전자 증폭을 위한 primer

Primer	염기서열
UP-1S	5'- GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA - 3'
UP-2R	5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGTCAT- 3'

표 34. PCR 반응 조건

Temperature (°C)	Time	Cycle
95	2 min	1
95	30 sec	1
60	30 sec	35
72	40 sec	

표 35. *B. velezensis* ARRI17 균주 *gyrB* 유전자 DNA 염기서열

유전자	염기서열
ARRI17 <i>gyrB</i>	5'- CATCTGTCGTAAACGCCTTGTTCGACCACTCTTGACGTTACGGTTC ATCGTGACGGAAAAATCCACTATCAGGCGTACGAGCGCGGTGTACCTG TGGCCGATCTTGAAGTGATCGGTGATACTGATAAGACCGGAACGATT ACCCACTTCGTTCCGGATCCGGAAATCTTCAAAGAAACAACCGTATAC GACTATGATCTGCTTTCAAACCGTGTCCGGGAATTGGCCTTCCTGACA AAAGGCGTAAACATCACGATTGAAGACAAACGTGAAGGACAAGAACG GAAAAACGAGTACCACTACGAAGGCGGAATCAAAGCTATGTTGAGT ACTTAAACCGTTCCAAAGAAGTCGTTTCATGAAGAGCCGATTTATATC GAAGGCGAGAAAGACGGCATAACGGTTGAAGTTGCATTGCAATACAA CGACAGCTATACAAGCAATATTTATTCTTTCACGAATAATATCAACA CATACGAAGGCGGCACGCACGAGGCCGGATTTAAAACCGGTCTGACCC GTGTCATAAACGACTATGCAAGAAGAAAAGGGATTTTCAAAGAAAA TGATCCGAATTTAAGCGGGGATGATGTGAGAGAAGGGCTGACTGCCA TTATTTCAATTAAGCACCTGATCCGCAATTCGAAGGGCAGACGAAA ACGAAGCTCGGCAACTCCGAAGCGAGAACGATCACTGATACGCTGTTT TCTTCTGCGCTGGAAACATTCTTCTTGAAAATCCGGACTCAGCCCGC AAAATCGTTGAAAAAGGTTTAATGGCCGCAAGAGCGCGGATGGCAGC GAAAAAAGCACGGGAATTGACCCGGCGCAAAGGTGCGCTTGAGATTT CCAATCTGCCGGGCAAACCTGGCGGACTGTTCTTCTAAAGATCCGAGCA TTTCCGAGCTGTATATCGTAGAGGGTGACTCTGCGGGCGGATCAGCGA AACAGGGACGGGACCGTCATTTCCAAGCTATTCTGCCGCTGCGCGGTA AGATTCTGAACGTTGAGAAAGCCAGACTTGATAAGATTCTCTCAAAC AATGAGGTCAGATCAATGATCACGGCCCTCGGAACAGGAATCGGAGA AGATTTT - 3'

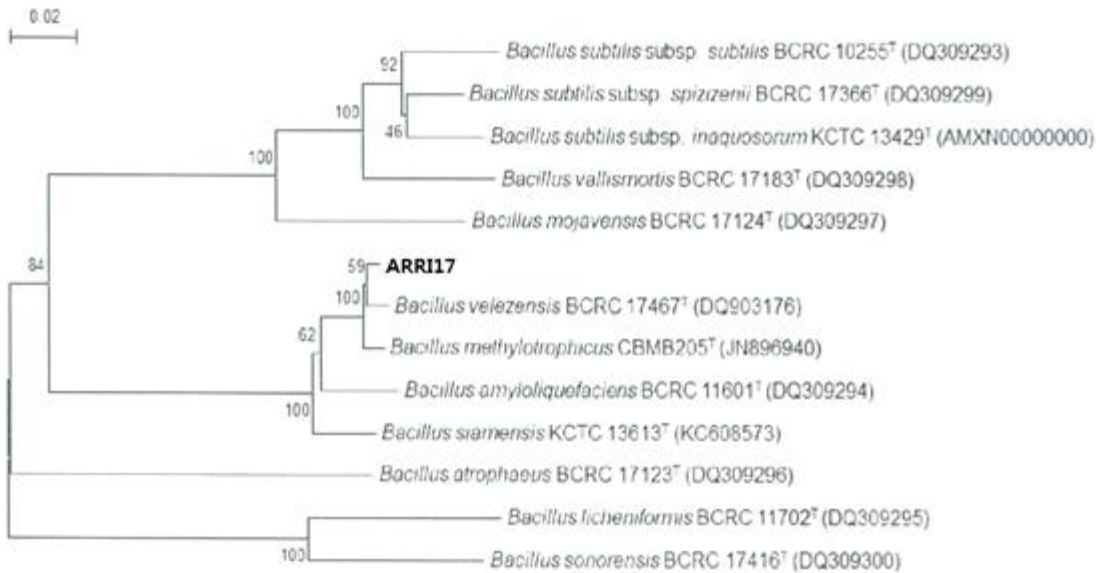


그림 32. *gyrB* 유전자 기준의 미생물 동정.

② *B. velezensis* ARRI17 길항능력 검증

*B. velezensis* ARRI17 균주의 인삼뿌리썩음병 주요 병원균에 대한 길항능력을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 인삼뿌리썩음병에 관한 병원균들로 일로넥트리아 모르스파나시스(*I. mors-panacis*) 균주는 충남농업기술원 인삼약초연구소에서 분양받아 사용하였고, 피토프토라 각토룸(*Phytophthora cactorum*) 균주는 허브킹에서 분양받아 사용하였으며, 푸사리움 슬라니(*B. velezensis*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 알타나리아 파낙스(*Alternaria panax*), 및 콜레토티리쿰 파나이콜라균(*Collectotrichumpanacicola*)은 소득자원연구소 도신리 시험포장에서 분리하여 사용하였다. *B. velezensis* ARRI17 균주에 대하여 인삼 뿌리썩음 병원균 6종(*I. mors-panacis*, *F. solani*, *B. cinerea*, *A. panax*, *C. panacicola*, *P. cactorum*)과 대치 배양하여 균사 성장 억제능력을 조사하였다. 배양시작일로부터 5일 후에 병원균의 생육정도를 확인한 결과는 그림 32과 같다.

인삼뿌리썩음병 주요 병원균별 *B. velezensis* ARRI17 균주와 대치 배양시 형성된 Clear zone의 직경을 측정된 결과는 표 36와 같다.

*I. mors-panacis*에 대해서는 10.85mm의 생육 저지원을 형성하여 제일 높은 항균활성을 나타냈다. 이에, *B. velezensis* ARRI17 균주는 인삼뿌리썩음병을 유발하는 곰팡이 균에 대하여 우수한 길항능력을 가짐을 확인할 수 있었다.

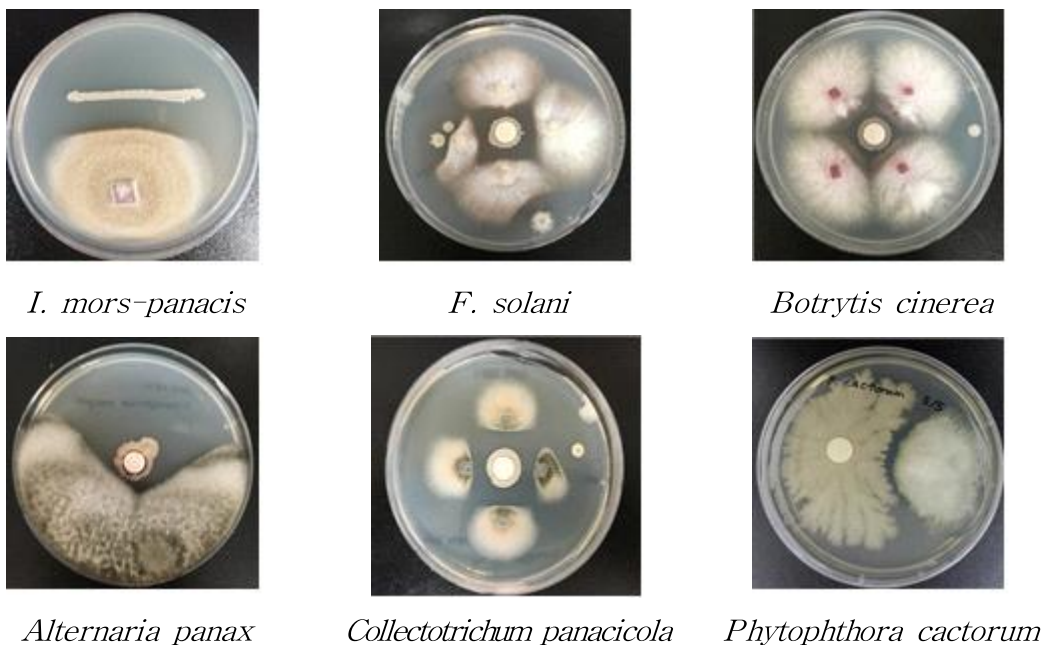


그림 33. 인삼뿌리썩음병 주요 병원균에 대한 ARRI17 균주 길항력 검증

표 36. 인삼뿌리썩음병 주요 병원균에 대한 ARRI17 균주의 생육 저지원 크기

길항미생물	Clear zone diameter(mm)					
	<i>I. mors-panacis</i>	<i>F. solani</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Collectotrichu m panacicola</i>	<i>Phytophthor a cactorum</i>
ARRI17	10.85	3.97	4.23	4.23	6.09	1.86

### ③ *B. velezensis* ARRI17 균주의 단백질 분해 능력 확인

*B. velezensis* ARRI17 균주의 단백질 분해 능력을 확인하기 위해 탈지유한천배지(skim milk agar)에 *B. velezensis* ARRI17 단일 콜로니를 접종하고, 30°C에서 2일 동안 배양한 후, 형성된 콜로니 주위에 투명환(clear zone)의 형성여부를 확인한 결과는 그림 34와 같다.

*B. velezensis* ARRI17 균주가 배지 상에 콜로니를 형성한 후, 단백질을 분해시켜 직경 1.5cm 이상의 투명환(clear zone)이 형성됨을 확인 할 수 있었다. 이에, *B. velezensis* ARRI17 균주는 단백질 분해효소를 분비하며, 단백질 분해능력이 우수함을 확인하였다.



그림 34. *B. velezensis* ARRI17 균주의 단백질 분해 능력

### ④ *B. velezensis* ARRI17 균주의 항진균 물질 분석

*B. velezensis* ARRI17 균주가 생성하는 항진균 물질을 확인하기 위해, *B. velezensis* ARRI17 균주를 멸균된 Tryptic soy agar(TSA)에 30°C에서 1일 동안 정치배양한 다음 ARRI17 균주의 콜로니(colony)하나를 멸균한 TSB에 투입하고 호기조건에서 30°C, 150 rpm, 20 ~ 24시간 동안 진탕배양한 후, 멸균한 TSB에 액체 배양한 *B. velezensis* ARRI17 균주 1%를 접종하고 호기조건에서 30°C, 150 rpm, 70~72시간 동안 진탕배양하였다. *B. velezensis* ARRI17 배양액을 4000rpm에서 20분간원심분리 후, 약 200 ml의 상등액의 배양여액을 획득하였다. 200ml의 배양여액에 140mL의 부탄올을 넣고 분획을 2회 실시하여, 부탄올층을 얻은 후 감압농축하였으며, 이로부터 얻어진 활성 분획물 100mg을 메탄올 300 $\mu$ l에 용해하였다. 활성물질을 분리하기 위해 TLC 플레이트 [1mm, 20 cm(가로)× 20 cm(세로)]에 추출물을 클로로포름:메탄올:물 (14:6:4)의 용매조건으로 전개시켰다. Prep-TLC 분획을 메탄올로 용출하여 F1 내지 F8의 8개의 분획물을 얻었고 8개의 분획물 중 F6 분획이 높은 항진균 활성을 나타냈다. 항진균 활성이 확인된 F6 분획을 1 mg/ml의 농도로 메탄올에 용해하여 준비하였고, HPLC 분석을 하기 위해 X bridge C18 5 $\mu$ m(4.6 × 25 mm) 컬럼을 사용하고 용매 A 0.1% TFA H<sub>2</sub>O와, 용매 B 0.1% TFA ACN을 이용하여, 표 37과 같은 조건으로 HPLC 분석을 수행하였다. HPLC 분석결과, retentiontime (RT) 34분부터 38분 사이에서 2개의 주요 피크가 나타났다. 상기 2개 주요 피크는 시그마알드리치로부터 구입하여 메탄올로 용해한 이투린 A(Iturin A) 물질을 HPLC를 수행한 결과와 동일한 RT에서 나타나는 피크임을 확인한 결과는 그림 34와 같다. 이에 따라, F6 분획의 항진균 활성 물질이 이투린 A인 것으로 추정하였다(그림 35). 이투린 A는 인체에 무해하고 환경오염을 유발하지 않으며, 다양한식물병 원인균에 대해 우수한 방제활성을 나타낸다. 따라서 본 발명의 ARRI17 균주가 인삼뿌리썩음병 유발 균주에 대해 우수한 방제활성을 확인하였다.

표 37. HPLC 분석 조건

Time	Solvent A	Solvent B
0.01min	90%	10%
80min	0%	100%
90min	0%	100%

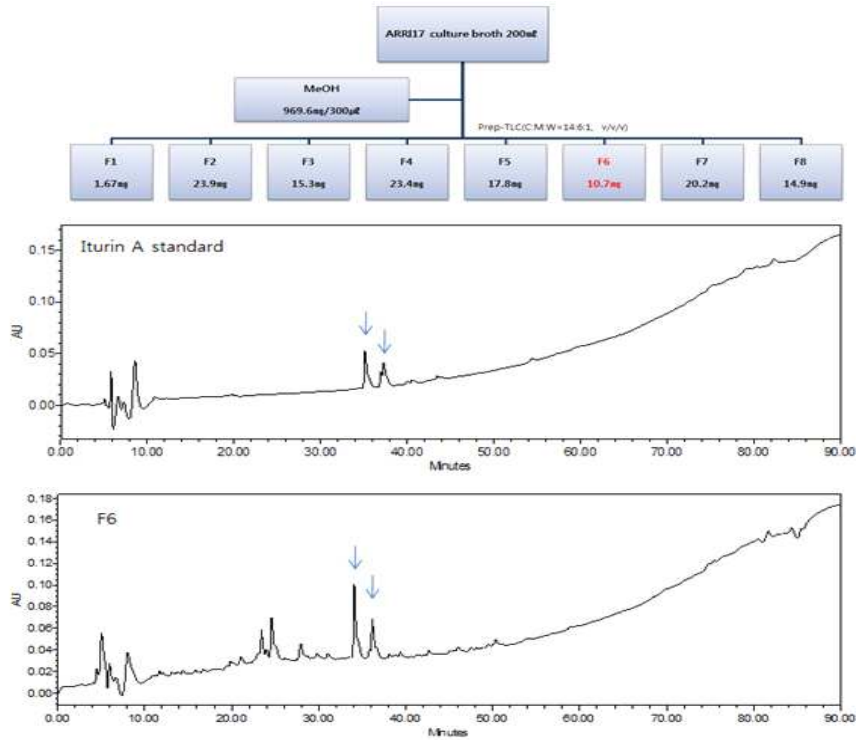


그림 35. *B. velezensis* ARRI17 균주의 항진균 물질 분석

⑤ *B. velezensis* ARRI17 균주의 사이클로리포펩타이드 유전자 확인

*B. velezensis* ARRI17 균주가 생산하는 2차 대사산물의 생합성에 관여하는 유전자를 확인하기 위해 PCR 검출법을 이용한 항생물질 생합성 유전자 분석을 수행하였다. 바실러스(*Bacillus*) 균주들이 일반적으로 생산하는 것으로 알려진 바실로마이신 D(bacillomycin D), 펜기신(fengycin), 이투린 A(iturin A), 설팩틴(surfactin), 쯔비터마이신 A(zwittermicin A)의 검출을 위해서 각각의 항생물질 생합성 유전자인 *bmyA*(875bp), *fend*(964bp), *ituA*(647bp), *srfA*(441bp), *zwiA*(779bp)에 특이적인 아래 표 37의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR분석은 전체 부피 20 $\mu$ l의 Reaction mixture(AccuPower PCRPre mix, BIONEER Corp.)를 사용하였고. 반응조건은 제조사의 사용 안내서를 따라 수행하였다. 그 결과는 그림 35-1.와 같다.

본 발명의 *B. velezensis* ARRI17 균주에서 이투린 A 와 설팩틴 생합성 유전자가 검출되었으나, 바실로마이신 D, 펜기신, 및 쯔비터마이신 A의 생합성 유전자는 검출되지 않았다. 따라서, *B. velezensis* ARRI17 균주가 보이는 인삼뿌리썩음병에 대한 길항 작용은 이투린 A나 설팩틴과 같은 리보솜이 없는 지질펩타이드(nonribosomal lipopeptide) 계열의 항균 물질들에서 의해 발생하는 것을 확인하였다.

표 37-1. 항생물질 생합성 유전자 특이적 프라이머

항생물질	증폭유전자	프라이머 명칭	프라이머 서열
Bacillomycin D	<i>bmyA</i>	BACC1F	5'-GAAGGACACGGCAGAGAGTC-3'
		BACC1R	5'-CGCTGATGACTGTTCATGCT-3'
Fengycin	<i>fend</i>	FEND1F	5'-TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT-3'
		FEND1R	5'-GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC-3'
Iturin A	<i>tuA</i>	ITUD1F	5'-GATGCGATCTGGTTGGATGT-3'
		ITUD1R	5'-ATCGTCATGTGCTGCTTGAG-3'
Surfactin A	<i>srfA</i>	SUR3F	5'-ACAGTATGGAGGCATGGTC-3'
		SUR3R	5'-TTCCGCCACTTTTTTCAGTTT-3'
Zwittermicin A	<i>zwiA</i>	ZWITF2	5'-TTGGGAGAATATACAGCTCT-3'
		ZWITR1	5'-GACCTTTTGAAATGGGCGTA-3'

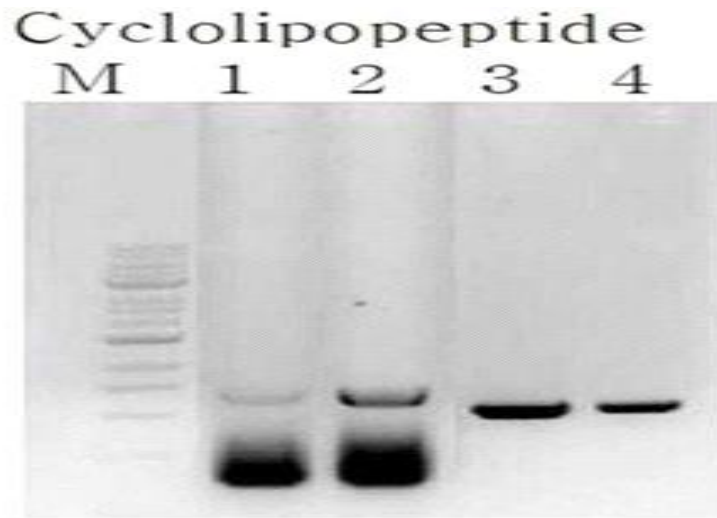


그림 35-1. *B. velezensis* ARRI17 균주의 항생물질 생합성 유전자 분석(M : maker, 1번과 2번 : IturinA, 3번과 4번 : Surfacin)

⑥ *B. velezensis* ARRI17 균주의 살선충 활성 프로테아제 확인

*B. velezensis* ARRI17 균주의 살선충 활성을 확인하기 위하여, 살선충 활성이 있다고 보고되어 있는 바실러스속 B16 알카리성 세린 프로테아제(alkaline serine protease)(AY708655)와 상동성을 보이는 *B. velezensis* ARRI17 균주에 포함된 프로테아제들의 conserved 부위를 비교하여 정방향 및 역방향 프라이머를 작성하였다(표 38). *B. velezensis* ARRI17 균주의 genomic DNA를 정제한 후 표 38의 라이머를 이용해 PCR을 실시하였다. 후, 98°C에서 30초, 55°C에서 30초 및 72°C에서 1분의 반응을 30회 반복해 수행하였다. 마지막으로 72°C에서 2분간 반응시켜 PCR 증폭 산물을 얻었다. 이어서, 증폭산물을 정제하고 전기영동 하였다. *B. velezensis* ARRI17 균주의 DNA를 SPB16\_F, SPB16\_R 프라이머를 사용해 증폭한 결과, *B. velezensis* ARRI17 균주의 DNA에서 예상된 크기의 증폭산물이 생성됨을 그림 36에서 확인하였다. 바실러스속 B16 알카리성 세린 프로테아제와 상동성을 보이는 프로테아제를 암호화하는 유전자가 *B. velezensis* ARRI17 균주의 DNA에 포함되어 있는 것으로 추정되는 바, 본 발명의 *B. velezensis* ARRI17 균주가 살선충 활성을 가짐을 알 수 있었다.

표 38. 살선충 활성 프로테아제 확인을 위한 프라이머

Primer	염기서열
SPB16_F	5'- GTGAGAGGCAAAAAGGTA - 3'
SPB16_R	5'-CTGAGCTGCCGCCTGTAC- 3'

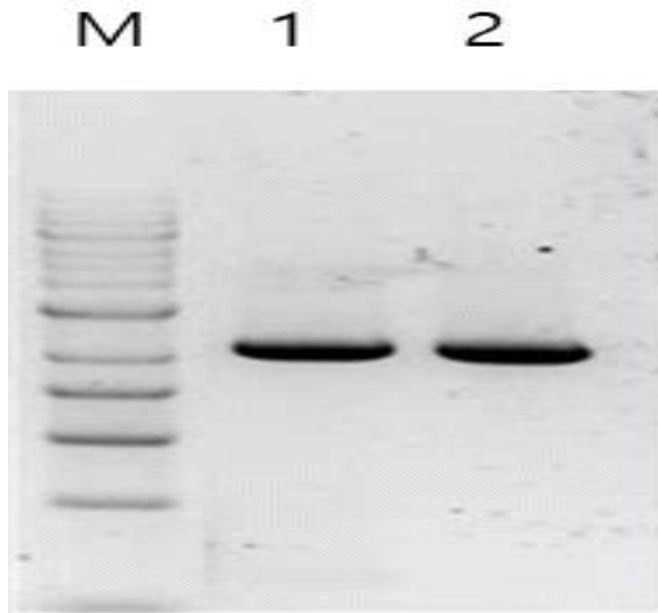


그림 36. *B. velezensis* ARRI17 균주의 살선충 활성 프로테아제 유전자 분석

⑦ 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 밀도진단 프라이머 개발

인삼 뿌리썩음병원균의 길항미생물로서 인삼 뿌리썩음병원균(*C. destructans*)에 대하여 길항 작용(항균작용)을 하는 *B. velezensis* ARRI17 균주 (*B. velezensis* ARRI17 strain; KFCC11778P)을 조사한 후, NCBI sequence data base를 이용하여 유전체의 핵산 서열을 수집 하였다. 수집된 길항미생물 균주들의 수집된 길항미생물 strain에 대하여 conserved region을 찾고 이를 기초로 프라이머 세트와 프로브를 디자인하였다. 검출 편의를 위하여 *B. velezensis* ARRI17 검출용 프로브의 5' 말단은 FAM (fluorescein amidite) 형광물질로 표지하고, 3' 말단은 Black hole quencher (BHQ<sup>TM</sup>)로 표지하였다. 그 결과는 표 39, 표 40, 표 41과 같다.

표 39. 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 특이적인 프라이머 및 프로브

Primer/Probe	염기서열
Forward primer	5'- ACAAAGTCGCTCCTCCGTTC - 3'
Reverse primer	5'- TCCAAGGTCGATGATTTCCC - 3'
Probe	5'FAM- CTTCTTTGGAGATTCCTTCACCGTACATAATGTCC - BHQ13'



표 40. 길항미생물 실시간 중합효소연쇄반응 primer 및 probe의 사용농도

System	Name	Final concentration (nM)
<i>B. velezensis</i>	<i>B.velezensis</i> F	1,000
	<i>B.velezensis</i> R	1,000
	<i>B.velezensis</i> probe (FAM, BHQ)	200

표 41. 길항미생물 검출 실시간 중합효소연쇄반응 반응 조건

Temperature (°C)	Time	Cycle
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

프라이머 쌍 및 프로브를 이용하여, 다양한 종류의 세균 및 동물 세포로부터 추출된 유전체 DNA (genome DNA; gDNA)에 대하여 real-time PCR을 수행하여, 상기 프라이머 쌍 및 프로브의 검출 특이도를 측정하였다. 또한, *In silico* 상에서 표적 길항미생물 (*B. velezensis*) 및 기존 등록된 바실러스 속의 다른 미생물에 대하여 검출 특이도를 시험하였다. 프라이머 및 프로브를 사용하여 Real-time PCR 수행시에 목적으로 하는 균주(바실러스 벨레젠시스)를 성공적으로 증폭하는 것을 확인할 수 있다. 또한 목적 균주 이외의 박테리아 및 가축에 대해서는 증폭반응을 보이지 않았다(표 42). 또한, *In silico* 분석 결과에서도 바실러스 벨레젠시스 특이적으로 검출하는 것으로 확인하였는데 그 결과는 표 43과 같다.

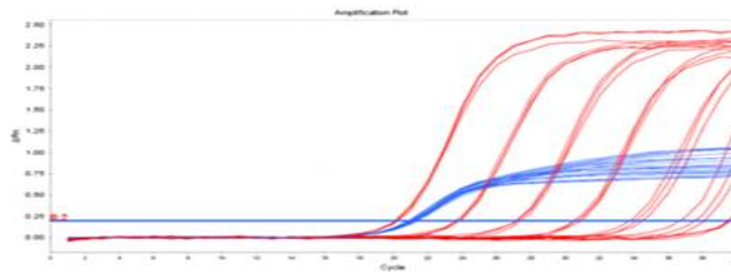
길항미생물 검출키트의 분석적 민감도를 확인하기 위해 PDA에 배양된 *B. velezensis* ARRI17균주로부터 추출된 gDNA를  $10^6 \sim 10^0$  copy/ reaction으로 희석하여 밀도별 3반복으로 Real-time PCR을 진행한 결과 *B. velezensis* ARRI17은 10 copies/rxn까지 검출되었고 직선성 테스트 결과 Eff%: 100.606%,  $R^2$ :0.994로 나타났는데 이를 설명한 자료는 그림 37이다.

표 42. 다중 실시간 중합효소연쇄반응 기술을 이용한 길항미생물 검출키트 특이도 비교

No.	Category	Name	<i>Bacillus velezensis</i>
1		<i>B. velezensis</i> ARRI17	+
2		<i>B. cereus</i>	-
3		<i>B. subtilis</i>	-
4		<i>B. thuringiensis</i>	-
5		<i>Campylobacter rectus</i>	-
6		<i>Campylobacter ureolyticus</i>	-
7		<i>E. coli</i> O157	-
8		<i>Listeria monocytogenes</i>	-
9		<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
10	Bacteria	<i>Clostridium perfringens</i>	-
11		<i>Salmonella typhi</i>	-
12		<i>Salmonella typhimurium</i>	-
13		<i>Shigella sonnei</i>	-
14		<i>Staphylococcus aureus</i>	-
15		<i>Vibrio vulnificus</i>	-
16		<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
17		<i>Legionella pneumophila</i>	-
18		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
19		<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
20		Pig	-
21		Duck	-
22		Cow	-
23		Chicken	-
24	Animal	Turkey	-
25		Sheep	-
26		Horse	-
27		Goat	-

표 43. *In silico* 상 길항미생물 검출키트 특이도 분석

No.	Strain name	Species name	Accession No.	Match(%)		
				Forward primer	Probe	Reverse primer
1	-	<i>B. velezensis</i>	-	100	100	100
2	SRCM103529	<i>B. licheniformis</i>	CP0035228	90	88.57	95
3	BSD-2	<i>B. subtilis</i>	CP013654	85	85.71	85
4	DSM8716	<i>B. clauui</i>	CP019985	85	82.86	50
5	NCT-2	<i>B. megaterium</i>	CP032527	85	82.86	80
6	NEB414	<i>B. caldolyticus</i>	CP025074	75	80	70
7	MBGJa3	<i>B. cereus</i>	CP026523	85	85.71	90
8	SRCM103574	<i>B. glycinifermentans</i>	CP035232	84	94.29	100
9	AM31D	<i>B. krulwichiae</i>	CP020814	70	74.29	35
10	T30	<i>B. intestinalis</i>	CP011051	85	88.57	85
11	ZB201702	<i>B. halotolerans</i>	CP029364	90	82.85	80



Copies/ $\mu$ l	Ct			Average
	1	2	3	
$10^6$	20.10	20.16	20.29	<b>20.18</b>
$10^5$	23.65	23.85	23.90	<b>23.80</b>
$10^4$	27.16	27.49	27.19	<b>27.28</b>
$10^3$	30.63	30.90	30.79	<b>30.77</b>
$10^2$	34.21	33.89	34.54	<b>34.21</b>
$10^1$	36.82	37.62	38.12	<b>37.52</b>
$10^0$	39.49	39.68	39.61	<b>39.59</b>

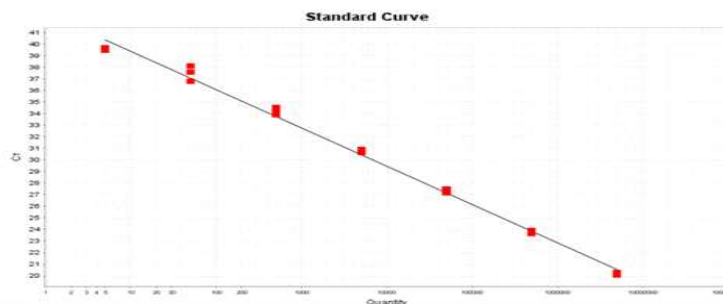


그림 37. 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 밀도진단 프라이머 및 프로브 민감도 분석(Eff %: 100.606%,  $R^2$ :0.994)

⑧ 토양 내 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 밀도 검증을 위한 검량선

개발한 인삼뿌리썩음병 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 밀도 분석용 키트를 이용하여 real-time PCR 수행 시 Ct값과 길항미생물 *B. velezensis* (ARRI17) 밀도와의 관계 분석을 위해 검량선을 도출한 결과는 표 44과 그림 38와 같다.

*B. velezensis* ARRI17을 배지에 배양한 후 원심분리를 이용하여 *B. velezensis* ARRI17을 얻었다. 얻어진 *B. velezensis* ARRI17을 10배씩 희석하여 DNA를 추출하고 real time PCR 수행하였다. 또한, 얻어진 *B. velezensis* ARRI17 10배씩 희석하여 배지에 도말하고 25°C 10일 배양 후 포자수를 세었고 Ct값과의 상관관계를 분석하였다.

추출된 DNA를 template로 사용하여 real-time PCR을 수행한 결과 얻어진 Ct값과 병원균 밀도와의 관계 분석을 위해 검량선을 구하였다. *B. velezensis* ARRI17 밀도  $1.1 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ l 일 때 Ct value는 23.10이었고,  $1.1 \times 10^4$  cfu/ $\mu$ l,  $1.1 \times 10^3$  cfu/ $\mu$ l,  $1.1 \times 10^2$  cfu/ $\mu$ l,  $1.1 \times 10^1$  cfu/ $\mu$ l 일 때는 26.68, 30.16, 33.91, 38.18이었다. 균밀도와 Ct value의 상관관계식은  $y = 1.358 \ln(x) + 40.09$  ( $R^2 = 0.971$ )이었다.

표 44. *B. velezensis* ARRI17 포자수와 정량 PCR Ct값

균밀도	1.10E+01	1.10E+02	1.10E+03	1.10E+04
<sup>b</sup> Ct value	38.18	33.91	30.16	26.68
표준편차	0.63	0.26	0.22	0.19

<sup>b</sup> cycle threshold(Ct) : 정량 PCR 이용 병원균 DNA 검출 한계농도 도달 증폭 사이클 수

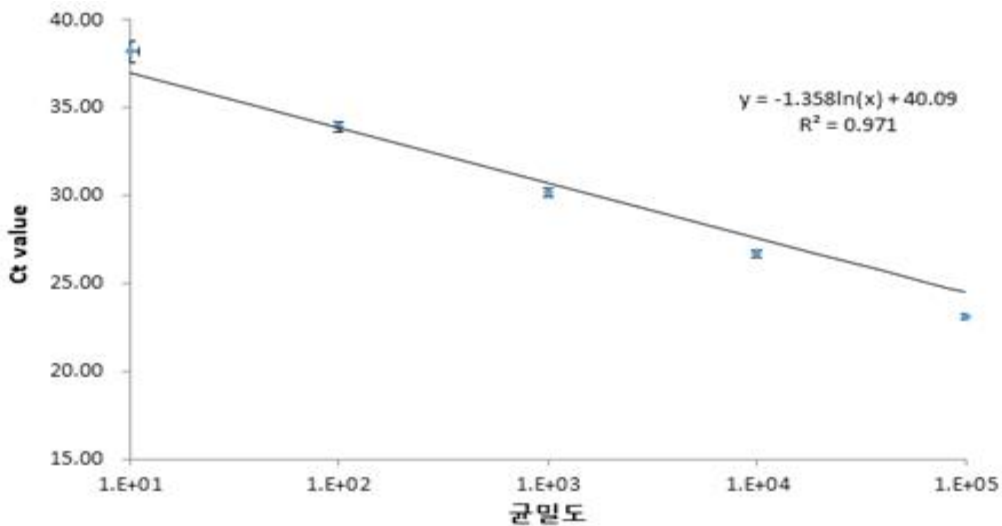


그림 38. 토양 내 *B. velezensis* ARRI17 밀도 검증을 위한 검량선

(마) 인삼의 염류 장애 및 생장증가에 미치는 유용 미생물의 메커니즘 검증

염류(Salinity) 스트레스는 식물에 해를 끼치는 요소로 알려져 있으며, 흙 또는 수역(Water body)에 염류이 축적되면서 발생된다(Shannon & Grieve, 1999). 식물에 대한 염류 스트레스의 부정적인 영향으로는 뿌리썩음, 식물생장감소, 영양상의 불충분, 수확량 축소, 미네랄 장애 등이 알려져 있다(Egamberdieva 등, 2007). 그러므로 인삼의 내염성(salinity tolerance)을 증진시키는 방법을 찾기 위해 인삼내의 염류 장애 메커니즘을 확인하고 유용 미생물을 이용한 인삼의 내염성 증진 연구를 수행 하였다.

① 인삼의 내염성 증진 연구에 사용된 *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>

*Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>는 경기도에 있는 산림토양에서 분리된 균주로 TSA (tryptic soy agar) 배지, 15~40도, pH 5-9, 0.5-4.5% NaCl에서 잘 자라는 것을 확인하였다. 균주의 동정은 유전자형과 표현형으로 분석되었고, 2014년 *Paenibacillus yonginensis* sp. nov., a potential plant growth promoting bacterium isolated from humus soil of Yongin forest 논문 제목으로 게재되었다. 균주의 동정 결과와 식물생장촉진(plant growth promoting)연구 결과를 그림39에 정리하였다.

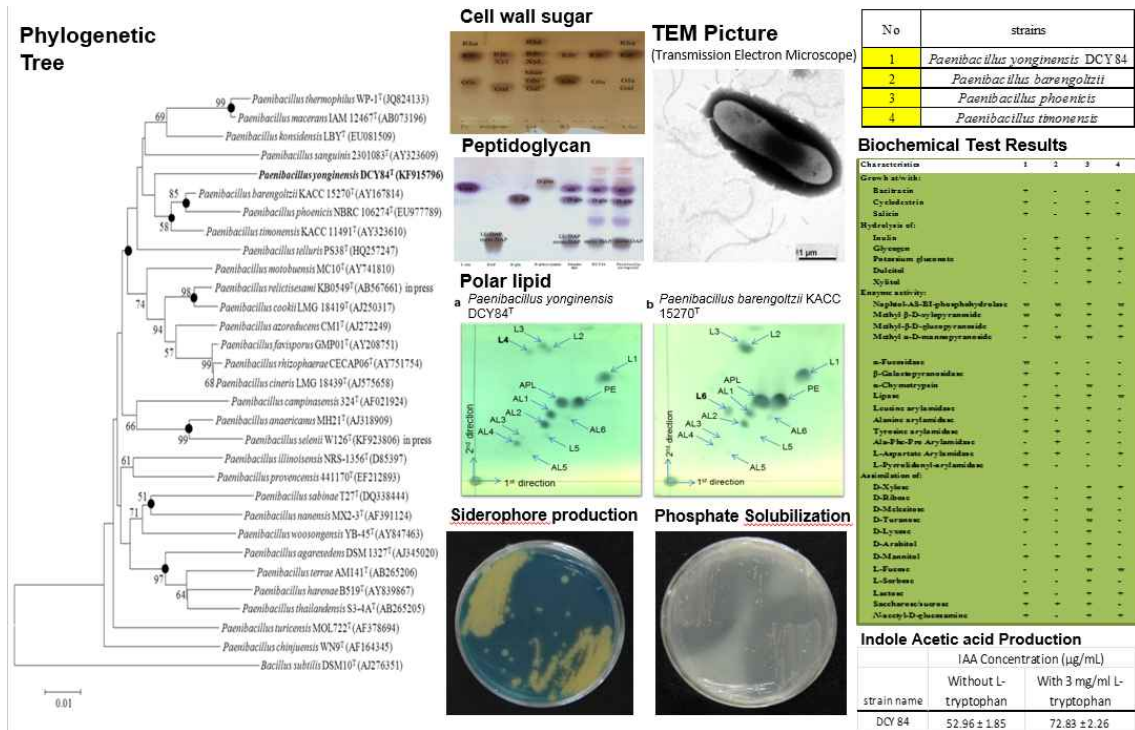


그림 39. Description of *Paenibacillus yonginensis* sp. nov. DCY84<sup>T</sup>

② *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>와 인삼의 적합성(Compatibility)

*Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>의 생균수에 따른 묘삼에 미치는 영향을 평가하였다(그림 40).



그림 40. *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>와 인삼의 적합성(Compatibility) 평가

*Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>와 인삼의 적합성 평가결과 10<sup>12</sup>CFU/mL DCY84<sup>T</sup> 균주 처리시 묘삼의 뿌리는 썩는 증상을 보이지 않았지만 줄기부분은 상당히 스트레스를 받은 것을 확인하였다. 따라서 인삼의 내염성 증진 연구에 10<sup>10</sup>CFU/mL DCY84<sup>T</sup> 균주를 처리 하였다.

③ 인삼의 내염성 평가

인삼이 염류의 어느 농도에서 영향을 받는지를 확인하기 위해, 발아 전, 후로 구분하고, 염류 스트레스 농도를 150, 300, 450 mM 처리하여 확인하였다 (그림41).

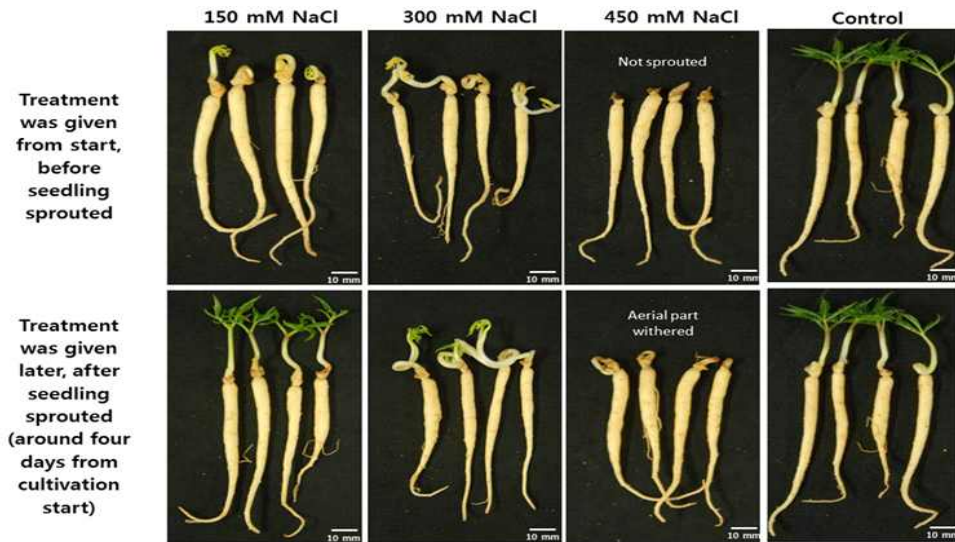


그림 41. 염류 농도와 인삼 발아 전, 후에 따른 내염성 평가

발아 전 묘삼은 모든 염류 처리 농도에서 생장이 저지된 것을 확인할 수 있었다. 한편, 발아 후 묘삼에서는 300 mM 염류 처리 시 스트레스를 받은 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 인삼의 내염성 증진 연구에 묘삼의 발아 후 300 mM 염류 스트레스를 처리하기로 하였다.

④ 인삼의 내염성을 유도하는 *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>의 활용

앞서 연구에서 인삼과 균주의 적합성 평가와 인삼의 내염성 평가 결과로 본 연구를 디자인 하였다. 균주의 생균수는 10<sup>10</sup>CFU/mL, 염류 스트레스 농도는 300 mM를 인삼에 처리하여 균주를 이용한 인삼의 내염성 증진 연구를 그림42과 같이 연구를 진행하였다.

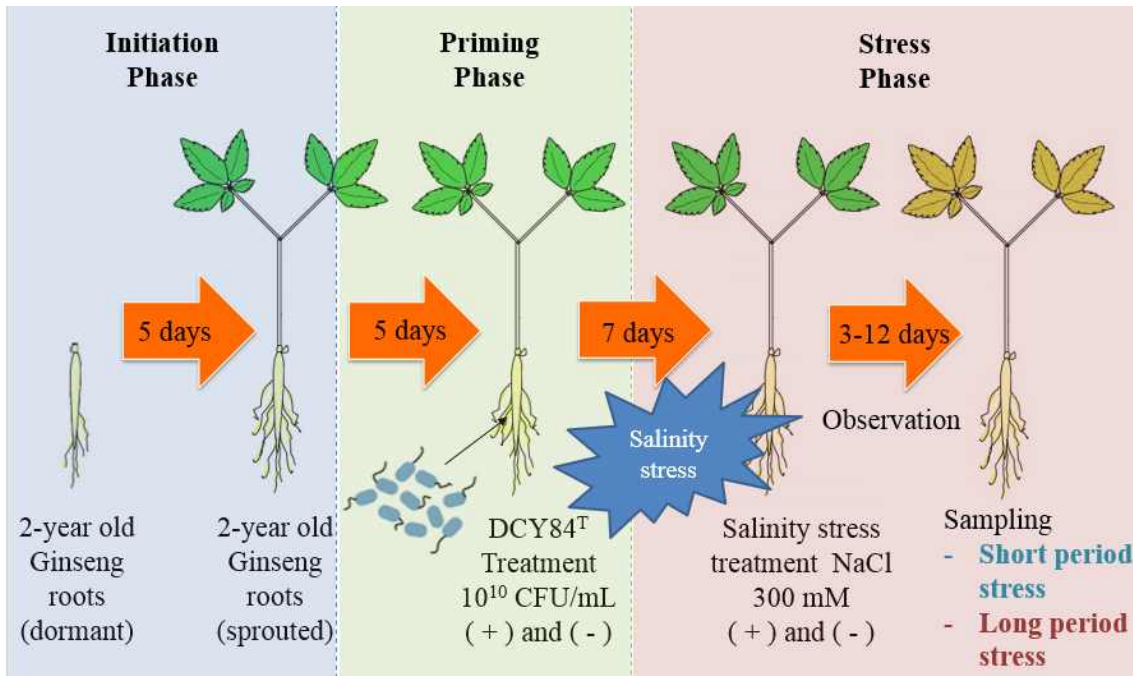


그림 42 . *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>을 이용한 인삼의 내염성 증진 연구 과정

먼저 2년생 묘삼을 5일동안 발아 시키고, 5일동안 pot에 심어 묘삼이 pot환경에 적응하게 하였다. 그 후 *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup> 10<sup>10</sup>CFU/mL을 처리하여 7일동안 균주의 활성화와 적응을 하게끔 하였다. 다음으로 300 mM 염류 스트레스를 주고 3일, 12일 후 인삼의 내염성 증진 결과를 확인하였다.

㉔ 염류 스트레스 3일, 12일처리

그림 43에서 염류 스트레스를 짧은 기간(3일) 받은 묘삼은 뿌리의 색이 변하였고 수축되었다. 그리고 줄기 부분은 말라 죽은 것을 확인하였다. 이 증상으로 보아 염류 스트레스로 인한 수분, 삼투 스트레스를 받은 것으로 보인다. 수분 손실은 줄기부분의 상대 수분 함량 (Relative water content, %RWC)의 감소로부터 확인하였다(그림 44). DCY84<sup>T</sup> 균주를 처리할 경우는 염류 스트레스로가 억제되어 어떠한 증상도 보이지 않았다.



그림 43. *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>를 이용한 인삼의 내염성 평가 (3일처리)

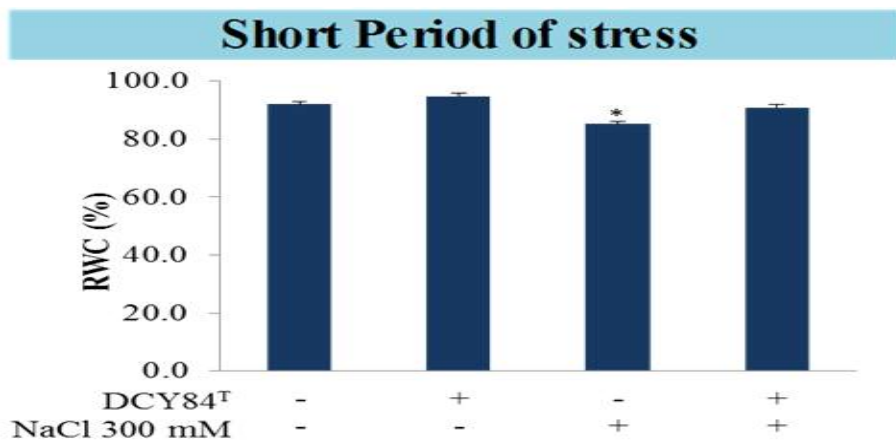


그림 44 . Relative Water Content of *P. ginseng* seedlings (3일처리)

그림 25.



그림45에서 염류 스트레스를 긴 기간(12일) 받은 묘삼의 줄기는 메마르고, 뿌리는 썩었으며, 완전히 말라 죽은 것을 확인하였다. 상대 수분 함량 (Relative water content, %RWC)으로 줄기부분의 수분함량을 그림46에서 확인하였고, DCY84<sup>T</sup> 균주를 처리했을 때, 염류 스트레스로 인한 증상으로 약간의 잎이 창백해졌으나 control(salt stressed)과 비교하였을 때 잘 자란 것을 확인하였다.

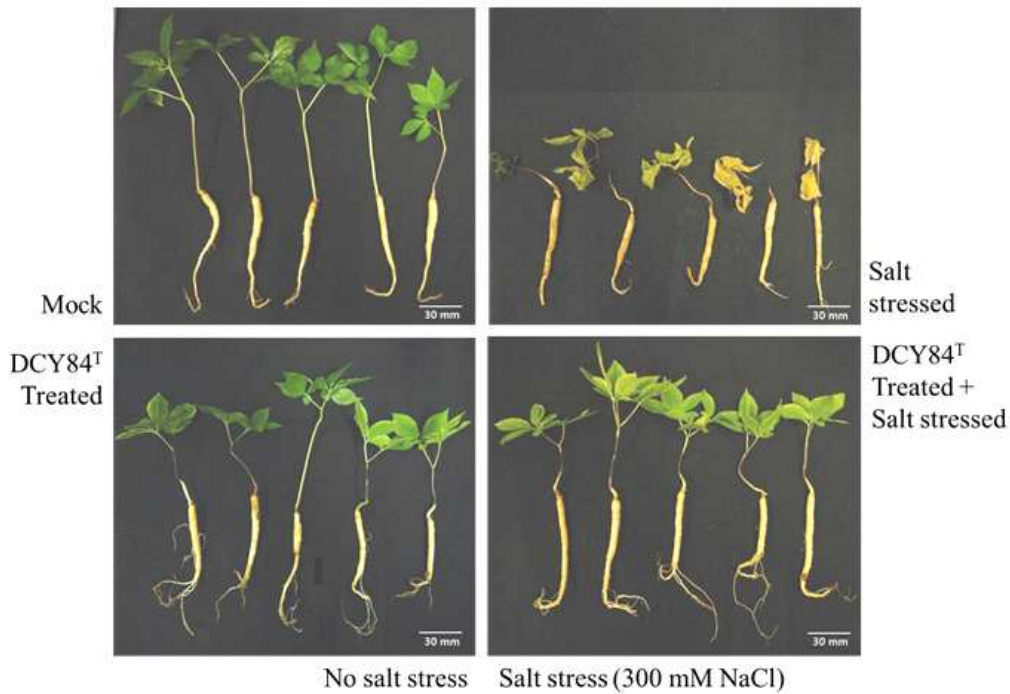


그림 45 . *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup>를 이용한 인삼의 내염성 평가 (12일처리).

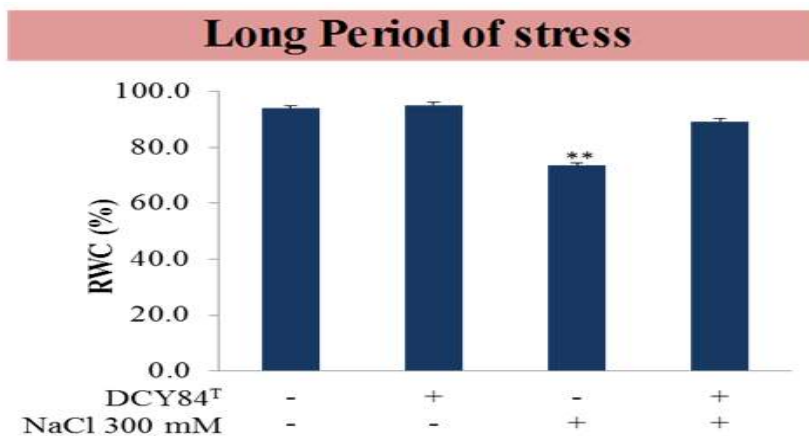


그림 46 . Relative Water Content of *P. ginseng* seedlings (12일처리)

㉔ 염류 스트레스를 받은 인삼의 메커니즘과 균주로 인한 내염성 증진 평가

앞서 짧은 기간(3일), 긴 기간(12일) 염류 스트레스를 받은 묘삼은 수분과 삼투 스트레스로 생장에 데미지를 입는 것을 상대 수분 함량 (Relative water content, %RWC)과 형태적 특징으로 확인할 수 있었다. qRT-PCR을 이용한 관련 유전자 분석, 삼투물질로 proline, total soluble sugar 함량 분석, ROS scavenging system 관련 분석 등을 통해 인삼의 염류 스트레스에서의 메커니즘, DCY84<sup>T</sup> 균주 처리시 인삼의 내염성 증진 메커니즘을 평가하였다.

㉕ Pot내의 토양에서 DCY84<sup>T</sup> 생균수와 enzymes 활성 평가

짧은 기간(3일), 긴 기간(12일) 염류 스트레스를 받은 인삼 pot내에 처리된 DCY84<sup>T</sup> 균주의 생균수를 pot내의 흙 DNA로부터 DCY84<sup>T</sup> specific PCR marker를 이용하여 확인하였다(그림 47).

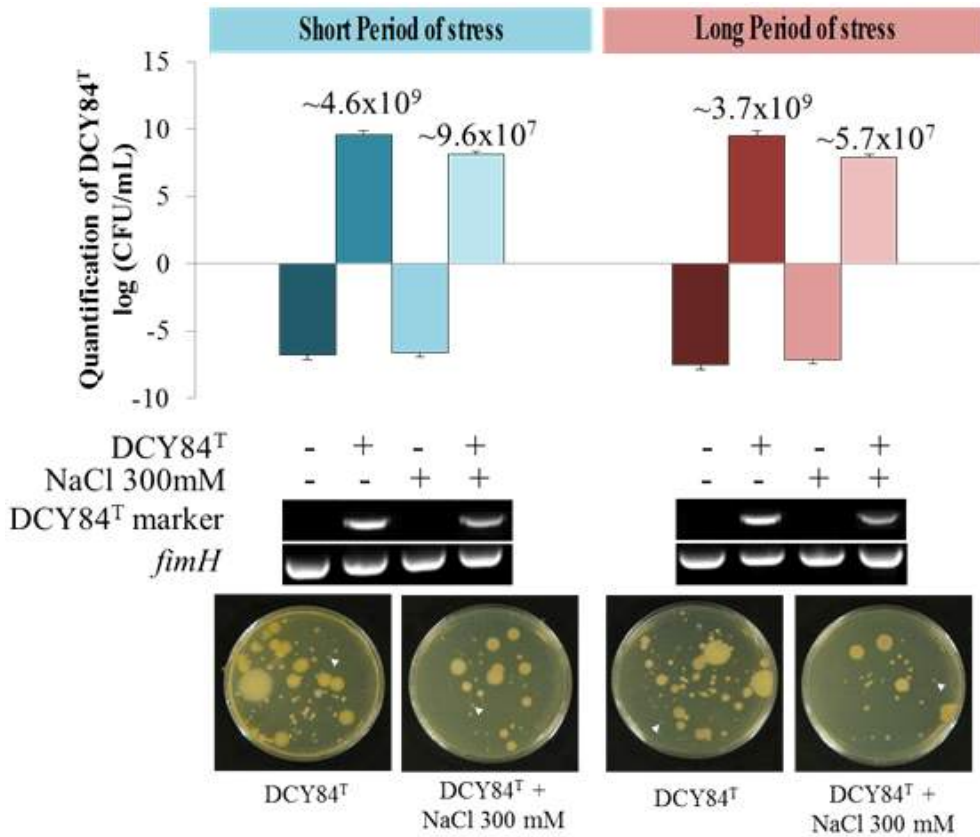
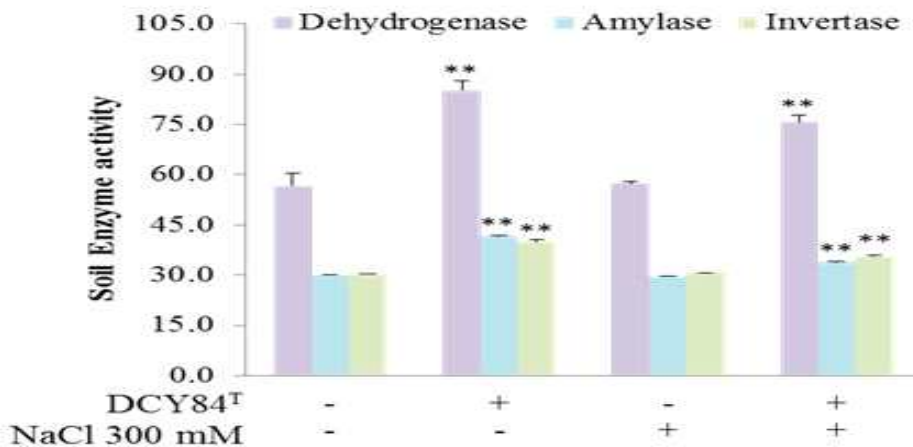


그림 47. Monitoring of strain DCY84<sup>T</sup> on the *P. ginseng* rhizospheric area.

처음 Pot에 균주 처리량은 CFU/mL = 10<sup>10</sup>로, 분석결과 처음과 비슷하게 DCY84<sup>T</sup> 균주가 생존해 있었다. 심지어 염류 스트레스 상에서도 생균수가 크게 줄지 않은 것을 확인할 수 있었다. 다른 균주의 오염이 있는 것을 확인하였지만, DCY84<sup>T</sup> marker와 배지에서 colony 형태로 DCY84<sup>T</sup>를 구분할 수 있었고, 오염균주의 수는 많지 않았다. 다음으로 그림48에서 pot내의 흙 enzymes 분석을 통해 DCY84<sup>T</sup> 균주의 유용성을 평가하였다.

## Short Period of stress



## Long Period of stress

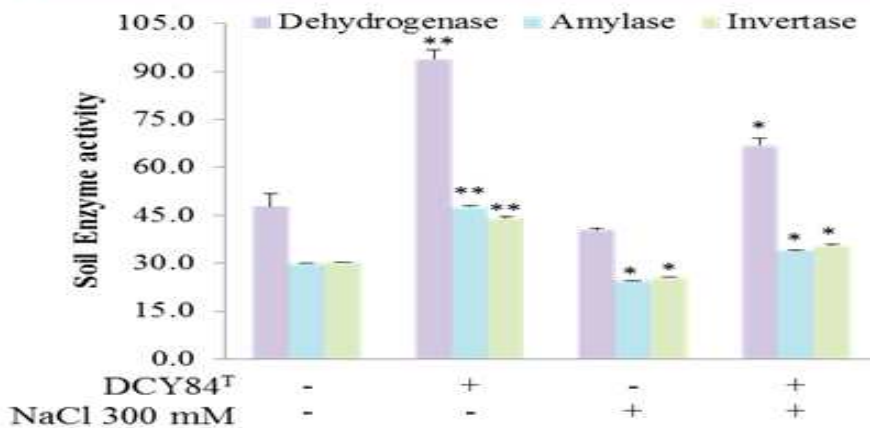


그림 48 . Soil enzyme activity of *P. ginseng* rhizospheric soil. Dehydrogenase activity: Formation of triphenyl formazan (g) from TTC/ g soil for 24 h. Amylase activity: Glucose (g) liberated from starch/ g soil for 48 h. Invertase activity: Glucose (g) liberated from sucrose/ g soil for 6 h. Statistical significance using student t-test was assigned at “\*” for  $P < 0.05$ , “\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*\*\*” for  $P < 0.001$ .

Dehydrogenase, amylase 그리고 invertase 활성은 DCY84<sup>T</sup> 균주 처리시 control 뿐만 아니라 염류 스트레스를 받은 처리군 에서도 높은 것을 확인할 수 있었다. 이것은 pot내에 DCY84<sup>T</sup> 균주가 흙에 풍부한 영양분 환경을 만든 것으로 보인다. 그러므로 염류 스트레스를 받은 묘삼이 이용 가능한 영양분들을 충분히 흡수 하게 도와주어 묘삼의 내염성을 증진 시킨 것으로 보인다.

㉔ 관련 유전자 분석

Ion transporter, stomatal closure, cell wall integrity, ABA 관련 유전자, ROS 관련 유전자, proline 대사 관련 유전자 등을 짧은 기간(3일), 긴 기간(12일) 염류 스트레스를 받은 인삼 반응과 여러 가수분해 효소관련 유전자와 polyamine 대사 관련 유전자 등을 DCY84<sup>T</sup> Full genome에서 qRT-PCR을 통해 확인하였다 (Kim 등, 2017).(그림49).

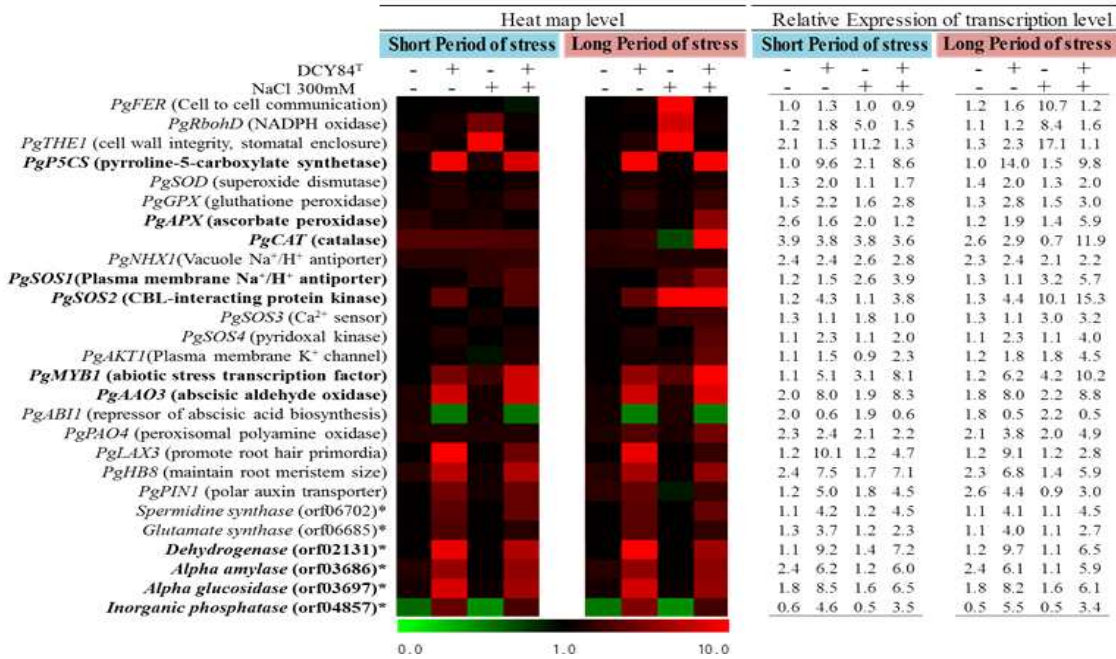


그림 49 . Heat map of qRT-PCR results of salinity responsive genes. The relative expression of ginseng gene was normalized using *PgCYP* as housekeeping gene; \* represent gene encoding several hydrolyzing enzymes (obtained from Full genome of DCY84<sup>T</sup>).

염류 스트레스를 받은 인삼은 *PgTHE1* 의 qRT-PCR 결과로 stomata enclosure 의 활성을 보여 인삼 방어 시스템으로 osmotic stress 내성 증진을 보였지만 충분하지 않은 것으로 보였다. DCY84<sup>T</sup> 균주는 *PgTHE1* 활성에 도움을 주진 못하였다. 하지만, DCY84<sup>T</sup> 균주 처리 시 *PgP5CS* 발현을 증가시켜 염류 스트레스를 받은 인삼의 osmotic stress 내성을 증진시킨 것으로 보인다. 긴 기간 염류 스트레스를 받은 인삼은 말라 죽게 되는데, DCY84<sup>T</sup> 균주 처리 시 그림45 과 같이 잎만 약간 창백해지는 현상을 보였다. 이것은 산화 스트레스와 이온 스트레스로 긴 기간 염류 스트레스를 받을 때 보이는 현상이다. *PgRbohD* 산화 효소 유전자 발현 증가로 확인 할 수 있었다. 이온 스트레스는 Na<sup>+</sup> 독성 때문에 발생한 것으로 인삼은 *PgSOS1*, *PgSOS2*, *PgSOS3*, *PgSOS4* 그리고 *PgAKT1* 같은 이온 펌프 유전자 발현 증가로 이온 스트레스에 내성을 나타내는 것으로 보인다. 특히, DCY84<sup>T</sup> 균주 처리시 *PgSOS2*가 가장 높은 유전자 발현을 보였다. 염류 스트레스를 받은 인삼의 *PgSOS1* 유전자 발현이 가장 높았고 *PgNHX1* 은 비교적 낮은 발현을 보였다. 이것은 vacuole 안에서 축적하는 것 보다 Na<sup>+</sup>를 cell 밖으로 내보내는 인삼의 메커니즘을 보여준다. ROS scavenging 활성을 보여주는 Abscisic acid (ABA) 관련 유전자 *PgMYB1* 와 *PgAAO3* 는 DCY84<sup>T</sup> 균주 처리시 높은 발현을 보였다. 그리고 여러 항산화 관련 유전자 *PgAPX*, *PgCAT* 역시 균주 처리시 크게 발현 되는 메커니즘을 확인하였다. DCY84<sup>T</sup> Full genome을 통해 얻은 여러 가수분해 효소 관련 유전자 발현 결과는 그림48의 효소 분석 결과와 마찬가지로 인삼의 osmotic stress 내성 증진에 도움을 준 것으로 생각된다.

㉞ 관련 성분 분석

Total soluble sugar (TSS), proline, malondialdehyde (MDA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그리고 Ion과 mineral 성분을 분석하여 염류 스트레스를 받은 인삼의 메커니즘과 균주로 인한 내염성 증진을 평가 하였다.

그림50에서 염류 스트레스를 받은 묘삼의 Total soluble sugar (TSS) 함량이 증가한 것을 확인하였고, 항상성을 유지하기 위한 묘삼의 메커니즘으로 생각된다. 그러나 DCY84<sup>T</sup> 균주 처리시 TSS 함량은 변화가 거의 없었다. 이것은 DCY84<sup>T</sup> 균주의 여러 가수분해 효소와(그림49) pot내 혹은 enzymes 분석 결과(그림48)와 부합하여 묘삼이 섭취할 영양분이 많기 때문으로 생각된다. proline 함량 분석 결과는 그림 49의 *PgP5CS* 유전자 발현 결과와 같은 양상을 보였다.

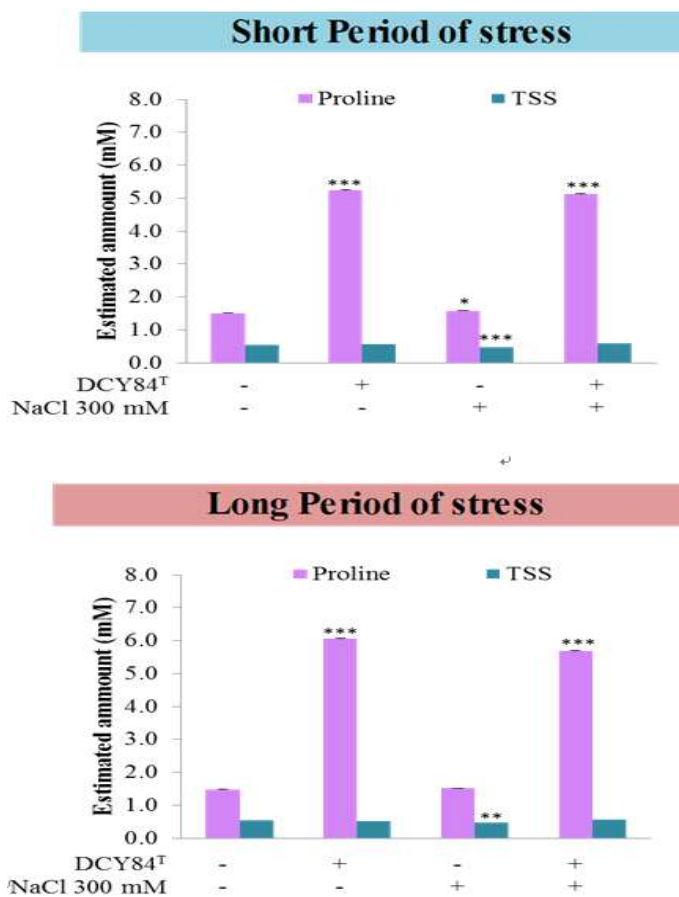


그림 50 . Proline and TSS level of *P. ginseng* seedlings Both proline and TSS assay was conducted using root tissue as sample. Statistical significance using student t-test was assigned at “\*” for P < 0.05, “\*\*” for P < 0.01 and “\*\*\*” for P < 0.001. TSS: Total soluble sugar;

그림51에서 ROS중 하나인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>함량은 염류 스트레스를 받은 묘삼에서 높게 나왔으며, MDA함량 분석 결과도 같은 양상을 보였다. DCY84<sup>T</sup> 균주 처리시 control과 비슷한 함량을보여 묘삼의 ROS scavenging에 영향을 미친 것으로 확인할 수 있었으며, 그림49에 ROS관련 유전자 분석과 같은 패턴을 보였다.

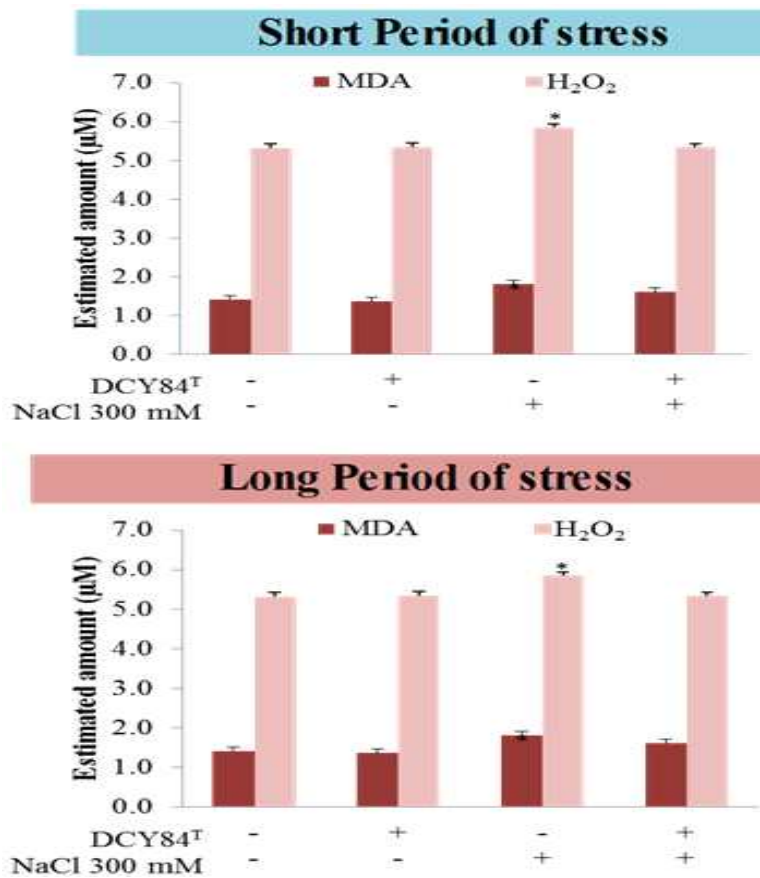


그림 51 . MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level of *P. ginseng* seedlings. Both MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assay was conducted using root tissue as sample. Statistical significance using student t-test was assigned at “\*” for P< 0.05, “\*\*” for P< 0.01 and “\*\*\*” for P< 0.001. MDA: Malondialedehyde.

그림52에서 ion profile결과로 DCY84<sup>T</sup> 균주 처리시 염류 스트레스를 받은 묘삼과 비교하여 K<sup>+</sup>함량이 높아졌고, Na<sup>+</sup>는 함량이 낮아진 것을 확인하였다. 이것은 그림49의 *PgAKT1* 이온 펌프 유전자 발현 증가와 연관이 있으며, 이온 스트레스를 막기위해 cell에서 K<sup>+</sup>함량을 유지하기 위한 것으로 보인다.

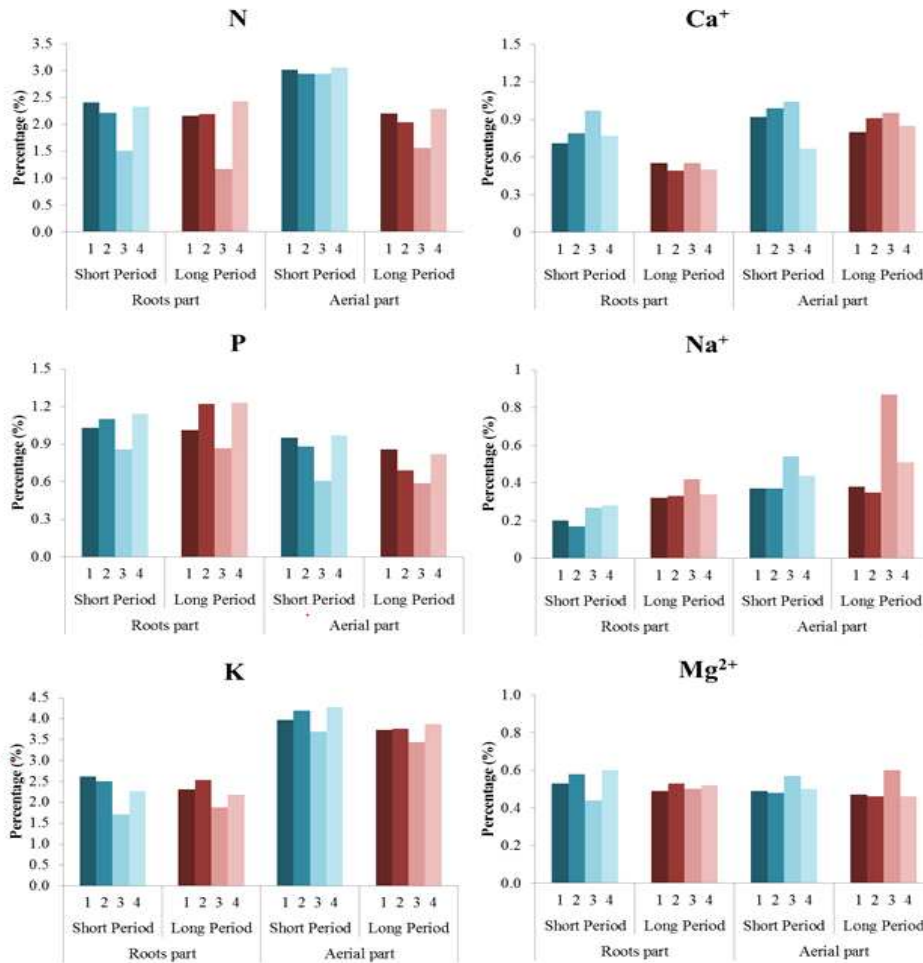


그림 52 . Ion and mineral profile of roots and aerial part of *P. ginseng*. 1, Control; 2, DCY84<sup>T</sup> treatment; 3, NaCl 300mM treatment; 4, DCY84<sup>T</sup> +NaCl 300mM treatment.

㉞ 염류 스트레스를 받은 인삼과 균주로 인한 내염성 증진 메커니즘

앞서 모든 연구 결과를 바탕으로 추정된 염류 스트레스를 받은 인삼과 균주로 인한 내염성 증진 메커니즘을 그림53에 정리하였다.

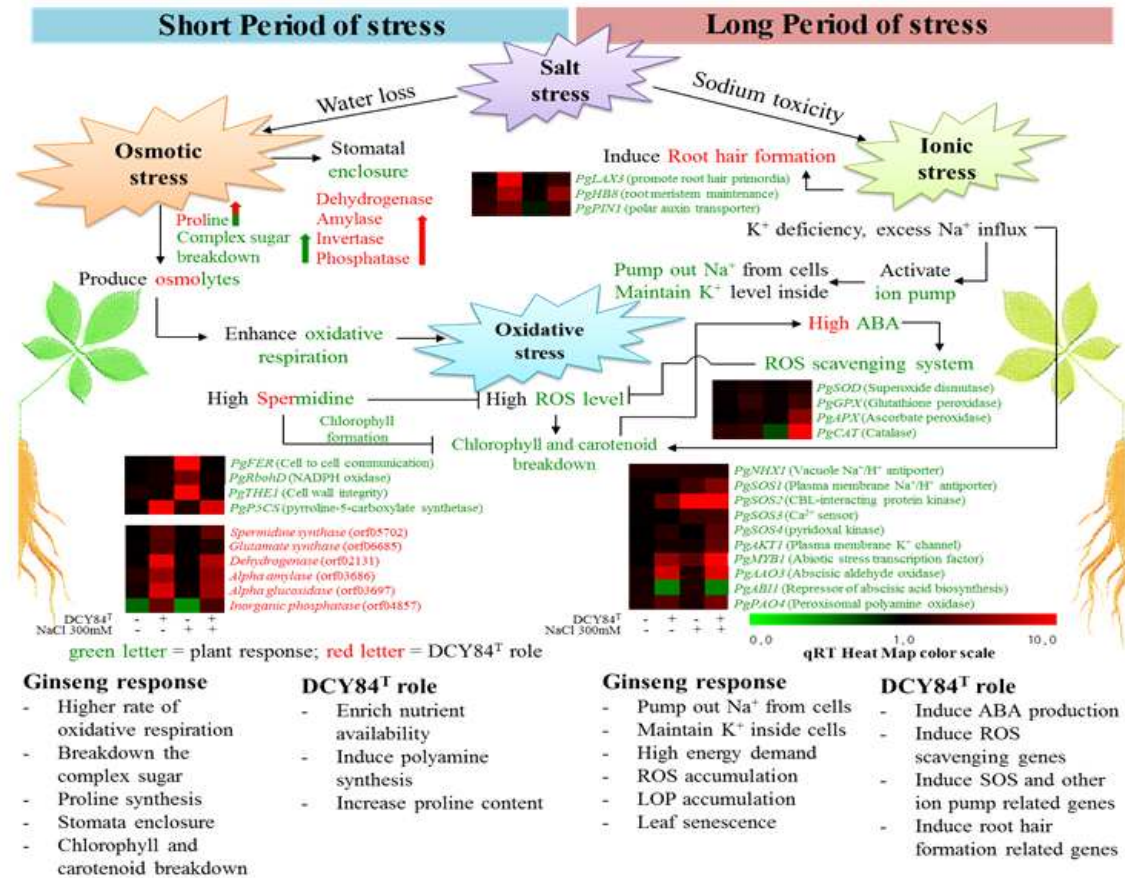


그림 53. Presumptive model of salinity defense strategy on *P. ginseng*.

DCY84<sup>T</sup> 균주는 묘삼 근권에 잘 자라며 근권 흡 시스템에서 이용 가능한 영양분이 많은 것을 확인하였다. 짧은 기간 염류 스트레스는 osmotic stress를 유도하며, 이것은 sugar, proline 과 같은 삼투물질을 생산하여 막는 것을 확인하였다. 긴 기간 염류 스트레스는 산화와 이온 스트레스를 묘삼에 주게 되고, 이것은 DCY84<sup>T</sup> 균주 처리로 염류 내성 관련 유전자를 유도하여 막는 것을 확인하였다.



## 다. 실리카나노파티클을 이용한 인삼뿌리 썩음병의 방제효과 검증

### (1) 실리카 나노파티클의 인삼뿌리썩음병 활용을 위한 소재개발

미네랄 영양소 및 식물생리학 분야에서 미네랄 영양소는 스트레스 반응을 포함하여 식물시스템의 다양한 생리학적 과정에 중요한 것으로 여겨져 왔다. 이러한 미네랄 영양소는 식물에 작용하는 중요도에 따라 Macro, Micro, Beneficial elements로 구분이 된다. 질소 (N), 인 (P), 칼륨 (K), 마그네슘 (Mg), 황 (S) 및 칼슘 (Ca)은 필수 Macronutrients이며, 철 (Fe), 망간 (Mn), 아연 (Zn), 니켈 (Ni), 구리 (Cu), 붕소 (B), 크롬 (Cr) 및 몰리브덴 (Mo)은 필수 Micronutrients이다. 그리고 나트륨 (Na), **실리콘 (Si)**, 코발트 (Co) 및 셀레늄 (Se)은 Beneficial elements로 간주된다.(Grusak *et al.*, 2001; Tripathi *et al.*, 2014).

1850년대 후반 독일의 식물학자인 Sachs는 식물 성장과 대사를 위한 여러 영양소의 중요성을 광범위하게 연구했습니다. 그러나 실리콘은 그의 분석에서 필수 요소로 간주되지 않았다 (Sachs, 1860). 이것은 논란의 여지가 많았으며, 여러 연구에서 plant system에 실리콘(Si)의 유익한 역할이 입증되었습니다. 수경 조건 하에서 Si가 결핍된 식물은 실험적 인공물로, 구조적으로 약화되고, 성장, 발달, 생존력 등에서 비정상적인 것으로 밝혀졌다. 또한 생물적 스트레스와 비 생물적 스트레스 모두에 민감한 것으로 밝혀졌다 (Epstein, 1999). 또한, 44K 마이크로어레이 칩을 이용한 딥 전 사체 분석에 의해 Arabidopsis-powdery mildew pathosystem (아라비도시스 분말 곰팡이 병리계)에서 실리콘의 유익한 효과가 명확하게 확립되었다. 실리콘의 역할은 기계적 장벽에 국한된 것뿐만 아니라 스트레스가 많은 조건에서 전사적 재 프로그래밍 (Transcriptional reprogramming)을 조절하는 것으로 밝혀졌다 (Fauteux *et al.*, 2006). *Isi1* 돌연변이 체 (실리콘 유입 수송체 돌연변이)는 해충 및 병원체에 민감한 것으로 밝혀졌다 (Ma and Yamaji 2015) (그림 2.4). 또한 많은 사람들은 Si가 스트레스 조건을 완화시키는 데 중추적인 역할을 한다고 보고했다 (Richmond and Sussman, 2003; Epstein, 2009; Van Bockhaven *et al.*, 2013).

따라서, 이러한 연구보고에 따라 인삼뿌리썩음병의 개선을 위해 Si를 활용하여 인삼뿌리썩음병 방제용 제제를 개발하고자 본 연구에서 실리카 나노파티클을 활용하고자 하였다.

(가) 천연물을 활용한 실리카 나노파티클의 생산

① 왕겨(Rice husk), 쇠뜨기(Horsetail), 대나무(Bamboo) 및 홍삼박을 이용한 실리카의 순수분리와 실리카 나노파티클의 생산

실리카 나노파티클 생산은 많은 보고들이 있으며 천연소재로부터 생산하는 가장 간단한 생산방법으로 Acid precipitation 과 Alkali extraction 방법을 활용하여 생산하였고(Kalapathy 등, 2000), 그림과 같이 Heat treatment - Acid leaching - Alkali extraction - Acid precipitation - Purification - Dry, Grinding and Calcination로 6단계로 진행하였다(그림54, 55, 56).

**Production of Silica nanoparticles from Rice Husk Ash**

**1. Heat treatment**



Rice husk(RH)



16% RHA from RH

Heat treatment at 800°C for 6hrs

**2. Acid leaching**



Acid leaching for washing out metallic impurities at pH 1(2hrs)



Residues for Alkali extraction

그림 54. 실리카 나노파티클 생산을 위해 사용된 방법에 대한 모식도(1단계)

**3. Alkali extraction**

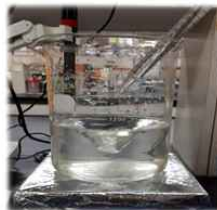


Alkali extraction using 1M NaOH at 100°C(1hrs)



Filtrate for acid precipitation

**4. Acid precipitation**



Adjust pH to 7



Silica gel 형성

그림 55. 실리카 나노파티클 생산을 위해 사용된 방법에 대한 모식도(2단계)

**5. Purification**



Centrifuge at 2500rpm(15min, RT)



**6. Dry, Grinding and Calcination**



Calcination to remove remaining impurities at 600°C for 4 ~ 6hrs



그림 56. 실리카 나노파티클 생산을 위해 사용된 방법에 대한 모식도(3단계)

3종의 실리카가 풍부하다고 알려진 재료(Rice husk, Bamboo, Horsetail)를 이용하여 실리카 나노파티클을 생산하였다. 왕겨 실리카 나노파티클의 경우 왕겨를 직접 사용하였고, 대나무(Bamboo)와 쇠뜨기(Horetail)를 이용한 실리카 나노파티클 생산은 제2협동과제(투엠바이오)로부터 70% Bamboo silicate power와 7% Horsetail silicate powder를 이전받아 실리카 나노파티클을 생산하였다(그림57).

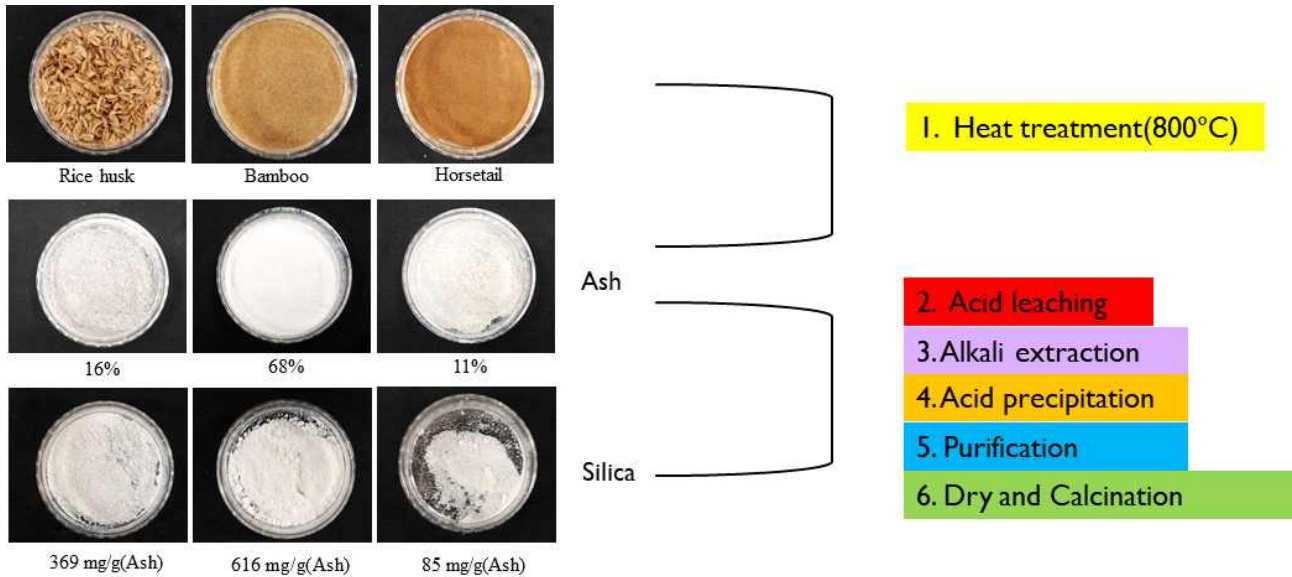


그림 57. Rice husk, Bamboo, Horsetail을 이용한 실리카 나노파티클의 생산

위 그림과 같이 Rice husk와 70% Bamboo silicate 및 7% Horsetail silicate 분말을 Muffle furnace에서 800°C의 온도로 가열하여 회분(Ash)을 얻었을 때 가열전과 비교하여 그 양은 각각 16, 68, 11%로 회분을 얻었고 1g의 회분으로부터 각각 369, 616, 85 mg의 실리카 나노파티클을 얻게 되었다.

### ② 홍삼박을 활용한 실리카 나노파티클의 생산

건강기능성 식품 분야에서 각광을 받는 홍삼은 그 성분을 추출한 후에 버려지거나 가축의 사료용으로 사용되는 경우가 있다. 따라서 산업폐기물인 홍삼박을 활용하여 저렴한 실리카 나노파티클을 생산하는 방안을 검토하고자 시도하였다.

홍삼박의 경우 Silica 함량이 매우 낮아 생산단계에 비해 극히 적은양의 실리카 나노파티클을 얻게 되었고(그림58), 생산하더라도 불순물 제거가 쉽지 않아 대량생산에는 용이하지 않을 것으로 판단되어 소재선정에서 제외하였다.



그림 58. 홍삼박을 이용한 실리카 나노파티클의 생산

(나) 생산된 실리카 나노파티클의 검증

3종의 Silica nanoparticles의 물리화학적 특성을 규명하기 위해 전자현미경과 여러 분석 장비들을 활용하여 분석을 진행하였다.

① 투과전자현미경(TEM)을 이용한 실리카 나노파티클 분석

그림60에서는 3종의 실리카 나노파티클(Silica Nanoparticles, Silica NPs)의 투과전자현미경 사진을 나타내며, Selected area electron diffraction pattern(SAED)은 실리카의 Amorphous(비정질) 특성을 나타낸다. TEM 분석을 위해 Carbon film으로 코팅된 Cu grid가 사용되었다(그림 59).

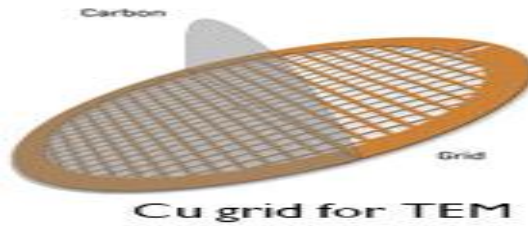


그림 59. 투과전자현미경분석에 사용된 Grid

TEM images of 3 types of silica nanoparticles

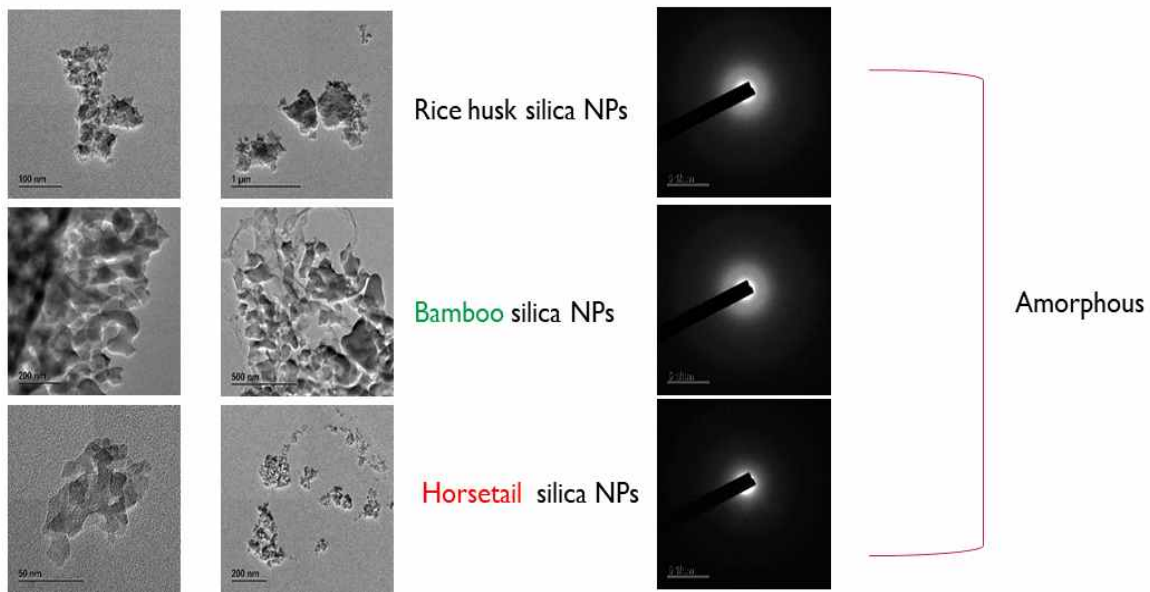


그림 60. 3종의 실리카 나노파티클의 투과전자현미경 사진(좌)과 SAED 패턴 분석결과.

결정은 내부 구조를 이루는 원자나 분자, 혹은 이온(ion)등이 공간에서 주기성을 가지고 규칙적으로 배열된 격자를 이루는 고체 물질이다. 고체 물질 전체가 하나의 결정구조를 이루는 경우 단결정(single crystal), 작은 크기의 여러 결정자(crystallite)가 그레인 경계(grain boundary)를 형성하며 모여 있는 경우 다결정(polycrystal)이라고 하며, 이와는 대조적으로 내부 구조가 규칙성 없이 배열된 물질을 비정질(amorphous)이라고 한다(그림 61).(출처: 네이버 물리학백과)

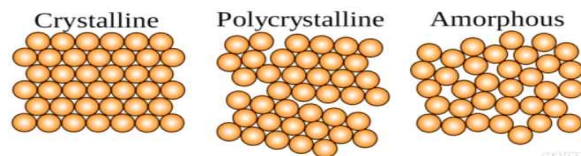


그림 61. 결정, 다결정, 비정질에서의 원자의 배열을 나타낸 개요도

② EDS 및 Elemental mapping을 활용한 실리카 나노파티클 분석

3종의 소재로부터 합성된 실리카 나노파티클이 실제로 Si와 O원소로 구성되어 있는지 확인하기 위해 Energy dispersive x-ray spectroscopy(EDS)와 Elemental mapping 분석을 진행하였다. 그림 16, 17, 18분석 결과는 3종의 나노파티클이 실제로 실리카 나노파티클임을 증명해주었다. 또한 EDS 분석결과는 다른 원소의 오염이 없이 실리카 나노파티클 생산과정 중 정제가 잘되었음을 의미하였고, Cu peak와 C peak가 검출되는 이유는 EDS 분석을 위해 전자현미경에 사용되는 Grid를 Carbon film이 코팅된 Cu Grid를 사용하였기 때문이다(그림.62, 63, 64)

**Rice husk silica NPs**

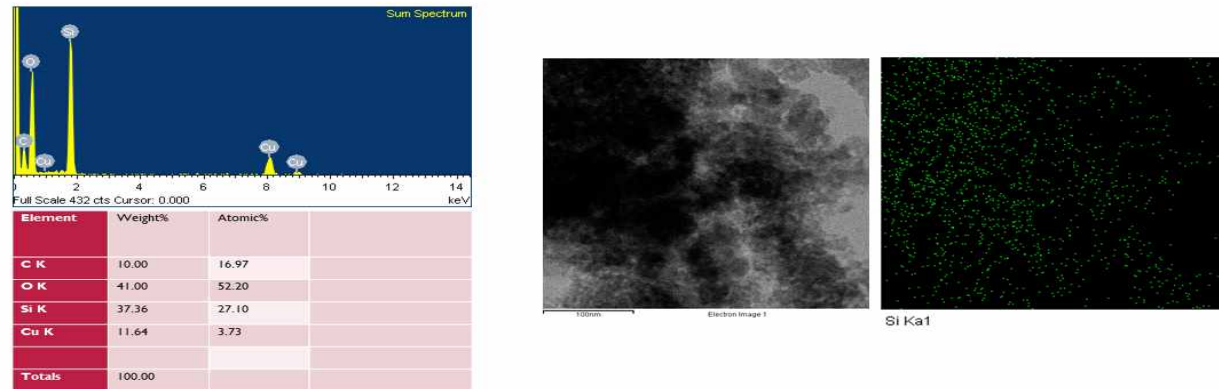


그림 62. Rice husk로부터 생산된 Silica nanoparticles(NPs)의 EDS 및 Elemental mapping 분석 결과.

**Bamboo silica NPs**

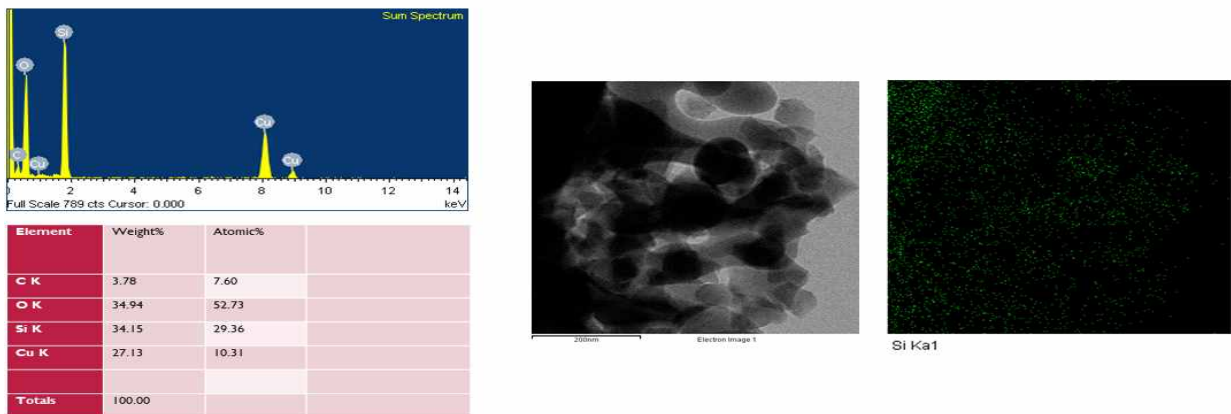


그림 63. 70% Bamboo silicate 분말로부터 생산된 Silica nanoparticles(NPs)의 EDS 및 Elemental mapping 분석 결과.

**Horsetail silica NPs**

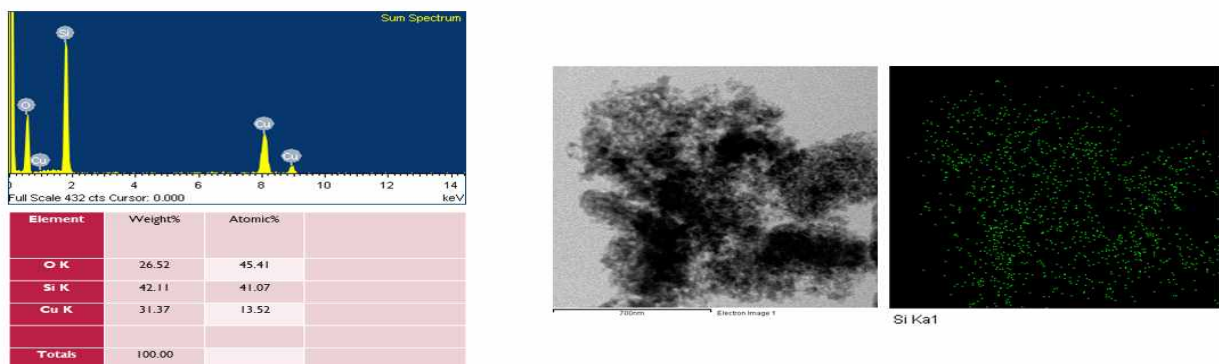


그림 64. 7% Horsetail silicate 분말로부터 생산된 Silica nanoparticles(NPs)의 EDS 및 Elemental mapping 분석 결과.

③ DLS를 활용한 실리카 나노파티클의 입도분석

실리카 나노파티클의 사이즈는 실리카 나노파티클의 흡수와 관련된 아주 중요한 요소이다. 따라서 Dynamic light scattering(DLS) 입도분석기를 이용하여 3종의 실리카 나노파티클의 사이즈를 측정하였고, 그 평균 사이즈는 아래 표와 같이 분석되었다(표45). 또한 그림 65를 보면 사이즈에 대한 분포를 확인할 수 있다.

표 45. Dynamic light scattering(DLS)를 이용한 입도분석결과

Sample		Diameter [nm]	Polydispersity Index
B	1st	317.6	0.149
	2nd	627.1	0.274
H	1st	588.6	0.254
	2nd	507.6	0.222
R	1st	599.0	0.249
	2nd	612.7	0.257

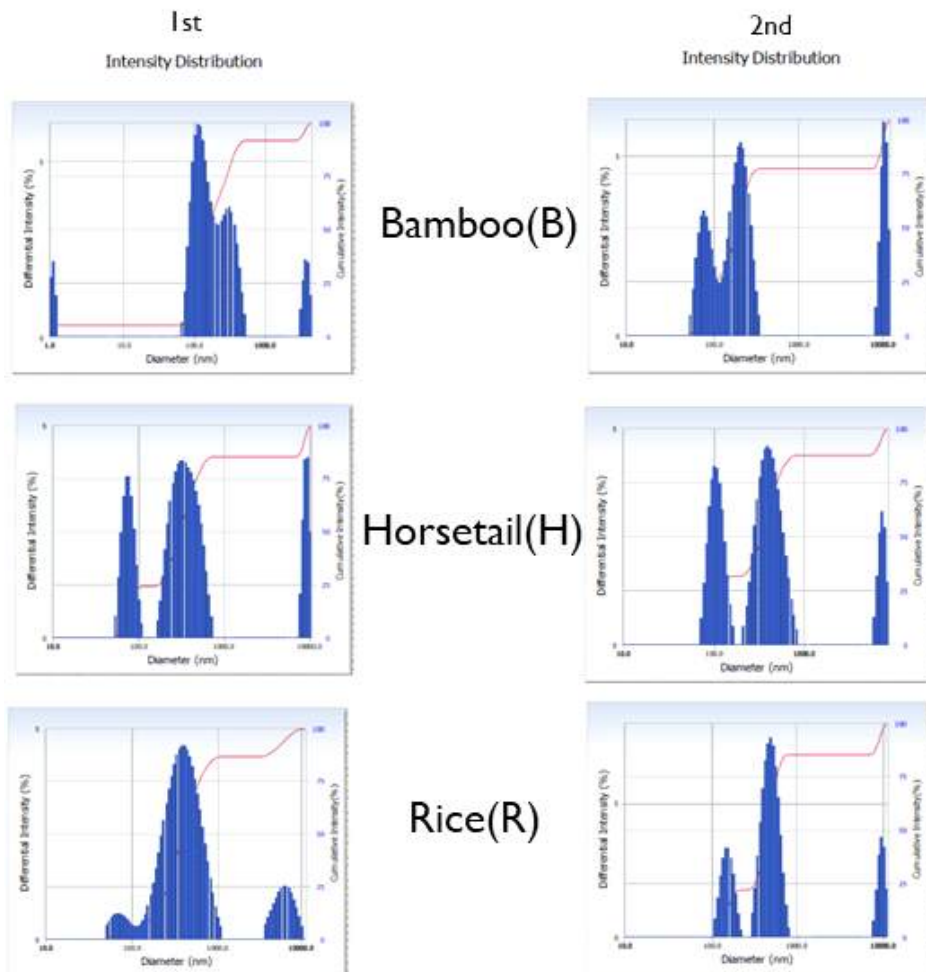


그림 65. DLS를 이용한 3종의 실리카 나노파티클의 사이즈 분포측정

(2) 실리카 나노파티클의 토양점막을 위한 대량생산 및 생물검증

(가) 왕겨, 대나무, 쇠뜨기 등을 이용한 실리카의 원가절감형 대량생산법 개발

실리카 나노파티클을 합성하는 과정에서 발생하는 비용과 절차를 최소화 하고자 Heat treatment - Acid leaching - Alkali precipitation - Acid precipitation - Purification - Dry, Grinding and Calcination의 6단계 과정을 5단계와 4단계로 축소하여 두 가지 가능한 방법을 설계하여 진행하였고, 그 방법은 아래와 같고, 기존 Ash로부터 생산하는 방법은 control로 간주하였다.(각 방법은 20g의 Rice husk를 사용하여 진행하였음)

**Modification(1)** : 1. Heat treatment 과정을 제외한 방법(Ash 생산단계를 생략)

**Modification(2)** : 1. Heat treatment와 2. Acid leaching 과정을 제외한 방법

① 절차와 비용 절감을 위한 실리카 나노파티클의 생산

위 두 가지 방법 모두 Muffle furnace 장비를 이용하여 Ash를 만들지 않았기 때문에 Alkali extraction을 한 후 실리카와 함께 다량의 유기물이 추출되었다. Purification 후에도 Silica gel에 불순물이 남아 있는 상태였다.(그림66). 그러나 Calcination을 한 후에 각 방법으로 생산한 실리카 나노파티클의 표면적인 차이는 없었다(그림 67).

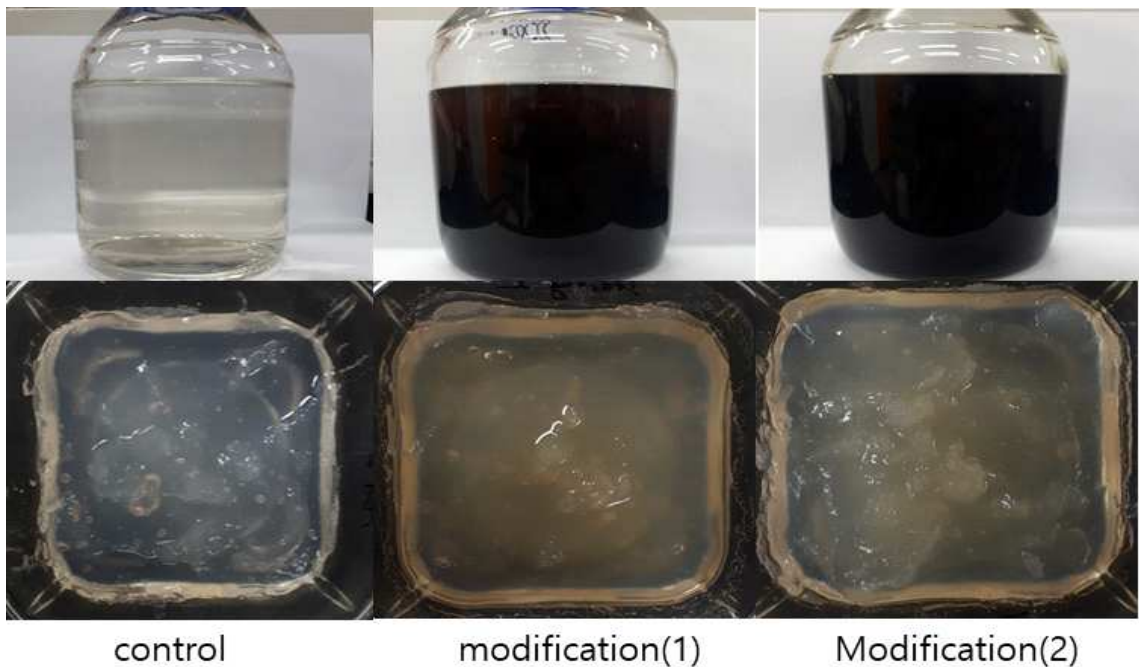


그림 66. Alkali extraction(상)후와 Gel Purification(하) 후의 차이 비교



그림 67. 각 방법을 통해 생산한 실리카 나노파티클의 Calcination(700°C, 6hrs) 후 비교  
 [좌 : control, 중간 : modification(1), 우 : modification(2)]

② 절차와 비용 절감을 위한 방법으로 생산된 실리카 나노파티클의 검증

㉞ 전자현미경을 활용한 실리카 나노파티클의 분석

표면적으로 생산된 실리카 나노파티클의 차이점이 구별할 수 없었기 때문에 전자현미경과, X선회절 분석을 통하여 생산된 실리카 나노파티클에 명확한 차이가 있는지 더 정확하게 확인하였다. 각 분석에 대한 표준물질로는 시중에 판매되는 KONASIL fumed silica(purity ≥ 99.8%) 이 사용되었다. 전자현미경 분석은 FE-TEM, Elemental mapping, EDS를 이용하여 분석을 진행하였다.

투과전자현미경 분석을 진행하였고, FE-TEM 이미지와 SAED 패턴 분석결과를 그림 68에 첨부하였다. SAED 패턴은 표준시료로 사용된 실리카와 마찬가지로 고유의 특성인 Amorphous(비정질)의 특성을 보여주었다.

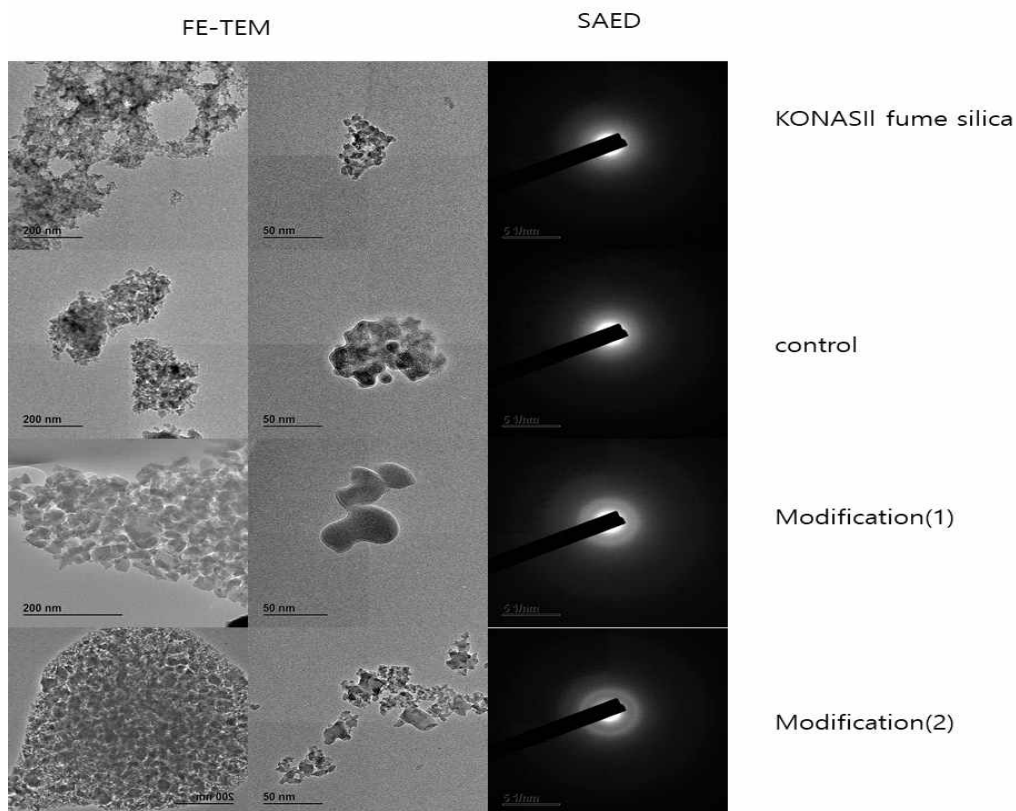


그림 68. 두가지 원가절감형 실리카 나노파티클 생산법에 의해 생산된 나노파티클의 전자현미경 분석 결과



다음으로 Elemental mapping(그림 69)과 EDS 분석(그림 70)을 진행하였고, 결과를 토대로 원가절감형 실리카 나노파티클을 이용한 방법을 이용하여도 실리카 나노파티클 생산 시 다른 불순물 오염으로부터 문제가 없음을 EDS 스펙트럼을 통해 확인하였다. 그림 32의 X선 회절분석(그림 71)은 이를 뒷받침해주었다.

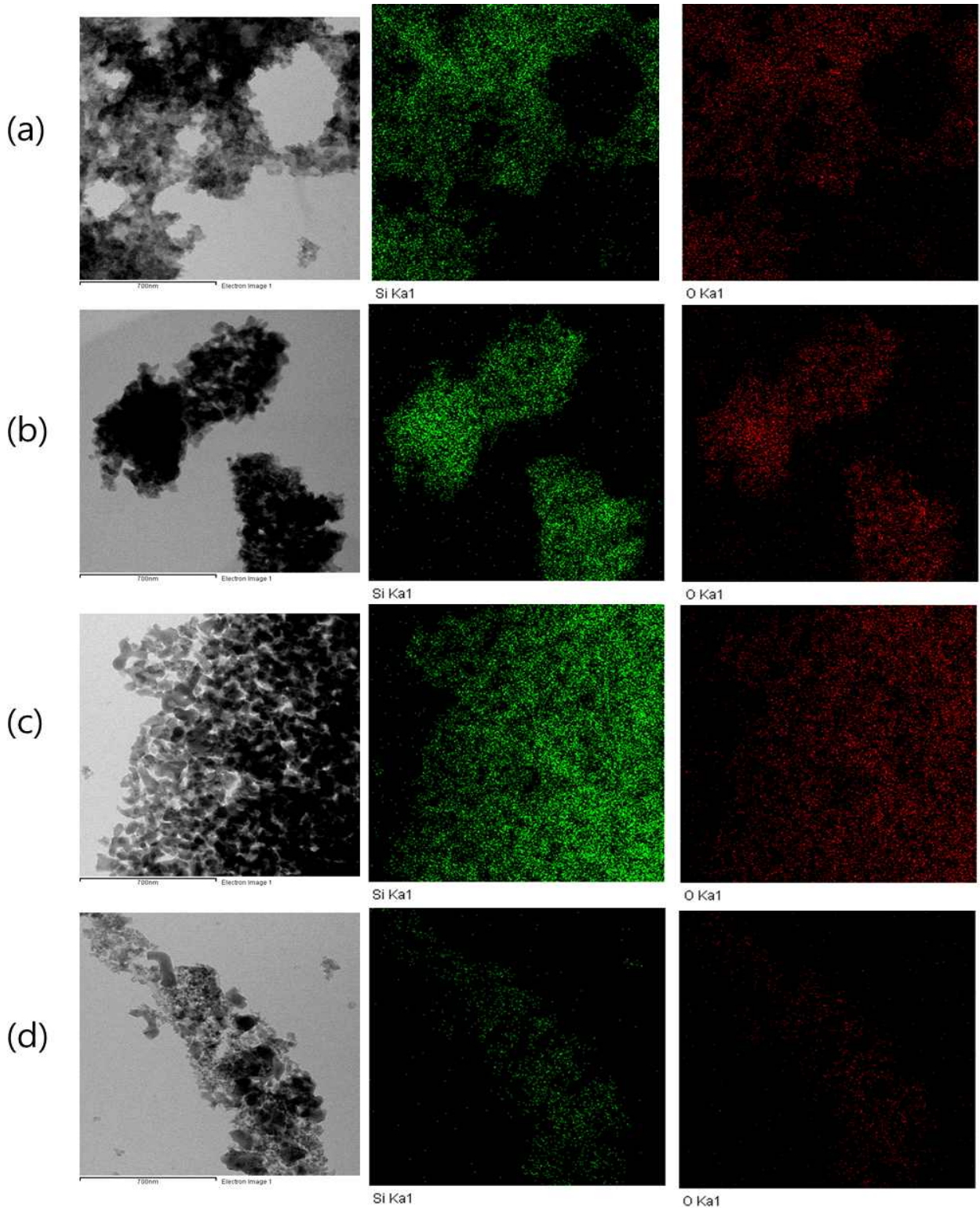
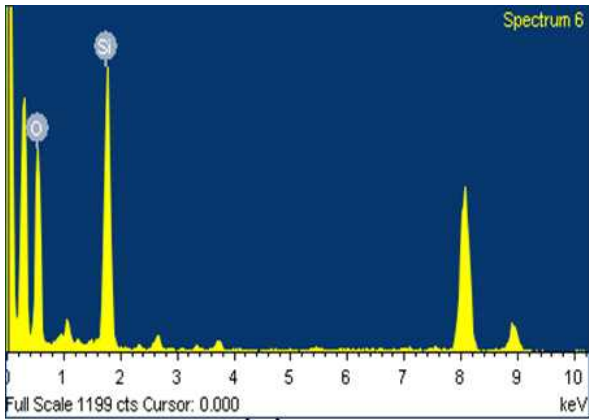
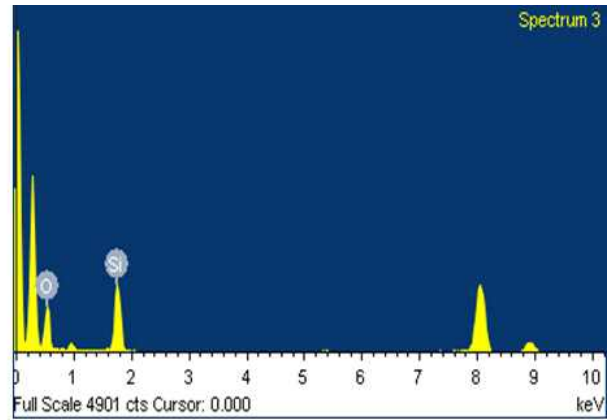


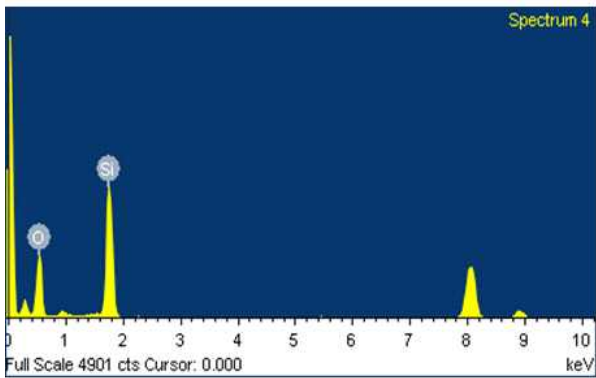
그림 69. 두가지 원가절감형 실리카 나노파티클 생산법에 의해 생산된 나노파티클의 전자현미경 Elemental mapping 분석 결과.(a) : KONSIL fumed silica, (b) : control, (c) : Modification(1), (d) : modification(2), 녹색 : Si 원소분포, 붉은색: O 원소 분포.



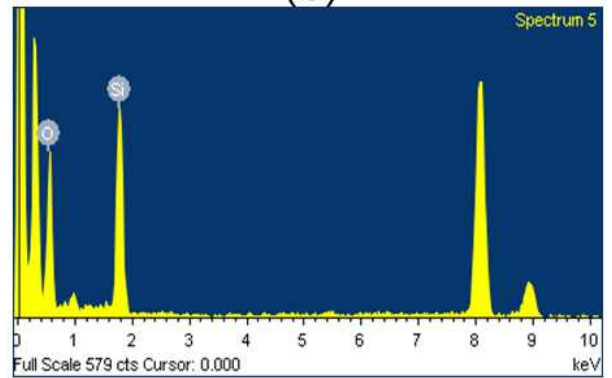
(a)



(b)



(c)



(d)

그림 70. 원가질감형 실리카 나노파티클 생산법에 의해 생산된 나노파티클의 전자현미경 EDS 분석 결과.(a) : KONASIL fumed silica, (b) : control, (c) : Modification(1), (d) : modification(2)

㉔ X-선 회절분석법(X-ray diffraction)

다음으로 X선 회절 분석법(XRD)를 수행하였다. X선을 결정에 부딪히게 하면 그중 일부는 회절을 일으키고 그 회절각과 강도는 물질 구조상 고유한 것으로서 이 회절 X선을 이용하여 시료에 함유된 결정성 물질의 종류에 관한 정보를 알 수 있다. 따라서 같은 물질이면 같은 XRD 패턴을 갖게 되므로 원가절감형 실리카 나노파티클 생산방법에 의해 생산된 나노파티클이 기존방법과 순도의 차이가 있는지 확인하기 위해 수행되었다. X-선회절분석 패턴은 상기의 방법으로 생산된 실리카 나노파티클의 순도의 차이가 거의 없음을 나타내었다(그림71).

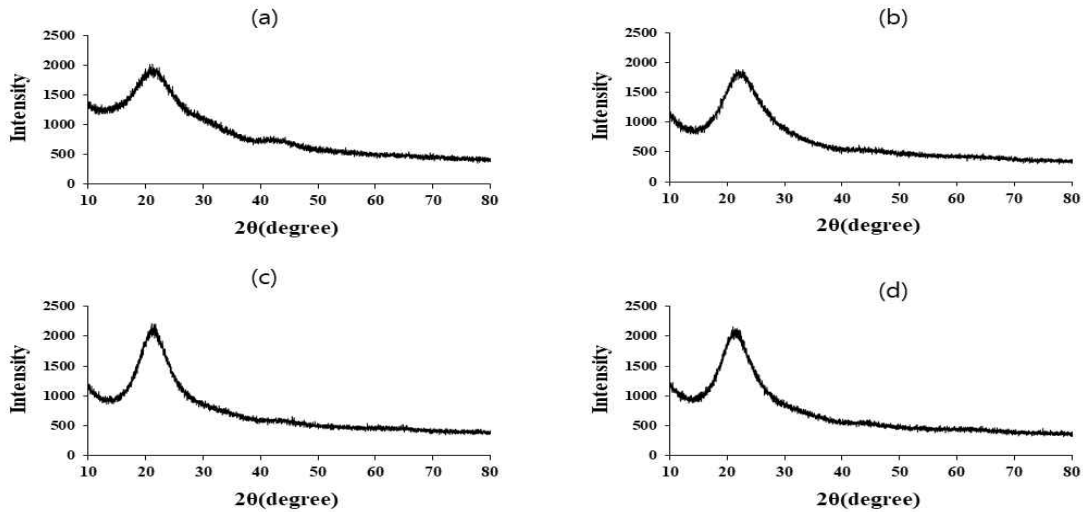


그림 71. 원가절감형 실리카 나노파티클 생산방법에 의해 생산된 나노파티클의 XRD 분석 결과.(a):KONASIL fumed silica, (b):control, (c):Modification(1), (d):modification(2)

㉔ 원가절감형 실리카나노파티클의 대량생산을 위한 최종방법 선정

각각 20g의 Rice husk를 이용하여 20g Rice husk으로부터 생산된 실리카 나노파티클의 무게를 측정하여 20g의 Rice husk로부터 생산된 실리카 나노파티클의 수득률(yield)을 계산하였고, 아래 그래프와 같은 결과를 얻었다. 따라서 제안된 원가절감형 실리카 나노파티클 생산 방법은 수득률의 많은 차이 없이 비슷한 순도를 가진 실리카 나노파티클을 생산할 수 있었다.

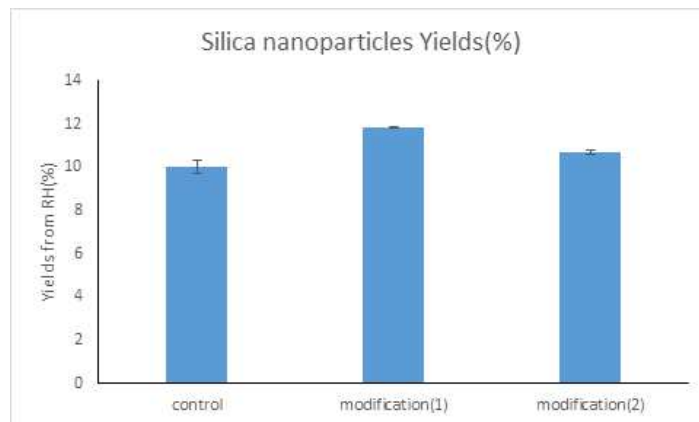


그림 72. 원가절감형 실리카 나노파티클 생산방법과 기존 방법과의 수득률 비교.

결론적으로, 실리카 나노파티클의 생산을 위해 고온처리를 하여 왕겨재를 만들지 않아도 실리카 나노파티클 생산이 가능하며, Acid leaching 과정 대신 이후에 Purification과정에서 충분히 금속성 불순물들을 정제할 수 있었음을 알 수 있었다.

따라서 그림 73과 같이 Alkali extraction에 Rice husk를 바로 이용하여 실리카 나노파티클을 생산하는 방법을 사용하면 보다 원가절감과 대량생산에 상당한 도움이 될 것으로 판단되었다.

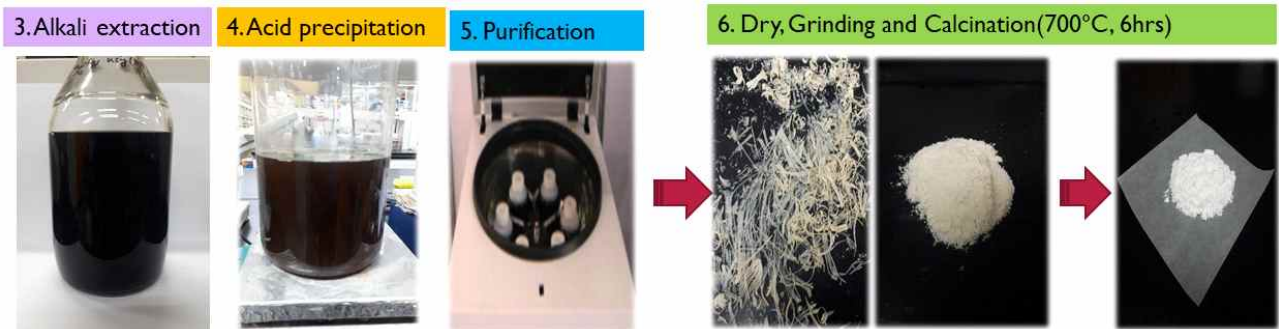


그림 73. 왕겨로부터 바로 생산 가능한 원가 절감형 실리카 나노파티클 생산 방법

(나) 개발된 3종 실리카 나노파티클의 *In planta* pot test에서 *Ilyonectria mors-panacis* 저항여부확인

① 고병원성 인삼뿌리썩음병원균인 *Ilyonectria mors-panacis*의 토양 접종을 위한 배지 제조 및 배양

㉞ V8 broth의 제조

V8 broth의 제조는 (Kernaghan 등, 2007)의 방법을 modification하여 사용하였다. 먼저 시중에 판매되는 V8 vegetable juice를 이용하여 만든 배지를 사용하여 배양되었다. V8 Broth media의 제조는 V8 juice를 원심분리하여 얻은 상층액을 5배 희석한 후 Chloramphenicol을 100mg/l의 양을 첨가하여 250 삼각플라스크에 150ml씩 배지를 분주 후, 멸균하여 *I. mors-panacis*를 같은 양을 각 플라스크 액체 배지에 동일량을 접종하여 25°C의 온도 교반기에서 14-17일 현탁 배양한 균주를 토양감염에 사용하였다(그림 74). 고병원성 균주인 *I. mors-panacis*는 먼저 Potato dextrose agar(PDA)배지 및 25°C에서 배양하였고, 동일 사이즈로 균주를 cutting한 후 동일양(5개의 disc 사이즈)을 각 플라스크의 V8 배지에 접종하였다.

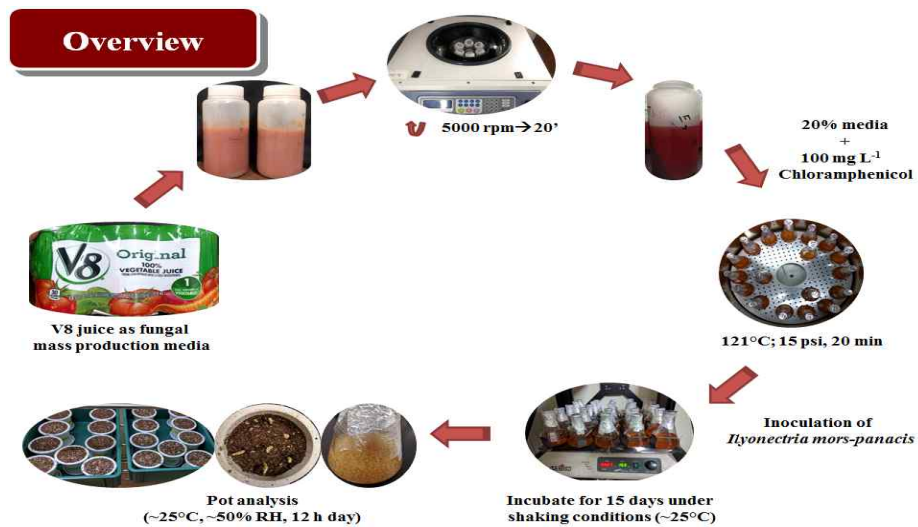


그림 74. *I. morspanacis*배양을 위한 배지 제조 및 배양 모식도

㉔ Pot test를 위한 인공토양의 제조와 토양 감염

위의 배양방법으로 배양된 고병원성 균주를 여과하여 얻은 균주 pellet 13g을 멸균수 40ml과 희석하여 Blender에 넣고 균일화 한 후 50ml의 균주 접종액을 만들 수 있는데, 이 중 24ml을 인공토양 (Vermiculite:perlite:peatmoss = 3 : 1 : 1)을 제조 후 이 인공토양 480g과 멸균수 360ml을 함께 넣고 균일하게 희석하여 감염토양을 제조하였고 그 모식도는 아래 그림과 같다..(인공토 100g당 접종액 5ml). 토양제조시 고병원성 균주 접종액을 넣지 않은 토양은 건전토양(대조군토양)으로 사용하였다(그림 75).

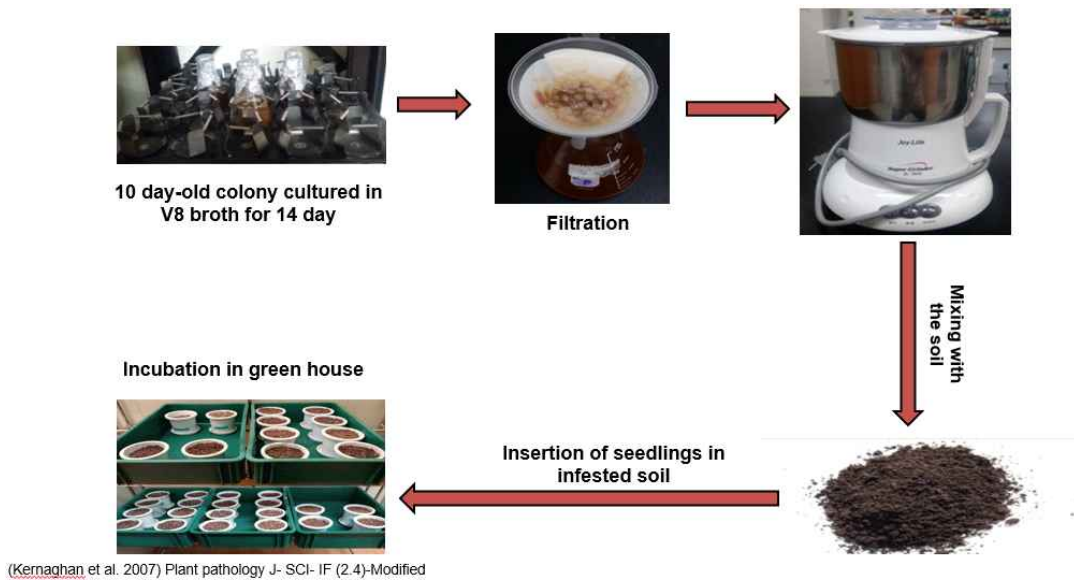


그림 75. *I. mors-panacis* 토양 감염에 대한 모식도

② *In planta* pot test에서 *Ilyonectria mors-panacis* 뿌리썩음병 저항성 여부확인

㉞ Rice husk로부터 생산된 실리카 나노파티클의 뿌리썩음병 저항성 여부확인

본 실험에서는 Rice husk로부터 생산된 실리카 나노파티클을 사용하였고, 1mM과 2mM 농도의 실리카 나노파티클(N-SiO<sub>2</sub>)를 처리하여 Pot내에서 실험을 진행하였다. 실리카 나노파티클의 처리는 위에서 감염 토양 및 비감염토양을 제조할 때 희석한 멸균수에 최종농도를 1mM과 2mM로 하여 토양희석 시 처리하였다. 1년생 묘삼을 Pot 내에서 4, 8, 16, 30일간 25°C의 온도와 50% 습도로 재배 후 수확하여 Disease severity index(DSI), Dried weight, Major ginsenoside 함량을 측정하였다. DSI는 30일 감염 묘삼을 이용하여 관찰하였고, 다음과 같은 이전 실험에서 사용한 같은 공식에 의해서 계산하였고, 그 척도에 대한 내용을 표46에 표시하였다. Total major ginsenoside 함량의 경우는 환류추출기를 이용하여 80% 메탄올로 70°C에서 1시간씩 두 번 추출하였다. 그 다음 45°C에서 감압농축하고, 20ml 증류수에 희석 후 20ml의 수포화 부탄올과 희석하여 부탄올 분획을 모아 감압농축하여 Crude ginsenosides를 얻었다. 이것을 HPLC grade 메탄올 1ml에 희석하고, Agilent 1260 infinity HPLC system을 이용하여 C18 column, water and acetonitrile을 전개용매로 하여 HPLC를 통해 major ginsenoside 함량을 측정하였다.

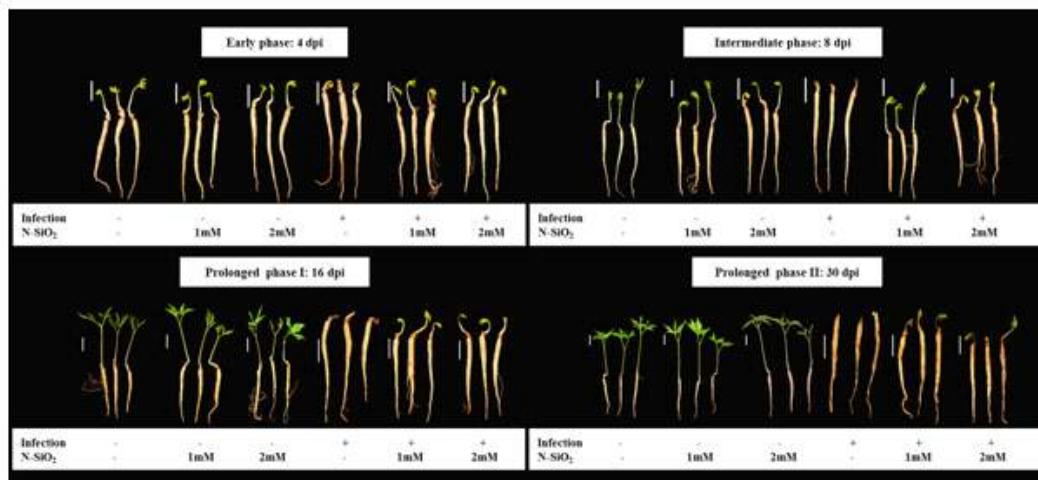


그림 76. *I. morspanacis*의 감염 처리 일수(4, 8, 16, 30일)별 뿌리썩음병 발병 및 억제 효과. Scale : 2cm

표 46 . Description of scaling for Disease severity index(DSI)

Scale	Description
1	Roots are healthy with fine roots and well grown shoot
2	Healthy roots with well grown shoot
3	Bottom portion of the root is rotten and shoot is present
4	Half rotten root with shoot
5	Fully rotten root with shoot
6	Completely dead root without any shoot

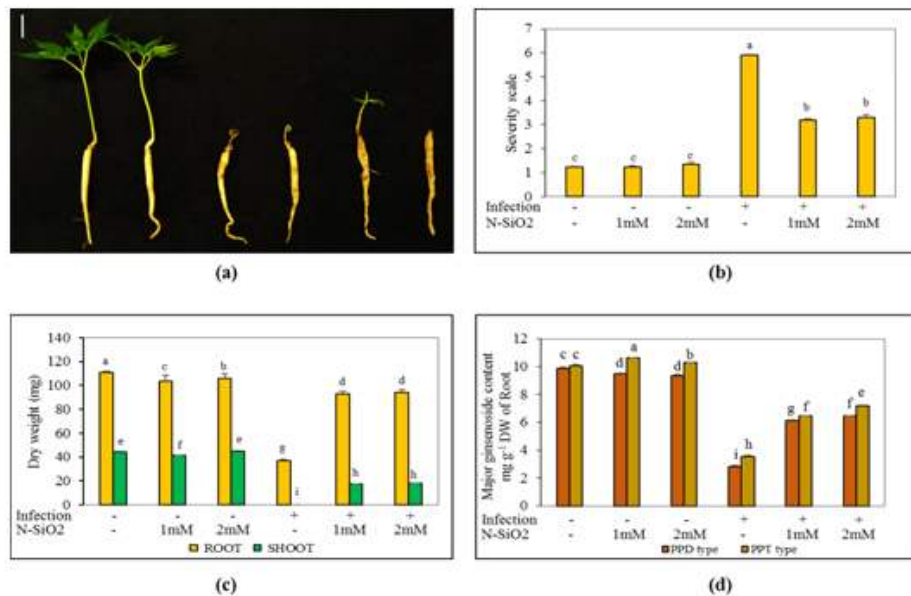


그림 77. 나노실리카 처리 시 뿌리썩음병에 대한 억제 효능. (a) 30일 감염 처리 시 묘상에서 뿌리썩음병 발병 정도 단계(1~6), Scale : 2cm. (b) Disease Severity Index (C)뿌리와 지상부의 건조 중량 (d) Total major ginsenoside profile in roots. PPD type : Rb1+Rc+Rb2+Rd; PPT type : Rg1+Re+Rf.

건전토양(비감염 토양)에서 실리카 나노파티클 처리시 DSI, Root와 Shoot dried weight 및 Total major ginsenoside 함량에서 유의한 차이를 보이지 않았으나, 감염토양에서는 병증이 두드러지게 나타났고, 병증의 증가로 DSI가 월등히 증가했고, root 및 Shoot의 dried weight의 소실과 Ginsenoside 함량이 현저히 줄어든 반면에, 감염된 토양에서 실리카나노파티클의 처리시 병증의 억제효과로 인해 DSI가 월등히 감소했고, root 및 Shoot의 dried weight의 회복과 함께 Ginsenoside 함량이 현저히 증가하였다. 하지만 실리카 나노파티클 처리에서 1mM과 2mM처리는 유의한 차이를 보이지 않았다(그림77).



위 실험의 추가로, 실리카 나노파티클 분석 시 사용한 시중에 판매되는 Fumed silica nanoparticle(purify  $\geq 99.8$ )대조군으로 하여 본 연구에서 Rice husk로부터 생산된 실리카 나노파티클의 병저항성 비교를 위해 2mM의 같은 농도로 각 실리카 나노파티클을 처리하여 1년생 묘삼에서 나타나는 뿌리썩음병의 정도를 비교하였다. 그 결과 본 연구에서 Rice husk로부터 생산된 실리카 나노파티클이 Fumed silica nanoparticle보다 뿌리썩음병 억제 효과가 우수함을 알 수 있었다(그림 78).

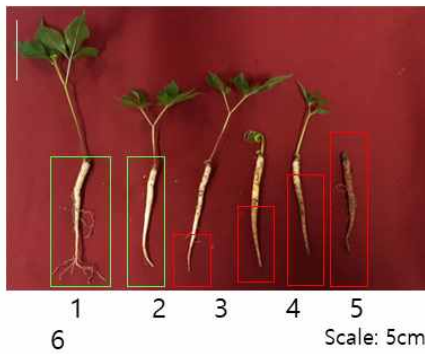


Table. Description of scaling for DSI

Scale	Description
1	Roots are healthy with fine roots and well grown shoot
2	Healthy roots with well grown shoot
3	Bottom portion of the root is rotten and shoot is present
4	Half rotten root with shoot
5	2/3 rotten root with shoot
6	Completely dead root without any shoot

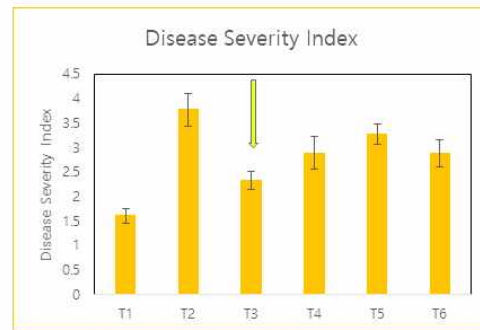
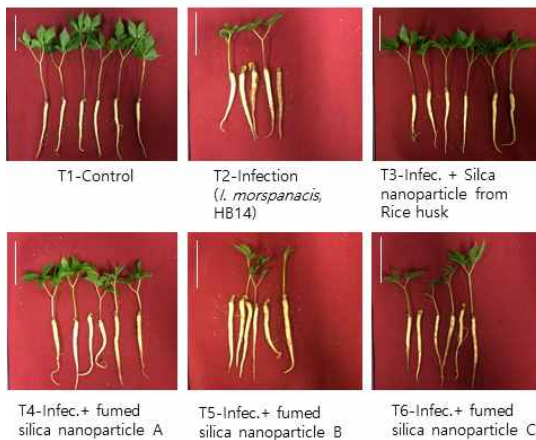


그림 78. Rice husk로부터 생산된 실리카 나노파티클과 Fumed 실리카 나노파티클 처리 시 뿌리썩음병 억제 비교.

㉔ 왕겨(Rice husk), 대나무(Bamboo), 쇠뜨기(Horsetail)로부터 생산된 3종 실리카 나노파티클 처리 시 뿌리썩음병 억제 비교

생산된 3종 실리카 나노파티클을 처리하여 인삼뿌리썩음병 억제 정도를 비교하였다. 실리카 나노파티클의 비교에 추가하여 제2협동기관으로부터 이전받은 70% Bamboo silicate 와 7% Horsetail silicate를 직접 처리에 활용하여 함께 비교하였다. 그 결과 3종 실리카 나노파티클 처리 시 비슷한 억제 효과를 보였고, 2mM처리와 1mM 처리 시 억제효과의 큰 차이를 보이지 않았기 때문에 이후 실험시 실리카 나노파티클 처리는 1mM로 고정하였다. 그리고 Horsetail 실리카 나노파티클의 경우 왕겨로부터 생산된 실리카 나노파티클과 비슷한 효과를 보이지만 생산 스투클이 저조하여 이후 제형화 및 산업화위해서는 부적절하여 왕겨 실리카 나노파티클 과 억제 효과가 비슷한 7% Horsetail silicate 분말을 직접 사용하고자 하였다. 7% Horsetail silicate의 뿌리썩음병 억제 수준이 실리카나노파티클과 비교하여 비슷한 결과를 보인 이유는 2mM의 농도는 SiO<sub>2</sub>의 몰농도를 기준으로 처리하였기 때문에 나머지 93%의 유기물이 묘삼생육에 영향을 미친 것으로 사료된다(그림 79, 80).

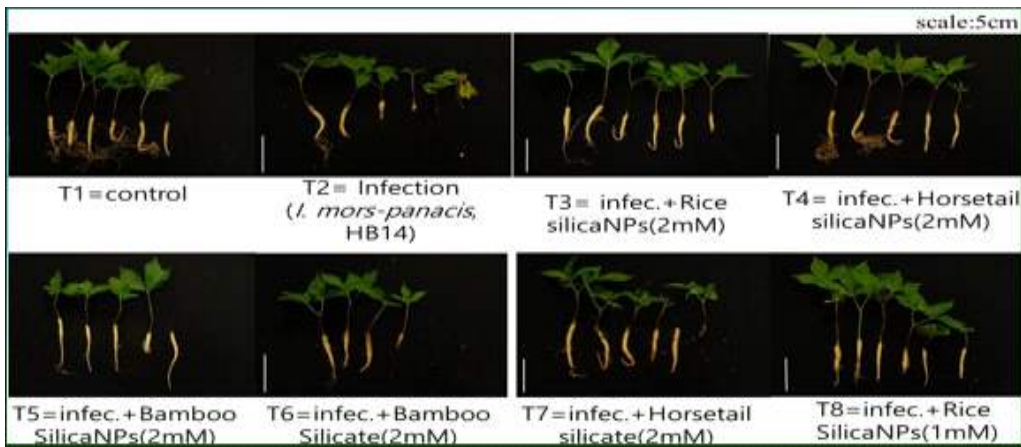


그림 79. 3종 실리카나노파티클 처리 시 뿌리썩음병 억제 비교.

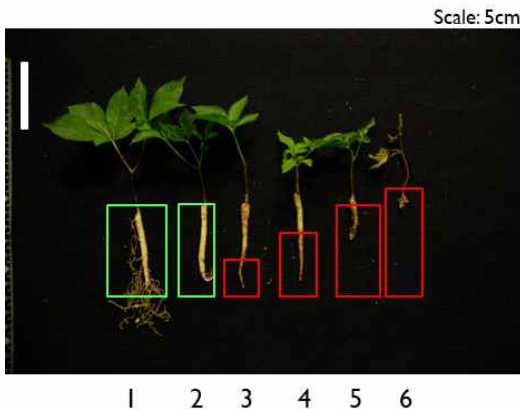


Table. Description of scaling for DSI

Scale	Description
1	Roots are healthy with fine roots and well grown shoot
2	Healthy roots with well grown shoot
3	Bottom portion of the root is rotten and shoot is present
4	Half rotten root with shoot
5	fully rotten root with shoot
6	Completely dead root without any shoot

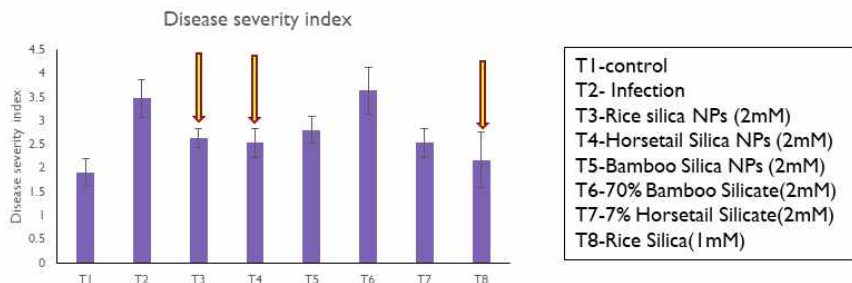


그림 80. 3종 실리카나노파티클 처리 시 뿌리썩음병 억제 비교(계속).

라. 실리카 나노파티클을 처리한 인삼에서의 병 저항성증대 메커니즘 검증

(1) 식물과 병원균의 상호작용 및 병원균의 감지

식물 병원체, 특히 곰팡이 균은 총체적으로 PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns)라고 불리는 elicitor를 분비한다. 이는 식물이 병원체를 감지하는 초기 신호이다. 이들은 일반적으로 PRR (Pattern Recognition Receptors)에 의해 인식되며 하류 방어 관련 신호 연속단계(Downstream defense related signal cascade)가 식물에서 활성화된다. PRR은 표면 국소화 된 RK (Receptor kinases) 또는 RLP (Receptor like proteins, 수용체 유사 단백질)이며, 전자는 ligand-binding ectodomain, single-pass transmembrane domain, and intracellular kinase domain을 보유하고 있으며, 후자는 또한 유사한 구조를 갖지만, intracellular kinase domain이 결여 되어있다 (Macho and Zipfel, 2014; Zipfel, 2014). 이 방어 반응은 PAMP에 의해 유발되므로, 이 방어 모드를 PTI (Pattern Triggered Immunity)라고하며 첫 번째 방어선이다 (그림 81).

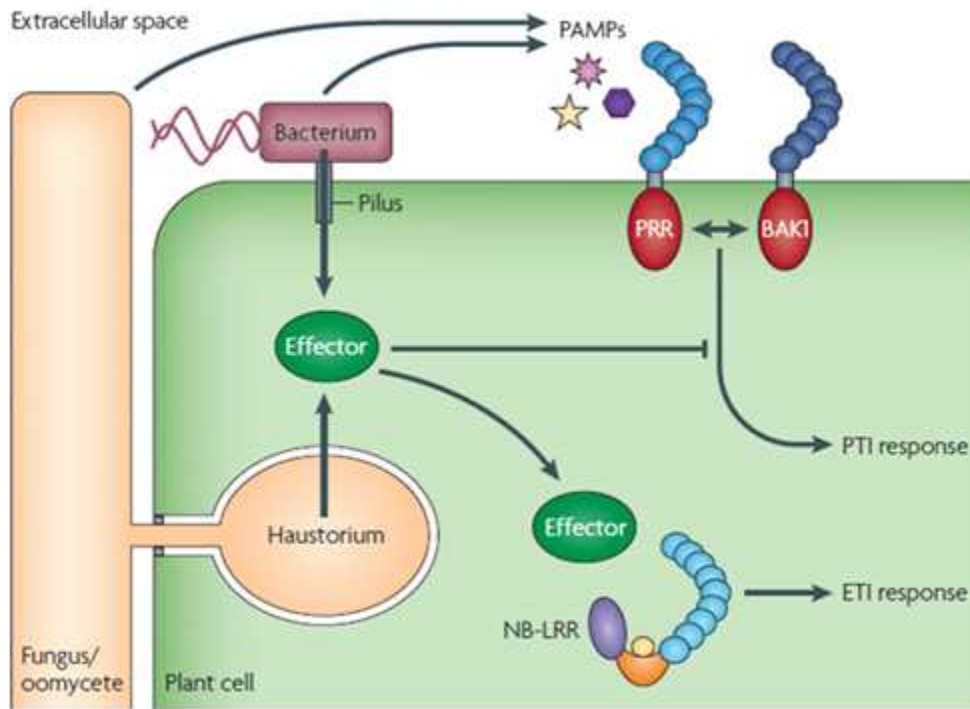


그림 81. Plant-pathogen interaction. Adepted from Dodds & Rathgen, 2010, Nature Reviews Genetics. 11(8):539-548

병원성 곰팡이가 공격적 일 때, PTI를 극복하고 'Effector'를 세포로 분비한다. 이 Effector를 처리하기 위해 식물은 ETI(Effector Triggered Immunity)를 활성화합니다. NB-LRR (Nucleotide binding Leucine Rich Repeats) 수용체는 ETI를 활성화시키는 다형성 세포 내 수용체(polymorphic intracellular receptors)이다. 그것은 PTI에 의해 매개 된 기초 전사 재 프로그래밍(basal transcriptional reprogramming)의 증폭을 초래하여 방어 반응의 촉진을 가능하게 한다 (Cui *et al.*, 2015).

## (2) 식물호르몬에 의한 방어체계

PTI와 ETI에서 발생하는 유전자 발현 특징은 거의 비슷하지만 정도와 크기가 다르다.(Pitzschke *et al.*, 2009). 병원체 탐지와 관련된 전략은 잘 정립되어 있지만 즉각적인 Downstream signaling은 확실한 증거가 부족하다. 그러나, downstream 방어 반응, 특히 SA (살리실산), JA (자스몬 산) 및 에틸렌 (ET) 매개 경로와 같은 호르몬 경로가 잘 확립되어있다. (Dodds and Rathjen, 2010).

RNA seq.에 의한 주기적인 전체 전사체 분석은 JA와 ET가 인삼 뿌리썩음병 시스템에서 주로 활성화됨을 보여 주었다 (Gao *et al.* 2016). JA는 옥시리핀(Oxylipins)으로 불리는 지질 유래 산화 화합물(lipid derived oxygenated compounds)에 속하며 이의 생합성은 LOX (Lipoxygenase)에 의해 개시된다. 이는 스트레스 반응을 포함한 다양한 생물학적 과정에 관여한다(Seilaniantz *et al.*, 2011). 유전적 스크리닝 접근법은 JA signaling에 대한 잠재적인 negative regulator 역할을 하는 단백질을 포함하는 12 JAZ (JASMONATE ZIM) domain의 family를 밝혀냈다. AtMYC2는 JA 매개 downstream transcriptional reprogramming을 위한 Master regulator인 것으로 밝혀졌다. 세포에서 더 낮은 JA 농도에서, 보존된 TIFY 도메인을 함유하는 JAZ 단백질은 AtMYC2와 결합하여 JA 신호 전달을 차단한다. 더 높은 JA 농도에서, JAZ는 분해되므로, AtMYC2는 JA 신호 전달을 활성화시킨다. 최근 PgLOX6는 *Panax ginseng*에서 JA 생합성의 전구체로 확인되었다. 또한, PgMYC, PgDELLA, PgWRKY22, PgERF3 등은 JA 반응 전사 인자 및 JA 매개 진세노사이드 생합성의 조절에 관여하는 잠재적 후보 인 것으로 밝혀졌다 (Rahimi *et al.*, 2016).

에틸렌은 기체성 식물호르몬이며 진세노사이드 축적을 매개하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (Broekgaarden *et al.* 2015). 초기에, ACC synthase에 의한 아테노 실 메티오닌으로부터의 1- 아미노 사이클로 프로판 -1- 카복실산의 합성에 이어 ACC oxydase에 의한 산화는 에틸렌의 생합성을 나타낸다. 진균 세포벽 유래 elicitor인 Cle는 ACC oxydase 활성을 유도하는 것으로 보고되어 에틸렌의 생성을 초래하고, 놀랍게도 SS (Squalene synthase), SE (Squalene epoxidase) 및  $\beta$ -AS( $\beta$ -Amyrin synthase)의 축적을 통해 더 높은 진세노사이드 합량을 기록하였다 (Xu *et al.*, 2005).

Silicon의 보호 역할은 Arabidopsis-powdery mildew pathosystem에서 잘 보고되었고, 방어 관련 유전자를 유도하고 동시에 1차 대사의 균형을 유지하는 것으로 입증되었다 (Fauteux *et al.*, 2006). 마찬가지로 수년에 걸쳐 방어 반응의 역할은 다른 많은 병리 시스템에서도 입증되었다 (Van Bockhaven *et al.*, 2013; Van Bockhaven *et al.*, 2015).

따라서, 위와 같은 보고들을 토대로 하여 실리카 나노파티클을 인삼뿌리썩음병에 적용 시 방어기작을 밝히고자 하였다.

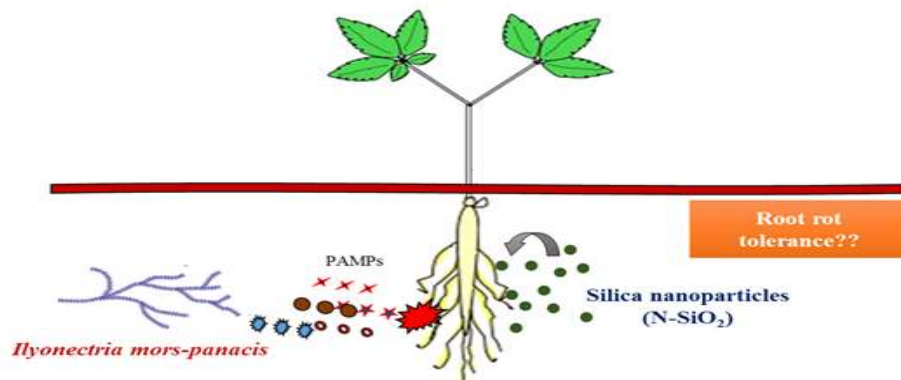


그림 82. Hypothesis: Silica nanoparticles treatment might enhance the tolerance of *Panax ginseng* against *Ilyonectria mors-panacis*

### (3) 실리카 나노파티클이 인삼뿌리썩음병 침투 시 방어기작 검증

#### (가) *In vitro*에서 실리카 나노파티클이 함유된 배지내에서 인삼뿌리썩음병원균의 성장 비교

본 실험에서는 *In vitro* 상에서 나노실리카가 고병원성 인삼뿌리썩음병원균인 *I. mors-panacis*의 성장에 직접적인 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. *I. mors-panacis*의 배양은 PDA에서 진행되었으며, control을 제외한 각 처리군 배지내에는 나노실리카를 각 농도별로 처리하였고, 실험결과 나노실리카는 뿌리썩음병 원인균주에 대한 직접적인 성장 억제 효과는 없었다(그림83).

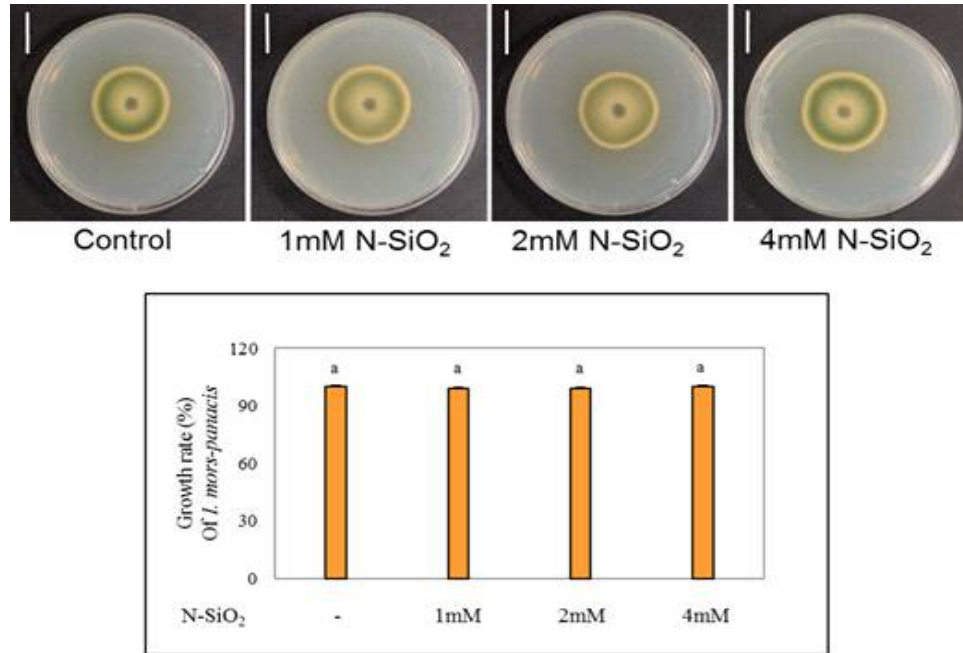


그림 83. 농도 나노실리카 별 처리 시 *I. mors-panacis*에 대한 생장억제 효과 비교. Scale: 2cm.

#### (나) 실리카 나노파티클 처리 시 뿌리썩음병원균에 대한 방어 작용과 관련된 후보유전자 발현 분석

본 후보유전자 발현 비교 분석 실험은 4, 8, 16일간 재배한 1년생 묘삼을 활용하여 인삼뿌리썩음병 감염 시 1년생 묘삼뿌리에서 발생하는 방어 기작관련 후보유전자들의 발현을 비교 분석하였다.

- ① 후보 유전자 분석을 위한 RNA의 추출과 PCR 분석 방법
  - ㉓ About 100 mg of frozen roots were ground in pre-chilled mortar in to fine powder using liquid nitrogen.
  - ㉔ 1 mL of TRI Reagent was added immediately to the homogenized samples and was gently vortexed. The supernatant devoid of tissue debris were collected by centrifugation (13, 500 rpm, 4°C for 5 min).
  - ㉕ Then, by chloroform extraction, DNA, proteins and other metabolites were precipitated, while the RNA remained in the aqueous phase.
  - ㉖ The total RNA was harvested by precipitating it from the aqueous phase using isopropanol.

- ㉞ Exactly, 1  $\mu$ g of DNase treated RNA were reverse transcribed to single stranded cDNA using RevertAid Minus M-MuLV Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions (Fermentas, US).
- ㉟ Quantitative Real-time PCR was performed in a 10  $\mu$ L reaction volume using iQTM SYBR® Green Supermix in a 96 well plate.
- ㊱ The thermal cycler conditions were, initial denaturation for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 10s, annealing for 10s and 72°C for 20s.
- ㊲ The fluorescent product was perceived at the final step of each cycle. It was conducted in CFX connect Real-time PCR detection system (Bio-Rad)
- ㊳ comparative cycle threshold (Ct) values were documented for the target transcripts.
- ㊴ The relative quantity of the target transcript with reference to mock (HC) was determined based on  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Schmittgen and Livak, 2008).
- ㊵ The primer details are compiled in Table

표 47. 이 연구에서 사용된 프라이머 목록.

S. No	Gene	Primer sequence (5'-3')
1	<i>PgSSI</i>	FOR: ATGGGAAGTTTGGGGGCAATTCT
		REV: GTTCTCACTGTTTGTTCAGTAGTAGGTT
2	<i>PgSE1</i>	FOR: AGCAGCAGTTGACAAAGG
		REV: GCCACATTCGTTTTGGTGAAGG
3	<i>PgDDS</i>	FOR: ATGTGGAAGCTGAAGGTTGCTCAAGGA
		REV: TTAAATTTTGAGCTGCTGGTGCTTAGGC
4	<i>PgLOX6</i>	FOR: TATACCCGGCTGGTTTTCTG
		REV: ACTTTGTTCAATTCTAAATCCGAA
5	<i>PgTIFY10A</i>	FOR: GTCGGGCCAAATATCCACAC
		REV: TTTTAGGCTCCATTGCTGCC
6	<i>PgWRKY22</i>	FOR: CCCACAAAGAAATCGTCGTT
		REV: GGTACAAACCGGCACAAGTT
7	<i>PgMYB3</i>	FOR: TTCTCAAAGCTTGCCGACTT
		REV: CCGGGTCCATGATAATTTTG
8	<i>PgSE2</i>	FOR: TTGCACCCCGGAGGATATTG
		REV: AACTCTCCGGCCATCTTTGG
9	<i>PgCAS</i>	FOR: GGAGGAGATCATGGGGGTCT
		REV: TCATGATGGCCCCTGGAGTA
10	<i>PgLAS</i>	FOR: CCAGTGCTTGTGCTTCAACC
		REV: AAGCTTCCACATGCTACCCC
11	<i>PgBAS</i>	FOR: CTACCACCACACTCCGAAGG
		REV: ACCAAGGGCGGAAGGAAAAA

② Silicon influx transporter(*PgLsi1*) 유전자의 발현 비교.

Silicon(Si)의 세포 내 흡수와 관련된 유전자의 발현 정도를 분석하였다. 아래 결과를 보면 건전토양에서 실리카나노파티클(N-SiO<sub>2</sub>) 처리 시 Si 흡수와 관련된 유전자의 발현 정도는 대조군과 거의 비슷하였다. 그러나 *I. morspanacis*에 감염된 토양에서 실리카나노파티클 처리 시 처리전보다 *PgLsi1*의 발현이 월등히 증가함을 알 수 있었다(표 84).

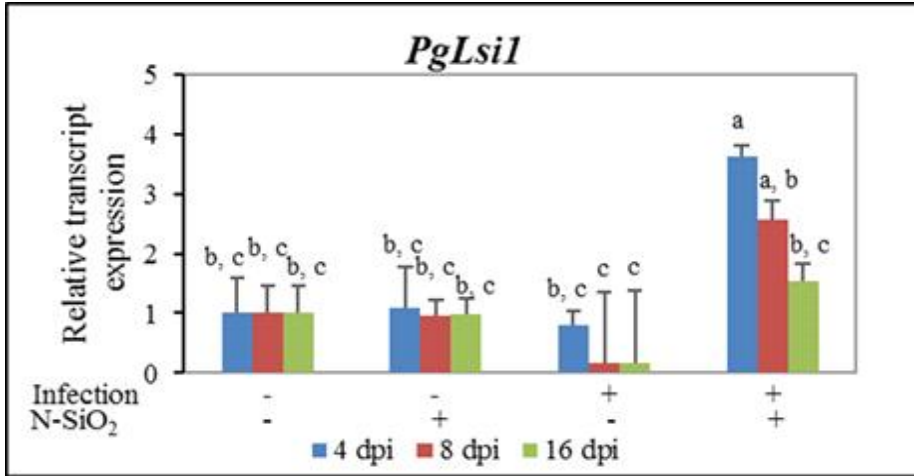


그림 84. Silicon influx transporter(*PgLsi1*)와 관련된 유전자의 발현정도.

③ Jasmonic acid(JA) 생합성과 관련된 유전자들을 비교 분석

Jasmonic acid(JA) 및 Methyl jasmonate 합성과 관련된 유전자들을 비교 분석한 결과, 감염된 토양에서 나노실리카 처리시 JA 생합성과 관련된 유전자(*PgLOX6*)는 감염된 토양에서 나노실리카 처리 시 발현이 증가되었으나, JA signaling repressor와 관련된 *PgTIFY10* 유전자의 경우 발현이 감소되었고, Methyl jasmonate 정량분석 데이터를 토대로 실리카 나노파티클 처리 시 뿌리썩음병에 대한 방어 기작 조절이 이루어졌음을 알 수 있었다(그림 85).

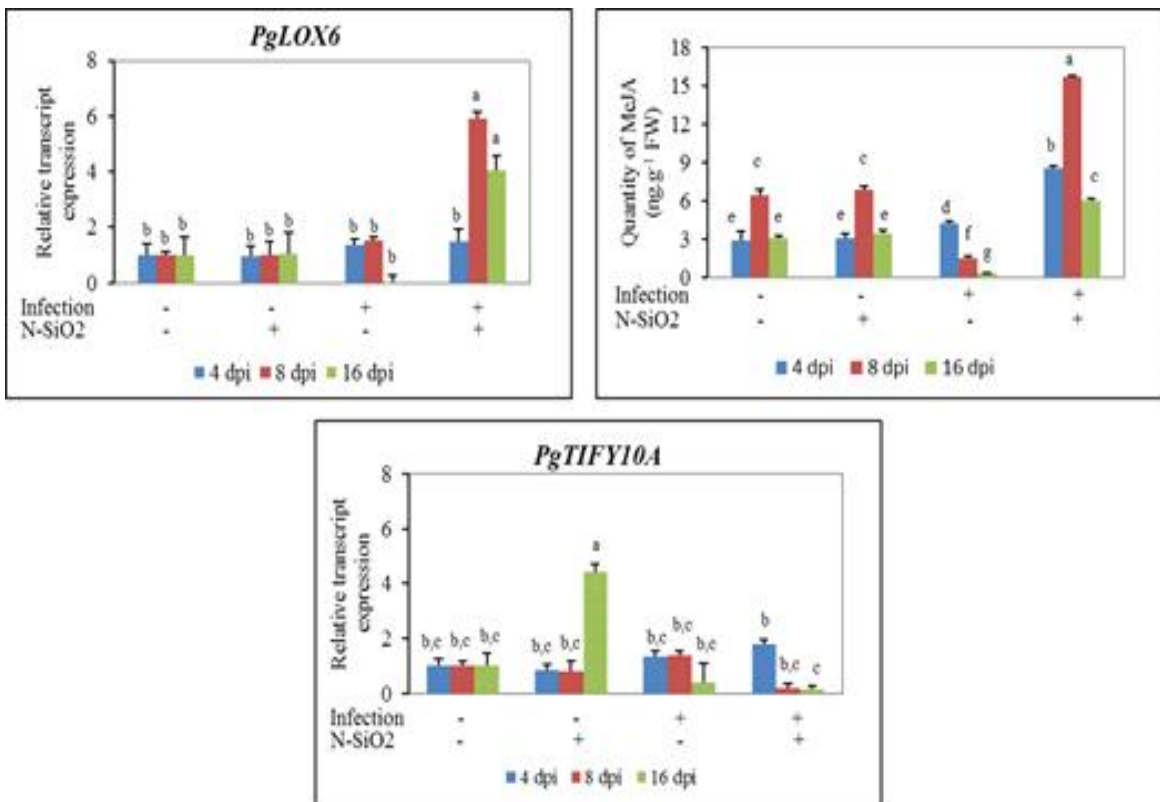


그림 85. JA 생합성, 세포내 신호전달과 관련된 유전자 발현 및 Methyl jasmonate 정량분석.

④ JA 매개 Ginsenoside 생합성 관련 후부 전사 인자들의 발현 분석

JA 매개 Ginsenoside 생합성과 관련된 전사 요소(Transcription factors)들의 발현 정도 알아보았다. 이 결과에서는 4개의 전사요소가 감염처리 일수별 발현 차이를 보였으나, 대부분 유전자에서 발현이 증가되었다(그림 86).

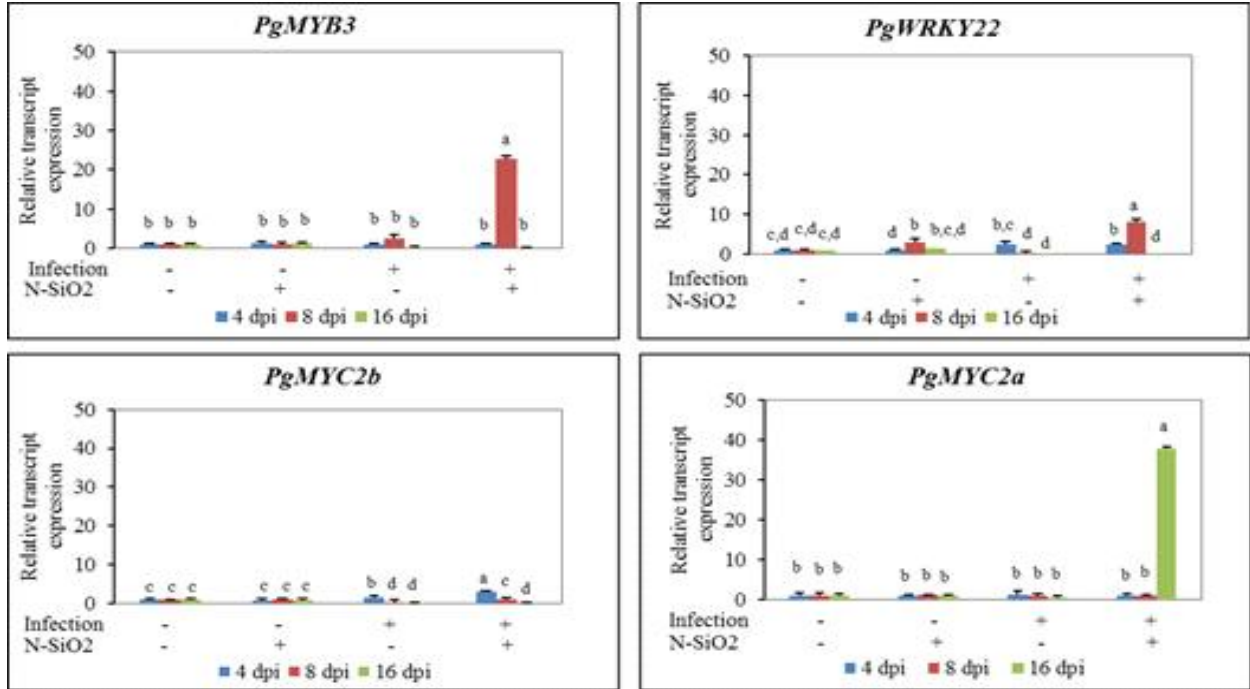


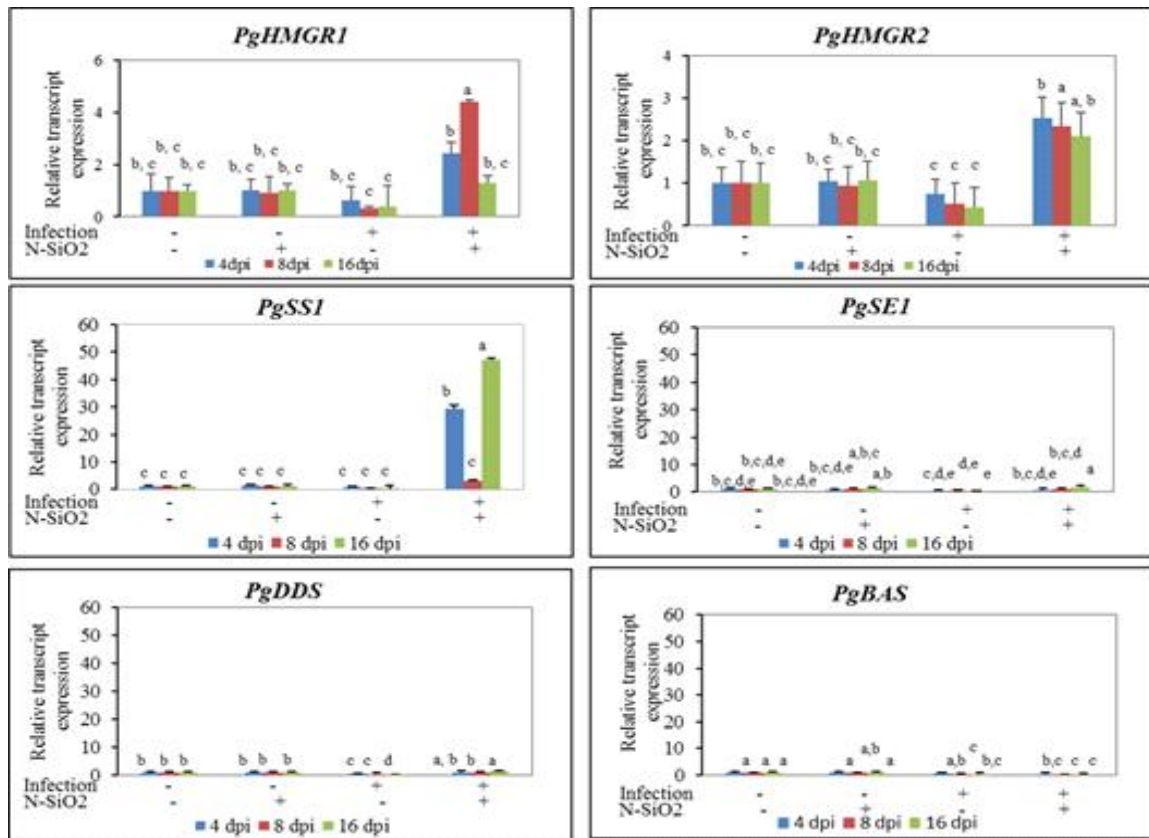
그림 86. JA 매개 ginsenoside 생합성 관련 후보 전사 요소들의 발현 분석.



⑤ Mevalonic acid 경로를 통한 ginsenoside 생합성과 관련된 주요 유전자들의 발현

Mevalonic acid 경로를 통한 Ginsenoside 생합성과 관련된 주요 유전자들의 발현을 분석한 결과 Mevalonic acid 경로의 활성화와 관련된 유전자(*PgHMGR1*, *PgHMGR2*, *PgSSI*)들은 토양 감염 상태에서 실리카 나노파티클 처리 시 발현이 증가되었지만, ginsenoside 생합성 경로에 관련된 세 유전자 중 두 유전자(*PgSE1*, *PgDDS*)들은 발현에 변화가 거의 없었고, 나머지 *PgBAS* 유전자는 발현이 감소되었다.

Mevalonic acid 경로의 활성화와 관련된 유전자 *PgHMGR1*, *PgHMGR2* 및 *PgSSI*의 발현 프로파일은 감염 토양에서 실리카 나노파티클 처리 될 때 메발론산 경로의 활성화를 분명히 나타내었다. 그러나, *PgSE1* 및 *PgDDS*와 같은 진세노사이드 생합성 경로와 관련된 유전자의 발현은 변화가 없던 반면, *PgBAS*는 감염된 상태에서 N-SiO<sub>2</sub> 처리 시 발현이 감소되었다(도 4.8). 반대로, 감염 토양에서 실리카 나노파티클 미 처리시, Upstream genes인, *PgHMGR1*, *PgHMGR2* 및 *PgSSI* 및 진세노사이드 생합성과 관련된 *PgSE1*, *PgDDS* 및 *PgBAS* 유전자 들은 발현이 상당히 감소되었다( 그림 87).



그 87. Mevalonic acid 경로를 통한 ginsenoside 생합성과 관련된 주요 유전자들의 발현.

⑥ Phytosterol과 Apoplast(원형질막 외측의 세포간극)으로의 당유출(Sugar efflux) 및 Pathogen nutrition

㉞ Phytosterol 생합성 관련 유전자들의 발현 분석

Phytosterol은 isoprenoid 유도체이며 필수 막 성분 또는 신호 분자이다.  $\beta$ -sitosterol(24-ethyl-sterols), stigmasterol (24-ethyl-sterols) 및 campesterol (24-ethyl-sterols)은 막 강성(rigidity) 조절에 관여하는 주요 막 성분이다 (Siebers *et al.*, 2016; Valitova *et al.*, 2016). Oxidosqualene은 식물에서 sterol 및 triterpenoid 생합성의 일반적인 전구체이다. 식물은 cycloartenol synthase, CAS에 의해 매개되는 cycloartenol과 lanosterol synthase, LAS에 의해 매개되는 lanosterol를 통해 스테롤 생합성을 위한 이중 경로를 사용한다 (Ohyama *et al.*, 2009).

최근에, 한 연구는 원형질막 물리적 및 화학적 성질의 변화가 식물과 진균의 상호 작용 동안 신호 연속단계(cascade)를 활성화시키는 데 주요한 역할을 한다는 것을 밝혀냈다. 또한, 곰팡이 elicitor인 cryptogein은 스테롤과 결합하여 세포막에서 스테롤을 제거하여 유동성을 증가시켜 병원체 침입에 도움을 주었음을 발견하였다 (Sandor *et al.*, 2016). 또한, 또 다른 연구는  $\beta$ -sitosterol을 stigmasterol로 전환 시키는데 관여하는 C22-스테롤 탈포화효소(C22-sterol desaturase)인 AtCYP710의 과발현(over expression)은 apoplast(원형질막 외측의 세포간극)로 영양소 유출을 조절함으로써 숙주 병원체에 대한 내성을 향상 시켰다는 것을 입증했다 (Wang *et al.*, 2012)

위 연구보고들을 토대로 Phytosterol관련 유전자들을 분석하였고, Sterol 생합성과 관련된 유전자 (*PgSE2*, *PgCAS*, *PgLAS*, *PgCYP51*)들의 발현정도를 비교분석하였다. 결과를 보면 *I. mors-panacis*에 감염 시 관련 유전자들의 발현이 감소되었다. 따라서 membrane의 rigidity가 감소되어 막 유동성의 증가로 뿌리썩음병원균의 침입이 쉬워지게 된다. 반면에 나노 실리카 처리 시 Phytosterol의 합성과 관련된 유전자들이 증가되었고(그림 88), phytosterol정량 분석 결과에서도  $\beta$ -sitosterol과 stigmasterol의 축적량이 증가되 cell membrane내 sterol 축적이 증가되어(그림 89) membrane rigidity의 증가와 fluidity (유동성)감소로 인해 뿌리썩음병에 대한 억제 효과를 보게 된 것을 알 수 있었다.

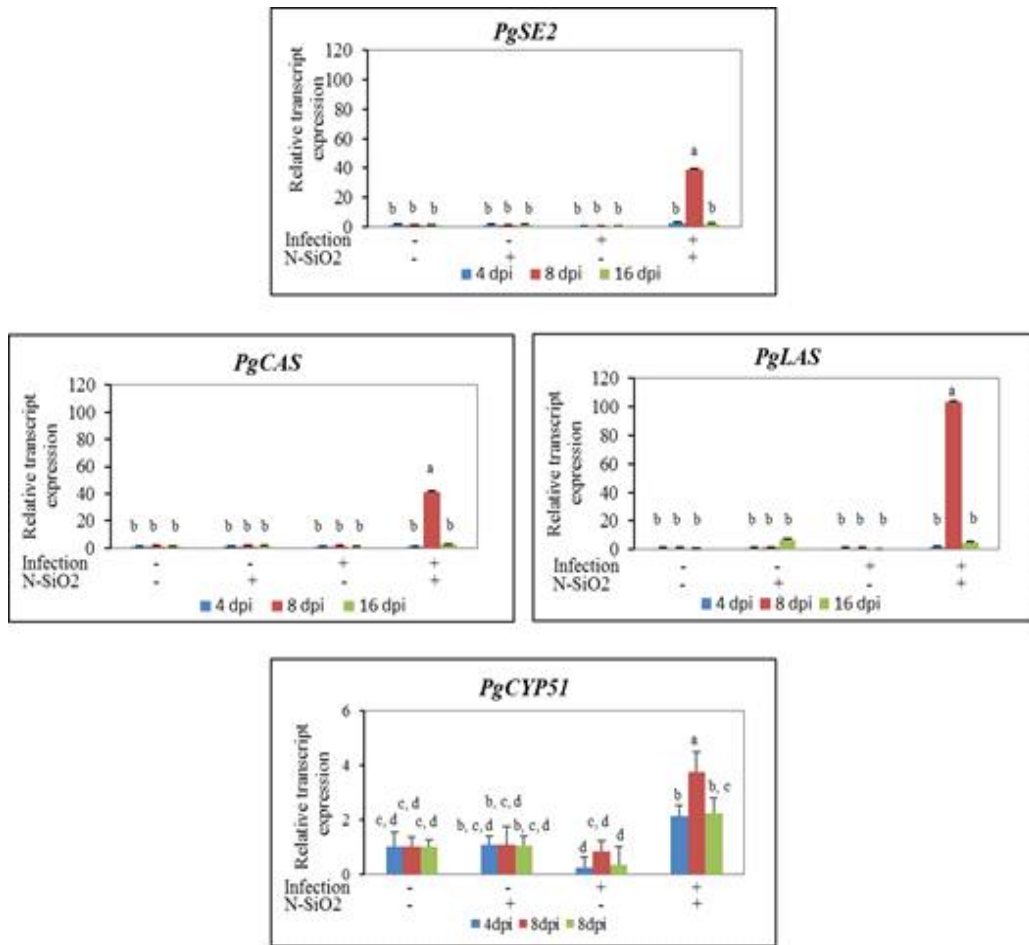


그림 88. 실리카 나노파티클 처리 시 Phytosterol 생합성 관련 유전자들의 발현

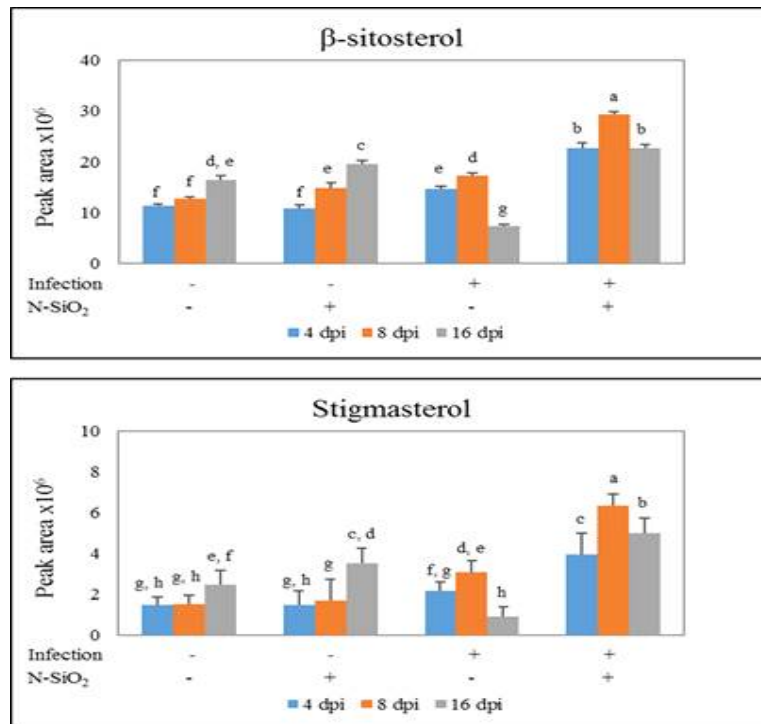


그림 89. 실리카 나노파티클 처리 시 Membrane sterol인  $\beta$ -sitosterol과 stigmasterol의 정량분석

㊦ Apoplast로의 당 유출(sugar efflux)와 pathogen nutrition

병원체 침입의 주요 목적은 영양분, 특히 식물에서 영양분(당분) 얻는 것입니다. SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters)는 주로 세포에서 apoplast(원형질막 외측의 세포간극)으로 당분 유출과 관련된 세포막에 결합된 운반체 이다. 영양분의 획득과정을 용이하게 하기 위해 apoplast로 당 유출을 증가시키기 위한 곰팡이(병원체)의 SWEET 수송체의 조작을 관찰하는 것은 매우 흥미로운 일이라고 보고되었고, TALEN (transcriptional activator-like effector nuclease) 기반 genome editing을 사용하는 SWEET mutant의 engineering으로 병원균 저항성을 engineering을 가능하게 하였다.(Chen, 2014).

따라서, 위의 위의 연구보고로부터 병원체는 sterol 조성을 조절함으로써 원형질막의 투과성을 조절할 잠재력이 있으며, 또한 당 유출률을 변화시켜 식물체로부터 영양분을 곧장 획득할 수 있다는 것이 분명하다는 결론을 내리게 되었다.

위 연고보고를 토대로 *PgSWEET*의 발현을 분석하였고 Apoplastic fluid내 총 sugar 함량과 총 reducing sugar 함량을 분석한 결과, 감염토양에서 *PgSWEET*의 발현이 폭등함과 동시에 apoplast내 당분의 양이 증가하였고, 실리카 나노과티클을 처리함으로써 *PgSWEET* 발현이 월등히 감소하여, apoplast 내 당분 함량이 회복되어 병원체의 영양분 획득이 불리하도록 변화된 것을 확인하였다.

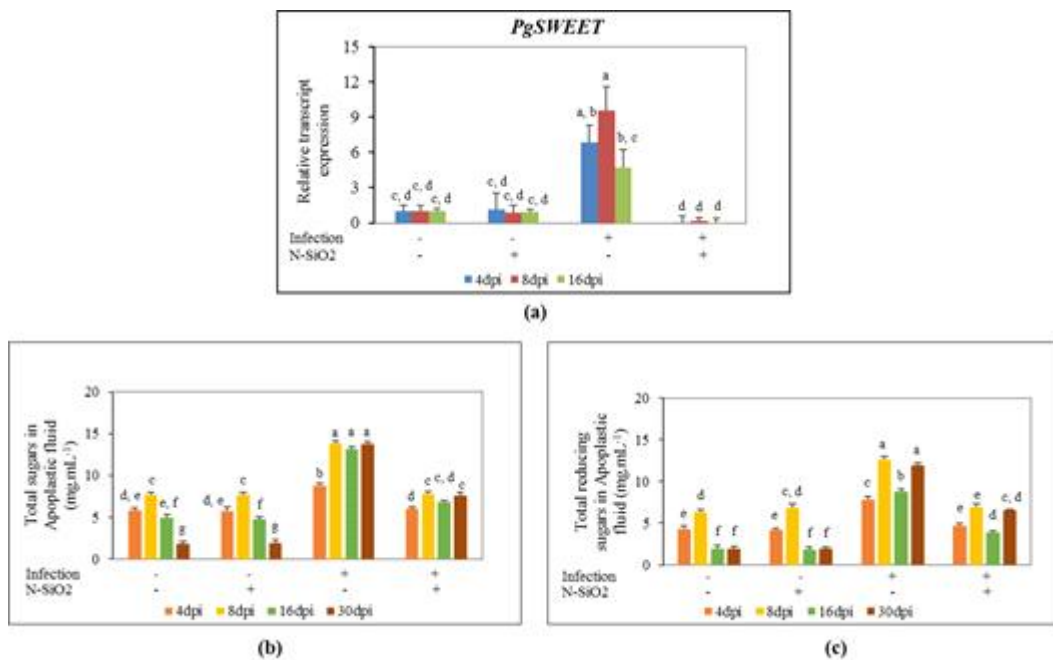


그림 90. Sugar Efflux와 관련된 유전자의 발현 분석과 apoplast로 당 유출의 분석

(4) 인삼뿌리썩음병에서 실리카 나노파티클의 처리 시 일어나는 방어 메커니즘 요약

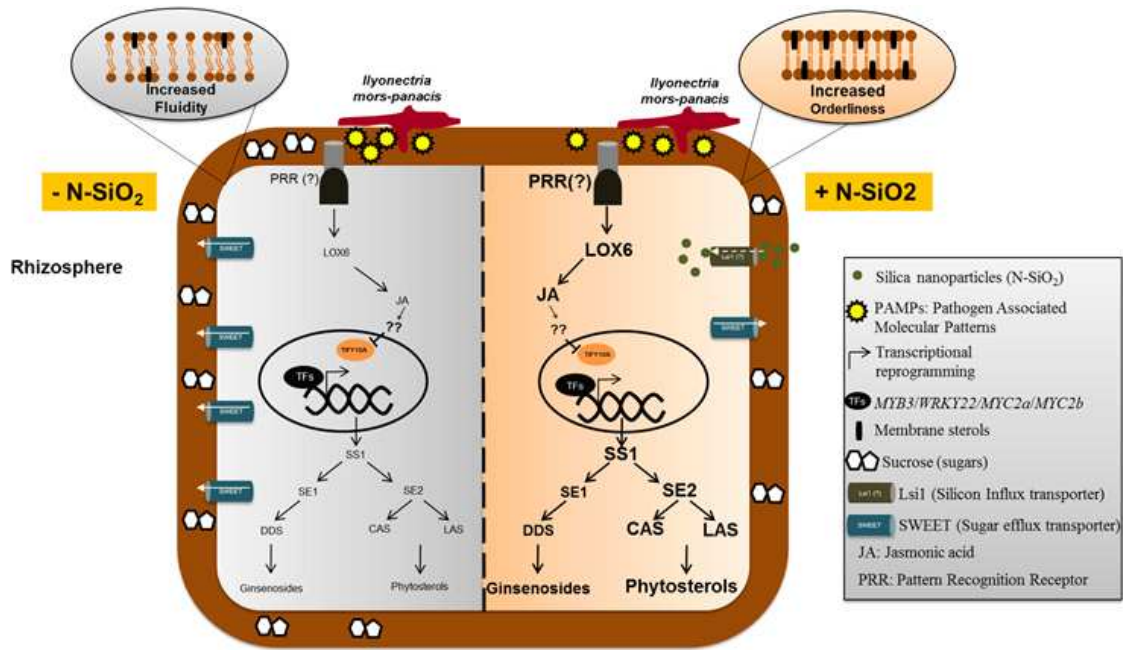


그림 91. 인삼뿌리썩음병원균에 대한 저항성 증대를 위한 실리카 나노파티클 처리 시 인삼 뿌리 세포 내에서 나타나는 Transcriptional reprogramming

종합적으로, 인삼 뿌리썩음병원균에 감염되게 되면 실리카를 세포내로 흡수하는 transporter의 발현이 감소로 세포 내 Si 흡수가 줄어들며, PTI와 ETI에 의한 식물의 방어기작이 약해져 JA 생합성과 관련된 유전자(*PgLOX6*) 발현의 감소와, JA signaling repressor(억제자)와 관련된 *PgTIFY10* 유전자의 경우 발현의 증가로 JA pathway관련 식물 방어기작이 감소하여, JA 매개 Ginsenoside 생합성 관련 전사요소(TF) 발현 감소와 *PgHMGR1*, *PgHMGR2*, *PgSS1* 및 진세노사이드 생합성과 관련된 *PgSE1*, *PgDDS*, *PgBAS* 유전자가 연속적으로 발현감소를 보이며 Sterol 생합성과 관련된 유전자(*PgSE2*, *PgCAS*, *PgLAS*, *PgCYP51*)들이 발현 감소하여 막 유동성이 증가하였다. 이에 추가하여 *PgSWEET*의 발현이 증가하여 Apoplast로 당유출이 증가하여 병원체가 영양분을 쉽게 얻을 수 있는 환경이 조성되어 병원체감염에 유리한 상태로 변하게 되었다.

반면에, 실리카 나노파티클을 처리하게 되면 이와 반대로 실리카를 세포내로 흡수하는 transporter의 발현이 증가로 세포 내 Si 흡수가 증가하며, PTI와 ETI에 의한 식물의 방어기작이 증가하여 JA 생합성과 관련된 유전자(*PgLOX6*) 발현의 증가, JA signaling repressor(억제자)와 관련된 *PgTIFY10* 유전자의 경우 발현의 감소로 JA pathway관련 식물 방어기작이 증가하여, JA 매개 Ginsenoside 생합성 관련 전사요소(TF) 발현 감소와 *PgHMGR1*, *PgHMGR2*, *PgSS1* 등 유전자가 연속적으로 발현감증을 보이며 Sterol 생합성과 관련된 유전자(*PgSE2*, *PgCAS*, *PgLAS*, *PgCYP51*)들이 발현이 증가하여 막 유동성이 감소하였다. 이에 추가하여 *PgSWEET*의 발현이 감소하여 Apoplast로 당 유출이 감소하여 병원체가 영양분을 쉽게 얻지 못하는 환경이 조성되어 병원체 감염에 불리한 상태로 변하게 되었다.

마. 실리카나노파티클(나노규산)을 이용한 인삼뿌리썩음병의 발병억제 효과 검증

인삼포에서 발병하는 인삼뿌리썩음병 원인균 *C. destructans* 중 병원성이 강한 계통은 낮은 농도에서도 상처 없이 발병이 되나 병원성이 약한 계통은 상처를 통해 감염되어 발병하는 것으로 보고되었다(Kim *et al.*, 2006).

실리카나노파티클은 상기 메커니즘 구명에서 설명한 방식으로 병에 대한 방어기작을 발휘하여 인삼뿌리썩음병을 경감시킬 수 있다는 결과를 토대로 본 실험을 추진하였다. 인삼포로 사용하기 위해 예정지관리가 된 포장에서 토양을 채취하였고 유기물함량이 17g/kg인 토양과 4.5톤/10a에 해당량의 볏짚퇴비를 혼합기에 함께 넣은 후 5분간 교반하여 토양을 조제하였다. 이 토양을 박스에 20kg을 충전한 후 2년생 인삼에 10곳을 투침한 후 박스당 20본 이식한 후 약 90일에 채취하여 생육과 스팟의 크기를 측정하한 결과는 표 48, 49와 같다.

생육상황은 초장은 건전토에 볏짚퇴비나 ARRI퇴비에 비해 양호하였고, 경장도 같은 경향이 나 그 외의 형질은 처리간에 차이가 없었다. *C. destructans*에 의해 투침된 상처에 발병된 부위의 크기를 측정하한 결과, *C. destructans* spot 직경의 비율은 건전토 퇴비구에 비해 볏짚퇴비구+나노규산구는 spot 직경 커질수록 높아 차이가 없었고, 볏짚퇴비+나노규산구와 볏짚퇴비(발병토)구와도 차이를 보이지 않았다. 발병도를 산출해 본 결과, spot의 직경 비율과 같은 경향을 보였다. 이 연구결과 나노규산의 효과는 기대와 달리 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*에 대한 발병억제를 기대할 수 없었다. 이와 같은 결과는 토양 미생물의 간섭이 없는 멸균토에서와 달리 다양한 미생물상을 갖춘 토양에서 발병억제력을 발휘하지 못한 것은 토양환경에 따라 차이를 의미한다.

표 48. *C. destructans*에 오염된 토양에서 실리카나노파티클 처리 효과

처리내용		초장 (cm)	경장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	개체중 (g)
병원균밀도	처리방법						
7.8×10 <sup>1</sup> cfu/g	볏짚퇴비	23.2±3.7	12.3±2.1	3.4±0.2	16.4±1.0	12.0±0.2	6.1±0.4
	ARRI퇴비	29.4±4.5	18.2±2.6	4.2±0.4	17.4±0.9	11.8±0.1	5.4±0.2
볏짚퇴비+나노 규산	27.1±3.4	17.4±1.2	3.8±0.6	17.7±1.7	11.2±0.4	5.4±0.7	7.9
	건전토	볏짚퇴비	24.6±2.3	14.9±1.4	4.1±0.3	17.2±0.7	11.9±0.5

표 49. 실리카나노파티클의 *C. destructans*에 의한 발병억제력

처리내용		<i>C. destructans</i> spot 직경의 비율(%)				발병도 (0-3)
병원균밀도	처리방법	0mm	0~1mm	1~2mm	2mm<	
7.8×10 <sup>1</sup> cfu/g	볏짚퇴비	19.0±4.2	38.2±6.5	33.1±4.1	9.7±3.6	1.33±0.22
	ARRI퇴비	54.1±8.6	26.7±5.8	15.0±2.2	4.2±2.6	0.69±0.12
	볏짚퇴비+나노규산	29.1±9.4	39.7±5.3	21.3±4.7	8.7±6.3	1.11±0.21
건전토	볏짚퇴비	44.5±7.8	27.3±4.5	21.3±6.7	6.4±3.1	0.90±0.15

### 3. *C. destructans*와 *Fusarium sp.* 동시 밀도판별기술 정립

#### 가. *C. destructans* 와 *Fusarium sp.* 동시 밀도진단 프라이머 개발

인삼뿌리썩음병 중 가장 심한 피해를 주는 것으로 추정되는 *C. destructans*와 *Fusarium sp.*을 동시 진단하기 위한 프라이머를 (주) 코젠바이오텍에 위탁하여 개발하였다. 기존의 SYBR Green 분석법보다 민감도와 분별력을 높이기 위해 개발을 진행하였다.

#### (1) *C. destructans*와 *Fusarium solani* 동시 밀도진단 프라이머 개발

인삼뿌리썩음병 *C. destructans*는 충청남도 농업기술원 인삼약초 연구소에서 분양받은 CY8005균주를 사용하였으며, *Fusarium solani*는 소득자원연구소 포장 내 이병개체에서 순수 분리하여 사용하였다. 토양에서 DNA 추출은 경기도농업기술원과 (주)코젠바이오텍이 공동연구를 통해 DNA 추출 효율성을 높인 키트를 이용하여 진행하였고 정량 PCR 기기는 Roche Light Cycler 480을 이용하였다. 그림 1은 토양에서 DNA를 추출하는 과정을 도식화한 그림이다.

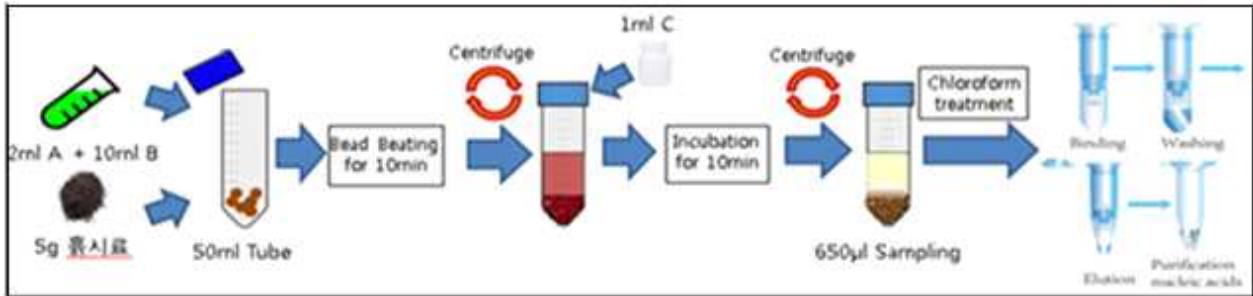


그림 1. DNA 추출과정 모식도

표 1은 Real-time PCR을 이용된 증폭 프라이머의 유전자 특성을 설명이다.

*C. destructans*에 특이적 프라이머 및 프로브의 제작은 *C. destructans*의 베타-튜블린2 유전자 내 conserved 부위에서 디자인하였다. PCR을 통해 증폭되는 서열은 78bp이다. *F. solani* 특이적인 프라이머 및 프로브의 제작은 *F. solani*의 베타 튜블린2 유전자 내 conserved 부위에서 디자인하였다. 검출효율을 높이기 위해 정방향 프라이머는 2개를 디자인하였고 PCR을 통해 증폭되는 서열은 109bp이다.

*C. destructans*과 *F. solani*의 특이적인 프라이머와 프로브는 표 2과 3과 같다.

표 1. Real-time PCR에 이용된 증폭 프라이머의 유전자 특성

인삼 뿌리썩음병원균	증폭크기(bp)	형광물질	Target gene
<i>C. destructans</i>	78	FAM	$\beta$ -tubulin2
<i>F. solani</i>	109	JOE	$\beta$ -tubulin2

표 2 *C. destructans* 특이적인 프라이머 및 프로브

Primer/Probe	염기서열
Forward primer	5'- CTTCAACGATCCGACGTGC - 3'
Reverse primer	5'- GTCTGCCAGAAAGCAGCACC - 3'
Probe	5'FAM- ATTCGCTAACGATGCGTGGATAGGGTAACC - BHQ13'

표 3. *F. solani* 특이적인 프라이머 및 프로브

Primer/Probe	염기서열
Forward primer 1	5'- GAAAGAGTGGGCGCCG - 3'
Forward primer 2	5'- GCGGAAAGAGTGAGCACCA - 3'
Reverse primer	5'- GAACTCTGACCTCCGAAAGCTC - 3'
Probe	5'JOE- TCAACATGGTTCCCTTCCCCCGTCT -BHQ1 3'

제작한 프라이머 및 프로브의 실시간 PCR에 대한 *In silico* 분석을 실시하였는데 그 결과는 표 4와 같다.

*In silico* 분석은 PCR 증폭 서열을 이용하여 NCBI의 blast를 통해 검출되는 sequence 정보를 확보한 후, 제작된 프라이머 및 프로브와 결합유무를 비교하는 방식으로 분석하였다. 그 결과, NCBI에 등재된 FASTA에서 *C. destructans*는 100%, *F. solani*는 95%의 높은 검출률을 보였고 다른 strain에서 교차반응이 없는 것으로 확인되었다.

표 4. *C. destructans*와 *F. solani* 특이적인 프라이머 및 프로브의 *In silico* 분석

Reference	Target	NCBI blast <sup>a</sup>	검출률 <sup>b</sup>	교차반응 <sup>c</sup>	분석제외 <sup>d</sup> (short seq)
<i>C. destructans</i>	Beta-tubulin2 (78bp)	28	28/28 (100%)	-	0
<i>F. solani</i>	Beta-tubulin2 (106bp)	24	23/24 (95%)	-	0

a : amplicon으로 NCBI blast하여 검색된 sequence의 수

b : 검색된 sequence 중 *C. destructans* 또는 *Fusarium solani*의 수 및 검출률(%)

c : 검색된 sequence 중 *C. destructans* 또는 *Fusarium solani* 이외 검출가능 종류

d : 검색된 sequence 중 길이가 짧아 분석에서 제외된 sequence의 수

*C. destructans*와 *F. solani*이 동시에 증폭될 때, 서로 간의 저해를 최소화시킨 PCR 조건은 표 5이 확립하였고 분석적 민감도 분석을 실시하였다.

*C. destructans* 및 *F. solani* 각각의 양성시료를  $1.0 \times 10^7$ copies/ $\mu$ l로 제작하였고 이를  $1.0 \times 10^6$ copies/ $\mu$ l에서  $1.0 \times 10^0$ copies/ $\mu$ l까지 10배 단위로 연속 희석하여 분석하였다. 그 분석 결과는 그림 2와 그림3과 같다.

*C. destructans* 및 *F. solani*의 민감도는 모두 10copies/ $\mu$ l였다.



표 5. *C. destructans*와 *F. solani*의 동시진단 조건 및 조성물

PCR 방법	PCR 조건	구성요소	
Real-time PCR	50°C 2 min 1 cycle	Primer/Probe Mix(C.des/F.sol)	5 $\mu$ l
	95°C 10min 1 cycle	2xReal-time PCR Master Mix	10 $\mu$ l
	95°C 15sec $\times$ 40 cycle	Template DNA	5 $\mu$ l
	60°C 1min	총	20 $\mu$ l

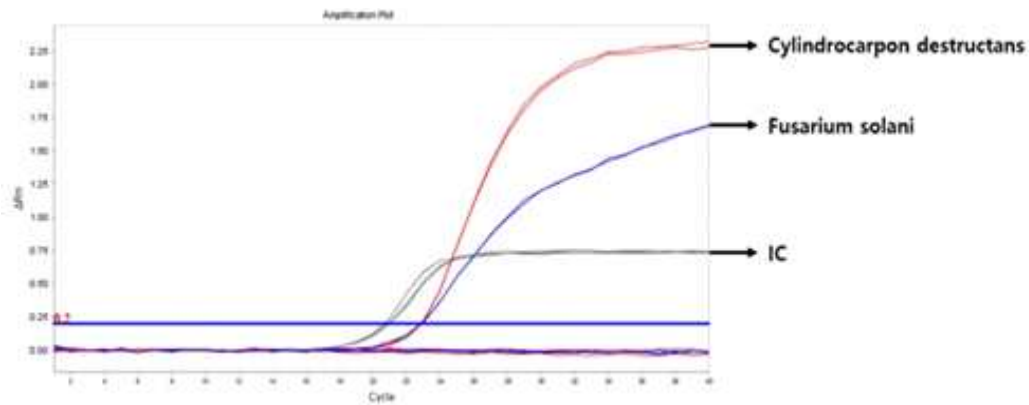


그림 2. *C. destructans* 와 *F. solani*의 real time PCR 결과

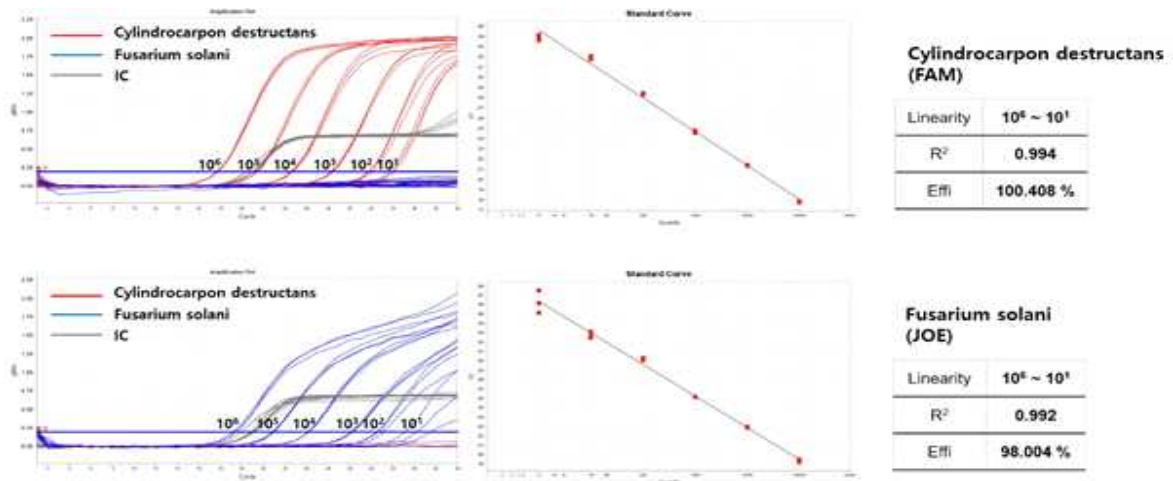


그림 3. *C. destructans* 와 *F. solani*의 검출 프라이머 및 프로브 민감도 분석

(2) 토양 내 *C. destructans* 밀도 검증을 위한 검량선

개발한 인삼뿌리썩음병 원인균 DNA 추출 키트를 이용하여 Real-time PCR 수행 시 얻어진 Ct값과 병원균 밀도와의 관계 분석을 위해 검량선을 구한 결과는 표 6과 같다.

*C. destructans*를 14일 동안 PDB배지에 정치배양한 후 원심분리를 이용하여 *C. destructans*을 얻었다. 얻어진 *C. destructans*을 10배씩 희석하여 DNA를 추출하고 Real-time PCR 수행하였다. 또한, 얻어진 *C. destructans* 10배씩 희석하여 rose bengal 배지에 도말하고 20℃ 10일 배양 후 포자수를 세었고 Ct값과의 상관관계를 분석하였다.

추출된 DNA를 template로 사용하여 Real-time PCR을 수행한 결과 얻어진 Ct값과 병원균 밀도와의 관계 분석을 위해 구한 균밀도와 Ct value의 상관관계식은 그림 4와 같다.

*C. destructans*밀도  $1.1 \times 10^4$ cfu/ $\mu$ l일 때 Ct value는 24.7이었고,  $1.1 \times 10^3$ cfu/ $\mu$ l,  $1.1 \times 10^2$ cfu/ $\mu$ l,  $1.1 \times 10^1$ cfu/ $\mu$ l일 때는 27.93, 31.02, 36.01이었다. 관계식은  $y=1.608\ln(x)+39.325$  ( $R^2=0.9459$ )이었다.

표 6. *C. destructans* 포자수와 정량 PCR Ct값

균밀도	1.10E+01	1.10E+02	1.10E+03	1.10E+04
<sup>∧</sup> Ct value	36.01	31.02	27.93	24.70
표준편차	1.87	0.77	0.72	0.62

<sup>∧</sup> cycle threshold(Ct) : 정량 PCR 이용 병원균 DNA 검출 한계농도 도달 증폭 사이클 수

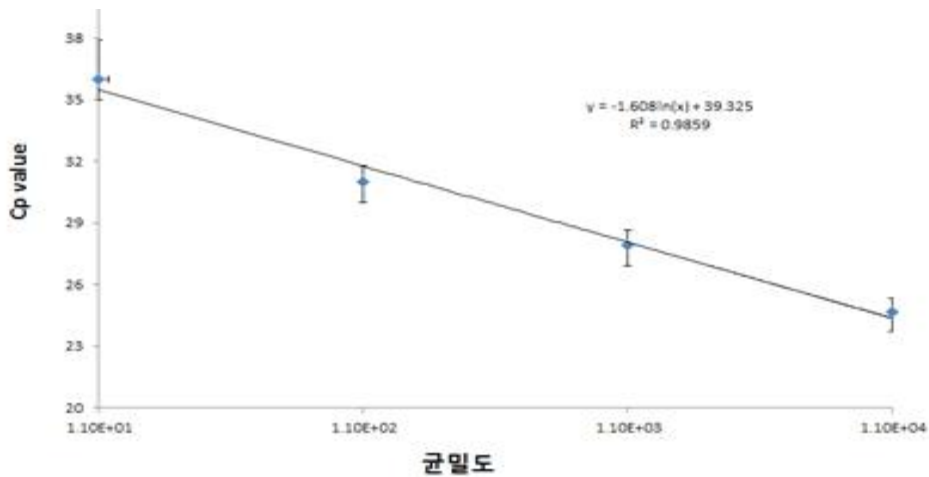
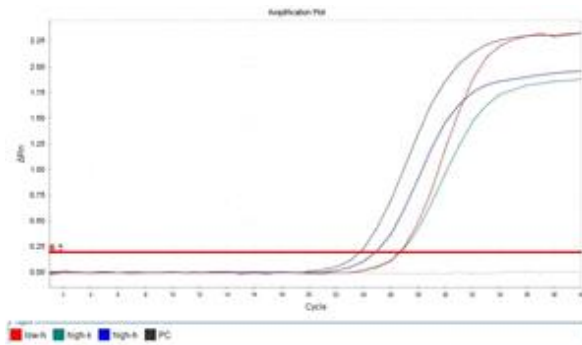


그림 4. 토양 내 *C. destructans* 밀도검증을 위한 검량선

(3) *C. destructans* 병원성별 테스트

개발한 인삼뿌리썩음병 진단 키트를 검증하기 위해 저병원성 균주(HB1), 고병원성균주(HB14, KACC 44660), positive control(CY8005)의 genomic DNA를 추출하여 Real-time PCR 분석을 통해 얻은 결과는 그림 5와 그림6과 같다.



Sample	Ct
저병원성 HB1 8130	26.7
고병원성 HB14 8130	25
고병원성 KACC 44660	26.8
Positive control	23.8

그림 5. *C. destructans* 병원성별 Real-time PCR 결과

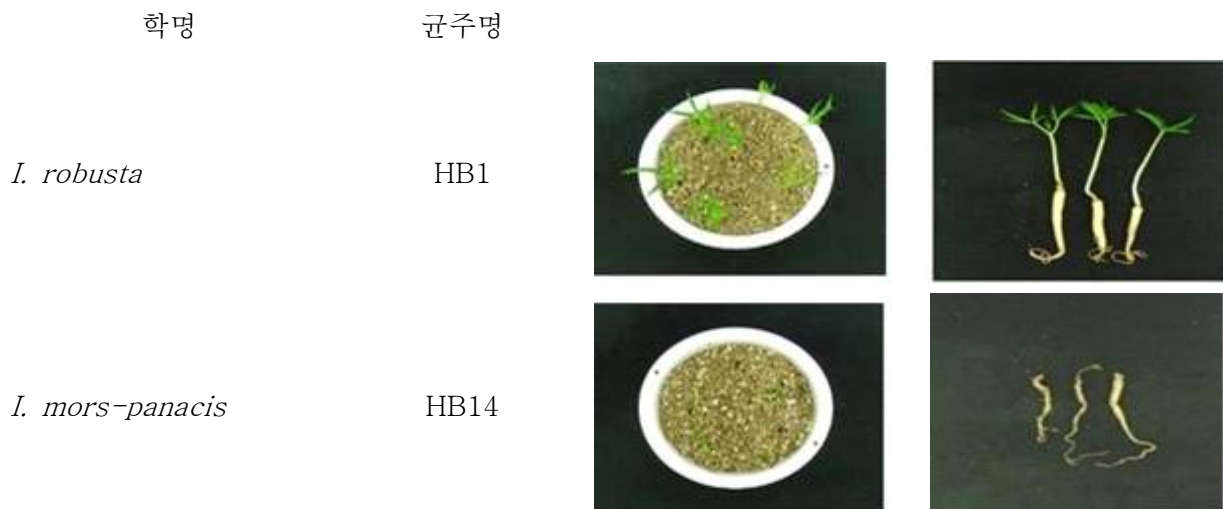


그림 6. *C. destructans* 병원성별 테스트.

저병원성 균주(HB1), 고병원성균주(HB14, KACC 44660), positive control(CY8005)의 genomic DNA를 추출하여 Real-time PCR 수행결과 강/약 병원성 균주에서 모두 검출되었다.

(4) 토양 내 *Fusarium solani* 밀도 검증을 위한 검량선

개발한 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도 분석용 Real-time PCR 수행하여 병원균 밀도에 대한 Ct값을 도출한 결과는 표 7과 같다.

*F. solani*를 5일동안 PDB배지에 정치배양한 후 원심분리를 이용하여 *F. solani*을 얻었다. 얻어진 *F. solani*을 10배씩 희석하여 DNA를 추출하고 real time PCR 수행하였다. 또한, 얻어진 *F. solani*을 10배씩 희석하여 rose bengal 배지에 도말하여 25℃ 3일 배양 후 포자수를 세었고 Ct값과의 상관관계를 분석하였다.

추출된 DNA를 template로 사용하여 Real-time PCR을 수행하여 얻어진 Ct값과 병원균 밀도와의 상관관계식은 그림 7과 같았다.

*F. solani* 밀도  $6.6 \times 10^4$ cfu/ $\mu$ l일 때 Ct value는 24.44이었고,  $6.6 \times 10^3$ cfu/ $\mu$ l,  $6.6 \times 10^2$ cfu/ $\mu$ l,  $6.6 \times 10^1$ cfu/ $\mu$ l일때는 27.63, 30.41, 33.32이었다. 관계식은  $y=1.336\ln(x)+39.077$  ( $R^2=0.9977$ )이었다.

표 7. *F. solani* 포자수와 real time PCR Ct값

균밀도(cfu/g)	6.60E+01	6.60E+02	6.60E+03	6.60E+04
<sup>Δ</sup> Ct value	33.32	30.41	27.63	24.44
표준편차	0.37	0.56	0.56	0.53

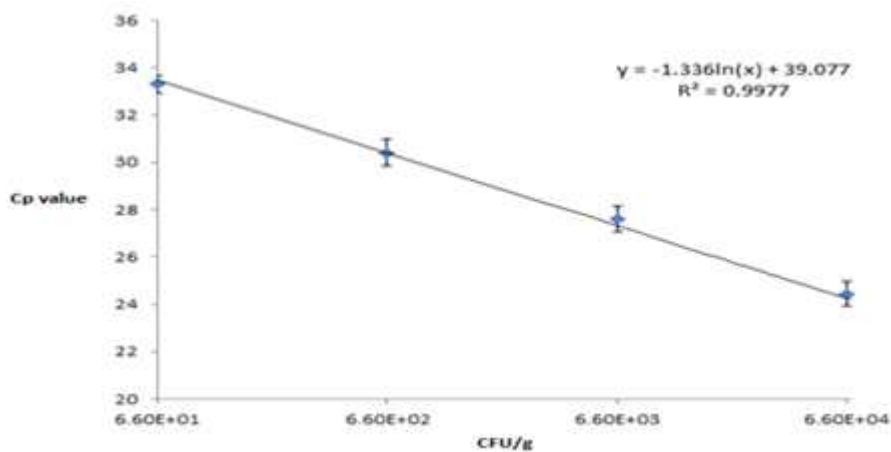


그림 7. 토양 내 *F. solani* 밀도 검증을 위한 검량선

나. 인삼밭 토양에 적용 가능한 진단 kit 제품 개발

최근까지는 토양에서 병원균을 직접 분리하여 정량하려는 시도는 다수 개발했지만 그 민감도나 정밀도가 낮아 현장에 적용하기에는 많은 문제가 있었다. 이를 해결하기 위해 경기도농업기술원에서는 (주) 코젠바이오텍(위탁연구기관)과 공동으로 개발하였는데 성공하였다. 정밀도를 높이기 위해 특이 프라이머를 개발하고 프로브의 민감도를 높이기 위해 반응에 장애가 되는 inhibitor를 제거하기 위해 클로로폼을 처리하는 과정을 추가하였는데 토양에서 직접  $10^0$  단위까지 정량이 가능하였다.

토양에서 직접 병원균의 DNA를 추출하여 Real-Time PCR를 기반한 인삼뿌리썩음병 병원균 정량 방법은 표 8에 나타내었다.

표 8. DNA 분리 Kit를 이용한 인삼뿌리썩음병 병원균 분리 및 밀도 정량 절차

단계		처리내용
1		토양시료 채취
2		토양 시료건조
<b>DNA 분리·추출 과정 (DNA Extraction Kit)</b>		
3		토양시료를 골고루 섞은 후 5g 채취하여 비드가 들어있는 튜브에 넣음
4		튜브에 Buffer A 2ml와 Buffer B 10ml를 넣은 후 Tissue lyser 30Hz/s로 10분간 분리
5		원심분리기 2,500rpm에서 5분간 원심분리
6		Buffer C 1ml를 넣은 후 4℃에서 10분간 반응
7		원심분리기 2,500rpm에서 5분간 원심분리

8		상등액을 전량 취하여 1.5ml 튜브에 넣고 튜브에 chloroform 0.65ml를 넣은 후 Vortex mixer로 30초간 혼화
9		15,000G에서 10분간 원심분리
10		상등액을 전량 취하여 1.5ml 튜브에 넣고 chloroform 0.65ml를 넣은 후
11		15,000G에서 10분간 원심분리(동결건조시 TE 0.4ml로 용해)
12		상등액 0.4ml를 취하여 1.5ml 튜브에 넣고 Binding Buffer 0.8ml를 첨가한 후 흔들어 혼합
13		위의 혼합액 1.2ml중 0.6ml를 취하여 DNA Binding column 튜브에 넣고 15000G에서 1분간 원심분리
14		Column을 통과한 여과액은 버린 후 남은 혼합액 0.6ml를 DNA Binding column 튜브에 넣고 15000G에서 1분간 원심분리
15		모아진 Binding column에 부착된 DNA를 70% 에탄올이 함유된 Wash buffer를 첨가하여 15,000G로 1분간 원심분리한 후 여과액을 버림
16		빈 Column을 15,000G에서 3분간 원심분리하여 에탄올을 완전히 제거
17		Column 아래 튜브는 버리고 윗부분 Binding column을 새로운 1.5ml 튜브로 옮긴 후 Elution buffer 0.1ml를 넣고 1분간 상온 방치
18		8000G에서 3분간 원심분리가 끝나면 Binding column을 제거하여 추출된 DNA 얻음

DNA 정량 과정 ( <i>C.destructans</i> / <i>Fusarium</i> diagnosis kit)		
19		진단키트 시약 튜브를 원심분리하여 시약을 튜브 밑으로 모음
20		PCR 8-strip white tube에 Primer/probe Mix 5 $\mu$ l와 2X Real-time PCR Master Mix 10 $\mu$ l를 넣고 추출한 DNA 5 $\mu$ l를 넣음
21		PCR 키트 용액과 DNA가 잘 혼합될 수 있도록 튜브를 가볍게 흔들어 혼합한 후 원심분리하여 혼합액이 튜브 밑으로 모이게 한다.
22		RT-PCR 분석
23		분석데이터 수집 및 해석

다. 고병원성 인삼뿌리썩음병원균 *Ilyonectria mors-panacis*의 특이 진단 마커개발

(1) Genomic DNA의 추출 및 분리

곰팡이 균주의 genomic DNA를 DNeasy plant mini DNA extraction kit (Qiagen Inc., Germany)를 사용하여 추출하고 정제 하였다. Bacteria 균주의 genomic DNA를 GeneAll Exgene™ Clinic SV (GeneAll Biotechnology Co, Republic of Korea)를 사용하여 분리하였다. 실험실내에서 인공적으로 감염된 토양 및 자연환경에서 토양 샘플의 DNA를 MoBio soil DNA isolation kit(MoBio Inc., USA)를 사용하여 추출하고 정량 하였다.

(2) *Iyonectria mors-panacis*의 특이 진단 마커 제작 및 PCR 조건

표적 유전자 위치로서 고병원성 *I. mors-panacis*만을 검출하는 종-특이 적 프라이머를 디자인하기 위해 HIS H3 서열을 사용되었다. HIS H3은 자낭균(ascmycetous)류에 속하는 진균류의 구별에 사용되는 유전자 서열 중 하나이다. *Fusarium udum*은 HIS H3 프라이머를 사용하여 다른 *Fusarium* 종과 구별 될 수 있다 (Mesapogu, 2011). 따라서, 본 연구에서는 *I. mors-panacis*의 특이 적 검출을 위한 프라이머를 설계하기 위한 표적 서열로 사용하고자 하였다(그림8).

다음과 같은 PCR 조건을 사용하여 MyCycler™ thermal cycler (BioRad, USA)에서 PCR을 수행 하였다.(94 °C, 10min; 94 °C, 15sec; 60 °C, 2sec; 72 °C, 20sec; 30cycle 및 72 °C, 5min final elongation). qRT-PCR은 Hard-Shell® 96-Well PCR Plate (BioRad, USA)에서 CFX Connect™ Real-Time System (BioRad, USA)을 사용하여 수행되었다. 10 μl의 반응 부피는 5 μl의 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, USA), 각각의 프라이머 10 pmol, target species의 genomic DNA 1 μl, 및 물을 포함 하였다. 사이클링 조건은 94 °C에서 10 분 동안, 이어서 94 °C에서 15 초, 40 °C에서 2 초, 72 °C에서 20 초 및 85 °C에서 2 초, 40 회 사이클을 수행하고 72 °C에서 fluorescence reading을 각 사이클의 마지막 수행하고, 이어서 0.1-C의 온도 증가분에서 65-95 °C에서 최종 용융 곡선 분석을 수행하였다.

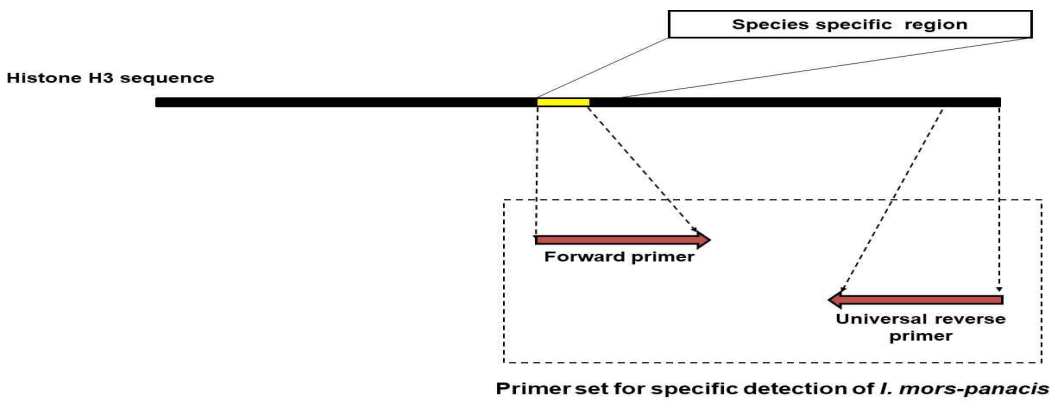


그림 8 . Specific marker development for *I. mors-panacis*.

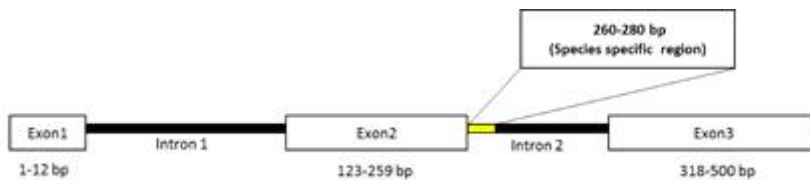


그림 9 . Histone H3 region내에 *I. mors-panacis*를 특이적으로 검출하기 위한 specific region



유전자의 부분 서열은 대략 500 bp이고 2 개의 인트론으로 분리 된 3 개의 엑손으로 구성된 다. *I. mors-panacis*의 특정 영역을 조사하기 위해 모든 *Ilyonectria* 종의 HIS H3 서열을 공개 GeneBank 데이터베이스에서 얻은 후에 본 연구에서 얻은 서열과 정렬했습니다. 정렬은 두 번째 인트론의 처음 20 개 뉴클레오티드가 각 종의 균주 내에서 고도로 보존되면서 다른 종들 사이에서 가변적임을 보여 주었다 (그림 9). 뉴클레오티드 영역은 *I. mors-panacis*를 특이적으로 검출하기 위한 정방향 프라이머로 사용되도록 결정되고 *I. mors-panacis*를 지정한다. Forward primer 제형은 (IMP 5'-CAC ACC CAA CGT GCC ACA T-3 ')이다. Reverse primer로 사용될 다른 특정 영역을 찾을 수 없으므로, Universal reverse primer는 검출 및 정량 분석에 사용되었다. 결과 생성물은 대략 230 bp 일 것으로 예상되었다.

### (3) 표준화 된 PCR 및 qRT-PCR 조건 하에서 프라이머 세트의 검증

*I. mors-panacis*의 DNA에 대한 프라이머 세트의 감도는 위에서 언급한 target template의 다양한 농도에 qRT-PCR 조건을 적용함으로써 확인하였다. 6.4 ng /  $\mu$ l의 최고 농도로 분석을 시작하고 0.1 ng /  $\mu$ l의 최저 농도로 분석을 종료했다. 생성된  $C_T$  값을 상응하는 농도로 blotting 회귀 계수 ( $R^2$ )를 결정 하였다.

HIS H3 프라이머 세트와 혼합된 다양한 농도의 *I. mors-panacis* DNA의 qRT-PCR 분석은 PCR 생성물의 표준화 된 기하급수적인 성장을 보여 주었다. 생성된 모든 제품은 단일 용융 온도 (88 ° C)를 보였다. 가장 낮은  $C_t$  값 (DNA의 가장 높은 농도에 해당하는)은  $19.1 \pm 0.03$  인 반면 가장 높은  $C_t$  값 (DNA의 가장 낮은 농도에 해당하는)은  $24.6 \pm 0.20$  였다. *I. mors-panacis* template가 없는 프라이머는 30 cycle 후에 형광을 나타내지만, 그 증폭산물 (amplicon)은 목표 증폭 산물과 다른 온도 포인트 (79.5 및 87.5 ° C)를 갖는 두 개의 용융곡선을 가진다(그림 3.4A). 다양한 DNA 농도의 로그 값과  $C_t$ 의 로그 값 사이의 선형 상관관계가 매우 높기 때문에 표준 곡선(standard curve)이 정밀한 것으로 관찰되었다 ( $R^2 = 1$ ) (도 3.4B). IGS 특이적 프라이머 세트를 사용한 PCR 생성물은 기하급수적으로 덜 성장 하였다. 증폭산물의 용점은 87, 87.5 및 88 ° C에서 변화되었다. 이전 연구에서 IGS 증폭산물의 녹는점의 가변성이 보고되었다 (Kernaghan *et al.*, 2007). 가장 낮은  $C_t$  값 (Template의 최고 농도를 나타냄)은  $11.6 \pm 0.76$ 이었고 가장 높은  $C_t$  값 (Template의 가장 낮은 농도를 나타냄)은  $17.5 \pm 0.20$ 이었습니다 (그림 10C). 상이한 다양한 농도의 로그 값과  $C_t$ 의 로그 값 사이의 선형 상관관계는 HIS H3 프라이머 세트의 로그 값보다 낮으므로 ( $R^2 = 0.98$ ), 표준 곡선은 덜 정밀한 것으로 간주되었다(그림 10D). 선형 상관 관계는  $\text{Log } C_t = -0.0598 (\text{Log DNA}) + 1.3295$ 로 제시 될 수 있다.

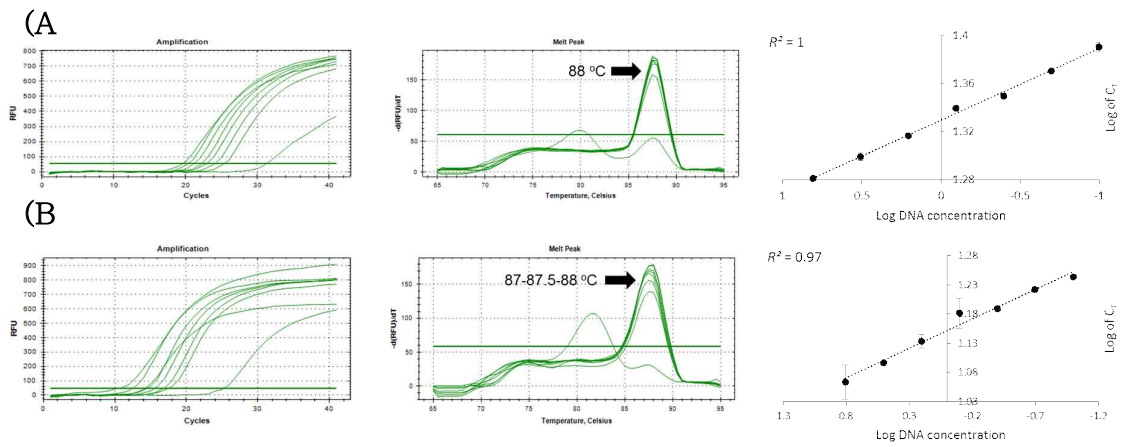


그림 10. Fluorescence of PCR products resulted after mixing specific HIS H3 (A) and IGS (B) primer sets with different concentration of *I. mors-panacis* DNA, with characteristic melting temperatures (88 °C), and (87, 87.5, and 88 °C), respectively. Standard curve analysis showing the logarithmic relationship between different concentrations of *I. mors-panacis* DNA and the corresponded  $C_t$  using specific HIS H3 (C) and IGS (D) primer sets

(4) *I. mors-panacis* 특이적 HIS H3 프라이머 세트의 특이도 평가

*I. mors-panacis*의 DNA에 대한 프라이머 세트 특이성을 확인하기 위해, 상기 언급 된 PCR 조건을 다른 *Ilyonectria* 종의 DNA 및 표9 에 열거 된 다른 곰팡이 및 박테리아 속과 비교하여 *I. mors-panacis*의 DNA에 적용하였다. *I. mors-panacis*의 DNA에 대한 프라이머의 세트의 특이성은 상기 언급된 PCR 및 qRT-PCR 반응을 사용하여 DNA 복합체 샘플에서 Target template를 검출하고 정량함으로써 추가로 확인되었다. 이 DNA 복합체 샘플은 다양한 농도의 *I. mors-panacis* DNA (0.005-1 ng /  $\mu$ l)를 포함하는 시험 된 모든 미생물의 DNA를 이용하여 제조하였다. 비교를 위해, 상기 기재된 PCR 및 qRT-PCR 분석은 이전 에보고 된 IGS 프라이머, CDU1 및 CDL1b와 동시에 수행되었다 (Kernaghan *et al.*, 2007; Seifert *et al.*, 2003).

표 9. HIS H3 primer의 특이성 평가를 위해 본 실험에서 사용된 균주 목록.

No.	Name	Code in our Lab.	KACC number
1	<i>I. robusta</i>	HB1, HB2, HB3, HB4, HB5	-
2	<i>I. leucospermi</i>	HB6, HB7, HB8	-
3	<i>Phytophthora cactorum</i> Schröt	HB15	40166
4	<i>Pythium ultimum</i> Trow	HB16	40705
5	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	HB17	44705
6	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1(IA) Kuhn	HB18	40123
7	<i>Phialophora mustea</i> Neerg.	HB19	43819
8	<i>Fusarium solani</i> (Martius) Saccardo	HB20	44891
9	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> Massey	HB21	44452
10	<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	HB23	42105
11	<i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Saccardo	HB24	42099
12	<i>Alternaria panax</i> Whetzel	HB25	42461
13	<i>Penicillium</i> spp.	HB26	-
14	<i>Cladosporium</i> spp.	HB27	-
15	<i>Paraconiothyrium</i> spp.	HB28	-
16	<i>Volutella</i> spp.	HB29	-
17	<i>Penicillifer</i> spp.	HB30	-
18	<i>Burkholderia ginsengiterrae</i>	DCY58 <sup>T</sup>	-
19	<i>sphingomonas panacis</i>	DCY99 <sup>T</sup>	-

프라이머 세트를 특이성을 평가하기 위해 *I. mors-panacis*의 순수한 DNA에 사용 하였다. 통상적인 PCR 조건 하에서, 모든 균주는 230 bp 크기의 PCR 산물을 생성하였다(그림 11). 프라이머 세트는 고려 인삼에서 분리 한 다른 *Ilyonectria* 종의 순수한 DNA와 다른 곰팡이 및 박테리아 속의 DNA에도 적용하였으며 결과 PCR 산물은 나타나지 않았습니다. 프라이머 세트가 설정된 다양한 농도의 *I. mors-panacis* template을 함유하는 DNA 혼합물과 혼합 될 때, 예상 크기 (230 bp)를 갖는 밴드가 검출되었다. *I. mors-panacis*를 제외한 모든 시험 된 미생물의 DNA 혼합물을 대조군으로 시험하였고 PCR 산물은 나타나지 않았다. qRT-PCR 조건 하에서, 설정된 다양한 농도의 *I. mors-panacis* 주형을 함유하는 DNA 혼합물은 단일 융점 (88 °C) 을 갖는 증폭산물을 나타내었다(그림 12A). DNA 혼합물에서 *I. mors-panacis* template의 정량 값은 혼합물에서 조정된 실제 농도와 거의 유사하였다(표 9). *I. mors-panacis*의 검출 및 정량화에 대해 이전에 보고 된 IGS 특이적 서열의 프라이머 세트 (Kernaghan *et al.*, 2007; Seifert *et al.*, 2003)를 동일한 균주 DNA에 사용 하였다. 통상적인 PCR 조건 하에서, IGS 프라이머 세트는 *I. leucospermi*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria panax*, *Paraconiothyrium* spp., and *Volutella* spp.을 제외한 모든 시험 된 미생물의 게놈 DNA와 PCR 밴드를 생성 하였다. 또한, IGS 프라이머 세트가 설정된 농도의 *I. mors-panacis* template을 함유하는 DNA 혼합물과 혼합 될 때, 예측 된 크기 (500 bp)의 밴드가 나타 났지만, 비특이성을 의미하는 두가지 관찰점을 보였는데, 첫째는 DNA 복합체에 *I. mors-pacis*의 template농도의 존재를 의미하지 않는 밝은 PCR산물(500bp)이 존재하였고, 두 번째는 *I. mors-pacis*의 template가 섞이지 않은 control군에서도 500bp의 PCR산물이 나타났다(그림 11). qRT-PCR 조건 하에서, HIS H3 프라이머 세트와 동일하게, IGS 프라이머 세트가 DNA 복합체와 혼합 될 때, 표적 PCR 생성물의 형광은 *I. mors-panacis* 주형이 가장 높은 샘플(1ng /  $\mu$ l)에서만 방출됨은 물론, 다른 융점을 갖는 다른 DNA 복합체 샘플의 PCR 생성물을 보여주었다. 이 융점은 대조군 DNA 복합체 및 음성 대조군에서 나타난 것과 동일 하였다 (그림 12B). 이에 따라서, *I. mors-panacis* 주형의 정량이 불가능하였다. IGS 프라이머 세트는 높은 농도의 주형 DNA가 존재할 경우에는 검출할 수 있지만, 검출 된 농도는 DNA 복합체에서 설정된 실제 농도와 크게 상이하였다 (표 9-1).

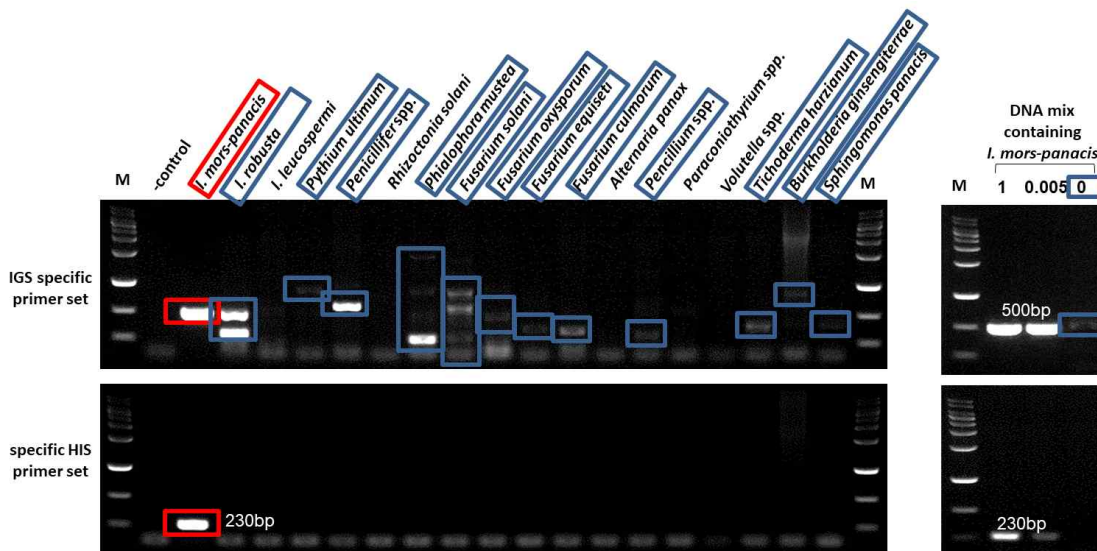


그림 11 . Comparison of Specificity of HIS H3 and IGS primer sets on *I. mors-panacis* and its mixture with other microbes.

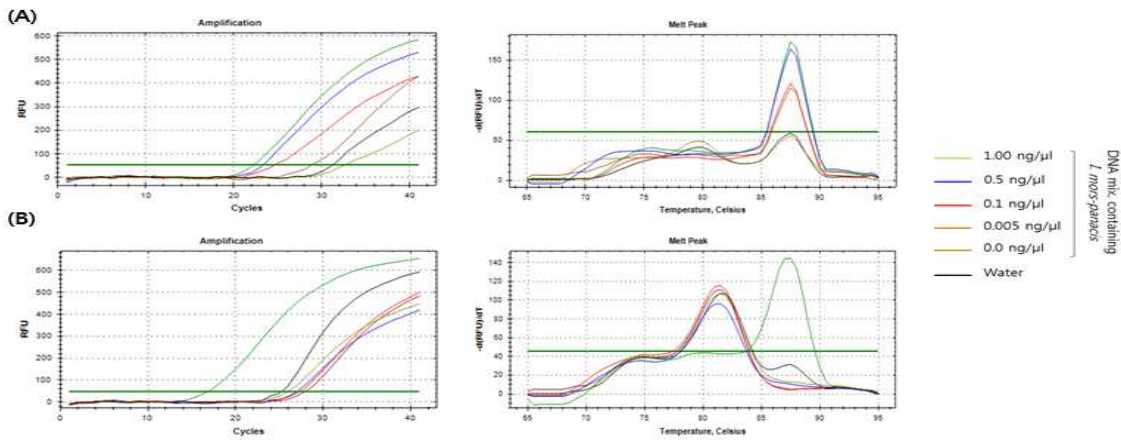


그림 12 .Fluorescence and melting curve graphs showing the detection of *I. mors-panacis* using specific HIS H3 (A) and specific IGS (B) primer sets in the DNA complex of all microbes tested in this study.

표 9-1. Quantification of *I. mors-panacis* template in DNA complex samples made from DNA of all tested microbes, but containing adjusted concentrations of *I. mors-panacis* DNA using HIS H3 specific and IGS specific primer set, respectively

Inserted DNA conc. (ng/μl)	Determined DNA conc. (ng/μl)	
	HIS primer set	IGS primer set
0.005	0.0028±0.0013	-
0.1	0.1520±0.0090	-
0.5	0.4305±0.0580	-
1	0.8000±0.0071	0.1038±0.0595

#### (5) *I. mors-panacis* 특이적 진단 프라이머를 활용한 토양에서의 생물검증

##### (가) 실험실 내 감염된 인공토양에서의 HIS H3 primer의 특이도 평가

###### ① 감염된 인공토양 시료의 제조

다양한 농도의 *I. mors-panacis*로 감염된 인공 토양 샘플을 이전에 보고(Kernaghan *et al.*, 2007)에서 설명한 방법에 약간 수정을 하여 제조하였다. 상기 실험에서 동일한 방법으로 병원체 균주를 25 °C에서 2 주 동안 V8 broth에서 배양한 후, 물 (50ml / culture)에 blending 한 다음 멸균된 인공 토양과 최종 농도 10 %로 혼합하였다. 이렇게 준비된 토양 시료를 100% 감염으로 간주하였다. 그리고 멸균된 인공 토양에 100% 감염토양을 희석하여 50, 10, 5, 0.1 및 0.05 % 감염 토양시료를 준비하였다. 그 후, *I. mors-panacis* DNA 및 CFU의 추정을 위해 각 희석액으로부터 토양샘플을 채취하였다. 건강한 멸균 토양과 *I. robusta* H3에 감염된 토양을 각각 control 및 negative control 시료로 사용하였다.

## ② 감염된 토양 시료로부터 HIS H3 프라이머의 특이도 평가 와 병원체의 검출 및 정량

### ㉞ 감염된 토양 시료로부터 HIS H3 프라이머의 특이도 평가

HIS H3 프라이머를 이용한 PCR을 통해 *I. mors-panacis*에 인위적으로 감염된 토양에서 추출한 DNA는 *I. mors-panacis*의 순수 배양 에서 얻은 전형적인 크기의 밴드(230 bp)를 보여주었다. 감염되지 않은 토양 또 *I. robusta* 감염된 토양으로부터 추출된 DNA는 어떠한 PCR 산물도 생성하지 않았다 (그림 13C). 위 실험의 음성 대조군으로 토양에 *I. robusta* 의 존재를 확인하기 위해, 비 감염 및 *I. robusta*에 감염된 토양 시료의 토양 DNA를 universal HIS H3 프라이머 세트와 혼합하였다. HIS H3의 예상 크기의 밴드 (500 bp)는 *I. robusta* 감염된 샘플에서 얻은 반면, 감염되지 않은 토양 샘플(control)에서는 밴드를 얻지 못했다 (테이터는 표시되지 않음). qRT-PCR 조건 하에서, 병원체 DNA는 각각의 인공 감염된 토양 샘플에서 성공적으로 정량되었다. *I. mors-panacis* DNA의 농도는 100% 감염된 토양 샘플에서  $0.23 \pm 0.0143$  ng /  $\mu$ l의 토양 DNA와  $91.20 \pm 5.75$  ng /g(토양 입자)부터 0.05 % 감염된 토양에서  $0.02 \pm 0.0004$  ng /  $\mu$ l의 토양 DNA와  $4.21 \pm 0.16$  ng / g(토양입자)의 범위였다. 또한, 각 토양 샘플에서 CFU 및 DSI를 계산 하였다. CFU는 가장 높게 감염된 토양 샘플에서 가장 낮게 감염된 토양 샘플 순으로 관찰하였다.(그림 13B). CFU 값은 가장 높은 농도로 감염된 토양에서  $3 \times 10^2$  / g의 토양 범위였으며 가장 낮은 농도로 감염된 토양에서는 콜로니가 검출되지 않았다. DSI의 계산을 위해, 가장 높은 농도로 감염된 토양 샘플에서 배양 된 뿌리가 약하게 발아되고 완전히 썩은 것으로 관찰되었습니다. 그런 다음, 가장 낮은 농도로 감염된 토양 샘플로 갈수록 썩음 및 약한 발아 증상이 점진적으로 감소하고 음성 대조 토양 샘플과 유사하였다(그림 13A). 각 토양 샘플에서 재배된 뿌리로부터 기록된 DSI의 범위는  $5.5 \pm 0.14$  에서  $1.47 \pm 0.22$ 였다. 토양에서 병원체 DNA의 검출은 DNA 농도가 토양 감염 범위 ( $R^2 = 0.95$ ) (그림 14A), DSI 범위 ( $R^2 = 0.99$ )(그림 14B), 그리고 CFU 범위 ( $R^2 = 0.87$ )(그림 14C)와 양의 상관관계가 있었기 때문에 정확한 것으로 사료된다.

### ㉟ 감염된 토양 시료로부터 병원체의 검출 및 정량

상기 언급한 통상적인 PCR 및 qRT-PCR 조건 하에서 다양한 농도의 *I. mors-panacis*의 DNA 주형을 사용하여 구축된 표준 곡선(standard curve)에 기초하여 인위적으로 감염된 토양에서 병원체를 검출하고 정량하였고, DNA template의 부피는 2ul를 사용하였다.

## ③ Colony Forming Unit(CFU)의 측정

각 토양 샘플에서 *I. mors-panacis*의 CFU는 다음과 같이 측정되었다. 토양 1g을 각 샘플에서 채취하여 9ml의 식염수(saline solution) (0.85 %)와 적절히 혼합했다. 이어서, 생성 된 용액을  $10^{-3}$ 까지 식염수로 연속 희석 하였다. 각각의 희석액 100  $\mu$ l를 상기 언급 된 반 선택성 배지(semi-selective medium)에 뿌렸다. 접종 된 plates를 25 °C에서 어두운 곳에서 2 주 동안 배양하였다. 그런 다음 배양된 colony (각 토양 시료로부터)를 계산하고 다음 식  $\Sigma C / (n1 + 0.1 \times n2)$  d를 사용하여 CFU/g 을 추정했다.  $\Sigma C$ 는 두 개의 다른 희석액의 plate 계산된 집락수이다. n1은 제 1 희석액 플레이트의 수이며; n2는 제 2 희석 플레이트의 수이며; d는 초기 희석 계수이다.



그림 13 . Evaluation of; the pathogenicity of *I. mors-panacis* inoculated in different concentrations in sterilized artificial soils in comparison with *I. robusta* inoculated (-control) and mock soils (A); CFU of *I. mors-panacis* in all inoculated sterilized artificial soil samples (B); conventional PCR analysis showing the specific detection of *I. mors-panacis* templates after applying the specific HIS H3 primer set on artificially inoculated soils' DNA (C).

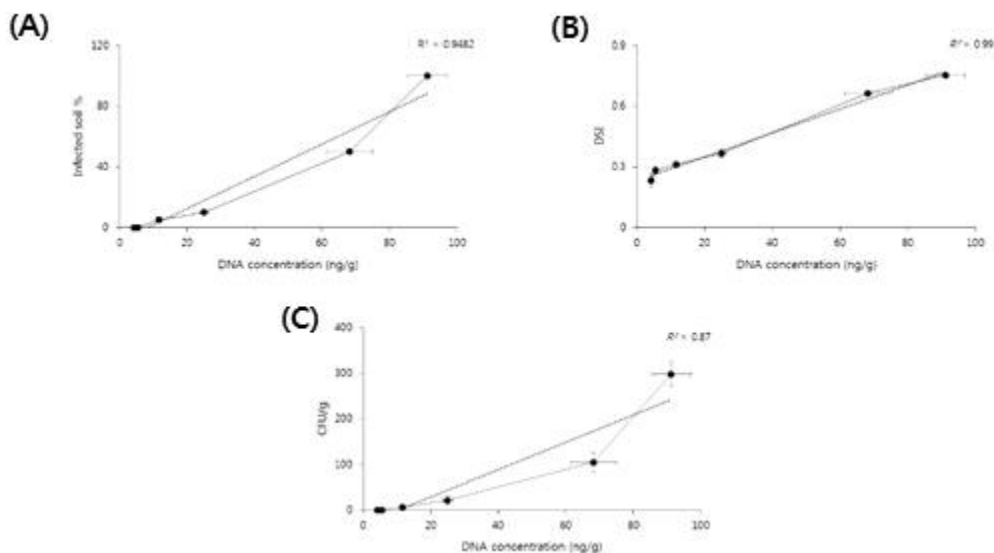


그림 14 . Evaluation of; the pathogenicity of *I. mors-panacis* inoculated in different concentrations in sterilized artificial soils in comparison with *I. robusta* inoculated (-control) and mock soils (A); CFU of *I. mors-panacis* in all inoculated sterilized artificial soil samples (B); conventional PCR analysis showing the specific detection of *I. mors-panacis* templates after applying the specific HIS H3 primer set on artificially inoculated soils' DNA (C).

(나) 자연 재배 토양에서 *I. mors-panacis*의 검출 및 정량

*I. mors-panacis*의 검출 및 정량을 위해 다양한 자연 환경의 필드(연천, 포천, 양주, 파주 인천 등)로부터 불량 또는 우수한 생산율을 갖는 다양한 토양 시료를 수집하였다. 또한 인삼 재배가 예정된 현장의 토양 시료에 병원체가 존재하는지 여부를 확인하였다. 시료의 지리적 위치에 대한 정보는 표 10에 나열되어 있다. 이전에 서술한 바와 같이 토양 DNA 분리 및 정제를 수행하였다. 이전에 실험실 내에서 수행된 바와 같이 병원체의 농도를 정량하였다.

자연환경의 재배 토양 시료는 인삼재배 토양이 양호한 인삼 생산 수율을 제공하는 토양, 수율이 나쁜 토양, 및 인삼 재배가 예정된 토양 샘플의 3 가지 범주로 분류되었다. 토양의 첫 번째 범주(수율이 양호한)에서, 병원균 주형은 qRT-PCR 분석에 의해 *I. mors-panacis*가. 이 결과는 이러한 토양이 계속해서 인삼 재배에 사용될 수 있음을 사료된다. 두 번째 범주의 토양 시료(수율이 불량한)에서 병원체 template은 토양의  $5.82 \pm 2.35$  내지  $892.34 \pm 103.70$  pg/g의 범위로 나타났으며, 나쁜 생산 수율을 보인 범주의 4개의 토양시료에서는 *I. mors-panacis* DNA 가 검출되지 않았는데, 이 재배 토양에서 수율이 낮았던 원인은 *Phytophthora cactorum*에 의한 뿌리의 썩음이 발생했을 가능성이 있음을 표면적 병증을 통해 유추하였다.

*Phytophthora cactorum*이 인삼에 뿌리 부패를 유발하지만 작물 증상이 *Ilyonectria* 뿌리 부패와 다르다는 보고가 있다. *P. cactorum*에 의한 뿌리 감염은 혈관계를 통해 감염된 잎에서 병원체를 뿌리로 전달하여 말기에서 발달 된 베이지 색의 내부 썩음을 유발하여 부패하게 된다 (Howard *et al.*, 1994). 토양 샘플의 마지막 범주(재배 예정토양)의 토양 대부분은 3 개의 토양 샘플을 제외하고 *I. mors-panacis* DNA가 검출되지 않았으며, 이 3개의 토양시료는 *I. mors-panacis* DNA의 양이 적은 것으로 기록 되었다 (표 10). 그러나, 병원체 DNA의 농도가 낮더라도 작물 감염의 가능성을 방지하기 위해 이러한 지역에서 재배하지 않는 것이 피하는 것이 좋을 것이라 사료된다.

㉟ 10. Quantification of *I. mors-panacis* template in soil samples collected from several locations for ginseng cultivation

History	Location	<i>I. mors-panacis</i> template quantity (pg/g)
Good yield	369-2, Sikhyeon-ri, Jeokseong-myeon, Paju	-
	San 161-8, Geumju-ri, Yeongjung-myeon, Pocheon	-
	San 161-8, Geumju-ri, Yeongjung-myeon, Pocheon	-
	665, Sajik-ri, Ildong-myeon, Pocheon	-
	575 Junggyo-ri Gasan-myeon Pocheon	-
	205-2, Hwangbang-ri, Nam-myeon, Yangju	-
	555-114, Hansan-ri, Nam-myeon, Yangju	-
	336-3, Ujeong-ri, Misan-myeon, Yeoncheon	-
Bad yield	338-54, Yulpo-ri, Jeokseong-myeon, Paju	280.41±170.22
	351, Gaekhyeon-ri, Jeokseong-myeon, Paju	239.73±20.71
	389-2, Dongmak-ri, Yeoncheon-eup, Yeoncheon-gun	51.18±13.52
	256, Wangjing-myeon, Yeoncheon-gun	114.96±58.39
	1000, Wangjing-myeon, Yeoncheon-gun	65.39±16.87
	916, Geumju-ri, Yeongjung-myeon, Pocheon	119.47±20.97
	575, Junggyo-ri Gasan-myeon Pocheon	892.34±103.70
	205-2, Hwangbang-ri, Nam-myeon, Yangju	9.22±1.81
	376, Sangbong-ri, Seolseong-myeon, Icheon	5.82±2.35
	957, Gueup-ri, Jeokseong-myeon, Paju	12.40±1.80
	74-4, Gueup-ri, Jeokseong-myeon, Paju	7.80±0.38
	944, Gueup-ri, Jeokseong-myeon, Paju	41.68±5.36
	851-1, Baekseok-ri, Misan-myeon, Yeoncheon-gun	-
	748-2, Daegwang-ri, Sinseo-myeon, Yeoncheon-gun	-
861, Igapal-ri, Sohol-eup, Pocheon	-	
938-2, Jail-ri, Yeongbuk-myeon, Pocheon	-	
Not yet cultured	259, Wangjing-myeon, Yeoncheon-gun	-
	706-3, Geumju-ri, Yeongjung-myeon, Pocheon	-
	Geumju-ri, Yeongjung-myeon, Pocheon	-
	1749, Sajik-ri, Ildong-myeon, Pocheon	-
	1749-1, Sajik-ri, Ildong-myeon, Pocheon	-
	517-5, Sajik-ri, Ildong-myeon, Pocheon	-
	190-1, Hwangbang-ri, Nam-myeon, Yangju	-
	423, Ibam-ri, Nam-myeon, Yangju	-
	423-1, Ibam-ri, Nam-myeon, Yangju	-
	938-2, Jail-ri, Yeongbuk-myeon, Pocheon	-
	222, Dapgok-ri, Sinseo-myeon, Yeoncheon	-
	1218, Juwol-ri, Jeokseong-myeon, Paju	18±1.35
	260, Wangjing-myeon, Yeoncheon-gun	21.10±8.15
	721, Junggyo-ri Gasan-myeon Pocheon	8.51±2.78



#### 4. 바실러스 속 계통 미생물의 산업용 배양조건 확립 및 제형화 기술 개발

##### 가. 길항미생물(ARRI17) 원제의 인삼 뿌리썩음병 성장 억제 효과 조사

###### (1) 인삼 뿌리썩음병 길항미생물 우수균주 선정

인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 미생물제제 개발을 위해 주관기관(경희대학교)과 협동기관(경기도농업기술원)에서 보유한 인삼 뿌리썩음병에 항균력이 우수한 길항미생물 중에서 길항미생물의 대량배양, 대량생산, 산업화 및 제형화 가능성을 평가하였다. 상기 길항미생물들에 대한 길항력 test *B. ginsengiterrae* DCY85와 *S. panacis* DCY99는 길항력이 우수하지만 endospore를 형성하지 않는 균주이기 때문에 제품화를 위한 액상제 및 분상제 등으로 제형화 될 경우 생균수 유지 등 제품 안정성을 보장할 수 없는 등의 문제들로 제품화로 이어질 수 있는 산업화 가능성이 *B. velezensis*에 비해 낮기 때문에 인삼 뿌리썩음병 방제용 복합 주성분 미생물제제 개발과 산업화가 가능한 길항미생물로 경기도농업기술원에서 보유하고 있는 인삼 뿌리썩음병균에 길항력이 우수한 미생물 *Bacillus velezensis* ARRI17 균주를 최종 선정하였다.

(2) 선발된 길항미생물 *B. velezensis* ARRI17 원제의 인삼 뿌리썩음병 병원균(*C. destructans*)에 대한 성장 억제와 대상 병원균에 대한 항균력을 대치배양법을 통해 확인한 결과 길항미생물 종균과 동일한 항균력이 확인되어 길항미생물 원제를 복합 주성분 길항미생물제제 시제품 제작용으로 사용하였다(그림 1).



그림 1. 인삼 뿌리썩음병에 대한 시제품 제작용 길항미생물 원제의 항균력 시험

###### (3) 길항미생물(ARRI17)제제 최적 억제농도 확인 시험용 기초 시제품 제작

길항미생물(ARRI17) 제제의 최적 억제농도를 확인하기 위한 시험용 기초 시제품으로 관주용의 액상제와 분말수화제 제형을 선정하였고, 길항미생물 효과 시험용 액상제와 분말수화제 기초 시제품의 복합 주성분으로 길항미생물(ARRI17), 해조추출물, 고분자폴리머 및 규산을 합제하여 각각 4개의 액상제와 4개의 분말수화제 시제품을 제작하였다. 제작한 각각의 액상제 제형과 분말수화제 제형의 기초 시제품 내 길항미생물 생균수를 조사하였다. 또한, 길항미생물(ARRI17)제제의 제형별 시험용 기초 시제품을 경기도농업기술원에 제공하여 인삼 뿌리썩음병에 대한 성장 억제와 방제 효과를 확인하였다.

(가) 길항미생물(ARRI17)제제의 최적 억제농도를 확인하기 위한 시험용 기초 시제품으로 관주용의 액상제와 분말수화제 제형의 복합 주성분 배합은 표 1와 같다.

표 1. 길항미생물(ARRI17)제제 시험용 기초 시제품 제형별 합제 주성분

번호	제형	주성분
1	액상제	ARRI17 + 해조추출물
2		ARRI17 + 해조추출물 + 규산
3		ARRI17 + 고분자 폴리머
4		ARRI17 + 고분자폴리머 + 규산
5	분말수화제	ARRI17 + 천연종자추출물
6		ARRI17 + 천연종자추출물 + 규산
7		ARRI17 + 천연종자추출물 + 규산 + 폴빅산
8		ARRI17 단제

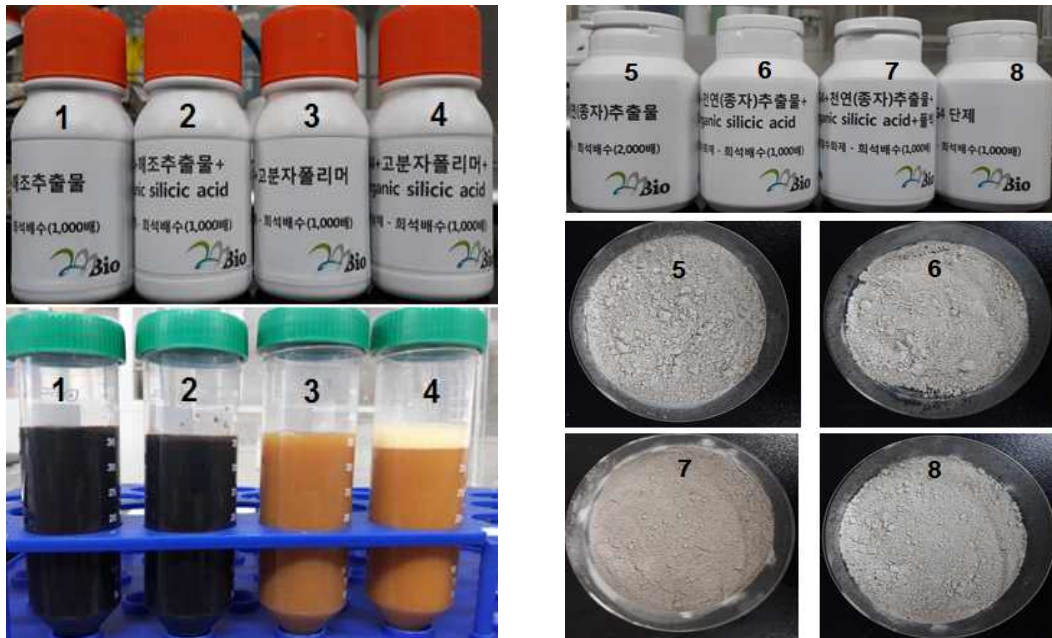
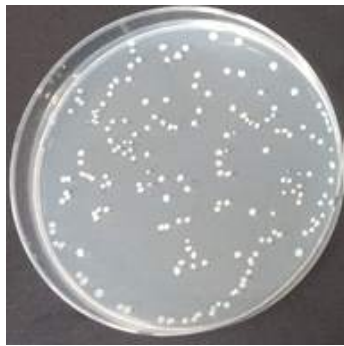


그림 2. 길항미생물(ARRI17)제제 시험용 기초 시제품 사진

(나) 액상제 제형과 분말수화제 제형의 기초 시제품 내 길항미생물 생균수 조사 결과 표 2와 그림3, 4과 같다.

표 2. 길항미생물(ARRI17)제제 시험용 기초 시제품 내 길항미생물 생균수

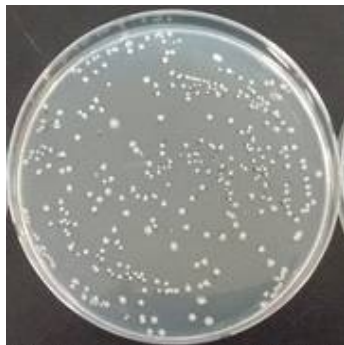
번호	제형	주성분	길항미생물 생균수
1	액상제	ARRI17 + 해조추출물	$1.3 \times 10^9$ CFU/ml
2		ARRI17 + 해조추출물 + 규산	$1.7 \times 10^9$ CFU/ml
3		ARRI17 + 고분자 폴리머	$1.5 \times 10^9$ CFU/ml
4		ARRI17 + 고분자폴리머 + 규산	$1.9 \times 10^9$ CFU/ml
5	분말수화제	ARRI17 + 천연종자추출물	$3.5 \times 10^9$ CFU/g
6		ARRI17 + 천연종자추출물 + 규산	$3.1 \times 10^9$ CFU/g
7		ARRI17 + 천연종자추출물 + 규산 + 폴빅산	$2.5 \times 10^9$ CFU/g
8		ARRI17 단제	$2.9 \times 10^9$ CFU/g



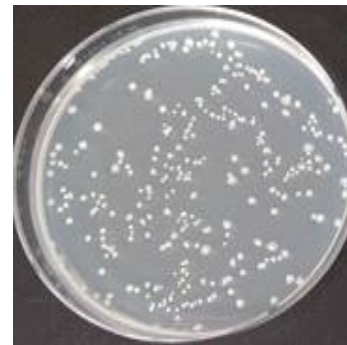
< ARRI17+해조추출물 >



< ARRI17+해조추출물+규산 >



< ARRI17+고분자 폴리머 >



< ARRI17+고분자폴리머+규산 >

그림 3. 액상제 길항미생물 생균수 조사



< ARRI17+천연종자추출물 >



< ARRI17+천연종자추출물+규산 >



< ARRI17+천연종자추출물+규산+폴빅산 >



< ARRI17 단제 >

그림 4. 분말수화제 길항미생물(ARRI17) 생균수 조사

(다) 길항미생물(ARRI17)제제 시험용 기초 시제품을 대상으로 인삼 뿌리썩음병원균 2종(*C. destructans*, *F. solani*)에 대한 성장 억제와 방제 효과를 확인(Pot 검증)한 결과는 표 4와 같다.

표 4. 길항미생물(ARRI17)제제 시험용 기초 시제품의 인삼 뿌리썩음병 방제효과 시험결과

처리 번호	처리내용		<i>C. destructans</i>			<i>F. solani</i>			방제가
	제형	주성분	출아 본수	출아율 (%)	발병주율 (%)	출아 본수	출아율 (%)	발병주율 (%)	
1	액상제	ARRI17 + 해조추출물	2.0	66.7	100	2.6	86.7	69.2	-
2		ARRI17 + 해조추출물 + 규산	1.2	40.0	100	2.6	86.7	50.0	23.1
3		ARRI17 + 고분자폴리머	1.4	46.7	100	2.6	86.7	80.8	-
4		ARRI17 + 고분자폴리머 + 규산	1.4	46.7	100	2.7	90.0	48.1	26.0
5	분말 수화제	ARRI17 + 천연종자추출물	2.0	66.7	100	2.9	96.7	37.9	41.7
6		ARRI17 + 천연종자추출물 + 규산	2.0	66.7	100	3.0	100.0	36.7	43.5
7		ARRI17 + 천연종자추출물 + 규산 + 폴빅산	0.9	30.0	100	2.9	96.7	24.1	62.9
8		ARRI17 단제	0.7	23.3	100	2.9	96.7	51.7	20.5
9		대조(토양소독구)	2.7	90.0	59.3	2.9	96.7	27.6	57.5
10		건전도양	2.2	73.3	81.8	1.2	40.0	25.0	61.5
11		발병도양	1.8	60.0	88.9	2.0	66.7	65.0	-

(라) 복합 주성분 합제 길항미생물제제 기초 시제품의 방제효과 향상을 위해 시제품 제형별 길항미생물(ARRI17) 밀도, 시제품 처리농도, 기능성 성분의 최적 효과 발현을 위한 합제 비율 선정, 살균 기능성 성분 등을 추가하여 시제품을 개선하였으며, 개선한 사항은 표 5와 같다.

표 5. 길항미생물(ARRI17)제제 시험용 기초 시제품의 시험결과에 따른 시제품 개선사항

항 목	기 준	개 선
1. 시제품 제형별 길항미생물 밀도	ARRI17 $10^9$	ARRI17 $10^{10}$
2. 시제품 처리농도(희석배수) (길항미생물 처리밀도)	1,000배 (최종 길항미생물 밀도 $10^6$ 이상 처리)	500배 (최종 길항미생물 밀도 $10^7$ 이상 처리)
3. 천연중자추출물	10%	15~20%
4. 규산(Organic silicic acid)	10%	10~15%
5. 살균 기능성 성분	무	성분 추가(그림 5)

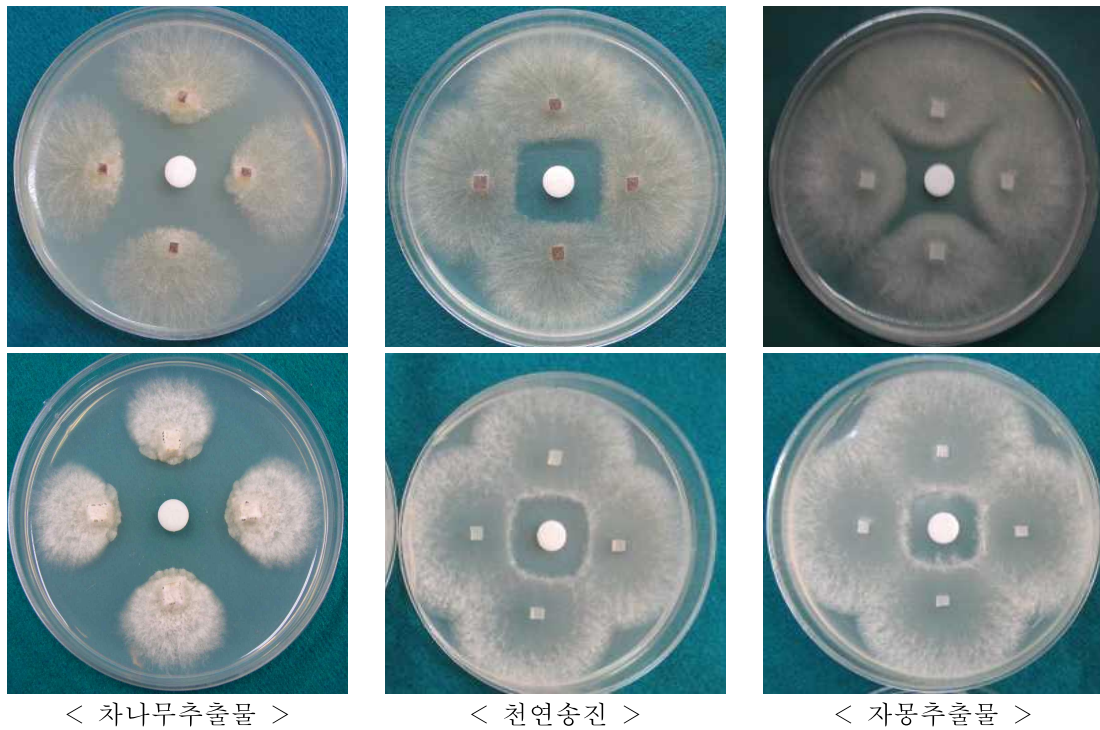


그림 5. 뿌리썩음병 병원균에 대한 살균 기능성 성분의 항균력 시험

## 나. 산업용 복합 미생물제제의 제형소재 선발 및 최적 제형화 공정개발

### (1) 인삼 뿌리썩음병 길항미생물 우수균주 선정

인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 미생물제제 개발을 위해 주관기관(경희대학교)과 협동기관(경기도농업기술원)에서 보유한 인삼 뿌리썩음병에 항균력이 우수한 길항미생물 중에서 길항미생물의 대량배양, 대량생산, 산업화 및 제품화 가능성을 평가하였다.

상기 길항미생물들에 대한 길항력 test *B. ginsengiterrae* DCY85와 *S. panacis* DCY99는 길항력이 우수하지만 endospore를 형성하지 않는 균주이기 때문에 제품화를 위한 액상제 및 분상제 등으로 제형화 될 경우 생균수 유지 등 제품 안정성을 보장할 수 없는 등의 문제들로 제품화로 이어질 수 있는 산업화 가능성이 *B. velezensis* ARRI17 에 비해 낮기 때문에 인삼 뿌리썩음병 방제용 복합 주성분 미생물제제 개발과 산업화가 가능한 길항미생물로 경기도농업기술원에서 보유하고 있는 인삼 뿌리썩음병균에 길항력이 우수한 미생물 *B. velezensis* ARRI17 균주를 최종 선정하였다.



그림 6. 인삼 뿌리썩음병균(*C. destructans*) 길항미생물 ARRI17 균주

(2) 인삼 뿌리썩음병 길항미생물(ARRI17) 산업화 대량배양 조건 확립

인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 미생물제제 개발을 위해 선정된 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17)의 산업화 대량배양 조건을 확립하고자 산업용 배지 및 배양조건에 대해 조사하였다.

인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 미생물제제 개발을 위해 선정된 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17)의 산업화 대량 배양조건을 확립하고자 산업용 배지 및 배양조건을 조사 분석한 결과 표 1과 같이 경제성을 고려한 산업용 배지 조성을 확립하고 배양 최적조건을 확립하였다.

표 6. 인삼 뿌리썩음병 길항미생물(ARRI17) 산업용 배지 조성 및 배양 최적조건

배지조성		배양최적조건
시약	함량	① 배양온도 : 30±0.5℃ ② 교반속도 : 150~200rpm ③ 통기조건 : 1.0~1.5 v/v/m ④ 배양시간 : 48~54시간 ⑤ 종료시점 : 포자 형성
Glucose	2%	
Soybean flour	2.5%	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2%	
CaCO <sub>3</sub>	0.1%	
MgSO <sub>4</sub>	0.03%	
CuSO <sub>4</sub>	0.001%	
MnSO <sub>4</sub>	0.002%	
FeSO <sub>4</sub>	0.002%	
ZnSO <sub>4</sub>	0.002%	

(가) 선발 길항미생물(ARRI17) 균주의 대량배양을 통해 복합 주성분 길항미생물제제 시제품 개발에 사용할 길항미생물 원제를 생산하고 그림 7와 같이 확보하였다.

(나) 길항미생물(ARRI17) 원제 내 미생물 생균수를 조사 분석한 결과 3.95×10<sup>11</sup> CFU/g 으로 원제를 생산하였으며, 복합 주성분 합제 길항미생물제제 시제품 제작에 투입 원제로 사용하였다.

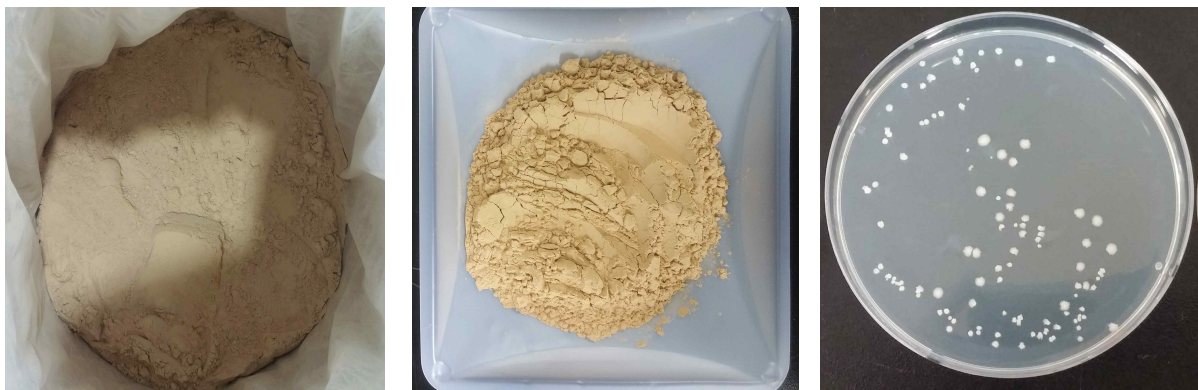


그림 7. 복합 주성분 길항미생물제제 시제품 제작용 길항미생물(ARRI17) 원제

다. 복합 주성분 합제 미생물제제 용도별 제형의 시제품 제작

(1) 복합 주성분 합제 미생물제제 관주제 제형별 주성분 투입농도 선정 및 시제품 제작  
 인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 합제 미생물제제의 관주제 제형별 주성분 세부 배합과 투입농도를 선정하여 시제품을 제작하였다. 관주제 액상제 시제품 복합 주성분으로 사용하는 차나무추출물, 천연송진, 자몽추출물 원료의 특성을 조사 분석하였으며, 제조된 제형별 시제품 내 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17)의 생균수를 측정하였다.

(가) 인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 합제 미생물제제의 관주제 제형별 주성분 세부 배합과 투입농도를 선정하였으며, 표 7과 같다.

(나) 관주제 액상제 제형의 시제품은 복합 주성분으로 길항미생물(ARRI17)과 차나무추출물, 송진 유화원제, 규산(Organic silicic acid), 종자 추출물, 천연 Algin acid, 증효제를 선정하고 배합 합제하여 시제품을 제작하였고, 관주제 분말수화제 제형의 시제품은 복합 주성분으로 길항미생물(ARRI17)과, 살균 기능성 미생물 (*Trichoderma viride*), 규산(Organic silicic acid), 종자 추출물, 천연 Algin acid, 마늘추출물 선정하고 배합 합제하여 시제품을 제작하였다(그림 8).

표 7. 복합 주성분 합제 미생물제제 관주제 제형 주성분 및 투입농도 선정

구분	제형	번호	주성분 배합농도
관주제	액상제	1	차나무추출물 40% + silicic acid 10% + 종자 추출물 20% + ARRI17 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml + 증효제 8%
		2	차나무추출물 40% + silicic acid 10% + 종자 추출물 20% + 천연 Algin 5% ARRI17 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml + 증효제 8%
		3	송진 유화원제 40% + silicic acid 10% + 종자 추출물 20% + 천연 Algin 5% + ARRI17 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml + 증효제 8%
		4	자중종자추출물 40% + silicic acid 10% + 종자 추출물 20% + 천연 Algin 5% + ARRI17 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml + 증효제 8%
	분말수화제	5	ARRI17 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml + <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 40% + silicic acid 10% + 종자 추출물 10%
		6	ARRI17 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml + <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 40% + silicic acid 10% + 종자 추출물 20%(10%) + 천연 Aligin acid 10%
		7	ARRI17 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml + <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 40% + silicic acid 10% + 종자 추출물 20%(10%) + 천연 Aligin acid 10% + 마늘추출물 5%
		8	ARRI17 $1 \times 10^{10}$ cfu/ml + <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 40% + silicic acid 10% + 종자 추출물 20%(10%) + 천연 Aligin acid 10% + 마늘추출물 10%



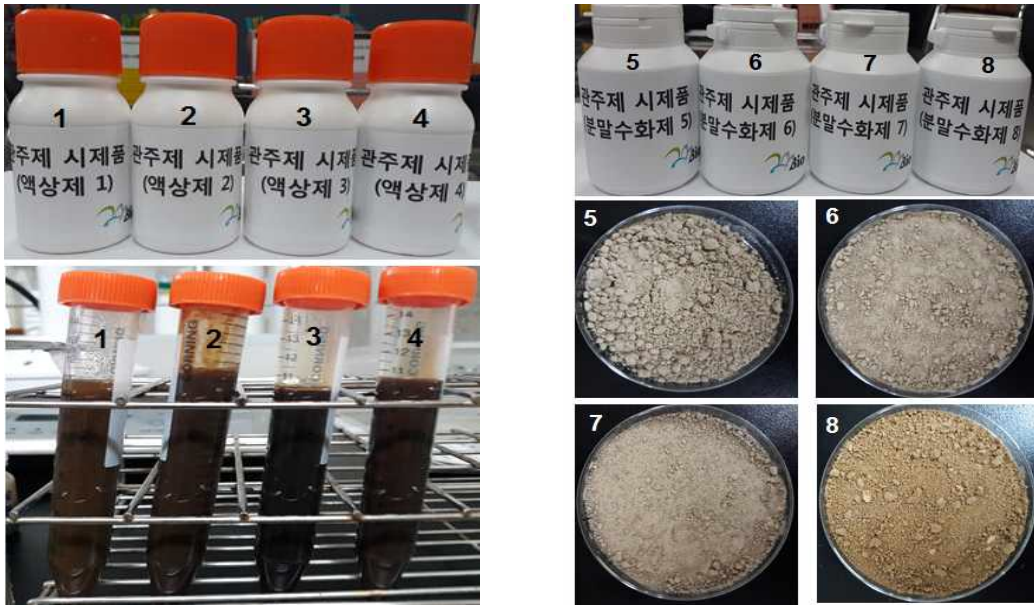


그림 8. 복합 주성분 합제 미생물제제 관주제 제형별 시제품

(다) 관주제 액상제 시제품 복합 주성분으로 사용하는 차나무추출물, 천연송진, 자몽추출물 원료 특성을 조사 분석한 결과 표 8, 표 9과 같다.

표 8. 관주제 액상제 시제품 투입원료 특성

투입원료	구분	내용
차나무추출물	원료	Camelia seed extract
	주성분 (Saponin)	60%
	pH	5.5 ~ 6.0
	Water solubility	100%
	주요 기능	천연 계면활성제로서 살충제, 살균제 천연 원료로 사용
천연송진	원료	소나무 송진
	주성분	100% 천연 송진
	성상	부정형 고상
	주요 기능	천연 고착제로 살균, 살충 기능 천연 원료로 농업적 이용
자몽추출물	원료	Grapefruit seed extract
	주성분 (Naringin)	40%
	pH	6.0 ~ 6.5
	Water solubility	100%
	주요 기능	천연 추출물로서 살균제 천연 원료로 사용

표 9. 관주제 액상제 시제품 투입원료 주성분 특성

투입원료	주성분	약효 발현 농도	약해 없는 농도
차나무추출물	Tea saponin	200 ppm	400 ppm ~ 800 ppm
천연송진	Pine Resin(10% 주성분) 유화완료 원료 기준	200 ppm	400 ppm ~ 800 ppm
자몽추출물	Naringin	200 ppm	400 ppm ~ 800 ppm

(라) 관주제 액상제 제형의 시제품 내 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 생균수를 측정 한 결과  $5.2\sim 5.7\times 10^9$  CFU/ml로 확인되었고, 관주제 분말수화제 제형의 시제품 내 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 생균수를 측정 한 결과  $7.3\sim 7.9\times 10^9$  CFU/g로 확인되었으며, 살균 기능성 미생물(*Thricodema viride*) 생균수는 측정 한 결과  $2.4\sim 2.9\times 10^6$  CFU/g로 확인되었다.

표 9. 복합 주성분 합제 미생물제제 관주제 제형별 시제품 내 미생물 생균수

구분	제형	번호	시제품 내 미생물 생균수	
			<i>B. velezensis</i> ARRI17	<i>Thricodema viride</i>
관주제	액상제	1	$5.4\times 10^9$ CFU/ml	-
		2	$5.7\times 10^9$ CFU/ml	-
		3	$5.3\times 10^9$ CFU/ml	-
		4	$5.2\times 10^9$ CFU/ml	-
	분말수화제	5	$7.7\times 10^9$ CFU/g	$2.7\times 10^6$ CFU/g
		6	$7.4\times 10^9$ CFU/g	$2.9\times 10^6$ CFU/g
		7	$7.9\times 10^9$ CFU/g	$2.4\times 10^6$ CFU/g
		8	$7.3\times 10^9$ CFU/g	$2.8\times 10^6$ CFU/g

(2) 복합 주성분 합제 미생물제제 기비제 제형별 주성분 투입농도 선정 및 시제품 제작 인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 합제 미생물제제의 기비제 제형별 주성분 세부 배합과 투입농도를 선정하여 시제품을 제작하였다. 기비제 입상제 시제품에 투입되는 휴믹산, 발효 대두박, 입상 규산 원료의 특성과 기비제 분상제 시제품에 투입되는 님박, Silicic acid, 분상 규산(분상 규산질 비료) 원료 특성을 조사 분석하였으며, 제조된 제형별 시제품 내 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17)과 살균 기능성 미생물(*Thricodema viride*)의 생균수를 측정하였다.

(가) 인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 합제 미생물제제의 기비제 제형별 주성분 세부 배합과 투입농도를 선정하였으며, 표 10과 같다.

표 10. 복합 주성분 합제 미생물제제 기비제 제형 주성분 및 투입농도 선정

구분	제형	번호	주성분 배합농도
기비제	입상제	1	ARRI17 $1 \times 10^7$ cfu/g + <i>Trichoderma viride</i> $1 \times 10^5$ cfu/g + silicic acid 1% + 풀빅산 60% + 입상규산 30% + 발효 대두박 10%
	분상제	2	ARRI17 $1 \times 10^7$ cfu/g + <i>Trichoderma viride</i> $1 \times 10^5$ cfu/g + silicic acid 1% + neem bark 90% + 분상 규산 10%

(나) 기비제 입상제 제형의 시제품 제작 복합 주성분으로 길항미생물(ARRI17)과, 살균 기능성 미생물(*Trichoderma viride*), 규산(Organic silicic acid), 풀빅산, 입상규산, 발효 대두박을 선정하고 배합 합제하여 시제품을 제작하였고, 기비제 분상제 제형의 시제품 제작 복합 주성분으로 길항미생물(ARRI17)과, 살균 기능성 미생물(*Trichoderma viride*), 규산(Organic silicic acid), 님박(neem bark), 분상 규산을 선정하고 배합 합제하여 시제품을 제작하였다.

(다) 기비제 입상제 시제품에 투입되는 휴믹산, 발효 대두박, 입상 규산 원료 특성을 조사 분석한 결과 표 11과 같다.

표 11. 기비제 입상제 시제품 투입원료 특성

투입원료	구분	특성
휴믹산	휴믹 함량	70%
	수분함량	15%
	입도	2~4 mm
	형태	Granule
발효 대두박	NPK 함량	N 8.3%, P 3%, K 2%
	유기물 함량	81%
	수분함량	11% 미만
	입도	2~4mm
Silicic acid	원료 물질	쇠뜨기풀
	silicic acid 함량	7%
	용해도(물)	100%
	성상	갈색 분상제
입상 규산 (입상 규산질)	규산	28~30
	고토	2~5
	알칼리분	45~50
	미량요소	철등 약간
	용도	토양개량



발효 대두박

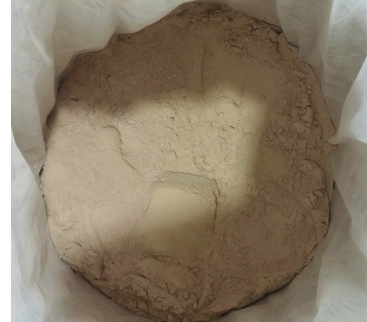
입상 규산

휴믹산



Silicic acid

살균 기능성 미생물  
(*Thricodema viride*)



길항미생물  
(ARR17)

그림 9. 기비제 입상제 시제품 제작 투입원료



그림 10. 기비제 입상제 제작 최종 시제품

(라) 기비제 분상제 시제품에 투입되는 님박, Silicic acid, 분상 규산(분상 규산질 비료) 원료 특성을 조사 분석한 결과 표 12와 같다.

표 12. 기비제 분상제 시제품 투입원료 특성

투입원료	구분	특성
님박	주성분	님빈(Nimbin), 님비딘(Nimbidin), 님비올(Nimbiol), 게두닌(Gedunin), 살라닌(Salannin), 아자디락틴(Azadirachtin), 퀘세친(Quercetin)
	주성분 기능	항진균, 염증, 해열, 항세균, 살충, 해충기피 등
	질소	2.87%
	인산	0.7%
	칼륨	1.04%
	Azadirachtin	300 ppm
	Nimbin	550 ppm
	Salann	750 ppm
	silica	0.5%
	Zinc	25mg/kg
	Calcium	0.3 %
	pH	5.5~5.7
	E.coli per gram	None
	중금속	Non
Silicic acid	원료 물질	쇠뜨기풀
	silicic acid 함량	7%
	용해도(물)	100%
	성상	갈색 분상제
분상 규산 (분상 규산질 비료)	규산	28~30
	고토	2~5
	알칼리분	45~50
	미량요소	철등 약간
	용도	토양개량
	물리적 구조	결정구조
	특징	가용성 알루미늄 함량이 적다
	시비 편이성	분말이므로 개량제 살포 기계에 적합 입상규산질 비료는 복비 시비기로 시비 가능
	시비 효과	시비 초년도부터 빠르게 효과가 나타난다.



넝박(Neem bark)



분상 규산



Silicic acid

살균 기능성 미생물  
(*Thricodema viride*)



길항미생물  
(ARRI17)

그림 11. 기비제 분상제 시제품 제작 투입원료



그림 12. 기비제 분상제 제작 최종 시제품

(마) 기비제 입상제 제형의 시제품 내 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 생균수를 측정한 결과  $5.2 \times 10^7$  CFU/g로 확인되었고, 살균 기능성 미생물(*Thricodema viride*) 생균수는  $4.3 \times 10^5$  CFU/g로 확인되었다.

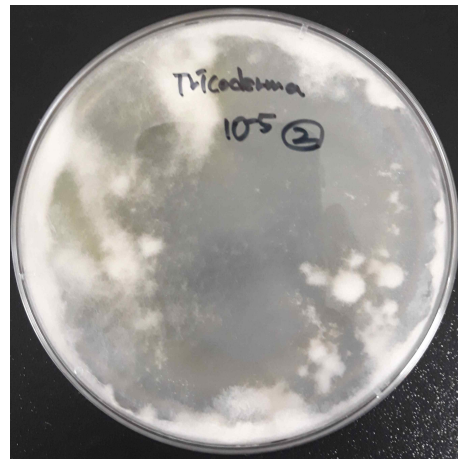
(바) 기비제 분상제 제형의 시제품 내 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 생균수를 측정한 결과  $4.3 \times 10^7$  CFU/g로 확인되었고, 살균 기능성 미생물(*Thricodema viride*) 생균수는  $4.8 \times 10^5$  CFU/g로 확인되었다.

표 13. 복합 주성분 합제 미생물제제 기비제 제형별 시제품 내 미생물 생균수

구분	제형	시제품 내 미생물 생균수	
		<i>B. velezensis</i> ARRI17	<i>Thricodema viride</i>
기비제	입상제	5.2×10 <sup>7</sup> CFU/g	4.3×10 <sup>5</sup> CFU/g
	분상제	5.7×10 <sup>7</sup> CFU/g	4.8×10 <sup>5</sup> CFU/g



길항미생물  
(*B. velezensis* ARRI17)



살균 기능성 미생물  
(*Thricodema viride*)

그림 13. 기비제 분상제 시제품 내 미생물 생균수 조사

라. 선발 물질 배합별 및 기능성 보조제, 증량제, 안정제 적용 최적 배합 결정

인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 미생물제제 시험용 기초 시제품의 제형별 합제 주성분을 추려 관주제의 2차 주성분 최적 배합 결정을 위해 길항미생물의 밀도 조사와 약효 및 약해 검증(경기농업기술원) 등 통하여 최적 배합을 선정하였다. 배합별, 제형별 시제품에 대해 경기도농업기술원과 협의하여 실험을 진행하였고, 미생물 밀도 조사, 약해 및 약효 실험(경기농업기술원)을 진행하여 인삼 뿌리썩음병 방제용 복합 주성분 미생물제제 최적 배합으로 액상제 (A-1), 분말수화제(B-1)를 선발하였다.

- (1) 액상제 주성분 조정 2차 시제품 최적 배합 선정
  - (가) 액상제 주성분 배합

표 14. 액상제 주성분 배합표

제형	번호	주성분 배합비
액상제	A-1	송진 유화원제 60% + 유칼립투스추출물 20% + silicic acid 5% + 종자 추출물 5% + ARRI 17 1×10 <sup>10</sup> cfu/g 10% + 키토산 3%
	A-2	송진 유화원제 80% + silicic acid 5% + 종자 추출물 5% + ARRI 17 1×10 <sup>10</sup> cfu/g 1% + 키토산 3%

(나) 액상제 미생물 밀도 조사

① 상온보관 밀도 조사

표 15. 상온 밀도 조사표

구분		밀도 조사방법	제조 직후 상온 밀도
액상제	A-1	시제품을 제조직 후 TSA(Tryptic Soy Agar) 배지를 사용하여 30℃에서 3일간 배양	$2.2 \times 10^{10}$ CFU/ml
	A-2		$4.0 \times 10^9$ CFU/ml

② 장기 안정성 미생물 밀도 조사 (60℃ 7일간 보관 밀도)

표 16. 장기 안정성 미생물 밀도 조사표

구분		밀도 조사방법	60℃ 7일간 보관 밀도
액상제	A-1	시제품을 60℃에서 7일간 보관 후 TSA(Tryptic Soy Agar) 배지를 사용하여 30℃에서 3일간 배양	$3.0 \times 10^{10}$ CFU/ml
	A-2		$1.5 \times 10^{10}$ CFU/ml

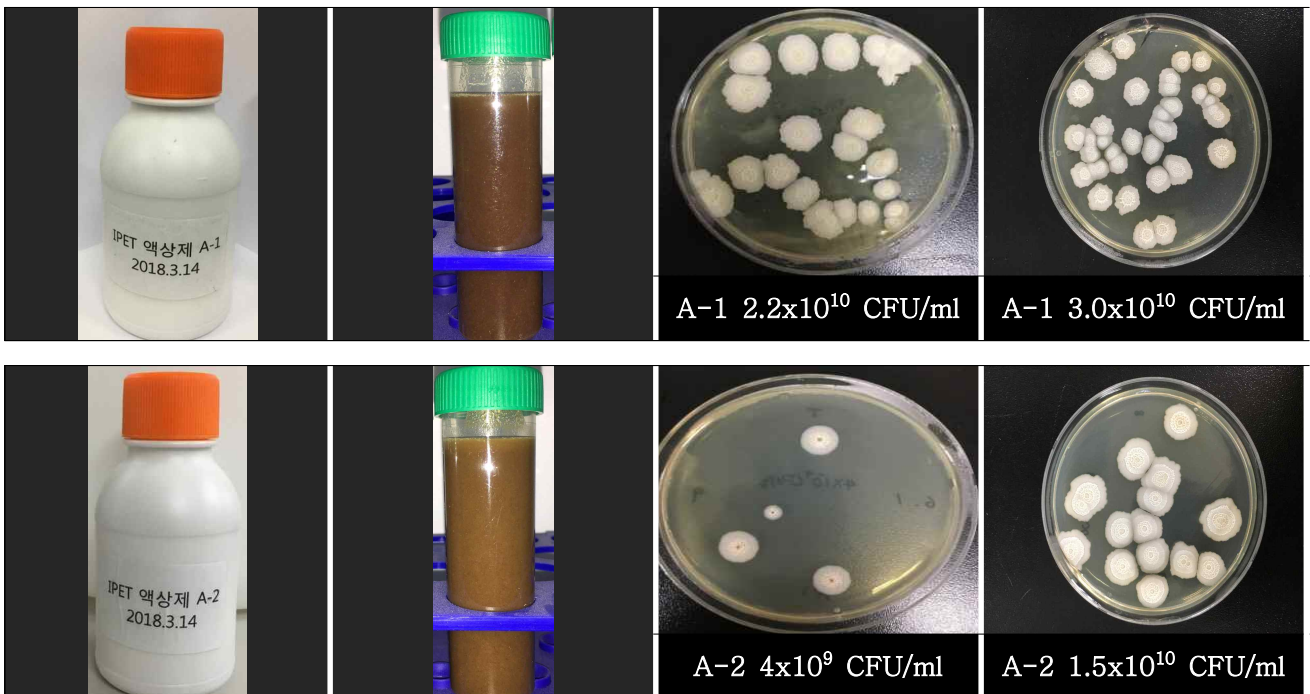


그림 14. 주성분 조정 2차 액상제 제형 및 미생물 밀도



(2) 분말수화제 주성분 조정 2차 시제품 최적 배합 선정

(가) 분말수화제 주성분 배합표

표 17. 분말수화제 주성분 배합표

제형	번호	주성분 배합비
분말수화제	B-1	ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10% + Trichoderma viride $2 \times 10^7$ cfu/g 50% + silicic acid 5% + 종자 추출물 20% + 키토산 3% + Bamboo extract 12%
	B-2	ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10% + Trichoderma viride $2 \times 10^7$ cfu/g 50% + silicic acid 5% + 종자 추출물 20% + 키토산 3% + 카올린 12%

(나) 분말수화제 미생물 밀도 조사

표 18. 분말수화제 미생물 밀도

구분		밀도 조사방법	밀도
분말수화제	B-1	TSA(Tryptic Soy Agar) 배지에 배양 30℃에 3일간 인큐베이션 실시	$8.6 \times 10^{10}$ CFU/g
	B-2	TSA(Tryptic Soy Agar) 배지에 배양 30℃에 3일간 인큐베이션 실시	$1.16 \times 10^{10}$ CFU/g



그림 15. 주성분 조정 2차 분말수화제 제형 및 미생물 밀도

마. 복합미생물제제 사용 용도별 효력보조제 및 첨가제 후보물질 선발

선발 물질의 배합별 및 기능성 보조제, 증량제, 안정제 적용 최적 배합 결정 과정에서 발생한 제형화 및 물성의 문제점 발생으로 복합미생물제제의 사용 용도별 효력보조제와 첨가제 후보물질 선발 및 실험을 통해 복합미생물제제의 사용 용도별 최적 배합에서 발생한 문제점을 보완하였다. 분말수화제는 레진 형성으로 고르게 접촉하지 못하는 문제와 관주시 사용 까다로움 문제 발생으로 분말 수화제 효력보조제 및 첨가제 후보물질을 선발하였고, 액상제는 고르게 접촉되지 못하는 문제와 장기 보관 시 압착 현상으로 사용성이 떨어지는 문제점이 발생하여 효력보조제 및 첨가제 후보물질 선발 실험을 진행하였다.

(1) 분말수화제

(가) 분말수화제 효력보조제 및 첨가제 후보물질 확보

표 19. 분말 수화제 효력보조제 및 첨가제 후보물질

품목	용도	주성분
NK-SLS	분산 활성제	리그노설포산 나트륨
NK-WC	일반 습윤활성제	도데실 황산 나트륨
NK-EW95	저기포성 분산활성제	1-트리데칸올 산화규소
NK-KAOLINE	증량제	Kaoline

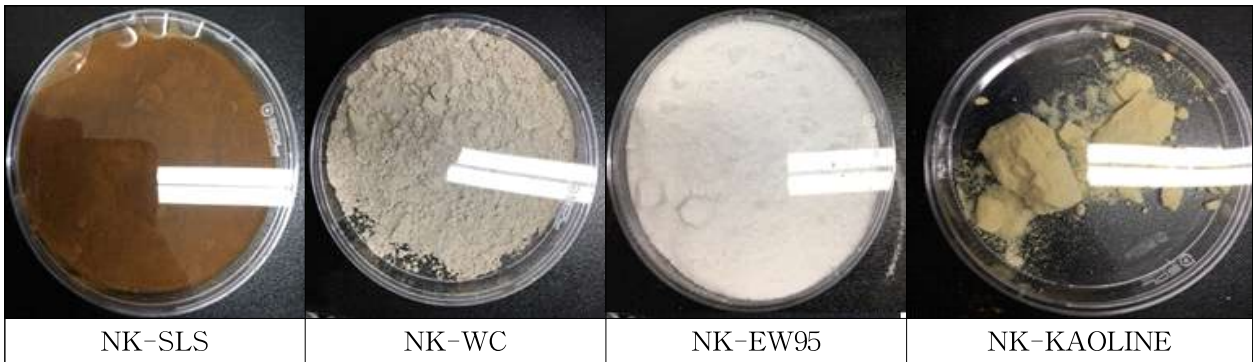


그림 16. 분말수화제 효력보조제 및 첨가제 후보물질

(나) 분말수화제 효력보조제 및 첨가제 후보물질 실험

표 19. 분말수화제 주성분 배합표

구 분		주성분 배합비	
무처리	B-1	ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10% + <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 50% + silicic acid 5% + 종자 추출물 20% + 키토산 3% + Bamboo extract 12%	
	B-2	ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10% + <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 50% + silicic acid 5% + 종자 추출물 20%+키토산 3% + 카올린 12%	
구 분		후보물질	주성분 배합비
실험구	B-1	NK-SLS	ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10% + <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 50% + silicic acid 5% + 종자 추출물 20% + 키토산 3% + Bamboo extract 12% + 각 후보물질
		NK-EW95	
		EW95+SLS+ NK-WC	
	B-2	NK-SLS	
		NK-EW95	
		EW95+SLS+ NK-WC	

※ 각 실험은 1%, 3%, 5% 진행

(다) 실험 결과

실험 결과 분말수화제 + EW95 3% + SLS3% + WC 조합 3%에서 가장 좋게 나타났으며, 5% 이상의 경우 3% 배합과 효능에 차이가 없었으나 거품이 발생하여, 경제적인 3% 조합으로 결정하였다.

표 20. 각 효력보조제 실험 결과

구분	효력보조제	결과		
		1%	3%	5%
B-1	NK-SLS	-	+	+
	NK-EW95	-	+	+
B-2	NK-SLS	-	+	+
	NK-EW95	-	+	+

※ - : 불량    + : 낮음    \*\* : 보통    \*\*\* : 양호

표 21. 효력보조제 합제 실험 결과

구분	효력보조제	결과		
		1%+1%	3%+3%	5%+5%
B-1	EW95+SLS	-	++	++
B-2	EW95+SLS	-	++	++

※ - : 불량    + : 낮음    \*\* : 보통    \*\*\* : 양호

표 22. 효력보조제 및 증량제 합제 실험 결과

구분	효력보조제	결과		
		1%+1%+1%	3%+3%+3%	5%+5%+5%
B-1	EW95+SLS+N K-WC	-	+++	+++ (거품발생)
B-2	EW95+SLS+N K-WC	-	++	+++ (거품발생)

※ - : 불량    + : 낮음    \*\* : 보통    \*\*\* : 양호

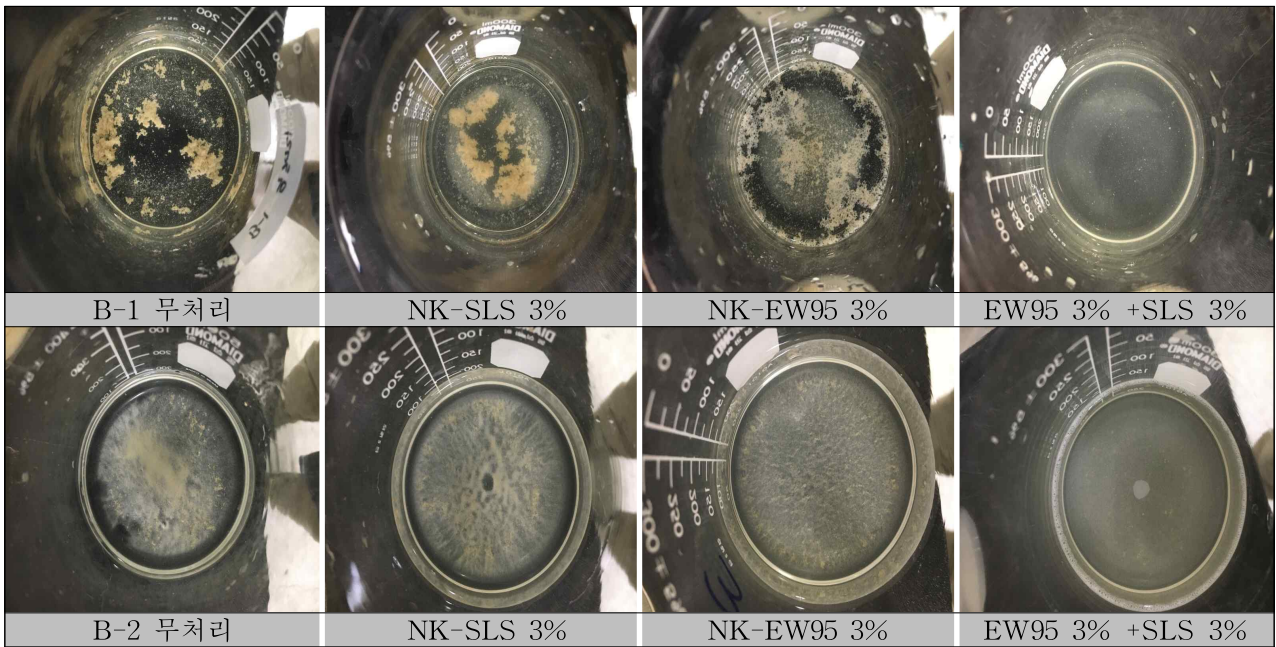


그림 17. 분말수화제 시험결과

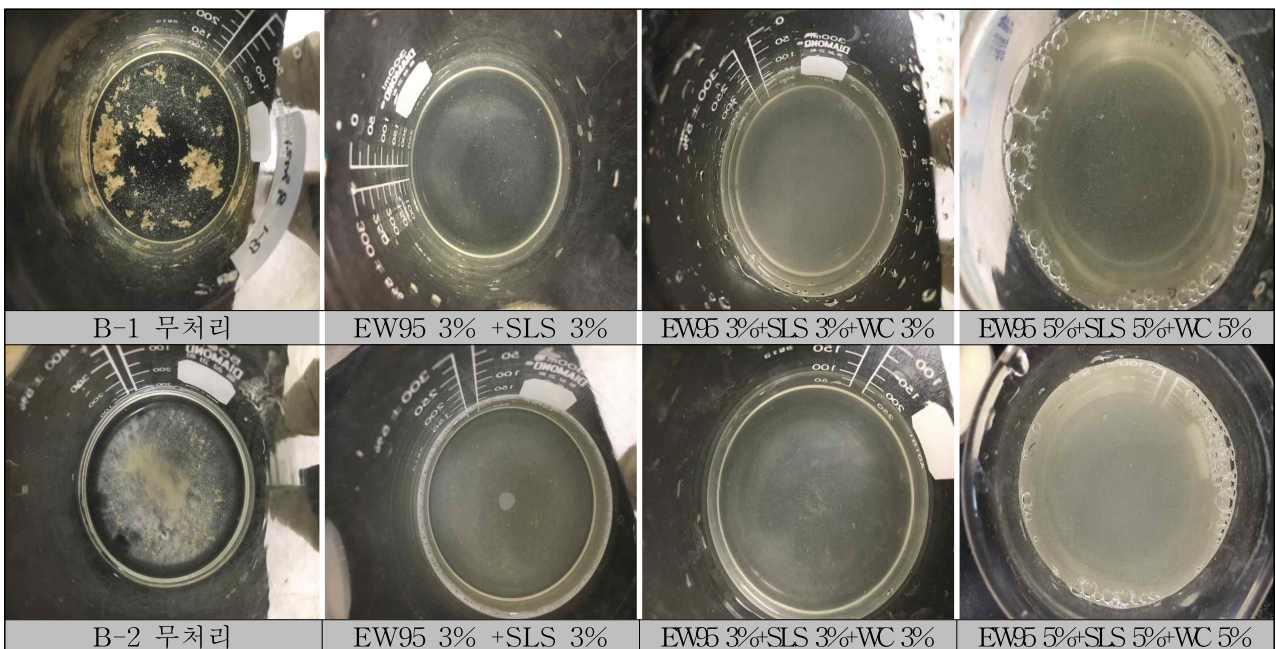


그림 18. 각 분말수화제 효력보조제 및 증량제 합제

(2) 액상제

(가) 효력보조제 및 첨가제 후보물질

표 23. 액상제용 효력보조제 및 첨가제 후보물질

	제품명	화학명	CAS No.	Inert list
1	COG 15	Castor oil, ethoxylated	61791-12-6	4B
2	OA 1019	Polyoxyethylene monooleate	9004-96-0	4B
3	PEG 400	Polyethylene glycol	25322-68-3	4B
4	OPE 1000	Polyoxyethylene (1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl ether	9036-19-5	4B
5	LE 5	Polyoxyethylene dodecyl mono ether	9002-92-0	4B
6	NP 1019	Polyoxyethylene nonylphenol	9016-45-9	4B
7	TWO 1015	Polyoxyethylene sorbitan monooleate	9005-65-6	4B
8	COG 100	Castor oil, ethoxylated	61791-12-6	4B
9	LC 50D	Castor oil, ethoxylated	61791-12-6	4B
		Polyoxyethylene dodecyl mono ether	9002-92-0	4B
10	Tween 80	Polyoxyethylene sorbitan monooleate	9005-65-6	4B
11	Oleic acid	Oleic acid	112-80-1	4A
12	565P	Nonylphenol, ethoxylated, phosphate ester	518-79-1	4B
13	GDO-325	polyoxyethylene glycerin monooleate	51192-09-7	4B
14	NP 1015	Poly(oxyethylene) nonylphenyl ether	9016-45-9	4B
15	Ethanol	Ethyl alcohol	64-17-5	4B
16	SA-BD100	Sorbitan monooleate + Castor oil, ethoxylated	1338-43-8	4B
17	SA-BO40	Nonylphenol, ethoxylated, phosphate ester + Polyoxyethylene sorbitan monooleate	9005-65-6	4B

(나) 효력보조제 및 첨가제 후보물질 4종 선발 및 추가 선발

표 24. 액상제용 효력보조제 및 첨가제 최종 4종 선발 및 추가 선발

제품명	화학명	CAS No.	Inert list
LC 50D	Castor oil, ethoxylated	61791-12-6	4B
	Polyoxyethylene dodecyl mono ether	9002-92-0	4B
LE 5	Polyoxyethylene dodecyl mono ether	9002-92-0	4B
SA-BD100	Sorbitan monooleate +Castor oil, ethoxylated	1338-43-8	4B
SA-BO40	Nonylphenol, ethoxylated, phosphate ester +Polyoxyethylene sorbitan monooleate	9005-65-6	4B
NK-SC199 (추가선발)	Triethanol amine, polytristyrylphenyl +Propylene glycol(57-55-6)	105362-40-1	4B

(다) 액상제 효력보조제 및 첨가제 후보물질 사진

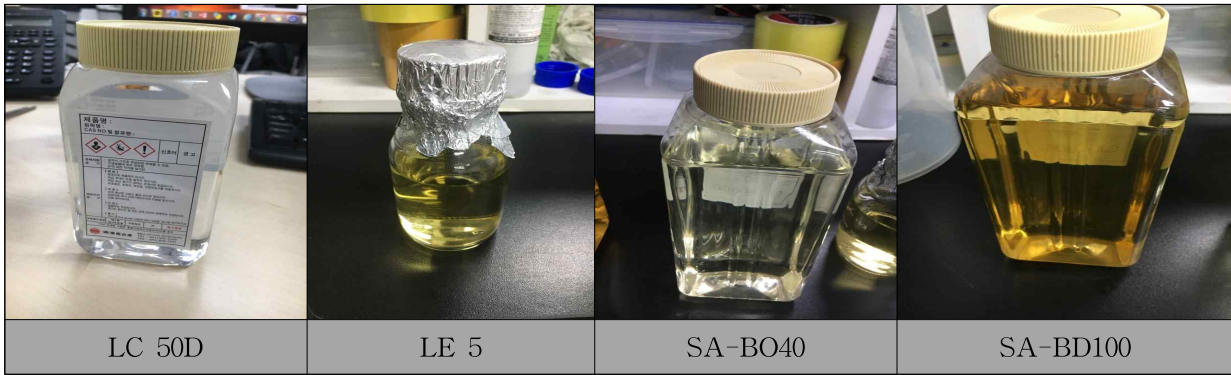


그림 19. 액상제 효력보조제 및 첨가제 최종 후보물질 4종

(라) 액상제 효력보조제 및 첨가제 후보물질 확보 실험

표 25. 액상제 효력보조제 및 첨가제 주성분 배합비

구 분	주성분 배합비	
무처리	송진 유화원제 60% + 유칼립투스추출물 20% + silicic acid 5% + 종자 추출물 5% + ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10% + 키토산 3%	
구 분	후보물질	주성분 배합비
실험구	LC 50D	송진 유화원제 60% + 유칼립투스추출물 20% + silicic acid 5% + 종자 추출물 5% + ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10% + 키토산 3% + 각 후보물질
	LE 5	
	SA-BD100	
	SA-BO40	

(마) 결과

표 26. 액상제 효력보조제 및 첨가제 후보물질 확보 결과

구분	효력보조제	결과		
		1%	3%	5%
액상제	LC 50D	효과 없음	효과 없음	효과 없음
	LE 5	효과 없음	효과 없음	효과 없음
	SA-BD100	효과 없음	초반 효과 좋음 시간경과시 효과 없음	초반 효과 좋음 시간경과시 효과 없음
	SA-BO40	효과 없음	효과 없음	효과 없음

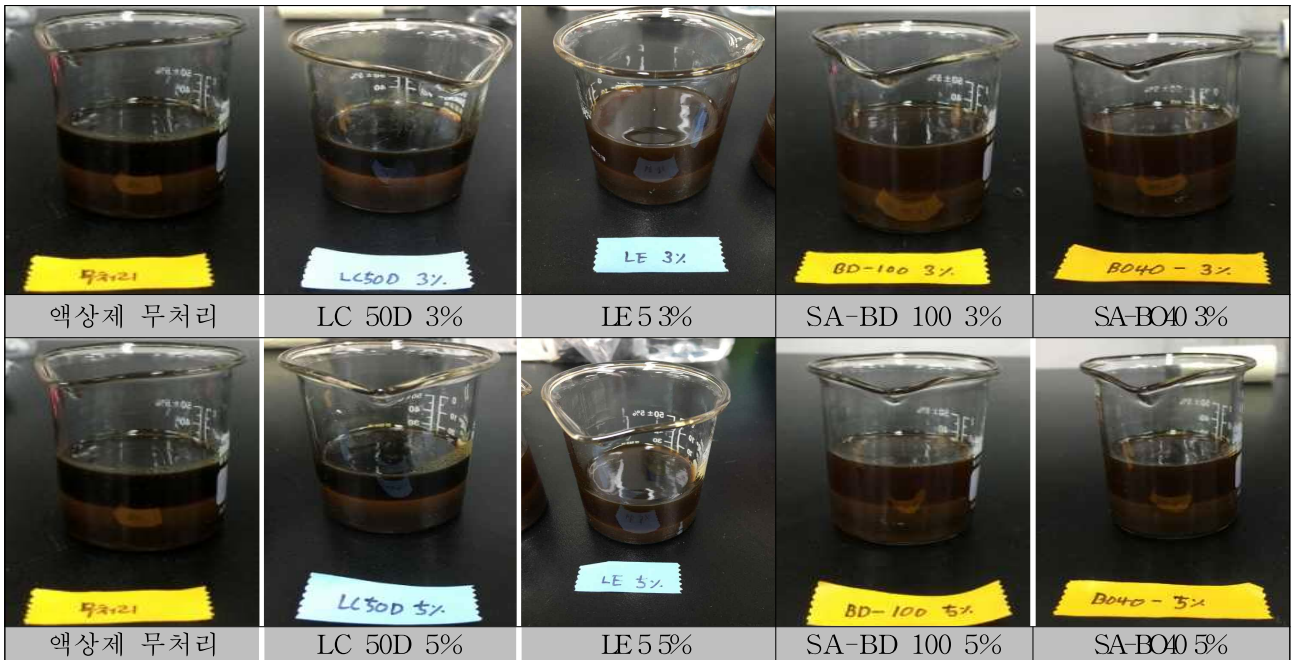


그림 20. 액상제 효력보조제 및 첨가제 실험 결과

(3) 복합미생물제제 사용 용도별 효력보조제 및 첨가제 선발 물질 문제점 개선

(가) 분말 수화제의 문제점 발생 및 개선

① 분말 수화제의 문제점 발생

㉞ 주성분 합제 과정에서 뭉침 현상의 문제점 발생

㉟ EW-95 관리의 까다로움과 *Trichoderma viride*와의 뭉침 현상으로 대체 물질 필요

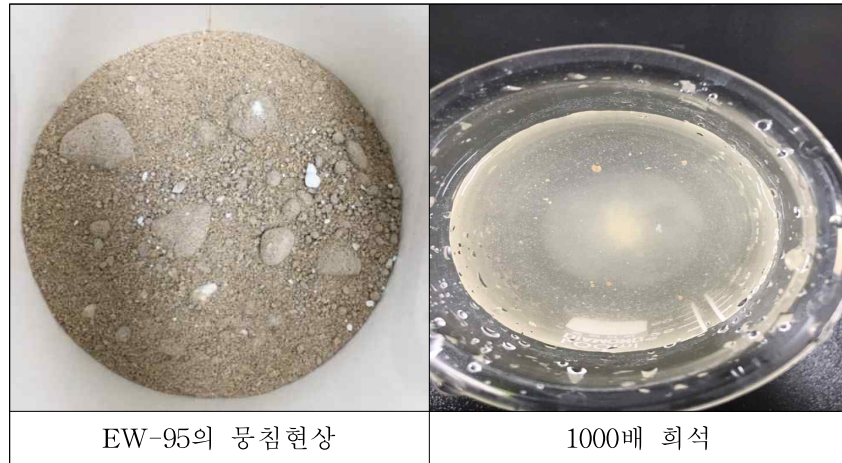


그림 21. 분말수화제 효력보조제 및 첨가제 문제점

② 분말수화제의 문제점 보완 및 개선

㉞ 제조 공정 중 뭉침 현상 방지 및 희석액 응집개선을 위해 EW-95와 같은 농도인 3%를 1,000배 희석하여 실험을 진행하였다.

㉟ EW-95와 효과는 비슷하며 보관이 용이한 EFW를 보조제로 최종 선발하였다.

③ 분말수화제 응집개선 실험 결과

표 27. 분말수화제 보조제 보완 실험

EW-95		EFW	
뭉침현상개선	분산효과	뭉침현상개선	분산효과
+	++	+++	++

+: 나쁨    ++:보통    +++:좋은



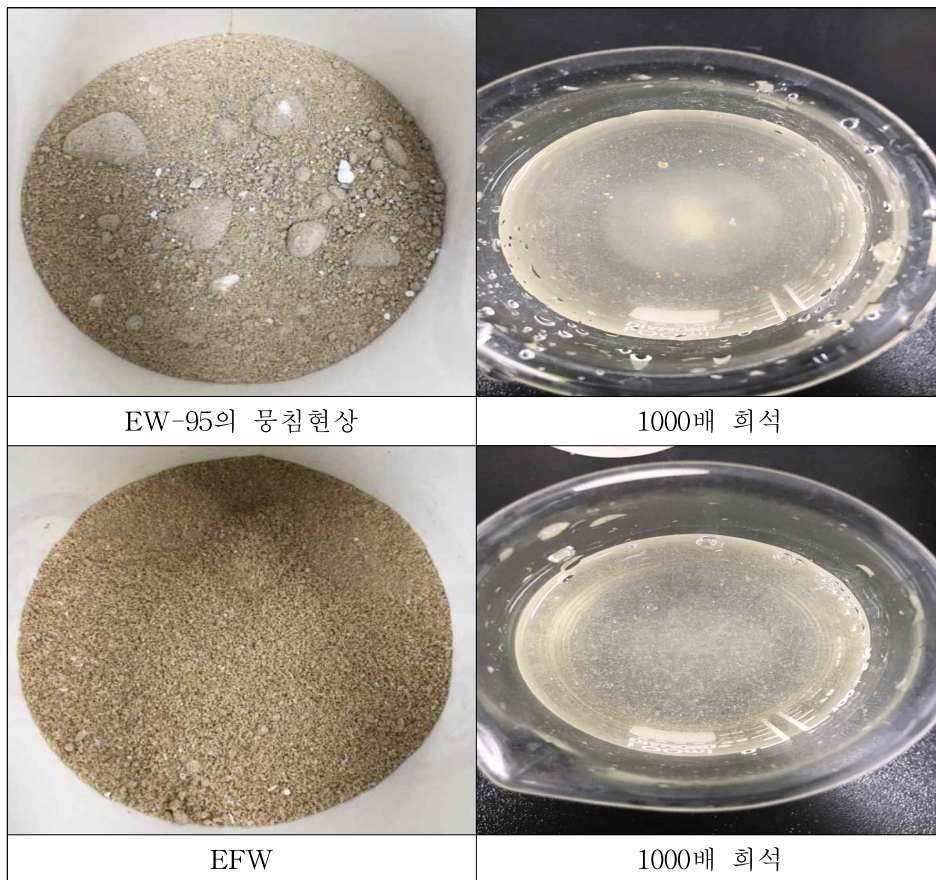


그림 22. 분말수화제 응집개선 실험 결과사진

(나) 액상제의 문제점 발생 및 개선

① 액상제의 문제점 발생

- ㉞ 1차 선발 보조제의 미비한 효과와 장기 안정성 결여로 침전물 증가 및 압착 강도 증가
- ㉞ 새로운 첨가제 보완 탐색 및 선정 필수(가벼운 Shaking으로 침전 해지, 장기보관용이)

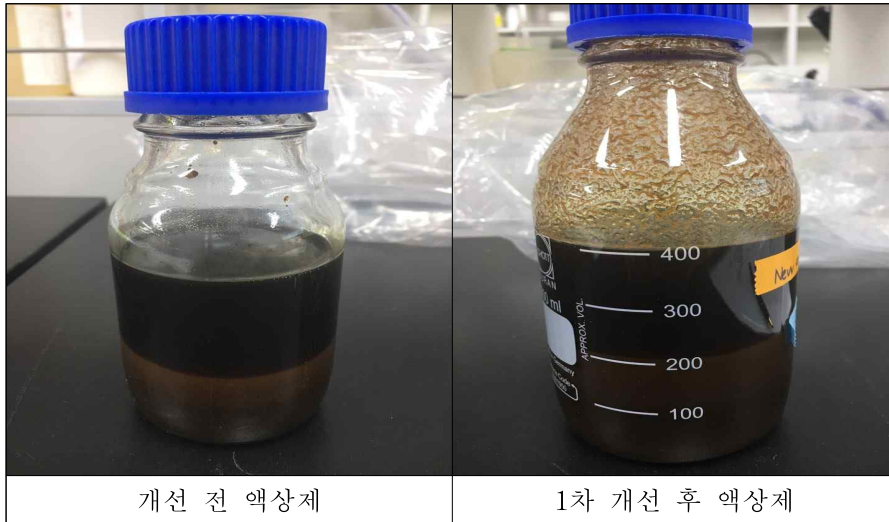


그림 23. 액상제 효력보조제 및 첨가제 문제점

② 액상제의 문제점 보완 및 개선

- ㉞ SA-BD 100 사용 시 시간의 경과에 따른 침전 및 압착강도 문제점 개선을 위한 보조제 선정실험 진행
- ㉞ 보조제 선정실험을 진행하여 SC199를 최종 선정
- ㉞ SC199는 복합 주성분 유화제로 계면 점성 및 탄성을 갖는 흡착막 형성으로 oil 과 물 분리 방지 효과가 있는 3종의 주성분을 복합 혼합하여 제조

③ 액상제 문제점 개선 실험 결과

㉞ 기존배합에 1%, 3%, 5%의 SC-199 첨가하여 24시간 경과 후 확인

㉟ 3%, 5%의 SC199의 효과는 비슷하여 경제적이고 효과적인 농도로 3% 결정

표 28. 액상제 문제점 개선 결과

SC-199 첨가(%)	기존배합	1%	3%	5%
물리성 개선	*	**	***	***
침전 개선 정도	*	**	***	***

\* : 나쁨    \*\* : 보통    \*\*\* : 양호

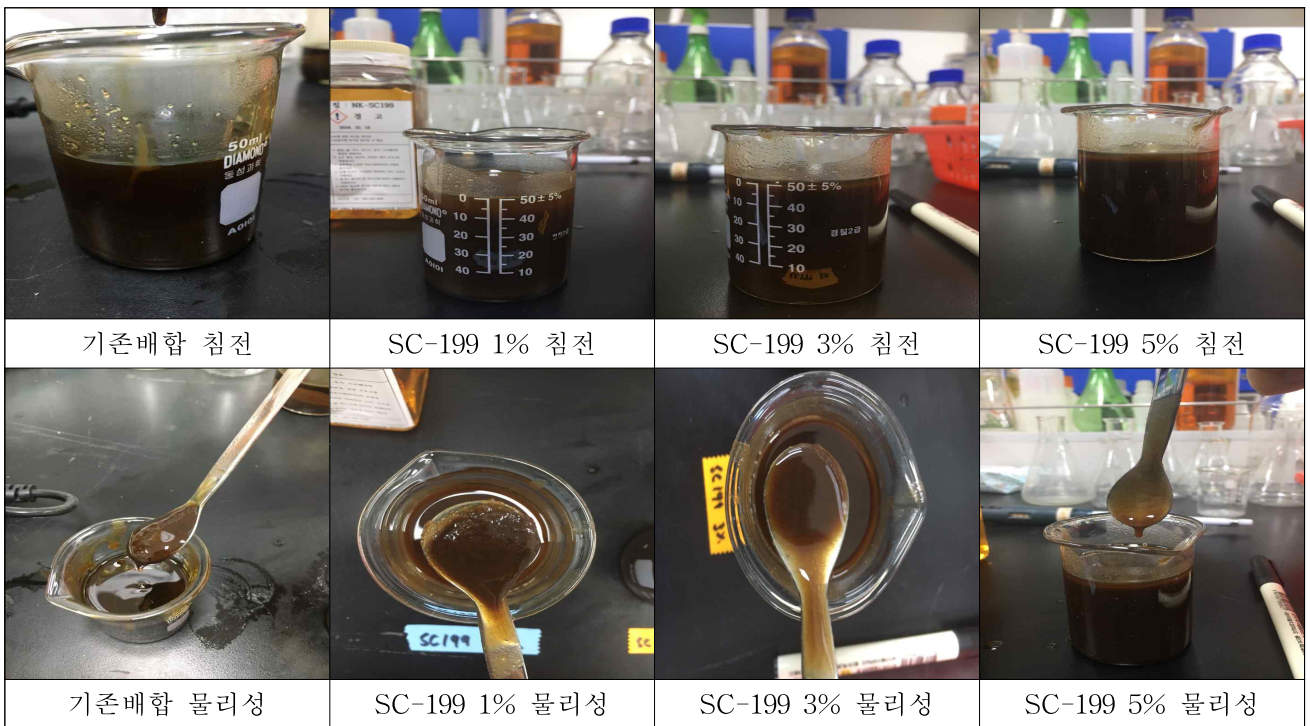


그림 24. 분말수화제 응집개선 실험 결과

바. 최종 제작 시제품의 경시적 품질 안정성 평가

인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 미생물제제 최적 배합 결정한 것을 경기도농업기술원과 협업하여 시제품의 경시적 품질 안정성 평가를 진행하였으며 1차년도 시제품으로 제작한 기비제 및 2차 조정 관주제로 약해 및 약효 검증 실험을 진행하였다. 또한, 제형별 유식물 약해시험을 진행하여 시제품의 약해 여부를 확인하였다.

(1) 2차 시제품의 제형별 현장평가 (약효, 약해 시험)

(가) 기비제 현장평가

① 제형별 배합

표 29. 기비제 제형별 배합

구분	제형	번호	주성분 배합비
기비제	입상제	1	ARRI 17 $1 \times 10^7$ cfu/g + <i>Trichoderma viride</i> $1 \times 10^5$ cfu/g + silicic acid 1% + 풀빅산 60% + 입상규산 30% + 발효 대두박 10%
	분상제	2	ARRI 17 $1 \times 10^7$ cfu/g + <i>Trichoderma viride</i> $1 \times 10^5$ cfu/g + silicic acid 1% + Neem bark 90% + 분상 규산 10%

② 처리 방법 (본포)

표 30. 현장평가를 위한 처리 투입량

구분	입상제	분말수화제
예정지 관리용	300평당 180kg 투입 600평 처리	300평당 180kg 투입 600평 처리
본포 관리용	300평당 180kg 투입 300평 (6필지) 3회 처리	300평당 180kg 투입 300평 (6필지) 3회 처리

(나) 관주제 현장평가

① 제형별 배합

표 31. 관주제 제형별 현장평가 주성분 배합비

구분	제형	번호	주성분 배합비
관주제	액상제	A-1	송진 유화원제 60% + 유칼립투스추출물 20% + silicic acid 5% + 종자 추출물 5% + ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10% + 키토산 3%
		A-2	송진 유화원제 80% + silicic acid 5% + 종자 추출물 5% + ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 1% + 키토산 3%
	분말 수화제	B-1	ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10%+ <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 50% + silicic acid 5% + 종자 추출물 20% + 키토산 3% + Bamboo extract 12%
		B-2	ARRI 17 $1 \times 10^{10}$ cfu/g 10%+ <i>Trichoderma viride</i> $2 \times 10^7$ cfu/g 50% + silicic acid 5% + 종자 추출물 20% + 키토산 3% + 카올린 12%

표 32. 관주제 별 처리량

액상제	분말 수화제
올해 2년근 인삼 포장에 처리	올해 2년근 인삼 포장에 처리
총 60칸 중 30칸 처리	총 60칸 중 30칸 처리
3월 3회처리 (10일 간격)	3월 3회처리 (10일 간격)
10월 3회처리 (10일 간격)	10월 3회처리 (10일 간격)

(다) 현장평가 결과

- ① 대상병해 : 인삼뿌리썩음병(*C. destructans*)
- ② 대상농가
  - ㉞ 병원균 밀도 :  $10^0 \sim 10^1$ cfu/g
  - ㉟ 시험대상 : 4년근 인삼밭(30칸/개소), 2개소 6필지
- ③ 처리내용
  - ㉞ 길항미생물 제형 및 시용량 : 액상제(16ℓ/1.62m<sup>2</sup>), 분말수화제(16g/1.62m<sup>2</sup>), 무시용
  - ㉟ 처리 시기 및 횟수 : 봄 3회(3월 하순, 4월 중순, 5월 상순 - 180칸/필지), 가을 3회(10월 중순, 10월 하순, 11월 상순 - 90칸/필지)

표 33. 농가 토양화학성 및 뿌리썩음병원균 밀도

농가명	년근	초작/재작	논/밭	pH (1:5)	EC (dS/cm)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N (mg/kg)	발병주율 (%)	C (cfu/g)	F (cfu/g)
이**	4	초작	논	5.6	0.26	4.0	30	5	32.7	4.4	N.D
문**	4	초작	논	4.8	0.73	17.4	112	63	79.5	4.3	16.0
박**	4	초작	논	5.6	0.80	10.7	66	59	47.2	6.5	N.D
최**	4	재작	논	5.5	1.11	15.1	49	98	88.0	N.D	N.D
임**	4	초작	논	4.9	1.21	15.3	25	116	17.8	N.D	N.D
주**	4	재작	밭	6.0	1.14	12.5	107	154	41.2	N.D	N.D

표 34. 농가 주소 및 처리일

지역	농가명	포장 주소	살포일		
			1차(월.일)	2차(월.일)	3차(월.일)
연천	이**	장단면 원당리	3.28~29	4.18	5.8
"	문**	장단면 원당리	3.29	4.19	5.9
"	박**	장단면 원당리	3.28	4.18	5.8
파주	최**	적성면 읍포리	4.2	4.19	5.9
"	임**	진동면 하포리	3.30	4.20	5.10
	주**	진동면 서곡리	3.30~31	4.20	5.10

표 35. 농가별 인삼뿌리썩음병 원인균 및 길항미생물 밀도

농가	시료내용	3월 (처리전)		7월		9월	
		CY	ARRI17	CY	ARRI17	CY	ARRI17
이**	무처리	36.63	37.43	35.30	38.58	36.58	37.59
	액상제	36.63	37.43	36.03	39.97	36.11	37.39
	분말수화제	36.63	37.43	35.64	38.46	35.20	40.00
문**	무처리	37.04	37.11	35.04	36.67	36.44	38.82
	액상제	37.04	37.11	34.51	38.13	36.32	39.15
	분말수화제	37.04	37.11	35.00	36.40	36.72	38.88
박**	무처리	34.9	38.0	34.90	38.01	37.44	39.01
	액상제	35.5	36.6	35.48	36.56	38.85	39.45
	분말수화제	35.7	35.9	35.73	35.87	38.74	39.30
최**	무처리	40.0	40.0	36.01	39.71	38.86	40.00
	액상제	40.0	40.0	35.36	38.49	37.27	38.95
	분말수화제	40.0	40.0	36.26	35.85	40.00	39.34
임**	무처리	40.0	40.0	34.74	37.65	35.49	39.38
	액상제	40.0	40.0	35.72	33.70	35.34	40.00
	분말수화제	40.0	40.0	33.39	31.14	35.46	36.53
주**	무처리	40.0	40.0	35.80	37.83	37.28	40.00
	액상제	40.0	40.0	33.89	36.76	36.37	39.34
	분말수화제	40.0	40.0	35.17	36.58	37.24	40.00

표 36. 지하부 생육특성

농가	처리	근장	동장	동직경	근중
이**	무처리	21.40	6.18	15.28	1.96
	액상제	24.19	6.62	17.30	4.44
	분말수화제	27.07	7.28	18.88	1.80
문**	무처리	14.72	5.32	11.47	1.22
	액상제	13.73	5.70	10.24	3.46
	분말수화제	14.18	5.82	12.63	3.14
박**	무처리	27.53	6.70	20.43	1.75
	액상제	24.22	6.59	18.60	4.06
	분말수화제	24.78	6.15	20.60	4.51
최**	무처리	19.33	7.83	18.53	0.70
	액상제	23.11	7.41	19.96	3.01
	분말수화제	18.28	7.39	16.28	2.26
임**	무처리	15.97	5.09	11.31	1.39
	액상제	18.18	5.50	12.96	1.63
	분말수화제	17.19	5.68	12.94	1.31
주**	무처리	17.16	5.39	13.76	4.33
	액상제	20.70	6.16	15.96	3.78
	분말수화제	21.19	6.14	14.70	5.44

(2) 2차 시제품 제형별 유식물 약해 시험

(가) 기비제 유식물 약해 시험

① 실험재료 및 방법

표 37. 작물 당 처리 기준량

분류	평당 재식수(관행 재배)	기준량
고추	1평당 9~10주 재식	주당 50g
토마토	1평당 7~8주 재식	주당 75g

※ 성목기준 보단 적게 하여 상토 500cc 기준, 기준량과 배량으로 나누어 무처리(대조군)와 3반복 실험을 진행

② 약해 시험결과 - (정식 후 3일, 5일, 10일)

표 38. 약해 시험결과

분류		기준량 50g			배량 100g		
		3일	5일	10일	3일	5일	10일
고추	입상제	더딘생장	더딘생장	더딘생장	더딘생장	더딘생장	더딘생장
	분상제	생장장애	생장장애	생장장애	생장장애	생장장애 위조현상	생장장애 위조현상
분류		기준량 75g			배량 150g		
		3일	5일	10일	3일	5일	10일
토마토	입상제	약해없음	약해없음	약해없음	생장장애	생장장애	생장장애
	분상제	초기위조	생장장애	초기위조 생장장애	초기위조	생장장애	초기위조 생장장애
무처리		약해없음	약해없음	약해없음	약해없음	약해없음	약해없음

표 39. 결과 및 보완 사항

기비제	결과	보완 사항
입상제	약해 없음	초기에 생장장애 발생우려 정식 20~30일 전에 처리 필요
분상제	물 빠짐이 좋지 않음. 초기위조현상이 발생하여 생장장애 유발	뿌리 발육 장애 발생 우려 정식 20~30일 전에 처리 필요 넘박 투입 농도 비율 조정 필요

③ (다) 추가 사항



그림 22. 실험 종료 후 10일, 20일 경과



그림 25. 20일 경과 기비제 결과 비교



(나) 관주제 유식물 약해 시험

① 실험방법 및 기간

- ㉠ 고추 및 토마토 관주제 약제마다 기준량과 배량 시비할 각 5포트 실시
- ㉡ 전면 관주 처리하여 잎과 줄기 생육 관찰 및 육안으로 약해 유무 판단
- ㉢ 1차 처리(2018.05.29) 실시 3일 경과 후 관찰 및 2차 처리 실시
- ㉣ 2차 처리(2018.06.01) 실시 3일 경과 후 관찰 및 3차 처리 실시
- ㉤ 3차 처리(2018.06.11) 실시 7일 경과 후 관

② 실험재료

표 40. 관주제별 약해 시험 처리량

분류	기준량	배량	희석배수
A-1	100mL	200mL	1,000배
A-2	100mL	200mL	1,000배
B-1	100mL	200mL	1,000배
B-2	100mL	200mL	1,000배

③ 유식물 약해 시험

표 41. 유식물 약해 - 황변 정도

분류		기준량 100mL			배량 200mL		
		①	②	③	①	②	③
고추	A-1	-	++	++	+	++	++
	A-2	-	+	++	++	++	+++
	B-1	-	-	-	-	-	-
	B-2	-	-	-	-	-	-
분류		기준량 100mL			배량 200mL		
		①	②	③	①	②	③
토마토	A-1	+	+	+	+	+	+
	A-2	+	+	+	+	+	+
	B-1	-	-	-	-	-	-
	B-2	-	-	-	-	-	-
무처리		-	-	-	-	-	-

표 42. 유식물 약해 - 생육장해 정도

분류		기준량 100mL			배량 200mL		
		①	②	③	①	②	③
고추	A-1	-	++	++	+	++	+++
	A-2	-	++	++	+	++	+++
	B-1	-	-	-	-	-	-
	B-2	-	-	-	-	-	-
분류		기준량 100mL			배량 200mL		
		①	②	③	①	②	③
토마토	A-1	+	-	-	-	-	-
	A-2	+	-	-	-	-	-
	B-1	-	-	-	-	-	-
	B-2	-	-	-	-	-	-
무처리		-	-	-	-	-	-

④ 유식물 약해 시험 결과 종합

표 43. 유식물 약해 시험결과

관주제		결과
액상제	A-1	국소적으로 황변 발생 배량 처리 시 생육장해 보임
	A-2	
분말수화제	B-1	약해 없음
	B-2	

사. 최종 제작 시제품의 효과검증

인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 복합 주성분 미생물제제 최적 배합 결정한 것을 경기도농업기술원에서 인삼에 병을 유발하는 병원성 곰팡이 5종을 대상으로 항균력 검증 시험을 진행하였다. 복합 주성분 미생물제제의 제형별 최종 시제품 액상제, 분말수화제 모두 항균효과가 있는 것으로 확인되었으며, 특히 액상제보다 분말 수화제가 비교적 항균효과가 양호한 것으로 확인되었다.

(1) 액상제의 병원성 곰팡이 5종에 대한 항균력 검증 시험

(가) 실험방법

- ① PDA(Potato Dextrose Agar) 배지 사용
- ② 희석액 제조 후 paper disc에 30 $\mu$ l 분주
- ③ 25 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양

(나) 실험재료

(다)

표 44. 실험 시료 및 처리농도

식물 병원균	시험 시료	처리 농도
<i>C. destructans</i>	A-1 액상제	100배 500배 1000배
<i>Iiyonectria mors-panacis</i>		
<i>Fusarium solani</i>		
<i>Botrytis cinerea</i>		
<i>Colletotrichum pancicola</i>		
<i>Alternaria panax</i>		

(라) 결과

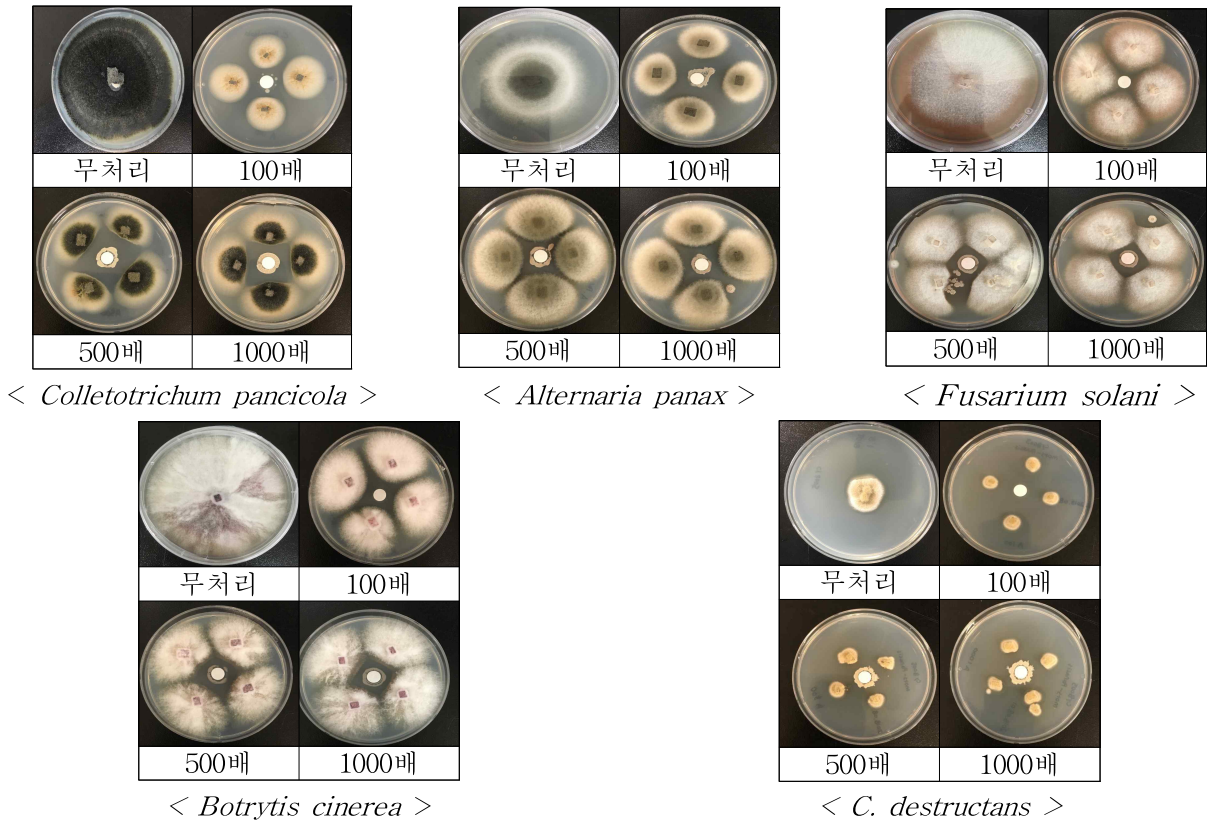


그림 26. 액상제의 항균력 결과

(2) 분말수화제의 병원성 곰팡이 5종에 대한 항균력 검증 시험

(가) 실험방법

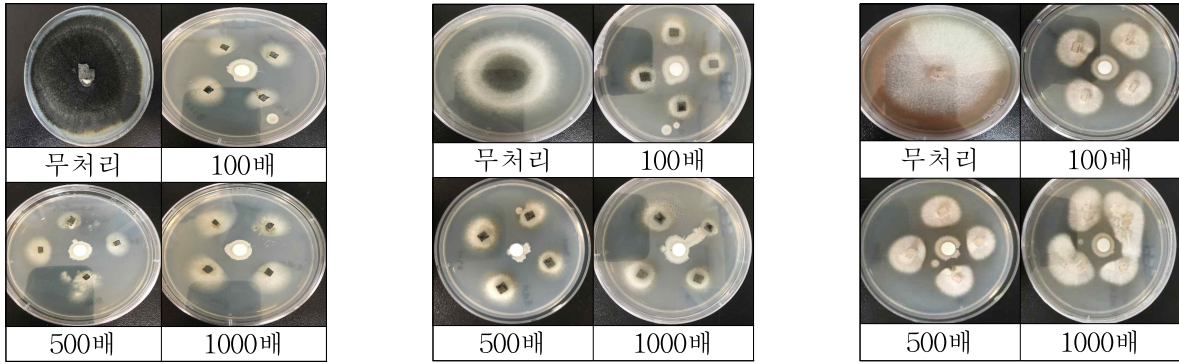
- ① PDA(Potato Dextrose Agar) 배지 사용
- ② 희석액 제조 후 paper disc에 30 $\mu$ l 분주
- ③ 25 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양

(나) 실험재료

표 45. 실험 시료 및 처리농도

식물 병원균	시험 시료	처리 농도
<i>C. destructans</i>	B-1 분말수화제	100배 500배 1000배
<i>Iiyonectria mors-panacis</i>		
<i>Fusarium solani</i>		
<i>Botrytis cinerea</i>		
<i>Colletotrichum pancicola</i>		
<i>Alternaria panax</i>		

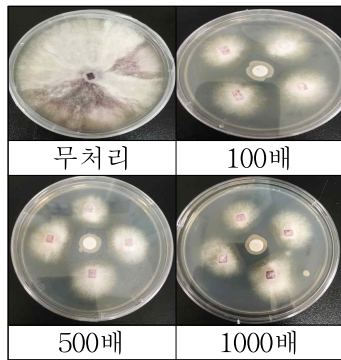
(다) 결과



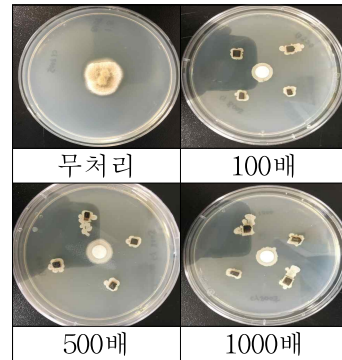
< *Colletotrichum pancicola* >

< *Alternaria panax* >

< *Fusarium solani* >



< *Botrytis cinerea* >



< *C. destructans* >

그림 27. 분말수화제의 항균력 결과

(3) 항균성 테스트 결과 종합

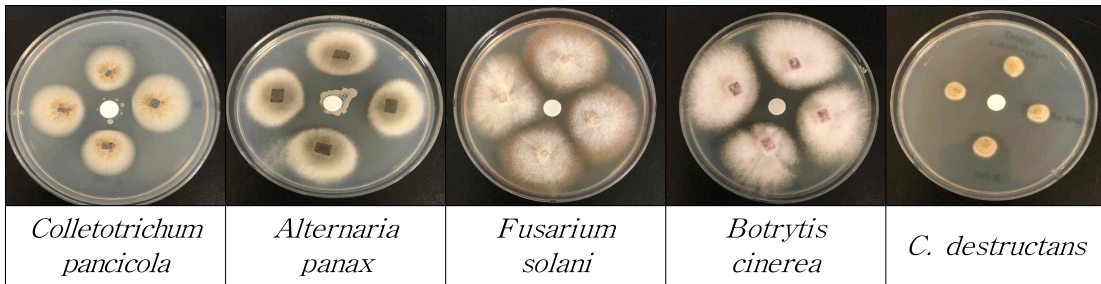


그림 28. 액상제 결과

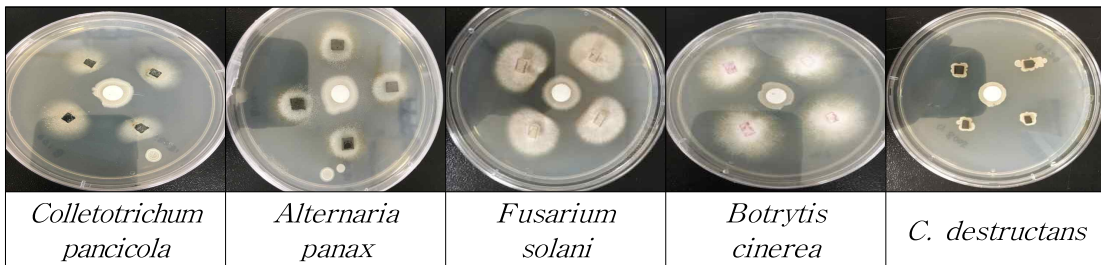


그림 29. 분말수화제 결과

## 5. 인삼 예정지 및 본포 관리를 위한 제품 용도별 현장적용 기술 연구

6년근 인삼재배에서 가장 문제가 되는 것은 초작지 부족과 연(재)작으로 인한 연작장해이다. 연작장해의 원인은 병원균의 밀도 증가와 양분의 축적 또는 결핍에 따른 양분의 불균형으로 알려져 있다. 양분의 불균형은 경제작물 재배면적 확대에 따른 질소비료 과다시용과 2006년 런던협약에 의거 2012년부터 축산분뇨 해양투기가 금지에 따른 미숙축분이 무분별하게 시용에 따른 것이다. 이러한 재배여건 속에서 인삼산업의 유지발전을 위해서는 무엇보다도 토양환경의 안정화일 것이다.

축분이나 미숙퇴비 시용에 따른 토양 동·미생물상과 양분의 불균형이 초래된다. 그 중 여기서는 인삼뿌리썩음병 원인균이나 또는 기생성 선충과 미소해충의 밀도가 증가에 따른 뿌리부위 가해로 인해 발생하는 뿌리썩음병 발병억제를 목표로 하였다.

따라서 인삼의 안정생산을 위해서는 인삼의 생육특성에 알맞은 토양 내 동·미생물상과 양분상태를 안정화 할 수 있는 유기자재의 개발하여 보급하는 일이다.

토양의 동·미생물상의 안정화하기 위해서는 우선 양질의 유기자원을 시용하여야 한다. 인삼에서는 특히 *C. destructans*과 *F. solani*에 대한 길항능력을 보이고 살선충력이 있는 *Bacillus* 속을 비롯해 다양한 유익 길항미생물 활용하는 연구가 보다 활성화 되어야 한다.

가. 현장적용(예정지 및 본밭) 시기별 적합 제형 선발 : 토양 기비제 및 관수제품 등

### (1) 길항미생물을 주성분으로 하는 제제의 뿌리썩음병 발병 억제 효과 비교

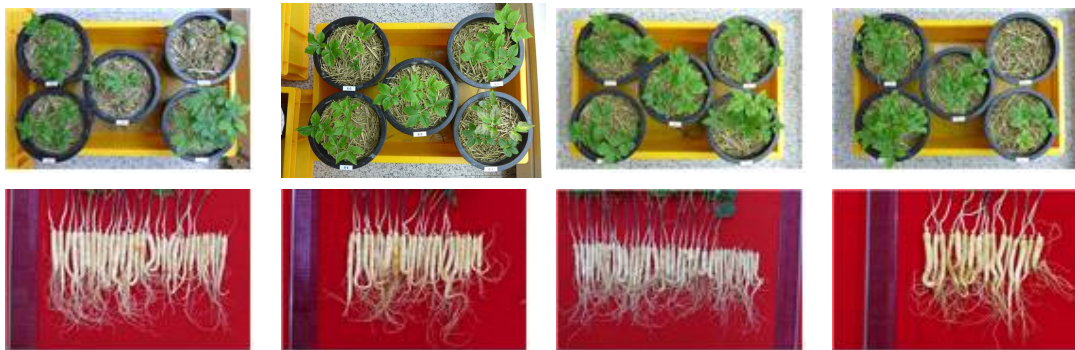
본 연구에서는 *C. destructans*와 *F. solani*가 원인인 뿌리썩음병 발병을 억제 능력이 있는 것으로 밝혀진 *B. velezensis* ARRI17의 주성분으로 하고 부성분으로 해조추출물, 규산, 고분자 폴리머, 천연중자추출물, 폴빅산 등을 조합하여 제재화하여 관주하였다. 토양을 열풍건조기 70°C에서 24시간 멸균하고 *C. destructans* 밀도가  $1.0 \times 10^4$ cfu/g가 되도록 귀리에 배양한 *C. destructans*균과 혼합하여 토양을 만들고 포트에 충전 한 후 2년생 인삼을 포트당 5분씩 10개 포트에 이식하였다. 관주할 용액은 길항미생물 *B. velezensis* ARRI17  $1.0 \times 10^{11}$ cfu/g인 제재를 1,000배액을 사용하였다. 관주량은 1.62m<sup>2</sup>에 해당하는 토양량을 환산하여 이에 해당하는 관주량을 환산하여 관주하였는데, 이식 당일부터 10일 간격으로 3회에 걸쳐 관주하였다. 이식 후 60일에 뿌리를 채굴하여 조사한 결과는 표1과 그림1과 같다.

액상제에서는 ARRI17+해조추출물+규산의 방제가가 52.6%로 가장 높았다. 분말제에서는 ARRI17+천연중자추출물과 ARRI17+천연중자추출물+규산에서 방제가가 52.6%로 가장 우수하였다. 이상의 결과로 보면 *B. velezensis* ARRI17는 단제보다 복합제품으로 개발하는 것이 더 효과적일 것으로 판단되었다.

표 1. *C. destructans*( $10^1$ cfu/g) 발병토양에서 길항미생물 처리별 출현율 및 뿌리썩음병 방제효과

제형	처리내용		출현율 (%)	개체수(주)		발병유형		발병도	방제가 (%)
	주성분	부성분		정상	발병	고사	생존		
액상제	ARRI17 60%	해조추출물 40%	78.0	31	14	8	6	31.1	26.3 <sup>d</sup>
	ARRI17 50%	해조추출물 40%+규산 10%	84.0	36	9	5	4	20.0	52.6 <sup>b</sup>
	ARRI17 92%	고분자폴리머 8%	80.0	35	10	5	5	22.2	47.4 <sup>c</sup>
	ARRI17 82%	고분자폴리머 8%+규산 10%	78.0	32	13	8	5	28.9	29.6 <sup>d</sup>
분말수화제	ARRI17 80%	천연종자추출물 10%	82.0	36	9	7	2	20.0	52.6 <sup>b</sup>
	ARRI17 80%	천연종자추출물 10%+규산10%	76.0	36	9	6	3	20.0	52.6 <sup>b</sup>
	ARRI17 60%	천연종자추출물10%+규산10%+폴빅산20%	78.0	35	10	6	4	22.2	47.4 <sup>c</sup>
	ARRI17 100%		36.0	27	18	11	7	40.0	5.2 <sup>e</sup>
	대조(토양소독구)		88.0	40	5	4	1	11.4	68.4 <sup>a</sup>
	발병토양		70.0	26	19	13	6	42.2	-

주) 주성분의 농도 : ARRI17  $1 \times 10^9$ cfu/g/ml



ARRI17+해조추출물+규산(액상제)

ARRI17+천연종자추출물+규산(분말수화제)

토양소독구

발병토양

그림 1 인삼 뿌리썩음병(*C. destructans*)에 대한 길항미생물 제형별 처리 효과

*F. solani*( $10^2$ cfu/g) 발병토양에서 길항미생물 처리별 출현율 및 뿌리썩음병 방제효과는 표 2, 그림 2와 같다. 그러나 인삼 뿌리썩음병 진단 및 피해예측기술 개발 시험 결과 *F. solani*는 인삼뿌리썩음병의 주원인이 아니지만 상처를 통해 잘 감염되는 병해로 의미가 있다, *B. velezensis* ARRI17를 주성분으로 고분자폴리머+규산에서 73.0%의 방제가를 보여 *F. solani*에 의한 인삼 뿌리썩음병 방제에 도움이 될 것으로 생각된다.

표 2. *F. solani*(10<sup>2</sup>cfu/g) 발병토양에서 길항미생물 처리별 출현율 및 뿌리썩음병 방제효과

제형	처리내용		출현율 (%)	개체수(주)		발병유형		발병주율 (%)	방제가
	주성분	부성분		정상	발병	고사	생존		
액상제	ARRI17 60%	해조추출물 40%	96.7	13	14	2	10	48.2	44.1 <sup>b</sup>
	ARRI17 50%	해조추출물 40%+규산 10%	93.3	14	14	8	6	50.0	42.1 <sup>b</sup>
	ARRI17 92%	고분자폴리머 8%	96.7	6	23	8	15	79.3	8.1 <sup>d</sup>
	ARRI17 82%	고분자폴리머 8%+규산 10%	100	23	7	0	7	23.3	73.0 <sup>a</sup>
분말 수화제	ARRI17 80%	천연중자추출물 10%	100	13	17	9	8	56.7	34.3 <sup>bc</sup>
	ARRI17 80%	천연중자추출물 10%+규산10%	93.3	12	16	6	10	57.1	33.8 <sup>bc</sup>
	ARRI17 60%	천연중자추출물10%+규산10%+폴빅산20%	93.3	6	22	5	17	78.6	8.9 <sup>d</sup>
	ARRI17 100%		100	15	15	7	8	50.0	42.1 <sup>b</sup>
	대조(토양소독구)		100	12	13	5	8	43.3	49.8 <sup>b</sup>
	발병토양		93.3	3	25	9	16	86.3	-

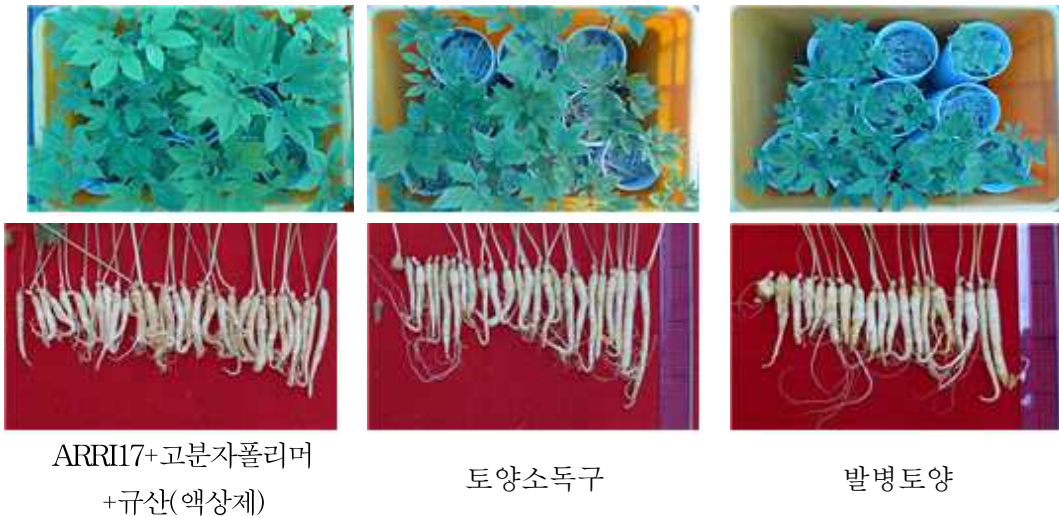


그림 2. 인삼 뿌리썩음병(*F. solani*)에 대한 길항미생물 제형별 처리 효과

(2) 길항미생물 접종퇴비 선발 및 효과검증

인삼재배에서 질소원이 적고 탄소원이 많은 유기소재는 토양 내 미생물 분포에 많은 영향을 미친다. 70년대까지만 해도 산야초나, 활엽수를 인삼포 예정지 관리 시 넣어 주었다. 그러나 최근 산림보호 차원에서 산야초와 낙엽 채취를 금지하고 있다. 따라서 이를 대체할 수 있는 유기자원 소재로 주변에서 쉽게 다량 확보가 가능한 유기자원을 선발하는 것은 매우 의미가 있다.

(가) 길항미생물과 친화력이 강한 유기자원 선발

이 연구에서는 우리 주변에서 구하기 쉬운 소재를 가지고 퇴비화하는 시험을 수행하였다. 유기 소재로는 벼짚, 낙엽, 수피, 호밀, 콩짚 등을 선택하였고, 유기물 소재 200kg와 유기재료의 C/N율을 감안하여 C/N율 20이 되도록 부숙재인 고오랑과 밀기울 등을 혼합하여 500ℓ 재생 플라스틱 통에 넣고 수부함량을 조절하기 위해 20kg정도 넣고 물을 뿌려주었다. 부숙기간 중



온도를 측정하기 위해 통의 중앙 위치에 토양온도 센서를 설치하여 측정하였다. 부숙정도를 파악하기 위해 30일 간격으로 부숙도측정 Kit를 이용하여 부숙도를 측정하였다. 부숙이 완료되었을 때 볏짚퇴비에 *B. velezensis* ARRI17을  $10^7$ cfu/g인 균주와 배합하여 30일간 후숙시켰다.

유기퇴비 제조는 그림 3과 같은 과정을 거쳐 퇴비를 제조하였다.

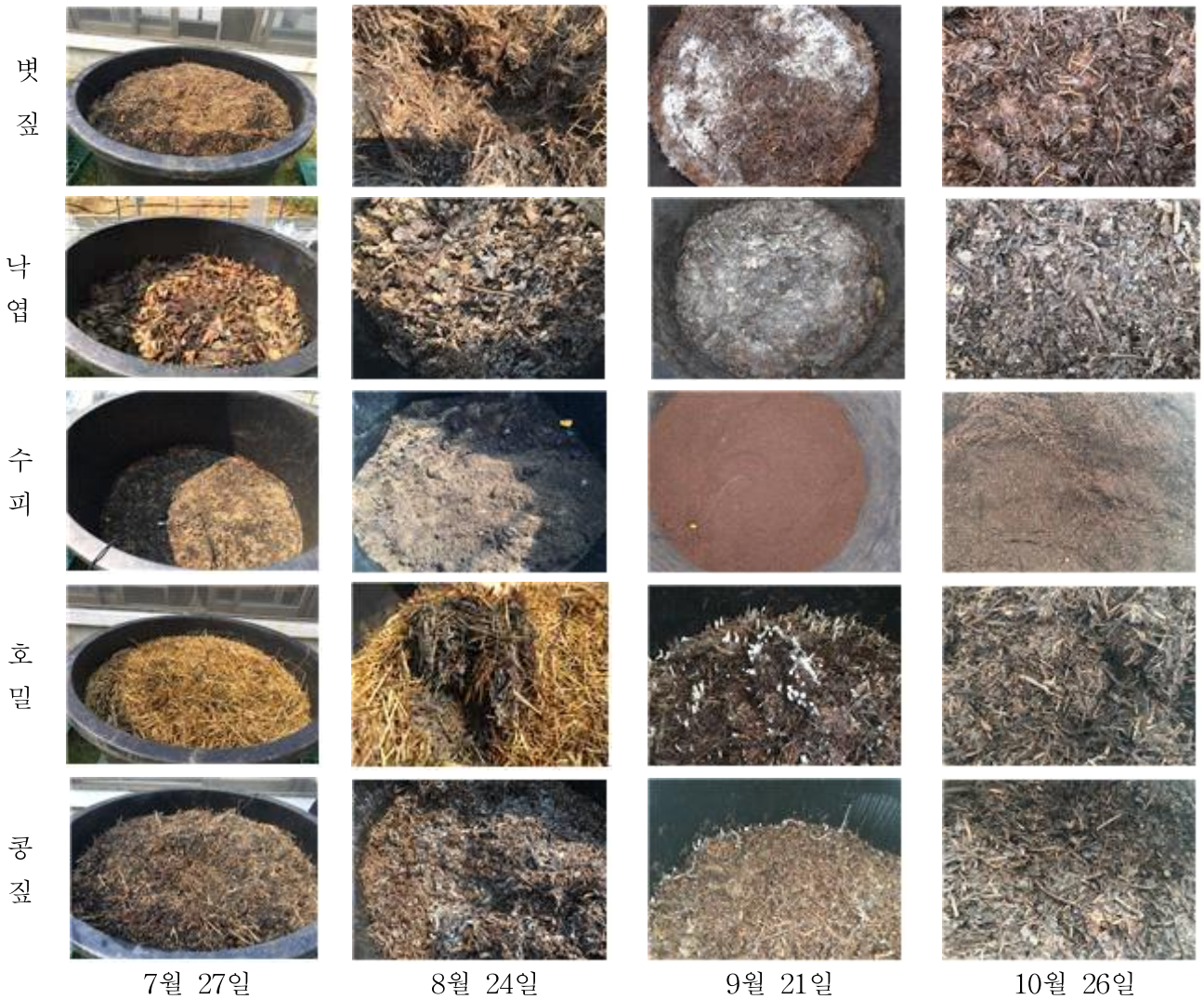


그림 3. 유기자원별 퇴비 제조과정

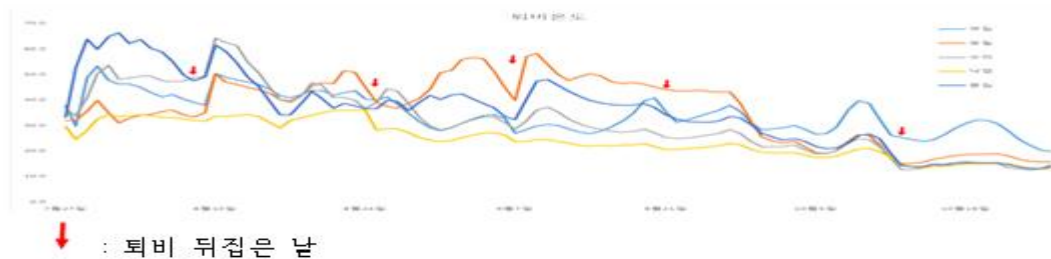


그림 4. 유기자원별 퇴비온도 변화

완전 부숙된 퇴비를 부숙도 검사를 위해 측정된 색도색차 값과 부숙도 Kit를 이용하여 측정된 부숙도 결과는 표 3과 그림 5와 같다.

시험재료로 한 유기소재가 완전부숙된 퇴비의 부숙도를 측정된 결과, 황색도인 b값은 수피를 제외한 유기자재에서 4.00 전후였다.

표 3. 색차색도계에 따른 유기자원별 퇴비 부숙정도(분석시료 채취일 : 10월 31일)

항목	콩짚	벼짚	수피	낙엽	호밀
L	26.08	26.34	23.56	27.24	27.93
a	1.10	0.74	1.24	0.03	0.99
b	4.08	4.87	1.84	3.64	4.87

※ L : 명도, a : 적색, b : 황색 - colorimetric sheet



그림 5. 유기자원별 퇴비 부숙정도

위와 과정을 통해 얻어진 벼짚퇴비에 *Bacillus velezensis* ARRI17 접종한 후 30일후에 측정 한 균밀도 정량한 결과는 표 4에서와 같다.

표 4. 벼짚퇴비와 *B. velezensis* ARRI17 접종 벼짚 퇴비의 균밀도

퇴비종류	균밀도(cfu/g)
<i>B. velezensis</i> ARRI17 접종 벼짚퇴비	$2.78 \times 10^6$
무접종 벼짚퇴비	$4.03 \times 10^5$

균밀도는 무접종 벼짚 퇴비  $4.03 \times 10^5$ 보다 *B. velezensis* ARRI17 접종 벼짚 퇴비가  $2.78 \times 10^6$  cfu/g 으로 약 7배정도 증가하였다. 따라서 벼짚 퇴비만 사용하거나 길항미생물 제품만 사용하는 것보다는 토양에서의 정착력을 높이기 위해서는 담체로 벼짚퇴비를 활용하는 것도 인삼 안전다수확 재배에 도움이 될 것으로 기대된다.

*B. velezensis* ARRI17 접종 벼짚 퇴비의 화학성을 검증해 본 결과는 표 5와 같다.

*B. velezensis* ARRI17 접종 벼짚 퇴비는 무접종 벼짚퇴비에 EC는 낮고, 총 질소함량과 OM은 높았다. 특히 EC가 낮고 총 질소함량(T-N)과 OM이 높아진 것은 더 분해가 촉진되었을 의미한다. EC가 낮은 것은 길항미생물 접종 퇴비를 사용할 시에 생리장해가 적고, OM이 높다는 것은 미숙퇴비에 많은 기생성 선충과 미소동물의 밀도가 낮을 있을 가능성이 높아 인삼 재배에 더욱 안정적인 것으로 보인다.

이 연구 결과 얻어진 퇴비의 *B. velezensis* ARRI17의 균밀도는  $2.78 \times 10^6$ cfu/g이었다. 하지만 이 퇴비가 어느 정도 시용했을 때 선충과 미소동물의 밀도를 낮출 수 있는지에 대한 연구도 추가과제로 수행되어야 할 것으로 사료되었다.

표 5. 볏짚퇴비와 *B. velezensis* ARRI17 접종 볏짚 퇴비의 화학성

퇴비종류	pH (1:5)	EC (dS/m)	T-N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	CaO (%)	MgO (%)	OM (%)
볏짚퇴비	6.8	4.2	0.9	0.6	2.6	0.8	1.8	27.9
ARRI17 볏짚 퇴비	7.5	2.5	1.3	0.4	3.0	1.6	4.6	31.2



후숙



퇴비 뒤집기



퇴비 부숙도

그림 6. *B. velezensis* ARRI17 접종 볏짚 퇴비 제조 장면

(나) 길항미생물 *B. velezensis* ARRI17 접종퇴비 시용효과

선행연구에서 얻어진 볏짚퇴비에 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17)을 혼합하여 후숙을 시켜 얻은 길항미생물 볏짚퇴비를 얻었다. 이 퇴비의 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*(CY8005)에 대한 발병 억제력을 구명하고자 하였다.

인삼뿌리썩음병 원인균 접종은 강 병원성인 *C. destructans* (CY8005)와 *F. solani*을 PDA 배지에 생육시킨 후 균사체를 귀리배지에 각각 접종하여 배양하였다. 균사가 골고루 퍼지도록 배양한 후 그늘에서 말린 다음 분쇄기로 분쇄하여 *C. destructans* 및 *F. solani*의 균 밀도를 Real time PCR로 확인하고 토양과 희석하여 토양내 *C. destructans* 밀도가 10<sup>0</sup>과 10<sup>1</sup>cfu/g인 오염토양을 조성하고 길항미생물 접종퇴비를 3.0, 4.5, 6.0톤/10a, 접종하지 않은 볏짚 퇴비를 4.5톤/10a 혼합하여 사용하였다. 2년생 묘삼을 NaDCC 500배액으로 표면소독 한 투침하여 이식하였고 90일 후 조사하였다. 효과검증 시험은 청백 양면 필름으로 된 비닐하우스, 180cm×180cm×30cm틀 안에서 수행하였다.

*C. destructans* 밀도별 퇴비종류와 시용량에 따른 생육특성을 조사한 결과, 출현율, 초장, 경장과 경직경은 병원균 밀도와 관계없이 *C. destructans* 균주 무접종 볏짚퇴비구에 비해 양호한 생육특성을 보인 길항미생물 퇴비 처리구 없었다. 근장, 근직경, 1.62m<sup>2</sup>당 수량은 병원균 밀도와 관계없이 무접종 퇴비 시용구에 비해 양호한 생육특성을 보인 길항미생물 퇴비 사용구는 없었다. 볏짚퇴비와 길항미생물 퇴비는 지상부와 지하부 생육 형질에 영향을 미치지 못하였다.

표 6. 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 접종퇴비 시용에 따른 생육특성

병원균 밀도 (cfu/g)	처리내용		지상부				지하부		
	퇴비종류	시용량 (톤/10a)	출현율 (%)	초장 (cm)	경장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	수량 (g/1.62m <sup>2</sup> )
4.2×10 <sup>0</sup>	ARRI17 퇴비	3.0	68 <sup>abc</sup>	29.2 <sup>ns</sup>	15.1 <sup>ns</sup>	4.2 <sup>ns</sup>	19.1 <sup>ab</sup>	12.5 <sup>abc</sup>	306 <sup>cd</sup>
		4.5	84 <sup>a</sup>	30.4	16.4	4.1	19.4 <sup>a</sup>	12.7 <sup>abc</sup>	367 <sup>ab</sup>
	벗짚 퇴비	4.5	81 <sup>ab</sup>	29.5	15.4	4.1	17.5 <sup>abcd</sup>	11.7 <sup>d</sup>	416 <sup>a</sup>
		4.5	65 <sup>abc</sup>	26.2	13.6	4.0	16.6 <sup>cd</sup>	12.2 <sup>abcd</sup>	331 <sup>bc</sup>
3.7×10 <sup>1</sup>	ARRI17 퇴비	3.0	61 <sup>bc</sup>	25.1	12.9	4.0	15.8 <sup>d</sup>	12.3 <sup>abcd</sup>	332 <sup>bc</sup>
		4.5	56 <sup>b</sup>	25.2	13.1	3.8	17.2 <sup>bcd</sup>	12.8 <sup>ab</sup>	344 <sup>bc</sup>
	벗짚 퇴비	6.0	64 <sup>abc</sup>	23.6	12.1	3.9	18.4 <sup>abc</sup>	12.0 <sup>bcd</sup>	331 <sup>bc</sup>
		4.5	64 <sup>abc</sup>	26.0	13.0	4.0	18.2 <sup>abc</sup>	12.9 <sup>a</sup>	372 <sup>ab</sup>
무접종	벗짚 퇴비	4.5	76 <sup>ab</sup>	25.1	13.4	4.1	18.5 <sup>abc</sup>	12.0 <sup>cd</sup>	288 <sup>d</sup>

병원균 밀도별 벗짚퇴비와 길항미생물 퇴비 시용구간의 생육을 비교하였는데, 결과는 그림 7와 같다.

이 사진에 나타난 바와 같이 4.2×10<sup>0</sup>cfu/g에 길항미생물 퇴비 4.5톤/10a 시용구 에서 세근의 발달이 다른 시험구에 비해 높은 것을 알 수 있었다. 이는 *B. velezensis* ARRI17에 성장촉진 효과가 있음을 알 수 있었다.



그림 7. 퇴비 종류 및 시용량별 생육 특성

*C. destructans* 밀도별 무접종 퇴비와 길항미생물퇴비 시용구에서 나타난 *C.destructans*과 *Fusarium sp.*에 의한 발병률과 발병정도를 분석한 결과는 표 7과 같다.

표 7. 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17) 접종퇴비 시용에 따른 발병특성

처리내용			<i>C.destructans</i>		<i>Fusarium sp.</i>	
균밀도 (cfu/g)	퇴비종류	시용량 (톤/10a)	발병률(%)	발병지수	병반 수(개)	발병률(%)
4.2×10 <sup>0</sup>	ARRI17	3.0	32 <sup>c</sup>	1.3 <sup>c</sup>	2.5 <sup>c</sup>	100 <sup>ns</sup>
	퇴비	4.5	33 <sup>c</sup>	1.2 <sup>c</sup>	2.2 <sup>c</sup>	99.1
		6.0	80 <sup>a</sup>	2.5 <sup>b</sup>	3.1 <sup>bc</sup>	99.6
		벼짚 퇴비	4.5	58 <sup>b</sup>	2.3 <sup>b</sup>	3.9 <sup>ab</sup>
3.7×10 <sup>1</sup>	ARRI17	3.0	65 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	4.8 <sup>ab</sup>	95.8
	퇴비	4.5	60 <sup>b</sup>	2.6 <sup>b</sup>	5.5 <sup>a</sup>	94.7
		6.0	66 <sup>b</sup>	3.2 <sup>a</sup>	4.8 <sup>ab</sup>	97.0
		벼짚 퇴비	4.5	57 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	5.3 <sup>a</sup>
무접종	벼짚 퇴비	4.5	38 <sup>c</sup>	1.6 <sup>c</sup>	2.4 <sup>c</sup>	99.5

*C. destructans*에 의한 뿌리썩음병에 발병률은 4.2×10<sup>0</sup>cfu/g 구의 길항미생물퇴비 3.0톤/10a, 4.5톤/10a 시용구에서 무접종 벼짚퇴비구와 동일한 수준의 발병률을 보였고 발병도도 마찬가지로였다. *F. solani*에 의한 병반수는 *C. destructans*에 의한 발병률과 같은 경향을 보여 길항미생물 벼짚퇴비 3.0톤/10a, 4.5톤/10a 시용구에서 발병률이 무접종 벼짚퇴비 시용구와 같은 수준이었다. 반면 발병률은 균밀도와 퇴비종류와 관계없이 94.7% 이상을 나타내었고 유의한 차이도 없었다.

본 연구의 결과를 종합해 볼 때 길항미생물인 *B. velezensis* ARRI17를 접종한 벼짚퇴비를 제조하여 활용할 경우, 발병억제 능력을 보이는 것으로 보아 기존의 단독균주 미생물 제품보다 유용한 것으로 판단되었다. 그러나 *F. solani*에 의한 뿌리썩음병 발병율이 차이를 보이지 않은 것은 조사기준이 병반의 크기나 개수에 관계없이 하나만 있어도 발병주로 계산됨에 따른 결과이었다.

(다) Salicylic acid 용액 관리처리 처리효과

지금까지 인삼의 병 발생을 억제하는 방법은 화학적 방제, 경종적 방제, 물리적 방제 수단을 활용해 왔다. 그러나 우리가 원하는 만큼 도달하지는 못 했다. 특히 인삼 뿌리에 발생하는 *C. destructans*과 *F. solani*에 의한 뿌리썩음병과 역병, 연부병, 잣빛곰팡이병 등은 더욱 그렇다.

우리는 이러한 문제를 해결하고자 *C. destructans*과 *F. solani*에 길항력을 보이고 생육을 좋게 하는 PGPR효과도 있는 *B. velezensis* ARRI17과 해충이나 물리적인 상체가 발생하였을 때 페놀화합물을 증가시켜 병저항성을 보이는 즉 유도저항성 물질인 Salicylic acid(Sigma, 99%)를 조합한 방제체계를 구축할 필요가 있다. 유도저항성 특성을 보이는 *B. velezensis* ARRI17와 Salicylic acid를 조합한 방제체계를 구축하기 위해 Salicylic acid 관주량 시험을 수행하였다. 본 시험은 6년근 인삼을 수확하고 1년이 경과한 토양을 채취하였고 *C. destructans* 10<sup>5</sup>의 밀도인 귀리배지를 토양 내 *C. destructans*의 밀도가 1.2×10<sup>1</sup>cfu/g이 되도록 귀리배리를 넣고 혼합기를 이용하여 혼합하였다. 이 토양을 규격 1.8×1.8.m의 나무틀에 토양을 충전한 후 126분을 이식하였다. 이식 후 Salicylic acid 4mg/ℓ, 8mg/ℓ, 12mg/ℓ의 용액을 제조하여 이식 후 3일 후에 3.24m<sup>2</sup>당 16ℓ를 관주하였다. 이식 후 90일후에 채굴하여 생육 형질 특성과 *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병률과 발병도, *F. solani*에 의한 뿌리썩음병 spot 수와 *C. destructans* 투침에 발병된 spot의 직경 비율을 산출하였다.

위와 같이 수행하여 얻어진 결과는 표 8와 같다. 조사한 생육 형질 모두 건전도와 salicylic acid 시용구간에 차이가 없었다. Salicylic acid 용액 관주에 따른 *C. destructans*과 *F. sokani*에 의한 발병도 및 spot 수, 잣빛곰팡이병 발병률 등을 조사 분석 한 결과는 표 9과 같다.

표 8. Salicylic acid 용액 관주에 따른 생육형질 특성

병원균 밀도	시용량 (mg/ℓ)	초 장 (cm)	경 장 (cm)	경직경 (mm)	엽면적 (cm <sup>2</sup> /10주)	근 장 (cm)	근직경 (mm)	근 중 (g/근)
1.2×10 <sup>1</sup> cfu/g	0	24.6±5.6	13.0±4.4	4.0±0.9	2262±408	16.7±3.5	12.4±1.9	7.7±0.3
	4	26.1±5.5	13.7±3.8	3.9±0.8	3153±497	17.8±3.5	12.5±2.0	8.2±0.4
	8	25.3±5.9	13.3±4.0	4.1±0.8	3576±330	18.3±3.8	12.5±1.9	7.9±0.6
	12	26.4±5.3	14.1±4.0	4.0±0.7	2795±364	18.1±3.3	12.4±1.9	8.4±0.6
건전도		27.9±5.8	15.1±3.8	4.0±0.6	3250±507	18.1±4.0	12.9±1.6	8.2±0.5

주) 재식분수 : 64본/1.62m<sup>2</sup>, 이식일 : 4월 11일, 조사일 : 이식 후 100일, 벧짚퇴비 4.5톤/10a 해당량

표 9. Salicylic acid 용액 관주에 따른 병 발생억제

병원균 밀도	시용량 (mg/ℓ)	출현율 (%)	수확근수 (주/1.62m <sup>2</sup> )	<i>C. destructans</i>		<i>F. solani</i>	잣빛곰팡이병
				발병률(%)	발병도(0-9)	스팟수(개/근)	발병률(%)
1.2×10 <sup>1</sup> cfu/g	0	80.5±7.9	51.5± 5.1	97.7± 1.8	3.4±0.7	11.3±1.4	62.6± 6.4
	4	78.9±2.7	50.5± 2.7	91.2± 6.7	2.9±0.1	9.0±0.8	45.0±10.0
	8	79.7±4.9	51.0± 3.2	89.2± 1.2	2.7±0.1	7.8±0.7	29.4± 3.6
	12	82.8±3.4	53.0± 2.2	74.7±13.5	2.1±0.4	6.9±1.1	25.9± 5.0
건전도		85.5±4.1	54.8± 2.6	54.6± 9.1	1.3±0.1	5.7±1.0	10.9± 1.5

주) 재식분수 : 64본/1.62m<sup>2</sup>, 이식일 : 4월 11일, 조사일 : 이식 후 100일, 벧짚퇴비 4.5톤/10a 해당량

출현율과 수확근수는 건전도와 관주량 간에 차이가 없었다. *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병률은 관주량이 많아질수록 감소하였고, 발병도도 같은 경향이였다. *F. solani*에 의한

spot 수와 잿빛곰팡이병 발병률도 관주량이 많을수록 감소하였다. 하지만 *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병, *F. solani*에 의한 spot 수, 잿빛곰팡이병 발병률 모두 Salicylic acid 관주량이 많을수록 감소하였으나 건전토에는 미치지 못했다.

이 결과로 미루어 볼 때 salicylic acid 관주량은 더 증량하여 시험해 볼 필요가 있는 것으로 생각되었다. 이 연구에서 고려해 볼 점은 고년근으로 갈수록 잿빛곰팡이병과 인삼뿌리썩음병 피해는 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 *B. velezensis* ARRI17과 Salicylic acid 용액 관주를 조합하여 방제체계를 수립한다면 보다 안정적인 인삼 재배가 가능할 것으로 판단된다.

#### (라) 벧짚퇴비와 혼합균주 체계처리 효과

인삼뿌리썩음병 발병억제를 통해 인삼의 생산성을 높이기 위해 다양한 노력을 해왔다. 그러함에도 불구하고 이렇다할 성과는 없는 실정이다. 이미 길항미생물인 *B. velezensis* ARRI17을 접종한 벧짚퇴비의 효과가 우수함을 앞의 실험에서 얻었다. 하지만 이보다 더 우수한 방법을 찾고자 기비로 ARRI17퇴비를 사용한 후 *B. velezensis* ARRI17를 포함한 복합균주 체계를 체계 처리하였다.

이 연구는 삼과장 형광등이 설치된 식물공장형 재배연구실에서 온도는 23±1℃, 습도는 50% 전후인 환경에서 수행하였다. 토양은 70℃로 조질된 열풍건조기에서 24시간 *C. destructans*과 *F. solani*를 멸균하였다. 멸균 토양에 *C. destructans*의 밀도는 7.8×10<sup>0</sup>cfu/g과 7.8×10<sup>1</sup>cfu/g이 되도록 사전에 배양한 규리배지를 넣고 벧짚퇴비와 길항미생물인 *B. velezensis* ARRI17을 접종한 벧짚퇴비를 10a기준 4.5톤 해당량을 넣고 혼합기를 이용하여 혼합하였다. 박스의 토양량은 20kg이었고, 박스당 2년생 인삼을 박스당 20본씩 이식한 후 당일 물을 관수해주고 3일 후에 복합균주를 1000배액으로 희석하여 1.62m<sup>2</sup>당 16ℓ 해당량을 1주일 간격으로 3회 관주해 주었다. 그리고 적습조건을 유지하기 위해 일주일 간격으로 박스당 1ℓ 씩 수확 전까지 관주하였다.

표 10. *B. velezensis* ARRI17퇴비와 복합균주 체계처리에 따른 생육형질 특성

처리내용		초장 (cm)	경장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	개체중 (g)
병원균 밀도	처리방법						
7.8×10 <sup>0</sup> cfu/g	ARRI17퇴비+표준관주 <sup>†</sup>	24.6 <sup>ns</sup>	14.9 <sup>ns</sup>	2.8 <sup>c</sup>	15.8 <sup>ns</sup>	11.8 <sup>ns</sup>	5.8 <sup>bc</sup>
	ARRI17퇴비+배량관주	26.2	15.4	4.2 <sup>ab</sup>	18.1	11.8	6.4 <sup>ab</sup>
	ARRI퇴비	26.0	15.6	3.9 <sup>b</sup>	17.9	11.7	6.5 <sup>ab</sup>
7.8×10 <sup>1</sup> cfu/g	ARRI17퇴비+표준관주	29.4	18.2	4.2 <sup>ab</sup>	17.4	11.8	5.4 <sup>c</sup>
	ARRI17퇴비+배량관주	28.6	17.7	4.7 <sup>a</sup>	18.2	11.7	6.6 <sup>a</sup>
	ARRI퇴비	28.9	18.2	4.0 <sup>b</sup>	18.4	11.8	6.0 <sup>abc</sup>
건전토	ARRI퇴비	25.6	16.1	4.2 <sup>ab</sup>	17.5	11.8	6.0 <sup>abc</sup>

<sup>†</sup> 복합균주의 조합비율 : ARRI17 1×10<sup>10</sup>cfu/g+Trichoderma viride 2×10<sup>7</sup>cfu/g 37%+나노규산(Rice Silica nanoparticles) 5%+중자 추출물 20%+키토산 3%+ 대나무 추출물 12%+DCY84 1×10<sup>9</sup>cfu/g 10%+EFW 3%, ARRI17퇴비의 균밀도 2.78×10<sup>6</sup>

*B. velezensis* ARRI17 퇴비와 복합균주 체계처리에 따른 지상부와 지하부 생육형질 특성을 비교한 결과는 표 10와 같다.

병원균 밀도와 관계없이 모든 생육 형질의 유의한 차이는 없었다. 그러나 *B. velezensis* ARRI17 퇴비+복합균주 관주조합에서 초장, 경장과 경직경 등 지상부 생육형질은 7.8×10<sup>1</sup>cfu/g에서 7.8×10<sup>0</sup>cfu/g보다 양호한 경향이었으나, 지하부 생육형질은 차이가 없었다.

*B. velezensis* ARRI17 퇴비와 복합균주 체계처리에 따른 *C. destructans*의 감염억제력을 비교한 결과는 표 11와 같다.

*C. destructans* spot(병반) 직경은 병원균 밀도에 관계없이 건전토보다 벧짚퇴비+복합균주 관주처리에서 *C. destructans*의 감염력이 억제되는 것으로 나타났다.

표 11. ARRI17퇴비와 복합균주 체계처리에 따른 *C. destructans*의 감염억제력

처리내용		<i>C. destructans</i> 병반 직경의 비율(%)			
병원균밀도	처리방법	0mm	0~1mm	1~2mm	2mm<
7.8×10 <sup>0</sup> cfu/g	ARRI17퇴비+표준관주 <sup>†</sup>	45.4 <sup>ab</sup>	30.4 <sup>ns</sup>	14.6 <sup>c</sup>	4.3 <sup>ns</sup>
	ARRI17퇴비+배량관주	56.3 <sup>a</sup>	28.0	12.6 <sup>c</sup>	2.9
	ARRI퇴비	21.9 <sup>b</sup>	33.1	41.2 <sup>a</sup>	3.3
7.8×10 <sup>1</sup> cfu/g	ARRI17퇴비+표준관주	54.1 <sup>a</sup>	26.7	15.0 <sup>c</sup>	4.2
	ARRI17퇴비+배량관주	54.8 <sup>a</sup>	28.5	12.7 <sup>c</sup>	4.0
	ARRI퇴비	19.4 <sup>b</sup>	42.4	32.4 <sup>ab</sup>	5.9
건전토	ARRI퇴비	32.8 <sup>ab</sup>	31.3	26.7 <sup>bc</sup>	5.7

<sup>†</sup> 복합균주의 조합비율 : ARRI17 1×10<sup>10</sup>cfu/g+Trichoderma viride 2×10<sup>7</sup>cfu/g 37%+나노규산(Rice Silica nanoparticles) 5%+중자 추출물 20%+키토산 3%+ 대나무 추출물 12%+DCY84 1×10<sup>9</sup>cfu/g 10%+EFW 3%, ARRI17퇴비의 균밀도 2.78×10<sup>6</sup>

#### 나. 인삼 예정지 및 본포관리를 위한 길항미생물 제품 현장적용 기술 연구

##### (1) 인삼 예정지 관리용 길항미생물 제품 현장실증

이 연구는 인삼 예정지 관리용 길항미생물 제품을 현장실증을 위해 연천, 파주지역의 예정지 관리 중인 인삼밭 40필지를 대상으로 토양화학성과 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*와 *F. solani*의 밀도를 분석하였고 그 중 질산태질소가 다른 필지에 비해 비교적 높은 3필지와 *C. destructans*가 검출된 3필지를 선정하여 현장실증을 진행하였다. 토양화학성은 경기도농업기술원 분석법에 따라 진행하였고 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도분석은 (주)코젠바이오텍에 위탁하여 개발한 *C. destructans*와 *F. solani* 동시진단 kit를 사용하였다. 2018년에 현장실증을 위한 6필지에 선발한 길항미생물(*B. velezensis* ARRI17)을 기반으로 투엠바이오(주)에서 제형화한 입상제와 분상제 제품을 기비(밀거름)의 형식으로 표준량(160kg/10a), 배량(320kg/10a)처리하고 관리기로 혼합한 후 묘삼을 이식하였다.

인삼포 예정지 시험 포장으로 선정된 시험전 토양화학성과 뿌리썩음병 병원균 밀도를 표 12와 같다.

*C. destructans*가 검출된 인삼포의 화학성은 모두 적정범위에 들었고 *C. destructans*만 4.5~8.1cfu/g이었다. 그리고 NO<sub>3</sub>-N 농도가 상대적으로 높은 필지도 화학성은 적정범위였으나 *C. destructans*는 검출되지 않았다.



표 12. 시험전 토양화학성 및 뿌리썩음병원균 밀도

구분	농가	pH (1:5)	EC (dS/cm)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)	<i>C. destructans</i> (cfu/g)
<i>C. destructans</i> 검출 밭	A	6.0	0.55	21.1	66	5.0	4.5
	B	5.8	0.34	23.1	101	4.0	8.1
	C	6.6	0.19	17.3	79	5.0	4.5
NO <sub>3</sub> -N 높은 밭	D	5.3	0.73	19.7	90	67.0	N.D
	E	4.4	0.43	15.6	55	30.0	N.D
	F	5.6	0.30	17.7	82	29.0	N.D
적정기준		5.0~6.5	<1.0	10~30	50~300	<50	0.0

※ N.D : not detected, 0cfu/g 이하

본 연구에서 살포한 길항미생물 제품의 성분조합은 표 13과 같다.

표 13. 길항미생물 제형별 성분 조합

제형	공통요소	구성요소
입상제	<i>B. velezensis</i> ARRI17 10 <sup>7</sup> cfu/g <i>Trichoderma viride</i> 10 <sup>5</sup> cfu/g	입상규산 30% 폴빅산(granule) 60% 발효대두박 10%
분상제	silicic acid 1%	분상규산 30% neem bark 90%

(가) *C. destructans*이 검출된 인삼포에서의 길항미생물 기비제 시용효과

본 연구는 표 12과 같은 토양 화학성과 *C. destructans*의 밀도인 조건에서 연구를 수행하였다. 토양 화학성을 분석한 결과 EC는 0.5dS/m 이상으로 적합범위는 초과하였고, NO<sub>3</sub>-N와 Na 이온도 EC와 같은 경향이였다. 그 외의 성분은 허용범위를 초과하지 않았다. 이러한 토양화학성인 상태에서는 인삼뿌리썩음병보다 생리장애로 인한 피해가 더 클 가능성이 있다.

표 14. *C. destructans* 검출 인삼포의 토양 화학성

처리내용	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex.cations(cmol/kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)	
					K	Ca	Mg	Na		
무처리	5.7±0.4	1.7±1.1	17.2±3.9	60.3±22.8	0.5±0.1	6.1±1.9	2.1±1	0.6±0.4	118.7± 87.7	
입상제	표준	5.7±0.8	2.1±1.1	17.6±6.2	73.0±38.7	0.4±0.1	6.5±1.2	2.2±0.6	0.7±0.3	164.0±117.0
	배량	5.7±0.5	2.3±1.2	16.8±5.5	70.0±33.4	0.4±0.1	6.4±1.2	2.2±0.6	0.8±0.3	169.3±111.8
분상제	표준	5.3±0.3	2.2±1.0	20.5±0.4	74.5±17.7	0.5±0.1	6.1±1.6	1.9±0.6	0.7±0.3	199.0±101.8
	배량	5.8±1.0	2.1±1.3	17.2±7.1	65.7±37.4	0.5±0.1	6.2±1.2	2.2±0.4	0.6±0.3	171.3±129.7
기준	밭	5.0~6.0	0.5이하	10~20	100~250	0.30~0.70	3.0~5.0	1.0~2.0	0.05~0.15	50이하
	논				50~150	0.20~0.60				

2019년에 3년생인 인삼의 지상부 생육형질 특성을 조사 분석한 결과는 표 15과 같다.

2년생의 출현율은 무처리보다 입상제 표준구를 제외한 처리구에서 뚜렷한 차이를 보였다. 3년생 출현율은 무처리에서 2년생때 보다 16.7%로 감소하여 가장 낮았고, 입상제나 분상제 처리구 모두 이보다 감소폭이 좁았다. 출현율은 2년생에서는 무처리구보다 길항미생물처리구에서 뚜렷한 감소를 보였으나, 3년생에서는 무처리구보다 분상제 처리구에서만 차이를 보였다. 지상부 생육형질은 처리 간에 뚜렷한 차이 없었다.

표 15. *C.destructans* 검출 필지의 지상부 생육 특성(3년생)

처리내용	출현율(%)		경장(cm)	경직경(mm)	엽장(cm)	엽폭(cm)	
	2년생	3년생					
무처리	95.0	78.3±10.9	11.2±2.0	2.6±0.1	6.6±1.1	3.3±0.4	
입상제	표준	94.2	81.8±0.6	11.4±5.9	2.6±0.7	7.4±2.0	3.7±0.6
	배량	87.1	77.1±11.2	11.7±2.5	2.6±0.5	6.8±2.3	3.3±0.7
분상제	표준	72.6	62.4±11.5	11.1±2.6	2.4±0.3	6.4±1.3	3.2±0.7
	배량	60.8	46.6±6.9	10.2±2.8	2.3±0.4	5.6±1.6	3.0±0.6

※조사 시기 : 6.10

3년생 인삼의 지하부의 생육형질 조사는 10월 상순에 채굴하여 조사하였는데, 무처리에 비해 분상제 표준이나 배량 모두 생육이 저조하였다. 특히 근중은 무처리의 50% 수준에도 못미칠 정도로 부진하였다. 이러한 결과가 초래된 것은 미생물 제품이지만 증량제로 이용된 neem bark이 살포 후 부숙되는 과정 중 가스장해를 입은 후 정상으로 회복하지 못 했기 때문인 것으로 판단되었다.

표 16. *C. destructans* 검출 필지의 지하부 생육 특성(3년생)

처리내용	근장(cm)	근직경(mm)	근중(g)
무처리	19.5±2.9	9.2±2.2	5.2±3.2
입상제	표준	18.2±6.2	9.1±4.3
	배량	17.7±4.1	8.7±2.6
분상제	표준	14.9±1.9	8.8±2.4
	배량	11.9±1.9	6.9±1.6

인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans*과 길항미생물인 *B. velezensis* ARRI17의 밀도를 진단하기 위해 인삼을 채굴하기 전에 지표하 20cm 깊이로 직경 7cm정도로 원통형이 되도록 토양시료를 5개 지점에서 채취한 후 지하부 생육조사를 한 시료를 채굴하여 병 발병지수를 조사한 결과는 표 17와 같다.

연생 또는 길항미생물 제제 살포여부와 관계없이 *C. destructans*는 조사시기간에 두렸한 경향이 없었으나, *B. velezensis* ARRI17는 2년생일때는 9월에, 3년생 일때는 3월에 많았다. 그리고 분상제보다는 입상제가 더 많은 경향이였다. *C. destructans*의 발병지수는 2년생일때는 길항미생물 제제살포 유무와 관계없이 3.0~4.9로 차이가 없었고 3년생일 때는 0.0~0.1로 거의 발병개체가 없었다. 이러한 결과는 표 14에서 설명된 것처럼 출현율이 10.2~16.7%정도 감소한 것으로 미루어 짐작된다.

표 17. *C. destructans* 검출 필지의 토양내 인삼뿌리썩음병원균 및 길항미생물 밀도, 발병률, 발병지수(3년생)

처리내용	밀도(cfu/g)								<i>C. destructans</i> 발병지수 <sup>↓</sup>		
	<i>C. destructans</i>				<i>B. velezensis</i> ARRI17				2년생	3년생	
	2년생		3년생		2년생		3년생				
3월	9월	3월	9월	3월	9월	3월	9월				
무처리		2.01	15.3	N.D		7.82	88.8	11.8	3.6	0.1	
입상제	표준		0.95	26.1	N.D		6.41	210.8	13.9	3.0	0.1
	배량	5.91	12.16	15.7	N.D	5.43	10.70	192.4	28.3	3.6	0.0
분상제	표준		0.92	13.9	N.D		7.80	104.9	4.3	3.9	0.0
	배량		7.29	13.3	N.D		6.16	166.0	36.8	4.9	0.1

※ N.D : not detected, 0cfu/g 이하

연생 또는 길항미생물 제제 살포여부와 관계없이 *C. destructans*는 조사시기간에 두렸한 경향이 없었으나, *B. velezensis* ARRI17는 2년생일때는 9월에, 3년생 일때는 3월에 많았다. 그리고 분상제보다는 입상제가 더 많은 경향이였다. *C. destructans*의 발병지수는 2년생일때는 길항미생물 제제살포 유무와 관계없이 3.0~4.9로 차이가 없었고 3년생일 때는 0.0~0.1로 거의 발병개체가 없었다. 이러한 결과는 표 63에서 설명된 것처럼 출현율이 10.2~16.7%정도 감소한 것으로 미루어 짐작된다.

(나) NO<sub>3</sub>-N함량이 과다수준인 예정지 포장 기비제 처리효과

인삼포에서 질소의 적합수준이상으로 높아지면 EC가 상승하고 생리장해 발생율이 높아진다. 그럼에도 아직 토양 내 NO<sub>3</sub>-N함량과 생리장해 발생과의 관계를 설명한 자료는 검색하지 못했다. 이 연구는 (가)에서와 같은 방법으로 수행하여 얻은 토양화학성 분석결과는 표 18과 같다.

표 18. NO<sub>3</sub>-N 높은 인삼포의 토양 화학성

처리내용	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex.cations(cmol/kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)	
					K	Ca	Mg	Na		
무처리	5.2±0.6	1.6±0.1	15.8±1.6	47.7±11.2	0.8±0.2	5.8±2.3	2.8±0.9	0.3±0.3	186.7±25.8	
입상제	표준	5.6±0.5	1.4±0.0	14.2±1.6	44.3±15.9	0.6±0.3	6.0±2.3	2.6±0.7	0.4±0.3	135.7±33.1
	배량	5.0±0.6	2.5±0.7	18.6±0.6	66.0± 6.2	1.1±0.2	6.7±2.0	3.0±0.6	0.4±0.3	219.0±27.1
분상제	표준	5.2±0.6	1.5±0.3	17.0±1.0	62.0± 4.6	0.9±0.2	6.0±2.4	2.6±0.9	0.3±0.2	152.3±51.5
	배량	5.3±0.5	1.8±0.2	18.2±0.4	58.0± 7.9	1.0±0.3	6.2±1.9	2.8±0.6	0.3±0.2	195.7±70.5
기준	밭	5.0~6.0	0.5이하	10~20	100~250	0.30~0.70	3.0~5.0	1.0~2.0	0.05~0.15	50이하
	논				50~150	0.20~0.60				

인삼포의 토양화학성은 분석대상 인자 중 pH와 Av. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>는 각각 2~5배, 3~4배정도 초과한 수준이었고 그 외의 인자도 초과한 수준이었다. 길항미생물 제제 처리와 관계없이 나타났다. 특히 EC와 NO<sub>3</sub>-N 함량은 인삼 재배특성상 고의로 비를 맞추지 않는 한 토양수분이 수직이동 시 토양수분에 녹아 있는 질소성분을 가지고 지표층 이용하기 때문에 항상 주의해야 하는 요소이다.

길항미생물제제를 표준량과 배량으로 처리하여 처리하였을 때 출현율과 지상부 생육특성을 조사하였는데, 그 결과는 표 19과 같다.

표 19. NO<sub>3</sub>-N 높은 필지의 지상부 생육 특성(3년생)

처리내용	출현율(%)		경장(cm)	경직경(mm)	엽장(cm)	엽폭(cm)	
	2년생	3년생					
무처리	82.5	59.1	9.9	1.9	6.1	2.9	
입상제	표준	74.2	61.2	9.7	2.0	6.3	3.0
	배량	73.4	61.5	8.6	1.9	5.7	2.6
분상제	표준	64.0	54.8	9.4	1.9	5.8	2.7
	배량	61.2	55.4	9.0	2.0	5.7	2.7

출현율은 2년생에서 3년생으로 경과되면서 무처리에서는 82.5%에서 59.1%로 23.4% 감소하였다. 이와 같은 감소폭은 *C. destructans*이 검출된 밭보다 더 큰 폭의 감소이다. 이는 인삼 결주 발생은 *C. destructans*보다 NO<sub>3</sub>-N 과다의 기여정도가 큼을 보여주는 것이다. 그 외 지상부 생육 형질은 길항미생물제제 살포와 관계없이 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

토양 화학성을 분석한 결과 EC는 0.5dS/m 이상으로 적합범위는 초과하였고, NO<sub>3</sub>-N도 EC와 같은 경향이였다. 그 외의 성분은 허용범위를 초과하지 않았다. 이러한 토양화학성인 상태에서는 인삼뿌리썩음병보다 생리장해로 인한 피해가 더 클 가능성이 높다.

지하부의 생육형질은 지상부와 달리 길항미생물 제제 살포에 의해 영향을 받아 무처리구에 비해 입상제는 배양에서, 분상제는 표준량이나 배양 모두 영향을 받아 근직경과 근중이 감소하였다(표 20). 이러한 결과는 2년생 출현기 때 받은 피해를 연차가 경과되었음에도 불구하고 극복하지 못했기 때문으로 여겨진다.

표 20. NO<sub>3</sub>-N 높은 필지의 지하부 생육 특성(3년생)

처리내용		근장(cm)	근직경(mm)	근중(g)
무처리		20.0 <sup>ns</sup>	10.1 <sup>a</sup>	6.2 <sup>a</sup>
입상제	표준	19.1	10.0 <sup>a</sup>	5.9 <sup>ab</sup>
	배양	18.6	9.1 <sup>b</sup>	4.8 <sup>b</sup>
분상제	표준	17.9	9.2 <sup>b</sup>	5.1 <sup>b</sup>
	배양	18.5	9.2 <sup>b</sup>	4.9 <sup>b</sup>

NO<sub>3</sub>-N 높은 검출 인삼포에서 토양내 인삼뿌리썩음병 원인균과 길항미생물의 밀도와 발병지수를 조사한 결과는 표 21과 같다.

*C. destructans*의 밀도는 2년생 3월에는 시험포 선정했을 때와 같이 검출되지 않았지만 9월에는 1.25~5.14cfu/g으로, 3년생 3월에는 16.7~26.2cfu/g으로 높아졌으나 9월에는 무처리를 제외한 길항미생물 제제를 살포한 시험구에서는 검출되지 않았다. 3년생 9월에 길항미생물 제제 살포구에서 불검출에 대한 원인은 불분명하다. 길항 미생물인 *B. velezensis* ARRI17의 밀도는 2년생 3월에는 7.72cfu/g이었으나 9월에는 1.58~6.93cfu/g으로 3년생 3월에는 49.4~87.8cfu/g으로 증가한 후 9월에는 2년생 3월보다도 낮은 수준으로 감소하였다. 무처리구와 길항미생물제제 처리구와의 차이가 없는 것은 제대로 정착이 되지 않은 것으로 여겨지나, 토양 내에 존재했던 것과 길항미생물 제제에서 유래된 것을 구분하는 연구를 추진하지 않은 점은 아쉬운 점이다. 이 연구에서 검출된 밀도는 길항미생물의 밀도는 큰 의미를 부여하기 어렵다. 그렇지만 3년생 9월에 감소한 것은 3년생 가을이나 4년근 봄부터 체계적인 관리를 통해 뿌리썩음병의 발생억제시킬 필요가 있음을 나타낸다. 그리고 *C. destructans*에 의한 인삼뿌리썩음병 발병지수는 2년생일 때에는 무처리구와 길항미생물 제제 처리구 간에 차이를 보이지 않았으나 평균적으로는 길항미생물 제제 살포구가 높게 나타났다. 3년생에서는 0.1정도의 지수를 보여 거의 *C. destructans*에 의한 인삼뿌리썩음병을 발견할 수 없었다. 이렇게 발병지수가 변화된 원인에 대한 근거도 구명하지 못했다. 이는 2년생에 발병된 개체가 대부분 고사했음을 의미하는데, 이데 대한 원인 구명을 위한 연구도 이루어져야 한다.

표 21. NO<sub>3</sub>-N 높은 검출 필지의 토양 내 인삼뿌리썩음병원균 및 길항미생물 밀도, 발병률, 발병지수

처리내용	밀도(cfu/g)								<i>C.destructans</i> 발병지수 <sup>1)</sup>		
	<i>C. destructans</i>				<i>B. velezensis</i> ARRI17				2년생	3년생	
	2년생		3년생		2년생		3년생				
3월	9월	3월	9월	3월	9월	3월	9월				
무처리		2.20	20.8	2.3		6.93	87.8	4.0	2.8±0.5	0.1±0.0	
입상제	표준		2.17	16.7	N.D		2.44	66.3	4.3	3.3±0.3	0.1±0.0
	배량	N.D	2.19	26.2	N.D	7.72	2.58	49.4	3.8	3.1±1.1	0.1±0.1
분상제	표준		5.14	16.8	N.D		1.58	65.3	6.4	3.8±0.6	0.1±0.0
	배량		1.25	18.8	N.D		1.83	93.2	N.D	3.2±0.7	0.2±0.1

※ N.D : not detected, 0cfu/g 이하

(2) 인삼포 고년근 관리용 길항미생물 제제 시용 효과

대부분의 인삼 뿌리썩음병은 대부분 2년생때 시작하여 고년근인 5년생부터 본격적으로 나타난다. 지금까지 문제가 된다고 보도된 병은 인삼뿌리썩음병, 잿빛곰팡이병 등이다(유 등,1998). 하지만 뿌리썩음병은 서서히 진행되기 때문에 지상부에서 관찰할 때에는 수습이 불가능한 상태이다. 잿빛곰팡이병은 4년근까지는 문제가 되지 않지만 5년생 이후 특히 질소함량이 높은 인삼포에서 대발하는 경우가 많다.

이런 어려움을 극복할 수 있는 방법이 길항미생물의 활용이다. 비록 효과는 화학적 방제에 비해 미약하지만 2019년 1월부터 시행된 PLS기준 적용 확대로 마음대로 화학농약을 사용하기 어려운 상황이다. 그래서 소득자원연구소에서는 예정지 단계부터 6년생까지 단계적으로 관리하는 방제체계를 확립하기 위해 본 연구를 수행하게 되었다.

본 연구는 연천과 파주에 소재한 3년생 포장을 대상으로 10월에 토양과 인삼시료를 채취한 후 조사분석을 한 후 각각 3필지를 선정하였는데, *C. destructans*이 검출된 인삼포 3필지, NO<sub>3</sub>-N농도가 적합수준보다 높은 3필지를 선정하였는데, 표 22과 같다. 시험규모는 필지당 150칸으로 하였고 매년 필요한 량의 시료를 채취하여 조사를 수행하였다.

길항미생물 제제의 성분조합은 표 23과 같다.

표 22. 시험전 인삼포의 토양 화학성 및 *C. destructans*의 밀도

구분	농가	포장 주소	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)	<i>C. destructans</i> (cfu/g)
<i>Cdestructans</i> 검출 밭	A	장남면 원당리 1161	5.6	0.26	4.0	30	50	4.4
	B	장남면 원당리 1073-3	4.8	0.73	17.4	112	63	4.3
	C	장남면 원당리 582-1	5.6	0.80	10.7	66	59	6.5
NO <sub>3</sub> -N 높은 밭	D	장남면 원당리 554-2	5.5	1.11	15.1	49	98	N.D
	E	백학면 노곡리 800	4.9	1.21	15.3	25	116	N.D
	F	적성면 읍포리 238-1	6.0	1.14	12.5	107	154	N.D
적정범위			5.0~6.5	<1.0	10~30	50~300	<50	0.0

※ N.D : not detected, 0cfu/g 이하

표 23. 시험에 사용된 길항미생물 제제의 성분조합

제형	공통요소	구성요소
액상제	<i>B. velezensis</i> ARRI17 10 <sup>12</sup> cfu/g silicic acid 1%	송진추출물(+유칼립투스 추출물) 60%
분말수화제	종자추출물 키토산 3%	마늘추출물 20% <i>Thricoderma viride</i> 2.0×10 <sup>7</sup> cfu/g

(가) *C. destructans* 검출된 고년근 인삼포에서의 길항미생물 제제 관주 효과

*C. destructans* 검출된 인삼포에 길항미생물 제제를 봄과 가을에 살포하였을 때 토양 화학성의 변화를 추정하고 연생별로 10월에 토양을 채취하여 토양 화학성을 분석한 결과는 표 24과 같다.

양 화학성은 4년생과 5년생 모두 EC는 약간 초과한 수준이고 NO<sub>3</sub>-N함량은 적합수준이거나 약간 초과한 수준이었다. 년생 때 분석한 결과와 차이없는 적합수준을 유지하였다. 오히려 NO<sub>3</sub>-N 함량은 오히려 감소한 것으로 나타났다. 그리고 처리 간에 차이도 없었다.

표 24. *C.destructans* 검출 인삼포의 토양 화학성

연근	제형	처리 시기	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex.cations(cmol/kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)
							K	Ca	Mg	Na	
4년 생	무처리	봄	5.1±0.3	0.6±0.2	13.2±6.5	79.4±47.2	0.5	3.1±1.2	1.0±0.2	0.2±0.0	47.4±25.4
	액상제	봄	5.3±0.3	0.5±0.2	12.5±6.6	82.6±57.1	0.4±0.1	3.5±1.2	1.2±0.5	0.2±0.0	41.0±17.2
	분말수화제	봄	5.3±0.3	0.5±0.2	12.4±6.5	72.3±42.3	0.4±0.1	3.6±0.8	1.2±0.4	0.2±0.0	40.9± 9.9
5년 생	무처리	봄	5.4±0.7	0.7±0.1	13.6±5.7	77.3±44.4	0.5±0.1	3.8±2.4	1.1±0.4	0.2±0.1	40.7±15.0
	액상제	봄	5.4±0.7	0.6±0.2	13.6±6.8	76.7±55.5	0.4±0.1	3.6±1.8	1.4±0.8	0.3±0.3	26.0± 7.2
		봄+가을	5.4±0.4	0.7±0.2	13.6±5.9	72.3±44.8	0.5±0.0	3.6±1.2	1.1±0.4	0.3±0.2	31.0±25.9
	분말수화제	봄	5.5±0.5	0.8±0.6	12.8±6.2	62.7±41.0	0.4±0.1	3.7±1.1	1.4±0.6	0.3±0.3	50.7±16.8
봄+가을		5.5±0.1	0.5±0.2	12.9±6.7	69.7±35.3	0.4±0.1	3.7±0.6	1.2±0.3	0.2±0.1	21.0±16.4	
기준	밭		5.0~6.0	0.5이하	10~20	100~250	0.30~0.70	3.0~5.0	1.0~2.0	0.05~0.15	50이하
	논					50~150	0.20~0.60				

※ 소수 둘째자리에서 반올림

*C. destructans* 검출 인삼포에서 길항미생물 제제를 4년생 봄과 5년생 봄에 3회 관주, 4년생 봄과 가을에, 5년생 봄과 가을에 각각 3회 관주한 후 생육상황을 조사한 결과는 표 25과 같다.

출현율은 4년생에는 68%진후였는데, 5년생에는 54.5~65.4%로 4.0~12.1% 감소하였다. 감소폭이 가장 적었던 처리는 무처리구였고, 가장 감소폭이 컸던 시험구는 액상제 봄과 가을에 처리한 구였다. 지상부생육은 제형과 살포시기에 영향을 받지 않았다.

표 25. *C.destructans* 검출 인삼포에서의 길항미생물 제제 처리에 따른 지상부 생육특성

제형	살포시기	출현주수 (주/1.62m <sup>2</sup> )		출현율(%)		경장 (cm)	근직경 (mm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)
		4년생	5년생	4년생	5년생				
무처리		44±6	41±8	69.4±9.5	65.4±12.3	32.5±9.8	6.45±2.00	13.4±3.0	5.7±1.2
액상제	봄	43±8	34±16	67.5±12.1	54.5±25.5	31.5±9.6	6.39±1.84	13.4±3.6	5.4±1.3
	봄+가을	-	35±15	-	55.4±23.7	32.8±9.5	6.65±1.84	14.6±3.0	6.0±1.1
분말 수화제	봄	42±8	36±10	67.2±13.0	57.8±16.3	32.0±9.2	7.01±1.42	14.4±2.5	5.8±0.9
	봄+가을	-	39±12	-	61.4±18.8	33.0±9.4	7.36±2.19	14.2±2.6	5.9±1.0

*C. destructans* 검출 인삼포에서 길항미생물 제제를 4년생 봄과 5년생 봄에 3회 관주, 4년생 봄과 가을에, 5년생 봄과 가을에 각각 3회 관주한 후 지하부 생육상황을 조사한 결과는 표 26와 같다.

지하부 생육은 지상부의 생육과는 다른 양상을 보였다. 무처리에 비해 분말수화제가 생육이 양호하였고, 근중도 유의한 차이를 보였다. 제제 간에는 액상보다는 분말수화제가 동장과 근직경, 근중에서 유의한 차이는 아니었지만 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 본밭에서 4년간 생육된 상태에서의 차이이기 때문에 의미를 부여할 수 있는 결과라고 생각한다.

표 26. *C. destructans* 검출 인삼포에서의 길항미생물 제제 처리에 따른 지하부 생육특성

처리	근장(cm)	동장(cm)	근직경(mm)	근중(g)
무처리	21.8±6.3	6.3±0.6	18.4±4.9	30.2±20.3
액상제	봄	22.5±6.0	7.1±2.1	19.4±3.7
	봄+가을	25.2±8.5	7.0±0.9	19.5±5.2
분말 수화제	봄	24.8±5.0	7.3±0.5	20.9±6.4
	봄+가을	25.2±4.3	7.4±1.0	20.7±4.9



*C. destructans* 검출 인삼포에서의 길항미생물 제제 처리에 따른 균 밀도를 연생별로 분석한 결과는 표 27와 같다.

*C. destructans*의 밀도는 3년생 가을에는 없었으나, 4년생 3월에는 5.3cfu/g, 9월에는 4.0~4.8cfu/g, 5년생 3월에는 불검출~1.58cfu/g, 9월에는 불검출로 분석되어 매우 낮은 밀도를 나타내었다. 그러나 길항미생물인 *B. velezensis* ARRI17의 밀도는 4년생 3월에는 불검출, 9월에는 1.7~3.3cfu/g, 5년생 3월에는 111~1,220cfu/g, 9월에는 11.1~45.3cfu/g로 나타나 토양에 정착이 된 것으로 보여진다. *B. velezensis* ARRI17의 5년생에서의 밀도는 상당히 의미가 있다고 생각된다. 무처리에 비해 특히 분말수화제 봄과 가을 관주처리에서 정착이 된 것으로 나타났다.

표 27. *C.destructans* 검출된 인삼포에서의 길항미생물 제제 처리에 따른 균 밀도

제형	살포시기	<i>C. destructans</i> 의 밀도(cfu/g)				<i>B. velezensis</i> ARRI17의 밀도(cfu/g)			
		4년생		5년생		4년생		5년생	
		3월	9월	3월	9월	3월	9월	3월	9월
	무처리	5.3	4.8	N.D	N.D	4.1	3.3	166	11.1
액상제	봄	ND	4.0	1.58	N.D	ND	2.9	111	45.3
	봄+가을	-	-	0.87	N.D	-	-	138	32.6
분말수화제	봄	ND	4.6	0.86	N.D	ND	1.7	440	13.6
	봄+가을	-	-	N.D	N.D	-	-	1220	15.6

※ N.D : not detected, 0cfu/g 이하

*C. destructans* 검출된 인삼포에서의 길항미생물 제제 관주처리에 따른 *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병률과 발병도, *F. solani*에 의한 스팟수와 발병률, 무름병, 역병, 잿빛곰팡이병 등의 발병률을 조사한 결과는 표 28과 같다.

*C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병률과 발병도는 무처리구보다 낮은 관주 처리구는 없었다. 발병률은 액상제 봄+가을, 분말수화제 봄 관주처리시에는 이도와는 반대로 발병률이 높았다. *Fusarium* sp.에 의한 스팟수는 차이가 없었고, 발병률은 무처리보다 길항미생물 관주구에서 오히려 높았다. 무름병, 역병, 잿빛곰팡이병은 일정한 경향이 없고 무처리구에 비해 우수한 관주처리구가 없었다.

표 28. *C.destructans* 검출된 인삼포에서의 길항미생물 제제 처리에 따른 병 발생

처리내용	<i>C. destructans</i>		<i>F. solani</i>		발병률(%)			
	발병률 (%)	발병지수	스팟 수 (개)	발병률 (%)	무름병	역병	잿빛곰팡이병	
무처리	5.9± 2.2	0.2±0.1	2.3±0.9	57.4±15.7	3.4±3.0	0.3±0.5	0.7±1.2	
액상제	봄	9.0± 9.0	0.2±0.2	2.2±0.5	66.0±20.9	2.8±2.8	0.4±0.4	0
	봄+가을	15.0± 5.6	0.4±0.2	3.4±0.8	70.4±20.0	4.4±6.3	0.4±0.8	0.2±0.4
분말수화제	봄	14.7±11.4	0.3±0.2	3.8±0.9	71.1±18.5	3.8±3.7	0	1.6±1.9
	봄+가을	6.2± 7.7	0.2±0.2	6.6±6.9	73.0±29.7	1.3±1.2	1.2±0.5	0

(나) NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 고년근 인삼포에서의 길항미생물 제제 관주 효과

NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포의 토양화학성을 4년생과 5년생 때 분석을 하였는데 그 결과는 표 29과 같다.

EC는 4년생부터 0.5dS/m 이상으로 적합범위는 초과하였고, NO<sub>3</sub>-N도 EC와 같은 경향이였다. 이는 NO<sub>3</sub>-N함량과 EC가 정의상관을 보인다(김 등, 2019)는 기존의 보고와 일치한다. 그 외의 성분은 적합수준을 초과하지 않았다. NO<sub>3</sub>-N함량은 4년생일 때 67.1~77.7mg/kg에서 140.7~305.3mg/kg으로 상승하여 기준 50mg/kg보다 연생에 관계없이 모든 처리구에서 높았다. 특히 5년생에서는 4년생에 비해 약 2~4.5배 증가였다. 이러한 토양화학성인 상태에서는 인삼 뿌리썩음병보다 생리장해로 인한 피해가 더 클 가능성이 높다. 양이온 치환 이온 중에서는 Ca와 Mg는 모든 처리에서 기준을 초과하였다. 반면 Av. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>는 기준에 미달하였다.

표 29. NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포의 토양 화학성

연근	제형	처리 시기	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex.cations(cmol/kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)
							K	Ca	Mg	Na	
4년생		무처리	5.7±0.2	0.9±0.1	13.4±1.8	82.4±78.7	0.4±0.1	6.6±4.0	2.2±1.5	0.3±0.2	67.1±11.1
	액상제	봄	5.6±0.3	0.9±0.3	14.6±1.5	87.8±95.5	0.4±0.1	6.3±4.1	2.0±1.4	0.3±0.3	70.7±30.1
	분말수화제	봄	5.5±0.5	1.0±0.2	13.7±2.6	91.7±92.4	0.4±0.1	6.8±4.3	2.1±1.2	0.3±0.2	77.7±31.8
5년생		무처리	5.4±0.9	1.8±0.2	13.3±1.4	56.0±41.6	0.4±0.2	8.1±5.6	3.1±1.7	0.4±0.2	196.0± 32.2
	액상제	봄	5.5±0.9	2.8±1.5	15.6±2.6	94.3±94.6	0.5±0.1	7.2±4.3	2.6±1.2	0.5±0.2	305.3±216.3
		봄+가을	5.6±0.9	1.5±0.2	15.4±1.5	69.7±57.1	0.5±0.1	6.6±3.8	2.2±1.4	0.4±0.2	140.7± 20.4
	분말수화제	봄	5.8±0.4	1.9±0.8	16.7±1.4	100.3±113.2	0.6±0.2	7.2±3.7	2.5±1.1	0.4±0.2	186.3±120.7
봄+가을		5.6±0.5	2.2±1.1	17.3±3.1	89.0±82.9	0.6±0.1	7.2±3.9	2.6±1.3	0.5±0.3	257.0±154.2	
기준		밭	5.0~6.0	0.5이하	10~20	100~250	0.30~0.70	3.0~5.0	1.0~2.0	0.05~0.15	50이하
		논				50~150	0.20~0.60				

NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포에서 길항미생물 제제 관주처리에 따른 지상부 생육특성을 조사한 결과는 표 30과 같다.

출현율은 4년생까지는 80% 전후였는데, 5년생에는 61.6~69.3%로 감소폭이 11.6~23.4%로 매우 컸다. 출현율의 감소폭이 크다는 것은 다른 병해나 생리장해로 인한 것으로 추정된다. 지상부 생육특성은 모든 형질에서 차이를 보이지 않았다.

표 30. NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포에서 길항미생물 제제 관주처리에 따른 지상부 생육특성

제형	살포시기	출현주수 (주/1.62m <sup>2</sup> )		출현율(%)		경장 (cm)	경직경 (mm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)
		4년생	5년생	4년생	5년생				
무처리		51±2	43.7±11.4	81±3	69.3±18.0	32.1±8.3	6.24±0.99	12.7±2.5	5.2±0.6
액상제	봄	53±5	38.4±20.3	84±8	61.0±32.2	29.9±9.7	6.85±1.49	12.8±2.3	5.3±0.7
	봄+가을	-	41.2±20.0	-	65.4±31.8	33.2±10.6	6.76±1.57	13.1±2.7	5.4±0.9
분말 수화제	봄	49±10	39.8±14.2	78±15	63.1±22.6	32.2±9.1	7.04±1.60	13.2±2.4	5.5±0.8
	봄+가을	-	38.8±13.9	-	61.6±22.1	30.0±8.6	6.35±1.62	12.6±1.6	5.2±0.5

NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포에 길항미생물을 봄과 가을에 살포를 하였을 때, 뿌리의 생육상황은 표 31와 같다.

뿌리의 생육은 무처리에 비해 생육이 양호한 상태였다. 근장을 제외한 동장은 분말 수화제 관주구에서, 근직경, 근중 모두 제형에 관계없이 증가하였다. 하지만 5년근이라는 점을 고려하면 절대 근중이 가벼웠다는 점을 고려하면 경제적으로는 의미가 없는 상황이다.

표 31. NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포에서 길항미생물 제제 관주처리에 따른 지하부 생육특성

제형	살포시기	근장(cm)	동장(cm)	근직경(mm)	근중(g)
무처리		19.0±4.4	6.0±2.4	16.3±5.4	20.9±17.8
액상제	봄	20.2±1.8	5.7±1.0	17.8±4.6	25.3±17.8
	봄+가을	21.5±3.3	6.6±1.1	19.1±5.4	28.9±18.1
분말 수화제	봄	19.4±1.9	7.0±0.3	18.2±4.5	27.5±13.6
	봄+가을	19.4±0.7	7.1±0.7	16.7±3.9	22.6±11.8

NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포에서 길항미생물 제제 관주처리에 따른 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C.destructans*의 밀도는 4년생 3월에는 불검출~0.7cfu/g, 9월에는 3.0~6.5cfu/g, 5년생 3월에는 불검출~1.4cfu/g, 9월에는 불검출~4.4cfu/g이었다(표32). 이 정도의 밀도는 *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병의 발병을 쉽지않은 밀도이다. 인삼뿌리썩음병의 길항미생물인 *B. velezensis* ARRI17의 밀도는 4년생 3월에는 불검출~1.1cfu/g, 9월에는 1.2~2.9cfu/g, 5년생 3월에는 11~850cfu/g, 9월에는 4.6~31.2cfu/g이었다. *B. velezensis* ARRI17의 밀도의 패턴은 앞의 연구결과에서도 일치하는 경향을 보였다. 우리가 좀 더 관심을 갖고 도전해야 할 과제는 “길항 미생물의 밀도를 연중 일정하게 유지할 수 있을까?”이다.

표 32. NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포에서 길항미생물 제제 관주처리에 따른 균 밀도

제형	살포시기	<i>C. destructans</i>				<i>B. velezensis</i> ARRI17			
		4년생		5년생		4년생		5년생	
		3월	9월	3월	9월	3월	9월	3월	9월
	무처리	0.7	3.7	1.1	N.D	1.1	1.2	11	4.6
액상제	봄	ND	6.5	1.4	4.4	ND	1.6	108	9.7
	봄+가을	-	-	0.8	N.D	-	-	850	29.3
분말수화제	봄	ND	3.0	N.D	N.D	ND	2.9	776	31.2
	봄+가을	-	-	N.D	N.D	-	-	139	7.1

※ N.D : not detected, 0cfu/g 이하

NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포에서 길항미생물 제제 관주처리에 따른 *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병률과 발병도, *Fusarium* sp.에 의한 스팟수와 발병률, 무름병, 역병, 잣빛곰팡이병 등의 발병률을 조사한 결과는 표 33와 같다.

*B. velezensis*에 의한 뿌리썩음병 발병률은 무처리구보다 낮은 관주 처리구는 분말수화제 봄 관주처리구였다. 하지만 유의한 차이를 보이지 못했다. 발병도는 관주처리간에 차이가 없었다. *Fusarium* sp.에 의한 스팟수, 발병률, 무름병, 역병, 잣빛곰팡이병은 일정한 경향이 없고 무처리구에 비해 우수한 관주처리구가 없었다.

표 33. NO<sub>3</sub>-N 함량이 높은 인삼포에서 길항미생물 제제 관주처리에 따른 병 발생

처리내용	<i>C. destructans</i>		<i>F. solani</i>		발병률(%)			
	발병률 <sup>g</sup> (%)	발병도 <sup>h</sup>	스팟 수 (개)	발병률 (%)	무름병	역병	잣빛 곰팡이병	
무처리	21.0±23.7	0.7±0.6	4.2±4.5	54.1±12.6	1.2±1.2	2.0±2.9	3.4± 4.0	
액상제	봄	24.7±27.1	0.8±0.7	4.0±3.8	64.5±30.9	1.0±1.7	4.1±6.1	2.2± 2.0
	봄+가을	26.2±25.5	0.9±0.6	4.0±4.5	55.5±12.8	2.4±3.1	3.1±2.2	15.7±13.8
분말 수화제	봄	18.1±16.8	0.7±0.5	5.1±4.6	67.6±33.9	2.6±1.0	2.0±1.7	0.8± 0.8
	봄+가을	26.1±31.3	0.8±0.7	4.4±5.9	50.9±16.2	4.6±4.0	1.1±0.7	2.5± 3.6

<sup>h</sup>발병지수 : 0:정상, 1:2차근 피해, 2:1차근 피해, 3:지근 0~50%피해, 4:지근 51~90%피해, 5:동체 0~20%피해, 6:동체 21~40%피해, 7:동체 41~60%피해, 8:동체 61~80%피해, 9:동체 81~100%피해

<sup>g</sup>발병률 : (이병개체수/조사개체수)×100

이상의 연구결과를 종합하면 인삼의 뿌리썩음병은 강한 병원성 *I. mors-panacis*와 약한 병원성인 *I. liriodendri*, *I. robusta*, *I. cyclaminicola*, 균주 등으로 분류된다(서문원, 2017). 강한 병원성을 가진 병원균은 앞선 연구에서 설명한바와 같이 10<sup>2</sup>cfu/g 정도이면 병을 유발한다. 하지만 그렇지 않을 경우에는 상처를 통해 감염이 이루어진다(Kim *et al.*, 2006). 특히 *Fusarium* sp.들은 병원성은 약하지만 상처를 통해 감염되고 그 피해 증상이 지상부에 나타날 때에는 이미 치료가 불가능한 상태이기 때문에 사전에 관리를 철저히 해야 함을 상기해야 한다.

다. 적용시기에 따른 제품 적정 처리량 및 살포주기 설정

(1) 최종 시제품에 대한 미생물 안정성 검토 및 최적 처리방법 도출

최종 시제품에 대해 온도조건에 따른 경시적 미생물 안정성을 측정하여 약효 보증기간 및 유통기간을 설정하였다. 또한, 인삼 묘삼을 대상으로 제형별 처리방법, 처리간격 등 사용방법에 따른 약해 유무를 확인하였다.

(가) 시제품의 주기적 추적 생균 수 밀도 분석을 통하여 안정성 확인

① 실험방법

- ㉞ 최종 시제품을 2가지 조건(실온, 40℃)에서 보관하며 ARRI 17 균주에 대한 경시적 생균수 측정
- ㉟ TSA(Tryptic Soy Agar) 배지에 도말하고, 30℃에서 24시간 배양

※ 농촌진흥청고시 제2019-14호 농약 및 원제의 등록기준 [별표 9] 이화학 분석 기준과 방법에 따라 가열 안정성 시험(학대)으로 40±2℃에서 8주 보관 시 약효 보증기간 1년으로 간주, 16주 보관 시 약효 보증기간 2년으로 간주

② 실험재료

표 32. 최종 시제품

구분	제형	주성분 배합비
관주제	액상제 (A-1)	송진 유화원제 60% + 유칼립투스추출물 20% + silicic acid 5% + 종자 추출물 5% + ARRI 17 1x10 <sup>10</sup> cfu/g 10% + 키토산 3% + SC-199 3%
	분말수화제 (B-1)	ARRI 17 1x10 <sup>10</sup> cfu/g 10%+ <i>Trichoderma viride</i> 2x10 <sup>7</sup> cfu/g 50% + silicic acid 5% + 종자 추출물 20% + 키토산 3%+Bamboo extract 12% + EFW 3%
기비제	입상제	ARRI 17 1x10 <sup>10</sup> cfu/g + <i>Trichoderma viride</i> 1x10 <sup>5</sup> cfu/g + silicic acid 1% + 풀빅산 60% + 입상 규산 30% + 발효 대두박 10%
	분상제	ARRI 17 1x10 <sup>10</sup> cfu/g + <i>Trichoderma viride</i> 1x10 <sup>5</sup> cfu/g + silicic acid 1% + neem bark 90% + 분상 규산 10%

③ 결과

표 33. 실온보관 안정성 시험결과

구분	제형	생균수, [ $\times 10^9$ cfu/ml(g)]					
		초기(1/30)	2개월(3/30)	4개월(5/30)	6개월(7/30)	8개월(9/30)	10개월(11/30)
관주제	액상제 (A-1)	2.81	2.72	2.92	2.83	2.79	2.71
	분말수화제 (B-1)	3.50	3.44	3.41	3.25	3.32	3.19
기비제	입상제	1.82	1.73	1.72	1.85	1.60	1.63
	분상제	2.63	2.41	2.50	2.47	2.45	2.42

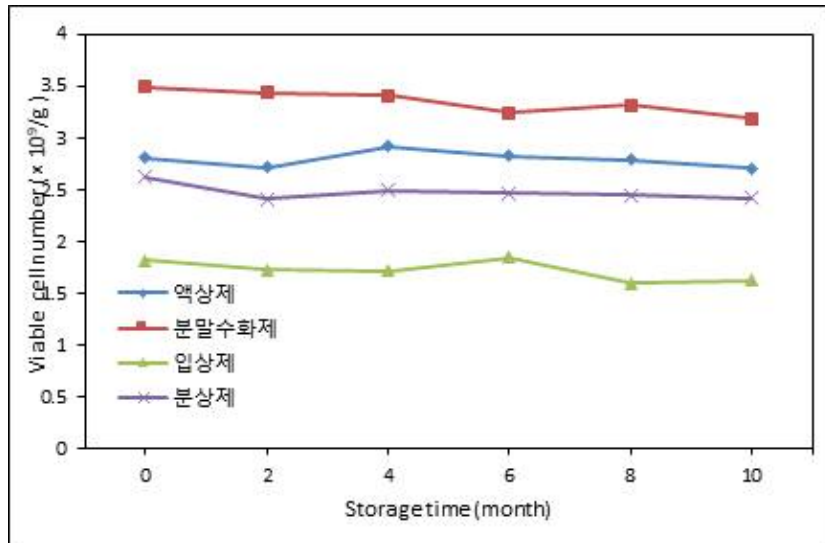


그림 8. 실온보관 안정성 시험결과

표 34. 가열 안정성 시험(40℃)

구분	제형	생균수, [ $\times 10^9$ cfu/ml(g)]						
		초기(6/10)	4주(7/8)	8주(8/5)	12주(9/2)	16주(9/30)	20주(10/28)	24주(11/25)
관주제	액상제 (A-1)	2.73	2.74	2.59	2.62	2.63	2.55	2.41
	분말수화제 (B-1)	2.81	2.72	2.78	2.69	2.57	2.62	2.53
기비제	입상제	2.13	2.01	1.89	1.97	2.05	2.02	1.88
	분상제	2.34	2.18	2.06	2.11	2.13	2.07	1.98

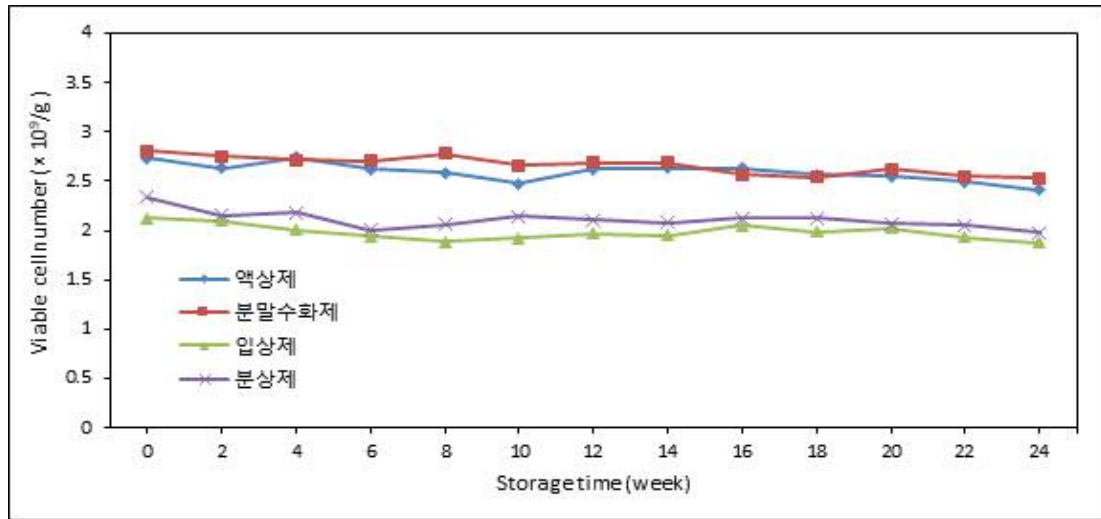


그림 9. 가열 안정성 시험결과

④ 결론

- ㉔ 실온에서 보관하는 시제품 4종 모두 유효 미생물인 ARRI 17 균주의 안정성은 10개월차까지 확인한 결과 안정성이 유지되는 것으로 확인되었다.
- ㉕ 40℃에서 보관하는 시제품 4종에서 24주차까지 확인한 결과 약간 감소하긴 하였지만 큰 이상 없이 안정성이 유지되는 것을 확인하였다. 따라서, 농촌진흥청 고시 제2019-14호 농약 및 원제의 등록기준 [별표 9] 이화학 분석 기준과 방법에 따라 가열 안정성 시험(학대)으로 40±2℃에서 16주 보관 시 약효 보증기간 2년으로 간주하는 내용에 따라 최종 시제품의 유통기간은 2년으로 산정하였다.

(나) 최종 시제품의 인삼 묘삼에 대한 약해 시험

① 실험재료 및 방법

- ㉔ 포트(Φ12cm×11cm)당 1년생 묘삼을 4주씩 정식하고, 시제품의 사용방법(기준량 180kg/10a)에 따라 약제처리를 하였다.
- ㉕ 기비제(분상제)는 포트당 처리량(기준량 2g, 배량 4g)에 따라 토양혼화 처리하고 0일, 5일, 10일, 15일 후에 정식 하였다.
- ㉖ 관주제(액상제, 분말수화제)는 정식 3일 후에 포트당 희석배수(기준량 1000배 희석, 배량 500배 희석)에 따라 10일 간격으로 3회 관주처리 하였다.
- ㉗ 결과관찰은 기비제의 경우 정식 20일, 40일 후, 관주제의 경우 최종 약제처리 10일 후에 지상부와 뿌리에 대한 약해 여부를 확인하였다.
- ㉘ 시험 기간 내 수분만 공급하였으며, 타 약제나 추가 시비는 없었으며, 기타 약해에 영향을 끼칠만한 사항은 없었다.



② 결과

표 35. 기비제 처리에 따른 약해시험 결과

구분		기비제 처리에 따른 정식							
		0일		5일후		10일후		15일후	
		기준량	배량	기준량	배량	기준량	배량	기준량	배량
지상부	20일차	4	4	4	4	2	2	0	1
	40일차	4	4	3	4	1	1	0	0
뿌리	40일차	4	4	3	4	1	2	0	1

표 36. 관주제 처리에 따른 약해시험 결과

구분	액상제		분말수화제	
	기준량	배량	기준량	배량
지상부	0	0	0	0
뿌리	0	1	0	1

표 36. 약해조사 기준

약해정도	약해증상
0	육안으로 약해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎의 적은 부분에 약해가 인정됨
3	처리된 잎의 50% 정도 약해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음
5	심한 약해를 받고 고사한 상태임
















		지상부		뿌리
		20일 경과후	40일 경과후	40일 경과후
무처리				
기비제 처리에 따른 정식	0일			
	5일 후			
	10일 후			
	15일 후			

그림 10. 기비제 처리에 따른 약해시험 결과










	지상부		뿌리
	20일 경과후	40일 경과후	40일 경과후
무처리			
액상제			
분말수화제			

그림 11. 관주제 처리에 따른 약해시험 결과

### ③ 결론

- ㉞ 기비제의 경우 처리후 바로 정식한 시험구(0일)와 처리 5일 후 정식한 시험구(5일)에서 지상부 생육과 뿌리 생육이 크게 저조하게 나타나 약해 증상이 있는 것으로 나타났다. 처리 10일 후 정식한 시험구(10일)에서도 지상부와 뿌리 생육이 일부 저조하게 나타나 약해가 있는 것을 확인하였다. 처리 15일 후 정식한 시험구(15일)에서는 지상부와 뿌리 생육이 무처리구와 비교하여 크게 이상 없었으며, 배량에서만 일부 생육이 다소 더딘 것을 확인하였다. 따라서 기비제의 경우 사용방법에 따른 처리량을 준수하고, 최소 정식 15일 전에는 토양혼화처리를 해야 할 것으로 판단된다.
- ㉟ 관주제의 경우 액상제와 분말수화제에서 기준량, 배량 모두 지상부와 뿌리 생육이 무처리구와 비교하여 이상 없었으며, 배량에서 뿌리의 생육이 다소 더딘 것을 확인하였다. 따라서 관주제의 경우 사용방법에 따라 처리량을 준수하면 이상이 없을 것으로 판단된다.

## 6. 인삼 뿌리썩음병 최적 방제기술 개발

### 가. 기존 다조멧 입제를 능가하는 방제가를 보유한 농약 선발 및 효과 분석

살균제로 등록되어 있는 대표적인 농약 24종을 선발하여 대표성분과 희석배수를 조사하였고, 다조멧 입제와 선발된 24종 농약의 식물병원균에 대한 항균력을 비교, 조사하여 대체 가능성이 있는 농약을 선발하였다. 천연원료인 Salicylic acid의 인삼 뿌리썩음병 및 식물병원균에 대한 항균효과를 조사하여 선발된 농약과 비교하였다. 최종 시제품의 농약 성분 노출에 따른 미생물 안정성을 확인하였다.

#### (1) 살균제로 등록된 농약 대표성분 및 희석배수 조사

표 1. 살균제로 등록된 농약 대표성분 및 희석배수


	제품명	주성분	희석배수 (사용량)	주요대상병해	비고	제품사진
1	리도밀골드	Metalaxyl-M 1%	10a / 6kg	생강 뿌리썩음병	입제 인삼 x	
2	리도밀동골드	Copper oxychloride 4.7% Metalaxyl-M 1%	10a / 8kg	인삼 역병	입제	
3	리도밀 골드	Metalaxyl-M 45.2%	12,000배 (1ml당 물12L)	인삼 역병	액제	



표 2. 살균제로 등록된 농약 대표성분 및 희석배수(계속)

	제품명	주성분	희석배수 (사용량)	주요대상병해	비고	제품사진
4	헥사코나졸	Hexaconazole 2%	2,000배 (1ml당 물2L)	수박 덩굴마름병	액상수화제	
5	프린트	Trifloxystrobin 22%	2,000배 (1ml당 물2L)	인삼 탄저병, 점무늬병	액상수화제	
6	프리엔	Propamocarb hydrochloride 66.5%	500배 (1ml당 물0.5L)	생강 뿌리썩음병	액제 인삼 x	
7	가벤다	Carbendazim 60%	1,000배 (1g당 물1L)	사과 탄저병	수화제 인삼 x	
8	아미스타	Azoxystrobin 10%	1,000배 (1g당 물1L)	인삼 점무늬 병	수화제	
9	비온-엠	Acibenzolar-S-met hyl 1% Mancozeb 48%	1,000배 (1ml당 물1L)	사과 탄저병	수화제 인삼 x	
10	후론사이드	Fluazinam 50%	2,000배 (1ml당 물2L)	인삼 점무늬병, 탄저병, 역병	수화제	
11	톱신엠	Thiophanate-methyl 70%	1,000배 (1g당 물1L)	더덕 점무늬병	수화제 인삼 x	
12	벨쿠르	Iminoctadline tris 40%	1,000배 (1ml당 물1L)	인삼 점무늬병, 탄저병	수화제	

표 3. 살균제로 등록된 농약 대표성분 및 희석배수(계속)

	제품명	주성분	희석배수 (사용량)	주요대상병해	비고	제품사진
13	안트라콜	Propineb 70%	500배 (1g당 물0.5L)	마 점무늬병	수화제 인삼 x	
14	트리후민	Triflumizole 30%	2,000배 (1ml당 물2L)	사과 흰가루병	수화제	
15	푸르젠	Difenoconazole 10%	2,000배 (1g당 2L)	인삼 점무늬병	수화제	
16	다이센엠-4 5	Mancozeb 75%	600배 (1g당 0.6L)	인삼 점무늬병	수화제	
17	베노밀	Benomy1 50%	2,000배 (1g당 2L)	사과 탄저병	수화제 뿌리관련 X	
18	다코닐	Chlorothanlonil 75%	600배 (1g당 0.6L)	감자 역병	수화제 뿌리관련 X	
19	새노브란	Iprodione 50%	1000배 (1g당 1L)	복숭아 잣빛곰팡이병	수화제 뿌리관련 X	
20	젬프로	Ametoctradin 27% Dimethomorph 20%	600배 (1ml당 물0.6L)	생강 뿌리썩음병	액상수화제	
21	벨리스플러 스	Boscalid 13.6% Pyraclostrobin 6.8%	2,000배 (1ml당 물2L)	인삼 잣빛곰팡이병, 점무늬병	입상수화제	

표 4. 살균제로 등록된 농약 대표성분 및 희석배수(계속)

	제품명	주성분	희석배수 (사용량)	주요대상병해	비고	제품사진
22	유닉스	Cyprodinil 50%	2,000배 (1g당 물2L)	인삼 잿빛곰팡이병, 점무늬병	입상수화제	
23	델란	Dithianon 66%	650배 (1ml당 물0.65L)	사과 탄저병	입상수화제 뿌리관련 X	
24	쏘일킹	Metam-Sodium 42%	10a당 30L (1ml당 물50ml)	인삼 뿌리썩음병	액제	
25	밧사미드	Dazomet 96.5%	10a당 30kg	인삼 뿌리썩음병 뿌리혹선충	입제	

(2) 인삼 뿌리썩음병원균 및 식물병원균에 대한 다조멧 입제의 항균력과 24종 농약의 항균력 조사와 항균력 우수 농약 선발

(가) 실험방법

- ① 각 농약별 사용방법에 따라 희석하여 희석액 제조 후 paper disc에 50 $\mu$ l 분주
- ② 균주별로 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 올려놓고 배양온도에 따라 7일간 배양

(나) 실험재료

표 5. 식물병원균 및 배양온도

식물 병원균	배양온도
<i>C. destructans</i> (뿌리썩음병)	19℃
<i>Alternaria panax</i> (점무늬병)	26℃
<i>Botrytis cinerea</i> (잿빛곰팡이병)	
<i>Colletotrichum pancicola</i> (탄저병)	
<i>Fusarium solani</i> (뿌리썩음병)	
<i>Rhizoctonia solani</i> (모잘록병)	

표 6. 농약 시료

	제품명	주성분		제품명	주성분
1	리도밀골드	Metalaxyl-M 1%	14	트리후민	Triflumizole 30%
2	리도밀동 골드	Copper oxychloride 4.7% Metalaxyl-M 1%	15	푸르겐	Difenoconazole 10%
3	리도밀 골드	Metalaxyl-M 45.2%	16	다이센엠-45	Mancozeb 75%
4	헥사코나졸	Hexaconazole 2%	17	베노밀	Benomyl 50%
5	프린트	Trifloxystrobin 22%	18	다코닐	Chlorothanlonil 75%
6	프리엔	Propamocarb hydrochloride 66.5%	19	새노브란	Iprodione 50%
7	가벤다	Carbendazim 60%	20	젼프로	Ametoctradin 27% Dimethomorph 20%
8	아미스타	Azoxystrobin 10%	21	벨리스플러스	Boscalid 13.6% Pyraclostrobin 6.8%
9	비온-엠	Acibenzolar-S-methyl 1% Mancozeb 48%	22	유닉스	Cyprodinil 50%
10	후론사이드	Fluazinam 50%	23	텔란	Dithianon 66%
11	툽신엠	Thiophanate-methyl 70%	24	쏘일킹	Metam-Sodium 42%
12	벨쿠르	Iminoctadline tris 40%	25	맞사미드	Dazomet 96.5%
13	안트라콜	Propineb 70%			



(다) 결과

① 식물병원균에 대한 농약별 항균효과



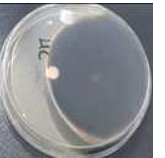



























표 7. 식물병원균에 대한 농약별 항균효과

	<i>C. destructans</i>	<i>C. Pancicola</i>	<i>A. Panax</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. solani</i>
리도밀골드 (입제)						
리도밀동 골드						
리도밀 골드 (액상)						
헥사코나졸						
프린트						
프리엔						
가펜다						
아미스타						
비온-엠						
후론사이드						

표 8. 식물병원균에 대한 농약별 항균효과(계속)

	<i>C. destructans</i>	<i>C. Pancicola</i>	<i>A. Panax</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. solani</i>
톱신엠						
벨쿠르						
안트라콜						
트리후민						
푸르겐						
다이센엠-45						
베노밀						
다코닐						
새노브란						
<b>젬프로</b>						

표 9. 식물병원균에 대한 농약별 항균효과(계속)

	<i>C. destructans</i>	<i>C. Pancicola</i>	<i>A. Panax</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. solani</i>
벨리스플러스						
유닉스						
텔란						
쏘일킹						
밧사미드						

상기 결과를 토대로, *C. destructans*에 항균효과를 나타내는 농약 6종을 선발하였다. (리도밀 골드 액제, 헥사코나졸, 프린트, 가벤다, 아미스타, 줌프로)

표 10. 항균효과 비교

No	제품	<i>C. destructans</i>	<i>C. Pancicola</i>	<i>A. Panax</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. solani</i>
1	리도밀 골드	중	중	중	하	중	중
2	리도밀동 골드	중	상	하	X	중	하
3	리도밀 골드(액상)	상	상	하	하	중	중
4	헥사코나졸	상	상	하	하	중	상
5	프린트	상	상	하	하	하	상
6	프리엔	중	중	X	X	X	X
7	가벤다	상	상	하	중	중	중
8	아미스타	상	상	하	하	하	중
9	비온-엠	X	X	X	X	X	X
10	후론사이드	X	하	X	X	X	X
11	툼신엠	하	X	X	X	X	X
12	벨쿠르	중	X	X	X	X	X
13	안트라폴	하	X	X	X	X	X
14	트리후민	X	X	X	X	X	X
15	푸르겐	X	X	X	X	X	X
16	다이센엠	X	X	X	X	X	X
17	베노밀	X	X	X	X	X	X
18	다코닐	X	X	X	하	X	X
19	새노브란	X	X	X	X	X	X
20	젬프로	상	상	중	X	중	하
21	벨리스플러스	X	X	X	X	X	X
22	유닉스	X	X	X	X	X	X
23	텔란	X	X	X	X	X	X
24	쏘일킹	하	X	X	X	X	X
25	밧사미드	하	X	X	X	X	X

(3) 천연 원료 Salicylic acid 농도별 인삼 뿌리썩음병 및 식물병원균 저지 농도 확인 시험

(가) 대치배양법

① 실험방법

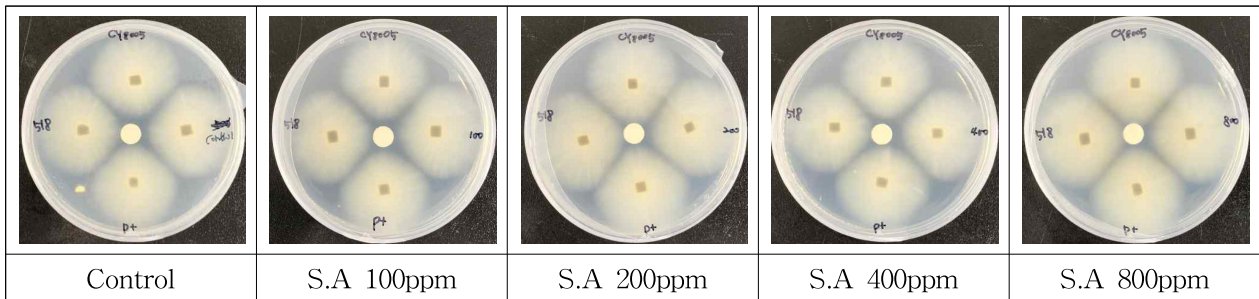
- ㉠ Salicylic acid를 농도별로 희석하여 희석액 제조 후 paper disc에 50 $\mu$ l 분주
- ㉡ 균주별로 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 올려놓고 배양온도에 따라 7일간 배양

② 실험재료

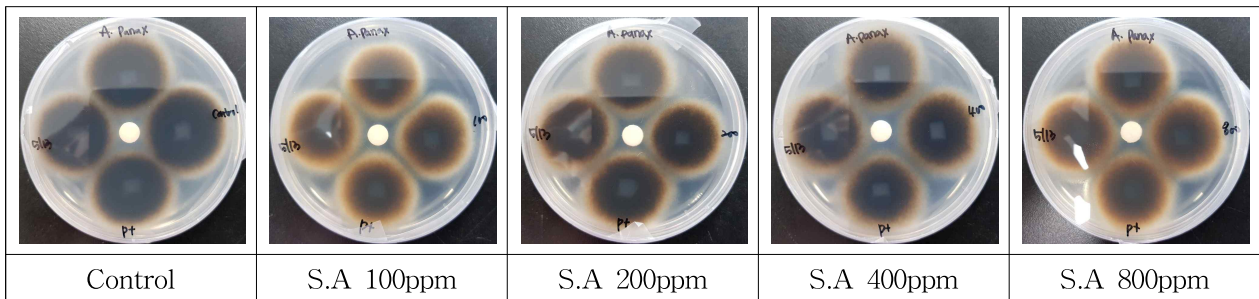
표 11. 실험 시료 및 처리농도

식물 병원균	배양온도	시험시료	처리농도 (ppm)
<i>C. destructans</i> (뿌리썩음병)	19 $^{\circ}$ C	Salicylic acid	100 200 400 800
<i>Alternaria panax</i> (점무늬병)	26 $^{\circ}$ C		
<i>Botrytis cinerea</i> (젓빛곰팡이병)			
<i>Colletotrichum pancicola</i> (탄저병)			
<i>Fusarium solani</i> (뿌리썩음병)			
<i>Rhizoctonia solani</i> (모잘록병)			

③ 결과

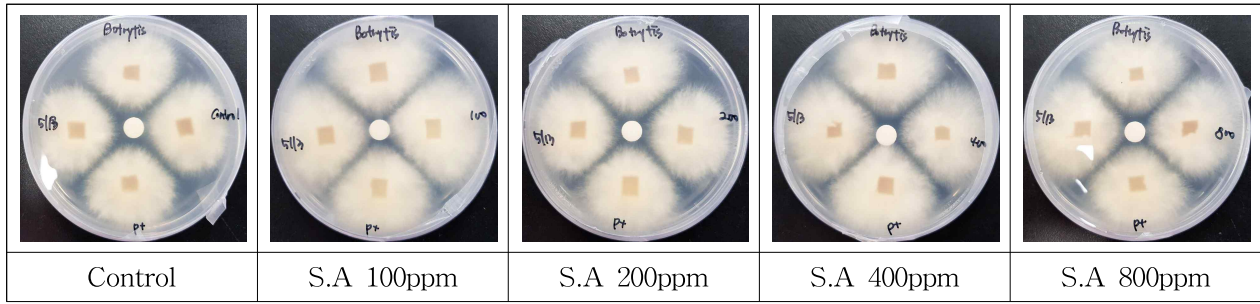


< *C. destructans* >

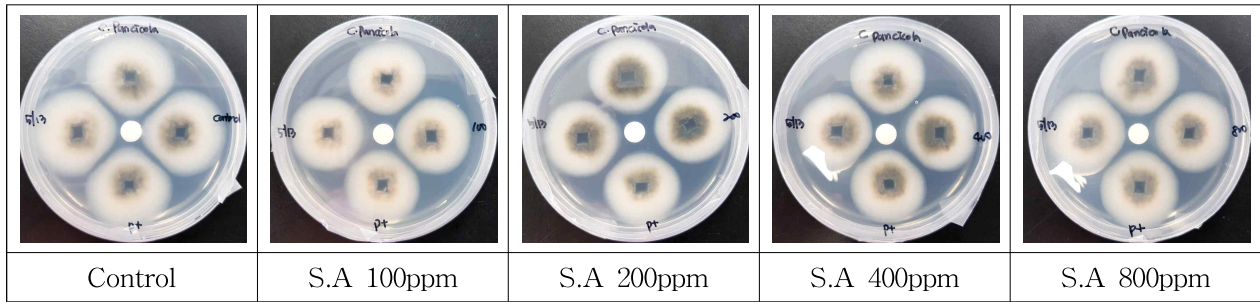


< *Alternaria panax* >

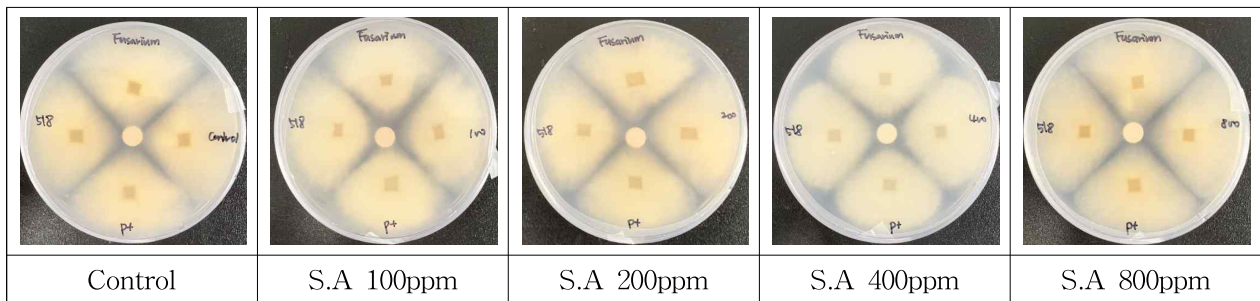
그림 1. 대치배양법에 의한 항균효과



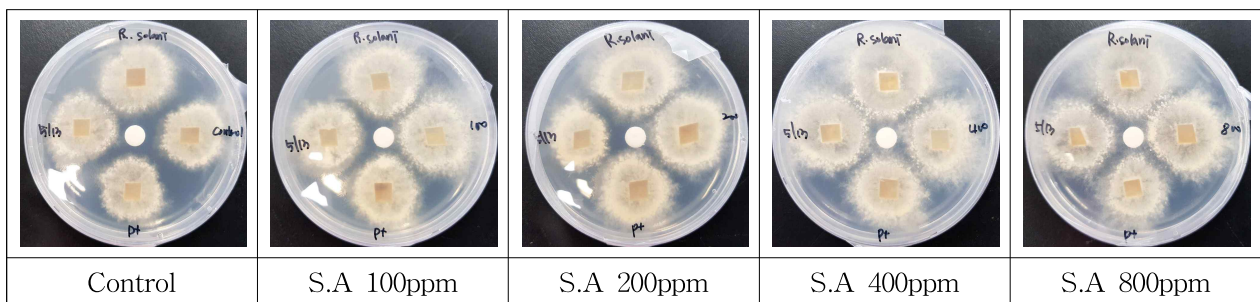
< *Botrytis cinerea* >



< *Colletotrichum panicola* >



< *Fusarium solani* >



< *Rhizoctonia solani* >

그림 2. 대치배양법에 의한 항균효과(계속)

(나) 배지혼입법

① 실험방법

- ㉞ Salicylic acid를 농도별로 PDA 배지에 투입하여 각각의 배지 제조
- ㉟ 균주별로 배지에 올려놓고 배양온도에 따라 7일간 배양

② 실험재료

표 12. 실험 시료 및 처리농도

식물 병원균	배양온도	시험시료	처리농도 (ppm)
<i>C. destructans</i> (뿌리썩음병)	19℃	Salicylic acid	100, 200
<i>Fusarium solani</i> (뿌리썩음병)	26℃		400, 800

③ 결과

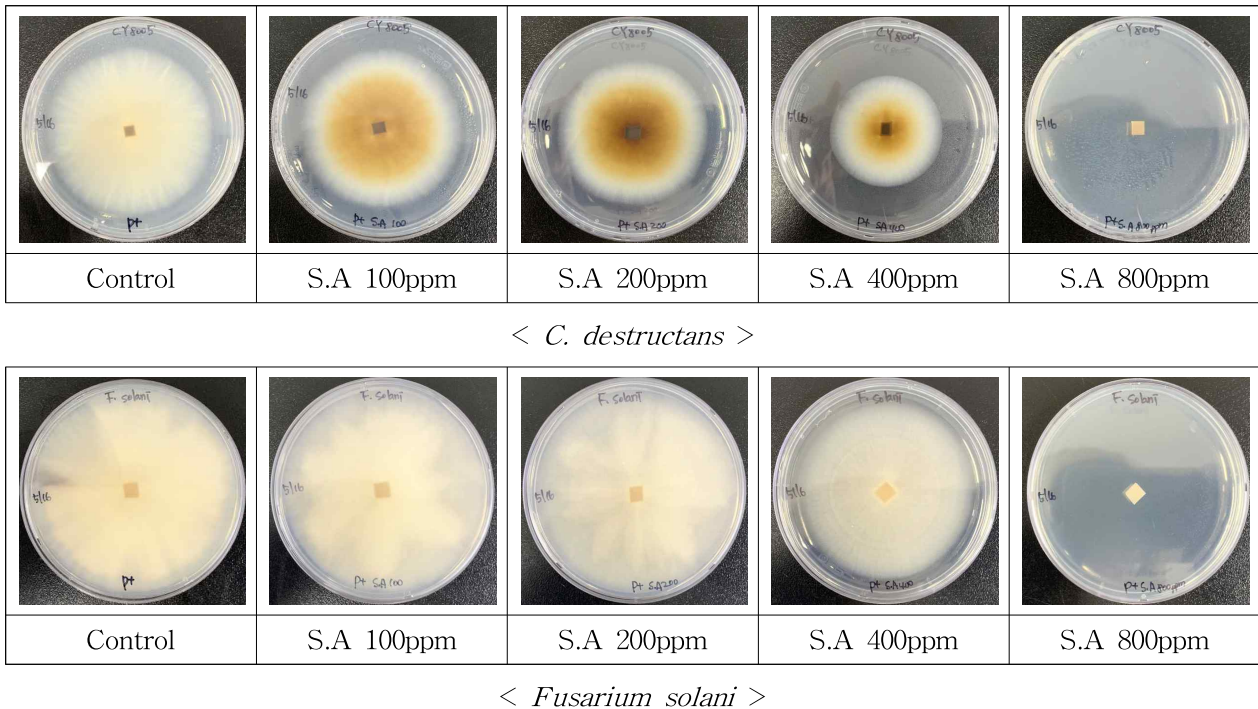


그림 3. 배지혼입법에 의한 항균효과

④ 결론

배지혼입의 경우 인삼 뿌리썩음병원균에 대해서 항균 활성을 확인하였다. *C. destructans*의 경우 100ppm에서부터 생육속도가 저하되는 것으로 나타났으며, 800ppm에서는 생육이 억제되는 것을 확인하였다. *Fusarium solani*의 경우 400ppm에서 생육속도가 약간 저하되었으며, 800ppm에서는 생육이 억제되는 것으로 나타났다.

(4) 선발 농약과 Salicylic acid의 항균력 비교

표 13. 선발 농약과 Salicylic acid의 항균효과 비교

			<i>C. destructans</i>	<i>Fusarium solani</i>
리도밀 골드 (액상)				
헥사코나졸				
프린트				
가벤다				
아미스타				
젬프로				
뱃사미드 (다조멧)				
Salicylic acid	대치배양	400ppm		
		800ppm		
	배지혼입	400ppm		
		800ppm		



(5) 최종 시제품의 다조맷과 선발 농약 성분 노출 시 경시적 미생물 안정성 확인

(가) 실험방법

- ① 멸균수 500ml에 최종 시제품(액상제), 다조맷, 선발 농약을 각각의 적용농도(희석 배수)에 맞게 투입한 후 실온에 보관하며 ARRI 17 균주에 대한 경시적 생균수를 측정
- ② TSA(Tryptic Soy Agar) 배지에 도말하고, 30℃에서 24시간 배양

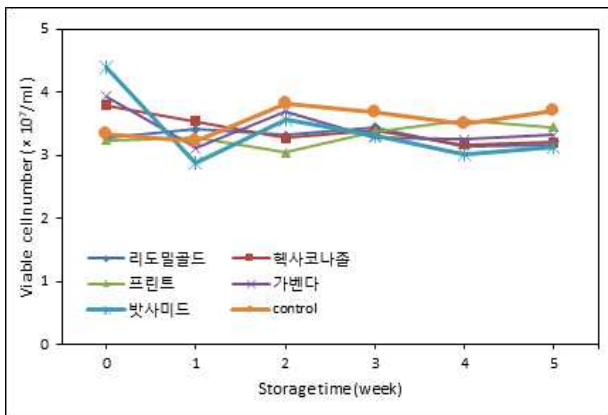
(나) 실험재료

- ① 최종 시제품 2종 (1,000배) : 액상제, 분상제
- ② 농약 5종 : 리도밀골드, 헥사코나졸, 프린트, 가벤다, 밧사미드(다조맷)

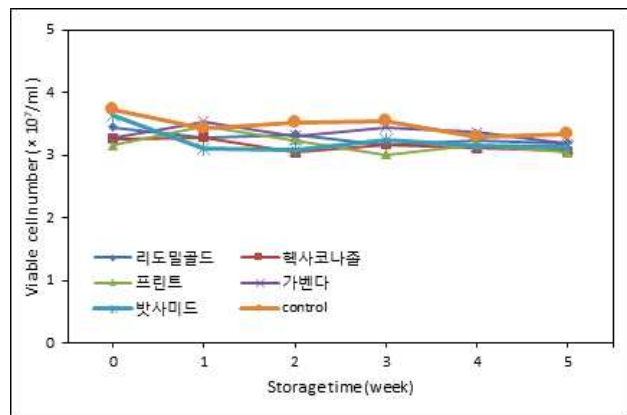
(다) 결과

표 14. 경시적 미생물 수

농약	시제품	생균수, [ $\times 10^7$ cfu/ml(g)]					
		초기(6/25)	1주(7/2)	2주(7/9)	3주(7/16)	4주(7/23)	5주(7/30)
리도밀골드 (12,000배)	액상제	3.29	3.42	3.33	3.45	3.15	3.16
	분상제	3.45	3.28	3.34	3.16	3.24	3.20
헥사코나졸 (1,000배)	액상제	3.80	3.54	3.28	3.39	3.17	3.21
	분상제	3.27	3.29	3.05	3.18	3.12	3.07
프린트 (2,000배)	액상제	3.25	3.29	3.05	3.38	3.55	3.45
	분상제	3.16	3.46	3.24	3.01	3.18	3.05
가벤다 (1,000배)	액상제	3.94	3.12	3.70	3.29	3.26	3.32
	분상제	3.28	3.54	3.31	3.45	3.37	3.19
밧사미드	액상제	4.40	2.88	3.57	3.33	3.02	3.14
	분상제	3.64	3.11	3.08	3.26	3.16	3.13
Control	액상제	3.35	3.23	3.83	3.69	3.51	3.72
	분상제	3.73	3.44	3.52	3.56	3.29	3.35



< 액상제 >



< 분상제 >

그림 4. 시제품 제형별 경시적 미생물 수

(라) 결론

최종 시제품 액상제와 분상제 모두 다조맷과 선발 농약 성분 노출에 대해 5주차까지 안정성을 유지하는 것으로 나타났다. 따라서 농약 성분에 대해 시제품의 길항미생물은 영향이 없는 것으로 확인되었다.

나. 친환경 재배를 위한 미생물 제제 개발 및 기존 제제와의 비교실험을 통한 효과 분석

최종 시제품과 시판 중인 타사 유기농업자재 병해관리용자재를 대상으로 인삼 뿌리썩음병 및 식물병원균에 대한 항균효과를 비교 조사하였다.

(1) 실험방법

시제품과 시판 중인 유기농업자재 병해관리용자재(B사)를 각각 농도별(500배, 1000배)로 PDA 배지에 투입하여 배지를 제조한 후 대상 식물병원균을 배지에 올려놓고 배양온도에 따라 7일~9일간 배양하였다. 또한, 천연원료로 선발한 Salicylic acid를 시제품에 투입하여 Salicylic acid 포함 여부에 따른 항균력을 비교하였다.

(2) 실험재료

표 15. 시료 및 처리농도 (타사 제품 비교)

식물 병원균	배양온도	시험시료	처리농도
<i>C. destructans</i> (뿌리썩음병)	19℃	1) 시제품 2) B사	500배 1000배
<i>Alternaria panax</i> (점무늬병)	26℃		
<i>Botrytis cinerea</i> (젓빛곰팡이병)			
<i>Colletotrichum pancicola</i> (탄저병)			
<i>Fusarium solani</i> (뿌리썩음병)			
<i>Rhizoctonia solani</i> (모잘록병)			

표 16. 시료 및 처리농도 (Salicylic acid 비교)

식물 병원균	배양온도	시험시료	처리농도
<i>C. destructans</i> (뿌리썩음병)	19℃	1) 시제품 2) S.A 포함 시제품	500배 1000배
<i>Alternaria panax</i> (점무늬병)	26℃		
<i>Botrytis cinerea</i> (젓빛곰팡이병)			
<i>Colletotrichum pancicola</i> (탄저병)			
<i>Fusarium solani</i> (뿌리썩음병)			
<i>Rhizoctonia solani</i> (모잘록병)			

(3) 결과

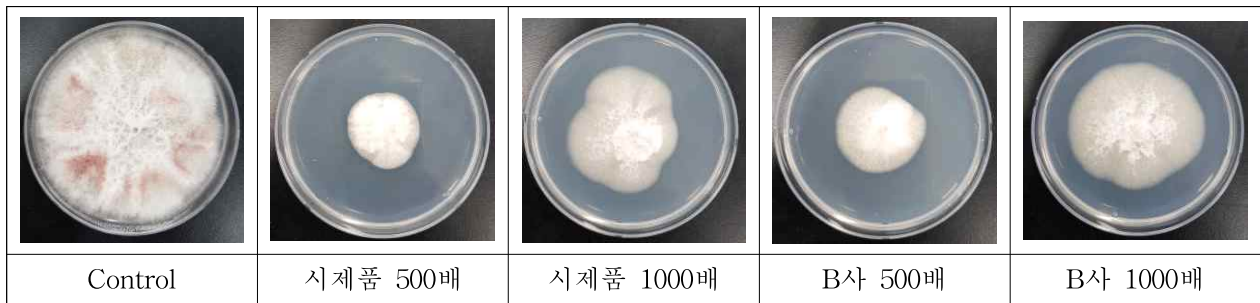


< *C. destructans* >

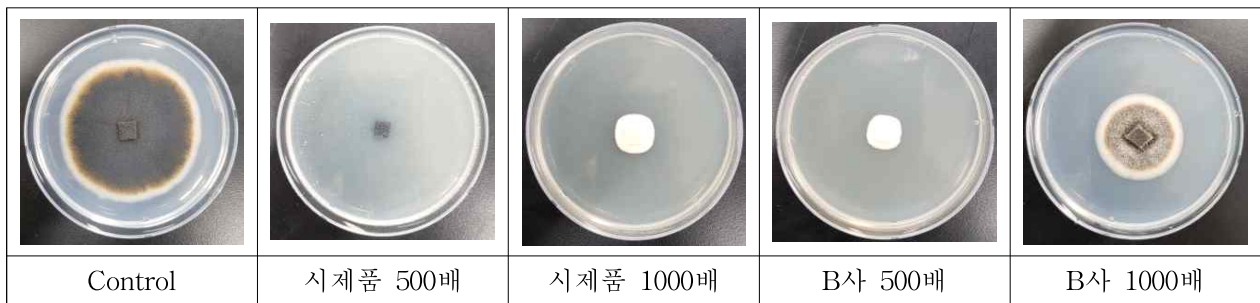


< *Alternaria panax* >

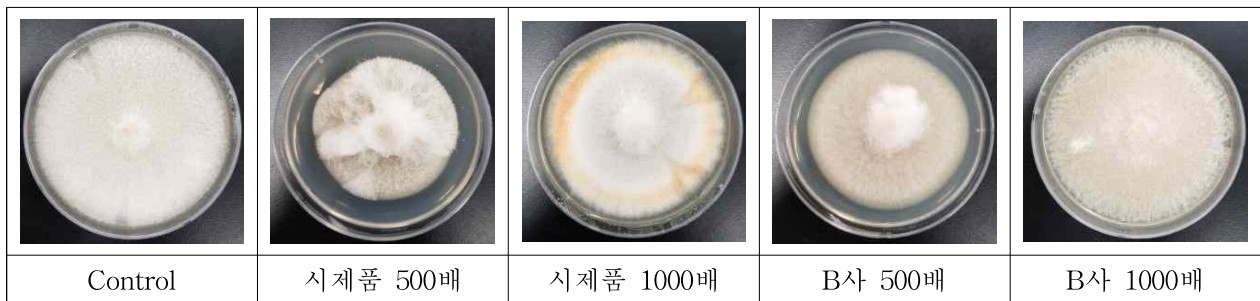
그림 5. 최종 시제품의 항균효과 비교



< *Botrytis cinerea* >



< *Colletotrichum pancicola* >



< *Fusarium solani* >



< *Rhizoctonia solani* >

그림 6. 최종 시제품의 항균효과 비교(계속)



< *C. destructans* >



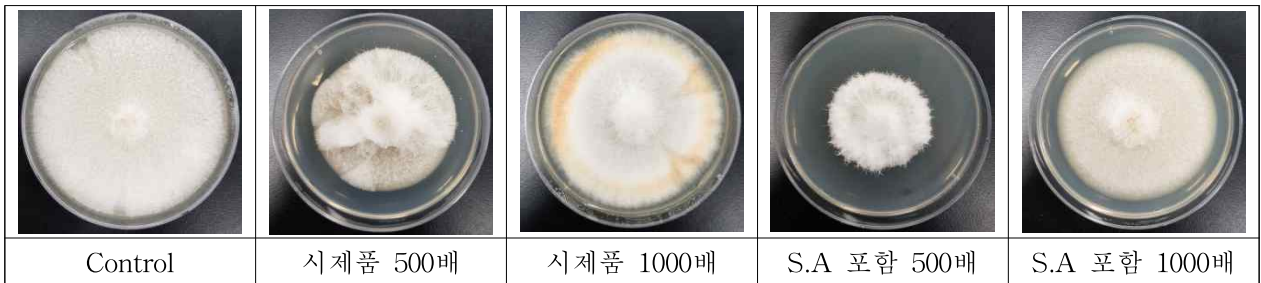
< *Alternaria panax* >



< *Botrytis cinerea* >

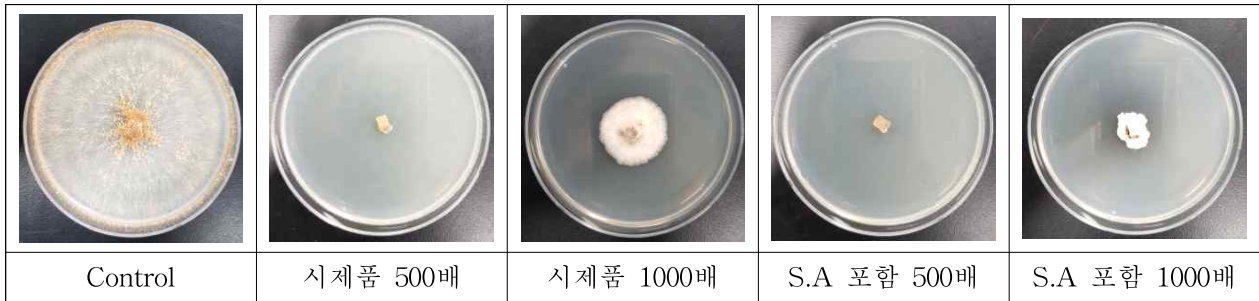


< *Colletotrichum panicola* >



< *Fusarium solani* >

그림 7. Salicylic acid 투입에 따른 최종 시제품의 항균효과 비교



< *Rhizoctonia solani* >

그림 8. Salicylic acid 투입에 따른 최종 시제품의 항균효과 비교(계속)

#### (4) 결론

인삼 뿌리썩음병원균 및 식물병원균에 대해서 항균 활성을 확인하였다. *C. destructans*을 비롯한 4개의 식물병원균에서 500배, 1000배 모두 항균 활성이 우수한 것으로 나타났다. 특히 500배에서는 병원균의 생육을 억제하는 것으로 확인되었다. 다만 *Fusarium solani*의 경우 500배에서도 항균 활성이 약한 것을 확인할 수 있었다. 타사 제품과 비교하여 위의 식물병원균에 대해 항균 활성이 우수한 것으로 나타났다. Salicylic acid가 포함된 시료의 경우 시제품과 비교하여 식물병원균의 초기에 배양이 더디게 나타남에 따라 전반적으로 항균 활성이 다소 증가하는 것으로 확인되었으며, 향후 최종 시제품에 추가적으로 투입하면 효과 상승에 도움이 될 것으로 판단된다.

다. 시설재배 시 확산할 수 있는 저비용의 고효율 친환경 방제 기술 개발

#### (1) 인삼재배 시설에 접목 가능한 방제기술

인삼 경작 과정 중 발생하는 비용 중 토지임차비와 장비 유지비이다. 보이지 않는 부분은 토지임차를 해도 안전한 경작이 보장되지 않는다. 그리고 인삼포가 많은 농가는 20개소 이상이다 보니 적기 작업을 위한 인력투입, 장비이동으로 발생하는 비용, 이동경작에 따른 낮은 노동효율성도 문제이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 정착화 경작으로 가야만 한다. 인삼재배의 정착화를 위해 지금의 재배시설로는 어렵다고 판단하여 소득자원연구소에서는 생력화와 ICT를 기반한 스마트 영농기술 도입을 위해 광폭해가림시설과 비가림 시설을 개발하였다.

#### (가) 인삼 비가림시설에서의 길항미생물 제제 관주효과

이런 시설을 이용한 정착형 인삼재배기술 개발을 위해 토양의 화학성과 동·미생물상 안정화를 위한 투엠바이오(주)와 공동 개발한 3종의 제제를 인삼 비가림시설에서 재배되고 있는 5년생부터 6년생까지 매년 4월에 10일간격으로 3회 1,000배액 16ℓ/1.62㎡를 관주하였다. 생육조사와 수량, 발병지수는 수확기인 9월 중순에 하였다.

인삼 비가림시설에서 길항미생물인 *B. velezensis* ARRI17를 주성분으로 한 대나무 추출물, 알기닌, 키토산, 규산, 근균류인 *Trichoderma viride* 등을 조합한 비율은 표 17과 같다.

표 17. 시험에 사용된 길항미생물 제제의 성분조합

제제명	구성 성분
A	<i>B. velezensis</i> ARRI17 10% + 대나무추출물 + 알긴산 + 키토산 + silicic acid
B	<i>B. velezensis</i> ARRI17 50% + 대나무 추출물 + 알긴산 + 키토산 + silicic acid
C	<i>B. velezensis</i> ARRI17 10% + <i>Trichoderma viride</i> ( $2.0 \times 10^8$ cfu/g)50% + silicic acid + 알긴산 + 키토산

위의 3종의 제제를 비가림시설에서 재배되는 인삼에 관주처리한 후 지상부와 지하부 생육형질과 발병지수를 분석한 결과는 표 18과 같다.

출아율은 *B. velezensis* ARRI17이 50%인 B제제에서 80.4%로 가장 높았고 경장과 경직경은 B와 C제제는 차이가 없었으나 A제제는 짧고 가늘었다. 뿌리의 생육은 제제간에 차이가 없었다. *C. destructans*에 의한 뿌리썩음병 발병도는 C 제제에서 가장 낮았다. 뿌리썩음병 발병도가 0.8~1.3은 상품성에 문제가 되지 않는 수준이므로 큰 의미가 없다.

표 18. 비가림 하우스 생육 특성 및 *C. destructans* 발병지수

제제명	지상부			지하부			<i>C. destructans</i> 발병도
	출현율 (%)	경장 (cm)	경직경 (mm)	근장 (cm)	근직경 (mm)	근중 (g/주)	
A	58.4	25.0±8.5	4.8±1.1	25.9±0.8	18.7±3.2	25.3±9.7	1.2±0.9
B	80.4	27.6±1.3	5.4±0.3	26.9±1.1	18.1±0.5	24.4±2.1	1.3±0.2
C	75.8	28.4±1.6	6.4±2.4	24.5±0.4	19.0±2.2	23.9±5.0	0.8±0.2

(나) 인삼 광폭해가림시설에서의 길항미생물 제제 관주 효과

광폭해가림 시설에서 사용된 제제는 *B. velezensis* ARRI17를 주성분으로 하고 부성분은 silicic acid, 자몽종자추출물, 키토산, 송진추출물, 마늘추출물, 유칼립투스 추출물, *Thricoderma viride* 등으로 조합한 것으로 표 19과 같다.

표 19. 시험에 사용된 길항미생물 제제의 성분조합

제제명	구성 성분
A	액상제+분말수화제 ( <i>B. velezensis</i> ARRI17 10 <sup>12</sup> cfu/g+silicic acid 1%+자몽종자추출물+키토산 3%+송진추출물 (+유칼립투스 추출물) 60%) 분말수화제 ( <i>B. velezensis</i> ARRI17 10 <sup>12</sup> cfu/g+silicic acid 1%+자몽종자추출물+키토산 3%+마늘추출물 20% + <i>Thricoderma viride</i> 2×10 <sup>7</sup> cfu/g)
B	액상제 ( <i>B. velezensis</i> ARRI17 10 <sup>12</sup> cfu/g+silicic acid 1%+자몽종자추출물+키토산 3%+송진추출물 (+유칼립투스 추출물) 60%)
C	분말수화제 ( <i>B. velezensis</i> ARRI17 10 <sup>12</sup> cfu/g+silicic acid 1%+자몽종자추출물+키토산 3%+마늘추출물 20% + <i>Thricoderma viride</i> 2.0×10 <sup>7</sup> cfu/g)

광폭해가림 시설 내에서 재배되고 있는 3년근에 11월에 3회에 걸쳐 1,000배액 16ℓ/1.62m<sup>2</sup>를 관주 하였다. 생육조사와 수량, 발병지수는 4년생인 2019년 9월에 수확하여 조사한 결과는 표 20와 같다.

지하부의 생육특성은 제제 관주처리간에 뚜렷한 차이는 없었다. *C. destructans*에 의한 뿌리 썩음병 발병도는 1.1~1.5로 관리처리간에 차이가 없어 이 시험에서는 처리효과는 없었던 것으로 보여진다. 이러한 결과는 제제의 문제라기보다 토양 환경이 안정화가 이루어져 *B. velezensis* ARRI17를 주성분으로 제제가 효과가 없었을 것으로 판단된다.

표 20. 광폭해가림 생육 특성 및 *C. destructans* 발병지수

제제명	지하부			<i>C. destructans</i>
	근장(cm)	근직경(mm)	근중(g/주)	발병도
A	19.4±5.0	19.5±5.0	22.9±16.3	1.5±0.9
B	17.4±3.0	17.12±4.7	14.7±8.0	1.4±2.9
C	16.1±4.3	14.9±4.8	11.93±10.7	0.8±2.0



## 7. 개발된 최적 방제기술 현장확산 모델 개발 및 매뉴얼 제작

가. 경기도농업기술원 기술보급 조직, 지역인삼농협, 시군별 인삼연구회 등 활용 모델

인삼은 건강기능성 식품, 한약제와 화장품의 원료로 사용됨에 따라 그 어느 농산물보다 고도의 안정성을 요구하는 작물이다. 안전성이 확보된 고품질의 인삼을 생산하기 위해서는 인삼포 예정지 선정전부터 철저한 준비를 해야 한다.

인삼을 안전다수확을 위해서는 인삼포 예정지로 선정하기 전에 그 토양 내에 인삼뿌리썩음병 원인균의 밀도와 토양화학성 검정 결과를 토대로 진단받아 예정지를 관리해야 한다. 그리고 이와 같이 관리방법으로 인삼포 예정지 관리를 한다고 하더라도 본밭에서 2년생 이후 인삼뿌리썩음병 발병증상을 보일 수 있다. 이런 경우에는 토양 내 인삼뿌리썩음병 밀도진단과 토양화학성 검정결과를 토대로 인삼뿌리썩음병 방제를 해야만 안전성이 확보된 고품질의 원료 인삼을 생산할 수 있다. 이를 위해 경기도농업기술원에서는 인삼뿌리썩음병원균 진단장비를 확보하고 인삼 재배적지 진단실 운영을 통해 서비스를 지원할 계획이다.

대한민국의 인삼 재배농가는 3부류로 나눌 수 있는데 한 부류는 한국인삼공사와의 계약농가, 인삼 조합과의 계약농가, 비계약 농가 등이다. 경기도농업기술원에서는 이들 3부류를 모두 지원할 수 있는 모델을 개발하려고 하였다. 이들 세 부류 중 한국인삼공사와의 계약농가는 한국인삼공사에서 자체적으로 인삼 예정지관리 단계부터 수확 전까지 체계적으로 안정성 관리하고 있다. 뿐만 아니라 경기도에서 개발한 모델에 참여도 꺼리고 있다. 해서 시범사업 대상에서 배제를 하였다. 그래서 정부사업에 참여가 가능한 인삼조합과의 계약농가와 비계약 농가를 대상으로 지원할 수 있는 모델을 개발하였는데, 결과는 그림 1와 같다.

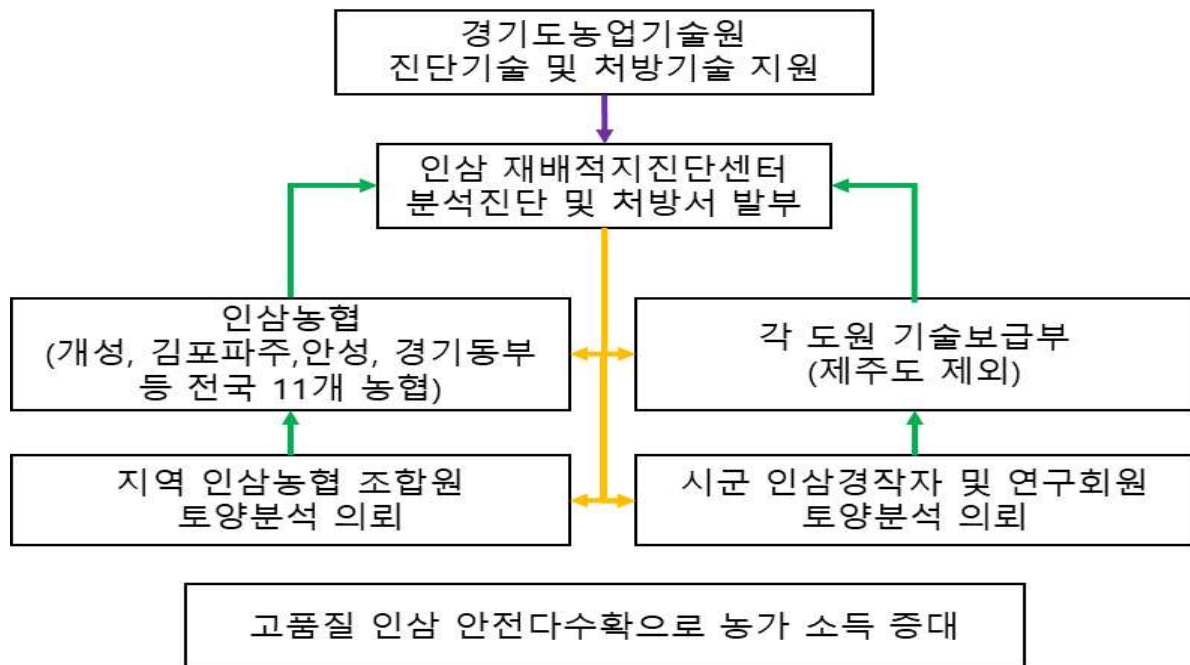


그림 1. 인삼뿌리썩음병 최적 방제기술 현장확산 모델

## 나. 인삼뿌리썩음병 최적방제기술 현장적용 매뉴얼 제작

### (1) 내용

- (가) 인삼 재배적지 진단 필요성
- (나) 인삼뿌리썩음병 이란?
- (다) 인삼 재배적지 진단을 위한 분석범위
  - ① 토양 시료 채취 및 건조
  - ② 병원균 밀도 및 토양 화학성 분석방법
  - ③ 병원균 밀도 정량 절차
- (라) 인삼 재배적지 진단 절차
- (마) 인삼 재배적지 진단 방법
- (바) 부록
  - ① 농가 컨설팅 사례
  - ② PLS 기준이란?

### (2) 인삼 재배적지 진단 필요성

인삼은 한민족과 함께 해온 한국의 대표적인 농특산품이다. 고려인삼은 한반도를 중심으로 만주, 연해주에서 자생한 신령스러운 약초이다.

인삼이용에 대한 최초의 기록은 환단고기 단군세기편에 따르면 4세 단군이신 오사구께서 「재위 39년 10월(BCE 2137)에 북쪽을 순수하고 돌아오시는 길에 태백산에 이르러 삼신께 천제를 지내고 영험한 약초를 얻으셨다. 이것이 인삼이며 선약이라고도 불렀다」고 기록되어 있다. 우리 선조께서는 4150년 이전부터 인삼을 약초로 이용해 왔음을 의미한다. 그 후 고조선, 북부여, 남삼한, 삼국시대, 발해, 고려, 조선을 거쳐 현재까지 이어져 왔다.

조선전기까지만 해도 우리의 강역에서는 인삼이 채취하여 이용해 왔으나, 조선후기에 이르러 인삼이 무역물품으로 자리잡음으로서 소요량 급증에 따른 남획으로 자연산 인삼은 더욱 고갈되어 선조대에 이르러서는 부족현상이 심화되었다. 이로 인해 공급의량을 감당하기 어려움에 처하자 이를 해결하기 위해 임하삼 단계를 거쳐 오늘날의 인삼재배방식의 전 단계인 가삼재배로 발전하였다. 숙종조에 이르면 영남지역에서 가삼재배가 시작되어 정조대에 이르러서는 전국적으로 확대되면서 개성을 중심으로 청과 왜로 수출이 확대되면서 조선의 중요 수출상품으로 발전하였다.

이와 같이 전국적으로 재배되면서 최근에는 연작장해로 인해 인삼의 수량성과 품질이 낮아져 이를 극복하기 위한 재배기술 개발이 절실한 실정이다. 특히 연작장해로 인한 뿌리썩음병 발병증가와 화학비료과다 사용과 축산업의 발전에 따른 축분 투입량 증가에 따른 염류증가로 인한 과영양으로 인삼의 재배적지는 절대부족한 상황이다. 토양오염에 따른 뿌리썩음병의 증가하지만 이를 해결할 수 있는 마땅한 대책 수립은 묘연한 실정이다. 2019년 1월부터 전면시행된 PLS(Positive List System)기준 적용으로 장기간 땅속에서 생육하는 인삼은 약제사용에 많은 제한이 따르고 소비자의 안전식품에 대한 소비자의 요구를 충족하기 위해서는 연작장해의 주요인인 인삼뿌리썩음병에 대한 해결방안의 강구가 절실한 실정이다.

그럼에도 불구하고 인삼재배적지에 대한 진단기술이 개발되지 않아 생산성이 낮고 수요량의 감소로 인삼산업이 크게 위축되어 매년 재배면적이 감소하고 있다. 이를 해결하기 위해 경기도농업기술원 소득자원연구소에서는 2011년부터 이를 해결하고자 인삼 재배적지 진단기술 개발 연구를 추진해 온 결과, 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도진단을 위한 『병원균 밀도 정량기술 개발』을 완성하였다. 최근 3년간 인삼뿌리썩음병 정량기술과 토양 화학성 검정 결과를 근거로 인삼 재배적지여부 진단기술 개발을 수행하여 얻은 결과를 현장에 적용하기 위해 이 매뉴얼을 제작하였다.

### (3) 인삼뿌리썩음병 이란?

인삼뿌리썩음병은 토양전염병으로 *C. destructans*과 *F. solani*에 의해 발생하는 병이다. 이 증상은 두 병원균이 거로 다른 증상을 보인다. *C. destructans*는 주로 뿌리의 끝에 시작하여 몸통으로 진행이 된다. 병징은 주로 적갈색 또는 흑갈색 병반을 형성한다. 그 진행속도가 느린 편이다. 이 병은 묘삼부터 6년근까지 발생한다. 이 병원균의 특성은 저온성이며 발병초기에는 지상부에 그 증상이 나타나지 않다가 병진행이 후기에 이르면 그때 잎이 시들고 엽색이 변하여 발병되었음을 확인할 수 있다. 이 병은 생육후기로 갈수록 진행이 빠르다. 특히 4년생 이후에는 뿌리가 서로 겹치게 됨으로 이때 발생하면 확산속도가 빠르게 진행된다.

*F. solani*는 부생성 병원균으로 독자적으로 발병을 하지는 않지만 선충이나 미소해충에 의해 피해를 받으면 상처를 통해 침입하여 발병을 한다. 이병은 식물체의 건전도와 토양환경에 의해 심하기도 약하게도 진행된다. 식물체가 건전하면 치료가 되는 경우도 많다. 하지만 이 병은 수량성보다는 품질을 저하시켜 상품수량을 감소시키기 때문에 경제적인 피해가 크다.

이 두 가지 병원균은 생육환경이 열악해지면 후막포자를 형성하여 땅속에서 10년 이상 생존이 가능한 균이어서 토양관리를 통해 발생을 억제하는 것이 필요하다. 재작까지 10년 이상이 경과해도 재발하는 경우가 많아 연작장해의 한 원인으로 분류된다. 따라서 예정지관리를 통해 이 병원균이 활동하기 어려운 환경으로 사전관리를 반드시 해야 한다.

### (4) 인삼 재배적지 진단을 위한 분석범위

#### (가) 인삼뿌리썩음병 원인균 종류

인삼의 뿌리에 발생하여 피해를 주는 병으로 인삼뿌리썩음병, 역병, 무름병, 균핵병 등이 있다.

표 1. 인삼뿌리 피해주는 주요 병원균

병명	병원균 학명
인삼뿌리썩음병	<i>Cylindrocarpone destructans</i> ( <i>lyonectria mors-panacis</i> ) <i>Fusarium solani</i>
역병	<i>Pythium sp.</i> , <i>Phytophthora cactorum</i>
무름병	<i>Erwinia carotovora</i>
균핵병	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

(나) 재배적지 진단 범위

표 2. 재배적지 진단 범위 분석 세부항목

분석 종류	분석 세부항목
병원균	<i>Cylindrocarpone destructans</i> <i>Fusarium solani</i>
토양 화학성	토양산도(pH), 염류농도(EC), 유기물(OM), 유효인산(Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ), 양이온(K, Ca, Mg, Na), 질산태질소(NO <sub>3</sub> -N)

※ 토양 중금속 및 농약 잔류 검사도 필수적으로 해야 함

(5) 인삼 재배적지 진단 절차

단계	주요 추진내용	추진주체
토양시료 접수	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소득자원연구소에 인삼재배적지진단 처방서를 발급 받을 토양시료 분석의뢰</li> <li>- 재배이력, 비료사용 등 특이사항 기록</li> <li>※ 토양검증의뢰 및 시료보관 : 500g은 소득자원연구소로 송부, 200g 자체보관</li> </ul>	인삼경작인
↓		
시료조제 및 토양검증 (진단)	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 토양 분석법에 준하여 시료 준비</li> <li>■ 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도 진단 실시</li> <li>    밀도진단과정 : 건조 및 시료조제 → 전처리 → 기기분석</li> <li>    ※ 분석항목 : <i>C. destructans</i>와 <i>F. solani</i></li> <li>■ 토양검증 실시</li> <li>    토양검증과정 : 건조 및 시료조제 → 전처리 → 기기분석</li> <li>    ※ 분석항목 : pH, EC, 유기물, 유효인산, 치환성양이온, 석회소요량, NO<sub>3</sub>-N 등</li> <li>    ※ 분석소요일수 : 14일, 1회 30점 분석기준</li> </ul>	소득자원연구소
↓		
검증(진단) 결과 등록	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소득자원연구소 인삼재배적지진단업무 시스템에 토양 검증(진단)결과 등록</li> </ul>	소득자원연구소
↓		
처방서 발급	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼 재배적지 선정을 위한 예정지관리 처방서 발급</li> </ul>	
↓		
처방서 발송	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소득자원연구소에서 의뢰인에게 처방서 발급</li> <li>    ※ E-mail, 또는 우편발송</li> </ul>	
↓		
처방서 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 발송된 처방서 수령 및 확인</li> </ul>	인삼경작인

(6) 인삼 재배적지여부 진단 방법

(가) 병원균 밀도 및 토양화학성 검증 방법

① 병원균 밀도 분석

- ㉞ DNA 분리·추출 : 시판중인 DNA 추출 키트(DNA extraction kit)를 사용
  - 본 기관에서는 (주)코젠바이오텍과 공동연구를 통해 개선한 DNA 추출 키트를 사용
- ㉟ DNA 정량 : *C. destructans*와 *F. solani*를 진단할 수 있는 Kit를 구입하여 Real-time PCR로 분석
  - 본 기관에서는 (주)코젠바이오텍과 공동개발한 *C. destructans* 와 *F. solani*를 동시진단 할 수 있는 PowerChek™ *C.destructans/Fusarium* multiplex diagnosis kit를 사용



DNA extraction kit



*C.destructans/Fusarium*  
Real-time PCR kit

(나) 토양 시료 채취 및 조제

- ① 깨끗하게 소독된 모종삽(깊이 20cm 채취할 수 있는 것)과 토양시료채취용 봉투 준비
- ② 토양 면적 330㎡(100평)을 기준으로 골고루 최소 10지점 토양시료 채취
  - ※ 객토, 복토 등으로 인한 토양 색이 다른 경우 토양색별로 채취
- ③ 토양표면과 수직이 되도록 20cm 깊이의 원통형이 되도록 시료 채취
  - ※ 가능하면 토양수분은 흙을 한줌 쥐었다 폈을 때 실금이 갈 정도일 때가 적합함. 너무 수분이 많아 손에 물기가 묻을 정도일 때는 1~3일 정도 후에 채취
- ④ 미리 소독된 깨끗한 용기에 얇게 펴서 그늘에서 건조하고 흙덩어리는 곱게 부수어 짧은 시간 내에 건조
- ⑤ 건조 후 2mm체를 이용하여 조제를 한다. 각 시료마다 소독(물 또는 알코올)된 체를 사용하여 시료간 오염을 방지

(다) 분석용 토양시료 분류

① 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도 정량용 시료

조제된 토양시료 중 토양시료가 균일하게 되도록 혼합한 후 약 100g을 시료봉투에 담는다.

② 토양 화학성 검증용 시료

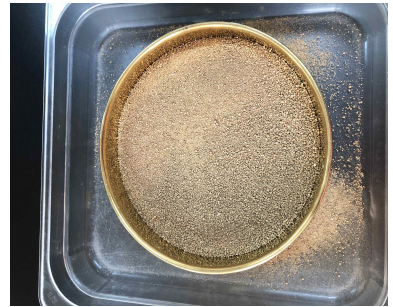
조제된 토양시료 중 약 500g을 시료봉투에 담는다.



토양시료 채취



토양시료 건조



분석용 시료

<주의사항>

정확한 시료에 대한 결과를 확인하기 위해 시료의 채취 및 조제 과정 중 시료간 교차 오염이 일어나지 않도록 철저한 소독과 주의가 필요

(라) 인삼 재배적지 검증방법

① 인삼뿌리썩음병 병원균 밀도 정량 방법

단계		처리내용
1		토양시료 채취
2		토양 시료건조
<b>DNA 분리·추출 과정 (DNA Extraction Kit)</b>		
3		토양시료를 골고루 섞은 후 5g 채취하여 비드가 들어있는 튜브에 넣음
4		튜브에 Buffer A 2ml와 Buffer B 10ml를 넣은 후 Tissue lyser 30Hz/s로 10분간 분리
5		원심분리기 2,500rpm에서 5분간 원심분리
6		Buffer C 1ml를 넣은 후 4℃에서 10분간 반응
7		원심분리기 2,500rpm에서 5분간 원심분리
8		상등액을 전량 취하여 1.5ml 튜브에 넣고 튜브에 chloroform 0.65ml를 넣은 후 Vortex mixer로 30초간 혼화

9		15,000G에서 10분간 원심분리
10		상등액을 전량 취하여 1.5ml 튜브에 넣고 chloroform 0.65ml를 넣은 후
11		15,000G에서 10분간 원심분리(동결건조시 TE 0.4ml로 용해)
12		상등액 0.4ml를 취하여 1.5ml 튜브에 넣고 Binding Buffer 0.8ml를 첨가한 후 흔들어 혼합
13		위의 혼합액 1.2ml중 0.6ml를 취하여 DNA Binding column 튜브에 넣고 15000G에서 1분간 원심분리
14		Column을 통과한 여과액은 버린 후 남은 혼합액 0.6ml를 DNA Binding column 튜브에 넣고 15000G에서 1분간 원심분리
15		모아진 Binding column에 부착된 DNA를 70% 에탄올이 함유된 Wash buffer를 첨가하여 15,000G로 1분간 원심분리한 후 여과액을 버림
16		빈 Column을 15,000G에서 3분간 원심분리하여 에탄올을 완전히 제거
17		Column 아래 튜브는 버리고 윗부분 Binding column을 새로운 1.5ml 튜브로 옮긴 후 Elution buffer 0.1ml를 넣고 1분간 상온 방치
18		8000G에서 3분간 원심분리가 끝나면 Binding column을 제거하여 추출된 DNA 얻음



DNA 정량 과정 ( <i>C.destructans</i> / <i>Fusarium</i> diagnosis kit)		
19		진단키트 시약 튜브를 원심분리하여 시약을 튜브 밑으로 모음
20		PCR 8-strip white tube에 Primer/probe Mix 5 $\mu$ l와 2X Real-time PCR Master Mix 10 $\mu$ l를 넣고 추출한 DNA 5 $\mu$ l를 넣음
21		PCR 키트 용액과 DNA가 잘 혼합될 수 있도록 튜브를 가볍게 흔들어 혼합한 후 원심분리하여 혼합액이 튜브 밑으로 모이게 한다.
22		RT-PCR 분석
23		분석데이터 수집 및 해석

㉞ Real-time PCR 실행 조건

Temp.	Time	PCR Cycle
50℃	2분	1
95℃	10분	1
95℃	15초	40
60℃	1분	

② 토양화학성 검증 방법

㉞ pH측정방법(전극법)

풍건토 5g을 50ml 팔콘 원심분리 튜브에 취하고 분주기로 증류수 25ml를 가한 후 마개를 닫는다.



수직 진탕기(시소형진탕기)로 30분간 진탕한다(진탕기가 없을 경우는 Vortex Mixer로 30분간 5회정도 상하 교반한다).



pH Meter 전극을 표준용액(pH7.00, pH4.01)으로 보정한다.



pH 전극을 원심분리 튜브 안에 있는 토양 현탁액에 넣고 측정한다.

㉟ EC측정방법(전극법)

풍건토 5g을 50ml 팔콘 원심분리 튜브에 취하고 분주기로 증류수 25ml를 가한 후 마개를 닫는다.



수직 진탕기(시소형진탕기)로 30분간 진탕하거나 Mixer로 30분간 5회 진탕한다.



EC 전극을 원심분리 튜브 안에 있는 토양침출액의 상층부(상등액)에 넣고 측정한다.



※ pH를 측정한 다음 50ml 팔콘 원심분리 튜브에있는 용액으로 EC를 측정한다.

㊦ 유기물함량(OM, 비색법)

건토1~3g + 250ml 초자 삼각flask 평량



Blank와 standard(표준용액) 0.1%,2%,3%,4%5% 1ml도 동일한 방법



Sulfuric acid <H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>> 20ml 첨가 (살며시 흔들어 준다)



증류수(DW) 100ml 첨가 (잘 혼합되도록 충분히 흔들어 준다)



100ml PE 비이커에 NO.2 여과지 통해 여과



과장 610nm에서 측정

㉔ 유효인산함량(Av. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 비색법)

풍건토 5g을 100ml PE 또는 PP 삼각flask에 평량



침출액 20ml 넣고 10분간 진탕후 NO.2. 여과지를 통해 여과



시료여액은 침출액으로 희석  
(논토양은 원액, 밭·과수토양은 5배, 시설토양은 10배 희석)



시료여액 3ml를 시험관에 취합(standard 0, 5, 10, 15, 20, 25ppm 3ml 동일방법)



조작액 6ml+ 1-2-4용액 0.4ml 넣고 시험관 혼합기로 혼합한다.



30℃ 항온기에서 30분간 발색



과장 720nm에서 비색 측정

㉕ 치환성 염기(Ex-K, Ca, Mg, Na (ICP-ASS)분석법)

풍건토 5g을 100ml PE 또는 PP 삼각 flask에 평량



침출액 50ml를 넣어 30분간 진탕



NO<sub>2</sub>여과지 여과



ICP 또는 AAS기로 측정(농도에 맞게 희석하여 분석한다)

㉞ 질산태질소(NO<sub>3</sub>-N, 전극법)

건토(습토) 5 ~10g을 비이커에 평량한다.



침출액 0.025M Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 50ml를 넣는다.



180rpm으로 10분간 진탕한다.



NO<sub>3</sub>-N Standard 0는 침출액 50ml, NO<sub>3</sub>-N Standard(5mg L<sup>-1</sup>) 50ml  
NO<sub>3</sub>-N Standard (50mg L<sup>-1</sup>) 50ml를 100ml 비이커에 정확하게 취하여 준비한다.

이온강도조절제 (ISA용액=2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1ml씩 넣는다.



Nitrate electrode와 reference electrode에 프로브를 작동하면서  
단계적으로 입력한다.



NO<sub>3</sub>-N Standard를 0, 5, 50mg L<sup>-1</sup> 입력 후 Standard를 다시 측정하여  
입력한 NO<sub>3</sub>-N Standard를 확인한다.



0, 5, 50이 안 나오면 반복으로 재입력하여 확인한다(반복적으로).



NO<sub>3</sub>-N Standard 기울기 값이 확인되면



180rpm으로 10분간 진탕이 끝난 시료와 침출액이든 100ml 비이커에  
이온강도조절제(ISA용액=2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1ml씩 넣고 측정한다.

(마) 인삼 재배적지 진단 기준

① 인삼뿌리썩음병 병원균 진단기준

구분	병원균 밀도(cfu/g)	
	<i>C. destructans</i>	<i>Fusarium sp.</i>
적합	10 <sup>0</sup> 미만	10 <sup>1</sup> 미만
가능	10 <sup>1</sup> 미만	10 <sup>2</sup> 미만
부적합	10 <sup>1</sup> 이상	10 <sup>2</sup> 이상

② 토양화학성 진단기준

구분		pH (1:5)	EC (dS/cm)	유기물함 량 (g/Kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/Kg)	Ex.cations(cmol/Kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/Kg)
						K	Ca	Mg	Na	
부족	밭	5.0 이하	-	10 이하	100 이하	0.30 이하	3.0 이하	1.0 이하	0.05이 하	-
적합	밭	5.0~ 6.0	0.5 이하	10~ 20	100~ 250	0.30~ 0.70	3.0~ 5.0	1.0~ 2.0	0.05~ 0.15	50이하
	논				50~ 150	0.20~ 0.60				
가능	밭	6.0~ 6.5	0.50~1.0 0	20~30	250~ 400	0.70~ 1.00	5.0~ 6.5	2.0~ 4.0	0.15~ 0.20	50~ 100
	논				150~ 300	0.60~1 .00				
부적합	밭	6.5 이상	1.00 이상	30 이상	400 이상	1.00 이상	6.5 이상	4.0 이상	0.20 이상	100 이상
	논				300이상					

※ 가능까지는 적합으로 예정지관리 방안을 제시하지만 부적합은 인삼포 예정지관리 대상에서 배제함

(바) 부록

- ① 농가 컨설팅 사례
- ② 병원균 밀도 진단

적합 사례

- 김포시 대곶면 대능리(논)

시료번호	<i>C. destructans</i> (cfu/g)	<i>F. solani</i> (cfu/g)
1253	불검출	불검출
1254	불검출	불검출
1255	불검출	불검출

※ 불검출 : 측정시료에서는 검출되지 않았음을 의미함

[진단·처방]

- 이 시료에서는 인삼뿌리썩음병 원인균이 검출되지 않았음
- 예정지 관리단계에서 투입된 유기물종류와 량에 따라 선충이나 미소곤충의 밀도가 높아지면 해충의 가해로 생긴 상처를 통해 감염될 수 있음
- 인삼뿌리썩음병이 발병할 경우 길항미생물 제품이나 미소곤충이나 선충의 밀도를 낮추기 위해 BT제품을 살포하여 주기 바람

재배가능 사례

<F. solani>

- 김포시 대곶면 송마리(임)

시료번호	<i>C. destructans</i> (cfu/g)	<i>F. solani</i> (cfu/g)
1248	불검출	75.2
1249	불검출	86.8

※ 불검출 : 측정시료에서는 검출되지 않았음을 의미함

[진단·처방]

- 인삼뿌리썩음병 원인균인 후사리움 속의 밀도는 발병수준은 아니지만 병 감염시 병징 확대속도가 빠른 위험이 있음
- 예정지 관리단계에서 투입된 유기물종류와 량에 따라 선충이나 미소곤충의 밀도가 높아지면 해충의 가해로 생긴 상처를 통해 인삼뿌리썩음병이 감염될 수 있음
- 미숙퇴비나 축분퇴비를 사용하지 말아야 하며, 길항미생물 제품을 작관전에 이용하여 미소곤충이나 선충의 밀도를 최소화하기 바람

<C. destructans>

○ 여주시 가남읍 상승리(밭)

시료번호	<i>C. destructans</i> (cfu/g)	<i>F. solani</i> (cfu/g)
1341	48.0	불검출

※ 불검출 : 측정시료에서는 검출되지 않았음을 의미함

[진단·처방]

- 검출된 병원균의 밀도는 발병이 가능한 수준의 밀도이며 특히 저년근부터 해충이나 선충의 밀도가 높으면 해충에 의한 약간의 상처만 있어도 발병이 가능한 수준임
- 토양 해충이나 병원균의 밀도가 높아지면 이들에 의한 피해를 입은 상처를 통해 인삼뿌리썩음병이 발병될 수도 있음
- 토양해충의 밀도가 높아지지 않도록 적절하게 관리를 해주기 바람

나. 토양화학성

□ 적합 사례

○ 연천군 신서면 답곡리(밭)

시료번호	pH (1:5)	EC (dS/cm)	유기물 함량 (g/Kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/Kg)	Ex.cations(cmol/Kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/Kg)
					K	Ca	Mg	Na	
1234	6.1	0.18	20	106	0.64	3.8	1.3	0.08	4
	허용	적합	적합	적합	적합	적합	적합	부족	적합
1235	6.0	0.16	21	130	0.52	2.9	0.9	0.06	3
	적합	적합	적합	적합	적합	부족	적합	부족	적합
1236	6.0	0.22	21	156	0.62	3.4	1.0	0.08	8
	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	부족	적합

[진단·처방]

- 분석한 모든 화학성이 허용수준이하였음
- 양분흡수와 관련된 EC와 NO<sub>3</sub>-N함량은 적합수준이나, 양분의 저장고 역할을 하는 유기물함량은 허용수준으로 비교적 양분이 풍부한 상태임
- 예정지 관리단계에서 투입된 유기물 종류와 량에 따라 토양환경이 변화하기 때문에 주의깊게 관심을 갖고 관리해야 함

□ 부적합 사례

1) 토양산도(pH)

○ 양주시 남면 상수리(논)

시료 번호	pH (1:5)	EC (dS/cm)	유기물 함량 (g/Kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/Kg)	Ex.cations(cmol/Kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/Kg)
					K	Ca	Mg	Na	
1205	8.5	0.54	13	177	0.52	14.7	1.4	0.07	18.1
	과다	적합	적합	적합	적합	과다	적합	부족	적합
1206	8.5	0.55	11	179	0.49	11.5	1.3	0.06	15.1
	과다	적합	적합	적합	적합	과다	적합	부족	적합

[진단·처방]

- 양분유효도와 관련된 pH는 교정을 해야 하는데 양이온치환 성분인 Ca함량이 높아 다소 어려움이 있을 것으로 판단됨
- 안전하게 pH 교정만 한다면 인삼재배에는 문제가 없을 것으로 사료됨
- 인삼 예정지 단계에서 어떤 종류의 유기물을 투입했느냐에 따라 화학성의 변화는 다양하게 일어나고 특히 양분의 유효도와 관련된 pH와 양분흡수완 관련된 EC가 변화할 수 있음

2) 염류농도(EC)

○ 화성시 장안면 사랑리(임)

시료 번호	pH (1:5)	EC (dS/cm)	유기물 함량 (g/Kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/Kg)	Ex.cations(cmol/Kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/Kg)
					K	Ca	Mg	Na	
1303	5.8	1.27	11	414	0.89	4.0	3.0	0.08	5
	적합	과다	적합	과다	허용	적합	허용	부족	적합

[진단·처방]

- pH, 유기물함량과 Ca함량과 NO<sub>3</sub>-N함량은 적합수준이고 K함량과 Mg함량은 허용수준이고 EC와 유효인산함량은 과다수준임
- 양분흡수와 관련된 EC가 과다수준으로 높으나 NO<sub>3</sub>-N함량이 낮아 비교적 안정할 것으로 판단됨
- 인삼은 EC가 높은 상태일 때 가뭄과 고온기에 도달하면 수분흡수 능력이 떨어져 고온장해가 발생하는 경우가 있으므로 관수체계와 투광량 조절 잘 해야만 정상적인 생육이 이루어져 다수확이 가능할 것으로 사료됨



3) 유효인산(Av.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)

○ 연천군 미산면 아미리(밭)

시료 번호	pH (1:5)	EC (dS/cm)	유기물 함량 (g/Kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/Kg)	Ex.cations(cmol/Kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/Kg)
					K	Ca	Mg	Na	
1207	5.5	0.33	21	520	0.85	3.6	0.7	0.05	23.7
	적합	적합	허용	과다	허용	적합	부족	부족	적합
1208	5.6	0.31	20	507	1.02	4.5	1.1	0.06	21.4
	적합	적합	허용	과다	과다	적합	적합	부족	적합

[진단·처방]

- 유효인산함량은 과다수준이고 K는 허용수준이나 그 외의 화학성은 적합 수준임
- 고년근으로 경과하면서 NO<sub>3</sub>-N함량이 증가하면 유효인산함량이 과다수준임으로 EC를 높이는 간접인자로 작용할 것으로 판단됨
- 밭의 일부에서는 Mg부족으로 황증으로 보이는 증상이 나타날 수도 있으니 필요시에는 Mg 제품을 엽면시비하기 바람

4) 질산태질소(NO<sub>3</sub>-N)

○ 여주시 가남면 건장리(밭)

시료 번호	pH (1:5)	EC (dS/cm)	유기물 함량 (g/Kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/Kg)	Ex.cations(cmol/Kg)				NO <sub>3</sub> -N (mg/Kg)
					K	Ca	Mg	Na	
1207	7.0	1.66	7	574	1.68	5.1	2.3	0.11	129
	과다	과다	부족	과다	과다	허용	부족	부족	과다

[진단·처방]

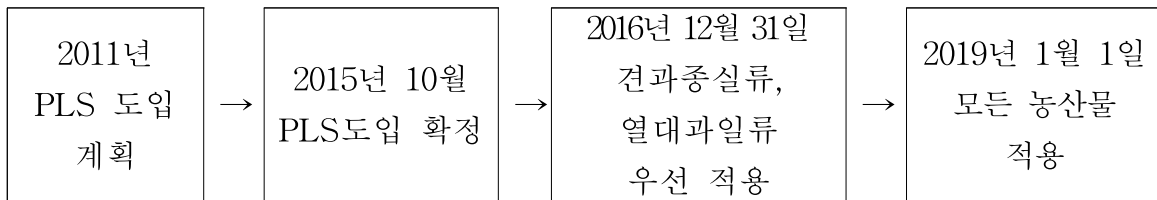
- pH, EC, 유효인산함량, K함량과 NO<sub>3</sub>-N함량은 과다수준이고 Ca함량과 Mg함량은 허용수준임
- pH, EC와 NO<sub>3</sub>-N함량이 과다수준이고 유기물함량은 부족한 수준임으로 경종적인 방법으로는 관리를 할 수 없는 토양 환경임
- 이 시료는 분석결과를 기준할 경우 인삼재배를 가급적 하지 말 것을 권장함
- 대체작물을 검토하실 것을 권장함

② 농약 허용물질목록 관리제도(PLS) 이란?

식품의약품 안전처에서 국민건강을 위해 먹거리 안전성을 높이고 농약의 오남용을 막고 수입 농산물 및 국내 생산 농산물에 대하여 농약성분 등록과 농약 잔류허용기준이 설정된 농약을 제외한 농약에 대하여 잔류허용기준을 0.01mg/kg(ppm)으로 일률적으로 적용하는 제도이다. 즉, 농약 잔류허용기준이 설정된 농약성분은 기존 기준을 적용하고, 미설정된 농약성분에 대해서 0.01mg/kg(ppm)을 기준으로 적용하는 것이다.

㉠ PLS 시행

PLS는 2011년 10월 ‘잔류물질 안전관리 종합계획’이 수립되었고 2015년 10월 PLS도입이 확정되었다. 2016년 12월부터 견과종실류(땅콩, 참깨, 커피 등)·열대과일류(바나나, 파인애플 등)에서 우선 실시하였고, 2019년부터는 모든 농산물로 확대 적용되었다.



㉡ 제도 시행 전·후 달라진 점

○ 농약 사용 기준

- 제도 시행 전 : 규제물질목록 관리제도(NLS : Negative List System)
- 제도 시행 후 : 허용물질목록 관리제도(PLS : Positive List System)

○ 잔류농약 검사기준

- 제도 시행 전
  - 잔류농약 허용기준이 설정된 농산물 : 기준에 따라 적용
  - 잔류농약 허용기준이 미 설정된 농산물 : 유사농산물, 해당 농약 최저기준
- 제도 시행 후
  - 잔류농약 허용기준이 설정된 농산물 : 기준에 따라 적용(현행과 같음)
  - 잔류농약 허용기준이 미 설정 농산물 : 모두 일률적으로 0.01mg/kg(ppm)기준

구분	제도 시행 전	제도 시행 후
기준 설정 농약	기준에 따라 적용	
기준 미설정 농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 당해 농산물의 CODEX 기준 적용</li> <li>○ 유사농산물 최저기준 적용</li> <li>○ 해당 농약의 최저기준 적용</li> </ul>	일률기준 적용 (0.01 mg/kg(ppm)이하)

※ 코덱스(CODEX) : 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission)에서 식품 국제 교역 촉진과 소비자 건강보호를 목적으로 제정되는 국제식품규격

예시) 농약 글리포세이트(Glyphosate, 제초제)적용 사례

농산물	시행 전		시행 후
콩	코텍스 : 20ppm 한국 : 미설정	코텍스 기준 적용	0.01ppm
유자	코텍스 : 미설정 한국 : 미설정	국내 유사농산물 적용 감귤 : 0.5ppm	0.01ppm
배추	코텍스 : 미설정 한국 : 미설정	해당 농약 최저기준 적용 최저기준 : 0.05ppm	0.01ppm

㉔ 부적합 농산물 및 제도 위반

농약 허용물질목록 관리제도(PLS) 시행에 따라 농산물의 잔류농약 검사결과 농약이 허용 기준인 0.01ppm보다 많이 검출되었을 경우, 해당 농산물의 출하금지(생산단계), 회수 및 판매중지(유통단계), 수입통관금지(수입단계) 등의 조치가 취해지고 농민은 100만원, 농약판매 상은 500만원 이하의 과태료 처분을 받는다.

농산물 출하금지
생산단계

농산물 회수 및 판매중지
유통단계

농산물 수입통관금지
수입단계

㉕ PLS 피해 방지 핵심사항

- 재배작목에 등록된 농약사용 준수
- 농약 희석배수와 살포횟수 지키기
- 출하 전 마지막 사포일 준수하기
- 농약 포장지 표기사항을 반드시 확인하고 사용하기
- 불법 밀수입 농약이나 출처 불분명한 농약 사용금지
- 농약 사용시 주변 다른 작물에 피해 주지 않도록 주의하기

[참고] 농약 안전관리 판매기록제 시행

PLS시행에 따라 농약의 안전관리 강화 및 농약의 올바른 사용문화 정착을 위해 ‘농약관리법’을 개정해 농약 판매 및 구매 정보를 기록·관리를 강화한다. 2020년 1월 1일부터 ‘농약안전정보 시스템’에 모든 농약(50ml 또는 50g이하 소포장 제외)에 대해 8가지 판매정보를 전자적으로 기록하고 3년간 보존하여야 한다. 이를 통해 구매자별 농약 구매이력 관리하고 농가별 맞춤형 농약을 처방하고 농작물에 적합한 등록농약만 판매 및 사용 할 수 있도록 유도한다.

- \* 8가지 정보 : 품목명, 포장단위, 판매일자, 판매량, 사용 농작물명, 구매자 이름, 주소, 연락처
- \* 위반 시 과태료(농약관리법 시행령) : 1차(40만원), 2차(60만원), 3차이상(80만원)

## 제 2절 결론 및 고찰

인삼은 우리의 역사와 함께 해온 민족의 의약품이며 건강식품인데, 중국에서 사용된 인삼은 모두 고구려, 백제, 신라에서 생산된 것으로 역사적으로 가장 우수한 약제로 후손에게 물려줘야 할 만한 민족의 자산이다. 이러한 인삼의 재배가 안정적으로 이루어 질 수 있도록 유량경작이 정착경작으로 자리잡을 수 있는 최적의 연장장해 해소기술 개발 및 정착이 절실히 필요한 실정이다. 이에 따라 본 연구에서는 인삼뿌리썩음병의 최적 방제기술 개발로 인삼 안정생산 기술확립을 목표로 하여 본 연구를 진행하였다.

본 연구를 위해 경기도내 인삼 농가 234호를 대상으로 연근별 토양 화학성을 분석한 결과, 인삼재배기간 중 적합수준을 초과하지 않는 인자는 pH, OM과 양이온친환성 이온인 K, Mg 등이었고 연근이 높아질수록 높아지는 성분은 EC와 NO<sub>3</sub>-N함량이었다. EC는 NO<sub>3</sub>-N 함량의 영향을 받아 NO<sub>3</sub>-N 함량이 높아지면 함께 높아지는 성분이므로 인삼재배에서는 관심을 갖고 관리해야 할 성분이다. 인삼농가 현장실태 조사결과, 연근별 인삼뿌리썩음병 원인균의 밀도는 차이 없었지만 발병률은 연근이 높아질수록 증가하였다. 경기도 인삼연구회원을 50농가를 대상으로 설문조사한 결과, 길항미생물 제제를 살포하는 농가는 76%였으나 이에 대한 효과를 보았다는 농가의 비율은 45.8%로 낮았다. 이는 토양화학성이나 토성 등 토양환경을 고려하지 않고 살포함에 따른 결과로 여겨진다.

인삼 연작장해의 원인 중 가장 해결이 어려운 것은 *C. destructans*과 *F. solani*에 의한 뿌리썩음병으로 인식되고 있다. *C. destructans*에 의한 발병밀도는 10<sup>2</sup>cfu/g 수준 판명되었고 *F. solani*는 10<sup>4</sup>cfu/g 수준에서도 발병이 되지 않아 부생성 병원균으로 판단되었다. 이는 Rahman M과 Punja ZK(2005)이 "*C. destructans* 는 상처가 없어도 토양 내 밀도 이상이면 발병이 된다"고 보고한 것과 같은 결과를 보였다.

선행연구결과를 살펴본 결과, 인삼뿌리썩음병 원인균은 *C. destructans*과 *Fusarium* sp.라고 하였고, 이 병원균은 미소곤충이나 선충에 의한 상처를 통해 감염되어 발병하고, 고년근으로 갈수록 뿌리밀도가 증가할수록 피해가 증가한다고 하였다. 인삼뿌리썩음병 병원균의 군사의 생장을 억제하는 길항 미생물은 주로 *Bacillus* sp. *Phenylbacillus* sp.와 *Streptomyces* sp. 등이라고 하였다. 이들 균은 주로 군사의 생육과 포자발아 억제하거나 용혈작용을 통해 군사의 생장을 억제하는 기능을 가지고 있고, *Streptomyces* sp.은 포자의 후막을 녹여 살균하는 능력이 있기도 하다. 유기산류 중에는 Salicylic acid와 Methyl jasmonate는 군사 생장억제 능력과 해충에 의한 상처부위에 작용하여 항산화 물질인 Phenol 화합물을 생성하게 하여 발병을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려졌다. 이 선행연구 결과 인삼 안전 다수확을 위해서는 예정지 전 단계에서 토양 내 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도와 토양화학성 검정결과에 따라 재배적합 여부를 진단하고 가능한 인삼포 예정지에 대해 길항미생물 제제와 유기산류를 조합한 방제체계를 예정지 관리단계부터 본포(2년생~6년)까지의 체계적인 관리방법을 제시한다.

인삼뿌리썩음병에 대한 신규 미생물의 길항효과 및 식물생장촉진효과 등과 같은 미생물의 인삼 생육에서의 유용성을 구명하고 최적 미생물 선발을 위하여 여러 환경의 인삼 근권으로부터 새로운 유용 미생물 8개를 분리 동정하였다. 그 결과 *Rhodanobacte ginsengiterrae* DCY112, *Paraburkholderia panacisoli* DCY113, *Paenibacillus panacihumi* DCY114, *Paraburkholderia panacihumi* DCY115, *Rhizobium panacihumi* DCY116, *Lysobacter panacihumi* DCY117, *Ornithinimicrobium panacihumi* DCY118, *Mesorhizobium panacihumi* DCY119 균주로 각각 새롭게 동정 되었고, 각 미생물의 유용성 및 인삼뿌리썩음병 길항 효과를 구명하기위해 *In vitro* 상에서 식물생장촉진활성, 항진균, 증금속 내성 평가 등을 수행하였다.

뿌리썩음병균에 대한 길항효과를 실험한 결과 기존에 보유한 미생물인 *Burkholderia ginsengiterrae* DCY85와 *Sphingomonas panacis* DCY99가 뿌리썩음병에 대하여 높은 길항효과를 보였다. 그리고 파주시 적성면에서 채집한 2년근 인삼으로부터 시료를 채집하여 이로부터 33개의 균을 분리하여 우수한 길항능력을 보이는 균주에 대한 *gyrB* 유전자 분석을 하여 *B. velezensis*임을 확인하였고 이를 *B. velezensis* ARRI17로 명명하였으며 인삼뿌리썩음병에 대한 길항력을 가지는 미생물로 특허출원(특허출원번호 제 10-2018-0164593)하였다. 토양 내 *B. velezensis* ARRI17의 토양내 정착여부를 확인하기 위해 특이적인 프라이머를 개발하여 특허출원(특허출원번호 제 10-2019-0166875) 하였다. DCY85와 DCY99는 우수한 길항력을 갖지만 endospore를 형성하지 않아 제품화를 위한 제형화로서 ARRI17균주가 적합하다고 판단하여 최종 길항미생물로 선발하였다. 또한 성장촉진활성 평가 결과 DCY116, DCY119 균주가 IAA 생산능력이 뛰어나고, 중금속 알루미늄과 철에 높은 내성을 보여, 이 2개 균주를 이용한 *in planta* pot상에서 인삼의 중금속 내성 증진 평가를 수행하였다. DCY116 과 DCY119 균주는 각각 인삼의 알루미늄, 철 독성에 대한 내성을 증진시켜주는 것을 여러 ROS scavenging system 관련 마커를 통해 확인하였다. 현재까지 연구된 결과로 밝혀 낸 균주들은 미래에 식물강화제, 생물비료, 인삼 뿌리썩음병에 대한 생물농약, 중금속이 오염된 토양 등 인삼 뿐만아니라 다른 여러 식물과 토양에 활용 가능 할 것으로 생각된다.

미네랄 영양소 및 식물생리학 분야에서 미네랄 영양소는 스트레스 반응을 포함하여 식물 시스템의 다양한 생리학적 과정에 중요한 것으로 여겨져왔는데, 그 중 Silicon(규소, Si)은 Beneticial elements로 간주된다. 여러 연구에서 plant system에 Si의 유익한 역할이 입증되었다. 수정 조건 하에서 Si가 결핍된 식물은 실험적 인공물로, 구조적으로 약화되고, 성장, 발달, 생존력 등에서 비정상적인 것으로 밝혀졌다. 또한 생물적 스트레스와 비 생물적 스트레스 모두에 민감한 것으로 밝혀졌다. 따라서 Si가 풍부한 천연 원료를 왕겨, 대나무, 쇠뜨기 등으로 선발하고 이러한 원료로부터 회분을 만든 후 acid reaching과 alkali extraction 및 acid precepitation 등의 방법을 활용하여 실리카나노파티클을 생산하였고, 산업화를 위한 생산 공정을 좀 더 개선하여 절차 및 원가를 절감하고자 하였다. 생산된 실리카 나노파티클은 실험실 내 *In vitro* test에서 뿌리썩음병원균에 대한 직접적인 성장 저해 효과는 없었지만 멸균 처리한 토양에 고병원성 인삼뿌리썩음병원균을 처리하여 검증한 결과 고병원성 인삼뿌리썩음병에 대해 우수한 억제효과를 보였다. 주된 억제 메커니즘은 Jasmonic acid 생합성 경로와 관련된 방어기작 관련 유전자 발현을 증가(transcriptional reprograming)시켜 membrane의 sterol축적을 증가시켜 막 유동성 감소와 세포질에서 apoplast로 당성분 유출의 통로 역할을 하는 막 단백질을 coding하는 *SWEET*유전자의 발현을 감소시켜 고병원성 인삼뿌리썩음병원균이 뿌리 조직으로부터 영양분을 쉽게 얻지 못하는 환경을 만들어 뿌리썩음병으로부터 억제효과를 갖는 것으로 밝혀졌다.

인삼포 토양 내 존재하는 인삼뿌리썩음병 원인균인 *C. destructans* 와 *F. solani*를 동시에 진단하기 위해 토양에서 직접 병원균의 DNA 추출할 수 있는 Kit와 이 두균을 동시에 진단할 수 있는 TaqMan™ 방식의 real-time PCR용 프라이머 개발하였다. 뿐만아니라 고병원성 인삼뿌리썩음병원균인 *I. mors-panacis*에 대한 특이적 프라이머를 제작하여 지역별 재배도양에서 *I. mors-panacis*의 밀도를 분석하였다.

현장적용 기술개발을 위해 제형화를 위한 길항미생물은 endospore형성 유무에 의해 *B. velezensis* ARRI 17로 선정하였고, 선발한 *B. velezensis* ARRI17을 이용하여 여러 천연 원료(기능성 보조제, 증량제, 안정제 등)들을 배합하여 길항미생물 기비제와 관주제 제품화를 진행하였고 퇴비를 활용한 방제기술을 개발하고자 시험을 수행한 결과, *B. velezensis* ARRI17을 접종한 벚짚퇴비를 10a기준 4.5톤을 처리하였을 때 생육촉진효과와 발병률, 발병도에서에서 우수한 효과를 보였고, 토양 내 정착력을 높이기 위한 담체로 벚짚퇴비를 활용하여 보다 값싸고 효율성 높게 실용화할 계획이다. 병원균에 대해 유도저항성 특성을 보이는 Salicylic acid(Sigma, 99%)을 활용한 방제 효과를 검토한 결과, 12mg/l의 Salicylic acid 용액을 관주량했을 때 발병률이나 발병도가 건전발 토양에는 못 미쳤으나 매우 가능성이 높아 좀더 높은 농도에서의 연구수행이 필요했다. 인삼뿌리썩음병 원인균에 대한 길항능력이 우수하고 생육을 양호하게 하는 미생물이나 유기산을 활용한 체계적인 방제체계를 확립할 수 있는 연구수행이 필요할 것으로 보였다.

배합된 여러 시제품들은 방제 효과에 대한 검증과 제형화를 위한 개선을 통해 최종시제품을 결정하여, 최종 시제품 중에서 기비제는 분상제로 결정하였으며, 관주제는 액상제, 분말수화제로 2가지 형태로 결정하였다. 또한 개발된 시제품과 기존 농가에서 일반적으로 쓰이는 제품의 효과를 비교 분석한 결과 본 연구과제를 통해 개발된 제품의 항균활성이 더욱 우수한 것으로 나타났다. 개발 시제품을 농가현장에서 사용할 때는 용도별로 반드시 사용방법을 준수하게 지도하는 것이 필요할 것이며, 이에 대한 교육도 필요할 것으로 판단된다.

추가시험을 통해 선발된 항균효과가 우수하게 나타난 Salicylic acid에 대해서는 현재 시제품 내에 포함되어 있지 않으며, 개발된 시제품도 항균효과가 우수하게 나타나지만, Salicylic acid를 투입할 경우 항균효과가 다소 증가되는 것을 확인한 바 제품 내에 투입할 계획이다. 따라서, 이를 위해서는 향후 기비제와 관주제의 시제품 배합을 일부 조정하고 물성 안정성 시험, 효과 평가 등을 통한 추가적인 시험이 필요할 것으로 여겨진다.

위의 연구를 토대로 하여 개발된 인삼뿌리썩음병 최적방제기술 확산을 위한 모델을 개발하였는데, 이는 인삼조합 계약농가와 비계약농가를 대상으로 기술보급을 하기 위해 각도 인삼조합과 농업기술원 기술 보급부 조직을 활용하여 확산시키는 모델을 제시하였다.

경기도농업기술원에서는 그간 개발된 연구성과를 인삼재배농가에 보다 체계적으로 서비스하기 위해 「인삼 재배적지 진단실」을 운영 할 계획이다. 진단실 운영을 통해 도내 인삼뿌리썩음병 관련 농가실태를 조사하고 이 데이터베이스화 하여 인삼 재배적지 진단 서비스를 할 계획이다.

본 연구에서 Pot 테스트에서는 인삼뿌리썩음병 원인균에 대한 확실한 방제효과 결과를 얻은 반면에, 실제 예정지 및 본발 실험에서는 실험실 내 pot 실험과 비교하면 좋은 효과를 보지는 못했다. 이러한 이유는 우리 연구의 조사결과 자연환경에서는 본 연구에서 지목한 고병원성 인삼뿌리썩음병 원인균인 *I. mors-panacis* 이외에 토양의 화학성, 미소곤충 및 선충, 기후 조건 등의 여러 환경조건들이 공존하여 높은 방제가를 얻는 데는 한계가 있었고, 특히 포장실험은 1년 동안에 1번 가능하기에 제재의 효과를 높이기 위한 개선을 위해 여러 해의 연구가 필요함을 느꼈다.

따라서 본 연구를 통해서 실제 포장에서의 연구의 어려운 점과 고병원성 인삼뿌리썩음병 원인균에 대한 방제의 이론적인 개념을 확인하였으며, 후속연구에서는 길항미생물제재의 효과를 계속해서 증진하기 위한 확인시험이 더 필요할 것으로 생각되고, 후속세대에서는 뿌리썩음병 원인균, 토양화학성 및 미소곤충과 선충 등 다양한 원인에 의한 뿌리썩음병 발병에 대해 높은 방제효과를 가진 제품의 개발이 필요하다.

### 제 3절 연구개발 성과

#### 1. 본 연구개발과제를 통해 달성된 성과

1. 기술실시					
번호	기술명	실시구분	실시유형	기술실시일	기술료
1	인삼 뿌리썩음병에 대한 길항력을 가지는 바실러스 벨레젠시스 ARRI17 및 이의 이용	타기관실시	특허출원	2019-04-30	3,000,000
2	왕겨로부터 실리카의 추출 및 나노파티클의 제조와 인삼 뿌리썩음병 방제를 위한 적용농도	타기관실시	노하우	2019-12-23	0

2. 사업화				
번호	사업화명	제품명	업체명	사업화 형태
1	인삼 뿌리썩음병 길항미생물을 이용한 관주처리제 사업화	관주처리제 (가칭)	농업회사법인 투엠바이오(주)	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
2	인삼 뿌리썩음병 길항미생물 “Bacillus velezensis”을 이용한 미생물비료 사업화	인삼발살림	농업회사법인 투엠바이오(주)	기술이전_기존업체-상품화

3. 고용창출				
번호	고용인력	고용기관명	고용창출일	고용형태
1	길**	농업회사법인 투엠바이오(주)	2018-01-06	정규직
2	오**	농업회사법인 투엠바이오(주)	2018-02-22	정규직
3	이**	경기도농업기술원	2018-08-06	계약직
4	이**	경기도농업기술원	2019-07-15	계약직
5	강**	경기도농업기술원	2019-07-15	계약직
6	김**	농업회사법인 투엠바이오(주)	2019-08-01	정규직

#### 4. 특허/산업재산권

번호	출원등록명	출원등록번호	산업재산권 종류	출원/등록일
1	길항미생물의 특성 및 이를 이용한 인삼뿌리썩음병 예방	10-2018-0159770	특허	2018-12-12
2	인삼뿌리썩음병 경감을 위한 실리카 나노파티클(Silica nanoparticle)의 제조방법	10-2018-0159639	특허	2018-12-12
3	길항미생물과 토양 물리성개량 및 항균활성 천연원료를 이용한 인삼뿌리썩음병 방제 예정지관리용 기비제 제형화 기술	10-2018-0160839	특허	2018-12-13
4	인삼 뿌리썩음병에 대한 길항력을 가지는 바실러스 벨레젠시스 ARRI17 및 이의 이용	10-2018-0164593	특허	2018-12-18
5	미생물을 포함하는 인삼 뿌리썩음병 방제용 작물 보호제	10-2019-0158959	특허	2019-12-03
6	인삼뿌리썩음병원균 길항미생물 검출용 핵산 분자 및 이를 포함하는 검출 키트	10-2019-0166875	특허	2019-12-13
7	인삼에서 중금속에 의한 산화 스트레스 경감에 도움을 주는 식물생장촉진 근권세균 <i>Mesorhizobium panacihumi</i> DCY119T 및 이의 용도	10-2019-0177631	특허	2019-12-30
8	인삼에서 알루미늄 스트레스 경감에 도움을 주는 식물생장촉진 근권세균 <i>Rhizobium panacihumi</i> DCY116T 및 이의 용도	10-2019-0177630	특허	2019-12-30
9	식물생장촉진세균을 이용하여 인삼의 엽류 스트레스를 경감시키는 방법	10-2019-0178255	특허	2019-12-30
10	인삼특이적 식물생장촉진근권세균 검출방법	10-2019-0177629	특허	2019-12-30
11	인삼 뿌리썩음병에 대한 길항력을 가지는 바실러스 벨레젠시스 ARRI17 및 이의 이용	10-2078252	특허	2020-02-11



5. 교육 및 지도 활용 내역

번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	인삼뿌리썩음병 방제를 위한 실리카 나노파티클의 활용방안	Presentation 자료	인삼뿌리썩음병 방제를 위한 실리카 나노파티클의 활용방안 교육지도	2018
2	경기도 최고농업경영자과정	약용식물의 재배, 성분, 효능	약용식물의 재배, 성분 및 효능 강의 중 인삼재배에서 실리카 나노파티클과 길항미생물의 활용 방안 강의	2018
3	SHARING EXCHANGE EXPERIENCE-GINSENG	고려인삼의 대량생산과 산업화	고려인삼의 대량생산과 산업화 및 대한민국에서 인삼의 재배와 산업화에 대한 시스템	2018
4	인삼뿌리썩음병 최적방제를 위한 현장교육	인삼무엇이든 물어보세요 설팅 사례집	인삼 생육불량 대책, 선충피해 관리요령, 인삼뿌리썩음병 방제대책, 토양화학성 분석, 인삼뿌리썩음병 원균 밀도 판별 등	2017
5	인삼뿌리썩음병 최적방제를 위한 현장교육	인삼무엇이든 물어보세요 설팅 사례집	인삼 생육불량 대책, 선충피해 관리요령, 인삼뿌리썩음병 방제대책, 토양화학성 분석, 인삼뿌리썩음병 원균 밀도 판별 등	2017
6	인삼뿌리썩음병 최적방제를 위한 현장교육	인삼무엇이든 물어보세요 설팅 사례집	인삼 생육불량 대책, 선충피해 관리요령, 인삼뿌리썩음병 방제대책, 토양화학성 분석, 인삼뿌리썩음병 원균 밀도 판별 등	2017
7	2018 새해농업인 실용교육 인삼	발표자료 및 유인물	인삼 재배기술 및 병해충 관리	2018
8	개성 인삼농협 조합원 교육	발표자료 및 유인물	인삼안전다수확 재배기술	2018
9	여주시인삼연구회교육	발표자료 및 유인물	인삼	2018
10	인삼 시설재배 및 연작장해 경감 연구	발표자료 및 유인물	인삼 병해충 강의	2018
11	유기농자재 사용 컨설팅 및 인삼뿌리썩음병 방제 교육	인삼뿌리썩음병 및 친환경 생물적 방제	유기농자재의 유효미생물의 작용원리, 사용되는 유효미생물의 특징 소개 및 인삼뿌리썩음병 발병에 미치는 환경 요인 설명 및 삼뿌리썩음병균 억제와 더불어 토양병원성 곰팡이 억제, 근권	2018
12	특용작물 수확과 가공 전략	PPT 자료	인삼의 병해충방제를 위한 실리카 나노파티클과 길항미생물 등의 적절한 활용을 통한 생산수율의 증대와 수확 전략 및 산업화를 위한 가공 전략 강의	2018
13	인삼농가 현장 교육(실태조사 결과)	인삼뿌리썩음병 농가현장 분석 결과	1. 경기 및 충남지역 인삼 농가현장 분석결과 설명 및 자료 제공 → 토양화학성 분석 결과, EC가 높은 편이나 큰 문제가 되는 수준은 아니었고 고온으로 인한 피해로 판단됨	2019
14	인삼농가 현장 교육(실태조사 결과)	인삼뿌리썩음병 농가현장 분석 결과	1. 경기 및 충남지역 인삼 농가현장 분석결과 설명 및 자료 제공 → 토양화학성 분석 결과, EC가 높은 편이나 큰 문제가 되는 수준은 아니었고 고온으로 인한 피해로 판단됨	2019
15	인삼농가 현장 컨설팅	인삼뿌리썩음병 현장 컨설팅	1. 지상부의 출현율이 약 50%정도로 낮음 → 지상부 출현기에 토양이 건조하고 단단하여 지상부가 올라오지 못한 것으로 판단됨.	2019

16	인삼농가 현장 컨설팅	인삼뿌리썩음병 현장 컨설팅	1. 인삼 지상부 고사 현상 발생 →심토층에 있던 염류 물질이 표 토층으로 이동하면서 염류 피해가 발생된 것으로 보이고 수분흡수가 원활 하지 않음으로 인해 이차적으로 고온 피해가 발생	2019
17	인삼농가 현장 컨설팅	인삼뿌리썩음병 현장 컨설팅	1. 인삼 결주 현상 발생 →결주 지점 NO <sub>3</sub> -N과 EC가 허 용범위 이상이었으나 결주로 연결 될 수준은 아니였고 묘삼구입 시 무름병이나 잿빛곰팡이병이 병원 인일 가능성 높음	2019
18	인삼농가 현장 컨설팅	인삼뿌리썩음병 현장 컨설팅	1. 인삼 지상부 고사 현상 발생 →토양화학성분분석결과, EC가 높 은편이나 큰 문제가 되는 수준은 아니였고 고온으로 인한 피해로 판단됨 2.황증피해발생	2019
19	인삼농가 현장 컨설팅	인삼뿌리썩음병 현장 컨설팅	1. 지상부가 40% 정도 고사 및 세근의 탈락 현상 발생 →고온과 높은 EC가 원인으로 판 단되며 복토 및 관수가 필요(겨울 차광시설 견어 수분 공급권장) 2.황증과적	2019
20	경기도 최고농업경영자 과정	인삼 안전다수술 재배기술 PPT	1. 인삼산업 현황 2. 인삼산업의위축된이유 3.인삼농가경영이어려운 이유 4. 인삼재배 현장 애로 기술 5. 재배적지 선정이 어렵다. 26. 적합한 예정지 관리가 어려운 이유	2018
21	고려인삼의 재배와 인삼을 활용한 고부가가치 소재개발	고려인삼의 재 배와 인삼을 활 용한 고부가가 치 소재개발	인삼의 재배시 문제점(연작장해, 뿌리썩음병, 묘잘록병 등)을 해결 할 수 있는 재배 방안과 고려인삼 을 활용한 고부가가치 소재(조직 배양을 통한 배양근의 대량생산 및 나노소재개발)의 개	2019
22	고려인삼의 재배와 인삼을 활용한 고부가가치 소재개발	고려인삼의 재 배와 인삼을 활 용한 고부가가 치 소재개발	인삼의 재배 시 문제점(연작장해, 뿌리썩음병, 염류장해 등)을 해결 할 수 있는 재배 방안과 고려인삼 을 활용한 고부가가치 소재(조직 배양기술을 통한 배양근의 대량생 산 및 나노소재개발	2019
23	미래의 인삼산업과 전망	미래의 인삼산 업과 전망	인삼 재배 시 겪게 되는 여러문제 로 인한 연작장해(뿌리썩음병, 염 류장해, 고온장해, 묘잘록병 등)를 타파할 수 있는 미래지향적인 기 술과 고려인삼을 활용한 다양한 소재의 발견과 개발	2017
24	고소득 약용작물 재배 가공	고소득 약용작 물 재배 가공 (인삼)	고소득 약용작물 재배 가공 강의 과정에서 인삼의 안전한 재배 방 법과 가공기술을 강의	2017
25	특용작물 종류 가공(인삼)	특용작물 종류 가공(인삼)	농협대학교 귀농귀촌대학 특용작 물과정 수강생을 대상으로 특용작 물 특히 인삼에 대한 고품질의 안 정된 재배 기술과 산업화를 위한 가공기술을 강의	2019
26	"고려인삼의 재조명"심포지엄	고려인삼의 재 배 역사_재배기 술 변천사	1. 조선왕조실록 및 농서를 통한 인삼의 역사와 재배기술 변천사 2. 인삼 재배 시 격게 되는 병충 해에 대한 과거와 현재의 재배 기 술 변화	2019

27	경기도 인삼 연구회 연말총회	인삼밭 예정지 관리실태조사에 따른 안전다수 확을 위한 본밭 관리기술	1. 경기지역 인삼 농가 예정지 분 석결과 설명 및 자료 제공 2.인삼밭예정지토양검사필요성	2019
28	Industrialization and Prospect of Ginseng in the World	Industrialization and Prospect of Ginseng in the World	1. 세계의 인삼의 사업화와 전망 에 대해 과거와 현재의 재배의 변 천사 인삼의 재배 시 기술의 변화 및 병충해에 대한 대응방식의 변 화 2. 인삼을 소재로 한 산업의 과거 와 현재의 변화 및 전망	2019
29	Development and Prospect of Ginseng Industry	Development and Prospect of Ginseng Industry	1. 인삼산업의 발전과 전망 - 인삼의 재배 전략 - 실리카 나노파티클 및 길항미생물을 활용 한 안전한 인삼 생산 및 다수확 재배 기술의 발전 - 인삼을 활용한 다양한 소재화 및	2017
30	나노 바이오텍을 활용한 새로운 인삼소재의 생산 및 활용	나노 바이오텍 을 활용한 새로 운 인삼소재의 생산 및 활용	연구소재 개발 및 실용화 사례 - 나노기술과 바이오기술의 융 합기술을 통한 새로운 인삼 소재의 생산 및 활용과 산업화 전 망	2017
31	Development and Industrialization of High value material using Korean Ginseng	Development and Industrialization of High value material using Korean Ginseng	Development and Industrialization of High value material using Korean Ginseng - 고려인삼의 재배 시 생산 수율 을	2019
32	2018년 경기도인삼연구회 농가 컨설팅	2018년 경기도 인삼연구회 농가 컨설팅	○ 인삼 농가 재배 컨설팅 -3년생인삼밭 · 증세: 고온피해로 잎끝이 타는 증 세, EC1.12ds/m로 염류장해 우려 대책 : 차광지 위 후주쪽 차광망 은 15~20cm를 설치해야 하며 너 무 높으면 열이 밖으로 빠져나가 지 않아 고온피해 과중 될 수 있음, 복토나 수분을 잘 관리해야 고온피해를 줄일 수 있음	2018
33	인삼뿌리썩음병 방제기술 개발 대상농가 폭염대응 현장 컨설팅	인삼뿌리썩음병 방제기술 개발 대상농가 폭염 대응 현장 컨설팅	○ 인삼밭 고온피해 및 생육 현황 - 고 온 피 해 로 잎 끝 이 타 는 증 세, EC1.0ds/m이상으로 염류장해우 려 - 인삼뿌리썩음병 발생관찰및 철저한 관리필요	2019
34	경기도 최고농업경영자 과정	인삼약초의 특 수 재배 및 배 양법	인삼약초의 특수 재배 및 배양법 - 건강 기능성 식품으로서 각광 을 받고 있는 인삼을 재배 시 여 러 생육장해 요인을 해결하여 수 확량을 증대 시킬 수 있는 재배 방법	2017

35	폭염에 따른 경기북부지역 인삼 고온피해 실태조사 결과 및 컨설팅	인삼 고온피해 실태조사 및 컨설팅	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 경기북부지역 연천, 파주, 포천 3개 시·군 21개소에 대하여 고온 피해조사를 8월1일~8월2일까지 실시 하였음.</li> <li>○ 피해정도에 차이가 있지만 년생에 관계없이 모든 인삼 고온피해가 발생하였으며 조사대상 필지에서 평균 30% 정도의 피해가 발생하였음</li> <li>○ 폭염 지속시 고온으로 인해 인삼피해가 확대될 것으로 예측됨</li> <li>○ 인삼밭 관리시 복토, 개량형 울타리, 차광망 추가 설치, 관수, 중수로 설치 등이 고온피해를 경감할 수 있음</li> <li>○ 근본적으로 예정지 관리시 추분 등 과다한 양분의 사용을 줄이고 수단그라스, 호밀 등 식물체 유기물을 사용해야 기후대비 고온피해를 줄일 수 있으므로 반드시 토양분석을 통한 예정지관리가 필요함</li> <li>○ 고온철 염류가 높으면 뿌리썩음병 발생이 증가할 수 있으므로, 포장 예정지 철저한 관리 필요함</li> </ul>	2018
----	-------------------------------------	--------------------	---	------

**6. 정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)**

번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도
1	정책건의	농림축산식품부 유통소비정책관 원예산업과	<input type="checkbox"/> 제안 내용 -인삼재배적지진단서비스센터설립건의 · 설치장소: 1안)경기도농업기술원소득자원연구소, 2안)㈜투엠바이오 · 진단규모:연간3,000점(10,000)	2020
2	정책건의	농림축산식품부 유통소비정책관 원예산업과	<input type="checkbox"/> 목적 ○ 지속적이고 안정적인 인삼 재배를 위해서는 예정지 선정전에 재배적지 여부 진단이 필요하므로 인삼농가가 모든 인삼 재배 예정지에 대해 재배적지 진단을 받을 수 있도록 분	2020

**7. 연구인력활용/양성 성과(박사,석사,학사 기타 인력양성 등)**

번호	인력양성명	학위수	인력양성년도	대상인원수
1	2017년 인삼뿌리썩음병 진단 자체분석요원 양성교육	학사:0/석사:0/박사: 0/기타:7	2017	7
2	박사학위양성	학사:0/석사:0/박사: 2/기타:0	2018	2
3	석사학위양성	학사:0/석사:1/박사: 0/기타:0	2018	1
4	인삼뿌리썩음병원 진단 분석요원 양성 교육	학사:0/석사:0/박사: 0/기타:14	2018	14
5	인삼뿌리썩음병 밀도진단 기술 인력양성	학사:0/석사:1/박사: 0/기타:8	2019	9
6	박사학위양성	학사:0/석사:/박사: 1/기타:8	2019	1

8. 논문(국내외 전문학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	학술지게재일	SCI 구분
1	<i>Paenibacillus panacihumi</i> sp. nov., a potential plant growth-promoting bacterium isolated from ginseng-cultivated soil	Archives of microbiology	2018-04-20	SCI
2	<i>Paraburkholderia panacihumi</i> sp. nov., an isolate from ginseng-cultivated soil, is antagonistic against root rot fungal pathogen	Archives of microbiology	2018-06-05	SCI
3	<i>Chryseobacterium ginsengiterrae</i> sp. nov., with Beta-Glucosidase Activity Isolated from Soil of a Ginseng Field	Current microbiology	2017-09-01	SCI
4	Cross Interaction Between <i>Ilyonectria mors-panacis</i> Isolates Infecting Korean Ginseng and Ginseng Saponins in Correlation with Their Pathogenicity	Phytopathology	2017-05-01	SCI
5	<i>Lysobacter panacihumi</i> sp. nov., isolated from ginseng cultivated soil	The journal of microbiology	2018-06-25	SCI
6	<i>Rhodanobacter ginsengiterrae</i> sp. nov., an antagonistic bacterium against root rot fungal pathogen <i>Fusarium solani</i> , isolated from ginseng rhizospheric soil	Archives of microbiology	2018-08-16	SCI
7	Gold Nanoparticles Synthesized with Fresh Panax ginseng Leaf Extract Suppress Adipogenesis by Downregulating PPAR $\gamma$ /CEBPalpha Signaling in 3T3-L1 Mature Adipocytes	Journal of nanoscience and nanotechnology	2019-02-01	SCI
8	Discovery of a new primer set for detection and quantification of <i>Ilyonectria mors-panacis</i> in soils for ginseng cultivation	Journal of ginseng research = 高麗人參學會誌	2019-01-01	SCI
9	<i>Rhizobium panacihumi</i> sp. nov., an isolate from ginseng-cultivated soil, as a potential plant growth promoting bacterium	Archives of microbiology	2019-01-01	SCI
10	<i>Ornithinimicrobium panacihumi</i> sp. nov., Antagonistic Bacteria Against Root Rot Fungal Pathogens, Isolated from Cultivated Ginseng Soil	Current microbiology	2019-01-01	SCI
11	Molecular discrimination of Panax ginseng cultivar K-1 using pathogenesis-related protein 5 gene	Journal of ginseng research = 高麗人參學會誌	2019-01-01	SCI
12	Silicon confers protective effect against ginseng root rot by regulating sugar efflux into apoplast	Scientific reports	2019-12-03	SCI

9. 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표제목	발표일시	장소
1	정량 PCR을 이용한 인삼뿌리썩음병원균 진단기술개발	2017-05-18	호텔인터불고 대구
2	Enhancement of salinity tolerance in <i>Panax ginseng</i> Meyer by <i>Paenibacillus yonginensis</i>	2017-09-26	청풍리조트레이크호텔 컨벤션홀(제천)
3	Antifungal activity of bacteria against root rot causing fungus <i>C. destructans</i>	2017-09-26	청풍리조트레이크호텔 컨벤션홀(제천)
4	Molecular detection of ginseng root-rot causing pathogen, <i>Ilyonectria mors-panacis</i>	2017-09-26	청풍리조트레이크호텔 컨벤션홀(제천)
5	Green synthesis of silver chloride nanoparticles by <i>Flavobacterium panacis</i> sp. nov. and its biological activities	2017-11-02	일산 킨텍스
6	Isolation and Identification of Novel Plant Growth Promoting Bacteria From Ginseng Resource and Their in vitro Plant Growth Promotion Activities	2017-11-02	일산 킨텍스
7	Silica nanoparticles suppress the root rot of panax ginseng from <i>Ilyonectria mors-panacis</i> infection by reducing sugar efflux into apoplast	2018-04-27	국립생태원
8	Silica nanoparticles enhance resistance against root rot disease in panax ginseng roots by modulating sterol biosynthetic pathway	2018-05-17	청송 임업인종합연수원 대강당
9	Influence of the plant growth promoting Rhizobacterium, <i>Rhizobium panacihumi</i> for improving aluminum resistant on <i>Panax ginseng</i>	2018-10-17	제주 호텔빠레브
10	<i>Paraburkholderia panacihumi</i> sp. nov., An isolate from ginseng-cultivated soil, is antagonistic against root rot fungal pathogen	2018-10-17	제주 호텔빠레브
11	인삼뿌리썩음병의 원인균인 <i>C. destructans</i> 와 <i>Fusarium solani</i> 를 동시 진단할 수 있는 새로운 real time PCR 진단법 개발	2018-10-17	제주 호텔빠레브
12	인삼 뿌리썩음병원균 발병 밀도 구멍 및 피해분석	2018-10-17	제주 호텔빠레브
13	인삼 뿌리썩음병원균 밀도 진단기술	2018-10-05	한경대학교
14	Development of New Real-time PCR Method for Simultaneous Diagnosis of <i>C. destructans</i> and <i>Fusarium solani</i> , and Density Analysis of Ginseng	2019-06-25	호텔 머큐어 빈 베스트반호프(오스트리아 비엔나)
15	Influence of the siderophore producing rhizobacteria for reducing oxidative stress in <i>Panax ginseng</i> under heavy metal stress	2019-04-18	건국대학교 새천년관 B2 우곡국제회의장

10. 홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	제목 산업재산권종류	일시
1	월간잡지	뉴스메이커	소비자 리드에 맞춘 새로운 바이오소재로 인삼소재은행이 탈바꿈하다.	2017-06-01
2	중앙TV 방송	SBS	SBS 일요특선다큐 118회	2017-09-03
3	중앙TV 방송	SBS	SBS 일요특선다큐 112회	2017-07-23
4	주간잡지	주간인물	오리지널 인삼의 세계화 명품화에 앞장서다	2017-07-21
5	월간잡지	월간 한국인	고려인삼 연구에 한 축을 감당하며, 세계인삼과학상의 영예를 안다	2017-11-01
6	월간잡지	월간월예	경기농기원, 인삼 뿌리썩음병원균 진단기술 사업화	2018-01-15
7	기타	한국인삼(韓國人蔘)	인삼밭 토양 내 인삼뿌리썩음병원균 밀도진단 실용화 연구	2018-05-01
8	중앙일간 지	경인일보	인삼 뿌리썩음병 연작 피해 해결 도 농기원, 밀도진단기술 시연회	2018-06-19
9	중앙일간 지	경기일보	지피지기면 백전백승... '인삼뿌리썩음병' 뿌리 뽑는다	2018-06-28
10	기타	경기농정 웹진	인삼 재배성공! 인삼뿌리썩음병원균 진단부터	2018-09-01
11	Internet/ PC통신	유튜브	너 딱 걸렸어! 병든 인삼을 구하라	2019-12-24
12	Internet/ PC통신	경인지널	인삼 재배 예정지 뿌리썩음병 진단 서비스 실시	2019-07-16
13	지방일간 지	충부일보	인삼뿌리썩음병 방제 미생물 기술이전	2019-04-30

11. 전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명칭	전시품목	장소	활용 년도
1	전시회	2017 제22회 부쿠레슈티 농축산업 국제전시회(INDAGRA 2017)	유기농업자재	루마니아 (부쿠레슈티)	2017
2	전시회	2017 24회 중국 시안 양링농업고신과학기술성과박람회	유기농업자재	중국(시안)	2017
3	전시회	제24회 브라질 상파울루 국제 농업기계박람회(Agrishow 2017)	유기농업자재	브라질( 상파울루)	2017
4	전시회	2017 베트남 국제 유통 및 프랜차이즈쇼	유기농업자재	베트남( 호치민)	2017
5	전시회	2017 태국 방콕 농기계박람회(SIMA ASEAN 2017)	유기농업자재	태국(방 콕)	2017
6	전시회	2017 동아프리카 농업가금축산 국제박람회(Agro & Polutry East Africa 2017)	유기농업자재	케냐(나 이로비)	2017
7	박람회	농업기술박람회	토양DNA 추출 키트, 인삼뿌리썩음 병원균 동시진단 키트	서울 코엑스	2017

8	박람회	과주개성인삼축제	토양DNA 추출 키트, 인삼뿌리썩음 병원균 동시진단 키트	과주 임진각광 장	2017
9	박람회	이천인삼축제	토양DNA 추출 키트, 인삼뿌리썩음 병원균 동시진단 키트	이천설봉 공원	2017
10	박람회	제22회 경기도 농업인의 날	토양DNA 추출 키트, 인삼뿌리썩음 병원균 동시진단 키트	안산시 화랑유원 지 대공연장	2017
11	제품설명 회	2017년 농촌진흥사업 종합보고회	토양DNA 추출 키트, 인삼뿌리썩음 병원균 동시진단 키트	푸르미르 호텔	2017
12	전시회	2018 제19회 중국국제농화학 및 작물보호박람회	유기농업자재	중국(상 해)	2018
13	전시회	2018 뉴질랜드 필데이스 농업 박람회(2018 Fiedays)	유기농업자재	뉴질랜드 (해밀턴)	2018
14	전시회	2018 베트남 농업 박람회 (2018 Agritech EXPO)	유기농업자재	베트남( 호치민)	2018
15	전시회	2018 제31회 사하라 농업 박람회	유기농업자재	이집트( 사하라)	2018
16	전시회	2018 농업기술박람회	인삼뿌리썩음 병 진단 키트, 인삼뿌리썩음 병 길항미생물 시제품(본발 예정지관리용 )	창원컨벤 션센터	2018

### 12. 기타 홍보실적(수상실적)

번호	일자	홍보명칭 구분	주요내용
1	2018-04-27	우수발표상	2018년도 한국자원식물학회 춘계학술발표대회 우수발표상
2	2017-10-23	제 5회 세계인삼과학상	In recognition of outstanding achievements in R&D related to Ginseng Science Based on the provisions of the world ginseng science award
3	2018-05-18	포스터발표상	2018 한국약용작물학회 춘계학술발표대회 포스터 발표상



13. 생명자원(생명정보)			
번호	등록기탁번호	생명정보(자원), 화합물명	등록기탁기관
1	KCTC 62721	<i>Mesorhizobium panacihumi</i>	KCTC
2	KCTC 62018	<i>Rhodanobacter ginsengiterrae</i>	KCTC
3	KCTC 52951	<i>Paraburkholderia panacisoli</i>	KCTC
4	KFCC11778P	<i>Bacillus velezensis ARRI17</i>	한국미생물보존센터
5	KCTC 52952	<i>Paraburkholderia panacihumi</i>	KCTC
6	JCM 32168	<i>Lysobacter panacihumi</i>	JCM
7	JCM 32156	<i>Ornithinimicrobium panacihumi</i>	JCM
8	JCM 32875	<i>Mesorhizobium panacihumi</i>	JCM
9	KCC 33915	<i>Paenibacillus panacihumi</i>	KCTC
10	KCTC 62017	<i>Rhizobium panacihumi</i>	KCTC
11	KCTC 62019	<i>Lysobacter panacihumi</i>	KCTC
12	KCTC 39962	<i>Ornithinimicrobium panacihumi</i>	KCTC
13	JCM 32167	<i>Rhodanobacter ginsengiterrae</i>	JCM
14	JCM 32251	<i>Rhizobium panacihumi</i>	JCM
15	JCM 32098	<i>Paraburkholderia panacisoli</i>	JCM
16	JCM 32073	<i>Paenibacillus panacihumi</i>	JCM
17	JCM 32099	<i>Paraburkholderia panacihumi</i>	JCM

# 제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 제 1절 목표 및 달성여부

### 1. 정량성과 목표 및 달성여부

성과목표												연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
											SCI	비SCI	논문 평균 IF						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	20	10		10		10	5		5				15	10	5	5	2.5	2.5	
1차년도	3								3		2		2.0	1	10	10		2	
2차년도	3								1		3		3.0	3	10	10	1	2	
3차년도	4	2		2		2	2				3	2	3.0	3	10	10	1	4	3
4차년도																			
5차년도																			
<b>목표 소계</b>	<b>10</b>	<b>2</b>		<b>2</b>		<b>2</b>	<b>2</b>		<b>4</b>		<b>8</b>	<b>2</b>		<b>7</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
달성 소계	10	1		2		2	5		6		10	2		15	35	34	2	29	16
달성도 (%)	100	50		100		100	100		100		100	100		100	100	100	100	100	100

### 2. 정성 및 연구개발 성과 목표 및 달성여부

#### 가. 논문성과

(1) 목표 (총 10편) 대비 12편을 게재하여 100% 달성함

나. 전략성과 목표인 신규 기능성 소재 개발과 실제 농가 사용자 매뉴얼 제작 1건에 따라 토양으로부터 신규한 식물생장촉진균주와 길항미생물 소재를 분리 동정 및 검증하여 기탁하고, 최적 방제기술 확산 모델과 실제농가 매뉴얼을 제작하여 농가 관리체계를 마련함.

다. 세부연구목표에 대한 달성여부

세부연구목표	비중 (%)	달성도 (%)	내용
국내 인삼뿌리썩음병 발생현황, 피해분석 및 기존의 저감 기술 분석	10	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 인삼뿌리썩음병 발생현황을 생육단계별, 지역별, 재배 방식별로 논문자료를 통해 발생현황을 분석 및 분야별 연구현황을 분석함.</li> <li>2. 경기도와 인천시, 충남지역의 농가 50호를 대상으로 발병실태와 토양화학성을 분석하여 발병현황과 피해분석 및 경감기술을 분석함.</li> </ol>
인삼근권으로부터 분리된 고병원성 인삼뿌리썩음병에 대한 길항효과 구명	15	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>C. destructans</i> 인삼뿌리썩음병원균 으로부터 고병원성 균주와 저병원성 균주를 분리하고 병원성을 검증 및 고병원성 인삼뿌리썩음병원균에 우수한 길항력을 갖는 신규 길항 미생물 및 식물생장촉진과 염류장에 개선 미생물의 발굴과 길항미생물 검출 마커를 개발함.</li> <li>2. 인삼뿌리썩음병 억제 후보 물질로 활용하기 위한 실리카나노파티클(규산)의 생산과 공정 개선 및 인삼뿌리썩음병에 대한 규소의 Jasmomic acid 합성경로와 관련된 방어 메커니즘을 구명하고 방어기작을 검증함.</li> </ol>
<i>C. destructans</i> 와 <i>Fusarium sp.</i> 동시 밀도판별기술 정립	10	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>C. destructans</i>와 <i>Fusarium sp.</i>를 동시 정밀하게 밀도 진단할 수 있는 키트를 개발하여 진단 분석요원 양성 교육 및 진단 시연회를 실시함.</li> <li>2. 고병원성 인삼뿌리썩음병원균 <i>I. mors-panacis</i>를 정밀 검출할 수 있는 특이적 진단마커를 개발함.</li> </ol>
바실러스 속 계통 미생물의 산업용 배양조건 확립 및 제형화 기술 개발	15	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 제형화를 위해 선정된 <i>B. velezensis</i> ARRI17 균주를 대량 배양하기 위한 산업용 배지 조성 및 배양 최적 조건을 구명함.</li> <li>2. 복합 주성분 합제 미생물제제의 관주제 및 기비제 제형별 주성분 세부 배합 투입 농도 구명과 기능성 보조제, 증량제, 안정제를 적용한 최적 배합을 선정하여 제형화 기술을 개발함.</li> </ol>

인삼 예정지 및 본포 관리를 위한 제품 용도별 현장적용 기술 연구	10	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 현장적용 시기별 적합 기비제 및 관주제 제형 선발과 길항미생물을 주성분으로하는 재제의 뿌리썩음병 억제 효과를 감염된 필드 토양에서 검증함.</li> <li>2. 길항미생물과 친화력이 강한 천연유기자원(퇴비)를 개발하여 길항미생물의 토양정착능력을 향상시킬 수 있는 방안을 마련함.</li> <li>3. 인삼 예정지관리용 길항미생물 제품의 현장 실증평가를 위해 연천,과주지역의 예정지 관리 중인 인삼밭을 대상으로 토양화학 성분분석과 개발된 밀도진탄 kit를 활용하여 인삼뿌리썩음병원균의 밀도를 분석함.</li> <li>4. 고년근 인삼포 관리용 ARRI17 길항미생물 기반 제형화 제품을 처리하여 실증평가하고 시기별 병원체와 길항미생물 균 밀도를 분석하여 제품 용도별 현장적용 기술을 구명함.</li> <li>5. 최적 제형화 제품을 선정하여 약해 이 제품에 대한 약해시험을 수행하고, 제품 보관 시 생균 수 밀도를 분석하여 약효 보증기간을 구명</li> </ol>
인삼 뿌리썩음병 최적 방제기술 개발	20	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 살균제로 등록되어 있는 대표적 농약 24종을 선발하여 대표성분과 희석배수를 조사함.</li> <li>2. 인삼뿌리썩음병 및 식물 병원균에 대한 다조맷 입제의 항균력과 24종 농약의 항균력을 조사하여 기존 다조맷 입제를 능가하는 방제가를 보유한 농약 선발 및 효과를 분석함</li> <li>3. 최종 시제품과 시판중인 병해관리용 자재와 항균효과를 비교하여 우수한 항균효과를 나타냄.</li> <li>4. 병저항성을 보이는 유도저항성 천연 물질인 Salicylic acid에 대한 길항효과를 구명하여 최종 시제품에 투입 후 기존 제품에 대한 효과를 비교함.</li> </ol>
개발된 최적 방제기술 현장확산 모델 개발 및 매뉴얼 제작	20	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 경기도 농업기술원 기술보급조직, 지역인삼농협, 시군병 인삼연구회 등으로 의 확산 및 활용을 위한 최적 확산 모델 구축</li> <li>2. 효율적인 현장관리를 위한 인삼뿌리썩음병 최적방제기술 현장적용 매뉴얼을 제작함.</li> </ol>
합계	100	100	

## 제 2절 목표 미달성 시 원인 및 차후대책

### 1. 미달성 성과에 대한 원인(사유)

가. 정량성과 목표 중 특히 1건을 연구기간 내 미달성

(1) 등록 심사 중 보정 요청으로 인한 등록 지연.

### 2. 미달성 성과에 대한 차후 대책

가. 현재 특허 1건 미달성 건에 대해 특허 등록결정되어 등록비 납부 예정임, 향후 등록 완료 시 종료 후 1차년도 목표 성과들에 포함하여 함께 제출할 것임.

### 3. 후속 연구의 필요성

가. 친환경 재배를 위한 미생물 제제 개발을 위하여 병저항성을 유도할 수 있는 천연물질의 계속적이 탐구와 구멍이 필요하며, 특히 최종시제품에 Salicylic acid를 투입하여 *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* 등과 같은 병원체들에 대한 항균효과가 많이 증가하였다. 따라서 친환경 재배기술의 발전을 위해 이러한 병저항성 유도 천연물들에 대한 메커니즘 구명과 활발함 제품 개발이 필요할 것으로 사료됨.

나. 화학비료 및 축산분뇨의 과다사용에 따라 불안정화 된 토양의 미생물상을 유익한 미생물이 서식할 수 있는 환경으로 복원하는 연구가 현재는 미흡한 실정이다. 따라서 인삼의 병해충 방제를 위한 토양 미생물상을 복원할 수 있는 관련 기술개발이 필요.

다. 따라서 인삼 밭 토양을 복원 할 수 있는 종합적인(병원성 및행물, 화학성, 미소동물 등) 검증을 통한 재배적지 종합 진단기술의 개발이 시급함.

# 제 4장 연구결과의 활용 계획 등

## 제 1절 연구 종료 후 성과 창출 계획

1. 연구종료 후 연차별 정량 성과 목표

가. 특허 등록 최종 10건

2. 사업화

가. 연구개발을 통해 개발된 제품 판매를 통한 매출실적 : 총 232,000,000원

3. 논문

가. 현재 2건의 SCI 논문이 추가로 승인되었고, 게재 대기 중임.

성과목표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문				학술발표	정책활용		홍보전시
										SCI		비SCI	논문평균IF						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	10		10		10	5		5				15	10	5	5	2.5	2.5	
최종목표	10	10		2		2	232		4		8	2		7	30	30	2	8	3
1차년도	3								3		2		2.0	1	10	10		2	
2차년도	3								1		3		3.0	3	10	10	1	2	
3차년도	4	2		2		2	2				3	2	3.0	3	10	10	1	4	3
4차년도																			
5차년도																			
목표소계	10	2		2		2	2		4		8	2		7	30	30	2	8	3
달성소계	10	1		2		2	5		6		10	2		15	35	34	2	29	16
종료 1차년도		3					30												
종료 2차년도		3					100												
종료 3차년도		3					100												
종료 4차년도																			
종료 5차년도																			
소계		8																	
합계	10	10		2		2	232		4		10	2		15	35	34	2	29	16

## 제 2절 연구개발결과를 통한 사업화 계획

### 1. 생산 계획

구분		( 2021 년 ) 개발 종료 후 1년	( 2022 년 ) 개발 종료 후 2년	( 2023 년 ) 개발 종료 후 3년	
국 내	시장점유율(%)	0.5	1	3	
	판매량	포(기비용)	15,000	30,000	90,000
		병 (1L, 관수용)	5,000	10,000	30,000
	판매단가 (원)	포(기비용)	20,000	20,000	20,000
		병 (1L, 관수용)	35,000	35,000	35,000
	국내매출액(백만원)	475	950	2850	
해 외	시장점유율(%)	-	-	-	
	판매량 (단위))	포(기비용)	15,000	75,000	120,000
		병 (1L, 관수 용)	18,000	90,000	150,000
	판매단가(\$)	포(기비용)	8	8	8
		병 (1L, 관수 용)	7	7	7
	해외매출액(백만\$)	0.246	1.23	2.01	
당사 생산능력1)	1000톤/년	1000	1000	1000	
	병 (1L, 관수용)	100	100	100	

### 2. 투자 계획

(단위 : 백만원)

항목		( 2021 년 ) 개발 종료 후 1년	( 2022 년 ) 개발 종료 후 2년	( 2023 년 ) 개발 종료 후 3년
매출원가1)		200	390	900
판매관리비2)		40	80	450
자본적 지출	토지			
	건물/구축물			
	기계장치등	20	40	90
자본적지출 합계		20	40	90

### 3. 사업화 전략

○ 개발 제품 사업화 추진전략(시장, 제품, 가격, 판로, 판매, 홍보 등)

구분	사업화 추진전략
시장세분화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 수도권, 광역시, 지방</li> <li>- 재배지 : 농가, 계약 재배 업체 및 단체</li> <li>- 재배 예정지 : 계약 재배 업체 및 단체, 재배 예정 농가</li> </ul>
목표 시장	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내: 지역별 인삼 계약재배 업체, 단체 및 농가 농협 농자재 백화점, 지역별 친환경농업자재 유통업체, 조달청 등</li> <li>- 해외: 현지 인삼 및 수출 인삼 재배 농가, 농자재 유통업체</li> </ul>
제품 위치	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 특히 길항미생물, 살균성 식물추출물, 기능성 나노실리카이트가 합제화된 인삼 고병원성 뿌리썩음병균 방제용 제품 소비자 제공</li> <li>- 품질관리와 품질인증 바탕으로 사용 소비자 신뢰도 확보 및 판매</li> <li>- 집중 투입지역 제품 기술 및 사용매뉴얼 시연과 교육으로 홍보 극대화</li> <li>- 인삼 뿌리썩음병 방제용 친환경 우수 농업자재 판매하는 기업으로 포지셔닝</li> </ul>
제품 전략	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제품 사용 소비자의 요구에 맞춘 용량의 다양화 개발</li> <li>- 제형별 제품 사용 범위 표기 외 사용 매뉴얼 제공</li> <li>- 수요처와 소비자의 주기적인 관리와 불만사항 점검 및 애로사항 해결</li> <li>- 국내 토착 우수미생물, 천연식물성분 사용으로 인축·환경 안전한 제품 보증</li> </ul>
가격 전략	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 상용화 초기 마케팅 및 홍보 위한 타사 경쟁제품 대비 가격 인하 판매</li> <li>- Win-Win : 사전 맞춤형 대량생산 주문 가격 할인 제공 납품</li> <li>- 해외 수출용 제품은 국가별 특성에 맞는 가격 구조 기획 및 제공</li> </ul>
유통 전략	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유통별, 고객별 맞춤형 차별화 유통 마케팅 전략 수립</li> <li>- 지역별, 규모별, 재배단지별, 마케팅 인프라(농협, 직영대리점) 구축</li> <li>- 자사 체계적 유통라인 구축까지 우수 원료 공급처 및 제품 소비처 확보 운영</li> <li>- 유통단계 감소를 통한 부담 절감(본사 - 수요처, 해외딜러 - 소비자)</li> <li>- 해외 유통 : 농자재박람회 참가, 시험포 운영, 딜러 고객 유치</li> </ul>
홍보 전략 (국내)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국문 홈페이지 사업화 제품 홍보 및 온라인 마케팅 준비</li> <li>- B to B, Off-Line 방식 : 우수 조달, 거점 대리점 운영 체제 구축</li> <li>- 농업전시회 참가, 대규모 농민단체, 생산자협의회 대상 홍보 및 판촉</li> <li>- 조달청 업체 품목 등록 : 인삼 뿌리썩음병 병해관리용 유기농업자재</li> </ul>
홍보 전략 (국외)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 영문 홈페이지 사업화 제품 홍보 및 온라인 마케팅 준비</li> <li>- B to C, On-line 방식 : ALIBABA.COM, e-bay, 아마존, 라쿠티 등 이용</li> <li>- 농자재박람회 전시 참가(인삼 재배 국가 집중)</li> <li>- 해당국가 등록기준 맞춤형 제품 제조 공급, 현지 필드시험 추진 진행</li> <li>- 정부지원사업 농업기술실용화재단, 중소기업청 수출지원센터, 무역협회 등의 협조를 통한 해외바이어, 마케팅, 진출 시장 발굴</li> </ul>



#### 4. 농업회사법인 투엠바이오(주)

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 상용화 형태 : 작물 병해용 유기농업자재</li> <li>○ 수요처 : 농협, 조달청, 대리점, 생산자 조합 (영농조합, 연구회 등)</li> <li>○ 예상 단가 : 병해용 유기농업자재 (20000원/포, 35000원/L)</li> <li>○ 개발 투입인력 및 기간 :               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발 투입인력 : 연구인력 3인</li> <li>- 개발 기간 : 2년 5개월</li> </ul> </li> </ul>
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미생물 대량 생산 및 산업화 기술 보유</li> <li>○ 식물추출물 및 기능성 물질과 미생물의 합제 제형화 기술 보유</li> <li>○ 완성 제형별 자체 생산 및 OEM 생산 시스템 구축 (제품QA 프로세스 확립)</li> <li>○ 국내 주요 생산자 협회 대상 마케팅 조직 확보</li> <li>○ 기술영농 컨설팅으로 농가 적용기술 교육 가능</li> <li>○ 인도, 터키, 베트남, 태국, 이란, 중국, 페루, 인도네시아, 말레이시아 유력 거래처 확보</li> <li>○ 해외 기술 마케팅 인력 확보</li> </ul>
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2018년 : 시제품 개발 완료 및 현장 적용 기술 개발</li> <li>○ 2019 : 친환경적, 경제적 적용기술 개발 완료           상품화 적용 기술 개발</li> <li>○ 2020년 : 현장 판매 루트 통한 실증 확인           해외 시범포 진행</li> <li>○ 2021년 : 국내외 판매 실시</li> </ul>

#### 5. 사업화를 위한 비즈니스 모델

##### 가. BM 수립 배경

- (1) 다조맷 주성분의 토양소독제의 경우 강력한 살균력 및 토양 기생성 선충에 대한 효과는 인정되나, 토양 근권 미생물성 파괴로 유발되는 유익균의 밀도 저하는 물론 강력한 약제 저항성 획득 토양 전염성 병원균을 양산하게 되며, 저항성 균 방제위한 사용법의 남용으로 농업 생태계를 위협하는 악순환 반복의 고리를 차단할 대안의 필요성이 매우 높게 대두 되고 있다.
- (2) 우리나라의 주요 약용 수출작물인 인삼의 경우 향후 수출시장 확대 및 내수시장 품질 안정화를 위한 다각적 노력의 일환으로 친환경 인삼생산에 가장 큰 병해인 인삼뿌리썩음병 방제의 친환경적 생물농약의 개발 보급은 인삼을 활용한 6차 산업 발전에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.
- (3) 인삼 뿌리썩음병 방제용 친환경 생물농약은 인삼 이외 주요 경제작물들의 토양전염성 병해에 대한 동시방제 효과를 방제 스펙트럼을 확대할 수 있으며 이는 국내는 물론 해외 주요 수출농산물 생산국가들로 수출 판로 확대로 이어질 수 있다.

- (4) 미국과 같은 농산물 수출국, 브라질, 아프리카 및 동남아의 주요 농산물 수출국가들은 EU 수출농산물의 잔류농약 기준 강화로 농산물 생산자들에게 생물농약의 사용은 필수가 되고 있다.

나. BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

- (가) 미생물과 천연물 주성분의 인삼뿌리썩음병 방제용 친환경 생물농약 개발
- (나) 친환경경적 인삼의 안정적 생산위한 최적의 방제 기술 개발
- (다) 방제 스펙트럼의 확대 위한 기초 제품 제형 확립 - 타 작목 적용 및 수출 증진
- (라) 중국, 인도, 터키와 같은 수출농산물 생산 집적지가 많은 국가로 진출 초석 마련

(2) 핵심경쟁요인

- (3) 복합 주성분 제형으로 주성분간 상호 시너지 효과 극대화로 방제력 구축
- (4) 인삼뿌리썩음병원균에 대한 강력한 길항 효과는 타 토양 전염성 곰팡이 병원균 동시 억제로 건전한 인삼 생산에 유리
- (5) 저투입 (노동력, 비용) 고효율 실현 현장적용 기술 매뉴얼 제공

다. 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

(가) 경쟁기업 현황

① 국내 경쟁기업 현황

- ㉠ 국내의 천연 식물 보호제 시장은 아직 초기 형성 단계이며 벤처기업이나 중소기업 중심 제품 판매 되어 지고 있으며, 친환경 농가 정부 지원사업에 많은 경쟁이 발생하고 있는 상황이다.
- ㉡ 국내 유기농업자재 병해관리용으로 등재된 제품의 주성분을 분석한 결과 미생물 단제 주성분 제품은 *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus velezensis*, *treptomyces griseus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Burkholdera pyrocinia*, *Bacillus subtilis* 등의 미생물이 활용되고 있다.
- ㉢ 복합 미생물 제형으로는 *Bacillus amyloliquefuciens* 와 *Pseudomonas putida*의 제품이 등재되어 판매 되어지고 있다.
- ㉣ 규산나트륨, 보르도액, 황을 주성분으로 하는 병해 방제용 제제가 가장 많으며, 식물추출물과 식물성 오일 주성분의 병해관리제가 그 뒤를 잇고 있다.
- ㉤ 국내 유기농업자재로 등재된 자재들의 효과 부분에 있어서는 생산자들로부터 투입 비용대비 만족할만한 효과가 없는 것으로 조사되어지고 있으며 지속적으로 생산자들로부터 유용한 제품이 개발에 대한 요구가 발생 하고 있다.
- ㉥ 본 연구과제를 통하여 미생물과 천연물의 주성분의 복합제형의 개발은 기존 상업화 미생물 살균제들보다 방제효과 및 방제 스펙트럼에 있어서 확실한 기술우위를 갖게 됨으로 시장성을 갖는 상품성 있는 제품이 될 것으로 본다.

표 1. 국내 농촌진흥청 유기농업자재 병해 관리용 유기농업자재 등록 현황(2016년 현재)

상표명 (자재명)	주성분	제조사
가드광(식물추출물)	황련추출물 80%	(주)캠포트
세머루(미생물)	미생물( <i>Bacillus methylothrophicus</i> ) 10%	(주)제일그린산업
도복그라입상(규산나트륨)	규산나트륨 25%	(주)진농산업
시드룸(미생물)	미생물( <i>Bacillus subtilis</i> ) 40%, 미생물( <i>Trichoderma harzianum</i> ) 10%	엔비아그로
해방뿌리(식물성 오일)	팔마로사오일 33%	우진비앤지(주)
크린가루(식물성 오일)	팔마로사오일 16.7%	우진비앤지(주)
건도보르도(보르도액)	황산동 12%, 생석회 20%	건도 산업사
탐플러스규산 액제	규산나트륨 60%	고려바이오(주)
BK보르도606	소석회 20.5%, 황산동 15.5%	(주)백광소재
팡시스(황)	황(sulfur) 4.4%	(주)씨엠씨코리아
박스타 유제(식물추출물)	울금추출물 50%	(주)유니테크
보르도액153(보르도액)	황산동 10%, 수산화칼슘 35%	창일바이오
한버내-쏘일(미생물)	미생물( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ) 2%	제노바이오
한버내-200(식물추출물+ 님추출물+ 목초액)	식물추출물 80%, 님추출물 10%, 목초액 7.5%	제노바이오
청운 농축보르도액(보르도액)	보르도액 33%	성원네이처
바이탄 (황)	황 10%	(주)이코바이오
바시리(미생물)	미생물( <i>Bacillus subtilis</i> ) 45%	고려바이오(주)
대유큐사이드(수산화동)	수산화동 40%	(주) 대유
지씨엠-피(P) (미생물)	미생물( <i>Bacillus amyloliquefacien</i> ) 50%	(주) 푸르네
서울유황수화제 (황)	황 79%	서울환경산업
미네콤21(석회유황합제)	생석회 2.63% , 황 5.08%	(주)생명바이오텍
단디탄 (제충국추출물+ 에틸알콜)	제충국추출물 10%+ 발효주정 70%	(주)비아이지
다제탄에스(식물추출물)	식물추출물(고추,겨자,레몬) 1.72%	(주)아트라텍
다지톨(식물성오일)	피마자오일 6% , 계피오일 6%	코스팜(주)
칼황(석회유황합제)	생석회 10% , 황 20% , 물 70%	(주)이연테크
탄저자비(미생물)	미생물( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ) 98%	(주)그린바이오텍
엔글로 (클로렐라)	클로렐라 추출액 6% , 클로렐라 배양액 94%	(주)단양클로렐라
쿠무러스(황)	유황(Sulfur) 80%	성보화학(주)
드림탑규산(규산나트륨)	규산나트륨 23.5%	(주)드림아그로
콤비황(광물질가루)	폴리할라이트 100%	(주)넬바이오텍
노팡스(미생물)	미생물	(주)한국바이오테크
생균팡(미생물)	미생물배양액( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ) 99%	(재)전남생물산업진흥원 생물방제연구센터
짜자바(식물추출물+ 식물성오일)	식물추출물(회화나무, 멀구슬나무, 양명아주) 30% , 녹나무오일 20% , 계피오일 5%	농업회사법인(주)자연과미래
광채(미생물)	미생물( <i>Bacillus tequilensis</i> ) 10%	한국삼공(주)
청정균(식물추출물)	자몽종자추출물 10%	(주)청정생물산업
해조짱짱플러스(규산나트륨+ 목초액)	규산나트륨 55% , 목초액 10%	(주)지디
랜드세이버 유제(식물성오일+ 파라핀오일)	계피오일 18% , 파라핀 오일(Paraffin oil) 3%	(주)대덕바이오
랜드세이버 입제(식물성오일+ 파라핀오일)	계피오일 5% , 파라핀 오일(Paraffin oil) 1%	(주)대덕바이오
투보르-탄(보르도액)	황산동 5% , 소석회 5%	(주)씨엠씨코리아
팡시스(황)	황 4.4%	(주)씨엠씨코리아
대유닥터황(황)	황 78%	(주)대유
슈팅탄(미생물)	미생물( <i>Bacillus velezensis</i> ) 50%	농업회사법인(주)투엠바이오(주)
안티브이(식물추출물+ 미생물추출물)	오배자추출물 80%, 효모( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )추출물 10%, 차나무추출물 10%	(주)비아이지
흙향(미생물)	미생물( <i>Streptomyces griseus</i> ) 0.003%	(주)비아이지
청고탄(미생물+ 규조토)	미생물( <i>Streptomyces griseus</i> ) 0.3% , 규조토 20%	(주)비아이지
팡키피(미생물제제)	미생물( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ) 50%	고려바이오(주)
클린필드(미생물)	미생물( <i>Burkholderia pyrocinia</i> ) 5%	고려바이오(주)
팡주거 (미생물)	미생물( <i>Bacillus amyloliquefuciens</i> ) 25%	고려바이오(주)

지하부대케이엠(지하부대KM) (미생물)	미생물( <i>Bacillus amyloliquefuciens</i> ) 50%, 미생물( <i>Pseudomonas putida</i> ) 50%	고려바이오(주)
가루사(식물추출물+ 식물성오일)	황련추출물 5% , 대두유 93%	(주)한국바이오케미칼
바이오나트룰-아이(식물성오일)	식물성오일 57%	영농조합법인 카프바이오
에코바이오황(황)	황 50%	에코바이오홀딩스(주)
바이도열골드(식물 추출물+ 파라핀유)	백리향오일 1% , 파라핀오일 20% , 에틸알콜 5%	KG케미칼(주)
논에풍 에코(규산나트륨+ 중탄산칼륨)	규산나트륨 10% , 중탄산칼륨 51%	(주)누보
팡사리(미생물)	미생물( <i>Bacillus subtilis</i> ) 25%	에이피메이트(주)
엔에프(NF) 균가라(황)	황 21%	농업회사법인(주)자연과미래
귀족바실러스플러스(미생물)	미생물 배양액( <i>Bacillus subtilis</i> ) 100%	팜누리
균바이(미생물)	미생물( <i>Bacillus subtilis</i> ) 100%	농업회사법인(주)자연과미래
진품도문(규산나트륨)	규산나트륨 23	(주)누림
참충균(식물추출물+ 식물성오일+ 파라핀오일)	회화나무, 멀구슬나무, 양명아주나무추출물 60% , 백리향오일 1.67% , 파라핀오일 15%	(주)에코윈
트리아눔-P(미생물)	미생물( <i>Trichoderma harzianum</i> ) 4%	코퍼트(주)
박스타골드(식물성오일+ 파라핀오일)	겨자유 22% , 계피유 28% , 파라핀오일 7%	(주)대덕바이오
황유(석회유황합제)	유황 5% , 생석회 0.2%	천연농업영농조합법인
활착(규산나트륨+ 규조토)	규산나트륨 25% , 규조토 75%	(주)엠제이원
듬지칸(규산나트륨)	규산나트륨 90%	(주)카프코
365(미생물)	미생물( <i>Bacillus subtilis</i> ) 100%	우진비앤지(주)
기적수화제(미생물)	미생물( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ) 50%	(주)팜한농
팡이코마수화제(미생물)	미생물 배양액( <i>Trichoderma atroviride</i> ) 10%	(주)남보
아라아라(식물추출물)	식물추출물(영롱향) 5%	(주)건영바이오
방충망(식물추출물+ 식물성오일+ 목초액)	식물추출물(회화나무, 멀구슬나무, 양명아주나무) 50% , 녹나무오일 5% , 목초액 30%	농업회사법인(주)자연과미래
참빛(식물성오일)	백리향오일 3.34%	(주)에코윈
업그레이드입제(규산나트륨)	규산나트륨 7%	(주)대덕바이오
알차니(미생물)	미생물( <i>Burkholderia pyrrocinia</i> ) 10%	네이처런스(주)
시스타 액제(규산나트륨)	규산나트륨 20%	명전바이오(주)
균격파(식물추출물+ 목초액)	정향추출물 70% , 목초액 20%	FM에그텍
균타진플러스(식물 추출물+ 식물성오일)	대황추출물 92% , 피마자오일 3%	(주)산수원
짱짱플러스(규산나트륨)	규산나트륨 7%	(주)팜한농
빅토리골드(식물추출물+ 규조토)	오배자추출물 50% , 규조토 10%	(주)비아이지
더기찬규산 입제(규산나트륨)	규산나트륨 100%	(주)코시플러스
그린도보젠(규산나트륨)	규산나트륨 52.2%	(주)오더스
코시액제(규산나트륨)	규산나트륨 20%	코시팜스
논에풍(규산나트륨)	규산나트륨 26% , 중탄산칼륨 35%	(주)누보

표 2. 국내 미생물유래 유기농업자재의 특성

허용물질	토양개량용 및 작물생육용 자재			병해충관리용 자재			Total
	SA	CF	SACF	CDC	CPC	CPDC	
미생물	1	17	140	22	10	31	221
미생물추출물		2	4	2	2	2	12
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>19</b>	<b>144</b>	<b>24</b>	<b>12</b>	<b>33</b>	<b>233</b>

SA, 토양개량용 자재; CF, 작물생육용 자재; SACF, 토양개량 및 작물생육용 자재; CDC, 병해충관리용 자재; CPC, 병해충관리용 자재; CPDC, 병해충관리용 자재

표 3. 국내 천연식물보호제의 등록 현황(2014년도 기준)

(2014년 12월말 기준)

연번	용도	제조수입	취급분야	품목명	유효성분 함유량
1	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스디비바501 수화제	1.0×10 <sup>8</sup> cfu/g
2	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스디비바501 입제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
3	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스제이아9 액상현탁제	1.0×10 <sup>7</sup> cfu/ml
4	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스알27 고상제	2×10 <sup>8</sup> cfu/g
5	살균	수입	미생물	바실루스사브딜리스알비아1600 수화제	2×10 <sup>7</sup> cfu/g
6	살균	수입	미생물	바실루스사브딜리스알비아335 수화제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
7	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스아더블유42-1 액상현탁제	1.0×10 <sup>7</sup> cfu/ml
8	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스지이케이케이238 액상제	5.0×10 <sup>7</sup> cfu/ml
9	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스지비366 수화제	3.0×10 <sup>7</sup> cfu/g
10	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스지비366 액상수화제	1.0×10 <sup>7</sup> cfu/ml
11	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스케이비비401 유상현탁제	2.0×10 <sup>7</sup> cfu/ml
12	살균	제조	미생물	바실루스사브딜리스케이비비401 수화제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
13	살균	수입	미생물	바실루스사브딜리스큐에스티73 수화제	5×10 <sup>8</sup> cfu/g
14	살균	수입	미생물	바실루스사브딜리스큐에스티73 액상수화제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
15	살균	제조	미생물	바실루스아일드리쿠마신스케이비비21 수화제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
16	살균	수입	미생물	바실루스푸일무스큐메스타2008 액상수화제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
17	살균	제조	미생물	스플라닐라클라엘리콜라비비미 수화제	5.0×10 <sup>7</sup> cfu/g
18	살균	제조	미생물	암필로마이세스쿠스칼리세이류94013 수화제	1.0×10 <sup>7</sup> cfu/g
19	살균	수입	미생물	트리코데아이드로비라이드메스케이티-1 수화제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
20	살균	제조	미생물	트리코데아이드로비라이드469 고상제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
21	살균	제조	미생물	짜니바실루스폴리익시제이아-1 액상수화제	5×10 <sup>8</sup> cfu/ml
22	살균	제조	미생물	모나크로스포움타우마슬케이비비3017 고상제	1.0×10 <sup>7</sup> cfu/g
23	살균	수입	미생물	뷰베리아바사아나지메이케이이 유상현탁제	1.0×10 <sup>8</sup> cfu/ml
24	살균	수입	미생물	뷰베리아바사아나티비아어-1 액상제	1.0×10 <sup>8</sup> cfu/ml
25	살균	수입	미생물	비티아이지오이 액상수화제	858IU/kg
26	살균	수입	미생물	비티아이지오이 입상수화제	35,000BIU/mg
27	살균	제조	미생물	비티아이지오이현탁제3 수화제	1×10 <sup>8</sup> cfu/g
28	살균	제조	미생물	비티아이지오이현탁제3 액상수화제	1×10 <sup>8</sup> cfu/ml
29	살균	제조	미생물	비티아이지오이제비43 액상수화제	1×10 <sup>7</sup> cfu/ml
30	살균	제조	미생물	비티쿠로스타키 수화제	168IU/kg
31	살균	수입	미생물	비티쿠로스타키 액상수화제	10%
32	살균	수입	미생물	비티쿠로스타키 입상수화제	648IU/kg
33	살균	수입	생화학	아자디락틴 입제	0.15%
34	살균	제조	미생물	패일로마이세스푸모스르세루스티비비-2032 수화제	5.0×10 <sup>7</sup> cfu/g
35	제조	수입	생화학	셀라로곤산 유제	53%

자료: 농촌진흥청(2014.12)

② 해외 경쟁기업 현황

- ㉞ 천연 식물보호제산업은 앞으로 급성장을 기대할 수 있는 유망한 사업분야로, 듀폰 (Dupont Pioneer), 다우 (Dow AgroSciences), 바이엘 (Bayer Cropscience), 바스프 (BASF)등 세계 굴지의 농화학기업들이 유망한 천연식물보호제 생산 회사들을 인수하는등 천연식물보호제 분야에 대한 높은 관심을 나타내고 있다.
- ㉟ BASF사는 미국 생물농약 회사인 Becker Underwood사를 인수하여 *Bacillus amyloliquetaciens* 주성분의 “SERIFEL” 상품을 2015년 북미 시장에 출시하였다.
- ㊱ Bayel사의 AgraQuest사와 Prophytat, Pasteuria Bioscience사를 인수하여 20종의 Biological 제품 브랜드를 선보였으며 대표적인 제품으로는 *Basillus subtilis* 주성분의 “Serenade”( AgraQuest사 제품), *Bacillus firmus*와 *clothiadin*을 주성분으로 하는 “Votivo”제품을 전면적으로 마케팅 하고 있다.
- ㊲ 물론 이 제품들은 대부분 지상부 병해 방제제로서 유통을 시작 하였으나 점차 토양전염성 병해 방제제로 영역을 확장해 나갈 것이다.
- ㊳ 현재까지 조사된 해외 농산물 주요 생산국가들로의 수출시장 진출을 위한 사전 조사로서 우선 진출국으로 선정된 인도, 중국, 터키 등의 나라들에 대한 시장 상황은 아래 표와 같다.

표 4. 해외 국가별 천연식물보호제의 시장 상황

국가	시장 상황
인도	인도전체 산업의 60~70%가 농업에 의존, 특히 수출농산물 및 인도 최대 수출작물인 차작물의 친환경 재배지역 확대에 따른 급격한 친환경농자재 시장 요구 급증
중국	중국 정부의 계획농업정책이 점차 저농약 고품질 재배정책으로 방향 선회, 추후 수출작물의 친환경 시장보다 중국내 고속 경제성장에 따른 중국 국내의 친환경 농산물 시장 확대로 중국 내수 친환경농산물 생산 시장 조기 진입으로 실수요 발생시기에 우점적 판매 지휘 확보 가능
터키	인접 유럽으로의 농산물 수출이 주요, EU연합국들의 수입농산물에 대한 허용금지농약 강화, 친환경 유기농자재에 대한 제품 수요 날로 증가, 전시회 참가를 통한 터키 바이어들의 관심도 확인
대만	이미 국민경제적지위가 향상되어 한국보다 친환경농산물에 대한 요구도 많음, 주로 내수시장 공략용 제품수요로, 판매량 급성장은 기대하기 어려우나 기존 형성된 시장 잡식이 가능하다.
요르단, 시리아, 에덴	중동지역의 관개시설 농업형태로 많은 토양 병해 및 병해충 발생, 주로 인근 국가로의 수출작물에 대한 농약규제 강화로 친환경 농자재 수요 점진적 증가
사우디아라비아	중동국가중 가장 많은 농업시장을 가지고 있으며, 유기농업이 차지하는 분야는 적으나 오래된 관개시설 농업으로 토양 병해충 심각, 화학방제의 한계를 스스로 극복하고자 미생물 및 천연물 자재에 대한 선호도 급증
말레이시아	유기농업이 가장 활성화된 분야는 쌀, 팜유 시장임, 오래된 화학비료 및 화학농약사용으로 제품 고유의 효과 발현미비로 생산된 농산물의 품질 및 수량저하, 근본적인 대책으로 토양 복원에 대한 제품 선호도 높음. 더불어 친환경 방제제에 대한 요구도 동반 상승되고 있음.
브라질	남미국가중 최대의 농업면적을 가지고 있고 많은 다국적 기업 진출, 7년전부터 중국으로부터 생물농약 수입 최대국으로 등극, 현재 유통중인 친환경 방제제의 한계 인식, 새로운 제품에 관심이 많음.
칠레	수출농산물이 많은 나라로, 마찬가지로 저농약, 무잔류 농산물 생산이 대표적 트렌드, 친환경 방제제 제품들의 아웃소싱이 늘어나고 있음.
스페인	브라질과 더불어 최대의 친환경 유기농업시장 가지고 있음.

표 5. 미국의 미생물유래 유기농업자재의 특성

허용물질	CS	CP	CT	Total
미생물	51	192	54	297
미생물추출물	81	51	31	163
바이러스		6		6
<b>Total</b>	<b>132</b>	<b>249</b>	<b>85</b>	<b>499</b>

CS, 작물비료 및 토양개량용 자재; CP, 작물 병해충 및 잡초제어용 자재; CT, 작물관리도구 및 생산보조제 자재

표 6. 해외 국가별 생물농약 개발 회사 및 주요 생산품목의 특징

분류	나라명	대표회사	주요 품목	특징
후진국	중국	Baicao Kinbo	식물성 살충농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 효력증진위하여 화학농약 일부 검출 : 중국 제품에 대한 신뢰도 저하</li> <li>* 제품의 안정적 효과 유지성 저하</li> <li>* 상당한 가격 경쟁력은 있으나 위의 기술된 문제점 있음</li> </ul>
	인도	Agri life	미생물 농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 적용 병해충에 대한 효과 미비</li> <li>* 제제 안정성기술 부족으로 제품안정성 유지 어려움</li> <li>* 가격 고가</li> </ul>
		Nico Agro	Neem base 식물성 농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Neem base 단일 성분 제형으로 방제 해충에 한계</li> <li>* 제제화 기술 미비로 주요성분 효과 발현 미비</li> <li>* 중국 제품에 비하여 가격 고가</li> </ul>
	스페인	SEIPASA	식물성 농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 수입완제품 원료 기초한 제품 제조 생산으로 제품 품질 안정성 미비</li> <li>* 유럽시장 적용 제품으로 가격이 매우 고가임</li> <li>* 제품별 해당 병해충 방제력 미비</li> </ul>
	우크라이나	BIONA	미생물 농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 자체 기술 미비로 대부분 수입원료 재포장 수준</li> <li>* 제제 안정성 및 효과 안정성 미비</li> <li>* 중국 제품에 비하여 가격 고가</li> </ul>
분류	나라명	대표회사	주요 품목	특징
선진국	미국	AgraQuest	미생물 농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 제제 안정성 우수</li> <li>* 제품별 적용 해충 병해충 범위가 협소</li> <li>* 제품 가격 고가</li> <li>* 늦은 효과 발현시기로 처리효과 미비</li> </ul>
	핀란드	Verdera		
	벨기에	Biobest		
	UK	Russel IPM	성페로몬 트랩	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 적용해충 범위 한계</li> <li>* 낮은 방제효과</li> <li>* 초기투자비용 과다, 비용대비 방제효과 미비</li> </ul>
	독일	Abitep GmbH	미생물 농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 미생물농약 원제배양 업체로서 원료공급(바이엘사)</li> <li>* 제품 공급가 고가</li> </ul>
		e-Nema	천적(선충)	
	영국	Beckr Underwood	천적 (선충)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 제품의 유통기한 2개월, 냉장유통 필요</li> <li>* 적용 해충 분야 극히 제한적임</li> <li>* 고가</li> </ul>
	스위스	BioControl	곤충 바이러스 살충제	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 적용 해충분야 제한적임.</li> <li>* 방제효과 발현 지연으로 투자비용대비 효과 미비</li> <li>* 고가 제품</li> <li>* 짧은 유통기한</li> </ul>
Andermatt				

(나) 경쟁구조

- ① 다국적 대기업의 전세계 진출 대륙별 거점국가를 선정한 후 거점국가에서의 생물 농약 등록을 진행하고 있으며 글로벌 마케팅 네트워크를 이용한 시장확대 준비에 박차를 가하고 있으며 등록 완료된 제품의 경우 판매가 진행되고 있다.
- ② 유럽기준을 따라야만 하는 수출농산물 생산 국가로의 진출을 위해서는 국제유기농업자재 인증획득이 필수 사항이며, 국내 중소기업 및 벤처기업의 우수한 제품도 해외규격인증을 획득하고 점진적 거점국가 네트워크 구축을 진행한다면 경쟁 대열에 당당히 참여할 수 있는 구조이다.

(2) 시장진입 장벽

(가) 제품화 및 산업화 연관 기술력 취약

(나) 상업화 전략 취약

(다) 농민에 대한 기술보급 미흡 (예방적 방제 개념 투입 어려움)

(라) 대량생산의 고비용 투입, 다소 높은 시장 가격 형성

(마) 천연물 주성분 생물농약의 화학농약 완전한 대체제로 미흡

(바) 국내시장의 경우 고효율화, 저가화, 안정성 확보, 고신뢰성 확보 모두 만족할만한 제품의 요구

(사) 국제 인증 조건에 맞는 친환경 농자재 개발에 필요한 시험 등록

(아) 수출국가의 생물 농약 등록 기준에 따라 정식등록 후 정상적 판매 제도 진입 가능

라. 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

(가) 본 연구개발을 통해 개발된 인삼뿌리썩음병 방제기술과 방제용 미생물 원료 기반 제품의 주요고객은 인삼 재배 농업인으로 인삼을 재배하는데 난방제 문제병해인 뿌리썩음병 관리와 방제에 활용될 것으로 사료되며, 개발 제품의 수요가 예상되는 인삼 주산단지 지역의 농자재마트, 농협농자재백화점, 농약판매점 등의 수요처가 주요 고객이 될 것으로 예상된다.

(나) 해외 고객 확보로 2015년부터 2017년 현재까지 중국, 인도, 태국, 터키, 사우디아라비아, 인도네시아 총 6개국 농업전시회 참가하여 발굴한 유력 바이어 및 잠재바이어들의 요구 품목에 해당됨으로 적극적 사전 제품 개발을 홍보할 계획임.

(2) BM의 수익창출 방안

(가) 전국 지역농협과 중앙회를 대상으로 판매망을 구축하고 이를 활용하여 제품시장 진입 및 홍보, 마케팅, 현장 시연회 등을 통해 판매가 용이할 것으로 판단

(나) 전국 시군보조사업 참여를 통해 인삼재배지, 예정지 등에 인삼뿌리썩음병 관리와 방제를 위해 개발 제품을 판매 공급할 예정이며, 제품 수요처와 소비자들에게 당사 홈페이지와 제품기술정보집을 활용하여 제품에 대한 정보를 제공하고 인삼재배 농가, 단체, 기관 등에 기술설명회 워크숍을 개최하고 기관 홍보와 언론(신문, 방송) 등을 활용하여 홍보함으로써 수익창출을 기대할 수 있다.

(다) 개발 완료 후 발굴 유력바이어들을 통한 수출 아이템 선택의 기회 제공으로 수출 증대



(라) 해외 수출 진행 준비 사항

- ① 해외시장 진출을 위한 준비도
- ② 해외 무역 관련 실무 교육 이수

2016.03.01	민간 사이버 FTA 과정 수료	관세국경관리연수원
2009.10.16	무역실무과정 2기 수료	(사)한국농업CEO연합회
2008.10.29	제2기 전자무역 과정 수료	KOTRA 아카데미
2008.10.28	제2기 해외전시 마케팅 과정 수료	KOTRA 아카데미
③ 2007.11.09	무역서신영어실무강좌 수료	화성상공회의소

④ 해외 전시회 참가, 수출 마케팅, 국가별 바이어 확보 활동 수행

전시회 참가 및 수출 마케팅 활동 국가(2015~2016년)	
- 아시아 :	중국, 태국, 베트남, 인도네시아, 말레이시아, 인도, 러시아
- 중동, 아프리카 :	사우디, 아랍에미레이트, 모로코, 이집트
- 유럽 :	터키
- 해당 국가별 잠재 바이어 및 유력 바이오 리스트 확보(20개국 120개사)	

⑤ 해외 수출 거래처 확보 및 진행사항

나라	거래처	비즈니스형태	진행사항
인도	Indochina Enterprise Makam agro chemical 외 3개사	<b>B to B</b>	수출 진행 중 및 샘플 테스트
말레이시아	Venture More사 JPB Asia pacific사		수출 진행 및 샘플 테스트
인도네시아	PT SANDANA		샘플 테스트 완료, 시험오더 진행 협의중
태국	Kannika Ltd		수출 위한 등록 업무 진행중
스페인	AGROLAC, S.A		등록관련 정보 교류 중
이집트	Shohora chemical		수출제품 성능 조율 중

⑥ 해외 농자제 분야 유사전시회 참가 실적 현황(2015 ~ 2016년도)

○ 2016년 총 4회 3개국 국제농업전시회 부스 참가

- 성과 : 신규 유통업체 13업체 발굴, 상담 111건 진행, 수출액 86,843 달러



중국 상해 CAC 작물보호박람회 (2016.03.09~11)



인도 Agritech India Expo (2016.08.24~30)



사우디아라비아 국제농업박람회 (2016.09.30~10.05)



중국 양림농업고신과학기술성과 박람회 (2016.11.05~09)

○ 2015년 총 4회 4개국 국제농업전시회 부스 참가

- 성과 : 신규 유통업체 11업체 발굴, 상담 102건 진행, 수출액 101,554 달러



< 중국 상해 CAC 작물보호박람회, 2015.03.09~11 >



< 인도네시아 IFT (International Farming Technology Expo), 2015.10.15~17 >



< 태국 방콕 Horti Asia, 2015.03.17~19 >



< 터키 Growtech Eurasia, 2015.12.2~5 >

⑦ 전시회 참가 사전 홍보 바이어 유치활동 준비

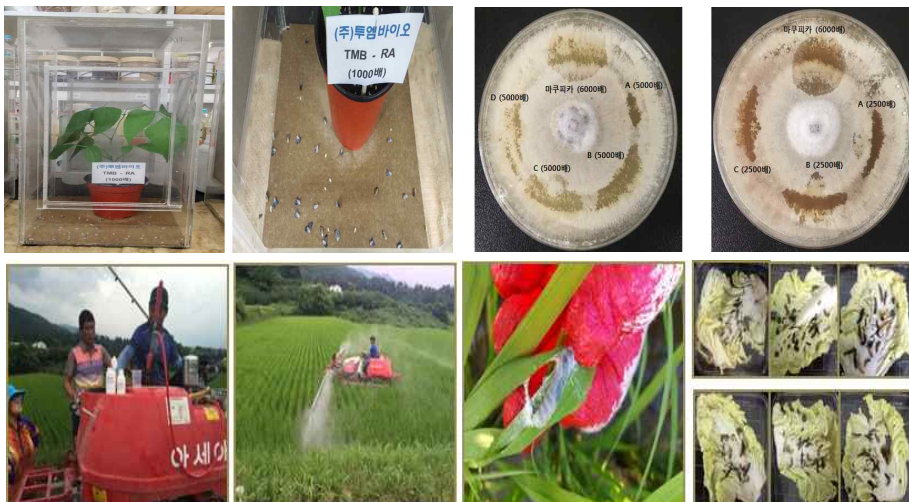
- ㉠ 기 확보 잠재바이어, 유력바이어 20개국 150여 업체 사전 접촉 진행 중
- ㉡ 부스 초청 미팅 제안 이메일 발송(참가 전시회명, 참가기간 등)
- ㉢ 전시 예정 상품 및 기술자료 메일 발송(영문 홈페이지 및 제품 카달로그 등)



⑧ 전시회 마케팅 차별화 전략 : 현장 프로모션 활동 추진

○ 전시회 기간 부스 내 수출 마케팅 및 바이어 발굴 활동 진행

- 고객 유치 및 홍보 : 제품 카달로그 및 홍보물 배포로 전시회 참관 고객 유치
- 바이어 및 유통업체 발굴 : 제품 기술 미팅, 상담을 통한 수출 거래라인 확보
- 마케팅 홍보 전략 : 특허기술 신상품, 수출 유력 제품, 요구 제품별 기술 마케팅 시, 약효 발현 실증 데이터 자료, 사진, 영상 중심 상담 진행



- ⑨ 전시회 종료 후 현지 비즈니스 파트너와 기술 협력 활동 진행
- 비즈니스 파트너사, 유통업체, 바이어 요구 기술 및 상품 파악
  - 현장 방문 문제 진단, 해결 방안 기술 교류, 당사 관련 제품 컨설팅 추진

< 인도, 말레이시아 현방 방문 기술협력 활동 사례 >



- ⑩ 비즈니스 파트너사 방문을 통한 제품 적용 기술 설명 및 수출 계약 협의 진행

- 바이어 요구 제품 기술 교류 협력
- 현지 현장 제품 테스트 시험포 진행 협의 : 3개국 진행 중 (인도네시아, 중국, 인도)
- 수출 제품별 성능 및 가격 조율
- 국가별 등록 관련 필요 정보 공유
- 수출 위한 등록 서류 업무 진행 : 영문서류 및 성적서 준비



< 말레이시아 기술상담 사례 >

### 제 3절 재배적지 및 병원체 진단을 위한 진단센터 운영

#### 1. 설립 배경

- 가. 인삼은 삼국시대 이후 한민족 최고의 특산품임
- 나. 인삼 재배의 가장 어려운 문제점은 초작지 부족, 질소성분함량이 높은 축분의 사용, 다비성 작물 재배확대 등으로 인삼재배에 알맞은 논밭이 부족함
- 다. 초작지보다 재(연)작 시 인삼뿌리썩음병 발병이 심해 생산량과 품질이 낮아 안정적인 원료인삼 조달이 어려움
- 라. 인삼산업의 안정화가 이루어지기 위해서는 무엇보다 안정적인 인삼포지 확보 시급

#### 2. 설립 내용

- 가. 인삼 재배적지 진단 서비스 센터 설립
  - (1) 설치장소 : 1안)경기도농업기술원 소득자원연구소, 2안)㈜투엠바이오
  - (2) 진단규모 : 연간 5,000점 ※ 점당 3.3a
  - (3) 대상지역 : 전국 농협계약재배농가 165ha
  - (4) 진단기준 :
    - (가) *C. destructans*의 밀도  $10^1$  이상인 필지 배제
    - (나) *C. destructans*의 밀도  $10^0$  이하의 필지는 토양화학적 특성 중 pH, OM, EC,  $Av.P_2O_5$ , 질산태-N 등 관리방법 제시

(5) 인삼 재배적지 진단 서비스 센터 예상 운영예산 건의

(가) 분석인건비 : 인삼뿌리썩음병 분석요원 4명, 토양분석(시군센터 자료활용)

(나) 분석에 따른 재료비 지원 건의

① 단체별 지원비율(%) 지자체 30(경상사업비 확보), 시군 20, 농협 20, 농가 30

② 단체별 지원액(천원) : 지자체 76,153, 시군 50,769, 농협 50,769, 농가 76,153

\* 1,000m<sup>2</sup> 분석비용(9점/1,000m<sup>2</sup>) : 253,845원

\* 토양분리키트 : 495,000원/박스(20점), 프라이머 : 544,000원/50점

토양분리키트 : 24,750원/점, 프라이머 : 10,880원/점

산출내역(1,000m<sup>2</sup>) : (17,325원/점×9점)+(10,880원/점× 점)

=155,925원+97,920원=253,845

\* 토양분리키트 : (주)코젠바이오텍과 공동개발제품으로 소비자가의 70%에 공급하기로 협의

3. 연구결과

가. 인삼뿌리썩음병 발병 밀도 구명

병원균밀도(cfu/g)	투침여부		건전엽율	발병지수
8.8 x 10 <sup>2</sup>	부	평균	0.0	9.0
		표준편차	0.0	0.0
2.5 x 10 <sup>1</sup>	부	평균±표준편차	32.0±10.4	8.1±0.2
		표준편차		
	여	평균	41.0±16.4	7.9±0.2
		표준편차		
5.1 x 10 <sup>0</sup>	부	평균	85.0±8.7	3.7±0.8
		표준편차		
	여	평균	86.0±6.5	4.2±0.3
		표준편차		
10 <sup>-1</sup>	부	평균	98.0±2.7	2.5±0.6
		표준편차		
	여	평균	92.0±5.7	3.7±0.5
		표준편차		

나. 길항미생물 제품의 인삼뿌리썩음병 방병 억제 효과

처리내용	발병도	
	3.8×10 <sup>1</sup> cfu/g	1.8×10 <sup>2</sup> fu/g
T1	4.4	5.9
T2	4.9	7.4
T3	3.5	6.2
T4	3.7	6.5
T5	3.7	6.9
T6	4.2	6.2
T7	2.8	6.5
T8	2.4	7.0
T9	4.9	7.3
T10	2.7	2.4

다. 인삼 발 토양 내 인삼뿌리썩음병 원인균 밀도 분포

	nd	10의 0승	10의 1승	10의 2승	총 필지수
농가	178	19	3	0	200
예정지	26	4	0	0	30

라. 장비 지원 내역

번호	장비명	규격	수량	단가 (천원)	소요예산 (천원)	비고
1	real time PCR 장비	Quantstudio 5	1	65,000	65,000	
2	Tissue lyser	TissueLyserII	4	15,000	60,000	
3	원심분리기	minispin	2	2,500	5,000	
4	원심분리기	centrifuge 5810	4	40,000	160,000	20,000rpm
5	ice maker	BM.GB902	1	4,200	4,200	
6	부대품(파이펫)	0.01, 0.2 1.0, 5.0, 10ml	3조	1,000	4,000	
	계				298,200	

마. 보급사업 지원 시 경제적이 효과 및 근거 제시

- (1) 인삼 재배적지 부족에 따른 무분별한 예정지 선택으로 인한 피해 감소 · 6년근 인삼 수량 증대(kg) : 현재) 431(2.3차/칸) → 사업 후) 750(4.0차/칸) · 조수익 증대효과(천원/1000m<sup>2</sup>) : 현재) 16,819 → 사업 후) 29,250(≒74% 증)
- (2) 인삼 재배적지 진단 대농민 서비스에 따른 인삼농가 정예화 가능사업대상 : 2017년 신규면적 2,977ha 중 농협계약 165ha(5.5%)소득 증대효과 : 124,310천원/ha × 165ha = 20,511,150천원정예화에 따른 신규 재배면적 감소(ha) : 현재) 2,977 → 사업 후) 2,000(≒33% 감소)

#### 4. 파급효과

가. 기술적 효과

- (1) 인삼 재배적지 진단 대농민 서비스 실시로 인한 수량성 증대 6년근 인삼 수량 증대 (kg) : 현재) 431(2.3차/칸) → 사업 후) 750(4.0차/칸)
- (2) 진단서비스 제공에 따른 재배상 문제점 파악으로 재배기술 개선 촉진
- (3) 인삼 재배적지 진단 및 토양복원 기술 개발로 정착형 인삼재배로 전환
- (4) 정착형 인삼재배로 전환에 따른 ICT 기반농업 활성화

나. 경제적 효과

- (1) 인삼 재배적지 진단서비스 제공에 따른 생산성 증대로 조수익 증대  
(가) 조수익 증대효과(천원/1000m<sup>2</sup>) : 현재) 16,819 → 사업 후) 29,250(≒74% 증)
- (2) 농가소득 안정화에 따른 전문농업인 증가로 규모화  
(가) 평균 경작면적 : 현재) 6,989m<sup>2</sup> → 사업 후) 15,000m<sup>2</sup>

다. 사회적 효과

- (1) 재배적지에서 인삼 재배로 안전한 인삼 생산에 따른 소비자와의 신뢰 개선작물보호제 사용횟수 감소(횟수) : 현재) 12회 전후 → 사업후) 유기농자제로 전환

5. 참고자료

가. 인삼뿌리썩음병원균 밀도진단(Real time PCR)

(1) 전처리과정

단계	처리내용
1	인삼밭에서 330㎡단위로 10지점 정도 토양시료 채취
2	토양 시료건조
3	토양시료를 골고루 섞은 후 5g 채취하여 비드가 들어있는 튜브에 넣는다
4	튜브에 buffer A 2ml와 Buffer B 10ml를 넣은 후 Tissue lyser 30Hz/s로 10분간 분리
5	원심분리기 2,500rpm에서 5분간 원심분리
6	Buffer C 1ml를 넣은 후 4℃에서 1분간 방치
7	원심분리기 2,500rpm에서 5분간 원심분리
8	상등액 0.7ml를 취한 후 chloroform 0.65ml를 넣은 후 Vortex mixer로 30초간 혼화
9	15000G에서 10분간 원심분리
10	상등액을 전량 취한 후 chloroform 0.65ml를 넣은 후
11	15000G에서 10분간 원심분리
12	상등액 0.4ml를 취한 후 Binding Buffer 0.8ml를 넣은 후
13	1.2ml중 0.6ml를 취하여 Binding column에 넣고 15000G에서 1분간 원심분리
14	여과액은 버리고 다시 0.6ml를 Binding column에 넣고 15000G에서 1분간 원심분리
15	모아진 Binding column에 부착된 DNA를 에탄올 70%로 세척
16	15,000G에서 3분간 원심분리
17	Elution buffer 0.1ml를 넣고 1분간 방치
18	8000G에서 3분간 원심분리 Binding column을 제거
19	RT-PCR 분석



병원균 분리

핵산추출(DNA)

PCR 시료혼합

PCR 분석

그림 1. 인삼뿌리썩음병원균 밀도진단 주요과정

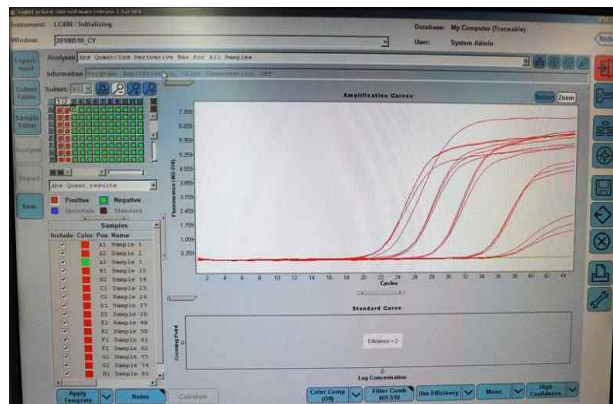


그림 2. 인삼뿌리썩음병원균 밀도 PCR 분석



개발된 토양 내 병원균 DNA추출 키트 개발



인삼뿌리썩음병원균 2종 동시진단 프라이머

그림 3. 현재 인삼뿌리썩음병 진단에 사용되는 진단키트

## 붙임. 참고문헌

- Ahn YJ, Kim HJ, Ohh SH and Choi SY. (1982). Effect of soil fumigation on growth, root rot, and red discoloration of *Panax ginseng* in replanted soils. Korean J. Ginseng Sci. 6(1) : 46-55.
- Ali, A. and F. Alqurainy. (2006). Activities of antioxidants in plants under environmental stress. In: Motohashi N (ed) The lutein-prevention and treatment for diseases. Transworld Research Network, India, pp 187 - 256.
- Ana C, Johannes ZG, Cecilia R, Helena O, Pedro WC. (2011). *Cylindrocarpon* root rot : Multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. Mycol Progress. 11(3) : 655-688.
- Bodah ET. (2017). Root rot disease in plants : A review of common causal agents and management strategies. Agri Res & Tech. 5(3) : 1-8.
- Bojórquez-Quintal, E., C. Escalante-Magaña, I. Echevarría-Machado and M. Martínez-Estévez. (2017). Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. Front Plant Sci. 8: 1767.
- Booth, C. 1959. Studies of pyrenomycetes. IV. Nectria (part 1). Myc Papers. 73: 1-115.
- Booth, C. 1966. The genus *Cylindrocarpon*. The Commonwealth Mycological Institute. Myc Papers.
- Booth, C. 1967. *Nectria radicola*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. 148: 1-2.
- Brayford, D. and G.J. Samuels. 1993. Some didymosporous species of *Nectria* with nonmicroconidial *Cylindrocarpon* anamorphs. Mycologia: 612-637.
- Brayford, D., B.M. Honda, F.R. Mantiri and G.J. Samuels. 2004. *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia. Mycologia. 96: 572-597.
- Brian H. (2004). Rusty root. UW-Madison plant pathology. Revised Apr. 25.
- Broekgaarden, C., L. Caarls, I.A. Vos, C.M. Pieterse and S.C. Van Wees. 2015. Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense. Plant Physiol. 169 (4):2371-2379.
- Cabral, A., J.Z. Groenewald, C. Rego, H. Oliveira and P.W. Crous. 2012a. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. Mycol Res. 11: 655-688.



- Cai J, Yu XS, Liu JJ and Ekramoddoullah AKM. (2001). Protein profile analyses of healthy and root rot disease infected pseudo-ginseng (*Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng*) roots. Promoting global innovation of agricultural science and technology and sustainable agriculture development. Session 4 : Ari-biotechnology Proceeding : 200-204.
- Catherine C, Lynne CB, Stewart H and Nabil K. (2010). Detection and Control of *Fusarium oxysporum* and *C. destructans* in Forest Nursery soils. USDA Forest Proceeding, RMRS-P-62. 32-34.
- Chaverri, P., C. Salgado, Y. Hirooka, A. Rossman and G. Samuels. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. Stud Mycol. 68: 57-78.
- Chen, L.Q. 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. New Phytol. 2014 (4):1150-1155.
- Cheon SR and Kim HJ. (1990). Comparison of resistance of root-rot caused by *Fusarium solani* in Ginseng Breeding Lines. Korean J. Ginseng Sci. 14(1) : 50-56.
- Cho DH and Yu YH. (2000). Effect of ultrasonic treatment on the isolation of the chlamydospores of *C. destructans* causing root rot of panax ginseng. J. Ginseng Res. 24(2) : 53-57.
- Cho DH and Yu YH. (2001). Effect of incubation temperature and pH on chlamydospores hermination of *C. destructans* causing root rot of *Panax ginseng*. J. Ginseng Res. 25(3) : 136-140.
- Cho DH, Park KJ, Yu YH, Ohh SH and Lee HJ. (1995). Root-Rot Development of 2-Year old ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) caused by *C. destructans* (Zinssm.) Scholten in the continuous cultivation field. Korean J. Ginseng Sci. 19(2) : 175-180.
- Cho DH, Yu YH and Kim YH. (2003). Morphological characteristics of chlamydospores of *C. destructans* causing root-rot of panax ginseng. J. Ginseng Res. 27(4) : 195-201.
- Christopher AD, Kim SJ, Kwon SW and Alejandro PR. (2015). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum and 'Bacillus oryzicola' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66, 1212 - 1217.
- Chung YR, Chung HS and Ohh SH. (1981). Antagonistic effects of *Streptomyces* species against *Fusarium solani* causing Ginseng root rot. Kor. J. Mycol. 9(3) : 163.
- Chung YR, Kim HJ, Ohh SH and Lee IH. (1983). Properties of suppressive and

- Conductive soils to ginseng root rot. Korean J. Plant Prot. 22(3) : 203-207.
- Chung YR, Kim HJ, Ohh SH and Park KJ. (1984). Comparison of Rhizosphere Environments in Soils Suppressive and Conductive to Ginseng Root Rot. Korean J. Plant Prot. 23(3) : 142-146.
- Chung YR, Ohh SH and Chung HS. (1989). Antagonistic activity of *Streptomyces* species against *Fusarium solani* causing ginseng root rot. Kor. J. Microbiol. 27(1) : 56-62.
- Crous, P., C. Schoch, K. Hyde, A. Wood, C. Gueidan, G. De Hoog and J. Groenewald. 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. Stud mycol. 64: 17-47.
- Crous, P.W., B. Slippers, M.J. Wingfield, J. Rheeder, W.F. Marasas, A.J. Philips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber and J.Z. Groenewald. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Stud mycol. 55: 235-253.
- Cui H., K. Tsuda, J.E. Parker.(2015) Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. Annu Rev Plant Biol. 2015;66:487-511
- de Oliveira, J.G., J. Cambraia, C. Ribeiro, J.A. de Oliveira, S.O. de Paula and M.A. Oliva. (2013). Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora* L. plants. Acta Physiol Plant. 35: 1645-1657.
- Dodds, P.N. and J.P. Rathjen. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant - pathogen interactions. Nat. Rev. Genet.11 (8):539-548.
- Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW and Rooney AP. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens* : *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and *Bacillus oryzicola* are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66 : 1212-1217.
- Egamberdieva, D., L. Gafurova and K. R. Islam. (2007). Salinity effects on irrigated soil chemical and biological properties in the Syr Darya basin of Uzbekistan. In: Lal, R., M. Sulaimanov, B. Stewart, D. Hansen and P. Doraiswamy. (eds) Climate change and terrestrial C sequestration in central Asia. Taylor-Francis, New York, pp 147 - 162.
- Entwicklungsgänge, A.Z.G. and P. Pilze.1913. Ramularia, Mycosphaerella, Nectria, Calonectria. Phytopathology. 3: 197.
- Eo J, Hong SC, Kim MH, Choi SK, Kim MK, Jang IB and So KH. (2016). Response of soil chemical properties and microbiota to elevated temperature under flooded conditions. Korean J. Environ Agric. 35(1) : 32-38.
- Eo J, Park KC and Yeon BR. (2011). Changes in soil biota affected by the application of

- organic materials in reclaimed upland and paddy-converted soils cultivated with Korea ginseng. Korean J. Soil Sci. Fert. 44(5) : 872–877.
- Eo J, Park KC, Lee SW, Bae YS and Yeon BR. (2010). Effects of organic materials on soil organism in a Korean ginseng field. Korean J. Soil Sci. Fert. 43(2) : 188–193.
- Eo J, Park KC, Park JM, Kim MH, Choi SK and Bang HS. (2016). Effect of continuous use of inorganic fertilizer on the soil organism and food chain. Korean J Environ Agric. 35(1) : 39–45.
- Epstein, E. 1999. Silicon. Annu. Rev. Plant Biol. 50 (1):641–664.
- Epstein, E. 2009. Silicon: its manifold roles in plants. Ann Appl Biol. 155 (2):155–160.
- Ezaki, B., M. Suzuki, H. Motoda, M. Kawamura, S. Nakashima and H. Matsumoto. (2004). Mechanism of gene expression of Arabidopsis glutathione S-transferase, AtGST1, and AtGST11 in response to aluminum stress. Plant Physiol. 134: 1672–1682.
- Farh, M.E.A., Y.J. Kim, H. Van An, J. Sukweenadhi, P. Singh, M.A. Huq and D.C. Yang. (2015). Burkholderia ginsengiterrae sp. nov. and Burkholderia panaciterrae sp. nov., antagonistic bacteria against root rot pathogen C. destructans, isolated from ginseng soil. Arch Microbiol. 197: 439–447.
- Farh, M.E.A., Y.J. Kim, J. Sukweenadhi, P. Singh and D.C. Yang. (2017). Aluminium resistant, plant growth promoting bacteria induce overexpression of Aluminium stress related genes in Arabidopsis thaliana and increase the ginseng tolerance against Aluminium stress. Microbiol Res. 200: 45–52.
- Fath MEA, Kim YJ, Kim YJ and Yang DC. (2018). *C. destructans/Ilyonectria radicola*-species complex : Causative agent of ginseng root-rot disease and rusty symptoms. J. Ginseng Res. 42(1) : 9–15.
- Fauteux, F., F. Chain, F. Belzile, J.G. Menzies and R.R. Bélanger. 2006. The protective role of silicon in the Arabidopsis - powdery mildew pathosystem. Proc. Natl. Acad. Sci. 103 (46):17554–17559.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution: 783–791.
- Forchetti, G., O. Masciarelli, S. Alemano, D. Alvarez and G. Abdala. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. Appl Microbiol Biotechnol. 76: 1145–1152.
- Fu J, Sun J, Zhou R and Yan X. (2012). Molecular detection of *C. destructans* in infected

- Chinese ginseng roots and soil. *Africa Journal of Biotechnology*. Plant pathol. J. 30(4) : 432-436.
- Gao, Y., X. He, B. Wu, Q. Long, T. Shao, Z. Wang, J. Wei, Y. Li and W. Ding. 2016. Time-Course Transcriptome Analysis Reveals Resistance Genes of *Panax ginseng* Induced by *C. destructans* Infection Using RNA-Seq. *PloS one*. 11 (2):e0149408.
- Ghnaya, A.B., A. Hourmant, S. Cerantola, N. Kervarec, J.Y. Cabon, M. Branchard and G. Charles. (2010). Influence of zinc on soluble carbohydrate and free amino acid levels in rapeseed plants regenerated in vitro in the presence of zinc. *Plant Cell Tiss Org*. 102: 191-197.
- Gräfenhan, T., H.-J. Schroers, H. Nirenberg and K. Seifert. 2011. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Stud Mycol*. 68: 79-113.
- Grusak, M.A., M.R. Broadley and P.J. White. 2001. *Plant Macro and Micronutrient Minerals*. eLS.
- Guan YM, Lu BH, Wang Y, Gao J and Wu LJ. (2014). First report of root rot caused by *Fusarium redolens* on Ginseng(*Panax ginseng*) in Jilin province of China. *Plant disease*. 98(6) : 844.
- Hildebrand A. A. (1966). Root rot of ginseng in Ontario caused by members of the genus *ramularia*. *Canadian Journal of Research*. 12(1) : 82-114.
- Hyun DY, Hyeon GS, Yeon BY, Kang SW, Kim YC, Lee KW and Kim SM. (2009). A guideline to land suitability used soil physical characteristics and yield potential in panax ginseng C. A. Mayer. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 17(6) : 421-426.
- Hyun DY, Yeon BY, Lee SW, Kang SW, Hyun GS, Kim YC, Lee KW and Kim SM. (2009). Analysis of occurrence type of physiological disorder to soil chemical components in ginseng cultivated field. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 17(6) : 439-444.
- Jang CS, Lim JH, Seo MW, Song JY and Kim HK. (2010). Direct Detection of *C. destructans*, Root rot pathogen of ginseng by nested PCR From soil samples. *Mycobiology*. 38(1) : 33-38.
- Jang YL, Kim SG and Kim YH. (2011). Biocontrol efficacies of *Bacillus* species against *C. destructans* causing ginseng root rot. *Plant pathol. J*. 27(4) : 333-341.
- Jesse AR and Jarett C. (2013). *Americal Ginseng in Iowa : Pest Managemen*. [http : www.Extention.iastae.edu/forestry/publications/PDF-files/Ginseng%20publication%20-20disease%2](http://www.Extention.iastae.edu/forestry/publications/PDF-files/Ginseng%20publication%20-20disease%2)

0 and 20pest%20%20F 402PDF.

Jiama S, Junfan F, Rujun Z, Xuerui Y. Influence of cinnamic acid on *Cylindrocarpon* root rot development on *panax ginseng*.

Jung HS. (1969). 주요 인삼병의 생태 및 방제법에 관한 연구. 문교부 연구보고 농학계. 1: 1-25.

Kalapathy, U., A. Proctor, J. Shultz. (2000) A Simple Method for Production of Pure Silica from Rice Hull Ash. *Bioresource Technology*. 73(3):257-262

Kang BR, Kim YH, Nam HS and Kim YC. (2017). Correlation between biosurfactants and antifungal activity of a biocontrol bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* LM11. *Res. Plant Dis.* 23(2) : 177-185.

Kang YH, Lee SH and Lee JK. (2014). Development of a selective medium for the fungal pathogen *C. destructans* using radicicol. *Plant pathol. J.* 30(4) : 432-436.

Kernaghan G, Reeleder RD and Hoke SMT. (2007). Quantification of *C. destructans* f. sp. *Panacis* in soils by real-time PCR. *Plant Pathology*. 56 : 508-516.

Kernaghan, G., R. Reeleder and S. Hoke. 2007. Quantification of *C. destructans* f. sp. *panacis* in soils by real time PCR. *Plant Pathol.* 56: 508-516.

Kim BM, Kim YH, Lee DS and Cho HJ. (1982). Biochemical study on the mechanism and protection of Ginseng root-rot Disease. *Korean J. Ginseng Sci.* 6(1) : 75-83.

Kim BY, Ahn JH, Weon HY, Song JK, Kim Sung I and Kim WG. (2012). Isolation and characterization of *Bacillus* species possessing antifungal activity against ginseng root rot pathogens. *The Korean Journal of Pesticide Science.* 16(4) : 357-363.

Kim CH. (1966). *Fusarium* sp. causing root rot of Korea ginseng. *Plant Protection(Eleventh Pacific Sci. Congress guide book)*. 23.

Kim DY, Kim BY, Ahn JH, Weon HY, Kim SI, Kim WG and Song JK. (2015). Quantitative analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* GR4-5 in soil. *Korean J. Org. Agric.* 23(4) : 847-858.

Kim JH and Lee MW. (1974). On the root rot of ginseng ( I ) Isolation and identification of *Fusarium* sp. *KOR. JOUR. MICROBIO.* 12 : 94-98.

Kim JH and Lee MW. (1975). 병원균 배양화병균에 관하여. *과학과 기술* 1975. 25-28.

- Kim JH, Jeon YH, Park H, Lee BD, Cho DH, Park B. and Kim YH. (2006). The root-lesion nematode, *Pratylenchus subpenetrans*, on ginseng (*Panax ginseng*) in Korea. *Nematology* 8: 637-639.
- Kim JH, Kim SG, Kim MS, Jeon YH, Cho DH and Kim YH. (2009). Different structural modifications associated with development of ginseng root rot caused by *C. destructans*. *The Plant Pathology Journal*. 25(1) : 1-5.
- Kim MY, Choi YH, Kim YJ, Jeon JG and Lee SB. (2019). Correlation relationship between soil NO<sub>3</sub>-N concentration and soil EC. *The Korean Society of Agricultural Engineers*. 158-158.
- Kim SI and Lee MW. (1994). Establishment of rhizosphere microbes for plant protection on soil-borne diseases : Beneficial root and pathon. *Kor. J. Microbiol.* 22(1) : 50-61.
- Kim YC, Kang BR, Kim YH and Park SK. (2017). An Effective and practical strategy for biocontrol of plant diseases using on-site mass cultivation of chitin-degrading bacteria. *Res. Plant Dis.* 23(1) : 19-34.
- Kim YH, Lee JH, Ohh SH, Yu YH and Lee IH. (1993). Ginseng growths in Abolished Ginseng Fields and Factors Affecting the Ginseng Growth. *Lorean J. Ginseng Sci.* 17(1) : 45-51.
- Kim YS, Balaraju K and Jeon YH. (2016). Biological characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* AK-o and suppression of ginseng root rot caused by *C. destructans*. *Journal of Applied microbiology.* 122(1) : 166-179.
- Kim YS, Lee MS, Yeom JH, Song JG, Lee IK, Yeo WH and Yun BS. (2012). Screening of antagonistic bacteria for biological control of ginseng root rot. *The Korean Journal of Mycology.* 40(1) : 44-48.
- Kim, Y. J., J. Sukweenadhi, J. W. Seok, S. Subramaniam, C. H. Kang, E. S. Choi and D. C. Yang. (2017). Complete Genome Sequence of *Paenibacillus yonginensis* DCY84, a Novel Plant Symbiont that Promotes Growth via Induced Systemic Resistance. *Stand Genomic Sci.* 12: 63.
- Lee BD and Park H. (2004). Control effect of *Bacillus subtilis* B-4228 on root rot of *panax ginseng*. *J. Ginseng Res.* 28(1) : 67-70.
- Lee BD and Park H. (2009). Effect of calcium cyanamide soil fumigation on sterilization of *Zhizoctonia solani*, *Phythium sp.*, soil microbes and plant seed. *J Ginseng Res.* 33(2) :

139-142.

- Lee CY and Lim SU. (1976). An Ecochemical study on soil sickness. Korean J. Ginseng Sci. 1(1) 51-58.
- Lee EJ, Kim KS, Hong SH and Ha JH. (1995). The mechanism of biological control of *Pseudomonas* spp. Against *Fusarium solani* causing plant root-rot disease. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23(1) : 91-97.
- Lee IH, Park CS, Park HS and Yuk CS. (1985). Studies on the soil management in ginseng preplanting soil(II) Relationship between the soil characteristics of 2-year-old ginseng field soil and the ratio of missing plant. Korean J. Ginseng Sci. 9(1) : 36-41.
- Lee IH, Park CS, Park HS and Yuk CS. (1985). Studies on the soil management in ginseng preplanting soil( I ) Changes of soil characteristics between pre- and post-management in the preplanting soil. Korean J. Ginseng Sci. 9(1) : 15-23.
- Lee IH, Yuk CS, Han KW, Park CS, Park HS and Nam KY. (1980). Influence of various soil characteristics in Ginseng field on the growth and yield of ginseng(*Panax ginseng* C. A. meyer). Korean J. Ginseng Sci. 4(2) : 175-185.
- Lee JS, Han KS, Lee SC, Soh JW and Kim DW. (2014). Environmental factors on the development of root rot on Ginseng caused by *C. destructans*. Res. Plant Dis. 20(2) : 87-94.
- Lee MW, Choi HJ and Shim JO. (1985). Spore germination of some plant pathogenic fungi under different soil conditions in relation to soil Fungistasis. Korean J. Plant pathol. 1(3) : 157-164.
- Lee MW, Lee HW and Shin HS. (1992). Suppressive mechanisms of soil-borne disease development and its practical uses. 연구과제 최종보고서.
- Lee MW. (1975). Studies on the *Pseudomonas fluorescens* causing root rot of ginseng. KOR. JOUR. MICROBIO. 13 : 143-156.
- Lee MW. (1979). Studies on the Etiology of Red rot of ginseng. KOR. JOUR. MICROBIO. 17(4) : 179-186.
- Lee SG. (2004). *Fusarium* species associated with ginseng(*Panax ginseng*) and their role in the root-rot of ginseng plant. Res. Plant Dis. 10(4) : 248-259.
- Lee SH, Jung HS, Choi SW, Na YJ. (1968). 인삼묘포의 병해충 연구. 문교부 연구보고 농학계. 1 : 1-54.

- Lee SW, Lee SH, Jin ML, Park KH, Jang IB and Kim KH. (2016). Control of Soil-Borne Pathogens in Ginseng Cultivation through the Use of Cultured Green Manure Crop and Solarization in Greenhouse Facilities. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 24(2) : 136-142.
- Lee SW, Lee SH, Park KH, Jang IB, Jin ML and Seo MW. (2017). Effect of crop rotation system on soil chemical properties and ginseng root rot after harvesting ginseng. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 25(4) : 244-251.
- Lee SW, Park KH, Lee SH, Jang IB and Jin ML. Effect of manure crop cultivation on soil chemical properties and root rot disease in continuous cropping field of ginseng. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 25(1) : 1-9.
- Lim HS and Kim SD. (1990). Antifungal Mechanism of *Pseudomonas stutzeri* YPL\_1 for biocontrol of *Fusarium solani* causing plant root rot. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18(1) : 81-88.
- Lim HS, Kim YS and Kim SD. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology.* 57(2) : 510-516.
- Lombard, L., C.M. Bezuidenhout and P.W. Crous. 2013. *Ilyonectria* black foot rot associated with Proteaceae. *Australas Plant Pathol.* 42: 337-349.
- Lombard, L., P.W. Crous, B.D. Wingfield and M.J. Wingfield. 2010. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Stud Mycol.* 66: 31-69.
- M. Putnam. (2017). Ginseng(*Panax* spp.)-*Cylindrocarpon* Root rot(disappearing root rot). Pacific northwest plant disease management handbook.<https://pnwhandbooks.org/node/2742>.
- Ma, J.F. and N. Yamaji. 2015. A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Sci.* 20 (7):435-442.
- Ma, J.F., N. Yamaji, N. Mitani, K. Tamai, S. Konishi, T. Fujiwara, M. Katsuhara and M. Yano. 2007. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature.* 448 (7150):209-212.
- Macho, A.P. and C. Zipfel. (2014) Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell.* 54 (2):263-272.
- Mantelin, S. and B. Touraine. (2004). Plant growth promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot.* 55: 27-34.
- Mantiri, F.R., G.J. Samuels, J.E. Rahe and B.M. Honda. 2001. Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can J Bot.* 79: 334-340.



- Mao ZS, Long YJ, Zhu YY, Zhu SS, He XH, and Chen ZJ. (2014). First Report of *C. destructans* var. *destructans* causing black root rot of sanqi (*Panax notoginseng*) in china. Plant disease. 98(1) : 162.
- Matuo T and Moiyazawa Y. (1984). Scientific name of *Cylindrocarpon* sp. causing root rot of ginseng. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 50 : 649-652.
- Matuo T and Snyder WC. (1972). Host virulence and Hypomyces stages of *Fusarium solani* f. sp. *Pisi*. Phytothology. 62 : 731-735.
- Matuo T and Snyder WC. (1973). Use of morphology and mating population in the identification of Formae Speciales in *Fusarium solani*. Phytothology. 63:562-565.
- Mesapogu, S. 2011. Rapid detection and quantification of *Fusarium udum* in soil and plant samples using real-time PCR. Journal of Plant Pathology & Microbiology.
- Mohamed BA, Hahn EJ and Paek KY. (2007). Methyl jasmonate and salicylic Acid induced Oxidative stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root suspension Cultures. Molecules. 12 : 607-621.
- Nirenberg, H. 1976. Untersuchungen uber die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola. Mitt Biol Bundesanst Land-u Forstwirtsch Berlin-Dahlem. 169: 1-117.
- Noh HW, Kim SD, Do JH and Kang SH. (1982). Studies on the Cellulolytic Enzyme system of *Rhizopus* sp. G-21 isolated from rotting ginseng. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 10(1) : 1-7.
- Ohh SH and Park CS. (1980). Studies on *Phytophthora* disease of *Panax ginseng* C. A Meyer; its causal agent and possible control measures. Korean J. Ginseng Sci. 4(2) : 186-193.
- Ohh SH, Lee SK, Lee JH and Han SC. (1983). New root rot disease of *Panax ginseng* due to *Ditylenchus destructor* Thore. Korean J. Plant. Prot. 22(3) : 181-185.
- Ohh SH, Yu YH, Cho DH, Lee JH and Kim YH. (1986). Chemical treatments on population changes og *Ditylenchus destructor* and Responses of *Panax ginseng*. Lkorean J. Plant Prot. 25(3) : 169-173.
- Ohh SH. (1981). Diseases of ginseng : Environmental and host effect on disease outbreak and growth of pathogens. Korean J. Ginseng Sci. 5(1) : 73-84.

- Ohh, S. (1986). Diseases of ginseng: environmental and host effect on disease outbreak and growth of pathogens. *Korean J Ginseng Sci.* 5: 73-84.
- Ohh, S., Y. Yu, K. Kim and D. Cho, (1992). Studies on control of soil-borne diseases and insects of ginseng and development of antifungal compound. In *Ginseng Cultivation Bull.* Korea Ginseng and Tobacco Research Inst. pp 121-184.
- Ohyama, K., M. Suzuki, J. Kikuchi, K. Saito and T. Muranaka. 2009. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (3):725-730.
- Paraburkholderia and Burkholderia: Paraburkholderia hiiakae sp. nov., Paraburkholderia metrosideri sp. nov., Paraburkholderia paradisi sp. nov., Paraburkholderia peleae sp. nov., and Burkholderia alpina sp. nov. a member of the Burkholderia cepacia complex. *Front Microbiol.* 8: 207.
- Park KJ, Park EW and Chung HS. (1997). Grouping the ginseng field soil based on the development of root rot of ginseng seedlings. *Korean J. Plant Pathol.* 13(1) : 37-45.
- Park KJ. (2001). Fitness analysis of the forecasting model for the root rot progress of ginseng based on bioassay and soil environmental factors. *Res. Plant Dis.* 7(1) : 20-24.
- Paudyal, S., R.R. Aryal, S. Chauhan and D. Maheshwari. (2007). Effect of heavy metals on growth of Rhizobium strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. *Sci World.* 5: 27-32.
- Pereira, L.B., C.M.d.A. Mazzanti, J.F. Gonçalves, D. Cargnelutti, L.A. Tabaldi, A.G. Becker, N.S. Calgaroto, J.G. Farias, V. Battisti and D. Bohrer. (2010). Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. *Plant Physiol Biochem.* 48: 683-689.
- Punja ZK, Wan A and Goswami RS. (2010). Root rot and distortiom of ginseng seedling roots caused by *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 30(4) : 565-574.
- Punja ZK. (1997). Fungal pathogens of American ginseng(*Panax quinquefolium*) in British columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 19(3) : 301-306.
- Putnam M.(2017) Ginseng(*Panax spp.*)-*Cylindrocarpon* Root rot(Disappearing root rot). Pacific northwest plant disease management handbook. <https://pnwhandbooks.org/node/2742>.

- Rahimi, S., Y.J. Kim, J. Sukweenadhi, D. Zhang and D.C. Yang. 2016. PgLOX6 encoding a lipoxygenase contributes to jasmonic acid biosynthesis and ginsenoside production in *Panax ginseng*. J. Exp. Bot.
- Rahman M and Punja ZK. (2005). Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. Plant Physiology and Biochemistry. 43 : 1103-1114.
- Rahman M and Punja ZK. (2005). Factor influencing development of root rot on ginseng caused by *C. destructans*. Phytopathology. 95 : 1381-1390.
- Rahman M and Punja ZK. (2006). Influence of Iron on *Cylindrocarpon* root rot development on Ginseng. Phytopathology. 96 : 1179-1187.
- Rahman, M. and Z.K. Punja. 2005b. Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *C. destructans*. Phytopathology. 95: 1381-1390.
- Reeleder RD and R.A. Brammall. (1994). Pathogenicity of Pythium species, *C. destructans*, and *Rhizoctonia solani* to ginseng seedlings in Ontario. Canadian Journal of Plant Pathology. 16(4):311-316.
- Richmond, K.E. and M. Sussman. 2003. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. Curr Opin Plant Biol. 6 (3):268-272.
- Rossmann, A.Y., G.J. Samuels, C.T. Rogerson and R. Lowen, 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). Stud Mycol. 42:1 - 248.
- Sachs, J.V. 1860. Vegetationsversuche mit ausschluß des bodens über die nährstoffe und sonstigen ernährungsbedingungen von mais, bohnen, und anderen pflanzen. Landw Versuchsst. 2:219-268.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4: 406-425.
- Sami, F., M. Yusuf, M. Faizan, A. Faraz and S. Hayat. (2016). Role of sugars under abiotic stress. Plant Physiol Biochem. 109: 54-61.
- Samuels, G. and D. Brayford. 1994. Species of *Nectria* (*sensu lato*) with red perithecia and striate ascospores. Sydowia. 46: 75-161.
- Samuels, G.J. and D. Brayford. 1990. Variation in *Nectria radicola* and its anamorph, *C. destructans*. Mycol Res. 94: 433-442.

- Sandor, R., C. Der, K. Grosjean, I. Anca, E. Noirot, N. Leborgne-Castel, J. Lochman, F. Simon-Plas and P. Gerbeau-Pissot. 2016. Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence. *J. Exp. Bot.*
- Schroers, H.-J., T. Gräfenhan, H. Nirenberg and K. Seifert. 2011. A revision of *Cyanonectria* and *Geejayessia* gen. nov., and related species with *Fusarium*-like anamorphs. *Stud Mycol.* 68: 115-138.
- Seifert, K., C. McMullen, D. Yee, R. Reeleder and K. Dobinson. 2003. Molecular differentiation and detection of ginseng-adapted isolates of the root rot fungus *C. destructans*. *Phytopathology.* 93: 1533-1542.
- Seo MW, Song JY, Kang KH, Park SY and Kim SI. (2017). Virulence assays and genetic reclassification to assess the pathogenicity of *C. destructans* isolated from peony in ginseng. *The Korean Journal of Mycology.* 45(2) : 132-138.
- Shannon, M. C. and C. M. Grieve. (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci Hort* 78: 5 - 38.
- Shim JO and Lee MW. (1990). Nature of Suppresiveness and conductiveness of some plant pathogens in soil. *Kor. J. Mycol.* 18(3) : 164-177.
- Shim JO and Lee MW. (1991). Identification of *Streptomyces* species antagonistic to *Fusarium solani* or *C. destructans* causing ginseng root rots. *Kor. J. Mycol.* 19(1) : 66-73.
- Shin HS and Lee MW. (1986). Environmental factors and distribution of soil microorganism in Ginseng Field. *Kor. J. Microbiol.* 24(2) : 184-193.
- Shin JH, Yun BD, Kim HJ, Kim SJ and Chung DY. (2012). Soil environment and soil-borne plant pathogen causing root rot disease of Ginseng. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 45(3) : 370-376.
- Siebers, M., M. Brands, V. Wewer, Y. Duan, G. Hölzl and P. Dörmann. 2016. Lipids in plant - microbe interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1861 (9):1379-1395.
- Sim CM. (2015). Study on control against root rot pathogen(*C. destructans*) in ginseng repeated culvating soil by electron beam sterilization. Deoartment of agricultural biology, graduate school chungnam national university, Master's Thesis.
- Sohn BK, Jin SY and Lee DJ. (2008). Distribution of Arbuscular Mycrrhizal Fungi(AMF) at ginseng cultivated fields in Jeonnam province. *Korea J. Soil Sci. Fert.* 41(3) : 214-222.

- Sohn BK, Jin SY, Kim HL, Cho JS and Lee DJ. (2008). Improvement of Arbuscula Mycorrhizal Fungi(AMF) propagule at the preplanting field for ginseng cultivation. Korea J. Soil Sci. Fert. 41(3) : 170-176.
- Song JY, Seo MW, Kim SI, Nam MH, Lim HS and Kim HG. (2014). Genetic diversity and pathogenicity of *C. destructans* isolates obtained from Korean panax ginseng.
- Song MJ, Yun HY and Kim YH. (2014). Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. J of Ginseng Res. 38 : 136-145.
- Souza, R.d., A. Ambrosini and L.M. Passaglia. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genet Mol Biol. 38: 401-419.
- Sun JM, Fu JF, Zhou RJ and Yan XR. (2013). Influence of exogenously applied methyl jasmonate *C. destructans* in vitro. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 19(3) : 530-535.
- Sun, Jia man, Fu, Jun fan, Yan, Xue Rui, Zhou, Ru Jun. (2012). Response of the defense enzymes to induced resistance of ginseng. Acta phytopathologica Sinica. 42(2) : 396-403.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 28: 2731-2739.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25: 4876-4882.
- Tripathi, D.K., V.P. Singh, S. Gangwar, S.M. Prasad, J.N. Maurya and D.K. Chauhan. 2014. Role of silicon in enrichment of plant nutrients and protection from biotic and abiotic stresses. In: Improvement of crops in the Era of climatic changes. Springer. pp 39-56.
- Valitova, J., A. Sulkarnayeva and F. Minibayeva. 2016. Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions. Biochem (Mosc). 81 (8):819-834.
- Van Bockhaven, J., D. De Vleeschauwer and M. Höfte. 2013. Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. J. Exp. Bot. 64 (5):1281-1293.
- Van Bockhaven, J., L. Spíchal, O. Novák, M. Strnad, T. Asano, S. Kikuchi, M. Höfte and D. De Vleeschauwer. 2015. Silicon induces resistance to the brown spot fungus *Cochliobolus miyabeanus* by preventing the pathogen from hijacking the rice ethylene pathway. New Phytol. 206 (2):761-773.
- Wang Y, Guan YM, Lu BH, and Gao J. (2016). First report of ginseng(*Panax ginseng*)

- root rot caused by *Fusarium acuminatum* in China. *Plant disease*. 100(2) : 525.
- Wang, K., M. Senthil Kumar, C.M. Ryu, L. Kang and K.S. Mysore. 2012. Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol*. pp. 111.189217.
- Weber, C.F. and G.M. King. (2017). Volcanic soils as sources of novel CO-oxidizing
- Xu Y, Chi K, Zhang A, Lei F, Yang H, Zhao Y, Li K, Wang E, Li Q, Kim JS, Lee SH and Kim YC. Chemotactic response study of *C. destructans* towards ginseng root exudates. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 24(5) : 360-369.
- Xu, X., X. Hu, S.J. Neill, J. Fang and W. Cai. (2005) Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell Physiol*. 46 (6):947-954.
- Yang DC, Kim YH, Yun KY, Lee SS, Kwon JN and Kang HM. (1997). Red-colored phenomana of ginseng (*Panax ginseng* C. A, Meyer) Root and soil environment. *Korean J. Ginseng Sci*. 21(2) 91-97.
- Yonghua X, Kun C, Aihua Z, Fengjie L, He Y, Yan Z, Kuo L, Erhuan W, Qiong L, Jong SK, Seung HL and Young CK. (2016). Chemotactic Response Study of *C. destructans* towards Ginseng Root Exudates. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 24(5) : 360 - 369.
- Zengin, F.K. and O. Munzuroglu. (2005). Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biol Cracov Ser Bot*. 47: 157-164.
- Zessmeister CL. (1918). *Ramularia* Root rot of ginseng. *Phytopathology*. 8:557-571.
- Zipfel, C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol*. 35 (7):345-351.
- 宮澤洋一. (1967). コロールピクリンの土壤消毒による薬用人参の生育障害. 農業及園藝. 42:1851-1855.
- 김미선, 김경희, 조지은, 최종진, 김영진, 김종환, 장순애, 육홍선. (2011). 눈개승마 용매 추출물의 항산화 및 항균활성. *한국식품영양과학회지*. 40(1) : 47-55.
- 김선익. (1996). 근권 길항세균을 이용한 인삼병의 생물학적 방제에 관한 연구. *충남대학교 석사학위논문*.
- 김창배, 최진국, 정원권. (2007). 인삼 연작장해 경감기술 개발. *경상북도농업기술원 2007년 시험연구보고서*. 407-425.
- 박기춘, 어진우. (2012). 훈증토양 생물생태 복원기술 개발;인삼 병역제성토양 생물지표 개발. *국립원예특작과학원 연구보고서*.

변종영, 조재성, 김홍기, 유성준, 유지원, 라준헌, 김현호, 성봉재, 김선익. (2002). Technology for Environment-friendly Plant Disease and weed control practices in ginseng. 충남대학교 연구과제 완결보고서.

上田次郎. (1090). 本邦と韓國の高麗人參赤腐病研究. 農試研報. 35:35:00.

서문원. (2017). 새로운 분류체계에 따른 국내 인삼뿌리썩음병균 (*C. destructans*)의 재분류와 초작지 병 발생 요인 분석 및 실용적 병 진단. 충남대학교 박사학위논문.

양덕춘, 이준원, 이연진, 김호빈, 박민주, 김명겸, 임완택, 안동선. (2007). 인삼뿌리썩음병 병원균 검출을 통한 인삼의 연작재배 지속 여부 판단기술 개발. 경희대학교 연구과제 완결보고서.

유연현, 오승환, 박규진, 조대휘. (1998). 인삼 근부관련 병해와 연작장해. 고려인삼학회:학술대회논문집. 22 : 16-18.

李康澈, 鄭夏元. (1965). 인삼토양병해에 관한 연구. 농진 식환연보. 8 : 487-500.

이승호, 김미란. (2017). 라디시콜 선택배지를 이용한 토양내 인삼뿌리썩음병 정량 분석. 대한민국특허청.

조혜선, 김재현. (2017). 인삼뿌리썩음병균 진단방법. 대한민국특허청.

中田賞五郎, 瀧元清透. (1922). 高麗人參의病害에 關한 研究. 勸模報. 5:76-77.

中田賞五郎. (1934). 作物病害圖篇. 養賢堂. 237.

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.