



Studies on Disease due to Continuous
Cropping of *Platycodon grandiflorus* and
Development of Technique for
Biological Control

“ ”

.

1999. 10. 31.

:

:

:

:

:

:

:

:

:

.

.

1.

가

, ,
가 가

가 가

가 .

가 3

가

.
가 ,

,

가

·
, , ,

·
가 가

2.

, ,

가

가

가 .

가 가

가 .

가

가

가

.

.

가

가

.

.

.

.

1.

가.

가 , ,

,

.

.

.

.

Bacillus

Pseudomonas

1

Rhizoctonia solani

2

,

Rifampicin

.

,

,

2

, *Rhizoctonia solani* 1

2

.

.

1.

3

가

가

가

3

· ,

·

·

가

·

·

가

가

·

가 가

·

가

가

, , , ,

가 가

가 가

가

·

chapter

·

가.

14 ,

,

0 6%,
 1m , 5kg/cm2 , 1.0 Mg/nB
 58 63%, 11 13%, 5 10%,
 38 64%가
 가 가 .

Rhizoctonia solani

10 - 30
 5 35
 가 35% 53% ,
 3 3
 가 . 가

Rhizoctonia solani

. *Rhizoctonia solani* 1
 2

Bacillus

Rhizoctonia solani 가 .

가

Bacillus sp.

Pseudomonas

3,000

2

Rhizotonia solani, *Fusarium* sp., *Phytophthora*

sp., *Pythium* sp

. 2

32

Bacillus sp.

31

Pseudomonas

sp.

Bacillus sp.

R19

R22가 가

Pseudomonas sp.

JS2, JS3,

JS4가

R19 R22 *Paenibacillus macerans*

SP2

Pseudomonas aurogonosa,

SP4

Pseudomonas cepacia

Paenibacillus macerans 19

Pseudomonas cepacia JS4

rifampicin

Paenibacillus macerans 19 *Pseudomonas cepacia* JS4

가

. *Paenibacillus macerans* 19

4

가 가

. *Paenibacillus macerans* 19

. *Pseudomonas cepacia* JS4

가

가

UV spectrum *Pseudomonas aeruginosa* JS2
 benzene group FR- IR
 spectrum JS2 hydroxyl group, carbonyl group, aliphatic
 C-H bond JS2 Mass spectrum library
 database 2, 4- di acetyl phloroglucinol (Phl)
 NMR spectrum JS2
 JS2 Phl *Paenibacillus*
macerans R19 (5+4)

Paenibacillus macerans R19
 acetylene (C₂H₂) R19
 degenerate
 primer PCR 280bp specific DNA fragment
 partial DNA sequencing Blast search
 aspartate aminotransferase

Rhizoctonia solani 1
 2
 2
Erwinia *Klebsiella*
 sp. 2
 CMCase, pectate lyase,
 protease, pectinase 가 *Erwinia*

Erwinia sp. CMCase 가 2 clone
celA celB .
 pectate lyase 가 clone
pelI .

dextrose, glycerol, peptone, NaH₂PO₄ MgSO₄ 7H₂O, K₂SO₄

1

liter Dextrose 10 g, Glycerol 10 g, Peptone 20 g,
 NaH₂PO₄ 10 g, MgSO₄ 7H₂O 1.4 g, K₂SO₄ 0.8 g 가

pilot fermenter pH

Paeniacillus macerans R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2, .

Pseudomonas cepacia JS4 3 pH

pH 7 *Paeniacillus*

macerans R19 30 , *Pseudomonas*

aeruginosa JS2 *Pseudomonas cepacia* JS4 25

seed 3% 28 ,

2liter/min , 200rpm 25% ,

2% silicon oil, pH 7 가 .

Paeniacillus macerans R19,

Pseudomonas aeruginosa JS2, *Pseudomonas cepacia* JS4

jar fermenter

Bacillus macerans

R19 2.3×10^8 / ml, *Pseudomonas aeruginosa* JS2 4.5×10^8 / ml,

Pseudomonas cepacia JS4 3.7×10^8 / ml .

가 .

1 가 .

(PDB)

1

5,650,000

2,288,000 .

가 , 2

가가 73.8% 가

가 .

2.

가.

1) 가

가 .

2)

가 , 가 ,
가 가 ,
가 .

3)

가
가 .

4)

, , ,
.

5)

3
가 가
3 -4
가 .

6) 가

.

.

(200 liter)

가 4

가

,

가

가

가

.

3

가

.

.

.

,

.

가

SUMMARY

In the present paper, the experiments were conducted to investigate the disease due to continuous cropping of *platycodon glaucum* and development of technique for biological control. This study was consisted of 7 chapters: Introduction; Optimum conditions for *Platycodon* cultivated land with soil physicochemical properties; Study on causal agent of radix rot of *Platycodon*; Isolation of bacteria for antifungal activity; Functional analysis of bacteria for antifungal activity and rhizosphere ecology of balloonflower root, Mass production of microbial inoculant for biocontrol; Efficacy test of antagonistic formulation in field. The results were summarized as following:

First chapter: Introduction

Balloonflower (*Platycodon glaucum*) is widely cultivated and used in East Asia as a remedy for asthma and as a vegetable. The plant is prone to several known diseases such as stem rot, Anthracnose, and *Fusarium* wilt. However, root rot which causes serious problems for the cultivation of balloonflower had not been described until recently, and its cause has not yet been

scientifically investigated. Balloonflower root rot was thought to be caused by some kind of soil sickness that developed due to continuous cropping and mainly occurs on 3- to 5-year old roots. Occasional root rot outbreaks caused by *Rhizoctonia solani* are difficult to control with chemicals. Furthermore, medicinal crops have traditionally been cultivated without the use of chemicals. Thus, a new strategy to control the pathogen causing balloonflower root rot is urgently needed. A most desirable method of control would be the use of a biological agent. The development of biological controls of plant pathologies has attracted the interest of ever more scientists during the last 25 to 30 years. Biocontrol mechanisms are generally classified based on their mode of action, such as competition for nutrition, parasitism/predation, and antibiosis. Antibiosis is regarded as the major single most important biological control mechanism. It is based on the inhibition of undesirable organisms by antibiotics, by which way competing microorganisms confer an advantage onto themselves in the competition for nutrients and space within an ecological niche.

Second chapter: Optimum conditions for *Platycodon* cultivated land with soil physicochemical properties

This study was conducted to determine the cultural environment soil morphological characteristics and

physicochemical properties of *Platycodon*. The optimum cultivated land of perennial *Platycodon* was average temperature 14 °C, direction of southeast, topography of flat or undulating slope of 0 - 6%, well drained, soil depth over 1m, soil hardness under 5 kg/cm², bulk density 1.0 mg/m³, porosity 58 - 63%, moisture content 11 - 13%, clay content 5 - 10%, silt content 38 - 64% and soil texture of silt loam.

Third chapter: Study on causal agent of radix rot of *Platycodon*

Platycodi Radix, radix of *Platycodon glaucum*, so called "Gil Gyeong" in Korea, has been long used as medicinal stuff for coughing, bad cold in oriental countries. The most severe barrier for cropping *P. glaucum* was root rot disease unknown causal agent yet. In this paper we succeeded to isolate the causal agent of radix rot of *P. glaucum* and identified the causal pathogen *Rhizoctonia solani Kuhn*, same as the pathogen of *P. glaucum* stem rot known before. The temperature for mycelial growth was ranged from 10 to 30 °C, the pathogen could not grow below 5 °C and above 35 °C. The occurrence of radix rot of *P. glaucum* were 35 - 53% in farm field. The disease were severely outbreaked year by year in the same field. In the plot of long term cropping of *P. glaucum* the disease were severely infected from 3 year old plants.

Fourth chapter: Isolation of bacteria for antifungal activity

A pathogenic fungus causing balloonflower root rot was turned to be *Rhizoctonia solani*. About five hundred bacterial species from field soils were screened for a biological agent against the above putative pathogen. Several bacteria exhibiting antifungal activity were isolated. Among them the isolates R19, JS2, JS4 were screened and identified as *Paenibacillus macerans* 19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2 and *Pseudomonas cepacia* JS4 respectively. These bacteria had a strong antifungal effect on major phytopathogens which included *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, and *Fusarium oxysporum* as well as *R. solani*. These strains showed the potential for antifungal activity of a broad spectrum in *in vitro* tests.

Fifth chapter: Functional analysis of bacteria for antifungal activity and rhizosphere ecology of balloonflower root

We found and characterized *Paenibacillus macerans* 19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2 and the structure of their antifungal substance was identified using spectrometric techniques such as UV, FT-IR, FAB-MS, EI-MS, and FT-NMR spectroscopy. The antifungal substance derived from strain JS2 was 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) but the substance from

strain R19 was not identified exactly because of its impurity. Interestingly, root-associated *Paenibacillus macerans* R19 showed *in vitro* nitrogen fixation activity using acetylene reduction method by gas chromatography.

In order to investigate the mechanism of root rot of baloonflower, the cell-wall degrading genes of phytopathogenic *Erwinia* sp as secondary root rot infection bacterium were cloned. Two clones that were able to hydrolyse carboxymethylcellulose were selected. 1.5 kb and 1.2 kb fragments containing the *celA* and *celB* genes, respectively, were subcloned and sequenced. The *celA* and *celB* genes had open reading frames of 1,161 bp and 792 bp encoding 487 and 264 amino acid residues with calculated molecular weights of 42,003 Da and 29,890 Da, respectively. One of the *E. coli* clones contained a 5.1 kb *BanHI* fragment and had the ability to hydrolyze polygalacturonic acid. By subsequent subcloning, we obtained a 2.9 kb fragment that contained the *pelI* gene. The *pel* gene had an open reading frame (ORF) of 1,277 bp encoding 425 amino acids with a signal peptide of 25 amino acids.

Sixth chapter: Mass production of microbial inoculant for biocontrol

In order to develop the method for mass production of the microbial inoculants from the isolates bacteria, optimum cultivation conditions for producing antifungal antibiotic

producing bacteria by cultivating the three bacteria (*Paenibacillus macerans* 19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2 and *Pseudomonas cepacia* JS4) in jar fermenter (200 liter) and medium characteristics were investigated. Optimum conditions for producing cell mass were found to be temperature 28 °C, initial pH 7.0, seed 3%, aeration rate 2 l/min, 200 rpm, antifoaming agent 2% silicon oil. Effective medium composition per liter was as following; dextrose 10g, glycerol 10g, peptone 20g, sodium diphosphate salt 10g, magnesium sulfate 1.4g, potassium sulfate 0.8g for the production of mixed culture of the bacteria in 200-liter jar fermenter. Freezer-dried and vacuum packaging for the inoculants has the best shelf-life.

Seventh chapter: Efficacy test of antagonistic formulation in field

Antagonistic bacteria against to the pathogen induced lysis of pathogen mycelia due to antifungal compound secretion. The effects of antagonists to *Rhizoctonia solani* were recognized from dipping seedlings before transplanting in field. The soil drenching of the antagonists to *P. glaucum* were also effective to suppression the pathogen. Two times drenching of the antagonists against the *P. glaucum* plants were the most effective. The inhibition effects of antagonists to the pathogen from *Rhizoctonia* stem rot were shown to be recognized. In the plot of the termcopping the *P. glaucum*

application of antagonists were also effective to reduce the *Rhizoctonia* disease. The effect of antagonistic formulation also was shown to be suppression the pathogen.

C O N T E N T S

Summary	16
Chapter 1. Introduction	34
Section 1. Background	34
Section 2. Object and necessity of research development	34
1. Technical aspects	34
2. Industrial and Economic aspects	35
3. Social and cultural aspects	36
Section 3. Referances	36
Chapter 2. Optimum conditions for <i>Platycodon</i> cultivated land with soil physicochemical properties	40
Section 1. Introduction	40
Section 2. Materials and Methods	41
1. Environment and soil morphological characteristics of cultivated land	41
2. Growth and yield of <i>Platycodon</i> with soil physicochemical properties	41
3. Growth of <i>Platycodon</i> with continuous cropping years	43
4. Growth of <i>Platycodon</i> with soil texture	45
5. Optimum conditions for perennial <i>Platycodon</i> cultivated land	45
Section 3. Results and discussion	46

1. Environment and soil morphological characteristics of cultivated land	46
2. Growth and yield of <i>Platycodon</i> with soil physicochemical properties	54
3. Growth of <i>Platycodon</i> with continuous cropping years	68
4. Growth of <i>Platycodon</i> with soil texture	71
5. Optimum conditions for perennial <i>Platycodon</i> cultivated land	73
Section 4. Summary	75
Section 5. References	77
 Chapter 3. Study on causal agent of radix rot of <i>Platycodon glaucum</i>	 81
Section 1. Introduction	81
Section 2. Materials and Methods	82
1. Isolation and identification of pathogen from infected radix of <i>P. glaucum</i>	82
2. Disease survey of radix rot of <i>P. glaucum</i>	83
Section 3. Results and Discussion	83
1. Symptom of radix rot	83
2. Isolation and identification of pathogen from infected radix of <i>P. glaucum</i>	85
3. Disease survey of radix rot of <i>P. glaucum</i>	88
Section 4. Summary	90

Section 5. References	91
Chapter 4. Isolation of bacteria for antifungal activity	98
Section 1. Introduction	98
Section 2. Materials and Methods	98
1. Microorganism culture, and growth conditions	98
2. Screening of bacteria for antifungal activity	99
3. Isolation of root-associated bacteria	105
4. Bacterial seed treatment	105
5. Enumeration of bacteria on seed or root samples	106
6. Production of the inoculum of the pathogens	106
7. Soil treatment	106
8. Bottle assay for biocontrol activity in growth chamber	107
9. Field studies	109
10. Identification of bacteria	109
11. <i>In vitro</i> inhibition spectrum of bacteria against root pathogens	109
12. Isolation and culture of rifampicin-resistant bacterial mutant	110
13. Population dynamics in growth chamber experiments	110
14. Population dynamics in a field test	111
Section 3. Results and Discussion	111
1. Pathogenicity of <i>Rhizoctonia solani</i> for root rot of balloonflower	111
2. Isolation of balloonflower root-associated <i>Bacillus</i> sp.	

isolates	118
3. <i>In vitro</i> screening for inhibitory activity against root pathogens	120
4. Identification of bacteria isolates	120
5. Isolation of rifampicin-resistant bacterial mutant	120
6. Population dynamics of bacteria for antifungal activity	129
7. Population dynamics of bacteria for antifungal activity in the balloonflower rhizosphere in the field	133
8. Performance in field trials	134
Section 4. Summary	135
Section 5. References	139
Chapter 5. Functional analysis of bacteria for antifungal activity and rotting and rhizosphere ecology of balloonflowerroot	143
Section 1. Introduction	143
Section 2. Materials and Methods	144
1. Purification and structural analysis of antifungal substances	144
2. Analysis of the asymbiotic nitrogen-fixing activity and cell-wall degrading enzyme activity by bacterium isolated	148
3. Analysis of on balloonflower tissue-macerating bacteria infected secondary after <i>Rhizoctonia</i> infection	150
4. Cell-wall degrading gene analysis of on balloonflower tissue-macerating bacteria	152
Section 3. Results and Discussion	154

1. Purification and structural analysis of antifungal substances . . .	154
2. Analysis of the asymbiotic nitrogen-fixing activity and cell-wall degrading enzyme activity	170
3. Studies on baloonflower tissue-macerating bacteria infected secondary after <i>Rhizoctonia</i> infection	181
Section 4. Summary	199
Section 5. References	205
Chapter 6. Mass production of microbial inoculant for bi ocontrol	211
Section 1. Introduction	211
Section 2. Materials and Methods	211
1. Organisms used	211
2. Bacterial culture	211
3. Cultural condition of microorganism by jar fermenter . .	212
4. Process for mass production of inoculant	214
5. Analysis of chemical composition of the inoculant . . .	216
Section 3. Results and Discussion	218
1. Optimization for cultural media	218
2. Analysis of cultural condition	218
3. Experiment of cultural condition for mass production by pilot fermenter	228
4. Cost evaluation, shelf-life, and chemical composition of inoculant	229
Section 4. Summary	234

Section 5. References	236
Chapter 7. Efficacy test of antagonistic formulation in field	241
Section 1. Introduction	241
Section 2. Materials and Methods	242
1. Selection of antagonists to <i>Rhizoctonia solani</i>	242
2. Effect of antagonists on <i>Rhizoctonia solani</i>	242
3. Effect of antagonists treated seedling of <i>P. glaucum</i> radix rot	242
4. Effect of soil drenching of the antagonists to <i>P. glaucum</i> radix rot in field	243
Section 3. Results and Discussion	245
1. Selection of antagonists to <i>Rhizoctonia solani</i>	245
2. Efficacy tests of antagonists on radix rot of <i>P. glaucum</i>	243
Section 4. Summary	248
Section 5. References	249

.....	1
.....	2
Summary	16
Contents	23
.....	29
1	34
1	34
2	34
1.	34
2.	35
3.	36
3	36
2	40
1	40
2	41
1. 가	41
2.	41
3.	42
4.	43
5.	45

3	46
1.	가	46
2.	54
3.	68
4.	71
5.	73
4	75
5	77
3	81
1	81
2	82
1.	82
2.	83
3	83
1.	83
2.	85
3.	88
4	90
5	91
4	98
1	98
2	98

1.	99
2.	99
3.	105
4.	105
5.	106
6.	106
7.	106
8.	107
9.	109
10.	109
11.	109
12.	Ri fampi ci n	110
13.	110
14.	111
3	111
1.	<i>Rhi zoctoni a sol ani</i>	111
2.	<i>Baci llus sp.</i>	118
3.	120
4.	120
5.	Ri fampi ci n	120
6.	129
7.	133
8.	134
4	135
5	139

5	,	143
1		143
2		144
1.		144
2.	<i>Paenibacillus macerans</i>	148
3. 2		150
4. 2		152
3		154
1.		154
2.	<i>Paenibacillus macerans</i>		
		170
3. 2		181
4		199
5		205
6		211
1		211
2		211
1.		211
2.		211
3.	Jar Fermenter	212
4.		214
5.		216
3		218

1.	218
2.	Jar Fermenter	222
3.	Pilot (200 liter) , pH	228
4.	,	229
4	234
5	236
7	241
1	242
2	242
1.	242
2.	242
3.	242
4.	243
3	245
1.	245
2.	259
4	258
5	259

1

1

가 , ,

가

가

가

.

2

1.

가

가

가

5

가

20

.

.

5

, 가

2 -3

1

3 -5

4 -5

3

90%

가

가

2.

가

가 가

가 가

가

1994

1,653ha

가

가

3.

(桔梗)

Platycodon glaucum

가

17

가

가

49

287

246

(禁忌 配合性)

가 가

3

1. , , . 1977.

2. 宮澤洋一. 1972. ,
9: 109-124(
143-167P, 1974)
3. , , , , , . 1993.
가 가
. 22(5): 524-530.
4. , , , . 1981,
, 3-19
5. , , , , . 1994. saponin
,
. 23(4). 568-573.
6. . 1985.
(). 2 . p. 88-91.
7. , , , , 1993.
. 25. (3): 197-203.
8. 申佶求. 1988. 申氏本草學, . 壽文社. p. 456-457.

9. 辛民教. 1989. 臨床本草學, . 永林出版社. p. 392.
10. 彦正華. 1984. 臨床應用中藥學, . 人民衛生出版社. p. 218.
11. , , , 1978, ,
7-16.
12. , , . 1979, ,
, 17-38.
13. , , , . 1980.
, , 5-22.
14. , , , , . 1982.
Fusarium ,
21(2): 68-27
15. 王好古. 1987. 湯液本草, . 人民衛生出版社. p. 68
16. , 1975, *Pseudomonas fluorescens*
, 13: 143-156.
17. 李相仁. 1981. 本草學, . 修書院. p. 329.
28. 李時珍. 1987. 本草綱目, . 高文社. p. 16-17.

19. 李昌福. 1985. 大韓 植物 園監. 鄉文社. p. 724- 725
20. , . 1976.
- 21.
- 1996.
22. 趙鎮泰. 1992. . 農試論文集(園藝篇)
. 34(1): 72-75
23. 洪文和. 1974. 桔梗配合 漢方處方 統計的 研究. 生藥學會
誌. 5(1): 61-67.
24. Chung, H. S. 1975. *Studies on Cyindrocarpon destructans*
(Zins.) Scholten causing root rot of ginseng. Rept. Torrori
mycol Inst. (Japan) 12: 127- 138
25. Matuo, T. and Y. miyazawa. 1969, *Cyindrocarpon panacis*
sp. nov. causing root rot of ginseng. Trans, Mycol. Soc. Japan.
9: 109- 112

2

1

. 가 가 가
가 가
가
. 20
. , , ,
pH,
. 가 10 20%
. ,
, , 가 .
15 20kg/cm²
가 . 1. 2,

1. $4\text{Mg}/\text{m}^3$ 17.4, 20.3%, 19.3, 22.5%,
21.0, 3.0% .

2

1. 가

6, 7, 3, 6, 4 , 6
32 '97 1 '98 12

2.

1

2inch core

3 384

1m Auger

가

No. 10(

2mm) sieve

pH , Tyurin ,
 Lancaster (Stasar)
 (Perkinelmer 2380)
 NH₄N N03-N Kj el dahl .
 5

5cm

20cm .

70 24 willy mill 270mesh

0.5g .

Kj el dahl , P₂O₅ vanadate , K₂O, CaO, MgO

1g

Egg al buni n agar 28 4 7 ,

Rose bengal 25 3 5

3.

'97 3

10 .

1

pH 6.2, 21g/kg 가 84.4%

가 .

Table 1. Physicochemical properties of soil used in this experiment

pH	OM	P205	Ex. Cat. (cmol /kg)			Fe	Mn	Clay	Silt	Sand
			K	Ca	Mg					
1:5	g/kg	mg/kg				-- mg/kg	--	----	%	----
6.2	21	230	0.18	9.60	0.94	54	19	5.9	9.8	84.3

20 × 25cm 90 × 120cm 30cm 가

2 8 7 3 .

 20, 15, 18 kg/10a

, 2

.

4.

 2

, , , 4 1/2000a

pot 5 .

 2 5, 78%,

10, 71.2%, 21, 73.9%,

29, 41.9% .

, ,

Hydrometer

.

Table 2. Texture properties of soil used in this experiment

Soil texture	Clay(%)	Silt(%)	Sand(%)
Loamy Sand(LS)	5.0	17.0	78.0
Sandy loam(SL)	10.0	18.8	71.2
Silt loam(SiL)	21.0	73.9	5.1
Clay loam(CL)	29.0	41.9	29.1

3

pH 5.0 5.1
 2.3 2.8g/kg
 Cl EC 2.05dS/m
 pH 5.8 14.9g/kg
 pH 5.0, 3.8g/kg

Table 3. Chemical properties of soil used in this experiment

Soil texture	pH	OM	P205	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	S04	Cl	EC	NH NO3 -N -N
	1:5	g/kg	mg/kg	--	cmol/kg	--	-----	mg/kg	-----	-----	dS/m	mg/kg	
LS	5.0	2.8	142	0.49	1.10	0.29	9.2	13.5	0.68	114	630	2.05	16122
SL	5.1	2.3	121	0.33	0.76	0.25	8.0	11.7	0.63	95	326	1.3	15318
SiL	5.8	14.9	159	0.37	7.22	2.64	55.9	6.7	0.93	214	57	0.55	14946
CL	5.0	3.8	64	0.81	3.10	2.43	3.4	5.3	1.13	357	615	2.15	19520

'97 5 3 pot 5 .
20, 15, 18 kg/10a
2 .

5.

가 ,

SAS

.

3

1. 가

가.

1 . 가
'97 7 '98 8

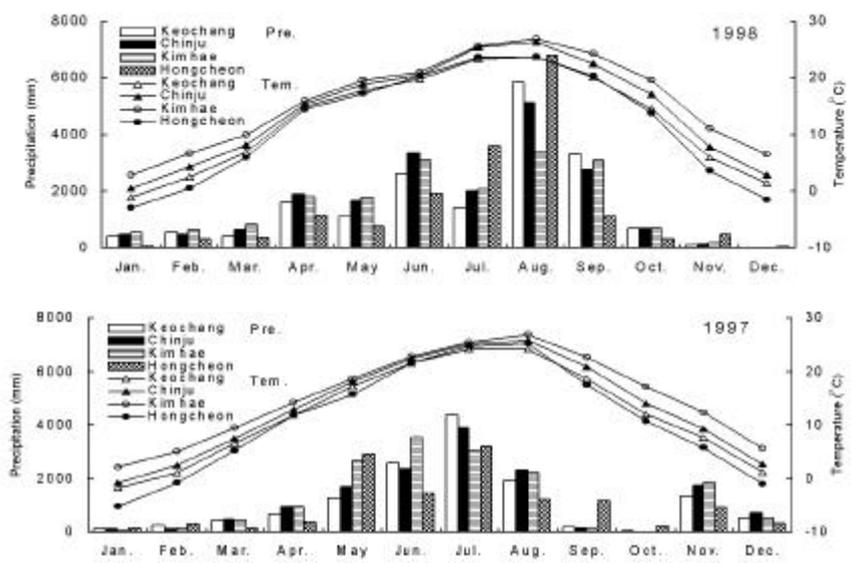


Fig. 1. Precipitation and temperature of sampling site in 1997 and 1998.

$$Y = 3.07X^2 - 87.16X + 649.26 \quad (R^2 = 0.947^{**})$$

$$Y = -478.68X^2 + 13403X - 90836 \quad (R^2 = 0.763^*)$$

$$Y = -0.0078X + 163.74 \quad (R^2 = 0.786^*)$$

$$Y = 0.0351e^{0.0007x} \quad (R^2 = 0.738^*)$$

14 가

가

17000mm

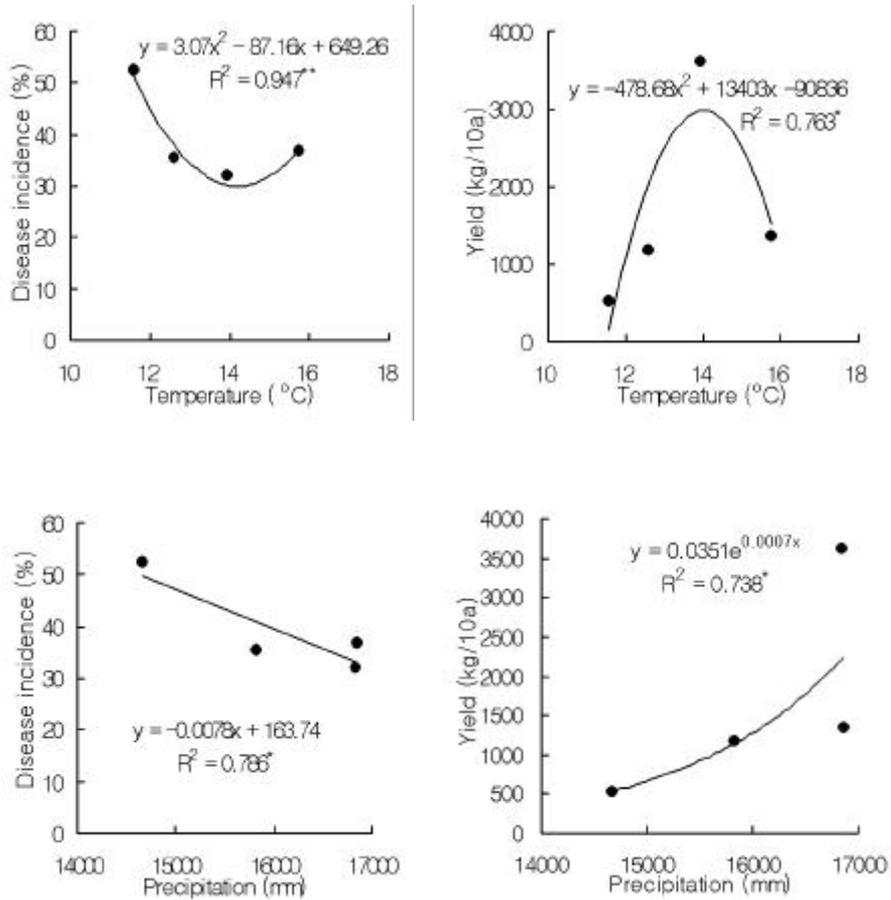


Fig. 2. Relationship between precipitation, temperature and disease incidence rate, yield.

4 가 8.0
 2.3 가 1
 130a 가 7.9a
 10,800kg/10a
 496kg/10a 가
 12.2kg/10a 가

Table 4. Cultural properties of surveyed areas

Region	No. of fields	Cropping year	Cropping area(a)	Fertilizer Application (kg/10a)			
				Compost	N	P	K
Koechang	4	3.8	7.9	1,063	8.7	7.0	7.0
Kinphae	7	3.1	11.6	496	7.7	6.3	6.3
Hanan	6	2.8	13.0	1,917	12.2	9.9	9.9
Chinju	6	8.0	21.7	900	6.6	5.3	5.3
Koseong	3	4.0	11.6	1,000	1.7	1.4	1.4
Hongcheon	6	2.3	130.0	10,800	7.6	6.1	0

3 3 가 44.8%
 가 6
 20.7% . 500kg/10a 가 48.3% 가
 4ton/10a 가 10.3%

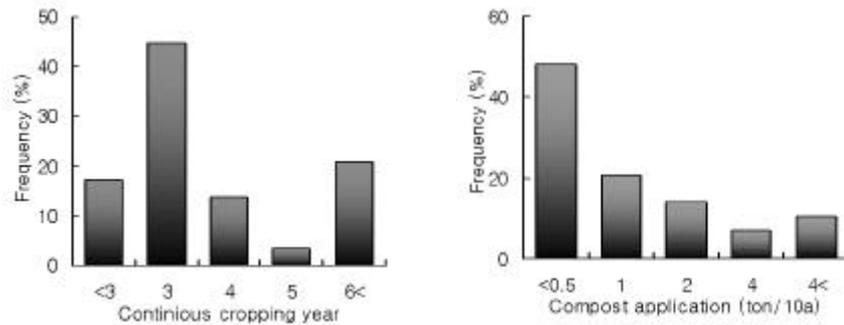


Fig. 3. Distribution percentage of continuous cropping year and compost application in surveyed areas.

5

Region	Slope (%)	Topography)	Drainage classes ²⁾	Direction
Koeseong	35.0	5	2.0	southeast
Kocheong	28.0	4.5	2.0	southeast
Kinhae	11.0	2.9	2.4	northeast
Hanan	16.0	3.5	2.8	northwest
Chinju	11.7	2.7	2.0	southeast
Hongcheon	7.5	2.8	3.2	northwest

Table 5. Morphological characteristics of soil in surveyed areas

Region	Slope	Topography)	Drainage classes ²⁾	Direction
Koeseong	35.0	5.0	2.0	southeast
Kocheong	28.0	4.5	2.0	southeast
Kinhae	11.0	2.9	2.4	northeast
Hanan	16.0	3.5	2.8	northwest
Chinju	11.7	2.7	2.0	southeast
Hongcheon	7.5	2.8	3.2	northwest

- 1) 1 : Flat, 2 : Undulating, 3 : Rolling, 4 : Hilly, 5 : Steeply slope
 2) 1 : Somewhat excessively drained, 2 : Well drained,
 3 : Poorly drained, 4 : Very poorly drained

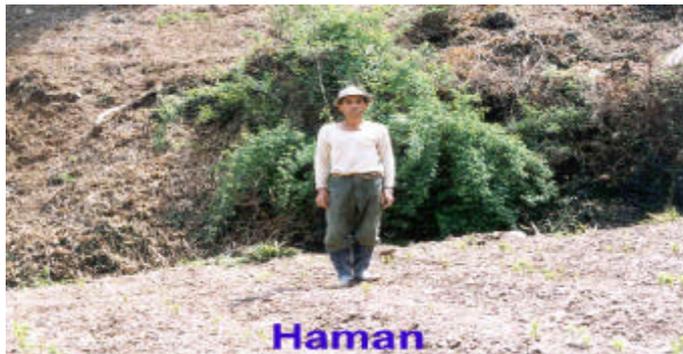


Fig. 4. Cultural field in Koechang and Hanan.



Fig. 5. Cultural field in Koseong and Chinju.

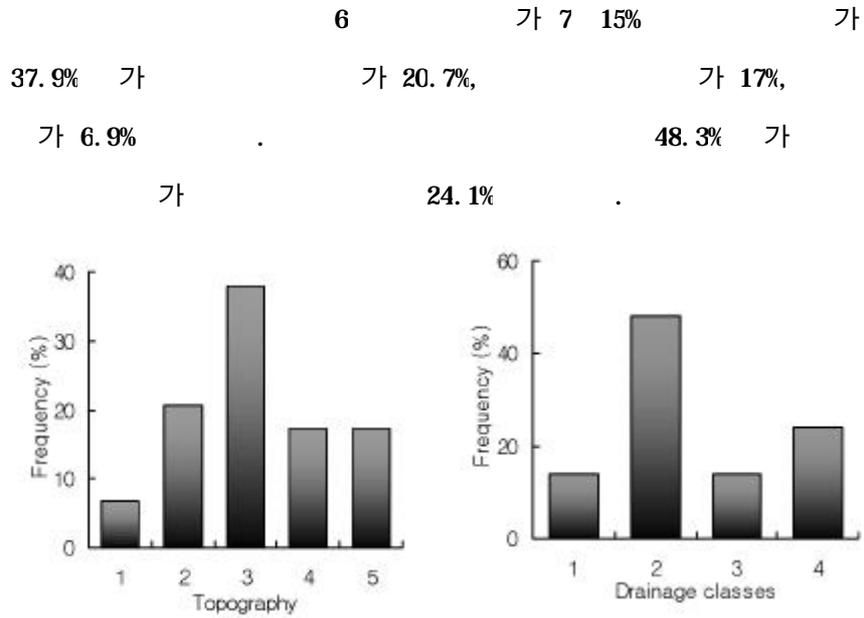


Fig. 6. Distribution percentages of topography and drainage classes.

6

가

Table 6. Correlations between fertilizer application and soil morphological characteristics($r=31$)

	Fertilizer application			Topography	Drainage classes
	N	P	K		
Drainage classes	0.217	0.217	0.095	0.402*	-
Compost application	-0.456*	-0.456*	-0.392*	-0.080	0.163
Slope	0.331	0.331	0.355	0.946***	0.303

배수등급은 화학비료 사용량과 상관이 없어 일반 농가에서 토양 수분상태를 고려하지 않고 시비하는 것으로 나타났다. 퇴비사용량은 질소, 인산, 칼리 사용량과 부의상관을 나타내어 퇴비사용량이 많을 경우 화학비료를 감비하는 것으로 나타나 긍정적인 시비법이라고 판단되었다.

지형에 따른 퇴비사용량을 보면 그림 7과 같이 급경지가 될 수록 질소, 인산 시비량이 많은 것으로 나타났다. 이러한 경향은 퇴비사용량과 관계가 있겠지만 경사가 높을수록 유실되는 비료량이 많기 때문에 비료량을 증시하는데 기인된 것으로 판단되었다.

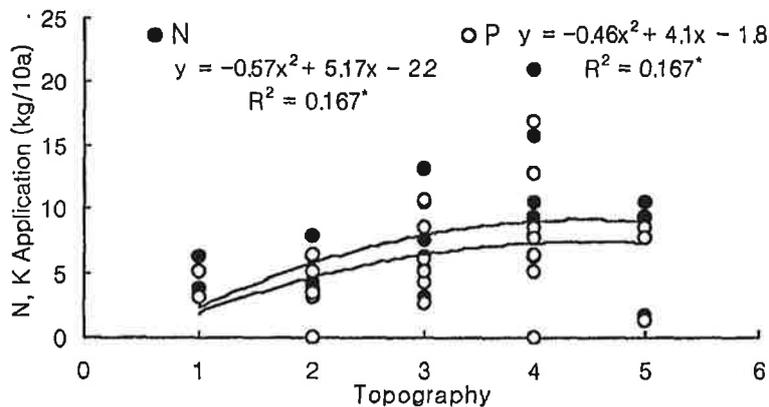


Fig. 7. Relationship between topography and N, K applications.

도라지 재배농가 대부분은 병발생 예방을 위한 농약살포가 없었으며 일부농가에서 카운터약제, 지오텍스, 데브리놀 등을 사용하고 있었지만 카운터약제가 어느정도 예방효과가 있었고 나머지는 효과가 없는 것으로 나타났다.

2.

가.

7 가

4. 20cm, 57g 3, 617kg/10a

56. 8, 52. 5%

30. 0, 32. 2%

가

524kg/10a

Table 7. Growth and yield of *platycodon glaucum* in survey areas

	Root diameter cm	Lateral root root/plant	Fresh root weight g/root	Disease incidence %	Yield kg/10a
Koechang	2. 65	2. 0	44. 9	35. 3	1, 175
Kinhae	1. 70	1. 6	18. 8	36. 7	1, 357
Hanan	2. 20	4. 0	36. 1	56. 8	950
Chinju	4. 20	10. 2	57. 0	32. 2	3, 617
Koseong	3. 10	4. 2	45. 9	30. 0	2, 500
Hongcheon	1. 82	2. 3	5. 4	52. 5	524

8

Table 8. Correlations between growth and fertilizer applications

	Fertilizer application			
	Compost	N	P	K
Yield	-0. 229	-0. 188	-0. 188	-0. 101
Disease incidence	0. 213	0. 253	0. 254	0. 243
Root diameter	0. 186	0. 156	0. 156	0. 156
Lateral root	0. 153	0. 202	0. 203	0. 199

$$Y=625.14X-739.53(R^2=0.715^{***})$$

$$Y=3342.4e^{-0.0274X}(R^2=0.354^{**})$$

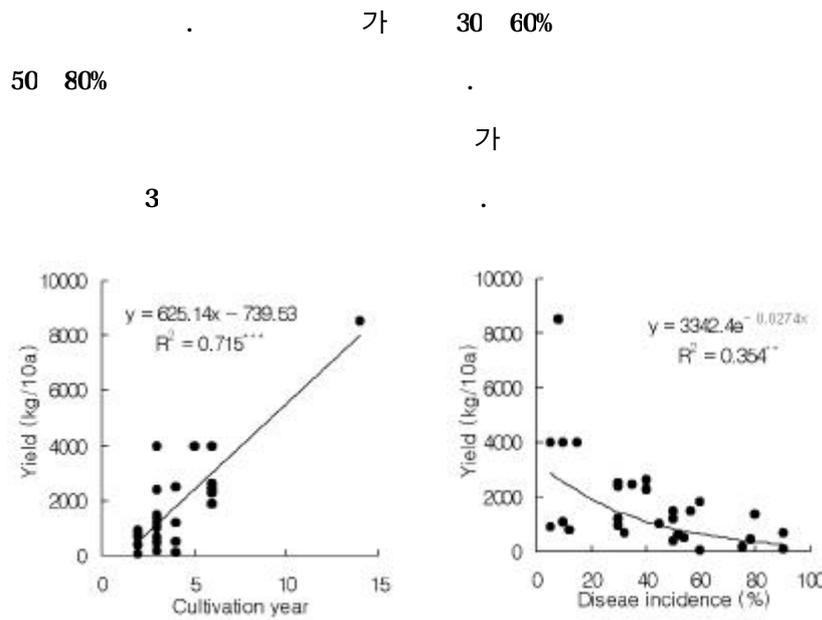


Fig. 8. Relationship between continuous cropping year, disease incidence rate and yield.

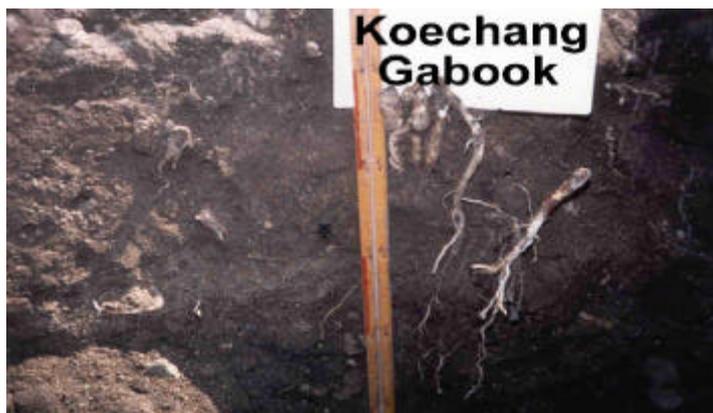


Fig. 9. Growth of *platycodon glaucum* in Koechang.

$$Y = 19.1X - 5.26 (R^2 = 0.592^{***})$$

$$Y = -3.27X^2 + 30.6X - 18.1 (R^2 = 0.241^{**})$$

7

$$Y = 7201.6e^{-0.775X} (R^2 = 0.458^{***})$$

$$Y = 509.1X^2 - 3784.8X + 7947 (R^2 = 0.322^{**})$$

가

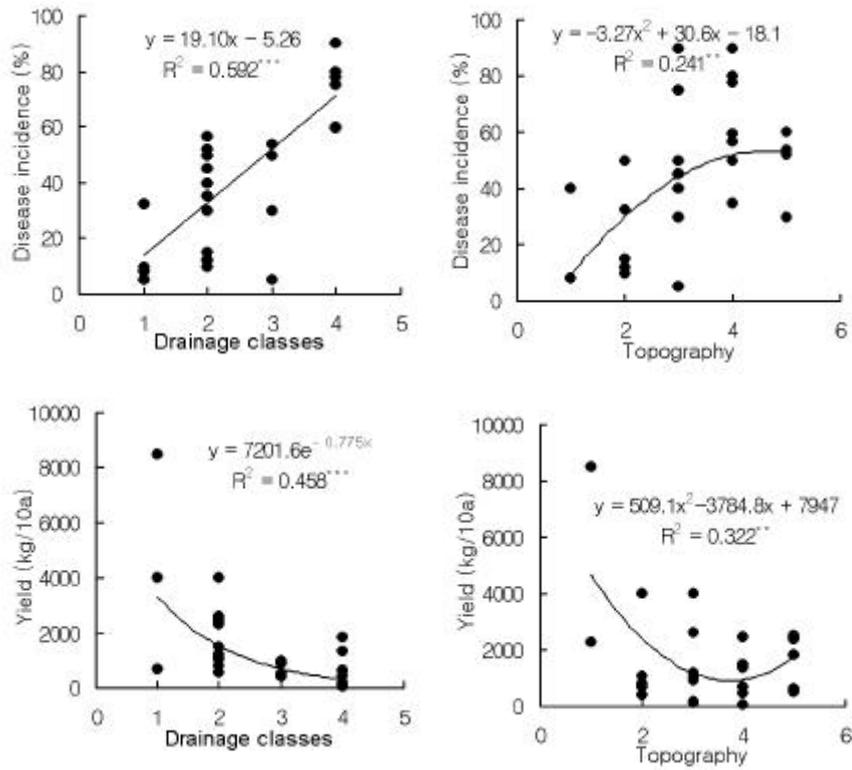


Fig. 10. Relationship between drainage classes, topography and disease incidence rate.

$$Y = -0.093X^2 + 4.3X + 8.5 \quad (R^2 = 0.261^{**})$$

. (11) 20%

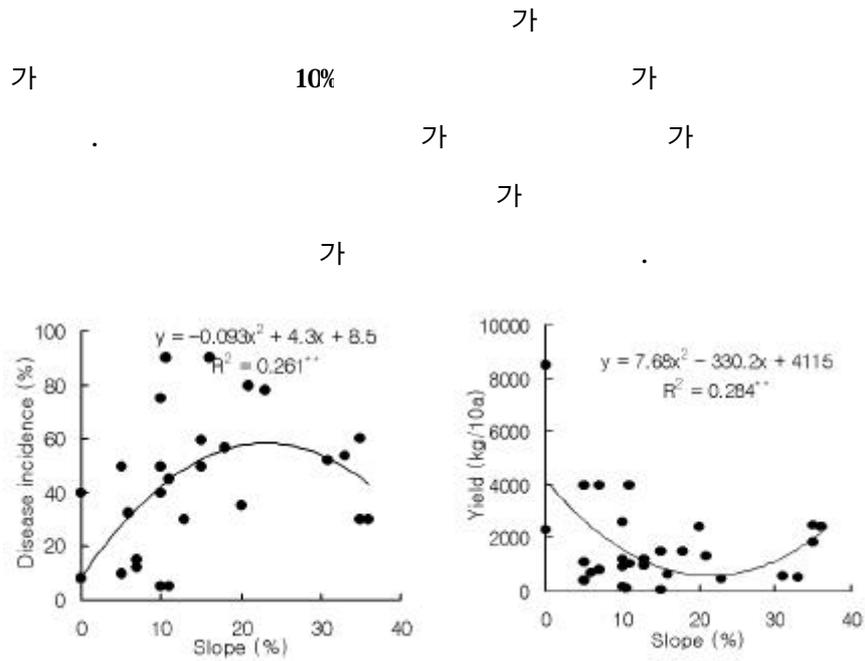


Fig. 11. Relationship between slope and disease incidence rate, yield.

9
 47.8% 가
 80cm 43cm
 31.3, 29.2%
 66.4, 62%
 0.1
 2.3 6.6% 3.3 5.6%
 Hasegawa 10 20%

가

Table 9. Physical properties of soil in surveyed areas

Region		Soil depth cm	Clay ----- %	Silt ----- %	Sand ----- %	Bulk density g/cm ³	Misture ----- %	Porosity ----- %	Stor ----- %
Koechang	Normal	67	15.5	18.2	66.4	1.22	21.0	53.9	33.2
	irjury	-	17.4	16.2	66.4	1.33	24.4	49.8	31.0
Kinhae	Normal	59	31.6	49.1	19.3	1.11	27.3	58.4	30.3
	irjury	-	31.0	48.6	20.5	1.24	31.9	52.8	34.5
Hanan	Normal	43	29.5	35.5	35.1	1.09	23.4	58.9	23.2
	irjury	-	28.8	33.2	38.0	1.18	26.4	55.6	28.9
Chinju	Normal	56	16.0	51.0	34.0	1.23	30.3	53.7	50.1
	irjury	-	17.0	46.0	37.0	1.33	36.9	49.8	45.4
Koseong	Normal	50	14.0	54.0	32.0	1.06	33.2	40.1	41.3
	irjury	-	14.0	57.0	29.0	1.17	35.5	44.3	41.5
Ergdeon	Normal	80	11.0	28.0	60.0	1.213	18.9	54.2	30.0
	irjury	-	12.0	25.0	64.0	1.305	23.2	50.8	30.4

$$Y=0.0037X^2-1.186X+99.71(R^2=0.399^{***})$$

(12)

$$Y=4.36X+8.93(R^2=0.201^*)$$

$$Y=104.7X-80.99(R^2=0.295^{**}),$$

$$Y=1.24X+$$

$$14.14(R^2=0.196^*)$$

$$Y=-3.11X+215.9(R^2=0.220^*),$$

$$Y=-0.75X+67.85(R^2=0.178^*)$$

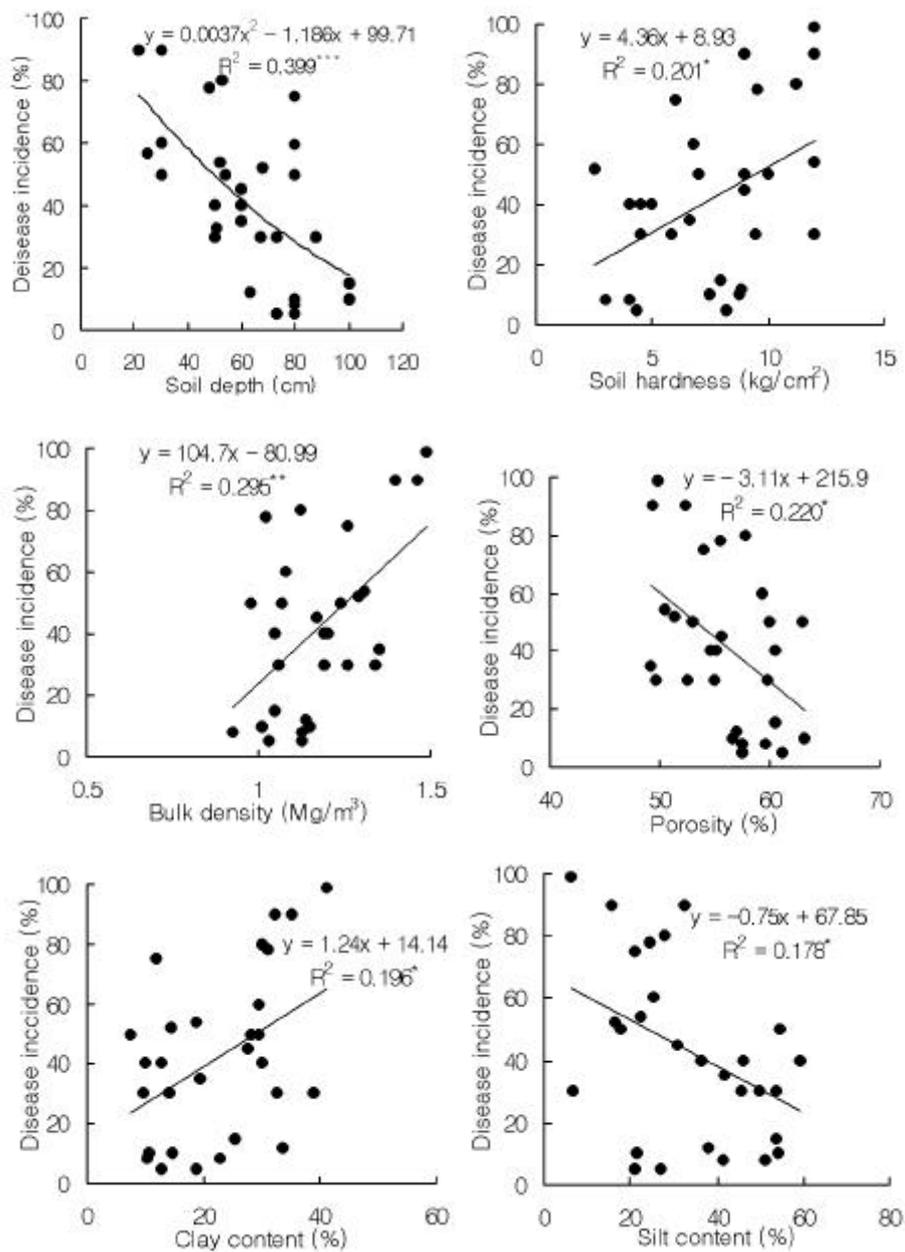


Fig. 12. Relationship between physical properties and disease incidence rate.

$$Y = 2.805X - 17.59 (R^2 = 0.425^{***})$$

$$Y = -121.13X + 4296 (R^2 = 0.201^*)$$

30%
 80cm , 5kg/cm² , 1.06
 Mg/n² , 60% , 17% .
 50.5% , 12.8% 가

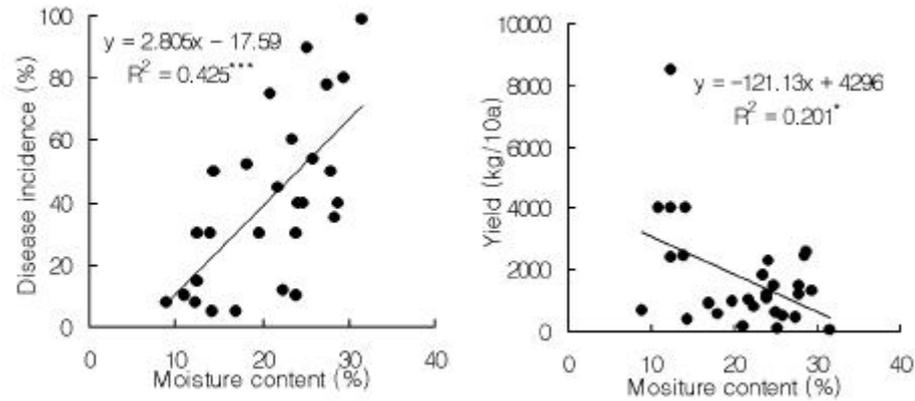


Fig. 13. Relationship between moisture content and disease incidence rate, yield.

$$Y = 0.51X^2 - 34.96X + 1707.2 (R^2 = 0.127^2)$$

$$Y = -5.06X^2 - 89.4X + 2784 (R^2 = 0.110^2)$$

$$Y = X^2 - 3387.6 \ln(X) + 13287 (R^2 = 0.204^2)$$

$$Y = -0.94X^2 - 25.5X + 2866 (R^2 = 0.160^2)$$

$$Y = 15.2X^2 - 1498X + 37705 (R^2 = 0.252^2)$$

$$Y = 53.05X - 108.65 (R^2 = 0.232^2)$$

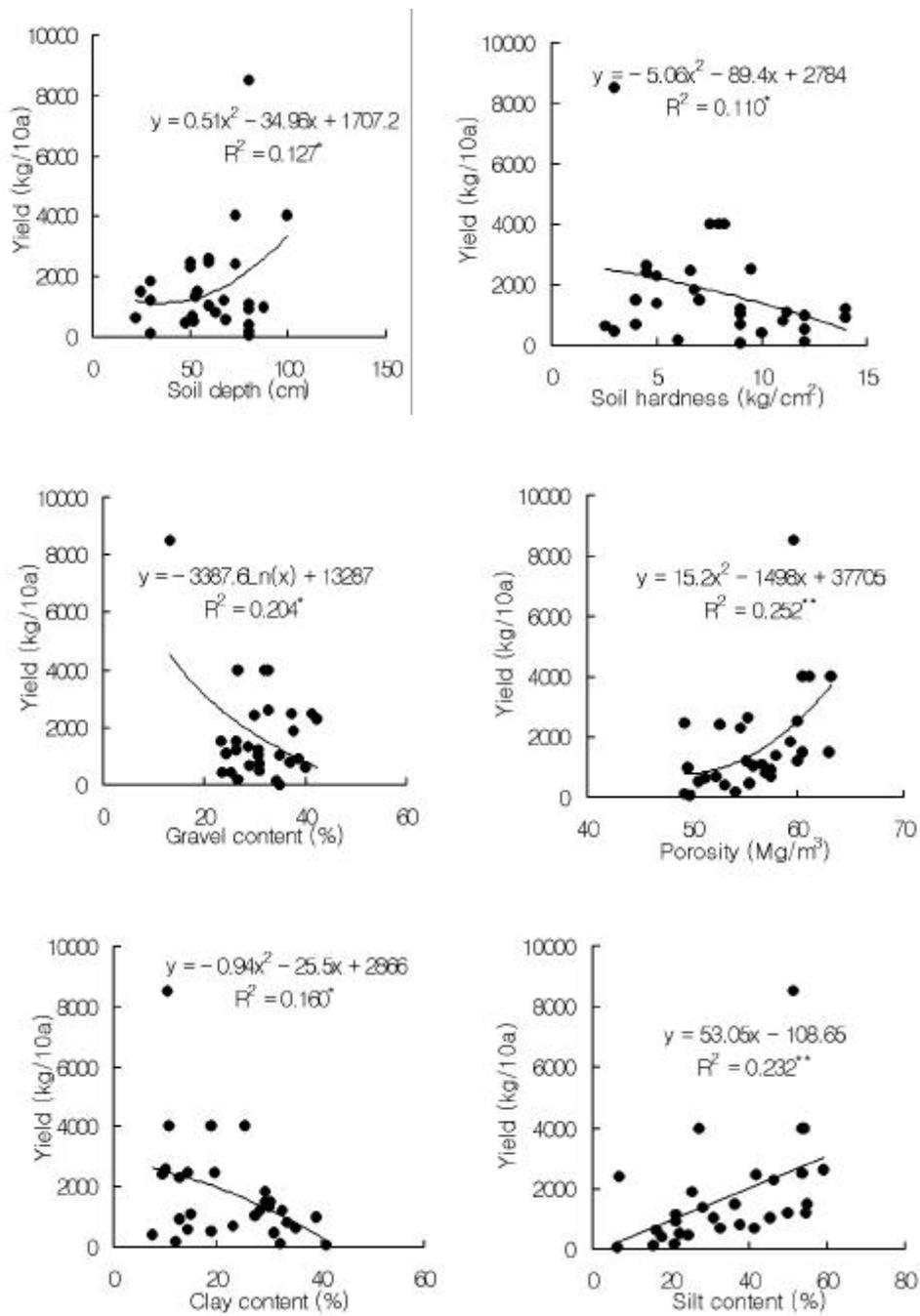


Fig. 14. Relationship between physical properties and yield.

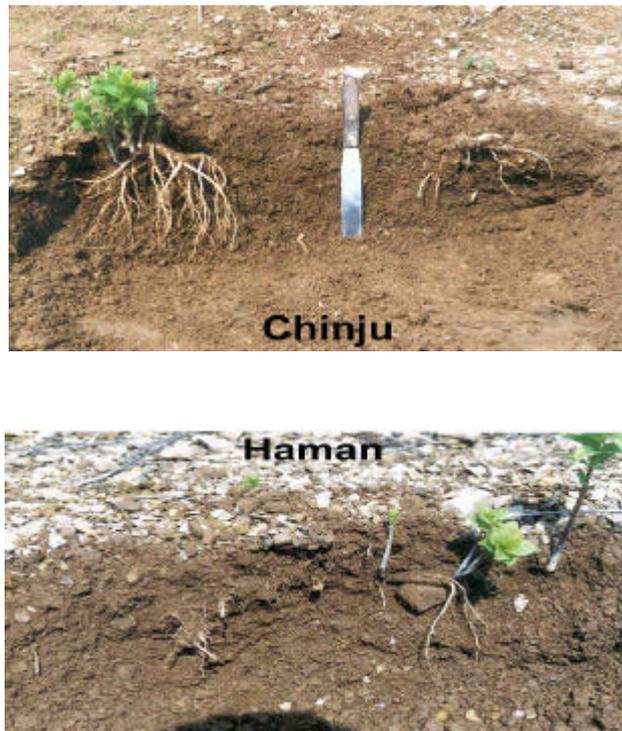


Fig. 15. Growth of *platycodon glaucum* in Chinju and Haman.

10 pH ,

4.6 4.8

가

가

39g/kg

14g/kg

Table 10. Chemical properties of soil in surveyed areas

Region		pH	OM 1:5 g/kg	P2O5 ng/k g	K -- cncl/kg	Ca -- cncl/kg	Mg -- cncl/kg	Fe -- ng/kg	Mn -- ng/kg	Zn -- ng/kg	EC dS/m	NH4-N ng/kg	NO3-N ng/kg
1	Tcpsoil	4.6	31	375	0.4	0.6	0.4	55	5.8	1.4	0.15	83	7
	Subsoil	4.6	26	363	0.2	1.2	0.4	53	3.2	1.0	0.14	83	6
2	Tcpsoil	5.2	22	194	0.7	5.8	2.0	51	10.8	2.9	0.36	87	13
	Subsoil	5.1	16	138	0.4	5.6	2.0	48	9.0	2.0	0.26	90	8
3	Tcpsoil	4.7	24	379	0.6	6.5	3.0	47	15.4	3.9	0.41	91	21
	Subsoil	4.8	21	399	0.6	6.3	3.1	44	13.3	3.2	0.34	86	15
4	Tcpsoil	5.4	14	303	0.4	2.1	1.6	57	42	4.4	0.1	107	11
	Subsoil	5.4	12	284	0.2	2.0	1.5	61	36	4.4	0.2	113	9
5	Tcpsoil	5.2	39	1206	1.5	1.5	1.1	41	54	9.5	0.6	152	29
	Subsoil	5.1	31	941	1.3	1.1	1.0	40	41	7.9	0.5	147	30
6	Tcpsoil	5.4	19	736	0.5	1.1	0.7	52	27	6.3	0.3	70	23
	Subsoil	5.4	19	875	0.4	1.0	0.8	53	28	6.8	0.3	56	22

* 1: Koechang, 2: Kinhae, 3: Hanan, 4: Chinju, 5: Koseong,
6: Hongcheon

Ca, Mg , 5.8 6.5, 2.0

3.0ng/kg

NH4-N 152ng/kg 가

70ng/kg 가 , P2O5, K

가

11

K, EC NH₄-N Mn
 P₂O₅, Ca, Mg
 Fe NH₄-N
 K, EC NH₄-N Mn

Table 11. Chemical properties of soil

		pH	OM	P ₂ O ₅	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	EC	NH ₄ -N	NO ₃ -N
		1:5	g/kg	ng/kg	--	cncl/kg	--	--	ng/kg	--	dS/m	ng/kg	ng/kg
Top soil	Normal	5.5	15.5	426	0.42	1.96	1.38	59	39	5.2	0.15	90	12
	Injury	5.5	15.2	443	0.55	2.29	1.46	59	31	5.3	0.21	108	12
ISE(5%)		0.32	9.07	47.91	0.11	0.49	0.22	6.2	6.6	0.6	0.04	15.2	8.6
sub soil	Normal	5.4	14.4	471	0.31	1.80	1.30	61	35	5.3	0.21	95	14
	Injury	5.5	14.3	440	0.40	1.89	1.31	74	33	5.1	0.18	99	13
ISE(5%)		0.15	2.54	83.17	0.09	0.26	0.16	46	5.1	0.9	0.10	10.1	17.27

12

88.27, 82.40 × 10⁴(cfu(Colony Forming Unit)/g

37.67, 38.42 × 10⁶ cfu/g

80.27 × 10⁴ cfu/g 가 /

(B/F) 437 가 103 가

Table 12. Distribution of soil microbial flora in surveyed areas

Region		Bacteria × 10 ⁶	Actinomyces × 10 ⁵	Fungi × 10 ⁴	B/F ratio
Koechang	Top-soil	37.67	65.17	30.93	122
	Sub-soil	33.97	19.13	23.55	144
Kinhae	Top-soil	88.27	88.30	34.63	255
	Sub-soil	77.00	86.41	20.29	379
Eanan	Top-soil	82.40	82.57	80.27	103
	Sub-soil	67.80	85.82	40.12	169
Chinju	Top-soil	48.15	56.73	18.56	259
	Sub-soil	34.95	33.04	10.52	332
Koseong	Top-soil	38.42	30.08	29.30	131
	Sub-soil	19.41	30.08	14.97	130
Eongcheon	Top-soil	55.15	40.74	12.63	437
	Sub-soil	31.99	53.86	11.46	279

13

50.57 × 10⁶

53.16 × 10⁵

B/F

418

281

Table 13. Soil microbial flora in surveyed areas

Region		Bacteria (× 10 ⁶)	Actinomyces (× 10 ⁵)	Fungi (× 10 ⁴)	B/F ratio
Topsoil	Normal	50.57	53.16	15.04	418
	Injury	37.98	46.18	19.82	281
LSI(5%)		22.87	21.50	7.30	248.32
Subsoil	Normal	31.50	41.93	11.86	404
	Injury	31.75	44.81	10.49	373
LSI(5%)		20.00	9.41	3.76	258

Fe, Zn

T-N, P₂O₅, K₂O

가

Table 14. Chemical properties of root in surveyed areas

Region		T-N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	Na ₂ O	Fe	Mn	Zn	Cu	
		----- % -----						----- mg/kg -----				
Kyecheong	Normal	1.65	0.52	0.88	0.08	0.35	0.07	621	37	39	14.7	
	Injury	1.70	0.62	2.15	0.07	0.36	0.06	920	40	27	13.6	
Kinkae	Normal	1.99	1.28	2.53	0.11	0.34	0.09	776	58	47	10.8	
	Injury	2.05	1.42	2.77	1.11	0.39	0.11	2047	101	60	15.7	
Eanan	Normal	2.16	1.01	2.41	0.09	0.36	0.08	727	75	51	13.5	
	Injury	2.62	1.34	2.99	0.10	0.42	0.11	1593	110	53	13.8	
Chirju	Normal	1.74	0.89	2.02	0.12	0.46	0.86	400	194	57	35.4	
	Injury	2.1	0.96	2.45	0.12	0.41	0.95	247	164	54	8.11	
Kcseong	Normal	2.29	1.16	2.6	0.13	0.45	0.94	163	62.3	61	16.8	
	Injury	1.37	0.99	2.2	0.12	0.39	0.88	150	40.1	52	5.26	
Ergcheon	Normal	1.51	1.07	2.65	0.1	0.25	0.85	56.7	199	60	6.45	
	Injury	1.63	1.07	3.06	0.1	0.28	0.88	52.4	207	53	8.2	

15

K₂O 2.56%,

Fe 968ng/kg CaO 5%

Table 15. Chemical properties of normal and injury root

	T-N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	Fe	Mn	Zn	Cu
	----- % -----					----- ng/kg -----			
normal	1.83	0.95	2.21	0.12	0.37	544	116	52	19
injury	1.99	1.07	2.56	0.10	0.38	968	119	51	12
LSD(5%)	0.32	0.10	0.277	0.01	0.04	343.19	26.65	1.18	17.9

CaO

16

$Y=20505X-367.9$ ($R^2=0.129$)

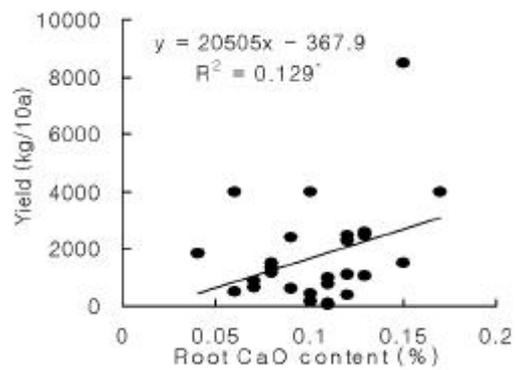


Fig. 16. Relationship between root CaO content and yield.

3.

17 .



Fig. 17. Soil survey and growth of *platycodon glaucun*.

$$Y = 17.24X + 0.95 \quad (R^2 = 0.948^{***}),$$

$$Y = 12.01X - 5.74 \quad (R^2 = 0.946^{***}) \quad (18).$$

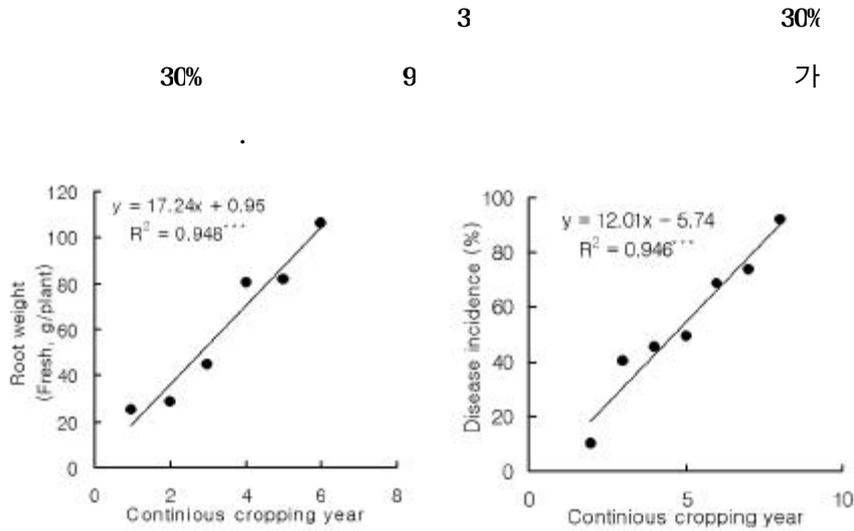


Fig. 18. Relationship between continuous cropping year and root weight and disease incidence rate.

16 pH 5.3 5.9

Fe 3 가 16.4ng/kg

pH 0.3 0.9 , P2O5, Ca, Fe, Mn

Table 16. Chemical properties of soil

Continuous cropping Year	pH	OM	P2O5	K	Ca	Mg	Fe	Mn	EC	NH4-N	NO3-N
	1:5	g/kg	ng/kg	--	cnol/kg	--	ng/kg	ng/kg	cS/m	ng/kg	ng/kg
2yr	5.7	7.6	143	0.19	4.72	1.20	32.5	2.19	0.20	74	3.0
3yr	5.9	9.4	214	0.17	5.12	1.28	16.4	3.13	0.19	76	3.2
4yr	5.7	7.8	128	0.15	4.63	0.99	24.4	1.98	0.15	77	3.0
5yr	5.3	6.8	90	0.13	5.43	1.08	11.0	1.55	0.10	73	2.0
6yr	5.8	9.6	124	0.18	4.56	1.03	23.6	2.18	0.11	76	2.5
7yr	5.5	10.4	121	0.16	3.56	1.08	33.4	2.56	0.15	80	2.7
8yr	5.8	10.6	143	0.14	4.71	1.13	21.3	2.59	0.13	80	3.1

P2O5, K, Fe, Mn Zn
가 .

Table 17. Chemical properties of soil at normal and injury root

Continicus cropping Year	pH	OM	P2O5	K	Ca	Mg	Fe	Mn	EC	NH4-N	NO3-N
	1:5	g/kg	ng/kg	--	cncl/kg	--	ng/kg	dS/m	ng/kg		
3yr normal	5.9	7.9	167	0.15	5.48	1.25	16.1	3.13	0.15	75	3.0
3yr injury	6.0	11.0	260	0.20	4.76	1.30	16.7	3.13	0.23	76	3.3
6yr normal	5.9	7.2	106	0.15	5.11	1.02	14.8	1.70	0.10	78	2.0
6yr injury	5.9	7.0	94	0.13	5.24	1.05	20.4	2.33	0.10	76	2.0
7yr normal	6.1	9.8	102	0.18	4.57	1.16	21.3	1.53	0.25	81	2.0
7yr injury	5.6	12.9	139	0.16	3.98	1.22	30.8	2.34	0.10	79	3.0
8yr normal	5.9	10.7	142	0.12	3.27	1.22	18.5	1.73	0.12	77	2.0
8yr injury	5.7	14.0	191	0.17	5.87	1.15	25.5	3.20	0.15	83	5.3

18 . 가

T-N, P2O5, MgO

T-N, P2O5, K2O

Table 18. Chemical properties of normal and injury root

Continicus cropping Year	T-N	P2O5	K2O	CaO	MgO	Na2O	Fe	Mn	Zn	Cu
	-----%						----- ng/kg -----			
3yr normal	3.46	1.70	2.80	0.12	0.48	0.19	1320	61	66	23
3yr injury	4.49	1.89	3.52	0.14	0.88	0.25	1756	90	86	21
6yr normal	2.02	0.89	1.30	0.04	0.32	0.07	693	35	37	10
6yr injury	3.00	1.13	1.67	0.10	0.41	0.18	907	65	46	15
7yr normal	1.24	0.71	1.92	0.04	0.28	0.07	858	42	45	12
7yr injury	2.17	0.94	2.08	0.06	0.57	0.15	2310	139	73	17
8yr normal	0.52	0.54	1.98	0.05	0.23	0.12	689	51	30	8
8yr injury	1.78	0.94	2.28	0.05	0.30	0.33	1610	57	52	12

4.

19

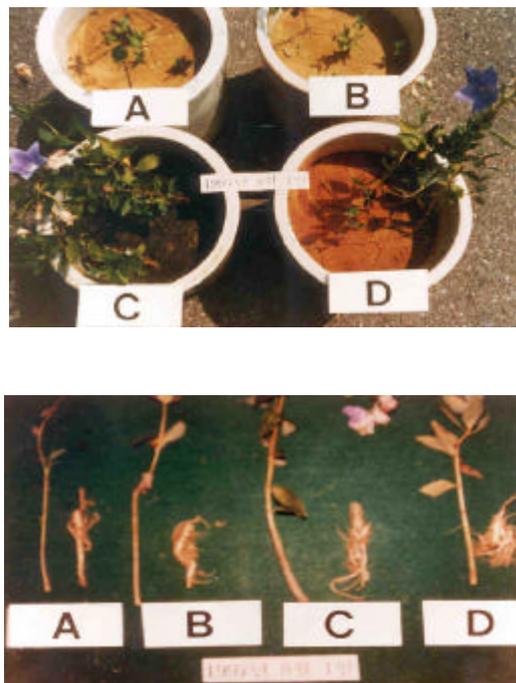


Fig. 19. Growth and yield of *platycodon glaucun*.

19 pH 가 6.4
 5.7 5.8 . P2O5 Fe
 Na

Table 19. Chemical properties of soil after experiment

Texture		pH	OM	H2O	K	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Zn	EC	N-N	MG-N
		1:5	g/kg	mg/kg	----	mg/kg	----	mg/kg	----	mg/kg	----	mg/kg	μS/cm	mg/kg
IS	Topsoil	5.7	1.3	95	0.26	2.78	0.17	0.09	10.8	12.0	2.25	0.13	13	3
	Subsoil	5.4	1.1	93	0.28	2.81	0.17	0.09	10.0	12.2	1.61	0.37	16	2
SL	Topsoil	5.8	1.5	88	0.22	2.43	0.15	0.09	8.7	10.9	1.17	0.12	5	2
	Subsoil	5.7	1.3	83	0.25	2.57	0.14	0.10	8.7	11.0	1.12	0.15	13	1
SiL	Topsoil	6.4	1.7	135	0.28	7.04	1.61	0.26	11.1	16.1	1.55	0.15	16	5
	Subsoil	6.3	1.4	141	0.33	7.20	1.61	0.27	12.6	12.8	1.54	0.17	16	4
CL	Topsoil	5.8	2.0	40	0.61	3.82	1.16	0.21	4.3	7.5	1.78	0.18	10	6
	Subsoil	5.4	2.9	36	0.69	3.99	1.30	0.25	4.0	6.6	1.60	0.48	14	5

20

10. 38g, 1. 34cn, 16. 8cn, 57. 9cn 1
 5. 46g 가 .

Table 20. Growth of different soil texture

Soil texture	Root weight	Shoot weight	Root diameter	Root height	Plant height
	g/plant		cm		
IS	2.25	1.19	0.95	17.53	26.2
SL	2.25	1.21	1.01	10.88	27.5
SiL	5.46	10.38	1.34	16.80	57.9
CL	5.01	4.50	1.30	11.95	52.2

5.

SAS

21 , 14 , , 4% , .

In , 5kg/cm², 0.96 Mg/m²

, 63%, 11 13%, 5 10%, 63.8%가 가 가

Table 21. Statistical analysis of disease incidence rate

	Disease incidence rate(%)				
	20	40	60	80	100
Ave. temperature ()	14	13, 16	12	11	<11
Direction	Southeast		Northwest		
Topography	Flat, undulating	Holling	Hilly	Steeply slope	Steeply slope<
Slope (%)	<4	10	15	20	20<
Drainage classes*	1	2	3	4	5
Cultivation year	<3	3	4 5	6 8	8<
Soil depth (cm)	100<	60 80	40 59	20 39	<20
Soil hardness (kg/cm ²)	5	7.1	11.7	16.3	20.9
Bulk density (Mg/m ³)	0.96	1.16	1.35	1.54	1.73
Porosity (%)	63.0	56.6	50.1	43.7	37.3
Moisture content (%)	11 13	14 21	22 26	27 29	30<
Clay content (%)	5 10	11 21	21 29	30 39	40<
Silt content (%)	63.8	37.1	10.5	5	<5
Soil texture	SiL	I, SL	SCL	CL	SC, C

* 1 : Somewhat excessively drained, 2 : Well drained,

3 : Imperfectly drained 4 : Poorly drained, 5 : Very poorly drained

4

6,

7, 3, 6, 4, 6 32

$$Y=3.07X_2-87.16X+649.26(R^2=0.947^{**}),$$

$$Y=-478.68X_2+13403X-90836(R^2=0.763^*),$$

8.0

2.3

가 1

130a

가

가

7.9a

10,800kg/10a

496kg/10a

35.0%

28%

가 11.7, 11.0, 7.5%

가

가

4.20cn,

57g

3,617kg/10a

56.8, 52.5%

30.0, 32.2%

$$Y=19.1X-5.26(R^2=0.592^{***}),$$

$$Y=-3.27X_2+30.6X-18.1(R^2=0.241^{**}),$$

$$Y=0.0037X_2-1.186X+99.71(R^2=0.399^{***}),$$

$$Y=4.36X+8.93(R^2=0.201^*),$$

$$Y=104.7X-80.99(R^2=0.295^{**}),$$

$$Y=1.24X+14.14(R^2=0.196^*),$$

$$Y=-3.11X+215.9(R^2=0.220^*),$$

$$Y = -0.75X + 67.85 (R^2 = 0.178^*)$$

$$Y = 7201.6e^{-0.0001X} (R^2 = 0.458^{***}), \quad Y = 509.1X^2 - 3784.8X + 7947$$

$$(R^2 = 0.322^{**}), \quad Y = 0.51X^2 - 34.96X + 1707.2 (R^2 = 0.127^*),$$

$$Y = -5.06X^2 - 89.4X + 2784 \quad (R^2 = 0.110^*),$$

$$Y = X^2 - 3387.6 \ln(X) + 13287 (R^2 = 0.204^*), \quad Y = -0.94X^2 - 25.5X + 2866$$

$$(R^2 = 0.160^*), \quad Y = 15.2X^2 - 1498X + 37705 (R^2 = 0.252^*),$$

$$Y = 53.05X - 108.65 (R^2 = 0.232^{**})$$

K, EC NH₄-N Mn
CaO

$$Y = 20505X - 367.9 (R^2 = 0.129^*)$$

Fe, Zn T-N, P₂O₅, K₂O

가

$$1 \quad Y = 17.24X + 0.95 (R^2 = 0.948^{***}),$$

$$Y = 12.01X - 5.74 (R^2 = 0.946^{***})$$

T-N, P₂O₅, MgO

T-N, P₂O₅, K₂O 2

pH 가 6.4

5.7 5.8 P₂O₅ Fe

10.38g,

1.34cn, 16.8cn, 57.9cn 1 5.46g

가 1

4, , 0

6%, , 1m ,

5kg/cn² , 1.0 Mg/n² , 58 63%,

11 13%, 5 10%, 38 64%가

가 가

5

1. . 1988. - , , . p. 215.
2. . 1995. . p.9 32.
3. , . 1980. () . 18: 172 179.
4. , , , . 1988. *Iusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* *Fythium zingiberun* . 4 : 271 277.
5. . 1992. . 6 : 7 16.
6. 李靈潭. 1974. 藥草栽培典書. 五星出版社. pp. 95 100.
7. , . 1998. , . 17(1) 1 4.
8. , , . 1990. 가 . 6 : 338 342.

9. 李壹鎬, 陸昌洙, 韓康完, 朴贊洙, 朴錫, 南基熱. 1980. 人蔘圃地土壤特性 人蔘 生育 收量 影響. 高麗人蔘學會誌. 4(2) :145 157.
10. 鄭求馥, 金福榮, 金奎植, 李宗植, 柳寅秀, 1996. 29(2) : 158 164.
11. 鄭錫來. 1961. 藥草栽培 利用法. 英倫社. pp. 43 46.
12. , , , , 1985. . 18(2) : 134 139.
13. , , , , . 1987. . 20(3) : 205 208.
14. 趙仁相, 玄炳根, 趙顯準, 張龍善, 愼齊晟. 1997. 가 . 30(1) : 51 55.
15. , . 1997. 充填 砂壤土 容積密度, 容積水分 含量 硬度 . 30(1) : 46 59.
16. 趙熙科. 1981. 土壤 硬度가 樹根 分布 影響 -砂防施工地. 後植 - 造林地 . 全南大農漁村開發研究 16(1):17 25.

17. 陳鉉五, 李明鐘, 申榮五, 金?齊, 全尙恨. 1994. 森林土壤學. p89 153.
18. 許泰九, 趙仁相, 閔庚範, 嚴基泰. 1984. 土壤 代表的物理化學的 特性. *韓土肥誌*. 17(4):330 336.
19. Gabrielle B., S. Menasseri and S. Mouot. 1995. Analysis and field evaluation of the ceres models water balance component. *Soil Sci. Soc. J.* 59 : 1403 1412.10
20. Gupta R. P. 1994. Physical rating of coarse textured soils to quantify production potential for sorghum. p. 306 311. In 15th World Congress of Soil Science. Vol. 5a. Symposia Transactions. July 10 16. 1994. Acapulco. Mexico.
21. Hallmark W. and Barber S. A. 1981a. Root growth and morphology, nutrient uptake and nutrient status of early growth of soybean as affected by soil K and bulk density. *Agr. J.* 76: 209 212.
22. Hallmark W. and Barber S. A. 1981a. Root growth and morphology, nutrient uptake and nutrient status of soybean as affected by soil K and bulk density. *Agr. J.* 73: 779 781.
23. Hasegawa S. 1994. Evaluation of water and oxygen supply

ability of soils to suffice the demands of crops. *Soil Physical Conditions and Plant Growth* 69(S) : 55-66.

24. Jeffrey S.K. 1995. Evaluation of soil water retention models based on basic soil physical properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59: 1134-1141.

25. SAS. 1988. SAS User's Guide. Release 6.03 Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

26. 權泰永, 鄭奇埰, 金鍾秀, 金昌吉, 朴善道, 崔富述. 1998. 鬱陵島川芎栽培地連作障害原因調査. 40(1) : 39-43.

27. 南基烈. 1980. 人蔘林間栽培가生育品質影響. 忠北大學校論文集. 6 : 69-80.

3

1

가

가

20

가

가

가

Cylindrocarpon, Fusarium

, *Rhizoctonia*

가

Rhizoctonia solani

. *Rhizoctonia solani*

, , 가 , .
가 가 .

2

1.

(가)

1% 30 - 1
PDA 25 PDA
PDA
PDA
colony PDA 5

。 35 .

2.

'97 6 , , 17 가

,

'96

1 8 .

1

3

1.

2 3 .

.

1

가

() 2 가

가 .

가 .

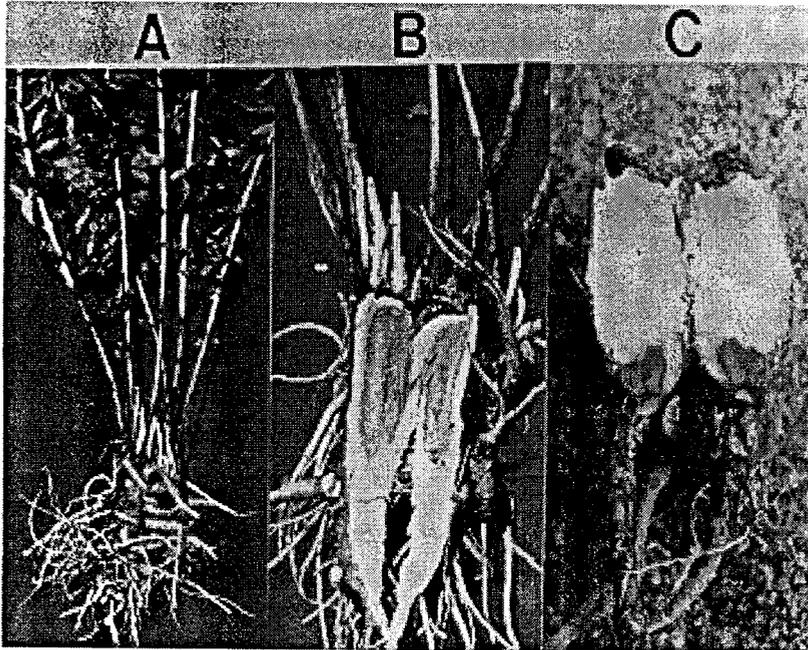


Fig 1. Symptoms of *Rhizoctonia radix* rot of balloon flowers. A: diseased plant, B : diseased radix infected from stem, C : infected from radix surface.

2. 병원균의 분리 동정

이병조직에서 분리한 세균과 곰팡이들의 병원성확인을 위하여 도라지 생체뿌리에 세균은 상이접종, 곰팡이는 균핵과 균총을 도라지뿌리 표면에 접촉 접종시킨후 발병을 조사한 결과 세균은 모두 병원성이 확인되지 않아 부생성균으로 확인되었다. 뿌리썩음병이 심하게 진전된 무름병증상은 병원성 세균이 아닌 부생균의 2차감염에 의한 무름증상으로 추정되었으며, 무름증상이 있는 이병조직에서는 병원균의 분리가 불가능하였다.

그림 1에서 보는 바와 같이 시들음 현상이 초기에 나타난 도라지 뿌리를 채취하여 절개한 결과 갈색썩음병징이 발견되어 여기에서 곰팡이를 분리 배양한 결과 그림 2에서와 같이 군사형태, 균총, 균핵의 형성 상태 등으로 볼때 이 곰팡이는 *Rhizoctonia solani*로 동정되었으며, 이 병원균은 도라지 뿌리에 접종한 결과 동일한 병징을 확인하였다. 한편 발병초기의 이병조직을 절개하여 습실처리했을 때 약 일주일 후에 군사와 함께 균핵이 형성되는 것을 볼 수 있었다.

도라지의 *Rhizoctonia solani*병은 줄기썩음병의 병원균으로 이미 알려져 있으나 뿌리썩음병에 대한 연구 보고는 없었는데 본 연구 결과 도라지 줄기썩음병균인 *Rhizoctonia solani*가 뿌리썩음병에도 관여하는 것으로 확인 되었다. 이 병원균의 생육온도를 알기 위하여 PDA 배지상에서 5~35℃로 온도 반응을 조사한 결과 표 1에서 보는 바와 같이 5℃와 35℃에서는 군사 생장이 불가하였으나 10℃에서 30℃까지 생장이 가능하였고 25℃와 30℃에서 생장이 가장 왕성하여 도라지 뿌리썩음병은 여름철에 발병이 심한 병으로 생각되었다.

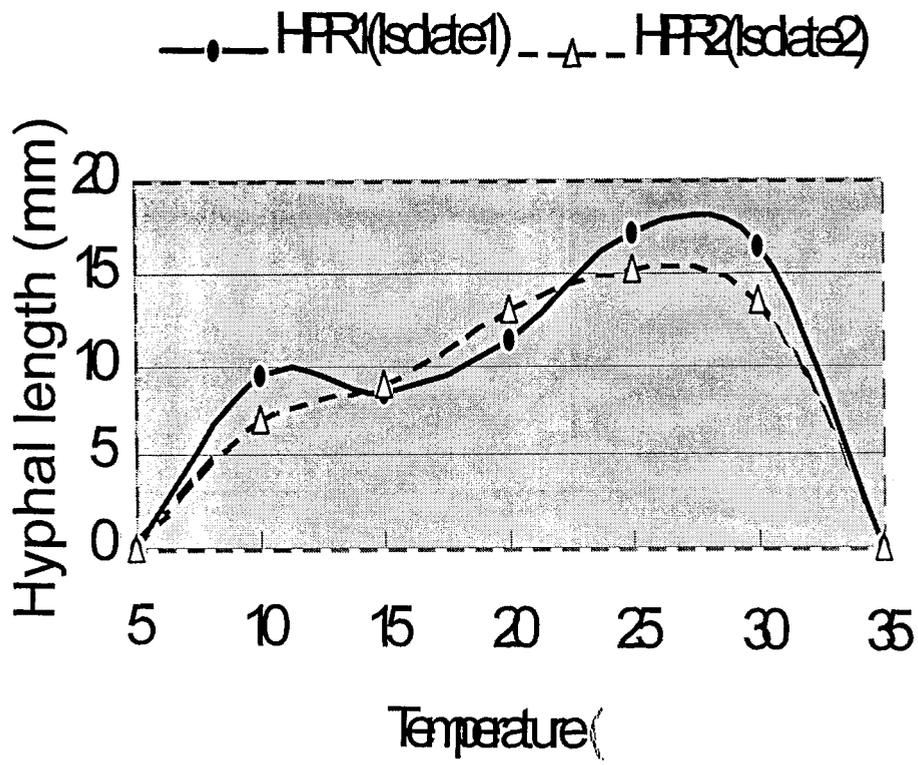


Fig.2. Mycelial growth of *Rhizoctonia solani*, a causal agent of balloon flower radix rot by different temperature for 24hours.

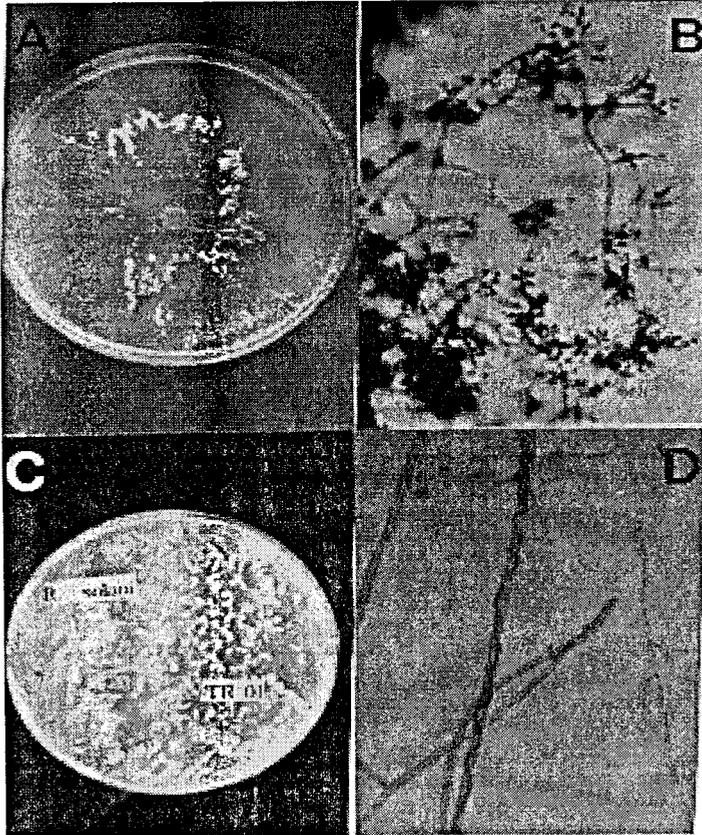


Fig.3. Morphology of *Rhizotonia solani*, a causal agent of balloon flower radix rot.

3. 도라지 근부병 발생조사

'97년 6월중에 도라지 재배면적이 많은 김해, 거창, 함안지역에서 도라지 재배농가의 근부병 발병율을 조사한 결과는 표 2에서 보는 바와 같이 함안지역에서 도라지 근부병 발병율이 평균 53.9%로 높았으며 김해와 거창에서의 도라지 근부병 발병율은 35~36% 이었으며 발병율이 높은 농가는 김해와 함안에서 90%에 달하여 심한 발병율을 나타내었다.

또한 도라지 재배년수별로 2~9년근을 구입하여 동일 조건의 포장에 재배한 결과 재배 2년차의 근부병 발병율을 보면 표 2에서 보는 바와 같이 종자로 파종한 1년생 도라지는 근부병 발병이 없는 반면에 2년생근부터 발생이 다소되었고 3년생근 이상의 도라지는 발병율이 높게 나타나 다년생인 경우 발병율이 높은 것으로 나타났다. 다년생 도라지의 경우 근부병 발병율이 높은 것은 도라지 뿌리의 크기가 크므로 뿌리 표면적이 넓어 병원균에 의한 침입 감염의 기회가 많기 때문인 것으로 생각되었다.

Table 1. Occurrence of *Rhizoctonia radix* rot of balloon flower in farmer's field

Region	No. of surveyed field	Average infecting rate
Geochang	4	35.3 (5~52)
Kimhae	7	36.3(12~90)
Haman	6	53.3 (8~90)

Table 2. Infecting rate of *Rhizoctonia radix* rot of balloon flower according to the cultivating age after transplanting in 1996

		Culture years of balloon flower						
		3	4	5	6	7	8	9
Infecting rate(%)	Second year(1997)	67.1	45.8	65.5	51.2	49.9	62.3	-
	Third year(1998)	-	73.5	68.5	62.6	70.5	56.6	54.2

Table 3. Annual occurrence of infecting rate of balloon flower radix rot by *Rhizoctonia solani* in same field

	Cultivating years in same field		
	1st (1997)	2nd (1998)	3rd (1999)
Infecting rate(%)	21.2	34.0	67.1

One year old seedlings were transplanted in 1997.

동일포장에서 재배년수가 경과될수록 도라지근부병의 발생이 현저히 증가되는 것은 해가 거듭될수록 병원균의 전염원이 증가될 뿐만 아니라 도라지 뿌리표피조직의 노화에 따라 내병성이 약화된 것으로 추측된다. 오랫동안 세균에 의한 무름병과 유사한 증상을 보여 세균성병해로 의심받았던 도라지근부병이 곰팡이병균인 *Rhizoctonia solani* 에 의한 병해로 밝혀지고 무름병증상은 *Rhizoctonia solani*

에 의한 조직의 괴사후 2차로 감염된 부생균에 의한 썩음병으로 본 연구 결과 처음으로 확인 되었다. 기 보고된 도라지 줄기썩음병과 뿌리썩음병이 같은 균에 의해 발생되며, 줄기썩음병이 진전되어 도라지 뇌두부분으로 침입하면 근부병이 발생된다. 본 연구에서는 뇌두부분의 침입외에도 뿌리의 하부조직에서의 침입에 의한 발병도 확인 됨에 따라서 앞으로 도라지 근부병의 방제대책 수립에 크게 기여할 것으로 생각하는 바이다.

*Rhizoctonia solani*는 다범성균으로 벼 문고병을 일으키고, 각종 식물의 갈록병을 일으키는데, 때로는 줄기썩음병과, 순마름병, 뿌리썩음병을 일으키는 병원균으로 병원체에 따라서 기주가 아닌 경우는 발병되지않는 것도 많으며, 대체로 특정한 균주가 일정한 범위의 기주식물을 침입하는 것으로 알려져있다. 도라지를 침입하는 균주는 균사융합군 AG-1(1A) 및 AG-1(1B) 에 속하므로 이들 균사융합군의 기주는 침입, 발병의 소지가 높다고 할 수 있다. 따라서 도라지에 발병하는 균주가 같은 균사융합군의 다른 작물의 병을 일으키고, 또한, 다른 작물의 균주가 도라지에 병을 일으킬 수가 있으므로 병의 방제를 위해서 후작물 재배시에는 주의해야한다.

제4절 요약

도라지 근부병의 원인균은 줄기썩음병을 일으키는 *Rhizoctonia solani*와 동일한 균으로 밝혀졌다. 도라지근부병균의 생육 온도는 10 - 30 °C에서 생육이 왕성하였고 5 °C 와 35 °C에서는 균사생장이 되지아니하였다. 근부병의 발병은 농가포장의 경우 35% ~ 53% 발생

되었고, 도라지 재배년수별 발병율은 3년생 도라지 부터 병발생이 심하였다. 도라지 근부병의 발생은 동일포장에서 재배년수가 경과될수록 발병이 심한 것으로 확인되었다.

제5절 참고문헌

1. 농림부. 1998. '98 특용작물생산실적. 127pp.
2. 농업과학기술원. 1995. 작물라이족토니아병 진단 및 방제. 167pp
3. 농업기술 연구소. 1991. 원색 약용작물 병해도감. 210pp
4. 안덕균. 1998. 한국본초도감. 교학사. 855pp.
5. 이시진. 1978. 본초강목. 고문사. 1806pp.
6. 정보섭, 신민교. 1990. 향약대사전. 영림사. 1160pp.
7. 허 준 1613. 동의보감.
8. Ainsworth, G. C. F.K. Sparrow and A. S. Sussman. 1973. The fungi an advanced treatise volume IVB. 504pp. Anagnostakis, S.L. and Day, P. R. 1979. Hypovirulence conversion in *Enthothia*

parasitica. Phytopathology 69 : 1226 - 1229.

9. Ayers, W. A. and Papavizas, G. C. 1963. Violet-pigmented pseudomonads with antifungal activity from the rhizosphere of beans. Appl. Microbiol. 11 : 533 - 538.

10. Beagle-Ristaino, J. E. and G. C. papavizas. 1985. Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. Phytopathology 75 : 560-564.

11. Burdsall, H.H. Jr., Hoch, H. C., Boosalis, M. G. and Setliff, E. C. 1980. *Laetisaria arvalis* (Aphylllophorales, Corticiaceae): A possible biological control agent for *Rhizoctonia solani* and *Phythium* species. Mycologia 72 : 728 - 736.

12. Castanho, B. and Butler, E. E and Shepherd, R. J. 1978. The association of double-stranded RNA with *Rhizoctonia decline*. Phytopathology 68 : 1515 - 1519.

13. Castanho, B. and Butler, E. E. 1978. *Rhizoctonia decline*: a degenerative disease of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 68 : 1505 - 1510.

14. Castanho, B. and Butler, E. E. 1978. *Rhizoctonia decline*: studies on hypovirulence and potential use in biological

control. *Phytopathology* 68 : 1511 - 1514.

15. Dupler, M. and R. Baker. 1984. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil *Phytopathology*. 74 : 195-200.

16. Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Henis. 1982. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73 : 85-88.

17. Elad, Y., Katan, J. and Chet, I. 1980. Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in Potatoes. *Phytopathology* 70 : 418-422.

18. Hadar, Y., Harman, G. E. and Taylor, A. G. 1984. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Phythium* spp. *Phytopathology* 74 : 106 - 110.

19. Harman, G. E., I. Chet and R. Baker. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed as a biocontrol agent. *Phytopathology* 71 : 569-572.

20. Henis, Y., A. Ghaffar and R. Baker. 1978. Intergrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish : Effect of

successive plantings, PCNB and

21. Howell, C. R and R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69 : 480-482.

22. Kim, W. G., Cho, W. D. and Lee, Y. H. 1992. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from ballon flower. *Korean J. Plant Pathol.* 8 : 159 - 163.

23. Kim, W. G., Cho, W. D. and Lee, Y. H. 1994. Anastomosis groups and cultural characteristics of *Rhizoctonia solani* isolates from crops in Korea. *Koren J. Mycol.* 22 : 309 - 324.

24. Kloepper, J. W. and Schroth, M. N. 1981. Development of a powder formulation of Rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology* 71 : 590 - 592.

25. Kommedahl, T. R and C. E. Windels. 1978. Evaluation of biological seed treatment for controlling root disease of pea. *Phytopathology.* 68 : 1087-1095.

26. Kuter, G. A., E. B. Nelson, H. A. J. Hoitink and L. V. Madden. 1983. Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to

Rhizoctonia damping-off. Phytopathology 73 : 1450-1456

27. Lewis, J. A. and Papavizas, G.C. 1985. Effect of mycelial preparation of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and incidence of damping-off. Phytopathology 75 : 812 - 817.

28. Lewis, J. A. and G. C. Papavizas. 1985. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. Phytopathology 75 : 812-817.

29. Lin, Y. S. and Cook, R. J. 1979. Suppression of *Fusarium roseum* 'Avanaceum' by soil microorganisms. Phytopathology 69 : 384 - 388.

30. Marois, J. J., Mitchell, D. J. and Sonada, R. M. 1981. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. Phytopathology 71 : 1257 - 1260.

31. Moody, A. R. and Gindrat, D. 1977. Biological control of cucumber black root rot by *Gliocladium roseum*. Phytopathology 67 : 1159 - 1162.

32. Nelson, E. B., G. A. Kuter and H. A. J. Hoitink. 1983. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of

Rhizoctonia damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* 73 : 1457-1462.

33. Odvody, G.N., Boosalis, M. G. and Kerr, E.D. 1980. Biological control of *Rhizoctonia solani* with a soil-inhabiting basidiomycete. *Phytopathology* 70 : 655 - 658.

34. Ogoshi, A. 1972. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn with hyphal anastomosis. *Ann Phytopath. Soc. Japan.* 38 : 117 - 122.

35. Ogoshi, A. 1975. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages. *Rev. Plant Prot. Res. Japan.* 8 : 98 - 103.

36. Ogoshi, A. 1976. Studies on the grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn with hyphal anastomosis and on the perfect stage of groups. *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. C* : 30 : 1 - 63.

37. Olsen, C. M and K. F. Baker. 1968. Selective heat treatment of soil and its effect on the inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology.* 58, 79-87.

38. Ou, S. H. 1985. Rice diseases. Second edition. Commonwealth Mycological Institute. 380pp.

39. Papavizas, G. C., M. T. Dunn, J. A. Lewis and J.

Beagle-Ristaino. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 74 : 1171-1175.

40. *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. *Phytopathology* 68 : 990-907.

Tu, J. C. 1980. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 70 : 670 - 674.

41. Weller, D.M. 1983. Colonization of wheat roots by fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* 73 : 1548 - 1553.

제 4 장 생물적 방제를 위한 길항균 선발

제1절 서론

본 실험에서는 도라지 발병에 관련된 병원균인 *Rhizoctonia solani*(뿌리썩음병), *Fusarium* sp.(시들음병), *Phytophthora* sp., *Pythium* sp.에 기항력을 가지는 길항균 분리를 위해 1-8년근의 도라지에서 채취한 토양 및 도라지 근권에서 길항균을 분리하여 이들의 기항력을 측정하였으며 분리된 길항균을 도라지 종자에 처리하여 종자발아 및 초기발병 실험을 수행하였으며, 이 과정에서 Bottle assay법 개발을 하여 초기 현장적용실험을 위한 실험도 수행하였다.

한편 분리 길항균의 생리적, 생화학적 특징을 조사하기 위해 분리 선정된 길항균의 동정을 MIDI, Vitex법을 병용한 신속 균동정법 확립하였으며 길항균의 생육 최적온도 및 배지 적합성, 분리 선정된 길항균의 최적온도, 최적배지 선정을 하였으며 길항균의 현장 처리효과 실험시 길항균의 분포상태를 조사시 screening을 위해 rifampicin 저항성 길항균 변이주도 분리하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

본 실험에서 사용한 식물 병원균인 *Rhizoctonia solani*,

Fusarium sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp.는 도라지 재배지에서 분리하였다 (Table 1). 이들 fungal pathogens은 potato dextrose agar (PDA: 200 g potato, 20 g dextrose, 15 g agar, 1L distilled water)에서 분리하였으며 4℃에서 보관하였다. 본 실험에서 길항균으로 사용한 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp.는 각각 Table 2.와 Table 3.과 같으며 그외 세균은 도라지 근근 및 근권 토양에서 분리하였다. 분리된 세균의 장기저장을 위해서는 nutrient-broth-yeast-extract broth (NBY: 8g Bacto nutrient broth, 2 g Bacto yeast extract, 5 g dextrose, 2 g K₂HPO₄, 0.5 g KH₂PO₄, 0.25 g MgSO₄.7H₂O, 1 l distilled water)에 배양하여 ampling 및 glycerol 저장하여 사용하였다. *Bacillus* 균주는 1/10 tryptic soy broth agar (1/10 TSA: 3 g Difco tryptic soy broth, 15 g agar, 1 l distilled water); *Pseudomonas* 균주는 King's medium B agar [KBM: 20 g proteose peptone, 1.5 g K₂HPO₄, 1.5 g MgSO₄.7H₂O, 10 ml glycerol (99.9%), 15 g agar, 1 l distilled water]를 사용하였다.

2. 길항균 분리

본 실험에서 길항균 분리를 위해 1 - 8 년간 재배한 생육이 양호한 도라지 뿌리 및 토양을 사용하였다. 재배지는 역시 *Rhizoctonia solani*에 의한 뿌리썩음병, *Fusarium* sp.에 의한 시들음병이 발생하는 지역이다. 1년근 - 8 년근된 도라지에서 근권 길항미생물을 분리하기 위해서 뿌리의 반복된 세척과 열처리를 하였다. 즉, 각 년근별 도라지 뿌리 표면을 1 cm² 크기로 살균된 면도날로 절단하고 50 ml 살균 증류수가 들어있는 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 10℃로 조정된 rotary shaker (250 rpm)에서 4회 연속적으로 세척하였다. 각 세

척된 뿌리를 다시 0.0125 M phosphate buffer (1.21 g potassium phosphate monobasic, 2.80 g potassium phosphate dibasic, 1L distilled water; pH 7.1) 5 ml에 옮겨 80℃로 조정된 항온수조에서 30 분간 열처리하였다. 이것을 다시 4회 연속하여 상기와 동일한 방법으로 세척하였다. 세척 및 열처리된 도라지 뿌리 표면을 살균된 막자사발에서 마쇄한 다음 5 ml phosphate buffer 액에 현탁시킨 다음 희석법에 의해 1/10 TSA 배지상에서 25℃로 조정된 항온기에서 분리하였다 (Fig. 1).

Table 1. Genera, species, strains and source of fungi used in tests for biocontrol activity of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.

Fungus	strain	source
<i>Rhizoctonia solani</i>		
	JS1	This work
	JS2	"
	JS3	"
	JS4	"
	JS5	"
	JS6	"
	JS7	"
<i>Fusarium</i> sp.		
	Fu1	"
	Fu2	"
	Fu3	"
	Fu4	"
<i>Pythium ultimum</i>		
	Py1	"
	Py2	"
	Py3	"
	Py4	"
	Py5	"
<i>Phytophthora</i> sp.		
	Ph1	"
	Ph2	"
	Ph3	"
	Ph4	"

Table 2. Genera, species, strains and source of microorganisms used as biocontrol agents or as standards for comparisons with *Bacillus* sp. strains.

Microorganism	strain	source
<i>Bacillus</i> sp.	WLE1	This work
	WLE2	"
	WLE3	"
	WLE4	"
	WLE5	"
	WLE6	"
	WLE22	"
	WLE23	"
	YL4	"
	YL5	"
	YL7	"
	N1	"
	N3	"
	N12	"
	N14	"
	N17	"
	N18	"
	N19	"
	N21	"
	WLC19	"
	WLC22	"
	WLL1	"
	WLL2	"
	WLL3	"
	WLL4	"
	WLL5	"
	WLL6	"
	WLL7	"
	WLL8	"
	WLL9	"
	WLL10	"
	WS23	"
<i>Bacillus subtilis</i>		Y. H Lee
<i>Bacillus megaterium</i>		"

Their ability to inhibit *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Pythium* sp. *in vitro*.

Table 3. Genera, species, strains and source of microorganisms used as biocontrol agents or as standards for comparisons and *Pseudomonas* sp. strains

Microorganism	strain	source
<i>Pseudomonas</i> sp.		This work
	JS1	"
	JS2	"
	JS3	"
	JS4	"
	JS5	"
	JS6	"
	JS7	"
	JS8	"
	JS9	"
	JS10	"
	JS11	"
	JS12	"
	PF1	"
	PF2	"
	PF3	"
	PF4	"
	PF5	"
	PF6	"
	PF7	"
	PF8	"
	PF9	"
	PF10	"
	PF11	"
	PF12	"
	PF13	"
	PP14	"
	PP15	"
	PP1	"
	PP2	"
	PP3	"
	PP4	"
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Y. H. Lee
<i>Pseudomonas putida</i>		"
<i>Pseudomonas cepacia</i>		"

Their ability to inhibit *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Pythium* sp. *in vitro*.

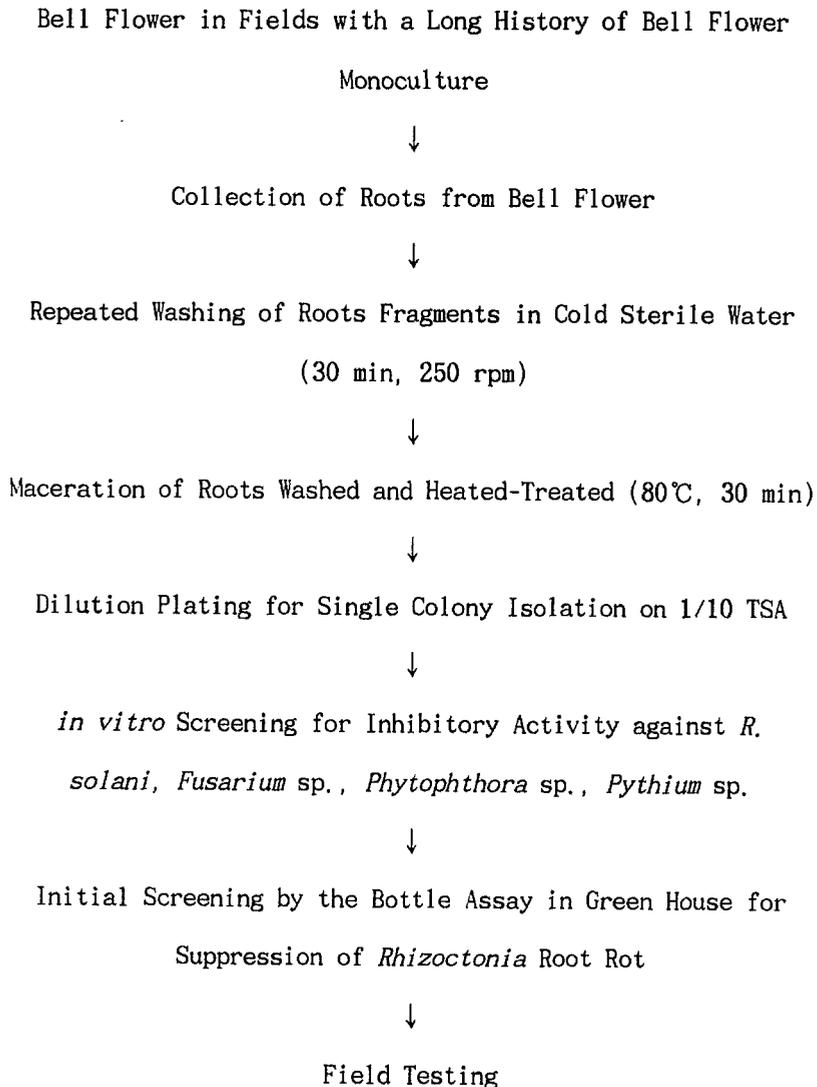


Fig. 1. Protocol for selecting biocontrol *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. strains with rhizosphere competence on bell flower and inhibitory activity against *Rhizotonia solani*, *Fuarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp.

3. 도라지 뿌리썩음병에 대한 길항미생물 분리

상기 방법에 따라 세척 및 열처리에 의해 25℃ 항온기에서 1/10 TSA 고체배지에서 도라지 근편에서 분리한 약 3000 개의 코로니를 얻었다. 이들을 PDA 고체배지 상에 생육시킨 *R. solani*를 직경 8mm의 크기로 하여 페트리 디쉬 중앙에 놓고 분리한 세균을 일정한 거리를 유지하며 사방으로 접종하였다. 이것을 25℃에서 1주일 배양시킨 다음 길항정도를 세균과 병원균 사이의 clear zone의 폭을 측정하였다. 각 분리 균주는 *R. solani*에 대한 반복 확인 실험을 행하였으며 1/10 TSA, 1/5 PDA (40 g potato, 4 g dextrose, 15 g agar, 1 l distilled water) 및 1/5 NBY 고체배지에서 확인실험을 하였다. *Fusarium sp.*, *Pythium sp.*, 및 *Phytophthora sp.*에 대한 항균성 실험도 병행하였다.

4. 길항균의 종자처리

도라지 종자의 미생물 처리는 도라지 종자를 70% 에틸알코올에 10분간 적신다음 1% sodium hypochlorite 용액에 10분간 처리하고 살균 증류수로 세척하였다. NBY broth에 생육시킨 길항균 1 ml를 NBY 고체배지에 도말시킨 후 25℃에서 2일간 배양하였다. 생육된 길항균을 살균 시약 스푼으로 긁어모은 다음 0.5% (W/V) methylcellulose 살균 용액 0.5 ml와 혼합하여 1 g의 표면 살균된 도라지 종자(약 1200 개)와 섞어 표면 coating하였다. 이것을 다시 vortexing한 다음 45℃로 조정된 건조기에서 4 시간 정도 건조하였다. 초기 종자에 존재하는 길항균 수는 희석법에 의해 계측하였다. 즉, 임의로 선발된 2개의 종자를 0.0125 M phosphate buffer (pH 7.1) 5 ml에 30 분간 방치한 다음 30 초간 강하게 vortexing하였다. 10-fold 희석법에 따라 일련의 희석액을 만들어 1/10 TSA 배지에 도

말한 다음 25 °C 항온기에 배양 후 생성되는 코로니를 조사하였다.

5. 뿌리 및 종자의 미생물 계측

시료의 크기에 따라 적당량의 phosphate buffer에 30 분간 종자 시료를 넣고 방치한 다음 30 초간 vortexing 하였다. 그리고 뿌리 시료는 300 rpm으로 조정된 진탕배양기에서 30 분간 세척하였다. 현탁액을 5 ml phosphate buffer로 10 배 희석하였다. 현탁액 100 μ l 를 각 고체배지에 도말하여 10배 희석액을 사용하여 3일된 1/10 TSA 배지에서 형성된 코로니 수 (cfu)를 계산하여 추정하였다.

6. 토양 전염원 제조

토양 병원균 조제를 위해 토양 1 kg, corn meal 300 g, 물 150 ml를 1 l 삼각플라스크에 혼합한 다음 2일 연속하여 90 분간 살균한 다음 PDA 배지에서 생육시킨 병원균 plate 전부를 접종하여 28°C에서 배양하였다. 삼각플라스크를 1주일마다 흔들여 준 다음 배지가 완전히 균사로 덮힐 때까지 2 -3 주간 배양하였다. 이 접종원을 상온에서 풍건한 다음 4°C에서 보관하여 사용하였다.

7. 토양 처리

특별한 언급이 없으면 길항균에 의한 도라지 뿌리썩음병의 생물학적 방제에 대한 실내 실험을 위한 토양은 경상대학교 부속 연습림지의 식양토를 사용하였다. 이 토양은 10-15 cm 표토층으로 0.5-cm-mesh를 사용하였다. 살균은 121°C에서 30분간 처리하여 풍건한 토양이다. 각 토양은 실험 1주일 전에 준비하여 풍건하였다. 한편 *Rhizoctonia*에 의한 뿌리썩음병, *Fusarium* sp.로부터 종자를 보호하기 위한 항균력을 조사하기 위해 도라지 접종 실험을 병행하였

다. 이 실험은 대곡면 포장의 토양을 사용하였다.

8. 온실 내에서 병재배에 의한 항균력 측정

"Bottle assay"는 초기실험에서 *R. solani*에 대한 병원성 검정, 제한된 온실재배 조건하에서 도라지 병원균에 대한 길항균 선발, 도라지 근권 및 그 주위에 도입된 길항균의 분포 상태를 조사하기 위해 사용하였다. 별 다른 언급이 없으면 Figure 2 와 같이 살균 프라스틱병을 사용하였는데 밑부분은 구멍이 뚫려 있으며 병마다 도라지 종자 혹은 유묘 3개를 심을 수 있으며 실험에 따라서 버미큘라이트 혹은 토양을 채워 사용하였다. *Rhizoctonia root rot*을 위해 각 병마다 살균 버미큘라이트를 반 정도 채우고 살균된 토양을 채웠다. 그 다음 *R. solani*로 접종된 corn meal 전염원 3g을 토양 위에 놓고 다시 10 g의 살균 토양을 덮었다. 각 병은 10 ml의 살균 수돗물을 주었으며 길항균을 접종한 것과 하지 않은 것 2 종자를 각 병의 토양표면에 놓고 2 cm 두께의 살균 버미큘라이트를 덮고 5 ml의 수돗물을 주었다. 각 병마다 첫 일주일엔 수돗물 10 ml를 두 번 주었으며 2 - 4 주일에는 1000배 희석 영양액 [제4종 복비(7-2-4)] 5 ml를 주었다. 발아(emergence), 줄기(shoot), 높이(height), 잎(leaf) 및 병증(severity of *Rhizotonia root rot*) 등은 3-4 주일 후부터 관찰하였다. *Rhizoctonia*에 대한 병유발 정도는 육안으로 관찰하여 판정하였다.



Fig. 2. Bottle assay used to evaluate biocontrol activity of bacteria against pathogen in green house under controlled condition. A, bottle for test; B1, pathogen only; B2, pathogen + strain JS2; B3, untreated control

9. 포장실험

in vitro 병원균의 생육저해와 *in vivo* 병실험에 의한 병발생 억제실험에 기초를 한 길항균을 선발하고 포장실험을 하였다. 현지포장실험은 대곡농장에서 하였다. 종자에 처리한 길항균 수는 *Bacillus* sp. 에서는 $10^6 - 10^7$ 이었으며, *Pseudomonas* sp. 는 약 10^8 정도로 하였다.

10. 길항균 동정

분리균 동정을 위해 Schaad의 지침과 Bergey's manual of systematic bacteriology의 분류기준에 따라 일반적인 조사를 하였으며, *Bacillus* sp. 길항균 동정을 위해서는 Gram 반응, 산소요구성, 포자형성, catalase 반응 (Sneath, 1986) 등을 조사하였다. 포자형성은 살균 전 NBY 고체배지에 0.003% (w/v) $MnSO_4$ 를 첨가함으로써 생성시켰다(Logan and Berkely, 1984). 즉 고체배지에서 세균을 도말하고 25°C에서 3일간 생육시킨 다음 현미경으로 포자형성 유무를 관찰하였다. 그리고 기기적 동정을 위해 MIDI 및 Vitex 방법을 사용하였다.

11. 병원균에 대한 길항균의 저해 스펙트럼

액체배양한 길항균을 1/5 PDA 고체배지 상에서 반대방향으로 접종한 후 2일간 배양하고 병원균의 절편을 8-mm 직경으로 고체배지 중앙에 놓는다. 이 실험에 사용한 병원균은 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. 등을 사용하였다. 접종한 배지를 28°C에서 배양하였으며 일주일 후 균사생육 양을 측정하여 분석하였다. 길항균 방향에서의 균사 반경을 길항균이 없는 방

향에서의 균사 양과 비교하여 계산하였다.

12. Rifampicin 저항성 길항균 변이주 분리

도라지 근권에서의 미생물 분포상태를 조사하기 위하여 rifampicin-resistant mutants를 분리하였다. NBY 액체배지에서 생육시킨 길항균 100 μ l (ca. 10^8 cell)를 rifampicin이 100 ug/ml 함유된 1/10 TSA 고체배지 (1/10 TSA_{rif100}) 상에 도말하여 25°C에서 5일간 배양한 후 나타나는 코로니를 선발하였다. 변이주의 안정성 조사를 위해 1/10 TSA 배지에서 3일째마다 새로운 배지에 7회 이식하여 최종적으로 1/10 TSA_{rif100}에서 생육시켜 확인하였다. 안정성이 있는 변이주를 길항성, 코로니의 형태적 관찰, 포자형성력 등을 조사하여 분리군과의 차이 유무를 조사하였다. 또한 이들은 이후의 온실 및 포장실험에서 길항균의 분포정도를 확인하는 실험에 사용하였다.

13. 온실 실험에서 길항균 분포

Rifampicin 저항성 균주 *Bacillus sp.*는 "Bottle assay"에서 도라지 근권에 정착할 수 있는 능력이 확인되었으므로 길항력이 있는 *Pseudomonas sp.*와 비교 검토하였다. 각 병은 면봉으로 밑부분을 막아 토양을 채운 다음 살균 버미큐라이트 50 cc를 채웠다. *Bacillus sp.*로 처리된 종자를 각 병 상단에 심고 20 cc의 살균 버미큐라이트를 덮었다. 시료 채취 시기마다 도라지 유묘를 병에서 분리하였다. 여분의 토양은 흔들어서 제거하였으며 뿌리 부분을 식물에서 분리하였다.

뿌리 표면의 세균을 조사하기 위해 식물의 뿌리 부분을 살균 phosphate buffer (pH 7.1)에 넣고 25°C에서 300 rpm 조정된 진탕기에서 30 분간 처리하여 희석법에 따라 1/10 TSA_{rif100cyc100} 배지에서

균수를 측정하였다. 예비 실험에서 대부분의 세균은 90% 이상이 이 방법에 의해 제거되었다. 근근에 도입된 길항균의 분포상태를 조사하기 위해 뿌리 종자 아래 0.5 cm에서 출발하여 1.5 cm의 크기로 분할하였으며 각 조각은 5 ml의 phosphate buffer에 30 분간 방치한 다음 30 초간 vortex하였다. 세척액을 1/10 TSA_{rif100cyc100} 배지에서 배양하여 측정하였다.

14. 포장실험에서의 길항균 분포

Bacillus sp. 및 *Pseudomonas* sp. 도라지 근권 분포는 대곡 포장에서 실시하였다. 길항균으로 처리된 것을 파종하였는데 각처리당 9반복으로 실험하였다. 각 plot 당 3분식 뽑아 뿌리 주변의 토양을 손으로 흔들어서 제거하였다. 이 식물을 새 비닐 봉지에 넣어 4℃에 보관하여 실험에 사용하였다. 이들 뿌리를 50 ml의 phosphate buffer에 넣고 300 rpm로 조정된 진탕배양기에서 30분간 처리하였다. 각각의 세척액을 1/10 TSA_{rif100cyc100} 배지에서 조사하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. *Rhizoctonia solani*에 의한 도라지 병유발실험.

도라지 재배지에서 분리한 근부병 원인균인 *Rhizoctonia solani*를 7 균주를 병시험법에 의한 병유발실험을 한 결과는 Table 4와 같으며 분리균 모두 도라지에 병을 유발시켰다. 그리고 본 실험에서 분리한 *Rhizoctonia solani*와 *Fuvarium* sp.를 현미경적으로 관찰한 결과는 Fig. 3이며 Fig. 4는 *Rhizoctonia solani*가 도라지 뿌리의

내부로 침투 초기 (Fig 4A)에 관찰한 것이며 Fig. 4B는 침투 후 조직을 보여준다. *Rhizoctonia solani*에 의한 1차 감염 후에 도라지의 생리적 조건이 불리하게 되면 세균에 의한 2차 감염이 급속도로 진행되어 근부현상을 촉진시키는 것으로 나타났다. Fig. 5은 확인되지 않은 세균에 의한 연부 현상이다. Fig. 6은 세균에 의하여 도라지 뿌리 조직이 더욱 연화된 현상을 보여주고 있다.

Table 4. *Rhizoctonia* root rot caused by isolates of *Rhizoctonia solani* in the bottle assay under controlled conditions.

Isolate ¹	EMG(%) ²	DS ³
<i>Rhizoctonia solani</i>		
JS1	75.3	++
JS2	72.4	++
JS3	64.3	+++
JS4	65.6	++++
JS5	57.4	++++
JS6	59.5	++++
JS7	67.5	+++
	64.3	+++

1. All isolates were obtained from the collection of root diseases.

2. EMG = emergence in percentage

3 DS = disease severity based on the scale ranging from 0 (no lesion evident) to ++++.

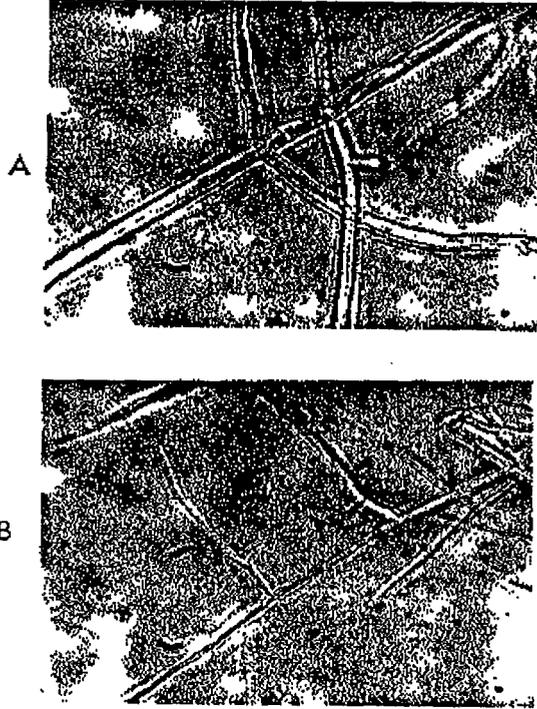


Fig. 3. Microscopy of the isolated fungal pathogen.

A. *Rhizoctonia solani*

B. *Fusarium* sp.

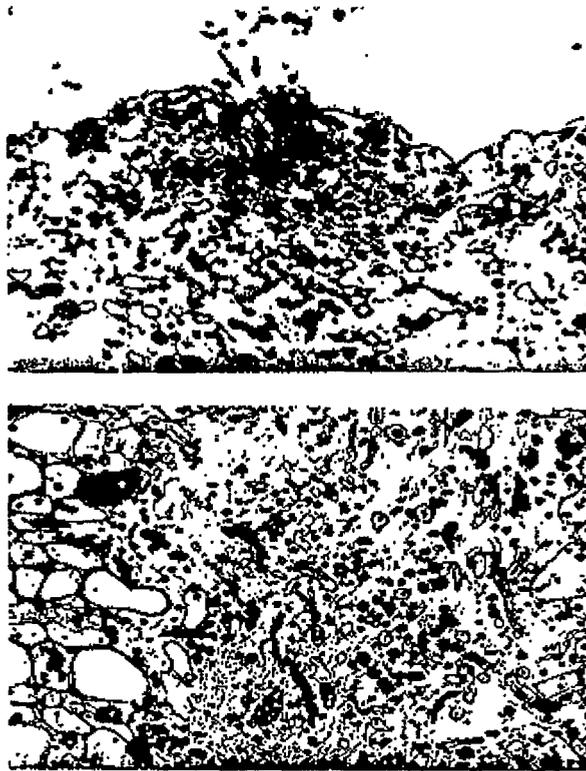


Fig. 4. Infection of root by *Rhizoctonia solani*.
A. Early stage infection (↓, region of curling).
B. lesion tissue after infection.

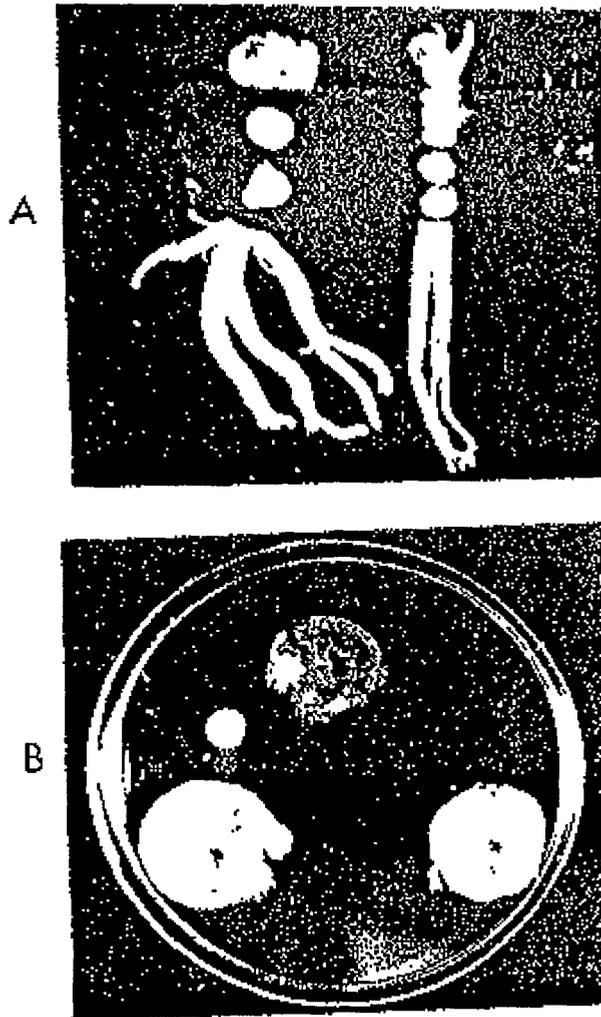


Fig. 5. Root rot of *Platycodon glaucum* caused by the isolated bacteria.

A. root-rot by bacteria during storization.

B. root-rot infested with artificially by the isolated bacteria.

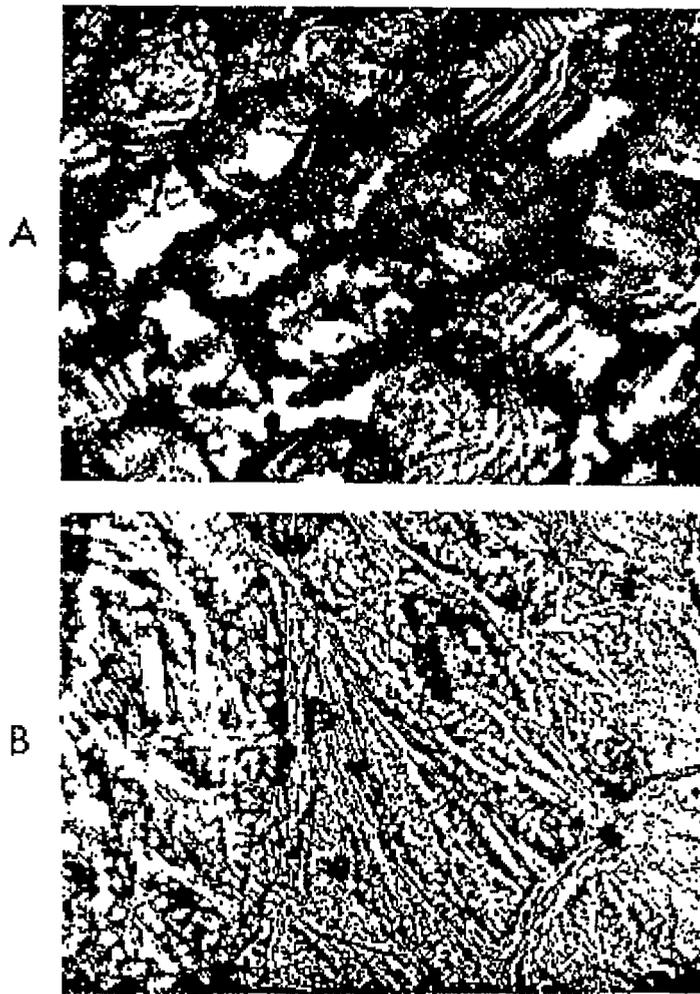


Fig. 6. Degradtion of root tissue of *Platycodon glaucum* caused by the isolated bacteria.

A. healthy root tissue.

B. degraded root tissue by the isolated bacteria.

2. 도라지 근권 *Bacillus* sp. 분리

Bacillus sp.의 분리는 함양약초시험장에서 재배한 1-8년 근의 도라지에서 분리하였다. 세척한 도라지 뿌리를 80℃, 30분간 열처리 한 세척 도라지 뿌리의 세균수는 열처리 전의 뿌리 파쇄액에 비교하여 0.01% 수준으로 4번의 연속적인 세척은 세척 전에 비해 세균 수가 0.5-2.0% 수준으로 세균 수가 감소하였다 (Fig. 7). 코로니의 형태에 따라 볼 때 1/10 TSA 상에서 분리된 코로니는 1차 뿌리 세척 후의 뿌리마쇄액에서 분리된 집단과 4차 뿌리 세척과 열처리 후의 뿌리마쇄액에서 분리한 미생물 집단은 매우 동질성 집단으로 나타났다. 반복된 세척 결과 도라지 유묘로부터 분리된 세균 집단의 우점형은 도라지 년근에 따라 동일하였다. 1차 세척과 열처리 후 뿌리 마쇄액으로부터 분리된 대부분의 코로니는 코로니 색깔에 있어서 dark-brown이었으며 일부는 milky-white 이었다. 대조적으로 4차 세척과 열처리 후의 뿌리 마쇄액으로부터 분리된 대부분의 코로니는 milky-white가 주였으며 일부는 dark-brown이었다. 이상의 결과에서 도라지가 척박한 토양에서 장기간 생육되는 것은 도라지 근권에 서식하는 길항미생물의 효과일 것으로 추정된다. 한편 아직 완전히 확인되고 있지 않다면 본 실험에서 분리한 *Bacillus macerans*R19 균주는 질소고정력을 보유하고 있는 것으로 추정되며 이에 대한 실험을 계속하고 있다. 만약 이러한 사실이 확인되면 본 실험에서 분리한 균주는 생태적으로 기주식물과 상호작용하고 있어 토양 내에서 생존력이 클 것이며, 길항능력과 질소고정력을 함께 가지고 있기 때문에 도라지의 생물적 방제 및 생육촉진 미생물 제제를 위한 좋은 균주라 사료된다.

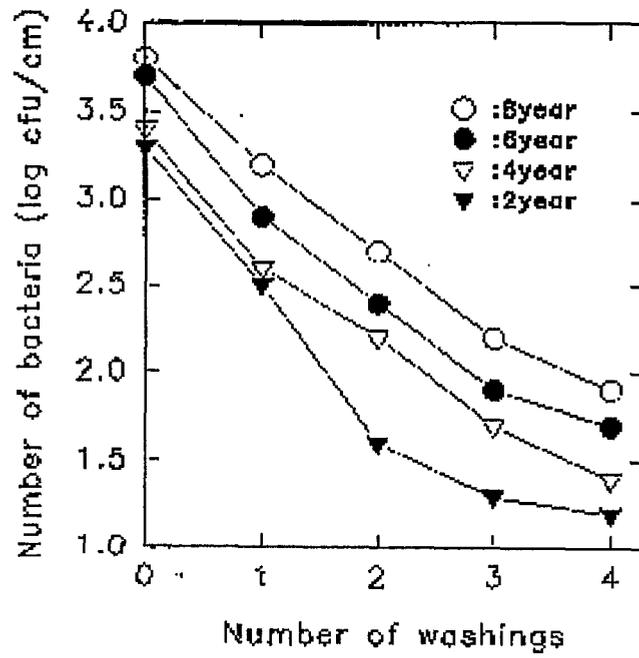


Fig. 7. Effect of repeat washing followed by heat treatment (80 °C, 30 min) on populations of bacterial isolates on roots according to the growth year of *Platycodon glaucum*.

3. 도라지병원균에 대한 길항균 선발

4차 세척 후 뿌리마쇄 현탁액을 희석한 후 1/10 TSA 배지 상에서 무작위로 약 3,000 개의 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp.의 코로니를 1차적으로 선발하였다. 30%는 *R. solani*에 대해 길항작용이 있었으나 분리균에 따라 정도의 차이가 있었다. 이들 균주를 2차 선발하여 1/10 TSA, 1/5 PDA 및 1/5 NBY 배지 상에서 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp.에 대한 항균력 조사를 하였다. 상당수의 균주는 *Rhizoctonia solani*에 대해 항균력을 가지고 있었으며 *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp.에 항균력을 가진 것이 있었다. 2차 선별한 결과 32 균주의 *Bacillus* sp.와 31 균주의 *Pseudomonas* sp.를 이후의 실험을 위해 선정하였다. (Table 5 & 6) 이 결과 *Bacillus* sp.에서는 분리균 R1919와 R22이 가장 양호하였으며(Fig. 8) *Pseudomonas* sp.에서는 분리균 JS2, JS3, JS4가 항균력이 우수하였다. (Fig. 9)

4. 분리균 동정

분리된 길항균을 생리적 기준에 의해 동정한 결과 분리균 R19와 R22는 *Paenibacillus macerans*로 동정되었으며 (Table 7) 분리균 SP4는 *Pseudomonas cepacia*로 동정되었다 (Table 8). MIDI system과 VITEX system에 의해서도 각각 *Paenibacillus macerans* (Table 7)와 *Pseudomonas cepacia* (Table 8)로 확인되었다.

5. Rifampicin 저항성 길항균 변이주 분리.

도라지 근권에서의 미생물 분포상태를 조사하기 위하여 rifampicin-resistant mutants를 분리하였다. NBY 액체배지에서 생육시킨 길항균 100 μ l (ca. 10^8 cell)를 rifampicin이 100 μ g/ml 함

유된 1/10 TSA 교체배지 (1/10 TSA_{ref100}) 상에 도달하여 25℃에서 5일간 배양한 후 나타나는 코로니를 선발하였다. 변이주의 안정성 조사를 위해 1/10 TSA 배지에서 3일째마다 새로운 배지에 7회 이식하여 최종적으로 1/10 TSA_{ref100}에서 생육시켜 확인하였다. 분리 후 길항력을 야생형과 비교한 결과 길항력 존재하였다 (Fig. 10).

Table 5. In vitro inhibitory activity against root pathogens by *Bacillus* sp.

Isolate s	1/10 TSA ¹				1/5 PDA ¹				1/5 NBY ¹			
	Rs	Fu	Py	Ph	Rs	Fu	Py	Ph	Rs	Fu	Py	Ph
Control	N/A ^b	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	/A	N/A
Bs	6	7	1	5	6	7	1	5	6	7	2	5
Bm	5	5	1	4	5	4	2	4	4	5	2	4
WLE1	3	4	1	2	2	2	0	2	2	1	0	1
WLE2	4	3	0	1	1	3	0	1	1	2	0	1
WLE3	3	4	0	0	1	2	0	1	2	1	1	2
WLE4	3	5	0	2	1	3	1	0	1	1	0	1
WLE5	2	2	0	1	2	2	1	1	2	2	0	0
WLE6	3	1	0	1	2	3	1	0	1	2	1	0
WLE22	2	2	0	2	2	2	0	0	2	1	0	0
WLE23	2	3	0	1	2	1	0	1	1	2	0	1
YL4	3	1	1	2	1	2	0	1	2	2	0	1
YL5	2	3	1	1	1	1	0	1	2	3	1	2
YL7	1	2	0	2	1	2	0	2	1	1	0	1
N1	3	4	0	4	2	2	0	1	3	2	0	2
N3	4	2	0	3	1	1	1	0	1	3	0	3
N12	3	3	0	2	1	2	0	1	2	2	1	1
N14	3	4	0	3	2	1	1	1	1	2	1	2
N17	3	2	2	4	2	1	1	1	3	3	1	2
N18	4	3	2	2	3	1	1	2	2	2	0	2
N19	4	2	2	5	3	3	2	3	2	3	1	1
N21	3	3	2	3	2	2	3	2	2	3	0	2
WLC19	14	11	9	12	13	11	9	13	12	11	8	11
WLC22	13	10	8	11	12	11	8	12	12	10	7	10
WLL1	6	7	3	4	6	3	0	1	6	4	1	3
WLL2	8	6	2	3	5	4	0	2	7	6	1	3
WLL3	9	8	3	5	4	3	0	3	5	5	2	4
WLL4	5	6	0	3	4	4	1	4	6	4	0	2
WLL5	8	7	0	5	3	3	1	2	4	5	0	1
WLL6	6	5	1	4	3	4	0	3	5	6	1	2
WLL7	6	6	0	4	4	4	0	4	5	5	2	3
WLL8	5	7	1	3	5	3	0	3	4	5	1	2
WLL9	4	6	0	3	4	3	1	3	5	6	1	2
WLL10	5	7	1	5	5	4	0	2	6	5	0	3
WS23	4	6	0	3	4	3	1	3	4	4	0	2

*1/10TSA: one tenth strength of tryptic soy agar.

*1/5PDA: one fifth strength of potato dextrose agar.

*1/5NBY: one fifth strength of nutrient-broth-yeast-extract agar.

*Four bacterial isolates were spotted equidistant from each other at the edge of agar plate 2 days prior to the placement of the fungal pathogen in the center. Plates were incubated at 15 °C for one week after the fungus placement, and width (mm) of the clear zone of inhibition formed by bacterial antibiosis to the pathogen growth was measured.

*Isolates of the fungal pathogen were grown on PDA for one week at 25 °C prior to transfer to each medium. (Rs, *Rhizoctonia solani*; Fu, *Fusarium* sp.; Py, *Pythium ultimum*; Ph, *Phytophthora* sp.

*N/A: not available.

*Other biocontrol agents tested for reference (Bs, *Bacillus subtilis*; Bm, *Bacillus megaterium*)

Table 6. In vitro inhibitory activity against root pathogens by *Pseudomonas* sp. isolates.

Isolates	1/10 TSA ¹				1/5 PDA ¹				1/5 NBY ¹			
	Rs	Fu	Py	Ph	Rs	Fu	Py	Ph	Rs	Fu	Py	Ph
Control	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PF3	7	6	5	6	7	9	5	8	6	6	5	7
PF2	6	6	5	6	5	6	4	6	5	7	5	6
JS1	8	6	5	5	5	5	2	4	7	5	0	5
JS2	10	5	6	6	5	6	0	5	7	6	1	6
JS3	10	7	5	5	5	4	1	4	8	7	0	4
JS4	10	11	7	10	10	11	6	10	10	9	5	8
JS5	5	5	7	8	5	6	2	5	6	6	0	3
JS6	5	6	0	8	6	4	0	4	8	7	2	4
JS7	4	5	2	8	5	6	1	6	7	4	0	3
JS8	4	4	3	5	6	4	3	4	7	6	10	4
JS9	6	6	1	6	5	5	1	5	7	7	0	3
JS10	5	7	0	7	5	4	2	4	9	5	0	4
JS11	4	5	7	5	5	6	0	4	8	7	0	5
JS12	5	4	1	6	6	4	1	3	7	5	0	2
PF1	4	6	2	7	5	5	3	5	5	7	0	3
PF2	6	5	2	5	6	6	0	4	7	4	1	4
PF3	4	4	1	5	5	4	1	6	9	5	2	5
PF4	5	5	0	6	6	6	2	4	7	7	0	3
PF5	4	4	1	7	5	5	0	6	8	5	1	4
PF6	5	6	2	5	6	6	1	4	5	7	0	5
PF7	6	7	0	5	5	5	0	2	7	5	1	4
PF8	5	5	1	5	6	3	1	5	9	7	0	3
PF9	4	4	2	6	5	4	3	4	7	5	0	4
PF10	6	5	3	5	5	6	1	4	9	7	0	5
PF11	4	4	2	4	5	4	3	2	7	5	1	4
PF12	5	5	0	6	5	6	0	4	9	5	2	3
PF13	4	4	1	5	5	4	2	5	7	5	0	4
PP14	5	6	2	4	5	5	0	4	6	5	0	3
PP15	4	4	1	5	5	5	2	5	4	6	0	4
PP1	4	5	2	4	5	4	2	4	5	5	1	3
PP2	5	6	3	5	4	5	1	5	2	4	2	4
PP3	6	5	3	3	3	4	2	2	4	5	2	1

*1/10TSA: one tenth strength of tryptic soy agar.

*1/5PDA: one fifth strength of potato dextrose agar.

*1/5NBY: one fifth strength of nutrient-broth-yeast-extract agar.

*Four bacterial isolates were spotted equidistant from each other at the edge of agar plate 2 days prior to the placement of the fungal pathogen in the center. Plates were incubated at 15 °C for one week after the fungus placement, and width (mm) of the clear zone of inhibition formed by bacterial antibiosis to the pathogen growth was measured.

*Isolates of the fungal pathogen were grown on PDA for one week at 25 °C prior to transfer to each medium. (Rs, *Rhizoctonia solani*; Fu, *Fusarium* sp.; Py, *Pythium ultimum*; Ph, *Phytophthora* sp.

*N/A: not available.

*Other biocontrol agents tested for reference (PF3, *Pseudomonas fluorescens*; PP4, *Pseudomonas putida* 4

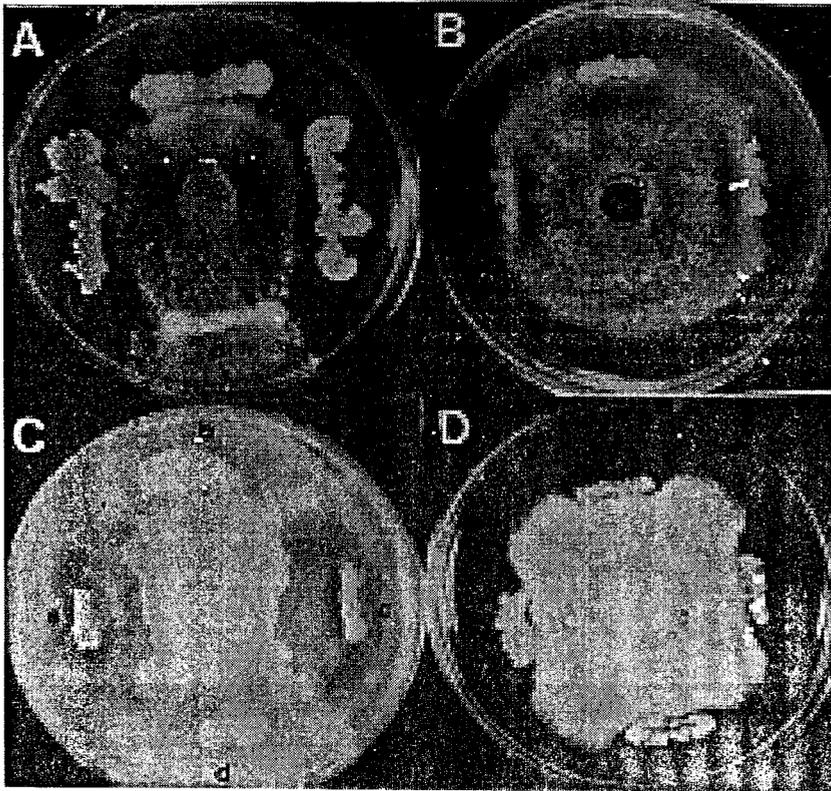


Fig. 8. Petri plate assay for antifungal activity of *Bacillus* sp. against *Rhizoctonia solani* (A), *Fusarium* sp. (B), *Phytophthora* sp (C), *Pythium* sp (D).

- a: *Paenibacillus macerans* 19
- b: *Paenibacillus macerans* 22
- c: *Bacillus cereus* 6
- d: *E. coli* as a negative control

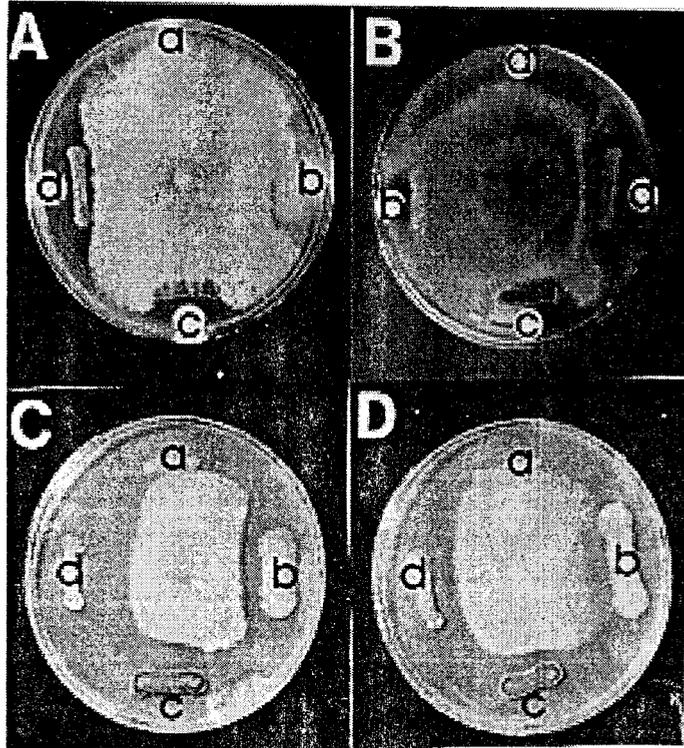


Fig. 9. Petri plate assay for antifungal activity of *Pseudomonas* sp. against *Rhizoctonia solani* (A), *Fusarium* sp. (B), *Phytophthora* sp (C), *Pythium* sp (D).

- a: *Pseudomonas cepacia* JS4
- b: *Pseudomonas aeruginosa* JS2
- c: *Pseudomonas putida* JS5
- d: *E. coli* as a negative control

Table 7. Comparison of the characteristics of antagonistic bacteria WWL19 with description of *Paenibacillus macerans* in Bergey's manual of systematic bacteriology

Characteristicst	B19	<i>Paenibacillus macerans</i>
Gram stain	+	+
Sporangium swollen	-	-
VP test	-	-
Anaerobic growth	+	+
Gas from glucose	+	+
Catalase	d	+
Starch	+	+
Gelatin	+	+
Casein	-	-
Indol	-	-
Other utilization of		
NEG	-	-
GAL	-	-
SOR	+	+
OLD	-	-
THER	-	-
SUC	+	+
ARA	-	-
INU	+	+
NAA	+	+
XYL	+	+
MAN	+	+
RAF	-	-

+ : Pasitive reaction - : Negative reaction

d : Reaction are varied depend on biovar or isolate

Table 8. Comparisons of the characteristics of antagonistic bacteria, JS4 with the description of *Pseudomonas cepacia* in Bergey's manual of systematic bacteriology

Characteristics	JS4	<i>Pseudomonas cepacia</i>
Motility	+	+
Cell shape	Rod	Rod
Gram reaction	-	-
O/F test	Oxi.	Oxi.
PHB accumulated	+	+
fluorescent pigment	-	-
Oxidase	+	+
Gelatin liquefaction	+	d
Catalase reaction	+	+
Lavan formation	-	-
Starch dihydrolysis	-	-
Arginin dihydrolysis	-	-
Utilization of		
DP3	+	+
OFG	+	+
GC	+	+
ACE	+	+
ESC	+	+
PLI	+	+
URE	-	-
CIT	+	+
MAL	+	+
TDA	+	+

+ : Pasitive reaction - : Negative reaction

O/F : Oxidative and / or fermentative respiration

d : Reaction are varied depond on biovar or isolate

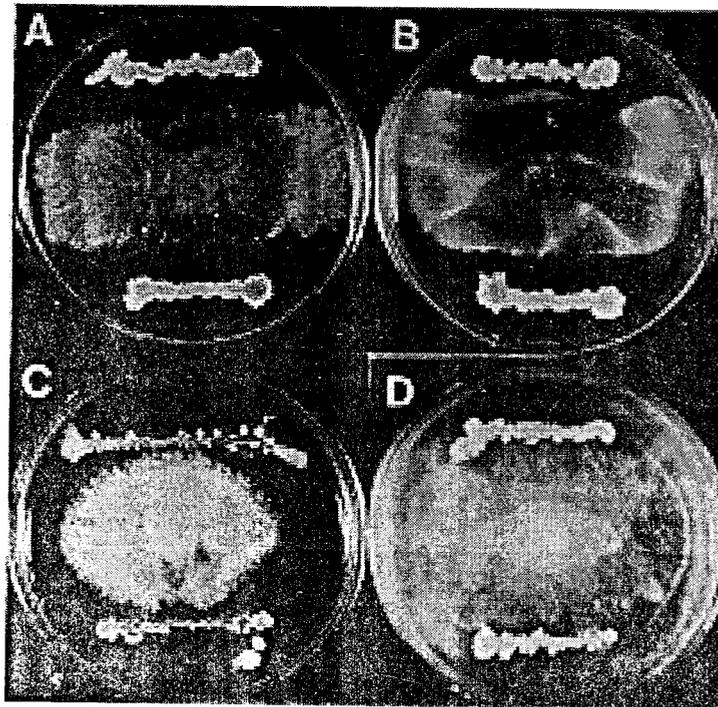


Fig. 10. Petri plate assay for antifungal activity of rifampicin resistant *kaenibacillus macerans* 19 (a) and *Pseudomonas cepacia* JS4 (b) against *Rhizoctonia solani* (A), *Fusarium* sp. (B), *Phytophthora* sp (C)., *Pythium* sp (D).

6. 조절된 조건에서의 길항균 동태

*in vitro*에서 *Rhizoctonia* root-rot을 가장 잘 억제하는 길항균주 *Paenibacillus macerans* 19, *Paenibacillus macerans* 22, *Paenibacillus macerans* 19 및 *Pseudomonas ceapcia* JS4 세 균주를 도라지 종자에 0.5% methylcellulose로 코팅 처리하여 발아율과 줄기의 생육 정도를 조사한 결과는 Fig. 11 & 12과 같다. Fig. 11의 종자 발아율은 길항균주 *Paenibacillus macerans* 19가 가장 양호하였다. 그리고 종자 처리 후 6주 후에 도라지 생육 정도를 줄기 신장율을 조사한 결과는 Fig. 12과 같다. Fig. 12에서와 같이 *Paenibacillus macerans* 19 처리가 신장율도 가장 좋았다. 이 결과는 *Paenibacillus macerans* 19가 도라지 근권에 부착하여 길항력을 가질 뿐만 아니라 이 균주의 질소고정력과 관계가 있을 것으로 추측된다. 이에 대한 실험을 진행 중에 있으며, 현재로서 이 균주가 기주식물과 상호작용을 하여 탄소원과 질소원의 상호교환의 가능성을 생각할 수 있을 것이다. 왜냐하면 도라지나 인삼 등은 어떤 재배 조건에서는 수십년간을 옮기지 않고 한 자리에서 생육이 가능하며 산삼과 같이 시비를 하지않아도 수십년을 자생할 수 있는 것은 식물과 미생물 사이의 알려지지 않은 기작이 있을 것으로 생각된다. 본 연구자도 인삼 및 산삼을 재료로 하여 미생물 분석을 한 결과 도라지와 유사한 결과를 얻었다. 앞으로 이에 관련되는 기작을 구명하면 도라지 외에도 인삼과 같은 구근 식물의 장기재배에 따르는 근부병 문제를 해결해 줄 것으로 기대된다.

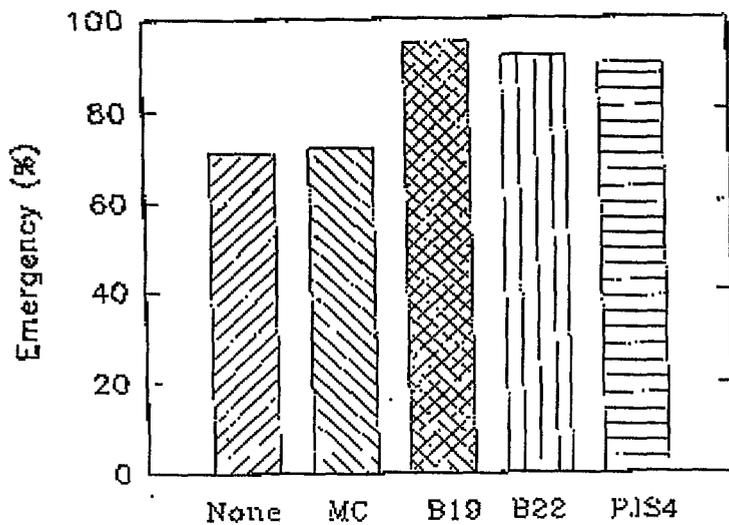


Fig. 11. Effect of seed treatments with two *Paenibacillus macerans* 19 (B19) and *Paenibacillus macerans* 22 (B22), and *Pseudomonas cepacia* JS4 (PJS4) on emergence of stem of *Platycodon glaucum* under controlled conditions. Loam soil (sterilized 121 °C, 30 min), MC (seed treated with 0.5% methylcellulose) and nontreated seeds were included as control.

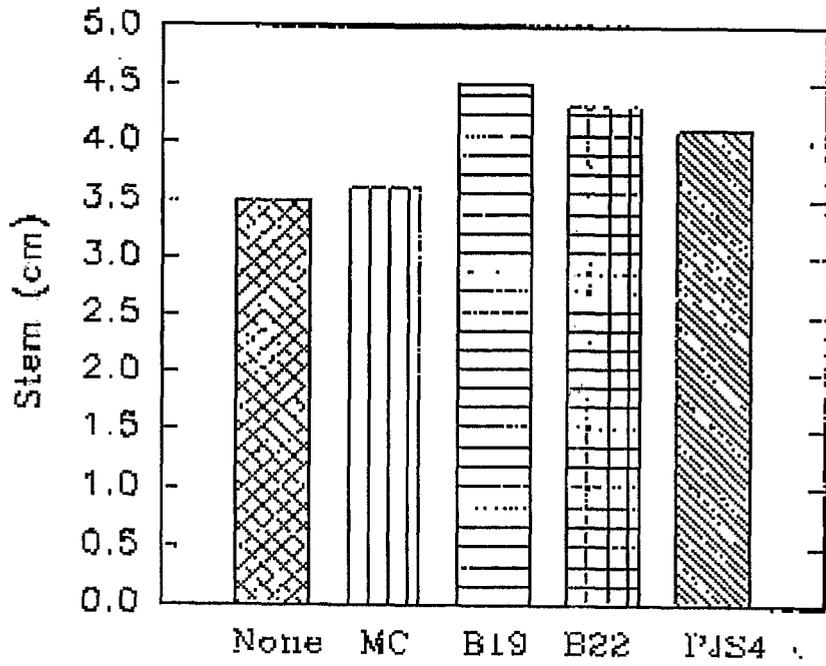


Fig. 12. Effect of seed treatments with two *Paenibacillus macerans* 19 (B19) and *Paenibacillus macerans* 22 (B22), and *Pseudomonas cepacia* JS4 on emergence of stem of *Platycodon glaucum* grown in loam soil in pots under controlled conditions after six weeks. Loam soil (sterilized 121 °C, 30 min), MC (seed treated with 0.5% methylcellulose) and nontreated seeds were included as control.

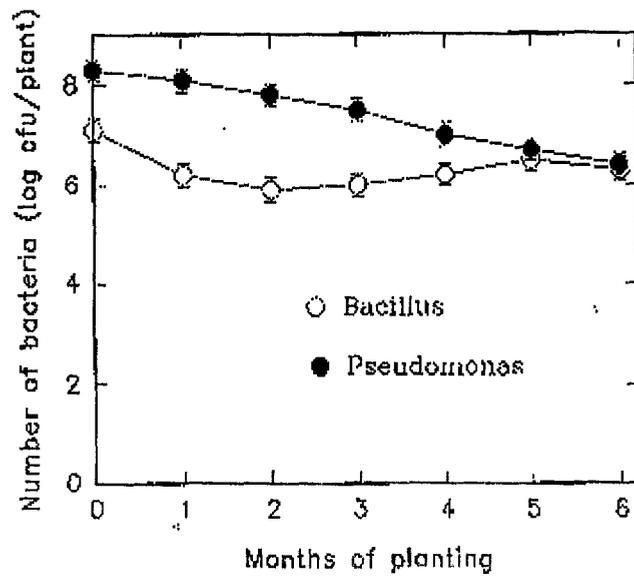


Fig. 13. Population sizes of *Paenibacillus macerans* 19 and *Pseudomonas cepacia* JS4 in rhizosphere of *Platycodon glaucum* grown in Daegok Farm. The vertical bars indicate standard deviation.

7. 도라지 재배지에서의 길항균 동태

Paenibacillus macerans 19와 *Pseudomonas cepacia* JS4에 대한 rifampicin 저항성 길항균 변이주를 NBY 액체배지에서 생육시킨 배양액 100 μ l (ca. 10^8 cell)를 1/10 TSA_{rif100} 상에서 도말시킨 결과 약 1.2×10^{-7} 의 비율로 얻어졌다. 변이주의 안정성 조사를 위해 1/10 TSA 배지에서 3일째마다 새로운 배지에 7회 이식하여 최종적으로 1/10 TSA_{rif100}에서 생육시켜 확인하였다. 대부분의 변이주들은 모균주가 1/10 TSA에서 잘 생육하는 것과 같이 1/10 TSA_{rif100}에서도 잘 생육하였다. 각각의 모균주의 형태적 특징, 세포생육, 포자형성에 유사한 변이주를 선발하여 병실험에서 *Rhizoctonia root rot*에 대한 길항력 유무를 조사하였다. *Rhizoctonia root rot*에 대한 길항력에 기초를 하여 한 균주를 모균주를 대표하는 균주로 선발하고 명명하였다. *Paenibacillus macerans* 19 와 *Pseudomonas cepacia* JS4 rifampicin 저항성 변이주가 모균주와 *Rhizoctonia root rot*에 대한 동일한 길항력을 가지고 있었기 때문에 도라지의 포장실험에서 길항균의 분포동태를 조사하기 위한 균주로 선발하였다. 종자 처리하여 시간 경과에 따른 길항균의 분포를 조사한 결과는 Fig. 13와 같다. 대곡 농장에서 재배 시험한 도라지는 전 생육기간을 통하여 *Paenibacillus macerans* 19와 *Pseudomonas cepacia* JS4 균주가 도라지 근권에 생육하였다. *Paenibacillus macerans* 19 균주는 초기 생육동안에는 양호하지 않았지만 파종 후 4 개월 이후에는 그 수가 증가하였다. *Paenibacillus macerans* 19는 전 생육기간을 통하여 안정하게 분포되어 있었다. *Pseudomonas cepacia* JS4는 종자가 있는 한 길항균이 존재하였으며 시간이 흐름에 따라 균수가 서서히 감소하였다.

8. 길항균 이용성

식물병 특히 뿌리병의 생물적 방제는 장래 지속농업의 실용화에
서 응용될 수 있는 가능성이 매우 높다. 도입되는 생물학적 방제제
는 그것이 필요한 시기와 장소에 대사적으로 활성이 있어야 하며 충
분한 양이 되어야 할 필요가 있다. 그것을 단독 혹은 혼합하여 사용
할 때 root colonization에 대한 보다 많은 정보와 각 biocontrol
agent에 대한 biocontrol mechanism에 관한 지식이 필요하다.

제4절 요약

*Rhizoctonia solani*에 의한 도라지 병유발실험으로 도라지 재배지에서 분리한 근부병 원인균인 *Rhizoctonia solani*를 7 균주를 병시험법에 의한 병유발실험을 한 결과분리균 모두 도라지에 병을 유발시켰다. 분리한 *Rhizoctonia solani*와 *Fuarium* sp.를 현미경적으로 관찰한 결과는 *Rhizoctonia solani*가 도라지 뿌리의 내부로 침투 초기를 관찰하였으며 *Rhizoctonia solani*에 의한 1차 감염 후에 도라지의 생리적 조건이 불리하게 되면 세균에 의한 2차 감염이 급속도로 진행되어 근부현상을 촉진시키는 것으로 나타났다.

도라지 근권에서 *Bacillus* sp.의 분리는 함양약초시험장에서 재배한 1-8년 근의 도라지에서 분리하였다. 세척한 도라지 뿌리를 80℃, 30분간 열처리한 세척 도라지 뿌리의 세균수는 열처리 전의 뿌리 파쇄액에 비교하여 0.01% 수준으로 4번의 연속적인 세척은 세척 전에 비해 세균 수가 0.5-2.0% 수준으로 세균 수가 감소하였다. 코로니의 형태에 따라 볼 때 1/10 TSA 상에서 분리된 코로니는 1차 뿌리 세척 후의 뿌리마쇄액에서 분리된 집단과 4차 뿌리 세척과 열처리 후의 뿌리 마쇄액에서 분리한 미생물 집단은 매우 동질성 집단으로 나타났다. 반복된 세척 결과 도라지 유묘로부터 분리된 세균 집단의 우점형은 도라지 년근에 따라 동일하였다. 이상의 결과에서 도라지가 척박한 토양에서 장기간 생육되는 것은 도라지 근권에 서식하는 길항미생물의 효과일 것으로 추정된다. 한편 아직 완전히 확인되고 있지 않치면 본 실험에서 분리한 *Paenibacillus macerans* R19 균주는 질소고정력을 보유하고 있는 것으로 추정되며 이에 대한 실험을 계속하고 있다. 만약 이러한 사실이 확인되면 본 실험에서 분

리한 균주는 생태적으로 기주식물과 상호작용하고 있어 토양 내에서 생존력이 클 것이며, 길항능력과 질소고정력을 함께 가지고 있기 때문에 도라지의 생물적 방제 및 생육촉진 미생물 제제를 위한 좋은 균주라 사료된다.

도라지병원균에 대한 길항균 선발을 위해 4차 세척 후 뿌리마쇄 현탁액을 희석한 후 1/10 TSA 배지 상에서 무작위로 약 3,000 개의 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp.의 코로니를 1차적으로 선발하였다. 30%는 *R. solani*에 대해 길항작용이 있었으나 분리균에 따라 정도의 차이가 있었다. 이들 균주를 2차 선발하여 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp에 대한 항균력 조사를 하였다. 상당수의 균주는 *Rhizoctonia solani*에 대해 항균력을 가지고 있었으며 *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp.에 항균력을 가진 것이 있었다. 2차 선별한 결과 32 균주의 *Bacillus* sp.와 31 균주의 *Pseudomonas* sp.를 이후의 실험을 위해 선정하였다. 이 결과 *Bacillus* sp.에서는 분리균 WLC19와 WLC22이 가장 양호하였으며 *Pseudomonas* sp.에서는 분리균 JS2, JS3, JS4가 항균력이 우수하였다. 분리균 동정을 위해 생리적 기준에 의해 동정한 결과 분리균 WWL19와 WWL22는 *Paenibacillus macerans*로 동정되었으며 분리균 SP4는 *Pseudomonas cepacia*로 동정되었다.

도라지 근권에서의 미생물 분포상태를 조사하기 위하여 rifampicin-resistant mutants를 분리하였다. NBY 액체배지에서 생육시킨 길항균 100 ul (ca. 10^8 cell)를 rifampicin이 100 ug/ml 함유된 1/10 TSA 고체배지 (1/10 TSA_{rif100}) 상에 도말하여 25C에서 5일간 배양한 후 나타나는 코로니를 선발하였다. 변이주의 안정성 조사를 위해 1/10 TSA 배지에서 3일째마다 새로운 배지에 7회 이식하여 최종적으로 1/10 TSA_{rif100}에서 생육시켜 확인하였다. 분리 후 길항력

을 야생형과 비교한 결과 길항력 존재하였다.

조절된 조건에서의 길항균 동태를 조사하기 위해 *in vitro*에서 *Rhizoctonia root-rot*을 가장 잘 억제하는 길항균주 *Paenibacillus macerans* R19, *Paenibacillus macerans* 22, *Paenibacillus macerans* 19 및 *Pseudomonas cepacia* JS4 세 균주를 도라지 종자에 0.5% methylcellulose로 함께 종자 코팅 처리하여 발아율과 줄기의 생육 정도를 조사한 결과 종자 발아율은 길항균주 *Paenibacillus macerans* 19가 가장 양호하였다. 그리고 종자 처리 후 6주 후에 도라지 생육 정도를 줄기 신장율을 조사한 결과 *Paenibacillus macerans* 19 처리가 신장율도 가장 좋았다. 이 결과는 *Paenibacillus macerans* 19가 도라지 근권에 부착하여 길항력을 가질 뿐만 아니라 이 균주의 질소고정력과 관계가 있을 것으로 추측된다. 이에 대한 실험을 진행 중에 있으며, 현재로서 이 균주가 기주 식물과 상호작용을 하여 탄소원과 질소원의 상호교환의 가능성을 생각할 수 있을 것이다. 왜냐하면 도라지나 인삼 등은 어떤 재배 조건에서는 수십년간을 옮기지 않고 한 자리에서 생육이 가능하며 산삼과 같이 시비를 하지 않아도 수십년을 자생할 수 있는 것은 식물과 미생물 사이의 알려지지 않은 기작이 있을 것으로 생각된다. 본 연구자도 인삼 및 산삼을 재료로 하여 미생물 분석을 한 결과 도라지와 유사한 결과를 얻었다. 앞으로 이에 관련되는 기작을 구명하면 도라지 외에도 인삼과 같은 구근 식물의 장기재배에 따르는 근부병 문제를 해결해 줄 것으로 기대된다.

도라지 재배지에서의 길항균 동태를 실험하기 위해 *Paenibacillus macerans* 19와 *Pseudomonas cepacia* JS4에 대한 rifampicin 저항성 길항균 변이주를 NBY 액채배지에서 생육시킨 배양액 100 μ l (ca. 10^8 cell)를 1/10 TSA_{rif100} 상에서 도말시킨 결과

약 1.2×10^{-7} 의 비율로 얻어졌다. 변이주의 안정성 조사를 위해 1/10 TSA 배지에서 3일째마다 새로운 배지에 7회 이식하여 최종적으로 1/10 TSA_{rif100}에서 생육시켜 확인하였다. 대부분의 변이주들은 모균주가 1/10 TSA에서 잘 생육하는 것과 같이 1/10 TSA_{rif100}에서도 잘 생육하였다. 각각의 모균주의 형태적 특징, 세포생육, 포자형성에 유사한 변이주를 선발하여 병실험에서 *Rhizoctonia root rot*에 대한 길항력 유무를 조사하였다. *Rhizotonia root rot*에 대한 길항력에 기초를 하여 한 균주를 모균주를 대표하는 균주로 선발하고 명명하였다. *Paenibacillus macerans* 19 와 *Pseudomonas cepacia* JS4 rifampicin 저항성 변이주가 모균주와 *Rhizotonia root rot*에 대한 동일한 길항력을 가지고 있었기 때문에 도라지의 포장실험에서 길항균의 분포동태를 조사하기 위한 균주로 선발하였다. 종자 처리하여 시간 경과에 따른 길항균의 분포를 조사한 결과는 Fig. 13와 같다. 대곡 농장에서 재배 시험한 도라지는 전 생육기간을 통하여 *Paenibacillus macerans* 19와 *Pseudomonas cepacia* JS4 균주가 도라지 근권에 생육하였다. *Paenibacillus macerans* 19 균주는 초기 생육동안에는 양호하지 않았지만 파종 후 4 개월 이후에는 그 수가 증가하였다. *Paenibacillus macerans* 19는 전 생육기간을 통하여 안정하게 분포되어 있었다. *Pseudomonas cepacia* JS4는 종자가 있는 한 길항균이 존재하였으며 시간이 흐름에 따라 균수가 서서히 감소하였다.

제5절 참고문헌

1. 이영한. 하호성. 윤한대. 식물생장 촉진 세균분리, 동정과 고추에 대한 처리효과. 1996. 한국토양비료학회지 29(1):67-73.
2. Agricultural Science Institute, RDA, Suwon, Korea
Agrios GN (1988) Plant pathology. pp 486-496. Academic press
INC London.
3. Baker R (1968) Mechanism of biological control of soil-born pathogens. Ann Rev Phytopathol 6: 263-294
4. Cho J T (1992) Studies on the flower breeding of Chinese Bellflower. Res Rept RDA (Horticulture) 34: 72-75
5. Chung, YM (1993) Biological control of *Rhizoctonia* diseases using antagonistic bacteria isolated from the rhizosphere of wild grasses. M. S. Thesis Gyeongsang Natl. Univ.
6. Chung. H.S. 1975. Studies on *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten causing root rot of ginseng. Rept. Torrori mycol Inst. (Japan) 12:127-138
7. Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling AN, and

Ogara F (1997) Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonad* strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Appl Environ Microbiol 63:1357-1361

8. Douglas B, Mabelis RP and Spencer H (1976) c-acetylphloroglucinols from *Pseudomonas fluorescens*. Phytochemistry 15: 1785-1786

9. Flaishman M, Eyal Z, Voisard C, Hass D (1990) Suppression of *Septoria tritici* by phenazine- or siderophore-deficient mutants of *Pseudomonas*. Curr Microbiol 20: 121-124

10. Fungi. APS press pp 265

11. Gutterson NI, Howie W, and Suslow T (1990) Enhancing efficacies of biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Alan R. Lisps, Inc., New York.

12. Holt JG, and Holt JG (1994) Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, London. pp. 151-169

13. Jee HJ, Nam CG, and Kim CH (1988) Studies on biological control of phytopathora blight of red-pepper I, isolation of antagonistics and evaluation of antagonistic activity *in vitro*

and in greenhouse. Korean J Pl Pathol 4: 305-312

14. Johnes JB, Chaes AR and Harris GK (1993) Evaluation of the Biolog GN microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. Plant Dis 77: 553-558

15. Kim DS (1992) Compendium of medicinal plant disease with colour plates. pp 46-54

16. Kim WG, Kim CK, and Yu SH (1988) Anastomosis grouping and cultural characteristics of isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn from sclerotia overwintered in paddy fields. Korean J Plant Pathol 4: 136-142

17. Lim HS, and Kim SD (1997) Role of siderophores in biocontrol of *Fusarium solani* and enhanced growth response of bean by *Pseudomonas fluorescens* GL20. J Microbiol Biotechnol 7: 13-20

18. Matuo, T. and Y. Miyazawa. 1969, *Cylindrocarpon pamacis* sp. nov. causing root rot of ginseng. Trans, Mycol. Soc. Japan. 9:109-112

19. Schaad, D.C., M.N. Schroth, and D.C. Hildebrand. 1989. Genus *Pseudomonas* in : Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, Schaad, N.W. ed. Bacterial Commit. Amer. phytopatho. Soc. Paul, Minnesota. p60-78.

20. Shikata H and Mitsueda T (1978) A method for isolating the white root rot pathogen, *Rosellinia necatrix* Berl., in soil. J Sericult Sci Japan 47: 519-521

21. Singleton LL, Mihail JD, Rush CM (1992) Methods research on soilborn phytophthgen.

22. Weller DM, Zhang BS and Cook RJ (1985) Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. Plant-Disease 69: 710-713

제 5 장 길항균, 연부균의 전문기능 및 근권생태 분석

제1절 서론

본 실험에서는 도라지 근부병 원인균에 대한 항균활성 가지는 길항균인 *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2, *Pseudomonas cepacia* JS4, *Pseudomonas putida* JS5, *Pseudomonas fluorescens* JS7을 분리하였으며 이 중에서 아직 항균력의 정밀화학성분이 잘 알려지지 않은 *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2의 길항성분을 분석하여 생물적방제제로의 가능성을 확인하였으며 이 중 *Paenibacillus macerans* R19는 특이하게도 항균력과 질소고정력을 가지고 있으며 또한 이 균은 도라지 뿌리 내에 침투하여 질소고정력을 가지고 있는 것으로 생각되며 식물 침투를 위한 세포벽분해효소 분비능을 조사하였다. 현재까지의 실험결과 이 균주는 도라지가 10년 이상의 장기간 토양 내에서 특별한 시비, 농약 살포 없이 생육할 수 있는 것은 이 균주의 역할이 관련될 것으로 추정되어 이에 대한 기초실험을 수행하였다. 그리고 도라지 근부병 원인균인 *Rhizoctonia solani*의 1차 감염 이후 세균에 의해 도라지 근권이 급속히 연화되어 연상을 조사하기 위하여 2차 감염세균을 분리 동정하였으며 이들이 분비하는 세포벽분해효소 특성 및 유전자를 분석하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 유용길항성분의 화학적 정밀 성분분석

가. 병원균에 대한 길항물질의 저해 스펙트럼 측정: 항균 활성의 조사 분리된 길항균의 배양물질을 도라지 근부병의 원인균인 *Rhizoctonia*을 비롯하여, 식물병원균인 *Fusarium*, *Phytium*, *Phytophthora* 속의 4가지 공시균과 대치 배양하였다. 즉, 사전배양된 식물병원균 곰팡이 균사를 멸균된 칼을 이용해 4x4mm 크기로 자른 후 PDA 배지 중앙부에 치상후 28 °C에서 3-4일간 배양하여 균사발단 부위가 활성을 가지게 한 후 균사발단부위에서 2.5cm떨어진 곳에 길항균이나 crude antibiotics를 함유한 paper disk를 얹는다. 28 °C에서 균사가 대조구를 완전히 덮을 때까지 배양한 후 저해부위의 크기를 조사하였다. 유기용매 분획시료는 예비실험으로 3일간 배양한 길항균의 배양여액 100ml을 동량의 benzene, chloroform, isopropanol 등으로 3차례 추출한 뒤 감압농축하여 최종volume을 1ml로 한것을 사용하였다. JS2 균주의 용매 추출방법은 Fig. 1과 같다.

나. Column chromatography

Pseudomonas aureginosa JS2의 길항물질 분리를 위해서 용매 분획에서 얻어진 chloroform분획을 silica gel(Merk, 70-230 mesh, ASTM)50g을 충전시킨 지름 4cm의 유리칼럼에 이동상 chloroform:acetonitrile = 2:3의 비율로 1,000ml elution시킨 다음 Fig. 2.에서 처럼 15개의 fraction을 얻어서 항균력을 대치법으로 확인하고 TLC패턴을 보았다. 그 다음 7-2, 7-3의 활성 분획을 지름 2cm인 유리 칼럼에 70-230mesh의 silica gel을 40cm 되게 채운 후 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}$ 의 비율을 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50의 비율로 300ml씩 흘려서 100ml되는 분획을 20개 얻었다 (Fig. 2). TLC로 monitoring후 대치법으로 항균력을 확인하여 활성밴드를 확인하였다. 마찬가지로 *Paenibacillus macerans*

R19의 길항물질 분리를 위해서는 배양액을 chloroform:isopropanol (1:1)의 비율로 섞은 혼합용액에서 추출된 물질을 Dowex로 처리하여 용출되는 fraction을 직경 4 cm 유리 column에 silica gel을 충전시킨 다음 chloroform:methanol (5:4) 혼합용액으로 용출시켜 각 fraction을 TLC로 monitoring 후 대치법으로 항균력을 확인하여 활성밴드를 확인하였다.

다. Thin layer chromatography에 의한 항균물질 분리

항생물질의 각 분획을 유리칼럼 조건을 참고하여 회수용 TLC (20×20 cm, 0.5 mm)와 적절한 전개용매를 사용하여 전개하였다. 235nm에서 UV active한 band를 확인하여 각각을 취하여 MeOH로 회수하였다. 회수된 물질을 감압농축하여 TLC상에서 single band임을 확인하였으며 회수된 각각의 band에 대해 대치 배양 실험을 거쳐 활성이 있는 물질을 얻었다.

라. 유용길항성분의 화학적 정밀 기기분석

HPLC 분석은 HP1100으로 reverse phase column (Hypersil ODS, 5 μ m, 200 x 4.6mm)으로 분석하였으며 mass spectrometer는 VG70-VSEQ (VG Analytical, UK), NMR은 Bruker AW300 (Germany)으로 CDC1₃를 이용하여 측정하였으며, FT-IR 분석은 IFS66 (Bruker, Germany)를 사용하여 항균물질의 정밀성분을 분석하였다. UV spectrum (HP8452A)은 methanol을 용매로 하여 측정하였다.

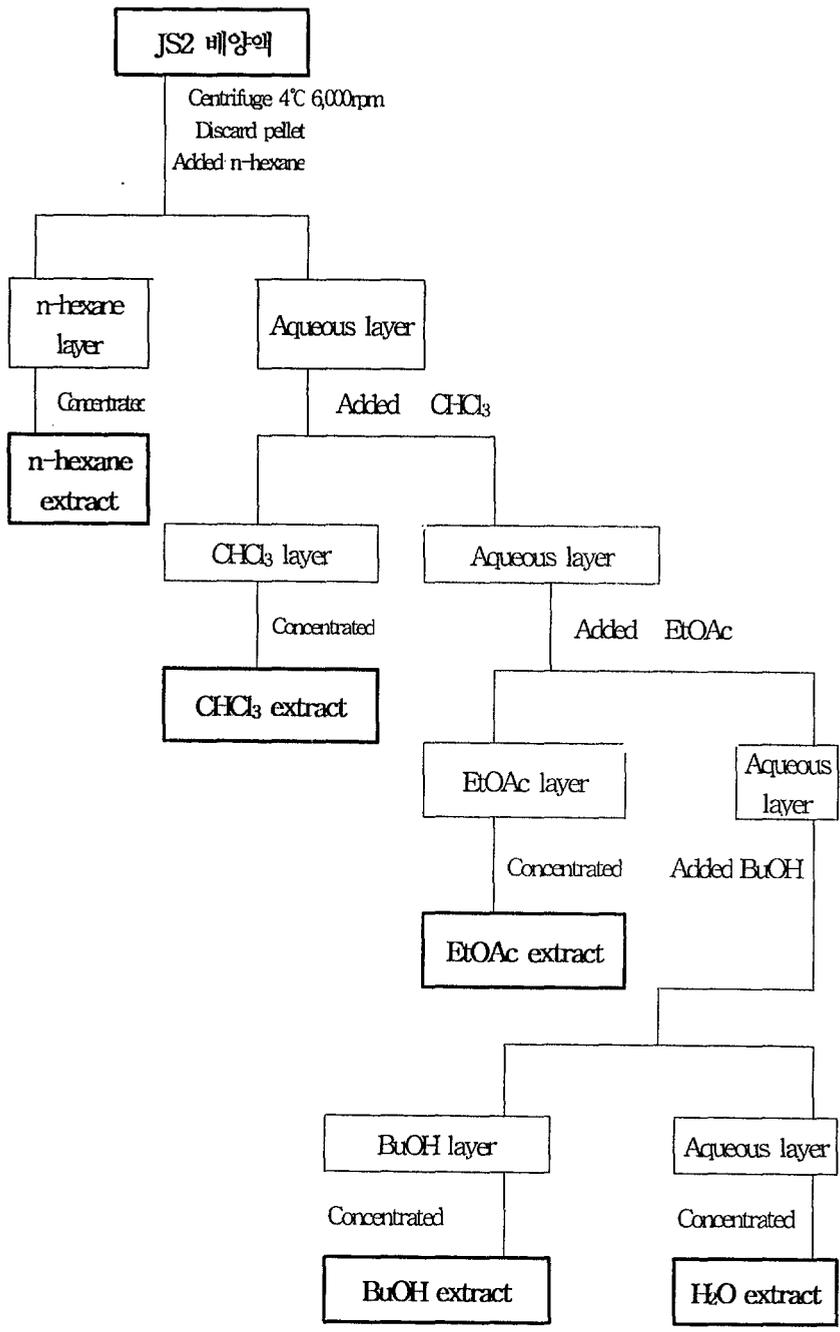


Fig. 1. The procedure for solvent fractionation of the centrifuged culture solution of *Pseudomonas aureginosa* JS2

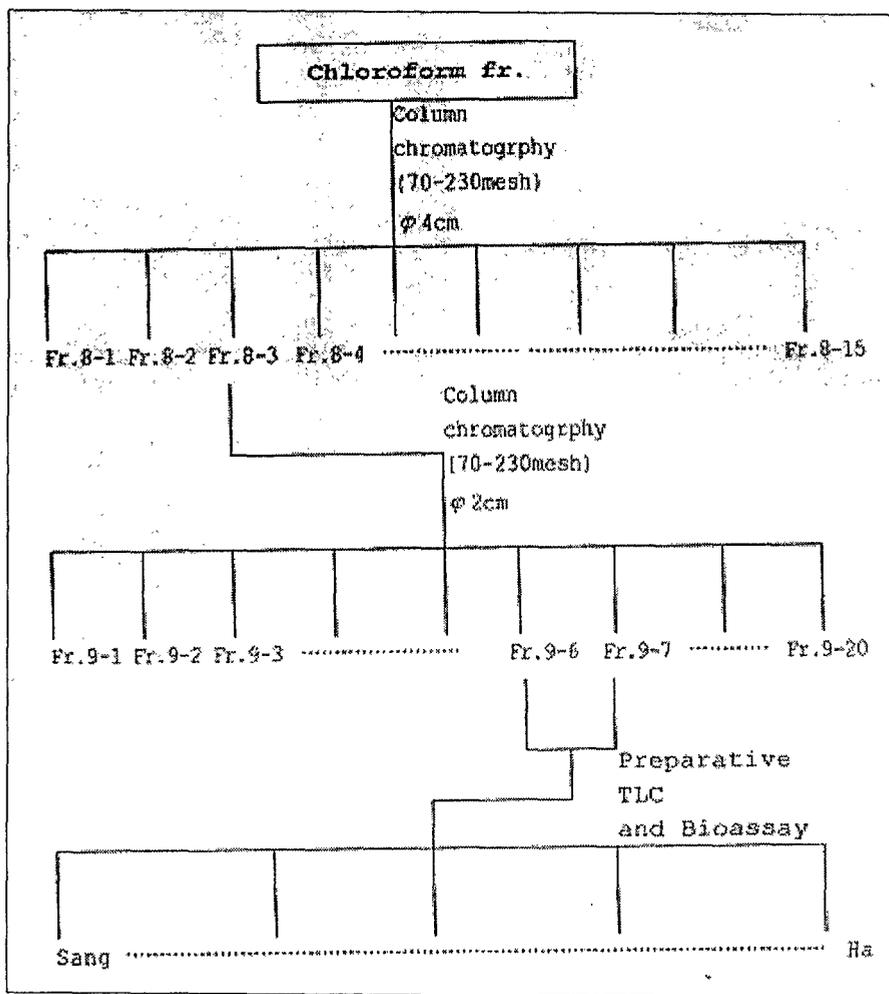


Fig. 2. Procedure of fractionation using column chromatography to isolation of antibiotics derived from *Pseudomonas aureginosa* JS2.

2. 길항세균 *Paenibacillus macerans*의 질소고정력 분석

가. 분리균 *Paenibacillus macerans* R19의 질소고정력 측정

Paenibacillus macerans R19의 질소고정력을 측정하기 위하여 acetylene 환원법 (C_2H_2 reduction)법에 의하여 측정하였다. 즉, 300ml의 살균 삼각플라스크에 토양 150g, 증류수 70 ml를 첨가한 후 고압살균 후 1년생 도라지 뿌리를 70% ethanol 및 hypochlorite에 침적 소독한 후 살균증류수로 7 회 세척한 후 상기 준비된 삼각플라스크에 심은 후 PDA 액체배지에서 생육시킨 *Bacillus macerans* R19 10^9 cells/ml 농도로 생육시킨 배양액 3 ml를 접종하고 C_2H_2 10 ml를 주사기로 고무마개를 통해 주입한 후 10일간 배양한 후 질소고정력을 측정하였다 (Fig. 3).

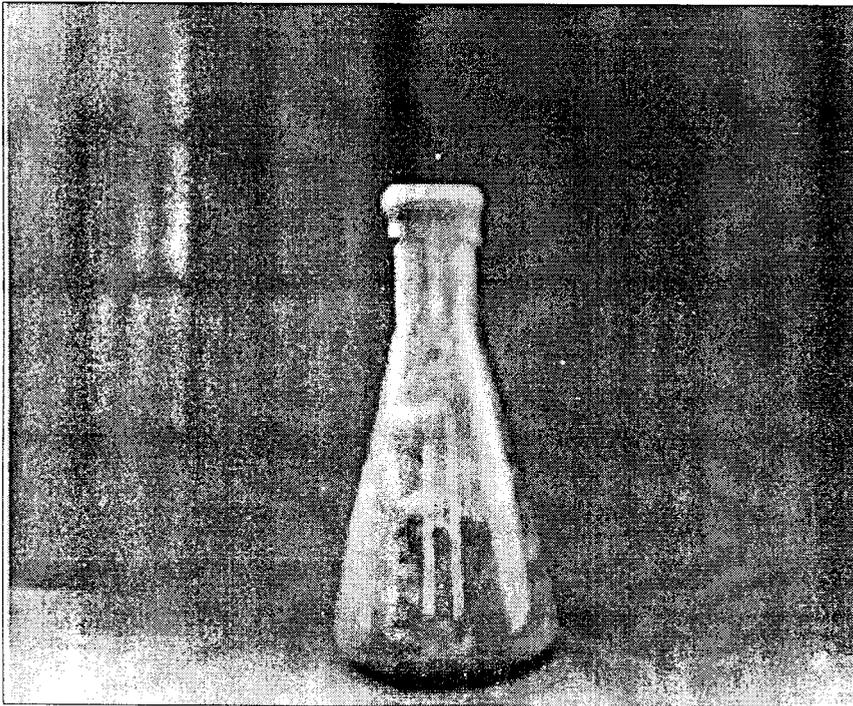


Fig. 3. *Platycodon glaucum* plant growing in erlenmeyer flask after 7 days incubation with serum stopper for acetylene reduction assay.

나. 분리균 *Panibacillus macerans* R19의 세포벽분해효소 분비특성

분리균의 세포벽분해효소의 생성 유무가 육안으로 관찰될 수 있는 한천확산법(agar diffusion method)으로 pectinase, cellulase, polygalacturonase, amylase의 활성을 TY배지(tryptone 5g, yeast extract 5g, CaCl₂ 1g, agar 15g)에 각 기질을 0.5%되게 첨가하여 측정하였으며, hemicellulase는 TY배지에 0.5% xylan을 기질로, CMCase는 CMC 1%, amylase는 amylase 1%, protease는 20% 탈지분유 용액을 최종 농도가 1%가 되게 만들어 사용하여 측정하였다. Cellulase 분리를 위해 0.1%의 carboxymethylcellulose를 첨가한 PDB 배지 1 liter에 분리 균주를 접종하고 10⁸ cells/ml 농도로 생육시킨 후 cellulase 생성을 유도하였다. 3 일간 배양한 상등액을 원심분리한 후 황산암모늄을 85% 포화시킨 침전물을 citric acid buffer (pH 6)에 녹여 membrane (Spectra/Por6)을 사용하여 멸균증류수를 3-4회 교환하면서 투석시킨 효소의 생화학적 분석을 위한 조효소로 사용하였다.

3. 2차감염 세균의 연부현상분석

가. 세균 및 동정

2차 감염 연부세균을 분리하기 위해 연부증상이 있는 시료로부터 nutrient agar를 사용하였다. 분리된 균주를 TY-CMC (tryptone 5g, yeast extract 5g, CaCl₂ 1g, carboxymethyl cellulose 5g, agar 15g) 배지에 배양하여 24시간 후 1% Congo red로 염색하여 주위에 노란 색 환¹⁴⁾을 나타내는 균에서 연부증상과 섬유소 분해능이 강한 균을 분리하였다. 선정균의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성은 Dickey, Thomson, Schaad, Dye 및 Bergey's manual의 방법에 준하였으며 Microlog 2 kit (Biolog. Inc., USA) 및 MIDI system

(Hewlett-Packard, USA)을 사용하였다.

나. 세포벽분해효소 활성 측정

Lim 등의 방법에 따라 분리균의 세포벽분해효소의 생성 유무가 육안으로 직접 관찰될 수 있는 한천확산법 (agar diffusion method)으로 pectate lyase, pectinase, cellulase의 활성을 TY배지 (tryptone 5g, yeast extract 5g, CaCl₂ 1g, agar 15g)에 각 기질을 0.5%되게 첨가하여 측정하였으며, hemicellulase는 TY배지에 0.5% xylan을 기질로, protease는 20% skim milk 용액을 최종 농도가 1%가 되게 만들어 사용하였다.

다. 병원성 검정

공시균주의 병원성 조사는 nutrient 고체배지에서 48 시간 배양한 세균을 약 10⁸ cells/ml 농도가 되도록 현탁하여 표면 살균된 식물조직에 접종하고 30℃에서 배양 관찰하였다. 시료를 먼저 멸균 증류수로 씻어 내고 1% sodium hypochloride에 2분간 적신 후 멸균 증류수로 수회 세척하여 물기를 제거한 후 접종하여 연부 정도를 조사하였다.

라. 광학현미경 조사

식물조직에 분리균을 접종 후 시료를 경시적으로 채취하여 광학현미경으로 관찰하였다.

마. CMC-SDS-PAGE에 의한 섬유소분해효소의 직접활성염색법

공시균에서 섬유소분해효소 유도를 위하여 0.1%의 CMC를 첨가한 MMY (K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%,

CaCl₂ · 2H₂O 1mM yeast extract 0.1%, CMC 0.3%) 배지 1ℓ *Erwinia* sp. PY35를 접종하여 10⁸ cells/ml 농도로 생육시킨 후 섬유소분해효소 생성을 유도하였다. 공시균이 분비하는 체외 섬유소분해효소 (extracellular cellulase)를 분리하기 위해 4 일동안 배양한 상등액을 원심분리 후 유안을 85%로 포화시키고 침전물을 citric acid buffer (pH 6.0)에 녹여 반투막을 사용하여 멸균증류수를 3-4회 교환하면서 염을 제거하였으며, 효소의 활성을 CMC 배지 상에서 확인 후 냉동 건조시켜 농축시킨 다음 보관하고 필요시 시료를 사용하였다. 체내효소(intracellular enzyme)는 원심분리한 균체를 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 현탁시킨 후 초음파 파쇄하여 완충용액에 녹여 다시 원심분리 후 사용하였다. 이들 조제된 효소를 Park 등의 방법인 직접활성염색법인 CMC-SDS-PAGE (carboxymethyl cellulose-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리된 활성 밴드를 확인하였다. 섬유소분해효소의 겔 상에서 직접 활성을 관찰하기 위해 0.1%의 CMC를 함유한 separating gel을 renaturation buffer (1% tritonX-100, 100mM Tris · HCl, pH 7.5)에 8시간 renaturation 시킨 후 Congo red 염색을 통하여 겔 상에서 섬유소분해효소의 isozyme 활성밴드를 확인하였다.

4. 2차 감염세균의 연부 관련 세포벽분해효소 유전자 분석

가. 사용균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 균주 및 *E. coli* 균주는 LB 배지에 적절한 항생제 농도를 첨가하여 사용한다.

나. Total DNA 및 plasmid DNA 분리

Genomic DNA, plasmid DNA, 제한효소 절단 등 일반적인 recombinant DNA 기술은 Sambrook 등의 방법에 준하였다.

다. 제한지도 작성

분리 확인된 각 유전자로부터 plasmid를 대량 분리하여 해당되는 DNA 부분을 제한효소로 DNA fragment를 분리한 후 지금까지 subcloning 하는데 사용되지 않은 2개 이상의 제한효소로 조합을 만들어 절단실험 하여 유전자 지도를 작성한다.

라. 세포벽효소 유전자 clone의 선별

LB+Tc+X-Gal plate에 의하여 1차 선별하고 선별된 gene bank를 cellulose 등을 함유한 배지에 옮겨 효소활성 정도를 조사하여 해당 gene을 함유한 clone을 선별한다.

마. DNA sequencing 및 구조분석

Subcloning하여 얻어진 structural gene 및 promoter 부분을 함유한 sequencing은 Sanger's dideoxymethod를 응용한 DNA sequencing법을 사용하였다. Automatic DNA sequencer (Genetic analyzer 310)로서 DNA 염기배열을 분석하였다. 염기서열의 상동성 분석은 BLAST program, PC/GENE program으로 유전자 구조 분석을 하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 유용길항성분의 화학적 정밀 성분분석

가. 용매분획 및 항균실험

1) 분리길항균 *Bacillus macerans* R19

Paenibacillus macerans R19 배양여액을 n-hexane, chloroform, ethylacetate와 n-butanol을 써서 차례로 용매분획한 후, 각각의 분획을 TLC하여 254nm, 366nm에서 band를 관찰하였다. 또 각각의 분획이 도라지 근부병 원인균인 *Rhizoctonia solani*에 대해 저해작용을 하는지 여부를 관찰한 결과 n-butanol fraction에서 저해 현상이 관찰되었다. 추출을 용이하기 위하여 chloroform : isopropanol (1:1)로 추출한 결과 butanol에서와 같이 *Rhizoctonia solani*에 대해 저해작용을 나타내었다. *Paenibacillus macerans* R19의 배양여액 70 liter를 원심분리시켜 미생물의 잔사를 제거시킨 다음 chloroform:isopropanol (3:1) 용매를 1:1로 가하여 추출하고 Dowex 50WX4-200의 용출 fraction을 methanol에 녹이고 다시 추출액을 brine으로 씻은 다음 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 건조시킨 분획물을 감압하에서 농축 후, Silica gel column chromatography(chloroform + methanol gradient system)를 반복적으로 하여 분획하였으며 이들을 TLC (chloroform:methanol:10% NH_4OH =5:4:1)하여 미지화합물 25mg을 분리하여 정밀성분분석을 계속하였다 (Fig. 4).

2) 분리길항균 *Pseudomonas aeruginosa* JS2

JS2의 배양여액을 n-hexane, chloroform, ethylacetate와 n-butanol을 써서 차례로 용매분획한 후, 각각의 분획을 TLC하여 254nm, 366nm에서 band를 관찰하였다. 또 각각의 분획이 도라지

근부병 원인균인 *Rhizoctonia solani*에 대해 저해작용을 하였다 (Fig. 5). *Pseudomonas aeruginosa* JS2의 배양액 40 liter로부터 open column을 사용하여 crude antifungal substance 약 80 mg을 분리하였다. 이들의 chloroform fraction의 TLC pattern은 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서와 같이 fraction 9-7과 fraction 9-8은 길항력을 보여주었다. Fraction 9-7과 fraction 9-8에서 유래한 물질들은 TLC 상에서 3개의 band를 가지고 있었다. 이 중에서 Ha fraction이 antifungal activity를 보여 주었다. 순수 정제된 antifungal substance와 antifungal activity를 Fig. 5에서 보여준다. 거의 순수 정제된 (Ha fraction) 약 35 mg을 HPLC에서 single peak로 확인하였다 (Fig. 8). 순수 정제된 길항물질의 결정은 흰색에 가까웠다. 최종 물질의 Rf value는 acetonitrile:chloroform = 2:3 용매 system에서 7.5 이었다 (Fig. 6).

나. 길항물질의 HPLC chromatograph

정제된 길항물질 R19와 JS2의 HPLC chromatogram은 Fig. 7와 같다. Fig. 7B에서 처럼 JS2는 column chromatography 및 TLC에 의해 분리 정제된 길항물질은 순수한 것으로 확인되었으나 R19는 Fig. 7A에서 처럼 분리에 약간의 문제점이 확인되었다.

다. 길항물질의 UV spectrum

길항물질의 UV spectrum을 관찰한 결과 Fig. 8 과 같다. Fig. 8B에서는 JS2의 spectrum을 보여주는 데 330nm, 268nm, 200nm에서 흡수 스펙트럼을 보여주고 있는 데 이 물질은 benzene 구조에서 어떤 group이 수소와 치환된 것으로 추측된다.

라. 길항물질의 FR-IR spectrum

길항물질의 Ft-IR spectrum은 Fig. 9와 같다. JS2는 Fig. 9B에서 처럼 peak 3385.8 cm^{-1} 는 hydroxyl group을, peak 1737.4 cm^{-1} 는 carbonyl group을 암시하며 두 종류의 peak 2924.2 cm^{-1} 와 peak 2852.5 cm^{-1} 는 aliphatic C-H bond를 암시하고 있다. 길항물질 R19는 M^+619 , IR(KBr): 3418, 2921, 1671, 1631 cm^{-1} 를 나타내었다 (Fig. 9A),

마. 길항물질의 Mass spectrum

길항물질의 mass spectrum은 Fig. 10, Fig. 11과 같다. Fig. 11에서 처럼 JS2의 FABMS spectrum은 211m/z, 241m/z, 374m/z의 molecular ion이 가능한 3종류 peak가 나타났으며 library database 검색 결과 2, 4-diacetylphloroglucinol과 유사한 것으로 판명되었다. Fig. 11B는 EIMS 결과이다.

바. 길항물질의 NMR spectrum

길항물질의 NMR spectrum은 Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14와 같다. Fig. 13은 JS2의 ^1H -NMR spectrum 결과로 peak δ 2.64은 carbonyl carbon과 결합된 methyl group으로 추측된다. 3가지의 peak δ 3.370, peak δ 3.334, peak δ 3.326은 ether와 alcohol group인 것으로 추측된다. ^{13}C -NMR spectrum에서 peak δ 205.57, 173.00, 170.57, 105.36, 96.120, 33.38의 6 peak로 나타났는데 peak δ 205.57는 carbonyl carbon으로 추측되며 4 peak δ 173.00, 170.57, 105.36, 96.120는 benzene carbon으로, peak δ 33.38는 methyl group과 결합한 carbon으로 추측되었다. 이상의 결과를 종합하면 길항물질 JS2는 2, 4-diacetylphloroglucinol (Ph1) 혹은 그 유도체 일 것으로 추측된다 (Fig. 15).

길항물질 R19의 NMR spectrum은 ^1H -NMR(500MHz, CD_3OD) δ 0.89(m, 1H), 1.23(d, 3H), 1.28~1.32(m, 3H), 1.48~1.75(m, 4H), 2.12(m, 1H), 2.18(m, 1H), 2.39(m, 3H), 2.67(m, 1H), 3.13~3.29(m, 4H), 3.48(m, 1H), 3.60~3.71(m, 2H), 3.85(m, 1H),

3.92(m, 1H), 4.35(m, 2H), 4.51(m, 1H), 5.05(m, 1H), 5.52(m, 1H), 5.60(m, 1H), 5.67(m, 1H), 6.05(m, 1H), 6.15(m, 2H), 6.23(m, 1H), 6.63(m, 1H), 6.67(m, 1H), 7.21(m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}(125\text{MHz}) \delta$ 1.41, 21.6, 26.8, 27.5, 32.2, 34.3, 37.4, 38.2, 42.8, 45.1, 64.3, 70.5, 71.2, 73.28, 73.32, 76.6, 79.41, 79.45, 79.7, 102.5, 119.2, 130.5, 130.9, 131.3, 132.4, 132.8, 133.3, 135.4, 136.3, 136.9, 143.7, 146.8, 162.9, 169.4 (Fig. 12). DEPT 90과 135스펙트럼에서 4차탄소 3개, 3차탄소 19개, 2차탄소 9개, 1차탄소 2개가 각각 존재함을 알 수 있었고 이것은 $^1\text{H-NMR}$ 에서 총양성자수와 잘 일치하였다. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼분석결과 4ppm보다 낮은 화학적 이동 값에서는 아래와 같은 화합물의 기본골격에 대한 정보를 얻을 수 있었다. 7.21ppm의 양성자는 6.63ppm의 양성자와 그리고, 5.52ppm의 양성자와의 Cross peak이 관찰되었다. 5.52 ppm의 양성자는 6.67ppm의 양성자, 6.15ppm의 양성자와 연속적으로 각각의 cross peak이 관찰되었고 6.15ppm의 양성자는 6.63ppm의 양성자와 cross peak이 관찰되었다. 또한 6.15ppm의 양성자는 6.23ppm의 양성자와 그리고 6.23ppm의 양성자는 6.67ppm의 양성자와 상관관계가 관찰되었다. 4ppm보다 낮은 화학적 이동값, 특히 1~2.5ppm사이에서는 서로 겹쳐있는 양성자들과 불순물로 인해 구조동정에 대한 특별한 정보를 얻을 수 없었다 (Fig. 14).

이상의 결과를 종합하면 미지의 화합물 R19는 (5+4)고리의 기본골격을 갖고 있는 화합물로 추정할 수 있고 추후 계속해서 이 화합물의 구조에 관한 연구를 기대한다.

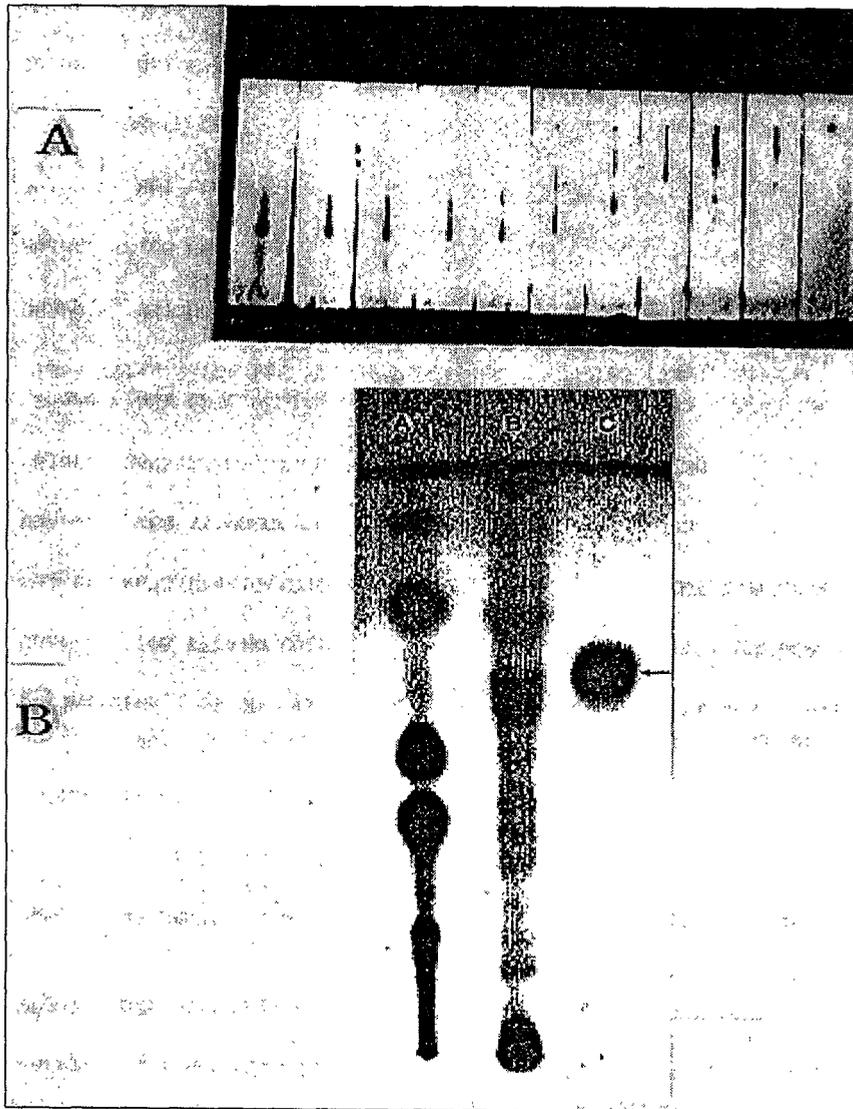


Fig. 4. TLC patterns of *Paenibacillus macerans* R19

A: Solvent system

B: Gradient fractions (A, before Dowex; B, after Dowex)
and purified R19 (C)

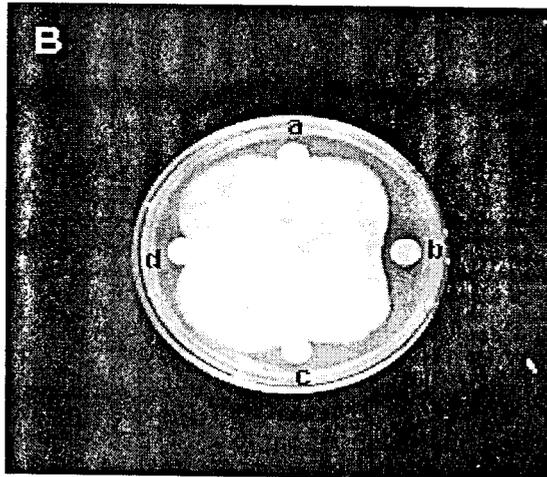
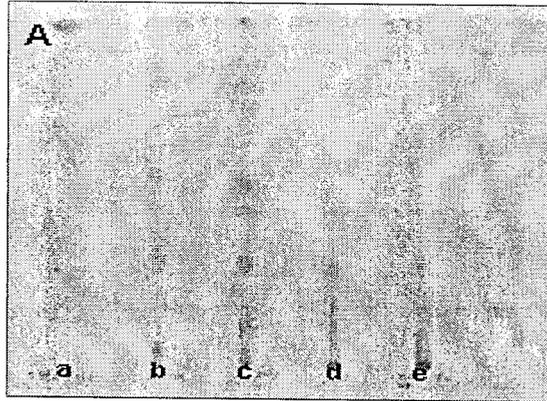


Fig. 5. TLC patterns under 254nm and antifungal activity of the solvent fractions isolated from *Pseudomonas aureginosa* JS2. (a, hexane fr.; b, chloroform fr.; c, ethylacetate fr.; d, n-butanol fr.; e, water fr.)

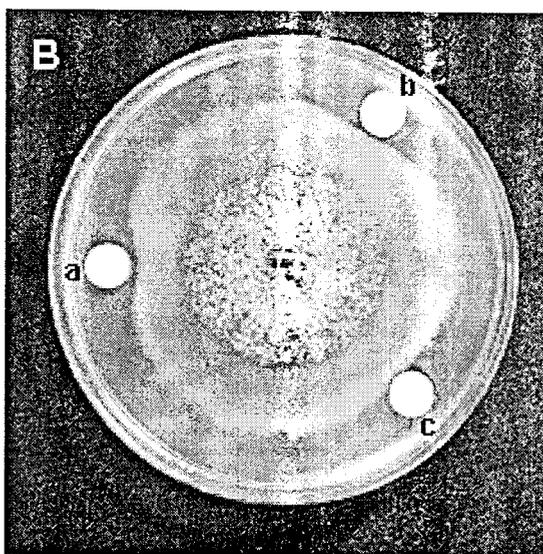
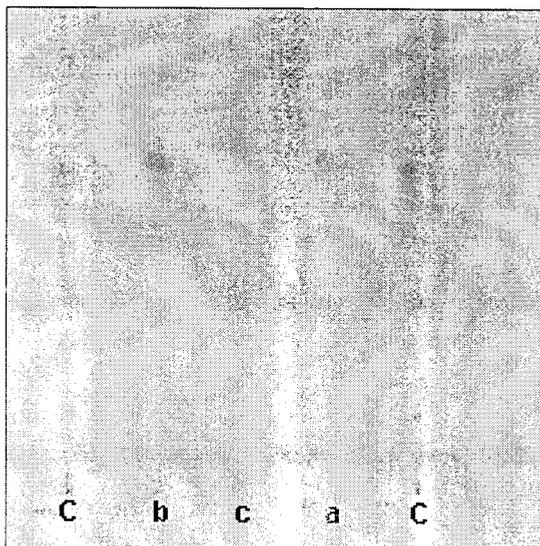


Fig. 6. TLC patterns and antifungal activity of the crude antifungal substance isolated from *Pseudomonas aureginosa* JS2. (C, chloroform fr.; a, sang fr.; b, 9-6 fr., c, ha fr.)

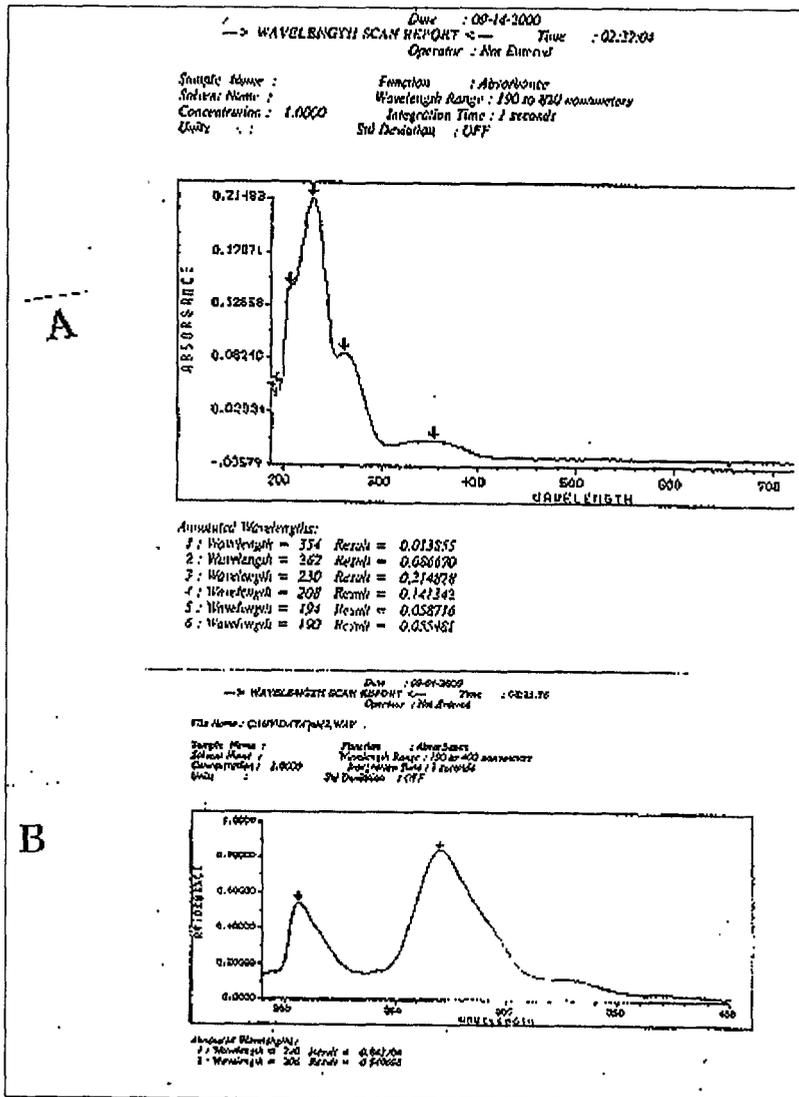


Fig. 8. Wavelength scanning spectrum of antifungal substance isolated from *Paenibacillus macerans* R19 and *Pseudomonas aureginosa* JS2 dissolved in methanol.

A: *Paenibacillus macerans* R19

B: *Pseudomonas aureginosa* JS2.

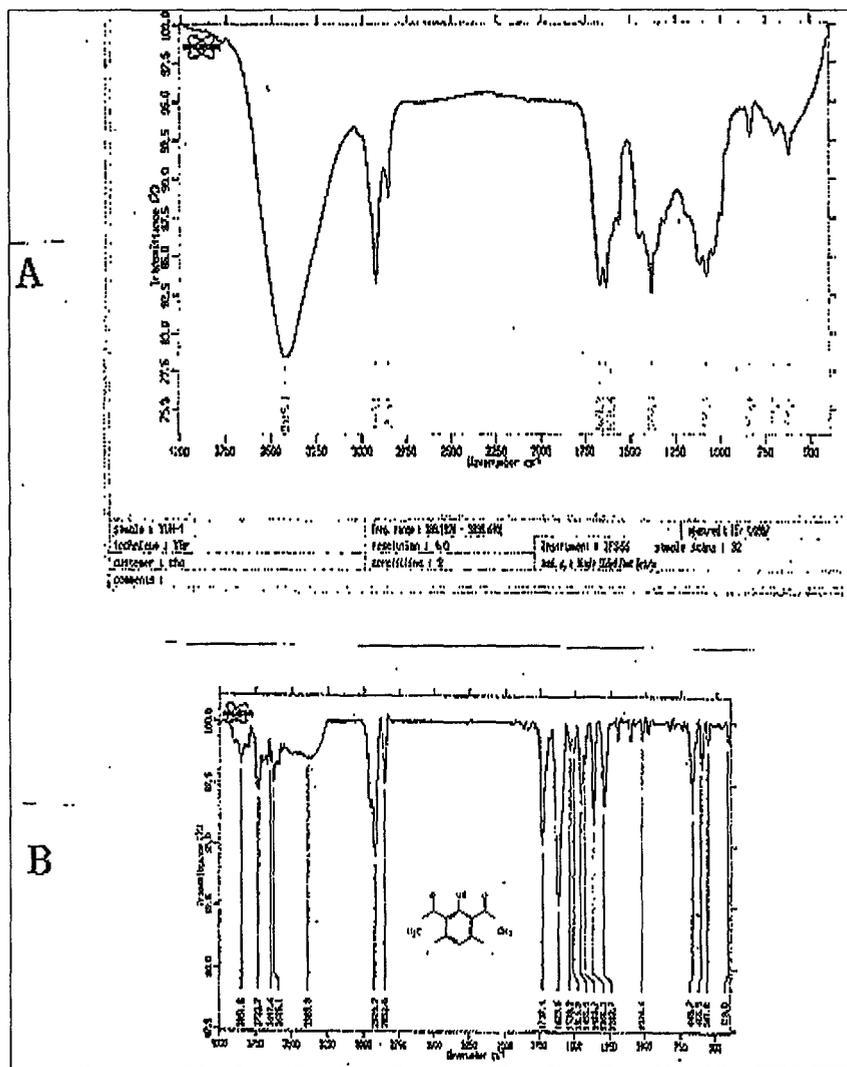


Fig. 9. FT-IR spectrum of the antifungal substance isolated from *Paenicillium macerans* R19 and *Pseudomonas aureginosa* JS2 (KBr).

A: *Paenicillium macerans* R19

B: *Pseudomonas aureginosa* JS2

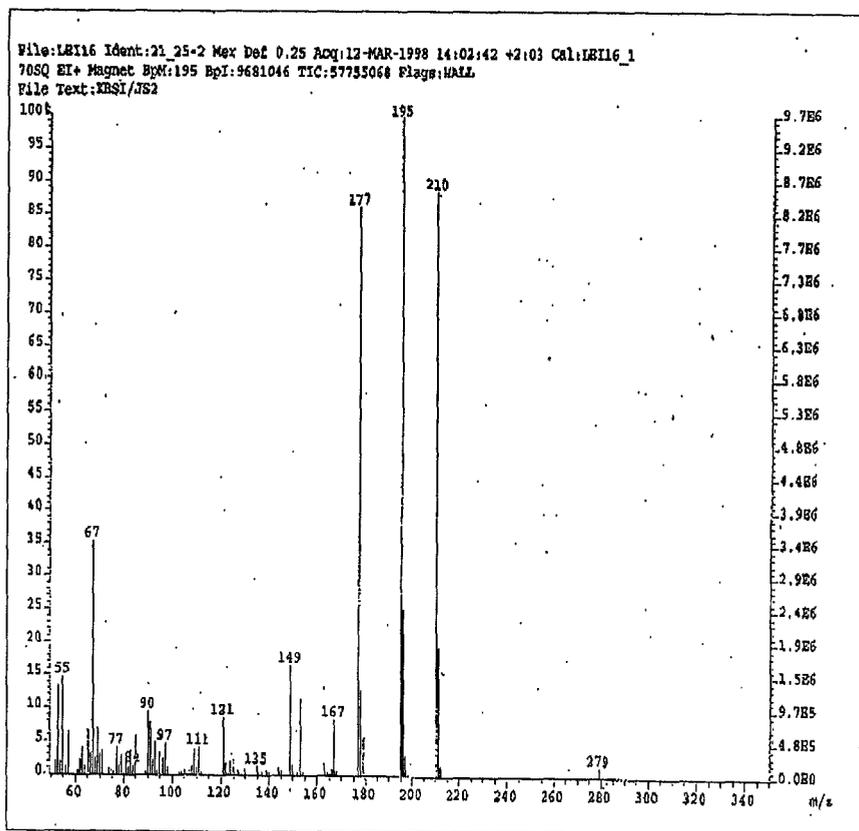


Fig. 10. Fast atom bombardment (FAB)-mass and electron ionization (EI)-mass spectrum of antifungal substance of *Paeniacillus macerans* R19.

A: FAB 70eV.

B: EI 70eV

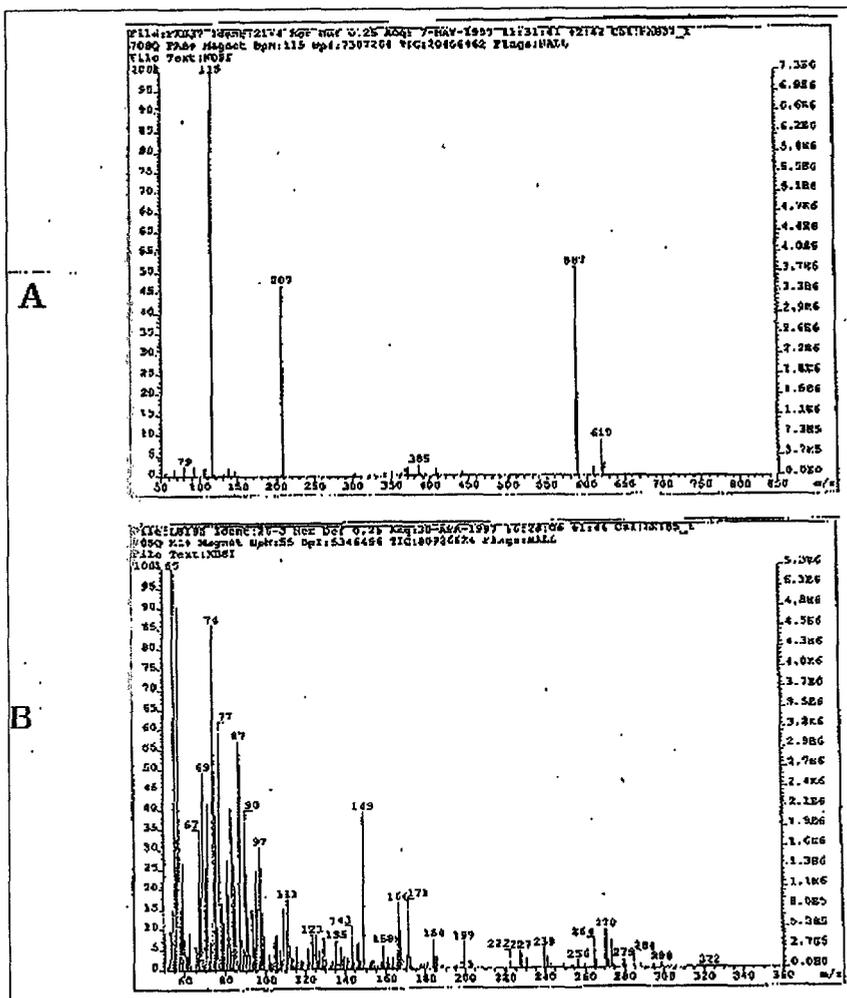


Fig. 11. Fast atom bombardment (FAB)-mass and electron ionization (EI)-mass spectrum of antifungal substance from *Pseudomonas aureginosa* JS2.

A: FAB 70eV

B: EI 70eV

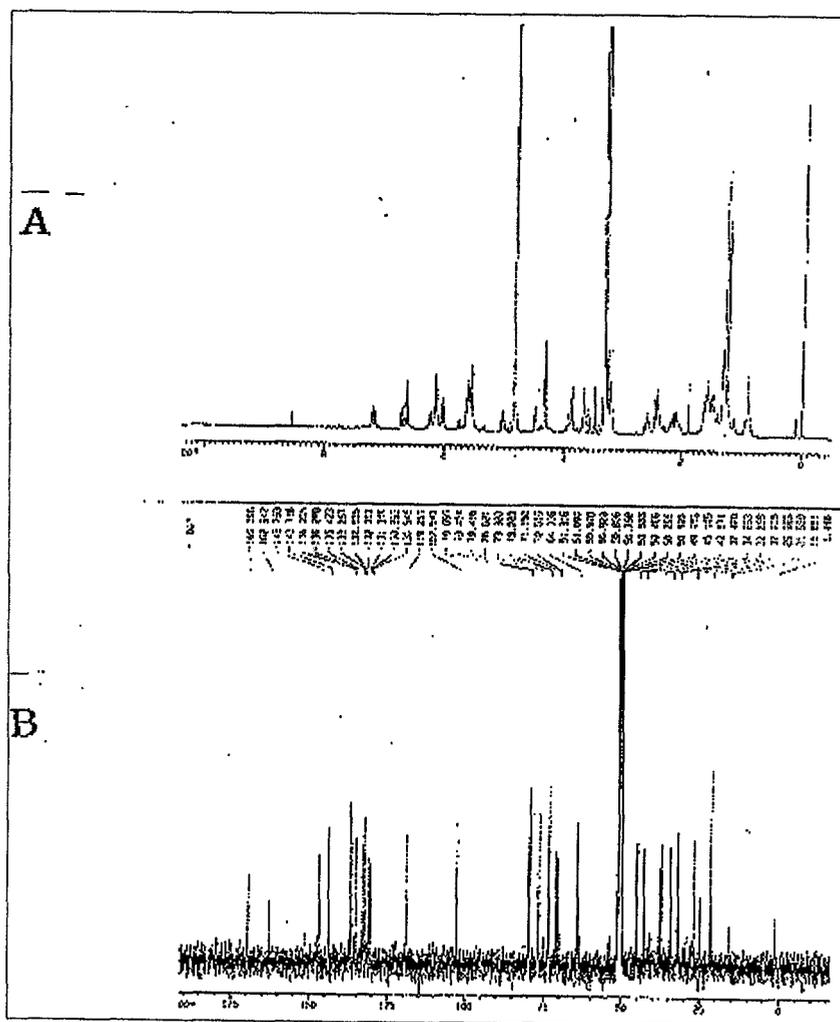


Fig. 12. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of antifungal substance isolated from *Paeniaceillus macerans* R19

A: $^1\text{H-NMR}$

B: $^{13}\text{C-NMR}$

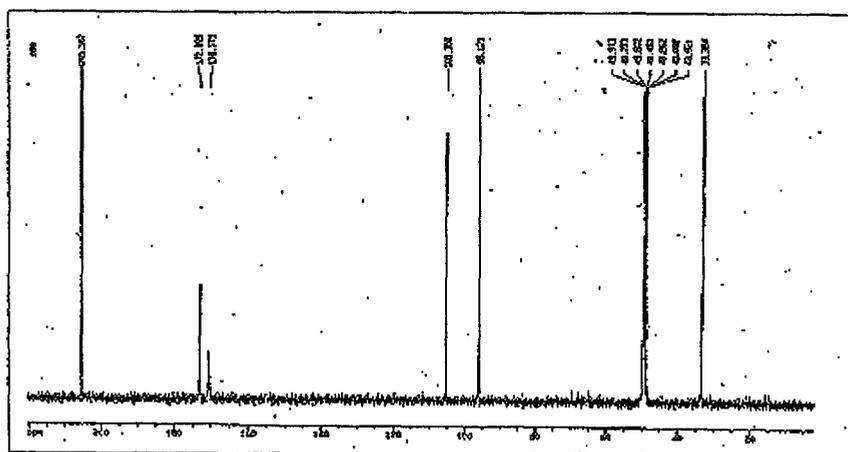
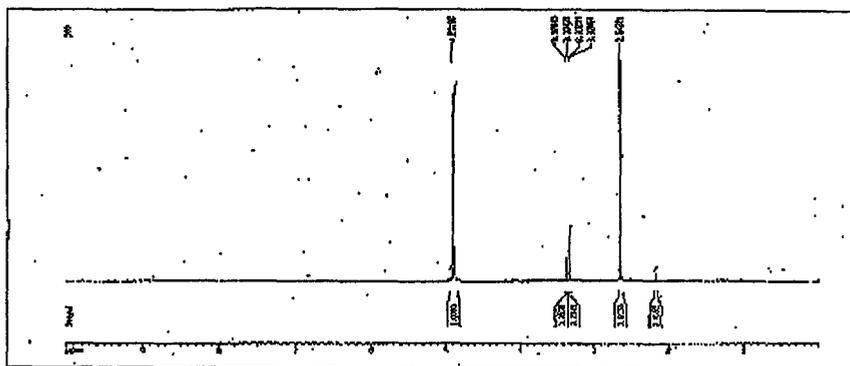
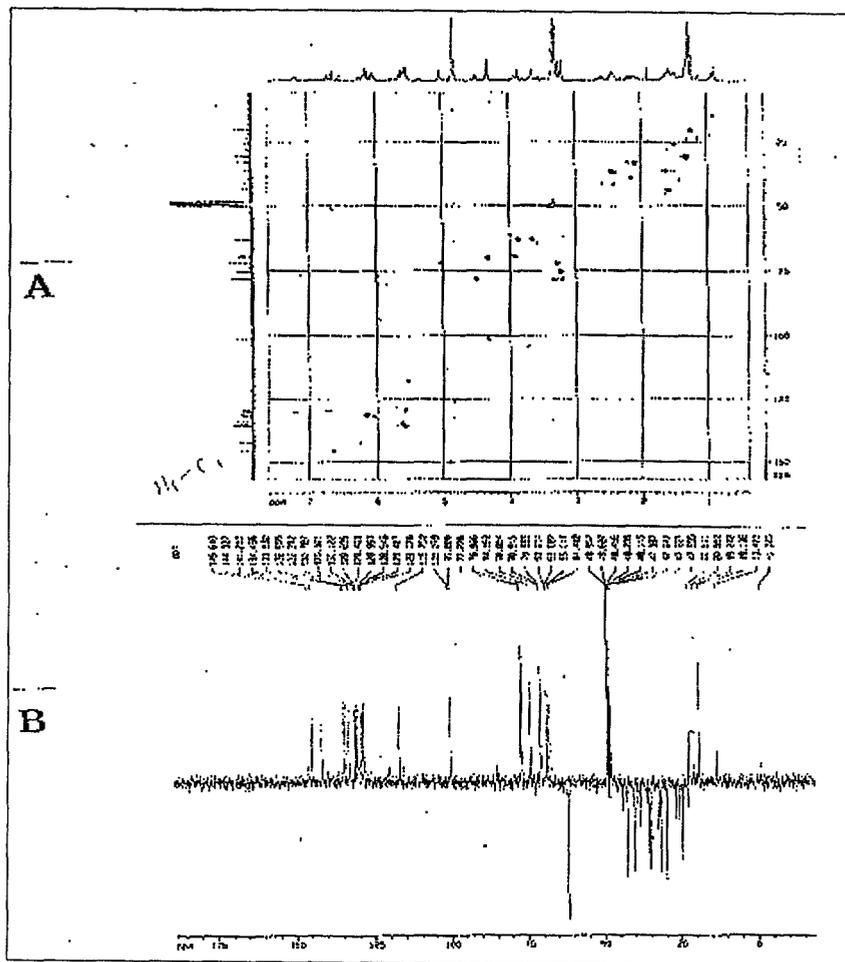


Fig. 13. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectrum of antifungal substance isolated from *Pseudomonas aureginosa* JS2

A: ^1H -NMR

B: ^{13}C -NMR



.Fig. 14. Cosy and Dept NMR spectrum of antifungal substance isolated from *Bacillus macerans* R19

- A: Cosy spectrum
- B: Dept 135 spectrum

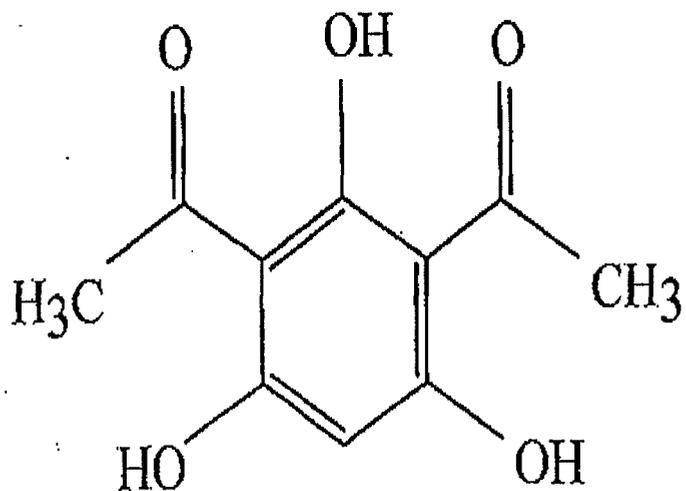


Fig. 15. Structural formula of the 2,4-diacetyl phloroglucinol (Ph1) from *Pseudomonas aureginosa* JS2.

2. 길항세균 *Paenibacillus macerans*의 질소고정력 및 세 포벽분해효소 분비 분석

가. 분리균 *Paenibacillus macerans* R19의 질소고정력 측정

Paenibacillus macerans R19의 질소고정력을 측정하기 위하여 acetylene (C_2H_2) 법에 의하여 측정하였다. 즉, 300ml의 살균 삼각플라스크에 토양 150g, 증류수 70 ml를 첨가한 후 고압살균 후 1년생 도라지 뿌리를 70% ethanol 및 hypochlorite에 침적 소독한 후 살균증류수로 7 회 세척한 후 상기 준비된 삼각플라스크에 심은 후 PDA 액체배지에서 생육시킨 *Paenibacillus macerans* R19 10^9 cells/ml 농도로 생육시킨 배양액 3 ml를 접종하고 C_2H_2 10 ml를 주사기로 고무마개를 통해 주입한 후 10일간 배양한 후 질소고정력을 측정한 결과 Fig. 16과 같다. Fig 16.에서 처럼 *Paenibacillus macerans* R19 균주는 질소고정력을 나타내었는데 아주 흥미있는 결과를 얻었다. 도라지가 10년 이상의 장기간 토양 내에서 특별한 시비, 농약 살포 없이 생육할 수 있는 것은 이 균주와 기주식물의 물질의 상호교환작용이 관련될 것으로도 추정된다. 앞으로 이에 대한 생화학적 접근이 요구된다. 더욱이 이러한 길항미생물과 기주식물의 상호작용의 응용으로 우리나라의 주산물인 인삼에 관한 연구에도 확장할 수 있을 것으로 생각된다.

그리고 아래 사진은 경남 합천군 가회면 야산에서 1997년4월에 채취된 것으로 30년생으로 추정되는 산삼으로 이 산삼에서도 도라지와 유사한 *Bacillus* sp.의 근권부착 미생물을 분리확인하였다 (Fig. 17).

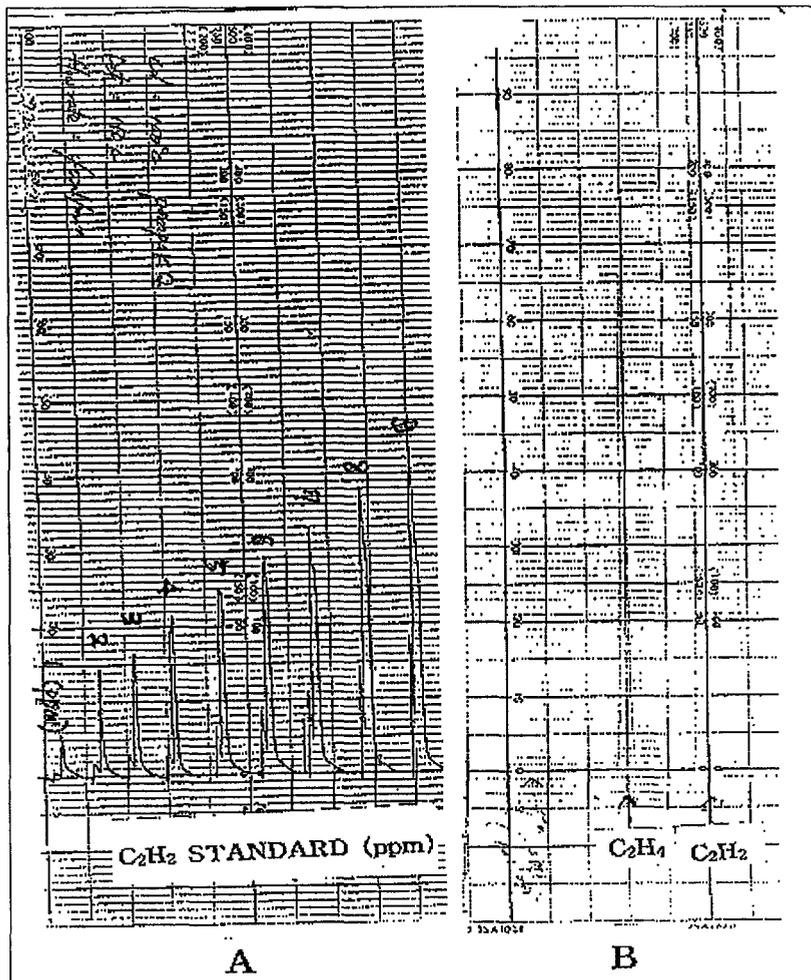


Fig. 17.. Nitrogen-fixation activity of *Paenibacillus macerans* R19 in mixed culture with measured by acetylene-reduction assay.

A: Ethylene standard curve

B: Acetylene reduction activity of *Paenibacillus macerans*

R19

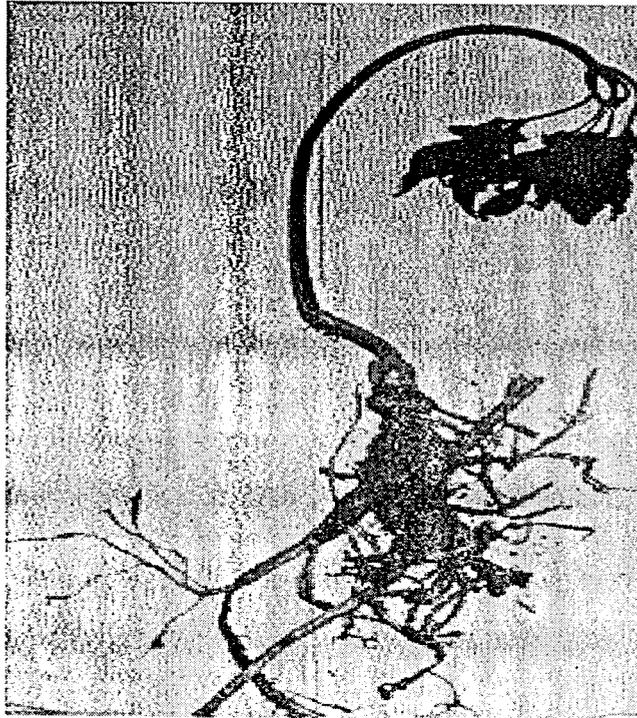


Fig. 17. 30년 추정 산삼

나. 길항균의 질소고정관련 유전자 분리

상기 실험의 생화학적인 결과를 토대로 본 실험에서는 길항균의 질소고정유전자 관련 유전자 분리를 위해 *Paenibacillus macerans* R19를 template로 하여 degenerate primer (forward primer, TCBACMGTRCTKGGBGAC: reverse primer KTCNCCMAGYACRTRWA)를 설계하여 template DNA 농도 및 primer 농도를 달리하여 PCR법에 의하여 280bp의 specific DNA fragment를 분리한 결과는 Fig. 18과 같다. 이 fragment를 forward primer를 이용하여 partial DNA sequencing을 하였다 (Fig. 19).

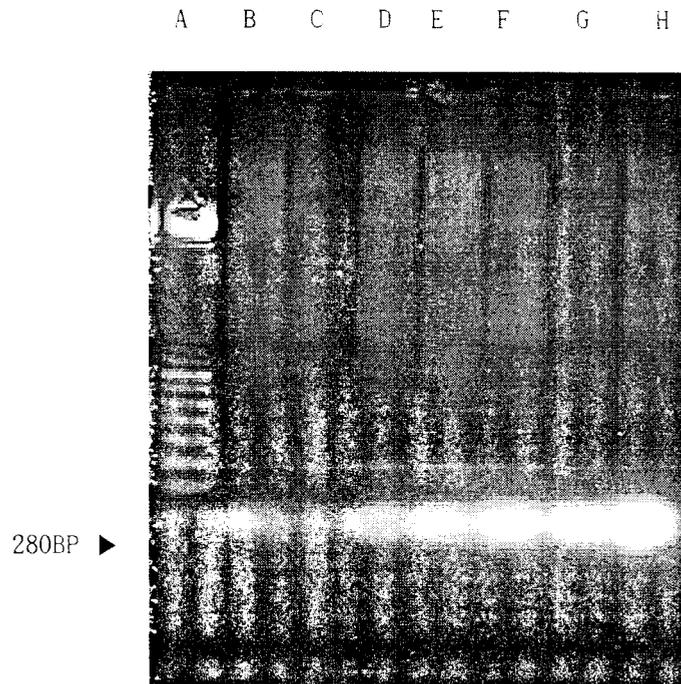


Fig 18. PCR for of nitrogen-fixation-related gene of *Paenibacillus macerans* R19

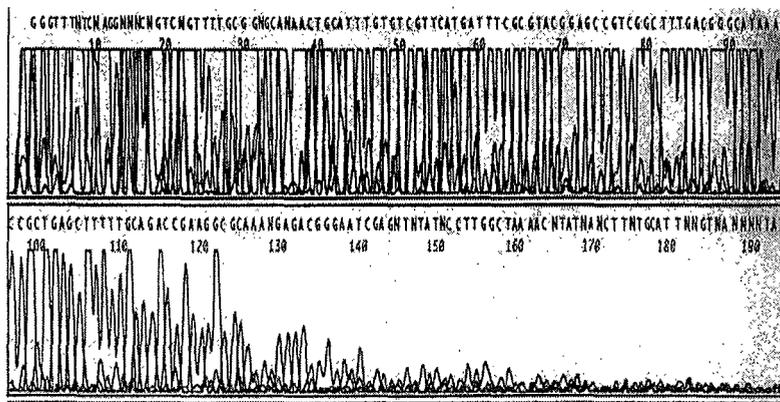


Fig. 19. Partial DNA sequence of nitrogen-fixation-related gene of *Panibacillus macerans* R19

상기 partial DNA sequence를 이용하여 BlastX로 search 하였을 때의 결과는 아래와 같았다.

```
Sequences producing significant alignments:          (bits) Value
gnl|PID:e1184948 (Z99111) similar to aspartate aminotransferase 59 2e-08
gi|2984300 (AE000772) aminotransferase (AspC family) [Aquifex 37 0.15
gi|2650220 (AE001076) aspartate aminotransferase (aspB-4) [Arch 36 0.26
sp|P39643|AAT2_BACSU PROBABLE ASPARTATE AMINOTRANSFERASE (TRANS 31 6.5
sp|Q58786|YD91_METJA PUTATIVE AMINOTRANSFERASE MT1391 >gi|21278 31 8.6
gnl|PID:e1184948 (Z99111) similar to aspartate aminotransferase [Bacillus
subtilis]
```

Score = 59.3 bits (141), Expect = 2e-08 Identities = 27/34 (79%),
Positives = 28/34 (81%) Frame = +1

```
Query: 19  RFCGQNXICVVHDFAYGAVGFDGHKXLSFLXTEG 120
          RF  +N  ICVVHDFAYGAVGFDG K LSFL TEG
Sbjct: 194 RFAAENGICVVHDFAYGAVGFDGCKPLSFLQTEG 227
```

gi|2984300 (AE000772) aminotransferase (AspC family) [Aquifex
aeolicus]

Length = 414 Score = 36.7 bits (83), Expect = 0.15 Identities = 14/34
(41%), Positives = 22/34 (64%) Frame = +1

```
Query: 19  RFCGQNXICVVHDFAYGAVGFDGHKXLSFLXTEG 120
          +F  ++  +  ++HDFAY  + FDG+K S L EG
Sbjct: 204 KFAKEHGLWIIHDFAYADIAFDGYKPPSILEIEG 237
```

gi|2650220 (AE001076) aspartate aminotransferase (aspB-4)
[Archaeoglobus

fulgidus] Length = 386 Score = 36.0 bits (81), Expect = 0.26
Identities = 16/32 (50%), Positives = 19/32 (59%) Frame = +1

Query: 22. FCGQNXCIVVHDFAYGAVGFDGHKXLSFLXTE 117

FC N I + HD AY + FDG+K SFL E

Sbjct: 194 FCIDNKIILAHDAAYSEITFDGYKAPSFLEFE 225

이상의 결과를 토대로 본 균주는 다양한 미생물 group에서 질소 고정과 관련될 것으로 추정되는 aspartate aminotransferase 유전자와 강한 상동성을 나타내었다. 앞으로 이와같은 방법으로 *nif* gene에 관련될 유전자의 확인도 요구된다. 도라지가 10년 이상의 장기간 토양 내에서 특별한 시비, 농약 살포 없이 생육할 수 있는 것은 이 균주와 기주식물의 물질의 상호교환작용이 관련될 것으로도 추정된다.

다. 분리균 *Paenibacillus macerans* R19의 세포벽분해효소 분비특성

분리균의 세포벽분해효소의 생성 유무가 육안으로 관찰될 수 있는 한천확산법(agar diffusion method)으로 pectinase, cellulase, polygalacturonase의 활성을 TY배지 (tryptone 5g, yeast extract 5g, CaCl₂ 1g, agar 15g)에 각 기질을 0.5%되게 첨가하여 측정하였으며, hemicellulase는 TY배지에 0.5% xylan을 기질로, protease는 20% 탈지분유 용액을 최종 농도가 1%가 되게 만들어 사용하여 측정한 결과 Fig. 19과 같으며 *Paenibacillus macerans* R19는 cellulase, protease, amylase, xylanase 등의 세포벽분해효소를 가지고 있었으며 이러한 사실은 분리균 *Paenibacillus macerans* R19는 도라지 뿌리 내부로 침투하여 기주식물과 공생하여 질소고정을 할 수 있는 근거를 마

련하는 것으로 추측된다..

라. *Paenibacillus macerans* R19의 cellulase 특성

질소고정력을 가지는 분리균 *Paenibacillus macerans* R19의 cellulase의 생화학적 특성으로 cellulase의 pH, 효소작용 온도, 효소 반응시간에 따른 활성을 측정한 결과 Fig. 20와 같다. Fig. 21에서 처럼 cellulase의 최적 pH는 6근방 이었으며, 최적효소 반응 온도는 40 ℃ 부근이었으며 효소반응 시간은 시간의 증가에 따라 증가하였으며 5 시간이후에는 효소 반응의 뚜렷한 증가는 볼 수 없었다.

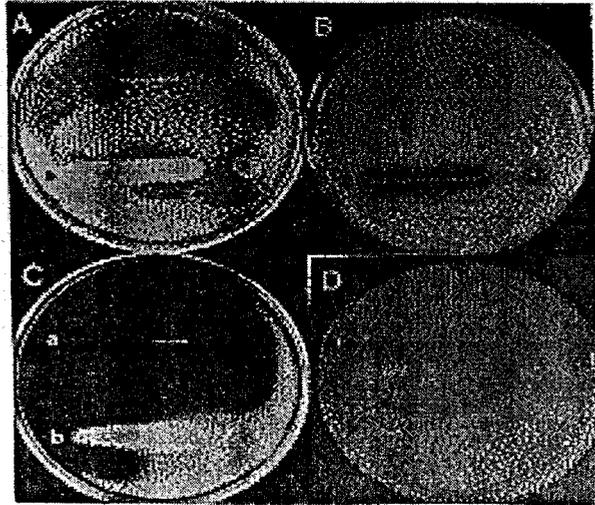


Fig. 20. Cell-wall degrading activity of *Paenibacillus macerans* R19 by plate assay method.

A: Cellulase

B: Protease

C: Amylase

D: Xylanase

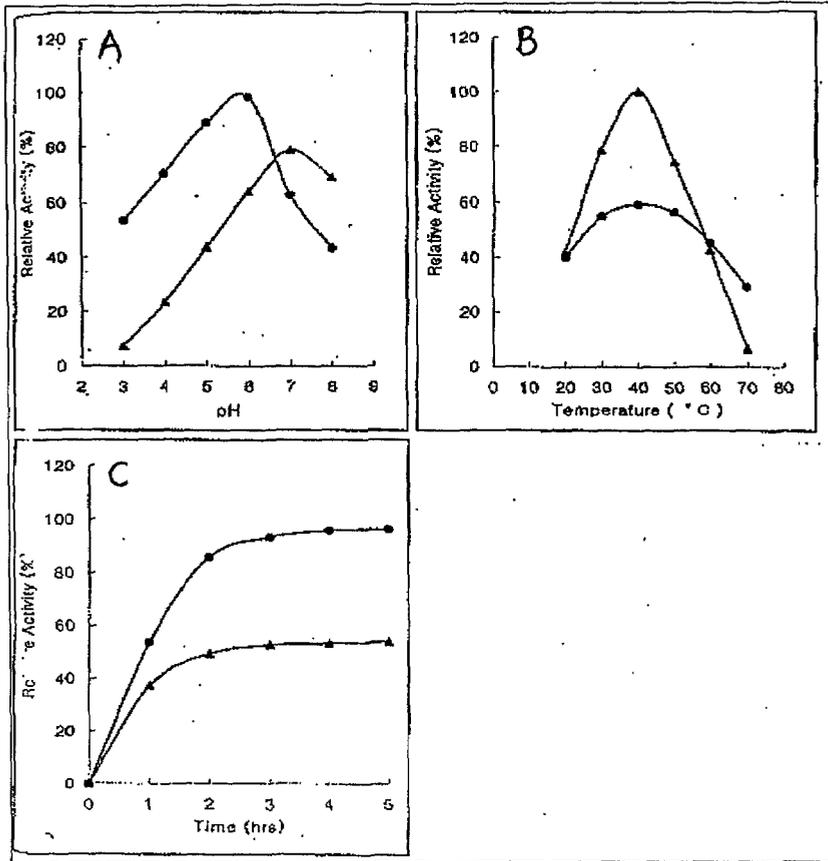


Fig. 21. Effect of pH (A), temperature (B), and time (C) on the cellulase activity of *Paenibacillus macerans* R19 by DNS assay method (●, intracellular cellulase; ▲, extracellular cellulase).

A: pH

B: Temperature

C: Time

3. 2차 감염세균의 연부기작 연구

가. 연부균의 분리

*Rhizoctonia solani*에 의해 1차 감염된 도라지는 병적현상을 일으키며 성장이 정지되며 이러한 상태에서 계속두면 토양 세균에 의해 재감염되어 근의 연부현상이 급속히 진전된다. 연부증상이 있는 시료에서 균주를 분리하여 선별하였다. 미생물학적 특징, 기기분석법인 Microlog 2 kit 및 MIDI system의 분석 결과를 Bergey's manual 등에 의하여 비교한 결과 pectin 분해, catalase, 감자의 부패, gelatin 액화, 혐기적 증식, indole 생성, methyl red test는 양성이었으며 oxidase, starch와 maltose에 의한 산생성 실험은 음성이었다. Gram 염색 결과 음성균으로 전자현미경 관찰 결과 1.5 μ m의 단간균이었다. 이상의 결과로 분리균은 *Erwinia* 속으로 판정되었으며 일부의 *Klebsiella* sp. 세균도 관찰되었다.

나. 세포벽분해효소

한천확산법에 의하여 연부세균에 대한 세포벽분해효소 생성을 실험한 결과는 대부분의 분리 균주는 CMCase, pectate lyase, protease, pectinase의 분해능을 가지고 있었다 (Data not shown). 이상의 결과로 분리균은 식물에 침투하여 식물을 와해시킬 수 있는 다양한 세포벽가수분해소를 분비하여 연부를 촉진시키는 것으로 생각된다.

다. 식물병원성 검정

분리균 *Erwinia* 속에 의한 도라지의 병원성 검정으로 표면살균된 도라지조직에 Fig. 2A는 *Ech* PY35, Fig. 2B는 *E. coli*로 접종하여

30℃에서 24시간 동안 배양한 후 육안으로 관찰한 것으로, *Ech*로 접종한 도라지조직은 심한 연부현상을 나타내었다. 이것으로 *Ech*는 식물병원성을 가지고 있음을 확인하였다.

라. 현미경 관찰

대부분의 식물세포는 기능적, 구조적 구분에 따라 middle lamella, primary wall 및 secondary wall로 구분된다. Primary wall은 arabinogalactan이 pectin 물질을 공유적으로 연결시켜 주고 있으며 구조적으로 식물세포는 matrix를 둘러싸고 있는 microfibril의 망상구조이다. Microfibril은 대부분 섬유소이며 matrix는 pectin 물질이 대부분으로 구성되어 있다. 본 실험에서는 분리균 *Erwinia* sp.를 식물에 접종하여 연부현상을 관찰하였으며 그들에 의해 분비되는 가수분해효소의 작용현상을 확인하였다. Fig. 23D는 400 배의 배율에서 도라지 뿌리의 정상조직이며 Fig. 23E는 *Ech* 접종 5일후 지난 조직으로 정상조직에 비하여 세포가 많이 와해된 것을 볼 수 있었다.

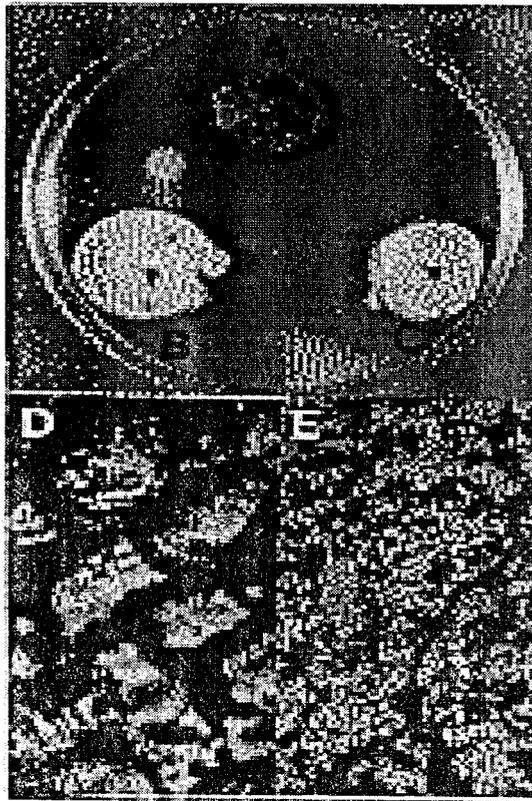


Fig. 22. Root rot of *Platycodon glaucum* caused by the isolated bacteria.

- A. root-rot infested with artificially by the *Erwinia* sp. isolated.
- B. not inoculated control.
- C. control inoculated by *E. coli*.
- D. healthy root tissue
- E. degraded root tissue by the the *Erwinia* sp. isolated.

이상의 현미경적 관찰을 통하여 *Ech*가 식물조직으로 침투 및 이들이 분비하는 세포벽분해효소 작용에 의해 연부가 진행되는 것으로 생각된다. 이들 식물체를 구성하는 조직의 구성분인 섬유소가 다양한 형태의 화학적 결합을 가진 복합된 polymer이기 때문에 이들을 분해하기 위해서는 특이한 형태의 효소작용이 존재할 것이며 따라서 *Ech*는 다양한 섬유소분해효소 isozyme이 생성될 것으로 추정된다.

마. 섬유소분해효소 직접활성염색법에 의한 효소의 분자량 결정

SDS-PAGE법의 변형으로 0.1% CMC를 첨가하여 만든 겔 상에 분리한 섬유소분해효소 단백질을 전기영동한 후 Povin 등이 SDS를 겔 상에서 제거하기 위하여 사용한 Triton-X 100으로 renaturation하여 Congo red 염색을 통하여 겔 상에서 섬유소분해효소 활성밴드를 확인할 수 있다. Fig. 23은 CMC-SDS-PAGE 의한 섬유소분해효소 직접활성염색법의 결과 분리균 *Ech*는 5 종류의 섬유소분해효소 활성밴드를 확인할 수 있었다. 이들 섬유소분해효소의 대략적인 분자량은 표준 단백질을 기준으로 대략의 추정치는 50 kDa, 48kDa, 34kDa, 31kDa, 29kDa 이었다. 체외분비효소는 50kDa, 29kDa 2 종류로 확인되었으며 50kDa는 그 활성이 매우 미약하여 육안으로 겨우 관찰이 가능하였다 (lane A). 체내분비효소로 48kDa, 34kDa, 31kDa의 3 종류로 관찰되었다 (lane B). 그러나 실제 균이 식물체 내로 침투되거나 생육 조건, 작용기질의 대상에 따라 분비되는 섬유소분해효소 isozyme의 종류가 다양할 것이라 생각된다. Fig. 24의 결과에서와 같이 본 연구자들이 전보에서 보고한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34에서도 5 종류의 섬유소분해효소를 분비하였다²¹⁾ (lane C). *Erwinia chrysanthemi*와 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*가

비슷한 종류의 섬유소분해효소 isozyme을 분비하는 것으로 추정되나 그 분자량은 각기 상이한 것으로 나타났다.

CMC-SDS-PAGE 방법의 장점으로 단백질 standard marker를 이용하여 활성밴드를 가진 섬유소분해효소의 대략적인 분자량을 직접 알 수 있었으며 또한 이 방법은 *Erwinia* 속뿐만 아니라 섬유소분해효소 활성을 가진 다른 균주의 섬유소분해효소 유전자의 수를 예측할 수 있으며, 간단한 열처리와 SDS의 처리를 통하여 단백질 전기영동과정에서 효소 dimer 형성 가능성이 적으며, 이들 유전자의 분자량을 직접 확인할 수 있으므로 앞으로 섬유소분해효소 확인실험에 있어서 유용한 방법으로 활용할 수 있을 것으로 생각되어 진다.

본 연구자들은 5 종류의 CMCase isozyme을 분비하는 *Erwinia* sp.에서 섬유소분해효소 유전자 *celA*, *celB*를 분리보고 한 바가 있으며 현재 새로운 CMCcase isozyme 유전자를 확인하고 그 특성을 조사하고 있으며 분리균 *Erwinia chrysanthemi* PY35에서도 이에 대응하는 유전자를 분리하여 작용 특성을 비교하고자 한다. *Erwinia*에서 분비되는 다양한 종류의 CMCcase isozyme의 유전자가 분리 확인되어 각 유전자산물의 기능이 구명되면 연부현상기작 연구를 위한 위한 기초 자료가 될 것으로도 기대된다.

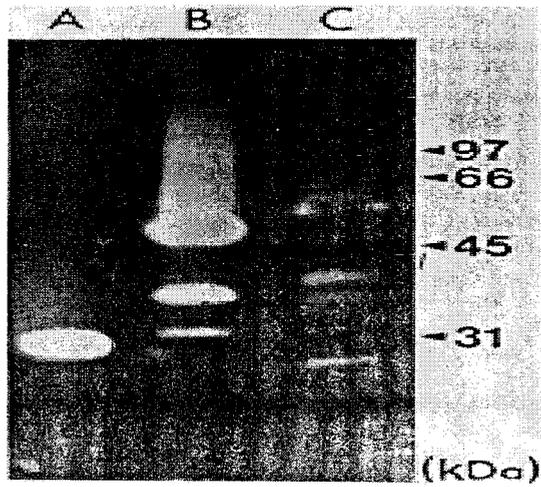


Fig. 23. Detection of CMCase activity by CMC-SDS-PAGE. Lane A is extracellular CMCase of *Erwinia* sp. Lane B is intracellular CMCase of *Erwinia* sp. Lane C is mixture of extracellular CMCase of *Erwinia* sp.

바. 섬유소분해효소 유전자 크로닝 및 효소활성

분리 세균 *Erwinia* sp.로부터 total DNA를 분리하고 *Sau3AI* 제한 효소로 partial digestion시킨 다음 3 - 5 kb 정도의 insert DNA를 분리하여 pBluescript vector를 *BamHI*로 처리한 후 ligation시킨 다음 형질전환시킨 다음 CMCase 활성 배지에 효소활성을 가지는 clone을 분리하였다. 그 결과 총 4000여 clone 중에서 CMCase 활성을 가지는 2개의 clone을 분리하여 제한지도를 작성한 결과는 Fig. 24과 Fig. 25과 같다. 그리고 이들을 각각 *ce1A* 및 *ce1B*로 명명하였다. 이들의 유전자 구조 특성을 조사한 결과는 Fig. 26과 Fig. 27과 같다. 그리고 이들 유전자 산물인 섬유소분해효소의 효소학적 특성을 조사한 결과는 Fig. 28와 Fig. 29과 같다. *Ce1B*의 pH에 대한 CMCase 영향을 50℃에서 pH2 - 10 구간에서 조사한 결과 최적 pH는 6.8이었으며 pH5에서 7사이에서 70% 정도의 활성을 가지고 있었으며 최적활성온도는 50℃ 부근이었다.

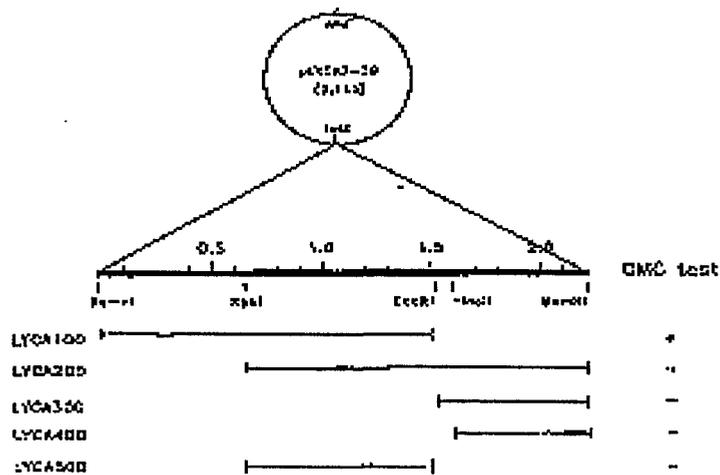


Figure 24. Physical map of the *Erwinia* sp. carboxymethylcellulase (CMCase) gene. The cleavage sites of restriction enzymes *KpnI*, *EcoRI*, and *HincII* are shown. pLYCA7-39 was constructed by cloning a 2.2 kb *Sau3AI* fragment of *Ecc* LY34 into *BamHI* site of pBluescriptII SK' vector. pLYCA100 (*ceIA*) was derived by cloning the 1.5 kb *BamHI*-*EcoRI* fragment of pLYCA7-39 into the corresponding sites of pBluescript II SK' vector. *EcoRI* site is the amino-terminal end.

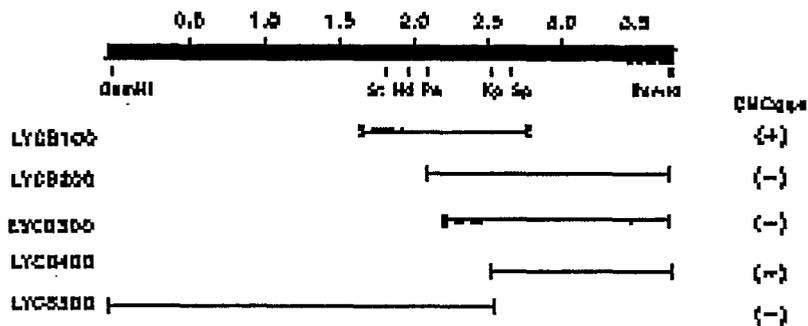


Figure 25. Physical map of the *Erwinia* sp. carboxymethylcellulase (CMCase) gene. The cleavage sites of restriction enzymes HindIII, PstI, and KpnI are shown. pLYCB12-82 was constructed by cloning a 3.7 kb Sau3AI fragment of *Erwinia* DNA into the BamHI site of pBluescriptII SK+ vector. pLYCB100 (celB) was derived by subcloning of the 1.2 kb fragment into the corresponding sites of pBluescript II SK+. Abbreviations for restriction enzymes and ORF sites are as follows. Hd, HindIII; Ps, PstI; Kp, KpnI; St, start codon; Sp, stop codon.

```

1  CAGCCGACGCT GCTGCTTTT TTGCGCTGAA AATGACCTC GGCAGATACT TAAGCTGCTT ACTATTCTCC TGTAAATAAT TAATAAATC AACCTGATG GGAATGTTCC TAAATTTTII
121  GCGGGAACAA AATCTCCCT TATCTCCCT ATACCCDAGA TGACATGGGT GTCCACAAAT GAGATAGG AATATGTGGA TDAGAAGGAT TCAAAATGTC AGGAATTGA CATTAGGGGT
-35 -10 SD M W W R R I Q I V R K L T L G V
241  GGTAAACAGG GTGCTGGGA TGTGCTCAG TTTTCTGCA TTATCCGCA CAGCGGTGA AACGCATGC CACTGTGCA TTAAATAGG GCGGCTGGT GAGGACAGG GGAAGGGT
V T T V L G M S L S F S A L S A T P V E T H G Q L S I E N G R L V D E Q G K R V
361  GCACTGAGA GCGGTAGTT GGCAGGTTT GCAGTGTTT GGTGACTAG TCAAAAGA TTAGATGAA TGGCTCCCG ATGACTGGG GATTAAGTA TCCGTTGTT CCATGTACAC
Q L R G V S S H G L Q W F G D V V K K D S N K W L P D D W G I N V S R V A M Y T
481  GCGAGCGAT GACTATATT CCAACCTTC CTTTGGAAT AAGTCAAAG AAGCGTTGC GCGGCAAA ABGCTGGGG TCTACATCAT CATGACTGG CACATTTTGT CGATACGAA
A A D G Y I S K P S L A N K V K E A V A A A Q S L G V Y I I I D W H I L S D N E
601  ACCTAATATT TATAAGAAC AGCCAAAC CTCTTTTCC GAATGGCGG GCGTATAGG TAATTCGCG ACCGTAATT ATBAATGCG CAATGAAGT AACGCGCGG TGACATGGA
P N I Y K E Q A K T F F A E W A G L Y G N S P T V I Y E I A N E P N G G V T W D
721  CCGGAAATT CCGCTTATG CCGTGGAGT GACTGAACT ATCGGTAGT AAGATCTGA TAATCTCATT ATCGTTGGCA CCGGTACCTG GACTAAGAT ATCCATGAG CCGCGGATA
G E I W P Y A L E V T E T I R S K D P D N L I I V G T G T W S Q D I N D A A D N
841  TACGCTGDC GATCCGATA CCGTGTAGC GCTGATTTC TATCGGTA GCGACGGCA GTTCTCGCG ATCCGATG ATTATGACA AAGCGCGGT GCGCGATTT TTGTACGGA
Q L P D P N T L Y A L H F Y A G T H G Q F L R I R I D Y A Q S R G A A I F V S E
961  GTGGGCACA AGCATGCGT CCGGCAAGG GCGACGTTT CTGCTGAAT GCGACACCTG GATCGATTTC CTGAACAAC GTCGTGTAG CAGGTTAAC TGTGCTGTA CCGATAAATC
W G T S D A S G N G G P F L P E S H T W I D F L N N R G G S R V N W S L T D K S
1081  AGAGCGTCT GCGCGCTGG CAGCGGAGC GAGCAATGT GCGGTTTGA CAGACAGAA TTGTCCGGG TCAGGAAAT TTGTGAGC ACAGATTGC GCGGCTGGA CATTAGGGG
E A S A A L A P O A S K C G G W T E Q N L S A S G K F V R A Q I R A A A T L S G
1201  TGGCTAGC CCAACGAGC CAGCGAAC GACCAACCA GGTAGCGAA CCAAGGTGA GCTGCTGCTG CAATATGTA ATGTGATTA CAACCTTCC GATGTTGGA TTGCGATG
G D T P T T P T E P T N P G S G T T G E L V L Q Y R N V D Y N P S D G A I R N A
1321  CPTCAACT AAAATAGCC GAATGAGCC GTTTAAACT TAGCGATCTG CAATGAGTT ACTACTTCA TTAGTATGG AACCTGGCG GAACTCTTT TGTGACTGG GAAAGTGG
V N I K N T G S T P V -

```

Figure 26. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *celA* gene of *Erwinia* sp. with its flanking regions (GenBank accession number AF025768). The putative Shine-Dalgarno (SD) region, the Pribnow box (-10) and the -35 region (-35) are indicated. Initiation and termination codons are shaded. Catalytic domain, interdomain, and cellulose binding domain are lined. The cleavage site of signal sequence is shown by an arrow. The consensus sequence (VIYEIANEPN) for cellulase family A is bold-faced.

```

TAAATAACACCCCTGATTTTATTCACATTATTCATATTTATTAAGACTTTAATCATTTCCCATGAATTGGATTATTCGACAGAGTGGAAATAACATAACCCAGTTAAACTAACCCACA 120

TCTCAGACTTGATCATAGTCACGTGATAACGATGTGTTAACTTTCAGATTAACACCCCTCAAGCATATATTTAAAGGAGATTATTTATGCTTACAGTGAATAAGAAGCCACAGCGTATT 240
                                     SD      M L T V N K K P Q R I 11

TTCGGTACATTATCCCGCGTGTATTTCTGCCTTGTACTCTCAACCCCTAACAGTTTCTGGCGTCAGCTCATCCAAAGACGACAGCAAACCTCTATTTTGTGAATAATAAATATTACGTA 360
F R T L F P A V F S A L L L S P L T V S A V S S S K D A D K L Y F V N N K Y Y V 51
                                     ↑

TTCATAACCGTCTGGGGAAAGGATGAAGTAAAAGGATGGCAGCAAACGGTTTTCTATAATAGCCCTACCAGCATGGGGTGGAACTGGCACTGGCCAAGCAGCAGCTCCAGCGTTAAAGCT 480
F N N V W G K D E V K W Q Q T V F Y N S P T S M G W N W H W P S S S S S V K A 91

TATCGATCACCGTCGACCTCTTGGCACTGGCTCAGGTTTATAAGGAAAATAGTGGTTGCCGATAAAAATTATCCAGTAATAAAAGTATTACCAGTAATGTCACTTATTTCTCAATCT 600
Y R S P S T S W H W L Q V Y T E N S G L P I K L S S N K S I T S N V T Y S I K S 131

AAGGCCACCTTATACGCCGCTTATGATGTATGGTTCCACACTACCGATAAAGCCAGTTGGGATTGACGCCGACCGAATTAATGATCTGGCTAAATAATACCAATGCAGGTCACAGCG 720
T A T L Y A A Y D V W F H T T D K A S W D S T P T D E L N J W L N N T N A G P A 171

GGTGATTATTTGAAACCGTTTTCTCGGGCAGCAGGTTGGAACGTATTCAAAGGTTGGATAAATGCTGGTAATGGTGAAGTTGGAATGTCTTTCTTCTTGTTCACCTCCAATACC 840
G D Y I E T V F L G D S S W N V F K G W I N A G N G E G W N V F S F V R T S N T 211

AACAGTGCATCGCTCAATATTOGTATTTCACCAACGATGTTGGGCAGAGAAGAATGGATCAGTAAATGCAAAATATATCAGCAGCGTTGAGTTGGTACCGAGATCTTTGGCGGGAT 960
N S A S L N I R H F T N D V G Q R K K W M S N A K Y I S S V E L G T E I F G G D 251

GGGCAGATCCACATCACCGAATGGCGGTAGACGTAATAACCGCGCTGCTCGCTATTCTCCCGGTTACGCCGCAATAAACACCGTTAACGTAGACGCTGAAACGGATTGGTCTCATC 1080
G Q I D I T E W R V D V K - 264

GACGTTCTCTTTTCATTTTCAGTTCAGACAGACGTTGCCCGTCTTTAGCGGGTTGCGTTCCCGCCACAACA44ATTCGTGAGCTGTGGCAGGTAATTTTCATTAGCGTTATGATAATC 1200

CCCTCGGCTAATCAGGAATGTCCC 1224

```

Figure 27. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *celB* gene of *Erwinia* sp (GenBank accession number AF025769), with its flanking regions. The putative Shine-Dalgarno (SD) box is indicated. Initiation and termination codons are shaded. The cleavage site for the signal sequence is marked by an arrow (↑).

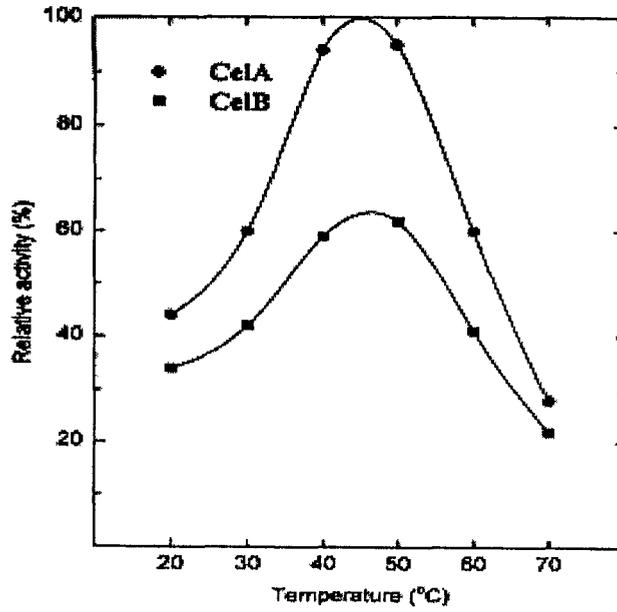


Figure 28. Effect of pH on CMCase activity of CelA and CelB. Enzyme activity was assayed at 50 °C for 30 min in citric-sodium phosphate buffers with the indicated pH values.

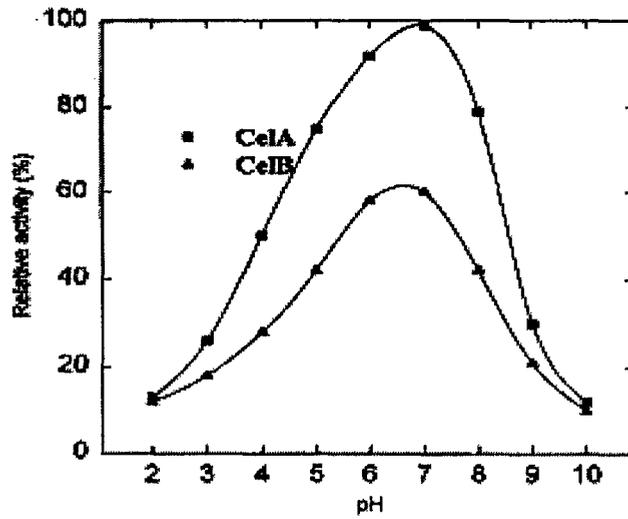


Figure 29. Effect of temperature on CMCase activity of CelA and CelB. Enzyme activity was assayed at pH 7 for 30 min at the indicated temperatures.

라. 세포벽분해효소 Pectate lyase 유전자 크로닝 및 효소활성

분리 세균 *Erwinia* sp.로부터 total DNA를 분리하고 *Sau3AI* 제한효소로 partial digestion시킨 다음 3 - 5 kb 정도의 insert DNA를 분리하여 pBluescript vector를 *Bam*HI로 처리한 후 ligation시킨 다음 형질전환시킨 다음 pectate lyase 활성 배지에 효소활성을 가지는 clone을 분리하였다. 그 결과 총 2000여 clone 중에서 pectate lyase 활성을 가지는 하나의 clone을 분리하여 제한지도를 작성한 결과는 Fig. 30과 같다. 그리고 이것을 각각 *pe*LI으로 명명하였다. 이들의 유전자 구조 특성을 조사한 결과는 Fig. 31와 같다. 그리고 이들 유전자 산물의 pectate lyase의 효소학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

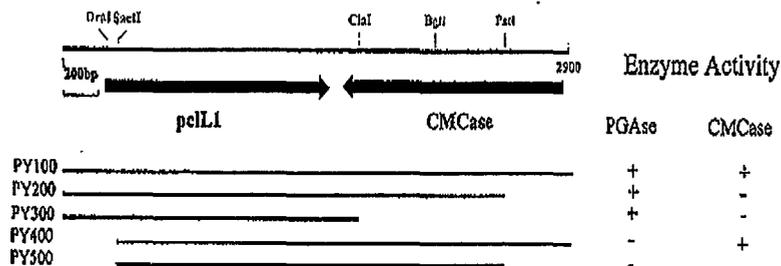


Fig. 30. Physical map of the *Erwinia peIL1* gene and the in tandem CMCase gene. The cleavage sites of the restriction enzymes *DraI*, *PstI*, *SacII*, *ClaI*, and *BglIII* are shown. pPY100 was constructed by cloning a 2.9 kb *Sau3AI* fragment of *Erwinia* genomic DNA into the *BamHI* site of the pBluescript II SK+ vector. pPY300 (*peIL1*) was derived by subcloning a 1.6 kb fragment into pBluescript II SK+.

1 TATATCTCAGCCACCTCAATATGCAGGATGCAATGTACTCGAACAGTCTCTGTTCAGG
61 GAAAACCGAAGGAATGGTCCCCTTCCAAAGTAATTTCTCACAGTGACAGACTGATTCATT
121 GGGCTATCGACTTTAGAGGTTGCGGATCGTAGCCTTTTCCCGCCTGACGACATTTGCCG
181 AAATATGCATCTTGAGGACAATGGATAAATGATTTTTACAACATCATGAGGCGAAGGATG
1 SD M
241 AAATATTTAAATTGCTTTATCAGTACCGGGTTGGCAACATTTTTCTGGTAAATAGCACA
6 K Y L N C F I S T G L A T F F L V N S T
301 TCAGTTCTGGCCGCGGATTGCAGTTCGGATCTCACTAGCGGAATTATCACCAAGCGTATT
26 S V L AspA D C S S D L T S G I I T K R I
361 TATTATGTTGCGCGAATGGCACCAGCAGCAATAACGGCAGCAGCTTAAATGCTCCGATG
46 Y Y V A P N G T S S N N G S S F N A P M
421 AGTTTTTCCGCTGCTATGGCGGCTGTTAACCCCGGTGAGTTGATTCTGTGAAACCGGGA
66 S F S A A M A A V N P G E L I L L K P G
481 ACCTATACCATTCCCTATACTCAGGGTAAAGGGAATACGATCACATTCAATAAATCCGGG
86 T Y T I P Y T Q G K G N T I T F N K S G
541 AAAGAGGGTGCTCCGATTTATGTGGCTGCCGCCAATTGCGGCCGGCGGTATTTGACTTC
106 K E G A P I Y V A A A N C G R A V F D F
601 TCATTCCTGATAGCCAATGGGTACAGGCGTCTTACGGGTTTTATGTGACCGCGGACTAC
126 S F P D S Q W V Q A S Y G F Y V T G D Y
661 TGGTATTTCAAAGCGTTGAAGTAACCCAAGCCGTTATCAGGGGGCTTATGTGATTGGT
146 W Y F K S V E V T Q A G Y Q G A Y V I G
721 AGCCATAATACCTTTGAAAATACGGCGTTCCATCATAACCGTAATACCGGCCTTGAAATC
166 S H N T F E N T A F H H N R N T G L E I
781 AACAATGGCGGTTACATAACACCGTAATTAATTCAGACGCCTACCGCAATTATGATCCT
186 N N G G S Y N T V I N S D A Y R N Y D P
841 AAAAAGAACGGCAGCATGGCCGATGGCTTTGGACAAAACAAAAGCAGGGACCGGTAAC
206 K K N G S M A D G F G P K Q K Q G P G N
901 CGATTCATCAGTTGCCCGCCTGGGAAAACCTCGGATGACGGATTTGACTTATTCGACAGT
226 R F I S C R A W E N S D D G F D L F D S
961 CCGCAAAAAGTGGTGATTGAAAACAGTTGGGCTTCCGTAACGGTATTAATTACTGGAAT
246 P Q K V V I E N S W A F R N G I N Y W N

1021 GACAGCGCGTTCCGCCGCAATGGCAACGGGTTCAAAC TGGGAGGAAACCAGGCGGTCGGC
266 D S A F A G N G N G F K L G G N Q A V G
1081 AATCATCGTATTACCCGCTCCGTCGCGTTTGGCAATGTGAGTAAAGGTTTGGACCAGAAC
286 N H R I T R S V A F G N V S K G F D Q N
1141 AATAACGCCGGCGGCGTACGGTAATAAATAACACGTCATATAAAAACGGCATTAAITAT
306 N N A G G V T V I N N T S Y K N G I N Y
1201 GGTTCGGAAGCAACGTCAGTCAGGGCAGAAACATTATTTCCGCAACAACGATTATTCTG
326 G F G S N V Q S G Q K H Y F R N N V F L
1261 TCTGCTTCTGTAACGGTCAATAATGCGGATGCGAAAATCCAATTCATGGGATACGGGACCG
346 S A S V T V N N A D A K S N S W D T G P
1321 GCGGCTTCGCATCCGATTTTCGTCAGCCTGGATACCTCGCTGGCTACCACATCTCGTGAT
366 A A S A S D F V S L D T S L A T T S R D
1381 AATGACGGCACGTTGCCGAAACCTCGCTGTTCCGCCTGTCGGCTAGCTCAA AATTGATT
386 N D G T L P E T S L F R L S A S S K L I
1441 AACGCGGGTACGAAAGAGAGCAATATCAGTTATTCAGGCAGCGCACCGGATTGGGGGCT
406 N A G T K E S N I S Y S G S A P D L G A
1501 TTTGAACGCAATTAAGTGATGGGATATTGCATATCAGGCTGCAATCGCAGCCCTGTTTTT
426 F E R N
1561 TGGGGTGTGAAAAGATTAATCAAT

Fig.31 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *pefL1* gene of *Erwinia sp.* with its flanking regions (GenBank accession number AF1712228). The putative Shine-Dalgarno (SD) box is indicated. 10 region and 35 region was underlined.

Table 1. Pectate lyase activity of clone harboring *peII1* gene of *Erwinia* sp.

Substrate	Enzyme Activity (μ moles/min/ml)
Polygalacturonate	0.9
Polygalacturonate + 1.5 mM CaCl ₂	2.3
Polygalacturonate + 10 mM EDTA	0.0
Pectin (30% methoxylated) + 1.5 mM CaCl ₂	2.8
Pectin (70% methoxylated) + 1.5 mM CaCl ₂	0.9
Pectin (90% methoxylated) + 1.5 mM CaCl ₂	0.1

*The enzyme reaction mixture were incubated at 40°C. Activity is defined as micromoles of unsaturated product release per minute per milliliter of enzyme sample.

제4절 요약

분리 길항균의 유용길항성분의 화학적 정밀 성분분석실험으로 분리길항균 *Bacillus macerans* R19 배양여액을 용매분획한 후, 각각의 분획을 관찰하였다. 추출을 용이하기 위하여 chloroform : isopropanol (1:1)로 추출한 결과 butanol에서와 같이 *Rhizoctonia solani*에 대해 저해작용을 나타내었다. *Bacillus macerans* R19의 배양여액 70 liter를 원심분리시켜 미생물의 잔사를 제거시킨 다음 chloroform:isopropanol (3:1) 용매를 1:1로 가하여 추출하고 Dowex 50WX4-200의 용출 fraction을 methanol에 녹이고 다시 추출액을 brine으로 씻은 다음 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 건조시킨 분획물을 감압하에서 농축 후, Silica gel column chromatography(chloroform + methanol gradient system)를 반복적으로 하여 분획하였으며 이들을 TLC (chloroform:methanol:10% NH_4OH =5:4:1)하여 미지화합물 25mg을 분리하여 정밀성분분석을 계속하였다. 분리길항균 *Pseudomonas aeruginosa* JS2의 배양여액을 n-hexane, chloroform, ethylacetate와 n-butanol을 써서 차례로 용매분획한 후, 각각의 분획을 TLC하여 254nm, 366nm에서 band를 관찰하였다. 또 각각의 분획이 도라지 근부병 원인균인 *Rhizoctonia solani*에 대해 저해작용을 하였다. *Pseudomonas aeruginosa* JS2의 배양액 40 liter로부터 open column을 사용하여 crude antifungal substance 약 80 mg을 분리하였다. 거의 순수 정제된 (Ha fraction) 약 35 mg을 HPLC에서 single peak로 확인하였다. 순수 정제된 길항물질의 결정은 흰색에 가까웠다. 최종 물질의 Rf value는 acetonitrile:chloroform = 2:3 용매 system에서 7.5 이었다.

길항물질의 HPLC chromatograph를 위해 정제된 길항물질 R19와 JS2의 HPLC

chromatogram을 한 결과 JS2는 column chromatography 및 TLC에 의해 분리 정제된 길항물질은 순수한 것으로 확인되었으나 R19는 분리에 약간의 문제점이 확인되었다.

길항물질의 UV spectrum 관찰한 결과 JS2는 330nm, 268nm, 200nm에서 흡수 스펙트럼을 보여주고 있는 데 이 물질은 benzene 구조에서 어떤 group이 수소와 치환된 것으로 추측된다.

길항물질의 FR-IR spectrum에서 JS2는 peak 3385.8 cm^{-1} 는 hydroxyl group을, peak 1737.4 cm^{-1} 는 carbonyl group을 암시하며 두 종류의 peak 2924.2 cm^{-1} 와 peak 2852.5 cm^{-1} 는 aliphatic C-H bond를 암시하고 있다. 길항물질 R19는 ν 619, IR(KBr): 3418, 2921, 1671, 1631 cm^{-1} 를 나타내었다.

길항물질의 Mass spectrum 결과 JS2의 FABMS spectrum은 211m/z, 241m/z, 374m/z의 molecular ion이 가능한 3종류 peak가 나타났으며 library database 검색 결과 2, 4-diacetylphloroglucinol과 유사한 것으로 판명되었다.

길항물질의 NMR spectrum 결과 JS2의 ^1H -NMR spectrum 결과로 peak δ 2.64은 carbonyl carbon과 결합된 methyl group으로 추측된다. 3가지의 peak δ 3.370, peak δ 3.334, peak δ 3.326은 ether와 alcohol group인 것으로 추측된다. ^{13}C -NMR spectrum에서 peak δ 205.57, 173.00, 170.57, 105.36, 96.120, 33.38의 6 peak로 나타났는데 peak δ 205.57는 carbonyl carbon으로 추측되며 4 peak δ 173.00, 170.57, 105.36, 96.120는 benzene carbon으로, peak δ 33.38는 methyl group과 결합한 carbon으로 추측되었다. 이상의 결과를 종합하면 길항물질 JS2는 2, 4-diacetylphloroglucinol (Ph1) 혹은 그 유도체 일 것으로 추측된다. 길항물질 R19의 NMR spectrum은 ^1H -NMR(500MHz, CD_3OD) δ 0.89(m, 1H), 1.23(d, 3H), 1.28~1.32(m, 3H), 1.48~1.75(m, 4H), 2.12(m, 1H), 2.18(m, 1H), 2.39(m, 3H), 2.67(m, 1H), 3.13~3.29(m, 4H), 3.48(m, 1H), 3.60~3.71(m, 2H), 3.85(m, 1H), 3.92(m, 1H), 4.35(m, 2H), 4.51(m, 1H), 5.05(m, 1H), 5.52(m, 1H), 5.60(m,

1H), 5.67(m, 1H), 6.05(m, 1H), 6.15(m, 2H), 6.23(m, 1H), 6.63(m, 1H), 6.67(m, 1H), 7.21(m, 1H)

¹³C-NMR(125MHz) δ 1.41, 21.6, 26.8, 27.5, 32.2, 34.3, 37.4, 38.2, 42.8, 45.1, 64.3, 70.5, 71.2, 73.28, 73.32, 76.6, 79.41, 79.45, 79.7, 102.5, 119.2, 130.5, 130.9, 131.3, 132.4, 132.8, 133.3, 135.4, 136.3, 136.9, 143.7, 146.8, 162.9, 169.4. DEPT 90 과 135스펙트럼에서 4차탄소 3개, 3차탄소 19개, 2차탄소 9개, 1차탄소 2개가 각각 존재함을 알 수 있었고 이것은 ¹H-NMR에서 총양성자수와 잘 일치하였다. ¹H-¹H COSY 스펙트럼분석결과 4ppm보다 낮은 화학적 이동 값에서는 아래와 같은 화합물의 기본골격에 대한 정보를 얻을 수 있었다. 7.21ppm의 양성자는 6.63ppm의 양성자와 그리고, 5.52ppm의 양성자와의 Cross peak이 관찰되었다. 5.52 ppm의 양성자는 6.67ppm의 양성자, 6.15ppm의 양성자와 연속적으로 각각의 cross peak이 관찰되었고 6.15ppm의 양성자는 6.63ppm의 양성자와 cross peak이 관찰되었다. 또한 6.15ppm의 양성자는 6.23ppm의 양성자와 그리고 6.23ppm의 양성자는 6.67ppm의 양성자와 상관관계가 관찰되었다. 4ppm보다 낮은 화학적 이동값, 특히 1~2.5ppm사이에서는 서로 겹쳐있는 양성자들과 불순물로 인해 구조동정에 대한 특별한 정보를 얻을 수 없었다. 이상의 결과를 종합하면 미지의 화합물 R19는 (5+4)고리의 기본골격을 갖고 있는 화합물로 추정할 수 있고 추후 계속해서 이 화합물의 구조에 관한 연구를 기대한다.

Paenibacillus macerans R19의 질소고정력을 측정하기 위하여 acetylene (C₂H₂) 법에 의하여 측정하였다. 즉, 300ml의 살균 삼각플라스크에 토양 150g, 증류수 70 ml를 첨가한 후 고압살균 후 1년생 도라지 뿌리를 70% ethanol 및 hypochlorite에 침적 소독한 후 살균증류수로 7회 세척한 후 상기 준비된 삼각플라스크에 심은 후 PDA 액체배지에서 생육시

킨 *Paenibacillus macerans* R19 10^9 cells/ml 농도로 생육시킨 배양액 3 ml를 접종하고 C_2H_2 10 ml를 주사기로 고무마개를 통해 주입한 후 10일간 배양한 후 질소고정력을 측정한 결과 *Paenibacillus macerans* R19 균주는 질소고정력을 나타내었는데 아주 흥미있는 결과를 얻었다. 도라지가 10년 이상의 장기간 토양 내에서 특별한 시비, 농약 살포 없이 생육할 수 있는 것은 이 균주와 기주식물의 물질의 상호교환작용이 관련될 것으로도 추정된다. 앞으로 이에 대한 생화학적 접근이 요구된다. 상기 실험의 생화학적인 결과를 토대로 본 실험에서는 길항균의 질소고정유전자 관련 유전자 분리를 위해 *Paenibacillus macerans* R19를 template로 하여 degenerate primer를 설계하여 template DNA 농도 및 primer 농도를 달리하여 PCR법에 의하여 280bp의 specific DNA fragment를 분리하였다. 이 fragment를 forward primer를 이용하여 partial DNA sequencing을 하였다. Partial DNA sequence를 이용하여 BlastX로 search 하였을 때의 결과 질소고정과 관련된 것으로 추정되는 aspartate aminotransferase 유전자와 강한 상동성을 나타내었다. 앞으로 이와같은 방법으로 nif gene에 관련될 유전자의 확인도 요구된다.

분리균 *Paenibacillus macerans* R19가 도라지 근권침투과정에서 세포벽분해효소 분비 가능성을 조사하기 위해 분리균의 세포벽분해효소의 생성 유무가 육안으로 관찰될 수 있는 한천확산법으로 pectinase, cellulase, polygalacturonase의 활성을 측정한 결과 Fig. 19과 같으며 *Paenibacillus macerans* R19는 cellulase, protease, amylase, xylanase 등의 세포벽분해효소를 가지고 있었으며 이러한 사실은 분리균 *Paenibacillus macerans* R19는 도라지 뿌리 내부로 침투하여 기주식물과 공생하여 질소고정을 할 수 있는 근거를 마련하는 것으로 추측된다. 분리균 *Paenibacillus macerans* R19의 cellulase의 생화학적 특성으로 cellulase의 pH, 효소작용 온도, 효소반응시간에 따른 활성을 측정한 결

과 cellulase의 최적 pH는 6근방 이었으며, 최적효소 반응 온도는 40 °C 부근이었으며 효소반응 시간은 시간의 증가에 따라 증가하였으며 5시간 이후에는 효소 반응의 뚜렷한 증가는 볼 수 없었다.

2차 감염세균의 연부기작 연구를 위해 *Rhizoctonia solani*에 의해 1차 감염된 도라지는 병적현상을 일으키며 성장이 정지되며 이러한 상태에서 계속두면 토양 세균에 의해 재감염되어 근의 연부현상이 급속히 진전된다. 연부증상이 있는 시료에서 균주를 분리하여 선별하였다. 미생물학적 특징, 기기분석법인 Microlog 2 kit 및 MIDI system의 분석 결과는 *Erwinia* 속으로 판정되었으며 일부의 *Klebsiella* sp. 세균도 관찰되었다. 한천확산법에 의하여 2차 감염 연부세균에 대한 세포벽분해효소 생성을 실험한 결과는 대부분의 분리 균주는 CMCase, pectate lyase, protease, pectinase의 분해능을 가지고 있었다 (Data not shown). 이상의 결과로 분리균은 식물에 침투하여 식물을 와해시킬 수 있는 다양한 세포벽가수분해소를 분비하여 연부를 촉진시키는 것으로 생각된다.

분리균 *Erwinia* 속에 의한 도라지의 병원성 검정으로 표면살균된 도라지조직에 *Erwinia*는 도라지 조직을 연화시켰다. *Ech*가 식물조직으로 침투 및 이들이 분비하는 세포벽분해효소 작용에 의해 연부가 진행되는 것으로 생각된다. 이들 식물체를 구성하는 조직의 구성분인 섬유소가 다양한 형태의 화학적 결합을 가진 복합된 polymer이기 때문에 이들을 분해하기 위해서는 특이한 형태의 효소작용이 존재할 것이며 따라서 *Ech*는 다양한 섬유소분해효소 isozyme이 생성될 것으로 추정되어 섬유소분해효소 직접활성염색법의 결과 분리균 *Ech*는 5 종류의 섬유소분해효소 활성밴드를 확인할 수 있었다. 5 종류의 CMCase isozyme을 분비하였다.

*Erwinia*의 섬유소분해효소 유전자 크로닝 및 효소활성 조사를

위해 분리 세균 *Erwinia* sp.로부터 total DNA를 분리하고 *Sau3AI* 제한효소로 partial digestion시킨 다음 3 - 5 kb 정도의 insert DNA를 분리하여 pBluescript vector를 *Bam*HI로 처리한 후 ligation시킨 다음 형질전환시킨 다음 CMCase 활성 배지에 효소활성을 가지는 clone을 분리하였다. 그 결과 총 4000여 clone 중에서 CMCase 활성을 가지는 2개의 clone을 분리하여 이들을 각각 *ce1A* 및 *ce1B*로 명명하였다. 이들의 유전자 구조 특성을 조사하였으며 이들 유전자 산물인 섬유소분해효소의 효소학적 특성을 조사한 결과 *Ce1B*의 pH에 대한 CMCase 영향을 50℃에서 pH2 - 10 구간에서 조사한 결과 최적 pH는 6.8이었으며 pH5에서 7사이에서 70% 정도의 활성을 가지고 있었으며 최적활성온도는 50℃ 부근이었다. 그리고 세포벽분해효소 Pectate lyase 유전자 크로닝 및 효소활성조사를 위해 분리 세균 *Erwinia* sp.로부터 total DNA를 분리하고 *Sau3AI* 제한효소로 partial digestion시킨 다음 3 - 5 kb 정도의 insert DNA를 분리하여 pBluescript vector를 *Bam*HI로 처리한 후 ligation시킨 다음 형질전환시킨 다음 pectate lyase 활성 배지에 효소활성을 가지는 clone을 분리하였다. 그 결과 총 2000여 clone 중에서 pectate lyase 활성을 가지는 하나의 clone을 분리하여 *pe1LI*으로 명명하였다. 이들의 유전자 구조 특성 및 유전자 산물의 pectate lyase의 효소학적 특성을 조사하였다.

제5절 참고문헌

1. Anh, B.Z.1980. ¹³C-NMR of the phenolic compounds. Kor. J. Phaarmacogn., 11(3), 153-162.
2. Bonsall RF, Weller DM and Thomashow LS (1997) Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. In vitro and in the rhizosphere of wheat. Appl Environ Microbiol 63: 651-955
3. Bonsall, R. F., D. M. Weller, and L. S. Thomashow. 1997. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. In vitro and in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 63:651-955.
4. Bull, C. T., D. M. Weller, and L. S. Thomashow. 1991. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. Phytopathology 81:954-959.
5. Cho J T (1992) Studies on the flower breeding of Chinese Bellflower. Res Rept RDA(Horticulture) 34: 72-75
6. Chung, YM (1993) Biological control of *Rhizoctonia* diseases

using antagonistic bacteria isolated from the rhizosphere of wild grasses. M. S. Thesis Gyeongsang Natl. Univ.

7. Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31:53-80.

8. Cronin D., Y. Moenne-Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, A. N. Dowling, and F. Ogara. 1997. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonas* strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1357-1361.

9. Douglas B, Mabelis RP and Spencer H (1976) c-acetylphloroglucinols from *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry* 15: 1785-1786

10. Dupler, M. and R. Baker. 1984. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil *Phytopathology*. 74 : 195-200.

11. Fenton, A. M., P. M. Stephens, J. Crowley, M. Ocallaghan, and F. O Gara. 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3873-3878.

12. Flaishman M, Eyal Z, Voisard C, Hass D (1990) Suppression of *Septoria tritici* by phenazine- or siderophore-deficient mutants of *Pseudomonas*. *Curr Microbiol* 20:121-124
13. Fokkema, N. J. 1978. Fungal antagonisms in the phyllosphere. *Ann. Appl. Biol.* 89:115-119.
14. Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26:75-91.
15. Gutterson NI, Howie W, and Suslow T (1990) Enhancing efficacies of biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Alan R. Liss, Inc., New York.
16. Han Dae Yun, Sun Tech Lim, Min Hwa Chung, Yong Woo Park, Hee Kyu Kim, Kyu Young Kang. Genomic cloning of cellulase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Mol. Cells.* 2:17-22(1992)
17. Han Dae Yun, Yong Woo Park, Sun Tech Lim, Hee Kyu Kim, Kyu Young Kang. The role of extracellular cellulase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on bacterial leaf blight. *Mol. Cells.* 3:143-148(1993)
18. Henis, Y., A. Ghaffar and R. Baker. 1978. Intergrated

control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish : Effect of successive plantings, PCNB and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. *Phytopathology* 68 : 990-907

19.Howell, C. R and R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69 : 480-482.

20.Jee HJ, Nam CG, and Kim CH (1988) Studies on biological control of phytopathora blight of red-pepper I, isolation of antagonistics and evaluation of antagonistic activity *in vitro* and in greenhouse. *Korean J Pl Pathol* 4: 305-312

21.Keel C, Schnider U, Maurhufer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Writhner P, Haas D, Defago G (1992) Suppression of root rot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacteria secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 4-13

22.Kim DS (1992) Compendium of medicinal plant disease with colour plates. pp 46-54. Agricultural Science Institute. RDA. Suwon, Korea

23.Kim WG, Kim CK, and Yu SH (1988) Anastomosis grouping and cultural characteristics of isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn

from Ssclerotia overwintered in paddy fields. Korean J Plant Pathol 4: 136-142

24. Kim, Y.S., H.S. Lim and S.D. Kim, 1994. *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent of *Fusarium solani* causing plant root-rot. J. Microbiol. Biotechnol. 4:68-74.

25. Kyu Young Kang, Chang Ryeol Kim, Han Dae Yun. Temporal regulation of insecticidal toxin gene expression of *B. thuringiensis*. Mol. Cells. 2: 185-190(1992)

26. Lewis, J. A. and G. C. Papavizas. 1985. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. Phytopathology 75 : 812-817.

27. Lim HS, and Kim SD (1997) Role of siderophores in biocontrol of *Fusarium solani* and enhanced growth response of bean by *Pseudomonas fluorescens* GL20. J Microbiol Biotechnol 7: 13-20

28. Mazzola M, Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, and Pierson LS (1992) Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *Pseudomonas* in soil habitats. Appl Environ Microbiol 58: 2616-2624

29. Seong, K.Y. and P.G. Shin. 1996. Effect of siderophore on

biological control of plant pathogens and promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* ps88. Agri. Chem. Biotechnol. 39:20-24.

30. Yong Woo Park, Han Dae Yun. Cloning of *Escherichia coli* endo-1,4- β -D-glucanase gene and identification of its product. Mol. Gen. Genet. 261:236-241 (1999)

31. Yong Woo Park, Sun Tech Lim, Han Dae Yun. Cloning and characterization of a CMCase gene, *celB*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 and its comparison to *celA*. Mol. Cells, 8(3) 280-285 (1998)

32. Yong Woo Park, Sun Tech Lim, Han Dae Yun. Cloning and sequencing of the *celA* gene encoding CMCase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34. Mol. Cells, 8(1) 27-35 (1998)

33. Yong Woo Park, Sun Tech Lim, Soo Jeung Cho, Han Dae Yun. Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 endo-1,4- β -glucanase genes and rapid identification of their gene products. Biochem. Biophys. Reser. Commun. 241(3): 636-641(1997).

제 6 장 생물적 방제를 위한 미생물 제제의 대량생산

제1절 서론

분리한 유용 길항 미생물의 대량배양 조건 검토를 위한 기초자료를 얻기 위한 초기 실험에서는 소규모 발효조를 사용하여 각 길항균의 배양학 조건을 실험하였으며 앞으로 미생물 농약으로서 산업적 규모로 대량배양할 수 있는 pilot 배양실험을 위한 조건 검토, 제제화를 위한 공정개발과 및 제제의 안정성, 성분분석 및 경제성 분석을 수행하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 사용균주

선발된 길항균 *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, *Pseudomonas cepacia* JS4의 길항균주를 미생물 제제화 실험 재료로 사용하였다. 이들 균주의 초기배양은 potato dextrose agar (PDA; 200 g potato, 20 g dextrose, 15 g agar, 1L distilled water)에서 배양하였으며 4℃에서 보관하면서 수행하였다.

2. 길항균 배양

일반적인 균의 28 °C로 하였다. 균주의 특성을 조사하기 위하여 분리한 균을 PDA 액체배지 50ml에 접종하여 10^8 cells/ml 농도로 생육시킨 1L의 PDA 액체배지에 분리균 *Paenibacillus macerans* R19를 접종하여 경시적으로 pH, 세포밀도를 측정하였다. 다른 균주들은 일반적인 *Pseudomonas* 속의 특성에 따라 배양하였다.

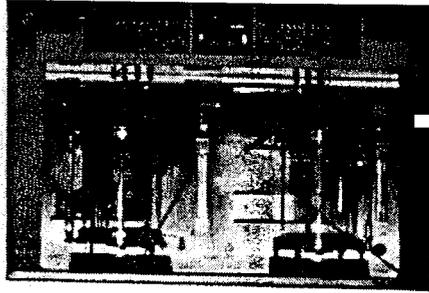
3. 미생물 생산을 위한 Jar Fermenter 배양 조건검토

가. 발효조를 이용한 균체생산

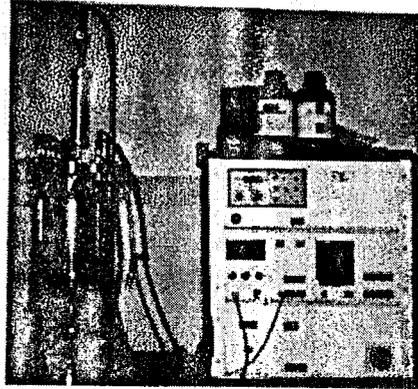
길항균에 의한 길항물질 생산은 배지의 경제성을 위해 PDB broth를 대신 dextrose, glycerol, peptone, NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 을 기본으로 한 반합성배지를 사용하였다. 사용한 발효기는 5 liter, 20 liter, 200 liter 용량의 발효기 (Fig. 1)를 scale-up하여 배양하였으며 seed 접종은 3% 수준으로 하였으며 온도, 통기량, 유속, 교반속도, 용존산소 포화도, 소포제는 silicon oil 농도를 변화시키면서 배양하였으며, 초기 pH 7로 조정하면서 배양조건을 검토하면서 실험하였다.

나. 미생물혼합배양법

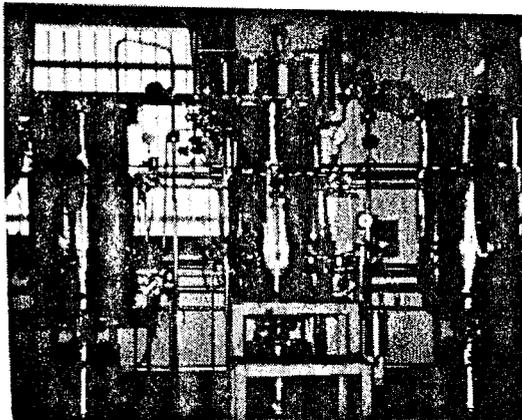
분리선정된 *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., *Pseudomonas cepacia* JS4 3균주의 ripampicin 저항성 균주를 분리하여 이들을 각각 혼합배양하여 각 균주의 분포를 확인하였다.



5 liter 발효조



20 liter 발효조



200 liter 발효조

Fig. 1. 실험에 사용한 발효조

4. 제제화의 공정개발과 수율향상을 위한 종합검토

Fig. 2와 같은 공정에 의해 미생물 제제 생산을 위한 공정실험을 수행하였으며 제제의 장기저장을 위해 액체배양법에서는 산저장법으로 1 liter 배양액에 대해 1% methyle orange 0.5 ml를 첨가한 후 citric acid를 첨가하여 변색범위를 참고로 하여 산처리하였으며 동결건조보존을 위해 skim milk 및 maltodextrin을 5%로 되게 첨가하여 동결시킨 후에 freezer dryer에 건조하여 알미늄 포장지에 진공포장하였다 (Fig. 3).

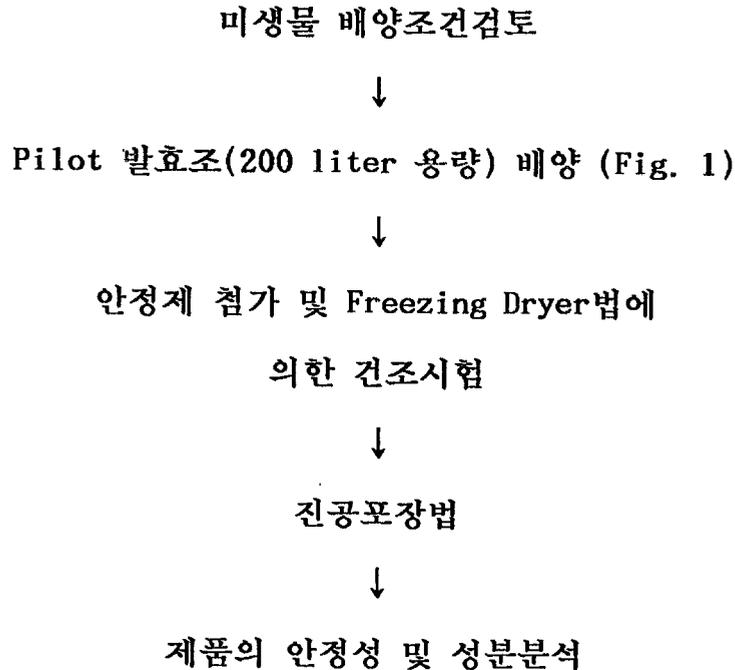


Fig. 2. Process for the production of microbial pesticide.



⇒ 액체저장처리



Fig. 3. 제제화 공정

5. 제제 성분분석

가. 무기물 분석

Freeze dry된 각 균체 5 g을 증발접시에 취하여 열판상에서 가열 탄화시킨 후 전기로에서 550℃로 회화시켰다. 회화가 끝난 시료는 진한 HClO₄ 5 ml 및 6N-HCl 5 ml를 차례로 가하여 열판상에서 분해한 다음 0.1N-HCl 25 ml를 가하여 Toyo No. 5B여지로 여과한 후 그 여액을 유도결합 플라즈마발광광도분석기로 카드뮴, 구리, 납 및 아연 함량을 측정하였다.

나. 구성 아미노산 분석

균체의 구성아미노산 분석은 freeze dry된 시료를 정칭하여 6N-HCl 용액을 가하고 진공 밀봉하여 heating block(110±1℃)에서 24시간 동안 가수분해시킨 후 glass filter로 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 HCl을 제거하고 감압농축하여 sodium citrate buffer(pH2.2) 3 ml로 용해한 후 0.2 μm membrane filter로 여과한 여액을 아미노산 자동분석기를 이용하여 분석하였으며, 아미노산 자동분석기의 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Amino acid autoanalyzer conditions for total amino acid and free amino acid analysis.

Items	Conditions
Instrument	Pharmacia Biochrom, 20
Column	Ultrapac 11 cation exchange resin (11 μm \pm 2 μm) 200 mm
Flow rate	Buffer 35 ml/hr, ninhydrin 25 ml/hr
Buffer change	pH 3.20 to pH 4.25 : between alanine and cysteine pH 4.25 to pH 10.0 : after phenylalanine
Column temp.	46 $^{\circ}\text{C}$
Reaction temp.	88 $^{\circ}\text{C}$
Analyzing time	44 min.

제3절 결과 및 고찰

1. 배지조성의 최적화

고농도 세포배양과 배지의 경제성을 조사하기 위하여 지금까지 사용한 상업용 PDB 배지는 고가이므로 대량 배양시 원료비가 고액이기 때문에 본 실험에서는 실험방법에서 언급한 대로 탄소원, 질소원, 인산원, 기타 무기영양원으로 dextrose, glycerol, peptone, NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 를 기본배지 원료로 하였다. 이들 배지성분들의 최적농도를 구하기 위하여 각 성분들의 최적농도를 구하기 위하여 각 성분들의 농도를 변화시키면서 플라스크 배양을 하여 정체기에 도달하지 않는 배양 시간 18시간 때의 세포농도를 측정하여 각을 비교하였다.

Fig. 4A에서와 같이 포도당 농도는 1 - 1.2% 범위의 농도에서는 세포성장 속도가 거의 일정하였으며 또 다른 탄소원인 glycerol은 0.8 - 1.2%의 농도에서는 세 균주의 성장속도는 각 최고농도에 도달한 것으로 나타났다 (Fig. 4B). 질소원 및 생육인자로 bacto peptone의 농도별로 첨가하여 분석한 결과 Fig. 5A와 같이 1.5 - 3%의 농도에서는 각 균주별 균체생육정도가 거의 일정한 수준에 도달하였다. 무기염인 인산의 최적농도를 조사한 결과 NaH_2PO_4 의 농도별로 조사한 결과 Fig. 5B와 같이 0.2%의 수준에서 각 균주마다 균체증식이 초고로 나타났으며 MgSO_4 의 농도는 Fig. 6A 와 같이 0.4% 수준이었으며, K_2SO_4 는 Fig. 6B에서와 같이 0.8% 수준이었다.

이상의 결과를 요약하면 길항균주의 대량배양을 위해 비교적 염가로 생각되는 반합성배지의 양분조성은 1 liter 배양기준으로 Dextrose 10 g, Glycerol 10 g, Peptone 20 g, NaH_2PO_4 10 g,

MgSO₄·7H₂O 1.4 g, K₂SO₄ .0.8 g으로 첨가하는 것이 좋은 것으로 나타났다. 특이한 것은 이상의 배지조성으로 배지조제시 최종 pH가 거의 7에 도달하였는 데 이후의 본 실험의 혼합배양시 최적배양 pH와 일치하여 앞으로 대량배양시 배지 조제 후 pH를 다시 조정할 필요가 없는 이 점을 가지고 있었다. 그리고 yeast extract와 같은 생육인자를 첨가하지 않아도 균체수율에 영양이 별로 없었다.

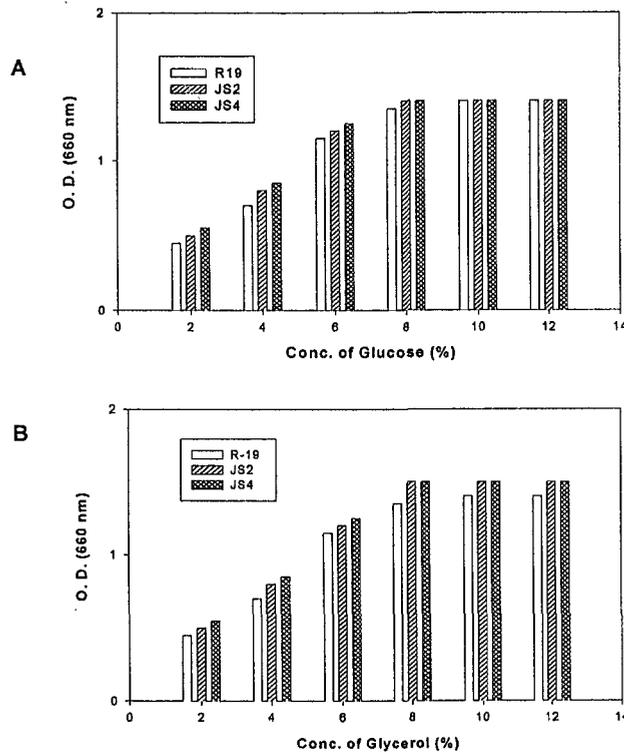


Fig. 4

The effects of culture medium concentrations on the specific growth of *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4.

A: Glucose

B: Glycerol

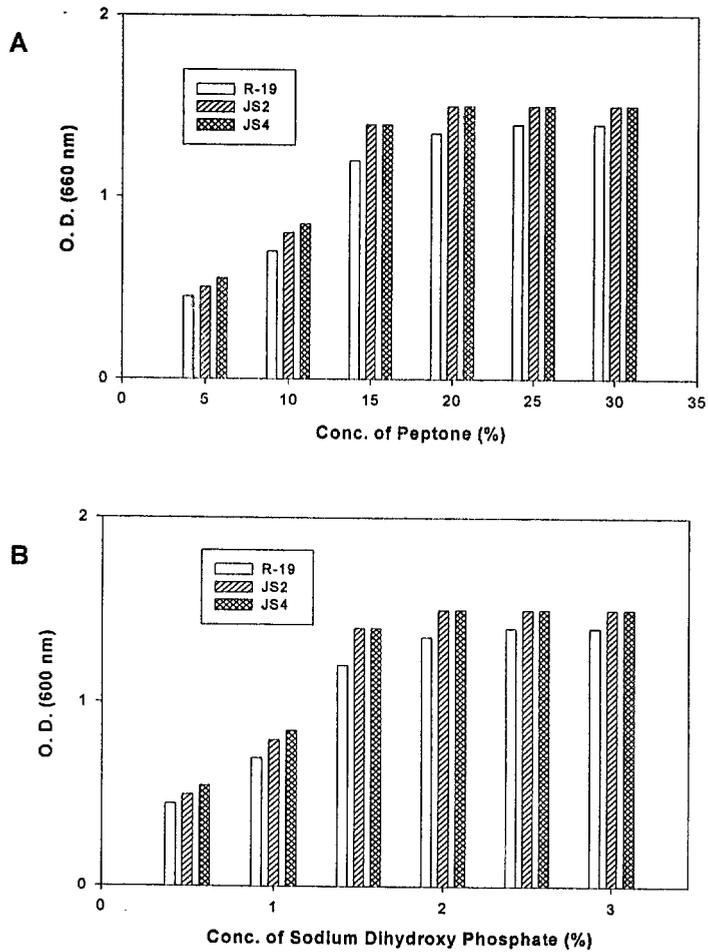


Fig. 5. The effects of culture medium concentrations on the specific growth of *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4.

A: Peptone

B: NaH_2PO_4

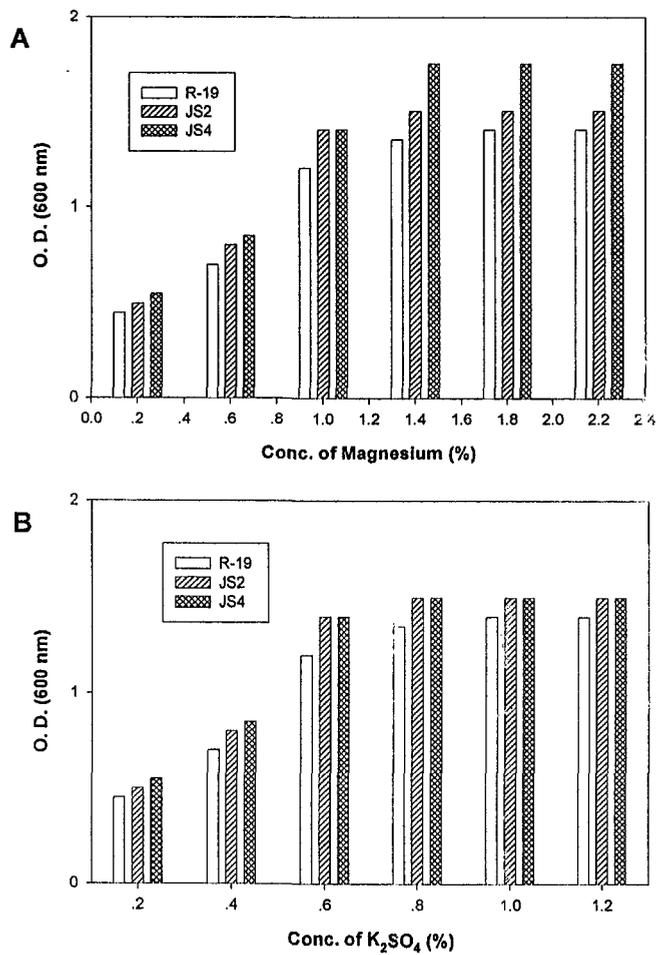


Fig. 6 The effects of culture medium concentrations on the specific growth of *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4.

A: MgSO₄

B: K₂SO₄

2. 미생물 생산을 위한 Jar Fermenter 배양 조건검토

발효조를 이용한 균체생산의 경제성을 위해 PDB broth를 사용하지 않고 상기 실험에서 실험한 반합성배지를 사용하였다 (Table 2). 발효기를 이용하여 seed를 3% 수준으로 집중하고 온도별, 통기량 유속, 교반속도, 용존산소포화도, 소포제, pH를 각각 조정하여 실험하였다.

Table 2. 길항균 생산을 위한 합성배지 조성 (1 liter 기준)

Dextrose	(98% 순도)	10 g
Glycerol		10 g
Peptone		20 g
NaH ₂ PO ₄	(98% 순도)	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	(98% 순도)	1.4 g
K ₂ SO ₄	(98% 순도)	0.8 g

가. pH별 영향

Paenibacillus macerans R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., *Pseudomonas cepacia* JS4 3균주의 pH 별 최적생육을 조사한 결과는 Fig. 7와 같다. Fig. 7.에서처럼 *Paenibacillus macerans* R19 (Fig. 7A), *Pseudomonas aeruginosa* JS2 (Fig. 7B), *Pseudomonas cepacia* JS4 (Fig. 7C) 모두 pH 7에서 최적으로 나타났다.

나. 온도별 영향

Paeniacyllus macerans R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., *Pseudomonas cepacia* JS4 3균주의 생육적온을 조사하기 위해 온도별 균체증식을 측정한 결과는 Fig. 8와 같다. Fig. 8A에서 처럼 *Paeniacyllus macerans* R19의 생육은 30℃에서 최고로 나타났으며, *Pseudomonas aeruginosa* JS2 (Fig. 8B)와 *Pseudomonas cepacia* JS4 (Fig. 8C)는 공히 25℃ 근방에서 양호한 것으로 나타났다. 따라서 이들의 혼합배양시에는 28℃로 배양하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

다. 세포생육의 경시적 변화

Paeniacyllus macerans R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., *Pseudomonas cepacia* JS4 이들 세 균주를 혼합배양하여 균체생육의 경시적 변화를 조사한 결과 Fig 9A와 같다. Fig. 9A에서 처럼 균체생육이 증기함에 따라 DNS법에 의한 환원당 정량법에 의한 탄소원의 변화는 균체증식과 비례하여 감소하였다 (Fig. 9B).

라. 미생물혼합배양법

분리선정된 *Paeniacyllus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2, *Pseudomonas cepacia* JS4 균주의 배양학적 특성을 고려하여 이들을 대량 배양하기 위한 혼합배양조건으로 배지의 선정, 배양온도 등을 조사하며 분리 선정된 균을 액체배지에 jar fermenter에 배양조건에 배양하여 이들 각 균주의 분포 상태는 Table 3와 같다. Table 3에서 처럼 3 균주는 같이 배양할 수 있는 특성을 가지고 있어 앞으로 대량 배양에 유리한 것으로 생각된다. 따라서 이들 균주를 앞으로 도라지 근부병 방지를 위한 생물적 방제를 위한 균체의 대량생산을 위한 기본 배양균과 배양조건으로 기초를 확립하였다. 그리고 감자배지 생육시킨

배양물과 반합성배지에서 생육시킨 결과 길항력 및 균수에서는 거의 차이가 없었다.

Table 3. Populations of the mixed culture of *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4

Strain	The number of cell / ml (10^8)
<i>Paenibacillus macerans</i> R19	2.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JS2	4.5
<i>Pseudomonas cepacia</i> JS4	3.7

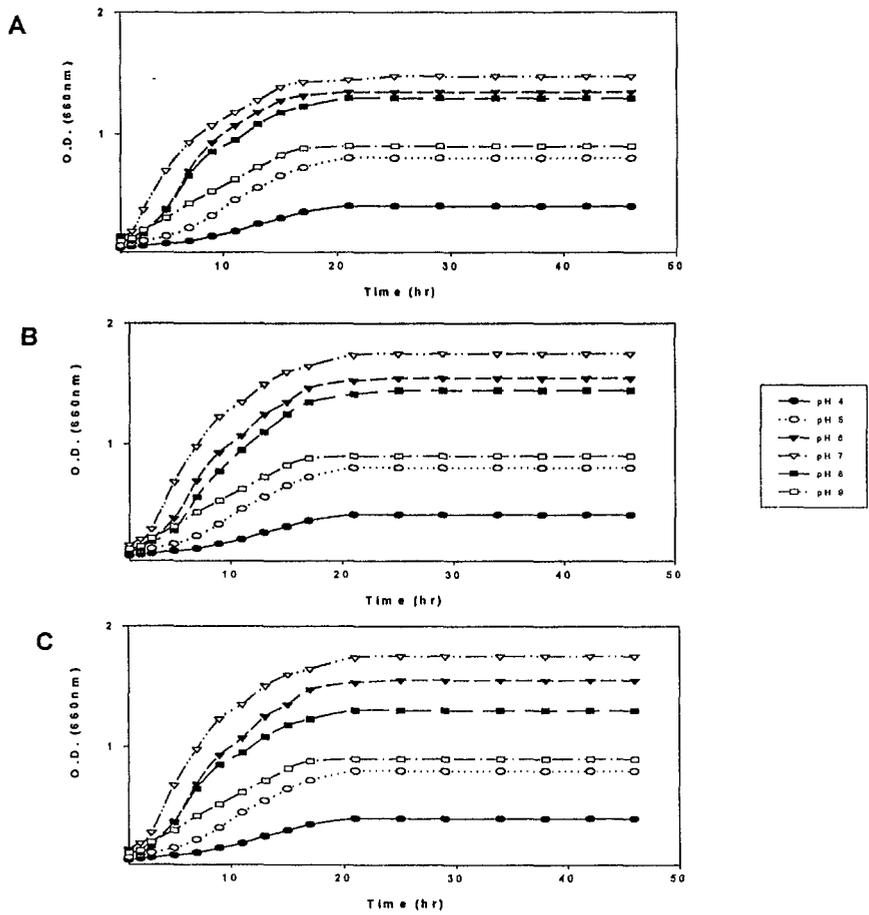


Fig. 7. The effect of pH on the cell growth of *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4 on semi-synthetic broth.

A: *Paeniacillus macerans* R19

B: *Pseudomonas aureginosa* JS2

C: *Pseudomonas cepacia* JS4

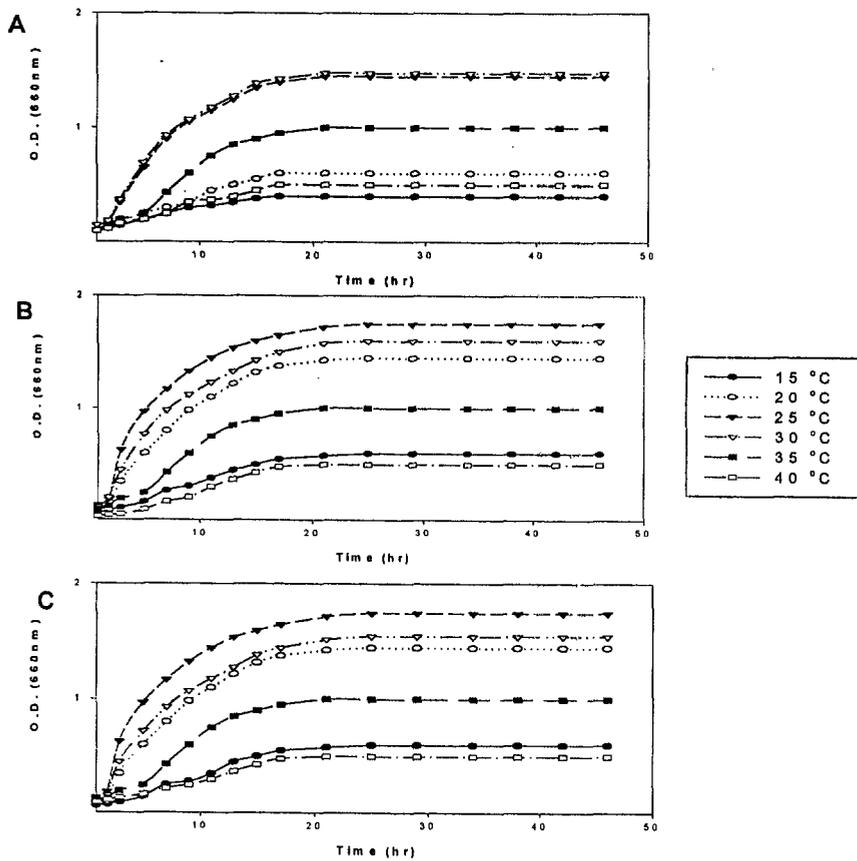


Fig. 8. The effect of temperature on the cell growth of *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4 on semi-synthetic broth.

A: *Paeniacillus macerans* R19,

B: *Pseudomonas aureginosa* JS2,

C: *Pseudomonas cepacia* JS4

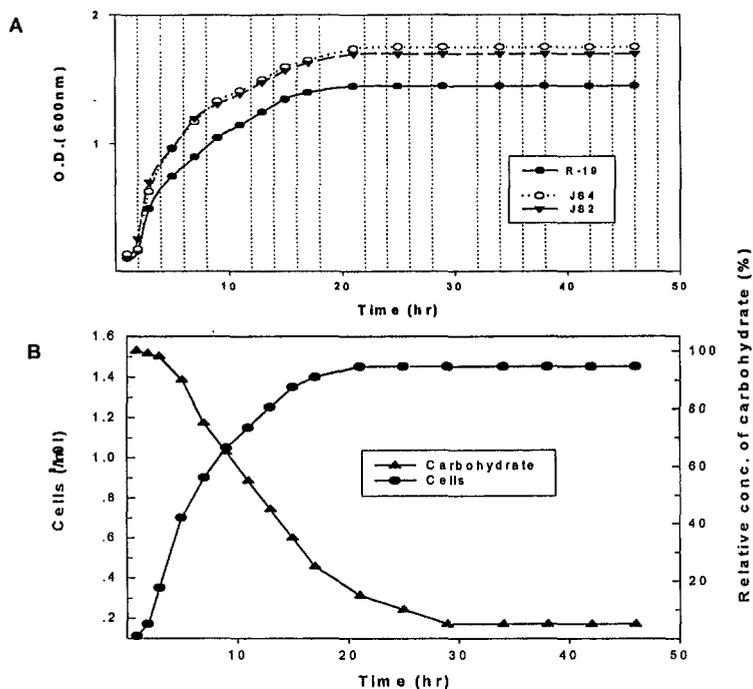


Fig. 9. The change of cell growth and carbohydrate reduction during the time courses of the batch culture on semi-synthetic broth of growth of *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4.

A: Single culture of *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4

B: Carbohydrate reduction and population of the mixed culture of *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aureginosa* JS2, and *Pseudomonas cepacia* JS4.

3. Pilot 배양을 위한 최적온도, pH, 통기교반 실험

가. 온도별 영향

200 liter 규모의 pilot jar fermenter 배양에서 *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., *Pseudomonas cepacia* JS4 3균주의 생육적온을 조사하기 위해 온도별 균체증식을 측정한 결과 *Paenibacillus macerans* R19의 생육은 30℃에서 최적 이었으며, *Pseudomonas aeruginosa* JS2와 *Pseudomonas cepacia* JS4는 28℃ 부근에서 양호한 것으로 나타났다.

나. pH별 영향

Paenibacillus macerans R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., *Pseudomonas cepacia* JS4 3균주의 pH 별 최적생육을 조사한 결과 모두 pH 7에서 최적으로 나타났다.

지금까지의 결과를 종합 검토한 결과 전배양된 seed를 3% 수준으로 접종하고 28 ℃, 통기량 2liter/min 유속, 교반속도 200rpm, 용존산소 포화도 25% 유지, 소포제 2% silicon oil, 초기 pH 7로 하였을 때가 최적조건인 것으로 나타났다.

Table 4. Cell number per gram after freezer drying of *Paenibacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., and *Peudomonas cepacia* JS4

Strain	The number of cell / g (10^{13})
<i>Paenibacillus macerans</i> R19	4.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JS2	4.5
<i>Peudomonas cepacia</i> JS4	4.3

4. 미생물제제의 안정성, 성분분석 및 경제성 분석

길항균 *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2, and *Peudomonas cepacia* JS4를 동결건조한 후 제제의 이마노산 조성 및 무기성분분석을 분석한 결과는 Table 4와 Table 6과 같다. 이들의 아미노산 조성은 비교적 필수아미노산이 적절하게 분포되어 있었다. 그리고 미기 성분도 작물생육에 필요한 다량 요소들이 적절하게 함유되어 있었다. 물론 이러한 성분의 대부분 균체에서 유래한 것으로 생각되나 궁극적으로는 토양 내에서 분해되어 식물의 영양원이 될 수 있을 것이다. 동결건조 후 진공건조한 제제에서의 미생물 생균수의 저장 중의 감소는 미약하였으나 액체저장에서 제제는 저장 1개월 후부터는 생균 수의 감소가 시작되었다. 따라서 액체제제는 가급적 유통기간을 단축하는 것이 바람직한 것으로 생각되며 동결건조는 경제성에 문제가 있으나 현재 외국 제품인 경우 동결건조형태

의 제제가 증가되는 추세를 감안할 때 앞으로 이에 대한 경비 절감 방법에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다. 그리고 액체배양액 10 liter 기준으로 동결건조한 후 무게는 약 600 g 정도로 보관 측면에서 볼 때 매우 편리하고 저장성이 좋을 것으로 생각된다. 앞으로 지속적인 농업과 환경보호적인 측면에서 그리고 현재 미생물 제제의 유통은 대부분 액체 제제로 유통되어지고 있으며 이들의 유통과정에서 보관상태에 따라 그 효능이 절감되어 대 농민 문제가 되고 있는 실정이며 국내 제품의 신뢰도가 떨어지고 있는 이유 중의 하나이기도 하다. 앞으로의 환경친화적 농업에서 미생물 제제의 사용이 필수적인 것으로 현실화되어 국내외적으로 그 사용량이 증대될 때에 경제성 면에서는 유리할 것으로 생각된다.

그리고 미생물 제제 생산시 배지의 경제적 비교 분석한 결과는 Table 6과 같다. Table 6에서와 같이 상용되고 있는 감자배지(PDB개소)와 비교분석한 결과 1 톤의 미생물 제제를 생산시 소용되는 배지 비용은 약 5,650,000원으로 추정되는 데 본 실험에서 사용한 반합성 배지의 소용비용은 2,288,000원 정도로 그 비용을 약 반 이상을 절감할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 7. Contents of mineral nutrient of *Panibacillus macerans* R19, *Pseudomonas* sp. JS2 and *Pseudomonas* sp. JS4

Components	Contents (mg/kg)		
	<i>Panibacillus macerans</i> R19	<i>Pseudomonas</i> sp. JS2	<i>Pseudomonas</i> sp. JS4
Na	582	715	720
Mg	126	145	148
K	2518	3288	3285
Ca	384	467	455
Zn	4.18	3.21	3.23
Cu	0.07	0.02	0.07
Cd	ND*	ND*	ND*
Cr	0.19	ND*	0.21
Pb	ND*	ND*	ND*
Fe	2.48	3.20	3.90
Mn	0.08	0.05	0.08
Al	2.31	2.05	3.07
Se	ND*	ND*	ND*

※ ND* : Not detected

Table 8. Contents of Total Amino acid of *Panibacillus macerans* R19, *Pseudomonas* sp. JS2 and *Pseudomonas* sp. JS4

Components	Contents (mg/g)		
	<i>Panibacillus macerans</i> R19	<i>Pseudomonas</i> sp. JS2	<i>Pseudomonas</i> sp. JS4
Aspartic acid	0.15	0.17	0.19
Threonine	0.11	0.15	0.13
Serine	0.10	0.15	0.12
Glutamic acid	0.25	0.25	0.30
Proline	0.4	0.55	0.58
Glycine	0.1	0.12	0.13
Alanine	0.07	0.05	0.07
Cystine	0.13	0.13	0.14
Methionine	0.08	0.05	0.09
Isoleucine	0.12	0.17	0.14
Leucine	0.15	0.18	0.18
Tyrosine	0.09	0.09	0.11
Phenylalanine	0.14	0.19	0.17
Histidine	0.08	0.15	0.11
Lysine	0.14	0.16	0.17
Arginine	0.11	0.13	0.17

Table 6. 길항균 생산을 위한 배지의 경제성 분석(1,000 liter 및 시가 기준)

성분	소요량/톤	단가(원/kg)	소요비용(원)
합성배지			
Dextrose(98% 순도)	10 kg	1,100	11,000
Glycerol	10 kg	5,500	55,000
Peptone	20 kg	110,000	2,200,000
NaH ₂ PO ₄ (98% 순도)	10 kg	1,980	19,800
MgSO ₄ ·7H ₂ O(98% 순도)	1.4 kg	704	986
K ₂ SO ₄ (98% 순도)	0.8 kg	1,375	1,100
소계			2,287,886원
PDBroth	24 kg	235,400원	5,649,600원

제4절 요약

효율적인 길항균 배양을 위해 경제적인 반합성 배지조성을 성을 조사하기 위하여 탄소원, 질소원, 인산원, 기타 무기영양원으로 dextrose, glycerol, peptone, NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 를 기본배지 원료로 하였다. 이들 배지성분들의 최적농도를 구하기 위하여 각 성분들의 최적농도를 구하기 위하여 각 성분들의 농도를 변화시키면서 배양을 하여 정체기에 도달하지 않는 배양 시간 18시간 때의 세포농도를 측정하여 각을 비교하였다. 그 결과 길항균주의 반합성배지의 양분조성은 1 liter 배양기준으로 Dextrose 10 g, Glycerol 10 g, Peptone 20 g, NaH_2PO_4 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 g, K_2SO_4 0.8 g으로 첨가하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

길항균의 pH별 배지 영향을 조사한 결과 *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., *Pseudomonas cepacia* JS4 3균주의 pH 별 최적생육을 조사한 결과는 모두 pH 7에서 최적으로 나타났으며 온도에 대한 영향으로 *Paeniacillus macerans* R19의 생육은 30℃에서 최적으로 나타났으며, *Pseudomonas aeruginosa* JS2와 *Pseudomonas cepacia* JS4는 공히 25℃ 근방에서 양호한 것으로 나타났다. 이들의 혼합배양 시에는 28℃로 배양하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2., *Pseudomonas cepacia* JS4 이들 세 균주를 혼합배양하여 균체생육의 경시적 변화를 조사한 결과 균체생육이 증기함에 따라 DNS법에 의한 환원당 정량법에 의한 탄소원의 변화는 균체증식과 비례하여 감소하였다.

미생물혼합배양법을 위해 *Paeniacillus macerans* R19, *Pseudomonas aeruginosa* JS2, *Pseudomonas cepacia* JS4 균주의 배양학적 특성을 고려하여 이들을 대량 배양하기 위한 혼합배양조건으로 배지의 선정, 배양온도

등을 조사하며 분리선정된 균을 액체배지에 jar fermenter에 배양조건에 배양하여 이들 각 균주의 분포 상태는 *Bacillus macerans* R19 2.3×10^8 /ml, *Pseudomonas aeruginosa* JS2 4.5×10^8 /ml, *Pseudomonas cepacia* JS4 3.7×10^8 /ml의 균 밀도로 나타났다. 그리고 감자배지 생육시킨 배양물과 반합성배지에서 생육시킨 결과 길항력 및 균수에서는 거의 차이가 없었다.

지금까지의 결과를 종합 검토한 결과 전배양된 seed를 3% 수준으로 접종하고 28 °C, 통기량 2liter/min 유속, 교반속도 200rpm, 용존산소포화도 25% 유지, 소포제 2% silicon oil, 초기 pH 7로 하였을 때가 최적조건인 것으로 나타났다.

미생물제제의 안정성 분석을 위해 동결건조 후 진공건조한 제제에서의 미생물 생균수의 저장 중의 감소는 미약하였으나 액체저장에서 제제는 저장 1개월 후부터는 생균 수의 감소가 시작되었다. 그리고 미생물 제제 생산시 배지의 경제적 비교 분석한 결과 상용되고 있는 감자배지(PDB)와 비교분석한 결과 1 톤의 미생물 제제를 생산시 소용되는 배지 비용은 약 5,650,000원으로 추정되는 데 본 실험에서 사용한 반합성배지의 소용비용은 2,288,000원 정도로 그 비용을 약 반 이상을 절감할 수 있었다.

제5절 참고문헌

1. Belimov, A. A., Kojemiakov, A. P. and Chuvarliyeva, C. V. (1995). Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil* 173: 29-37.
2. Berge, O., Fages, J., Mulard, D. and Balandreau, J. (1990) Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field grown maize. *Symbiosis* 9: 259-266.
3. Elshanshoury, A. R. (1995). Interactions of *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* and *Streptomyces mutabilis*, in relation to their effect on wheat development. *J. Agron. Crop Sci.* 175: 119-127.
4. Frommel M. I., Pazos, G. S. and Nowak, J. (1991). Plant growth stimulation and biocontrol of fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by co-inoculation of tomato seeds with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas* sp. *Fitopatologia* 26: 66-73.
5. Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by

- free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
6. Glick, B.R. and Bashan, Y. (1997). Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* 15:353-378.
7. Glick, B.R., Karaturovic, D.M. and Newell, P.C. (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can. J. Microbiol.* 41:533-536.
8. Hagedorn, C., Gould, W.D. and Bardinelli, T.R. (1993). Field evaluations of bacterial inoculants to control seedling disease pathogens on cotton. *Plant Dis.* 77:278-282.
9. Holguin, G. and Bashan, Y. (1996). Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biol. Biochem.* 28: 1651-1660.
10. Huber, D.M., EI-Nasshar, L., Moore, H.W., Mathre, D. E. and Wagner, J. E. (1989). Interaction between a peat carrier and bacterial seed treatments evaluated for biological control of the take-all diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biol. Fertil. Soils* 8:166-171.
11. Kerr, A. (1989). Commercial release of a genetically

engineered bacterium for the control of crown gall.
Agricultural Sci. 2:41-44.

12. Khammas, K.M. and Kaiser, P. (1992). Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. Can. J. Microbiol 38:794-797.

13. Kim, Y.S., H.S. Lim and S.D. Kim. 1994. *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent of *Fusarium solani* causing plant root-rot. J. Microbiol. Biotechnol. 4:68-74.

14. Lippi, D., Cacciari, I., Pietrosanti, T. and Pietrosanti, W. (1992). Interactions between *Azospirillum* and *Arthrobacter* in diazotrophic mixed culture. SYMBIOSIS 13:107-114.

15. McIntyre, J. L., and Press, L. S. (1991). Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In The Rhizosphere and Plant Growth (BARC Beltsville Symposium on Agricultural Research no. 14), R.R Baker and P.E. Dunn (eds.), pp. 289-295, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.

16. Mugnier, J. and Jung, G. (1985). Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. Appl. Environ. Microbiol. 50: 108-114.

17. Olsen, C. M and K. F. baker. 1968. Selective heat treatment of soil and its effect on the inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. 58 : 79-87.

18. Paau, A.S. (1988). Formulations useful in applying beneficial microorganism to seeds. *Trends Biotechnol.* 6:276-279.

19. Papavizas, G. C., M. T. Dunn, J. A. Lewis and J. Beagle-Ristaino. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 74 : 1171-1175.

20. Robert, P.C., Rust R.H. and Larson, W.E. (eds). 1995. Site-specific management of agricultural systems. 993 p. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI., USA.

21. Seong, K.Y. and P.G. Shin. 1996. Effect of siderophore on biological control of plant pathogens and promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* ps88. *Agri. Chem. Biotechnol.* 39:20-24.

22. Smit, E., Wolters, A.C., Lee, H., Trevors, J.T. and Van Elsas, J.D. (1991) Interactions between a genetically marked

Pseudomonas fluorescens strain and bacteriophage Φ R2f in soil: effects of nutrients, alginate encapsulation, and the wheat rhizosphere. *Microbial. Ecol.* 31: 125-140.

23. Van Elsas, J.D. Hekman, W., van Overbeek, L.S. and Smit, E. (1991). Problems and perspectives of the applications of genetically engineered microorganisms to soil. *Trends soil Sci.* 1:373-392.

24. Van Elsas, J.D. Kijkstra, A.F., Govaert, J.M. and van Veen, J.A. (1986). Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38:151-160

제 7 장 길항균 제제의 현장처리 효과

제1절 서론

재배년수가 오래된 다년생 도라지는 약효가 높다고하여 20년생 이상 장기재배하는 방법을 개발하여 다년생도라지를 재배하는 농가도 있다. 다년생도라지 재배에서 가장 큰 문제가되는 장애요인은 뿌리썩음병으로 현재까지 그 주원인이되는 병원균을 분리하지 못하여 효과적인 방제 수단을 찾지 못하였다.

근부병을 일으키는 병원균은 *Cylindrocarpon*, *Fusarium* 등이 인삼의 뿌리썩음병에 관여하고, 역병균에 의한 작물의 뿌리썩음병 발생이 많고, *Rhizoctonia*에 의한 뿌리썩음병은 황기, 지황, 당귀 등 약용작물에서 많이 볼 수 있다. 한편, 양파 무름병 과 같은 세균에 의한 뿌리썩음병도 무서운 병해이다. 특히 도라지뿌리썩음병은 무름병과 유사한 증상을 보임으로써 세균병으로 오인되어 방제가 쉽지 않았던 것은 병원체를 제대로 밝히지 못하였기 때문이다. 도라지의 *Rhizoctonia solani* 병해는 잘록병과 줄기썩음병이 보고되어 있고 균사융합군도 보고된바 있으나 뿌리썩음병에 대한 연구 보고는 없었다. *Rhizoctonia solani*는 다범성균으로 주로 초본식물의 잘록병과, 줄기마름병, 또는 뿌리썩음병을 일으키는 균으로 분생포자를 형성하지 않고 균핵과 균사가 주전염원이 되고, 완전세대를 형성하여 담포자를 형성하지만 담포자의 전염원으로서의 역할은 크지않다. 토양전염성병해의 방제가 어려운데 최근에는 길항균에 의한 생물적 방제, 비병원성균에 의한 방제연구가 활발히 추진되고 있어서 효과적인 방제

법이 곧 개발될 수있을 것으로 생각되어진다

본 연구자들이 도라지뿌리썩음병의 원인이되는 병원균을 분리하였고, 도라지가 한약재로 사용는 생약이므로 농약에 의한 방제 방법 개발 보다는길항미생물 등의 방제법을 개발하기 위하여 길항균을 선발하고 길항균의 효과를 확인하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 길항균 선발

도라지 재배지의 토양을 채취하여 희석법에 의거 토양현탁액을 PDA 배지 상에 도말하여 25℃의 항온기에서 배양한 후 생성된 미생물의 colony를 분리 배양하여 도라지 근부병 병원균과 대치배양하여 저지대를 형성하는 세균과 균기생성 곰팡이를 선발하였으며, 이들균의 병원균 억제 기작을 현미경으로 관찰하였다. 본 실험에서 분리한 곰팡이 길항균은 *Trichoderma* 속은 액체대량시험에서 혼합배양법의 어려움 때문에 제제화 시험에서는 제외되었다.

2. 길항균 처리효과 확인

선발된 길항균 중에서 *Trichoderma* 1개 균주(TR01), *Bacillus*속 세균 2개 균주(R19, R22), *Pseudomonas* 1개 균주(JS4)를 액체배양 제제화하여 도라지 1년생 종근에 침지처리하여 포장에 30×15cm 거리로 정식하여 발병율을 조사하였다.

3. 선발된 길항균의 도라지 종근처리 효과

1년생 도라지 종근을 뿌리썩음병균(*Rhizoctonia solani*)에 강한 길항작용을 보이는 길항균의 배양현탁액에 침지하여 시험포장에 이식한 후 줄기마름병과 뿌리썩음병을 조사하였는데 줄기마름병은 전년도 8월중에 조사하여 기보고가된 바 있으나 뿌리썩음병은 12월 중에 수확하여 뿌리썩음병에 이병된 개체수를 조사하여 발병율을 구하였다.

4. 길항균의 도라지 재배지 관주처리 효과

가. '98년 4월 10일에 2년생 종근을 재식거리 30 × 15cm 로 정식 한후 5월 20일과 6월 15일에 길항균 배양 현탁액을 1회 및 2회 처리하고 8월 12일에 줄기마름병을 조사하여 길항균의 처리효과를 구명하였다. 이때 길항균의 처리밀도는 10^8 - 10^9 /ml, 처리량은 주당 20 ml 씩 관주하였다. 공시한 길항균은 전년도 시험결과 비교적 우수한 TR01, R19, R22 및 JS4 3개 균주를 감자전즙배지에 배양하여 공시균으로 사용하였다.

나. 다년생 도라지에 대한 길항균 처리효과

함양약초시험장 포장에 재배중인 다년생 도라지중 4년생부터 9년생 도라지에 상기균주들의 배양 현탁액을 6.15일에 1회 관주하여 8월 12일에 줄기마름병을 조사하였고, 뿌리썩음병은 12월 중에 전체 주수에 대한 이병주수를 조사하였다



Fig. 1. 함양약초시험장 도라지 재배 시험지

제3절 결과 및 고찰

1. 길항균 선발

도라지는 생약 또는 채소로 식용으로 사용하기 때문에 근부병의 방제를 위한 약제사용은 농약의 잔류때문에 바람직하지 못한 것으로써 환경보호와 국민의 건강상 항미생물이나 식물농약에 의한 방제법의 개발이 바람직하다고 생각되므로 근부병의 방제법 개발을 위하여 도라지 근부병균을 억제하는 길항미생물을 선발하였다.

도라지 재배지의 토양을 채취하여 토양희석법에 의거 배지상에 형성된 세균과 곰팡이의 군락(colony)을 분리 배양하여 병원균인 *Rhizoctonia solani*와 대치 배양하여 억제 능력이 있는 길항균을 선발한 결과 우수한 길항균으로는 Table 1에서 보는 바와 같이 본 장에서는 사상균으로 *Trichoderma harzianum* 1개 균주, 4장에서와 같이 길항 세균을 선발하였다.

Table 1. Selected antagonists for field tests against *Rhizoctonia solani*

Antagonist	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
No. of selected Isolates	1	2	1

*Trichoderma harzianum*은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 근부병균을 억제하였는데 길항작용의 기작은 *Rhizoctonia*의 균사를 칭칭 감아서 병원균의 균사를 고사시키는 작용을 하였는데, 이들 기작은 Elad등(1983)이 전자현미경으로 확인한 결과 *Trichoderma*균의 균사 coiling은 균사가 접촉된 부위에 β -1,3 glucanase 및 chitinase의 작용으로 병원균의 균사 내용물이 없어지고 결국 고사하게 된다고 하였다. 본 연구에서 선발한 *Trichoderma harzianum* TR01은 Elad등이 연구한 *Trichoderma* 균주와 같은 길항작용을 갖는 것으로 생각되었다. 선발된 *Trichoderma harzianum*의 균사 생장온도를 조사한 결과 10°C 이하와 35°C 이상에서는 생장이 어려웠고 균의 생장은 20°C~30°C에서 비교적 양호하였으나 25°C에서 생육이 가장 좋았다.

길항균으로 분리된 세균 중에서 *Paenibacillus*속 균의 균주들은 Fig. 3에서와 같이 도라지 근부병 병원균인 *Rhizoctonia solani*의 균사 생장을 억제하는 저지대를 형성하였고, 이들 저지대 끝의 균사를 현미경으로 관찰한 결과 Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼 병원균의 균사 끝부분부터 세포가 용해되어 세포 내용물이 없어져 균사가 사멸하는 것으로 관찰되었다. 이는 *Bacillus*속 세균이나 *Pseudomonas*속 세균들이 항균물질을 생성 분비하여 곰팡이의 균사 생장을 저해한다는 많은 연구 보고의 결과와 일치되는 것으로 생각된다.

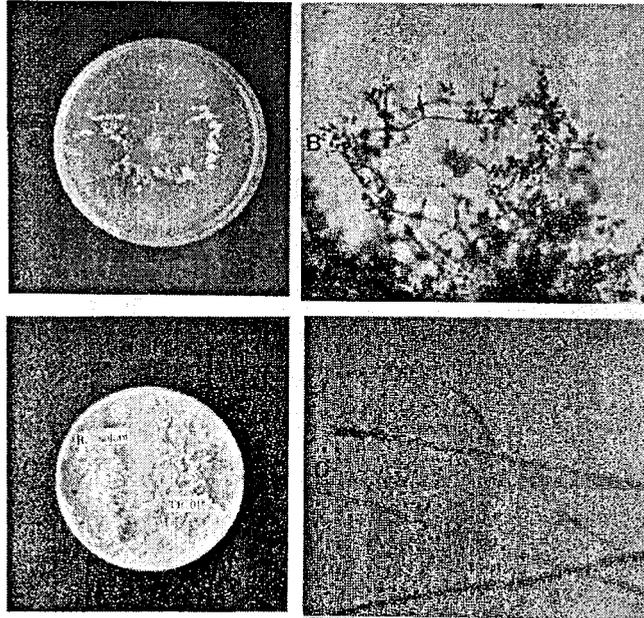


Fig. 2. Morphology of *Trichoderma haziarum* and antagonistic action. A, Colony shape in media; B, Conidiophore; C, Dual culture *Rhizobium solani* with *Trichoderma haziarum*; D, Coiling *Rhizoctonia hypae* by *Rhizoctonia solani*.

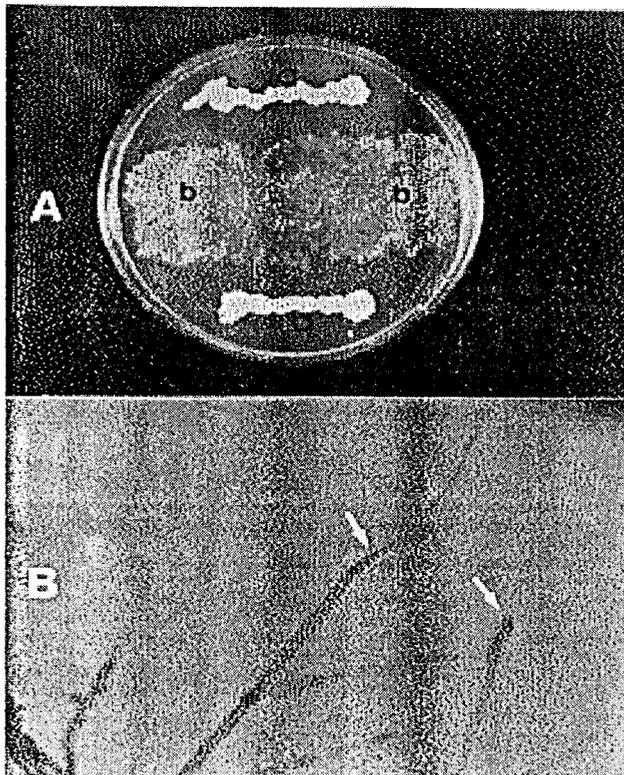


Fig. 3. Inhibition zone and hyphal lysis of *R. solani* by the antagonistic bacteria, *Paenibacillus macerans* R19.

2. 길항균 효과 확인

실내에서 선발한 길항균들의 도라지 근부병 발병억제 효과를 포장실험으로 확인하기 위하여 *T. harzianum* TR01균주, *Bacillus*속 R19 및 R22, *Pseudomonas* 속 JS4 균주를 배양하여 현탁액을 만든후 1년생 종근을 침지하여 포장에 정식한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 본 실험에서 도라지 근부병의 발생이 경미한 편이나 무처리에 비하여 길항균 처리구의 발병율이 낮았다. 무처리의 발병율이 경미한 것은 도라지 근부병은 2년생근 또는 3년생근의 경우 발병이 심하고 1년생근은 생육이 왕성하여 병원균에 대한 저항성이 높은 것으로 추측되며, 표에서 보는 바와 같이 가을에서 겨울을 거치는 동안에 줄기마름병이 진전되어 뿌리썩음병으로 발병되어 고사되는 비율이 높는데 길항균 처리구에서는 TR01의 억제효과가 비교적 좋았다.

Table 2. Efficacy test of the antagonists treated seedlings by dipping method against balloon flower radix rot in field

Antagonists	Rate of stem rot(%)	Rate of radix rot(%)	Control value(%)
Control	5.2	21.2	-
TR01	0.9	12.9	39.1
R19	1.3	15.1	29.3
R22	1.1	18.2	27.9
JS4	0.9	13.2	37.8

길항균을 도라지 정식 전에 뿌리에 부착시키기 위하여 현탁액에 침지 후 정식한 결과는 표1에서 보는 바와 같이 줄기마름병에는 현저한 억제효과가 있었으나 뿌리썩음병의 억제효과는 현저하지 못하였다. 그러나, TR01, R19, R22 및 JS4 균주의 발병억제는 다소 인정되었으므로 처리횟수를 증가시키면 뿌리썩음병의 억제가 가능할 것으로 생각되어 2년차 시험에서는 미생물을 대량배양하여 밀도를 높게하여 3년생 도라지 생육중에 관주처리한 결과 표2에서 보는 바와 같이 길항균의 효과가 42.3%에서 54.7%로 비교적 높게 인정되어 길항균에 의한 도라지 뿌리썩음병의 방제 가능성이 보였다.

Table 3. Effects of antagonists treated by soil drenching on radix rot of balloon flower in field

Antagonists	Infected rate of radix rot (%)	Control value (%)
Control	34.0	-
TR01	19.6	42.3
R19	15.4	54.7
R22	18.8	44.7
JS4	19.0	44.1

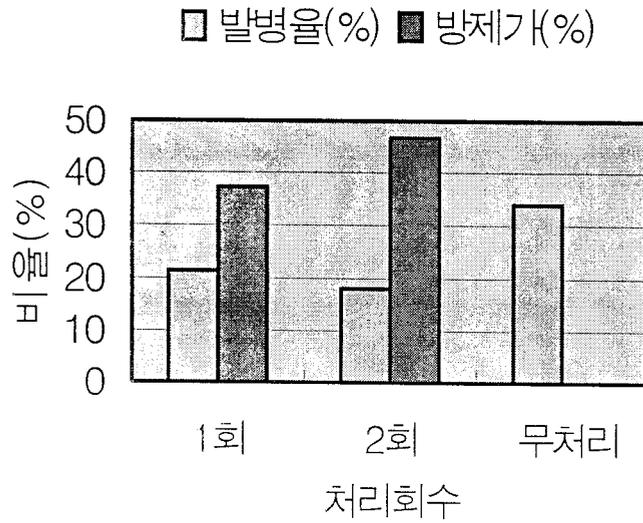


Fig. 4. Effects of *Trichoderma harzianum* TR01 on suppression of radish rot of balloon flower by treating times in field.

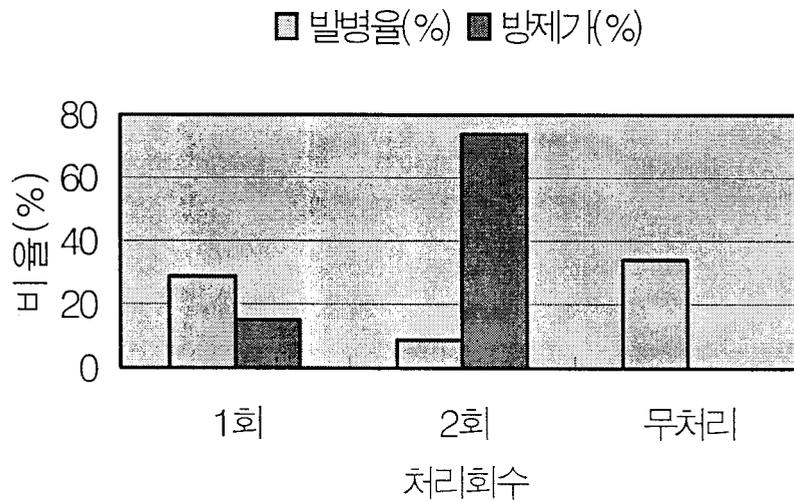


Fig. 5. Antagonistic effect of R19 treated by soil drenching on rot of radix balloon flower in field.

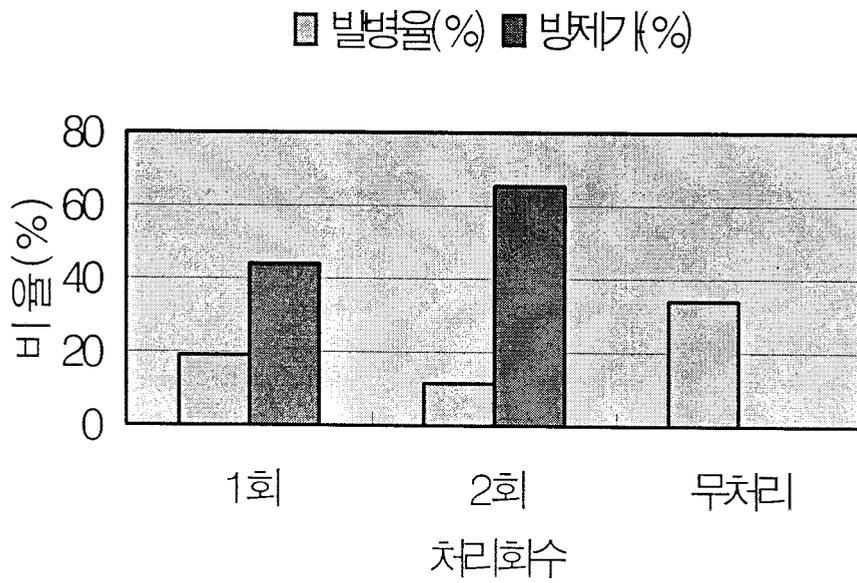


Fig. 6. Antagonistic effect of JS4 treated by soil drenching on radish rot of balloon flower in field.

또한 길항균의 처리회수를 2회로 증가시킨 결과, 그림4, 5, 6
에서와 같이 길항균의 처리효과가 현저하였는데 특히 *Trichoderma*
균주인 TR01 보다 *Bacillus* 균주인 R19 및 JS4 균주의 길항효과가
높은 방제가를 나타내어 길항균 처리회수를 늘림으로써 길항균에의
한 방제가능성이 높아 보였다.

한편 그림7에서 볼 수 있는 것 처럼 길항균을 관주처리하였을
때 뿌리썩음병과 동종의 균에 의해 발생하는 지상부의 줄기마름병이
진전되어 뿌리로 침입하는 것을 저지하여 뿌리를 보호하는 현상을
볼 수가 있었는데 이는 관주처리한 길항균이 뿌리표면에 정착하여
병원균의 생육과 침입을 억제한 결과로 판단된다.

다년생도라지에 대한 길항균의 발병억제효과를 알기위하여 관주
처리한 결과는 표4과 같다. 다년생도라지의 경우 길항균을 처리하지
않은 것은 뿌리썩음병의 발생이 극심한데 비하여 길항균을 관주한
것은 병발생이 현저히 적어 길항균의 효과가 크게 인정되어 길항균
에 의한 다년생도라지 제배가능성이 인정되었다

Table 4 Effects of antagonists treated by soil drenching on radix rot of longterm growing balloonflower

Cropping years	TR01			R19			J51		
	Treat.	Control	Efficacy	Treat.	Control	Efficacy	Treat.	Control	Efficacy
4	33.3*	47.1*	29.2	45.5	100	54.5	-	-	-
5	20.0	50.0	60.0	46.2	100	53.8	53.3	55.6	4.1
6	25.0	80.0	68.7	37.5	60.0	37.5	7.7	47.8	83.8
7	37.5	75.0	50.0	50.0	75.0	33.3	20.0	61.5	67.4
8	33.3	34.8	4.3	31.3	75.0	53.2	18.8	60.0	68.6
9	16.7	57.1	70.7	37.5	45.5	17.5	33.3	60.0	44.5

* Infected radix rot (%).

Efficacy means control value of radix rot.

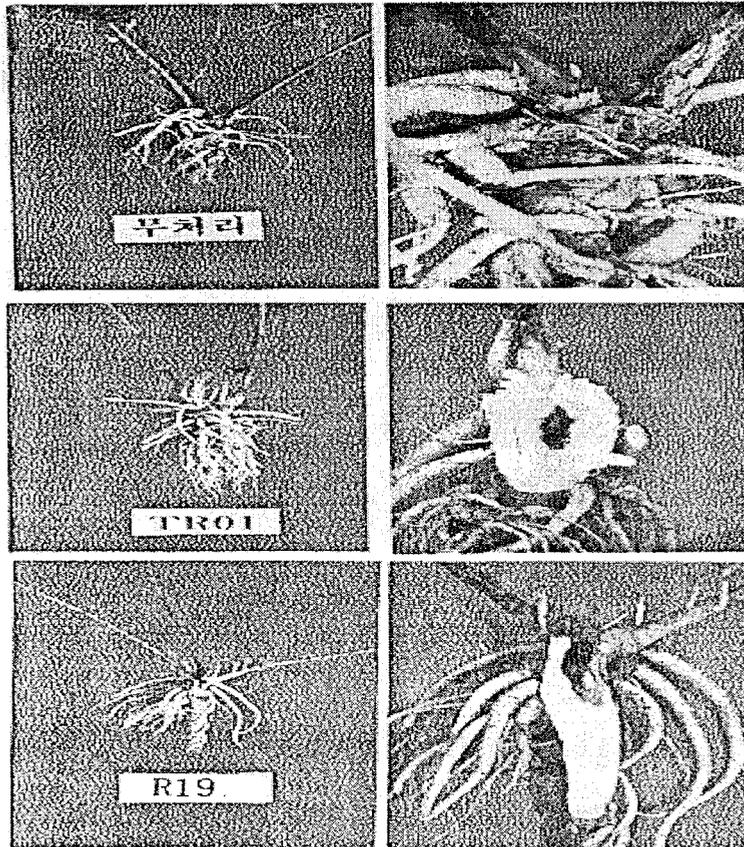


Fig. 7. Effect of antagonists on suppression of radix rot of balloon flower. The radix of control was infected from stem rot, however, those of TR01 and R19 were healthy due to inhibition by antagonists.

길항균의 배양액 처리효과는 Kommedahl and Windels(1978)의 종자처리에 의한 완두 잘록병 억제, Henis 등(1978)의 무의 *Rhizoctonia solani* 잘록병의 방제에 *Trichoderma harzianum*을 밀기울에 배양하여 토양처리했을 때와, Howell and Stipanovic(1979)은 *Pseudomonas fluorescens*는 항생물질 pyrrolnitrin을 생산하여 *Rhizoctonia solani*에 의한 목화 잘록병을 방제하는데 효과적이었다고 하였고, 또한 Kloepper and Schroth(1981)는 길항세균의 분말제형을 개발하여 세균의 생존을 검토하였으며, Ayers and Papavizas(1963)는 강남콩의 근권에서 분리한 자색침전물형성 세균이 *Rhizoctonia solani*를 억제한다고 하였다.

제4절 요약

도라지 근부병균에 길항작용을 하는 *Trichoderma harzianum*은 균사를 갇아서 양분을 흡수하여 병원균을 사멸하게 하였으며 *Bacillus*속 세균은 항균물질을 분비하여 병원균의 균사를 용해시키는 작용을 하였다.

포장에서 길항균의 효과 확인은 1년차 중간성적이지만 무처리구에 비하여 길항균 처리구에서 병발생이 감소되었다. 길항균 배양액의 관주처리에 의한 도라지뿌리썩음병 발병억제 가능하였는데, 길항균을 2회 관주한 처리구에서 방제가가 73.8%를 나타내어 방제가능성이 보였다. 길항균을 처리한 경우 줄기마름병이 뿌리썩음병으로 진전되는 것을 저지하여 병해발생을 억제하였다. 길항균처리에 의한

다년생도라지의 재배가능성이 높아졌다.

제5절 참고문헌

1. Ainsworth, G.C.F.K. Sparrow and A.S. Sussman. 1973. The fungi an advanced treatise volume IVB. 504pp.

2. Anagnostakis, S.L. and Day, P. R. 1979. Hypovirulence conversion in *Enthothia parasitika*. Phytopathology 69 : 1226 - 1229.

3. Ayers, W. A. and Papavizas, G. C. 1963. Violet-pigmented pseudomonads with antifungal activity from the rhizosphere of beans. Appl. Microbiol. 11 : 533 - 538.

4. Beagle-Ristaino, J. E. and G. C. papavizas. 1985. Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. Phytopathology 75 : 560-564.

5. Burdsall, H.H. Jr., Hoch, H. C., Boosalis, M. G. and Setliff, E. C. 1980. *Laetisaria arvalis* (Aphylllophorales, Corticiaceae): A possible biological control agent for *Rhizoctonia solani* and *Phythium* species.. Mycologia 72 : 728 - 736.

6. Castanho, B. and Butler, E. E and Shepherd, R. J. 1978. The

association of double-stranded RNA with *Rhizoctonia decline*.
Phytopathology 68 : 1515-1519.

7. Castanho, B. and Butler, E. E. 1978. *Rhizoctonia decline*: a degenerative disease of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 68 : 1505-1510.

8. Castanho, B. and Butler, E. E. 1978. *Rhizoctonia decline*: studies on hypovirulence and potential use in biological control. Phytopathology 68 : 1511-1514.

9. Dupler, M. and R. Baker. 1984. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil Phytopathology. 74 : 195-200.

10. Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Henis. 1982. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-Scanning electron microscopy and luorescence microscopy. Phytopathology 73 : 85-88.

11. Elad, Y., Katan, J. and Chet, I. 1980. Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in Potatoes. Phytopathology 70 : 418-422.

12. Hadar, Y., Harman, G. E. and Taylor, A. G. 1984. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils

for biological control of seed rot caused by *Phythium* spp.
Phytopathology 74 : 106 - 110.

13. Harman, G. E., I. Chet and R. Baker. 1981. Factors affecting
Trichoderma hamatum applied to seed as a biocontrol agent.
Phytopathology 71 : 569-572.

14. Henis, Y., A. Ghaffar and R. Baker. 1978. Intergrated
control of *Rhizoctonia*
solani damping-off of radish : Effect of successive plantings,
PCNB and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease.
Phytopathology 68 : 990-907.

15. Howell, C. R and R. D. Stipanovic. 1979. Control of
Rhizoctonia solani on cotton seedlings with *Pseudomonas*
fluorescens and with an antibiotic produced by the bacterium.
Phytopathology 69 : 480-482.

16. Kim, W. G., Cho, W. D. and Lee, Y. H. 1992. Anastomosis
groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from
ballon flower. Korean J. Plant Pathol. 8 : 159-163.

17. Kim, W. G., Cho, W. D. and Lee, Y. H. 1994. Anastomosis
groups and cultural characteristics of *Rhizoctonia solani*
isolates from crops in Korea.. Koren J. Mycol. 22 : 309-324.

18. Kloepper, J. W. and Schroth, M. N. 1981. Development of a powder formulation of Rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology* 71 : 590-592.
19. Kommedahl, T. R and C. E. Windels. 1978. Evaluation of biological seed treatment for controlling root disease of pea. *Phytopathology*. 68 : 1087-1095.
20. Kuter, G. A., E. B. Nelson, H. A. J. Hoitink and L. V. Madden. 1983. Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to *Rhizoctonia* damping-off.. *Phytopathology* 73 : 1450-1456
21. Lewis, J. A. and G. C. Papavizas. 1985. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. *Phytopathology* 75 : 812-817.
22. Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. 1985. Effect of mycelial preparation of *Trichoderma* and *Gliocadium* on populations of *Rhizoctonia solani* and incidence of damping-off. *Phytopathology* 75 : 812-817.
23. Lin, Y. S. and Cook, R. J. 1979. Suppression of *Fusarium roseum* 'Avanaceum' by soil microorganisms. *Phytopathology* 69 : 384-388.

24. Marois, J. J., Mitchell, D. J. and Sonada, R. M. 1981. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. *Phytopathology* 71 : 1257-1260.
25. Moody, A. R. and Gindrat, D. 1977. Biological control of cucumber black root rot by *Gliocladium roseum*. *Phytopathology* 67 : 1159-1162.
26. Nelson, E. B., G. A. Kuter and H. A. J. Hoitink. 1983. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* 73 : 1457-1462.
27. Odvody, G.N., Boosalis, M. G. and Kerr, E.D. 1980. Biological control of *Rhizoctonia solani* with a soil-inhabiting basidiomycete. *Phytopathology* 70 : 655-658.
28. Ogoshi, A. 1972. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn with hyphal anastomosis. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 38 : 117-122.
29. Ogoshi, A. 1975. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages. *Rev. Plant Prot. Res. Japan.* 8 : 98-103.
30. Ogoshi, A. 1976. Studies on the grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn with hyphal anastomosis and on the perfect stage of

groups. Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. C : 30 : 1-63.

31. Olsen, C. M and K. F. Baker. 1968. Selective heat treatment of soil and its effect on the inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. Phytopathology. 58 : 79 - 87.

32. Papavizas, G. C., M. T. Dunn, J. A. Lewis and J. Beagle-Ristaino. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. Phytopathology. 74 : 1171-1175.

33. Tu, J. C. 1980. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 70 : 670-674.

34. Weller, D.M. 1983. Colonization of wheat roots by fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. Phytopathology 73 : 1548-1553.