

취나물 점무늬병을 억제하는 *Paenibacillus polymyxa* JE201의 생물학적 특성*

안성호** · 김다연*** · 박병용**** · 한지희***** · 이상엽*****

Biological Characterization of *Paenibacillus polymyxa* JE201 with Antifungal Activity Against Fungal Leaf Spot Disease of *Aster scaber*

Ahn, Seong-Ho · Kim, Dayeon · Park, Byeng-Yong · Han, Ji Hee · Lee, Sang-Yeop

Koreans consume cham-chwi (*Aster scaber* Thunb.) as a common vegetable in a meal because of its bitter taste and rich flavor. In addition, it is the crop with the most residual pesticides detected in the last five years. Among the detected pesticides, the most common was azoxystrobin, which is a drug used primarily to prevent the leaf spot disease of *A. scaber* caused by *Septoria* sp.. We isolated the microorganisms that antifungal activity against *Septoria* sp.. The optimum incubation conditions (temperature, pH and growth medium) were examined for the growth of the isolates. Additionally, cellulase and protease activity and siderophore production ability were also examined. According to 16S rRNA sequencing of the isolate was affiliated to *Paenibacillus polymyxa* JE201. Largest inhibition zone measuring up to 9.2 mm was observed for *P. polymyxa* JE201 after 7 days of inoculation. *P. polymyxa* JE201 strain showed antifungal activity against various fungal phytopathogens *Altaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Ph. drechesleria*, *Rhizoctonia solani* and *Stemphylium* sp.. Based on these observations, *P. polymyxa*. JE201 can be used as a promising biocontrol agent for preventing the leaf spot disease and other phytopathogens.

Key words : *aster scaber*, biocontrol, leaf spot, *Paenibacillus polymyxa*

* 본 연구는 국립농업과학원 연구과제(과제번호 PJ012595)의 연구에 의해 이루어졌습니다.

** Corresponding author, 국립농업과학원 농업미생물과 농업연구사(ash0510@korea.kr)

*** 농촌진흥청 국립농업과학원 환경개선미생물연구단 농업연구사

**** 농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과 농업연구관

***** 농촌진흥청 국립농업과학원 기획조정과 농업연구사

***** (사)한국농자재시험연구기관협회 본부장

I. 서 론

취나물은 삼국유사에 기록되어 있을 정도로 우리나라에서 오랫동안 먹어온 산나물로서 현재에는 건강식품으로 애용하고 있다. 산나물에 대한 관심은 1980년대 초반부터 증대되어 노지재배와 하우스 재배를 통해 고품질의 산채류를 생산함으로써 농가 소득을 증대하려는 노력이 주로 재배적인 측면에서 시도되어왔다. 일반적으로 잘 알려진 취나물은 참취이며, 그 외에도 개미취, 곰취 등이 식용으로 재배되고 있다. 취나물은 각종 비타민뿐만 아니라 베타카로틴 등의 함량이 높은 것으로 알려져 있으며(Shin et al., 1998), 경남 고성, 전남 광양 및 충남 부여 등의 지역에서 매년 약 7,300 ton 가량 생산되고 있다(Korea Forst service, 2016). 2017년 농산물 품질관리원에서 조사된 바에 따르면 지난 5년간 잔류농약 검출 건수가 가장 높은 채소는 취나물(538건)이었고, 주로 azoxystrobin이 검출되었으며, 건조 취나물에서는 methoxyfeozide, chloranfaniprole과 azoxystrobin 등의 농약이 검출되었다(Gang et al., 2017). 그만큼 취나물을 재배기간 동안 농약을 많이 사용하여 잔류허용치 이상으로 검출된 경우가 많아 농약 사용에 주의를 요하고 있다. 주로 검출된 azoxystrobin 성분은 strobilurin계 농약으로 취나물에서는 주로 점무늬병을 방제하기 위해 사용되고 있다. 취나물에 발생하는 점무늬병의 원인균은 *Septoria* sp. 로 보고되어 있으며(Shin and Sameva, 1999), 이 균은 토마토를 비롯하여 수많은 작물의 잎에 반점이나 마름증상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 취나물에서 점무늬병은 5월부터 10월까지 수확기 전반에 걸쳐 발생하고 있으며, 병든 식물체 내나 병자각 형태로 토양에서 월동하기 때문에 취나물과 같이 한 포장에서 지속적으로 재배하는 작물의 경우 피해가 더욱더 커지는 경향이 있어 문제가 점차 커지고 있다. 취나물 점무늬병을 방제하기 위한 농약으로는 difenoconazole, polyoxin B, azoxystrobin 등이 등록되어 있으나, 생물학적 방제제는 유기농업자재인 세레나데 맥스(바이엘크롭사이언스) 1종만이 등록되어 있는 실정이다.

작물보호제는 화학농약과 생물농약으로 구분되고, 생물농약은 생화학적 농약과 기타 방제제로 구분된다. 생물학적 농약은 효소, 페로몬, 호르몬, 천연 식물생장조절제와 같은 생화학 농약과 진균, 세균, 바이러스, 원생동물 등을 이용하는 미생물 농약으로 나눌 수 있다. 이 중 미생물 농약은 토양이나 식물체 등 자연생태에 존재하는 미생물을 이용하여 병, 해충을 억제하고, 농작물의 생장을 촉진하기도 한다고 알려져 있다. 우리나라에서의 생물농약은 살아있는 미생물, 천연에서 유래된 추출물 등을 이용한 생물학적 방제제”로 정의하고 있으며, 그 중 미생물 농약을 “진균, 세균, 바이러스 및 원생동물 등 살아있는 미생물을 이용한 농업용 미생물 방제제”로 정의하고 있다(Kim et al., 2009). 미생물 농약으로 주로 연구되고 있는 것은 다양한 기작으로 병원균을 방제하는 세균으로 *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* 속 등이 있다(Whipps, 2001). 최근에는 *Paenibacillus* 속 세균이 작물 생육촉진 및 병 방제 관련 다양한 기작을 나타낸다는 사실이 여러 연구자에 의해 보고되고

있다. *Paenibacillus* 속 세균은 여러 종류의 항진균 및 항세균 물질을 생산하며(Raza et al., 2009), 균주에 따라서는 siderophore를 생성하고(Timmusk, 2003), cellulose, mannase, xylanase, chitinase와 같은 가수분해 효소를 생성하며, *Rhizoctonia solani* 등의 병원균에 대한 방제 활성을 보이는 것으로 알려지면서 식물병 방제를 위한 활용 가능성이 증대되고 있다(Karpunina et al., 2003). 그중 *P. polymyxa*는 작물의 내염성을 높이거나, 가뭄에 대한 내성을 증진시키기도 한다.

본 연구는 충청남도 보령시 미산면의 취나물 농가에서 취나물 점무늬병균 *Septoria* sp. BM2를 직접 분리하였고, 전국 12개 지역의 토양에서 분리한 세균을 이용하여 취나물 점무늬병균에 대해 항균활성을 나타내는 토양미생물을 선발하고, 선발한 균주는 16S rRNA sequencing을 통해 동정하였다. 그 결과 항균활성이 높은 *Paenibacillus polymyxa* JE201을 선발하였다. 선발한 균주 *P. polymyxa* JE201의 특성을 분석하고, 항균활성 스펙트럼을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 취나물 점무늬병균과 길항미생물 분리 및 동정

취나물 점무늬병균은 충청남도 보령시 미산면의 취나물 재배농가에서 점무늬병반을 나타내는 잎을 채취하여 병원균을 분리하였다. 분리한 병원균은 BM2로 명명하여 실험에 사용하였다. 시료의 병든 조직과 건전 조직의 경계 부위를 5×5 mm 크기로 절단하여 2% 차아염소산나트륨(NaClO) 용액으로 표면살균하고, 멸균수로 3회 세척한 후 멸균 filter paper를 이용하여 물기를 제거하고 water agar 배지에 치상하였다. 병조직을 치상한 배지는 20℃ 조건에서 배양하였다. 배양 7~10일 후 잎 절편 표면에 생성된 병자각을 해부현미경을 이용하여 확인하고, 병자각에서 나출된 포자를 수거하여 광학현미경을 이용하여 *Septoria* 균을 확인하였다. 병원균의 단포자를 분리하여 potato dextrose agar (PDA) 배지에 옮겨 배양하고, 15℃에 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 1).

취나물 점무늬병균에 항균활성을 가지는 길항미생물을 분리하기 위해 국내 12개 지역(충남 청양, 논산, 부여, 보령, 전북 순창, 정읍, 익산, 전남 담양, 장성, 순천, 광양, 광주광역시)에서 2016년부터 2017년까지 농가 포장의 작물 뿌리, 근권 및 bulk soil 50여점을 채취하였다. 채취한 토양시료 3 g을 멸균생리식염수 30 mL에 현탁한 후 실온에서 10분간 정지하였다. 토양현탁액의 상등액 부분을 회수하여 10⁶배까지 연속 희석하여 희석액 100 µL을 Nutrient agar (NA, BD difco) 배지, tryptic soy agar (TSA, BD difco)와 1/10 TSA 배지에 도말한 후 25℃에서 48시간 배양하여 형성된 콜로니를 순수분리하였다.

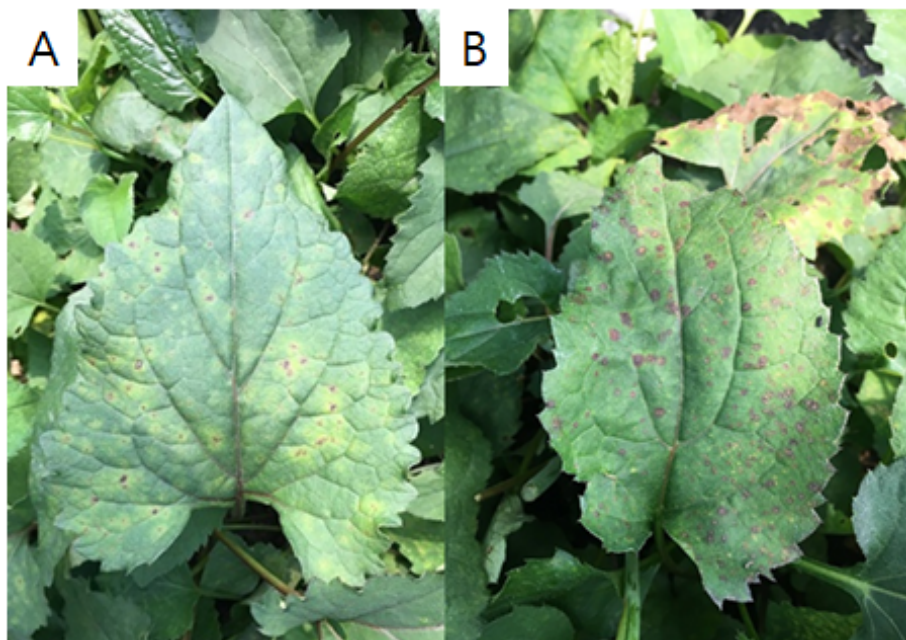


Fig. 1. Symptoms of leaf spot disease on *Aster scaber* leaves caused by *Septoria* sp.. A: Small spots on leaves at the early stage of infection, B: Enlarged lesions at the later stage of infection.

분리한 병원균 BM2를 동정하기 위해 형태적인 특성을 조사하고, 18S ribosomal DNA의 염기서열을 분석하였다. 분리한 점무늬병균의 total DNA를 추출하기 위해 genomic DNA extraction kit (TaKaRa)을 이용하였다. 유전자를 증폭시키기 위해 ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer를 사용하였다(White et al, 1990). 증폭된 PCR 산물은 (주)마크로젠에 의뢰하여 18S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였고, BLASTN 프로그램으로 NCBI database의 18S rRNA sequence과 비교하여 동정하였고, MEGA v.6.06 (MEGA software, 2015) 프로그램을 이용하여 계통수를 작성하였다.

취나물 점무늬병 길항미생물 중 가장 항균활성이 강한 균주 JE201을 선발하였고, 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통하여 동정하였다. 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머는 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 와 1492 R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였다(Smibert et al., 1994). 증폭된 PCR 산물은 (주)마크로젠에 의뢰하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였고, 그 결과를 BLASTN 프로그램을 이용하여 NCBI database와 Ezbiocloud database의 16S rRNA sequence와 비교하여 동정하였고, MEGA v.6.06 (MEGA software, 2015) 프로그램을 이용하여 계통수를 작성하였다.

2. 취나물 점무늬병균의 병원성 검정

취나물 잎을 대상으로 병원성을 확인하기 위해 건전한 취나물 잎에 70% 에탄올을 분무, 무균대에서 건조하여 표면살균 하였다. 분리한 병원균 *Septoria* sp. BM2 균주는 취나물 잎을 이용하여 만든 leaf agar 배지에 25°C 에서 7일간 배양하여 포자를 발생시켰다. 멸균수를 이용하여 포자를 회수하여 1×10^7 spore/mL 농도로 포자현탁액을 만들었다. 표면살균 한 취나물 잎의 표면을 멸균한 바늘로 찔러 상처를 낸 잎과 상처가 없는 잎에 포자현탁액을 10 μ L 씩 접종하였다. 그 위에 멸균한 molten agar (10% V8 juice, 1.5% agar)를 10 μ L를 증충접종 하였다. 접종한 잎은 습실처리 한 투명 플라스틱 박스에 넣고 25°C 배양기에 두면서 24h (14 Light/ 10 Dark) 조건에서 습도와 온도를 유지시켰다. 접종 후 7일차에 잎에 생성된 병반을 확인하였다.

3. 취나물 점무늬병에 대해 항균활성을 나타내는 균주 선발

취나물 점무늬병균에 대하여 항균활성을 나타내는 미생물을 선발하기 위해 대치배양 (replacement cultural)을 실시하였다. 점무늬병균은 직접 분리한 *Septoria* sp. BM2 균주를 사용하였다. 포자생성은 Leaf assay법(Anteneh et al., 2013)을 응용하였다.

Septoria sp. BM2의 균체를 그라인더를 이용하여 취나물 잎배지(멸균한 취나물 잎을 petri dish에 넣고 60°C 로 식힌 water agar를 분주하여 제조)에 접종하여 25°C 에서 7일간 배양하여 포자를 발생시킨 후 멸균수를 이용하여 포자를 수확한 다음, 1×10^6 conidia/mL 농도로 희석하여 PDA 배지에 200 μ L씩 분주하여 고르게 도말하고, 토양에서 분리한 세균을 TSB에 배양조건은 28°C, 180 rpm 조건에서 48h 배양하였다. 배양액을 직경 8 mm의 멸균한 paper disc (49005010, Advantec)에 50 μ L씩 접종한 다음 30분간 건조시키고 병원균 포자를 도말한 PDA 배지에 치상하여 25°C 에서 7일간 배양하였다. 7일 후 paper disc 주변에 형성된 균사생육저지대를 측정하였다. 선발된 균주 JE201은 KACC에 기탁하여(KACC 81114BP) 보존한 다음, 분양받아 사용하였다.

4. 배지에 따른 JE201의 항균활성 검정

선발한 균주 JE201의 배양조건에 따른 항균활성의 변화를 조사하기 위해 배지종류를 달리하여 배양한 후 대치배양을 통해 항균활성을 보았다. R2A broth, Luria-Bertani broth (LB), nutrient broth (NB), TSB와 NYDB 배지를 사용하여 항균활성 능력의 차이를 조사하였다. 배양조건은 28°C, 180 rpm 조건에서 48h 배양하였다. 배양액을 직경 8 mm의 멸균한 paper disc에 50 μ L씩 접종한 다음 병원균 *Septoria* sp. BM2 포자를 도말한 PDA 배지에 치상한 뒤,

25°C 배양기에 7일간 배양한 다음 균사생육저지대를 측정하여 항균활성을 조사하였다.

5. 선발균주의 배양 조건 특성 검정

선발균주의 최적 배양조건을 찾기 위해 배지, 온도와 pH조건을 다르게 하여 배양하였다. 배지는 R2A, LB, NB, TSB와 NYDB 를 사용하였고, 선발균주는 1% (v/v)씩 접종하여 미생물 성장분석기 Bioscreen C (Bioscreen)을 이용하여 흡광도값(OD₆₀₀)을 2시간마다 조사하여 최적 배지와 시간을 선정하였다. pH에 따른 성장조사는 TSB 배지에 1N NaOH와 1N HCl을 이용하여 pH를 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조절하고, 선발한 균주를 1% (v/v) 접종하여 같은 조건에서 배양하였다. 배양액 1 mL을 멸균수를 이용하여 단계희석하여 TSA 배지에 도달한 다음 28°C에서 48h 배양하고, colony-forming unit (CFU)를 조사하였다. 배양온도 조사는 TSA배지에 선발균주를 희석으로 접종하여, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 40, 50°C 조건에서 7일간 배양하여 자란 균주의 폭(mm)을 측정하였다.

6. 가수분해 효소 활성 및 siderophore 생산능력 검정

선발균주 JE201의 가수분해효소 활성 능력을 조사하기 위해 셀룰로오스 분해능력과 단백질 분해능력을 검정하였다. 셀룰로오스 분해 능력은 CMC agar (KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, MnSO₄·H₂O 0.01 g, NH₄NO₃ 0.3 g, CMC 10.0 g, agar 12.0 g, pH 7.0 per Liter) 배지에 JE201 균주를 희석접종 한 후 28°C에서 5일간 배양한 다음 0.2% Congo Red로 30분간 염색한 후 1N NaCl을 이용하여 세척한 다음 생성된 clear zone을 측정하여 분해능력을 검정하였다.

단백질 분해 능력은 skim milk agar (Skim Milk powder 28.0 g, Tryptone 5.0 g, Yeast extract 2.5 g, Dextrose (Glucose) 1.0 g, agar 15.0 g, pH 7.0 per Liter) 배지에 JE201 균주를 희석접종한 후 28°C에서 5일간 배양한 다음 clear zone을 측정하여 분해능력을 검정하였다(Alnahdi, 2012).

Siderophore 생산능력을 확인하기 위해 chrome azurol S agar (CAS) 배지를 제조(Schwyn and Neilands, 1987)하여 실험에 사용하였다. Petri dish에 TSA 배지와 CAS agar 배지를 반으로 절단하여 중앙부분의 배지가 잘 맞닿도록 잘 붙인 후 TSA 배지 상에 JE201 균주를 희석 배양한 다음 28°C에서 14일간 배양한 다음 CAS 배지 부분에 오렌지색으로 변화된 부분의 폭을 측정하여 siderophore 생성유무를 검정하였다(Kim et al., 2013).

7. 선발균주의 점무늬병 방제효과 포장검정

P. polymyxa JE201 균주의 취나물 점무늬병 방제효과를 검정하기 위하여 취나물을 재배

하고 있는 시험포장에서 실험을 진행하였다. JE201 균주를 NYDB 배지에 28°C, 180 rpm, 48h 조건으로 배양한 다음, 지하수를 이용하여 10배 희석하여 사용하였다. 처리구는 총 6반 복으로 처리구(1.5×2.2 m)마다 JE201 현탁액 1 L를 3일 간격으로 3회 분무 살포하였으며, 병 발생은 최종 처리 후 1주일 뒤 병반면적률로 조사하였다. 무처리구로는 지하수와 NYDB 배지를 사용하였고, 대조구로는 취나물 점무늬병에 사용 가능한 생물농약인 세레나테 맥스 (바이엘크롭사이언스)를 사용하였다. 발병도는 오이 점무늬병 조사식을 참고하였다.

8. 선발균주의 항균활성 스펙트럼 조사

P. polymyxa JE201 균주의 항진균활성 스펙트럼을 조사하기 위해 10종의 식물병원성 진균에 대한 항균력을 검정하였다. 농촌진흥청 국립농업과학원(KACC)에서 보존하고 있는 식물병원성 진균 10종을 분양받아 실험에 사용하였다.

실험에 이용한 병원균은 작물의 지상부 및 지하부에 병을 일으키는 병원균을 대상으로 실험을 진행하였다. 사용한 병원균은 *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Ph. drechesleri*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum* 과 *Stemphylium* sp. 을 실험에 사용하였다(Table 1).

PDA 배지 중앙에 식물병원균을 배양한 배지를 5 mm cork borer를 이용하여 중앙에 치상하고, TSB배지에 배양한 *P. polymyxa* JE201 균주를 멸균한 paper disc에 50 µL씩 접종한 다음 건조 후 치상하였다. 25°C 조건에서 7일간 배양한 후 저해대를 육안으로 관찰하였다.

Table 1. Phytopathogenic fungi used for screening of antifungal activity

Scientific name	KACC No.	Disease name
<i>Alternaria</i> sp.	KACC 42698	Leaf spot
<i>Botrytis cinerea</i>	KACC 45074	Gray mold
<i>Collectotrichum acutatum</i>	KACC 40042	Anthraconse
<i>Fusarium oxysporum</i>	KACC 40032	Fusarium walt
<i>Phytophthora capsici</i>	KACC 40157	Phytophthora blight
<i>Phytophthora drechesleri</i>	KACC 40196	Phytophthora blight
<i>Rhizoctonia solani</i>	KACC 40101	Root rot
<i>Sclerotium rolfsii</i>	KACC 48132	Southern blight
<i>Sclerotium cepivorum</i>	KACC 40582	Sclerotina rot
<i>Stemphylium</i> sp.	KACC 42222	Leaf blight

Ⅲ. 결 과

1. 취나물 점무늬병균과 선발 미생물의 분리 및 동정

취나물 점무늬병 시료에서 병원균의 포자를 분리하여 현미경으로 관찰한 결과 분생포자의 형태는 *Septoria* sp. 특유의 길고 가늘며, 약간 휘어진 형태인 것을 확인하였다. 분리한 병원균 BM2의 분생포자 크기는 $49 \pm 4 \times 1.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 이었으며, 격막은 2~4개가 관찰되었다 (Table 2). 병원균은 malt extract agar (MEA) 배지상에서 13~18 mm/19d의 크기를 나타냈으며, 짙은 갈색과 검은색을 띠는 것을 확인하였다(Fig. 2).

Table 2. Comparison of morphological characteristics between the BM2 and *Septoria* species

Structure*	Characteristics		
	BM2	<i>Septoria convolvuli</i>	<i>Septoria phlogis</i>
Conidia size (w × d, μm)	43 ~ 55 × 1.5 ~ 2	22 ~ 55 × 1.8 ~ 2.5	22 ~ 60 × 1.5 ~ 2
Conidia shape	Filiform-cylindrical straightly to slightly curved	Filiform-cylindrical straightly to slightly curved	Filiform-cylindrical straightly to slightly curved
Septate	2 ~ 4	1 ~ 5	0 ~ 4
Colony size on MEA	13 ~ 18 mm/19d	5 ~ 11 mm/25d	12 ~ 17 mm/19d
Colony color	Brown to black	Brown to black	Brown to black

* All structures were investigated on Malt Extract Agar (MEA) plate incubated in 25°C on microscope.

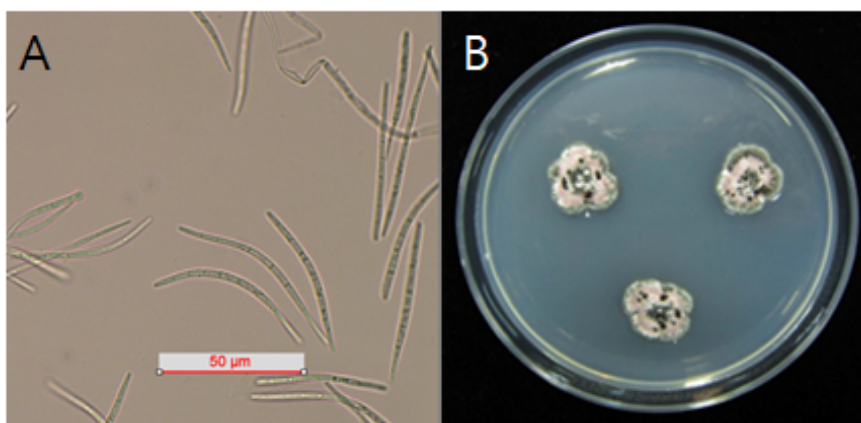


Fig. 2. *Septoria* sp. BM2 conidia and mycelia on MEA. A: Conidia of *Septoria* sp. BM2, B: Mycelia of *Septoria* sp. BM2 on malt extract agar (MEA) on 7 day.

5.8S rDNA 유전자 염기서열을 이용하여 계통수를 분석한 결과 *Septoria* sp.인 것으로 동정되어 *Septoria* sp. BM2로 명명하여 실험에 사용하였다(Fig. 3).

길항 미생물 JE201의 16S rRNA 염기서열을 조사한 결과 1,327 bp의 염기서열이 결정되었고, BLASTN 프로그램을 이용하여 Ezbiocloud database에서 유사성검색을 진행한 결과 *Paenibacillus polymyxa* ACTT842 (t) 균주와 99.77% 일치하여 *P. polymyxa* JE201로 동정하였다(Fig. 4).

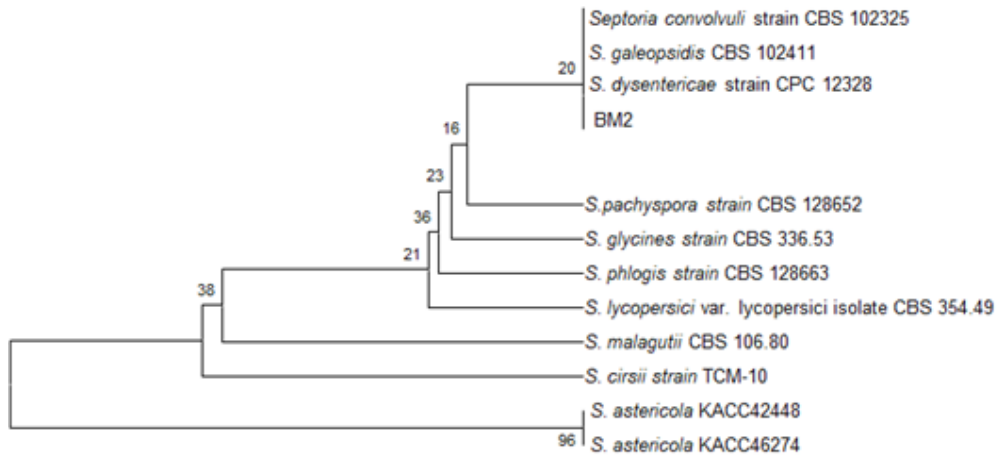


Fig. 3. Phylogenetic tree based on 5.8S rDNA sequences showing the position of BM2 and related fungal taxa.

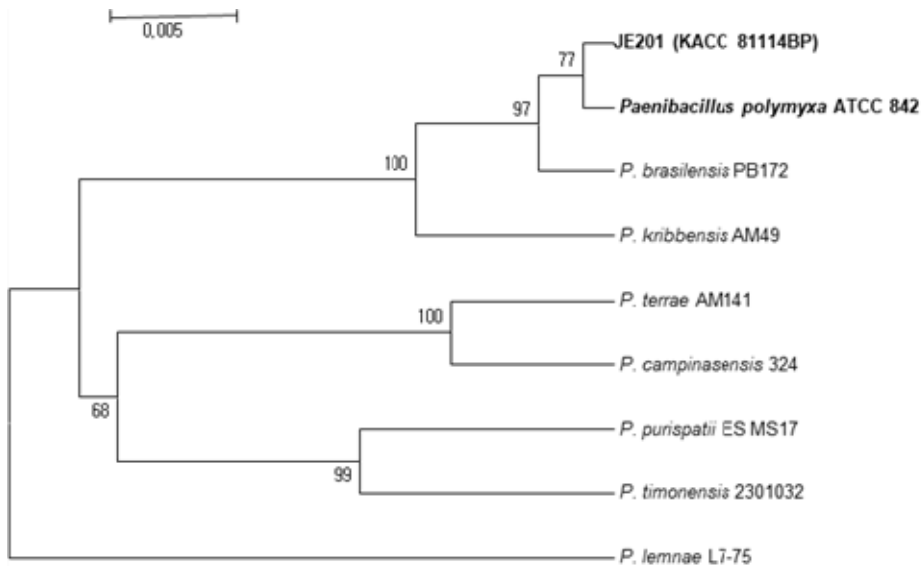


Fig. 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences showing the position of JE201 (KACC81114BP) and related bacterial taxa.

2. 취나물 점무늬병균의 병원성 검정

분리한 병원균 *Septoria* sp. BM2를 이용하여 취나물에 대한 병원성을 검정한 결과, 병원균 접종 7일 후부터 상처를 내고 포자를 접종한 부위에서 갈색의 병반이 관찰되었고, 10일 후에는 병반이 5 mm 이상 진전되었으며, 잎의 뒷면에서도 병반이 확대된 것을 확인할 수 있었다. 병반 부위에서 발생한 병자각과 포자는 헤부현미경을 이용하여 관찰하고, 병자각을 분리하여 광학현미경을 이용하여 형태를 관찰하고, 병자각 안에 *Septoria* sp. BM2의 포자와 같은 형태의 분생포자가 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 5).

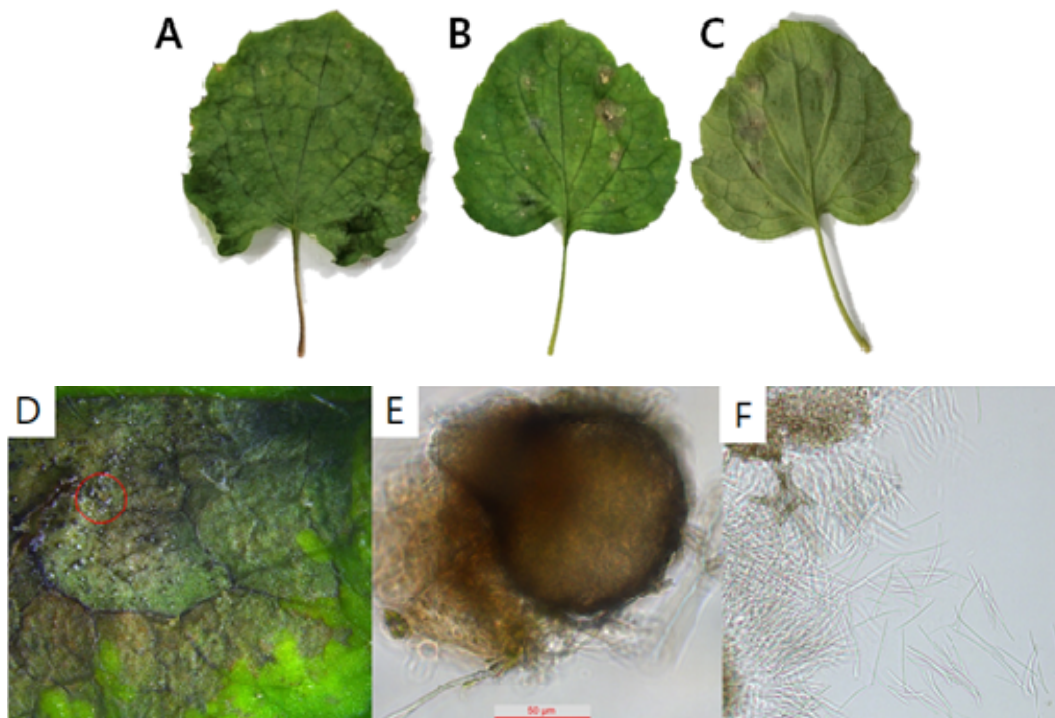




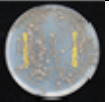
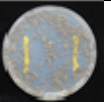




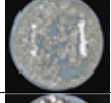
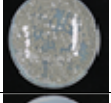


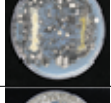
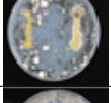

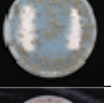






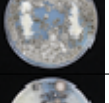

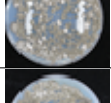
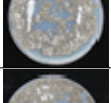
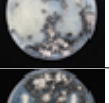

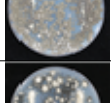


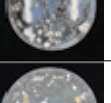

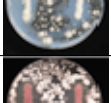
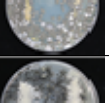
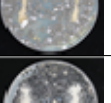
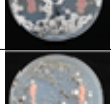
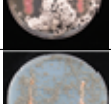
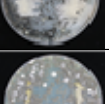

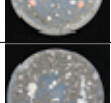

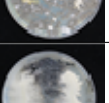



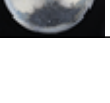

Fig. 5. Pathogenicity test on unwounded or wounded. A: Control, B: *Aster scaber* leaves inoculated with *Septoria* sp. BM2 (front side), C: *Aster scaber* leaves inoculated with *Septoria* sp. BM2 (reverse side), D: Pycnidium and conidia on the leaf, E: Pycnidium of leaf spot symptom, F: Conidia in the pycnidium. The wounding was done by perforating the leaf by needle.

3. 항진균활성 균주 선발

취나물 점무늬병균 *Septoria* sp. BM2 균주에 대한 토양세균의 항진균활성을 조사한 결과

256개의 미생물 중 23개의 미생물만이 항균활성을 나타냈으며, 이 중 세균 주위에 병원균의 균사생장이 억제되는 것을 육안으로 관찰하였고, 균사생장 억제력이 가장 큰 JE201 균주를 선발하여 이후 실험에 사용하였다(Table 3).

Table 3. Dual culture test on strains by *Septoria* sp. BM1 and BM2

Strains	BM1	BM2	Strains	BM1	BM2
Control			BMr106		
JE201			BMr201		
GJ805			BMr202		
GJ807			BMr203		
IS404			BMr302		
JE706			GJ101		
JE708			SC211		
NS404			SC307		
BY102			YS302		
SA501			YS503		
BMr101			CY602		
BMr105			CY607		

4. JE201 균주의 배지에 따른 항균활성 변화

배지에 따른 JE201 균주의 항균활성의 변화를 조사한 결과, NYDB 배지에서 배양한 결과 저해대가 11.3 mm로 가장 강하게 나타났으며, NB와 TSB에서는 9.2 mm로 나타났다(Fig. 6).

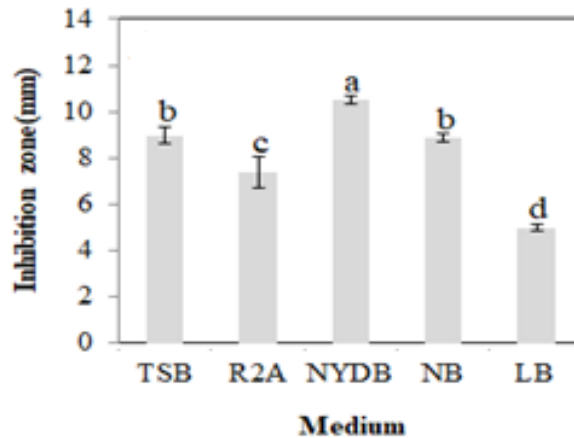


Fig. 6. Effect of antifungal activities of *P. polymyxa* JE201 on different medium. Different letters denote significant differences among isolates, p-value < 0.05 using Duncan's multiple range test.

5. JE201 균주의 배양조건 조사

P. polymyxa JE201 균주의 경우 최적 생육온도는 28°C 이었으며, 25~40°C 조건에서 생육이 왕성하였으나, 50°C 이상에서는 생육하지 못하였다. 배지에 따른 성장속도를 관찰한 결과 TSB 배지에서 흡광도(OD₆₀₀) 값이 가장 높게 측정되었으며, 성장속도도 가장 빠른 것으로 판단되었다. pH에 따른 성장 변화를 조사한 결과 pH 7.0~9.0의 범위에서 왕성한 생육을 보였다. JE201 균주의 경우 18~30h 경 최대 증식하였으며, 배양 후 36~40h 경과 시 정지기를 거쳐 사멸기로 들어가는 것으로 확인되어 항균물질이 최대한 생성되도록 하기 위해 배양시간은 40~48h으로 결정하였다(Fig. 7).

6. 가수분해 효소활성과 siderophore 생성

P. polymyxa JE201 균주의 cellulase의 활성을 조사한 결과 clean zone이 12.61 ± 0.36 mm 범위로 나타났으며, protease의 활성을 조사한 결과 clean zone이 10.96 ± 0.19 mm 범위로 나타나 활성이 강한 것으로 조사되었다. 하지만 *P. polymyxa* JE201의 siderophore 생산 능력을

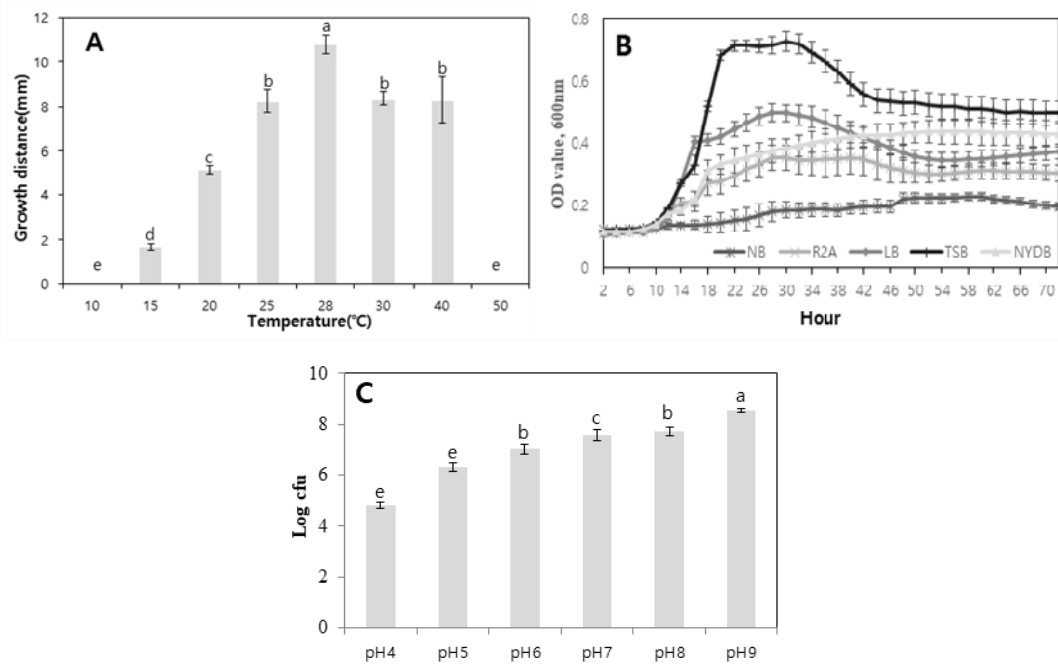


Fig. 7. Effect of Growth condition of *P. polymyxa* JE201. A: Growth distance (mm) of isolates in responses of different temperatures on TSA media, B: Effect of medium on the growth rate, C: Effect of pH on the growth rate. p-value < 0.05 using Duncan's multiple range test.

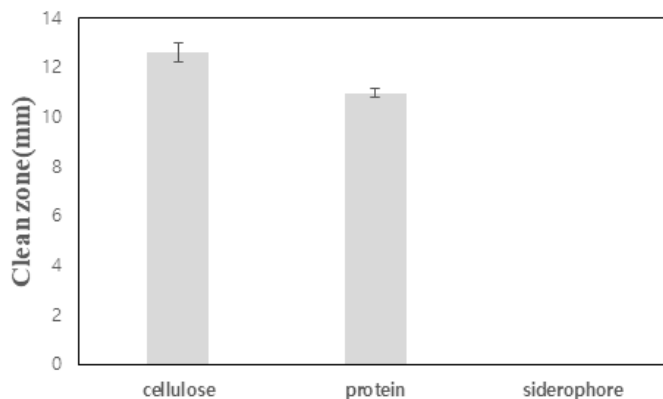


Fig. 8. Hydrolysis and siderophore assay by *P. polymyxa* JE201 on CMC, SMA, CAS medium at 28°C for 7 days.

조사한 결과 clean zone이 생성되지 않는 것으로 보아 siderophore 생성 능력이 없는 것으로 조사되었다(Fig. 8).

7. 선발균주의 점무늬병 방제효과 포장검정

P. polymyxa JE201 균주의 취나물 점무늬병 방제효과 포장검정을 시행한 결과, 62.43%의 방제효과를 보여 positive control인 세레나데 맥스(62.26%)와 비슷한 효과를 보이는 것으로 조사되었다(Table 4).

Table. 4. Disease control effects of *P. polymyxa* JE201 on leaf spot in the greenhouse

Treatment	Occurrence rate (%)	Control value (%)
<i>P. polymyxa</i> JE201	30.20 ± 3.88	62.43 ± 2.24
Serenade max	30.34 ± 3.25	62.26 ± 1.83
Control (NYDB)	80.42 ± 5.00	0
Untreated	100 ± 0	

8. 선발 균주의 식물병원균에 대한 항균활성

P. polymyxa JE201 균주의 다른 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성을 조사한 결과, *Alternaria* sp. (점무늬병), *Botrytis cinerea* (젯빛곰팡이병), *Colletotrichum acutatum* (탄저병),



Fig. 9. Mycelial growth inhibition by *P. polymyxa* JE201 on potato dextrose agar (PDA) medium at 25°C of 7 days.

1: *Alternaria* sp. KACC 42698, 2: *Botrytis cinerea* KACC 40574, 3: *Colletotrichum acutatum* KACC 40042, 4: *Fusarium oxysporum* KACC 40032, 5: *Phytophthora capsici* KACC 40157, 6: *Phytophthora drechlesleri* KACC 40196, 7: *Rhizoctonia solani* KACC 40101, 8: *Sclerotium rolfsii* KACC 40582, 9: *Sc. cepivorum* KACC 40582, 10: *Stemphylium* sp. KACC 42222.

Fusarium oxysporum (풋마름병), *Phytophthora capsici* (고추 역병), *Ph. drechesleri* (곰취 역병), *Rhizoctonia solani* (뿌리썩음병)과 *Stemphylium* sp. (잎마름병)에 대해 항균활성을 나타내는 것으로 조사되었다(Fig. 9).

IV. 고 찰

본 연구는 취나물에 발생한 점무늬병의 병원균을 분리하고, 이 병원균에 대해 항균활성을 나타내는 미생물을 선발하고, 선발한 미생물의 배양 조건과 가수분해효소 활성 등을 조사하였다. 충청남도 취나물 재배농가에서 병원균을 직접 분리하여 실험에 사용하였으며, 토양과 근권 등에서 분리한 미생물을 이용하여 항균활성을 조사하였다. 분리한 병원균은 *Septoria* sp.로 동정 되었는데, 이 점무늬병균의 경우 생장이 매우 느리고, 배지상에서 분생포자가 형성되지 않아 Leaf assay법(Anteneh et al., 2013)을 응용하여 분생포자를 형성시키고, 나출된 분생포자를 멸균수를 이용하여 수확할 수 있었다. 포자를 이용하여 분리 미생물과의 항균활성을 검정한 결과 JE201 균주가 가장 큰 저해대를 나타내었고, 배양조건에 따른 항균활성 차이를 확인한 결과, LB배지에서만 항균활성이 크게 감소한 것으로 나타났다. 그 이유는 LB배지 구성물질에 글루코스가 없어서 항균활성이 감소한 것으로 보인다(Lee et al., 2017). *P. polymyxa* JE201 균주의 점무늬병 방제효과 포장검정을 진행한 결과 3일 간격, 3회 처리 시 점무늬병을 62.43% 정도 방제하는 것으로 나타났으며, 대조구로 사용한 세레나데 맥스와 방제가 차이가 크지 않은 것으로 보아 효과가 있는 것으로 생각된다. *Paenibacillus* 속 세균이 작물 생육 촉진 및 병 방제 관련 다양한 기능을 가지고 있고, 여러 항균 및 항세균 활성물질을 생산한다고 알려져 있어(Raza et al., 2009), 다양한 식물 병원성 진균에 대해 항균활성을 나타낼 것으로 생각되어 작물의 지상부 및 지하부 병을 일으키는 병원균 10종에 대해 군사생장억제력을 조사한 결과 10종 중 9종에서 군사생장억제를 나타내 취나물 점무늬병 뿐만 아니라 다른 작물의 병 방제에도 사용 가능하다고 생각되며, 앞으로 항균활성 물질 탐색과 방제 기작에 대한 연구가 필요할 것이다.

V. 적 요

취나물 재배 시 문제가 되는 점무늬병(*Septoria* sp.)에 대해 항균활성을 나타내는 세균 *P. polymyxa* JE201를 분리하였다. JE201 균주를 이용하여 점무늬병 방제효과 포장검정을 시행한 결과, 대조구로 사용한 세레나데 맥스와 비슷한 정도의 방제효과를 나타낼 정도로 효과가 있었으며, 다른 식물 병원성 진균에 대한 항균활성 스펙트럼을 조사한 결과, 10종 중 9

종에 대해서도 균사생장억제력이 크게 나타나는 것으로 보아, 앞으로 추가적인 연구를 통해 다른 병에도 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

[Submitted, January, 31, 2021 ; Revised, March, 9, 2021 ; Accepted, May, 14, 2021]

References

1. Alnahdi, H. S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2(9): 71.
2. Anteneh, B., D. Woubit, and W. A. Getaneh. 2013. Evaluation of detached leaf assay for assessing leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) resistance in wheat. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 4(5): 176.
3. Gang G., S. Mun, Y. Yang, S. Lee, E. Choi, D. Ha, E. Kim and B. Cho. 2017. Monitoring of pesticide residues on dried agricultural products. *Korean J. Pestic. Sci.* 21(1): 49-61.
4. H. Y. Kim, H. Y. Weon, W. G. Kim, and K. H. Yoo. 2009. Identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* DY5 with antifungal activity against crop pathogenic fungi. *Korean J. Mycol.* 37(2): 181-188.
5. Karpunina, L. V., U. Y. Mel'nikova, and S. A. Konnova. 2003. Biological Role of Lectins from the Nitrogen-Fixing *Paenibacillus polymyxa* Strain 1460 During Bacterial-Plant-Root Interactions. *Curr. Microbiol.* 47(5): 376-378.
6. Kim Y. K., E. J. Choi, S. J. Hong, C. K. Shim, M. J. Kim, H. J. Jee, J. H. Park, E. J. Han, B. K. Jang, and J. C. Yun. 2013. Biological control of tomato and red pepper powdery mildew using *Paenibacillus polymyxa* CW. *Korean J. Pestic. Sci.* 17(4): 379-387
7. Lee Y. D., A. H. Khalid, and J. H. Joo. 2017. *Paenibacillus polymyxa* and *Burkholderia cepacia* antagonize ginseng root rot pathogens. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 50(6): 598-605.
8. Raza, W., X. Yang, H. Wu, Y. Wang, Y. Xu, and Q. Shen. 2009. Isolation and characterization of fusaricidin-type compound-producing strain of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 active against *Fusarium oxysporum* f. sp. *neivium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 125(3): 471-483.
9. Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160(1): 47-56.
10. Shin H. D. and E. F. Sameva. 1999. Taxonomic Notes on the Genus *Septoria* in Korea (I). *Mycotaxon.* 73: 215-234.

11. Shin, K. H., S. Lee, D. H. Cho, and C. H. Pack. 1998. Analysis of vitamins and general components in the leaves of chwinamul. Korean J. Plant Res. 11: 163-167.
12. Smibert, R. M., Krieg, N. R., and Gerhardt, P. 1994. Methods for general and molecular bacteriology.: Microb Wash DC. 607-654.
13. Timmusk, S. 2003. Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa* (Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis).
14. Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52: 487-511.
15. White T. J., T. Bruns, S. J. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A guide to methods and applications. 18(1): 315-322.