

어 젠 다 코 드	4 - 2 - 2		구 분	완결	
기술분야코드	V2	기술유형코드	C04	작목구분코드	IC-03-1924
과 제 종 류	농업 현장 실용화 기술 개발		과제번호	PJ013625	
과 제 명	황기 토양전염성 병해 저감기술 개발				
과 제 책 임 자	성 명		직 급	소속기관 및 부서	
	이재형		농업연구사	강원도원 인삼약초연구소	
연 구 기 간	2018 ~ 2020		참여연구기관	-	
세부과제명			부 서	세부책임자	연구기간
1) 황기 토양전염병 발생실태 조사			인삼약초연구소	이재형	'18~'20
2) 황기 안정생산을 위한 친환경 농자재 활용기술 개발			인삼약초연구소	이기욱	'18~'20
색 인 용 어	황기, 시들음병, 뿌리썩음병, 친환경방제, 토양전염성 병해				

ABSTRACT

Astragalus(*Astragalus membranaceus* bunge) was a major herb in Gangwon Province. Astragalus increased its efficacy in 3 year cultivation, but the incidence of root rot and wilt disease was also increased. Recently, root rot and wilt disease in Astragalus, caused by *Phytophthora drechsleri* and *Fusarium oxysporum* has been reported in Korea.

In this study, we carried out to identify and analyze the causative bacteria that cause Astragalus soil borne disease and to investigate the mechanism of the Astragalus soil borne disease through microbial community analysis of the soil of Astragalus field.

Also we first identified *Phytophthora cryptogea* as a causative fungi of Astragalus root rot from isolates with symptoms of root rot.

As a result of microbial community analysis, in the 1-year-old and 2-year-old field of Astragalus, there was no difference in the distribution of *Fusarium* spp. between the diseased and non-diseased sites. However in the 3-year-old Astragalus field, the distribution of *Fusarium* spp. was 8.3 times higher than that of the non-diseased sites.

In addition, in this study was conducted to select and develop effect of environment-friendly materials for the environment-friendly prevention of Astragalus soil borne disease.

This study was conducted with 2-year-old and 3-year-old Astragalus field in Jeongseon-gun, Gangwon-do. Phosphite(KH_2PO_3) was used at a ratio of 1,000 times with commercially available and the treatment interval was 4 times(June-September) at monthly interval. The control effect of phosphite was higher with 56.5% levels than non-control.

For the selection of antagonistic antibiotics for the control of Astragalus soil borne disease, we isolated bacterial isolates in rhizosphere soil of Astragalus and microorganisms were distributed from the Agricultural Food Research Institute of Gangwondo ARES and subsequently tested for antagonistic

activities against *F. oxysporum* and *P. drechsleri*. Among them two bacterial strains(A11, 10201) were selected, based on antagonistic effects against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora* species.

The selected strains A11 and 10201 were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas putida* using 16S rRNA se-quence analysis, respectively.

As in the above study, in order to confirm the control effect of the selected strains(A11, 10201) against Astragalus soil borne diseases, the results were treated 10 times at intervals of 2 weeks from June to October in the 2-year-old and 3-year-old Astragalus field, A11 treatment was higher with 53.8~30.5% levels than non-control.

In this study, through microbial community analysis, it was confirmed that the *Fusarium* species, which contains the causative agent of wilt disease, predominates when the Astragalus soil borne disease occurs, and thus the diversity of microorganisms decreases. Also Phosphite(KH_2PO_3) and *Bacillus amyloliquefaciens* A11 have potential for being used for the development of a biological control agent for Astragalus soil borne disease.

1 연구목표

황기(*Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과에 속하는 다년생 초본식물로 우리나라 전국 어느 곳에서나 재배가 가능하며 특히 추위에 강해 비교적 서늘한 중북부 산간지방인 강원도와 충북, 경기도 일부지역을 중심으로 주산지가 형성되어 있다.

황기의 주요 이용부위는 뿌리로서 예로부터 한방에서는 주피를 벗긴 뿌리를 건조시켜 지산, 이노, 강장, 혈압강하 등의 목적으로 이용해 왔다 (Baek et al., 1996). 황기의 약리적 효과는 polysaccharide, saponin, flavonoid 등 성분에 기인하는데 해당 성분들에 대한 항산화 효과, 간기능 보호효과, 항바이러스 효과, 항고혈압효과, 세포성장효과 및 면역증강작용 등 다양한 생리활성 작용이 잘 알려져 있다 (Xie et al., 1994; Rios and Waterman, 1997).

황기 뿌리는 재배년수가 높을수록 항산화 활성이 높은 것으로 나타나 있는데 (Yin et al., 2009), 주요성분의 함량이 재배년수에 따라 증가하는 경향을 보여 총 astrogaloside, astrogalosideIV, flavonoid 등 유효성분의 함량이 1년근, 2년근 보다 3년근에서 50% 이상 높으며, polysaccharide 함량 또한 3년근이 2년근에 비해 50% 이상 높아 경제성을 고려한 황기의 최적년근을 3년근으로 보고된 바 (Lim et al., 2014), 일반적으로 재배년수에 따라 효능과 지표성분의 함량이 변화한다고 알려져 있다.

이와 같은 이유로 황기 뿌리 1년생은 대부분 식품으로 소비되고 약용으로는 3년생 이상의 고년근을 이용하고 있는데, 3년생 이상의 고년근 생산 시 토양전염성 병해에 의한 수량감소 우려로 최근 3년근 생산의 주산지인 정선의 황기 재배면적이 '13년 89.7 ha에서 '19년 28.9 ha로 감소하고 있는 추세이다 (GARES, 2014.; GARES, 2019).

실제로 2019년 기준 황기의 국내 재배면적과 생산량은 각각 193 ha와 547 톤으로, 2013년 357 ha, 708 톤과 비교하여 지속적인 감소 추세에 있으나 (KOSIS, 2014; KOSIS, 2019), 수입량은 같은 기간 검사실적 기준으로 2013년 1,314 톤에서 2019년 1,487톤으로 증가하고 있어 (APQA, 2014.; APQA, 2019), 국내 자급률 확보 노력이 요구되는 작물이다.

황기 수량감소의 원인이 되는 주요 토양전염병은 시들음병 (*Fusarium oxysporum* Schltd) (Lee et al., 1991)과 뿌리썩음병 (*Phytophthora drechsleri*)이 보고되어 있다 (Jee et al., 2000). 시들음병의 경우 1년근에서는 발생 빈도가 미미하지만 재배년수가 늘어나면 그 빈도가 증가하고 (Ahn et al., 2008), 뿌리썩음병 역시 1년근은 발병지수가 1.3 정도이나 (발병정도에 따라 0 - 9까지 표기) 3년근의 경우 6.0 까지 크게 증가해 (Nam et al., 2006) 농가에서는 주로 1년근을 생산하고 있는 실정이며 (Kim et al., 1996) 이러한 이유로 황기 재배농가를 중심으로 황기 토양전염성 병해 저감기술 개발에 대한 현장 요구가 크다.

그러나 현재까지 황기 토양전염성 병해에 대한 등록약제가 없어 화학적 방제를 적용하기 어렵고 다양한 방제 방법이 시도되었으나 이 역시 이렇다 할 방제효과가 없어 현장에서는 예정지 관리나 고 휴재배 등 경종적 재배관리에 의존하고 있는 실정이다.

약용작물 중에서 비교적 토양전염성 병해에 대해 다양한 방제기술을 시도하고 있는 인삼의 경우에는 뿌리썩음병(*Fusarium solani*) 방제를 위해 토양 훈증제를 이용한 토양 소독법을 활용하고 있다. 그러나 이 역시 토양 내 유익한 미생물 사멸로 인해 토양 미생물상을 복원하는 기술이 요구되고 (Bonanomi et al., 2008), 토양훈증제 분해 후 남게 되는 각종 산물이 인삼 생육에 영향을 미칠 수 있다고 하여 (Frick et al., 1998), 화학적 방제가 갖는 부작용을 내재하고 있다.

이에 본 연구에서는 미생물을 이용하여 황기 토양전염성 병해를 효과적으로 제어하는 기술을 시도함으로써 황기의 안정적인 생산과 친환경 재배를 위한 생물학적 방제제 개발 및 관련 활용기술을 확보하고자 수행되었다.

2 재료 및 방법

〈제1세부과제: 황기 토양전염병 발생실태 조사〉

(시험 1) 재배 환경별 발병실태 조사

강원도 황기 주산지인 정선 지역의 토양전염성 병해 발생실태를 조사하기 위해 거점 농가를 선정하고 주요 토양 전염병인 시들음병과 뿌리썩음병의 발병여부를 조사하였다. 거점 농가는 황기 1-4년 생까지 연생별로 선정하여 토양전염병 발생 여부를 조사하였고, 분리가 어려운 난배양성 원인균의 분석은 연생별(1-3년)로 발병지와 미발병지의 근권 부위의 토양을 채취하여 (주)천랩에 미생물 군집분석을 의뢰하여 실시하였다. 미생물 군집분석은 연생별 발병여부에 따라 문(phylum) 수준과 속(genus) 수준에서 비교 분석하였다. 또한 EzBioCloud 분석 Tool을 활용하여 원인균의 분포도와 종 다양성을 분석하였다.

(시험 2) 토양전염병 원인균 분석

황기의 토양전염병 원인균을 분석하기 위하여 발병이 확인 된 병반 부위에서 1 g의 시료를 채취하여 10 ml의 멸균수에 첨가한 후 균질화 한 뒤 선택배지인 PDA(Potato dextrose agar, Difco, USA)배지에 150 μ l씩 각각 분주하여 25°C 배양기에서 72시간 배양 후 균사 생성 여부를 확인 한 후 다시 선택배지에 치상한 후 순수 분리하였다.

균주의 동정은 18S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 위해 Chromosomal DNA 추출은 PDB(Potato dextrose broth, Difco, USA) Broth에서 72시간 동안 배양시킨 배양액 3 ml을 Higene™ Genomic DNA Prep Kit(BIOFACT, Korea)의 방법으로 추출하였다. 추출한 DNA는 universal primer로서 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG)과 ITS4(5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC)을 이용하여 Polymerase Chain Reaction (PCR) 을 실시하였다. PCR은 10 ng의 DNA를 주형으로 사용하고 1.25 U Taq polymerase (Bioneer, Korea), 10 pmol primers, 0.2 mM dNTPs와 10배 농축반응용액(10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 105 mM MgCl₂, pH 8.3)을 첨가하고 최종 부피를 25 µl로 하여 수행하였다. PCR은 CFX96™ Touch Thermal Cycler(BIO-RAD, USA)를 사용하여 95℃에서 15초간 미리 반응 후 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 35회 반복한 후 마지막에 72℃에서 7분간 반응 시켰다. PCR 산물은 1×TAE(Tris-acetate-EDTA)buffer를 이용하여 1.5% agarose gel에서 30분간 전기영동 후 UV-transilluminator에서 밴드를 확인하였다. 400bp 범위에서 증폭된 밴드를 확인 후 (주)마크로젠에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열 분석 결과는 NCBI(The National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 Blast Search 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교하여 계통분류학적 유연관계를 분석하여 동정하였다.

(시험 3) 재배 환경별 발병실태 조사(2년차)

재배 환경별 발병실태 조사는 미생물 군집분석을 확대하여 실시하였다. 1년차 군집 분석을 실시한 6개소에 4년근 발병지와 미발병지 2개소를 추가하여 총 8개소의 토양을 장마철이 지난 2019년 8월 초순에 채취하여 분석하였다. 군집분석을 1년차와 마찬가지로 (주)천랩에 의뢰하였으며 미생물의 종(species) 수준까지 분석하고, 분석 방법은 1년차와 동일하게 실시하였다.

(시험 4) 토양전염성 병원균 길항미생물 추가 선발 및 동정

황기의 주요 토양전염성 병해인 시들음병 원인균 *Fusarium oxysporum*과 뿌리썩음병 원인균 *Phytophthora drechsleri*의 항균 활성을 나타내는 길항미생물을 분리하기 위해 7월 장마 시기 이후에 강원도 정선지역에서 건전하게 생육 중인 황기의 근권 토양을 채취하여 사용하였다. 채취한 토양 시료 1 g을 멸균수(sterile water) 9 ml에 현탁하고 conical tube에 10⁻⁵의 농도로 희석하여 NA 배지 (Nutrient agar, Difco, USA) 에 도말하여 25℃에서 2 일간 배양하였다. 배양 후 육안으로 모양과 색이 서로 다른 미생물의 단일 콜로니를 루프를 이용하여 1 차 분리한 뒤 다시 순수 분리하였다. 순수 분리한 미생물은 원인균과의 대치배양을 통해 길항균을 선발하였다. 길항미생물과의 대치배양을 위한 병원균은 농촌진흥청 농업유전자원정보센터로부터 *P. drechsleri* (KACC 40196)와 *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (KACC 40051)를 분양받았으며 해당균이 실제 병원성을 나타내는지 확인하기 위해 포트에서 한 달간 육묘한 황기에 병원균을 5 일간 연속 접종하여 각각의 병징 특성을 나타내는 개체의 병반을 분리해 해당 병원균을 재동정하여 확인한 뒤 사용하였다.

선발균의 동정은 16S rRNA 및 gyrA 유전자 계통 발생 분석에 기반한 분자생물학적 방법과 VITEK2 compact (Biomérieux, Craaponne, France)를 이용한 생화학적 방법을 이용하여 특성 분석을 실시하였다. 16S rDNA 염기서열 분석을 위해 chromosomal DNA 추출은 LB Broth에서 24 시간 동안 배양시킨 배양액 3 ml을 Higene™ Genomic DNA Prep Kit (BIOFACT, Daejeon, Korea)의 방법으로 추출하였다.

16s rRNA 부분 증폭은 universal primer인 27F와 1492R primer를 이용하였다.

Polymerase Chain Reaction (PCR)은 CFX96™ Touch Thermal Cycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 사용하여 95℃에서 30 초간 denaturation 후 65℃에서 30 초, 72℃에서 30 초 과정을 35 회 반복한 후 72℃에서 7 분간 반응시켰다. PCR 산물은 1 × TAE (Tris acetate -EDTA) buffer를 이용하여 1% agarose gel에서 30 분간 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV-transilluminator (DAIHAN Scientific, Korea) 에서 DNA 밴드를 확인하였다. 1,600 bp 범위에서 증폭된 밴드를 확인 후 염기서열 분석을 의뢰하였다 (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

gyrA 유전자를 이용한 염기서열 분석은 프라이머 gyrA-F (5'-CAGTCAGGAAATGCGT ACGTC CTT-3') 및 gyrA-R (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGC-3')을 사용하여 서울대학교 농생명과학 공동기기원 NICEM (National Instrumentation Center for Environmental Management, Seoul, Korea)에 의뢰하여 동정하였다.

각각의 염기서열 분석결과는 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 BLASTN 프로그램을 이용하여 등록된 염기서열과 비교한 뒤 MEGA X 프로그램 (MEGA, Pennsylvania, PA, USA)을 이용하여 계통도를 작성하였다.

유용균주의 생화학적 분석은 VITEK2 compact (Biomérieux, Craponne, France) 시스템을 이용하여 제품 매뉴얼에 따라 LB Broth 배지에서 25℃, 1일간 배양한 선발미생물의 집락을 원심 분리하여 루프로 따낸 뒤 이를 멸균된 생리식염수에서 2.0 McF의 탁도로 맞춰 BCL card에 침지시켰다. 침지한 card는 제품 카세트에 장착한 뒤 판독과정을 거쳐 사용하였다.

(시험 5) 길항미생물 대량생산을 위한 특성 검정

선발한 길항미생물(A11)의 대량생산을 위한 배양 특성을 알아보기 위해 최적 온도, 최적 배지, 최적 pH를 각각 측정하였다. 먼저 최적 온도를 확인하기 위하여 25℃ - 40℃까지 5℃간격으로 세팅된 진탕 배양기에 TSB (Tryptic soy broth, Difco, USA) 배지에 접종된 A11을 동일양 첨가하고, 분광광도기를 사용하여 OD 600nm에서 1시간 마다 12시간까지 측정하여 균주의 생육을 확인하였다. 최적 배지는 TSB (Tryptic soy broth, Difco, USA), LB (Luria-Bertani broth, Difco, USA), NB (Nutrient broth, Difco, USA) 배지를 이용하여 최적 온도인 35℃에서 온도 측정과 같은 조건으로 측정하여 균체의 생육을 확인하였다. 최적 pH 특성 검정은 pH 5 부터 pH 9 까지 5구간으로 나누어 TSB 배지와 35℃ 조건에서 상기와 같은 방법으로 측정하였다. 교반 속도와 배양 부피는 각각 150 rpm 과 50 ml/250 ml 로 고정하여 사용하였다.

〈제2세부과제: 황기 안정생산을 위한 친환경 농자재 활용기술 개발〉

(시험 1) 토양전염병 친환경 방제를 위한 길항미생물 선발

황기 토양전염병 친환경 방제를 위한 길항미생물을 분리하기 위해 강원도 정선군 등 황기 재배지에서 토양전염병이 급증하는 8월 집중 호우 시기 이 후에도 병이 발생하지 않은 황기 개체의 근권부에서 토양 시료를 채취하였다.

시료에서 길항미생물을 분리하기 위해 토양 1g과 생리식염수(NaCl 0.85%) 9ml을 섞고 1.5ml

conical tube에 10-4의 농도로 희석하여 미리 제조한 NA배지에 도말하여 30℃에서 1일 동안 배양하였다. 1일 경과 후 모양과 색이 서로 다른 단일콜로니를 needle을 이용해 분리하여 NA 배지에 순수 분리하였다. 분리한 균주들은 20% glycerol에 현탁하여 -70℃ deep freezer에 보관하였다. 추가로 강원도농업기술원 농식품연구소에서 96종의 고초균을 분양받아 길항미생물 선발 재료로 활용하였다.

황기 토양전염병 원인균은 황기 재배지에서 시들음병 병징을 나타내는 개체에서 분리한 황기 시들음병 원인균인 *Fusarium oxysporum*과 황기 뿌리썩음병 원인균으로 알려진 *Phytophthora drechsleri*, 담배와 토마토 뿌리썩음병의 원인균인 *Phytophthora nicotianae*를 농촌진흥청 농업유전센터로부터 분양받아 사용하였다. 병원균 보관을 위해 미리 제조해놓은 PDA 배지에 접종하여 25℃ 항온배양기에서 1주일간 배양한 후 멸균한 매스 칼날을 이용해 포자를 긁어 멸균수와 혼합해 포자현탁액을 만들고 20% glycerol을 첨가해 -70℃ deep freezer에 보관하였다.

황기 시들음병 원인균(*F. oxysporum*)에 대해 순수 분리한 길항미생물이 항균 활성을 나타내는지 알아보기 위하여 대치배양법과 펀칭법을 통해 균사생장 억제효과를 검정하였다.

본 실험에서 길항미생물은 LB broth 배지에 접종하여 진탕배양기에서 25℃, 150rpm 조건으로 24 시간 배양하여 준비하였다.

대치배양법에서는 NA 50% 와 PDA 50%를 혼합한 배지를 만들어 4mm cork borer로 떼어낸 병원균 agar plug를 가운데 접종하고 여기서 3cm 떨어진 주변 4곳에 paper disk를 놓고 각각의 길항미생물 배양액을 100μl 씩 분주하였다.

펀칭법에서는 PDB 배지에서 25℃, 150rpm 조건으로 1일간 진탕배양한 시들음병 원인균 배양액을 Glass bead를 이용해 위와 같이 제조한 혼합 배지에 도말한 후 각각의 길항미생물 배양액을 punching needle로 혼합 배지에 접종하였다.

위 두가지 방법으로 병원균과 길항미생물이 접종된 혼합 배지를 25℃ 항온배양기에서 7일 간 빛을 차단하여 배양하였으며 길항미생물이 균사생장을 억제하는 clear zone 형성 유무를 통해 길항능력이 있는 후보균주를 확인하였다.

균사생장 억제 능력이 있는 길항미생물을 동정하기 위해 16S rDNA 염기서열 분석을 실시하였다. chromosomal DNA 추출은 LB Broth에서 24 시간 동안 배양시킨 배양액 3 ml을 Higene™ Genomic DNA Prep Kit (BIOFACT, Daejeon, Korea)의 방법에 따라 실시하였다. 16s rRNA 부분 증폭을 위해 universal primer인 27F와 1492R primer를 이용하였고 Polymerase Chain Reaction (PCR)은 CFX96™ Touch Thermal Cycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 사용하여 95℃에서 30 초간 denaturation 후 65℃에서 30 초, 72℃에서 30 초 과정을 35 회 반복한 후 72℃에서 7 분간 반응시켰다. PCR 산물은 1 × TAE (Tris acetate -EDTA) buffer를 이용하여 1% agarose gel에서 30분간 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV-transilluminator (DAIHAN Scientific, Korea) 에서 DNA 밴드를 확인하였다. 1,600 bp 범위에서 증폭된 밴드를 확인 후 Macrogen(서울)에 염기서열 분석을 의뢰하였다.

(시험 2) 친환경 농자재 효과검정 및 활용기술 개발

친환경 농자재 처리를 통한 황기 토양전염성 병해 저감 효과를 확인하기 위해 강원도 정선군에 위치한 황기 재배지에서 2년생 황기와 3년생 황기를 재배중인 포장 1개소를 각각 선정하였다.

선정한 황기 재배지에 친환경 농자재를 처리하기 위한 관수시설을 설치하고 6월에서 9월까지 1개월 간격으로 각각의 친환경 농자재를 총 4회 처리하였다.

처리구는 아인산염 처리, 석회보르도액(6-6식) 처리, 무처리(용수 공급), 화학약제(하이멕사졸)처리로 구성하였으며 각 처리는 표준사용량에 맞춰 용수와 희석하여 10a 당 3,000L 수준으로 공급하였다.

처리구별 토양전염성 병해 저감 효과검정은 10월 중 황기 개체를 수확하여 지하부 생육특성을 평가하였으며 각 처리구별 평균간 차이의 의한 유의성 검정은 SPSS 12.0을 이용하여 Duncan의 다중검정방법으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

(시험 3) 1년차 선발 길항균의 토양전염성 병해 경감효과 검정

대치배양법과 펀칭법을 통해 황기 시들음병 원인균(*F. oxysporum*)에 대해 군사생장 억제능력을 나타낸 1년차 선발 길항미생물이 뿌리썩음병 원인균(*Phytophthora drechsleri*)에서도 군사생장 억제능력을 나타내는지 확인하기 위해 뿌리썩음병 원인균과 대치배양을 실시하였다.

대치배양은 위 실험과 마찬가지로 NA 50% 와 PDA 50%를 혼합한 배지를 만들어 4mm cork borer로 떼어낸 병원균 agar plug를 가운데 접종하고 중심에서 3cm 떨어진 주변 4곳에 paper disk를 놓고 각각의 길항미생물 배양액을 100 μ l씩 분주하였다. 길항미생물이 병원균의 군사생장을 억제한 거리를 3반복으로 3회 시험하여 군사억제능력을 평가하였다.

황기 토양전염병 원인균과 대치배양하여 확인한 길항미생물의 군사억제능력을 식물체에서 확인하기 위해 황기 유묘를 이용하여 포트시험을 실시하였다. 대상 병원균은 대치배양과 마찬가지로 황기 시들음병을 유발하는 원인균인 *F. oxysporum*과 뿌리썩음병을 유발하는 원인균인 *P. drechsleri*로 실시하였다. 처리 방법은 한달 간 육묘한 황기 유묘에 각각의 병원균을 접종한 후 3일을 경과시킨 뒤 길항미생물을 접종하는 방법으로 3주간 실시하였다.

(시험 4) 친환경 자재 토양전염병 경감효과 검정 및 활용법 확립

대치배양과 황기 유묘를 이용한 포트시험에서 황기 토양전염병 원인균에 대해 억제능력이 높은 길항미생물의 황기 토양전염성 병해 저감 효과를 확인하기 위해 강원도 정선군에 위치한 황기 재배지에서 2년생 황기와 3년생 황기를 재배중인 포장 1개소를 각각 선정하였다.

선정한 황기 재배지에 길항미생물을 포함하여 친환경 농자재를 처리하기 위한 관수시설을 설치하고 처리효과를 높이기 위해 6월에서 10월까지 30일 간격으로 각각의 친환경 농자재를 총 5회 처리하였다.

처리구는 황기 시들음병 방제효과가 높은 길항미생물 1종 처리, 뿌리썩음병 방제효과가 높은 길항미생물 1종 처리, 아인산염 처리, 무처리(용수 공급), 화학약제(하이멕사졸)처리로 구성하였으며 각 처리는 표준사용량에 맞춰 용수와 희석하여 10a 당 3,000L 수준으로 공급하였다.

처리구별 토양전염성 병해 저감 효과검정은 10월 중 황기 개체를 수확하여 지하부 생육특성을 평가하였으며 각 처리구별 평균간 차이의 유의성 검정은 SPSS 12.0을 이용하여 Duncan의 다중검정방법으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

(시험 5) 길항미생물 식물생장 촉진 및 병원균 억제능 검정

선발한 길항미생물의 식물생장촉진에 관여하는 생장촉진물질 분비 여부를 확인하기 위해 무 종자와 황기 유묘를 이용하여 생장촉진실험을 수행하였다.

무 종자를 이용한 생장촉진실험에서는 필터페이퍼를 2매씩 넣은 petri dish에 1% sodium hypochloric acid가 포함된 멸균수를 5 ml씩 넣어 충분히 적신 후 무 종자를 12개씩 일정한 간격으로 치상한 후 1일간 실온에 경과시켰다. 배양여액은 각각의 유용균주를 LB Broth에서 1 일간 배양한 뒤 RC 0.45 μ m syringe filter로 필터링하여 멸균수와 1: 1로 혼합하여 준비하였고 petri dish에 치상한 무 종자는 24시간 중 16시간의 광 조건에서 각각의 배양여액을 1ml씩 5일간 분주한 뒤 발아한 개체의 초장과 생체중량을 측정하였다.

황기 유묘를 이용한 생장촉진실험에서는 건조기에서 뒤엎기를 포함하여 105℃, 2 시간 동안 소토법으로 살균한 원예상태를 넣은 4 × 4 연결포트에 황기 종자를 파종한 뒤 안정적인 양분 흡수 및 뿌리 활착을 위해 저면관수로 14일간 육묘하여 지상부가 고르게 전개된 개체를 준비하였다.

길항미생물 배양액은 1.0 × 10⁵ colony/ml 농도로 멸균수와 1: 1로 희석하여 식물체 지제부에 10 ml씩 5일 간격으로 4회 관주처리 하였고 마지막 처리일로부터 5일이 경과한 후 지상부 및 지하부의 생육정도를 측정하였다.

길항미생물의 병원균 억제능력을 검정하기 위해 일반적으로 길항미생물이 분비한다고 알려져 있는 protease 등 분해효소 분비 여부와 항생물질 생성 유전자 발현 여부를 검정하였으며 길항미생물의 병원균 억제능력을 식물체에서 확인하기 위해 황기 유묘를 이용한 포트시험을 수행하였다.

길항미생물의 protease 분비를 확인하기 위해 증류수 200ml에 nutrient agar 5g과 skim milk powder 3%를 혼합한 배지를 autoclave(121℃, 30 min)하여 petri dish에 분주하여 준비하였다. 준비된 배지에 cork borer를 이용하여 직경 5mm의 구멍을 뚫은 후 미리 배양해놓은 미생물 배양액 20 μ l를 접종하였다. 그리고 25℃에서 5일간 배양한 뒤 배지의 clear zone 형성을 관찰하여 protease 분비를 확인하였다.

길항미생물의 siderophore 활성은 CAS(chrome azurol sulfonate) assay를 간단하게 변형한 방법을 사용하였다(Han et al., 2015).

먼저 염료용액 60.5mg을 증류수 50ml에 녹이고 HDTMA(hexadecyltrimethyl ammonium) 72.9mg은 증류수 50ml에 녹인 뒤 광을 차단하여 준비하고, Nutrient Agar 20.7g을 900ml 증류수에 녹인 다음 두 가지 용액을 혼합하여 autoclave에 고압 멸균하였다. 고압 멸균된 용액은 50℃로 식힌 뒤 거품이 나지 않도록 천천히 섞어 petri dish에 분주하여 CAS 평판배지를 만들었다. 이 후 위의 방법으로 미리 배양해놓은 미생물 배양액을 접종하여 25℃에서 5일간 배양하고 균주의 콜로니를 중심으로 CAS배지의 색이 청색에서 점점 벌어지며 투명해지는 clear zone 형성을 통해 siderophore 생성 여부를 확인하였다.

길항미생물의 cellulase 분해 효소 분비 여부는 sodium carboxymethyl cellulose (CMC) agar 배지를 Sazci 등 (1986)에서 사용한 방법을 변형하여 확인하였다.

먼저 NA 배지 5g을 증류수 200 ml에 녹인 후 CMC(sodium carboxymethyl cellulose) 1%와 congo red 0.01%을 함께 넣어 섞어준 뒤 autoclave를 통해 고압 멸균하여 준비하였다. cellulase 활성 검정 역시 위 방법처럼 미생물 배양액을 접종하여 25℃에서 5일간 배양하여 배지의 clear zone 형성을 관찰하였다.

길항미생물이 항생물질 생성 유전자를 분비하는지 확인하기 위해 길항미생물의 DNA를 추출하여 주요 항균성 2차 대사물질인 iturin, surfactin, fengycin 3종에 대해 특이적으로 반응하는 primer를 제작하여 PCR분석을 실시하였다.

chromosomal DNA 추출은 LB Broth에서 24시간 동안 배양시킨 배양액 3ml을 Higene™ Genomic DNA Prep Kit(BIOFACT, Daejeon, Korea)의 방법에 따라 실시하였다. 16s rRNA 부분 증폭을 위해 각 항균성 2차 대사물질에 특이적으로 반응하는 primer를 이용하여 Polymerase Chain Reaction (PCR)은

CFX96™ Touch Thermal Cycler에서 95℃에서 30초간 denaturation 후 65℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 35회 반복한 후 72℃에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 1 × TAE (Tris acetate -EDTA) buffer를 이용하여 1% agarose gel에서 30 분간 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV-transilluminator (DAIHAN Scientific, Korea) 에서 DNA 밴드를 확인하였다.

식물체에서 길항미생물의 군사억제능력을 확인하기 위해 황기 유묘를 이용하여 포트시험에서는 위 포트시험과 마찬가지로 황기 시들음병 원인균인 *F. oxysporum*과 뿌리썩음병 원인균인 *P. drechsleri*를 대상으로 수행하였다. 처리 방법은 한달 간 육묘한 황기 유묘에 각각의 병원균을 접종한 후 3일을 경과시킨 뒤 길항미생물을 접종하는 방법으로 4주간 실시하였다.

원인균에 의한 병해 발병정도는 황기 지하부에 나타나는 병해의 특징에 따라 구분하였는데 시들음병의 경우 지체부 줄기와 가까운 뿌리를 절단하면 도관부가 갈색으로 변색되고, 뿌리썩음병은 뿌리가 검게 변색되어 썩는 병징을 보인다(RDA, 2015). 이를 참고하여 시들음병 발병정도는 뿌리를 절단하여 도관부 변색을 확인 후, 그 정도에 따라 0에서 3까지 구분하였고, 뿌리썩음병은 뿌리 표면이 검게 변색되며 썩어가는 병반을 크기에 따라 0에서 3까지 구분하였는데, 0은 0%, 1은 1% - 30%, 2는 31% - 60%, 3은 61%이상으로 총 3 반복 실시하였고, 방제가는 (무처리구발병정도 - 처리구발병정도) / 무처리구발병정도 × 100으로 계산하였다.

(시험 6) 길항미생물 재배지 효과 검정 및 실용화기술 개발

황기 생육촉진능력과 병원균 억제능력이 높은 길항미생물의 황기 토양전염성 병해 저감 효과를 확인하기 위해 강원도 정선군과 철원군에 위치한 황기 재배지에서 2년생 황기와 3년생 황기를 재배중인 포장 1개소를 각각 선정하였으며, 포장 1개소는 전년도 친환경 농자재 현장 실증의 연차 변이를 평가하기 위해 동일한 포장에서 실시하였다.

선정한 황기 재배지에 길항미생물을 처리하기 위한 관수시설을 설치하고 처리효과를 높이기 위해 6월에서 10월까지 15일 간격으로 총 10회 처리하였다.

처리구는 황기 시들음병 방제효과가 높은 길항미생물 1종 처리, 뿌리썩음병 방제효과가 높은 길항미생물 1종 처리, 무처리(용수 공급), 화학약제(하이멕사졸)처리로 구성하였으며 길항미생물의 밀도는 1×10^5 CFU/ml 이상 용수와 희석하여 10a 당 3,000L 수준으로 공급하였다.

처리구별 토양전염성 병해 저감 효과검정은 10월 중 황기 개체를 수확하여 지하부 생육특성을 평가하였으며 각 처리구별 평균간 차이의 유의성 검정은 SPSS 12.0을 이용하여 Duncan의 다중검정방법으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

3 결과 및 고찰

〈제1세부과제: 황기 토양전염병 발생실태 조사〉

(시험 1) 재배 환경별 발병실태 조사

황기 재배 환경별 발병실태를 조사하기 위해 강원도 정선지역의 황기 재배 농가 중 연생별로 그룹을 만들어 전체 30농가를 선정하고 전년도의 시들음병 및 뿌리썩음병의 발병여부를 확인하였다. 선정하

농가는 1년생 5 농가, 2년생 11 농가, 3년생 12 농가, 4년생 2 농가로 이루어져 있으며(표 1), 정선의 사복읍과 남면 일대의 농가를 선정하였으며 그 중 연생별로 대표적인 1개소 씩 선정하여 토양샘플을 채취하고, 토양 이화학적성과 토양내 곰팡이의 군집분석을 실시하였다.

표 1. 정선군 황기 재배농가 조사거점 목록

구분	연생	농가명	주소	2017 병발생		미생물 군집분석
				시들음병	뿌리썩음병	
		합계		13	13	
1	1	조○규	신동읍 방제리	X	X	
2	1	조○규	신동읍 방제리	X	X	
3	1	주○교	사복읍 직전리	X	X	✓
4	1	주○교	사복읍 직전리	X	X	
5	1	송○만	사복읍 직전리	X	X	
6	2	주○교	사복읍 직전리	O	O	
7	2	송○만	사복읍 직전리	O	O	✓
8	2	송○만	사복읍 직전리	X	X	
9	2	조○호	남면 광덕1리	X	X	
10	2	조○호	남면 광덕1리	X	X	
11	2	조○호	남면 광덕1리	X	X	
12	2	조○호	남면 광덕1리	X	X	
13	2	조○호	남면 광덕1리	X	X	
14	2	조○호	남면 광덕1리	X	X	
15	2	조○호	남면 광덕1리	X	X	
16	2	이○용	사복읍 직전리	O	O	
17	3	나○채	사복읍 직전리	X	X	
18	3	나○채	사복읍 직전리	O	O	
19	3	나○채	사복읍 직전리	X	X	
20	3	주○교	사복읍 직전리	O	O	
21	3	이○용	사복읍 직전리	O	O	
22	3	이○용	사복읍 직전리	O	O	
23	3	이○용	사복읍 직전리	O	O	
24	3	안○권	신동읍 방제리	O	O	
25	3	안○권	신동읍 방제리	X	X	
26	3	고○윤	사복읍 직전리	O	O	✓
27	3	고○윤	사복읍 직전리	O	O	
28	3	조○호	남 면 광덕1리	O	O	
29	4	조○규	신동읍 방제리	X	X	
30	4	박○빈	사복읍 직전리	O	O	

토양 내 미생물 군집분석 할 농가 목록은 표 2와 같이 연생별로 선정하고 8월 이후 토양 전염성 병

발생이 많은 시기에 토양을 채취하여 분석기관에 의뢰하였다. 토양 화학성 분석 결과는 표 3과 같이 연생별로 큰 차이가 없었다.

표 2. 미생물 군집분석 목록

구분	연생	샘플명	농가명	병발생 유무		범례(문 수준)
				시들음병	뿌리썩음병	
1	1	J152X	주○교	X	X	Legend - Chytridiomycota - Rozellomycota - Chlorophyta - Chlorophyta - Fungi_uc - Fungi_p - Chromista_p - Plantae_p - Unclassified - Basidiomycota - Macrosporium - Ascomycota - Mortierellomycota - ETC [< 1.0%]
2		J152O	주○교	O	O	
3	2	S312X	송○만	X	X	
4		S312O	송○만	O	O	
5	3	Y242X	이○용	X	X	
6		Y242O	이○용	O	O	

표 3. 토양 화학성

구분	pH (1:5)	EC (dS/m)	SOM (g/kg)	P ₂ O ₅ (mg/kg)	Ca	K	Mg	Na
					(cmol(+)/kg)			
J152	5.72	0.29	24.99	161	7.74	0.72	1.02	0.08
S312	6.37	0.22	30.99	381	4.52	0.55	2.07	0.12
Y242	5.98	0.29	14.08	592	5.69	1.19	1.98	0.07

미생물 군집분석은 데이터베이스가 존재하는 황기의 시들음병 원인균인 *Fusarium* 속 대상으로 분석하였고, 전체 곰팡이의 분포는 그림 1과 같다. 다양한 곰팡이의 분포를 보여주지만 그 중에서도 *Fusarium* 속이 속한 문의 분포가 가장 높았다. 그림 2는 *Fusarium* 속의 상위 항목인 *Ascomycota* 문의 분포만 연생별로 따로 분리한 그림이다.

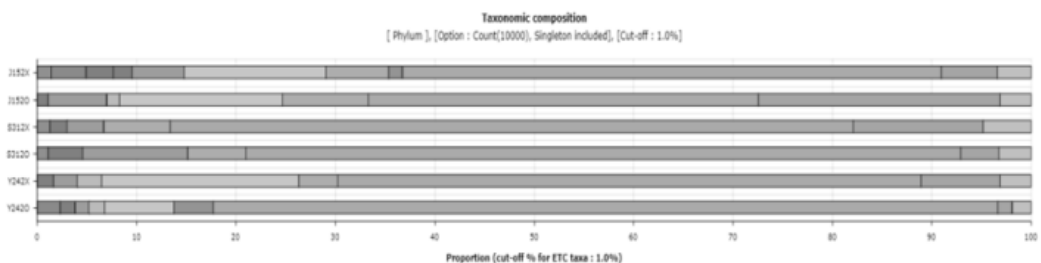


그림 1. 연생별 토양전염성 병해 발생여부별 미생물 군집분석(문 수준)

그림 2는 가장 위쪽부터 연생별 병 발생 유무별 *Fusarium* 속을 포함하는 Ascomycota 문 수준의 미생물 분포를 나타낸 것이다. 연생별로 큰 차이를 보이지 않았고 발병 여부에 따라서도 분포율의 차이는 크지 않았다.

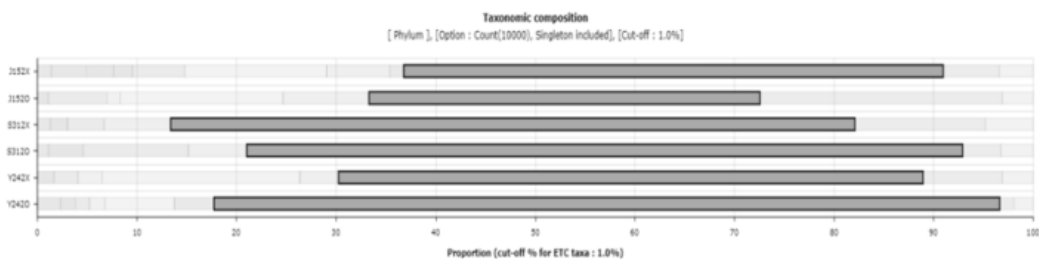


그림 2. *Ascomycota* 문 수준 미생물 군집분석

그림 3은 *Fusarium* 속만 추출하여 토양 내 밀도를 분석한 결과 1년생과 2년생은 병 발생여부에 따라 *Fusarium*의 분포가 큰 차이를 보이지 않았지만, 3년생의 경우 분포율의 차이가 미발병지에 비해 발병지에서 약 8.3배로 큰 차이를 나타내었다(표 4). 이 같은 결과는 1, 2년생의 황기 재배지에서 시들음병의 경우 1년 근에서 발생빈도가 미미하지만 재배 연수가 늘어나면서 그 빈도가 증가한다는 보고와 (Ahn et al., 2008) 일치하는 결과를 나타내었다.

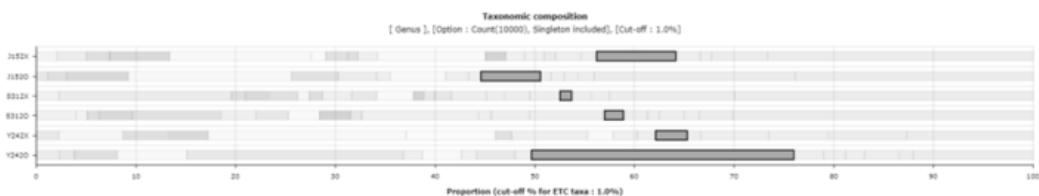


그림 3. *Fusarium* 속 수준 미생물 군집분석

표 4. *Fusarium* 속 미생물 분포

연생	샘플명	농가명	분포수	분포율(%)
1	J152X	주O교	759	7.95
	J152O	주O교	598	5.98
2	S312X	송O만	116	1.16
	S312O	송O만	191	1.91
3	Y242X	이O용	319	3.19
	Y242O	이O용	2,632	26.32

그림 4,5 는 토양 내 미생물의 다양성을 나타내는 지수로 값이 클수록 다양한 종의 미생물이 있음을 알려준다. ACE 지수는 3년근 미발병 지역에서 지수평균이 1.27로 발병지 평균 1.07보다 0.2 높은 수치를 보여 종 다양성이 높음을 확인 하였다.

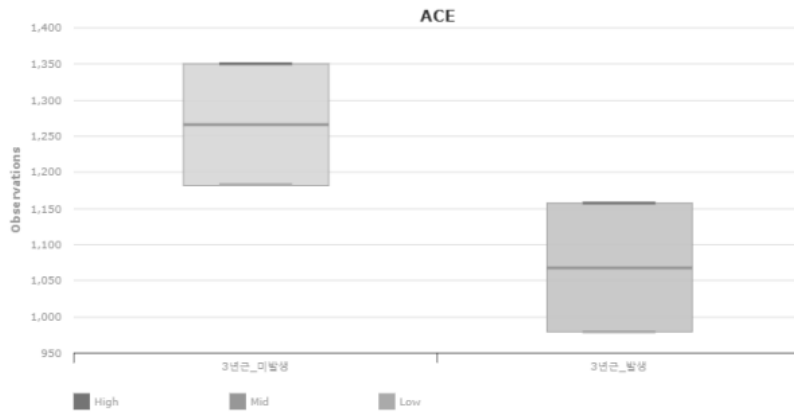


그림 4. 미생물 종 다양성 분석(ACE 지수)

Chao1 지수 역시 미발병 지역에서 1.23으로 발병지 1.04보다 높은 수치를 보였다. 이 같은 결과는 모두 미발병지에서 곰팡이의 다양한 종이 존재하다가 특정병이 발생하면 병원균이 우점하여 종 다양성이 낮아짐을 확인하였다.

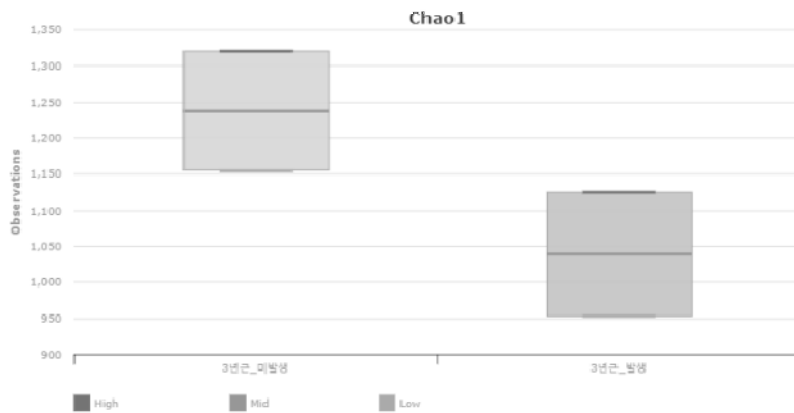


그림 5. 미생물 종 다양성 분석(Chao1 지수)

(시험 2) 토양전염병 원인균 분석

가. 원인균 분리



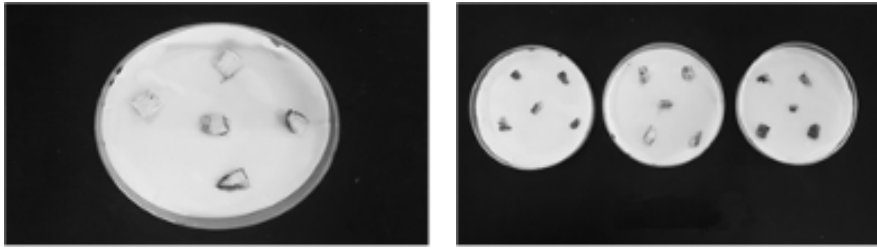


그림 6. 발병개체 수집 및 원인균 분리

토양전염병 원인균 분리는 발병 부위를 세척, 절단한 뒤 한천배지에 치상하여 3-5일 간 배양하여 육안으로 구분되는 군사를 분리하여 DNA를 추출하고 ITS¹⁾ 부분을 PCR을 통해 증폭하여 염기서열을 분석하였다(그림 6).

원인균 동정 결과, 콩이나 감귤의 뿌리썩음병 원인균으로 알려진 *Fusarium solani* 가 주로 확인 되었고, 황기 시들음병의 원인균인 *Fusarium oxysporum*과, 툴립 뿌리썩음병 원인균인 *Phytophthora cryptogea* 가 확인되었다. *Phytophthora cryptogea*는 *Phytophthora drechsleri*와 같은 종으로 알려졌으나, 최근에 계통 발생 분석 결과 다른 종으로 밝혀진 병원균으로 국내에서는 처음으로 황기에서 발견되었다 (표 5). 이와 같은 결과는 대표적인 뿌리 작물인 인삼의 경우 뿌리썩음병 원인균으로 알려진 *Fusarium solani* 의 분포가 높은 것으로 판단할 때 황기 뿌리썩음병에도 일정 부분 관여하는 것으로 추정 할 수 있었다.

표 5. 황기 뿌리썩음병 원인균 동정

군주명	Identification	E-Value*	Homology(%)	비고
N-1	<i>Fusarium solani</i>	1e-100	88	콩, 감귤 뿌리썩음병
N-2	<i>Acremonium</i> sp.	2e-73	93	-
B-1	<i>Fusarium oxysporum</i>	1e-80	95	황기 시들음병
B-2	<i>Fusarium solani</i>	2e-44	88	콩, 감귤 뿌리썩음병
B-3	<i>Uncultured fungus</i>	9e-38	86	-
C-2	<i>Acremonium</i> sp.	7e-54	88	-
D-2	<i>Uncultured fungus</i>	4e-129	93	-
D-3	<i>Phytophthora cryptogea</i>	1e-116	91	툴립 뿌리썩음병
D-4	<i>Fusarium solani</i>	5e-86	96	콩, 감귤 뿌리썩음병
I-1	<i>Peronospora oblati</i> pora	4e-52	99	-
I-2	<i>Fusarium oxysporum</i>	3e-107	91	황기 시들음병
I-3	<i>Fusarium solani</i>	2e-88	87	콩, 감귤 뿌리썩음병
I-4	<i>Uncultured Ascomycota</i>	2e-113	90	-
I-5	<i>Acremonium</i> sp.	8e-98	98	-

(시험 3) 재배 환경별 발병실태 조사(2년차)

황기 주산지의 토양전염성 원인균의 군집 밀도를 조사하는 발병실태 조사는 연생별로 1개소씩 총 8개소 (표 6)를 선정하여 표본 샘플을 채취하고 원인균인 곰팡이의 군집분석을 실시하였다.

1) ITS: Internal Transcribed Spacer region의 약자로 미생물을 동정할 때 쓰이는 rDNA 부위

표 6. 미생물 군집분석 목록

구분	연생	샘플명	농가명	병발생 유무	
				시들음병	뿌리썩음병
1	1	J406-9-1-X	이○용	X	X
2		J406-9-1-O	이○용	O	O
3	2	Y262-6-2-X	고○윤	X	X
4		Y262-6-2-O	고○윤	O	O
5	3	J312-3-X	조○호	X	X
6		J312-3-O	조○호	O	O
7	4	W188-2-4-X	임○자	X	X
8		W188-2-4-O	임○자	O	O

NGS (Next generation sequencing) 기법을 활용한 미생물 군집분석 결과 그림 7과 같이 전체 연근별 미발병지와 발병지의 미생물 (곰팡이, 효모)의 군집 양상이 다르게 분석되었다. 미발병지에서는 *Ascomycota* 속, *Mortierella* 속, *Plantae* 속이 많이 분포한 반면 발병지에서는 *Mortierella* 속이 가장 많은 분포를 보이고 다른 속들은 유사한 분포도를 보여주었다.

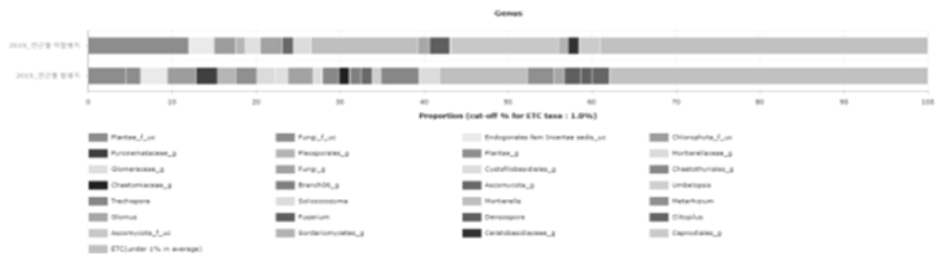


그림 7. 병발생 유무별 총 미생물 군집분석(속 수준), 상:미발병지 하: 발병지

그림 8은 '18-'19년 분석 데이터를 취합하여 재현성을 확인한 것으로 미발병지에 비해 발병지에서 *Fusarium* sp.의 분포가 높음을 다시 한번 확인하였다.

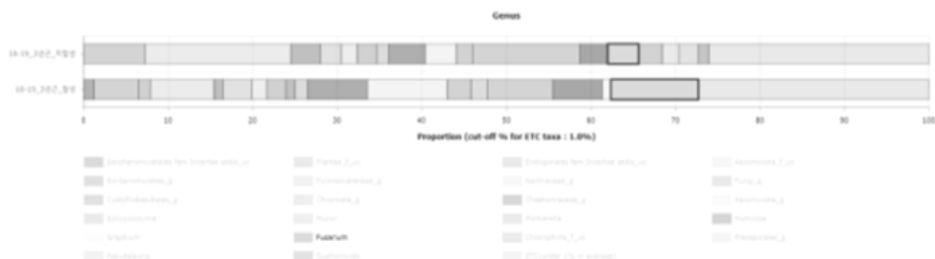


그림 8. 병발생 유무별 *Fusarium* 속 분포율(3년근), 상:미발병지 하: 발병지

특이한 점은 3년근 병발생지에서 *Fusarium* 속 중 시들음병의 원인균인 *Fusarium oxysporum* 보다 *Fusarium solani*의 분포가 약 6배 높게 분포하였다 (그림 9). 이와 같은 결과는 1년차에 분석한 황기 뿌리썩음병 원인균 분석 결과와 일치하는 내용으로 뿌리썩음병 원인균으로 *F. solani*도 일정부분 연관성이 있음을 확인하였다.

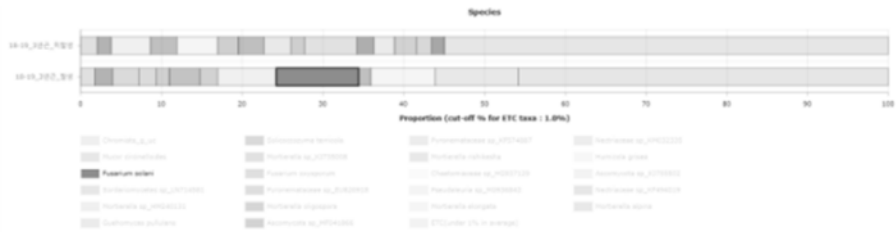


그림 9. 병발생 유무별 *Fusarium* 종 분포율(3년근), 上:미발병지 下: 발병지

토양 내 미생물의 다양성을 문자의 크기로 나타내어 주는 Word Cloud로 원인균인 *Fusarium oxysporum* 을 시각적으로 표현하였는데 미생물 다양성 분포율 시각화에서 시들음병 발병지는 미발병지와 비교하여 주요 우점종이 확인되며 다양성이 감소되었음을 알 수 있었다(그림 10, 11).



그림 10. 시들음병 미발병지(3년근) 분포율 시각화



그림 11. 시들음병 발병지(3년근) 분포율 시각화

토양전염성 병발생 유무에 따른 미생물 바이오마커 탐색은 발병지에서만 확인되는 *Anthophyta*, *Eudicotyledonae* 등 12종이 유망하였고, 추후 추가적인 연구를 통해 규명할 필요가 있다고 판단되었다.

표 7. 병발생 유무에 따른 미생물 바이오마커 탐색

Taxon name	Taxon rank	p-value (FDR)	2019_연근별 미발병지	2019_연근별 발병지
Herpotrichiellaceae	Family	0.02098	0.58500	1.36500
Mortierella_uc	Species	0.02099	0.95000	0.09250
Ascomycota sp_HM162171	Species	0.02474	0.10750	0.00500
Basidiomycota_g	Genus	0.03613	0.04750	0.02500
Chytridiomycota sp_FJ827729	Species	0.04061	0.00750	0.00000
Rhizaria	Kingdom	0.04353	1.01750	0.52250
Cercozoa	Phylum	0.04355	1.01750	0.52250
Fungi_uc	Phylum	0.04356	0.87000	0.10250
Cercozoa_c	Class	0.04358	1.01750	0.52250
Cercozoa_o	Order	0.04360	1.01750	0.52250
Cercozoa_f	Family	0.04362	1.01000	0.52250
Microbotryales	Order	0.04584	0.00000	0.02500
Apicomplexa_f	Family	0.04588	0.00000	0.01500
Chromista_o_uc	Family	0.04590	0.11000	0.00000
Fungi sp_JX982451	Species	0.04593	0.01250	0.00000
Anthophyta	Phylum	0.04769	0.00000	0.03250
Eudicotyledonae	Class	0.04771	0.00000	0.03000
Boloniales	Order	0.04773	0.00000	0.02000
Fagales	Order	0.04774	0.00000	0.03000
Boloniales fam Incertae	Family	0.04776	0.00000	0.02000
Fagaceae	Family	0.04778	0.00000	0.03000
Pezizales_uc	Family	0.04780	0.00000	0.02250
Junewangia	Genus	0.04782	0.00000	0.02000
Fagaceae_uc	Genus	0.04784	0.00000	0.03000
Junewangia_uc	Species	0.04786	0.00000	0.02000
Petrakia	Genus	0.04788	0.00000	0.03250
Petrakia sp_KY231233	Species	0.04790	0.00000	0.03250
Mortierellaceae_uc	Genus	0.04791	0.08500	0.00000
Fungi sp_KP714616	Species	0.04793	0.11000	0.00000
Entolomataceae_uc	Genus	0.04795	0.01750	0.00000
Chytridiomycota sp_DQ421210	Species	0.04797	0.01500	0.00000

(시험 4) 토양전염성 병원균 길항미생물 추가 선발 및 동정

토양전염성 병원균의 길항미생물을 추가 선발하기 위하여 정선균 남면 일대의 황기 재배지 중 건전한 토양에서 73종을 분리하고 병원균과 대치배양을 실시하였다. 대치 배양결과 균사 억제 능력이

우수한 4종을 최종 선발하고 균주명을 각각 A5, A10, A11, 10201로 명명하였다. 대치배양 결과는 A5와 A11균주가 시들음병과 뿌리썩음병 원인균의 군사 억제력이 우수하였다(그림 12, 표 8).

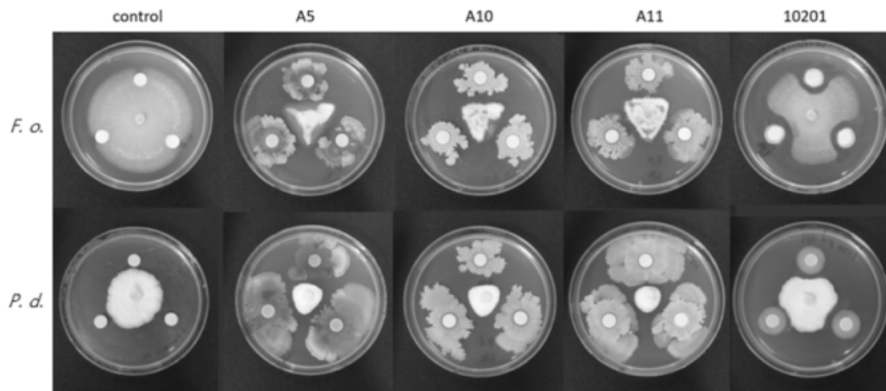


그림 12. NA50%+PDA50%배지 대치배양(25℃, 10days)

표 8. 길항미생물 4종의 병원균 군사억제능력 결과

No	Treatment	Pathogens	Fusarium oxysporum	Phytophthora drechsleri
1	A5(KCGW34N16-2)		++*	+++
2	A10(KCGW34N16-4)		++	+++
3	A11(KCGW34N16-5)		+++	++++
4	10201		++	++

*: Determined by measuring the average distance of inhibition zone: + for less than 0.5cm, ++ for 0.5 to 0.8cm, +++ for 0.9 to 1.2cm, ++++ for 1.3 to 1.6cm in distance of inhibition zone.

군사억제력이 우수한 길항미생물 4종을 동정하기 위해 16S rRNA 및 gyrA 유전자를 이용하여 염기서열 (마크로젠·NICEM, 한국) 및 Blast 분석을 실시하였고 분석에 사용한 프라이머 시퀀스는 다음과 같다(표 9).

표 9. 길항미생물 4종 동정 프라이머 목록

No.	Gene	Primer	Primer sequence(5'-3')	References
1	16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCAC	Kim et al.
		1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Song et al.
2	gyrA	47F	CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT	Roberts and Cohan
		1066R	CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT	

16S rRNA 및 gyrA 유전자를 이용한 길항미생물 4종의 염기서열 분석 결과, A5 균주와 A11 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 근연관계인 것으로 확인되었고 A10 균주는 *Bacillus velezensis*, 10201 균주는 *Pseudomonas putida*와 근연관계인 것으로 최종 동정하였다(표 10, 그림 13).

표 10. 길항미생물 4종 16S rRNA 및 gyrA 이용 sequence 분석 결과

No.	Strains	Identification	Homology(%)	Origin
1	A5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	김치
2	A10	<i>Bacillus velezensis</i>	98	김치
3	A11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98	김치
4	10201	<i>Pseudomonas putida</i>	-	토양

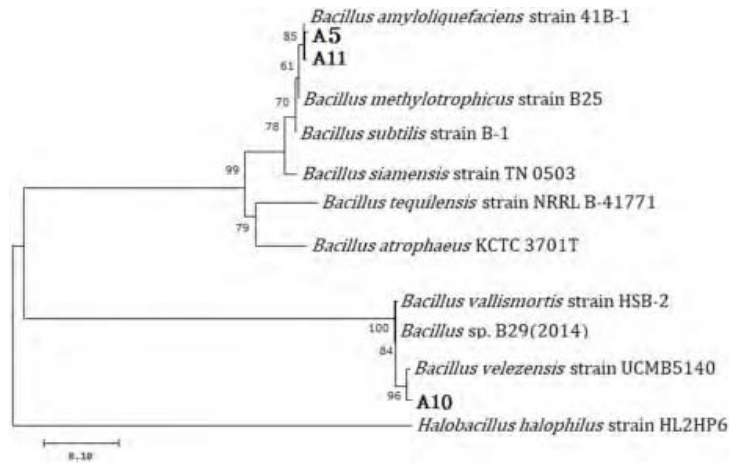


그림 13. 길항미생물 4종 중 *Bacillus* 속 계통도(Phylogenetic tree) 결과

표 11. 길항미생물 4종 VITEK2 system Biochemical Details 결과

No.	Biochemical	A5	A10	A11	Biochemical	10201
1	BXYL	+	+	+		
3	LysA	-	-	-	ADONITOL	-
4	AspA	-	-	-	PyrA	-
5	LeuA	(-)	+	+	IARL	-
7	PheA	+	+	+	dCEL	-
8	ProA	-	-	-		
9	BGAL	+	-	-	BGAL	-
10	PyrA	+	+	+	H2S	-
11	AGAL	+	+	+	BNAG	-
12	AlaA	-	-	-	AGLTp	-
13	TyrA	+	+	+	dGLU	-
14	BNAG	-	-	-	GGT	-
15	APPA	-	-	-	OFF	-
18	CDEX	+	-	-	dMAL	-
19	dGAL	-	-	-	dMAN	-
21	GLYG	+	-	+	BXYL	-

No.	Biochemical	A5	A10	A11	Biochemical	10201
22	INO	+	+	+	Balap	+
24	MdG	+	+	+		
25	ELLM	+	-	-		
26	MdX	-	-	-	LIP	-
27	AMAN	-	-	-	PLE	-
29	MTE	+	-	-	TyrA	+
30	GlyA	-	+	+		
31	dMAN	-	+	+	URE	-
32	dMNE	+	+	+	dSOR	-
34	dMLZ	-	-	-	dTAG	-
36	NAG	-	-	-	CIT	+
37	PLE	+	+	+	MNT	-
39	IRHA	-	-	-	5KG	-
41	BGLU	+	+	+	AGLU	-
43	BMAN	+	+	-	NAGA	-
44	PHC	-	-	-	AGAL	-
45	PVATE	-	+	(-)	PHOS	-
46	AGLU	+	+	+	GlyA	-
47	dTAG	-	-	-	ODC	-
48	dTRE	+	+	+	LDC	-
50	INU	+	-	-		
53	dGLU	+	+	+	IHISa	-
54	dRIB	+	(-)	-		
56	PSCNa	-	-	-	CMT	-
58	NaCl 6.5%	+	+	+	O129R	-
59	KAN	+	-	+	GGAA	-
60	OLD	+	-	-		
61	ESC	+	+	+	IMLTa	-
62	TTZ	+	+	+	ELLM	-
63	POLYB_R	+	+	+		
					ILATa	-

VITEK2 system을 이용한 길항미생물 4종의 생화학적 동정 확인 결과, A5균주와 A11균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*로 유전학적 동정 결과와 일치하였으나 A5균주는 낮은 신뢰도를 나타냈다. 반면에 A10 균주와 10201 균주는 증명에서 일치하였으나 속명은 불일치하였다.

표 12. 길항미생물 4종 VITEK2 system 분석 결과

Strains	Selected Organism	Probability(%)	Confidence
A5	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus/Bacilluslicheniformis</i>	-	Low Discrimination

Strains	Selected Organism	Probability(%)	Confidence
A10	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	–	Excellent
A11	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	–	Excellent
10201	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	96	Excellent

(시험 5) 길항미생물 대량생산을 위한 특성 검정

최종 선발된 A11의 대량 생산을 위한 최적 배양 조건은 온도별, pH별, 배지종류별로 A11의 생육 곡선으로 확인하였다. A11의 최적 온도는 35℃로 생육온도 25℃에 비해 대수기가 5시간 정도 단축됨을 확인하였다 (그림 14).

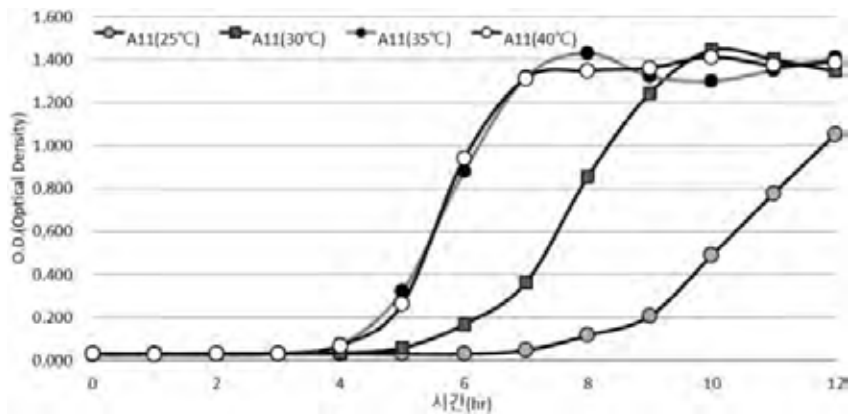


그림 14. 선발균(A11)의 온도별 생육곡선

(Media: TSB, Agitation Speed: 150rpm Working Volume: 50ml/250ml)

A11의 최적 pH는 6-7로 약산성에서 잘 자랐고, 최적 배지는 TSB (Tryptic soy broth)로 확인 되었다(그림 15, 16).

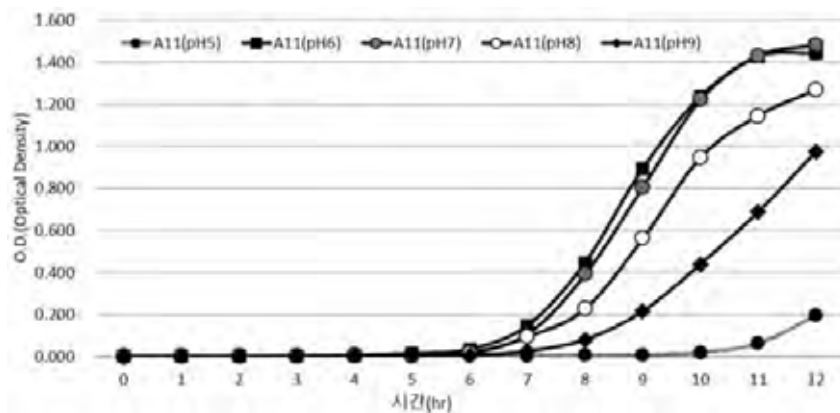


그림 15. 선발균(A11)의 pH별 생육곡선

(Media: TSB, Agitation Speed: 150rpm Working Volume: 50ml/250ml, Temperature: 35℃)

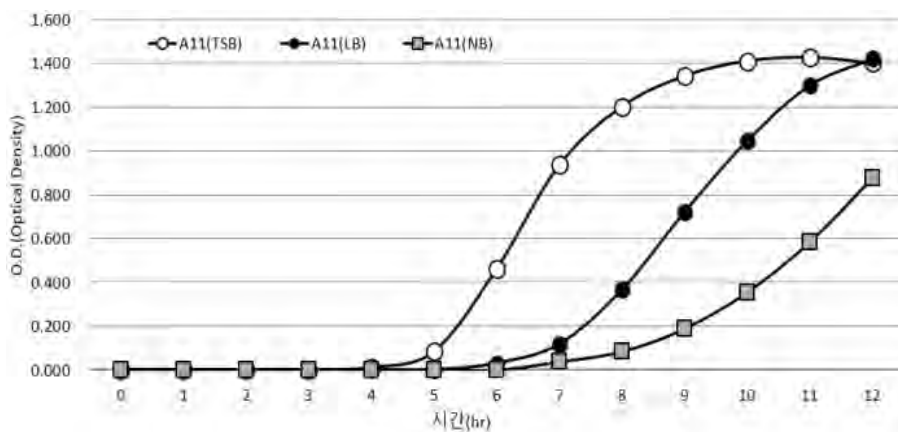


그림 16. 선발균(A11)의 pH별 생육곡선

(media: TSB, Agitation Speed: 150rpm Working Volume: 50ml/250ml, Temperature: 35℃)

최종 선발 균주 A11 활용을 위한 최적 배양 조건은 TSB(Tryptic soy Broth)배지에서 배양온도 35℃, pH 6~7이며, 교반속도 150rpm과 50ml/250ml 수준에서 배양할 경우 8시간 이내 세포 최대수에 도달하며 일반배양조건(LB, 30℃, pH7)에 비해 배양시간이 4~6시간 단축되었다(표 13).

표 13. 최종 선발균(A11) 최적 생육 조건 결과

균 주	구 분	최적조건
A11	배지	TSB(Tryptic Soy Broth)
	온도	35℃
	pH	pH6~7

〈제2세부과제: 황기 안정생산을 위한 친환경 농자재 활용기술 개발〉

(시험 1) 토양전염병 친환경 방제를 위한 길항미생물 선발

○ 대치배양법

강원도농업기술원 농식품연구소에서 분양받은 고초균 96종이 황기 시들음병 원인균(*Fusarium oxysporum*)에 대해 군사생장 억제능력을 나타내는지 확인하기 위해 NA 50% 와 PDA 50%를 혼합한 배지에서 대치배양을 실시한 결과, 길항미생물 활성을 확인하기 어려웠다(그림 1, 2).

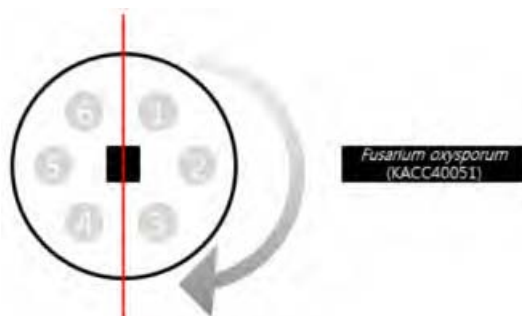


그림 1. 대치배양 방법 모식도

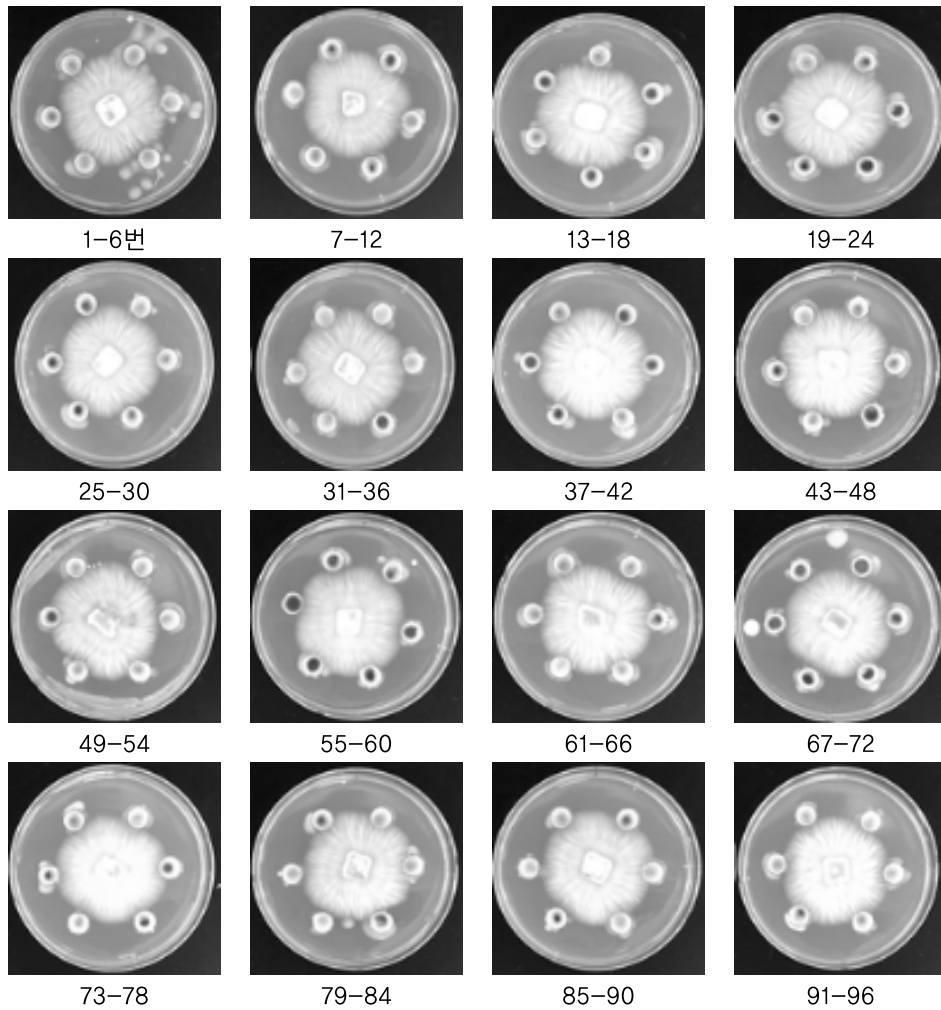


그림 2. NA배지 대치배양(25℃, 4days)

그러나 황기 재배지 건전 토양으로부터 분리한 길항미생물 3점(표 1)은 대치배양에서 그림 4와 같이 *Fusarium oxysporum*에 대해 항균활성을 나타내었다.

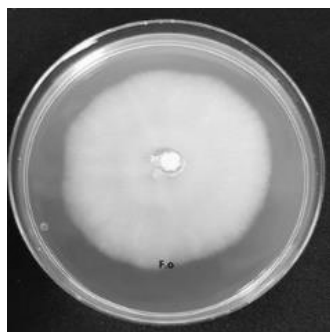


그림 3. *Fusarium oxysporum*

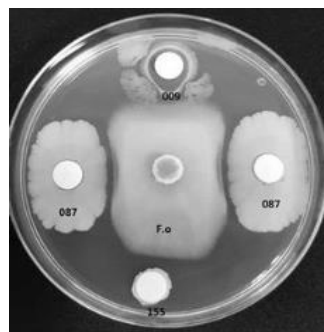


그림 4. 대치배양

표 1. 시들음병 원인균 길항미생물 목록(대치배양법)

No.	Strains	Identification	Origin
1	009	<i>Bacillus subtilis</i>	토양
2	087	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	"
3	155	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	"

○ 편칭법

Glass bead를 이용하여 시들음병 원인균을 도말하고 고초균을 punching 방법을 이용하여 접종한 뒤 배양하여 항균 활성을 검정한 결과, 그림6, 7과 같이 4개의 길항미생물 후보균주를 확인하였고, 표 2와 같이 동정하였다.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1	KCO034N18-1
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4	KCO034N18-4
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D65-4	D65-4	D65-4	D65-4	D65-4	D65-4	D65-4	D65-4	D65-4	D65-4	D65-4	D65-4
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
D65-18	D65-18	D65-18	D65-18	D65-18	D65-18	D65-18	D65-18	D65-18	D65-18	D65-18	D65-18
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
D65-12	D65-12	D65-12	D65-12	D65-12	D65-12	D65-12	D65-12	D65-12	D65-12	D65-12	D65-12
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
D65-14	D65-14	D65-14	D65-14	D65-14	D65-14	D65-14	D65-14	D65-14	D65-14	D65-14	D65-14
73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11	CBV6-11
85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1	D65-15-1

그림 5. Glass bead를 이용한 항균 활성 검정(고초균 96점)

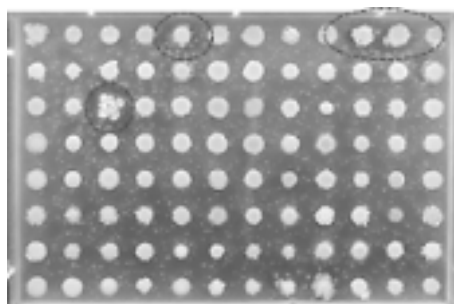


그림 6. 원인균 도말(300μl)

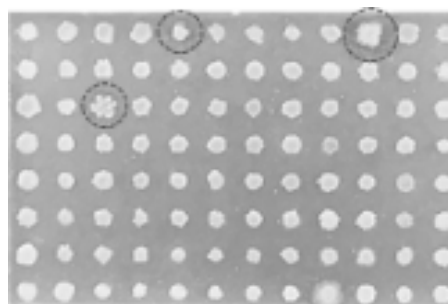


그림 7. 원인균 도말(700μl)

표 2. 시들음병 원인균 길항미생물 동정

No.	Strains	Identification	Homology(%)	Origin
1	A5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	94	김치
2	A10	<i>Bacillus</i> sp.	96	김치

No.	Strains	Identification	Homology(%)	Origin
3	A11	<i>Bacillus aryabhatai</i>	96	김치
4	D65-6	<i>Bacillus</i> sp.	95	된장

○ 뿌리썩음병 원인균(*Phytophthora* sp.) 길항 미생물 스크리닝 결과

황기의 뿌리썩음병 원인균으로 알려진 *Phytophthora drechsleri*와 담배와 토마토의 뿌리썩음병 원인균인 *Phytophthora nicotianae*에 대해 군사생장 억제능력을 나타내는 길항미생물은 10201(그림 9)과 009, 87(그림 11)번 균주로 확인되었다. 길항미생물의 동정결과는 표 3과 같다.

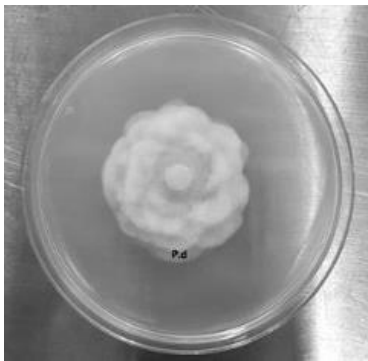


그림 8. *Phytophthora drechsleri*

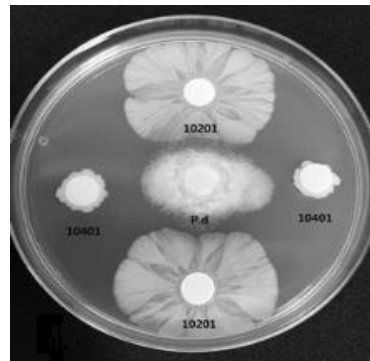


그림 9. 대치배양

표 3. 뿌리썩음병 원인균 길항미생물 목록(대치배양법)

No.	Strains	Identification	Origin
1	009	<i>Bacillus subtilis</i>	토양
2	087	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	"
3	155	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	"
4	10201	<i>Pseudomonas putida</i>	"
5	10401	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	"

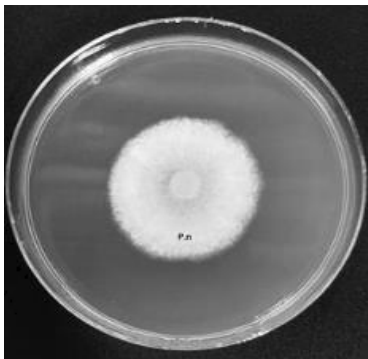


그림 10. *Phytophthora nicotianae*

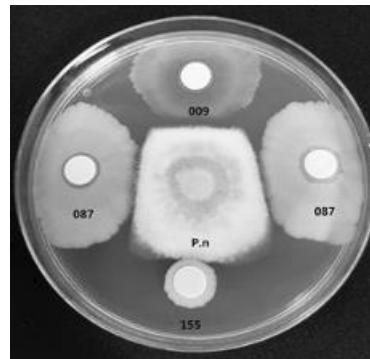


그림 11. 대치배양

(시험 2) 친환경 농자재 효과검정 및 활용기술 개발

○ 친환경 농자재 처리 포장 선정 및 관수시설 설치



그림 12. 직전리 3**번지(2년생)



그림 13. 직전리 2**번지(3년생)

○ 친환경 농자재 처리 후 지하부 생육특성

2년, 3년생 황기 포장을 선정하여 관수시설을 설치하고 아인산염, 석회보르도액(6-6식)을 30일 간격으로 4회 처리한 결과(대조구로는 일반 용수 처리와 화학약제(하이맥사줄·메타락실)를 처리, 관수량은 3000L/10a를 기준), 2년생 지하부 생육특성을 보면 생근중 기준, 아인산염 처리구에서 79.7g으로 대조구 61.1g에 비해 우수하였고, 3년생에서도 비슷한 경향을 보여주었다(표 4).

처리구별 수량에서는 대조구 건근수량 지수를 100으로 보았을 때 아인산염 처리구에서 152로 가장 우수하였고, 방제가 56.5%로 양호하였다.

표 4. 지하부 생육 특성

연생	구분	근장 (cm)	근경 (mm)	지근수 (개/주)	근중(g/주)		
					생	건	건물률(%)
2년생	NC ¹⁾	40.1a ²⁾	19.2b	4.9a	61.1ab	24.2ab	39.2a
	T1	41.1a	19.3b	4.3a	79.7b	31.0b	39.0a
	T2	35.7a	17.2ab	4.1a	62.4ab	27.3ab	44.2ab
	T3	37.2a	14.3a	4.6a	42.9a	19.1a	48.5b
3년생	NC	35.0a	16.4ab	6.0a	46.2ab	17.1a	36.6a
	T1	39.2a	18.1b	7.3a	62.7b	23.7b	37.9a
	T2	34.2a	15.9a	6.9a	46.2ab	17.5ab	37.7a
	T3	36.7a	15.3a	5.6a	39.2a	14.4a	36.0a

1) NC: 대조구, T1: 아인산염, T2: 석회보르도액(6-6), T3: 화학약제(하이맥사줄·메타락실)

2) DMRT(p<0.05), 통계는 연생내 비교

표 5. 지하부 수량 특성

연생	구분	입모율(%)	수량(Kg/10a)			이병주율 (%)	방제가 (%)
			생	건	지수		
2년생	NC ¹⁾	31.3a ²⁾	540.4a	199.5a	100	33.3b	0.0

연생	구분	입모율(%)	수량(Kg/10a)			이병주율(%)	방제가(%)
			생	건	지수		
2년생	T1	33.9a	799.9b	302.4b	152	15.5a	56.5
	T2	29.2a	526.8a	198.9a	100	20.9a	34.7
	T3	23.2a	406.3a	149.3a	75	11.1a	66.3
3년생	NC	74.7ab	294.1ab	115.5ab	100	95.9c	0.0
	T1	81.9b	411.7b	158.9b	138	87.0b	9.6
	T2	71.3a	278.4ab	120.7ab	105	90.1b	6.3
	T3	66.4a	155.3a	69.2a	60	80.7a	15.9

1) NC: 대조구, T1: 아인산염, T2: 석회보르도액(6-6), T3: 화학약제(하이멕사졸·메타락실)

2) DMRT($p<0.05$), 통계는 연생내 비교

(시험 3) 1년차 선발 길항균의 토양전염성 병해 경감효과 검정

○ 시들음병 원인균(*Fusarium oxysporum*) 길항미생물 최종 선발

대치배양법을 통해 *Fusarium oxysporum*에 대해 항균 활성을 나타낸 1년차 선발 길항미생물(표 1)의 진균 성장 억제 효과를 확인하였다.

표 1. 시들음병 원인균 1년차 선발 길항미생물 목록

No.	Strains	Identification	Origin
1	009	<i>Bacillus subtilis</i>	토양
2	087	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	"
3	155	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	"
4	A5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	김치
5	A10	<i>Bacillus</i> sp.	"
6	A11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	"
7	D65-6	<i>Bacillus</i> sp.	된장

그 결과 길항미생물 A11이 *Fusarium oxysporum*의 균사생장을 72.1% 억제하여 가장 높은 억제율을 보였고 087이 67.5%, D65-6이 67.4%를 억제하였다(표 2).

표 2.

Pathogens	Strains						
	009	087	155	A5	A10	A11	D65-6
F. oxysporum	0c*	67.5b	0c	0c	0c	72.1a	67.4b
Control	0c	0c	0c	0c	0c	0c	0c

* DMRT($p<0.05$)

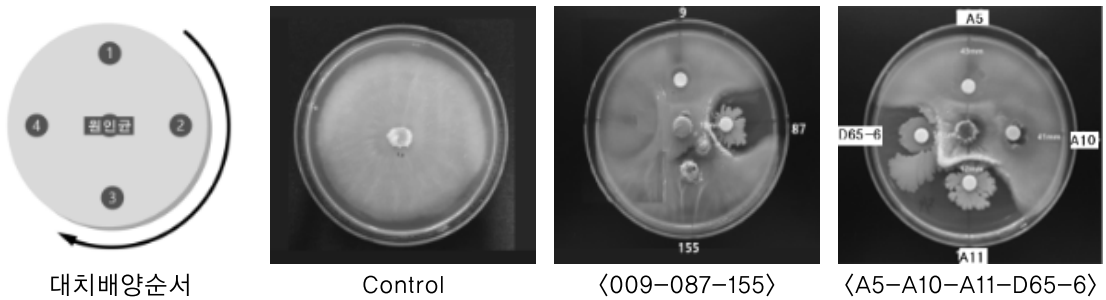


그림 1. 1년차 선발 길항미생물의 시들음병 원인균 생장 억제능력 검정(25℃, 10days)

○ 포트시험을 통한 선발 길항미생물의 시들음병 원인균 길항력 검정

시들음병 원인균에 대해 대치배양을 통해 확인된 1년차 선발 길항미생물(16-5등 3종)의 길항력을 식물체에서 검증하기 위해 포트 실험을 수행하였다.

포트시험을 실시한 결과 길항미생물 A11 접종시 병이 발생하지 않아 억제율이 가장 높았고 대조구 처리(NB배지액 처리), 길항미생물 D65-6 처리에서는 16.7%가 발병하였고 대조구 처리(무처리=Control), 길항미생물 087 처리에서는 33.3%의 병 발생율을 보였다.

1년차 선발한 길항미생물 7종에서 대치배양 및 포트시험을 통해 가장 높은 원인균 억제율을 보인 길항미생물 A11을 정선균 일대 황기 재배 실증지에 처리할 선발 길항균으로 최종 선정하였다.

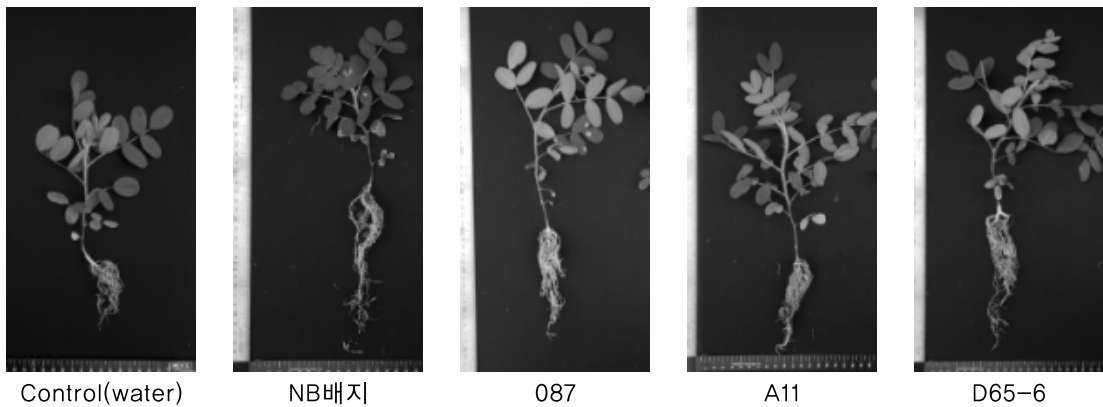


그림 2. 길항미생물-시들음병 원인균(*F. oxysporum*) 교호 처리시 생육결과

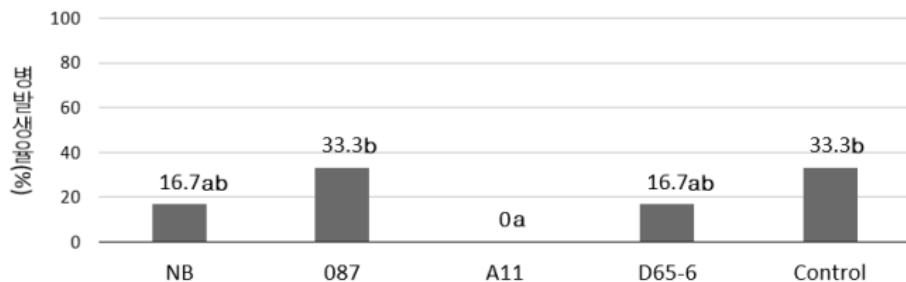


그림 3. 선발 길항미생물-시들음병 원인균(*F. oxysporum*) 처리시 병발생율 비교

○ 뿌리썩음병 원인균(*Phytophthora* sp.) 길항미생물 최종 선발

황기 뿌리썩음병 원인균(*Phytophthora* sp.)에 대해 군사 성장 억제능력을 확인한 길항미생물(표 3)에 대해 해당 병원균의 군사 성장을 억제한 거리를 3반복으로 3회 시험하여 군사억제능력을 평가하였다.

표 3. 뿌리썩음병 원인균 1년차 선발 길항미생물 목록

No.	Strains	Identification	Origin
1	009	<i>Bacillus subtilis</i>	토양
2	087	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	"
3	155	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	"
4	10201	<i>Pseudomonas putida</i>	"

그 결과 길항미생물 10201이 *Phytophthora* sp.에 대해 평균 63.2%의 군사생장을 억제하여 가장 높은 억제율을 보였고 087이 50.8%, 155가 27.3% 억제하였다.

표 4. 길항미생물의 뿌리썩음병 원인균(*Phytophthora* sp.) 군사 성장 억제율

Strains Pathogens	009	087	155	10201
<i>P. drechsleri</i>	0c*	51.2b	0c	66.7a
<i>P. cryptogea</i>	42.6b	55.0a	31.8c	60.5a
<i>P. nicotianae</i>	0c	46.1b	50.1b	62.4a
Control	0c	0c	0c	0c

* DMRT($p < 0.05$)

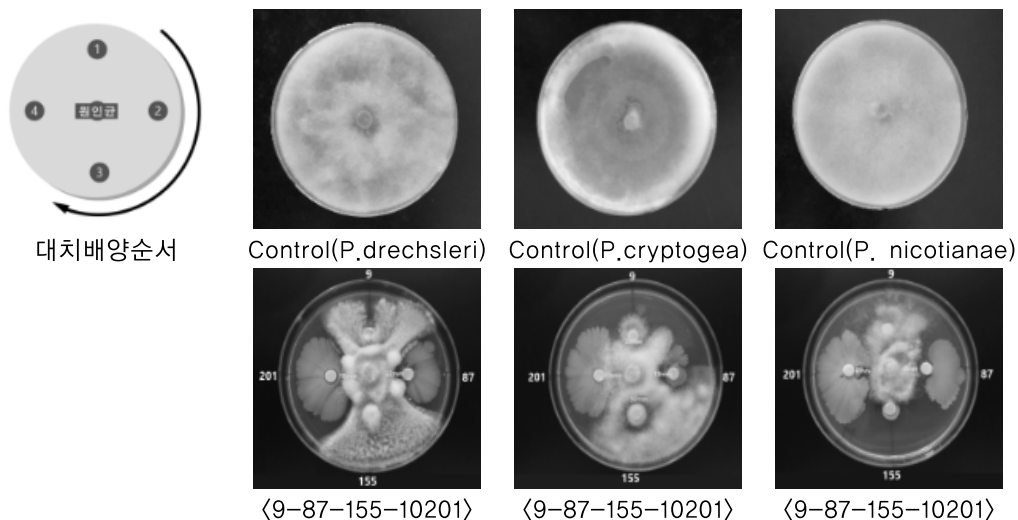


그림 4. 길항미생물의 뿌리썩음병 원인균 성장 억제능력 검정(25°C, 10days)

○ 뿌리썩음병 원인균의 발병 조건 검토

뿌리썩음병 원인균인 *Phytophthora* sp.은 일반 진균과는 매우 다른 여러 가지 특성을 가지고 있는데 균사 성장 후 유주자낭(번식기관)을 형성한 뒤 유주자를 유출시켜 식물체로 침입한다. 이에 효과적인 식물체의 병 발생을 위해서는 다수의 유주자낭을 형성시키는 게 중요하여 유주자낭을 형성하는 최적 온도조건을 확인하였다. *Phytophthora* sp. 모두 20℃보다 높은 24℃ 조건에서 유주자낭을 많이 형성하였다(표 5).

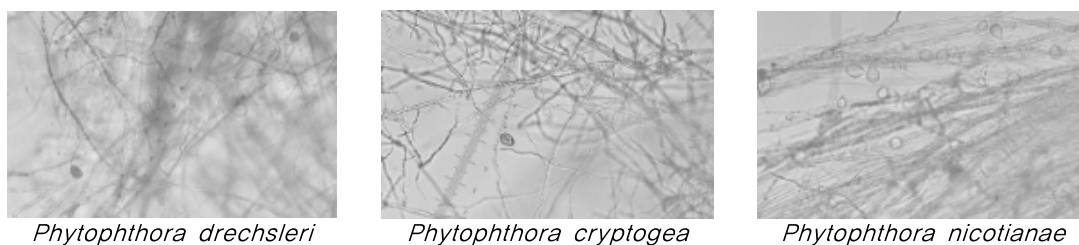


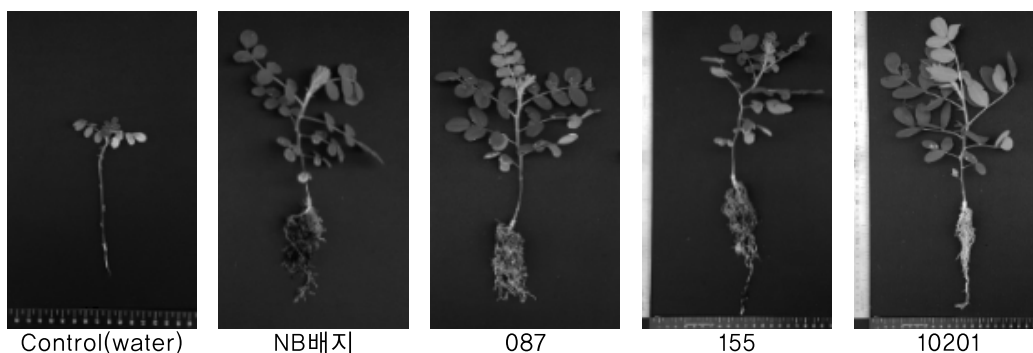
그림 5. 뿌리썩음병 원인균 번식기관 형성(광학현미경 400배율)

표 5. 뿌리썩음병 원인균 번식기관 형성 최적 온도 비교(48hr 배양 조건)

역병균별	온도(℃)	유주자낭 수	유주자 수
Phytophthora drechsleri	20	+	+
	24	+++	++
Phytophthora cryptogea	20	+	++
	24	++	+++
Phytophthora nicotianae	20	++	++
	24	+++++	+++++

○ 포트시험을 통한 길항미생물의 뿌리썩음병 원인균 길항력 검토 결과

식물체에서 길항미생물의 병원균 억제능력을 확인하기 위한 황기 유묘를 이용한 포트실험에서 10201과 155를 접종 후 원인균으로 *Phytophthora drechsleri*를 접종한 처리구에서는 뿌리썩음병이 16.7% 발생하여 억제율이 가장 높았고 087을 접종한 처리구에서는 50%의 발병율을 보였다(그림 6).



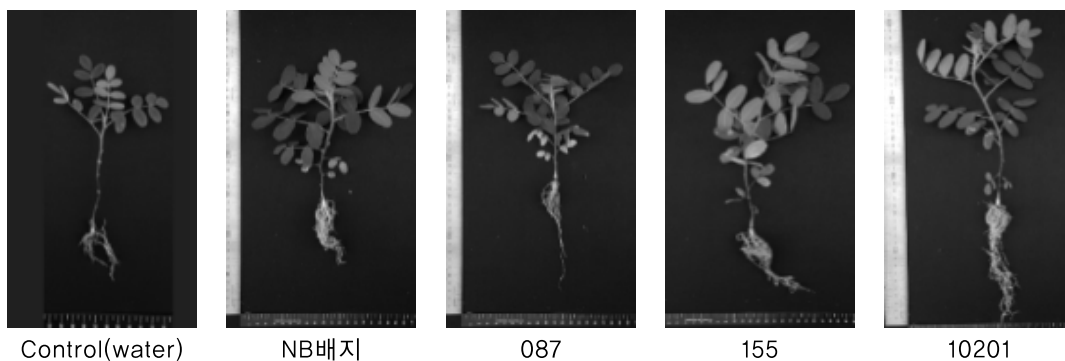


그림 6. 길항미생물-뿌리썩음병 원인균(*P. drechsleri*) 교호 처리시 생육결과

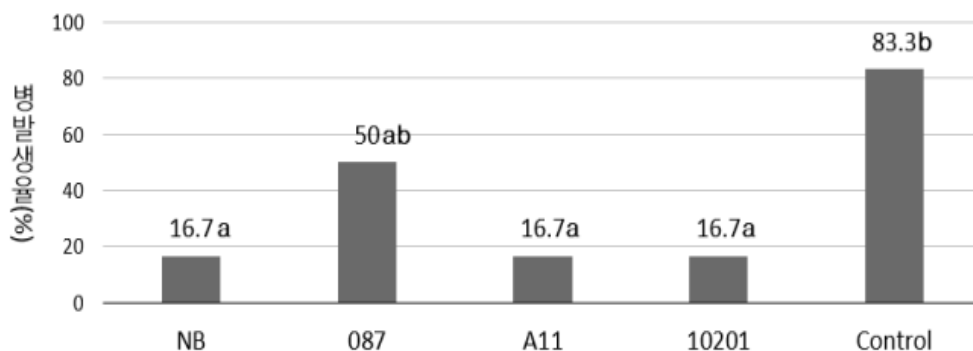


그림 7. 길항미생물-뿌리썩음병 원인균(*P. drechsleri*) 처리시 병발생을 비교 * DMRT($p < 0.05$)

Phytophthora drechsleri, *Phytophthora cryptogea*를 원인균으로 접종한 처리구에서는 길항 미생물 087, A11, 10201 모두 16.7%로 발병율이 낮았고 대조구(무처리)와 희석 배지액 처리구에서는 각각 50.0%, 33.3%로 발병율이 높았다(그림 7, 8).

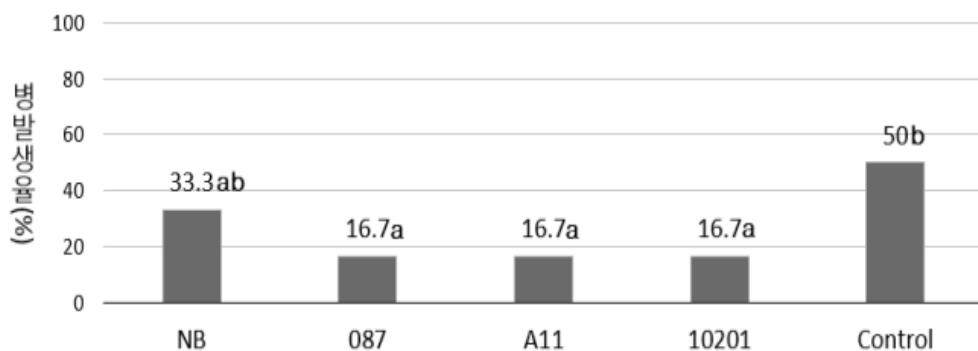


그림 8. 길항미생물-뿌리썩음병 원인균(*P. cryptogea*) 처리시 병발생을 비교 * DMRT($p < 0.05$)

1년차 선발 길항미생물 4종에서 원인균 억제능력과 생장촉진능력을 갖춘 길항미생물 10201을 실증지 선발 길항미생물로 최종 선정하였다.

(시험 4) 친환경 자재 토양전염병 경감효과 검정 및 활용법 확립

○ 친환경 농자재 처리를 위한 실증지 선정 및 관수시설 설치



정선군 신동읍 예리리 2**-* (2년생)



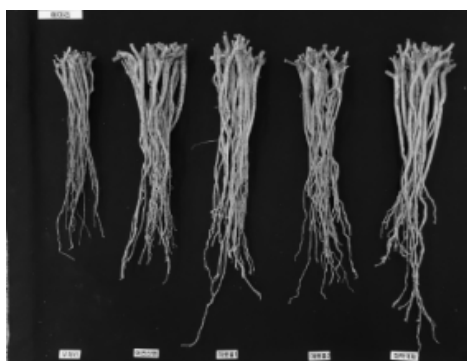
정선군 사북읍 직전리 3** (3년생)

그림 9. 친환경 농자재 처리 실증지 현황

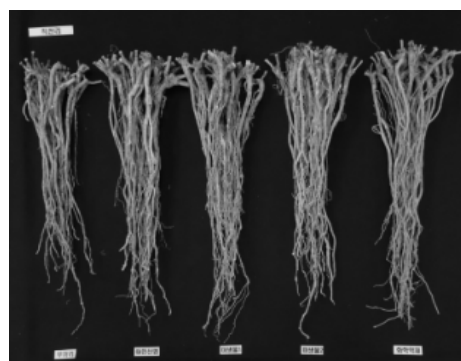
○ 친환경 농자재 처리 후 지하부 생육 특성 결과

아인산염, 선발 길항미생물 2종(A11, 10201, 1×10^5 CFU/ml 이상)을 6월부터 10월까지 한 달 간격으로 총 5회 처리한 결과, 지하부 생육특성은 생근중을 기준으로 2년생에서는 화학약제 처리구에서 22.6g으로 가장 높았고 3년생에서는 아인산염 처리구에서 25.0g으로 가장 높았다.

선발 길항미생물 처리구는 무처리구에 비해 2년생과 3년생 재배지 모두 생근중이 4.1~6.3g 정도 높았다.



황기 2년생



황기 3년생

그림 10. 친환경농자재 처리시 지하부 생육 특성(무처리-아인산염-A11-10201-화학약제 순)

표 6. 지하부 생육 특성

연 생	구 분	근장 (cm)	근경 (mm)	지근수 (개/주)	근중(g/주)		
					생	건	건물률(%)
2년생	Control ¹⁾	37.9a	11.7a	8.8a	12.7a	4.0a	31.2a
	T1	40.0a	14.4b	9.2a	18.9ab	6.1ab	32.3a
	T2	41.1a	13.4ab	9.6a	19.2ab	6.2ab	32.5a
	T3	42.2a	13.7ab	8.1a	19.0ab	5.9ab	30.9a
	T4	42.6a	14.8b	7.0a	22.6b	7.3b	32.2a

연 생	구 분	근장 (cm)	근경 (mm)	지근수 (개/주)	근중(g/주)		
					생	건	건물률(%)
3년생	Control	42.7a	13.2a	9.0a	19.0a	6.3a	33.3a
	T1	45.2a	15.0a	12.0ab	25.0a	8.1a	32.3a
	T2	47.1a	14.9a	13.3ab	23.5a	8.1a	34.5a
	T3	47.8a	14.2a	14.4b	23.1a	7.8a	33.5a
	T4	49.1a	13.4a	9.5a	21.3a	7.4a	34.6a

1) Control: 대조구, T1: 아인산염, T2: 시들음병 길항균(A11), T3: 뿌리썩음병 길항균(10201) T4: 화학약제(하이멕사졸)
2) DMRT(p<0.05)

처리구별 황기 지하부 생육특성에서는 2년생과 3년생 모두 근장, 근경, 지근수, 근중 등 처리간 유의성이 거의 나타나지 않았다.

처리구별 수량 특성에서는 무처리와 비교하여 처리구별 방제가에서 유의적인 차이가 나타나 2년생 재배지와 3년생 재배지 모두 비교적 높은 수량성을 나타냈다. 2년생 재배지에서는 대조구 건근수량을 100으로 할 때, 화학약제 185.4 > 아인산염 156.7 > 선발 길항미생물이 각각 158.1, 147.1로 무처리에 비해 높은 수량성을 나타냈다. 3년생 재배지에서는 아인산염 131.2 > 시들음병 길항미생물(A11) 128.0 > 뿌리썩음병 길항미생물(10201) 122.5 > 화학약제 118.4 순으로 수량성이 높았다.

처리구별 방제가는 2년생 재배지에서는 아인산염이 56.0%로 가장 높았고 뿌리썩음병 선발길항미생물(10201)이 35.0%, 시들음병 길항미생물(A11)이 26.7%를 나타냈다.

3년생 재배지의 방제가는 뿌리썩음병 길항균(10201)이 44.1%로 가장 높았고 아인산염 42.4% > 시들음병 길항미생물(A11) 37.4% > 화학약제 33.5% 순이었다.

친환경 농자재를 처리할 경우 3년생 재배지보다 2년생 재배지에서 이병율과 수량지수에 있어 유의미한 결과를 나타내므로 1년생부터 처리하는 등 년생에 대한 처리시기를 앞당길수록 효과적이라 판단된다.

표 7. 지하부 수량 특성

연 생	구 분	입모율(%)	수량(Kg/10a)			이병주율 (%)	방제가 (%)
			생	건	지수		
2년생 (예미리)	Control ¹⁾	92.3a ²⁾	183.2b	57.1b	100.0	47.7a	0.0a
	T1	93.8a	276.4ab	89.5ab	156.7	21.0c	56.0c
	T2	92.4a	278.4ab	90.3ab	158.1	35.0b	26.7b
	T3	92.0a	271.2ab	84.0ab	147.1	31.0bc	35.0bc
	T4	93.0a	328.3a	105.9a	185.4	24.7bc	48.2bc
3년생 (직전리)	Control	90.3a	267.3a	89.4a	100.0	58.9a	0.0a
	T1	93.1a	362.9a	117.3a	131.2	33.9b	42.4b
	T2	90.9a	332.8a	114.4a	128.0	36.9b	37.4b
	T3	91.1a	325.2a	109.5a	122.5	33.0b	44.1b
	T4	92.4a	306.0a	105.8a	118.4	39.2ab	33.5ab

1) Control: 대조구, T1: 아인산염, T2: 시들음병 길항균(A11), T3: 뿌리썩음병 길항균(10201) T4: 화학약제(하이멕사졸)
2) DMRT(p<0.05)

(시험 5) 길항미생물 식물생장 촉진 및 병원균 억제능 검증

길항미생물 5종 배양여액을 이용한 무 종자의 생장촉진효과를 평가한 결과, 초장에서는 길항미생물 5종 모두 무처리에 비해 유의적인 수준에서 높았으나 각각의 길항미생물간에는 유의성이 나타나지 않았다. 생체중에서는 A11과 10201이 0.14g으로 가장 높았으나 유의성이 나타나지는 않았다(그림 1, 2).

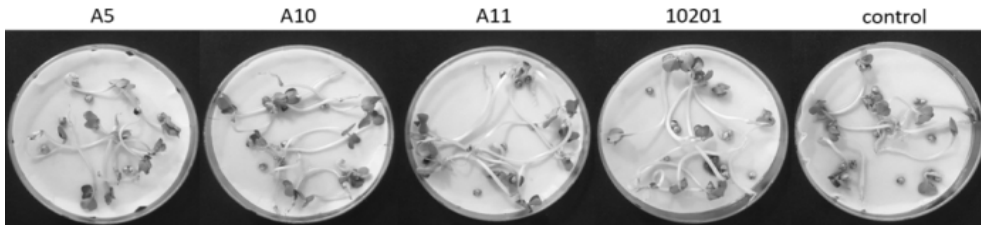


그림 1. 길항미생물 5종 배양여액 분주시 무 종자 생장촉진효과 양상

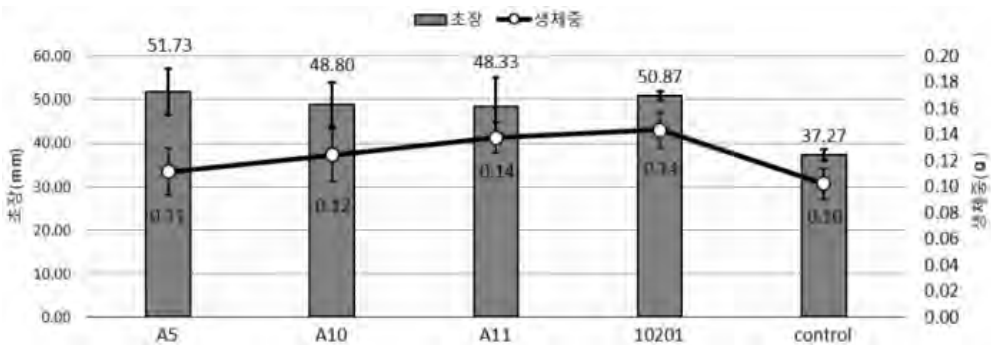


그림 2. 길항미생물 5종 배양여액의 무종자 초장 및 생체중 수준

○ 길항미생물 5종의 protease 생성 평가

미생물 중 *Bacillus* 속이 분비하는 가수분해효소 중 protease는 토양 내 난용성 단백질을 식물이 흡수할 수 있는 가급태로 분해하는 역할을 하고 식물 병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용을 통해 항균활성을 나타낼 수 있다.

길항미생물 5종의 protease 생성 평가에서 길항미생물 A11과 B2-087, A10이 가장 높은 분해 능력을 나타냈고 A5도 분해 능력을 보여주었다. 그러나 10201에서는 단백질 분해능력을 확인할 수 없었다(그림 3).

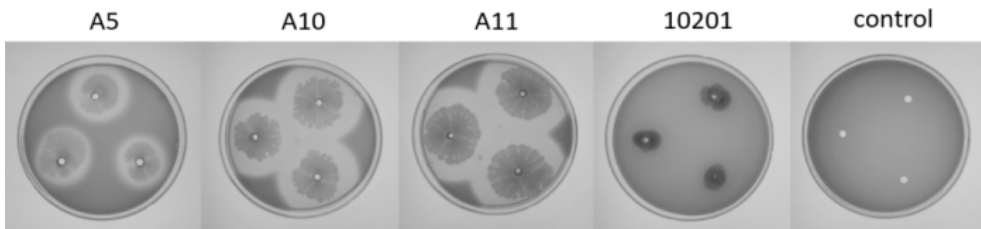


그림 3. 길항미생물 5종의 Protease 생성 평가(투명환 생성 수준)

○ 길항미생물 5종의 Siderophore 생성 평가

미생물은 siderophore 생성을 통해 토양 내 결합된 Fe을 해리시키거나 흡수하여 식물의 Fe 흡수를 돕는 한편, 병원균의 Fe 이용을 억제하여 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용을 한다(Niranjan et al., 1980).

길항미생물 5종의 siderophore 생성 능력을 확인한 결과, 길항미생물 10201에서 가장 높은 siderophore 활성을 확인하였고 A10과 A11, B2-087이 비슷한 수준으로 siderophore를 활성을 보여주었다. 길항미생물 A5에서는 가장 낮은 수준의 활성을 나타내었다(그림 4).

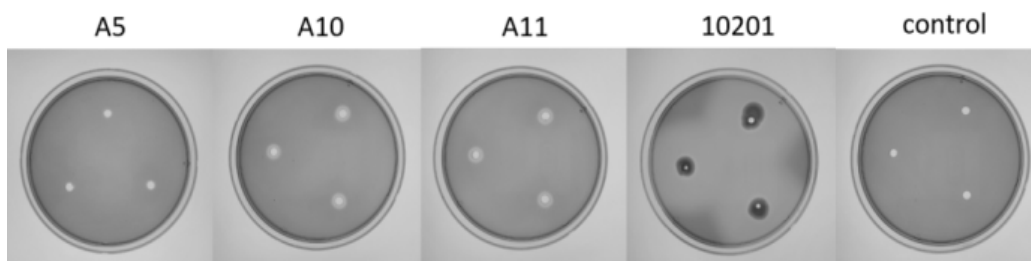


그림 4. 길항미생물 5종의 Siderophore 생성 평가(투명한 생성 수준)

○ 길항미생물 4종의 cellulose 분해 효소 생성 평가

*Bacillus*속이 분비하는 가수분해효소 중 cellulase는 cellulose를 가수분해하는 효소로 황기 뿌리썩음병 원인균(*Phytophthora* 속)의 세포벽을 구성하는 cellulose를 분해하여 직접적인 항균활성을 나타낸다고 알려져 있다.

길항미생물 5종의 cellulase 생성 평가에서는 길항미생물 A5와 A10, B2-087에서 낮은 수준으로 분비하고 있음을 확인하였고 A11과 10201에서는 확인할 수 없었다(그림 5).

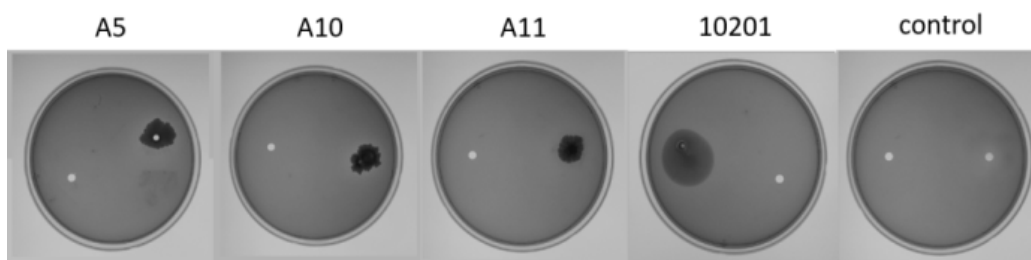


그림 5. 길항미생물 5종의 Cellulase 생성 평가(투명한 생성 수준)

○ 길항미생물 4종의 항생물질 생성 유전자 검정

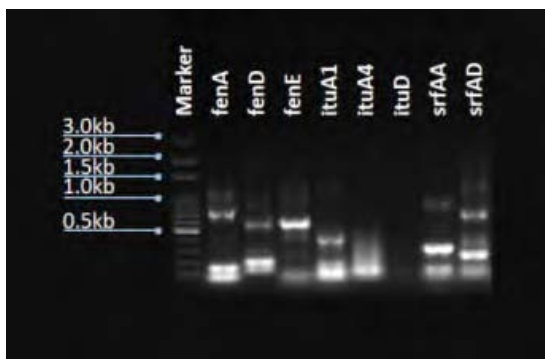
Bacillus 균주들은 iturin, surfactin, fengycin 등의 항균성 2차 대사물질을 분비하여(Akira et al., 1987) 항균 활성을 나타낸다고 알려져 있다(Ongena and Jacques, 2008). 이에 대체배양을 통해 황기 토양전염병 원인균 2종(*F. oxysporum*, *P. drechsleri*)의 군사를 효과적으로 억제한 4종의 선발균주에 대해 항생물질 분비 여부를 유전자 발현 검정을 통해 확인하였다. 주요 항균성 2차 대사물질인 iturin, surfactin, fengycin 3종에 대해 특이적으로 반응하는 primer(표 1)를 제작하여 PCR 분석을 실시하였다.

표 1. 항균성 2차 대사물질 검정 primer sequence 목록

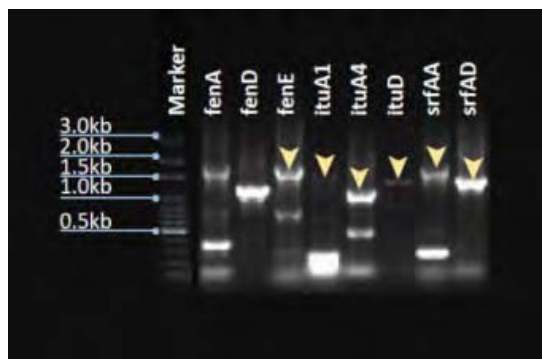
No.	Primer	bp	Sequence
1	fenA-f fenA-r	1574	CCTCGCTCCGCATGATCTTTTGG CGGGAGCACGGTGGCAATGTG
2	fenD-f fenD-r	2000	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC
3	fenE-f fenE-r	1580	GTTTCATGGCGGCGAGCACG GATTCGCGGGAAGCGGATTGAGC
4	ituA1-f ituA1-r	1445	CGCCCGTGAAGGAGCAGCCG GCCAGGAAGCGGGGCTTCAC
5	ituA4-f ituA4-r	920	CTGCCTGCGTATATGATTCCGGC CCGTGATGATGCCGTTCTTCAATCC
6	ituD-f ituD-r	998	ATGAACAATCTTGCCTTTTTTA TTATTTTAAAATCCGCAATT
7	srfAA-f srfAA-r	1485	GCCCGTGAGCCCAATGGATAAG CCGTTTCAGGGACACAAGCTCCG
8	srfAD-f srfAD-r	1239	CCGTTTCGAGGAGGCTATTCC CGCCATCCTGCTGAAAAAGCG

길항미생물 4종에 대해 항생물질 3종(iturin, surfactin, fengycin)의 유전자 발현을 검정한 결과, 길항미생물 A10은 fenE 등 6개 primer에서 각각의 항생물질 유전자 발현이 확인되었고 A11은 5개, 10201에서는 1개의 항생물질 유전자 발현이 확인되었다. 그러나 길항미생물 A5에서는 항생물질 3종의 유전자 발현을 확인할 수 없었다(그림 6).

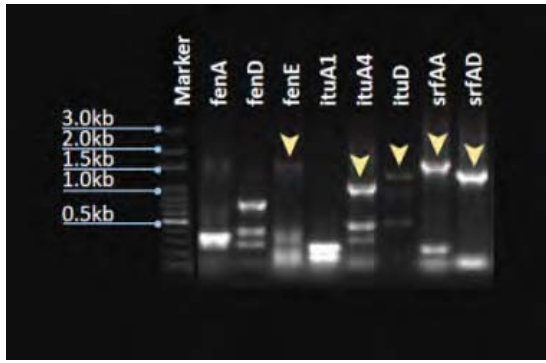
이를 통해 항생물질 3종의 유전자 발현이 확인된 길항미생물 A10과 A11, 10201은 다수의 항생물질 분비가 토양진염병 원인균을 저해하는데 영향을 미치는 것으로 판단되었고 항생물질 유전자 발현이 확인되지 않은 길항미생물 A5는 protease 등 가수분해효소 분비를 통해 병원균을 저해한다고 추정되었다.



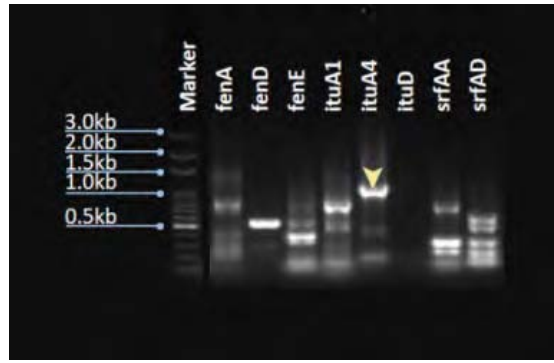
A5



A10



A11



10201

그림 6. 전기영동을 통한 길항미생물 4종 항생물질 유전자 발현 검정 결과

○ 길항미생물 4종 황기 유묘 성장촉진능력 평가

선발 길항미생물 4종의 황기 유묘 생육촉진능력을 측정한 결과, 엽수와 생체중에서 길항미생물 4종 모두 무처리와 비교하여 유의적인 결과를 나타냈다. 특히 10201의 경우 엽수와 생체중에서 가장 높은 성장촉진능력이 나타났다. 이는 무종자를 이용한 성장촉진능력시험 결과와 일치하였다(그림 7, 표 2).

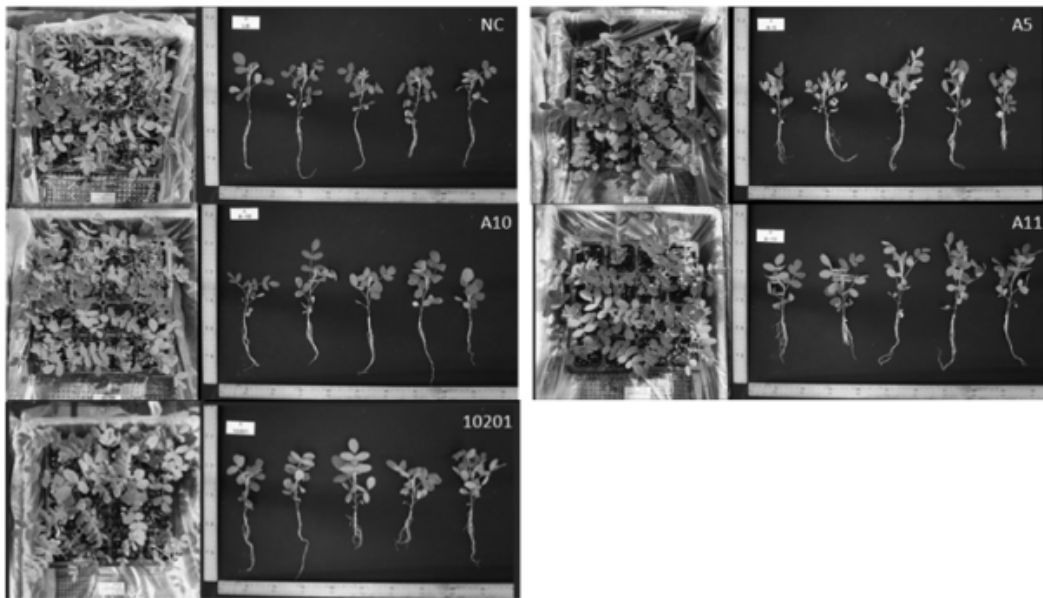


그림 7. 선발균주 4종 접종 후 황기 유묘 성장 수준

표 2. 길항미생물 4종 황기 유묘 성장촉진능력 측정 결과

구분 처리	초장(cm)	엽수(매)	근장(cm)	근수(개)	근경(cm)	생근중(g)	생체중(g)
무처리	12.13a	5.8a	13.3a	4.4ab	1.8a	0.20a	0.83a

구분 처리	초장(cm)	엽수(매)	근장(cm)	근수(개)	근경(cm)	생근중(g)	생체중(g)
A5	12.89a	6.5ab	11.0a	7.0c	2.4b	0.22a	1.20ab
A10	12.49a	6.3ab	11.4a	4.2ab	1.9ab	0.20a	0.98ab
A11	12.58a	6.3ab	12.1a	5.9bc	2.2ab	0.24a	1.16ab
10201	12.99a	6.7b	10.5a	3.5a	2.0ab	0.20a	1.27b

* DMRT($p < 0.05$)

○ 선발 길항미생물 4종의 황기 토양전염병 원인균 억제능력 평가

- 황기 토양전염병 원인균 2종에 대한 발병 기준

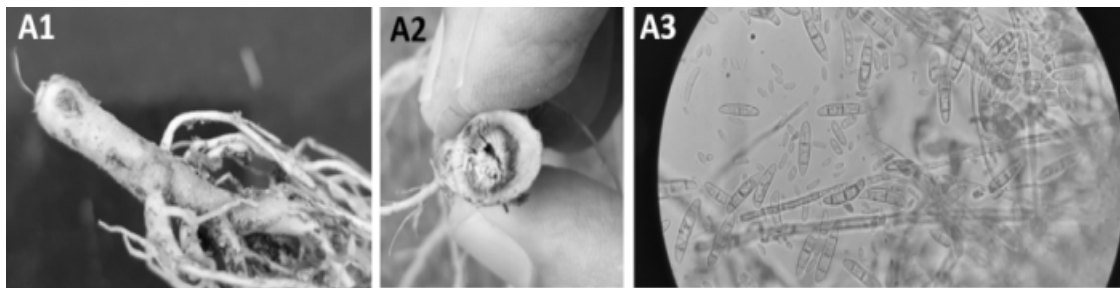
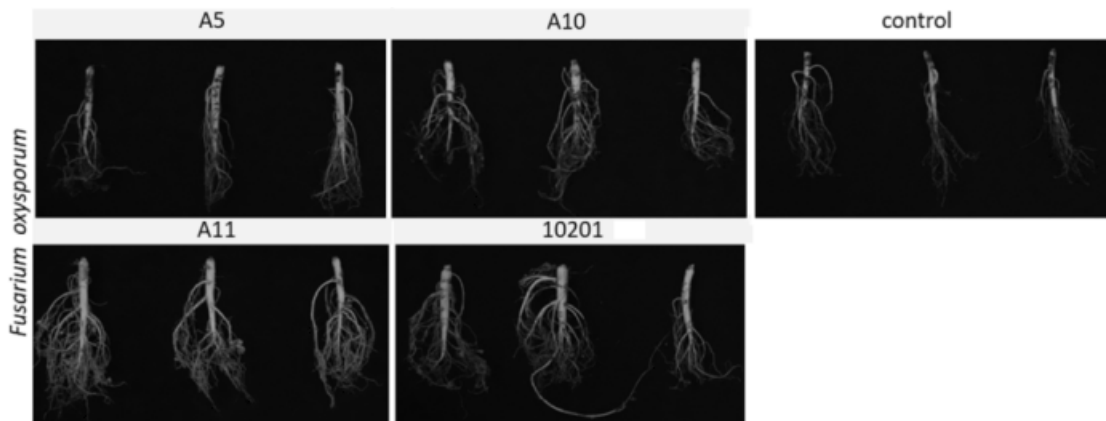


그림 8. 황기 시들음병(*F. oxysporum*) 병징에 따른 발병 기준 및 분생자 특성

식물체에서 길항미생물의 군사억제능력을 확인하기 위해 30일 간 육묘한 황기를 이용하여 시들음병 원인균인 *F. oxysporum*과 뿌리썩음병 원인균인 *P. drechsleri*를 각각 교호 접종하는 방법으로 포트 시험한 결과, 길항미생물 4종 모두 무치리에 비해 유의적인 수준에서 방제가가 높게 나타났다. 길항미생물 A11의 경우 시들음병 원인균과 뿌리썩음병 원인균 발병율이 각각 28.9%와 15.6%로 나타나 방제가로 환산할 때 72.0%, 68.2%의 방제가를 보여 가장 높은 수준을 나타냈다. 이러한 결과는 대치배양을 통한 병원균 군사 생장 억제 효과 검정 결과와 일치하였다(그림 10, 11).



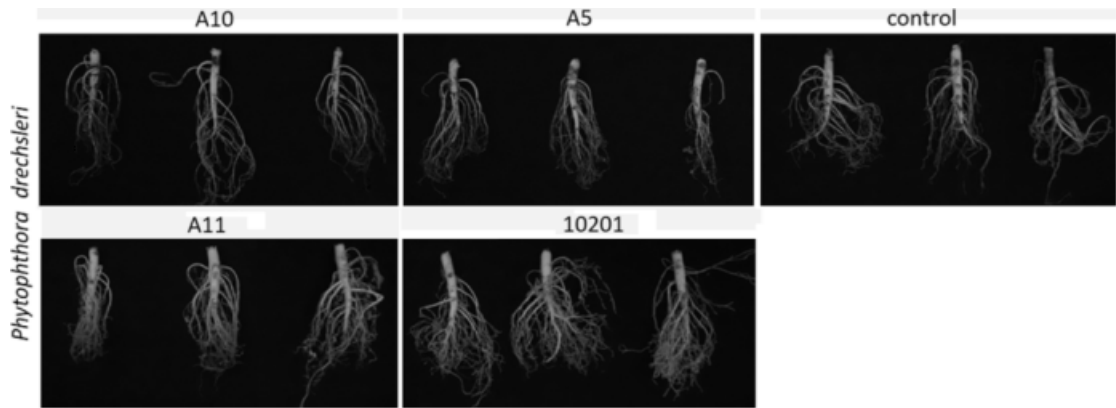


그림 10. 길항미생물-병원균 교호 접종시 지하부 발병 수준

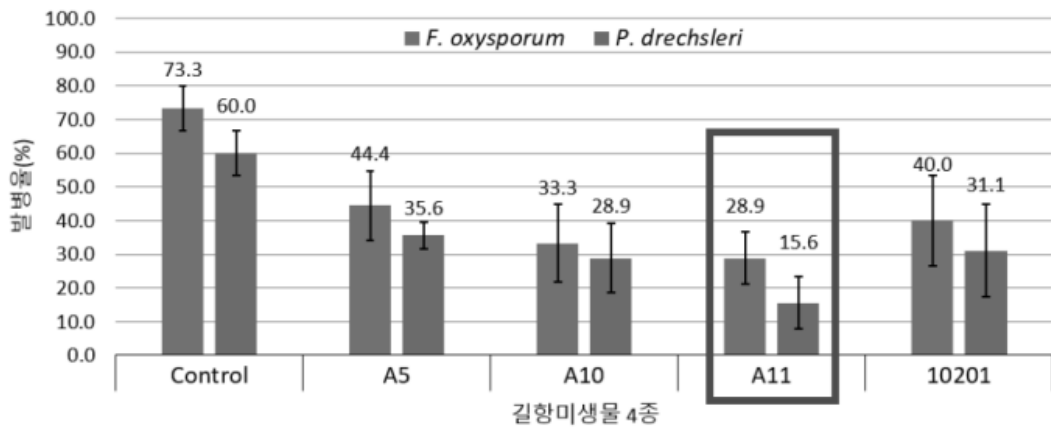


그림 11. 길항미생물-병원균 교호 접종시 토양전염병 발병율(%)

황기 토양전염병 원인균에 대해 길항미생물 4종의 대치배양 및 포트시험(생육촉진효과 검정, 병원균 억제능력 검정) 검정 결과 병원균 억제능력이 높은 A11과 생육촉진효과가 높은 10201을 최종 길항미생물로 선발하였다.

표 3. 황기 재배지 효과 검정 길항미생물 2종 최종 선발 결과

No.	Strains	Identification	Origin	Note
1	A11	Bacillus amyloliquefaciens	김치	병원균 방제효과 우수
2	10201	Pseudomonas putida	토양	생육촉진효과 우수

(시험 6) 길항미생물 재배지 효과 검정 및 실용화기술 개발

○ 실증지 선정 및 처리시설 설치

황기 생육촉진능력과 병원균 억제능력이 높은 길항미생물 2종의 황기 토양전염성 병해 저감 효과를

확인하기 위해 강원도 정선군과 철원군에 위치한 황기 재배지에서 2년생 황기와 3년생 황기를 재배 중인 포장 1개소를 각각 선정하였으며, 포장 1개소는 전년도 친환경 농자재 현장 실증의 연차 변이를 평가하기 위해 동일한 포장에서 실시하였다(그림 1).



그림 1. 정선군 신동읍 예미리 2**~*(3년생)(좌) / 철원군 청양리 3**(2년생)(우)

○ 실증지 친환경농자재 처리별 지하부 생육 특성 결과

－ 황기 3년생 지하부 생육 특성 결과

길항미생물 2종의 황기 3년생 재배지 효과 검정 결과, 처리구별 토양전염병 방제가는 무처리와 비교하여 길항미생물 A11 처리구에서 30.5%로 가장 높게 나타났으며 화학약제 처리구와 길항미생물 10201 처리구에서 각각 21.5%와 13.6% 높게 나타났다

방제가를 고려한 처리구별 지하부 수량지수에서는 무처리구를 100으로 할 때, 길항미생물 A11 처리구에서 215.5로 가장 높게 나타났으며 화학약제 처리구와 10201 처리구에서도 무처리에 비해 유의적인 수준에서 높게 나타났다(그림 3).

지하부 생육 특성에서는 처리구별 유의성이 크게 나타나지 않았으나 지근수의 경우 길항 미생물을 처리한 A11과 10201 처리구에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다(표 1).

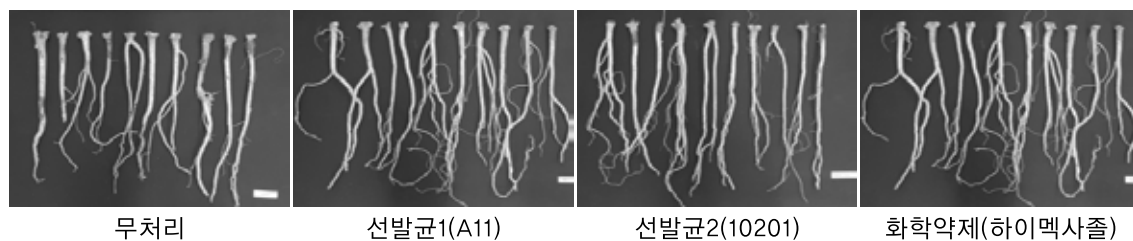


그림 2. 친환경농자재 처리별 황기 3년생 지하부 생육 비교

표 1. 지하부 생육 특성(10. 8.기준)

연생	구분	근장 (cm)	근경 (mm)	지근수 (개/주)	근중(g/주)		
					생	건	건물률(%)
3년생 (정선)	무처리	43.5a	15.5a	1.6a	37.0a	11.9a	32.03a
	A11	46.3a	16.1a	3.3c	47.3a	15.6a	33.04a
	10201	50.4a	15.7a	2.8bc	46.9a	16.3a	34.68a
	화학약제	44.2a	15.3b	2.1ab	39.7a	13.0a	32.84a

* DMRT($p < 0.05$)

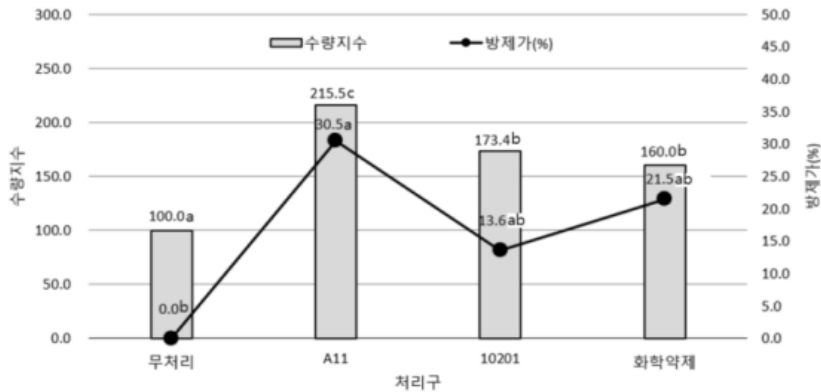


그림 3. 황기 3년생 실증지 처리구별 지하부 수량지수 및 방제가 비교 * DMRT($p < 0.05$)

- 황기 2년생 지하부 생육 특성 결과

길항미생물 2종의 황기 2년생 재배지 효과 검정 결과, 황기 토양전염병 방제가는 무처리와 비교하여 길항미생물 A11 처리구에서 53.8%로 가장 높게 나타났고 화학약제 처리구와 10201 처리구에서 각각 40.3%와 17.7%로 나타났다. A11 처리구의 경우 황기 3년생 포장에서의 방제가와 비교하여 23.3% 높은 수준이다(8, 10, 기준).

방제가를 고려한 처리구별 지하부 수량지수에서는 무처리구를 100으로 할 때 A11 처리구는 184.1, 화학약제 처리구는 158.4, 10201 처리구는 97.4로 나타났다(8, 10, 기준).

그러나 8. 1.~8. 11. 기간 동안 총 783.7mm(최대 일일강수량 155.5mm)의 집중호우가 발생하여 집중호우 이후부터 길항미생물 처리구의 이병주율이 급격히 증가하였는데(그림 6, 7), 이는 토양 내 포화수분이 길항미생물 활성화에 영향을 미쳤을 것으로 추정되며 이에 대한 후속 연구가 필요하다.

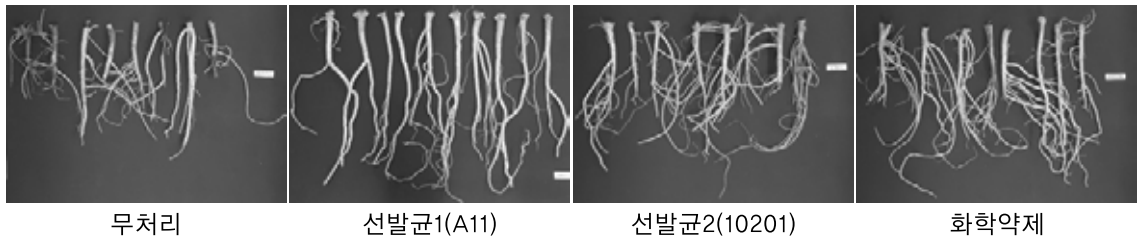


그림 4. 친환경농자재 처리별 황기 2년생 지하부 생육 비교

표 2. 지하부 생육 특성(8, 10, 기준)

연생	구분	근장 (cm)	근경 (mm)	지근수 (개/주)	근중(g/주)		
					생	건	건물률(%)
2년생 (철원)	무처리	36.6a	15.4a	5.8a	38.9a	12.5a	32.13a
	A11	38.4a	17.6a	7.1a	46.1a	14.7a	31.87a
	10201	34.9a	14.1a	4.2a	37.4a	11.2a	29.80a
	화학약제	42.4a	16.6a	5.5a	43.7a	14.1a	32.27a

* DMRT($p < 0.05$)

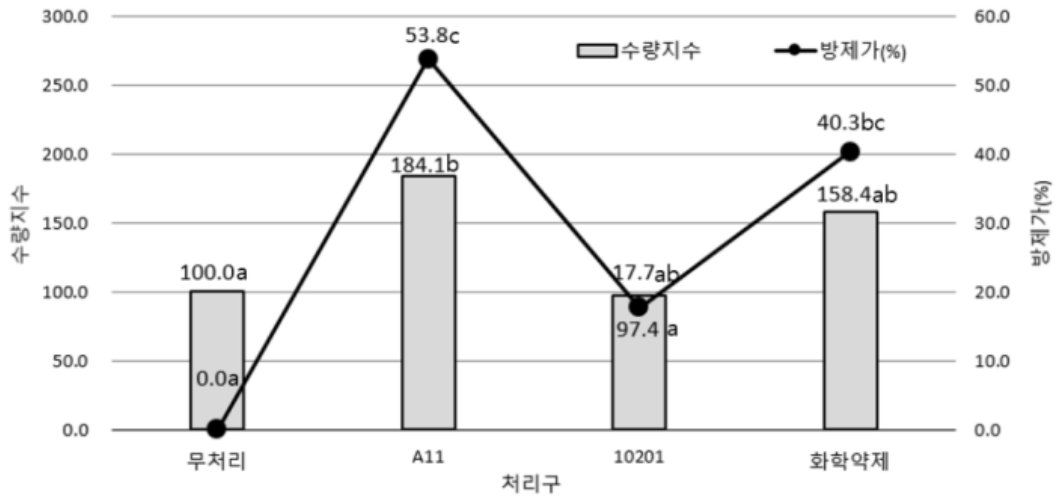


그림 5. 황기 2년생 실증지 처리구별 지하부 수량지수 및 방제가 비교 * DMRT($p < 0.05$)

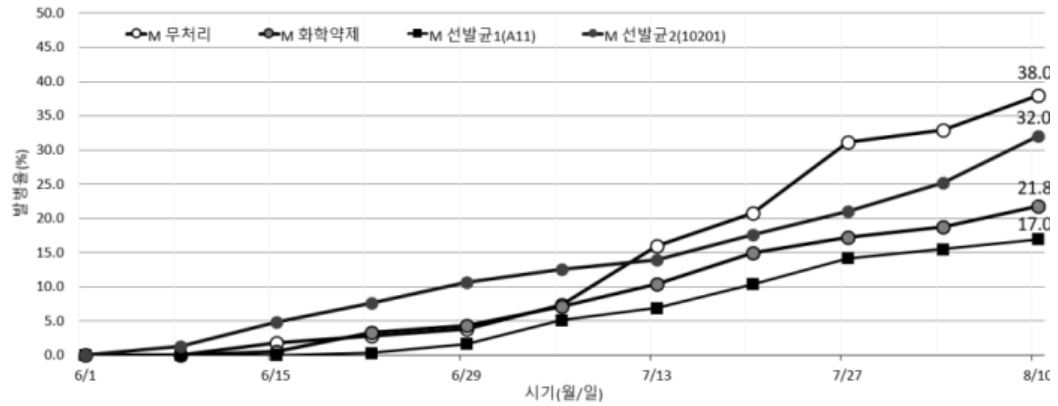


그림 6. 재배 기간 중(6월~8월) 처리구별 이병주율 추이(2020. 철원)

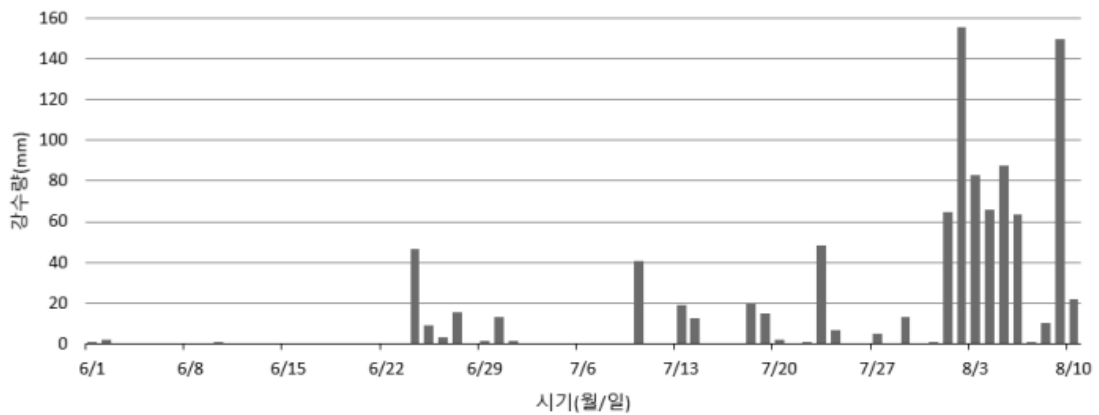


그림 7. 재배 기간 중(6월~8월) 일강수량(2020. 철원)

4 적 요

〈제1세부과제: 황기 토양전염병 발생실태 조사〉

(시험 1) 재배 환경별 발병실태 조사

- 가. 황기 연생별 토양전염병 발생 여부에 따른 미생물 군집분석에서 1년생과 2년생 포장의 경우 병 발생 여부에 따라 시들음병 원인균이 속한 *Fusarium* 속 분포율에 큰 차이가 없었으나 3년생의 경우 미발병지와 비교하여 발병지에서 8.3배 높아 재배 연수에 따라 황기 시들음병 빈도가 증가한다는 보고와 일치하였음.
- 나. 토양 내 미생물 중 다양성 수준을 나타내는 ACE지수가 3년근 미발병 지역에서는 1.27로 발병지 1.07보다 높았으며 Chao1 지수 역시 미발병 지역에서 1.23으로 발병지 1.04보다 높아 병 발생시 미생물 다양성 지수가 감소하였음.

(시험 2) 토양전염병 원인균 분석

- 가. 황기 토양전염병 발병 부위에서 원인균을 분리한 결과, 콩이나 감귤 뿌리썩음병 원인균으로 알려진 *Fusarium solani*와 *F. oxysporum*이 주로 동정되었으며 튕립 뿌리썩음병 원인균으로 알려진 *Phytophthora cryptogea*가 황기에서 처음 발견되었음.

(시험 3) 재배 환경별 발병실태 조사(2년차)

- 가. 황기 토양전염병 발병 여부에 따라 *Fusarium* spp. 의 분포율 차이 재현성을 확인한 결과, 미발병지에 비해 발병지에서 *Fusarium* spp. 분포율이 높음을 확인하였음.
- 나. 3년근 병 발생지에서는 *Fusarium* 속 중 시들음병 원인균인 *Fusarium oxysporum* 보다 *Fusarium solani*의 분포가 약 6배 높게 나타나 황기 토양전염병 발병에 연관성이 있을 것으로 사료됨.
- 다. 토양 미생물 중 *Anthophyta*, *Eudicotyledonae* 등 12종은 토양전염병 발생 토양에서만 확인되어 바이오마커로서 유망할 것으로 사료됨.

(시험 4) 토양전염성 병원균 길항미생물 추가 선발 및 동정

- 가. A5 균주와 A11 균주가 시들음병 원인균과 뿌리썩음병 원인균에 대한 균사 억제능력이 우수하였으며 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었음.

(시험 5) 길항미생물 대량생산을 위한 특성 검정

- 가. 황기 토양전염병 방제 길항미생물로 최종 선발된 A11 균주의 최적 배양 조건은 TSB 배지에서 온도 35℃, pH 6~7으로 일반배양조건에 비해 배양시간이 4~6시간 단축되었음.

〈제2세부과제: 황기 안정생산을 위한 친환경 농자재 활용기술 개발〉

(시험 1) 토양전염병 친환경 방제를 위한 길항미생물 선발

- 가. 황기 시들음병 원인균에 대해 항균 활성을 갖는 길항미생물 후보균주 *Bacillus subtilis*를 포함하

여 7종을 선발하였으며 황기 뿌리썩음병 원인균에 대해 항균 활성을 갖는 길항미생물 후보균주 *Bacillus amyloliquefaciens* 등 5종을 선발하였음.

(시험 2) 친환경 농자재 효과검정 및 활용기술 개발

가. 황기 토양전염병 방제를 위한 친환경 농자재 선발을 위해 황기 2년생과 3년생 포장에서 관수시설을 설치하여 아인산염, 석회보로도액을 6월에서 9월까지 1개월 간격으로 4회 처리한 결과, 아인산염 처리시 지하부 생근중이 가장 높았으며 토양전염병 방제기도 최대 56.5% 높았음.

(시험 3) 1년차 선발 길항균의 토양전염성 병해 경감효과 검정

- 가. 황기 토양전염병 원인균에 대해 항균 활성을 보이는 1년차 선발 길항미생물 중 시들음병 원인균 *F. oxysporum*에 대해 대치배양하여 군사 억제능력을 측정한 결과, A11 균주가 72.1%의 가장 높은 억제율을 보였으며 황기 유묘를 이용한 포트시험에서도 가장 높은 억제율을 나타냈음.
- 나. 황기 토양전염병 원인균 중 뿌리썩음병 원인균이 포함된 *Phytophthora* spp. 에 대해 대치배양하여 1년차 선발 길항미생물의 군사 억제능력을 측정한 결과, 10201 균주가 가장 높은 억제율을 보였으며 황기 유묘를 이용한 포트시험에서는 A11 균주와 10201 균주가 가장 높은 억제율을 나타냈음.
- 다. 황기 토양전염병인 시들음병과 뿌리썩음병 원인균에 대해 대치배양과 황기 유묘를 이용한 포트시험에서 가장 높은 원인균 억제능력을 나타낸 A11과 10201 균주를 선발 길항미생물로 최종 선정함.

(시험 4) 친환경 자재 토양전염병 경감효과 검정 및 활용법 확립

- 가. 황기 토양전염병 방제를 위해 길항미생물 등 친환경 농자재의 처리 효과를 확인한 결과, 길항미생물 처리시 무처리구와 비교하여 지하부 생근중이 4.1~6.3g 정도 높았으나 그 외 생육특성에서는 차이가 없었음.
- 나. 황기 토양전염병 방제 효과는 2년생 재배지의 경우 아인산염 처리시 방제가가 56.0%로 나타나 가장 높았고 10201 균주 처리시 35.0%, A11 균주 처리시 26.7%를 나타냈음.
- 다. 3년생 재배지에서 황기 토양전염병 방제 효과는 10201 균주 처리시 44.1%로 가장 높았고 아인산염 처리시 42.4%, A11 균주 처리시 37.4%를 나타냈음.
- 라. 황기 토양전염병 방제를 위한 친환경 농자재 처리시 3년생 재배지보다 2년생 재배지에서 방제가와 수량지수가 유의미한 결과를 나타내므로 방제효과를 높이기 위해 1년생부터 처리하는 것이 좋을 것으로 사료됨.

(시험 5) 길항미생물 식물생장 촉진 및 병원균 억제능 검정

가. 황기 토양전염병 원인균에 대해 군사 억제능력이 가장 높은 길항미생물 4종이 분비하는 가수분해 효소를 확인한 결과 protease는 A11 균주와 A10, A5 균주에서 확인하였고 cellulose 가수분해효소는 A5 균주에서 확인하였으며 siderophore 활성은 10201 균주에서 가장 높았음.

- 나. 길항미생물 4종의 항생물질 생성 유전자 검정에서 A10 균주에서 fenE 등 6개 항생물질 유전자 발현을 확인하였고 A11 균주에서는 5개, 10201 균주에서는 1개의 항생물질 유전자 발현을 확인하였음.
- 다. 황기 유묘를 이용하여 길항미생물 4종의 생장촉진능력을 평가한 결과, 길항미생물 처리시 무처리와 비교하여 엽수와 생체중에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였음.
- 라. 황기 유묘를 이용하여 길항미생물 4종의 병원균 방제가를 평가한 결과, 길항미생물 처리시 무처리와 비교하여 유의적으로 높은 방제가를 나타냈으며 A11 균주의 경우 최대 68.2~72.0%의 억제율을 나타냈음.

(시험 6) 길항미생물 재배지 효과 검정 및 실용화기술 개발

- 가. 길항미생물을 이용한 황기 토양전염병 방제 처리 효과를 확인하기 위해 황기 2년생과 3년생 포장에서 관수시설을 설치하여 6월에서 10월까지 2주 간격으로 10회 처리한 결과, 3년생 포장에서는 무처리와 비교하여 A11 균주 처리구의 방제가가 30.5%로 가장 높았으며 10201 균주 처리시 13.5% 높았음.
- 나. 2년생 포장에서는 A11 균주 처리시 53.8%의 높은 방제가를 보였으나 10201 균주 처리시 17.7%의 방제가를 나타내 화학약제를 처리한 대조구의 40.3%보다 낮았음.
- 다. 그러나 8. 1.~8. 11. 기간 중 집중호우가 발생하여 길항미생물 처리구에서 이병주율이 급격히 증가한 것으로 보아 길항미생물 처리시 토양 내 포장용수량을 고려해야할 것으로 사료됨.

5 인용문헌

- Ahn TJ, Ahn YS, Kim YG and Park CG. (2008). Studies on methods of control Astragalus wilt disease. National Institute of Horticultural and Herbal Science. Rural Development Administration. Wanju, Korea. p.376-377.
- Akira N, Takeshi U and Teruhiko B. (1987). Nucleotide sequence of a cellulase gene of *Bacillus subtilis*. European Journal of Biochemistry. 164:317-320.
- Animal and Plant Quarantine Agency(APQA). (2019). 2018 Year book of plant quarantine statistics. Department of Plant Quarantine. Animal and Plant Quarantine Agency. Gimcheon, Korea. p.215. http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=114&tblId=DT_114_2012_S0095&conn_path=I2 (cited by 2020. Sep 15).
- Baek NI, Kim YS, Kyung JS, and Park KH. (1996). Isolation of anti-hepatotoxic agent from the root of *Astragalus membranaceus*. The Korean Journal of Pharmacognosy. 27:111-116.
- Bonanomi G, Chiurazzi M, Caporaso S, Sorbi GD, Moschetti G and Felice S. (2008). Soil solarization with biodegradable materials and its impact on soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry. 40:1989-1998.

- Cho IC, Ryu KY, Hahm YI, Kim JS and Jee HJ. (2000). Root rot of Astragalus(Astragalus membranaceus) caused by *Phytophthora drechsleri*. Plant Disease Research. 6:88-91.
- Frick A, Zebarth BJ and Szeto SY. (1998). Behavior of the soil fumigant methyl isothiocyanate in repacked soil columns. Journal of Environmental Quality. 27:1158-1169.
- Han JH, Park GC, Kim JO and Kyoung Su Kim. (2015). Biological control of *Fusarium* stalk rot of maize using *Bacillus* spp. Research in Plant Disease. 21:280-289.
- Kim YG, Chang YH, Lee ST and Yu HS. (1996). Studies on planting density and labor saving in machine sowing for Astragalus membranaceus Bunge. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 4:157-162.
- Korean Statistical Information Service(KOSIS). (2019). 2018 special crop production statistics. Korean Statistical Information Service. Daejeon, Korea. http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=114&tblId=DT_114_2012_S0095&conn_path=I2 (cited by 2020. September. 15).
- Lim JD, Yoo CY, Kim GG and Chung IM. (2014). Development of vaccine adjuvant products and improvement of food materials through KFDA approval in aboveground parts of Astragalus membranaceus, Rural Development Administration. Jeonju, Korea. p.2.
- Nam SY, Kim IJ, Kim MJ, Choi SY, Rho CW, Yun T and Min KB. (2006). Difference of growth and tuber yield by prior crops in Astragalus Membranaceus Bunge. Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services. Cheongju. Korea. p.57.
- Niranjan RS, Shetty HS and Reddy MS. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria: Potential green alternative for plant productivity. In Siddiqui, Z.A. (ed.), PGPR: Biological and biofertilization. Springer, Dordrecht, Netherlands. p.197-216.
- Ongena M and Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology. 16:115-125.
- Richter BS, Ivors K, Shi W, and Benson DM. (2011). Cellulase activity as a mechanism for suppression of *Phytophthora* root rot in mulches. Phytopathology. 101:223-230.
- Rios JL and Waterman PG. (1997). A review of the pharmacology and toxicology of Astragalus. Phytotherapy Research. 11:411-418.
- Rural Development Administration(RDA). (2015). Standard cultivation guidebook for Astragalus membranaceus Bunge. Rural Development Administration. Jeonju, Korea. p.50-53.
- Sazci A, Erenler K and Radford A. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using congo red as an indicator: A comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. Journal of Applied Bacteriology. 61:559-562.
- Xie ZF. (1994). Classified dictionary of traditional chinese medicine. New World Press. Beijing. China. p.374.
- Yin Y, Heo SI, Jung MJ and Wang MH. (2009). Antioxidant and antidiabetic effect of various sections of Astragalus membranaceus. The Korean Journal of Pharmacognosy. 40:1-5.

6 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2018(1년)	농가기술지도/컨설팅	황기 토양전염성 병해 발생 실태 현황 조사 및 친환경 농자재 처리법 현장 지원
	농가기술지도/컨설팅	친환경 농자재 처리에 따른 생육조사 및 뿌리썩음병 방제효과 지도
	학술발표	Isolation and identification of antagonistic microorganisms for biological control of <i>Astragalus membranaceus</i> (Hwanggi) wilt disease
	학술발표	Root Rot of <i>Astragalus membranaceus</i> Caused by <i>Phytophthora cryptogea</i>
2019(2년)	농가기술지도/컨설팅	고품질 황기 친환경 재배를 위한 재배기술 현장지원 컨설팅
	학술발표	Control of <i>Astragalus membranaceus</i> (Hwanggi) Root Rot with Potassium Phosphonate
	농가기술지도/컨설팅	장마철 황기 재배관리 및 병해 친환경 방제 현장지원 컨설팅
	학술발표	Analysis of Microbial Community during <i>Astragalus membranaceus</i> (Hwanggi) Cultivation Period
	홍보성과	강원 농기원, 황기 고년근 친환경 재배기술 연구 박차
	홍보성과	피가되고 살이되는 강원의 약초 '황기'
	홍보성과	황기 고년근 친환경 재배기술 연구 박차
	영농정보	황기 재배지 토양전염성 병해 발생 이력에 따른 토양미생물 분포 양상
2019(2년)	농가기술지도/컨설팅	고품질 황기 친환경재배를 위한 재배기술 현장지원 컨설팅
	농가기술지도/컨설팅	장마철 황기 병해 예방 및 재배관리 컨설팅 컨설팅
	산업재산권 출원	신규한 바실러스 아밀로리케파시엔스 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 황기 시들음병 또는 뿌리썩음병 방제용 조성물
	학술발표	Analysis of Microbial Community during <i>Astragalus membranaceus</i> (Hwanggi) Cultivation Period
	영농기술	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> A11을 이용한 황기 뿌리썩음병 방제방법
	논문게재	<i>Bacillus</i> spp.에 의한 황기의 생육촉진 및 토양병해 방제효과

성과지표명		연 도		1년차(2018)		2년차(2019)		3년차(2020)		계	
				목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
논문 게재	SCI	-	-	-	-	40	-	-	-	40	-
	비SCI	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
특허	출원	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1
	등록	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

성과지표명		연 도		1년차(2018)		2년차(2019)		3년차(2020)		계	
				목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
학술 발표	국제			-	-	1	-	-	-	1	1
	국내			1	-	2	-	-	-	3	4
영농 활용	기술			-	-	1	-	-	-	1	1
	정보			1	-	1	-	-	-	2	1
홍 보				1	-	1	-	-	-	2	3
농기기술지도/컨설팅				2	-	2	-	-	-	4	6
계				-		-		-		15	18

7 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도		
					'18	'19	'20
과제책임자	인삼약초연구소	농업연구사	이재형	과제 총괄	○	○	○
1세부책임자	인삼약초연구소	농업연구사	이재형	세부주관 수행	○	○	○
공동연구자	인삼약초연구소	농업연구사	모영문	평가분석 지원	○	○	○
	인삼약초연구소	농업연구관	엄남용	연구방향 설정	-	○	○
	인삼약초연구소	농업연구사	이기욱	평가분석 지원	-	○	○
	인삼약초연구소	농업연구관	임수정	연구방향 설정	-	○	○
	인삼약초연구소	공업서기	이상규	현장조사 지원	○	○	○
	인삼약초연구소	공무직	김정미	현장조사 지원	○	○	○
	인삼약초연구소	공무직	이은열	현장조사 지원	○	○	○
	인삼약초연구소	공무직	홍지은	현장조사 지원	○	○	○
2세부책임자	인삼약초연구소	농업연구사	이기욱	세부주관 수행	-	○	○
공동연구자	인삼약초연구소	농업연구사	모영문	평가분석 지원	○	○	○
	인삼약초연구소	농업연구관	엄남용	연구방향 설정	-	○	○
	인삼약초연구소	농업연구사	이재형	평가분석 지원	○	○	○
	인삼약초연구소	농업연구관	임수정	연구방향 설정	-	○	○
	인삼약초연구소	농업연구사	윤예지	평가분석 지원	○	○	○
	인삼약초연구소	운전서기보	조태희	현장조사 지원	-	○	○
	인삼약초연구소	공무직	김정미	현장조사 지원	○	○	○
	인삼약초연구소	공무직	이은열	현장조사 지원	○	○	○