한국잔디 갈색퍼짐병의 생물학적 방제를 위한 길항미생물의 분리 및 선발

마기윤¹ ·곽수년² ·이궁주^{3*}

¹전라남도농업기술원, ²목포대학교 원예과학과, ³충남대학교 원예학과

Isolation and Selection of Antagonistic Microbes for Biological Control of Zoysiagrass Large Patch Disease

Ki-Yoon Ma¹, Soo Nyeon Kwark², and Geung-Joo Lee^{3*}

¹Jeollanam-do Agricultural Research & Extension Services, Naju 520-715, Korea

²Department of Horticulture, Mokpo National University, Mu-an 534-729, Korea

³Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 361-763, Korea

Abstract. A large patch disease caused by *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV) is a serious problem in Korean lawngress (*Zoysia japonica*) sites including golf courses and sports fields in Korea. Antagonistic microorganisms against *R. solani* AG2-2 (IV) were isolated from various forest and crop soil sources in Southern Korea. Among the 61 isolates, I-009, FRIN-001-1, and YPIN-022 strains showing dramatic inhibition of the mycelial growth of *R. solani* AG2-2 (IV) in the pairing culture were selected as the most potential antagonistic microorganisms for this study. Based on the 16S RNA sequence comparison, I-009 and FRIN-001-1 isolates were identified as *Bacillus* spp., while YPIN-022 isolate belongs to the genus *Pseudomonas*. The greater inhibition (clear) zone between two edges of the selected and pathogenic microbes ranged from 11 to 15 mm in three selections, but the others averaged to 7 mm out of 30 mm distance. In another antifungal test using culture filtrate, those three isolates represented a range of 51.7 to 63.5% suppression potential. The selected isolates also inhibited significantly the stem-segment colonization by *R. solani* AG2-2 (IV) in vivo test by 28.1%, 43.0%, and 23.7% when inoculated with I-009, FRIN-001-1, and YPIN-022, respectively. The highest antagonistic activity for the large patch disease was demonstrated by the isolate FRIN-001-1, which will be useful for developing a bio-pesticide against *Rhizoctonia*.

Additional key words: 16s rRNA, antagonistic microorganism, microbe isolation, pairing culture, turfgrass disease

서 언

난지형 잔디로 조성된 대부분의 국내 골프장에서 특히 한국 들잔디(Korean lawngress)에 발생하여 가장 심각한 피해를 주는 병 중의 하나는 갈색퍼짐병(large patch disease)이다(Tredway and Burpee, 2001). 이 갈색퍼짐병은 잔디가 휴면에 들어가는 늦은 가을과 휴면에서 깨어나는 이른 봄에 발생되며, 한여름에는 장마기, 습한 지역, 음지 등에서 발생되기도 한다(Shim and Kim, 1995). 병 발생 초기에는 원형으로 병반의 가장자리가 밝은 옅은색으로 변하고 줄기 밑

부분과 포복경이 암갈색으로 변하면서 병반은 둥근 원형으로 확대되고 병의 진전과 함께 병반의 직경은 작게는 30cm 부터 크게는 10m에 이르는 대형 원형의 마름현상을 보인다. 병의 진전이 계속되면서 원형 병반 중심부의 오래된 병든 잎은 회백색으로 변하며 썩은 잎집은 쉽게 뽑히는 증상을 보인다(Tredway and Burpee, 2001).

병원균은 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)으로 완전세대는 Thanatephorus이며, 분류학적 위치는 Basidiomycota(담자균문), Hymenomycetes(모균강), Ceratobasidiales(뿔담자균목)에 속한다(Gonzalez Garcia et al., 2006; Kim et al., 1991).

*Corresponding author: gilee@cnu.ac.kr

※ Received 24 January 2013; Revised 22 April 2013; Accepted 29 April 2013. 본 연구 수행을 위한 산림청 산림과학기술개발사업(S111012 L020100)과 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(식물분자유종사업단 PJ009081)의 지원에 감사 드립니다.

국내에서는 68종의 작물에서 *Rhizoctonia solani*를 분리하여 AG-1, AG2-1, AG2-2, AG-3, AG-4, AG-5의 6개의 균사 융합군(anatomosis group)과 AG-1의 배양형 1A, 1B, 1C와 AG2-2의 배양형 IIIB, IV를 동정하여 모두 11개의 종내 그룹을 보고하였다(Kim et al., 1991; Shim and Kim, 1995).

갈색퍼짐병은 경종적 방법, 살수 및 시비관리, 화학적 방법에 의해 예방 및 방제가 이루어지고 있으며, 주로 화학적 방제에 의존하고 있다(Shim and Kim, 2000). 갈색퍼짐병을 비롯한 토양전염성 병원균은 주로 태치층(thatch layer) 밑에 서식하므로 발병 이후에는 약제를 사용하여 효과적으로 방제하기가 어렵기 때문에 주로 예방적인 농약의 살포가 실시되고 있다(Aoyagi et al., 1998; Park et al., 1998). 그러면서 병 예방 및 방제를 위해서 무기농약과 유기합성 농약의 사용은 계속 증대되어 왔다(Goodman and Burpee, 1991). 이에 따라 사용되는 농약량, 노동력 등 경제적인 부담이 매우 크다. 또한 정기적으로 농약을 살포할 경우, 저항성 균주의 출현과 그 동안 문제가 되지 않았던 병원균의 만연에 의해 병이 발생되어 문제가 되는 경우도 있다(Couch and Smith, 1991).

국내에서 각종 잔디병에 대한 피해조사, 병원균의 특성조사 및 방제 관련 체계적인 연구는 1989년 이후 활발하게 수행되어 왔다(Kim et al., 1991, 2006; Shim and Kim, 1995). 하지만 대부분의 연구결과는 잔디의 각종 병을 생물학적으로 방제할 수 있는 방향과 가능성만을 제시해주고 있었다. 그리고 잔디의 경우 다른 작물병원균의 생물학적 방제에 관한 연구결과에 비해 충분하지 않으며, 실제 재배지에서 미생물제제로써 사용 가능한지의 연구가 미비한 실정이다. 앞으로 생활수준 향상과 더불어 골프장을 위시한 휴식 및 오락 공간과 그 이용의 증가에 따른 잔디의 식재면적과 이용성의 증대로 농약의 사용을 줄일 수 있는 효과적인 병해충

의 방제법 개발이 요구되고 있다.

본 연구는 한국 들잔디에서 심각한 병해를 유발하는 갈색퍼짐병 병원균[*Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)]의 성장을 저해하는 능력이 우수한 길항미생물을 토양으로부터 분리 선발하고 in vitro 및 in vivo 검정을 통하여 향후 생물학적 방제를 위한 미생물 제제 개발 가능성과 그 기초를 마련하고자 실시하였다.

재료 및 방법

길항미생물의 분리

한국잔디에 주로 발생하는 갈색퍼짐병 병원균[*Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)]에 대한 항균활성을 갖는 길항 미생물을 선발하기 위해 수년간 *Rhizoctonia solani* 병해가 발생하지 않은 전남지역 7개군 18곳, 경남지역 1개군 1곳의 산림토양, 논토양 및 밭토양으로부터 19개 토양샘플을 수집하여 길항 미생물 분리의 시료로 사용하였다.

길항미생물의 분리는 희석방법으로 LB(Luria Broth; 1% tryptone, 0.5% NaCl, 1% yeast extract, 1.5% agar) 배지를 이용하여 실시하였다(Islam et al., 2012). 채취한 토양 1g에 멸균 증류수로 현탁한 다음 10^2 , 10^3 , 10^4 로 희석한 후 평판 배지에 100μL씩 도말하여 35°C에서 24시간 배양 후 단일균 집을 이용하여 분리 선발하였다(Fig. 1). 선발된 미생물을 대상으로 색소의 생성 유무, 포자의 형성 및 형태 등을 관찰하여 각기 다르다고 판단되는 균주를 32°C 배양기에서 24 시간 배양하면서 그람 염색 후 광학현미경으로 관찰하였고, 주사전자현미경(scanning electron microscope)을 이용하여 세균의 형태를 확인하였다. 이렇게 2차로 선발한 미생물은 계대 배양 배지에 접종하여 4°C에서 냉장 보관하면서 항균력을 검정하는데 사용하였다.

Fig. 1. Microbial colonies from suspension of soil samples on Luria Broth agar plate (A), and isolation of antagonistic microbes by inhibition of central *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV) mycelia (B).

길항미생물의 선발 및 동정

분리한 토양 미생물을 대상으로 *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV)의 균사 생육 억제력을 보이는 길항미생물을 선발하기 위해 농촌진흥청 농업미생물유전자원센터[Korean Agricultural Culture Collection(KACC) for Microbes]로부터 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)(KACC No. 40132)를 분양 받아 공시 병원균으로 사용하였다. 생육저지환측정법(clear zone measurement)으로 선발 미생물의 길항력을 확인하였다(Islam et al., 2012). Potato dextrose agar(PDA) 배지 중앙에 전 배양한 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)를 구멍뚫이(cork borer; 직경 5.0mm)를 이용하여 중앙에 접종하고 25°C 항온기에서 3일간 배양한 후 3cm 떨어진 곳에 분리한 미생물의 배양액에 6mm 크기의 종이원반을 침지하여 접종한 후, 27°C 배양기에서 7일간 배양하면서 병원성 진균의 균사 생육 억제력을 갖는 미생물을 길항미생물 후보군으로 선발하였다.

선발된 균주의 16s rRNA 유전자 염기서열 분석을 위하여 변형된 benzyl chloride법을 이용하여 DNA를 분리하였다(Heng et al., 1993). 선발한 길항미생물 배양액을 우선 4°C에서 8,000rpm으로 10분간 원심 분리하여 회수된 균체에 500μL의 TE buffer(100 mM Tris-HCl, 40mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하여 현탁시켰다. 현탁액에 3μL의 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 3μL의 proteinase K(20mg·mL⁻¹)를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 100μL 5M NaCl 용액을 첨가하여 혼합한 다음 80μL의 CTAB/NaCl 혼합용액을 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켰다.

Chloroform:isoamylalcohol(24:1)으로 분리한 상층액에 phenol:chloroform:IAA(25:24:1)를 혼합하여 원심 분리한 후 isopropanol로 DNA를 침전시켰고, 50μL 멸균 증류수를 첨가하여 희석한 후 전기영동에 사용하였다.

염기서열 분석을 위하여 추출된 DNA를 프라이머 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')로 증폭한 후 1% 아가로스 겔을 이용하여 전기영동하고 밴드를 분리하였다(Lane, 1991). 16s rRNA의 염기서열은 NCBI/GeneBank에 있는 미생물 염기서열을 기초로 Blast program을 이용하여 비교 분석하였으며, Clustal W2 program을 이용하여 계통분류도를 작성하였다(Tompson et al., 1994).

길항미생물의 항균력 재검정 및 배양여액의 항진균 활성조사

1차에서 균사 생육억제력을 보이는 선발 미생물을 대상으로 길항미생물 선발에서와 같이 대치배양하여 균사생장 억제 효과를 다시 한번 검정하여 최종 길항미생물 후보군으로 선발하였다(Elkahoui et al., 2012).

또한 선발한 길항균주의 배양여액을 이용하여 LB(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)와 PDB(potato dextrose broth, 0.4% potato starch, 2.0% dextrose)를 1:1(v/v)로 혼합한 배지를 제조하여 *R. solani* AG2-2(IV)의 균총(직경 5.0mm)을 접종하여 25°C 항온기에서 3일간 배양하여 항균력을 다시 한번 검정하였다. 32°C에서 24시간, 190rpm으로 진탕 배양한 선발 길항미생물 배양액을 12,000rpm에서 4°C, 10분간 원심분리하여 균체를 침전시키고 배양여액을 회수하여 병원체가 접종된 배지에 1%(v/v)를 접종하여 25°C에서 5일간 배양하였다. 대조구는 배양여액과 동량의 멸균 증류수를 첨가하였다. 높은 온도(80°C)에서 미리 건조한 멸균 여과지를 이용하여 병원균의 균체를 회수한 다음 60°C에서 2일간 건조시켜 대조구와의 균체 무게를 비교하여 병원균 균체의 생육 억제력을 조사하였다.

선발 미생물의 한국잔디 갈색퍼짐병 병원균 억제효과 검증

모래와 상업용 원예상토를 2:1 비율로 혼합하여 121°C에서 20분간 고압 멸균한 뒤 전남 장성지역에서 자란 건전한 상태의 한국잔디 증지를 깨끗이 씻은 후 재배지 토양을 제거한 뒤 사각형 화분(22cm × 18cm × 9cm)에 18cm × 18cm로 절단하여 3반복으로 이식하였다. 재배지 토양으로부터 장성증지 품종을 이식한 후 27°C 식물 생육상 안에서 3주간 활착시킨 후 *R. solani* AG2-2(IV) 병원균에 대한 방제효과 검정용 시험 재료로 사용하였다.

접종에 사용할 갈색퍼짐병 병원균은 1일 간격으로 2회 연속 살균한 sand-oatmeal 배지(모래 760g, oatmeal 40g, 증류수 150mL)에 PDA 배지에서 5일간 배양한 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV) 균총을 구멍 뚫이로 20개씩 이식하여 27°C 항온기에서 21일간 배양하였다. 배양된 병원균은 잔디가 이식된 포트에 지름 20mm, 깊이 20-30mm 구멍을 5개씩 뚫고 각 5g 수준으로 접종하였다.

각 화분당 LBB에서 32°C, 190rpm으로 48시간 배양된 후보 길항미생물을 1/10로 희석하여 200mL씩 병원균 접종 5일 후부터 10일 간격으로 2회 관주하였다. 대조구는 병원균이 접종된 화분에 일반 수도물을 길항미생물 관주와 동일하게 처리하였다. 갈색마름병에 대한 억제효과는 병원균 접종 28일 후 조사하였으며, 병 발생지수(Disease Index)를 바탕으로 확인하였다. 병 발생지수는 다음과 같이 계산하였다(Islam et al., 2012).

$$\text{병 발생지수 (\%)} = \frac{[(0 \times A + 2 \times B + 3 \times C + 5 \times D + 8 \times E + 10 \times F)]}{\text{총 줄기수}} \times 100$$

A(0), 건전묘; B(2), 생육상태 보통이고 약간 잎 마름 증상; C(3), 잎 마름 증상 10% 이내; D(5), 잎 마름 증상이 11-50%까지(중간 정도); E(8), 잎 마름 증상이 51-90%까지(심한 정도); F(10), 전체 잎 마름 증상이 91-100%일 경우(극심한 정도)를 나타낸다.

결과 및 고찰

길항미생물의 토양 분리 및 선발

한국잔디에 주로 발생하는 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)

병원균에 대한 항균활성을 갖는 길항미생물을 선발하기 위해 수년간 *Rhizoctonia solani* 병해가 발생하지 않은 전남 7개 군과 경남 1개 군으로부터 19지역의 토양을 수집하여 연속희석 방법으로 미생물을 분리하고(Fig. 1), 형성된 단일 균집을 취하여 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV) 병원균과 대치배양을 통해 길항력을 갖는 총 61개의 길항미생물을 1차로 분리하였다(Table 1 and Fig. 1). 앞서 분리한 균주를 *R. solani* AG2-2(IV) 병원균과의 1:1 대치배양을 통하여 2차로 선발하였다. 이 중 가장 균사 생육 억제거리가 큰 균주 중 수집 지역이 다른 균주 I-009, FRIN-001-1 및 YPIN-022 등

Table 1. Inhibition zone of mycelial growth of *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV) by various antagonistic bacterial isolates from soil².

Source ID ^y	Colony ID	Inhibition zone (mm) ^x	Source ID	Colony ID	Inhibition zone (mm)
I	008	2	BY	001	7
	009	11		002	5
	015	8		003	9
	019	5		004	3
HDSNON	007	3		005	10
	009	2		012	7
	014	3		021	4
	016	3		022	8
FRIN	001	7	HE	001	8
	001-1	15		002	8
	005	13		003	10
	006	14		014	9
	009	10		016	8
	010	6		017	10
	011	11		019	6
GYR	008	10		023	10
	011	9		028	10
GYL	002	8	YPNON	007	5
	005	10		008	4
	006	6		008	3
	008	9		014	1
	010	8		022	7
	011	8	NH	002	10
HDSIN	004	7		029	4
	014	2	FRNON	003	8
	017	1		011	6
	018	3		031	6
SRS	005	4	YPIN	022	14
	005-1	3		001	8
	006	5		007	10
	008	4	Total		61

²The antagonistic microorganisms were streaked on the LB agar plate, and after 48 h incubation at 25°C, mycelia disk (5 mm × 5 mm) of *R. solani* AG2-2 (IV) was placed at a 30 mm distance from the antagonistic microorganisms.

^yI, Shinan; HDSNON, Hampyeong; FRIN, Haenam; GYR and GYL, Goheung; HDSIN, Hampyeong; SRS, Yeongam; BY, Boseong; HE and YPNON, Haenam; NH Namhae; MPUM, Muan; FRNON, Haenam; YPIN, Haenam; MPUB, Muan.

^xDistance from the edge of antagonistic microorganism to the edge of *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV).

3종의 균주를 최종 선발하였다(Fig. 2). 잔디의 갈색퍼짐병과 같이 곰팡이 병원균의 길항작용을 나타내는 세균의 분리를 위해 화분과 또는 두과작물 재배포장 등 다양한 토양원을 활용한 사례는 최근에 많이 보고되고 있다(Islam et al., 2012; Mushtaq et al., 2010). 이렇게 토양에서 분리한 미생물은 이미 작물이 자랄 수 있는 환경에 적응한 형태로 식물병의 방제는 물론 토양 비옥도 개선 가능성과 미생물제제로 활용될 경우 병원균의 방제를 위한 생물학적 활성을 최대로 나타낼 수 있어 유리하다(Meera and Balabaskar, 2012). 특히 길항 세균류는 빠른 번식력과 근권부에서의 우수한 경쟁력을 보유하고 있어 많은 식물 병원균의 방제를 위해 분리 및 이용되어 왔다. 본 연구에서는 그람염색을 통해 *Pseudomonas* 속 또는 *Bacillus* 속으로 확인되었는데 세포학적 및 분자학적 동정을 통해 최종 확인할 수 있었다(Ma, 2012).

대치배양 및 배양여액을 이용한 길항미생물의 항균력 검정

최종 선발한 길항미생물을 대상으로 갈색마름병 표준 병원균주 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)와 대치배양을 실시하였고 길항미생물 배양여액을 이용한 항균력을 확인하였다(Fig 2). 신안군 밭 토양에서 분리한 I-009균주는 11mm의 군사생육 억제거리를 나타내었으며, 해남의 산림토양에서 분리한 FRIN-001-1 균주와 YPIN-022 균주는 각각 15mm와

14mm로 높은 군사생육 억제거리를 나타내었다(Table 2). 이러한 군사생육의 억제(37-50%)는 *Bacillus* 속 길항 세균 등이 생산하는 항균 대사물질(예, lipopeptide, iturin family)의 생성속도와 관련 있는 것으로 보고되고 있는데(Elkahoui et al., 2012) 이들 물질의 동정과 항균성 관련 여부는 추가적인 연구가 필요하다고 하겠다.

항균력 검정을 위해서 다른 방법으로 길항 균주의 배양 여액을 이용하여 *R. solani* AG2-2(IV) 병원균에 대한 항진균 활성을 비교하였다. 앞서 사용한 LB와 PDB를 1:1(v/v) 비율로 혼합한 배지를 제조하여 병원균과 길항미생물을 배양한 후 균체량을 측정한 결과 I-009 균주는 대조구에 비하여 63.5%의 갈색퍼짐병 병원균의 균체 생장이 감소하였고, FRIN-001-1 균주와 YPIN-022 균주는 각각 62.7% 및 51.7%의 성장 억제력을 보였다(Fig. 3). PDA plate에서의 대치배양과는 달리 배양여액을 이용한 혼합액체 배지에서는 I-009 균주와 FRIN-001-1 균주의 배양여액에서 *R. solani* AG2-2(IV)의 군사생육을 억제하는 항균활성 물질이 높은 것으로 나타났다. 이는 배양액에도 길항 균주로부터 갈색퍼짐병 병원균을 억제하는 항균물질이 분비됨을 시사하고 이들 물질에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

한편 선발 미생물들의 군사 생장의 억제효과(52-64%)는 다른 길항세균의 항진균 방제능력(59-74%)과 유사한 것으로 나타났다(Rahman et al., 2007). *Bacillus* 속 항진균 미생

Fig. 2. Mycelia growth of *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV) suppressed by antagonistic microorganism isolates [I-009 (A), FRIN-001-1 (B), and YPIN-022 (C)] in a dual culture on Luria Broth agar plate.

Table 2. Inhibition zone of mycelial growth of *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV) by selected antagonistic microorganisms isolates from soil^z.

Selected antagonistic microorganism	Soil sample	Inhibition zone (mm $\pm$ SE) ^y (n = 3)
I-009	Shinan upland	11 $\pm$ 1.0
FRIN-001-1	Haenam forest	15 $\pm$ 1.0
YPIN-002	Haenam forest	14 $\pm$ 1.0

^zThe antagonistic microorganisms were streaked on side of the LB agar plate, and 48h after incubation at 25°C mycelia disk (5 mm $\times$ 5 mm) of *R. solani* AG2-2 (IV) was placed at 30 mm distant from the antagonistic microorganisms.

^yDistance from the edge of antagonistic microorganism to the edge of *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV).

물의 경우 종에 따라 차이가 있고 생성되는 항균물질(iturin, surfactin 등)도 차이가 나타나는 것으로 알려져 구체적인 항균 기작에 관한 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다 (Elkahoui et al., 2012; Yu et al., 2002).

16s rDNA 염기서열 분석 및 계통도 작성

선발된 길항미생물의 16s rDNA 염기서열의 분석을 통해 분류학상 위치를 확인하였다(Table 3). 또한 분리균주

I-009, FRIN-001-1 및 YPIN-022의 계통분류도를 작성하였다(Figs. 3, 4, and 5). I-009 균주의 16s rDNA의 염기서열을 분석하고 database를 이용하여 유사도를 조사한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*와 100%의 유사성을 보여 *Bacillus* sp. I-009로 명명하였다. 마찬가지로 FRIN-001-1 균주의 16s rDNA의 염기서열을 분석한 결과 I-009 균주와 유사한 *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*와 100% 유사성을 보여 *Bacillus* sp. FRIN-001-1 균주로 명명하였다. YPIN-022 균주 또한

Fig. 3. A phylogenetic neighbor-joining tree of an isolate I-009 strain with other related species in the genus *Bacillus* based on 16s rRNA sequence.

Table 3. Sequence similarity of 16s rRNA of three antagonistic isolates with the related strains within the genus *Bacillus* or *Pseudomonas*.

Isolated microbe	Comparing strain	Sequence length (bp)	Sequence similarity (%)
I-009	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain S2QPS25	1454	100
	<i>Bacillus</i> sp. strain JMP-B	1442 ²	100
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i> strain Kt6-3	1454	99
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain JXLJ15	1441	99
FRIN-001-1	<i>Bacillus subtilis</i> strain MP17-1B	1511	100
	<i>Bacillus subtilis</i> strain CJ-H-TSA1	1456	100
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i> strain Ht10-23	1454	100
	<i>Bacillus vallismortis</i>	1453 ²	100
YPIN-002	<i>Pseudomonas</i> sp. LB185	1483	99
	<i>Pseudomonas</i> sp. YGJ3 16s	1456	99
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain MM-B	1488	99
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain ATCC 17386	1498	99

²Denotes partial sequence compared to others with full length sequences.

Fig. 4. A phylogenetic neighbor-joining tree of an isolate FRIN-001-1 strain with other related species in the genus *Bacillus* based on 16s rRNA sequence.

Fig. 5. A phylogenetic neighbor-joining tree of an isolate YPIN-022 strain with other related species in the genus *Pseudomonas* based on 16s rRNA sequence.

동일한 방법으로 확인한 결과 *Pseudomonas* sp.로 확인되어 *Pseudomonas* sp. YPIN-022로 명명하였다. 본 연구결과는 한국잔디 갈색퍼짐병 병원균의 생장억제 효과는 다양한 속(genus)의 토양 미생물에서 항진균 효과에 대한 가능성을 시사한다고 하겠다. 이들 *Bacillus* 및 *Pseudomonas* 속 미생

물들은 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물 병원균의 생육을 저해시키는 항생작용(antibiosis)과 식물의 근권 정착능력을 촉진함으로써 작물생육을 돕는 것으로 보고되고 있으므로 구체적인 길항기작에 대한 연구가 필요할 것이다(Arima et al., 1964; Gregory et al., 1952; Leoffler et al., 1986).

갈색퍼짐병의 방제력 확인

R. solani AG2-2(IV)에 대한 선발 길항미생물의 in vivo 방제효과를 알아보기 위해 온도와 광조건이 동일한 생육상에서 생육한 한국잔디를 이용하여 방제력 시험을 실시하였다. 대조구에서는 병이 진전되어 잎집(leaf sheath)이 찢거나 뽑히는 전형적인 갈색퍼짐 병징을 나타냈고 병 발생율도 83.8%를 보였다. 반면에 I-009 균주 처리구에서는 60.3%, FRIN-001-1 균주 처리구에서는 47.8%, 그리고 YPIN-022 균주 처리구에서는 65.0%의 병 발생율을 나타냈다(Table 4). 이처럼 FRIN-001-1 균주를 접종한 화분에서는 갈색퍼짐병 병원균의 병 발생 억제효과가 가장 높게 나타났고 다른 보고에 서와 같이 외관상 생육을 촉진하는 경향을 보였다(Elkahoui et al., 2012). 식물이 가지고 있는 저항성 면역기능을 활성화하여 병원균 침입으로부터 방어하는 기작을 총칭하여 유도 저항성이라고 한다(Ryals et al., 1996). 일차적으로 기주식물의 과민감 반응에 의한 조직의 괴사나 살리신산(salicylic acid)과 같은 신호물질에 의해 식물체내 항병원성 물질(예,

Fig. 6. In vitro confirmation of mycelia growth inhibition of *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV) using culture filtrates of three selected antifungal microbes in the Luria Broth and potato dextrose broth mixture (1:1-v/v). ^zinoculated with only *R. solani* AG2-2 (IV). ^y{1 - (dry weight of treatment / dry weight of control)} × 100.

chitinase, glucanase) 등이 방어체계를 형성하면 전신획득저항성(systemic acquired resistance)을 확보하게 된다(Hunt and Ryals, 1996; Ryals et al., 1996). 또한 토양 근권미생물(plant growth promoting rhizomicrobe)들은 저항성 유도 신호물질을 분비하여 병원균 감염을 억제하는 2차적인 기작이 보고되었다(Hoffland et al., 1996). 본 연구에서 배양여액을 이용한 군사억제와 생육촉진 효과는 이러한 저항성 기작과 관련있는 것으로 판단된다(Ma, 2012).

실제 잔디를 활용한 갈색퍼짐병에 대한 병 발생 억제율을 확인한 결과 in vitro에서와 마찬가지로 in vivo에서도 FRIN-001-1 균주가 갈색퍼짐병 병원균에 대한 억제력이 가장 우수하였고, I-009 균주와 YPIN-022 균주는 실제 잔디를 이용한 방제력 검정에서는 in vitro에서의 우수한 군사생육 억제효과와는 반대로 상대적으로 약한 방제효과를 나타냈다. 이는 이들 토양 세균이 보이는 유도저항성 물질의 생성 또는 이들의 면역 유도 기능의 차이로 보여져 본 연구결과와 결부하여 조사된다면 정확한 방어기작을 설명할 수 있으리라 여겨진다(Ma, 2012).

따라서 FRIN-001-1 균주가 가장 우수한 병 발생 억제율을 보였으므로 실제 여러 환경요인이 복합적으로 작용하는 잔디 포장에서의 방제력 검정을 통해 포장 항균능력이 검증되고, 배양조건 등 미생물 생산 조건 등이 확립된다면 FRIN-001-1균주를 활용한 미생물제제 개발이 가능할 것으로 기대된다.

초 록

본 연구의 목적은 한국잔디에 발생하는 병해 중 가장 큰 피해를 나타내는 갈색퍼짐병의 생물학적 방제를 위해 새로운 길항 미생물을 분리하고 그 방제효과를 기내 및 생물검정을 통해 확인하는 것이다. 갈색퍼짐병에 항균활성을 갖

Table 4. Efficacy of the selected antagonistic microorganisms on the reduction of zoysiagrass large patch disease in a pot test.

Selected antagonistic microorganisms	Soil sample	Stem-segment colonization (% ± SE) ^z	Disease reduction as compared to control (%) ^y
I-009	Shinan upland	60.3 ± 2.1 b ^w	28.1 ± 2.5 a
FRIN-001-1	Haenam forest	47.8 ± 1.3 a	43.0 ± 1.6 b
YPIN-022	Haenam forest	65.0 ± 3.9 b	23.7 ± 4.1 a
Control ^x	-	83.8 ± 2.4 c	-

^zAfter application of selected antagonistic microorganisms suspension and inoculation of *R. solani* AG2-2 (IV), stem segment colonization was calculated [stem segment colonization (%) = (0 × A + 2 × B + 3 × C + 5 × D + 8 × E + 10 × F) / (total number of stem) × 100, where A (0), healthy stem; B (2), growth is normal but little blight; C (3), blight < 10%; D (5), blight = 11-50%; E (8), blight = 51-90%; F (10), blight = 91-100%].

^yDisease reduction (%) = [(control-treated) / control] × 100.

^xInoculated with only *R. solani* AG2-2 (IV).

^wMean separation by Duncan's multiple range test, *P* = 0.05.

는 길항미생물을 선발하고자 토양으로부터 미생물을 분리하여 *R. solani* AG2-2 (IV)와의 대치배양을 통해 61균주를 1차로 선발하였으며, 선발 균주 중 *R. solani* AG2-2(IV)의 균사 생육 억제력이 가장 큰 3종의 균주 I-009, FRIN-001-1 및 YPIN-022를 최종 길항미생물로 선발하였다. 이들 세 분리균주의 16s rRNA 염기서열을 분석한 결과 I-009와 FRIN-001-1은 *Bacillus* 속에 속하였고, YPIN-022 균주는 *Pseudomonas* 속의 미생물로 확인되었다. 배양여액을 이용한 *R. solani* AG2-2 (IV)의 균체량 측정결과 선발 길항미생물 모두 51.7-63.5%의 균체 증식 억제력을 확인하였다. 장성에서 수확한 들잔디의 일종인 장성중지를 생육상에서 활착시킨 후 조사한 생물검정에서 잔디줄기 위에 균체 발생율은 I-009와 YPIN-022 균주 처리구에서 각각 60.3%와 65.0%로 갈색퍼짐병 병원균 단독처리구에 비하여 28.1%와 23.7%의 병 발생 억제효과를 나타냈으나, FRIN-001-1 균주 처리구는 47.8%의 균체 발생율을 보여 비교적 높은 43.0%의 병 발생 억제율을 보였다. 본 연구결과 한국잔디 갈색퍼짐병에 대한 병 발생 억제율이 가장 우수한 선발 길항미생물 균주는 FRIN-001-1였고, 향후 추가적인 포장검증을 통해 한국잔디 이용지역을 위한 생물농약 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

추가 주요어 : 16s rRNA, 길항미생물, 미생물 분리, 대치배양, 잔디병

인용문헌

Aoyagi, T., K. Kageyama, and M. Hyakumachi. 1998. Characterization and survival of *Rhizoctonia solani* AG2-2 LP associated with large patch disease of zoysia grass. *Plant Dis.* 82:857-863.

Arima, K.H., M. Imanaka, K.A. Fukuta, and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 28:575-576.

Couch, H.B. and B.D. Smith. 1991. Increase in incidence and severity of target turfgrass diseases by certain fungicides. *Plant Dis.* 75:1064-1067.

Elkahoui, S., N. Djebali, O. Tabbene, A. Hadjbrahim, B. Mnasri, R. Mhamdi, M. Shaaban, and F. Limam. 2012. Evaluation of antifungal activity from *Bacillus* strains against *Rhizoctonia solani*. *African J. Biotechnol.* 11:4196-4201.

Gonzalez Garcia, V., M.A. Portal Onco, and V. Rubio Susan. 2006. Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish J. Agr. Res.* 4:55-79.

Goodman, D.M. and L.L. Burpee. 1991. Biological control of dollar spot disease of creeping bentgrass. *Phytopathology* 81: 1438-1446.

Gregory, K.F., O.N. Allen, A.J. Riker, and W.H. Peterson. 1952. Antibiotics as agents for the control of certain damping-off fungi. *Amer. J. Bot.* 9:405-415.

Heng, Z., Q. Feng, and H. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi, and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic*

Acids Res. 21:5279-5280.

Hoffland, E., J. Hakulinen, and J.A. van Pelt. 1996. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology* 86:757-762.

Hunt, M. and J.A. Ryals. 1996. Systemic acquired resistance signal transduction. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:583-606.

Islam, Md. R., Y.T. Jeong, Y.S. Lee, and C.H. Song. 2012. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40:59-66.

Kim, W.G., G.Y. Shim, W.D. Cho, and Y.H. Lee. 1991. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates causing *Rhizoctonia* blight of turfgrasses. *Kor. J. Plant Pathol.* 7:257-259.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. John Wiley & Sons, Chichester, U.K.

Leoffler, W.J., S.M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T.F. Hsieh, and T.G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115:204-213.

Ma, K.Y. 2012. Antimicrobial test and selection of antagonistic microbes for biological control of large patch of zoysiagrass. MS thesis, Mokpo National University, Mu-an, Korea.

Meera, T. and P. Balabaskar. 2012. Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* from rice fields. *Intl. J. Food Agr. Vet. Sci.* 2:113-120.

Mushtaq, S., A. Ali, I. Khokhar, and I. Mukhtar. 2010. Antagonistic potential of soil bacteria against food borne fungi. *World Appl. Sci. J.* 11:966-969.

Park, J.H., S.Y. Kang, and H.K. Kim. 1998. Physiology of *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV), *Trichoderma harzianum*, and *Chaetomium cochliodes*, and their utilization of thatch-related carbohydrate in *Zoysia japonica*. *Kor. Turfgrass Sci.* 12:211-220.

Rahman, M.A., J. Kadir, T.M.M. Mahmud, R. Abdul Rahman, and M.M. Begum. 2007. Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. *Asian J. Plant Sci.* 6:12-20.

Ryals, J.A., U.H. Neuenschwander, M.G. Willits, A. Molina, H. Steiner, and M.D. Hunt. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.

Shim, G.Y. and H.K. Kim. 1995. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from turfgrasses in golf courses in Korea. *Kor. Turfgrass Sci.* 9:235-252.

Shim, G.Y. and H.K. Kim. 2000. Control of large patch caused by *Rhizoctonia solani* AG2-2 by combined application of antagonists and chemicals in golf courses. *Kor. Turfgrass Sci.* 13:131-138.

Tompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4690.

Tredway, L.P. and L.L. Burpee. 2001. *Rhizoctonia* diseases of turfgrass. *Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-I-2001-1109-01.

Yu, G.Y., J.B. Sinclair, G.L. Hartman, and B.L. Bertagnolli. 2002. Production of iturine A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34:955-963.