농약과학회지 (Korean J. Pestic. Sci.)
Vol. 25, No. 3, pp. 221-229 (2021)
Open Access https://doi.org/10.7585/kjps.2021.25.3.221
ORIGINAL ARTICLES

Online ISSN 2287-2051
Print ISSN 1226-6183
Check for updates

참다래 궤양병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 대한 항세균 지의류 추출물 및 방선균 선발

이수인[1] · 김다란[2] · 곽연식[1,2]*
[1]경상국립대학교 식물의학과, [2]경상국립대학교 생명과학연구원

Screening of Antibacterial Lichen Extract and *Streptomyces* against Kiwifruit Bacterial Canker Pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Su In Lee[1], Da-Ran Kim[2], Youn-Sig Kwak[1,2]*
[1]Department of Plant Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea
[2]Division of Applied Life Science (BK21Plus), Research Institute Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

(Received on August 29, 2021. Revised on September 8, 2021. Accepted on September 10, 2021)

Abstract Kiwifruit bacterial canker disease, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), is the most destructive disease in kiwifruit production. Management of Psa is a critical issue in kiwifruit industry worldwide. Emerging resistance strains of Psa against antibacterial agents such as streptomycin makes it difficult to control the cankers disease. Currently effective treatments for Psa infection are scarce, and copper contained agrochemicals are often sprayed in kiwifruit orchards. Therefore, control of the pathogen with new antibacterial compounds and bio-compounds that required to replace the agrochemicals. This study has focused to investigate potential resources as new anti-Psa agent in lichen extracts and *Streptomyces* spp. libraries. Among 622 lichen extracts, 7 lichen extracts were selected as anti-Psa resources through screening for strength inhibition the Psa pathogen growth. From 1,006 *Streptomyces* spp., 4 strains effectively inhibited the Psa. The finding suggests that the 7 lichen extractions and 4 *Streptomyces* spp. could be useful to control the kiwifruit bacterial canker disease.

Key words Biocontrol, Kiwifruit canker, Lichen, *Streptomyces*

서 론

참다래(*Actinidia chinensis*) 궤양병(Kiwifruit bacterial canker)은 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)에 의해 발생하는 병해이며, 1984년 일본에서 최초로 보고되었다(Takikawa et al., 1989). 국내와 이탈리아에서는 1994년에 처음으로 보고되었으며(Koh, 1994; Scortichini, 1994) 일본과 이탈리아에서 분리된 Psa는 유전적으로 동일 하였고 국내에서 분리된 균주는 그들과 다른 것으로 확인되었다(Han et al., 2003). Psa는 일본과 국내에서는 심각한 피해를 주었지만 다른 국가에서는 비교적 약한 피해를 보였다(Ferrante and Scortichini, 2010). 그러나 2008년도부터 이탈리아(Balestra et al., 2009; Ferrante and Scortichini, 2009)를 시작으로 포르투갈(Balestra et al., 2010), 스페인(Balestra et al., 2011), 프랑스(Vanneste et al., 2011) 등 유럽 전 지역에 전파가 되었으며, 2010년부터는 칠레와 뉴질랜드(Everett et al., 2011)에서도 궤양병이 보고되었다.

현재 Psa는 유전적 특성 및 생산하는 독소에 따라 biovar 1, 2, 3, 5, 6으로 분류된다(Fujikawa and Sawada, 2019). 국내에서는 biovar 2와 3에 속하는 Psa 균주가 보고되었으며, biovar 2 균주는 국내에서만 발견되었고 식물독소인 coro-

*Corresponding author
E-mail: Kwak@gnu.ac.kr

natine을 생산한다(Lee et al., 2017; Vandelle et al., 2021). Biovar 3 균주는 2011년에 국내에서 처음 발견되었고, biovar 2와 함께 국내 참다래 재배지역에서 검출되고 있다(Koh et al., 2012; Kim et al., 2016; Lee et al., 2017). Psa가 처음 보고된 일본에서는 phaseolaotoxin을 생산하는 biovar 1이 보고되었으며 2014년에 biovar 3와 함께 일본 재배 지역 전체에서 발견되고 있다(Takikawa et al., 1989; Sawada et al., 2015). 최근에는 일본 일부 지역에서는 biovar 5와 6이 보고되었으며(Sawada et al., 2016; Poulter et al., 2017), 일본과 국내를 제외하고 다른 국가에서는 biovar 3 균주만 보고되었다(McCann et al., 2017; Sawada et al., 2019).

참다래 궤양병의 방제를 위해 주로 동제와 항생제가 주로 사용되었다(Lee et al., 2020). 현재 국내에서 사용되는 동제는 copper hydroxide, copper sulfate가 있으며, 항생제는 streptomycin, oxytetracycline, validamycin, kasugamycin 등의 조합으로 조성된 약제가 있다(Koh et al., 2017; Kim and Koh, 2018; Lee et al., 2020). 항생제 중 가장 많이 사용되는 스트렙토마이신의 경우 아시아 국가에서는 사용이 허가되었지만 뉴질랜드에서는 허가되지 않아 동제에 의존하고 있다(Scortichini et al., 2017). 이러한 화학적 방제의 경우 작물에 미치는 약해, 과일에 잔류하는 문제 등이 있으며, 특히 저항성인 병원세균의 출현으로 인해 궤양병 방제에 있어 어려움을 겪고 있다(Kim and Koh, 2018; Lee et al., 2020).

이와 같은 문제점을 해결하기 위해 생물적 자원과 다양한 대사산물을 분비하는 지의류 추출물과 방선균을 이용한 연구가 활발히 이루어졌다(Basile et al., 2015; Sugathan et al., 2021). 지의체라는 특별한 구조를 가진 지의류(Lichen)은 진균류와 광합성을 하는 공생체의 연합체로 전세계적으로 널리 분포하는 진핵생물 중 하나이다(Crittenden et al., 1995). 본래 지의류에서 생성되는 1차, 2차 대사산물들은 약리적 작용이 뛰어난 것으로 알려져 있었으며, streptomycin과 penicillin이 발견된 후 지의류에서 분비되는 대사 산물에 관하여 보다 활발히 연구가 진행되었다(Ingolfsdottir et al., 2002). 그 결과로 항균작용을 하는 탄닌 성분들과 usnic acid와 같은 항균작용이 우수한 대사산물들이 발견되었다(Ingolfsdottir et al., 2002). 또한 방선균(Actinomycetes)은 매우 다양하고 풍부한 2차 대사산물의 구조와 기능을 가지며 지금까지 알려진 항생물질 중 75% 이상 분리되었으며 최근 20년간 보고된 항균제, 면역 조절제 등 다양한 생리활성물질은 방선균에서 82% 이상 유래되었다는 보고가 있다(Fguira et al., 2005; Arafat et al., 2021). 이와 같은 다양한 항균물질을 통해 병원성 세균과 진균의 생장억제 또는 살균작용을 하여 유용 미생물에게 유용한 환경을 제공할 수 있다고 밝혀졌다(Horinouchi and Beppu et al., 1992). 이를 통해 생리활성 물질의 응용성이 매우 중요하다고 생각하지만, 분리되는 항생물질이 점차 감소하고 있는 상황이다(Berdy, 2012). 따라서 새로운 기작의 항생물질을 발견하기 위해 지속적인 연구가 필요하다.

본 연구는 참다래 궤양병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)를 대상으로 지의류 추출물과 국내 토양에서 분리된 방선균 중 참다래 궤양병에 우수한 항세균활성을 보이는 후보군 들을 선발하고 선발된 균주의 세균학적 특성을 밝혀 새로운 생물적 자원을 선발을 위한 기반연구를 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

지의류 추출물 및 참다래 궤양병원균 배양 조건

실험에 사용한 지의류 추출물은 지의류 생물자원 소재은행(Korea Lichen Research Institute, KoLRI)에서 분양 받은 622종의 지의류 추출물을 사용하였다. 그리고 항세균성 지의류 추출물을 선발하기 위해 병원균을 1/5 TSA media (TSB, 6 g; Agar, 20 g per liter)를 제조하여 정체 배양기 및 진탕 배양기에서 20°C, 3일간 배양하였다(Kim et al., 2019).

지의류 추출물의 참다래 궤양병원균 생육 억제효과 검정

Psa3 균주는 1/5 TSA media에 선상도말하여 20°C에서 3일간 정체 배양 후, 생성된 단일 colony를 1/5 TSB media 10 mL (TSB, 6 g per liter)에 접종하고 20°C에서 3일간 진탕 배양하였다. 1차 screening에서 배양이 완료된 Psa3 균주는 1/5 TSB media를 이용해 OD_{600}에서 0.1로 희석하여 96-well plate (SPL, Korea)에 각각 100 μL 분주하였고, 622종의 지의류 추출물은 10 μL (V/V)로 3반복으로 첨가였다. 2차 screening은 1차 screening과 동일하게 균주를 OD_{600}에서 0.1로 희석 후 96-well plate에 각각 100 μL 분주하였고 항세균력이 높은 지의류 추출물을 선발하기 위해 5 μL (V/V)로 3반복으로 첨가하였다. 그리고 3차 screening은 지의류 추출물의 양을 1 μL (V/V)로 낮추어 5반복으로 진행하였다. 흡광도 측정은 1시간 간격으로 파장 600 nm에서 Microplate reader (BioTek, Synergy H1, Nederland)를 이용해 20°C 조건으로 48시간 동안 측정하였다. 측정값을 통해 참다래 궤양병원균의 생장이 저해되는 정도를 두가지 방법으로 선발하였다. 절대값 수치인 48시간 배양 후 OD_{600}에서 배양 전 OD_{600} 차이를 통해 선발하는 방법과 상대적 수치인 *I* (Represents inhibition rate)로 전환하여 1차: >90%, 2차: >95%, 3차: >98%를 기준으로 선발하였다(Liu et al., 2021). 최종적으로 두가지 선발 방법 모두에 해당하며 항세균력을 나타낸 지의류 추출물을 선발하였다.

$$I(\%) = \frac{(CK-T)}{CK} \times 100\%$$

*CK: OD of untreated, T: OD of treated

방선균의 참다래 궤양병원균 생육 억제효과 검정

항균활성 검정은 paper disc법을 진행하였으며(Ahn et al., 2009), Psa 병원균을 1/5 TSB media (TSB, 6 g per liter)에 20°C에서 3일간 진탕 배양하였다. 1차 screening에서 1/5 PDK media (potato dextrose, 2 g; peptone, 2 g; agar, 20 g per liter)에 96-pin microplate replicator (Boekel Scientific, Feasterville, PA, USA)를 사용해 28°C에서 5일간 배양하였다. 그리고 1/5 TSB broth에서 3일간 배양한 궤양병 병원균을 1/5 TSA media (TSB, 6 g; Agar, 3 g per liter)에 OD_{600}에서 0.3로 희석 후 5 mL 분주하여 20°C에서 2일간 배양하여 주위에 형성된 생육저지대(growth inhibition clear zone)의 크기를 확인하였다. 2차 screening은 paper disc (8 mm)를 치상한 다음 OD_{600}에서 0.6으로 희석된 방선균 포자현탁액을 10 μL 분주후 28°C 조건으로 5일간 배양하였다. 배양 후, 1차 screening과 동일하게 궤양병 병원균을 분주하여 생육저지대의 크기를 확인하였다. 마지막 3차 screening은 2차 screening에서 방선균의 분주량을 20 μL로 하여 3반복 진행하였으며, 병원균 분주 48시간 후 생육저지대의 크기를 측정하였다.

선발 방선균의 DNA 추출 및 종동정

선발된 방선균은 16S rRNA, *atpD*, *rpoB* 그리고 *trpB*의 염기서열을 이용해 동정하였으며, MS agar (mannitol soya; mannitol, 20 g; soya, 20 g; agar, 20 g per liter)에 삼단 선상도말 하여 28°C에서 3일간 배양 후, 단일 colony를 MS agar 배지에 전면 도말 하여 28°C에서 5일간 배양하였다. 배양균의 DNA 추출 과정은 다음과 같다. 1.7 mL E-tube에 CTAB buffer [2% CTAB, 20 mM EDTA.Na_2.$2H_2O$, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris, pH 8.0] 500 μL (Valizadeh et al; Kim et al., 2017)과 배양한 균주를 넣은 후, Lysozyme solution (50 mg/mL)을 15 μL 첨가한 후 37°C에서 1시간 배양하였다. 이후 Proteinase K solution (20 mg/mL)을 8 μL를 첨가 및 분쇄하여 65°C Heating block에서 30분간 반응을 하였다. 반응 후 상온에서 10분간 식힌 다음 PCI (Phenol:Chloroform: Isoamyl alcohol, 24:25:1) 500 μL를 넣고 5~7회 좌우로 흔들어 혼합하였다. 다음 12,470 × g로 10분간 원심분리기를 작동하였으며, 상층액 400 μL를 새로운 E-tube에 옮겨 Isopropanol 400 μL 첨가하였다. 첨가된 tube를 5~7회 좌우로 흔들어 혼합 후 12,470 × g으로 5분간 원심분리에서 DNA를 침전시켜 주었다. 마지막으로 70% Ethanol 500 μL 첨가하여 원심분리기에서 5분간 반응을 시켰으며 이후 상층액을 버리고 1~2시간 가량 건조를 진행하였다. 건조된 tube에 20 μL의 TE-buffer를 첨가하여 DNA를 녹인 후 농도를 검정하기 위해 1 μL를 이용해 Nano Drop 2000C spectrophotometer (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 정제된 DNA는 16S rRNA, *atpD*, *rpoB* and *trpB* 영역을 증폭하기 위해 16S rRNA 유전자에 대하여 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')/ 1492R (5'-TACGGY TACCTTGTTACGACTT-3'), *atpD* 유전자에 대하여 atpDF (5'-GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTC AACACC-3')/ atpDR (5'- GTGAACTGCTTGGCGACGT GGGTGTTCTGGGACAGGAA-3'), *rpoB* 유전자에 대하여 rpoBPF (5'-GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC-3')/ rpoBPR (5'-CCTCGTAGTTGTGACCCTCCCACGGC ATGA-3'), *trpB* 유전자에 대하여 trpBPF (5'-GCGCGAGG ACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA-3')/ trpBPR (5'-TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCG CGACAGCAGGC-3') primer (Rong and Huang, 2014)를 사용하였고 염기서열 분석은 Macrogen (Seoul, Korea)에서 진행하였으며 확보된 염기서열은 NCBI nucleotide blast search program (https://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi)를 통해 동정하였다. 동정 후 maximum likelihood method를 사용하여 MEGA 10 program 유사성 검증을 통해 계통수를 나타내었다.

통계분석처리

지의류 추출물의 3차 screening의 결과값을 이용한 성장곡선 그래프는 R program (version 4.0.3)의 ggplot2 package를 사용하여 시각화를 수행하였다. 그리고 방선균의 항세균 능력 측정값의 유의성 분석으로 Kruskal-Wallis Rank Sum Test를 진행하였으며 사후 분석으로 Tukey's honestly significant difference test를 진행하여 분석이 완료된 결과 값은 R program (version 4.0.3)의 ggplot2 package를 사용하여 분석 및 시각화를 수행하였다.

결과 및 고찰

지의류 추출물의 궤양병원균 억제

지의류생물자원 소재 은행(Korean Lichen Research Institute (KoLRI)로부터 분양 받은 622종의 지의류 추출물을 대상으로 참다래 궤양병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)에 대한 길항 능력을 확인하였다(Fig. 1). 절대값 수치인 48시간 배양 후 OD_{600}에서 배양 전 OD_{600}의 차이를 통해 선발된 10종은 C-3B, C-7F, E-10B, G-1A, G-5B, G-7A, G-8A, H-5D, H-7F, H-8E이었으며 각 *Parmelia sulcate*, *Melanelia*, *Parmotrema*, *Crustose* sp., *Myelochroa irrugans*, *Parmelia pseudolaevior*, *Umbilicaria esculenta*, *Lecanora*, *Stereocaulon* sp., *Pamalina conuplicans* 균주로부터 추출되었다(Table 1). 선발된 항세균력을 가진 지의류 추출물 중 *I* (Inhibition rate, %) 결과값을 통해 C-3B, C-7F, E-10B, G-7A, G-8A, H-5D, H-7F (*Parmelia sulcate*, *Melanelia*, *Parmotrema*, *Parmelia pseudolaevior*, *Umbilicaria esculenta*,

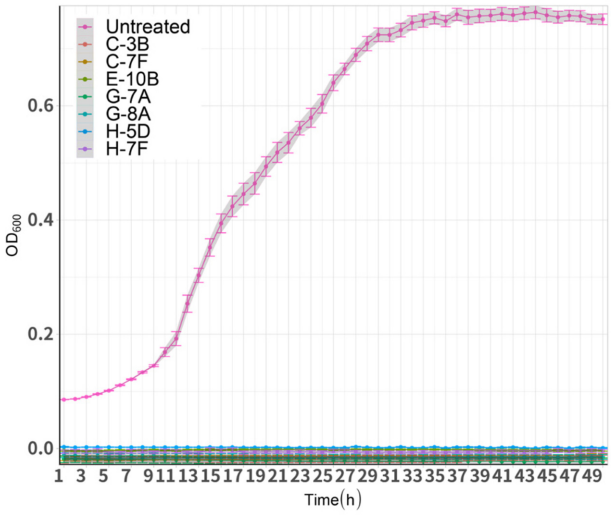

Fig. 1. Inhibition effect of lichen extracts against the *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. The bacterial stock added 100 μL and lichen extracts is 1 μL on 1/5 TSB broth medium ($n = 5$). Plate-96 well is incubated at 20°C for 48 h. Lichen list: C-3B, C-7F, E-10B, G-7A, G-8A, H-5D, H-7F. Bacterial growth curve was calculated with ggplot2 package of the R (4.0.3).

Lecanora, *Stereocaulon* sp.)의 추출물 7종을 최종적으로 선발하였다(Table 1). 공통적으로 선발된 지의류 추출물은 Table 2에서 7종으로 확인되었으며 그 중 5종은 항세균력과 항진균력을 가진 것으로 보고가 되었다(Ranković et al., 2006; Chauhan and Abraham, 2013; Wei et al., 2008; Santiago et al., 2010). 이러한 이유로 선발된 지의류가 참다래 궤양병원균에 대하여 길항 능력을 나타내는 것으로 여겨진다. 또한 본 결과를 통해 선발된 지의류 추출물 중 기작이 보고되지 않은 지의류 추출물이 항세균 능력으로 선발된 것을 통해 새로운 생물학적 방제 연구에 기초적 자료 마련을 할 수 있을 것이라 사료된다.

Table 1. Selection status from antibacterial lichen extract candidates

Screening	Methods	
	OD_{600} after - OD_{600} before	I [a)]
Non-screening	622	622
1st screening	52	85
2nd screening	10	13
3rd screening	10	7

[a)] selected candidate numbers

방선균의 참다래 궤양병원균 생육 억제효과 검정 및 분자생물학적 동정

본 실험실에서 국내 토양에서 분리 보관중인 방선균 자원 1,006개를 대상으로 참다래 궤양병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 대한 길항 능력을 확인하였다(Fig. 2). 검정 균주 1,006개 중 Psa와 1차 대치 배양을 통해 길항 능력을 지닌 방선균 51개, 2차 대치배양을 통해 5개, 3차 대치배양에서 4개가 최종 선발되었다(Table 3). 항세균작용이 가장 우수한 균주는 GU1E7으로서 참다래 궤양병원균과 대치배양 결과 병원균 생장억제력이 56.7% 였으며, 그 다음으로는 GU1D7 (55.8%), GU2C7 (54.2%), GU2C5 (50.8%) 순으로 참다래 궤양병원균을 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 방선균을 처리하지 않은 대조구 보다 방선균 처리구가 병원균의 생장을 더욱 강력하게 억제하는 것을 확인하였으며, 이전에 보고된 *Streptomyces racemochromogenes* W1SF4 (Kim et al., 2019) 보다 약 2배의 clean zone을 형성하는 것으로 확인되었다. 각 처리구별 유의성 확인을 위해 Kruskal-Wallis Rank Sum Test를 진행하였고, 결과 값으로 P 값이 0.02174812로 0.05보다 낮은 값을 나타내 처리구

Table 3. Selection status by order through the selection process of antibacterial *Streptomyces* spp. candidates

	anti-Psa strain number
Non-screening	1,006
1st screening	51
2nd screening [a)]	5
3rd screening [a)]	4

[a)] Antibacterial rate: 2nd screening, >30%; 3rd screening, >50%

Table 2. Lists of antibacterial lichen extract for suppression of Psa growth

Sample	Isolated lichen species	Inhibition rate (I%) [a)]	Function	References
C-3B	*Parmelia sulcata*	+++ (100%)	Antibacterial	Ranković et al., 2006
C-7F	*Melanelia*	+++ (100%)	Unknown	-
E-10B	*Parmotrema*	+++ (99%)	Antimicrobial	Chauhan et al., 2013
G-7A	*Parmelia pseudolaevior*	+++ (100%)	Antifungal	Wei et al., 2008
G-8A	*Umbilicaria esculenta*	+++ (100%)	Antifungal	Wei et al., 2008
H-5D	*Lecanora*	+++ (99%)	Unknown	-
H-7F	*Stereocaulon* sp.	+++ (99%)	Antimicrobial	Santiago et al., 2010

[a)]85% ~87%, +; 88% ~ 95%, ++; >98%, +++

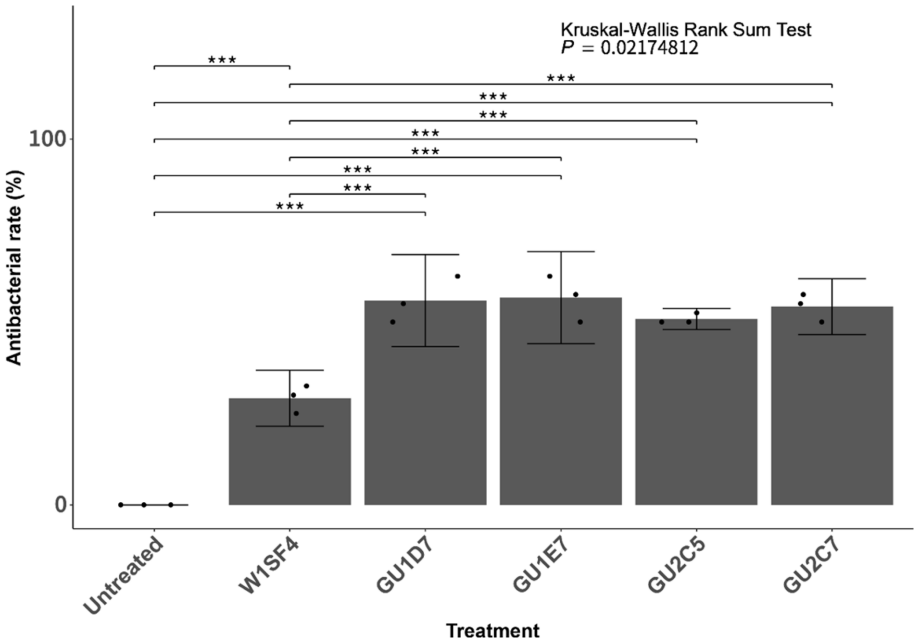

Fig. 2. Antibacterial rate of anti-Psa strains against Psa by disk diffusion assay. *Streptomyces* spp. was pre-inoculated with 20 μL of OD_{600} 0.6. After 5 days later, added 5 mL of Psa bacterial stock (OD_{600} 0.3) incubated at 20°C for 2 days ($n = 3$). Tukey's honestly significant difference test and bar graph were calculated with ggplot2 package of the R (4.0.3).

별 차이를 가진다고 확인하였다. 그리고 사후 분석으로 Tukey HSD (Tukey's honestly significant difference test)를 통해 분석하였을 때 *P* 결과 값이 0.001보다 낮은 것을 확인할 수 있으며, 방선균을 처리한 처리구와 처리하지 않은 처리구가 차이가 유의미한 것을 확인하였다. 이전에 보고된 *S. racemochromogenes* W1SF4와 선발된 방선균의 항세균 능력 또한 *P* 결과 값이 0.001보다 낮아 차이가 있다는 것을 확인하였다. 항세균능력을 나타낸 4개의 길항균주는 유전자 염기서열을 통한 분류 및 동정을 진행하였다. 결과를 통해 확보된 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST를 이용하여 유전자 상동성을 검색한 결과를 기반으로 *Streptomyces* sp.와 99%의 유연관계를 보였으며 분자계통학적 유연 관계 분석에서도 함께 속함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이를 바탕으로 계통학적 유연관계를 분석한 결과 *Streptomyces* sp. GU1D7 (Accession number: MZ081661), *Streptomyces* sp. GU1E7 (Accession number: MZ081647), *Streptomyces* sp. GU2C5 (Accession number: MZ081658), *Streptomyces* sp. GU2C7 (Accession number: MZ081660)으로 명명하였다. 그리고 각 균주의 16S rRNA, *atpD*, *rpoB*, *trpB* 유전자를 사용하여 계통학적 유연관계를 분석한 결과 보고된 균주들 중 유사한 종은 없는 것으로 확인이 되었으며, 항세균력을 가진 *S. racemochromogenes* W1SF4와는 다른 것으로 확인하였다(Fig. 4).

국내에서는 참다래 궤양병에 대한 방제로는 동제 또는 항생제가 주로 사용되고 있는 상황이다(Lee et al., 2020). 이러한 화학적 방제는 식물에 미치는 약해와 과일에 잔류 등의 문제의 한계가 있다. 특히 이러한 방제제의 저항성을 가진 병원세균의 출현이라는 어려움을 겪고 있다. *Streptomyces* 균주는 국외에서도 생물학적 방제 인자로서 다양한 보고가 이루어졌으며 streptomycin, chloramphenicol, tetracycline, kanamycin, hygromycin (Procópio et al., 2012) 등과 같은 항생물질과 rapamycin, amphotericin, pikromycin (Hwang et al., 2014) 등과 같은 다양한 이차대사산물을 보유하고 있어 병원성 세균에 대한 친환경 방제제로 활용되고 있다. 기존의 보고에 따르면 참다래 궤양병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 항세균력을 지니고 있는 *Streptomyces* sp.가 보고된 바가 있다(Fang et al., 2017; Kim et al., 2019). 그리고 지의류(Lichen)의 경우 대부분 약용으로 사용되었지만 streptomycin과 penicillin이 발견된 후 대사 산물에 관한 연구가 활발히 진행되었다(Ingolfsdottir et al., 2002). 그 후 다양한 대사산물들이 발견되었으며, 실제 지의류의 추출물의 항균작용이 보고가 되었다. 하지만 Psa에 대한 지의류의 항세균 결과는 아직 보고가 된 것이 없다. 본 연구를 통해 선발된 *Streptomyces* sp.와a 지의류 추출물은 방제의 어려움을 겪고 있는 참다래 궤양병에 대하여 항세균 능력을 지니고 있으며 생물적 방제 균주 및 새로운 생물적 자원으로서 제형 개발 및 포장에서의 효과 검정 등의 연구를 통해 실효성이 확인된다면 향후 참다래의 안정적인 생산에 기여할 수 있을 것이라 사료된다.

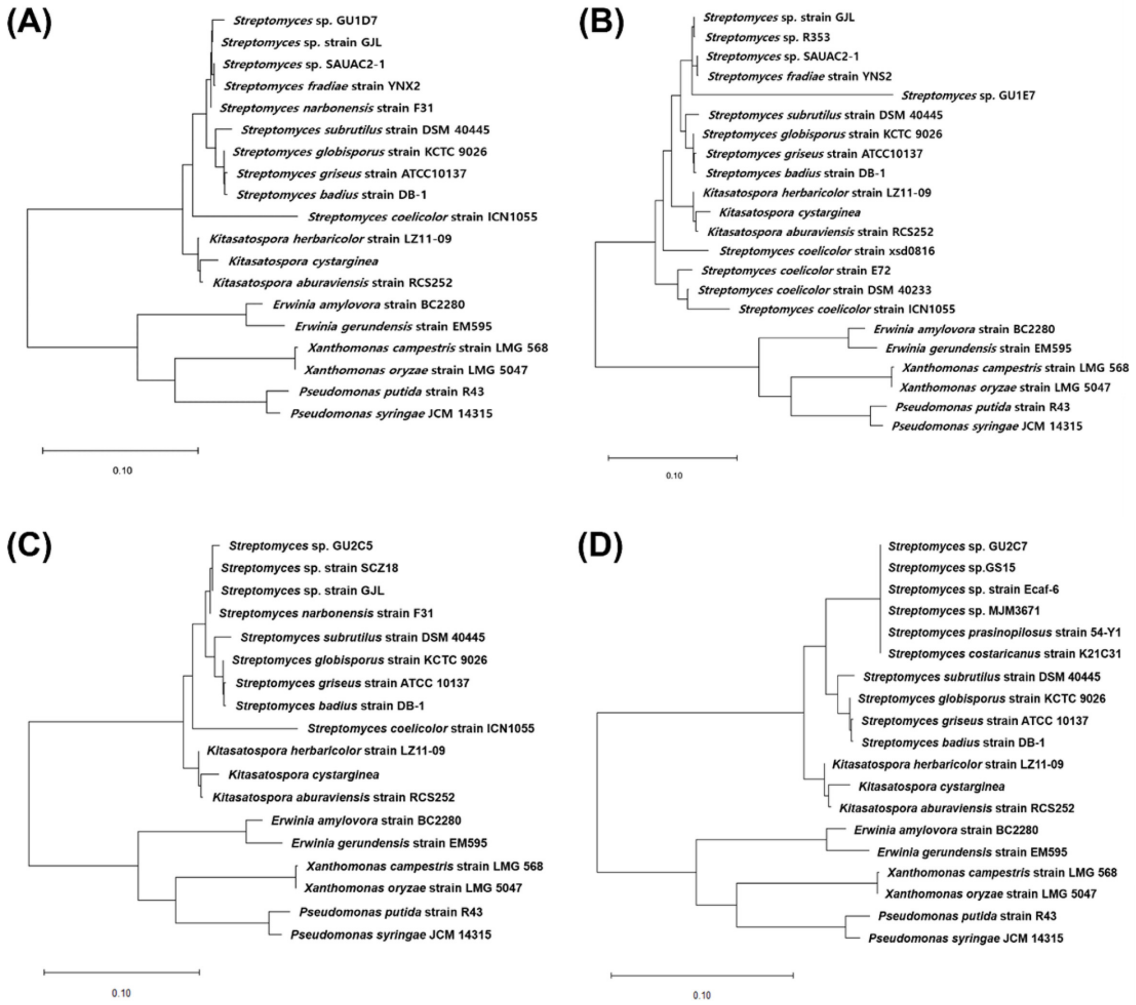

Fig. 3. Phylogenetic tree of the anti-*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains based on gene sequences by the maximum likelihood method and MEGA 10 alignment. The sequences of reference species were obtained from NCBI GenBank. (A): Phylogenetic tree of *Streptomyces* sp. GU1D7, (B): Phylogenetic tree of *Streptomyces* sp. GU1E7, (C): Phylogenetic tree of *Streptomyces* sp. GU2C5, (D): Phylogenetic tree of *Streptomyces* sp. GU2C7.

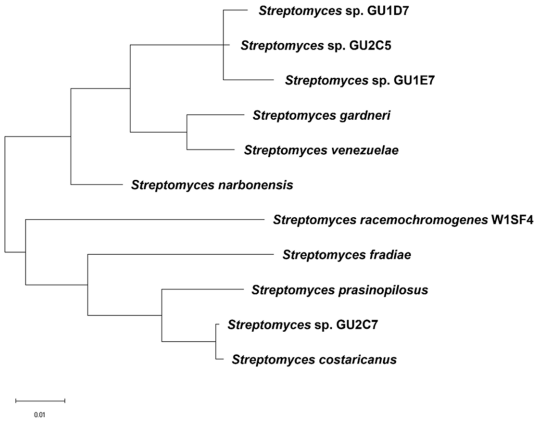

Fig. 4. Phylogenetic tree of strains GU1D7, GU1E7, GU2C5 and GU2C7 based on 16S rRNA and housekeeping genes (*atpD*, *rpoB* and *trpB*). Sequences were compared by multiple alignment analyses using Maximum likelihood method of MEGA 10 alignment.

감사의 글

본 연구는 연구재단(2020R1A2C2004177)의 지원으로 수행되었습니다. 지의류 추출물을 분양하여 주신 한국지의류 생명자원소재은행에 감사드립니다.

Author Information and Contributions

Su In Lee, Department of Plant Medicine, Gyeongsang National University, Undergraduate student

Da-Ran Kim, Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Research Professor, http://orcid.org/0000-0003-3460-901X

Youn-Sig Kwak, Division of Applied Life

Science(BK21Plus), Gyeongsang National University, Professor, http://orcid.org/0000-0003-2139-1808

Literature Cited

Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS, 2009. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. Dent. Mater. 25(2):206-213.

Arafat HH, Abu-Tahon MA, Isaac GS, 2021. Production of antibiotic carbomycin from *Streptomyces graminofaciens* with high lipid content mutation. Arch. Microbiol. 203(3):901-911.

Basile A, Rignao D, Loppi S, Di Santi A, Nebbioso A, et al., 2015. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. Int. J. Mol. Sci. 16(4):7861-7875.

Balestra GM, Mazzaglia A, Quattrucci A, Renzi M Rossetti A, 2009. Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. Australas. Plant Dis. 4:34-36.

Balestra GM, Renzi M, Mazzaglia A, 2010. First report of bacterial canker of Actinidia deliciosa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. New Dis. Rep. 22(1):10.

Balestra GM, Renzi M, Mazzaglia A, 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit plants in Spain. New Dis. Rep. 24(1):10.

Berdy J, 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. J. Antibiot. 65(8):385-395.

Chauhan R, Abraham J, 2013. *In vitro* antimicrobial potential of the lichen *Parmotrema* sp. extracts against various pathogens. Iran J. Basic Med. Sci. 16(7):882-885.

Crittenden PD, David JC, Hawksworth DL, Campbell FS, 1995. Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. New Phytol. 130(2):267-297.

Everett KR, Taylor RK, Romberg MK, Rees-George J, Fullerton RA, et al., 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. Australas. Plant Dis. Notes. 6(1):67-71.

Fang W, Tingting W, Xuecheng X, Jiiao J, Jiguang L, et al., 2017. Control efficacy of *Streptomyces* sp. SY-L12 and Chitooligosaccharide on kiwifruit bacterial canker, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Plant Dis. Pest. 8(4):17-20.

Ferrante P, Scortichini M, 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. J. Phytopathol. 157(11-12):768-770.

Ferrante P, Scortichini M, 2010. Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. Plant Pathol. 59(5):954-962.

Fujikawa T, Sawada H, 2019. Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 6, which produces the phytotoxins, phaseolotoxin and coronatine. Sci. Rep. 9(1):1-11.

Han HS, Koh YJ, Hur JS, Jung JS, 2003. Identification and characterization of cirinatine-produciong *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. J. Microbial. Biotechnol. 13(1):110-118.

Hwang KS, Kim HU, Charusanti P, Palsson BØ, Lee SY, 2014. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 32(2):255-268.

Horinouchi S, Beppu T, 1992. Autoregulatory and communication in actinomycetes. Annu. Rev. Microbiaol. 46(1):377-392.

Ingolfsdottir K, 2002. Usnic acid. Phytochemistry. 61(7):729-736.

Kim DR, Lee JT, Kim HS, Jeon CW, Kwak YS, 2017. Selection of biocontrol agent of tomato gray mold disease from flower and pollinator hive. Korean J. Pestic. Sci. 21(1):90-96.

Kim GH, Choi ED, Lee YS, Jung JS, Koh YJ, 2016. Spread of bacterial canker of kiwifruit by secondary infection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 in gyeongnam in 2016. Res. Plant Dis. 22(4):276-283.

Kim GH, Koh YJ, 2018. Diagnosis and control of major leaf diseases on kiwifruit in Korea. Res. Plant Dis. 24(1):1-8.

Kim MJ, Chae DH, Cho GJ, Kim DR, Kwak YS, 2019. Characterization of antibacterial strains against kiwifruit bacterial canker pathogen. Plant Pathol. J. 35(5):473-485.

Koh YJ, 1994. Outbreak and spread of bacterial canker in kiwifruit. J. Plant Pathol. J. 10:68-72.

Koh YJ, Kim GH, Koh HS, Lee YS, Kim SC, et al., 2012. Occurrence of a new type of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain of bacterial canker on kiwifruit in Korea. Plant Pathol. J. 28(4):423-427.

Koh YJ, Kim GH, Jung JS, 2017. A proposed manual for the efficient management of kiwifruit bacterial canker in Korea. Res. Plant Dis. 23(1):1-18.

Lee YS, Kim J, Kim GH, Choi ED, Koh YJ, et al., 2017. Biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, isolated in Korea. Res. Plant Dis. 23(1):35-41.

Lee YS, Kim GH, Song YR, Oh CS, Koh YJ, et al., 2020. Streptomycin resistant isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. Res. Plant Dis. 26(1):44-47.

Liu T, Ren X, Cao G, Zhou X, Jin L, 2021. Transcriptome analysis on the mechanism of ethylicin inhibiting *Psedomonas syringae* pv. *actinidiae* on Kiwifruit. Microorganisms. 9(4):724.

Fguira LFB, Fotso S, Ameur-Mehdi RB, Mellouli L, Laatsch

H, 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res. Microbiol. 156(3):341-347.

McCann H, Li L, Liu Y, Li D, Pan H, et al., 2017. Origin and evolution of the kiwifruit canker pandemic. Genome Biol. Evol. 9(4):932-944.

Poulter R, Taiaroa G, Sumpter N, Stockwell P, Butler M, 2017. Complete genome sequence of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 5, originating from Japan. Genome Announc. 5(50):e1409-17.

Procópio RED, Silva IRD, Martins MK, Azevedo JLD, Araújo JMD, 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Braz. J. Infect. Dis. 16(5):466-471.

Ranković B, Mišić M, Sukdolak S, 2007. Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcate*, *Umbilicaria crustulosa*, and *Umbilicaria cylindrica*. Microbiology. 76(6):723-727.

Rong X, Huang Y, 2014. Multi-locus sequence analysis: taking prokaryotic systematics to the next level. Methods Microbiol. 41:221-251.

Santiago K, Borricano J, Canal JN, Marcelo DMA, Perez MCP, et al., 2010. Antibacterial activities of fruticose lichens collected from selected sites in Luzon island, Philippines. Philipp. Sci. Lett. 3(2):18-29.

Sawada H, Shimizu S, Miyoshi T, Shinozaki T, Kusumoto S, et al., 2015. Characterization of biovar 3 strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 81(2):111-126.

Sawada H, Kondo K, Nakaune R, 2016. Novel biovar (biovar 6) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 82(2):101-115.

Sawada H, Fujikawa T, 2019. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, pathogen of kiwifruit bacterial canker. Plant Pathol. J. 68(7):1235-1248.

Scortichini M, 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. Plant Pathol. J. 43(6):1035-1038.

Scortichini M, 2017. Aspects still to solve for the management of kiwifruit bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3. Eur. J. Hortic. Sci. 83(4):205-211.

Sugathan S, Valsala G, Parambath JN, Menon K, Bahuleyan RK., 2021. Production, purification and characterization of an antibacterial compound from *Streptomyces griseus* TBG19NRA1 isolated from the forest soils of the western ghats of kerala, India. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. e590-e590.

Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, Tsuyumu S, Goto M, et al., 1989. *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae pv. nov. the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55(4):437-444.

Valizadeh N, Holasou HA, Mohammadi SA, Khawar KM, 2021. A comparison of genomic DNA extraction protocols in Artemisia annua L. for large scale genetic analyses studies. Iran J. Sci. Technol. Trans Sci. 45:1587-1595.

Vanneste JL, Poliakoff F, Audusseau C, Cornish DA, Paillard S, et al., 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacteria canker of kiwifruit in France. Plant Dis. 95(10) 1311-1311.

Vandelle E, Colombo T, Regaiolo A, Maurizio V, Libardi T, et al., 2021. Transcriptional profiling of three *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovars reveals different responses to apoplast-like conditions related to strain virulence on the host. Mol. Plant Microbe Interact. 34(4):376-396.

Wei X, Jeon HS, Han KS, Koh YJ, Hur JS, 2008. Antifungal activity of lichen-forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. Plant Pathol. J. 24(2):202-206.

참다래 궤양병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 대한 항세균 지의류 추출물 및 방선균 선발

이수인[1] · 김다란[2] · 곽연식[1,2]*

[1]경상국립대학교 식물의학과, [2]경상국립대학교 생명과학연구원

요 약 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)에 의해 발생하는 참다래 세균성 궤양병은 참다래 생산에서 가장 파괴적인 질병이다. Psa의 관리는 전 세계 참다래 생산 산업에서 가장 중요한 문제이다. 스트렙토마이신 등 항균제에 대한 Psa의 저항성 변종 출현은 궤양병을 통제하기 어렵게 만들고 있다. 현재 Psa 감염에 대한 효과적인 치료는 드물고, 구리 함유 농약들은 참다래 과수원에 뿌려지는 경우가 많다. 따라서 새로운 항세균성 화합물과 농약 대체에 필요한 바이오 화합물로 병원균를 제어해야 한다. 본 연구는 지의류 추출물 및 Streptomyces 유전자원 라이브러리에서 새로운 궤양병원균 억제 자원을 조사하는 데 초점을 맞췄다. 622개의 지의류 추출물 중 7개의 지의류 추출물이 Psa 병원체 성장을 효과적으로 억제하는 자원으로 선발되었다. 1,006의 Streptomyces 유전자원에서 4개의 균주가 Psa를 효과적으로 억제했다. 이러한 결과는 7개의 지의류와 4개의 *Streptomyces* spp.가 참다래 세균성 궤양병을 통제하는 데 유용할 수 있음을 시사한다.

색인어 생물적방제, 참다래 궤양병, 지의류, 방선균