농약과학회지 (Korean J. Pestic. Sci.)
Vol. 26, No. 1, pp. 9-15 (2022)
Open Access https://doi.org/10.7585/kjps.2022.26.1.9
ORIGINAL ARTICLES

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

참다래 궤양병원균에 대한 길항방선균 *Streptomyces venezuelae* 1-1 9D 균주의 특성

김수현[1] · 김다란[2] · 곽연식[1,2]*
[1]경상국립대학교 응용생명과학부, [2]경상국립대학교 식물의학과

Characteristics of *Streptomyces venezuelae* 1-1 9D Strain against Kiwifruit Bacterial Canker Pathogen

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

(Received on February 4, 2022. Revised on February 18, 2022. Accepted on February 25, 2022)

Abstract kiwifruit bacterial canker disease, which is caused *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), is known to a destructive disease in kiwifruit production worldwide. Psa is classified into the five biovars such as 1, 2, 3, 5, and 6 by genetic variation of the pathogen. Chemical control, which is streptomycin and copper-based agricultural chemicals, was performed to manage Psa, but the disease was not completely controlled. Therefore, this study focused development of a biological control agent against the Psa pathogen using *Streptomyces* spp. library. In this study, we constructed a *Streptomyces* library, which was collected from kiwifruit rhizosphere, and screen anti-Psa agent. As the result, *Streptomyces venezuelae* 1-1 9D was selected as the most aggressive anti-Psa strain. Additionally, *S. venezuelae* 1-1 9D showed strong enzyme activities such as cellulase, chitinase, protease and siderophore. Strain of *S. venezuelae* 1-1 9D has many potentials to develop as the biological control agent against the kiwifruit bacterial canker disease.

Key words Antibacterial, Biological control, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Streptomyces*

서 론

참다래(*Actinidia chinensis*)는 Actinidiacea과에 속하며 원산지는 동남아시아로 알려져 있다(Kim et al., 2019). 참다래는 1970년부터 재배되었으며 과실에는 비타민C, 칼륨이 높은 비율로 함유되어 있다(Jeong et al., 2007). 참다래에 포함된 비타민C는 혈관의 노화를 방지하여 고혈압을 방지하고 예방, 칼륨은 몸속의 과다 염분을 체외로 배출시키는 역할을 한다.

하지만 최근 다양한 병원균에 의한 피해로 참다래의 생산량과 품질에 심각한 영향을 미치고 있다. 궤양병(Kiwifruit bacterial canker)은 참다래에 발생하는 병해 중 하나로 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)가 원인균이다. 일본에서 1984년 최초로 보고되었으며 국내와 이탈리아에서 1994년 처음 보고되었다(Takikawa et al., 1989; Koh, 1994; Scortichini, 1994). Psa는 2008년도부터 2011년 사이에 이탈리아(Ferrante and Scortichini, 2009), 한국(Koh et al., 2010), 프랑스(Vanneste et al., 2011), 포르투갈(Balestra et al., 2011), 스페인(Balestra et al., 2011), 터키(Bastas and Karakaya, 2012) 등 여러 국가에서 궤양병의 발생이 보고되었다.

초기 궤양병은 항생제 사용 및 과수원 관리를 통해 병원균 확산을 통제하기에 충분하였으나 재출현한 Psa을 관리하

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

는데 어려움을 겪고 있다. 현재 Psa는 유전적 특성, 생산 독소에 의해 biovar 1, 2, 3, 5, 6으로 분류되며 각 나라에 보고된 biovar가 다르다(Fujikawa and Sawada, 2019). 다양한 biovar를 가지는 Psa를 관리하기 위해 주기적인 모니터링, 감염된 숙주 제거, streptomycin 항생제, 구리 함유 농약 등을 이용한 화학적 방제에 의존하여 왔다(Frampton et al., 2014). 하지만, streptomycin의 사용은 많은 국가에서 적절한 방제가 이루어 지지 않았으며, Psa에서 저항성을 나타내는 유전자가 발견되었다. 또한, 구리를 함유한 농약을 주기적으로 사용할 경우 구리 잔류물의 독성 축적을 유발하여 환경문제를 야기할 수 있다(Pietrzak and McPhail, 2004). 이에 따라서, Psa를 방제하기 위한 대안으로 생물학적 방제 연구가 활발히 이루어졌다.

방선균(*Streptomyces* spp.)은 그람 양성, 호기성, 비운동성 박테리아로 구성되며, 곰팡이와 비슷한 사상체 형태를 가진다(Flärdh and Buttner, 2009; Hasani et al., 2014). 대부분 방선균은 토양내에서 생활하며 기주 식물의 근권에 집락화할 수 있다(Vurukonda et al., 2018). 토양에 서식하는 미생물 일부는 내생미생물로서 효율적으로 기주 식물 내 조직에 집락화하여 그들 주기의 일부 혹은 완전히 수행하는데(Meschke and Schrempf, 2010) 다양한 생물 활성 화합물을 생성하여 항균제(Ramesh and Mathivanan, 2009; de Lima Procópio et al., 2012; Kumar et al., 2014; Ser et al., 2016), 항진균제(Lam, 2006), 항바이러스제(Ara et al., 2012), 면역억제제(Kino et al., 1987)의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이점으로 방선균을 이용한 식물 병원체의 생물학적 방제에 대한 많은 연구가 이루어졌다.

이에 본 연구는 참다래의 근권에서 분리한 방선균을 이용하여 참다래 궤양병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)에 대한 친환경 방제법 개발을 위한 유전자원을 선발하였다. 우수한 방제 능력을 나타낸 균주는 계통학적 특성을 밝혀 냈으며 이는 Psa에 대한 생물학적 방제 연구의 기초가 될 것으로 보인다.

재료 및 방법

참다래 조직 채집 및 조직에서 방선균 분리

참다래 궤양병원균에 항세균능력을 나타내는 방선균을 분리하기 위해 참다래를 채집하였다. 농촌진흥청 국립원예특작과과학원(34°48′56.8″N 127°55′42.7″E)에서 참다래의 근권을 50 mL 튜브(SPL, Republic of Korea)에 채집하였다. 근권은 균분리를 위해 20% glycerol는 1:1로 혼합하여 -20°C에 보관하였다.

근권 1 g은 멸균수 9 mL와 희석하여 1/5 PDK (potato dextrose, 2 g; peptone, 2 g; agar, 20 g per L) 배지에 100 μL 분주, 도말을 진행하였다. 도말을 진행한 배지는 28°C에서 5일 간 배양하였다. 배양한 배지에서 방선균 표현형을 나타내는 colony는 96-well plate (SPL, Republic of Korea)에 보관균주를 제작하였다. 보관균주 제작은 96-well plate에 TSB 150 μL를 분주 후, 방선균의 colony를 접종하였고 28°C 진탕 배양기에서 5일 간 배양하였다. 배양한 plate에는 50% glycerol 150 μL을 분주하여 -20°C에 보관하였다.

참다래 궤양병원균 생육 억제 방선균 선발

참다래 궤양병원균을 억제하는 방선균을 선발하기 위해 대치배양을 총 3차로 진행하였다. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 (Psa) 균주는 1/5 TSA (Tryptic soya broth 6 g, agar 20 g per L) 배지에 획선도말하여 20°C에서 3일간 배양하였다(Lee at al., 2021). 배양 후, 생성된 단일 colony는 1/5 TSB (Tryptic soya broth 6 g per L) 배지 10 mL에 접종하였다. 접종한 배지는 20°C에서 3일간 배양하였고 OD_{600}을 0.3로 희석하여 모든 대치배양 실험에 사용하였다. 1차 대치배양은 96-well plate에 분리된 방선균을 사용하여 실험을 진행하였다. 방선균은 96-pin microplate replicator (Boekel Scientific, USA)를 이용해 tray plate TSA 배지에 접종하였다. 접종한 배지는 28°C에서 5일간 배양하였으며, OD_{600}를 0.3으로 조절한 Psa 균주를 5 mL 분주하여 20°C에서 3일간 키웠다. Psa 병원균을 억제하는 방선균은 2차 대치배양에 사용하였다. 2차 대치배양은 9 cm petri dish PDK 배지에 1차로 선발된 균주를 배양하였다. 균주들은 배지의 중심에서 3 cm 떨어진 위치와 직각을 이루도록 약 3 cm 길이의 선을 그어주었다. 그 후, 1차와 동일한 조건으로 배양한 Psa 균주를 분주하여 대치배양을 진행하였다. 항세균능력을 나타내는 균주들은 3차 대치배양을 하였다. 3차 대치배양은 9 cm petri dish PDK 배지의 Paper disc에 균주를 동일한 농도로 접종하였다. 각 방선균들은 OD_{600}을 0.6로 조절하였고 8 mm paper disc에 20 μL 접종되었다. 분주한 plate는 28°C에서 5일간 배양하였고 Psa를 분주하여 항균능력을 나타내는 균주가 선발되었다(Clean zone 길이 5 mm 이상). 선발된 균주와 Psa만 처리한 처리구는 Wilcoxon rank-sum test를 이용해 통계적 차이를 나타내었다. Wilcoxon rank-sum test는 각 처리구들의 표본이 서로 독립적이고 정규분포를 만족하지 않을 때 사용하는 분석방법으로 p 값이 0.05보다 작을 때, 통계적 차이가 유의미함을 나타낸다. 방선균은 보관균주 제작을 위해 MS (Mannitol Soya; Mannitol 20 g, Soya 20 g, Agar 20 g per 1 L) 배지에 4방향 전면도말하여 28°C에서 5일간 배양하였다. 배양된 방선균은 20% glycerol 1 mL을 적신 멸균솜으로 모아 syringe (10 mL)에 넣었으며 밀대를 밀어 추출물로 보관균주를 제작하였다. 추출물은 -20°C에 보관하였다.

참다래 궤양병원균 억제 방선균 분자생물학적 동정 및 계통학적 분석

참다래 궤양병원균에 항세균 능력을 나타낸 방선균은 분자생물학적 동정을 하였다. 방선균 후보군 들은 각각 MS 배지에 4방향 전면도말을 시행한 후, 분자생물학적 동정을 위해 DNA 정제 및 16S rRNA 영역을 이용한 PCR을 진행하였다. 배양한 방선균은 CTAB 방법을 사용하여 DNA를 추출하였다(Graham et al., 2003). CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide; 2.0% (w/v) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl) 500 μL에 방선균과 Lysozyme solution Lysozyme solution (50 mg/mL)을 15 μL 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양한 균주는 Protease K solution (20 mg/mL)을 8 μL를 넣어 65°C Heating block에서 30분간 반응시켜주었다. 단백질 변성 과정을 거친 후, PCI (Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol, 24:25:1) 700 μL를 넣고 혼합하였다. 혼합액은 12,470 × g에서 10분 동안 원심분리를 통해 단백질을 분리해주었다. 분리 과정을 거친 상층액은 새로운 microcentrifuge tube에 넣어 400 μL Isopropanol을 첨가하였다. 첨가된 tube는 5~7회 좌우로 흔들어서 혼합하였으며 12,470 × g에서 5분 간 원심분리를 하였다. 침전 외 남은 용액은 제거하였으며, 70% ethanol 500 μL를 이용하여 동일한 속도로 5분 동안 원심분리를 통해 이물질을 제거하였다. 원심분리 후, tube의 상층액을 제거하여 1~2시간 동안 완전히 건조하였다. 추출한 DNA는 NanoDrop™ 2000c (Thermo scientific, USA)를 이용해 DNA 양을 측정하였다. DNA 측정 시 A260/280 비율은 1.8 미만으로 A260/230 비율이 1.8~2.2인 DNA를 이용하여 PCR을 진행하였다.

PCR은 16S ribosomal RNA (16S rRNA), ATP synthase subunit beta (*atpD*), RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) 영역을 증폭하였다. 16S rRNA 영역에 대해 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')/1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), *atpD* 유전자에 대하여 atpDF (5'-GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC-3')/atpDR (5'-GTGAACTGCTTGGCGACGTGGGTGTTCTGGGACAGGAA-3'), *rpoB* 유전자에 대해 rpoBPF (5'-GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC3')/ rpoBPR (5'-CCTCGTAGTTGTGACCCTCCCACGGCATGA-3') primer (Rong and Huang, 2014)를 사용하였다. PCR은 Genomic DNA 1 μL (100 ng/μL), primer (10 pmol) 1 μL, dNTP (2 mM) 4 μL, 2 × PCR buffer 20 μL, KOD FX Neo 0.3 μL (0.1 U/μL), ddH_2O로 최종 40 μL으로 맞추어 진행하였다. PCR 과정은 98°C 5분간 pre-denaturation을 수행한 후, 98°C denaturation 30초, 56°C (16S rRNA)/63°C (*atpD*)/65°C (*rpoB*) annealing 30초, 72°C elongation 1분 30초 과정을 30회 반복하였고 final-elongation 72°C에서 10분과정을 진행하였다. PCR 후 산물은 1% agarose gel에 전기영동을 하였고 gel elution 진행하였다. 전기 영동을 통해 얻어진 약 1.5 kb (16S rRNA)/1 kb (*atpD*)/0.8 kb (*rpoB*) band는 elution을 위해 소독한 메스로 잘랐다. 절단된 agarose 절편은 Expin™ Gel SV kit (GeneAll, Republic of Korea)를 이용하여 정제하였다. Microcentrifuge tube에 절편과 300 μL GB buffer를 첨가해 50°C에서 10분간 반응하였다. 반응한 tube는 상온에서 식힌 후, column tube에 모두 옮겨 원심분리를 해주었다. 원심분리한 column은 80% ethanol을 이용해 불순물을 제거하였으며 건조시켜 EB buffer로 genomic DNA를 column에서 분리하였다. 분리된 DNA는 전기영동을 통해 단일 밴드 여부를 확인하였다.

정제된 PCR 산물은 Cosmogenetech (Seoul, Korea)에 high throughput DNA sequencing을 통해 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 NCBI Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)에서 동정을 진행하였다. 동정 된 방선균은MEGA 10 program의 maximum likelihood 방법을 사용하여 16S rRNA phylogenetic tree와 각 해당 영역(16S rRNA, *atpD*, *rpoB*)을 모두 합하여 Multiple sequence alignment을 진행하여 phylogenetic tree를 제작하였다.

선발된 방선균 효소 활성 실험

선발된 방선균은 cellulase, chitinase, protease, siderophore 생성 활성을 확인하였다. 선발된 균주는 해당 배지의 8 mm filter disk (Advantec, Taiwan)에 접종하여 cellulase, chitinase 활성 실험을 진행하였다. Cellulase (yeast extract 1 g, CMC 1 g, KH_2PO_4 4 g, $MgSO_4$ 1 g, $MnSO_4$ 0.05 g, $FeSO_4$ 0.05 g, $CaCl_2$ 2 g, NH_4Cl 2 g, Agar 18 g per L; pH 7.0~7.4) 배지, Chitinase 배지(Chitin 5 mL, Yeast 5 g, KH_2PO_4 0.7 g, K_2HPO_4 0.05 g, $MgSO_4$ 0.3 g, $FeSO_4$ 0.1 g, NaCl 0.1 g, Agar 20 g per L; pH 6.5~7.0) 배지는 다음과 같이 제작하였다. 방선균의 량은 OD_{600}에서 0.6 (6×10^8 cfu/mL)값으로 조절하였다. 농도를 조절한 방선균은 filter disk에 10 μL 접종하여 28°C에서 7일 동안 배양하였다(Carder, 1986). 배양한 plate는 Congo Red 0.1%, 0.2% 2 mL 분주하여 plate의 투명한 영역 길이를 측정하였다(Hwang et al., 2016). Protease 활성은 protease (skim milk 10 g, Agar 20 g, per L) 배지에 OD_{600} 0.6으로 접종하였다. 접종한 plate는 5일 후에 투명한 영역 길이를 쟀다(Berg et al., 2005). Siderophore (MM9 salt solution 100 mL, ddH_2O 750 mL, PIPES 32.24 g, Agar 15 g; pH 6.5 autoclave에서 멸균 후, 50°C에서 casamino acid solution 30 mL, 20% glucose solution 10 mL, blue dye solution 100 mL) 배지에 균주 OD_{600}에서 0.6 (6×10^8 cfu/mL)값으로 10 μL 접종하여 siderophore 합성 실험을 진행하였다(Louden et al., 2011).

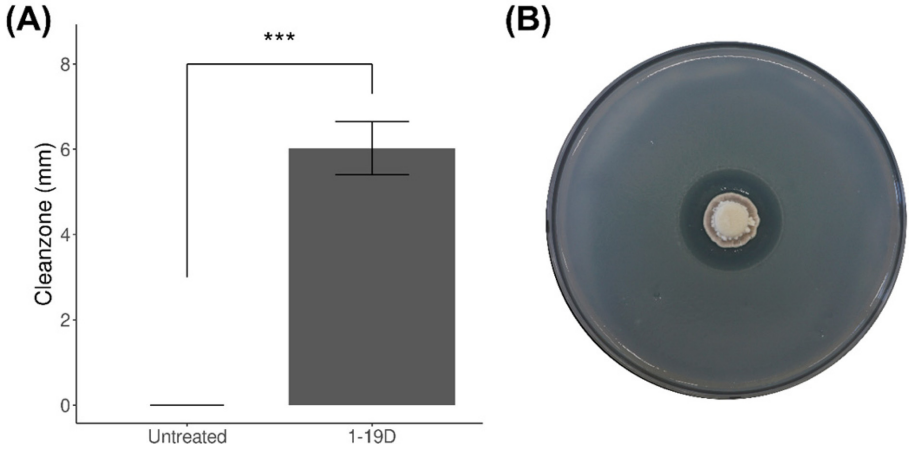

Fig. 1. Antibacterial ability of selected bacteria. (A): Comparison of untreated and 1-1 9D treatment after overlay of Psa. Wilcoxon rank-sum test is used to statistical analysis between the group. (B): Antibacterial assay against Psa. The selected bacteria 1-1 9D was cultured to OD_{600} 0.6 in PDK media and incubated in 28°C. Psa is overlaid to OD_{600} 0.3 after 8 days and plate is incubated in 20°C. Clear zone is measured after 2 days ($n = 3$).

결과 및 고찰

참다래 궤양병 억제 방선균 선발

참다래 궤양병을 억제하는 방선균을 선발하기 위해 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 참다래의 근권을 채집하였다. 참다래의 근권에서 분리된 방선균은 총 288개의 보관균주로 제작되었다. 1차 대치배양에서는 96-well plate에 제작된 균주들을 이용하여 방선균을 선발되었다. Psa를 분주한 결과로 선발된 46개 방선균은 2차 대치배양을 진행하였고 항균 능력을 나타낸 16개의 방선균을 2차적으로 선별하였다. 3차 대치배양은 filter disk에 실험을 진행함으로써 Psa에 대하여 가장 뛰어난 항세균능력을 나타내는 1-1 9D 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 5.5~6.5 mm의 뛰어난 활성 효과를 확인하였다(Fig. 1B). Wilcoxon rank-sum test를 통해 Untreated와 처리구의 clean zone 길이를 비교하였을 때, 통계적 차이가 유의미함을 알 수 있었다(Fig. 1A).

참다래 궤양병 항세균성 방선균의 계통학적 유연관계 분석

참다래 궤양병에 대해 높은 항균능력을 나타낸 1-1 9D 균주는 16S rRNA, ATP synthase subunit beta (*atpD*), RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) 영역을 이용하여 계통학적 관계를 알아냈다. 각 해당 영역의 크기는 1.5 kb (16S rRNA), 1 kb (*atpD*), 0.8 kb (*rpoB*)인 것으로 확인되었고 해당 영역 염기서열을 통해 동정을 진행하였다. NCBI BLAST 동정 결과로 *S. venezuelae*와 98% 이상 일치함을 나타내었다 (NCBI Accession number: OM403094). 종의 정확한 분류을 위해 다른 *Streptomyces* spp.들과 16S RNA 영역 비교 (Fig. 2A) 및 3가지 영역(16S rRNA, *atpD*, *rpoB*) multiple alignment analysis 비교(Fig. 2B) 두가지를 동시에 진행하였다. 이는 MEGA 10 프로그램을 통해 *S. venezuelae*와 분리된 1-1 9D 균주가 함께 분류되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A, B). *S. venezuelae*에 대한 다양한 선행 연구 결과들이 존재한다. *S. venezuelae* ATCC 15439는 빠르게 성장하는 *Streptomyces* 균주 중 하나로 알려져 있으며 methymycin, pikromycin의 생산자로 보고되어 있다(He et al., 2016). *S. venezuelae* P10은 chitinase를 생산하여 식물병원균들에 대해 항진균능력을 나타내었다(Mukherjee and Sen, 2006). *S. venezuelae*로 동정된 1-1 9D 균주는 앞서 보고된 다양한 기작을 사용하여 Psa를 억제하는 것으로 판단된다. 분리된 1-1 9D 균주를 이용하여 Psa에 대해 생물학적 방제로 보고된 사례가 처음이며 이는 효율적인 관리에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

선발 방선균 효소 활성 능력 검정

참다래 궤양병에 항균 능력을 나타내는 1-1 9D 균주의 cellulase, chitinase, protease, siderophore 생성 활성 실험을 진행하였다(Fig. 3). 1-1 9D 균주는 cellulase, chitinase, protease 효소 활성을 나타내었으며 siderophore 생성에도 관여하였다. 특히 protease에 비해 cellulase, chitinase 활성 및 siderophore 생성에 더 큰 효과를 나타내었다. 이전에 보고된 *S. venezuelae* P10와 동일하게 chitinase 생산 능력을 가지는 것이 확인되었고 chitin이 주요 세포벽 성분인 진균의 생장을 효율적으로 억제하는 능력을 가질 것으로 추측된다(Mukherjee and Sen, 2006). Cellulose, protease, siderophore 생성은 chitinase와 마찬가지로 생물학적 방제 메커니즘에 다양한 방식으로 기여를 하는 것으로 알려져 있다(Richter et al., 2011; Singh and Chhatpar, 2011; Shanmugaiah et al., 2015). 참다래에서 분리된 균주 *S. venezuelae* 1-1 9D는 다

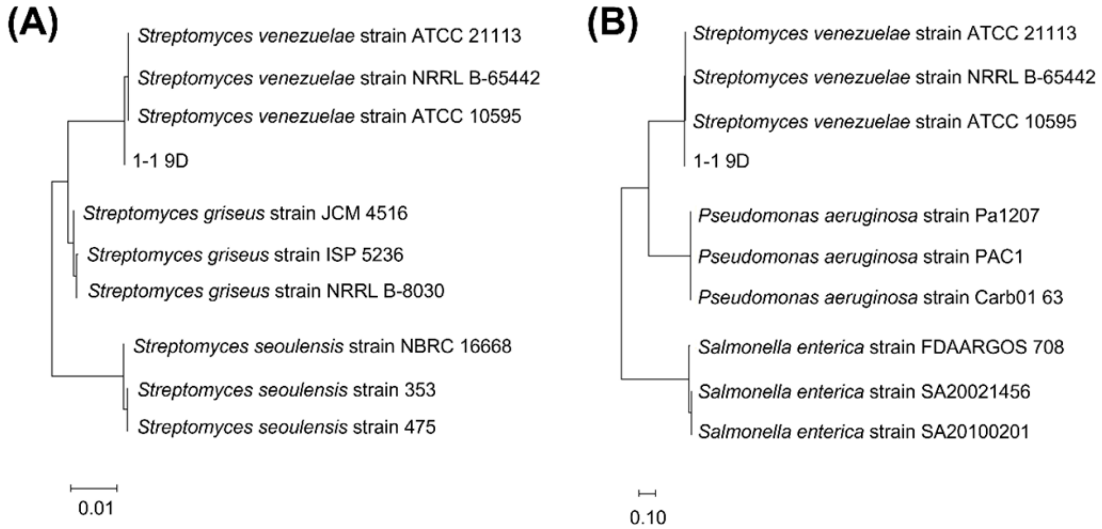

Fig. 2. Identification of the selected bacterium through the maximum-likelihood method in MEGA 10 program. (A): Phylogenetic tree of 1-1 9D using region of 16S rRNA region among *Streptomyces* spp. (B): Phylogenetic tree of 1-1 9D using combined sequences of 16S rRNA, ATP synthase subunit beta, and RNA polymerase beta subunit. Sequences were compared by multiple alignment analysis.

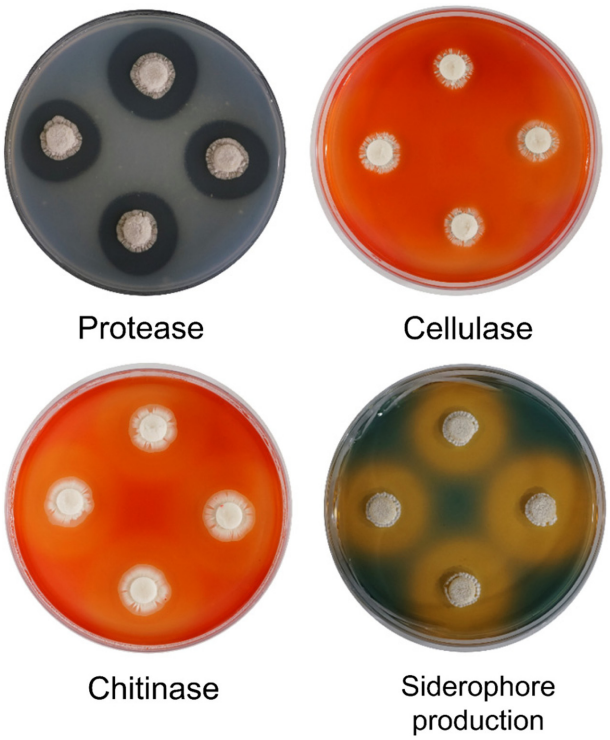

Fig. 3. Enzyme assay of the selected strain. The 1-1 9D was inoculated to 0.6 value at OD_{600} (6×10^8 cfu/mL) in all media for 5~7 days. Congo Red of 0.1% (Cellulase), 0.2% (Chitinase) was overlaid in cellulose and chitin media after inoculation of bacteria. Clear zone was measured after inoculation ($n = 12$).

양한 효소에 대한 뛰어난 활성을 나타내었으나 Psa에 항세균능력에 기여하는지는 명확하지 않아 추후에 연구 해야할 부분으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 연구재단(2020R1A2C2004177)의 지원으로 수행되었습니다.

Author Information and Contributions

Su-Hyeon Kim, Division of Applied Life Science (BK21Plus), Gyeongsang National University, graduate student

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

Youn-Sig Kwak, Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Professor, http://orcid.org/0000-0003-2139-1808

이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

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.

Ara I, Bukhari NA, Aref N, Shinwari MM, Bakir M, 2012.

Antiviral activities of streptomycetes against tobacco mosaic virus (TMV) in *Datura* plant: evaluation of different organic compounds in their metabolites. Afr. J. Biotechnol. 11(8):2130-2138.

Balestra GM, Renzi M, Mazzaglia A, 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit plants in Spain. New Dis. Rep. 24(10):2044-0588.

Bastas KK, Karakaya A, 2012. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. Plant Dis. 96(3):452.

Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, et al., 2005. Endophytic and ectophytic potatoassociated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 51(2):215-229.

Carder JH, 1986. Detection and quantitation of cellulase by Congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. Anal. Biochem. 153(1):75-79.

De Lima Procópio RE, Da Silva IR, Martins, MK, De Azevedo JL, De Araújo JM, 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Braz. J. Infect. Dis. 16(5):466-471.

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.

Flärdh K, Buttner MJ, 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat. Rev. Microbiol. 7(1):36-49.

Frampton RA, Taylor C, Holguín Moreno AV, Visnovsky SB, Petty NK., et al., 2014. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Appl. Environ. Microbiol. 80(7):2216-2228.

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.

Gordon AH. 1976. Proteases and biological control. Nature. 264(5583):299-299.

Graham J, Marshall B, Squire GR, 2003. Genetic differentiation over a spatial environmental gradient in wild *Rubus idaeus* populations. New Phytol. 157(3):667-675.

Hasani A, Kariminik A, Issazadeh K, 2014. Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities. Int. J. Adv. Biol. Biomed. 2:63-75.

He J, Sundararajan A, Devitt NP, Schilkey FD, Ramaraj T, et al., 2016. Complete genome sequence of *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439, producer of the methymycin/pikromycin family of macrolide antibiotics, using PacBio technology. Genome Announc. 4(3):e00337-16.

Hwang DH, Hong SW, Hwang HS, Chung KS, 2016. Purification and characterization of a chitinolytic enzyme produced by *Bacillus licheniformis* GA9. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 44(4):470-478.

Jeong CH, Lee WJ, Bae SH, Choi SG, 2007. Chemical components and antioxidative activity of Korean gold kiwifruit. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 36(7), 859-865.

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.

Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, et al., 1987. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. fermentation, isolation, and physicochemical and biological characteristics. J. Antibiot. 40(9):1249-1255.

Koh Y, Kim G, Jung J, Lee Y, Hur J, 2010. Outbreak of bacterial canker on Hort16A (Actinidia chinensis Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. N. Z. J. Crop Hortic. Sci. 38:275-282.

Kumar PS, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, 2014. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. Kaohsiung J. Med. Sci. 30(9):435-446.

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

Lam KS, 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Curr. Opin. Microbiol. 9(3): 245-251.

Lee SI, Kim DR, Kwak YS, 2021. Screening of antibacterial lichen extract and *Streptomyces* against kiwifruit bacterial canker pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Korean J. Pestic. Sci. 25(3), 221-229.

Louden BC, Haarmann D, Lynne AM, 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. J Microbiol Biol Educ. 12(1):51-53.

Meschke H, Schrempf H, 2010. *Streptomyces lividans* inhibits the proliferation of the fungus *Verticillium dahliae* on seeds and roots of *Arabidopsis thaliana*. Microb. Biotechnol. 3(4):428-443.

Mukherjee G, Sen SK, 2006. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Streptomyces venezuelae* P 10. Curr. Microbiol. 53:265-269.

Pietrzak U, McPhail DC, 2004. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. Geoderma. 122(2-4):151-166.

Ramesh S, Mathivanan N, 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. World J. Microbiol. Biotechnol. 25(12):2103-2111.

Richter BS, Ivors K, Shi W, Benson DM, 2011. Cellulase activity as a mechanism for suppression of Phytophthora root rot in mulches. Phytopathology. 101(2):223-230.

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

Scortichini M, 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv.

actinidiae on kiwifruit in Italy. Plant Pathol. J. 43(6):1035-1038.

Ser HL, Law JWF, Chaiyakunapruk N, Jacob SA, Palanisamy UD, et al., 2016. Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: a systematic review. Front. Microbiol. 7:522.

Singh AK, Chhatpar HS, 2011. Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. J. Basic Microbiol.51(4):424-432.

Song JY, Yoo YJ, Lim SK, Cha SH, Kim JE, et al., 2016. Complete genome sequence of *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439, a promising cell factory for production of secondary metabolites. J. Biotechnol. 219:57-58.

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.

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

Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E, 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. Int. J. Mol. Sci. 19(4):952.

Shanmugaiah V, Nithya K, Harikrishnan H, Jayaprakashvel M, Balasubramanian N, 2015. Biocontrol mechanisms of siderophores against bacterial plant pathogens. Sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria. Taylor & Francis, USA. 167-190.

참다래 궤양병원균에 대한 길항방선균 *Streptomyces venezuelae* 1-1 9D 균주의 특성

김수현[1] · 김다란[2] · 곽연식[1,2]*

[1]경상국립대학교 응용생명과학부, [2]경상국립대학교 식물의학과

요 약 참다래 궤양병의 원인균인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)는 전세계적으로 발생하여 참다래의 수량, 품질에 큰 손실을 초래하였다. Psa는 최근 유전적 다양성으로 인해 biovar 1, 2, 3, 5, 6로 분류되며 각 나라에 보고된 biovar가 다르다. Psa 관리를 위해 streptomycin 항생제와 구리계 농약을 이용하여 화학적 방제를 시행하였으나 병원균의 완전한 방제가 불가능하였다. 이에 따라서, 본 연구에서는 방선균을 이용한 병원균의 생물학적 방제에 초점을 맞추었다. 방선균은 대부분 토양 내에 서식하는데 이는 토양내에서 기주 식물의 근권과 식물 내 조직에 집락화하여 많은 병원균의 성장을 억제하고 살균 능력을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서 분리된 방선균을 자원을 확보하였으며, 뛰어난 항균능력을 보였다. 이러한 능력을 나타내는 균주는 분자생물학적 특성에 따라 동정하였고 *Streptomyces venezuelae*와 98% 이상 일치하는 것을 확인하였다. 참다래에서 분리한 *S. venezuelae* 1-1 9D는 참다래 궤양병의 생물학적 방제제로 개발될 가능성이 클 것으로 보인다.

색인어 항세균, 생물적방제, 참다래궤양병균, 스트렙토마이세스