

인삼종자로부터 분리된 내생균의 동정과 식물생장 촉진 관련 활성의 평가

엄유리*¹ · 김보라**¹ · 정진주** · 정찬문** · 이 이**[†]

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **충북대학교 특용식물학과

Identification of Endophytic Bacteria in *Panax ginseng* Seeds and Their Potential for Plant Growth Promotion

Yurry Um*¹, Bo Ra Kim**¹, Jin Ju Jeong**, Chan Moon Chung** and Yi Lee**[†]

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-871, Korea.

**Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea.

ABSTRACT : Endophytes are microorganisms that live in the internal tissues of plants without harming the host plants. In this symbiotic relationship, the host plants provide nutrients and shelter to the endophytes, in turn, endophytes can promote the growth of host plants and act as a biological control agents against plant pathogens. Plant-microbe interactions like this are noted for natural methods for sustainable agriculture and environmental conservation. However, in spite of the infinite potential, there are only a few reports on the endophytes present in ginseng. In this study, we isolated and identified the endophytes from *Panax ginseng* seeds and evaluated the biological activities (IAA production ability, nitrogen fixation ability, phosphate solubilization capacity, siderophore production ability, and antifungal activities) of the endophyte isolates. Eight different endophytes were identified by 16S rRNA sequencing. Most of the endophytes have antibiotic and plant growth promoting (PGP) activities. Particularly, PgSEB5-37E have the highest antibiotic activity, both PgSEB5-37B and PgSEB5-37H have high PGP traits such as an abilities to produce IAA, solubilize phosphate and fix nitrogen. These results indicated that the endophytes from *P. ginseng* seeds may have applicable value to many industries. In order to use the isolated endophytes, quantitative analysis and field tests are needed to be performed.

Key Words : *Panax ginseng* Seed, Endophyte, Antibiotic Activity, Plant Growth Promoting (PGP) Activity

서 언

내생균 (Endophyte)이란 그들의 생활환을 완성하면서 기주 식물 (Host plant)의 조직 내부에서 서식하지만 식물에게 피해 증상을 나타내지 않는 미생물을 말한다 (Schulz and Boyle, 2005). 내생균은 박테리아 (Bacteria)나 진균류 (Fungi)가 대부분이며 식물 내에서 흔하게 발견된다 (de Siqueira *et al.*, 2011). 특히 꽃이나 종자, 뿌리, 줄기 그리고 잎과 같은 식물의 내부기관과 조직에서 서식한다 (Park *et al.*, 2012).

내생균은 식물과 다양한 메커니즘으로 공생관계를 유지하며, 식물과 함께 지속적인 안정 관계를 수립한다고 보고되었다. 이러한 협력을 위해 식물은 내생균을 위해 영양분과 주거지를

제공해주며, 내생균은 식물의 생장을 촉진시키거나 식물을 병원균으로부터 보호함으로써 상보적인 관계를 형성한다 (Doty, 2011). 식물의 생장과 관련하여 내생균은 기주식물의 생리활성 물질, 예를 들면, 지베렐린이나 IAA (Indole-3-Acetic Acid), abscisic acid, cytokinin과 같은 식물호르몬을 생산하여 식물 생장을 촉진시키거나 혹은 에틸렌, ACC deaminase, acetoin, 2, 3-butanediol과 같은 성장조절 물질들을 생산한다 (Tan and Zou, 2001; Ryu *et al.*, 2003; Glick, 2004; Guo *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009). 또한 토양으로부터 질소고정이나 인산가용화 같은 작용으로 영양분을 흡수하도록 도와 식물 생장을 촉진시키는 역할을 한다 (Reyes *et al.*, 2002). 병원균에 대해서는 생물학적 방제제로서 역할을 하며 식물을 보호하고

¹Y Um and BR Kim contributed equally to this paper.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-261-3373 (E-mail) leeyi22@cbnu.ac.kr

Received 2014 July 1 / 1st Revised 2014 July 14 / 2nd Revised 2014 July 20 / 3rd Revised 2014 July 24 / Accepted 2014 August 6

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

병원균에 직접적인 항균작용을 하거나 (Lugtenberg and Kamilova, 2009) 바이오액티브한 이차대사물질을 생산을 통해 ISR (Induced Systemic Resistance)을 유도한다고 보고되었다 (Ongena *et al.*, 2007).

그리고 환경적인 오염에 의한 식물독소 (Phytotoxic) 효과를 극복하도록 식물환경복원 (Phytoremediation)을 증가시킴으로써 기주식물을 돕거나, 환경을 정화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Barac *et al.*, 2004; Taghavi *et al.*, 2005). 이외에 약용식물에서는 몇몇의 내생균 (*Taxus brevifolia*, *T. celebica*, *T. mairei*, *T. chinensis var. mairei*, *T. wallachiana*)에서 항암효과가 있는 것으로 알려진 택솔 (taxol)과 같은 2차 대사물질을 생산하기도 한다는 보고가 있었고 (Kumaran *et al.*, 2010), 뿌리에 내생하는 진균류가 인삼의 사포닌생산에 긍정적인 효과가 있다는 보고가 있었다 (Wu *et al.*, 2013).

이와 같이 식물내 미생물은 의학적, 산업적 가치가 크며 안정적인 농업과 환경을 위한 작물생장의 친환경적 생물비료로써 관심을 받고 있다 (Ryan *et al.*, 2008). 인삼도 마찬가지로 성장촉진에 기여하는 내생균을 발굴할 수 있는 가능성이 있음에도 불구하고 몇몇의 인삼 내생균을 발견하여 성장촉진 및 기능에 관한 연구만 보고되고 있다 (Cho *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2007). 최근 고려인삼의 다양한 조직 (뿌리, 줄기, 잎, 잎자루, 꽃자루)에 내생하는 진균류의 균집을 확인한 보고가 있었고 (Park *et al.*, 2012), 근권에서 *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*을 포함한 약 30개 박테리아 속을 발견한 연구 (Nguyen *et al.*, 2013)가 있었으나 종자수준의 연구는 이루어지지 않았으며 발견된 미생물들에 대한 생물활성검정관련 연구는 진행되지 않았다.

세균의 동정은 현재 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용하는 것이 가장 일반적이며 특정한 지식이 없이도 적은 양의 시료로부터 PCR을 이용하여 해당 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석한 후 database에 저장된 염기서열과 비교를 통해 속과 종을 구분하고 있다 (Janda and Abbott, 2007).

따라서 본 실험에서는 인삼 종자로부터 내생균을 분리하여 균집의 다양성을 확인하였다. 또한 생물방제활성 검정 (식물병원성 길항능, siderophore 생성능) 및 생물비료활성 검정 (IAA 생성능, 질소고정능, 인산가용능)을 조사하여 인삼종자 내생균의 농업적 활용도를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 쓰인 인삼 종자는 강원도 양구군에 위치한 인삼 농가에서 2012년 7월에 채종한 것으로, 괴산군 청천면의 농가에서 약 100일간 모래층적으로 개갑이 완료된 금풍종자를 사용하였다.

1. 인삼종자 내생균 분리

인삼 종자의 겉 표면을 살균하기 위해서 70% ethanol에 2분 침지 후 멸균수로 행구고 0.5% NaOCl에 15분 침지시키는 것을 5회 반복하여 멸균하였다. 분쇄기에 0.5% NaOCl을 넣고 30분 이상 방치한 후 멸균수로 5회 세척하여 멸균한 분쇄기에 멸균된 종자의 종피를 제거하고 멸균수와 함께 넣고 1분간 분쇄했다. 분쇄가 끝난 시료를 튜브로 옮기고 종자 파편들이 가라앉을 때까지 약 20분 기다린 후 상등액 500 μ l를 1/10 TSA (Tryptic Soy Agar) 배지에 유리막대로 도말하였다. 도말 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양된 내생균들은 자란 형태와 색깔로 구분하여 계대배양 하여 분리하였다.

2. 인삼종자 내생균 동정

분리된 96개의 콜로니에서 SolGent purification system (Daejeon, Korea)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 16s rRNA 유전자의 염기서열 분석을 통해 미생물 동정을 실시하였다. 시퀀싱 반응은 Applied Biosystems (Foster City, California, USA)의 BigDye (R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits을 이용하여 진행하였다. BIO-RAD (Hercules, CA, USA)의 DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler 로 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R(5'-TACG GYTACCTTGTACGACTT-3') primer를 이용하여 PCR 분석한 뒤 inter-primer인 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTA ATAC G-3')와 800R (5'-TACCAGGGTATCTAAT CC-3')을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 반응이 끝나면 반응에 참여하지 않은 dNTP와 반응물을 제거한 후, ABI 3730xl DNA Analyzer에 로딩하여 시퀀싱 결과를 얻었다. 얻어진 16s rRNA 유전자 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA)의 BLAST program (program: BLASTN 2.2.29, database name: rRNA_typestrains/prokaryotic_16S_ribosomal_RNA) 을 이용하여 유사한 염기서열을 검색하였고 CLUSTAL_X software (Thompson *et al.*, 1997)를 활용하여 유연관계를 분석하였다. Phylogenetic tree분석은 neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)를 사용하였다.

3. 생물방제활성 조사

1) 식물병원성 길항능 조사

인삼 병원성 곰팡이로 알려진 *Rhizoctonia solani* (모잘록병), *Botrytis cinerea* (젓빛곰팡이병), *Fusarium solani* (뿌리썩음병), *Cylindrocarpon destructans* (뿌리썩음병) 등 4종에 대해 본 연구에서 분리동정한 인삼종자내생균의 길항능을 조사하였다. 병원성 길항능을 조사하기 위해서 원판확산법 (disc diffusion method)을 사용하였다. PDA (potato dextro agar) 배지의 중

양에 곰팡이 균종 (Ø 5.0 mm)을 접종하고, 접종 위치로부터 1.5 cm 떨어진 양쪽에 페이퍼디스크를 올린 후 인삼종자 내생 균주를 접종하였다. *Rhizoctonia solani*와 *Fusarium solani*가 접종된 배지는 25°C, *Botrytis cinerea*와 *Cylindrocarpon destructans*가 접종된 배지는 20°C 조건에서 배양하였고, 배양이 끝난 후 페이퍼디스크 주위에 생성된 clear zone (투명환)의 직경을 측정하여 길항능을 조사하였다.

2) Siderophore의 생산성 조사

인삼종자 내생균들의 siderophore 생산성을 조사하기 위하여 Schwyn와 Neilands (1987)의 방법에 따라 제조한 CAS (Chrome Azurol Sulfonate) blue agar 배지에 균주를 접종하여 37°C에 배양시키면서 orange halo zone의 생성유무를 관찰하여 siderophore의 생산성을 조사하였다.

4. 생물비료활성 조사

1) IAA (Indole-3-Acetic Acid) 생성능 조사

Bric 등(1991)의 방법에 따라 L-tryptophan이 첨가된 배지에 인삼종자 내생균을 37°C에서 72시간 배양하였다. 배양 후 원심 분리 (10,000 rpm, 15 min)하여 얻은 상등액을 orthophosphoric acid와 salkowski's reagent (0.5 M FeCl₃·6H₂O of 35% HClO₄)를 넣은 시험관에 옮겨 발색을 시키고, 실온에서 UV-spectrophotometer를 이용하여 530 nm의 파장에서 흡광도를 측정 한 후, 측정 한 값을 IAA standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 비교하여 분리균주에 대한 IAA의 농도를 계산하였다 (Ivanova *et al.*, 2001).

2) 질소고정능 조사

인삼종자 내생균을 NFB (Nitrogen Free Broth; malic acid, 5.0 g/L; K₂HPO₄, 0.5 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.2 g/L; NaCl, 0.1 g/L; CaCl₂, 0.02 g/L; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.002 g/L; MnSO₄·H₂O, 0.001 g/L; KOH, 4.5 g/L; biotin, 0.0001 g/L; Fe-EDTA (1.64% (w/v)), 4.0 mL/L; Agar, 15 g/L)에 접종하여 37°C에서 72 시간 동안 배양하였다. 위의 질소고정세균 분

리용 NFB 배지는 무기염과 탄소원만 들어 있고 질소원이 결핍된 배지로써 대기 중의 질소를 고정할 능력이 있는 균주만이 성장할 수 있는 선택배지이다. NFB 배지에서의 균주의 성장 유무로 인삼종자 내생균의 질소고정능을 확인하였다.

3) 인산가용화능 조사

Chatli 등(2008)의 방법에 따라 불용성 인산인 0.5% Ca (PO)₄이 첨가된 Pikovskaya 배지 (glucose 1%, (NH₄)₂SO₄ 0.05%, NaCl 0.02%, KCl 0.02%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, MnSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.05%, yeast extract 0.05%)에 인삼종자 내생균을 접종하여, 37°C에서 3일간 배양 후 인삼종자 내생균 콜로니 주위에 가용화 된 클리어존 형성유무를 조사하여 불용성 인산 가용성능을 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼종자 내생균 분리와 동정

개갑처리 완료된 인삼종자에서 내생균을 분리하기 위해 표면 살균된 종자를 분쇄하고 멸균수에 침지한 후 상등액을 배지에 배양한 결과 Fig. 1과 같은 인삼종자내생균을 확인하였다.

균동정을 위해 배지의 단일콜로니 96개를 계대 배양하여 16s rDNA 염기서열을 분석한 결과 8개의 종으로 분류할 수 있었다. 분리된 인삼종자내생균을 각각 PgSEB5-37A, PgSEB5-37B, PgSEB5-37C, PgSEB5-37D, PgSEB5-37E, PgSEB5-37F, PgSEB5-37G, PgSEB5-37H

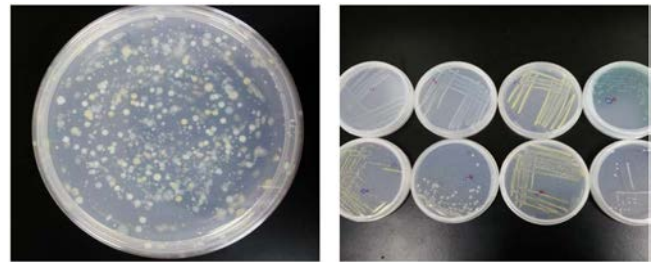


Fig. 1. The characteristics of the colonies which were isolated from the ginseng seeds on 1/10 TSA medium.

Table 1. Identity between the DNA sequences of the isolates and the closest species in GenBank.

Strain ID	Accession No.	Closest species	Identity (%)
PgSEB5-37A	KC818601	<i>Caulobacter</i> sp.	98.8
PgSEB5-37B	KC818602	<i>Enterobacter</i> sp.	99.8
PgSEB5-37C	KC818603	<i>Chryseobacterium</i> sp.	99.6
PgSEB5-37D	KC818604	<i>Sphingomonas</i> sp.	99.8
PgSEB5-37E	KC818605	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.9
PgSEB5-37F	KC818606	<i>Duganella violaceusniger</i>	98.6
PgSEB5-37G	KC818607	<i>Duganella</i> sp.	99.5
PgSEB5-37H	KC818608	<i>Enterobacter asburiae</i>	97.1

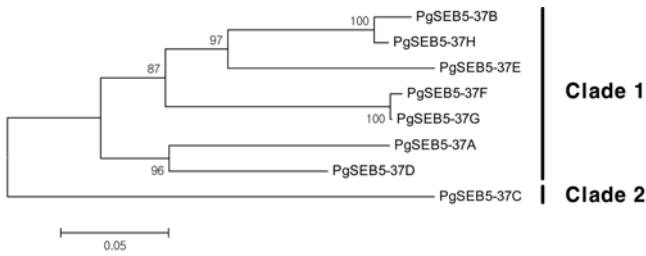


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the endophytic bacteria of the ginseng seeds using neighbor-joining method. Bootstrap values (from 1,000 replicates) are indicated at the node. Scale bar, 0.05 substitutions per base position.

37G, PgSEB5-37H 라고 명명하였다. 그 염기서열을 BLASTN program을 이용하여 분석한 결과에 따르면 PgSEB5-37A는 *Caulobacter* sp., PgSEB5-37B와 PgSEB5-37H는 장내세균과 (*Enterobacteriaceae*)에 속하는 *Enterobacter* sp., PgSEB5-37C는 *Chryseobacterium* sp., PgSEB5-37D는 *Sphingomonas* sp., PgSEB5-37E는 *Pseudomonas aeruginosa*, PgSEB5-37F는 *Duganella violaceusniger*, PgSEB5-37G는 *Duganella* sp.로 동정되었고, 분리된 인삼내생균 모두 각각의 미생물들과 상동성이 97% 이상인 것으로 확인되었다 (Table 1).

그리고 인삼종자내생균에서 분석된 16s rDNA 염기서열정보를 NCBI의 GenBank에 등록하였다. 또한 8종의 인삼종자내생균에서 분석된 염기서열정보를 이용하여 미생물들 간의 유연관계를 분석하였다 (Fig. 2). 그 결과 분자적 유연관계에서는 2개의 clade가 형성되었다.

특히 clade A를 형성하는 PgSEB5-37A, PgSEB5-37B, PgSEB5-37D, PgSEB5-37E, PgSEB5-37F, PgSEB5-37G, PgSEB5-37H는 매우 근접한 유연관계를 형성하고 있었으며

PgSEB5-37C는 단일 clade를 형성하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, clade A에 속하는 내생균들과 clade B에 속하는 PgSEB5-37C는 생물학적 특성에 차이가 있을 것으로 사료된다.

2. 생물방제활성

각각의 인삼종자내생균이 미생물비료로써 활용가능성을 탐색하기 위해 생물방제활성과 생물비료활성을 조사하였다. 인삼종자 내생균주를 접종하지 않고 병원균을 배양하여 대조군으로 사용하였으며 내생균주를 접종한 배지와 비교한 결과, PgSEB5-37E이 *Cylindrocarpon destructans*에 대해 3 mm 이상의 균사생장 저지원을 형성하였으며 *Botrytis cinerea*과 *Fusarium solani*에 대해서는 1.45 mm의 저지원이 형성되었다. 그러나 *Rhizoctonia solani*에 대해서는 항균활성 효과가 나타나지 않았다 (Fig. 3).

PgSEB5-37E는 *Pseudomonas aeruginosa*으로 추정되며, 이 속의 미생물은 항진균활성 물질을 내어 여러 식물의 병을 억제한다고 밝혀져 있다. 이러한 이유로 *Pseudomonas* 속 미생물은 생물학적 방제에 널리 사용되는 세균이라는 보고가 있다 (Di Battista-Leboeuf *et al.*, 2003; Rye *et al.*, 2000). 위 실험에서 PgSEB5-37E는 인삼병원균에 대한 항균활성 효과가 확인되었기 때문에 인삼포장 적용을 통해서도 병증억제에 대한 효과가 있을 것으로 사료된다.

미생물이 생성하는 siderophore는 토양에 유리되어 있는 철이온과 선택적으로 결합하여 식물병원균보다 우선적으로 철이온을 흡수하여 식물병원균의 생육을 저해시켜 생물학적 방제효과가 있는 것과 동시에 식물이 이용할 수 없었던 철을 가용시켜 식물 성장에 도움이 되는 것으로 알려져 있다 (Arora *et al.*, 2001). 종자내생균의 siderophore 생산성을 조사한 결과, PgSEB5-37D, PgSEB5-37F, PgSEB5-37G는 siderophore의



Fig. 3. Antifungal activity of the *P. ginseng* endopytes isolated from *Panax ginseng* seeds on the *P. ginseng* pathogens. A; The controls of *P. ginseng* pathogens, B; Antifungal activity of the PgSEB5-37E against plant pathogens.

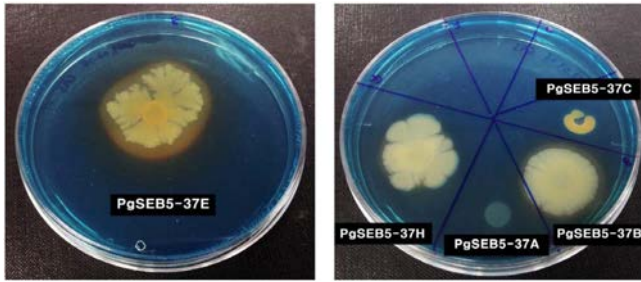


Fig. 4. Detection of siderophore production by the orange halo zone around the endophytes on CAS medium.

생산성이 없었고, PgSEB5-37A, PgSEB5-37B, PgSEB5-37C, PgSEB5-37E, PgSEB5-37H에서는 생산성을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

PgSEB5-37E 균주를 배양시킨 CAS-blue agar 배지의 orange halo zone의 비율이 더 크므로 다른 균주들에 비해 siderophore를 더 많이 생성한 것으로 보인다. 그러나 이는 정성적 연구결과이므로 추후에 정량적 실험을 통해 정확한 분석이 필요할 것으로 사료된다.

3. 인삼종자내생균의 생물비료활성

인삼종자내생균의 다양한 생리활성 유무는 Table 2에서 보는 바와 같으며, PgSEB5-37B와 PgSEB5-37H 두 균주가 미량의 IAA를 생성하는 것으로 확인되었다.

IAA는 대표적인 생물생장촉진 호르몬으로, 식물에서 줄기신장, 뿌리형성, 과실생장, 세포분열 등을 촉진시켜 식물이 성장하는데 도움을 주며, 정아우세, 굴성과 같은 다양한 생리학적 과정을 제어하는 역할이 있어 식물에서 아주 중요하다 (Pandey *et al.*, 2005). 식물은 식물내부에서 합성되는 IAA에 영향을 받을 뿐만 아니라 외부에서 공급되는 IAA에 생리적인 활성을 나타낸다 (Thimann, 1937).

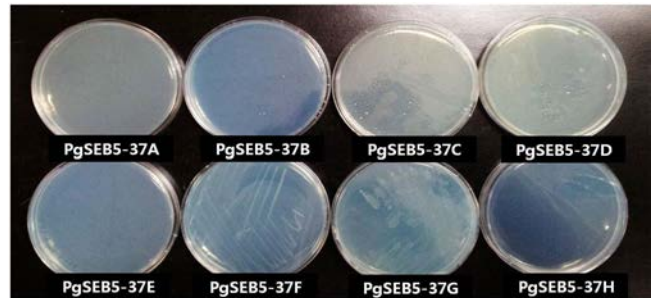


Fig. 5. Detection of nitrogen fixation ability of the endophytes isolated from *Panax ginseng* seeds on nitrogen free agar medium.

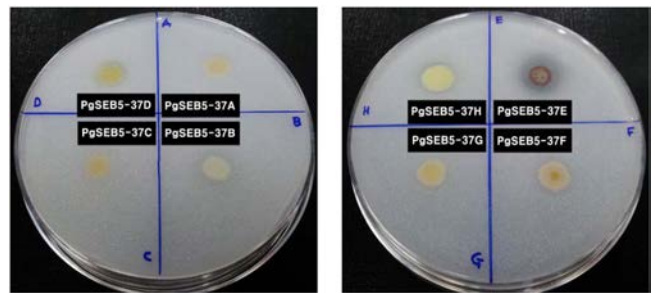


Fig. 6. Detection of the phosphate solubilization activity by the clear zone around the endophytes on Pikovskaya medium.

또 PgSEB5-37B, PgSEB5-37E, PgSEB5-37F, PgSEB5-37G, PgSEB5-37H는 질소원이 없는 배지에서 자라는 것으로 보아 질소고정능력이 확인되었다 (Fig. 5).

한편, 인삼종자 내생균들의 불용성 인산 가용화 능력을 조사한 결과 PgSEB5-37D, PgSEB5-37E, PgSEB5-37H가 NBRIP agar 배지에서 콜로니 주위에 투명대를 형성하였다 (Fig. 6).

인산은 식물 성장과 발달에 중요한 영양분 중 하나이다. 이것은 토양에서 식물이 흡수 할 수 없는 불용성 형태의 인산염을 미생물이 가용화 시킴으로써 합성인산비료의 사용을 경감시킬

Table 2. Plant growth promoting activities of selected endophytic bacterial strains from the ginseng seeds.

Strain ID	Production of indole-3-acetic acid ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^{***}	Ability of of inorganic phosphate solubilization ^{**}	Ability of nitrogen fixing [*]
PgSEB5-37A	ND ^{****}	-	-
PgSEB5-37B	1.09 ± 0.21	-	+
PgSEB5-37C	ND	-	-
PgSEB5-37D	ND	+	-
PgSEB5-37E	ND	+	+
PgSEB5-37F	ND	-	+
PgSEB5-37G	ND	-	+
PgSEB5-37H	1.07 ± 0.05	+	+

*+; positive, -; negative.

**The diameter of the halo zone formed on Pikovskaya medium supplemented with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

***The amount of IAA in the culture supernatants supplemented with 500 $\mu\text{l}/\text{ml}$ L-tryptophan in the growth media.

****ND; Not detected.

수 있으며, 지력의 감소 없이 작물의 생산성을 향상시킬 수 있다. 그러므로 본 연구에서 분리동정된 인삼종자내생균인 PgSEB5-37D, PgSEB5-37E, PgSEB5-37H가 식물생장을 촉진시키는데 도움을 줄 것으로 사료된다. 종합적으로 살펴보면 PgSEB5-37C를 제외한 나머지 인삼종자 내생균들이 생물방제 및 비료활성에 가능성을 보였다. 이 결과는 앞서 조사한 분자적 유연관계를 통해서도 PgSEB5-37C를 제외한 나머지가 하나의 clade를 형성하는 것에서부터 그들이 비슷한 역할을 할 것이라는 추정이 가능하다.

본 연구는 인삼종자내생균의 생물비료활용가능성을 평가하기 위해 개갑 처리된 인삼 종자로부터 내생균을 분리하여 미생물 군집의 다양성을 조사하였고, 생물방제활성과 생물비료활성을 조사하여 생물비료 효용가치를 확인하였다.

최근 인삼재배에 따른 농약사용 및 비료시비에 관한 문제점이 대두되고 있지만 이를 해결할 수 있는 방안은 제시되고 있지 않다. 선행연구자들에 의해 보고된 바에 의하면 친환경비료 및 병방제제로써 미생물을 이용한 기술이 효과적이라는 보고 (Sa and Chauhan, 2009)가 있지만 인삼에서 연구된 사례는 자연발효식품에서 분리한 *Bacillus* 균을 이용해 점무늬탄저병 방제용 길항미생물을 선발하기 위한 연구 (Lee et al., 2012) 이외에는 없었다. 특히 인삼 내생균에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이며, 인삼종자로부터 분리된 내생균에 대한 연구는 없었다. 이번 실험결과에서 발굴된 PgSEB5-37E가 항균활성과 siderophore 생성에 양성결과를 보여 생물방제활성에 이용가능성이 높은 것으로 사료되며, PgSEB5-37B와 PgSEB5-37H가 모든 생물비료활성에 양성을 보여 생물비료로 이용가능성이 높다고 판단된다. 따라서 추후 각 실험에 대해 더 깊이 연구하여 정량분석, 포장적용실험 등이 필요하다. 본 실험을 통하여 선발된 인삼종자내생균을 이용해 추후 생물방제 및 비료로 활용될 수 있을 것이라 사료된다. 특히, 인삼은 1년생부터 4년생까지는 생육이 왕성하게 증가하나 4년생 이후 6년생까지 생육이 완만하게 증가하는데 (Park et al., 2013), 생장촉진능을 가진 인삼 내생균을 활용한다면 생육이 완만해지는 4년 이후에도 지속적인 생장을 유지하여 고품질 인삼을 생산하는데 이용할 수도 있을 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Arora NK, Kang SC and Maheshwari DK. (2001). Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their

biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*. 81:673-677.

Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J and van der Lelie D. (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology*. 22:583-588.

Bric JM, Bostock RM and Silverstone SE. (1991). Rapid in site assay for indole acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:535-538.

Chatli AS, Beri V and Sidhu BS. (2008). Isolation and characterisation of phosphate solubilising microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Microbiology*. 48:267-273.

Cho KM, Hong SY, Lee SM, Kim YH, Kahng GG, Lim YP, Kim H and Yun HD. (2007). Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology*. 54:341-351.

de Siqueira VM, Conti R, de Araújo JM and Souza-Motta CM. (2011). Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis*. 53:89-95.

Di Battista-Leboeuf C, Benizri E, Corbel G, Piutti S and Guckert SPA. (2003). Distribution of *Pseudomonas* sp. populations in relation to maize root location and growth stage. *Agronomie*. 23:441-446.

Doty SL. (2011). Growth-promoting endophytic fungi of forest trees. *Forestry Science*. 80:151-156.

Glick BR. (2004). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*. 56:291-312.

Guo B, Wang Y, Sun X and Tang K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44:153-158.

Ivanova EG, Doronina NV and Trotsenko YuA. (2001). Aerobic methylotrophic bacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiology*. 70:392-397.

Janda JM and Abbott SL. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45:2761-2764.

Khan SA, Hamayun M, Kim HY, Yoon HJ, Lee IJ and Kim JG. (2009). Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:829-833.

Kumaran RS, Kim HJ and Hur BK. (2010). Taxol promising fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidata*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110:541-546.

Lee HJ, Park KC, Lee SH, Bang KH, Park HW, Hyun DY, Kang SW, Cha SW and Chung IM. (2012). Screening of antifungal *Bacillus* spp. against *Alternaria* Blight pathogen (*Alternaria panax*) and Anthracnose pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*) of ginseng. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:339-344.

Lugtenberg B and Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63:541-556.

- Nguyen NL, Kim YJ, Hoang VA, Min JW, Liang ZQ and Yang DC.** (2013). *Bacillus ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:855-860.
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL and Thonart P.** (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environmental Microbiology. 9:1084-1090.
- Park SY, Lee GA, Chang YK, Kim DH, Kim MS, Heo SJ, Jeong HN, Park KC, Cha SW and Song BH.** (2013). Comparative analysis on major growth responses and characteristics of shoot and root of *Panax ginseng* C. A. Meyer with six different years old. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 21:296-300.
- Park YH, Lee SG, Ahn DJ, Kwon TR, Park SU, Lim HS and Bae H.** (2012). Diversity of fungal endophytes in various tissues of *Panax ginseng* Meyer cultivated in Korea. Journal of Ginseng Research. 36:211-217.
- Pandey P, Kang SC, Gupta CP and Maheshwari DK.** (2005). Rhizosphere competent *Pseudomonas aeruginosa* grc1 produces characteristic siderophore and enhances growth of Indian mustard(*Brassica campestris*). Current Microbiology. 51:303-309.
- Qiu F, Huang Y, Sun L, Zhang X, Liu Z and Song W.** (2007). *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57:405-408.
- Reyes I, Bernier L and Antoun H.** (2002). Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. Microbial Ecology. 44:39-48.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ and Dowling DN.** (2008). Bacterial endophytes: Recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters. 278:1-9.
- Rye JS, Lee SD, Lee YH, Lee ST, Kim DK, Cho SJ, Park SR, Bae DW, Park KH and Yun HD.** (2000). Screening and identification of an antifungal *Pseudomonas* sp. that suppresses balloon flower root rot caused by *Rhizoctonia solani*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 10:435-440.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Pare PW and Kloepper JW.** (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100:4927-4932.
- Saitou N and Nei M.** (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4:406-425.
- Sa T and Chauhan PS.** (2009). Research trends on plant associated beneficial bacteria as biofertilizers for sustainable agriculture: An overview. Korean Journal of Soil Science and Fertilizer. Special Issue. 20-28.
- Schulz B and Boyle C.** (2005). The endophyte continuum. Mycological Research. 109:661-686.
- Schwyn B and Neilands JB.** (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Annual Review of Biochemistry. 160:47-56.
- Taghavi S, Barac T, Greenberg B, Borremans B, Vangronsveld J and van der Lelie D.** (2005). Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. Applied and Environmental Microbiology. 71:8500-8505.
- Tan RX and Zou WX.** (2001). Endophytes: A rich source of functional metabolites. Natural Product Reports. 18:448-459.
- Thimann KV.** (1937). On the nature of inhibition caused by auxin. American Journal of Botany. 24: 407-412.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 25:4876-4882.
- Wu H, Yang HY, You XL and Li YH.** (2013). Diversity of endophytic fungi from roots of *Panax ginseng* and their saponin yield capacities. SpringerPlus(SpringerOpen Journal). 2:107.