



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0133344
(43) 공개일자 2018년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2018-0130091(분할)

(22) 출원일자 2018년10월29일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2017-0018565

원출원일자 2017년02월10일

심사청구일자 2017년02월10일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

경기도

경기도 수원시 팔달구 효원로 1 (매산로3가)

(72) 발명자

양덕춘

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 (보라동, 보라마을 현대 모닝사이드2차 아파트) 111동 301호

김연주

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 애지원 인삼소재은행 (서천동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

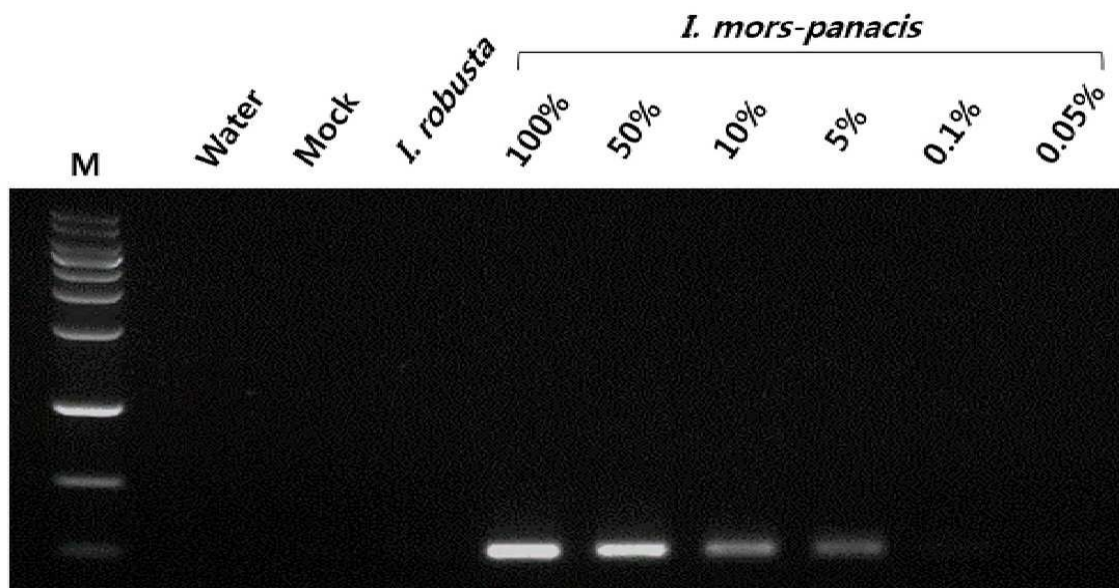
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 인삼근부병 진단용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인삼근부병 유발균 중에서 강한 병원성을 나타내는 균주(*Ilyonectria morspanacis*)를 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 포함하는 인삼근부병 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 인삼근부병 진단용 키트, 상기 조성물을 이용하여 인삼근부병을 진단하는 방법 및 인삼재배지의 선정방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 인삼근부병 진단용 조성물을 이용하면 인삼근부병의 원인균을 검출하여, 보다 효과적으로 검출하여 인삼근부병의 발병여부를 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 인삼이 재배되지 않은 토양에 상기 원인균이 오염되었는지의 여부를 확인함으로써 인삼근부병의 발병을 예방할 수 있으므로, 인삼근부병의 효과적인 방제에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3c



(72) 발명자

한정아

경기도 수원시 권선구 동수원로242번길 37

모하메드 엘-아가미 파

경기도 수원시 서천동 경희대학교 국제캠퍼스 에지
원 한방바이오연구실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313038-03-3-SB010

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품 기술 기획 평가원

연구사업명 생명산업기술개발사업

연구과제명 한국형 토종 미생물을 활용한 고부가가치 제품개발

기 여 율 1/3

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.11.19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0120342016

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 Probiotic 유래 재조합 효소를 이용한 희귀유용사포닌 대량생산 및 ginsenoside nanoconjugate 최적생산 기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.04 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 112142-5

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원(IPET)

연구사업명 농생명산업 기술개발사업

연구과제명 고려인삼과 미국삼의 중간 교잡종 F1불임타파로 신품종 소재창출

기 여 율 1/3

주관기관 경희대 기술자회사 한방바이오㈜

연구기간 2012.12.21 ~ 2017.12.20

명세서

청구범위

청구항 1

인삼근부병 유발균인 일료넥트리아 모르스파나시스(*Ilyonectria morspanacis*) 유래 히스톤 H3 유전자내의 서열 번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 19 내지 230개의 염기로 구성된 염기서열을 검출하는 체제를 포함하는, 인삼근부병 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 1의 염기서열은 히스톤 H3 유전자의 두번째 인트론 부위내에 위치하는 것인, 인삼근부병 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 체제는 상기 연속하는 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 염기쌍 또는 프로브인 것인, 인삼근부병 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 프라이머 염기쌍은 서열번호 3 및 4의 염기서열로 구성된 것인, 인삼근부병 진단용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 프라이머 염기쌍은 상기 연속하는 염기서열의 수준을 정량분석하는데 사용할 수 있는 것인, 인삼근부병 진단용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 인삼근부병 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트 또는 DNA 칩 키트인 것인, 인삼근부병 진단용 키트.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 이용하여, 인삼근부병의 발병이 의심되는 인삼의 시료에서 일로벡트리아 모르스파나시스 유래 히스톤 H3 유전자내의 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 19 내지 230개의 염기서열을 검출하는 단계를 포함하는, 인삼근부병 진단방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 시료는 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 이들의 분획 또는 이들에 함유된 세포인 것인, 인삼근부병 진단방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 조성물을 이용하여 상기 연속하는 염기서열의 수준을 정량분석하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 인삼근부병 진단방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 이용하여, 인삼재배가 예정된 토양에서 일로벡트리아 모르스파나시스 유래 히스톤 H3 유전자내의 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 19 내지 230개의 염기서열을 검출하는 단계를 포함하는, 인삼재배지의 선정방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 토양에서 상기 연속하는 염기서열이 검출되지 않는 경우, 상기 토양을 포함하는 지역을 인삼재배지로 선정하는 것인, 인삼재배지의 선정방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인삼근부병 진단용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 인삼근부병 유발균 중에서 강한 병원성을 나타내는 균주(*Ilyonectria morspanacis*)를 특이적으로 검출할 수 있는 제제를 포함하는 인삼근부병 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 인삼근부병 진단용 키트, 상기 조성물을 이용하여 인삼근부병을 진단하는 방법 및 인삼재배지의 선정방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 농업기술원 연구결과에 따르면 4년근 이상 인삼의 결주 원인은 근부병(뿌리썩음병) 35%, 잿빛곰팡이병 32%, 줄기반점병 등이 15%를 차지하고 있으며, 그 중에서도 근부병은 병에 의한 결주율 피해가 초작지 4년근 21.8%, 6년근 50%으로서 인삼생산에 있어 최대의 적으로 평가되고 있다. 또한, 근부병은 병진전이 더디게 나타나 초기 병진단이 어렵고, 토양에서 월동함에 따라 뿌리에 직접 병을 일으키기 때문에 식물체가 시드는 증상이 나타나도 이미 병이 뿌리에 만연되어 방제하기에는 늦은 경우가 대부분이다.

[0004] 인삼근부병의 방제를 위하여 토양 훈증제를 사용하는 방법 및 화학농약을 이용한 방제가 알려져 있으나, 이상의 방제법으로는 뚜렷한 효과를 거두기 어렵고 인삼 근부병 등과 같은 토양 전염성 병원균들은 토양 중에 후막포자

를 형성하여 열악한 조건에서도 장기간 생존할 수 있어 완벽한 방제가 매우 어렵다. 또한, 훈증방법은 인삼경작 중에 뿌리썩음증이 발생하여 뿌리가 부패하는 경우에는 적용이 불가능하고, 유해 미생물 및 유용 미생물까지 원천적으로 제거하여 토양생태계의 파괴에 대한 위험성이 있으며, 일부경작지에서는 무분별하게 화학농약을 남용하여 재배 인삼은 물론 주변 수질과 토양까지 심각하게 오염시킬 가능성도 있기 때문에 인삼의 근부병을 해결하기는 쉽지 않다. 최근 저독성, 친환경적인 생물농약의 개발이 시도되고 있으나, 상용화를 위한 노력이 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 이러한 인삼근부병을 조기에 진단하여 피해수준을 감소시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다, 예를 들어, 한국공개특허 제10-2013-0077288호에는 *Cylindrocarpus destructans* 균주로 부터 유래된 베타튜불린을 특이적으로 인식할 수 있는 프라이머 세트를 이용하여 인삼근부병을 진단하는 기술이 개시되어 있다. 그러나, 이러한 기술은 인삼근부병의 원인균에 감염된 후에나 적용가능하기 때문에, 인삼근부병의 발병전에 검출하여, 발병을 방지할 수는 없다는 문제점이 있었다.

[0006] 만일, 인삼근부병의 발병 자체를 방지할 수 있다면, 인삼의 재배효율을 현저하게 향상시킬 수 있을 것으로 기대되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과가 보고되지 않고 있는 실정이다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 보다 효과적으로 인삼근부병을 진단할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 인삼근부병 유발균 중에서 강한 병원성을 나타내는 균주(*Ilyonectria morspanacis*) 유래 히스톤 H3 유전자의 두번째 인트론 부위를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 염기쌍을 이용할 경우, 인삼근부병의 발병여부를 진단할 수 있음은 물론, 인삼근부병의 원인균으로 오염된 토양을 사전에 확인함으로써, 인삼근부병의 발병을 예방할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 인삼근부병 유발균인 일료넥트리아 모르스파나시스(*Ilyonectria morspanacis*)를 특이적으로 검출할 수 있는 체제를 포함하는 인삼근부병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 인삼근부병 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 인삼근부병을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 인삼재배지를 선정하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 보다 효과적으로 인삼근부병을 진단할 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 인삼근부병의 발병 원인균에 주목하게 되었다. 인삼근부병의 발병원인균이라고 알려진 일료넥트리아(*Ilyonectria*) 속 균주는 강한 병원성을 나타내는 *Ilyonectria morspanacis* 균주와 약한 병원성을 나타내는 *Ilyonectria panacis*, *Ilyonectria robusta* 및 *Ilyonectria crassa* 균주로 구별되는데, 대부분의 인삼근부병은 *Ilyonectria morspanacis* 균주의 감염에 의하여 발병된다고 알려져 있다.

[0015] 이에 따라, 본 발명자들은 강한 병원성을 나타내는 *Ilyonectria morspanacis* 균주를 특이적으로 검출하는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행한 결과, 히스톤 H3 유전자의 염기서열의 일부 영역에서 상기 강한 병원성을 나타내는 균주와 약한 병원성을 나타내는 균주가 차이를 나타냄을 확인하였다. 구체적으로, 히스톤 H3 유전자에 존재하는 특정 염기서열이 균주 특이적으로 변이되어, 각 균주별로 차이를 나타내므로, 상기 변이영역을 검출할 경우, *Ilyonectria morspanacis* 균주를 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0016] 이에, 상기 *Ilyonectria morspanacis* 균주의 히스톤 H3 유전자에 존재하는 특정 염기서열을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 염기쌍을 제작하고, 이를 사용하여 PCR 방법으로 *Ilyonectria morspanacis* 균주를 검출할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 상기 프라이머 염기쌍은 높은 특이도와 민감도를 갖고 *Ilyonectria morspanacis* 균주를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, qRT-PCR을 통해, 상기 균주를 정량분석하는데 사용할 수도 있음을 확인하였다.

- [0017] 아울러, 상기 프라이머 염기쌍은 *Ilyonectria morspanacis* 균주에 감염된 인삼시료로부터 *Ilyonectria morspanacis* 균주를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 토양에 존재하는 *Ilyonectria morspanacis* 균주까지도 검출할 수 있음을 확인하였다.
- [0018] 따라서, 상기 프라이머 염기쌍을 사용하면, 토양에 *Ilyonectria morspanacis* 균주가 오염되어 있는지의 여부를 확인할 수 있으므로, *Ilyonectria morspanacis* 균주에 오염되지 않은 토양에서 인삼을 재배함으로써, 인삼근부병의 발병을 예방할 수도 있음을 확인하였다.
- [0019] 이처럼, *Ilyonectria morspanacis* 균주의 히스톤 H3 유전자에 존재하는 특정 염기서열을 검출함으로써, 인삼근부병을 진단할 수 있음은 물론, 토양에서 상기 균주를 검출하여 인삼근부병의 발병을 예방하는 기술은 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.
- [0020] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 인삼근부병 유발균인 일료넥트리아 모르스파나시스(*Ilyonectria morspanacis*) 유래 히스톤 H3 유전자내의 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 19 내지 230개의 염기로 구성된 염기서열을 검출하는 제제를 포함하는, 인삼근부병 진단용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 용어 "인삼근부병(root rot of panax ginseng)"이란, "인삼뿌리썩음병"이라고도 호칭되고, 토양에 존재하는 병원성 진균류인 일료넥트리아(*Ilyonectria*) 속 균주의 감염에 의하여 인삼의 뿌리가 썩는 증상을 나타내는 질환을 의미한다. 상기 일료넥트리아 속 균주는 강한 병원성을 나타내는 *Ilyonectria morspanacis* 균주와 약한 병원성을 나타내는 *Ilyonectria panacis*, *Ilyonectria robusta* 및 *Ilyonectria crassa* 균주로 구별되는데, 대부분의 인삼근부병은 *Ilyonectria morspanacis* 균주의 감염에 의하여 발병된다고 알려져 있다.
- [0022] 본 발명의 용어 "일료넥트리아 모르스파나시스(*Ilyonectria morspanacis*) 균주"란, 인삼근부병의 주된 발병원인균의 하나를 의미하는데, 강한 병원성을 나타낸다고 알려져 있다.
- [0023] 본 발명의 용어 "히스톤 H3(Histone H3, HIS H3)"란, 염색질을 구성하는 주요 단백질인 히스톤 단백질의 일종을 의미한다. 상기 히스톤 단백질은 H1, H2, H2A, H2B, H3 및 H4로 분류된다고 알려져 있다. 상기 히스톤 H3를 코딩하는 유전자는 구조적으로 볼 때, 3개의 엑손과 상기 엑손을 연결하는 2개의 인트론으로 구성된다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 일료넥트리아 속 균주의 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열인, 하기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 19 내지 230개의 염기로 구성된 염기서열은 일료넥트리아 모르스파나시스 균주에서만 특이적으로 존재하므로, 인삼의 시료 또는 토양시료에서 상기 영역을 검출함으로써 일료넥트리아 모르스파나시스의 감염여부를 진단할 수 있다. 이때, 상기 서열번호 1의 염기서열은 히스톤 H3 유전자의 두번째 인트론 부위에 위치하는 서열이 될 수 있다.
- [0025] 5'-ATGTGGCACGTTGGGTGTG-3'(서열번호 1)
- [0026] 따라서, 상기 일료넥트리아 속 균주의 히스톤 H3 유전자로부터 상기 특정 염기서열을 검출함으로써, 일료넥트리아 모르스파나시스의 감염여부를 진단할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 용어 "일료넥트리아 모르스파나시스 유래 히스톤 H3 유전자내의 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 19 내지 230개의 염기로 구성된 염기서열을 검출하는 제제"란, 상기 일료넥트리아 모르스파나시스의 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열에 특이적으로 결합하여, 상기 염기서열을 검출할 수 있는 제제를 의미하는데, 상기 제제는 일료넥트리아 모르스파나시스를 특이적으로 검출할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 특정 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 염기쌍 또는 프로브가 될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 용어 "프라이머 염기쌍"이란, 본 발명에서 제공하는 일료넥트리아 모르스파나시스의 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열에 특이적으로 결합하여 증폭시킬 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 특정 염기서열에 결합할 수 있는 정방향 및 역방향의 프라이머로 이루어진 모든 조합의 프라이머 염기쌍이 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 특정 염기서열에 대하여 특이성 및 민감성을 갖고 결합할 수 있는 프라이머 염기쌍이 될 수 있다. 예를 들어, 상기 프라이머 염기쌍은 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열로 구성되어, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 높은 특이성을 갖는 프라이머 쌍 일 수 있다.
- [0029] 상기 프라이머 염기쌍은 일료넥트리아 모르스파나시스 유래 히스톤 H3 유전자에서 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 단편을 검출하기 위하여 사용될 수 있는데, 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 한, 연속하는 19 내지 230개의 염기로 구성된 염기서열뿐만 아니라, 연속하는 50 내지 200개의 염기로 구성된 염기서열, 연속하는

100 내지 150개의 염기로 구성된 염기서열 등도 효과적으로 검출할 수 있다.

- [0030] 본 발명에서는 하기 서열번호 3 및 4의 염기서열로 구성된 프라이머 염기쌍을 사용하였는데, 상기 서열번호 3의 프라이머는 서열번호 1의 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있고, 서열번호 4의 프라이머는 히스톤 H3 유전자의 세번째 엑손 부위에 위치하는 서열번호 2의 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0031] 5'-CAGTCCAAGGACAT-3'(서열번호 2)
- [0032] 정방향 프라이머: 5'-CAC ACC CAA CGT GCC ACA T-3'(서열번호 3)
- [0033] 역방향 프라이머: 5'-AGC TGG ATG TCC TTG GAC TG-3'(서열번호 4)
- [0034] 상기 프라이머 염기쌍은 일로벡트리아 모르스파나시스의 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열의 수준을 정량분석하는데 사용할 수도 있다. 즉, 시료내에 존재하는 상기 특정 염기서열의 함량을 정량분석함으로써, 일로벡트리아 모르스파나시스의 감염수준을 측정할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 상기 프로브의 구성물질은 상기 표적물질과 특이적으로 결합할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA, DNA 등이 될 수 있고, 다른 예로서, cDNA, 게놈 DNA 등과 같은 DNA; 게놈 RNA, mRNA 등과 같은 RNA; 및, 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등과 같은 단백질이 될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 일련의 행위를 의미한다.
- [0037] 본 발명의 목적상, 상기 진단은 인삼근부병 유발균인 일로벡트리아 모르스파나시스를 검출하는 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있으며, 이를 통해 인삼근부병의 발병여부를 조기에 진단할 수 있다.
- [0038] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 인삼근부병 진단용 조성물을 포함하는, 인삼근부병 진단용 키트를 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 제공하는 인삼근부병 진단용 키트는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트 등이 될 수 있다.
- [0040] 상기 인삼근부병 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 추가로 포함할 수 있다.
- [0041] 일 예로서, 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있는데, 상기 일로벡트리아 속 균주의 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 이외에, 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리메라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수등을 포함할 수 있다.
- [0042] 다른 예로서, 상기 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0043] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여, 인삼근부병의 발병이 의심되는 인삼의 시료에서 일로벡트리아 모르스파나시스 유래 히스톤 H3 유전자내의 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 19 내지 230개의 염기서열을 검출하는 단계를 포함하는, 인삼근부병 진단방법을 제공한다.
- [0044] 상기 일로벡트리아 모르스파나시스로부터 유래된 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열은 인삼근부병이 발병된 인삼의 시료에서 검출될 수 있으므로, 상기 특정 염기서열이 검출되면, 상기 인삼에서 인삼근부병이 발병된 것으로 진단할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 용어 "시료"는 인삼근부병의 발병이 의심되는 인삼에서 수집된 시료를 의미하는데, 상기 시료는 인삼근부병의 발병여부를 확인할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 이들의 분획 또는 이들에 함유된 세포 등이 될 수 있다.
- [0046] 아울러, 상기 인삼근부병의 진단성공율을 향상시키기 위하여, 상기 조성물을 이용하여 일로벡트리아 모르스파나

시스 유래 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열의 수준을 정량분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

- [0047] 서로 다른 양의 인삼 시료를 대상으로 상기 조성물을 이용한 qRT-PCR을 수행한 후, 이로부터 얻어진 데이터를 분석하면, 상기 인삼 시료에 감염된 일로벡트리아 모르스파나시스의 감염수준을 확인할 수 있으므로, 상기 인삼 근부병의 진단성공율을 향상시킬 수 있다.
- [0048] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여, 인삼재배가 예정된 토양에서 일로벡트리아 모르스파나시스 유래 히스톤 H3 유전자내의 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 19 내지 230개의 염기서열을 검출하는 단계를 포함하는, 인삼재배지의 선정방법을 제공한다.
- [0049] 상기 일로벡트리아 모르스파나시스가 오염된 토양시료를 사용하여도, 본 발명의 조성물을 이용하면, 일로벡트리아 모르스파나시스로부터 유래된 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열을 검출할 수 있다.
- [0050] 이로 인하여, 인삼을 재배하기 전에, 본 발명의 조성물을 이용하여 토양시료에 일로벡트리아 모르스파나시스가 오염되었는지의 여부를 확인할 수 있으므로, 상기 방법을 통해 일로벡트리아 모르스파나시스가 오염되지 않은 것으로 확인된 토양을 포함하는 지역을 인삼재배지로 선정할 수 있다.
- [0051] 즉, 상기 방법에 의하여, 상기 토양시료에서 일로벡트리아 모르스파나시스로부터 유래된 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열이 검출되지 않으면, 상기 토양에 일로벡트리아 모르스파나시스가 오염되지 않은 것으로 확인할 수 있고, 이처럼 일로벡트리아 모르스파나시스에 오염되지 않은 토양에서 인삼을 재배하면, 일로벡트리아 모르스파나시스에 의한 인삼근부병의 발병을 억제할 수 있으므로, 상기 토양을 포함하는 지역을 인삼근부병의 발병을 예방할 수 있는 인삼재배지로 선정할 수 있다.
- [0052] 상기 선정된 지역에서 인삼을 재배하면, 오염된 토양에 의한 인삼근부병의 발병을 예방할 수 있다.
- [0053] 아울러, 상기 인삼재배에 적합한 토양의 확인성공율을 향상시키기 위하여, 상기 조성물을 이용하여, 토양시료에서 일로벡트리아 모르스파나시스 유래 히스톤 H3 유전자에 포함된 특정 염기서열을 정량분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 예를 들어, 서로 다른 양의 토양시료를 대상으로 상기 조성물을 이용한 qRT-PCR을 수행한 후, 이로부터 얻어진 데이터를 분석하면, 상기 토양에서 일로벡트리아 모르스파나시스의 오염수준을 확인할 수 있으므로, 상기 인삼 재배에 적합한 토양의 확인성공율을 향상시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0056] 본 발명에서 제공하는 인삼근부병 진단용 조성물을 이용하면 인삼근부병의 원인균을 검출하여, 보다 효과적으로 검출하여 인삼근부병의 발병여부를 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 인삼이 재배되지 않은 토양에 상기 원인균이 오염되었는지의 여부를 확인함으로써 인삼근부병의 발병을 예방할 수 있으므로, 인삼근부병의 효과적인 방제에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 다양한 유전자를 서열번호 3 및 4의 프라이머로 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진으로서, 1번 레인은 대조군이고, 2번 레인은 *I. mors-panacis* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 3번 레인은 *I. robusta* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 4번 레인은 *I. leucospermi* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 5번 레인은 *Pythium ultimum* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 6번 레인은 *Penicillifer* spp. 유전자를 증폭시킨 결과이며, 7번 레인은 *Rhizoctonia solani* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 8번 레인은 *Phialophora mustea* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 9번 레인은 *Fusarium solani* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 10번 레인은 *Fusarium oxysporum* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 11번 레인은 *Fusarium equiseti* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 12번 레인은 *Fusarium culmorum* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 13번 레인은 *Alternaria panax* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 14번 레인은 *Penicillium* spp. 유전자를 증폭시킨 결과이며, 15번 레인은 *Paraconiothyrium* spp. 유전자를 증폭시킨 결과이고, 16번 레인은 *Volutella* spp. 유전자를 증폭시킨 결과이며, 17번 레인은 *Trichoderma harzianum* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 18번 레인은 *Burkholderia ginsengiterrae* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 19번 레인은 *Sphingomonas panacis* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 20번 레인은 *I. mors-panacis* 유전자를 포함하지 않는 혼합유전자를 증폭

시킨 결과이며, 21번 레인은 0.005ng/μl의 *I. mors-panacis* 유전자를 포함하는 혼합유전자를 증폭시킨 결과이고, 22번 레인은 1ng/μl의 *I. mors-panacis* 유전자를 포함하는 혼합유전자를 증폭시킨 결과이다.

도 2a는 서로 다른 농도의 *I. mors-panacis* DNA를 대상으로 PCR 증폭을 수행한 경우, 얻어진 증폭산물과 젤링포인트의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 2b는 서로 다른 농도의 *I. mors-panacis* DNA를 대상으로 PCR 증폭을 수행한 경우, 얻어진 증폭산물의 CT 로그 값과 사용된 주형 DNA 양의 상관관계를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3a는 토양내 *I. mors-panacis* 균주의 농도에 따른, 인삼의 품질변화를 나타내는 사진이다.

도 3b는 서로 다른 농도의 *I. mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료의 CFU 값을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3c는 서로 다른 농도의 *I. mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료에서 수득한 DNA를 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용하여 PCR 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 4a는 qRT-PCR에 의하여 *I. mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료에서 산출된 DNA 농도와 상기 토양시료내 *I. mors-panacis* 균주의 농도간의 연관성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 qRT-PCR에 의하여 *I. mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료에서 산출된 DNA 농도와 상기 토양시료의 DSI 간의 연관성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4c는 qRT-PCR에 의하여 *I. mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료에서 산출된 DNA 농도와 상기 토양시료의 CFU/g 값간의 연관성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: *I. mors-panacis* 균주 특이적 히스톤 H3 유전자 증폭용 프라이머의 제작

인삼의 뿌리에 감염되어 인삼근부병을 발병시키는 원인균으로 알려진 3종의 일리오넥트리아(*Ilyonectria*) 속 균주(*I. robusta*, *I. leucospermi* 및 *I. mors-panacis*)로부터 유래된 히스톤 H3(HIS H3) 유전자의 서열을 증폭시키고 이의 서열을 결정하였다.

상기 3종의 균주 중에서 *I. mors-panacis* 균주에 특이적 유전자 영역을 발굴하기 위하여, 상기 3종의 인삼품종에서 알려진 HIS H3 서열을 GeneBank 데이터베이스로부터 수득하고, 이를 비교한 결과, 하기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 연속하는 염기서열에서 3종의 인삼품종 별로 변이를 나타냄을 확인하였다.

5'-ATGTGGCACGTTGGGTGTG-3'(서열번호 1)

이에 따라, 상기 변이된 영역 중에서 *I. mors-panacis* 균주에 특이적인 서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 다음과 같이 제작하였다:

정방향 프라이머: 5'-CAC ACC CAA CGT GCC ACA T-3'(서열번호 3)

역방향 프라이머: 5'-AGC TGG ATG TCC TTG GAC TG-3'(서열번호 4)

상기 프라이머를 사용하여 *I. mors-panacis* 균주의 히스톤 H3 유전자를 증폭시킬 경우, 약 230bp의 증폭산물을 수득할 수 있을 것으로 예상되었다.

실시예 2: 특이도 분석

실시예 2-1: PCR 분석

상기 실시예 1에서 제작한 프라이머가 *I. mors-panacis* 균주에 특이적인지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0074] 구체적으로, 3종의 인삼(*I. mors-panacis*, *I. robusta*, *I. leucospermi*), 15종의 진균류 및 세균류(*Pythium ultimum*, *Penicillifer* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phialophora mustea*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria panax*, *Penicillium* spp., *Paraconiothyrium* spp., *Volutella* spp., *Trichoderma harzianum*, *Burkholderia ginsengiterrae* 및 *Sphingomonas panacis*) 및 이들 균주의 혼합유전자(*I. mors-panacis* 유전자가 포함되지 않은 혼합물, 0.005ng/ μ l의 *I. mors-panacis* 유전자를 포함하는 혼합물 및 1ng/ μ l의 *I. mors-panacis* 유전자를 포함하는 혼합물)을 각각 주형으로 하고, 상기 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍과, IGS(intergenic spacer) 영역을 증폭시킬 수 있는 하기 서열번호 5 및 6의 프라이머 염기쌍을 대조군 프라이머 염기쌍으로 사용한 PCR을 수행하여, 어떠한 시료에서 증폭산물이 얻어지는지를 확인하였다(도 1). 이때, 대조군으로는 유전자 주형을 포함하지 않는 시료를 사용하였다.

[0075] CDU1: 5'-GGTCGCGGCGAGAGTCTC-3'(서열번호 5)

[0076] CdL1b: 5'-CAGCGGCGCCCACTAACAAC-3'(서열번호 6)

[0077] 도 1은 다양한 유전자를 서열번호 3 및 4의 프라이머로 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진으로서, 1번 레인은 대조군이고, 2번 레인은 *I. mors-panacis* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 3번 레인은 *I. robusta* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 4번 레인은 *I. leucospermi* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 5번 레인은 *Pythium ultimum* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 6번 레인은 *Penicillifer* spp. 유전자를 증폭시킨 결과이며, 7번 레인은 *Rhizoctonia solani* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 8번 레인은 *Phialophora mustea* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 9번 레인은 *Fusarium solani* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 10번 레인은 *Fusarium oxysporum* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 11번 레인은 *Fusarium equiseti* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 12번 레인은 *Fusarium culmorum* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 13번 레인은 *Alternaria panax* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 14번 레인은 *Penicillium* spp. 유전자를 증폭시킨 결과이며, 15번 레인은 *Paraconiothyrium* spp. 유전자를 증폭시킨 결과이고, 16번 레인은 *Volutella* spp. 유전자를 증폭시킨 결과이며, 17번 레인은 *Trichoderma harzianum* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 18번 레인은 *Burkholderia ginsengiterrae* 유전자를 증폭시킨 결과이며, 19번 레인은 *Sphingomonas panacis* 유전자를 증폭시킨 결과이고, 20번 레인은 *I. mors-panacis* 유전자를 포함하지 않는 혼합유전자를 증폭시킨 결과이며, 21번 레인은 0.005ng/ μ l의 *I. mors-panacis* 유전자를 포함하는 혼합유전자를 증폭시킨 결과이고, 22번 레인은 1ng/ μ l의 *I. mors-panacis* 유전자를 포함하는 혼합유전자를 증폭시킨 결과이다.

[0078] 도 1에서 보듯이, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용할 경우(도 1의 상단사진), *I. mors-panacis* 균주의 유전자를 일정수준 이상 포함하는 경우(2번 및 22번 레인)에만 증폭산물을 획득할 수 있음을 확인하였다. 이에 반하여, IGS 영역을 증폭시킬 수 있는 프라이머 염기쌍을 사용한 경우에는(도 1의 하단사진), *I. mors-panacis* 균주 뿐만 아니라, *I. robusta* 균주(3번 레인), *Penicillifer* spp. 균주(6번 레인) 및 *Phialophora mustea* 균주(8번 레인)에서도 증폭산물을 얻을 수 있음을 확인하였다.

[0079] 따라서, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍은 *I. mors-panacis* 균주에 특이적인 프라이머임을 알 수 있었다.

[0081] 실시예 2-2: PCR 및 qRT-PCR 비교분석

[0082] 상기 실시예 2-1의 결과로부터, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용할 경우, *I. mors-panacis* 균주의 유전자를 일정수준 이상 포함하는 경우에만 증폭산물을 획득할 수 있음을 확인하였으므로, 이러한 결과를 qRT-PCR 조건에서도 동일하게 얻을 수 있는지 확인하고자, 상기 서열번호 3 및 4의 염기쌍과, IGS 영역을 증폭시킬 수 있는 프라이머 염기쌍을 대조군 프라이머 염기쌍으로 사용하여, 상기 각 균주를 대상으로 일반적인 PCR과 qRT-PCR을 수행한 후, 그 결과를 비교하였다(표 1).

표 1

[0083] 다양한 균주에 대한 본 발명의 프라이머 염기쌍의 특이도 분석결과

균주명	프라이머 염기쌍			
	IGS 증폭용 프라이머		<i>I. mors-panacis</i> 특이적 프라이머	
	일반 PCR	qRT-PCR	일반 PCR	qRT-PCR

<i>Ilyonectria morspanacis</i> HB9	+	+	+	+
<i>I.mors-panacis</i> HB10	+	+	+	+
<i>I.mors-panacis</i> HB11	+	+	+	+
<i>I.mors-panacis</i> HB112	+	+	+	+
<i>I.mors-panacis</i> HB13	+	+	+	+
<i>I.mors-panacis</i> HB14	+	+	+	+
<i>Ilyoenctria robusta</i> HB1	+	+	-	-
<i>I.robusta</i> HB2	+	+	-	-
<i>I.robusta</i> HB3	+	+	-	-
<i>I.robusta</i> HB4	+	+	-	-
<i>I.robusta</i> HB5	+	+	-	-
<i>Ilyonectria leucospermi</i> HB6	-	-	-	-
<i>I. leucospermi</i> HB7	-	-	-	-
<i>I. leucospermi</i> HB8	-	-	-	-
<i>Pythium ultimum</i> KACC 40705	+	-	-	-
<i>Penicillifer</i> spp. HR21	+	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i> KACC 40123	-	-	-	-
<i>Phialophora mustea</i> KACC 43819	+	-	-	-
<i>Fusarium solani</i> KACC 44891	+	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. gladioli KACC 44452	+	-	-	-
<i>Fusarium equiseti</i> KACC 42105	+	-	-	-
<i>Fusarium culmorum</i> KACC 42099	+	-	-	-
<i>Alternaria panax</i> KACC 42461	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp. RR22	+	+	-	-
<i>Paraconiothyrium</i> spp. HR41	-	-	-	-
<i>Volutella</i> spp. HR42	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> KACC 44705	+	-	-	-
<i>Burkholderia ginsengiterrae</i> DCY85	+	+	-	-
<i>Sphingomonas panacis</i> DCY99	+	-	-	-

[0084] 상기 표 1에서 보듯이, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍은 *I.mors-panacis* 균주를 제외한 다른 균주에서는 증폭산물을 나타내지 않았으므로, 상기 프라이머 염기쌍은 *I.mors-panacis* 균주에 특이적인 프라이머임을 알 수 있었다.

[0085] **실시예 2-3: 증폭산물의 정량분석**

[0086] 상기 실시예 2-2의 결과로부터 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍이 *I.mors-panacis* 균주에 특이적임을 확인하였으므로, 상기 프라이머를 정량분석에도 사용할 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0087] 구체적으로, *I.mors-panacis* 균주의 DNA를 서로 다른 농도(0.005, 0.1, 0.5 및 1ng/ μ l)으로 포함하는 시료와 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 이용한 qRT-PCR을 수행하여 얻어진 형광신호의 강도를 측정하고, 측정된 신호의 강도를 비교분석하였다(표 2). 이때, 대조군으로는 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍 대신에 IGS 영역을 증폭시킬 수 있는 프라이머 염기쌍을 사용한 qRT-PCR 결과를 사용하였다.

표 2

[0088] 본 발명의 프라이머 염기쌍을 이용한 qRT-PCR 분석결과

DNA 농도(ng/ μ l)	정량분석결과 (ng/ μ l)	
	<i>I.mors-panacis</i> 특이적 프라이머	IGS 증폭용 프라이머

0.005	0.0028 ± ¼0.0013	-
0.1	0.1520 ± ¼0.0090	-
0.5	0.4305 ± ¼0.0580	-
1	0.8000 ± ¼0.0071	0.1038 ± ¼0.0595

[0089] 상기 표 2에서 보듯이, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 이용하여 qRT-PCR을 수행하면, 사용된 DNA의 농도와 유사한 정량분석결과를 얻을 수 있는 반면, 대조군으로 사용된 IGS 증폭용 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 수행하면 정량분석이 수행될 수 없음을 알 수 있었다.

[0090] **실시예 3: 민감도 분석**

[0092] 서로 다른 농도의 *I.mors-panacis* DNA를 대상으로 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 이용한 PCR을 수행하고, 주형의 농도에 따른 증폭산물과 멜팅포인트의 변화를 측정함으로써, 상기 프라이머 염기쌍의 민감도를 분석하고자 하였다(도 2a).

[0093] 도 2a는 서로 다른 농도의 *I.mors-panacis* DNA를 대상으로 PCR 증폭을 수행한 경우, 얻어진 증폭산물과 멜팅포인트의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0094] 도 2a에서 보듯이, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 이용하면 주형농도가 변화됨에 따라, 얻어지는 증폭산물의 양이 동일수준으로 증가되었으나, 멜팅포인트는 변화되지 않음을 확인하였다. 이때, 측정된 CT값은 최저 19.1±0.03 내지 최고 24.6±0.20임을 확인하였다.

[0095] 따라서, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍은 *I.mors-panacis* DNA에 대하여 매우 높은 수준의 민감성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0096] 상기 도 2a의 결과를 통계분석하여, CT의 로그값과 DNA 농도의 상관관계를 분석하였다(도 2b).

[0097] 도 2b는 서로 다른 농도의 *I.mors-panacis* DNA를 대상으로 PCR 증폭을 수행한 경우, 얻어진 증폭산물의 CT 로그값과 사용된 주형 DNA 양의 상관관계를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0098] 도 2b에서 보듯이, 본 발명의 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용하여 *I.mors-panacis* DNA를 증폭시킬 경우, 얻어진 증폭산물의 CT 로그값과 사용된 주형 DNA 양이 비례함을 확인하였다.

[0100] **실시예 4: 토양시료에 대한 프라이머 염기쌍의 활용성 분석**

[0102] *90 *I.mors-panacis* 균주는 인삼근부병의 주요 원인균으로서, 인삼의 재배시에 인삼의 품질에 가장 큰 악영향을 주는 토양미생물로 알려져 있다.

[0103] 상기 *I.mors-panacis* 균주의 토양내 함량이 증가할 수록 재배되는 인삼의 품질이 급격히 악화되는 것으로 알려져 있다(도 3a).

[0104] 도 3a는 토양내 *I.mors-panacis* 균주의 농도에 따른, 인삼의 품질변화를 나타내는 사진이다.

[0105] 멸균된 토양시료에 *I.mors-panacis* 균주를 서로 다른 농도로 접종하여, *I.mors-panacis* 균주를 일정한 농도로 토양에 인위적으로 감염시킨 토양시료를 제작하였다. 제작된 토양시료에 포함된 *I.mors-panacis* 균주의 수준을 확인하기 위하여, 각 농도별 CFU(colony forming unit) 값을 확인하였다(도 3b).

[0106] 도 3b는 서로 다른 농도의 *I.mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료의 CFU 값을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

[0107] 상기 제작된 토양시료로부터 각각의 DNA를 추출하고, 추출한 DNA를 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용하여 PCR 증폭시켰다(도 3c).

[0108] 도 3c는 서로 다른 농도의 *I.mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료에서 추출한 DNA를 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용하여 PCR 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동 사진이다. 도 3c에서 보듯이, 토양시료에 접종된

I.mors-panacis 균주의 농도에 비례하여 증폭산물의 수준이 변화됨을 확인하였다.

[0109] 이어, 동일한 토양시료로부터 수득한 DNA를 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용하여 qRT-PCR을 수행하고, 이로부터 얻어진 DNA 농도 대비, 토양내 *I.mors-panacis* 균주의 농도, DSI(disease severity index) 및 CFU/g 값의 연관성을 분석하였다(도 4a 내지 4c).

[0110] 도 4a는 qRT-PCR에 의하여 *I.mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료에서 산출된 DNA 농도와 상기 토양시료내 *I.mors-panacis* 균주의 농도간의 연관성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 4b는 qRT-PCR에 의하여 *I.mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료에서 산출된 DNA 농도와 상기 토양시료의 DSI간의 연관성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 4c는 qRT-PCR에 의하여 *I.mors-panacis* 균주가 접종된 토양시료에서 산출된 DNA 농도와 상기 토양시료의 CFU/g 값 간의 연관성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0111] 도 4a 내지 4c에서 보듯이, qRT-PCR을 통해 산출된 DNA 농도는 토양내 *I.mors-panacis* 균주의 농도, DSI(disease severity index) 및 CFU/g 값에 대하여, 각각 비례함을 확인하였다.

[0112] 상기 결과를 종합하면, *I.mors-panacis* 균주로 오염된 토양시료를 대상으로 할 경우에도, 본 발명에서 제공하는 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용하면 토양시료에 포함된 *I.mors-panacis* 균주의 수준을 높은 정확도로 검출 및 정량분석할 수 있음을 알 수 있었다.

[0114] 실시예 5: 프라이머 염기쌍을 이용한 인삼재배 토양의 분석

[0116] 상기 실시예 4의 결과로부터, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용하면 토양시료에 포함된 *I.mors-panacis* 균주의 수준을 높은 정확도로 검출 및 정량분석할 수 있음을 확인하였으므로, 실제로 인삼을 재배하는 토양을 대상으로 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용하여 *I.mors-panacis* 균주의 오염여부를 확인하였다.

[0117] 구체적으로, 국내의 인삼재배에 적합한 7지역의 토양시료, 인삼재배에 부적합한 16지역의 토양시료 및 인삼재배 예정인 14지역의 토양시료를 대상으로, 서열번호 3 및 4의 프라이머 염기쌍을 사용한 qRT-PCR을 수행하여, 각 토양시료에 포함된 *I.mors-panacis* 균주의 수준을 산출하였다(표 3).

표 3

[0118] 인삼재배 지역별 토양에서 산출된 *I.mors-panacis* 균주의 수준

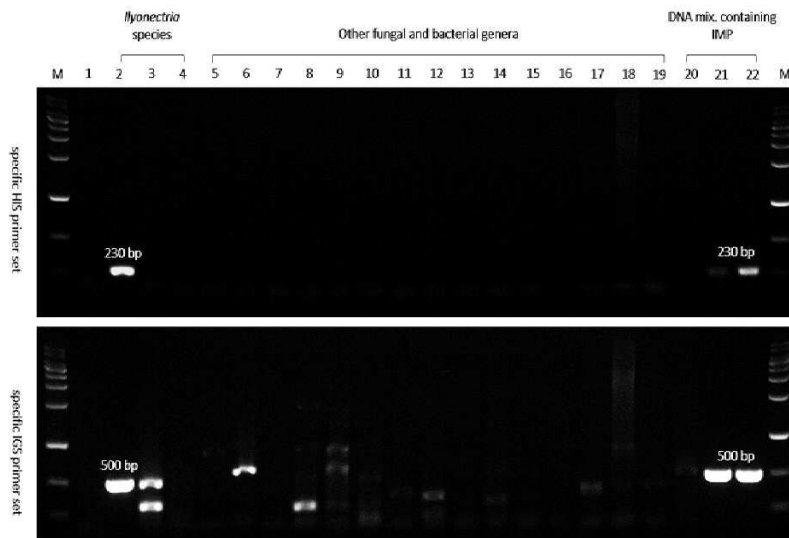
지역구분	주소	토양내 <i>I.mors-panacis</i> 균주의 수준(pg/g)
인삼재배 적합지역	경기도 과천시 적성면 식현리 368-2	-
	경기도 포천시 일동면 사직리 665	-
	경기도 양주시 남면 황방리 205-2	-
	경기도 양주시 남면 한산리 555-114	-
	경기도 연천군 미산면 우정리 336-3	-
	경기도 포천시 가산면 정교리 575	-
	경기도 과천시 영중면 금주리 산 161-8	-

인삼재배 부적합지역	경기도 파주시 적성면 울포리 338-54경기도 파주시 적성면 객현리 351	280.41± ; ¼170.22 239.73± ; ¼20.71
	경기도 파주시 적성면 구읍리 957	12.40± ; ¼1.80
	경기도 파주시 적성면 구읍리 74-4	7.80± ; ¼0.38
	경기도 파주시 적성면 구읍리 944	41.68± ; ¼5.36
	경기도 연천군 연천읍 동막리 389-2	51.18± ; ¼13.52
	경기도 연천군 왕징면 256	114.96± ; ¼58.39
	경기도 연천군 왕징면 1000	65.39± ; ¼16.87
	경기도 연천군 미산면 백석리 851-1	-
	경기도 연천군 신서면 대광리 748-2	-
	경기도 포천시 영중면 금주리 916	119.47± ; ¼20.97
	경기도 포천시 가산면 정교리 575	892.34± ; ¼103.70
	경기도 포천시 소흘읍 이가팔리 861	-
	경기도 포천시 영북면 자일리 938-2	-
	경기도 양주시 남면 황방리 205-2	9.22±1.81
	경기도 이천시 설성면 상봉리 376	5.82± ; ¼2.35
인삼재배 예정지역	경기도 연천군 왕징면 259경기도 연천군 신서면 답곡리 222	- -
	경기도 연천군 왕징면 260	21.10± ; ¼8.15
	경기도 포천시 영중면 금주리 706-3,4	-
	경기도 포천시 영중면 금주리	-
	경기도 포천시 일동면 사직리 1749	-
	경기도 포천시 일동면 사직리 1749-1	-
	경기도 포천시 일동면 사직리 517-5	-
	경기도 포천시 영북면 자일리 938-2	-
	경기도 포천시 가산면 정교리 721	8.51± ; ¼2.78
	경기도 양주시 남면 황방리 190-1	-
	경기도 양주시 남면 입암리 423	-
	경기도 양주시 남면 입암리 423-1	-
	경기도 파주시 적성면 주월리 1218	18± ; ¼1.35

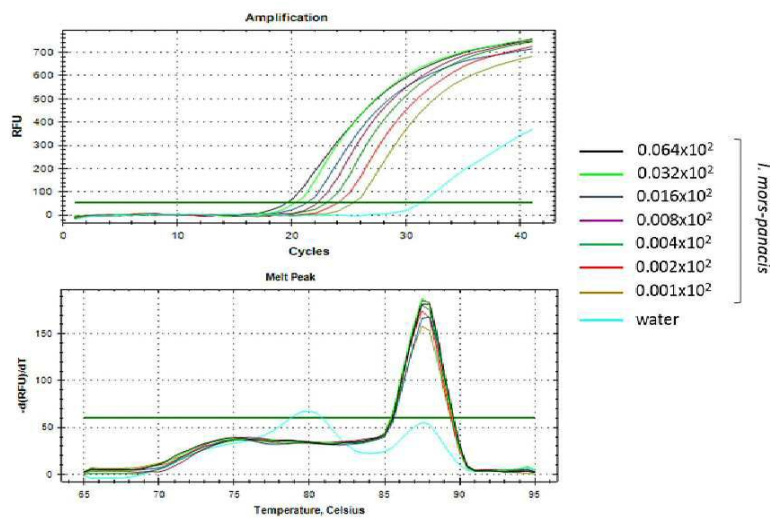
[0119] 상기 표 3에서 보듯이, 인삼재배에 적합한 7지역의 토양시료에서는 *I.mors-panacis* 균주가 검출되지 않았으나, 인삼재배에 부적합한 16지역 중 12지역의 토양에서는 *I.mors-panacis* 균주가 검출됨을 확인하였다. 상기 결과로부터, 적어도 *I.mors-panacis* 균주가 검출되는 지역에서는 상기 균주의 감염에 의한 인삼근부병으로 인하여 인삼재배가 부적합함을 확인하였다. 아울러, 인삼재배가 예정된 14지역 중에서는 3지역에서 *I.mors-panacis* 균주가 검출되었으므로, 이들 3지역에서는 인삼을 재배하지 않는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

도면

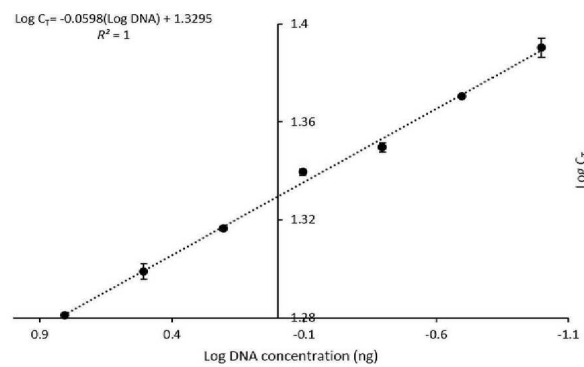
도면1



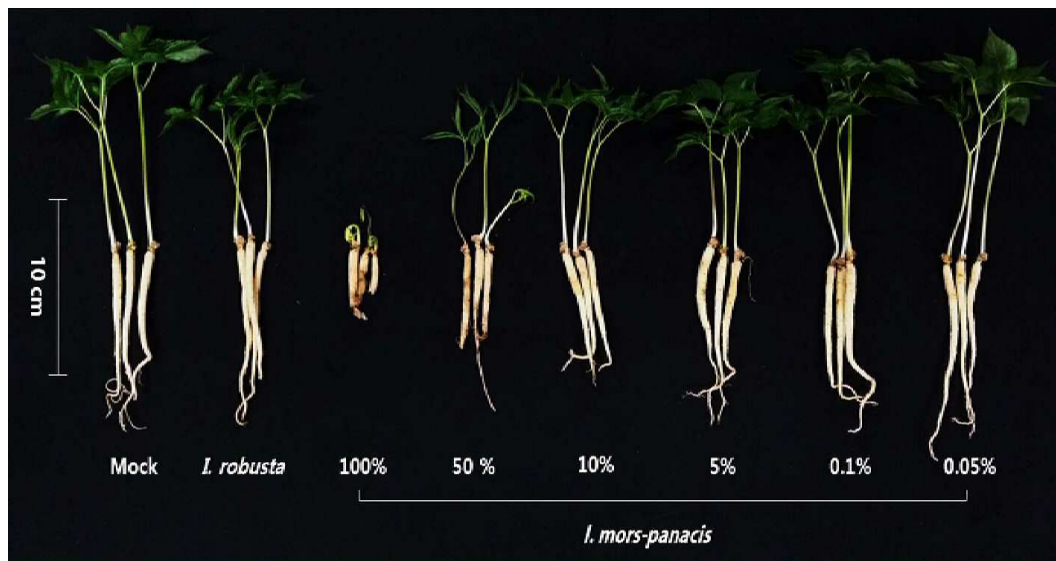
도면2a



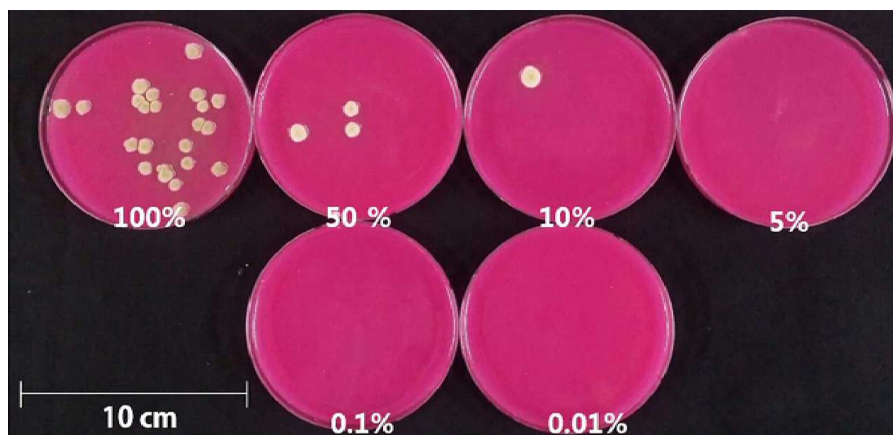
도면2b



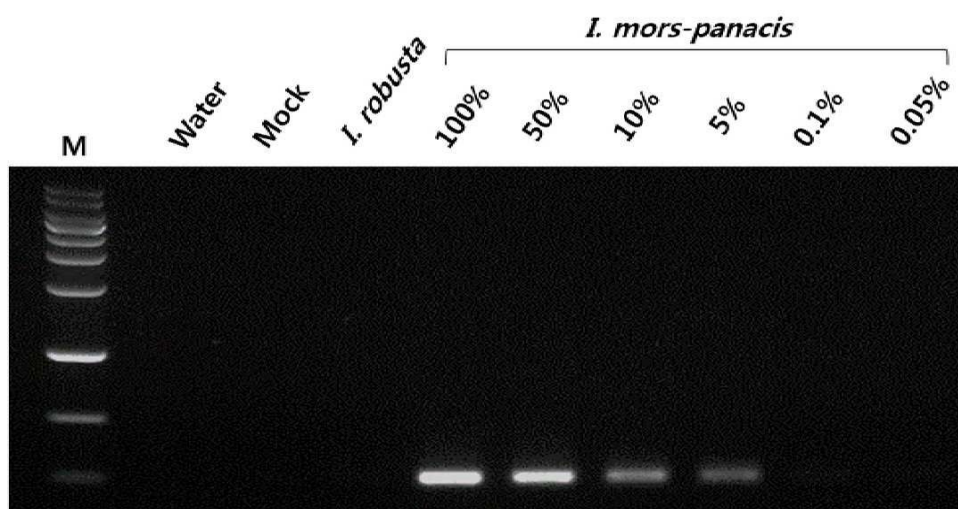
도면3a



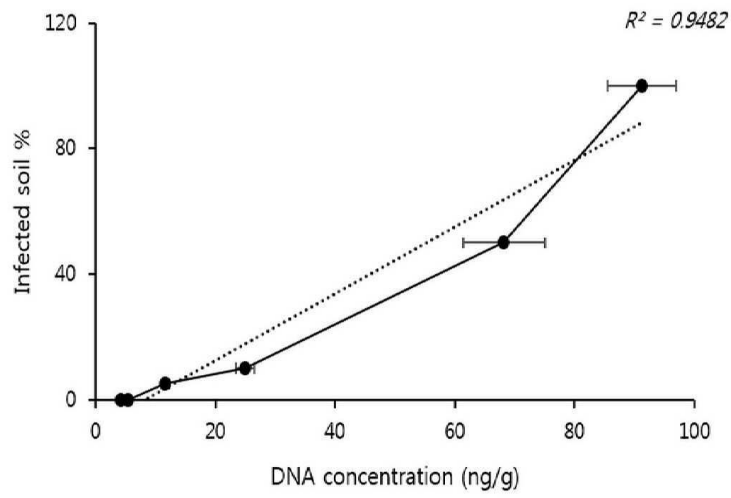
도면3b



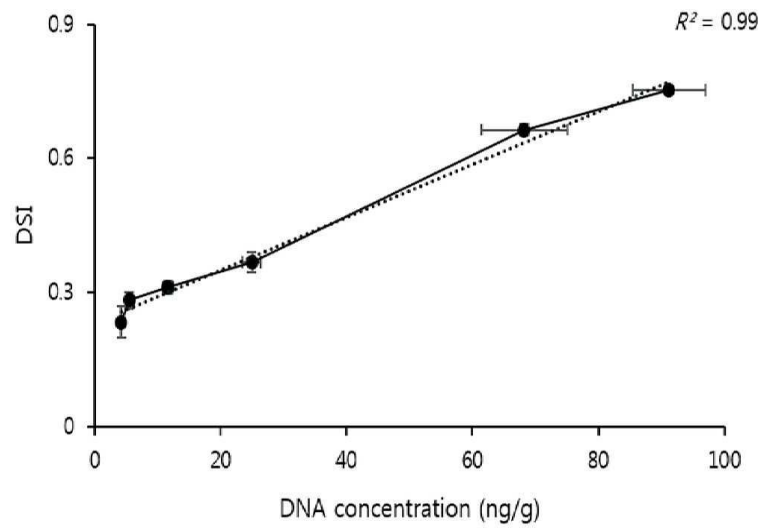
도면3c



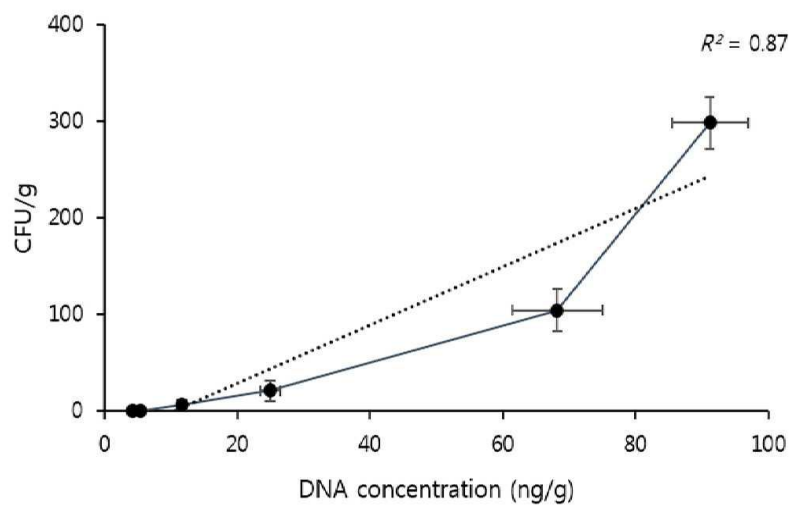
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 Kyonggi-Do Agricultural Research and Extension Service

<120> A composition for diagnosing root rot of panax ginseng and uses
 thereof

<130> KPA170136-KR

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide

<400> 1

atgtggcacg ttgggtgtg 19

<210> 2

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide

<400> 2

cagtccaagg acat 14

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

cacaccaac gtgccacat 19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

agctggatgt ccttggactg

20

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ggtcgcggcg agagtctc

18

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

cagcggcgcc cactaacaac

20