(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0088495
(43) 공개일자 2012년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2006.01) *A01N 63/02* (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0069612
(22) 출원일자 2011년07월13일
심사청구일자 2011년07월13일

(71) 출원인
(주) 제일그린산업
경상남도 창녕군 창녕읍 창녕공단길 30
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
정영륜
경상남도 진주시 주약동 현대아파트 102동 502호
비비 페미다
파키스탄 라왈핀디 옥테리오 22 아드라 칸트 하우스 넘버 555씨
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이숙열

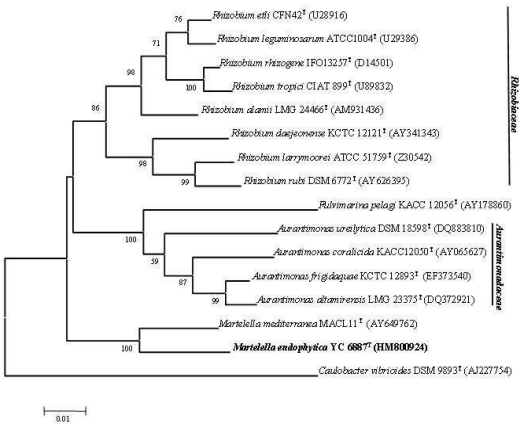
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **식물병의 생물학적 방제 효능 및 질소 고정 효능을 갖는 마르테렐라 엔도파이티카 Y C6887 균주 및 이를 함유한 다기능성 미생물 제제**

(57) 요 약

본 발명은 식물병의 생물학적 방제 효능 및 질소 고정 효능을 갖는 신균주 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주 및 이를 함유한 미생물 제제를 제공하여, 식물 병원균의 생육 억제 효능 또는 식물병 저항성 유도 효능 등 식물병에 대한 생물학적 방제 효능을 갖는 신균주로서, 동시에 질소 고정 효능 및 식물 생장 촉진 효능 등 미생물 비료 효능을 구비한 신균주와 이를 이용한 미생물 제제를 대량 생산할 수 있도록 함으로써, 미생물 비료 효능을 가진 생물 농약이라는 신개념의 미생물 제제를 제공할 수 있게 된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

정유진

경상남도 진주시 상평동 268-40

김근곤

경상남도 창원시 북면 외산리 586-2

특허청구의 범위

청구항 1

마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 식물병에 대한 생물학적 방제 효능을 갖는 것을 특징으로 하는마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 방제 효능은 식물 병원균의 생육 억제 효능 또는 식물병 저항성 유도 효능인 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 질소 고정 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 균주는 식물병에 대한 생물학적 방제 효능 및 질소 고정 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 균주는 식물 생장 촉진 효능을 더 갖는 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주.

청구항 7

제1항 내지 제6항의 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 미생물 제제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물병의 생물학적 방제 효능 및 질소 고정 효능을 갖는 신균주 및 이를 함유한 미생물 제제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887 균주 및 이를 함유한 미생물 제제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세계적으로 지난 수십여 년간 곡류, 채소, 과수 등 농작물의 수량을 증가시키기 위하여 해마다 많은 양의 화학비료와 병, 해충 및 잡초 방제를 위한 화학 농약을 사용해 왔다. 이와 같은 계속적인 화학 비료 및 농약 사용에 의하여 토양 산성화, 지력 손실, 환경오염과 생태계 파괴, 인축독성, 병해충 및 잡초의 농약에 대한 저항성 유

발 등의 문제가 지속적으로 제기되고 있다.

[0003] 국내외에서는 이러한 문제들을 해결하기 위하여 화학 비료 및 농약의 사용량을 감축하고자 노력하고 있으며, 특히 우리나라에서는 1999년 친환경농업 육성법을 제정하여 2013년까지 약 40% 정도의 화학 비료 및 농약 사용량 감축 노력을 계속해오고 있다. 이와 동시에 사회적으로는 생활수준 향상으로 인한 안전 식품에 대한 국민의 요구가 증가되고 있고, 농업 생산 환경 및 자연 생태계의 보존을 지향하는 유기농업이나 자연농법 등의 친환경농업이 급속히 확대되고 있어, 화학 비료 및 농약을 대체할 수 있는 미생물을 이용한 비료 및 생물 농약 개발에 대한 연구가 급격히 증가되고 있다. 이렇게 개발된 미생물제는 대량 배양 후 제제화하여 엽면 살포 또는 입제로 토양 처리함으로써 병해충을 방제하거나 미생물 비료로 이용되기도 한다.

[0004] 여기에 사용되는 미생물들은 토양, 식물근권, 해양 등 자연환경에 널리 분포되어 있으면서 그 종류가 다양하고 여러 종의 대사산물을 분비하기 때문에 친환경농업에 효과적으로 이용되고 있다. 미생물의 이용 방법으로는 크게 3가지로 나눌 수 있는데, 미생물 자체를 이용하는 방법, 미생물 발효에 의해 생산되는 대사 물질을 이용하는 방법, 새로운 농약 합성을 위한 선도 화합물로 미생물 대사 물질을 이용하는 방법 등이다. 이 중에서도 대부분이 식물 병원균을 억제할 수 있는 길항 미생물, 식물 생육을 촉진시키는 식물 생육 촉진 근권 세균(PGPR) 및 식물 내생(endophytic) 미생물에 의한 식물병 저항성 연구가 대부분을 차지하고 있으며, 미생물 비료에 대한 연구는 상대적으로 적은 편이다.

[0005] 최근 여러 미생물 중에서도 식물 내생 세균에 대한 연구가 국내외적으로 활발하게 이루어지고 있는데, 내생 세균은 살아 있는 건강한 식물 조직 내에 살면서 식물에는 실질적인 해를 주지 않고 여러 가지 이점을 주는 세균으로 정의되고 있다. 일반적으로 식물 내생 세균은 식물 세포 사이의 공간이나 세포 내에 존재하기도 하며 직?간접적으로 식물의 병해충, 스트레스에 대한 저항성을 유도하기도 하고 식물 생장에도 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 보다 구체적으로는 내생 세균은 질소 고정, 인산의 가용화, 철분 착화합물질(siderophore) 생산, 활성 호르몬의 생성, 항균 물질 생산 또는 식물의 병 저항성을 유도하여 병 감염을 방지하고 식물 생장을 촉진하는 것으로 여겨진다(비특허문헌 1 내지 4 참조). 이러한 내생 세균은 기주 식물과 친화적이며 병원균으로 인식되지 않고 기주 식물의 조직에 공생할 수 있다(비특허문헌 5 참조). 어떤 특정 내생 세균은 하나 또는 그 이상의 기작을 동시에 이용하여 식물 생장 촉진과 병 방제 효과를 낼 수 있고, 식물의 일생 동안 각 다른 시기에 다른 기작이 적용될 수도 있다. 식물 유전자는 세균이 존재함으로써 바뀔 수도 있으며, 이렇게 변화된 유전자가 식물에서의 내생 세균의 효과에 대한 실마리를 제공하기도 한다(비특허문헌 6 참조). 식물 내생 세균은 세포 내에서 증식하는데, 보통 뿌리와 줄기 시작 부분에서 전체 밀도가 높고, 줄기, 잎 등의 식물체 윗부분으로 갈수록 점점 줄어들며, 옥수수 잎의 경우에는 그 밀도가 $\log_{10}3$~$\log_{10}7$cfu/g 정도로 밝혀졌다. 현재까지 분리된 내생 세균은 슈도모나스(*Pseudomonas*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 바실러스(*Bacillus*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 등 50여 속에서 130여 종이 알려져 있으며, 이들은 토마토, 감자, 옥수수, 벼 등과 같은 경제적으로 중요한 작물의 생장 및 병 발생을 억제하여 작물의 생산을 증진시킨다. 그 외 콩은 세계 5대 작물이지만 콩과 식물의 공생 질소 고정 세균인 브라디리조비움(*Bradyrhizobium*) 및 리조비움(*Rhizobium*) 종류 외에 다른 내생 세균 또는 식물 생육 촉진 미생물 및 생물학적 방제에 대한 연구는 상대적으로 적은 편이다. 특히 북미에서는 브라디리조비움(*Bradyrhizobium*) 및 리조비움(*Rhizobium*)을 이용한 미생물 비료는 많이 판매되고 있지만 병 방제를 위한 생물 농약은 아직 개발된 것이 없다.

[0006] 한편, 콩을 포함한 여러 작물의 병 중에서 난균류에 의한 병은 작물 생산에 치명적인 손실을 일으키는 것으로, 병균은 경작지 토양에서 항상 존재하며 특히, 따뜻하고 습한 조건에서 뿌리 조직을 감염시킨다. 많은 작물이 이 병에 취약하고 일단 한 번 발병이 시작되면 방제하기가 매우 어렵다. 이 병원균들은 유주자, 난포자 등과 같은 여러 형태의 포자를 형성하며, 오랜 기간 동안 휴면 상태로 지낼 수 있다. 이 병원균의 방제는 주로 화학 살균제를 이용한 방법이 오래 사용되어 왔지만 대부분의 살균제 사용은 환경적인 위험의 문제가 있어, 이를 대체할 수 있는 환경 친화적인 생물 농약에 대한 관심이 커지고 있다. 그러나, 토양 전염 병원균인 난균류의 생물학적 방제를 위하여 수십 년간 연구가 진행되어 왔으나, 피시움(*Pythium*)과 파이토프쏘라(*Phytophthora*)에 의해 발생되는 병에 대하여 상업적으로 성공한 예는 아직 없다. 그 중요한 이유 중의 하나는 대부분의 미생물들이 병원균이 잘 생장할 수 있는 고수분 환경에서 생장이 부적합하고 또 미생물 제형의 불안정으로 실제 재배 환경에서 밀도가 급격히 감소하기 때문으로 생각된다.

[0007] 따라서, 이러한 환경에서도 생장 가능하고 다양한 생물학적 활성을 갖는 새로운 미생물의 탐색과 개발이 필요하다. 이러한 고수분 환경의 대표적인 것은 호수 또는 해양 환경인데, 특히 해양 환경은 백만 종이 넘는 매우 다양한 미생물 군락이 존재하는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 7 참조). 최근 해양 환경에서 서식하고 있는 식물

이나 미생물로부터 여러 종의 새로운 세균이 발견되었으며, 이들로부터 독특한 구조를 가진 중요한 생리 활성 물질이 발견 분리되었다(비특허문헌 8 내지 10 참조). 해양 미생물은 흔히 영역과 영양의 한계, 다른 미생물들과의 경합, 고등생물의 군집 등 어려운 조건의 서식처에서도 번성한다. 이토록 심한 경쟁적인 환경 조건에 맞서서 경쟁 생물의 정착과 성장을 막기 위하여, 해양 미생물들은 독성 물질을 생성하거나 부착기 구조, 생물 활성막의 형성, 기주 회복과 같은 방법으로 진화되어 왔다(비특허문헌 11 및 12 참조). 이 중에서도 해양 사구 또는 갯벌과 접한 지역에서 자생하는 염생 식물(halophyte)의 내생 미생물의 존재, 기능 그리고 활성 물질을 이용할 수 있는 정보는 한정되어 있다.

[0008] 염생 식물의 조직에서 살아가는 내생 세균은 그 동안 연구 개발이 거의 되지 않아서 잘 알려지지 않았고, 농업 및 기타 생명 산업에 이용 가능한 새로운 소재의 잠재적인 천연 자원이다. 최근 연구에서 다양한 해양 세균의 효과에 대한 시험이 실시되었고 이런 특성이 해양 서식지에 넓게 퍼져 있는 것으로 나타났으며, 많은 세균군에 존재하였다(비특허문헌 13 내지 15 참조). 알파-프로테오박테리아(*α-Proteobacteria*)에 속하는 세균은 바닷물에 널리 분포하고 표면 부양 세균 군락에 속하며 생리 활성 물질을 생산한다고 보고된 주요 세균군이다(비특허문헌 16 내지 18 참조).

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Chert, C. 외. (1995). Biological control of Fusarium wilt of cotton by use of endophytic bacteria. Biol. Cont. 5: 10-16.

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Costa, J. M. 외. (1994). Characterization of siderophore production by the biological control agent Enterobacter cloacae. Mol. Plant-Microbe Interact.7: 440-448.

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Madhaiyan, M. 외. (2006). Regulation of ethylene levels in canola (Brassica campestris) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminasecontaining Methylobacterium fujisawaense. Planta 224: 268-278.

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Wakelin, S. A. 외. (2004). Phosphate solubilization by Penicillium spp. closely associated with wheat roots. Biology and Fertility of Soils 40: 36-43.

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: Rosenblueth, M. 외. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 827-837.

(비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: de Matos Nogueira, E. 외. (2001). Expression of sugarcane genes induced by inoculation with Gluconacetobacter diazotrophicus and Herbaspirillum rubrisubalbicans. Genet. Mol. Biol. 24: 199-206.

(비특허문헌 0007) 비특허문헌 7: Whitman, W. B. 외. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 6578-6583.

(비특허문헌 0008) 비특허문헌 8: Faulkner, D. J. (2000). Marine pharmacology. Antonie Leeuwenhoek 77:135-145. Gene 115: 135-140.

(비특허문헌 0009) 비특허문헌 9: Strobel, G. 외. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67: 491-502.

(비특허문헌 0010) 비특허문헌 10: Wagner-Dobler, I. 외. (2002). Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 74: 207-238.

(비특허문헌 0011) 비특허문헌 11: Harvell, C. D. 외. (1999). Emerging marine diseases climate links and anthropogenic factors. Science. 285:1505-1510.

(비특허문헌 0012) 비특허문헌 12: Persson, O. P. 외. (2009). High abundance of virulence gene homologues in marine bacteria. Environ. Microbiol. 11: 1348-1357.

(비특허문헌 0013) 비특허문헌 13: Burgess, J. G. 외. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue

of natural products research. J. Biotechnol. 70:27-32.

(비특허문헌 0014) 비특허문헌 14: Grossart, H.-P. 외. (2004). Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. FEMS Microbiol. Ecol. 47: 387-396.

(비특허문헌 0015) 비특허문헌 15: Long, R. A. 외. (2001). Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4975-4983.

(비특허문헌 0016) 비특허문헌 16: Lafay, B. 외. (1995). Roseobacter algicola sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate Prorocentrum lima. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:290-296.

(비특허문헌 0017) 비특허문헌 17: Morris, R. M. 외. (2002). SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. Nature 420: 806-810.

(비특허문헌 0018) 비특허문헌 18: Selje, N. 외. (2004). A newly discovered Roseobacter cluster in temperate and polar oceans. Nature 427: 445-448.

(비특허문헌 0019) 비특허문헌 19: Smibert, R. 외. (1994). Phenotypic characterization. Pages 607-654 in: Methods for General and Molecular Bacteriology, P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood., and N. R. Krieg, eds. American Society for Microbiology, Washington, DC.

(비특허문헌 0020) 비특허문헌 20: Kim, K.D. 외. (1997). Control of Phytophthora root and crown rot of bell pepper with composts and soil amendments in the greenhouse. Applied Soil Ecology 5: 169-179.

(비특허문헌 0021) 비특허문헌 21: Whalen, M.C. 외. (1991). Identification of Pseudomonas syringae pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. Plant Cell 3: 49-59.

(비특허문헌 0022) 비특허문헌 22: Swanson, J. 외. (1988). Cloned avirulence gene of Xanthomonas campestris pv vesicatoria complements spontaneous race change mutant. Mol. Plant-Microbe Interact. 1: 5-9.

(비특허문헌 0023) 비특허문헌 23: Pieterse, C. M. J. 외. (1996). Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. Plant Cell 8: 1225-1237.

(비특허문헌 0024) 비특허문헌 24: Domenech, J. 외. (2007). Elicitation of systemic resistance and growth promotion of Arabidopsis thaliana by PGPR from Nicotiana glauca: a study of the induction pathway. Plant Soil. 290: 43-50.

(비특허문헌 0025) 비특허문헌 25: Gordon, S. A. 외. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid production. Plant Physiol. 26: 192-195.

(비특허문헌 0026) 비특허문헌 26: Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170: 265-270.

(비특허문헌 0027) 비특허문헌 27: Keen, N.T. 외. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. Gene 70: 191-197.

(비특허문헌 0028) 비특허문헌 28: Unge, A. 외. (1998). GFP as a marker gene. Molecular microbial ecology manual, p. 6.1.13: 1-16. Kluwer Academic Publisher, Amsterdam, The Netherlands.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명은 상기한 문제를 보완할 수 있는 한 방법으로 난균류를 포함한 식물 병원균의 생육 억제 등 식물병에 대한 생물학적 방제 효능을 보유함은 물론, 동시에 식물 생장 촉진과 질소 고정을 할 수 있는 다기능 식물

내생 세균을 분리, 대량 배양하여 제제화 함으로써, 미생물 비료 효능을 가진 새로운 형태의 생물 농약을 개발하여 제공하는 것을 그 목적으로 하고 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은, 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주를 제공한다.

[0012] 또한, 상기 균주는 식물병에 대한 생물학적 방제 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주를 제공한다.

[0013] 또한, 상기 방제 효능은 식물 병원균의 생육 억제 효능 또는 식물병 저항성 유도 효능인 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주를 제공한다.

[0014] 또한, 상기 균주는 질소 고정 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주를 제공한다.

[0015] 또한, 상기 균주는 식물병에 대한 생물학적 방제 효능 및 질소 고정 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주를 제공한다.

[0016] 또한, 상기 균주는 식물 생장 촉진 효능을 더 갖는 것을 특징으로 하는 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주를 제공한다.

[0017] 상기 또 다른 과제 해결을 위하여 본 발명은, 상기 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887(수탁번호: KCCM 11156P) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 미생물 제제를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 이러한 본 발명에 따르면, 식물 병원균의 생육 억제 효능 또는 식물병 저항성 유도 효능 등 식물병에 대한 생물학적 방제 효능을 갖는 신균주로서, 동시에 질소 고정 효능 및 식물 생장 촉진 효능 등 미생물 비료 효능을 구비한 신균주를 제공하여 이를 이용한 미생물 제제를 대량 생산할 수 있도록 함으로써, 미생물 비료 효능을 가진 생물 농약이라는 신개념의 미생물 제제를 제공할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 YC6887 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열,

도 2는 YC6887 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석으로 만든 계통수,

도 3은 고추 역병에 대한 YC6887 균주의 처리 효과를 나타내는 그래프,

도 4는 완충액을 처리한 고추 역병 균사(a) 및 YC6887 균주를 처리하고 12시간 후의 고추 역병 균사(b)의 주사전자현미경 사진,

도 5는 YCS 배지 배양 여액에 의한 고추 잘록병균 억제 효과(a) 및 부분 정제된 분획들에 의한 고추 역병균 억제 효과(b 및 c)를 나타낸 사진,

도 6은 YC6887 균주 처리 여부에 따른 애기장대의 전신성 유도저항성 효과를 나타내는 사진,

도 7은 YC6887 균주 처리 여부에 따른 애기장대의 방어 관련 유전자 발현을 설명하는 사진,

도 8은 YC6887 균주 처리 여부에 따른 고추와 애기장대에 대한 생장 촉진 효과를 비교한 사진,

도 9는 YC6887 균주 처리에 의한 콩의 뿌리혹 형성을 나타낸 사진,

도 10은 담배 잎 내부에서 YC6887 균주의 집락 형성을 나타낸 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예의 구성은 본 발명의 가장

바람직한 일실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0021] **[실시예 1] 본 발명의 신규 미생물 YC6887 균주의 분리 및 동정**

[0022] (1) YC6887 균주의 분리

[0023] 염생 식물 조직에서 식물병에 대한 생물학적 방제 효능 및 미생물 비료 효능을 갖는 내생 세균을 분리하기 위하여, 경남 남해군 설천면 문항리 개펄과 접한 토양에서 자라는 해당화(*Rosa rugosa*)의 뿌리 내부 조직에서 하기와 같이 균주 분리를 수행하였다.

[0024] 먼저, 상기 뿌리 절단 조각의 표면을 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액에 10분간 담그어 표면을 살균하였다. 이 조각들을 무균적으로 말린 후 여과지로 거른 바닷물(FS)이 들어 있는 10배 희석된 R2A(1/10 R2A) 배지에 올려놓고, 2~3일 정도 배양하면서 표면에서 세균 생장 여부를 관찰하면서 표면 살균 여부를 확인하였다. 조각의 표면 살균이 확인된 뿌리 조각 1.0g을 취하여 고압멸균기에서 살균 여과된 바닷물(AFS) 9.0㎖를 넣어 살균된 주발과 절구로 마쇄하였다. 상기 마쇄된 액 0.1㎖를 취하여 살균된 바닷물 0.9㎖에 넣어 10배 희석(10^{-3})하고 순차적으로 10배씩 추가 희석(10^{-4} 및 10^{-5})하였고, 여과된 바닷물이 포함된 1/10 R2A 배지에 3등분하여 분주한 후 고르게 도말하였다. 이 배양기를 28℃에서 2~3주 동안 배양하고 생육된 단일 집락을 순수하게 분리하였고, 이를 YC6887 균주로 명명하였다.

[0025] (2) YC6887 균주의 동정

[0026] 상기 분리된 YC6887 균주의 동정을 위하여, 하기와 같이 형태학적 특성, 생리?생화학적 특성, 지방산 분석 및 분자생물학적 특성에 관한 조사를 수행하였다. 상기 분리된 YC6887 균주와 유사한 타입 균주를 대상으로, 형태학적 특성은 주사전자현미경으로 조사하였고, 생리?생화학적 특성 및 분자생물학적 특성은 본 발명자가 개발한 분석 방법과 일반적인 분석법을 사용하여 조사하였으며(비특허문헌 19 참조), 지방산 분석을 위하여 1/2 marine agar(Difco) 배지에서 28℃ 조건으로 48시간 배양한 균체를 이용하였다. 또한, 여러 가지 탄소원의 이용 시험은 바닷물을 포함한 배양액에서 28℃ 조건으로 24시간 동안 자란 세균 세포를 이용하여 실시하였다.

[0027] 상기 분리된 YC6887 균주는 그람(Gram) 음성으로 운동성이 없고, 세포는 막대형(폭 0.5~0.8㎛, 길이 1.2~2.3㎛)이며, 포자는 형성하지 않는다. Marine agar 2216에서의 균집락은 불투명하고, 둥글고, 가장자리가 매끄럽고, 가운데가 볼록하고 매끄럽다. 대사는 임의 혐기성이고 옥시다아제(oxidase) 반응과 카탈라아제(catalase) 반응은 양성이다. 생장에 소금은 필수적이지는 않으나, NaCl 농도 9%(w/v)까지 생장한다. 인돌(indole) 생산, 아르기닌 디아미나아제(arginine deaminase) 활성, 에스큘린(aesculin) 가수분해는 양성이고, 반면에 젤라틴(gelatin) 가수분해와 ONPG(o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) 반응은 음성이다. 보게스-프로스카우어(Voges-Proskauer) 반응은 양성이다. YC6887 균주의 생리?생화학적 특성은 유사한 다른 종들과 비교하여 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0028] 표 1을 참조하여 마르테렐라(*Martelella*) 속 형태 종(type species)과 다른 유사한 속들에 대한 YC6887 균주의 차별화된 표현형의 특징을 비교할 때, YC6887 균주가 유사 종들과 다른 중요한 점은 에스큘린(aesculin), 베타-1,3-글루칸(β-1,3-glucan), 카세인(casein) 및 카르복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose; CMC)를 가수분해하고, 탄소원으로 카프로에이트(caproate)와 아디페이트(adipate)를 이용한다는 것이다. YC6887 균주는 단일 탄소원으로 글루코오스(glucose), 아라비노오스(arabinose), 만노오스(mannose), 만니톨(mannitol) 및 말토오스(maltose)를 이용한다. YC6887 균주의 주 호흡 퀴논(quinone)은 Q-10이었다.

[0029] YC6887 균주의 지방산 분석 결과는 다른 유사 종들과 그 함량(%)을 비교하여 하기 표 2에 나타내었다.

[0030] 표 2를 참조하면, YC6887 균주의 주요 지방산은 $C_{18:1}\omega7c$ 57.1% 및 $C_{19:0}\omega8c$ cyclo 7.6%로 마르테렐라(*Martelella*) 속 형태종의 그것과 유사하였다. 그러나, YC6887 균주는 iso-$C_{17:0}$3-OH, $C_{16:0}$ 및 $C_{18:0}$의 비율이 달라서 마르테렐라(*Martelella*) 속의 형태종과는 구별되었다.

표 1

[0031]

Characteristic	1	2	3	4
Isolation source	Halophyte	Lakewater	Seawater	Coral
Growth without NaCl	+	+	-	+
Salt range (%)	0-9	0-6	1-8	0-10
Temperature range (°C)	4-40 °C	4-37 °C	4-37°C	4-40 °C
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Productionof pigment	-	-	+	+
Nitrate reduction	+	+	-	-
Hydrolysis of:				
Aesculin	+	+	-	-
β-1,3 glucanase	+	-	-	-
Casein	+	-	-	-
CMC	+	-	-	-
Acid from carbohydrate				
Glucose	+	+	+	+
Rhamnose	+	-	+	-
Melibiose	+	-	+	+
Mannose	-	-	-	+
Sucrose	+	-	-	-
Amygdalin	+	-	-	-
Arabinose	+	-	-	+
Utilization of carbon source				
Glucose	+	+	+	+
Arabinose	+	-	+	+
Mannose	+	-	+	+
Gluconate	-	+	+	-
Malate	-	+	+	-
Mannitol	+	+	-	+
Maltose	+	+	-	+
Caproate	-	-	-	-
Adipate	-	-	-	+

[0032] * 주

[0033] - 1: YC6887

[0034] - 2: *Martelella mediterranea* DSMZ17316

[0035] - 3: *Fulvimarina pelagi* KACC2056

[0036] - 4: *Aurantimonas coralicida* KACC12050

[0037] - +: 양성, -: 음성

표 2

[0038]

Fatty acid	1	2	3	4
$C_{12:0}$	tr	-	-	-
$C_{16:0}$	2.4	12	2.6	6.7
$C_{17:0}$	-	tr	-	tr
$C_{18:0}$	2.2	tr	8.2	1.5
$C_{16:1}\omega7c$	-	tr	-	1.3
$C_{18:1}\omega7c$	57.1	21.6	82.9	76.9
$C_{16:0}$ 3-OH	tr	tr	-	-
$C_{18:1}$ 2-OH	-	tr	tr	2
$C_{18:0}$ 3-OH	1.7	tr	tr	
iso-$C_{17:0}$ 3-OH	7.4	tr	-	-
$C_{19:0}\omega8c$ cyclo	7.6	41.4	2.6	10.5
$C_{19:0}$10-methyl	2.6	tr	-	-
$C_{18:1}\omega7c$11-methyl	tr	8.8	-	-
Summed feature 2	5	7.6	-	-
Summed feature 3	1.3	tr	-	-
Summed feature 7	tr	-	-	-

[0039] * 주

[0040] - 1: YC6887

[0041] - 2: *Martelella mediterranea* DSMZ17316

[0042] - 3: *Fulvimarina pelagi* KACC2056

[0043] - 4: *Aurantimonas coralicida* KACC12050

[0044] - tr: 1.0% 이하, -: 미검출

[0045] 한편, YC6887 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열(1495bp, 도 1 참조)을 결정하고, GenBank/EMBL/DDBJ의 데이터베이스와 상동성 검색을 수행하여 계통학적 위치를 검토하였다. 도 2는 YC6887 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석으로 만든 계통수이다. 도 2에서 교점 숫자는 1000 반복에서 나온 부트스트랩 값(bootstrap value)을 나타낸다.

[0046] 검토 결과 *Martelella mediterranea* MACL11와 98.3% 유사도로 가장 가까운 것으로 확인되었으며, 다른 리조비움(*Rhizobium*) 속의 형태 종들과는 91.6~93.6%, *Aurantimonas coralicida* DSM14790와 92.1% 및 브루셀라(*Brucella*) 속의 종들과는 92.4% 유사도를 나타내었다. 염기서열 분석 결과를 이용한 계통수에서 보면 높은 부트스트랩 값(bootstrap value, 100%)을 나타낸 것을 볼 때, YC6887 균주는 *Martelella mediterranea* MACL11와 가장 가까운 집단을 형성하였다. 이와 같이, 16S rRNA 유전자 서열의 유사성과 계통발생학적 분석의 유전적 특성으로 볼 때, YC6887 균주는 분명히 마르테렐라(*Martelella*) 속에 포함됨이 확인되었다. 이 외에도 YC6887 균주는 다른 속 종류와의 여러 표현형 특징, 즉 생리?생화학적 특성, 분리 장소, 가수분해 효소 생산 종류, 지방산 종류 등과 같은 특성 차이로 이 균주는 계통발생학적으로 마르테렐라(*Martelella*) 속으로 분류되었다.

[0047] 따라서, 분리된 YC6887 균주를 마르테렐라(*Martelella*) 속의 새로운 종으로 동정하고 마르테렐라 엔도파이티카

(*Martelella endophytica*) YC6887로 명명하였다. 새로운 종으로 동정된 마르테렐라 엔도파이티카(*Martelella endophytica*) YC6887에 대하여 2010년 12월 28일자로 한국미생물보존센터(KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms)로부터 수탁번호 KCCM 11156P를 부여받았다.

[0048] **[실시예 2] YC6887 균주의 식물 병원균에 대한 생육 억제 효능 검정**

[0049] (1) YC6887 균주의 난균류에 대한 길항력

[0050] YC6887 균주의 식물 병원균에 대한 생육 억제 효능을 검정하기 위하여, 하기와 같이 난균류 병원균에 대한 항균 활성과 생물적 방제 효과를 조사하였다.

[0051] 내생 세균 YC6887의 항균 활성은 난균류 병원균인 고추 역병균(*P. capsici*) 및 고추 잘록병균(*Py. ultimum*)에 대한 대면 생물검정(confrontation bioassay) 방법으로 균사 생장의 억제 조사로 확인하였다. 상기 병원균과 YC6887 균주는 감자한천설탕 배지(PDA)와 V8 주스한천 배지(여과한 바닷물(FS) 1L에 1/2 PDA와 1/2 R2A(0.25g yeast extract, 0.25g proteose peptone No.3, 0.25g casamino acid, 0.25g dextrose, 0.25g soluble starch, .15g sodium pyruvate, 0.15g K_2HPO_4, 0.03g $MgSO_4$)를 넣은 V8 주스 배지)에서 평판디스크 측정법(paper disc method)을 이용하여 균사 생장 억제 효과를 조사하였다.

[0052] YC6887 균주의 배양액 또는 생산하는 배양 여액의 병균 억제 효과는 균주를 콩가루 0.5%(w/v)를 첨가한 바닷물 포함 1/2 R2A 액에서 28℃ 조건으로 48시간 진탕 배양(120rpm) 후 배양액을 그대로 올리거나 원심분리 후 밀리포어 필터(millipore filter)로 걸러낸 여액을 이용하였다. 종이 디스크(직경 5㎜)를 배양기 가장자리로부터 1㎝의 똑같은 거리에 놓았고, 배양 여액 100㎕를 종이 디스크에 충분히 스며들게 한 후 가운데에 PDA 배지(고추 잘록병균: *Py. ultimum*)와 V8 주스한천 배지(고추 역병균: *P. capsici*)에서 4일 동안 자란 병원균 균사 디스크(직경 6㎜)를 놓고 28℃에서 4~6일간 배양하였다. 배양 후 병원균 균사의 생장 억제 정도를 측정하여 평가하였다.

[0053] 이러한 실험실내 배양기를 통한 시험 결과 균사 생장 억제 효과는 고추 역병균(4~5㎜ 억제 거리)보다는 고추 잘록병균(7~8㎜ 억제 거리)에 대한 효과가 더 좋았다. 그러나, 고추 재배에서 역병균에 의한 피해가 더 크므로, 상기 실험실내 시험의 억제 효과를 바탕으로 YC6887 균주의 고추 역병에 대한 생물적 방제 효과를 조사하였다.

[0054] YC6887 균주의 생물적 방제 효과 조사는 고추씨를 표면 살균 후 멸균 토양에서 재배하면서 온실에서 수행하였다. YC6887 균체 준비는 상기 방법으로 배양된 500㎖ 배양액을 9,000g, 10℃에서 15분간 원심분리하여 수확하였고, 균체를 10mM $MgSO_4$ 완충액에 넣어 10^7cfu/㎖(OD_{600}≒0.7) 정도로 조정하였다. 병균 접종원은 Kim 등(비특허문헌 20 참조)의 방법으로 준비하였다. 고추 역병균(*P. capsici*)은 오우트밀(귀리)한천 배지에서 28℃ 조건으로 7일간 배양 후 살균된 증류수 20㎖를 넣어 넘쳐 흐르게 한 후 유주자낭을 형성시키기 위하여 계속적인 형광 불빛 아래에서 28℃로 7일간 더 배양하였다. 이 배지에 살균 증류수를 넣고 4℃에서 30분간 유지한 후 다시 상온에 30분간 유지함으로써 유주자낭에서 유주자가 방출되도록 하였다. 이후 세 겹의 의료용 헝겊으로 포자낭 찌꺼기를 걸러 낸 후 유주자 현탁액을 30초간 잘 섞어 접종원 농도가 5.0×10^4유주자/㎖가 되도록 살균 증류수로 희석하였다. 시험용 고추는 파종 후 5주 동안 재배된 고추 묘를 살균된 토양을 넣은 포트(직경 10㎝, 깊이 9㎝)에 이식하였고, YC6887 균주 처리는 세균 현탁액(10^7 cfu/㎖)에 고추 묘의 뿌리를 1시간 동안 담근 후에 포트에 이식하였다. 무처리 대조구는 10mM $MgSO_4$ 완충액에 담근 묘목을 사용하였다. 이식 후 1일째 날에 고추 역병의 유주자 현탁액 5㎖를 각 고추 묘 포트에 접종하였다. 접종된 고추 묘와 대조 포트 모두 22℃ 온실 벤치에 계속 놓아 두면서 감염된 고추 묘의 수를 조사하였다. 각 시험 당 3반복으로 1처리 당 고추 묘 20주를 사용하였다.

[0055] 도 3은 고추 역병에 대한 YC6887 균주의 처리 효과를 나타내는 그래프이다.

[0056] 도 3에 나타낸 바와 같이, 역병균 만을 접종한 대조구에서는 접종 7일 내에 역병 증상인 암색 갈반 병반이 줄기에 나타났으며, 27일 이내에 그 병반은 급속히 확대되어 모든 잎들이 시들어 떨어지고 줄기가 꺾이면서 지상부로 전파되어 완전히 고사되었다. 반면에 YC6887 균주를 처리한 고추는 묘 이식 1개월 후, 역병 발생율이 70%로 무처리구(100%)보다 현저히 낮았다.

[0057] (2) YC6887 균주에 의한 고추 역병균 균사 억제 관찰

[0058] YC6887 균주에 의한 고추 역병균 균사의 억제를 관찰하기 위하여, 하기와 같이 주사전자현미경을 사용하여 균사의 형태적인 변형을 조사하였다.

[0059] 먼저, V8 주스한천 배지가 들어 있는 배양기에서 6일 동안 자란 6㎜ 직경의 균사 덩어리를 직경 3㎝인 소형 배양기로 옮겼다. 이 균사 덩어리에 YC6887 균주의 현탁액(10^4cfu/㎖) 2㎖를 넣고 균사와 상호 작용하도록 12시간 동안 놓아두었다. 그리고, 이 균사 덩어리를 살균된 증류수로 부드럽게 세 번 씻고 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 포함하는 인산 완충액에 3시간 동안 고정시켰다. 전처리 된 시료의 주사전자현미경 관찰은 경상대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 수행하였다.

[0060] 도 4는 완충액을 처리한 고추 역병 균사(a) 및 YC6887 균주를 처리하고 12시간 후의 고추 역병 균사(b)의 주사전자현미경 사진이다.

[0061] 도 4를 참조하면, YC6887 균주를 처리한 병원균 균사는 공통적으로 터지고 비정상적으로 변형되어 균사 주위에 많은 소낭들과 불규칙적으로 비틀어진 기형 균사가 관찰되어 YC6887 균주에 의해 고추 역병균 균사가 억제되었음을 알 수 있다.

[0062] (3) 병원균 억제 항균 물질의 생산 및 부분적 정제

[0063] YC6887 균주에 의한 병원균의 억제가 항균 물질 생산에 의한 것인지를 알아보기 위하여, 먼저 R2A 바닷물이 포함된 여러 종의 복합 배지에서 항균 물질 생산 여부를 조사하였다. 그 결과 항균 물질이 바닷물 포함 배지에서 생성되었기 때문에 대량 생산을 위해 증류수를 포함한 최적의 배지 선택이 필요하였고, 증류수에 각각 다른 배지를 넣어서 항균 물질 생산을 시험하였다. 최종적으로 항균 물질 생산에 가장 적합한 YCS 배지(효모 추출물 8.0g, casein 2.0g, 콩가루 5.0g, 포도당 10g, $MgSO_4$ 4.0g, $MgCl_2$ 2.0g / 증류수 1ℓ)를 만들어 항균 물질의 대량 생산에 사용하였다. 항균 물질의 억제 효과 정도는 상기한 디스크 확산법(disc diffusion method)으로 실시하여 종이 디스크 주위에 형성된 균사 생장 억제 거리(㎜)를 측정하여 확인하였다.

[0064] 구체적으로, YC6887 균주를 YCS 배지에 28℃로 96시간 배양하면서 배양 시간별 세균 밀도와 항균 물질의 활성을 측정하였다. 먼저, YC687 세균 균주는 2ℓ YCS 배지가 들어 있는 플라스크를 28℃로 48시간 진탕(120rpm) 배양하여 대량 배양용 접종원으로 사용하였다. 대량 배양은 YCS 배지 200ℓ를 사용하여 500ℓ 발효배양기에서 수행하였다. 가동 조건은 온도 28℃, 교반 속도 110rpm, 환기 속도 0.6VVM 및 pH는 6.8~7.2로 유지하였다. 그 결과 최대 항균 물질 생산의 최적 배양 시간은 60시간으로 나타났고, 60시간 배양 후의 배양 여액과 상층액 50L를 에틸아세테이트(ethyl acetate)로 추출 부분 정제한 분획으로 고추 역병균과 고추 잘록병균에 대한 억제 효과를 조사하였다.

[0065] 도 5는 YCS 배지 배양 여액에 의한 고추 잘록병균 억제 효과(a) 및 부분 정제된 분획들에 의한 고추 역병균 억제 효과(b 및 c)를 나타낸 사진으로, YCS 배지에서 YC6887 균주의 배양 추출 물질이 고추 역병균과 고추 잘록병균의 억제에 효과적인 것을 알 수 있다.

[0066] **[실시예 3] YC6887 균주의 전신성 병 저항성 유도 효과 검증**

[0067] YC6887 균주가 식물의 전신성 유도저항성(induced systemic resistance, ISR) 효과가 있는지 알아보기 위하여, 하기와 같이 애기장대와 병원 세균(*Pseudomonas syringae*) 간의 상호 작용을 이용하여 실험하였다.

[0068] 사용된 병원균으로 비병원성 유전자 *avrRpt*를 가진 병원성이 없는 *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 균주와 이 유전자가 없는 병원성 *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000를 병 발생을 위한 접종원으로 사용하였다(비특허문헌 21 참조). 병원 세균은 King's B 액체 배지에서 28℃로 하루 밤 동안 배양하였고, 비병원성 병원균의 플라스미드 선발을 위하여 테트라시클린(tetracycline) 20㎎/ℓ를 첨가한 King's B 액체 배지를 사용하였다. 유도저항성 효과 확인을 위한 YC6887 균주는 트리픽 소이 브로스(trypic soy broth, TSB)에서 28℃로 24시간 배양 후 9,000g에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확 후 10mM $MgSO_4$ 용액(계면활성제 0.01%(v/v) Silwet L-77 함유)에 최종 농도가 10^7cfu/㎖(OD_{600}≒0.7)이 되도록 재현탁하여 준비하였다.

[0069] 애기장대 재배는 상기 고추 재배에서 기술한대로 수행하였다. 애기장대의 전신성획득저항성(systemic acquired resistance, SAR)의 관찰을 위하여 Swanson 등(비특허문헌 22 참조)에 의한 방법대로 바늘이 없는 1㎖ 주사기를 이용하여 10mM $MgSO_4$ 용액에 10^7 cfu/㎖ 농도로 조절된 비병원성 *Pseudomonas syringae* pv. tomato 병원균을 각 식물의 3엽 이하 잎에 침투시키고 병원성 균주를 접종하기 전 3일 동안 전신획득저항성을 유도하였다.

[0070] 또한, YC6887 균주 처리에 의한 전신성 유도저항성 효과를 조사하기 위하여 식물 묘를 심기 바로 직전에 YC6887 세균 농도가 10^7 cfu/㎖ 토양이 되도록 세균 현탁액을 토양에 혼합 처리(비특허문헌 23 참조)하였고, 무처리 대조구 토양에는 10mM $MgSO_4$ 용액만을 토양 관주하였다. 이후 유도저항성 평가를 위하여 계면활성제를 함유한 10mM $MgSO_4$ 용액에 최종 농도가 10^7 cfu/㎖로 조절된 병원균 현탁액에 5주 된 식물 잎을 2초 동안 잠기게 하였다. 병원균 접종 하루 전에 식물을 100% 상대 습도의 식물배양상에 두고 접종 4일 후 각 발병된 식물의 잎 면적 비율을 조사함으로써 발병 정도를 평가하였다. 잎의 괴저나 잎이 탈색되어 물러지면 발병으로 기록하였다.

[0071] 도 6은 YC6887 균주 처리 여부에 따른 애기장대의 전신성 유도저항성 효과를 나타내는 사진이다.

[0072] YC6887 균주가 처리된 토양과 무처리 토양에 5주 된 묘를 심고 병원성이 있는 균주와 병원성이 없는 균주를 접종한 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 먼저, 묘 이식 4일 후 YC6887 균주를 처리한 토양에서 자란 식물(b)이 무처리 토양에서 자란 식물(a)보다 생육이 더 좋은 것을 알 수 있다. 또한, *Pseudomonas syringae* 병원성 균을 접종한 식물(d)의 잎은 탈색과 괴저가 전반적으로 나타난 반면, YC6887 균주를 미리 토양에 처리한 토양에서 자란 식물(e)이나 비병원성 균을 처리한 식물(c)에서는 그 증상이 현저히 감소한 것으로 보아, YC6887 균주 처리에 따라 식물의 전신성 유도저항성 효과가 나타났음을 알 수 있다. 도 6의 사진에서 화살표로 표시된 것은 병원균에 의한 병징이 나타난 부위를 가리키는 것이다.

[0073] 한편, YC6887 균주 처리에 의한 식물의 병 저항성 유도 시 관련되는 유전자가 어떤 경로를 통하고 있는지 알아보기 위하여 RT-PCR 분석 방법을 이용하였다. 먼저, YC6887 균주가 처리구와 무처리된 대조구에서의 애기장대 잎에서 전체 RNA를 추출하였다. 동결된 잎(약 0.5g)을 액체 질소 하에서 멸균 막자사발을 이용하여 균일하게 마쇄한 후 그 분말을 폴리프로필렌 관에 옮겨 미리 50℃가 되도록 가온한 TriZol(Life Technologies, Rockville, MD) 시약 5㎖를 가하였다. 이 균질화된 물질을 약 30초 동안 잘 혼합한 후 4℃에서 10분 동안 원심분리(10,000g)하여 식물 찌꺼기를 제거한 후 그 상층액에 클로로포름-이소아밀알콜(24:1)(chloroform-isoamylalcohol(24:1)) 2㎖를 넣고 혼합하고 4℃에서 10분 동안 원심분리하였다. 여기에 0.6배 분량의 이소프로판올(isopropanol)을 넣은 수용성 상태에서 4℃로 10분 동안 원심분리(10,000g)하여 전체 RNA는 침전시키고, 이 침전물을 70% 에탄올(ethanol)로 씻고 말린 다음 디에틸 피로카보네이트(diethyl pyrocarbonate)를 처리한 증류수의 적당한 양에 녹였다. 상기 TriZol 시약 제조사에서 제공된 지침에 따라 oligo$(dt)_{15}$ 프라이머 및 M-MLV 역전사효소(M-MLV reverse transcriptase, Promega)를 이용한 RNA 2㎍에서 1차 cDNA가 전사되었다. 태그 DNA 중합효소(Taq DNA polymerase) 1㎕가 존재하는 상태에서 전체 4㎕의 cDNA가 94℃(5분), 94℃(1분), 68℃(1분) 30회 반복, 72℃ 1분 및 최종 72℃(5분) 조건으로 PCR 증폭에 사용되었다. 음성 대조구로 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)(58℃, 25회 반복)가 이용되었다. 사용된 유전자 특이적 프라이머(specific primer)는 다음과 같고 증폭된 PCR 산물을 1.2% 한천겔로 분석하였다.

[0074] PDF1.2(At5g44420): 5'-AATGAGCTCTCATGGCTAAGTTTGCTTCC-3'; 5'-AATCCATGGAATACACACGATTTAGCACC-3'

[0075] PR-5(At1g75040): 5'-ATGGCAAATATCTCCAGTATTCACA-3'; 5'-ATGTCGGGGCAAGCCGCGTTGAGG-3'

[0076] 도 7은 YC6887 균주 처리 여부에 따른 애기장대의 방어 관련 유전자 발현을 설명하는 사진이다. 도 7에서 M은 균주 무처리구, B는 YC6887 균주 처리구, Avr은 비병원성균 접종 및 vr은 병원성균 접종을 의미한다.

[0077] 도 7을 참조하여 RT-PCR 분석 결과를 살펴보면, 먼저 *Pseudomonas syringae* 접종 24시간 후에 PR-5가 높은 농도로 국부적으로 축적되었음을 알 수 있다(도 7(a)). 이에 반하여, YC6887 균주를 토양에 처리한 후 병원균을 접종한 잎에서는 PR mRNA의 국부적 축적은 관찰되지 않았다.

[0078] 한편, 근권 세균 처리에 의한 유도저항성 발현은 자스모네이트(jasmonate)와 에틸렌(ethylene) 유도 과정과 연관되어 있음이 밝혀져 있으며, 이와 관련된 항진균 단백질(defensin) 유전자 PDF1.2의 발현이 자스모네이트(jasmonate)와 ACC에 의하여 유도된다.

[0079] 따라서, PDF1.2의 발현을 조사한 결과 YC6887 균주를 처리한 식물의 잎에서 PDF1.2의 발현 정도가 증가되는 것

이 관찰되었고(도 7(b)), 이는 YC6887 균주에 의한 유도저항성이 자스모네이트(jasmonate)와 에틸렌(ethylene) 경로를 거친다는 것을 나타낸다고 할 수 있다.

[0080] **[실시예 4] YC6887 균주의 식물 생장 촉진 효과 검증**

[0081] (1) YC6887 균주의 식물 생장 촉진 효과 조사

[0082] YC6887 균주의 식물 생장 촉진 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같이 애기장대와 고추를 이용하여 조사하였다.

[0083] 애기장대의 야생형인 Columbia(Col-0)와 고추 종자를 70% 에탄올(1분간)과 1% 차아염소산나트륨(NaOCl)(3분간)을 이용하여 표면 살균 후 살균된 증류수로 여러 번 씻었다. 애기장대는 휴면타파를 위하여 2일간 4℃에 넣어 둔 후 MS 배지에 심고 21℃ 항온기에서 12시간은 빛을 비추고 12시간은 어두운 상태로 재배하면서 식물 생장 촉진 정도를 조사하였다(비특허문헌 24 참조).

[0084] YC6887 균주는 marine broth(Difco)에서 30℃로 하루 밤 동안 진탕 배양하였고, 원심분리 후 세균 세포를 10mM $MgSO_4$ 용액에 현탁시키고 농도를 10^7 cfu/㎖로 조절하였다. 이후, 세균 균주 현탁액 100㎖를 121℃에서 30분간 살균된 육묘용 배양토 1kg과 골고루 혼합하였고, 세균으로 혼합된 토양(10^7 cfu/㎖ 토양)을 담은 포트에 2주간 자란 애기장대와 고추 묘를 이식하였다. 대조구는 같은 양의 10mM $MgSO_4$ 완충 용액만으로 혼합한 토양을 사용하였다. 접종 2주 후에 세균 밀도의 유지를 위하여 동일한 양의 세균 현탁액을 식물 뿌리 부분 토양에 다시 관주 처리하였다. 각 처리 당 20주의 식물을 사용하였고, 수확은 세균 처리 2주 후에 실시하였으며, 모든 시험은 2회 반복하였다.

[0085] 도 8은 YC6887 균주 처리 여부에 따른 고추와 애기장대에 대한 생장 촉진 효과를 비교한 사진이다.

[0086] 도 8을 참조하면, 고추의 경우 YC6887 균주 처리구(b)가 미처리구(a)에 비해 고추 뿌리와 줄기 길이 신장 효과가 있음을 알 수 있고, 애기장대의 경우 YC6887 균주 처리구(d)가 미처리구(c)에 비해 전체적인 식물 생장이 촉진되고 생육 표면적을 증가시킨 것을 알 수 있다.

[0087] (2) YC6887 균주의 식물 생장 촉진 관련 특성 조사

[0088] 상술한 YC6887 균주의 생장 촉진과 관련된 중요 특성을 알아보기 위하여, 하기와 같이 질산염 환원력, 철착염 화합물질 사이드로포어(siderophore) 생산능, 호르몬 생성, 무기 영양분 가용화 능력 등을 조사하였다.

[0089] 질산염 환원력은 미생물 실험법에 의한 방법을 이용하였다(비특허문헌 19 참조). 사이드로포어 생산 확인은 O-CAS 방법을 사용하여, YC6887 균주를 CAS 한천 배지에 접종하고 28℃에서 2~3일간 배양한 후 CAS 배양액 10㎖를 넣고 최대 30~50분이 지난 후 색깔 변화로 생산 여부를 확인하는 것으로 수행하였다. 식물 생장 호르몬인 인돌초산(indole-3-acetic acid, IAA) 생산을 확인하기 위하여 Gordon 분석 방법(colormetric)을 사용하였고(비특허문헌 25 참조), YC6887 균주의 무기 영양분 가용화 능력은 무기 인산염을 포함하는 배지(한천 15g, 포도당 10g, NH_4Cl 5g, NaCl 1g, $MgSO_4?7H_2O$ 1g, $Ca_3(HPO_4)$ 0.8g, 효모추출물 0.5g, pH 7.2)를 사용하여 인산염 용해 세균의 활력을 평가하되(비특허문헌 26 참조), 세균 균주를 3회 반복으로 접종하고 28℃에서 10~12일간 배양 후 세균 개체 주위에 뚜렷한 윤문을 형성하는 것으로 인산염의 용해를 확인하였다.

[0090] 조사 결과 YC6887 균주는 질산염 환원 작용을 하고 질소가 없는 배지에서도 생장이 가능하였으며, IAA를 생산하고 인산염을 가용화시킬 수 있는 것으로 나타났다. 그러나, YC6887 균주는 철착화합물인 사이드로포어는 생산하지 않는 것으로 나타났다. 이로부터 YC6887 균주가 고추 및 애기장대의 생장을 촉진시키는 것은 이 균주가 식물체의 뿌리 또는 근계에 살아서 호르몬인 IAA를 생산하고 인산염을 가용화한 것 때문으로 판단된다.

[0091] 또한, YC6887 균주가 질산염을 환원시킬 수 있고 질소가 없는 배지에서도 생장이 가능한 것을 알아내어, 후술하는 바와 같이 콩과 식물에서 질소 고정 능력이 있는지 조사하였다.

[0092] **[실시예 5] YC6887 균주의 질소 고정 효과 검증**

[0093] YC6887 균주가 콩과 식물에서 질소 고정을 하는지 알아보기 위하여, 하기와 같이 콩(*Glycine max*)에 균주를 처

리하여 뿌리혹 형성 여부와 혹 내에서 공생하는지 확인하였다.

[0094] 먼저, 콩 종자를 70% 에탄올(1분) 및 2% 차아염소산나트륨(NaOCl)(1분)에 처리하여 표면 살균 후 살균 증류수로 씻어 내고, 살균된 배양토가 들어 있는 작은 플라스틱 포트(36㎠)에 파종하여 2주 동안 온실에서 재배하였다. 이렇게 육묘된 콩 모종을 YC6887 균주 현탁액($2x10^7$cfu/㎖) 500㎖와 살균 토양 1kg을 잘 혼합하여 나누어 담은 포트(직경 12㎝)에 옮겨 심고 23~28℃의 식물배양기에서 재배하였고, 2~3주 동안 재배 후 콩이 생장하고 있는 포트에 균주 현탁액 30㎖를 다시 한 번 관주 처리하였다. 균 현탁액은 균 배양액의 원심분리 후 침전된 세포만을 수확하여 10mM $MgSO_4$ 용액으로 준비하였고 대조구는 $MgSO_4$만을 처리하였다. 이후 다시 2~3주 재배 후 콩 뿌리에서 혹 형성 정도를 관찰하였다.

[0095] 도 9는 YC6887 균주 처리에 의한 콩의 뿌리혹 형성을 나타낸 사진이다.

[0096] 도 9에 나타낸 바와 같이, YC6887 균주를 콩에 처리한 결과 놀랍게도 뿌리혹이 형성되는 것을 확인하였다(a). 또한, 혹 내부에 균주가 존재하는지 확인하기 위하여, *gfp* 표지 균주를 접종한 결과 뿌리혹 내부에서 형광을 포함한 세균 집락이 확인되어 YC6887 균주가 콩과 식물 내부에 공생하며 콩 뿌리에서 혹을 형성하도록 함으로써 질소 고정능이 있는 것을 확인하였다.

[0097] 상기 *gfp* 표지 균주를 이용한 실험에서 형광 플라스미드 pRK415-GFP의 준비와 YC6887 균주 삽입은 수용성(competent) 세포를 준비하여 Unge 등의 방법으로 전자천공(electroporation)하여 수행하였다(비특허문헌 27 및 28 참조). 수용성 세포(100㎕)를 얼음 위에 해동시키고 정제된 pRP-GFP 전달 플라스미드 200ng을 이 세포에 가하여 빨리 혼합하고, 혼합한 것을 얼음 위에서 15분 동안 배양한 후, 12.5kV, 200Ω 및 25㎌에 고정된 Gene Pulser Plus pulse controller(Bio-Rad, Richmond, Calif.)에 미리 살균하여 냉장시킨 큐벳(cuvette, 0.2㎝ interelectrode gap)에 옮겼다. 펄스에 따라 세포를 LB 배양액 1㎖에 즉시 희석하여 살균된 유리관에 옮기고 30℃에서 3~4시간 배양 후 각 유리관으로부터 100㎕를 취하여 테트라시클린(tetracycline) 함유 LB 한천 배지에 도말하였다. *gfp* 표지를 지닌 전환체는 테트라시클린 50㎍이 함유된 LB 한천 배지에서 배양 후 형광현미경(Olympus SZX12)을 이용하여 선발하였다.

[0098] **[실시예 6] YC6887 균주의 식물 내 집락 형성 조사**

[0099] YC6887 균주가 내생 균주이므로 다른 식물체 내에서도 생장이 가능한지 알아보기 위하여, 상기 실시예 5와 같이 표지로 형광유전자를 삽입한 YC6887 균주를 이용하여 담배 잎에서의 생장을 확인하였다.

[0100] *gfp*-YC6887 균주의 집락 형성을 위한 식물체로 담배를 사용하였는데, 담배 종자를 표면 살균 후 파종하여 포트에서 4주간 재배 후 형광 표지 균주를 잎에 접종하였다. 담배 잎 조직 한 부분에 균 현탁액 (10^7 cfu/㎖) 50㎕를 주사기로 침투시켜 접종하였으며, 접종시킨 후 온실에서 3일간 둔 후 접종 부위에서 3㎝ 부위의 잎을 절단하여 균 집락 형성 정도를 확인하였다. 생장 정도의 확인은 1㎝의 담배 잎 조각을 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 함유한 인산 완충액(10mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 150mM NaCl)에 4시간 동안 담구어 고정한 후 다시 완충액으로 씻어내고 공초점 레이저(confocal laser) 주사형광현미경으로 관찰하였다.

[0101] 도 10은 담배 잎 내부에서 YC6887 균주의 집락 형성을 나타낸 사진이다.

[0102] 도 10에 나타낸 바와 같이, 담배 잎의 절단 부위 세포 조직에서 전환체 세포 개체가 확실하게 관찰되었으며(a), 담배 잎의 세포내 공간에 집락 형성이 관찰되었다(b 및 c, 화살표 참조). 따라서, YC6887 균주는 최초 분리된 기주 식물이 아닌 다른 식물체 내에서도 생육이 가능한 것으로 확인되었다.

[0103] **[실시예 7] YC6887 균주의 제제화**

[0104] YC6887 균주의 활성과 보관 중 밀도 유지를 위하여, 하기와 같이 분말과 액제 형태로 제제화하였다.

[0105] 균주를 대형 발효기(1톤 이상)에서 배양하여 얻은 세균 배양액 또는 원심분리 후 얻은 균체를 카올린(kaolin), 벤토나이트(bentonite), 이탄(peat) 등의 점토 광물과 1:100으로 혼합하여 저온에서 말린 후 균일하게 분쇄하여 펠렛화함으로써 입제 또는 수화제로 제조하였다. 동시에 균 배양체를 상기 점토 광물과 1:100으로 혼합하여 액제 현탁액 형태로도 제조하였다.

수탁번호

[0106]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11156P

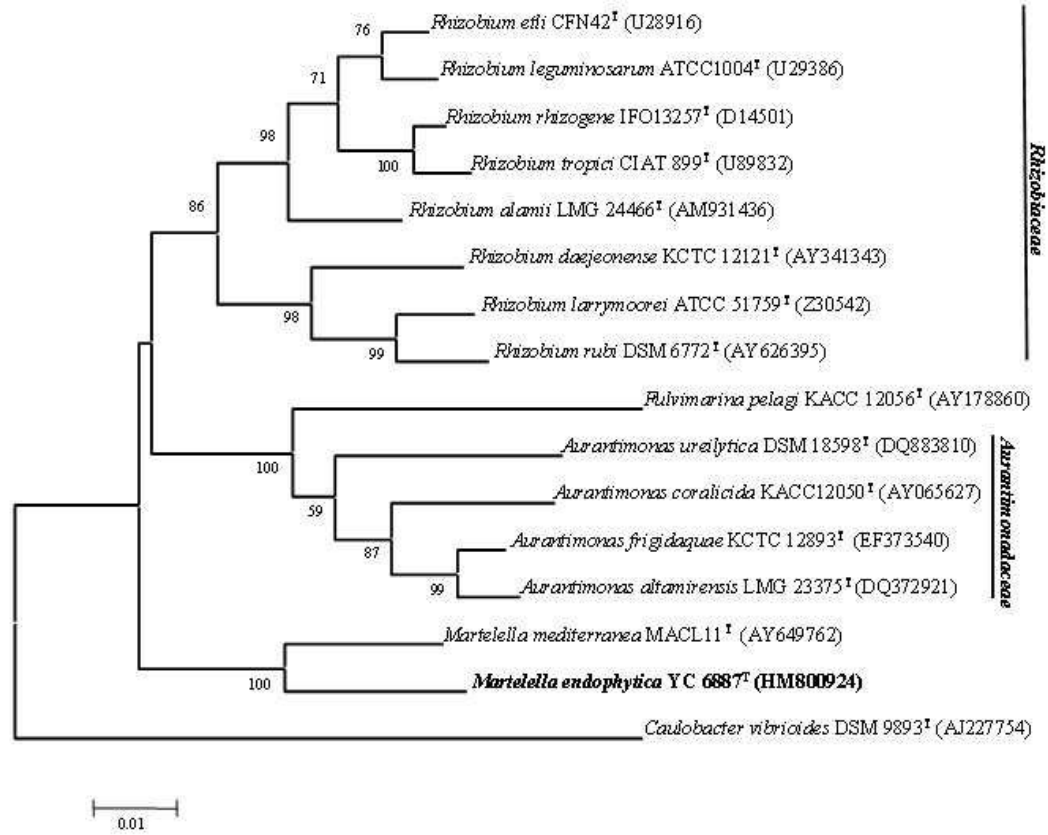
수탁일자 : 20101228

도면

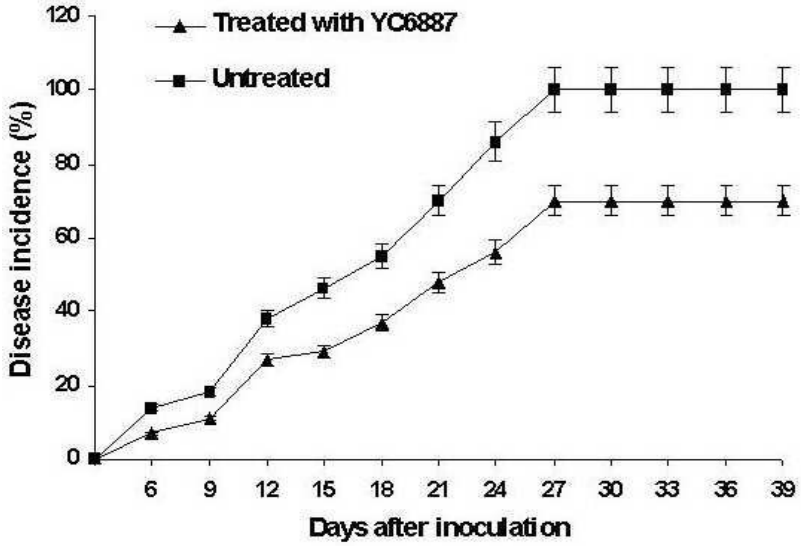
도면1

TCATTCAACTTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
CCTTCGGGATAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCTTTTGGTACGGAATAGCTCCGGGAAACTG
GAATTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGCCAAGAGATGAGCCCGCGTTTGATTAGGTAGTTG
GTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCGACGATCAATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACA
CGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCCGGTGAAGATAATGACTGTAGCCGGTAAAGAAGCCCC
GGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAACTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTG
AGTATGGAAGAGGTAAGTGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGATAGCTAGCCGTCGGGTTGCATGCAATTCGGTGGCGCAGTTAACGCATTAAGCTATCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGTGCTACCTGGAGAGATCCAGGGTTCCTTC
GGGACGCCAGGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTCGCCCCTAGTTGCCAGCATTTGGTTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCA
GCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAA
GTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGAAGGCGCTGCGCTAACCGCAAGGGGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGCGA
CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAGCG

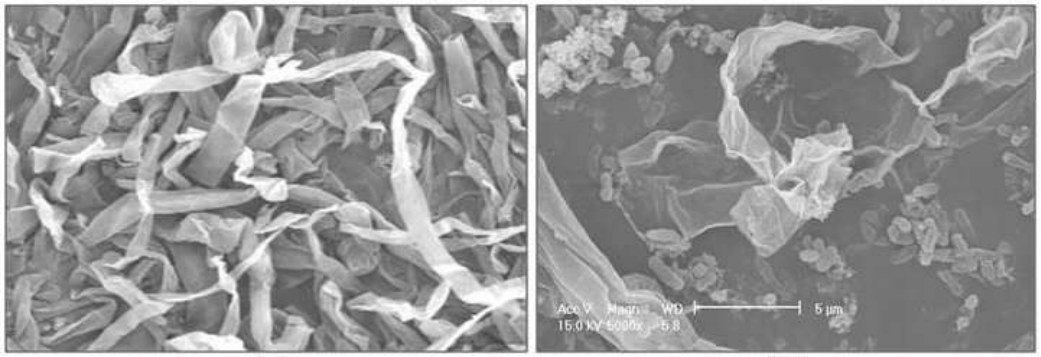
도면2


Rhizobium etli CFN42T (U28916)
Rhizobium leguminosarum ATCC10004T (U29386)
Rhizobium rhizogene IFO13257T (D14501)
Rhizobium tropici CIAT 899T (U89832)
Rhizobium alamii LMG 24466T (AM931436)
Rhizobium daejeonense KCTC 12121T (AY341343)
Rhizobium larrymoorei ATCC 51759T (Z30542)
Rhizobium rubi DSM 6772T (AY626395)
Rhizobiaceae
Fulvimarina pelagi KACC 12056T (AY178860)
Aurantimonas ureilytica DSM 18598T (DQ883810)
Aurantimonas coralicida KACC12050T (AY065627)
Aurantimonas frigidaquae KCTC 12893T (EF373540)
Aurantimonas altamirensis LMG 23375T (DQ372921)
Aurantimonadaceae
Martelella mediterranea MACL11T (AY649762)
Martelella endophytica YC 6887T (HM800924)
Caulobacter vibrioides DSM 9893T (AJ227754)
76
71
98
100
86
98
99
100
59
87
99
100
0.01

도면3


Treated with YC6887
Untreated
Disease incidence (%)
120
100
80
60
40
20
0
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
36
39
Days after inoculation

도면4



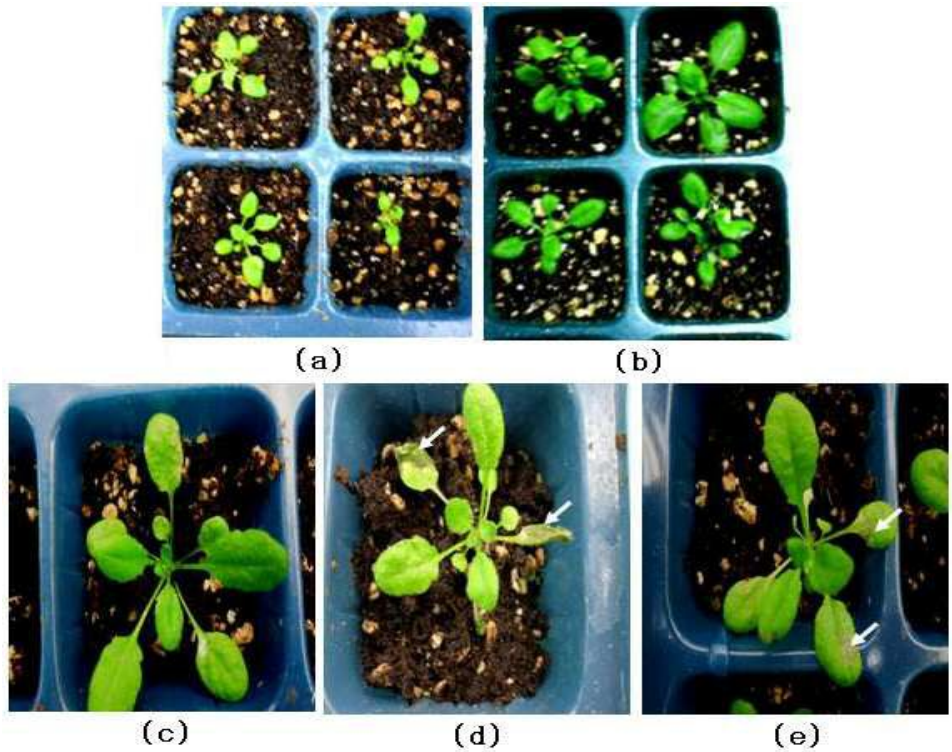
(a) (b)

도면5



(a) (b) (c)

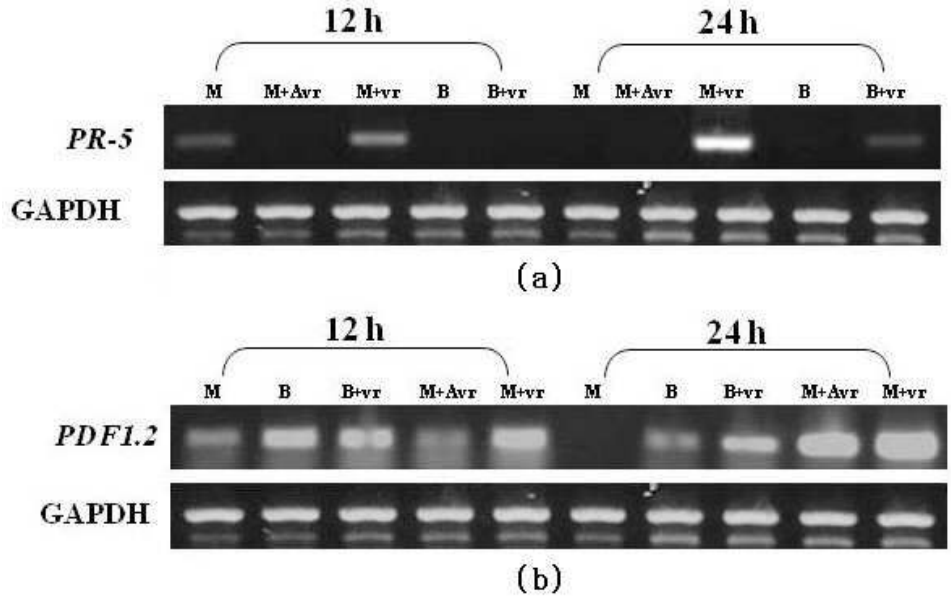
도면6



(a) (b)

(c) (d) (e)

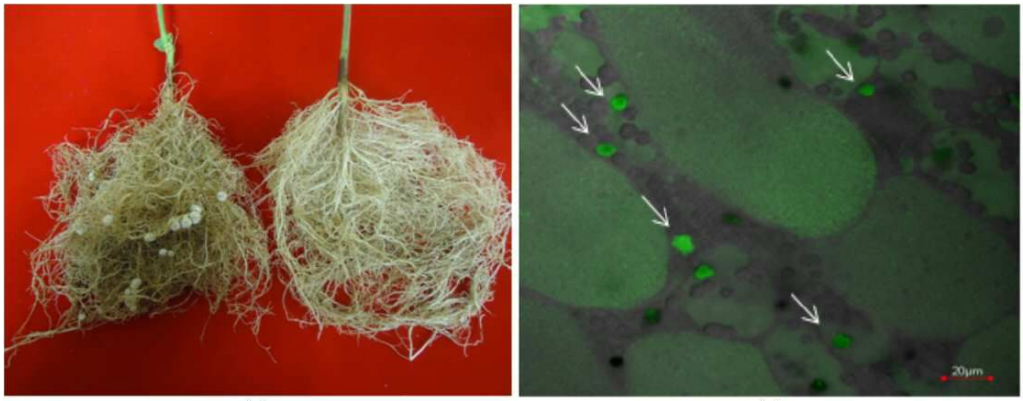
도면7



도면8

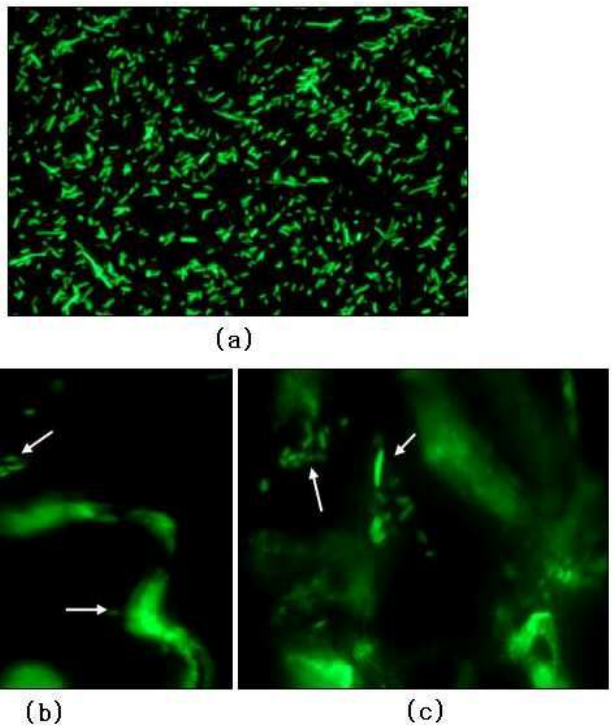


도면9



(a) (b)

도면10



(a)

(b) (c)

서 열 목 록

<110> Jgreen Inc.

INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Martelella endophytica YC6887 having biocontrol activity of plant diseases and nitrogen fixation effect and bacterial inoculant containing the same

<130> NP11-01005

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1495

<212> RNA

<213> Martelella endophytica

<400> 1

tcattcaact tgagagtttg atcctggctc aggacgaacg ctggcggcag gcttaacaca 60

tgcaagtcga acgatccttc gggatagtgg cagacgggtg agtaacgcgt gggaatctac 120

cttttggtac ggaatagctc cgggaaactg gaattaatac cgtatgtgtc cttcgggaga 180

aagatttatc gccaagagat gagcccgcgt ttgattaggt agttggtggg gtaatggcct 240

accaagccga cgatcaatag ctggtctgag aggatgatca gccacattgg gactgagaca 300

cggcccaaac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg gacaatgggc gcaagcctga 360

tccagccatg ccgcgtgagt gatgaaggcc ctagggttgt aaagctcttt cgccggtgaa 420

gataatgact gtagccggta aagaagcccc ggctaacttc gtgccagcag ccgcggtaat 480

acgaaggggg ctagcgttgt tcggaattac tgggcgtaaa gcgcacgtag gcggacattt 540

aagtcagggg tgaaatccca gagctcaact ctggaactgc ctttgatact gggtgtcttg 600

agtatggaag aggtaagtgg aattgcgagt gtagaggtga aattcgtaga tattcgcagg 660

aacaccagtg gcgaaggcgg cttactggtc cattactgac gctgaggtgc gaaagcgtgg 720

ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacgatgata gctagccgtc 780

gggttgcatg caattcggtg gcgcagttaa cgcattaagc tatccgcctg gggagtacgg 840

tcgcaagatt aaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt 900

ttaattcgaa gcaacgcgca gaaccttacc agcccttgac atttggtgct acctggagag 960

atccagggtt ccttcgggac gccaggacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg 1020

tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg cccctagttg ccagcatttg 1080

gttgggcact ctaggggggac tgccggtgat aagccgagag gaaggtgggg atgacgtcaa 1140

gtcctcatgg cccttacggg ctgggctaca cacgtgctac aatggtggtg acagtgggca 1200

gcgagcacgc gagtgtgagc taatctccaa aagccatctc agttcggatt gttctctgca 1260

actcgagagc atgaagttgg aatcgctagt aatcgcggat cagcatgccg cggtgaatac 1320

gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gttggttcta cccgaaggcg 1380

ctgcgctaac cgcaaggggg caggcgacca cggtagggtc agcgactggg gtgaagtcgt 1440

aacaaggtag ccgtagggga acctgcggct ggatcacctc ctttctaagg aagcg 1495