(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0085026
(43) 공개일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01) *A01G 22/35* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
A01G 22/35 (2018.02)
(21) 출원번호 10-2019-0177629
(22) 출원일자 2019년12월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
한방바이오 주식회사
경기도 용인시 기흥구 흥덕1로 13, 피동 138,139,140호(영덕동, 흥덕아이티밸리)
(72) 발명자
양덕춘
경기도 용인시 기흥구 탑실로 15 공세동 대주피오레 아파트 104동 803호(공세동, 탑실마을 대주피오레1단지)
김연주
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 애지원 인삼소재은행 (서천동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한일

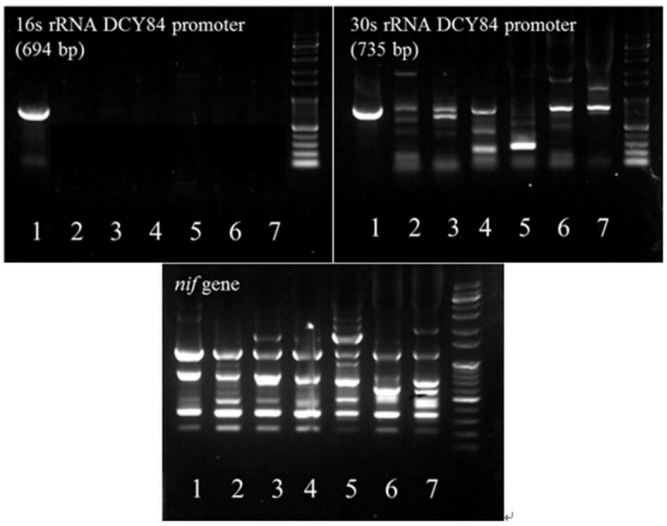
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **인삼특이적 식물생장촉진근권세균 검출방법**

(57) 요 약

본 발명은 식물생장촉진근권세균의 일종인 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 키트, 상기 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 검출하는 방법 및 상기 방법으로 확인된 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 포함하는 토양에서 인삼을 재배하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출방법을 이용하면, *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주가 포함되어 인삼의 재배에 유리한 토양을 선별할 수 있으므로, 보다 효과적인 인삼재배에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2531/113 (2013.01)
(72) 발명자
조한 수퀴나디
경기도 수원시 영통구 덕영대로 1731 애지원 한방 바이오 연구실
양동욱
경기도 용인시 기흥구 탑실로 15 104동 1405호(공세동, 탑실마을대주피오레1단지아파트)
안종찬
충청북도 충주시 대소원면 대소원3길 28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	317007-3
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발사업
연구과제명	인삼 뿌리썩음병 길항미생물제제 및 방제기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2017.04.21 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

P. yonginensis DCY84^{T} 균주의 유전자를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 서열번호 1 및 2의 프라이머 염기쌍 및 서열번호 3의 프로브 염기서열을 포함하는, *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 조성물.

청구항 2

제1항의 조성물을 포함하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 키트.

청구항 3

(a) 토양시료로부터 분리된 미생물로부터 DNA를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 수득한 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 프라이머 염기쌍을 사용한 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 증폭산물을 확인하는 단계를 포함하는, *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주의 검출방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 (b) 단계의 증폭산물이 확인되는 경우, 상기 토양시료에 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주가 포함된 것으로 판정하는 것인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 (b) 단계의 증폭산물이 확인되지 않는 경우, 상기 토양시료에 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주가 포함되지 않는 것으로 판정하는 것인, 방법.

청구항 6

(a) 토양시료로부터 분리된 미생물로부터 DNA를 수득하는 단계;

(b) 상기 수득한 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 프라이머 염기쌍을 사용한 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 증폭산물을 확인된 토양시료를 선별하는 단계; 및,

(c) 상기 선별된 토양시료가 유래된 토양에서 인삼을 재배하는 단계를 포함하는, 인삼의 재배방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인삼특이적 식물생장촉진근권세균 검출방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로, 본 발명은 인삼 특이

적인 식물생장촉진근권세균인 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 키트, 상기 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 검출하는 방법 및 상기 방법으로 확인된 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 포함하는 토양에서 인삼을 재배하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 한국 인삼(Panax ginseng Meyer, Araliaceae)은 두릅나무과에 속하며 약용작물로의 가치가 높기 때문에 중국, 일본, 대만 등 아시아 국가 들에서 주로 재배되고 있는데, 최근에는 인삼의 약용 가치가 널리 알려져서 미국과 캐나다 등 북아메리카 인근 지역 에서도 약용작물로서 재배되고 있다. 인삼의 재배는 4-6년간 재배되기 때문에 각 생육 단계와 잎, 줄기 및 뿌리에 이르기까지 모든 생육기관에서 많은 병들이 발생하고, 인삼 재배 포장과정에서 뇌두와 뿌리에 발생하는 부패병이 발생함에 따라 품질 저하와 수량이 현저히 감소되고 있다. 이렇듯 인삼 재배농가 연작장해를 겪는 원인으로 토양 내 축적되어 있는 고농도의 염류들로 인해 인삼을 연작할수록 인삼생육이 저해되고 뿌리썩음병균등에 의한 감염 확률이 높아진다는 문제점이 대두되고 있다. 이를 방지하기 위하여, 인삼 연작장해에 대응하는 경종적 방법, 물리 화학적방법, 생물학적 방법 등이 사용되고 있으나, 이들 방법의 효율이 낮기 때문에, 보다 효과적인 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0003] 한편, 식물생장촉진근권세균(Plant-growth-promoting rhizobacteria, PGPR)이라고 알려진 Rhizobacteria는 식물에 직접 또는 간접적으로 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, rhizobacteria는 영양분과 호르몬을 공급하고, 중금속 독성을 줄이기 위해 사이드로 포어를 생성하며, 전신 저항(inducing systemic resistance, ISR)을 유도하여 식물의 성장을 증가시킬 수 있다. 이에 따라, 인삼의 재배에도 적용할 수 있는 PGPR를 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행한 결과, 인삼의 생육을 촉진시킬 수 있는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주가 확인되었다. 그러나, 상기 확인된 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주는 모든 토양에 존재하는 것이 아니므로, 상기 균주가 존재하는 토양을 선별하는 작업이 우선되어야 하지만, 이러한 선별을 효과적으로 수행하는 방법이 개발되어 있지 않다는 단점이 있다.

[0004] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 토양에서 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 효과적으로 검출하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주로부터 유래된 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 염기쌍 및 프로브를 개발하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제101720658호, 신규한 식물 생장 촉진 미생물 및 이의 용도

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제101862362호, 규산 또는 이의 염 및 미생물이 처리된 식물 종자 및 이의 용도

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 주된 목적은 식물생장촉진근권세균의 일종인 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 확인된 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 포함하는 토양에서 인삼을 재배하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시양태는 식물생장촉진근권세균의 일종인 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 조성물을 제공한다.

[0011] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 조성물은 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주의 16S rRNA를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 서열번호 1 및 2의 프라이머 염기쌍 및 서열번호 3의 프로브 염기서열을 포함한다.

[0012] DCY84 F: 5'-TGCGGCCCGCAAAGTTCAA-3'(서열번호 1)

[0013] DCY84 R: 5'-TCGTCAATCAACACGCCGAT-3'(서열번호 2)

[0014] DCY84 probe: 5'-TCCTTCGGAACGATTTAACACTACCGGATCT-3'(서열번호 3)

[0015] 본 발명의 다른 실시양태는 상기 조성물을 포함하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출용 키트를 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 검출하는 방법을 제공한다.

[0017] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주의 검출방법은 (a) 토양시료로부터 분리된 미생물로부터 DNA를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 수득한 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 프라이머 염기쌍을 사용한 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 증폭산물을 확인하는 단계를 포함한다.

[0018] 상기 방법을 통해 증폭산물이 얻어진 경우, 토양시료에 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주가 존재하는 것으로 판정할 수 있는 반면, 상기 방법을 통해 증폭산물이 얻어지지 않은 경우, 토양시료에 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주가 존재하지 않는 것으로 판정할 수 있다.

[0019] 상기 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주는 인삼의 생장을 촉진시킬 수 있으므로, 상기 균주가 존재하는 토양에서 인삼을 재배하면, 인삼의 생산성을 향상시킬 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 방법으로 확인된 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 포함하는 토양에서 인삼을 재배하는 방법을 제공하는 것이다.

[0021] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 인삼의 재배방법은 (a) 토양시료로부터 분리된 미생물로부터 DNA를 수득하는 단계; (b) 상기 수득한 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 프라이머 염기쌍을 사용한 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 증폭산물을 확인된 토양시료를 선별하는 단계; 및, (c) 상기 선별된 토양시료가 유래된 토양에서 인삼을 재배하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에서 제공하는 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주 검출방법을 이용하면, *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주가 포함되어 인삼의 재배에 유리한 토양을 선별할 수 있으므로, 보다 효과적인 인삼재배에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에서 제공하는 프라이머 염기쌍을 이용한 PCR을 수행하여, 다양한 균주의 16S rRNA를 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동 사진으로서, 1번 레인은 *P. yonginensis* DCY84^{T} 균주를 나타내고; 2번 레인은 *P. phoenicis* NBRC 106274^{T} 균주를 나타내며; 3번 레인은 *P. timonensis* KACC 11491^{T} 균주를 나타내고; 4번 레인은 *P. barengoltzii* NBRC 106274^{T} 균주를 나타내며; 5번 레인은 *Sphingomonas asaccharolytica* NBRC 15499^{T} 균주를 나타내고; 6번 레인은 *S. panaciterrae* DCY91^{T} 균주를 나타내며; 7번 레인은 *Burkholderia ginsengiterrae* DCY85-1^{T} 균주를 나타낸다.

도 2는 본 발명에서 제공하는 프라이머 염기쌍의 특이도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하

기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0025] **실시예 1: *P. yonginensis* DCY84^T 균주 특이적 프라이머 염기쌍 및 프로브의 제작**

[0026] *P. yonginensis* DCY84^T 균주를 검출하기 위하여, 상기 균주의 유전자를 특이적으로 증폭시키는 프라이머 염기쌍(서열번호 1 및 2) 및 상기 균주의 유전자와 특이적으로 결합하는 프로브(서열번호 3)를 각각 제작하였다.

[0027] DCY84 F: 5'-TGCGGCCCGCAAAGTTCAA-3'(서열번호 1)

[0028] DCY84 R: 5'-TCGTCAATCAACACGCCGAT-3'(서열번호 2)

[0029] DCY84 probe: 5'-TCCTTCGGAACGATTTAACACTACCGGATCT-3'(서열번호 3)

[0030] **실시예 2: *P. yonginensis* DCY84^T 균주의 검출**

[0031] 상기 실시예 1에서 제조한 프라이머 염기쌍을 이용한 PCR 방법으로 다양한 균주(*P. yonginensis* DCY84^T; *P. phoenicis* NBRC 106274^T; *P. timonensis* KACC 11491^T; *P. barengoltzii* NBRC 106274^T; *Sphingomonas asaccharolytica* NBRC 15499^T; *S. panaciterrae* DCY91^T; *Burkholderia ginsengiterrae* DCY85-1^T)로부터 유래된 각각의 16S rRNA를 증폭시키고, 16S 와 30S rRNA 프로모터로부터 디자인된 프라이머를 이용한 PCR 결과와 비교하였다(도 1). 이때, 대조군으로는 nifH 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 사용하여 수행한 PCR 결과를 사용하고, 비교군으로는 P. yonginensis DCY84^T 균주의 30S rRNA를 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 사용하여 수행한 PCR 결과를 사용하였다.

[0032] 도 1은 본 발명에서 제공하는 프라이머 염기쌍을 이용한 PCR을 수행하여, 다양한 균주의 16S rRNA를 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동 사진으로서, 1번 레인은 *P. yonginensis* DCY84^T 균주를 나타내고; 2번 레인은 *P. phoenicis* NBRC 106274^T 균주를 나타내며; 3번 레인은 *P. timonensis* KACC 11491^T 균주를 나타내고; 4번 레인은 *P. barengoltzii* NBRC 106274^T 균주를 나타내며; 5번 레인은 *Sphingomonas asaccharolytica* NBRC 15499^T 균주를 나타내고; 6번 레인은 *S. panaciterrae* DCY91^T 균주를 나타내며; 7번 레인은 *Burkholderia ginsengiterrae* DCY85-1^T 균주를 나타낸다.

[0033] 도 1에서 보듯이, 16S rRNA를 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 사용할 경우, *P. yonginensis* DCY84^T 균주를 특이적으로 검출할 수 있었으나, 대조군으로 사용된 nifH 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머와 비교군으로 사용된 30S rRNA를 증폭시키는 프라이머를 사용할 경우, *P. yonginensis* DCY84^T 균주를 특이적으로 검출할 수 없음을 확인하였다.

[0034] **실시예 3: 프라이머의 특이도 분석**

[0035] *P. yonginensis* DCY84^T 균주의 유전자에 대한, 상기 실시예 1에서 제조한 프라이머 염기쌍의 특이도를 확인하기 위하여, qRT-PCR 후 과정에 대한 융용곡선(해리곡선)을 분석하였다(도 2).

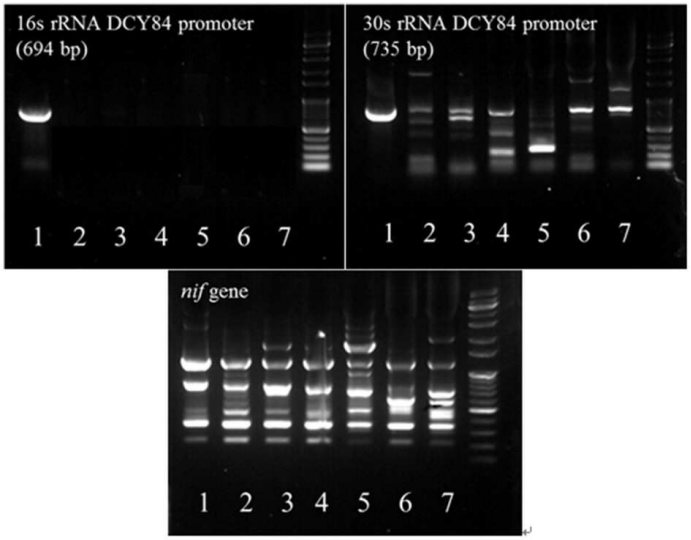
[0036] 도 2는 본 발명에서 제공하는 프라이머 염기쌍의 특이도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0037] 도 2에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 프라이머 염기쌍은 16S RNA 프로모터 영역에 대하여 85℃의 융용곡선(해리곡선)을을 나타내므로, *P. yonginensis* DCY84^T 균주의 유전자에 대하여 특이도를 나타냄을 알 수 있었다.

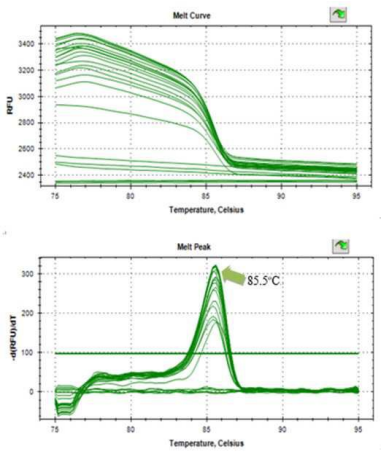
[0038] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

HANBANG BIO

<120> Method for detection Plant-growth-promoting rhizobacteria for Panax ginseng

<130> KPA191677-KR

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

tgcggcccgc aaagttcaa 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tcgtcaatca acacgccgat 20

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 3

tccttcggaa cgatttaaca ctaccggatc t 31