

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0116244 (43) 공개일자 2009년11월11일
(51) Int. Cl. <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12N 1/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0042071 (22) 출원일자 2008년05월06일 심사청구일자 2008년05월06일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내 (72) 발명자 김기덕 서울특별시 노원구 공릉1동 573-1 대주파크빌 101-507 상미경 서울특별시 관악구 신림1동 414-10 (74) 대리인 김선애	

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내는 토양 근권세균라이조박터 엔지모제네스 균주 I S E 1 3

(57) 요약

본 발명은 파이토프토라 캡시시(*Phytophthora capsici*)에 의한 고추 역병에 대해 뛰어난 생물적 방제 효과가 있는 친환경적 생물적 방제균인 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13, 이를 이용한 식물병 방제용 살균제 및 식물병 방제방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 친환경적으로 포장에서도 고추 역병을 우수하게 방제할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1a

```

CATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAG
TGGCGGACGGGTGAGGAATACGTGGAATCTGCCTATTTGTGGGGGATA
ACGTAGGGAACCTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGTGG
GGGACCGCAAGGCTCACGCAGATAGATGAGCCGACCTCGGATTAGCTA
GTTGGCGGGTAAAGGCCCAAGGCGACGATCCGATGCTGCTGAG
AGGATGATCAGCCACACTGGAATGAGACACGCTCCAGACTCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTGGACAATGGCGCAAGCCGATCCAGCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTTCGGGAA
AGAAAAGCTTAGGGTTAATAACCTTGAGTCATGACGGTACCGGAAGAATA
AGCACCGGCTAATCTGTCAGCAGCGCGGTAAATACGAAGGGTGCA
CGTTACTCGGAATTAAGGCGTAAGCGCTGCTAGGTGTTGTTTAAAG
TCTGATGTGAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATGGCAATGGAACTGGC
TTACTAGAGTGCGGTAGAGGGTAGCGGAATTCGGGTGATGACAGTGAAT
GCGTAGATCGGGAGGAACATCTGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCA
GCACTGACACTGAGGCACGAAAGCTGGGGAGCAACAGGATTAGATAC
CTGTGATGCCACGCCCTAAACGATGCGCAACTGGATGTTGGGGCAACTT
GGCCCTCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTGCCGCTGGGAAGTACG
GTGCGAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGGCACAGCGGT
GGAATATGTGGTTTAAATCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT
ACATGTCGAGAACTTCCAGAGATGGATTGTGCTTCGGGAACCTCGAAC
ACAGGTGCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTATGTTCCAGCACGTAATGGTG
GGAACCTAAGGAGACCGCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCAGGGCTACACAGTACTACAATG
GTAGGGACAGAGGCTGCAAAACCGCGAGGGCAAGCCAATCCAGAAAC
CCTATCTCAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTGCACTCCTGAAAGTCCGAA
TCGCTAGTAATCGCAGATCAGATTGCTGCGGTGAATACGTTCCGGGGCC
TTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAGTTTGTTCACACAGAAGCAGG
TAGCTTAACCTTCGGGAGGCGCTGC

```

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0604011

부처명 농림기술관리센터

연구사업명 농림수산특정연구개발사업

연구과제명 (총괄)내생, 근권세균을 이용한 환경친화적 고추역병 방제용미생물살균제 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2005년 04월 25일 ~ 2008년 04월 24일

특허청구의 범위

청구항 1

식물 병원균에 길항 효과를 가지는 라이조박터 엔지모제네스 균주 ISE13 (*Lysobacter enzymogenes* strain ISE13; 기탁번호 KACC 91369P).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물 병원균은 파이토프소라 캡시시(*Phytophthora capsici*)인 것을 특징으로 하는 라이조박터 엔지모제네스 균주 ISE13.

청구항 3

제1항 기재의 균주 또는 이 균주의 배양여액을 포함하는 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 살균제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 식물병은 파이토프소라 캡시시(*Phytophthora capsici*)에 의해 발생하는 식물병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 살균제.

청구항 5

제1항 기재의 균주 또는 이 균주의 배양여액을 포함하는 살균제를 식물에 처리하여 식물병을 방제하는 식물병 방제방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물병은 파이토프소라 캡시시(*Phytophthora capsici*)에 의해 발생하는 식물병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내는 토양 근권세균 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 고추 생산에 심각한 피해를 야기하는 파이토프토라 캡시시(*Phytophthora capsici*)에 의한 고추 역병을 포함한 식물병에 대해 뛰어난 생물적 방제 효과가 있는 친환경 경적 생물적 방제균인 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13, 이를 이용한 식물병 방제용 살균제 및 식물병 방제방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 현대 농업은 작물을 병으로부터 보호하기 위해 유기합성의 농용 살균제 사용에 의존하고 있는데, 이러한 농용 살균제들은 현재로서는 안정적인 농업생산을 위해서 계속적인 사용이 불가피하나, 맹독성, 약제 저항성을 가진 병원균 균주의 출현 및 토양 내 농약 잔류 등 인간 및 환경에 대한 부작용이 심각한 수준에 이르러 사회문제를 유발하고 있는 실정이다.
- <3> 이러한 이유로 국내외 많은 연구자들이 새롭고 인간과 환경에 안전한 미생물 농약을 개발하고자 노력하고 있다. 그러나, 실험실의 제한된 조건에서 선발된 길항 능력이 있는 미생물은 실제 포장에서는 정착하여 생존하지 못하고, 실험실의 제한된 조건에서만 길항 세균을 선발하기 때문에 길항효과를 발휘하지 못하는 경우가 매우 많다.
- <4> 특히 외국에서 우수한 효과를 갖는 길항 미생물이 실제 우리나라에서는 효과를 발휘하지 못하는 경우가 있는데, 이 또한 수입된 길항 미생물과 우리나라의 환경이 서로 맞지 않아서 근권에서의 정착과 생존이 어렵고 길항 효과를 발휘하지 못하기 때문이다. 그리고 생물적 방제제를 위하여 길항 미생물을 적용할 경우 주로 균주가 분비하는 항생물질에 의존하는 경향이 있으므로 포장과 같은 다양한 환경 조건에서도 제한된 실험실 조건과 동일한 병억제 효과를 가지는 경우가 많지 않다. 그러므로 우리나라 환경에 적응하여 토착적으로 존재하고 있는 다양한

병 억제 기작을 가지고 있는 미생물을 이용하는 것이 바람직하다.

- <5> 국내 연구기관들이 선진 외국처럼 세균, 진균 등을 사용하여 식물병 방제를 위한 길항미생물 탐색 및 실용화 연구를 하고 있으나 여전히 기초단계의 연구를 수행하고 있으며, 작물재배에서 길항미생물을 이용한 식물병 방제에 대한 연구는 대학교, 농업관련 국가연구소, 정부출연연구소 등을 중심으로 추진되고 있으나, 아직 국내 연구인력 및 기술 축적이 외국만큼 충분하지 않고 국내 재배여건에 적용되어 작물생산에 효과 있는 농용 생물농약의 사용 및 실용화는 미미한 실정이다.
- <6> 한편, 고추는 지난 약 400년 전에 우리나라에 도입된 후에 전통적으로 중요한 식품 중 하나로써 고추와 고추 부산물을 이용한 식품도 지속적으로 증가하고 있으며, 우리나라에서 2005년도 기준으로 전체 채소 재배 면적의 약 24%를 차지하며, 조미 채소류 재배 면적에서는 약 49%를 차지한다. 또한 농가 소득기여도가 연간 8,500억원 이상으로 농가 경제의 주요작물 중 하나이다. 그러나 고추 재배에 있어서 고추 역병, 탄저병, 세균성 점무늬병이 심각한 피해를 야기하는데, 특히 고추 역병은 2006년에는 고추 생산량의 약 25%의 수량을 감소시키는 피해를 주었다.
- <7> 고추 재배시 상기와 같이 가장 큰 경제적 손실을 일으키는 역병을 방제하기 위해, 주로 과도한 양의 유기 합성 농약에 의존하고 있다. 상술한 바와 같이 이러한 유기 합성 농약의 오남용으로 인하여 저항성 균주의 출현, 오존층의 파괴, 토양과 작물내의 잔류 등의 문제가 야기되고 있으며 이를 대체하기 위하여 길항 미생물을 이용한 생물적 방제 등의 많은 연구들이 진행되어 오고 있지만, 아직까지 국내외적으로 고추 역병에 대한 효과적인 길항 미생물의 확보는 미미한 실정이며, 이에 따라 고추 역병에 대한 생물적 방제가 이루어지지 않고 있다.
- <8> 특히 최근에 환경 보전적 지속 농업과 무농약 고부가가치 산업과 관련하여 고추 역병의 생물적 방제 연구가 집중적으로 수행되어야 할 필요가 있지만, 아직까지 포장 조건 아래에서도 기존의 농용 살균제와 비교하여 실제 길항 효과를 갖는 길항 미생물의 확보는 미미한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <9> 따라서 본 발명은 고추 역병을 포함한 식물병을 친환경적으로 방제하기 위하여 근권토양으로 분리한 세균 중 포장에서도 길항 효과가 우수한 근권세균 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <10> 또한, 본 발명의 목적은 상기 근권세균 균주를 이용하여 고추 역병을 포함한 식물병에 사용될 수 있는 무독성이고 친환경적인 미생물 살균제 및 식물병 방제방법을 제공하는 것이다.
- <11> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

- <12> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 우리나라 토양으로부터 신규의 토양 근권세균 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13를 분리하고, 이 균주가 실험실 조건뿐만 아니라 포장에서도 고추 역병 억제효과가 뛰어나고 토착 미생물에도 영향을 주지 않는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- <13> 따라서, 본 발명은 고추 역병균을 포함한 식물병원균에 대한 길항 효과를 나타내는 라이조박터 엔지모제네스 균주 ISE13 (*Lysobacter enzymogenes* strain ISE13; 기탁번호 KACC 91369P)를 제공한다.
- <14> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 신규의 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13 또는 이 균주의 배양여액을 함유하는 고추 역병을 포함하는 식물병 방제에 사용될 수 있는 무독성이고 친환경적인 살균제를 제공한다.
- <15> 또한 본 발명은 상기 신규의 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13 또는 이 균주의 배양여액을 이용하여 고추 역병을 포함하는 식물병을 방제하는 방법도 제공한다.
- <16> 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- <17> 본 발명자들은 고추 역병을 포함한 식물병에 대한 길항 효과를 가지는 토양 근권세균을 선별하여 확보하기 위하여 전국의 다양한 작물의 근권 토양을 수집하여, 그 중 ISE13 균주를 확보하였다.
- <18> 본 발명에 의한 ISE13 균주는 오이의 근권토양에서 분리한 우리나라의 토양 환경에서 수집된 자원으로써, 고추의 종자 유근(radicle), 유묘(seedling)와 성체식물(plant)에서의 순차적 검증에서 뛰어난 고추 역병 억제 효과

가 있었다(표 1 내지 표 4 참조). 또한 본 발명에 의한 근권세균 ISE13 균주는 다양한 처리에 의한 3년 동안의 포장검증에서도 매우 안정적으로 고추 역병을 억제하였으며, 토착 미생물 (total population)에는 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다(표 5 내지 표 9 참조).

- <19> 본 발명에 의한 ISE13 균주는 16S rRNA 서열 분석, 형태학적 특성 등을 통해 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*)에 속하는 신균주로 동정되었고, 라이조박터 엔지모제네스 균주 ISE13라 명명되고 기탁되었다(기탁번호 KACC 91369P).
- <20> 보다 구체적으로 본 발명에 의한 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13는 16S rRNA 염기서열(서열번호 1)을 분석한 결과 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*)와 99%의 상동성을 보였다(도 1a 및 도 1b 참조).
- <21> 또한 본 발명에 의한 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13는 긴 간상형의 세균으로 양쪽 끝부분에 편모가 있으며(도 2 참조), 96종류의 당 이용 능력을 조사해 본 결과 그 결과 ISE13 균주는 당이용 능력에서 포토박테리움 로지(*Photobacterium logei*)와 가장 유사한 것으로 확인되었다(도 3 참조).
- <22> 나아가 본 발명에 의한 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13는 지방산(fatty acid methyl ester, FAME) 분석 결과 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*)와 가장 유의적인 것으로 확인되었다(도 4).
- <23> 종합적으로 16S rRNA 분석, 전자현미경에 의한 형태적 관찰, 세균의 지방산 분석을 통하여 본 발명에 의한 ISE13 균주는 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*)에 속하는 새로운 균주인 것으로 확인되었다(도 1a ~ 도 4).
- <24> 본 발명에 의한 분리된 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13 및 이 균주의 배양여액은 모두 천연 유래의 물질로서, 자연 환경에서 미생물에 의해 쉽게 분해될 수 있는 물질이다. 따라서 본 발명에 의한 균주 및 배양여액은 단독 또는 본 발명에 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 충전제 등을 혼합하여 무공해, 친환경 식물병 방제용 살균제 조성물로 제조될 수 있어, 고추 역병 등 식물병 방제에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

<25>

효 과

- <26> 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13는 우리나라 토양 근권세균으로서 포장에서도 고추 역병에 대하여 뛰어난 병억제 효과를 나타내기 때문에 기존에 사용하였던 농용살균제의 사용량을 감소시킬 수 있는 효과를 도모할 수 있을 것이다.
- <27> 또한, 본 발명에 의한 ISE13 균주는 이 균주의 토양 처리에 의하여 토양 미생물의 수에 영향을 주지 않기 때문에 친환경적 생물적 방제제로써 생물 농약 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <28> 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- <29> [실시예 1] 고추 역병에 대한 길항 토양 근권세균 ISE13 균주의 분리
- <30> 고추 역병에 대한 길항 근권세균을 선별하기 위하여, 본 발명은 표 1에서 표기한 것과 같이 2002년에 우리나라 전라북도 익산 지역의 오이뿌리를 샘플링 한 후, 오이 뿌리 내부로부터 세균을 분리하기 위하여 샘플링한 오이 뿌리 10g을 1% NaOCl 용액에 90초 동안 담구어 표면 살균을 한 후 살균 증류수로 여러번에 걸쳐 씻어내었다. 이와 같이 표면 살균한 오이 뿌리를 살균된 분쇄기로 완전히 분쇄하였으며, 이 분쇄된 뿌리는 100ml의 살균수에 넣고 28℃ 160 rpm에서 30분 동안 진탕하여 뿌리 내부에 있는 세균을 현탁하였다. 이 현탁액을 사이클로헥사마이드(cyclohexamide)가 50mg/L의 농도로 혼합되어 있는 TSA(tryptic soy agar, Difco, Detroit, USA) 배지에 도말하여 48시간 동안 28℃에서 배양 한 후, 형태적으로 다른 세균을 분리하였으며, 그 중 연한 베이지색의 ISE13 균주를 분리하였다(표 1). 분리한 ISE13 균주는 20% 글라이세롤이 혼합된 NB(Nutrient broth, Difco, Detroit, USA) 배지에 배양되어 -70℃에서 보관되었다. 표 1은 고추 역병에 대한 근권 길항세균 ISE13 균주의

분리 지역, 작물, 시기 등의 정보를 나타낸다.

표 1

<31>

지역	수집 년도	분리원	기주
익산	2002년	뿌리 내부	오이

<32>

[실시예 2] ISE13 균주의 고추 역병에 대한 길항 효과 유근(radicle) 검증

<33>

분리한 근권세균 ISE13 균주가 고추 유근(radicle)에서 고추 역병에 대한 감염율을 감소시키는 효과가 있는지를 평가하였다. 고추의 유근에서 고추 역병의 감염률 감소 효과를 평가하기 위하여, 고추 종자는 10립씩 3반복을 하여 실험하였으며, 고추 종자를 1% NaOCl에서 1분 30초 동안 표면 살균 한 후, 살균 증류수로 5회 세척하였다. 이와 같이 표면 살균된 고추 종자를 살균된 필터페이퍼 위에 침종하여 28℃에서 3일 동안 배양하여 고추의 유근 형성을 유도하여 사용하였다.

<34>

고추 역병균 파이토프토라 캡시시(*Phytophthora capsici*)는 V-8 juice agar 배지에서 3일 동안 배양하였으며, 3일 배양된 고추 역병균의 균사 가장자리를 코르크보러(corkborer)로 지름 0.5cm의 일정한 크기로 만든 후, 글루코오스가 0.02% 첨가된 WA(water agar) 배지의 중앙에 접종하여 5일 동안 28℃에서 배양하였다.

<35>

ISE13 균주는 NA에서 48시간 동안 배양한 후 10mM MgSO₄ 버퍼(buffer)로 수확한 후 세균 현탁액을 만들었으며, 이 ISE13 균주의 세균현탁액에 표면 살균한 종자를 3시간 동안 침지하였다. 세균에 침지한 고추 종자를 WA에서 5일 동안 배양한 역병균의 균사 가장자리에 고추 종자의 유근의 끝 부분이 닿게 올려놓아 28℃에서 2~3일 동안 배양하였다.

<36>

고추 역병균이 자라면서 유근이 형성된 고추 종자에 침입하여 갈색의 병징을 야기한 것을 감염된 것으로 하여, 10개 종자에 대한 고추 역병에 감염된 종자의 비율로 감염율을 평가하였다. 그 결과 ISE13 균주는 고추 역병에 의한 유근 감염을 실험 1에서는 무처리 대조구가 100% 감염되었을 때 40%로 감염율이 감소하였으며, 실험 2에서는 대조구가 약 97%일 때 50%로 감염율을 감소시켰다. 두 번의 반복 실험에서 ISE13 균주는 무처리 대조구에 비하여 약 54%의 방제가를 나타내어 현저하게 감염율을 감소시켰다(표 2). 표 2는 길항세균 ISE13 균주에 의한 고추의 유근(radicle)에서 고추 역병균인 파이토프토라 캡시시(*Phytophthora capsici*)에 의한 감염 억제 효과 평가 결과를 나타낸 것이다.

표 2

<37>

처리	유근 감염율(%)		
	실험 1	실험 2	평균
무처리	100.0±0.0	96.7±3.3	98.3±2.4
ISE13	40.0±15.3	50.0±5.8	45.0±10.8

<38>

<39>

[실시예 3] ISE13 균주의 고추 역병에 대한 길항 효과 유묘 검증(seedling assay)

<40>

고추의 유근(radicle)에서 고추 역병에 대한 효과적인 감염률 감소를 보인 ISE13 균주가 순차적으로 고추 유묘(seedling)에서 고추역병 방제 효과가 있는지 검증하였다. 이러한 고추 유묘 검증(seedling assay)을 위하여 ISE13 균주는 NA (Nutrient agar, Difco, USA) 배지에서 48시간 동안 28℃에서 배양하였고, 단일 균총을 NB (Nutrient broth, Difco, USA) 5ml에 전배양 한 후, 전배양한 ISE13 균주를 500ml의 NB에 접종하여 48시간 동안 28℃에서 160rpm으로 배양하였다. 배양된 ISE13 균주를 5,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 ISE13 균주의 세포를 수확한 후 10mM MgSO₄ 버퍼로 세균 현탁액을 만들었다. 세균현탁액은 분광광도계로 흡광도를 측정하여 10mM MgSO₄ 버퍼로 A600에서 O.D.=0.5 (약 10⁸ cell/ml)의 농도로 맞추었다.

<41>

고추 종자는 8립씩 3반복으로 TKS2:피트모스(peat moss)가 1.5:1 (v/v)로 혼합된 상토가 담긴 128구 트레이에

과중하였으며, ISE13 균주의 세균 현탁액을 상토 1g에 1ml의 농도로 처리하였다. 이 때 대조구로는 10mM MgSO₄ 버퍼를 사용하였다. 과중한 고추는 16시간 광조건의 배양실에서 2주 동안 생육하였으며, 과중 2주 후 고추 역병균을 인위 접종하였다.

<42> 고추 역병균은 오토밀(oatmeal) 배지에서 7일 동안 28℃에서 배양되었으며, 이후 살균증류수 15ml을 관주한 후 24시간 동안 광조건에서 7일 동안 배양하여 유주 포자낭을 형성하였다. 그 후 고추 역병균의 주요 접종원인 유주포자를 형성하기 위하여 4℃에서 30분, 상온에서 30분 동안 처리한 후 거즈로 걸러서 유주포자만 수확하였다. 수확된 유주포자는 헤모사이토미터를 사용하여 12,000 유주포자/ml의 농도로 맞추었다.

<43> 고추 역병균의 접종원인 유주포자를 2주 동안 생육한 고추 종자에 1cm 깊이로 접종하였으며, 균일한 병발생을 위하여 병접종 이후 병징이 발생할 때 동안 지속적인 토양 수분을 유지하였다. 병접종후 4일 후 고추 유묘에서 발생하는 모잘록 증상을 기준으로 건진 식물에 대한 병발생율(%)을 평가하였다. 위의 실험은 8개 식물을 3반복하여 총 2회 반복하여 실행하였다. 표 3에서와 같이 실험 1에서 대조구가 약 96% 병이 발생하였을 때 ISE13 균주를 처리한 고추 유묘에서는 약 35%만 병이 발생하였으며, 실험 2에서도 대조구가 96% 병이 발생하였을 때 약 30%로 병을 감소시켰다. 위의 실험 1과 2에서 전체적으로 대조구가 96% 병이 발생하였을 때 ISE13 균주는 약 32%로 병을 감소시키므로 약 67%의 방제가가 있다(표 3). 표 3은 ISE13 균주에 의한 고추 유묘에서 고추 역병 발생 억제 효과 평가 결과를 나타낸다.

표 3

처리	유묘(병 발생율%)		
	실험 1	실험 2	평균
무처리	95.8±4.2	95.8±4.1	95.8±6.5
ISE13	34.5±3.0	29.2±4.2	31.8±2.6

<45> [실시예 4] ISE13 균주의 고추 역병에 대한 길항 효과 성체식물(plant) 검증

<46> 고추 유근(radicle)과 유묘(seedling)에서 고추 역병에 대하여 현저한 병억제 효과를 가진 ISE13 균주가 5주된 고추 성체 식물에서 고추 역병에 대한 길항 효과가 있는지 평가하기 위하여 고추 성체 식물 검증(plant test)를 수행하였다.

<47> 고추 성체 식물 실험을 위하여 고추 종자를 상토가 담긴 128구에 과중 한 후 3주 동안 16시간 광조건에서 배양하였으며, 3주된 고추 유묘를 지름 9cm의 포트에 파스퇴르 살균된 밭토양으로 이식하였다. 이식한 1주일 후에 상기에 명시된 방법대로 ISE13 세균 현탁액을 준비하여 25ml/포트의 농도로 관주처리하였으며, 대조구로는 10mM MgSO₄ 버퍼(buffer)를 사용하였다. 세균 현탁액을 처리한 1주일 이후에 위의 상기에 명시한 것과 같이 고추 역병균의 유주포자를 형성하였으며, 25유주포자/g 토양의 농도로 병접종하였다.

<48> 병 접종한 이후 균일한 병발생을 위하여 토양 수분을 유지시켜주었으며, 약 4~5일 이후 병징이 발생하는 시점부터 병피해도(disease severity)로써 병을 평가하였다. 병피해도(disease severity)로 병평가 하기 위하여 0 (건진한 식물)~5(죽은 식물)의 기준으로 병징이 발생한 시점으로부터 병피해도를 매일 평가하였으며, 15개의 식물을 2회 반복 실험하였다. 표 4에서와 같이 실험 1과 2에서 대조구에서 0~5의 병피해도 중에서 약 4 정도의 병피해도가 야기될 때, ISE13 균주 처리는 2 미만의 1.8로 병피해도를 현저하게 감소시켰다. 또한 시간에 따른 병 발생 양상을 나타내는 병진전곡선 (AUDPC)에서도 대조구가 실험 1과 2에서 18.8과 19.5일 때 ISE13 균주는 각각 5.8과 6.4로 시간에 따른 병의 진전도 현저하게 감소시켰다(표 4). 표 4는 고추 성체식물에서 ISE13 균주에 의한 고추 역병 발생 억제 효과 평가 결과를 나타낸다.

표 4

처리	병 피해도(Disease severity)		병진전곡선(AUDPC)	
	실험 1	실험 2	실험1	실험 2
무처리	4.3±0.2	4.1±0.2	18.8±1.9	19.5±1.4
ISE13	1.8±0.4	1.8±0.4	5.8±1.6	6.4±1.7

<50> [실시예 5] ISE13 균주의 고추 역병에 대한 길항 효과 포장 검증

<51> 고추 유근(radicle), 유묘(seedling)와 성체식물(plant)에서 모두 뛰어난 고추 역병 억제 효과가 있는 길항세균 ISE13 균주가 실제 포장에서도 동일한 고추 역병에 대한 병억제 길항 효과가 있는지 평가하기 위하여, 경기도 남양주시 덕소에 위치한 고려대학교 부속농장에서 2005년~2007년의 3년에 걸친 포장 실험을 통하여 검증하였다.

<52> 2005년과 2006년도 포장 검증에서는 병원균을 인위 접종한 포장에 ISE13 균주를 고추 식물에 관주처리하여 검증하였으며, 2006년과 2007년에는 자연적으로 고추 역병이 발생하는 포장에서 고추 정식시 ISE13 균주의 세균 현탁액에 고추 유묘를 담근 후 정식하여 재배 방법에 효과적으로 적용하여 실험하였다.

<53> **실험예 1. 본 발명에 의한 ISE13의 2005~2006년 인위병접종 포장 검증**

<54> 2005년과 2006년에 인위병접종 포장 검증을 위하여, 고추 종자는 2005년 3월 26일, 2006년 3월 16일에 파종되었으며 포장에 2005년 6월 1일, 2006년 5월 10일에 각각 정식되었다. 포장에서 처리구는 임의배치하였으며, 처리당 40식물씩 4반복을 하였고 대조구로는 10mM MgSO₄ 버퍼(buffer)와 고추 역병을 방제하기 위하여 가장 많이 사용되고 있는 살균제인 메타락실(metalaxyl)을 제조사의 권장사항에 따라 처리하였다.

<55> 길항 세균 ISE13는 상기에 명시한 것과 같이 배양한 후 세균 현탁액을 만들어 2005년에는 7월 23일과 8월 6일, 2006년에는 7월 26일과 8월 2일에 2회에 걸쳐 포장에 심겨진 고추 식물에 각각 100ml씩 관주처리되었다. 이후 상기에 명시된 방법대로 고추 역병균의 유주자를 형성하여 10⁵ 유주포자/고추식물의 농도로 2005년 8월 11일, 2006년 8월 7일에 각각 인위접종 하였다.

<56> 2005년과 2006년에 인위접종한 덕소 포장에 전체적으로 병이 발생하였으며, 2005년과 2006년도에서 무처리 대조구가 65.4%와 69%의 병이 발생하였을 때 ISE13균주를 처리한 고추는 35.2%와 55.0%로 병이 무처리 대조구에 비하여 현저하게 감소하였다. 길항 세균 ISE13 균주는 무처리 대조구에 비하여 2005년도에는 약 46%, 2006년에는 약 20%의 방제가를 가졌다(표 5). 표 5는 2005~2006년 ISE13 균주의 세균 현탁액 관주처리에 의한 고추 역병 병 발생 포장 검증 결과를 나타낸다.

표 5

처리구	병발생율(%)	
	2005년	2006년
무처리	65.4±8.0	69.0±6.8
메타락실(살균제)	25.6±3.8	16.6±6.8
ISE13	35.2±10.6	55.0±12.3

<58> 또한 길항세균 ISE13 균주가 실제로 고추 뿌리의 감염율을 감소시켰는지 확인하기 위하여, 2005년에는 4개 식물씩 4반복, 2006년에는 5개 식물씩 4반복하여 고추뿌리를 임의로 샘플링하였다. 샘플링한 고추 뿌리를 1cm의 크기로 자른 후 고추 역병균 선택배지인 PARPH (Pimaricin-ampicilin-rifampicin-PCNB-hymexazol) 배지에서 뿌리 감염율(%)을 평가하였다. PARPH 배지는 기본 배지로 CMA(Cornmeal agar) 17g/L를 고압멸균 한 후, 피마리신(pimaricin) 5mg, 소디움암피실린(sodium ampicillin) 250mg, 리팜피신(rifampicin) 10mg, PCNB 100mg, 하이멕사졸(Himexazol, 70% a.i.) 50mg/L의 농도로 혼합하여 준비하였다.

<59> 뿌리에서 역병의 감염율은 PARPH 배지에 1cm의 크기로 고추 뿌리를 잘라 올려놓은 것 중에서 고추 역병균에 의해 감염된 뿌리에서 자라나오는 역병균의 유무를 백분율로 평가하여 감염율을 조사하였다. 그 결과 길항세균 ISE13 균주는 대조구에 비하여 약 2005년에는 약 25%의 방제가로 고추 역병균에 의한 뿌리 감염을 감소시켰다(표 6). 표 6은 2005~2006년 ISE13 균주의 세균 현탁액 관주처리에 의한 고추 역병의 고추 뿌리 감염율 조사 결과를 나타낸다.

표 6

처리구	뿌리 감염율(%)	
	2005년	2006년
무처리	82.4±1.3	78.2±7.0
메타락실(살균제)	60.7±4.2	24.9±2.9
ISE13	61.8±3.1	76.9±1.7

<61> 길항세균 ISE13균주를 포장에 인위적으로 처리함으로써 토착 미생물에 영향을 주는지를 알아보기 위하여, 근권 포장에 존재하는 총 세균과 곰팡이 수를 양적으로 평가하였다. 2005년에는 4개 식물씩 4반복, 2006년에는 5개 식물씩 4반복하여 고추뿌리를 임의로 샘플링하였다. 샘플링한 토양 10g을 100ml의 살균수에 현탁한 후 토양 현탁액을 만들어, 사이크로헥사마이드(cyclohexamide)가 50mg/L의 농도로 혼합된 TSA (Tryptic soy agar)배지에 도말하여 토양내 존재하고 있는 총 세균의 수를 평가하였으며, OAES 배지(agar 20g, sucrose 5g, yeast extract 2g, NaNO₃ 1g, MgSO₄ 7H₂O 0.5g, KH₂PO₄ 1g, Na propionate 1g, Oxgall 1g, streptomycin sulfate 50mg, chloramphenicol 50mg/L)에 도말하여 토양내 존재하고 있는 총 곰팡이의 수를 평가하였다. 그 결과 길항세균 ISE13 균주는 무처리 대조구와 메타락실 처리와 비교하여 토착적으로 존재하고 있는 총 세균과 곰팡이의 수에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다(표 7). 표 7은 2005~2006년 ISE13 균주의 세균 현탁액 관주처리에 의한 인위 병발생 포장에서의 토양 총 세균과 곰팡이 수를 나타낸다.

표 7

처리	총 세균수 (Log ₁₀ CFU/g 토양 건물중)		총 곰팡이수 (Log ₁₀ CFU/g 토양 건물중)	
	2005년	2006년	2005년	2006년
무처리	6.62±0.11	6.23±0.16	4.45±0.05	3.38±0.01
메타락실(살균제)	6.52±0.05	6.00±0.08	4.31±0.08	3.27±0.06
ISE13	6.64±0.03	6.27±0.04	4.54±0.03	3.40±0.02

<63> 실험예 2. 본 발명에 의한 ISE13의 2006~2007년 자연병접종 포장 검증

<64> 2006년과 2007년 자연병발생 포장 실험을 위하여 상기에 명시한 것처럼 근권세균 ISE13 균주의 세균 현탁액을 준비하였다. 이 포장 실험을 위하여 2006년 5월 10일, 2007년에는 6월 1일에 포장에 고추를 정식하기 직전에 준비된 길항세균 ISE13 현탁액에 고추 유묘를 30분 동안 담근 후 고추 역병균이 이미 토양내 존재하고 있는 토양에 정식에 정식하였다.

<65> 2006년과 2007년에 모두 포장에 역병이 전체적으로 발생하였으며, 2006년과 2007년에 무처리 대조구에서 병이 약 87%와 65% 발생하였을 때, 길항 세균 ISE13 처리시에는 각각 약 79%와 39%로 병이 감소하였다.

<66> 또한 실제 고추 뿌리에서 고추 역병에 의한 감염율을 확인하기 위하여 상기에 명시한 것과 마찬가지로 고추 역병 선택배지인 PARPH 배지에 고추 뿌리를 1cm 크기로 잘라서 올려놓은 후 감염율을 평가하였으며, 그 결과 실제 뿌리에서의 뿌리 감염율(%)도 2006년과 2007년에 무처리 대조구에서 각각 86%와 66%인 것에 비하여 길항세균 ISE13을 처리한 것에서는 약 71%와 47%로 감염율이 감소하였다(표 8). 표 8은 2006~2007년 역병 자연발생포장에서 길항세균 ISE13 균주에 의한 고추 역병균인 파이토프토라 캡시시 (*Phytophthora capsici*)의 병 발생을 및 뿌리 감염율 억제 효과 조사 결과를 나타낸다.

표 8

처리	병 발생율 (%)		뿌리 감염율 (%)	
	2006년	2007년	2006년	2007년
무처리	87.3±5.6	65.3±2.3	86.0±2.8	65.7±2.9
메타락실(살균제)	-	22.5±3.1	-	40.5±8.8
ISE13	78.6±15.2	38.8±2.6	70.8±0.3	46.6±2.4

<68> 2006년과 2007년의 포장 검증에서도 상기에 명시된 것과 마찬가지로 고추 정식시 인위적으로 처리된 길항근권세균 ISE13 균주가 토착세균과 곰팡이에 영향을 주는지 양적으로 평가하였으며, 그 결과 길항세균 ISE13을 고추 정식시 자연병발생 포장에 처리할 경우에도 무처리 대조구에 비하여 토착 총 세균과 곰팡이의 수에 영향을 주지 않는 것으로 보아 생태계 교란과 같은 위험성은 적다고 할 수 있다(표 9). 표 9는 2006~2007년 ISE13 균주 세균 현탁액 관주처리에 의한 자연 병발생 포장에서의 토양 총 세균과 곰팡이 수를 나타낸다.

표 9

<69>

처리	총 세균수 (Log ₁₀ CFU/g 토양 건물중)		총 곰팡이수 (Log ₁₀ CFU/g 토양 건물중)	
	2006년	2007년	2006년	2007년
무처리	5.72±0.01	6.46±0.12	3.08±0.07	3.12±0.10
메타락실(살균제)	-	6.63±0.14	-	3.30±0.17
ISE13	5.98±0.12	6.56±0.11	3.17±0.03	3.30±0.12

<70>

[실시예 6] 고추 역병에 대해 병억제 효과가 있는 근권 길항세균 ISE13 균주의 분자적, 생리적 특성을 이용한 균 동정

<71>

세균 동정을 위하여 일반적으로 사용하는 세균의 16S rRNA 염기서열(sequence)을 증폭하기 위하여 ISE13 균주의 DNA를 분리하였다. ISE13 균주를 배양한 후 3000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 세균을 수확하여, 300μl의 SET 버퍼(buffer)로 섞어 주었다. 라이소자임(lysozyme)을 50mg/ml의 농도로 만들어 6μl를 섞어준 후 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양한 후 1/10 부피의 SDS를 첨가한 후 프로테이나제 K(proteinase K)를 0.5mg/ml의 농도로 혼합하여 55℃에서 2시간 동안 배양한 후, 75℃에서 20분 동안 처리함으로써 프로테이나제 K(proteinase K)를 불활성화시켰다. 이 후 RNase를 첨가하여 37℃에서 30분 동안 배양한 후 1/3 부피의 5M NaCl과 1 부피의 클로로포름(chloroform)을 혼합하여 상온에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 10,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액만 수거하여 같은 양의 이소프로판올(isopropanol)을 혼합한 후 DNA를 수확하였다. 수확한 DNA는 70% 에탄올로 2회 세척하여 사용하였다.

<72>

이와 같이 분리한 ISE13의 DNA를 유니버설 프라이머(universal primer)인 fd1 (AGAGT TTVAT CCTGGG; 서열번호 2)와 rp2 (ACGGC TACCT TGTTA CGACTT; 서열번호 3) 프라이머를 사용하여, PCR을 수행하였다. 16S rDNA를 PCR을 통해 증폭하기 위한 조건으로, 초기 95℃에서 4분을 한 후 95℃에서 4분, 58℃에서 1분, 72℃에서 2분을 반복하여 35회 시행하였으며, 마지막 신장반응(extension step)으로 72℃에서 10분 동안 PCR하였다. PCR 산물을 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후 순화하였다. PCR 산물의 순화를 위하여 전기 영동하여 UV에서 확인된 PCR 증폭된 밴드를 분리하여 -20℃에서 15분 동안 놓은 후, 파라필름(parafilm)으로 PCR 증폭된 밴드가 있는 액체 부분 50μl를 수확하여 1.5ml의 멸균된 튜브에 담은 후 400μl의 TE 버퍼(buffer)와 혼합하였다. 이 후 450μl의 페놀:클로로포름 (24:1) 용액을 첨가하여 3분 동안 섞은 후 13,000rpm에서 7분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 상등액 400μl를 새로운 튜브에 넣은 후 44μl의 3M 소디움아세테이트(Sodium acetate, pH 5.2)를 첨가하고 섞어주었으며, 1ml의 99% 에탄올을 첨가한 후 -20℃에서 15분간 두었다. 이 후 13,000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 액체 부분을 제거하고, 다시 70% 에탄올 500μl를 혼합하여 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 순수한 PCR 산물을 얻었다.

<73>

이와 같은 방법으로 순화된 PCR 산물을 fd1 (AGAGT TTVAT CCTGGG)와 rp2 (ACGGC TACCT TGTTA CGACTT) 프라이머로 염기서열결정(sequencing)을 하였으며 약 1,400개의 염기서열을 분석하여 NCBI에서 블라스트(blast)하여 분석하였다. 16S rDNA 염기서열(서열번호 1)을 분석한 결과 ISE13 균주는 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*)와 99%의 상동성을 보이는 것으로 나타났다(도 1a 및 도 1b).

<74>

또한 투과전자현미경을 통하여 ISE13 균주의 편모와 세균의 형태를 관찰하기 위하여, NA배지에서 24시간 동안 ISE13 균주를 배양하였으며, 단일 균총의 ISE13 세균 현탁액을 골드 코터(gold coater) 위에 고정시킨 후 투과전자 현미경으로 관찰하였으며, 그 결과 긴 간상형의 세균 모양이 관찰되었으며, 양쪽 끝부분에 편모가 관찰되었다(도 2).

<75>

ISE13 균주가 서로 다른 96종류의 당을 이용할 수 있는지를 확인하기 위하여 GN2 Biolog system을 사용하여 분석하였다. Biolog system을 이용하기 위하여, ISE13 균주는 24시간 동안 TSA 배지에서 배양하였으며, 0.8%의 생리 식염수로 세균 현탁액을 준비하여 분광광도계로 A600 O.D=0.5로 세균 농도를 맞추었다. 이 세균 현탁액을 GN2 Biolog 96 well plate에 100μl씩 넣은 후 28℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 GN2 Biolog 96 well plate는 당 이용 정도에 따라 반응이 되어 Miolog GN Microplate system에서 Microlog 3 database release 4.01A (Biolog, Hayward, CA)로 분석하였다. 그 결과 ISE13 균주는 당이용 능력에서 포토박테리움 로지 (*Photobacterium logei*)와 가장 유사한 것으로 확인되었지만(도 3), 다른 16S rRNA 분석, 전자현미경 관찰, 세균의 지방산 분석 등에 의해 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*)에 속하는 것으로 확인되었다.

- <76> 세균의 지방산 함량에 따른 세균 분류 및 동정을 하기 위하여, ISE13 세균의 지방산(fatty acid methyl ester, FAME) 부분을 추출하여 MIDI 시스템을 이용한 가스크로마토그래피에 의해 동정하였다. ISE13 균주의 지방산(fatty acid methyl ester, FAME) 부분을 분석한 결과, 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*)와 가장 유의적인 것으로 확인되었다(도 4).
- <77> 결론적으로 16S rRNA 분석, 전자현미경에 의한 형태적 관찰과 세균의 지방산 분석을 통하여, 본 발명에 의한 ISE13 균주는 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13로 동정할 수 있다(도 1a ~ 도 4).
- <78> 상기의 내용을 종합하면, 우리나라 근권토양에서 분리한 본 발명에 의한 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*) 균주 ISE13는 고추 역병의 병발생을 감소시킬 수 있는 새로운 길항세균이며, 친환경적 생물적 방제 세균으로써 이용될 가치가 있다 할 것이다.
- <79> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

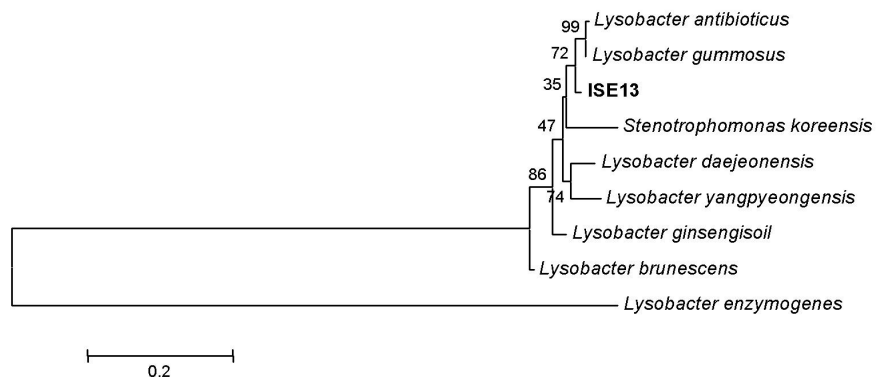
- <80> 도 1a 및 도 1b는 본 발명에 의한 ISE13 균주의 분자적 동정을 위한 16S rDNA 염기 서열과 계통도를 나타내는 도면이다.
- <81> 도 2는 본 발명에 의한 ISE13 균주의 세균동정을 위한 투과전자현미경에 의한 세균 형태를 나타내는 도면이다.
- <82> 도 3은 본 발명에 의한 ISE13 균주의 세균동정을 위한 생리적 당 이용도 BIOLOG 분석 결과를 나타내는 도면이다.
- <83> 도 4는 본 발명에 의한 ISE13 균주의 세균동정을 위한 세균의 지방산(fatty acid methyl ester, FAME) 분석 결과를 나타내는 도면이다.

도면

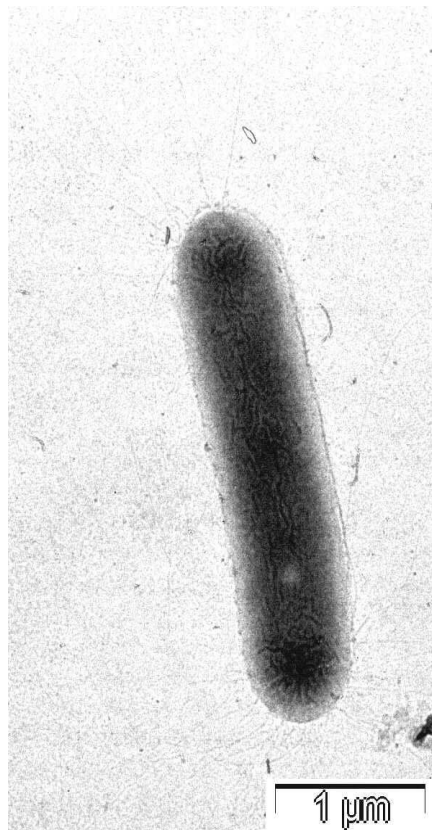
도면1a

```
CATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAG
TGGCGGACGGGTGAGGAATACGTCGGAATCTGCCTATTTGTGGGGGATA
ACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGTGG
GGGACCGCAAGGCCTCAGCAGATAGATGACCGGACGTCGGATTAGCTA
GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAA
AGAAAAGCTTAGGGTTAATAACCTTGAGTCATGACGGTACCGGAAGAATA
AGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGAAGGGTGCAA
GCGTTACTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTTGTAA
TCTGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATGGCAATGGAACTGGC
TTACTAGAGTGCGGTAGAGGGTAGCGGAATCCCGGTGATGCAAGTGAAT
GCGTAGATATCGGGAGGAACATCTGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCA
GCACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAC
CCTGCTAGTCCAGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGGCAACTT
GGCCCTCAGTATCGAAGCTAAGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGAAGTACG
GTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGT
GGAGTATGTGTTAATTCTGATGCAACGCAAGAACCTTACCTGGCCTTG
ACATGTCGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAAC
ACAGGTGCTGCTGGCTGTCTGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTG
GGAACTCTAAGGAGACCGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTACTACAATG
GTAGGGACAGAGGGCTGCAAAACCGCGAGGGCAAGCCAATCCAGAAAC
CCTATCTCAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGCAGATCAGATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCGTCACCATGGGAGTTTGTTCACCCAGAAGCAGG
TAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTGC
```

도면1b



도면2



도면3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	<246>	<267>	<246>	191+	147	<319>	<334>	<273>	<324>	<281>	<296>
B	<266>	<349>	<283>	<254>	<317>	<297>	<267>	<318>	<306>	<311>	<324>	<326>
C	<307>	<303>	<294>	<296>	221+	<254>	<285>	<322>	<300>	<275>	<296>	<304>
D	<335>	<433>	<369>	<302>	<296>	<376>	<328>	<301>	<372>	<259>	<486>	<310>
E	<306>	<261>	<343>	<376>	<321>	<291>	<276>	<328>	<288>	<389>	<249>	<305>
F	<285>	<249>	<315>	<331>	<279>	<365>	<334>	<309>	<328>	<335>	<344>	<358>
G	<346>	<307>	<339>	<288>	<291-	<323>	<306>	197+	<338>	<313>	<266>	<307>
H	<324>	<273>	<289>	<246>	<332>	<294>	<300>	<299>	<306>	<289>	<308>	<354>

=> Species ID : **PHOTOBACTERIUM LOGEI** <=

	Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1)	PHOTOBACTERIUM LOGEI	100	0.743	3.88	GN-NENT
2)	AQUASPIRILLUM DISPAR	0	0.000	7.78	GN-NENT
3)	FLAVOBACTERIUM FERRUGINEUM	0	0.000	8.00	GN-NENT
4)	BREVUNDIMONAS VESICULARIS	0	0.000	8.73	GN-NENT
5)	PSEUDOMONAS SPINOSA (BURKHOLDERIA)	0	0.000	10.00	GN-NENT
6)	BURKHOLDERIA CEPACIA	0	0.000	10.00	GN-NENT
7)	ACINETOBACTER CALCOACETICUS/GENOSPECIES 1	0	0.000	10.41	GN-NENT
8)	CHRYSEOBACTERIUM GLEUM/INDOGENES	0	0.000	10.63	GN-NENT
9)	AGROBACTERIUM TUMEFACIENS/RADIOBACTER	0	0.000	10.97	GN-NENT
10)	BREVUNDIMONAS DIMINUTA	0	0.000	11.10	GN-NENT
Other)					

도면4

E06C267.36A [4166] ISE13

Volume: DATA File: E06C267.36A Seq Counter: 29 ID Number: 4166
 Type: Samp Bottle: 26 Method: TSBA50
 Created: 12/27/2006 5:19:10 AM
 Sample ID: ISE13

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.647	4.027E+8	0.027	----	7.015	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.769	2096	0.025	----	7.257		----	< min rt	
1.835	133	0.020	----	7.389		----	< min rt	
1.921	8320	0.026	----	7.560		----	< min rt	
1.990	268	0.025	----	7.696		----	< min rt	
2.510	775	0.038	----	8.736		----	< min rt	
2.712	935	0.024	----	9.135		----		
3.058	459	0.024	----	9.823		----		
3.190	2870	0.027	----	10.063		----		
3.246	371	0.026	----	10.144		----		
3.569	6831	0.028	1.107	10.609	11:0 ISO	3.81	ECL deviates 0.003	Reference -0.002
3.970	416	0.036	1.077	11.143	10:0 2OH	0.23	ECL deviates -0.010	
4.229	711	0.023	1.063	11.425	10:0 3OH	0.38	ECL deviates 0.003	
4.574	3404	0.031	1.046	11.802	unknown 11.799	1.80	ECL deviates 0.003	
4.749	733	0.039	1.038	11.993	12:0	0.38	ECL deviates -0.007	Reference -0.011
4.860	14444	0.031	1.034	12.091	11:0 ISO 3OH	7.53	ECL deviates 0.002	
5.463	441	0.029	1.014	12.616	13:0 ISO	0.23	ECL deviates 0.002	Reference -0.001
7.270	1144	0.038	0.975	14.001	14:0	0.56	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
7.537	2907	0.037	----	14.176		----		
8.003	455	0.028	0.966	14.479	Sum In Feature 1	0.22	ECL deviates 0.001	15:1 ISO I/13:0 3OH
8.227	83936	0.039	0.963	14.624	15:0 ISO	40.76	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
8.363	660	0.041	0.961	14.713	15:0 ANTEISO	0.32	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
9.449	1578	0.046	0.951	15.389	16:1 w7c alcohol	0.76	ECL deviates 0.002	
9.846	1305	0.042	0.949	15.627	16:0 ISO	0.62	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
10.163	30389	0.043	0.946	15.818	Sum In Feature 3	14.50	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.463	6317	0.044	0.945	15.999	16:0	3.01	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
11.187	31514	0.045	0.941	16.419	ISO 17:1 w9c	14.96	ECL deviates 0.003	
11.287	864	0.039	0.941	16.477	Sum In Feature 4	0.41	ECL deviates 0.001	17:1 ISO I/ANTEI B
11.552	12555	0.043	0.940	16.631	17:0 ISO	5.95	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
13.545	1171	0.037	0.935	17.772	18:1 w9c	0.55	ECL deviates 0.003	
13.638	4244	0.046	0.935	17.825	18:1 w7c	2.00	ECL deviates 0.002	
13.946	1619	0.041	0.934	18.000	18:0	0.76	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
17.418	548	0.039	0.932	19.999	20:0	0.26	ECL deviates -0.001	Reference -0.007
----	455	----	----	----	Summed Feature 1	0.22	15:1 ISO H/13:0 3OH	13:0 3OH/15:1 i I/H
----	----	----	----	----	----	----	15:1 ISO I/13:0 3OH	
----	30389	----	----	----	Summed Feature 3	14.50	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
----	864	----	----	----	Summed Feature 4	0.41	17:1 ISO I/ANTEI B	17:1 ANTEISO B/i I

ECL Deviation: 0.003 Reference ECL Shift: 0.005 Number Reference Peaks: 11
 Total Response: 212821 Total Named: 205279
 Percent Named: 96.46% Total Amount: 198314

Matches:
Library **Sim Index** **Entry Name**
 TSBA50 5.00 0.866 **Lysobacter-enzymogenes-enzymogenes**

서열 목록

- <110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
- <120> Lysobacter enzymogenes strain ISE13, an antagonistic rhizobacterium for controlling Phytophthora blight of pepper
- <130> P11-080416-04
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 1415
- <212> DNA
- <213> Lysobacter enzymogenes ISE13

<400> 1
catgcaagtc gaacggcagc acagaggagc ttgctccttg ggtggcgagt ggcggacggg 60

tgaggaatac gtcggaatct gcctatttgt gggggataac gtagggaaac ttacgctaat 120

accgcatacg acctacgggt gaaagtgggg gaccgcaagg cctcacgcag atagatgagc 180

cgacgtcggg ttagctagtt ggcggggtaa aggccaccca aggcgacgat ccgtagctgg 240

tctgagagga tgatcagcca cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca 300

gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa gcctgatcca gccatgccgc gtgtgtgaag 360

aaggccttcg ggttgtaaag cacttttgc cgaaagaaa agcttagggt taataacctt 420

gagtcatgac ggtaccggaa gaataagcac cgctaactt cgtgccagca gccgcggtaa 480

tacgaagggt gcaagcgta ctcggaatta ctggcgtaa agcgtgcgta ggtggtttgt 540

taagtctgat gtgaaagccc tgggctcaac ctgggaatgg cattggaaac tggcttacta 600

gagtcgggta gagggtagcg gaattcccgg tglagcagtg aaatgcgtag atatcgggag 660

gaacatctgt ggcaaggcg gctacctgga ccagcactga cactgaggca cgaaagcgtg 720

gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgcctt aaacgatgcg aactggatgt 780

tgggggcaac ttggccctca gtatcgaagc taacgcgta agttcgccgc ctgggaagta 840

cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagtatgt 900

ggtttaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctggcctt gacatgtcga gaactttcca 960

gagatggatt ggtgccttcg ggaactcgaa cacaggctgt gcatggctgt cgtcagctcg 1020

tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgaac cgagcgcaac ccttgcctt agttgccagc 1080

acgtaatggt gggaactcta aggagaccgc cggtagacaaa ccggaggaag gtggggatga	1140
cgtaagtca tcatggccct tacggccagg gctacacag tactacaatg gtagggacag	1200
agggtcgcaa acccgcgagg gcaagccaat ccagaaaacc ctatctcagt ccggattgga	1260
gtctgcaact cgactccatg aagtcggaat cgctagtaat cgcagatcag cattgctgcg	1320
gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt ttgttgacc	1380
agaagcaggt agcttaacct tcgggagggc gctgc	1415

<210> 2
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 2	
agagtttvat cctggg	16

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 3	
acggctacct tggtacgact t	21