



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0092616
(43) 공개일자 2011년08월18일

(51) Int. Cl.

A01N 63/02 (2006.01) A01P 3/00 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0012133

(22) 출원일자 2010년02월09일

심사청구일자 2010년02월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김기덕
서울특별시 노원구 공릉1동 573-1 대주파크빌
101-507

상미경

서울특별시 관악구 신림1동 414-10

(74) 대리인

김선애

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 토양근권세균 크라이세오박테리움 인돌로제네스 균주 ISE14를 포함하는 식물 탄저병 방제용 및 성숙 촉진용 조성물 그리고 이를 이용한 탄저병 방제방법

(57) 요약

본 발명은 식물 탄저병에 대해 뛰어난 생물적 방제 효과 및 성숙촉진 효과가 있는 친환경적 생물적 방제균인 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14를 포함하는 식물 탄저병 방제용 및 성장촉진용 조성물 및 이를 이용한 식물 탄저병 방제방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 친환경적으로 포장에서도 식물의 탄저병을 우수하게 방제할 수 있는 동시에 성숙을 촉진시킬 수 있고, 농용 살균제의 문제점을 해결할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1a

```
CATGCAAGCCGAGCGGTAGAGATCTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGT
ACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGCCCTTATCTGGGGGATAGCC
TTTCGAAAGGAAGATTAATACCCCAATATACTGGATGGCATCATTGG
GTATTGAAACTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATA
GTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAGTCTACGATCTTTAGGGGGCTGA
GAGGGTGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCACTCTAC
GGGAGCGACGAGTGAGGAATATTGGACAATGGGTGAGAGCTGATCC
AGCCATCCCGCTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAACCTCTTT
TGTATAGGGATAAACCTACTCTCGTGAGAGTAGCTGAAGGTACTATAC
GAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
GGTGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGG
ATGTGTAAGTCAGTGGTGAATCTCACAGCTTAAGTGTGAAGCTGCCA
TTGATACTGATGTCTTGAAGTGTGTAAGTAGCTGAATAAGTAGT
GTAGCGGTGAATGCATAGATATTACTTGAACACCAATTGCGAAGGC
AGTTACTAAGCAACACTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAGCCGTAACGATGCTAACT
CGTTTTGGAGCGCAAGCTTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAGTTAG
CCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCGCACAGCGGTGGATTATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGA
GGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGAATGACAGGTTAGAAATAGAC
TTTTCTCGGACATTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGCTGCTCAGCTCTG
CCGTGAGGTGTTAGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTCACT
AGTTGCCATCATTAAAGTTGGGACTCTAGTGAGACTGCCTACGCAAGT
AGAGAGGAAGTGGGATGACGCTCAATCATCAGGCCCTTACGCCT
TGCGCCACACAGTAAATACAAATGGCCAGTACAGAGGGCAGCTACAG
GTGACGTGATGCAATCTGAAAGCTGCTCAGTTCGATTGGAGTC
TGCAACTGACTCTATGAGCTGGAATGCTAGTAATCGGCATCAGC
CATGGCGCGTGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCGAA
GCCATGGAAAGTCTGGGGTACCTGAAGTCGGTGACCGTAACAGGAGCT
GCCTAGG
```

특허청구의 범위

청구항 1

크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14(기탁번호 KACC 91370P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 탄저병 방제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물 탄저병은 콜레토티리쿰(*Colletotrichum sp.*)의 병원균에 의해 발생하는 탄저병인 것을 특징으로 하는 식물 탄저병 방제용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 식물은 고추, 파프리카, 딸기, 토마토, 수박, 오이 및 사과로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 식물 탄저병 방제용 조성물.

청구항 4

크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14(기탁번호 KACC 91370P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 조성물을 식물에 처리하는 단계를 포함하는 식물 탄저병 방제방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 식물 탄저병은 콜레토티리쿰(*Colletotrichum sp.*)의 병원균에 의해 발생하는 탄저병인 것을 특징으로 하는 식물 탄저병 방제방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 식물은 고추, 파프리카, 딸기, 토마토, 수박, 오이 및 사과로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 식물 탄저병 방제방법.

청구항 7

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 대사산물은 휘발성 물질인 것을 특징으로 하는 식물 탄저병 방제용 방제방법.

청구항 8

크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14(기탁번호 KACC 91370P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 성숙 촉진용 조성물.

청구항 9

크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14(기탁번호 KACC 91370P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 조성물을 식물에 처리하는 단계를 포함하는 식물 성숙 촉진 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 토양근권세균 크라이세오박테리움 인돌로제네스 균주 ISE14을 포함하는 탄저병 방제용 및 성숙촉진용 조성물 그리고 이를 이용한 탄저병 방제방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 고추의 포장과 시설재배 시 고추 열매에 발생하여 고추 생산에 심각한 피해를 야기하는 탄저병(Anthracnose)에 대해 뛰어난 생물적 방제 효과가 있으며, 동시에 고추의 성숙을 촉진시켜서 상품적 가치가 높은 붉은 고추의 수량을 증진시키는 친환경적 생물적 방제균인 크라이세오박테리움 인돌로제네스 균주 ISE14을 포함하는 식물 탄저병 방제용 및 성숙촉진용 조성물 그리고 이를 이용한 탄저병 방제방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 현대 농업에서는 작물을 병으로부터 보호하기 위해 농용 살균제 사용에 의존하고 있는데, 이러한 농용 살균제들은 인간 및 환경에 대한 부정적인 영향에도 불구하고 안정적인 농업생산을 위해서 계속적인 사용이 불가피하다.
- [0003] 이러한 이유로 국내외 많은 연구자들이 새롭고 인간과 환경에 안전한 미생물 농약을 개발하고자 노력하고 있지만, 국내외적으로 식물병에 대하여 길항 효과를 갖는 미생물의 확보는 아직 부족한 실정이다.
- [0004] 실험실의 제한된 조건에서 선발된 길항 능력이 있는 미생물은 실제 포장의 다양한 환경조건에서 생존하지 못하거나 길항 효과를 발휘하지 못하는 경우가 있으며, 이러한 이유로 외국에서 우수한 길항 미생물이 실제로 우리나라의 환경에서 효과를 발휘하지 못하는 경우가 많다.
- [0005] 또한, 고추와 같이 고부가가치를 생산하는 작물을 재배할 때 수확량 증가를 위하여 과도한 양의 비료를 사용하며 실제 농가에서는 생장 촉진제와 같은 화학약품을 사용하기도 하므로, 환경오염과 독성의 문제를 야기하여 지속적이고 안전한 고추의 생산에 심각한 문제가 발생할 수 있다.
- [0006] 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 생물농약과 비료의 사용 및 실용화는 미미한 실정이다.
- [0007] 한편 식물의 탄저병은 콜레토티리쿰(genus *Colletotrichum*) 등의 곰팡이에 의해 일어난다. 우리 밥상에 올라오는 대부분의 식물이 그 병원균에 의해 피해를 입는다. 식물 탄저병균은 잎, 줄기, 과일, 꽃 등 부위를 가리지 않고 파괴한다. 우리나라 음식에 빼놓을 수 없는 양념 채소인 고추, 여름철 과일인 수박 등 가지과와 박과 작물에서 특히 심하다.
- [0008] 이러한 탄저병에 의한 피해가 큰 고추는 우리나라에서 2005년도 기준으로 전체 채소 재배 면적의 약 24%를 차지하며, 조미채소류 재배 면적에서는 약 49%를 차지하고, 농가 소득기여도가 연간 8,500억 원 이상으로 농가 경제 주요작물 중 하나이다. 특히 우리나라의 식생활의 특성으로 인하여 붉은 고추의 소비가 현저하게 높으며, 이를 이용한 가공품에 대한 시장 규모도 증가하고 있다.
- [0009] 그러나 고추 재배에 있어서 고추탄저병, 역병, 세균성 점무늬병이 심각한 피해를 야기하는데, 특히 고추 열매의 생산과 관련하여 고추 열매에 발생하는 고추 탄저병에 의한 피해가 심각하며, 이를 방제하기 위해 권장 사용량 이상의 과도한 유기 합성 농약 살포에 의존하고 있다. 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 공기 전염성 병으로 온난하고 비가 많을 때와 수확기에 접어들면서 많이 발생하는 고추의 병해인 고추 탄저병에 대한 효과적인 길항 미생물을 이용한 생물적 방제가 미미하다. 특히 최근에 환경 보전적 지속 농업과 무농약 고부가가치 산업과 관련하여 식물 탄저병의 생물적 방제 연구가 집중적으로 수행되어야 할 필요가 있지만, 공기 전염성병에 대한 이해의 부족과 식물의 지상부에 발생하는 병에 대하여 아직까지 포장 조건 아래에서도 기존의 농용 살균제와 비교하여 효과적인 길항 미생물을 확보하는데 미비한 실정이다. 또한, 동시에 고추의 수량과 고추의 성숙을 촉진시키는 효과를 갖는 미생물은 확보되지 않고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 따라서 본 발명은 고추를 포함한 식물 재배 시 심각한 문제를 야기하는 공기전염성 병인 탄저병을 친환경적이며 효과적으로 방제할 수 있는 우리나라의 근권 토양에서 분리한 내생 근권 세균 크라이세오박테리움 인돌로제네스 균주 ISE14를 포함하는 식물 탄저병 방제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 크라이세오박테리움 인돌로제네스 균주 ISE14를 이용한 식물 탄저병 방제방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 식물의 수량을 증진시키며 성숙을 촉진시킬 수 있는 우리나라의 근권 토양에서 분리한 내생 근권 세균 크라이세오박테리움 인돌로제네스 균주 ISE14를 포함하는 성숙촉진용 조성물을 제공하는 것

이다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 상기 크라이세오박테리움 인돌로제네스 균주 ISE14를 이용한 식물의 성숙을 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 탄저병에 대한 길항 효과를 가지는 토양 근권세균을 선발하여 확보하기 위하여 전국의 다양한 작물의 근권 토양을 수집하였으며, 그 중 오이의 근권 토양에서 분리한 ISE14 균주를 확보하였고, 이 균주는 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주로 동정되었다. ISE14 균주를 경기도 남양주시 덕소에 위치한 고려대학교 부속농장에서 2008년과 2009년의 2년 동안 포장과 시설에서 고추를 재배하여 발생하는 고추 탄저병에 대한 방제효과를 평가하였으며, 또한 ISE14 균주 처리에 따른 고추 수량 및 고추 성숙 촉진 효과를 검증하였다. 그 결과 상기 ISE14 균주가 고추 탄저병에 대한 생물적 방제 및 식물생장촉진 내지 성숙촉진에 효과가 뛰어난 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0016] 따라서 본 발명은 상기 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14(기탁번호 KACC 91370P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 탄저병 방제에 사용될 수 있는 무독성이고 친환경적인 살균제 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14(기탁번호 KACC 91370P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 조성물을 식물에 처리하는 단계를 포함하는 식물 탄저병 방제방법도 제공한다.

[0018] 본 발명은 상기 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14(기탁번호 KACC 91370P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 성숙촉진용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14(기탁번호 KACC 91370P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 조성물을 식물에 처리하는 단계를 포함하는 식물 성숙 촉진 방법도 제공한다.

[0020] 본 발명에 따른 조성물 및 방법에 있어서, 상기 균주 또는 대사산물은 상기 균주의 균체, 상기 균주의 현탁액, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 휘발성 물질의 농축물 및 상기 배양물의 건조물 등의 상태로 이용될 수 있다. 상기 균주의 균체는 균 자체의 몸체 및 포자를 모두 포함하는 의미이며, 상기 현탁액은 상기 균체가 증류수, 생리식염수, 완충액 등에 현탁된 상태를 의미하고, 상기 배양물은 균체 포함 및 균체 비포함 배양물을 모두 포함하며, 상기 농축물 및 건조물은 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라서 농축 또는 건조된 것을 의미한다. 바람직하게 상기 균주 대사산물은 휘발성 물질이다.

[0021] 본 발명에 따른 조성물 및 방제방법에 있어서, 상기 탄저병은 콜레토티리쿰(*Colletotrichum* sp.)의 병원균에 의해 발생하는 탄저병인 것을 특징으로 한다. 예컨대, 상기 식물 탄저병은 콜레토티리쿰 아쿠타툼(*Colletotrichum acutatum*), 콜레토티리쿰 코코데스(*Colletotrichum coccodes*), 콜레토티리쿰 글로이오스포리 오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 콜레토티리쿰 데마티움(*Colletotrichum dematium*), 글로메렐라 싱굴라타(*Glomerella cingulata*) 및 콜레토티리쿰 라제나리움(*Colletotrichum lagenarium*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 병원균에 의해 발생하는 탄저병일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0022] 본 발명에 따른 조성물 및 방법에 있어서, 적용 가능한 식물은 특별한 제한은 없으며, 예를 들어 고추, 파프리카, 딸기, 토마토, 수박, 오이 및 사과로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 식물에 적용이 가능하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 본 발명에 따른 조성물 및 방법에 있어서, 탄저병 방제용 또는 성숙촉진용 조성물을 식물에 처리하는 방법에는 특별한 제한은 없으며, 예를 들어 정식 전 식물에 딥핑처리(root-dipping)하거나 관주 처리하여 이용할 수 있다. 침지하는 방법의 경우, 식물체 주변에 조성물을 붓거나 또는 종자를 담가둘 수 있다.

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

- [0025] 본 발명자들은 고추 역병에 대한 길항 효과를 가지는 토양 근권세균을 선발하여 확보하기 위하여 전국의 다양한 작물의 근권 토양을 수집하여, 그 중 ISE14 균주를 확보하여 기탁번호 KACC 91370P로 기탁한 바 있는데 이 균주는 탄저병의 방제 및 성숙 촉진에도 효과적인 것으로 확인되어 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0026] 본 발명에 의한 ISE14 균주는 오이의 근권 토양에서 분리한 우리나라의 토양 환경에서 수집된 자원으로써, 탄저병원균의 생장에 뛰어난 억제 효과가 있었다(표 8 참조). 또한, 본 발명에 의한 근권세균 ISE14 균주는 다양한 처리에 의한 2년 동안의 시설재배 및 포장재배에서도 매우 안정적으로 고추 탄저병을 억제하는 것으로 확인되었다(표 2 및 표 3 참조). 나아가, 본 발명에 의한 ISE14 균주는 다양한 처리에 의한 2년 동안의 시설재배 및 포장재배에서 고추 수량 증진 및 고추 성숙촉진에 효과적인 것으로 확인되었다(표 4 내지 표 7 참조).
- [0027] 본 발명에 의한 ISE14 균주는 16S rRNA 서열 분석, 형태학적 특성 등을 통해 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*)에 속하는 동정되었고, 크라이세오박테리움 인돌로제네스 균주 ISE14라 명명되고 기탁되었다(기탁번호 KACC 91370P).
- [0028] 보다 구체적으로 본 발명에 의한 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14는 16S rRNA 염기서열(서열번호 1)을 분석한 결과 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*)와 99%의 상동성을 보인다(도 1a 및 도 1b 참조).
- [0029] 또한, 본 발명에 의한 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14는 간상형이며, 편모가 없으며 세균 표면에 수많은 필리(pili)가 존재하며 점질성 물질이 세포 표면에 다량 존재하며(도 2a 및 도 2b 참조), 96종류의 당 이용 능력을 조사해 본 결과 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*)와 가장 유사한 것으로 확인되었다(도 3 참조).
- [0030] 나아가 본 발명에 의한 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14는 FAME(Fatty acid methyl ester) 분석 결과 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14와 가장 유의적인 것으로 확인되었다(도 4).
- [0031] 그러므로 16S rRNA 분석, 전자현미경에 의한 형태적 관찰, Biolog 분석에 의한 탄소원 이용 정도, 세균의 지방산 분석을 통하여 본 발명에 의한 ISE14 균주는 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*)에 속하는 균주인 것으로 확인되었다(도 1a ~ 도 4).
- [0032] 본 발명에 의한 분리된 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14 및 이 균주의 대사산물은 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 충진제 등을 혼합하여 무공해, 친환경 식물병 방제용 살균제 조성물 및 성숙촉진용 조성물로 제조될 수 있어, 고추를 포함한 식물 탄저병 방제 및 성숙촉진에 매우 유용하게 이용될 수 있다.
- [0033] 따라서 본 발명에 의한 토양 근권 세균 ISE14 균주는 고추 등 식물 탄저병에 대한 길항효과를 가지는 생물적 방제 및 식물생장 내지 성숙 촉진 세균으로써 활용할 수 있을 것이다.

발명의 효과

- [0034] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14는 우리나라 토양 근권세균으로서 포장에서도 식물 탄저병에 대하여 뛰어난 병억제 효과를 나타내기 때문에 친환경적으로 식물 탄저병을 방제할 수 있는 효과를 도모할 수 있을 것이다. 또한, 기존에 사용하였던 농용 살균제의 사용량을 감소시킬 수 있어 환경오염과 저항성 균주의 출현 등의 문제를 해결할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명에 의한 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14를 포함하는 조성물은 친환경적으로 고추를 포함한 식물의 수확량을 증가시키는 동시에 성숙을 촉진시킬 수 있는 효과를 도모할 수 있다. 특히 본 발명에 의한 조성물은 고추의 성숙을 촉진시켜서 상품적 가치가 높은 붉은 고추의 수량을 증진시키는 생물적인 비료로도 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1a 및 도 1b는 본 발명에 의한 ISE14 균주의 분자적 동정을 위한 16S rDNA 염기 서열과 계통도를 나타내는 도면이다.
- 도 2a 및 도 2b는 본 발명에 의한 ISE14 균주의 세균동정을 위한 투과전자현미경에 의한 세균 형태를 나타내는 도면이다.
- 도 3은 본 발명에 의한 ISE14 균주의 세균동정을 위한 생리적 당 이용도 BIOLOG 분석 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 4는 본 발명에 의한 ISE14균주의 세균동정을 위한 세균의 지방산(fatty acid methyl ester, FAME) 분석 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 5는 식물 탄저병원균의 분자적 동정을 위한 염기서열과 분류적 위치를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 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.

[실시예 1] 탄저병에 대한 길항 토양 근권세균 ISE14 균주의 분리

- [0039] 탄저병에 대한 길항 근권세균을 선별하기 위하여, 본 발명은 표 1에서 표기한 것과 같이 2002년에 우리나라 전라북도 익산 지역의 포장에서 재배된 오이를 샘플링 한 후, 오이의 뿌리 내부에서 세균을 분리하기 위하여 오이 뿌리 10g을 1% NaOCl 용액에 90초 동안 담구어 표면 살균을 한 후 살균 증류수로 여러 번에 걸쳐 씻어냈다. 표면 살균한 오이 뿌리를 살균된 분쇄기로 완전히 분쇄하였으며, 이 분쇄된 뿌리를 100ml의 살균수에 넣고 28℃ 160 rpm에서 30분 동안 진탕하였다. 이 현탁액을 사이클로헥사마이드(cyclohexamide)가 50mg/L의 농도로 혼합되어 있는 TSA(tryptic soy agar, Difco, Detroit, USA) 배지에 도말하여 48시간 동안 배양 한 후, 형태적으로 다른 세균을 분리하였으며, 그 중 노란색의 ISE14 균주를 분리하였다. 분리한 ISE14 균주는 20% 글라이세롤이 혼합된 NB(Nutrient broth, Difco, Detroit, USA) 배지에 배양되어 -70℃에서 보관되었다. 표 1은 탄저병에 대한 근권 길항세균 ISE14 균주의 분리 지역, 작물, 시기 등의 정보를 나타낸다.

표 1

지역	수집 년도	분리원	기주
익산	2003년	뿌리 내부	오이

[실시예 2] 탄저병에 대해 병억제 효과가 있는 근권 길항세균 ISE14 균주의 분자적, 생리적 특성을 이용한 균 동정

- [0042] 탄저병에 대하여 병억제 효과가 있는 근권 길항세균 ISE14 균주를 분자적, 생리적 특성을 이용하여 방법을 사용하여 동정하였다. 세균 동정을 위하여 일반적으로 사용하는 세균의 16S rRNA 염기서열(sequence)을 증폭하기 위하여 ISE14 균주의 DNA를 분리하였다. ISE14 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 10000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액만 수거하여 같은 양의 이소프로판올(isopropanol)을 혼합한 후 DNA를 수확하였다. 수확한 DNA는 70% 에탄올로 2회 세척하여 사용하였다.

- [0043] 이와 같이 분리한 ISE14의 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 겔에 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 50 μ l를 수확하여 1.5ml의 멸균된 튜브에 담은 후 400 μ l의 TE 버퍼(buffer)와 혼합하였다. 이 후 450 μ l의 페놀:클로로포름 (24:1) 용액을 첨가하여 3분 동안 섞은 후 13,000rpm에서 7분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 상등액 400 μ l를 새로운 튜브에 넣은 후 44 μ l의 3M 소디움아세테이트(Sodium acetate, pH 5.2)를 첨가하고 섞어 주었으며, 1ml의 99% 에탄올을 첨가한 후 -20℃에서 15분간 두었다. 이 후 13,000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 액체 부분을 제거하고, 다시 70% 에탄올 500 μ l를 혼합하여 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 순수한 PCR 산물을 얻었다.
- [0044] 이와 같은 방법으로 순화된 PCR 산물을 fd1 (AGAGT TTVAT CCTGGG; 서열번호 2)와 rp2 (ACGGC TACCT TGTTA CGACTT; 서열번호 3) 프라이머로 염기서열결정(sequencing)을 하였으며 약 1,400개의 염기서열을 분석하여 NCBI에서 블라스트(blast)하여 분석하였다. 16S rDNA 염기서열(서열번호 1)을 분석한 결과 ISE14 균주는 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*)와 99%의 상동성을 보이는 것으로 나타났다(도 1a 및 도 1b).
- [0045] 또한, 투과전자현미경을 통하여 ISE14 균주의 편모와 세균의 형태를 관찰하기 위하여, NA배지에서 24시간 동안 ISE14 균주를 배양하였으며, 단일 균총의 ISE14 세균 현탁액을 골드 코터(gold coater) 위에 고정시킨 후 투과전자 현미경으로 관찰하였으며, 그 결과 ISE14 균주는 간상형이었으며, 편모가 관찰되지 않았고 세균 표면에 수많은 필리(pili)가 존재하며 점질성 물질이 세포 표면에 다량 존재한다는 것이 관찰되었다(도 2a 및 도 2b).
- [0046] ISE14 균주가 서로 다른 96종류의 당을 이용할 수 있는지를 확인하기 위하여 GN2 Biolog system을 사용하여 분석하였다. Biolog system을 이용하기 위하여, ISE14 균주는 24시간 동안 TSA 배지에서 배양하였으며, 0.8%의 생리 식염수로 세균 현탁액을 준비하여 분광광도계로 A600에서 O.D=0.5로 세균 농도를 맞추었다. 이 세균 현탁액을 GN2 Biolog 96 well plate에 100 μ l씩 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 ISE14 균주는 당이용 능력에서 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*)와 가장 유사한 것으로 확인되었다(도 3).
- [0047] 세균의 지방산 함량에 따른 세균 분류 및 동정을 하기 위하여, ISE14 세균의 지방산 (fatty acid methyl ester, FAME) 부분을 추출하여 MIDI 시스템을 이용한 가스크로마토그래피에 의해 동정하였다. ISE14의 지방산 (fatty acid methyl ester, FAME) 부분을 분석한 결과, 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*)와 가장 유의적인 것으로 확인되었다(도 4).
- [0048] 그러므로 16S rRNA 분석, 전자현미경에 의한 형태적 관찰, Biolog 분석에 의한 탄소원 이용 정도, 세균의 지방산 분석을 통하여, 본 발명에 의한 ISE14 균주는 크라이세오박테리움 인돌로제네스 (*Chryseobacterium indologenes*) 균주 ISE14으로 동정할 수 있다(도 1a ~ 도 4).
- [0049] [실시예 3] ISE14 균주의 고추 탄저병에 대한 병억제 효과 시설재배 검증
- [0050] 길항세균 ISE14 균주가 고추 탄저병에 의한 병발생을 감소시키는 효과가 있는지 2008년과 2009년에 경기도 남양주시 덕소에 위치한 고려대학교 부속 농장의 비닐하우스 시설 재배 시설에서 병억제 효과를 검증하였다.
- [0051] 시설재배 검정을 하기 위하여 ISE14 균주를 NA (nutrient agar, Difco, USA) 배지에서 48시간 동안 28℃에서 배양하였고, 단일 균총을 NB (nutrient broth, Difco, USA) 5ml에 24시간 동안 전배양 한 후, 전배양한 ISE14

균주를 500ml의 NB에 접종하여 48시간 동안 28℃에서 160rpm으로 배양하였다. 배양된 ISE14균주를 5000rpm에서 15분 동안 원심 분리하여, ISE14 균주의 세포를 수확한 후 10mM MgSO₄ 버퍼로 세균현탁액을 만들었다. 세균현탁액은 분광광도계로 흡광도를 측정하여 10mM MgSO₄ 버퍼로 A600에서 O.D=0.5 (약 10⁸ cell/ml)의 농도로 맞추었다.

[0052] 이렇게 만들어진 세균 현탁액을 2008년 4월 19일과 2009년 4월 18일에 고추 유묘에 100ml씩 관주처리하였고, 2008년 4월 22일과 2009년 4월 20일에 시설하우스 재배 시설에 정식하였다. 병 평가는 2008년 8월 2일에 15식물씩 4반복으로 수행하였고, 2009년에는 7월 29일에 20식물씩 4반복으로 수행되었다. 표 2에 그 결과를 나타내었다. 즉 표 2는 길항세균 ISE14 균주에 의한 고추 탄저병에 대한 병억제 효과를 시설재배에서 검정한 결과를 나타낸다(2008~2009년, 경기도 남양주시 덕소 고려대학교 부속 농장).

표 2

[0053]

연도와 처리	병발생율 (%)		
	푸른 고추	붉은고추	푸른+붉은 고추
2008			
무처리	1.7 ± 1.2	8.3 ± 1.4	4.1 ± 1.4
ISE14	0.7 ± 0.5	5.0 ± 0.5	2.2 ± 0.2
2009			
무처리	5.5 ± 1.1	8.6 ± 0.7	7.3 ± 0.4
ISE14	1.3 ± 0.4	4.0 ± 0.9	2.8 ± 0.6

[0054] 표 2에 나타난 바와 같이, ISE14를 처리한 시설재배의 고추에서는 푸른 고추와 붉은 고추에서 2008년과 2009년에 모두 무처리 대조구에 비하여 탄저병의 발생이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 2008년에 무처리 대조구가 푸른 고추와 붉은 고추, 푸른+붉은 고추에서 1.7, 8.3과 4.1 % 탄저병이 발생하였을 때 ISE14 처리구에서는 각각 0.7, 5.0과 2.2 % 탄저병이 발생하였다. 2009년에도 2008년과 유사하게 ISE14 처리에 의해 탄저병발생이 감소하였는데, 무처리 대조구가 푸른 고추와 붉은 고추, 푸른+붉은 고추에서 5.5, 8.6과 7.3 % 탄저병이 발생하였을 때 ISE14 처리구에서는 각각 1.3, 4.0과 2.8 % 탄저병이 발생하였다. 2008년에는 ISE14가 무처리 대조구에 비하여 탄저병을 40~59% 감소시켰고, 2009년에는 53~76% 병을 감소시켰다.

[0055] [실시예 4] ISE14 균주의 고추 탄저병에 대한 병억제 효과 포장재배 검증

[0056] 길항 세균 ISE14는 시설재배 검증에서와 같이 준비하였으며, 세균 현탁액을 2008년 6월 13일, 2009년 5월 14일에 고추 유묘에 100ml씩 관주처리하여 정식하였으며, 고추 열매는 2008년 9월 2일 수확하여 7식물씩 4반복으로 수행하였고, 2009년에는 8월 5일에 수확하여 10식물씩 4반복으로 탄저병의 발생을 평가하였다. 표 3에 그 결과를 나타내었다. 즉 표 3은 길항세균 ISE14 균주에 의한 고추 탄저병에 대한 병억제 효과를 포장재배에서 검정한 결과를 나타낸다(2008~2009년, 경기도 남양주시 덕소 고려대학교 부속 농장).

표 3

[0057]

연도와 처리	병발생율(%)		
	푸른 고추	붉은 고추	푸른 + 붉은 고추

2008			
무처리	9.3 ± 1.7	45.3 ± 4.6	15.9 ± 1.5
ISE14	3.6 ± 0.6	12.6 ± 3.0	5.4 ± 0.6
2009			
무처리	8.9 ± 0.6	21.9 ± 3.8	12.8 ± 1.4
ISE14	2.4 ± 0.2	16.7 ± 6.0	8.3 ± 2.5

[0058] 표 3에 나타난 바와 같이, ISE14를 처리한 경우 포장재배의 고추에서는 2008년과 2009년에 모두 무처리 대조구에 비하여 탄저병의 발생이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 2008년에 무처리 대조구에 비하여 푸른 고추에서 61%, 붉은 고추에서 72%, 푸른+붉은 고추에서 66% 탄저병을 감소시켰으며, 2009년에는 무처리 대조구에 비하여 ISE14를 처리한 포장 재배 고추에서 푸른 고추에서 73%, 붉은 고추에서 24%, 푸른+붉은 고추에서 35% 탄저병을 감소시켰다 (표 3).

[0059] [실시예 5] ISE14 균주의 시설재배에서 수량 증진 효과

[0060] 길항 세균 ISE14를 처리한 시설 재배의 고추에서 고추 생산이 증진되는지 알아보기 위하여 세균 현탁액을 위에 설명한 것과 동일하게 준비하여 2008년 4월 19일과 2009년 4월 18일에 고추 유묘에 100ml씩 관주처리하였고, 2008년 4월 22일과 2009년 4월 20일에 시설하우스 재배 시설에 정식하였다. 수량 증진 평가는 2008년 8월 2일에 15식물씩 4반복으로 수행하였고, 2009년에는 7월 29일에 20식물씩 4반복으로 수행되었고, 2회에 걸쳐서 고추의 수와 수확량을 측정하였다 (표 4와 5). 표 4는 길항세균 ISE14 균주에 의한 고추 수 증진 효과를 시설재배에서 검정한 결과를 나타낸 것이고, 표 5는 길항세균 ISE14 균주에 의한 고추 수확량 증진 효과를 시설재배에서 검정한 결과를 나타낸 것이다 (2008~2009, 경기도 남양주시 덕소 고려대학교 부속 농장).

표 4

[0061]

연도와 처리	고추 수					
	1차 수확			2차 수확		
	푸른 고추	붉은 고추	푸른+붉은 고추	푸른 고추	붉은 고추	푸른+붉은 고추
2008						
무처리	171.0±12.6	302.3±22.3	473.3±28.0	234.5±19.7	223.0±14.2	457.5±32.1
ISE14	209.8±14.9	407.5±15.5	617.3±12.8	295.8±18.6	229.3±12.6	525.0±12.2
2009						
무처리	142.8±11.3	209.8±4.8	352.5±15.6	62.5±9.0 b	88.0±13.9	150.5±20.2
ISE14	158.0±4.8	205.5±7.1	363.5±11.6	116.8±15.8	125.5±6.0	242.3±20.2

표 5

연도와 처리	붉은 고추 무게	
	1차 수확	2차 수확
2008		
무처리	3.4 ± 0.4	4.6 ± 0.5
ISE14	4.1 ± 0.3	4.8 ± 0.1
2009		
무처리	2.9 ± 0.4	1.2 ± 0.1
ISE14	3.9 ± 0.4	2.4 ± 0.2

표 4 및 5에 나타난 바와 같이, 2008년과 2009년에는 1차와 2차 수확 동안에 ISE14 균주를 처리할 경우에 무처리 대조구에 비하여 약 1.0~1.9배로 고추 수가 증가하였고, 고추 무게는 1.0~2배 증가하였다. 특히 시설 재배에서 붉은 고추의 생산량이 2008년에는 1차 수확시에 ISE14 균주 처리에 의해서 약 1.2배의 증가를 가져왔으며, 2009년에는 붉은 고추 생산량이 1차 수확에는 1.3배, 2차 수확에는 2배 증가하였다 (표 5).

[실시예 6] ISE14 균주의 포장재배에서 수량 증진 효과

길항 세균 ISE14를 고추에 처리할 경우에 포장 재배할 때 시설재배에서와 유사하게 고추 생산이 증가하는지 알아보기 위하여 생산된 고추의 수와 수확량을 측정하였다 (표 6과 7). 표 6은 길항세균 ISE14 균주에 의한 고추 수 증진 효과를 포장재배에서 검정한 결과를 나타낸 것이고, 표 7은 길항세균 ISE14 균주에 의한 고추 수확량 증진 효과를 포장재배에서 검정한 결과를 나타낸 것이다 (2008~2009, 경기도 남양주시 덕소 고려대학교 부속 농장).

표 6

연도와 처리	수확한 고추 수		
	푸른 고추	붉은 고추	푸른+붉은 고추
2008			
무처리	99.3 ± 0.8	21.3 ± 5.3	120.7 ± 5.5
ISE14	134.0 ± 18.9	40.0 ± 9.1	174.0 ± 26.1
2009			
무처리	43.8 ± 7.8	17.3 ± 4.6	61.0 ± 5.5
ISE14	60.8 ± 15.7	34.3 ± 2.9	95.0 ± 13.3

표 7

[0067]

연도와 처리	수확한 고추 무게		
	푸른 고추	붉은 고추	푸른+붉은 고추
2008			
무처리	0.98 ± 0.01	0.22 ± 0.06	1.20 ± 0.17
ISE14	1.95 ± 0.28	0.58 ± 0.13	2.53 ± 0.38
2009			
무처리	0.60 ± 0.08	0.30 ± 0.10	0.90 ± 0.12
ISE14	1.12 ± 0.29	0.46 ± 0.03	1.58 ± 0.28

[0068]

표 6 및 7에 나타난 바와 같이, ISE14 균주 처리에 의한 포장 재배시 고추의 수확은 고추의 수가 2008년과 2009년에는 1차와 2차 수확시 동안에 무처리 대조구에 비하여 약 1.3~2.0배 범위로 증가하였고, 고추 무게는 1.5~2.6배 증가하였다. 포장에서 푸른 고추의 수는 2008년에는 ISE14균주 처리에 의해 대조구보다 1.3배, 붉은 고추의 수는 1.9배 증가하였으며, 2009년에는 푸른 고추는 1.4배 붉은 고추는 2배 증가하였다 (표 6). 또한 생산된 고추의 무게도 2008년에는 ISE14 균주 처리에 의해 대조구에 비하여 푸른 고추는 2배, 붉은 고추는 2.6배 수확량이 증가하였으며, 2009년에는 각각 1.9배, 1.5배 증가하였다 (표 7).

[0069]

[실시예 7] ISE14 균주의 고추 탄저병원균 생장 억제 효과 검증

[0070]

ISE14 균주에 의해 고추에 발생하는 탄저병이 감소하였고, 또한 고추의 수확량이 증가하였는데 이 중에서 복합적인 휘발성 물질의 형성에 의하여 붉은 고추로의 고추 성숙을 촉진하는 효과가 있음을 관찰한 결과를 토대로 하여, ISE14가 분비하는 휘발성 물질에 의하여 고추 탄저병원균의 생장에 영향을 주는지 평가하였다.

[0071]

이를 위하여 직경 9cm의 페트리디쉬 중에서 중간에 칸막이가 형성되어 있어서 직접적으로 ISE14 균주와 탄저병원균이 만나지는 않고 오로지 ISE14 균주가 형성하는 휘발성 물질에 의한 효과만을 평가할 수 있는 페트리디쉬(I-plate)를 사용하였다. 이 페트리디쉬의 반은 ISE14 배양을 위하여 NA배지를, 나머지 반은 고추 탄저병원균을 배양하기 위하여 PDA (potato dextros agar, Difco, USA)를 만들었다. ISE14 균주는 위에서 설명한 것과 동일한 방법으로 세균 현탁액을 준비하여 200 µl를 NA배지에 도말하였고, 고추 탄저병원균은 5일 동안 PDA배지에서 배양한 것의 균사 가장자리 부분을 코르크보러(직경 5mm)를 사용하여 동일한 크기의 균사 플러그를 만들어서 PDA에 배양하였다. 처리한 페트리디쉬는 파라필름(parafilm)으로 밀폐하여 28℃ 배양기에서 배양하여 평가하였다.

[0072]

이 때 사용한 고추 탄저병원균은 2008년과 2009년에 포장과 시설재배 시 발생한 고추 탄저병을 병반으로부터 분리하여 사용하였다. 병반으로부터 고추 탄저병원균을 분리하기 위하여, 병반을 1% NaOCl로 표면살균한 후 50 µg/ml의 농도로 스트렙토마이신(streptomycin)을 넣은 PDA에 배양하여 나온 균사를 순수분리하여 배양하였다. 배양된 고추 탄저병원균 중에서 형태적으로 가장 일반적인 균주 3균주를 선발하여 CTAB방법에 의하여 DNA를 분리하였으며, 이를 PCR로 증폭한 후 염기서열을 분석하여 모두 콜레토크리툼 아쿠타툼(*Colletotrichum acutatum*)으로 동정한 후 이를 사용하였다 (도 5, 서열번호 4 ~ 6). 배양 한 후 균사의 길이를 측정하였으며, 측정 한 후 1ml 1차 살균 증류수로 포자를 수확하여 포자량을 200배 현미경에서 헤모사이토미터(hemocytometer)를 사용하여 측정한 후 균사 생장한 단위면적에 대하여 계산하였다. 또한, 수확한 포자를 슬라이드글라스 위에 20 µl씩 놓은 후 24시간 동안 배양 한 후 발아율과 부착기 형성률을 평가하여, 고추 탄저병원균의 생장에 대한 평가를 실행하였다. 표 8에 그 결과를 나타내었다. 즉 표 8은 길항세균 ISE14 균주에 의한 고추 탄저병원균의 생장(균사 생장, 포자형성량, 발아율, 부착기 형성률) 억제 효과를 검증한 결과를 나타낸

다.

표 8

처리	균사길이(mm)	포자형성율 (%)	발아율 (%)	부착기형성율 (%)
무처리	23.90 ± 0.78	5.46 ± 0.07	88.51 ± 1.50	86.19 ± 1.53
ISE14	24.19 ± 0.96	5.03 ± 0.05	50.51 ± 4.33	55.62 ± 3.84

표 8에 나타난 바와 같이, ISE14가 형성한 휘발성 물질에 의하여 균포자 형성률은 8%, 발아율은 43%, 부착기 형성률은 35% 감소하였다. 특히 발아율과 부착기 형성률의 감소가 현저하게 나타났으며, 이는 고추 탄저병원균의 고추 표면에서 생존하여 부착기를 형성한 후 침입하는 기작에 ISE14의 휘발성 물질이 영향을 주는 것으로 알 수 있다.

수탁번호

기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91370

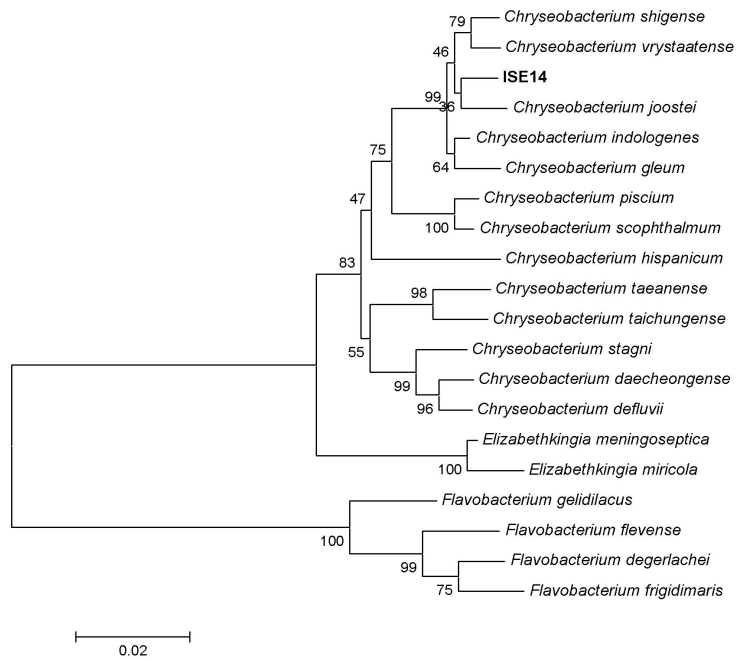
수탁일자 : 20080317

도면

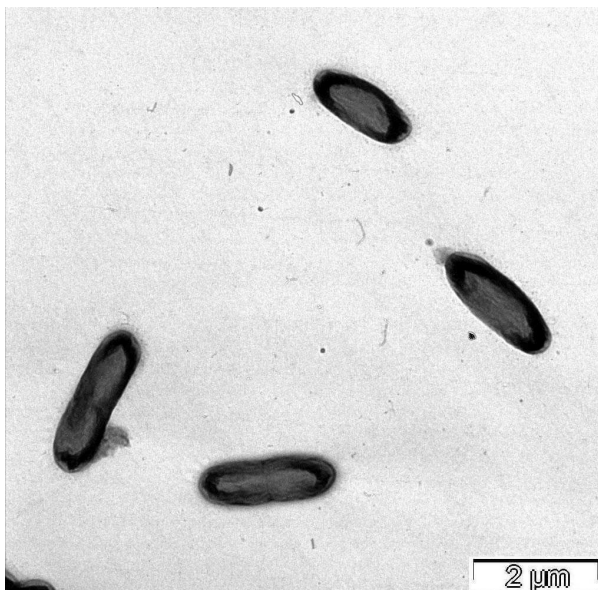
도면1a

CATGCAAGCCGAGCGGTAGAGATCTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGT
ACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGCCTTTATCTGGGGGATAGCC
TTTCGAAAGGAAGATTAAATACCCATAATATCTGGATGGCATCATTCTG
GTATTGAAAACTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGTCTACGATCTTTAGGGGGCTGAC
GAGGGTGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCTAC
GGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGGTGAGAGCCTGATCC
AGCCATCCCGCTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAACCTTCTTT
TGTATAGGGATAAACCTACTCTCGTGAGAGTAGCTGAAGGTACTATAC
GAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAG
GGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGG
ATGTGTAAGTCAGTGGTAAATCTCACAGCTTAACTGTGAACTGCCA
TTGATACTGCATGCTTGAAGTGTGTTGAAGTAGCTGGAATAAGTAGT
GTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCCAAGGC
AGGTTACTAAGCAACAACCTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGCTAACT
CGTTTTTGGAGCGCAAGCTTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAAGTTAG
CCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAAATGAACTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGATTATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGA
GGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGAAATGACAGGTTTAGAAATAGAC
TTTTCTTCGACATTTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTG
CCGTGAGGTGTTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCT
AGTTGCCATCATTAAAGTTGGGACTCTAGTGAGACTGCCTACGCAAGT
AGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGCCT
TGGGCCACACGTAATACAATGGCCAGTACAGAGGGCAGCTACACG
GTGACGTGATGCAATCTCGAAAGCTGGTCTCAGTTGCGATTGGAGTC
TGCAACTCGACTCTATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGC
CATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAA
GCCATGGAAGTCTGGGGTACCTGAAAGTCGGTGACCGTAACAGGAGCT
GCCTAGG

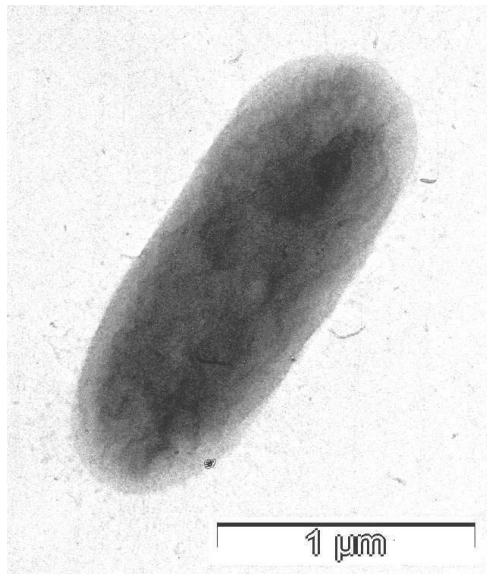
도면1b



도면2a



도면2b



도면3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	<549>	<600>	<631>	<468>	<516>	<413>	<381>	<371>	294+	<372>	<354>
B	<349>	<527>	<376>	<348>	<647>	<621>	<360>	<357>	<346>	<552>	<589>	<496>
C	<421>	<339>	<399>	<351>	<357>	<399>	<378>	<606>	<380>	<349>	<381>	<410>
D	<510>	<327>	<482>	<594>	<347>	<406>	<381>	<396>	<346>	<350>	<354>	<374>
E	121	<310>	<597>	<329>	<446>	<334>	<384>	<571>	<404>	<340>	90	<334>
F	220	<367>	249	<410>	294+	<442>	<578>	<538>	<517>	<665>	<630>	<571>
G	<362>	<413>	<426>	<456>	<515>	<575>	<349>	236+	<518>	<623>	<371>	276
H	276+	<448>	<546>	<415>	120	36	274	<425>	<485>	<650>	<457>	<388>

=> Species ID : **CHRYSEOBACTERIUM GLEUM/INDOGENES** <=

	Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1)	CHRYSEOBACTERIUM GLEUM/INDOGENES	94	0.678	4.18	GN-NENT
2)	BREVUNDIMONAS VESICULARIS	6	0.042	5.09	GN-NENT
3)	CHRYSEOBACTERIUM SCOPHTHALMUM	0	0.001	6.24	GN-NENT
4)	PHOTOBACTERIUM LOGEI	0	0.000	9.25	GN-NENT
5)	AQUASPIRILLUM DISPAR	0	0.000	10.79	GN-NENT
6)	BREVUNDIMONAS DIMINUTA	0	0.000	11.49	GN-NENT
7)	BERGEYELLA ZOOHELCUM	0	0.000	12.00	GN-NENT
8)	PSEUDOMONAS BATHYCETES	0	0.000	12.42	GN-NENT
9)	AGROBACTERIUM TUMEFACIENS/RADIOBACTER	0	0.000	12.76	GN-NENT
10)	SPHINGOMONAS MACROGOLTABIDUS	0	0.000	13.47	GN-NENT

(Other)

도면4

E06C267.36A [4165] ISE14

Volume: DATA File: E06C267.36A Seq Counter: 28 ID Number: 4165
 Type: Samp Bottle: 25 Method: TSBA50
 Created: 12/27/2006 4:54:08 AM
 Sample ID: ISE14

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.647	4.016E+8	0.027	----	7.015	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.756	40149	0.025	----	7.230		----	< min rt	
1.921	5127	0.026	----	7.559		----	< min rt	
1.990	322	0.025	----	7.696		----	< min rt	
2.553	241	0.026	----	8.815		----	< min rt	
4.737	659	0.041	----	11.976		----		
5.463	4076	0.032	1.014	12.613	13:0 ISO	0.87	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
6.684	9251	0.069	0.986	13.571	unknown 13.565	1.93	ECL deviates 0.006	
7.270	1085	0.036	0.975	14.001	14:0	0.22	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
7.908	760	0.040	0.967	14.416	15:1 ISO F	0.16	ECL deviates 0.001	
8.001	408	0.040	0.966	14.476	Sum In Feature 1	0.08	ECL deviates -0.002	15:1 ISO I/13:0 3OH
8.229	189956	0.039	0.963	14.625	15:0 ISO	38.64	ECL deviates 0.002	Reference 0.000
8.365	1512	0.039	0.961	14.714	15:0 ANTEISO	0.31	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
8.996	590	0.040	0.955	15.115	14:0 ISO 3OH	0.12	ECL deviates -0.004	
9.842	460	0.036	0.949	15.624	16:0 ISO	0.09	ECL deviates -0.003	Reference -0.005
10.211	51231	0.047	0.946	15.846	Sum In Feature 3	10.24	ECL deviates -0.006	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
10.464	4127	0.042	0.945	15.999	16:0	0.82	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
10.696	15157	0.043	0.944	16.134	15:0 ISO 3OH	3.02	ECL deviates 0.000	
11.189	104252	0.044	0.941	16.419	ISO 17:1 w9c	20.73	ECL deviates 0.003	
11.311	1920	0.050	0.941	16.490	Sum In Feature 4	0.38	ECL deviates 0.004	17:1 ANTEISO B/i I
11.470	5307	0.050	0.940	16.582	unknown 16.582	1.05	ECL deviates 0.000	
11.553	6823	0.041	0.940	16.630	17:0 ISO	1.35	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
12.465	1209	0.047	0.937	17.156	16:0 ISO 3OH	0.24	ECL deviates 0.006	
13.105	7280	0.045	0.936	17.520	16:0 3OH	1.44	ECL deviates 0.001	
13.599	1301	0.047	----	17.801		----		
13.812	3136	0.047	0.934	17.922	18:1 w5c	0.62	ECL deviates 0.003	
14.233	88958	0.047	0.934	18.162	17:0 ISO 3OH	17.55	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
14.403	648	0.046	0.934	18.259	17:0 2OH	0.13	ECL deviates 0.005	
16.999	2191	0.075	----	19.753		----		
18.439	2717	0.056	----	20.586		----	> max rt	
----	408	----	----	----	Summed Feature 1	0.08	15:1 ISO H/13:0 3OH	13:0 3OH/15:1 i I/H
----	----	----	----	----		----	15:1 ISO I/13:0 3OH	
----	51231	----	----	----	Summed Feature 3	10.24	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
----	1920	----	----	----	Summed Feature 4	0.38	17:1 ISO I/ANTEI B	17:1 ANTEISO B/i I

ECL Deviation: 0.003 Reference ECL Shift: 0.002 Number Reference Peaks: 8
 Total Response: 502299 Total Named: 498147
 Percent Named: 99.17% Total Amount: 473386

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0.842	Chryseobacterium-indologenes (Flavobacterium)
	0.835	Chryseobacterium-balustinum (Flavobacterium)

도면5

>G4 [Organism=Colletotrichum acutatum] Colletotrichum acutatum isolate G4; beta-tubulin gene, partial sequences
GGTGGGGAACCCACGCCACGACGCGGC GATTTGACATTTGAC
ACGATCTCGTACTGACCTCGGTACAGGCAAAACATTTCTGGCGA
GCACGGCCTCGACAGCAATGGCGTGTATGTCACCTGCTCCAG
TGTGGCTTCCTCATGGACCCAGCAGCTAATCATACCACAGGTAC
AACGGCACTTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTT
CAACGAAGTTTGTATCTAGTCCCCCAGTGTGCAGGCAATCCT
ATTGACAAATGCTGACCTTCTCACCCAAATAGGCCCC

>R14 [Organism=Colletotrichum acutatum] Colletotrichum acutatum isolate R14; beta-tubulin gene, partial sequences
GGTAACAGATTGGTGCTGCCCTTCTGGTGCGTAGCCAACCGCC
AACGACGCGGCGATTTGACATTTGACACGATCTCGTACTGACC
TCGGTACAGGCAAAACATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGC
AATGGCGTGTATGTCACCTTGTCTCCAGTGTGGCTTCCTCATGG
ACCCAGCAGCTAATCATACCACAGGTACAACGGCACTTCCGAGC
TCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAAGTTTGTAT
CCTAGTCCCCCAGTGTGCAGGCAATCCTATTGACGAATGCTGAC
CTTCTCACCCAGGCTCCGGCAACAAGTACGTTCCCCGC
GCCGTCTCGTCTGACTTGGAGCCGGTACCATGGACGCCGTCC
GTGCCGGTCCCTTTGGCCAGCTTTCCG

>R2 [Organism=Colletotrichum acutatum] Colletotrichum acutatum isolate R2; beta-tubulin gene, partial sequences
CGCCACGACGCGGCGATTTGACATTTGACACGATCTCGTACTG
ACCTCGGTACAGGCAAAACATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGAC
AGCAATGGCGTGTATGTCACCTTGTCTCCAGTGTGGCTTCCTCA
TGGACCCAGCAGCTAATCATACCACAGGTACAACGGCACTTCCG
AGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAAGTTTGT
TATCTAGTCCCCCAGTGTGCAGGCAATCCTATTGACAAATGCT
GACCTTCTCACCCAGGCTCCGGCAACAAGTACGTTCCCC
GCCGCGTCTCGTCTGACTTGGAGCCGGTACCATGGACGCCGT
CCGTGCCGGTCCCTTTGGCCAGCTTTTCCGCCCGACAACCTCG
TCTTTGGCCAGTCCGGTGCCGGCAACAACCTGGGCCA

서열 목록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation

<120> Composition for controlling anthracnose and ripening of plant
comprising Chryseobacterium indologenes strain ISE14 and
controlling method using the same

<130> P11-091230-02

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1392

<212> DNA

<213> Chryseobacterium indologenes ISE14

<400> 1

catgcaagcc gagcggtaga gatctttcgg gatcttgaga gcggcgtagc ggtgcggaac 60

acgtgtgcaa cctgccttta tctgggggat agcctttcga aaggaagatt aatacccat 120

aatatactgg atggcatcat tcggtattga aaactccggt ggatagagat gggcacgcgc 180

aagattagat agttggtgag gtaacggctc accaagtcta cgatctttag ggggcctgag 240

agggtgatec cccacactgg tactgagaca cggaccagac tctacggga ggcagcagtg 300

aggaatattg gacaatgggt gagagcctga tccagccatc ccgcgtgaag gacgacggcc 360
 ctatgggttg taaacttctt ttgtataggg ataaacctac tctcgtgaga gtagctgaag 420
 gtactatacg aataagcacc ggctaactcc gtgccagcag ccgcggtaat acggagggtg 480
 caagcgttat ccggatttat tgggtttaaa ggggccgtag gcggatgtgt aagtcagtgg 540

 tgaaatctca cagcttaact gtgaaactgc cattgatact gcatgtcttg agtgttgttg 600
 aagtagctgg aataagtagt gtagcgggtga aatgcataga tattacttag aacaccaatt 660
 gcgaaggcag gttactaagc aacaactgac gctgatggac gaaagcgtgg ggagcgaaca 720
 ggattagata ccttggtagt ccacccgta aacgatgcta actcgttttt ggagcgcaag 780
 cticagagac taagcgaaag tgataagtta gccacctggg gactacgttc gcaagaatga 840
 aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaaca agcgggtgat tatgtggttt aattcgatga 900
 tacgcgagga accttaccaa ggcttaaatg ggaaatgaca ggtttagaaa tagacttttc 960

 ttcggacatt tticaagggtg ctgcatgggt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgttaggt 1020
 taagtcttgc aacgagcgca acccctgtca ctagttgcca tcattaagtt ggggactcta 1080
 gtgagactgc ctacgcaagt agagaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcacggccct 1140
 tacgccttgg gccacacacg taatacaatg gccagtacag agggcagcta cacggtgacg 1200
 tgatgcaaat ctcgaaagct ggtctcagtt cggattggag tctgcaactc gactctatga 1260
 agctggaatc gctagtaatc gcgcacagc catggcgcgg tgaatacgtt cccgggcctt 1320
 gtacacaccg cccgtcaagc catggaagtc tggggtacct gaagtcggtg accgtaacag 1380

 gagctgccta gg 1392
 <210> 2
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 2
 agagttttat cctggg 16
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR PRIMER
 <400> 3

acggctacct tgttacgact t	21
<210> 4	
<211> 300	
<212> DNA	
<213> Colletotrichum acutatum	
<400> 4	
ggtggggaac ccacgccacg acgcggcgat ttcgacattt gacacgatct cgtactgacc	60
tcggtacagg caaaacattt ctggcgagca cggcctcgac agcaatggcg tgtatgtcac	120
ttgtctcca gtgtggcttc ctcatggacc cagcagctaa tcataccaca ggtacaacgg	180
catttccgag ctccagctcg agcgcatgag cgtctacttc aacgaagttt gttatcctag	240
tccccagtg tgcaggcaat cctattgaca aatgctgacc ttctaccca aataggcccc	300
	300
<210> 5	
<211> 419	
<212> DNA	
<213> Colletotrichum acutatum	
<400> 5	
ggtaaccaga ttggtgctgc cttctgggtgc gtagccaacc gccaacgacg cggcgatttc	60
gacatttgac acgatctcgt actgacctcg gtacaggcaa aacatctctg gcgagcacgg	120
cctcgacagc aatggcgtgt atgtcacttg tcctccagtg tggcttcctc atggaccag	180
cagctaatca taccacaggt acaacggcac ttccgagctc cagctcgagc gcatgagcgt	240
ctacttcaac gaagtttggt atcctagtcc ccagtggtgc aggcaatcct attgacgaat	300
gtgaccttc tcaccaacc aggcctccgg caacaagtac gttccccgcg ccgtcctcgt	360
cgacttggag cccggtacca tggacgccgt ccgtgccggt ccctttggcc agctttccg	419
<210> 6	
<211> 430	
<212> DNA	
<213> Colletotrichum acutatum	
<400> 6	
cgccacgacg cggcgatttc gacatttgac acgatctcgt actgacctcg gtacaggcaa	60
aacatctctg gcgagcacgg cctcgacagc aatggcgtgt atgtcacttg tcctccagtg	120
tggcttcctc atggaccag cagctaatca taccacaggt acaacggcac ttccgagctc	180

cagctcgagc gcatgagcgt ctacttcaac gaagtttggt atcctagtcc cccagtgtgc	240
aggcaatcct attgacaaat gctgaccttc tcaccaacc aggctccgg caacaagtac	300
gttccccgcg cgtctctcgt cgacttggag ccggtacca tggacgccgt cgtgccggt	360
ccctttggcc agcttttccg ccccgacaac ttcgtctttg gccagtccgg tgccggcaac	420
aactgggcca	430