

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0116245 (43) 공개일자 2009년11월11일
(51) Int. Cl. <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12N 1/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0042073 (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 8 항

(54) 고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내는 토양 근권세균슈도모나스 코루가타 C C R 8 0

(57) 요약

본 발명은 파이토프토라 캡시시(*Phytophthora capsici*)에 의한 고추 역병에 대해 뛰어난 생물적 방제 효과 및 식물체 생장 촉진 활성이 있는 친환경적 생물적 방제균인 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80, 이를 이용한 식물병 방제용 살균제 및 식물병 방제방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 친환경적으로 포장에서도 고추 역병을 우수하게 방제할 수 있고 수량 증가의 이점이 있다.

대표도 - 도1a

```

GTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGACCTCTTGAGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC
TGCTTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGC
AGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGG
CTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGGAAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATA
CGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
AGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGAT
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTG
GTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCA
CCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGCGCAGCTAACGCATTA
AGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAAT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTATGTTACCAGCACGTTATGGT
GGGCACTCTAAGGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG
CCCTTACGGCCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGGT
GAGCTAATCCCAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAAT
CGCTAGTAATCGCAATCAGAATGTGCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCCGTCCAC
ACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGTAGTCTAACCTTCGGGGGACGGTAC

```

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 슈도모나스 코루가타 균주 CCR80(*Pseudomonas corrugata* strain CCR80; 기탁번호 KACC 91367P).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물 병원균은 파이토프소라 캡시시(*Phytophthora capsici*)인 것을 특징으로 하는 슈도모나스 코루가타 균주 CCR80.

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.

청구항 7

제1항 기재의 균주 또는 이 균주의 배양여액을 유효성분으로 포함하는 식물체의 생장을 촉진시킬 수 있는 미생물 비료.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식물체는 고추인 것을 특징으로 하는 미생물 비료.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 고추 역병에 대한 길항 효과를 나타내며 고추 수량 증진 활성을 갖는 토양 근권세균 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 고추 생산에 심각한 피해를 야기하는 파이토프토라 캡시시(*Phytophthora capsici*)에 의한 고추 역병을 포함한 식물병에 대해 뛰어난 생물적 방제 효과가 있으며 또한 식물체의 생장을 촉진시킬 수 있는 친환경적 생물적 방제균인 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80, 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 길항효과를 발휘하지 못하는 경우가 많으며, 이는 식물체의 근권에서 처리된 미생물이 정착하여 생존하지 못하거나, 실험실의 제한된 조건에서만 길항 세균을 선발하기 때문이다.

- <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 병 억제 효과를 가지는 경우가 많지 않다. 그러므로 우리나라 환경에 적응하여 토착적으로 존재하고 있는 다양한 병 억제 기작을 가지고 있는 미생물을 이용하는 것이 바람직하다.
- <5> 또한 현대 농업이 집약적 농업으로 진행되면서 수량증가를 하기 위하여 과도한 양의 비료를 토양에 살포하여 토양에 이러한 고도의 양분이 집적되어 토양 환경이 산성으로 변하는 등의 악영향을 야기하였다. 이에 대한 대안으로써 미생물을 이용하여 식물의 성장을 촉진시키기 위한 연구가 진행되었으나, 직접적으로 식물의 수량을 증가시키는 미생물의 확보는 아직 미미한 실정이며, 외국의 식물 성장촉진효과 세균을 도입할 경우 로열티 지불과 국내 토양 환경의 변화 및 국내에서는 그 효과를 발휘하지 못하는 등의 여러 가지 문제점이 있다.
- <6> 종합적으로 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 연구 인력 및 기술 축적이 외국만큼 충분하지 않고 국내 재배여건에 적용되어 작물생산에 효과 있는 농용 생물농약의 사용 및 실용화는 미미한 실정이다.
- <7> 한편, 고추는 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.
- <8> 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.
- <9> 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.
- <10> 나아가 상술한 현대 농업의 과다 비료 살포로 인한 현상은 점진적으로 누적되고 있으므로 과도한 유기 합성 비료 사용에 의해 야기되는 토양 오염을 방지하면서 수량을 증진시키기 위한 대안이 절실히 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <11> 따라서 본 발명은 고추 역병을 포함한 식물병을 친환경적으로 방제하기 위하여 근권토양으로 분리한 세균 중 포장에서도 길항 효과가 우수한 근권세균 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <12> 또한, 본 발명의 목적은 상기 근권세균 균주를 이용하여 고추 역병을 포함한 식물병에 사용될 수 있는 무독성이고 친환경적인 미생물 살균제 및 식물병 방제방법을 제공하는 것이다.
- <13> 본 발명의 다른 목적은 식물의 성장을 촉진시킬 수 있는 미생물 비료를 제공하는 것이다.
- <14> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

- <15> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 우리나라 토양으로부터 신규의 토양 근권세균 슈도모나스 코루가타

(*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80을 분리하고, 이 균주가 실험실 조건뿐만 아니라 포장에서도 고추 역병 억제 효과가 뛰어나고 토착 미생물에도 영향을 주지 않으며, 식물체의 생장을 촉진시킬 수 있는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

- <16> 따라서, 본 발명은 고추 역병균을 포함한 식물병원균에 대한 길항 효과를 나타내는 슈도모나스 코루가타 균주 CCR80 (*Pseudomonas corrugata* strain CCR80; 기탁번호 KACC 91367P)을 제공한다.
- <17> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 신규의 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80 또는 이 균주의 배양여액을 함유하는 고추 역병을 포함하는 식물병 방제에 사용될 수 있는 무독성이고 친환경적인 살균제를 제공한다.
- <18> 또한 본 발명은 상기 신규의 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80 또는 이 균주의 배양여액을 이용하여 고추 역병을 포함하는 식물병을 방제하는 방법도 제공한다.
- <19> 나아가 본 발명은 상기 신규의 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80 또는 이 균주의 배양여액을 유효성분으로 포함하는 미생물 비료 및 이를 이용한 식물의 생장을 촉진시키는 방법을 제공한다.
- <20> 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- <21> 본 발명자들은 고추 역병을 포함한 식물병에 대한 길항 효과를 가지는 토양 근권세균을 선별하여 확보하기 위하여 전국의 다양한 작물의 근권 토양을 수집하여, 그 중 CCR80 균주를 확보하였다.
- <22> 본 발명에 의한 CCR80 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 효과가 있었다(표 1 내지 표 4 참조). 또한 본 발명에 의한 근권세균 CCR80 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). 나아가 본 발명에 의한 CCR80 균주는 비료를 사용하지 않고도 균주 자체 처리만으로도 고추의 수량을 증진시키는 효과가 있었다(표 10 참조).
- <23> 본 발명에 의한 CCR80 균주는 16S rRNA 서열 분석, 형태학적 특성 등을 통해 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)에 속하는 신규주로 동정되었고, 슈도모나스 코루가타 균주 CCR80라 명명되고 기탁되었다(기탁번호 KACC 91367P).
- <24> 보다 구체적으로 본 발명에 의한 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80은 16S rRNA 염기서열(서열번호 1)을 분석한 결과 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)와 99%의 상동성을 보인다(도 1a 및 도 1b 참조).
- <25> 또한 본 발명에 의한 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80은 간상형이며, 다른 슈도모나스 코루가타와 유사하게 한쪽 부분에 편모가 4 ~ 5 개 있으며(도 2a 및 도 2b 참조), 96종류의 당 이용 능력을 조사해 본 결과 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)와 가장 유사한 것으로 확인되었다(도 3 참조).
- <26> 나아가 본 발명에 의한 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80는 지방산(Fatty acid methyl ester, FAME) 분석 결과 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)와 가장 유의적인 것으로 확인되었다(도 4).
- <27> 그러므로 16S rRNA 분석, 전자현미경에 의한 형태적 관찰, Biolog 분석에 의한 탄소원 이용 정도, 세균의 지방산 분석을 통하여 본 발명에 의한 CCR80 균주는 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)에 속하는 새로운 균주인 것으로 확인되었다(도 1a ~ 도 4).
- <28> 본 발명에 의한 분리된 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80 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.
- <29> 나아가 본 발명에 의한 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80은 식물의 생장을 촉진시킴으로써 작물의 수량을 증진할 수 있어, 고추 등 식물체의 수량 증대를 위한 무공해, 친환경적 미생물 비료로도 이용할 수 있다.

<30> 따라서 본 발명에 의한 토양 근권 세균 CCR80 균주는 고추 역병에 대한 길항효과와 식물생장촉진에 의한 수량증가 효과를 동시에 가지는 생물적 방제 및 식물생장촉진 세균으로써 활용할 수 있을 것이다.

효 과

<31> 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80은 우리나라 토양 근권세균으로서 포장에서도 고추 역병에 대하여 뛰어난 병억제 효과를 나타내기 때문에 기존에 사용하였던 농용 살균제의 사용량을 감소시킬 수 있는 효과를 도모할 수 있을 것이다.

<32> 또한, 본 발명에 의한 CCR80 균주는 이 균주의 토양 처리에 의하여 토양 미생물의 수에 영향을 주지 않기 때문에 친환경적 생물적 방제제로써 생물 농약 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

<33> 나아가, 본 발명에 의한 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80은 식물 생장 촉진 효과가 있으므로 고추 등 작물의 수량을 증대시킬 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<34> 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.

<35> [실시예 1] 고추 역병에 대한 길항 토양 근권세균 CCR80 균주의 분리

<36> 고추 역병에 대한 길항 근권세균을 선별하기 위하여, 본 발명은 표 1에서 표기한 것과 같이 2003년에 우리나라 춘천 지역의 오이의 근권토양을 샘플링한 후(표 1), 오이 근권 토양으로부터 세균을 분리하기 위하여 샘플링한 토양 10g을 100ml 살균수에 넣고, 28℃ 160rpm에서 30분 동안 진탕하여 토양 현탁액을 만들었다. 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 연한 갈색의 CCR80 균주를 분리하였다. 분리한 CCR80 균주는 20% 글라이세롤이 혼합된 NB(Nutrient broth, Difco, Detroit, USA) 배지에 배양되어 -70℃에서 보관되었다. 표 1은 고추 역병에 대한 근권 길항세균 CCR80 균주의 분리 지역, 작물, 시기 등의 정보를 나타낸다.

표 1

지역	수집 년도	분리원	기주
춘천	2003년	뿌리 표면	오이

<38> [실시예 2] CCR80 균주의 고추 역병에 대한 길항 효과 유근(radicle) 검증

<39> 오이 토양의 근권에서 분리한 근권세균 CCR80 균주가 고추 유근(radicle)에서 고추 역병에 의한 감염율을 감소시키는 효과가 있는지를 평가하였다. 고추의 유근에서 고추 역병의 감염률 감소 효과를 평가하기 위하여, 고추 종자를 1% NaOCl에서 1분 30초 동안 표면 살균한 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. 이 유근 검증을 위하여 10개 종자를 3반복하여 실험하였다.

<40> 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.

<41> CCR80 균주는 NA에서 48시간 동안 배양한 후 10mM MgSO₄ 버퍼(buffer)로 수확한 후 세균 현탁액을 만들었으며, 이 CCR80 균주의 세균현탁액에 표면 살균한 종자를 3시간 동안 침지하였다. 상기와 같이 세균 현탁액에 침지한 고추 종자를 WA에서 5일 동안 배양한 역병균의 균사 가장자리에 고추 종자의 유근의 끝 부분이 닿게 올려놓아 28℃에서 2~3일 동안 배양하였다.

<42> 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 CCR80 균주는 고추 역병에 의한 유근 감염을 실험 1에서는 무처리 대조구가 100% 감염되었을 때 53%로 감염율이 감소하였으며, 실험 2에서는 대조구가 약 97%일 때 37%로 감염율을 감소시켰다. 두 번의 반복 실험에서 CCR80 균주는 무처리 대조구에 비하여 약 59%의 방제가를 나타내어 현저하게 감염율을 감소시켰다(표 2). 표 2는 길항세균 CCR80 균주에 의한 고추의 유근(radicle)에서 고추 역병균인 파이토포thora 캡시시(*Phytophthora capsici*)에 의한 감염 억제 효과 평가 결과를 나타낸 것이다.

표 2

처리	유근 감염율(%)		
	실험 1	실험 2	평균
무처리	100.0±0.0	96.7±3.3	98.3±2.4
CCR80	53.3±8.8	37.3±12.7	40.0±8.2

[실시예 3] CCR80 균주의 고추 역병에 대한 길항 효과 유묘 검증(seedling assay)

고추의 유근(radicle)에서 고추 역병에 대한 효과적인 감염률 감소를 보인 CCR80 균주가 순차적으로 고추 유묘(seedling)에서 고추역병 방제 효과가 있는지 검증하였다.

이러한 고추 유묘 검증(seedling assay)을 위하여, CCR80 균주는 NA(Nutrient broth, Difco, USA) 배지에서 48 시간 동안 28℃에서 배양하였고, 단일 균총을 NB(Nutrient broth, Difco, USA) 5ml에 전배양 한 후, 전배양한 CCR80 균주를 500ml의 NB에 접종하여 48시간 동안 28℃에서 160rpm으로 배양하였다. 배양된 CCR80 균주를 5000rpm에서 15분 동안 원심 분리하여, CCR80 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.

고추 종자는 8립씩 3반복으로 TKS2:피트모스(peat moss)가 1.5:1 (v/v)로 혼합된 상토가 담긴 128구 트레이에 파종하였으며, CCR80 세균 현탁액을 상토 1g에 1ml의 농도로 처리하였다. 이 때 대조구로는 10mM MgSO₄ 버퍼에 침지한 종자를 사용하였다. 파종한 고추는 16시간 광조건의 배양실에서 2주 동안 생육하였으며, 파종 2주 후 고추 역병균을 인위접종하였다.

고추 역병균은 오토밀(oatmeal) 배지에서 7일 동안 28℃에서 배양되었으며, 이후 살균증류수 15ml를 관주한 후 24시간 동안 빛이 있는 조건에서 7일 동안 배양하였다. 그 후 고추 역병균의 주요 접종원인 유주포자를 형성하기 위하여 4℃에서 30분, 상온에서 30분 동안 처리한 후 거르기로 걸러서 유주포자만 수확하였다. 수확된 유주포자는 헤모사이토미터를 사용하여 12,000 유주포자/ml의 농도로 맞추었다.

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 3반복으로 총 2회 반복하여 실험하였다. 표 3에서와 같이 실험 1에서 대조구에서 약 96% 병이 발생하였을 때 CCR80 균주를 처리한 고추 유묘에서는 약 34%만 병이 발생하였으며, 실험 2에서도 대조구에서 96% 병이 발생하였을 때 약 31%로 병을 감소시켰다. 위의 실험 1과 2에서 전체적으로 대조구에서 96% 병이 발생하였을 때 CCR80 균주는 약 32%로 병을 감소시키므로 약 66%의 방제가가 있다(표 3). 표 3은 CCR80 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±2.6
CCR80	33.9±14.6	30.6±6.9	32.2±7.3

[실시예 4] CCR80 균주의 고추 역병에 대한 길항 효과 성체식물(plant) 검증

<53> 고추 유근(radicle)과 유묘(seedling)에서 고추 역병에 대하여 현저한 병억제 효과를 가진 CCR80 균주가 5주된 고추 성체 식물에서 고추 역병에 대한 길항 효과가 있는지 평가하기 위하여 고추 성체 식물 검증(plant test)을 수행하였다. 고추 성체 식물 실험을 하기 위하여 고추 종자를 상토가 담긴 128구에 파종 한 후 3주 동안 16시간 광주조건에서 배양하였으며, 3주된 고추 유묘를 지름 9cm의 포트에 파스퇴르 살균된 발토양으로 이식하였다. 이식한 1주일 후에 상기에 명시된 방법대로 CCR80 균주의 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.

<54> 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 병평가하기 위하여 0 (건전한 식물)~5(죽은 식물)의 기준으로 병징이 발생한 시점으로부터 병피해도를 매일 평가하였으며, 15개의 식물을 2회 반복 실험하였다. 표 4에서와 같이 실험 1과 2에서 대조구가 0~5의 병피해도 중에서 약 4정도의 병피해도를 야기할 때, CCR80 세균은 2 미만의 1.9와 1.5로 병피해도를 현저하게 감소시켰다. 또한 시간에 따른 병 발생 양상을 나타내는 병진전곡선 (AUDPC)에서도 대조구가 실험 1과 2에서 18.8과 19.5일 때 CCR80 균주는 각각 6.1과 4.2로 시간에 따른 병의 진전도 현저하게 감소시켰다(표 4). 표 4는 고추 성체식물에서 CCR80 균주에 의한 고추 역병 발생 억제 평가 결과를 나타낸다.

표 4

처리	병 피해도(Disease severity)		병진전곡선(AUDPC)	
	실험 1	실험 2	실험1	실험 2
무처리	4.2±0.2	4.1±0.2	17.8±1.9	19.5±1.4
CCR80	1.9±0.3	1.5±0.2	6.1±1.3	4.2±1.0

<56> [실시예 5] CCR80 균주의 고추 역병에 대한 길항 효과 포장 검증

<57> 고추 유근(radicle), 유묘(seedling)와 성체식물(plant)에서 모두 뛰어난 고추 역병 억제 효과가 있는 길항세균 CCR80 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.

<58> 2005년과 2006년도 포장 검증에서는 병원균을 인위 접종한 포장에 CCR80 균주를 고추 식물에 관주처리하여 검증하였으며, 2006년과 2007년에는 자연적으로 고추 역병이 발생하는 포장에서 고추 정식시 CCR80 균주의 세균 현탁액에 고추 유묘를 담근 후 정식하여 재배 방법에 효과적으로 적용하여 실험하였다.

<59> 실험예 1. 본 발명에 의한 CCR80의 2005~2006년 인위병접종 포장 검증

<60> 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.

<61> 길항 세균 CCR80은 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.

<62> 2005년과 2006년에 인위접종한 덕소 포장에 전체적으로 병이 발생하였으며, 2005년과 2006년도에서 무처리 대조구가 65.4%와 69%의 병이 발생하였을 때 CCR80균주를 처리한 고추는 13.9%와 29.2%로 병이 대조구에 비하여 현저하게 감소하였다. 길항 세균 CCR80 균주는 무처리 대조구에 비하여 2005년도에는 약 79%, 2006년에는 약 58%의 방제가를 가졌다(표 5). 표 5는 2005~2006년 CCR80 균주의 세균 현탁액 관주처리에 의한 고추 역병 병발생 포장 검증 결과를 나타낸다.

표 5

<63>

처리구	병발생율(%)	
	2005년	2006년
무처리	65.4±8.0	69.0±6.8
메타락실(살균제)	25.6±3.8	16.6±6.8
CCR80	13.9±1.6	29.2±7.4

<64>

또한 길항세균 CCR80 균주가 실제로 고추 뿌리의 감염율을 감소시켰는지 평가하기 위하여, 포장에서 2005년에는 4개 식물씩 4반복, 2006년에는 5개 식물씩 4반복하여 고추뿌리를 임의로 샘플링 하였으며, 샘플링한 고추 뿌리는 1cm 크기로 잘라서 고추 역병균 선택배지인 PARPH (Pimaricin-ampicilin-rifampicin-PCNB-hym

<65>

-exazol) 배지에 올려놓은 후 28℃에서 배양하였다. 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.

<66>

뿌리에서 역병의 감염율은 PARPH 배지에 1cm의 크기로 고추 뿌리를 잘라 올려놓은 것 중에서 고추 역병균에 의해 감염된 뿌리에서 역병균이 배양되는 것을 확인 한 후 역병균이 고추 뿌리로부터 감염된 수를 평가하였다. 즉, 샘플당 감염된 고추 뿌리 조각/각 샘플당 고추 뿌리조각 x 100 으로 평가하였으며, 한 식물체에서 100개의 뿌리를 3반복하여 실험하였다. 그 결과 길항세균 CCR80은 2005년과 2006년에 무처리 대조구가 82.4%와 78.2% 뿌리 감염율을 나타낼 때, 각각 64.8%와 42.1%로 뿌리 감염율을 감소시켰다. 이는 무처리 대조구에 비하여 약 21~46%의 방제가로 고추 역병균에 의한 뿌리 감염을 감소시켰으며, 살균제인 메타락실 처리구와도 유사하게 고추 역병에 의한 뿌리 감염을 감소시켰다(표 6). 표 6은 2005~2006년 CCR80 균주의 세균 현탁액 관주처리에 의한 고추 역병의 고추 뿌리 감염율 조사 결과를 나타낸다.

표 6

<67>

처리구	뿌리 감염율(%)	
	2005년	2006년
무처리	82.4±1.3	78.2±7.0
메타락실(살균제)	60.7±4.2	24.9±2.9
CCR80	64.8±4.3	42.1±2.2

<68>

길항세균 CCR80 균주를 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 샘플링 하였다. 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 CCR80 균주는 무처리 대조구와 메타락실 처리와 비교하여 토착적으로 존재하고 있는 총 세균과 곰팡이의 수에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다(표 7). 표 7은 2005~2006년 CCR80 균주의 세균 현탁액 관주처리에 의한 인위 병발생 포장에서의 토양 총 세균과 곰팡이 수를 나타낸다.

표 7

<69>

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
CCR80	6.57±0.03	6.10±0.08	4.48±0.03	3.33±0.04

실험예 2. 본 발명에 의한 CCR80의 2006~2007년 자연병발생 포장 검증

2006년과 2007년 자연병발생 포장 실험을 위하여 상기에 명시한 것처럼 근권세균 CCR80 균주의 세균 현탁액을 준비하였다. 이 포장 실험을 위하여 2006년 5월 10일, 2007년에는 6월 1일에 포장에 고추를 정식하기 직전에 준비된 길항세균 CCR80 균주의 세균현탁액에 고추 유묘를 30분 동안 담근 후 고추 역병균이 이미 토양내 존재하고 있는 토양에 정식에 정식하였다. 2006년과 2007년에 모두 포장에 역병이 전체적으로 발생하였으며, 2006년과 2007년에 무처리 대조구에서 병이 약 87%와 65% 발생하였을 때, 길항 세균 CCR80 균주는 각각 약 11%와 31%로 대조구에 비해 현저하게 병이 감소하였다(표 8).

또한 실제 고추 뿌리에서 고추 역병에 의한 감염율을 확인하기 위하여 상기에 명시한 것과 마찬가지로 고추 역병 선택배지인 PARPH 배지에 고추 뿌리를 1cm 크기로 잘라서 올려 놓은 후 감염율을 평가하였으며, 그 결과 실제 뿌리에서의 감염율(%)도 2006년과 2007년에 무처리 대조구에서 각각 86%와 66%인 것에 비하여 길항세균 CCR80 균주를 처리한 것에서는 각각 약 41%로 감염율이 감소하였다(표 8). 길항세균 CCR80 균주는 살균제인 메타락실과 유사한 정도로 포장에서 고추 역병의 발생과 뿌리 감염율을 효과적으로 감소시켰다. 표 8은 2006~2007년 역병 자연발생포장에서 길항세균 CCR80 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
CCR80	11.4±4.5	30.6±1.9	40.9±6.1	41.2±1.7

2006년과 2007년의 포장 검증에서도 상기에 명시된 것과 마찬가지로 고추 정식시 인위적으로 처리된 길항근권세균 CCR80 균주가 토착세균과 곰팡이에 영향을 주는지 양적으로 평가하였으며, 그 결과 길항세균 CCR80 균주를 고추 정식시 자연병발생 포장에 처리할 경우에도 무처리 대조구에 비하여 토착 총 세균과 곰팡이의 수에 영향을 주지 않는 것으로 보아 생태계 교란의 위험성은 적다고 할 수 있다(표 9). 표 9는 2006~2007년 CCR80 균주 세균 현탁액 관주처리에 의한 자연 병발생 포장에서의 토양 총 세균과 곰팡이 수를 나타낸다.

표 9

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
CCR80	5.73±0.09	6.69±0.12	3.19±0.15	3.23±0.13

[실시에 7] 길항 근권세균 CCR80의 식물생장촉진에 의한 고추 수량증가

길항세균 CCR80에 의하여 식물 생장이 촉진됨으로써 고추 수량이 증가하는지를 2007년 포장 실험을 통하여 확인하였다. CCR80 균주는 고추 정식시 세균현탁액에 정식할 고추 유묘를 30분간 침지한 후 포장에 정식하여 2007년 8월 13일, 8월 27일, 9월 22일 3차례 상품성 있는 8cm이상의 고추를 수확한 후 푸른 고추와 붉은 고추로 구분하여 고추의 수와 무게를 측정하였다. 측정된 식물은 40식물씩 4반복실험을 하였으며, 각 반복에 대하여 평균을 구하였다.

무처리 대조구가 푸른고추 287개, 2423g과 붉은 고추 150개, 1728g을 생산할 때, CCR80 균주를 처리한 고추는 푸른 고추 433개 3480g과 붉은 고추 221개, 2646g을 생산하였다. 전체 고추의 수와 무게는 무처리 대조구가 437개 4151g을 생산할 때 CCR80 균주를 처리한 고추에서는 654개 6126g의 고추를 생산하여, 고추 수에서는 총 51%

를 생산된 고추의 무게는 약 48%의 수량 증가 효과가 있다(표 10). 그러므로 CCR80 균주는 고추 역병의 병 억제 효과에 더하여 고추의 생육을 촉진함으로써 고추 수량을 증진시키는 효과도 있다. 표 10은 2007년 길항 세균 CCR80 균주에 의한 고추 수량 증가 결과를 나타낸다.

표 10

처리	고추 수			고추 열매 생체중 (g)		
	푸른고추	붉은고추	합계	푸른고추	붉은고추	합계
무처리	287±28	150±16	437±32	2423±430	1728±248	4151±431
메타락실(살균제)	324±74	138±31	462±93	2621±782	1674±467	4295±1171
CCR80	433±73	221±16	654±63	3480±629	2646±236	6126±772

[실시예 7] 고추 역병에 대해 병억제 효과가 있는 근원 길항세균 CCR80 균주의 분자적, 생리적 특성을 이용한 균 동정

세균 동정을 위하여 일반적으로 사용하는 세균의 16S rRNA 염기서열(sequence)을 증폭하기 위하여 CCR80 균주의 DNA를 분리하였다. CCR80 균주를 배양한 후 3000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 세균을 수확하여, 300 μ l의 SET 버퍼(buffer)로 섞어 주었다. 라이소자임(lysozyme)을 50mg/ml의 농도로 만들어 6 μ l를 섞어준 후 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양한 후 1/10 부피의 SDS를 첨가한 후 프로테아제 K(proteinase K)를 0.5mg/ml의 농도로 혼합하여 55℃에서 2시간 동안 배양한 후, 75℃에서 20분 동안 처리함으로써 프로테아제 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.

이와 같이 분리한 CCR80의 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 소듐아세테이트(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 500 μ l를 혼합하여 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 순수한 PCR 산물을 얻었다.

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 CCR80 균주는 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)와 99%의 상동성을 보이는 것으로 나타났다(도 1a 및 도 1b).

또한 투과전자현미경을 통하여 CCR80 균주의 편모와 세균의 형태를 관찰하기 위하여, NA배지에서 24시간 동안 CCR80 균주를 배양하였으며, 단일 균총의 CCR80 세균 현탁액을 골드 코터(gold coater) 위에 고정시킨 후 투과전자 현미경으로 관찰하였으며, 그 결과 CCR80 균주는 간상형이었으며, 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)에서 관찰되는 것과 유사하게 한쪽 끝에 4-5개의 편모가 관찰되었다(도 2a 및 도 2b).

CCR80 균주가 서로 다른 96종류의 당을 이용할 수 있는지를 확인하기 위하여 GN2 Biolog system을 사용하여 분석하였다. Biolog system을 이용하기 위하여, CCR80 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 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 CCR80 균주는 당이용 능력에서 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)와 가장 유사한 것으로 확인되었다(도 3).

- <86> 세균의 지방산 함량에 따른 세균 분류 및 동정을 하기 위하여, CCR80 세균의 지방산 (fatty acid methyl ester, FAME) 부분을 추출하여 MIDI 시스템을 이용한 가스크로마토그래피에 의해 동정하였다. CCR80의 지방산 (fatty acid methyl ester, FAME) 부분을 분석한 결과, 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*)와 가장 유의적인 것으로 확인되었다(도 4).
- <87> 그러므로 16S rRNA 분석, 전자현미경에 의한 형태적 관찰, Biolog 분석에 의한 탄소원 이용 정도, 세균의 지방산 분석을 통하여, 본 발명에 의한 CCR80 균주는 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80으로 동정할 수 있다(도1a ~ 도 4).
- <88> 상기의 내용을 종합하면, 우리나라 근권토양에서 분리한 본 발명에 의한 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80은 고추 역병의 병발생을 감소시킬 수 있는 새로운 길항세균이며, 친환경적 생물적 방제 세균으로써 이용될 가치가 있다 할 것이다.
- <89> 나아가, 본 발명에 의한 슈도모나스 코루가타 (*Pseudomonas corrugata*) 균주 CCR80은 식물의 생장을 촉진시킴으로써 고추 수량증대에도 기여할 수 있어 상업적으로 이용될 수 있는 매우 유용한 발명이다.
- <90> 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

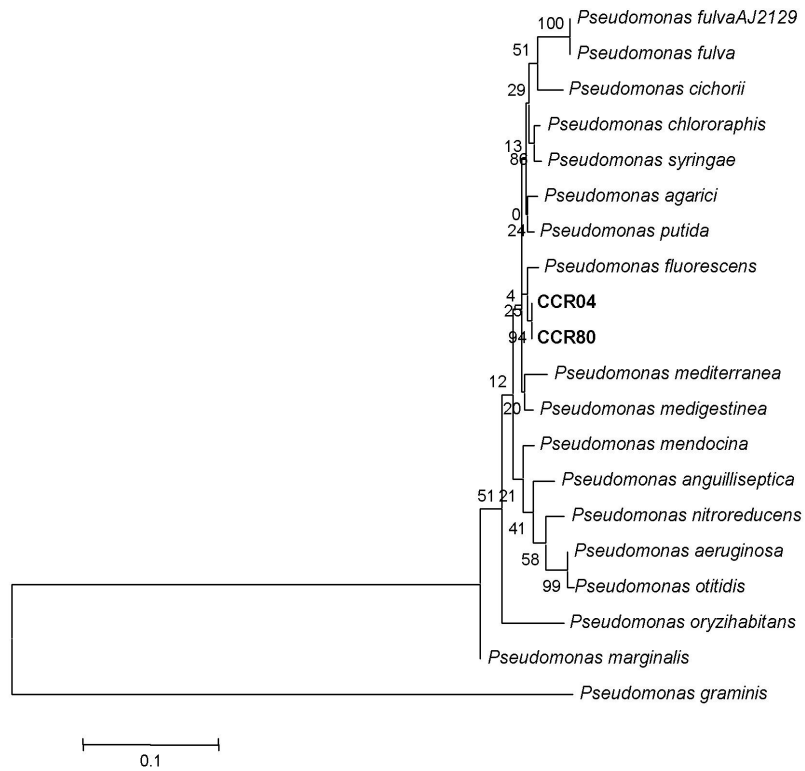
- <91> 도 1a 및 도 1b는 본 발명에 의한 CCR80 균주의 분자적 동정을 위한 16S rDNA 염기 서열과 계통도를 나타내는 도면이다.
- <92> 도 2a 및 도 2b는 본 발명에 의한 CCR80 균주의 세균동정을 위한 투과전자현미경에 의한 세균 형태를 나타내는 도면이다.
- <93> 도 3은 본 발명에 의한 CCR80 균주의 세균동정을 위한 생리적 당 이용도 BIOLOG 분석 결과를 나타내는 도면이다.
- <94> 도 4는 본 발명에 의한 CCR80 균주의 세균동정을 위한 세균의 지방산 (fatty acid methyl ester, FAME) 분석 결과를 나타내는 도면이다.

도면

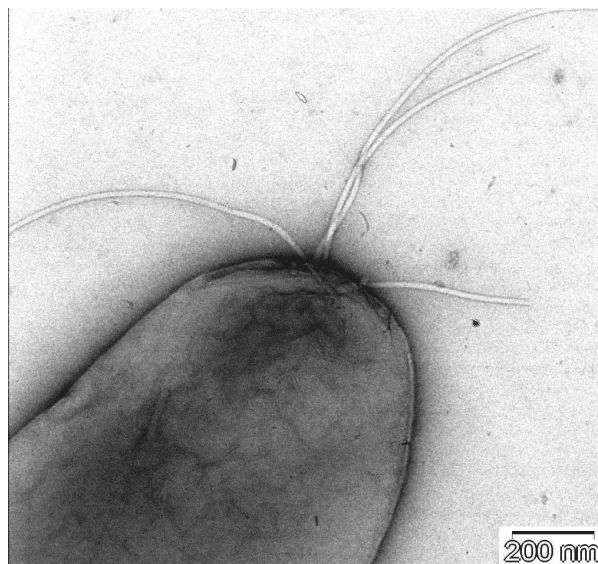
도면1a

```
GTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC
TGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGC
AGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGG
CTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATA
CGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGAGCCGCGGTAATAC
AGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGAT
GTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTG
GTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACCA
CCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGCGCGAGCTAACGCATTA
AGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAACTCAAACTGAATGACGGGGGCCGCGACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAAC
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCTAGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGT
GGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG
CCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTACAGAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTG
GAGCTAATCCCAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAAT
CGCTAGTAATCGCAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGCTCAC
ACCATGGGAGTGGTTGCACCAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGACGGTAC
```

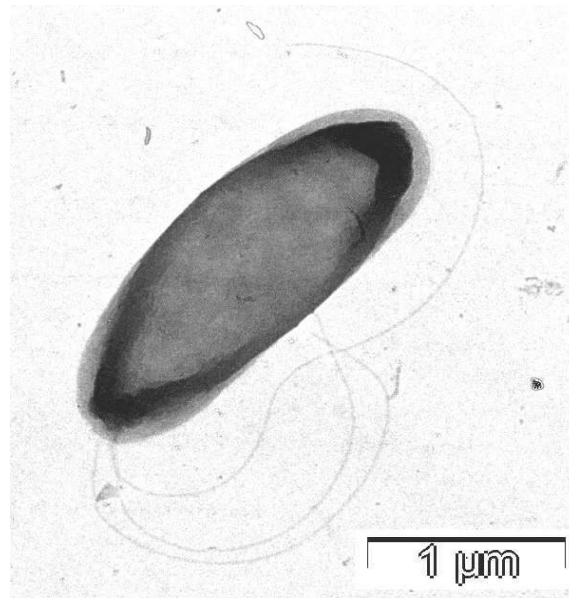
도면1b



도면2a



도면2b



도면3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	27	61	{ 85}	<210><189>	19	{157}	33	<413>{129}	28		
B	29	{150}	25	<290>	22	<254><215>	26	23	22	{146}	{170}	
C	28	-3	60	26	20	34	<219>{167}	26	21	<220>{172}		
D		<242><504><659>{153}		<263><836><342><285><682>	52		<357>	39				
E	<602>	25	47	<465>	70	<350><258><214><457><636>	21	<455>				
F	<203>	60	71	{117}	<327><359><329><453><431><610>	31	{104}					
G	<218><287>{171}	59	38	<391><348>	26	<228>{137}	<243><323>					
H	<258><430>{122}	33	-2	{106}	50	{105}	{170}	58	41	34		

=> Species ID : **PSEUDOMONAS CORRUGATA**<=

	Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1)	PSEUDOMONAS CORRUGATA	100	0.911	1.32	GN-NENT OXI+
2)	PSEUDOMONAS FLUORESCENS	0	0.000	5.30	GN-NENT
3)	PSEUDOMONAS FLUORESCENS BIOTYPE G	0	0.000	5.58	GN-NENT
4)	PSEUDOMONAS FLUORESCENS BIOTYPE F	0	0.000	5.86	GN-NENT
5)	PSEUDOMONAS ASPLENII	0	0.000	6.06	GN-NENT OXI+
6)	PSEUDOMONAS PUTIDA BIOTYPE B	0	0.000	6.22	GN-NENT OXI+
7)	PSEUDOMONAS MARGINALIS	0	0.000	6.49	GN-NENT OXI+
8)	PSEUDOMONAS FUSCOVAGINAE	0	0.000	6.72	GN-NENT OXI+
9)	PSEUDOMONAS TOLAASII	0	0.000	6.91	GN-NENT OXI+
10)	PSEUDOMONAS SYNXANTHA	0	0.000	6.91	GN-NENT OXI+
Other)					

도면4

E06C267.36A [4168] CCR80

Volume: DATA File: E06C267.36A Seq Counter: 31 ID Number: 4168
 Type: Samp Bottle: 28 Method: TSBA50
 Created: 12/27/2006 6:09:25 AM
 Sample ID: CCR80

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.647	4.037E+8	0.027	----	7.024	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.771	2027	0.020	----	7.270		----	< min rt	
1.921	7363	0.026	----	7.568		----	< min rt	
1.990	229	0.021	----	7.704		----	< min rt	
2.298	666	0.028	----	8.325		----	< min rt	
2.455	296	0.022	----	8.636		----	< min rt	
2.843	544	0.026	1.187	9.404	8:0 3OH	0.36	ECL deviates 0.012	
3.144	507	0.030	1.144	9.998	10:0	0.32	ECL deviates -0.002	Reference -0.014
3.475	479	0.025	----	10.479		----		
4.228	7868	0.029	1.063	11.427	10:0 3OH	4.63	ECL deviates 0.005	
4.758	7134	0.032	1.038	12.003	12:0	4.10	ECL deviates 0.003	Reference -0.002
6.147	6204	0.036	0.996	13.179	12:0 2OH	3.42	ECL deviates 0.002	
6.299	1547	0.037	0.993	13.289	12:1 3OH	0.85	ECL deviates 0.001	
6.526	7609	0.036	0.989	13.456	12:0 3OH	4.16	ECL deviates 0.002	
7.209	2135	0.063	0.976	13.956	unknown 13.957	1.15	ECL deviates -0.001	
8.043	1179	0.040	0.965	14.503	unknown 14.502	0.63	ECL deviates 0.001	
9.099	2336	0.041	----	15.176		----		
9.616	2172	0.041	0.950	15.487	Sum In Feature 2	1.14	ECL deviates -0.001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10.163	58302	0.043	0.946	15.817	Sum In Feature 3	30.53	ECL deviates -0.005	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.464	47071	0.043	0.945	15.998	16:0	24.60	ECL deviates -0.002	Reference -0.003
11.754	742	0.042	----	16.746		----		
11.999	4663	0.044	0.938	16.889	17:0 CYCLO	2.42	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
12.605	1121	0.041	0.937	17.236	16:0 2OH	0.58	ECL deviates 0.003	
13.102	1210	0.051	0.936	17.519	16:0 3OH	0.63	ECL deviates 0.000	
13.363	1497	0.059	----	17.668		----		
13.637	37760	0.047	0.935	17.823	18:1 w7c	19.53	ECL deviates 0.000	
13.944	1305	0.040	0.934	17.998	18:0	0.67	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
15.523	545	0.039	0.933	18.904	19:0 CYCLO w8c	0.28	ECL deviates 0.002	Reference -0.003
16.869	2205	0.050	----	19.683		----		
18.438	1745	0.066	----	20.593		----	> max rt	
----	2172	----	----	----	Summed Feature 2	1.14	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	----	----	----	----	----	----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	58302	----	----	----	Summed Feature 3	30.53	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0.004 Reference ECL Shift: 0.006 Number Reference Peaks: 6
 Total Response: 196136 Total Named: 188876
 Percent Named: 96.30% Total Amount: 180757

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0.848	Pseudomonas-corrugata
	0.575	Pseudomonas-savastanoi-nerium
	0.572	Pseudomonas-savastanoi-oleae
	0.559	Pseudomonas-putida-biotype A
	0.559	Paucimonas-lemoinei
	0.519	Pseudomonas-syringae-syringae

서열 목록

- <110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
- <120> Pseudomonas corrugata strain CCR80, an antagonistic rhizobacterium for controlling Phytophthora blight of pepper
- <130> P11-080416-05
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 1400
- <212> DNA
- <213> Pseudomonas corrugata CCR80

<400> 1
gtcgaacggt agagaggtgc ttgcacctct tgagagcggc ggacgggtga gtaatgccta 60

ggaatctgcc tggtagtggg ggataacgct cggaaacgga cgctaatacc gcatacgtcc 120

tacgggagaa agcaggggac cttcgggcct tgcgctatca gatgagccta ggtcggatta 180

gctagtgtgt gagtaatgg ctcaccaagg cgacgatccg taactggtct gagaggatga 240

tcagtcacac tggaactgag acacggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata 300

ttggacaatg ggcgaaagcc tgatccagcc atgccgctg tgtgaagaag gtcttcggat 360

tgtaaagcac ttttaagtgg gaggaagggc attaacctaa tacgttagtg ttttgacgtt 420

accgacagaa taagcaccgg ctaactctgt gccagcagcc gcggtaatat agagggtgca 480

agcgtaaatc ggaattactg ggcgtaaagc gcgcgtaggt ggtttggtta gttggatgtg 540

aaagccccgg gcicaacctg ggaactgcat tcaaaactga caagctagag tatggtagag 600

ggtggtggaa tticctgtgt agcgttgaaa tgcgtagata taggaaggaa caccagtggc 660

gaaggcgacc acctggactg atactgacac tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg 720

attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgtcaac tagccgttgg gacccitgag 780

ctcttagtgg cgcagctaac gcattaagtt gaccgcctgg ggagtacggc cgcaaggtta 840

aaactcaaat gaattgacgg gggcccgcac aagcgttgga gcatgtggtt taattcgaag 900

caacgcgaag aaccttacca ggccttgaca tccaatgaac tttccagaga tggattggtg 960

cttcgggaa cattgagaca ggtgtgtcat ggtgtgtgtc agtcgtgtc gtgagatgtt 1020

gggttaagtc ccgtaacgag cgcaaccctt gtccttagtt accagcacgt tatggtgggc 1080

actctaagga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcacat	1140
ggcccttacg gcctgggcta cacacgtgct acaatggtcg gtacagaggg ttgccaagcc	1200
gcgaggtgga gctaatccca caaaaccgat cgtagtccgg atcgagtcct gcaactcgac	1260
tgcgtgaagt cggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttccc	1320
ggccttgtag acaccgccc tcacacatg ggagtgggtt gcaccagaag tagctagtct	1380
aaccttcggg gggacggtac	1400

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

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 2	
agagtttvt cctggg	16

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

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 3	
acggctacct tgtagact t	21