



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월23일
(11) 등록번호 10-1971576
(24) 등록일자 2019년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2017.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0169805
(22) 출원일자 2017년12월11일
심사청구일자 2017년12월11일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020050034000 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
동아대학교 산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
(72) 발명자
김지현
서울특별시 종로구 송월길 99, 경희공자이아파트 205호 1604호
이선우
부산광역시 북구 화명신도시로 100, 203-906 (코오롱 하늘채아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 5 항

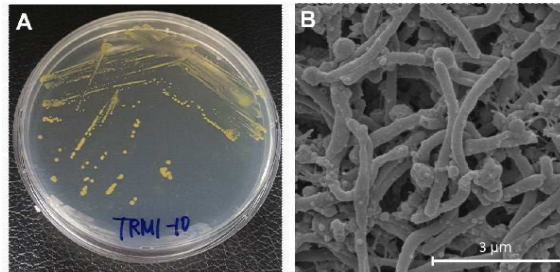
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10 또는 근연 균주를 함유하는 식물 병 방제 또는 성장촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 16S rDNA를 포함하고, 풋마름병을 비롯한 식물병에 대한 방제 효과 또는 식물 성장촉진 효과를 가지는 마리니플렉실리(*Mariniflexile*) 속 균주가 제공된다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
C12R 1/01 (2013.01)
- (72) 발명자
곽민정
서울특별시 영등포구 선유서로21길 19, 양평벽산블루밍아파트 103동 1305호
- 이지담**
서울특별시 마포구 마포대로 195, 마포래미안푸르지오 413호 1903호
- 이평안**
대구광역시 북구 복현2동 서한1차 아파트 107동 805호
- 송주연**
서울특별시 영등포구 가마산로 575, 한성아파트 104호 1607호
- 권순경**
서울특별시 서대문구 경기대로 58, 대우디오빌 1716호
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020050034001 A
KR1020100116562 A
KR1020100052797 A
International Journal of Microbiology, Vol.2014, pp.1-14(2014.05.19.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 914001-4
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 미생물유전체전략연구사업
연구과제명 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단(3/4)
기여율 1/2
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2016.08.23 ~ 2017.08.22

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01093901
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청 연구운영과
연구사업명 우장춘프로젝트
연구과제명 작물 병저항성 양적형질 조절 홀로바이옴 구명 및 운용
기여율 1/2
주관기관 동아대학교 산학협력단
연구기간 2016.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

풋마름병에 대한 방제 효과를 가지는 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10(*Mariniflexile rhizosphaerae* TRM1-10; KCTC 18646P) 균주.

청구항 6

제5항의 균주 또는 그의 배양액을 유효성분으로 포함하는 풋마름병 방제용 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제5항의 균주 또는 그의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물 성장 촉진용 조성물.

청구항 9

제6항의 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 풋마름병 방제방법.

청구항 10

제5항의 균주를 배양하는 단계를 포함하는 풋마름병 방제용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 새롭게 분리, 동정된 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10(*Mariniflexile rhizosphaerae* TRM1-10)을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제 또는 식물 성장촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대표적인 세균성 식물병 중 하나인 풋마름병(bacterial wilt)은 식물체의 잎과 줄기가 녹색인 상태에서 시드는 병이다. 풋마름병이 발병되면 초기에는 어린잎이 시들기 시작한다. 발병되는 환경에 따라 병이 급속히 진행되면 2 내지 3일만에 식물체 전체가 푸른 상태로 시들어 죽거나, 외형적으로 시들지 않아도 유관속에 갈색으로 썩고 흰색의 발병 균주 덩이가 발견된다.

- [0003] 풋마름병의 발병 균주인 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)은 1개 이상의 편모를 가진 호기성 세균이다. 랄스토니아 솔라나세아룸은 토양에서 4년 이상 생존하며, 뿌리를 통해 식물체로 침입한다. 랄스토니아 솔라나세아룸에 감염되는 식물은 감자, 토마토, 바나나, 땅콩, 가지, 고추, 담배 등 50과 450종 이상의 많은 산업용 작물이며, 방제가 힘들고 한 개체가 발병하면 토양을 통해 근처에 있는 작물에 전염되기 때문에 장마철에는 빠르게 넓은 지역에 전염되어서 작물 손실의 피해가 크다.
- [0004] 풋마름병의 발병 균주에 대한 각종 방제 방법이 개발되었으며, 발병 균주를 직접적으로 제거하는 화학 합성농약을 사용하는 방제 방법이 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 화학 합성농약은 인체에 유해한 물질을 다량 함유하며, 상기 유해 물질은 토양 및 식물체 내에 잔류하는 문제가 있다. 따라서 인체에 해롭지 않으면서 효과적으로 풋마름병을 방제하는 방법에 대한 연구가 진행되고 있다.
- [0005] 한편, 식물은 근권(rhizosphere)에 존재하는 다양한 미생물과 공생관계를 이룬다. 근권은 식물뿌리의 생리작용에 영향을 받는 토양권역으로 뿌리 표면으로부터 수 밀리미터(mm) 내지 수 센티미터(cm) 범위에 해당된다.
- [0006] 근권 토양에서 식물 뿌리는 수분과 무기양분, 산소를 흡수하면서 탄산가스나 다양한 형태의 유기물을 분비한다.
- [0007] 그에 따라 근권 토양은 유기물함량, 미생물상 및 미생물 밀도, 토양 pH 등이 비근권 토양과 구별되며, 이러한 근권의 환경 조건은 식물마다 차이가 있다. 근권에 있는 미생물을 식물 내부에 공생하면서 서로 상호작용 하는데, 풋마름병의 발병균주인 랄스토니아 솔라나세아룸도 이러한 근권 미생물이다.
- [0008] 그러나 같은 종류의 작물에 따라서 같은 식물병 발병 균주에 감염되어도 식물병이 발병하는 작물과 그렇지 않은 작물이 존재한다. 일반적으로 식물 고유의 유전적 면역체계가 식물병 발병에 영향을 주지만, 선천적인 식물체의 방어 체계 이외에도 식물 생리활성에 영향을 주는 근권 환경의 차이가 식물병 발병에 영향을 줄 수 있다.
- [0009] 최근에는 식물병에 내성이 있는 작물의 근권에서 분리된 균주를 생물학적 방제로 사용 가능한지에 대한 연구가 증대되고 있다. 균주를 이용한 생물학적 방제는 화학 합성농약을 사용하는 대신 미생물 또는 식물의 추출물을 이용하기 때문에 인체에 영향을 미치지 않으면서 대상 병을 선택적으로 방제하기 때문에 산업적 손실을 줄이면서 소비자에게 안전한 작물을 제공할 수 있다.
- [0010] 따라서 본 발명자들은 풋마름병에 내성이 있는 작물에서 분리된 풋마름병에 대한 방제로 이용 가능한 새로운 균주 및 조성물을 제공하고자 하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

(비특허문헌 0001) International Journal of Microbiology, Vol. 2014, pp. 1-14(2014.05.19.).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 풋마름병에 내성이 있는 작물의 근권에서 새로운 균주를 분리하고, 이를 동정하여 신규한 풋마름병에 방제 효과가 있는 균주를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 목적은 상기 풋마름병에 방제 효과가 있는 균주 또는 그의 배양액을 유효성분으로 포함하는 풋마름병 방제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 목적은 상기 풋마름병 방제용 조성물을 이용한 풋마름병 방제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열번호 1의 16S rDNA를 포함하고, 식물병에 대한 방제 효과를 가지는 균주가 제공된다.
- [0015] 일 실시예에 있어서, 상기 균주는 박테로이데테스(*Bacteroidetes*) 문일 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 균주는 마리니플렉실리(*Mariniflexile*) 속일 수 있다.

- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 식물병은 풋마름병, 토마토 궤양병, 양배추 흑부병, 고추 세균성점무늬병, 배추 무름병, 키위 궤양병, 감귤 궤양병, 복숭아 세균성 구멍병, 감자 더덩이병, 감자 무름병, 감자역병, 검은무늬썩음병, 흑각병, 하역병, 절편부패병, 홍색부패병, 균핵병, 시들음병, 감자탄저병, 더덩이병, 둘레썩음병, 마른썩음병, 감자빛자루병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 토마토 시들음병, 토마토 뿌리혹선충병, 오이 뿌리혹선충병, 콩 뿌리혹선충병, 고추 역병, 상추 균핵병, 인삼 점무늬낙엽병, 배추 뿌리혹병, 무 시들음병, 담배 입고병, 감자 갈색썩음병 및 인삼 뿌리썩음병으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 식물병에 대한 방제 효과를 가지는 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10(*Mariniflexile rhizosphaerae* TRM1-10; KCTC 18646P) 균주가 제공된다.
- [0019] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 균주 또는 그의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물이 제공된다.
- [0020] 일 실시예에 있어서, 상기 식물병은 풋마름병, 토마토 궤양병, 양배추 흑부병, 고추 세균성점무늬병, 배추 무름병, 키위 궤양병, 감귤 궤양병, 복숭아 세균성 구멍병, 감자 더덩이병, 감자 무름병, 감자역병, 검은무늬썩음병, 흑각병, 하역병, 절편부패병, 홍색부패병, 균핵병, 시들음병, 감자탄저병, 짓밟곰팡이병, 더덩이병, 둘레썩음병, 마른썩음병, 감자빛자루병, 벼 잎집무늬마름병, 벼 도열병, 토마토 역병, 토마토 시들음병, 토마토 뿌리혹선충병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병, 고추 탄저병, 고추 역병, 상추 균핵병, 인삼 점무늬낙엽병, 배추 뿌리혹병, 무 시들음병 및 오이 뿌리혹선충병으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 균주 또는 그의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물 성장 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 식물병 방제용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제방법이 제공된다.
- [0023] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 식물병 방제용 조성물의 제조방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따르면, 상기 풋마름병 방제용 균주 및 조성물은 효과적으로 풋마름병을 방제할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정된 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 풋마름병에 내성이 있는 토마토 품종인 Hawaii 7996의 근권에서 분리된 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10(*Mariniflexile rhizosphaerae* TRM1-10; KCTC 18646P) 균주의 형태학이다. (A) 해양 한천 배지에서 30℃ 4일간 자란 콜로니의 모습. (B) 해양 한천 배지에서 30℃ 4일간 자란 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10 균주의 주사 전자현미경 사진.
- 도 2는 TRM1-10 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 1을 분석하여 동정한 결과를 계통학적 위치로 나타낸 것이다.
- 도 3은 TRM1-10 균주를 이용한 풋마름병 방제 효과를 나타낸 그래프이다. 풋마름병의 질병 지수는 0, 질병 증상 없음; 1, 잎의 1-25%는 시들음; 2, 잎의 26-50%는 시들음; 3, 잎의 51-75%는 시들음; 4, 잎의 76-100%는 시들음;을 기준으로 평가하였다. 상기 TRM1-10 균주를 이용한 풋마름병 방제 평가 실험은 3반복 하여 오차 범위를 표시하는 오차 막대를 그래프 상에 표시하였다.
- 도 4는 TRM1-10 균주의 식물 생육촉진효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

- [0028] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0029] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당 업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당 업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고서에 기술되어 있다.
- [0030] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당 업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0031] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당 업계에서 이용 가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실험 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당 업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 쓰여지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카복실 방향으로 쓰여진다.
- [0033] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0034] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열번호 1의 16S rDNA를 포함하고, 식물병에 대한 방제 효과를 가지는 균주가 제공된다.
- [0035] 상기 균주는 식물병에 대한 저항성을 증진시키고, 식물병을 유발하는 미생물의 성장을 억제하므로 식물병 방제를 위한 미생물 제제로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0036] 상기 식물병은 광범위한 식물 병원성 세균에 의한 식물병해를 포함하는 것으로, 풋마름병, 토마토 궤양병, 양배추 흑부병, 고추 세균성점무늬병, 배추 무름병, 키위 궤양병, 감귤 궤양병, 복숭아 세균성 구멍병, 감자 더덩이병, 감자 무름병, 감자역병, 검은무늬썩음병, 흑각병, 하역병, 절편부패병, 홍색부패병, 균핵병, 시들음병, 감자탄저병, 더덩이병, 둘레썩음병, 마른썩음병, 감자빛자루병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 토마토 시들음병, 토마토 뿌리혹선충병, 오이 뿌리혹선충병, 콩 뿌리혹선충병, 고추 역병, 상추 균핵병, 인삼 점무늬낙엽병, 배추 뿌리혹병, 무 시들음병, 담배 입고병, 감자 갈색썩음병 및 인삼 뿌리썩음병으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 바람직하게는 풋마름병일 수 있다.
- [0037] 상기 풋마름병은 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)에 의해 발생할 수 있으며, 예컨대, 풋마름병, 고추 풋마름병, 가지 풋마름병, 감자 풋마름병, 파프리카 풋마름병 또는 땅콩 풋마름병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 상기 마리니플렉실리(*Mariniflexile*) 속 균주는 플라보박테리아세에 (*Flavobacteriaceae*) 과에 속하며 해양 환경에서 서식할 수 있으며, 작물 근권에서도 서식할 수 있다. 상기 마리니플렉실리(*Mariniflexile*) 속은 2006년 러시아 Troitsa Bay의 성계에서 처음 분리되었으며, 상기 마리니플렉실리(*Mariniflexile*) 속은 *M. aquimaris*, *M. gromovii*, *M. ostreae*, *M. jejuense*, *M. soesokkakensis* 및 *M. fucanivorans* 총 6종을 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 식물병에 대한 방제 효과를 가지는 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10(*Mariniflexile rhizosphaerae* TRM1-10; KCTC 18646P) 균주가 제공된다.
- [0040] 상기 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10(이하 “TRM1-10”) 균주는 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2017년 11월 28일자로 기탁되었다(기탁번호: KCTC 18646P).
- [0041] 상기 마리니플렉실리 라이조스페라 TRM1-10(*Mariniflexile rhizosphaerae* TRM1-10; KCTC 18646P)는 박테로이데테스(*Bacteroidetes*) 문, 플라보박테리아(*Flavobacteriia*) 강, 플라보박테리아세에(*Flavobacteriaceae*) 과, 마리니플렉실리(*Mariniflexile*) 속, 라이조스페라(*rhizosphaerae*) 종의 신규 균주이다.
- [0042] 상기 TRM1-10 균주는 그람 음성의 호기성이며, 간균으로, 포자를 형성하지 않고, 활주 운동을 한다. 크기는 0.3 내지 0.5 μm 의 직경에 길이는 3 내지 4 μm 이다.
- [0043] 상기 TRM1-10 균주는 30°C 온도 조건의 해양 한천 배지에서 3일 이내의 불록하고 노란 콜로니를 형성하며 형성되는 콜로니의 직경은 0.5-2 mm이다.

- [0044] 혐기성 조건의 해양한천배지에서 10일 동안 발생하지 않으며, 성장 온도 범위는 4~40℃이고, 최적의 성장 온도는 30℃일 수 있다. 상기 균주의 최적의 성장 pH는 7.0~8.0이고 최적의 성장 NaCl 농도는 5%(w/v)일 수 있다.
- [0045] 상기 TRM1-10 균주는 질산염 환원, H₂S 생성 및 산화 효소 활성이 음성이고, 카탈라아제 활성이 양성이다. Flexirubin형 안료는 검출되지 않았으며, API ZYM 및 20NE를 통한 효소 분석은 다음과 같다.
- [0046] 효소 활성 양성: α-갈락토시다아제(α-galactosidase), 포스파타아제(phosphatase), β-갈락토시다아제(β-galactosidase), β-글루코시다아제(β-glucosidase), 에스테라제(esterase (C4)), 에스테라제 리파아제(esterase Lipase (C8)), 류신 아릴아미다아제(leucine arylamidase), N-아세틸-β-글루코사미니다아제(N-acetyl-β-glucosaminidase), 나프톨-AS-BI-포스포하이드로라아제(naphtol-AS-BI-phosphohydrolase), 및 발린 아릴아미다아제(valine arylamidase).
- [0047] 효소 활성 음성: α-푸코시다아제(α-fucosidase), α-글루코시다아제(α-glucosidase), α-만노시다아제(α-mannosidase), α-키모트립신(α-chymotrypsin), 아르기닌 디하이드로라아제(arginine dihydrolase), β-글루코시다아제(β-glucosidase), β-글루쿠로니다아제(β-glucuronidase), 크리스틴 아릴아미다아제(crystine arylamidase), 리파아제(lipase (C14)), 프로테아제(protease), 트립신(trypsin), 및 уре아제(urease).
- [0048] 탄소원으로 D-셀로비오스(D-cellobiose), D-만노스(D-mannose), D-라피노스(D-raffinose), 락토오스(lactose), 말토오스(maltose), 멜리비오스(melibiose), 석신산(succinate), 및 설탕(sucrose)을 이용하였지만, 벤조산염(benzoate), D-갈락토오스(D-galactose), D-마니톨(D-mannitol), D-리보오스(D-ribose), L-아라비노오스(L-arabinose), 및 L-람노오스(L-rhamnose)를 탄소원으로 분해하지 못한다.
- [0049] 상기 마리니플렉스 라이조스패레 TRM1-10의 항생제 감수성 및 내성은 다음과 같다.
- [0050] 항생제 감수성 : 암피실린(ampicillin), 카르베니실린(carbenicillin), 린코마이신(lincomycin), 노보비오신(novobiocin), 리팜피신(rifampicin), 및 테트라사이클린(tetracycline).
- [0051] 항생제 내성 : 세파로신(cephalothin), 겐타마이신(gentamicin), 카나마이신(kanamycin), 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 폴리믹신(polymyxin), 스트렙토마이신(streptomycin) 및 사이클로헥시미드(cycloheximide).
- [0052] 상기 마리니플렉실리 라이조스패레 TRM1-10의 isoprenoid quinone은 MK-6(menaquinone-6)이며, 주요 지방산은 iso-C_{15:0}, iso-C_{17:0} 3-OH 및 iso-C_{15:0} G이다.
- [0053] 상기 TRM1-10 균주의 극성 지질은 포스파티딜 에탄올 아민(phosphatidylethanolamine), 미확인 아미노 지질 및 미확인 지질이 존재한다.
- [0054] 상기 마리니플렉실리(*Mariniflexile*) 속 균주는 서열번호 1의 16S rDNA를 분석함으로써 동정할 수 있다.
- [0055] 상기 "16S rDNA(16S ribosomal DNA)"는 16S rRNA를 코딩하는 DNA를 의미하며, 동종 간에는 거의 다양성이 나타나지 않지만 타종 간에 다양성이 나타나 생물 동정에 널리 활용된다. 특히 상기 16S rDNA는 배양이 불가능하거나 어려운 생물, 또는 보고된 적 없는 생물의 동정 및 분류에 유용하게 사용된다. 상기 16S rDNA는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다.
- [0056] 상기 16S rRNA 유전자 분석법은 세균간의 계통학적 관계를 밝히는 데에 있어서 혹은 균종을 동정하는 데에 있어서 탁월한 장점을 가지며, 본 발명자는 16S rDNA를 분석함으로써 꽃마름병에 대한 우수한 방제 활성을 가지는 신규 마리니플렉스 속 균주를 동정하였다.
- [0057] 구체적으로, 상기 균주의 16S rDNA를 프라이머(primer)를 통해 증폭시킴으로써 동정할 수 있다.
- [0058] 상기 프라이머(primer)는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 포함하는 짧은 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능할 수 있다.
- [0059] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 미생물에 존재하는 핵산과 혼성화되어 상기 표적 미생물의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.
- [0060] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 바람직하게는 단쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드

(deoxyribonucleotide)일 수 있다.

- [0061] 상기 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 프라이머는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아미이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조틸-, 이미다조틸-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-테아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조 틸-, 이미다조틸-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 증합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지할 수 있다.
- [0064] 상기 연장 프라이머는 타겟 핵산의 특정 위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0065] 상기 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포함할 수 있다. 상기 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 상기 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함할 수 있다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).
- [0067] 상기 특정 서열을 규명하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있으며, 예컨대, 특정 서열을 규명하는 방법으로서 형광 핵산 혼성화(FISH), 직접적 DNA 서열결정, PFGE 분석, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 건퍼메이션 분석(SSCA, Orita et al., PNAS, USA 86:2776(1989)), RNase 보호 분석(Finkelstein et al., Genomics, 7:167(1990)), 닷트 블롯 분석, 변성 구배 젤 전기영동(DGGE, Wartell et al., Nucl. Acids Res., 18:2699(1990)), 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 단백질(예: *E. coli*의 *mutS* 단백질)을 이용하는 방법(Modrich, Ann. Rev. Genet., 25:229-253(1991)), 및 대립형-특이 PCR이 사용될 수 있다.
- [0068] 서열 변화가 단일-가닥 분자 내 염기 결합의 차이를 초래하여 이동성이 다른 밴드가 형성될 수 있으며, 상기 SSCA는 상기 밴드를 검출할 수 있다. 상기 DGGE 분석은 변성 구배 젤을 이용하여, 야생형 서열과 상이한 이동성을 나타내는 서열을 검출할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 균주 또는 그의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물 및 식물 성장 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0070] 상기 조성물은 수화제(wettable powder) 또는 액상수화제(suspension concentrate) 형태의 제형일 수 있다. 상기 꽃마름병 방제용 조성물은 액상 형태로 제조될 수 있으며, 이에 증량제를 첨가하여 가루분말의 형태로 이용하거나 이를 제형화하여 과립화시킬 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 상기 조성물은 식물병 방제 또는 성장 촉진을 위한 충분한 양으로, 물로 균일하게 희석한 후 동력살포기와 같은 적절한 살포장치를 이용하여 경작지에 살포할 수 있다.
- [0072] 상기 수화제 또는 액상수화제를 물에 희석하는 경우 수화제 또는 액상수화제의 농도는 유효성분이 생물학적으로 유효한 범위가 될 수 있도록 10^5 내지 10^{10} CFU/ml, 바람직하게는 10^8 CFU/ml 내외로 조절할 수 있으나, 이에 제

한되지 않는다.

- [0073] 상기 조성물은 농업적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있으며, 충전제(fillers), 용매, 부형제, 계면활성제(surfactants), 현탁제(suspending agents), 스프래더(spreaders), 부착제(adhesives), 소포제, 분산제, 습윤제, 드리프트 감소제(drift reducing agents), 보조제(auxiliaries), 보강제(adjuvants) 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0074] 상기 조성물의 제형은 특별히 제한되지 않으며, 농축물, 용액, 스프레이, 에어로졸, 침수용(immersion baths), 침지(dips), 에멀전(emulsions), 현탁 농축액, 겔, 과립(granules) 등의 타입으로 제제화 할 수 있다.
- [0075] 상기 조성물은 단독으로 또는 다른 농업용 제제, 농약(pesticides), 살충제(insecticides), 살응애제(acaracides), 살진균제, 살박테리아제, 제초제, 항생제, 항균제, 살선충제(nematicides), 쥐약(rodenticides), 곤충병원체(entomopathogens), 페로몬(pheromones), 유인제(attractants), 식물성장조절제(plant growth regulators), 식물 호르몬(plant hormones), 곤충성장 조절제(insect growth regulators), 화학 불임제(chemosterilants), 미생물 작물보호제(microbial pest control agents), 방충제(repellents), 바이러스, 식자극제(phagostimulents), 식물 영양제, 식물비료 및 생물학적 방제제와 함께 배합하거나, 순차적으로 사용될 수 있으나, 사용 방법이 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 상기 조성물은 상기 서열번호 1의 16S rDNA를 포함하는 신규 균주 또는 마리니플렉실리 라이조스페레 TRM1-10 균주를 해양 한천 배지 및 해양 액상 배지에 30℃ 온도 조건에서 3일간 배양한 배양액일 수 있다.
- [0077] 상기 조성물은 상기 서열번호 1의 16S rDNA를 포함하는 신규 균주 또는 마리니플렉실리 라이조스페레 TRM1-10 균주를 정제수에 희석한 현탁액일 수 있으며, 상기 균주 현탁액의 농도는 2×10^6 내지 2×10^8 CFU/토양 g일 수 있다.
- [0078] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 식물병 방제용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제방법이 제공된다.
- [0079] 상기 식물병 방제용 조성물은 처리하고자 하는 작물의 화분 토양에 혼합하는 형식으로 처리할 수 있으며, 액상의 조성물을 처리하고자 하는 작물의 토양 위에 주사하거나, 작물을 화분에서 분리하여 조성물과 혼합한 토양이 있는 화분에 재배치하는 분갈이 방법으로 사용될 수도 있으나, 사용방법은 특별히 제한되지 않는다.
- [0080] 상기 식물병 방제용 조성물의 사용량은 대상병해, 대상작물, 시용방법, 발생경향, 피해의 정도, 환경조건, 사용하는 제형 등에 따라서 변동하기 때문에, 적절하게 제어할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 식물병 방제용 조성물의 제조방법이 제공된다. 상기 균주는 당해 기술분야의 널리 알려진 방법에 의해 배양될 수 있으며, 배양된 균주는 식물병 방제용 조성물의 제조에 사용될 수 있다.
- [0082] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 기술한다.
- [0083] **실험방법**
- [0084] **실험예 1 : 풋마름 내성 작물의 근권에서 방제용 균주 분리**
- [0085] 풋마름병에 대한 저항성을 증진시켜 미생물 제제로 사용할 수 있는 풋마름병 방제용 균주를 선발하기 위해 동아대학교 시험포장(N 35.239° , E 128.978°)의 그린하우스에서 재배되는 토마토 품종을 사용하였다.
- [0086] Hawaii 7996 토마토 품종은 풋마름병에 내성이 있는 토마토 품종이고, 2011년 10월 14일부터 11월 17일까지 재배되었다. 토마토 품종의 재배 토양 조건은 다음과 같다.
- [0087] pH 7.0; EC 39.50 ds/m; 염분 2.53 %; 유기물 2.62 %; 총 N 0.15 mg/kg; 총 P 1,037.00 mg/kg; P₂O₅ 545.26 mg/kg; Ca 1,688.00 mg/kg; Mg 216.50 mg/kg; K 106.90 mg/kg; Na 289.80 mg/kg; 총 미생물 4.3×10^7 CFU/g 건조 토양.
- [0088] 상기 Hawaii 7996 토마토 품종의 근권 토양으로부터 TRM1-10 균주를 분리하였다. 분리된 TRM1-10 균주는 30℃ 온도 조건에서 해양 한천 배지 및 해양 액상 배지에 배양되었고, 장기 보존을 위해 -80℃ 온도 조건에서 15% 글리세롤 현탁액에 보관하였다.

[0089] **실험예 2 : TRM1-10 균주의 형태학적 분석 및 생화학적 분석**

- [0090] Hawaii 7996 토마토 품종의 근권 토양으로부터 분리된 TRM1-10 균주를 형태학 및 생화학 특성을 분석하였다.
- [0091] TRM1-10 균주의 그람 염색 시험은 Gram straining kit (YD Diagnostics Inc., Korea)를 이용하였고, 광학 현미경(Carl Zeiss, Axio Lab.A1)을 사용하여 TRM1-10 균주의 형태와 운동성을 관찰하였다.
- [0092] 또한 TRM1-10 균주의 형태와 크기를 관찰하기 위해 주사 전자현미경(한국생명공학연구원에 설치된 FEI Quanta 250 FEG)을 사용하였다(도 1B).
- [0093] TRM1-10 균주의 4~40℃ 범위의 온도에 대한 성장은 해양 한천 배지에서 7일 동안 관찰하였다.
- [0094] TRM1-10 균주의 2~10% NaCl 범위 및 4.5~9 pH 범위에 대한 성장은 30℃ 온도 조건의 해양 액상 배지에서 7일 동안 관찰하였다.
- [0095] TRM1-10 균주의 혐기성 성장 시험은 혐기성 챔버에서 25℃ 온도 조건의 해양 한천 배지에서 10일 동안 관찰하였다.
- [0096] TRM1-10 균주의 KOH 시험은 Flexirubin 형 안료의 유무로 판단하였고, H₂S의 생산 여부는 SIM 배지와 Kovacs 시약(Becton, Dickinson and Company, USA)으로 시험하였다.
- [0097] 3% H₂O₂ 및 산화효소 시약(Becton, Dickinson and Company, USA)을 사용하여 TRM1-10 균주의 카탈라아제 및 산화효소에 대한 효소 활성을 시험하였다.
- [0098] API 20NE 및 API ZYM (bioMerieux, France)으로 TRM1-10 균주의 다른 효소 활성 및 기질의 동화 작용을 조사하였다.
- [0099] TRM1-10 균주의 카제인(casein) 가수분해 시험은 2% NaCl이 함유된 30° C 온도 조건의 skim milk 한천 배지에서 7일간 측정하였다.
- [0100] TRM1-10 균주의 전분(starch), 크산틴(xanthine) 및 하이퍼크산틴(hypoxanthine) 가수분해 시험은 0.2% 전분, 0.4% 크산틴 및 0.4% 하이퍼크산틴을 함유하는 해양 한천 배지에서 측정하였다.
- [0101] TRM1-10 균주의 L-타이로신 가수분해 시험은 0.5% 펩톤, 0.3% beef extract, 0.5% 타이로신 및 2% NaCl 조성의 배지에서 30℃ 7일 동안 측정하였다.
- [0102] TRM1-10 균주의 95 종의 탄소원 동화 시험은 Biolog GN2 microplates를 이용하여 30℃ 3일간 측정하였다.
- [0103] TRM1-10 균주의 항생물질 감수성 테스트는 항생물질 감수성 테스트 디스크(Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)에서 해양 한천 배지로 수행되었다: 암피실린(ampicillin, 10 µg/disc), 카르베니실린(carbenicillin, 100 µg/disc), 세파로신(cephalothin, 30 µg/disc), 클로람페니콜(chloramphenicol, 50 µg/disc), 겐타마이신(gentamicin, 30 µg/disc), 카나마이신(kanamycin, 30 µg/disc), 린코마이신(lincomycin, 15 µg/disc), 네오마이신(neomycin, 30 µg/disc), 노보비오신(novobiocin, 5 µg/disc), 페니실린(penicillin, 10U µg/disc), 폴리믹신(polymyxin, 300U µg/disc), 리팜피신(rifampicin, 5 µg/disc), 스트렙토마이신(streptomycin, 25 µg/disc), 설파메톡사졸(sulphamethoxazole, 25 µg/disc), 테트라사이클린(tetracycline, 30 µg/disc), 사이클로헥시미드(cycloheximide, 100 µg/ml).
- [0104] 화학적 분류의 특징을 비교하기 위해 *Mariniflexile* 종을 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 얻었고, 모든 균주는 30℃ 해양 한천 배지 및 해양 액상 배지에서 배양되었다.
- [0105] 지방산 및 극성 지질을 분석하기 위해, TRM1-10 및 *M. soesokkakense* RSSK-9(KCTC 32427) 균주를 30℃ 해양 한천 배지에서 3일간 배양하였다.
- [0106] 지방산 분석은 Miller's 방법에 따라 지방산을 추출하고 가스 크로마토그래피(Agilent 6890 gas chromatograph, KCCM, South Korea)를 이용하여 동정하였다.
- [0107] 극성 지질 분석을 위해 동결 건조된 TRM1-10 및 *M. soesokkakense* RSSK-9의 세포 50 mg을 준비하였다. Miller's 방법에 따라 극성 지질을 추출하고, 2차원 박막 크로마토그래피 (KCCM, South Korea)로 분석 하였다.
- [0108] Isoprenoid quinine 분석을 위해 동결 건조된 TRM1-10 및 *M. soesokkakense* RSSK-9의 세포 100 mg을 준비하였다. Isoprenoid quinine 은 chloroform-methanol(2:1, v/v)로 추출하고, 고성능 액체 크로마토그래피(KCCM,

South Korea)로 동정하였다.

[0109] TRM1-10 균주는 그람 음성 호기성 간균이며, 해양 한천 배지에서 3일 동안 0.5-2mm 크기의 노란색 콜로니를 형성하였다(도 1A).

[0110] TRM1-10의 생리학 및 생화학적 분류의 특성을 *M. soesokkakense* RSSK-9와 비교하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

특징	TRM1-10	<i>M. soesokkakense</i> RSSK-9
생육 온도 범위 (°C)	4-40	4-35
질산 환원	-	+
산화 효소 활성	-	+
가수분해 활성		
Casein	-	-
Hypoxanthine	-	-
Starch	+	+
l-tyrosine	-	+
Esculin	+	+
Gelatin	-	-
Tween 80	-	-
이용 탄소원		
Benzoate	-	-
d-Cellobiose	+	-
d-Galactose	-	+
d-Mannose	+	+
d-trehalose	+	-
l-Arabinose	-	+
l-glutamate	+	-
Maltose	+	+
Succinate	+	-
Sucrose	+	+
항생물질 감수성		
Ampicillin	+	+
Carbenicillin	+	+
Cephalothin	-	+
Gentamicin	-	-
Kanamycin	-	-
Lincomycin	+	+
Neomycin	-	-
Novobiocin	+	+
Polymyxin B	-	-
Streptomycin	-	-
Tetracycline	+	-
DNA G+C 비율		
G+C(%)	34.56	34.6

[0112] 실험예 3 : TRM1-10 균주의 분자생물학적 분석

[0113] 분자생물학적 동정을 위해 16S rRNA 유전자를 하기 표 2의 프라이머 세트로 증폭하였다. PCR 조건은 annealing 55° C, 30초; extension 72° C, 1.5분, 30 cycles로 하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 서열은 생어 염기서열 분석법(Sanger sequencing)을 이용하여 염기서열을 분석하였고, EzTaxon 웹 서버에서 동정하였다.

[0114] 16S rRNA 유전자를 이용한 계통 분석은 ARB(Ludwing, W. et al., Nucleic Acids Res 32, 1363-1371, 2004) 및 MEGA5(Tamura, K. et al., Mol Biol Evol 28, 2731-2739, 2011)를 참고하였다.

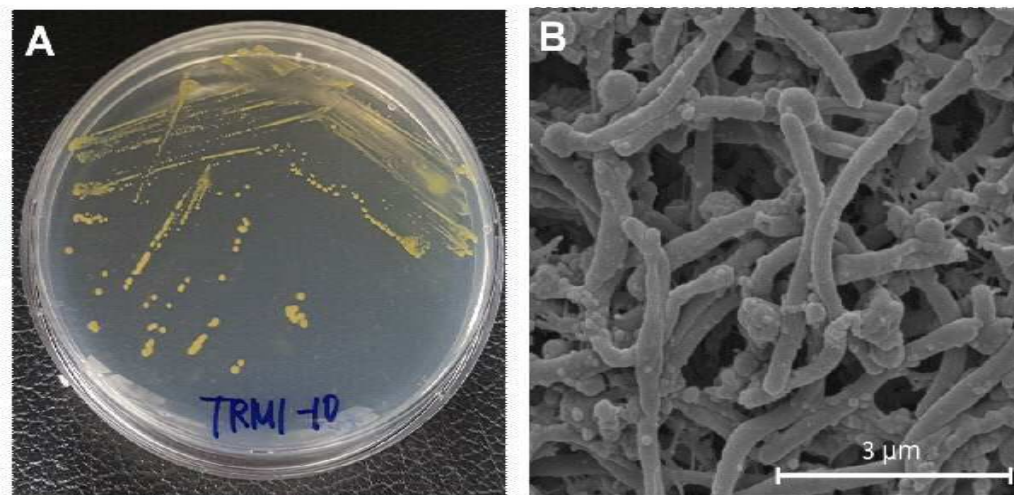
표 2

- | | | |
|--------|--------------|---|
| [0115] | 구분 | 프라이머 서열 |
| | 27F | 5'-GTG CTG CAG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' |
| | 1492R | 5'-CAC GGA TCC TAC GGG TAC CTT GTT ACG ACT T-3' |
- [0117] DNA의 G+C 비율을 분석하기 위해 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)를 사용하여 TRM1-10의 DNA를 추출하고, Illumina platforms(DNA Link, Inc., South Korea)의 PacBio RS II system 및 HiSeq 2000 sequencer를 사용하여 염기서열을 분석하였다.
- [0118] TRM1-10 균주의 16S rRNA 전체 길이는 1,510 nt 이고, *M. soesokkakensis* RSSK-9와 염기 서열의 유사성이 가장 높았다(96.94 %).
- [0119] 16S rRNA를 기초한 계통수에서 TRM1-10은 *Mariniflexile*속에 포함되었고, *M. soesokkakensis*, *M. fucanivorans* 및 *M. gromovii*과 공통의 조상을 공유하였다(도 2).
- [0120] 계통 발생 위치 및 다른 *Mariniflexile* 종과의 미생물학, 유전학 및 생화학적 특성을 비교한 결과 TRM1-10 균주가 *Mariniflexile* 속의 새로운 종이며, 본 발명자들은 TRM1-10 균주를 *Mariniflexile rhizosphaerae* sp. nov. 로 명명하였다.
- [0121] **실험예 4 : TRM1-10 균주의 풋마름병 방제 시험**
- [0122] TRM1-10 균주의 풋마름병 방제 효과를 평가하기 위해 풋마름병 감수성 작물인 토마토 Moneymaker를 이용하였다.
- [0123] 표면이 살균된 토마토 씨앗을 멸균수에서 1주일간 발아시키고, 12°C에서 40분 2회 멸균한 상업용 원예시설에서 이용하는 토양(Punong Co., Ltd, Korea)이 담긴 포트에 이식하여 2주 동안 재배하였다.
- [0124] 실험에 사용되는 작물은 28°C 온도조건에서 14시간은 빛 조건, 10시간은 어둠 조건으로 통제된 배양실에서 재배하였다.
- [0125] TRM1-10 균주는 30°C 온도조건인 해양 한천 배지에서 4일간 배양하고, 멸균수로현탁액을 제조하여 토마토가 재배되고 있는 포트에 처리하였다.
- [0126] 균주 현탁액을 다양한 희석배수로 처리하여 토양에 혼합하되 최종 토양당 2×10^6 CFU/토양 g, 2×10^7 CFU/토양 g 및 2×10^8 CFU/토양 g이 되도록 조정하였다. 균주 현탁액을 포함하지 않은 토마토 작물을 음성 대조군으로 사용하였고, 모든 실험은 토마토 10개체씩3번 반복하였다.
- [0127] TRM1-10을 처리하거나 처리하지 않은 모든 작물은 28°C 온도조건에서 14시간은 빛 조건, 10시간은 어둠 조건에서 7일간 배양하고, 풋마름병 발병 균주인 *R. solanacearum* SL341를 토양 g 당 10^7 CFU 이 처리되도록 토양에 혼합하여 접종하였다. 접종 후 2주 동안 풋마름병의 질병 경과를 관찰하였다.
- [0128] 고농도(2×10^8 CFU/토양 g)의 TRM1-10 균주 희석액을 처리한 토마토 작물은 TRM1-10 균주 희석액을 처리하지 않은 토마토 작물(control)에 비해 풋마름병에 대해 높은 방제 효과를 나타내었다(도 3).
- [0129] **실험예 5 : TRM1-10 균주의 식물 생장 촉진 시험**
- [0130] TRM1-10 균주를 대상으로 자연농지 토양(경상남도 김해시 대동면 동아대학교 농장)을 이용하여 토마토 식물체의 생육에 미치는 효과를 분석하였다.
- [0131] 토마토 품종은 Hawaii 7996 종자를 0.1% Triton X-100이 첨가된 70% 에탄올에서 1분간 강하게 흔들어 주고 다시 토마토 종자를 0.1% Triton X-100이 첨가된 10% bleach(chlorox)에서 강하게 흔들며 15분간 유지하였다.
- [0132] 이후 종자를 회수하여 충분한 멸균수로 5회 철저히 행구고 건조하여 멸균종자로 준비하였다. 토양은 물빠짐을 위해 자연 농지와 Calcined clay(수돗물에 씻고 121°C에서 40분 2회 멸균 후 건조한)를 부피비율 1:1로 혼합하여 토마토를 재배하였다.
- [0133] 멸균한 토마토 종자는 멸균수로 적시진 멸균 여과지(Advantec; Toyo Roshi Co. Ltd., Tokyo, Japan)에 치상 후 7일간 광주기 32°C에서 14 시간, 암주기 28°C에서 10 시간으로 생육하였다.

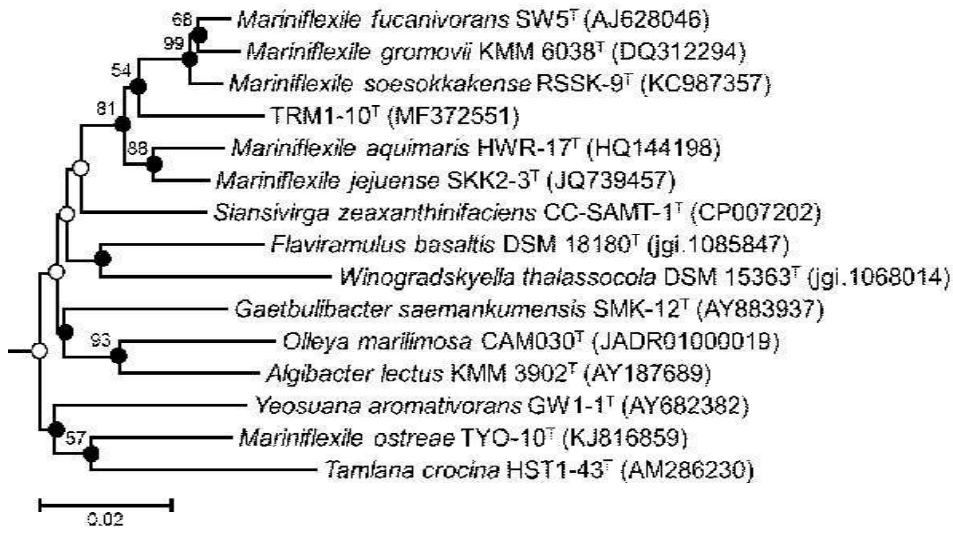
- [0134] 치상 후 7 일째에 준비한 농지토양을 한 포트 당 60g씩 나누어 담고 발아한 토마토 유묘를 정식하였다. 각 포트 당 살균수 또는 TRM1-10 현탁액을 처리하여 토양 g당 세균 수를 10^7 CFU로 조절하였다.
- [0135] 정식 후 토마토 식물을 생육상 내에서 광주기 28℃에서 14 시간, 암주기 28℃에서 10 시간으로 생육하면서 생육 촉진을 검정하였다.
- [0136] 정식 후 40일이 경과한 후 토마토 식물의 생육을 1차 정량하였으며, TRM1-10 균주 처리구와 무처리 간의 생중량을 각각 측정하여 비교하였다.
- [0137] 각 처리 당 반복은 5개의 식물체로 반복하였고, T-test 통계처리 방법을 통하여 각 처리구 당 유의차를 검정하였다.
- [0138] Hawaii 7996의 생중량의 경우 TRM1-10 미생물 처리구에서 평균 2.418 g으로 1.86 g의 미생물 무처리구에 비해 생중량이 1.3 배 증가하였으며 통계적으로 유의한 증가를 보였다($p=0.0039795$)(도 4).
- [0139] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0140] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [0142] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- [0143] 수탁번호 : KCTC18646P
- [0144] 수탁일자 : 20171128

도면

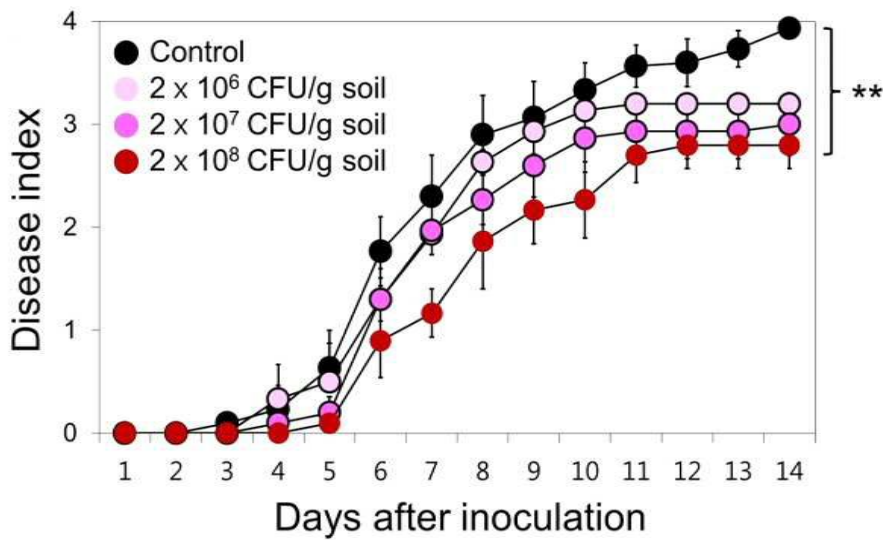
도면1



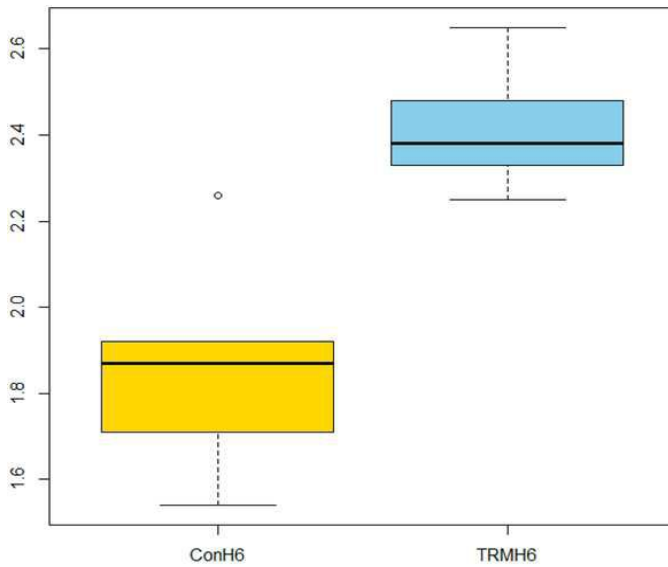
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> YONSEI UNIVERSITY
 <120> A COMPOSITION FOR CONTROLLING PLANT DISEASE AND PROMOTING PLANT
 GROWTH COMPRISING MARINIFLEXILE RHIZOSPHAERAE TRM1-10
 <130> 17PP10867
 <160> 1
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1510
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TRM1-10_16S_rRNA
 <400> 1
 tgaagagttt gatcctggct caggatgaac gctagcggca ggcctaacac atgcaagtcg 60
 aggggtagag ggagcttgct cccttgagac cggcgcacgg gtgcgtaacg cgtatacaac 120
 ctgcctctta ctgcgggata gccagagaa atttgatta acaccgata gtatagttac 180

 ttggcatcaa gttattatta aaggttacgg taagagatgg gtatgcgttc tattagctag 240
 atggagtggg aacggcacac catggcaacg atagataggg gccctgagag ggggatcccc 300
 cacactggta ctgagacacg gaccagactc ctacgggagg cagcagtgag gaatattgga 360
 caatgggggc aaccctgac cagccatgcc gcgtgcagga agactgccct atgggttgta 420
 aactgctttt gtacgggaag aaactgccc acgtgtggca gcttgacggt accgtaagaa 480
 taaggatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatcca agcgttatcc 540

ggaatcattg ggittaaagg gtccgtaggt ggatggtaa gtcagagggtg aaatcctgca	600
gctcaactgt agaattgctt ttgatactgg ctatcttgaa tcaatgtgaa gtggtagaa	660
tatgtagtgt agcggtgaaa tgcatagata ttacatagaa taccaattgc gaaggcagat	720
cactaacatt gcattgacac tgatggacga aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc	780
ctggtagtcc acgccgtaaa cgatggatac tagctgttcg ggtttacctg agtggctaag	840
cgaaagtgat aagtatccca cctggggagt acgggcgcaa gcctgaaact caaaggaatt	900
gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgatacg cgaggaacct	960
taccaggct taaatgtaag ttgcattagc tggagacagc tatttcttcg gaccacttac	1020
aaggtgctgc atggttctcg tcagctctg cctgagggtg tcaggttaag tcctataacg	1080
agcgaaccc ctgttcttag ttgccagcga gtcaagtcgg gaactctagc aagactgcca	1140
gtgcaactg tgaggaaggt ggggatgacg tcaaatcacc acggccctta cgtcctgggc	1200
tacacacgtg ctacaatggt agggacagag agcagccact gggcgaccag gagcgaatct	1260
acaaaccta tcacagttcg gatcggagtc tgcaactcga ctccgtgaag ctggaatcgc	1320
tagtaatcgc atatcagcca tgatcgggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc	1380
cgtaagcca tggaaactgg gactgcctga agtccgtcac cgcaaggagc ggcctagggt	1440
aaaatcggta actagggcta agtcgtaaca aggtagccgt accggaaggt gcggctggaa	1500
cacctccttt	1510