(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.7
C12N 1/20

(45) 공고일자 2004년02월21일
(11) 등록번호 10-0419783
(24) 등록일자 2004년02월10일

(21) 출원번호 10-2001-0025922
(22) 출원일자 2001년05월11일

(65) 공개번호 10-2002-0086154
(43) 공개일자 2002년11월18일

(73) 특허권자 경기도(농업기술원)
경기 화성군 태안읍 기산리 315

(72) 발명자 임재욱
경기도수원시팔달구매탄동1174-15

이상우
경기도수원시권선구고색동5-4상우아파트101동1201호

서명훈
서울특별시강남구대치1동612국제아파트3동101호

이수연
서울특별시서초구방배2동453-20102호

심상연
경기도화성군태안읍병점리809주공아파트107동1104호

이용환
경기도안양시동안구달안동샛별한양아파트201동101호

(74) 대리인 신명건

심사관 : 권오희

(54) 식물의 생장을 촉진시키며 식물병원균에 대하여 길항력을 갖는 슈도모나스 애루지노사 17S 및 그 돌연변이주

요약

본 발명은 식물병원균에 대한 길항력을 나타내고 식물생장촉진 효과가 있는 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 17S 균주에 관한 것이다. 보다 상세하게는 토마토 줄기썩음병균에 대해 길항력을 가지는 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)에 관한 것으로써, 토마토 뿌리에서 토마토 줄기썩음병균에 대해 길항력을 나타내는 균주들을 분리한 후, 토마토 생육을 촉진하는 균주들을 다시 분리하여 그 중 17번째 분리된 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)에 항생물질을 처리하여 항생물질에 대해 저항성을 나타내는 것을 특징으로 하는 변이주인 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa 17S*)에 관한 것이다. 본 발명의 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa 17S*)는 식물병원균에 대한 길항력과 식물생장촉진 효과가 있어 육묘기에 가지의 생체중 및 건물률을 향상시키며 유용미생물 17S는 실내 실험에서 참외덩굴마름병(*Mycosphaerella melonis*) 등 15여종의 식물병원균에 대하여 균사생육을 억제시킨다.

색인어

슈도모나스 애루지노사 17S(Pseudomonas aeruginosa 17S), 돌연변이주, 토마토 줄기썩음병균

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식물병원균에 대한 길항력을 나타내고 식물생장촉진 효과가 있는 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 17S 균주에 관한 것이다. 보다 상세하게는 토마토 줄기썩음병균에 대해 길항력을 가지는 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)에 관한 것으로써, 토마토 뿌리에서 토마토 줄기썩음병균에 대해 길항력을 나타내는 균주들을 분리한 후, 그 중 토마토 생육을 촉진하는 균주들을 다시 분리하여 그 중 17번째 분리된 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)에 항생물질을 처리하여 항생물질에 대해 저항성을 나타내는 것을 특징으로 하는 변이주인 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa 17S*)에 관한 것이다.
본 발명과 관련하여 식물 생장 촉진의 기작에 대한 연구결과를 살펴보면 다음과 같다. 식물생장촉진 미생물이 식물체의 병원균에 대한 전신성 저항성을 유도하는 리포다당류(lipopolysaccharide) 등의 엘리씨터(elicitor)를 생산함으로써 식 물체의 병원균에 대한 저항성을 높이고 작물의 생장을 촉진한다(Leeman 등, 1995). 식물 병원균의 생장을 억제하는 유기산이나 항생물질을 생산한다(Carroll 등, 1995; Moon 등, 1996; Rosales 등, 1995). 그리고 사이드로포어(siderophore)를 생산, 분비함으로써 토양 내의 철 이온의 농도를 급감시켜 식물 병원균이 자라지 못하도록 한다(Buysens 등, 1996; Carroll 등, 1995; Seong 등, 1991; Seong 등, 1992). 위의 연구결과를 토대로 자명한 것은 식물 생장촉진 미생물의 작용 기작 중 여러 부분이 식물 병원균의 생육 및 침입 억제와 관련되어 있으므로 식물 생장 촉진과 식물 병원균의 생물학적 방제는 밀접한 관계를 갖는다는 것이다.
본 발명의 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa 17S*)와 관련한 문헌을 살펴보면 다음과 같다. 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)는 여타의 *Pseudomonas* spp.와 같이 토양에 서식하는 토양 세균이며 식물병의 생물학적 방제원으로서 보고되고 있다(Busens 등, 1995; Buysens 등, 1996; Kurmar 등, 1992; Moon 등, 1996; Seong 등, 1991; Seong 등, 1992). 특히 피티움 아파니더마튬(*Pythium aphanidermatum*), 피티움 울티움(*P. ultimum*), 푸사리움 옥시스포리움(*Fusarium oxysporum*) 등의 다양한 병원균에 대하여 모두 길항능을 보이는 균주에 대한 보고도 있으며 그 기작으로 사이드로포어(siderophore)와 항생 물질 생산이 거론되고 있다(Gamliel 등, 1993). 이러한 생물학적인 재배방법에 의해 작물의 병충해 피해발생을 방지하는 방제원의 처리는 수확량을 증가시키나, 현재 양액 재배에서 근권 미생물의 이용에 대한 연구는 미진한 편이다. 펄라이트와 피트모스를 7:3으로 섞은 배지에 토마토를 정식하고 슈도모나스 플로리센스(*Pseudomonas fluorescens*)의 세균을 처리한 결과 10% 정도의 상품 과중이 증가하였다고 보고하였다(Gagne 등, 1993). 식물 생장촉진 근권 세균을 오이에 처리했을 때 푸사리움(*Fusarium*) 시들음병에 대하여 전신저항성을 유도시켰다(Liu 등, 1995). 또한 플러그 육묘시 광합성 세균과 세포융합에 의한 융합균주를 토마토와 오이에 처리하였을 때 식물체 생장이 촉진되었으나 슈도모나스(*Pseudomonas*) 균주는 생육을 억제하는 경향이 있었다(Cho 등, 1998).
또한, 본 발명과 관련한 양액재배에서의 병발생 원인은 작업농기구, 신발의 흙, 장비를 매개로 하거나 그리고 역경 또는 사경 재배시 자갈이나 모래에 있는 병원균이 재배되는 작물에 전반되어 병이 발생하기도 한다. 또한 종자, 초파리 등의 곤충에 의해 병발생이 가능하다(Paulitz, 1997). 일단 병원균이 전염되면, 순환식 양액 재배의 경우 병의 전반 속도가 빨라 방제가 힘들며, 채소류 양액 재배의 경우 잔류 독성 등의 문제로 농약에 의한 방제가 곤란하여 길항균을 이용한 식물병 방제에 대한 연구를 필요로 하고 있다. 토마토 암면 양액재배시 푸사리움 옥시스포리움(*Fusarium oxysporium*)에 의한 청고병을 방제하기 위하여 길항성 트리초더마(*Trichoderma)* 를 처리한 결과 발병도를 70% 감소시키는 등(Rattink, 1993), 생물학적 방제에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으므로(Paulitz, 1997), 유용미생물을 근권에 안정적으로 정착시켜 병발생을 억제함과 동시에 작물의 수량을 증대시킬 목적으로 근권세균을 선발하여 이용할 수 있는 연구를 필요로 한다.
이에 본 발명자들은 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 17S의 배양여액을 식물병원균인 토마토 시들음병균(*Fusarium oxysporum f. sp. radis-lycopersici*)의 포자발아의 62%를 억제시키고 인삼근부병(*Nectria radicicola*)의 포자발아의 97.4%를 억제시키며, 또한 가지 육묘시 배양현탁액을 처리하면 생체중과 건물율을 증가시켜 토마토 시들음병과 고추 역병을 100% 방제하는 것을 확인하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기 본 발명의 문제점을 해결하기 위하여, 토마토 뿌리에서 토마토 줄기썩음병균에 대하여 길항력을 나타내는 균주를 일차 선발하였고, 토마토의 생육을 촉진하는 균주에 17번째 균을 분리하고, 상기 분리한 균주가 항생물질에 대해 저항성을 가지는 변이주임을 확인하였다.
따라서, 본 발명은 식물병원균에 대한 길항력과 식물생장촉진 효과가 있는 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas a*

eruginosa) 17S를 제공하는데 특징이 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 식물병원균에 대한 길항력을 나타내고 식물생장촉진 효과가 있는 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 17S 균주에 관한 것이다. 보다 상세하게는 토마토 줄기썩음병균에 대해 길항력을 가지는 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)에 관한 것으로써, 보다 구체적으로는 토마토 뿌리에서 토마토 줄기썩음병균(*Pseudomonas corrugata*)에 대해 길항력이 있는 균주들을 분리한 후, 토마토의 생육을 촉진하는 균주를 다시 분리하여 그 중 가지의 생육을 촉진하는 아래 표 1의 특성을 지니는 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 17번 균주를 분리하였다.
슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 17번 균주는 길항균 중에서 17번째 분리한 것으로, 이를 이용하여 항생물질인 스트랩토마이신(streptomycin) 200ppm에서 저항성을 나타내는 돌연변이주를 유기하였다. 따라서 이를 도모나스 애루지노사 17S로 명명하였다.
이러한 연구에서 식물병원균에 대한 길항력과 식물생장촉진 작용을 하는 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa* 17S) 균주, 그리고 상기 균주는 항생물질인 스트랩토마이신에 대해 저항성을 가지는 변이주임을 확인하였다.
이하 미생물 분리 및 동정, 정착성, 효과검정, 저항성 등을 실시예를 통하여 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 청구범위를 실시예에 내재된 기술적 사상에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1. 길항세균 및 식물생장촉진세균의 분리와 동정

토마토 근면에서 정착한 세균 중 토마토 줄기썩음병균에 대하여 길항력을 보이는 세균을 선발하기 위하여 토마토 뿌리 5g을 200㎖ 플라스크에 살균수 100㎖를 넣고 5분간 진탕하여 근권 토양을 제거한 후, 뿌리 5g을 살균수 200㎖를 넣고 마쇄하여 순차 희석한 후 킹스(King's) B배지에 1일간 배양하였다. 하루 후 24시간 150rpm으로 영양배지(nutrient broth)에서 배양한 줄기썩음병균(*Pseudomonas corrugata*)을 킹스(King's) B배지 표면에 분무하여 병원균과 콜로니가 형성된 세균이 같이 자라게 한 후 병원균의 생장을 억제한 세균 콜로니를 선발하였다. 선발된 38균주의 길항세균 중에 식물 생장촉진세균을 분리하고자 '하우스 모모타로' 토마 토 종자를 파종하고, 본엽이 나기 전에 길항세균을 영양(nutrient) 배지에 접종한 후 100rpm, 25℃에서 48시간 배양한 후 5,000rpm으로 원심분리하였다. 10mM-인산 완충용액(10mM-phospate buffer)을 사용하여 배양액을 10^{8} cell/㎖로 희석하고 토마토묘의 배축을 절단 후 길항세균 배양 희석액에 2시간 침지한 다음 살균토양에 삽목하여 토마토 생체중을 조사하여 17번 균주를 선발하였다. 선발된 균주를 동정하기 위하여 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행에 동정을 위탁하여 세균의 형태 및 배양특성, 생화학적 특성을 API20NE 키트(kit)로 조사한 결과 85%의 신뢰도로서 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로 동정할 수 있었다(표 1). 버기스 매뉴얼(Bergey's manual)에 기재된 표준균주와 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa1* 17S)의 형질을 비교해 보면 모든 특징이 일치하였지만 젤라티나아제 생성과 탈질산능은 불일치하였다. 상기의 두 가지 특성은 모두 배양 조건에 따라서 민감하게 달라지는 부분으로서 동정의 신뢰도를 떨어뜨릴 만큼 큰 차이는 아니었다(표 1). 항생제에 대한 저항성을 조사해 본 결과 앰피실린에 대해서 저항성을 보였다.

실시예 2. 균주의 정착성 조사를 위한 마커 측정

항생제 저항성 균주를 유기하기 전에, 각각의 항생제에 대하여 원래의 균주가 가지고 있는 저항성을 조사하기 위하여 앰피실린, 스트렙토마이신, 카나마이신, 네오마이신, 클로람페니콜, 테트라싸이클린, 리팜피신을 각각 50ppm씩 처리한 5㎖ 영양(nutrient) 배지에 첨가하고 각각의 균주를 접종한 다음 30℃, 150rpm에서 16 시간 동안 배양하여 혼탁도를 흡광도 550㎚에서 측정하였다. 17번 균주로부터 항생제 내성 균주를 선발하기 위하여 두 가지 방법을 이용하였다. 첫번째, 각 균주를 5㎖ 영양(nutrient) 배지에서 30℃, 150rpm으로 16시간 동안 현탁 배양한 다음 이로부터 50㎕ 접종원을 취하여 동일한 조건에서 2 4시간 동안 배양하며 550㎚에서의 흡광도가 0.3 0.5가 되도록 하였다. 배양체 1.5㎖를 5,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 1.2㎖를 버린 후 여액에 세균 침전을 재현탁하고 이에 사면을 주어 항생제 농도 구배를 둔 스트렙토마이신, 카나마이신, 네오마이신, 테트라싸이클린, 리팜피신 50ppm을 첨가한 영양(nutrient) 한천 배지에 항생제 농도 구배 방향에 대하여 직각으로 접종하였다. 7일간 30℃, 암조건에서 배양하여 생장을 보이는 균주를 다시 해당 항생제 50ppm의 영양(nutrient) 한천 배지에 접종하여 항생제 내성을 안정화한 후 농도를 100ppm, 200ppm으로 조절한 한천 배지에 접종하여 항생제 내성이 강화된 균주를 분리하였다. 두번째, 상기와 동일한 방법으로 17번 균주의 550㎚에서의 흡광도가 0.3 0.5인 접종원을 준비한 다음 스트렙토마이신, 카나마이신, 네오마이신, 테트라싸이클린, 리팜피신을 5ppm씩 첨가한 50㎖ 영양(nutrient) 배지에 500㎕를 접종하고 30℃, 150rpm에서 7일간 배양하여 혼탁도를 조사하였다. 혼탁이 관찰되면 이에서 다시 접종원 500㎕를 취하여 항생제 농도를 2배로 증가시킨 50㎖ 영양(nutrient) 배지에 접종하고 30℃, 150rpm에서 16시간 배양하여 생장 여부를 관찰하였다. 이 과정에서 항생제의 농도가 100ppm, 200ppm이 될 때까지 반복한 후 생장을 보이는 균주를 분리하였다. 두 가지 방법으로 분리된 균주를 항생제가 첨가되지 않은 영양(nutrient) 배지에서 4차례 계대 배양한 다음 다시 항생제 200ppm을 첨가한 영양(nutrient) 배지에서 현탁배양하여 생장 여부를 확인하였다. 항생제 내성의 안정성을 확인한 후 생장이 확인된 균주만을 선발하여 마커로 이용하였다. 유용세균의 근권 내 정착성과 밀도를 조사하기 위하여 앰피실린 저항성의 특성은 확인하였으나 보다 정확한 자료를 얻기 위하여 다시 선발된 근권세균의 항생제 돌연변이주를 분리하였다. 17번 균주로부터 스트렙토마이신 200ppm에 저항성을 갖는 균주인 17S 균주를 분리할 수 있었으며, 항생제에 대해 저항성을 갖는 균주는 항생제를 처리하지 않은 배지에서 모두 4차례의 계대배양 후에도 항생제 저항성을

상실하지 않고 있었으며 또한 균주의 생장에 있어서도 원래의 균주와 차이가 없었다(표 2).

실시예 3. 식물병원균 균사생장억제 효과 검정

참외덩굴마름병균(*Mycosphaerella melonis*), 가지균핵병균(*Sclerotina sclerotiorum*), 벼잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*), 가지시들음병균(*Verticillium dahliae*), 참외덩굴마름병균(*Didymella bryoniae*), 율무잎마름병균(*Bipolaris coicis*), 토마토겹무늬병균(*Alternaria solani*), 백합잎마름병균(*Botrytis elliptica*), 스토크 균핵병균(*Sclerotinia screlotiorum*), 상추균핵병균(*Sclerotinia sp.*), 상추잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 모잘록병균(*Rhizoctonia solani*), 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 벼도열병균(*Magnaporthe grisea*), 토마토잎마름병균(*Phytophthora infestans*)에 대한 균사생장억제율을 조사하였다. 배지로는 PDA, YDA, V8한천배지를 사용하였으며 우선 병원균을 9㎝ 페트리디쉬(petridish) 가운데 접종하고 주변부에 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)를 접종하여 균사생장 억제율[(대조구 균사길이-처리구 균사길이)/대조구 균사길이×100]을 조사하였다(표 3). 그 결과 배지에 따라서 또 균주 조합에 따라서 균사 생장의 억제 효과가 다르게 나타났다. 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)의 균사생장억제효과를 보면 세 가지 배지에서 모두 15개의 식물병원균의 균사생장을 억제한 것으로 나타났으며 YDA배지에서도 다른 배지와 비교 시 높은 균사생장억제율을 보였다.

실시예 4. 육묘시 식물병 발생억제 효과 시험

슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)를 액체영양배지(쇠고기추출물 3g, 글루코오스 2.5g, 펩톤 5g, 증류수 1ℓ)에서 28℃, 150rpm으로 72시간 진탕배양하여 사용하였다. 토마토(하우스모모타로)와 고추(여명)를 72공 플러그트레이에 서울농자재에서 생산한 과채류 비접목용 육묘용상토를 넣고 파종하여 육묘하였다. 본엽이 3매 나왔을 때, 증류수로 10^{8} cfu/㎖로 희석하여 관주하였다. 토마토 시들음병(*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*), 고추역병(*Phytophthora capsici*)은 호밀에 10% 자당(sucrose)을 첨가하고 2번에 걸쳐 121℃에서 살균 후 병원균에 접종하여 25℃에서 배양하였다. 사용 전 접종원 2g을 마쇄후 물 1ℓ에 혼합하여 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa* 25R, 17S)를 처리한 처리구를 다음날 관주하였다. 그 결과, 무처리구(*Pseudomonas aeruginosa* 25R)에서는 토마토 시들음병이 53% 발생하였으나 처리구(*Pseudomonas aeruginosa 17S*)에서는 전혀 발생하지 않아서 방제가가 100%이었다. 고추 역병은 대조구에서 13% 발생되었으 나 처리구에서는 병이 전혀 발생하지 않아 역시 가지역병에 대한 방제가도 100%이었다.

실시예 5. 육묘시 생육촉진효과 검정 및 양액재배시 처리효과 규명

17S 균주 액체영양배지에서 진탕배양 후 5,000rpm에서 원심분리하였고, 증류수 10^{8} cfu/㎖로 희석된 용액을 70공 플러그 트레이당 100㎖씩 피트모스에 혼입한 후에 '모모타로' 토마토와 '백다다기' 오이종자를 파종하였다. 생육조사는 파종 25일 후에 실시하였다. 또한 토마토 양액재배에서 17S 균주의 처리효과를 검정하기 위하여 17S 균주를 킹스(King's) B 액체배지를 이용하여 25℃에서 150rpm으로 36시간 배양 후 5,000rpm에서 원심분리하여 침전시켰으며, 증류수 10^{8} cfu/㎖로 희석한 후 사용하였다. 토마토 '모모타로T93' 품종(1998년 7월 11일)인 펄라이트와 피트모스를 7:3의 비로 혼합시 공시세균을 혼입하였으며, 상토는 직경 9㎝의 지피포트에 담은 후 종자를 파종하였다. 파종 후 야마자키 토마토전용액을 1/2 농도로 양액 육묘하였다. 육묘 후 본토에서는 펄라이트 단용배지에 미리 공시유용세균을 증류수 10^{8} cfu/㎖로 희석한 후에 처리하였다. 세균의 밀도조사는 정식전에 1회, 재배기간 중 1회, 재배 후 1회 조사하여 총 3회 조사하였다. 조사방법은 뿌리 1.5g을 취하여 100㎖의 살균수에 넣고 150rpm, 20분간 진탕한 후에 항생제를 첨가한 슈도모나스 아가(Pseudomonas agar, Difco사) 배지에 순차 희석한 시료를 도말한 후 42℃에서 배양하여 토마토 근면에 정착한 공시세균의 밀도를 조사하였다. 항생제로는 앰피실린 50μg/㎖, 리팜피신 50μg/㎖를 첨가하여 다른 미생물이 자라지 못하게 하였다. 그 결과, 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)는 펄라이트와 코코피트 혼합배지에서는 대조구와 비교시 큰 차이가 없었으나 원예용 상토에서는 고추와 가지의 생체중을 다소 증가시켰다. 또한 처리농도별로 살펴보면 펄라이트와 코코피트 혼합배지에서 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S) 10^{8} cfu/㎖로 처리하여 토마토 생육을 촉진시켰으며 원예용 상토에서는 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S) 10^{6} cfu/㎖로 처리하여 고추와 가지의 생체중을 증가시켰다.

실시예 6. 유용미생물 처리에 의한 토마토 유도저항성 조사

시험작물로서는 모모타로T93과 서광을 실시예 1과 동일방법으로 육묘하여 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)를 같은 방법으로 처리하였다. 분석방법은 라스킨(Laskin)(1989) 등이 이용한 방법을 변형하여 사용하였다. 처리 후 본엽 5매 정도 전개되면 잎을 취하여 살리실릭산(salicylic acid)을 분석하였다. 우선 시료 1g을 막자사발로 액체질소를 이용하여 잘 분쇄한 다음 90% 메탄올 10㎖를 넣고 다시 추출하였다. 추출 후 18,000g으로 15분간 원심분리한 다음 피펫으로 상등액을 취하였다. 침전물을 100% 메탄올 5㎖로 다시 추출후 원심분리하여 두 상층액을 모아 18,000rpm에서 원심분리하였다. 이 상층액을 40℃에서 감압 농축하고 농축잔재물을 5%(wt/vol) 트리클로로아세틱산(trichloroacetic acid) 5㎖로 용해시켰다. 10㎖의 에틸아세테이트-싸이클로펜탄-이소프로판올(ethylacetate-cyclopantane-isopropanol)(50:50:10)의 유기용매로 분액여과기에서 추출하여 상층 액을 질소가스로 농축한 후 0.5㎖의 메탄올로 다시 용해시켜 시료로 사용하였다. 유동상으로 메탄올을 사용하였고, 유속은 0.6㎖/min이었고, 컬럼(colum) C_{18} 컬럼(Lichrosorb RP-18 10micron, 25㎝)을 사용하였고 스펙트로 플로르슨스 디텍터를 이용하여 검출하였다. 들뜸(excitation) 파장은 314㎚이었고 방사(emission)파장은 406㎚이었다.

상기 실시예 6은 전신획득저항성과 관련한 실험으로 이는 식물병원균이 침입하였을 때 나타나는 식물의 방어적 반응으로 이러한 반응은 생물적 또는 화학적 유기 인자에 의해 일어나는데 화학적 유기 인자는 살리실릭산(salicylic acid : SA) 등이 있다(White 등 1994). 이 SA는 병든 조직에 축적이 많이 되어 있으며, 이러한 SA의 농도는 전신획득 저항성 발현과 관련된 단백질(SAR marker protein)과 관련이 높은 것으로 보고되었다(Yalpani 등, 1991).

따라서 본 발명에서는 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S) 처리구와 무처리구(슈도모나스 애루지노사 25R 처리구)로 토마토에서 SA의 농도 차이를 실험하였다. 실험결과 모모타로 T93에서 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S) 처리구와 무처리구인 슈도모나스 애루지노사 25R(*Pseudomonas aeruginosa* 25R)처리구와 비교시 SA농도는 무처리구(*Pseudomonas aeruginosa* 25R 처리구)보다 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S) 처리구에서 SA농도가 높게 나타났다(표 5).
이와 같은 실험결과로 볼 때 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)처리는 엽내 SA함량을 증가시켜 토마토가 식물병원균에 대한 저항성을 가지게 함을 확인하였다.
그리고, 상기 분리된 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)가 신규한 미생물로 인정되어, 반복재현성을 입증하기 위해 미생물기탁기관(KCTC: KOREAN COLLECTION FOR TYPE CULTURES)에 기탁일(2001.3.30)자로 기탁하였다.(기탁번호: KCTC 0978BP)

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하였듯이, 본 발명은 토마토 줄기썩음병균에 대해 길항력을 가지는 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)를 제공한다. 본 발명의 슈도모나스 애루지노사 17S(*Pseudomonas aeruginosa* 17S)를 육묘기에 처리시 토마토 시들음병과 고추역병의 병발생을 억제시키며 가지와 고추의 생체중을 증가시킨다. 특히 토마토의 엽내 살리실릭산(salicylic acid)의 함량을 증가시켜 식물병원균에 대한 전신저항성과 식물생장촉진을 증가시킨다.

[표 1]

분리균주와 표준균주의 형태 및 배양 특성표		
배양특성	분리균주(17S)	표준균주 x
옥시다아제	양성	양성
카탈라아제	양성	양성
베타-갈락토시다아제	음성	음성
베타-글루코시다아제	음성	음성
아르기닌 디하이드로라아제	양성	양성
트립토판 디아미나아제	음성	음성
라이신 디카르복실라아제	음성	ND
오르니틴 디카르복실라아제	음성	ND
씨트릭산 사용	양성	ND
황화수소 생성	음성	음성
유레아제 생성	음성	ND
젤라티나아제 생성	음성	양성
인돌 생성	음성	ND
VP반응	음성	ND
질산 환원능	양성	양성
탈질산능	음성	양성
42℃ 생장	양성	양성
리파아제 생성(트윈 80 가수분해)	양성	ND
글루코오스,멜리보오스의 산화적 발효	양성	양성
아라비노오스의 산화적 발효	음성	ND
만니톨, 이노시톨, 솔비톨, 람노오스, 슈크로오스, 아미그달린, 아라비노오스 발효	음성	ND
글루코오스, 아라비노오스, 만노오스, 글루코네이트, 카프릭산, 말레이트, 만니톨, 아세틸화글루코오스아민 집적	양성	양성
말토오스, 아디페이트, 페닐아세테이트 집적	음성	음성

*ND는 버기스 매뉴얼(Bergey's manual)에 설명되어 있지 않은 형질

[표 2]

토마토, 가지, 고추 육묘시 슈도모나스 애루지노사 17S 처리효과							
육묘용토	작 물	처 리 (cfu/mℓ)	초장 (cm)	경경 (mm)	생체중 (g)	건물율 (%)	균밀도 (cfu/g)
펄라이트: 코코피트 (7:3)	토마토	10^{8}	34.9 b*	4.4 a	32.5 b	6.5 a	4.5×10^{5}
		10^{6}	36.5 b	4.5 a	27.1 c	5.7 b	5.0×10^{5}
		10^{4}	32.9 b	4.6 a	27.4 c	6.0 ab	7.5×10^{4}
		대조구	40.9 a	4.9 a	38.2 a	6.1 ab	-
	가지	10^{8}	21.1 a	3.0 a	20.2 a	7.3 a	5.0×10^{6}
		10^{6}	19.6 a	2.9 b	16.6 b	6.7 a	1.3×10^{5}
		10^{4}	19.9 a	3.0 ab	20.8 a	7.2 a	2.5×10^{5}
		대조구	21.1 a	3.0 ab	16.1 b	5.5 b	-
	고추	10^{8}	18.5 b	2.7 b	8.1 b	7.2 a	1.8×10^{6}
		10^{6}	18.9 a	2.6 b	8.1 b	7.4 a	6.0×10^{5}
		10^{4}	21.2 a	3.0 a	11.9 a	7.6 a	6.0×10^{5}
		대조구	21.3 a	2.9 ab	10.6 a	6.7 b	-
원예상토	토마토	10^{8}	45.5 a	4.5 a	36.1 bc	10.1 a	3.3×10^{6}
		10^{6}	46.3 a	4.7 a	38.7 ab	9.8 a	5.8×10^{6}
		10^{4}	41.0 a	4.7 a	32.5 c	9.4 a	8.8×10^{5}
		대조구	46.1 a	4.7 a	42.8 a	10.0 a	-
	가지	10^{8}	17.5 a	2.8 ab	13.1 a	10.4 a	3.0×10^{5}
		10^{6}	18.5 a	2.8 ab	13.3 a	10.4 a	1.5×10^{5}
		10^{4}	14.1 b	2.7 b	9.1 b	10.9 a	1.3×10^{4}
		대조구	18.1 a	3.0 a	11.9 a	10.1 a	-
	고추	10^{8}	26.8 ab	3.2 a	12.5 b	10.1 a	5.8×10^{5}
		10^{6}	28.5 a	3.4 a	15.3 a	9.9 a	1.3×10^{6}
		10^{4}	25.6 b	3.3 a	13.1 b	7.6 a	-
		대조구	26.4 ab	3.2 a	12.0 b	8.9 a	-
* DMRT at 5% level							

[표 3]

슈도모나스 애루지노사 17S의 식물병원균에 대한 균사생장억제율			
병원균명	균사억제율(%)		
	PDA	YDA	V8
참외덩굴마름병(*Mycosphaerella melonis*)	40	42	33
가지균핵병(*Sclerotina sclerotiorum*)	27	40	24
벼잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*)	36	34	14
가지시들음병(*Verticillium*)	39	44	12

참외덩굴마름병(*Didymella bryoniae*)	30	36	22
율무잎마름병(*Bipolaris coicis*)	48	41	35
토마토겹무늬병(*Alternaria solani*)	38	39	27
백합잎마름병(*Botrytis elliptica*)	45	44	33
스토크균핵병(*Sclerotinia screlotiorum*)	33	35	22
상추균핵병(*Sclerotinia sp.*)	37	28	19
상추잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)	33	39	40
모잘록병(*Rhizoctonia solani*)	33	38	31
고추역병(*Phytophthora capsici*)	23	37	32
벼도열병(*Magnaporthe grisea*)	26	40	56
토마토잎마름병(*Phytophthora infestans*)	37	37	33
*억제율 = (대조구 균사길이 - 처리구 균사길이) / 대조구 균사길이 ×100			

[표 4]

플러그 육묘시 유용미생물 처리에 의한 병발생 억제 효과							
작 물	처리*	초장 (㎝)	생체중 (g/주)	건물율 (%)	발병주율 (%)	방제가	유용세균밀도 (cfu/g)
토마토	17S	41.8 b	6.0 ab	11.4 ab	0	100	2.4×10^{8}
	17S+F	46.3 a	7.1 a	10.9 b	0	100	1.2×10^{8}
	F	37.9 c	5.7 b	12.1 a	53	0	-
고 추	17S	34.7 a	3.0 a	13.0 ba	0	100	2.1×10^{5}
	17S+P	34.3 a	3.1 a	12.2 b	0	100	1.8×10^{5}
	P	344 a	3.5 a	13.8 a	13	0	-
* LSD at 5% level * 25R : 슈도모나스 애루지노사 25R 17S : 슈도모나스 애루지노사 17S F : 토마토 시들음병(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) P : 고추역병(*Phytophthora capsici*)							

[표 5]

슈도모나스 애루지노사 17S 처리시 엽내 SA함량 변화		
품 종	살리실산 함량(μg/g 생체중)	
	무처리	17S 처리구
모모타로 T93	5.5	7.0

(57) 청구의 범위

청구항 1.

표 1의 특성을 가지는 슈도모나스 애루지노사 17S(KCTC 0978BP).

청구항 2.

제1항에 있어서,
스트랩토마이신에 대한 저항성을 보유하는 것을 특징으로 하는 슈도모나스 애루지노사 17S.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서,
살리실릭산(salicylic acid) 생산을 증가시켜 식물병원균의 저항성을 향상시키는 슈도모나스 애루지노사 17S.

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제