

발간등록번호

11-1541000-000510-01

**전신유도저항성(induced systemic resistance)을
이용한 식물병 방제 기술 개발**
(Management of plant diseases by
induced systemic resistance)

한국생명공학연구원

농림수산식품자료실



0004560

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전신유도저항성(induced systemic resistance)을 이용한 식물 병 방제 기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 4월 23일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구

주관연구책임자 : 류충민

세부연구책임자 : 류충민

연 구 원 : 양정욱

연 구 원 : 이수현

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 양 광 열

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 김사열

협동연구기관명 : 충북대학교

협동연구책임자 : 김흥태

협동연구기관명 : 그린바이오텍

협동연구책임자 : 이재호

요 약 문

I. 제 목:

제 1세부: ISR을 이용한 고추 병 방제

제 1협동: ISR을 이용한 벼 병해 방제

제 2협동: 세균으로부터 ISR 결정 인자 개발 및 탐색

제 3협동: 온실과 포장상태에서 ISR에 의한 고추병의 방제

제 4협동: ISR 유도물질 및 미생물의 미생물제제의 산업화 연구

제 1세부: ISR을 이용한 고추 병 방제

II. 연구개발의 목적 및 필요성

식물병은 현재 농업생산에서 가장 중요한 걸림돌로 작용한다. 농작물 수확량의 5-80%가 식물병에 의한 수확량 감소와 관련이 있다. 이러한 식물병을 방제하기 위하여 지금까지 세계 각국은 유기 화합물을 기초로 한 농약을 제조하여 사용하여 왔다. 하지만 이러한 유기 화합물의 폐해가 최근 들어 보고 됨으로써 선진국을 중심으로 유기 화합 농약의 사용량을 엄격하게 규제하고, 그 사용량을 2010년까지 현재 사용량의 반으로 줄이려는 시도를 하고 있다. 선진국에서 친환경 농산물의 소비량이 점차 증가 추세이며 이러한 친환경 농자재를 이용한 친환경 농산물 생산에 의한 농민의 고소득 보장되고 있는 추세이다. 현재 유기합성 물질을 대신할 식물병 방제 기술로 세균이나 곰팡이 등 미생물에 의한 식물병 방제(생물적 방제) 기술이 차세대 기술로 부상할 것으로 예측, 미국을 중심으로 한 세계 각국은 이 기술을 확보하려는데 총력을 기울이고 있다. 그러나 현재 친환경 생물농약에 대한 학문적 기초 자료가 전무한 상태이다. 친환경 생물적 방제 기술은 기금까지 항생물질 생산에 의한 직접적인 병원균을 대상으로 했기 때문에 그 상용 범위가 제한되고, 그 생산이 환경 조건에 의한 변이가 심한 문제가 제기 되고 있다. 하지만 최근 이러한 미생물에 의한 식물의 전신 저항성 (induced systemic resistance, ISR)이 보고되고 이러한 전신 유도 저항성이 다양한 병원균에 대한 광범위한 저항성을 유도하기 때문에 차세대 식물병 방제 기술로 각광 받을 것으로 예상되고 있다. 하지만, 이러한 ISR은 아직 그 정확한 기작과 이용기술이 개발 되지 않은 상황이며, 우리나라에서 개발 시 전 세계의 기술을 우점할 수 있다. 기존의 유도 저항성 실험들이 대부분이 모델 식물인 애기장대를 대상으로 한 실험들이어서 직접적으로 작물에 적용하는데 문제점을 제기 되었다. 또한 작물에서도 외떡잎식물과 쌍떡잎식물에서 이러한 유도저항성 기작이 다르다는 것이 보고되었기 때문에 외떡잎 식물과 쌍떡잎 식물을 나누어서 실험하는 것이 농업현장에 이용할 기술을 확보하는 측면에서 중요하리라고 생각된다. 그래서 본 연구는 우리나라에서 중요한 작물중에 외떡잎식물의 대표로 벼를 쌍떡잎 식물의 대표로 고추를 대상으로 실험할 것이 타당하리라 본다. 특히 ISR유

도물질에 대한 식물의 생장에 대한 반응의 조사 없이는 실제 농업현장에 적용 시 수확량 감소와 같은 또 다른 문제점을 야기 할 수 있다. 그래서 "fitness cost" 개념에서의 유도저항성 연구가 반드시 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

식물병 유도에 관여하는 미생물자체 및 미생물의 생리활성물질 및 인자들의 분리, 구조 결정 및 최적 발현 조건 확립하고, 식물병 저항성 유도 생리활성물질 생성에 관련된 미생물 유전자의 분리 및 이들의 발현에 관련된 조절자 규명을 하여 미생물에 의한 유도 저항성 원리를 규명하는데 집중하였다.

또한, 미생물의 식물병 저항성유도 생리활성물질에 반응하는 식물의 유전자확보를 하여 이를 이용한 형질 전환 작물 개발 가능성을 열어두고, 미생물 자체 및 미생물 유래 생리활성물질의 formulation을 확립하고 확립된 미생물 유래 생리 활성물질 및 미생물 자체를 실제 포장 실험에 적용하여 활용 가능성여부를 확인한다.

IV. 연구개발결과

직접적인 항생작용이 아닌 미생물에 의해 식물의 면역반응을 증가 시키는 방법을 통하여 식물의 저항성을 증진 시키는 방법인 식물 전신 유도 저항성 (ISR, induced systemic resistance) 방법을 이용하여, 식물생장촉진근권세균에 의해 유도되어지는 유도저항성에 대한 저항성 기작을 확인하였다. ISR 실험을 위하여 고추에서 유도저항성을 유도하는 *Bacillus thuringiensis* strain BS107을 유도저항성 스크린을 통하여 선별하였다. BS107은 다양한 조건에서 일정한 유도저항성 능력을 보여주었으며, 포장과 온실 검정에서도 강력한 유도저항성 능력을 보여 상품화를 위한 시제품화 작업을 진행 하였다. 고추에서 유도 저항성 기작을 알기 위해 우리는 *Bacillus thuringiensis* strain BS107를 사용하여 고추 잎에서 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 의해 발생하는 고추 궤양병에 대한 유도 저항성 실험을 수행하였다. 특히 고추에서 *B. thuringiensis* strain BS107 에 의해 유도저항성 반응이 유도되어질 때 priming되는 유전자에 대한 연구를 집중적으로 관찰하였다. 기존에 고추에서 선행 연구 되어졌던 저항성 관련 유전자중 *CaPR4*와 *CaPR1* 유전자는 *B. thuringiensis* strain BS107 균주의 뿌리에 처리함으로 인해 전신적으로 저항성이 촉진되어짐을 정량적 유전자 증폭 방법(quantitative-reverse transcriptase PCR)을 이용하여 확인하였다. 또한 에틸렌에 의해 반응하는 유전자인 *CaBPR1*, *CaTin1*, 그리고 *CaTin1-2* 유전자도 *Bacillus thuringiensis* strain BS107에 의해 빠르고 강하게 발현되는 것을 확인하였다. 더 많은 저항성 반응 촉진 유전자를 찾기 위하여 microarray 분석을 수행하였다. 총 345,000 유전자가 포함된 칩에서 604개의 유전자가 BS107처리 후 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 처리시 과발현되었으며, 62개 유전자가 BS107을 처리하지 않은 고추에 비하여 적게 발현되었다. 대부분 과발현된 유전자들은 물질 대사와 저항성 반응 신호 전달에 관련된 유전자들이 과 발현되어 있

었다. 온실 실험을 토대로 선별된 *B. thuringiensis* strain BS107 를 이용하여 포장 실험을 수행하였다. 그 결과 *Bacillus thuringiensis* strain BS107 처리 후 10일째에 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*에 대하여 유도 저항성이 있음을 확인하였다. 또한 포장에서 자연적으로 발생하는 고추 궤양병과 바이러스 병에 대하여도 저항성이 유도됨을 확인하였다. 포장에서 *B. thuringiensis* strain BS107에 의해 유제 저항성이 유도되는 동안 빠르고 강하게 발현되는 저항성 관련 유전자의 발현을 조사한 결과 *CaPRA* 유전자가 온실 실험 동일하게 강하게 발현됨을 확인하였다. 포장에서 *B. thuringiensis* strain BS107에 의해 유도 저항성은 이루어지나 온실 실험과 같이 식물 생장 촉진은 관찰할 수 없었다. 최종적으로 BS107에서 고추에 저항성 반응을 유도하는 유도결정인자를 선별하였다. fractionation을 통한 선별과정을 통하여 2-aminobenzoic acid을 선별할 수 있었다. 2-aminobenzoic acid는 고추에서 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*에 대하여 저항성을 유도하고 담배에서 *Erwinia carotovora* subsp. *crotovora*에 대하여도 저항성을 유도하였다. 결론적으로 식물근권세균 중에서 내생포자를 만들 수 있는 바실러스종의 BS107균주를 선별하였으며 이러한 유도저항성이 식물의 저항성유도에 의한 작용인 것을 분자생물학적 방법에 의해 증명하였으며, 그 결정인자로 2-aminobenzoic acid를 선별하여, 시제품을 만들어 상품화 할 수 있게 되었다. 본 연구를 통하여 유도저항성 기본의 생물적 방제 방법과 미생물과 미생물 유래의 물질을 실용화 할 수 있는 전기를 마련하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 고추에서 ISR을 유도하는 BS107 균주 및 비슷한 능력을 보이는 균주를 선별하였으며, 특히 BS107은 온실조건 및 실외포장조건에서도 방제가 높은 균주로서 추후 유용 미생물제제로 사용가능하다.
- BS107에 의한 고추 유도 저항성 유도시 식물체 내에서 변화되는 transcriptom 분석을 통하여 저항성에 관련된 유전자를 대량 선별하였으며 저항성에 관련된 유전자들의 기능 분석을 하여 저항성 형질 전환 식물의 개발의 가능성이 충분하다
- 유도저항성의 특징상 고추에서 유도저항성이 증명된 미생물을 이용하여 담배등 다양한 식물에 적용할 수 있다는 가능성을 보여주었다.
- 화학 농약을 대처할 수 있는 미생물제제를 개발함으로써 유기농 고추 생산을 가능할 수 있다.
- 특정 유도 저항성에 관련된 물질을 찾아냄으로써 새로운 저항성 물질을 이용한 생화학 농약으로 개발이 가능해 졌다.
- 여러 유도 저항성에 관련된 미생물이 가진 요소들을 좀 더 많은 연구를 통해 확보하여 여러 환경에 안정적인 미생물 제제 및 미생물 유래 물질을 개발하기 위해 전문가 집단에 의한 체계적이고 맞춤형 연구가 필요하리라 생각한다.

제 1협동: ISR을 이용한 벼 병해 방제

II. 연구개발의 목적 및 필요성

농약에 의한 문제점을 줄이기 위해 최근에 들어 환경친화적인 방법으로 병해를 방제하고자 하는 노력들이 많이 시도되고 있는 시점에서 본 연구과제는 우리나라의 주요 작물인 벼의 재배시 문제가 되는 병해를 병저항성을 유도시키는 유용미생물을 이용하여 친환경적 방법으로 방제하는 기술 개발과 생명공학 기법을 이용해 그 작용 기작을 밝히고자 수행되었 으며 아래와 같은 기술적, 산업적 및 학문적인 필요성을 가지고 있다.

- 기존의 유도저항성 실험들이 대부분이 모델 식물인 애기장대를 대상으로 한 실험들이어서 직접적으로 작물에 적용하는데 문제점을 지니고 있어 유도저항성 관련 기작이 밝혀지지 않은 벼를 대상으로 연구를 진행함으로써 기술개발의 완성 시현장에서 직접 활용할 수 있는 기술 확보가 필요함

- 발작물에 대해서는 최근 다양한 유용길항 미생물제제가 개발되어 유기농업에 이용되고 있지만 벼의 경우 아직까지 전무한 실정에 있으며 고품질의 유기농 쌀 생산 및 수입대체를 위한 국내 고품질 쌀 생산을 위해서는 발작물과 같이 다양한 미생물 제제의 개발이 절실히 필요함

- 우리 주곡작물인 벼의 안전다수확을 위한 분자유종 및 marker-aid selection에 이용하기 위해서는 다양한 저항성 유전자 확보가 매우 시급한 실정이며 가능한 많은 다양한 내병성 유전자를 발굴해야할 필요성이 있음

- 미생물 유래 내병성 유도 물질에 반응하는 식물 유전자자원 확보 및 기능 분석을 통해 신개념 내병성 유전자원 확보 및 병해 저항성 형질전환 작물 개발이 필요함

- ISR에 의한 내병성관련 신호전달 체계를 분석하고, 형질전환에 의해 이들 유전자를 벼에 도입하여 그 기능을 분석함으로써, 유전공학 및 전통적인 육종방법에 의해 병해 내성 벼를 생산할 수 있는 유전자원 확보가 필요함

III. 연구개발 내용 및 범위

내병성 유도균 또는 전신획득저항성 활성제를 이용한 벼의 내병성 확인을 실내 및 포장 실험을 통해 확인 하였으며 *P. chlororaphis* O6균을 벼에 처리한 후 유도되는 내병성 관련 유전자들을 Affymetrix rice 57K microarray를 수행하여 대량으로 확보하였다. 확보된 유전자들 중 병저항성 관련 유전자를 선발 한 후 유전자들의 내병성 연관 관계 및 priming 효과를 확인하였다. 특히 유전자들 중 전사조절인자로 병저항성에 중요한 역할을 수행하고 있는 벼 WRKY45 유전자의 기능 분석을 생화학적 및 분자생물학적인 방법을 이용하여 수행하였다. 또한 유도저항성과 밀접한 연관성이 확인된 galactinol synthase 유전자가 삽입된 형질전환 벼를 이용하여 생육조사, 내병성 및 내재해성과 같은 형질을 실내 및 포장 검정을 통해 확인 하였다.

IV. 연구개발결과

가. 내병성 유도균 또는 전신희독저항성 활성제를 이용한 벼의 내병성 확인

벼에서 내병성 유도균 처리 후 병저항성을 확인하기 위해 온실과 포장에서 내병성 유도를 검정하였다. 먼저 온실에서 대조구로 사용한 물 처리구와 비교해 볼 때 *P. chlororaphis* O6균을 처리한 벼에서 내병성을 확인 하였으며, 포장에서도 *P. chlororaphis* O6균 처리구를 포함해 농약 처리구, 무처리구, SAR activator인 Harpin 처리구로 분획한 후 O6균의 내병성 유도 활성을 검정한 결과 *P. chlororaphis* O6균 처리구가 농약 처리구에 비해 잎도열병과 목도열병을 포함한 전체적인 도열병과 문고병의 발병이 더 많이 나타났고 SAR activator인 Harpin 처리구와 비교해서는 비슷하거나 약간 높게 나타났지만 무처리구에 비해서는 내병성의 효과가 있는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 *P. chlororaphis* O6균의 벼 주요 해충인 흑명나방의 피해에 대한 방제 효과를 확인 해 본 결과 놀랍게도 농약 처리구와 비슷하게 좋은 방제 효과가 인정되었다

나. *P. chlororaphis* O6균을 벼에 처리한 후 유도되는 내병성 관련 유전자 확보

온실과 포장에서 실시한 시험에서 내병성의 효과가 확인된 *P. chlororaphis* O6균에 의해 유도되어지는 벼의 내병성 관련 유전자들을 Affymetrix rice 57K microarray를 통해 확보하였다. Microarray를 수행하여 *P. chlororaphis* O6균에 의해 유도되는 것으로 확인된 여러 유전자들 중 gene ontology 정보가 존재하는 유전자들을 중심으로 기능을 분석한 결과 크게 세포 구조, 전사 관련 인자, 신호전달체계, 방어기작, 대사과정, 그 밖의 다른 기능에 관련된 유전자들 및 아직 기능이 밝혀지지 않은 유전자들로 범주를 나눌 수 있었다. Cutoff 2 이상의 유전자들 중 대조구에 비해 처리구에서 up-regulated 유전자들이 총 986개가 있었으며 down-regulated 유전자들이 589개가 있었다. 그 up-regulated 유전자들 중 gene ontology 정보가 존재하는 55개 유전자들 중 주요한 유전자들을 선발 하였으며 그 유전자들의 발현 양상을 RT-PCR을 이용하여 확인 하였다.

다. 선발된 유전자들의 벼 흰잎마름병에 대한 내병성 연관 관계 및 priming 효과 확인

Microarray 분석에 의해 선발되어 발현 양상이 재확인된 유전자인 WRKY45와 terpene synthase 유전자 그리고 유도저항성과 밀접한 연관이 있는 galactinol synthase (GolS) 유전자를 재차 선발하여 이들의 특성을 조사한 결과 유전자들 모두 벼 흰잎마름병원균에 대해 강하게 유도되고 있음을 확인되어 이들 유전자들이 벼 내병성에 관련이 있음을 알 수 있었다. O6가 전처리된 식물에서 유전자들 모두 Xoo K3를 처리하기 전에도 발현이 강하게 나타나고 있었으며 Xoo K3를 처리한 뒤

에는 그 발현 양상이 지속적으로 강해지는 것을 확인할 수 있어 확인된 유전자들이 *P. chlororaphis* O6가 나타내는 유도저항성의 표현형인 priming 효과와 관련되어 있음을 알 수 있었다. 더구나 이들 유전자가 벼에서 병저항성 관련 MAPK cascade의 조절을 받는 하류의 유전자임이 밝혀져 전사조절인자인 WRKY45 유전자, phytoalexin인 diterpenoid의 생합성 및 galactinol 생합성의 일부분이 이 MAPK cascade와 연관이 되어 있어 MAPK cascade의 기능이 유도저항성과도 관련이 있음을 알 수 있었다.

라. 선발된 병저항성 관련 전사조절인자인 벼 WRKY45 유전자의 기능 분석

P. chlororaphis O6균에 의해 유도되는 것으로 확인되어 선발된 유전자들 중 벼의 병저항성에 관여된 MAPK cascade의 조절을 받는 하위 유전자로 확인된 WRKY45 유전자를 깊이 연구한 결과 벼 WRKY45 유전자가 벼와 흰잎마름병원균의 상호 관계시 비친화적인 관계 뿐만 아니라 친화적인 관계 하에서도 발현이 강하게 유도되고 있어 벼에서 병저항성의 신호전달에 중요한 역할을 수행하고 있음을 알 수 있었고 35S::EGFP-WRKY45 construct가 형질전환된 cell에서는 세포 내 핵 부분에서 강한 형광물질이 존재하고 있어 벼 WRKY45 단백질은 세포의 핵 내에 존재하고 있음을 알 수 있었다. 현재 항생제가 포함된 배지에서 벼 WRKY45 유전자가 형질전환된 식물체를 선별 중에 있으면 형질전환체가 얻어지면 지속적인 연구를 수행하고자 한다.

마. 유도저항성과 밀접한 연관성이 확인된 galactinol synthase 유전자가 삽입된 형질전환 벼로부터 내병성 및 내재해성 검정

P. chlororaphis O6균에 의해 유도되는 것으로 확인된 galactinol synthase (*Gols*) 유전자가 형질전환된 벼로부터 외래 유전자의 발현 양상을 northern으로 확인 하였고, TLC 그리고 이온 크로마토그래피를 이용하여 형질전환체에서 생성되고 있는 galactinol의 양을 확인하였다. 외래 유전자의 발현 양상이 확인된 형질전환 벼를 이용하여 생육 조사를 해 본 결과 야생종과 비교해 차이를 확인 할 수 없었으나 실내에서 내병성을 검정한 결과는 두 개의 형질전환체가 야생종에 비해 병반길이가 짧은 것을 확인 할 수가 있어 어느 정도는 내병성이 부여되고 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 두 개의 형질전환체에서 야생종에 비해 내건성이 현저히 부여되고 있음을 확인 할 수 있었다. 그러나 형질전환 벼를 포장에서 밭짓자리 검정을 통해 벼도열병에 대한 내병성을 확인 해 보고자 하였으나 야생종 벼와 비교해 약간의 내병성은 있었으나 기대한 만큼의 내병성을 보여 주지 못했다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 유용미생물에 의한 식물의 내병성 유도 관련 유전자원이 유전체학의 microarray 기법을 통해 대량으로 확보되었으며 또한 중요한 유전자들의 기능 분석이 이루어

어져 신개념 병해 저항성 형질전환 작물이 개발되었다.

- 식물과 유용미생물간의 상호 관계에 대한 이해가 확대되어 벼를 대상으로 현장에서 직접 활용할 수 있는 기술이 확보되었다.
- 고품질의 유기농 쌀 생산 및 수입대체를 위한 국내 고품질 쌀 생산을 위해서 사용 가능한 유용한 미생물 제제의 이용이 가능해졌다.
- ISR에 의한 내병성관련 신호전달 체계가 일부분 분석되어 앞으로 유전공학 및 전통적인 육종방법에 의해 병해 내성 벼를 생산할 수 있는 유전자원 확보가 가능해질 것으로 여겨진다.
- 여러 가지 환경에 저항성을 가지는 안정적인 작물 품종을 개발하기 위해서는 종묘회사 및 육종학자와 연계된 추가 연구를 통하여 환경 내성 작물을 육성하는 연구가 필요하리라 생각한다.
- 농업 현장에서 실질적으로 이용하기 위해서는 더 많은 형질전환체의 확보와 실제 재배 환경 조건하에서 실시되는 포장 실험에 활용이 필요하리라 생각한다.

제 3 협동: 세균으로부터 ISR 결정 인자 개발 및 탐색

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 미생물에 의한 전신유도저항성(induced systemic resistance, ISR)의 결정인자를 선별하고 이를 직접 농업에 적용, 다양한 병원균 식물을 보호하는 작용을 하는 기술 개발하는 것을 목표로 하였다. ISR에 의한 식물병의 방어 체계가 확립된다면, 한 가지 물질에 의해 다양한 식물병에 대한 방제가 가능해질 수 있다. 또한 미생물에 의한 이러한 ISR 물질은 기존의 합성 물질에 의한 유도저항성에 비해 식물의 수량이나 생장에 최소의 영향을 주기 때문에 기존의 화학 합성 유도물질을 대체하는 친환경 농자제로서 유기 화합 농약의 사용을 최소화 할 수 있을 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

위와 같은 연구를 수행하기 위해 먼저 본 실험실의 ISR 유도물질의 검정 시스템 구축하고 *Paenibacillus polymyxa* E681 유래 물질 분리 및 고효율의 신균주 탐색하였다. 한반도 남부지방에서 고추 재배지역의 고추로부터 식물생장촉진성근류세균(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)이면서 ISR 활성을 가진 세균을 분리하여 균주 자체뿐 아니라 ISR 결정인자를 찾아 고추의 세균성 점무늬 병원균에 대하여 유도저항성을 나타내는지 여부를 현장에서 검증하였다.

실험실에서 ISR 유도물질의 검정 시스템 구축 및 3종의 ISR 고효율성 균주를 이용하여 ISR 효과를 소규모로 온실 검정을 시행하였다. 이를 위해 실내 식물생장에

영향 없이 ISR 능력을 보이는 물질 및 균주를 선발하였다. 선발된 ISR 유도물질 및 균주들을 대상으로 ISR 능력을 검정하기 위해 실제 농가 포장 상태에서 실험을 수행하였다.

IV. 연구개발결과

ISR활성 균주로 알려진 *P. polymyxa* E681으로부터 2종류의 ISR 유도 물질로 2,3-butanediol과 acetoin을 분리, 동정하였다. 또한 ISR효과를 가진 고효율성 신균주를 탐색하기 위해 한반도 남부지역 및 독도로부터 식물을 채집하며 포장형성세균 및 질소고정세균 수백 종을 분리하여 이들의 ISR능력을 알아보고자 직접 고추 및 담배 유묘에 적용하여 ISR효과를 검정하였다. 그 결과 고효율의 *Bacillus* sp. KNUC251과 KUDC1015 2종, *Paenibacillus* sp. KNUC265 1종, *Xanthomonas* sp. KNUC393 1종, *Ochrobactrum* sp. KUDC1013 1종, *Novoshingobium* sp. KUDC1065 1종으로 총 6종의 신균주를 탐색하였다. E681 유래 2가지 ISR유도 물질 및 신균주의 ISR효과가 온실에서 높은 활성을 가지는지 알아보고자 소규모로 온실 환경에서 고추의 세균성점무늬 병원균을 접종하여 병반 면적의 억제됨을 확인하였다. 특히 KUDC1013과 KUDC1065 처리구에서 가장 높은 ISR활성이 나타나는 것을 확인하였다. 필드 환경에서 2,3-butanediol과 acetoin과 같은 ISR유도 물질을 분리균주들을 단일 또는 혼합 처리하였을 때 ISR 효과를 비교하였다. 두 ISR 유도물질들 중 acetoin이 필드 환경에서 좀 더 높은 ISR 활성을 가지는 것으로 나타났다. 신균주들을 단일 및 혼합 처리하였을 때 병원균을 처리하는 방법에 따라 결과가 조금 다르게 나타났으나 단일 균주 처리구보다는 혼합 균주 처리구에서 보다 식물병 방제 효과가 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 특히 E681과 KUDC1065 처리구에서 가장 높은 ISR 활성을 보였다. 또한 ISR 효과뿐만 아니라 고추의 키, 생체중량, 그리고 건조중량을 측정하여 식물 성장촉진효과를 비교하였을 때 혼합 균주 처리구들의 식물 성장촉진효과가 단일 균주처리구들보다 더 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 반면 두 가지 ISR 유도물질의 식물성장촉진효과를 비교하였을 때, acetoin 처리구보다 2,3-butanediol 처리구들의 효과가 더 높게 나타났다. 또한 독도에서 분리한 신균주들 중 하나인 KUDC1013으로부터 새로운 ISR 유도물질을 분리하여 이 물질을 분석하여 동정하는 과정 중에 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

P. polymyxa E681 균주로부터 ISR 유도물질을 2종 분리 동정하였다. 또한 이 물질들의 ISR 효과를 포장 검정을 통해 확인하여 실제 농가에 적용 가능할 수 있음을 예측하였다. 또한 6종의 고효율성 신균주를 발견하여 이들 또한 식물 생장에 영향을 주지 않을 뿐만 아니라 오히려 식물의 성장을 촉진하고 병원균에 대한 식물의 저항성을 유도함을 확인하였다. 신균주들 및 ISR 유도물질이 다양한 병원균에 대한 ISR 활성을 검정한다면 기존의 화학 합성 유도물질을 대체하는 친환경 농자

제로서 활용이 가능 할 것으로 기대된다.

제 3 협동: 온실과 포장상태에서 ISR에 의한 고추병의 방제

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목적

가. ISR을 이용한 고추병의 온실 스크리닝과 포장에서의 효과 검정: 고추 세균성점무늬병과 흰별무늬병에 대한 유도저항성 능력을 온실 조건에서 검정하여 후보 미생물을 선발하고, 선발한 ISR 유도 미생물과 식물체에서 저항성을 유도하는 것으로 알려진 살균제(BTH와 Probenazole)와의 효과를 포장에서 비교하고자 한다.

나. 병 저항성을 유도하는 미생물을 선발하여 온실과 포장에서의 병 방제 효과를 검정한다.

2. 연구개발 필요성

전 세계적으로 병해충과 잡초방제에 사용하는 미생물농약은 114종의 상품이 등록되어 사용되고 있으며, 미생물 농약의 사용량은 유기화학농약의 판매량의 단지 1%에 불과하다. 미생물 농약은 화학농약과는 다른 작용기작을 이용하여 병해관리를 할 수 있으며, 미생물방제제의 역할이 기대되고 있기 때문에, 지속적인 시장 확대와 화학적인 방제와 병행하여 처리함으로써 방제 효율의 상승 등이 기대되고 있다. *Bacillus spp.*를 이용한 고추 역병에 대한 병 발생 억제에 대한 연구는 많이 진행되었다. 그러나 역병은 토양을 타고서 쉽게 전파되는 병해이기 때문에, 매년 피해가 심하고, 살균제에 대한 저항성균도 출현하여, 고추 세균성점무늬병 및 탄저병과 더불어 생물적 방제제의 개발이 필요한 고추 병해이다. 따라서 본 논문에서는 고추 밭에서 분리한 미생물 가운데서 고추의 주요한 병해에 대한 방제 효과가 우수한 미생물을 선발하여 고추의 주요 병을 방제하고자 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위(필요에따라 제목을 달리할 수 있음)

1. ISR을 이용한 고추병의 온실 스크리닝 : 고추 세균성점무늬병과 흰별무늬병에 대한 유도저항성 능력을 온실 조건에서 검정

가. ISR 유도물질의 온실 스크리닝 검정 체계 확립

나. 고추병에 대한 온실에서의 효과 검정 및 사용 방법 확립

다. 기존의 저항성 유도 살균제와의 효과 비교

2. 포장에서의 ISR 유도물질의 효과 검정 : ISR 유도물질의 포장 실험

포장에서 선발한 ISR 유도물질과 식물체에서 저항성을 유도하는 것으로 알려진 살균제(BTH와 Probenazole)와의 효과 비교

3. 고추의 주요 병에 대하여 ISR을 유도하는 미생물의 온실 스크리닝
4. 선발한 ISR 유도 미생물과 식물체에서 저항성을 유도하는 것으로 알려진 살균제 (Bion-M; BTH와 mancozeb의 혼합제)와의 효과 비교
5. 포장에서의 효과 검정

IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

2006년 전라북도와 충청남도의 고추 재배 지역에서 고추 뿌리에서 분리한 토양 미생물을 고추 세균성점무늬병과 탄저병에 대한 효과 검정 실험에 사용 하였다.

1. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 대표병원균을 선발하고자 균주 KACC11157, KACC11158, No. 1523를 6엽기 고추 유묘에 접종 6일 후에 발병도를 조사한 결과 33%, 8%, 58% 각 각의 발병도를 나타내었고 가장 높은 발병도를 나타내는 1523을 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 대표병원균으로 선발 하였다. 이렇게 선발된 병원균으로 효과적인 발병을 유도하기 위해서 접종 농도 OD600 값을 0.2와 0.4로 조정하여 3엽기 고추 유묘 잎 표면에 경엽분무 5일 뒤에 발병도를 조사 하였을 때 56%, 87%의 발병도를 나타내어서 3엽기 고추 유묘에서 효과적으로 발병이 유도되는 것을 볼 수 있었다. 세균성점무늬병 접종시 OD600은 0.4로 조정 하였다. 대표균 선발과 접종농도를 확립한 후에 효과적인 접종 방법에 대해 조사 하였다. 3엽기 고추 유묘 잎 표면의 윗부분만, 아래부분만, 위와 아래부분을 동시에 경엽분무 방법으로 접종하고 접종 3일, 5일, 7일차의 발병도를 조사하면서 병의 진전과 양상을 조사 하였다. 접종 후 3일차에는 잎 표면의 아래부분만, 위와 아래부분을 동시에 경엽분무한 처리 구에서만 발병이 유도 되었지만, 접종 5일차에서는 모든 처리에서 발병되었고, 접종 7일차에는 유사한 발병도를 나타내었다. 병원균을 접종하고 시간이 지속됨에 따라 점차적으로 병이 진전하는 고추 잎 표면의 위와 아래부분을 동시에 경엽분무하는 방법으로 병원균 접종방법을 확립하였다.

2. 고추 유묘에서 고추 세균성점무늬병에 대하여 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 합제의 효과에 대해 검정 하였다. 6엽기 고추 유묘에서 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 합제의 농도를 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6 $\mu\text{g/ml}$ 으로 관주 처리 7일 후에 세균성점무늬병을 접종하고 10일 뒤에 방제가를 조사 하였다. 5000, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 높은 방제가를 나타낸 반면 약해가 나타났고, 또한 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 50%의 방제효과를 보았지만, 다른 고추 유묘에 비해 느린 생장과 고추 잎의 노랗게 변색되는 것을 볼 수 있었다.

acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 합제를 고추 세균성점무늬병 방제에 사용할 때에는 200 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 40 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 살포하는 것이 고추 생육에도 피해를 끼치지 않고 병을 방제하기에 적당 하였다. 고추 유묘에서 고추 유묘의 엽기와 병

원균의 접종농도에 따라서 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 합제의 방제효과에 대해 조사 하였다. 8엽기의 고추 유묘에서는 모든 처리구에서 세균성점무늬병의 발병에 실패하였고, 병원균의 접종 농도 OD600값을 0.4와 0.1로 조정하여 접종한 결과 OD600값을 0.1로 조정한 처리에서는 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 합제 농도 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 40%정도의 방제가 나타났고, OD600값을 0.4로 조정한 처리에서는 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 합제 농도 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리에서만 방제가 나타났다.

3. 토양미생물의 유도저항성 여부를 검정하기 위해서 *Bacillus* spp. 배양액을 2엽기 고추 유묘에 처리한 후 고추 세균성점무늬병에 효과를 보이는 16개 균주를 선발하여 병원균 접종 1주일, 2주일 전에 *Bacillus* spp. 배양액을 침지처리하여 처리 시기에 따른 효과를 검정 하였다. 그 결과 총 9개의 균주(7-6, 8-5, 21-13, 22-5, 22-7, 22-8, 23-14, 25-2, 25-3)가 모든 처리에서 효과를 나타냈고, 병원균 접종 1주일 전 침지처리에서 2주일 전 침지처리 보다 높은 방제가를 나타내었다. 이렇게 선발된 균주 중에서 21-13, 22-5, 22-7, 23-14, 25-2 균주를 고추 유묘에서부터 처리하여 성체가 되었을 때 고추 탄저병 발병과율을 조사한 결과 균주 21-13, 22-5 처리에서 100%의 방제가가 나타내었다.

4. 선발된 균주들을 in vitro에서 진균과 고추 세균성점무늬병에 대한 활성 검정하였다. 고추 유묘 검정에서 선발된 16균주를 총 18종의 진균에 대하여 활성을 검정한 결과 *Alternaria solani*에 대해서 균주 21-13, *Pestalotiopsis longiseta*에 대해서 균주 22-7, 25-3이 효과를 나타내었다. 고추 세균성점무늬병에는 균주 25-2 처리에서 clear zone이 관찰 되었다.

5. 2007년 충북대학교 부속농장 고추 포장 균주들에 대하여 in vitro에서 고추 열매에서 탄저병균에 대한 방제를 검정 하였다. 탄저병균 접종 2일 전, 12시간 후, 1일 후, 2일 후 모든 처리에서 균주 22-5가 효과를 나타내었다. 처리구 별로는 접종 2일 전, 12시간 후 처리구에서 높은 방제가를 나타내었다. 2008년 충북대학교 부속농장 고추 포장 균주들을 이용하여 고추 열매 상처에 따른 탄저병균 방제효과를 검정 하였다. 고추 열매에 상처를 낸 처리에서는 탄저병의 높은 발병도를 나타내었고, 병원균 접종 1일 후 처리에서는 낮은 방제가를 나타내었다. 2008년 충북대학교 부속농장 고추 포장 균주가 고추 열매 표면에서 탄저병균의 포자발아 및 부착기 형성 억제에 대한 효과를 검정하였다. 총 3개 균주 21-13, 22-5, 25-2가 고추 열매 표면에서 탄저병균의 발아율은 모든 처리구에서 유사하게 나타났으나, 부착기 형성물이 현저하게 떨어지는 것을 관찰 하였다.

6. 탄저병 실험에서 가장 높은 효과를 나타내는 균주 22-5의 OD값을 다양하게 하

여 오이 유묘에서부터 처리하면서 오이 흰가루병에 대한 효과를 검정한 결과 Bacillus spp. 배양액 OD값에 따른 방제가 차이는 확인할 수 없었다.

7. 2007년, 2008년에 걸쳐 충북대학교 부속농장 고추 포장에서 탄저병균과 세균성점무늬병에 대한 실험을 하였다. 세균성점무늬병은 발병되지 않아서 효과는 확인할 수 없었다. 2007년 포장실험에서 균주 22-5 처리에서 가장 높은 방제가를 나타내었다. 2008년 포장실험에서도 균주 22-5 처리에서 효과를 나타내었고, 균주 25-2 처리에서도 높은 방제가를 나타내었다.

8. 효과를 검정한 균주 22-5, 25-2의 대량 배양 조건 확립을 위해서 배양온도, 배양시간, 배양배지의 탄소원, 질소원 그리고 pH에 따른 균주의 생장을 조사 하였다. 그 결과 균주들의 최적 배양온도 24~28℃, 최적 배양시간 36~48시간으로 조사 되었다. 탄소원과 질소원을 첨가한 NB배지에서 균주들의 OD값을 측정한 결과 두 개의 균주에서 질소원 tryptone을 첨가한 배지에서 높은 생장을 나타내었다. 배지의 pH에 따른 생장 실험에서 균주 22-5, 25-2는 배지 pH 6, pH 7에서 높은 생장률을 나타내었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에따라 제목을 달리할 수 있음)

제 4 협동: ISR 유도물질 및 미생물의 미생물제제 산업화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 친환경 농산물에 대한 관심이 높아지면서 친환경 농자재에 대한 관심도 마찬가지로 증가하고 있다. 친환경 농자재 중 길항 미생물제제, 특히 미생물 농약은 화학 농약을 대체할 수 있는 대안으로 가장 유력한 후보 중 하나이다. 길항 미생물 자체 혹은 그들이 생산하는 항균활성물질을 이용한 미생물 농약은 화학 농약의 단점인 저항성 병원균의 발현, 인축독성, 환경오염 등에서 비교적 자유로우며, 높은 방제 효과를 기대할 수 있다.

그러나, 기존 미생물 농약은 농민들의 인식부족과 제품의 효력에 대한 불신, 사용상의 어려움 등으로 농업 현장에서 널리 사용되지 못하고 있다. 본 연구과제는 전신 저항성 유도 미생물을 이용한 새로운 식물병 방제제의 산업화 모형 개발 및 미생물 제제로 상업화 하고자 실시되었다.

- 높은 효과와 넓은 스펙트럼으로 기존 화학농약을 대체할 미생물제에 대한 개발요구가 점차 높아지고 있으며, 검증되지 않은 약제의 무분별한 유통에 의한 피해로 인해 점차 미생물제 전반에 대한 불신이 확대되고 있어 이를 해소할 새로운 미생물제의 개발이 시급함.

- 기존 유도저항성 미생물 연구의 경우 대부분 연구 단계에서 종료되었으며 사업

화 역량 부족으로 인해 사업화에 실패한 경우가 많으나, (주)그린바이오텍은 국내 미생물농약 선두 기업으로 다양한 미생물에 대한 배양 및 상업화 노하우를 이용하여 유도저항성 미생물제의 산업화를 달성할 수 있음.

- 본 연구에서 산업화 기술을 개발한 미생물제는 기존 미생물 방제제로 방제가 어려운 병해충에 대한 방제가 가능하며 특히 작물 자체에 저항성을 유도하여 병해를 방제하므로 효과 면에서도 우수하여 기존 미생물제에 비해 더욱 시장이 넓음.

III. 연구개발 내용 및 범위

ISR 유도 물질 및 미생물의 5L 수준의 배양조건 확립 및 제형화 연구를 진행하였으며, 300L 수준의 배양 profile 확립, 액상수화제와 수화제 2 가지 형태의 제형 제조 공정 확립, 시배양과 시제품의 제조를 실시하였다. 제조한 시제품을 이용하여 미생물 제제의 온실 및 실내 검정 시험을 실시하였으며, 특히 시제품의 고추 탄저병과 점무늬병 대상 실내 생물 검정을 실시하였다. 추가로 시제품 개발을 위한 보완 연구를 진행하였으며 실내 검정 시험 결과를 토대로 제품의 효력을 상승시키기 위한 배양 및 제형 보완 연구를 수행하였다. 마지막으로 시제품의 현장 적용 및 미생물 제제로의 이용 가능성 연구 및 시제품의 대규모 포장 시험을 통한 산업화 가능성 검증을 진행하였다.

IV. 연구개발결과

가. ISR 기능의 유용 미생물의 선발

주관 기관인 생명공학연구원을 비롯한 협동 연구 기관에서 진행된 연구 중 고추 탄저병과 점무늬병에 대하여 전신유도저항성을 가진 것으로 생각되는 균주를 분양받아 산업화를 위한 연구를 진행하였다. 미생물 균주를 산업화하여 미생물 제제로 개발하기 위해 산업화 가능한 후보 균주의 선발, 후보 균주의 배양 공정 확립, 미생물 제제의 제형 개발, 시제품의 제작과 생물 검정 등의 세부 단계를 거쳐 연구를 진행하였으며, 최종적으로 *Bacillus cereus*으로 동정된 BS107 균주를 최종 후보 균주로 선발하였다.

나. 미생물 제제의 산업화를 위한 후보 균주의 선발

기존 연구에서 선발된 후보 균주 6종에 대하여 미생물 제제의 산업화를 위한 연구를 진행하였다. 이들 균주는 이전 연구를 통해 동정한 결과에 따르면, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. samanii*, *B. cereus* 등으로 *Bacillus* spp.에 속하였다. 당 연구 기관은 기 개발된 산업화 배지 중 *Bacillus* spp.에 대체적으로 양호한 배지를 선정하였고, 각 균주의 배지 적용

성을 1차적으로 검정하였다. 6종의 후보 균주 중 *B. cereus*인 BS107과 *B. megaterium*인 25-2 가 높은 적응성을 보였으나, BS107이 25-2보다 더 빠른 시간 안에 영양세포가 자랐고, 미생물 제제의 최종 균주 상태인 포자의 형성이 이루어졌다.

다. 미생물 제제의 산업화를 위한 연구

50L 규모의 배양기(fermentor)를 이용하여 2종의 후보 균주에 대한 배양 공정을 확립하고자 하였다. 배양 결과 viable counting을 통해 확인한 BS 107은 영양 세포가 1.03E+09 cfu/ml, 포자수가 1.03E+09 cfu/ml로 100% 영양세포가 포자를 생성하였고, 24시간 경과 후 포자가 영양 세포를 뚫고 밖으로 나온 양호한 배양 상태를 확인할 수 있었다.

라. 미생물제제의 대량배양공정 확립

액상 배양공정 설계를 통해 산출된 조건을 이용하여 시배양을 실시하였다. 배지 조성은 기 개발된 최적배지 조성을 이용하였으며 동일한 조건에서 수 회간 배양을 실시하였다. 배양 시작 후 약 15시간 이후부터 포자수가 증가하기 시작하였으며 약 22시간 경과 후 가장 높은 증가율을 보였다. 증가율은 약 27시간 이후부터 감소하기 시작하였으며 최종 배양 종료시 포자수는 2.0E+09 cfu/ml 수준으로 나타났다. 이는 기존 배양 공정에 비해 포자수가 크게 증가한 것으로, 실제 제품화 시 농축 등을 고려할 경우의 상업화 적정선인 1.0E+09 cfu/ml 이상 수율을 보여 차후 상업화에 용이할 것으로 보인다.

마. 미생물제제의 포장 약효약해시험

경기도 화성시에 위치한 고추 노지포장을 임대하여 기 제조한 시제품을 이용한 약효약해시험을 진행하였다. 고추는 육묘한 마니따고추를 정식하였으며 재배 방식은 농가 관행 재배에 따라 실시하였다. 시험 결과 액상 시료 처리구 및 분상 시료 처리구 모두에서 대조구 대비 60% 이상의 방제 효과를 나타내었다. BS107에 사전 침지하여 저항성을 유도한 고추의 경우 탄저병에 대하여 60% 이상의 방제 효과를 나타내어 생물농약으로 실효성이 있을 것으로 보인다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 당사는 기존의 미생물제제의 문제점인 경제성을 해결하고자 대량 배양 시스템과 안정적인 제품 생산 노하우를 연구하였다. 당사는 5ton 규모의 배양조를 구비하여

충분한 대량 배양시스템을 구비하고 있으며, 이러한 배양 시스템을 이용하여 향후 안정적인 제품 생산이 가능할 것으로 예상하고 있다.

○ 현재 친환경 농가에서는 기존의 토양미생물제제 등 저급 제품으로 인해 미생물 자재의 인식이 현저히 낮아진 상황이다. 당사는 현재 개발 진행 중인 제품의 등록 이후 인지도 향상이 기대되며, 향후 이들 자재를 이용한 IPM 모델을 보급한다면 높은 수요가 있으리라 예상된다. 바실루스 세레우스 BS107은 식물에 전신유도저항성을 일으켜 병을 방제하는 제품으로, 식물의 난방제성 병해에 대한 뛰어난 방제효과를 지녀 상업화 시 많은 수요가 있을 것으로 기대된다.

○ 당사는 본 연구 과제를 진행하면서 실제 고추 및 오이 등을 재배하는 친환경 농가를 통해 제품의 효능 검증 및 농민의 호응도 등을 조사하였다. 본 제품에 대한 농민들의 호응도가 비교적 좋은 편이었으며, 사업화하여 제품이 제조될 경우 구매 의사 또한 비교적 높게 나타나 상업화 가능성은 비교적 높은 편으로 조사되었다.

○ 본 연구 과제에서 개발된 길항 미생물은 타작물에 발생하는 병에 대해서도 높은 방제 효과를 기대할 수 있다. 전신유도저항성 미생물의 특성 상 식물의 병해에 대한 넓은 스펙트럼의 방제효과를 가지고 있으며, 이는 별도의 비용 없이 수요처를 창출할 수 있는 것으로 타작물 타병해로 영역을 넓힐 경우 높은 수익이 예상된다.

SUMMARY

1. Induced systemic resistance in pepper plant by *Bacillus* spp.

Within an ecosystem, many organisms exist in perpetual inter- and intra-species relationships that can be either positive or negative, depending on the needs of each organism. A group of beneficial plant bacteria, which includes *Bacillus* spp., has been shown to increase crop growth referring to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). PGPR can decrease plant disease directly, through the production of antagonistic compounds, and indirectly, through the elicitation of a plant defense response termed induced systemic resistance (ISR). While the mechanism of ISR elicited in response to PGPR has been studied extensively in the model plant *Arabidopsis thaliana*, it is less well characterized in crop plants such as tomato and pepper. In an effort to better understand the mechanism of ISR in crop plants, we investigated the induction of ISR to bacterial spot disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in pepper leaves by *Bacillus cereus* strain BS107. We focused on the priming effect of *B. cereus* strain BS107 on plant defense genes as an ISR mechanism. Of ten known pepper defense genes that were previously reported to be involved in pathogen defense signaling, the expression of *Capsicum annuum* *pathogenesis-protein 4* (*CaPR4*) and *CaPR1* was systemically primed by the application of strain BS107 onto pepper roots confirming by quantitative-reverse transcriptase PCR. Additionally ethylene signaling-dependent genes (*CaBPR1*, *CaTin1*, and *CaTin1-2*) appeared to be primed by strain BS107. To find more priming genes during ISR by BS107 in pepper, we employed microarray methods. A method of microarray analysis using oligo-genechip probe representing approximately 345,000 genes showed 604 genes to be up regulated and 62 genes down regulated at least two fold by *X. axonopodis* pv. *veiscatoria* infiltration after treated BS107 compare to non-treatments. Most up regulated genes were involved in metabolism and defense responses.

Bacillus thuringiensis strain BS107 was selected through in vitro and field experiment in order to be increased ISR capacity and plant growth promotion. The results of ISR capacity of *B. thuringiensis* BS107 was accomplished only at 10 day after treated *Bacillus thuringiensis* strain BS107 under field conditions. For validation of ISR capacity elicited by *B. thuringiensis* BS107 and ISR chemical inducers (BTH and BABA) against naturally occurred diseases in the field, we measured disease severity of naturally occurred diseases including

bacterial spot disease and viral diseases at day 60 after treatment of *B. thuringiensis* BS107 and ISR chemical inducer. To understand mechanism on strain BS107-mediated ISR on pepper, we focused on priming effect of the defense related genes after pathogen challenge. We assessed *CaPR4* expression as a marker gene for induction of plant defense after pathogen challenge with *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. To confirm these results, we used qRT-PCR to analyze the priming of *CaPR4* expression by strain BS107 at day 10. During the ISR by *Bacillus thuringiensis* strain BS107 in the field, plant growth promotion by *Bacillus thuringiensis* strain BS107 was not observed. For investigation of pepper growth promotion ability by *B. thuringiensis* BS107 treatment, we harvest pepper fruits through in twice. However, the yield of pepper fruits treated by *B. thuringiensis* BS107 was not differ compared with control and chemical inducer treatments. Finally, 2-aminobenzoic acid was identified as an ISR determinant secreted from BS107. 2-aminobenzoic acid itself could be induced resistance against *X. axonopodis* pv. *veiscatoria* in pepper and *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* in tobacco. Our results provide novel biological mechanism for biological control in order to be applied in the field with endospore-forming rhizobacterium to manage broad spectrum plant pathogens. In addition to practical application of rhizobacterium, we also exploited genetic evidence of the priming effect of a rhizobacterium on the expression of pepper defense genes involved in ISR as well as provide 2-aminobenzoic acid as new ISR elicitor in pepper.

2 .Management of rice diseases by induced systemic resistance

II. Importance and objectives of the research

Rice disease control methods aimed at preventing the disease outbreaks through the use of chemical pesticides. However, current research focuses on environmentally-friendly agricultural practices and materials are required to produce pesticide-free agricultural products. Biological control tactics have become an major approach to establishing sustainable agriculture. However, most of biological control methods are not thought of as acceptable alternative for chemical pesticides because of the lack of the mode of action and consistent performance. The beneficial rhizobacteria has been known to provoke the elicitation of a plant defense response termed induced systemic resistance (ISR). The purpose of this research was to develop technical and scientific knowledge in control of rice diseases by induced systemic resistance.

III. Research content and scope

In order to get rice genes associated with induced systemic resistance upon root colonization of the rhizobacteria, *Pseudomonas chlororaphis* O6, Affymetrix rice 57K microarray analysis were performed. The microarray analysis did lead to be resulted in the selection of ISR-related genes such as WRKY45, terpene synthase and galactinol synthase. The O6-pretreated rice plants showed priming effects on their selected genes. In addition, the selected genes were regulated by pathogen-responsive MAPK cascade in rice. The selected genes were also characterized molecular biologically and transformed into rice to produce the disease resistant rice plants. The GolST4 transgenic rice plants were examined disease resistance against rice disease and drought tolerance as well. Although crop carrying stress-resistant gene is produced, its function is effective at green house but not in field with hard environmental condition. Thus, GolST4 transformed rice was studied its function in both green house and field with the raising seedling and confirmed whether it could be the practical molecular breeding resource or not.

3. Isolation of ISR determinant from rhizobacteria

In order to characterize the induced systemic resistance (ISR)-determinants of *Paenibacillus polymyxa* E681, the extracellular molecules from bacterial culture supernatant were successively extracted with organic solvents and fractionated by silica gel chromatography column. Among the fractions tested, sub-fraction No. 7-8 triggered ISR activity. Collectively, the two bacterial metabolites, acetoin and 2,3-butanediol, extracted from *P. polymyxa* E681 were ISR inducing determinants in this study.

And in order to detect ISR-determinants of *Ochrobactrum lupini* KUDC1013, a novel strain isolated from Dokdo, extracellular components were extracted with organic solvents. Of four fractions tested for ISR activity on tobacco, hexane and butanol fractions showed ISR activity on tobacco seedlings. Further analyzes such as HPLC and TLC were needed to identify the ISR-determinants of *O. lupini* KUDC1013.

To find of new strains with high ISR ability, roots, stem and leaves of pepper and rice cultivated in the southern part of Korea were collected in 2006 and wild plant family *Solanum nigrum* L. plants in Dokdo collected in 2007. From samples collected in 2006, eighty four nitrogen-fixing bacteria and 16 spore-forming bacteria, mostly *Bacillus* species, were isolated. The isolates were

partially identified by 16S rDNA sequence analysis. Among those isolates tested for ISR ability, *Xanthomonas axonopodis* KNUC393, *Bacillus megaterium* KNUC251 and *Paenibacillus polymyxa* KNUC265, induced systemic resistance in pepper and tobacco. The three treatments reduced disease severity compared with negative control and significantly increased pepper fresh and dry weight. These results suggest that these 3 isolates might be considered as useful rhizobacteria capacities of inducing systemic resistance and promoting plant growth.

From samples collected rhizosphere of *Solanium nigrum* L. plants in Dokdo, forty four nitrogen-fixing or spore forming bacteria were isolated. These isolates were tested for their ability to elicit ISR and to promote growth in pepper and tobacco. Among them, *O. lupini* KUDC1013, *Bacillus megaterium* KUDC1015 and *Novosphingobium panipatense* KUDC1065 elicited ISR against *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* as well as promoted growth of pepper and tobacco seedlings.

To investigate whether these 6 isolates can play as biological control agents, we applied the isolates to pepper seedlings transplanted to greenhouse. KUDC1013 and KUDC1065 were useful for the suppression of pathogen when applied as bacterial suspensions at various growth stages of pepper. It was therefore expected that the mixture of two isolates will protect crop from phytopathogen.

In addition, field trial was conducted in order to determine the effect of treatment with single, mixture of two strains and two ISR inducers on growth of pepper and their capacity as biological controls. Acetoin treatment showed higher ISR activity compared with 2,3-butanediol treatment. Although there was no greater disease suppression of mixtures compared to single strains, there were a trend in disease reduction. Among the three mixtures, mixtures of E681 and KUDC1013 showed the highest fresh and dry weight. There was a trend to significant enhancement of fresh and dry weight of pepper with mixtures compared when applied singly. Collectively, the application on pepper of mixtures of two stains and two ISR-inducers has potential as biocontrol agents under greenhouse and field conditions.

4. Management of pepper diseases under greenhouse and field conditions

Biological management of pepper anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) and bacterial leaf spot diseases (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Xcv) were using rhizosphere bacteria (444 isolates) isolated during 2006 from Jeonbuk and

Chungnam pepper fields. Three isolates of *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC11157, KACC11158 and 1523 were obtained from various sources and inoculated on pepper plants at three leaves stage leaf stage at various concentrations (OD at 600nm). The isolate 1523 was identified as a virulent pathogen based on pathogenicity tests at a concentration of OD₆₀₀ 0.4 and used for our further studies.

Since, rhizosphere bacteria found to induce systemic resistance in plant system against the pathogen; we have used acibenzolar-S-methyl in combination with mancozeb as a standard chemical ISR inducer. Under greenhouse conditions, all the 444 isolates were screened against bacterial leaf spot by soil drenching methods (5 ml/plant) and selected 16 isolates for our studies. Owing to high number isolates, they were further screened against the bacterial pathogen. Roots of pepper seedlings at 2 leaves stage were dipped in *Bacillus* spp. cell suspension for one hour and transplanted in the pots and inoculated with *Xcv* cell suspension (OD₆₀₀=0.4) at one week and two weeks later. Based on the results it was noticed that the pathogen inoculation one week after the biocontrol agent showed good results. We have selected 9 isolated out of 16 for our studies. Among 9, 5 isolated selected in random and again tested on pepper plants grown in green house were given with sequential treatments of root drenching at two leaves stage, seedling soaking at six leaves stage and spraying at different stages of crop viz., flowering, green pepper and red pepper formation. The isolates 21-13 and 22-5 were showed 100% efficacy when the plants were inoculated 2 days after *Bacillus* spp. spray. The selected isolates were tested for their effectiveness against *Alternaria solani* and *Pestalotiopsis longiseta* which revealed that the isolate 21-13 was effective against the former while the isolates 22-7 and 25-3 were against the later. The isolate 25-2 was equally effective against the pepper bacterial pathogen *Xcv* also. Among the different treatments including pre and post inoculation of anthracnose pathogen on pepper fruits, the pre inoculation (2 days before the pathogen inoculation) and post inoculation of *Bacillus* spp. isolate 22-5 at 12 hrs after pathogen inoculation showed potential disease reduction activity and recorded 100% control value, while the post inoculations of *Bacillus* spp. at one and two days after pathogen inoculation were not effective. The same isolate 22-5 showed 76% *C. acutatum* spore germination and very low number of appressorium formation (3%). During 2007, 12 isolated were tested under field conditions for the management of anthracnose disease. Application of the isolate 22-5 for four times (root dipping, soil drenching two times followed by two spray) effectively reduced the disease

incidence and showed 93% control value and found on par with acibenzolar-S-methyl + mancozeb (100%) followed by the isolate 22-9 (64%) at last observation.

In the year 2008, three isolates namely 22-5, 21-13 and 25-2 were tested under field conditions to select the best one for commercial exploitation. Pepper plants were given with sequential application of bacterial isolates viz., soaking, drenching (two times), spraying (three times) revealed that the isolate 25-2 found effective than the other isolates and recorded 100% control value on first and second observation, while the same showed 79, 61 and 13% on 3rd, 4th and 5th observations. Based on the aforesaid experiments, we have selected two isolates (22-5 and 25-2) for commercial exploitation and experimented for their growth parameters. Both the isolates were best grown in a media with tryptone as nitrogen source at a pH of 6-7 and incubated at a temperature of 24 to 28°C for 36-48 hours.

On overall performance, we have sequenced the 16s rDNA of the isolates 22-5, 25-2 and 21-13 and compared with other bacteria in NCBI website. The phylogenetic tree generated using the software PHYDIT by neighbour joining method revealed that the isolates 21-13, 22-5 and 25-2 showed 99% similarity and homology with *B. samanii*, *B. megaterium* and *B. cereus*, respectively.

5. Commercialization of induced systemic resistance microbes and its substances

Recently, well-being life became a main issue among us. As peoples interest on eco-friendly agriculture, farmers concerned about biological agent to prevent crop disease and insects. One of the best agent to alternate chemical pesticide is microbial biopesticide. But commercialized microbial biopesticides are less applied because its low efficacy and difficulty of application. The purpose of this research was to develop plant scale fermentation and commercial formulation in order to commercialize induced systemic resistance microbes and its substances.

To develop induced systemic resistance microbes into microbial biopesticide, we've searched for the effective microorganisms of induced systemic resistance. *Bacillus cereus* BS107 and other microbes were selected as target microorganism. Target microbes were tested on plant disease in vitro. And finally *Bacillus cereus* BS107 was selected to develop microbial biopesticide. Before developing microbial biopesticide, plant scale

fermentation design and formulation design of target microbe have to be proceeded. Lab scale, pilot scale and plant scale fermentation design were designed in order. 15 hours after seed inoculation, spore counts were slightly increased, and at 22 hours after inoculation, spore counts showed highest increasing rate. With designed plant scale fermentation method, formulation design of BS107 was proceeded. Fermented broth was formulated as liquid form and spray dried powder form with profit carriers and additives. In vivo efficacy on plant disease was tested at hot pepper field in Hwasung, Gyeonggi Province. BS107 was treated on hot pepper with root soaking method before planting. As a result, both powder form and liquid form have more than 60% efficacy on hot pepper anthracnose. This result shows that *Bacillus cereus* BS107 can be developed as microbial biopesticide.

제 1장 연구 개발과제의 개요

1절 연구개발의 필요성

최근 친환경 농산물에 대한 관심이 높아지면서 친환경 농자재에 대한 관심도 마찬가지로 증가하고 있다. 친환경 농자재 중 길항 미생물제제, 특히 미생물 농약은 화학 농약을 대체할 수 있는 대안으로 가장 유력한 후보 중 하나이다. 길항 미생물 자체 혹은 그들이 생산하는 항균활성물질을 이용한 미생물 농약은 화학 농약의 단점인 저항성 병원균의 발현, 인축독성, 환경오염 등에서 비교적 자유로우며, 높은 방제 효과를 기대할 수 있다.

그러나, 기존 미생물 농약은 농민들의 인식부족과 제품의 효력에 대한 불신, 사용상의 어려움 등으로 농업 현장에서 널리 사용되지 못하고 있다. 본 연구과제는 전신 저항성 유도 미생물을 이용한 새로운 식물병 방제제의 산업화 모형 개발 및 미생물 제제로 상업화 하고자 실시되었다.

- 높은 효과와 넓은 스펙트럼으로 기존 화학농약을 대체할 미생물제에 대한 개발 요구가 점차 높아지고 있으며, 검증되지 않은 약제의 무분별한 유통에 의한 피해로 인해 점차 미생물제 전반에 대한 불신이 확대되고 있어 이를 해소할 새로운 미생물제의 개발이 시급함.

- 기존 유도저항성 미생물 연구의 경우 대부분 연구 단계에서 종료되었으며 사업화 역량 부족으로 인해 사업화에 실패한 경우가 많으나, (주)그린바이오텍은 국내 미생물농약 선두 기업으로 다양한 미생물에 대한 배양 및 상업화 노하우를 이용하여 유도저항성 미생물제의 산업화를 달성할 수 있음.

- 본 연구에서 산업화 기술을 개발한 미생물제는 기존 미생물 방제제로 방제가 어려운 병해충에 대한 방제가 가능하며 특히 작물 자체에 저항성을 유도하여 병해를 방제하므로 효과 면에서도 우수하여 기존 미생물제에 비해 더욱 시장이 넓음.

■ 생명공학적 기능 검정을 통한 친환경 소재 개발

○ 식물병은 현재 농업생산에서 가장 중요한 걸림돌로 작용한다. 농작물 수확량의 5-80%가 식물병에 의한 수확량 감소와 관련이 있음.

○ 이러한 식물병을 방제하기 위하여 지금까지 세계 각국은 유기 화합물을 기초로 한 농약을 제조하여 사용하여 왔다. 하지만 이러한 유기 화합물의 폐해가 최근 들어 보고 됨으로써 선진국을 중심으로 유기 화합 농약의 사용량을 엄격하게 규제하고, 그 사용량을 2010년까지 현재 사용량의 반으로 줄이려는 시도를 하고 있음.

○ 미국과 유럽에서는 토양 식물병 방제를 위해 가장 많이 사용하여 온 토양 훈증제인 methyl bromide를 지구의 오존층 파괴의 주범으로 인식 그 사용을 완전히 금지 시켰다. 하지만 그 대체 물질은 아직 유용하지 않은 상황임.

○ 친환경 농업에 의한 고급화와 브랜드화에 의한 농산물의 질적 향상이 요구됨.

- 선진국에서 친환경 농산물의 소비량이 점차 증가 추세 (영국, 10%)
- 친환경 식물보호 소재 실용화가 급증
 - * 국내 농약 시장 : 1조원
 - * 생물농약의 비중을 2008년 30%로 높이면 : 3,000억원 시장
- 친환경 농자재를 이용한 친환경 농산물 생산에 의한 농민의 고소득 보장
- 유기합성 물질을 대신할 식물병 방제 기술로 세균이나 곰팡이 등 미생물에 의한 식물병 방제(생물적 방제) 기술이 차세대 기술로 부상할 것으로 예측, 미국을 중심으로 한 세계 각국은 이 기술을 확보하려는데 총력을 기울이고 있음.
- 선진국은 미래에 농업발전을 주도해 나갈 원천 기술 개발에 국운을 걸고 있음 - EU와 미국은 다양한 친환경 보호 소재 개발에 박차를 가함
- 친환경 농업에 필요한 원천적인 친환경 농자재 연구 및 기술개발이 요망
- 친환경 생물농약에 대한 학문적 기초 자료가 전무한 상태임.

제 2절 연구개발과제의 개요

작물에 발생하는 병해에 의한 피해는 농업 생산에 중요한 제한 요인으로 작용하고 있기 때문에 이로 인한 손실을 감소시키기 위해 농약을 보편적으로 사용하고 있다. 그러나 수년에 걸쳐 과다한 농약 사용으로 인해 환경파괴 및 사람과 동물에게도 심각한 피해를 주고 있는 실정이다. 그래서 이러한 농약에 의한 문제점을 줄이기 위해 최근에 들어 환경친화적인 방법으로 병해를 방제하고자 하는 노력들이 많이 시도되고 있다. 그래서 본 연구과제는 우리나라의 주요 작물인 벼의 재배시 문제가 되는 병해를 병저항성을 유도시키는 유용미생물을 이용하여 친환경적 방법으로 방제하는 기술 개발과 생명공학 기법을 이용해 그 작용 기작을 밝히고자 수행되었으며 아래와 같은 기술적, 산업적 및 학문적인 필요성을 가지고 있다.

- 기존의 유도저항성 실험들이 대부분이 모델 식물인 애기장대를 대상으로 한 실험들이어서 직접적으로 작물에 적용하는데 문제점을 지니고 있어 유도저항성 관련 기작이 밝혀지지 않은 벼를 대상으로 연구를 진행함으로써 기술개발의 완성 시 현장에서 직접 활용할 수 있는 기술 확보가 필요함

- 벼의 전체 염기서열이 완전 결정됨에 따라 국제적으로 벼 유전자의 기능분석 연구를 통하여 유전자의 지적 소유권화의 추세가 가속되고 있으며, 기능 유전체학(functional genomics) 중 DNA chip 및 insertional mutant를 이용한 유용유전자 발굴에 있어 high throughput screening을 통한 기능 규명연구가 진행되고 있다. 또한 벼의 경우 도열병, 흰잎마름병 및 벼알마름병이 주요 병해로 알려져 있는데 병원균들의 race 분포가 매우 다양화 되어 가고 있는 추이에 있다. 그러나 밭작물에 대해서는 최근 다양한 유용길항 미생물제제가 개발되어 유기농업에 이용되고 있지만 벼의 경우 아직까지 전무한 실정에 있으며 고품질의 유기농 쌀 생산 및 수입대체를 위한 국내 고품질 쌀 생산을 위해서는 밭 작물과 같이 다양한 미생물 제제의 개발

이 절실히 필요함

- 따라서 우리 주곡작물인 벼의 안전다수확을 위한 분자유종 및 marker-aid selection에 이용하기 위해서는 다양한 저항성 유전자 확보가 매우 시급한 실정이며 가능한 많은 다양한 내병성 유전자를 발굴해야할 필요성이 있음

- 미생물 유래 내병성 유도 물질에 반응하는 식물 유전자자원 확보 및 기능 분석을 통해 신개념 내병성 유전자원 확보 및 병해 저항성 형질전환 작물 개발이 필요함

- ISR에 의한 내병성관련 신호전달 체계를 분석하고, 형질전환에 의해 이들 유전자를 벼에 도입하여 그 기능을 분석함으로써, 유전공학 및 전통적인 육종방법에 의해 병해 내성 벼를 생산할 수 있는 유전자원 확보가 필요함.

제 3절 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

○ 친환경 생물적 방제 기술은 기금까지 항생물질 생산에 의한 직접적인 병원균을 대상으로 했기 때문에 그 상용 범위가 제한되고, 그 생산이 환경 조건에 의한 변이가 심한 문제가 제기 되고 있다. 하지만 최근 이러한 미생물에 의한 식물의 전신 저항성 (induced systemic resistance, ISR)이 보고되고 이러한 전신 유도 저항성이 다양한 병원균에 대한 광범위한 저항성을 유도하기 때문에 차세대 식물병 방제 기술로 각광 받을 것으로 예상.

○ 하지만, 이러한 ISR은 아직 그 정확한 기작과 이용기술이 개발 되지 않은 상황이며, 우리나라에서 개발 시 전 세계의 기술을 우점할 수 있다. 기존의 유도 저항성 실험들이 대부분이 모델 식물인 애기장대를 대상으로 한 실험들이어서 직접적으로 작물에 적용하는데 문제점을 제기 되었다.

○ 또한 작물에서도 외떡잎식물과 쌍떡잎식물에서 이러한 유도저항성 기작이 다르다는 것이 보고되었기 때문에 외떡잎 식물과 쌍떡잎 식물을 나누어서 실험하는 것이 농업현장에 이용할 기술을 확보하는 측면에서 중요하리라고 생각된다. 그래서 본 연구는 우리나라에서 중요한 작물중에 외떡잎식물의 대표로 벼를 쌍떡잎 식물의 대표로 고추를 대상으로 실험할 것이 타당하리라 본다. 특히 ISR유도물질에 대한 식물의 생장에 대한 반응의 조사 없이는 실제 농업현장에 적용 시 수확량 감소와 같은 또 다른 문제점을 야기 할 수 있다. 그래서 "fitness cost"개념에서의 유도저항성 연구가 반드시 필요하다.

(2) 고추

○ 고추는 우리나라에서 생산량과 재배 면적에서 벼 다음으로 중요하고 우리의 생활에 없어서는 안 될 작물이다.

○ 2009년 기준으로 생산면적으로 440만 헥타아르이고 생산액으로 1.6조원으로 벼

의 10조원에 이어 우리나라 두 번째로 농민들의 생산액에 중요하다. 이를 김치, 고추장등 파급 산업까지 계산한다면 10조원을 상향 하리라 예상된다.

○ 고추 생산에 있어 다양한 문제들이 발생할 있는데 그중에서 병에 대한 피해가 가장 중요한 문제로 인식되고 있다. 특히 고추역병과 열매에 발생하는 탄저병 그리고 잎에 발생하는 고추 더듬이병이 가장 중요한 병들이다.

○ 최근 생명공학연구원을 중심으로 고추 Genome에 대한 EST가 확보된 상태이며 이미 microarray를 위한 oligo chip이 완성된 상태여서 사용가능한 상태에 있다. 특히 새로운 gene knock-down system인 RNAi기술을 이용한 Tobacco rattle virus 중심의 virus-induced gene silencing방법이 개발 되어 사용하고 있다.

제 4절 연구개발과제의 개요

고추(*Capsicum annuum*)는 쌍떡잎식물 통화식물목 가지과에 속하며 열매는 수분이 적은 원뿔 모양 장과로 8~10월경에 익으며 붉게 익은 열매는 말려서 향신료, 관상용, 약용 등으로 다양하게 이용되고 있다. 한국의 고추 종류는 약 100여 가지에 이르며 산지의 이름을 따서 영양, 천안, 음성, 임실, 청양, 제천 고추 등으로 불리고 있다. 1600년경에 한국에 들어와서 현재까지 한국인의 식생활에 다양한 방면으로 영향을 미치고 있다. 이러한 고추(풋고추 제외)는 전반적인 농업의 축소과정 속에서 재배면적이 1995년 87,469 ha에서 2000년 74,471 ha, 2005년 61,299 ha로 매년 감소하는 추세이다. 그럼에도 불구하고 조미채소 재배면적에서 고추가 차지하는 비중은 1995년 50.6%, 2000년 45.8%, 2005년 46.8%로 조미채소의 대표적인 작목으로 자리 잡고 있다(이용선 등, 2007). 현재 우리나라에서 발생하고 있는 고추의 병해는 바이러스, 세균, 진균에 의해 3가지, 5가지, 21가지 병해가 보고되었고 이외에도 선충에 의한 병 3가지가 보고되어 있다. 많은 종류의 고추 병해 중에서 고추 세균성점무늬병은 식물체의 각 부위에서 발병하지만 주로 잎에 발병하여 조기낙엽을 유발하므로 수량에 직접적인 피해를 끼칠 수 있다. 잎에서 초기 병징은 회갈색의 작은 점무늬로 나타나고, 진전되면 중심부는 흰색으로 변하며, 병반의 가장자리는 암갈색을 띠게 된다. 병반의 주위에는 황색의 테두리가 형성된다. 심한 경우에는 잎 전체가 갈색으로 변해 떨어진다. 잎자루와 과경에는 갈색의 둥근 반점이 형성되고 진전되면 암갈색 부정형으로 약간 확대되면서 심하게 발병하면 방제하기 어려운 병으로 알려져 있다(조용섭 등, 1999). 착색기에서 수확기 사이에 고온과 잦은 강우에 영향을 받아서 병의 발생이 증가하고 약제 살포 적정시기 선정의 어려움으로 피해가 증가하고 있는 추세이며, 약제방제는 예방을 목적으로 사용하는 것이 효과적이나 방제시기를 놓치면 낮은 방제율을 나타내기 때문에 방제적기를 설정하여 농약사용을 절감하는 효율적인 방제방법이 시급하다. 또한 고추 열매에 직접으로 피해를 끼쳐서 수량감소에 영향을 미치는 고추재배에 있어서 가장 큰 병해는 고추 탄저병으로 알

려져 있다(박 등, 2006). 열매가 맺히기 시작하는 7월 초순경부터 발생하기 시작하여 장마기와 고온 다습한 조건이 지속되면서 급속하게 증가한다. 병징은 잎과 과실에 모두 발병하며 잎에는 청록색의 윤문이 생겨서 확대되고 과실에는 진한녹색의 수침상의 작은 반점이 생겨 점차 윤문형으로 진전되며 건조기에는 병반에 형성된 분생포자는 점질물에 쌓여 부착되어 있다가 비, 바람, 빗방울 등에 의해 전반된다. 병반에는 흑색 소립이 생성 되거나 홍색의 점질물로 쌓인 분생포자 덩어리가 누출되어 나오며, 병든 부위는 움푹 들어간 궤양 형태의 병반을 형성한다. 고추 탄저병 병원균은 종에 따라 포자의 크기 및 모양이 약간의 차이를 나타내지만, 포자의 크기는 평균적으로 $15\sim 18 \times 3.5\sim 4.0 \mu\text{m}$ 이며, $25\sim 28^\circ\text{C}$ 가 생육적온이다. 또한 질소비료의 과용으로 고추가 연약해지면 병 발생에도 영향을 끼치게 된다(Jung 등, 1984; Oh 등, 1998; Park 등, 1992). 많은 종류의 병해가 고추를 기주로 발병하고 있고 이를 방제하고자 많은 종류의 농약을 살포하고 있으며, 화학비료 및 농약의 남용과 축산폐기물의 무단방류 등에 의한 농업환경의 오염이 점차적으로 늘어남에 따라 유용미생물을 이용한 환경정화와 환경 친화적 농업의 개발이 요구되고 있다. 또한 화학농약의 사용에 따른 토양내의 잔류농약에 의한 토양의 오염 및 생태계의 파괴의 문제가 지속적으로 제기되면서(Kim 등, 1998; Oh 등, 1997), 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 다양한 천연물질을 이용한 항진균제의 개발과 연구(Banos 등, 2003; Park 등, 2002; Park 등, 2005)가 진행되어지고 있고 토양에서 *Bacillus* sp.(Jeon 등, 2003; Jung 등, 2003; Kim 등, 1999; Park 등, 2005), *Pseudomonas* sp.(Lee 등, 2000; Lee 등, 2002)와 *Streptomyces* sp.(Oh 1992) 등과 같은 미생물을 분리하여 항생물질과 미생물제제의 개발을 위한 연구들이 지속적으로 이루어지고 있다.

제 2장 국내외 기술 개발 현황

제 1절. 연구개발대상 기술의 국내·외 현황

(1) 세계적 수준

○ 1926년 유럽에서 최초로 길항 미생물을 이용하여 병원균 생장 억제 효과를 얻은 이후 근래에 미생물 농약에 대한 연구가 급격히 이루어지고 있다. 1960년대에는 European Spruce sawfly(잎벌류)와 나방류를 각각 바이러스(virus)와 Bt(*Bacillus thuringiensis*)를 이용하여 방제에 성공하였고, 1991년도에는 식물 유도 저항성 미생물을 종자처리제로 개발하여 식물 병의 발생을 억제하는 수준에 도달하였다.

○ 유도저항성을 이용한 미생물 살균제의 개발 사례는 다수 있으나 이를 상업화하여 실제 판매되고 있는 제품은 거의 없는 실정이다. 상업화 된 제품은 주로 화학적으로 합성한 물질을 이용해 유도저항성을 일으키는 농약이며 미생물의 경우 Rhizosphere sp., Rhizobacter sp. 등이 연구되고 있다. 관련 특허로써 [Induced systemic resistance of plants to pathogenic microorganisms] (Backman et al., 1999) 등이 있다.

○ 2006년 해외 미생물농약 시장의 규모는 약 260백만 달러로 추정되고 있으며 (CPL Business Consultants, 2006), 이중 Bt제가 159백만달러로 대부분을 차지하고 있다. 앞으로 해외 미생물농약의 시장 규모는 각국의 화학농약 사용 저감 정책에 따라 확장되어 2014년에는 약 330-400 백만 달러로 성장할 것으로 예상되고 있다.

○ Utrecht대학에서는 이러한 세균에 의한 ISR의 식물의 반응과 세균의 ISR 결정인자 (determinants)에 대한 연구에 주력 하였다. 지금까지 알려진 식물의 저항성 반응 기작으로는 기존에 알려진 유도 저항성 (systemic acquired resistance, SAR)과는 달리 salicylic acid가 요구되지 않는 저항성반응과 달리 곤충저항성에 주로 이용되는 자스몬산에 의한 signaling에 의존적인 것을 찾아 냈음.

○ 하지만 그 정확한 기작이 정확하게 알려져 있지 않고, ISR을 이용한 상품화된 제품들이 시중에 나와 있지 않는 상태임.

○ 다국적 기업인 Novartis는 이런 유도저항성을 이용한 합성 농약을 개발하여 salicylic acid로부터 다양한 유도체를 합성하여 다년간의 실험을 거쳐 BTH (acibenzolar-S-methyl)를 선발 유럽에서 Bion, 미국에서 Actigard라는 상품명으로 시판 했으나 포장에서 사용 시 식물의 생장과 수확량 감소를 가져오는 문제를 발생 시켰다.

○ 하지만 현재까지 알려진 ISR 결정인자인 세균의 외벽 물질인 LPS나 EPS등은 식물의 생장을 억제하는 결과는 보여주지 않았다. 더불어 최근에 발표된 세균의 휘발성 물질에 의한 ISR은 동일한 물질 (2,3-butanediol, acetoin)이 유도저항성뿐만 아니라 식물의 생장을 촉진시키는 작용을 한다는 것이 보고되면서 미생물 유래의

ISR 물질이 기존의 BTH가 가진 문제를 극복 할 수 있는 대안이 될 수다.

(2) 국내수준

- 1990년대 후반부터 농업과학 기술원을 중심으로 미생물(주로 세균)에 의한 전신 유도저항성 (ISR)에 대한 기술이 소개 되었고, 미생물의 ISR 유도 물질을 보고한 바 있다.
- 2000년 초반부터는 1-2곳의 대학 및 연구소에서 이러한 과제를 수행하면서 이러한 미생물이 식물병에 대한 저항성 뿐만 아니라 환경스트레스인 가뭄에 대해서도 저항성을 보이는 것을 관찰하였다.
- 아직 국내의 기술 수준은 초보적인 단계로 실험을 할 수 있는 기본 infra 조직은 갖추어져 있는 상황이지만 그 외 기술 축적이 되지 않은 상황임.
- 하지만 본 연구팀은 2003년에 세균으로부터 세계 최초로 휘발성 물질이 식물의 성장촉진과 무름병원균인 *Erwinia carotovora*에 대한 유도저항성의 기작을 밝혀 PNAS와 Plant Physiology등에 발표 하였으며, 기존의 근권미생물에 의한 유도저항성을 선도한 Auburn Univeristy의 Joseph Kloepper 실험실과 Utah State University의 Anne Anderson 실험실의 최근 지식과 기술을 습득하여 이를 현장에 이용할 수 있는 많은 기술을 가지고 있는 상태이다.

(3) 국내·외의 연구현황

- 미생물에 의한 식물 유도 저항성 (induced systemic resistance, ISR)은 1991년 미국 Auburn University의 Dr. Joseph W. Kloepper와 Utrech 대학의 Dr. Kees Van Loon 그룹에서 거의 동시에 발표한 후 Kloepper 박사의 경우 이러한 기술을 실제 농업에 이용하기 위해 온실 실험과 포장실험들을 거쳐 안정화된 기술을 확보하여, 실제 이러한 기술을 이용하여 포장상태에서 발생하는 세균, 바이러스, 곰팡이, 선충, 심지어 곤충에 의한 피해까지 줄일 수 있다는 것을 보고 하였다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Auburn University	바실러스를 중심으로한 ISR 미생물 농약 개발	대두를 대상으로 Yield Shield 등 ISR 약재를 미국 전역에 시판하고 있음
Utrecht University	Pseudomonas에 의한 ISR 기작 규명	ISR의 기작을 모델 식물인 Arabidopsis thaliana를 대상으로 세균의 결정인자와 식물의 신호전달체계 연구.
생명공학연구원	근권 바실러스의 계놈 지도 완성	계놈 지도 완성후 Functional genomics작업 진행중
전남대학교	Pseudomonas로부터 다양한 ISR 결정인자 선별 및 식물 반응 유전자 대량 확보	유용유전자를 식물체에 도입하여 다양한 병해에 대한 저항성 확인.

제 2 절 국내외 기술개발 현황

국외의 경우 미생물에 의한 식물 유도저항성 (induced systemic resistance, ISR) 관련 연구는 1991년 미국 Auburn University의 Dr. Joseph W. Kloepper와 Utrecht 대학의 Dr. Kees Van Loon 그룹에서 거의 동시에 발표되었으며 Kloepper 박사의 경우 이러한 기술을 실제 농업에 이용하기 위해 온실 실험과 포장실험들을 거쳐 안정화된 기술을 확보하여, 실제 이러한 기술을 이용하여 포장상태에서 발생하는 세균, 바이러스, 곰팡이, 선충, 심지어 곤충에 의한 피해까지 줄일 수 있다는 것을 보고 하였다. 또한 Utrecht University에서는 세균에 의한 ISR의 식물의 반응과 세균의 ISR 결정인자 (determinants)에 대한 연구에 주력하여 기존에 알려진 유도 저항성 (systemic acquired resistance, SAR)과는 달리 salicylic acid가 요구되지 않고 곤충저항성에 주로 이용되는 자스몬산에 의한 signaling에 의존적인 것을 확인하였다.

국내의 경우는 1990년대 후반부터 농업과학기술원을 중심으로 미생물(주로 세균)에 의한 전신유도저항성 (ISR, Induced systemic resistance)에 대한 기술이 소개되었고, 미생물의 ISR 유도 물질을 보고한 바 있으며 2000년 초반부터는 1-2곳의 대학 및 연구소에서 이러한 과제를 수행하면서 이러한 미생물이 식물병에 대한 저항성 뿐만 아니라 환경스트레스인 가뭄에 대해서도 저항성을 보이는 것을 관찰하였다. 그러나 아직 국내의 기술 수준은 초보적인 단계로 실험을 할 수 있는 기본 infra 조직은 갖추어져 있는 상황이지만 그 외 기술 축적이 되지 않은 상황이다. 특히 대부분의 연구팀들이 식물 실험모델인 애기장대를 이용하여 실험에 임하고 있으며 본 연구과제의 대상 식물인 벼에서 ISR을 이용한 병방제 기술 개발 및 그 기작 연구는 전혀 이루어지지 않은 상태이다.

국내에서 ISR을 이용한 미생물 살균제는 농촌진흥청에서 개발된 EXTN-1 (*Bacillus vallismortis*) 미생물을 이용한 제품이 상업화 되어 판매되고 있으며 기타 다양한 연구가 진행되고 있다. 미생물제 전체 시장은 전체 농약시장의 1% 수준이나 차후 지속적으로 증가할 것으로 추정되며 유도 저항성 미생물제의 시장도 크게 증가할 것으로 예상된다.

제 3절 제작성

제4절 국내외 기술개발 현황

이러한 관점에서 유용미생물을 이용한 연구는 식물의 생장을 촉진시키며, 각종 비료성분을 공급하고 여러 병해에 대하여 환경 친화적인 식물병방제법을 알아내는 것을 목표로 삼고 있다. 저항성 품종 이용, 재배방법의 개선뿐만 아니라 미생물과 천연물질을 이용한 생물적 방제 방법은 합성농약의 문제점을 극복하고 안전한 농산물 생산을 위한 방제수단으로서의 연구가 활발히 진행되고 있고(Baker 등, 1983; Becker, 1993; Chet와 Inbar, 1994; Joo 등, 2002; Lim 등, 2000; Lim, 2005), 생물학적 방제력을 높이는 연구도 진행되고 있다(Nielands 등, 1986). 특히 식물과 미생물 유래 천연물질은 활성성분의 직접적인 이용뿐만 아니라 신농약 개발을 위한 선도물질과 신규 작용점 연구 분야에 이용가치가 높다(Katz와 Demain, 1977; Lange 등, 1993; Agrios, 2005). 현재까지 국내에서 진행된 고추 탄저병에 대한 연구는 주로 살균제 및 병원성에 대한 고추의 저항성에 관한 것이 대부분이었으며(Chang 등, 2001; Park 등, 1988), 병원균의 생태학적 특성에 관한 연구가 일부 보고되어 있는 가운데(Lee 등, 1997), 미생물을 이용한 연구 역시 지속적으로 증가하고 있다(Bae 등, 1978; Chang 등, 1985; Cho 등, 2004; Chung 등, 1986; Paik 등, 1995). 생물학적 방제는 1963년에 최초로 시도되었는데, 잘라내고 남은 소나무 그루터기를 비병원성 균(Peniophora gigantea)의 포자로 접종하여 소나무의 뿌리 및 그루터기 썩음을 일으키는 병원균인 *Heterobasidion annosum*을 효과적으로 방제하게 되었다. 어떤 토양은 토양 중에 있는 미생물 또는 다른 요인들에 의해서 토양병원균에 의한 특정병의 발생을 억제한다는 사실이 20세기 초반에 보고되었다. 식물병리학자들은 식물체가 병원균에 감염되기 전후에 식물체에 유용 미생물을 처리하여 병원균에 길항작용을 나타내고, 그에 따라 식물이 감염되지 않도록 보호해 줄 수 있는 미생물을 찾기 시작하였다. 토양미생물 중에는 병을 유발하는 병원미생물도 있지만, 작물의 근권에서 군집하면서 뿌리의 활력을 촉진 시키며 작물생육을 증진시키는 유용한 미생물도 함께 공존하고 있으며(장병춘 등, 2006. 유용미생물에 의한 작물체 양분 및 토양 이화학성 변화 구명) 이러한 미생물 중에 식물생장조절물질인 옥신, 지베렐린, 싸이토키닌 등을 분비하여 식물 생장에 영향을 주는데 이를 생산하는 미생물은 세균, 방선균, 사상균 등 다양하게 보고되어 있다 (Pan 등, 1999; Gamalero 등, 2003). 상추 균핵병에는 *Brevibacillus brevis*와 *Bacillus stearothermophilus* (황 등, 2006), 사과 푸른곰팡이병에는 *Bacillus* spp. 및 *Serratia marcescens* (김 등, 2003), *Pythium* 모잘록병에는 *Bacillus stearothermophilus* YC4194(양 등, 2002)가 효과를 나타내고 있다. 고추 잿빛곰팡이병 (Park 등, 1999)과 토양전염성 균에 대한 연구도 수행되었으며(Kim 등, 2005), 최근 보고된 바에 따르면 *Bacillus subtilis* S1-0210은 딸기 잿빛곰팡이병 방제에 효과적이며, *Bacillus pumilus* B1146은 인삼의 *Cylindrocarpon destructans*와 *Phytophthora cactorum* 방제에 효과적이라고 한다(Bae 등, 2004; Hang 등, 2005). 이러한 것의 일부는 병원체에 의한 감염으로부터 기주식물을 보호

해주는 것이 확인되었고, 유도저항성이나 획득저항성을 유도하기도 한다. 식물의 유도저항성은 식물병원체 외에 여러 가지 다양한 생물적, 화학적인 물질에 의해서도 유도된다고 알려져 있다(Hoffland 등. 1995.; Malamy 등. 1996).

전 세계적으로 병해충과 잡초방제에 사용하는 미생물농약은 114종의 상품이 등록되어 사용되고 있으며(Copping. L. G., 2004), 미생물 농약의 사용량은 유기화학농약의 판매량의 단지 1%에 불과하기 때문에, 화학농약과는 다른 작용기작을 이용하여 병해관리를 할 수 있으며, 미생물방제제의 역할이 기대되고 있기 때문에(Fravel. D. R., 2005), 지속적인 시장 확대와 화학적인 방제와 병행하여 처리함으로써 방제 효율의 상승 등이 기대되고 있다(Park 등, 1999). *Bacillus* spp.를 이용한 고추 역병에 대한 병 발생 억제에 대한 연구는 많이 진행되었다(Lee 등, 1999; 정 등, 2003; Shen 등, 2002; Shen 등, 2005). 그러나 역병은 토양을 타고서 쉽게 전파되는 병해이기 때문에, 매년 피해가 심하고, 살균제에 대한 저항성균도 출현하여, 고추 세균성점무늬병 및 탄저병과 더불어 생물적 방제제의 개발이 필요한 고추 병해이다.

제 5절 없음

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 전신유도저항성(induced systemic resistance)을 이용한 고추병 방제 기술 개발

1. ISR 유도 균주의 분리 및 abiotic stress 저항성 검증

가. 고추 더맹이병에 대한 ISR 검정 및 유용 *Bacillus* spp. 선발

대한민국의 다양한 장소의 토양에서 분리되어진 그람양성 *Bacillus* spp. 741균주를 이용하여 고추 더맹이병에 대한 induced systemic resistance (ISR)를 유도하는 균주를 선별하는 실험을 수행하였다. 741개의 그람양성 (G+) *Bacillus* sp. 균주는 모두 고추의 뿌리를 열처리 후 내열성 세균을 중심으로 분리하였다. 그 방법을 자세하게 살펴보면, 먼저 채집한 고추의 뿌리에서 흙을 최대한 털어내고 이후 고추의 뿌리 일부를 막자와 막자사발을 이용하여 마쇄한 후 1.5 ml tube에 넣고 80°C heating block에 1시간동안 열처리를 하였다. 이 열처리로 인해 세포벽 구조가 얇은 그람 음성 세균은 사멸 하게 되며 그람 양성 세균 중에서도 포자(spore)를 형성하는 균주는 살아남게 된다. 이 후 열처리한 고추의 뿌리용액에서 일부를 취하여 1/10 tryptic soy agar (TSA)배지에 고르게 도말하고 2일 동안 30°C 배양기에서 배양하였다. 이 후 TSA배지에서 자라나온 세균의 single colony를 계대 배양하여 단일 종의 균주를 분리하였다. 총 4차례의 선별과정을 걸쳐 single colony를 선별하였고 이중 *Bacillus* spp.로 보여지는 균주를 선택하여 고추에서 ISR을 유도하는 균주의 선별을 위한 실험을 수행하였다.

나. ISR 실험을 위한 고추의 준비와 배양

ISR 유도하는 *Bacillus* spp.를 선별하기 위한 식물재료로 고추 (*Capsicum annuum* L.)를 선택하고, 부강 품종을 사용하였다. 부강 종자는 한국생명공학연구원내에서 고추 EST database 구축시에 사용된 품종으로 고추 ISR 유도 실험시 분자적 수준에서 관찰하기에 좋은 재료이다. ISR유도 실험을 위해서 먼저 고추의 종자를 표면 살균하였다. 표면 살균은 차아염소산나트륨 (Sodium hypochlorite; 락스)에 10분간 침지 후 멸균된 물로 5-6 차례 씻어낸다. 잘 씻어낸 고추의 종자는 MS (MURASHIGE & SKOOG media) 식물배양 배지에 골고루 흩어 뿌린 후 오염이 되지 않도록 밀봉 하여 호일로 감싸고 발아가 되어 떡잎이 나올 때 까지 23°C 식물 배양기에서 배양한다. 발아된 고추 종자를 멸균된 상토가 담겨진 50개의 구멍이 있는 pot에 이식하여 25°C 항온실에서 2주간 배양한다.

다. 고추에서 BTH 사용농도의 결정

ISR 실험에 진행하기 전에 이미 많은 참고문헌에서 입증된 바 있는 positive control benzothiadiazole (BTH)의 적정 농도 확인 및 사용농도를 결정하고자 BTH 사용 농도에 따른 병징의 정도와 성장의 상관관계를 알아보는 실험을 수행하였다. BTH의 농도는 각각 10 mM, 5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.1mM, 0.05 mM 0.01 mM을 사용하였고 negative control 로는 멸균된 물을 사용하였다. 고추에서 BTH에 의한 약해 반응을 줄이고 고추 전체에 저항성을 유도하는 적정 농도를 알아내기 위하여 몇 번의 실험을 수행하여 사용 범위를 좁혀 나갔다. 첫 번째 사용 범위를 10 mM 시작하여 10배 단위로 줄여가면서 실험을 진행하였다. 이후 좀 더 명확한 농도를 찾기 위하여 5 mM, 0.5 mM, 0.05 mM을 추가하여 실험을 진행하였다. 각 농도의 BTH를 고추의 뿌리에 관주 후 day별로 고추의 줄기 길이 측정하여 성장 정도를 측정하였다. 또한 BTH의 유도 저항성 정도를 측정하기 위하여 BTH처리 7일 후 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav)를 접종하였다. Xav 접종 후 일별로 병징의 정도를 관찰하며 유도 저항성을 측정하였다.

라. 고추에서 ISR을 유도한 *Bacillus* spp. 균주의 선별

일차 균주 선별 과정에서 분리한 총 741개의 *Bacillus* spp. 균주를 대상으로 고추에서 ISR을 유도하는 균주를 선별하는 실험을 진행하였다. 선별과정은 5번의 선별과정을 걸쳐 진행되었다. 1, 2, 3차 선별 과정은 741개 균주에서 ISR 유도 가능성 있는 균주를 선별 과정이며, 4, 5차는 선별 과정은 3차에 선별된 균주에서 정확한 ISR 효과를 지닌 균주를 선택하는 과정이다. 본 실험에 사용되어진 741개의 균주는 G+ Bacteria로 형태학적으로 Bacilli균주 보여지는 것을 사용하였으며 대상 식물로는 고추를 대상으로 했으며 품종은 부강고추를 사용하였다. 선별방법은 아래의 제시 방법에 근거하여 실험에 임하였다. 비교균으로 기존에 다양한 식물체에서 ISR반응을 유도하는 것으로 알려진 *Paenibacillus polymixa* E681균주와 전신획득저항반응 (Systemic Acquired Resistance; SAR)을 유도하는 화학 물질인 SA (salicylic acid)의 유사물질인 0.5 mM BTH (benzothiadiazole carbothioc acid)를 positive control로 사용하였으며, negative control로는 멸균수를 사용하였다. 741개의 균주와 control로 사용된 *P. polymixa* E681 균주의 배양은 TSA(Tryptic soy agar) 고체 배지를 사용하였으며, TSA 고체 배지에 배양한 균주를 모아서 최종 OD₆₀₀ = 1.0 (10⁸ CFU/mL) 되도록 멸균수에 풀고 본엽이 4-5엽 정도로 자란 고추 뿌리에 5mL 씩 관주했다. 또한 positive control로 사용한 BTH는 0.5 mM (0.2mg/mL)농도로 동일한 양을 사용 했다

마. ISR 유도 균주와 선별한 *Bacillus* spp.의 ISR 능력 검증

기준에 ISR을 유도한다고 알려져 있는 *Bacillus* spp. 균주와 비교하여 본 실험에서 선별된 균주의 ISR능력 정도를 검증하는 실험을 수행하였다. *Bacillus subtilis* GB03, *Bacillus subtilis* INR7, *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, and *Bacillus pumilus* SE34는 기준에 ISR 유도하는 것으로 잘 알려진 균주으로써 본 실험에서 분리한 BS101과 BS107균주를 위의 이미 알려진 균주들과 비교하여 ISR 효능을 검증하였다. ISR유도 효능 검증에 대한 실험은 ISR유도 균주 선별 과정과 동일한 방법으로 수행하였으며 병징 정도를 수치로 환산 한 후 통계분석을 통해 유의성을 검증했다.

바. 선별된 균주의 ISR 능력과 식물 성장 촉진 능력 측정

ISR 유도능력을 가진 것으로 보이는 BS101과 BS107 균주의 ISR 유도능을 재확인하고, 식물 성장촉진 능력을 확인하기 위해 균주 접종에 의한 식물의 길이와 무게 변화를 측정하였다. 배양한 고추의 본엽이 4-5개가 나오면, 각 pot에 OD₆₀₀=1.0 (10⁸CFU/mL) 농도의 두 균주와 0.5 mM BTH를 각각 5mL씩 뿌리에 관주를 한다. 7일 후 고추 더맹이 병을 유발하는 세균인 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) 를 OD₆₀₀ = 0.001 (10⁵ CFU/mL) 로 맞춘 후 고추의 3, 4, 5 번째 본엽에 바늘을 제거한 1mL 주사기를 이용하여 팽압에 의한 방법으로 각 식물체의 3개의 잎에 Xav를 접종한다. 접종 5일 후부터 잎에 나타나는 병징을 관찰하고 병 관찰이 끝난 후 고추 묘의 길이와 무게를 측정하였다.

사. 선별된 두 균주의 뿌리의 정착 능력

ISR을 유도하는 BS101과 BS107 균주의 뿌리정착 능력을 관찰하기 위하여 두 균주를 일정한 농도 (10⁸ CFU/mL)로 뿌리에 관주하고 관주 당일과 5, 10, 15, 20일 후 각각 뿌리를 취하여 뿌리 1g당 존재하는 균주의 수를 측정하였다.

아. 선별된 BS107 균주의 16S rDNA 및 균주 동정

선별된 BS107 최종 동정을 위하여 16S rDNA 분석과 지질 분석(MIDI analysis)과 특정 유전자 분석 pattern analysis를 수행하였다. 16S rDNA분석은 (주)Bioneer에 sequencing을 의뢰하였으며, sequencing 결과를 MEGA4.0 program을 이용하여 *Bacillus thuringiensis*와 *Bacillus cereus*중 sequence가 잘 알려진 대표 균주를 선별하여 비교 분석하였다. 16S rDNA서열은 MEGA 4.0 program을 사용하여 근연종의 서열과 비교하였고, *Bacillus anthracis* 균주와 구분하기 위해 Hemolytic test를 수행하였으며, PCR을 통해 병원성 유전자의 존재 여부를 확인했다. MIDI 분석을

통하여 BS107 균주의 지방산 조성을 분석 하였으며, *Bacillus thuringiensis*와 *Bacillus cereus*가 지니고 있는 특정 pathogenic gene을 PCR 방법을 이용하여 비교 분석하였다.

자. BS101과 BS107 균주에 의한 abiotic stress tolerance 관찰

BS101과 BS107에 처리에 의한 cold tolerance와 drought tolerance 증가여부를 측정하기 위하여 본엽이 4-5개 나오기 시작한 고추 묘에 BS101과 BS107 균주를 10^8 CFU/mL 농도로 뿌리에 관주하고, 4°C에서 3일 동안 배양 후 생존하는 개체수를 관찰 하는 것으로 cold tolerance를 측정 하였으며, 7일간 물을 주지 않았다가 다시 물을 준 뒤 생존하는 개체수를 관찰 하는 것으로 drought tolerance를 측정 했다.

1-1. 결과

가. 고추 더듬이병에 대한 ISR 유도 능력 검정 및 유용 *Bacillus* spp. 선발

고추에서 ISR 유도 능력을 가진 균주를 확보하기 위하여 전국의 고추 배양지에서 병이 발생하지 않은 고추 뿌리를 취하여 균주 분리를 수행하였다. 고추의 뿌리에는 다양한 미생물들이 분포하고 있다. 이 중 곰팡이(fungi)를 제외한 세균(bacteria)만을 선별 하였으며, 세균 중에서도 그람 음성 세균을 제외한 그람 양성 세균만을 선별 하였다. 기존에 ISR유도 능력을 지닌 세균으로는 *Pseudomonas* spp. 와 *Bacillus* 계열의 균주가 보고되었다. 특히 *Bacillus* 계열의 균주는 endospore를 만들기 때문에 여러 극한 환경에 대한 내구성이 뛰어나고 상품성으로 가치가 뛰어나 본 실험에서는 *Bacillus* 계열의 세균만을 선별하기로 했다. *Bacillus* 계열의 균주를 구분 하기 위해 열처리를 통하여 그람 음성 세균을 제거 하였으며, 나머지 그람 양성 세균 중 *Bacillus* 계열만을 분리하기위해 몇 차례의 single colony 분리과정을 거쳐 총 741개의 균주를 일차 선별했다.

나. ISR유도 실험을 위한 고추의 준비와 배양

ISR 유도하는 *Bacillus* spp.를 선별하기 위한 식물 재료로 부강 고추(*Capsicum annuum* L. cv. Bukang)를 사용하였다. 소독된 종자를 MS (MURASHIGE & SKOOG media) 식물배양 배지에서 발아시켜 상토에 이식 후 25°C 항온실에서 2주간 배양한다. 고추의 본엽이 4-5개가 나오면, 각 pot에 $OD_{600}=1.0$ (10^8 CFU/mL) 농도의 741종의 균주를 각각 5mL 씩 뿌리에 관주 했다. 7일 후 고추 더듬이 병을 유발하는 세균인 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) 를 10^5 CFU/mL 농도로 고추의 3, 4, 5 번째 본엽에 바늘을 제거한 1mL 주사기를 이용하여 팽압에

의한 방법으로 각 식물체의 3개의 잎에 접종했다. 접종 5일 후부터 잎에 나타나는 병징을 관찰하고 병이 나타나는 정도를 수치로 환산 하여 통계분석 하고 이 결과를 토대로 ISR반응을 유도하는 균주를 선별했다 (Fig. 1-1).

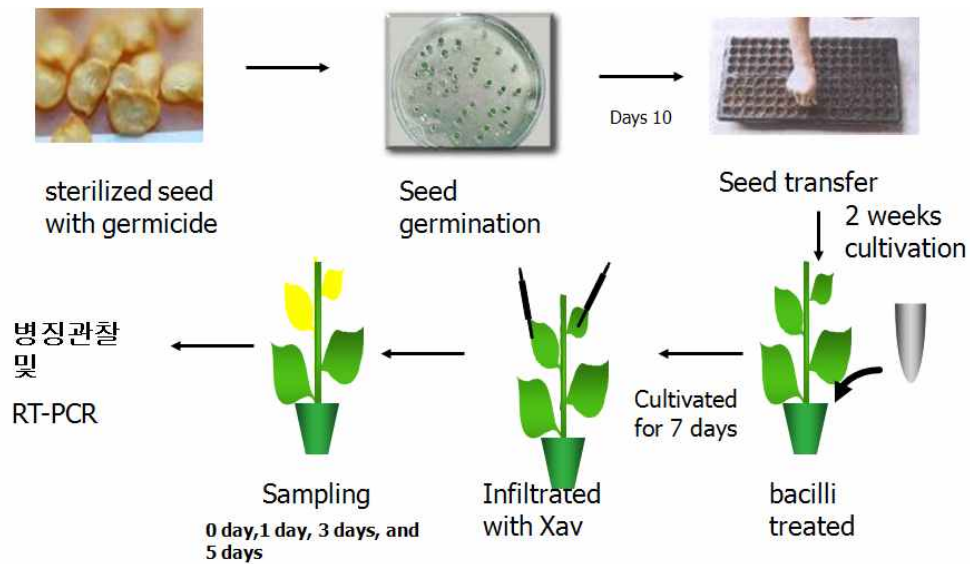


Fig. 1-1. ISR 실험의 모식도

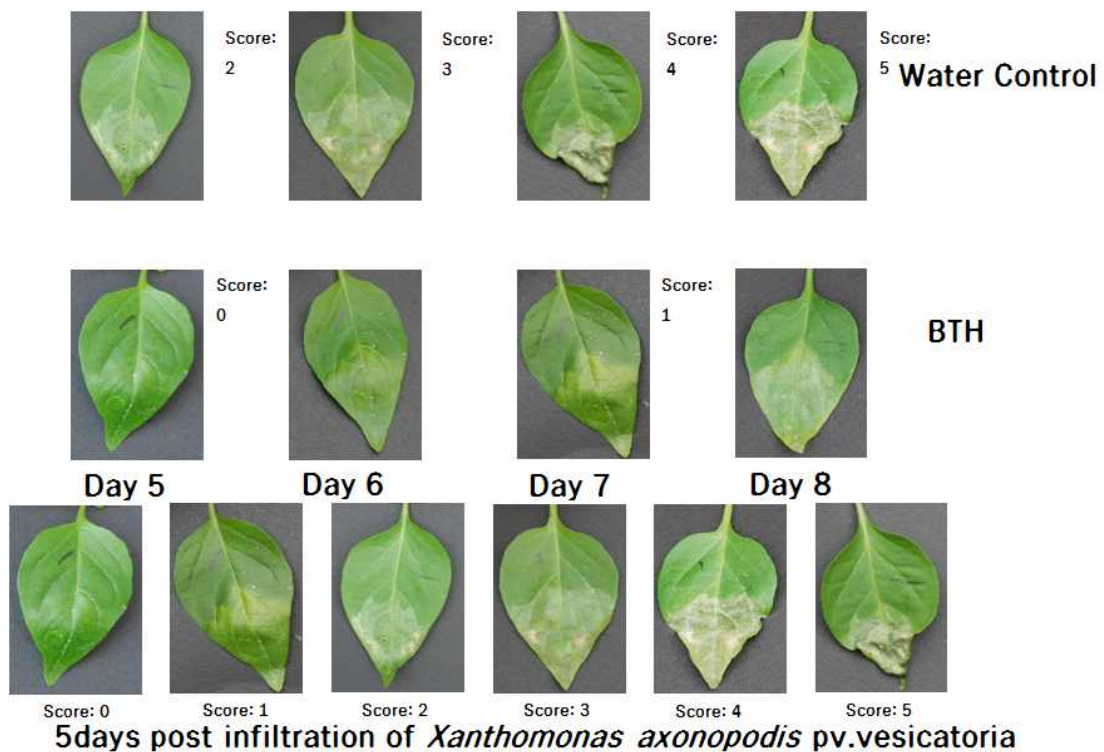


Fig. 1-2. Disease index that mean disease severity by Xav. Effect of BTH on plant growth and ISR day 6 after treatment. BTH was treated with 0.5mM before drenched in the soil. As a control, plants were treated with water. Disease severity (0 - 5) as an indicator of ISR was measured 0 to 6 days after pathogen challenge. 0, no symptoms; 5, severe necrosis.

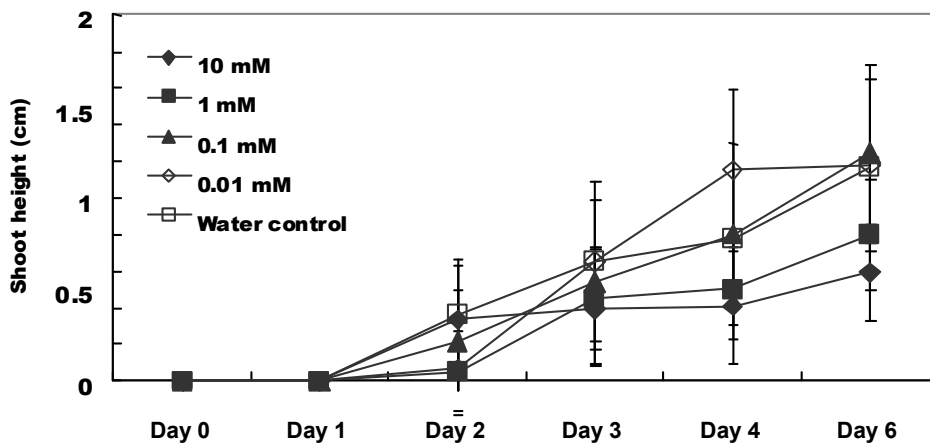
다. 고추에서 BTH 사용농도의 결정

고추에서 ISR유도 실험을 진행 하기위하여 negative control로는 물처리를 사용하였고 positive control로는 기존에 다양한 식물체에서 ISR반응을 유도하는 것으로 알려진 *Paenibacillus polymixa* E681균주와 전신획득저항반응 (SAR;Systemic Acquired Resistance)을 유도하는 화학 물질인 SA (Salicylic acid)의 유사물질인 0.5 mM BTH (benzo thiadiazole carbothioc acid)를 사용하였다. *P. polymixa* E681은 앞서 분리한 741개의 *Bacillus*와 동일한 농도도 사용하였다. 그러나 BTH의 경우 BTH는 미국에서는 Actigard® 유럽에서는 BION® 이라는 제품으로 잘 알려져 있는 식물 유도 저항성 유도 물질이지만 식물이 작게 자라거나 수확량이 떨어지는 약해 반응을 지닌 물질이다. BTH에 대한 사용 농도는 각 식물마다 다르게 적용되고 있으며 모델 식물로 사용되어지고 있는 *Arabidopsis*에는 0.33 mM을 사용하고 있으나 고추에서는 그 사용 농도가 명확히 알려져 있지 않았다. 본 실험에서는 고추에서 positive control로 BTH를 사용하기 위하여 약해 반응이 적고 ISR 반응을 유도할 수 있는 적절한 농도를 찾는 실험을 진행하였다.

두 단계로 나누어 실험을 진행하였다. 첫 단계로는 BTH 사용 가능 범주를 정하는 것이며 두 번째 단계는 고추에서 ISR 실험에 사용 적합한 BTH 농도를 결정하는 것이다. 첫 단계에서 BTH의 사용 농도는 10 mM, 1 mM, 0.1 mM, 그리고 0.01 mM BTH를 적용하여 이에 따른 고추의 길이 생장과 병징에 대한 저항성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1-2에서 보는바와 같이 10 mM BTH로 처리한 고추의 길이 생장은 6일째 0.5 cm 이내의 길이 성장을 보였으며, 1 mM BTH 처리 고추의 길이 생장은 0.8 cm 이내의 길이 성장을 보였다. 그러나 0.1 mM BTH 이하로 처리한 고추의 길이 생장은 물처리와 거의 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1-3A). 반면 각 농도 별로 처리한 고추에서의 병징이 정도는 1 mM 이상의 BTH 처리시 물처리와 0.1 mM 이하의 BTH 처리와 비교하여 20% 정도 병징이 덜 진전되었다 (Fig. 1-3B). 즉 첫 번째 실험 결과를 보아 고추에서 저항성을 유도하면서 약해 반응을 최소화 할 수 있는 BTH의 농도는 0.1 mM과 1 mM사이로 그 범주가 좁혀졌다. 위의 결과를 바탕으로 고추에서 사용 적절한 BTH의 명확한 농도를 찾기 위해 위에 처리한 농도이외에 5 mM, 0.5 mM BTH를 추가하여 ISR 실험을 진행하였다. 그 결과 각

농도별 BTH처리에 따른 길이 생장은 1 mM 이상의 BTH 처리시 물처리에 비하여 평균 0.4-0.7 cm가 적게 자랐으며 0.5 mM 이하로 처리한 고추에서는 물처리와 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1-4A). 반면 각 농도별 BTH 처리에 따른 병징의 심각성은 1 mM 이상의 BTH 처리시 물처리에 비하여 평균 3정도의 병징 정도를 나타내었으나 0.1 mM 이하로 처리한 고추에서는 물처리와 같이 병징이 심하게 발생하였다. 그러나 0.5 mM BTH처리시에는 병징이 1 mM 이상으로 처리한 것에 비하여 많이 발생하나 물처리나 0.1 mM BTH처리에 비하여 병이 덜 발생하였으며 더욱이 BTH처리에 따른 약해 반응 적게 발생 하였다. 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1-4B).

A



B

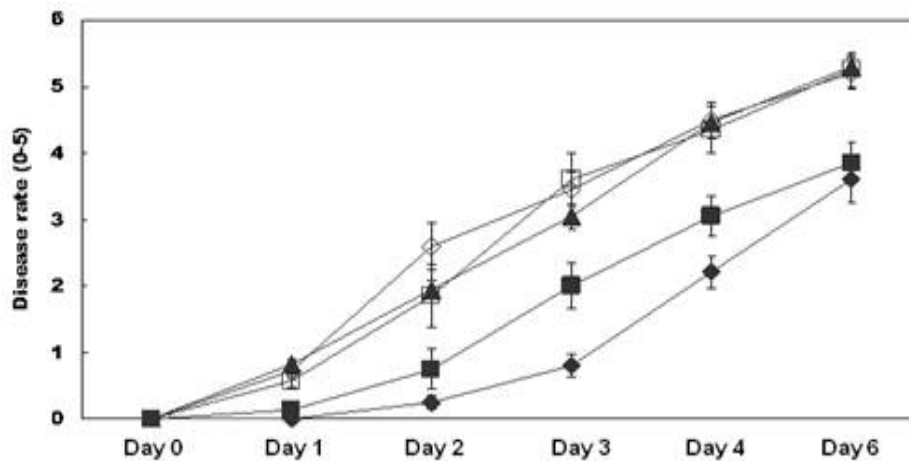
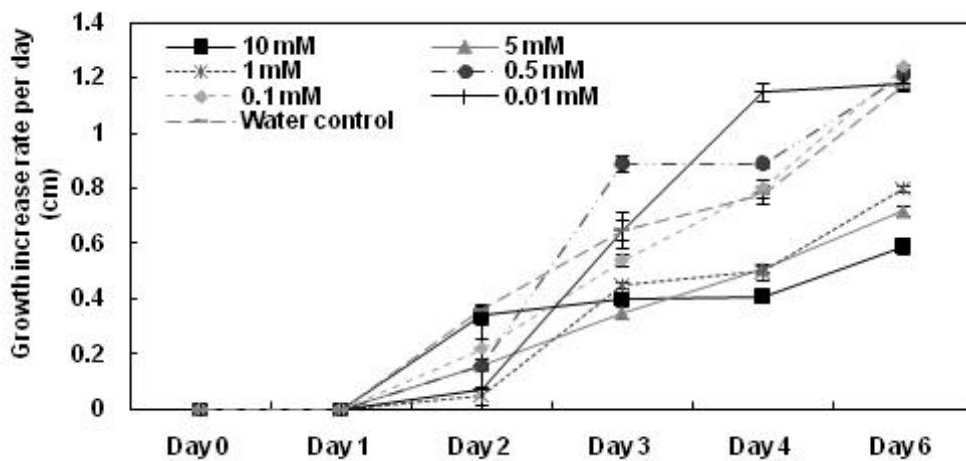


Fig. 1-3. Effect of different concentration BTH on plant growth and induced systemic resistance (ISR) at the different time points. BTH was treated with 10

mM, 1 mM, 0.1 mM and 0.01 mM before drenched in the soil. As a control, plants were treated with water. A) Shoot height were assessed 6 days after inoculation with BTH into pepper plants. B) Disease severity (0 - 5) as an indicator of ISR was measured 0 to 6 days after pathogen challenge. 0, no symptoms 5, severe necrosis.

A



B

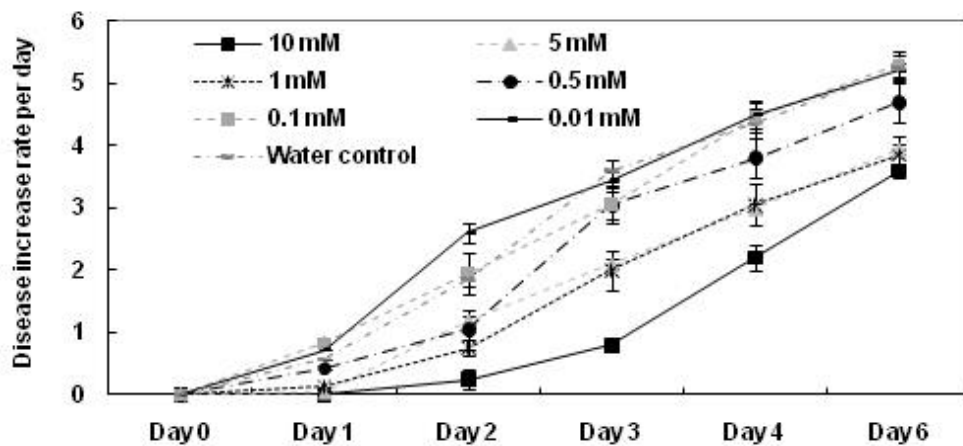


Fig. 1-4 Effect of BTH on plant growth and ISR day 6 after treatment. BTH was treated with 10mM, 5mM 1mM, 0.5mM, 0.1mM and 0.01mM. before drenched in the soil. As a control, plants were treated with water. A) Shoot height were assessed 6 days after inoculation with BTH into pepper plants. B) Disease severity (0 - 5) as an indicator of ISR was measured 0 to 6 days after pathogen challenge. 0, no symptoms; 5, severe necrosis.

라. 고추에서 ISR을 유도한 *Bacillus* spp. 균주의 선별

일차로 분리한 총 741가지의 *Bacillus* spp. 를 대상으로 고추에서 ISR을 유도하는 균주를 선별하는 실험을 진행하였다. 선별과정은 5차례에 걸쳐 진행되었고 최종적으로 가장 뛰어난 2개의 균주를 분리하였다. 대조군으로 기존에 다양한 식물체에서 ISR반응을 유도하는 것으로 알려진 *Paenibacillus polymixa* E681과 0.5 mM BTH (benzo-thiadiazole carbothioc acid)를 positive control로 사용하였으며, negative control로는 멸균수를 사용하였다.

741가지의 대상으로부터 1차 선별 결과 102가지를 선택 했고, 2차 선별 과정을 거쳐 37가지로 범위를 좁혔으며, 3차 과정에서 13개, 4차 과정에서는 10가지 후보 균주를 줄였다 (Fig. 1-5). 이 후 추가 실험을 통하여 BS101과 BS107 이 두 균주가 다른 후보균주에 비하여 ISR 효능이 높게 나타났으므로 추 후 실험은 이 두 균주를 가지로 진행하였다.

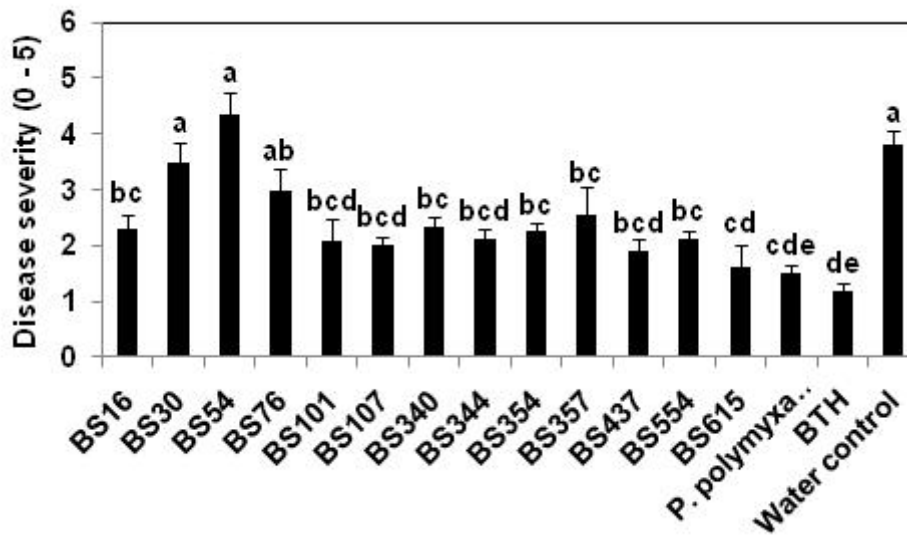


Fig. 1-5 Effect of BS101 and BS107 on ISR for 3 weeks after treatment. *Bacillus* sp. cells were collected and resuspended in 10mM MgSO₄ to a final density of 10⁸ CFU/mL (OD₆₀₀= 1.0) before drenched in the soil. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH. Disease severity (0 - 5) as an indicator of disease severity was observed at 7 days after pathogen challenge. 0, no symptoms; 5, severe necrosis (inset indicates disease index). Different letter like a, b and c in figure indicate statistically significant differences as compared to water-treated control plants ($P = 0.05$). Error bar represents standard error mean (SEM).

마. BS101과 BS107의 ISR 유도 능력 비교 및 검증

기존의 ISR을 유도한다고 알려져 있는 *Bacillus* spp. 세균과 본 연구에서 새롭게 분리한 세균의 ISR유도능력을 비교하기 위해 *Bacillus subtilis* GB03, *Bacillus subtilis* INR7, *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, and *Bacillus pumilus* SE34 를 선택하여 선별과정과 동일한 실험을 수행하였다. 그 결과 새롭게 분리된 BS101과 BS107은 0.5 mM BTH 보다는 ISR 유도 효과가 떨어지나 다른 알려진 세균과는 유사한 정도로 ISR을 유도하는 것으로 나타났다.

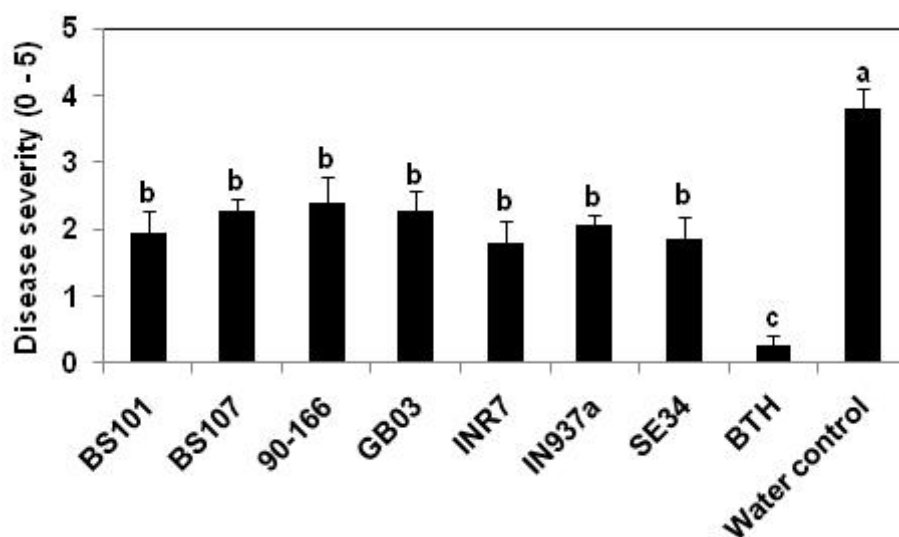


Fig. 1-6 Confirmation of ISR effect of BS101 and BS107 compare with ISR induced *Bacillus* spp. Effect of *Bacillus cereus* strains BS101 and *B. thuringiensis* strain BS107 on ISR for 3 weeks after treatment. *Bacillus cereus* strains BS101 and *B. thuringiensis* strain BS107 cells were collected and resuspended in 10Mm MgSO₄ to a final density of 10⁸ cfu ml⁻¹ (OD₆₀₀= 1.0) before drenched in the soil. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH. Disease severity (0 - 5) as an indicator of ISR was measured 7 days after pathogen challenge. 0, no symptoms; 5, severe necrosis (inset indicates disease index). Different letters indicate statistically significant differences ($P = 0.05$). Data represents the means the standard error of the mean

마. BS101과 BS107의 ISR유도 능력과 식물 성장 촉진 능력 확인

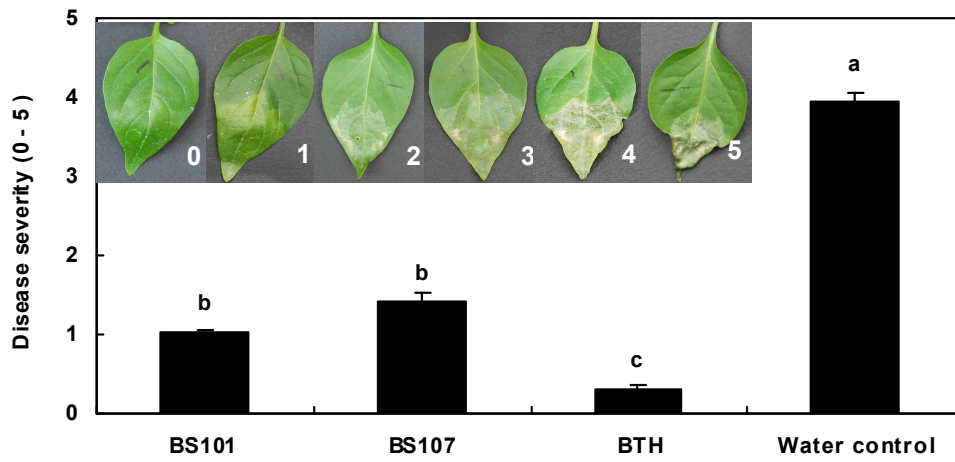
새롭게 분리한 BS101과 BS107의 ISR 유도 능력과 고추의 성장 촉진 능력을 동시에 관찰하기 위하여 두 균주를 $OD_{600}=1.0$ (10^8 CFU/mL) 농도로 식물에 처리 하고, 7 일 뒤 병원균인 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav)를 처리하였다. 이후 시간에 따라 병 발생을 한 결과 BS101과 BS107은 여전히 식물의 ISR을 유도하여 병 발생을 줄였다 (Fig. 1-7AB). 두 세균이 유도한 ISR이 식물 성장에는 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 식물의 fresh weight과 길이생장을 관찰 한 결과 BS101과 BS107을 처리한 고추의 무게는 평균 0.8g 과 1.8g 을 각각 나타내었고, BTH 처리구는 평균 1g, 물 처리한 고추의 무게는 평균 1.5g 을 나타내었다. 고추의 길이를 측정 한 결과 BS101은 평균 9 cm, BS107은 평균 14 cm, BTH 처리는 평균 12 cm, 물 처리는 평균 12 cm를 나타내었다 (Fig 1-7C). 위 결과를 종합할 때, BS101은 ISR을 강력히 유도하지만 식물생장은 억제하는 반면 BS107은 강한 ISR을 유도함과 동시에 식물의 성장도 촉진 시키는 것을 알 수 있었다.

BS107의 ISR 유도 능력을 좀 더 확고히 하기위해 병원균에 의한 세포 사멸정도를 ion leakage를 측정함으로써 측정, 비교하였다. 병원균인 Xav를 처리한 첫 날 ion leakage를 측정 한 결과 BS107 처리구, 양성 대조군인 0.5mM BTH 처리구 물 처리구 모두에서 거의 같은 수준의 ion leakage를 관찰했다. 병원균 처리 2일 후 0.5 mM BTH 처리구에서 다른 두 처리구에 비해 적은 양의 ion leakage가 나타났으며 4일째에는 BS107 처리구의 ion leakage 가 70%, 0.5 mM BTH 처리구는 60%, 물 처리구는 82%로 나타나 BS107 처리에 의해 세포 사멸이 줄어든 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1-8).

A



B



C

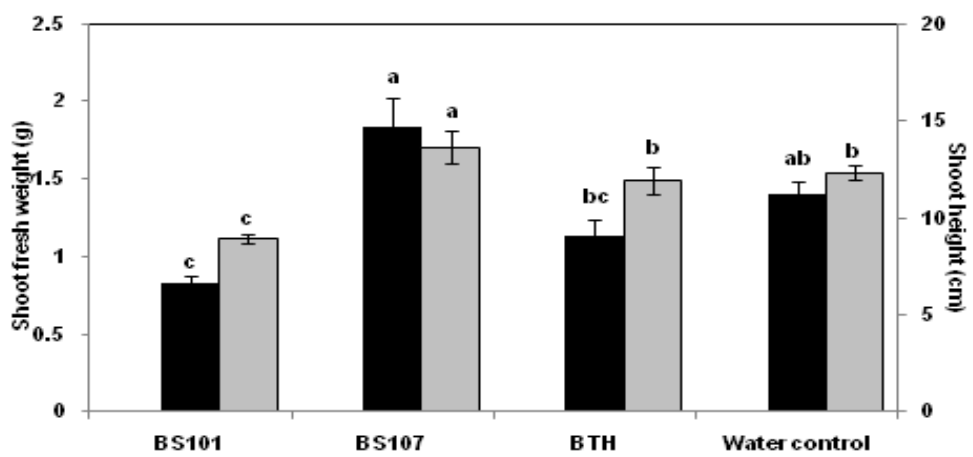


Fig. 1-7. Effect of *Bacillus cereus* strains BS101 and *B. thuringiensis* BS107 on ISR and plant growth 3 weeks after treatment. A) Representative photographs taken 12 days after spray-inoculation of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (105cfu/ml). *B. cereus* strain BS101 and *B. thuringiensis* BS107 cells were collected and resuspended in 10Mm MgSO₄ to a final density of 10⁸cfu ml⁻¹ (OD₆₀₀= 1.0) before drenched in the soil. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH. b) Shoot height (gray bar) and shoot fresh weight (black bar) were assessed 3 weeks after inoculation with strain BS101 or strain BS107 into pepper plants. C) Disease severity (0 - 5) as an indicator of ISR was measured 7 days after pathogen challenge. 0, no symptoms; 5, severe necrosis (inset indicates disease index). A, B and C in A and C indicate statistically significant differences as compared to water-treated control plants (P = 0.05). Data represents the means plus the standard error of the mean.

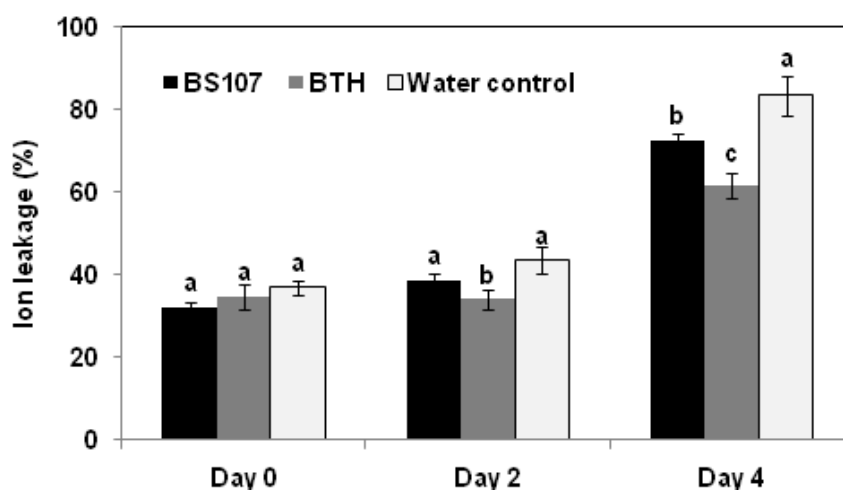


Fig. 1-8. Assessment of cell death use Ion-leakage on *B. thuringiensis* BS107-elicited induced systemic resistance against *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. The three leaf of each plant were sampled at 0, 2 and 4 day after challenge with *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Different letters indicate statistically significant differences (P = 0.05). Data represents the means the standard error of the mean.

사. BS101과 BS107의 뿌리 정착 능력

ISR 유도능을 가지고 있는 BS101과 BS107의 뿌리 정착 능력을 관찰하기 위하여 두 균주를 OD₆₀₀=1.0 (10⁸ CFU/mL)농도로 뿌리에 관주 하고 1시간 후 그리고 5, 10, 15, 20일 후 각각 뿌리를 취하여 뿌리 1g당 존재하는 균주의 수를 측정하였다. BS101과 BS107 두 균주 모두 첫날 10⁶ CFU/mL 농도의 세균이 존재 했으며 이후 5일 간격으로 20일 동안 관찰한 결과 20일이 지난 이후에도 10⁵ CFU/mL 농도의 세균이 계속 유지 되었다.

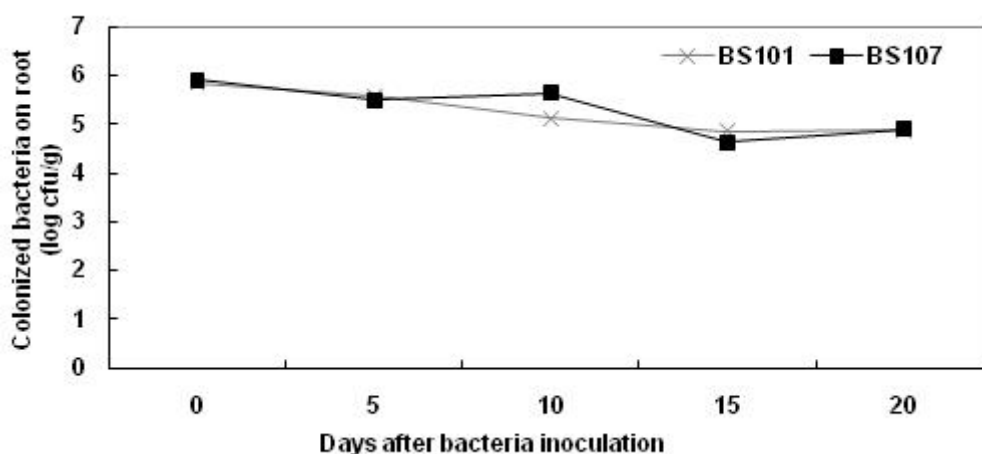


Fig. 1-9. Assessment of root colonized ability of BS101 and BS107. *B. cereus* BS101 cells and *B. thuringiensis* BS107 were collected and resuspended in 10Mm MgSO₄ to a final density of 10⁸ cfu ml⁻¹ (OD₆₀₀ = 1.0) before drenched in the soil. Count of bacteria population (log cfu/g root) for 20 days after treated on pepper root.

아. BS107 균주의 동정

식물의 ISR을 유도하며 생장을 촉진하는 BS107을 동정하기위해 우선 16S rDNA 서열을 분석하고 MEGA 4.0을 이용 하여 진화적 위치를 확인 해 보았다. BS107은 *Bacillus thuringiensis* WS2626과 진화적으로 가장 가까운 위치이며 *Bacillus cereus* 등과도 근연종 인 것으로 드러났다 (Fig. 1-10C).

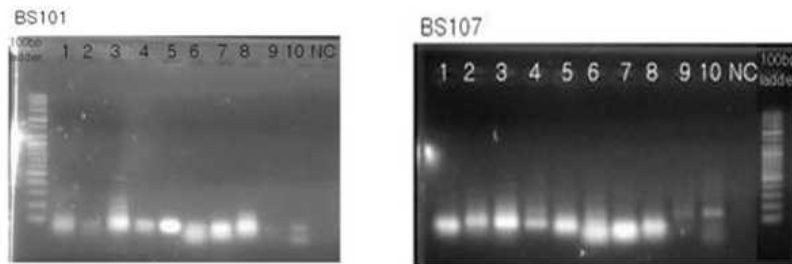
또한 BS107의 이 후 실험과정이나 응용시 안정성을 위하여 병원성 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 우선 BS107 유전체 내에 병원성 *Bacillus* 에 속하는

Bacillus anthracis 가 가지고 있는 병원성 유전자 - pXO1 plasmid의 *paq*, *cya*, *lef* gene - 가 존재 하는지 PCR을 통해 확인했다. Fig. 1-10A에서 볼 수 있듯이 본 연구에서 분리한 BS107과 BS101의 유전체에서는 특정 병원성 유전자가 증폭되지 않았다. BS107의 비병원성을 좀 더 확고히 하기 위해 한양대학교 채영규 박사님께 의뢰하여 일반적으로 *B. anthracis* 의 특징이 되는 hemolysis test 를 수행 하였다. BS107의 경우 *B. anthracis* 와 달리 hemolysis를 관찰 할 수 없었다(Fig. 1-10B). 병원성 유전자 유무 검증과 hemolysis test를 통하여, 본 연구에서 분리한 BS107의 병원성 위험도는 매우 낮을 것으로 생각할 수 있다.

BS107 균주의 좀 더 정확한 학명을 알아보기 위하여 지방산 분석을 시도하였다. MIDI 분석을 통하여 지방산 분석 결과 BS107균주는 *Bacillus cererus subgroup* 혹은 *Bacillus mycoides* 인 것으로 판단되었다. *B. cererus subgroup*은 *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*를 모두 포함하기 때문에 *B. anthracis* 제외하고 다른 두 세균의 특징과 어떤 차이를 보이는지 확인 했다. *B. thuringiensis* 는 일반적인 *Bacillus* 배양 배지인 TSA (Tryptic soy agar)나 NA (Nutrient agar)에서 crystal을 형성하는데 반해 BS107은 crystal을 만들지 못했다. 또한 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*의 차이를 나타낼 수 있는 특정 유전자를 선택하여 BS107균주와 *B. thuringiensis*, *B. cereus* 의 유전체를 대상으로 PCR을 수행 하였다 (Fig. 1-10D). 그 결과 BS107에서는 *B. thuringiensis* 와 동일한 패턴으로 PCR product의 밴드가 나타나는 것이 확인 되었다 (Fig. 1-10D).

위의 모든 특징을 고려할 때 BS107은 *B. thuringiensis* 의 특징과 일치하는 부분이 가장 많으므로 *B. thuringiensis* 에 속할 가능성이 가장 크다고 생각된다.

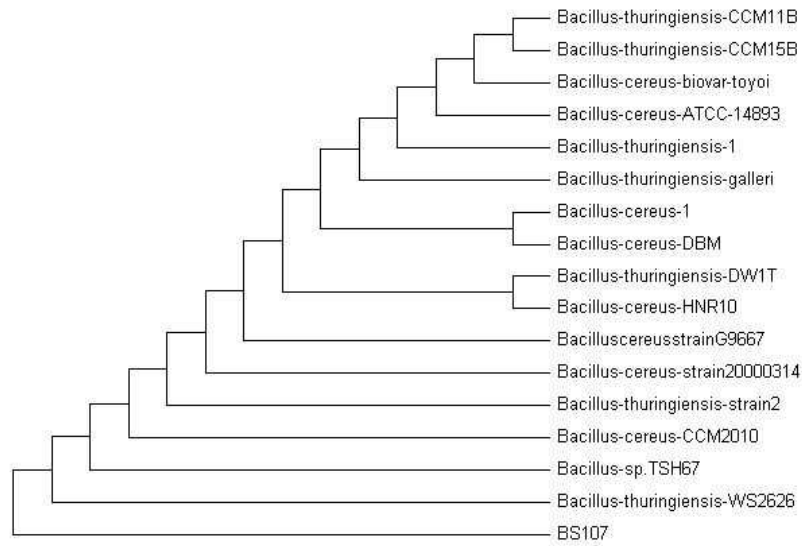
A



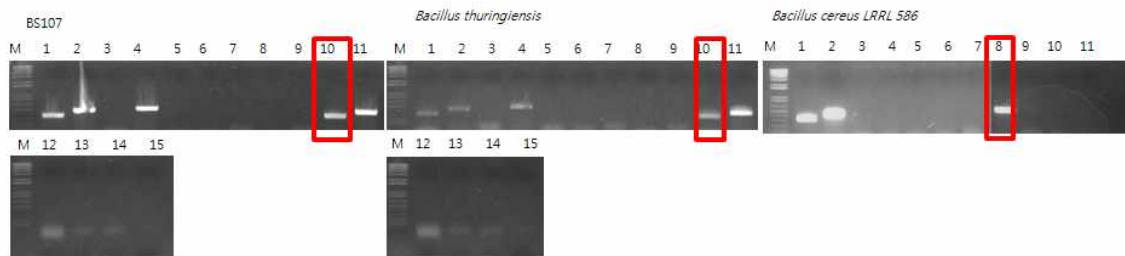
B



C



D



Line	Gene description	Line	Gene description
Line 1	<i>hblA</i> (hemolytic)	Line 9	<i>Bacillus mycooides gyrB</i>
Line 2	<i>hblD</i> (hemolytic)	Line 10	<i>Bacillus thuringiensis gyrB</i>
Line 3	<i>hblC</i> (hemolytic)	Line 11	<i>Bacillus cereus</i> GROUP <i>groEL</i>
Line 4	<i>nheA</i> (non-hemolytic)	<i>Bacillus cereus</i> Pathogenic island complex	
Line 5	<i>nheB</i> (non-hemolytic)	Line 12	<i>Bacillus cereus ces</i> complex
Line 6	<i>nheC</i> (non-hemolytic)	Line 13	<i>Bacillus cereus hbi</i> complex
Line 7	<i>Bacillus anthracis gyrB</i>	Line 14	<i>Bacillus cereus cytk</i> complex
Line 8	<i>Bacillus cereus gyrB</i>	Line 15	<i>Bacillus cereus nhB</i> complex

Fig. 1-10. Identification of *Bacillus* spp. A) Detection of pathogenic genes expression in BS107 and BS101 comparing with *B. anthracis* and B) Hemolysis test. C) Phylogenetic tree of BS107 by 16S rDNA sequence analysis using

MEGA 4.0 program D) Expression of *Bacillus* specific genes in BS107, *B. thuringiensis* and *B. cereus*.

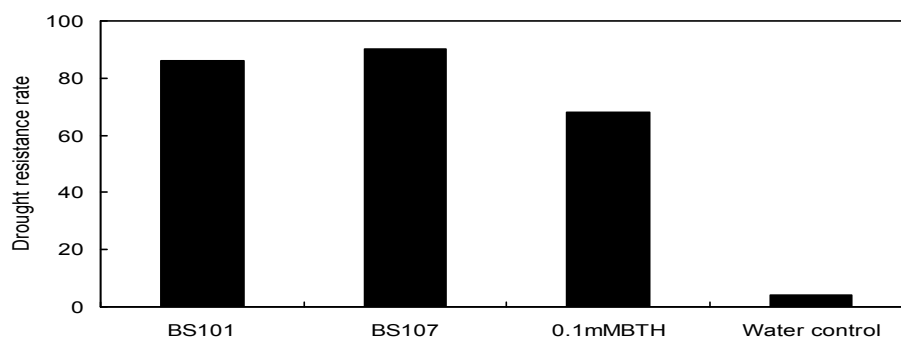
자. BS101과 BS107 균주에 의한 식물의 abiotic stress tolerance 증가

BS101과 BS107에 의해 식물의 abiotic stress에 대한 내성이 증가할 수 있는지 확인하기 위해 cold 와 drought 조건에서 방치 후 회복되는 양상을 관찰 했다. BS101과 BS107 모두 drought tolerance를 증가 시켰으며 (Fig. 1-11AB), cold 의 경우 BS101은 식물의 내성을 positive control인 abscisic acid (ABA) 정도로 증가 시켰으나 BS107은 큰 효과가 없었다 (Fig. 1-11CD).

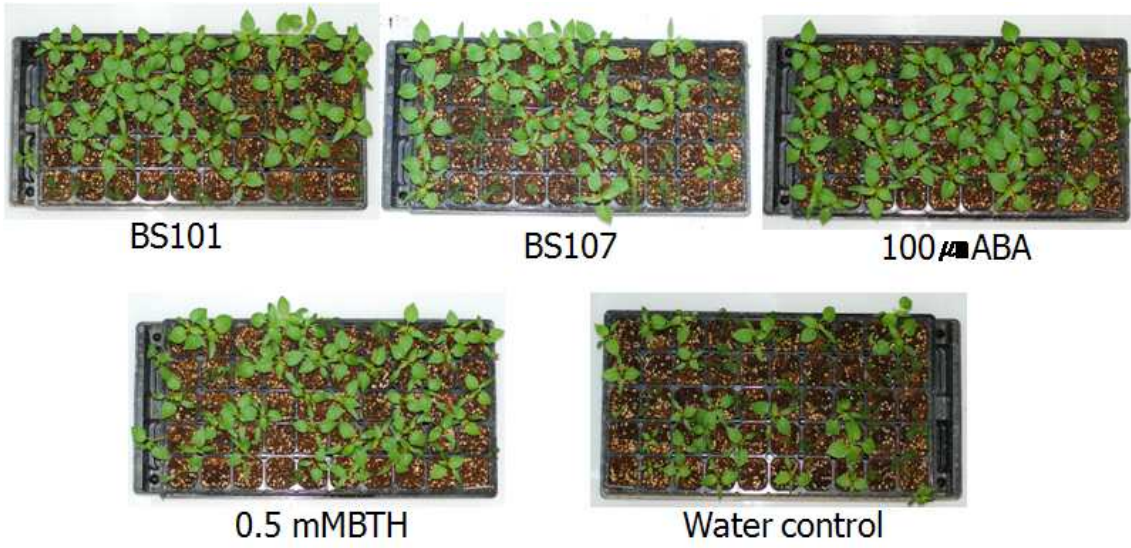
A



B



C



D

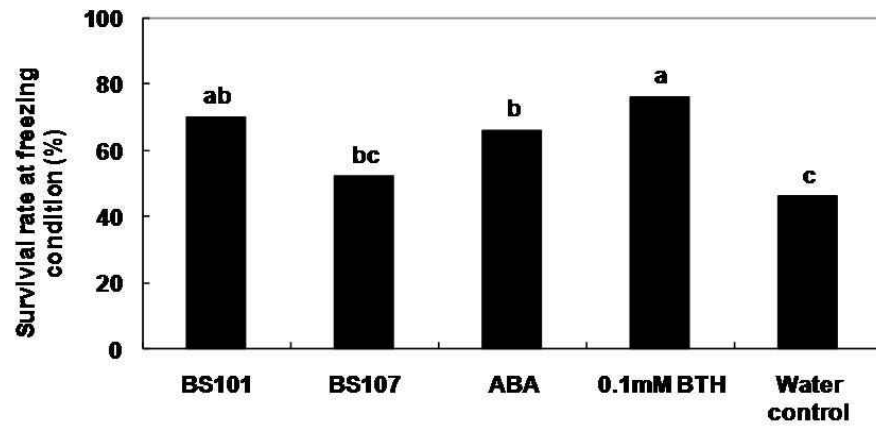


Fig. 1-11 BS101과 BS107에 의한 식물의 abiotic stress 내성 증가

A, B: drought stress, C, D: cold stress

2. 그람양성세균에 의한 ISR 유도 시 발현되는 유전자분석

- 고추의 Oligo Chip을 이용한 유전자 발현 조사

BS107에 의해 식물의 ISR 유도 시 transcriptom 변화를 관찰 하기 위해 oligo chip microarray를 수행하였다. BS107을 전처리 한 고추와 그렇지 않은 고추를 대상으로 7일후에 고추 병원성 세균인 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) 를 접종하였다. 병 접종 후 0시간, 6시간, 24 시간에 고추 잎으로부터 total RNA를 분리 하고 이를 이용하여 oligo chip microarray를 수행하였다. Oligo chip microarray 분석은 Green gene bio tech회사에 의뢰를 하여 수행하였다.

- 고추의 Oligo Chip을 이용한 ISR 유도시 priming 유전자 조사

Microarray분석 결과를 토대로 priming 유전자를 선별하기 위하여 BS107처리 하지 않은 고추 0 시간, 6시간, 그리고 24시간에 발현된 유전자들과 BS107처리 한 고추에서 발현된 유전자들을 0시간, 6시간, 24시간에 발현된 유전자들 비교 분석하였다. 명확한 priming 유전자를 분석하기 위해 수식을 설정하여 그 값이 2배 이상 증가한 유전자를 선택하고 이 유전자들의 기능 분석을 위하여 *Arabidopsis* database 를 기반으로 하여 예측, 분석 하였다. 선별된 유전자 일부를 qRT-PCR을 이용하여 검증하였다.

결과

그람양성세균에 의한 ISR 유도 시 변화하는 transcriptome 분석

BS107균주의 처리와 비 처리에 의한 ISR 유도 시 변화되는 유전자 transcriptome 분석을 위해 microarray를 분석한 결과 0 시간에 \log_2 ratio로 3배 이상 발현이 증가한 유전자는 BS107처리구에서 62개 이고, BS107 비 처리구에서는 3배 이상으로 발현이 증가한 유전자가 존재하지 않았다. 6 시간 때에는 BS107처리구에서 804개 유전자의 발현이 증가하였으며 비 처리구에서는 645종의 유전자 발현이 증가하였다. 병 접종 24 시간 후에 발현이 증가한 유전자는 BS107 처리구에서 93개 비 처리구에서 65개의 유전자 발현이 증가했다. 전체적으로 BS107처리구에서 비처리구에 비해 다양한 종류의 유전자 발현이 증가했다. 발현이 감소한 유전자의 경우도 BS107 처리구에서 비 처리구에 비해 많은 수의 유전자 발현에 변화가 나타났다 (Fig. 1-12). 각 시간대 (1h, 6h and 24h) 별로 변화한 고추의 유전자 발현은 고추의 EST로 표현 되어 있는데 이를 연구가 잘 이루어진 *Arabidopsis*의 유전자들과 비교하여 homolog를 찾고 그 기능을 예상 할 수 있는 것만을 모아 Table. 1-1, 2, 3에 나타내었다. BS107에 의해 발현양이 크게 증가한 유전자 중에는 *Arabidopsis*의 BPR1 유전자와 homolog인 PEPPERS0010160과 cytochrome P450, WRKY67와 같은 transcription에 관련된 유전자, ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1)과 같이 ethylene 신호 전달 관련 유전자, jasmonic acid carboxyl methyltransferase과 같은 JA 신호전달 관련된 유전자들이 있었다. 이러한 경향은 6 시간 째 와 24 시간째에서 동일하게 나타났다. PR1 (pathogenesis-related gene1), PR3 chitinase, *Arabidopsis* thaumatin-like protein 1등과 같은 저항성 관련 유전자들의 발현역시 증가 하였고, bZIP transcription factor, WRKY72 와 같은 transcription factor들의 발현양도 증가했다.

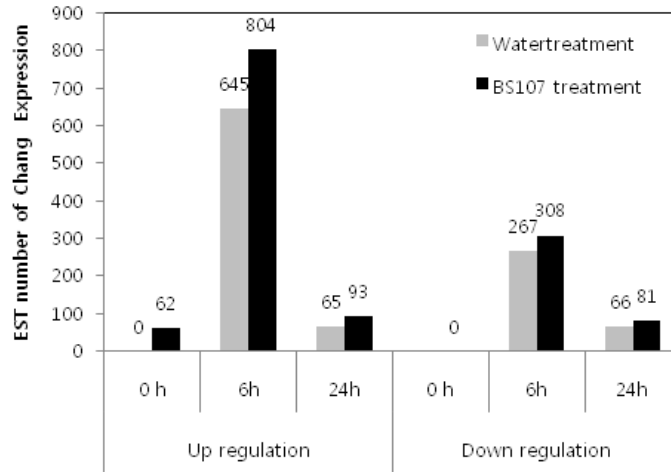


Fig. 1-12. The variation of ESTs number at 0 h, 6 hrs, 24 hrs after Xav treatment. The gray bar means water treatment and black bar means BS107 treatment on pepper root.

Table 1-1. Expression profiles at the time of pathogen (Xav) challenge.

Down regulated EST at 0h			
CaEST ID	F o l d change	COG	Description
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING			
PEPPERS0013680	-2.36	K	MADS box transcription factor
PEPPERS0002262	-2.03	DO	Metacaspase involved in regulation of apoptosis
PEPPERS0005895	-2.07	V	Arylacetamide deacetylase
METABOLISM			
PEPPERS0011360	-2.3	GC	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
PEPPERS0015136	-2.32	Q	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
POORLY CHARACTERIZED			
PEPPERS0000656	-2.27	R	Predicted chitinase
PEPPERS0002876	-2.05	R	Predicted chitinase

UP regulated EST at 0h			
CaEST ID	F o l d change	COG	Description
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING			
PEPPERS0009936	3.02	J	40S ribosomal protein S29
PEPPERS0019513	2.12	J	60s acidic ribosomal protein
PEPPERS0011290	2.34	K	Heat shock transcription factor
PEPPERS0011291	2.25	K	Heat shock transcription factor
PEPPERS0015854	2.38	K	MADS box transcription factor
CELLULAR PROCESSING AND SIGNALING			

PEPPERS0000559	4.52	T	Calmodulin and related proteins (EF-Hand superfamily)
PEPPERS0004432	2.74	T	Serine/threonine protein phosphatase
PEPPERS0005924	3.65	T	Predicted membrane protein, contains DoH and Cytochrome b-561/ferric reductase transmembrane domains, Protein of unknow
PEPPERS0008650	2.23	T	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, and related proteins
PEPPERS0008651	2.23	T	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, and related proteins
PEPPERS0008973	2.45	T	Ca ²⁺ -binding protein, EF-Hand protein superfamily
PEPPERS0009762	2.04	T	Serine/threonine protein kinase
PEPPERS0010161	2.07	T	Serine/threonine protein kinase
PEPPERS0010162	6.14	T	Serine/threonine protein kinase
PEPPERS0010163	3.11	T	Serine/threonine protein kinase
PEPPERS0010208	2.18	T	MEKK and related serine/threonine protein kinases
PEPPERS0010733	2.70	T	Apoptotic ATPase
PEPPERS0013988	4.12	T	Predicted seven transmembrane receptor - rhodopsin family
PEPPERS0017177	2.00	T	Serine/threonine protein kinase
PEPPERS0017261	8.94	T	Rhomboid family proteins
PEPPERS0017774	2.18	T	Mitogen-activated protein kinase
PEPPERS0019454	2.06	T	Apoptotic ATPase
PEPPERS0018135	3.75	Z	Actin filament-coating protein tropomyosin
PEPPERS0016624	2.15	U	Karyopherin (importin) alpha
PEPPERS0000784	3.57	O	AAA ⁺ -type ATPase
PEPPERS0003729	2.81	O	Aspartyl protease
PEPPERS0009503	2.95	O	Ubiquitin-protein ligase
PEPPERS0013352	2.00	O	Aspartyl protease
PEPPERS0017361	2.15	O	Aspartyl protease
PEPPERS0006408	3.35	C	Mitochondrial phosphate carrier protein
PEPPERS0008799	2.25	C	NADH-dehydrogenase (ubiquinone)
PEPPERS0012909	2.02	GC	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
PEPPERS0013793	2.73	C	Proteins containing the FAD binding domain
PEPPERS0016755	2.06	C	Proteins containing the FAD binding domain
PEPPERS0018021	2.06	C	FOF1-type ATP synthase, beta subunit
PEPPERS0012909	2.02	GC	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
PEPPERS0006342	2.95	E	Lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase
PEPPERS0013432	2.14	E	Alanine-glyoxylate aminotransferase AGT2
PEPPERS0000162	2.07	F	Nucleoside diphosphate kinase
PEPPERS0000515	3.12	H	Protoheme ferro-lyase (ferrochelatase)
PEPPERS0000341	3.27	I	Ca ²⁺ -independent phospholipase A2
PEPPERS0010030	3.60	QI	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
PEPPERS0010829	3.96	QI	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
PEPPERS0000100	2.09	PQ	Ferric reductase, NADH/NADPH oxidase and related proteins
PEPPERS0010308	2.28	P	Calcium transporting ATPase
PEPPERS0011545	2.06	PQ	Ferric reductase, NADH/NADPH oxidase and related proteins

PEPPERS0016508	2.40	P	Fe ²⁺ /Zn ²⁺ regulated transporter
PEPPERS0000038	2.19	Q	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)
PEPPERS0000100	2.09	PQ	Ferric reductase, NADH/NADPH oxidase and related proteins
PEPPERS0004095	2.36	Q	Multicopper oxidases
PEPPERS0010030	3.60	QI	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
PEPPERS0010829	3.96	QI	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
PEPPERS0011545	2.06	PQ	Ferric reductase, NADH/NADPH oxidase and related proteins
PEPPERS0013073	2.05	Q	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
PEPPERS0014463	6.38	QR	Iron/ascorbate family oxidoreductases
POORLY CHARACTERIZED			
PEPPERS0005845	2.66	R	Haloacid dehalogenase-like hydrolase
PEPPERS0012762	3.53	R	Leucine rich repeat
PEPPERS0013375	2.01	R	FAD-binding protein
PEPPERS0014123	18.98	R	Transposon-encoded proteins with TYA, reverse transcriptase, integrase domains in various combinations
PEPPERS0014124	3.08	R	Transposon-encoded proteins with TYA, reverse transcriptase, integrase domains in various combinations
PEPPERS0014463	6.38	QR	Iron/ascorbate family oxidoreductases
PEPPERS0015414	2.75	R	Zn-finger protein
PEPPERS0016249	2.07	R	WD40 repeat
PEPPERS0018387	2.79	R	Transposon-encoded proteins with TYA, reverse transcriptase, integrase domains in various combinations
PEPPERS0018555	2.31	R	Leucine rich repeat
PEPPERS0019200	2.12	R	RRM domain
PEPPERS0010890	3.59	S	Predicted membrane protein

Table 1-2. The list of defense related ESTs at 6h

CaEST ID	Fold change	cog	A_thaliana_homologue	A_thaliana_homologue
PEPPERS0010160	34.9	S	AT2G14580	Arabidopsis thaliana BPR1
PEPPERS0009346	2.63	S	AT3G19690	pathogenesis-related protein
PEPPERS0009344	2.57	S	AT3G19690	pathogenesis-related protein
PEPPERS00002919	4.65	Q	AT3G26320	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 36
PEPPERS0014551	3.52	Q	AT5G25120	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 11

PEPPERS00029 51	3.94	Q	AT4G13290	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 19
PEPPERS00125 87	2.06	K	AT3G57040	Response reactor 4; transcription regulator
PEPPERS00051 39	4.93	NA	AT5G28010	Bet v I allergen family protein
PEPPERS00064 13	3.74	NA	AT5G28010	Bet v I allergen family protein
PEPPERS00135 22	2.06	NA	AT4G18250	receptor serine/threonine kinase, putative
PEPPERS00101 51	2.17	NA	AT1G66550	WRKY67 transcription factor
PEPPERS00027 16	5.68	NA	AT5G23960	terpene synthase/cyclase family protein
PEPPERS00049 73	3.64	NA	AT1G61680	terpene synthase/cyclase family protein
PEPPERS00137 79	2.33	NA	AT1G53920	GLIP5 carboxylesterase
PEPPERS00122 56	2.27	NA	AT1G18250	Arabidopsis thaumatin-like protein 1
PEPPERS00084 56	2.13	NA	AT1G09970	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
PEPPERS00100 34	4.3	NA	AT2G27310	F-box family protein
PEPPERS00003 48	3.35	NA	AT3G22400	LOX5; lipoxygenase
PEPPERS00045 17	4	NA	AT1G19640	Jasmonic acid carboxyl methyltransferase
PEPPERS00114 43	3.11	NA	AT3G23240	ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1)
PEPPERS00096 86	2.51	NA	AT3G57260	PR-2; glucan 1,3-beta-glucosidase

Table 1-3. The list of defense related ESTs at 24h.

CaEST ID	F o l d change	cog	A_thaliana_ho mologue	A_thaliana_homologue_Description
PEPPERS0002590	2.75	S	AT4G25780	pathogenesis-related protein
PEPPERS0009345	2.26	S	AT2G14610	PR1 (pathogenesis-related gene1)
PEPPERS0001689	2.24	K	AT5G25830	zinc finger (GATA type) family protein
PEPPERS0003108	2.27	R	AT3G20820	leucine-rich repeat family protein
PEPPERS0015294	2.32	G	AT3G13750	beta-galactosidase
PEPPERS0008816	2.44	R	AT3G02040	Senescence-related gene 3
PEPPERS0019061	2.05	T	AT5G58380	SIP1, SNRK3.8, PKS2, CIPK10
PEPPERS0003147	4.35	NA	AT3G12500	PR3 chitinase
PEPPERS0019921	2.65	NA	AT3G12500	PR3 chitinase
PEPPERS0006159	23.63	NA	AT1G49320	BURP domain-containing protein
PEPPERS0006423	13.45	NA	AT3G25820	Terpene synthase-like sequence
PEPPERS0004973	8.3	NA	AT1G61680	terpene synthase/cyclase family protein
PEPPERS0004448	5.17	NA	AT5G48485	Defective in induced resistance 1
PEPPERS0012256	2.89	NA	AT1G18250	Arabidopsis thaumatin-like protein 1
PEPPERS0010268	2.73	NA	AT5G58600	Powdery mildew resistant 5
PEPPERS0012430	4.32	NA	AT2G14900	gibberellin-regulated family protein
PEPPERS0007292	2.22	NA	AT1G19180	JAZ1,Jasmonate-zim-domain protein 1
PEPPERS0007277	2.16	NA	AT1G19180	JAZ1,Jasmonate-zim-domain protein 1
PEPPERS0004517	7.01	NA	AT1G19640	Jasmonic acid carboxyl methyltransferase
PEPPERS0001484	4.9	NA	AT2G42380	bZIP transcription factor family protein
PEPPERS0001483	4.11	NA	AT2G42380	bZIP transcription factor family protein
PEPPERS0022336	2.07	NA	AT5G15130	WRKY72
PEPPERS0017197	2.69	NA	AT5G57520	ZINC FINGER PROTEIN 2
PEPPERS0010674	2.3	NA	AT1G28590	lipase, putative
PEPPERS0012257	2.3	NA	AT1G18250	Arabidopsis thaumatin-like protein 1
PEPPERS0005679	2.29	NA	AT2G38540	LP1 (nonspecific lipid transfer protein 1)
PEPPERS0012220	2.27	NA	AT4G12510	protease inhibitor
PEPPERS0008991	2.75	NA	AT3G18280	lipid transfer protein (LTP) family protein
PEPPERS0008188	2.59	NA	AT2G38530	lipid transfer protein 2
PEPPERS0012498	3.81	NA	AT5G48485	Defective in induced resistance 1
PEPPERS0004449	2.14	NA	AT5G48485	Defective in induced resistance 1
PEPPERS0014012	2.14	NA	AT3G45140	LOX2 (lipoxygenase2)
PEPPERS0004977	2.03	NA	AT3G45140	LOX2 (lipoxygenase2)

Priming 유전자의 선별과 검증

BS107처리 후 병원균 Xav 접종에 따른 유전자 발현의 변화 중에서 특별히 BS107 전 처리에 의해서만 발현양의 변화가 커진 유전자는 BS107에 의해 priming 되었다고 생각하여 priming된 유전자를 알아보기 위해 다음과 같은 수식을 설정 하였다.

$$BS107 (6h \text{ or } 24h) - (BS107 0h + \text{물처리 } 6h \text{ or } 24h) > 1$$

위 수식에 따라 발현양 증가 비율이 계산된 유전자목록을 기능별로 나열하여 Table. 1-4에 나타내었다. Cytochrome P450와 같은 transcription 조절에 관련된 유전자, amino acid transportation 에 관련된 유전자 및 metabolism에 관련된 유전자들의 BS107에 의해 빠르고 강하게 발현이 되었으며, JMT (jasmonic acid carboxyl methyl transferase), LOX5 (jasmonic acid biosynthesis)에 관련된 유전자가 포함되어 있었다. 또한 malate synthase와 같은 일련의 대사과정에 관련되어져 있는 유전자는 물처리에 비하여 9배 이상 증가하였다. 이렇게 선별된 priming 유전자의 일부를 RT-PCR과 qRT-PCR을 통하여 validation 하였다 (Fig. 1-13). Malate synthase를 유전자는 BS107에 의해 병 처리 후 3시간부터 증가하다 24 시간때에 발현이 감소한 반면 물처리에서는 병처리후 6시간때부터 증가하며 72시간에 최대로 증가하였다. 즉 BS107에 의해 대조군에 비해 빠르고 강하게 증가하였음 보여줌으로써 priming 된 유전자를 선택하는 수식이 신빙성 있음을 확인 할 수 있었다. Terpene synthase의 발현 역시 malate synthase와 비슷한 양상을 보였다. Malate synthase와 terpene synthase는 qRT-PCR을 통해 발현 양상을 재확인 하였다 (Fig 1-13BC). 이 외에 병 저항성에 관련 되었을 것으로 생각되는 *Arabidopsis*에서 PR10 유전자의 homolog인 Bet v I allergen family protein 유전자와 고추의 PR1 (CaPR1) 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR로 확인 한 결과 (Fig. 1-13DE) BS107처리구 에서 대조군에 비해 20배 이상 높은 발현양을 나타내는 것을 확인 하였다. 병 처리 후 짧은 시간 내에 대조군에 비해 물질대사에 관련된 유전자를 높게 발현시킴으로써 저항성 및 성장에 빠른 대응력을 나타내게 하거나 저항성 유전자를 빠른 시간에 발현시킴으로써 병원균에 빠른 저항성을 유도하는 것으로 여겨진다.

이 밖에 다른 PR protein의 유전자인 PR4 역시 BS107에 의해 priming 된 것을 RT-PCR을 통해 확인 하였다 (Fig. 1-13A) 특히 PR1과 PR4 유전자의 경우 병원성 세균이 침입하기 전에는 발현이 되지 않거나 아주 낮은 수준으로 발현되어 있다가 병원균의 침입과 동시에 아주 빠르고 강력하게 발현되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1-13A). 이 내용은 qRT-PCR을 이용하여 그 결과를 확고히 하였다 (Fig. 1-14C).

Table. 1-4 The list of screened priming ESTs at 6h and 24h. Fold-change ratio

of representative constitutively expressed control genes in *B. thuringiensis* strain

CaEST ID	F o l d change	COG	A_thaliana homologue	A_thaliana_homologue_Description
PEPPERS0014164	1.37	QR	AT3G11180	Iron/ascorbate family oxidoreductases
PEPPERS0012868	1.02	Q	AT1G31770	Transporter, ABC superfamily
PEPPERS0013200	1.27	QR	AT2G44800	Iron/ascorbate family oxidoreductases
PEPPERS0010663	1.13	QR	AT5G24530	Iron/ascorbate family oxidoreductases
PEPPERS0010700	1.01	Q	AT2G45570	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
PEPPERS0006575	2.51	Q	AT1G64950	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
PEPPERS0014174	1.45	QI	AT5G63450	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
PEPPERS0016190	2.29	QI	AT5G38450	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
PEPPERS0009409	1.38	QI	AT3G48520	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
PEPPERS0015491	1.43	QI	AT1G73340	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26
PEPPERS0016419	2.64	E	AT2G39020	Diamine acetyltransferase
PEPPERS0019579	1.79	E	AT2G38120	Amino acid transporters
PEPPERS0000701	1.74	E	AT1G64660	beta-lyases / cystathionine gamma-synthases
PEPPERS0002061	1.18	E	AT2G44160	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
PEPPERS0003053	4.49	E	AT1G10070	Branched chain aminotransferase BCAT1,
PEPPERS0014283	2.23	E	AT1G08230	Amino acid transporters
CaEST ID	F o l d change	COG	A_thaliana homologue	A_thaliana_homologue_Description
PEPPERS0014681	1.37	R	AT4G18520	FOG PPR repeat
PEPPERS0014387	1.37	R	AT4G15920	Multitransmembrane protein
PEPPERS0013650	2.48	R	AT2G32150	Haloacid dehalogenase-like hydrolase
PEPPERS0014125	1.24	R	AT4G26260	Aldehyde reductase
PEPPERS0016697	1.19	R	AT5G18840	Predicted transporter
PEPPERS0014046	1.44	I	AT1G78955	Oxidosqualene-lanosterol cyclase
PEPPERS0011917	1.77	I	AT4G29010	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
PEPPERS0016376	2.56	I	AT2G26560	Ca ²⁺ -independent phospholipase A2
PEPPERS0014507	1.42	O	AT1G56300	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)
PEPPERS0013194	3.18	O	AT5G18600	Glutaredoxin and related proteins

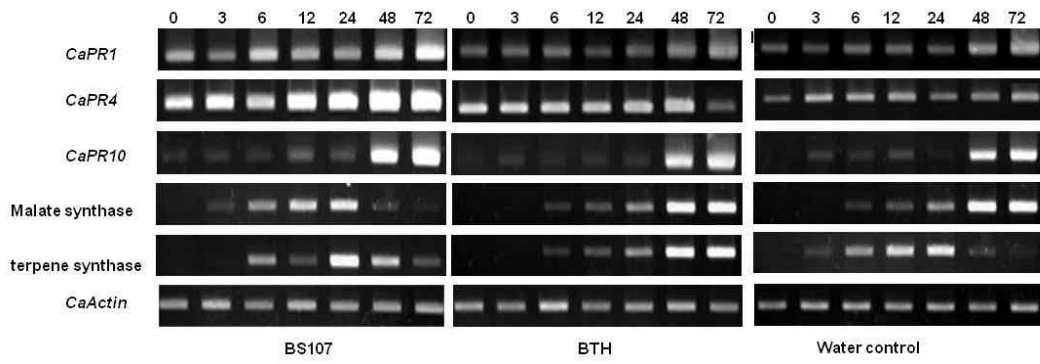
PEPPERS0013195	2.18	O	AT5G18600	Glutaredoxin and related proteins
PEPPERS0018502	1.5	O	AT2G17880	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)
PEPPERS0003369	1.27	O	AT1G03220	Aspartyl protease
PEPPERS001247	2.47	O	AT1G09750	Aspartyl protease
PEPPERS0002078	1.59	O	AT1G03220	Aspartyl protease
PEPPERS0012045	2.4	O	AT5G50260	Cysteine proteinase Cathepsin L
PEPPERS0002885	1.83	O	AT1G49230	FOG Predicted E3 ubiquitin ligase
PEPPERS0002558	1.56	O	AT1G17180	Glutathione S-transferase
PEPPERS0019850	8.3	O	AT3G62930	Glutaredoxin and related proteins
CaEST ID	Fold change	COG	A_thaliana homologue	A_thaliana_homologue_Description
PEPPERS0019838	1.83	K	AT2G41690	Heat shock transcription factor
PEPPERS0014475	2.41	K	AT5G62020	Heat shock transcription factor
PEPPERS0013766	1.25	T	AT2G30360	Serine/threonine protein kinase
PEPPERS0019709	1.17	T	AT3G23000	Serine/threonine protein kinase
PEPPERS0017536	1.84	T	AT1G07630	Protein phosphatase
PEPPERS0013109	2.31	T	AT4G34920	Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C
PEPPERS0013088	1.48	G	AT3G22960	Pyruvate kinase
PEPPERS0013087	1.18	G	AT3G22960	Pyruvate kinase
PEPPERS0015333	1.31	G	AT5G18070	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase
PEPPERS0014837	1.11	G	AT1G68020	Trehalose-6-phosphate synthase component TPS1 and related subunits
PEPPERS0017364	1.71	GC	AT1G22370	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
PEPPERS0013964	2.62	GC	AT5G49690	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
PEPPERS0019204	2.77	G M W	AT5G03795	Acetylglucosaminyltransferase EXT1/exostosin 1
PEPPERS0013649	1.75	AR	AT5G46190	PolyC-binding proteins alphaCP-1
PEPPERS0001794	9.23	C	AT5G03860	Malate synthase
PEPPERS0001731	5.18	C	AT2G16060	Globins and related hemoproteins
CaEST ID	Foldchange	COG	A_thaliana homologue	description
PEPPERS0001729	1.72	C	AT2G16060	Globins and related hemoproteins

PEPPERS0004721	1.46	OE	AT3G45010	Serine carboxypeptidases (lysosomal cathepsin
PEPPERS0003520	1.85	V	AT3G48690	Arylacetamide deacetylase
PEPPERS0003519	1.87	V	AT3G48690	Arylacetamide deacetylase
PEPPERS0004312	1.49	OE	AT3G45010	Serine carboxypeptidases (lysosomal cathepsin
PEPPERS0001009	1.16	J	AT3G03920	H/ACA small nucleolar RNP component GAR1
PEPPERS0009397	1.72	J	AT2G40010	60S acidic ribosomal protein P0
PEPPERS0009603	1.83	Z	AT2G19770	Profilin
PEPPERS0011476	1.69	J	AT3G04840	40S ribosomal protein S3A
PEPPERS0006173	1.69	J	AT5G04800	40S ribosomal protein S17
PEPPERS0017052	1.62	M	AT5G23870	Pectin acetylerase and similar proteins
PEPPERS0018661	2.11	F	AT3G46540	Equilibrative nucleoside transporter protein
PEPPERS0001756	2.38		AT1G02205	CER1; epicuticular wax biosynthesis
PEPPERS0000348	3.22		AT3G22400	LOX5; jasmonic acid biosynthesis
PEPPERS0006305	1.37		AT2G27500	glycosyl hydrolase family 17 protein
PEPPERS0006423	3.74		AT3G25820	ATTPS-CIN(TERPENE SYNTHASE-LIKE SEQUENCE-1,8-CINEOLE);
PEPPERS0005126	1.39		AT3G25820	ATTPS-CIN (TERPENE SYNTHASE -LIKE SEQUENCE-1,8-CINEOLE
CaEST ID	Foldch ange	COG	A_thaliana homologue	description
PEPPERS0005125	2.45		AT3G25820	ATTPS-CIN (TERPENE SYNTHASE -LIKE SEQUENCE-1,8-CINEOLE
PEPPERS0004792	1.86		AT4G12560	F-box family protein
PEPPERS0004973	3.38		AT1G61680	terpene synthase/cyclase family protein
PEPPERS0004517	3.88		AT1G19640	JMT(JASMONIC ACID -CARBOXYL METHYLTRANSFERASE)
PEPPERS0020061	1.49		AT4G20260	DREPP plasma membrane polypeptide family protein
PEPPERS0018617	2.43		AT1G52200	unknown protein
PEPPERS0018749	2.12		AT5G18930	adenosylmethionine decarboxylase
PEPPERS0022049	2.38			Glycine rich protein family
PEPPERS0021654	1.94		AT2G15880	leucine-rich repeat family protein
PEPPERS0021255	2.55			7TM chemoreceptor

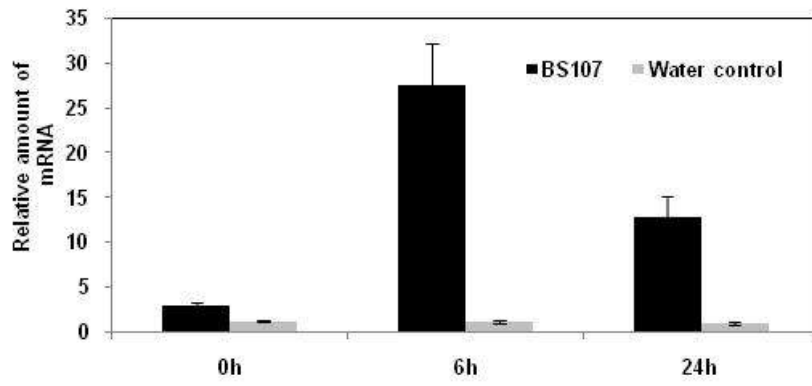
PEPPERS0021385	2.4			sulfate symporter transmembrane region
PEPPERS0018138	1.63		AT5G63770	diacylglycerol kinase
PEPPERS0015917	1.7		AT4G24670	alliinase family protein
PEPPERS0015807	1.28		AT3G02350	GAUT9 (Galacturonosyltransferase 9);
PEPPERS0014103	1.45		AT4G09160	SEC14 cytosolic factor family protein
PEPPERS0013398	1.31		AT2G39210	nodulin family protein
CaEST ID	Foldchange	COG	A_thalianahomologue	description
PEPPERS0013541	1.97		AT2G46490	unknown protein
PEPPERS0014331	1.47		AT1G59710	unknown protein
PEPPERS0014455	2.64		AT1G77210	sugar transporter
PEPPERS0017487	2.42		AT5G33303	negative regulation of transcription
PEPPERS0016006	2.11		AT4G23160	protein kinase family protein
PEPPERS0016670	1.77		AT5G38200	hydrolase
PEPPERS0023387	1.92			sulfate symporter transmembrane region
PEPPERS0013501	9.17		AT3G03480	Transferase
PEPPERS0014669	1.14		AT5G48930	Transferase
PEPPERS0012796	4.47		AT3G26040	Transferase,
PEPPERS0001314	1.48		AT5G20950	BglX, Beta-glucosidase-rela
PEPPERS0034699	1.44			DppB, ABC-type dipeptide
PEPPERS0034698	1.3			DppB, ABC-type dipeptide
PEPPERS0032019	2.31			Predicted membrane
PEPPERS0023481	4.1			PRP8, U5 snRNP spliceosome
PEPPERS0016089	1.96		AT4G29010	FadB, 3-hydroxyacyl-CoA deh
PEPPERS0010185	2.67		AT2G36640	TolA, Membrane protein invo
PEPPERS0014133	1.04		AT1G80160	GloA, Lactoylglutathione ly
PEPPERS0022706	1.3		AT5G18290	PstA, ABC-type phosphate

BS107-treated compared with water treated pepper roots.

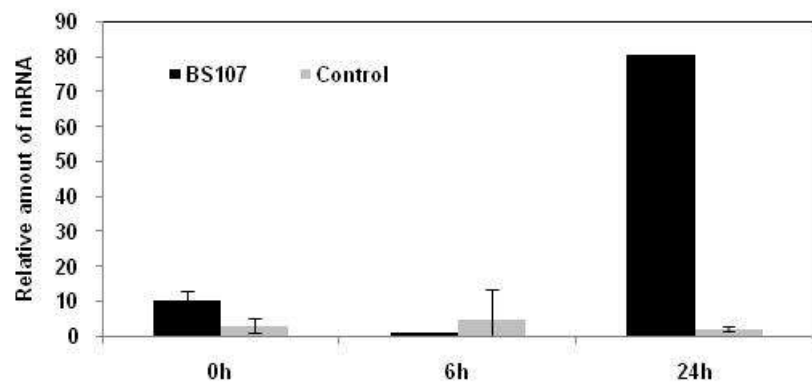
A



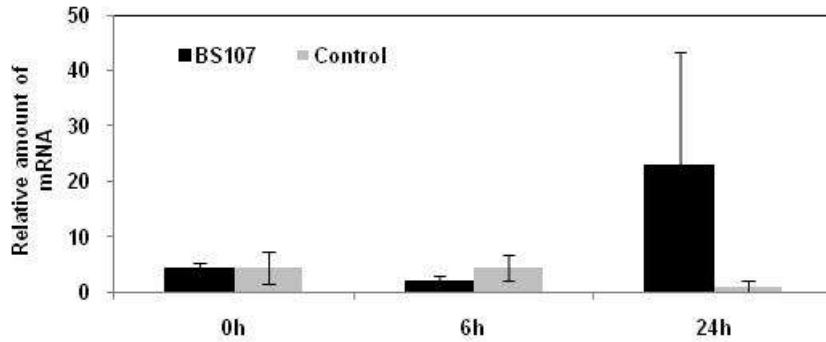
B



C



D



E

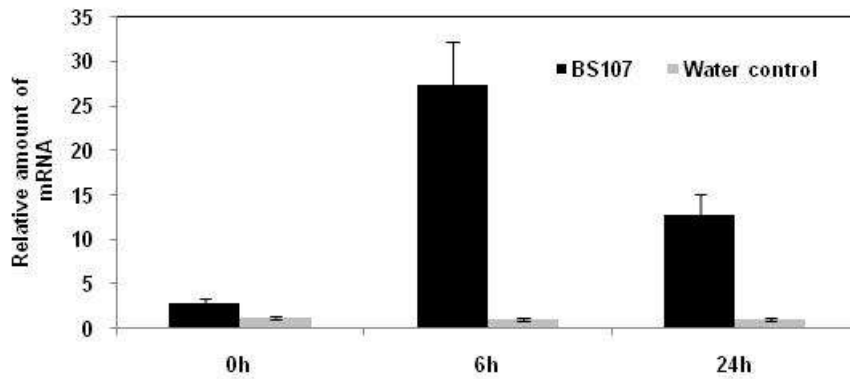


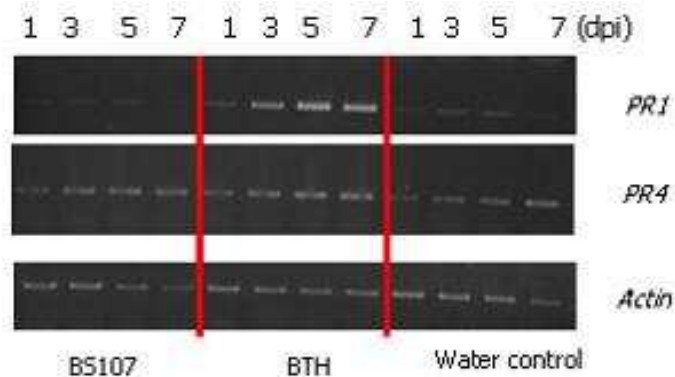
Fig. 1-13. Elicitation of defense-related gene expression by strain BS107 in pepper following pathogen challenge. a) Expression of the indicated defense signaling related-genes(CaPR1,CaPR4,CaPR10, Malate synthase, terpene synthase/cyclase family protein)wasanalyzedbyRT-PCR.

Amplified products were separated by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. The expression of B) Malatesynthase C) terpene synthase/cyclase family protein D)BetvI allergen family protein and E)CaPR1was validated by quantitative RT-PCR. Relative expression was calculated and then normalized to CaActin expression, which was set as 100%. Samples were collected 0h, 6h and 24h after pathogen challenge. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH.

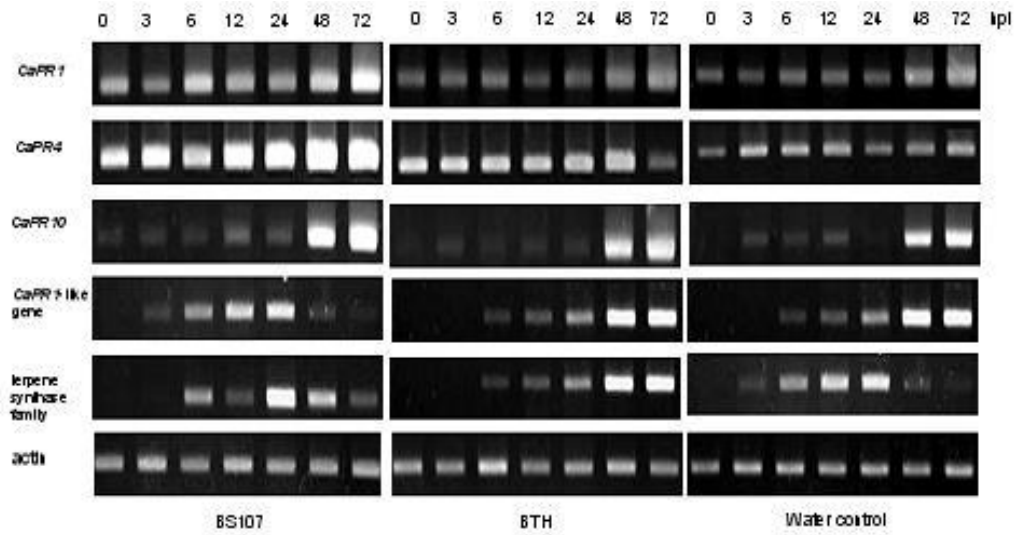
BS107의 한 고추에서 병저항성 신호전달체계 수립

BS107을 처리하고 이후 병원성 세균인 Xav를 접종 후 0시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 그리고 72시간에서 고추잎을 채취하여 RNA를 추출한 후 Oligo-microarray 분석을 통해 선별된 Priming 유전자중 일부 유전자를 대상으로 RT-PCR을 수행하였다. 특히 Defense-related protein containing SCP domain을 암호화 하고 있는 PEPPERS0010160는 PR단백질이 암호화 하고 있는 SCP domain와 blast search 결과 100% 일치하고 있었으며, terpene synthase family를 암호화 하고 있는 PEPPERS0010704 경우에도 아기 장대의 terpene synthase 상당히 높은 유사성을 지닌 것으로 확인 되었다. 이 두 유전자를 포함하여 방어기작에 알려져 있는 대표적인 PR 유전자의 RT-PCR수행결과 Fig. 1-14B 에서 보는 바와 같이 PR10을 제외한 PR4유전자가 Priming 된 유전자로 확인 되었다. 특히 PR1과 PR4 유전자의 경우 병원성 세균이 침입하기 전에는 발현이 되지 않거나 아주 낮은 수준으로 발현되어 있다가 병원균의 침입과 동시에 아주 빠르고 강력하게 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 즉 평상시에는 발현되지 않다가 병원체가 침입할 경우에만 강하고 빠르게 발현되는 것임을 확인 할 수 있었다. 이후 좀 더 명확한 발현정도를 알아보기 위하여 PR1과 PR4 유전자를 대상으로 Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)을 수행하였다(Fig. 1-14C). 그 결과 PR1의 경우 BTH를 처리한 고추잎에서는 RT-PCR결과와 유사하게 항상 높게 발현이 되었으며, *B. thuringiensis* BS107균주를 처리한 잎에서만 0시간 비하여 24시간에서는 12배 이상 높게 발현되었으며, PR4유전자의 경우 BS107균주를 처리한 경우 0시간에 비하여 24시간에서 3배 이상 발현이 되었고, BTH처리한 잎에서도 2배 정도 증폭되어 발현되는 것을 확인 할 수 있었으나 물 처리에서는 0시간과 24시간에서도 발현양의 차이를 볼 수 없었다.

(A)



(B)



(C)

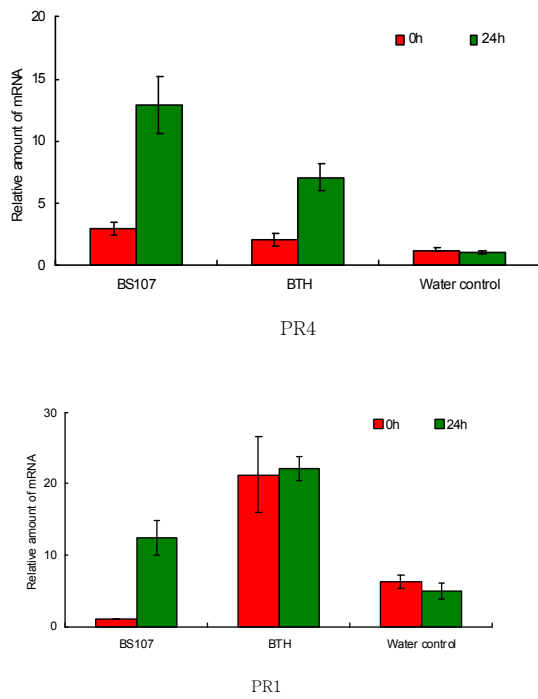


Fig. 1-14. Oligo-microarray에 의해 선별된 priming 유전자의 RT-PCR과 qRT-PCR에 의한 분석 (A) Xav접종 전 *B. thuringiensis* BS107균주에 의한 PR 유전자의 발현 (B) Xav접종 후 *B. thuringiensis* BS107균주에 의한 PR 유전자의 발현 (C) Xav접종 후 *B. thuringiensis* BS107균주에 의한 PR 유전자의 qRT-PCR을 통한 정량 분석

앞선 실험에서 *B. thuringiensis* BS107이 고추 병원성 세균인 Xav에 대하여 저항성을 유도함을 확인하였고, 또한 priming 유전자 발현도 RT-PCR을 통하여 확인되었다. *B. thuringiensis* BS107에 의한 병 저항성 신호전달 체계를 알아보기 위해 기존 고추에서 선행 연구되어진 여러 문헌을 조사하여 17개 유전자들을 병 저항성 신호 전달 체계를 밝히는 지표 유전자로 사용하였다. 식물의 방어 기작에는 크게 3가지 pathway를 통하여 이루어지는데 첫째는 살리실산 (Salicylic acid; SA) 의존적인 pathway, 두번째는 자스몬산 (Jasmonic acid; JA) 의존적인 pathway 세 번째는 에틸렌 (Ethylene; ET) 의존적인 pathway가 있다. Table 1-3 에는 기존에 실험을 통하여 밝혀진 식물 방어 기작의 대표적인 화학물질인 SA, JA, ET에 반응 하는 유전자들을 나열하였고, 이 유전자들이 *B. thuringiensis* BS107의 처리 시 발현되는 패턴을 분석하여 병 저항성 신호 전달 체계를 분석하였다. Table 1-3의 유전자들은 크게 세 그룹으로 나눌 수 있는데 첫 번째는 SA와 ET에 동시에 반응하는 유전자 그룹과 두 번째는 JA와 ET에 동시 반응하는 유전자 그룹, 세 번째는 방어 반응에 있어 항상 발현되어지는 유전자 그룹으로 나누었다. 이들 유전자들을 RT-PCR을 통해 분석을 해 본 결과 Fig. 1-15 에서와 같이 PR4와 Tin1, Tin1-2 유전자의 발현이 BS107 처리에 의해 강하게 나타나고 cyp 유전자도 약하게나마 차이를 나타냈다. 위의 Fig. 1-13, Fig. 1-14 그리고 Table. 1-3에서 확인된 일부 유전자들의 발현 패턴을 조합하여 볼 때 *B. thuringiensis* BS107에 의해 유도된 저항성은 ET과 JA 의존적 유전자들이 빠르고 강하게 발현 되고, ET와 SA에 반응하는 유전자들의 발현도 눈에 띄는 것으로 보아 ET 의존적인 방어 기작이 주가 되는 것으로 생각된다. 한편 SA와 JA는 서로 다른 pathway를 통하여, SA pathway와 JA pathway는 cross talking 한 다는 것이 일반적이다. 위 사실을 종합해 보면 *B. thuringiensis* BS107에 의한 저항성 반응은 JA와 SA 모두를 조절하는 ET에 의존적인 Pathway로 예상되어진다. 이에 대한 정확한 실험은 추후 실험을 통하여 명확히 밝혀 낼 예정이다.

Table. 1-5. *B. thuringiensis* BS107에 의한 ISR 유도 pathway를 찾기 위한 화학물 질처리에 따른 유전자들의 반응

Treatment/ Genes	SA	JA	ET	ABA	H2O2	Nacl	Wound	Expression pattern	Time h
<i>CaCYP1</i>	++		-	++				SA dependent	24
<i>CaAlaAT1</i>	+++	-	+++					SA, ET dependent	12
<i>CabZIP1</i>	+++		+++					SA, ET dependent	6,24
<i>CaGLP1</i>	+++	-	++			-	-	SA, ET dependent	6
<i>CaLTP1</i>	+++	-	++				-	SA, ET dependent	6
<i>CaPF1</i>		+++	+++			++		JA, ET dependent	6
<i>CaODC1</i>	-	+++	++		+++		++	JA, ET dependent	6
<i>CaPR4</i>	-	++	++				++	JA, ET dependent	6
<i>CaTin1</i>	-	-	+					ET dependent	8
<i>CaTin1-2</i>	-	-	+	-	++	-		ET dependent	6
<i>CaBPR1</i>	+	-	+++				-	SA, ET dependent	
<i>CaWRKY-a</i>	+++	+++	+++			++	+++	JA, SA, ET dependent	2
<i>Ca-COX-1</i>	+	++	+		+		+	JA, SA, ET dependent	6
<i>CaPR10</i>	++	+++	+++		+++	++		JA, SA, ET dependent	
<i>CaPKc1</i>	+++	+++	++			+	+	JA, SA, ET dependent	24
<i>Cadh</i>				+		+			6,24
<i>CaPINII</i>	+++	+	+				+	JA, SA, ET dependent	6,24

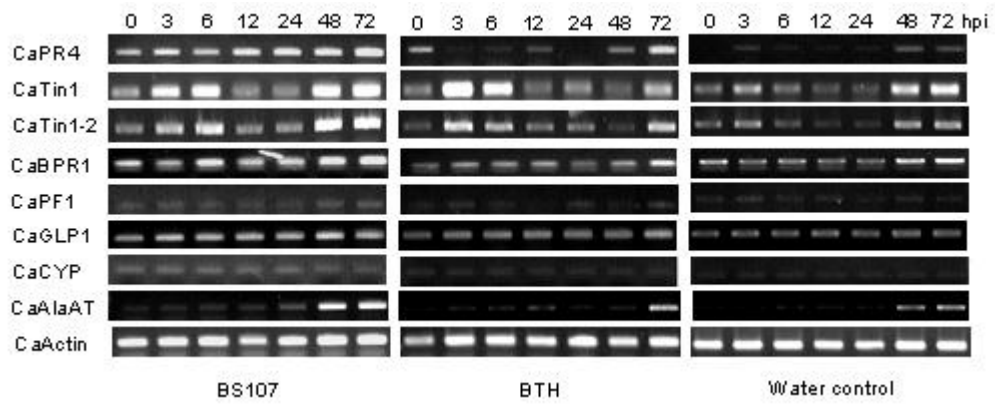


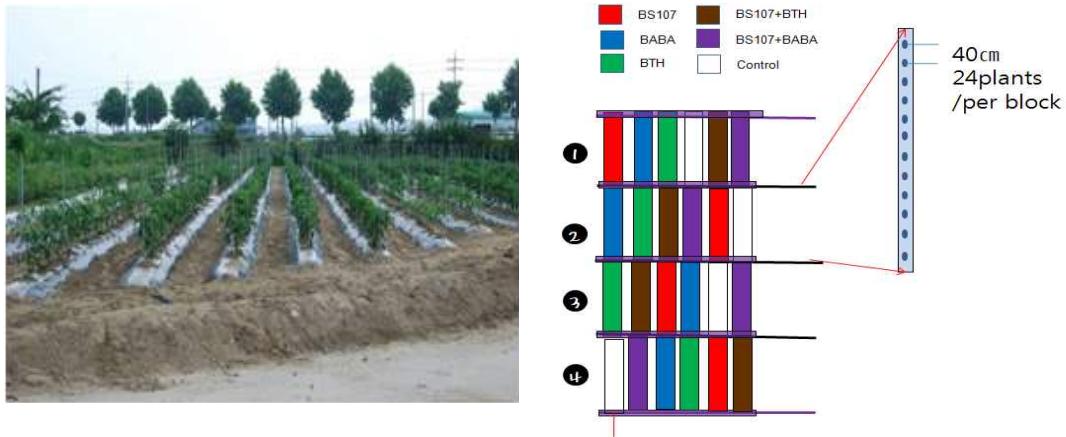
Fig 1-15. *B. thuringiensis* BS107에 의한 유도저항성 pathway를 찾기 위한 여러 유전자들의 발현 조사를 위한 RT-PCR.

3. 고추 포장에서의 ISR 유도 실험

실험 방법

가. 고추 포장에서 ISR 유도 실험을 위한 고추 준비 및 포장 설계

고추 포장에서 ISR 유도 실험을 하기 위하여 표면 살균한 고추 종자를 28℃ 하우스에서 6-8엽이 될 때까지 3주간 배양하였다. 배양한 고추 묘를 포장에 이식하기 전에 OD₆₀₀=1.0 (10⁸ CFU/mL)농도의 BS107 세포 배양액과 0.5mM BTH, 60mM β-aminobutyric acid (BABA), BS107/BTH 그리고 BS107/BABA 혼합 용액에 고추 묘의 뿌리를 한 시간 동안 침지하였다. 침지 한 고추 묘를 아래의 그림에서 보는 것 같이 무작위적으로 계획한 고추 포장에 정식 하였다.



나. 고추 뿌리에 정착한 BS107 population 조사

고추 뿌리에 침지한 BS107균주의 정착 능력을 확인하기 위하여 고추 근권에 존재하는 BS107의 개체수를 조사하였다. BS107만을 선별하기 위하여 균주를 rifampicin에 저항성을 지닐 수 있도록 spontaneous mutant 를 제작하였다. rifampicin 저항성 BS107균주는 rifampicin 100μg/ml이 들어간 TSA배지에서 배양하였다. TSA배지에서 자란 BS107을 모은 후 멸균된 물에 풀어 균의 농도가 OD₆₀₀=1.0 (10⁸ CFU/mL)가 되도록 만들었다. 만들어진 BS107 균액에 고추 묘의 뿌리를 침지 한 후 1시간 뒤 고추를 포장에 이식하였다. BTH, BABA도 동일한 방법으로 처리 후 이식하였다. 이식 후 1시간이 지나 고추의 뿌리를 취하여 고추 뿌리에 붙어 있는 토양을 제거하였다. 토양을 제거한 고추의 뿌리를 0.1 mM MgSO₄ buffer에 담구어 1시간동안 shaking incubator에 배양하였다. 1시간 동안 배양한 고추 뿌리 상등액을 1ml 취

하여 적절한 비율로 희석하고 rifampicin (100 μ g/ml)이 들어간 TSA 배지에 도말하였다. 또한 토양내에 존재하는 다른 세균들의 개체수를 관찰하기 위하여 rifampicin이 들어가지 않은 TSA배지도 동일하게 도말 하였다. BS107균주가 고추 뿌리 내부로 유입되어 생존할 수 있는지 확인하기 위하여 고추 뿌리 내의 세균 개체수를 조사하였다. 이 실험을 위하여 MgSO₄ buffer에 담구어 1시간동안 shaking incubator에 배양한 고추의 뿌리를 5% sodium hypochlorite (NaOCl)으로 30분동안 표면 살균 하고, 70% ethanol으로 30초 동안 표면 살균을 하였다. 이후 멸균된 물로 5차례 걸쳐 NaOCl과 ethanol을 씻어내었다. 표면 살균이 된 고추의 뿌리 1g을 멸균된 막자와 막자사발을 이용하여 곱게 갈아 희석 후 rifampicin (100 μ g/ml)이 들어간 TSA 배지에 도말하였다. 도말된 배지를 30 $^{\circ}$ C incubator에서 하루 동안 배양하였다. colony가 형성된 배지를 꺼내어 colony 수를 센 후 희석 배율을 곱하여 뿌리 1g에 존재하는 BS107균주 및 전체 세균의 수를 측정하였다.

다. 포장에서 BS107에 의한 고추 괴양병에 대한 ISR 조사

고추 포장에서 고추 괴양병에 대한 BS107의 ISR 유도 효과를 확인하기 위하여 고추 정식 후 10일 후부터 고추의 괴양병 유발균인 *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria (Xav)를 접종하였다. Xav의 농도를 OD₆₀₀=1.0 (10⁶ CFU/mL)로 희석하고 바늘이 없는 주사기를 이용하여 고추 잎의 뒷면에 접종하였다. 접종한 고추의 잎은 5일 뒤에 병징을 관찰하였다. 병징은 disease index를 참고를 하여 병의 심각도를 0에서 5로 나누어 환산 하고 통계 프로그램인 JMP software version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC)를 사용하여 각 처리별 차이점을 확인하였다. 본 실험은 BS107 균주 및 Chemical 침지 후 10일, 20일, 30일, 40일 총 4차례 걸쳐 실험을 수행하였다.

라. 포장에서 발생하는 자연 발생적인 병에 대한 ISR 능력 조사

BS107에 의해 유도되는 ISR 반응이 자연발생적인 병에 대해서도 효과를 나타내는지 알아보기 위하여 BS107을 침지 후 80일 뒤에 포장에서 발생하는 여러 가지 병 중 심각하게 발생한 병을 대상으로 병징 조사를 수행하였다. 각 그룹별 각각의 개체마다 병의 발생 정도를 disease index와 동일하게 병의 심각도에 따라 0(병이 발생하지 않음)부터 5(병이 심하게 발생)까지 단계를 두어 점수를 두었다. 각 처리별 병 정도를 점수로 환산하고 JMP software version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC)를 사용하여 통계처리를 하였다.

마. 고추 포장에서 BS107에 의해 유도되는 ISR 반응시 priming 유전자 발현 조사

포장에서 BS107에 의해서 ISR 반응이 유도될때 식물체내의 저항성 유전자들의 발현과 priming 효과를 알아보기 위하여 병 접종 후 0 시간 3 시간 6 시간 때에 잎을 sampling하여 액체 질소에 보관하였다. 액체 질소에 보관된 잎을 막자와 막자사발을 이용하여 곱게 간 후 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA를 대상으로 reverse transcription하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 template로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR을 수행하기 위한 primer는 CaPR1: 5' - ACTTGCAATTATGATCCACC - 3' 과 CaPR1, 5' - ACTCCAGTTACTGCACCATT - 3' CaPR4, 5' -AACTGGGATTTGAGAAGTGCAGC-3' 와 5'-ATCCAAGGTACATATAGAGCTTCC-3'; 그리고 CaTin-1,5'-TGGGCTTATGGGCAGTGGTTAC-3' 그리고 5'- GCATCGTTTGTGTTCTCCTGT GG-3'를 사용하였다. 대조군으로 CaActin primer를 사용하였다. CaActin 5'-TTGGAAGTCTGGTGATGGTGTG-3' 그리고 5'-AACATGGTTGAGCCACCAC TG-3'. PCR 조건은 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분의 조건으로 각각 29 cycle로 PCR을 수행하였다.

qRT-PCR을 수행하기 위해서는 Chromo4 real-time PCR system (BIO-RAD)을 사용하였고, 하나의 처리구마다 세 번씩 반복 수행을 하였으며 각 tube마다 1 x Brilliant SYBR Green QPCR master mix 가 들어가도록 하여 전체 volum 이 20 μ l 되도록 하여 PCR을 수행하였다. qRT-PCR의 수행조건은 다음과 같다: 95°C에서 10 min denaturation, 95°C, 60초, 55°C 30초 72°C도에서 30초 조건으로 40 cycles을 각 처리구마다 3반복씩 수행하였다.

바. BS107에 의한 생육 변화 조사

포장에서 BS107에 의한 ISR 반응에 대한 실험을 진행함과 동시에 BS107 균주에 의한 식물 성장 촉진 능력에 대하여 조사하였다. 본 실험에서는 두 차례에 걸쳐 고추 열매 총량을 조사하여 BS107 과 BTH, BABA 처리에 의한 생산량의 차이를 조사하였다. 첫 번째는 생산량 조사는 고추 묘 정식 후 60일 후에 두 번째 생산량 측정은 고추 묘 정식 후 100일에 생산량을 조사하였다. 생산량 산출은 각 개체에서 고추 열매를 수확하여 무게를 측정하였으며, 측정된 무게를 각 처리별 개체 수를 나누어 한 개체당 생산되는 평균 생산량을 조사하였다.

결과

포장에서 BS107에 의한 유도 저항성 실험

하우스 실험에서 ISR유도 효과가 입증된 BS107이 포장에서도 동일한 효과를 나타

내는지 알아보기 위해 포장에서 고추를 대상으로 ISR 실험을 진행하였다. 첫째로 처리한 BS107과 원래 토양에 존재하는 미생물 군집과 관계, 그리고 BS107이 고추와 상호 관계를 오랫동안 유지 하는 지에 대하여 관찰하였다. 10^8 CFU/mL 으로 처리한 BS107은 Table 1-6에서와 보는 바와 같이 균 침지 후 1시간 뒤에 취한 고추의 근권에 정착한 epiphyte BS107의 개체수는 10^6 CFU/ml 이었다. 동시에 전체 토양내의 균주의 개체수는 10^7 CFU/ml 이었다. BS107과 함께 BTH를 처리한 고추와 BS107균주와 BABA를 함께 처리한 고추의 뿌리에서도 BS107 단독 처리한 것과 동일하게 epiphyte BS107 개체수는 10^6 CFU/ml, 전체 토양내의 균주의 개체수는 10^7 CFU/ml 이었다. 또한 BS107을 처리하지 않고 BTH, BABA, 물처리 에서의 전체 토양내의 균주 수는 10^7 CFU/ml로 동일했다. 이로써 초기 BS107균주가 고추의 뿌리 부위에 정착할 때 토양내 원래 존재하는 다른 균주에 특별한 영향을 주지 않았다는 것을 알수있다. BS107이 식물 내생 균주인지 확인하기 위하여 고추 뿌리 내부의 개체수를 측정 해 본 결과 식물 내부에서 BS107을 발견 하지 못함으로 BS107은 내생 균주가 아닌 것으로 결론지었다. BS107 침지 후 40일 동안 10일 간격으로 균주의 개체수를 측정 는데, 침지 10일 후 BS107과 토양 내 전체 균 수를 측정해 본 결과 균주 침지 한 당일에 측정한 결과에 비하여 BS107균주를 처리한 처리군에서 토양의 전체 균수가 약간 증가한 것을 확인 할 수 있었다. BS107을 단독으로 처리한 것에서는 10^1 CFU/mL 만큼 증가한 것으로 나타났으며 다른 BS107/BTH나 BS107/BABA 복합 처리한 것에도 10^1 CFU/ml 보다는 적지만 약간의 증가를 관찰 할 수 있었다. 실험이 진행된 40일 동안 BS107, BS107/BTH, BS107/BABA 처리군에서 BS107의 정착능력을 관찰 한 결과 시간이 지남에 따라 세균수가 10^6 CFU/mL 수준에서 조금씩 줄어드는 양상을 보였으나 최종 10^5 CFU/mL 수준 정도로 유지 되는 것을 관찰 하였다 동시에 내생 균주 수를 함께 측정해 본 결과 내생 균주는 발견 할 수 없었다. 따라서 BS107은 식물체 내에서 정착하여 살아가는 능력은 없다고 생각한다.

Table. 1-6. Population of root colonized bacteria

Treatment	Population		
	Treated bacteria (cfu/g)		
	Epiphyte	Endophyte	Total bacteria(cfu/g)
Day 0			
<i>B.thuringiensis</i> BS107	6.51 ± 0.12 a	ND	7.40 ± 0.11 a
<i>B.thuringiensis</i> BS107/BTH	6.46 ± 0.04 a	ND	7.28 ± 0.18 a
<i>B.thuringiensis</i>	6.43 ± 0.11 a	ND	7.38 ± 0.09 a

BS107/BABA			
BTH	NT	NT	7.43 ± 0.11 a
BABA	NT	NT	7.29 ± 0.05 a
Control	NT	NT	7.42 ± 0.11 a
Day 10			
<i>B. thuringiensis</i> BS107	7.42 ± 0.29 a	ND	8.06 ± 0.10 ab
<i>B. thuringiensis</i> BS107/BTH	6.96 ± 0.06 a	ND	8.80 ± 0.27 a
<i>B. thuringiensis</i> BS107/BABA	6.76 ± 0.27a	ND	8.14 ± 0.41 ab
BTH	NT	NT	7.96 ± 0.10 ab
BABA	NT	NT	7.80 ± 0.32 b
Control	NT	NT	7.95 ± 0.07 ab
Day 20			
<i>B. thuringiensis</i> BS107	6.47 ± 0.42 a	ND	8.31 ± 0.16 abc
<i>B. thuringiensis</i> BS107/BTH	5.04 ± 0.16 ab	ND	7.59 ± 0.10 c
<i>B. thuringiensis</i> BS107/BABA	5.09 ± 0.10 ab	ND	7.87 ± 0.11 bc
BTH	NT	NT	8.13 ± 0.27 abc
BABA	NT	NT	8.15 ± 0.09 abc
Control	NT	NT	8.21 ± 0.05 abc
Day 30			
<i>B. thuringiensis</i> BS107	6.29 ± 0.18 b	ND	7.90 ± 0.18 abc
<i>B. thuringiensis</i> BS107/BTH	7.09 ± 0.14a	ND	7.70 ± 0.30 bc
<i>B. thuringiensis</i> BS107/BABA	5.80 ± 0.15 c	ND	7.73 ± 0.11 bc
BTH	NT	NT	7.78 ± 0.14 abc
BABA	NT	NT	7.74 ± 0.18 bc
Control	NT	NT	7.67 ± 0.08 c
Day 40			
<i>B. thuringiensis</i> BS107	5.27 ± 0.11a	ND	7.29 ± 0.17a
<i>B. thuringiensis</i> BS107/BTH	4.95 ± 0.15a	ND	7.75 ± 0.15a
<i>B. thuringiensis</i> BS107/BABA	4.64 ± 0.08a	ND	7.89 ± 0.24a
BTH	NT	NT	7.44 ± 0.47a

BABA	NT	NT	7.21 ± 0.22a
Control	NT	NT	7.82 ± 0.25a

포장에서 BS107에 의해 유도된 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*에 대한 고추의 ISR과 자연발생적인 병에 대한 ISR

고추 포장에서 BS107에 의한 ISR유도 여부를 확인하기 위하여 BS107을 침지 10일 후 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) 를 접종하여 병징을 관찰하였다. Fig. 1-16에서 보는 바와 같이 BS107 침지 후 10일째 병 접종 후 병징 관찰 결과 물처리의 병징의 심각성이 4.5를 나타내는 반면 BS107을 처리한 고추에서 발생하는 병징은 정도는 2.5, BS107/BABA 2, BS107/BTH는 1을 나타내었으며 BABA는 3.5, BTH 처리는 2를 나타내었다. BTH처럼 강하게 ISR을 유도하지는 못하였지만 BS107/BTH를 함께 처리한 고추에서는 BS107과 BTH의 상호효과를 볼 수가 있었다. 반면 BTH와 같이 식물 저항성 유도 물질로 알려진 BABA는 BS107과 함께 처리할 경우 BTH와 달리 상호효과가 없었으며 BABA 단독 처리시에도 고추에서는 저항성 유도 능력이 높지 않았다 (Fig. 1-16B). 침지 후 20일 째 Xav를 접종하여 병징을 관찰 한 결과, BS107/BTH, BTH를 처리한 고추 이외에 BS107, BABA, BS107/BABA를 처리한 고추에서는 저항성이 나타나지 않았다. 물처리, BS107, BABA, 그리고 BS107/BABA의 병징이 5를 나타내는 반면 BTH, BS107/BTH 처리구에서는 3.5와 3을 나타냈는데 이는 BTH에 의해 유도된 ISR로 생각된다 (Fig. 1-16C). 이후 침지 후 30일과 40일째에도 ISR반응을 관찰 하였다. 그 결과 30일째 유도 저항성 반응은 물 처리에 비하여 통계학적으로 차이가 나는 처리군이 없었다. 전반적으로 병이 잘 발생하지 않은 가운데 물처리의 병이 2를 나타내었으며 BS107/BABA는 1.5 정도로 나타났으며 BS107, BTH를 포함한 다른 처리 병징도 3을 넘지 않은 수준에서 병이 발생하였다 (Fig. 1-16D). 40일째 병 저항성 반응은 물 처리를 포함함 모든 처리에서 차이를 볼 수 없었다. 모든 처리에서의 병징이 1이하로 전혀 발생하지 않았다 (Fig. 1-16E). 결론적으로 포장상태에서는 BS107, BTH, BABA처리에 의한 ISR이 10일째 까지 나타나지만 그 이후 까지 지속되지 않음을 알수있다.

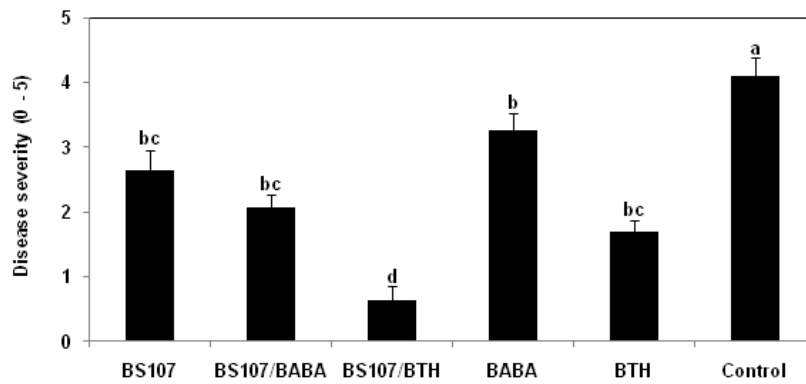
자연발생적 병에 대하여 여러 처리구에서의 ISR 반응을 관찰하였다. 본 포장에서는 전반적으로 cucumber mosaic virus (CMV)에 의한 virus병과 Xav에 의한 궤양병이 포장 전반적으로 발생하였다. BS107, BTH, BABA침지 후 60일째 발생한 두 병징에 대하여 각 개체별로 병징을 조사한 결과 BS107처리에 의한 Xav에 대한 병징은 2를 나타내었고 BS107/BABA, BS107/BTH, BABA, BTH처리에 대한 병징은 각각 1.5, 1.5, 2, 1.5를 나타내었다 (Fig. 1-17A). 반면 물처리는 3을 나타내었다. 전반적으로 커다란 병징의 차이를 나타내지 않았으나 통계학적 분석에 따르면 BS107, BTH, BABA 처리에 따른 유도 저항성 능력은 물처리에 비하여 높게 발생하였다. 또한 CMV 병징에 대한 저항성 유도 반응은 물처리에서 비하여 높게 나타났다.

BS107, BS107/BTH, BS107/BABA, BABA, BTH처리는 각각 1.5, 1.2, 2, 1.5를 나타내었다. 이에 반하여 물처리는 3을 나타내어 다른 BS107, BTH, BABA처리가 저항성 반응을 유도함을 알 수 있었다 (Fig. 1-17B).

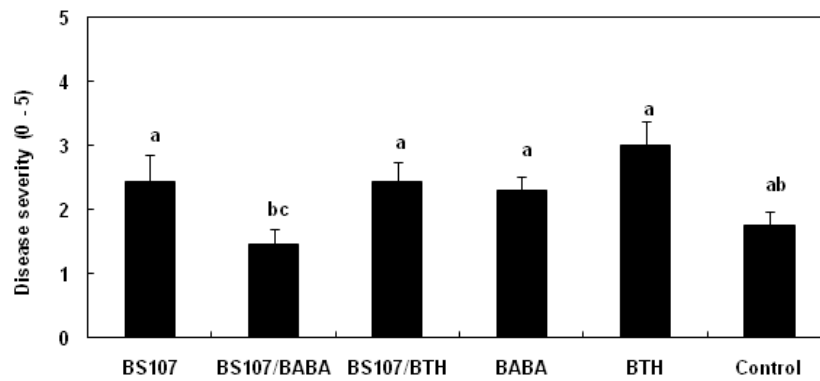
A



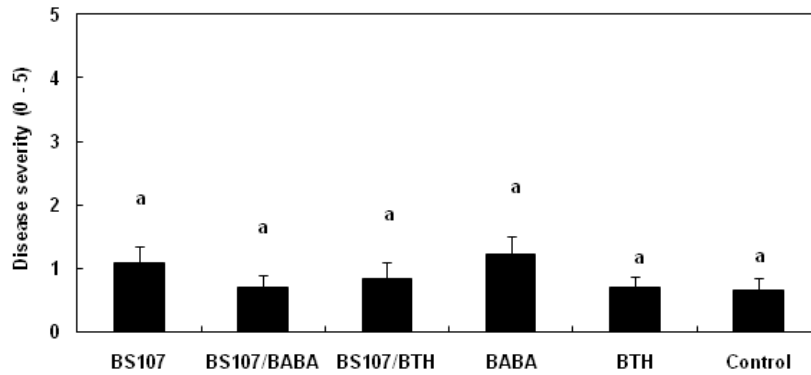
B



C



D



E

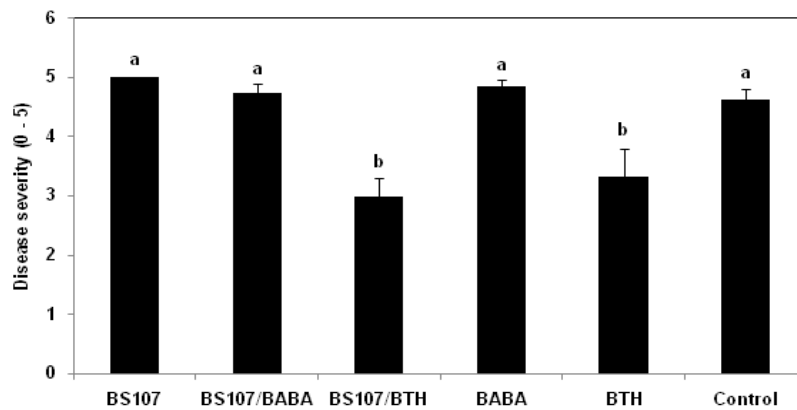
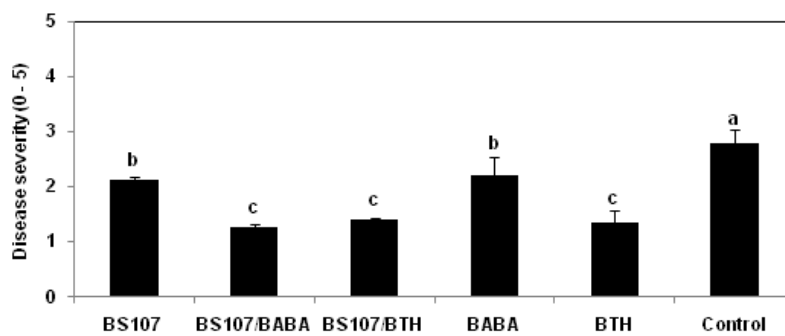
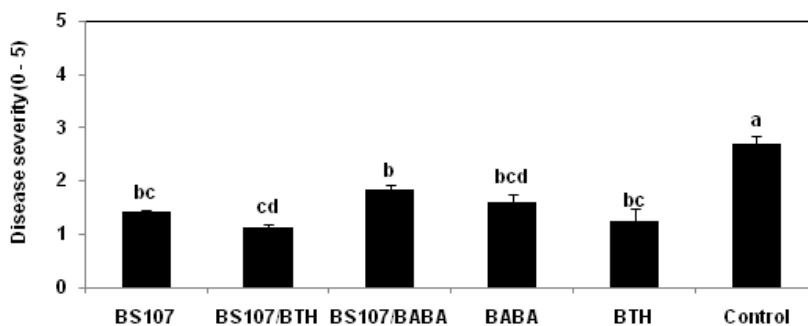


Fig. 1-16 Effect of *B. thuringiensis* BS107 BABA , and BTH on ISR at 40 days after treatment. *B. thuringiensis* BS107 cells were collected and resuspended in 10 mM MgSO₄ to a final density of 10⁸ cfu ml⁻¹ (OD₆₀₀= 1.0) before drenched in the soil. A) Representative photographs taken 0 day and 30 days after transplants. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH and BABA. Disease severity (0 has possibility as biocontrol agents pathogen challenge. B) day 10, C) day20, D) day30, and E) day 40. no symptoms; 5, severe necrosis. Different letters indicate statistically significant differences (P= 0.05). Data represents the means the standard error of the mean.

A



B



C



Bacterial disease symptom

Viral disease symptom

Fig. 1-17 Effect of *B. thuringiensis* BS107 and BTH, BABA on ISR against naturally occurred A) bacterial spot disease, B) viral disease (CMV) at 80 days after treatment. *B. thuringiensis* BS107 cells were collected and resuspended in 10 Mm MgSO₄ to a final density of 10⁸ CFU/mL1 (OD₆₀₀= 1.0) before drenched

in the soil. C) Representative photographs taken at 80 days. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH and BABA. Disease severity (0 - 5) as an indicator of ISR was measured at 80 days after transplant. 0; no symptoms, 5; severe necrosis. Different letters indicate statistically significant differences ($P = 0.05$). Data represents the means the standard error of the mean.

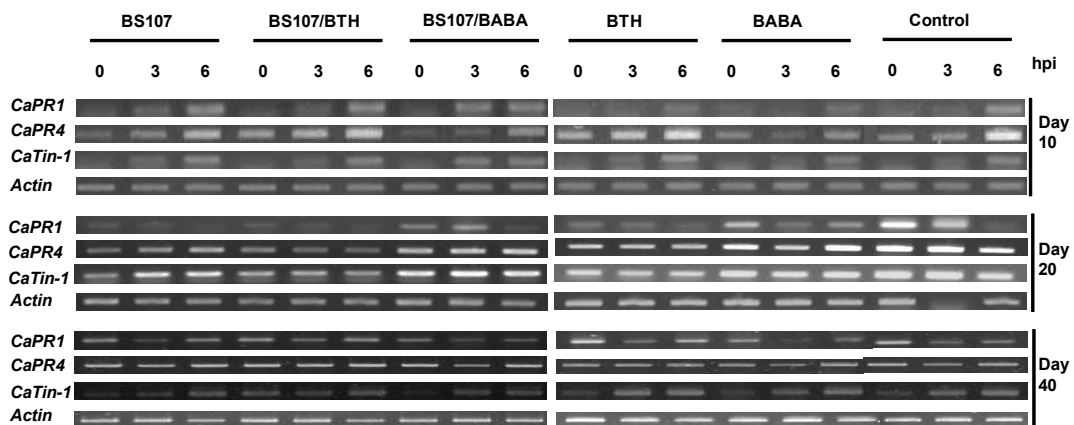
BS107에 의한 ISR이 유도되는 동안 저항성 유전자의 발현 조사

하우스 실험을 통하여 BS107균주에 의해 발현되는 저항성 유전자의 발현이 포장실험에서도 발현되는지 알아보기 위하여 *CaPR1*, *CaPR4*, *Tin-1* 유전자를 대상으로 유전자 발현을 조사하였다. 하우스의 실험과 동일하게 BS107에 의하여 ISR 반응이 일어나는 동안 특정 저항성 유전자의 priming 효과가 있는지 확인하기 위하여 병 접종 후 초기 시간인 0시간 3시간 6시간에 sampling한 고추에서 유전자의 발현을 조사한 결과, 침지 10일 뒤 *CaPR1* 유전자의 발현이 병 접종 3시간과 6시간 후에 BS107, BS107/BTH, BS107/BABA 처리에서 강하게 발현이 되었다. 반면 BTH, BABA 단독 처리에서는 3시간 6시간때에도 물처리와의 차이를 확인 할 수 없었다. Jasmonic acid/ethylen 의존적으로 발현되는 *CaPR4* 유전자의 경우 BS107, BS107/BTH, BTH 처리에 의해 강하게 발현되었다. 병 접종 하자마자인 0시간때에도 BS107/BTH, BTH 처리구 에서 *CaPR4* 유전자의 발현은 물처리에 비하여 강하게 발현되었으며 시간이 지남에 따라 더 강하게 발현 되었다. 또한 BS107 단독 처리구의 경우에는 3시간 후 부터 물처리에 비하여 강하게 발현이 되었다. 반면 BS107/BABA, BABA 처리구에서는 대조구에 비해 강한 발현을 관찰 할 수 없었다. Ethylene 의존적인 *Tin-1* 유전자의 경우 BS107, BS107/BABA 처리에서 3시간 때 부터 물처리 비하여 강하게 발현이 되었으며, BS107/BTH, BTH 처리에서는 6시간때부터 물처리에 비하여 강하게 발현이 되었다 (Fig. 1-18A). 이와 같은 실험을 침지 20일과 40일 후에도 동일한 방법으로 sampling 하여 RT-PCR을 통한 유전자의 발현 패턴 분석과 저항성 유전자의 priming 효과를 관찰 해 보았으나 뚜렷한 priming을 관찰 할 수 없었으며 이 결과는 앞서 알아본 병징 관찰 결과와 일치한다. 병이 적게 발생한 처리구 에서 저항성 관련 유전자인 *CaPR1*, *CaPR4*, *Tin-1*의 발현이 높게 발현이 되었고, 병징 관찰이 어려웠던 20일과 40일에 결과는 각 처리별로 물처리와 비교하여 차이가 나지 않았다.

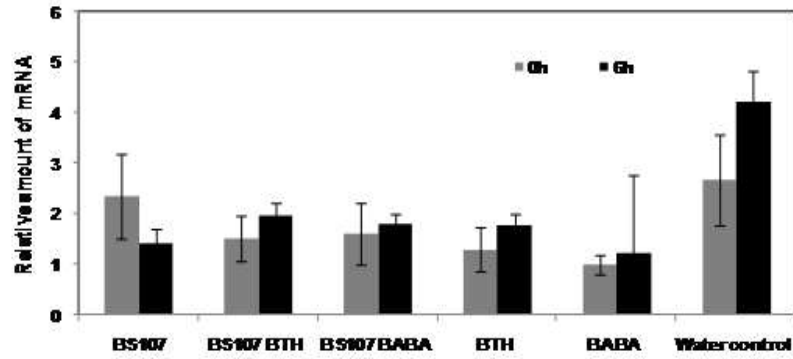
침지 후 10일 뒤에서 BS107에 의한 뚜렷한 ISR효과를 관찰 할 수 있었으므로 이 결과를 좀더 확고히 하고자 *CaPR1*, *CaPR4*, *Tin-1* 유전자를 대상으로 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 수행하였다 (Fig. 1-18BCD). RT-PCR로 확인 했던 결과와 차이를 나타내는 부분은 *CaPR1* 유전자의 발현이었는데 이 전에는 BS107,

BTH 처리구에서 대조군에 비해 발현양이 많은 것으로 보였으나 qRT-PCR 결과에서는 대조군과 차이가 없는 것으로 보인다 (Fig. 1-18B). 반면 *CaPR4* 유전자의 발현은 BS107처리에서 물처리에 비하여 2배정도 높게 발현이 되었으며 BS107/BTH, BTH, BABA 처리에서는 물처리에 비하여 각각 8배, 8배, 4배 높게 발현이 되었다 (Fig. 18C). 즉 BS107을 포함한 BTH, BABA에 의하여 *CaPR4* 유전자가 6시간때에 priming 되어졌다고 판단되어진다. *Tin-1* 유전자의 발현은 모든 처리에서 물처리에 비하여 높게 발현되는 경우가 없었다(Fig. 18D). 즉 *Tin-1* 유전자는 포장실험에서 BS107이나 BTH, BABA 처리에 의해 6시간이내에 priming 효과는 없다고 볼 수 있다. 하우스에서 이뤄진 실험과 달리 포장에서 이뤄진 ISR 실험과 유전자 발현은 분명한 차이를 보여준다. 하우스 실험에서 priming 효과를 보여주던 *CaPR1*과 *Tin-1* 유전자의 priming 효과는 포장실험에서 찾을 수가 없었다. 그러나 *CaPR4* 유전자는 하우스나 포장실험에서 동일하게 priming 효과를 찾을 수 있었으며 다른 유전자에 비하여 강하게 발현되었다. 그러나 하우스 실험과 달리 BTH에 의한 priming 효과도 상당히 강하게 발현이 되는 것을 확인했다. 이는 제어된 하우스 실험과 각종 다양한 환경 변수가 있는 포장 실험에서의 차이로 여겨진다. 그러나 BS107에 의한 *CaPR4* 유전자의 발현이 하우스나 포장에서 동일하게 priming된 효과를 나타내므로 *CaPR4* 유전자를 priming marker 유전자로 사용할 수 있음을 시사한다.

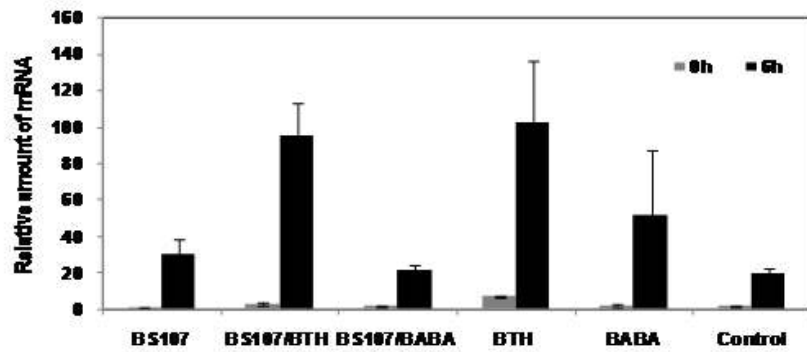
A



B



C



D

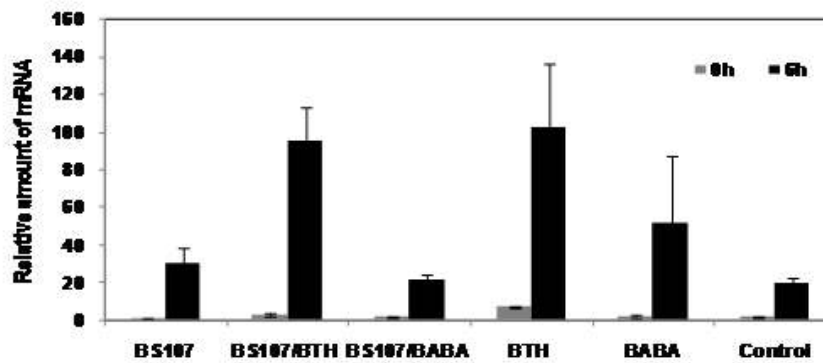


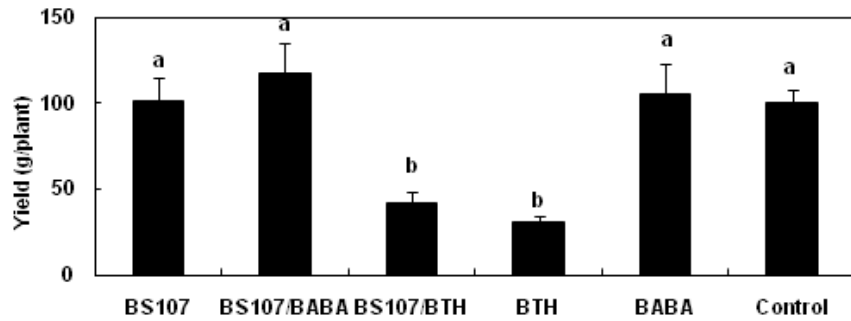
Fig. 1-18. Elicitation of defense-related gene expression by *B. thuringiensis* BS107 in pepper following pathogen challenge. A) Expression of the indicated defense signaling related-genes (*CaPR1*, *CaPR4*, and *Tin1*) was analyzed by

RT-PCR. Amplified products were separated by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. The expression of B) CaPR1, C) CaPR4 and D) CaTin1 was validated by qRT-PCR. Relative expression was calculated and then normalized to CaActin expression, which was set as 100%. Samples were collected 0 and 24 h after pathogen challenge. As a positive control, plants were treated with BTH and BABA.

포장에서 BS107에 의한 식물 성장 측정

식물체에는 한정된 에너지를 이용하여 각기 처한 환경에 따라 성장을 하거나 혹은 저항성 반응등에 에너지를 사용하게 된다. ISR 반응은 저항성 반응의 일종으로서 식물체가 병원체에 대하여 저항성 반응을 유도하는 기작이다. ISR 반응이 일어날 때 일부 식물체에 저항성을 유도하는 ISR 유도 균주는 저항성 반응만을 유도하는 균주가 있고 또한 저항성 반응과 식물 성장 반응을 동시에 유도 하는 균주가 존재한다. 본 실험에 사용된 BS107은 하우스 실험을 통하여 저항성 유도와 동시에 식물 성장 촉진을 유도하는 것으로 알려진 균주이다. 이 BS107이 포장실험에서도 하우스 실험과 동일하게 식물 성장과 ISR 반응을 동시에 유도 하는지 알아보기 위하여 두 번에 걸쳐 고추의 생육 조사를 실행하였다. 첫 번째는 고추 열매가 열리기 시작하는 초기 시점과 두 번째는 고추 열매가 한창 열리는 시기에 고추 각 처리별 고추 수확량을 측정하였다. 그 결과 고추 열매가 열리는 초기 시점에서의 고추의 수확량은 BS107/BTH, BTH 처리를 제외한 모든 처리에서 물처리와 차이를 보이지 않았다. 물처리를 포함한 BS107, BABA처리에서는 각 개체당 100g의 수확량을 보였으나 BS107/BTH, BTH 처리에서는 그 절반인 50g의 수확량을 보여주었다 (Fig. 1-19A). 두 번째 수확량을 측정 한결과 모든 처리에서 차이를 보이지 않았다. BS107, BTH, BABA, 물처리 까지 각 처리의 각 개체마다 평균 250g의 수확량을 보여주었다. BTH 또한 물처리나 BS107과 비교하여도 동일하게 평균값을 보여주었다 (Fig. 1-19B). 이 결과는 BS107처리는 하우스 실험과 달리 포장에서 식물 성장 촉진에는 영향을 미치지 않음을 확인 할 수 있었다. BTH 또한 시간이 장기간 지나면 저항성 효과가 사라짐과 동시에 생육이 정상 상태로 진전됨을 알려주는 결과이기도 하다.

A



B

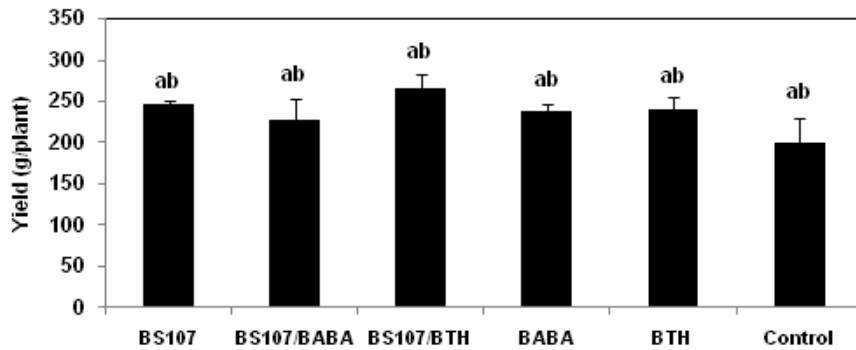


Fig. 1-19. Effect of *B. thuringiensis* BS107, BABA and BTH, on plant growth for 80 days after treatment. *B. thuringiensis* BS107 cells was collected and resuspended in 10 mM MgSO₄ to a final density of 10⁸ CFU/mL (OD₆₀₀= 1.0) before drenched in the soil. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH. A) early stage and B) late stage fruit yield was assessed at day 50 and day 80 after inoculation with strain BS107 on pepper root. a, b and c in A and B indicate statistically significant differences as compared to water-treated control plants (P = 0.05). Data represents the means plus the standard error of the mean.

4. *B. thuringiensis* BS107의 유도저항성 관련 세균의 결정인자 탐색

고추 식물에서 유도 저항성 균주로 선발된 *B. thuringiensis* BS107의 유도 저항성

물질을 탐색하기 위해 *B. thuringiensis* BS107의 돌연변이체를 만들었다. *B. thuringiensis* BS107균주의 돌연변이체를 만들기 위해 *Bacillus*종의 특이적인 Tn10 transposon을 가지고 있는 pAW068을 이용하였다. pAW068 벡터의 transposon은 28°C에서는 복제만 되고 37°C에서는 bacterial chromosome내로 무작위적으로 들어가는 기능을 지니고 있다. 선별을 위해 chloramphenicol 7.5µg/ml과 spectinomycin 100µg/ml을 사용하여 2000여개의 돌연변이체를 확보하였다. (Fig. 1-20)

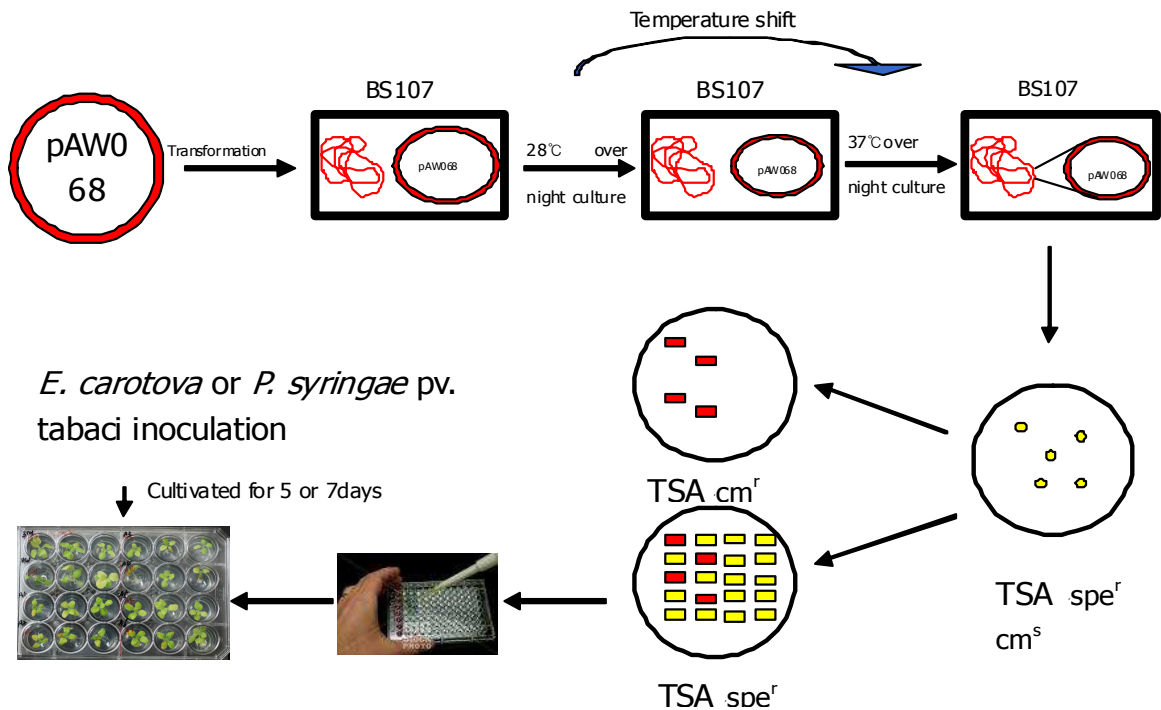
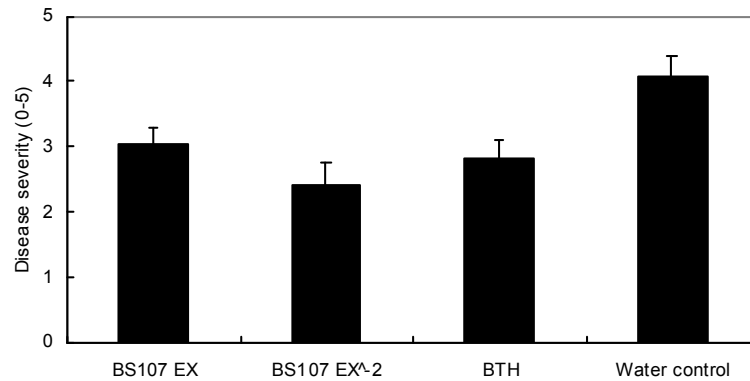


Fig. 1-20. pAW068 온도 특이적인 벡터를 이용한 *B. thuringiensis* BS107균주의 무작위적 돌연변이체 제작과 이를 이용한 저항성 유도 물질 관련 유전자의 탐색 모식도

고추에서 저항성을 유도하는 물질을 알아보기 위해 위의 Fig. 1-22와 같은 방법으로 2000여개의 돌연변이체를 확보하였다. 선별된 돌연변이체를 실험실내에서 선별이 가능하도록 24-multiwell microtitre 플레이트와 담배(*Nicotiana benthamiana*)를 대상으로 실험을 수행하였다. 표면 살균한 담배 종자를 발아 시킨 후 MS agar가 채워진 24-multiwell microtitre 플레이트에 담배 종자를 이식하였다. 이후 2주 동안 식물 성장 배양기에 배양하였다. 4엽 정도의 담배뿌리에 *B. thuringiensis* BS107 및 그 돌연변이체를 10⁸ CFU/mL 농도로 접종한 후 7일간 배양하였다. 이렇게 배양된 담배에 담배 병원성 세균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*와 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 두 종류의 병원균을 잎에 10⁶ CFU/mL 농도로 접종한다. 담배 잎에 접종된 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 병은 길게 30시간 이내에 병

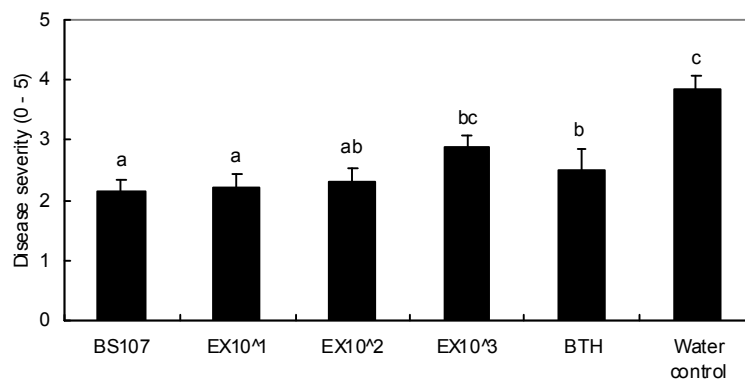
이 발생되어 빠른 시간 내에 병징 관찰 및 선별이 가능하다. 담배 세균성 들불병균인 *P. syringae* pv. *tabaci*는 보통 5일 이후에 병이 발생한다. *B. thuringiensis* BS107균주가 담배에서도 병원성 세균에 대하여 저항성을 유도하는지를 알아보기 위한 실험을 수행 하였다(Fig. 1-21).

A



E. carotovora infection

B



P. syringae pv. *tabaci* infection

Fig. 1-21. Effect of *B. thuringiensis* BS107 , and BTH on ISR against A) *E. carotovora* and B) *P. syringae* pv. *tabaci*. *B. thuringiensis* BS107 cells were collected and resuspended in 10 mM MgSO₄ to a final density of 10⁸ CFU/mL (OD₆₀₀= 1.0) before drenched on the roots. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH. Disease severity (0; no symptoms, 5; severe necrosis.) Different letters indicate statistically significant differences (P= 0.05). Data represents the means the standard error of the mean.

Fig. 1-21 에서 보는것과 같이 *B. thuringiensis* BS107 균주는 담배에서도 고추와 동일하게 병원성 세균에 대하여 저항성이 유도하였으며, 서로 다른 병원성을 지닌 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와 *P. syringae* pv. *tabaci*에 대해서도 저항성을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 고추 ISR 유도 균주인 *B. thuringiensis* BS107는 광범위 기주를 가질 수 있는 가능성을 지닌 것으로 볼 수 있으며, 24-multiwell microtitre 플레이트에서 담배를 이용한 실험도 가능함을 입증하였다. Fig. 1-21에서 입증된 실험 방법에 의거하여 *B. thuringiensis* BS107의 돌연변이체를 만들고 병원성 균주에 대하여 저항성이 유도 되지 않는 돌연변이체를 선별하는 실험을 진행하였다. Fig. 1-20과 같은 방법으로 spectinomycin 저항성을 지닌 *B. thuringiensis* BS107의 돌연변이체를 2000여개 이상 만들어 내었고 이를 96-multiwell microtitre 플레이트에 배양하여 보관하고 실험에 이용하였다. 선별된 2000여개의 *B. thuringiensis* BS107의 돌연변이체는 24-multiwell microtitre플레이트에 배양된 담배의 뿌리에 10^8 CFU/mL농도로 관주 하였고 7일이 지난 후 담배 병원성 세균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와 *P. syringae* pv. *tabaci*를 10^6 CFU/mL농도로 잎에다 접종을 하여 30시간 과 5일 이후에 *E. carotovora*와 *P. syringae* pv. *tabaci*에 대한 병징을 관찰 하는 것으로 저항성이 유도 되지 않는 *B. thuringiensis* BS107의 돌연변이체를 선별하였다 (Fig. 1-22).



Fig. 1-22. 제작된 *B. thuringiensis* BS107돌연변이체들을 통한 저항성 유도물질을 선별하기 위한 24-multiwell microtitre플레이트에서의 선별과정. 비교균으로 항상 저항성이 유도되도록 BTH와 저항성이 유도 되지 않는 물처리균, *B. thuringiensis* BS107의 야생형(WT)과 비교하여 물 처리균과 비슷하게 병이 나는 *B. thuringiensis* BS107-B8 돌연변이체 균주의 선별 그림.

Fig. 1-22에서 보는 것과 같이 약 2000여개의 *B. thuringiensis* BS107돌연변이체들을 전 처리 하고 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와 *P. syringae* pv. *tabaci*에 대한 저항성을 유도하지 못한 돌연변이체를 선별한 결과 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 대해서 100여개가 선별되었으며, *P. syringae* pv. *tabaci*에 대하여 약

80여개가 선별이 되었다. 이 중 이 두 병원성세균에 대하여 공통적으로 저항성 능력이 결여된 균주는 30여개 였다. 이렇게 선별된 *B. thuringiensis* BS107돌연변이체들이 고추에서도 Xav에 대한 유도 저항성 능력이 사라졌는지를 확인하기 실험을 수행 하였다. 토양에 이식한 고추의 뿌리에 선별된 돌연변이체를 10^8 CFU/mL농도로 관주한 후 7일간 배양하였다. 이후 고추 잎에 병원성 세균인 Xav를 접종하여 5일 동안 병징을 관찰하였다. *B. thuringiensis* BS107 돌연변이체들을 처리한 고추와 *B. thuringiensis* BS107의 야생형(WT)균주를 처리한 고추 , BTH를 처리한 고추 그리고 물 처리를 한 고추와 비교하여 유도저항성이 사라진 *B. thuringiensis* BS107 돌연변이체들을 선별하였다. 그 결과 Fig. 1-23에서와 같이 담배에서 선별된 *B. thuringiensis* BS107 돌연변이체들 중 일부가(1-B5, 1-B8, 1-C6, 그리고 1-E4) 고추에서도 병원성 세균에 대한 저항성 유도 능력이 상실된 것을 확인할 수 있었다. 이런 가능성을 토대로 더 많은 돌연변이체를 확보하여 *in vitro* 에서 유도저항성 능력을 상실한 돌연변이체를 선별하는 실험을 계속해서 진행하였으나 mutant 제작 과정 중 vector의 불안정함과 토양에서 선별된 BS107균주의 불안정성에 의해 mutation된 위치가 검증되지 않았다.

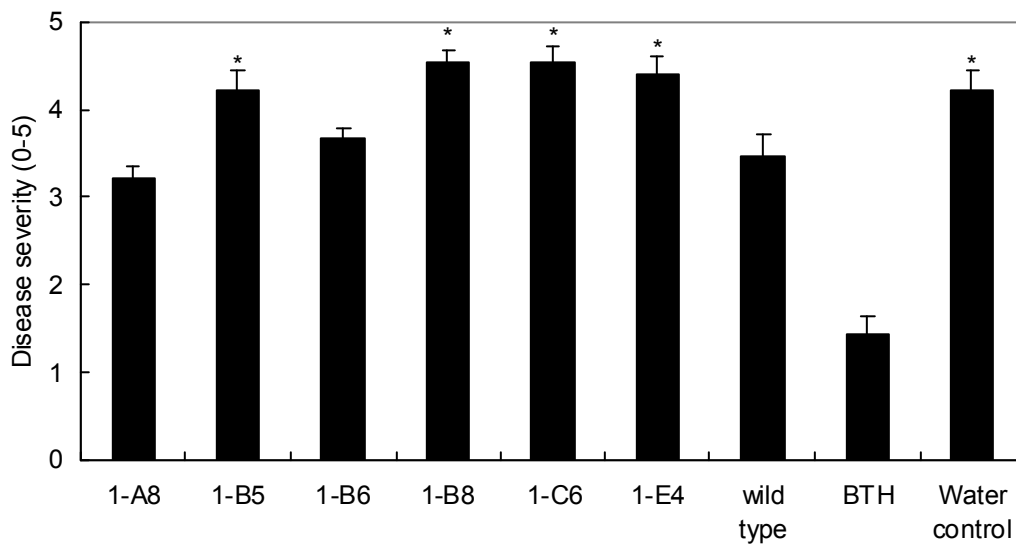
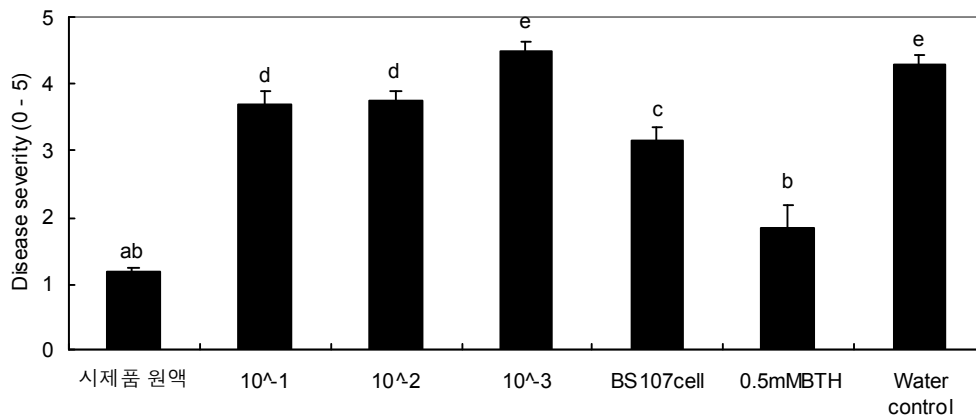


Fig. 1-23. 24공 플레이트에서 배양된 담배를 이용하여 다량 확보된 *B. thuringiensis* BS107돌연변이체들의 고추의 병원성 세균인 Xav에 대한 저항성 유도 실험. *; *B. thuringiensis* BS107 야생형(WT)처리에 비하여 병이 심하게 발생된 고추

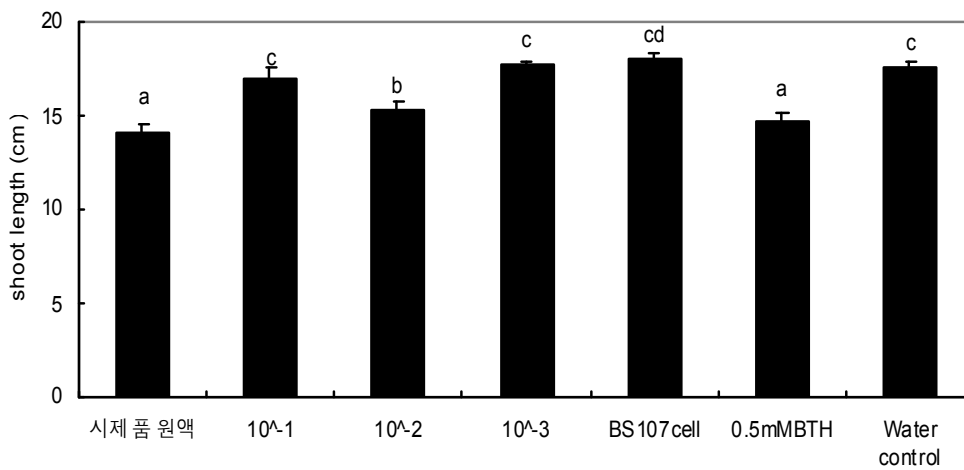
선발된 *B. thuringiensis* BS107의 액상 시제품을 이용한 토양에서의 유도저항성 실험

고추에서 Xav에 대한 유도저항성 능력이 검증된 *B. thuringiensis* BS107균주를 이용하여 그린바이오테크에서 액상 미생물제제를 만들었고 이를 이용하여 고추의 병원균인 Xav에 대한 유도 저항성 실험을 수행하였다.

A



B



C

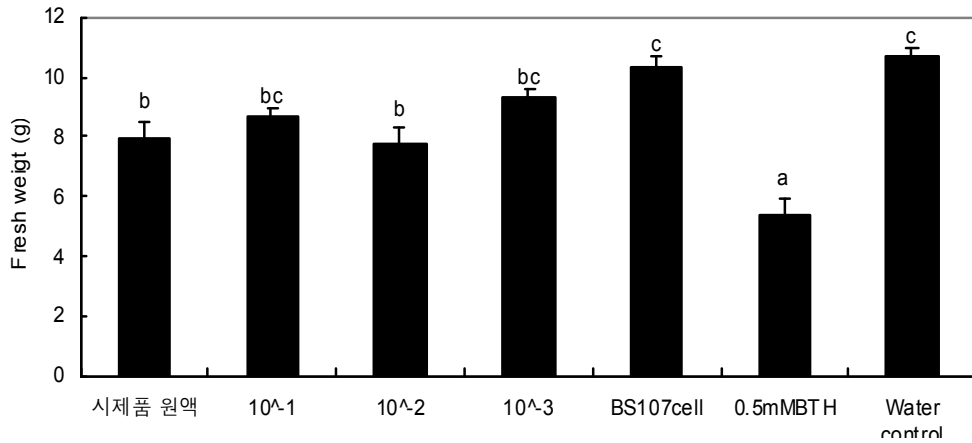


Fig. 1-24 제품화 된 *B. thuringiensis* BS107균주 제제의 유도저항성과 식물 성장 촉진 검증 실험 A) Xav에 대한 유도 저항성 실험. Disease severity를 0에서 5의 범위로 정해놓고 병징이 낮음을 0 병징이 심각해질수록 높은 수치로 놓아 5까지 측정하였다. B)와 C)는 제품화 된 *B. thuringiensis* BS107균주에 의한 식물 성장 촉진 능력 실험으로 B)식물 무게 C) 식물 길이를 의미하며 통계학적인 구분에 의해 a,b,c,d,e로 구분하였다.

B. thuringiensis BS107균주의 시제품 원액과 이를 10배, 100배, 1000배 희석한 용액, *B. thuringiensis* BS107(WT)균주 배양액, BTH 그리고 물 (negative control)에 고추의 뿌리를 30분간 침지한 후 토양에 이식하여 일주일간 배양하였다. 이후 고추 점무늬병 세균인 Xav를 바늘이 없는 주사기를 이용하여 10⁶ CFU/mL 농도로 잎에 접종하여 병징을 관찰한 결과 Fig. 1-24A에서와 같이 시제품의 원액을 사용하였을 경우는 BTH 처리시 보다 낮은 병징이 관찰됨으로써 저항성이 확실히 유도 되어짐을 확인 할 수 있었다. 그러나 희석되어진 시제품 용액을 사용시에는 유도 저항성이 이루어지지 않았다. 또한, 식물성장 능력을 측정하기 위하여 Fig. 1-24B 와 C처럼 각 처리에 따른 식물체의 무게와 길이를 측정한 결과 시제품 원액을 사용시에는 BTH처리와 유사한 성장을 보여주었다. 그러나 *B. thuringiensis* BS107 배양액을 처리한 경우 시제품에 비해 식물 생장이 증가하였다. 이것은 현재 제품화 하는 과정이며 여러 가지 형태로 제품화 가능성이 있으므로 여러 조건들을 다양하게 만들어 실험을 진행한다면 식물 성장 저해를 하지 않으면서 저항성을 유도하는 조건을 찾을 수 있을 것이다.

5. BS107로 부터 ISR 유도 대사물질의 분리

ISR 유도 대사물질을 분리하기 위하여, BS107을 rhifampicin이 포함된 tryptic soy broth (TSB)에서 2일동안 배양하였다. 균주 배양액을 20분동안 10,000 g으로 원심 분리를 수행하여 세포 제거 후 상등액만 회수 하였다. 이후 상등액에 두 배 부피의 ethyl acetate를 처리하여 물질을 추출하였다. Organic phase의 물질은 40°C에서 evaporator를 이용하여 건조시킨 뒤 80% chloroform 과 20% methanol 혼합 용액에 녹였다. 80% chloroform 과 20% methanol로 slurry-packing 된 silica gel이 들어 있는 glass column (15 mm or 300 mm in length)에 2배 volume의 solvent를 넣고 씻어 내었다. 각 단계마다 5%(v/v)의 methanol의 비율을 높여 진행하였다. 각 단계에서 분리된 물질들을 다시 40°C에서 evaporator를 이용하여 건조시켰고 그 물질을 이용하여 ISR bioassay를 수행하였다. ISR 활성 물질이 포함된 fraction은 Sephadex LH-20 column chromatography을 수행하였다. Sephadex LH-20 column chromatography수행하여 얻은 물질로 다시 ISR 실험을 수행하였다. ISR 활성이 나온 fraction은 reversed phase-prep-HPLC (Dionex P680 dual pump, USA)와 NMR을 수행하여 구조를 밝혔다.

***B. thuringiensis* strain BS107 culture fluid로부터 분리된 ISR 유도 물질을 이용한 Bio assay.**

BS107으로 부터 분리된 2-aminobenzoic acid (2-ab)의 ISR 능력을 확인하기 위하여 bioassay를 수행하였다. 본 실험을 위하여 24 multi-well systems과 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NC를 도입 하였다. 또한 2-aminobenzoic acid의 analog인 3-aminobanzoic acid (3-ab) and 4- aminobenzoic acid (4-ab)도 같은 방법으로 Bio assay를 수행하였다. Murashige & Skoog salt (MS) nutrient agar가 들어 있는 24 multi-well에 표면 살균하여 발아된 *Nicotiana tabacum* cv Xanthi NC.종자를 이식하여 2주 동안 배양하였다. 2 주후 2-aminobenzoic acid, 3-aminobanzoic acid (3-ab) and 4- aminobenzoic acid를 10nM, 10uM, 1mM의 농도로 담배 뿌리에 관주하였다. 일주일 후 담배의 병원균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*를 10^6 CFU/mL의 농도로 담배 잎에 접종하였다. 이후 24시간 이내 병징을 disease index를 기준으로 하여 병징을 측정하였다. 비교군으로 0.5 mM BTH를 사용하였으며 동일한 방법으로 병징 조사를 수행하였다.

하우스에서의 BS107에서 분리된 2-aminobenzoic acid에 의한 고추와 담배에서의 ISR 반응

하우스에서 BS107에서 분리된 2-aminobenzoic acid와 이성질체인 3-aminobenzoic acid, 4-aminobenzoic acid의 ISR능력을 검증하기 위해 *N. tabacum* 와 pepper를 이용하여 ISR 실험을 진행하였다. 고추와 담배는 하우스에서 2주간 배양한 개체를 사용하였으며, 담배는 각 물질마다 10 nM, 10 uM, 1 mM을 뿌리에 5 ml씩 접종하였으며, 고추는 각 물질별로 10 uM, 50 uM, 100 uM, 500 uM, 1 mM 그리고 10 mM을 5 ml씩 관주하였다. 비교군으로 BS107 균주 배양액과 0.5 mM BTH를 사용하였다. 각 물질을 뿌리에 관주 후 1주일 뒤 담배에는 담배의 병원균인 *E. carotovora* subsp. *carotovorum* SCC1 와 고추의 병원균인 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (OD₆₀₀=0.01)를 접종하였다. 이후 앞의 ISR 병징관찰과 동일하게 disease index를 참고로 하여 ISR 유무를 관찰하였다.

ISR 반응 동안 일어나는 유전자의 발현 조사

담배에서 BS107에 의해서 ISR 반응이 유도 되어질때 식물체내의 저항성 유전자들의 발현도와 Priming 효과를 알아보기 위하여 2-aminobenzoic acid처리 후와 병접종 후 0시간 3시간 6시간때에 병접종한 잎을 sampling하여 액체 질소에 보관하였다. 액체 질소에 보관된 잎을 막자와 막자사발을 이용하여 곱게 간 후 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출 하였다. total RNA를 reverse transcription하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR을 수행하기 위한 primer는 5'-AAT ATC CCA CTC TTG CCG-3' (PR1a-F) 와 5'-CCT GGA GGA TCA TAG TTG-3' (PR1a-R). PR1b, 5'-ATC TCA CTC TTC TCA TGC-3' 와 5'-TAC CTG GAG GAT CAT AGT-3'; PR1c, 5'-CTT GTC TCT ACG CTT CTC-3' 와 5'-AAC ACG AAC CGA GTT ACG-3'; PR2, 5'-ACCATCAGA CCAAGATGT-3' 와 5'-TGGCTAAGAGTGGAAGGT-3'; PR4, 5'-ATGGTTGGAACCTCCGGA-3'와 5'-TCCTGATCTCTCTGCTAC-3'; PR5, 5'-ATGAGAAAGACCCACGTC-3'와 5'-ATGCCTTCTTTGCAGCAG-3'; PR6, 5'-ATGCCACAATCTCAACCA-3' 와 5'-ACCTAATGCAGCCCGAAT-3'; S A R 8 . 2 , 5 ' - C C T T G C C T T T C T T T G G C T - 3 ' 와 5'-GACATTTAGGACATTTGCTGC-3'를 사용하였다. 대조군으로 Actin Primer를 사용하였다. Actin 5'-TGGACTCTGGTGATGGTGTC-3' and 5'-CCTCCAATCC AAACACTGTA-3'. PCR 조건은 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분의 조건으로 각각 29 cycle로 PCR을 수행하였다. 확인은 2% agarose gel에서 수행하였다

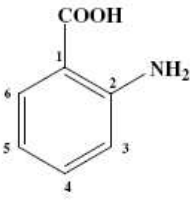
Antimicrobial activity of 2-,3-,4-aminobenzoic acid

2-,3-,4-aminobenzoic acid의 ISR 실험을 위해서 세 물질의 병원성 세균에 대한 직접적인 영향을 미치지 알아보기 위해 antimicrobial activity를 측정하였다. antimicrobial activity는 Luria Bertani agar (LB agar)에서 수행하였으며, 그 방법으로는 지름 1 cm disk위에 10 mM, 1 mM, 10 uM 그리고 100 nM의 2-,3-,4-aminobenzoic acid를 떨어뜨렸다. 이후 disk를 충분히 말리고 담배와 고추의 병원균인 *E. carotovora* subsp. *carotovorum* SCC1 와 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*가 도말된 LB agar plate 위에 disk를 올려놓고 24시간동안 30°C incubator에서 배양한다. 이후 disk 주변에 clear zone을 관찰한다.

BS107에서 ISR 반응 유도 인자의 발견

BS107균주는 하우스와 포장실험을 통하여 고추에 ISR 반응을 유도하는것을 입증하였다. ISR을 유도함에 있어서 BS107균주 지닌 ISR 유도 인자가 무엇인지 알아보기 위하여 물질 분석을 진행하였다. BS107 배양 배지에서 BS107 세포를 제거한 배양 상등액을 이용하여 몇 단계의 분리 작업을 진행하였다. Q-TOF MS 분석에서 (M-H)⁺ 136.0390 특정 위치에서 peak이 확인됐다 (Fig. 1-25). 분리된 대사 물질을 GC/MS 분석을 통하여 분석을 하였다. EI 분석에서 137 위치에서 M+Peak이 나왔고 CI 분석에서 138 위치에서 (M+H)⁺ peak이 나왔다 (Fig. 1-26) 추후 MASS spectrum분석을 통하여 2-aminobenzoic acid와 98% 상동성이 있음을 밝혀내었다. 1H NMR 분석을 통하여 Table 1-7. 와 같은 protons를 분석하였으며 다른 benzene protons 위치를 δ 7.86 (1H, dd), δ 7.31 (1H, td), δ 6.85 (1H, dd), 그리고 δ 6.73 (1H,td)으로 확인했다. 모든 분석을 통하여 정확히 2-aminobenzoic acid임을 확인했다.

Table. 1-7 NMR data of 2-aminobenzoic 1 acid isolated from BS107

Structure	Position	δ ¹ H (ppm)	Multiplicity	Coupling constant (Hz)	
				³ J	⁴ J
	3	7.86	1H, dd	7.2	1.2
	4	7.31	1H, td	7.2	1.2
	5	6.85	1H, dd	7.2	1.2
	6	6.73	1H, td	7.2	1.2

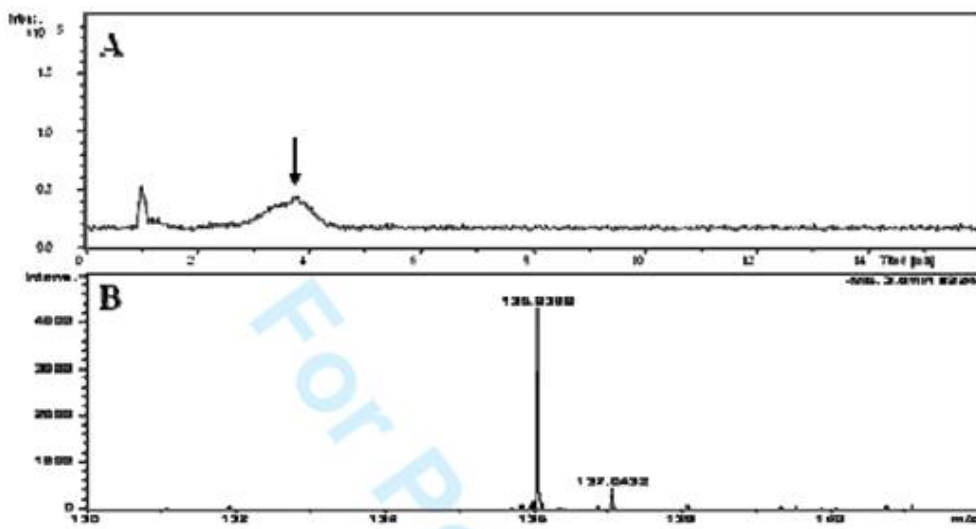


Fig. 1-25. LC Q-TOF MS total ion chromatogram (A) and spectrum (B) of 2-aminobenzoic acid isolated from. The arrow symbol represents the peak of 2-aminobenzoic acid.

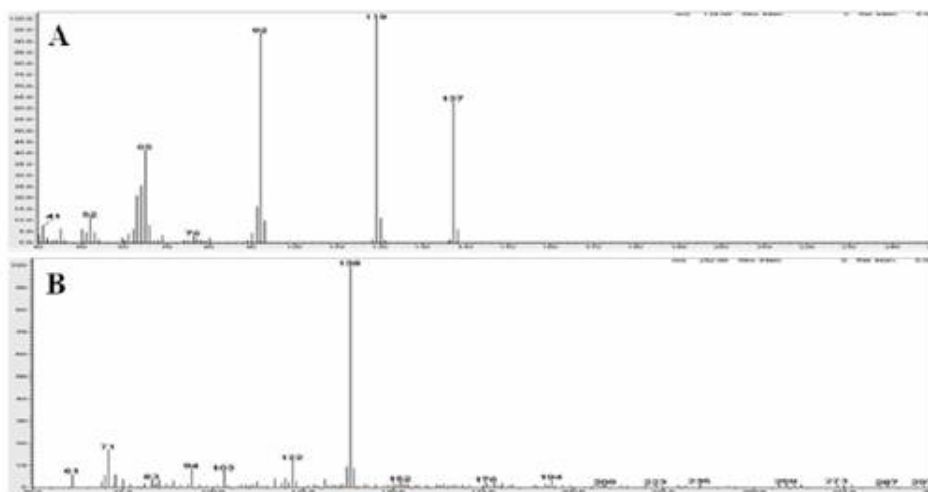


Fig. 1-26. GC mass spectrum of 2-aminobenzoic acid isolated from BS107 in EI (A) and CI (B) modes. HPLC-MS chromatograms of reaction mixtures: (A) *B. thuringiensis* strain BS107 culture filtrate ; (B) 2-animobenzoic acid were identified on the basis of retention times and characteristic MS/MS spectra by comparison to synthetic standards.

BS107으로부터 분리된 2-aminobenzoic acid의 병원성 세균에 대한 antimicrobial activity

BS107으로부터 분리된 2-aminobenzoic acid의 병원성 세균에 대한 직접적인 저해 능력이 있는지를 알아보기 위하여 고추의 병원성 세균인 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*와 담배의 병원성 세균인 *E. carotovora* sbsp. *carotovora*를 대상으로 antimicrobial activity를 측정하였다. 또한, 2-aminobenzoic acid의 유사 물질인 3-aminobenzoic acid와 4-aminobenzoic acid (Fig. 1-27)를 포함하여 antimicrobial activity를 측정하였다. 그 결과 2-,3-,4-aminobenzoic acid는 두 개 병원성 세균에 대하여 직접적인 저해능이 없었다 (Fig. 1-28). 이 결과를 토대로 ISR 실험을 진행함에 있어 문제가 없음을 확인 할 수 있었다.

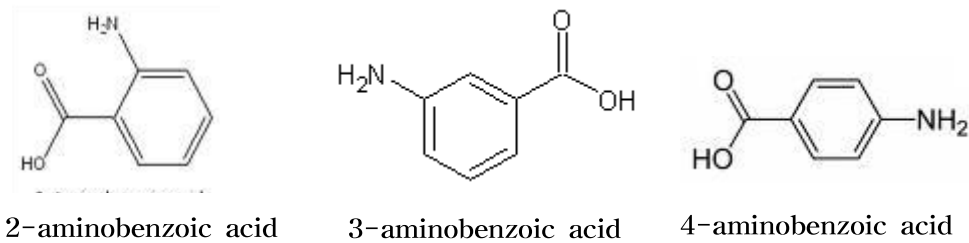


Fig. 1-27. Chemical structure of 2-aminobenzoic acid isolated from *B. thuringiensis* BS107 cultures and 2-AA analog 3-aminobenzoic acid, 4-aminobenzoic acid.

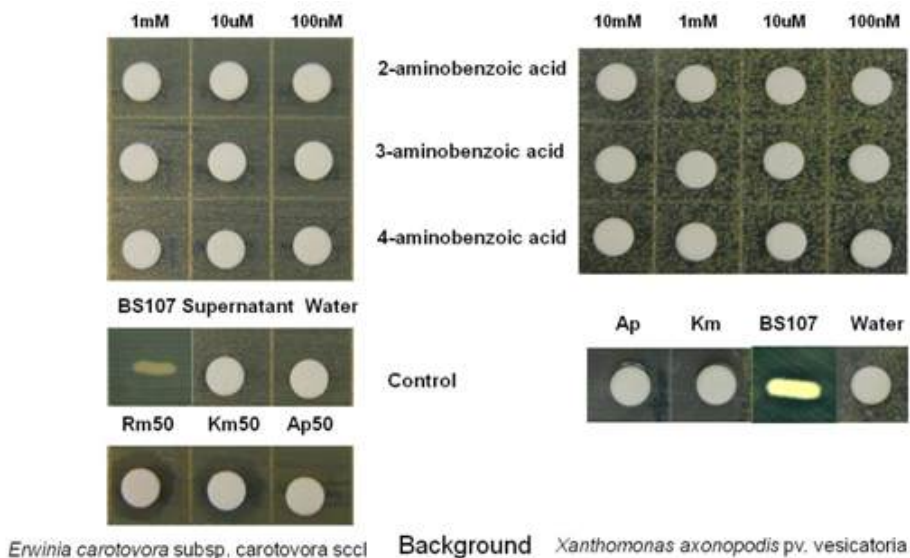


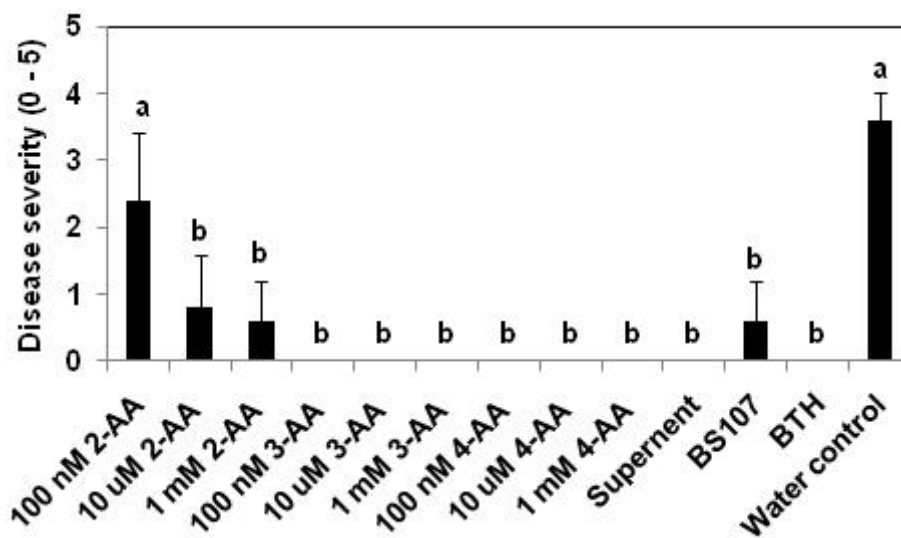
Fig. 1-28. Antimicrobial activity of 2-,3-, and 4-aminobenzoic acid against *E.*

carotovora subsp. *carotovora* and *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*.

2-,3-, and 4- aminobenzoic에 의한 고추와 담배에서의 ISR

BS107에서 선별된 2-aminobenzoic acid와 3-, and 4- aminobenzoic acid를 이용하여 고추와 담배에서 각각 ISR 실험을 진행하였다. 먼저 담배를 이용하여 하우스와 실험실내에서 ISR 실험을 각각 진행하였다. 하우스에서 배양된 담배 묘에 2-,3-, and 4- aminobenzoic를 농도별로 처리 후 병원성 세균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 를 접종하여 병원성을 측정하였다. 그 결과 하우스 실험에서는 10 uM 이상의 2-aminobenzoic acid를 적용시 ISR 유도 효과가 나타났으며 3-,4-aminobenzoic acid 적용시에는 물질의 농도와 상관없이 ISR 유도반응이 일어났다. 24 multi well system을 이용한 ISR 실험에서는 하우스 실험에서와 달리 세 물질 처리구 모두 에서 농도와 상관없이 ISR 반응이 이뤄지는 것을 확인하였다 (Fig. 1-29A). 이후 담배와 동일하게 고추에서도 동일하게 하우스에서 ISR 실험을 진행하였다. 각 물질별로 ISR 실험을 진행한 결과 2-aminobenzoic acid는 고추에서 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*에 대하여 농도와 상관없이 병징이 3으로 나타났으며 물처리는 4정도로 병징이 관찰되었다. 강한 ISR 반응이 이뤄지지 않는 않으나 물처리에 비하여 ISR 효과가 입증되었다 (Fig. 1-30B). 또한 2-aminobenzoic acid의 유사 물질인 3-,4-aminobenzoic acid를 이용하여 ISR 실험을 진행한 결과 3-aminobenzoic acid는 고추에서 ISR 반응을 유도 하지 못하였으며 (Fig. 1-30B), 4-aminobenzoic acid는 고추에서 10 uM 과 10 mM에서 유도저항성 능력이 있음을 확인하였다 (Fig. 1-30C).

A



B

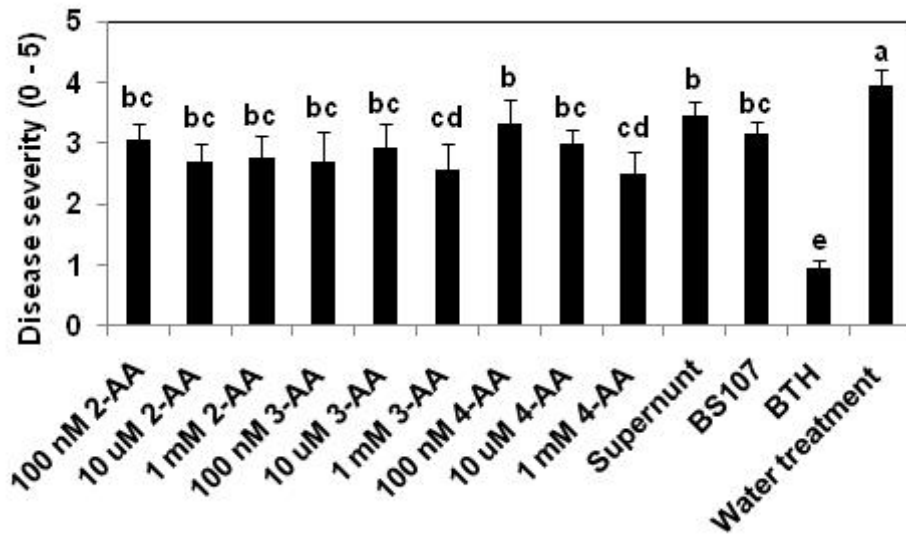
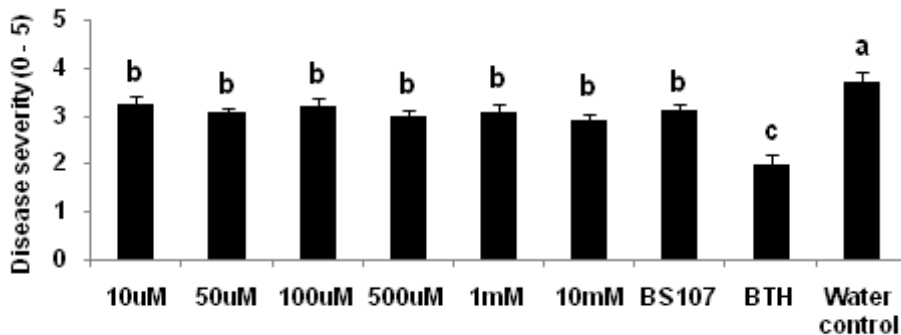
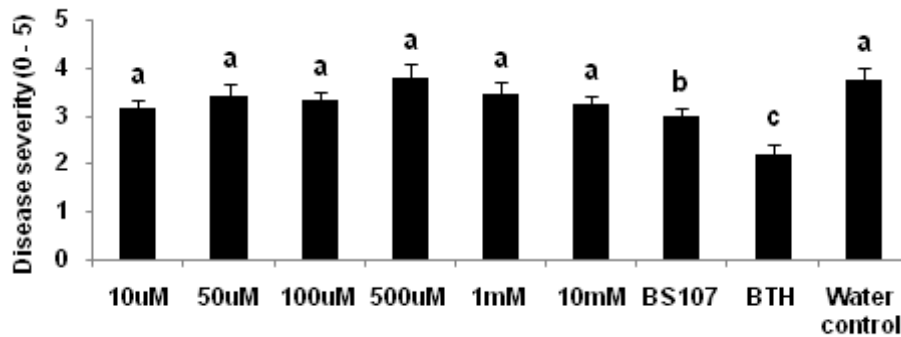


Fig. 1-29. Disease severity values of tobacco seedlings treated with water (H₂O) as a negative control, 2-aminobenzoic acid isolated from BS107 (BS107), 0.5 mM salicylic acid (SA) as a positive control, and commercial authentic 2-aminobenzoic acid (2AB) at different concentrations in 24 multi-well (A) and greenhouse (B). Disease severity (%) was evaluated 1 days after *E. carotovora* subsp. *carotovorum* SCC1 inoculation. Three independent experiments were performed with 12 seedlings per treatment. a, b and c in A and B indicate statistically significant differences as compared to water-treated control plants (P = 0.05). Data represents the means plus the standard error of the mean.

A



B



C

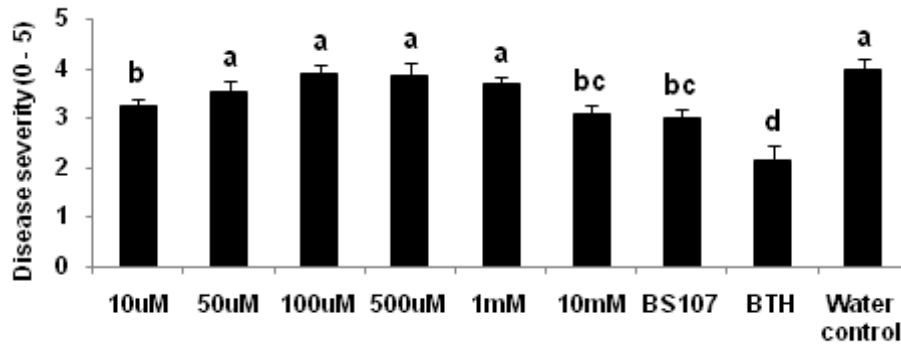


Fig. 1-30 Disease severity values of tobacco seedlings treated with 2-, 3-, and 4-aminobenzoic acids. Disease severity values of pepper seedlings treated with A) 2-aminobenzoic acid isolated from BS107 and analog, B) 3-, C) 4-aminobenzoic in greenhouse. Disease severity (%) was evaluated 5 days after *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* inoculation. Three independent experiments were performed with 10 seedlings per treatment. a, b and c in A, B and C indicate statistically significant differences as compared to water-treated control plants ($P = 0.05$). Data represents the means plus the standard error of the mean.

2-aminobenzoic acid에 의한 ISR 반응 동안 유전자의 발현의 변화

실험실내에서 진행되어진 담배에서 ISR 반응 실험하는 동안 준비된 담배에서 2-aminobenzoic acid에 의한 저항성 관련 유전자의 변화를 관찰하였다. 유전자의 priming에 관점을 두고 초기 시간에 강하고 빠르게 발현되는 저항성 유전자를 분석하였다. 그 결과 PR1a 유전자는 2-aminobenzoic acid 처리 후 1일 후부터 강하게

발현되다가 병 접종후 3시간뒤 부터 물처리에 비하여 강하게 발현되었으며 BS107 처리에 의해서도 병 접종후 3시간부터 물처리에 비하여 강하게 발현되었다. PR1c 유전자는 2-aminobenzoic acid 처리 후 1일 후부터 강하게 발현되었으며 병 처리 후에 약한 발현을 나타냈다. PR2 유전자는 2-aminobenzoic acid 처리 후 1일 후부터 강하게 발현되었으며 병 처리 후에도 3시간 6시간에 물처리에 비하여 강하게 발현되었다. PR4 유전자는 2-aminobenzoic acid와 BS107 처리 후 3일 후부터 강하게 발현되었으며 병 접종 후 6시간 때부터 강하게 발현되었다. 나머지 PR1b와 PR5, PR6, JAZ, SAR8.2 유전자의 발현은 물처리와 차이가 없었으므로 priming되지 않은 것으로 생각된다 (Fig. 1-31).

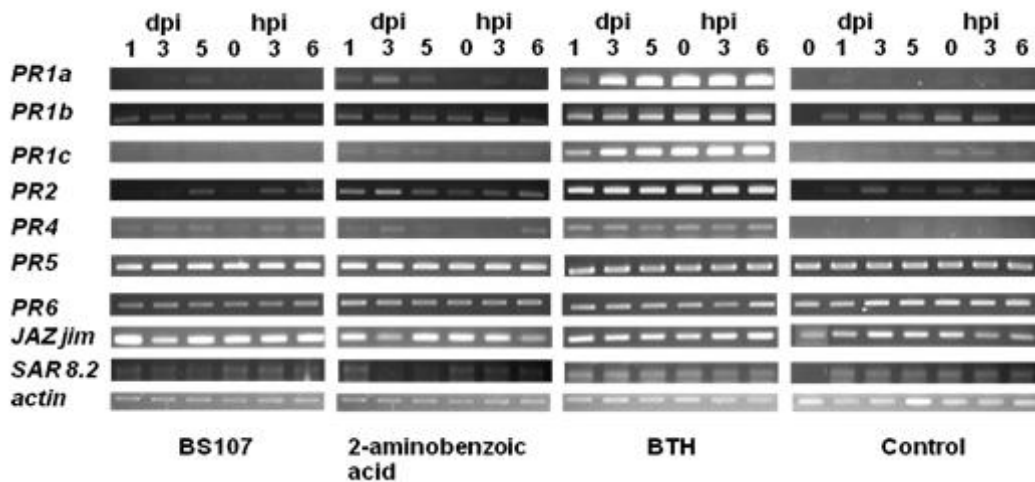


Fig. 1-31. Elicitation of defense-related gene expression by 2-aminobenzoic acid in tobacco following pathogen challenge. Before challenge with pathogen, the expression of PR genes gene by inoculated 2-aminobenzoic acid on tobacco root (dpi). After challenge with pathogen (hpi), the expression of the indicated defense signaling related-genes (PR1a, PR1b, PR1c, PR2, PR4, PR5, PR6, JAZ-jim, SAR8.2) was analyzed by RT-PCR. Amplified products were separated by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. As a positive control, plants were treated with 0.5 mM BTH.

제 2 절 ISR을 이용한 벼 병해 방제

1. 연구개발수행 내용 및 결과

가. 내병성 유도균 또는 전신획득저항성 활성제를 이용한 벼의 내병성 확인

벼에서 내병성 유도균 처리 후 병저항성을 확인하기 위해 온실과 포장에서 내병성 유도를 검정하였다. 본 실험에 사용한 내병성 유도균은 담배 그리고 *Arabidopsis*와 같은 쌍자엽 모델식물의 뿌리에 정착해 phenazine과 siderophore와 같은 항생물질을 분비하거나 2R, 3R-butanediol과 같은 휘발성 물질을 생성해 식물에 유도저항성을 나타내는 유용미생물로 알려진 *Pseudomonas chlororaphis* O6균으로 본 협동과제의 실험실에서 많이 연구가 진행되고 있다. 먼저 온실에서의 내병성 여부를 검정하기 위해 유묘상태의 벼에 *P. chlororaphis* O6균을 처리한 후 일주일 뒤에 root colonization을 확인하였다. *P. chlororaphis* O6균은 오렌지색깔의 phenazine를 생성하기 때문에 Fig. 2-1의 A와 같이 root colonization을 확인할 수 있다. *P. chlororaphis* O6균의 root colonization이 확인된 벼와 대조구로 물을 처리한 벼, 그리고 전신획득저항성 활성제 (Systemic acquired resistance, SAR activator)로 이용되고 있는 BABA를 처리한 벼로부터 병저항성 여부를 확인하고자 벼 흰잎마름병원균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* K3를 가위 접종하여 14일 뒤에 병반의 길이를 측정하였다. 대조구로 사용한 물 처리구와 비교해 볼 때 *P. chlororaphis* O6균을 처리한 벼에서 내병성을 확인하였다. 또한 전신획득저항성 활성제로 이용되고 있는 BABA를 처리한 벼와 비슷한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 2-1B). 이러한 결과는 유용미생물인 *P. chlororaphis* O6균이 쌍자엽 식물에서와 같이 단자엽 식물에서도 ISR 능력을 보여 주고 있으며 그 유도저항성의 능력은 SAR activator로 알려진 BABA의 능력과 비슷한 수준임을 의미하는 것으로 포장 상태에서 이용할 수 있을 것으로 생각되어졌다.

포장에서의 *P. chlororaphis* O6균의 내병성 유도 활성을 검정하기 위해 전남 함평 월야면의 포장에서 *P. chlororaphis* O6균 처리구를 포함해 농약 처리구, 무처리구, SAR activator인 Harpin 처리구로 분획한 후 각각을 7월 13일에 처음으로 처리하였고 8월 4일에 두 번째, 8월 17일에 세 번째, 9월 15일에 마지막으로 처리하였다. 병해 발병 정도는 8월 17일, 9월 13일 과 9월 27일 세 차례에 걸쳐 잎도열병과 목도열병, 문고병 및 주요해충인 흑명나방에 대한 방제 효과에 대해 조사하였다. 포장 실험의 정확도를 기하기 위해 2년에 걸쳐 비슷한 날짜에 처리 및 병 발생 정도를 조사 하였다 (Fig. 2-2).그러나 2년차 실험기간에는 평년과 다르게 기상이변으로 인한 여름 장마가 심하여 농약 처리구를 제외한 다른 처리구는 변이가 너무 심하여 실험결과를 데이터하기가 어려웠다. 이러한 결과는 직접적으로 병원균을 방제하는

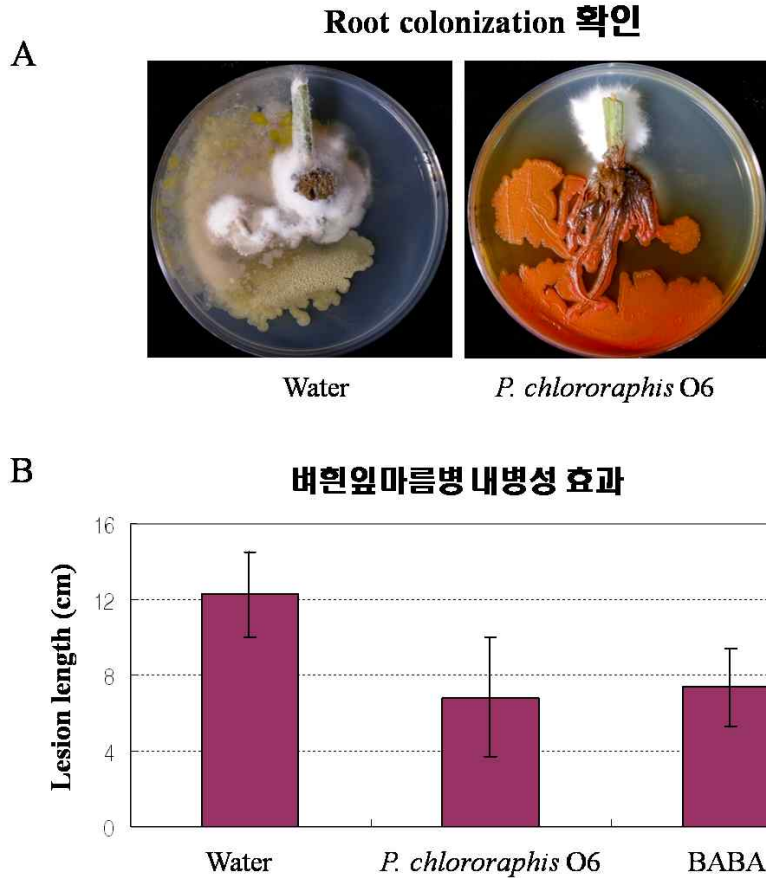


Fig. 2-1. *Pseudomonas chlororaphis* O6균을 처리한 벼에서 root colonization을 확인한 결과 (A), *P. chlororaphis* O6균을 처리한 벼로부터 벼흰잎마름병에 대한 내병성이 유도됨을 확인한 결과 (B).

기작을 가진 농약과 달리 간접적으로 식물에 유도저항성을 부여함으로써 병원균을 방제하는 유용한 미생물이나 식물 유래 추출물 등과 같은 환경친화적인 제제들은 환경의 영향을 많이 받기 때문에 농업 현장에서 활용시 이 점을 고려해야 할 것으로 생각된다. 그래서 1년차의 결과만을 중심으로 *P. chlororaphis* O6균의 내병성 유도 활성을 확인 할 수 있었다. 먼저 벼의 생육에 *P. chlororaphis* O6균이 미치는 영향을 확인 해 보기 위해 각처리구의 3반복 당 3주를 조사한 결과 총장, 간장, 수장 등에 유의한 차이를 발견하지 못했다. 이러한 결과는 ISR 유도균이 벼의 생육 촉진 능력은 없음을 의미 한다 하겠다 (Fig. 2-3A). 그러나 각처리구의 3반복 당 각각 20주를 대상으로 실시한 병해충의 조사에서는 *P. chlororaphis* O6균 처리구가 농약 처리구에 비해 잎도열병과 목도열병을 포함한 전체적인 도열병과 문고병의 발병이 더 많이 나타났고 SAR activator인 Harpin 처리구와 비교해서는 비슷하거나 약간 높게 나타났지만 무처리구에 비해서는 내병성의 효과가 있는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2-3BC). 이 결과로 볼 때 *P. chlororaphis* O6균을 예방차원에서 병의 발병

전에 살포해 주었을 경우 벼의 주요 병인 도열병과 문고병의 발생을 경감시킬 수 있을 것으로 생각되어진다. 또한 *P. chlororaphis* O6균의 벼 주요 해충인 흑명나방의 피해에 대한 방제 효과를 확인 해 본 결과 놀랍게도 농약 처리구와 비슷하게 좋은 방제 효과가 인정되었다 (Fig. 2-3D). 이러한 결과는 아마도 *P. chlororaphis* O6균이 생산하는 2차 대사산물에 의한 것으로 판단되어진다.



Fig. 2-2. 전남 함평 월야면 시험포장에서 농약처리구, 무처리구, SAR activator인 Harpin 처리구 및 *P. chlororaphis* O6균 처리구에 대한 처리 모습 및 벼의 주요 병해인 도열병과 문고병 및 주요해충인 흑명나방에 대한 피해 정도를 조사하는 모습

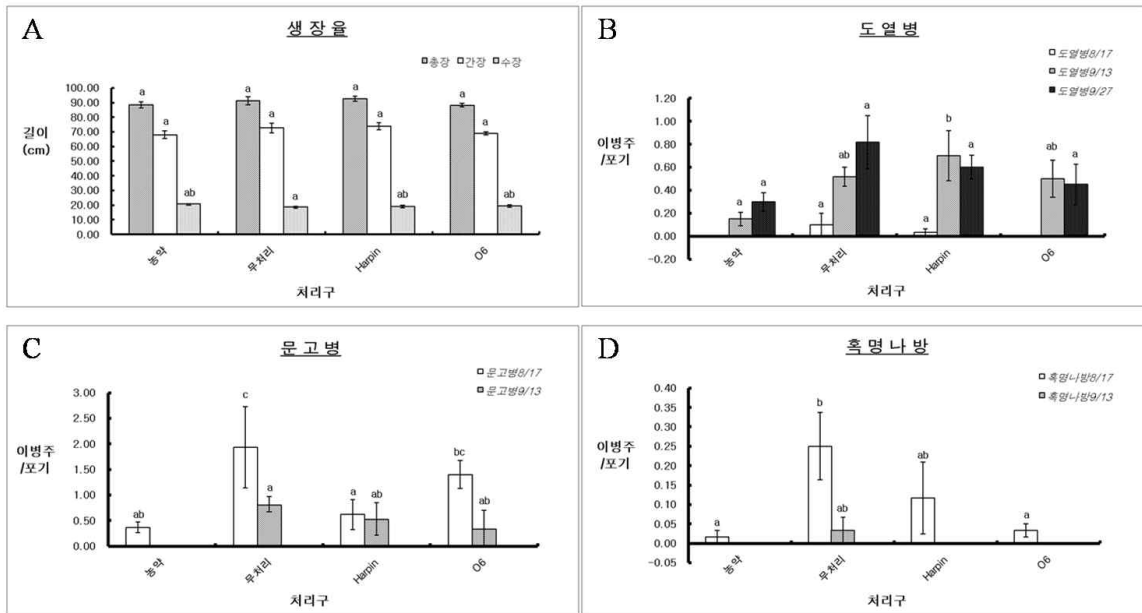


Fig. 2-3. 전남 함평군 월야면 시험포장에서 실시한 처리구간별 생장을 (A) 및 주요 병해인 도열병 (B), 문고병 (C) 그리고 주요 해충인 흑명나방 (D)에 대한 방제 효과를 비교한 결과

나. *P. chlororaphis* O6균을 벼에 처리한 후 유도되는 내병성 관련 유전자 확보

온실과 포장에서 실시한 시험에서 내병성의 효과가 확인된 *P. chlororaphis* O6균에 의해 유도되어지는 벼의 내병성 관련 유전자들을 대량 확보하여 *P. chlororaphis* O6균이 보이는 ISR 능력을 유전자 수준에서 그 기작을 이해하고자 대조구인 물 처리구와 O6균의 root colonization을 확인된 벼(Fig. 2-1)로부터 각각 total RNA를 추출하여 ACP-based DDRT-PCR과 Affymetrix rice 57K microarray를 수행하였다. ACP-based DDRT-PCR 후 물 처리한 대조구에 비해 O6 처리구에서 강하게 발현되는 differentially expressed genes들을 (Fig. 2-4 윗그림에서 빨간색 화살표가 된 부분) 클로닝하여 염기서열을 분석하였으나 대부분이 기능이 알려지지 않은 유전자들 이었다 (Fig. 2-4). 그래서 ACP-based DDRT-PCR 수행하여 내병성 관련 유전자들을 대량으로 확보한 것이 어려울 것 같아 같은 샘플을 가지고 Affymetrix rice 57K microarray를 수행하였다. 대조구와 O6균주 처리구 사이의 데이터를 global scaling을 이용하여 normalization 시켰다 (Fig. 2-4의 아래 그림).

ACP-based DDRT-PCR 수행

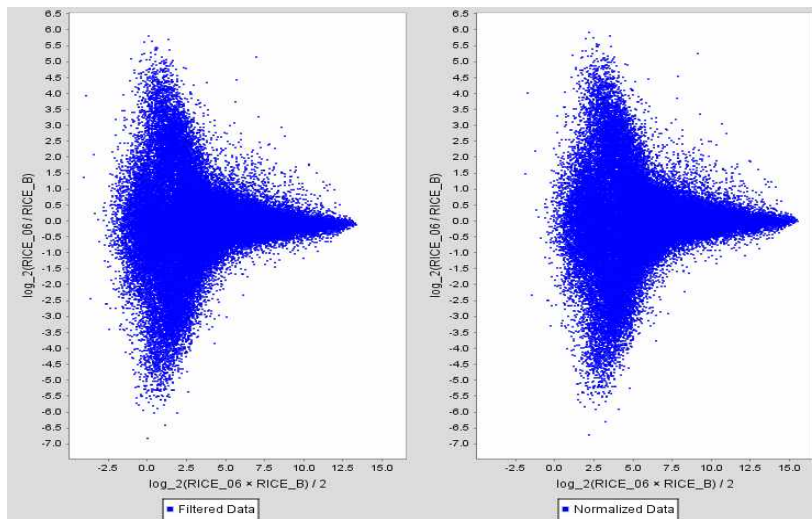
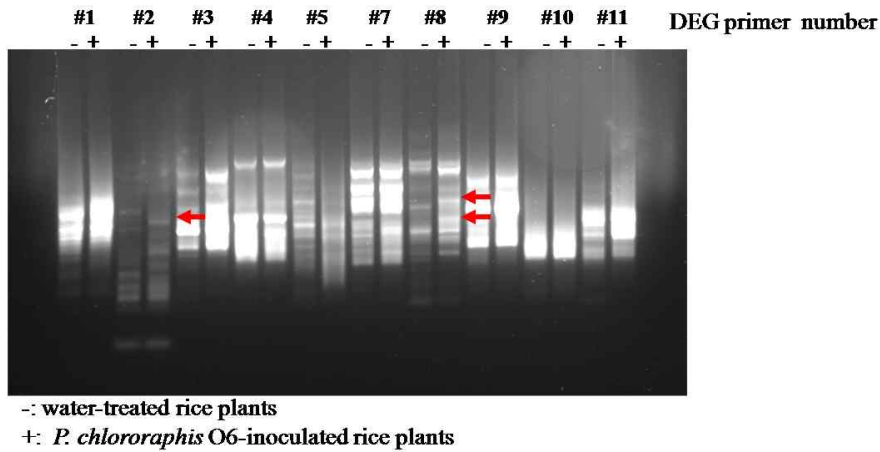


Fig. 2-4. *P. chlororaphis* O6균이 처리된 벼로부터 ACP-based DDRT-PCR 수행 후 DEG를 선택한 결과 (윗그림), Affymetrix rice 57K microarray를 수행한 후 대조구와 O6균주 처리구 사이의 데이터를 global scaling을 이용하여 normalization한 결과 (아랫그림)

Microarray를 수행하여 *P. chlororaphis* O6균에 의해 유도되는 것으로 확인된 여러 유전자들 중 gene ontology 정보가 존재하는 유전자들을 중심으로 기능을 분석하였다. 크게 세포 구조, 전사 관련 인자, 신호전달체계, 방어기작, 대사과정, 그 밖의 다른 기능에 관련된 유전자들 및 아직 기능이 밝혀지지 않은 유전자들로 범주를 나누어 확인해 본 결과 up-regulated 유전자들 그룹의 경우 방어기작과 대사과

정에 관련된 유전자들이 다른 범주의 유전자들에 비해 발현이 많이 되고 있음을 확인하였다 (Fig. 2-5). Cutoff 2 이상의 유전자들 중 대조구에 비해 처리구에서 up-regulated 유전자들이 총 986개가 있었으며 down-regulated 유전자들이 589개가 있었다. 그 up-regulated 유전자들 중 gene ontology 정보가 존재하는 55개 유전자들 중 주요한 유전자들을 선별 하였으며 그 유전자들의 발현 양상을 RT-PCR을 이용하여 확인 하였다 (표 1과 Fig. 2-6). 그 결과 대체적으로 microarray 결과와 비슷한 양상으로 발현이 증가되고 있는 것을 확인하였다 (Fig. 2-6)

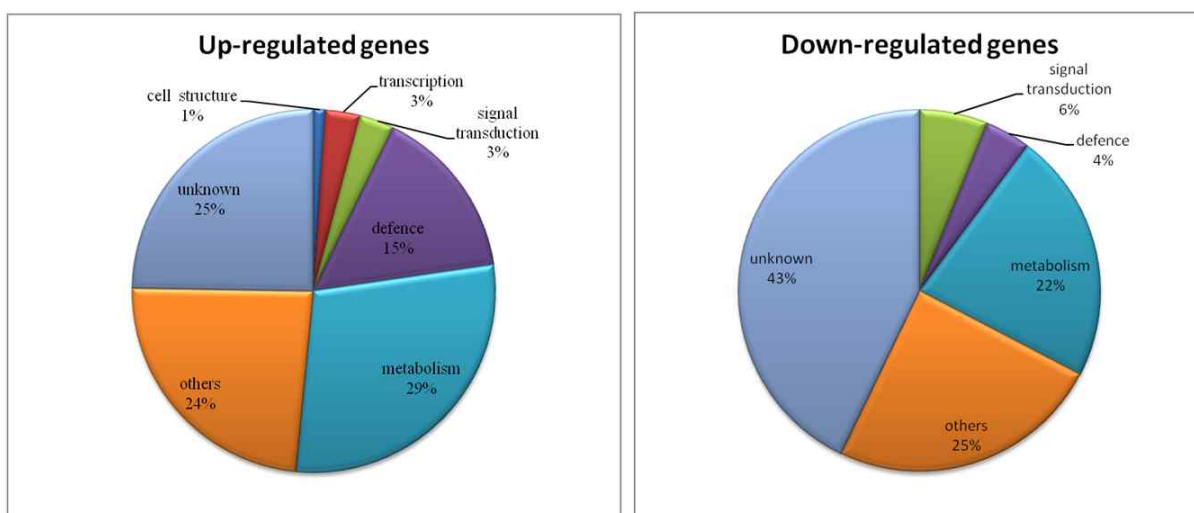


Fig. 2-5. Microarray를 수행하여 확인된 여러 유전자들 중 gene ontology 정보가 존재하는 유전자들의 기능을 중심으로 세포 구조, 전사 관련 인자, 신호전달체계, 방어기작, 대사과정, 그 밖의 다른 기능에 관련된 유전자들 및 아직 기능이 밝혀지지 않은 유전자들로 범주를 나누어 분석한 결과

Probe ID	RICE B Signal	RICE 06 Signal	Gene Title
Os. 55955.1. S1 at	1.391595	5.665941	OsGME mRNA for GDP mannose 3',5' epimerase
Os. 8655.1. S1 at	1.3966662	5.0244346	Thionin Osthil
Os. 25596.1. A1 x at	1.7299286	4.7534122	WRKY transcription factor 45
Os. 17112.1. S1 at	2.552713	6.512435	CDNA clone:001-024-H01, full insert sequence
Os. 28030.1. S1 at	5.9034896	8.985519	AK104912 mRNA sequence
Os. 53414.1. S1 at	3.605676	6.5675077	CDNA clone:J023131k07, full insert sequence

Os. 27583.1.S1 at	4.1003866	7.0462894	cDNA clone: J013023k14, full insert sequence
Os. 49769.1.S1 at	3.5673442	5.292063	Aspartyl proteinase (Asp1)
Os. 9286.1.S1 s at	10.461794	12.153213	cDNA clone: J033036C04, full insert sequence

Table 1. Affymetrix rice 57K microarray를 수행 결과 up-regulated 유전자들 중 gene ontology 정보가 존재하는 대표적인 유전자들을 선택해 나열한 결과

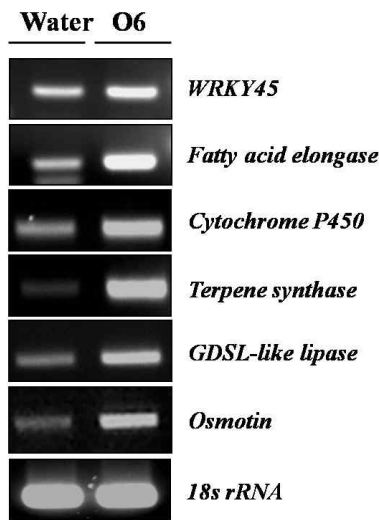


Fig. 2-6. 선발된 몇 개의 유전자들의 microarray 결과를 RT-PCR을 통해 재확인한 결과

다. 선발된 유전자들의 벼 흰잎마름병에 대한 내병성 연관 관계 및 priming 효과 확인

Microarray 분석에 의해 선발되어 유도 발현 양상이 재확인된 유전자들 중 병저항성 관련이 있을 것으로 여겨지며 유도저항성과 관련된 그 기능이 아직까지 보고가 되지 않은 식물 고유의 전사조절인자이며 특히 방어 기작에 중요한 역할을 하고 있는 WRKY45 유전자와 병원균에 대한 방어 물질로 알려진 phytoalexin인 diterpenoid의 생합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 재차 선발하여 이들의 특성을 조사하였다. 먼저 벼에서 중요한 병원균인 벼 흰잎마름병원균 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* K3)를 처리한 후 이들 유전자들의 발현 양상을 real time qPCR를 이용하여 확인한 결과 WRKY45 와 terpene synthase 두 유전자 모두 벼 흰잎마름병원균에 대해 강하게 유도되고 있음을 확인되어 이들 유전자들이 벼 내병성에 관련이 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2-7A). 그러나 WRKY45 유전자의 발현 양상은 병원균이 침입한 후

초기에 유도 발현된 뒤 침입 후반부까지 지속적으로 꾸준히 발현되고 있었으며, terpene synthase 유전자의 경우는 *Xoo* K3를 처리 후 72시간 이후에 80배 이상 유도되었는데 이러한 결과는 이 유전자가 병원균이 침입한 뒤 후반부에 강하게 유도되고 있음을 의미하는 것으로 식물의 phytoalexin는 식물과 병원균의 상호관계에 의한 신호전달체계가 활성화 된 뒤 늦게 생성됨을 의미한다 하겠다. 또한 본 연구실에서 오이에 유용미생물을 처리한 후 유도저항성과 관련된 여러 유전자들을 선별해 그 특성을 조사한 결과 galactinol synthase (GolS) 유전자가 유도저항성과 밀접한 연관이 있었음을 역시 확인 할 수 있었다. 그래서 오이 GolS 유전자의 ortholog를 벼에서 찾아 그 기능을 확인 해 본 결과 벼에서는 두 개의 유전자 (AK071812;OsGolS-A, AK107065;OsGolS-B)를 선별 할 수 있었으며 이들 역시 벼 흰잎마름병원균에 의해 유도되었다 (Fig. 2-7C). 특히 유도저항성 (ISR)을 나타내는 여러 가지 요소들 중 priming 효과가 ISR의 중요한 역할을 수행하고 있다는 결과가 여러 연구 그룹을 통해 확인되어지고 있다. 따라서 물을 처리한 대조구와 *P. chlororaphis* O6를 전처리한 실험구의 벼에 흰잎마름병원균을 접종한 후 시간별로 샘플링하여 유전자들의 발현 양상을 확인해 봄으로써 WRKY45, terpene synthase, OsGolS-A 및 OsGolS-B 유전자를 포함해 여러 병저항성 관련 유전자들이 O6가 나타내는 priming 효과와 연관되어 있는가를 살펴 보았다. Fig. 2-7 B와 D에서 확인할 수 있듯이 *P. chlororaphis* O6가 전처리된 식물에서 대조구에 비해 OsPR-1a 유전자를 제외한 WRKY45, terpene synthase, OsPAL, OsPR3, OsGolS-A 및 OsGolS-B 유전자 모두 *Xoo* K3를 처리하기 전에도 발현이 강하게 나타나고 있었으며 *Xoo* K3를 처리한 뒤에는 O6가 전처리된 식물에서 그 발현 양상이 지속적으로 강해지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 확인된 유전자들이 *P. chlororaphis* O6가 나타내는 유도저항성의 하나의 표현형인 priming 효과와 관련되어 있음을 의미한다 하겠다.

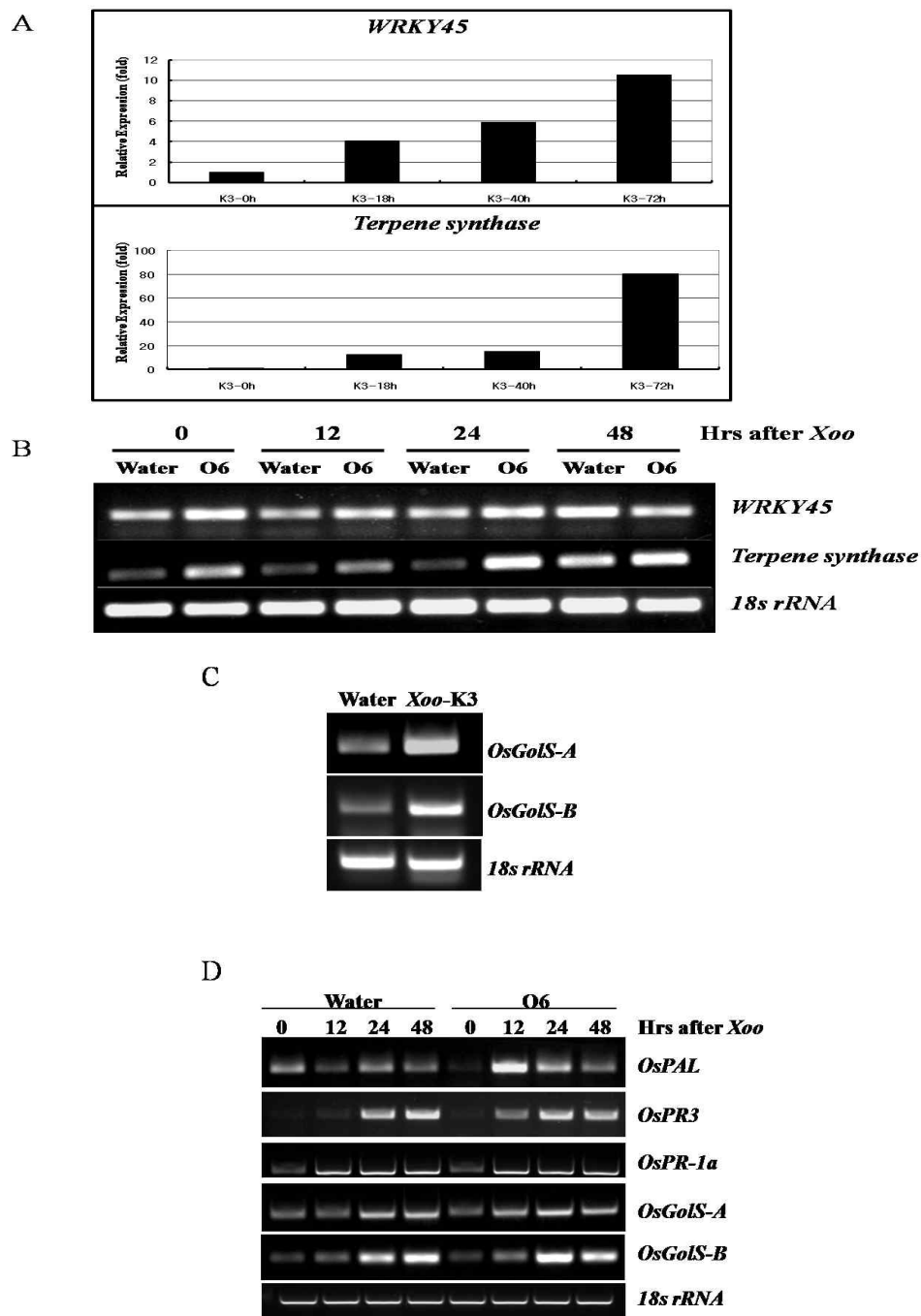


Fig. 2-7. 선발된 두 유전자들 모두 WRKY45, terpene synthase, OsGolS-A 및 OsGolS-B 유전자가 벼 흰잎마름병원균에 대해 강하게 유도되고 있음을 확인한 결과 (A와 C), 벼의 병저항성 관련 유전자들이 *P. chlororaphis* O6가 전처리된 벼에서 priming 효과와 관련되어 있음을 확인한 결과 (B와 D)

식물 병저항성에 중요한 역할을 수행하고 있는 신호전달체계인 MAPK

(mitogen-activated protein kinase) cascade가 활성화 되면 하류의 기질 단백질이나 전사 조절인자가 활성화 되고 그것들은 다시 최종적으로 병저항성 관련 방어 유전자들을 유도시켜 준다. 그래서 선발된 유전자들이 과연 벼의 병저항성에 관여된 MAPK cascade에 조절을 받는 유전자임을 확인해 봄으로써 벼의 신호전달체계인 MAPK cascade와 유전자간의 연관성을 살펴보고 유전자들의 유도저항성에 의한 병저항성 관련 작용 기작을 알아보기 위해 본 연구자의 실험실에서 개발한 벼 형질 전환체를 이용하여 확인해 보았다. 이 벼 형질전환체는 담배의 MPAK인 SIPK나 WIPK의 상위 인산화 단백질인 MAPK kinase (NtMEK2)를 활성화시킨 NtMEK2^{DD} 유전자를 벼에 형질전환시킨 식물체로 삽입된 담배의 MAPK kinase가 이질적인 벼의 하위 MAPK들을 활성화 시킬 수 있는 것으로 보고되었기 때문에 활용할 수 있었다 (Jeong et al., 2008). Fig. 2-8의 A에서 확인할 수 있듯이 OsGolS-A를 제외한 WRKY45,terpene synthase 및 OsGolS-B 유전자들의 발현이 대조구로 이용한 MAPK kinase (NtMEK2)를 불활성화시킨 NtMEK2^{KR} 유전자가 형질전환된 벼와 비교해 NtMEK2^{DD} 유전자가 형질전환된 벼에서 강하게 유도되어 졌다. 그러나 Table 2-1의 다른 유전자들 (thionin 등)의 발현은 대조구인 비활성화된 NtMEK2^{KR} 벼 형질전환체와 차이가 없었다 (결과 미제시). 이 결과는 이들 유전자가 벼에서 병저항성 관련 MAPK cascade의 조절을 받는 하류의 유전자임을 의미하며 결론적으로는 전사조절인자인 WRKY45 유전자, phytoalexin인 diterpenoid의 생합성 및 galactinol 생합성의 일부분이 이 MAPK cascade와 연관이 되어 있어 MAPK cascade의 기능이 유도저항성과도 관련이 있음을 시사한다 하겠다. 따라서 본 연구결과로부터 얻어진 유도저항성과 벼 MAPK cascade의 기능과 연관된 연구는 추후에 좋은 연구 재료로 이용될 수 있으리라 생각한다.

현재까지 벼에서는 단지 몇 개만의 MAPK가 분리 되었을 뿐 많은 연구가 수행되지는 않았다. 분리되어 기능이 밝혀진 MAPK 유전자들 중 벼 도열병원균 및 SAR activator인 BTH에 의해 유도되는 것으로 보고된 BIMK1가 O6균에 의해 protein 수준에서 priming 효과를 나타내는지 여부를 확인해 보았다. Fig. 2-8의 B에서와 같이 BIMK의 antibody를 제작하여 western blot를 수행하였으나 대조구인 물처리구와 비교해 보았을 때 O6균이 전처리된 후 *Xoo*가 처리한 샘플에서 뚜렷한 priming 효과가 있음을 확인하지 못했다. 이러한 결과는 *P. chlororaphis* O6균과 관련된 벼의 유도저항성에 BIMK가 관여되지 않았음을 시사한다 하겠다.

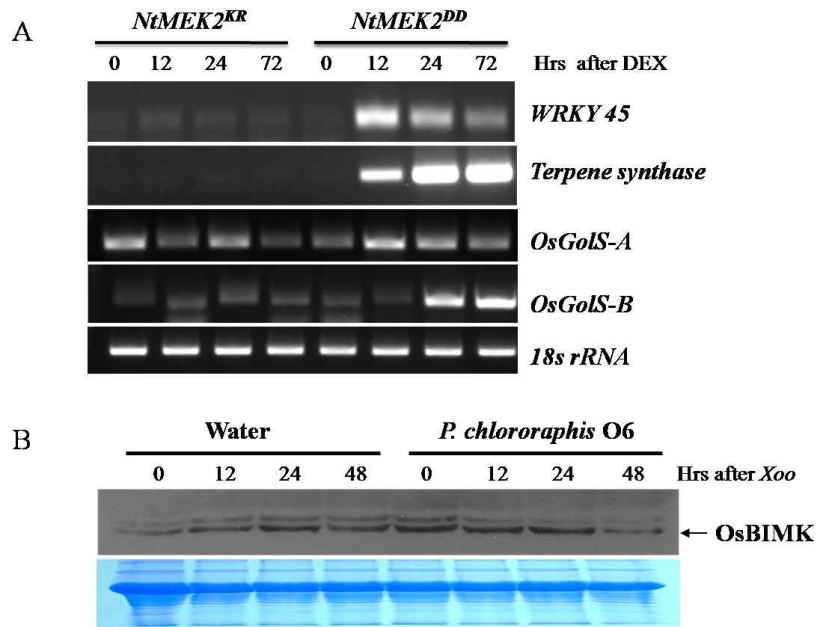


Fig. 2-8. 선발된 유전자들 중 WRKY45, terpene synthase, 그리고 OsGolS-B 유전자가 벼 병저항성 신호전달체계인 MAPK cascade의 조절을 받는 하위 유전자임을 확인한 결과 (A), BIMK의 antibody를 제작하여 western blot를 수행하여 O6균이 *Xoo* 처리 후 뚜렷한 priming 효과가 없음을 확인한 결과 (B)

라. 선발된 병저항성 관련 전사조절인자인 벼 WRKY45 유전자의 기능 분석

P. chlororaphis O6균에 의해 유도되는 것으로 확인되어 선발된 유전자들 중 벼의 병저항성에 관련된 MAPK cascade의 조절을 받는 하위 유전자로 확인된 WRKY45 유전자를 깊이 연구하고자 하였다. 모델 식물인 *Arabidopsis*에서의 연구 결과, 몇 개의 WRKY 유전자가 병원균에 반응하는 MAPK cascade의 하위 유전자로 밝혀짐으로써 MAPK-WRKY 신호전달체계가 확립되었다. 그러나 아직까지 벼의 경우는 이러한 신호전달체계에 대한 연구가 전무한 상태이다. 따라서 벼 WRKY45의 내병성 연관 여부를 벼 흰잎마름병원균에 감수성 품종인 동진벼과 저항성 품종인 주남벼를 이용하여 확인해 보았다. 대조구로 병저항성 대표 마커 유전자인 PR-1a 유전자를 이용하였다. PR-1a 유전자의 발현 정도는 감수성 품종인 동진벼에서는 비교적 적게 발현하였으나 저항성 품종인 주남벼에서는 접종 후 12시간 부터 높은 발현 수준을 유지하였다. 그러나 WRKY45 유전자의 경우는 동진벼나 주남벼에서 모두 비슷하게 발현이 유도되고 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2-9). 이 결과는 벼 WRKY45 유전자가 벼와 흰잎마름병원균의 상호 관계시 비친화적인 관계 뿐만 아니라 친화적인 관계 하에서도 발현이 강하게 유도되고 있어 벼에서 병저항성의 신호전달에 중요한 역할을 수행하고 있음을 의미한다 하겠다.

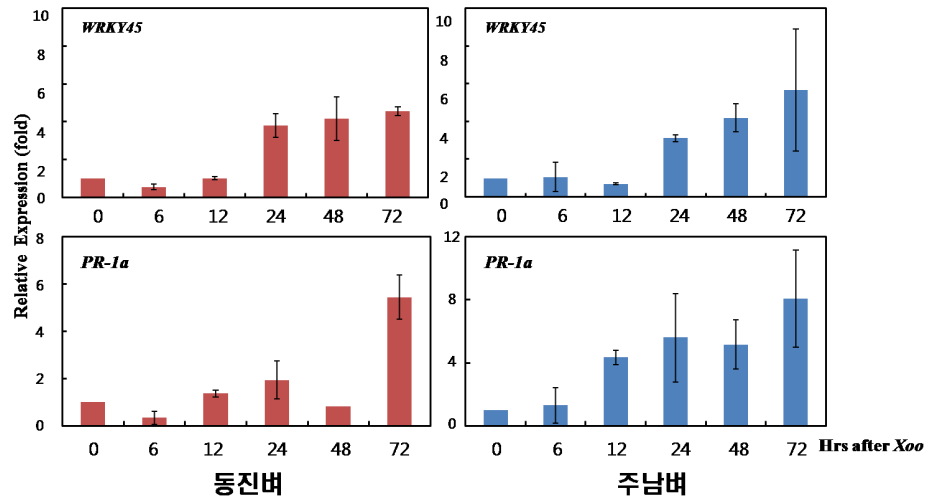


Fig. 2-9. 벼 WRKY45 유전자가 벼와 흰잎마름병원균의 상호 관계시 비친화적 및 친화적인 관계에서 모두 유도 발현되고 있는 결과

WRKY 유전자들은 식물 고유의 전사조절인자로서 식물의 발육 및 생리학적 과정 뿐만 아니라 병저항성 작용을 조절하는 역할을 하고 있으며 현재까지 벼에는 109개 유전자가 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. 전사조절인자로 역할을 수행하고 있으므로 WRKY 단백질은 주로 핵 내에 존재하게 된다. 그러므로 벼 WRKY45 유전자를 GFP 유전자와 fusion 시킨 35S::EGFP-WRKY45 construct를 *Arabidopsis* protoplast cell에 형질 전환 시킨 후 confocal laser scanning microscope를 이용하여 세포내 위치를 확인 해 보았다. 대조구로 PBI221-EGFP vector를 이용하여 같은 방법으로 *Arabidopsis* protoplast cell에 형질전환시켰으나 Fig. 2-10의 B부터 D까지에서 확인 할 수 있듯이 주로 세포질에 푸른색의 형광물질이 존재하고 있었다. 그러나 35S::EGFP-WRKY45 construct가 형질전환된 cell에서는 Fig. 2-10의 A 전체 그림과 E부터 G까지에서 확인 할 수 있듯이 세포 내 핵 부분에서 강한 형광물질이 존재하고 있었다. 이 결과로 보아 벼 WRKY45 단백질은 세포의 핵 내에 존재하고 있음을 알 수 있다.

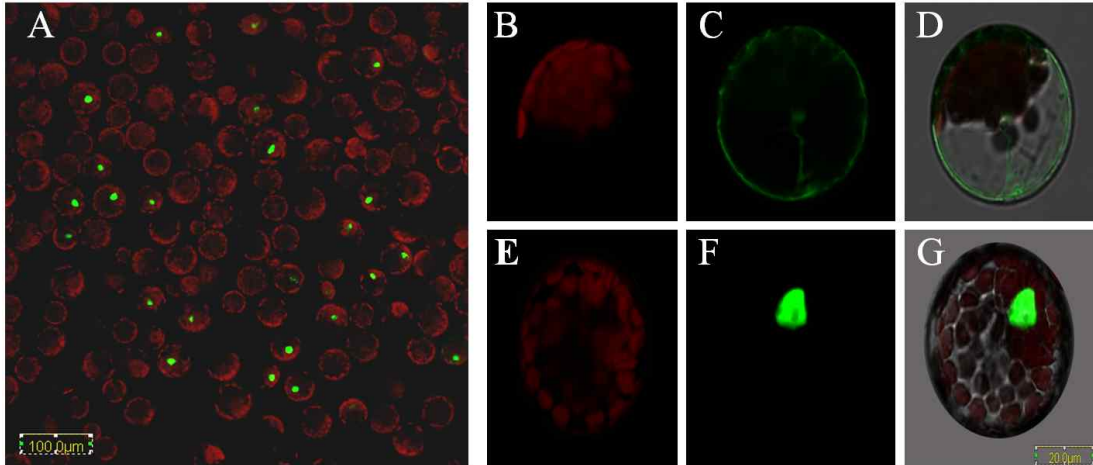


Fig. 2-10. 35S::EGFP-WRKY45 construct를 *Arabidopsis* protoplast cell에 형질전환시킨 후 전체 cell를 확인 한 결과 (A). 대조구인 35S::EGFP vector(B, C, D) 와 35S::EGFP-WRKY45 construct (E, F, G)를 각각 *Arabidopsis* protoplast cell에 형질전환시킨 후 대표적인 하나의 cell로부터 세포 내 위치를 확인한 결과

선발되어 생화학적 및 분자생물학적 특성이 밝혀진 벼 WRKY45 유전자를 이용해 벼 형질전환체를 제작하여 유도저항성과 관련된 정확한 작용 기작 연구 및 병저항성 형질전환체를 창출하기 위해 이 유전자의 full length를 아래의 primer를 이용하여 얻었다.

WRKY45 Forward: TAC GGG CAG AAG GAG ATC C; WRKY45 Reverse: CAA ATT AAG ATC CGC GCT GC

PCR를 이용해 얻어진 유전자를 Ubiquitin 프로모터를 가진 pGA1611 벼 형질전환용 벡터에 클로닝한 후 *Agrobacterium*-mediated 방법을 이용하여 본 협동과제책임자의 실험실에서 일반적으로 벼 형질전환할 때 이용하고 있는 callus 유도 배지인 N6D 배지에서 배양한 후 항생제가 포함되어 있는 배지에 옮겨 형질전환체를 선별하였다. 그러나 다른 유전자의 경우 어떠한 어려움 없이 쉽게 형질전환체를 얻을 수 있었으나 (Fig. 2-11A), WRKY45 유전자의 경우는 수 많은 반복 실험을 수행하였음에도 불구하고 계속 callus가 물러지면서 죽어 버려 형질전환체를 얻을 수 가 없었다 (Fig. 2-11B). 그래서 여러 문헌을 참고하여 배지의 성분이 차이가 있는 2N6배지로 바꾼 후 각 성분을 제거하는 과정을 통해 최근에 Fig. 2-11의 C에서와 같이 2N6배지에서 proline이 제거된 배지 조성에서 정상적으로 건강한 callus를 얻을 수 있었고 현재 항생제가 포함된 배지에서 형질전환체를 선별 중에 있으면 형질전환체가 얻어지면 지속적으로 연구를 수행하고자 한다.

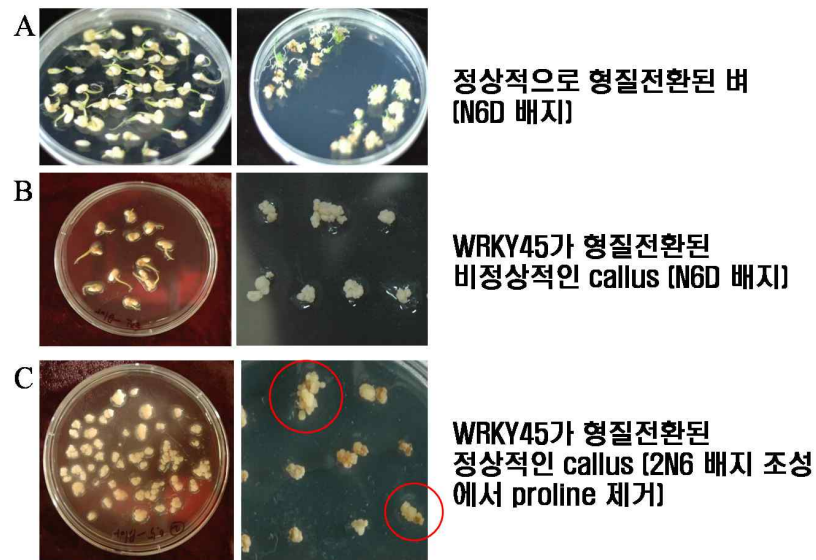


Fig. 2-11. *Agrobacterium*-mediated 형질전환을 수행한 후 항생제가 포함되어 있는 여러 배지에서 형질전환체를 선별 중에 있는 그림

마. 유도저항성과 밀접한 연관성이 확인된 galactinol synthase 유전자가 삽입된 형질전환 벼로부터 내병성 및 내재해성 검정

P. chlororaphis O6균에 의해 유도되는 것으로 확인된 galactinol synthase (GolS) 유전자를 형질전환 벼에 삽입 시킨 후 *Agrobacterium*-mediated 형질전환을 수행하여 얻어진 형질전환 벼로부터 외래 유전자의 발현 양상을 northern을 통해 확인해 보았다. Fig. 2-12의 A에서 확인 할 수 있듯이 두 개의 형질전환 라인에서 야생종에 비해 GolS 유전자의 발현이 현저히 증가됨을 확인 할 수 있었다. 더구나 thin layer chromatograph (TLC) 기법을 이용하여 역시 형질전환체로부터 galactinol synthase의 산물인 galactinol이 많이 생성되고 있음을 확인하였다 (Fig. 2-12B). 또한 이온 크로마토그래피를 이용하여 형질전환체에서 생성되고 있는 galactinol의 양을 확인해 보았다 (Fig. 2-12C). 이러한 결과들로부터 galactinol synthase (GolS) 유전자가 형질전환된 벼로부터 외래 유전자의 발현을 확인하였으며 이 외래 유전자의 발현으로 나타나는 내병성 및 내재해성을 검정 하였다.

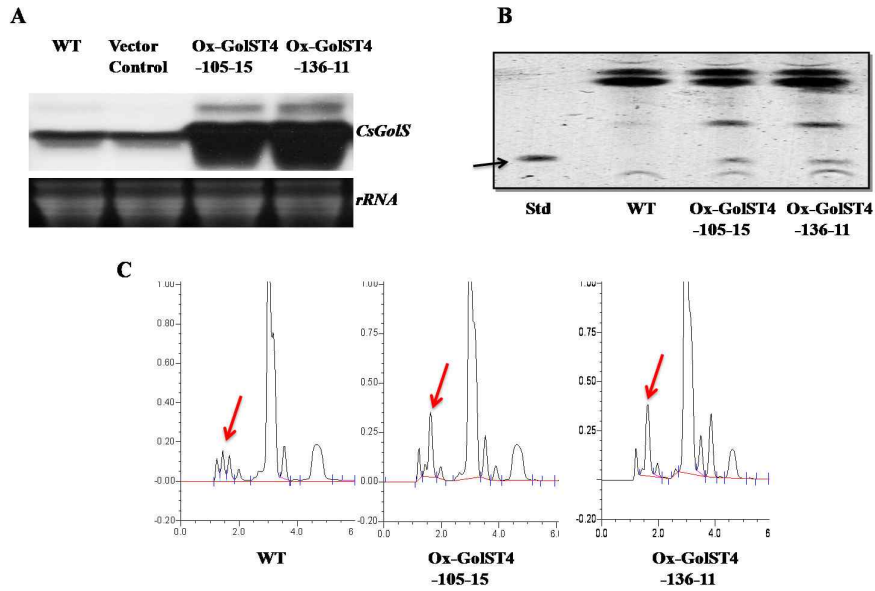


Fig. 2-12. Galactinol synthase (GolS) 유전자가 형질전환된 벼로부터 외래 유전자의 발현 양상을 northern을 통해 확인한 결과 (A). Thin layer chromatograph (TLC) 기법을 이용하여 형질전환체로부터 galactinol synthase의 산물인 galactinol을 확인한 결과. 화살표로 표시한 부분이 galactinol standard임 (B). 이온 크로마토그래피를 이용하여 생성되고 있는 galactinol의 양을 확인한 결과. 화살표로 표시한 부분이 galactinol peak임 (C).

외래 유전자의 발현 양상이 확인된 형질전환 벼를 이용하여 먼저 과종 후 10일, 15일, 40일 간격으로 생육 조사를 해 본 결과 야생종과 비교해 차이를 확인 할 수 없었다 (Fig. 2-13A). 우선 실내에서 내병성 기능을 검정하기 위해 과종한 뒤 약 4달이 지난 형질전환 벼와 야생벼에 벼 흰잎마름병원균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* K3를 가위 접종한 뒤 15일 뒤에 병반의 길이를 측정한 결과 Fig. 2-13의 B에서 확인 할 수 있듯이 두 개의 형질전환체에서 야생종에 비해 병반길이가 짧아지는 것을 확인 할 수가 있어 어느 정도는 내병성이 부여되고 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 galactinol synthase 유전자가 *Arabidopsis*에서 추위와 가뭄에 의해 유도가 된다는 보고가 있었기 때문에 형질전환 벼의 여러 생육 단계별로 10일간 물을 주지 않고 온실에서 키우다 물을 주어 회복 시킨 후 2일 뒤에 생체중 및 chlorophyll을 측정하는 방식으로 건조 스트레스에 대한 내건성을 조사해 본 결과 Fig. 2-13C에서 볼 수 있듯이 두 개의 형질전환체에서 야생종에 비해 내건성이 현저히 부여되고 있음을 확인 할 수 있었다. 그러나 기존의 여러 보고에 의하면 실내 검정에서 확인 된 형질전환체를 포장에서 그 효과를 재확인하는 과정에서 여러 가지 문제가 있었다. 그래서 실내에서 내병성이 확인된 형질전환 벼를 포장에서 잘못된 자리 검정을 통해 벼도열병에 대한 내병성을 확인 해 보고자 하였으나 야생종 벼와

비교해 약간의 내병성은 있었으나 기대한 만큼의 내병성을 보여 주지 못했다 (Fig. 2-13의 D).

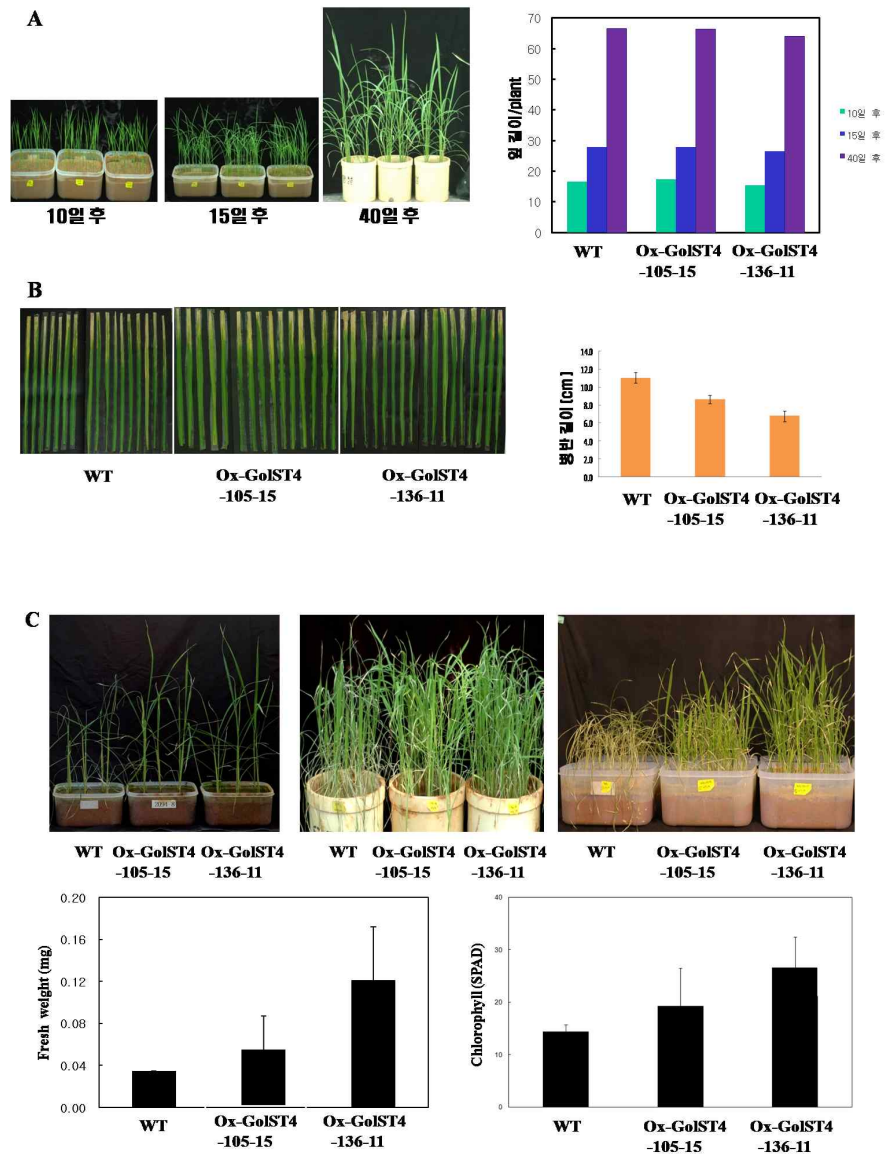




Fig. 2-13. 형질전환 벼의 생육조사 결과 (A), 실내에서 벼 흰잎마름병원균을 접종한 후 내병성을 검정한 결과 (B), 가뭄 스트레스에 대한 내건성을 검정한 결과 (C), 및 GMO 격리포장에서 밭못자리 검정을 통한 벼 도열병에 대한 포장 내병성 검정 결과 (D)

제 3 절 세균으로부터 ISR 결정 인자 탐색 및 개발 (협동2)

1. 미생물로부터 ISR 결정 인자 분리, 동정 및 신균주 탐색

본 연구팀은 ISR 능력을 가지고 있는 미생물로부터 ISR 결정인자를 분리 동정하여 실제 농업에 적용할 수 있는지 알아보려고 하였다. 기존에 ISR 능력을 가진 것으로 알려진 *Paenibacillus polymyxa* E681로부터 전신유도저항성(ISR) 물질 분리하고 고효율의 ISR 능력을 가진 새로운 신균주를 탐색하였다.

가. *P. polymyxa* E681로부터 ISR 결정인자 분리

P. polymyxa E681로부터 ISR 결정인자 분리하기 위해 84시간 동안 키운 E681 상층액을 유기용매의 극성·비극성 성질을 이용한 단계적인 분리 과정을 통해 물질을 분리하였다(Fig. 3-1). 유기용매의 단계적 분리과정을 통해 얻어진 4개의 fraction을 직접 생장 초기 단계의 고추에 적용하여 ISR 발현 여부를 확인해 보았다(Fig. 3-2). Hexane, ethylacetate, butanol fraction을 적용한 고춧잎은 음성대조군처럼 검게 타들어가는 모습이었다. 그러나 remaining supernatant와 E681 whole cells를 처리한 고춧잎은 BTH(positive control)를 처리한 고춧잎의 병징 정도와 비슷한 양상을 보였다. 따라서 remaining supernatant에 ISR 결정인자가 존재할 것으로 예상되었다. ISR 결정인자를 분리하기 위하여 remaining supernatant를 methanol에 용해시켜 soluble phase와 nonsoluble phase로 분획하였다. 두 개의 fraction을 고추에 적용하여 ISR 발현 양상을 살펴본 결과, methanol-soluble phase가 BTH 처리군과 비슷한 병징 정도를 보여주었다. 이를 근거로 soluble phase에 ISR 결정인자가 존재할 것으로 예상되어, silica column chromatography를 이용하여 methanol-soluble phase에서 13개의 fraction을 분리하여 ISR 결정인자를 분리하고자 하였다. 메탄올 용해층의 13개 fraction 또한 고추에 적용하여 ISR 발현 여부를 조사한 결과, ISR 활성을 가진 2개의 후보군을 선별하였다(Fig. 3-3). 2개의 후보군 중에서 fraction 7을 다시 분리하여 ISR 활성 여부를 조사하였다. 그 결과 fraction 7-8에서 높은 ISR 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 3-4). 분리된 fraction 7-8로부터 *P. polymyxa* E681 유래 ISR 물질 동정을 위해 TLC, HPLC를 이용한 물질을 확인하고 NMR, GC-Mass 등을 통해 물질 분석을 하였다. 그 결과 2종의 ISR 유도 물질로 2,3-butanediol과 acetoin이 동정되었다.

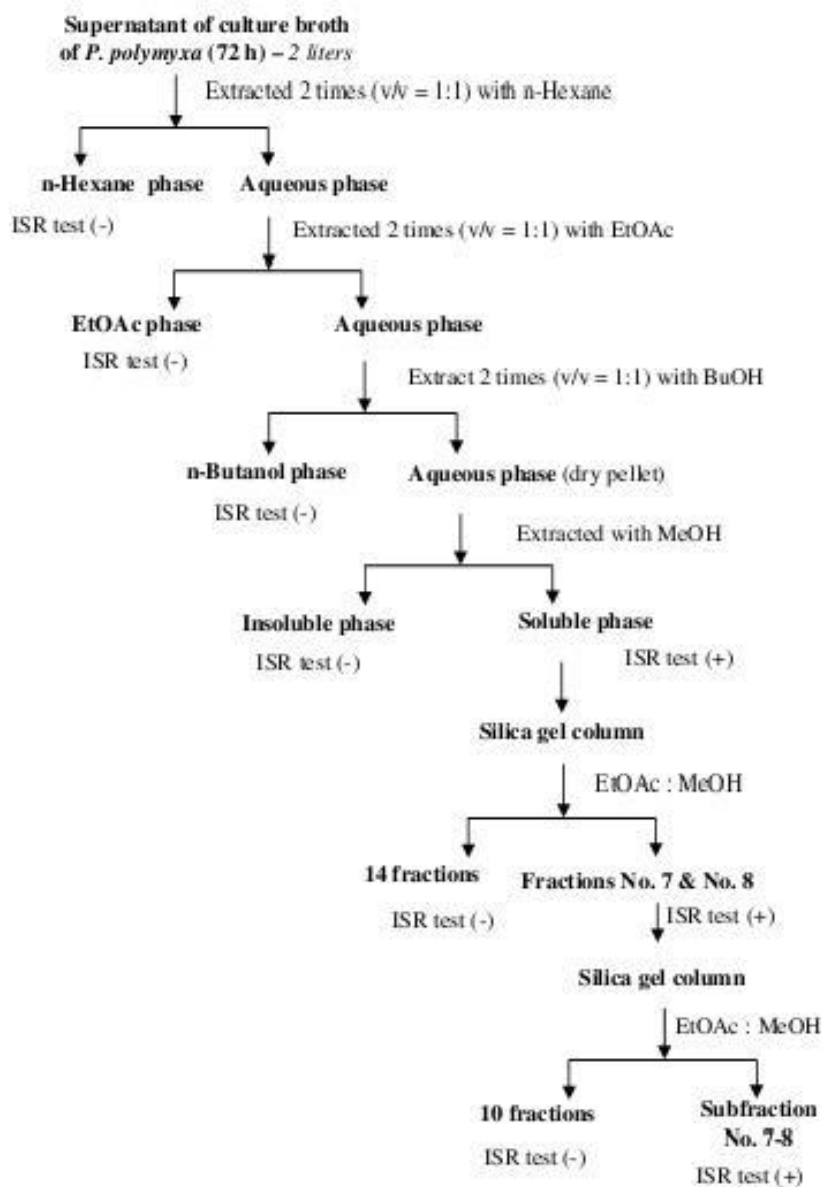


Fig. 3-1 Fractionation procedure for ISR-active compounds from *P. polymyxa* strains.

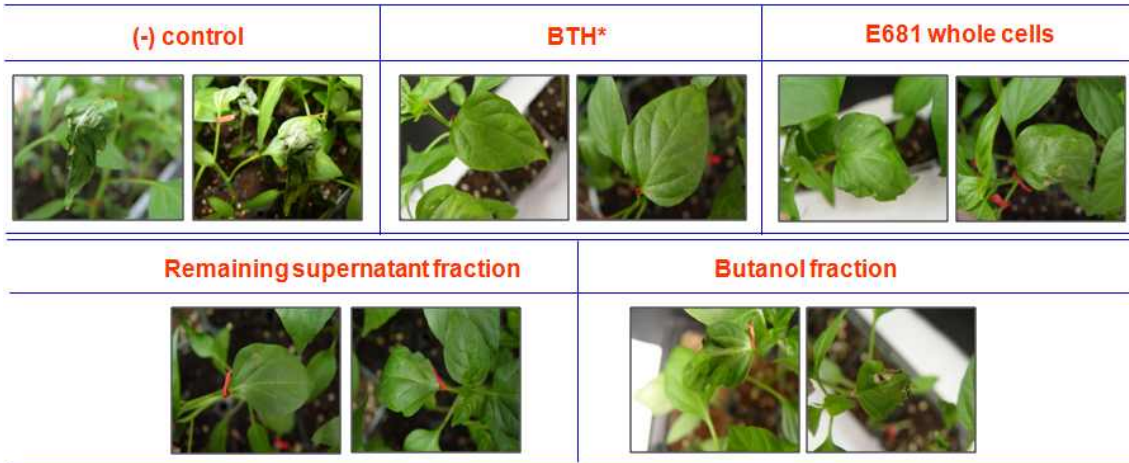


Fig. 3-2 ISR eliciting effects on pepper leaves teated with *P. polymyxa* E681 whole cells, remaining supernatant fraction, after 10 days of *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria post-infection.

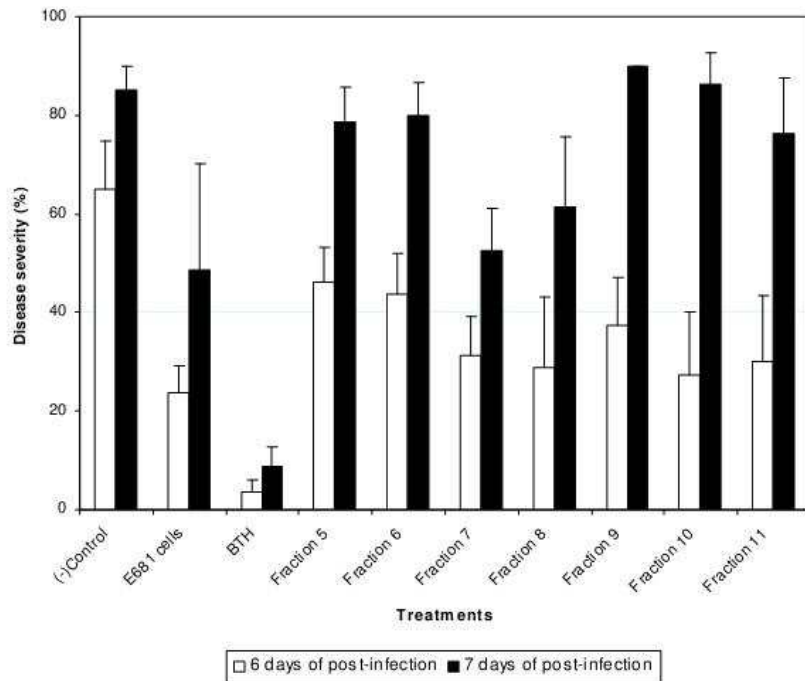


Fig. 3-3. ISR activity mediated by fractions eluted from silica gel column chromatography in pepper plants.

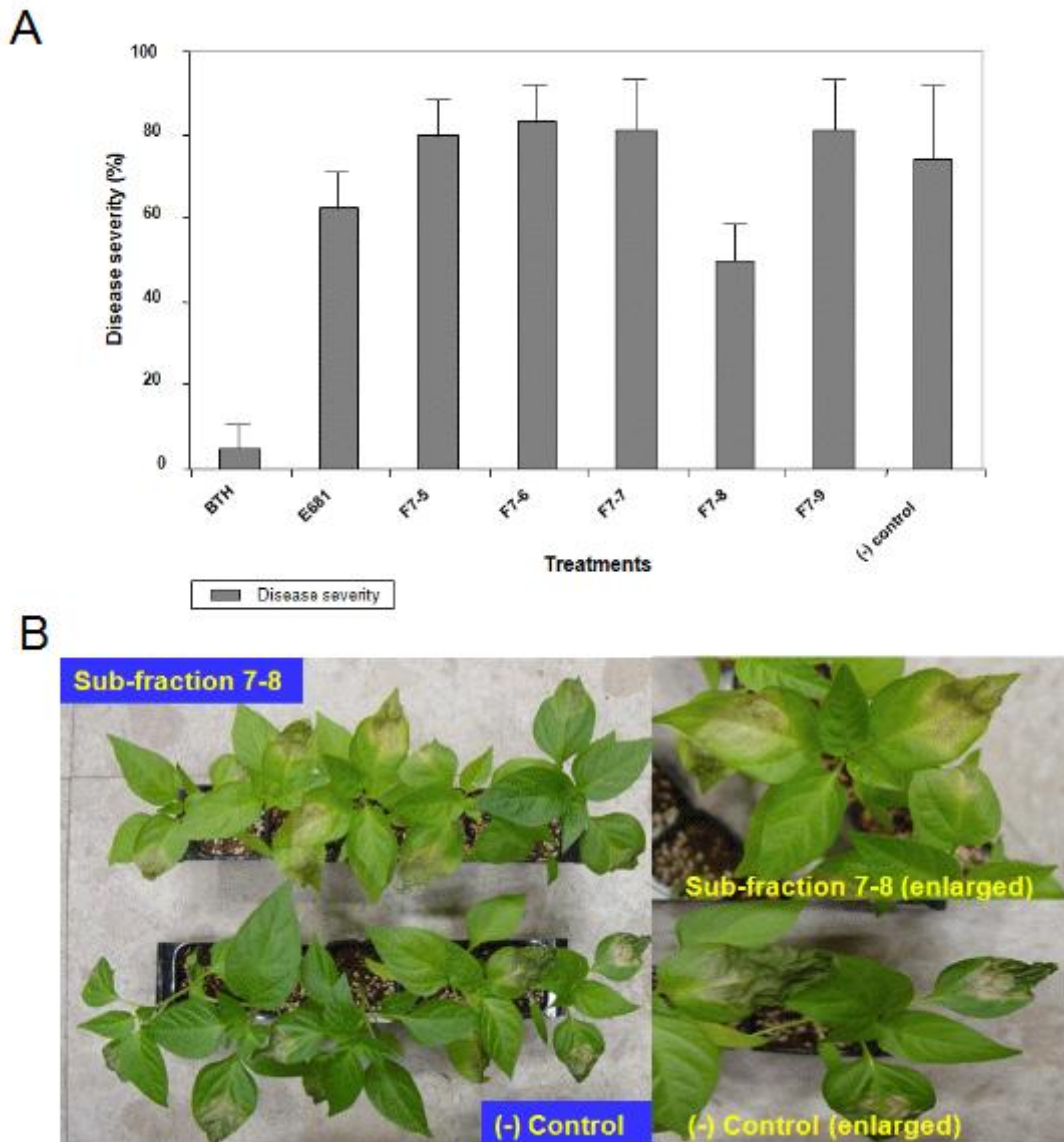


Fig. 3-4. ISR activity mediated by sub-fractions eluted from silica gel cloumn chromatography. (A) Disease severity (%), (B) The sub-fractions 7-8 showed ISR activity on pepper leaves.

나. 독도에서 분리한 신크주 *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 유래 ISR 유도 물질 분리 및 동정

독도의 까마중으로부터 분리된 균주 *O. lupini* KUDC1013의 ISR 유도물질을 분리,

동정하기 위해 위의 E681와 같이 hexane, ethyl acetate, butanol과 같은 유기용매를 이용한 단계적 분리방법을 통해 물질을 분리하였다. 이 과정을 통해 얻어진 4개의 fraction을 직접 담배 유묘에 적용하여 이들의 ISR 활성 여부를 조사하였다. 담배 유묘를 MS media가 첨가된 24 well plate에 성장시킨 뒤 1주일 후에 4개의 fraction를 뿌리에 적용하였다. 분리된 4개의 fraction은 10% DMSO solution에 resuspention시켜 담배 뿌리에 10 μ l씩 처리하였다. 담배에 fraction을 처리 뒤, 7일 후 담배짓무름 병원균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 현탁액(10^8 CFU/ml)을 담배 유묘에 각각 4장의 잎 위에 5 μ l씩 떨어뜨렸다. 병원균 접종 24시간 후 이들의 병징을 조사하였다. 발병도는 병반이 나타나는 잎의 개수/담배 개체 수로 조사하였다. Fraction의 ISR효과를 비교하기 위해 음성대조군으로는 멸균된 1차 증류수, 양성대조군으로는 0.5mM BTH가 각각 사용되었다. 또한 KUDC1013균주 현탁액을 처리한 처리구 및 supernatant 처리구도 포함하여 fraction 처리구들과 ISR효과를 비교하였다. 4개의 fraction과 KUDC1013 균주현탁액 처리구 및 음성대조군과 양성대조군의 병징을 조사한 결과 hexane, butanol fraction에서 높은 ISR 활성을 나타내었다(Fig. 3-5). KUDC1013의 hexane과 butanol fraction에서 ISR 결정인자가 존재할 것으로 예상되었다. KUDC1013 유래 ISR 물질 동정을 위해 TLC, HPLC를 이용한 물질을 확인 및 검증하고 NMR, GC-Mass 등에 의한 물질의 분석을 진행 중에 있다.

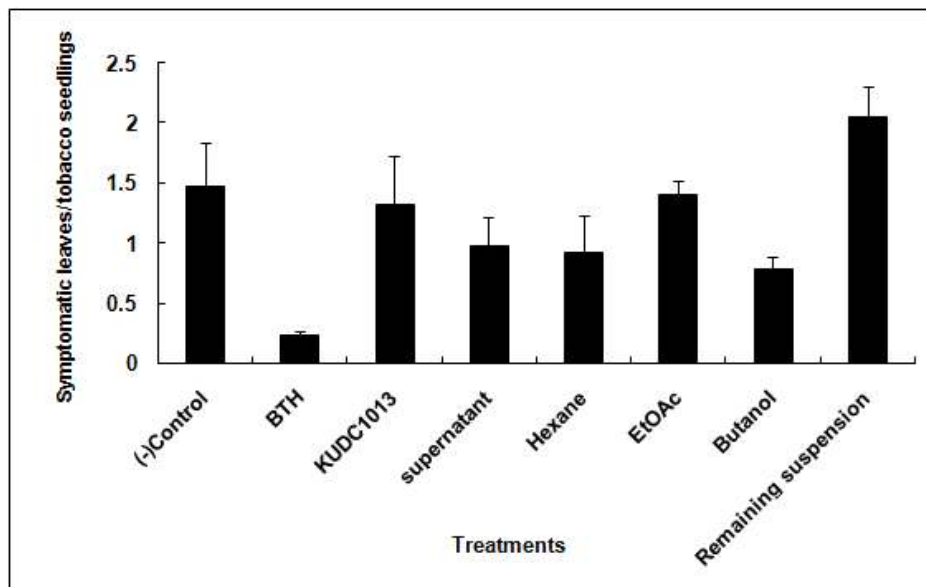


Fig. 3-5. ISR activity mediated by hexane and butanol fractions on tobacco seedlings.

2. 고추와 담배에서 고효율의 ISR활성을 가지는 신균주 탐색

가. 한반도 남부 지역의 고추 및 벼로부터 분리한 고효율 ISR균주 탐색

먼저 ISR 능력을 가진 신균주를 탐색하기 위해 대구, 포항, 순천, 경주 등 전국의 고추 및 벼 재배 지역의 고추 및 벼를 수집하여 이들의 잎, 줄기, 및 뿌리로부터 다양한 질소 고정 세균과 포자형성세균(*Bacillus* sp.)을 형태, 색상, 크기 등에 따라 분리하고 16S rDNA 염기서열을 통해 부분 동정 하였다. ISR 결정인자를 보유한 신균주 선발을 위해 *Bacillus* sp. 16종과 질소고정세균 84종을 직접 고추 및 담배 모종에 적용하여 ISR 능력을 가진 균주를 탐색하였다. 분리균주들이 식물의 생장 및 고추의 세균성점무늬병원균 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)에 대한 저항성 유도에 미치는 영향 관찰하고자 식물에 각 분리균주들과 병원균을 접종한 후 나타나는 병징의 관찰을 통해 분리균주들에 의한 식물의 저항성 유도 여부 확인하였다. 그 결과 포자형성세균들 중에서 *Bacillus megaterium* KNUC251과 *Paenibacillus polymyxa* KNUC265 두 균주가 음성대조군보다 높은 ISR효과를 보였다(Fig. 3-6) 질소고정세균에서는 음성대조군과 비교하였을 때 *Xanthomonas axonopodis* KNUC393이 ISR 효과가 높은 것으로 확인되었다(Fig. 3-7).

또한 담배에서도 ISR 효과가 나타나는지 알아보하고자 담배잎무름병을 유발하는 병원균(*Erwinia caratovora* subsp. *caratovora*)을 처리하여 각 균주의 ISR 활성 여부를 조사하였다. 그 결과 *B. megaterium* KNUC251과 *P. polymyxa* KNUC265 두 균주 모두 담배에서도 ISR 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 3-8). 이를 통해 분리균주들 중에서 ISR 능력을 가진 균주를 최종 3종(*B. megaterium* KNUC251, *P. polymyxa* KNUC265, *X. axonopodis* KNUC393)을 분리하였다.

이들의 PGPR로써의 특성에 대해서도 알아보하고자 인가용화능, 옥신생산능, 질소고정능력, siderophore 형성능력 등에 대해 조사하였다. 세 균주 모두 질소고정능력 및 옥신생산능을 가지는 것을 확인하였으며, KNUC251 균주만이 인을 가용화할 수 있는 능력을 나타내었다(Table 3-1). 또한 이들을 고추 및 담배에 적용하여 고추의 생체중량과 건조중량을 측정함으로써 직접적인 생물생장촉진효과를 검정하였다. KNUC251과 KNUC393 모두 음성대조군에 비해 건조중량을 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 3-9).

Table 3-1. Characterization of KNUC251, KNUC265, KNUC393 and E681 strains as plant growth-promoting rhizobacteria.

Characteristics	KNUC251	KNUC265	KNUC393	E681
Nitrogen fixation	+	+	+	+
phosphate solubility	+	-	-	-
Auxin production	+	+	+	+
siderophore production	-	-	ND*	+

*ND: not determined

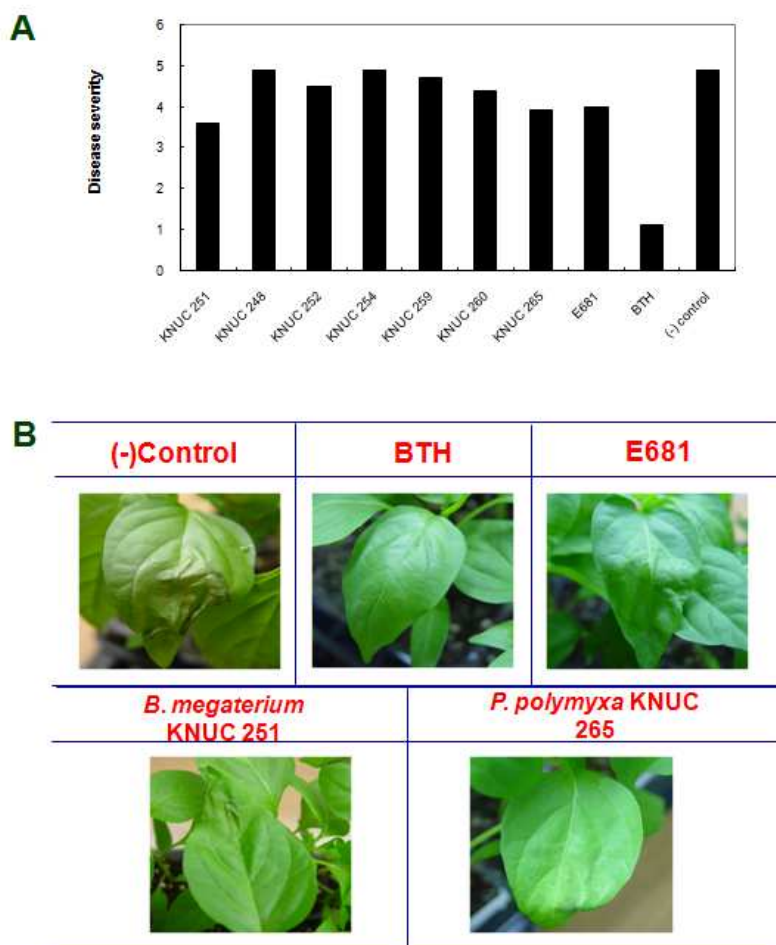


Fig. 3-6. Suppression of bacterial spot disease induced by KNUC251 and KNUC265.

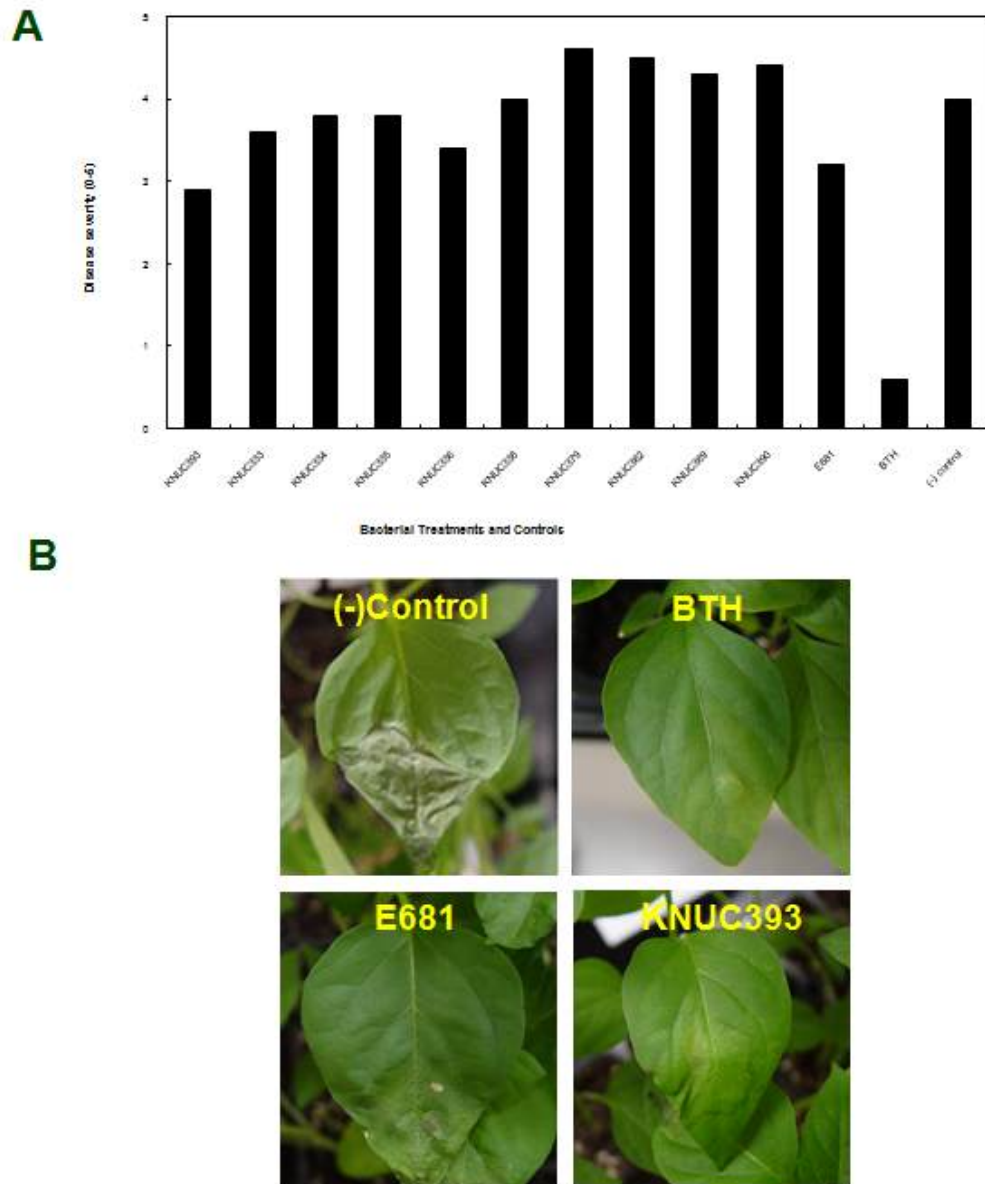


Fig. 3-7. Resistance induced in roots of pepper plants treated with KNUC393.

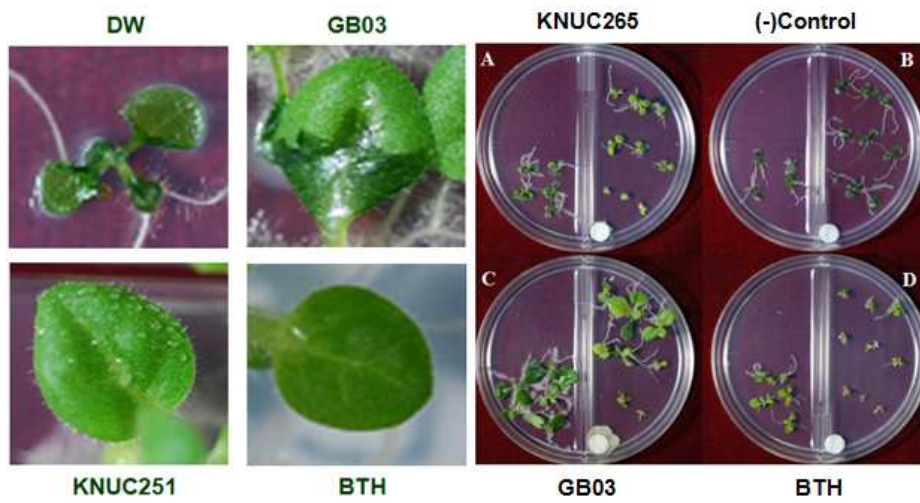


Fig. 3-8. Inhibition of soft-rot symptom development by ISR elicitors.

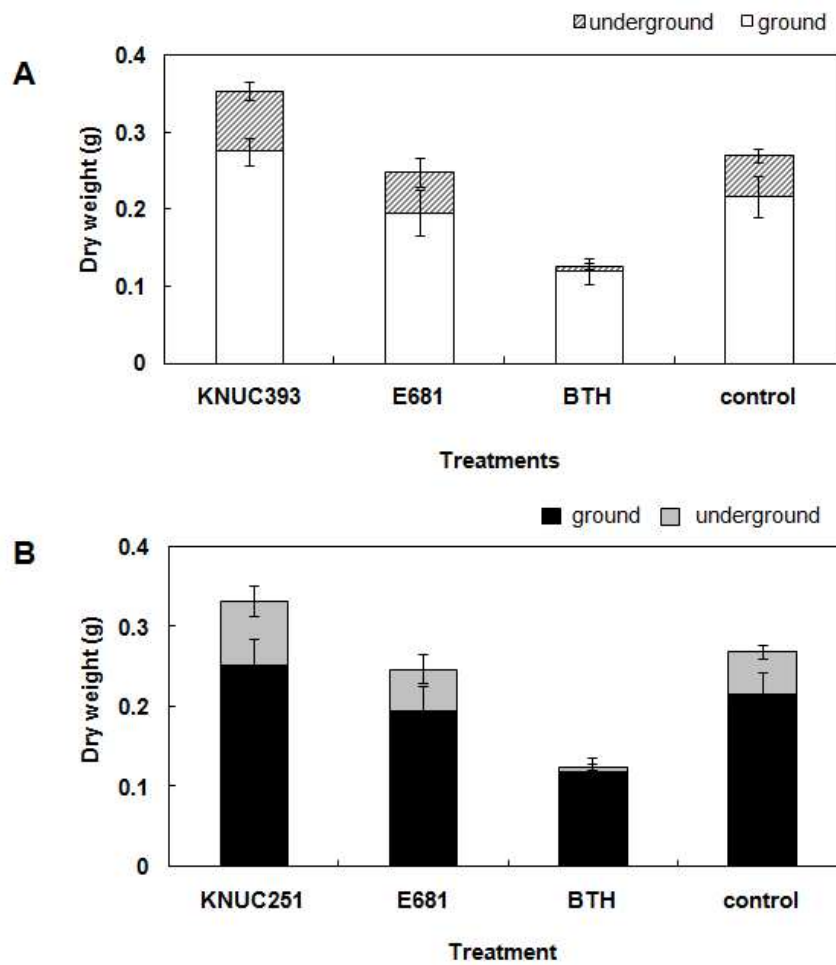


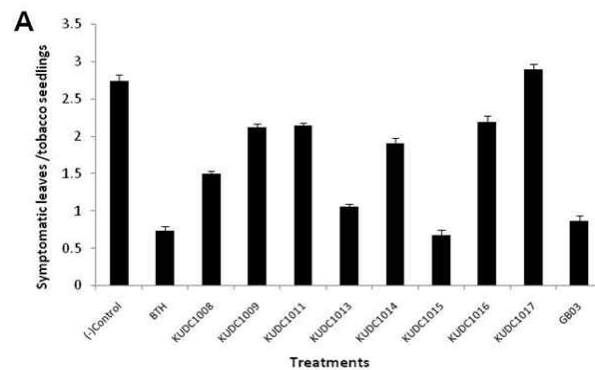
Fig. 3-9. The effect of *B. megaterium* KNUC251 and *X. axonopodis* KNUC393 on dry weight of pepper seedlings.

나. 독도의 까마중으로부터 신균주 탐색

독도에 자생하는 야생 가지과식물인 까마중으로부터 분리한 포자형성세균 27종 및 질소고정세균 17종, 모두 44종을 분리하였다. 먼저 담배에 적용하였을 때 ISR활성 여부를 조사하기 위해 담배에 균주현탁액을 직접 적용하여 담배잎무름병 병원균(*E. caratovora* subsp. *caratovora*)을 접종하여 나타내는 위와 같은 방법으로 발병도를 조사하였다. 그 결과 *Ochrobactrum lupini* KUDC1013과 *Bacillus megaterium* KUDC1015에서 양성대조군인 GB03과 비슷하거나 오히려 낮은 병징 수치를 보임으로써 높은 ISR활성을 확인하였다(Fig. 3-10). 고추에서도 ISR활성을 나타내는지 조사하기 위해 균주들을 직접 고추에 적용한 뒤 세균성점무늬 병원균을 접종하여 나타나는 병반의 면적을 관찰하여 이들의 병징 억제 정도를 조사하였다. KUDC1013, KUDC1015와 *Novosphingobium panipatense* KUDC1065 세 균주에서 양성대조군과 비슷한 수준으로 높은 ISR효과를 확인 할 수 있었다(Fig. 3-11).

ISR효과 뿐 아니라 식물 성장촉진능력을 나타내는지 알아보고자 고추의 키와 생체중량을 측정하였다. 음성대조군과 각 처리구들의 고추의 키를 비교하였을 때 세 종 모두 높은 수치를 나타내었다. 생체중량의 경우 KUDC1013을 제외한 나머지 두 종 모두 음성대조군보다 높은 수치를 보임으로써 세 종 모두 어느정도 성장을 촉진시키는 것을 알 수 있었다(Table 3-2).

이 결과를 바탕으로 KUDC1013, KUDC1015와 KUDC1065 3종을 후보균으로 선발하였다.



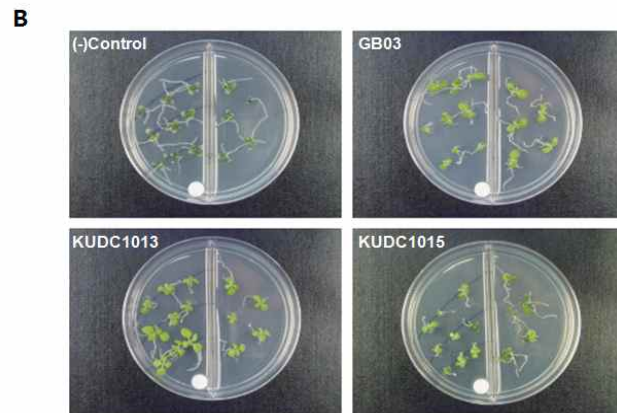


Fig. 3-10. The effect of isolates on induced systemic resistance of tobacco against *E. carotovora* sub. *carotovora* strain SCC.

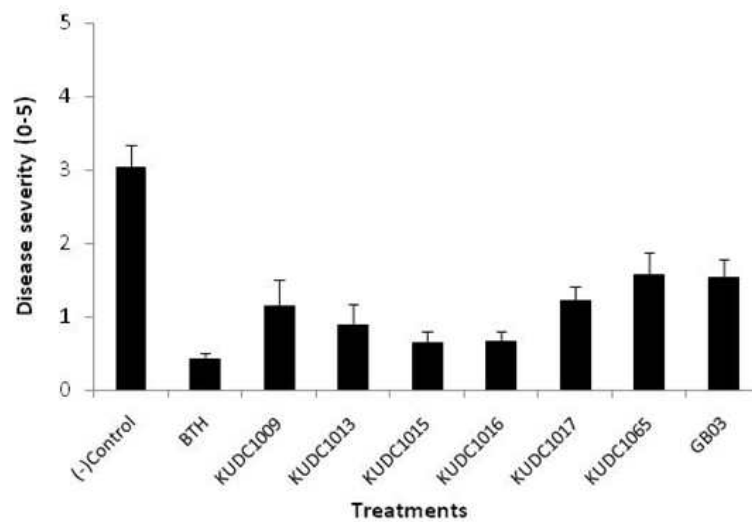


Fig. 3-11. Induced systemic resistance against *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* by the isolates.

Table 3-2. Effect of bacterial and control treatments on growth promotion of peppers.

Treatment	Height (cm)	Root fresh weight (g)	Total fresh weight (g)
BTH	8.8 ^b	0.46 ^b	3.99 ^b
GB03	11.9 ^a	1.05 ^a	7.13 ^a
KUDC1009	10.3 ^b	0.83 ^a	5.74 ^a
KUDC1013	11.4 ^a	1.27 ^a	5.38 ^b
KUDC1015	11.8 ^a	1.06 ^a	6.71 ^a
KUDC1016	10.8 ^a	1.06 ^a	5.68 ^a
KUDC1017	10.8 ^a	1.29 ^a	7.2 ^a
KUDC1065	11 ^a	1.09 ^a	6.46 ^a
(-)Control	10.5	0.82	5.62

^{a,b} Data are significantly higher and lower than (-)control, respectively (P = 0.05).

3. ISR 유도 물질의 소규모 온실 검정

가. 미생물로부터 분리된 ISR결정인자의 소규모 온실 검정

ISR 유도물질을 선발하여 실제 포장에서 고추 병을 방제하는데 사용하기 위해서는, ISR 유도물질의 병 방제 효과에 대한 정확한 검정이 필요하다. 실험실 수준에서 ISR 효과를 나타내었던 분리균주들 중 KNUDC251, KNUC265, KUDC1013, KUDC1015, KUDC1065 등을 각각 온실 환경에서도 ISR 효과가 나타나는지 알아보고자 온실에서의 식물 유도저항성 활성 여부를 조사하였다.

고추 종자(부강고추, 홍농종묘)를 1.2% NaClO 용액에 30분간 살균한 다음 1차 증류수로 30분간 행군다. 실온에서 잠시 말린 후 흐르는 물에 30분간 행군다. 실온에서 적당히 말린 고추 종자를 50구 플러그 묘판에 불린 고추 종자를 심어 30℃에서 발아시킨다. 발아 된 고추 유묘를 온실로 옮겨 22~23℃, 일조시간 12시간으로 재배하였다(Fig. 3-12).



Fig. 3-12. Green house facility at KNU campus.

고추의 본엽이 3~4장이 되었을 때, 고추 뿌리에 ISR 활성을 지닌 *Paenibacillus polymyxa* KNUC265, *P. polymyxa* E681을 각각 뿌리에 분주하였다. 고추 뿌리에 균을 처리하고 5일이 지난 후에 고추의 세균성 점무늬병을 유발하는 병원균(*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, Xav.)을 10^8 CFU/ml의 농도로 분무 접종하였다. 고추 병원균인 Xav.에 대한 저항성을 비교하기 위한 대조군으로 멸균된 1차 증류수 (sterilized distilled water, SDW)와 systemic acquired resistance(SAR) 활성을 가진 화학물질인 0.5 mM BTH(Benzo(1,2,3) thiadiazole-7-carboxylic acid-S-methyl ester)와 ISR 활성을 가진 균체로 알려진 *Bacillus subtilis* GB03을 양성대조군으로 사용하였다. Xav. 접종 10일 후에 병징을 관찰하였다. 발병도는 병반의 형태와 크기 및 병반의 숫자를 고려하여 1-5등급으로 조사하였다. 이를 표로 나타내면 다음과 같다(Table 3-3). 온실에서는 *P. polymyxa* E681 균주가 GB03보다 더 높은 ISR 활성을 나타내었다. 또한 실험실 검정에서 ISR 활성이 높았던 KNUC265 균주가 음성대조군인 멸균된 1차 증류수 보다 병징의 수치가 오히려 높게 나타났다.(Fig. 3-13) 아마도 온실에서는 실험실 수준보다 더 많은 요인들이 작용하기 때문인 것으로 예상된다.

KNUC265를 제외한 다른 분리균주들의 온실에서 ISR 활성 여부를 다시 조사하였다. 위와 같은 방법으로 실험을 수행을 하였다. Fig. 3-14에서 보는 것과 같이 E681, KUDC1013, KUDC1065 그리고 KNUC251에서 음성대조군에 비해 낮은 병징

수치를 나타냄으로써 이러한 분리균주들의 온실에서의 ISR 효과가 확인되었다.

Table 3-3. Disease severity check.

발병도	관찰 현상
1	병징이 보이지 않는 것
2	연필자국 모양의 병반이 형성되나 매우 제한된 것
3	수침(물먹은 듯 투명함) 혹은 유침상(갈색점 형성)의 병반이 형성되나 병반면적이 25% 이내
4	수침상의 병반이 다수 형성되었으며, 병반 면적 50% 내외
5	수침상의 병반이 서로 엉기거나 낙엽된 것

평균 발병도 = 모든 개체 발병도의 합/총 고추 개체 수

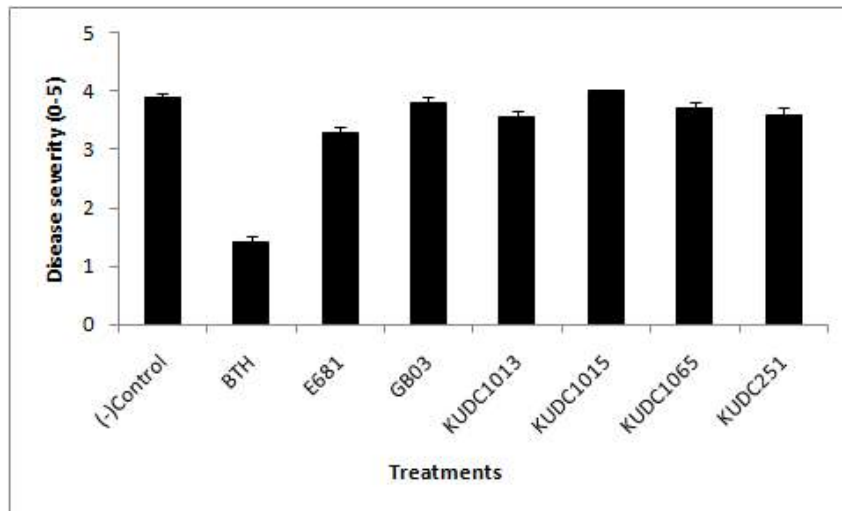


Fig. 3-13. ISR activity of against *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* on pepper.

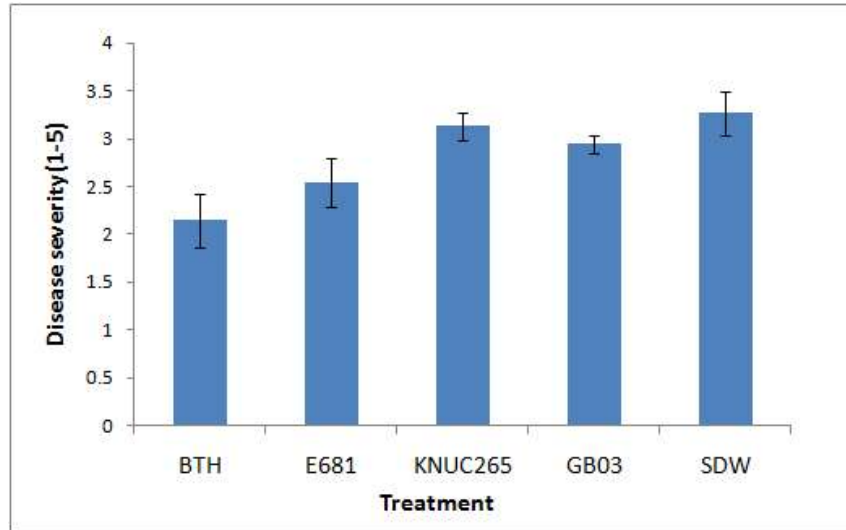


Fig. 3-14. Elicitation of induced resistance against *X. axonopodis* by isolates in peppers.

분리 세균들의 고추 뿌리에 적용하는 시기를 달리하였을 때 나타나는 ISR 효과를 알아보기 위해 고추가 발아된 지 3주, 4주, 5주 후에 분리균주 현탁액을 뿌리에 처리하였다. 균주 처리 7일 후 10일이 지난 후에 고춧잎에서 나타나는 병반의 면적을 위와 같은 방법으로 관찰하였다. 그 결과 Fig. 3-15와 같이 KUDC1013 처리구에서는 발아 3주 후 고추에 적용하였을 때 ISR 효과가 가장 높게 나타났다. 반면 KUDC1065 처리구의 경우 고추에 적용 시기를 늦출수록 ISR 효과가 더 높아지는 것을 알 수 있었다(Fig. 3-16). 이에 따라 KUDC1013과 KUDC1065 두 균주를 함께 처리한다면 다양한 시기의 고추에 적용하였을 때 식물의 저항성을 유도하여 병을 방제 할 수 있을 것으로 기대된다.

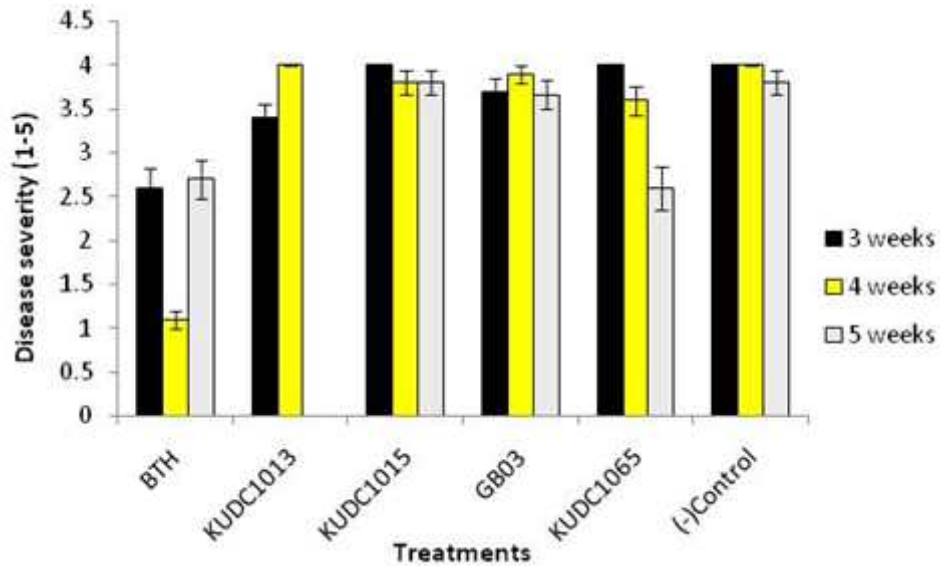


Fig. 3-15. The two isolates, KUDC1013 and KUDC1065, elicited induced systemic resistance against *X. axonopodis* according to pepper growth stage under greenhouse conditions.

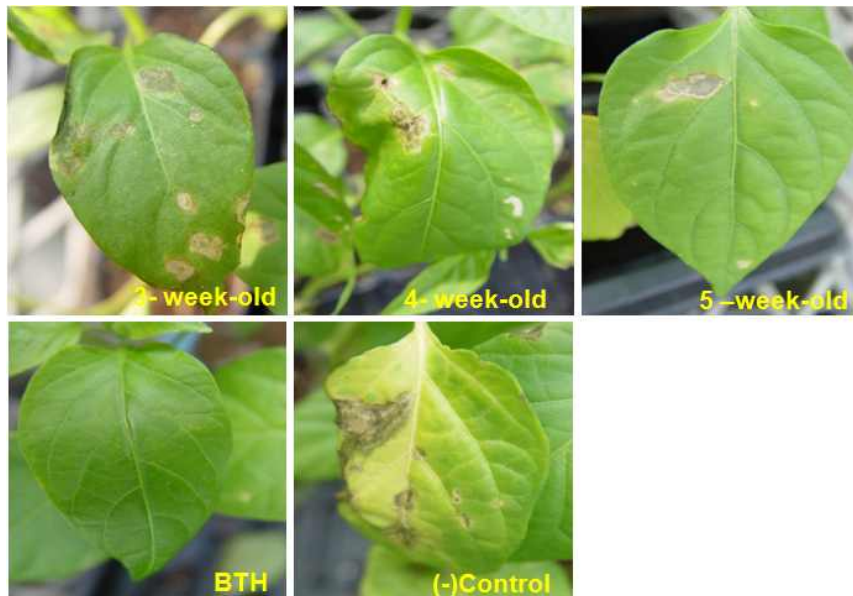


Fig. 3-16. Disease protection induced by KUDC1065 strain on 3-week-old, 4-week-old, and 5-week-old pepper seedlings against *Xanthomonas*.

4. ISR 물질의 대규모 포장 실험

온실에서 ISR 효과가 검정된 KUDC1013, KUDC1065와 E681을 포장 실험에서 ISR 활성을 나타내는지에 대해 알아보려고 필드 실험이 수행되었다. 또한 이들의 식물 성장 촉진 효과도 조사하였다. 앞서 온실 검정을 통해 KUDC1013과 KUDC1065를 함께 처리하였을 때 ISR 효과가 높게 나타날 것으로 예상되어 포장 검정을 수행하였다. 또한, 이전에 실험실 수준에서 E681의 ISR 유도 물질로 밝혀진 2,3-butanediol과 acetoin의 포장에서의 ISR 효과를 검정하였다.

가. 포장 실험 디자인

ISR 물질의 대규모 포장 실험은 2009년 9월부터 11월까지 약 두 달간 경북대학교 캠퍼스 내에 위치한 필드에서 수행되었다(Fig. 3-17). 필드 실험에 사용된 처리구들은 randomized complete block (RCB)으로 디자인 되었으며 한 개의 RCB의 사이즈는 가로 65 cm와 세로 400 cm로 고추들은 40 cm의 간격을 두고 심었다. 이 실험을 수행하기 위해 약 1200개체의 고추가 사용되었다. 10종류의 처리구들은 3~4회 반복 시행되었으며 필드 검정에서 이들의 ISR 효과 및 식물 성장촉진효과를 알아보려고 대조군을 포함하여 총 10 종류의 처리구를 적용하여 비교하였다.

음성대조군은 멸균증류수, 양성대조군은 0.5 mM BTH를 적용하였으며, 단일 처리구(E681, KUDC1013, KUDC1065)와 혼합 처리구(E681+KUDC1013, E681+KUDC1065, KUDC1013+KUDC1065) 그리고 E681의 2가지 ISR 유도물질인 2,3-butanediol과 acetoin을 처리구로 사용하였다.



Fig. 3-17. Field at KNU campus.

나. 미생물과 ISR 유도물질에 의한 세균성 점무늬 병의 방제

고추 종자(청양, 농우신흥)를 1.2% NaClO 용액에 30분간 살균한 다음 1차 증류수로 30분간 헹군다. 실온에서 잠시 말린 후 흐르는 물에 30분간 헹군다. 실온에서 적당히 말린 고추 종자를 50구 플러그 묘판에 불린 고추 종자를 심어 30°C에서 발아시킨다. 발아 된 고추 유묘를 온실로 옮겨 22~23°C, 일조시간 12시간으로 재배하였다. 고추 본엽이 6~7엽이 되었을 때 고추 유묘를 분리 균주현탁액(10^{8-9} CFU/ml)에 1~2시간 동안 침지시킨 후에 필드로 이식하였다. 이들의 ISR 효과 및 식물 생장 촉진효과를 비교하기 위해 멸균증류수와 BTH를 각각 음성대조군, 양성대조군으로 사용하였다. 세 분리균주 E681 KUDC1013, KUDC1065 각각의 단일 처리구들과 E681+KUDC1013, E681+KUDC1065, KUDC1013+KUDC1065를 함께 처리한 3가지 혼합 처리구들의 ISR효과를 비교하였다. 또한 앞서 E681의 ISR 유도 물질로 검정된 2,3-butanediol과 acetoin을 고추 뿌리에 적용하였다. 고추들을 필드로 침지 이식한 뒤 7일 후에 분리균주 현탁액(단일 처리구: 10^{8-9} CFU/ml, 혼합 처리구: 10^{9-10} CFU/ml) 20 ml을 뿌리에 적용하였다.

각 처리구들의 ISR효과를 검정하기 위해, 분리 균주현탁액 적용 7일 후에 병원균인 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*를 접종하였다. 병원균은 일주일 간격을 두고 접종 방법을 달리하여 두 차례 접종하였다. 첫 번째 병원균 접종은 한 개체의 고추에 3장의 고춧잎 뒷면에 주사기의 주사바늘을 제거한 뒤 병원균 현탁액(10^{5-6} CFU/ml)을 주사하였다. 첫 번째 접종 일주일 후 병원균 현탁액(10^8 CFU/ml)을 고추 식물체 전체에 골고루 살포하였다. 첫 번째 병원균 접종 6일 뒤 병원균을 주사한 잎들의 병반의 형태와 면적 및 병반의 숫자를 고려하여 0-5등급으로 조사하였다(Table 3-4).

두 번째 병원균 옆면 살포 접종 20일 후에 나타난 고추의 병징 정도를 Table 3-5에 제시되어 있는 기준에 따라 0~5등급으로 나누어 조사하였다.

Table 3-4. Disease rating scale from 0 to 5 for injection.

발병도	관찰 현상
0	잎에서 병반이 보이지 않음
1	접종한 잎의 병반 면적이 10% 미만
2	접종한 잎의 병반 면적이 10%에서 25% 미만
3	접종한 잎의 병반 면적이 25%에서 50% 미만
4	접종한 잎의 병반 면적이 50%에서 75% 미만
5	접종한 잎의 병반 면적이 75%이상 또는 죽은 잎

평균 발병도 = 모든 개체 발병도의 합/총 고추 개체 수

Table 3-5. Disease rating scale from 0 to 5 for spraying.

발병도	관찰 현상
0	병징을 보이지 않음
1	전체 식물체의 병반 면적이 1%~20%
2	전체 식물체의 병반 면적이 20%~40%
3	전체 식물체의 병반 면적이 40%~60%
4	전체 식물체의 병반 면적이 60%~80%
5	전체 식물체의 병반 면적이 80%~100%

평균 발병도 = 모든 개체 발병도의 합/총 고추 개체 수

주사기를 이용하여 병원균을 접종하여 나타난 고춧잎의 병징을 조사한 결과, 대부분의 처리구들에서 음성대조군과 비교하였을 때 ISR 효과를 나타내었다. 특히 8개의 처리구들 중에서 E681과 KUDC1065 혼합 처리구에서 가장 높은 ISR 활성을 보였다(Fig. 3-18A). KUDC1013과 KUDC106군주들의 혼합 처리구가 각각의 단일 처리구들 보다 더 높은 ISR 활성을 기대하였으나 거의 비슷한 수준으로 세균성점무늬병을 방제하는 것을 확인하였다. ISR 유도균주인 E681을 직접 적용하는 것뿐만 아니라 E681의 ISR 유도물질인 acetoin을 직접 적용함으로써 더 높은 ISR 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한, E681의 2종류의 ISR 유도 물질 처리구를 비교하였을 때 acetoin 처리구가 2,3-butanediol 처리구보다 높은 ISR 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3-18A).

옆면 살포를 통한 병원균 접종으로 인해 발생한 고추의 병징을 조사한 결과, 8개 처리구에서 모두 음성대조군과 비슷하거나 미약한 ISR 활성을 나타내었다(Fig. 3-18B).

특히 분리균주들의 혼합 처리구들의 병징 정도가 각각의 단일 균주처리구보다 근소

하지만 3 종류 모두에서 낮은 병징 수치를 나타내었다. 분리균주들의 단일처리구와 혼합처리구가 큰 차이를 보이지는 않지만 혼합처리구들의 ISR 효과가 미약하지만 더 높게 나타나는 것으로 보아 ISR 유도할 수 있는 혼합처리구들의 식물 방제재로서의 잠재적인 가능성을 확인 할 수 있었다.

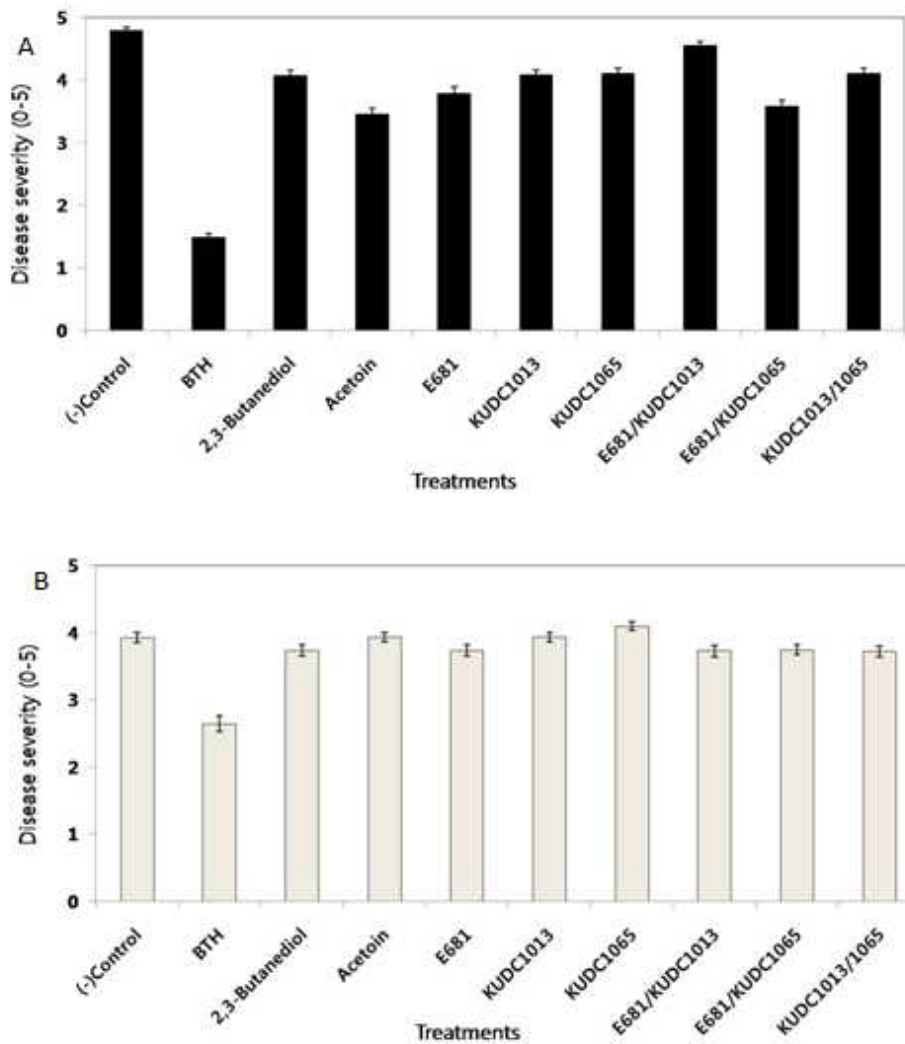


Fig. 3-18. Disease protection induced by PGPR mixture strains after *X. axonopodis* challenge of pepper plants under field conditions. (A) The

disease severity was assessed 6 days after pathogen challenge by injection. (B) The disease severity was assessed 20 days after pathogen challenge by spraying.

다. 미생물에 의한 필드 환경 하에서 식물 성장촉진효과 검정

분리균주들의 식물성장촉진효과를 조사하기위해 이들의 키, 생체중량, 건조중량이 측정되었다. 2회의 분리균주 현탁액 처리 2달 후 고추의 키, 생체중량 그리고 건조중량을 조사하였다. 고추의 키를 비교하였을 때 근소한 차이지만 8개의 처리구에서 모두 음성대조군보다 높은 수치를 나타내었다(Table 3-3). 좀 더 명확한 성장촉진효과를 검정하기 위해 이들의 생체중량과 건조중량을 측정하였다. 건조중량 측정을 위해 각 고추를 채취하여 65°C 오븐에서 3~4일간 넣어 통풍이 되도록 말린 후 무게 변동이 없을 때까지 수차례 측정하였다. 음성대조군과 비교하였을 때 8개의 처리구에서 모두 성장촉진효과를 확인하였다. 특히 각 균주들의 단일처리구보다 혼합처리구들의 생체중량 및 건조중량이 더욱 높은 수치를 나타냄으로써 단일처리구보다 혼합처리구들이 성장촉진효과가 더 높은 것을 알 수 있었다. 3개의 혼합처리구들 중에서 E681과 KUUDC1013 처리구에서 가장 높은 성장촉진효과를 검정하였다(Table 3-6).

Table 3-6. Enhancement of pepper height, fresh weight and dry weight by PGPR strains and mixture under field conditions.

Treatment	Height (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
(-)Control	27.08±0.31	30.03	5.02
BTH	24.06±0.45	24.97	3.80
Acetoin	28.77±0.27	36.26	5.89
2,3-Butanediol	28.75±0.23	44.52	7.20
E681	27.52±0.25	41.45	6.49
KUUDC1013	29.23±0.23	42.40	6.50
KUUDC1065	30.11±0.30	40.17	6.48
E681/KUUDC1013	28.79±0.30	55.73	8.26

E681/KUDC1065	27.94±0.27	50.45	7.15
KUDC1013/KUDC1065	28.68±0.32	46.57	7.60

제 4절 온실과 포장상태에서 ISR에 의한 고추병의 방제 (협동3)

1. 고추 세균성점무늬병의 방제 실험에 사용한 균주 및 식물체

실험에 사용한 *Bacillus* spp.는 한국생명공학연구원에서 분양 받아서 사용 하였고 (Table 4-1), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*(Xav, 고추 세균성점무늬병) 1523은 한국생명공학연구원에서 분양 받고, KACC11157과 KACC11158 균주는 한국농업미생물자원센터(KACC)에서 분양 받아서 대표 병원균 선발을 위해서 사용하였다. 세균성점무늬병균은 NA(nutrient agar, Becton, Diskinson and Company)배지에서 2일간 배양하여 단 콜로니를 취한 다음 NB(nutrient broth: Water 1 ℓ, Beef extract 3 g, yeast extract 2 g, peptone 5 g)배지에서 진탕배양(150 rpm, 28℃)하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용되는 식물체인 고추(품종; 녹광)는 50공 플러그 묘판에서 키운 후, 지름 4.4 cm 포트에 옮겨 심은 후 온실에서 재배하여 실험에 사용하였다.

2. 토양에서 분리한 미생물 균주의 보관

NA배지에 28℃ 2일간 배양한 균주의 단 콜로니를 취하여 NB배지 500 ml을 넣은 Cryotube™(지름: 12 mm, 높이: 48 mm, Nunc Co. Ltd)에서 1일간 진탕배양(150 rpm, 28℃) 후, glycerol 40%(DC Chemical Co., Ltd)를 동량으로 넣어 교반하고 -70℃ 초저온냉장고에 보관 하였다.

3. 고추 세균성점무늬병 방제를 위한 미생물 선발 검정법 확립

가. 대표균 선발

Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria* (Xav, 고추 세균성점무늬병) 대표균 선발을 위해서 병원성 검정 균주 KACC11157, KACC11158, 1523 3가지 균을 6엽기 고추에 주 당 5 ml씩 경엽분무 접종하고 6일 뒤에 Table 4-2와 같은 방법으로 이병엽율을 조사한 후에 발병도를 계산하여 병원성이 우수한 대표 병원균을 선발하였다.

Table 4-1. Isolates used in this study

Isolate	Collected location
1	gimje-si
2	gimje-si
3	gimje-si jeongjo-dong
4	buan-gun jeonggeum-ri
5	buan-gun jeonggeum-2ri
6	buan-gun haseo-myeon
7	buan-gun haseo-2myeon
8	buan-gun haseo-3myeon
9	buan-gun jangsin-ri
10	buan-gun haseo-myeon
11	buan-gun haseo-myeon
12	buan-gun wido-myeon
13	buan-gun byeonsan-myeon
14	buan-gun docheong-ri
15	buan-gun docheong-ri
Jeollabuk-do	
16	boryeong-si naehang-dong
17	boryeong-si
18	boryeong-si hyangcheon-ri
19	boryeong-si rawon-1ri
20	boryeong-si rawon-2ri
21	boryeong-si rawon-3ri
22	cheongyang-gun hwaseong-myeon janggye-ri
23	cheongyang-gun hwaseong-myeon janggye-2ri
24	cheongyang-gun sinjeong-ri
25	cheongyang-gun jangseung-ri
26	cheongyang-gun songbang-ri
27	cheongyang-gun gyowol-ri
28	cheongyang-gun daechi-ri
29	cheongyang-gun jeongsan-myeon yongdu-ri
30	cheongyang-gun sinheung-ri
Chungcheongnam-do	

나. 병원균 농도 및 접종 방법 확립

선발된 세균성점무늬병균의 OD600(optical density at 600 nm) 값을 0.2 와 0.4로 조정하여 6엽기 고추에 주 당 5 ml씩 경엽분무 접종하고, 이병엽을 조사한 후에 발병도를 계산한다. 위 실험에서 결정된 병원균의 접종 농도로 3엽기 고추 유묘에 Xav를 접종할 때에 잎의 표면, 잎 뒷면, 잎의 표면과 뒷면 모두에 경엽분무 접종하였을 때, 이병엽을 조사하여 발병도를 계산하여 병원균 접종 농도와 접종 방법을

선택하였다.

다. 고추 세균성점무늬병에 대한 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제의 효과검정

6엽기 고추에 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제(a.i. 49%, WP)를 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6 µg/ml로 주 당 5 ml씩 토양에 관주 처리하고, 7일 후에 Xav 1523의 OD600 값을 0.4로 조정하여 접종하고, 28°C 12 hrs (L/D) 상태에서 발병을 유도하여, 접종 10일 뒤에 이병엽율을 조사하였다.

라. 고추 유묘의 엽기와 병원균의 접종 농도가 acilbenzolar-S-methyl과 mancozeb 합제의 효과에 미치는 영향

1000, 200, 400, 8, 1.6 µg/ml로 농도를 조절한 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제(a.i. 49%, WP)를 6엽기, 8엽기 고추 유묘에 주 당 5 ml 씩 토양 관주처리 하고 7일 후에 Xav의 OD600 값을 0.1과 0.4로 조정하여 경엽분무 접종하였다. 병원균을 접종하고 28°C(12 hrs, L/D)에서 발병을 유도한 후, 10일 뒤에 이병엽율 조사하였다.

Table 4-2. Assessment key for investigating disease severity of pepper bacterial spot

Disease index	lesion percentage of Bacterial Spot in pepper leaves
0	No disease observed
1	more than 0.1% or under 5%
2	more than 5% or under 20%
3	more than 20% or under 50%
4	more than 50%

$$\text{Disease severity(\%)} = \frac{\sum(\text{No. of diseased plants} \times \text{disease index})}{5 \times \text{No. of plants}} \times 100$$

4. 후보 미생물 선발을 위한 온실 검정

가. 고추 유묘 검정

50공 플러그 묘판에서 재배한 2엽기 고추에, 고추 발 토양에서 분리한 444개의

Bacillus spp. 균주를 주 당 5 ml씩 관주처리하고 일주일 후에 Xav 1523의 농도를 106 으로 맞춘 후 주사접종 방법으로 접종하고 습실상(28°C, 12 hrs, L/D)에서 5일간 배양한 후, 발병지수를 이용하여 발병도를 조사 하였다.

나. 고추 유묘에서 선발 *Bacillus* spp.의 방제 효과 확인

앞선 유묘검정 실험을 통하여 선발된 *Bacillus* spp. 균주들은, 병원균주인 Xav 1523 접종 1주일 전과 2주일 전에 각각의 배양액에 고추 유묘를 1시간 침지 처리한 후, 새로운 포트(직경; 4.4 cm)에 옮겨 심은 후에 병원균을 접종하고, 5일 후에 발병도를 조사하였다.

5. 선발 *Bacillus* spp.의 항균 스펙트럼 조사

가. 선발 *Bacillus* spp.의 진균에 대한 항균활성 조사

유묘 검정실험에서 선발된 16개의 *Bacillus* spp.를 가지고 여러 가지 진균에 대한 항균활성을 조사하였다. 고추에 병을 일으키는 진균과 그 외에 식물진균을 포함하여 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC40690, *Colletotrichum acutatum* JC24, *Colletotrichum coccodes* KACC40008, *Pestalotiopsis longiseta* 12-2, *Phoma* sp. 1-1, *Cladosporium fulvum*, *Botrytis cinerea* GBYP8, *Stemphylium lycopersici* CNV-4038, *Alternaria alternata* GKPE-1, *Alternaria panax* KACC40570, *Alternaria solani* KACC40570, *Magnaporthe grisea* 060CAM1, *Phytophthora capsici* JHAI 1-7, *Rhizoctonia solani* KACC40141, *Phythium ultimum* KACC40705, *Sclerotinia rolsii* KACC42086, *Curvularia lunata* KACC40861, *Diaporthe* sp. KACC40303 총 18종 진균에 대하여 항균활성을 PDA(potato dextrose agar, Becton, Dickinson and Company)에서 대치 배양 방법으로 실시하였다. PDA배지의 가운데에 *Bacillus* spp.를 streaking하고 양 옆에 일정한 간격으로 3 mm 크기의 진균 균사조각을 접종하여 25°C에서 6일간 배양한 후, 진균의 균총 직경을 조사하였다. 대조구의 균사생장과 비교하여 균사 성장 억제율이 20% 이상인 *Bacillus* spp.는 재실험을 통하여 항균활성 여부를 확인하였다.

항균활성의 재조사 실험에서는 앞에서 수행한 실험과 동일하게 PDA에서 실험을 수행하였는데, 배지 중앙에 직경 5 mm의 진균의 조각을 접종하고, 배지 중앙에서 일정한 간격에 멸균된 paper disc(지름: 6mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd)를 올려놓았다.

Bacillus spp.의 배양액을 10 μ l씩 점적한 후, 25°C에서 6일간 배양한 뒤, 진균의 균사 성장 억제 여부를 관찰하였다.

나. 선발 *Bacillus* spp.의 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 1523에 대한 항균활성 검정 조사

NA배지에 Xav 1523 OD600값을 0.5로 조정된 배양액 50 μ l를 도말한 후에 무균상태에서 건조시키고, 멸균된 paper disc를 일정한 간격으로 5개 올려 놓고 각 paper disc에 선발한 각각의 *Bacillus* sp. 배양액을 10 μ l 접종한 후에 28°C에서 2일 배양하고 clear zone의 크기를 측정하였다.

다. 고추 탄저병에 대한 효과 검정

(1) 고추 탄저병균의 포자발아 및 부착기 형성 억제 효과 검정

고추 탄저병 포장 실험에서 우수한 효과를 보인 21-13, 22-5, 25-2 등 세가지의 균주를 선발하여 탄저병균의 포자발아 및 부착기 형성 억제 효과를 검정하였다. 선발한 3가지의 *Bacillus* spp. 배양액에 고추 탄저병균의 포자 농도가 2×10^6 spores/ml가 되도록 혼합한 다음, 고추 열매에 5 ml씩 분무 접종하고 포화습도가 100%로 유지되게 하여 30°C에서 배양하였다. 병원균을 접종하고 2일과 5일 후에 다용도 테이프(19 mm x 20 mm 스카치™ 3M company)를 이용하여 고추 열매 표면의 탄저병균 포자를 떼어 내어, 현미경 하에서 포자 발아율과 부착기 형성율을 조사하였다.

(2) 고추 열매를 이용한 선발 *Bacillus* spp.의 고추 탄저병에 대한 효과 검정

2007년 충북대학교 부속농장에서 실시한 고추 포장 시험에서 탄저병에 대해 효과를 보인 6개 균주를 고추 열매를 이용한 실내검정에서 탄저병에 대한 방제효과를 조사하였다. 고추 열매표면에 NB배지에서 1일간 배양한(150 rpm, 28°C) *Bacillus* spp.의 배양액을 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum* JC24)을 분무 접종하기 2일 전과 접종하고 12시간 후, 1일 후, 2일 후에 고추 열매표면에 4 ml씩 분무 처리하였다. *Colletotrichum acutatum* JC24를 25°C의 PDA에서 10일간 배양한 후, 분생포자를 수확하였다. 수확한 포자 현탁액의 농도는 1×10^4 spores/ml로 조절된 후에 고추 열매표면에 4 ml씩 분무하여 접종하였다. 접종한 고추 열매는 암상태의 25°C

에서 2일 동안만 습실을 유지 하고, 동일한 조건에서 습실만을 제거한 후에 계속 배양하면서 탄저병의 발병을 유도하였다. 탄저병균을 접종하고 10일 후에 각각의 고추 열매에서 발생한 탄저병의 발병도를 조사하였다. 또한 2008년 충북대학교 부속농장의 고추 포장에서 실험한 21-13, 22-5, 25-2 균주의 탄저병에 대한 방제효과를 위에서 기술한 방법을 개선한 방법으로 수행 하였다. 본 실험에서는 포장에서 수확한 독야청청 고추의 열매를 세척한 후 건조하여 사용하였다. 각 처리구 당 5개의 열매는 상처를 내지 않은 채로, 5개의 열매는 인위적으로 상처를 내서 실험에 사용하였다. 모든 고추 열매는 탄저병균을 접종하기 1일 전과 접종하고 1일 후에, NB배지에서 2일간 배양(150 rpm, 28℃)한 각각의 *Bacillus* spp.의 배양액을 10 ml씩 분무 처리하였다. 고추 탄저병균은 현탁액의 포자 농도를 10^6 spores/ml로 조정하여 처리 당 5 ml씩 분무하여 접종하였다. 접종한 고추 열매는 30℃에서 5일간 보관하면서 습실을 유지하였고, 병원균 접종 12일 후에 발병도를 조사 하였다.

(3) 탄저병에 대한 지속 효과

탄저병에 대해 방제 효과가 인정된 5개 균주 *Bacillus* spp. 21-13, 22-5, 22-7, 23-14, 25-2를 선발하여 실험하였다. 50공 플러그 묘판에서 재배하는 2엽기의 고추 유묘에 주 당 5 ml씩 각각의 균주 배양액을 토양에 관주처리 하고, 온실에서 6엽기 까지 재배하였다. 고추 유묘가 6엽기가 되었을 때, 실험에 사용한 5개 균주의 배양액 20 ml에 30분간 침지처리하고 새로운 포트(지름: 19.0 cm)로 이식하였다. 계속 온실에서 재배하며 개화기 때에 각 *Bacillus* spp. 배양액을 고추 성체 한 주 당 100 ml씩 경엽분무 처리하고, 다시 고추 열매가 맺혔을 때 주 당 100 ml씩 경엽분무를 하였다. 고추 열매가 홍고추로 변할 때, 주 당 100 ml씩 2주 간격으로 두 차례의 경엽분무 처리를 하였다. *Bacillus* spp. 배양액을 총 6회 처리하고 2일 후에 고추 탄저병균을 접종하였다. 접종원의 포자 농도는 10^6 spores/ml로 조절하였으며, 포자 현탁액에는 1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20, Junsei chemical Co., Ltd)와 0.01% silicon carbide(400 mesh)를 첨가하고 고압 분무기를 이용하여 주 당 포자 현탁액을 40 ml씩 분무 접종하였으며, 16일 후에 발병과율을 조사하였다.

6. 선발 *Bacillus* spp.의 동정

선발된 미생물 동정은 16s rDNA의 염기서열 분석을 통하여 수행하였다. 선발된 미

생물 균주의 chromosomal DNA를 분리한 후 primer 518F(5'-CCAGCAGC CGCGGTAATACG-3')와 primer 800R(5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')를 사용하여 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 polymerization시키는 조건에서 PCR로 증폭 하였다.

BigDye terminator를 이용한 Cycle sequencing 방법으로 Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer와 phred /Phrap 프로그램을 사용하여 분석 하였다.

7. 포장에서의 효과 검정

가. 오이 흰가루병에 대한 선발 균주의 효과 검정

고추 탄저병에 우수한 효과를 나타낸 균주 22-5를 NB배지에서 2일간 배양(150 rpm, 28°C)한 후에 4,000 rpm에서 원심분리 후 하층액만을 수거하여 멸균수에 현탁 하여 OD값을 측정하였다. *Bacillus* sp. 22-5 현탁액의 O. D. 값을 1.0, 0.2, 0.03으로 조정 한 후, 1엽기 오이(품종: 백다다기) 유묘를 30분간 침지처리한 후 이식하고, 다시 7일 후에 주 당 동일한 농도의 현탁액을 20 ml씩 관주처리를 하였다. 최종적으로 다시 10일 후에 22-5의 현탁액을 주 당 100 ml씩 경엽처리를 하였다. *Bacillus* spp. 22-5의 배양액을 처리한 오이 유묘는 7일 간격으로 오이 흰가루병의 발병도를 조사하였다.

나. 선발 *Bacillus* spp.의 고추 탄저병에 대한 포장실험

2007년 충북대학교 부속농장의 고추 포장에 고추(품종: 청풍명월) 유묘를 5월11일에 정식한 후에 1번의 침지처리(주 당 100 ml씩), 2번의 관주처리(주 당 30 ml씩) 그리고 2번의 경엽처리(처리 당 3000 ml씩) 방법으로 총 5번의 선발 *Bacillus* spp. 균주를 처리하면서 3차례에 걸쳐 고추 탄저병 발병과율을 조사 하였다. 그리고 2008년에는 충북대학교 부속농장의 고추 포장에서 고추(품종: 독야청청) 유묘를 5월 6일에 정식하고 1번의 침지처리, 2번의 관주처리 그리고 3번의 경엽처리 방법으로 총 6번의 선발 *Bacillus* spp. 균주를 처리하면서 5차례에 걸쳐 고추 탄저병 발병과율을 조사 하였다.

8. 균주 22-5와 25-2의 대량 배양 조건 확립

2007년, 2008년 충북대학교 부속농장 고추 포장에서 효과를 나타낸 균주 22-5, 25-2를 상업적으로 이용하기 위해서 최적 온도 및 시간과 배지의 조성과 pH에 따른 *Bacillus* spp. 배양액의 배양 조건을 확립 하고자 하였다.

가. 균주 22-5, 25-2 최적 배양온도 및 배양시간 조건 확립

150 rpm, 28℃에서 1일간 배양한 *Bacillus* spp. 배양액을 접종원으로 사용 하였다. NB배지 50 ml을 넣은 100 ml 삼각플라스크에 접종원을 10 µl를 접종 하고 24℃, 28℃, 32℃, 36℃ 각 각의 온도 조건에서 150 rpm으로 진탕배양 하면서 접종 12시간 전 까지는 4시간 간격으로 OD600값을 조사하고, 접종 12시간 후 부터는 12시간 간격으로 OD600값을 조사 하였다(김 등, 2006).

나. 배지 조성 및 pH에 따른 균주 22-5, 25-2 배양 조건 확립

위 실험과 동일하게 150 rpm, 28℃에서 1일간 배양한 *Bacillus* spp. 배양액을 접종원으로 사용 하였다. NB배지에 0.05% FeSO₄·7H₂O와 0.005% MnCl₂·4H₂O를 첨가한 배지를 기본 배지로 1% glucose, maltose, sorbitol 탄소원을, 0.5% tryptone, malt extract, yeast extract 질소원을 각 각 첨가하여 28℃에서 150 rpm 배양하면서 접종 36시간 후에 OD값을 측정하여 탄소원과 질소원에 따른 균주 22-5, 25-2의 성장을 조사하였다.

NB배지의 pH를 4, 5, 6, 7, 8로 조정하여 150 rpm, 28℃에서 1일간 배양한 *Bacillus* spp. 배양액을 접종원으로 10 µl를 접종하고 28℃에서 150 rpm 배양 36시간 후에 OD값을 측정하여 균주 22-5, 25-2의 성장을 조사하였다.

2 . 결 과

1. 고추 세균성점무늬병에 대한 검정 방법 확립과 acilbenzolar -S-methyl과 mancozeb 합제 효과 검정

가. 실험에 사용한 세균성점무늬병균의 선발

Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria 균주 KACC11157, KACC11158, 1523의 각각의 배양액을 6엽기 고추 유묘의 잎 표면에 골고루 경엽분무 접종하고, 28℃에

서 6일 동안 습실을 유지하며 관리한 후, 발병도를 측정하였다(Fig. 4-1). 그 결과 Xav 균주의 발병도는 KACC11158 8.33%, KACC11157 33.33%, 1523 58.33%로 조사 되었다. 동일한 방법으로 각각의 Xav 균주를 접종하였을 때 가장 높은 발병도를 나타낸 Xav 균주 1523를 고추 세균성점무늬병의 스크리닝 균주로 결정하였다.

나. 병원균 농도 및 접종 방법 확립

Xav 1523의 OD600값을 0.2와 0.4로 조정하여 경엽분무 접종하고 5일 뒤에 발병도를 조사하였다. OD600값 0.2 처리에서는 56.25%, OD600값 0.4 처리에서는 87.50% 발병도를 나타내었다(Fig. 4-2). 병원균 농도 확립실험에서 3엽기 고추 유묘에서 병원균의 OD600 값을 0.4로 조정하여 접종하였을 때 효과적으로 병이 발생하는 것을 알 수 있었다.

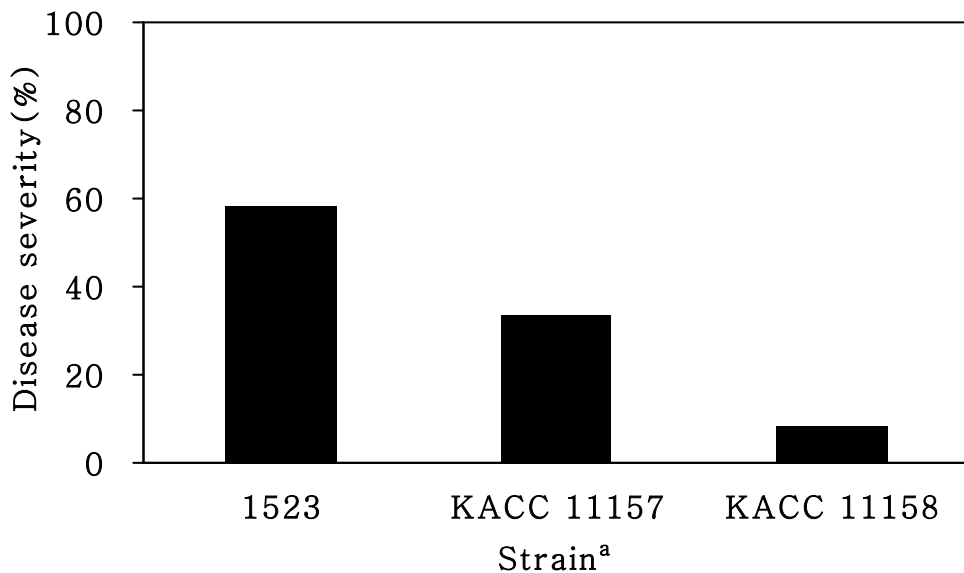


Fig. 4-1. Comparison of the disease severities of pepper bacterial spot isolates caused by *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*.

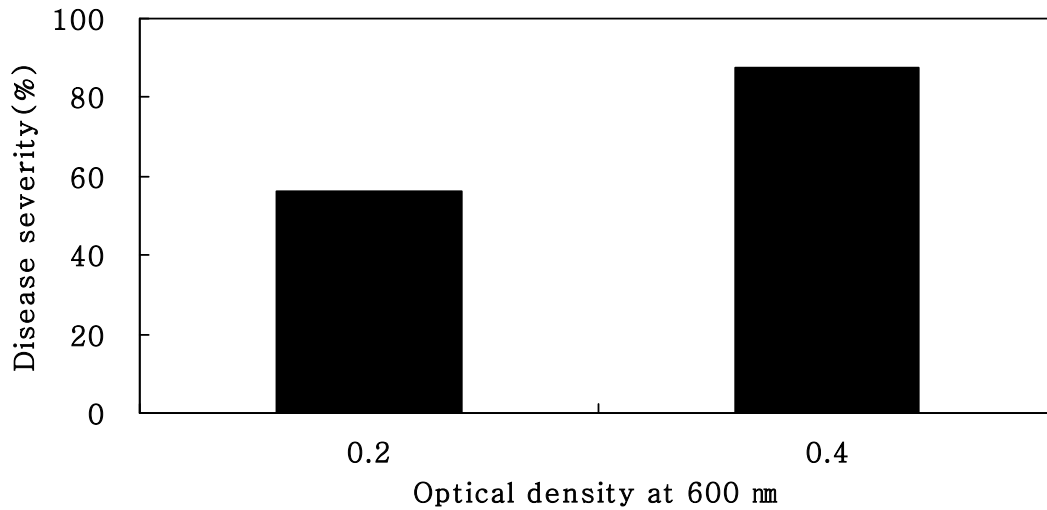


Fig. 4-2. Disease severities caused by isolate 1523 of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* treated with different OD600 value.

병원균 접종 방법을 확립하고자 Xav 1523의 OD600값을 0.4로 조정하여 3엽기 고추 유묘의 앞 표면, 잎 뒷면, 그리고 표면과 뒷면 모두에 경엽분무 접종하고, 3일, 5일, 7일째에 발병도를 조사하였다(Fig. 4-3). 접종 3일째에는 고추 유묘 아래 부분을 접종한 처리에서 높은 발병도를 나타내었다. 접종 후 시간이 지날수록 모든 처리의 발병도는 점차 증가 하다가, 접종 7일째에서는 모든 처리간의 발병도가 유사해 짐을 알 수 있었다. 앞의 한 면보다는 표면과 이면을 모두 접종한 고추 유묘에서 접종 후 3일째인 접종 초기부터 다른 처리구에 비하여 발병도가 높았다(Fig. 4-4).

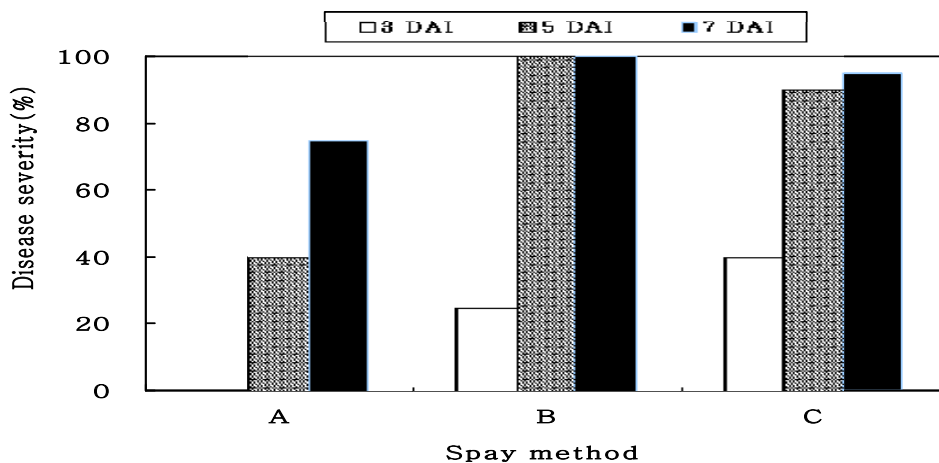


Fig. 4-3. Comparison of disease severities of isolate 1523 on pepper bacterial spot with different spraying-treatment. A: spraying-treatment on the front of leaf, B: spraying-treatment on the back of leaf, C: both side of leaf.

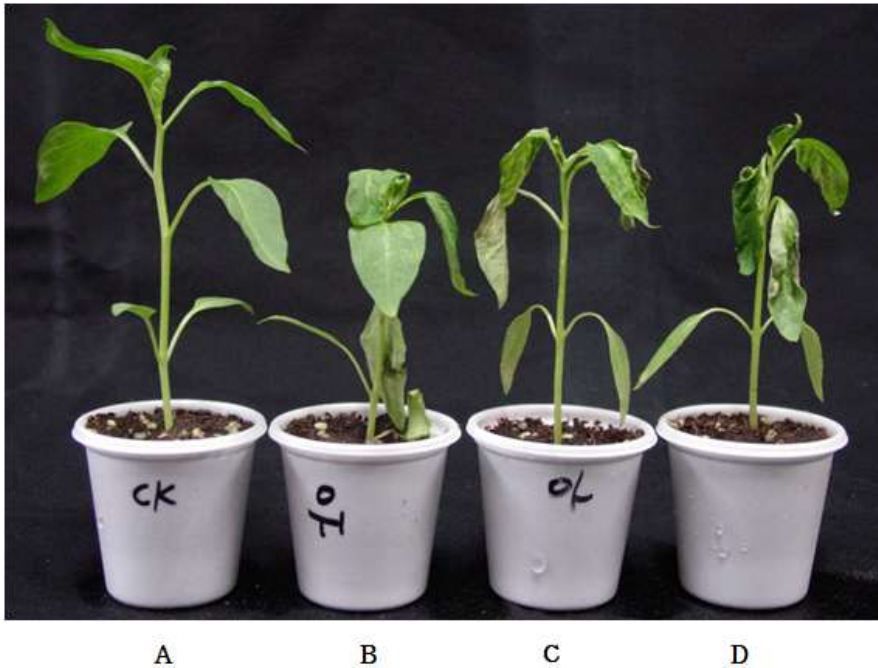


Fig. 4-4. Comparison of disease severities of isolate 1523 for establishment of inoculation concentration or inoculation method with different partial spraying-treatment on pepper seedlings. A: control, B: spraying-treatment on the front of leaf, C: spraying-treatment on the back of leaf, D: both side of leaf.

다. acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제의 처리 농도에 따른 약제 효과

6엽기 고추 유묘에 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제를 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도별로 처리한 후에 Xav를 접종하고 10일 뒤에 발병도를 조사하여 방제가를 측정 하였다(Table 4-3). acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리구에서는 고추 유묘가 약해로 인하여 고사 되었으며, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리구에서는 방제가가 75%이었지만, 약해로 인하여 고추의 신장이 무처리구에 비하여 억제되며 황변하는 것을 관찰하였다. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리구에서는 약해 증상은 관찰되지 않았지만, 방제가가 50%로 감소하였다.

acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제를 고추 유묘에 처리할 때에는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다는 소량을 처리하고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다는 많은 양을 처리하면 고추의 생육에 영향을 끼치지 않으면서 고추 세균성점무늬병을 방제하는 것을 알 수 있었다.

Table 4-3. Control value of bacterial spot about acilbenzolar-S-methyl/mancozeb several concentration on pepper seedling in chamber

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Control value(%)
5000	91
1000	75
200	50
40	8
8	0
1.6	0

라. 고추 유묘의 엽기와 병원균 OD600 값에 따른 acilbenzolar-S-methyl과 mancozeb 합제 억제효과

위 실험으로 고추 생육에 영향을 끼치는 5000 $\mu\text{g/ml}$ 를 제외하고 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제 농도를 재조정하여 6엽기의 고추 유묘에 처리하고 7일 뒤에 Xav1523의 접종원 농도를 600 nm에서의 OD값을 0.4와 0.1로 조정 후 접종하고 10일 뒤에 발병도를 조사하여 방제가를 구하였다(Table 4-4). Xav의 OD값을 0.1로 처리하였을 경우에는 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리구에서는 90% 방제가를 보였으며, 40 $\mu\text{g/ml}$ 처리구에서는 70%의 효과를 보였다. 하지만 8엽기의 고추 유묘에서는 무처리구에서 조차 세균성점무늬병이 발생되지 않아 혼합제의 효과를 조사할 수 없었다.

Table 4-4. Effect of several concentrations of acilbenzolar-S-methyl/mancozeb for bacterial spot on six leaves stage pepper seedling in chamber

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Optical density at 600nm	
	0.4	0.1
1000	100	100
200	0	90
40	0	70
8	0	60
1.6	0	40

2. 고추 세균성점무늬병에 대한 방제 효과가 우수한 *Bacillus* spp.의 스크리닝

가. 온실에서서의 유묘 검정

고추 세균성점무늬병에 효과를 보이는 *Bacillus* spp. 균주를 선발하기 위해서 2엽기 고추 유묘에 *Bacillus* spp. 배양액을 토양 관주 처리하고, 세균성점무늬병을 접종하였다. 고추를 재배하는 포장의 토양에서 분리한 444개의 *Bacillus* spp. 중, 16개의 균주에서 세균성점무늬병에 대한 방제 효과가 인정되었다.

나. 선발한 *Bacillus* spp.의 세균성점무늬병에 대한 방제 효과 확인

2엽기 고추 유묘 검정을 통해서 선발된 16개의 *Bacillus* spp. 균주 배양액에 2엽기의 고추를 침지처리하고 새로운 포트에 이식하였다. 고추를 이식하고 1주일과 2주일 후에 각각 병원균을 접종하여, 선발한 균주의 병 방제효과를 확인하였다. 고추 유묘를 침지처리한 혼합제는 병원균을 접종하기 1주일 전과 2주일 전 처리보다 효과가 우수하였다(Table 4-5). 그러나 21-13과 25-3은 2주일 전 처리에서 100%로 병 방제 효과가 상승하였다. 병원균 접종하기 1주일과 2주일 전 침지처리에서 모두 50% 이상의 효과를 보이는 균주는 8-5, 21-13, 22-7, 25-2, 25-3으로 총 5개 균주에서 방제 효과가 확인되었다. 12-9, 15-5, 22-9, 23-4 균주는 병원균 접종 1주일 전에 침지처리 하였을 때, 병 발생을 100% 억제 하였으며, 2주일 후에는 그 효과가 0 또는 33%로 감소하였다.

Table 4-5. Effect of interval dipping-treatment with culture solution selected *Bacillus* spp. on pepper seedling in chamber

Isolate	Control value(%)	
	before one week	before two weeks
7-6	50	25
8-2	83	0
8-5	83	50
9-5	83	0
11-9	83	0
12-9	100	0
15-5	100	0
21-13	66	100
22-5	16	66
22-7	100	66

22-8	83	33
22-9	100	0
23-14	100	33
24-18	0	50
25-2	50	66
25-3	16	100
acilbenzolar-S-methyl/mancozeb	100	100

3. 선발 *Bacillus* spp.의 항균 스펙트럼

가. 선발 *Bacillus* spp.의 진균에 대한 항균활성 조사

고추 유묘 검정실험에서 선발된 16개의 *Bacillus* spp. 균주의 항균활성을 18종의 진균과 대치 배양하여 진균의 균사 생장 억제 여부를 조사하였다. 실험에 사용한 18종의 진균 중에서 *C. gloeosporioides* 등 11종의 진균에서만 *Bacillus* spp.와의 대치 배양에서 무처리구의 균사생육과 비교하여 균사 생육이 20% 이상 억제되었다. Table 4-6에서 보는 것과 같이 *Bacillus* spp.의 균주에 따라서 진균에 대한 항균 스펙트럼은 매우 다양하였다. 11-9 균주는 다른 균주에 비해서 항균 스펙트럼이 넓은 것으로 나타났는데, *Pestalotiopsis longiseta*, *Cladosporium fulvum*, *Stemphylium lycopersici*, *Alternaria solani*, *Magnaporthe grisea*, *Diaporthe* sp. 등 6개의 식물병원진균에 대해서 항균활성을 보이고 있었다. 22-9는 *C. gloeosporioides*, *P. longiseta*, *B. cinerea* 등 3가지의 식물병원진균에, 25-3은 *P. longiseta*, *M. grisea*, *P. capsici*, 그리고 12-9는 *P. longiseta*, *Phoma* sp., *C. lunata*에 항균활성을 나타내고 있었다. 실험에 사용한 식물병원진균 중에서는 *P. longiseta*와 *C. fulvum*이 7개 *Bacillus* 균주에 의해서 균사생장이 억제되었다.

Table 4-6. Antifungal activity of isolates of *Bacillus* spp. against some phytopathogenic fungi

Fungi isolate	Bacterial isolate
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	8-2, 22-9
<i>Pestalotiopsis logiseta</i>	11-9, 12-9, 22-7, 22-8, 22-9, 24-18, 25-3
<i>Phoma</i> sp.	12-9
<i>Cladosporium fulvum</i>	11-9, 15-5, 21-13, 22-5, 22-7, 22-8, 25-2
<i>Botrytis cinerea</i>	22-9
<i>Stemphylium lycopersici</i>	11-9

<i>Alternaria solani</i>	11-9, 21-13
<i>Magnaporthe grisea</i>	11-9, 25-3
<i>Phytophthora capsici</i>	25-3
<i>Curvelaria lunata</i>	12-9
<i>Diaporthe</i> sp.	11-9

나. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 1523에 대한 항균활성

고추 세균성점무늬병균에 대한 유묘검정에서 선발된 16종류의 *Bacillus* spp. 를 NA 배지에서 Xav에 대한 clear zone을 조사한 결과, 25-2 균주에서 clear zone이 관찰되었다(Fig. 4-5).



Fig. 4-5. Nutrition agar plate showing inhibition of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* growth by isolate 25-2.

다. 고추 탄저병에 대한 효과

(1) 선발 *Bacillus* spp.의 고추 탄저병균 포자발아 및 부착기 형성 억제 효과

포장에서 탄저병에 대한 방제 효과를 실험한 *Bacillus* spp. 21-13, 22-5, 25-2 등 3개의 균주를 사용하여 탄저병균의 포자발아 및 부착기 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 선발한 3균주의 세균 현탁액을 고추 탄저병균인 *C. acutatum* JC24와 혼합하여 고추 열매 표면에 분무 처리하고 5일간 습실 처리한 후에 JC24의 포자 발아율을 조사한 결과, Fig. 4-6에서 보는 것과 같이 무처리구에서는 51%의 포자 발아율을 보였지만, 21-13, 22-5, 25-2 균주 처리구에서는 무처리구 보다 높은 80% 이상의 발아율을 보여 탄저병균 포자 발아에는 전혀 억제 효과가 없음을 알 수 있었다. 하지만 무처리구에서 53%이었던 부착기 형성율이 21-13, 22-5, 25-2의 세균 현탁액을 같이 처리하였을 때는 각각 3.6, 10.3, 7.1%로 크게 감소하였다.

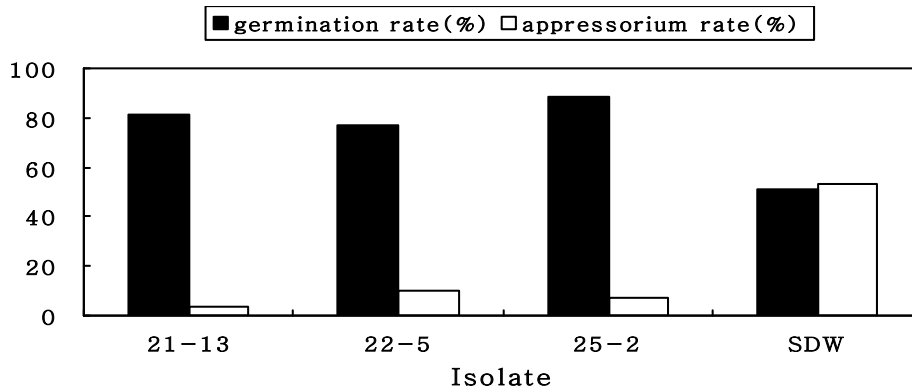


Fig. 4-6. Effect of selected bacterial isolates on the rate of spore germination and appressorium formation.

(2) 고추 열매를 이용한 탄저병에 대한 방제 효과 검정

탄저병에 대한 포자 발아 억제와 부착기 형성 억제 효과를 실험한 21-13, 22-5, 25-2의 세 균주를 고추 열매에 병원균을 접종하기 1일 전과 1일 후에 처리하여, 탄저병에 대한 예방효과와 치료효과를 조사하였다. Fig. 4-7에서 보는 것과 같이 대조구로 사용한 혼합제를 1일 전에 처리하고 무상처 접종하였을 때에는 88%의 가장 높은 방제가를 보였지만, 상처 접종을 하면 50%로 감소하였다. 병원균을 접종하고 1일 후에 처리할 경우는 접종 방법과 관계없이 방제가가 감소하였는데, 무상처 접종에서는 42%, 상처 접종에서는 31%이었다. 선발한 세 균주는 병원균 접종 1일 전에 처리하고 무상처 접종을 하였을 경우, 21-13, 22-5, 25-2가 각각 43.9, 50.3, 53.1%의 방제가를 보였다. 그러나 병원균을 상처 접종 하였을 때는 21-13과 25-2 균주 처리구의 방제가는 급격하게 감소하였으나, 22-5 균주 처리구는 41.8%로 효과가 지속되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4-8). 병원균을 접종한 후에 선발한 균주를 처리하였을 경우에는 접종 방법과 관계없이 모든 처리구의 방제가가 20% 미만으로 아주 미미하였다(Fig. 4-9). 2007년 고추 포장 시험에서 선발한 총 6개 균주를 고추 열매에 시기별로 처리하고 무상처 접종하였을 때, 균주 22-5를 처리한 고추 열매에서 높은 방제가를 나타내었다. 모든 균주들이 탄저병균 접종 1일 후 *Bacillus* spp. 배양액 처리에서 낮은 방제가를 나타냈고 균주 9-5만이 효과를 나타내었다. 탄저병균 접종 2일 전, 12시간 후 *Bacillus* spp. 배양액 처리에서 모든 균주들이 높은 방제가를 나타내었다(Fig. 4-10).

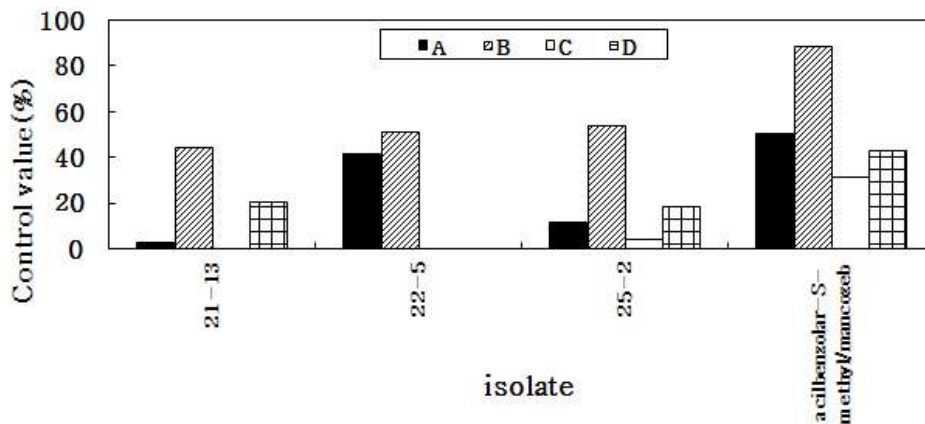


Fig. 4-7. Comparison of control efficacy of selected isolates(2008) on wound and unwound inoculated peppers plants against the anthracnose disease. Efficacy of bacterial isolates when applied A: one days before the inoculation (wound inoculation), B: one days before the inoculation(unwound inoculation), C: one days after the inoculation(wound inoculation), D: one days after the inoculation(unwound inoculation).



Fig. 4-8. Disease symptoms showing typical lesions on pepper fruits by anthracnose pathogen. A: symptoms of anthracnose with treatment of isolate 22-5 at one day before wound-inoculation, B: symptoms of anthracnose with treatment of isolate 22-5 at one day after wound-inoculation.



Fig. 4-9. Disease symptoms of anthracnose with treatment of selected isolates at one day before wound-inoculation.

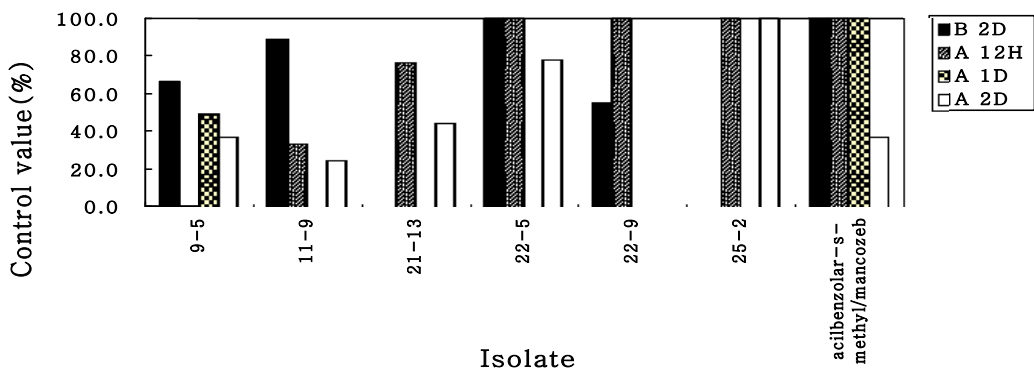


Fig. 4-10. Control efficacy of pepper field effective isolates(2007) against pepper anthracnose on pepper fruits. B 2D: treatment at two days before non-wound inoculation, A 12H: treatment at 12 hours after non-wound inoculation, A 1D: treatment at one day after non-wound inoculation, A 2D: treatment at two days after non-wound inoculation.

(3) 탄저병에 대한 지속 효과

고추 유묘시기부터 성체가 될 때 까지 총 5개 균주(21-13, 22-5, 22-7, 23-14, 25-2)를 재료 및 방법에서 기술한 것과 같은 순서로 각각 처리하고, 고추 탄저병에 대한 방제 효과를 온실에서 검정하였다. 각각 *Bacillus* spp. 균주의 배양액은 한 번의 침지처리, 관주처리 그리고 4번의 경엽처리 방법으로 처리하였다. 그 결과 Fig. 4-11에서처럼 대조약제로 사용된 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제처리와 균주 21-13과 22-5 처리에서는 100%의 방제가를 나타낸 반면에, 균주 22-7은 17%의 방제가로 모든 처리구 중에서 가장 낮은 방제가를 나타내었다.

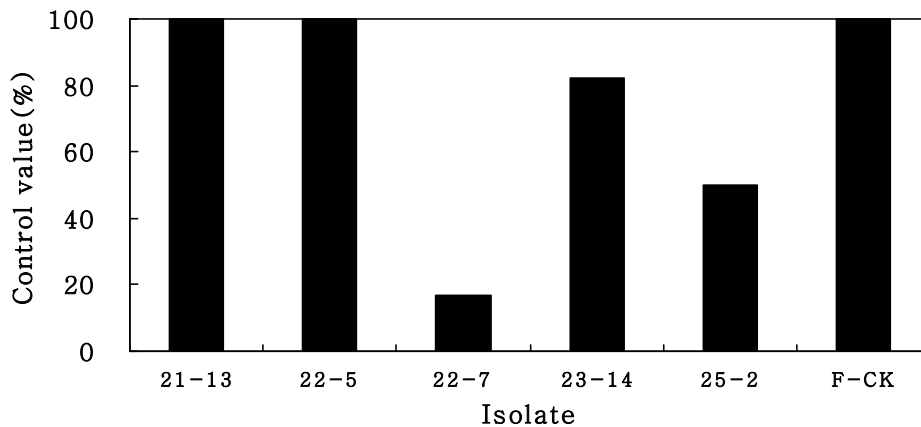


Fig. 4-11. Control efficacy of culture solution selected *Bacillus* spp. against pepper anthracnose in greenhouse. F-CK: acilbenzolar-S-methyl/mancozeb.

4. 선발 *Bacillus* sp.의 동정

BigDye terminator를 이용한 Cycle sequencing 방법으로 phred /Phrap 프로그램을 사용하여 16s rDNA의 염기서열을 분석한 결과, 균주 21-13 균주는 *Bacillus sammanii*, 22-5 균주는 *Bacillus megaterium*, 25-2 균주는 *Bacillus cereus*로 동정

되었다 (Fig. 4-12).

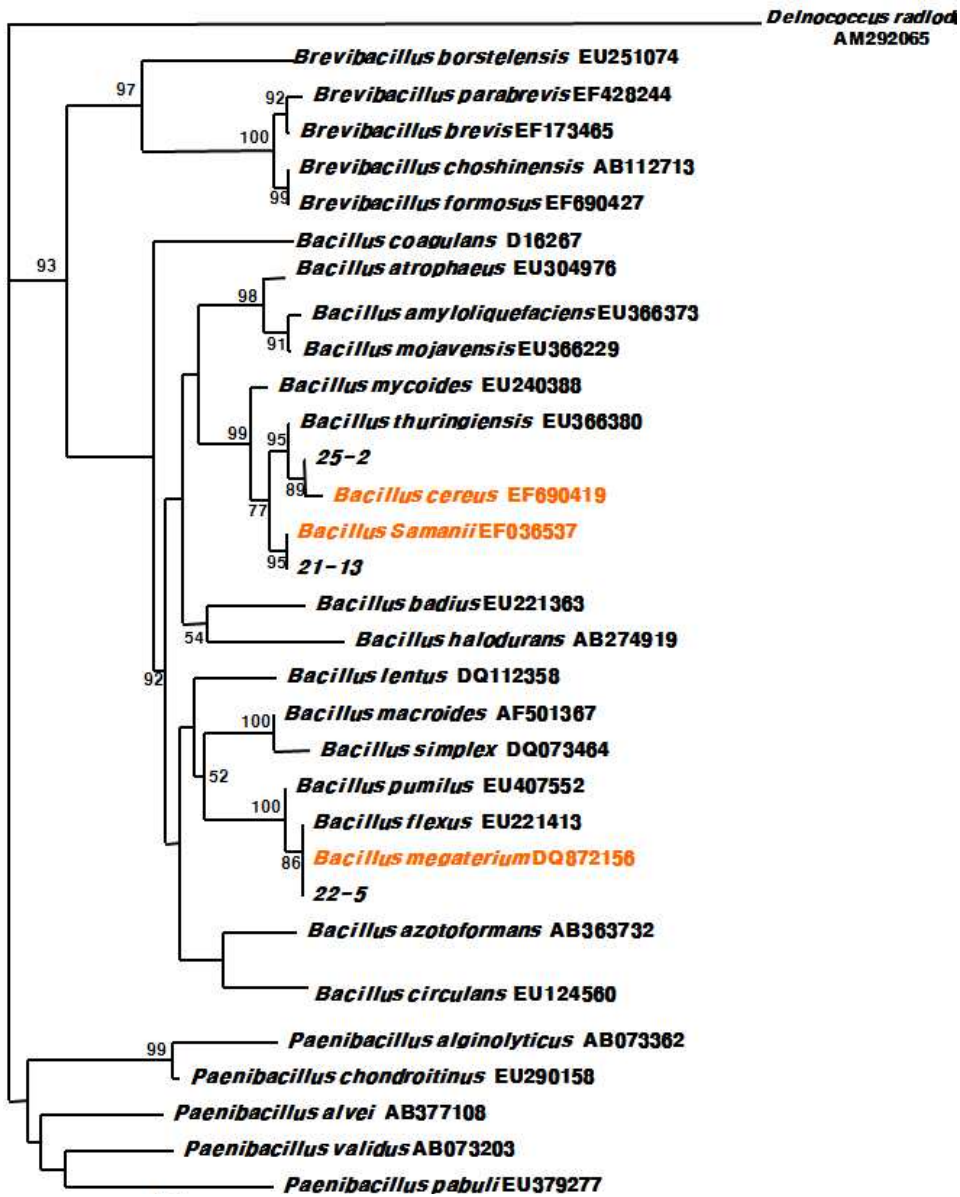


Fig. 4-12. Neighbor-joining tree from 16s rDNA sequencing results in PHYDIT. Number at the branches are bootstrap values obtained from 1000 replications.

5. 포장에서 *Bacillus* spp. 균주들의 병 방제 효과

가. 오이 흰가루병에 대한 방제 효과

고추 포장에서 탄저병에 대해서 우수한 효과를 나타낸 균주 22-5 배양액의 OD값을 다양하게 오이 유묘에서부터 처리하면서 오이 흰가루병에 대한 발병도를 조사 하였다(Fig. 4-13). 총 3차례에 걸쳐 조사에서 조사 횟수가 지날수록 흰가루병의 급격한 진전으로 방제가는 시간이 지날수록 낮게 나타났으며, OD값에 따른 처리구에서 방제가의 차이를 볼 수 없었다.

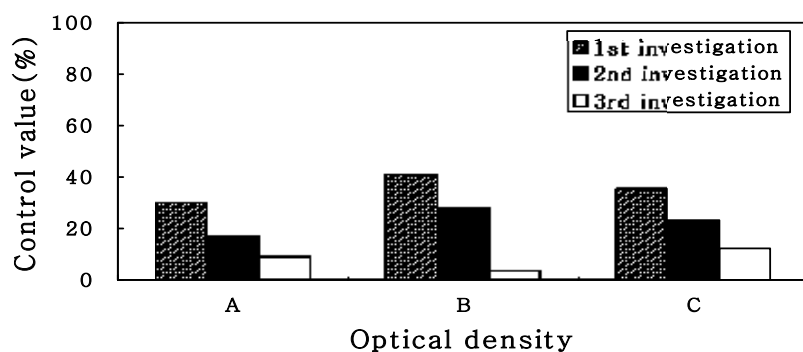


Fig. 4-13. Control value of various optical density of isolate 22-5 on cucumber powdery mildew.

나. 고추 탄저병에 대한 방제 효과

2007년 충북대학교 부속농장의 고추 포장에서 탄저병에 대한 방제가를 조사 하였다 (1차 : 2007년 8월 22일, 2차 : 8월 31일, 3차 : 9월 10일). 1차 조사에서는 8-2, 11-9, 22-5 균주가 효과를 나타내었고, 이 중에서 22-5 균주가 94.1%의 방제가를 나타내었다. 2차 조사에서는 9-5, 22-8, 22-9, 25-2 균주가 추가적으로 효과를 나타내었지만 22-8 균주의 효과는 1.4%에 불과 하였다. 2차 조사 후에 장마철이 지나고 3차 조사를 하였을 때에는 고추 탄저병의 발생이 급격하게 증가하여 22-5 균주만이 효과를 나타 내었다(Fig. 4-14). 진균에 대한 in vitro 실험에 효과를 나타낸 21-13, 세균성점무늬병에 대한 in vitro 실험에서 효과를 나타낸 25-2, 2007년 충북대학교 부속농장 고추 포장에서 탄저병실험에서 우수한 효과를 나타낸 22-5 균주, 총 3균주를 2008년 충북대학교 부속농장의 고추 포장에서 탄저병에 대한 방제가를 재조사 하였다(1차 : 2008년 7월 29일, 2차 : 8월 9일, 3차 : 8월 19일, 4차 : 8월 29일, 5차 : 9월 8일). 2008년 학교 포장에서 고추 탄저병에 대한 방제가를 총 5차례에 걸쳐 조사한 결과 4차 조사에서는 모든 균주에서 30%가 넘는 방제가를 나타내었지만, 대조약제로 사용된 acilbenzolra-S-methyl에 비해 낮은 방제가를 나타내었다(Table

4-7). 하지만 2007년과는 다르게 2008년에는 25-2 균주의 처리에서 탄저병에 대한 우수한 효과가 나타났는데, 3차 조사 70%, 4차 조사에서는 61%의 효과를 보였다.

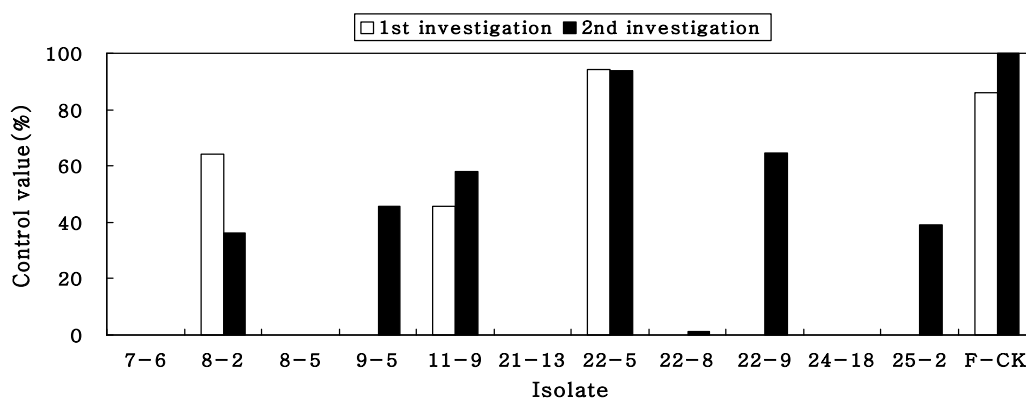


Fig. 4-14. Changes of control efficacy of 1st investigation and 2nd investigation to pepper anthracnose with culture solutions selected *Bacillus* spp. in pepper field(2007). F-CK: acilbezolar-S-methyl/mancozeb.

Table 4-7. Effect of culture solution selected *Bacillus* spp. treatment against pepper anthracnose in pepper field(2008)

Isolate	Investigation				
	1st (07/29)	2nd (08/09)	3rd (08/19)	4th (08/29)	5th (09/08)
21-13	51	14	42	40	15
22-5	0	0	38	37	18
25-2	100	100	79	61	13
acilbenzolzr-S-methyl	95	96	94	85	51

6. 균주 22-5, 25-2의 대량 배양 조건 확립

가. 균주 22-5, 25-2 최적 온도 및 시간 조건 확립

균주 22-5, 25-2의 배양 최적온도 및 시간을 확립하고자 24°C, 28°C, 32°C, 36°C에서 각각 배양 하였다. 균주 22-5에 비해서 25-2가 모든 조건에서 생장이 빠른 경향을 나타내었고, 균주 25-2는 접종 8시간에서 12시간 후에 OD값이 증가하기 시작하였고, 균주 22-5는 접종 12시간에서 24시간 후에 OD값이 증가하기 시작하였다. 접종

12시간 후까지는 모든 온도에서 동일한 양상을 나타내었으나, 접종 24시간 후 부터는 각각의 온도에 따라 다른 성장 양상을 나타내었다. 모든 조건에서 접종 36시간부터 48시간 후에 가장 높은 OD값이 측정되어서 균주 22-5와 25-2의 최적 배양 시간은 36시간~48시간으로 조사 되었다. 온도에 따른 배양에서는 큰 차이를 나타 내지 않았지만, 24℃와 28℃에서 같은 조건 하에 가장 높은 OD값이 측정되어서 균 주 22-5, 25-2의 최적 배양온도 범위는 24℃ ~ 28℃로 조사되었다(Fig. 4-15).

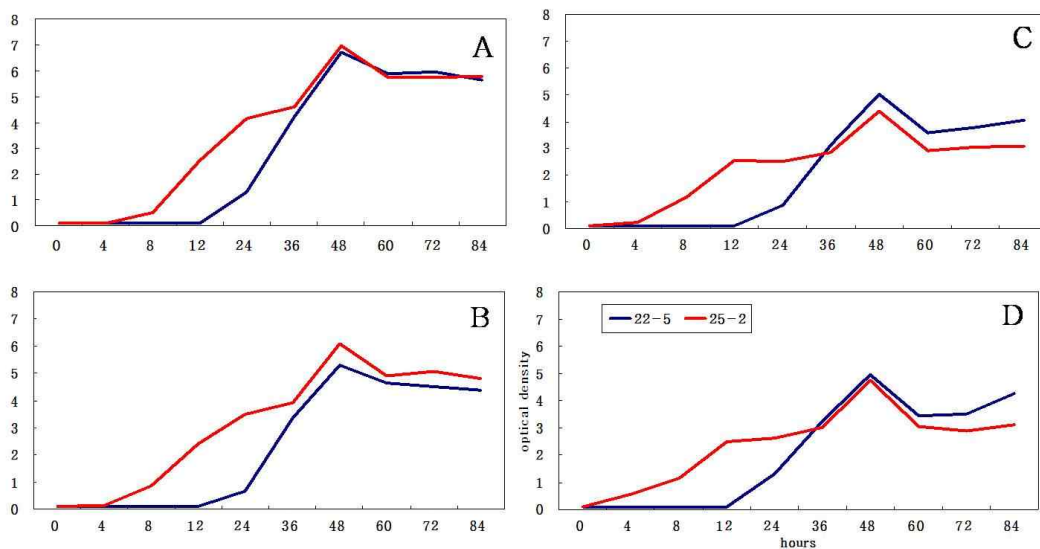


Fig. 4-15. Effect of cultivation temperature and time on the cell growth of isolate 22-5, 25-2 in nutrient broth. A: 24℃, B: 28℃, C: 32℃, D: 36℃.

나. 배지 조성 및 pH에 따른 균주 22-5, 25-2 배양 조건 확립

최적 배양온도 28℃에서 150 rpm으로 배양하면서 최적배양 시간 36시간에 OD값을 조사 하였다. NB배지에 0.05% FeSO₄·7H₂O와 0.005% MnCl₂·4H₂O를 첨가한 배지를 기본 배지로 1% glucose, maltose, sorbitol 탄소원을, 0.5% tryptone, malt extract, yeast extract 질소원을 첨가한 배지에서의 OD값을 측정한 결과 1%의 탄소원을 각 각 첨가한 배지간의 성장 차이는 볼 수 없었지만, 0.5%의 질소원을 각 각 첨가한 배지에서는 tryptone을 첨가한 배지에서 가장 높은 성장률을 나타내었다. 모든 처리를 비교해 보면 균주 25-2를 0.5% 질소원 tryptone을 첨가한 배지에서 가장 높은 성장을 나타내었다. 질소원을 첨가한 배지에서 균주간의 차이가 나타났다 (Fig. 4-16). 배지의 pH에 따른 성장 실험에서 균주 22-5는 pH 6, pH 7에서 높은 성장을 나타내었고, 균주 25-2는 pH 5, pH 6, pH 7, pH 8에서 높은 성장을 나타내

었다. 두 개의 균주는 pH 6, pH 7에서 높은 성장률을 나타내었다.

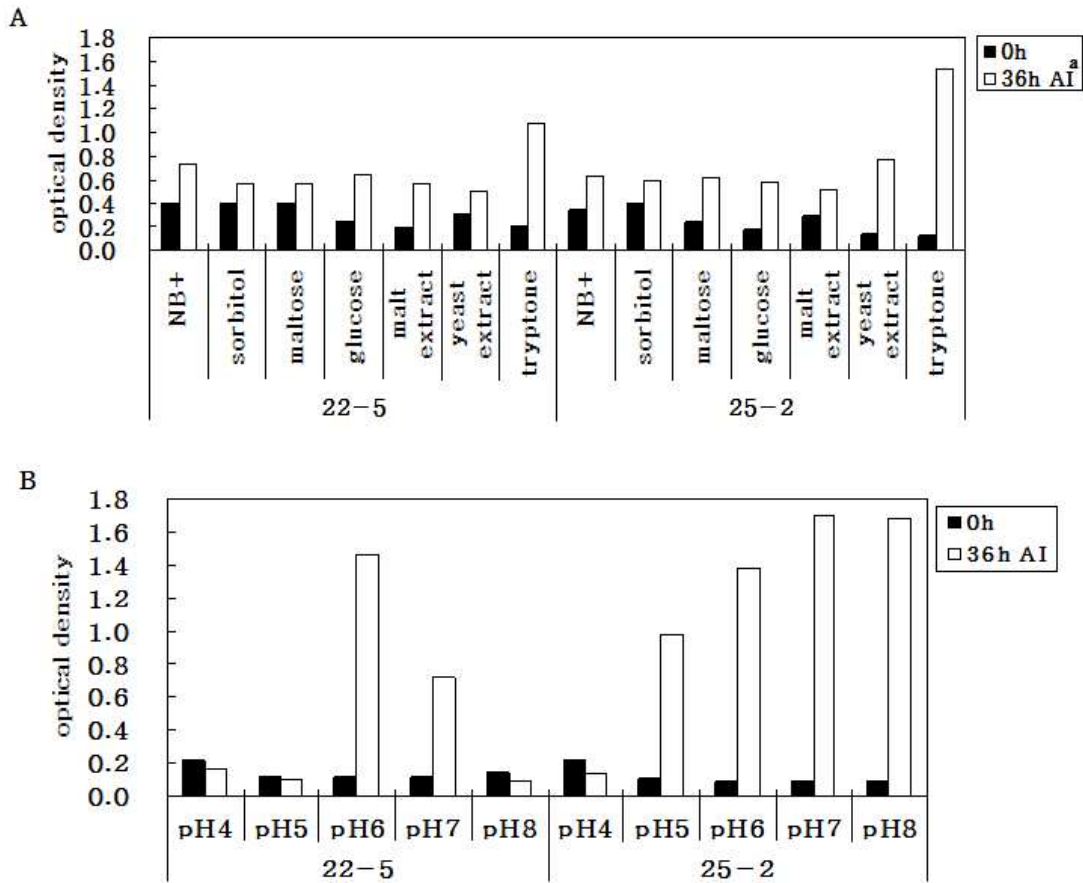


Fig. 4-16. Effect of various carbon sources, nitrogen sources (A) and pH (B) on the cell growth of isolate 22-5, 25-2 in nutrient broth. a hours after inoculation.

충청남도과 전라북도 30여개 지역의 고추 밭에 걸쳐서 분리한 토양 미생물을 고추 세균성점무늬병과 탄저병에 대한 효과를 검정하였다. 고추 세균성점무늬병에 대한 효과 검정 전에 병원균으로 사용할 대표균을 선발하기 위하여 6엽기 고추 유묘에서 각 균주의 병원성 여부를 확인하였다. 균주들 간의 발병도를 비교한 결과 KACC11157, KACC11158, 1523 균주들은 33%, 8%, 58% 발병하였고, 세균성점무늬병원균으로 균주 1523을 선발하여 실험에 사용 하였다. 이렇게 선발된 병원균 균주의 접종농도와 접종방법에 따른 세균성점무늬병의 발병양상을 조사 하였다. 식물병원세균들은 기주에 침입하여 생존에 적당한 서식처에 정착한 뒤 기주의 1차 방어시스템을 무력화시켜 생존하고 대량 증식하는 과정에서 개체군의 밀도가 중요하게 여겨진다. 그 결과 접종 농도는 0.4, 접종방법은 고추 잎 표면의 위와 아래를 동시에 경엽분무 하였을 때 병이 지속적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 세균은 자연개구 방식을 통해 침입하여 병을 유발시키기 때문에 잎 뒷면에 병원균을 경엽처리 하

는 것이 효과적으로 발병 한다. 하지만, 잎 뒷면에 집중적으로 병원균을 경엽분무 하였을 때, 병이 급격하게 번지기 때문에 발병 양상을 지켜볼 수 없어서 잎의 앞면과 아랫면을 동시에 경엽분무 하였을 때 세균성점무늬병이 점차 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

토양미생물에 대한 유도저항성 여부를 검정하고자 SA과 같은 유도저항성 기작을 나타내는 acilbenzolar-s-methyl/mancozeb 합제를 대조약제로 사용하여 농도에 따른 효과를 유묘에서 검정하였다. 그 결과 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb 합제의 농도 5000, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 높은 방제율을 나타내는 반면에 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 유효성분은 1%에 불과하여 고농도로 살포시 고추 생육에 영향을 끼쳤다. 고추 생육에도 영향을 끼치지 않고 세균성점무늬병을 방제하기 위해서는 acilbenzolar-S-methyl/mancozeb의 합제를 40 ~ 200 $\mu\text{g/ml}$ 살포하여야 한다. 또한 병원균 접종농도를 0.1로 조정하여 접종했을 때에는 낮은 농도의 약제 처리구에서조차 높은 방제율을 나타내었다. 기주식물에 미생물이 침입하면 저항성이 유도되어 그 후에 침입하는 병원체에 대하여 저항성을 나타내는 유도저항성 또는 획득저항성(Sticher 등, 1997; Uknes 등, 1993)이라고 한다. 고추 세균성점무늬병에 대하여 토양미생물의 유도저항성 여부를 검정하기 위해 분리한 토양미생물 배양액을 고추 유묘에 관주처리 하였다. 이 실험을 통하여 효과를 나타내는 16개 균주를 선발하였고, 선발된 균주들의 효과 재검정을 위해서 침지처리 방법으로 병원균 접종 1주일, 2주일 전에 토양미생물을 처리하였다. 병원균 접종 1주일 전 침지처리에서 높은 방제율을 나타내었는데, 토양미생물의 효과지속 기간이 병 방제에 영향을 나타낸 것 같다. 또한 모든 처리에서 총 9개의 균주 7-6, 8-5, 21-13, 22-5, 22-7, 22-8, 23-14, 25-2, 25-3 가 효과를 나타내었다. 고추 탄저병에 대하여 선발된 균주들 중에서 균주 21-13, 22-5, 22-7, 23-14, 25-2를 선발하여 고추의 재배기간 동안 여러 차례 처리 하였을 때, *Bacillus* spp.의 지속적인 효과를 검정하였다. 고추 재배기간에 침지, 관주, 경엽 처리를 하였고 균주 21-13, 22-5 처리구에서 방제가 100% 나타냈다. 유도저항성 검정에서 선발된 16균주를 다양한 18종의 진균에 대하여 배지에서 활성검정을 하였을 때, 균주 21-13은 *Alternaria solani*, 균주 22-7과 25-3은 *Pestalotiopsis longisetata*에 효과를 나타내었다. 세균성점무늬병에 대한 clear zone 형성 여부 실험에서는 균주 25-2만이 clear zone을 나타내었다. 배지에서 실내검정을 통해서 탄저병에 대해 효과를 나타내는 균주는 없었고, 미생물이 고추 탄저병 병 발생을 억제하는 물질을 분비하지 않기 때문에 배지에서 효과를 나타내지 않았던 것으로 여겨진다. 다른 진균에 효과를 나타내는 균주 21-13, 22-7, 25-3 온실 및 다른 검정실험에서도 효과를 나타내는 균주로 선발되었다. 고추 열매에서 직접

적인 탄저병에 대한 효과를 검정하고자 탄저병균 접종 2일 전, 12시간 후, 1일 후, 2일 후에 선발된 *Bacillus* spp. 배양액을 처리하여 습실상 내에서 고추 열매 탄저병 발병에 대한 실험을 수행하였다. 모든 처리구에서 균주 22-5가 효과를 보였고, 처리구 간에는 접종 2일 전, 12시간 후 처리에서 높은 방제가를 나타냈고 선발된 *Bacillus* spp.는 고추 탄저병에 대하여 치료적인 효과 보다는 예방의 효과가 더 높게 나타났다. 고추 열매의 상처 유무에 따른 탄저병균 발병 실험에서 고추 열매에 상처가 있을 경우 무상처 열매보다 탄저병 발병이 증가하는 것을 확인 하였고 상처로 인해 병원균이 쉽게 침투할 수 있을 것이라 여겨진다. 고추 열매의 상처 유무가 탄저병균 발병양상에 끼치는 영향에 대하여 2008년 충북대학교 부속농장 고추 포장 실험균주(21-13, 22-5, 25-2)를 탄저병균 접종 1일 전, 1일 후 처리하여 실험 하였을 때 모든 균주에서 무상처 고추 열매에 비하여 상처 고추 열매에서 탄저병균의 높은 발병을 관찰할 수 있었고, 앞 실험과 마찬가지로 치료처리 보다 예방처리가 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이는 병원균 침입 전에 *Bacillus* spp. 처리하였을 때 기주와 반응하여 방어물질을 유도하거나 방어기작을 낼 것이라 여겨진다. 2008년 충북대학교 부속농장 고추 포장 실험균주(21-13, 22-5, 25-2)가 탄저병에 대한 방어기작을 알아보하고자 탄저병균의 포자발아 및 부착기 형성률 억제를 고추 열매표면에서 실험하였다. 균주를 처리한 고추 열매표면에서 포자발아율은 무처리와 유사한 포자발아율을 나타내었으나, 부착기 형성률에서는 현저하게 억제되는 것을 확인 하였고, 실험에 사용된 3가지 균주들은 탄저병 발병 억제에 효과가 있으며 탄저병균 포자 부착기 형성을 억제하여 탄저병 발병에 영향을 끼칠 것으로 여겨진다. 유용미생물들은 오이와 감자의 근권에는 잘 정착하나, 고추의 근권에서는 30일 이상 정착하는 미생물 찾을 수 없다는 보고(박창석, KOSEF)에 따라 탄저병균에 효과를 나타내는 균주 중에서 22-5를 선발하여 *Bacillus* spp. 배양액 처리농도에 따라서 오이 흰가루병에 대한 효과를 검정하였다. 그러나 오이 흰가루병 방제에는 효과를 나타내지 않았고 처리농도에 따른 방제가의 차이도 확인할 수 없었다. 오이 흰가루병에 처리할 때, 하층액만을 수거하여 처리하였기 때문에 배지 성분에서도 방제효과를 나타낼 것이라 생각하였고, 22-5균은 근권 정착시간이 병 발생억제에 효과를 나타내지 않는 것 같다. 고추 탄저병과 세균성점무늬병에 대한 유묘, 실내, 열매 검정을 하면서 2007년과 2008년 2년에 걸쳐서 충북대학교 부속농장 고추 포장에서 탄저병균에 대한 실험을 하였을 때, 2007년에는 균주 22-5 처리에서 가장 높은 방제가를 나타내었으며 2008년에도 마찬가지로 균주 22-5가 효과를 나타내었으나 균주 25-2에서 더 높은 방제가를 확인할 수 있었다. 세균성점무늬병의 무발병으로 인하여 세균성점무늬병에 대한 포장에서 방제효과는 확인할 수 없었다. 실내검정과 다

소 차이는 있지만, 포장실험에서는 주변 환경과 포장배치도의 영향을 받는 것을 고려해야 할 것이다. 길항세균을 대량 배양하여 미생물제제로 제형화할 때 길항세균의 항균활성을 증대시킬 수 있는 특정 영양원을 배지에 첨가함으로써 미생물제제의 길항능력을 향상시킬 수 있으며, *Bacillus* 속 세균은 항생물질을 분비함으로써 길항능력을 발휘하는 것으로 알려져 있다(강 등, 2000; Nagano 등, 1998; Nguyen 등, 2004; Silo-Suh 등, 1994; Vanittanakom 등, 1992). 균주 22-5와 25-2의 생물적방제제로 개발하기 위하여 최적 배양온도와 배양시간 및 배지 조성과 pH에 따른 두 균주의 성장 실험을 한 결과 기존의 보고와는 다소 차이가 있지만(김상달, KOSEFF), 최적 배양온도는 24~28℃, 배양시간은 36~48시간으로 배지에 질소원 tryptone을 첨가하였을 때 높은 성장을 보였고, 최적 배지 pH는 6~7로 조사되었다. 선발된 균주들에 대하여 16s rDNA sequencing을 하였고 모두 *Bacillus* spp. 로 동정되었다. 2006년 30종의 생물농약이 등록되어 판매되고 있는데(이경원, 2008년, 농촌진흥청 생물농약 등록현황), 생물농약 4종을 제외하고 모두 *Bacillus* spp.임을 고려하면 균주 22-5와 25-2도 미생물농약으로써의 발전 가능성을 엿볼 수 있다.

제 5절 ISR 유도물질 및 미생물의 미생물제제의 산업화 연구 (협동4)

1. 미생물제제의 선발 및 대량배양공정 개발

가. ISR 기능의 유용 미생물의 선발

주관 기관인 생명공학연구원을 비롯한 협동 연구 기관에서 진행된 연구 중 고추 탄저병과 점무늬병에 대하여 전신유도저항성을 가진 것으로 생각되는 균주를 분양받아 산업화를 위한 연구를 진행하였다. 미생물 균주를 산업화하여 미생물 제제로 개발하기 위해 산업화 가능한 후보 균주의 선발, 후보 균주의 배양 공정 확립, 미생물 제제의 제형 개발, 시제품의 제작과 생물 검정 등의 세부 단계를 거쳐 연구를 진행하였으며, 최종적으로 *Bacillus thuringiensis* 으로 동정된 BS107 균주를 최종 후보 균주로 선발하였다.

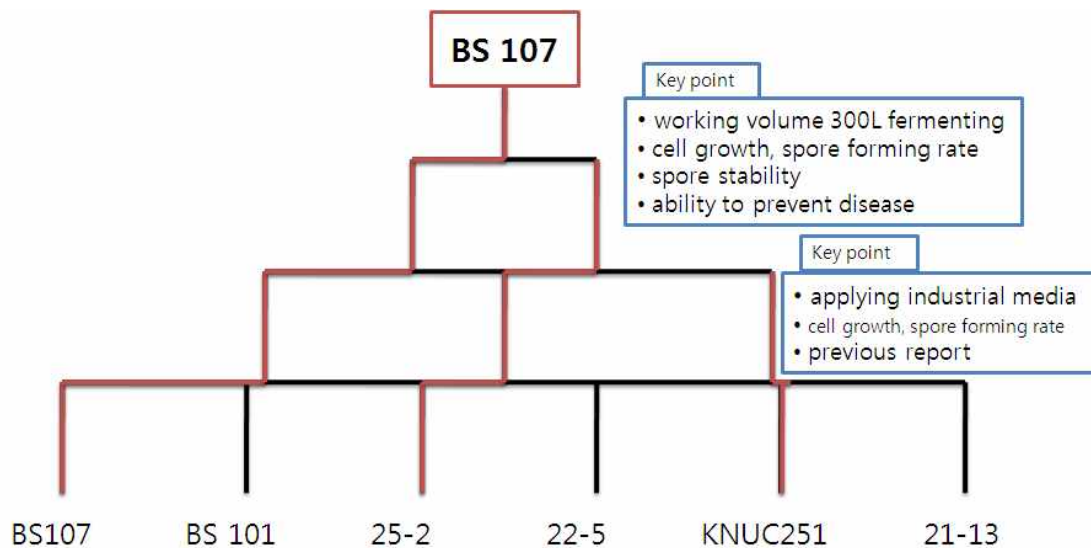


Fig. 5-1. 후보 균주의 산업화를 위한 최종 후보 균주의 선발 과정

나. 미생물 제제의 산업화를 위한 후보 균주의 선발

(1) 기 선발 균주 6종의 산업용 배지에 대한 적응성 검토

기존 연구에서 선발된 후보 균주 6종에 대하여 미생물 제제의 산업화를 위한 연구를 진행

하였다. 이들 균주는 이전 연구를 통해 동정한 결과에 따르면, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. samanii*, *B. thuringiensis* 등으로 *Bacillus* spp.에 속하였다. 당 연구 기관은 기 개발된 산업화 배지 중 *Bacillus* spp.에 대체적으로 양호한 배지를 선정하였고, 각 균주의 배지 적응성을 1차적으로 검정하였다. 산업화 배지는 미생물 균주의 배양에 있어 경제성과 배양 수율, 경시 안정성 등을 고려하여 구성된 조성물로 이후의 보고서에는 GB 산업화 배지라고 명명하기로 한다.

GB 산업화 배지에 대한 후보 균주의 적응 결과는 48시간에 걸친 플라스크 배양을 통해 자란 영양 세포와 포자수를 viable counting하여 비교함으로써 알 수 있었다. 6종의 후보 균주 중 *B. thuringiensis*인 BS107과 *B. megaterium*인 25-2 가 높은 적응성을 보였으나, BS107이 25-2보다 더 빠른 시간 안에 영양세포가 자랐고, 미생물 제제의 최종 균주 상태인 포자의 형성이 이루어졌다. 나머지 균주는 포자수가 1.00E+06 cfu/ml 이하로 일반적으로 미생물 농약 혹은 제제로 사용하기에 부적합하여 이후의 실험에서 제외하였다.

Table. 5-1. 후보 균주의 산업화 배지에 대한 적응력 비교를 위한 배양 결과

	BS107	BS101	25-2	22-5	KNUC251	21-13
영양 세포수 (cfu/ml)	9.03E+08	>>1.00E+06	6.73E+08	>>1.00E+06	3.60E+07	>>1.00E+06
포자수 (cfu/ml)	7.40E+08	>>1.00E+06	4.33E+08	>>1.00E+06	>>1.00E+06	>>1.00E+06

다. 미생물 제제의 산업화를 위한 연구

(1) 후보 균주의 배양 공정 확립

50L 규모의 배양기(fermentor)를 이용하여 2종의 후보 균주에 대한 배양 공정을 확립하고자 하였다. 농업용 미생물 제제의 생산에 있어 working volume 30L 수준으로 배양이 가능한 50L 규모 배양기는 일반적으로 산업화 규모의 생산 1 단계로 여겨진다. 미생물 제제의 생산을 위해서는 접종원은 약 1-3% 수준의 농도로 다음 단계의 배양기에 접종되는데, 플라스크를 통해 배양하는 미생물 접종원(seed)은 1차 접종원으로써 50L 수준의 가장 작은 규모의 배양기에 접종이 되고, 이는 소규모 생산으로 배양이 끝나거나 더 큰 규모의 배양이 진행될 경우 2차 접종원으로 사용되어 진다. 그러므로 50L 규모의 배양기에서의 미생물 균주의 배양 공정 확립은 산업화의 가능성을 확인할 수 있는 단계라 할 수 있다. 플라스크 배양의 경우 배양 도중에 aeration과 pH control, 내부 압력 조절 등의 세부적인 배양 공정의 조절이 어렵지만, 배양기의 경우 이와 같은 배양 공정을 조절할 수 있으므로 배양 수율과 포자 형

성, 배양 시간 등의 면에서 생산 효율을 높일 수 있다. 또한 후보 균주 역시 배양기 내에서 환경에 대한 적응력과 외부 오염에 대한 내성 등이 우수한 것을 선정하는 것이 바람직하다.

후보 균주인 BS107과 25-2를 50L 규모의 배양기에서 30L의 working volume으로 배양하기 위해 working volume 기준으로 colony → 30ml → 3L → 30L로 규모를 확장하여 배양하였으며, 접종원의 농도는 1%로 하여 접종하였다. working volume 30L의 50L 규모의 배양기의 배양 조건은 다음과 같았다. 배양기의 내부 온도를 30℃로 유지하며, aeration은 0.5vvm, agitation 속도는 150rpm으로 고정하였으며, pH control은 별도로 하지 않았다. 영양 세포가 충분히 포자를 생성하였다고 생각하는 시점을 기준으로 배양을 마무리 하였는데, 총 배양 시간은 24시간이었다.

배양 결과 viable counting을 통해 확인한 BS 107은 영양 세포가 1.03E+09 cfu/ml, 포자수가 1.03E+09 cfu/ml로 100% 영양세포가 포자를 생성하였고, 24시간 경과 후 포자가 영양 세포를 뚫고 밖으로 나온 양호한 배양 상태를 확인할 수 있었다. 25-2의 경우 포자를 전혀 형성하지 못하는 것을 확인할 수 있었고, 외부 오염에 매우 취약하여 배양이 용이하지 않았다. 최종적으로 비교적 빠른 시간 안에 포자가 형성되며, 배양 수율이 양호한 BS107을 최종 후보 균주로 선정하였고, 배양 규모의 확대와 시제품의 제작을 진행하기로 하였다.

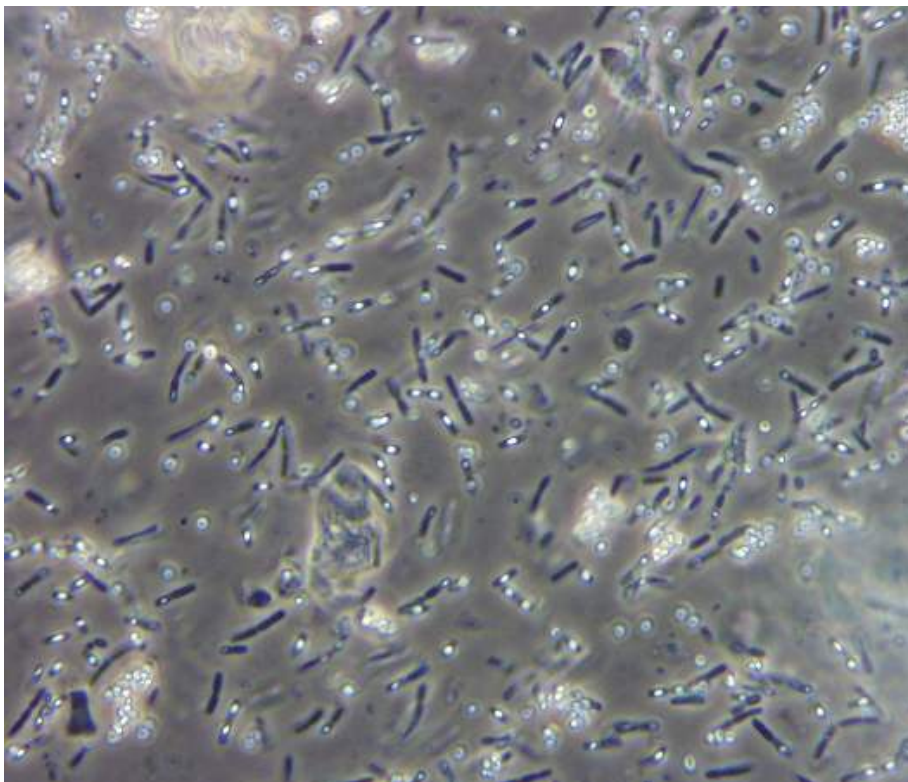


Fig. 5-2. 포자를 형성하고 있는 BS107의 현미경을 통해 촬영한 사진

(2) 최종 후보 균주에 대한 배양 규모의 확대와 profile 확립

최종적으로 선발된 후보 균주인 BS107을 300L의 working volume으로 배양 규모를 확대하고, 배양 공정(profile)을 확립하기 위해 연구를 진행하였다. 배양 공정은 일반적인 *Bacillus* spp.을 참고하였으며, working volume 30L의 시배양을 통해 균주의 특성 및 배양 수율 등을 확인하였다. 배양 조건은 아래의 Table.. 2와 같다.

Table. 5-2. BS107의 working volume 300L의 배양 조건

항 목	배양 조건
온도	30℃
Aeration	0.4 - 0.7 vvm
Agitation	80 - 110 rpm
Initial pH	4.9
내부 압력	0.5 - 0.7 kgf/cm ²
Antifoamer	10% silicone oil
온도, pH 조절	배양 28시간 후부터 포자의 생 성 촉진을 위해 2℃/hr로 상승

300L 규모의 배양에서는 영양 세포의 수는 비교적 초기에 정상적으로 증가하였으나, 포자 형성이 이루어지지 않았고, 영양 세포수도 10^7 중반과 후반에 장시간 머무르는 배양 상태가 지속되었다. 완만한 영양 세포의 증가가 계속되는 가운데, 28시간 후부터 포자의 생성을 유도하기 위해 인위적으로 서서히 내부 온도를 상승시켰고, 이에 따라 pH가 상승하며, 포자가 형성되기 시작하였다. 최종적으로 배양액 내부의 용존 산소량은 90% sat.에서 2% 대까지 낮아졌으며, viable counting을 통해 확인한 영양 세포수는 $1.30E+09$ cfu/ml이고, 포자수는 $1.28E+09$ cfu/ml로 99% 이상 포자를 생성하였다. 배양 공정의 그래프는 아래 Fig. 5-3과 같으며, 표시된 시점에서 향후 배양액 내부의 용존 산소량과 온도, pH 등의 변화를 통해 배양 시간의 단축과 배양 수율의 향상을 얻고자 하는 연구를 진행하였다.

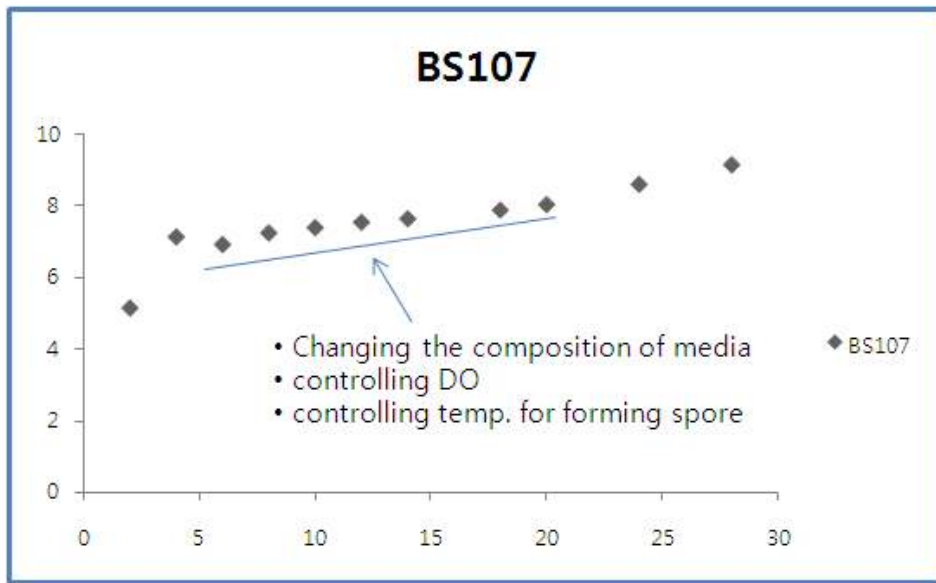


Fig. 5-3. 300L working volume의 배양 profile

라. 미생물제제의 대량배양공정 확립



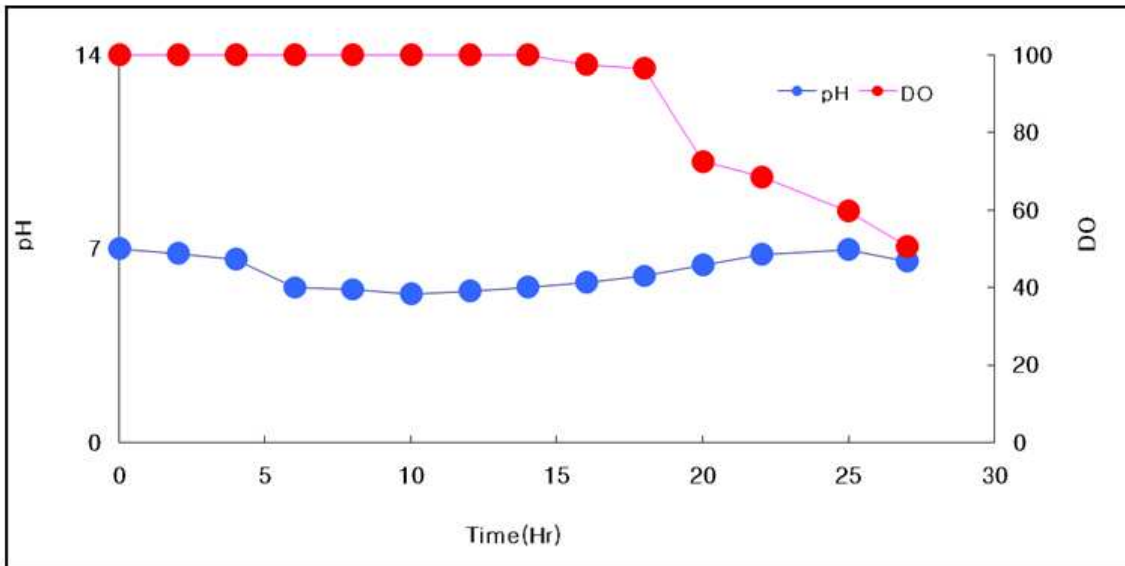


Fig. 5-4. 산업화 규모(5ton scale)의 미생물 배양기

액상 배양공정 설계를 통해 산출된 조건을 이용하여 시배양을 실시하였다. 배지 조성은 기 개발된 최적배지 조성을 이용하였으며 동일한 조건에서 수 회간 배양을 실시하였다. 2시간 간격으로 배양액을 채취하여 미생물 수 및 오염도, pH, DO 등을 조사하였으며 지속적으로 육안 관찰하여 배양 중 이상 유무를 관찰하였다. 최종적으로 시간 당 미생물의 증가 속도가 감소하였을 때 배양을 종료하였으며 배양 종료 후 배양액의 상태를 조사하고 상온, 고온(40도), 저온(4도)에서 장기간 보관하여 배양액의 상태 변화를 조사하였다. 산업화 규모 배양의 배지조성 및 배양 조건은 Table. 3과 같다.

Table. 5-3. 산업화 규모(5ton scale)에서의 산업화 배지조성 및 배양 조건

Ingredient	Content (%)	Content	Condition
Corn starch	1.00	Temperature	30 ℃
Glycerin	0.50	Aeration rate	0.5 Vvm
Yeast extract	0.50	Agitation speed	120 Rpm
Soybean meal	1.00	Inner pressure	0.35 kg/cm ³
K ₂ HPO ₄	0.25	Initial pH	7.0
CaCl ₂	0.15	Inoculum size	1.0 %, v/v
FeSO ₄	0.10	Cultivation time	24-30 hrs
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05		
CSL	0.20		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.10		



Max. Yield : 4.5E+09 CFU/ml(sproe count)

Fig. 5-5. 산업화 규모(5ton scale)에서의 배양 profile

Plant scale fermenter에서의 배양 결과에 따라 배양 profile을 작성하였다(Fig. 5-5). 배양 시작 후 약 15시간 이후부터 포자수가 증가하기 시작하였으며 약 22시간 경과 후 가장 높은 증가율을 보였다. 증가율은 약 27시간 이후부터 감소하기 시작하였으며 최종 배양 종료시 포자수는 2.0E+09 cfu/ml 수준으로 나타났다. 이는 기존 배양 공정에 비해 포자수가 크게 증가한 것으로, 실제 제품화 시 농축 등을 고려할 경우의 산업화 적정선인 1.0E+09 cfu/ml 이상 수율을 보여 차후 산업화에 용이할 것으로 보인다. 이 때 pH는 전반적으로 증가하는 추세를

나타내었는데, 이는 균사생장 및 포자 형성을 하면서 내부의 물질을 소모한 결과로 보이며, DO의 경우 포자수가 급격히 늘어남에 따라 급격히 낮아지다가 일정 수준 이후부터 균일하게 유지되는 경향을 나타내었다.

2. 미생물 제제의 제형 개발 및 시장성 검토

가. 제형 다변화의 필요성

미생물 제제는 대상 병해의 특성, 재배 기간 동안의 강수량·기온·습도, 재배 규모 등 다양한 재배 환경에 따라 적용 방법을 다르게 해야 할 필요가 있다. 이에 따라 미생물 제제의 제형도 액상수화제(Suspension Concentrate), 수화제(Wettable Powder), 과립수화제(Water Dispersible Granule), 입체(Granule) 등 다양한 형태로 제작되어 진다. 본 연구 과제에서는 미생물 제제의 산업화를 위해 액상수화제와 수화제를 3차년도 연구 기간 동안 시제품으로 제작하였다.

나. 건조 공정의 확립

건조 공정은 액상 배양을 통해 제조된 미생물 배양액을 담체를 이용하여 분말형태로 제작하는 과정으로 제형 다변화의 첫 단계라 할 수 있다. 본 연구 과제에서는 미생물 제제에 일반적으로 이용하는 건조 공정 중 동결건조법(Freeze-Drying)과 분무건조법(Spray-Drying)을 적용하였다. 본 연구 과제에서 적용한 동결건조법은 정확히 말하자면 진공동결건조법으로 액상 시료나 다량의 수분을 함유한 재료를 동결시키고 감압함으로써 얼음을 승화시켜 수분을 제거하여 건조물을 얻는 방법이다. 조작이 저온에서 이루어지므로 열에 약한 물질의 건조법으로 유용하다. 분무건조법은 액상의 원료를 분무, 미립화하여 열풍기류에 접촉시키면 순간적으로 증발, 건조되어 일거에 분립상 제품을 얻을 수 있는 공정이다.

본 연구 과제에서 이용한 동결건조법의 조건은 다음과 같다. 담체의 경우 락토오즈를 이용하였고, 원제와 담체의 비율을 1:2(Wt:Wt)로 하여 배합하였으며, 시료는 영하 28 - 영하 3℃ 사이에서 4시간 이상 냉동 하였다. 동결 건조에 적용한 온도와 시간에 따른 시료 건조 조건은 Table. 4에 구체적으로 나타내었다. 본 동결 건조는 당사 연구소 내부의 동결 건조기를 이용하여 진행되었다. 영동대 산학지원센터에서 진행한 분무 건조의 구체적인 조건은 다음의 Table. 5와 같다. BS107의 건조에 있어서 중점적으로 고려한 점은 건조 과정 중에 미생물인 BS107이 외부 온도의 변화에 따라서 균주 특성의 변화가 오거나, 고온에 의해 사멸하는 현상이 발생하고, 유도저항성 발현 물질이 소멸되는 것 등이었다. 그리하여 분무 건조에 있어서 열풍 기류의 온도를 가능한 낮게 유지하였고, 동결건조와 분무건조 시 외부의 악조건에서 미생물인 BS107을 보호할 수 있는 담체(Carrier)를 기존의 연구 결과를 참고하여

참가하였다.

Table. 5-4. BS107의 온도와 시간에 따른 동결 건조 조건

온도(℃)	-30	-20	-10	0	10	20	30	35	40
시간(min.)	120	120	120	180	120	120	240	240	900

Table. 5-5. BS107의 분무건조 조건

항 목	조건 내용
배합비 ^a	BS107 배양액(20) : 텍스트린(2) : 화이트카본(1)
Inlet temp.	200℃
Outlet temp.	70℃
Air pressure	0.8 bar
시료 주입량	2.5L/hr

a: 배합비는 시료와 담체의 중량(Wt)을 기준으로 함

두 건조법에 사용한 BS107의 건조 수율은 동결건조가 6.5E+09 cfu/g이고, 분무건조는 4.76E+09 cfu/g으로 두 건조법 모두 건조에 따른 균주의 영향은 거의 없는 것으로 나타났다. 하지만, 동결건조의 경우 분무 건조에 비해 담체의 소모량이 크고, 동결 건조가 시간당 소요 비용이 더욱 높은 관계로 경제성과 건조의 용이성을 고려하였을 때, 분무건조법이 BS107의 건조법으로 적합한 것으로 사료된다(Fig. 5-6, Table.6). 기존의 세균(Bacteria) 배양액의 경우 열안정성에 취약하여 분무건조가 불가능한 경우가 존재하였으나 담체에 흡착된 BS107은 열안정성이 우수하므로 분무건조법으로 건조가 가능하였다.

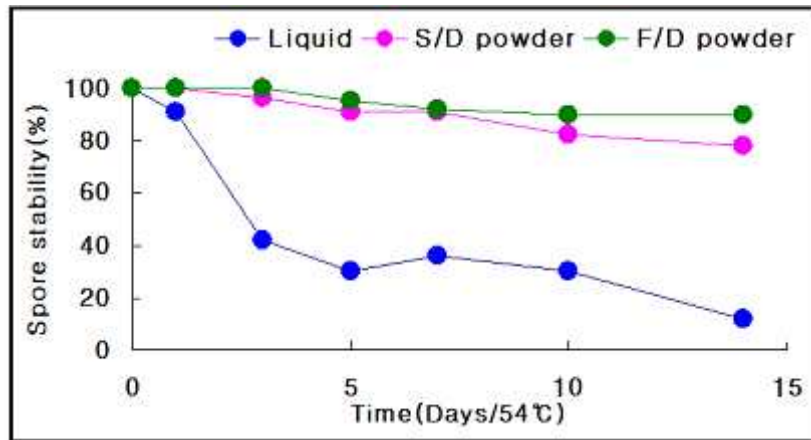


Fig. 5-6. 건조방법에 따른 포자 안정성 비교 (54°C, 2주간 시험: 1년 경시)

Table. 5-6 . 제형에 따른 이화학 및 물리적 특성

Content	Liquid	F/D	S/D
Physical property	Brown liquid, water soluble	White powder, water soluble	Yellow powder, slight soluble
Manufacturing convenience	High	Low	Med
Spore gained	High	Med	Low
Stability	Low	High	High
Portability	Low	High	High
Cost	Low	Very High	Low
Efficacy	High	High	High
Maleficence	-	-	-

▶검토한 제형 중 생산 공정 및 단가 등을 고려할 때 S/D 제형이 가장 상업성이 높을 것으로 판단하여, BS107 제품을 S/D 제형으로 개발하고자 한다.

다. 분쇄 공정의 확립

미생물 제제의 수화제의 제작을 위해서는 건조 이후 분쇄 과정이 필요한데, 이는 수화제의 이화학 기준 중 입도 크기가 직경 기준 45 μ m 이하이고, 325mesh 체를 통과할 수 있어야 하기 때문이다. 일반적으로 건조 후에는 미생물제제의 건조물의 입도 크기가 이 기준을 충족할 수 없으므로 분쇄가 필요하다. 그러나 분쇄 과정 상에서 미생물 포자가 파괴되거나 손상 받을 수 있기 때문에 분쇄 공정 설계가 필요하다. 자사에서 보유한 Airjet-mill을 이용하여 본 제품의 분쇄 제형화 시험을 실시하였으며, Fig. 5-7, 5-8과 같이 분쇄 속도는 50g/m에서 가장 높은 분말도와 포자 수율을 얻을 수 있었다.

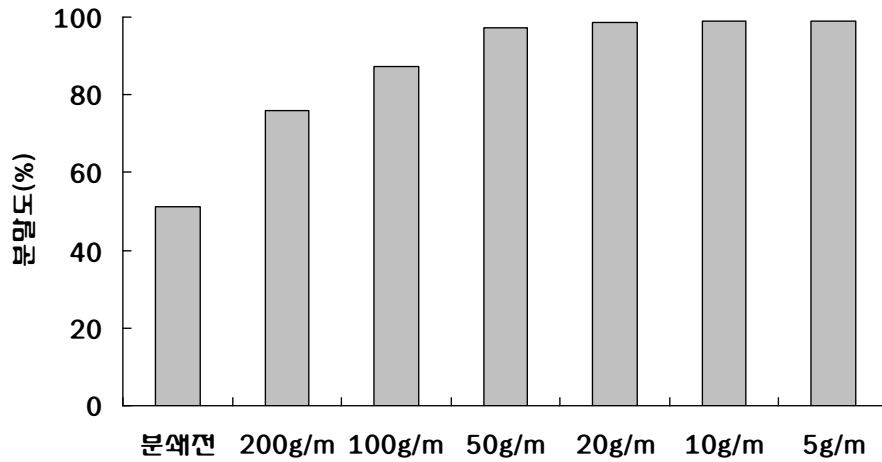


Fig. 5-7. Airjet-mill의 분쇄 속도 별 분말도 차이

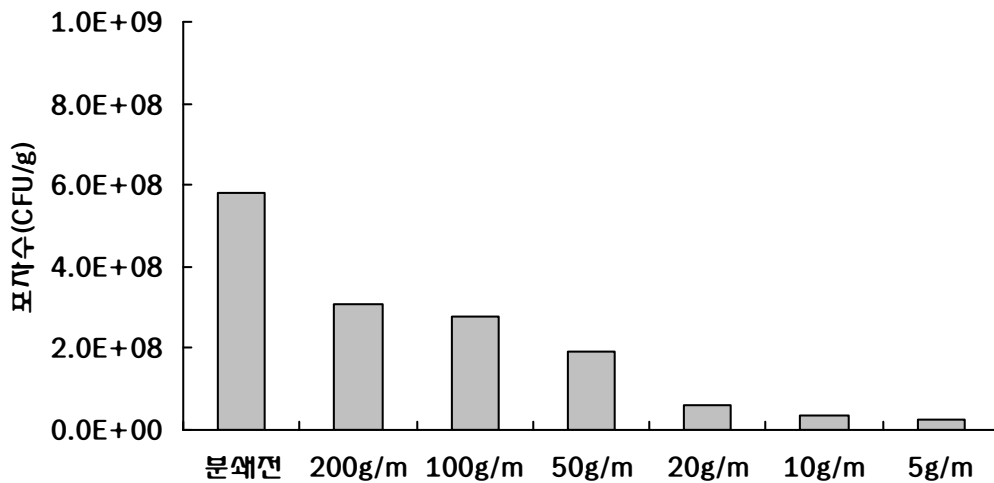


Fig. 5-8. Airjet-mill의 분쇄 속도 별 포자 수율

라. 시제품의 제작과 시장성 확인을 위한 연구

(1) 시제품의 제작

시제품은 크게 액상수화제와 수화제 두 가지 형태로 제작 되었다. 액상수화제는 산업화 수준의 액상 배양 공정을 통해 제조된 미생물 배양액에 당사의 외부 오염 차단제와 경시 안정성 향상제를 첨가하여 제조하였으며, 수화제는 액상 배양액에 외부 자극으로부터 미생물을 보호하고, 경시 안정성을 향상시킬 수 있는 담체를 첨가한 것을 분무건조한 것으로 제조하였다. 본 시제품은 고추 탄저병과 점무늬병 대상 병해에 대한 생물검정에 사용되었다.

(2) 시제품의 대상 병해에 대한 생물 검정

시제품의 병 방제 효과에 대해 알아보기 위해 고추 점무늬병과 탄저병에 대해 생물검정 시험을 실시하였다. 고추 점무늬병은 액상수화제형의 시제품을 실험 약제로 하여 대조 약제로 유도 저항성을 가진 물질로 알려진 BTH를 이용하였다. 3-4 엽기의 고추 유묘에 실험 약제와 대조 약제를 토양 관주 처리하고, 1주일 후에 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 현탁액을 주사기로 고추 유묘의 잎에 접종하였다. 접종한 고추 유묘는 30°C의 비닐 상자(습도; 90% 이상, 광/암; 12hr/12hr) 안에서 보관하며, 발병을 유도하였다. 접종한 지 5일 후에 접종한 잎에서 나타나는 수침상 병반을 확인하여 발병도를 조사하여 효력을 검정하였다. BS107의 액상수화제 시제품은 시제품 원액의 경우 대조 약제인 BTH 0.5mM과 비슷한 점무늬병 방제 효과를 얻을 수 있었지만, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ 배 희석액에서는 만족할 만한 효과를 얻지 못하였다(Fig. 5-9).

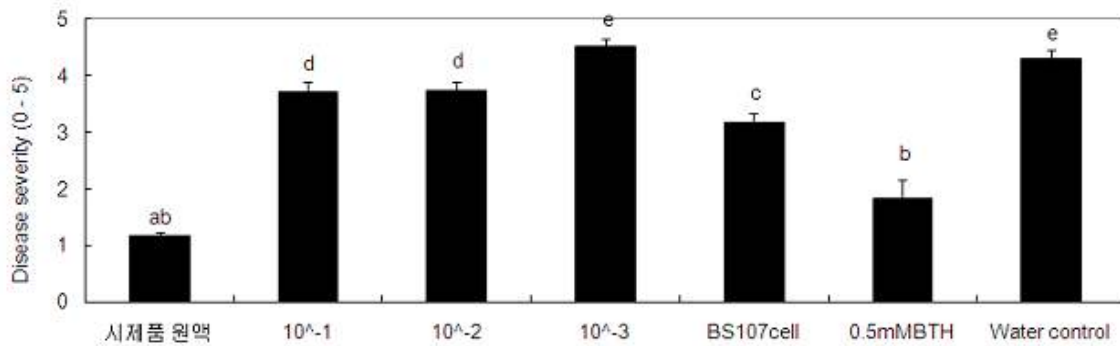


Fig. 5-9. 고추 점무늬병 대상의 BS107 액상수화제 시제품의 생물 검정 결과

고추 탄저병의 경우 BS107의 액상수화제와 분상수화제 두 가지 형태에 대해 BTH와 화학 농약인 mancozeb의 혼합제제 비온엠(신젠타)을 대조 약제로 방제 효과를 검정하였다. 3-4 엽기의 고추 유묘를 온실에서 재배한 후, 각 처리당 3반복으로 turn table 위에 놓고 회전시키면서 스프레이건(1kg/cm²)으로 식물체 전체에 골고루 실험 약제가 부착되도록 살포하였다. 약제 처리한 식물은 1일 동안 실내에 둔 후 고추 탄저병 병원균인 *Collectotrichum coccodes* 를 오트밀 배지에 접종하고 25°C에서 10일 동안 배양하여 형성된 포자를 수확하고, 포자 농도를 4.00E+05 cfu/ml가 되도록 조정하여 고추 유묘에 분무접종 하였다. 이 실험구들은 무처리 대조구와 함께 25°C에 2일 동안 습실 처리 하였고, 항온항습실(습도; 75%, 광/암; 12hr/12hr)에서 발병시켰다. 접종 3일 후에 고추 잎에 형성된 병반의 면적율을 조사하였고, 방제가를 구하여 고추 탄저병에 대한 방제 효과를 검정하였다.

$$\text{방제가 (\%)} = (1 - \text{처리구의 병반 면적율(\%)} / \text{무처리구의 병반 면적율(\%)}) \times 100$$

액상 수화제 100배의 경우 실험 약제 중 가장 좋은 효과인 73%의 방제가를 보였고, 액상 수화제 100배와 200배 처리구가 미생물 농약의 방제 효과 기준인 50%를 넘어 산업화의 가능성을 볼 수 있었다. 대조 약제인 비온엠의 경우 100% 방제 효과를 보였다(Fig. 5-10).

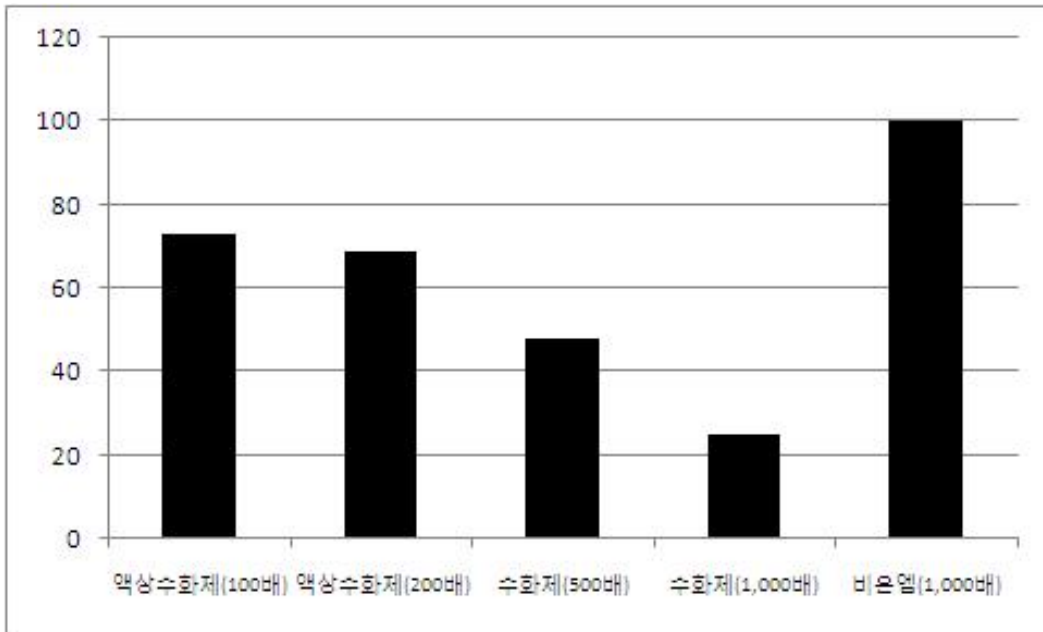


Fig. 5-10. 고추 탄저병 대상의 BS107의 액상수화제와 수화제 시제품 생물 검정 결과

마. BS107 제품의 상업화 제조공정

BS107의 상업화를 위한 배양에서 제품화까지의 제조공정 모식도는 Fig. 5-11과 같다.

● 제조공정도

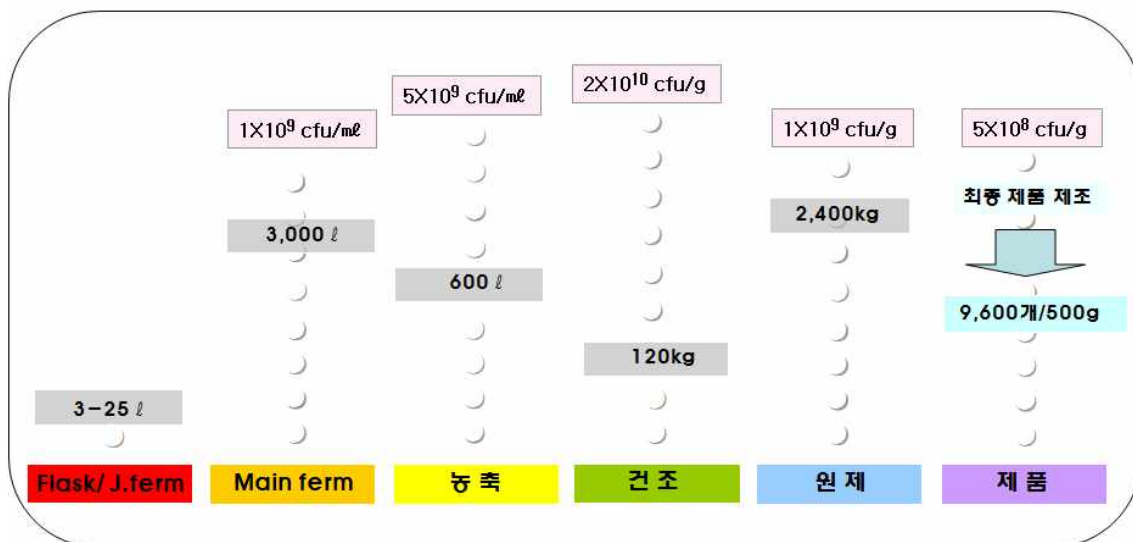


Fig. 5-11. BS107을 이용한 상업화 제품 제조공정 모식도

3. 미생물제제의 포장 적용시험 및 약효약해 분석

가. 미생물제제의 포장 약효약해시험

(1) 포장 약효약해시험 개요

경기도 화성시에 위치한 고추 노지포장을 임대하여 기 제조한 시제품을 이용한 약효약해시험을 진행하였다. 고추는 육묘한 마니따고추를 정식하였으며 재배 방식은 농가 관행 재배에 따라 실시하였다.

BS107의 약효 시험은 고추 탄저병 및 고추 세균성점무늬병, 2종의 병해를 대상으로 실시하였다. 고추 탄저병과 세균성점무늬병은 고추의 주요한 병해로 특히 화학 약제로도 방제가 어려워 농가의 큰 문제가 되고 있다. 본 연구에서는 BS107에 의해 생성되는 고추의 전신유도저항성을 통해 고추의 난방제 병해인 탄저병과 세균성점무늬병을 방제코자 시험을 실시하였다(Table. 7, Fig. 5-12).

Table. 5-7. 포장시험 계획표

시험작물	고추(마니파)	대상병해	탄저병(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>) 세균성 점무늬병(<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatorina</i>)
시험기간	2009. 4.~2009. 9.	시험장소	경기도 화성(노지재배, 농가관행농법, 타 살균제 살포 금지)



Fig. 5-12. 시험 포장 전경(경기도 화성시)

(2) 시험 방법

시험 전, BS107 시제품을 뿌리에 충분히 흡수시켜 전신유도저항성이 유도될 수 있도록 30분간 고추 포트 전체를 BS107 희석액에 충분히 침지하였다. 침지한 후 약 30분간 통풍하여 흐르는 액을 제거한 후 포장에 정식하였다. 병원균 배양액을 사전 살포하여 발병을 유도하였으며 시기적으로 해당 병해가 가장 크게 나타나는 때에 시험 조사를 실시하였다(Table. 8, Fig. 5-13).

Table. 5-8. 약제 처리 방법 및 조사방법

시험구명		처리방법	조사방법
BS107 액상	정량	정식 전 고추 포트를 희석액 에 30분간 침지 후 정식함.	발병 유도(병원균 배양액 사전 살포) 후 육안으로 병 발생정도를 조사함. (이병과울 및 이병엽울 조사)
	배량		
BS107 분상	정량		
	배량		
화학약제 처리구		발병 초 엽면살포	
무처리 대조구		-	



Fig. 5-13. BS107 시험 방법(좌: 원액 희석, 우: 침지 처리)

(3) 약효약해시험 결과

(가) 고추 세균성점무늬병 약제방제 효과시험

시험 결과 액상 시료 처리구 및 분상시료 처리구 모두에서 대조구 대비 80% 이상의 방제 효과를 나타내었다. 화학약제 처리구의 경우 발병 후 약제를 처리하여 다소 방제가가 낮게 나타난 것으로 보인다. BS107에 사전 침지하여 저항성을 유도한 고추의 경우 세균성점무늬병에 대하여 80% 이상의 높은 방제 효과를 나타내어 생물농약으로 실효성이 있을 것으로 보인다(Fig. 5-14~17).

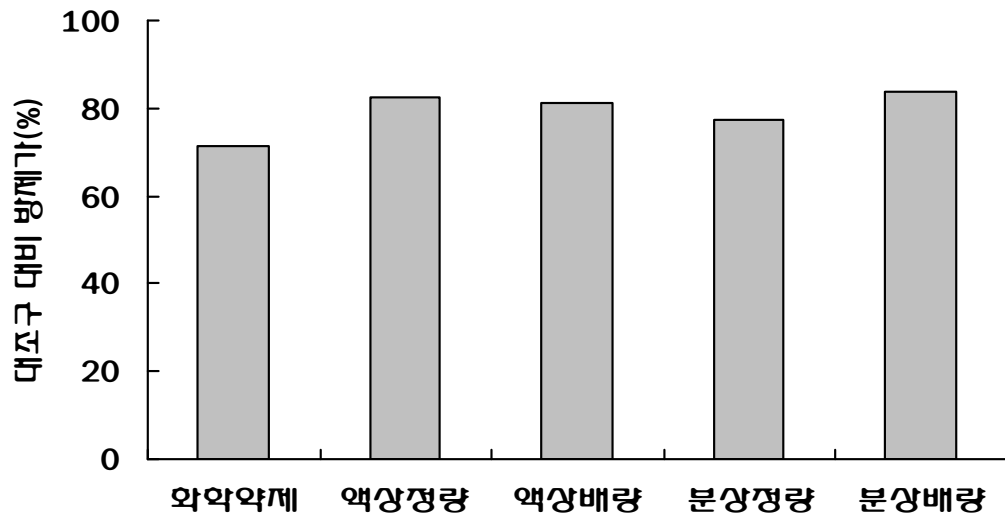


Fig. 5-14 . BS107을 이용한 고추 세균성점무늬병 방제시험 결과



Fig. 5-15. 화학약제 처리구





Fig. 5-16 . BS107 처리구





Fig. 5-17. 무처리구 (점무늬병 발병 모습)

(나) 고추 탄저병 약제방제 효과시험

시험 결과 액상 시료 처리구 및 분상 시료 처리구 모두에서 대조구 대비 60% 이상의 방제 효과를 나타내었다. 전체적으로 방제가가 다소 낮게 나타났는데, 이는 기상이 불규칙하여 병 발생이 예년에 비해 시기적으로 늦게 나타났기 때문이다. BS107에 사전 침지하여 저항성을 유도한 고추의 경우 탄저병에 대하여 60% 이상의 방제 효과를 나타내어 생물농약으로 실효성이 있을 것으로 보인다(Fig. 5-18~21).

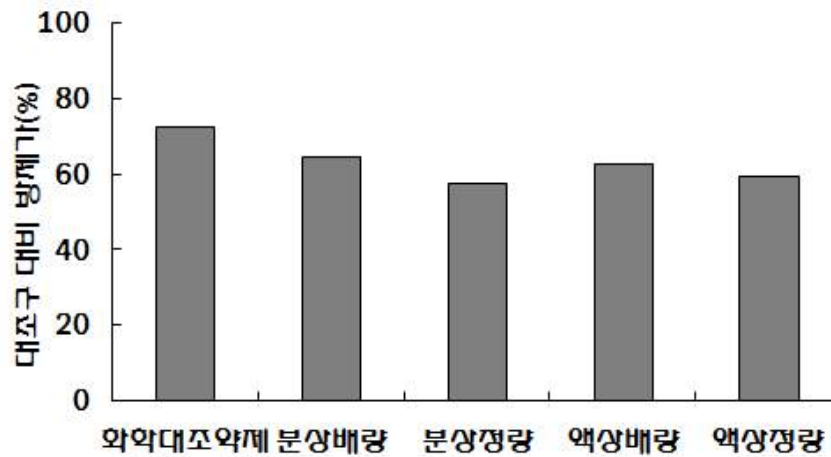


Fig. 5-18. BS107을 이용한 고추 탄저병 방제시험 결과



Fig. 5-19. 화학대조약제 처리구





Fig. 5-20. BS107 처리구 (액상정량, 분상정량, 액상배량, 분상배량)





Fig. 5-21. 무처리구(고추 탄저병 발병 모습)

4. 개발된 미생물제의 산업화 방안 개발

본 연구를 통해 BS107을 이용한 전신유도저항성 미생물제제의 대량배양공정 개발 및 제형화 연구를 실시하였다. 또한 기 개발된 공정을 통해 생산된 시제품의 포장시험 적용 결과 난방제성 병해에 대한 높은 방제 효과를 나타내었다. 이러한 높은 효과의 미생물제를 상업화하고자 상업화 가능성 및 시장 접근 방안 등에 대한 연구를 실시하였다.

Table. 5-9. 친환경 제제의 등록 제도 비교

	미생물농약	친환경 유기농자재	토양미생물제제
관리법	농약관리법에 따른 등록	친환경 유기농자재 목록공시제에 따른 등록	비료관리법에 따른 등록
등록시험 항목	약효시험 3회, 약해시험 3회, 타작물병원성 및 약해시험 1회, 이화학성 시험, 포유동물 독성, 환경생물독성, 잔류성 시험	효과시험성적 1회, 급성경구/경피/어독성 시험, 오염미생물 검사시험	비효시험 성적서 1회
등록기간	2-3년	1년 이내	1년 이내
소요비용	1-2억	1000만원	2-300만원
친환경유무	친환경 농업에 사용 가능함.		

미생물 제제를 상업적으로 판매하거나 유통하기 위해서는 제품 등록 절차를 거쳐야 하며, 현재 이를 등록하는 방법은 Table. 9와 같이 미생물농약, 유기농자재, 토양

미생물제제가 있다. 미생물농약의 경우 약효 및 안전성이 확실히 보장되는 제품이나 비용과 시간이 많이 소요되며 친환경 유기농자재의 경우 미생물농약에 비해 비용과 시간이 짧게 소요된다. 토양미생물제제의 경우 병해충 방제제로 표기가 불가능하며 비료로써의 효능만 인정된다.

현재 상업화를 위한 추가적인 시험이 진행되고 있으며, 차후 등록을 통한 상업화가 본 과제 의 최종 목표이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2006 년	▶ 다른 작물에서 ISR이 보고된 바실러스 종 에 대한 고추병에 대한 시스템 구축 및 transcriptome 분석을 통한 유용 유전자 대량 발굴	100%	ISR 시스템구축 및 유용유전자 발굴
2차 년도	2007 년	▶ 바실러스로부터 ISR 결정 유전자 탐색 및 virus-induced gene silencing을 이용한 고추 transcriptome 분석을 통해 확보된 유전자 확인	10 %	확보된 유전자의 VIGS이용 10종이상 확인
		▶ 세균 유래 ISR 유도물질 선발	50%	유도물질 5종이상 선발
3차 년도	2008 년	▶ 선발된 바실러스유래 유전자와 고추 유래 유전자의 기능 연구	20 % 20 %	10종 이상의 고추 유전자확보
		▶ ISR 물질의 소규모 온실 검정	30 % 20 % 20 %	2종 이상의 물질 온실검정
4차 년도	2009 년	▶ 바실러스 이용한 ISR재제화	20 % 50 %	ISR 재제화
		▶ ISR 물질의 대량 포장 실험	20 % 50 %	대량 포장실험
최종 평가		▶ ISR을 이용한 바실러스의 생물적 방제 기술 개발	50 %	ISR 생물적 방제 기술 개발
		▶ 세균 유래 ISR 결정인자를 이용한 식물병 방제 기술 개발	60 %	ISR 물질 2종이상의 실용화
		▶ ISR시 발현되는 고추 유전자 대량 발굴	10 %	10개이상의 ISR관련 고추유전자발굴

제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 나타냈으며 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하여 달성되었다고 생각한다.

1. 연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가	목표달성도 (%)	참조부분
	평가의 착안점		
내병성 유도균 또는 전신희독저항성 활성제를 이용한 식물의 내병성 관련 유전자 선발 및 대량 확보	○ 내병성 유도균 또는 전신희독저항성 활성제를 식물에 처리한 후 병원균을 처리해 병저항성 확인 및 유도되는 내병성 관련 유전자 대량 확보	100	3장가 및나
선발된 유전자들의 분자생물학적 특성 조사 및 벼 형질전환 수행	○ 선발된 유전자들의 분자생물학적 특성 조사 - 선발된 유전자들의 생화학적, 생리학적, 분자생물학적 특성 조사 및 발현 양상과 내병성 상관관계 규명 ○ 형질전환 벡터 제작 및 벼 형질전환 수행 - 형질전환용 유전자 벡터 제작 및 <i>Agrobacterium</i> -mediated 벼 형질전환 수행	100	3장다 및라
벼 형질전환체의 선별 및 돌연변이체를 이용한 유전자의 기능 연구	○ 벼 형질전환체 확인 및 외래 유전자의 발현 양상 조사 - 벼 형질전환체 표현형 조사 및 분석 및 외래 유전자의 전사 활성 및 발현 양상 조사 ○ 돌연변이체를 이용한 발현 유전자의 기능 규명	100	3장라 및마
벼 형질전환체의 벼 병해 포장 저항성 검정	○ 벼 형질전환체 내병성 및 내재해성 검정 - 벼 형질전환체의 내병성 및 내재해성 포장 저항성 검정 및 생육 및 기타 형질 조사 ○ 벼 형질전환체 후대 분석 및 형질전환체의 실용화 검정	100	3장마

본 연구를 통해 확인된 ISR 내병성 유도균에 의한 벼의 병방제 기술과 그 기작 연구는 농업 현장에서 활용될 수 있을 뿐만아니라 학문적으로도 많은 기여를 할 것으로 여겨진다. 특히 발작물의 경우는 여러 유용한 미생물을 이용한 환경친화적인

병방제가 가능하나 벼의 경우는 그러한 노력이 전혀 이루어지지 않고 있는 현실에서 그 가능성을 확인 한 것은 큰 의미가 있다 하겠다. 또한 간접적으로 식물에 유도저항성을 부여함으로써 병원균을 방제하는 유용한 미생물과 같은 환경친화적인 제제들은 환경의 영향을 많이 받기 때문에 농업 현장의 조건에 따라 그 방제 효과가 천차만별일 수가 있다. 그러한 단점을 보완하기 위해서는 유용미생물들이 유도저항성을 표현하게 하는 결정인자에 대한 연구가 꾸준히 이루어져야 하는데 본 연구의 결과가 이러한 연구를 할 수 있는 기초가 된다는 점에서 큰 의미가 있다 하겠다.

또한 microarray 기법을 이용해 유용한 미생물에 의해 반응하는 식물의 유전자의 대량 확보는 전세계적으로 유전자 전쟁이라고 표현될 수 있을 만큼 유용한 유전자에 대한 경쟁이 치열한 시점에서 산업적으로 큰 의미가 있으며, 확보된 유전자들 중 중요한 유전자들의 병리학적, 생화학적 및 분자생물학적 방법을 이용한 기능 분석을 통한 병저항성 관련 신호전달체계와의 연관성 연구는 병 방제에 대한 새로운 전략을 수립할 수 있는 기초가 될 수 있어 새로운 개념의 병저항성 형질전환체의 개발에 학문적으로나 기술적으로 큰 기여를 할 것이다.

게다가 식물병리학, 분자생물학, 식물분자병리학, 유전체학을 기본으로 하는 생명공학 기술은 국가 첨단기술 산업의 하나로 급속도로 발전하는 현대사회에서 식량 문제를 해결해 줄 수 있을 뿐만 아니라 21세기에 다양한 고부가가치 신산업을 창출할 수 있는 원동력이 될 것이다. 그래서 본 연구 과제를 수행하는 동안 양성된 석사 및 학사 학생들을 생명공학 기술을 가진 고급 인력에 대한 양성이라는 관점에서 보면 국가 경쟁력 확보 차원에서 큰 기여라 생각한다.

제 3 절

과제 1차년도인 2006년도의 연구목표는 *Paenibacillus polymyxa* E681로부터 전신 유도저항성(ISR) 물질 분리 및 고효율의 신균주 탐색이었다. 한반도 남부지역의 여러 곳에서 고추 샘플을 채취하여 이로부터 포자형성세균(특히 *Bacillus* sp.) 16종과 질소고정세균 84종을 분리하였다. 분리균주들을 모두 고추에 직접 적용하여 ISR 활성이 높은 고효율의 신균주를 3종 확보하였다. 또한 기존에 알려진 *P. polymyxa* E681의 ISRG 유도물질을 분리하기 위해 상층액의 극성·비극성 성질을 이용하여 fraction하였다. 그 결과 remaining suspension에서 ISR 효과를 확인하였고 이를 다시 silica gel column chromatography를 통해 분리하였다. 1차년도의 과제는 100% 수행되었다.

2차년도의 연구목표는 신균주가 분비하는 고효율 ISR 물질의 분리 · 동정 및 *P. polymyxa* E681 유래의 ISR 물질의 동정이었다. 앞서 1차년도에서 ISR 유도물질이 포함되어 있을 것으로 예상되는 remaining suspension을 silica gel column

chromatography로써 정제된 *P. polymyxa* E681 유래 ISR 물질 동정을 위해 TLC, HPLC를 이용한 물질의 확인 및 검증, NMR, GC-Mass 등에 의한 물질의 분석한 결과 2,3-butanediol과 acetoin으로 동정되었다. 하지만 KNUC251 균주로부터 새로운 ISR 물질을 분리하기 위해 실험을 수행하였으나 실험이 순조롭게 진행되지 않아서 결과를 얻을 수 없었다. 2차년도 과제 목표달성도는 60% 정도였다.

3차년도의 연구목표인 ISR 유도물질의 소규모 온실 검정을 수행하기 위해 앞서 실험실 수준에서 ISR 활성을 나타내었던 KNUC251, KNUC265, KUDC1013, KUDC1015, KUDC1065를 온실에서 고추에 적용하였을 때 ISR 효과를 조사하였다. 이들의 ISR 유도물질을 온실 환경 하에 적용하였을 때 실험이 순조롭게 진행되지 않아서 결과를 얻을 수 없어 70~80%정도 3차년도 목표를 달성하였다.

4차년도의 연구목표인 ISR 물질의 대규모 포장 검정이었다. 온실에서 ISR 효과가 높았던 KUDC1013과 KUDC1065 및 E681을 필드환경 하에서 각각 단일처리와 혼합 처리하여 각 균주들의 ISR 효과를 검정하였다. 또한 E681 유래 ISR 유도물질이었던 2,3-butanediol과 acetoin을 적용하여 ISR 효과를 조사하였다. 2종의 ISR 유도물질은 필드환경에서 어느 정도 ISR 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 독도로부터 분리한 새로운 고효율성의 미생물들을 단일 및 혼합 처리하였을 때 높은 ISR 효과를 확인하였다. 본 연구팀은 침지 및 관주처리방법(현탁액을 직접 뿌리에 적용)으로 ISR 유도물질 및 미생물을 처리하였으나 식물에 이들을 적용하는 방법은 옆면 살포, 침지, 종자처리, 관주처리 등이 있으므로 각 처리방법의 차이에 따라 미생물 및 ISR 유도물질의 효과를 확인하는 실험이 필요할 것으로 생각된다. 4차년도의 과제의 목표는 70% 정도 달성하였다.

제 4 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- * 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술

제 5 절

연구 항목	연구 목표	달성도
최적 균주 선정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전신유도저항성 균주 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 배양 용이성(배양 시 균수 및 배양일수 등) - 실내 간이 효과시험 : 유도저항성 확인 	100%
최적배지조성 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 배지조건의 탄소원, 질소원 및 미량요소 구명 ○ 최적 배지조건으로 제조된 배지를 이용한 배양 시험 ○ 균주 적응성 평가 	100%
대량배양공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 배양조건의 pH, 온도, 배양일수, seed 접종량 등 시험 ○ Scale up을 통한 통기량, 회전수 등 결정 ○ 대량배양공정에서의 배양수율 확보 	100%
최적 제형 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 각 공정단계 별 최적화 여부 조사 ○ 각 병해 별 적합한 2종 이상의 제형개발 ○ 제형 별 보존성 및 경시안정성 확인 : 1년 이상 ○ 제형 별 실내 약효시험 : 방제가 확보 	100%
포장 적용시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소규모 적용시험 : 살포방법, 살포횟수 등 확립 ○ 시험방법 및 수행의 적합성 평가 ○ 약효 평가 : 작물의 난방제성 병해에 대한 유도저항성 평가 	100%
상업화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 독성 및 약효약해시험 실시 ○ 적용확대 시험 실시 : 타작물 및 타병해 대상 시험 	100%

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절

본 연구과제에서 선별된 유용미생물을 이용한 실내 및 포장에서의 고추 병해 방제 기술을 바탕으로 농업 현장에서 미생물을 이용한 병 방제에 대한 방법을 제시 할수 있으며 본 연구 과제뿐만 아니라 다양한 작물을 대상으로도 폭 넓은 연구가 지속적으로 수행되어진다면 친환경 농법에 새로운 방법과 재료를 제시 할 수 있을것이다. 본 연구에서 선별된 균주에서 분리된 새로운 유도 저항성 유도 물질도 기존에 알려져 있지 않았던 저항성 유도 기능을 밝혀냄으로써 새로운 유도 저항성 물질로 사용이 가능할것이라 여겨지며 고추 뿐만 아니라 다양한 작물에서도 적용이 가능할 것이다. 또한 고추에서 본 실험에서 선별된 균주에 의해 저항성이 유도 되어질때 발현되는 priming 유전자들의 분석을 통해 고추에서 유도 저항성이 이루어지는 원리를 이해하는데 많은 도움이 되었으며 이러한 유전자들을 좀 더 세밀히 연구를 하게 된다면 저항성 품종 개발에 일조를 할 수 있을 것이라 여겨진다.본 연구에서 발견한 저항성 유도 미생물과 미생물에서 분리된 유도 저항성 물질 그리고 식물유래 저항성 유도에 관련된 유전자들의 연구는 고추라는 작물에서 병 저항성의 증진과 병 저항성 원리를 밝혀내는데 커다란 기여를 했다.

제 2절

본 연구과제의 유용미생물을 이용한 실내 및 포장에서의 병 병해 방제 기술을 바탕으로 농업 현장에서 농민들과 방제력에 대한 경험을 공유 할 수 있으며 본 연구과제에서 이용한 유용미생물을 포함한 다른 제제들의 폭 넓은 연구가 지속적으로 수행되어 친환경 농법을 선호하는 농가에 이용될 수 있다. 그리고 선별된 유전자들 중 벼 WRKY45 유전자는 심도있게 기능 분석을 수행되어 저항성 신호전달체계인 MAPK cascade와 연관되어 있다는 결과를 얻어서 현재 그 결과를 종합해 논문을 준비 중에 있다. 또한 GolS 유전자가 형질전환된 식물체를 통해 확인된 내병성 및 내재해성 결과 역시 종합해 논문을 준비 중에 있다.

그리고 WRKY45 유전자, diterpenoid의 생합성 및 galactinol 생합성과 병저항성 관련 MAPK cascade가 서로 연관되어 있다는 결과는 MAPK cascade의 기능이 유도저항성과도 관련이 있음을 시사하므로 추후에 유도저항성과 벼 MAPK cascade의 기능과 관련된 연구의 좋은 자료가 될 수 있으리라 생각한다.

제 3절

제 1 세부과제

본 연구팀에 의한 4년간의 연구 결과를 바탕으로 3건의 특허를 출원하였다. 또한 균주에 대한 특허를 출원하였다. 또한 2009년까지 SCI논문 12건, 국내 논문 3건을 발표하였다. 또한 2009년 수행한 실험 결과는 2010년에 국외 및 국내에 2건의 논문을 게재할 예정이다. 17번의 국내외 학술회의에서 발표를 진행하였으며, 1건의 홍보 실적을 가지고 있다. 1건의 특허를 출원 예정이며, 2010년에 국외 및 국내에 2건의 논문을 게재할 예정이다.

▶ 국내 특허 출원

1. Composition and method for increasing resistance against plant pathogen by comprising bacterial gene 출원등록자명:류충민,이보영,이수현 출원등록번호 KR-2007-005952 산업재산권 종류: 특허 출원등록일: 2007년)
2. 동물 바이러스 유래 siRNA를 생산하는 식물체 및 이의 용도(출원등록자명:류충민, 이보영, 출원등록번호:1020080120859 산업재산권 종류:특허 출원등록일:2008년 12월 02일 등록)
3. PLANT PRODUCING SIRNA OF ANIMAL VIRUS AND USES THEREOF (출원등록자명:류충민 이보영 출원등록번호:007806 산업재산권 종류: 특허 출원등록일:2008년 12월 02일 등록)

▶ 국제학술지 논문

- 1 Proteome Analysis of *Paenibacillus polymyxa* E681 Affected by Barley Seul, Keyung-Jo ; Park, Seung-Hwan ; Ryu, Choong-Min ; Lee, Yong-Hyun ; Ghim, Sa-Youl *J Microbiol Biotechnol.* 2007 17(6):934-44.
2. Characterization of rhizobacteria isolated from family Solanaceae plants in Dokdo island 함미선, 박유미, 성혜리, Marilyn Sumayo, 류충민,박승환, 김사열 *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 37, No. 2, 110--117(2009)
- 3 Priming of Defense-Related Genes Confers Root-Colonizing Bacilli-Elicited Induced Systemic Resistance in Pepper Jung Wook Yang · Seung Hun Yu · Choong-Min Ryu *The Plant Pathology Journal* 2009 25(4)p. 389~399
- 5 Isolation and Characterization of Transposon-Insertional Mutants from *Paenibacillus polymyxa* E681 Altering the Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid Quyet Tien Phi *Current Microbiololy* 2008 56(5)524-530
6. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Yang J, Kloepper JW,

- Ryu CM. Trends Plant Sci. 2009 Jan;14(1):1-4.
- 7 A Super-Absorbent Polymer Combination Promotes Bacterial Aggressiveness Uncoupled from the Epiphytic Population. Boyoung Lee, Dalsoo Kim and Choong-Min Ryu The Plant Pathology Journal Volume 24, No 3, pp. 283-288
 8. Functional identification and expression of indole-3-pyruvate decarboxylase from *Paenibacillus polymyxa* E681. Phi QT, Park YM, Ryu CM, Park SH, Ghim SY. J Microbiol Biotechnol. 2008 18(7):1235-44.
 9. Park K, Kloepper JW, Ryu CM. Rhizobacterial exopolysaccharides elicit induced resistance on cucumber. J Microbiol Biotechnol. 2008 18(6):1095-100.
 10. A two-strain mixture of rhizobacteria elicits induction of systemic resistance against *Pseudomonas syringae* and Cucumber mosaic virus coupled to promote plant growth on *Arabidopsis thaliana*. Ryu, Choong-Min, John F. Murphy, M. S. Reddy, and Joseph W. Kloepper Journal of Microbiol and Biotechnology (2007), 17(2), 280-286
 11. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu CM, Allen R, Melo IS, Paré PW. Planta. 2007 Sep;226(4):839-51.
 12. The Effects of Wood Vinegar on Growth and Resistance of Peppers. Jeong, J.-H. Jeong, D.-E. Lee, S.-J. Seul, K.-J. Ryu, C.-M. Park, S.-H. Ghim, S.-Y. KOREAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 2007, VOL 35; p 41-44
 13. Proteome analysis of *Paenibacillus polymyxa* E681 affected by barley. Seul KJ, Park SH, Ryu CM, Lee YH, Ghim SY. J Microbiol Biotechnol. 2007 Jun;17(6):934-44.
 14. 벼 도열병에 대한 indole butyric acid (IBA)의 방제 효과 (Control effect of isobutyric acid on rice blast), 김흥태 (Heung Tae Kim), 홍경식 (Kyeong Sik Hong), 최경자 (Gyung Ja Choi), 장경수 (Kyung Soo Jang), 류충민 (Choong-Min Ryu) 저, 농약과학회지 2007년 12월 pp. 313~319 (7 pages)
 15. Functional identification and expression of indole-3-pyruvate decarboxylase from *Paenibacillus polymyxa* E681. Phi QT, Park YM, Ryu CM, Park SH, Ghim SY. J Microbiol Biotechnol. 2008 Jul;18(7):1235-44.

▶ 국내 및 국제 학술 회의

1. 류충민 Priming of plant immunity via airborne signal on inter-plant communications 20080425 경상대학교 농업생명과학관
2. 류충민 Practical use of induced resistance compounds derived from endophytic and soil microorganisms 20080516 건국대학교 산학협동관
3. 류충민 Membrane associated stigmaterol plays an important role in plant innate immunity 20080725 Minneapolis, USA
4. 류충민 Use of virus-induced gene silencing and surrogate model *Nicotiana*

- benthamiana for studying *Pseudomonas syringae* pv. tomato-induced chlorosis and cell death 20080725 Minneapolis, USA
5. 류충민 Identification of genes involved in nonhost disease resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* 20080725 Minneapolis, USA
 6. 류충민 Resistance induced by rhizobacterial volatiles 20080725 Minneapolis, USA
 7. 류충민 Resistance induced by rhizobacterial volatiles 20080924 Torino, Italy
 8. 류충민 Bacterial RNA elicited-plant innate immunity 20080924 Torino, Italy
 9. 류충민 Bacterial chemical dialogue with plants by volatiles 20081016 서울교육문화회관
 10. 류충민 Bacterial odors are stinking but sweet to plants 20081022 한국생명공학연구원
 11. 류충민 Bacterial odors are stinking but sweet to plants 20081022 농촌진흥청 국립농업과학원
 12. 류충민 Airborne induction and priming of plant defenses against a bacterial pathogen 20081023 무주리조트
 13. 류충민 Role of priming resistance genes on bacilli-elicited induced systemic resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in pepper 20081024 무주리조트
 14. 류충민 Rhizobacterial volatiles as elicitors of plant defense and growth promotion. 20090517 Portland, USA.
 15. 류충민 Insight into the effects of bacterial volatiles on rhizosphere competence. 20090517 Portland, USA.
 16. 류충민 Forward genetic investigation of rhizobacterial determinat genes related to elicitation of induced resistance on pepper 20090528 제주 샤인빌리조트
 17. 류충민 Pathogen infection on the leaf affects underground population dynamics of root associated bacteria 20091028 제주 칼호텔

▶기타 홍보실적

1. 류충민 숭실대 개교 112주년 기념 특강, 미생물과 식물 간 상호작용에 대한 생태학적 이해 2009년 10월 15일

제 1 협동과제

본 연구팀에 의해 수행된 4년간의 연구 결과를 바탕으로 ISR에 관련된 갈락티놀을 합성하는 유전자에 대한 특허를 등록하였으며, 2009년까지 SCI급 논문 2편과 국내 및 국제 학술회의에서 8편의 발표를 실시하였다. 또한 현재까지 얻은 결과를 정리하거나 보충 실험을 통해 앞으로 국외 및 국내에 3편의 논문을 게재할 예정으로 준비 중에 있다.

▶ 국내 특허 출원

1. 갈락티놀 합성효소를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 이용하여 식물에 내병성을 부여하는 방법 (2007년 3월 등록).

▶ 국제 학술지 논문

1. Transgenic rice plants expressing an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase induce multiple defense responses. 2008. The Plant Pathology Journal 24(4): 375-383.
2. Mitogen-activated protein kinase in signaling polyamine biosynthesis in tobacco. 2009. Plant & Cell Physiology 50(3): 658-664
3. Expression of ISR-related defense genes elicited by *Pseudomonas chlororaphis* O6 against bacterial blight pathogen in rice. (*in preparation*)
4. Rice WRKY45 is involved in *Pseudomonas chlororaphis* O6-mediated induced systemic resistance in rice. (*in preparation*)
5. Transgenic rice plants expressing a cucumber galactinol synthase show enhanced tolerance to abiotic and biotic stresses. (*in preparation*)

▶ 국내 및 국제 학술 회의

- 1 양광열 Foliar application using by selected useful microorganisms and environmental friendly agri-materials to control diseases and pests in rice farm. 20070427, 농촌진흥청, 한국식물병리학회
- 2 양광열 Galactinol as a novel priming component on induced systemic resistance elicited by *Pseudomonas chlororaphis* O6. 20070620, Beijing, China
- 3 양광열 Transgenic rice plants expressing a cucumber galactinol synthase show enhanced tolerance to abiotic and biotic stress. 20080425, 경상대학교, 한국식물병리학회
- 4 양광열 Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance casued by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. 20080728, Minneapolis, USA
- 5 양광열 Transgenic rice plants expressing an active tobacco mitogen-activated

protein kinase kinase induce multiple defense responses. 20080728, Minneapolis, USA

- 6 양광열 Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase enhances bacterial resistance in transgenic rice. 20081110, 제주도, 벼 기능유전체학 국제회의
- 7 양광열 Transgenic rice plants expressing a cucumber galactinol synthase show enhanced tolerance to drought stress. 20081110, 제주도, 벼 기능유전체학 국제회의
- 8 양광열 Mitogen-activated protein kinase in signaling polyamine biosynthesis in tobacco. 20090430, 광주, 한국식물학회

제 2 협동과제

본 연구팀에 의한 4년간의 연구 결과를 바탕으로 KNUC251과 KUDC1013 균주에 대한 특허를 출원하였다. 또한 2009년까지 국내 논문 4건, 국외 논문 1건을 발표하였다. 2009년 수행한 실험 결과는 2010년에 국외 및 국내에 2건의 논문을 게재할 예정이다.

▶ 국내 특허 출원

1. 식물병 방제 효과와 식물 성장 촉진의 활성을 가지는 바실루스 메가테리움 KNUC 251 과 상기 균주를 이용한 식물병 방제제 및 식물성장 촉진제 (2008년 1월 출원).
2. 오크로박트럼 sp. KUDC1013과 상기 균주를 이용한 식물병 방제제 및 식물성장 촉진제 (2009년 4월 출원).

▶ 국내학술지 논문

1. 목초액이 고추의 성장 및 내병성에 미치는 영향. 2007. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 35(1): 41-44.
2. 독도에 서식하는 가지과식물로부터 분리된 근권세균의 특성. 2009. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 37(2): 110-117.

▶ 국제학술지 논문

1. Proteome analysis of *Paenibacillus polymyxa* E681 affected by barley. 2007

Journal of Microbiology and Biotechnology 17(6): 934-944.

2. Isolation and characterization of transposon-insertional mutants from *Paenibacillus polymyxa* E681 altering the biosynthesis of indole-3-acetic acid. 2008. *Current Microbiology* 56: 524-530.
3. Functional identification and expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase from *Paenibacillus polymyxa* E681. 2008. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(7): 1235~1244.
4. Assessment of the diverse root-associated *Paenibacillus polymyxa* on induced resistance and plant growth on pepper and tobacco. *European Journal of Plant Pathology* (submitted).
5. Nonpathogenic *Xanthomonas axonopodis* KNUC393 elicits induced systemic resistance and plant growth promotion in pepper. *European Journal of Plant Pathology* (submitted).
6. Investigation of bacterial determinants derived from *Bacillus megaterium* KNUC251 as elicitors of induced systemic resistance and plant growth promotion on pepper and tobacco. *Biological control* (submitted).
7. Determinants of *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 involved in induction of systemic resistance against soft-rot pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in tobacco. (in preparation)
8. Expression of ISR-related defense genes in pepper stimulated by Dokdo-derived rhizobacteria. (in preparation)
9. Biological control capacity of Doko-derived rhizobacteria on pepper under field conditions. (in preparation)

제 4절

1. 연구개발사업의 사업화 가능성

* (주)그린바이오텍은 미생물농약 전문 기업으로서, 미생물농약 전문 회사로서는 국내 최대 기업이다. 또한 다수의 미생물농약을 산업화한 경험을 바탕으로 제형화 공정 설계 및 배양공정 설계 등 산업화에 적합한 기술과 생물농약 영업망, 제조 시설을 보유하여 차후 상업화 제품을 용이하게 생산, 판매할 수 있다.

* 본 과제에서 연구한 *Bacillus cereus* BS107 제품은 현재 친환경제제로 산업화하고자 시제품 생산 중이며, 친환경 재배농가에 적용하여 IPM 재배를 위한 자재로 적용할 예정이다. 또한 기 검토한 ISR 균주를 추가적으로 산업화하여 친환경 농자재로 제조, 판매할 예정이다.

* 특히 본 연구 과제에서 개발된 길항 미생물은 담배 등 타 작물에 발생하는 병에 대해서도 높은 방제 효과를 기대할 수 있다. 이는 별도의 비용 없이 수요처를 창출할 수 있는 것으로 기 개발된 다른 균주로 영역을 넓힐 경우 높은 수익이 예상된다.

2. 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 활용 가능성

* 길항미생물제제의 경우 효과를 발현하는 시간이 일반 화학농약에 비해 느린 편이다. 기존 길항미생물제제의 경우 효과를 높이기 위해 처리 횟수를 늘리거나 사용량을 늘려도 그 효과가 크게 증가하지 않는 이유 또한 이러한 미생물제제의 특징 때문이다. 이런 이유로 길항 미생물제제는 속효성 효과를 원하는 농민들에게는 외면을 받을 수밖에 없다.

* BS107과 같은 ISR 미생물은 식물 자체에서 저항성을 유도해 병해충을 방제한다. 이러한 이유로 기존의 미생물제제와 달리 생육 초기에만 처리하여도 병해충 방제가 가능하게 된다. 그러나 유도저항성 미생물은 미생물의 처리가 병해충 억제에 어느 정도나 효과가 있었는지 확인하기 힘들다는 단점이 존재한다. 이러한 이유로 실제 농가 포장에서 유도저항성에 의한 병해충 방제력 개발 및 적용 IPM 기술 개발이 필요하다.

* 현재 개발한 제품의 경우 액상현탁제 제형과 수화제형으로 생산되고 있다. 작물의 생육 상태 및 시기에 따라 추가적인 제형 개발이 필요할 것으로 생각된다. 또한 기 개발되어 있는 미생물제제와 동시에 적용하여 더욱 효과적으로 병을 방제하는

방법의 추가적인 연구 또한 필요하다.

* 본 연구 과제를 포함한 그 동안 연구를 통해 얻은 미생물의 배양, 제형 개발, 필드 테스트, IPM 모델 구축 지식은 타 병해의 방제에 효과적인 길항 미생물을 연구하는데 사용되어 더욱 큰 부가가치를 생성할 수 있으리라 생각된다.

* 당사의 배양 시스템은 균주의 선발, 영양 요구원 분석, 파일럿 스케일의 배양, 대량 배양 등 개발부터 생산에 이르기 까지 모든 과정을 진행할 수 있다. 이런 체계적인 배양 시스템은 향후 개발된 각종 유용 미생물의 산업화에 이용될 수 있으며, 유용한 균주에 대한 선발이 이루어졌으나 산업화를 진행하기 어려운 타 연구 기관의 용역 개발 업무를 진행하여 부가가치를 창출할 수 있다.

3. 향후 해당기술을 이용한 기술 확산 및 사업화 계획

* (주)그린바이오텍은 현재 미생물 농약을 포함한 농업용 자재의 생산·판매 업체로써 개발된 미생물제제를 농가에 직접적으로 판매하거나 주요 농자재 공급처 납품을 통해 판매할 수 있다. 현재 다수의 미생물제제를 판매 중에 있어 개발된 미생물제제의 판매가 용이할 것으로 생각된다.

* 현재 ISR 길항미생물을 이용한 병해충 방제법에 대한 농민들의 인식이 부족한 상황이다. 차후 지속적인 농민교육 및 제품 홍보를 통해 본 연구를 통해 개발된 제품의 작용기작 및 적용 레 등을 보급할 예정이며 우수한 방제 사례에 대한 자료를 수집하여 홍보 자료로 활용할 계획이다.

제5절

1. 연구개발사업 성과의 사업화 가능성

○ 당사는 기존의 미생물제제의 문제점인 경제성을 해결하고자 대량 배양 시스템과 안정적인 제품 생산 노하우를 연구하였다. 당사는 5ton 규모의 배양조를 구비하여 충분한 대량 배양시스템을 구비하고 있으며, 이러한 배양 시스템을 이용하여 향후 안정적인 제품 생산이 가능할 것으로 예상하고 있다.

○ 현재 친환경 농가에서는 기존의 토양미생물제제 등 저급 제품으로 인해 미생물 자재의 인식이 현저히 낮아진 상황이다. 당사는 현재 개발 진행 중인 제품의 등록 이후 인지도 향상이 기대되며, 향후 이들 자재를 이용한 IPM 모델을 보급한다면 높은 수요가 있으리라 예상된다. 바실루스 세레우스 BS107은 식물에 전신유도저항성을 일으켜 병을 방제하는 제품으로, 식물의 난방제성 병해에 대한 뛰어난 방제효과를 지녀 상업화 시 많은 수요가 있을 것으로 기대된다.

○ 당사는 본 연구 과제를 진행하면서 실제 고추 및 오이 등을 재배하는 친환경 농가를 통해 제품의 효능 검정 및 농민의 호응도 등을 조사하였다. 본 제품에 대한 농민들의 호응도가 비교적 좋은 편이었으며, 사업화하여 제품이 제조될 경우 구매 의사 또한 비교적 높게 나타나 상업화 가능성은 비교적 높은 편으로 조사되었다.

○ 본 연구 과제에서 개발된 길항 미생물은 타작물에 발생하는 병에 대해서도 높은 방제 효과를 기대할 수 있다. 전신유도저항성 미생물의 특성 상 식물의 병해에 대한 넓은 스펙트럼의 방제효과를 가지고 있으며, 이는 별도의 비용 없이 수요처를 창출할 수 있는 것으로 타작물 타병해로 영역을 넓힐 경우 높은 수익이 예상된다.

2. 추가연구의 필요성 및 타연구에의 응용 가능성

○ 길항 미생물이 효과를 나타내기 위해서는 서식처인 토양에 정착하여 증식하고 항균활성 물질을 발생하는 일련의 과정을 거쳐야 한다. 기존 길항미생물제제가 효과를 높이기 위해 처리 횟수를 늘리거나 사용량을 늘리는 것은 이런 길항 미생물의 특성을 알지 못하여 발생하는 일이다. 이런 이유로 길항 미생물제제는 효과를 발휘하는 데 많은 시간이 소요되므로 속효성 효과를 원하는 국내 관리자들에게는 외면

을 받을 수밖에 없다.

○ 길항 미생물의 효력을 더욱 빠르게 하는 방안이 필요할 것으로 생각된다. 이의 해결 방안으로 당사에서는 길항 미생물의 병원균에 대한 항균활성을 높이거나 작물의 생육과 건전성을 향상시킬 수 있는 천연물질의 선발을 지속적으로 연구하고 있다.

○ 현재 개발 중인 BS107 제품은 수화제형의 제품이다. 본 연구 과제에서 개발한 액상수화제와 입제 등의 등록을 위한 과정이 추가적으로 진행되어야 할 것이며, 이를 위한 추가 연구가 이루어질 필요가 있다.

○ 미생물을 이용한 식물병 방제 모델의 개발에는 길항 미생물 외에도 많은 작물 관리 자재가 필요하다. 본 연구에서는 실험 규모와 인력의 한계로 이에 대한 실험이 충분히 이루어질 수 없었으나 작물 관리 전반에 걸쳐 친환경 전략을 적용하려면 추가 연구가 필요하다. 예를 들어 제초제와 살충제의 경우 본 연구 과제에서는 화학 농약을 대체할만한 소재가 아직 선발되어 있지 않은 관계로 적용할 수 없었다. 당 연구기관은 현재 미생물을 이용한 친환경 제초제의 산업화를 연구 중이고, 페로몬을 이용한 해충의 방제를 위해 국외 연구 기관과 협력 연구 중이다. 이와 같은 소재의 추가 연구가 이루어진다면 더욱 높은 화학 농약 저감 효과와 작물의 친환경 방제가 가능하리라 생각된다.

○ 현재 국내의 기후는 여름철 장마 기간이 길어지고, 온난화가 지속되는 등 급격히 변화하고 있는 실정이다. 이는 각종 작물 병해를 조장하고, 결과적으로 작물 관리에 더욱 많은 화학 농약을 사용하게 된다. 앞으로 지속 가능한 작물의 관리를 위해서는 기후 변화에 따른 작물 관리법의 전반적인 변화가 요구되므로 이에 대한 연구가 필요하다.

○ 본 연구 과제를 포함한 그 동안 연구를 통해 얻은 미생물의 배양, 제형 개발, 필드 테스트 등의 지식은 타 병해의 방제에 효과적인 길항 미생물을 연구하는데 사용되어 더욱 큰 부가가치를 생성할 수 있으리라 생각된다.

○ 당사의 배양 시스템은 균주의 선발, 영양 요구원 분석, 파일럿 스케일의 배양, 대량 배양 등 개발부터 생산에 이르기 까지 모든 과정을 진행할 수 있다. 이런 체계

적인 배양 시스템은 향후 개발된 각종 유용 미생물의 산업화에 이용될 수 있으며, 유용한 균주에 대한 선발이 이루어졌으나 산업화를 진행하기 어려운 타 연구 기관의 용역 개발 업무를 진행하여 부가가치를 창출할 수 있다.

3. 기술 개발 시 예상되는 파급효과 및 활용방안

가. 환경적 효과

- 농작물의 환경 친화적 관리 체계 구축을 통해 화학농약 사용량을 줄이고 농업 생태계를 건전하게 보호할 수 있다.
- 골프장 및 공원 등에 대해 차후 추가적인 연구를 통해 전반적인 식물 병 방제제로 적용할 경우 더욱 큰 환경 보호 효과를 기대할 수 있다.

나. 경제적 효과

- 본 과제를 통해 개발된 미생물제제는 국내 유사 기술이 없기 때문에 난방제성 병해 등에 대한 시장을 상당부분 점유할 수 있을 것으로 기대된다.
- 차후 적용확대 시험 진행 시 잠재적인 시장은 현재 예측 규모의 5배 이상으로 예상된다.
- 화학농약 사용을 대체하고 유해미생물로부터 작물을 보호하며, 타 생물농약의 보조제로서 역할도 가능하여 추가적인 제품의 개발 및 효능 향상에도 큰 도움이 될 수 있다.

다. 기술적 효과

- 본 과제를 통해 개발된 고효성 고농도 배양기술의 축적을 통한 미생물제제의 생산비 절감 및 품질의 향상에 따른 제품 경쟁력 향상 등을 기대할 수 있다.
- 본 과제를 수행하며 축적된 자료를 이용하여 환경 친화적인 작물보호 시스템 개발에 기초자료로써 활용할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 2절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 3절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 4절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 5절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 7 장 참고문헌

제 1절

- Alström, S (1991) Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J Ge. Appl Microbiol* 37: 495-501
- Aime S, Cordier C, Alabouvette C, Olivain C (2008) Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiol Mol Plant Pathol* doi:10.1016/j.pmpp.2008.10.001
- Ahn IP, Kim S, Lee YH, Suh SC(2007) Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143:838-848
- Akram A, Ongena M, Duby F, Dommes J, Thonart P (2008) Systemic resistance and lipooxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biol* 8:113-124
- Slaughter AR, Hamiduzzaman MM, Gindro K, Neuhaus JM, Mauch-Mani B (2008)

- Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *Eur J Plant Pathol* 122:185 - 195
- Attaran E, Rostás M, Zeier J (2008) *Pseudomonas syringae* elicits emission of the terpenoid (E, E)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraene in *Arabidopsis* leaves via jasmonate signaling and expression of the terpene synthase TPS4. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1482-1497
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233-266
- Beckers GJ, Conrath U (2007) Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Curr Opin Plant Biol* 10:425-431
- Cartieaux F, Contesto C, Gallou A, Desbrosses G, Kopka J, Taconnat L, Renou JP, TouraineB (2008) Simultaneous interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* Sp. strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 leads to complex transcriptome changes. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 244-259
- Chassot C, Buchala A, Schoonbeek HJ, Métraux JP, Lamotte O (2008) Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *Plant J* 55:555-567
- Conn VM, Walker AR, Franco CM (2008) Endophytic actinobacteria induce defense pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 208-218
- Conrath U, Pieterse CM, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant - pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7:210-216
- Conrath U, Beckers GJ, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CM, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B (2006) Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* 19:1062-1071
- De Vleeschauwer D, Djavaheri M, Bakker PA, Höfte M (2008) *Pseudomonas fluorescens* WCS 374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiol* 148: 1996-2012
- William G. D'Arcy (1986) *Solanaceae biology and systematics* columbia university Press

- Edreva A (2005) Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15years. *Plant Physiol* 31: 105-124
- Goellner K, Conrath U (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* 121:233-242
- Gómez-Ariza J, Campo S, Rufat M, Estopà M, Messeguer J, San Segundo B, Coca M (2007) Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. *Mol Plant Microbe Interact* 20:832-842
- Hacisalihoglu G, Longo P, Olson S, M. Momol T (2007) Bacterial wilt induced changes in nutrient distribution and biomass and the effect of acibenzolar-S-methyl on bacterial wilt in tomato. *Crop Prot* 26: 978-982
- Heil M, Kost C (2006) Priming of indirect defences. *Ecol Lett* 9:813-817
- Hossain MM, Sultana F, Kubota M, Hyakumachi M (2008) Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in *Arabidopsis thaliana* by plant-growth-promoting fungus *Penicillium*. *Plant Soil* 304:227-239
- Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B (2005) Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol* 139: 267-274
- Jetiyanon K, Kloepper JW (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol Control* 24:285-291
- Jetiyanon K, Fowler W D, Kloepper J W (2003) Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. *Plant Dis* 87:1390-1394
- Jung WJ, Jin YL, Kim KY, Park RD, Kim TH (2005) Changes in pathogenesis-related proteins in pepper plants with regard to biological control of phytophthora a blight with *Paenibacillus illinoisensis*. *Biocontrol* 50: 165-178
- Kloepper J W (1993) Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: F. B. Metting *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management* , Marcel Dekker Inc., New York, pp 255-274

- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266
- Kang SH, Cho HS, Cheong H, Ryu CM, Kim JF, Park SH (2007) Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper(*Capsicum annuum* L.). (1)*J Microbiol Biotechnol* 17:96-103
- Kim KJ, Park CJ, Ham BK, Choi SB, Lee BJ, Paek KH (2006) Induction of a cytosolic pyruvatekinase 1 gene during the resistance response to Tobacco mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rep* 25:359-364
- Kim MS, Kim YC, Cho BH (2004) Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biol* 6:105-108
- Kim MS, Cho SM, Kang EY, Im YJ, Hwangbo H, Kim YC, Ryu CM, Yang KY, Chung GC, Cho BH (2008) Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1643-1653
- Kim YC, Yi SY, Mang HG, Seo YS, Kim WT, Choi D (2001) Pathogen-induced expression of cyclo-oxygenase homologue in hot epper(*Capsicum annuum* cv. Pukang). *J Exp Bot* 53:383-385
- Kim YC, Kim SY, Paek KH, Choi D, Park JM (2006) Suppression of CaCYP1, a novel cytochrome P450 gene, compromises the basal pathogen defense response of pepper plants. *Biochem Biophys Res Commun* 345:638-645
- Kim YJ, Hwang BK (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol Plant* 108: 51-60
- Kokalis - Burrelle N, Vavrina CS, Roskopf EN, Shelby RA (2002) Field evaluation of plantgrowth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant Soil* 238: 257-266
- Malolepsza U (2006) Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Crop Prot* 25: 956-962
- Nam YW, Paek KH (2001) Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene. *Plant Sci* 161: 727-737

- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, Yoo TH, Paek KH (2001) Hot pepper cDNA encoding a germin-like protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Mol Cells* 11:122-127.
- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, You JS, Paek KH (2002) Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol Biol* 48:243-254
- Park CJ, An JM, Shin YC, Kim KJ, Lee BJ, Paek KH (2004) Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* 219:797-806
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH (2004) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J* 37:186-198
- Park CJ, Shin YC, Lee BJ, Kim KJ, Kim JK, Paek KH (2006) A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and *Xanthomonas campestris*. *Planta* 223:168-179
- Pflieger S, Palloix A, Caranta C, Blattes A, Lefebvre V (2001) Defense response genes colocalize with quantitative disease resistance loci in pepper. *Theor Appl Genet* 103:920-929
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* 10: 393-398
- Quilis J, Peñas G, Messeguer J, Brugidou C, San Segundo B (2008) The Arabidopsis AtNPR1 inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic Rice. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1215-1231
- Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R (2002) Enhancing resistance of tomato and hotpepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 429-441
- Sadd BM, Kleinlogel Y, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P (2005) Trans-generational immune priming in a social insect. *Biol Lett* 1:386-388.

- Shin R, Kim MJ, Paek KH (2003) The CaTin1(Capsicum annuum TMV-induced Clone 1) and CaTin1-2 genes are linked head-to-head and share a bidirectional promoter. *Plant Cell Physiol* 44: 549-554
- Ton J, Jakab G, Toquin V, Iavicoli V, Maeder M, Me´traux JP, Mauch-Mania B (2005) Dissecting the b-aminobutyric acid - induced priming phenomenon in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 987-999
- Ton J, D'Alessandro M, Jourdie V, Jakab G, Karlen D, Held M, Mauch-Mani B, Turlings T C, Turlings T (2006) Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J* 49:16-26
- van Hulst M, Pelsler M, van Loon LC, Pieterse CM, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5602-5607
- van Loon L.C (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243-254
- van Peer R, Niemann GJ, Schippers B (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by Pseudomonas sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM (2004) The transcriptome of Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 895-908
- Yi SY, Kim JH, Joung YH, Lee S, Kim WT, Yu SH, Choi D (2004) The pepper transcription factor CaPF1 confers pathogen and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136:2862-2874
- Yoo TH, Park CJ, Ham BK, Kim KJ, Paek KH (2004) Ornithine decarboxylase gene (CaODC1) is specifically induced during TMV-mediated but salicylate-independent resistant response in hot pepper. *Plant Cell Physiol* 45:1537-1542
- Walters DR, Boyle C (2005) Induced resistance and allocation costs: what is the impact of pathogen challenge? *Physiol Mol Plant Pathol* 66: 40-44
- Wei G, Kloepper JW, Tuzun S (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to Colletotrichum orbiculare by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81:1508-1512

제 2절

- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., and Croteau, R. (1998) Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4126-4133.
- Liu, X., Bai, X., Wang, X., Chu, C. (2007) OsWAKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J. Plant Physiol.* 164, 969-979.
- Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tagiri, A., Oka, S., and Tanaka, H. (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J.* 47, 969-976.
- Kottapalli, KR., Rakwal, R., Satoh, K., Shibato, J., Kottapalli, P., Iwahashi, H., and Kikuchi, S. (2007) Transcriptional profiling of indica rice cultivar IET8585 (Ajaya) infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 834-850.
- Jeong, JA., Yoo, SJ., Yang, DH., Shin, SH., Lee, MC., Cho, BH., and Yang, K-Y. (2008) Transgenic rice plants expressing an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase induce multiple defense responses. *Plant Pathol. J.* 24, 375-383.
- Yang, K-Y., Liu, Y., and Zhang, S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 741-746.

제 3절

- Andrey, A. B., I. C. Dodd, N. Hontzeas, J. C. Theobald, V. I. Safronova, and W. J. Davies. 2009. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. *New phytol.* 181: 413-423.
- Arora, N. K., S. C. Kang, and D. K. Maheshwari. 2001. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Marcophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Curr. Sci.*

81: 673-677.

- Frey-Klett, P., M. Chavatt, M.-L. Clause, S. Courrier, C. L. Roux, J. Raaijmakers, M. G. Martinotti, J.-C. Pierrat, and J. Garbaye. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New phytol.* 165: 317-328.
- Gorden, S. A., and R. P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant physiol.* 26: 192-195.
- Hameeda, B., G. Harini, O. P. Rupela, S. P. Wani, and G. Reddy. 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163: 234-242.
- Heil, M., A. Hilpert, W. Kaiser, and K. E. Linsenmair. 2000. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: Does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *J. Ecol.* 88: 645-654.
- Heil, M and I. Baldwin. 2002. Costs of induced resistance: Emerging experimental support for a slippery concept. *Trend Plant Sci.* 7: 61-67.
- Jeon, S. A., H. R. Sung, Y. M. Park, J. H. Park, and S.-Y. Ghim. 2009. Analysis of endospore-forming bacteria of nitrogen-fixing bacteria community isolated from platns rhizosphere in Dokdo island. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 37: 189-196.
- Kang, S. H., H. S. Cho, H. Cheong, C. M. Ryu, J. F. Kim, and S. H. Park. 2007. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defence on pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 96-103.
- Kuklinsky-Sobral, J., W. L. Araujo, R. Mendes, I. O. Gerldi, A. A. Pizzirani-Kleiner, and J. L. Azervedo. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Envrion. Microbiol.* 6: 1244-1251.
- Lee, S. J., S. E. Lee, K. J. Seul, S. H. Park, and S.-Y. Ghim. 2006. Plant growth-promoting capabilities of diazotrophs from wild gramineous crops. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 78-82.
- Mohamed, A. F., C. M. Ryu, L. W. Sumner, and P. W. Pare. 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochmistry* 67: 2262-2268.
- Murashinge T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Planta* 15: 473-497.
- Murphy, J. F., M. S. Reddy, C. M. Ryu, J. W. Klopper, and R. Li. 2003.

- Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. *Virology* 10: 1301-1307.
- Padidam, M. 2003. Chemically regulated gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 169-177.
- Presello-Cartieaux F., L. Nussaume, and C. Robaglia. 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189-199.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, and R. Samiyappan. 2001. Induced of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and disease. *Crop Protection* 20: 1-11.
- Raupach G. S. and J. W. Kloepper. 2000. Biocontrol of cucumber diseases in field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* 84: 1073-1075.
- Research Institute for Ullengdo & Dokdo Islands. 2008. The plant of Dokdo island. pp 166-221. Nature of Dokdo island. Kyungpook National University Press. Daegu. Korea.
- Ryu, C. M., M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, H. X. Wei, P. W. Pare, and J. W. Kloepper. 2002. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4972-4932.
- Ryu, C. M., C. H. Hu, M. S. Reddy, and J. W. Kloepper. 2003. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytol.* 160: 413-420.
- Ryu, C. M., J. F. Murphy, K. S. Mysore, and J. W. Kloepper. 2004. Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid dependent signaling pathway. *Plant J.* 39: 381-392.
- S. Prez-Miranda, N. Cabirol, R. George-Tllez, L. S. Zamudio-Rivera, and F. J. Fernandez. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods* 70: 127-131.
- Salme, T., and E. Gerhart H. Wagner. 1999. The plant growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *MPMI* 12: 951-959.
- Schwyn, B., and J. B. Neilans. 1987. University chemical assay for the determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 46-52.

Walters, D., and M. Heil. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. PMPP 7: 3-17.

제 4절

강길진, 정지현, 조정일. 2000. *Bacillus subtilis*가 생산하는 길항물질에 의한 아플라톡신 생성균의 억제. 한국식품위생안전성학회지. 15; 122-127.

김경희, 오순옥, 허재선, 염규진, 고영진. 2006. 차나무 겹등근무늬병 방제용 미생물제제 개발을 위한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310의 대량배양 최적 조건. 한국식물병리학회지. 12(2): 85-90.

김상달. 고추역병 길항미생물로부터 생물방제용 항진균성 항생물질의 분리 및 특성에 관한 연구. 기초과학연구사업 학술기사.

김용기, 이승돈, 류재기, 류재당. 2003. *Bacillus* spp. 및 *Serratia marcescens*에 의한 사과 푸른곰팡이병의 생물적 방제. 한국식물병리학회지. 9(4): 229-236.

박성민, 정혁준, 유대식. 2006. 고추 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*의 방제를 위한 길항 미생물의 분리 및 항진균 활성. Journal of Life Science. 16(3): 420-426

박창석. 생물적 방제제의 근원정착과 기존 토양미생물과의 관계. 기초과학연구사업 학술기사.

양현숙, 손황배, 정영륜. 2002. *Bacillus stearothermophilus* YC4194에 의한 *Pythium* 모잘록병의 생물학적 방제. 한국식물병리학회지. 8(4):234-328.

이경원. 2008년. 농촌진흥청 생물농약 등록현황.

이용선, 심송보. 2007. 농업·농촌경제동향 2006년 겨울호.

장병춘, 이주영, 이상엽, 권장식, 김완규. 2006. 유용미생물에 의한 작물체 양분 및 토양 이화학적 변화 구명. 농업과학기술원

정희경, 김상달. 2003. 고추역병균 *Phytophthora capsici*를 방제하는 길항균주 *Bacillus megaterium* KL39의 선발과 길항물질. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 31(3): 235-241.

조용섭, 박창석, 이순구, 이영근, 임춘근, 차재순, 최용철, 최재을, 허성기, 황인규. 1999. 식물세균병학. 서울대학교출판부.

황지영, 심창기, 류경열, 최두희, 지형진. 2006. 상추 균핵병 생물적방제를 위한 *BreviBacillus brevis* B23과 *Bacillus stearothermophilus* B42의 선발. 한국식물병리학회지. 12(3):254-259

Bae, M. 1978. Present status and future of antibiotics of agriculture. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 20, 141-148.

- Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, C. A., Saser, M. and MacFall, J. S. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* 73: 1148-1152.
- Becker, J. O. 1993. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pestic. Sci.* 37: 355-363.
- Chang, J. Y., H. H. Lee, I. C. Kim and H. C. Chang. 2001. Characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* cy2. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 30, 227-233.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.
- Cho, S. J., S. K. Lee, B. J. Cha, Y. H. Kim and K. S. Shin. 2003. Detection and characterization of the *Cloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound irurin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 47-51.
- Chung, B. K. and S. B. Lee. 1986. Effects of conidial number and nutrition on the germination of conidia in *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum* causing red pepper anthracnose. *Kor. J. Plant Prot.* 25, 41-46.
- Copping, L. G. 2004. The manual of biocontrol agents. The third edition of the biopesticide manual. BCPC. UK. 702.
- Dey, R., K.K. Pal, D.W. Bhatt and S.M. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological research* 159: 371-394.
- Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 : 337-359.
- Gamalero, E., L. Fracchia, M. Cavaletto, J. Garbaye, P. Frey-Klett, G.C. Varese, M.G. Martinotti. 2003. Characterization of functional traits of two fluorescent pseudomonads isolated from basidiomes of ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry.* 35 : 55-63.
- Hoffland, E., Pieterse, C. M. J., Bik, L., and van Pelt, J. A. 1995. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 46:309-320.
- Jeon, Y. H., S. P. Chang, I. Hwang and Y. H. Kim. 2003. Involvement of growth-promoting Rhizobacterium *PaeniBacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 881-891.

- Joo, G. J., Lee, I. H. and Kim, J. H. 2002. Chitinase production and Isolation of *Serratia plymuthica* AL-1 antagonistic to white rot fungi *Allium fistulosum* roots. *Kor. j. Microbiol. Biotechnol.* 30: 135-141.
- Jung, B. K. and S. H. Chang. 1984. An etiological study on the anthracnose fungus of pepper caused by *Colletotrichum dematium* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 12, 153-157.
- Jung, H. K. and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-pepper phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 235-241.
- Katz, E. and Demain, A. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible function. *Bacteriol. Rev.* 41: 449-474.
- Lange, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicide—the natural choice. *Pestic. Sci.* 39: 155-160.
- Kim, J. Y., E. A. Bae, M. J. Han and D. H. Kim. 1999. Inhibitory activity of *Bacillus licheniformis* AJ on the growth of diarrheal pathogens. *J. Appl. Pharm.* 7, 385-389.
- Kim, S. H., Y. D. Lee, W. S. Ha and H. M. Ro. 1998. A study on the transport phenomena of hydrophobic pesticides influenced by the interfaces of groundwater in unsaturated inorganic porous media. *J. of KSEE.* 20, 1545-1553.
- Lee, E. T. and S. D. Kim. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against red-pepper rotting *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 334-340.
- Lee, K. M., O. M. Lee, M. S. Cha, E. H. Park, G. T. Park, H. J. Son and S. J. Lee. 2002. Production and characteristics of environment friendly antimicrobial substance by *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM. *J. of the Environmental Science.* 11, 33-40.
- Lee, K. S. 1997. Evaluation on the effects of pesticide residues to agroecosystem in Korea. *Kor. J. Environ. Agric.* 16, 80-93.
- Lim, T. H., Lee, J. M., Chang, T. H. and Cha, B. J. 2000. Antifungal activity and identification of an Actinomycetes strain isolated from mummified peaches. *Kor. j. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 161-166.
- Lim, T. H. 2005. Antifungal activity of *Streptomyces griseofuscus* 200401 against pathogens causing late blight and anthracnose on pepper. *Korean J. Pestic. Sci.* 9: 102-107.
- Malamy, J., Sanchez-Casas, P., Henning, J., Guo, A., and Klessing, D. F. 1996. Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Molecular*

- plant-Microbe Interactions 9:474-482.
- Nagano, M. M., Marahiel, M. A. and Zuber, P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170: 5622-5668.
- Nguyen Thi Thu Hang, Soon-Ok Oh, Gyoung Hee Kim, Jae-Seoun Hur¹ and Young Jin Koh. 2005. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in Strawberries. *Plant Pathology. J.* 21: 59-63.
- Nielands, J. B. and S. A. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu. rev. Plant Physiol.* 37, 187-208.
- Oh, I. S., M. S. In, I. S. Woo, S. K. Lee and S. H. Yu. 1998. Anthracnose of pepper seedling caused by *Colletotrichum coccodes*(wallr.) hughes. *Kor. J. Mycol.* 16, 151-156.
- Oh, Y. K. and J. H. Kim. 1997. Effects of residual organochlorine pesticides in the coastal environment on the Cheju Island. *J. KSWQ* 13, 317-324.
- Oh, Y. J. 1992. Studies on the optimization of media composition and cultural conditions for kasugamycin production by *Streptomyces kasugansis*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 583-587.
- Okon, Y., and Y. Kapulnik 1986. Development and function of *Azospirillum* inoculated root., *Plant and Soil.* 90:3-16.
- Pan, B., Y. M. Bai, S. Leibovitch and D. L. Smith. 1999. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote com growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy*, 11:179--186.
- Park, K. S. and C. H. Kim. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Kor. J. Plant Pathol.* 8, 61-19.
- Park, S. B. and D. W. Kim. 1995. Screening for phyllospherical antagonistic microorganism for control of red-pepper anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Kor. J. Mycoi.* 23, 190-195.
- Park, S. M., H. J. Jung., S. H. Han, S. H. Yeo, Y. W. Kim, H. G. Ahn, H. S. Kim and T. S. Yu. 2005. Antifungal activity of extract from *Xanthium strumarium* L. against plant pathogenous fungi. *J. of Life Science* 15, 692-695.
- Park, S. M., S. H. Han and T. S. Yu. 2005. Culture conditions and antifungal activity of *Bacillus licheniformis* KMU-3 against crop pathogenic fungi. *Kor. J. Microbiol. Biotechol.* 33, 112-116.

- Park, R. D., K. J. Jo., Y. L. Jin, K. Y. Kim, J. H. Shim and Y. W. Kim. 2002. Variation of antifungal activities of chitosans on plant pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 84-88.
- Park, W. M., Y. S. Lee, S. H. Kim and Y. H. Ko. 1988. Biochemical investigation of resistance of green pepper fruit to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Kor. J. Plant Pathol.* 4, 290-296.
- Seoung-Hee Lee and Jae-Soon Cha. 1999. Ethyl Acetate Extract of *Bacillus pumilus* SH122 Induces Resistance Against Phytophthora Blight in Pepper Plant. *Kor. J. Plant Pathol.* 15(6): 319-322.
- Seon-Hee Park, Dong-Won Bae, Joon-Taek Lee, Sung-Ok Chung and Hee Kyu Kim. 1999. Integration of Biological and Chemical Methods for the Control of Pepper Gray Mold Rot Under Commercial Greenhouse Conditions. *Plant Pathology. J.* 15(3): 162-167
- Shun-Shan S. Ok-Hee Choi. Sun-Mi Lee. Chang-Seuk Park. 2002. In vitro and In vivo Activities of a Biocontrol Agent, *Serraria plymu-thica* A21-4, Against *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology Journal.* 18(4): 221-224.
- Shun-Shan S. Ok-Hee Choi. Sun-Mi Lee. Chang-Seuk Park. 2005. Root Colonizing and Biocontrol Competency of *Serraria plymuthica* A21-4 against *Phytophthora* Blight of pepper. *Plant Pathology Journal.* 21(1): 64-67.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Metraus, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270.
- Sunwoo, J. Y., Lee, Y. K., and Hwang, B. K. 1996. Induced resistance against *Phytophthora capsici* in pepper plants in response to DL- β -amino-n-bityric acid. *European J. Plant Pathology.* 102:663-670.
- Uknes, S., Winter, A. M., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, G., Potter, S., Ward, E., and Ryals, J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 6:692-298.
- Yeoung-Seuk Bae, Kyungseok park and Choong-Hoe Kim. 2004. *Bacillus* spp. as biocontrol agents of root Rot and phytophthora Blight on Ginseng. *Plant Pathology. J.* 20: 63-66

제 5절

없음

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

