

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)

작물바이러스 및 병해충대응 연구개발사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004599-01

복숭아나무 수지증상 발생원인 구명 및 종합 방제시스템 개발

2024. 06. 12.

주관연구기관 / 경북대학교

공동연구기관 / (주)대원화학

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

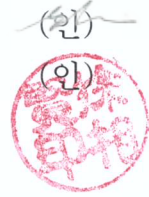
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “복숭아나무 수지증상 발생원인 구명 및 종합 방제시스템 개발”(개발기간 : 2021. 4. 1 ~ 2023. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.12.

주관연구기관명 : 경북대학교 (대표자) 신 재 호
공동연구기관명 : (주)대원화학 (대표자) 서 상 현



주관연구책임자 : 신 재 호
공동연구책임자 : 서 상 현

국가연구개발혁신법 제17조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서

보안등급

일반[], 보안[]

중임행정기관명	농림축산식품부		사업명	작물바이러스 및 병해충대응사업					
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원	사업명	내역사업명 (해당 시 작성)	방제기술개발					
광고번호	제 농출 2021-55	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
		연구개발과제번호		321097-3					
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB 0401명	60%	LB 0304	20%	LB 0303	20%		
	농림식품과학기술분류	RA 0303	60%	RA 0304	20%	RA 0305	20%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문							
		영문							
연구개발과제명		국문	복숭아나무 수지증상 발생원인 규명 및 종합 방제시스템 개발						
		영문	Investigation of the cause of peach tree resin symptoms and development of a comprehensive control system						
주관연구개발기관		기관명	경북대학교		사업자등록번호		504-82-09678		
		주소	(41566) 대구광역시 북구 대학로 80, 703호 (산격동, 글로벌프라자)		법인등록번호		176271-0001921		
연구책임자		성명	신 재 호		직위		교수		
		연락처	직장전화	053-950-5716		휴대전화		010-2811-8095	
			전자우편	jhshin1@knu.ac.kr		국가연구자번호		10084336	
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)					
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)					
			2단계	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년 0개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계	연구개발비 외 지원금	
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계
총계		715,000	4,000	56,000			719,000	56,000	775,000
1단계	1년차	195,000		20,000			195,000	20,000	215,000
	2년차	260,000	2,000	18,000			262,000	18,000	280,000
2단계	1년차	260,000	2,000	18,000			262,000	18,000	280,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		
							역할	기관유형	
공동연구개발기관		(주)대원화학	서상현	연구소장			제 1공동	기업	
연구개발담당자 실무담당자		성명	박시현		직위		연구원		
		연락처	직장전화			휴대전화			
			전자우편			국가연구자번호			

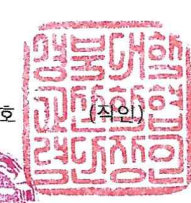
이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 2월 26일

연구책임자: 신 재 호

주관연구개발기관의 장: 경북대학교 산학협력단 공 성 호

공동연구개발기관의 장: (주)대원화학 김 수 정



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	작물바이러스 및 병해충대응사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)	방제기술개발		연구개발과제번호		321097-3	
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB 0401명	60 %	LB 0304	20 %	LB 0303 20%
	농림식품 과학기술분류	RA 0303	60 %	RA 0304	20 %	RA 0305 20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)						
연구개발과제명 복숭아나무 수지증상 발생원인 구명 및 종합 방제시스템 개발						
전체 연구개발기간 2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2 년 9 개월)						
총 연구개발비 총 775,000 천원 (정부지원연구개발비: 715,000 천원, 기관부담연구개발비: 60,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)						
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	복숭아 고품질 안정생산을 위한 수지증 발생 원인을 구명하고, 친 환경적인 종합 방제 시스템 개발				
	전체 내용	<p>[연구개발 개요 및 최종목표]</p> <p>○ 본 연구는 우리나라의 농업 현장에서 사용되고 있거나 선행연구를 통해 농·산업적 유용성이 입증된 세균 및 진균 미생물을 이용하여 복숭아 수지증의 발생원인을 규명하고, 이를 기반으로 한 친환경적인 종합 방제 시스템의 개발을 목표로 함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 복숭아 수지증은 과수의 줄기나 가지에 진한 갈색의 수지(Gummosis)가 분비되는 현상으로 발생 시 생산량과 품질의 저하되고 식물체의 고사를 통해 나무 전체를 제거해야 하므로 농가 수익이 감소되고 있는 실정임. ✓ 복숭아 수지증의 주된 원인균은 <i>Botryosphaeria</i> sp. 에 속하는 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>, <i>Diplodia seriata</i> 및 <i>Botryosphaeria dothidea</i>로 알려져 있음. ✓ 복숭아 수지증은 병변 발생전 예방적 차원에서의 관리방법만 알려져 있으며 발생 후 이를 방제하기에는 어려운 실정임. ✓ 따라서, 수지증원균의 군사 생장 억제 효과가 있는 미생물 배양액과 복숭아 나무의 근권과 식물 내생균의 미생물 군집변화를 확인하여 친환경제제/생리학적 방제 통합 체계의 개발을 목표로 함. 				

		<p>■ 주관연구기관 - Plant Microbe interaction을 통한 복숭아 수지증의 발생원인 구명 및 식물·미생물 유래의 유용물질을 활용한 생물방제물질 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 복숭아 수지증 제어와 관련된 식물 내생 및 근권 미생물 확보 ○ 수지증 병변발생 유무에 따른 복숭아나무 근권, 내생 미생물 군집 분석 ○ 규명된 병변 발생원의 군집분석을 활용한 Machine learning 기반 방제 체계연구 ○ 복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술 개발을 위한 친환경제제/생리학적 방제 통합 체계 개발 ○ 복숭아 수지증 방제 미생물의 분리, 선발 및 동정 ○ 복숭아 수지 병원균 방제 길항미생물의 유전적 구성조사 및 생리학적 특성 조사 ○ 복숭아 수지 병원균 생육 억제 작용기작 구명 ○ 복숭아 수지 병원균에 대한 방제 길항미생물의 효율적인 방제 체계 연구 <p>■ 공동연구기관- 복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술 개발 및 포장시험</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 복숭아 수지증의 병리학적 생리학적 발생원인 구명 및 효능 검정 ○ 복숭아 수지증에 대한 길항미생물의 현장 적용 가능성 조사 ○ 개발 시제품에 대한 효능 및 범용성 검증을 위한 실증 시험 ○ 복숭아 수지증의 생리학적 발생원의 경감 체계 연구 ○ 개발 제품의 효능 및 범용성 검증을 위한 실증시험 ○ 복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술 개발 ○ 개발 제품의 상용화를 위한 비료 및 친환경 유기농자재 등록 가능성 검토 ○ 개발 제품의 현장 보급 확대 전략 수립 및 상용화 증대 방안 도출
	<p>1단계 (해당 시 작성)</p>	<p>목표 복숭아나무 수지증상의 발생원인 구명 및 길항 미생물 탐색</p> <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 복숭아 나무 근권 및 내생미생물 군집분석을 통한 발생원인 구명 - 복숭아 수지 길항미생물의 탐색 및 특성규명 - 길항 미생물의 제제화를 위한 조건확립 - 생물방제균의 처리 및 미생물군집의 변화양상 확인
	<p>n단계 (해당 시 작성)</p>	<p>목표 친환경 미생물제제의 처리 및 미생물군집의 변화양상 및 수지증 경감확인 및 친환경 종합 방제시스템 개발</p> <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 생물방제균의 대량배양 조건 확립 - Machine learning 및 Deep learning 기술 기반의 방제체계 구축 - 생물방제균의 유전적 구성조사 및 생리학적 특성 조사 - 복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술 개발
<p>연구개발성과</p>		
<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p><연구개발성과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 복숭아 수지증 유발 병원균에 대한 정보 - 추가적인 병 방제용 친환경농자재 개발 자료로 활용 : 복숭아 수지증 병반으로부터 	

분리·동정한 정보를 바탕으로 각 병원균에 길항작용을 가지는 미생물의 추가 분리를 위한 자료로 활용하여 다른 병 방제용 친환경농업자재 개발에 활용

- 복숭아 수지증 길항미생물에 대한 유전체 분석 자료
 - 부가적인 작물생육촉진 효과 검증 자료로 활용 : 길항미생물의 유전체 분석 자료를 바탕으로 미생물이 생산 가능한 작물생육촉진 물질을 추측하여 작물생육촉진용 제품으로 확대시킬 수 있는 자료로 활용
- 친환경유기농업자재 등록을 위한 시험 자료
 - 개발 제품의 친환경유기농자재 등록을 위한 자료로 활용 : 본 연구개발에서 얻은 활성물질 규명 자료, 각종 시험 성적(작물 재배시험, 이화학분석 시험, 독성 시험 등) 등을 친환경유기농업자재 등록을 위한 자료로 활용하고 추가적으로 생물 유래 생물 제제의 효과에 대한 객관성 확보 자료로 활용
- 항균활성물질 분리 및 분석 기술
 - 개발 제품의 품질관리를 위한 자료로 활용 : 과제 수행 중 얻은 미생물 유래의 항균 활성물질 분리 및 분석 기술을 제품 양산화 과정에서 품질 관리 기술로 활용

<활용계획>

- 1) 매출 증대 : 과제 수행 중 3년차 50,000천원 매출 예상
- 2) 길항미생물 유전정보 : 타 핵과류 작물(자두, 매실 등)에 대한 적용확대를 위한 실험 자료로 활용
- 3) 연구과제를 통해 획득한 결과를 활용하여 제품의 품질관리 자료로 활용

<기대효과>

- 1) 부가가치 : 국내시장은 저가 공급, 부가가치는 신시장(중국)개척에 의한 매출 기대
- 2) 고용창출 : 개발 제품의 품질 관리를 위한 신규 인력 고용 기대(연구 기간 중 3명)
- 3) 생물제제에 대한 신뢰도 향상 : 연구 결과를 근거로 활성성분에 대한 품질 관리를 함으로써 효과의 안정성을 재고시킴으로써 농민의 생물제제에 대한 인식 변화 기대

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	10	2(출원)							2			
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	수지증		농업용미생물		미생물군집		생물학적조절		머신러닝			
영문핵심어 (5개 이내)	Gummosis (resin)		Agricultural microorganisms		Microbiome		Bio-control		Machine learning			

< 목 차 >

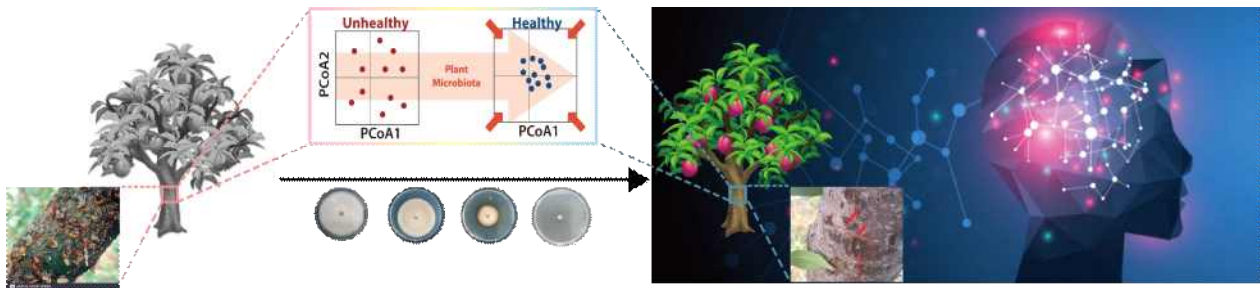
1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

[연구개발 개요 및 최종목표]

- 본 연구는 우리나라의 농업 현장에서 사용되고 있거나 선행연구를 통해 농·산업적 유용성이 입증된 세균 및 진균 미생물을 이용하여 복숭아 수지증의 발생원인을 규명하고, 이를 기반으로 한 친환경적인 종합 방제 시스템의 개발을 목표로 함(그림4).
 - ✓ 복숭아 수지증은 과수의 줄기나 가지에 진한 갈색의 수지(Gummosis)가 분비되는 현상으로 발생시 생산량과 품질의 저하되고 식물체의 고사를 통해 나무 전체를 제거해야 하므로 농가 수익이 감소되고 있는 실정임.
 - ✓ 복숭아 수지증의 주된 원인균은 *Botryosphaeria* sp. 에 속하는 *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata* 및 *Botryosphaeria dothidea*로 알려져 있음.
 - ✓ 복숭아 수지증은 병변 발생전 예방적 차원에서의 관리방법만 알려져 있으며 발생 후 이를 방제하기에는 어려운 실정임.
 - ✓ 따라서, 수지증원균의 균사 생장 억제 효과가 있는 미생물 배양액과 복숭아 나무의 근권과 식물내생균의 미생물 군집변화를 확인하여 친환경제제/생리학적 방제 통합 체계의 개발을 목표로 함.



■ 주관연구기관 - Plant-Microbe interaction을 통한 복숭아 수지증의 발생원인 규명과 발생원의 친환경 방제를 위한 식물·미생물 유래의 친환경 방제 시스템 개발 및 복숭아 수지증 제어를 위한 방제 미생물의 동정 및 효과 구명

- 복숭아 수지증 제어와 관련된 식물 내생 및 근권 미생물 확보
- 수지증 병변발생 유무에 따른 복숭아나무 근권, 내생 미생물 군집 분석
- 규명된 병변 발생원의 군집분석을 활용한 Machine learning 기반 방제 체계연구
- 복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술 개발을 위한 친환경제제/생리학적 방제 통합 체계 개발
- 복숭아 수지증 방제 미생물의 분리, 선발 및 동정
- 복숭아 수지 병원균 방제 길항미생물의 유전적 구성조사 및 생리학적 특성 조사
- 복숭아 수지 병원균 생육 억제 작용기작 구명
- 복숭아 수지 병원균에 대한 방제 길항미생물의 효율적인 방제 체계 연구

■ 공동연구기관- 복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술 개발 및 포장시험

- 복숭아 수지증의 병리학적 생리학적 발생원인 구명 및 효능 검증
- 복숭아 수지증에 대한 길항미생물의 현장 적용 가능성 조사
- 개발 시제품에 대한 효능 및 범용성 검증을 위한 실증시험
- 복숭아 수지증의 생리학적 발생원의 경감 체계 연구
- 개발 제품의 효능 및 범용성 검증을 위한 실증시험
- 복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술 개발
- 개발 제품의 상용화를 위한 비료 및 친환경 유기농자재 등록 가능성 검토
- 개발 제품의 현장 보급 확대 전략 수립 및 상용화 증대 방안 도출

[핵심기술]

- 유전체 염기서열 분석 기술

: Sequence raw reads의 길이가 상대적으로 긴 PacBio RS II 및 Sequel 플랫폼을 활용하여 농·식품 유용 미생물의 전장 유전체 염기서열을 분석함. HGAP, Falcon 등 용도에 맞는 *de novo* assembler를 사용하여 반복조립하고 완전해독의 확증을 위하여 Gepard 등을 활용하여 원형의 유전체를 조립하거나 확증함.

◎ **미생물군집 분석 기술**

: Ion Torrent PGM, Illumina Miseq, Agilent Bioanalyzer 2100 system, 그리고 분석용 server 3대 등 미생물 군집분석 활용에 가능한 장비운용 및 다양한 분석 tool을 사용하여 토양, 장내 미생물, 피부, 식물 등 다양한 환경 유래의 미생물 군집분석을 위한 기술 확립함.

◎ **비교유전체 분석 기술**

: 세균, 사상균, 효모에 적합한 비교유전체 도구인 BPGA (Bacterial pan-genome Analysis pipeline), OrthoMCL, 및 USEARCH 등의 프로그램을 활용함. 진화론적인 입장에서 유전체 염기서열의 유사성을 근거로 한, 동일 기능 유전자를 그룹화하는 것을 기본으로 각종 비교유전체를 실시함.

◎ **유전체 정보 데이터베이스(DB) 구축 기술**

: 미생물 유전체 정보를 표준화하고, 참조 및 비교유전체 정보를 통합하여 관리함과 동시에 유용 유전자 검색을 위한 웹기반 DB의 구축과 유전체와 유전자, RNA-Seq 정보를 맵핑한 통합 웹사이트 구현. 유전체 정보가 구축된 미생물 분양 연계 시스템을 구축함.

◎ **농업 및 식품 산업에 활용도가 높은 미생물 보유**

: 보유한 산업적 활용도가 높은 미생물(진균, 세균)이 다양하며, 백강균, BT(*Bacillus thuringiensis*) 균주들을 보유함으로써, 친환경 농산물 생산에 적합한 미생물 제제를 확보함.

◎ **Machine learning 및 Deep learning을 통한 판별법 구축**

: 2011년 이후 NGS 관련 기기를 보유와 리눅스 기반 서버를 3대 구축하고 있어 NGS 장비 운용과 생물정보학적 분석 노하우 보유 (Ion Torrent PGM, Illumina MiSeq, Agilent Bioanalyzer 2100 system, data 분석용 server 3대, data storage 용 NAS server 1대)

◎ **미생물 및 식물 생명공학 기술**

: 미생물과 식물에서의 분자생물학적 지식을 가지고 있음으로써, Plant-Microbe interaction에서의 미생물에 의한 식물체 내의 전사체 및 대사 변화 또는 식물에 의한 미생물의 군집변화와 같이 양방향적인 관점을 폭 넓게 제시할 수 있음. 식물체의 total RNA 추출 및 cDNA 합성 기술을 보유함으로써, 식물체 내의 유전자 발현양상을 분석할 수 있음. 유전자 재조합 기술을 보유하고 있어 단일 유전자의 기능검증을 위한 유전자 변형 및 단백질 발현 연구가 가능함

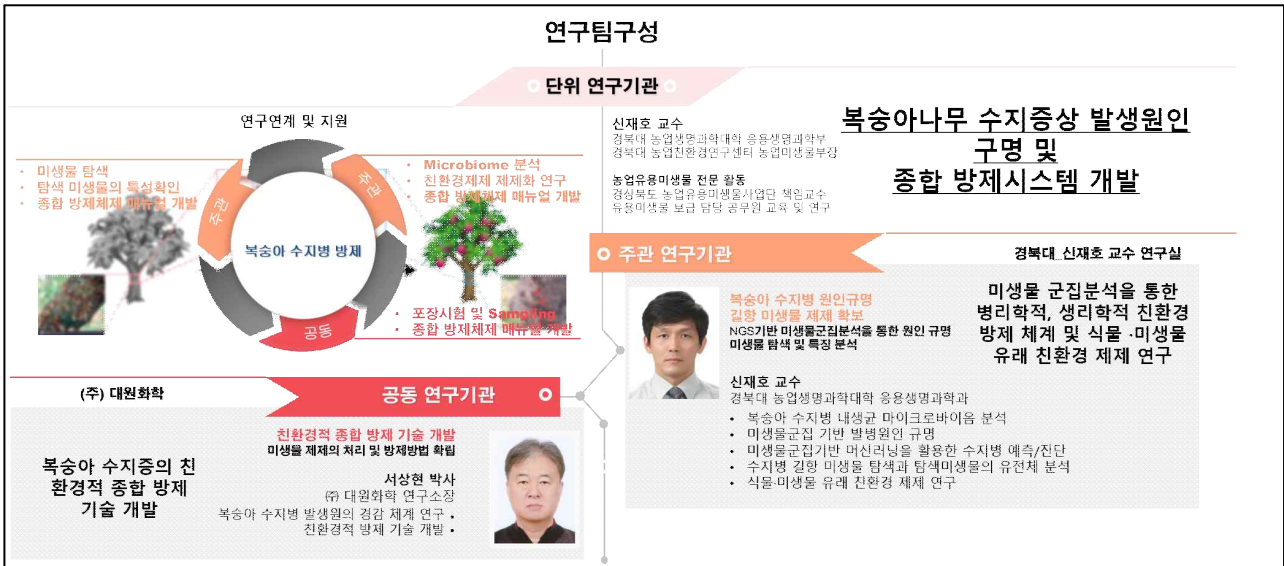
◎ **식물 전사체 분석 기술**

: 식물의 전사체 분석에 대한 전문지식을 보유하고 있음으로써, 외부 자극(복숭아 수지증)에 의해 정교하게 조절되는 식물체 내부의 조절 네트워크를 규명할 수 있는 노하우를 보유함

◎ **친환경 생물방제균의 제제화 기술**

: 생물방제균의 제제화를 위한 전문지식을 보유하고 있으며, 다양한 생물방제균의 제제화 기술을 구축하여 농가에 보급중

[연구팀 구성과 연계 연구]



2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용



■ 주관연구기관_경북대학교

- 수지증 병변발생 유무에 따른 복숭아나무 근권, 내생 미생물 균집 분석
 - 복숭아나무의 수지와 내생균집의 확인을 위한 샘플의 확보를 위해 경상북도 칠곡, 청도, 경산 그리고 전라북도 김제시 금산면 소재의 복숭아 농가의 협조를 통한 복숭아 수지증에 대한 음성/양성의 복숭아 나무 표피 시료를 확보.
 - 수지 발생 유무에 따른 복숭아 나무 근권의 토양시료 확보
 - 근권, 내생 미생물 균집 분석을 위해 시료의 전처리를 통해 Total DNA 분리 및 Amplicon sequencing을 위해 library제작을 위한 PCR 수행
 - 제작된 Library를 활용하여 Miseq platform을 활용한 차세대 염기서열분석(Next Generation Sequencing, NGS) 수행
 - 확보된 raw data의 후처리 및 분석을 실시하여 Alpha diversity, Beta diversity 등의 분석 기법을 활용하여 복숭아 수지증의 원인미생물 균집 예측
- 복숭아 수지증의 병리학적 생리학적 발생원인 구명 및 효능 검증
 - 선별된 길항미생물의 전장 유전체 분석 결과를 생리학적 특성을 서열 정보 수준에서 해석

- 기능성 유전자를 이용한 분리 균주의 특이적 유전자를 선별하여 미생물의 특성을 예측 및 기능성 유전자의 아미노산 서열을 이용한 아미노산 서열 기반 독소 유사 단백질을 예측
- Multilocus sequence typing (MLST) 또는 코어 유전체의 유전자를 이용하여 계통학적 분석을 수행하여 유전체학적 진화 경로를 확인
- 복숭아 수지증 길항미생물 대량 배양을 위한 최적배지(탄소원 · 질소원 선발) 조성 및 대량 배양 조건 조사(배양 시간, 산소 조건 등)를 통한 시제품 개발
- 복숭아 수지증의 병리학적 발생원의 친환경 방제 체계 연구
 - 생물혼증을 통한 복숭아 수지발생 토양의 친환경 방제 체계 연구 실시
 - 선발 길항미생물 및 복숭아 수지 병원균의 형태학적인 특징과 구조적 차이를 확인함으로써 미세 형태학적 자료 정보를 확보할 수 있으며, 복숭아 수지 병원균 관련 면역체계 개발을 위한 이해와 기초자료를 확보
- 복숭아 수지증 제어를 위한 식물 · 미생물 유래 친환경 제제 연구
 - *Beauveria bassiana* 균주를 활용한 총채벌레 및 복숭아 순나방, 좀벌레 등 및 천공충 방제를 통한 복숭아 수지 생성 물리적 방제 체계 연구
 - 공동 연구기관과의 유기적인 협업을 통해 확보된 친환경 생물방제균제제, 유용활성물질과 미생물군집분석 및 머신러닝기술을 접목하여 종합적인 방제대책 확보

■ 주관연구기관_김원찬 교수 연구실

- 복숭아 수지 병원균 분리 및 특성 조사
 - 복숭아 수지 병변에서의 시료를 채취하여 실험실 수준에서 배양 가능한 병원균을 선별
 - 복숭아 수지 유발 후보 병원균들의 DNA를 추출하여 ITS1 (5' -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) / ITS4 (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 프라이머를 이용하여 Internal transcribed spacer (ITS) 영역을 PCR을 이용하여 증폭
 - 증폭된 PCR product를 sequencing하여 서열을 확보 및 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 blast를 이용하여 동정
 - 선별된 복숭아 수지 병원균인 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 특이적인 프라이머를 제작 및 *Botryosphaeria dothidea*의 gDNA를 주형으로 한 PCR을 통한 특이적인 프라이머 성능 확인
- 항균활성 기반 복숭아 수지증의 방제용 길항미생물 탐색 및 동정
 - 복숭아 수지 병원균으로 알려진 줄기썩음병균인 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 선발 길항미생물의 균사생육억제 정도를 통한 1차 생물검정 실시 및 신규로 선별된 다양한 복숭아 수지 병원균에 대한 균사생육억제 정도를 통한 2차 생물검정을 실시하여 복합적인 복숭아 수지증에 대한 다방면적인 효과를 가지는 길항미생물 선별
 - 다양한 복숭아 수지 병원균에 다방면적인 항균활성을 지니는 길항미생물의 분자생물학적 동정을 위해 길항미생물의 DNA를 추출하여, 785f (5' -GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3') / 907r (5' -CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3') 프라이머를 이용하여 16S rRNA의 variable region V5을 PCR을 이용하여 증폭
 - 증폭된 PCR product를 sequencing하여 서열을 확보 및 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 blast를 이용하여 동정
 - 선발 길항미생물의 이차 대사물질에 의한 *Botryosphaeria dothidea*의 생육 억제 효능 검증

■ 공동연구기관_(주)대원화학

- 지역별 복숭아 수지증 발생 실태 및 현황 조사
 - 복숭아 수지증의 발생현황을 조사하기 위해 청도, 영농지역의 농가를 방문하여 부위별 수

지누출 원인, 발생정도 및 발생원인 조사

- 시기별 지역별 수지 발생 정도 및 양상을 조사하며 발생과원의 수지 샘플링을 통하여 연계 연구기관에 전달.
- 복숭아 수세 및 수령에 따른 복숭아 수지증 발생 현황 조사

○ 복숭아 수지증 병반 경감을 위한 기존 약제의 효능 검증

- 3% 티오파네이트메틸 도포제, 수성페인트 등과 같이 예방적 차원으로 시행되어진 방제법을 이용하여 기존 약제의 효능 검증.
- 발생영농 및 과원에 기존에 사용되어온 약제를 사용하여 복숭아 수지증의 감정도 측정

○ 복숭아 수지증의 병리학적 생리학적 발생원인 구명 및 효능 검증

- 복숭아 수지증 발생 실태 및 현황 조사
 - 복숭아 수지증의 발생 원인균 분리 및 발생현황을 조사하기 위해 청도, 영농지역의 농가를 방문하여 부위별 수지누출 원인, 발생정도 및 발생원인 조사
 - 복숭아 수지증 병반의 시료 채취하여 공동 연구 기관에 전달

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

가. 1단계_1차년도

■ 경북대학교, 신재호 교수 연구실

○ 수지증 병변발생 유무에 따른 복숭아나무 근권, 내생 미생물 균집 분석

- 복숭아나무 수지증 발생 지역을 대상 시료 채취 및 시료 전처리
 - 수지 발생 및 미발생 복숭아나무의 토양 및 수지 발생 조직을 샘플링하기 위해 5개 지역(경상북도 칠곡, 청도, 경산, 김천, 전라북도 김제) 185개의 시료를 채취함(그림 1, 표1)

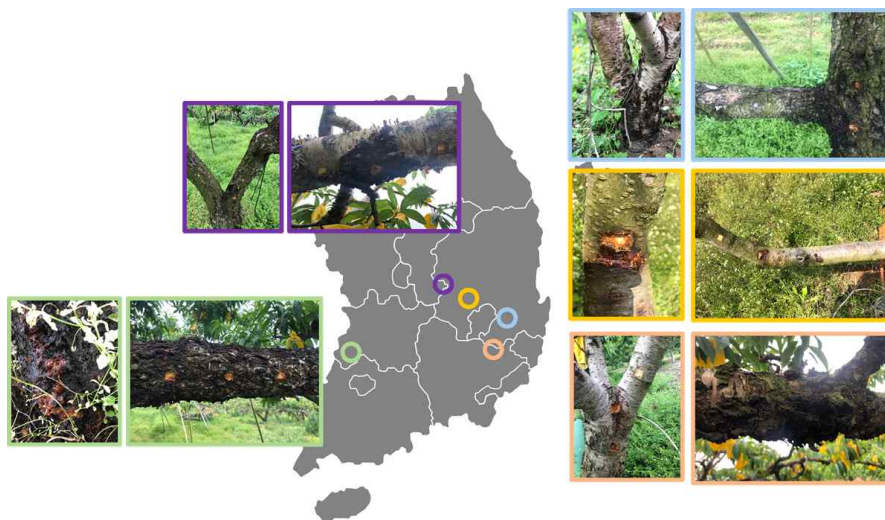


그림 1 복숭아 농가 수지 샘플링

표1. 복숭아 수지증 발생 및 비발생목 시료 채취 현황

Type		시료 수
Unhealthy (복숭아수지증 발생)	수지증 발생목	168
	고사목	1
	합계	169
Healthy	수지증 비발생목	15

(복숭아수지증 비발생)	치료목	1
	합계	16
총합		185

- 복숭아나무 수지증 병변 발생 유무에 따른 복숭아 나무 토양, 병변 발생부, 수지부 별 채취 방법 및 DNA 추출 방법
 - 복숭아나무의 토양 시료 채취는 농촌진흥청에서 고시하는 토양 시료 채취법에 따라 진행하였으며, 복숭아 수지와 감염부위의 표피 그리고 감염부위의 15 cm ~ 30 cm 전, 후의 표피를 깊이 0.5 cm, 직경 2 cm 씩 조각칼을 활용하여 확보하였음(그림 2)



그림 2 복숭아 나무 시료 채취

- 토양근권 미생물의 total DNA 추출을 위하여 10% SDS 방법과 © QIAGEN 사의 DNeasy PowerSoil Pro Kit을 이용하여 total DNA를 추출하였음
- 내생 미생물의 total DNA 추출을 위하여 채취한 시료를 95% Ethanol에서 60초, 6% NaOCl에서 360초, 70% Ethanol 에서 30초간 소독 후 멸균수에 6차례 세척하여 외부에 존재하는 미생물을 제거하였다. 이후 0.25g의 시료를 멸균된 면도날과 조직 그라인더를 이용하여 분쇄하였으며, 10% SDS 방법과 © QIAGEN 사의 DNeasy PowerSoil Pro Kit을 이용하여 total DNA를 추출하였음
- 수지 내 미생물의 total DNA 추출을 위하여 0.2g의 시료를 10ml의 0.85% NaCl saline 용액을 이용하여 55도의 용액에서 2시간 진탕하여 수지를 용해하였으며, 이후 40도, 3900g에서 30분간 원심분리한 뒤 상등액을 제거한 뒤 남은 부분을 10% SDS 방법과 © QIAGEN 사의 DNeasy PowerSoil Pro Kit을 이용하여 total DNA를 추출하였음
- 복숭아 수지증의 유무에 따른 근권미생물군집과 식물내생미생물군집 분석
 - 복숭아 수지증 발생 유무에 따라 확보된 시료의 total DNA를 확보한 후 세균 및 곰팡이의 16S rRNA gene 내 V4-5 영역과 ITS2 영역을 대상으로 한 amplicon sequencing library를 제작한 후 illumina Miseq을 운용하여 sequence를 확보함. Microbiome 및 Mycobiome 분석의 경우 리눅스 기반의 QIIME2 program을 활용하여 분석하였으며 data visualization의 경우 Calypso program을 활용함.

■ 지역별 복숭아 수지증에 대한 미생물 군집 분석

1. 지역별 추출된 미생물 군집 분석

1-1. 경상북도 칠곡군 (세균)

- 토양의 군집분석 결과, Genus level에서 *Steroidobacter* sp.가 검출되었으며, 이 속의 균은 일반적으로 식물 근권에서 다당류를 분해하며(Sakai, et al. 2014), 탈질능을 보유하는(Fahrbach, et al. 2008) 활성을 보유하고 있는 것으로 알려짐. *Nitrocosmicus* sp.은 높은 암모니아 농도에 내성이 있는 암모니아 산화 고세균으로 밝혀짐(Jung et al., 2016), *Udaobacter*은 잠재적인 다제내성균으로써 많은 토양에서 존재한다고 알려짐(Willms et al., 2020). *Sphingomonas* sp. 는 주요 근권생물 중 하나로써, 식물생장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려

져 있음(Kim et al., 2004). *Massilia* sp.는 뿌리 집락 박테리아의 주 그룹으로써, 종자, 뿌리, 줄기 등의 다양한 곳에서 균락을 형성하는 것으로 알려져 있음(Ofek et al., 2012).

- 경상북도 칠곡군의 내생균의 군집분석 결과, *Pseudomonas* sp.는 목본 식물등에서 중요한 역할을 하지만, species 및 strain에 따라 극명한 차이를 가지는 속으로써, 일부 균은 식물생장촉진능을 보유하나, 일부 종에 따라 감염증 및 마름병, 줄기 고사를 유발할 수 있다고 알려짐(Jones and Bensin, 2001, Sinclair and Lyon, 1987). *Methylobacterium* sp.은 식물과 상호작용하며 생물막을 형성하는데 관여하며(Andreote et al., 2006), 식물 성장 촉진에 관여하는 물질을 생산하는(Rye et al., 2006) 식물체 내의 다양한 곳에서 발견되는 공생균 중 하나로 알려짐. *Catenibacterium* sp.은 혐기성 미생물로서 당분을 발효시키는 균으로 알려짐(Kageyama and Benno, 2000). *Paenibacillus* sp.은 질소 고정능을 가지고있으며, 다당류를 분해할 수 있는 능력이 있어 여러 미생물에 대한 길항능을 가지고 있다고 알려짐(Bloemberg and Lugtenberg, 2001). *Burkholderia* sp.은 다양한 종이 존재하나, 일부 종은 식물 병원성을 가지는 것으로 알려짐(Burkholder, 1950). *Friedmanniella* sp.는 일부 식물의 목질부에서 발견되었으나 병원성에 대한 연구에는 많은 연구가 필요함(Giampetruzzi, 2020). *Sphingomonas* sp.는 주요 근권생물 중 하나로써, 식물생장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004).
- 경상북도 칠곡군 샘플 중 수지의 군집분석 결과, *Acidisoma* sp.는 다양한 산성 환경에서 존재하며, Poly-3-hydroxybutyrate와 셀룰로오스 가수분해 효소를 생산하는 것으로 알려짐(Mieszkina et al., 2021). *Pseudomonas* sp.는 목본 식물등에서 중요한 역할을 하지만, species 및 strain에 따라 극명한 차이를 가지는 속으로써, 일부 균은 식물생장촉진능을 보유하나, 일부 종에 따라 감염증 및 마름병, 줄기 고사를 유발할 수 있다고 알려짐(Jones and Bensin, 2001, Sinclair and Lyon, 1987). *Sphingomonas* sp.는 식물생장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004). *Catenibacterium* sp.은 혐기성 미생물로서 당분을 발효시키는 균으로 알려짐(Kageyama and Benno, 2000). *Burkholderia* sp.은 다양한 종이 존재하나, 일부 종은 식물 병원성을 가지는 것으로 알려짐(Burkholder, 1950). *Steroidobacter* sp.가 검출되었으며, 이 속의 균은 일반적으로 식물 근권에서 다당류를 분해하며(Sakai, et al. 2014), 탈질능을 보유하는(Fahrbach, et al. 2008) 활성을 보유하고 있는 것으로 알려짐. *Paenibacillus* sp.은 질소 고정능을 가지고있으며, 다당류를 분해할 수 있는 능력이 있으며 여러 미생물에 대한 길항능을 가지고 있다고 알려짐(Bloemberg and Lugtenberg, 2001).

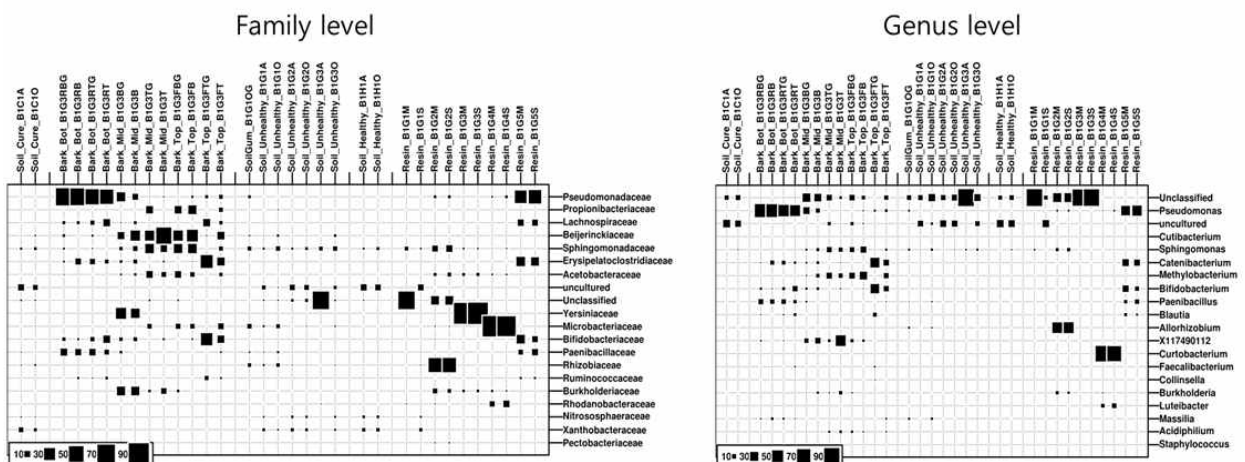


그림 3 경상북도 칠곡군 복숭아나무 및 토양의 세균 미생물 군집 분석

1-2. 경상북도 청도군 (세균)

- 경상북도 청도군 샘플 중 토양의 군집분석 결과, 대표적인 우점종으로써 *Nitrocosmicus*

sp.은 높은 암모니아 농도에 내성이 있는 암모니아 산화 고세균으로 밝혀짐(Jung et al., 2016). *Methylobacterium* sp.은 식물과 상호작용하며 생물막을 형성하는데 관여하며 (Andreote et al., 2006), 식물성장 촉진에 관여하는 물질을 생산하는(Rye et al., 2006) 식물체 내의 다양한 곳에서 발견되는 공생균 중 하나로 알려짐. *Sphingomonas* sp.는 주요 근권생물 중 하나로써, 식물성장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004). *Paenibacillus* sp.은 질소 고정능을 가지고있으며, 다당류를 분해할 수 있는 능력이 있으며 여러 미생물에 대한 길항능을 가지고 있다고 알려짐(Bloemberg and Lugtenberg, 2001). *Pseudomonas* sp.는 목본 식물등에서 중요한 역할을 하지만, species 및 strain에 따라 극명한 차이를 가지는 속으로써, 일부 균은 식물성장촉진능을 보유하나, 일부 종에 따라 감염증 및 마름병, 줄기 고사를 유발할 수 있다고 알려짐(Jones and Bensen, 2001, Sinclair and Lyon, 1987).

- 경상북도 청도군 샘플 중 껍질 내생균 군집분석 결과, 대표적인 우점종으로써 *Pseudomonas* sp.는 목본 식물등에서 중요한 역할을 하지만, species 및 strain에 따라 극명한 차이를 가지는 속으로써, 일부 균은 식물성장촉진능을 보유하나, 일부 종에 따라 감염증 및 마름병, 줄기 고사를 유발할 수 있다고 알려짐(Jones and Bensen, 2001, Sinclair and Lyon, 1987). *Paenibacillus* sp.은 질소 고정능을 가지고있으며, 다당류를 분해할 수 있는 능력이 있으며 여러 미생물에 대한 길항능을 가지고 있다고 알려짐 (Bloemberg and Lugtenberg, 2001). *Catenibacterium* sp.은 혐기성 미생물로서 당분을 발효시키는 균으로 알려짐(Kageyama and Benno, 2000). *Nitrocosmicus* sp.은 높은 암모니아 농도에 내성이 있는 암모니아 산화 고세균으로 밝혀짐(Jung et al., 2016).
- 경상북도 청도군 샘플 중 수지의 미생물 군집 분석 결과, abundance가 높은 *Pseudomonas* sp.는 목본 식물등에서 중요한 역할을 하지만, species 및 strain에 따라 극명한 차이를 가지는 속으로써, 일부 균은 식물성장촉진능을 보유하나, 일부 종에 따라 감염증 및 마름병, 줄기 고사를 유발할 수 있다고 알려짐(Jones and Bensen, 2001, Sinclair and Lyon, 1987). *Paenibacillus* sp.은 질소 고정능을 가지고있으며, 다당류를 분해할 수 있는 능력이 있으며 여러 미생물에 대한 길항능을 가지고 있다고 알려짐 (Bloemberg and Lugtenberg, 2001). *Catenibacterium* sp.은 혐기성 미생물로서 당분을 발효시키는 균으로 알려짐(Kageyama and Benno, 2000). *Sphingomonas* sp.는 주요 근권생물 중 하나로써, 식물성장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004). *Massilia* sp.는 뿌리 집락 박테리아의 주 그룹으로써, 종자, 뿌리, 줄기 등의 다양한 곳에서 군락을 형성하는 것으로 알려져 있음(Ofek et al., 2012).

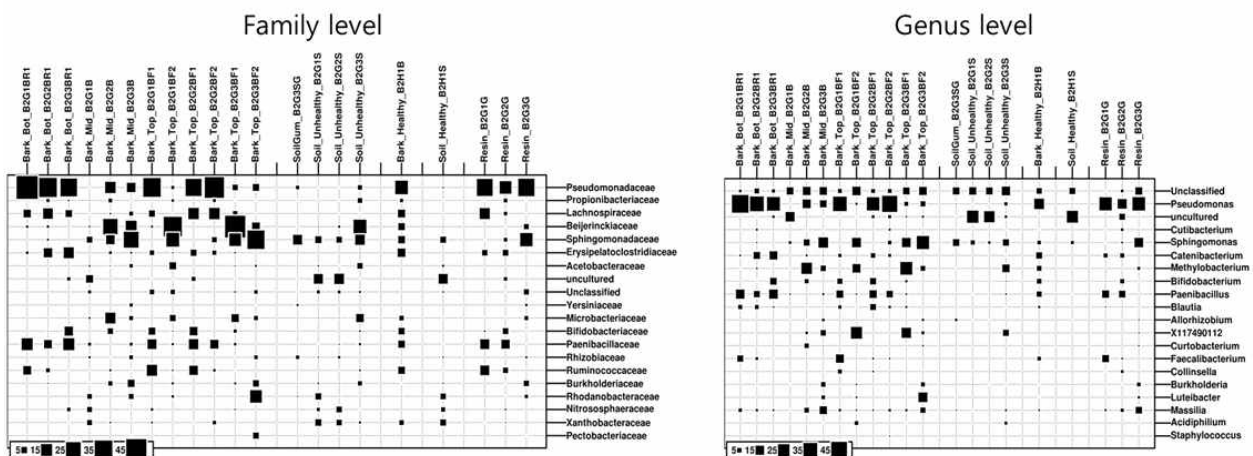


그림 4 경상북도 청도군 복숭아나무 및 토양의 세균 미생물 군집 분석

1-3. 경상북도 경산 (세균)

- 경상북도 경산시 시료의 토양 근권내 세균 군집분석 결과, 가장 높은 abundance를 보여주는 *Sphingomonas* sp. 는 주요 근권생물 중 하나로서, 식물생장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004). *Paenibacillus* sp.은 질소 고정능을 가지고있으며, 다당류를 분해할 수 있는 능력이 있으며 여러 미생물에 대한 길항능을 가지고 있다고 알려짐(Bloemberg and Lugtenberg, 2001). *Burkholderia* sp.은 다양한 종이 존재하나, 일부 종은 식물 병원성을 가지는 것으로 알려짐(Burkholder, 1950). *Allorhizobium* sp.은 토양 근권에서 식물 뿌리 내 공생균으로써 질소 고정의 기능을 하는 것으로 알려져 있음(Lajudie et al., 1998).
- 경상북도 경산시 샘플의 목질부 내생 세균 군집분석 결과, *Cutibacterium*은 식물 내생균으로써 중금속 스트레스를 낮출 가능성이 있는 것으로 알려져 있음(González-Benítez et al., 2021). *Catenibacterium* sp.은 혐기성 미생물으로써 당분을 발효시키는 균으로 알려짐(Kageyama and Benno, 2000).
- 경상북도 경산시 샘플의 수지 내 세균 군집분석 결과, 특이적으로 abundance가 높게 나온 *Methylobacterium* sp.은 식물과 상호작용하며 생물막을 형성하는데 관여하며 (Andreote et al., 2006), 식물성장 촉진에 관여하는 물질을 생산하는(Rye et al., 2006) 식물체 내의 다양한 곳에서 발견되는 공생균 중 하나로 알려짐.

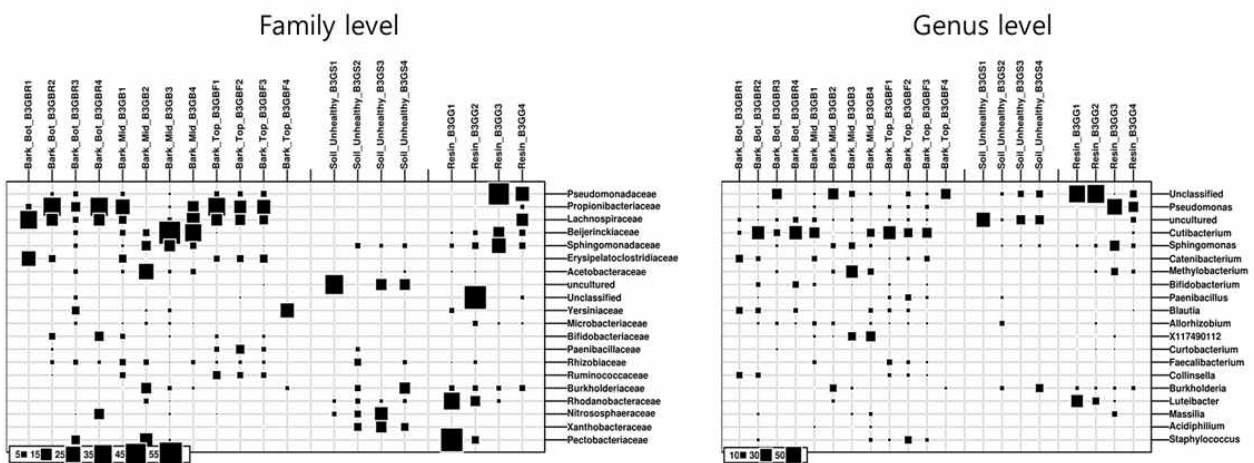


그림 5 경상북도 경산시 복숭아나무 및 토양의 세균 미생물 군집 분석

1-4. 전라북도 김제 (세균)

- 전라북도 김제 샘플의 토양 근권내 세균 군집분석 결과, 우점종으로써 *Sphingomonas* sp. 는 주요 근권생물 중 하나로서, 식물생장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004). *Paenibacillus* sp.은 질소 고정능을 가지고있으며, 다당류를 분해할 수 있는 능력이 있으며 여러 미생물에 대한 길항능을 가지고 있다고 알려짐(Bloemberg and Lugtenberg, 2001). *Burkholderia* sp.은 다양한 종이 존재하나, 일부 종은 식물 병원성을 가지는 것으로 알려짐(Burkholder, 1950).
- 전라북도 김제 샘플의 목질부 내생 세균 군집분석 결과, *Cutibacterium*은 식물 내생균으로써 중금속 스트레스를 낮출 가능성이 있는 것으로 알려져 있음(González-Benítez et al., 2021). *Catenibacterium* sp.은 혐기성 미생물으로써 당분을 발효시키는 균으로 알려짐(Kageyama and Benno, 2000). *Blautia*, *Collinsella* sp.은 인간 뿐 아니라 곤충의 장내미생물에서 검출되는 균 중 하나로 알려짐(Young et al., 2020)
- 전라북도 김제 샘플의 수지 내 세균 군집분석 결과, *Sphingomonas* sp. 는 주요 근권생물 중 하나로서, 식물생장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에

게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004). *Faecalibacterium* sp. 는 일반적으로 장내 미생물에 존재하나, 식물의 열매나 씨앗 등에서 존재하기도 함으로 알려짐(Raj et al., 2019, Ren et al., 2018).

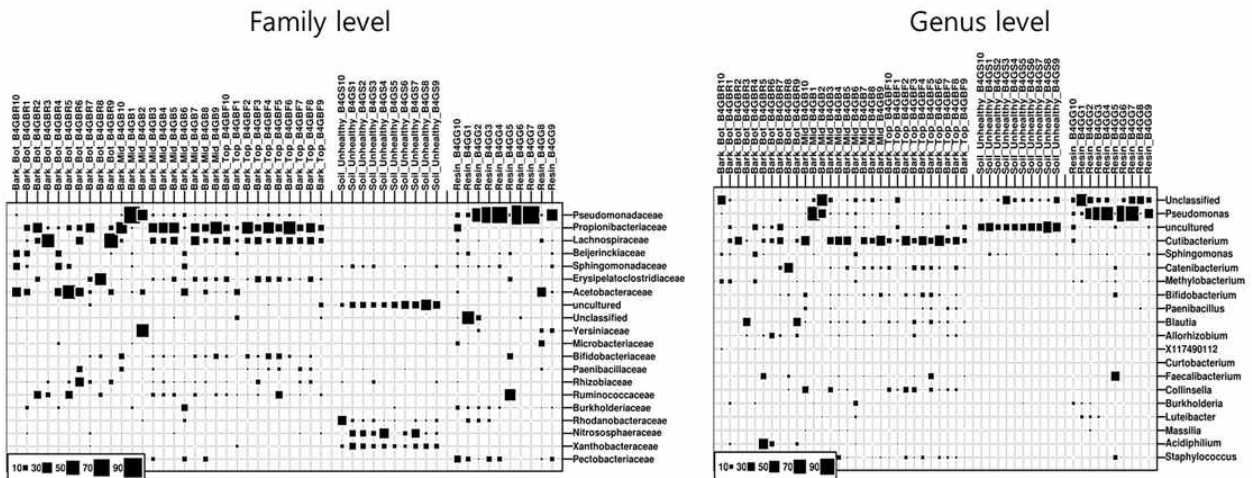


그림 6 전라북도 김제시 복숭아나무 및 토양의 세균 미생물 군집 분석

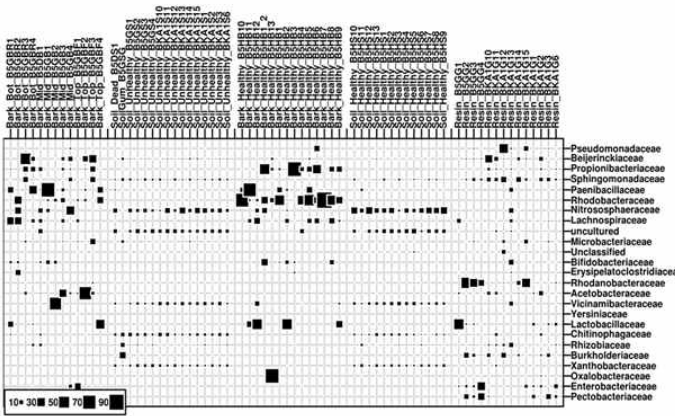
1-5. 경상북도 김천 아포 (세균)

- 경상북도 김천 아포 샘플의 토양 근권내 세균 군집분석 결과, 우점종으로써 *Sphingomonas* sp. 는 주요 근권생물 중 하나로써, 식물생장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004). *Nitrocosmicus* sp.은 높은 암모니아 농도에 내성이 있는 암모니아 산화 고세균으로 밝혀짐(Jung et al., 2016).
- 경상북도 김천 아포 샘플의 목질부 내생 세균 군집분석 결과, 우점종으로써 *Cutibacterium*은 식물 내생균으로써 중금속 스트레스를 낮출 가능성이 있는 것으로 알려져 있음(González-Benítez et al., 2021). *Paenibacillus* sp.은 질소 고정능을 가지고있으며, 다당류를 분해할 수 있는 능력이 있으며 여러 미생물에 대한 길항능을 가지고 있다고 알려짐(Bloemberg and Lugtenberg, 2001). *Rhodobacter* sp.은 광합성능을 가진 세균의 일종이며 질소고정능이 있는 것으로 알려짐(van Niel, 1944).
- 경상북도 김천 아포 샘플의 수지 내 세균 군집분석 결과, 우점종으로써 *Pseudomonas* sp. 는 목본 식물등에서 중요한 역할을 하지만, species 및 strain에 따라 극명한 차이를 가지는 속으로써, 일부 균은 식물생장촉진능을 보유하나, 일부 종에 따라 감염증 및 마름병, 줄기 고사를 유발할 수 있다고 알려짐(Jones and Bensin, 2001, Sinclair and Lyon, 1987). *Sphingomonas* sp. 는 주요 근권생물 중 하나로써, 식물생장촉진능을 보유하고 있으며 식물 병원체를 제어하는데 식물에게 도움을 주는 주요 균 중 하나로 알려져 있음(Kim et al., 2004). *Luteibacter* sp.은 식물생장촉진능을 보유하고 있는 균으로 알려짐(Guglielmetti et al., 2013)

1-6. 경상북도 칠곡군 (진균)

- 경상북도 칠곡군 샘플 중 토양 근권 진균의 군집분석 결과, Genus level에서는 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 군집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). 또한 *Cladosporium* sp.는 일부 식물 병원체로써 발견되며, 잎 곰팡이병을 발생시킨다고 알려져 있음(Rivas et al., 2005). *Gibberella* sp.는 *Fusarium*의 완전 세대로써, 일부 종이 이삭마름병 및 이삭썩음병을 유발하며 식물 호르몬 유사체를 생산하는

Family level



Genus level

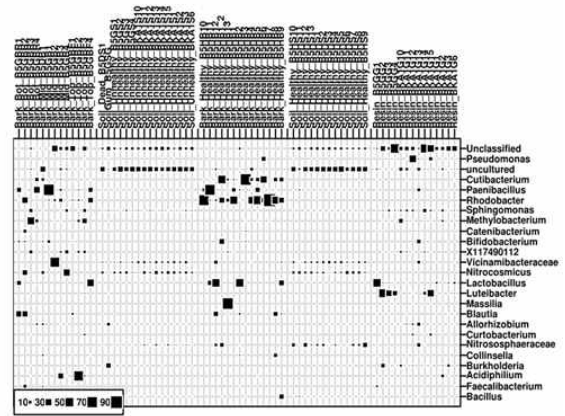


그림 7 경상북도 김천 아포 복숭아나무 및 토양의 세균 미생물 군집 분석
 균 중 하나로써 알려짐(Hsuan et al., 2011). *Fusicolla*, *Tausonia*와 같은 균들은 나무 상처에서 발생하는 수지에서 성장하는 균으로써 알려짐(Gräfenhan et al., 2011).

- 경상북도 칠곡군 샘플 중 목질부 내생 진균의 군집분석 결과, *Cytospora*가 발견되었으며, 이는 체관부와 목질부를 감염시키는 식물 병원체로 알려져 있으며, 복숭아를 포함한 핵과류에 *cytospora* canker을 일으키고 줄기마름병을 유발하는 심각한 병원균이 검출됨(Pan et al., 2020), *Collophora*는 아몬드 등의 핵과류와 포도나무에서 줄기 궤양병을 유발하는 것으로 알려져 있음(Arzanlou et al., 2016). *Trametes* sp.는 리그닌을 분해시키는 것으로 알려져 있으며(Liu et al., 2019), 나방류 유충들의 영양원이 된다고 알려져 있음(Jaworski, 2018). 이는 수지증 발생 원인 중 하나로 알려진 복숭아 순나방 유충의 잠재적인 영양 공급원으로써 판단할 수 있음. *Cladosporium* sp.는 일부 식물 병원체로써 발견되며, 잎 곰팡이병을 발생시킨다고 알려져 있음(Rivas et al., 2005). *Zasmidium* sp.은 식물 반점병을 일으키는 병원체 중 하나로써 알려져 있음(Yap et al., 2020).
- 경상북도 칠곡군 샘플 중 수지의 진균 군집분석 결과에서도 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 군집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Cystobasidium* sp.은 일반적으로 식물에 기생하는 효모 중 하나로써, 비소, 구리, 아연, 납등의 중금속에 대해 저항성을 가지는 것으로 알려져 있음(Ramos-Garza et al., 2015). *Cladosporium* sp.는 일부 식물 병원체로써 발견되며, 잎 곰팡이병을 발생시킨다고 알려져 있음(Rivas et al., 2005). *Papiliotrema* sp.는 다양한 과일등 당류가 많은 환경에서 병원성 곰팡이와 경쟁하는 효모로 밝혀진 바 있음(Castoria et al., 2021). *Alternaria* sp.는 주로 주요 식물 병원체로 알려져 있으며, 농업의 다양한 분야에서 약 20%에 달하는 분해와 부패에 관여하며 최대 수확량의 80%를 감소시킬 수 있다고 알려짐. 또한, 잎 마름병을 유발시킨다고 알려져 있음(Nowicki et al., 2012, Pati et al., 2009). *Minutiella* sp.는 자두나무와 같은 벗나무속에서 신규하게 검출되는 등의 내생 곰팡이로써 알려짐(Bien et al., 2020)

1-7. 경상북도 청도군 (진균)

- 경상북도 청도군 샘플 중 토양 근권 진균의 군집분석 결과, 대표적인 우점종으로써 동일하게 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 군집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Cladosporium* sp.는 일부 식물 병원체로써 발견되며, 잎 곰팡이병을 발생시킨다고 알려져 있음(Rivas et al., 2005). *Mycochlamys* sp.는 과수 농업환경의 토양에서 발견되는 진균 중의 하나로 판별되었음.(Landinez-Torres et al., 2019). *Fusicolla*는 나무 상처에서 발생하는 수지에서 성장하는 균으로써 알려짐(Gräfenhan et al., 2011). *Gibellulopsis* sp. 는 일부 *Verticillium*의 새로운 속으로써 판별되었으며, 몇몇

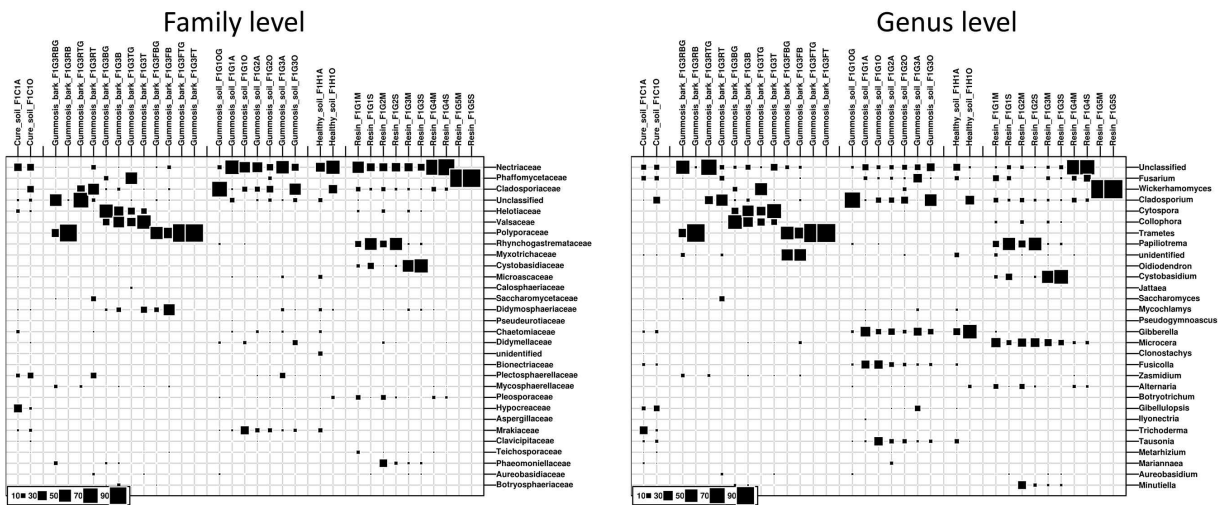


그림 8 경상북도 칠곡군 복숭아나무 및 토양의 진균 미생물 군집 분석 식물 병원균을 포함하는 것으로 알려져 있음(Barbara et al., 2003).

- 경상북도 청도군 샘플 중 목질부 내생 진균의 군집분석 결과, 대표적인 우점종으로써 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 군집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Cladosporium* sp.는 일부 식물 병원체로써 발견되며, 잎 곰팡이병을 발생시킨다고 알려져 있음(Rivas et al., 2005). *Cytospora* sp.가 발견되었으며, 체관부와 목질부를 감염시키는 식물 병원체로 알려져 있으며, 복숭아를 포함한 핵과류에 cytospora canker을 일으키고 줄기마름병을 유발한다고 알려짐(Pan et al., 2020). *Collophora* sp.는 아몬드 등의 핵과류와 포도나무에서 줄기 궤양병을 유발하는 것으로 알려져 있음(Arzanlou et al., 2016). *Alternaria* sp.는 주로 주요 식물 병원체로 알려져 있으며, 농업의 다양한 분야에서 약 20%에 달하는 분해와 부패에 관여하며 최대 수확량의 80%를 감소시킬 수 있다고 알려짐. 또한, 잎 마름병을 유발시킨다고 알려져 있음(Nowicki et al., 2012, Pati et al., 2009). *Zasmidium* sp.은 식물 반점병을 일으키는 병원체 중 하나로써 알려져 있음(Yap et al., 2020).
- 경상북도 청도군 샘플 중 수지의 진균 군집분석 결과, 대표적인 우점종으로써 *Cytospora* sp.는 체관부와 목질부를 감염시키는 식물 병원체로 알려져 있으며, 복숭아를 포함한 핵과류에 cytospora canker을 일으키고 줄기마름병을 유발함(Pan et al., 2020). *Collophora* sp.는 아몬드 등의 핵과류와 포도나무에서 줄기 궤양병을 유발하는 것으로 알려져 있음(Arzanlou et al., 2016). *Cystobasidium* sp.은 일반적으로 식물에 기생하는 효모 중 하나로써, 비소, 구리, 아연, 납등의 중금속에 대해 저항성을 가지는 것으로 알려져 있음(Ramos-Garza et al., 2015). *Alternaria* sp.는 주로 주요 식물 병원체로 알려져 있으며, 농업의 다양한 분야에서 약 20%에 달하는 분해와 부패에 관여하며 최대 수확량의 80%를 감소시킬 수 있다고 알려짐. 또한, 잎 마름병을 유발시킨다고 알려져 있음(Nowicki et al., 2012, Pati et al., 2009).

1-8. 경상북도 경산 (진균)

- 경상북도 경산시 샘플의 토양 근권 진균의 군집분석 결과, 우점종으로써 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 군집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Pseudogymnoascus* sp.는 근권에서 가장 풍부한 곰팡이 속중 하나로써, 일반적으로 cellulose 분해에 관여한다고 알려짐(Sigler et al., 2000). *Metarhizium* sp.은 숙주 식물의 성장을 유도한다고 알려진 바 있으며, 해충으로부터 식물을 보호하는 곤충병원성 곰팡이로 알려짐(Siqueira et al., 2020). *Mariannaea* sp.는 다양한 amylase, beta-glucosidase,

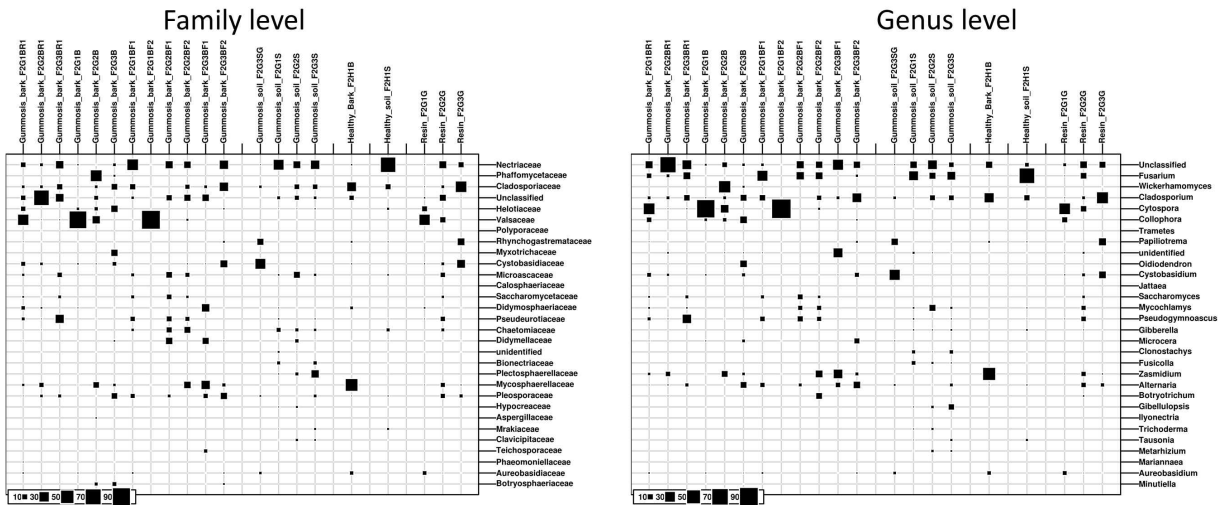


그림 9 경상북도 청도군 복숭아나무 및 토양의 진균 미생물 군집 분석
cellulase, and protease를 생산하며(Tang et al., 2012) cellulose 분해능이 뛰어나 (Domsch et al., 1980) 고사한 식물체의 분해에 관여한다는 것으로 알려짐(Bisette, 1979).

- 경상북도 경산시 샘플의 목질부 내생 진균의 군집분석 결과, 우점종으로써 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 군집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Cladosporium* sp.는 일부 식물 병원체로써 발견되며, 잎 곰팡이병을 발생시킨다고 알려져 있음(Rivas et al., 2005). *Cytospora* sp.는 체관부와 목질부를 감염시키는 식물 병원체로 알려져 있으며, 복숭아를 포함한 핵과류에 cytospora canker을 일으키고 줄기마름병을 유발하는 진균으로 알려짐(Pan et al., 2020). *Jattaea* sp.는 육상 환경의 나무에서 풍부하게 발견되나, 일부 산림 나무의 줄기에서 감염을 일으킨다고 알려진 바 있음(Kazemzadeh-Chakusary et al., 2020).
- 경상북도 경산시 샘플의 수지의 진균 군집분석 결과, 우점종으로써 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 군집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Papiliotrema* sp.는 다양한 과일등 당류가 많은 환경에서 병원성 곰팡이와 경쟁하는 효모로 밝혀진 바 있음(Castoria et al., 2021). *Cystobasidium* sp.은 일반적으로 식물에 기생하는 효모 중 하나로써, 비소, 구리, 아연, 납등의 중금속에 대해 저항성을 가지는 것으로 알려져 있음(Ramos-Garza et al., 2015).

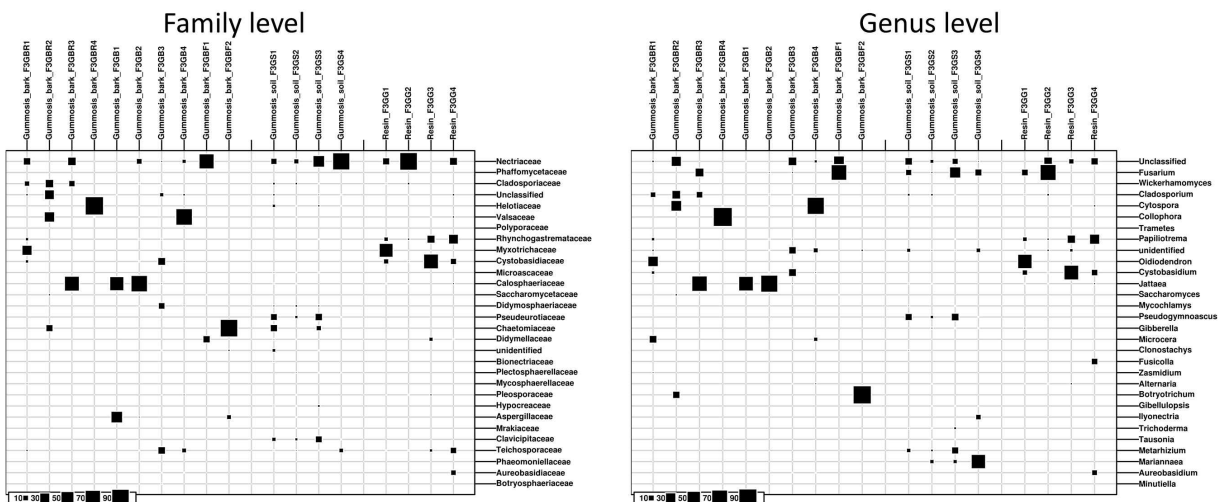


그림 10 경상북도 경산시 복숭아나무 및 토양의 진균 미생물 군집 분석

1-9. 전라북도 김제 (진균)

- 전라북도 김제 샘플의 토양 근권 진균의 군집분석 결과, 우점종으로써 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 군집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Mycochlamys* sp.는 과수 농업환경의 토양에서 발견되는 진균 중의 하나로 판별되었음.(Landinez-Torres et al., 2019). *Pseudogymnoascus* sp.는 근권에서 가장 풍부한 곰팡이 속종 하나으로써, 일반적으로 cellulose 분해에 관여한다고 알려짐(Sigler et al., 2000). *Clonostachys* sp.는 일반적인 식물 내생균으로써 나비목 유충, 총채벌레(Oliveira et al., 2020), 식물 기생 선충 및 기타 곤충(Elias et al., 2020)등에 감염을 일으키는 곤충 병원성 진균으로 알려져 있음. *Gibellulopsis* sp. 는 일부 *Verticillium*의 새로운 속으로써 판별되었으며, 몇몇 식물 병원균을 포함하는 것으로 알려져 있음(Barbara et al., 2003). *Trichoderma*는 다양한 진균 병원체등에 길항하는 진균으로 알려져 있으며(Elad et al., 1982), 나비목 유충, 총채벌레 및 기타 곤충에 감염을 일으키는 능력을 보유하고 있음이 밝혀져 있음(Akello, 2012)
- 전라북도 김제 샘플의 목질부 내생 진균의 군집분석 결과, 우점종으로써 *Wickerhamomyces*는 자연 상태에서 발효에 관여하는 효모중 하나로 밝혀졌으며, biofilm 형성 능력이 우수하며(Dufour et al. 2003), pectin을 분해할 수 있다고 알려져 있음(Masoud and Jespersen, 2006). *Cladosporium* sp.는 일부 식물 병원체로써 발견되며, 잎 곰팡이병을 발생시킨다고 알려져 있음(Rivas et al., 2005). *Collophora* sp.는 아몬드 등의 핵과류와 포도나무에서 줄기 궤양병을 유발하는 것으로 알려져 있음(Arzanlou et al., 2016). *Oidiodendron* sp.은 토탄, 토양, 부식질, 목재, 이끼등의 다양한 장소에서 유기물 분해를 진행하는 균으로 밝혀짐(Calduch et al., 2004).
- 전라북도 김제 샘플의 수지의 진균 군집분석 결과, 우점종으로써 *Wickerhamomyces* sp.는 자연 상태에서 발효에 관여하는 효모중 하나로 밝혀졌으며, biofilm 형성 능력이 존재하며(Dufour et al. 2003), pectin을 분해할 수 있다고 알려져 있음(Masoud and Jespersen, 2006). *Cladosporium* sp.는 일부 식물 병원체로써 발견되며, 잎 곰팡이병을 발생시킨다고 알려져 있음(Rivas et al., 2005). *Papiliotrema* sp.는 다양한 과일등 당류가 많은 환경에서 병원성 곰팡이와 경쟁하는 효모로 밝혀진 바 있음(Castoria et al., 2021). *Fusicolla* sp., *Tausonia* sp.와 같은 균들은 나무 상처에서 발생하는 수지에서 성장하는 균으로써 알려짐(Gräfenhan et al., 2011).

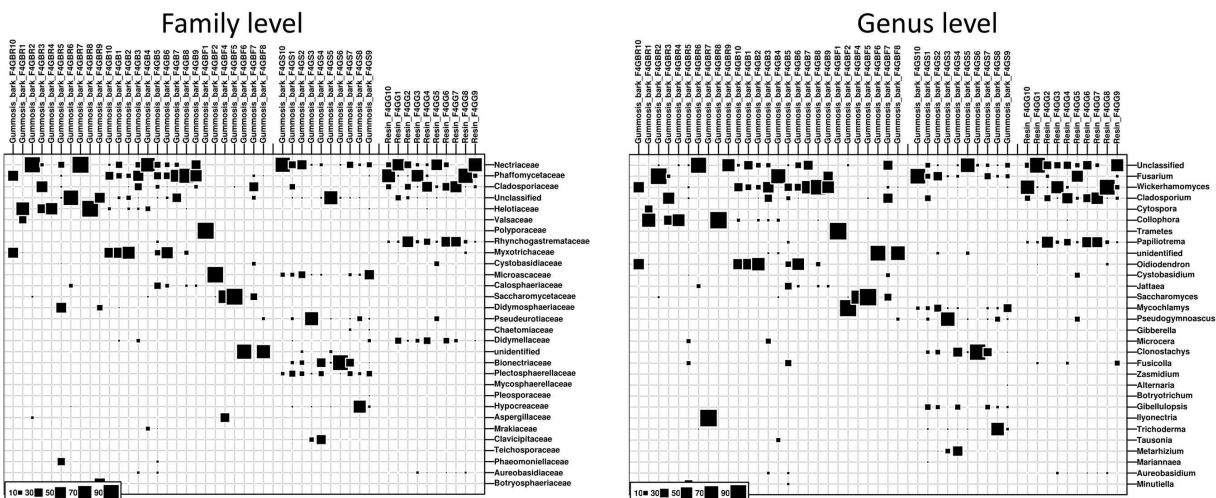


그림 11 전라북도 김제시 복숭아나무 및 토양의 진균 미생물 군집 분석

1-10. 경상북도 김천 아포 (진균)

- 경상북도 김천 아포 샘플의 토양 근권 진균의 균집분석 결과, 우점종으로써 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 균집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Pseudogymnoascus* sp.는 근권에서 가장 풍부한 곰팡이 속중 하나로써, 일반적으로 cellulose 분해에 관여한다고 알려짐(Sigler et al., 2000).
- 경상북도 김천 아포 샘플의 목질부 내생 진균의 균집분석 결과, 우점종으로써 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 균집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Cytospora* sp.는 체관부와 목질부를 감염시키는 식물 병원체로 알려져 있으며, 복숭아를 포함한 핵과류에 cytospora canker을 일으키고 줄기마름병을 유발하는 진균으로 알려짐(Pan et al., 2020). *Talaromyces*는 biomass 분해에 사용되는 중요한 cellulose 분해 진균으로써 알려져 있으며(Fujii et al., 2013, Houbraken et al., 2014), 다양한 분해 효소와 용해성 색소를 생산하는 것으로 알려짐(Reyes et al., 1999). *Hortaea*는 극도의 내염성 및 내산성을 을 가지고 있는 균으로써 알려져 있음(Kogej et al., 2007). *Rousoella*는 엽면 병원균의 일종으로 작용하며(Ariyawansa et al., 2020), biofilm 을 억제하는 균으로 알려져 있음(Phukhamsakda et al., 2018).
- 경상북도 김천 아포 샘플의 수지의 진균 균집분석 결과, 우점종으로써 *Fusarium* sp. 이 발견되었으며, 일반적으로 토양 미생물 균집에 풍부하나 진균 독소를 생성할 가능성이 존재한다고 알려져 있음(Brewing Microbiology, 3rd edition. Priest and Campbell). *Wickerhamomyces* sp.는 자연 상태에서 발효에 관여하는 효모중 하나로 밝혀졌으며, biofilm 형성 능력이 존재하며(Dufour et al. 2003), pectin을 분해할 수 있다고 알려져 있음(Masoud and Jespersen, 2006). *Oidiodendron* sp.은 토탄, 토양, 부식질, 목재, 이끼등의 다양한 장소에서 유기물 분해를 진행하는 균으로 밝혀짐(Calduch et al., 2004). *Oncopodiella* sp.는 살아있는 나무의 죽은 부분이나, 나무와 나뭇잎 등을 분해한다고 알려져 있음(Gönczöl and Révay, 2004).

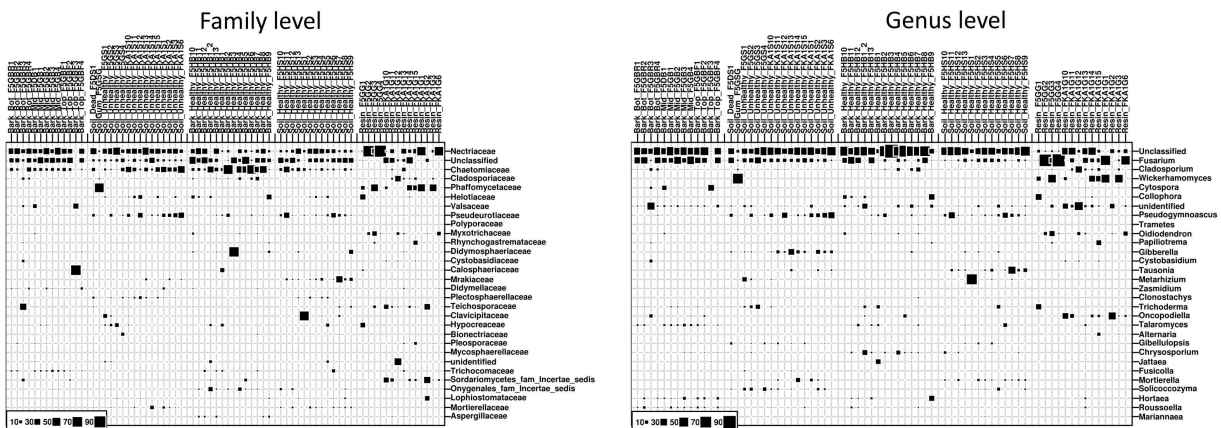


그림 12 경상북도 김천 아포 복숭아나무 및 토양의 진균 미생물 균집 분석

2. 복숭아나무 수지증 발생 유무에 따른 미생물 균집 분석

2-1. 토양 근권 세균 분석

- Alpha diversity 분석에서 미생물 다양성, 풍부도, 및 균등도를 확인하였으며 그 결과 복숭아 수지증의 유무에 대해 유의미한 차이점이 없는 것으로 확인되었음. 그러나, 실

험균 간의 미생물 군집 거리를 확인하는 beta diversity 분석을 수행한 결과 Redundancy Analysis 분석을 진행하였을 때는 수지증의 유무에 따라서 극명한 차이를 확인 할 수 있음.

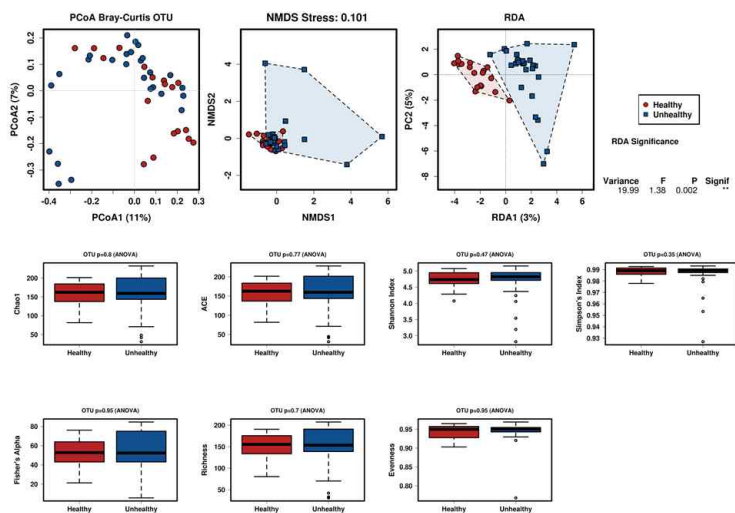


그림 13 복숭아나무 토양의 세균 Diversity Index 분석

2-2. 병변 발생 목질부 세균 분석

- 복숭아 나무의 내생미생물의 Diversity를 분석하기 위해 Alpha 및 Beta diversity를 확인하였으며, 수지증이 발생한 목질부에서 Shannon, Simpson, Fisher, Chao 1, ACE 등의 다양도가 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, Richness와 Evenness 같이 종의 풍부도와 균등도 역시 증가하는 경향을 확인 할 수 있었음.
- Beta diversity분석법 중 하나인 RDA score에서 수지증 유무에 따라서 차이점을 확인 할 수 있으며 목질부의군집에서 다양성, 풍부도, 균등도의 차이점을 확인 할 수 있음

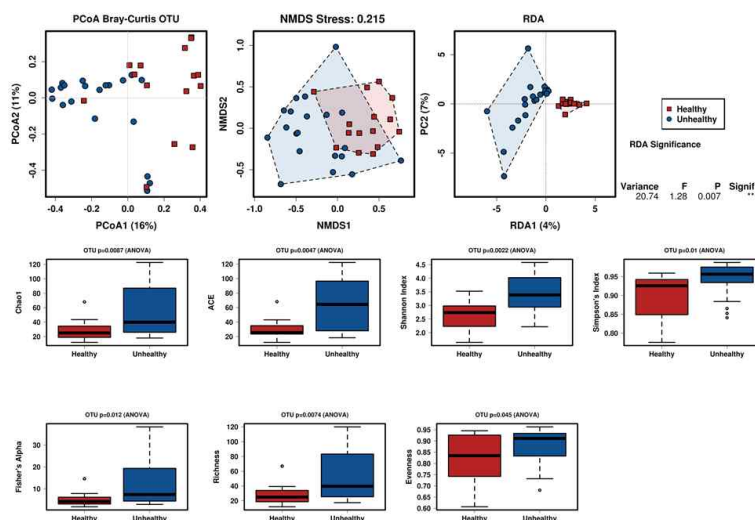


그림 14 복숭아나무 목질부 내생균의 Diversity index 분석

2-3 복숭아나무에서 나오는 수지액의 세균 군집 분석

- 병변부 목질부 내생균과 수지액 유래의 세균의 군집을 비교하였으며 그 결과 수지에서

는 *Luteibacter*, *Blautia*, *Curtobacterium*, *Mucilaginibacter*, *Novosphingobium*이 특이적으로 존재하는 것이 확인되었으며, 반면에 목질부에서는 *Cutibacterium*과 *Collinsella*만 존재하는 것으로 확인되었음. 수지가 유출된 복숭아 나무의 목질부에서 공통적으로 존재하는 core microbiota에는 아래그림과 같이 crown gall을 발생시키는 *Allorhizobium*과 새싹 및 줄기 반점을 일으킬수 있는 *Robbsia*가 존재하는 것으로 확인되었음.

- 또한, 수지 생성으로 인한 복숭아 나무자체의 염증이 발생했을 때, 세균성 병원체에 대한 질병 저항성을 부여할 수 있는 *Sphingomonas*속이 공통적으로 존재하는 것을 확인하여 병원체로부터의 저항성을 부여하기 위한 역할을 예상할 수 있음.

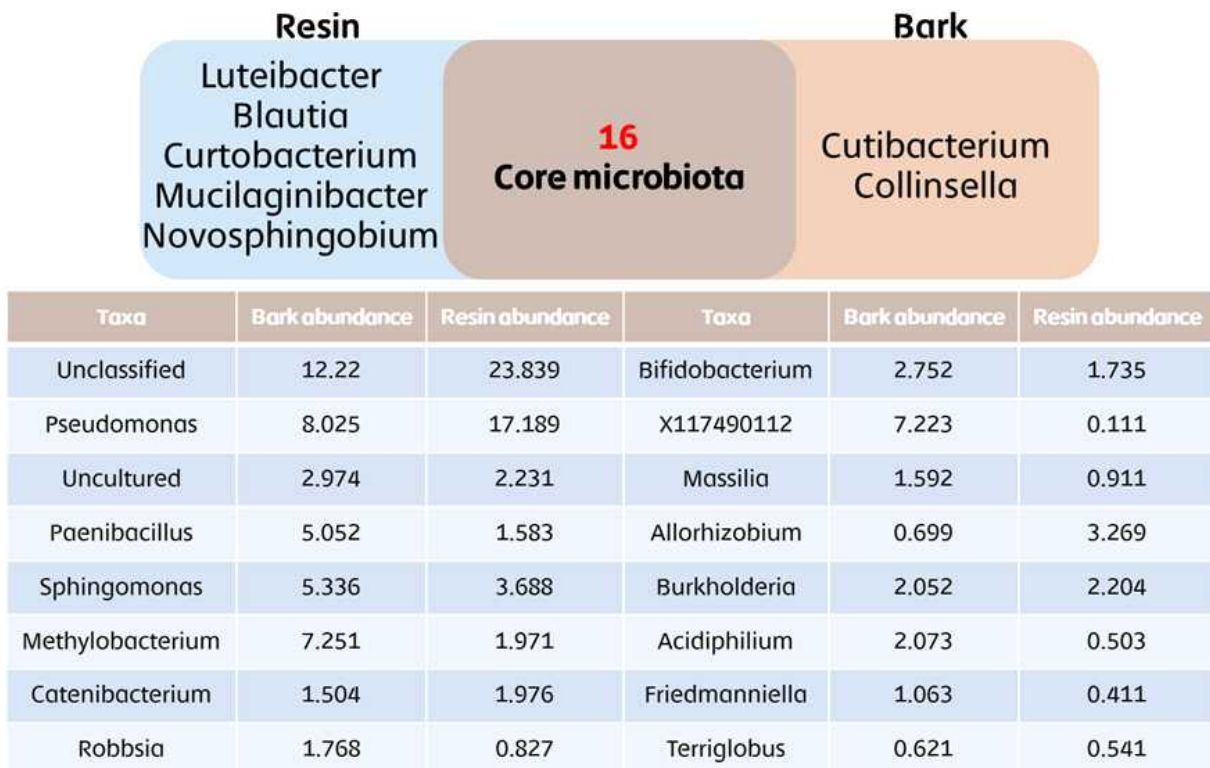


그림 15 복숭아 수지와 수지생산 표피 유래 세균의 Core microbiome

2-4. 토양 근권 진균 분석

- Chao1, ACE, Shannon, Simpson' s, Fisher' s alpha, Richness, Evenness 지수에서 전반적으로 건강한 복숭아나무 근권 토양에서 alpha diversity가 상대적으로 수지증 발생목 토양보다 높으나 통계적으로 유의미한 차이는 존재하지 않았음
- 반면 Beta diversity에서는 Redundancy Analysis를 진행하였을 때, 복숭아 수지증의 유무에 따라서 Healthy와 Unhealthy로 극명하게 나뉘는 것을 확인 할 수 있음

2-5. 병변 발생 목질부 진균 분석

- Chao1, ACE, Shannon, Fisher' s alpha, Simpson' s index, Richness, 에서 전반적으로 수지증 발생부위 목질 내생균 군집의 alpha diversity가 증가하나, 통계적으로 유의미한 차이는 없었음
- Evenness에서, 수지증 발생부위 목질 내생진균 군집은 정상 목질 내생균 군집에 비해 상대적으로 덜 균일하다고 분석됨.

2-6. 복숭아나무에서 나오는 수지액의 진균 군집 분석

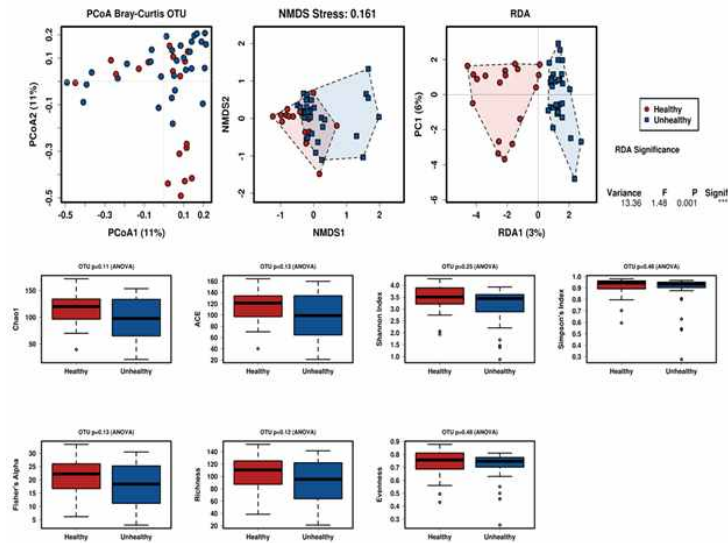


그림 16 복숭아나무 토양의 진균 Diversity Index 분석

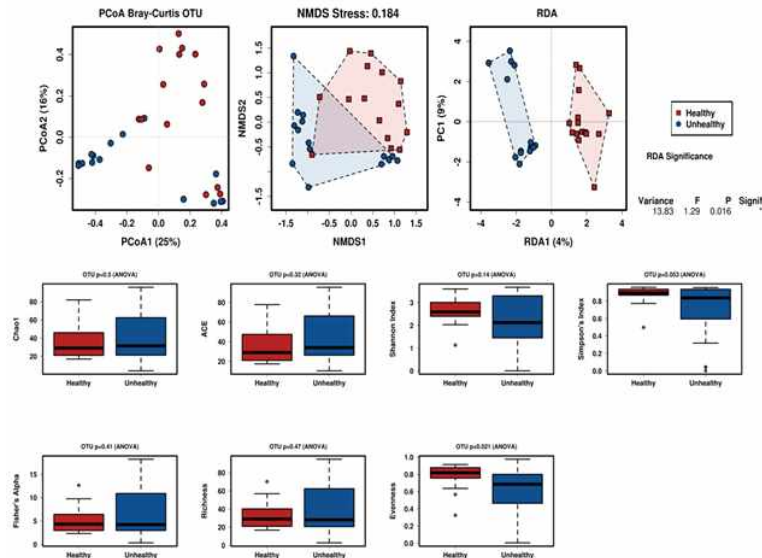


그림 17 복숭아나무 토양의 진균 Diversity Index 분석

- 세균의 공통된 군집분석결과와 마찬가지로 진균의 공통된 군집을 비교하였을 때, 특이적으로 공통적으로 *Cytospora* genus가 존재하는 것을 확인하였으며, 이 진균은 식물에서 *cytospora* canker 질병을 유발하며 상처가 생긴 나무의 조직으로 침투하여 canker 병과 수지를 유발하는 것으로 알려져 있음.
- 또한 복숭아 수지를 유발한다고 알려진 *Botryosphaeria*속이 채집된 복숭아나무의 표피에서만 발견되는 것으로 보아 상처가 생긴 복숭아나무 표피에 *Botryosphaeria*속이 감염됨에 따라 수지를 생산하는 것으로 예상됨.

2-7. 복숭아나무에서 나오는 수지액의 진균 군집 분석

- 선형 차별분석(LEfSe, Linear discriminant analysis Effect Size)을 통하여 통계적 유의성에 대한 표준 분석 및 분류별 차이를 설명할 수 있는 가능성이 가장 큰 생물체 결정
 - LEfSe 결과, 연구결과 및 동정이 되어있지 않은 3개의 taxa외, 병변 발생 복숭아 근권에서 관찰되는 7종의 Genus 확인.



Taxa	Bark abundance	Resin abundance	Taxa	Bark abundance	Resin abundance
Unclassified	15.785	11.65	Zasmidium	1.18	0.384
Fusarium	8.533	22.269	Alternaria	0.615	1.633
Cladosporium	1.713	7.831	Minutiella	0.356	1.175
Wickerhamomyces	6.176	15.48	Aureobasidium	0.259	0.769
Cytospora	20.644	1.402	Exophiala	0.111	0.22
Unidentified	1.61	5.085	Papiliotrema	0.143	7.965
Oidiodendron	6.959	4.159	Collophora	15.631	3.491
Cystobasidium	0.57	4.421			

그림 18 복숭아 수지와 수지생산 표피 유래 진균의 Core microbiome

- Sphingomonas sp, Microvirga sp, Methylobacterium sp., Nocardioides sp., Nakamurella sp., Flavisolibacter sp., Abditibacterium sp. 등의 Genus 등이 정상부에 비해 병변부 근권에서 탐색될 확률이 높은 것으로 분석됨.
- 토양 근권 세균 분석을 바탕으로 복숭아 수지증 발생에 영향을 주는 균 선발
- LEfSe 결과 선별된 균의 anova를 통하여 병변부에 유의미하게 더 많은 균들을 분석

LEfSe

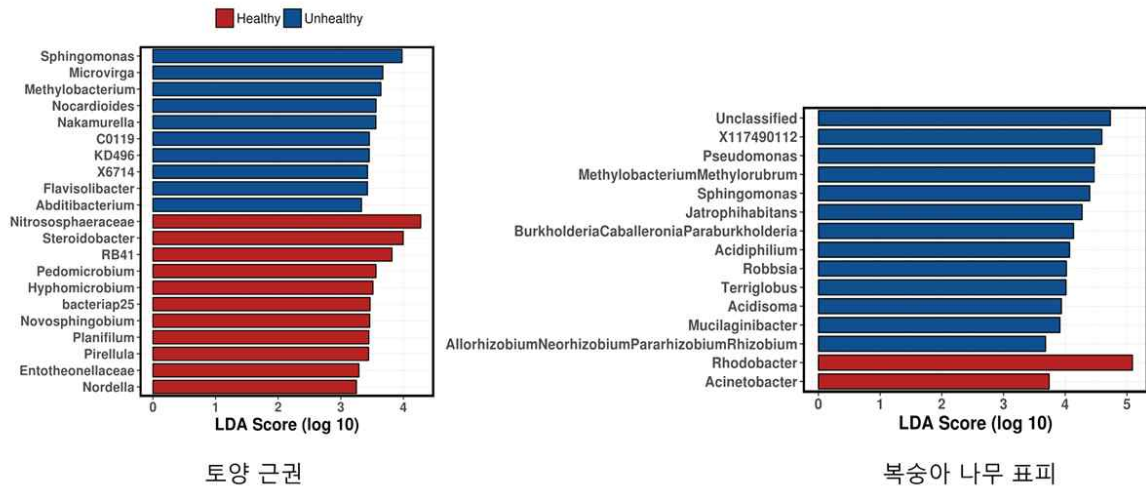


그림 19 LEfSe 분석을 통한 생리학적 발생원에 대한 예측

○ 복숭아 수지증의 병리학적 생리학적 발생원인 구명 및 효능 검증

- 선별된 길항미생물의 전장 유전체 분석 결과를 생리학적 특성을 서열 정보 수준에서 해석
 - 분리된 *Bacillus amyloliquefaciens* DH01균주를 LB agar 및 Nutrient agar 배지에서 희석도말하여 30°C 에서 16시간 배양하였다.
 - 배양된 agar 배지의 colony를 5mL LB broth에 접종하여 30°C 에서 12시간 진탕배양을 통해 Genomic DNA를 추출하기 위한 전배양을 실시하였음.
 - 전배양이 완료된 길항미생물은 50mL의 동일배지에 접종하여 30°C 에서 진탕배양을 실시하였음.
 - *Bacillus amyloliquefaciens* DH01은 Gram-positive 미생물로 peptidoglycan 층이 두겹기 때문에, 생육곡선상 Early exponential phase에 해당하는 3시간때 OD600=1.0 일때의 bacterial cell을 전장유전체 회수를 위해 harvest 하였음.

- 분리된 길항미생물 균주의 분자생물학적 분석을 위해 길항미생물의 genomic DNA를 추출하였다. Full-culture 된 배양액 5ml을 20°C, 12,000 rcf에서 5분간 원심분리하여 cell down후 균체를 회수하였다.
- 균체 회수 후 Promega DNA extraction Kit을 이용하여 DNA를 추출하였다.
- 추출된 DNA는 Oxford Nanopore Sequencing 장비를 이용하여 전장유전체 염기서열을 분석하였으며 Guppy software를 활용한 Basecalling을 실시하였으며, Quality check을 위해 EPI2ME를 사용하였음
- 최종적으로 조립된 전장유전체는 PGAP과 RAST system을 활용하여 Annotation을 진행함

Organism Overview for *Bacillus amyloliquefaciens* (1390.784)

Genome	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Taxonomy ID: 1390)	For each genome we offer a wide set of information to browse, compare and download.
Domain	Bacteria	
Taxonomy	Bacteria; Terrabacteria group; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus subtilis group; Bacillus amyloliquefaciens group; Bacillus amyloliquefaciens	Browse Compare Download Annotate Browse through the features of Bacillus amyloliquefaciens both graphically and through a table. Both allow quick navigation and filtering for features of your interest. Each feature is linked to its own detail page. Click here to get to the Genome Browser
Neighbors	View closest neighbors	
Size	3,958,462	
GC Content	46.6	
L50	1	
Number of Contigs (with PEGs)	1	
Number of Subsystems	328	
Number of Coding Sequences	4249	
Number of RNAs	113	

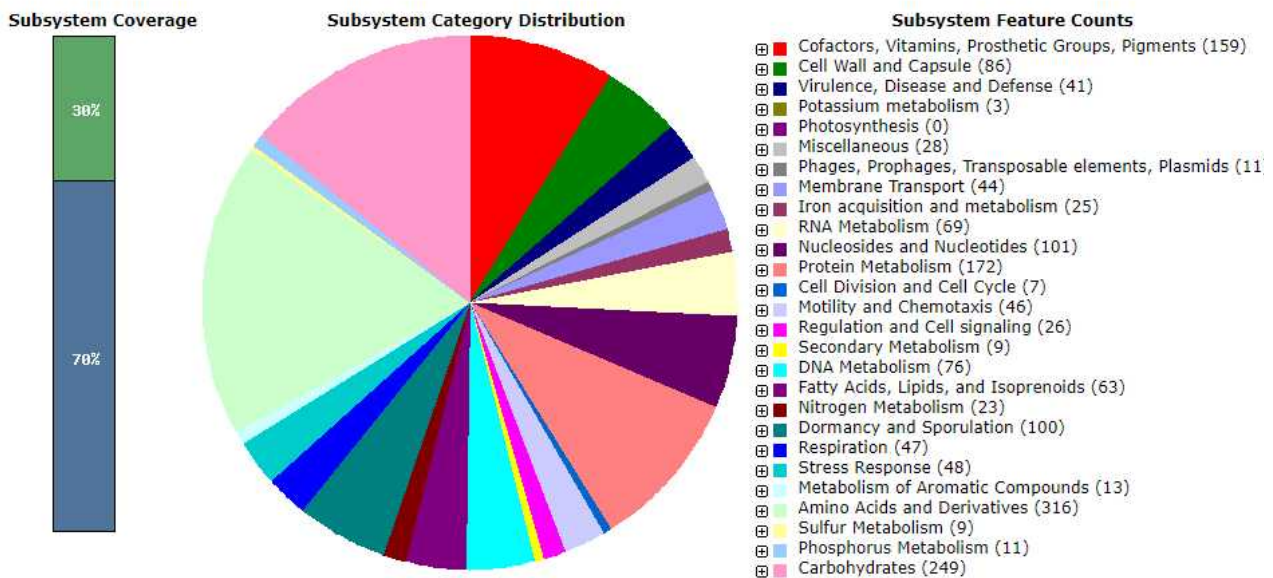


그림 20 RAST 분석을 통한 *Bacillus amyloliquefaciens* DH01의 annotation 정보

- 조립된 염기 서열의 유전체 정보 annotation을 통한 유전자 해석
 - NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)을 이용한 gene annotation을 진행하였음.
 - Assembly 및 Annotation 결과 약 3.9 Mbp의 유전체를 보유하는 것으로 확인되었으며, 46.6%의 GC contents, 4249개의 coding sequence를 보유하는 것을 확인하였음.
 - 확보된 *Bacillus amyloliquefaciens* DH01균주는 Amino acids and derivatives,

carbohydrates, cofactors, vitamins, prosthetic groups, pigments, protein metabolism, nucleosides and nucleotides와 같이 Central dogma에 관련되거나 Bacterial cell의 energy대사에 관련된 유전자들이 주로 존재하였음.

- I path tool3등을 활용하여 균주 자체의 전체적인 metabolism map을 확보하였음. 본 map을 활용하여 비교유전체 및 pan-genomics를 실시하여 진균에 대해 길항능을 가질 수 있는 특이적인 유전자를 탐색할 수 있을것이라 예상함(그림).

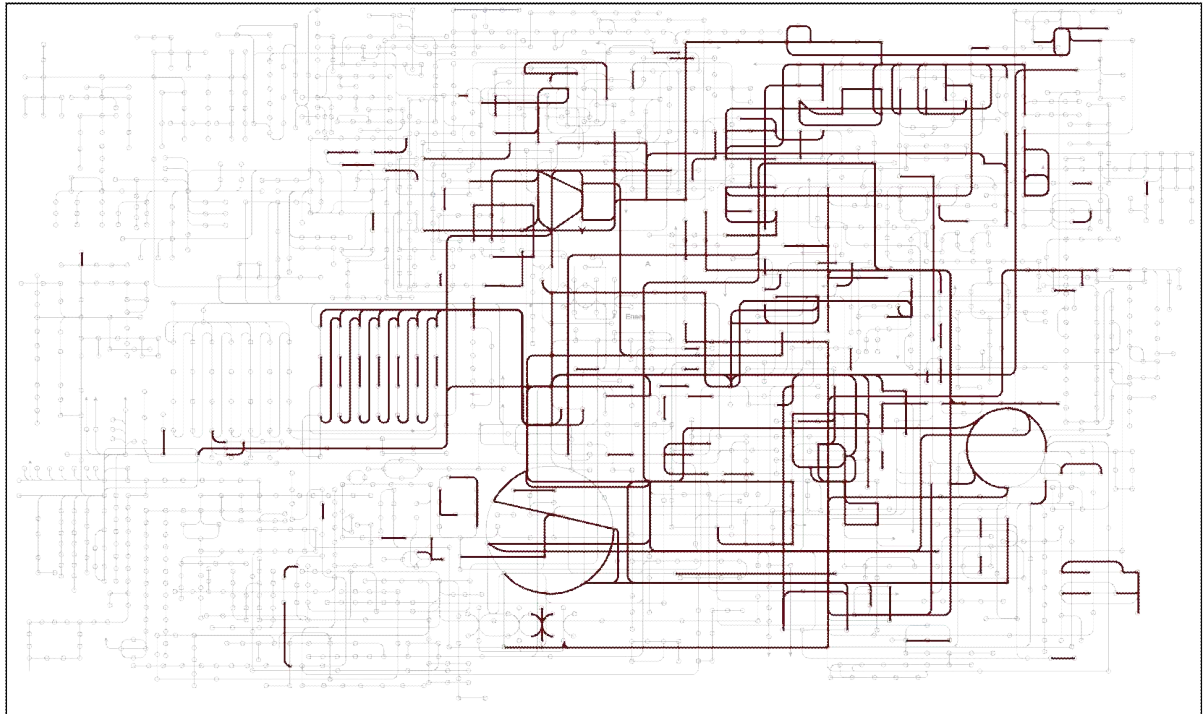


그림 21 I path tool 3를 활용한 *Bacillus amyloliquefaciens* DH01의 metabolism map

- Whole genome sequencing이 완료된 *Bacillus amyloliquefaciens* DH01 균주의 근연관계를 확인하기 위해 NCBI에서 확보된 *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 type strain을 이용하여 EzTaxon을 활용하여 Average Nucleotide Identity를 확인하였음.
- ANI 결과 99.35%로 *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 균주와 높은 상동성을 보이는 것을 확인 할 수 있음(표 2)

표2. *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 표준균주와의 Average Nucleotide Identity analysis

Metric	Value
OrthoANLu value (%)	99.35
DH01 length (bp)	3,957,600
DSM7 length (bp)	4,025,940
Average aligned length (bp)	2,844,346
DH01 coverage (%)	71.87
DSM7 coverage (%)	70.65

- 기능성 유전자를 이용한 분리 균주의 특이적 유전자를 선별하여 미생물의 특성을 예측 및 기능성 유전자의 아미노산 서열을 이용한 아미노산 서열 기반 독소 유사 단백질을

예측하기 위해 Clantox를 이용하여 독소 유사 단백질을 확인하였음

- 총 18개의 Probably toxin-like (0.4%) 단백질을 확인하였으나, 모두 hypothetical protein으로 identification 되어 기능을 알 수 없는 유전자 인 것으로 확인됨(그림 22)

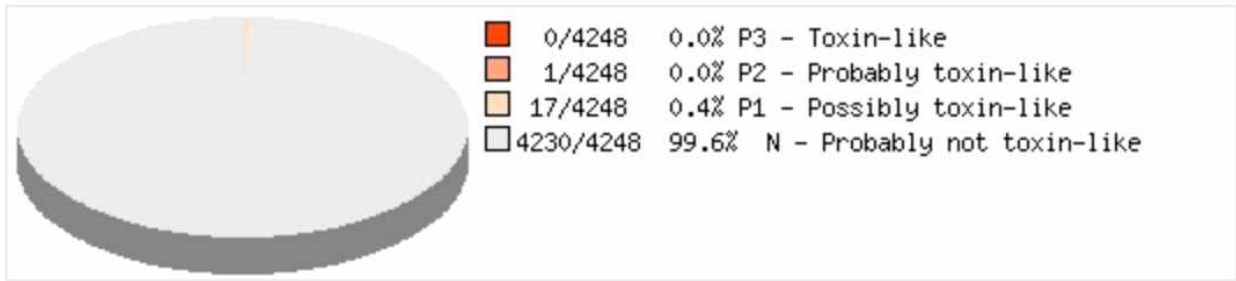


그림 22 Clan Tox 결과를 통해 확인된 비병원성 길항세균

○ 복숭아 수지증의 병리학적 발생원의 친환경 방제 체계 연구

- 선발 길항미생물 및 복숭아 수지 병원균의 형태학적인 특징과 구조적 차이를 확인함으로써 미세 형태학적 자료 정보를 확보할 수 있으며, 복숭아 수지 병원균 관련 면역체계 개발을 위한 이해와 기초자료를 확보
- *Bacillus amyloliquefaciens* DH01 균주의 성장곡선과 Auxin 생산능을 그리고 질소대사에 관련된 PGP(Plant Growth Promotion) 표현형을 확인하여 식물 성장촉진에 관련된 유전자 집단을 확인함(그림 23).

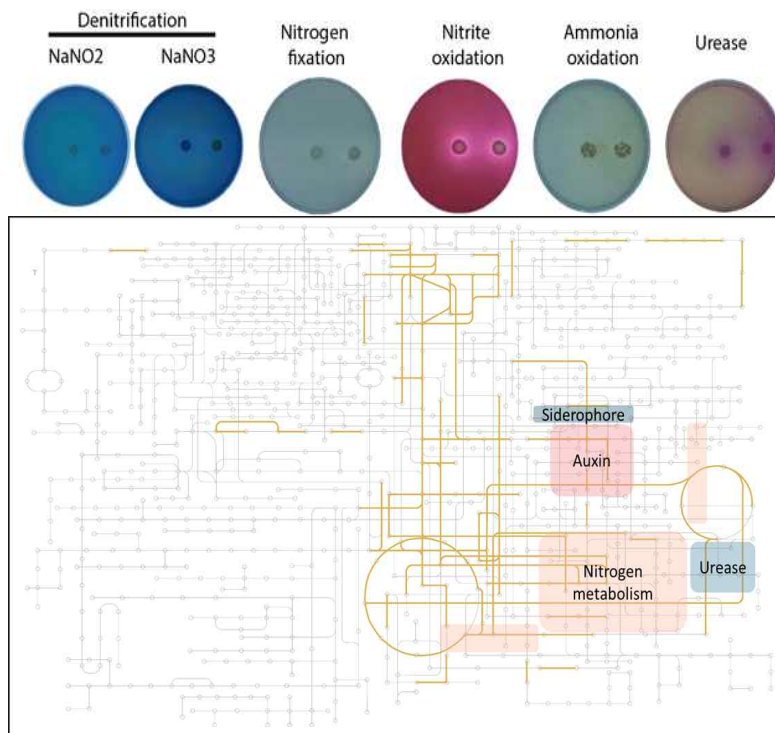


그림 23 *Bacillus amyloliquefaciens* DH01의 PGP 활성 및 유전체 level에서의 pathway 확인

- *Bacillus amyloliquefaciens* DH01 균주는 Siderophore생산, Chitinase생산, 그리고 Mycobacterium virulence operon을 보유하고 있어 항진균활성을 보이는 것으로 판단되며 해당균주가 보이는 항진균활성 표현형을 확인한 선행연구의 결과에 부합됨



그림 24 수지증 유발 진균과의 항진균활성 표현형 확인

○ 복숭아 수지증 제어를 위한 식물·미생물 유래 친환경 제제 연구

- *Beauveria bassiana* 균주를 활용한 총피해 및 복숭아 수지 생성에 물리적 방제 체계 연구
 - 복숭아 수지증은 동해, 일소 등 다양한 요인에 의해 물리적인 상처가 생기며, 이를 통해 미생물의 감염을 통해 복숭아의 수지가 생성됨.



그림 25 총피해로 생긴 상처에 감염된 복숭아나무

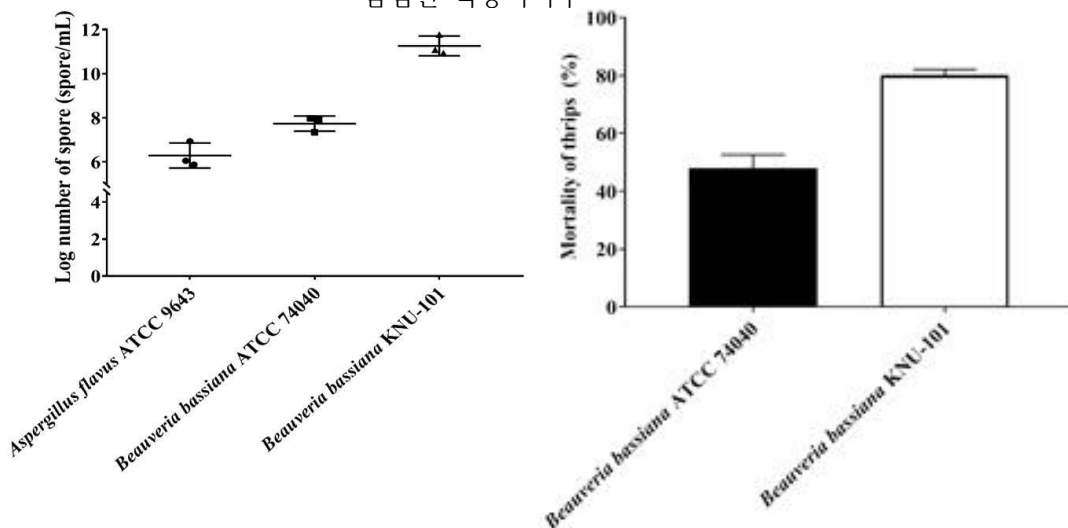


그림 26 *Beauveria bassiana* 균주의 포자생성능과 살충능

- *Beauveria bassiana*는 대표적인 곤충 병원성 진균으로 알려져 있으며 포자가 곤충의 왁스 층을 분해하면서 곤충을 탈수시켜 사멸에 이르게 하고 이들의 사체를 영양분 삼아 다음 세대를 이어나가는 것으로 알려져 있음
- 이러한 이유로 곤충에 대한 경구 및 접촉 독성이 모두 유효하며 다양한 곤충 숙주에 감염이 가능하다는 것이 알려져 있음

- 따라서 본 연구실에서는 산업화를 위해 우수한 살충력을 보임과 동시에 대량의 포자를 생산할 수 있는 두가지 요건을 모두 가지는 진균을 선발하여 보유하고 있음
- *Beauveria bassiana* KNU101 균주는 곤충 병원성을 가지고 농작물에 해를 끼치는 토양 해충인 총채 벌레 방제에 탁월한 살충효과를 가지고 있으며, 포자 생산력 또한 우수하므로, 친환경적 해충 방제 수단으로 유용하게 활용될 것이라 예상함
- 또한 기존에 보고된 *Beauveria bassiana* 균주와의 총채벌레에 대한 mortality를 비교하였을 때 약 20% 이상 더 높은 살충력을 보유하는 것을 확인함(그림 26)

■ 경북대학교, 김원찬 교수 연구실

○ 복숭아 수지 병원균 분리 및 특성 조사

- 복숭아 수지 병변에서의 시료를 채취하여 실험실 수준에서 배양 가능한 병원균을 선별
 - 복숭아 수지 병변에서의 시료를 채취하여 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에서 획선도말(streaking)하여 25°C 에서 28 시간 생육하였다 (그림 27).
 - 다양한 종의 균의 colony를 분리한 후 새로운 PDA 배지에 생육하여 균주를 분리하였다.

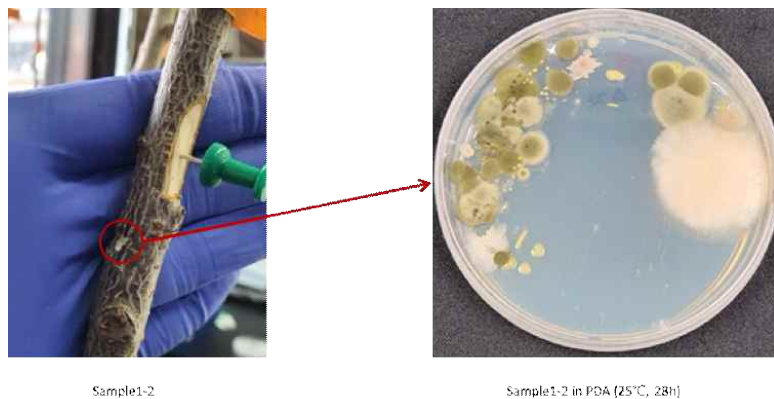


그림 27 복숭아 수지 병변을 획선도말하여 생육한 PDA 배지

- 복숭아 수지 유발 후보 병원균들의 DNA를 추출하여 ITS1 (5' -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) / ITS4 (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 프라이머를 이용하여 Internal transcribed spacer (ITS) 영역을 PCR을 이용하여 증폭
 - single isolation된 균주는 Phenol / Chloroform DNA extraction 방법을 통해 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다.
 - 추출된 gDNA는 곰팡이를 동정하기에 효율적으로 사용되는 ITS 영역을 증폭할 수 있는 ITS1과 ITS4의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다 (표 3).
 - PCR 수행을 위한 혼합물에는 1 U PrimeSTAR^R HS DNA Polymerase (Takara), 10 mM dNTP Mixture (Takara), 60 ng genomic DNA 및 0.5 μ M 프라이머가 포함되어 있다.
 - PCR은 98°C 에서 5분 preheating 한 후 98°C 에서 30초, 52°C 에서 10초, 72°C 에서 1분의 단계를 32 cycles 반복하여 수행하였다.
 - Sample 1, Sample 2, 그리고 Sample 3에는 각각 gDNA를 template로 사용하였으며, Negative는 gDNA 대신 물을 넣어 프라이머의 거짓 양성(false positive)를 확인하였다.

표 3. ITS 프라이머 목록

Name	Primer	Primer sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	60.7	536
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	54.1	

- 증폭된 PCR product는 Expin™ Combo GP mini (GeneAll)를 통해 정제하여 1% Agarose gel에 전기영동하여 예상 PCR product size인 536 bp 부근에서 PCR product가 존재하는 것을 확인하였다 (그림 28).

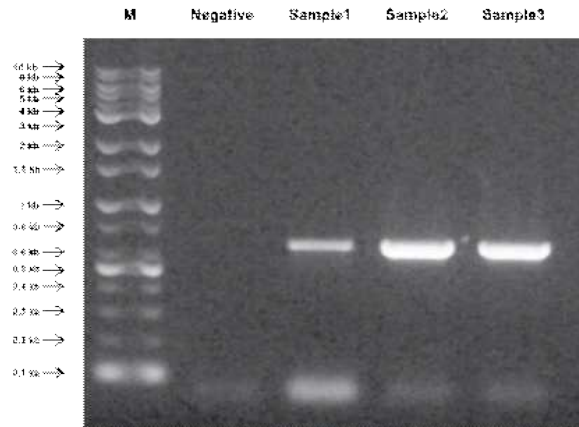


그림 28 ITS 영역이 증폭된 PCR product

- 증폭된 PCR product를 sequencing하여 서열을 확보 및 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 blast를 이용하여 동정
 - 정제된 PCR product는 Macrogen 사의 Sanger sequencing을 통해 염기서열 분석을 실시하였다.
 - Macrogen 사의 Sanger sequencing 결과를 토대로 NCBI의 blast를 이용하여 각 균주의 계통 분석 (Phylogenetic analysis)를 수행하였다 (그림 29).
 - 계통 분석 결과, 복숭아 수지 병원균으로 알려진 *Botryosphaeria dothidea* 뿐 아니라 빵나무 눈마름병을 유발하는 식물 병원균인 *Fusarium lateritium*이 동정되었다.

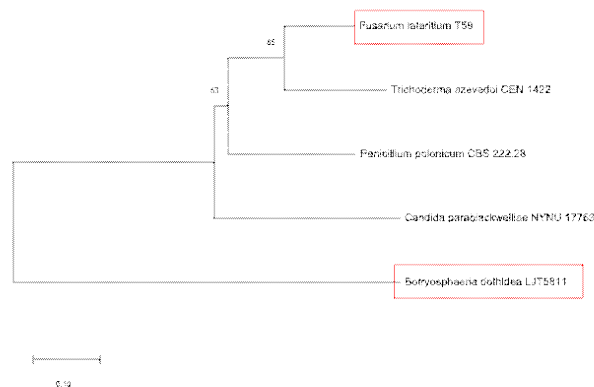


그림 29 복숭아 수지 유발 후보균의 계통 분석

- 선별된 복숭아 수지 병원균인 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 특이적인 프라이머를 제작 및 *Botryosphaeria dothidea*의 gDNA를 주형으로 한 PCR을 통한 특이적인 프라이머 성능 확인
 - 복숭아 수지 병원균인 *Botryosphaeria dothidea*를 복숭아에 감염 후 추적 또는 복숭아

- 수지 감염 biomarker로서의 진단을 위한 특이적인 프라이머 제작을 수행하였다.
- 기존 NCBI database 내에서 *Botryosphaeria dothidea*의 해독된 전장 유전체(Whole genome)을 이용하여 *Botryosphaeria dothidea*에 특이적으로 선별할 수 있는 β -tubulin 영역을 선정하였다.
 - 선정된 β -tubulin 영역을 기준으로 특이적인 primer를 Bioneer 사를 통해 제작하였다 (표 4).

표 4. *Botryosphaeria dothidea*에 특이적인 β -tubulin 프라이머 목록

Name	Primer	Primer sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
β -tubulin	FaF	CAT CCG CAG CGT GGG AGA ACA T	64.4	322
	Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	65.0	

- 특이적인 β -tubulin 프라이머가 *Botryosphaeria dothidea*를 특이적으로 선별할 수 있는지 확인 하기 위하여 *Fusarium lateritium*과 비교하여 프라이머 성능을 확인하였다.
- 각각의 *Botryosphaeria dothidea*와 *Fusarium lateritium*의 gDNA를 추출하기 위하여 Phenol / Chloroform DNA extraction 방법을 통해 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다 (그림 30).

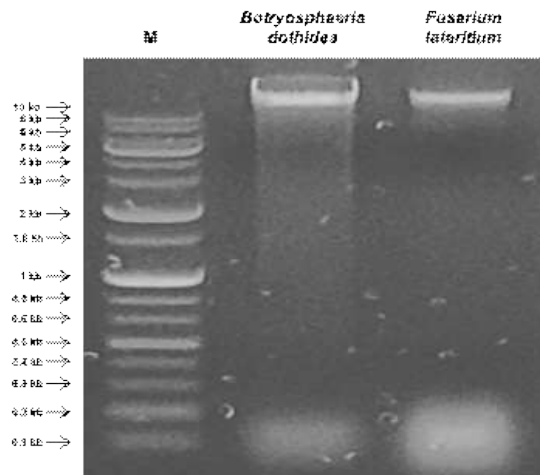


그림 30 *Botryosphaeria dothidea*와 *Fusarium lateritium*의 gDNA

- 추출된 각각의 gDNA를 template로 사용하여 특이적인 β -tubulin 프라이머 및 ITS 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.
- PCR 수행을 위한 혼합물에는 1 U PrimeSTARR HS DNA Polymerase (Takara), 10 mM dNTP Mixture (Takara), 60 ng genomic DNA 및 0.5 μ M 프라이머가 포함되어 있다.
- PCR은 98°C 에서 5분 preheating 한 후 98°C 에서 30초, 60°C (β -tubulin), 52°C (ITS)에서 10초, 72°C 에서 1분의 단계를 32 cycles 반복하여 수행하였다.
- *Botryosphaeria dothidea*와 *Fusarium lateritium*의 gDNA를 template로 사용하여 곰팡이의 동정을 위한 ITS 프라이머로 PCR을 수행한 반응에서는 두 template에서 정상적으로 예상 PCR product size인 522 bp가 증폭된 것을 확인하였다.
- 각각의 예상대로 *Botryosphaeria dothidea*의 gDNA를 template로 사용한 PCR product는 예상 size인 322 bp 부근에서 PCR product가 존재하는 것을 확인하였으며

- Fusarium lateritium에서는 PCR product가 증폭되지 않는 것을 확인하였다 (그림 31).
- 이는 제작한 특이적인 β -tubulin 프라이머가 Botryosphaeria dothidea에 특이적으로 증폭됨을 확인할 수 있다.

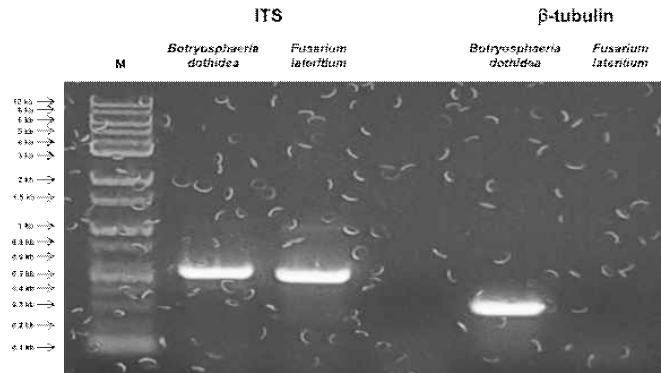


그림 31 특이적인 β -tubulin 프라이머의 성능 확인

○ 항균활성 기반 복숭아 수지증의 방제용 길항미생물 탐색 및 동정

- 복숭아 수지 병원균으로 알려진 줄기썩음병균인 Botryosphaeria dothidea에 대한 선발 길항미생물의 군사생육억제 정도를 통한 1차 생물검정 실시 및 신규로 선별된 다양한 복숭아 수지 병원균에 대한 군사생육억제 정도를 통한 2차 생물검정을 실시하여 복합적인 복숭아 수지증에 대한 다방면적인 효과를 가지는 길항미생물 선별
 - Botryosphaeria dothidea에 대한 길항 미생물을 선별하기 위하여 복숭아 수지 병변, 복숭아 나무 잎, 복숭아 나무의 흙, 복숭아 나무 침출수를 PDA 배지에서 희석도말하여 25°C, 37°C 에서 18 시간 생육하였다.
 - 각각 부위에서 분리된 미생물은 단일 colony를 분리한 후 새로운 PDA 배지에 생육하여 각 샘플별 4 종류의 균주를 분리하였다.
 - PDA 배지에 키운 각 샘플별 4가지 종류의 단일 균주를 Botryosphaeria dothidea에 대한 군사생육억제 정도를 확인하기 위한 antagonist test를 수행하였다 (그림 32).
 - 이에, 복숭아 수지 병변에서 분리한 균주(1-4)와 복숭아 나무의 흙에서 분리한 균주(4-1), 그리고 복숭아 나무의 침출수에서 분리한 균주(5-1)에서 Botryosphaeria dothidea에 잠재적인 길항능을 가지고 있는 것으로 확인되었다.
 - 이 중 가장 길항능이 높아 보이는 4-1 균주를 선별하여 추가적인 실험에 사용하였다.

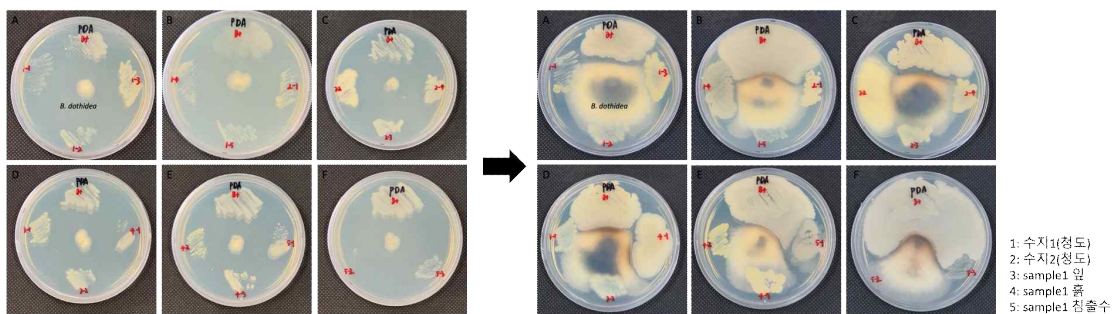


그림 32 Botryosphaeria dothidea에 대한 각 샘플에서 분리된 균주의 antagonist test

- 추가적으로 이전에 분리되었던 잎 곰팡이병의 길항 미생물인 Bacillus amyloliquefaciens와 곤충병원성 곰팡이인 Beauveria bassiana에 대한 Botryosphaeria dothidea의 군사생육억제 정도를 확인하였다 (그림 33).
- 결과적으로, Bacillus amyloliquefaciens에서만 Botryosphaeria dothidea에 대한 길항능을 가지고 있음을 확인하였다.

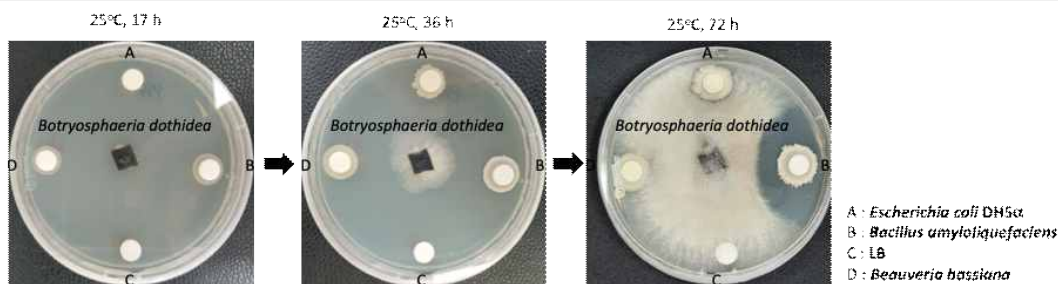


그림 33 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 *Bacillus amyloliquefaciens* 및 *Beauveria bassiana*의 antagonist test

- 다양한 복숭아 수지 병원균에 다방면적인 항균활성을 지니는 길항미생물의 분자생물학적 동정을 위해 길항미생물의 DNA를 추출하여, 785f (5' -GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3') / 907r (5' -CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3')의 프라이머 이용하여 16S rRNA의 variable region V5을 PCR을 이용하여 증폭
 - 25% (v/v) glycerol에 저장된 4-1 균주를 Luria-Bertani (LB)에 접종하여 37°C 에서 18 시간 동안 진탕배양하였다(180 rpm).
 - 4-1 균주의 gDNA를 추출하기 위하여 배양 완료된 배양액 3 mL을 4°C, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여균체를 회수하였다. 1 mL의 NaCl-EDTA buffer (30 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0)를 이용하여 회수한 균체를 3회 씻어준 후, 100 μL의 동일 buffer에 균체를 현탁하였다. 이후 현탁액에 100 μL lysozyme solution (10 mg/mL in NaCl-EDTA)를 첨가하여 37°C 에서 1시간동안 반응을 수행하였다. 반응 후 300 μL 의 NaCl-EDTA buffer, 50 μL 10% (w/v) SDS 및 10 μL proteinase K solution (20 mg/mL)을 첨가하여 55°C 에서 1시간동안 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 용액에 phenol-chloroformmixture (1:1)을 동일한 부피로 첨가한 후, 22°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액에 sodium acetate buffer (pH 5.2, 0.3 M) 및 isopropanol (0.8 x)을 첨가하여, 4°C, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리를 수행하였다. 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척 후 공기 건조하여 HPLC water 50 mL에 용해시키고, 추가 분석이 이루어질 때까지 -20°C 에서 보관하였다. 추출된 gDNA을 확인하기 위해 1.5% (w/v) agarose gel에서 전기영동을 수행하였다 (그림 34).

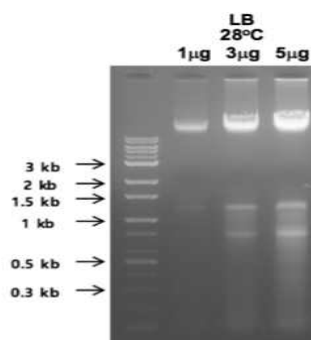


그림 34 4-1균주의gDNA

- 추출된 gDNA는 미생물을 동정하기에 효율적으로 사용되는 16S rRNA의 전체 영역을 증폭할 수 있는 8f (5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') / 1492r (5' -CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3')의 프라이머 이용하여 PCR을 수행하였다 (표 5).

표 5. 16S rRNA 프라이머 목록

Name	Primer	Primer sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
16S	8f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	56.0	1492
rRNA	1492r	CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT	54.5	

- PCR 수행을 위한 혼합물에는 1 U PrimeSTAR^R HS DNA Polymerase (Takara), 10 mM dNTP Mixture (Takara), 60 ng genomic DNA 및 0.5 μM 프라이머가 포함되어 있다.
- PCR은 98°C 에서 5분 preheating 한 후 98°C 에서 30초, 53°C 에서 10초, 72°C 에서 1분 의 단계를 32 cycles 반복하여 수행하였다.
- 4-1에는 추출된 gDNA를 template로 사용하였으며, Negative는 gDNA 대신 물을 넣어 프라이머의 거짓 양성(false positive)를 확인하였다.
- 증폭된 PCR product는 ExpinTM Combo GP mini (GeneAll)를 통해 정제하여 1% Agarose gel에 전기영동하여 예상 PCR product size인 1500 bp 부근에서 PCR product 가 존재하는 것을 확인하였다 (그림 35).

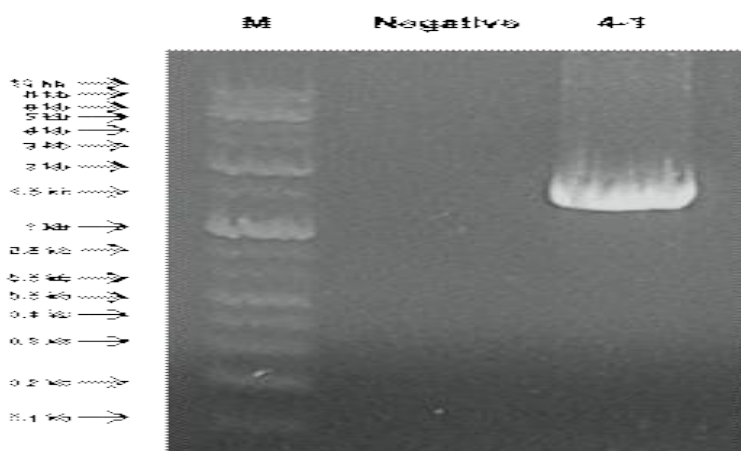


그림 35 16S rRNA 영역이 증폭된 PCR product

- 증폭된 PCR product를 sequencing하여 서열을 확보 및 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 blast를 이용하여 동정
 - 정제된 PCR product는 Macrogen 사의 Sanger sequencing을 통해 염기서열 분석을 실시하였다.
 - 이때, 동정을 위해 사용한 프라이머는 미생물을 동정하기에 효율적으로 사용되는 16S rRNA의 variable region V5 영역을 증폭할 수 있는 785f (5' -GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3') / 907r (5' -CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3')을 사용하였다 (표 6).

표 6. V5 영역을 증폭하는 프라이머 목록>

Name	Primer	Primer sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
V5	785f	GGA TTA GAT ACC CTG GTA	47.6	144-148
	907r	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	50.7	

- Macrogen 사의 Sanger sequencing 결과를 토대로 NCBI의 blast를 이용하여 균주의 계통 분석 (Phylogenetic analysis)를 수행하였다 (그림 36).

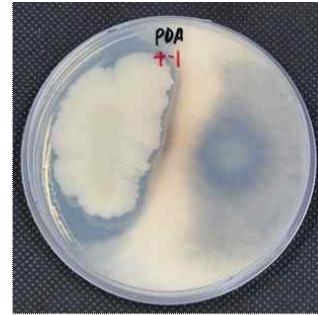
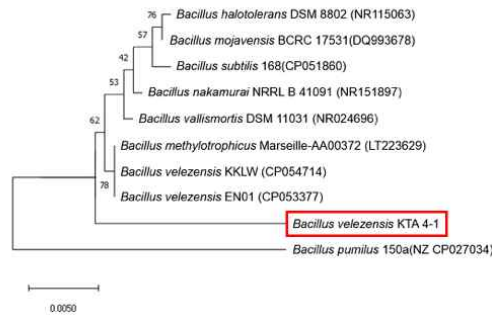


그림 36 복숭아 수지 유발균의 길항 미생물의 계통 분석

- 계통 분석 결과, *Bacillus velezensis*로 동정되어 새로운 균주로써 *Bacillus velezensis* KTA 4-1로 명명하였다.
- 선발 길항미생물의 이차 대사물질에 의한 *Botryosphaeria dothidea*의 생육 억제 효능 검증
 - *Bacillus amyloliquefaciens*의 이차 대사물질 생산을 위해 각 균주별 growth profiling 을 실시하였다 (그림 37).

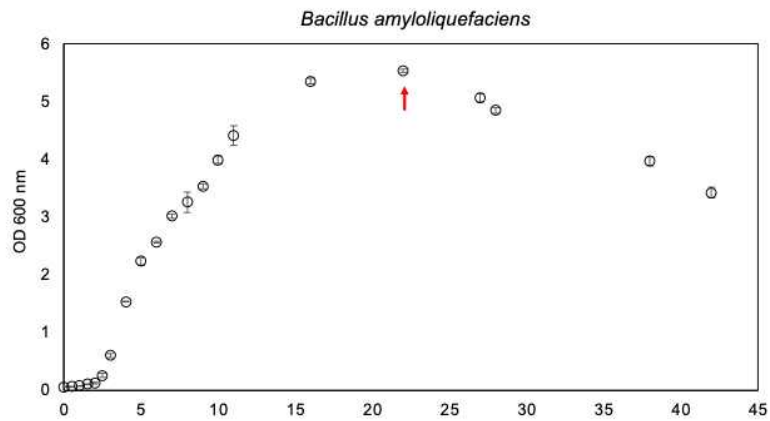
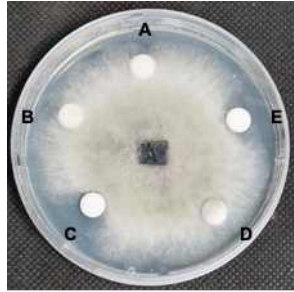


그림 37 *Bacillus amyloliquefaciens*의 생육 곡선 그래

- 이차 대사물질을 충분히 생산할 수 있는 정체기 (stationary phase) [그림 41에서 화살표를 표시한 phase]에서의 배양 상등액을 0.2 μ m membrane filter를 이용하여 여과하였다.
- 여과된 배양 상등액을 이용하여 *Bacillus velezensis* 및 *Bacillus amyloliquefaciens*가 생성하는 이차 대사물질이 *Botryosphaeria dothidea*에 생육 억제하는지 확인하기 위하여 antagonist test를 실시하였다 (그림 38).



A : LB
 B : *Escherichia coli* DH5α
 C : *Bacillus amyloliquefaciens*
 D : *Beauveria bassiana*
 E : *Bacillus velezensis* KTA 4-1

그림 38 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 *Bacillus amyloliquefaciens* 및 *Bacillus velezensis* KTA 4-1의 배양 상등액을 이용한 antagonist test

- 그 결과, negative control로 사용한 LB 배지, *Escherichia coli* DH5α, 그리고 *Beauveria bassiana*에서는 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 생육 억제능이 전혀 없는 것을 확인하였다.
- 특히, *Bacillus amyloliquefaciens* 및 *Bacillus velezensis* KTA 4-1의 경우에는 배양 상등액에서 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 생육 억제가 일어나는 것을 확인하였다.
- 이는 두 균주가 생산하는 이차 대사물질이 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 억제능을 가지는 것을 의미한다.

■ 공동연구기관_(주)대원화학

○ 지역별 복숭아 수지증 발생 실태 및 현황 조사

1) 지역별 복숭아 수지증 발생 실태 및 수지증 병반 시료 채취

본 연구과제에서 지역별 복숭아 수지증 발생 실태를 조사하기 위하여 복숭아가 재배되고 있는 각 지역을 방문하여 복숭아 과원을 조사하였다.

복숭아 수지증은 복숭아 나무 표피에 진물이 나는 현상으로 그림39과 같은 형태를 나타내며 그림39과 같은 현상이 나타나는 복숭아 나무를 수지증 발생 나무로 판정하였다.

복숭아 수지증 발병 유무는 그림39 과 같은 병반이 보이는 나무를 발생주로 판단했으며 복숭아 과원 전체 나무 중에서 수지증이 발생한 나무수를 세고 또한 발생한 각 나무에서 주지와 부주지를 나누어서 수지증 병반 발생수를 조사하였다.

현황 조사를 진행하면서 복숭아 수지증이 발생한 과원에서 복숭아 수지증 병반과 발생한 나무의 토양을 채취하여 주관연구기관인 경북대학교에 전달하였다(그림 40).





그림 39 복숭아 수지증 발병 양상



그림 40 복숭아 수지증 및 토양 시료 채취 사진

표 7. 지역별 복숭아 수지증 발생 현황 및 부위별 발생량

시도	재배 포장별 발생 현황			나무별 발생 현황		
	조사 포장수	발생 포장수	포장별 발생율*(%)	조사 나무수	발생 나무수	나무별 발생율**(%)
경북	121	81	66.9	9,002	2,440	27.1
전북	3	1	33.3	215	25	11.6
충북	6	6	100.0	324	296	91.4
합계	130	88	66.7	9,541	2,761	28.9

*:포장별 발생율(%)=(발생 포장수/조사포장수)×100

**:나무별 발생율(%)=(발생 나무수/조사 나무수)×100

본 현황 조사에서는 경북지역을 중심으로 하여 군위군, 의성군, 칠곡군, 영천시, 청도군, 김천시, 영덕군, 경산시 등 경상북도 121개소를 조사하였으며 타시도인 전라북도 3개소 및 충청북도 6개소에 대해서도 조사하였으며 그 결과를 표 7에 나타내었다.

경북지역의 경우 121개소 중에서 81개소에서 복숭아 수지증이 발생하여 66.9%의 포장별 발생율을 나타냈으며, 조사 대상인 9,002주 중에서 2,440주에서 복숭아 수지증이 발생했으며 복숭아 수지증 나무별 발생율은 27.1%로 조사되었다.

전북지역의 경우 조사한 과원 3곳 중에서 1곳에서 복숭아 수지증이 조사되어 33.3%의 포장 발생율을 나타냈으며 조사 대상인 215주 중에 25주에서 복숭아 수지증이 발생되어 11.6%의 나무별 발생율을 나타내었다. 충북지역의 경우 조사한 과원 6곳 중에서 6곳 모두에서 복숭아 수지증이 발생한 것으로 조사되었으며 조사대상인 324주 중에서 296주에서 수지증이 조사되어 91.4%의 나무별 발생율을 나타내었다.

전북지역과 충북지역의 경우에는 그 조사 대상이 많지 않았으며 추가적인 조사가 필요할 것으로 판단된다.

1-1) 경북 지역의 시군별 복숭아 수지증 발생 현황

경산시, 군위군, 김천시, 영덕군, 영천시, 의성군, 청도군 및 칠곡군 등 8개 시군, 121개소의 복숭아 과원에 대해 복숭아 수지증 발생 현황을 조사했으며 각 시군별 발생 현황을 표 8에 나타내었다.

본 현황 조사에서 경산시의 경우 조사 과원 12개소 중에서 9개소에 복숭아 수지증이 조사되어 75%의 포장별 발생율을 나타냈으며, 조사 대상인 1,193주 중에서 599주에서 복숭아 수지증이 관찰되어 50.2%의 나무별 발생율을 나타내었다.

각 지역의 포장별 수지증 발생율은 군위군의 경우 조사 대상인 7개 과원 중에서 5개소에서 수지증이 조사되어 71.4%, 김천시의 경우 2개소 중에서 1개소에서 수지증이 조사되어 50%, 영덕군의 경우 12개소 중에서 12개소에서 수지증이 조사되어 100%, 영천시의 경우 25개소 중에서 13개소에서 수지증이 조사되어 52%, 의성군의 경우 22개소 중에서 12개소에서 수지증이 조사되어 54.5%, 청도군의 경우 37개소 중에서 25개소에서 수지증이 조사되어 67.6%, 칠곡군의 경우 4개소 중에서 4개소에서 복숭아 수지증이 발생하여 100%로 조사되었다.

경북 지역의 포장별 복숭아 수지증 발생율은 50%~100%로 조사되었으며 영덕군, 칠곡군 및 경산시에서 75%이상으로 복숭아 수지증 발생율이 높게 조사되었다(표 8).

표 8의 복숭아 수지증 발생 현황 조사에서 각 복숭아 나무별 복숭아 수지증 발생 현황을 보면 경산시의 경우 조사 나무수 1,193주 중에 599주에 수지증이 발생했으며 나무별 발생율은 50.2%로 조사되었다.

표8. 경북 시군별 복숭아 수지증 발생 현황

시도	재배 포장별 발생 현황			나무별 발생 현황		
	조사 포장수	발생 포장수	포장별 발생율*(%)	조사 나무수	발생 나무수	나무별 발생율**(%)
경산시	12	9	75.0	1,193	599	50.2
군위군	7	5	71.4	266	66	24.8
김천시	2	1	50.0	68	38	55.9
영덕군	12	12	100.0	1,209	851	70.4
영천시	25	13	52.0	2,145	205	9.6
의성군	22	12	54.5	1,597	264	16.5
청도군	37	25	67.6	2,353	305	13.0
칠곡군	4	4	100	171	112	65.5
합계	121	81	66.9	9,002	2,440	27.1

*:포장별 발생율(%)=(발생 포장수/조사포장수)×100

**:나무별 발생율(%)=(발생 나무수/조사 나무수)×100

군위군의 경우 조사대상인 266주 중에서 66주에 수지증이 발생하여 24.8%, 김천시의 경우 조사대상인 68주 중에서 38주에서 수지증이 발생하여 55.9%, 영덕군의 경우 조사대상인 1,209주 중에서 851주에서 수지증이 발생하여 70.4%, 영천시의 경우 조사대상인 2,145주 중에서 205주에서 수지증이 발생하여 9.6%, 의성군의 경우 조사대상인 1,597주 중에서 264주에서 수지증이 발생하여 16.5%, 청도군의 경우 조사대상인 2,353주 중에서 305주에서 수지증이 발생하여 13.0%, 칠곡군의 경우 조사대상인 171주 중에서 112주에서 복숭아 수지증이 발생하여 65.5%로 조사되었다.

경북 지역의 복숭아 수지증 발생율은 최저 9.6%에서 70.4%로 조사되었다.

본 현황 조사에서 복숭아 과원별 수지증 발생율은 영덕군/칠곡군>경산시>군위군>청도군>의성군>영천시>김천시 순으로 높게 조사되었으며 복숭아 나무별 수지증 발생율은 영덕군>칠곡군>김천시>경산시>군위군>의성군>청도군>영천시 순으로 발생율이 높은 것으로 조사되었다(표 8).

본 연구 과제의 지역별 복숭아 수지증 현황 조사에서 지역적인 특이점은 없는 것으로 조사되었다. 다만 경북 지역의 복숭아 주산지로 알려져 있는 청도 지역의 복숭아 나무별 수지증 발생율이 13%로 타시도에 비해 낮은 것으로 조사되었다.

2) 복숭아 수세 및 수령에 따른 복숭아 수지증 발생 현황 조사

2-1) 수령에 따른 포장별 및 나무별 복숭아 수지증 발생 현황

복숭아 수지증 현황 조사에서 복숭아 수세에 따른 복숭아 수지증 발생 현황을 조사하기

위하여 복숭아 나무의 수령을 10년을 기준으로 10년 미만과 10년 이상으로 나누어 수지증 발생 현황을 조사하였다(표 9).

조사 대상 과원 130개 중에서 수령이 10년 미만은 31개소, 10년 이상은 99개소이며 수령이 10년 미만인 경우에는 19개소에서 복숭아 수지증이 발생하여 61.3%의 포장별 수지증 발생율을 나타냈으며 10년 이상인 경우에는 69개소에서 수지증이 발생하여 69.7%의 포장별 수지증 발생율을 나타내었다.

복숭아 포장별 수지증 발생율에서는 10년 이상과 10년 미만 수령에서 약 8%정도 10년 이상인 복숭아 나무에서 수지증 발생율이 높게 조사되었다.

또한 복숭아 나무별 수지증 발생율은 수령이 10년 미만인 복숭아 나무 2,093주 중에서 453주에서 수지증이 발생하여 21.6%, 10년 이상인 복숭아 나무 7,448주 중에서 2,308주에서 수지증이 발생하여 31%로 조사되었으며 수령이 10년 이상인 복숭아 나무에서 약 10% 정도 높게 조사되었다.

표 9. 복숭아 수세 및 수령별 복숭아 수지증 발생량

수령	재배 포장별 발생 현황			나무별 발생 현황		
	조사 포장수	발생 포장수	포장별 발생율*(%)	조사 나무수	발생 나무수	나무별 발생율**(%)
10년 미만	31	19	61.3	2,093	453	21.6
10년 이상	99	69	69.7	7,448	2,308	31.0
합계	130	88	67.7	9,541	2,761	28.9

*:포장별 발생율(%)=(발생 포장수/조사포장수)×100

**:나무별 발생율(%)=(발생 나무수/조사 나무수)×100

2-2). 동일 포장에서 수령 및 부위별 조사 시기에 따른 복숭아 수지증 발생 현황

동일 포장에 수령이 10년 이상인 복숭아 나무와 10년 미만인 나무가 혼재하고 있는 포장(경북 영덕군 지품면 신양리) 전체의 복숭아 수지증 발생 현황을 그림 41과 그림 42에 나타내었다.

재배 초기인 2021년 5월 27일 조사한 결과에 따르면 수령이 10년 이상인 경우 주지 발생수가 744개이며 부주지 발생수가 81개로 조사되었으며 수령이 10년 미만인 경우에는 주지 발생수가 111개이며 부주지 발생수가 0개로 조사되었다(그림 41).

재배 후기인 2021년 9월 29일 조사한 결과에 따르면 수령이 10년 이상인 경우 주지 발생수가 2,058개이며 부주지 발생수가 206개로 조사되었으며 수령이 10년 미만인 경우에는 주지 발생수가 302개이며 부주지 발생수가 35개로 조사되었다(그림 42).

두 경우 모두 수령이 10년 미만인 경우에 복숭아 수지증 발생율이 낮은 것으로 조사되었다.

9(1)	8(1)	11(1)	12(1)	9(1)	1(0)	8(1)	11(1)	12(1)	8(1)
8(1)	1(0)	11(1)	11(1)	1(0)	2(0)	9(1)	2(0)	11(1)	9(1)
0(0)	2(0)	10(1)	0(0)	10(1)	3(0)	1(0)	2(0)	10(1)	2(0)
1(0)	3(0)	2(0)	1(0)	0(0)	0(0)	10(1)	3(0)	2(0)	10(1)
11(1)	9(1)	3(0)	10(1)	2(0)	10(1)	0(0)	11(1)	3(0)	11(1)
10(1)	0(0)	9(1)	9(1)	4(0)	10(1)	1(0)	10(1)	9(1)	12(1)
7(1)	10(1)	9(1)	2(0)	3(0)	11(1)	8(1)	10(1)	10(1)	1(0)
1(0)	9(1)	1(0)	2(0)	10(1)	2(0)	8(1)	7(1)	3(0)	10(1)
2(0)	1(0)	1(0)	3(0)	11(1)	0(0)	1(0)	7(1)	4(0)	10(1)
9(1)	2(0)	0(0)	9(1)	11(1)	8(1)	0(0)	8(1)	8(1)	1(0)
0(0)	3(0)	8(1)	9(1)	3(0)	9(1)	9(1)	9(1)	8(1)	0(0)
2(0)	0(0)	8(1)	2(0)	2(0)	9(1)	10(1)	9(1)	3(0)	7(1)
3(0)	8(1)	1(0)	0(0)	6(1)	8(1)	0(0)	4(0)	2(0)	7(1)
8(1)	9(1)	0(0)	8(1)	6(1)	2(0)	1(0)	3(0)	9(1)	3(0)
8(1)	9(1)	10(1)	8(1)	8(1)	1(0)	10(1)	1(0)	9(1)	3(0)

그림 41. 동일 포장에서 조사 시기에 따른 수령 및 부위별 복숭아 수지증 발생 현황.

주지(부주지) : 수령 10년 미만, 주지(부주지) : 수령 10년 이상, 조사일 : 2021년 5월 27일

25(3)	21(2)	30(3)	32(3)	24(2)	3(0)	21(2)	31	32(3)	21(2)
22(2)	4(0)	31(3)	30(3)	4(0)	5(1)	24(2)	5(1)	30(3)	26(3)
0(0)	5(1)	28(3)	1(0)	27(3)	7(1)	4(0)	6(1)	29(3)	5(1)
2(0)	8(1)	6(1)	2(0)	0(0)	0(0)	27(3)	9(1)	6(1)	29(3)
30(3)	25(3)	8(1)	27(3)	5(1)	27(3)	0(0)	30(3)	7(1)	30(3)
29(3)	0(0)	25(3)	24(2)	10(1)	28(3)	3(0)	29(3)	26(3)	32(3)
20(2)	27(3)	24(2)	5(1)	9(1)	30(3)	22(2)	27(3)	27(3)	4(0)
3(0)	26(3)	4(0)	6(1)	29(3)	6(1)	23(2)	19(2)	9(1)	27(3)
5(1)	3(0)	3(0)	7(1)	30(3)	0(0)	2(0)	20(2)	11(1)	28(3)
25(3)	6(1)	0(0)	25(3)	31(3)	21(2)	1(0)	23(2)	21(2)	2(0)
0(0)	7	23(2)	26(3)	7(1)	26(3)	25(3)	25(3)	23(2)	1(0)
6(1)	0(0)	22(2)	6(1)	5(1)	25(3)	27(3)	26(3)	8(1)	19(2)
7(1)	22(2)	2(0)	0(0)	17(2)	22(2)	0(0)	10(1)	5(1)	20(2)
23(2)	24(2)	1(0)	22(2)	18(2)	5(1)	2(0)	7(1)	25(3)	8(1)
21(2)	25(3)	27(3)	23(2)	21(2)	3(0)	28(3)	4(0)	26(3)	7(1)

그림 42. 동일 포장에서 조사 시기에 따른 수령 및 부위별 복숭아 수지증 발생 현황.

주지(부주지) : 수령 10년 미만, 주지(부주지) : 수령 10년 이상, 조사일 : 2021년 9월 29일

3) 발생 원인별 복숭아 수지증 발생 현황 조사

복숭아 수지증의 발생 원인은 영농 작업 중 발생한 기계적 상처, 가지치기, 동해, 일소 피해 등 물리적 상처에 의한 복숭아 수지증 발생(그림 43)과 복숭아 순나방, 줌벌레 등 해충 가해에 의한 생물학적 상처에 의한 복숭아 수지증 발생(그림 44)으로 알려져 있으며 본 연구과제에서도 이와 같은 두 가지 원인에 의한 복숭아 수지증 발생을 조사하였다(표 10).

그 결과 조사한 전체 복숭아 과원 130개소 중에서 수지증이 발생한 과원 88개소 중에서 물리적 상처에 의해 수지증이 발생한 과원은 29개소로 발생율이 33%로 조사되었으며 생물학적 원인에 의해 수지증이 발생한 과원은 59개소로 발생율이 67%로 조사되었다.

본 조사에서는 물리적 요인 중에서 동해나 일소 피해에 의해 수피가 갈라지는 상처에서 수지가 발생하는 경우가 많았으며, 복숭아 순나방 등 해충의 가해에 의한 상처에서 수지

가 발생하는 경우는 발생율이 67%로 두배 가량 많은 것으로 조사되었다(표 10). 또한 수지증인 발생한 조사 대상인 6,393주 중에서 물리적 상처에 의한 수지증 발생주가 4,215주인 65.9%의 발생율을 나타냈으며, 해충에 의한 수지증 발생주는 2,178주인 34.1%의 발생율을 나타내었다.

본 연구 결과로 볼 때 가지치기 등 농작업시 수피에 상처가 생기지 않도록 주의하고 상처 발생시 빠른 시간 내에 감염이 일어나지 않도록 조치하는 것이 중요할 것으로 판단된다.

표 10. 발생 원인별 복숭아 수지증 발생 현황

발생원인	재배 포장별 발생 현황			나무별 발생 현황		
	조사 포장수	발생 포장수	포장별 발생율*(%)	조사 나무수	발생 나무수	나무별 발생율**(%)
M	88	29	33.0	6,393	4,215	65.9
B	88	59	67.0	6,393	2,178	34.1

M : 물리적(가지치기, 기계적 상처, 일소, 동해 등) 상처에 의한 물리적 원인에 의해 발생한 수지

B : 해충(순나방, 좀벌레 등 천공충) 가해에 의한 생물학적 원인에 의해 발생한 수지

*:포장별 발생율(%)=(발생 포장수/조사포장수)×100

**:(나무별 발생율(%)=(발생 나무수/조사 나무수)×100



그림 43 발생 원인별(물리적 상처) 복숭아 수지증 양상



그림 44 발생 원인별(생물학적 상처) 복숭아 수지증 양상

4) 재배 시기별 복숭아 수지증 발생 현황 조사

복숭아 재배시기별 복숭아 수지증 발생 현황을 조사하기 위하여 재배 초기인 5월과 6월에 조사한 포장을 9월과 10월에 재방문하여 수지증 발생 현황을 재조사하였다(표 11). 재배 시기별 복숭아 수지증을 조사한 결과 경북 의성군의 복숭아 재배 포장의 경우 재배 초기인 5월 12일에는 나무별 발생율이 52.1%였으며 8월 25일에는 14.6%로 감소하다가 재배 후기인 9월에는 79.2%로 증가하는 것으로 조사되었다.

경북 영천시의 복숭아 재배 포장의 경우에는 재배 초기인 6월 21일에는 75.3%였으며 재배 중반기인 7월 30일과 8월 30일에는 39.7%로 감소하는 것으로 조사되었다.

경북 청도군의 경우 재배 중반기인 7월 12일에는 18.8%, 9월 9일에는 34.4%로 약 두배가량 증가하는 것으로 조사되었다.

경북 김천시의 복숭아 재배 포장의 경우에는 재배 초기부터 후기까지 95%이상의 수지증 발생율을 나타내었다.

충북 충주시의 경우 5월 26일에는 96.7%의 수지증 발생율인 포장이 9월에는 100%로 증가했으며 94.4%인 포장은 86.1%로 다소 감소하는 것으로 조사되었다.

경북 영덕군의 경우 5월 27일의 복숭아 수지증 발생율이 42.0%이던 것이 9월 29일에는 53.6%, 5월 27일 발생율이 36.8%인 과원의 경우에는 9월 29일 조사 결과 70.6%의 수지증 발생율을 나타내었다.

경북 경산시의 경우에는 6월 3일의 복숭아 수지증 발생율이 83.0%에서 10월 19일에는 94.0%로 증가했으며, 90.0%로 조사된 포장의 경우에는 100%로 증가하는 것으로 조사되었다(표 11).

본 연구과제에서 시기별 복숭아 수지증을 조사한 결과를 종합해 보면 재배 초기인 5월~6월의 복숭아 수지증 발생율은 74.3%로 조사되었으며 재배 중기인 7월~8월의 경우에는 55.9%로 다소 감소하였다. 그러나 재배 후기인 9월~10월의 경우에는 82.3%로 다시 증가하는 것으로 조사되었다(그림 45). 이러한 결과는 재배 기간 중 초기와 후기에 수지증 관

리에 더 신경을 써야할 것으로 판단된다.

또한 수지증 발생 부위는 전반적으로 생육 초기에는 주지부분에서 발생량이 낮고 생육 후기로 갈수록 주지 부분에서 그 발생량이 크게 증가하는 것으로 조사되었으며 부주지의 경우에는 생육 시기별로 별다른 경향성은 조사되지 않았다.

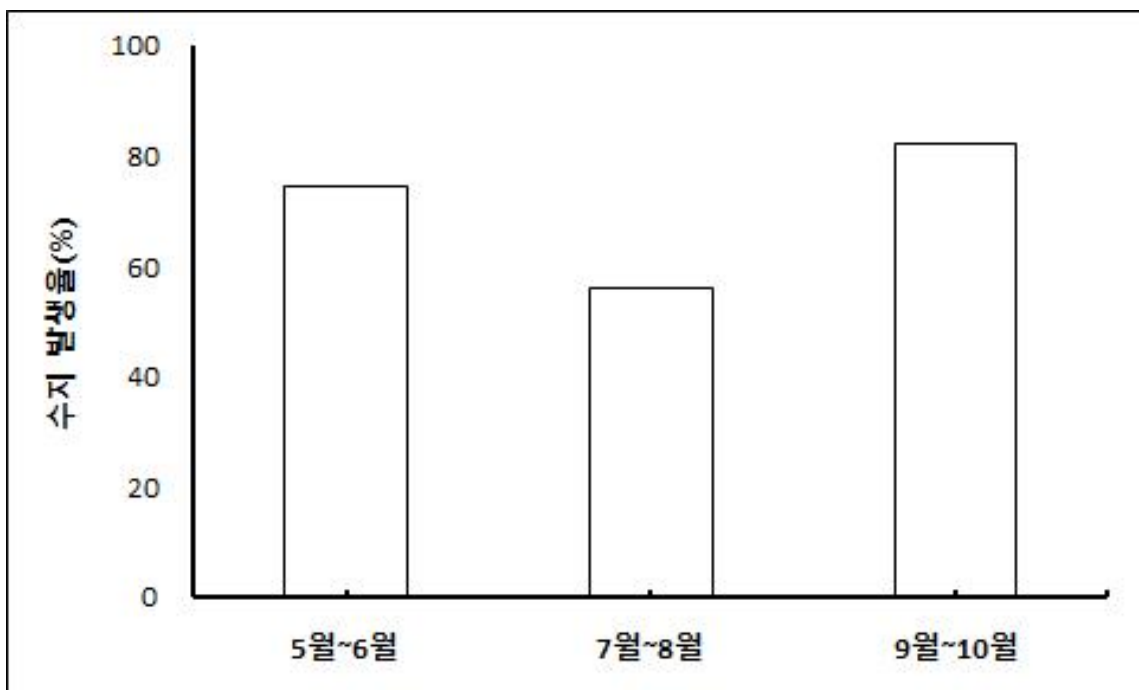


그림 45 재배 시기별 복숭아 수지증 발생 추이

표 11. 재배시기별 복숭아 수지증 발생 현황

지역	조사일	조사주수	발생주수	나무별 발생율* (%)	주지 발생수	부주지 발생수	주지 발생율** (%)
경북 의성군	5/12	48	25	52.1	54	0	100.0
	8/25	48	7	14.6	54	0	100.0
	9/3	48	38	79.2	189	7	96.4
경북 군위군	5/13	30	24	80.0	194	10	95.1
	8/12	30	24	80.0	253	13	95.1
경북 영천시	6/21	73	55	75.3	216	12	94.7
	7/30	73	29	39.7	53	3	94.6
	8/30	73	29	39.7	138	0	100.0
전북 김제시	6/4	25	25	100.0	1,175	0	100.0
	8/31	25	25	100.0	1,071	0	100.0
경북 청도군	7/12	64	12	18.8	43	0	100.0
	9/9	64	22	34.4	93	0	100.0
경북 김천시	7/16	40	38	95.0	1,262	0	100.0
	7/23	40	39	97.5	1,749	0	100.0
	8/13	40	39	97.5	1,748	0	100.0
	9/2	40	39	97.5	1,821	0	100.0
	10/5	40	39	97.5	1,912	0	100.0
충북 충주시	5/26	120	116	96.7	967	44	95.6
	9/27	120	120	100.0	1,902	95	95.2
충북 충주시	5/26	36	34	94.4	269	30	90.0
	9/27	36	31	86.1	280	31	90.0
경북 영덕군	5/27	112	47	42.0	51	0	100.0
	9/29	112	60	53.6	92	0	100.0
경북 영덕군	5/27	68	25	36.8	31	0	100.0
	9/29	68	48	70.6	95	3	96.9
경북 경산시	6/3	200	166	83.0	2,387	134	94.7
	10/19	200	188	94.0	5,386	265	95.3
경북 경산시	6/3	80	72	90.0	502	8	98.4
	10/19	80	80	100.0	2,145	96	95.7

*:나무별 발생율(%)=(발생주수/조사주수)×100

** :주지 발생율(%)=(주지발생수/(주지발생수+부주지발생수))×100

5) 나무 부위별(주지, 부주지) 복숭아 수지증 발생 현황 조사

각 지역별 복숭아 나무의 주지 및 부주지의 수지증 발생율을 조사한 결과는 표 5와 같다. 경북 지역의 경우 조사 대상 121개 포장의 81개 포장의 16,950 병반 중에서 주지 발생수는 16,080개로 94.9%가 주지에서 발생하는 것으로 조사되었다.

전북 지역의 경우 조사 대상 3개소 포장에서 발생한 1,175 병반 중에서 주지 발생수는 1,175개로 모두 주지에서 발생하는 것으로 조사되었다.

충북 지역의 경우 조사 대상 6개소 포장에서 발생한 3,855 병반 중에서 주지 발생수는 3,650개로 94.7%가 주지에서 발생하는 것으로 조사되었다.

표 12. 나무 부위별 복숭아 수지증 발생 현황

시도	재배 포장별 발생 현황			나무별 발생 현황			
	조사 포장수	발생 포장수	포장별 발생율*(%)	전체 발생수	주지 발생수	부주지 발생수	주지 발생율**(%)
경북	121	81	67	16,950	16,080	870	94.9
전북	3	1	33	1,175	1,175	0	100
충북	6	6	100	3,855	3,650	205	94.7
합계	130	88	67.7	21,980	20,905	1,075	95.1

*:포장별 발생율(%)=(발생포장수/조사포장수)×100

**:주지발생율(%)=(주지발생수/전체발생수)×100

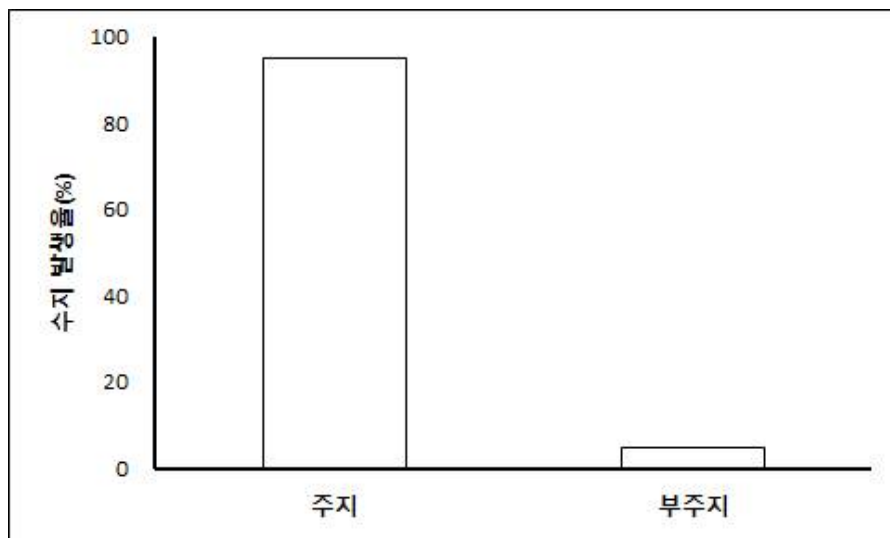


그림 46 복숭아 나무 부위별(주지, 부주지) 수지증 발생 양상

본 연구과제에서 조사된 복숭아 수지증의 발생 부위는 조사 대상 포장 130개 포장 중에서 수지증이 발생한 88개 포장에서 발생한 병반 21,980개 중에서 주지 부분에 발생한 병반수는 20,905개로 95.1%가 주지부분에서 발생한 것으로 조사되었으며 부주지의 복숭아 수지증 발생율은 4.9%로 거의 대부분이 주지에서 발생하는 것으로 조사되었다(그림 46). 이러한 양상은 복숭아 나무 전체로 볼 때 주지 부분의 수분 이동량이 대부분이며 주지 부분에서 수지가 발생함으로써 상대적으로 부주지로의 수분이동이 적어지는 것도 식물 생리학적인 측면에서의 한가지 이유가 될 수 있을 것으로 판단된다.

○ 복숭아 수지증 병반 경감을 위한 기존 약제의 효능 검증

복숭아 수지증에 대한 정확한 판단 기준은 확립되어 있지 않으며 본 연구과제를 통해 복숭아 수지증 병반을 조사한 결과 수지증이 진행됨에 따라 수지증 병반의 형태가 변화하

는 것으로 조사되었으며 크게 3단계로 나누어 복숭아 수지증 병반의 진행 상황을 판별하였다(그림 47~그림 49).

발생 초기의 복숭아 수지증 병반은 손으로 만졌을 경우 손에 묻을 정도로 무르고 색깔이 투명한 상태이나 수지증 병반의 색깔보다는 수지증 병반의 무르기가 판단에서 더 큰 비중을 차지하는 것으로 판단된다(그림 47). 발생 중기의 복숭아 수지증 병반은 손으로 만졌을 경우 손에 묻지 않을 정도로 무르고 색깔이 갈색으로 변화하는 양상을 나타냈으며 그림 48와 같이 둥근 형태의 모양을 유지하는 양상을 보였다. 발생 후기의 복숭아 수지증 병반은 딱딱하게 굳은 상태이며 짙은 갈색을 나타내고 그림 49와 같이 둥근 형태를 유지하지 않는 양상을 나타냈다.

복숭아 수지증의 변화 양상은 사람의 피부에 상처가 생겼을 경우 딱지가 생기는 과정과 유사한 양상으로 진행되는 것으로 조사되었다.

본 연구과제에서 기존 약제의 효능 검증은 수지증 병반의 양상이 후기 양상으로의 변화 유무, 발생된 수지증 병반의 크기 변화 및 추가로 발생하는 수지증 병반의 유무로 확인하였다.



그림 47 발생 초기(1단계) 복숭아 수지증 병반의 형태



그림 48 발생 중기(2단계) 복숭아 수지증 병반의 형태

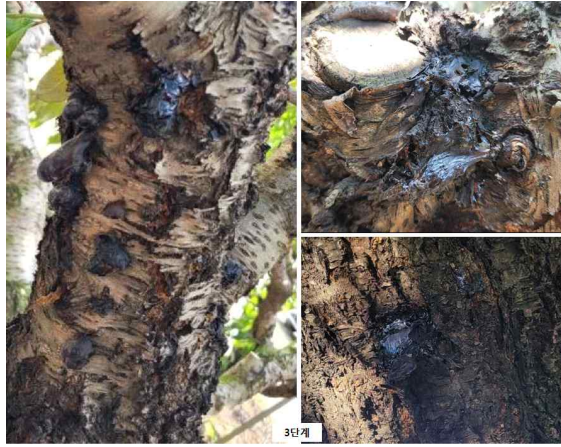


그림 49 발생 후기(3단계) 복숭아 수지증 병반의 형태

1) 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제)의 효능 검정

복숭아 수지증 발생 전 후에 사용하도록 권장되고 있는 3% 티오파네이트메틸 도포제의 복숭아 수지증에 대한 효과를 검증하기 위하여 경북농업기술원 산하 청도복숭아연구소 시험포장에서 효능 검증 시험을 진행하였다.

3% 티오파네이트메틸 도포제의 처리는 제품이 권장하는 방식으로 동봉된 붓으로 수지증 병반 부분에 도포하여 처리하였다.

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구1의 경우 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 12일 후에 수지증 병반의 색깔이 짙어지고 병반의 크기가 처리 전과 차이가 없었으나 처리 37일 후에는 병반의 크기가 커지고 처리 부위에 수지증 병반이 추가적으로 발생하였다(그림 50).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구2의 경우 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 12일 후에 수지증 병반의 수지량이 증가하는 양상을 보였으며 처리 37일 후에는 기발생된 수지증 병반의 수지량이 감소하는 경향을 보였으나 처리 부위에 새로운 수지증 병반이 발생하는 양상을 보였다(그림 51).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구3의 경우 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 12일 후에 수지증 병반의 변화가 거의 없었으며 처리 37일 후에는 기발생된 수지증 병반의 크기가 다소 증가하였으며 추가적인 병반의 발생은 나타나지 않았다(그림 52).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구4의 경우 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 12일 후에 수지증 병반의 변화가 거의 없었으며 처리 37일 후에는 기발생된 수지증 병반의 크기가 감소하면서 말라가는 양상을 나타내었다(그림 53).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구5의 경우 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 12일 후에 수지증 병반이 말라가는 양상을 보였으며 처리 37일 후에는 처리 12일차보다도 더 말라가는 양상을 나타내었다(그림 54).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구6의 경우 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 12일 후에 수지증 병반이 말라가는 양상을 보였으며 처리 37일 후에는 처리 12일차보다 더 말라가는 양상을 보였으며 추가적인 수지증 병반의 발생은 나타나지 않았다(그림 55).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구4, 처리구5, 처리구6에서 복숭아 수지증에 대한 효능이 있는 것으로 조사되었으며(그림 53~그림 55) 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구1, 처리구2, 처리구3에서는 복숭아 수지증에 대한 효능이 없는 것으로 조사되었다(그림 50~

그림 52).

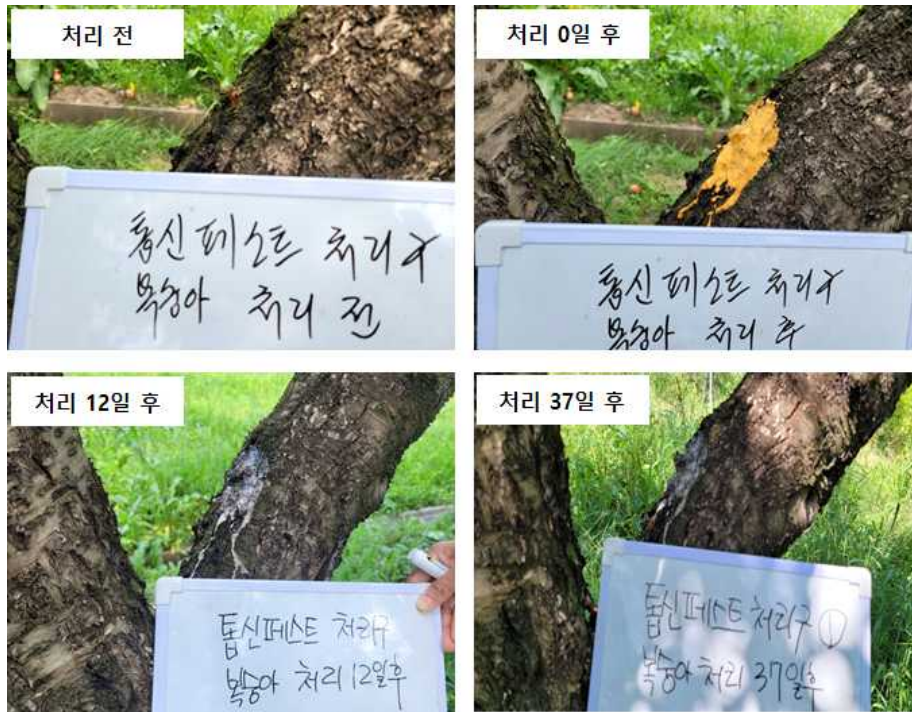


그림 50 복숭아 수지증에 대한 기존 약제 (3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구1, 경북농업기술원 청도복숭아연구소 시험포장



그림 51 복숭아 수지증에 대한 기존 약제 (3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구2, 경북농업기술원 청도복숭아연구소 시험포장.



그림 52 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구3, 경북농업기술원 청도복숭아연구소 시험포장.



그림 53 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구4, 경북농업기술원 청도복숭아연구소 시험포장.



그림 54 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구5, 경북농업기술원 청도복숭아연구소 시험포장.



그림 55 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구6, 경북농업기술원 청도복숭아연구소 시험포장.

또한 복숭아 수지증 발생 전 후에 사용하도록 권장되고 있는 3% 티오파네이트메틸 도포제의 복숭아 수지증에 대한 효과를 검증하기 위하여 경북 김천시 아포읍 복숭아 재배포장에서 추가적인 효능 검증 시험을 진행하였으며 그 결과를 표 6에 나타내었다.

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구1의 경우 처리 48일 후에 처리 전 병반수 11개에 비

해 21개가 증가한 32개로 조사되었으며 처리 81일 후에는 처리 전보다 29개가 증가한 40개로 조사되었다(표 13, 그림 56).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구2의 경우 처리 48일 후에 처리 전 병반수 14개에 비해 13개가 증가한 27개로 조사되었으며 처리 81일 후에는 처리 전보다 17개가 증가한 31개로 조사되었다(표 13, 그림 57).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구3의 경우 처리 48일 후에 처리 전 병반수 13개에 비해 4개가 증가한 17개로 조사되었으며 처리 81일 후에는 처리 48일차보다 4개가 감소한 13개로 조사되어 처리 전과 같은 병반수를 나타내었다(표 6, 그림 58).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구4의 경우 처리 48일 후에 처리 전 병반수 9개에 비해 17개가 증가한 26개로 조사되었으며 처리 81일 후에는 처리 전보다 23개가 증가한 32개로 조사되었다(표 13, 그림59).

3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구5의 경우 처리 48일 후에 처리 전 병반수 30개에 비해 35개가 증가한 65개로 조사되었으며 처리 81일 후에는 처리 전보다 40개가 증가한 70개로 조사되었다(표 13, 그림 60).

본 시험에서 복숭아 수지증에 대한 3% 티오파네이트메틸 도포제의 효과는 처리구3에서 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 48일 후에 병반이 다소 증가하다가 처리 81일 후에는 증가되는 병반이 관찰되지 않아 3% 티오파네이트메틸 도포제의 효과가 일부 있는 것으로 조사되었으나 나머지 처리구(처리구1, 처리구2, 처리구4, 처리구5)에서는 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 후 수지증 병반이 지속적으로 증가하는 것으로 볼 때 그 효과가 없는 것으로 조사되었다.

본 연구과제에서 복숭아 수지증에 대한 3% 티오파네이트메틸 도포제의 효능 시험에서 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 전에 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 처리 했으며 수지증 병반을 제거한 후 처리 시험이 추가적으로 필요할 것으로 판단되며, 청도복숭아연구소와 김천시 아포읍 시험의 결과 복숭아 수지증에 대한 3% 티오파네이트메틸 도포제의 효과는 초기에는 어느 정도 효과가 있으나 시간이 경과함에 따라 그 효과가 떨어지는 것으로 판단된다.

표 13. 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리 후 복숭아 수지증 병반수 변화 양상.

처리구	처리전 병반수	처리 48일 후		처리 81일 후	
		병반수(병반증가수)	병반 증가율*(%)	병반수(병반증가수)	병반 증가율*(%)
처리구1	11	32(+21)	190.9	40(+29)	263.6
처리구2	14	27(+13)	92.8	31(17)	121.4
처리구3	13	17(+4)	30.7	13(+0)	0.0
처리구4	9	26(+17)	188.8	32(+23)	255.5
처리구5	30	65(+35)	116.6	70(+40)	133.3

*:병반 증가율=(병반 증가수÷처리전 병반수)×100



그림 56 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구1, 경북 김천시 아포읍 복숭아 재배포장.



그림 57 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구2, 경북 김천시 아포읍 복숭아 재배포장.



그림 58 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구3, 경북 김천시 아포읍 복숭아 재배포장.



그림 59 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구4, 경북 김천시 아포읍 복숭아 재배포장.



그림 60 복숭아 수지증에 대한 기존 약제(3% 티오파네이트메틸 도포제) 처리 후 수지증 병반 변화 양상; 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구5, 경북 김천시 아포읍 복숭아 재배포장.

3. 결론

1) 지역별 복숭아 수지증 발생 실태

경북지역의 경우 121개소 중에서 81개소에서 복숭아 수지증이 발생하여 66.9%의 포장별 발생율을 나타냈으며, 조사 대상인 9,002주 중에서 2,440주에서 복숭아 수지증이 발생했으며 복숭아 수지증 나무별 발생율은 27.1%로 조사되었다(표 7).

경북 지역의 복숭아 과원별 수지증 발생율은 영덕군/칠곡군>경산시>군위군>청도군>의성군>영천시>김천시 순으로 높게 조사되었으며 복숭아 나무별 수지증 발생율은 영덕군>칠곡군>김천시>경산시>군위군>의성군>청도군>영천시 순으로 발생율이 높은 것으로 조사되었다(표 8).

본 연구 과제의 지역별 복숭아 수지증 현황 조사에서 지역적인 특이점은 없는 것으로 조사되었다. 다만 경북 지역의 복숭아 주산지로 알려져 있는 청도 지역의 복숭아 나무별 수지증 발생율이 13%로 타 시도에 비해 낮은 것으로 조사되었다.

전북지역과 충청지역의 경우에는 그 조사 대상이 많지 않았으며 추가적인 조사가 필요할 것으로 판단된다.

2) 복숭아 수세 및 수령에 따른 복숭아 수지증 발생 현황

복숭아 나무별 수지증 발생율은 수령이 10년 미만인 복숭아 나무 2,093주 중에서 453주에서 수지증이 발생하여 21.6%, 10년 이상인 복숭아 나무 7,448주 중에서 2,308주에서 수지증이 발생하여 31%로 조사되었으며 수령이 10년 이상인 복숭아 나무에서 약 10%정도 높게 조사되었다(표 9).

3) 발생 원인별 복숭아 수지증 발생 현황 조사

또한 수지증인 발생한 조사 대상인 6,393주 중에서 물리적 상처에 의한 수지증 발생주가 4,215주인 65.9%의 발생율을 나타냈으며, 해충에 의한 생물학적 원인에 의한 수지증 발생주는 2,178주인 34.1%의 발생율을 나타내었다(표 10).

본 연구 결과로 볼 때 가지치기 등 농작업시 수피에 상처가 생기지 않도록 주의하고 상처 발생시 빠른 시간 내에 감염이 일어나지 않도록 조치하는 것이 중요할 것으로 판단된

다.

4) 재배 시기별 복숭아 수지증 발생 현황

본 연구과제에서 시기별 복숭아 수지증을 조사한 결과를 종합해 보면 재배 초기인 5월~6월의 복숭아 수지증 발생율은 74.3%로 조사되었으며 재배 중기인 7월~8월의 경우에는 55.9%로 다소 감소하였다. 그러나 재배 후기인 9월~10월의 경우에는 82.3%로 다시 증가하는 것으로 조사되었다(그림 45).

수지증 발생 부위는 전반적으로 생육 초기에는 주지부분에서 발생량이 낮고 생육 후기로 갈수록 주지 부분에서 그 발생량이 크게 증가하는 것으로 조사되었으며 부주지의 경우에는 생육 시기별로 별다른 경향성은 조사되지 않았다.

5) 나무 부위별(주지, 부주지) 복숭아 수지증 발생 현황

본 연구과제에서 조사된 복숭아 수지증의 발생 부위는 조사 대상 포장 130개 포장 중에서 수지증이 발생한 88개 포장에서 발생한 병반 21,980개 중에서 주지 부분에 발생한 병반수는 20,905개로 95.1%가 주지부분에서 발생한 것으로 조사되었으며 부주지의 복숭아 수지증 발생율은 4.9%로 거의 대부분이 주지에서 발생하는 것으로 조사되었다(그림 46). 이러한 양상은 복숭아 나무 전체로 볼 때 주지 부분의 수분 이동량이 대부분이며 주지 부분에서 수지가 발생함으로써 상대적으로 부주지로의 수분이동이 적어지는 것도 식물 생리학적인 측면에서의 한가지 이유가 될 수 있을 것으로 판단된다.

2. 복숭아 수지증 병반 경감을 위한 기존 약제의 효능 검증

경북농업기술원 청도복숭아연구소 시험포장에서의 시험에서는 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구4, 처리구5, 처리구6에서 복숭아 수지증에 대한 효능이 있는 것으로 조사되었으며(그림 53~그림 55) 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구1, 처리구2, 처리구3에서는 복숭아 수지증에 대한 효능이 없는 것으로 조사되었다(그림 50~그림 52).

이러한 결과를 바탕으로 복숭아 수지증에 대한 3% 티오파네이트메틸 도포제의 효과 시험을 경북 김천시 아포읍에서 추가적으로 진행하였으며 그 결과는 3% 티오파네이트메틸 도포제 처리구3에서만 일부 효과가 있는 것으로 나타났으나 다른 처리구에서는 그 효과가 없는 것으로 조사되었다.

이러한 결과를 볼 때 복숭아 수지증에 대한 3% 티오파네이트메틸 도포제의 효과는 초기에는 어느 정도 효과가 있으나 시간이 경과함에 따라 그 효과가 떨어지는 것으로 판단되며 추가적인 시험이 더 필요할 것으로 판단된다.

나. 1단계_2차년도

■ 경북대학교, 신재호 교수 연구실

○ 수지증 생물방제균 적용 후 미생물 군집 변화 양상 분석

- 복숭아나무 수지증 발생 지역을 대상 시료 채취 및 시료 전처리
 - 수지증 발생 과수원의 미생물 제제 처리를 위하여 경상북도 칠곡, 청도, 경산, 김천 등 경북 내 복숭아 산지의 수지증 증상 측정
 - 2개 지역의 복숭아 과수원(경북 군위, 경북 칠곡)을 대상으로 친환경 미생물 제제 처리를 시행하며, 8주간 수지증 개수 발생 및 내생 미생물 군집 분석을 위한 시료 채취를 수행함.
- 복숭아나무 수지증 발생 지역을 대상 미생물 제제 처리
 - 2개 지역의 복숭아 과수원(경북 군위, 경북 칠곡)을 대상으로 *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28 제제 처리를 수행
 - 0주차, 4주차 2회 *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28 균주의 실제 작물에서 수지증에 대한 방제가를 검증하고자 실증 실험을 실시함. 시험 작물은 복숭아를 사용하여 총 55일간 실시하였고, 총 1,700 m² 면적에서 완전임의배치법에 의한 반복을 수행함.
 - *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28은 포장실험은 외부와 차단된 시험구 내에서 액체배양에서 배지 1 mL 당 약 1.0×10^7 cfu/ml 의 농도로 복숭아나무의 나뭇가지에 관주하여 접종함. 방제가는 시험 시작 후 55일 뒤에 포장내의 복숭아나무 껍질에 발생한 수지증의 증상 개수를 조사하여 확인함.
 - 이후 8주간 수지증 개수 발생 및 내생 미생물 군집 분석을 위한 시료 채취를 수행함.

표 14. 처리구에 따른 채취한 시료 수.

Type		시료 수
생물방제균 처리 (복숭아수지증 미발생)	수지증 발생목	56
생물방제균 미처리 (복숭아수지증 발생)	수지증 발생목	47

생물방제균 미처리 (복숭아수지증 비발생)	수지증 비발생목	10
총합		113

- 복숭아나무 수지증 병변 발생 유무에 따른 복숭아 나무 토양, 병변 발생부, 수지부 별 채취 방법 및 DNA 추출 방법
 - 복숭아나무의 토양 시료 채취는 농촌진흥청에서 고시하는 토양 시료 채취법에 따라 진행하였으며, 복숭아 나무의 표피는 수지증 발생부를 중심으로 깊이 0.5 cm, 직경 2 cm 씩 조각칼을 활용하여 확보하였음.
 - 토양근권 미생물의 total DNA 추출을 위하여 10% SDS 방법과 © QIAGEN 사의 DNeasy PowerSoil Pro Kit을 이용하여 total DNA를 추출하였음
 - 복숭아 나무 껍질에 존재하는 미생물의 total DNA 추출을 위하여, -196° C의 액체질소를 이용하여 막자사발로 분쇄하였으며, 분쇄된 시료를 추가적으로 MP Biomedicals의 FastPrep®-24를 이용하여 추가적으로 분쇄하였음. 이후 10% SDS 방법과 © QIAGEN 사의 DNeasy PowerSoil Pro Kit을 이용하여 total DNA를 추출하였음.
- 복숭아 수지증의 발생 과수에 대한 미생물제제 처리에 따른 근권미생물군집과 식물내생미생물군집 분석
 - 복숭아 수지증 발생 유무에 따라 확보된 시료의 total DNA를 확보한 후 세균 및 곰팡이의 16S rRNA gene 내 V4-5 영역과 ITS2 영역을 대상으로 한 amplicon sequencing library를 제작한 후 illumina Miseq을 운용하여 sequence를 확보함. Microbiome 및 Mycobioime 분석의 경우 리눅스 기반의 QIIME2 program을 활용하여 분석하였으며 data visualization의 경우 MicrobiomeAnalyst program을 활용함.

1. 복숭아나무 수지증 미생물 제제의 시간에 따른 목질부 미생물 군집 분석

- 미생물 제제 처리에 따른 주수별 수지증 발생 목질부 미생물 군집 분석

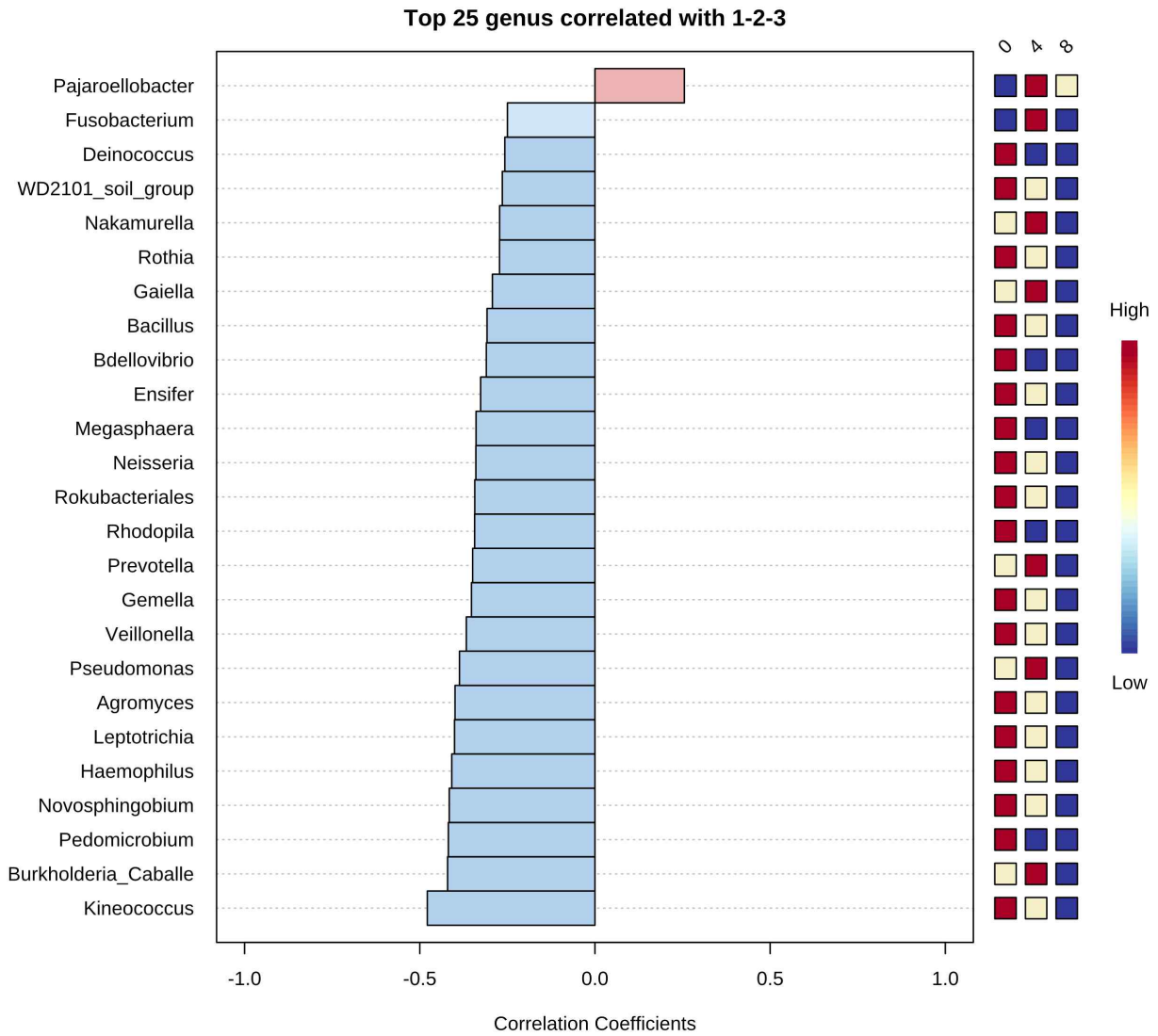


그림 61 KNU-28 제제 처리후 시간별 세균 군집 변화 양상

- 수지증이 발생한 복숭아나무에서 *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28 제제 처리후 미생물 군집 변화 양상을 분석하였음.
- KNU-28 제제 처리 후, 0, 4, 8 주를 분석하였으며, 그림67과 같이 *Pajaroellobacter sp.* 가 증가하였으며, *Kineococcus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Pedomicrobium sp.*, *Novosphingobium sp.* 등의 종이 감소하는 것으로 분석되었음.
- *Bacillus* 제제를 0주, 4주 2회에 걸쳐 처리하였으나, *Bacillus sp.*의 abundance는 감소하였더라도 다른 미생물들의 abundance 또한 변화하는 것으로 보아, *Bacillus* 제제 처리 후 미생물 군집에 변화를 일으키는지 파악하고자 함.

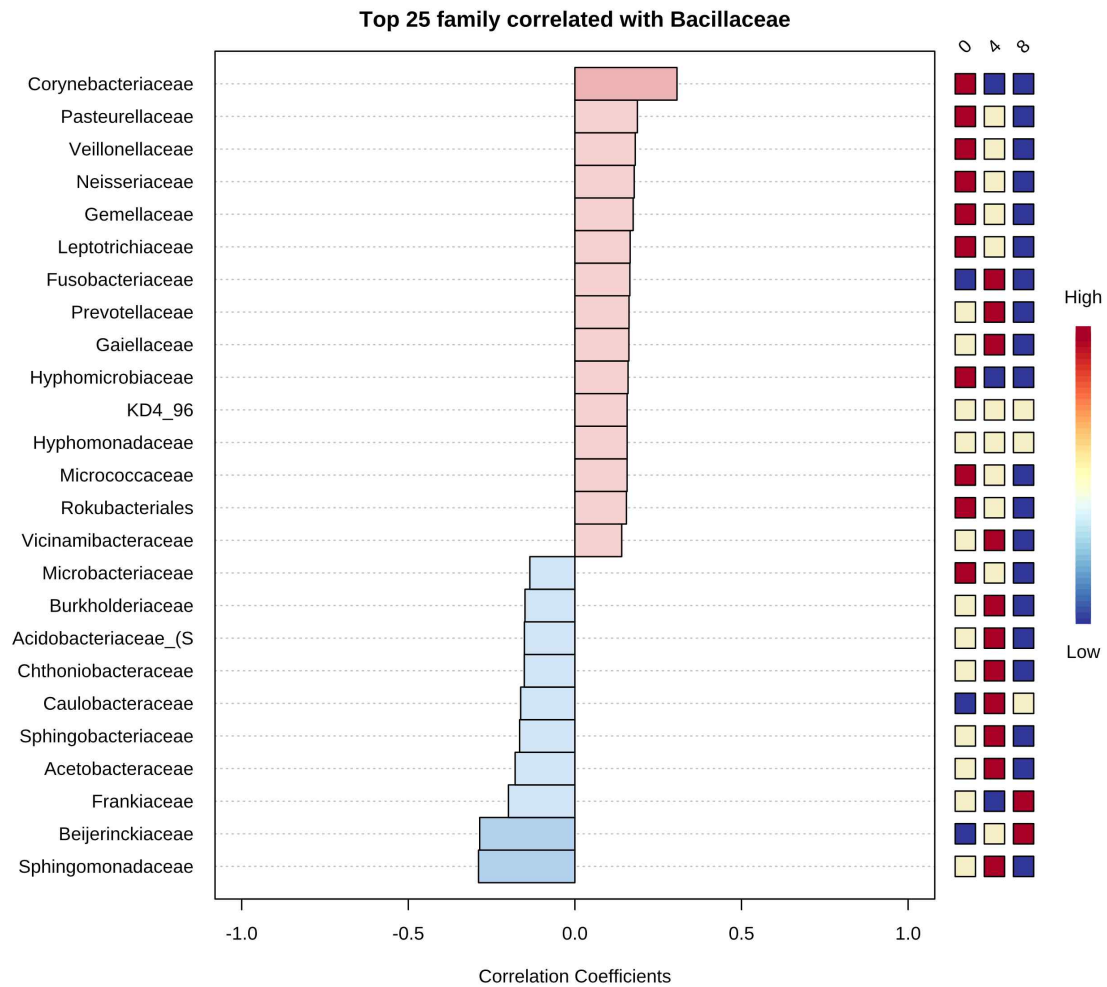


그림 62 KNU-28 제제 처리후 Bacillaceae에 연관된 시간별 세균 군집 변화 양상

- 수지증이 발생한 나무에서 KNU-28 제제 처리 후, family level에서 *Bacillus sp.* 가 포함되어 있는 Bacillaceae 와 타 미생물간의 연관성을 조사하고자 하였음.
- 결과적으로, Bacillaceae와 양의 상관관계로써, 동시에 abundance가 감소하는 미생물로서 Corynebacteriaceae가, Bacillaceae와 음의 상관관계를 가져 abundance가 증가하는 미생물로서 Spingomonadaceae와 Beijerinckiaceae가 확인되었음.

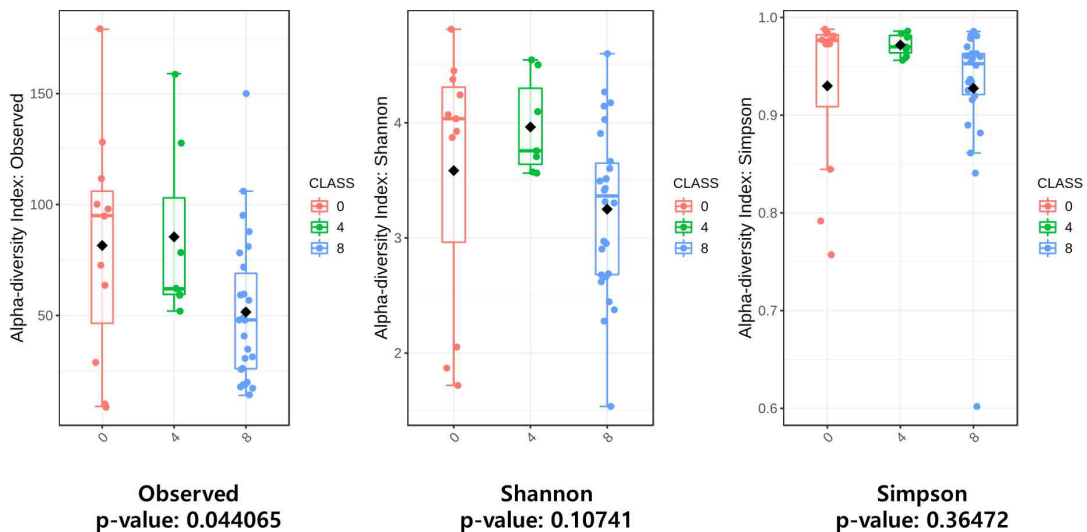


그림 63 KNU-28 제제 처리후 세균의 시간별 alpha diversity 변화

- 미생물 제제 처리 후 샘플 간 다양성을 알아보기 위하여 alpha diversity 분석을 수행하였다. 결과적으로, observed diversity에서 직접적으로 관측된 종 풍부도가 유의미하게 감소하였으나, shannon 및 simpson diversity와 같은 풍부도 및 균일도 다양성적인 측면에서는 유의미한 차이가 존재하지 않았음.

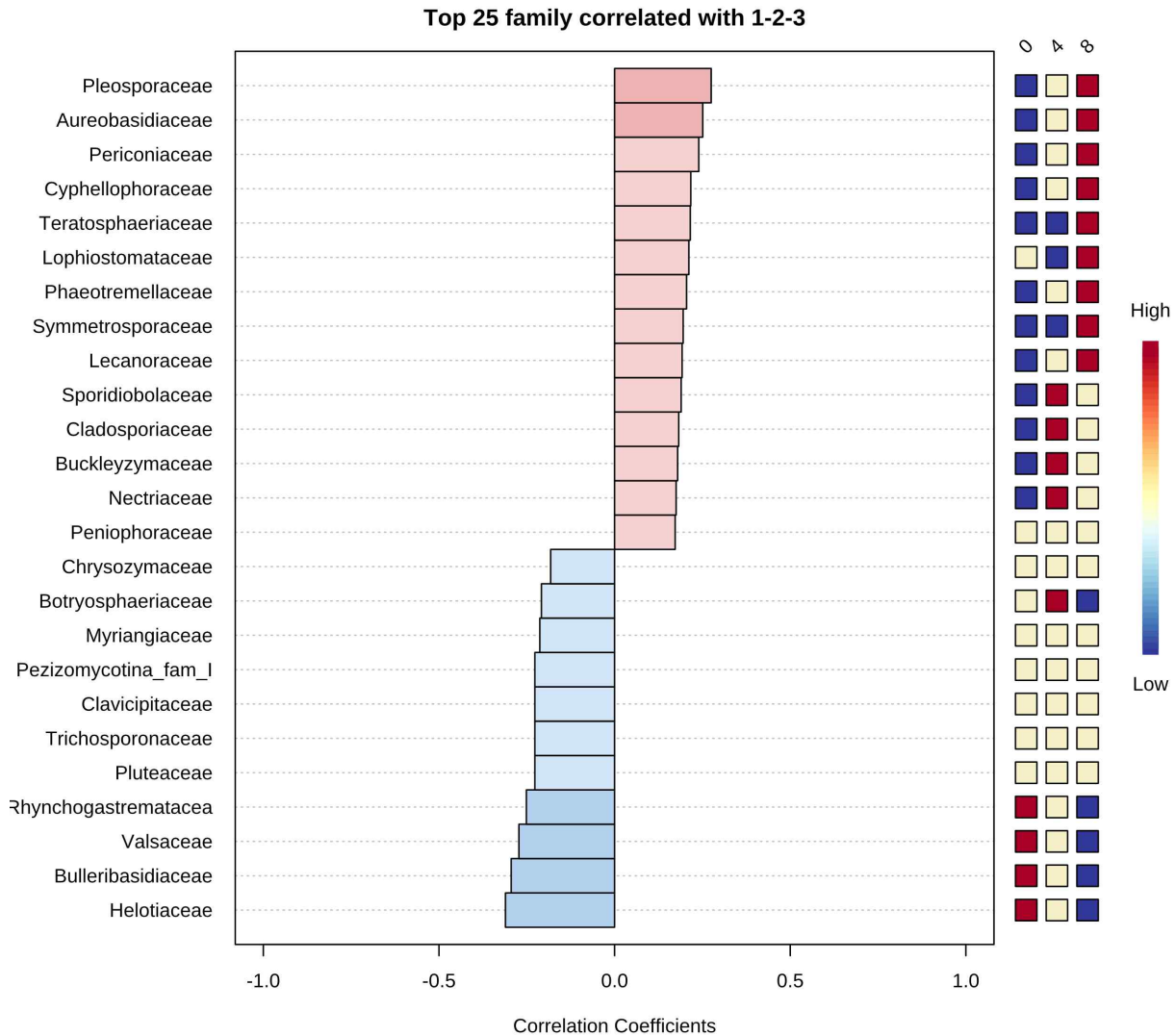


그림 64 KNU-28 제제 처리후 시간별 진균 군집 변화 양상

- KNU-28 제제 처리 후, 진균의 군집 변화와 함께 진균 군집의 변화를 상관관계 분석을 통하여 확인하였음.
- 그림64와 같이 family level에서 확인하였으며, Pleosporaceae 및 Aureobasidiaceae가 증가하는 것이 확인되었음. 이와 반대로, Helotiaceae 및 Bulleribasidiaceae, Valsaceae, Rhynchogastremataceae등이 감소하는 것으로 확인되었음. 또한, 수지증의 원인 식물 병원성 진균으로써 지목된 *Botryosphaeria dothidea*가 포함되어 있는 Botryosphaeriaceae의 감소가 확인되었음.

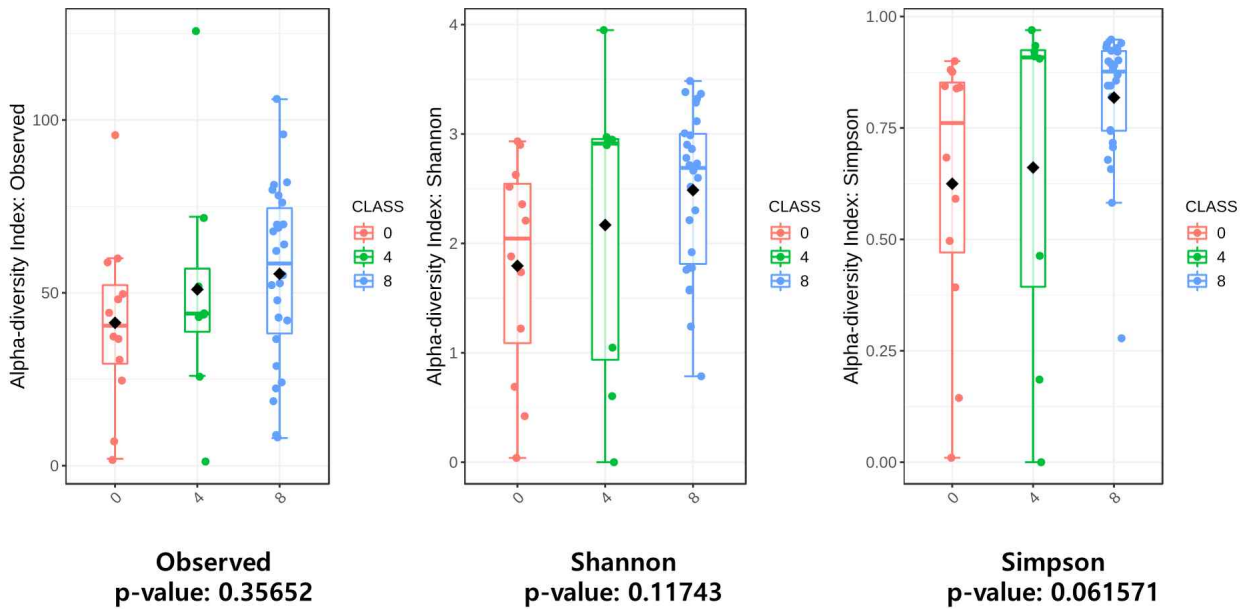


그림 65 KNU-28 제제 처리후 진균 균집의 시간별 alpha diversity 변화

- 미생물 제제 처리 후 샘플 간 다양성을 알아보기 위하여 진균의 alpha diversity 분석을 수행하였음. 결과적으로, observed diversity, shannon 및 simpson diversity와 같은 풍부도 및 균일도 다양성적인 측면에서는 증가하는 경향성은 존재하였으나, 유의미한 차이가 존재하지 않았음.
- 미생물제제 무처리에 따른 주수별 수지증 발생 목질부 미생물 균집 분석
 - KNU-28 제제 처리의 대조군으로써, 시간 별 수지증 발생 복숭아나무 목질부의 수지증 발생부위의 세균의 균집 변화와 함께 진균 균집의 변화를 상관관계 분석을 통하여 확인하였음.

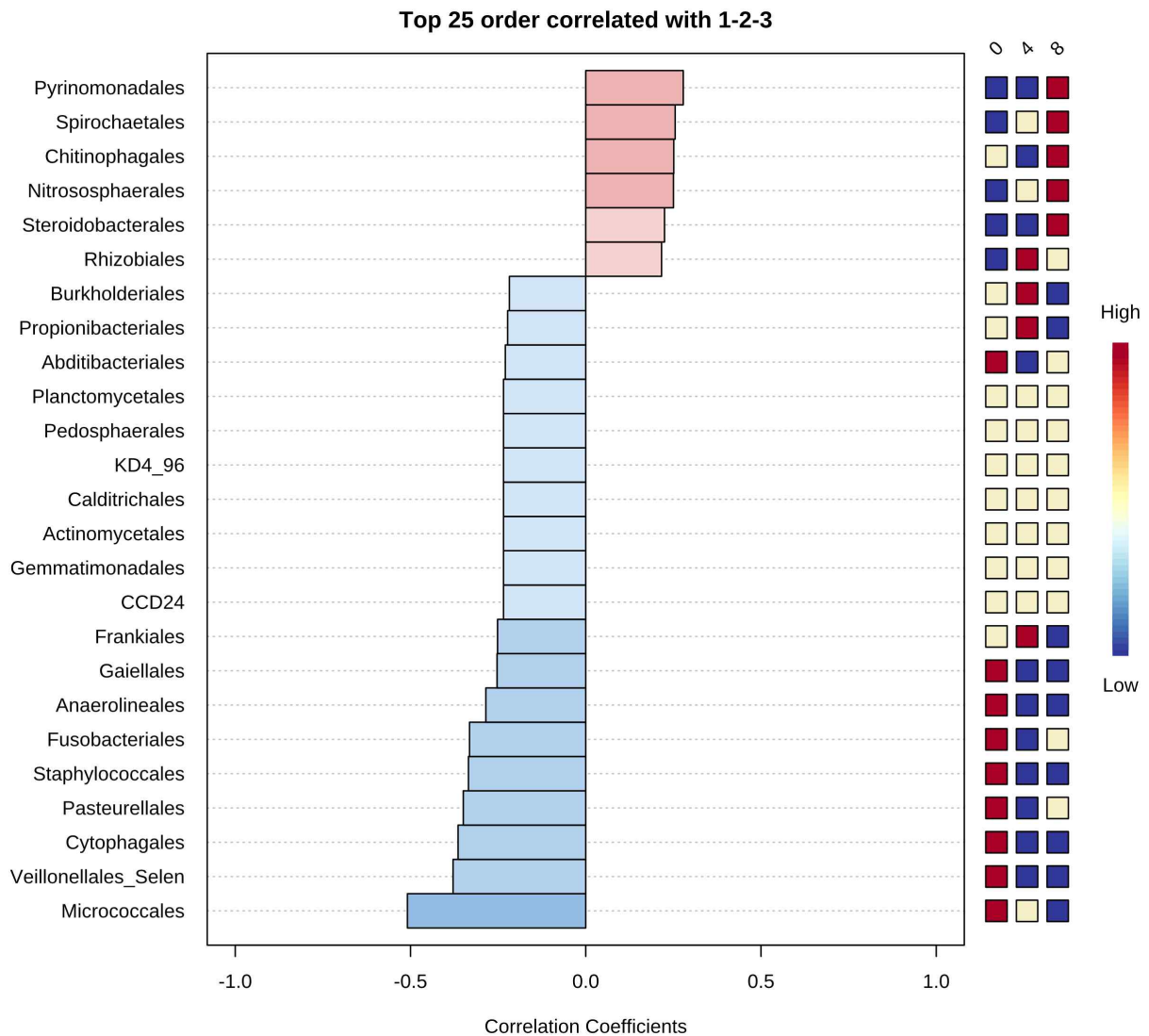


그림 66 무처리군의 시간별 세균 군집 변화

- 그림66과 같이 0, 4, 8주차로 진행되며 시간과 상관관계가 존재하는 세균들을 파악하고자 함. order level에서 확인하였으며, genus level 및 family level에서는 상관관계가 발견되지 않았음.
- Pyrinomonadales, Spirochaetales, Chitinophagales, Nitrososphaerales등과 같은 order등에서 양의 상관관계를 나타내었으며, Cytophagales, Staphylococcales, Fusobacteriales, Anaerolineals, Gaiellales, Frankiales 등과 같은 order등에서 시간에 따른 음의 상관관계를 확인하였음. 그러나, 이하 하위 종속 계통에서 뚜렷한 상관관계는 확인되지 않았음.

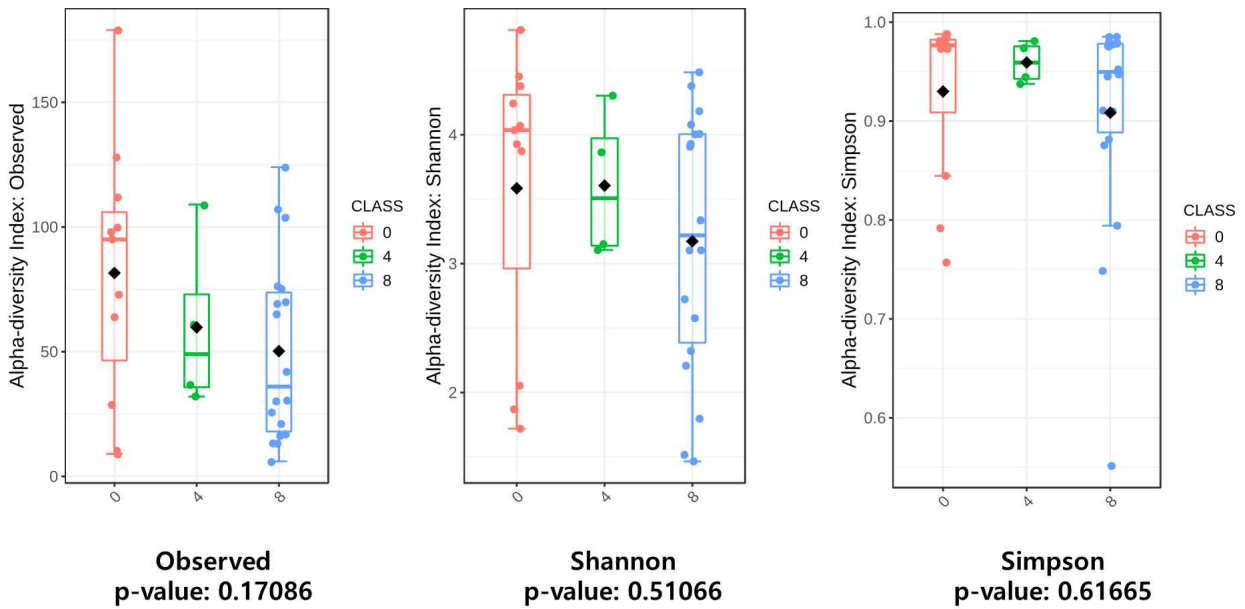


그림 67 무처리군 세균 군집의 시간별 alpha diversity 변화

- 무처리구의 시간 별 샘플 간 다양성을 알아보기 위하여 그림 73과 같이, 세균의 alpha diversity 분석을 수행하였음. 결과적으로, observed diversity, shannon 및 simpson diversity와 같은 풍부도 및 균일도 다양성적인 측면에서는 감소하는 경향성은 존재하였으나, 유의미한 차이가 존재하지 않았음.

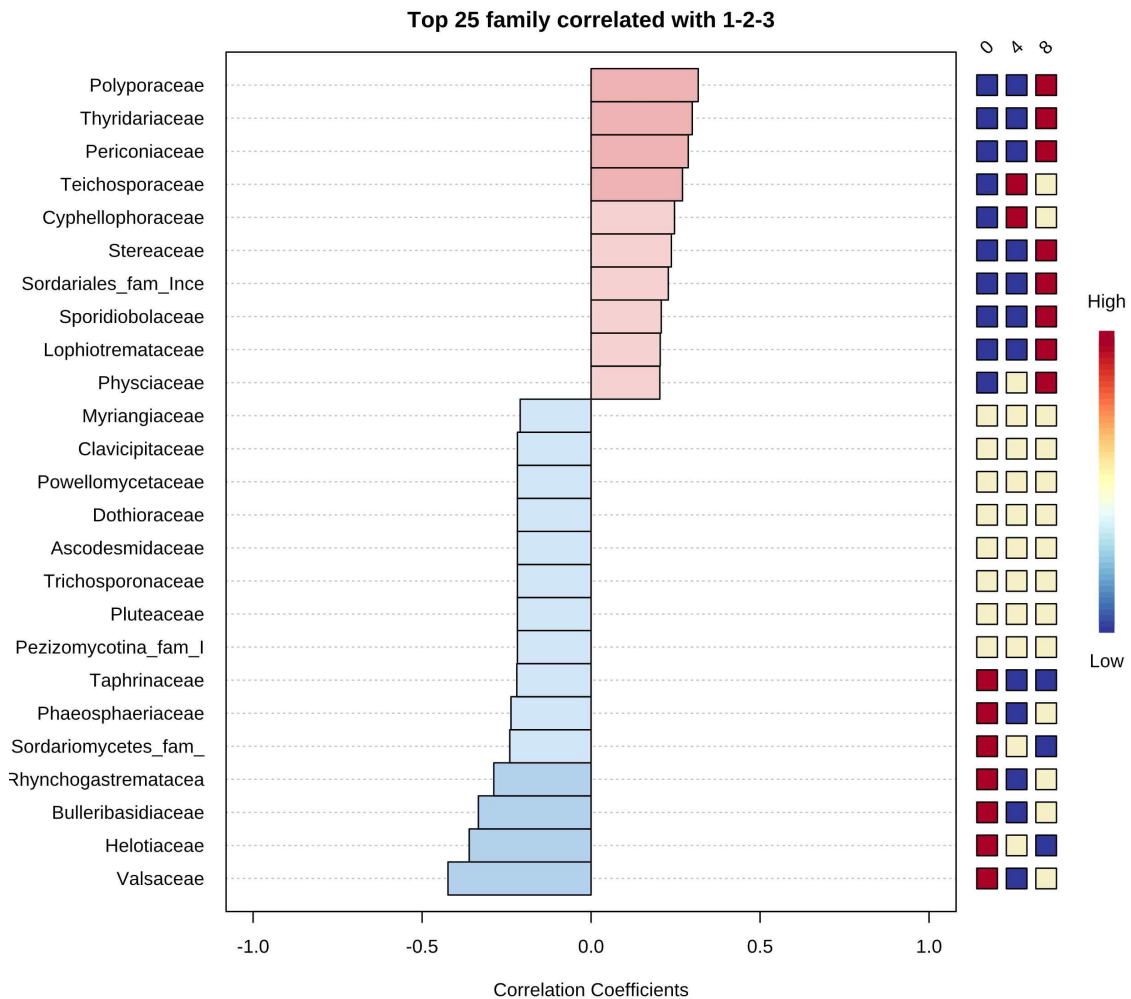


그림 68 무처리군의 시간별 진균 군집 변화

- 무처리군의 시간별 진균 균집 변화를 확인하기 위하여, 0, 4, 8주에 나누어 진균의 변화를 관찰하고자 하였음.
- Family level에서, Polyporaceae, Thyridariaceae, Periconiaceae, Cyphellophoraceae등에서 양의 상관관계를 나타내었으며, Valsaceae, Helotiaceae, Bulleribasidiaceae, Rhtnchogastremataceae 등과 같은 family에서 시간에 따른 음의 상관관계를 확인하였음.

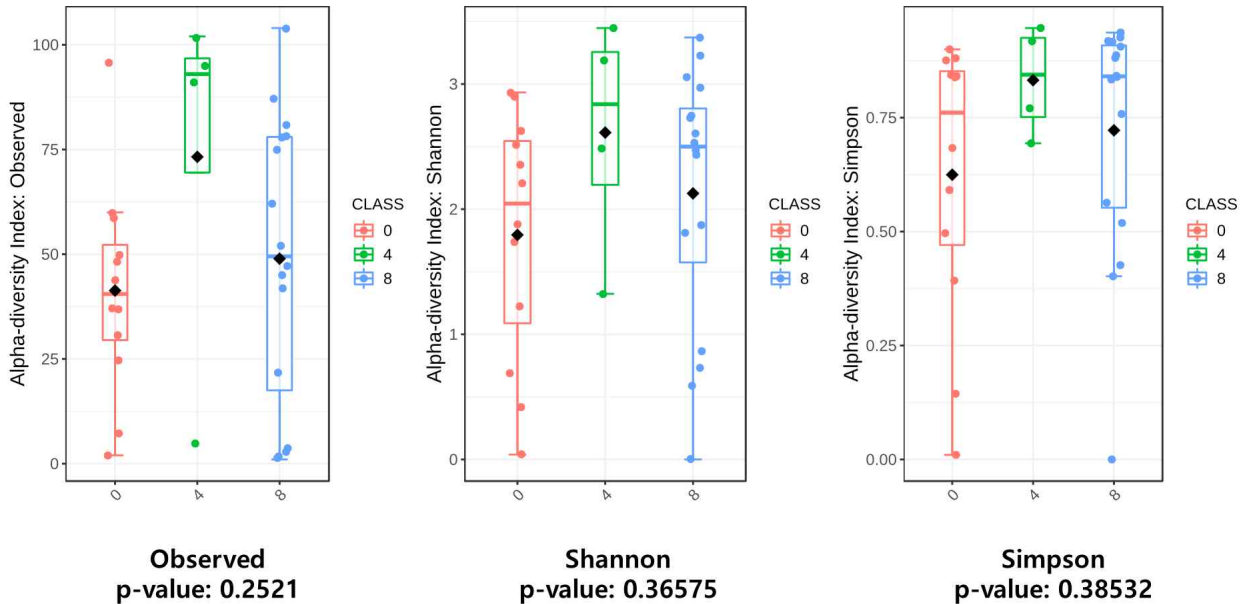


그림 69 무처리군 진균 균집의 시간별 alpha diversity 변화

- 무처리구의 시간 별 샘플 간 다양성을 알아보기 위하여 그림 73과 같이, 세균의 alpha diversity 분석을 수행하였음. 결과적으로, observed diversity, shannon 및 simpson diversity와 같은 풍부도 및 균일도 다양성적인 측면에서 0주에서 4주차에 증가하였으나, 다시 8주차로 이동하며 감소하는 경향성은 보였으나, 유의미한 차이가 존재하지 않았음.
- 결론적으로, KNU-28 처리군에서 수지증 유발 미생물인 *Botryosphaeria dothidea*와 시간별로 음의 상관관계를 확인할 수 있었음.
- Alpha diversity에서, KNU-28처리구 및 무처리구에서, 세균의 다양성 지수가 감소하는 경향이 존재하였으나, KNU-28의 풍부도 외에는 유의미한 통계적 차이를 나타내지 못하였음. 진균 균집에서는, KNU-28 처리구에서는 다양성 지수가 증가하는 경향이 나타났으나, 유의미한 통계적 차이가 존재하지 않았음.
- 이에, 초기 처리 후 8주차의 건강한 복숭아 나무 및 미생물 제제 처리가 시행된 수지증 발생 나무, 수지증이 발생하였으나 미생물 제제 처리가 되어있지 않은 무처리구에 대해 분석을 진행하였음.

2. 복숭아나무 수지증 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 미생물 군집 분석

- 복숭아나무 수지증 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 세균 군집 분석
 - 복숭아나무 수지증에 대한 미생물 제제로써, *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28 균주를 처리한 BacilliB group, 수지증이 발생하지 않은 건강한 HB group, 수지증이 발생하였으나 미생물 제제를 처리하지 않은 GB group으로 나누어 초기 관찰 및 미생물 제제 적용 후 8주로부터 지난 시점의 미생물 군집을 분석하였음.

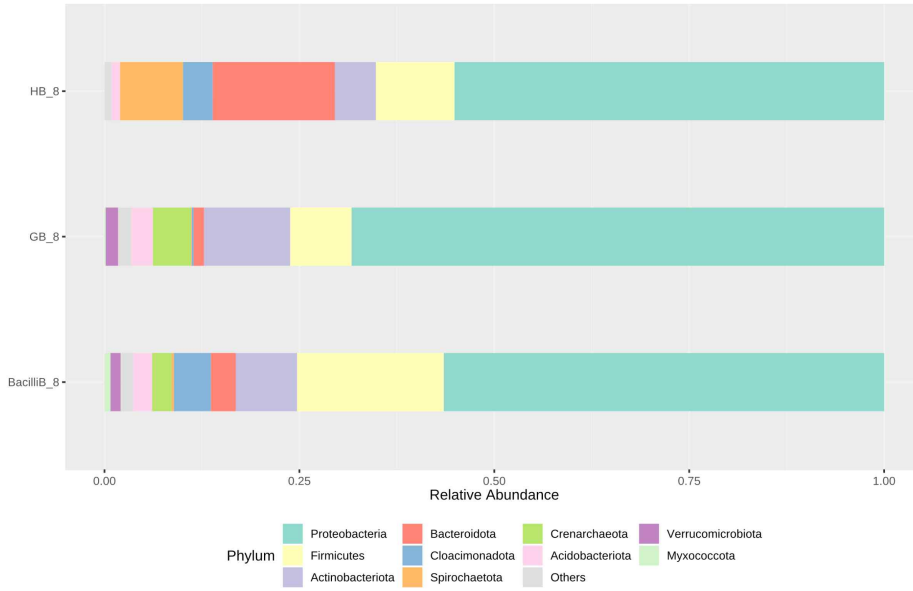


그림 70 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 세균 군집 구조

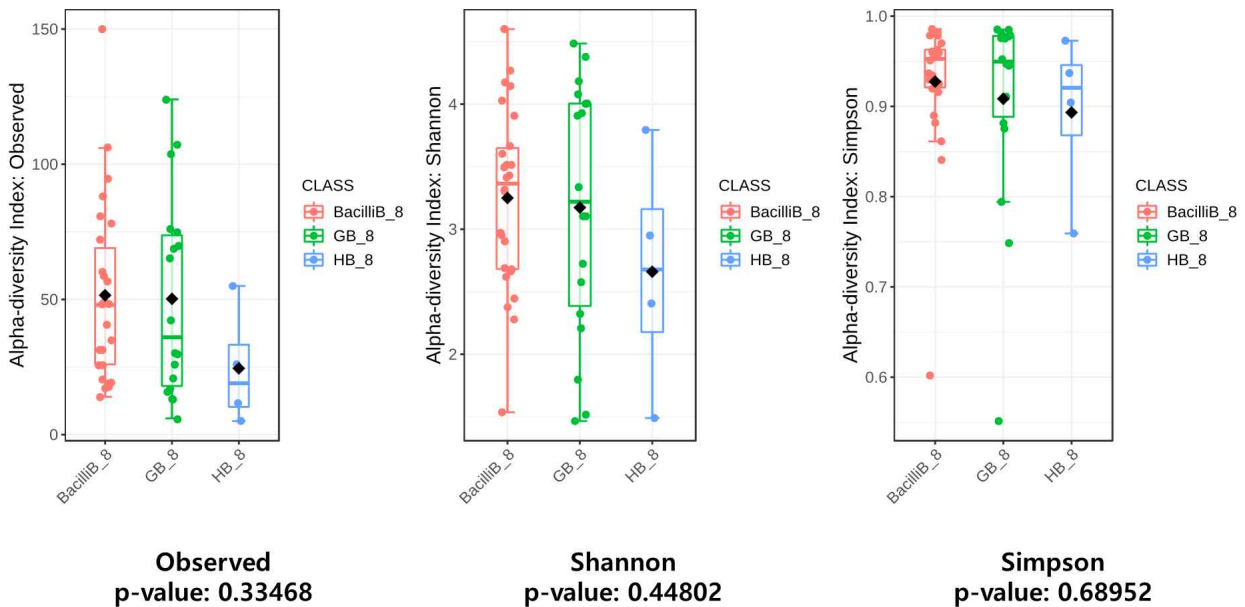


그림 71 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 세균의 alpha diversity

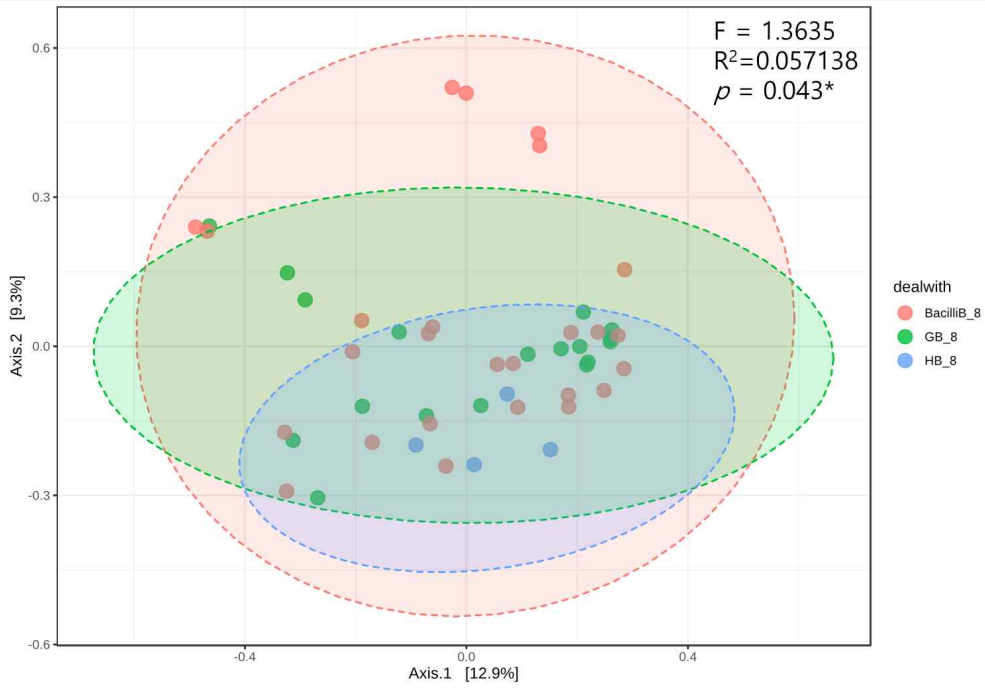


그림 72 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 세균의 beta diversity

- ASV level에서, 각 그룹별 alpha 및 beta diversity 분석을 통하여 미생물 군집간 비교를 수행하고자 함.
- 결과적으로, KNU-28 미생물 제제 처리군, 건강한 복숭아나무 및 무처리군 모두 Shannon, Simpson, Observed 등의 alpha diversity에서 유의미한 차이가 없었음.
- 이와 달리, 각 group별로 차이를 측정하기 위한 Bray-Curtis dissimilarity에서 PERMANOVA 분석 결과, $p = 0.043$ 으로 차이가 존재하였다.

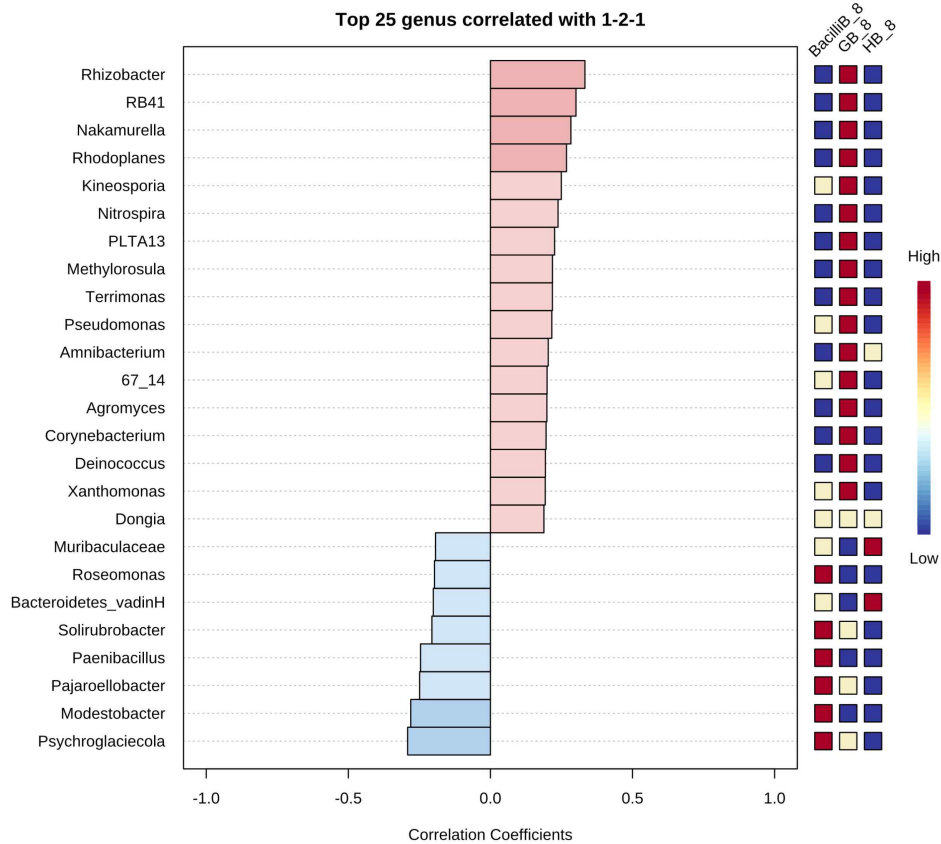


그림 73 무처리구와 상관관계를 가지는 세균의 genus

- 수지증 발생 및 무처리구에는 높은 abundance, KNU-28처리구 및 수지증 미발생 무처리구에는 낮은 abundance를 가지는 세균의 genus를 분류하였다. 분류 결과, 수지증 발생 무처리구에서는 *Rhizobacter sp.*, *RB41*, *Nakamurella sp.*, *Rhodoplanes sp.* 등의 세균이 상대적으로 높게 존재하였으며, 이와는 반대로 KNU-28 처리구에서는 *Psychroglaciecola sp.*, *Modestobacter sp.* 와 같은 세균들의 abundance가 상대적으로 높게 측정되었다.

■ 복숭아나무 수지증 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 진균 균집 분석

- 복숭아나무 수지증에 대한 미생물 제제로써, *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28 균주를 처리한 BacilliB group, 수지증이 발생하지 않은 건강한 HB group, 수지증이 발생하였으나 미생물 제제를 처리하지 않은 GB group으로 나누어 초기 관찰 및 미생물 제제 적용 후 8주로부터 지난 시점의 미생물 균집을 분석하였음.

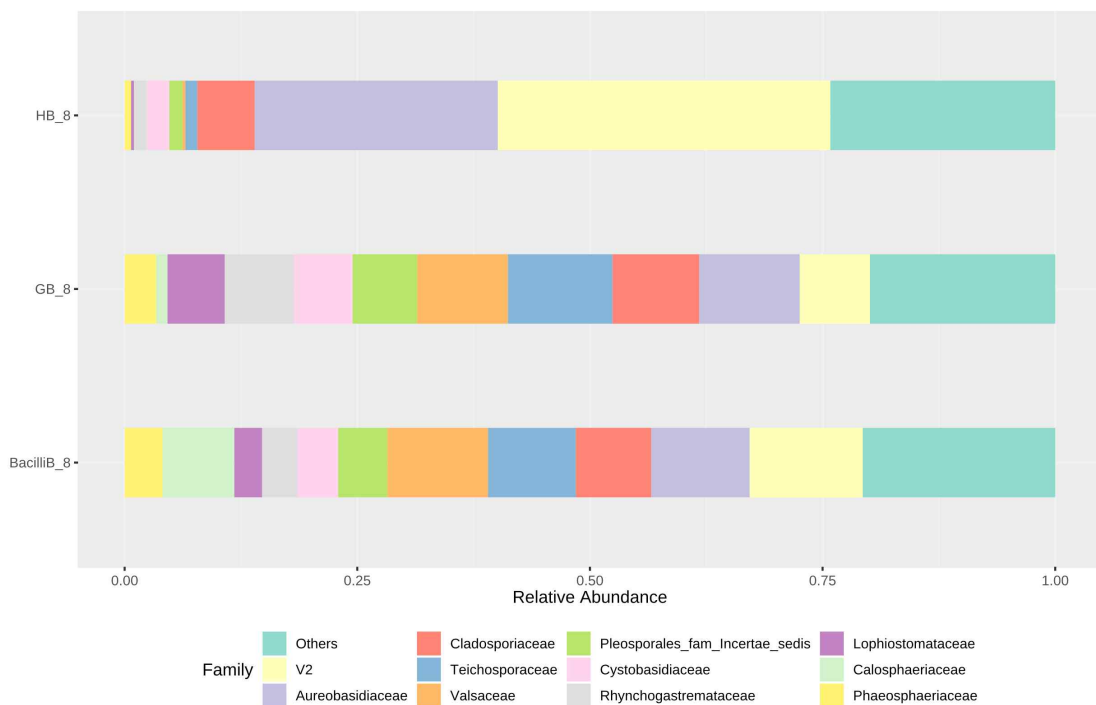


그림 74 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 진균 균집 구조

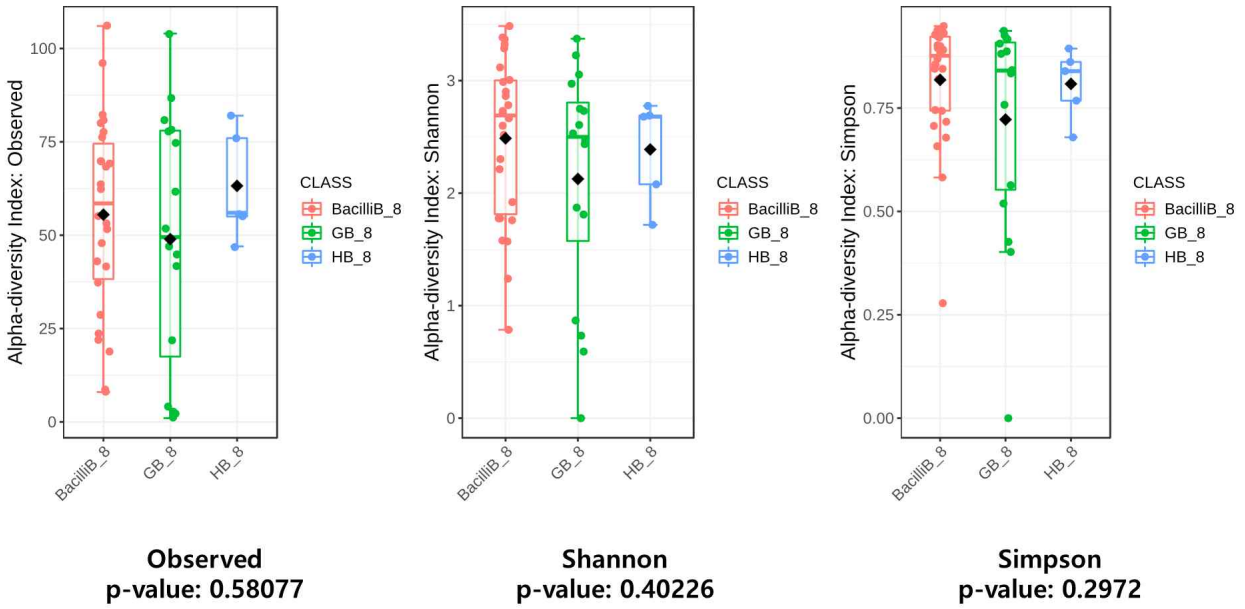


그림 75 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 진균의 alpha diversity

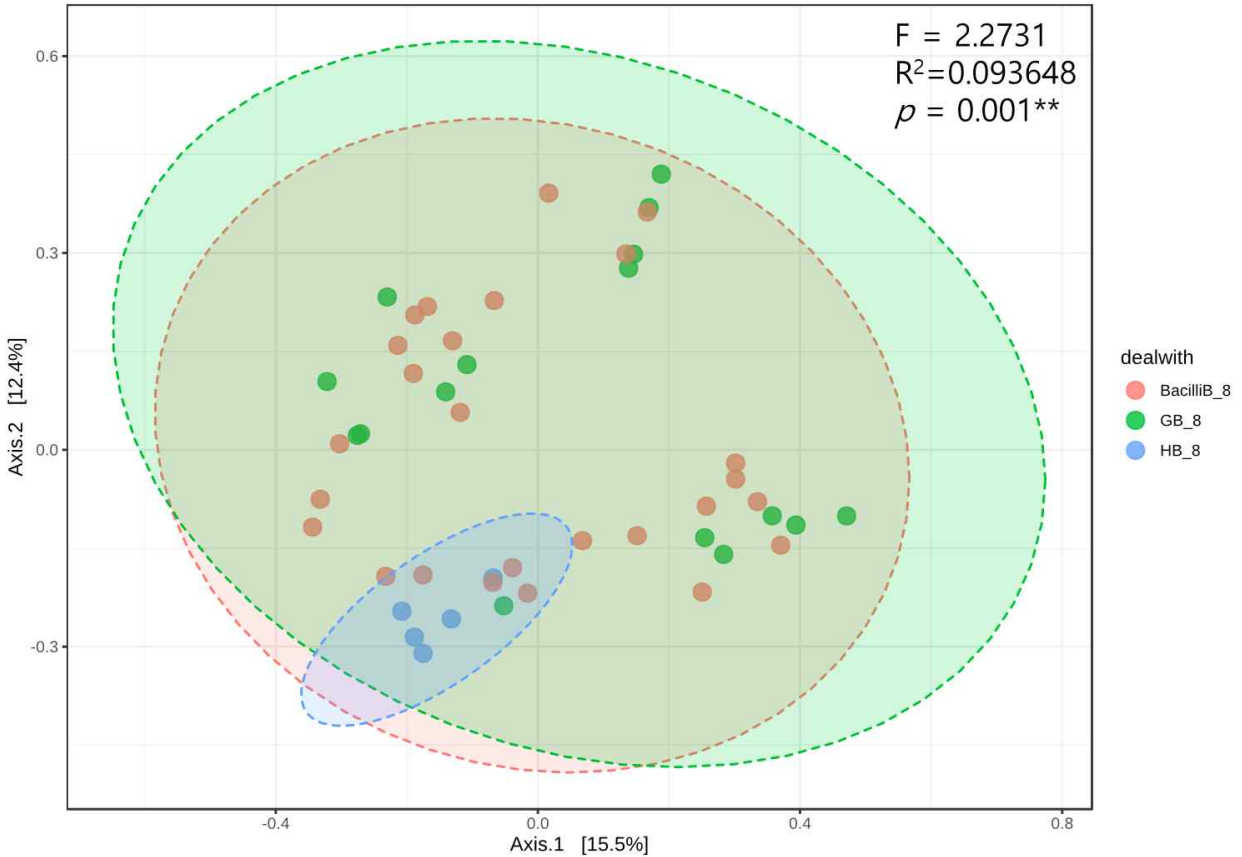


그림 76 미생물 제제 처리 유무에 따른 목질부 진균의 beta diversity

- ASV level에서, 각 그룹별 alpha 및 beta diversity 분석을 통하여 미생물 군집간 비교를 수행하고자 함.
- 결과적으로, KNU-28 미생물 제제 처리군, 건강한 복숭아나무 및 무처리군 모두 Shannon, Simpson, Observed 등의 alpha diversity에서 유의미한 차이가 없었음.
- 이와 달리, 각 group별로 차이를 측정하기 위한 Bray-Curtis dissimilarity에서 PERMANOVA 분석 결과, $p = 0.001$ 으로 차이가 존재하였다.

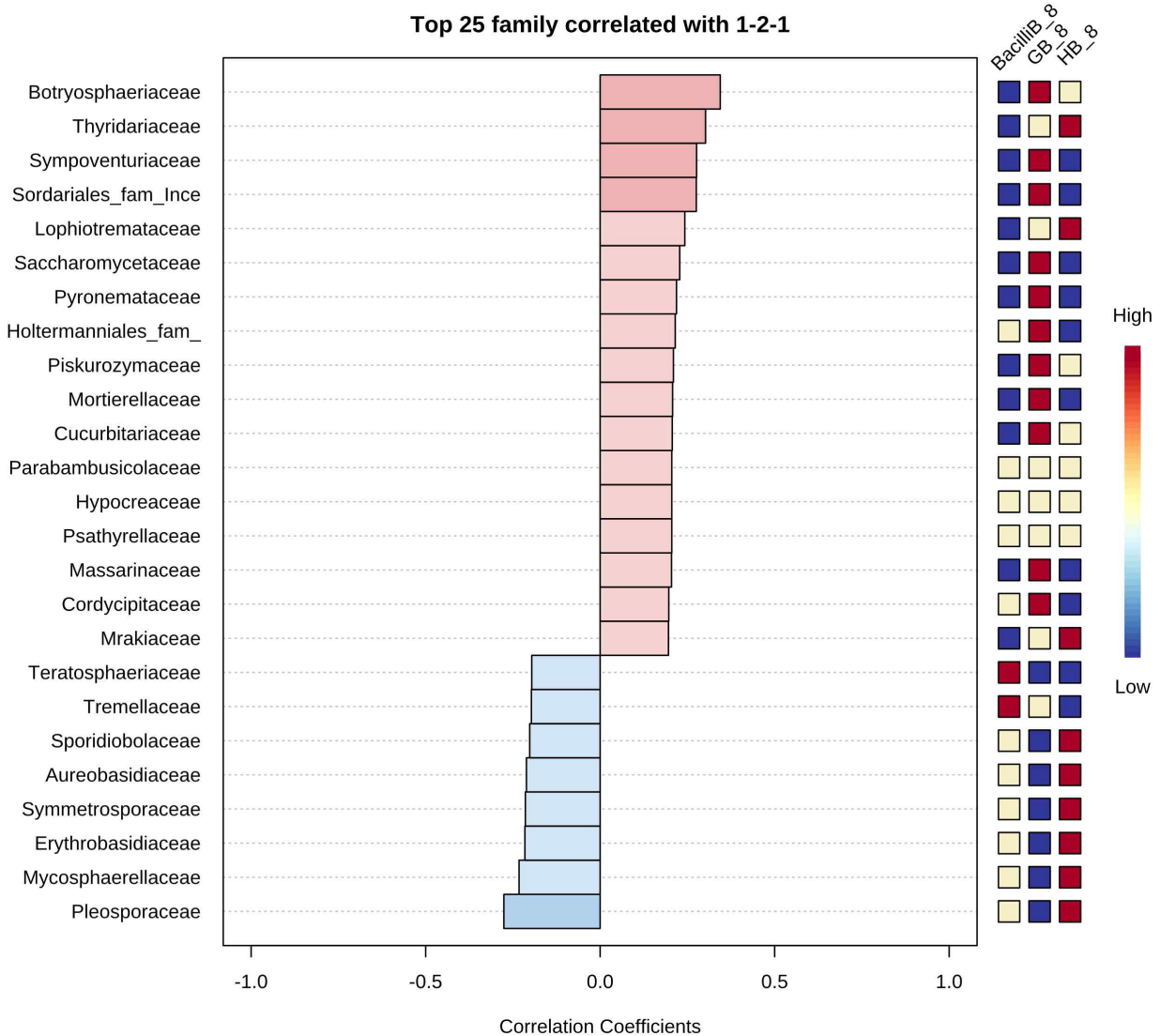


그림 77 무처리구와 상관관계를 가지는 진균의 family

- 수지증 발생 및 무처리구에는 높은 abundance, KNU-28처리구 및 수지증 미발생 무처리구에는 낮은 abundance를 가지는 진균의 genus를 분류하였다. 분류 결과, 수지증 발생 무처리구에서는 Pleosporaceae 등의 진균이 상대적으로 높게 존재하였으며, 무처리구에서는 Botryosphaeriaceae, Thyridariaceae, Sympoventuriaceae와 같은 진균 family 등이 확인되었음. 수지증의 원인 식물병원성 진균으로써 지목된 *Botryosphaeria dothidea*가 포함되어 있는 Botryosphaeriaceae가 가장 높은 연관성을 가지는 것으로 확인되었음.

○ 선발 미생물 유래 활성 물질의 증폭 생산 조건 조사 및 표준화 방안 연구

■ 활성물질의 증폭 생산 조건 조사

- 분리된 *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28 균주를 LB agar 및 Nutrient agar 배지에서 희석도말하여 30°C 에서 16시간 배양함
- 배양된 agar 배지의 colony를 5mL LB broth에 접종하여 30°C 에서 12시간 진탕배양을 통해 Genomic DNA를 추출하기 위한 전배양을 실시함
- 전배양이 완료된 길항미생물은 50mL의 동일배지에 접종하여 30°C 에서 진탕배양을 실시함.
- *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28은 Gram-positive 미생물로 peptidoglycan 층이 두껍

기 때문에, 생육곡전상 Early exponential phase에 해당하는 3시간때 OD600=1.0 일때의 bacterial cell을 전장유전체 회수를 위해 harvest 하였음.

- 분리된 길항미생물 균주의 분자생물학적 분석을 위해 길항미생물의 genomic DNA를 추출하였다. Full-culture 된 배양액 5ml을 20℃, 12,000 rcf에서 5분간 원심분리하여 cell down후 균체를 회수하였다.
- 균체 회수 후 Promega DNA extraction Kit을 이용하여 DNA를 추출하였다.
- 추출된 DNA는 SQK-LSK109(Oxford Nanopore Technologies) 및 NEBNext Companion Module for Oxford Nanopore Technologies 라이게이션 시퀀싱 키트(New England BioLabs, USA)를 사용하여 라이브러리를 준비하였다.
- 경북대학교의 차세대 시퀀싱(NGS) 코어 시설에서 Oxford Nanopore MinION을 사용하여 전장유전체 분석을 수행하였음. Guppy software(v.4.4.1)를 활용한 Basecalling을 실시하였으며, Quality check을 위해 EPI2ME를 사용하였음.
- N50 값은 5,139bp 으로, 1,655,695,148개의 서열을 얻었으며, 최종적으로 Flye(v.2.9)를 이용하여 전장유전체 조립을 수행하였음.
- 최종적으로 조립된 전장유전체는 PGAP과 RAST system을 활용하여 Annotation을 진행함
- NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)을 이용한 gene annotation을 진행하였음.

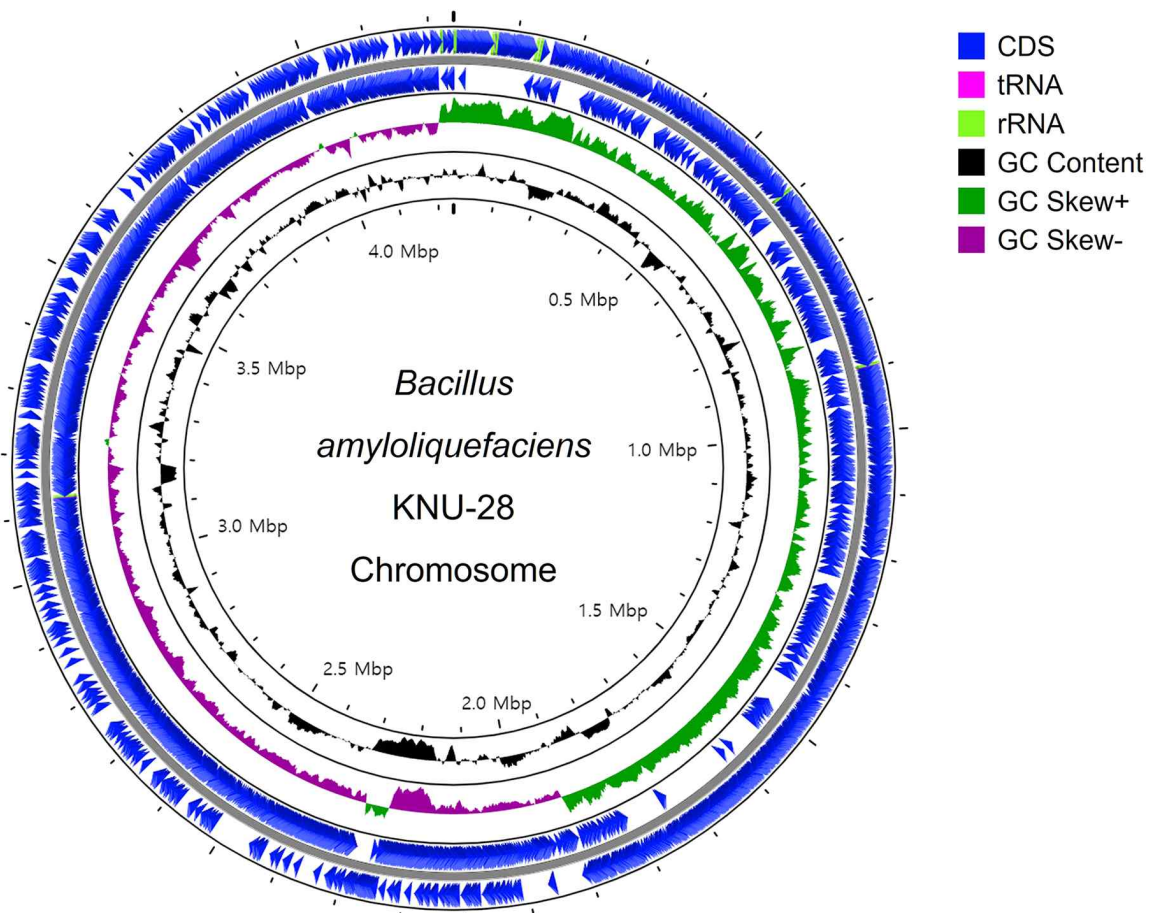


그림 78 *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28의 전장유전체

- Assembly 및 Annotation 결과 약 4,238,926 bp의 유전체를 보유하는 것으로 확인되었으며, 3,313개의 단백질 coding sequence, 28개의 rRNA, 86개의 tRNA, 5개의 ncRNA 및 873개의 유사유전자를 보유하는 것을 확인하였음.
- 확보된 *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28 균주는 Amino acids and derivatives, carbohydrates, cofactors, vitamins, prosthetic groups, pigments, protein metabolism,

nucleosides and nucleotides와 같이 Central dogma에 관련되거나 Bacterial cell의 energy대사에 관련된 유전자들이 주로 존재하였음.

- 또한, surfactin, bacillomycin, bacilysin과 같은 다양한 항진균 lipopeptide를 생산하는 능력 또한 갖추고 있음

Gene	Size(bp)	Protein
lmr(B)	1440	lincomycin efflux MFS transporter
srfAC	3836	surfactin non-ribosomal peptide synthetase
srfAD	732	surfactin biosynthesis thioesterase SrfAD
bamA	11949	bacillomycin D hybrid PKS/NRPS
bamD	1203	bacillomycin D biosynthesis malonyl-CoA transacylase
bacA	615	bacilysin biosynthesis protein
bacC	762	bacilysin biosynthesis protein
satA	522	streptothricin N-acetyltransferase
csn	837	chitosanase

표 15 KNU-28의 주요 antifungal gene

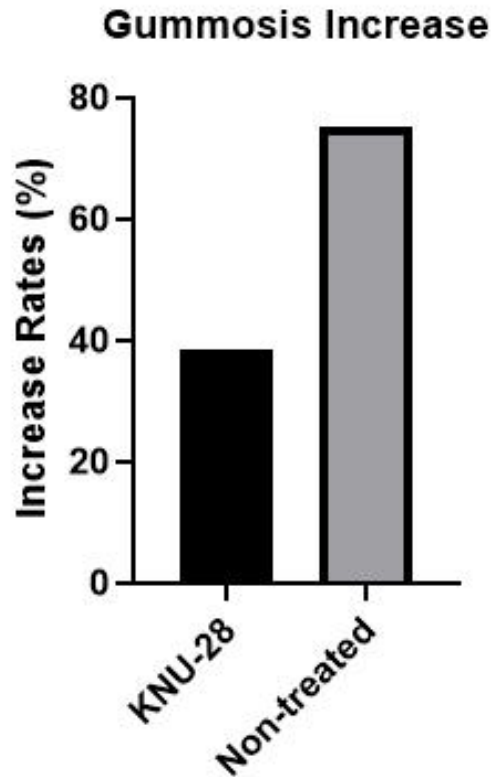


그림 79 미생물 포장 적용시 수지증 증가율

- *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28의 실제 포장 적용시 무처리구에 비해 수지증 추가 발생률이 약 51.15% 낮음.

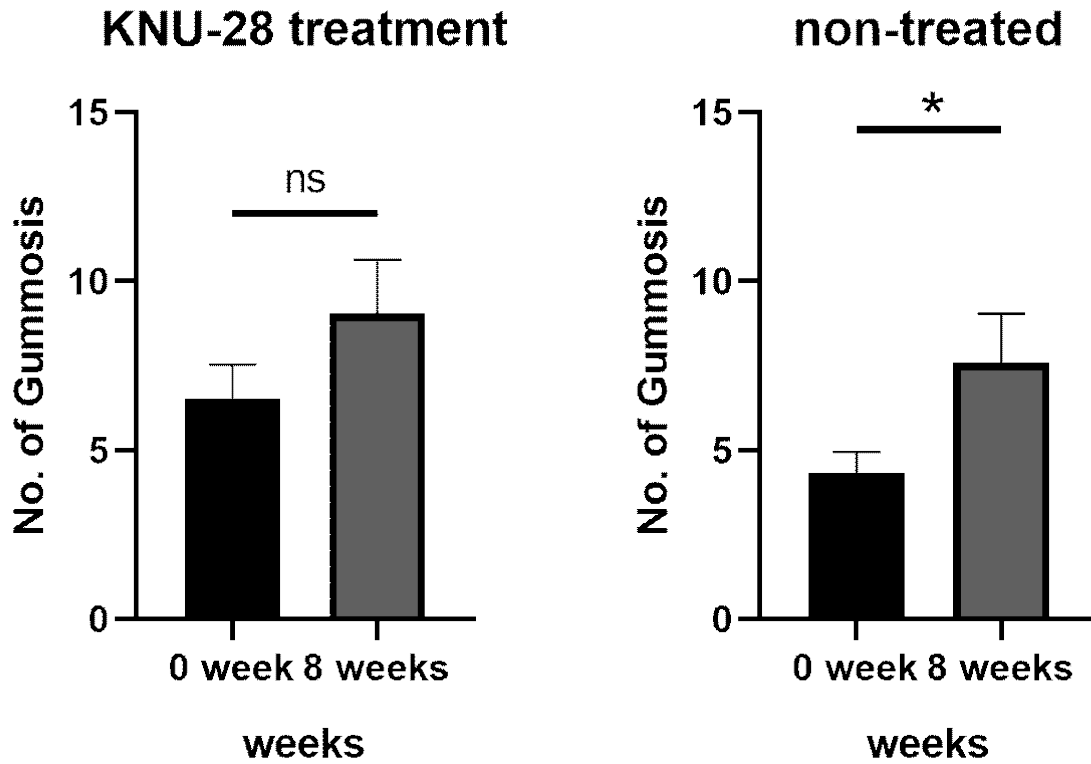


그림 80 미생물 처리 후 8주 뒤의 KNU-28 처리구와 무처리구의 수지증 발생 개수

- 무처리구는 통계적으로 유의미하게 증가한 것으로 나타나지만, KNU-28의 처리구는 통계적으로 유의미하게 증가하지 않은 것으로 나타남.

표 16. KNU-28 처리구 회귀분석 결과표

	<i>B</i>	β	R^2	<i>F</i>
상수	1.174	-	.0056	1.599
사용 빈도	.2343	.075	-	-

$p = .2071$

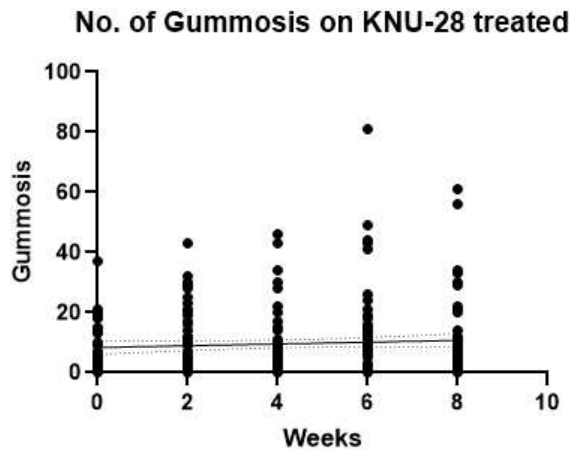


그림 81 수지증 길항균 처리 후 수지증 발생 횟수

표 17. 무처리구 회귀분석 결과표

	B	β	R^2	F
상수	4.668	-	.0254	9.291**
사용 빈도	.5105	.159**	-	-

$p = .0025$

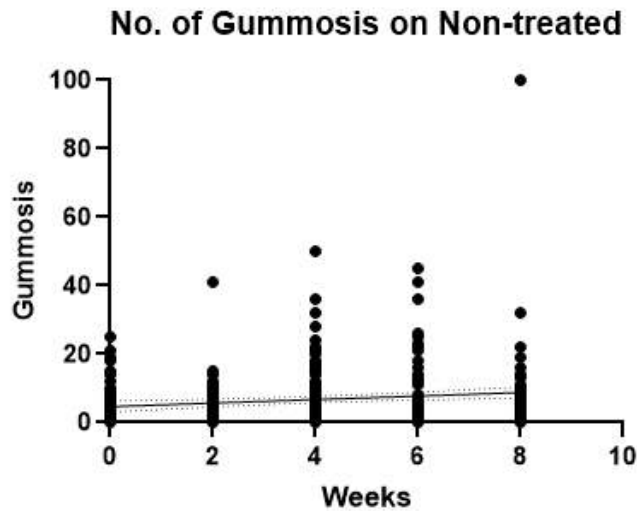


그림 82 수지증 길항균 무처리구의 수지증 발생 횟수

- 상관분석 및 회귀분석을 통하여 시간이 지남에 따라 처리군 및 무처리군 간 수지증의 증감률을 비교하고자 하였음. 결과적으로, 무처리구에서는 시간의 경과에 따라 수지증이 증가하는 양의 상관관계가 있음($p = 0.0025$)
- , 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) KNU-28의 처리구는 시간의 경과에 따른 상관관계가 존재하지 않았음($p = 0.2071$).

		DF	Sum of Sqs	Means Sqs	F. model	R^2	Pr
KNU-28 treatment	Treatment	4	934.1	233.5	1.868	0.02599	0.1162
	Residual	280	35004	125			
	Total	284	35938				
Non treatment	Treatment	4	1605	401.2	4.966	0.05313	0.0007 **
	Residual	354	28599	80.79			
	Total	358	30204				

표 18. KNU-28 처리에 따른 회귀분석 주요 통계 값

■ 제 2 세부연구기관 (경북대학교, 김원찬 교수 연구실)

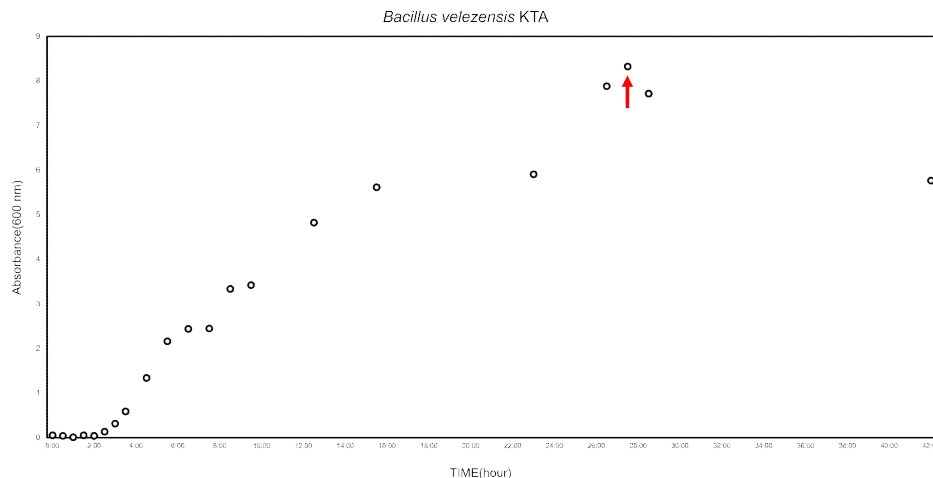
○ 수지증 생물방제균 유전체분석 및 인축 독성 유전자 판별

- 선발 길항미생물의 균체와 복숭아 수지 병원균의 생육 억제 효능 검증을 통한 물리적인 상호작용에 의한 면역 체계 검증
 - 이전 연구에서 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 길항 능력을 갖추고 있다고 판단하였던 *Bacillus velezensis* KTA 균주를 물리적인 요인에 의한 *Botryosphaeria dothidea*의 생육 억제 정도를 확인하기 위해 antagonist test를 수행하였다.
 - 복숭아 수지 병원균인 *Botryosphaeria dothidea*와 이전 연구에서 분리한 *Bacillus velezensis* KTA 균주를 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 접종하여 25°C에서 120 시간 생육하였다 (그림 1).

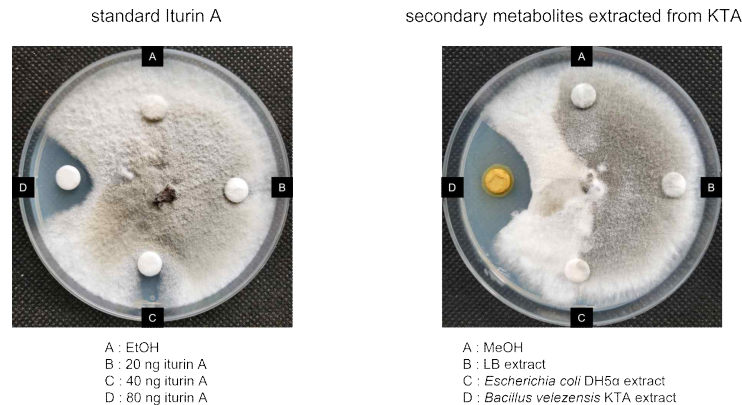


<그림 83. *Botryosphaeria dothidea*에 대한 물리적인 상호작용에 의한 면역 체계 검증을 위한 *Bacillus velezensis* KTA의 antagonist test>

- 그 결과, *Bacillus velezensis* KTA 균주의 근처에 *Botryosphaeria dothidea*가 자라지 못하고 투명한 지역(clear zone)이 생긴 것을 확인하였다.
 - 이것으로, *Bacillus velezensis* KTA 균주의 물리적인 요인에 의해 균주 근처에서 *Botryosphaeria dothidea* 균사 성장을 억제한다는 것을 간접적으로 검증하였다.
- 선발 길항미생물에 의해 분비된 이차 대사물질에 의한 복숭아 수지 병원균의 생육 억제 효능 검증
 - *Bacillus velezensis* KTA의 이차 대사물질 생산을 위해 37°C에서 growth profiling을 실시하였다 (그림 2).



- 이차 대사물질을 충분히 생산할 수 있는 정체기 (stationary phase) [그림 2에서 화살표를 표시한 phase]에서의 배양 상등액에 HCl을 첨가하여 pH 2.0으로 적정 후 생성된 침전물을 methanol을 이용하여 이차 대사산물을 분리 및 추출하였다.
- *Bacillus velezensis* KTA로부터 추출된 이차 대사산물 용액을 이용하여 antagonism test를 통해 *Botryosphaeria dothidea*의 생육 억제를 확인하였다 (그림 3).

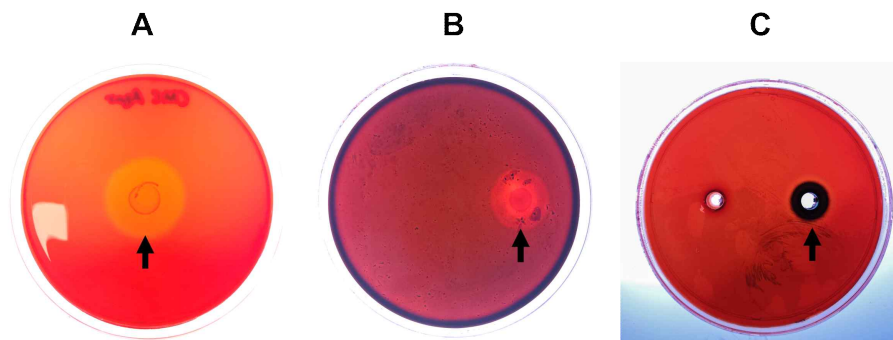


<그림 85. Iturin A 용액, *Escherichia coli* DH5a와 *Bacillus velezensis* KTA로부터 추출한 이차대사물질 용액의 antagonist test>

- 그 결과, negative control로 사용한 EtOH(ethanol), MeOH(methanol), LB extract 그리고 *Escherichia coli* DH5a 추출용액에서는 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 생육 억제 능력이 전혀 없는 것을 확인하였다.
 - 특히, standard iturin A 및 *Bacillus velezensis* KTA의 경우에는 이차 대사산물 추출용액에서 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 생육 억제가 일어나는 것을 확인하였다.
 - 이는 *Bacillus velezensis* KTA가 생산하는 이차 대사산물이 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 억제능을 가지는 것을 의미한다.
- 복숭아 수지 병원균 중 진균의 세포벽을 이루는 chitin, β -glucan, cellulose 다당류를 분해할 수 있는 효소 분비 및 활성 측정을 통해 진균의 생장을 선택적으로 저해 가능성 검증
- *Bacillus velezensis* KTA로부터 세포벽 분해 효소를 생산하기 위해 LB 액체배지에 접종 후 37°C에서 5일간 배양한 뒤 배양액을 원심분리 후 0.2 μ m membrane filter를 이용하여 여과하였다.
 - cellulase activity assay를 위한 배지(A) 제조 방법은 1 L 기준으로 KH_2PO_4 1.0 g, MgSO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, MnSO_4 0.01 g, NH_4NO_3 0.3 g, CMC 10.0 g과 Agar 15 g을 첨가하고 NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하여 petri dish에 분주하였다.
 - chitinase activity assay를 위한 배지(B) 제조 방법은 1 L 기준으로 yeast extract 2.0 g, colloidal chitin 2.0 g, KH_2PO_4 0.3 g, K_2HPO_4 0.7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.017 g과 Agar 15 g을 첨가하고 NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하여 petri dish에 분주하였다.
 - colloidal chitin 제조 방법은 Chitin(DAEJUNG) 분말 4 g 을 85% H_3PO_4 100 ml에 2시간 동안 현탁 시킨 후 혼합액을 guaze를 이용하여 85% H_3PO_4 로부터 분해되지 않은 chitin을 제거하였다. Colloidal chitin 혼합액의 H_3PO_4 을 제거하기 위해 증류수 1 L를 첨가하여 5,000 x g에서 1시간 원심분리시킨 후 상등액을 제거하고, pH 2.0이 될 때까지 세척

한 뒤 6 M NaOH를 첨가하여 pH 7.0으로 적정하였다. 세척된 colloidal chitin을 Whatman No. 1 여과지로 상등액을 제거한 후 60°C에서 24시간 건조 시켜 colloidal chitin을 제조하였다.

- β -glucanase activity assay를 위한 배지(C) 제조 방법은 1 L 기준으로 urea 0.3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 3.0 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g, CoCl_2 0.002 g, peptone 1.0 g, yeast extract 10.0 g Tween 80 1.0 g, CMC 10.0 g과 Agar 15 g을 첨가하고 NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하여 petri dish에 분주하였다.
- 각각의 배지에 여과된 배양여액을 분주한 뒤 37°C에서 5일 동안 배양하였으며, 0.1% congo red 용액으로 20분간 염색한 후 1 M NaCl 용액으로 15분간 세척하고 4°C에서 16시간 뒤 배양여액 주변 투명 환을 확인하여 분해 능력을 검정하였다.



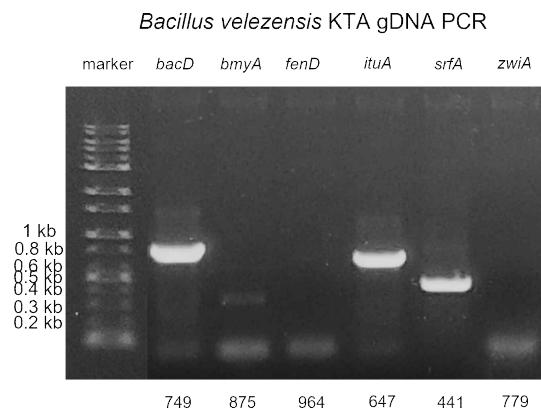
<그림 86. *Bacillus velezensis* KTA의 cellulase, chitinase 및 β -glucanase activity assay>

- 그 결과, A, B와 C 배지에서 모두 배양액 근처[그림 4에서 화살표를 표시한 영역]에 투명한 환이 나타나 각각 cellulase, chitinase 그리고 β -glucanase의 활성이 나타난 것으로 확인하였고, 활성 능력 정도는 A > B > C 순서로 조사되었다.
- 이는 *Bacillus velezensis* KTA가 생산하는 세포벽 분해 효소가 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 억제능을 가지는 것을 의미한다.

- 선발 길항미생물이 생성하는 항생물질의 생합성 유전자를 확인하기 위하여 항진균성 폴리펩티드 항생제인 *bacillomycin D*, 항진균성 리포펩티드 항생제인 *fengycin*, *iturin A*, *surfactin*, 그람 양성 및 그람 음성 원핵 미생물 아미노폴리올 항생제인 *zwittermicin A* 유전자에 대한 특이적 프라이머를 제작
 - 선발 길항미생물인 *Bacillus velezensis* KTA 균주를 Phenol/ Chloroform/ isoamyl alcohol DNA extraction 방법을 통해 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다.
 - 추출된 gDNA는 이차 대사산물 후보 물질인 bacilysin, bacillomycin D, fengycin, iturin A, surfactin 및 zwittermicin A 유전자의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.
 - PCR 수행을 위한 혼합물에는 1 U PrimeSTAR^R HS DNA Polymerase (Takara), 10 mM dNTP Mixture (Takara), 60 ng genomic DNA 및 0.5 μ M 프라이머가 포함되어 있다.
 - PCR은 98°C에서 5분 preheating 한 후 98°C에서 30초, 52°C에서 10초, 72°C에서 1분 30초의 단계를 32 cycles 반복하여 수행하였다.
 - 증폭된 PCR product는 ExpinTM Combo GP mini (GeneAll)를 통해 정제하여 1% Agarose gel에 전기영동하여 예상 PCR product size인 749 bp, 647 bp, 441 bp 부근에서 PCR product가 존재하는 것을 확인하였다. (그림 5).

<표 19. 이차 대사산물 프라이머 목록>

Antibiotic	Gene	Primers	Primer sequence (5'→3')	Fragment size(bp)
Bacilysin	<i>bacD</i>	BACD-F1 BACD-R1	AAAAACAGTATTGGTYATCGCTGA CCATGATGCCTTCKATRCTGAT	749
Bacillomycin D	<i>bmyA</i>	BACC1F BACC1R	GAAGGACACGGCAGAGAGTC CGCTGATGACTGTTCATGCT	875
Fengycin	<i>fenD</i>	FEND1F FEND1R	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT GCTGTCCGTTCTGCTTTTTC	964
Iturin A	<i>ituA</i>	ITUD1F ITUD1R	GATGCGATCTCCTTGGATGT ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	647
Surfactin	<i>srfA</i>	SUR3F SUR3R	ACAGTATGGAGGCATGGTC TTCCGCCACTTTTTCAGTTT	441
Zwittermicin A	<i>zwiA</i>	ZWIF2 ZWIR1	TTGGGAGAATATACAGCTCT GACCTTTTGAATGGGCGTA	779

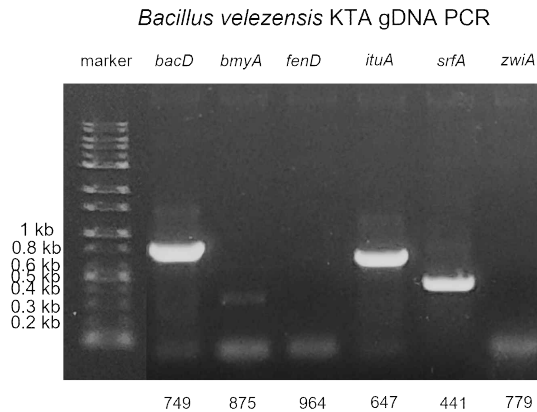


<그림 87. 이차 대사산물 유전자 영역이 증폭된 PCR product>

- 그러나 각각 bacillomycin D, fengycin, zwittermycin에 해당하는 PCR product가 확인되지 않아, bacilysin, bacillomycin D, fengycin 유전자의 다른 프라이머를 추가로 제작하여 PCR을 수행하였다.
- 반면, zwittermycin A 유전자는 *Bacillus velezensis* KTA 균주와 관련된 자료가 적어, 이를 참고하여 추후 실험부터 배제하였다.
- 그리고 추후 연구인 RT-PCR 실험을 위해 housekeeping 유전자인 *gyrase b* 유전자의 프라이머 또한 합성하여 PCR을 수행하였다.
- PCR은 98°C 에서 5분 preheating 한 후 98°C 에서 30초, 52°C 에서 10초, 72°C 에서 1분의 단계를 40 cycles 반복하여 수행하였다.
- 증폭된 PCR product는 Expin™ Combo GP mini (GeneAll)를 통해 정제하여 1% Agarose gel에 전기영동하여 예상 PCR product size인 180 bp, 471 bp, 573 bp, 647 bp, 441 bp 및 585 bp 부근에서 PCR product가 모두 존재하는 것을 확인하였다. (그림 6).

<표 20. 이차 대사산물과 housekeeping 유전자 프라이머 목록>

Antibiotic	Gene	Primers	Primer sequence (5'→3')	Fragment size(bp)
Bacilysin	<i>bacA</i>	BAC F1	GACCGGATCTGCAGCTTCTGC	471
		BAC R1	TGTATGCGGCGGAACGTAAGA	
Bacillomycin	<i>bmyC</i>	BMF F1	AGCTGATCAGGATATCACCGGG	573
		BMF R1	GCTTCGGAAGCCGAATCGATC	
Iturin A	<i>ituA</i>	ITU F1	GATGCGATCTCCTTGGATGT	647
		ITU R1	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	
Surfactin	<i>srfA</i>	SRF F1	ACAGTATGGAGGCATGGTC	441
		SRF R1	TTCCGCCACTTTTTCAGTTT	
Fengycin	<i>fenA</i>	FEN F1	TTGAGCCGCAGCAGCTTTATC	585
		FEN R1	CTCCCGTCTCAATTCTGTATCCCC	
Gyrase B	<i>gyrB</i>	GRYB F1	GGCTCTCGGGACAGGAAT	180
		GRYB R1	GGCGGCTGAGCAATGTAG	



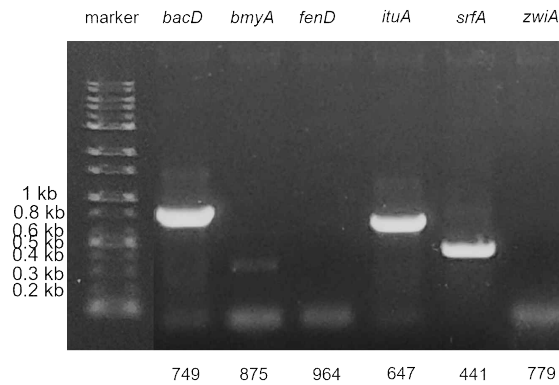
<그림 88. 이차 대사산물과 housekeeping 유전자 영역이 증폭된 PCR product>

- 이는 *Bacillus velezensis* KTA이 *Botryosphaeria dothidea*에 길항능력을 나타내는 이차 대사산물 유전자를 가지고 있으며, 유전자의 전사 및 번역에 관한 연구 가능성을 확인하였다.
- Trizol 방법을 이용한 선발 길항미생물의 total RNA 추출 및 cDNA 합성을 통한 길항미생물 내의 항생물질의 생합성 유전자의 전사 유무 검증
 - 선발 길항미생물인 *Bacillus velezensis* KTA 균주를 Trizol RNA extraction 방법을 통해 total RNA를 추출하였다.
 - 추출된 total RNA 1.0 μ g를 DNase 처리 후 oligo dT, 10 mM dNTP mix, 5x first-strand buffer, 0.1 M DTT 및 SuperScript III를 이용하여 RNA를 cDNA로 합성하였다.
 - cDNA는 housekeeping 유전자인 gyrase와 이차 대사산물 후보 물질인 bacilysin, bacillomycin D, fengycin, iturin A 및 surfactin 유전자의 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.
 - RT-PCR 수행을 위한 혼합물에는 1 U PrimeSTAR^R HS DNA Polymerase (Takara), 10 mM dNTP Mixture (Takara), 60 ng cDNA 및 0.5 μ M 프라이머가 포함되어 있다.
 - PCR은 95°C 에서 10분 preheating 한 후 95°C 에서 30초, 60°C 에서 30초, 72°C 에서 30초의 단계를 40 cycles 반복하여 수행하였다.
 - 증폭된 PCR product는 ExpinTM Combo GP mini (GeneAll)를 통해 정제하여 1% Agarose gel에 전기영동하여 gyrase, iturin A 및 surfactin의 예상 PCR product size인 180 bp, 155 bp, 179 bp 부근에서 PCR product가 존재하는 것을 확인하였다. (그림 7).

<표 21. 이차 대사산물과 housekeeping 유전자의 RT-PCR 프라이머 목록>

Antibiotic	Gene	Primers	Primer sequence (5'→3')	Fragment size(bp)
Bacilysin	<i>bacA</i>	rtBAC F1	CTCGCCAGATATGTAGGC	90
		rtBAC R1	GTGACGACGTTGGAAGAT	
Bacillomycin	<i>bmyC</i>	rtBMY F1	AGTTGTTACTCGTGCAGAATCA	137
		rtBMY R1	ATAGGCCAGATGATCCGGAC	
Iturin A	<i>ituA</i>	rtITU F1	GATCTTCGTTTCAGACCAGCTC	155
		rtITU R1	GCATTGTAGTTCAGCCTCAGC	
Surfactin	<i>srfA</i>	rtSRF F1	GACCGGTCAAGCTGTTTCG	179
		rtSRF R1	CTTCATCAGCGCCTGGAC	
Fengycin	<i>fenA</i>	rtFEN F1	GTCCGACAGCTTCAGAGAAA	95
		rtFEN R1	GATGGACCGTCAGAAACAAGTA	
Gyrase B	<i>gyrB</i>	GRYB F1	GGCTCTCGGACAGGAAT	180
		GRYB R1	GGCGGCTGAGCAATGTAG	

Bacillus velezensis KTA gDNA PCR



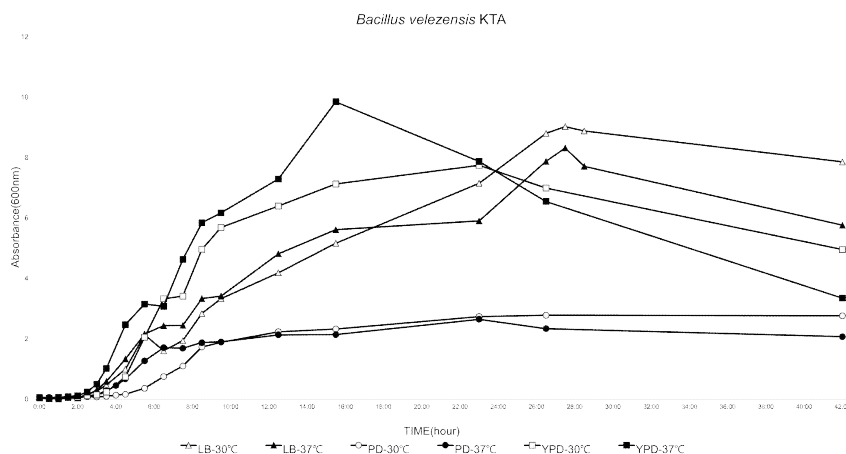
<그림 89. *Bacillus velezensis* KTA의 cDNA로부터 이차 대사산물과 housekeeping 유전자 영역이 증폭된 RT-PCR product>

- 그러나 각각 bacilysin, bacillomycin 그리고 fengycin에 해당하는 RT-PCR product가 확인되지 않아, *Bacillus velezensis* KTA가 LB 배지에서 37°C에 배양되었을 때, *Botryosphaeria dothidea*에 성장 억제 능력을 나타내는 iturin A와 surfactin의 유전자가 mRNA로 전사되었다는 것을 확인하였다.

○ 선발 미생물의 대량 배양 및 Scale-up 방안 연구

■ 대량 배양을 위한 영양원 및 배양조건에 따른 생육 특성 조사

- *Bacillus velezensis* KTA의 생육 특성을 조사하기 위해 각각 2 L 플라스크에 400 mL의 LB, PD 및 YPD 액체배지에 접종 후 30°C와 37°C에서 growth profiling을 실시하였다 (그림 8).

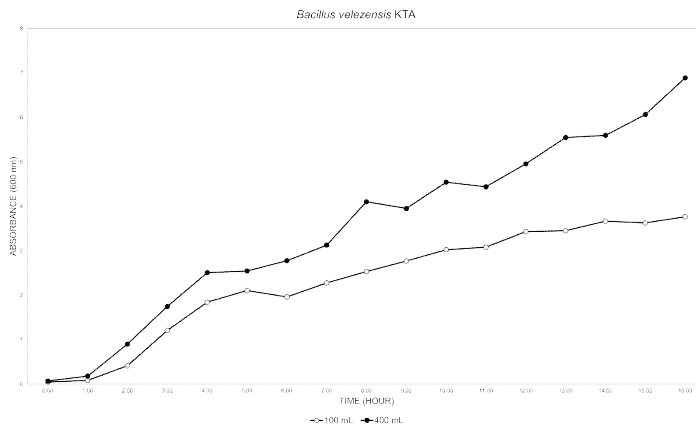


<그림 90. *Bacillus velezensis* KTA의 배양조건에 따른 생육 곡선 그래프>

- 그 결과, 37°C에서 배양한 균주는 YPD > LB > PD 순서로 높은 흡광도가 측정되었고 이에 따라 YPD > LB > PD 순서로 높은 CFU/mL을 나타낼 것으로 추정하였다.
- 30°C에서 배양한 균주는 LB > YPD > PD 순서로 높은 흡광도가 측정되었고, 이에 따라 LB > YPD > PD 순서로 높은 CFU/mL을 나타낼 것으로 추정하였다.
- 따라서 YPD에서 배양한 *Bacillus velezensis* KTA가 가장 높은 CFU/mL 값을 나타내었지만, *Botryosphaeria dothidea*에 길항 능력을 나타내는 이차 대사산물들을 생산하는 stationary phase가 불안정하여 균주를 LB에서 배양하는 것이 가장 적절할 것으로 판단하였다.

■ scale-up에 따른 생육 특성 조사

- *Bacillus velezensis* KTA의 효율적인 대량 배양을 위해 각각 다른 volume의 액체배지에서 배양하였다.
- 배지는 1 L 당 LB powder를 25 g 넣고 증류수로 최종 부피(100 mL 또는 400 mL)를 맞춘 후 고온·고압 멸균하여 균주를 접종 후 37°C에서 growth profiling을 실시하였다 (그림 9).

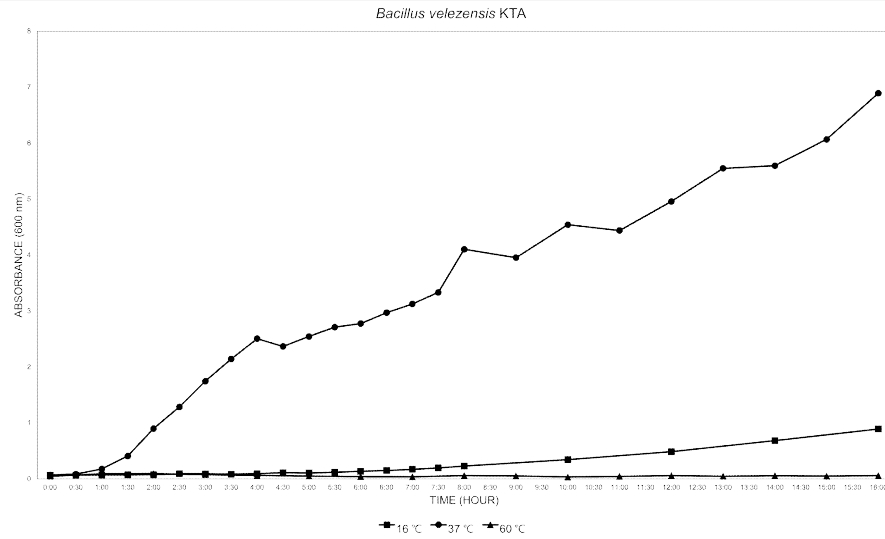


<그림 91. *Bacillus velezensis* KTA의 배양 부피에 따른 생육 곡선 그래프>

- 그 결과, 100 mL LB 액체배지보다 400 mL의 LB 액체배지에서 같은 시간 내에서 더 빠른 생육 속도와 더 높은 흡광도 값이 측정되었고, 이에 따라 더 큰 CFU/mL 값을 나타낼 것으로 추정하였다.
- 따라서 *Bacillus velezensis* KTA는 400 mL의 LB 액체배지에서 배양하는 것이 적절할 것으로 판단하였다.

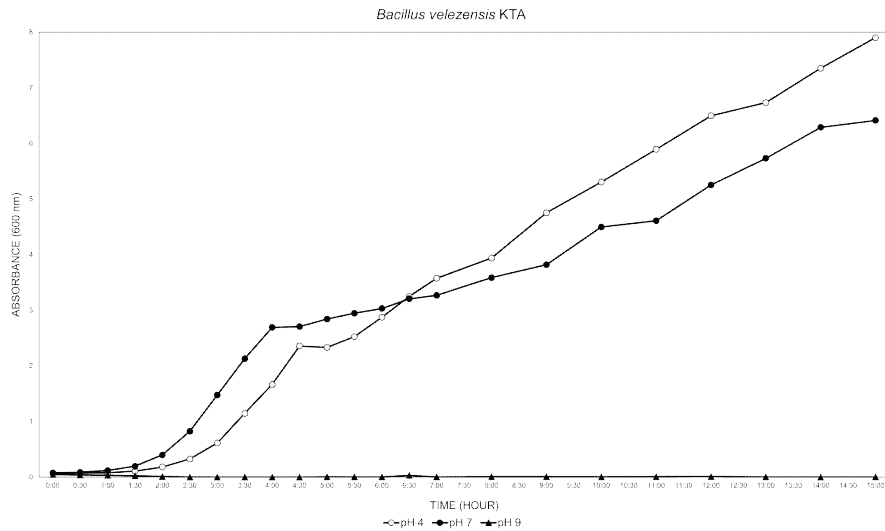
■ 선발 길항미생물의 생균수를 증대시키기 위한 최적 배지 조건을 선정하기 위하여 온도 별(15°C ~60°C) 및 pH 4~9에서의 균주의 생장곡선을 통해 doubling time 및 biomass 양 및 Colony-Forming Unit (CFU)를 측정

- *Bacillus velezensis* KTA의 최적 배지 조건을 위해 각각 다른 온도와 pH 조건에서 균주를 LB 액체배지에서 배양하였다.
- 온도 변화에 따른 growth profiling은 각각 16°C, 37°C 및 60°C에서 실시하였고, pH 변화에 따른 growth profiling은 각각 pH 4, 7, 9 조건에서 실시하였다.



<그림 92. *Bacillus velezensis* KTA의 온도 변화(16°C, 37°C 및 60°C)에 따른 생육 곡선 그래프>

- 온도 변화에 따른 *Bacillus velezensis* KTA의 growth profiling 결과, doubling time은 60°C > 16°C > 37°C의 값이 확인되었고, biomass 양은 반대로 37°C > 16°C > 60°C의 값이 측정되었다. Absorbance (OD₆₀₀) = 1.0일 때 *Bacillus velezensis*의 CFU/mL = 5 x 10⁸이므로 CFU/mL 또한 37°C > 16°C > 60°C로 확인되었다.

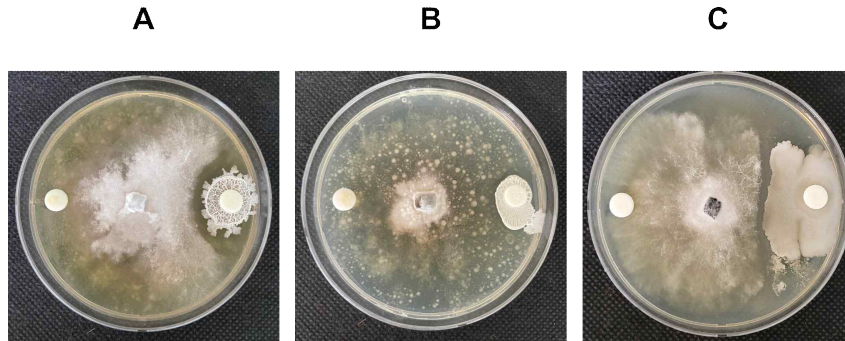


<그림 93. *Bacillus velezensis* KTA의 pH 변화(4, 7 및 9)에 따른 생육 곡선 그래프>

- pH 변화에 따른 *Bacillus velezensis* KTA의 growth profiling 결과, doubling time은 pH 9 > pH 7 > pH 4의 값이 확인되었고, biomass 양은 반대로 pH 4 > pH 7 > pH 9의 값이 측정되었다. Absorbance (OD₆₀₀) = 1.0일 때 *Bacillus velezensis*의 CFU/mL = 5 x 10⁸이므로 CFU/mL 또한 pH 4 > pH 7 > pH 9로 확인되었다.
- pH 4 균주의 경우, 16:00 지점에서 pH 값이 약 7.0으로 측정되었는데, 이는 pH 4 배지의 균주가 lag phase에서 알칼리성 물질을 생산·배출하여 높은 산도의 환경에서 적응하였기 때문이라 추측하였다.

- 다양한 배지 조성(LB, TSB, NB 등)에서의 복숭아 수지 병원균의 생육 억제 정도를 측정
- *Bacillus velezensis* KTA의 배지 조성에 따른 *Botryosphaeria dothidea* 생육 억제 정도를 측정하기 위해 LB, TSB 및 NB 고체배지를 제조하였다.

- LB, TSB 및 NB 배지는 1 L 기준으로 LB powder 25.0 g, TSB powder 30.0 g 및 NB powder 8.0 g에 각각 Agar 15.0 g을 첨가하고 멸균 증류수로 1 L로 부피를 맞춘 후 고온·고압 멸균하여 petri dish에 분주하였다.
- 각각의 고체배지에 LB 액체배지와 *Bacillus velezensis* KTA 배양액을 antagonism test를 통해 *Botryosphaeria dothidea*의 생육 억제를 확인하였다 (그림 12).

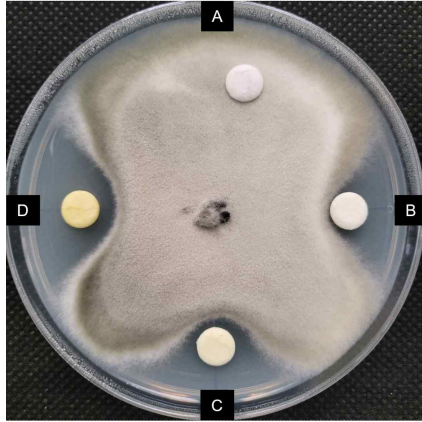


<그림 94. 다양한 배지 조성에서의 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 *Bacillus velezensis* KTA의 antagonist test>

- 실험 결과, A(LB), B(TSB) 그리고 C(NB) 배지에서 negative control로 사용한 LB, TSB 및 NB 액체배지(왼쪽)에서는 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 생육 억제능이 전혀 없는 것을 확인하였다.
- 이와 달리, *Bacillus velezensis* KTA는 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 생육 억제가 나타나 길항 능력을 갖추고 있음을 확인하였다.
- 추가로, 생육 억제 정도를 비교하였을 때, *Bacillus velezensis* KTA는 B 배지에서 가장 적은 활성을 나타내고, A와 C에서 비슷한 정도의 활성을 나타내었다.

○ 복숭아 수지증 길항미생물의 배양조건 확립 및 시제품 개발

- 선발 길항미생물의 이차 대사물질 추출물의 병원균의 억제 활성을 탐색하기 위하여 여러 농도의 추출물을 이용하여 복숭아 수지 병원균의 생육 억제효과를 탐색
- *Bacillus velezensis* KTA로부터 추출된 이차 대사산물 용액[그림 3]에서 10x, 20x, 40x 희석한 용액을 antagonism test를 통해 *Botryosphaeria dothidea*의 생육 억제를 확인하였다 (그림 13).



A : MeOH
B : 0.025 LPs
C : 0.05 LPs
D : 0.1 LPs

<그림 95. *Bacillus velezensis* KTA로부터 추출한 이차대사물질 용액(LPs)의 농도별 antagonist test>

- 그 결과, negative control로 사용한 MeOH(methanol) 용액에서는 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 생육 억제 능력이 전혀 없는 것을 확인하였다.
- *Bacillus velezensis* KTA의 경우에는 이차 대사산물의 농도가 높은 용액이 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 더 강한 생육 억제가 일어나는 것을 확인하였다.
- 이는 *Bacillus velezensis* KTA가 생산하는 이차 대사산물이 농도에 비례하여 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 억제능을 가지는 것을 의미한다.

대원화학 1차 2년

1. 길항미생물에 대한 수지증 효능 및 범용성 검증을 위한 실증 시험

1) 복숭아 수지증 관련 시험 현황 및 판단 기준

- 복숭아 수지증은 복숭아나무 표피에 진물이 나는 현상으로 발생 초기에는 수분이 많은 대체적으로 투명한 젤리와 같은 형태를 나타내며 손으로 만졌을 경우에 손에 묻어날 정도로 무른 상태이다(그림 1-1).
- 발생 중기에는 발생 초기 때보다 수분은 더 적은 상태이고 발생 초기 때보다 광택은 더 나지만 덜 투명하며 손으로 만졌을 때 손에 묻어나지 않을 정도로 무른 상태이다(그림 1-2).
- 발생 후기에는 수분이 거의 없이 완전히 마른 상태이며 발생 중기 때보다 광택은 현저히 없으며 투명하지 않고 짙은 갈색을 나타낸다. 그리고 손으로 만졌을 때 손에 묻어나지 않을 정도로 무른 상태이고 수피에서 쉽게 떨어지기도 한다(그림 1-3).



그림 96. 복숭아 수지증 발생 초기때 수지증 병반의 시각적 형태 사진.



그림 97. 복숭아 수지증 발생 중기때 수지증 병반의 시각적 형태 사진.



그림 98. 복숭아 수지증 발생 후기때 수지증 병반의 시각적 형태 사진.

- 본 연구과제에서 핵과류인 복숭아 수지증 조사 시에 복숭아 수지증 발병 유무는 수지

병변이 보이는 나무를 발생주로 판단했으며 복숭아 과원 전체 나무 중에서 수지증이 발생한 나무를 시험대상으로 선정하여 각 나무에서 주지와 부주지를 나누어서 수지증 병변 발생수를 조사하였다.

- 시제품의 복숭아 수지증에 대한 효능 유무 판단 기준은 지금까지 정확하게 확립되어 있지 않은 실정이다. 이에 경상북도 농업기술원 산하 청도복숭아연구소에 문의를 하였으나 복숭아 수지증의 완치여부에 대한 명확한 판단기준은 정립되어 있지 않다는 의견을 들었다.
- 이에 본 연구과제를 통해서 복숭아 수지증 병반을 관찰한 결과 발생한 수지증 병반은 시간이 경과함에 따라 시각적·촉각적으로 일정한 변화 양상을 가지는 것을 확인할 수 있었다.
- 복숭아 수지증 발생 초기의 발생된 병반은 시각적으로 수분을 함유하고 있는 것으로 보이고 일정한 형태보다는 부정형의 형태를 보였으며 밝고 투명한 색깔, 밝은 옅은 갈색을 나타내었다.
- 또한 이러한 발생 초기의 수지증 병반을 촉각적으로 만져보았을 때 손에 묻어날 정도로 마치 젤리처럼 무른 상태를 보였다.
- 복숭아 수지증의 발생 중기의 발생된 병반은 시각적으로 발생 초기 때 보다는 수분이 감소한 상태로 병반 표면에 광택이 나타나기 시작한 상태를 보이며 등근 형태를 보이기 시작하였으며 더 밝고 투명한 색깔을 나타내었다. 또한 이러한 발생 중기의 수지증 병반을 촉각적으로 만져보았을 때 손에 묻어나지 않을 정도로 무른 상태를 보였다.
- 복숭아 수지증의 발생 후기의 발생된 병반은 시각적으로 발생 중기 때보다 수분이 감소하여 완전히 마른 상태를 보이고 발생 중기 때의 등근 형태가 없어지고 다시 부정형의 상태를 보였으며 수지증 병반 표면에 광택은 사라지고 어두운 짙은 갈색을 나타내었다.
- 또한 이러한 발생 후기의 병반을 촉각적으로 만져보았을 때 손에 묻어나지 않고 딱딱한 상태이며 발생 부위에서 쉽게 떨어지는 상태를 보였다
- 본 실험에서 시제품의 효능·효과를 판단하는 기준은 위의 복숭아 수지증 병반의 진행 상태를 기준으로 하여 판단하였다.
- 이에 본 실험의 처리 방법은 사용상의 편의성을 고려하여 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 시제품 희석액을 처리하는 방법으로 포장 실증 시험을 수행하였다.
- 포장 실증 시험은 수지증이 관찰되는 나무 중에서 수지증 병반이 발생한 일정한 부분을 선정하여 시제품을 희석하여 살포한 후 시간 경과에 따라 달관 조사하였다.

2) 시제품의 효능·효과 시험 방법

- 본 시험에 사용할 포장을 선정하기 위하여 경북 군위 및 칠곡 지역을 조사하던 중 수령이 10년 이상인 복숭아 나무가 식재되어 있는 과원에 복숭아 수지증이 발생하여 본 시험 포장으로 선정하였다.
- 본 시험에 사용한 포장을 전체 조사한 후 복숭아 수지증이 발생한 나무를 시험에 사용할 나무로 선정하였다.
- 본 시험의 처리 방법은 복숭아 수지증 병반이 관찰되는 복숭아 나무의 줄기 부분에 시제품(길항미생물 배양액 1, 2) 각각을 50배액을 기준으로 스프레이로 1회 처리하였다.
- 본 시험 포장에 발생한 복숭아 수지증에 대한 시제품의 효능·효과 판단은 앞에서 언급한 바와 같이 수지증 병반의 외관상 변화 양상을 달관 조사하여 그 판단기준으로 하였다. 또한 복숭아 수지증 병반의 외관상 특징이 복숭아 수지증 병반의 발생 후기 상태에 가깝게 변화하는 경우에 시제품의 복숭아 수지증에 대한 효능·효과가 있는 것으로 판단하였다.
- 공시 미생물 제제의 이화학적 특성은 아래 표 1과 같다.

- 전체적으로 성분량은 배지 조성고 같이 미량의 원소가 포함되어 있었으며 비료적 특성을 나타내기에는 상당히 낮은 특성을 가지고 있었다. 또한 유해성분은 모두 불검출로 나타났다.

표 21. 공시제품(길항미생물 제제)의 이화학적 특성

분석항목(단위)		분석성적	비고
성분	질소 전량(T-N)	0.1%	비료의 품질검사방법 및 시료채취기준(농촌진흥청 고시 제 2020-29호, 2020.11.25.)에 준해 검사
	인산 전량(P ₂ O ₅)	0.02%	
	칼리 전량(K ₂ O)	0.02%	
	수용성 석회(CaO)	0.005%	
	수용성 고토(MgO)	0.003%	
	수용성 규산(SiO ₂)	불검출	
	수용성 철 (Fe)	불검출	
	수용성 구리 (Cu)	불검출	
	수용성 붕소 (B ₂ O ₃)	불검출	
	수용성 망간 (MnO)	불검출	
유해성분	수용성 몰리브덴 (Mo)	불검출	
	비소 (As)	불검출	
	니켈 (Ni)	불검출	
	크롬 (Cr)	불검출	
	티탄 (Ti)	불검출	
	카드뮴 (Cd)	불검출	
	아질산 (NO ₂)	불검출	
아황산 (SO ₂)	불검출		

- 시험을 위한 처리구는 아래와 같으며 각 처리구별로 무처리구, 수지증 길항미생물처리구 1, 수지증 길항미생물처리구 2 의 세가지 처리구를 두어 시험하였으며 시험방법은 아래와 같다.

처리구		효능 효과 시험	
		살포량	시험방법
I	무처리	50배액	각 처리구에 공시제제 50배액을 수지증 병반 주위에 분무기를 이용해 약액이 흐르도록 살포함 재배관리는 농가의 일반 관리법에 따라 관수 및 재배관리함
II	수지증 길항미생물 1 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DH-01)		
III	수지증 길항미생물 2 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KNU-28)		

3) 시험 결과

(1) 1차 시험-경북 군위군 효령면 장기리 소재 복숭아 포장

- 복숭아 포장 1차 시험은 아래 사진과 같이 경북 군위군 효령면 장기리 소재의 수령 10년 이상의 복숭아 시험포장에서 수행하였다(그림 2).
- 본 시험의 처리 방법은 복숭아 수지증 병반이 관찰되는 복숭아 나무의 줄기 부분에 길항미생물을 네가지 처리구로 나누어 50배액을 분무기로 처리하였으며, 복숭아 수지증

병반을 제거하지 않은 상태로 수행하였다.



그림 99. 군위 포장 전경

- 처리전 복숭아 수지증 병반을 조사하고 난 후 희석액을 처리한 후 각 처리구의 병반수를 조사하여 표 2에 나타내었다.

표 22. 복숭아 수지증 병반에 시제품 처리구에 따른 병반수 변화.

시험구	수지증 병반수(개)				비고
	처리 전	처리 2주후	처리 4주후	처리 8주후	
I	97	106	271	286	
II	144	156	236	141	
III	140	180	186	145	

- 각 시험구별로 조사결과는 다음과 같다.
- 먼저 시험구 I(무처리)의 처리전 수지증 병반수는 97개로 조사되었으며 시험구 II(수지길항미생물 1)는 144개, 시험구 III(수지길항미생물2)는 140개의 수지증 병반수를 나타내었다.
- 각 시험구별로 병반수 변화는 처리 후 2주차에는 전체적으로 약간 증가하였으나 큰 변화 없는 것으로 조사되었다. 이후 처리 4주후는 전체적으로 크게 증가하는 경향을 나타내었으며 특이적으로 해충에 의한 주지부분의 가해가 집중적으로 발생하여 병반의 수가 크게 증가하는 것으로 나타났다. 처리 8주후에는 무처리구에서는 초기부터 지속적으로 증가하였으나 다른 처리구에서는 크게 감소하는 경향을 나타내었다.
- 즉, 수지증 병반은 처리 4주차까지는 지속적으로 증가하였으며 이후 급격한 감소를 나타내어 처리 8주차에는 4주차에 대비해 큰 감소폭을 나타내었으며 처리전과 비슷한 병반수를 나타내었다. 농가의 관행적인 살충제 살포 등이 진행되면서 해충의 가해가 감소한 것으로 추측되며 이전에 발생한 수지증 병반은 일부가 치유가 되어 최종적인 병반의 개수는 감소하는 것으로 판단하였다.
- 결론적으로 무처리구의 경우 지속적인 병반수 증가가 관찰되었으며 다른 처리구에서는 최종적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 다만 이결과는 무처리구에서 보듯이 지속적으로 복숭아 나무에 수지증이 증가하는 경향이 있으므로 각 처리구도 이러한 증가 양

상을 반영하여 그 감소폭을 판단하여야 더 정확한 수지증 병반의 증감 변화를 확인할 수 있을 것으로 생각되며 이를 통해 각 처리구의 수지증상에 대한 치유효과를 정확하게 판단 할 수 있을 것으로 생각된다.

- 그러므로 시험포장의 각 시험구는 무처리구의 수지증 병반 증가정도를 조사하여 각 처리구에 반영함으로써 복숭아 수지증 자연 증감변화를 감안하여 수지증 치유효과와 관련한 결과를 해석하여야 할 것으로 사료된다.

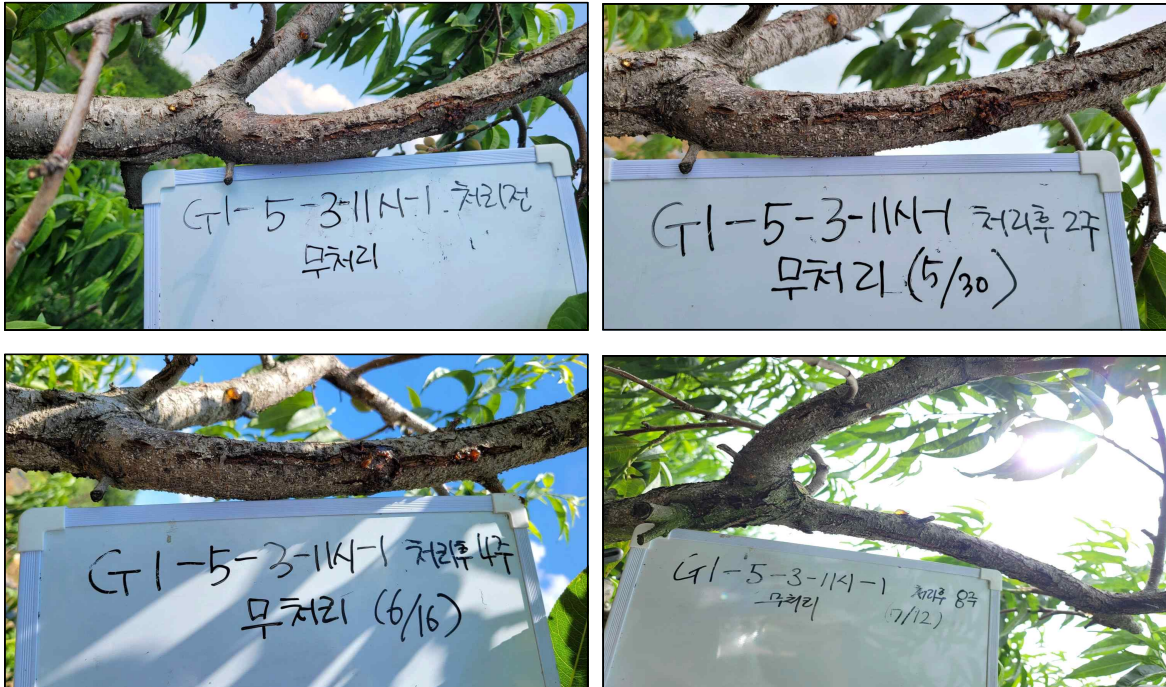


그림 100. 균위 복숭아 시험구 I(무처리구)



그림 101. 균위 복숭아 시험구 II(수지길항미생물 1)

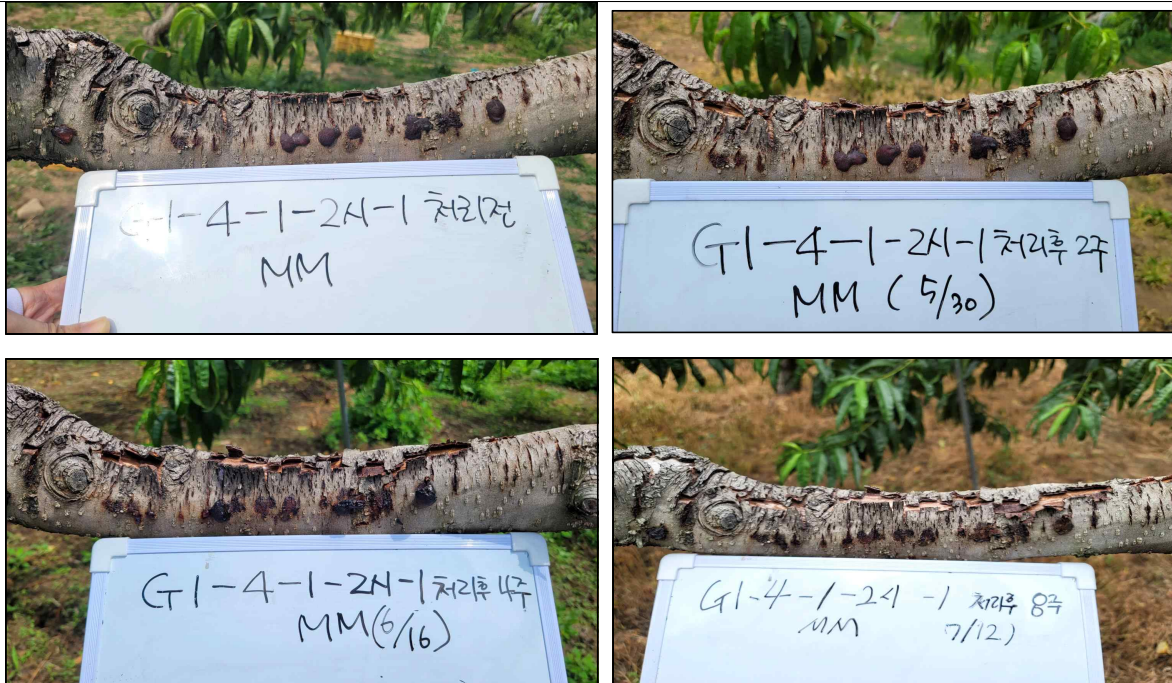


그림 102. 군위 복숭아 시험구 III(수지길항미생물 2)

(2) 시험 포장의 복숭아 수지증 자연 증감 변화

- 본 시험에 사용된 시험 포장 무처리구에서의 복숭아 수지증의 자연적인 발생 추이는 표 3과 같다.

표 23. 무처리구의 재배 기간별 복숭아 수지증 자연 발생 변화

구분	조사일별 병반수(개)				일일자연 증감비 (갯수/일수)
	처리전	처리 2주후	처리 4주후	처리 8주후	
주지	96	78	157	217	2.16
부주지	1	28	114	69	1.21
합계	97	106	271	286	3.37

- 무처리구의 경우 수지증 병반이 복숭아 나무의 주지와 부주지 공히 크게 증가하는 경향을 나타내었다 다만 처리 8주후에는 부주지에서 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 전체적으로는 크게 증가하였다.
- 전체적인 수지증 병반 수는 재배 초기인 처리전에는 97개에서 조사일수가 경과할수록 수지증 병반이 지속적으로 증가하였으며 처리 8주후에는 286개로 나타나 최종적으로 처리전에 비해 295%로 크게 증가하는 것으로 조사되었다.
- 이와 같은 결과를 바탕으로 무처리구를 기준으로 시험기간 동안 병반의 자연 증가 정도를 반영하여 일일 자연 증감비를 산출하고 이를 앞의 각 처리구에 반영하여 수지증 병반수 변화를 판단하여야 될 것으로 사료된다
- 결론적으로 군위 복숭아 시험 포장의 경우 재배 기간 중 복숭아 수지증 일일 자연 증감비는 3.37 갯수/일수 증가하는 것으로 조사되어 자연 발생 증감비를 감안하여 수지 증상 저감율을 평가하는 것이 더 정확한 결과를 도출해 낼 수 있을 것으로 판단된다.

(3) 시험 포장의 복숭아 수지증 자연 증감 변화를 감안한 수지증 저감율 변화

- 복숭아 수지증에 대해 자연 증감 변화를 감안한 경우와 그렇지 않은 경우의 수지증상 저감율을 비교한 것은 표 4에 나타내었다.
- 자연 증감 변화를 감안하지 않은 경우 시험구 II의 경우 2.1%의 수지증상 저감율을 나타내어 그 효과가 미미하였으며 시험구 III의 경우 -3.6%로 오히려 약간 증가하는 것으로 나타나 그 효과가 없는 것으로 조사되었다.
- 자연 증감 변화를 감안한 경우 시험구 II의 경우 57.5%의 저감율을 나타내어 큰 효과가 있는 것으로 판단되었으며 시험구 III의 경우 55.8%를 나타내어 큰 저감율을 나타내어 공히 효과가 있는 것으로 나타났으며 시험구 II의 경우 처리 2주 후의 수지증 억제력이 높은 것으로 관찰되었고 시험구 III에서 처리 후 4주 후의 수지증 억제력이 뛰어난 것을 보았을 때 균별로 효과적인 억제 시기에 차이가 있는 것으로 사료된다.

표 24. 각처리구별 복숭아 수지증 자연 증감 변화를 감안한 수지 증감 저감율(8주차기준)

시험구	수지 증감 저감율(%)		일일자연 증감비 (갯수/일수)
	자연 증감 변화를 감안하지 않은 경우 ¹⁾	자연 증감 변화를 감안한 경우 ²⁾	
I	0	0	3.37
II	2.1	57.5	
III	-3.6	55.8	

1)수지증 저감율(%) = (처리 전 병반수-처리 후 병반수) ÷ 처리 전 병반수 × 100

2)수지증 저감율(%) = (처리 전 병반수+(일일증감비×처리후일수)-처리 후 병반수) ÷ 처리 전 병반수+(일일증감비×처리후일수) × 100

2) 2차 시험-경북 칠곡군 가산면 학하리 소재 복숭아 포장

- 복숭아 포장 2차 시험은 경북 칠곡군 가산면 학하리 소재의 수령 10년 이상의 복숭아 시험포장에서 수행하였다(그림 5).
- 본 시험의 처리 방법은 복숭아 수지증 병반이 관찰되는 복숭아 나무의 줄기 부분에 개 발 시제품을 네가지 처리구로 나누어 50배액을 분무기로 처리하였으며, 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않은 상태로 나누어 수행하였다.



그림 103. 칠곡군 포장 전경

- 처리전 복숭아 수지증 병반을 조사하고 난 후 희석액을 처리한 후 각 처리구의 병반수를 관찰하여 표 5에 나타내었다.

표 25. 복숭아 수지증 병반에 시제품 처리구에 따른 병반수 변화.

시험구	수지증 병반수(개)				비고
	처리 전	처리 2주후	처리 4주후	처리 8주후	
I	136	141	177	289	
II	161	298	163	261	
III	213	453	347	589	

- 각 시험구별로 조사결과는 다음과 같다. 먼저 시험구 I(무처리)의 처리전 수지증 병반수는 136개로 조사되었으며 시험구 II(수지길항미생물 1)는 161개, 시험구 III(수지길항미생물2)는 213개의 수지증 병반수를 나타내었다. 시험구 3의 경우 병반수가 가장 많았을 뿐더러 육안으로 확인되는 수지증의 정도가 가장 심한 상태였다.
- 각 시험구별로 병반수 변화는 처리 후 2주차에는 크게 증가하였으며 이후 처리 4주후는 2주차에 비해 감소하는 경향을 나타내었다. 이후 처리 8주차에는 4주차에 비해 증가하는 것으로 조사되었다.
- 무처리구에서는 각 조사시기에 지속적으로 증가하였으나 다른 처리구에서는 처리 4주차에 감소하였다가 처리 8주후에는 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 즉, 수지증 병반은 처리 2주차까지는 지속적으로 증가하였으며 이후 4주차에 급격한 감소를 나타내었다가 처리 8주차에는 다시 증가하는 경향을 나타내었다.
- 처리 8주후에 이러한 증가를 보인 것은 해충의 지속적인 가해가 발생하고 있는 것을 의미하는 것으로 적절한 해충방제를 효과적으로 수행하여야만 추가적인 발생을 막을 수 있을 것으로 판단된다.
- 결론적으로 무처리구의 경우 지속적인 병반수 증가가 관찰되었으며 다른 처리구에서는 최종적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 다만 이결과는 무처리구에서 보듯이 지속적으로 복숭아 나무에 수지증이 증가하는 경향이 있으므로 각 처리구도 이러한 증가 양상을 반영하여 그 감소폭을 판단하여야 더 정확한 판단을 할 수 있을 것으로 생각되어 시험포장의 복숭아 수지증 자연 증감변화를 감안하여 결과를 해석하여야 할 것으로 사

료된다.

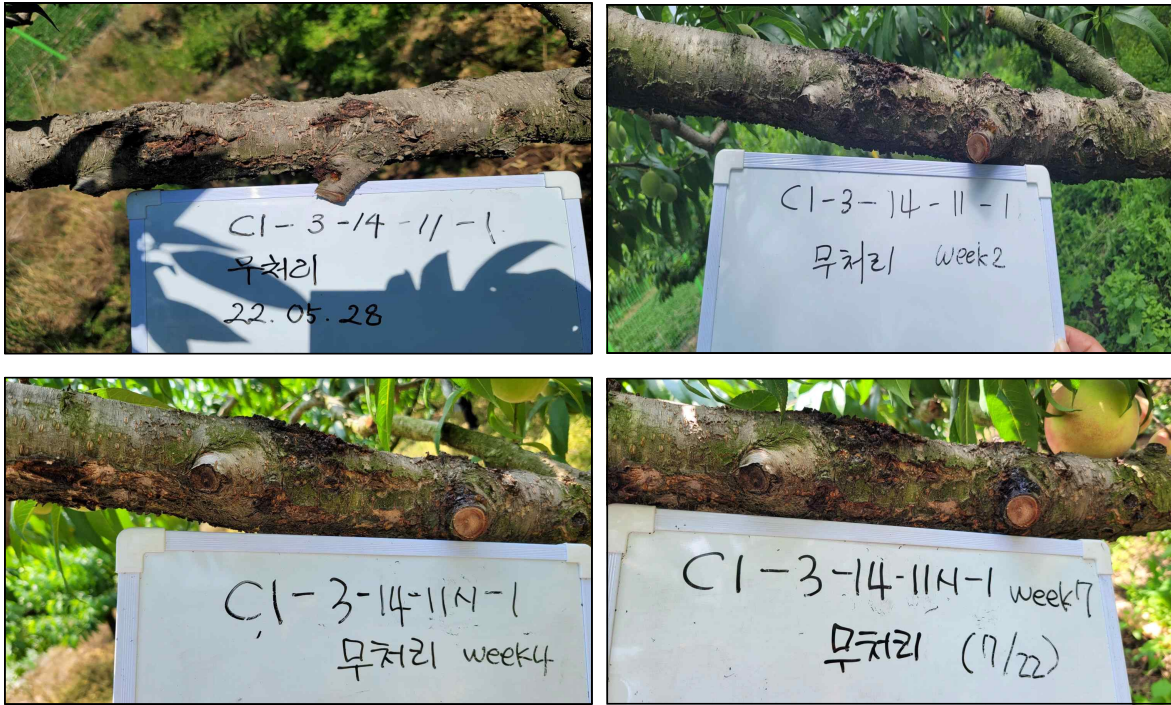


그림 104. 칠곡 복숭아 시험구 I(무처리구)

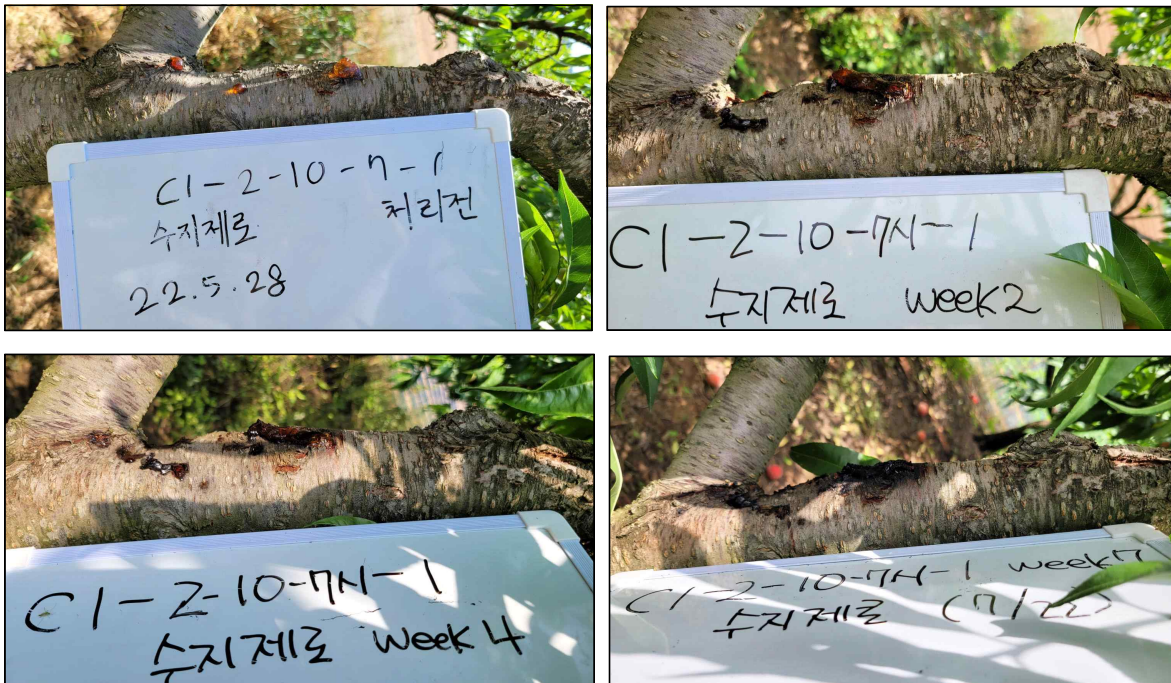


그림 105. 칠곡 복숭아 시험구 II(수지길항미생물 1)

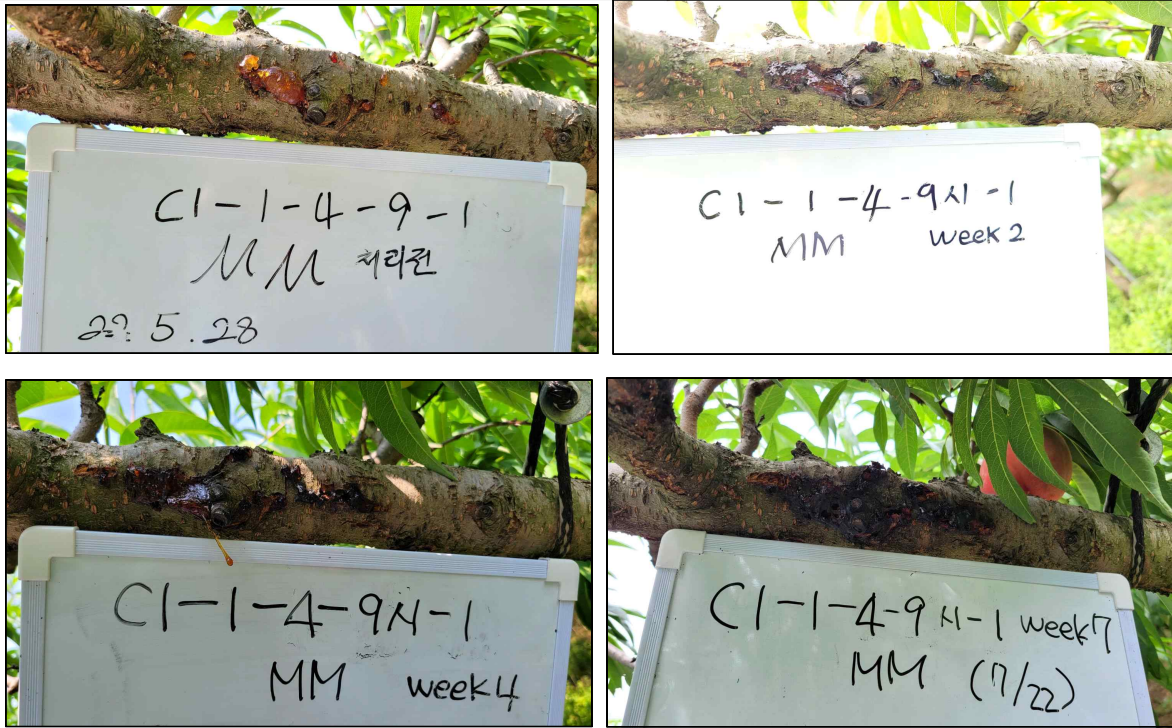


그림 106. 칠곡 복숭아 시험구 III(수지길항미생물 2)

(2) 시험 포장의 복숭아 수지증 자연 증감 변화

표 26. 무처리구의 재배 기간별 복숭아 수지증 자연 발생 변화

구분	조사일별 병반수(개)				일일자연 증감비 (갯수/일수)
	처리전	처리 2주후	처리 4주후	처리 8주후	
주지	128	121	156	158	0.53
부주지	8	20	21	131	2.19
합계	136	141	177	289	2.72

- 본 시험에 사용된 시험 포장 무처리구에서의 복숭아 수지증의 자연적인 발생 추이는 표 6과 같다.
- 무처리구의 경우 수지증이 복숭아 나무의 주지와 부주지 공히 크게 증가하는 경향을 나타내었으며 특히 부주지가 처리 8주차에 크게 증가하는 것으로 조사되었다.
- 전체적으로는 재배 초기인 처리전 병반수가 136개에서 조사일수가 경과할수록 수지증 병반은 지속적으로 증가하였으며 처리 8주후에는 289개로 나타나 최종적으로 212% 증가해 크게 증가하는 것으로 조사되었다.
- 이와 같은 결과를 바탕으로 무처리구를 기준으로 시험기간 동안 병반의 자연 증가 정도를 반영하여 일일 자연 증감비를 산출하고 이를 앞의 각 처리구에 반영하여 수지증 병반수 변화를 판단하여야 될 것으로 사료된다
- 결론적으로 균위 복숭아 시험 포장의 경우 재배 기간 중 복숭아 수지증 일일 자연 증감비는 2.72 갯수/일수 증가하는 것으로 조사되어 자연 발생 증감비를 감안하여 수지증 상 저감율을 평가하는 것이 더 정확한 결과를 도출해 낼 수 있을 것으로 판단된다.

(3) 시험 포장의 복숭아 수지증 자연 증감 변화를 감안한 수지증 저감율 변화

- 복숭아 수지증에 대해 자연 증감 변화를 감안한 경우와 그렇지 않은 경우의 수지증상 저감율을 비교한 것은 표 7에 나타내었다.
- 자연 증감 변화를 감안하지 않은 경우 시험구 II의 경우 -1.2%의 수지증상 저감율을 나타내어 그 효과가 없었으며 시험구 III의 경우 -62.9%로 오히려 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이는 균위 시험장의 결과와 상이한 것으로 칠곡군 시험장의 총피해가 균위에 비해 컸기 때문으로 사료된다. 시험구 III의 경우 가장 천공충에 의한 피해가 높았던 시험구로 다른 시험구보다 총피해로 인한 수지증의 경과가 가속화 되었다.
- 자연 증감 변화를 감안한 경우 시험구 II의 경우 31.2%의 저감율을 나타내어 큰 효과가 있는 것으로 판단되었으며 시험구 III의 경우 -20.1%를 나타내었지만 처리 2주 후에서 4주 후로의 병반갯수가 억제됨을 보았을 때 수지증을 억제하는 효과적인 시기가 균위 시험장의 결과와 일치하였다.

표 27. 각처리구별 복숭아 수지증 자연 증감 변화를 감안한 수지 증상 저감율(4주차기준)

시험구	수지 증상 저감율(%)		일일자연 증감비 (갯수/일수)
	자연 증감 변화를 감안하지 않은 경우 ¹⁾	자연 증감 변화를 감안한 경우 ²⁾	
I	0	0	2.72
II	-1.2	31.2	
III	-62.9	-20.1	

1)수지증 저감율(%) = (처리 전 병반수-처리 후 병반수) ÷ 처리 전 병반수 × 100

2)수지증 저감율(%) = (처리 전 병반수+(일일증감비×처리후일수)-처리 후 병반수) ÷ 처리 전 병반수+(일일증감비×처리후일수) × 100

- 위의 사실을 종합하면 전체 포장에서 무처리 구의 경우 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 수지증상 저감율은 자연증감 변화를 감안하지 않은 경우 처리 효과가 낮은 것으로 판단되었으나 자연 증감 변화를 감안한 경우 처리구 II에서는 칠곡 및 균위 시험포장 공히 수지증 병반이 감소하는 것으로 조사되었고 처리구 III에서는 칠곡 시험포장에서 수지증의 병반 억제효과를 확인하였다. 제품개발 가능성을 확인 할 수 있었다.
- 두 처리구에서 효과적으로 수지증 병반을 억제하는 시기가 다른 것을 보아 수지역제미생물의 혼합 처리가 모든 시기에서 효과적으로 수지증을 억제할 수 있을것으로 기대하며 2종의 수지역제미생물의 혼합처리를 통한 제품개발 가능성을 확인 할 수 있었다.
- 다만, 지속적인 해충의 피해에 의해 수지증상이 증가하는 것을 조절하지 않고서는 전체 포장의 수지증상을 억제하기는 어려워 보이며 이러한 해충방제를 병행해 조절하는 것이 범용성을 높이는데 중요하다고 판단되었다.

2. 복숭아 수지증의 생리학적 발생원에 따른 경감체계 연구

- 위의 실험 결과에서 해충가해에 따른 수지증상이 지속적으로 발생하는 경향을 나타내

었으므로 수지증 방제에는 수지병원균 조절과 더불어 해충방제가 무엇보다도 병행되어야 효과적인 경감을 유도할 수 있을 것으로 판단하였다.

- 다만 결과에는 나타내지 않았으나 해충과 관련한 길항미생물을 적용하였을 경우 수지병원균 조절 길항미생물의 효과가 감소하는 경향을 나타내어 앞으로 추가적인 연구를 더 수행하고 있으며 다만 해충방제를 위해 기존에 알려진 살충제를 사용하였을 경우 그 효과에 대해 검토하여 경감체계 연구를 수행하였다.
- 위의 실험에서 생물학적 원인 중 천공 해충에 의해 발생한 수지증의 경우에는 시제품을 단독으로 처리했을 경우에 그 효과가 떨어지는 것으로 나타났기 때문에 수지증을 유발하는 해충 방제를 위하여 살충제(애니충, 스미치온)를 혼용 처리하는 방법을 모색하고자 본 실험을 수행하였다.
- 본 실험은 김천시 아포읍 지리에서 수행하였다(그림 9).
- 각 처리구별로 복숭아 수지증에 시제품(수지길항미생물)과 살충제(애니충, 스미치온)를 혼용 처리한 후 각 처리구의 복숭아 수지증 병반수를 관찰하였다.



그림 107. 김천시 아포읍 포장 전경

- 본 시험은 5개의 처리구에 대해 실험을 진행했으며 각 처리구의 처리 전 수지증 병반수는 표 8과 같았으며, 처리 전 처리구 전체의 수지증 병반수는 255개로 조사되었다.
- 시제품 처리 11일 후에는 KA1-21는 처리 전보다 7개가 감소한 20개, KA1-22는 11개가 감소한 64개, KA1-23는 36개 감소한 42개, KA1-24는 5개가 감소한 37개 그리고 KA1-25는 처리 전 병반수보다 10개가 감소한 23개가 관찰되었다. 처리 후 31일 후에는 17개, 56개의 병반수가 관찰되었으며, KA1-23는 처리 11일후보다 19개가 증가한 61개가 관찰되었다. KA1-24, KA1-25는 각각 30개와 41개가 관찰되었다.
- 처리 후 64일 후에는 KA1-21는 처리 전 병반수보다 25개가 감소한 2개, KA1-22는 45개가 감소한 30개, KA1-23는 65개가 감소한 13개, KA1-24는 34개가 감소한 8개 그리고 KA1-25는 9개가 감소한 24개가 관찰되었다.
- 전체적으로 볼 때 처리 11일 후에는 처리 전 병반수인 255개보다 69개가 감소한 186개, 처리 31일 후에는 50개가 감소한 205개 그리고 처리 64일 후에는 178개가 감소한 77개의 병반수가 관찰되었다.
- 이러한 결과로부터 일반적인 재배 포장의 경우 생물학적 원인 즉 해충의 가해에 의해 발생하는 수지증상에 대해서는 농약 등의 해충을 조절할 수 있는 제제의 사용을 통해 해충 방제가 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

표 28. 시제품(수지길항미생물) 및 살충제 혼용 처리 후 시간 경과에 따른 복숭아 수지증 병반수 변화.

처리구	수지증 병반수(개)			
	처리 전 ¹⁾	처리 11일후	처리 31일후 ²⁾	처리 64일후
KA1-21	27	20	17	2
KA1-22	75	64	56	30
KA1-23	78	42	61	13
KA1-24	42	37	30	8
KA1-25	33	23	41	24
합계	255	186	205	77

- 1) 시제품과 살충제(애니충) 혼용 처리
- 2) 시제품과 살충제(스미치온) 혼용 처리

- 본 시험에서 복숭아 수지증상에 대한 시제품과 살충제의 혼용 처리의 복숭아 수지증상 저감율은 처리 11일후에는 27.1%의 나타냈으며 처리 31일후에는 205개의 수지증 병반이 발생하여 19.6%로 다소 감소하였다. 그러나 처리 64일후의 경우에는 69.8%로 조사되어 수지증 병반수가 크게 감소하여 그 효과가 큰 것으로 조사되었다.
- 시제품과 살충제를 혼용 처리하고 시간이 경과함에 따라 발생한 복숭아 수지증 병반의 외관상 형태를 관찰한 결과 처리 64일후에는 발생한 수지증 병반이 전체적으로 발생 중기에서 후기로 변화하는 수지증 병반의 형태를 보였다(그림 10).





그림 108. 시제품(수지길항미생물 1)과 살충제(애니충, 스미치온) 혼용 처리한 후 시간 경과에 따른 복숭아 수지증 병반의 변화 양상.

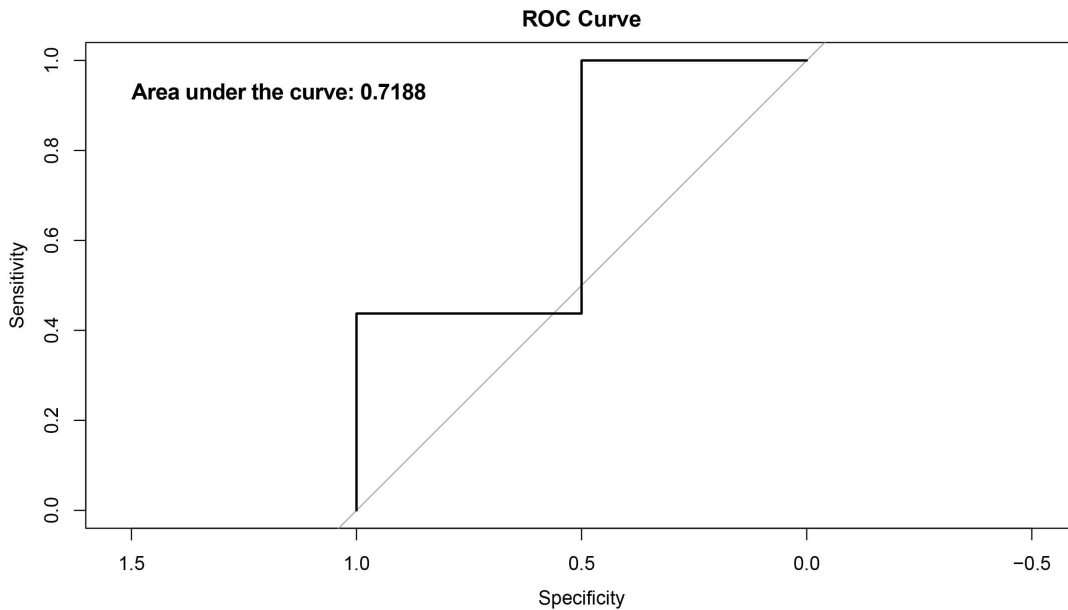
다. 2단계_1차년도

■ 주관연구기관 (경북대학교, 신재호 교수 연구실)

○ Machine learning 및 Deep learning을 활용하여 복숭아 수지증 진단 및 판별

- 복숭아 나무의 경작지, 복숭아 나무의 내생미생물 군집의 구성을 머신러닝 기술 중 하나인 랜덤포레스트 분석과 경작지와 복숭아나무 수지증 표현형과의 연관 분석을 실시하여, 이를 통해 병증의 패턴을 예측, 모델링을 실시
 - 복숭아 나무 수지증 발생 목질부의 세균 및 진균의 마이크로바이옴 구성 분석 후, Randomforest를 이용하여 패턴화 및 keystone으로써 주요 미생물을 확인하고자 하였음.
 - RandomForest분석은 결정 트리의 앙상블로 구성된 기계 학습 알고리즘으로써, 분류 및 회귀를 통해 미생물 군집에서 중요한 미생물을 확인할 수 있음.
 - package의 ‘RandomForest’ library를 활용하여 분석하였으며, data 전처리는 qiime2 와 ‘pyloseq’, ‘microbiome’, ‘microeco’, ‘ggplot2’, ‘tibble’, ‘readxl’, ‘qiime2R’ R library를 활용하였음.
 - Parameter 설정으로써, 결정 트리를 가지치기하는데 사용하고, 모델의 복잡도에 관한 ‘prunescale’ 을 0.0001, 각 결정 트리를 구성하는데 사용되는 최소 샘플수를 나타내는 ‘minlib’ 을 15000으로 설정하였으며, OTU level (ASV level)에서 RandomForest 분석을 수행하였음.

그림 109 수신자 조작 특성 곡선 (ROC curve)를 통한 예측모델 평가



Accuracy : 0.89

Prediction

		Reference	
		Healthy	unhealthy
Prediction	Healthy	0	0
	unhealthy	2	16

표 29. 오차행렬(Confuse matrix)을 통한 예측모델 평가

- 생성된 Random Forest 알고리즘 기반 머신러닝 모델을 생성하였고 균위와 칠곡의 복숭아 나무의 내생미생물 균집 샘플을 7:3으로 나누어 학습과 검증 세트로 사용하였음.
- 분류 모델의 성능을 보여주는 그래프인 ROC curve의 결과 모델이 데이터를 제대로 분류함의 정도를 나타낸 AUC(Area Under Curve : 그래프 아래의 면적)가 0.7188로 약 72%의 확률로 수지증을 판별 할 수 있는 모델임을 확인하였음.
- 또다른 모델 성능 평가 지표로 사용할 수 있는 오차행렬을 통해 모델의 성능을 평가해보았을 때도 검증 데이터 세트 중 바르게 분류한 비율을 나타내는 Accuracy 값도 0.89로 높은 정확도를 확인할 수 있었음.
- 해당 연구는 복숭아나무 수지증을 판별 할 수 있는 첫 번째 머신러닝 모델로써 해당 자료를 토대로 복숭아나무의 내생미생물 균집 샘플의 개수가 더 확보하여 모델을 구축한다면 모델의 판별성능을 높일 수 있을것으로 기대함.

Most important OTUs for classifying Erie samples into nearshore or offshore

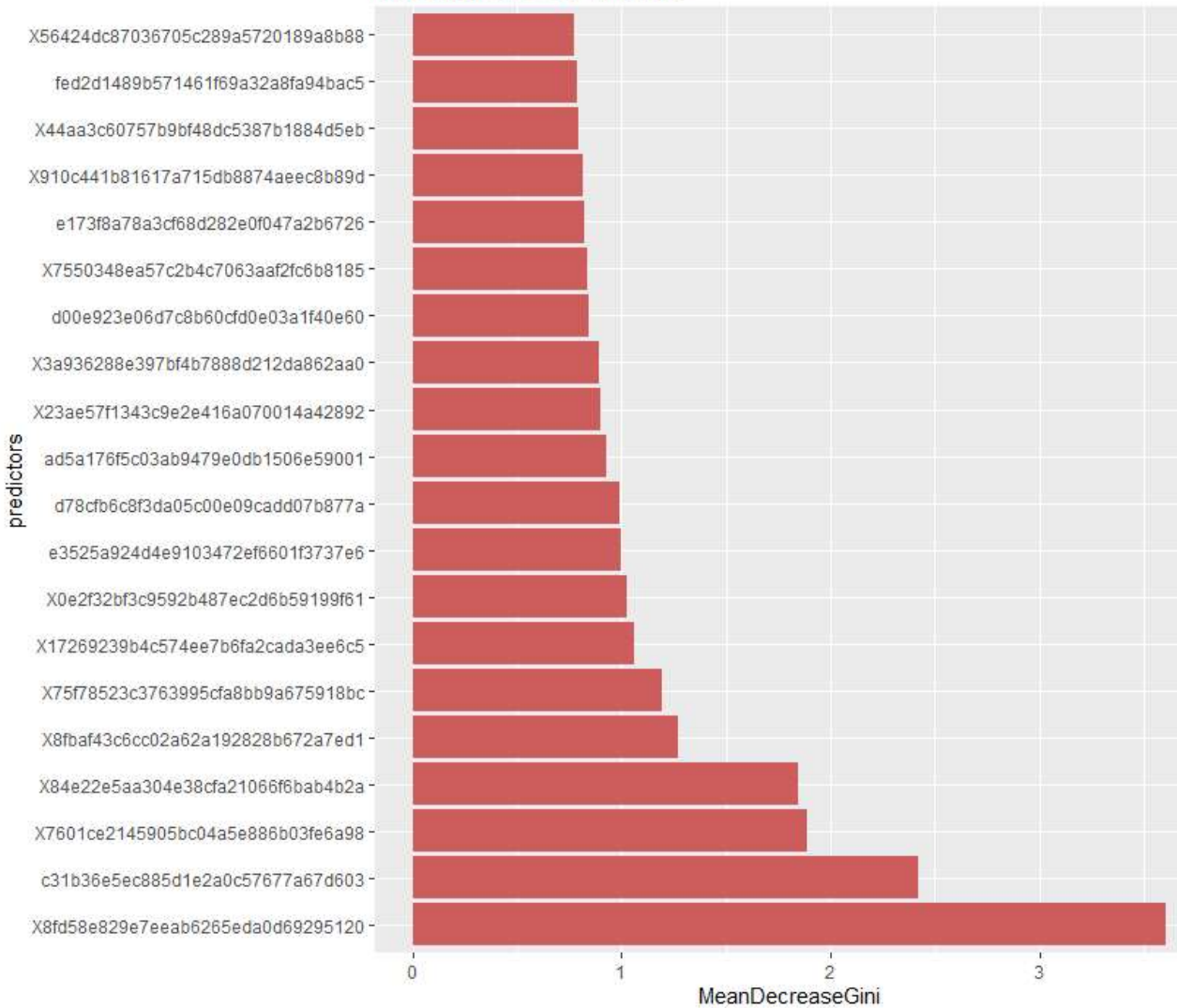


그림 110 RandomForest 분석을 통해 예측된 중요 OTU 및 목록.

	kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
c31b36e5ec885d1e2a0c57677a67d603	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae	Candidatus_Nitrososmicus	NA
d00e923e06d7c8b60cfd0e03a1f40e60	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae	Candidatus_Nitrososmicus	NA
fed2d1489b571461f69a32a8fa94bac5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	NA
d78cfb6c8f3da05c00e09cadd07b877a	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Steroidobacterales	Steroidobacteraceae	NA	NA
ad5a176f5c03ab9479e0db1506e59001	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	NA
e3525a924d4e9103472ef6601f3737e6	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilla	Gaelliales	Gaellaceae	Gaella	actinobacterium_wwh12
e173f8a78a3cf68d282e0f047a2b6726	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Beijerinckia	rhizobiales_bacterium

그림 111 RandomForest 분석에서 Gini 감소 평균(Mean Decrease Gini)값이 1 이상인 세균 목록

- 머신러닝 모델을 기반으로 복숭아나무 수지증을 판별하는데 높은 중요도를 가진 균주를 확인하였음. 결과적으로, 세균 군집에서 확인된 바로, indole-3-acetic acid, 즉 IAA를 생산하며 식물과 상호작용할 수 있는 *Acinetobacter*, 복숭아 수지증을 경감시킬 수 있으며, 식물과 상호작용 할 수 있고, 또한 건강한 목질부와 달리 수지증이 발생한 부위에서 LEfSe 분석을 수행하였을 때에도 확인가능하였던 *Bacillus*, plant-microbe interaction에서 중요한 역할을 수행하여 microbiome 조립에 중요하며, 질소 순환에 필수적인 *Gaella*, *Beijerinckiaceae*에 속하며 질소 고정, 식물 성장 촉진, 병원균으로부터의 식물

보호를 수행하는 1174-901-12로 명명된 Rhizobiales목의 세균이 RandomForest 분석을 통해 확인되었음.

- 상기 예측 모델을 이용하여 실제 복숭아 농가의 경작지 및 내생미생물의 마이크로바이오타 데이터 기반의 머신러닝을 통해 분명하게 판별 및 표준화 방안 마련
 - 목질부 세균 및 진균 분석, 토양부 세균 및 진균 분석을 수행하였으며, 또한 Ion-exchange chromatography를 통한 토양 성분의 이화학적 분석, 토양 수분, 이온치환능, 산성도, 수지증의 병징에 대한 질병의 상대적 심각도 및 수지증상이 발생한 병원부의 개별 개수를 바탕으로, 각 그룹을 비교할 뿐만 아니라 추가적으로 복숭아나무에서 발생하는 모든 수지증 증상과 관련된 요인을 찾고자 하였음.
 - 개체 및 나무로 나누어 세균 및 진균, 토양과 목질부, 알과 다양성, 개별 물리화학적 토양 분석의 네 가지 범주 각각에 대해 일대일 매칭 데이터를 생성하였음.
 - 생성된 매칭 데이터에 대하여, Pearson's correlation을 분석하여 상관관계 분석을 실시하였으며, 이에 대하여 시각화하였음.
 - 결론적으로, 상관관계 도표에서 볼 수 있듯이, 4주차의 수지증 발현 수와 토양 진균의 심슨 다양성 사이에는 음의 상관관계가 존재하였음. 6주차에 관찰된 수지증 발현의 수는 수분 함량과 양의 상관관계를 보였고, 토양산성도와는 음의 상관관계를 보였음. 8주차에 관찰된 수지증 증상의 수가 NO₃⁻ 이온, NH₄⁺ 이온, K⁺ 이온, Ca⁺ 이온 및 수분 함량과 뚜렷한 양의 상관관계를 보였음.

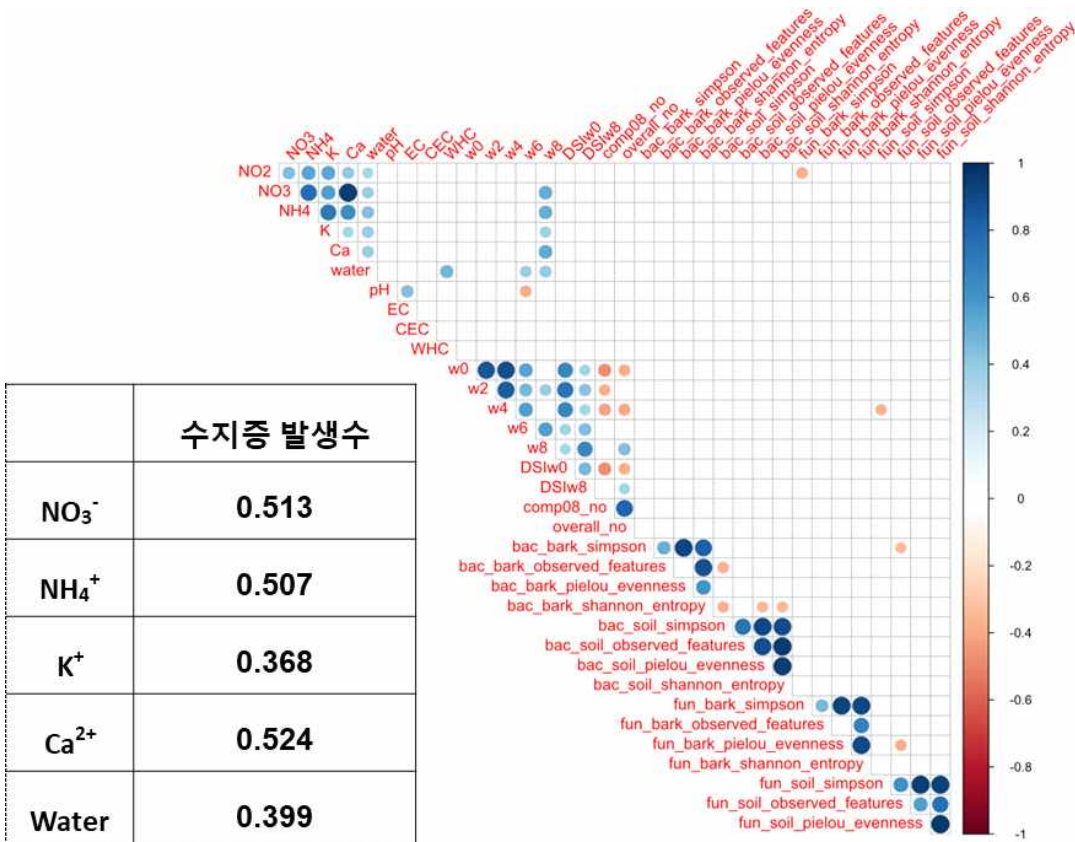


그림 112 복숭아 나무 수지증 개수, 토양 이화학성 및 미생물 군집 간의 Pearson's Correlation 분석

- 전체적으로, 건강한 나무 및 수지증이 발생한 복숭아 나무 사이에서는, 상기 1차년도 및 2차년도의 결론과 비추어 보았을 때, 그 목질부 내생 미생물 및 토양부 내생 미생물의 종류와 그 군집에서 차이가 발생하였으며, 이는 상대적으로 수지증이 발생하여 건강하지 못한 복숭아 나무의 그룹에 식물병원성 진균의 관측빈도가 상대적으로 높은 것을 알 수 있었음.
- 그러나, 수지증이 발생한 나무만을 한정하여 분석하였을 때, 대부분 동일하게 식물병원성 진균이 관측되는 것을 확인할 수 있었으나, 박테리아나 곰팡이 군집과의 상관관계보다는 토양의 물리화학적 특성과 더 밀접한 관련이 있는 것으로 관측되었으며, 이는 수지증 완화에는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 같은 항진균성 미생물들의 역할이 존재하지만, 또한 토성개선 및 토양수분함량의 개선의 필요성 또한 존재함.

○ 복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술 개발

- 복숭아 수지증의 경감 및 친환경 생물방제균의 처리효율을 예측하기 위한 미생물 군집 분석 시행
 - 복숭아수지증과 마이크로바이옴의 관계를 조사하기 위해 차세대 염기서열 분석법을 사용하여 토양 샘플과 나무껍질 샘플에서 추출한 16s rRNA 코딩 유전자의 hypervariable V4-V5 영역과 ITS2 영역에 대해 앰플리콘 시퀀싱을 수행하였음.
 - 복숭아 수지증 발생 및 이에 따른 2개의 처리구(*Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28 처리구, 이하 MMB, *Bacillus amyloliquefacines* KNU-28 및 *Baeuveria bassiana* KNU-101 각 테일 처리구, 이하 BMB) 및 무처리구(이하 NB)에 대하여 개별적으로 처리 주수별로 시료를 확보하였음.
 - 확보된 시료의 total DNA를 추출한 후 세균 및 곰팡이의 16S rRNA gene 내 V4-5 영역과 ITS2 영역을 대상으로 한 amplicon sequencing library를 제작한 후 illumina Miseq을 운용하여 sequence를 확보함. Microbiome 및 Mycobiome 분석의 경우 리눅스 기반의 QIIME2 program을 활용하여 분석하였으며 data visualization의 경우 R program을 활용함. 처리전의 0주와 8주째를 기준으로 각 그룹에 대한 상대적 풍부도와 알파 다양성을 계산하였음.
 - 전반적으로 그룹별로 분석한 결과, 상대적 풍부도에는 큰 차이가 존재하지는 않았음. 그러나, 같은 그룹에 속했음에도 불구하고 개별 샘플은 박테리아와 곰팡이 군집 모두에서 유의미한 차이를 보였음.
 - 먼저, 목질부 내생 세균의 상대적 풍부도를 계산한 결과, 주요 분류군에는 *Acidiphilim*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bryocella*, *Burkholderia*, *Fimbriimonas*, *Jatrophihabitans*, *Methylobacterium*, *Nitrososphaera*, *Paenibacillus*, *Sphingoaurantiacus*, *Sphingomonas*, *Terriglobus*, and *Tundrisphaera*. 등이 존재하고 있었으며, 이러한 분류군은 식물의 건강, 영양소 흡수, 병원균으로부터의 보호를 지원하는 다양한 능력으로 알려져 있음.

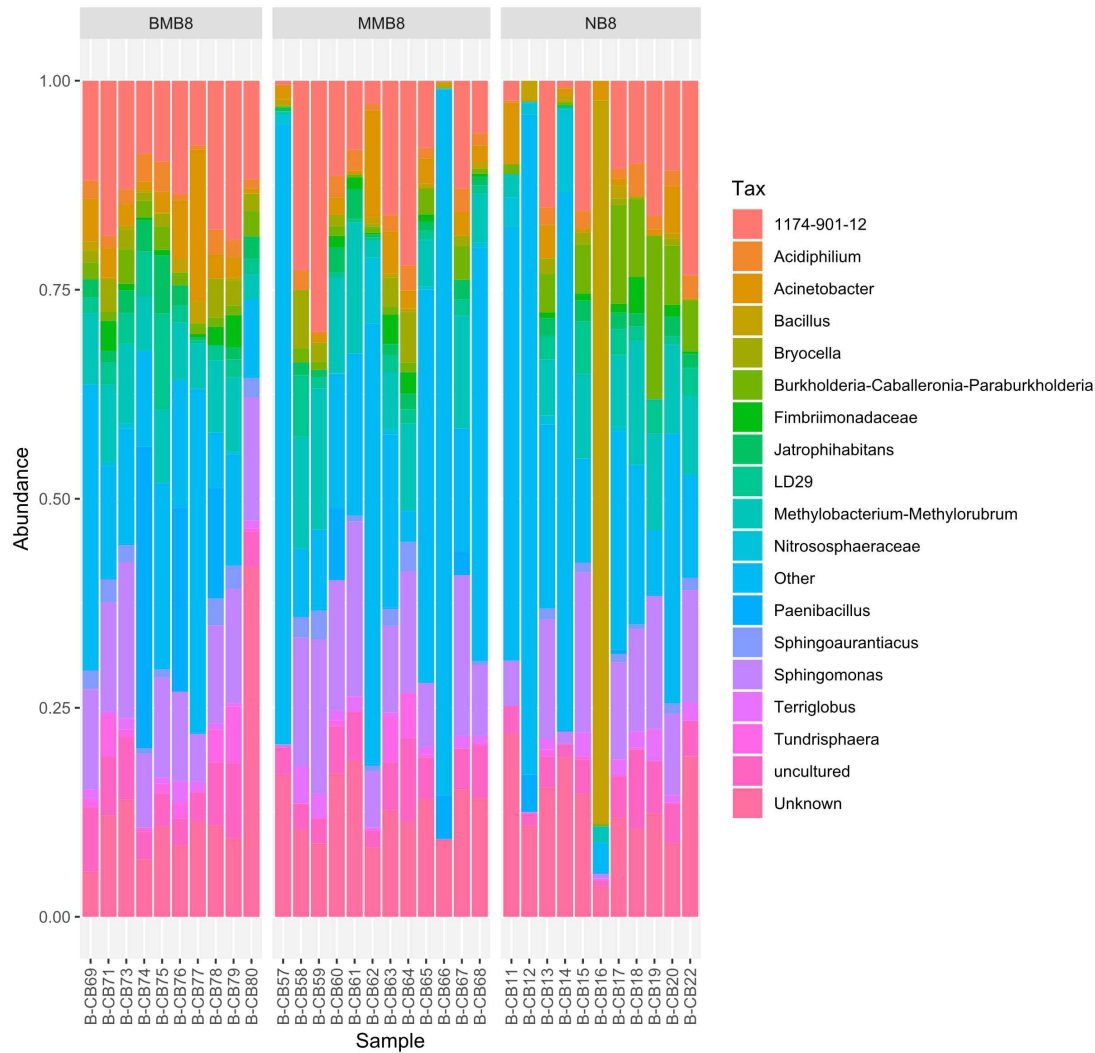


그림 113 8주차 목질부 세균의 Relative Abundance(상대적 풍부도)

- 목질부 내생 진균의 경우, 주요 속은 *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Calosphaeria*, *Cladosporium*, *Cystobasidium*, *Exophiala*, *Jattaea*, *Magnibotryascoma*, *Minutiella*, *Naganishia*, *Oncopodiella*, *Papiliotrema*, *Parapyrenochaeta*, *Phallus*, *Septobasidium*, *Setomelanomma*. 등이 존재하는 것을 확인하였으며, 이러한 진균들은 식물 성장 촉진, 스트레스 내성 강화, 식물 질병 억제 등 식물과 미생물의 상호작용에서 다양한 역할군으로써 존재함.

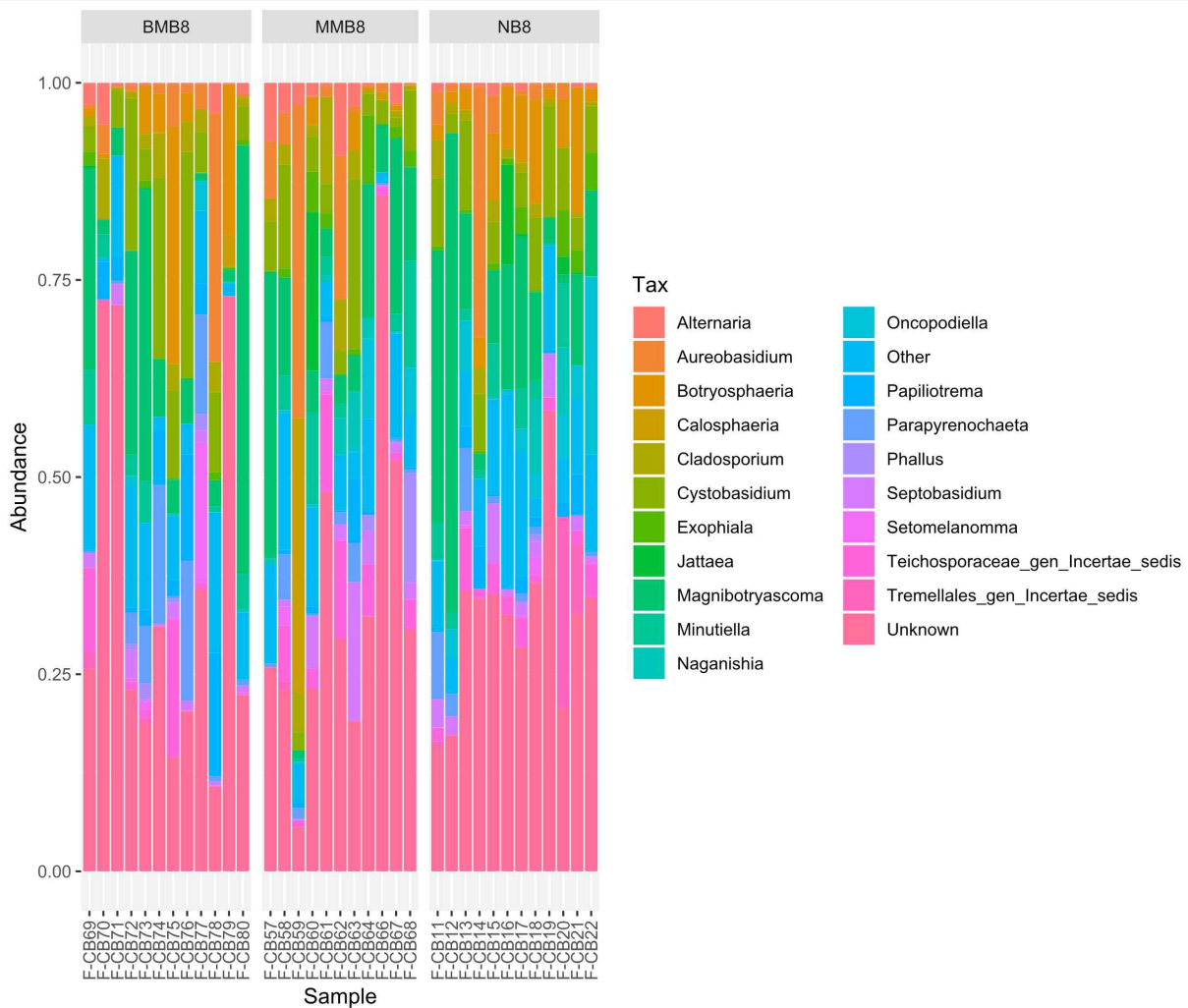


그림 114 8주차 목질부 진균의 Relative Abundance(상대적 풍부도)

- 목질부 내생 미생물과는 다르게, 토양근권의 경우, 상대적 풍부도에서 비교적 일관된 결과를 보여주었음. 근권 세균의 경우 목질부의 세균과 상당 부분 그룹이 공유되며, 서로 다른 그룹에 속함에도 불구하고 비교적 비슷한 상대적 풍부도를 보였습니다. 이는 즉 서로 다른 그룹별, 또는 개체별 수지증의 발생에 대한 토양미생물 군집이 크게 영향을 미치지 못한다는 것을 시사할 수 있음.
- 토양 근권 세균의 경우, *Acidibacter*, *Bacillus*, *Nitocosmicus*, *Udaeobacter*, *Gaiella*, *Nitrospira*, *Pedomicrobium*, *Pseudolabrys*, *Rokubacteria*, *Sphingomonas* 등의 속이 존재하였으며, 이러한 세균들은 영양분 순환, 질소 고정, 식물 성장 촉진에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음.

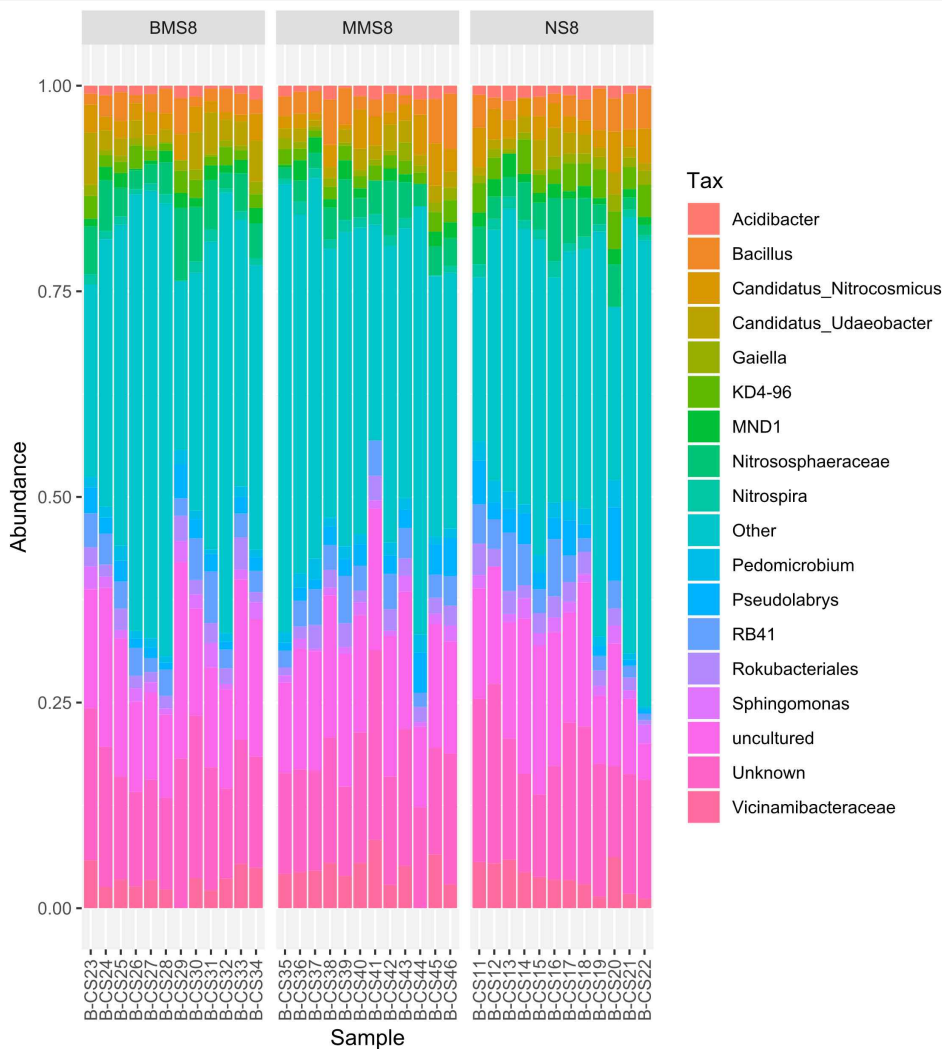


그림 115 8주차 토양 근권 세균의 Relative Abundance(상대적 풍부도)

- 토양 근권 진균의 경우 *Cheilmenia*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Cordana*, *Cryptococcus*, *Dissophora*, *Fusarium*, *Gibellulopsis*, *Halenospora*, *Leucoagaricus*, *Mortierella*, *Mycochlamys*, *Nectria*, *Phallus*, *Sagenomella*, *Solicocozyma*, *Spoonermyces*, *Tausonia*, *Tertracladium* 등의 속이 존재하며, 이 곰팡이들은 영양분 동원, 뿌리 발달, 질병 억제 등 식물 건강의 다양한 측면에 관여하는 것으로 알려져 있음.

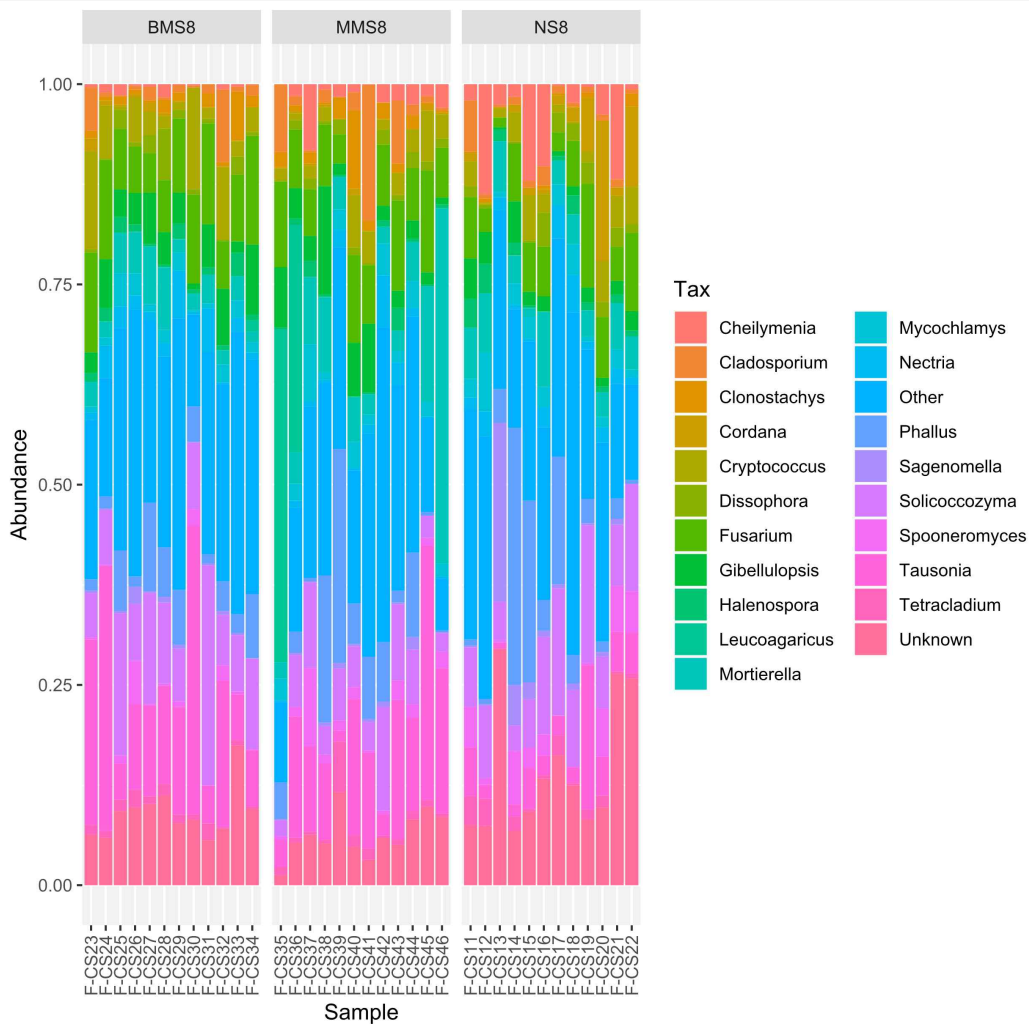


그림 116 8주차 토양 근권 진균의 Relative Abundance(상대적 풍부도)

- 시간에 따른 식물병원성 진균의 거동을 살피기 위하여 처리구 2개(MMB, BMB) 및 무처리구에 대하여, 중요하게 여겨지는 6가지 종류의 진균들에 대하여 시간에 따른 변화양상을 관측하였음.

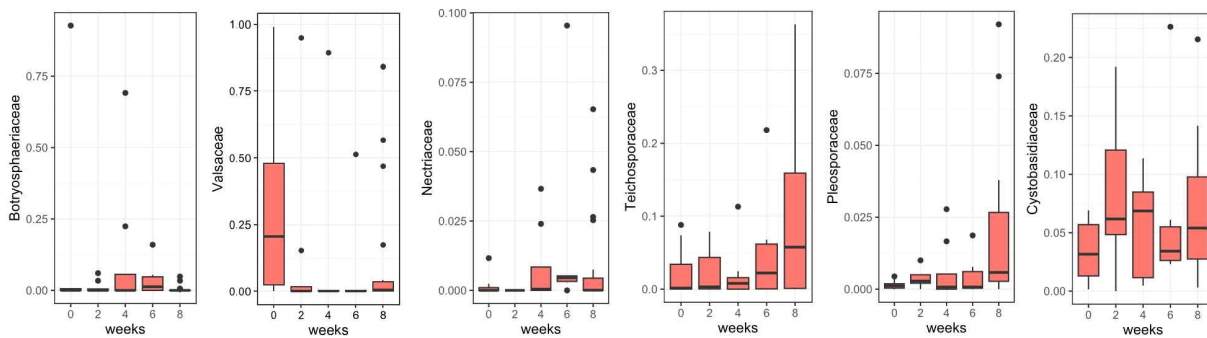


그림 117 MMB group(*Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28)의 시간 변화에 따른 진균의 변화 양상

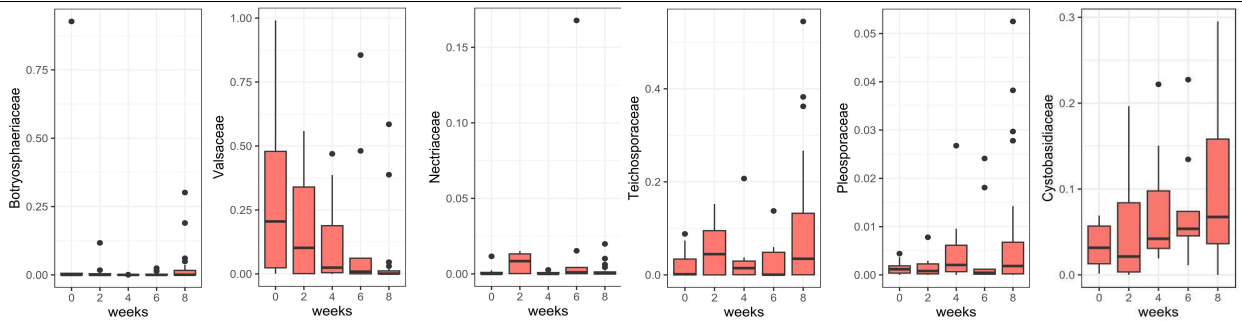


그림 118 BMB group(2종 혼합 처리)의 시간 변화에 따른 진균의 변화 양상

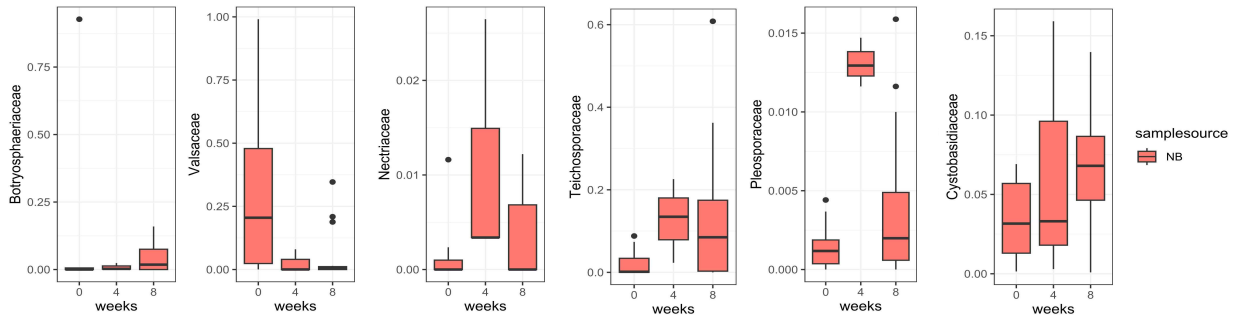


그림 119 NB group(무처리)의 시간 변화에 따른 진균의 변화 양상

- 복숭아나무의 목질부 진균 미생물 군집에서 중요하게 판단할 수 있었던 *Botryosphaeriaceae*, *Valsaceae*, *Nectriaceae*, *Teichosporaceae*, *Pleosporaceae*, 그리고 *Cystobasidiaceae* 6종의 진균에 대해 시간에 따른 Relative abundance 변화를 조사하였음.
- 2개의 처리그룹에서는 식물 내에서 흔하게 관찰될 수 있는 공생관계적인 진균인 *Teichosporaceae*에 대하여 증가하는 경향성이 뚜렷하였으나, 무처리 그룹에서는 크게 증가하지 않았음.
- 1차년도에서 또한 수지증의 발생가능한 원인 중 하나로서 지목하여 다루었던 *Valsaceae*에 대하여, 상기 3개의 그룹 모두에서 감소하는 경향을 보였음.
- 제일 중요하게도, 미생물 제제를 처리하였던 상기 2개의 처리그룹에서는 복숭아 수지증을 일으키는 것으로 알려져 있는 *Botryosphaeriaceae*과, 식물병원성 진균으로서 알려져 있는 *Nectriaceae*에 대한 억제가 존재하였으나, 무처리 그룹에서는 억제되지 않았으며 증가하는 경향을 보여주었음.
- 이는 미생물 제제 처리를 통하여 식물병원성 진균의 억제가 가능함을 보여주었으며, 특히 *Botryosphaeriaceae* 및 *Nectriaceae* family에 대한 추가적인 발생을 억제할 수 있음을 시사함.

■ 생물방제균의 효과적인 처리량을 확인하기위해, Specific primer를 제작하여 방제균이 처리된 처리군의 효과적인 추적 시행

- 기능적 및 진화적으로 중요한 RNA 코딩 영역 유전자에 초점을 맞추어, 고유하고 변이가 적어 다른 종들과의 구별이 용이한 부위들에 대한 탐색을 수행하였음.
- 일반적으로 세균의 분류와 동정에 널리 사용되는 16s rRNA, 16s rRNA에 비해 더 큰 ribosome unit을 코딩하는 23S rRNA, DNA gyrase의 B subunit을 코딩하며, 16s rRNA 영역에 비해 변이가 더 많은 *gryB*, DNA 복구 및 재조합에 주요 역할을 수행하는 *recA*,

RNA polymerase의 beta subunit을 구성하는 rpoB, elongation factor Tu를 coding하며 세포의 단백질 합성에 관여하는 tuf, ATP 합성요서의 Beta subunit을 코딩하는 atpD, 세포의 스트레스 반응과 단백질 접힘에 관여하는 hsp, 전사 개시 요소인 elongation factor IF-2 관련 infB, 세포의 에너지 대사와 관련된 adk, Glucose 6 Phosphate Isomerase로써 탄수화물 대사에 관여하는 pgi, Triosephosphate Isomerase로써, glycolysis 경로에 관여하는 tpi 등의 후보군들을 포함하였음.

- 또한, 2차년도에서 확인한 바와 같이 Bacillus 중에서 생산되는 다양한 항균 및 항진균 물질 생성하는 유전자 코딩 영역을 탐색하였으며, 그 후보로써, 철 결합 siderophore인 Bacillibactin 관련 유전자로써 세균의 성장과 타 균의 경쟁에 관여하는 dhbABCDE 클러스터, 항진균 펩타이드로써 진균에 대한 활성을 가지고 있는 Fengycin에 관여하는 fenABCDE 클러스터, 생물학적 계면활성제로써, 항균 및 항바이러스 활성을 가지고 있는 Surfactin에 관련된 srfABC 클러스터, lipopeptide로써 강력한 항진균 활성을 가지고 있어 식물 병원균에 대한 방어 메커니즘으로 작동하는 Iturin에 관련된 ituABC 및 ituD 클러스터, 그람양성 세균에 대한 항균활성을 가지는 항균펩티드로써, Bacilysin 관련 bacABCDE 클러스터, 항생제 내성 박테리아, 특히 메티실린 내성 황색포도상구균 (MRSA)에 대한 활성을 가지는 Mersacidin 관련 mrsA, Fengycin과 유사한 항진균 lipopeptide로써 Plipastatin에 관한 ppsABCDE 클러스터, 항균활성을 가지는 Subtilin 관련 spaS 및 spaBTC 클러스터에 대하여 탐색을 수행하였음.
- 또한, Non-coding DNA 영역에 대해 추가적인 탐색을 수행하였음.
- 데이터베이스로써, Bacillus amyloliquefaciens의 reference sequence에 한정짓지 않고 더 나아가 전체 Bacillus 종에 대하여 전체 뉴클레오타이드 DB를 활용하여 탐색하였으며, mismatch 조건을 엄격하게 작성하여 primer 후보군을 선택하였음.
- 검색 결과, PCR 뿐만 아니라 더 나아가 추가적인 시퀀싱을 통해 확인할 수 있도록 염기 서열 일치율이 100%인 서열들을 제외하여 Hsp20/alpha crystallin family protein, srfAA, srfAB, srfAC cluster, rpoB, gyrB, 16s rRNA 영역에서 확인할 수 있도록 primer 세트 후보군들을 좁혀 탐색 및 구성하였음.
- 최종적으로, Hsp20/alpha crystallin family protein 코딩 영역과, Non-coding DNA 영역의 primer 세트를 구성하였음.
- 또한, Non-coding DNA 영역에 대해 추가적인 탐색을 수행하였음.

hsp20	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Tm	GC%
Forward primer	TTTCACTCAG	Plus	20	59.97	55.00
Reverse primer	GTCCCTTCGC	Minus	20	59.96	55.00
Product length	TCGTTTCCAC		179bp		

표 30. Bacillus amyloliquefacines KNU-28의 hsp20 coding gene영역 대상 primer

non-coding (2309696-2310183)	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Tm	GC%
Forward primer	CCGCTATCGC	Plus	20	59.97	55.00
Reverse primer	CTTTTTGACG	Minus	20	59.97	60.00
	GAGTACGAGG				
	TGATGAGCCG				

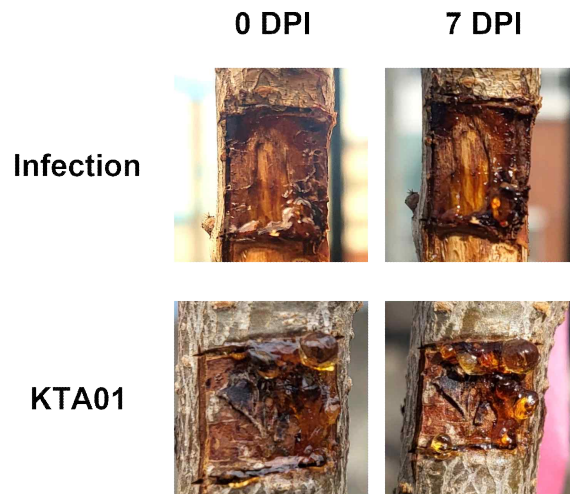
Product length	507bp
----------------	-------

표 31. *Bacillus amyloliquefaciens* KNU-28의 non-coding 영역 대상 primer

- 해당 primer를 이용하여 복숭아나무 수지증 방제를 위한 미생물 제제의 지속적인 관리 추적이 가능할 것으로 예상됨.

○ 식물·미생물 유래 친환경 제제 연구

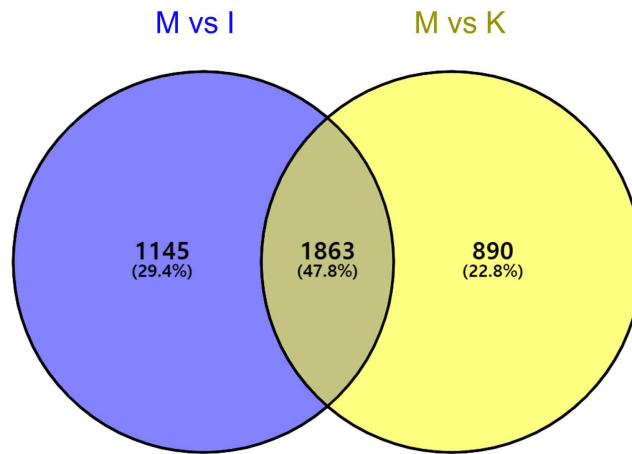
- 세포벽 손상(Cell Wall Damage; CWD)에 대한 반응으로 식물체 내에서는 상처 스트레스(wound stress)에 의해 식물 호르몬인 자스몬산(Jasmonic acid)가 축적되고 보고된 바, 복숭아 수지 병변에서 길항미생물의 처리 전후의 식물체 내의 자스몬산의 생합성 유전자의 발현양상을 조사
 - 이전 연구에서 *Botryosphaeria dothidea* 균주에 대한 길항 능력을 갖추고 있다고 판단하였던 *Bacillus velezensis* KTA01 (이전 보고서의 *Bacillus velezensis* KTA와 동일균주) 균주를 *B. dothidea* 균주에 감염되어 수지가 발생한 복숭아 나무의 병변에 처리하여, 식물체내의 유전자 발현 양상을 RNA-seq을 진행하여 확인하였다. 식물체 표면에 상처만 낸 그룹(Mock) 또한 대조군으로 사용되었다.
 - 복숭아 수지 병원균인 *B. dothidea*를 식물체 상처 부위에 접종한 14일 후, 대조군으로 사용된 0.85% saline buffer(Infecion)와 *B. velezensis* KTA01 균주를 첨가한 1×10^8 CFU/ml 현탁액(KTA01)을 각각 식물체 병변 주변에 7일 동안 처리하였다. (그림 1).



<그림 120. *Botryosphaeria dothidea*에 감염되어 수지가 발생한 복숭아 나무 병변에 0.85% saline buffer와 *Bacillus velezensis* KTA01 현탁액 처리 실험>

- 그 결과, 대조군으로 사용된 0.85% saline buffer를 처리한 식물체에는 새로운 액체상의 수지가 계속해서 발생되었고, *Bacillus velezensis* KTA01 균주를 처리한 식물체에는 수지가 대부분 굳어있었으며, 기존에 발생하였던 수지 이외에 새로운 수지가 크게 발생하지 않았다.
- 이것으로, *Bacillus velezensis* KTA 균주 처리 시, 처리 하지 않은 식물체에 비해 수지 발생이 억제되는것으로 확인되었다.
- 7일 후 식물체의 수지 병변 주변을 확인한 후 멸균된 면도날을 사용하여 병변 조직을 샘플링하였다.
- 샘플링한 식물체 조직을 액체질소로 냉각시킨 후 막자사발을 사용하여 마쇄하였고, TRIzol, chloroform, isopropanol과 70% ethanol을 사용하여, 식물체 조직의 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 DNase를 처리하여 gDNA를 제거한 후, PolyATtract mRNA Isolation System Kit를 사용하여 mRNA를 분리하였다. mRNA의 순도와 농도를 측정 후, MGIEasy RNA Directional Library Prep Set를 사용해 RNA-seq 라이브러리를 구축하였다. RNA-seq은 경북대학교 차세대시퀀싱센터(KNU NGS Core Facility)에서 수행되었다.

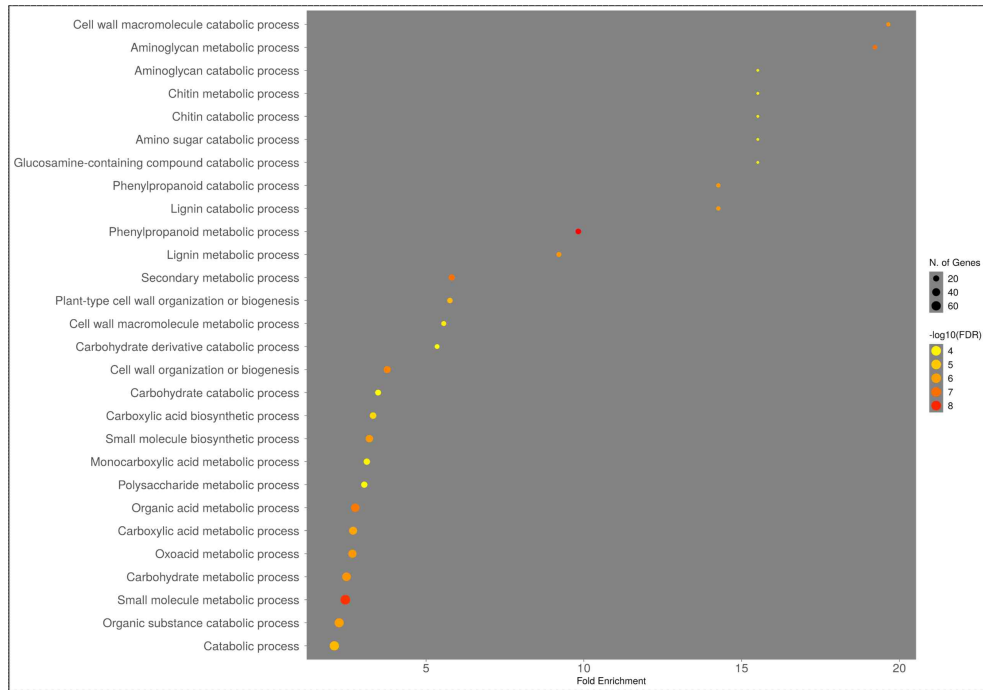
- 그 결과, Mock vs Infection 그룹에서는 총 3,008개의 DEGs가 발견되었고, Mock vs KTA01 그룹에서는 총 2,753개의 DEGs가 발견되었다. Venn analysis를 통해 두 그룹(M vs I, M vs KTA01) 사이에 1,863개의 DEGs를 공유하는 것으로 확인되었다 (그림 2).



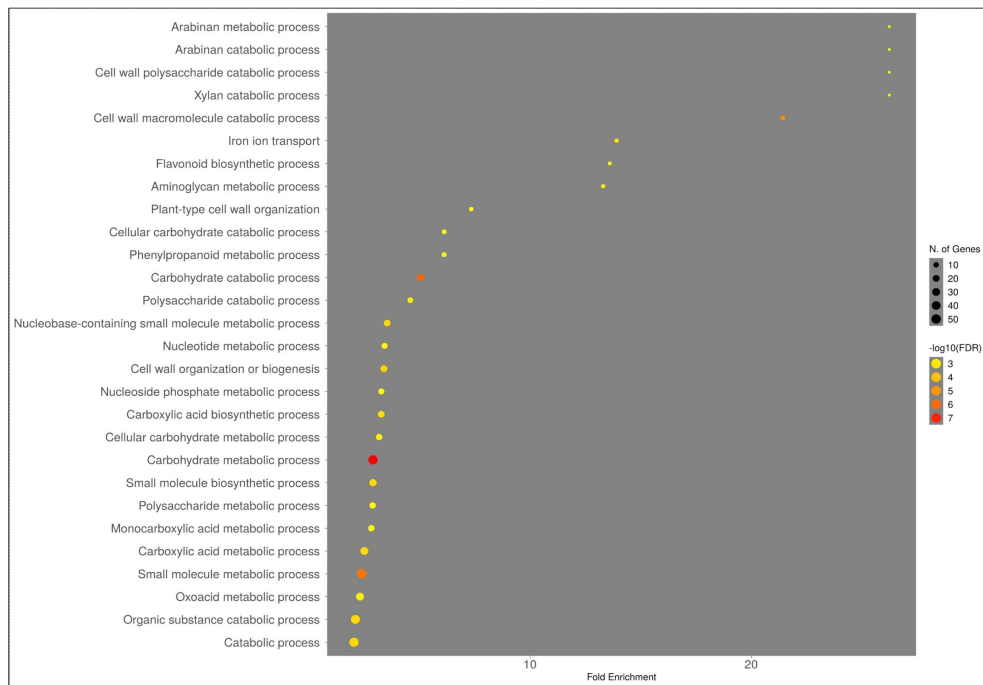
<그림 121. Venn analysis를 통한 Mock vs Infection과 Mock vs KTA01 그룹 간의 DEGs>

- M vs I와 M vs K 그룹의 DEGs들을 GO 분석을 통하여 “Catabolic process“, “Carbohydrate metabolic process“, “Organonitrogen compound biosynthesis process“에 각각 463, 413개의 관련된 유전자들이 높은 발현량을 나타낸 것으로 확인되었다 (그림 3).

M vs I



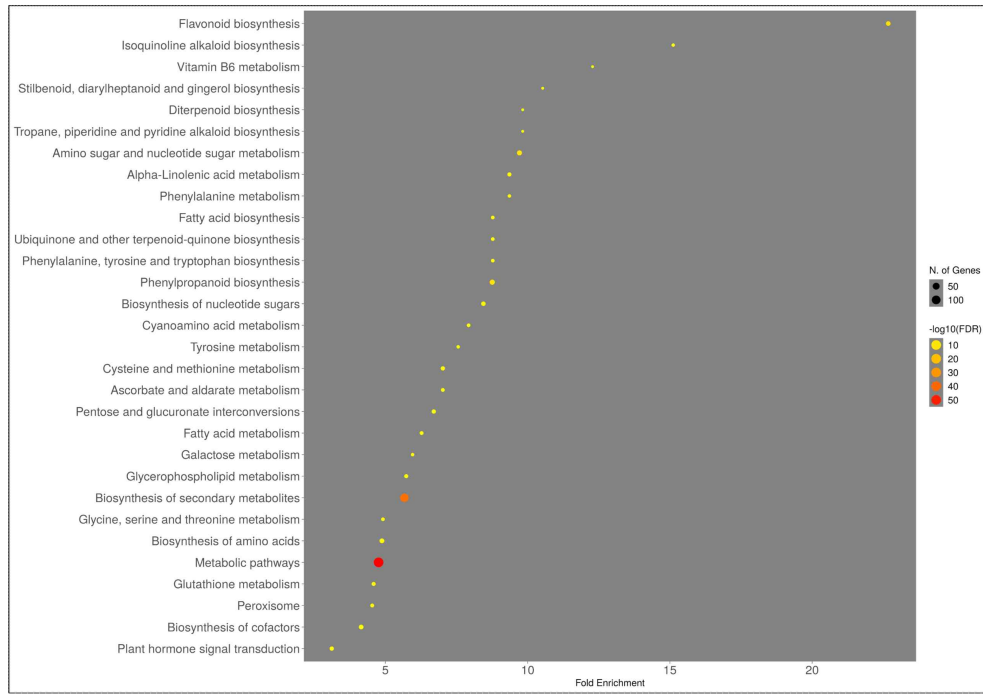
M vs K



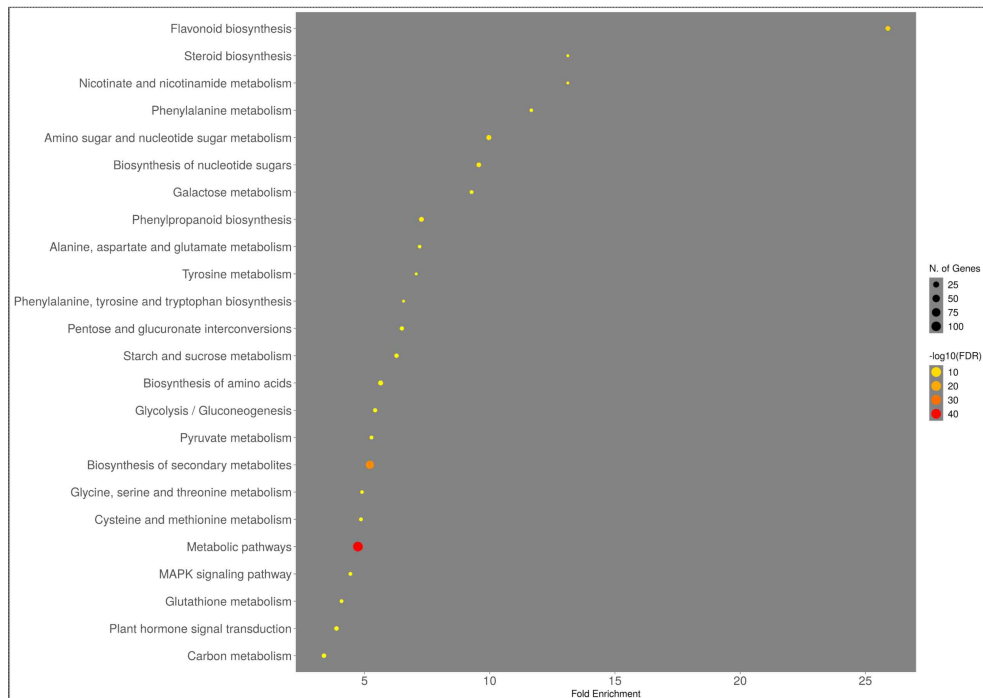
<그림 122. Mock vs Infection과 Mock vs KTA01 그룹의 DEGs를 GO 분석>

- 또한, M vs I와 M vs K 그룹의 DEGs들을 KEGG 분석을 통하여 “Flavonoid biosynthesis“, “Phenylpropanoid biosynthesis“, “Plant-pathogen interaction“에 각각 59, 54개의 관련된 유전자들이 높은 발현량을 나타낸 것으로 확인되었다 (그림 4).

M vs I



M vs K

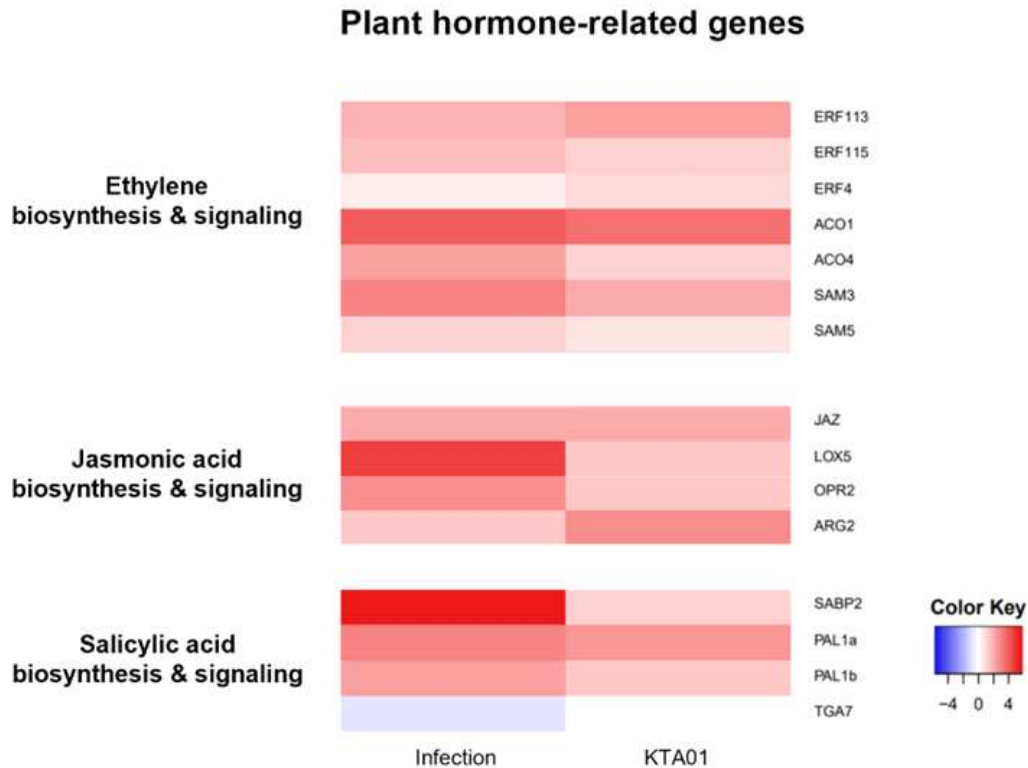


<그림 123. Mock vs Infection과 Mock vs KTA01 그룹의 DEGs를 KEGG pathway 분석>

- 그 중, 3가지 조건에서 식물체 내에 상처 스트레스(wound stress)에 영향을 받는 식물 호르몬인 자스몬산(Jasmonic acid), 살리실산(Salicylic acid) 그리고 에틸렌(Ethylene) 생합성 및 신호 전달과 관련된 유전자들의 발현 패턴을 확인하였다. 그 결과, 에틸렌 생합성 및 신호 전달과 관련된 유전자들의 발현 패턴은 mock보다 전체적으로 높은 발현량이 확인되었고, M vs K그룹에서는 발현량이 M vs I그룹보다 조금 낮아졌다. 자스몬산 생합성 및 신호 전달과 관련된 유전자들의 발현 패턴 또한 mock보다 전체적으로 높은 발현량이 확인되었고, M vs I에서 자스몬산 생합성 유전자(LOX5, OPR2)의 발현량은 M vs K보다 높은 발현량이 확인되었다. 살리실산 생합성 및 신호 전달과 관련된 유전자들의

발현 패턴은 복합적으로 나타났다. (그림 5).

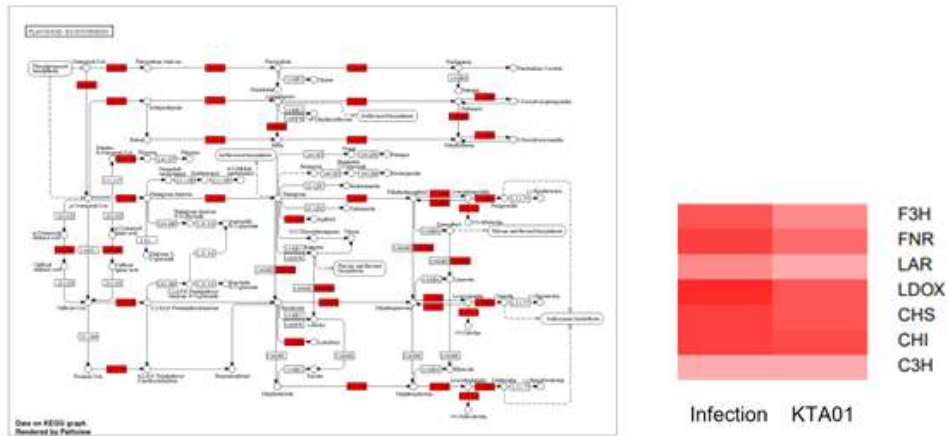
- 이는 수지 발생 후 KTA01 균주를 7일 동안 처리한 후 식물체 내의 유전자 발현 패턴을 확인한 것이다. 따라서 수지 발생 당시 높았던 식물 호르몬 생합성 및 신호 전달과 관련된 유전자 발현량이 KTA01 균주 처리 시 7일 동안 식물체 내의 병원균에 부정적인 영향을 주어 식물체의 유전적 레벨에서 증상이 완화되는 것으로 판단하였다.



<그림 125. Heatmap을 통한 식물 호르몬 생합성 및 신호 전달과 관련된 M vs I 와 M vs K 그룹의 DEGs의 발현 패턴 분석>

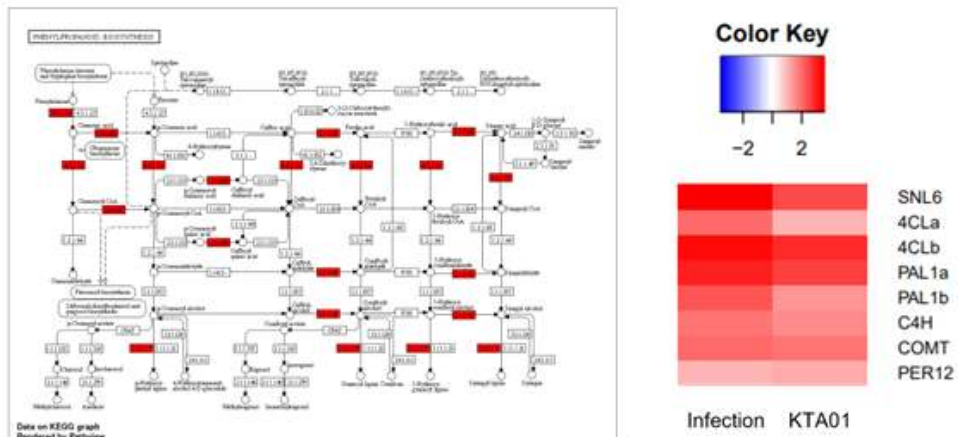
- 자스몬산은 phenylpropanoids와 리그닌 생합성과 같은 이차 대사의 네트워크를 조절한다고 보고된 바, phenylpropanoids 및 리그닌 생합성 유전자의 발현양상을 조사하여 복숭아 수지증에 대한 생리학적 수준과 분자 수준에서의 방어기작 구명
 - 위 3가지 조건에서 KEGG pathway 분석 결과로 “Flavonoid biosynthesis“, “Phenylpropanoid biosynthesis“와 관련된 유전자들의 발현 패턴을 Heatmap을 통해 확인하였다. 그 결과, flavonoid 및 phenylpropanoid 생합성과 관련된 유전자들의 발현량은 mock보다 매우 높은 발현량이 확인되었다. 그리고 대부분 유전자들이 M vs K보다 M vs I그룹의 유전자 발현량이 약간 높은 것이 확인되었다.
 - 이는 식물 호르몬 생합성 및 신호 전달과 관련된 유전자들의 발현 패턴 양상과 마찬가지로, 수지 발생 당시 높았던 flavonoid 및 phenylpropanoid 생합성과 관련된 유전자들의 발현량이 KTA01 균주 처리 시 7일 동안 식물체 내의 병원균에 부정적인 영향을 주어, 수지 발생 당시 높았던 유전자 발현량이 식물체의 유전적 레벨에서 증상이 완화되는 것으로 판단하였다.

Flavonoid biosynthesis pathway



<그림 126. Heatmap을 통한 Flavonoid biosynthesis pathway와 관련된 M vs I 와 M vs K 그룹의 DEGs의 발현 패턴 분석>

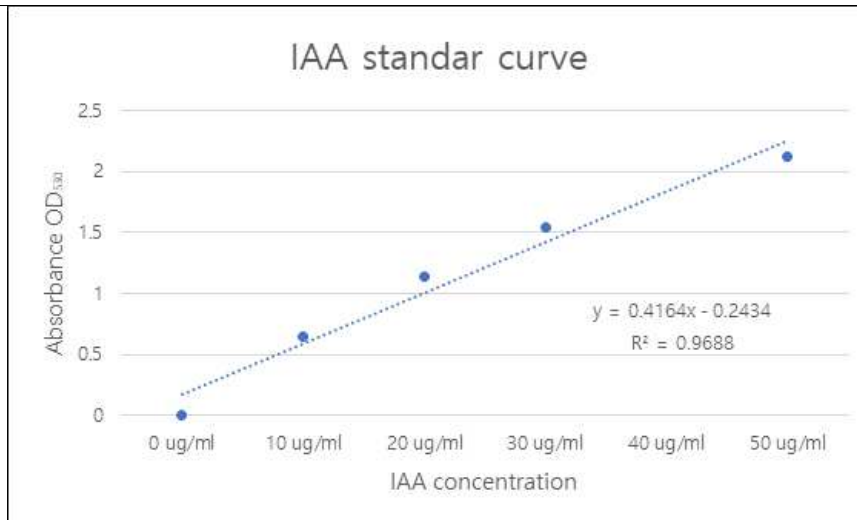
Phenylpropanoid biosynthesis pathway



<그림 127. Heatmap을 통한 Phenylpropanoid biosynthesis pathway와 관련된 M vs I 와 M vs K 그룹의 DEGs의 발현 패턴 분석>

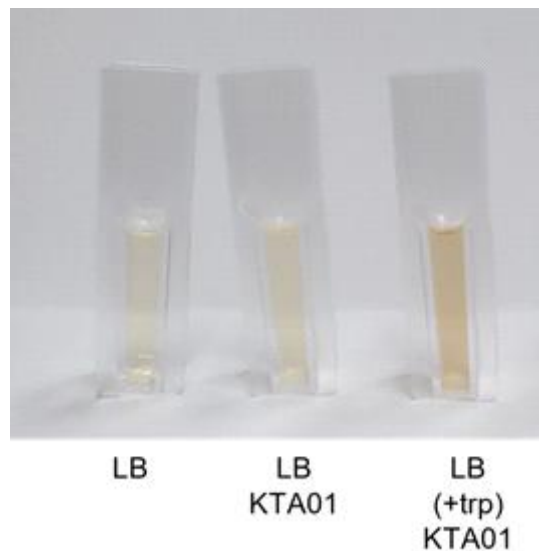
○ 복숭아 수지 병원균 생육 억제 작용기작 구명

- 선발된 길항미생물의 식물호르몬(옥신 등) 생성능을 Salkowski 시약 등을 이용하여 검출 및 생성량 조사
 - *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 IAA 생성량을 측정하기 위하여 LB 액체배지에 standard IAA를 첨가하여 각각 10, 20, 30, 50 $\mu\text{l/ml}$ 로 맞춘 후, Salkowski 시약과 1:1 혼합 후 30분간 반응하여, spectrometer로 흡광도를 측정하였다.
 - 그 결과, 측정된 값을 기반으로 IAA standard curve를 구축하였다 (그림 8).



<그림 128. IAA standar curve>

- *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 식물호르몬인 옥신(IAA) 생성능을 확인하기 위하여 Salkowski 시약을 사용하였다.
- *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 IAA 생성량을 측정하기 위하여 LB 액체배지에 옥신의 전구체인 tryptophan을 첨가하여 24시간, 30°C 에서 배양하였다. 균주의 배양액을 5,000 rpm 15분간 원심분리하여 배양 여액을 Salkowski 시약과 1:1 혼합 후 30분간 반응하여, spectrometer로 흡광도를 측정하였다 (그림 9).



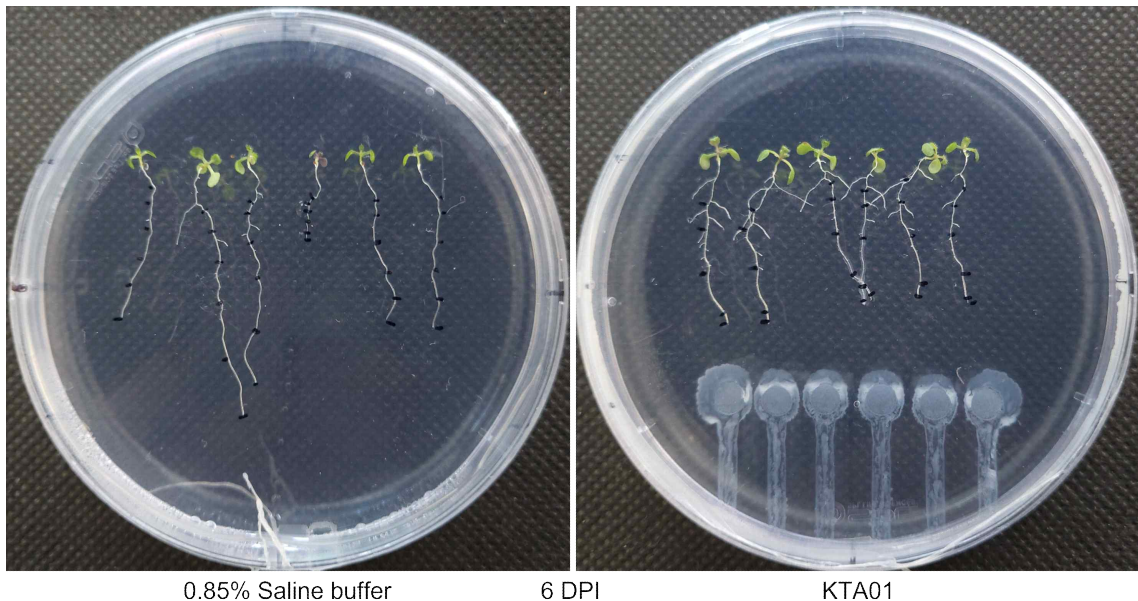
<그림 129. 각 조건의 배양액과 Salkowski 시약의 반응 비교>

- tryptophan을 첨가하지 않은 KTA01 균주의 배양 여액과 LB 액체배지는 대조군으로써 사용되었다.
- 그 결과, LB 액체배지에 tryptophan을 첨가하지 않고 배양한 KTA01 균주의 배양 여액에서 흡광도가 약 0.256이 측정되었다. LB 액체배지에 tryptophan을 첨가하여 배양한 KTA01 균주의 배양 여액에서 흡광도가 약 0.409가 측정되었다 (그림 10).

	test 1	test 2	test 3	avg	IAA(μg/ml)
LB KTA	0.245	0.267	0.257	0.256	12.001
LB(+trp) KTA	0.412	0.418	0.398	0.409	15.675

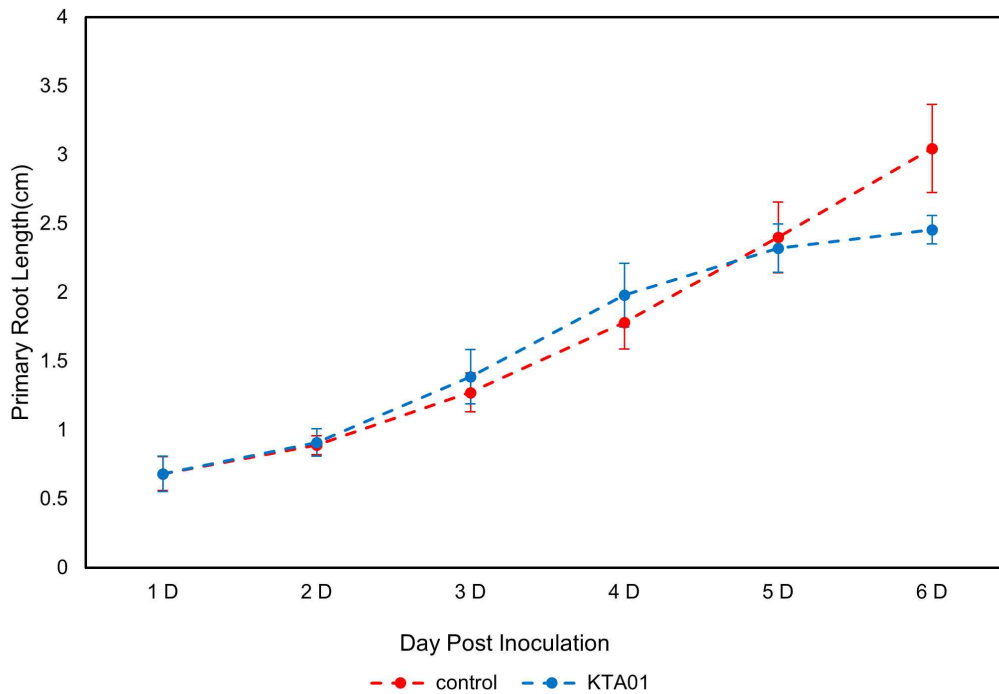
<그림 130. 각 조건의 배양 여액의 흡광도 측정값과 배양 여액에 존재하는 것으로

- 따라서 IAA의 전구체인 tryptophan을 첨가하여 배양한 KTA01 균주의 배양 여액에서 첨가하지 않은 배양 여액보다 높은 흡광도 값이 측정되었고, 이는 KTA01 균주가 옥신을 생성할 수 있다는 것으로 확인되었다.
- 길항 미생물 균체 및 배양 여액에 따른 모델 식물인 *Arabidopsis thaliana*의 뿌리 성장을 조사
 - *Bacillus velezensis* KTA01 균주가 식물체 뿌리 성장에 영향을 줄 수 있는지 *Arabidopsis thaliana*를 이용하여 확인하였다.
 - *A. thaliana*의 씨앗들은 1/2 MS 배지(2.151 g/L Murasige & Skoog medium, 0.6 g/L MES, 5.0 g/L sucrose, 6.0 g/L phyto agar, KOH를 pH 5.7이 될 때까지 첨가)상에 4°C에서 24시간 동안 층화처리 하였다. 이후, 성장상에서 16 hour light/8 hour dark, 23°C 조건으로 3일 동안 수직배양 하였다. Seedling들을 6개씩 새로운 1/2 MS 배지로 옮긴 후, shoot에서 7 cm 거리에 KTA01 균주 또는 대조군으로 0.85% saline buffer를 10 µl 접종하였다. 각 배지를 성장상에서 16 hour light/8 hour dark, 23°C 조건으로 6일 동안 수직 배양한 뒤 관찰하였다 (그림 11).



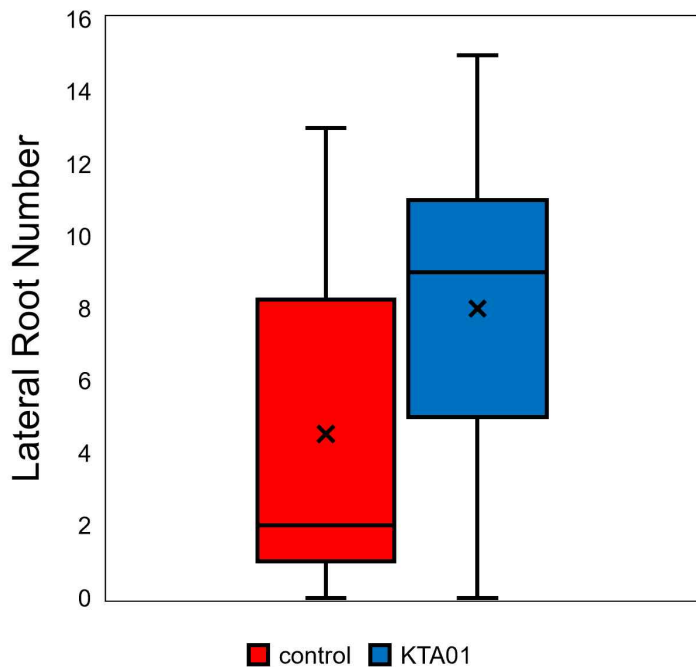
<그림 131. 1/2 MS 배지 상에 *A. thaliana* seedling과 각각 0.85% Saline buffer 및 KTA01 균주를 접종하여 수직 배양한 후 비교>

- 그 결과, 1/2 MS 배지에 0.85% saline buffer를 접종 한 *A. thaliana*의 뿌리 길이는 6일 차에 약 3.0 cm 증가하였고, KTA01 균주를 접종 한 *A. thaliana* 뿌리 길이는 약 2.5 cm 증가하였다 (그림 12).



<그림 132. 각 조건에서의 *A. thaliana* 뿌리 길이 비교>

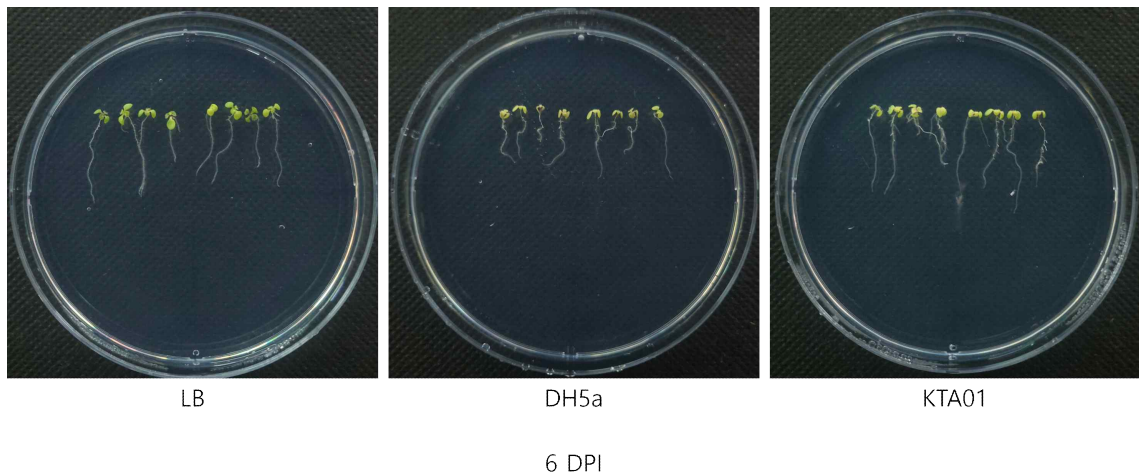
- 1/2 MS 배지에 0.85% saline buffer를 접종 한 *A. thaliana*의 결뿌리의 개수는 약 4.53개로 측정되었고, KTA01 균주를 접종 한 *A. thaliana* 결뿌리의 개수는 약 8개로 측정되었다 (그림 13).



<그림 133. 각 조건에서의 *A. thaliana* 결뿌리 개수 비교>

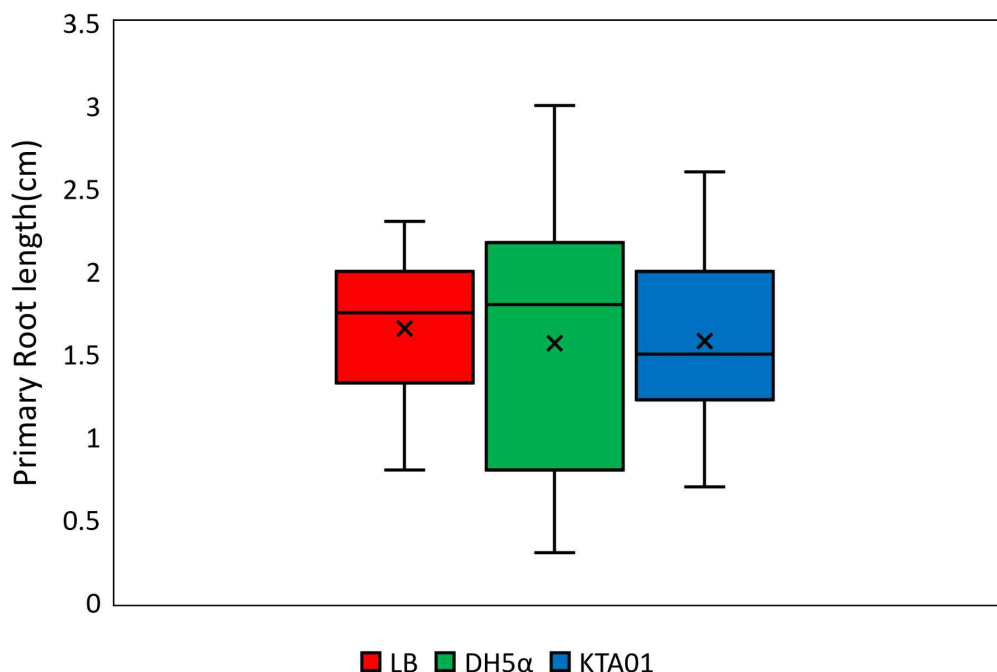
- *Bacillus velezensis* KTA01 균주는 *Arabidopsis thaliana*의 뿌리 길이 성장에는 영향이 미흡하였지만, 결뿌리 개수를 증가시키는 것이 확인되었다. 이는 식물체가 영양분과 수분을 흡수하는 것과 직접적인 연관이 있는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 *Bacillus velezensis* KTA01 균주는 *Arabidopsis thaliana*의 성장에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 확인되었다.

- *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 배양 여액이 식물체 뿌리 성장에 영향을 줄 수 있는지 *Arabidopsis thaliana*를 이용하여 확인하였다.
- *A. thaliana*의 씨앗들은 1/2 MS 배지(2.151 g/L Murasige & Skoog medium, 0.6 g/L MES, 5.0 g/L sucrose, 6.0 g/L phyto agar, KOH를 pH 5.7이 될 때까지 첨가)상에 4°C에서 24시간 동안 층화처리 하였다. 이후, 성장상에서 16 hour light/8 hour dark, 23°C 조건으로 3일 동안 수직배양 하였다.
- 새로운 1/2 MS 배지에 LB 액체배지, *Escherichia coli* DH5 α , 그리고 *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 배양 여액 500 ml을 도말한 후, seedling들을 8개씩 새로운 1/2 MS 배지로 옮겼다. 각 배지를 성장상에서 16 hour light/8 hour dark, 23°C 조건으로 6일 동안 수직 배양한 뒤 관찰하였다 (그림 14).
- *Escherichia coli* DH5 α 와 *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 배양 여액은 각 균주를 LB 액체배지에 30°C 24시간 동안 배양한 후 원심분리 하여 얻었다.



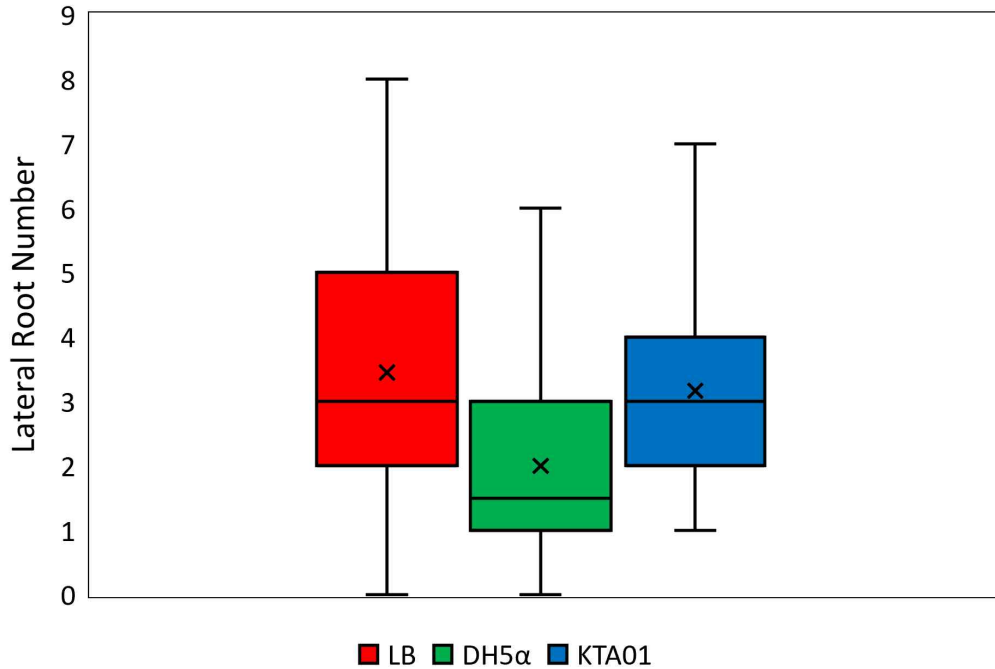
<그림 134. 1/2 MS 배지 상에 *A. thaliana* seedling과 각각 LB 액체배지, DH5 α 및 KTA01 균주의 배양 여액을 접종하여 수직 배양한 후 비교>

- 그 결과, 1/2 MS 배지에 LB 액체배지를 접종 한 *A. thaliana*의 뿌리 길이는 6일 차에 약 1.67 cm 증가하였고, DH5 α 와 KTA01 균주의 배양 여액을 접종 한 *A. thaliana* 뿌리 길이는 약 1.57 cm, 1.58 cm씩 증가하였다 (그림 15).



<그림 135. 각 조건에서의 *A. thaliana* 뿌리 길이 비교>

- 1/2 MS 배지에 LB 액체배지를 접종 한 *A. thaliana*의 곁뿌리의 개수는 약 3.45개로 측정되었고, DH5 α 와 KTA01 균주의 배양 여액을 접종 한 *A. thaliana* 곁뿌리의 개수는 각각 2개, 3.17개로 측정되었다 (그림 16).



<그림 136. 각 조건에서의 *A. thaliana* 곁뿌리 개수 비교>

- *Escherichia coli* DH5 α 와 *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 배양 여액은 *Arabidopsis thaliana*의 뿌리 길이 성장과 곁뿌리 개수에는 영향을 크게 주지 않는 것으로 확인되었다. 하지만 *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 배양 여액은 *Escherichia coli* DH5 α 균주의 배양 여액에 비해 곁뿌리에 부정적인 영향을 끼치지 않는 것이 확인되었다. 따라서 *Bacillus velezensis* KTA01 균주의 배양 여액은 *Arabidopsis thaliana*의 성장에 부정적인 영향을 끼치지 않는 것으로 확인되었다.

○ 개발 시제품의 효능 및 범용성 검증을 위한 실증시험(수지증 치유시험)

1) 복숭아 수지증상에 대한 개발 시제품의 포장 시험

1-1) 시험 개요

- 복숭아 수지 증상에 대한 개발 시제품의 효능 및 범용성 검정 관련 포장시험을 시행하여 개발 시제품의 수지증상 억제 및 치료효과 실증시험을 수행하였다.
- 시험은 2회(1차 : 경북 칠곡군 가산면 학하리, 2차 : 경북 김천시 아포읍 지리) 수행하였으며 각 포장 모두 재배 년 수 10년 이상의 과수로 처리구당 5-10주를 3반복으로 수행하였다.
- 각 처리구별로 수지병반을 달관조사 하여 수지가 더 이상 나오지 않으면 효능 효과가 인정되는 것으로 판단하였다. 복숭아 수지증 병반을 제거한 후 개발 시제품을 처리한 경우에는 수지증 병반의 추가 발생수를 계수하여 판단하였으며, 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 개발 시제품을 처리한 경우에는 수지증 병반의 외관상 변화 양상을 달관 조사하여 판단하였다

1-2) 시험 결과

- 복숭아 포장 1차 시험은 경북 칠곡군 가산면 학하리 소재의 수령 10년 이상의 복숭아 시험포장에서 수행하였다.

1-2-1) 포장시험결과 (1차)

- 시험 시작 전 각 시험구에 수지증 병반 수를 조사하였으며 이후 복숭아 수지증 병반을 제거한 후 시제품 50배액을 살포 처리한 후 시간별로 수지증 병반수를 조사하였다.
- 각 처리구의 처리 전 수지증 병반수는 아래와 같으며 각 처리구 별로 다양하게 분포하였고 전체 처리구의 병반 수는 69개로 조사되었다.
- 각 처리구의 수지증 병반수를 조사한 후 즉시 병반을 제거하고 난 후 개발 시제품을 처리한 결과 각 처리구에서 병반 수는 모두 크게 감소하는 경향을 나타내었으며, 전체적으로 처리 11일 후에 12개 (83% 감소), 17일차 9개 (87% 감소), 최종 67일차에는 8개 (88% 감소)의 병반이 조사되어 수지 병반이 80%이상 감소하는 결과를 나타내어 그 효과가 큰 것으로 나타났다.

표 32. 복숭아 수지증 병반을 제거한 후 시제품 처리에 따른 병반 수 변화

처리구	수지증 병반 수(개)					비고
	처리 전	처리 후 0일차	처리 후 11일차	처리 후 17일차	처리 후 67일차	
1	19	0	0	0	0	
2	9	0	0	0	0	
3	3	0	2	2	2	
4	2	0	1	1	0	
5	5	0	3	2	2	
6	7	0	1	0	3	
7	13	0	2	1	1	
8	3	0	0	0	0	
9	8	0	3	3	0	
합계	69	0	12	9	8	

1-2-1-2) 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 시제품 처리

- 이전 시험과는 달리 수지증 병반을 제거하지 않은 상태에서 시제품을 처리한 후 각 처

리구의 병반수를 조사한 결과는 아래와 같다.

- 처리 전 처리구 전체의 수지증 병반수는 197개로 조사되었으며, 시제품 처리 11일 후 3개의 처리구에서 병반이 관찰되지 않았으며 전체적으로 약 68% 감소하였다. 17일 후에는 9개의 처리구에서 병반이 관찰되지 않았으며 전체적으로 약 85% 이상 감소하는 등 기타 다른 처리구에서도 병반수가 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

표 33. 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 시제품 처리에 따른 병반수 변화

처리구	수지증 병반 수(개)					비고
	처리 전	처리 0일차	처리 11일차	처리 17일차	처리 67일차	
1	1	1	0	0	0	
2	15	15	3	2	1	
3	3	3	0	0	0	
4	3	3	3	2	1	
5	2	2	2	0	0	
6	10	10	3	2	2	
7	2	2	2	1	0	
8	6	6	1	0	0	
9	20	20	0	0	0	
10	9	9	5	2	0	
11	6	6	2	0	0	
12	5	5	2	1	0	
13	5	5	3	2	0	
14	7	7	4	2	0	
15	23	23	2	0	0	
16	7	7	2	2	0	
17	7	7	3	2	0	
18	13	13	7	0	0	
19	10	10	2	0	0	
20	15	15	3	1	0	
21	9	9	6	5	3	
22	5	5	1	1	0	
23	14	14	7	4	1	
합계	197	197	63	29	8	

- 특히, 개발 시제품 처리 67일차에는 18개 처리구에서는 복숭아 수지증 병반이 관찰되지 않았고 전체적으로서 96% 이상 감소하여 치유효과가 있는 것으로 판단되었다.
- 결론적으로 수지병반의 존재 유무와 관련한 효과는 수지병반을 제거한 경우에 그 효과의 발현속도는 더 빠르게 나타났으나 수지증 병반을 제거하지 않고 처리한 처리구에서 효과는 상대적으로 약간 느리게 나타났으나 최종적인 수지 병반수의 감소폭은 더 크게 나타났다.

1-2-2) 포장시험결과(2차)

- 본 시험은 경북 김천시 아포읍 소재의 농가에서 수행하였는데 생물학적 원인 중 천공충이 유발하는 상처에 의해 다량 발생한 복숭아 수지증에 대한 개발 시제품의 효능·효과 및 범용성을 검증하기 위하여 수행하였다.
- 본 시험포장은 천공충 피해가 극심하여 폐원을 앞둔 포장을 선정하여 시험을 수행하였

으며 각 처리구는 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않은 상태에서 개발 시제품 단용 처리구, 처리 전 수지증 병반을 제거한 상태와 제거하지 않은 처리구로 나눈 후 개발 시제품과 살충제(1차처리-애니충, 2차처리-스미치온)를 혼용하여 처리하였다.

1-2-2-1) 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 개발 시제품 단용 처리

- 앞의 1차 시험에서 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 개발 시제품을 처리한 경우 그 처리 효과가 더 우수하였으므로 2차 시험에서도 포장을 달리하여 동일한 방법으로 처리하였고 그 결과는 아래에 나타내었다.
- 본 시험구는 앞서도 언급한 바와 같이 천공충 피해가 극심해 폐원을 앞둔 농가로서 전체 10개 처리구에서 천공충에 의한 수지증 병반이 크게 증가하는 경향을 보였으며, 개발 시제품 단용 처리 전 병반수가 285개이던 것이 처리 후 7일차에는 97개가 증가한 382개로 약 34% 증가되었다. 처리 17일차에는 처리 전보다 451개가 증가하여 736개로 조사되어 약 158% 증가되었다.
- 본 시험의 결과로 볼 때 천공충(유리나방 등)에 의한 피해가 심한 포장의 경우 개발 시제품만 단용으로 처리해서는 해충의 2차 가해에 의한 수지증의 발생을 조절하기는 어려운 것으로 판단되어 추가적으로 살충제를 혼용 처리하여 해충 방제도 동시에 하는 방법이 필요할 것으로 판단된다.

표 34. 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 시제품 단용 처리에 따른 병반수 변화.

처리구	수지증 병반수(개)				비고
	처리 전	처리 0일차	처리 7일차	처리 17일차	
1	24	24	30	67	
2	32	32	44	85	
3	35	35	75	98	
4	21	21	32	81	
5	28	28	11	29	
6	17	17	22	73	
7	29	29	30	42	
8	25	25	20	71	
9	30	30	57	94	
10	44	44	61	96	
합계	285	285	382	736	

1-2-2-2) 개발 시제품과 살충제 혼용 처리

- 수지증 발생원인 중 생물학적 원인 즉, 천공 해충(유리나방 등)에 의해 발생한 수지증의 경우에는 개발 시제품을 단용으로 처리했을 경우에 그 효과가 떨어지는 것으로 조사되어 수지증을 유발하는 해충 방제를 위하여 살충제(애니충, 스미치온)를 개발 시제품과 혼용 처리하는 방법으로 본 실험을 수행하였다.
- 본 실험은 처리 전 발생된 수지증 병반을 제거한 처리구와 병반을 제거하지 않은 처리구를 나누어 수행하였다.

① 복숭아 수지증 병반 제거하지 않고 개발 시제품과 살충제 혼용처리

- 복숭아 수지증에 대한 개발 시제품의 범용성 검증을 위하여 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 시제품과 살충제(애니충, 스미치온)를 혼용 처리한 후 각 처리구의 병반수를 관찰하였다.
- 본 시험은 5개의 처리구에 대해 실험을 진행했으며 각 처리구의 처리 전 수지증 병반수는 아래와 같았으며, 처리 전 처리구 전체의 수지증 병반수는 255개로 조사되었다. 혼용

처리시 각 처리구 별로 차이가 있었으나 감소하는 경향을 나타내었으며 전체적으로 볼 때 처리 11일차에는 처리 전 병반수인 255개보다 69개가 감소한 186개 (17% 감소), 처리 31일차에는 50개가 감소한 205개 (20% 감소) 그리고 처리 64일차에는 178개가 감소한 77개 (70% 감소)의 병반수가 관찰되었다.

표 35. 복숭아 수지증 병반을 제거하지 않고 시제품과 살충제 혼용처리시 병반수 변화.

처리구	수지증 병반수(개)					비고
	처리 전	처리 0일차 ¹⁾	처리 11일차	처리 31일차 ²⁾	처리 64일차	
1	27	27	20	17	2	
2	75	75	64	56	30	
3	78	78	42	61	13	
4	42	42	37	30	8	
5	33	33	23	41	24	
합계	255	255	186	205	77	

1) 살충제(애니충) 혼용처리, 2) 살충제(스미치온) 혼용처리

② 복숭아 수지증 병반 제거한 후 시제품과 살충제 혼용처리

- 복숭아 수지증에 대한 개발 시제품의 범용성 검증을 위하여 복숭아 수지증 병반을 제거한 상태에서 시제품과 살충제(애니충, 스미치온)를 혼용 처리한 후 각 처리구의 병반수를 관찰하였다. 각 처리구의 처리 전 수지증 병반수는 아래와 같았으며, 처리 전 처리구 전체의 수지증 병반수는 218개로 조사되었다.
- 개발 시제품 처리 11일차에는 처리 전 병반수인 218개보다 168개가 감소한 50개 (77% 감소), 처리 31일차에는 처리 11일차보다 32개가 증가하여 82개 (62% 감소)로 조사되어 다소 증가하였으나 처리 64일차에는 다시 감소하여 15개 (93% 감소)의 병반수가 관찰되었다.

표 36. 복숭아 수지증 병반을 제거한 후 시제품과 살충제 혼용처리시 병반수 변화

처리구	수지증 병반수(개)					비고
	처리 전	처리 0일차 ¹⁾	처리 11일차	처리 31일차 ²⁾	처리 64일차	
1	93	0	12	28	0	
2	36	0	7	10	4	
3	31	0	4	1	1	
4	26	0	19	32	10	
5	32	0	8	11	0	
합계	218	0	50	82	15	

1) 살충제(애니충) 처리, 2) 살충제(스미치온) 처리

③ 결론

- 결론적으로 1차 시험을 했던 칠곡 포장의 경우 천공충의 피해가 적은 포장으로 이 경우 병반 제거하지 않고 시제품 단용 사용하는 것이 더 우수한 결과를 나타내었다.
- 다만 2차 시험과 같이 천공충 피해가 큰 포장은 병반을 제거한 후 살충제와 혼용처리를 할 때 더 좋은 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 이러한 결과로 발생 원인에 따라 그 처방을 달리 해야 할 것으로 판단된다.

2-1)범용성 검정 시험(자두 품종에 대한 시험)

- 시제품의 효능과 범용성을 알아보기 위해 복숭아와 다른 핵과류 품종인 자두 품종에 대한 시험을 수행하였다. 시험은 경북 군위 지역의 수령이 10년 이상인 자두나무가 식재되어 있으며 수지증상이 나타나고 있는 과원에서 수행하였다.
- 자두 수지증에 대한 개발 시제품의 효능·효과를 확인하기 위하여 자두 수지증 병반을 제거한 후 개발 시제품 희석액을 처리한 후 각 처리구의 자두 수지증 병반수를 관찰하였다.

표 37. 자두 수지증 병반을 제거한 후 시제품 단용 처리에 따른 병반수 변화.

처리구	수지증 병반수(개)				비고
	처리 전	처리 0일차	처리 12일차	처리 40일차	
1	4	0	0	0	
2	1	0	0	0	
3	3	0	0	0	
4	2	0	0	0	
5	1	0	1	1	
6	5	0	0	4	
7	15	0	15	15	
8	5	0	0	0	
9	3	0	1	3	
10	10	0	1	4	
11	10	0	1	0	
합계	59	0	19	27	

- 전체 11개 처리구에서 수지증 병반을 제거하고 개발 시제품을 처리한 후 12일이 경과한 후에 수지증 병반이 처리 전 병반수보다 40개가 감소한 19개 (68% 감소)가 관찰되었으며 처리 40일차에는 32개가 감소하여 27개 (54% 감소)의 수지증 병반이 발생하는 것으로 조사되었다.
- 본 시험에서 전체적으로 감소하는 경향을 나타내어 자두의 수지증상에도 일부 효과가 있을 것으로 판단되어 수지 증상이 있는 다른 작물에서도 그 활용성이 있을 것으로 판단된다. 다만 앞의 복숭아에 비해 그 감소 폭은 크지 않아 본 제제를 자두에 활용하기 위해서는 그 효과를 높이는 연구를 추가적으로 수행하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

2. 시제품의 상용화를 위한 이화학적 및 식물 시험(비료등록 및 비해시험)

- 본 시제품의 판매를 위한 제도권 허가를 위해 비료 등록을 추진하였으며 이를 위해 비료공인시험기관에 의뢰하여 시험한 결과 비료 등록에 적합하다는 판정을 받아 비료생산업 등록증을 취득하였으며 마지막으로 첨부한 바와 같이 등록을 완료하였다.

미량요소복합비료의 작물에 대한 비효 및 비해 시험 보고서

2023년 12월 11일

경북대학교
농산물품질·안전성평가연구소장

미량요소복합비료 검사성적서				
신청인	성 명	김수경	주민(사업자)등록번호	513-81-71878
	주 소	경북 칠곡군 가산면 학하리길 53		
의뢰 내용	대상물품명	미량요소복합비료(붕소 0.065, 폴리브롬 0.0005)-수지제로골드		
	분석개요	시료번호 : DW-23-10		
		분석방법 : 비료의 품질검사 방법 및 시료채취기준에 의거 분석 (농촌진흥청 고시 제2020-29호, 2020.11.25)에 준하여 실시함		
		제조년월일 : 2023. 10.		
용 도	비료생산업 등록			

<분석결과>

분석항목(보증성분량)	분석결과	비고
보존 수용성 붕소(0.065)	0.067%	
성분 수용성 폴리브롬(0.0005)	0.0006%	
유해 성분	비소	ND*
	니켈	ND
	크롬	ND
	티탄	ND
	카드뮴	ND
	아질산	ND
	아황산	ND

*ND : 검출한계 이하임
*합유 주성분 함계량의 합유율 1%에 대한 함량
상기의 의뢰자가 의뢰한 제품에 대한 분석결과를 위와 같이 통지합니다.
이 성적은 신청인이 일의 제출한 시료를 분석한 것으로 용도 이외의 선전, 소송 등
중기자료로 사용하지할 수 없습니다.

2023년 12월 11일

경북대학교 농산물품질·안전성평가연구소장

<연구과제명 : 비료 효과 검증을 위한 포장시험>

1. 시험목적

본 식물재 재배 시험은 위탁시험 의뢰자(주)대원화학에서 제조한 미량요소복합비료(수지제로 붕소 0.065, 폴리브롬 0.0005)를 생육기 일면사비 시 공시작물(시금치)에 대한 비효 및 비해를 검증할 위한 포장시험을 하고자 함에 그 목적이 있다.

2. 시험기관

대구시 북구 대학로 80 경북대학교 농업생명과학대학

3. 시험기간 및 장소

가. 시험장소 : 경북 칠곡군 왜관읍 금남7길 농가 시험포장

나. 시험구분 : 시설재배(무가온 시설재배)

다. 시험기간 : 2023. 9. 1 - 2023. 11. 30

라. 시험 전 토양 이화학성

시험 전 토양	pH (1:5)	전질소 (%)	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	기환성양이온(cmol/kg)		EC (dS/m)
				칼륨	칼슘	마그네슘	
	6.22	0.24	1.50	279	0.76	3.28	1.21
							0.31

4. 시험작물의 종류 및 특성

가. 시험작물의 종류 : 시금치(품종: 월동 시금치)

나. 특성 : 발아율 80%이상, 내서성 강한 품종

5. 시험물질의 이화학적 특성

가. 공시비료의 종류 및 명칭 : 미량요소복합비료(붕소 0.065, 폴리브롬 0.0005)

성분	분석항목(단위)	분석성적	비고
		질소 전량(T-N)	0.17%
인산 전량(K ₂ O)		0.033%	
칼리 전량(K ₂ O)		0.019%	
수용성 질화(CaO)		0.0042%	
수용성 고토(MgO)		0.0035%	

유해성분	수용성 규산(SiO ₂)	-
	수용성 철(Fe)	-
	수용성 구리(Cu)	-
	수용성 붕소(B ₂ O ₃)	0.067%
	수용성 망간(MnO)	-
	수용성 폴리브롬(Br)	0.0006%
	비소(As)	ND
	니켈(Ni)	ND
	크롬(Cr)	ND
	티탄(Ti)	ND
카드뮴(Cd)	ND	
아질산(NO ₂)	ND	
아황산(SO ₂)	ND	

6. 시험규모 및 시험구 배치

가. 시험규모 : 구당 면적 24m²(6×4m)

나. 시험구 배치 : 3반복 난리법

7. 처리내용

가. 파종일 : 2023년 9월 5일 파종

나. 처리일자 : 파종 17일 후 일면 사비

처리구	공시제제	비효 시험		비해 시험
		사비량	사비방법 및 시기	
적량처리구	미량요소 복합비료 기준량	기준량	· 파종 17일 후 기준량(500배) 일면사비(9/22)	기준량(500배) 및 배량(250배) 사비
			· 파종 17일 후 배량(250배) 일면사비(9/22)	
배량처리구	미량요소 복합비료 배량	배량	· 파종 17일 후 기준량 일면사비(9/22)	
			· 파종 17일 후 기준량 일면사비(9/22)	
대조비료 처리구	대조비료	기준량	· 파종 17일 후 기준량 일면사비(9/22)	
무처리구	-	-	-	

8. 재배관리 개요

가. 파종일 : 2023년 9월 5일 파종

나. 관수 및 방제 : 농가 일반 관리법에 따라 관수 및 방제처리



공시 비료 처리



수확 전

9. 경중개요

가. 포장준비 : 10a당 퇴비 250kg, 원예용 복합비료(20-12-20) 20kg를 넣고 경운한 후 각 처리구(6m × 4m, 9구)을 준비함. 각 처리 당 3반복 난괴법으로 시험구를 배치함.

나. 파종 : 공시작물의 파종은 미리 준비된 포장에 일정한 간격(30×30cm)으로 3립씩 각각 파종하고 스프링클러를 사용하여 수분을 공급함.

다. 생육기 관리 : 발아 후 생육이 일정한 유효 1주 만 남기고 수확일을 하였으며 이후 생육 관리는 일반 농가의 관행적인 방법으로 관리함.

라. 재배방법

재배양식	파종방법	포기 수 (24㎡)
무가는 시설재배	30×30cm 간격으로 각각 3립씩 파종	310

10. 조사항목 및 조사방법

구 분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
비효시험	생육조사	1	수확일 (10/20)	반복 당 30주를 조사함
비효시험	비효조사	3	10/4, 10/13, 10/20	조사일시에 달관조사

가. 비효 : 최종 엽면시비 후 공시작물을 위하여 각 처리구별로 엽장, 엽수, 엽폭, 생체중

을 조사하고 그 결과를 단산다중검정(DMRT)에 의해 유의성을 검정함.

나. 비효 : 공시작물의 전 생육 기간 동안 공시제제의 엽면시비에 의한 피해(비효) 상향을 조사 일자에 달관 조사함.

11. 비료효과 검증 결과

가. 작물생육 효과

처리	엽장 (cm)				유의차	환산지수
	I	II	III	평균		
적량처리구	21.80	21.50	22.40	21.90	a	102.7
배량처리구	22.50	22.60	21.70	22.26	a	104.4
대조처리구	22.10	22.50	22.30	22.30	a	104.5
무처리구	21.30	21.50	21.20	21.33	a	100.0

처리	잎수 (개)				유의차	환산지수
	I	II	III	평균		
적량처리구	15.3	15.4	15.2	15.30	a	102.0
배량처리구	15.2	15.5	15.6	15.43	a	102.9
대조처리구	15.4	15.5	15.4	15.43	a	102.9
무처리구	15.1	14.7	15.2	15.00	a	100.0

처리	생체중 (g/구)				유의차	환산지수
	I	II	III	평균		
적량처리구	45.90	47.60	48.40	47.23	a	117.0
배량처리구	47.10	48.50	47.20	47.60	a	118.5
대조처리구	47.50	47.23	48.10	47.61	a	118.5
무처리구	38.90	39.40	42.20	40.17	b	100.0

나. 비효

○ 정식 후부터 수확기까지 전 생육기간에서 작물영향을 달관조사

시험제제	작물(품종)	비효조사	비효 증상(0~5)		비효 증상
			기준량	배량	
공시비료 (미량요소 복합비료)	시금치 (월동 시금치)	전 생육기간	0	0	비효 없음

<연구과제명 : 비료피해 검증을 위한 분시험>

1. 시험목적 : 미량요소복합비료의 유식물에 대한 비효조사

2. 시험기간 : 2023. 9. 1 ~ 11. 30

3. 시험장소 : 경북대학교 농업생명과학대학

4. 시험재료 및 방법

- 1) 공시재료의 종류 및 명칭 : 미량요소복합비료
- 2) 공시작물 : 5종의 유식물체
 - 파종작물 3종(참깨, 땅콩, 무(뿌리작물)),
 - 이식작물 : 2종(오이, 고추)
- 3) 포트시험 [대조(무처리), 배량(500배), 2배량(250배), 처리 당 5반복]

5. 처리내용 및 처리구 배치 : 각 작물별 Spots × 3반복, 원전임의 배치법

공시 제제	처리량	처리방법		비효 시험		비고
		처리방법	시기	기준량	배량	
미량요소 복합비료	기준량	· 발아 후 2~4일의 유식물에 대해 공시 제제를 기준량과 배량을 처리 (오이, 땅콩 : 9/15일 처리, 고추, 참깨 : 9/13 처리, 무 : 9/15일 처리)	500배	250배	달관 조사 및 생육조사	비효
	배량					
대조구	무처리	· 처리 하지 않음	-	-	-	-

6. 조사일시

작물(5종)	조사 일시	조사 항목	조사 횟수	조사 방법
오이	9/18, 9/21, 9/25, 9/27	각(5종) 유 식물에 대한 비해 조사	2-3일 간격으로 4회 조사	조사일시에 달린 조사하여 비해 정도를 0-5 등급으로 표시
망종				
고추	9/15, 9/18, 9/21, 9/25			
참깨				
무	9/20, 9/27, 10/4, 10/11			

7. 비해판정기준

약해정도	판정기준
0	육안으로 볼 때 생육에 영향이 없고 피해가 보이지 않음(뿌리포함)
1	육안으로 볼 때 경미한 반점·입 또는 뿌리의 변색 등의 느낌이 있음
2	육안으로 볼 때 다소의 반점·입 또는 뿌리의 변색·입소 등의 증상이 있음. 다소(5~10% 정도)의 발아(입도) 저조·뿌리 크기(무게 또는 길이)저조
3	육안으로 볼 때 상당 부분(50% 정도)에 반점·입 또는 뿌리의 변색·입소 등의 증상이 있음. 뚜렷한(10~20%) 발아(입도)저조·뿌리 크기(무게 또는 길이)저조
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음(뿌리 포함)
5	심한 피해를 받고 고사상태임(뿌리 포함)

8. 비해 조사 결과

1) 1회차 조사

시험계제	작물	비해 조사(0~5등급)		약해비해 증상
		기준량	배양	
미량요소 복합비료	오이	0	0	없음
	망종	0	0	
	고추	0	0	
	참깨	0	0	
	무	0	0	

품종	오이	망종	고추	참깨	무
조사일자	9/18	9/18	9/15	9/15	9/20
대조					
적량					
배양					

2) 2회차 조사

시험계제	작물	비해 조사(0~5등급)		약해비해 증상
		기준량	배양	
미량요소 복합비료	오이	0	0	없음
	망종	0	0	
	고추	0	0	
	참깨	0	0	
	무	0	0	

품종	오이	망종	고추	참깨	무
조사일자	9/21	9/21	9/18	9/18	9/27
대조					
적량					
배양					

3) 3회차 조사

시험계제	작물	비해 조사(0~5등급)		약해비해 증상
		기준량	배양	
미량요소 복합비료	오이	0	0	없음
	망종	0	0	
	고추	0	0	
	참깨	0	0	
	무	0	0	

품종	오이	망종	고추	참깨	무
조사일자	9/25	9/25	9/21	9/21	10/4
대조					
적량					
배양					

4) 4회차 조사

시험계제	작물	비해 조사(0~5등급)		약해비해 증상
		기준량	배양	
미량요소 복합비료	오이	0	0	없음
	망종	0	0	
	고추	0	0	
	참깨	0	0	
	무	0	0	

품종	오이	망종	고추	참깨	무
조사일자	9/27	9/27	9/25	9/25	10/11
대조					
적량					
배양					

9. 작물 별 생육조사

1) 오이

처리	초장 (cm)					
	I	II	III	평균	유의차	환산지수
적량처리구	3.70	3.80	3.50	3.67	a	104.9
배양처리구	3.50	3.60	3.50	3.53	a	100.9
무처리구	3.70	3.50	3.30	3.50	a	100.0

처리	잎수 (개)					
	I	II	III	평균	유의차	환산지수
적량처리구	4.3	4.2	4.1	4.2	a	102.4
배양처리구	4.2	4.1	4.6	4.3	a	104.9
무처리구	4.1	4.2	4.0	4.1	a	100.0

2) 망종

처리	초장 (cm)					
	I	II	III	평균	유의차	환산지수
적량처리구	8.80	10.00	10.10	9.63	a	100.6
배양처리구	9.70	10.10	9.30	9.70	a	101.4
무처리구	9.80	9.40	9.50	9.57	a	100.0

처리	잎수 (개)					
	I	II	III	평균	유의차	환산지수
적량처리구	7.6	8.1	8.5	8.07	a	105.2
배양처리구	7.6	8.2	8.4	8.07	a	105.2
무처리구	7.6	8.4	7.0	7.67	a	100.0

3) 고추

거리	초장 (cm)					유의차	환산지수
	I	II	III	평균			
적량처리구	14.80	14.50	14.10	14.47	a	102.1	
배양처리구	14.70	14.60	14.30	14.53	a	102.5	
무처리구	14.50	13.80	14.20	14.17	a	100.0	

거리	일수 (개)					유의차	환산지수
	I	II	III	평균			
적량처리구	9.5	9.1	9.5	9.37	a	104.1	
배양처리구	9.1	9.5	9.9	9.50	a	105.6	
무처리구	9.5	8.5	9.0	9.00	a	100.0	

4) 참깨

거리	초장 (cm)					유의차	환산지수
	I	II	III	평균			
적량처리구	7.60	7.10	7.20	7.30	a	103.8	
배양처리구	7.00	7.50	7.20	7.23	a	102.8	
무처리구	6.90	7.00	7.20	7.03	a	100.0	

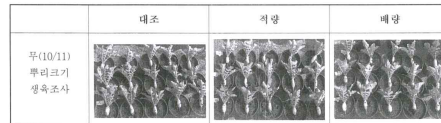
거리	일수 (개)					유의차	환산지수
	I	II	III	평균			
적량처리구	5	5	6	5.33	a	103.1	
배양처리구	5.5	6	5	5.5	a	106.4	
무처리구	5.5	5	5	5.17	a	100.0	

5) 무

거리	초장 (cm)					유의차	환산지수
	I	II	III	평균			
적량처리구	15.70	16.30	17.20	16.40	a	101.9	
배양처리구	16.60	16.30	15.90	16.27	a	101.1	
무처리구	16.20	15.90	16.20	16.10	a	100.0	

거리	일수 (개)					유의차	환산지수
	I	II	III	평균			
적량처리구	9.6	9.5	10.2	9.77	a	100.7	
배양처리구	9.5	10.1	10.5	10.03	a	103.4	
무처리구	9.7	9.5	9.9	9.70	a	100.0	

거리	뿌리 길이 (cm)					유의차	환산지수
	I	II	III	평균			
적량처리구	16.90	16.40	15.60	16.30	a	104.0	
배양처리구	16.30	16.70	16.40	16.47	a	105.1	
무처리구	16.30	15.70	15.00	15.67	a	100.0	



10. 시험 후 토양의 이화학적

시험구	pH (1:5)	전질소 (%)	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	지환성암모니아 (cmol ⁺ /kg)			EC (dS/m)
					합량	합산	마그네슘	
적량처리구	6.23	0.19	1.50	251	0.78	5.16	1.25	0.33
배양처리구	6.31	0.21	1.54	247	0.69	5.34	1.23	0.36
대조비료처리구	6.26	0.22	1.52	265	0.70	4.94	1.14	0.31
무처리구	6.29	0.18	1.57	248	0.73	4.90	1.02	0.26

11. 결과요약

- 가. 본 시험의 목적은 (주)대원화학의 미량요소복합비료 시비 시 작물에 대한 비료 및 비배를 검증하여 비료생산업 등록을 위한 자료로 활용하고자 포장시험과 분시험을 각각 수행 하였다.
- 나. 포장시험에서 각 시험구 별로 시험 전과 시험 후의 토양이화학성 변화는 전반적으로 약간 증가하는 것으로 나타났으나 큰 변화는 관찰되지 않았다.
- 다. 포장시험에서 비료 조사 결과 공시비료는 엽장, 엽폭 및 염수에서의 증수효과는 통계적 유의성이 인정되지 않았으나 생체 중에서는 통계적 유의성이 인정되어 공시제품인 미량요소복합비료가 공시식물의 생체중의 증가에 영향을 주어 작물의 증수(수확량 증가)에 효과가 있는 것으로 판단된다.
- 라. 포장시험에서 전 재배시험 기간 동안 공시제품의 시비 시 공시작물의 비배(작물영양)는 관찰되지 않았다.
- 마. 포장시험은 결론적으로 공시비료인 미량요소복합비료를 시비 시 공시작물(시금치)에 대한 비배는 없으며, 수확량 증가에 효과가 있는 제품으로 판단된다.
- 바. 분시험에서 유기물(오이, 땅콩, 고추, 참깨, 무)에 대한 비배 조사 결과 기준량과 배양을 5종의 유식물에 시비 후 나타나는 비배를 조사한 결과 비배는 전혀 관찰되지 않았다.

12. 시험담당자 의견

본 시험의 공시비료인 (주)대원화학의 미량요소복합비료 수거제로 분소 0.065, 폴리브덴 0.0005)는 비료 효과 검증을 위한 포장시험에서 공시식물(시금치)의 생체중(수확량) 증가 효과가 인정되었으며 비배는 관찰되지 않았으며, 또한 비료피해시험을 위한 분시험에서 유식물 5종에 대해 비배가 나타나지 않아 미량요소복합비료로 등록하기에 적절하다고 판단됨.

비료생산업 등록증

1. 법인(상호)명: (주)대원화학

2. 주 소: 경상북도 칠곡군 가산면 학하6길 53

3. 대표자의 성명: 김수정

4. 대표자의 생년월일: 1970-12-25


5. 제조장 소재지: 경상북도 칠곡군 가산면 학하6길 53

6. 비료의 종류: 미량요소복합

「비료관리법」 제11조제1항, 같은 법 시행령 제11조4항 및 같은 법 시행규칙 제7조 제8항에 따라 위와 같이 비료생산업을 등록하였음을 증명합니다.

2023년 12월 18일

경상북도 칠곡군수



3. 친환경적 종합방제 기술-친환경 유기 농자재 등록 가능성 검토

- 친환경적 종합방제기술 개발과 관련해 친환경유기농자재 등록 가능성을 검토하여 유기농업자재의 가능성이 있음을 확인하였다.
- 본 시험은 독성시험과 관련한 공인기관인 (주)에이비솔루션에 의뢰하여 시험을 진행하였으며 급성경구독성시험 및 급성경피독성시험에 한해 수행하였다.
- 급성경구독성시험결과는 첨부와 같으며 요약하면 아래와 같다.

- 시험물질 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 배양 추출물(crude type)을 암컷 SD 랫드에

급성경구투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 반수치사약량(LD₅₀) 및 GHS의 Category를 알아보고자 수행하였다. 투여용량은 300 mg/kg B.W.(1 단계 및 2 단계) 및 2000 mg/kg B.W.(3 단계 및 4 단계)로 설정하였으며, 군당 3 마리를 사용하였다. 투여한 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

- 시험기간 동안 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
 - 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
 - 체중측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 체중의 이상변화가 관찰되지 않았다.
 - 부검 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
 - 이상의 결과, *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 배양 추출물(crude type)의 GHS(Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures)의 분류는 Category 5 or Unclassified(LD₅₀ Cut-off value: 5000 mg/kg B.W.)로 분류하였다
-
- 다음으로 급성경피독성시험결과는 아래 내용과 같다.
 - 시험물질인 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 배양 추출물(crude type)을 암·수 Sprague Dawley Rat(SD 랫드)에 급성경피투여 하였을 때의 독성반응을 관찰하고, 반수치사약량(LD₅₀)을 알아보기 위하여 수행하였다. 시험군의 시험물질 투여용량은 4000 mg/kg B.W.로 설정하였으며, 암·수 각 5 마리를 사용하였다.투여한 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.
 - 시험기간 동안 모든 동물에서 사망동물은 관찰되지 않았다.
 - 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
 - 체중측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 체중의 이상변화가 관찰되지 않았다.
 - 부검 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
 - 본 시험의 조건에서 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 배양 추출물(crude type)을 암·수 Sprague Dawley Rat(SD 랫드)에 급성경피투여한 결과, 사망동물이 관찰되지 않아 LD₅₀ 은 4000 mg/kg B.W. 이상으로 판단된다.

첨부 1) 급성경구독성시험



최종보고서

랫드(Sprague Dawley Rat)를 이용한 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)의 급성경구독성시험

시험의뢰자

㈜대원화학
경상북도 칠곡군 가산면 학하 6길 53
시험의뢰자: 서상현
TEL: 054)972-2908 FAX: 054)972-2909

시험기관

㈜에이비솔루션
경기도 화성시 정남면 정남산단 2 길 26
운영책임자: 김판건 시험책임자: 이흥희
TEL: 070-4345-3835 FAX: 031-273-1933

㈜에이비솔루션



목차

페이지

제 출 문	3
시 험 참 여 자	4
1. 요약	5
2. 시험의 개요	6
3. 시험재료	7
4. 시험계	8
5. 사육조건	9
6. 시험군 구성 및 투여용량 설정	10
7. 투여	10
8. 관찰, 측정 및 부검	11
9. 결과	12
10. 고찰	13
11. Tables(Group summary)	14
12. Appendices(Individual data)	15
13. Annex	19



제 출 문

시험제목: 랫드(Sprague Dawley Rat)를 이용한 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양
추출물(crude type)의 급성경구독성시험

시험번호: AO23039N

본 시험은 시험책임자의 책임하에 아래의 규정을 준수하며 실시하였다.

*농약 및 원재의 등록기준: [별표12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-20. 급성경구독
성시험: 급성독성등급법" 농촌진흥청 고시 제2023-20호(2023년 07월 03일)

본 최종보고서는 승인된 시험계획서의 절차 및 목적에 따라 진행하였으며, 시험 진행
중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

㈜에이비솔루션 : 이 흥 희 2023. 11. 01.
시 험 책 임 자 이 흥 희 날짜

㈜에이비솔루션 : 김 판 건 2023. 11. 01.
운 영 책 임 자 김 판 건 날짜



시 험 참 여 자

해당 시험의 시험참여자자는 ㈜에이비솔루션 표준작업지침서(SOP)와 시험계획서에 따라
시험을 수행하고 기록하였다.

시 험 담 당 자 : 문정원, 박다영, 김동윤, 김선영, 이도연, 김가연

조 제 담 당 자 : 김가연, 윤혜은, 류정석, 고수지

동 물 관 리 책 임 자 : 김태우

법 리 책 임 자 : 박혜준

보 고 서 작 성 자 : 이흥희

1. 요약

시험물질 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)을 알컷 SD 컷드에 급성경구투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 반수지사약량(LD₅₀) 및 GHS의 Category를 알아보고자 수행하였다. 투여용량은 300 mg/kg B.W.(1 단계 및 2 단계) 및 2000 mg/kg B.W.(3 단계 및 4 단계)로 설정하였으며, 군당 3 마리를 사용하였다. 투여한 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

그 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 동안 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 2) 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
- 3) 체중측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 체중의 이상변화가 관찰되지 않았다.
- 4) 부검 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과, Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)의 GHS(Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures)의 분류는 Category 5 or Unclassified(LD₅₀ Cut-off value: 5000 mg/kg B.W.)로 분류하였다.

2. 시험의 개요

- 2.1. 제목

컷드(Sprague Dawley Rat)를 이용한 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)의 급성경구독성시험
- 2.2. 목적

시험물질 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)을 알컷 Sprague Dawley Rat(SD 컷드)에 급성경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 반수지사약량(LD₅₀) 및 GHS의 Category를 알아보고자 수행하였다.
- 2.3. 시험기준
 - 1) "농약 및 원재의 등록기준; [별표12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-20. 급성경구독성시험: 급성독성등급법" 농촌진흥청 고시 제2023-20호(2023 년 07 월 03 일)
 - 2) "OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method"(Adopted: 17th December 2001)
- 2.4. 동물윤리

"동물보호법 (제정 1991 년 05 월 31 일 법률 제4379호, 일부개정 2023 년 06 월 20 일 법률 제19486호)"
승인번호: ABIACUCRA23155
- 2.5. 시험일정

1) 시험개시일	: 2023 년 08 월 17 일
2) 실험개시일(실험동물입수일)	: 2023 년 08 월 21 일
3) 실험종료일	: 2023 년 09 월 22 일
4) 시험종료일	: 2023 년 11 월 01 일
- 2.6. 시험계획서의 변경 및 이탈

시험계획서 승인 후 본 시험기간 동안 시험계획서의 변경 및 이탈사항은 발생하지 않았다.
- 2.7. 자료 보관

시험계획서 관련기록, 최종보고서 관련기록, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 해당 농약등 또는 원재의 등록일로부터 3 년간 ㈜에이비솔루션 자료보관실(자료보관실1: 시험물질 표본, 자료보관실2: 시험계획서 및 최종보고서 관련기록, 시험기초자료)에 보관한다. 이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

3. 시험재료

- 3.1. 시험물질

1) 시험물질명	: Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)
2) 입수일	: 2023 년 08 월 11 일
3) 입수량	: 40 mL x 1 ea(용기비포함)
4) 외관 및 색상	: 미세의 액상시료(밀균상태)
5) 제조일	: 2023 년 07 월 24 일
6) 유효기간	: 2024 년 01 월 24 일
7) 제조번호	: -
8) 유효성분	: -
9) 보관조건	: 실온
10) 제공원	: ㈜대원화학
11) 잔여물질 처리	: 폐기
- 3.2. 부형제

1) 물질명	: 멸균중류수
2) 제조사	: 대한약품공업회
3) 고유번호	: J25821
4) 보관조건	: 실온
- 3.3. 시험물질의 조제

시험물질은 유효성분에 대한 보정 없이 조제를 실시하였다. 시험물질은 전자저울로 칭량하여 tube에 넣고, 부형제를 일부 넣어 vortex mixer로 혼합시킨 뒤 부형제를 추가하여 조제하였다. 조제는 각 단계별 투여당일 실시하였다.

4. 시험계

- 4.1. 시험계

1) 계통 및 종	: Sprague Dawley 컷드, SPF
2) 생산자 및 공급처	: ㈜생탁고 BIO KOREA (경기도 안산시 서암로 105)
3) 입수 시 주령 / 성별 / 동물수	: 8 주령 / 암컷 / 13 마리
4) 동물의 이력	

투여 단계	1 단계	2 단계	3 단계	4 단계
동물 투여 시 마리	3	3	3	3
동물 투여 시 주령	9	9	10	10
동물 투여 시 체중	190.4 g ~ 197.5 g	195.0 g ~ 202.8 g	195.2 g ~ 207.7 g	196.3 g ~ 215.2 g
- 4.2. 선정사유

본 시험에 사용하는 SD 컷드는 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과와 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.
- 4.3. 구역 및 순회

실험동물 입수 후 권역실에서 3 일 이상 권역을 하였고, 동물사육실에서 5 일 이상 순회를 실시하였다. 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰하였다.
- 4.4. 개체 및 사육상자 식별

개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다(검역 및 순회기간은 빨간색, 관찰기간은 파란색). 사육상자에는 개체식별카드를 부착하였다.
- 4.5. 군관리

순회기간을 거친 후 간헐한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 무작위 방법을 이용해 군분리하였다. 군분리 시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.
- 4.6. 잔여동물

잔여동물은 시험계에서 제외하였고, 해당 SOP에 따라 진행하였다.

5. 사육조건

5.1. 사육환경

- 1) 검역실 번호 : 검역실 2
- 2) 동물실 번호 : 설치류 1
- 3) 사육상자 정보 : 폴리카보네이트 사육상자(260 W×420 D×180 H mm)
- 4) 사육관리(사육상자형) : 4 마리 이하
- 5) 온도 : 21.4 ~ 23.2 °C (검역실 2) / 20.7 ~ 22.3 °C (설치류 1)
- 6) 상대습도 : 49.1 ~ 54.1 % (검역실 2) / 48.5 ~ 55.9 % (설치류 1)
- 7) 환기횟수 : 10 ~ 15 회/hr
- 8) 조광주기 : 12 시간(오전 8 시 정동 ~ 오후 8 시 소동)
- 9) 조도 : 150 ~ 300 lux

5.2. 환경측정

시험기간 중 동물실의 온습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 15 분마다 측정된 데이터를 기반으로 1 시간 단위의 평균수치로 기록하였으며, 조도 등의 환경조건은 SOP에 따라 정기적으로 측정된 결과, 시험결과에 영향을 주는 요인은 발생하지 않았다.

5.3. 깔짚

상적서를 확인하여 오염물질을 확인하였고, 적합함이 확인된 깔짚을 121 °C에서 15 분 이상 멸균하여 사용하였다.

5.4. 사료

상적서를 확인하여 오염물질을 확인하였고 적합함이 확인된 실험동물용 쥐 사료를 자유 섭취 시켰다.

5.5. 음수

오염물질 정기검사(2 회 / 년)를 실시하여 '먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙'에 적합함이 확인된 상수도수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 살균 여과한 후 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 시켰다.

6. 시험군 구성 및 투여용량 설정

6.1. 시험군 구성

Test substance	Group	Dose (mg/kg B.W.)	Dose Volume (mL/kg)	Sex	Number of Animals	Animal No.
Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물 (crude type)	1 단계	300	10	암컷	3	2101 ~ 2103
	2 단계	300	10	암컷	3	2201 ~ 2203
	3 단계	2000	10	암컷	3	2301 ~ 2303
	4 단계	2000	10	암컷	3	2401 ~ 2403

6.2. 투여용량 설정

- 1 단계: 본 시험의 투여용량 설정은 시험물질에 대한 독성자료를 얻을 수 없어, 1 단계 시험을 300 mg/kg B.W. 용량으로 설정하였다.
- 2 단계: 1 단계 투여 후, 2 단계 투여 전까지 사망동물 및 빈사동물이 관찰되지 않아, 2 단계의 시험물질 투여용량을 300 mg/kg B.W.로 설정하였다.
- 3 단계: 2 단계 투여 후, 3 단계 투여 전까지 사망동물 및 빈사동물이 관찰되지 않아, 3 단계의 시험물질 투여용량을 2000 mg/kg B.W.로 설정하였다.
- 4 단계: 3 단계 투여 후, 4 단계 투여 전까지 사망동물 및 빈사동물이 관찰되지 않아, 4 단계의 시험물질 투여용량을 2000 mg/kg B.W.로 설정하였다.

7. 투여

- 7.1. 투여경로 및 선택이유
경구로 노출되었을 때에 대한 안전성을 평가하기 위하여 경구경로를 선택하였다.
- 7.2. 투여횟수
시험물질을 1 회 경구 투여하였다.
- 7.3. 투여역량 산출
투여역량은 10 mL/kg으로 하였고, 개별별 투여역량은 결식 후(투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다.
- 7.4. 투여방법
경구 투여용 용량을 부착된 일회용 주사기를 이용하여 위내에 1 회 강제 투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16 시간 이상 결식시키고, 음수는 자유섭취 시켰다. 투여 후 약 4 시간에 사료를 공급하였다.

8. 관찰, 측정 및 부검

8.1. 일반증상 관찰

투여당일에는 투여 후 30 분, 1, 2, 3 및 4 시간째에 일반증상을 관찰하였으며, 투여 후 1일부터 14 일(부검 전)까지는 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰하였다.

8.2. 체중측정

체중은 입수일, 군분리일, 투여당일(투여 전), 투여 후 3 일, 7 일 및 14 일(부검 전에 측정하였고, 최종보고서에는 투여당일(투여 전), 투여 후 3 일, 7 일 및 14 일(부검 전에 측정된 결과를 기술하였다.

8.3. 부검

관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO₂ 가스를 흡입시켜 후대장적/복대동맥에서 방혈하여 안락사 시키고 부검하였다.

9. 결과

- 9.1. 사망동물(Table 1, Appendix 1)
시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 9.2. 일반증상(Table 1, Appendix 1)
일반증상 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 9.3. 체중(Table 2, Appendix 2)
체중측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
- 9.4. 부검소견(Table 3, Appendix 3)
모든 개체의 주요장기에 대한 육안적 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다.

10. 고찰

시험물질 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)을 양적 SD 컷트드에 급성경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 반수치사량(LD₅₀) 및 GHS의 Category를 알아보고자 수행하였다. 투여용량은 300 mg/kg B.W(1 단계 및 2 단계) 및 2000 mg/kg B.W(3 단계 및 4 단계)로 설정하였으며, 군당 3 마리를 사용하였다. 투여 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

그 결과는 다음과 같다.

1 단계 ~ 4 단계 투여 시 시험물질 투여에 의한 사망동물, 일반증상, 체중변화 및 부검소견에서의 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과, Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)의 GHS(Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures)의 분류는 Category 5 or Unclassified(LD₅₀ Cut-off value: 5000 mg/kg B.W.)로 분류하였다.

11. Tables(Group summary)

Table 1. Mortality and clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality
Step 1	300	Female	3	Normal	0 % (0 / 3) ^{*)}
Step 2	300	Female	3	Normal	0 % (0 / 3)
Step 3	2000	Female	3	Normal	0 % (0 / 3)
Step 4	2000	Female	3	Normal	0 % (0 / 3)

*) : Number of dead animals / Number of tested animals

Table 2. Body weight

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days (g)				
			0	3	7	14	
Step 1	300	Female	Mean	194.7	224.3	239.6	248.0
			S.D.	3.8	4.8	3.2	6.5
			N	3	3	3	3
Step 2	300	Female	Mean	196.4	229.7	251.3	259.4
			S.D.	4.0	2.5	2.7	4.3
			N	3	3	3	3
Step 3	2000	Female	Mean	200.9	247.0	255.8	266.0
			S.D.	6.3	5.3	5.6	5.2
			N	3	3	3	3
Step 4	2000	Female	Mean	204.5	232.6	246.7	257.6
			S.D.	9.7	2.5	8.3	6.5
			N	3	3	3	3

S.D. : Standard deviation, N : Number of animals

Table 3. Necropsy findings

Findings	Group Dose (mg/kg B.W.)	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
		300	300	2000	2000
No remarkable finding		3 ^{*)}	3	3	3

*) : Number of animals

12. Appendices(Individual data)

Appendix 1. Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Hours after administration				Days after administration				
			0.5	1	2	3	4	1	2	3	4
Step 1	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Step 2	300	2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Step 3	2000	2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Step 4	2000	2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 1. (Continued) Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration											
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Step 1	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Step 2	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Step 3	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Step 4	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 2. Body weight of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days (g)			
			0	3	7	14
Step 1	300	2101	197.5	226.3	239.8	243.4
		2102	196.1	227.8	242.7	255.4
		2103	190.4	218.8	236.3	245.1
		Mean	194.7	224.3	239.6	248.0
		S.D.	3.8	4.8	3.2	6.5
		N	3	3	3	3
Step 2	300	2201	195.0	228.2	248.2	254.5
		2202	202.8	232.5	253.1	262.8
		2203	197.5	228.3	252.6	260.9
		Mean	198.4	229.7	251.3	259.4
		S.D.	4.0	2.5	2.7	4.3
		N	3	3	3	3
Step 3	2000	2301	199.9	241.8	250.2	263.5
		2302	195.2	247.0	255.9	262.5
		2303	207.7	252.3	261.4	271.9
		Mean	200.9	247.0	255.8	266.0
		S.D.	6.3	5.3	5.6	5.2
		N	3	3	3	3
Step 4	2000	2401	196.3	231.0	242.9	254.0
		2402	201.9	231.4	241.0	253.8
		2403	215.2	235.5	256.2	265.1
		Mean	204.5	232.6	246.7	257.6
		S.D.	9.7	2.5	8.3	6.5
		N	3	3	3	3

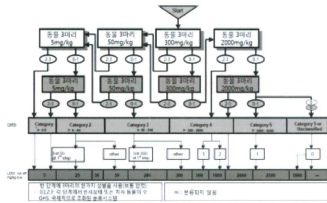
S.D. : Standard deviation, N : Number of animals

Appendix 3. Necropsy findings

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Animal number	Necropsy day	Finding
Step 1	300	Female	2101	14	No remarkable finding
			2102	14	No remarkable finding
			2103	14	No remarkable finding
Step 2	300	Female	2201	14	No remarkable finding
			2202	14	No remarkable finding
			2203	14	No remarkable finding
Step 3	2000	Female	2301	14	No remarkable finding
			2302	14	No remarkable finding
			2303	14	No remarkable finding
Step 4	2000	Female	2401	14	No remarkable finding
			2402	14	No remarkable finding
			2403	14	No remarkable finding

13. Annex

Annex 1. 시각 약량 300 mg/kg B.W.의 시험절차



첨부 2) 급성경피독성시험

최종보고서

랫드(Sprague Dawley Rat)를 이용한 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물(crude type)의 급성경피독성시험

시험의뢰자
위대원화학
경상북도 칠곡군 가산면 학하 6길 53
시험의뢰자-서상현
TEL: 054)972-2908 FAX: 054)972-2909

시험기관
㈜에이비솔루션
경기도 화성시 정남면 정남산단 2 길 26
운영책임자: 김판건 시험책임자: 이홍희
TEL: 070-4345-3835 FAX: 031-273-1933

(주)에이비솔루션

목차

페이지

제 출 문	3
시 험 참 여 자	4
1. 요약	5
2. 시험의 개요	6
3. 시험재료	7
4. 시험계	8
5. 사육조건	9
6. 시험군 구성 및 투여용량 설정	10
7. 투여	10
8. 관찰, 측정 및 부검	11
9. 결과	12
10. 고찰	13
11. Tables(Group summary)	14
12. Appendices(Individual data)	15

제 출 문

시험제목: 랫드(Sprague Dawley Rat)를 이용한 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 추출물
(crude type)의 급성경피독성시험

시험번호: AD23039N

본 시험은 시험책임자의 책임하에 아래의 규정을 준수하며 실시하였다.

*농약 및 원재의 등록기준: (별표12) 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-2. 급성경피독성
시험* 농촌진흥청 고시 제2023-20호(2023. 07. 03 일)

본 최종보고서는 승인된 시험계획서의 절차 및 목적에 따라 진행하였으며, 시험 진행
중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

㈜에이비솔루션 : 이 홍 희 2023. 11. 01.
시 험 책 임 자 이 홍 희 날 짜

㈜에이비솔루션 : 김 판 건 2023. 11. 01.
운 영 책 임 자 김 판 건 날 짜

시 험 참 여 자

해당 시험의 시험참여자는 ㈜에이비솔루션 표준작업지침서(SOP)와 시험계획서에 따라
시험을 수행하고 기록하였다.

시 험 담 당 자 : 문정원, 박다형, 김동윤, 장봉, 김선영

조 제 담 당 자 : 김가연

동 물 관 리 책 임 자 : 김태우

병 리 책 임 자 : 박혜준

보 고 서 작 성 자 : 이홍희

1. 요약

시험물질인 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 주출물(crude type)을 양수 Sprague Dawley Rat(SD 랫드)에 급성경피투여 하였을 때의 독성반응을 관찰하고, 반수지사막형(LD50)을 알아보기 위하여 수행하였다. 시험군의 시험물질 투여용량은 4000 mg/kg B.W로 설정하였으며, 암수 각 5 마리를 사용하였다. 투여 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

그 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 동안 모든 동물에서 사망동용은 관찰되지 않았다.
2) 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
3) 체중측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 체중의 이상변화가 관찰되지 않았다.
4) 부검 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

본 시험의 조건에서 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 주출물(crude type)을 양수 Sprague Dawley Rat(SD 랫드)에 급성경피투여한 결과, 사망동용이 관찰되지 않아 LD50은 4000 mg/kg B.W 이상으로 판단된다.

2. 시험의 개요

- 2.1. 제목: 랫드(Sprague Dawley Rat)를 이용한 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 주출물(crude type)의 급성경피독성시험
2.2. 목적: 시험물질 Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 주출물(crude type)을 양수 Sprague Dawley Rat(SD 랫드)에 급성경피투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 반수지사막형(LD50)을 알아보고자 수행하였다.
2.3. 시험기준: '농약 및 원재의 등록기준: [별표12] 인축 독성 시험기준과 방법, 12-1-2. 급성경피독성시험' 농촌진흥청 고시 제2023-20호(2023. 07. 03. 일)
2.4. 동물유리: '동물보호법 (제정 1991. 05. 31. 일 법률 제4379호, 일부개정 2023. 06. 06. 20. 일 법률 제19486호)' 승인번호: ABIAJUCRA23148
2.5. 시험일정: 1) 시험개시일 : 2023. 08. 08. 월 17. 일, 2) 실험개시일(실험동물입수일) : 2023. 08. 08. 월 21. 일, 3) 실험종료일 : 2023. 09. 01. 월 12. 일, 4) 시험종료일 : 2023. 11. 01. 월 01. 일
2.6. 시험계획서의 변경 및 이탈: 시험계획서 승인 후 본 시험기간 동안 시험계획서의 변경 및 이탈사항은 발생하지 않았다.
2.7. 자료 보관: 시험계획서 관련기록, 최종보고서 관련기록, 시험기초자료, 시험물질 표준 및 각종 증거자료는 해당 농약 또는 원재의 등록일로부터 3 년간 내에비밀무선 자료보관실(자료보관실1: 시험물질 표준, 자료보관실2: 시험계획서 및 최종보고서 관련기록, 시험기초자료)에 보관한다. 이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

3. 시험재료

- 3.1. 시험물질: 1) 시험물질명 : Bacillus amyloliquefaciens 균주의 배양 주출물(crude type), 2) 입수일 : 2023. 08. 08. 월 11. 일, 3) 입수량 : 40 mL x 1 ea(용기비포함), 4) 외관 및 색상 : 미색의 액상시료(밀균상태), 5) 제조일 : 2023. 07. 07. 월 24. 일, 6) 유효기간 : 2024. 01. 01. 월 24. 일, 7) 제조번호 : -, 8) 유효성분 : -, 9) 보관조건 : 실온, 10) 제공원 : ㈜대원화학, 11) 잔여물질 처리 : 폐기

3.2. 부형제

- 1) 물질명 : 열균중류수, 2) 제조사 : 대전약품공업㈜, 3) 고유번호 : J225821, 4) 보관조건 : 실온

3.3. 시험물질의 조제

시험물질은 유효성분에 대한 보장이 없었기에, 시험물질을 전자저울로 칭량하여 tube에 넣고, 부형제를 일부 넣어 vortex mixer로 혼합시킨 뒤 부형제를 추가하여 조제하였다. 조제는 투여 당일 실시하였다.

4. 시험계

- 4.1. 시험계: 1) 계종 및 종 : Sprague Dawley 랫드, SPF, 2) 생산자 및 공급원 : ㈜생타코 BIO KOREA (경기도 오산시 서항로 105)
3) 동물의 이력: 동물 성별, 수컷, 암컷; 동물 입수 시 마리, 6 마리, 6 마리; 동물 투여 시 마리, 5 마리, 5 마리; 동물 입수 시 주령, 7 주령, 9 주령; 동물 투여 시 주령, 8 주령, 10 주령; 동물 투여 시 체중, 275.4 g ~ 289.1 g, 217.2 g ~ 235.5 g
4.2. 선정사유: 본 시험에 사용하는 SD 랫드는 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과와 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.
4.3. 검역 및 순화: 실험동물 입수 후 검역실에서 3 일 이상 검역을 하고, 동물사육실에서 5 일 이상 순화를 실시하였다. 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰하였다.
4.4. 개체 및 사육상자 식별: 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다(검역 및 순화기간은 빨간색, 관찰기간은 파란색). 사육상자에는 개체식별카드를 부착하였다.
4.5. 군분리: 순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 무작위 방법을 이용해 군분리하였다. 군분리 시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.
4.6. 잔여동물: 잔여동물은 시험계에서 제외하였고, 해당 SOP에 따라 진행하였다.

5. 사육조건

5.1. 사육환경

- 1) 검역실 번호 : 검역실 2
- 2) 동물실 번호 : 설치류 1
- 3) 사육상자 정보 : 폴리카보네이트 사육상자(260 W×420 D×180 H mm)
- 4) 사육관리(사육상자당) : 3 마리 이하
- 5) 온도 : 21.4 ~ 23.2 °C (검역실 2) / 20.7 ~ 22.2 °C (설치류 1)
- 6) 상대습도 : 49.1 ~ 54.1 % (검역실 2) / 49.7 ~ 55.9 % (설치류 1)
- 7) 환기횟수 : 10 ~ 15 회/hr
- 8) 조광주기 : 12 시간(오전 8 시 정동 ~ 오후 8 시 소동)
- 9) 조도 : 150 ~ 300 lux

5.2. 환경측정

시험기간 중 동물실의 온습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 15 분마다 측정된 데이터를 기반으로 1 시간 단위의 평균수치로 기록하며, 조도 등의 환경조건은 SOP에 따라 정기적으로 측정된 결과, 시험결과에 영향을 주는 요인은 발생하지 않았다.

5.3. 알질

성적서를 확인하여 오염물질을 확인하였고, 적합함이 확인된 알질을 121 °C에서 15 분 이상 멸균하여 사용하였다.

5.4. 사료

성적서를 확인하여 오염물질을 확인하였고, 적합함이 확인된 실험동물용 쥐 사료를 자유롭게 시켰다.

5.5. 음수

오염물질 정기검사(2 회 / 년)를 실시하여 "먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙"에 적합함이 확인된 상수도수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 살균·여과한 후 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유롭게 시켰다.

6. 시험군 구성 및 투여용량 설정

6.1. 시험군 구성

Test substance	Group	Dose (mg/kg B.W)	Dose Volume (mL/kg)	Sex	Number of Animals	Animal Number
Bacillus amyloquelicifaciens 군 주의 배양 주출물(crude type)	G1	4000	5	수컷	5	1101~1105
				암컷	5	2101~2105

6.2. 투여용량 설정

시험물질의 투여용량은 농촌진흥청 고시 "농약 및 원제의 등록기준"에 근거하여 기초시험에서 역상계제의 투여용량인 4000 mg/kg B.W.를 시험군으로 설정하였다.

7. 투여

7.1. 투여경로 및 선택 이유

피부로 노출되었을 때에 대한 안전성을 평가하기 위하여 경피투여 경로를 선택하였다.

7.2. 투여횟수

시험물질을 1 회 피부에 노출시켜 24 시간 동안 유지하였다.

7.3. 투여역량 산출

투여역량은 5 mL/kg으로 하였고, 개체별 투여역량은 투여당일의 체중을 기준으로 산출하였다.

7.4. 투여방법

시험물질 투여 전날 실험동물의 등 부위에 체모를 피부가 손상되지 않도록 밀게 제거하였다. 체모부위의 4 cm × 4 cm 넓이를 투여부위로 하였다. 시험물질을 거즈에 도포한 후, 투여부위에 부착하였다. 시험물질의 유실을 막기 위해 비자극성 테이프(Tegaderm, 3M)와 탄력붕대(Coban, 3M)로 24 시간 고정하였다. 시험물질 노출 종료 후 도포물을 제거하고, 피부에 남아있는 시험물질을 멸균종류수분 기관의 종류기로 중류수를 생산하여, 고압증기멸균기로 멸균로 제거하였다.

8. 관찰, 측정 및 부검

8.1. 일반증상 관찰

투여당일에는 투여 후 30 분, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 시간째에 일반증상을 관찰하였으며, 투여 후 1 일부터 14 일(부검 전)까지는 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰하였다.

8.2. 체중측정

체중은 인수일, 군분리일, 투여당일(투여 전), 투여 후 7 일 및 14 일(부검 전)에 측정하였고, 최종보고서에는 투여당일(투여 전), 투여 후 7 일 및 14 일(부검 전)에 측정된 결과를 기술하였다.

8.3. 부검

관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO₂ 가스를 흡입시켜 후대정맥/복대동맥에서 방혈하여 인락사 시키고 부검하였다.

9. 결과

9.1. 사망동물(Table 1, Appendix 1.)

시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.

9.2. 일반증상(Table 1, Appendix 1.)

일반증상 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

9.3. 체중(Table 2, Appendix 2.)

체중측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

9.4. 부검소견(Table 3, Appendix 3.)

모든 개체의 주요장기에 대한 육안적 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다.

10. 고찰

본 시험은 시험물질인 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 배양 주출물(crude type)을 암-수 SD 랫드에 급성경피투여 하였을 때의 독성반응을 관찰하고, 반수치사약량(LD₅₀)을 알아보기 위하여 수행하였다.

시험군의 시험물질 투여용량은 4000 mg/kg B.W.로 설정하였으며, 암-수 각 5 마리를 사용하였다. 투여한 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

그 결과는 다음과 같다.

시험물질 투여에 의한 사망률, 이상증상 및 체중변화는 관찰되지 않았다. 부검결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

본 시험의 조건에서 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 배양 주출물(crude type)을 암-수 Sprague Dawley Rat(SD 랫드)에 급성경피투여한 결과, 사망동물이 관찰되지 않아 LD₅₀은 4000 mg/kg B.W. 이상으로 판단된다.

11. Tables(Group summary)

Table 1. Mortality and clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead / total)
G1	4000	Male	5	Normal	0 % (0 / 5) ^{a)}
		Female	5	Normal	0 % (0 / 5)

^{a)} : Number of dead animals / Number of tested animals

Table 2. Body weight

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days (g)			
			0	7	14	
G1	4000	Male	Mean	279.9	319.7	360.1
			S.D.	5.8	12.5	18.5
			N	5	5	5
		Female	Mean	225.7	239.6	254.1
			S.D.	7.9	9.2	11.1
			N	5	5	5

N : Number of animals, S.D. : Standard deviation

Table 3. Necropsy findings

Findings	Group	
	G1	
	Dose (mg/kg B.W.)	
No remarkable finding	Male	5 ^{a)}
	Female	5

^{a)} : Number of animals

12. Appendices(Individual data)

Appendix 1. Clinical signs

Group/ Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Animal number	Hours after administration						Days after administration			
			0.5	1	2	3	4	5	6	1	2	3
G1/ 4000	Male	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Female	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Appendix 1. (Continued) Clinical signs

Group/ Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Animal number	Days after administration													
			4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
G1/ 4000	Male	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	Female	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		2104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		2105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

N : Normal

Appendix 2. Body weight

Group/ Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Animal number	Days (g)		
			0	7	14
G1/ 4000	Male	1101	275.4	299.8	333.2
		1102	289.1	331.6	378.8
		1103	282.0	316.5	349.7
		1104	275.8	328.2	372.3
		1105	277.0	322.2	366.6
	Female	Mean	279.9	319.7	360.1
		S.D.	5.8	12.5	18.5
		2101	217.2	229.5	240.2
		2102	231.9	240.3	250.4
		2103	219.4	243.5	257.3
Female	2104	235.5	252.5	270.5	
	2105	224.6	232.4	252.2	
	Mean	225.7	239.6	254.1	
	S.D.	7.9	9.2	11.1	

S.D. : Standard deviation

Appendix 3. Necropsy findings

Group/ Dose(mg/kg B.W.)	Sex	Animal number	Necropsy day	Findings
G1/ 4000	Male	1101	14	No remarkable finding
		1102	14	No remarkable finding
		1103	14	No remarkable finding
		1104	14	No remarkable finding
	Female	1105	14	No remarkable finding
		2101	14	No remarkable finding
		2102	14	No remarkable finding
		2103	14	No remarkable finding
		2104	14	No remarkable finding
		2105	14	No remarkable finding

4. 개발제품의 현장 보급확대전략 수립 및 상용화 증대방안도출

1) 시제품 생산 조건 수립

- 본 연구결과의 성과물인 시제품 생산의 기본 배합은 앞의 연구결과를 바탕으로 균주배양액에 산화방지제를 기본 배합 원료로 하여 시제품을 생산하였다.
- 이에 본 연구에서는 균체 생산성이 좋은 연구용 최적배지를 약간 변형하여 사용하는 것이 좋을 것으로 판단되었으며 시제품 생산에서도 이를 사용하였다. 다만 소량배양 시 배지 단가 상승 및 소규모 배양에 따른 경제성 확보라는 측면에서는 부분적인 어려움이 있을 것으로 판단되어 앞으로 추가적인 연구도 필요할 것으로 생각된다.
- 시제품 생산을 위한 샘플 조제시 일반적으로 운반 취급이 용이한 부피를 기준으로 하는 것이 농가 및 판매상에서 취급하기에 좋다는 의견을 반영하여 시제품 크기를 제작하였다. 또한 유용성분의 산화를 방지하기 위해 산화방지제로서 아스코브산을 사용하였으며 제품 안정성을 확보하였다.
- 시제품 생산은 주원료인 균주배양액과 부재료를 배합조에 넣고 1시간 동안 혼합하여 제품을 안정화 한 후 충전기로 이송하여 제품을 충전한 후 실링하여 밀봉하고 인쇄된 제품 라벨지를 부착하여 시제품을 완성하였다.



<배합조>



<추진기>



<라벨부착기>



<시제품(수지제로)>

그림.137 시제품 생산 공정 및 생산된 시제품 사진

2) 시장진입을 위한 단계적 전략 (시장진입시기, 현지화 전략 등)

- 먼저 본 연구개발과제 수행 후 관련 연구 결과는 국가 공인기관의 공인인증을 취득하여 연구결과의 신뢰성과 객관성을 확보할 것이며 관련 기술 및 제품은 특허 및 상표 등록을 출원하여 이를 특허시켜 활용할 예정이다
- (주)대원화학은 농자재 생산전문업체로서 발효액상비료 및 친환경농자재 생산을 하고 있는 기업으로 현재 대부분의 거래처가 농협과 단위조합 위주여서 그 시장이 협소하므로 이를 다변화하여 각 지역 농협, 품목(과수)농협 및 시판거래상과의 연계 판매 프로그램을 구축하여 시장 다변화를 꾀할 것임.
- 제품 홍보 전략의 하나로 새로운 양산기술이 확보되면 시범사업으로 경북 각 지역별로 특정 농가 또는 특종 작물 등에 대단위 적용 시험을 하여 제품의 효과검정과 병행한 홍보를 할 계획이며 또한 농민신문 광고를 수회 실시하여 제품인지도를 높일 계획임.
- 본 과제의 수행이 종료되는 시점 이후인 2024년도에 관련기술을 활용한 제품 양산을 위한 인력과 설비 확충을 시작할 것이며 현재 본사는 농협에 대부분의 매출을 창출하는 업체로 개발될 친환경 농자재의 판매와 납품에 이점이 있으며 금번에 개발될 제품은 이미 구축된 영업망인 농협과 농금조합 뿐만 아니라 친환경 농산물 생산자 단체에 제품에 대한 사전 영업을 통하여 사업성을 극대화 한다.

3) 대학, 연구소, 협력업체, 대기업 등 외부 네트워크 활용 방안

- 본 사에서는 경북바이오산업연구원과 산업 발효 시스템의 원활한 사용을 위해 현재 입주 계약을 하고 있는 상태이며 이를 활용해 발효관련 산업설비의 안정적인 사용에 만전을 기

하고자 한다. 또한 산업적 발효 시스템에 관한 연구원의 풍부한 연구경험을 활용하고자 관련 자문을 수시로 진행할 예정이다.

- 이번 과제를 함께한 경북대학교 연구팀과의 주기적인 미팅 및 기술자문으로 관련 기술정보의 취득과 활용에 만전을 기하도록 하면서 추가적인 연구를 기업체에서 의뢰하여 더욱 기술개발에 박차를 가할 예정이다.
- 저희 회사는 기업부설연구소 설치하여 미래창조과학부에 인정을 득하여 연구개발을 위한 제반 인프라를 구축하였으며 특히 농화학계열 전문인력을 배치하여 운용중이다.

4) 사업화를 위한 핵심인력 확보 방안

- 본 과제 수행을 위해 연구 및 마케팅 인력 1명을 채용(2021년)하였으며 연구인력확충을 위해 농화학관련 학과 졸업생 1명을 경력사원으로 채용(2023년)하여 연구개발과 과제수행에 활용할 준비를 하였으며 과제 수행 후 관련 업무를 담당하게 할 예정임.
- 연구개발의 새로운 동력확보를 위해 고경력과학기술인력지원센터의 경력연구 인력의 채용 또는 전문경력인사 초빙활용사업 등에 지원하여 새로운 핵심인력의 확보에도 힘쓸 것임.
- 기 확보된 핵심 연구 인력은 유관기관(한국산업기술진흥협회, 농촌진흥청)의 주기적인 연구 개발 교육 프로그램에 참여토록 하여 연구 개발 역량 강화에 힘쓰도록 할 예정임.

5) 사업화 계획

- BBC Research에 따르면 미생물 제제 관련 세계시장은 2012년 1,170억 달러였으나 2012년에는 1,340억 달러로 12.6% 성장하였으며 2018년 1,790로 연평균 성장률이 6%에 이를 전망으로 농생명소재 산업중 미생물 제제관련 산업은 확대일로에 있는 산업이라고 할 수 있다. 또한 국내 친환경 농업시장은 2020년 재배면적13.3만ha, 친환경농산물 시장 2.5조원으로 커지고 있으며 화학농약이나 화학비료 사용은 매년 약 2%정도 감소하는 추세이다. 이에 따라 친환경 미생물 제제 관련 시장은 국내에서도 친환경 농업 인증 재배면적 증가와 함께 꾸준히 성장할 전망이다. 또한 농생명소재 분야의 발전은 연간 1조 2천억원 이상 규모의 경제적 파급효과 뿐만 아니라 향후 중국, 일본과의 FTA체결 등 세계적 시장개방 흐름 속에서 농가의 피해를 최소화하는데 큰 기여를 할 것으로 생각된다.
- 중소기업청에서 발표한 자료에 따르면 국내 생물비료 시장은 야기 253억원 규모로 예상되며 친환경 농업의 확산에 따라 생물비료 생산량은 크게 성장할 것으로 추정된다.
- 이와 같이 본 기술개발을 바탕으로 한 제품은 핵과류(복숭아)의 수지증상을 경감시키는 제품이기 때문에 나아가 다른 과수 작물에도 적용이 가능할 것으로 판단되며 환경유래의 유용미생물을 사용하므로 환경 친화적인 농산물 생산을 가능하게 하므로 농업 경쟁력 향상에 기여할 수 있을 것이며 그 시장은 더욱 확대될 것으로 판단된다.

- 현재 국내시장 상황을 고려해 보면 당사 제품의 시장 규모는 다음과 같이 예측된다.

<개발제품 국내시장규모 - 복숭아 적용>

1ha 당 약 30kg를 사용한다는 가정을 하면 아래와 같이 계산된다.

$30\text{kg}/\text{ha} \times 21,015\text{ha}(\text{복숭아 재배면적}) \times 2\text{회사용}(\text{봄, 여름})/\text{년} = 1,260,900\text{kg}/\text{년}(\text{년간 사용량})$

$1,260,900\text{kg}/\text{년}(\text{년간사용량}) \times 25,000\text{원}/\text{kg}(\text{제품예상단가}) \times 10\%(\text{사용비율}) = 31\text{억 원}/\text{년}$

핵과류 작물에 적용확대할 경우에는

$30\text{kg}/\text{ha} \times 36,752\text{ha}(\text{핵과류 재배면적}) \times 2\text{회사용}(\text{봄, 여름})/\text{년} = 2,205,120\text{kg}/\text{년}(\text{년간 사용량})$

$2,205,120\text{kg}/\text{년}(\text{년간사용량}) \times 25,000\text{원}/\text{kg}(\text{제품예상단가}) \times 10\%(\text{사용비율}) = 55\text{억 원}/\text{년}$

- 본 연구과제를 통해 개발된 신제품은 친환경적인 제품으로 농가 및 소비자의 욕구를 충족시켜줄 수 있는 제품으로 현재의 친환경 농업이 확대 발전하는 것과 보조를 맞추는 제품이 될 것이다. 이러한 제품을 통해 아래와 같은 신시장 개척을 통해 시장을 확대시켜 나아갈 것이다.
- 주관기관인 (주)대원화학은 농자재 생산 전문업체로서 기능성 발효액상비료 및 친환경 농자재 생산을 하고 있는 기업으로 현재 대부분의 거래처가 농협과 단위조합 위주여서 그 시장이 협소하므로 각 지역 농협, 품목(과수) 농협 및 친환경 재배단지와의 연계 판매 프로그램을 구축하여 시장을 다변화해 나갈 것이다. 또한 당사는 농협중앙회의 전국계통계약이 되어 있는 업체임을 강조하여 제품 판로확보를 용이하게 할 것이며 제품의 우수성을 공인성적서, 특서 등을 제시함으로써 객관적이며 신뢰성 있는 제품임을 적극 홍보할 예정이다. 마케팅을 위한 계획은 아래와 같다
- 국내 비료유통량의 90%이상을 농협중앙회가 점유하고 있어 이를 중심으로 마케팅을 추진하여야 각 지역 실제 소비농가에 접근하기 용이할 것으로 판단된다. (주)대원화학은 농협중앙회의 전국계통계약이 되어 있는 업체임을 강조하여 제품판로확보를 용이하게 할 것이며 제품의 우수성을 공인성적서, 특서 등을 제시함으로써 객관적이며 신뢰성 있는 제품임을 적극 홍보할 예정이다
- 농협중앙회를 통한 판매전략의 경우 소비자인 농민에게 과급되는 시간이 걸려 빠른 시간내에 제품홍보가 용이하지 않을 수 있는 단점을 보완하기 위해 농민 및 영농작목반 단위의 교육을 통해 제품홍보에 주력할 예정이다. 홍보는 지역단위의 현장영농지도, 사용법 교육 및 시범포 운영을 통해 농민과의 거리를 좁혀나갈 예정이다.
- 미생물 제제의 사용시 가장 큰 문제점으로 지적되는 높은 가격 문제는 관련 제제 시장의 확대에 걸림돌로 향시 지적되고 있는 사항이다. 이를 해결하기 위한 방편으로 제제의 생산원가를 낮추기 위해 현재 본 사는 경북바이오산업연구원에 부분 입주해 있어 연구원 소유의 관련 장비를 낮은 단가에 사용 가능하며 또한 생산과 관련한 협력이 원활히 진행 될 수 있는 장점이 있다. 이를 통해 연구원에서 보유한 미생물 대량배양 시스템을 적극 활용하여 생산원가를 낮추어 생산성 향상을 꾀하여 저렴한 가격으로 제품 생산 및 공급이 가능한 체제를 구축하고자 하며 이를 통해 동종 업체와 의 가격 경쟁력을 확보하고자 한다.
- 미생물제제 비료의 생산 및 품질관리의 문제점 중 제품의 효능을 담보하는 유효기간이 짧은 단점이 있으며 이러한 문제로 생산에서 소비에 이르기까지의 시간이 오래 걸려 제품의 신뢰성이 떨어지는 문제점이 있어왔다. 본 과제를 통해 개발될 미생물제제의 경우 이러한 문제점을 해결하고 원활한 재고 관리를 위하여 Order-Made방식의 판매방식을 부분적으로 도입하여 신뢰성과 재고부담을 해결하는 방식의 마케팅 전략을 수립하였다. 이를 통해 소비자와 직접연계성도 강화하고 제품 유통후 사후관리부분도 지역별 작목별로 단계적으로 실현하고자 한다.
- 새로운 공급·유통채널 확보를 통한 판로를 위해 기존에 확보된 농협중앙회 계통라인과 연계한 판매망 구축 및 신규 시판업체와의 연계성을 강화한 제품판로 개척하며 농산물 생산자 단체 및 지역의 선도농가에 각각 샘플제품을 제공해 제품에 대한 사전 영업을 통하여 사업성을 극대화하고 농업실용화재단과의 연계를 추진하여 관련기술의 홍보에 활용하며 해외 마케팅 지원사업 등을 활용한 판로 확보, 해외 네트워크를 활용한 해외 파트너 확보 등을 개척해 나갈 것이며 다양한 농업박람회 참가 및 제품 홍보 전시 부스 설치할 계획으로 제품 홍보전략을 구사해 나갈 것이다.
- 본 제품은 프로슈머 마케팅전략의 수립이 필요할 것으로 판단된다. 프로슈머(Prosumer)

마케팅이란 영향력 있는 소비자에게 마케팅 전략을 집중함으로써 프로슈머에 의한 상품선택 확산을 겨냥하는 마케팅 전략으로 본 제품은 기능성 제품으로 독농가 또는 각 지역의 우수농가들이 사용하는 농자재는 주변의 기타농가들이 그들의 농업을 따라하는 경향이 있어 이러한 프로슈머(Prosumer)를 통해 상품 정보를 공유하게 함으로서 지역단위의 각 농가들에게 자연스럽게 제품 홍보를 할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 지역단위로 버즈 마케팅을 담당할 지역 농민 또는 유관자를 선별 접촉하여 빠른 속도로 제품 정보가 퍼지도록 할 예정이다.

- 초기의 부족한 인지도 상승을 위해 기존에 본사의 다양한 제품과의 연계마케팅 및 묶음 상품화 전략에 대해 기존의 다른 제품과의 연계성 추진을 통해 제품을 접해 볼 기회를 제공함으로써 제품 홍보, 인지도 상승 등을 자연스럽게 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 아직까지는 시도해 본적이 없는 방법이지만 기존에 확보하고 있는 농가와의 텔레마케팅도 연계 추진할 예정이다. 또한 공식 유통업체를 선정하여 딜러로서 제품 유통 판매 서비스를 제공하도록 하여 구매자 및 제품 사용자와 가장 밀접한 곳에서 제품 유통을 담당하게 하여 유통 효율성을 재고한다. (주)대원화학은 마케팅에만 초점을 맞춰 구성 단위 간 시너지가 나도록 마케팅 전략을 구사할 예정이다.
- 시장 진입 초기에 제품의 확산을 위해 대량판매시장 가격이 민감한 소비자 규모의 경제로 단위당 단가 하락이 필요할 것으로 판단하고 있으며 초기에 가격경쟁력을 확보하기 위해 특정기간의 한정 이벤트성 가격 조정을 통해 기존 시장을 선점하는 전략을 구사하고 가격 세분화정책을 통해 인지도 상승 시장 성장률과 시장점유율을 높이기 위한 전략을 구사할 예정이다.
- 개발될 제품에 대한 기술적 특징을 강조하는 전략으로 농림부의 연구과제로 취득한 성과물임을 강조하여 기술적 우위성이 있는 제품임을 적극 홍보하여 소비자의 제품 신뢰성을 높일 수 있는 전략을 추진할 예정이며 기존의 본사의 제품과 관련해 브랜드 이미지도 제고를 통해 판매와의 연계성 구축을 추진할 예정이며 브랜드를 스위칭 하도록 홍보 활동 강화할 예정이다.
- 광고매체를 활용한 홍보를 추진하고자하며 농업관련 가장 유력지인 농민신문에 매월 단위로 수회 광고할 계획을 추진하고자 하며 회사 기업부설연구소내의 기술보급팀을 활용하여 지역별 순환제품설명회를 개최할 예정이다. 또한 농업유관단체의 홈페이지에 관련 기술과 제품에 관한 내용 게시를 추진할 것이며 본사의 홈페이지도 제품관련 내용을 게시하고 제품관련 문의 사항에 대한 답변을 실시간으로 진행되도록 담당직원을 고정 배치 할 예정이다.
- 개발 제품은 핵과류(복숭아)의 수지증상을 해소하는데 기여할 것으로 생각되어 장기적으로는 불량환경에 처한 작물에 모두 적용가능한 제품으로 업그레이드 하여 모든 농가 및 유관단체에 사용가능한 제품으로 개발할 수 있을 것으로 판단되며 이를 통해 전체 재배작물에 공급가능한 제품으로 적용작물을 확대해 주요 고객군을 확대해 나갈 예정이다.
- 구체적으로는 해당 제품이 겹무늬썩음병을 포함한 진균에 대한 길항작용이 있기 때문에 이를 사과 배 등의 인과류에 과수병에 확대해서 적용할 수 있을것으로 생각한다. 또한 해당 연구를 통해 구축한 미생물 균집 데이터베이스를 활용하여 수지증을 포함한 진균으로부터 발생하는 과수병의 기초자료로 활용될 수 있다고 사료된다.
- 해당제품의 친환경유기농자재 등록을 위해서 보고서에서 언급했던 급성경구시험 및 급성경피시험 뿐만이 아니라 어독성시험, 유해미생물분석, 다른 작물에 대한 약해시험을 추가로 계획하고 있으며 실시하고자 한다.
- 뿐만 아니라 해당 미생물의 핵심 활성물질에 대한 추가 연구를 통해 활성물질의 증대를 목표로 하여 추후에 균주 개량 및 개발하고자 한다.

표 38. 2024년도 사업화 전략 추진계획

년도	구분	추진계획	비고
2024	농업박람회 (전시회) 참가	대한민국 농업박람회 참가 및 제품 홍보 전시 부스 설치 계획	
	공급·유통 채널 확보를 통한 판로 개척	-기존에 확보된 농협중앙회 계통라인과 연계한 판매망 구축 및 신규 시판업체와의 연계성을 강화한 제품판로 개척 -농산물 생산자 단체 및 지역의 선도농가에 각각 샘플 제품을 제공해 제품에 대한 사전 영업을 통하여 사업성을 극대화 -농업실용화재단과의 연계를 추진하여 관련 기술의 홍보에 활용함. 해외 마케팅 지원사업 등을 활용한 판로 확보, 해외 네트워크를 활용한 해외 파트너 확보 등	
	판매 전략	(주)대원화학은 농협중앙회의 전국계통계약이 되어 있는 업체임을 강조하여 제품 판로확보를 용이하게 할 것이며 제품의 우수성을 공인성적서, 특허 등을 제시함으로써 객관적이며 신뢰성있는 제품임을 적극 홍보할 예정임	
	On/Off 홍보 활동	-농민신문에 매월 단위로 광고할 계획. -회사의 기술보급팀을 활용하여 지역별 순환제품설명회를 개최할 예정임. -농업유관단체의 홈페이지에 관련 기술과 제품에 관한 내용 게시 예정임. -본사의 홈페이지에 게시하고 제품관련 문의 사항에 대한 답변을 실시간으로 진행되도록 담당직원을 고정 배치 할 예정임.	

(1) 정성적 연구개발성과

- 다양한 지역의 수지증 병변발생 유무에 따른 복숭아나무 근권, 내생 미생물 군집 분석
- 복숭아 수지증의 병리학적 생리학적 발생원인 구명 및 효능 검정
- 복숭아 수지증의 병리학적 발생원의 친환경 방제 체계 연구
- 복숭아 수지증 제어를 위한 식물·미생물 유래 친환경 미생물제제 개발
- 복숭아 수지 병원균 분리 및 특성 조사
- 항균활성 기반 복숭아 수지증의 방제용 길항미생물 탐색 및 동정
- 지역별 복숭아 수지증 발생 실태 및 현황 조사
- 복숭아 수지증 병반 경감을 위한 기존 약제의 효능 검증
- 복숭아 수지증의 병리학적 생리학적 발생원인 구명 및 효능 검정

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 백만원, 명)

성과지표명			연도	1단계	2단계	계	가중치 (%)
				(2021~2022)	(2023)		
연구개발과제 특성 반영 지 표	지식재산권	특허(지식재산권)출원	목표(단계별)	1	1	2	10
			실적(누적)	1	1	2	
		특허(지식재산권)등록	목표(단계별)		1	1	10
			실적(누적)				
		품종등록	목표(단계별)				
			실적(누적)				
	기술실시(이전)	기술실시(이전)	목표(단계별)		1	1	
			실적(누적)				
		기술료(백만원)	목표(단계별)				
			실적(누적)				
	사업화	제품화	목표(단계별)		1	1	20
			실적(누적)				
		매출액(백만원)	목표(단계별)		13.2	50	20
			실적(누적)				
		수출액(백만원)	목표(단계별)				
			실적(누적)				
		고용창출	목표(단계별)	1	1	2	20
			실적(누적)		2	2	
투자유치		목표(단계별)					
		실적(누적)					

전담기관 등록·기탁 지표	기술인증		목표(단계별)				
			실적(누적)				
	학술성과	논문(SCI)	목표(단계별)	1	1	2	
			실적(누적)	1	3	4	
		논문(비SCI)	목표(단계별)	2	2	4	
			실적(누적)	2	4	6	
		논문평균 IF	목표(단계별)	2.5	2.5	2.5	5
			실적(누적)	3.95	3.99	3.98	
	학술발표	목표(단계별)	2	4	6	10	
		실적(누적)	4	19	23		
	교육지도		목표(단계별)				
			실적(누적)				
	인력양성		목표(단계별)	1	1	2	5
			실적(누적)	4	3	7	
	정책 활용·홍보	정책활용	목표(단계별)				
			실적(누적)				
		홍보전시	목표(단계별)				
			실적(누적)				
기타		목표(단계별)					
		실적(누적)					

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (21-23)	2단계 (23-24)	
1 사업화 매출액	원	20	미국	70%	60%		50백만원	
2 미생물 제품화	건	30	미국	70%	60%	-	1	
3 신규채 용	명	10	-	-	-	1	1	
4 학술발 표	건	20	미국	70%	60%	3	3	
5 논문	편	20	미국	60%	50%	3	3	

(2) 평가방법 및 평가환경

순번	평가항목 (성능지표)	평가방법	평가환경
1	수지증상 방제 기 술을 활용한 핵과 류 수지증상 발생 률 저감	농촌진흥청에서 고시한 시험작물 재배방법에 준함	공인기관 시험성적서
2	개발제품의 효과 에 대한 공인기 관 검정		
3	개발 제품의 안 전성 검증을 위 한 비해 평가		
4	개발 제품의 공 인인증등록	공공기관의 허가증 취득	
5	특허출원	특허 출원 및 등록증	
6	논문발간	편	
7	학술발표	학술 발표 6건 이상	

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비 SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Biocontrol of Peach Gummosis by <i>Bacillus velezensis</i> KTA01 and Its Antifungal Mechanism	Journal of Microbiology and Biotechnology	Tae-An Kang	2	대한민국	The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	SCIE	2023. 11.30	1738-8872	
2	Growth Increase in the Herbaceous Plant <i>Centella asiatica</i> by the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria <i>Priestia megaterium</i> HyangYak-01	Plants	Hyung Woo Jo, Kyeongmo Lim	13	Switzerland	MDPI	SCIE	2023. 06.21	2223-7747	
3	Use of Acyl-Homoserine Lactones Leads to Improved Growth of Ginseng Seedlings and Shifts in Soil Microbiome Structure	Agronomy	Jerald Conrad Ibal, Min-Kyu Park	11	Switzerland	MDPI	SCIE	2021.10.28	2073-4395	
4	Changes in Microbial Community Structure in Response to Gummosis in Peach Tree Bark	Plants	YoungJae Jo	11	Switzerland	MDPI	SCIE	2022. 10. 25	2223-7747	
5	Complete genome sequence of <i>Bacillus velezensis</i> 2F-NA isolation from the soil of a livestock farmhouse	Korean Journal of Microbiology	GyuDaee Lee	3	대한민국	The Microbiological Society of Korea	비SCIE	2023. 07.11	2383-9902	
6	Complete Genome Sequence of the <i>Enterobacter asburiae</i> IK3 Isolated from a Soybean (<i>Glycine max</i>) Rhizosphere	Microbiology and Biotechnology Letters	Sihyun Park	3	대한민국	The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	비SCIE	2023. 07.25	1598-642X	
7	Whole-Genome Sequence of <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> Strain A6, Isolated from the Rhizosphere of Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Microbiology Resource Announcements	Tino Bashizi	7	United States of America	American Society for Microbiology	비SCIE	2023. 06.26.	2576-098X	
8	Complete Genome Sequence of <i>Priestia megaterium</i> S1, Isolated from the Soybean Soil	Microbiology and Biotechnology Letters	YoungJae Jo	51	대한민국	The Korean Society for Microbiology and Biotechnology	비SCIE	2023. 07.25.	1598-642X	
9	Complete Genome Sequence of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KNU-28 Isolated from Peach Leaves (<i>Prunus Persica</i> [L.] Batsch)	Microbiology Resource Announcements	Min-Ji Kim	11	United States of America	American Society for Microbiology	비SCIE	2022. 11.19	2576-098X	
10	Complete genome sequence of <i>Bacillus inaquosorum</i> 1HC-NA assembled from the Oxford Nanopore sequencing data	Korean Journal of Microbiology	Min-Ji Kim	58	대한민국	The Microbiological Society of Korea	비SCIE	2022. 09. 30	2383-9902	

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국응용생명화학학회	박민규	2021.08.23	제주, 라마다 플라자	한국
2	한국응용생명화학학회	박태형	2022.06.27	대구, 호텔인터볼고	한국
3	한국미생물 생명공학회	박태형	2022.06.22	경주, HICO	한국
4	한국미생물학회	박태형	2022.10.30	제주, 제주국제컨벤션센터	한국
5	Congress of European Microbiologists	VINEET	2023.07.11	CCH - Congress Center Hamburg Hamburg, Germany	독일
6	Congress of European Microbiologists	손현우	2023.07.11	CCH - Congress Center Hamburg Hamburg, Germany	독일
7	American society for microbiology conference	김민지	2023.06.16	Houston, TX	미국
8	American society for microbiology conference	정다령	2023.06.18	Houston, TX	미국
9	American society for microbiology conference	이규대	2023.06.17	Houston, TX	미국
10	American society for microbiology conference	임경모	2023.06.16	Houston, TX	미국
11	American society for microbiology conference	정민수	2023.06.16	Houston, TX	미국
12	한국미생물 생명공학회	김완로	2023.06.21	경주, HICO	한국
13	한국미생물 생명공학회	조영재	2023.06.21	경주, HICO	한국
14	한국미생물 생명공학회	박태형	2023.06.22	경주, HICO	한국
15	한국미생물 생명공학회	박시현	2023.06.22	경주, HICO	한국
16	한국응용생명화학학회	조영재	2023.06.18	제주, 제주국제컨벤션센터	한국
17	한국응용생명화학학회	이도경	2023.06.18	제주, 제주국제컨벤션센터	한국
18	한국응용생명화학학회	Justina Klingate	2023.06.18	제주, 제주국제컨벤션센터	한국
19	한국응용생명화학학회	김완로	2023.06.18	제주, 제주국제컨벤션센터	한국
20	한국응용생명화학학회	이연경	2023.06.18	제주, 제주국제컨벤션센터	한국
21	한국응용생명화학학회	박시현	2023.06.18	제주, 제주국제컨벤션센터	한국
22	한국응용생명화학학회	손현우	2023.06.18	제주, 제주국제컨벤션센터	한국
23	한국응용생명화학학회	박태형	2023.06.18	제주, 제주국제컨벤션센터	한국

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Bacillus amyloliquefaciens KNU-28	KCTC 15061BP	KCTC	2022.08.25
2	Enterobacter asburiae IK3	KACC 92552P	KACC	2023.10.16

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	복숭아 수지증의 진행 억제와 복숭아 수지증 유발 식물 병원성 진균에 대한 항진균 활성 및 식물 생장 촉진능을 가지는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(Bacillus amyloliquefaciens) KNU-28 균주 및 이의 이용	한국	경북대학교 산학협력단	2023-04-20	10-2023-0051762					
2	엔테로박터 아스부리에 IK3 및 이의 용도	한국	경북대학교 산학협력단	2023.10.31	10-2023-0148450					

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
	√			√						

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관	인증일
1	수지제로	23.12.18/ 23.12.18	(주)대원화학	(주)대원화학	농업용자재 (복숭아 수지증상완화)	1년	경북 칠곡군청	23.12.18

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상	복숭아 수지증의 진행 억제와 복숭아 수지증 유발 식물 병원성 진균에 대한 항진균 활성 및 식물 생장 촉진능을 가지는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(Bacillus amyloliquefaciens) KNU-28 균주 및 이의 이용	(주)대원화학	2024.02.15	15백만원	15백만원

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
-	-	-	-	-	-

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	신제품 개발	국내	수지제로	농업용 자재로 복숭아 수지증상 완화	(주)대원화학	13,000		2023	

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
수지제로 골드	2023	13,000		13,000	
합계		13,000		13,000	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		1년		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1년		
	소요예산(천원)	50,000		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		13,200	200,000	400,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내		1	10	20
국외		0	0.2	1
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	본제품은 복숭아 수지증 완화에 효과가 있는 제품으로 이는 향후 수지증상이 있는 핵과류 전체에 응용 가능성이 있는 것으로 판단된다. 향후 핵과류(복숭아, 자두, 체리 등)의 수지증상을 완화 할 수 있는 제품으로 가능성을 향상하여 제품의 범용성을 높이는 형태로 개발할 계획이다.			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
		-	100,000	200,000
	수출	-	100,000	200,000

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1		(주) 대원화학	1	1	2
합계			1	1	2

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2022		4			3	1			4		
2		2023		3			2	1	1		2		

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 특허(지식재산권) 2건 출원	○ 23년도 2건의 특허출원 완료하였음	○ 100
○ 특허(지식재산권) 1건 등록	○ 출원된 2건의 특허가 등록 절차 중에 있음	○ 0
○ 기술실시(이전) 1건	○ 특허출원된 수지증 개선 균주 (주)대원화학에 24년 2월 16일부로 기술실시(이전) 완료하였음.	○ 100
○ 제품화 1건	○ 기술실시 이전 Material transfer agreement (MTA)를 체결하여 조기 사업화 및 제품화 실시하였음.	○ 100
○ 매출액 50백만원 달성	○ 23년도 매출액 13.2백만원 달성하였음.	○ 26
○ 고용창출	○ (주)대원화학에서 2명의 고용창출 완료하였음	○ 100
○ 학술성과 논문(SCI) 2편 투고	○ 3편의 SCI 논문 투고하였고 1편의 SCIE 논문 투고 완료하였음	○ 100
○ 학술성과 논문(비SCI) 4편 투고	○ 6편의 비SCI 논문 투고 완료하였음	○ 100
○ 투고 논문평균 IF 2.5 이상 달성	○ 4편의 논문(SCI, SCIE)이 평균 IF 3.98 달성 하였음	○ 100
○ 학술발표 6회 진행	○ 6회의 해외 학술발표와 23회의 국내 학술발표 진행하였음	○ 100
○ 연구인력 2명 양성	○ 7명의 석사졸업 연구인력 배출하였음	

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 복숭아 수지증 방제 미생물제제의 특허 등록 심사의 연기로 인해 연구개발년도 내에 등록하지 못하였음. 연구개발년도 종료 1차년도에 등록 심사 진행하여 특허등록 완료할 계획에 있음.
- 제품화 실시 초년도로 아직 판매 및 홍보채널 미활성화 되어 매출액 미달성 되었음. 미달성된 매출액만큼 연구개발년도 종료 5차년도 내 매출액을 증액하여 달성하도록 하겠음.

2) 자체 보완활동

- 균주 특허 등록을 위한 균주 특이적 프라이머 개발과 같은 세부 준비 작업을 완료하였고 24년 1건의 특허 등록심사를 통해 등록 하도록 하겠음.
- 절차상의 기술실시(이전)은 2월 15일에 진행되었지만 Material transfer agreement(MTA)를 통한 조기 사업화를 실시하였음. 이를 통해 복숭아 농가에 해당 미생물 제제 공급하였고 제제에 대한 제품평가 및 개선점 도출할 수 있었음. 또한, 시제품 생산 조건 수립하여 연구개발년도 종료 후 대량 생산 조건 확립하였음. 또한 비료등록 및 비해시험을 완료하였고 유기 농자재 등록 가능성 검토를 위한 급성경구독성시험, 급성경피독성시험 진행하여 사업화를 위한 준비활동을 하였음.

3) 연구개발 과정의 성실성

- 학술성과 논문(SCI) 게재 편수 2건 초과달성 하였음.
- 학술성과 논문(비SCI) 게재 편수 2건 초과달성 하였음.
- 학술발표 19회 초과달성 하였음.
- 연구인력 5명 초과달성 하였음.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명		기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술 기여도	
									산정 근거	비율
복숭아나무 수지증상 발생원인 구명 및 종합 방제시스템 개발	A-1	Plant Microbe interaction을 통한 복숭아 수지증의 발생원인 구명 및 식물·미생물 유래의 유용물질을 활용한 생물방제물질개발	경북대학교	대학 (비영리)	535	535	100	신규 기술개발	해당 없음	-
	A-2	복숭아 수지증의 친환경적 종합 방제 기술개발 및 포장시험	(주)대원 화학	중소기업 (영리)	240	180	75.00	신규 기술개발	①-①	75.00
계					775	715	-	-	-	-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

6-1) 국내외 시장 동향

(1) 국내외 시장규모 및 수출입 현황

○ 국내의 과수재배와 생물농약 시장규모

- 환경 보전과 식품 안전에 대한 소비자들의 관심이 증가함에 따라 친환경 농업의 규모가 점차 늘어나고 있음. 국내 친환경농산물 시장 규모는 2018년 20,599억원 규모였으며, 지속적으로 증가하여 2025년에 26,286억원에 달할 것으로 전망되고 있음. 이 중 유기농산물의 시장규모는 연평균 3.7%의 성장세를 보여주고 있으며 2025년에는 5,948억원에 이를 것으로 예측되며 무농약산물의 시장규모는 유기농산물보다 빠르게 증가하여 2025년에 20,338억원에 이를 것으로 전망되고 있음(표4)

표 4. 국내 인증단계별 친환경농산물 시장규모 및 전망

(단위 : 억원)

구분	2016	2017	2018	2019	2020	2025
유기농	4,291	4,211	4,428	4,645	4,862	5,948
무농약	12,255	15,576	16,171	16,766	17,362	20,338
전체	16,546	19,787	20,599	21,412	22,224	26,286

출처 : 한국농촌경제연구원

- 친환경 농산물에 대한 국민적 수요가 증대됨에 따라 미생물제제와 같은 친환경 농자제의 중요성 또한 증가하고 있음. 국내 생물비료 시장은 약 253억 원 규모로 예상되며 친환경 농업의 확산에 따라 생물비료 생산량은 지속적으로 증가할 것으로 예상됨(표5).

표 5. 국내 생물비료 시장 현황

시장규모(단위 : 억원)					성장률 CAGR(%)
2012	2013	2014	2015	2016	
240	253	267	281	297	5.5

CAGR(compound annual growth reate, 연평균성장률), 2013년 중소기업청 자료

- 그러나 소비자의 안전한 농산물에 대한 요구 증대, 정부의 저탄소녹색성장 정책의 핵심 분야인 친환경농업 육성 의지 강화, 친환경 농산물 학교급식 시행까지 확산될 경우 친환경 농산물 생산을 위해 반드시 수반되어야하는 유기농자재 산업도 함께 발전할 것으로 전망 됨.
- 국내에서 미생물농약과 생화학농약에 대한 연구는 1980년대부터 시작되어 1987년에는 인삼 뿌리썩음병 방제용 바이코나의 개발로 시작되었음. 본격적인 생물농약 연구개발은 1990년대 후반부터 이루어졌으며 한국화학연구원과 한국생명공학연구원, 농업과학기술원 등의 연구소, 경상대학교, 순천대학교, 서울대학교, (주)동부한농화학, (주)그린바이오텍, (주)비아이지, 고려바이오 등의 기업체에서 개별적으로 연구를 진행해오고 있음(표6).

표 6. 국내 미생물 농약 제조업체

기업명	품목명	비교
그린바이오텍	솔빛채, 탐시드	생물농약
동부하이텍	토박이, 엑스텐	
한국바이오케미칼	재노탄	
우진 B&G	플루오스타 APP	비료
(주)카프코	친환경칼라링	
중앙바이오텍	동물용의약품, 사료첨가제	사료첨가제
CTC바이오	동물약품/생리활성제	
바이엘	테프루벤주론 · 비티 수화제	생물농약
경농	비티쿠르스타키액상수화제	

○ 국외의 과수재배와 생물농약 시장규모

- 세계 유기농식품 산업은 식품 안전에 대한 요구가 증가함에 따라 재배면적 3,750만ha, 640억달러로 연 20% 성장 추세에 있음. 전체 경지면적 대비 호주 38%, EU 24%, 남미 20%, 아시아 9%, 북미 7% 순이며, 국가별 시장 규모는 EU 222, 미국 211, 중국 19.6억달러이며 이와 같이 각국이 경쟁적으로 유기농 육성 정책을 펼치고 있음(2014 FIBL-IFOAM).
- BCC Research에서 전 세계 미생물 제품 시장을 조사한 결과, 2012년 미생물 및 미생물제품 시장은 1,170억 달러 수준이며, 2018년에는 1,790억 달러로 연평균 성장률(CAGR)이 6%에 이를 전망으로 보임. 이 중에서 세계 미생물 비료 시장은 2011년 기준 12억 달러 수준이었으나, 연평균성장률이 4.5%인 것을 고려하면 2016년에는 약 15억 달러에 달할 것으로 전망하고 있음(표7)

표 7. 세계 생분비료 시장 규모

Segment	2010	2011	2016	CAGR(%)
Bacterial fertilizers	920	980	1,165	3.5
Fungal products	180	210	315	8.4
Total(단위:백만달러)	1,100	1,190	1,480	4.5

CAGR(compound annual growth reate, 연평균성장률)

○ **국내의 NGS 시장의 규모**

- 국내에는 마크로젠, 천랩, 테라젠이텍스, 인실리콘젠 외 다수의 기업이 유전체 서열분석을 위한 Pacbio 및 illumina 장비보유 및 분석을 실시하고 있음.
- 또한 글로벌 변화에 맞춰 시퀀싱 플랫폼을 적극적으로 도입하고 있으며, 다양한 분석기술 및 데이터 베이스 구축을 통한 유전체정보 확보에 많은 기여를 하고 있음.
- 국가적으로는 주요부처에서는 맞춤 의료의 기반을 갖추기 위한 R&D를 기획 중에 있으며, 보건복지부는 정밀의료 연구개발 추진위원회 (2016년 3월)를 구성하고 개인의 유전체 및 진료정보를 고려한 건강, 생활환경, 습관 정보에 기반을 둔 모바일 헬스케어가 통합된 맞춤형 예방,진단,치료 의료 서비스를 포함한 정밀의료 분야 연구 구상에 착수함.

○ **국외의 NGS 시장의 규모**

- 유전체 시장은 제품, 기술, 응용분야 및 지역별로 유전체 기술시장(핵산 추출 및 정제, 중합효소 연쇄반응, DNA 시퀀싱, DNA microarray 기술), 유전체 응용시장(신약개발, 진단, 학술연구, 농업 및 동물연구, 맞춤의학, 과학적 수사기법 및 해양생물학 등)을 포함함(표8).

표 8. 유전체 시장의 분류

제품군		기술별	응용분야	지역
장비	<ul style="list-style-type: none"> • 핵산 추출 및 정제 시스템 • 중합효소 연쇄반응 장치 • DNA 시퀀싱 • 차세대 염기서열 분석기 • DNA 마이크로 어레이 	핵산추출 및 정제	신약개발	북미
		중합효소 연쇄반응	진단	유럽
소비재	<ul style="list-style-type: none"> • 유전자 칩/탐침 • 시약 	중합효소 연쇄반응	진단	아시아 태평양
		DNA 시퀀싱	학술연구 농업 및 동물 연구	
서비스	<ul style="list-style-type: none"> • 염기서열 분석 서비스 • 마이크로 어레이 서비스 • 소프트웨어 	DNA 마이크로어레이	맞춤의학	아시아 태평양, 라틴아메리카 등

- 글로벌 NGS 시장규모는 2015년 40억 달러에서 2021년 120억 달러로 연평균 20 %의 빠른 성장 전망을 보이고 있으며, 이는 Moore’ s Law를 추월하여 2017년 이후에는 1,000 Tb당 더 저렴한 비용으로 고품질의 sequence를 제공받을 수 있을 것임.
- 최근 Illumina는 2017년 새로운 NGS 장비 노바식(NovaSeq) 출시와 함께 임상 분야의 수요 증가로 전년대비 15% 증가한 27.5억 달러(약 3조원)의 매출 기록.
- 매년 단계적으로 노바식의 시약 가격을 낮추되 지속적인 일루미나 매출이 증가하는 상황을 유지하면서 500달러, 300달러, 궁극적으로는 100달러까지 비용이 낮춰지게 될 것이라고 발표
- 차세대 유전체서열 해독기술(NGS) 관련 시장이 급속히 성장하고 있음
- 2014년 Illumina社의 Genome analyzer HiSeq X 10이 출시되면서 30억 염기쌍의 인간 유전체를 단 이틀 동안 1천 달러 이하의 비용으로 해독할 수 있게 되었음.
- NGS 기술이 등장한 이후 10년 만에 연 30억 달러의 시장 규모로 성장하게 되었음(2013년도

기준).

- 2020년도 NGS 관련 시장 규모는 48억 9200만 달러, 연평균 성장률(CAGR)은 20.7%로 추정됨(IQ41 Research & Consultancy).
- 기술 분야로 NGS 시장을 세분할 경우 현재 resequencing의 비중이 가장 크지만, 전체 유전체 분석(whole-genome sequencing)의 연평균 성장률은 25% 이상으로 급성장하고 있음.
- Short read 위주의 NGS가 대중화하면서 완성도가 낮은 초안 수준의 미생물 유전체 성과물이 지나치게 양산되는 문제가 있었으나, long read 기법이 출현하면서 활용성이 매우 높은 nearly finished genome 정보 생산의 새로운 기회가 열리고 있음.
- Long read를 생성하는 최신 NGS 기술이 등장함에 따라 미생물의 전장 유전체 해독에 새로운 전기가 마련되고 있음.
- 최근에는 Pacific Biosciences의 RS II나 Illumina의 TruSeq synthetic long read(舊 'Moleculo') 등 10 kb를 훨씬 상회하는 길이의 시퀀싱 read가 생산되고 있음.

(2) 국내외 주요 수요처 현황

- 국내 미생물농약 시장규모는 아래와 같은 근거를 바탕으로 약 1,200억 원으로 추정됨.
- 농산물 유통시장규모(약 33조원) x 친환경 농산물 비율(10%) x 농약제품 비율(4%)
- 화학농약 시장 규모(1조 2,000억원) x 미생물 제품 비율(10%)
- 국내에서 미생물농약과 생화학농약에 대한 연구는 1980년대부터 시작되어 1987년에는 인삼 뿌리썩음병 방제용 바이코나의 개발로 시작되었음. 본격적인 생물농약 연구개발은 1990년대 후반부터 이루어졌으며 한국화학연구원과 한국생명공학연구원, 농업과학기술원 등의 연구소, 경상대학교, 순천대학교, 서울대학교, (주)동부한농화학, (주)그린바이오텍, (주)비아이지, 고려바이오 등의 기업체에서 개별적으로 연구를 진행해오고 있음

(3) 국내외 경쟁기관 및 기술 현황

- 국내에는 마크로젠, 천랩, 테라젠이텍스, 인실리콘젠 외 다수의 기업이 유전체 서열분석을 위한 Pacbio 및 illumina 장비보유 및 분석을 실시하고 있음.
- 또한 글로벌 변화에 맞춰 시퀀싱 플랫폼을 적극적으로 도입하고 있으며, 다양한 분석기술 및 데이터 베이스 구축을 통한 유전체정보 확보에 많은 기여를 하고 있음.
- 국가적으로는 주요부처에서는 맞춤 의료의 기반을 갖추기 위한 R&D를 기획 중에 있으며, 보건복지부는 정밀의료 연구개발 추진위원회 (2016년 3월)를 구성하고 개인의 유전체 및 진료정보를 고려한 건강, 생활환경, 습관 정보에 기반을 둔 모바일 헬스케어가 통합된 맞춤형 예방,진단,치료 의료 서비스를 포함한 정밀의료 분야 연구 구상에 착수함.
- 세계 유기농식품 산업은 식품 안전에 대한 요구가 증가함에 따라 재배면적 3,750만ha, 640억 달러로 연 20% 성장 추세에 있음. 전체 경지면적 대비 호주 38%, EU 24%, 남미 20%, 아시아 9%, 북미 7% 순이며, 국가별 시장 규모는 EU 222, 미국 211, 중국 19.6억달러이며 이와 같이 각국이 경쟁적으로 유기농 육성 정책을 펼치고 있음(2014 FIBL-IFOAM).
- BCC Research에서 전 세계 미생물 제품 시장을 조사한 결과, 2012년 미생물 및 미생물제품 시장은 1,170억 달러 수준이며, 2018년에는 1,790억 달러로 연평균 성장률(CAGR)이 6%에 이를 전망으로 보임. 이 중에서 세계 미생물 비료 시장은 2011년 기준 12억 달러 수준이었으나, 연평균성장률이 4.5%인 것을 고려하면 2016년에는 약 15억 달러에 달할 것으로 전망하고 있음

6-2) 지식재산권, 표준화 및 인증기준 현황

- 현재 국내에 등록된 복숭아 수지증 관련 특허는 “천연 재료를 이용한 복숭아 수지증 처리액 및 그 제조 방법” 임(특허출원번호 : 10-2012-0102169). 이것은 복숭아발효액, 천일염, 천연당 발효액, 토착미생물을 배합하여 발효시킨 액체를 이용해 수지증 조절 영향을 줄 수 있는 것이나 특허의 구체성과 과학성이 결여된 것으로서 그 실체가 명확하지 않은 특허로 볼 수 있다.
- 현재까지 복숭아 수지증 방제를 위한 친환경 자재의 표준화는 이루어지지 않은 상황이며 교과서적으로 예방차원에서 상처에 수성페인트나 3% 티오파네이트메탈 도포제를 도포하여 병원균 감염을 차단하여 병발생을 억제하는 예방적인 방법을 권장하고 있으며 병 발생 후 이를 치료하는 것과 관련된 방법은 전무한 실정임.
- 해외에서는 유전체 시퀀싱, 유전체 조립, 유전체 주석화와 관련한 각종 지식재산권이 활발히 생산, 축적되고 있음.
- 유전체 분야의 기술이 바로 경제적 성공으로 이어지고 있어서 기업을 중심으로 한 연구개발 뿐만 아니라 대부분의 성공 기업들은 초기에 기술력만으로 창업, 성공하는 벤처기업 형태로 시작하였음.
- 현재에는 시퀀싱 뿐만 아니라 분석과 관련한 지적재산권이 축적되고 있으며, 동시에 유전체 결과물과 생물정보학 도구들의 open source 운동이 일어나고 있어 정부주도의 연구개발 산물을 공공재화 하려는 움직임이 있음.
- Ultra-low coverage genome sequencing and uses thereof US-0673753 (2017-08-10)
- Linear genome assembly from three dimensional genome structure US-0036649 (2017-06-08)
- High throughput method for identification and sequencing of unknown microbial and eukaryotic genomes from complex mixtures US-0033008 (2017-05-17)
- 미국의 Genbank, 일본의 국립유전학연구소 산하기관인 DDBJ, 유럽의 EMBL 등이 공동으로 생물의 DNA 염기서열 DB를 상호 교환, 운용하고 있으며, 대중에게 무료로 공개하고 있음. 관련 내용을 저널에 수록하기 위해서는 이들 3개 기관에서 표준화된 유전체를 점검, 인증, 처리 및 갱신하는 역할을 수행하고 있음.
- 유전자 시퀀싱 기술 자체는 해외 선진국에서 개발되어 선도하고 있으므로 국내의 이 분야 지식재산권 보유수는 많지 않으나 주로 생물정보학적 방법을 이용한 방법특허를 획득하는 경우가 생기고 있음.
- 게놈 시퀀싱 및 정렬을 위해 개체군 카운트 기능성을 제공하는 방법, 장치, 명령어 및 로직 10-1775294-0000 (2017-08-30)
- 차세대 시퀀싱 방법을 이용하여 생물체의 엽록체, 미토콘드리아 또는 핵 리보솜 DNA의 완전한 게놈 서열을 해독하는 방법 10-1447593-0000 (2014-09-29)
- 개인 전장 유전체의 유전변이정보를 이용한 질병원인 발굴 시스템 10-1693504- 0000 (2017-01-02)

6-3) 사업화 계획

(1) 사업화 전략 및 투자계획

구분		사업화 연도					
연도		(2023)년 (개발종료 해당년)	(2024)년 (개발종료 후 1년)	(2025)년 (개발종료 후 2년)	(2026)년 (개발종료 후 3년)	(2027)년 (개발종료 후 4년)	(2028)년 (개발종료 후 5년)
사업목표		제품 홍보 및 국내판매	제품광고 및 통하 인지도 상승	전국적인 시어 통하 제품내 시	내수정착 과 수출기 다지기	내수기 및 수출 다변 화 전략	판매 극 대 화 를 위 하 는 시 장 다 변 화
사업화 내용		- 시제품 통하 제 어 를 통 하 는 제 품 홍 보 활 용 하 는 제 품 홍 보	- 시제품 통하 제 어 를 통 하 는 제 품 홍 보 활 용 하 는 제 품 홍 보	- 지역 단 위 농 협 사 회 화 를 통 하 는 제 품 홍 보 활 용 하 는 제 품 홍 보	- 적용 장 비 확 대 를 위 하 는 제 품 홍 보 활 용 하 는 제 품 홍 보	- 내수 기 본 수 출 기 본 위 하 는 제 품 홍 보 활 용 하 는 제 품 홍 보	- 시장 성 숙 기 에 대 응 하 는 제 품 홍 보 활 용 하 는 제 품 홍 보
투자 계 획	인건비	-	100	200	300	400	500
	재료비 및 설비투자비	-	500	1,000	1,500	2,000	2,500
	경상운영비	-	100	300	500	700	900
	계	-	700	1,500	2,300	3,100	3,900
생산 계획		1,000L	2,000L	9,000L	9,000L	20,000L	35,000L
판매 계 획	매출 (백만원)	50	100	300	300	600	1,000
	수출 (만불)	-	-	-	10	30	50

(2) 생산 계획

구분	구분	단위	생산 능력	2024년	2025년	2026년	합계
시제품	시제품	L	3,000	2,000	-	-	2,000
완제품	양산계획	L	16,000	1,000	1,000	2,000	4,000
합계			19,000	3,000	1,000	2,000	6,000

(3) 해외시장 진출 계획

- 본 과제의 수행이 종료되는 시점 이후인 2024년도에 연구과제 결과물을 활용하여 KOTRA 등의 협조를 받아 해외 수출 특히 중국 시장 진출을 위한 업무 협조 요청 예정임
- 본 과제의 수행이 종료 시점 이후인 2023년도에 관련기술을 활용한 제품 양산을 위한 인력과 설비 확충을 시작할 것이며 현재 당사는 농협에 대부분의 매출을 창출하는 업체로 개발될 친환경 농자재의 판매와 납품에 이점이 있으며 금번에 개발될 제품은 이미 구축된 영업망인 농협과 유관조합 뿐만 아니라 친환경 농산물 생산자 단체에 제품에 대한 사전 영업을 통하여 사업성을 극대화 예정임.

(4) 사업화에 따른 기대효과

[고용 효과]

(주)대원화학은 최근 5년을 기준으로 보았을 때 2015년도부터 매년 1명 이상의 정규직 인력을 고용(2018년 제외)하였으며 2020년 코로나로 고용시장이 불안한 해에도 2명의 청년고용을 실시하여 고용안정화에 작으나마 기여한 바가 있다. 이를 근거로 향후에 매년 1명 이상의 정규직원의 고용이 가능할 것으로 사료됨

〈고용목표〉

기관명	창출내용	고용목표(명)						
		총 수행 기간	종료 1년차	종료 2년차	종료 3년차	종료 4년차	종료 5년차	합계
주)대원 화학	① 연구개발계획서 중 신규채용인력	1						1
	② 사업관련 신규채 용인력	1				1	1	3
	소계	2				1	1	4
합계		2				1	1	4

[산업생태계 활성화 효과]

- (주)대원화학은 농자재 생산 전문업체로서 발효액상비료 및 친환경농자재 생산을 하고 있는 기업으로 각 지역농협 품목(과수) 농협, 시판거래상과의 연계판매프로그램을 구축하고 있어 각 거래업체들과의 상생구조를 만들어갈 수 있을 것으로 판단된다. 또한 이를 바탕으로 시장다변화 및 제품인지도 상승을 꾀하여 그 파급효과를 더욱더 넓혀나갈 예정이다.
- 본 과제에서 개발될 미생물제제는 Order-Made방식의 판매방식을 부분적으로 도입하여 신뢰성과 재고부담을 해결하는 방식의 마케팅 전략을 수립하였으므로 각 유통주체와의 연계성을 강화하여 산업 생태계 활성화 효과를 예상함.
- 개발될 신제품은 새로운 원부자재를 경북 군위소재의 배지전문업체로부터 공급·유통채널을 확보하고 제품 디자인 및 사용방법에 따른 포장용기의 다양화에 지역업체의 제품을 적용함으로써 거래업체들과의 동반성장을 가능하게 할 것임.

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2024	2025	2026	2027	2028
국외논문	SCIE					
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내	1	1			
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발					
	상품출시					
	기술이전	1				
	매출액(단위 : 백만원)	100	150	200	300	500
	수출액(단위 : 백만원)			100	300	500
	기술료(단위 : 백만원)	18				
	고용창출				1	1

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 특허균주 기탁증
2.	1)
	2)

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 연구개발사업 복숭아 나무 수지증상 발생원인 구명 및 종합 방제시스템 개발 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원 전문기관)에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	321097-3		
사업구분	작물바이러스 및 병해충대응사업				
연구분야	LB 0401, LB 0304, LB 0303, RA 0303, RA 0304, RA0305		과제구분	단위	
사업명	방제기술개발			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	복숭아나무 수지증상 발생원인 구명 및 종합 방제시스템 개발		과제유형	개발	
연구개발기관	경북대학교		연구책임자	신재호	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021.04.01.~2021.12.31	195,000	20,000	215,000
	2차년도	2022.01.01.~2022.12.31	260,000	20,000	280,000
	3차년도	2023.01.01.~2023.12.31	260,000	20,000	280,000
	계		715,000	60,000	775,000
참여기업	(주)대원화학				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024.02.26

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경북대학교	교수	신재호

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 신 재 호

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약 

[별첨 1]

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

본 연구는 복숭아 수지증의 원인을 체계적으로 분석하고 친환경 방제 기술을 개발하여, 기존에 많이 연구되지 않은 분야인 복숭아 수지증의 병증을 완화하는 연구에서 가치를 가짐. 이는 전 세계적으로도 연구가 적은 만큼, 과학 및 농업 분야에 큰 기여를 할 것으로 예상됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

연구는 복숭아나무의 수지증 발생 원인 규명과 관련된 미생물 군집의 분석을 통해 새로운 지식을 제공함. 이는 복숭아를 비롯한 다른 과수류의 수지증 방제 연구에 기초 자료를 제공할 것이며, 머신러닝을 판별모델을 발전시켜 조기진단 모델로 활용이 기대됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

이 연구에서 개발한 길항 미생물은 복숭아 수지증 뿐만 아니라 다른 핵과류의 수지증상 방제에도 활용 가능할 것으로 보임. 이는 농가에서의 실질적인 문제 해결은 물론, 경제적 이익을 증대시킬 수 있는 기술로서 높은 활용가능성을 지님.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

본 연구의 성과이자 핵심기술인 친환경 미생물 제제를 Material transfer agreement(MTA)를 통해 (주)대원화학에서 조기 사업화를 진행하고, 현장 시험을 통해 실용성을 검증하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

본 연구팀은 계획된 목표를 초과 달성하여 SCI급 논문 2편 및 비SCI 논문 2편을 발표함. 평균 IF는 목표를 상회하는 3.98을 달성, 해외 및 국내 학술발표 34건을 통해 연구 성과를 적극적으로 공유하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허(지식재산권) 2건 출원	10	100	2건의 특허출원 완료하였음
특허(지식재산권) 1건 등록	10	0	출원된 2건의 특허가 특허등록 절차 중에 있음
제품화 1건	20	100	Material transfer agreement (MTA) 체결을 통해서 제품화 완료하였음
매출액 50백만원	20	26%	23년도 매출액 13.2백만원 달성하였음
고용창출 2명	20	100	(주)대원화학에서 2명의 고용창출 완료하였음
투고 논문평균 IF 2.5 이상 달성	5	100	4편의 논문(SCI, SCIE)이 평균 IF 3.98 달성 하였음
학술발표 6회 진행	10	100	6회의 해외 학술발표와 28회의 국내 학술발표 진행하였음
연구인력 2명 양성	5	100	7명의 석사졸업 연구인력 배출하였음
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 복숭아 수지증의 복합적인 원인을 규명하고, 이에 대한 친환경 방제 기술을 개발하는 데 중점을 두었음. 달성하지 못한 성과도 있으나 전반적인 연구의 진행과 결과는 매우 긍정적이라고 평가함. 특허 등록의 경우 현재의 특허청 소요기간으로 보아 연구개발기간 이후인 2024년 내로 무난히 달성될 것으로 보이며, 추가 특허 등록을 위한 균주 특이적 프라이머 개발을 완료하였음. (주)대원화학의 조기사업화를 통해 제품화 및 판매를 위한 비료 등록과 생산 준비도 이미 완료되었으며, 대원화학 자체 균주에 의한 예비 매출도 시작되었음 (13백만원). 본 연구과제에서 개발된 균주의 기술이전이 완료되면 연구개발기간 이후인 2024년 이내로 매출 목표 50백만원이 무난히 달성될 것으로 보임.

기술적으로는 수지증의 발생원인에 대해 NGS 기술과 머신러닝 모델을 적용하여 복숭아 수지증의 발생원인을 규명하는 새로운 방법론을 제시하였음. 식물과 미생물의 상호작용에 대한 기작과 복숭아 나무 내생 미생물 및 근권 미생물 군집에 대한 데이터는 이는 복숭아뿐만 아니라 다른 핵과류 수목의 병증에도 응용 가능한 귀중한 자료로 생각되며, 농업 분야의 지속 가능한 발전에 기여할 것으로 기대됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 연구개발계획에 따라 성실히 과제를 수행하였음. 당초 특허 등록과 매출액 목표 달성은 연구개발기간이 끝난 뒤에 추가 달성 실적으로 진행되었음. 따라서 본 과제기간의 종료 시점인 2024년 2월 29일에는 원래 과제 종료 시점에 계획되었던 성과로 평가해 주시기를 부탁드립니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구의 성과로 개발된 미생물 제제에 대한 지식재산권 확보를 위해 특허등록을 진행중이며 재산권 보호를 위한 프라이머세트 특허도 진행할 예정임.

(주)대원화학에서는 농협중앙회를 포함한 다양한 채널로 친환경 미생물 제제를 시장에 공급할 예정이며 타 핵과류 적용을 확대함으로써 앞으로의 활용이 기대됨.

(주)대원화학은 본 제품을 가지고 24년 농업박람회 참가, 공급 유통 채널 확보, 농협중앙회 공급, On/Off 홍보 활동을 통해서 제품에 대한 기술과 사례를 활발히 홍보하고 제품을 판매할 예정임.

본 연구의 성과는 복숭아 수지증의 예방 및 치료에 중요한 기여를 할 것으로 기대됨. 연구 결과를 통해 개발된 길항 미생물과 친환경 방제 기술은 복숭아 농가에 직접적인 이익을 제공하며, 수지증으로 인한 경제적 손실을 줄일 수 있는 효과적인 수단이 될 것으로 기대됨.

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	방제기술개발
연구과제명	복숭아나무 수지증상 발생원인 구명 및 종합 방제시스템 개발		
주관연구개발기관	경북대학교	주관연구책임자	신재호
연구개발비 (천원)	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타
	715,000	60,000	775,000
연구개발기간	2021.04 ~ 2023.12		
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)		

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 특허출원 2건	특허출원 2건 달성
② 특허등록 1건	미달성 (연구기간 후 달성 계획)
③ 사업화 1건	달성
④ 매출액 50백만원	매출액 13.2백만원 달성 (연구기간 후 달성 계획)
⑤ 고용창출 2명	고용창출 2명 달성
⑥ 논문평균 IF 2.5	SCI 4편, 비SCI 6편 게재하였고 평균 IF 3.98
⑦ 학술발표 6건	학술발표 23건으로 달성
⑧ 인력양성 2명	인력양성 2명 달성

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

<연구개발성과 목표>

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활동등)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
													SCI	비SCI						
단위	건	건	건	평균건수	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10				20	20		20					5	10	5				
최종목표	2	1				1	50		2			2	4	2.5	6	2				
1단계 (2021~2022)	1	0							1			2	2	3.95	4	4				
2단계 (2023)	1	0				1	13		1			2	4	3.99	19	3				
계	2	0				1	13		2			4	6	3.98	23	7				
달성률 (%)	100	0				100	26		100					100	100	100				

[별첨 2]

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	복숭아나무 수지증상 발생원인 구명
②	복숭아나무 수지증상 방제를 위한 친환경 미생물제제 개발 및 이의 활용

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책자료	기타
①의 기술		v						v		
②의 기술		v				v		v		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	마이크로바이옴 기반 머신러닝 판별모델 최초로 개발하였고 정확도의 조기진단 모델로의 개선될 것으로 예상.
②의 기술	해당 친환경 미생물 제제를 이용하여 복숭아를 포함한 핵과류의 수지증상을 해소할 수 있는지 포장시험을 지속적으로 실시하여 해당 핵심기술을 적용성을 확대하고자 함.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문 SCI	비SCI			논문 평균 I-F	학술 발표		정책 활용
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건	명	건	건		
가중치	10	10					20	20		20				5	10		5			
최종목표	2	1					1	50		2				2	4	2.5	6		2	
연구기간내 달성실적	2	0								2				4	6	3.9	23		2	
연구종료후 성과창출 계획		1			1	18	1	1,250	900	2							2			

[별첨 2]

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	복숭아나무 수지증상 방제를 위한 친환경 미생물제제 개발 및 이의 활용		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	1,500천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	-	실용화예상시기 ³⁾	2024.03.01
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	-		

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리

통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)


BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO: **Kyungpook National University**
Kyungpook National University
80 Daehak-ro, Buk-gu, Daegu
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KNU-28	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 15061BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on August 25, 2022 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 181, Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  KIM, Song-Gun, Director Date: August 25, 2022

Form EP/4 (KCTC Form 17)

no page



특허미생물 수탁증

2023년 10월 16일

경북대학교 산학협력단 귀중

KACC는 2023년 09월 13일 제P23-096호로 귀하가 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 수탁번호를 통지합니다.

- 다 음 -

1. 미생물의 명칭 : *Enterobacter asburiae* IK3
2. 미생물 수탁 번호 : KACC 92552P

국립농업과학원장

