

발간등록번호

11-1541000-001438-01

**Metagenome/천연물 기반
복합재해저항성 유도 작물보호제 개발**
(Development of defense triggers derived
from natural product and metagenome
against biotic and abiotic stresses)

한국생명공학연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Metagenome/천연물 기반 복합재해저항성 유도 작물보호제 개발” 과제의
보고서로 제출합니다.

2011 년 04 월 09 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 류 충 민

세부연구책임자 : 류 충 민

연 구 원 : 박 효 비

연 구 원 : 이 수 현

연 구 원 : 이 보 영

협동연구기관명 : POSTECH

협동연구책임자 : 황 일 두

협동연구기관명 : (주) 현 농

협동연구책임자 : 김 철 홍

요 약 문

I. 제목

Metagenome/천연물 기반 복합재해저항성 유도 작물보호제 개발

II. 연구개발의 목표 및 필요성

1. 목표

- Metagenome 유래 small peptide 식물병저항성 증진제 선발 및 실용화
- 미생물/식물 천연물 बैं크로 부터 식물병저항성 유도물질 분리 및 실용화
- 선발 물질의 복합재해에 대한 저항성 formulation 및 실용화

2. 필요성

1) 환경이 급격하게 변화하고 있어 다양한 환경스트레스에 대한 저항성 유도가 작물생산성 향상에 큰 관건이 되고 있어 한 번의 처리로 식물 병에 대한 저항성뿐만 아니라 환경재해저항성도 동시에 극복할 수 있는 복합재해저항성 유도 농업소재가 큰 관심을 받고 있음.

2) 병저항성의 유도는 전 세계적으로 제 3세대 농약으로 많은 관심이 집중되는 분야이지만 아직 전 세계적으로 BION을 제외하면 약제가 개발되어 있지 않고 BION도 작물에 처리 시 작물이 왜소해 지는 단점을 극복하지 못하여 전 세계적으로 시장을 확보하지 못하고 있다. 특히, BION의 active ingredient인 BTH는 생태학적인 접근으로 그 왜소화 현상을 "allocation fitness cost"라는 현상으로 설명이 가능한데, 이 현상은 일반적인 포장상태에서 항상 식물은 그 재원이 한정되어 있어 병저항성을 발현 시켰을때 생장에 사용해야 하는 에너지를 병저항성에 사용하기에 식물이 왜소하게 된다는 것을 밝혔다. 이러한 "allocation fitness cost"현상을 극복하기 위해서는 식물체내에서 항상 유도저항성을 발현하는 것이 아니라 병원균의 침입시에만 병저항성을 발현하는 효과적인 에너지 사용이 요구되는데 이러한 현상이 최근 들어 밝혀지면서 BION과 같은 유도저항성 약제들의 단점을 극복하려는 시도들이 이루어지고 있다. 이러한 병원균 침입시에만 저항성이 유도되는 현상을 "priming"이라고 하는데 식물의 memory 기능으로 볼 수 있다.

3) 미생물 유래의 small peptide에 의한 식물의 병저항성 유도는 최근 들어 많은 연구가 진행되고 있다. 대표적인 예로 그람음성 세균의 flagella의 22개에 peptide로 구성된 flg22는 식물의 다양한 병 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있고, 곰팡이의 effector인 AVR2와 AVR4는 대표적인 유도저항성 peptide로 알려져 있음.

4) 또한 최근 들어 식물에서 기계적 스트레스나 병충해를 입은 식물에서 분비되는 휘발성 유기물(volatile organic compounds; VOC)이 해를 입지 않은 주변 식물에서 priming 반응을 일

으킴으로서 주변 식물의 병저항성이 증가시키는 현상이 보고되어 있다. VOC에 의한 priming 효과는 동종의 식물 간에서 뿐 아니라 이종 간에서도 일어날 수 있다 (Kessler A et al. 2006). 또한 세균의 VOC가 식물의 광범위한 *Erwinia carotovora*와 내염성의 증가와 식물의 생장 촉진을 유도하는 결과를 본 연구팀이 2003년도에 세계 최초로 보고 하였음.

5) 따라서 본 연구팀이 확보하고 있는 자생 식물 추출 천연물이 모델 식물인 담배/애기장대에 high-throughput 스크린을 통하여 식물 병뿐만 아니라 환경재해 저항성 등에 대한 복합재해 저항성을 유도할 수 있는 물질을 선발, formulation을 통하여 포장 적용기술을 확립하고 특히 유도저항성시 문제시 되었던 식물의 왜소화 없이 이러한 저항성유도를 일으킬 수 있는 priming 현상의 근본적인 이해를 통하여 그 적용 범위를 확대시킬 수 있는 기반 마련

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 환경생물자원인 metagenome으로부터 식물의 생장의 변화 없이 전신획득저항성을 유도하는 물질의 선발/실용화 연구 및 RNAi기반 저항성 기전 연구
2. KRIBB내의 식물 천연물뱅크로부터 유도저항성의 마커 유전자가 표지된 담배 (*PRI::Luc*)를 대상으로 이미 set-up된 high-throughput 스크린을 통하여 병해 저항성 천연물 동정 및 순수 분리; 천연물에 의한 유도저항성시 발현되는 priming 기전연구.
3. 기 선발된 metagenome유래 대사산물과 미생물/식물 천연물뱅크로부터 선발된 식물병저항성 유도물질을 대상으로 다양한 복합재해에 대한 저항성 연구 및 포장 검정

IV. 연구개발결과

1. 자연 상태에서 유전자를 직접 채취하여 Fosmid cloning을 통하여 *E. coli*에 발현 시키고 이를 식물 유도저항성 indicator 유전자인 PR-1a::GUS/ PDF1.2::GUS 형질 전환 식물체를 이용하여 대량스크린을 통하여 유전자 및 물질을 분리함.
2. 분리된 물질의 온실 검정을 실시하고 선발된 물질의 포장실험을 실시함.
3. 선발된 유도저항성 clone을 대상으로 대량배양 조건과 QC 조건 탐색 및 응용.
4. Microarray와 proteomics를 이용한 metagenome에 의한 식물의 fitness cost/priming관련 유전자 및 단백질의 대량 분리 및 특성화.
5. 천연물뱅크로부터 확보된 1455종의 자생식물 추출물을 대상, 애기장대의 *Erwinia carotovora*에 대한 유도저항성 형성 여부 및 JIN1, PAL1의 발현 증가 여부를 확인함으로써 9종의 유도저항성 증진 천연물 동정 .
6. 천연물뱅크로부터 확보된 400종의 생약 추출물을 대상, 애기장대의 *E. carotovora*에 대한 유도저항성 형성 여부 및 JIN1, PR1의 발현 증가 여부를 확인함으로써 11종의 유도저항성 증진 생약 성분 동정.
7. 총 11개의 애기장대 chromatin remodeling factor knockout에 대한 BABA에 의한 유도저항성 조절 여부 확인 결과 DDM1이 유도저항성을 억제하는 기능을 하고 있음을 확인
8. microarray를 통하여 유도저항성 형성 과정에서 중요한 역할을 할 수 있는 DDM1의 목표 유전자 동정.
9. 선발 fosmid clone과 선발 천연 추출물의 병저항성 유도 능력 검정을 담배 무름병과 고추 흰가루병에 대해 검증함.

10. 선발 fosmid clone과 선발 천연 추출물의 가뭄에 대한 저항성 유도 능력에 대하여 검증함.
11. 2차 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 병저항성 유도 능력 검정을 벼의 도열병과 키다리병 및 고추의 흰가루병에 대해 검증하였으며, 가뭄에 대한 저항성 유도 능력에 대하여 검증함.
12. 최종 fosmid clone 6D2와 그로부터 선발된 단일 clone pcc1fos-epi300을 선발하였으며 이들의 능력을 확인하기 위하여 고추 탄저병을 대상으로 포장 검정함.
13. 최종 선발 clone의 배양 배지를 제작하고 최적 배양 조건을 제시함.
14. 최종 선발 clone과 천연 추출물에 대하여 다양한 시제품을 제작함.
15. 최종 개발된 시제품의 병방제 효과를 검정하기 위하여 벼 도열병을 대상으로 농가 포장 검정을 실시함.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 유도 저항성에 관련한 유전자 조사

유도저항성을 일으키는 균주들은 보고되어져 있지만, 균주들내에 무엇이 유도저항성을 일으키는지에 대한 보고는 거의 알려져 있지 않다. 자연계 내에 존재하는 유전자들을 유도저항성이 보고되지 않은 대장균에 도입하여 단일 유전자 혹은 유전자 클러스터로부터 유도저항성을 유발하는 요인을 확인한다면 유도저항성 기작규명에 도움을 줄 것으로 생각된다.

2. 유도저항성 기작 규명 연구에 있어서의 활용 계획

현재 histone modification 과 같은 후생유전학적 유전자 발현 조절 기작이 식물의 유도저항성에 관련되고 있다는 내용이 학계에 보고되고 있다. 그러나 DNA 메틸화와 같은 다른 후생유전학적 조절 기작의 유도저항성 형성 과정에서의 역할은 전혀 보고된 바가 없다. 본 연구팀은 DDM1과 같이 DNA 메틸화를 조절하는 chromatin remodeling factor 가 식물의 유도저항성을 조절한다는 것을 최초로 확인하였으므로, 이를 관련 학회지에 보고함으로써 유도저항성의 후생유전학적 조절 기작의 규명 연구에 선도적인 역할을 할 것이다. 또한 DDM1의 목표유전자로써 발굴된 새로운 유전자에 대한 유도저항성 형성과정에서의 기능 분석을 통하여 유도저항성이 증진된 작물 개발에 필요한 새로운 유전자원을 확보할 것이다.

3. 새로운 형태의 미생물 제제의 개발 가능성

현재 국내 농업에서 사용되고 있는 미생물 제제의 경우는 단순한 토양 근권 미생물을 배양하여 토양에 살포함으로써 얻어지는 항균활성 능력 및 식물 생육 촉진 등의 효과를 기대하는 수준이었다. 본 연구를 통하여 얻어진 형질전환체는 배양이 쉽고 빠른 *E.coli*내에 형질 전파되어 있어 저항성 유도 능력에 관련된 물질의 대량 확보에 용이하며 향후 국내 농업에서 형질전환체의 사용이 법률적으로 허락 된다면 새로운 형태의 미생물 농약이나 혹은 생화학 농약으로 개발될 가능성이 높을 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title: Induction of systemic resistance against biotic and abiotic stresses by metagenome and plant extract

II. Research objectives

- Commercialization of small-peptide derived from metagenome
- Screening of microbial and plant extract for eliciting plant systemic defenses
- Formulation and field application of the selected microbial and plant extracts

III. Research contents and spectrum

1. Screening and commercialization of metagenome to elicit induction of systemic resistance without plant growth alteration
2. Screening plant extracts obtained from KRIBB plant extract bank to induce systemic resistance using by *PR1::Luc* transgenic plant and mechanism study during elicitation of induced systemic resistance
3. Field application and commercialization approach by the selected metagenome and plant extract

IV. Results

1. Screening metagenome in *E. coli* using by promoter fusion PR-1a::GUS/ PDF1.2::GUS
2. Greenhouse and field trials with selected metagenome
3. Optimization and quality control of the selected metagenome clone for large scale production and further characterization
4. Mechanism study by microarray and proteomics during elicitation of induced systemic resistance by metagenome
5. Pre-selection of 9 plant extracts to be showed ISR in *Arabidopsis* against *Erwinia carotovora* out of 1455 plant extracts
6. Understanding on chromatin remodeling during elicitation of ISR induced by BABA
7. Isolation and characterization of DDM1 gene related to chromatin remodeling
8. Assessment of ISR capacity against soft rot and powdery mildew and of induced systemic tolerance against drought and salt stresses under greenhouse and field trials
9. Large-scale production and optimization for formulation and commercialization

V. Research application

1. Genetic study of metagenome for further application
2. New finding on histone modification as a means for post-transcriptional regulation during ISR
3. New biological control protocol using by metagenome and plant extract

CONTENTS

Chapter I Project introduction	-----8
Chapter II Current status of technology trends	-----17
Chapter III Results	-----20
Chapter IV Future perspectives	-----122
Chapter V Achievement and application	-----125
Chapter VI New information collected from abroad	-----126
Chapter VII References	-----127

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	-----8
제 2 장	국내외 기술개발 현황	-----17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	-----20
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	-----122
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	-----125
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	-----126
제 7 장	참고문헌	-----127

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구 개발의 필요성

1) 기후변화와 농업작부체계의 변화에 따른 새로운 병해충의 출현에 의해 새로운 병방제 시스템의 확보가 필요하며 한 번의 처리로 다양한 병해로부터 식물을 보호하려는 노력이 필요하며, 특히 최근 들어 환경이 급격하게 변화하고 있어 다양한 환경스트레스에 대한 저항성 유도가 작물생산성 향상에 큰 관건이 되고 있어 한 번의 처리로 식물병에 대한 저항성뿐만 아니라 환경재해저항성도 동시에 극복할 수 있는 복합재해저항성 유도 농업소재가 큰 관심을 받고 있음.

2) 병저항성의 유도는 전세계적으로 제 3세대 농약으로 많은 관심이 집중되는 분야이지만 아직 전 세계적으로 BION을 제외하면 약제가 개발되어 있지 않고 BION도 작물에 처리시 작물이 왜소해 지는 단점을 극복하지 못하여 전세계적으로 시장을 확보하지 못하고 있다. 특히, BION의 active ingredient인 BTH는 생태학적인 접근으로 그 왜소화 현상을 "allocation fitness cost"라는 현상으로 설명이 가능한데, 이 현상은 일반적인 포장상태에서 항상 식물은 그 재원이 한정되어 있어 병저항성을 발현 시켰을때 생장에 사용해야 하는 에너지를 병저항성에 사용하기에 식물이 왜소하게 된다는 것을 밝혔다. 이러한 "allocation fitness cost"현상을 극복하기 위해서는 식물체내에서 항상 유도저항성을 발현하는 것이 아니라 병원균의 침입 시에만 병저항성을 발현하는 효과적인 에너지 사용이 요구되는데 이러한 현상이 최근 들어 밝혀지면서 BION과 같은 유도저항성 약제들의 단점을 극복하려는 시도들이 이루어지고 있다. 이러한 병원균 침입 시에만 저항성이 유도되는 현상을 "priming"이라고 하는데 식물의 memory기능으로 볼 수 있다.

3) 미생물 유래의 small peptide에 의한 식물의 병저항성 유도는 최근 들어 많은 연구가 진행 되고 있다. 대표적인 예로 그람음성 세균의 flagella의 22개에 peptide로 구성된 flg22는 식물의 다양한 병 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있고, 곰팡이의 effector인 AVR2와 AVR4는 대표적인 유도저항성 peptide로 알려져 있음.

4) 또한 최근 들어 식물에서 기계적 스트레스나 병충해를 입은 식물에서 분비되는 휘발성 유기물(volatile organic compounds; VOC)이 해를 입지 않은 주변 식물에서 priming 반응을 일으킴으로서 주변 식물의 병저항성이 증가시키는 현상이 보고되어 있다. VOC에 의한 priming 효과는 동종의 식물 간에서 뿐 아니라 이종 간에서도 일어날 수 있다 (Kessler A et al. 2006). 또한 세균의 VOC가 식물의 광범위한 *Erwinia carotovora*와 내염성의 증가와 식물의 생장 촉진을 유도하는 결과를 본 연구팀이 2003년도에 세계 최초로 보고 하였음.

5) 따라서 본 연구팀이 확보하고 있는 자생 식물 추출 천연물이 모델 식물인 담배/애기장대에서 high-throughput 스크린을 통하여 식물병 뿐만 아니라 환경재해 저항성등에 대한 복합재해 저항성을 유도할 수 있는 물질을 선발, formulation을 통하여 포장 적용기술을 확립하고

특히 유도저항성시 문제시 되었던 식물의 왜소화 없이 이러한 저항성유도를 일으킬 수 있는 priming 현상의 근본적인 이해를 통하여 그 적용 범위를 확대시킬 수 있는 기반 마련

제 2 절. 연구개발의 목표

1. Metagenome 유래 small peptide 식물병저항성 증진제 선발 및 실용화
2. 미생물/식물 천연물 बैं크로 부터 식물병저항성 유도물질 분리 및 실용화
3. 선발 물질의 복합재해에 대한 저항성 formulation 및 실용화
4. 기 확보된 미생물유래 식물유도저항성 증진물질에 의한 포장실험 실시 후 시제품화

제 3절. 연구 내용

1. Metagenome기반 대사산물 식물보호제 선발 및 실용화

가. Metagenome 유래 병저항성유도 식물보호제 선발

기 선발된 세균의 휘발성 물질에 대한 온실 및 포장 실험과 함께 환경유전체로부터 선발된 식물의 복합재해저항성 유도물질을 선발함: 미생물프런티어사업단에서 기 보유중인 metagenome library는 국내 다양한 지역에서 추출한 유전자를 직접 채취하여 fosmid cloning을 통하여 *E. coli*에 발현시킨 pool형태로, 각 풀당 200 - 300개의 metagenome을 함유하고 있어 일단 이들을 LB broth에서 배양시킨 후 유도저항성의 마커유전자인 *PR1a*에 GUS가 fusion되어 있는 담배에 infiltration한 후 시기별로 GUS staining을 실시하여 접종일과 systemic 일에 병저항성 유무를 확인함. 실제 병저항성 반응의 유무를 알기위해 담배에 병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*를 10^4 CFU/ml를 주사기를 이용 일에 주입 후 병진전 정도를 관찰하여, 병저항성을 유도하는 pool을 선발하고 각 pool에 포함된 *E. coli*를 개별 선별하여 각각 상기와 동일한 방법으로 metagenome을 선별 후 화학적 방법에 의해 LC/MS와 GC/MS를 이용하여 해당 물질을 분리, 동정함. 이 모든 실험은 유리온실 조건에서 실시함. 실험 실시 중 작물의 생장을 줄기 길이로 측정하여 작물의 왜소화 없이 식물의 병저항성을 유도하는 metagenome 또는 이들의 대사산물을 최종 선발함.

나. Allocation fitness cost와 priming 기전연구

기 선발된 식물의 왜소화 없이 저항성유도가 가능한 metagenome 및 이들의 대사산물을 대상으로 allocation fitness cost의 기전을 연구함. 최근 식물의 병저항성과 생장에 궁극적인 작용을 한다고 알려진 RNA interference (RNAi)에 대한 식물병 저항성 및 환경저항성에 대한 역할을 먼저 애기장대에서 RNAi pathway의 중요한 단백질인 ago1, dcl1-4와 rdr1-4의 각각의 돌연변이체에 대해 선발 물질의 처리후 allocation fitness cost와 priming 현상을 관찰함. 특히 priming 유전자의 대량 발굴을 위해 선발 물질 처리 1주일후 애기장대의 병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*를 일에 접종 후 30분, 1, 2, 4, 6, 12시간후에 잎을 채취하여 PR1을 대상으로 RT-PCR을 실시하고 가장 극적인 변화를 보이는 시간을 대상으로 microarray를 실시함. 이러한 microarray와 함께 같은 시간에 solexa를 이용하여 smallRNA을

대량 선별하고 그 target 유전자를 생물정보학을 이용하여 선별하고 이를 생물학적으로 애기장대 돌연변이체와 q-RT-PCR을 이용하여 증명함.

2. 식물/미생물 천연물로부터 식물전신저항성 증진제 선별 및 기전연구

가. 천연물유래 물질로부터 유도저항성물질 선별

유도저항성의 마커유전자를 쉽게 선별할 수 있는 *PR1::LUCIFERASE* 를 도입한 애기장대를 이용 priming을 통한 유도저항성 반응을 일으키는 천연물의 검색: KRIBB내에서 보유하고 있는 국내에서 선별된 다수의 자생식물 및 미생물 유래에서 추출된 천연물 बैं크의 확보. *PR1*의 발현은 식물의 전신획득저항성 (systemic acquired resistance, SAR)의 정도와 비례하여 식물의 병저항성을 직접적으로 관찰 할 수 있는 척도로 사용될 수 있음. 본 연구팀에서는 *PR1* 유전자의 promoter 활성도를 정량적으로 측정할 수 있도록 *PR1* promoter에 의하여 형광 단백질인 luciferase (LUC)의 발현이 조절되는 *pPR1::LUC* 보고자 유전자를 가진 애기장대 형질전환체를 확보 하고 있음 (그림 1-1).

본 연구팀에서는 이미 *Pseudomonas syringae pv.tomato* DC3000 에 의한 *PR1* 유전자 발현을 크게 증가시키는 천연물 1종을 확보하였다. 특히 본 연구팀은 애기장대에서 이 천연물의 함량이 변화된 형질 전환체를 확보하였고, 천연물의 함량이 높아질 경우 균류인 *A. brassicicola*에 대한 저항성이 증가하고 함량이 감소할 경우 저항성이 떨어지는 것을 확인하였다.

또한 이 천연물은 애기장대의 성장에는 전혀 영향을 주지 않았다 (그림 1-2). 이렇게 최종 선별된 천연물을 대상으로 HPLC/MS, GC-MS와 같은 분석 기법을 통하여 성분을 분석 한 후 priming을 유도하는 성분을 순수하게 분리·정제하여 천연물 유래 유도저항성물질을 선별할 것이다.

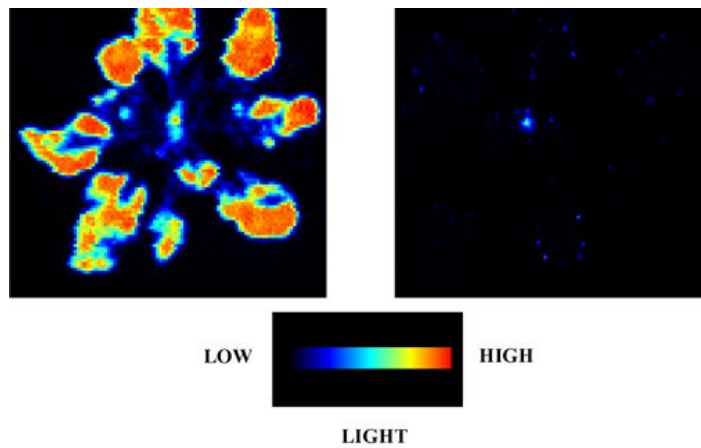
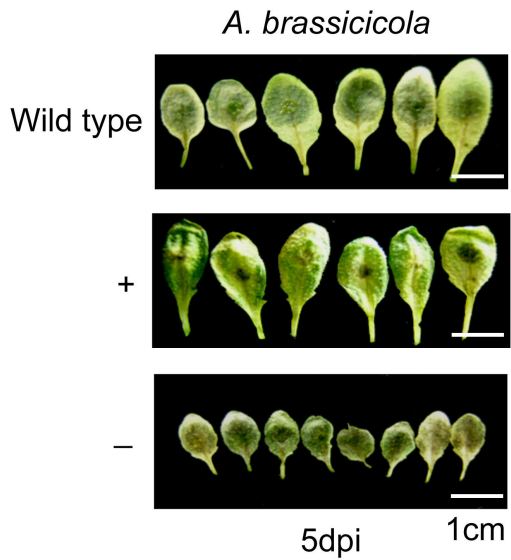
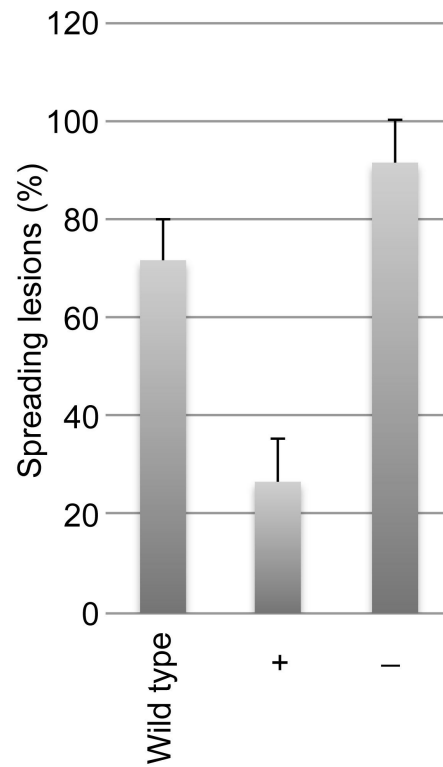


그림 1-1. pPR1::LUC 형질전환체. (왼쪽) *adr1* 돌연변이체에서의 pPR1::LUC의 발현 (오른쪽) 정상 성장조건에서의 pPR1::LUC의 발현 (Tani H et al. 2004)

A



B



C

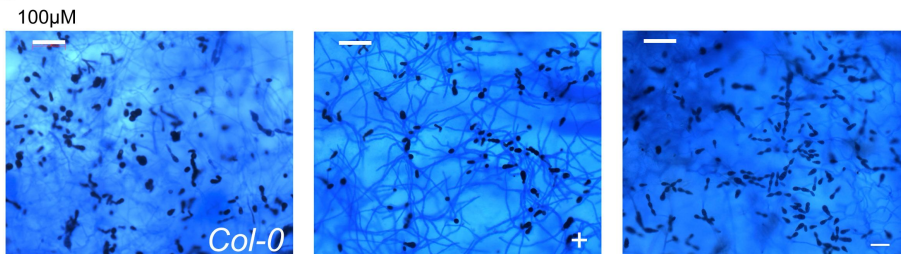


그림 1-2. 천연물에 의한 애기장대에서의 *A. brassicicola*에 대한 저항성 증가. 천연물의 함량이 증가 되었을때(+)는 병증의 정도 (A) 및 포자의 증식 (B, C)이 크게 감소되고, 천연물의 함량이 감소 되었을때(-)는 반대의 현상이 나타나는것을 확인 할 수 있다.

나. Priming 현상 기전의 이해

식물의 생장의 차이 없이 저항성을 유도할 수 있는 priming현상의 기전 연구를 chromatin remodeling 측면에서 접근하여 효과적인 유도저항성 증진제의 개발. 천연물에 의한 priming은 직접적으로 유전자의 발현에 영향을 주지 않으면서도 그 효과가 기억되어 재해를 입었을 때 유도저항성 반응을 활성화하기 때문에 기존에 잘 알려진 병저항성 관련 신호 전달 체계 및 전사 조절 인자에 의하여 조절되지 않을 가능성이 높으나, 현재까지 priming을 일으키는 요인이 무엇인지에 대해서는 알려진 바가 거의 없음. 최근 유일하게 SWI/SNF class ATP-dependent chromatin remodeling complex인 SPLAYED (SYD)가 애기장대의 jasmonic acid에 의한 병저항성 반응에 중요한 역할을 한다는 것이 알려짐. 이에 본 실험실은 총 12개의 SWI/SNF chromatin remodeling 유전자가 존재한다고 알려진 애기장대를 대상으로 T-DNA insertion knockout 돌연변이체 26개 라인을 확보 중에 있다. 이들 knockout 돌연변이체에서의 천연물에 의한 priming 반응의 변화를 확인하고 병저항성 관련 유전자의 promoter에 chromatin remodeling complex의 존재 여부를 chromatin immunoprecipitation (ChIP)을 통하여 확인함으로써 chromatin remodeling에 의한 priming 조절 기작을 규명할 것임. 이를 통하여 생장의 영향을 최소화 하면서 병원균의 감염시에는 병저항성을 발현 할 수 있는 시스템 구비 할 수 있음.

3. 선발 물질의 복합저항성 유도물질 포장 적용실험 및 실용화

가. 포장실험을 통한 복합내재저항성 metagenome/천연물 선발

1차년도에는 제 1 세부과제에서 선발된 세균 휘발성물질의 포장 실험 및 최적화를 통한 농가 적용 실험 실시; 2차년도부터 1 세부와 1 협동에서 선발된 metagenome/천연물에 대한 온실 검정 및 포장 실증 실험 실시:

(1) 식물 병원균에 대한 유도 저항성 검정: 벼와 고추를 유묘기까지 성장시킨 후 선발된 저항성 유도 물질을 적정 농도로 뿌리 및 경엽 처리 한다. 벼의 경우는 못자리 검정을 통하여 도열병을 일으키는 *Pyricularia oryzae*에 대한 저항성 유도 능력을 검정하고 흰잎마름병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*를 가위접종하여 세균성 병에 대한 저항성 발현 유무를 조사한다. 고추의 경우는 세균성 무름병을 일으키는 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*와 청고병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*를 접종하여 무름증상 및 시들음 증상의 방제 효과를 조사하며 고추에 탄저병균을 접종하여 역병 발생 억제 효과를 조사한다. 바이러스 방제 효과는 고추에 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 접종하여 바이러스에 의한 병반 생성 유무 및 병 진전 상태를 조사하고 유도 저항성 효과를 검정한다.

(2) 가뭄/고온/저온에 대한 유도저항성 검정: 고추를 상기와 같이 준비하여 물질을 뿌리 및 경엽 처리 한 후 가뭄 스트레스를 주어 무처리구의 식물체가 회복 되지 않은 수준에서 전체 처리구의 회복률을 조사하고, 동시에 동일한 잎의 RWC (Relative water contents) 값을 조사하여 가뭄에 대한 저항성 능력을 지표화함. 엽록소 형광 분석장치를 이용하여 각 처리구별 잎에 함유하고 있는 수분의 함유량을 수치화 함. 고온 처리를 위해 growth chamber의 온도를 45℃로 6시간 유지한 후 상온에서 회복하는 식물의 수를 상기와 같이 조사함. 저온 처리시에는 4℃, 초저온 처리시에는 -20℃로 처리 후 상온으로 옮기고 식물의 회복 상태를 조사함.

나. 식물 약해 검정

선발된 물질의 식물약해 검정: 고추 종자에 선발된 물질을 각 농도별로 처리하여 종자의 발아력에 미치는 영향을 조사하고 초기 고추 유묘의 생육상태를 점검한다. 향후 물질에 의한 고추의 생육 상태를 조사하기 위하여 생육 중기에 생체중과 건물중 및 고추의 초장과 경경등을 조사하고 최종 수확량을 조사하여 전체적인 약해 발생 유무를 검정한다.

다. 시제품 제작

효과적인 첨가제와 부가제 개발: 농가에서 수확 후 나오는 부산물이나 가공 산업에서 발생하는 산업 부산물을 효과적인 증진제 및 첨가제를 개발하여 시제품 개발에 적용한다. 또한 다양한 전착제와 침투이행제를 적용하여 저항성 유도 물질의 효과적인 적용에 도움이 될 수 있는 제형을 완성한다.

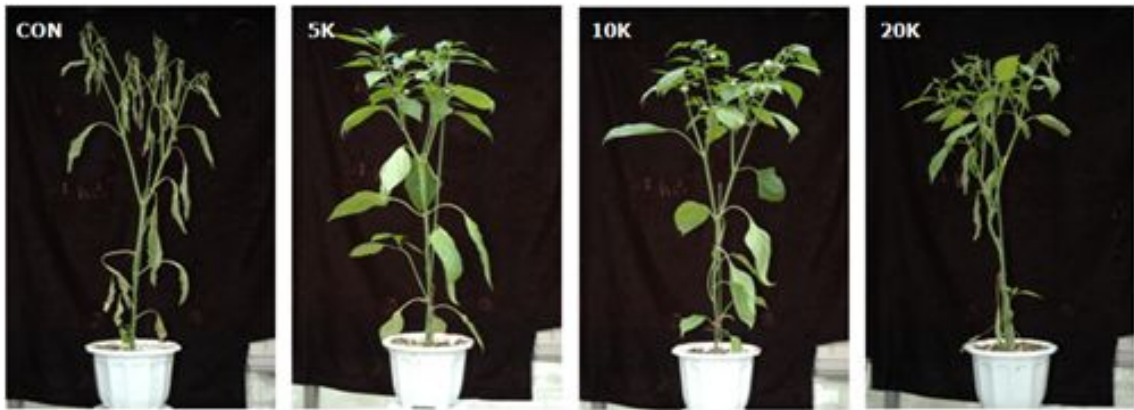


그림 1-3. 고추에 유도저항성 물질 처리 후 인위적인 가뭄에 대한 저항 능력 유도 예

라. 농가 실증 실험

최종 선발된 물질로 제작된 시제품을 대상으로 농가 실증 실험 실시 : 전남에 위치한 고추 재배 농가 및 벼 재배 농가를 선정하여 시험포 재배 계약을 실시하여 준비된 시제품의 최종 효능 검정을 실시한다. 준비된 시험포에 고추와 벼를 식재한 후 시제품을 처리한 후 발생하는 병저항성 유도 능력 조사한다. 고추의 경우는 자연 발생하는 흰가루병 방제효과 및 탄저병 역병 등에 대한 방제효과를 조사하고 병의 경우는 도열병과 흰잎마름병에 대한 방제효과를 조사한다. 또한 시설 고추 재배 농가를 대상으로 온실 내 인위적인 가뭄이나 염 스트레스를 제공하고 이에 대한 저항성 유도 능력 조사한다. 또한 온실 내 인위적인 온도 조절을 통하여 다양한 환경 스트레스를 유도하고 이에 대한 저항성 유도 능력을 조사하여 시제품의 최종 효능을 검정한다. 또한 시험포의 벼와 고추의 최종 수확량을 조사하여 시제품에 의한 수량의 증가 및 감소에 대하여 조사한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 생산 및 시장현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

국내에는 아직 유도 저항성에 의한 작물 보호제는 보고된 바가 없음.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

미국 신젠타에서 1999년 개발한 BION(유럽)/Actigard(미국) 제품이 존재하나, 시장을 확보하지 못하고 현재 살균제인 mancozeb와의 50:50혼합제로 전세계적으로 시판하고 있음. 이 약제는 1989년 isonicotinic acid를 모체로 약물 스크린중 발견된 CGA-245704로 명명된 benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid (S) methyl ester (BTH)을 선발하여 미국의 Reserach Triangle의 Novartis사와 스위스의 Novartis사에서 주도하여 세계 최초의 식물저항성유도 약제로 1998년 미국 EPA의 등록을 거쳐 상품화하게 된다. 하지만 상품화 첫해에 유럽에서 BION을 처리한 밀의 수량이 급격하게 감소되어 시장을 확보하지 못하고 관련 연구소들이 폐쇄되었음.

(Tally A, Oostendorp M, Lawton K, Staub T, Bassi B. 1999. Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. In: Agrawal AA, Tuzun S, Bent E, editors. Induced plant defenses against pathogens and herbivores. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society Press. p 357-370.)

제 2 절. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

(1) 미 국

- 미국의 경우 생물농약 시장은 주로 중소 업체들이 이끌어 가고 있으며, 대표적인 기업으로는 Certis-USA사·AgraQuest사 등이 있다
- 이들은 각각 대표적인 살충·살균제 제품들을 보유하고 있으며 글로벌 사업을 진행하고 있고 특히 미국뿐만 아니라 전 세계의 distributors들을 이용하여 글로벌 사업을 진행하고 있다.
- 최근 새로운 개념의 바이오작물보호제의 기전으로 이해되는 식물전신유도저항성 유도에 대한 연구 분야에서는 세균에 의한 ISR의 식물의 반응과 세균의 유도저항성결정인자에 대한 연구에 주력 하고 있다. 하지만 그 정확한 기작이 정확하게 알려져 있지 않고, 유도저항성을 이용한 상품화된 미생물유래 제품은 미국 Bayer에서 개발한 Yield Shield가 유일하게 출시되어 앞으로 이 섹터에서 경쟁이 치열할 것으로 판단된다. 비슷한 개념에서 최

근에 발표된 세균의 휘발성 물질에 의한 ISR은 동일한 물질 (2,3-butanediol, acetoin)이 유도저항성뿐만 아니라 식물의 생장을 촉진시키는 작용을 한다는 것이 보고되면서 미생물 유래의 ISR 물질이 기존의 BTH가 가진 문제를 극복 할 수 있는 대안이 될 수 있는 가능성을 보인다.

(2) 유 럽

- 유럽의 경우 독자적인 개발 기업들보다는 생물농약을 유통 판매하는 기업들이 많으며, 이들은 Biological industry meeting을 매년 스위스에서 진행하면서 다양한 정보들을 교환하고 있다.
- 특히, 유럽은 전 세계 어느 지역보다 생물농약 개발에 많은 시간과 비용이 소요되는 지역으로 보통 6년~8년이 소요된다고 볼 수 있으며, 최근에는 독성에 대한 자료제출의 요구 수준이 높아지고 있는 추세이다.

(3) 일 본

- 일본의 생물농약 개발기업으로는 가켄사(기존 의약품생산시스템 구축)·아그로가네쇼사·SDS사 등이 있으며, 가시적인 성과들을 만들고 있다.
- 특히, 가켄사의 경우 기존 항생제 생산 시스템에 대한 노하우로 인하여 성공적인 생물농약 개발 모델을 만들고 있는 것으로 알려지고 있다.
- 또한, 일본은 생물농약 규정에 따라 천적곤충에 대한 등록수가 많으며, 시장도 마찬가지로 이러한 맥락에서 증가하고 있는 것으로 알려져 있다.

(4) 중 국

- 1996년부터 기존의 각성과 농민중심의 생물농약 사용이 2001년부터 시작된 국가발전개혁위원회의 생물기술 산업화프로젝트 가운데 생물농약 산업화개발이 포함되어 있었다. 제 1 생물농약 산업화 세부항목으로 진균제제 산업화가 채택되었으며 지원 금액은 8760만 위엔에 달하였고 길림연변춘뢰생물제품유한공사에서 담당하여 진행해 왔다. 생물농약산업화제품(연간 생산 1000만위엔 이상)은 2001년에 13개가 되었다.

(5) 세계시장 종합

- 전 세계 생물농약 시장은 2001년 현재 세계 농약 시장의 약 2%인 5.8억불이었으나, 2005년 전체 농약 시장의 2.5% 점유율을 보이고 있으며, 2010년에는 4.3%의 시장 점유율로 10억 7,500만 달러의 시장이 형성될 것으로 추정되는데, 생물농약 시장은 Bt제와 기타 미생물제제가 4:6의 비율로 형성될 것으로 예상된다. 최근에는 OECD국가를 중심으로 한 친환경농업정책으로 인하여 그 시장규모가 2013년에는 세계 농약시장의 약 15%인 45억 불에 달할 것으로 추정되고 있다 (Santander Investment, 1998).

유도저항성은 기존의 화학농약으로 방제가 힘들었던 세균병과 바이러스병을 극복할 뿐만 아니라 한번 사용으로 장기간 그리고 2개 이상의 병에 대해 작물을 보호함으로써 전세계적으로 유수의 연구그룹이 연구에 매진하고 있고, 최근 들어 이러한 유도저항성에 대해 다양한 환경스트레스 내성의 증진이 보고되면서 이 유도저항성에 대한 관심은 더욱 고조되고 있다. 하지만 신젠타의 BION의 예에서 보는바와 같이 식물의 왜소화의 원인인 allocation fitness cost를 극복하지 못한다면, 유도저항성관련 연구는 실용화가 힘들 것이다. 최근 들어 미생물 휘발성 물질이 식물의 왜소화 없이 식물병저항성을 유도한다는 것이 보고되어 앞으로 미생물 및 천연물

유래 물질 중 allocation fitness cost 독립적 유도저항성을 유도하고 그 기전이 밝혀지고 이를 농업에 적용한다면 신개념의 농약을 개발 할 뿐만 아니라 새로운 원천기술로 자리 잡을 수 있을 것이다.

2. 산업화를 통한 기대효과

화학비료와 농약의 과다 사용에 따른 인축독성 및 환경 악화로 대체재 개발이 시급하며, 신 바이오 작물보호제 개발에 따른 농약대체효과가 2,400억원 이상('12년)일 것으로 예상 (녹색기술 연구개발 종합대책(안); 녹색기술 연구개발 종합대책 참고자료(2호 안건)

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과				50	200	
경제적 파급효과				1,000	3,000	
부가가치 창출액				2,000	4,000	
합 계				3,050	7,200	

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. Metagenome기반 대사산물 식물보호제 선발 및 실용화

실험 배경

Metagenome으로부터 담배들불병과 세균성 무름병에 대한 식물유도저항성 클론 검정.

Metagenome은 한국생명공학연구원내 미생물유전체사업단의 미생물소재 은행에서 기 확보된 (자연 상태에서 직접 채취 된 유전자를) Fosmid clone을 통해 대장균에 발현된 것을 이용하였다. 각 fosmid clone는 각각 다른 지역과 환경에서 확보된 것으로 일반적으로 평균 30k bp의 사이즈의 DNA가 들어가 있는 클론이 500-1000가 혼합된 형태로 존재하여, 이 혼합된 클론을 담배들불병과 세균성 무름병균에 대한 식물 유도저항성 검정을 위한 대량 스크리닝 실험을 사용하였음.

1. Metagenome library 준비하기

메타지놈은 미생물의 DNA를 그 서식환경에서 직접 분리하여 그 유전체(genome)의 구성 유전자들을 있는 그대로 연구할 수 있는 분야로 새로운 유전자를 확보할 수 있는 새로운 개념으로 최근 각광받고 있는 학문 분야이다 (그림 3-1). 식물 근권에서 획득한 DNA상태의 메타지놈은 일정한 벡터에 클로닝 되어 *E. coli*에 형질전환 된 상태로 보관되어 있으며, 실험에 사용한 메타지놈은 미생물소재은행 (<http://www.microbank.re.kr/>)으로부터 약 600여개를 분양받아 이용하였다 (표 3-1). 각 메타지놈은 agar plate나 slant agar형태로 제공되었으며, LB액체배지에서 16시간 배양하였다

2. 담배에서 Metagenome에 의한 유도저항성 검정

무균상태에서 식물을 재배하기 위하여 1/2 MS (Murashige and Skoog Basal Medium, Duchefa biochemistry) 고체배지를 고체화 되기 전에 24 well plate에 분주한 후, 7일정도 발아된 담배의 종자를 이식하였음. 온도와 빛이 조절된 식물생장상에서 3주간 배양한 후, 준비한 메타지놈 배양액 (메타지놈을 보유하고 있는 *E. coli* 배양액)을 식물의 뿌리부분(crown part)에 200ul가량 관주하였음.

담배들불병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*는 King's B, 세균성무름병을 일으키는 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LB 고체배지에서 30C에서 48시간 배양한 후, 멸균된 증류수에 희석하여 OD600 = 1.0로 농도를 맞춘 후, 담배의 잎에 세균배양액을 5-10 ul를 떨어뜨려 접종하였음. 세균성무름병균의 경우 처리한 후 30℃배양기에서 16시간 후 병징을 관찰하였고 담배들불병의 경우 식물 생장상에서 1주일 후에 Disease severity와 Disease incidence를 조사하였음.(그림 3-2)

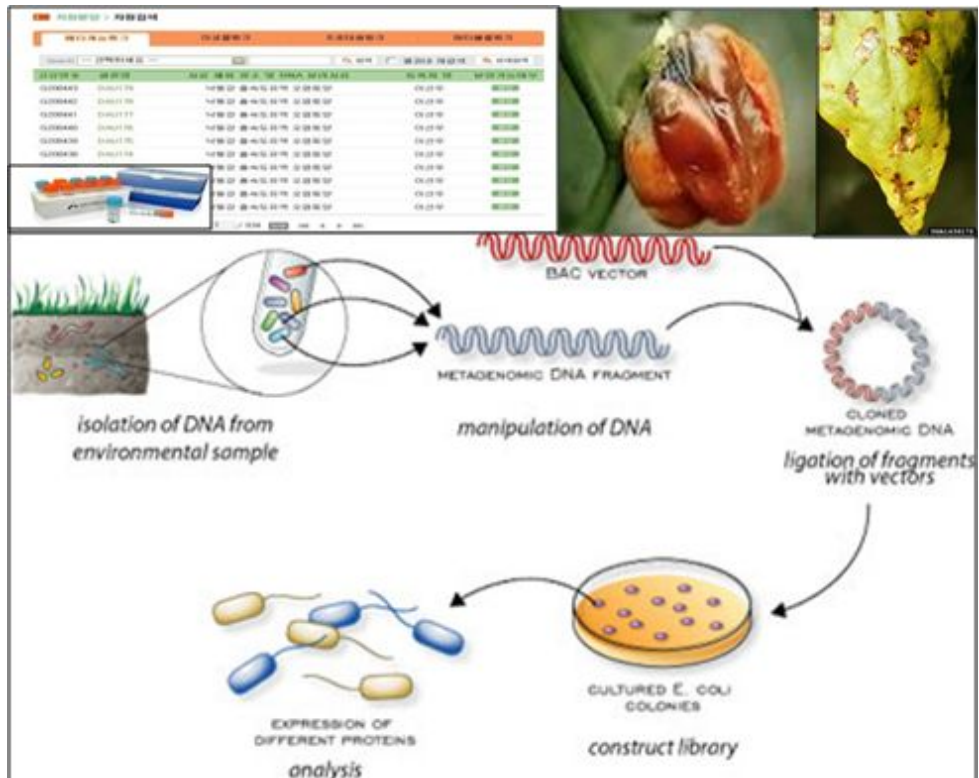


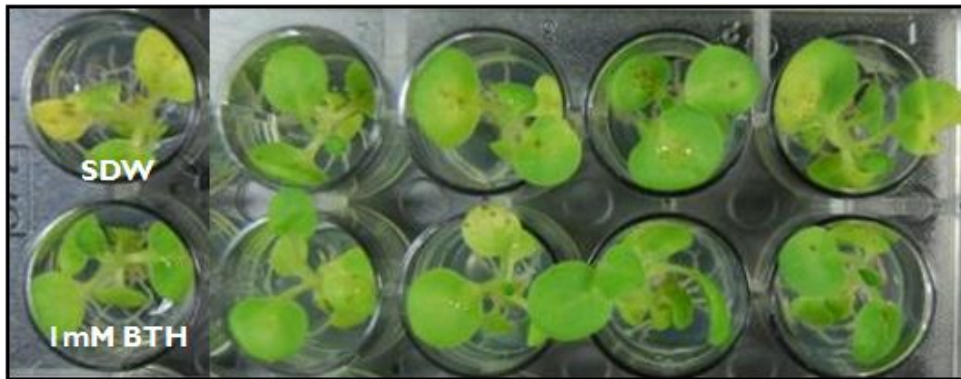
그림 3-1. Metagenome의 개념 및 실험의 개요

표 3-1. 메타지놈 library 목록

Source	vector	size (kb)	No. of clones	고유번호
성류굴	fosmid	35	2,000	G2-11
	fosmid	35	8,185	
중국염호수	fosmid	35	1,215	G46-50
	fosmid	35	5,850	
대전유성산림표토 및 소나무근권	fosmid	35	243	G77-103
경기도 광릉 수목원 산림 표토	fosmid	35	239	G104-179
충북괴산밭토양	fosmid	35	192	G2377-2396 (G2388-)
충북음성밭토양	fosmid	35	255	G2397-99, G2402, G2409-2413, G2418, 2420, 2423, 2425-26, 2428, 2430, 2432, 2434
경북청송밭토양	fosmid	35	233	G2437, G2439, G2441, G2443, G2445, G2447, G2449-50, G2452, G2455, G2456, G2458, G2460, G2462, G2464-65
강화도 장화리갯벌	fosmid	31	284	G2414-7, G2419, G2421-22, G2424, G2427, G2429, G2431, G2433, G2435-36, G2438, G2440, G2442, G2444, G2446, G2448, G2451, G2453-54, G2457, G2459, G2461, G2463, G2466
경북 영양 식물근권 -suppressive soil	fosmid	35	182	G2467-2480
대전용두해수욕장 해수	fosmid	35	12,500	G7689-7693
충남 서해안 염전토양	fosmid	35	2,244	G7794-7800
전라북도 부안군 새만금 간척지 갯벌	fosmid	35	386,400	G7801-7968
충남 아산,공주,전남 순천 논토양-벼근권	fosmid	35	80,000	G8169-8218
인제군 점봉산 진동계곡 초지 및 산림토양	fosmid	35	49,700	G8256-8306
북극 기지 연안 퇴적물	fosmid	35	60,000	G8312-8335
부산 강서구대저동 식물근권토양	pEPI-FOS5	35	64,000	G8336-8375
Bloom water	pBACe3.6	8	2,000	G358-G377
충주시 충주호 reservoir water	pBACe3.6	14	1,000	G2495-96, G2501, G2506, G2553-5, G2558, G2560, G2571
아산시 둔포호 reservoir water	pBACe3.6	15	1,000	G2581, G2585, G2589, G2593, G2597, G2601, G2604, G2608-9, G2611
청주시 대청호 reservoir water	pBACe3.6	13	1,000	G2613, G2616, G2619, G2621, G2624, G2626, G2629, G2640, G2643, G2646
경기도 화성 팔탄 매곡 측사 바닥 soil	pCC1BAC	15	6,000	G7694-7753

Source	vector	size (kb)	No. of clones	고유번호
Bovine rumen	pCC1BAC	15	5,232	G337-357 G3525-3536
시화호 soil	pCC1BAC	15	4,000	G7754-7793
관악산 소나무 뿌리 토양	pCC1BAC	15	10,000	G7969-8068
	pBluelysis	5	10,000	G8069-8168
군산 하천흙	pUC19	4	3,400	G3491-3524
서울대학교 부속 목장	pUC19	4	3,264	G180-196
경기 수원 서호천 하천흙	pUC19	4	1,536	G197-204
Bovine rumen	pUC19	4	5,080	G205-G336
은행앞surface	fosmid	45	2,000	G3224-G3228
일반토양	fosmid	45	200	G3211
금병산soil	fosmid	45	200	G3212
마곡사soil	fosmid	45	400	G3213-14
제주도soil	fosmid	45	1,800	G3215
sand dune soil	fosmid	45	6,600	
변산반도	fosmid	35	1,632	
화산국립공원soil	fosmid	30	4,200	
갑사산림토양	fosmid	35	9,600	
Bovine rumen	fosmid	35	100,000	
중국 북경시 혐기성 암모니아반응조슬러지	fosmid	35	600	G8376-8377
	pUC18	3	3,000	G8403-8405
퇴비	fosmid	40	13,000	G8378-8402

A. controls metagenome library treatments



B. controls metagenome library treatments

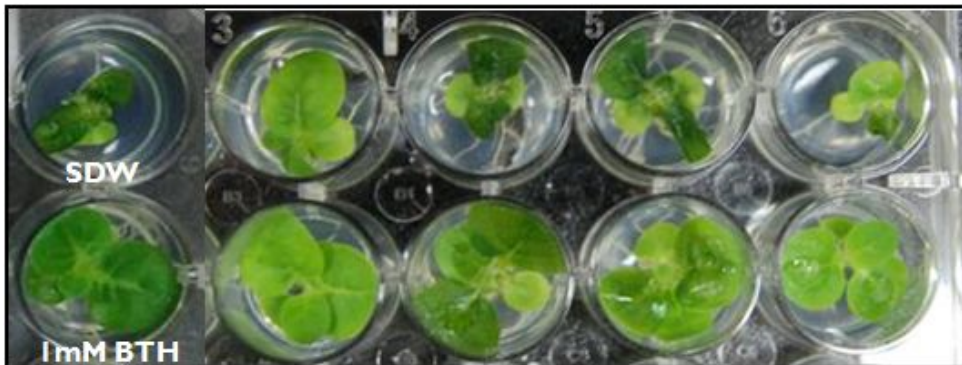


그림 3-2. 병원균처리 후 식물의 병징 A) *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 처리 7일 후 담배잎의 들불병 병징, B) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 처리 24시간후 담배무름병 병징, 물처리 (SDW, sterile distilled water)와 1 mM BTH처리는 대조군으로 사용함.

각 병원균에 대해 605개의 metagenome을 스크리닝 하여 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 대해 저항성을 보이는 85개의 library와 *P. syringae* pv. *tabaci*에 대해 저항성을 보이는 122개 library를 선발하였음. 여기서 선발된 하나의 library는 500-1000개의 metagenome clone이 혼합된 형태로 존재하기 때문에 선발된 하나의 library를 대상으로 metagenome clone을 확보하기 위하여 가장 높은 저항성을 보인 2(1B8(4)-D7_2_3과 1F4(2)-F7)개의 library를 선발하였음. shot gun library를 제작 후, 300 clone으로 분리하여 유도 저항성 검정을 하였음. 한 clone당 10여개의 clone을 확보하였음.(표 3-2.)

3. Shot-gun library로부터 유도저항성 결정 유전자 분리

약 35kb의 거대 유전자 부위 중 유도저항성을 일으킨 부분의 유전자를 탐색하기 위해 shot gun library를 제작하였다. 조각난 유전자들을 pUC118 vector에 ligation시킨 후 대장균(DH5a)에 형질전환 하였다. 각 클론을 37°C에서 16시간 배양한 후 식물의 뿌리주변에 뿌려주었다. (그림 3-3). 선별된 약 30kb의 메타지놈에 대해 shot gun library의 제작 및 sequence 분석을 (주)제노텍에 의뢰하여 아래와 같은 결과를 얻었음 (표3-3, 3-4).

표3-2. 선별된 library로부터 선발된 메타지놈 클론

Metagenome library	Clone No.	Description
1F4②-F7	G3	NR
	F10	NR
	G4	Escherichia coli DH1
	G12	Two component, sigma54 specific, transcriptional regulator, Fis family
	B11	Bradyrhizobium sp. BTAi1, DNA replication; Nucleoproteins
	D8	NR
1B8④-D7_2_3>	A1	NR
	A2	NR
	B6	NR
	B9	NR
	D12	NR
	D8	NR

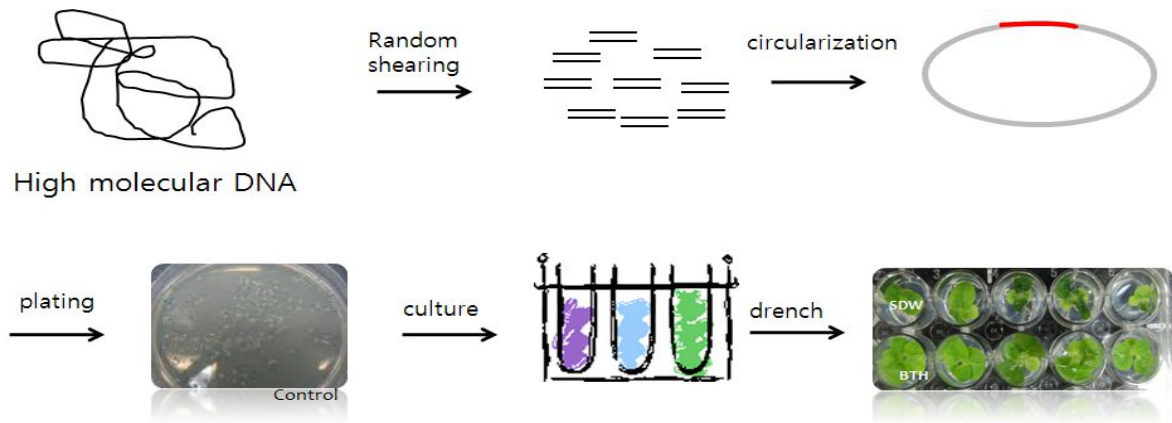


그림 3-3. Shot-gun library로부터 유도저항성 결정 유전자 분리

표 3-3. Clone 1F4의 shot-gun sequencing에 의한 metagenome 유전자 분석

Fosmid_Name	Orf_Name	Start_position	End_position	Function
1F42-F70	orf00003	515	363	Bsl7127 protein
1F42-F70	orf00004	1894	593	ABC-1 domain protein
1F42-F70	orf00006	2049	2798	No hits found
1F42-F70	orf00008	4809	2962	Peptidase M3B, oligoendopeptidase-related clade 3
1F42-F70	orf00010	5139	6683	Two-component response regulator
1F42-F70	orf00011	6871	9045	Peptidoglycan-binding domain 1
1F42-F70	orf00012	9256	10794	Putative uncharacterized protein precursor
1F42-F70	orf00013	11084	10812	Putative uncharacterized protein
1F42-F70	orf00014	11801	11508	Bll7136 protein
1F42-F70	orf00015	13030	11849	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase
1F42-F70	orf00018	13240	14532	Hydroxypyruvate reductase precursor
1F42-F70	orf00020	14634	15104	Putative uncharacterized protein precursor
1F42-F70	orf00022	15101	16534	Pyruvate kinase
1F42-F70	orf00023	17260	16646	TPR repeat protein precursor
1F42-F70	orf00024	17515	17390	50S ribosomal protein L36
1F42-F70	orf00025	17831	17616	No hits found
1F42-F70	tRNA_1	18176	18102	tRNA-Val
1F42-F70	orf00026	18626	18249	Response regulator receiver protein
1F42-F70	orf00027	18794	19684	Putative N-formylglutamate amidohydrolase
1F42-F70	orf00030	20103	20897	Inositol monophosphatase family protein
1F42-F70	orf00031	21901	20957	Alpha/beta hydrolase fold
1F42-F70	orf00034	22086	22547	Heat shock protein Hsp20
1F42-F70	orf00036	23579	22893	No hits found
1F42-F70	orf00037	24779	23736	Putative low specificity L-threonine aldolase
1F42-F70	orf00038	24831	25073	No hits found
1F42-F70	orf00041	25222	29895	glutamate synthase
1F42-F70	orf00042	29927	31369	Glutamate synthase small subunit
1F42-F70	orf00044	32379	31474	Putative uncharacterized protein

표3-4. Clone 1B8의 shot-gun sequencing에 의한 metagenome 유전자 분석

Fosmid_Name	Orf_Name	Start_position	End_position	Function
1B84-D07	orf00001	1001	1768	No hits found
1B84-D07	orf00002	2052	1780	Putative uncharacterized protein
1B84-D07	orf00003	3161	2148	Predicted membrane protein
1B84-D07	orf00004	6354	3217	WD40 domain protein beta Propeller precursor
1B84-D07	orf00006	8077	6380	Hypothetical Protein
1B84-D07	orf00007	8683	8204	Ketosteroid isomerase-like protein
1B84-D07	orf00008	8654	9118	Hypothetical Protein
1B84-D07	orf00009	9213	9953	Putative uncharacterized protein
1B84-D07	orf00010	9973	10677	6-phosphogluconolactonase
1B84-D07	orf00011	12346	10682	Major facilitator family transporter
1B84-D07	orf00013	13057	12863	Acetyl-CoA synthetase
1B84-D07	orf00015	12866	12381	Lipoprotein, putative precursor
1B84-D07	orf00018	14784	13114	Acetyl-coenzyme A synthetase
1B84-D07	orf00020	15621	14788	Citrate (Pro-3S)-lyase
1B84-D07	orf00021	16073	15621	MaoC-like dehydratase
1B84-D07	orf00025	18395	16083	Transketolase, central region
1B84-D07	orf00026	19402	18428	Beta-hydroxylase, aspartyl/asparaginyl family
1B84-D07	orf00027	19728	19399	Transcriptional regulator, HxlR family
1B84-D07	orf00028	19903	20457	(Acyl-carrier-protein) phosphodiesterase
1B84-D07	orf00031	20522	20767	Putative uncharacterized protein
1B84-D07	orf00033	20876	21394	Putative uncharacterized protein
1B84-D07	orf00035	22703	21417	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 component
1B84-D07	orf00037	23716	22703	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component
1B84-D07	orf00038	24984	23716	2-oxoisovalerate dehydrogenase
1B84-D07	orf00039	25117	25407	Putative uncharacterized protein
1B84-D07	orf00040	25595	25404	Putative uncharacterized protein
1B84-D07	orf00041	25823	25960	No hits found
1B84-D07	orf00042	25953	26726	Phage shock protein A, PspA
1B84-D07	orf00043	26742	27146	Phage shock protein C, PspC
1B84-D07	orf00045	27146	27376	Putative uncharacterized protein
1B84-D07	orf00048	27528	28421	Cation diffusion facilitator (CDF) family transporter
1B84-D07	orf00050	28425	29147	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme, beta subunit
1B84-D07	orf00052	29148	29621	Bll4777 protein
1B84-D07	orf00054	29988	30779	Exodeoxyribonuclease III Xth
1B84-D07	orf00057	30902	31360	Putative uncharacterized protein precursor

4. 프로테오믹 분석을 통한 metagenome으로부터 유도저항성 결정인자 탐색

Shot-gun library로부터 선발된 유전자의 크기가 metabolite를 만들어 낼 만큼의 크기가 되지 않는 것으로 생각하여 peptide나 단백질일 것이라는 가설을 세우고, 대장균에서 분비되는 전체 단백질분석을 위한 상등액을 대상으로 2D-PAGE실험을 수행하였음. Empty vector와 #1(1F4-3-D8) clone이 삽입된 대장균을 대상으로 ampicillin 20ug/ml가 첨가된 1L LB에서 16시간 배양하였음. 세포 밖으로 분비된 단백질만을 분리하기 위해 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었음. TCA 단백질 침강법(500g/350ml, Luis Sanchez) 을 이용하여 상등액에 존재하는 단백질을 침전시킨 후 최종 단백질량은 200ug으로 이용하였음. 분리된 단백질은 Rehydration buffer에 녹인 후 11cm strip(GE healthcare)를 이용하여 20°C, 16시간 rehydration(Gel Company)하였음. 다음 날, 단백질을 전하별로 분리하기 위한 300v 1분, 3500v 90분, 3500v 15시간의 순서로 focusing을 하였음. PAGE running은 50v 30분, 120v 30분, 300v 10분, 1000v 90분의 순서로 12.5%젤상에서 Flat top gel electrophoresis chamber(Gel Company)를 이용하여 실험하였다. 분리된 단백질의 spot은 16시간 Staining후 관찰하였음. control에 비교하여 metagenome clone이 선발된 상등액에서 다양한 spot이 관찰되어 현재 MALDI-TOP을 이용하여 분석 중에 있음.

Shot gun library로부터 선발된 유전자의 기능을 검증하기 위해 Transposon mutagenesis (그림 3-5.)방법으로 target유전자의 돌연변이 시켜 보았다. 대상 유전자에 transposon을 삽입한 후 유도 저항성에 대한 스크리닝을 하였다. 1B8-4-D7와 1F4-2-F7의 두 종류의 메타지놈에서 각각 500개씩 스크리닝을 수행하였다. 1B8-4-D7에서 14개 1F4-2-F7에서 13개의 positive clone (유도 저항성을 잃음)을 획득하였다. sequence 분석을 통해 shot gun library와 일치하는 부위를 가진 유전자(M15)를 선별하였다.

5. 식물병저항성유전자 발현을 통한 메타지놈의 유도저항성의 검증

확보된 메타지놈(M15)의 유도 저항성을 검증하기위해 식물의 저항성 유전자 발현을 조사하였다(그림 3-7). 메타지놈을 처리 후 일주일 뒤, 식물 무름병균 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*을 잎에 처리하였다. (0, 3 시간) 그리고 6시간 쯤 식물의 잎을 채취하여 RNA를 분리 및 cDNA를 합성한 후 qPCR방법으로 유전자발현을 비교하였다. 병원균을 처리한 후 3시간째 메타지놈을 처리한 실험구에서 PR1(PR1b)의 발현이 대조구에 비해 증가한 것을 확인하였다 (그림 3-6a). 단일클론인 6D2-G5를 처리한 담배에서는 0시간째 PR 유전자의 발현이 이미 증가되어 있었으나 병원균 처리 후 3시간째에는 대조구와 큰 차이가 없었다.

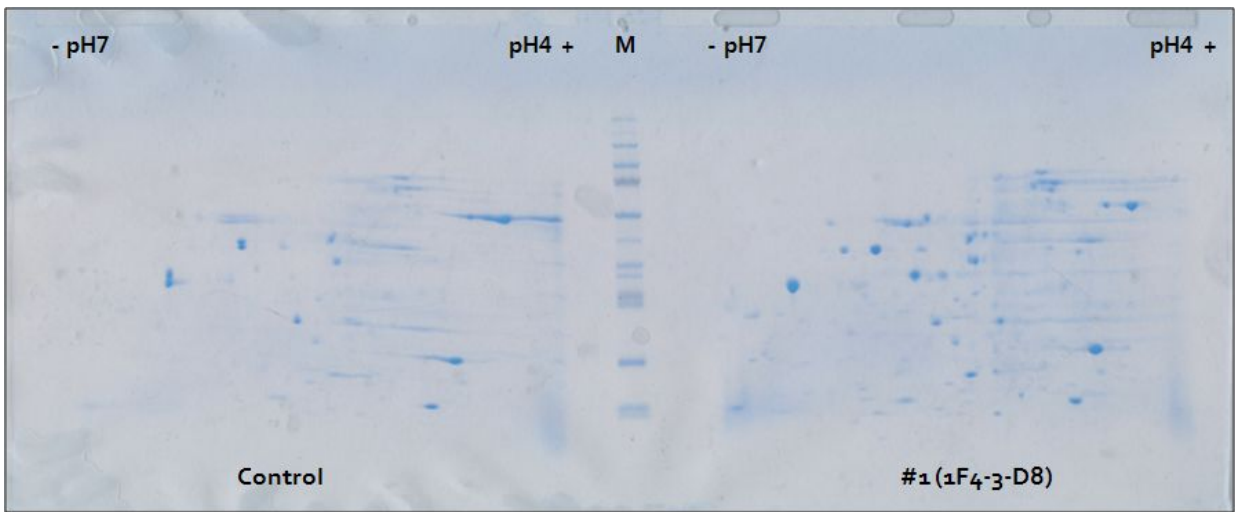


그림 3-4. 프로테옴 분석을 통한 metagenome으로부터 유도저항성 결정인자 탐색

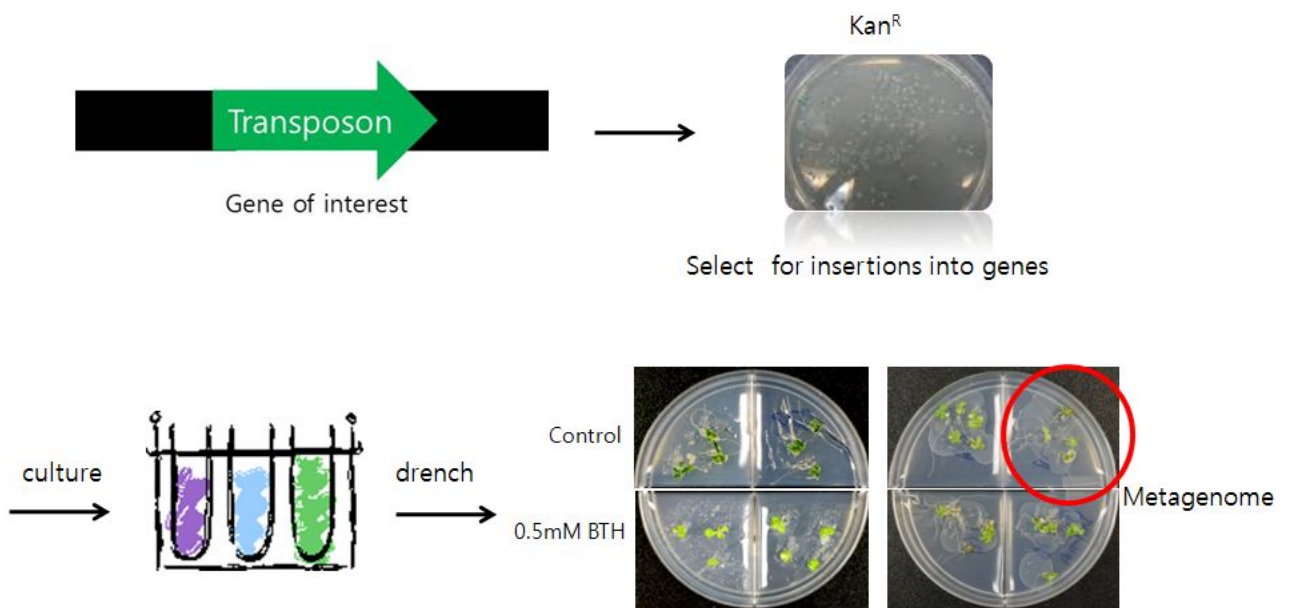
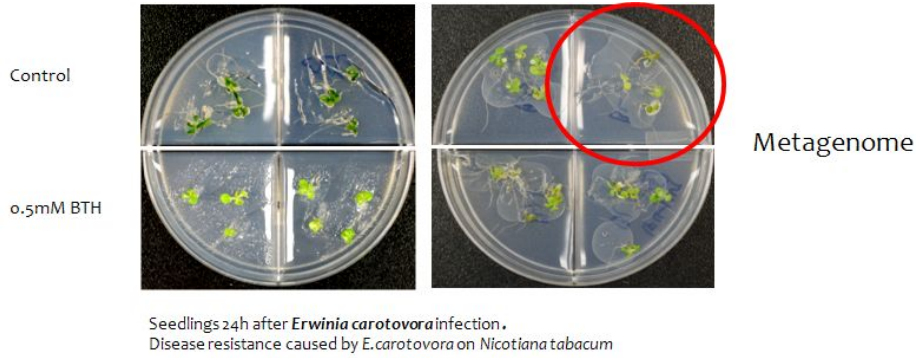
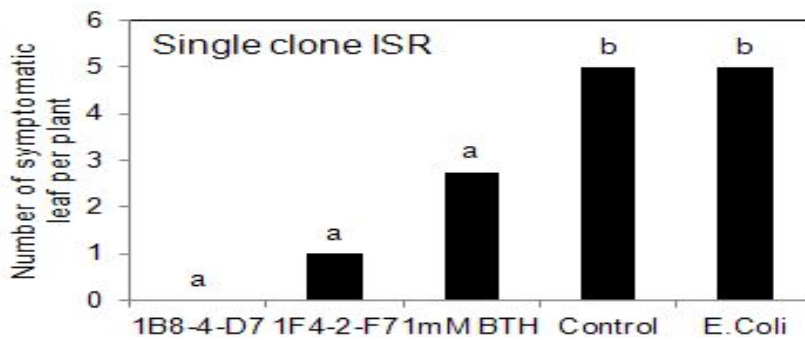


그림 3-5. Transposon mutagenesis에 의한 유도저항성 결정인자 탐색

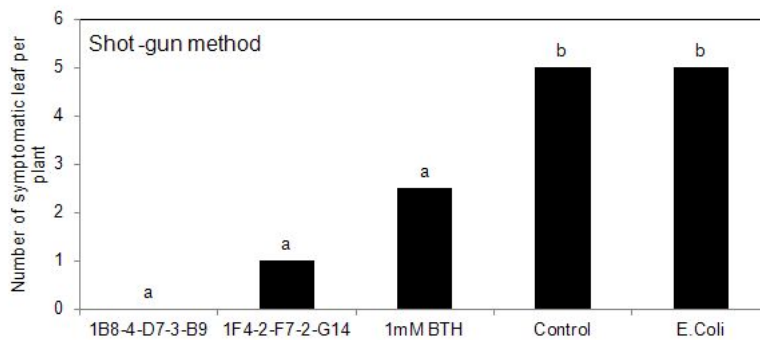
(a)



(b)



(c)



(d)

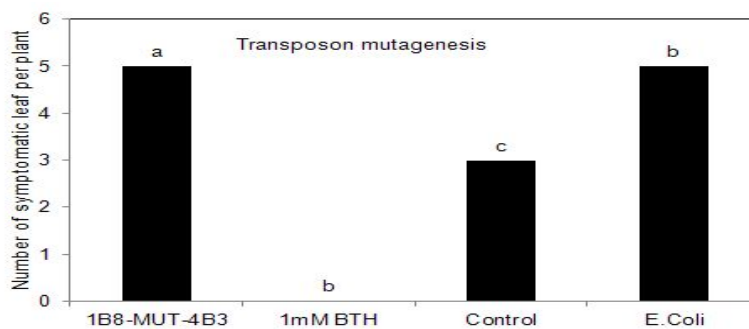
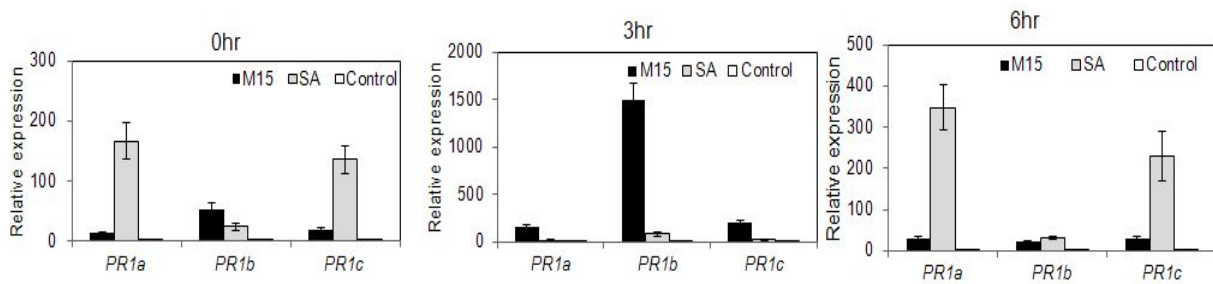


그림 3-6. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 처리 24시간 후 담배무름병 감염 식물의 병징.

(a) 병원균처리 후 식물의 병징 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 처리 24시간후 담배무름병병징, 물처리 (SDW, sterile distilled water)와 0.5 mM BTH처리는 대조군으로 사용함.

(b) 메타지놈 단일클론, (c) shot gun library, (d) transposon mutagenesis의 유도 저항성.

(a)



(b)

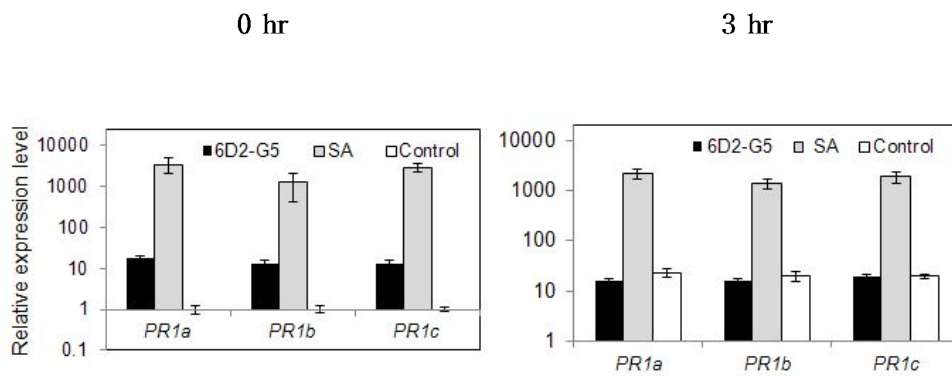


그림 3-7. 담배(*Nicotiana tabacum*)에서 식물병저항성유전자 발현을 통한 메타지놈의 유도저항성의 검증

6. 포장에서 메타지놈처리에 의한 식물병 유도 저항성과 억제 능력 검증

실험실내에서 얻은 유도저항성 결과를 바탕으로 실제 밭(그림 3-8)에서 고추(*Capsicum annuum* L. cultivar.)에 적용해보았다. 6D2 pool, 6D2-G5 단일클론, 1B8-4D7-3B9, 그리고 1F4-2F7-3D8의 메타지놈을 포함한 대장균을 LB(20 ug / ml ampicillin)에서 배양하였다. 고추 잎이 8~9개 정도 나왔을 때 밭에 이식을 하였으며, 밭의 각 처리구를 4구획으로 나누어 임의로 배치하였다. 한 구획 당 35개의 식물을 심었으며, 한 식물 당 배양액 50 ml을 1주 간격으로 2회 뿌리에 관주하였다. 분주 후, 10일 제부터 10일 간격으로 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 고추 병원균을 10^8 cfu / ml infiltration 하여 접종하였다. 접종 후 0, 6시간째 각 식물당 2-3개의 잎을 채취하여 액체질소에 동결시켰다. 메타지놈을 관주 한 지 20일 째이며, 접종 후 5일 째인 Day 20, Day 30일에 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*에 대한 병징을 관찰하였다. 다른 처리구에 비해 6D2-G5 단일클론의 처리구에서 병징이 대조구에 비해 낮게 나타난 것을 확인하였다(그림 3-9(a)). 2차례에 걸쳐 고추를 수확하였으며, 개체당 과실의 무게변화는 메타지놈 처리구별로 비교해 본 결과 큰 차이가 없음을 확인하였다. 포장에서의 자연병 발생률을 측정한 결과 박테리아와 바이러스에 대한 병의 저항성이 6D2-mix(pool)과 6D2-G5 단일클론에서 증가함을 관찰할 수 있었다(그림 3-9(c),(d)). qRT-PCR을 이용하여 확인한 결과 대 발생한 Cucumber mosaic virus로 포장상태에서 다양한 변이를 일으키기 때문에 다년간에 걸쳐 metagenome의 효과를 검증하기 위하여 다양한 포장에서 실험을 실시할 예정이다.



그림 3-8. 충북 청원군 가덕면 청룡리 고추밭.

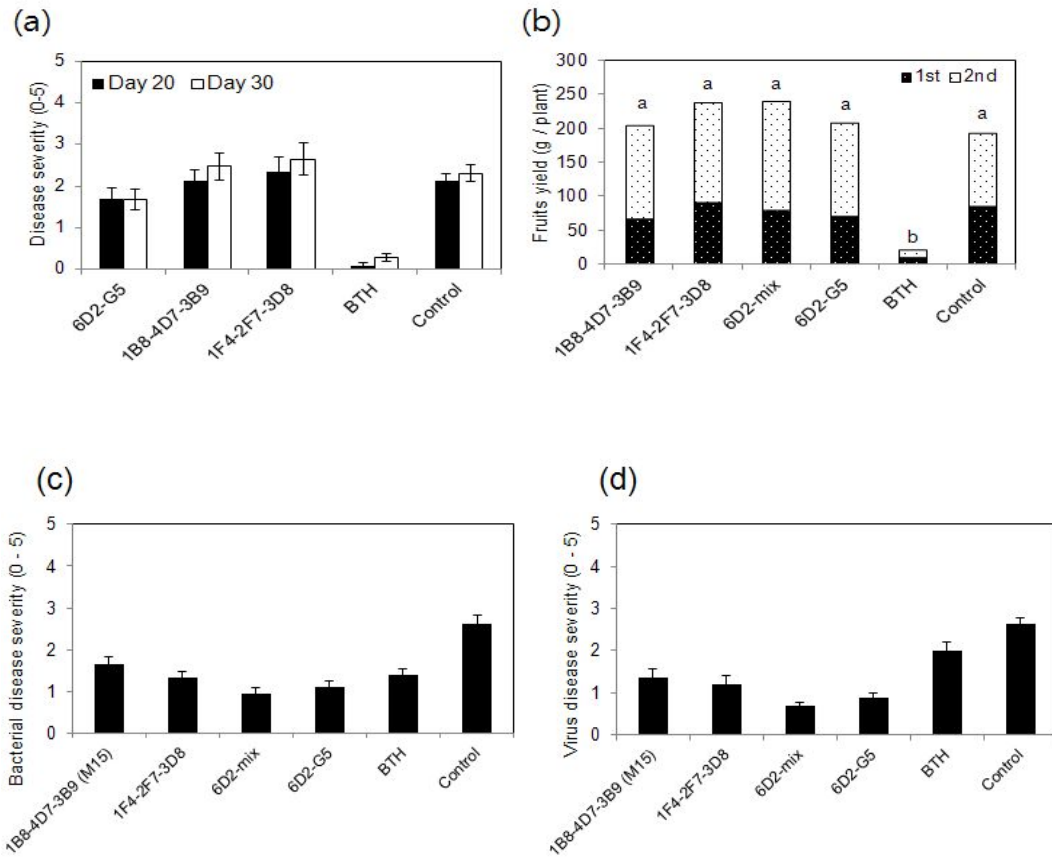
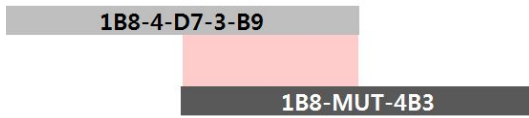


그림 3-9. 포장에서 메타지놈치리에 의한 식물병 유도 저항성과 억제 능력 검정과 생장추정. (a) *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 고추병에 대한 병징 (b) 개체당 과실수의 추정. (c) 박테리아에 대한 자연병징 (d) 바이러스에 대한 자연병징,

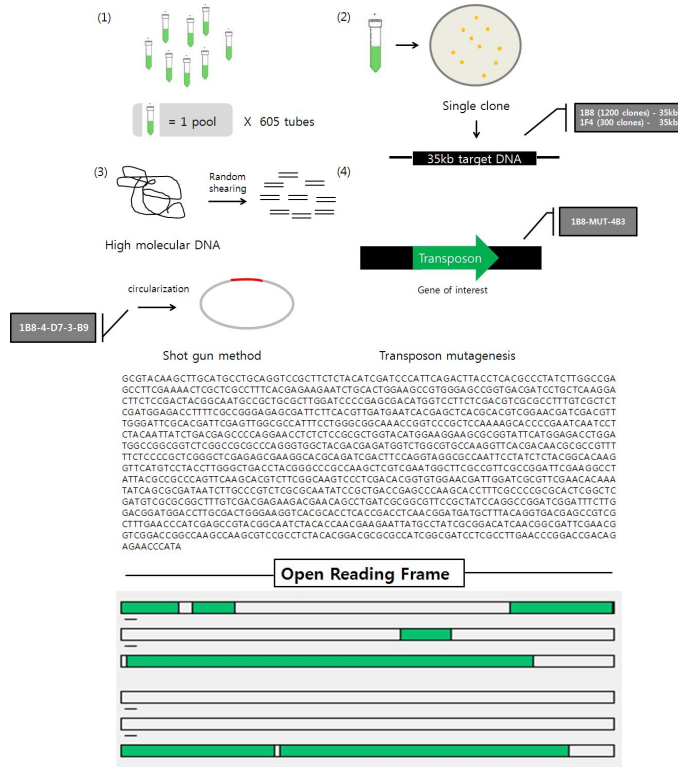
7. 확보된 유전자 서열의 분석

현재까지 총 4번의 스크리닝을 통해 유도 저항성을 일으키는 유전자서열을 찾기 위한 실험을 수행하였다. 분양받은 메타지놈 풀(Pool)로부터 유도저항성 실험을 시작하였으며 단일클론라이브러리, shot gun 라이브러리, 그리고 마지막으로 Transposon mutagenesis의 라이브러리로 스크리닝을 과정을 수행하였다. Figure 7(a)-3,4번에서 탐색된 유전자의 일치하는 부분의 약 1.2kb의 서열을 찾을 수 있었으며 7개의 Open reading frame을 가지고 있다. 탐색된 유전자들의 서열을 비교한 결과 1B8-4D7-3B9(M15)와 6D2-G5에서 약 30 basepair의 anaphylatoxin domain이라는 공통적인 서열을 가지고 있었다.

(a)



(b)



(c)

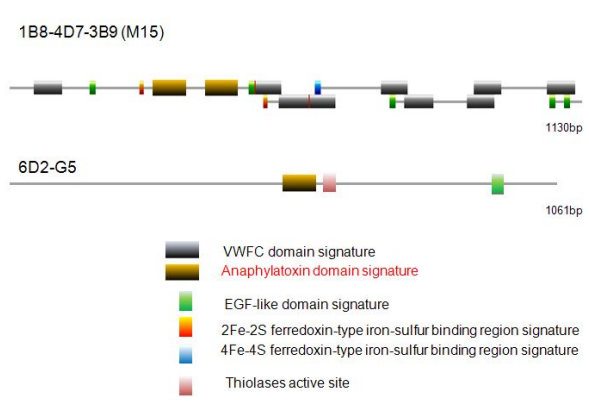


그림 3-10 유도저항성 유발 유전자탐색. (a) 메타지놈으로부터 유도저항성을 일으키는 유전자 서열 탐색과정(1) 605개의 메타지놈 풀의 라이브러리로부터 유도 저항성 클론의 탐색 (2) 단일 클론을 분리하여 유도 저항성 검정 (3) shot gun방법으로 유도저항성을 일으키는 target유전자 서열의 탐색 (4) Transposon mutagenesis으로 target유전자의 인위적인 돌연변이체 제작. 유도저항성이 감소하는 클론탐색(3)의 결과와 상반되는 표현형찾기). (b) (3)의 클론과 (4)의 클론의 서열이 일치하는 유전자 부위확보(위) 및 유전자서열의 분석(아래). 1.2kb의 서열이며 약 7개의 Open Reading Frame을 가지고 있다. (c) 유도 저항성을 일으키는 유전자 서열들의 분석

제 2 절. 식물/미생물 천연물로부터 식물전신저항성 증진제 선별 및 기전연구

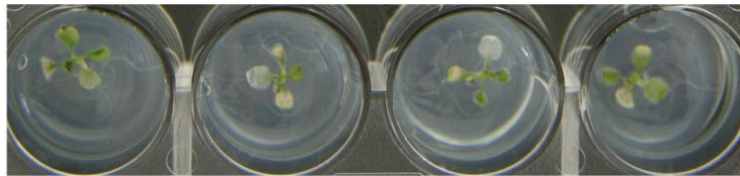
1. 유도저항성 형성에 관여하는 식물 유래 천연물 동정

가. 애기장대에서 *Erwinia carotovora* 에 대한 저항성을 증가시키는 천연물의 동정

본 연구실에서는 천연물에 의한 유도저항성 증가 효과를 확인하기 위하여 애기장대와 *E. carotovora* 병원균을 사용하였다. 애기장대는 식물의 성장 속도가 빠르고 크기가 작아 빠르게 많은 식물을 재배할 수 있는 장점이 있다. *E. carotovora*는 necrotrophic 병원균으로 감염 시 1일 이내에 식물의 잎이 녹아내리는 병증을 보여 병증의 발생 여부를 쉽고 빠르게 구분할 수 있는 장점이 있다. 각각의 천연물을 10일간 키운 애기장대 유식물 12개체에 2일간 처리하여 유도저항성이 형성되도록 한 이후 *E. carotovora*를 처리한 후 1일 후에 식물의 병증 발생 여부를 확인하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군에서는 모든 식물체가 병증을 나타내는데 비하여 80%이상의 식물이 저항성을 보이는 천연물을 선별한 결과 총 34종의 천연물이 유도저항성 효과를 나타내고 있음을 확인할 수 있었다 (그림 3-11, 표 3-5).

천연물을 기반으로 한 유도저항성 증진제를 개발하기 위해서는 매우 낮은 농도의 천연물로도 저항성을 유도할 수 있어야한다. 따라서 선별된 34종의 천연물을 대상으로 본래의 처리량 (5mg/plant)의 1/100, 1/10,000을 처리하여 여전히 유도저항성 효과를 보이는 천연물을 검색하였다. 그 결과 총 9종의 천연물이 식물 당 0.5 μ g의 처리만으로 50% 이상의 식물에서 유도저항성 효과를 보임을 확인할 수 있었다 (표 3-6).

대조군



천연물
처리구

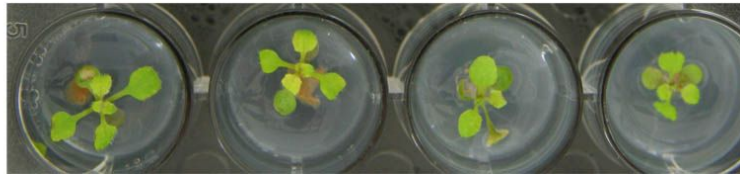


그림 3-11. 천연물에 의한 유도저항성 증가 효과. 아무 처리하지 않은 대조군에서는 *E. carotovora*에 의해 식물의 엽록소가 모두 파괴되고 잎이 녹아내리는데 반해 천연물을 처리한 식물은 높은 저항성을 보이고 있음을 확인할 수 있다.

표 3-5. 80% 이상 식물에서 *E. carotovora*에 대한 저항성을 증가시킨 천연물

	생존율 (%)		생존율 (%)
쇠고비	83.333333	털맹강나무	100
산겨릅나무	83.333333	창고사리	100
보리밥나무	100	섬다래	100
난티나무	100	쭈	80
큰금계국	100	나도옥잠화	100
곰작고사리	100	해당화	100
신갈나무	100	후박나무	83.33333333
개비름	83.333333	동근이질풀	100
두충	100	참소리쟁이	100
물참대	80	냉초	80
점나도나물	83.333333	벌개미취	100
차나무	100	탑꽃	100
맹맹이덩굴	83.333333	얇은잎고광나무	100
황벽나무	80	기름나물	100
바위구절초	83.333333	갯능쟁이	100
조팝나무	100	참당귀	100
꽃창포	100	좁쌀바귀	100

표 3-6 식물당 0.5ug의 처리로 유도저항성을 증가시킨 천연물

처리량	생존율 (%)		
	5 mg	50 µg	0.5 µg
개비름	83.33333	50	50
두충	100	33.33333	50
물참대	80	16.66667	50
조팝나무	100	50	50
갯능쟁이	100	50	50
후박나무	83.33333	16.66667	50
참소리쟁이	100	16.66667	50
벌개미취	100	50	50
냉초	80	50	83.33333

나. 광범위한 병원균에 대한 유도저항성을 일으키는 천연물의 동정

Necrotrophic 병원균에 대한 저항성은 주로 식물 호르몬인 자스몬산과 에틸렌이 관여하는데, 이들은 hemibiotrophic 병원균에 대한 저항성에 중요한 역할을 하는 살리실산 신호전달을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 necrotrophic 및 hemibiotrophic 병원균 모두에 대한 저항성을 증가시킬 수 있는 기작은 현재까지 거의 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구실에서는 광범위한 병원균에 대한 유도저항성을 일으킬 수 있는 천연물을 동정하기 위해 necrotrophic 병원균인 *E. carotovora* 뿐 아니라 hemibiotrophic 병원균인 *Pto* DC3000에 대한 저항성도 동시에 증가시키는 천연물을 동정하고자 하였다. 그러나 hemibiotrophic 병원균은 병증이 나타내는데 상대적으로 오랜 시간이 걸리고 (3-5일) 병증이 뚜렷하지 않아 병증의 확인을 통한 저항성의 증감 여부를 판단하기 어려운 점이 있다. 따라서 본 연구실에서는 자스몬산과 살리실산 신호전달의 보고자 유전자인 *JIN1*과 *PAL1*의 발현 증가 여부를 확인함으로써 *Pto* DC3000에 대한 유도저항성을 증가시키는 천연물을 동정하였다 (그림 3-12).

그 결과 총 2종의 천연물이 *E. carotovora*와 *Pto* DC3000에 대한 저항성을 동시에 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이들은 모두 1/10,000 희석 하였을 때도 *E. carotovora*에 대한 높은 유도저항성 효과를 보여 작물의 광범위 유도저항성 증진제 개발의 매우 좋은 후보 물질임을 확인할 수 있었다.

다. 동정된 천연물의 살균효과 검증

본 연구의 목적은 천연물에 의해 식물의 유도저항성을 증진시킴으로서 병원균에 대한 저항성을 증가시키는 것이다. 그러나 본 연구실에서 수행한 천연물의 동정 방법은 천연물이 직접적으로 병원균에 대한 살균 효과를 보이는 경우를 구분할 수 없는 단점이 있다. 따라서 본 연구실에서는 동정된 천연물이 병원균에 대한 살균 효과에 의해 저항성을 증가시키지 않았음을 확인하기 위하여 이들이 병원균의 생장에 미치는 영향을 확인하였다 (그림 3-13). 그 결과 단 1종의 천연물을 제외하고는 *E. carotovora*의 생장에 전혀 영향을 미치지 않음을 확인, 천연물에 의한 병저항성 증진 효과가 식물의 유도저항성 조절을 통해 나타난 것임을 확인할 수 있었다.

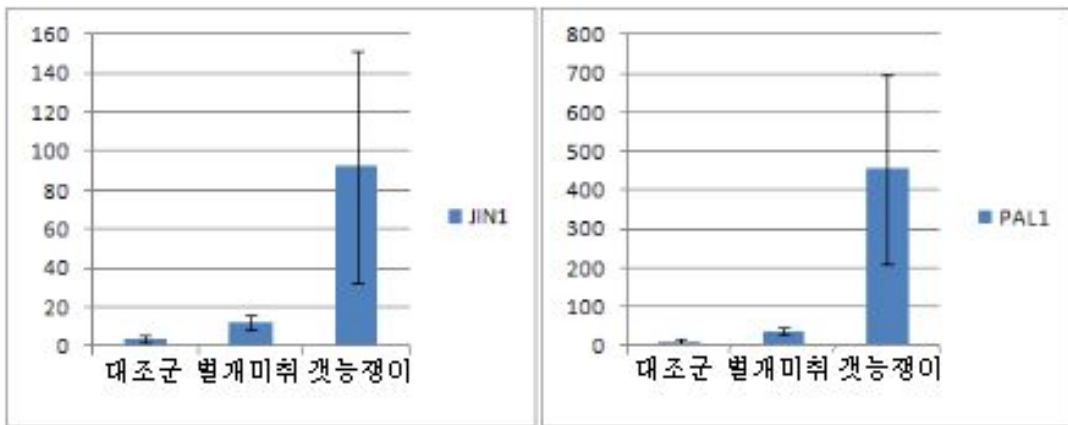


그림3-12. 별개미취와 갯능쟁이 추출물 처리에 의한 *JIN1*과 *PAL1*의 발현 증가

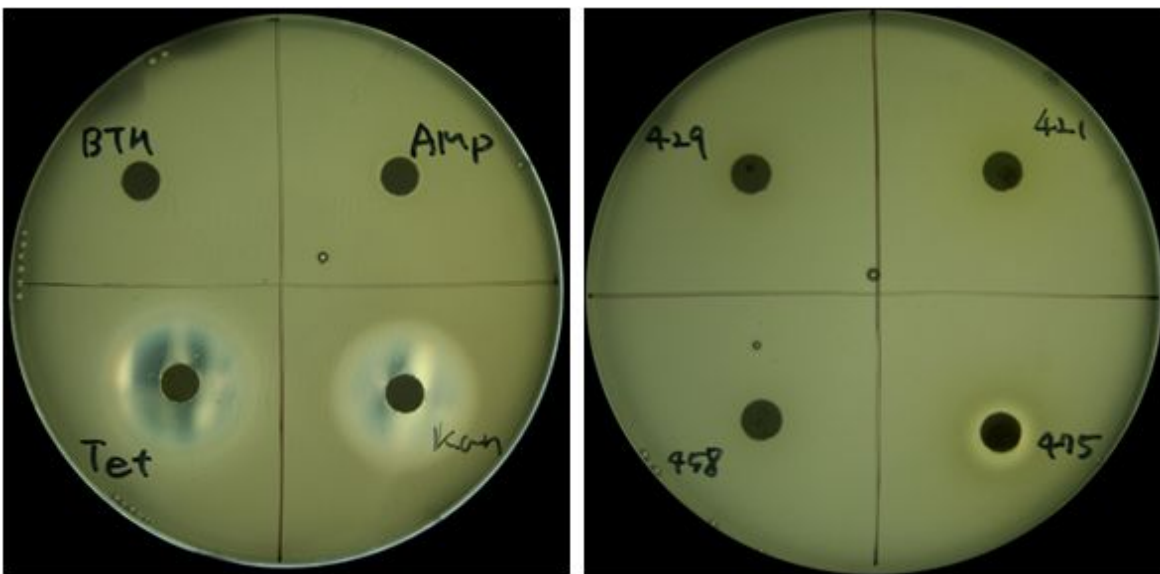


그림 3-13. 천연물에 의한 *E. carotovora*의 성장 저해 효과. (왼쪽) *E. carotovora*의 성장을 저해하는 것으로 알려진 tetracyclin과 kanamycin의 효과. (오른쪽) 475번 (조팝나무 추출물)에 의한 *E. carotovora*의 성장 저해 효과.

2. 유도저항성 형성에 관여하는 생약 추출물 동정

가. 애기장대에서 *Erwinia carotovora* 에 대한 저항성을 증가시키는 생약 추출물의 동정

본 연구실에서는 생약 추출물에 의한 유도저항성 증가 효과를 확인하기 위하여 애기장대와 *E. carotovora* 병원균을 사용한 screening을 진행하였다. 각각의 생약 추출물을 7일간 키운 애기장대 유식물 3개체에 3일간 처리하여 유도저항성이 형성되도록 한 이후 *E. carotovora*를 처리한 후 1일 후에 식물의 병증 발생 여부를 확인하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군에서는 모든 식물체가 병증을 나타내는데 비하여 100%의 식물이 저항성을 보이는 생약 추출물을 선발한 결과 335종의 생약 추출물 중 총 11종의 천연물이 유도저항성 효과를 나타내고 있음을 확인할 수 있었다 (그림 3-14, 표 3-7). 여기에서 특히 사항은 각 생약성분이 각각 약탕기를 통한 추출과 에탄올을 용매로 한 추출 두 가지 방식으로 추출되었는데, 모든 유도저항성 증진 효과를 내는 추출물이 약탕기를 이용한 추출 방식을 통해 추출 되었다는 점이다.

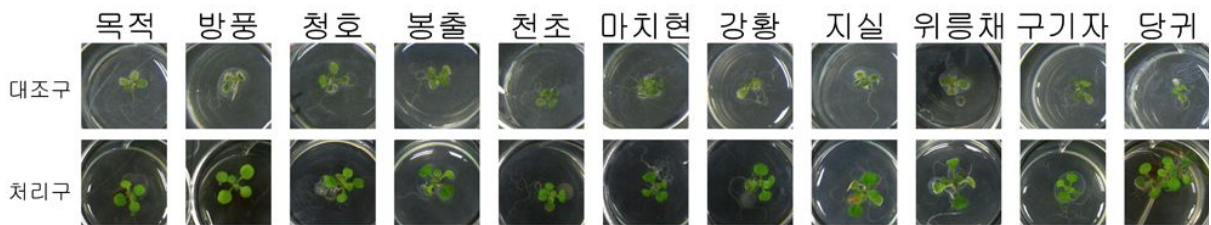


그림 3-14. 생약 추출물에 의한 유도저항성 증가 효과. 아무 처리하지 않은 대조군에서는 *E. carotovora*에 의해 식물의 엽록소가 모두 파괴되고 잎이 녹아내리는데 반해 생약 추출물을 처리한 식물은 높은 저항성을 보이고 있음을 확인할 수 있다.

표 3-7 모든 식물체에서 *E. carotovora*에 대한 저항성을 증가시킨 천연물

강황	<i>Curcumae longae Rhizoma</i>
마치현	<i>Portulacae Herba</i>
봉출(초)	<i>Zedoariae Rhizoma</i>
위릉채(지내초)	<i>Potentillae Radix</i>
지실	<i>Ponciri Fructus</i>
천초	<i>Zanthozyli Pericarpium</i>
청호	<i>Artemisiae Apiaceae Herba</i>
방풍	<i>Ledebouriellae Radix</i>
구기자(북)	<i>Lycii Fructus</i>
당귀(신)	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>
목적	<i>Equiseti Herba</i>

나. 생약 추출물에 의한 유도저항성 증가 기작의 규명

광범위한 병원균에 대한 유도저항성을 일으키기 위해서는 necrotrophic 병원균에 대한 저항성에 중요한 역할을 하는 식물 호르몬인 자스몬산과 에틸렌 신호 전달 및 biotrophic 병원균에 대한 저항성에 필요한 살리실산 호르몬 신호 전달이 모두 활성화 되어야 한다. 따라서 본 연구실에서는 앞서 선발된 11종의 생약 추출물을 대상, 자스몬산 산호 전달의 보고자 유전자인 *JINI*과 살리실산의 신호전달에 의해 활성화되는 *PRI* 유전자의 발현 조절 여부를 확인 하였다 (그림 3-15).

그 결과 강황, 위롱채, 천초, 지실, 당귀의 경우 살리실산과 자스몬산 신호전달을 모두 활성화 하는 것을 확인할 수 있었고, 따라서 이들 생약 추출물이 식물체에 광범위한 유도저항성을 일으킬 수 있는 가능성이 매우 높음을 알 수 있었다. 이에 따라 현재 이들 생약 추출물에 대한 포장 실험을 준비 중에 있다. 앞서 언급한 바와 같이, 유도저항성 증진 효과를 보이는 생약 추출물은 모두 전통적인 약탕 방식으로 추출된 것으로서, 실제 제품화를 위한 공정의 개발이 매우 쉽고 추출물이 수용성이기 때문에 시비가 쉬운 장점이 있다. 따라서 앞으로 포장 실험을 통해 작물에 유도저항성을 일으키는 생약 추출물이 확인될 경우 빠르게 제품화가 가능할 것으로 예상된다.

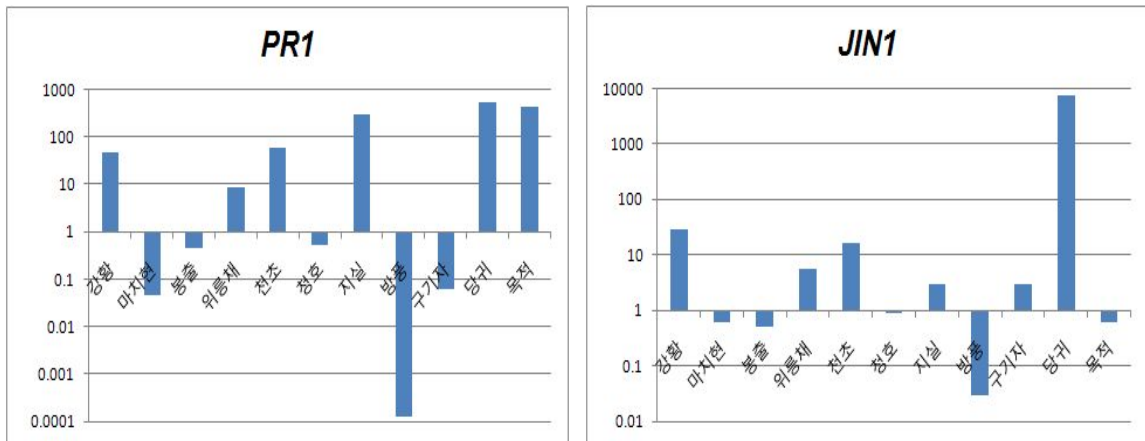


그림 3-15. 생약 추출물에 의한 살리실산과 자스몬산 신호전달의 조절. 구기자는 자스몬산 신호전달만을, 목피는 살리실산 신호전달만을 활성화 시키는 것을 확인할 수 있다. 또한 마치현, 봉출, 청호, 방풍 추출물은 기존 살리실산과 자스몬산이 아닌 다른 병저항성 신호 전달 경로를 통해 *E. carotovora*에 대한 유도저항성을 생성함을 확인할 수 있다 (세로축: 대조구 대비 처리구에서의 *PR1* 과 *JIN1*의 발현 변화 비율)

3. 유도저항성 형성 기작의 규명

가. Chromatin remodeling factor에 의한 유도저항성 조절 기작의 규명

Beta-aminobutyric acid (BABA) 는 본 연구를 통해 발굴된 천연물과 같이 식물유래 천연물이며 식물의 유도저항성을 형성하는 것으로 알려져 있다. 본 연구를 통해 천연물에 의한 유도저항성 생성 기작을 연구하기 위하여 BABA에 의한 유도저항성 형성 과정에 관여하는 유전자를 발굴하였다. 이를 위하여 애기장대에 존재하는 chromatin remodeling factor중 11개 유전자의 knockout line을 구축, BABA에 의한 유도저항성에 영향을 미치는 chromatin remodeling factor를 동정하였다. 그 결과 *DECREASED DNA METHYLATION 1 (DDM1)* 의 knockout에 의하여 BABA에 의한 유도저항성 효과가 크게 증대됨을 확인할 수 있었다 (그림 3-16). 특이한 점은 DDM1이 식물의 면역력에 미치는 효과가 BABA에 의한 유도저항성 반응이 일어났을 때만 나타나며, BABA가 없을 때는 야생형과 동일한 병저항성을 보인다는 점이다 (그림 3-16).

DDM1은 같은 chromatin remodeling factor인 SYD1 과는 달리 병저항성 반응을 억제하는 것으로 확인되었다. DDM1은 다른 chromatin remodeling factor와는 달리 DNA의 메틸화에도 매우 중요한 역할을 하여, *ddm1* knockout의 경우 전체 게놈의 70%의 DNA 메틸화가 없어짐이 알려져 있다. 이러한 DNA의 메틸화는 histone modification의 변화를 통하여 유전자의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구실은 SYD1과 달리 DDM1이 병저항성 유전자의 발현을 억제하는 것이 DDM1에 의한 DNA 메틸화 기작에 의한 것으로 추측하고 있다.

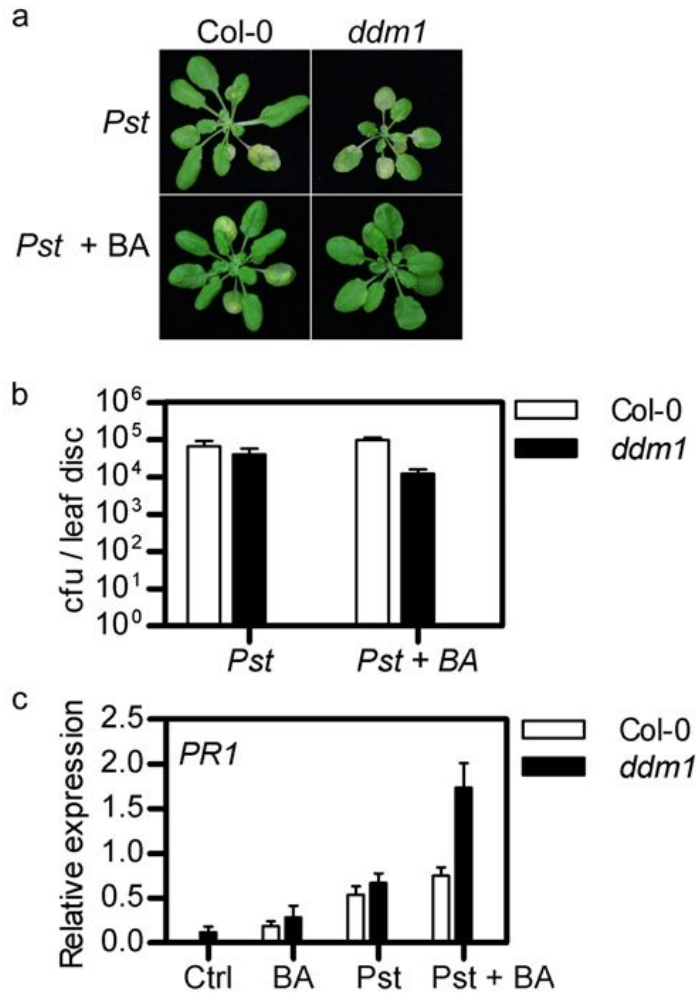


그림 3-16 DDM1에 의한 유도저항성 조절. (왼쪽) BABA를 처리하여 유도저항성이 일어날 경우 *ddm1* knockout은 Col-0에 비해 증가된 저항성을 보인다. (오른쪽) BABA를 처리하지 않았을 경우 *ddm1* knockout은 Col-0와 동일한 저항성을 보인다.

나. DDM1에 의한 유도저항성 억제 과정에 관여하는 목표 유전자 동정

DDM1은 chromatin remodeling factor로써 histone의 위치 및 modification, DNA 메틸화의 조절을 통하여 유전자의 발현을 조절하게 된다. 이에 따라서 *ddm1* knockout에서의 증가된 유도저항성이 유전자의 발현 변화에 의한 것으로 판단, *ddm1* knockout 돌연변이체에서의 microarray 실험을 통하여 DDM1에 의하여 그 발현이 조절되어 유도저항성을 일으키는데 중요한 역할을 하는 유전자를 동정하기로 하였다 (그림 3-17).

야생형의 애기장대 (Col-0)와 *ddm1* knockout 돌연변이체에서 각각 BABA, *Pto* DC3000, BABA 와 *Pto* DC3000을 함께 처리 했을 때의 유전자의 발현 양상을 살펴 본 결과, 많은 유전자가 *ddm1* knockout에서만 그 발현이 증가하거나 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이들 유전자의 발현변화 패턴에 따른 clustering 결과 *ddm1* knockout에서 BABA나 병원균 처리에 의하여 발현이 증가하는 유전자들이 apoptosis, immune response, protein amino acid phosphorylation과 같이 식물의 면역 과정에 관여하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구팀은 이들 DDM1에 의한 발현 조절을 받는 유전자들이 천연물에 의한 유도저항성 생성 과정에서 중요한 역할을 할 것이라 예측, 이들 중 핵심적인 역할을 하는 유전자를 유전자 상호 네트워크 구축을 통하여 동정하였다 (그림 3-18).

이는 현재 애기장대에서의 대단위 yeast two hybrid를 통한 직접적인 단백질-단백질 상호작용 네트워크를 이용, DDM1에 의한 발현 조절을 받는 유전자들의 상호관계 네트워크를 구축하여 봄으로써 이루어졌다. 그 결과 이미 식물의 면역 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 살리실산과 자스몬산 합성 효소인 *ATICS1* 과 *ATLOX2*, 그리고 gene-for-gene resistance에 관여하는 R gene 인 *RPP4* 의 발현이 DDM1에 의해 조절되는 것을 확인, 본 연구를 통해 동정된 새로운 유전자들이 유도저항성 형성 과정에 중요한 역할을 할 수 있을 것임을 알 수 있었다. 따라서 본 연구팀에서는 이러한 새로운 유전자에 대한 유도저항성 형성 과정에서의 역할을 확립 함으로써 천연물에 의한 유도저항성 형성 기작을 규명할 것이다.

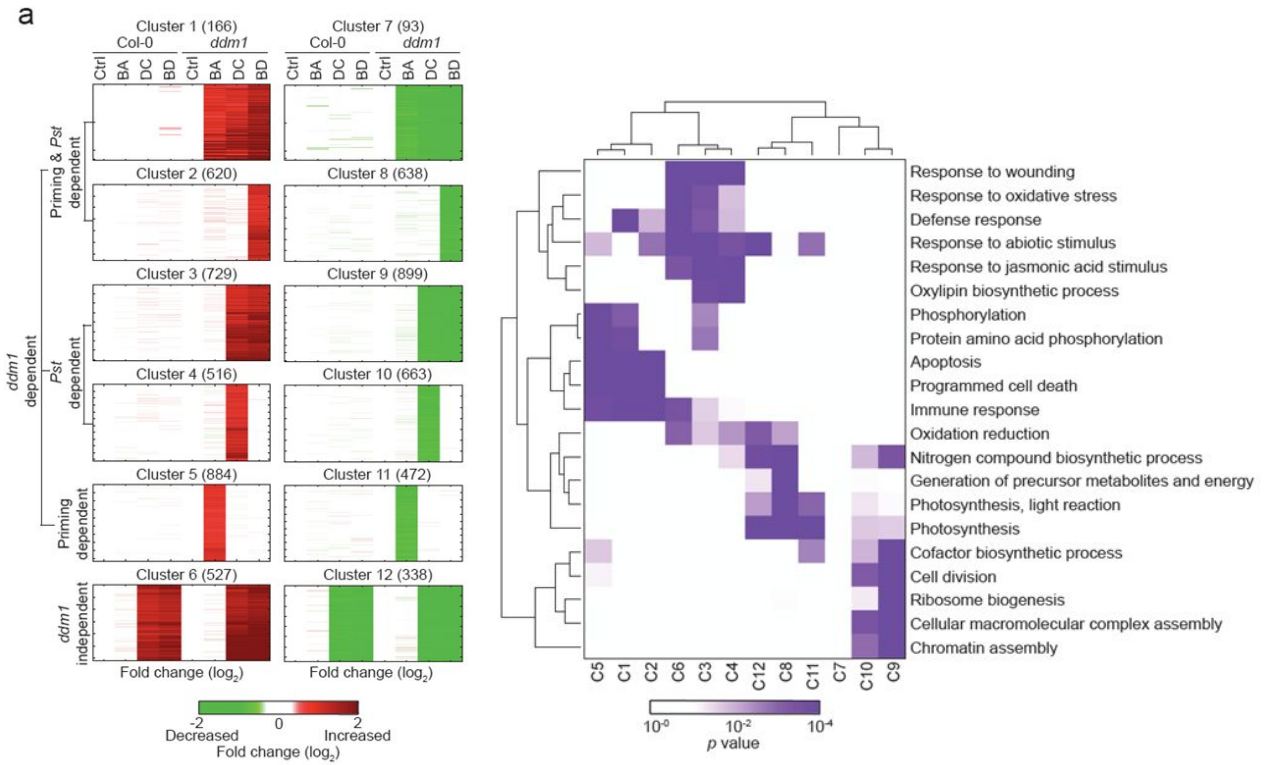


그림 3-17 (왼쪽) *ddm1* knockout에 의한 유전자의 발현 변화. 야생형인 Col-0와 *ddm1* knockout에서 BABA (BA), *Pto* DC3000 (DC), BABA 처리 후 *Pto* DC3000 (BD)을 처리 했을 때의 유전자 발현 양상을 보여주고 있다. (오른쪽) 각 유전자 발현 클러스터에 포함되는 유전자의 기능 분석. *ddm1* knockout에서 발현이 증가되는 클러스터 (C1, C2, C5)에는 apoptosis, protein amino acid phosphorylation, immune response 등 식물 면역과 관련된 유전자가 다수 포함되어 있음을 확인할 수 있다.

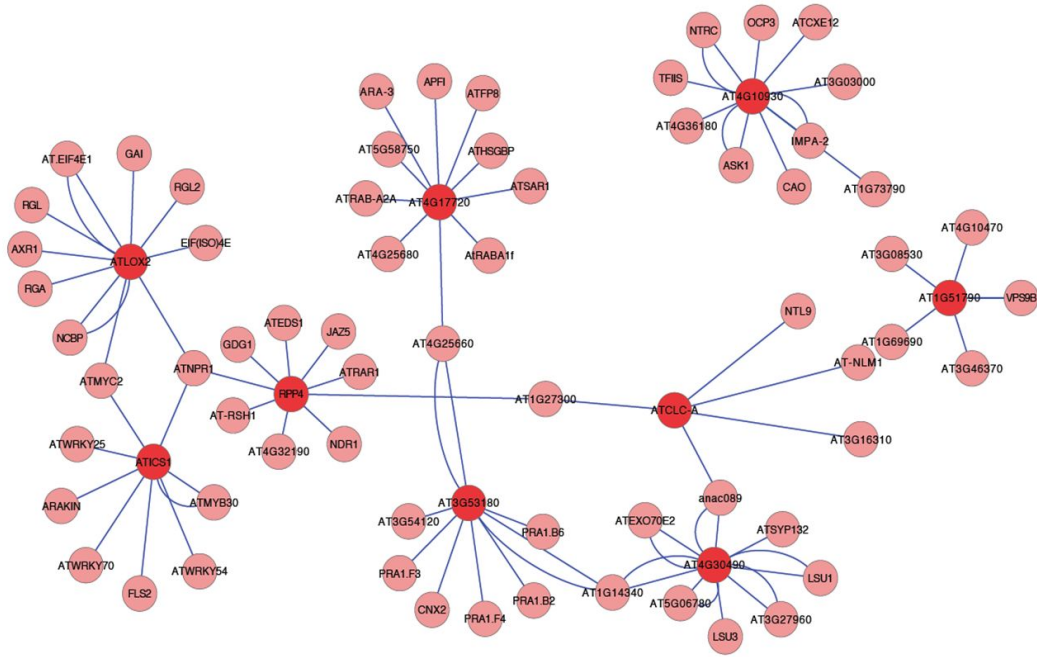


그림 3-18. DDM1에 의해 발현이 조절되는 유전자의 상호작용 네트워크. 진한 붉은색으로 표시된 유전자가 DDM1에 의한 발현 조절을 받는 유전자이다.

제 3 절. 선발 물질의 복합재해저항성 유도물질 포장 적용실험 및 실용화

1. 병저항성 유도 능력이 뛰어난 clone과 천연 추출물 선발

가. 식물 병원균에 대한 유도 저항성 능력을 지닌 형질전환체 선발

(1) 담배 유묘를 통하여 선발 fosmid clone의 저항성 유도 능력 확인

제 1세부과제에서 선발한 3종의 식물병 저항성 유도 형질전환체(Metagenome fosmid clone : 각각 다른 지역과 환경에서 확보된 것으로 일반적으로 평균 30k bp의 사이즈의 DNA가 들어가 있는 클론이 500-1000가 혼합된 형태)에 대하여 저항성 유도 능력의 발현 유무를 확인하기 위하여 기초실험으로 공시작물인 담배를 대상으로 무름병에 대한 저항성 유도 능력을 검정하였다. 2주간 자란 담배 유묘의 뿌리에 각각의 선발 fosmid clone을 배양하여 OD : 1.0으로 적정한 다음 10 μ l를 접종하였다. 일주일 뒤에 담배 유묘의 잎에 무름병 균을 2 μ l씩 접종하고 다음 날 무름병에 대한 저항성 유도 능력을 살펴본 결과 무처리구는 약 63%의 병이 발생하였으며 선발 fosmid clone A1과 B1은 각각 약 21%의 병 발생률을 나타내었다. 선발 fosmid clone C1은 약 48% 정도의 발생률을 보여주었고 대조구로 사용된 *P. chlororaphis* O6는 약 45% 정도 병이 발생하였으며 또 다른 대조구인 BTH의 경우는 약 19%의 병 발생률을 나타내었다. 무처리구와 비교하여 방제가를 산출한 결과 A1과 B1은 약 67%의 방제가를 나타내었고 C1은 약 24.6%, 대조구인 O6와 BTH는 각각 28.8%, 69.8%의 방제가를 보여주었다 (그림3-19, 20).

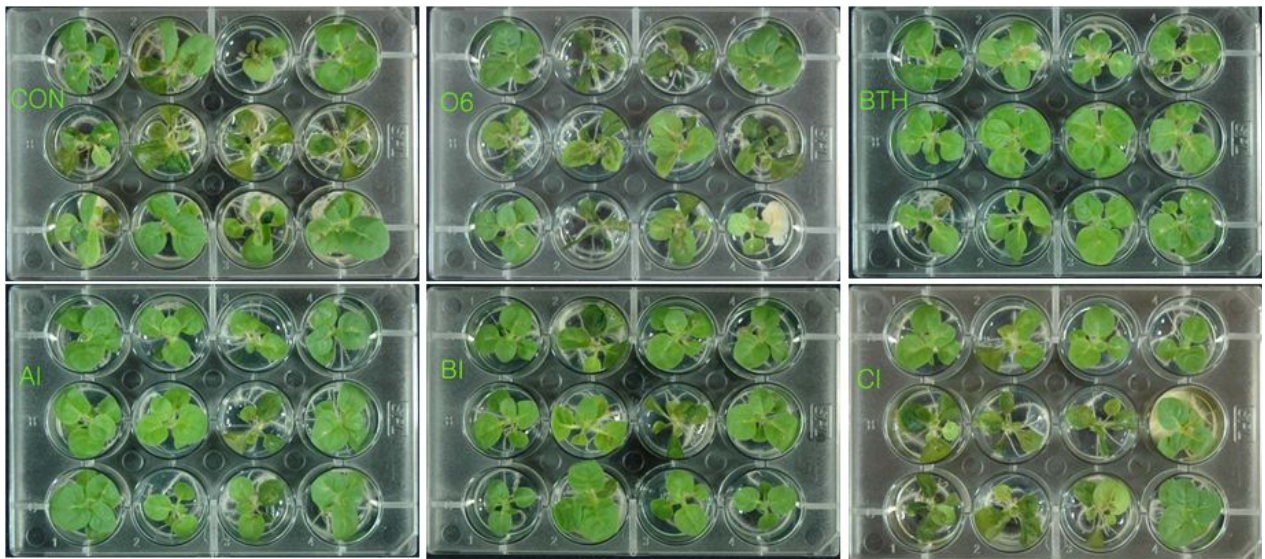


그림 3-19. 선발된 균주 처리 후 담배 무름병에 대한 저항성 유도 능력 확인

담배 무름병 발병율

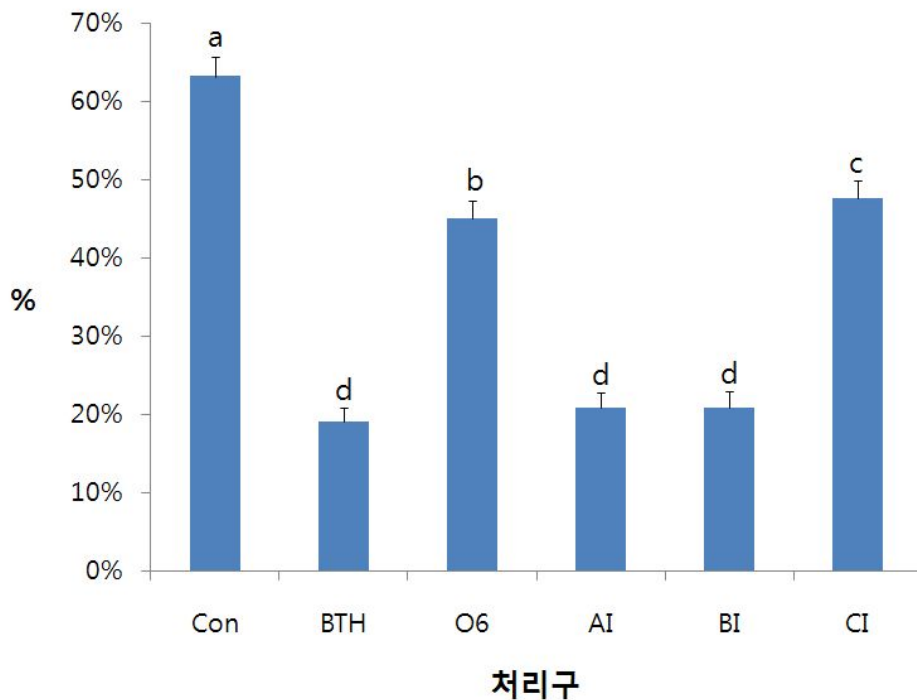


그림 3-20. 선발된 균주 처리 후 담배 무름병에 대한 발병률 및 방제가 조사. 대상작물 : 담배 (*tobacco* cv. *Xanthi*), 대상병원균 : 담배 무름병균 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCCI), 공시재료 : 선발된 저항성 유도 fosmid clone A1, B1, C1, 대조구-1 : 식물병 저항성 유도 균주로 알려진 *Pseudomonas chlororaphis* O6, 대조구-2 : 식물병 저항성 유도 물질로 알려진 Benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH)

(2) 벼의 유묘를 통한 키다리병에 대한 저항성 유도 능력 검정

벼의 키다리병에 대한 저항성 유도 검정에서는 선발균주와 다양한 대조구를 종자 처리한 후 4주간 벼를 생육시켜 발생하는 키다리병 감염률을 조사하였다. 감염종자로 사용한 품종은 호평벼이며 감염 정도는 95% 이상의 종자만 선발하여 실험에 사용하였다. 4주후 키다리병에 대한 감염률을 조사한 결과 무처리구에 비해 벼 유묘의 신초 길이가 선발 fosmid clone A1, B1, C1의 경우 약 11.26%, 15.52%, 11.47% 정도가 작았다. 대조구로 사용된 BTH와 *P. chlororaphis* O6의 경우에는 무처리구와 비교하여 약 23.17%, 23.48%가 작았으며 키다리병 전문 종자 소독제로 사용되는 작물 보호제인 스포탁 2,000배 처리구에서는 무처리구와 비교하여 약 24.45% 정도 신초의 크기가 작았음을 확인하였다 (그림 그림 3-21).

키다리병 발생 유무를 조사한 결과 무처리구는 약 68.63%의 병이 발생하였으며 선발 fosmid clone A1과 C1은 각각 약 50.7%, 53.66%의 다소 높은 병 발생률을 나타내었지만 B1의 경우에는 약 37.5%의 병발생률을 보여주었다. 대조구로 사용된 *P. chlororaphis* O6는 약 24.49% 정도 병이 발생하였으며 또 다른 대조구인 BTH의 경우는 약 9.68%의 병 발생률을 나타내었고 키다리병 전용 약제인 스포탁 처리구에서는 약 15.25% 병 발생률을 나타내었다. 무처리구와 비교하여 방제가를 산출한 결과 선발 fosmid clone A1과 C1은 각각 약 26.13%, 21.81%의 방제가를 나타내었고 B1은 약 45.36%의 방제가를 나타내었다. 대조구인 O6와 스포탁은 각각 64.32%, 77.78%의 방제가를 보여주었고 BTH의 경우는 가장 높은 85.9%의 높은 방제가를 나타내었다 (그림3-22, 3-23).

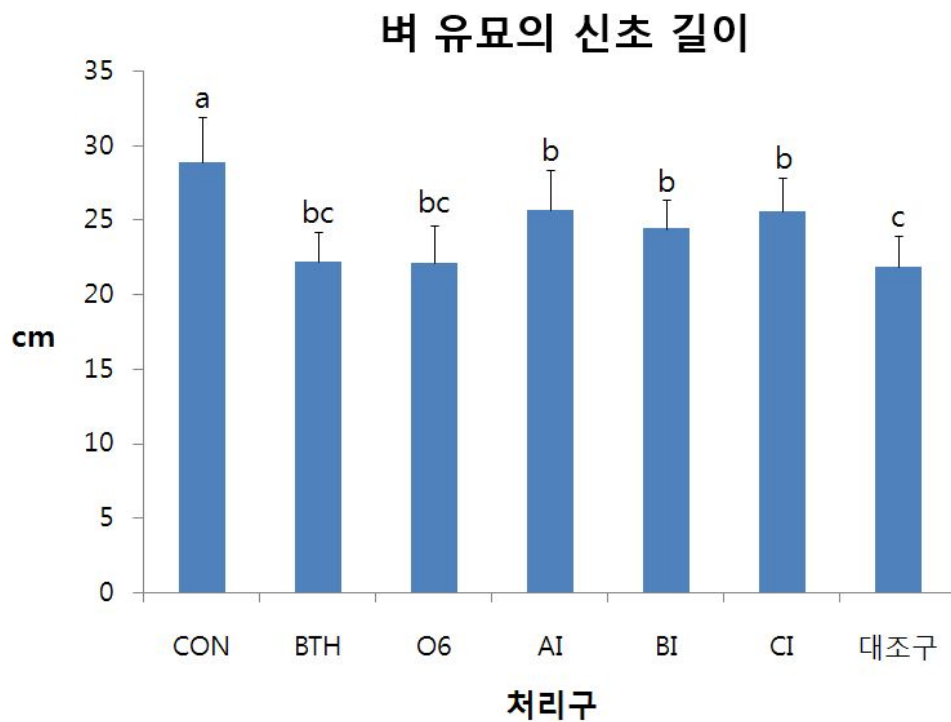


그림 3-21. 키다리병 감염 종자에 선발 균주 처리후 벼 유묘 신초 길이 조사. 대상작물 : 벼 (호평벼, 키다리병 감염률 95% 이상), 대상병원균 : 벼 키다리병, 공시재료 : 선발된 저항성 유도 균주 A1, B1, C1, 대조구 : *P. chlororaphis* O6, BTH, 스포탁 (prochloraz 25%)

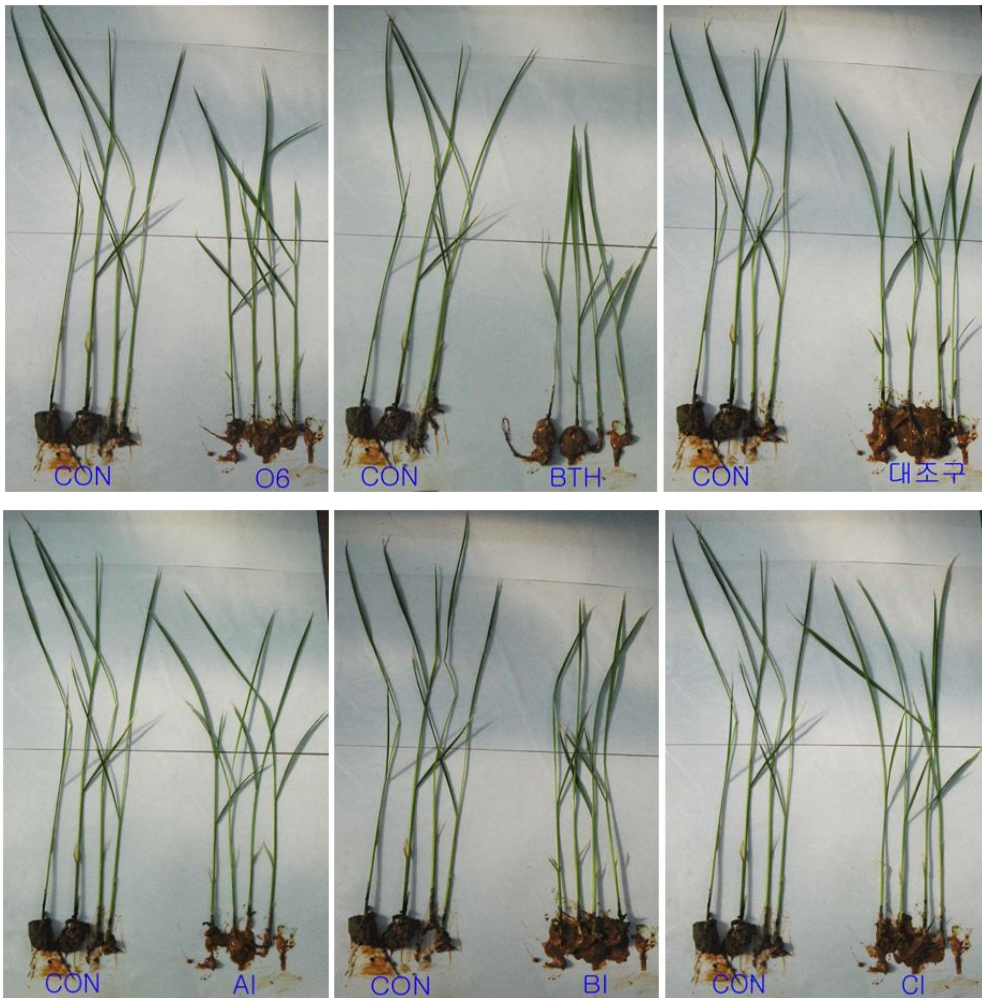


그림 3-22. 벼 키다리병에 감염된 무처리구와 각각의 처리구의 생육모습

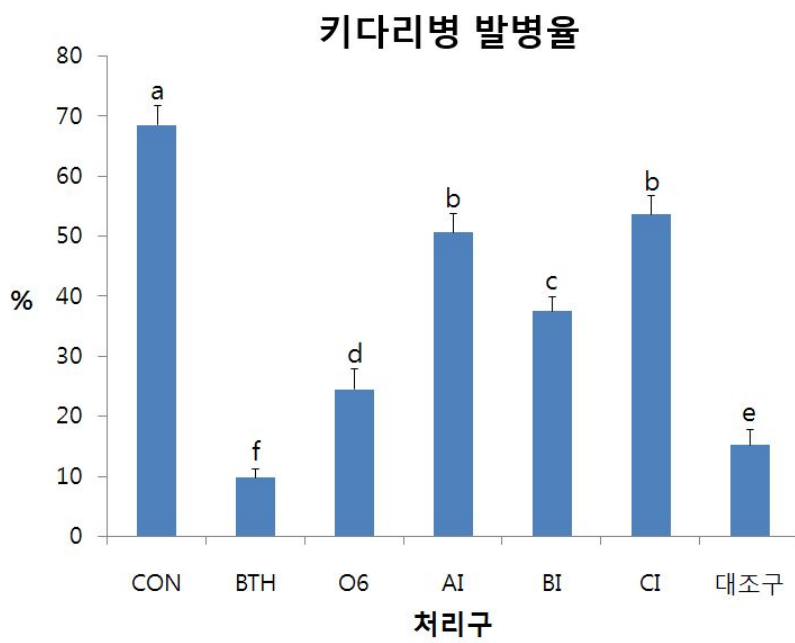


그림 3-23벼 키다리병 발병률 및 방제가 조사

나. 2차년도 선발 fosmid clone과 천연 추출물에 대한 저항성 검정

(1) 담배 유묘를 통하여 선발 fosmid clone의 저항성 유도 능력 확인

(가) 18종 fosmid clone을 대상으로 한 저항성 유도 능력 검정

제 1세부과제에서 1차년도에 선발한 3종의 fosmid clone과 2차년도에 선발한 15종의 fosmid clone을 대상으로 저항성 유도 능력의 발현 유무를 확인하였다. 기초실험으로 공시작물인 담배를 대상으로 무름병에 대한 저항성 유도 능력을 검정하였다. 2주간 자란 담배 유묘의 뿌리에 각각의 선발 균주를 배양하여 OD : 1.0으로 적정한 다음 10 μ l를 접종하였다. 일주일 뒤에 담배 유묘의 잎에 무름병 균을 2 μ l씩 접종하고 다음 날 무름병에 대한 저항성 유도 능력을 살펴본 결과 무처리구는 약 93.8%의 병이 발생하였으며 선발 균주 18종 중 AI, BI, CI, 6D2, B12, C2, D9, E6, A2, B2, D6, G6의 총 12종이 무처리구와 비교하여 유의성 있는 수준에서 병 저항성 유도 효과를 나타내었다. 그 중 positive control인 *P. chlororaphis* O6과 비교하여 오차 범위내의 병저항성 유도 능력을 나타낸 것은 AI, BI, CI, B12, E6, G6이며 또 다른 positive control인 BTH와 비교하여 더 확실한 병저항성 유도 능력을 나타낸 것은 6D2로 조사되었으며 6D2의 병발생율은 14.3%로 다른 어떤 처리구보다도 강력한 유도 저항성 능력을 보여주었다 (그림 3-24, 3-25).

(나) 최종 선발된 7종 균주의 저항성 유도 능력 재 검정

1차 담배 무름병에 대한 저항성 유도 능력 검정 후 선발된 7종의 fosmid clone (AI, BI, CI, 6D2, B12, E6, G6)를 대상으로 저항성 유도 능력을 재확인하기 위한 2차 검정을 실시하였다. 처리 방법은 1차 검정과 동일하게 진행하였으며 무름병을 접종하고 다음 날 무름병에 대한 저항성 유도 능력을 살펴보았다. 2차 검정에서 무처리구는 약 56.3%의 병이 발생하였으며 선발 fosmid clone 7종 중 AI는 약 24.2%, BI는 약 29.4%, CI는 약 35.6%, 6D2는 약 1.3%, B12는 약 21.5%, G6는 약 51.5%, E6는 약 24.4%의 병발생율을 나타내었다. positive control인 O6와 BTH의 경우는 각각 약 24%, 12.7%의 무름병이 발생하였다. 2차 검정에서도 6D2는 가장 강력한 저항성 유도 효과를 나타내었으며 G6를 제외한 나머지 균주에서 모두 무처리구와 비교하여 유의성 있는 저항성 유도 효능을 보여주었다 (그림 3-26).

저항성 유도 능력이 없는 처리구



저항성 유도 능력을 발휘하는 처리구



그림 3-24. 선발된 균주 처리 후 담배 무름병에 대한 저항성 유도 능력 확인

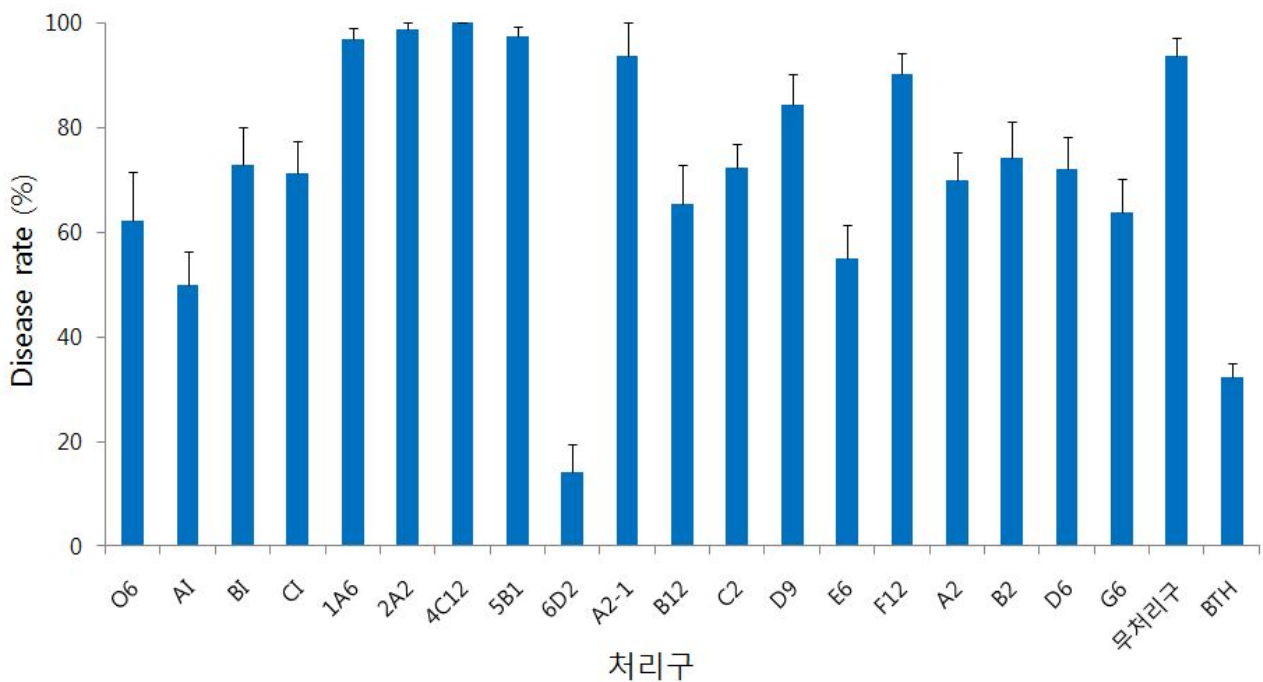


그림 3-25. 선발된 균주 처리 후 담배 무름병에 대한 발병률 및 방제가 조사. 대상작물 : 담배 (*tobacco cv. Xanthi*), 대상병원균 : 담배 무름병균 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCCI), 공시재료 : 선발된 fosmid clone 18종, O6 : 식물병 저항성 유도 균주로 알려진 *Pseudomonas chlororaphis* O6, BTH : 식물병 저항성 유도 물질로 알려진 Benzo (1,2,3) thiadiazole-7- carbothioic acid S-methyl ester (BTH)

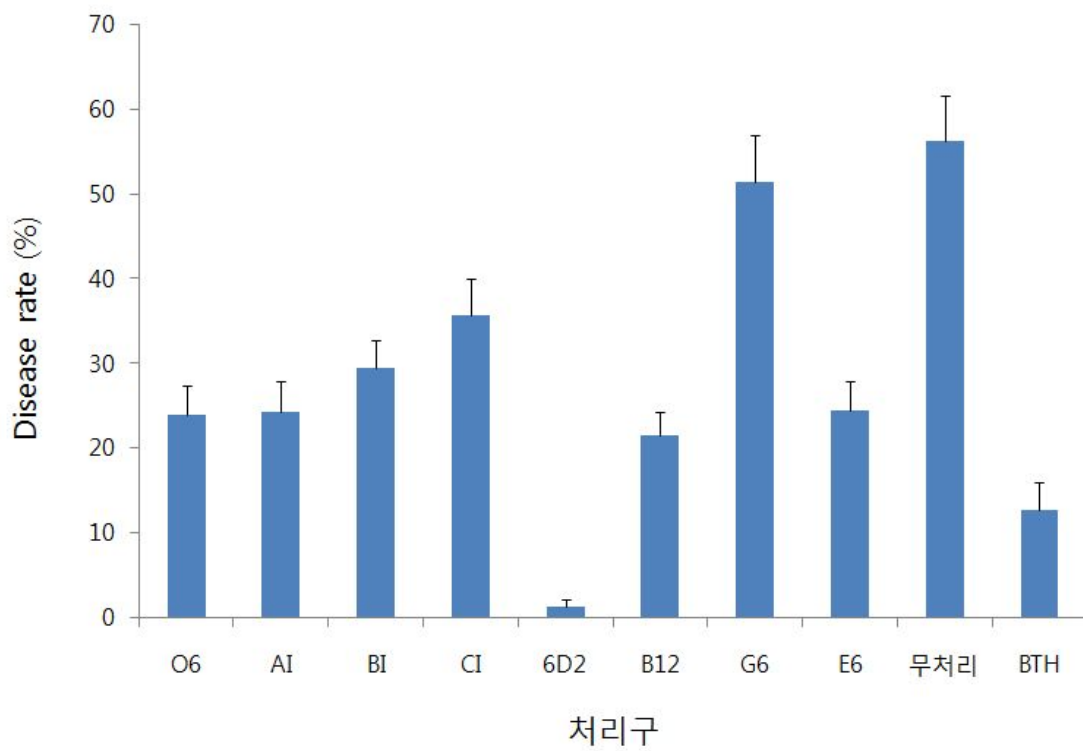


그림 3-26. 선발된 7균주의 저항성 유도 능력 2차 검정 결과

(2) 선발한 천연 추출물에 대한 저항성 유도 능력 확인

(가) 선발된 12종의 천연 추출물을 대상으로 한 저항성 유도 능력 검증

제 1협동과제에서 1차년도에 선발한 2종의 천연 추출물과 2차년도에 선발한 10종의 천연물을 대상으로 저항성 유도 능력의 발현 유무를 확인하였다. 담배의 무름병을 대상으로 실시하였으며 실험 방법은 앞서 진행된 fosmid clone의 선발방식과 동일하게 진행하였다. 실험결과를 살펴보면 무처리구는 약 56.3%의 병이 발생하였으며 선발 천연 추출물 12종 중 갯능쟁이는 약 32.1%, 개비름은 약 56%, 나도옥잠화는 약 23.1%, 냉초는 약 26.3%, 두충은 약 21.5%, 물참대는 약 42.1%, 벌개미취는 약 19.6%, 산겨릅나무는 약 51.9%, 조팝나무는 약 58.1%, 참소리쟁이는 약 31.5%, 털맹강나무는 약 53.8%, 후박나무는 약 59.8%의 무름병이 발생하였다. positive control인 O6와 BTH의 경우는 각각 약 24%, 12.7%의 무름병이 발생하였다. 이 중 무처리구와 비교하여 유의성 있는 저항성 유도 능력을 보여준 갯능쟁이, 나도옥잠화, 냉초, 두충, 물참대, 벌개미취, 참소리쟁이 총 7개의 천연 추출물을 선발하였다. 이 중 나도옥잠화, 냉초, 두충 및 벌개미취는 positive control인 O6와 비교하여 오차범위내의 저항성 유도 능력을 보여주었다 (그림 3-27).

(나) 선발된 6종의 fosmid clone과 7종의 천연 추출물의 최종 선발 검증

총 18종의 Metagenome 균주에서 1차 선발과 2차 선발을 통하여 선발된 6종의 fosmid clone과 최초 12종의 천연 추출물 중 1차 선발을 통하여 선택된 7종의 추출물을 대상으로 식물병 저항성 유도능력이 뛰어난 fosmid clone과 천연물을 선발하기 위하여 마지막 저항성 유도능력 기내 검정을 실시하였다. 실험법은 지금까지 진행된 무름병 실험과 동일하게 진행되었으며 최종 선발의 기준은 무처리구와 비교하여 저항성 유도 능력이 뛰어나며 positive control인 O6와 비교하여 오차 범위 안에 들어가야 한다는 기준을 설정하여 최종 fosmid clone과 물질을 선발하였다. 마지막 선발 실험에서 무처리는 약 91.4% 정도 병이 발생하였으며 선발된 fosmid clone 6종 중 AI는 약 41.7%, BI는 약 51.9%, CI는 약 48.9%, 6D2는 약 2.1%, B12는 약 66%, E6는 약 70%의 병발생율을 나타내었다. 이 중 최종 선발 기준에 적합한 균주는 AI, BI, CI, 6D2 4종으로 최종 포트 및 필드 실험의 재료로 결정하였다. 7종의 천연 추출물의 경우 갯능쟁이는 약 23.8%, 나도옥잠화는 약 41.7%, 냉초는 약 72.9%, 두충은 약 64.1%, 물참대는 약 76.1%, 벌개미취는 약 43%, 참소리쟁이는 약 41.6%의 병발생율을 나타내었고 최종 선발 기준에 적합한 추출물은 갯능쟁이와 나도옥잠화 및 벌개미취와 참소리쟁이의 총 4종을 선발하였다 (그림 3-28).

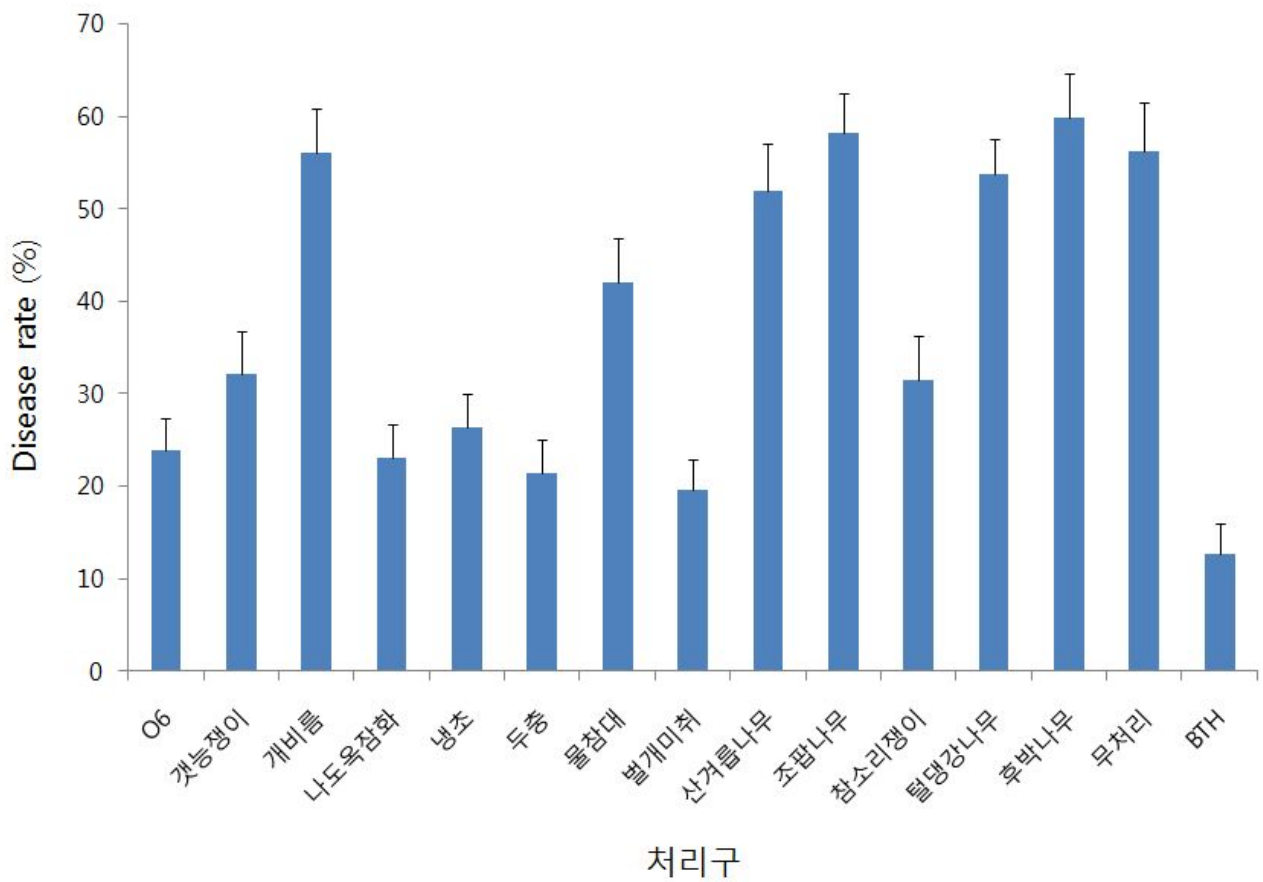


그림 3-27 선발된 천연 추출물 처리 후 담배 무름병에 대한 발병률 및 방제가 조사

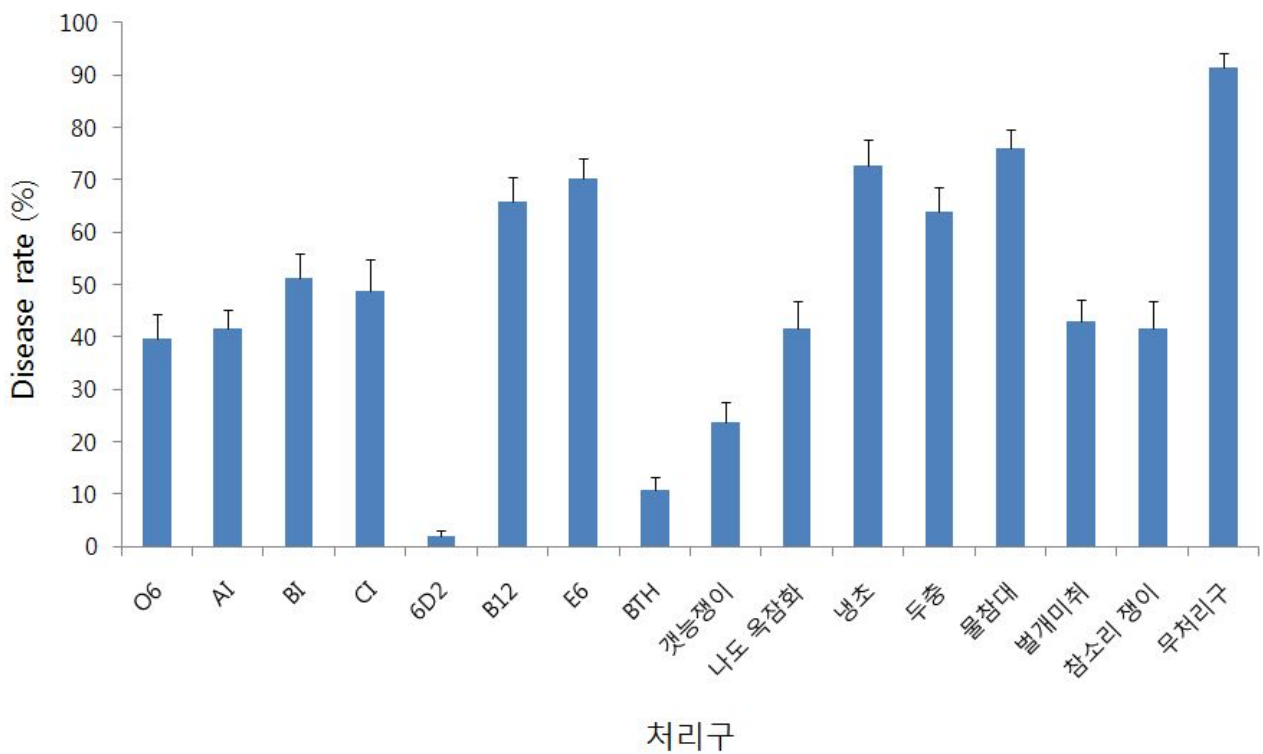


그림 3-29 선발된 6종의 fosmid clone과 7종의 천연 추출물의 최종 선발 검정 결과

(3)선발된 18종의 fosmid clone 이차 대사산물의 병저항성 유도 능력 검정

최초 선발된 fosmid clone의 저항성 유도 능력이 clone 자체의 능력인지 혹은 clone이 생산하는 이차 대사산물에 의한 능력인지 확인하기 위하여 fosmid clone이 생산하는 이차 대사산물을 이용하여 병저항성 유도 능력을 검정하였다. 선발된 18조의 fosmid clone을 최대 48시간 LB에 진탕배양하고 원심분리기를 이용하여 균주를 제외한 배양 상등액 만을 획득하였다. 획득된 상등액을 다시 재 멸균하여 균주를 완전히 제거하고 멸균된 상등액 자체를 담배 유묘 뿌리에 각각 10 μ l씩 접종하고 접종 후 3일 후에 무름병균을 잎에 접종한 후 다음날 무름병에 대한 저항성 유도 능력을 측정하였다. 총 18종 fosmid clone 중에 배양 상등액에서 무처리구와 비교하여 유의성 있는 차이를 보여준 균주는 AI, BI, CI, 6D2, B12의 총 5종의 clone 상등액에서 저항성 유도 능력을 보여주었다. 본 실험 결과를 바탕으로 저항성 유도 능력이 뛰어난 균주는 그들이 생산하는 이차대사산물을 이용하더라도 저항성 유도 능력을 유지하고 있음을 확인하였으나 fosmid clone을 직접 처리한 이전 실험 보다는 저항성 유도 능력이 다소 떨어지는 것을 확인하였다 (그림 3-29).

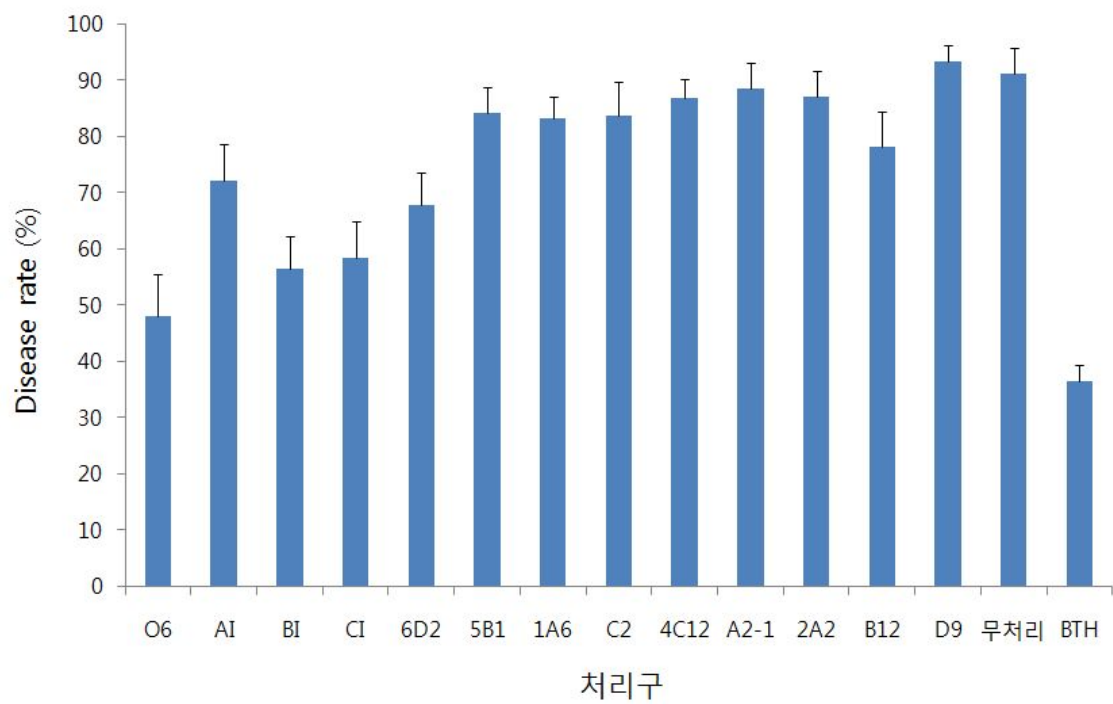


그림 3-29. 선발된 18종의 fosmid clone 이차 대사산물의 병저항성 유도 능력 검정결과

(4) 고추 유묘를 통한 흰가루병에 대한 저항성 유도 능력 검정

(가) 1차 선발된 6종의 fosmid clone과 7종의 천연 추출물의 병방제 효과 (1차 Test)

선발된 저항성 유도 균주를 대상으로 고추 유묘를 통한 병원성 곰팡이에 대한 저항성 유도 능력을 검정하였다. 먼저 4주간 무균 상태에서 키운 고추 유묘를 대상으로 선발된 균주를 포트에 관주 처리한 후 일주일이 지난 시점에 고추 유묘에 흰가루병이 발생하도록 1차로 흰가루병이 발생한 오이 잎을 채취하여 붓으로 털어주고 2차로 흰가루병이 발생한 오이잎을 멸균수에 깨끗이 씻어 멸균수에 희석된 흰가루병 포자를 다시 고추 유묘에 처리하는 방식으로 흰가루병을 발생시켰다 (그림 3-30).

최초 1차 포트 실험에서는 1차 선발된 fosmid clone 6종과 1차 선발된 천연 추출물 7종을 대상으로 실시하였으며 각각의 명칭은 AI, BI, CI, 6D2, B12, E6, 갯능쟁이, 나도 옥잠화, 냉초, 두충, 물참대, 벌개미취, 참소리 쟁이 이다. 대조구로서는 positive control로서 O6와 BTH 그리고 관행농약으로 휘나리를 사용하였으며 무처리구로서는 물을 사용하였다. 흰가루가 발생한 양상을 살펴보면 무처리 구에서는 56.33%의 병이 발생하였으며 나머지 처리구에서는 무처리구와 비교하여 병 발생률이 많이 경감한 것을 확인하였다. 6종의 fosmid clone인 AI, BI, CI, 6D2, B12, E6는 각각 35.67%, 27.17%, 21.17%, 12.17%, 46%, 67%의 병이 발생하였으며 7종의 천연 추출물인 갯능쟁이, 나도 옥잠화, 냉초, 두충, 물참대, 벌개미취, 참소리 쟁이는 각각 27.83%, 31.17%, 47.33%, 54.5%, 46.83%, 30.17%, 32.17%의 흰가루병 발생을 나타내었다. positive control인 O6와 BTH, 휘나리의 경우는 각각 25.67%, 6.33%, 15.0%의 병발생율을 보여주었다 (그림 3-31, 표 3-8).

(나) 최종 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 병방제 효과 (2차 Test)

최종 선발된 저항성 유도 fosmid clone 4종과 천연 추출물 4종을 대상으로 고추 유묘를 통한 병원성 곰팡이에 대한 저항성 유도 능력을 검정하였다. 실험 방법은 이전 실험과 동일한 방법으로 진행하였으며 각각의 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 흰가루병에 대한 병 발생률과 방제가를 조사하였다. 무처리구의 흰가루병 발생률은 약 66.5%이고 각 처리구별 병 발생률을 살펴본 결과 positive control인 O6는 약 34.33%, AI은 약 28%, BI은 약 31.5%, CI은 약 25.33%, 6D2는 약 8.67%의 병발생율을 나타내었고 추출물인 나도 옥잠화는 약 35%, 벌개미취는 약 41.83%, 갯능쟁이는 약 28.33%, 참소리 쟁이는 약 46.17%, 또다른 positive control인 휘나리와 BTH는 각각 5.33%와 15%의 병 발생률을 보여주었다 (그림 3-32, 표 3-9).



그림 3-30 고추 유묘를 통한 흰가루병에 대한 저항성 유도 능력 검정 모습

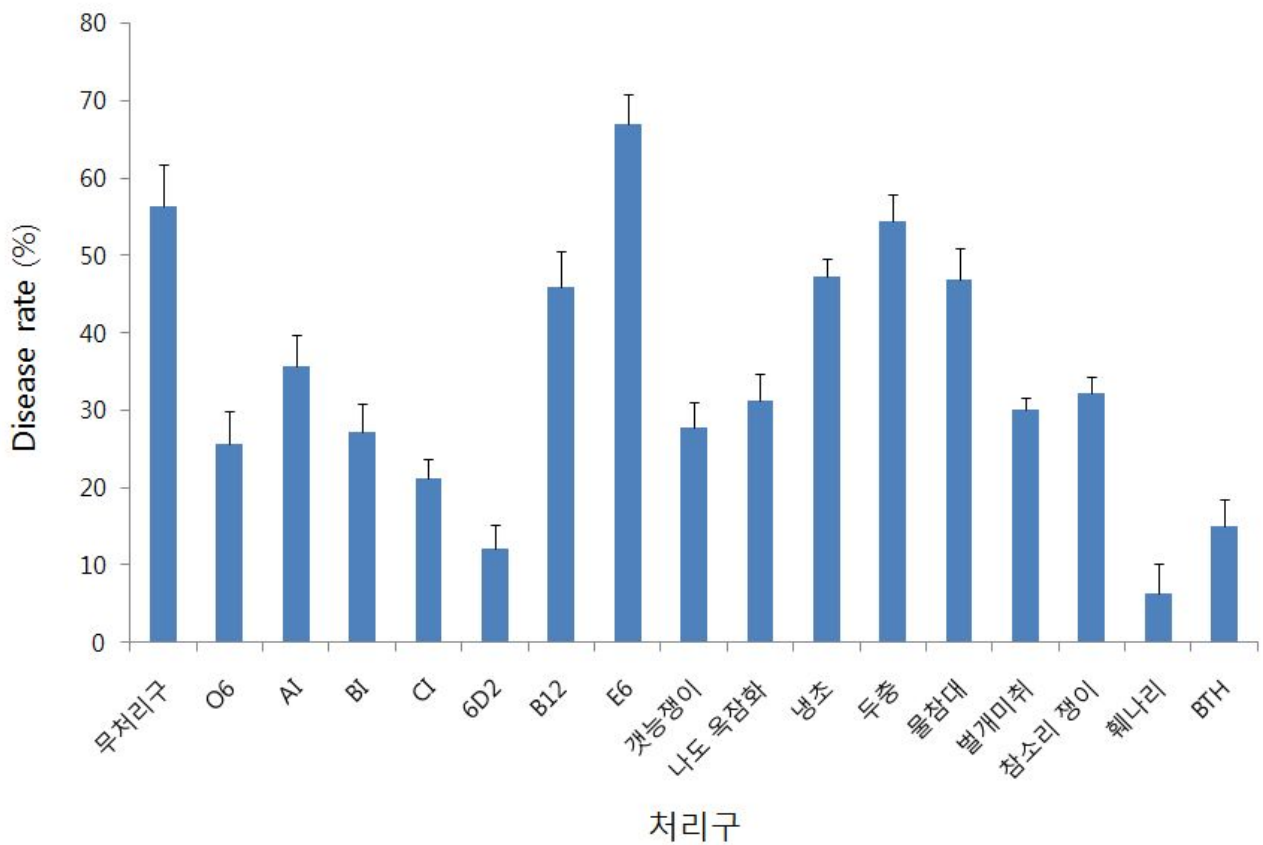


그림 3-31. 고추 유묘를 통한 흰가루병에 대한 저항성 유도 능력 검정 결과

표 3-8. 흰가루병에 대한 1차 방제가

처리구	평균 병발생율 (%)	방제가 (%)
Control	56.33	-
O6	25.67	54.44
AI	35.67	36.69
BI	27.17	51.78
CI	21.17	62.43
6D2	12.17	78.40
B12	46.00	18.34
E6	67.00	-18.93
갯능쟁이	27.83	50.59
나도옥잠화	31.17	44.67
냉초	47.33	15.98
두충	54.50	3.25
물참대	46.83	16.86
벌개미취	30.17	46.45
참소리쟁이	32.17	42.90
훼나리	6.33	88.76
BTH	15.00	73.37

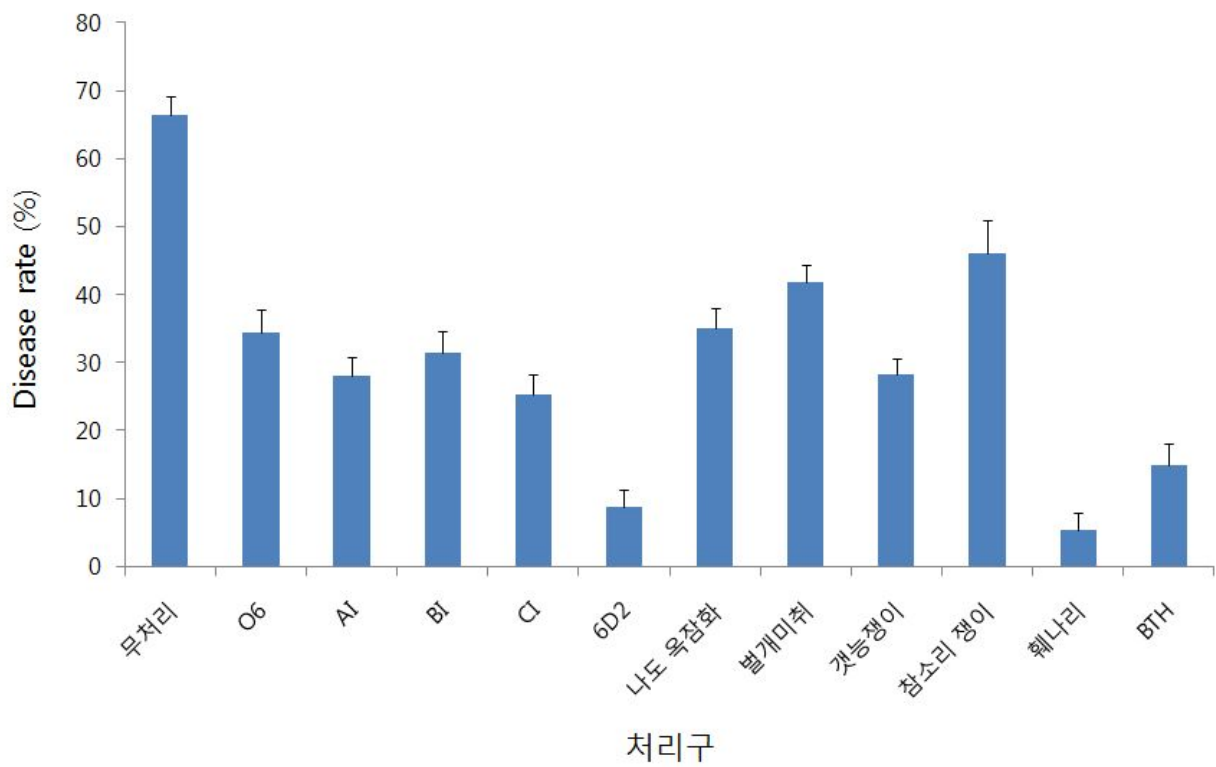


그림 3-32. 최종 선발된 균주 fosmid clone과 천연 추출물의 흰가루병 효과 검정 결과

표 3-9. 최종 선발된 균주와 추출물의 흰가루병에 대한 2차 방제가

	평균 병발생율 (%)	방제가 (%)
Control	66.50	-
O6	34.33	48.37
AI	28.00	57.89
BI	31.50	52.63
CI	25.33	61.90
6D2	8.67	86.97
나도 옥잠화	35.00	47.37
별개미취	41.83	37.09
갯능쟁이	28.33	57.39
참소리쟁이	46.17	30.58
훼나리	5.33	91.98
BTH	15.00	77.44

(5) 비 도열병과 키다리병에 대한 저항성 유도 능력 검정

(가) 비 도열병 검정

비에 발생하는 도열병에 대하여 선발된 fosmid clone과 천연 추출물이 어느 정도 저항성을 유도하는지 알아보기 위하여 포트 검정을 실시하였다. 우선 도열병 실험에서는 도열병에 감수성인 동진벼를 대상으로 두 달간 생육시킨 벼의 잎에 도열병 포자를 경엽 살포하여 도열병 발생 유무를 살펴보았다. 도열병 포자를 살포한 농도는 6.5×10^5 cfu/ml 였으며 병의 발생을 촉진하기 위하여 24시간 100% 습식 챔버에서 병 발생을 조장하였다 (그림 3-33).

4종의 선발 fosmid clone와 4종의 천연 추출물을 벼 뿌리에 관주하고 5일 후 벼의 잎에 도열병을 처리한 후 일주일 지나 병반 개수를 조사한 결과 무처리구에서는 약 66%의 병이 발생하였으며, O6는 약 23.33%, AI는 약 36%, BI는 약 30.67%, CI는 약 23.17%, 6D2는 약 8.67%, 나도 옥잠화는 약 17.50%, 벌개미취는 약 18.33%, 갯능쟁이는 약 40.33%, 참소리쟁이는 약 41.83%, 빔은 약 15.17%, BTH는 약 41.50%의 병 발생률을 나타내었다(그림3-34, 표3-10).



그림 3-33. 벼 도열병 검정 모습

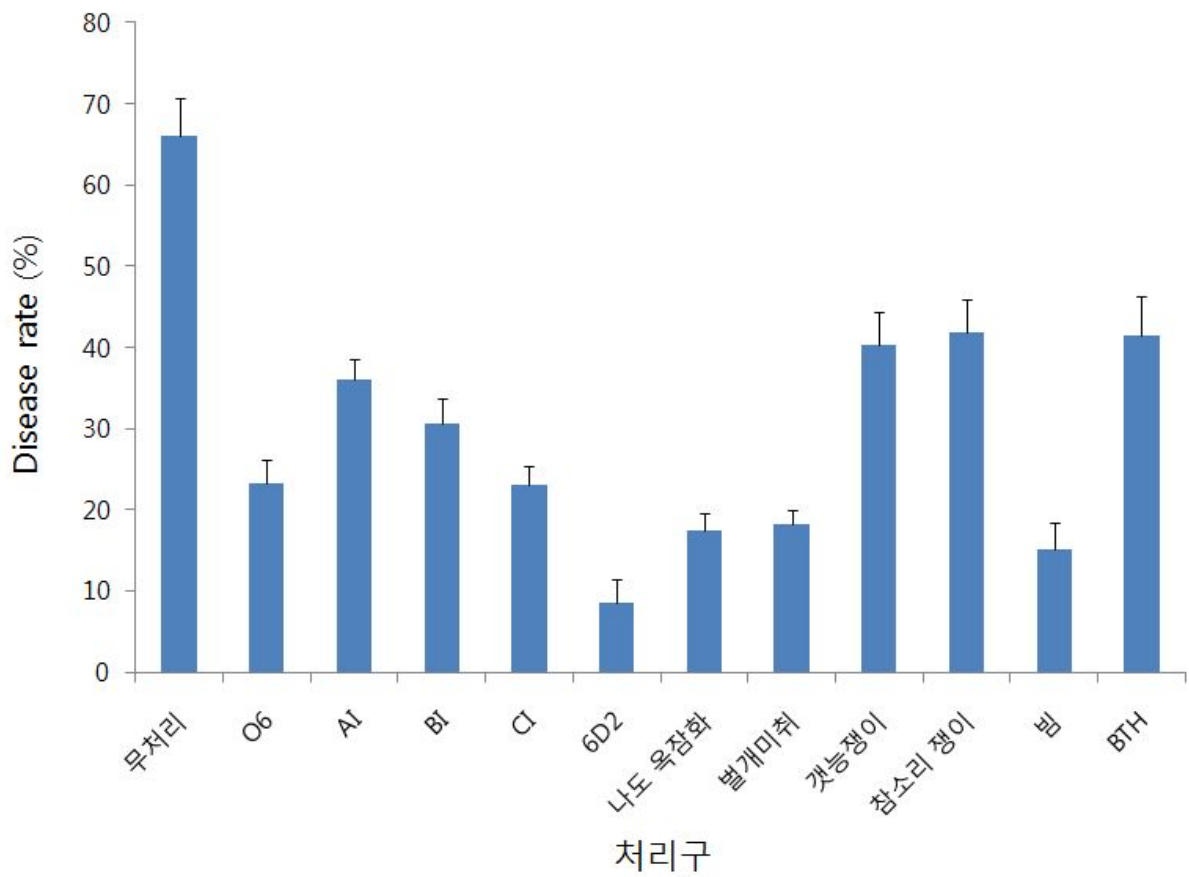


그림 3-34. 최종 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 벼도열병 방제효과 검정 결과

표 3-10. 최종 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 벼도열병에 대한 방제가

	평균 병발생율 (%)	방제가 (%)
무처리	66.00	-
O6	23.33	64.65
AI	36.00	45.45
BI	30.67	53.54
CI	23.17	64.90
6D2	8.67	86.87
나도 옥잠화	17.50	73.48
별개미취	18.33	72.22
갯능쟁이	40.33	38.89
참소리 쟁이	41.83	36.62
빔	15.17	77.02
BTH	41.50	37.12

(나) 벼 키다리병 검정

두 번째 병해 실험인 벼의 키다리병에 대한 저항성 유도 검정에서는 선발 fosmid clone과 천연 추출물을 종자 처리한 후 4주간 벼를 생육시켜 발생하는 키다리병 감염률을 조사하였다. 감염종자로 사용한 품종은 호평벼이며 감염 정도는 95% 이상의 종자만 선발하여 실험에 사용하였다. 4주후 키다리병에 대한 감염률을 조사한 결과 무처리구에서는 약 76.83%의 병이 발생하였으며, O6는 약 33.17%, AI는 약 40.17%, BI는 약 29.67%, CI는 약 36.67%, 6D2는 약 12.83%, 나도 옥잠화는 약 42.83%, 별개미취는 약 37.17%, 갯능쟁이는 약 28.83%, 참소리쟁이는 약 34.67%, 스포탁은 약 19.67%, BTH는 약 20.17%의 병 발생률을 나타내었다 (그림 16, 그림 17, 표4).

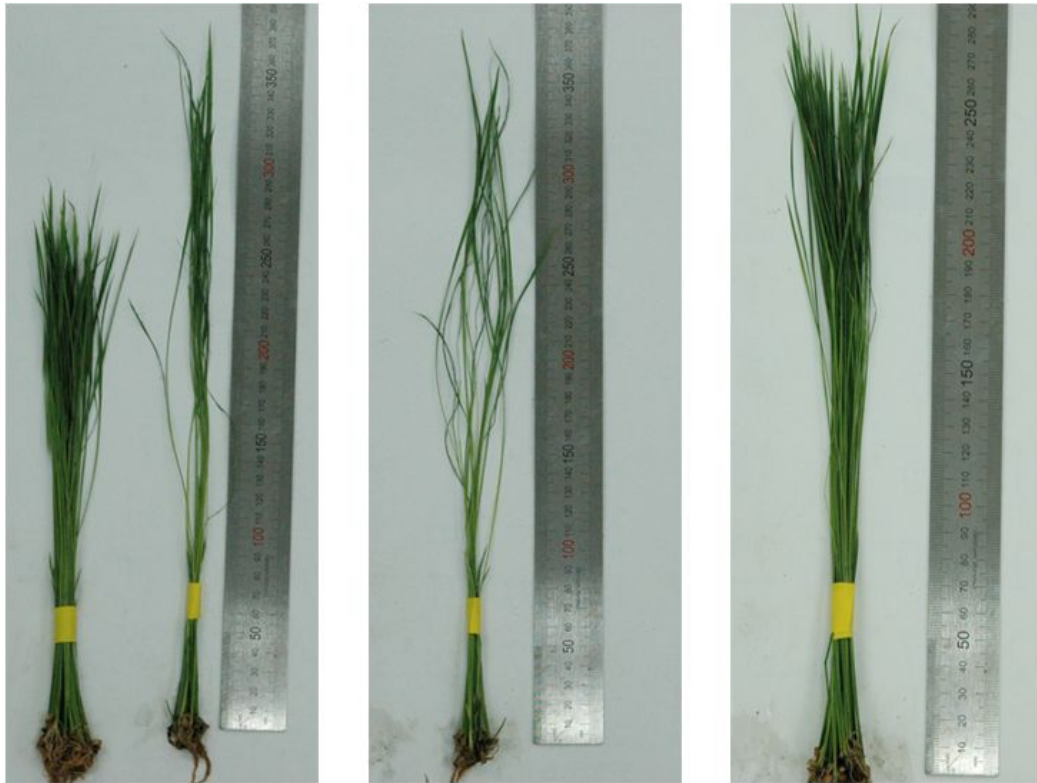


그림 3-35. 키다리병 감염 종자에 선발 균주 및 물질 처리후 벼 유묘 신초 길이 조사

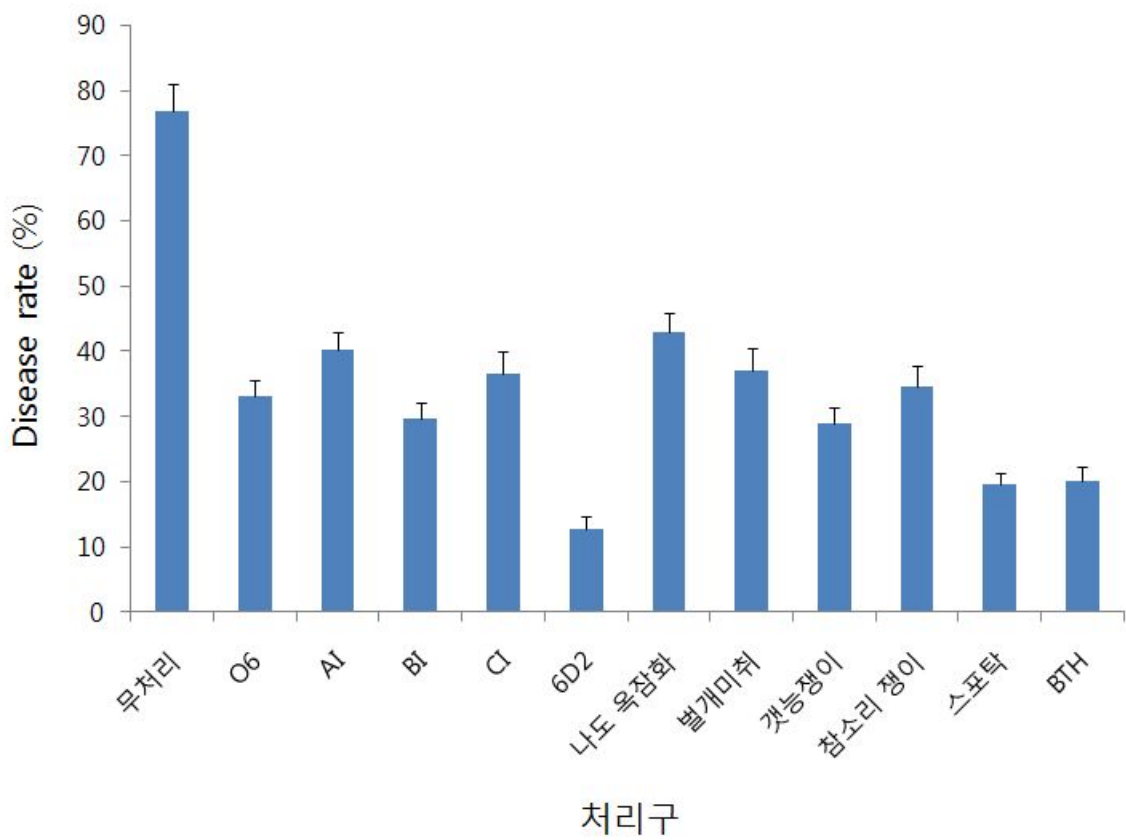


그림 3-36. 최종 선발된 균주와 천연 추출물의 벼 키다리병 방제효과 검정 결과

표 3-11 최종 선발된 균주와 추출물의 벼 키다리병에 대한 방제가

	평균 병발생율 (%)	방제가 (%)
무처리	76.83	-
O6	33.17	56.83
AI	40.17	47.72
BI	29.67	61.39
CI	36.67	52.28
6D2	12.83	83.30
나도 옥잠화	42.83	44.25
별개미취	37.17	51.63
갯능쟁이	28.83	62.47
참소리쟁이	34.67	54.88
스포탁	19.67	74.40
BTH	20.17	73.75

(6) 1차 필드 검정

지금까지 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 병 저항성 유도 능력 검정은 모두 기내에서 이루어졌다. 이들의 능력이 야외에서도 동일한 결과를 나타내는지 검정하기 위하여 야외 온실 내 토경 실험을 실시하였다. 공시 작목으로는 고추를 선택하였으며 대상병으로는 흰가루병을 선택하여 실험을 실시하였다. 선발 fosmid clone 4종을 대상으로 실시하였으며 선발 천연 추출물의 경우는 그동안 실험에서 방제가가 우수한 2종만을 선발하여 실험을 실시하였고 흰가루병 접종 방법은 포트실험과 동일한 방법으로 진행하였다 (그림 3-37).

토경에 식재한 고추의 꽃이 필 무렵 선발된 fosmid clone과 천연 추출물을 처리하였으며 처리 일주일 후 흰가루병을 접종하였다. 흰가루병이 초기에 발생되지 않아 2회에 걸쳐 흰가루병을 접종하였고 2차 접종후 감염률을 조사한 결과 무처리구에서는 약 39%의 병이 발생하였으며, O6는 약 21.67%, AI는 약 18.17%, BI는 약 15.33%, CI는 약 17.83%, 6D2는 약 7.67%, 나도 옥잠화는 약 22.67%, 갯능쟁이는 약 18.00%, 휘나리는 약 0.00%, BTH는 약 16.67%의 병 발생률을 나타내었다 (그림 3-38, 표3-12).



그림 3-37. 고추 필드 검정을 위한 하우스 구성 모습

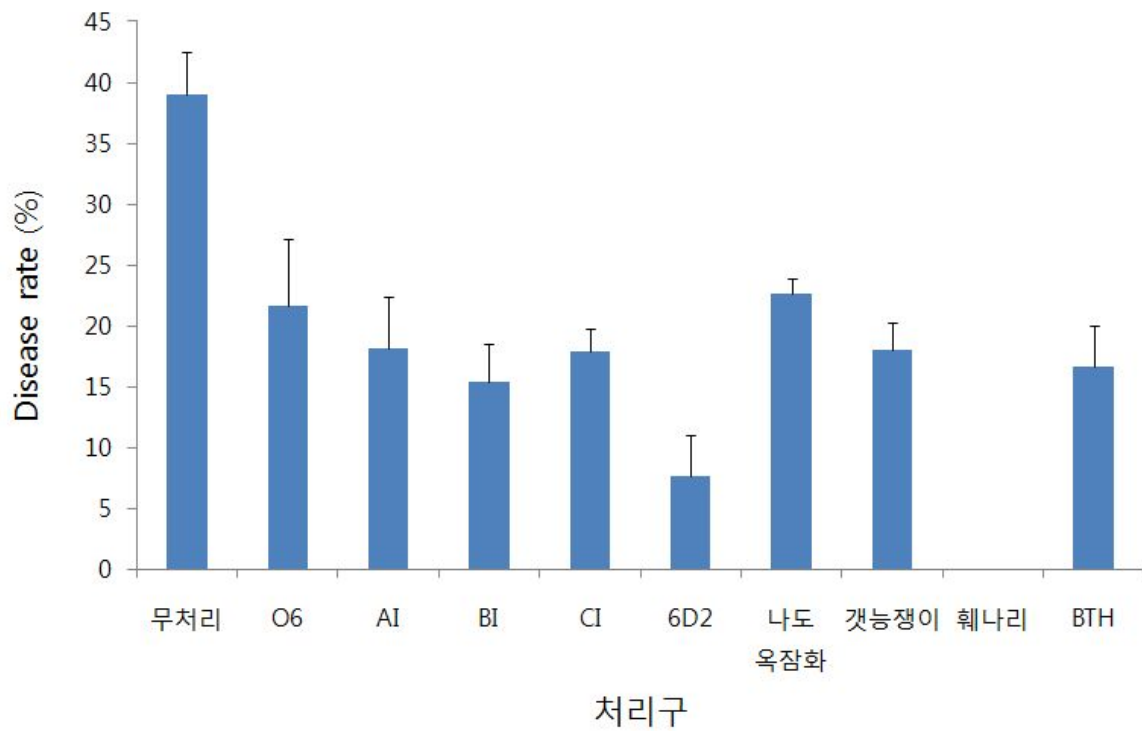


그림 3-38. 최종 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 필드 검정 결과

표 3-12. 최종 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 흰가루병에 대한 방제효과 (필드 검정)

	평균 병발생율 (%)	방제가 (%)
무처리	39.00	-
O6	21.67	44.44
AI	18.17	53.42
BI	15.33	60.68
CI	17.83	54.27
6D2	7.67	80.34
나도 옥잠화	22.67	41.88
갯능쟁이	18.00	53.85
훼나리	0.00	100.00
BTH	16.67	57.26

다. 3차년도 선발 fosmid clone과 천연 추출물에 대한 저항성 검정

(1) 단일 clone 선발을 위한 기내 저항성 유도 능력 검정

2차년도에서 필드 검정을 통해 저항성 유도 능력이 증명된 fosmid clone 6D2 (평균 30k bp의 사이즈의 DNA가 들어가 있는 클론이 500-1000가 혼합된 형태)에서 단일 clone을 선발하고 선발된 clone들의 병저항성 유도 능력을 검정하였다. 제1세부과제에서 기초 실험을 통하여 저항성 유도 능력이 검정된 단일 clone pcc1fos-epi300, epi300, 1b8-4, 1B8, M15에 대한 저항성 유도 능력을 재 검정하고자 담배의 무름병을 대상으로 저항성 유도 실험을 실시하였다. Negative control로서 형질전환의 Host cell의 역할을 한 *E.coli* DH5a와 단일 클론의 유전자를 운반하는 운반체 plasmid인 puc118을 함유하고 있는 *E.coli* DH5a-puc118을 사용하였고, positive control로서는 저항성 유도 능력이 입증된 fosmid clone 6D2와 *Pseudomonas chlororaphis* O6를 사용하였다 (그림 그림 3-39, 3-40).

저항성 유도 능력이 뛰어난 fosmid clone 6D2에서 선발한 5가지 단일 clone (pcc1fos-epi300, epi300, 1b8-4, 1B8, M15)들에 대한 담배 무름병 저항성 유도 능력을 살펴본 결과 pcc1fos-epi300은 약 30.21%의 병발생율을 나타내었고, epi300은 약 40.63%, 1b8-4는 약 42.71%, 1B8은 약 62.5%, M15는 약 33.33%의 병발생율을 나타내었다. 대조구로서 사용한 *E.coli* DH5a 처리구에서는 약 60.42%, *E.coli* DH5a-puc118 처리구에서는 약 52.08%, fosmid clone 6D2 처리구에서는 약 14.58%, *Pseudomonas chlororaphis* O6 처리구에서는 약 39.58%의 병발생율을 나타내었다. fosmid clone 6D2에서 대조구인 *E.coli* DH5a 처리구와 비교하여 약 75.86%의 방제가를 나타내었고 단일 clone인 pcc1fos-epi300에서만 대조구와 비교하여 약 50%의 방제가를 나타내었다. 그 외에 처리구에서는 대조구와 비교하여 모두 50%미만의 방제가를 보여주었다 (그림 3-41).

1차 담배 무름병에 대한 저항성 유도 능력 검정에서 약 50%의 방제가를 나타낸 단일 clone pcc1fos-epi300의 저항성 유도 능력을 재검정하기 위하여 동일한 처리법으로 소형 포트 검정을 실시하였다. 각각의 처리구별로 clone들을 처리한 후 담배 무름병균을 접종하여 저항성 유도 능력을 살펴본 결과 단일 clone pcc1fos-epi300 약 28.13%의 병발생율을 나타내었고, epi300은 약 48.96%, 1b8-4는 약 41.67%, 1B8은 약 52.08%, M15는 약 36.46%의 병발생율을 나타내었다. 대조구로서 사용한 *E.coli* DH5a 처리구에서는 약 68.75%, *E.coli* DH5a-puc118 처리구에서는 약 61.46%, fosmid clone 6D2 처리구에서는 약 12.5%, *Pseudomonas chlororaphis* O6 처리구에서는 약 37.5%의 병발생율을 나타내었다. fosmid clone 6D2에서 대조구인 *E.coli* DH5a 처리구와 비교하여 약 81.82%의 방제가를 나타내었고 단일 clone인 pcc1fos-epi300에서만 대조구와 비교하여 약 59.1%의 방제가를 나타내었다. 그 외에 처리구에서는 1차 실험과 동일하게 대조구와 비교하여 모두 50%이하의 방제가를 보여주었다 (그림 3-42).

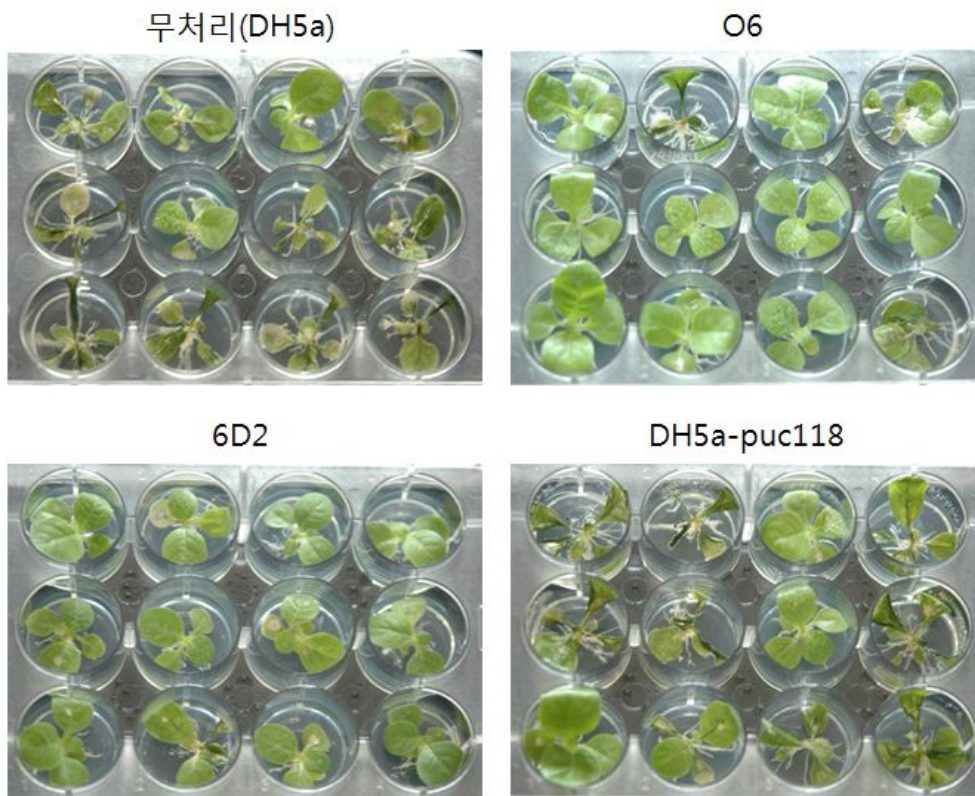


그림 3-39. 저항성 유도 능력 검증을 위한 대조구로 사용된 치리구의 저항성 유도 능력 모습

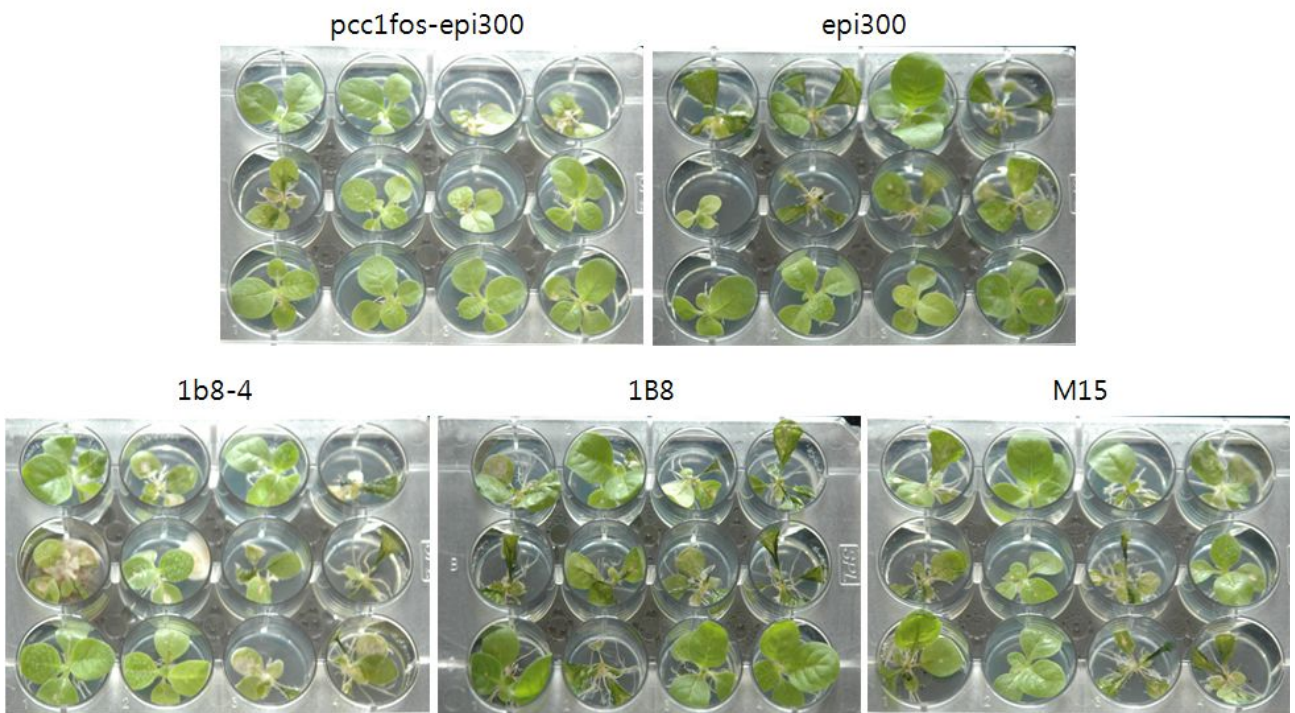


그림 3-40. Fosmid clone 6D2에서 선발한 단일 clone의 저항성 유도 능력 검증

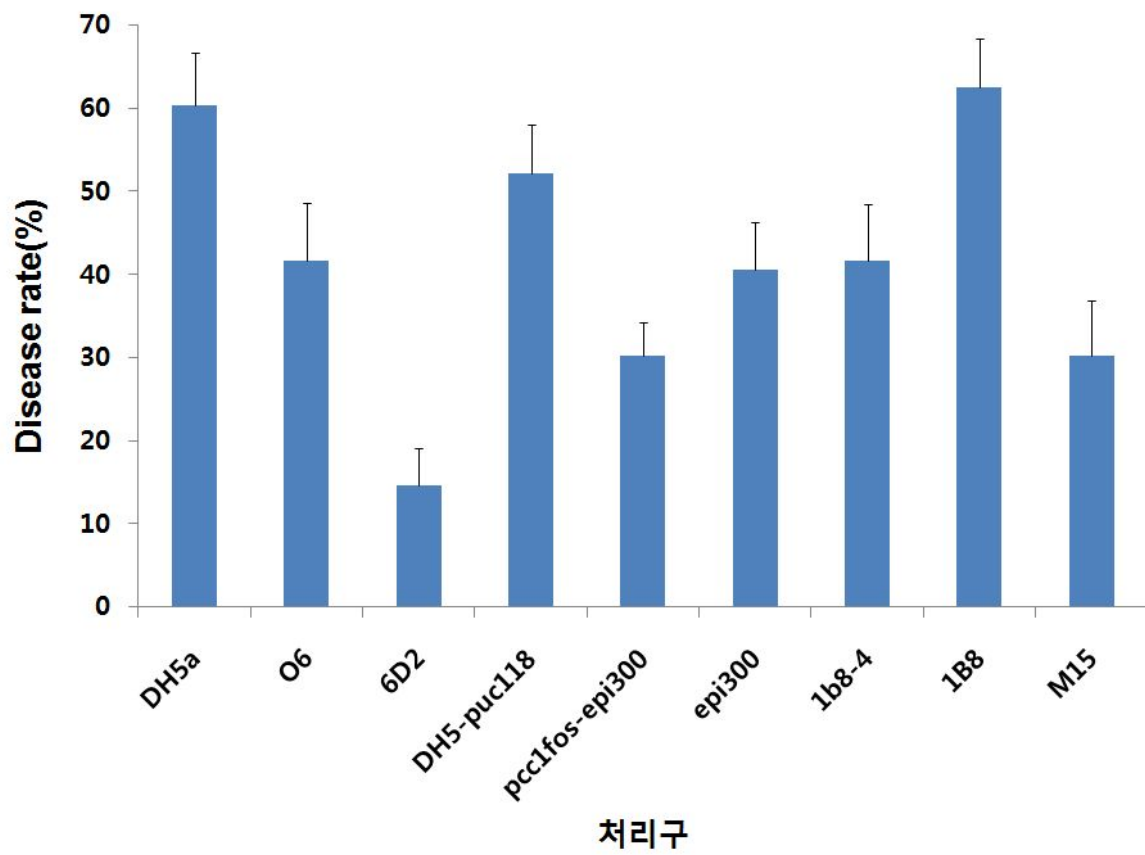


그림 3-41. Fosmid clone 6D2에서 선발한 단일 clone의 담배 무름병 발생율

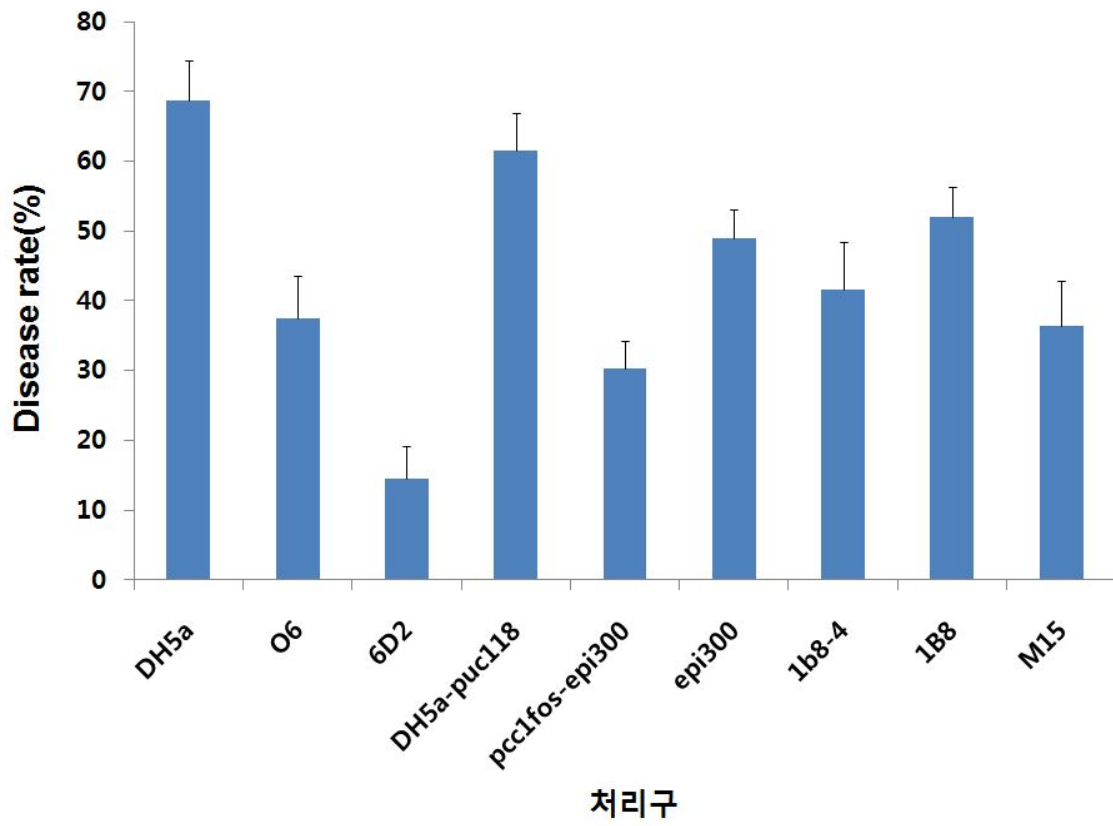


그림 3-42. Fosmid clone 6D2에서 선발한 단일 clone의 담배 무름병 발생을 포트 조사

(3) 최종 선발 clone과 최종 천연물의 저항성 유도 능력 포장 검정

최종 선발된 단일 clone pcc1fos-epi300의 저항성 유도 능력의 정확한 방제가를 산출하고 필드에서의 효능을 검정하기 위하여 곡성 생물방제센터 시험 포장에서 2차년도에 이어 3차년도 필드 검정을 실시하였다. 대조구로서는 무처리구와 *Pseudomonas chlororaphis* O6 및 fosmid clone 6D2를 사용하였고, 검정하고자 하는 단일 clone pcc1fos-epi300과 천연물로서는 갯능쟁이, 나도 옥잠화를 처리하였다 (그림그림 3-43).

각각의 처리구에 선발 clone과 천연 추출물을 정식후 2주 간격으로 4회 처리하였으며 선발 clone과 천연 추출물 처리 후 탄저병원균을 분무 살포하여 최종 발생한 탄저병의 병반을 잎과 열매로 나누어 조사하였다. 앞에서 발생한 탄저병 발생량을 조사한 결과 무처리구에서는 약 72.34%의 병발생율을 나타내었고 O6처리구에서는 약 40.16%의 병발생율을 나타내었다. fosmid clone 6D2의 경우에는 약 14.57%의 병이 발생하였고 단일 clone인 pcc1fos-epi300 약 12.37%의 병이 발생하였다. 천연 추출물인 갯능쟁이 처리구에서는 약 35.41%의 병이 발생하였으며, 나도 옥잠화 처리구에서는 약 24.56%의 병이 발생하였다. 각각의 처리구의 방제가를 살펴보면 대조구인 O6처리구와 6D2처리구에서는 약 44.48%, 79.86%의 방제가를 나타내었고, 단일 clone인 pcc1fos-epi300 약 82.90%의 방제가를 나타내었다. 천연 추출물인 갯능쟁이와 나도 옥잠화의 경우는 약 51.05%와 66.05%의 방제가를 나타내었다 (그림 3-44, 표3-13).

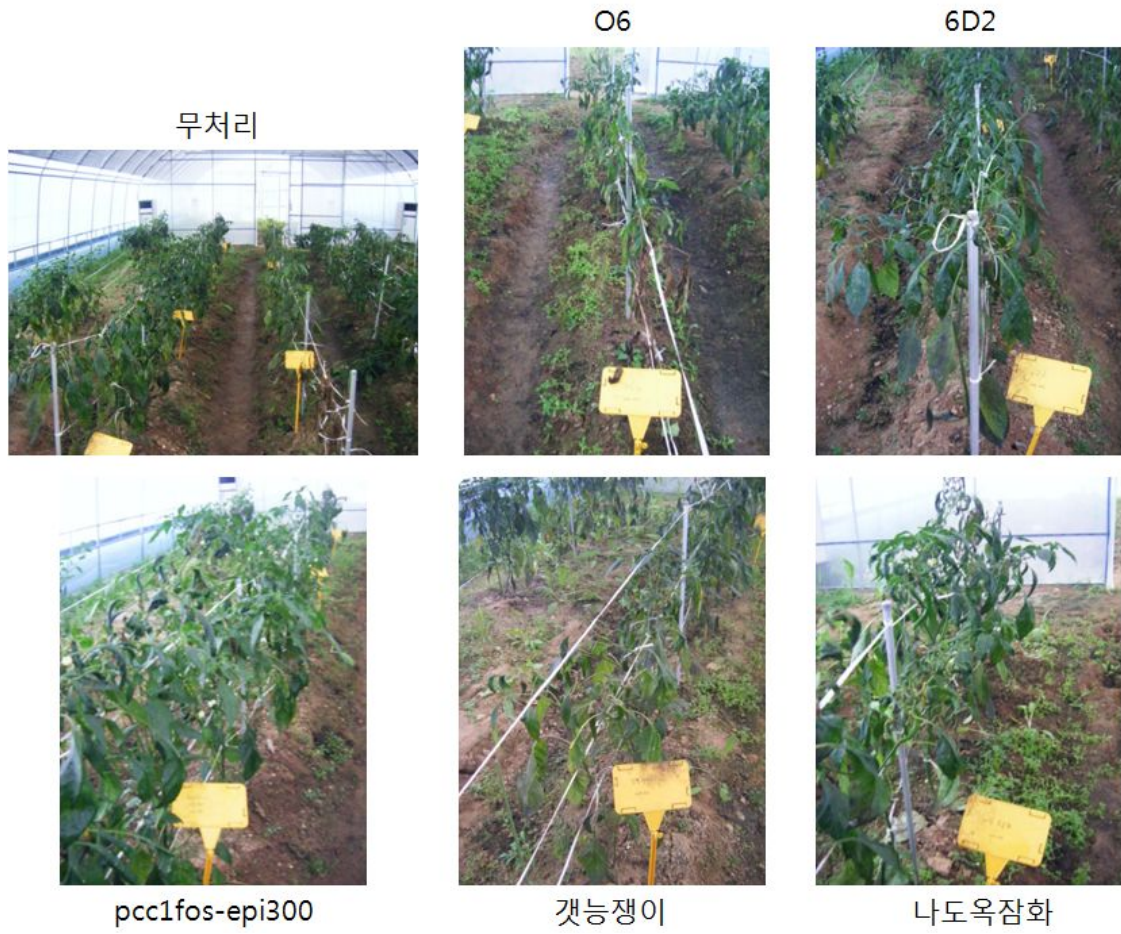


그림 3-43. 최종 선발 clone과 천연 추출물의 고추 필드 실험

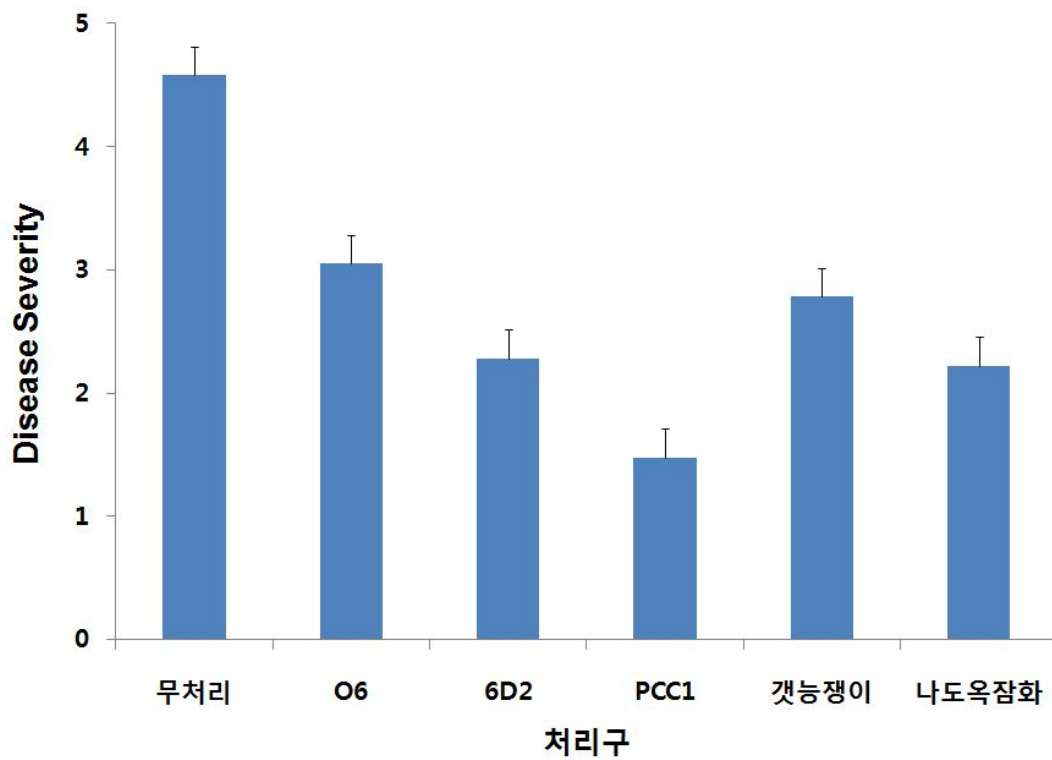


그림 3-44. 최종 선발 clone과 천연 추출물의 잎탄저병 발생율. Disease severity : 잎에 병이든 정도에 따라 병발병도 측정 1-5로 구분함, 0: health plant, 1: 10-20%, 2: 21-40%, 3: 41-60%, 4: 61-80%, 5: 80-100%

표 3-13. 최종 선발된 clone과 천연 추출물의 잇탄저병에 대한 방제효과 (필드 검증)

	평균 병발생율 (%)	방제효과 (%)
무처리	72.34	-
O6	40.16	44.48
6D2	14.57	79.86
pcclfos-epi300	12.37	82.90
갯능쟁이	35.41	51.05
나도 옥잠화	24.56	66.05

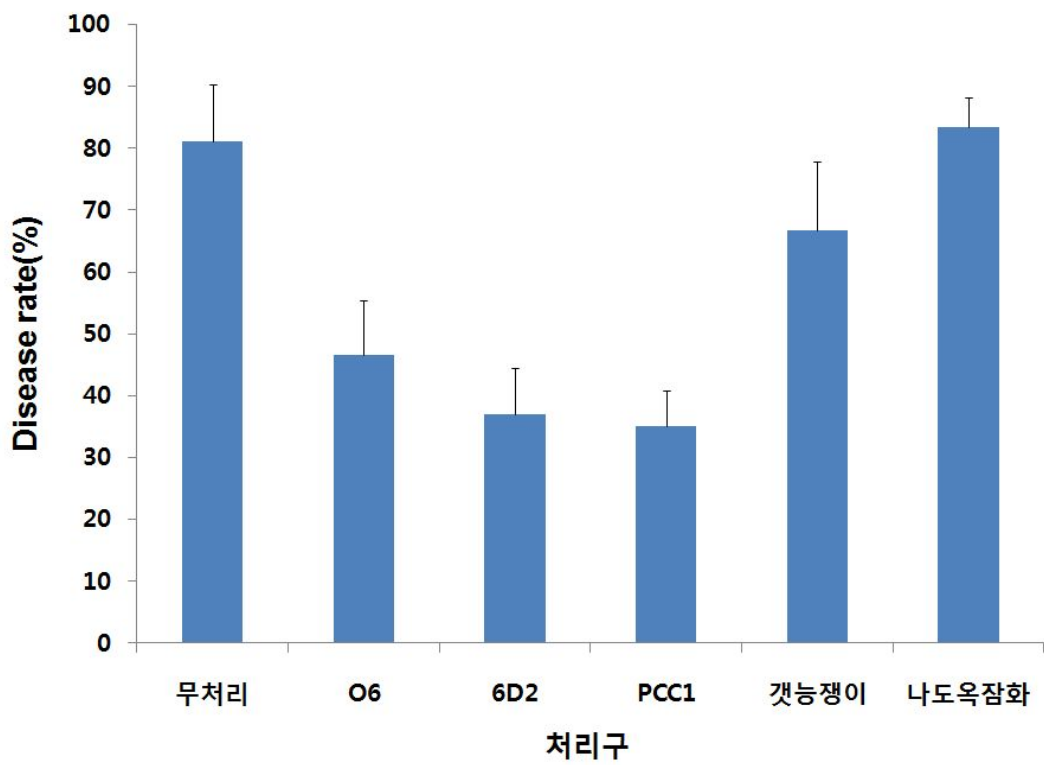


그림 3-45. 최종 선발 clone과 천연 추출물의 열매 탄저병 발생율

표 3-14. 최종 선발된 clone과 천연 추출물의 열매 탄저병에 대한 방제효과 (필드 검정)

	평균 병발생율 (%)	방제가 (%)
무처리	81.17	-
O6	46.67	42.51
6D2	37.00	54.41
pcc1fos-epi300	35.00	56.88
갯능쟁이	66.67	17.86
나도 옥잠화	83.33	-2.67

(3) 천연 한방 추출물에 대한 병방제 효과조사

제1협동 과제에서 사전 실험을 통해 병저항성 유도 효과가 탁월한 10가지 한약 추출물(강황, 봉출, 지실, 목적, 구기자, 마치현, 천초, 당귀, 방풍, 청호)에 대한 방제가 산출을 위하여 고추 유묘를 대상으로 고추 잿빛곰팡이병에 대한 저항성 유도 효과를 조사하였다 (그림 3-46).

각각의 한약 추출물 (121℃에서 열수 추출함)에 대하여 고추의 잿빛 곰팡이 병에 대한 병 발생율을 조사한 결과 한약재 추출물의 10배 희석액 처리구에서는 무처리구와 비교하여 당귀 처리구에서만 약 40.36%의 방제가가 산출되었으며 다른 처리구에서는 모두 무처리구와 비교하여 유의성이 없거나 오히려 병 발생율이 더 높아 저항성 유도 효과가 없음을 확인하였다 (그림 3-47).

10가지 한약제를 다시 100배로 희석하여 농가에서 실제 사용할수 있는 최소 농도로 병 저항성 유도 효능을 검증한 결과 당귀에서도 무처리구와 비교하여 유의성이 없었으며 다른 처리구에서도 무처리구와 비교하여 차이가 없거나 오히려 병 발생률이 높았다. 한약재 추출물의 경우 추출 원액을 이용한 방제 효과는 기대 할 수 있을지라도 제품화 하고자 하는 희석 배율에서는 전혀 방제 효과가 없어 제품화에 의미가 없다고 판단된다 (그림3-48).

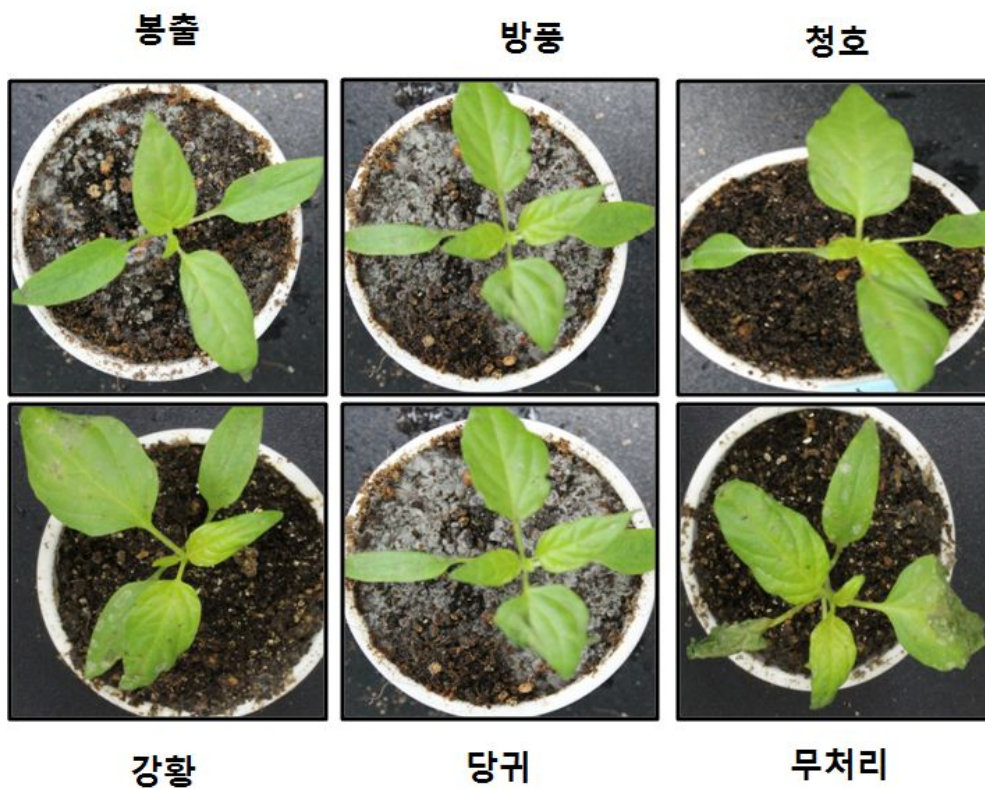


그림 3-46. 한방 추출물에 대한 병저항성 유도 효과 검정

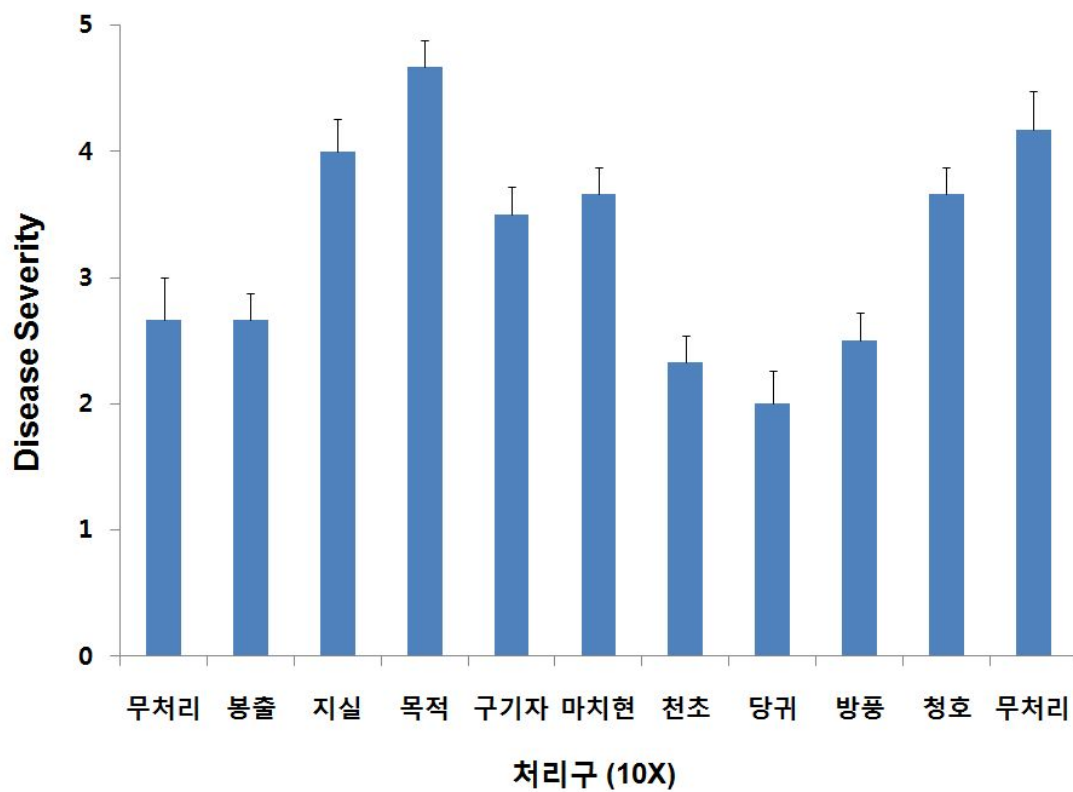


그림 3-47. 한방 추출물 10배액의 고추 잿빛 곰팡이병에 대한 방제 효과

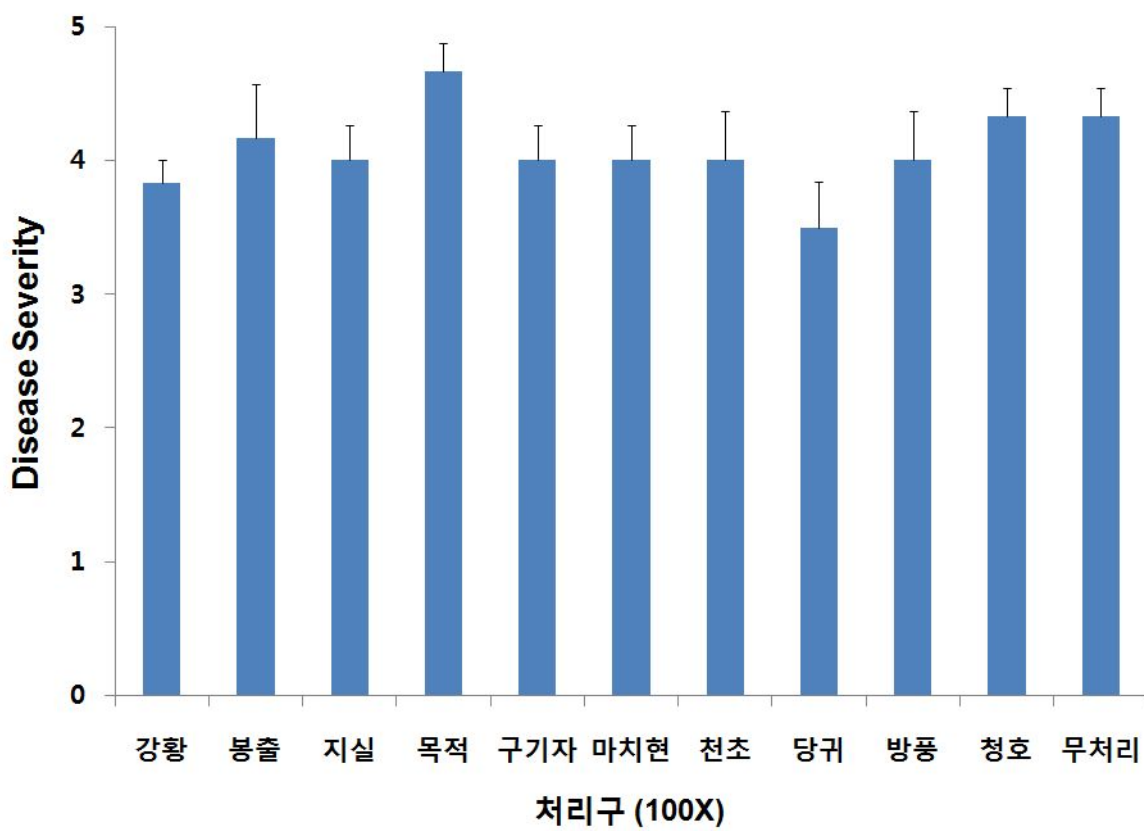


그림 3-48. 한방 추출물 100배액의 고추 잿빛 곰팡이병에 대한 방제 효과

2. 선발 clone 및 천연 추출물을 이용한 농업용 시제품 제작

가. 다양한 제형의 시제품 제작

Fosmid clone 6D2와 단일 clone인 pcc1fos-epi300를 대상으로 액상 시제품을 제작하기 위하여 최적 배양 조건을 조사하였다. clone들의 적정 배양 온도는 37°C에서 가장 빠른 배양 속도를 나타내었고 배양 배지로서는 LB 배지에서 가장 많은 수의 미생물이 배양 되었다. 하지만 LB 배지의 경우 배양 배지의 단가가 고가이기 때문에 산업적인 배양 배지로 사용하기에는 무리가 있다. 따라서 최소 배지인 M9 배지를 바탕으로 기존의 0.2%가 첨가되는 당의 양을 2%로 늘려주어 48시간이내 최대 10^9 승의 균수가 나올 수 있도록 배양 배지 조건을 만들었다 (표 3-15, 3-16).

조성된 M9+2% sucrose 배양용 배지에서 48시간 배양한 fosmid clone 6D2와 단일 clone pcc1fos-epi300를 각각 용기에 담아 액상형 시제품을 제작하였다 (그림 3-49).

Fosmid clone 6D2와 단일 clone pcc1fos-epi300의 보존 기간을 증진시키고 농가 사용이 간편하게 분상 제제와 토양 기비제로 사용할 수 있도록 입상 제제 시제품을 제작하였다. 분상 제형의 경우는 M9+2% sucrose 배지에서 48시간 배양된 배양액을 곡성 생물방제센터 300L 대형 동결 건조기를 이용하여 동결 건조한 후 증량제로서 옥수수 전분을 사용하여 분상화 하였으며 입상 제형의 경우는 배양된 배양액을 제오라이트에 분사하여 미생물을 코팅한 후 옥수수 전분을 이용하여 재 코팅하였으며 수분을 잡기 위하여 탈크를 이용하여 다시 한 번 코팅한 후 최종 제형을 완성하였다 (그림 3-50, 3-51).

표 3-15. 적정 배양 시간 및 배지 선발

배지명	24시간	48시간	72시간	96시간	120시간
LB배지	2.62×10^{10}	4.17×10^{10}	1.25×10^{10}	7.47×10^9	5.21×10^9
M9	2.31×10^8	5.24×10^9	8.35×10^8	5.24×10^8	1.43×10^8
M9+3% sucrose	6.35×10^9	9.25×10^9	4.32×10^9	4.75×10^8	5.26×10^8

표 3-16. 최종 100L 배양용 배지 조성표

시료명	사용량/100L
Na ₂ HPO ₄	600g
KH ₂ PO ₄	300g
NaCl	50g
NH ₄ Cl	100g
MgSO ₄	1M solution 100ml
CaCl ₂	0.1M solution 100ml
Sucrose	2Kg



그림 3-49. 액상형 시제품이 용기에 담긴 모습

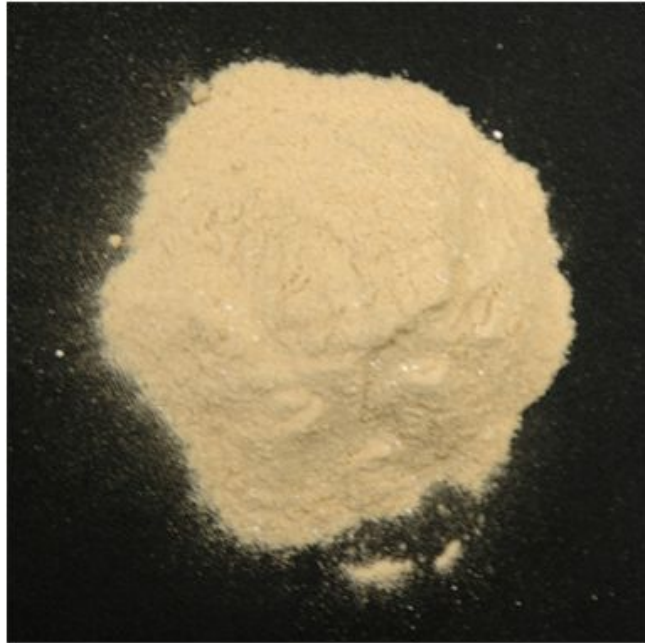


그림 3-50. 분상형 시제품의 제형

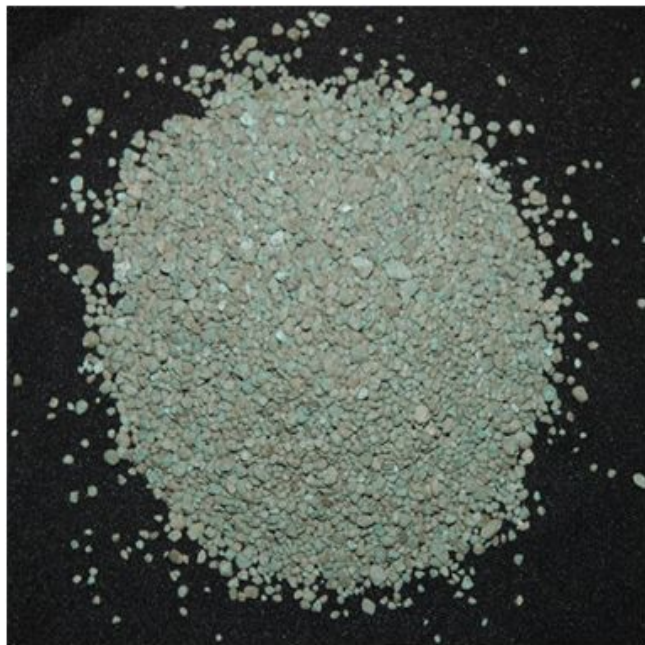


그림 3-51. 입상형 시제품의 제형

천연 추출물의 경우에는 생명공학 연구소에서 추출물의 구입비용과 자생하는 나도 옥잠화 및 갯능쟁이를 채취하여 추출하는 비용이 너무 많이 들기 때문에 제품을 만들어 농가에 판매할때의 판매 금액이 너무 고가가 되어 버리는 단점이 있다. 따라서 천연 추출물의 시제품 제작은 단순 액상형 시제품만 제작하였고 향후 천연 추출물을 이용한 제품의 경우에는 병방제 효과 및 제조 단가의 문제로 제품화에 문제가 있을 것으로 사료된다.

나. 최종 시제품의 농가 포장 검정

제형이 완성된 fosmid clone 6D2와 단일 clone pcc1fos-epi300 및 천연 추출물의 실제 포장에서 효능을 검정하기 위하여 전남 함평군 대동면 유기재배 수도작 포장을 임대하여 각각의 제품의 병방제 효과를 검정하였다. 2011년 6월부터 2011년 10월까지 진행하였으며 처리구로서는 무처리구와 O6처리구 6D2 처리구 및 pcc1fos-epi300 처리구로 나누었으며 천연 추출물로서는 나도 옥잠화와 갯능쟁이를 선발하여 실험을 실시하였다 (그림 3-52).

각각의 처리구에서 발생한 도열병 병반을 대상으로 잎에 병이든 정도에 따라 병발병도를 측정하였으며 무처리구 기준 방제가를 조사하였다. 무처리구와 비교하여 모든 처리구에서 병방제 효과가 나타났으나 fosmid clone 6D2와 단일 clone pcc1fos-epi300 처리구를 제외한 타 처리구에서는 방제가가 모두 60% 이하의 방제가를 나타내었고 fosmid clone 6D2에서는 무처리구와 비교하여 약 71.12%의 방제가를 나타내었으며 단일 clone pcc1fos-epi300 60.08%의 방제가를 나타내었다 (그림 3-53, 표 3-17).

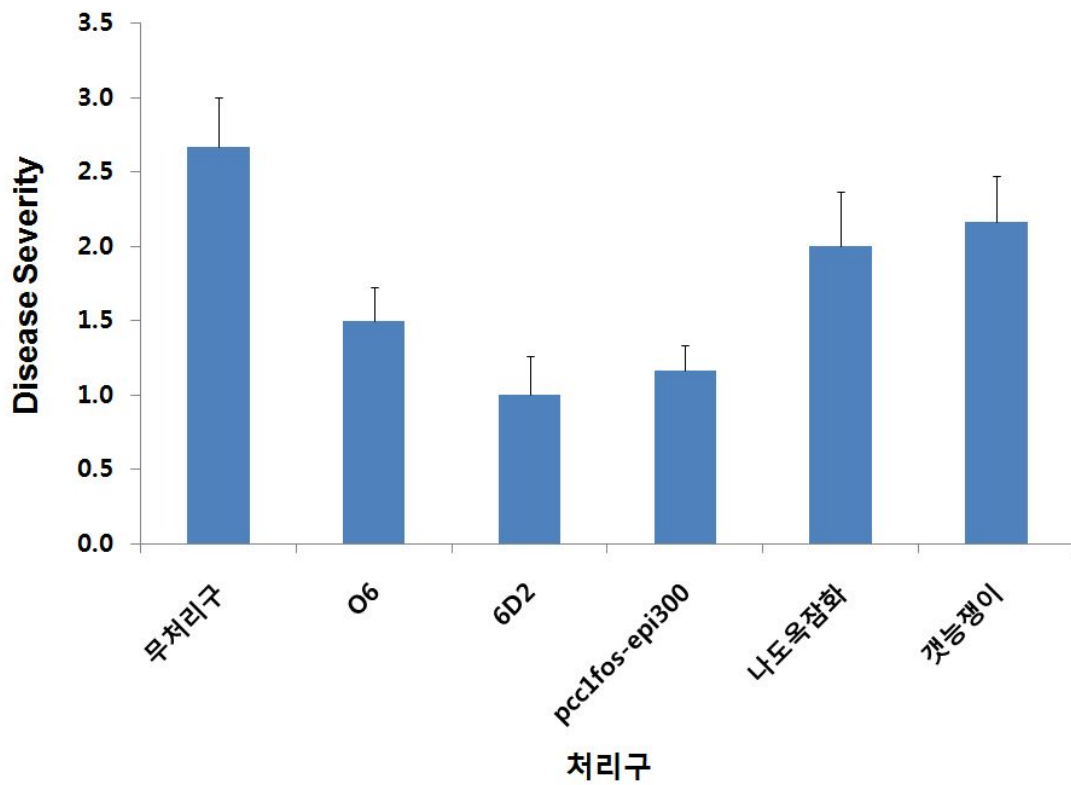


그림 3-53. 최종 시제품의 도열별 발생을 조사. Disease severity : 잎에 병이든 정도에 따라 병발병도 측정 1-5로 구분함, 0: health plant, 1: 10-20%, 2: 21-40%, 3: 41-60%, 4: 61-80%, 5: 80-100%

표 3-17. 최종 시제품의 도열병에 대한 방제가

	평균 병발생율 (%)	방제가 (%)
무처리	34.17	-
O6	15.11	55.78
6D2	9.87	71.12
pcc1fos-epi300	13.64	60.08
갯능쟁이	21.24	37.84
나도 옥잠화	24.15	29.32

3. 선발 clone 및 천연 추출물의 가뭄 저항성 유도능력 검증

가. 1차 선발 fosmid clone 및 천연 추출물의 가뭄 저항성 유도 능력 검증

1차 선발된 식물병 저항성 유도 fosmid clone의 부가적인 능력을 검증하기 위하여 환경 스트레스중 농작물에 가장 피해가 심한 가뭄 스트레스에 대한 저항성 유도 능력을 검증하고자 고추 유묘를 대상으로 실험을 실시하였다. 4주간 생육한 고추 유묘를 대상으로 선발된 저항성 유도 균주를 처리한 후 일주일간 물을 단수 시켜 인위적인 가뭄 스트레스를 주었다. 가뭄 처리 후 무처리구가 생육 한계점에 도달한 시점에 RWC (relative water content)를 측정하여 가뭄 스트레스에 대한 저항성 유도 능력을 검증하였다. 하지만 각각의 처리구에서 무처리구와 비교하여 유의성 있는 결과를 확인할 수 없었다 (그림 3-54, 3-55).

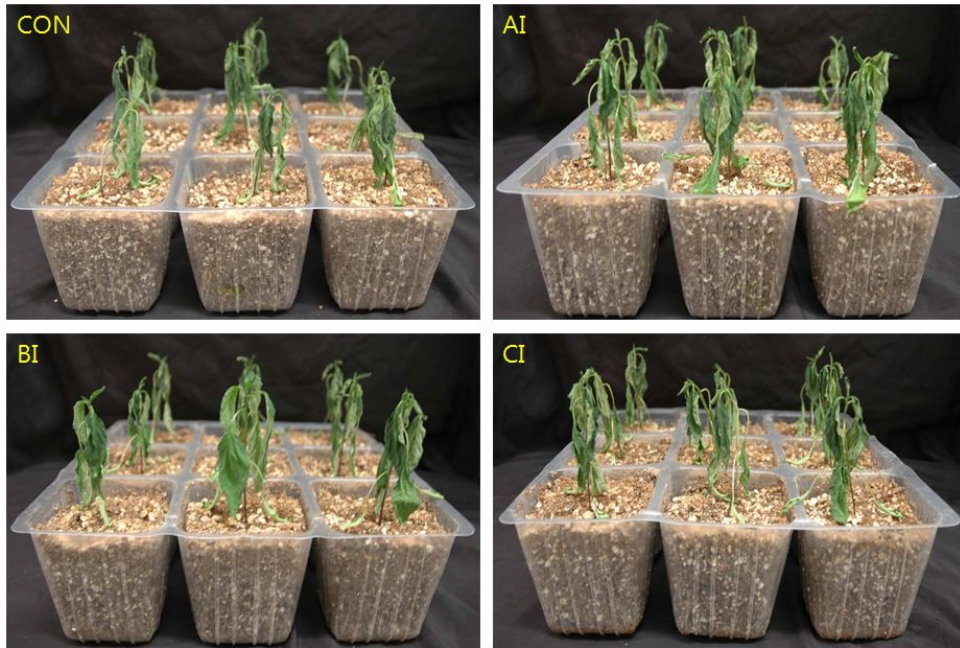


그림 3-54. 고추 유묘를 통한 가뭄 스트레스 저항성 유도 능력 검정

가뭄 저항성 유도 능력

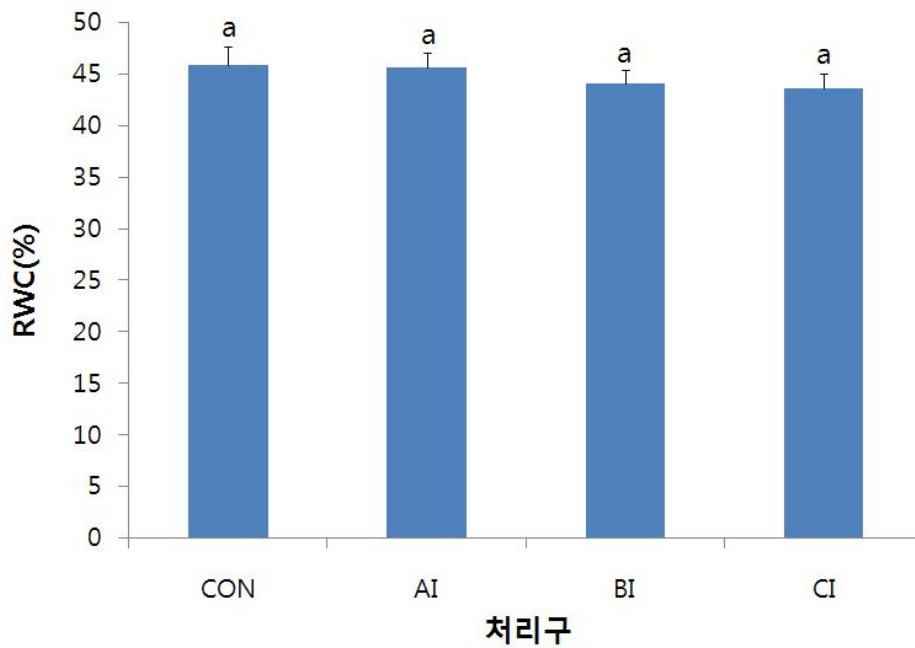


그림 3-55. 고추 유묘를 통한 가뭄 스트레스 저항성 유도 능력 검정. 대상작물 : 고추 (녹국 풋고추), 공시재료 : 선발된 저항성 유도 균주 A1, B1, C1, $RWC = ((FW-DW)/(TW-DW)) \times 100\%$, FW = 가뭄 스트레스 후 고추 잎의 생체의 무게, TW = 가뭄 스트레스 후 고추 잎을 4℃ 냉장 Chamber 안에서 24시간 물에 담가두었다가 측정된 무게, DW = TW를 측정 후 60℃ dry oven에서 3일간 완전 건조 후 측정된 무게

나. 2차 선발 fosmid clone 및 천연 추출물의 가뭄 저항성 유도 능력 검정

2차 선발 fosmid clone 및 천연 추출물의 환경 재해 내성을 알아보기 위하여 1차와 동일하게 고추를 대상으로 유묘 검정을 실시하였다. 고추 유묘를 포트에 식재하고 각각의 선발 fosmid clone과 선발 천연 추출물을 포트가 충분히 잠길 정도로 1회 처리하였다. 그 후 물 공급을 중단하고 자연스럽게 수분이 작물에 흡수 및 공기 중에 증발되도록 자연 방치하였다. 가뭄 처리 후 무처리구가 생육 한계점을 넘어선 시점에 각 작물의 생체중을 측정하여 가뭄 스트레스에 대한 저항성 유도 능력을 검정하였다(그림3-56).

2차 선발된 fosmid clone과 선발된 천연 추출물을 처리한 처리구의 가뭄 저항성을 생체중의 측정 결과로 조사한 결과 무처리구는 대부분 자연 사멸하여 그 생체중이 약 6.47g 정도 이었으나 선발 균주중 AI의 경우에는 가뭄에 대한 저항성 능력이 뛰어나 평균 생체중이 약 28.32g 정도 되었다. 그 외에 균주 처리구는 대부분 가뭄에 저항하는 능력을 보여주었으나 천연 추출물에서는 벌개미취를 제외한 다른 추출물에서는 무처리구와 비교하여 가뭄에 대한 저항성 능력을 나타내지 못하였다. 벌개미취의 경우에는 평균 생체중이 약 20.9g 정도 되어 무처리구와 비교하여 유의성 있는 차이를 나타내었다 (그림 3-57).

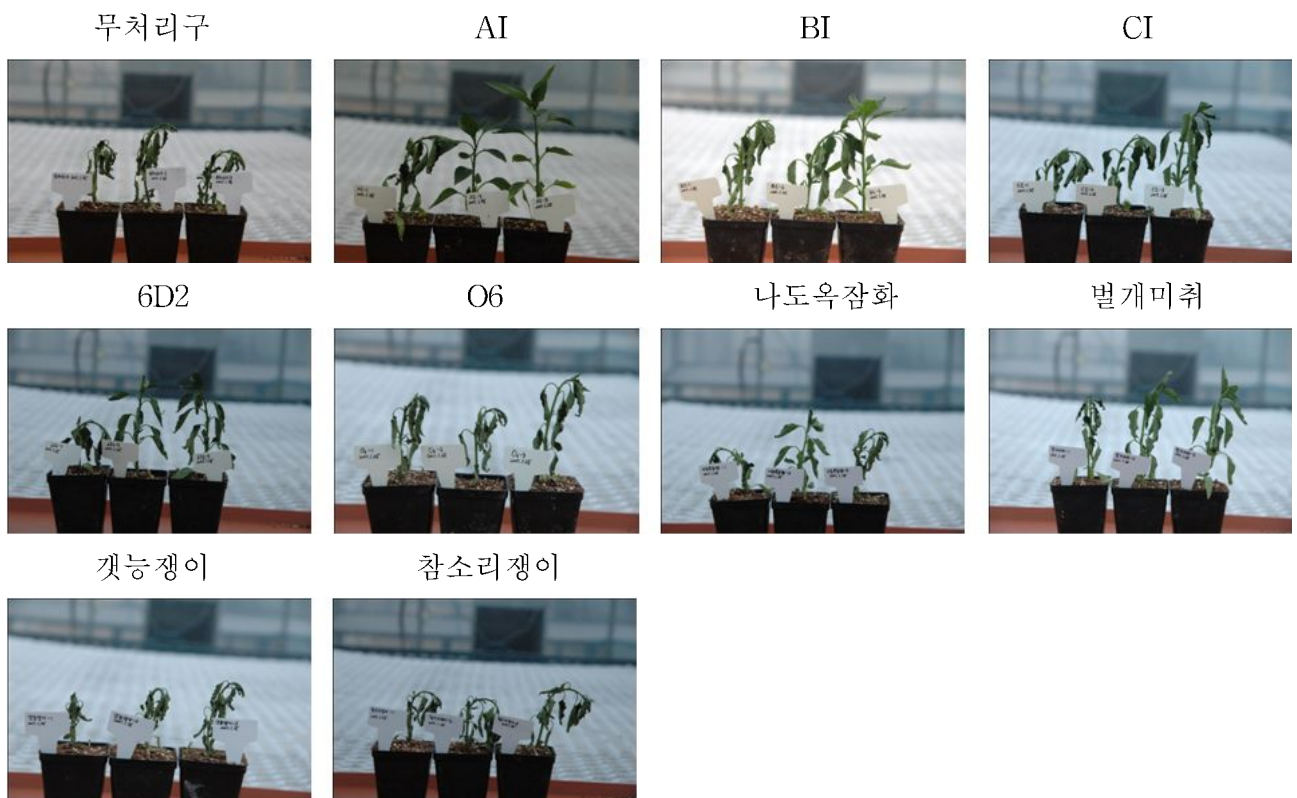


그림 3-56. 2차 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 가뭄 저항성 유도 능력 검정

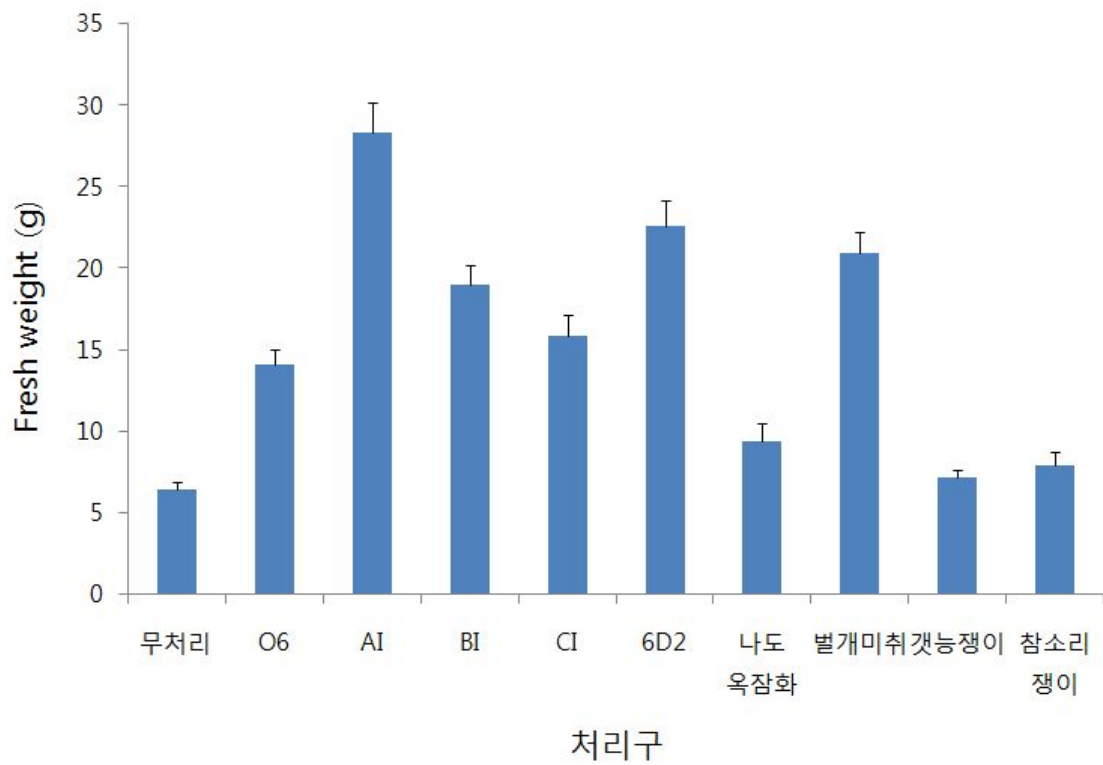


그림 3-57. 2차 선발 fosmid clone과 천연 추출물의 가뭄 스트레스 저항성 유도 능력 검정

다. 최종 선발 fosmid clone 및 선발 추출물의 가뭄 저항성 유도 능력 검정

3차년도에서 최종 선발된 fosmid clone 6D2와 단일 clone pcc1fos-epi300의 가뭄에 대한 저항성 유도 능력을 확인하기 위하여 고추 유묘를 대상으로 저항성 유도 능력 검정을 실시하였다. 실험의 조건은 1, 2차와 동일한 조건에서 수행하였으나 수차례 반복 실험에서 결과의 재현성에 문제가 있는 것으로 판단되었다. 결과적으로 무처리구와 비교하여 fosmid clone 6D2와 단일 clone pcc1fos-epi300의 경우에는 유의성 있는 가뭄 저항성 유도 능력을 지니고 있지 않은 것으로 판단되며 천연 추출물인 나도 옥잠화와 갯능쟁이에서도 가뭄에 대한 저항성 유도 능력은 그 효과가 미비한 것으로 판단된다 (그림 3-58).

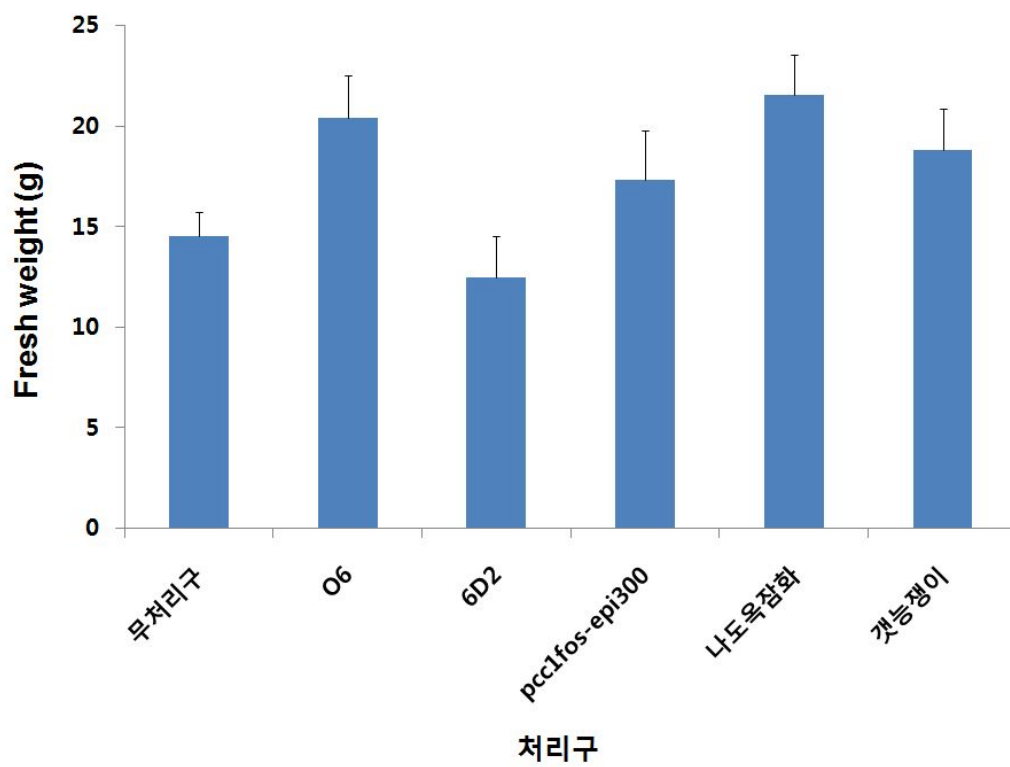


그림 3-58. 최종선발 fosmid clone과 천연 추출물의 가뭄 스트레스 저항성 유도 능력 검정

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 연구 목표 달성도

구분	연도	당초 연구개발의 목표		연구개발의 결과	달성도
1차년도	2009	제1세부	○ Metagenome으로부터 식물유도저항성 증진제 선별 및 온실 검정	-자연상태에서 유전자를 직접 채취하여 Fosmid cloning을 통하여 <i>E. coli</i> 에 발현 시키고 이를 식물 유도저항성 indicator 유전자인 <i>PR-1a::GUS/PDF1.2::GUS</i> 식물체를 이용하여 대량스크린을 통하여 유전자 및 물질을 분리	100%
		제1협동	○ <i>pPRI::GUS</i> 담배를 이용한 천연물 라이브러리의 탐색	○ 천연물뱅크로부터 확보된 145종의 자생식물 추출물을 대상, 애기장대의 <i>E. carotovora</i> 에 대한 유도저항성 형성 여부 및 <i>JIN1, PAL1</i> 의 발현 증가 여부를 확인함으로써 9종의 유도저항성 증진 천연물 동정	100%
		제2협동	○ Metagenome/천연물을 대상으로 복합재해저항성 검정	선발 fosmid clone과 선발 천연 추출물의 병저항성 유도 능력 검정을 담배 무름병과 고추 흰가루병에 대해 검증하였다. 선발 fosmid clone과 선발 천연 추출물의 가뭄에 대한 저항성 유도 능력에 대하여 검증하였다.	100%
2차년도	2010	제1세부	○ 선별 metagenome의 온실 검정 및 저항성 기작 구명	-분리된 물질의 온실 검정을 실시하고 선발된 물질의 포장실험을 실시함	100%
		제1협동	○ <i>pPRI::GUS</i> 담배를 이용한 천연물 라이브러리의 탐색 ○ 담배 이외의 작물에 대한 응용 가능성 탐색	○ 천연물뱅크로부터 확보된 400종의 생약 추출물을 대상, 애기장대의 <i>E. carotovora</i> 에 대한 유도저항성 형성 여부 및 <i>JIN1, PRI</i> 의 발현 증가 여부를 확인함으로써 11종의 유도저항성 증진 생약 성분 동정	100%
		제2협동	○ 선발된 metagenome/천연물을 대상으로 복합재해 저항성 검정	2차 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 병저항성 유도 능력 검정을 비의도열병과 키다리병 및 고추의 흰가루병에 대해 검증하였으며 1차 포장 실험을 고추 흰가루병에 대해 실시하였다. 2차 선발된 fosmid clone과 천연 추출물의 가뭄에 대한 저항성 유도 능력에 대하여 검증하였다.	100%

3차년도	2011	제1세부	○ Fitness cost/priming 기전 구명	-선발된 유도저항성 clone을 대상으로 대량배양 조건과 QC 조건 탐색 및 응용. -Microarray와 proteomics를 이용한 metagenome에 의한 식물의 fitness cost/priming관련 유전자 및 단백질의 대량 분리 및 특성화	
		제1협동	○ 식물 호르몬 및 chromatin remodeling과 천연물에 의한 priming 기작의 연관성 연구	○ 총 11개의 애기장대 chromatin remodeling factor knockout에 대한 BABA에 의한 유도저항성 조절 여부 확인 결과 DDM1이 유도저항성을 억제하는 기능을 하고 있음을 확인 ○ microarray를 통하여 유도저항성 형성 과정에서 중요한 역할을 할 수 있는 DDM1의 목표 유전자 동정	100%
		제2협동	○ Metagenome/천연물로부터 선발된 물질을 대상으로 포장 실증시험 및 상품화	최종 fosmid clone 6D2와 그로부터 선발된 단일 clone pcc1fos-epi30을 선발하였으며 이들의 능력을 확인하기 위하여 고추 탄저병을 대상으로 포장 검정하였다. 최종 선발 clone의 배양 배지를 제작하고 최적 배양 조건을 제시하였다. 최종 선발 clone과 천연 추출물에 대하여 다양한 시제품을 제작하였다. 최종 개발된 시제품의 병방제 효과를 검정하기 위하여 벼 도열병을 대상으로 농가 포장 검정을 실시하였다. 최종 선발된 clone과 천연 추출물의 가물에 대한 저항성 유도 능력에 대하여 검증하였다.	100%

제 2 절 관련 분야 기술 발전에의 기여도

1. 식물병 저항성 유도 clone 및 천연 추출물의 개발

현재까지 국내에서 개발하고 있는 식물병 저항성 유도 능력에 관한 연구는 대부분 토양 근권에서 분리한 균주를 대상으로 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 토양 근권의 미생물을 이용하는 것이 아니라 토양에서 우리가 그동안 알지 못했던 다양한 균주로부터 유전자를 획득하여 형질전환 시킨 형질전환체로부터 유도 저항성 능력이 있는지 찾아보는 것으로서 병 저항성 유도 능력에 관한 유전자원의 확보라는 측면에서 관련 분야의 기술 발전에 큰 파급효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 국내 자생하는 식물의 천연 추출물에 대해서도 지금까지는 직접적인 살균 및 살충 효과에 대한 연구가 대부분이었으나 본 연구 과제를 통하여 국내 자생 식물의 병저항성 유도 능력을 확인하였고 향후 관련 분야 연구 발제에 기여하는 효과가 클 것으로 판단된다.

2. 유도저항성 증진 천연물 बैं크 확보

현재까지 BTH, azelaic acid, BABA 등 10여 종 이내의 화합물만이 식물의 유도저항성을 증

진시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 총 9 종의 식물 추출물 유래 유도저항성 증진제 및 11종의 생약 추출물 유래 유도저항성 증진제를 발굴할 수 있었다. 특히 9종의 식물 추출물 유래 유도저항성 증진제는 한국에 자생하는 자생식물 추출물이라는 점에서 외국에서는 활용하기 힘든 국내의 식물 자원에서의 검색을 통해 발굴되었다는 점에서 큰 의의가 있다. 향후 이들 추출물에서 직접적으로 식물 유도저항성을 증진시키는 물질을 순수 분리할 경우 농업적으로 큰 가치를 지니는 유도저항성을 특이적으로 형성하는 물질을 확보할 수 있다는 점에서 관련 분야의 기술 발전에 큰 파급효과가 있을 것으로 예상된다.

3. 유도저항성 기작 규명

현재 유도저항성 형성과정에 관여하는 유전자군의 발굴을 위하여 많은 forward genetic screening이 수행되었으나, IBS1, 2, 3를 제외한 대부분의 유전자들은 기존 살리실산 및 자스몬산 신호전달에 관여하는 유전자들로서 유도저항성 형성에 특이적으로 관여하는 유전자의 발굴은 요원한 실정이었다. 본 연구를 통하여 DDM1에 의한 유도저항성 형성 과정에서 특이적으로 발현을 조절 받는 유전자 군을 발굴하였으므로, 이들 유전자의 기능 연구를 통하여 유도저항성의 형성 과정에 특이적으로 관여하는 분자 기작을 규명할 수 있을 것이다.

4. 식물병 저항성 유도 clone 및 천연 추출물의 제형의 개발

친환경 미생물 제제 및 천연물 제제를 생산하는 업체들의 경우 제품 제형에 있어 대부분이 단순한 액상 제형이고 동부한농 등의 몇몇 대형 업체만이 설비투자를 통한 입제 제제를 생산하여 판매하고 있다. 하지만 단순한 액상 제형이나 입제제형 외에 합성 농약처럼 다양한 제형의 개발이 미비한 수준이며 효과적인 첨가제나 부가제의 개발도 전무한 실정이다. 따라서 단순히 미생물 혹은 천연 추출물만을 이용하여 효과를 내기 보다는 그들의 효과를 증진시키고 부가적인 효과를 나타내기 위한 뛰어난 부가제 및 첨가제가 필요로 하다. 본 연구과제에서는 선발 clone을 대상으로 액상 제형과 분상 제형 및 입상 제형을 개발하였으나 아직까지도 제형화에 있어서는 많은 연구가 되어야 할 것으로 판단된다. 하지만 다양한 제형의 개발하여 시제품화 함으로서 향후 관련된 연구 개발에 있어 밑거름이 될 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 유도저항성에 관련한 유전자 조사

유도저항성을 일으키는 균주들은 보고되어져 있지만, 균주들내에 무엇이 유도저항성을 일으키는지에 대한보고는 거의 알려져 있지 않다. 자연계 내에 존재하는 유전자들을 유도저항성이 보고되지 않은 대장균에 도입하여 단일 유전자 혹은 유전자 클러스터로부터 유도저항성을 유발하는 요인을 확인한다면 유도저항성 기작규명에 도움을 줄 것으로 생각된다. 하지만 Metagenome이 LMO로 분류되어 생물농약으로 등록이 어려워 현재 활성을 보이는 metagenome으로부터 활성 물질을 분리하여 물질에 의한 생화학농약으로 상품화를 시도하고 있음.

제 2 절 유도저항성 기작 규명 연구에 있어서의 활용 계획

현재 histone modification 과 같은 후생유전학적 유전자 발현 조절 기작이 식물의 유도저항성에 관련되고 있다는 내용이 학계에 보고되고 있다. 그러나 DNA 메틸화와 같은 다른 후생유전학적 조절 기작의 유도저항성 형성 과정에서의 역할은 전혀 보고된 바가 없다. 본 연구팀은 DDM1과 같이 DNA 메틸화를 조절하는 chromatin remodeling factor 가 식물의 유도저항성을 조절한다는 것을 최초로 확인하였으므로, 이를 관련 학회지에 보고함으로써 유도저항성의 후생유전학적 조절 기작의 규명 연구에 선도적인 역할을 할 것이다. 또한 DDM1의 목표유전자로써 발굴된 새로운 유전자에 대한 유도저항성 형성과정에서의 기능 분석을 통하여 유도저항성이 증진된 작물 개발에 필요한 새로운 유전자원을 확보할 것이다.

제 3 절 새로운 형태의 미생물 제제의 개발 가능성

현재 국내 농업에서 사용되고 있는 미생물 제제의 경우는 단순한 토양 근권 미생물을 배양하여 토양에 살포함으로써 얻어지는 항균활성 능력 및 식물 생육 촉진 등의 효과를 기대하는 수준이었다. 본 연구를 통하여 얻어진 형질전환체는 배양이 쉽고 빠른 *E.coli*내에 형질 전하되어 있어 저항성 유도 능력에 관련된 물질의 대량 확보에 용이하며 향후 국내 농업에서 형질전환체의 사용이 법률적으로 허락 된다면 새로운 형태의 미생물 농약이나 혹은 생화학 농약으로 개발될 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Metagenome이 *E. coli* 내에 유전자가 삽입된 플라스미드로 되어 있기 때문에 현행 법규상 LMO로 분류되어 생물 농약을 등록 하는데 어려움이 있다. 이를 극복하기 위하여 현재 활성을 보이는 metagenome 으로부터 활성물질을 분리하여 물질에 의한 생화학농약으로 상품화를 시도 하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 2절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 3절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 4절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 5절

특별히 해외과학기술정보를 수집한 것은 없음

제 7 장 참고문헌

제 1절

- Alström, S (1991) Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J Ge. Appl Microbiol* 37: 495-501
- Aime S, Cordier C, Alabouvette C, Olivain C (2008) Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiol Mol Plant Pathol* doi:10.1016/j.pmpp.2008.10.001
- Ahn IP, Kim S, Lee YH, Suh SC(2007) Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143:838-848
- Akram A, Ongena M, Duby F, Dommès J, Thonart P (2008) Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biol* 8:113-124
- Slaughter AR, Hamiduzzaman MM, Gindro K, Neuhaus JM, Mauch-Mani B (2008) Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *Eur J Plant Pathol* 122:185 - 195
- Attaran E, Rostás M, Zeier J (2008) *Pseudomonas syringae* elicits emission of the terpenoid (E, E)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraene in *Arabidopsis* leaves via jasmonate signaling and expression of the terpene synthase TPS4. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1482-1497
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233-266
- Beckers GJ, Conrath U (2007) Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Curr Opin Plant Biol* 10:425-431
- Carteaux F, Contesto C, Gallou A, Desbrosses G, Kopka J, Taconnat L, Renou JP, Touraine B (2008) Simultaneous interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* Sp. strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 leads to complex transcriptome changes. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 244-259
- Chassot C, Buchala A, Schoonbeek HJ, Métraux JP, Lamotte O (2008) Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *Plant J* 55:555-567
- Conn VM, Walker AR, Franco CM (2008) Endophytic actinobacteria induce defense pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 208-218
- Conrath U, Pieterse CM, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7:210-216
- Conrath U, Beckers GJ, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CM,

- Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B (2006) Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* 19:1062-1071
- De Vleeschauwer D, Djavaheri M, Bakker PA, Höfte M (2008) *Pseudomonas fluorescens* WCS 374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiol* 148: 1996-2012
- William G. D'Arcy (1986) *Solanaceae biology and systematics* columbia university Press
- Edreva A (2005) Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15years. *Plant Physiol* 31: 105-124
- Goellner K, Conrath U (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* 121:233-242
- Gómez-Ariza J, Campo S, Rufat M, Estopà M, Messeguer J, San Segundo B, Coca M (2007) Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. *Mol Plant Microbe Interact* 20:832-842
- Hacisalihoglu G, Longo P, Olson S, M. Momol T (2007) Bacterial wilt induced changes in nutrient distribution and biomass and the effect of acibenzolar-S-methyl on bacterial wilt in tomato. *Crop Prot* 26: 978-982
- Heil M, Kost C (2006) Priming of indirect defences. *Ecol Lett* 9:813-817
- Hossain MM, Sultana F, Kubota M, Hyakumachi M (2008) Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in *Arabidopsis thaliana* by plant-growth-promoting fungus *Penicillium*. *Plant Soil* 304:227-239
- Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B (2005) Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol* 139: 267-274
- Jetiyanon K, Kloepper JW (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol Control* 24:285-291
- Jetiyanon K, Fowler W D, Kloepper J W (2003) Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. *Plant Dis* 87:1390-1394
- Jung WJ, Jin YL, Kim KY, Park RD, Kim TH (2005) Changes in pathogenesis-related proteins in pepper plants with regard to biological control of phytophthora a blight with *Paenibacillus illinoisensis*. *Biocontrol* 50: 165-178
- Kloepper J W (1993) Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: F. B. Metting *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management* , Marcel Dekker Inc., New York, pp 255-274

- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266
- Kang SH, Cho HS, Cheong H, Ryu CM, Kim JF, Park SH (2007) Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). (1) *J Microbiol Biotechnol* 17:96-103
- Kim KJ, Park CJ, Ham BK, Choi SB, Lee BJ, Paek KH (2006) Induction of a cytosolic pyruvate kinase 1 gene during the resistance response to Tobacco mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rep* 25:359-364
- Kim MS, Kim YC, Cho BH (2004) Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biol* 6:105-108
- Kim MS, Cho SM, Kang EY, Im YJ, Hwangbo H, Kim YC, Ryu CM, Yang KY, Chung GC, Cho BH (2008) Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1643-1653
- Kim YC, Yi SY, Mang HG, Seo YS, Kim WT, Choi D (2001) Pathogen-induced expression of cyclo-oxygenase homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Pukang). *J Exp Bot* 53:383-385
- Kim YC, Kim SY, Paek KH, Choi D, Park JM (2006) Suppression of CaCYP1, a novel cytochrome P450 gene, compromises the basal pathogen defense response of pepper plants. *Biochem Biophys Res Commun* 345:638-645
- Kim YJ, Hwang BK (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol Plant* 108: 51-60
- Kokalis - Burelle N, Vavrina CS, Roskopf EN, Shelby RA (2002) Field evaluation of plant growth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant Soil* 238: 257-266
- Malolepsza U (2006) Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Crop Prot* 25: 956-962
- Nam YW, Paek KH (2001) Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene. *Plant Sci* 161: 727-737
- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, Yoo TH, Paek KH (2001) Hot pepper cDNA encoding a gene-at-valuation of plant pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic Virus. *Mol Cells* 11:122-127.
- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, You JS, Paek KH (2002) Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol Biol*

- Park CJ, An JM, Shin YC, Kim KJ, Lee BJ, Paek KH (2004) Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* 219:797-806
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH (2004) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J* 37:186-198
- Park CJ, Shin YC, Lee BJ, Kim KJ, Kim JK, Paek KH (2006) A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and *Xanthomonas campestris*. *Planta* 223:168-179
- Pflieger S, Palloix A, Caranta C, Blattes A, Lefebvre V (2001) Defense response genes colocalize with quantitative disease resistance loci in pepper. *Theor Appl Genet* 103:920-929
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* 10: 393-398
- Quilis J, Peñas G, Messeguer J, Brugidou C, San Segundo B (2008) The Arabidopsis AtNPR1 inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic Rice. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1215-1231
- Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R (2002) Enhancing resistance of tomato and hotpepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 429-441
- Sadd BM, Kleinlogel Y, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P (2005) Trans-generational immune priming in a social insect. *Biol Lett* 1:386-388.
- Shin R, Kim MJ, Paek KH (2003) The CaTin1(*Capsicum annuum* TMV-induced Clone 1) and CaTin1-2 genes are linked head-to-head and share a bidirectional promoter. *Plant Cell Physiol* 44: 549-554
- Ton J, Jakab G, Toquin V, Iavicoli V, Maeder M, Métraux JP, Mauch-Mania B (2005) Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 987-999
- Ton J, D'Alessandro M, Jourdie V, Jakab G, Karlen D, Held M, Mauch-Mani B, Turlings T C, Turlings T (2006) Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J* 49:16-26
- van Hulten M, Pelsler M, van Loon LC, Pieterse CM, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5602-5607
- van Loon L.C (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243-254

- van Peer R, Niemann GJ, Schippers B (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728–734.
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM (2004) The transcriptome of Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 895–908
- Yi SY, Kim JH, Joung YH, Lee S, Kim WT, Yu SH, Choi D (2004) The pepper transcription factor CaPF1 confers pathogen and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136:2862–2874
- Yoo TH, Park CJ, Ham BK, Kim KJ, Paek KH (2004) Ornithine decarboxylase gene (CaODC1) is specifically induced during TMV-mediated but salicylate-independent resistant response in hot pepper. *Plant Cell Physiol* 45:1537–1542
- Walters DR, Boyle C (2005) Induced resistance and allocation costs: what is the impact of pathogen challenge? *Physiol Mol Plant Pathol* 66: 40–44
- Wei G, Kloepper JW, Tuzun S (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81:1508–1512

제 2절

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

Yang, K-Y., Liu, Y., and Zhang, S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 741-746.

제 3절

Andrey, A. B., I. C. Dodd, N. Hontzeas, J. C. Theobald, V. I. Safronova, and W. J. Davies. 2009. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. *New phytol.* 181: 413-423.

Arora, N. K., S. C. Kang, and D. K. Maheshwari. 2001. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Marcophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Curr. Sci.* 81: 673-677.

Frey-Klett, P., M. Chavatt, M.-L. Clausse, S. Courier, C. L. Roux, J. Raaijmakers, M. G. Martinotti, J.-C. Pierrat, and J. Garbaye. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New phytol.* 165: 317-328.

Gorden, S. A., and R. P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant physiol.* 26: 192-195.

Hameeda, B., G. Harini, O. P. Rupela, S. P. Wani, and G. Reddy. 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163: 234-242.

Heil, M., A. Hilpert, W. Kaiser, and K. E. Linsenmair. 2000. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: Does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *J. Ecol.* 88: 645-654.

Heil, M and I. Baldwin. 2002. Costs of induced resistance: Emerging experimental support for a slippery concept. *Trend Plant Sci.* 7: 61-67.

Jeon, S. A., H. R. Sung, Y. M. Park, J. H. Park, and S.-Y. Ghim. 2009. Analysis of endospore-forming bacteria of nitrogen-fixing bacteria community isolated from plants rhizosphere in Dokdo island. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 37: 189-196.

Kang, S. H., H. S. Cho, H. Cheong, C. M. Ryu, J. F. Kim, and S. H. Park. 2007. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defence on pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 96-103.

Kuklinsky-Sobral, J., W. L. Araujo, R. Mendes, I. O. Gerldi, A. A. Pizzirani-Kleiner, and J. L. Azervedo. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6: 1244-1251.

Lee, S. J., S. E. Lee, K. J. Seul, S. H. Park, and S.-Y. Ghim. 2006. Plant growth-promoting

- capabilities of diazotrophs from wild gramineous crops. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 78-82.
- Mohamed, A. F., C. M. Ryu, L. W. Sumner, and P. W. Pare. 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry* 67: 2262-2268.
- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Planta* 15: 473-497.
- Murphy, J. F., M. S. Reddy, C. M. Ryu, J. W. Kloepper, and R. Li. 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. *Virology* 10: 1301-1307.
- Padidam, M. 2003. Chemically regulated gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 169-177.
- Presello-Cartieaux F., L. Nussaume, and C. Robaglia. 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189-199.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, and R. Samiyappan. 2001. Induced of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and disease. *Crop Protection* 20: 1-11.
- Raupach G. S. and J. W. Kloepper. 2000. Biocontrol of cucumber diseases in field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* 84: 1073-1075.
- Research Institute for Ullengdo & Dokdo Islands. 2008. The plant of Dokdo island. pp 166-221. Nature of Dokdo island. Kyungpook National University Press. Daegu. Korea.
- Ryu, C. M., M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, H. X. Wei, P. W. Pare, and J. W. Kloepper. 2002. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4972-4932.
- Ryu, C. M., C. H. Hu, M. S. Reddy, and J. W. Kloepper. 2003. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytol.* 160: 413-420.
- Ryu, C. M., J. F. Murphy, K. S. Mysore, and J. W. Kloepper. 2004. Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid dependent signaling pathway. *Plant J.* 39: 381-392.
- S. Prez-Miranda, N. Cabirol, R. George-Tllez, L. S. Zamudio-Rivera, and F. J. Fernandez. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods* 70: 127-131.
- Salme, T., and E. Gerhart H. Wagner. 1999. The plant growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *MPMI* 12: 951-959.

- Schwyn, B., and J. B. Neilans. 1987. University chemical assay for the determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 46-52.
- Walters, D., and M. Heil. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *PMPP* 7: 3-17.

제 4절

- 강길진, 정지현, 조정일. 2000. *Bacillus subtilis*가 생산하는 길항물질에 의한 아플라톡신 생성균의 억제. *한국식품위생안전성학회지*. 15; 122-127.
- 김경희, 오순옥, 허재선, 염규진, 고영진. 2006. 차나무 겹등근무늬병 방제용 미생물제제 개발을 위한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310의 대량배양 최적 조건. *한국식물병리학회지*. 12(2): 85-90.
- 김상달. 고추역병 길항미생물로부터 생물방제용 항진균성 항생물질의 분리 및 특성에 관한 연구. 기초과학연구사업 학술기사.
- 김용기, 이승돈, 류재기, 류재당. 2003. *Bacillus* spp. 및 *Serratia marcescens*에 의한 사과 푸른곰팡이병의 생물적 방제. *한국식물병리학회지*. 9(4): 229-236.
- 박성민, 정혁준, 유대식. 2006. 고추 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*의 방제를 위한 길항 미생물의 분리 및 항진균 활성. *Journal of Life Science*. 16(3): 420-426
- 박창석. 생물적 방제제의 근원정착과 기존 토양미생물과의 관계. 기초과학연구사업 학술기사.
- 양현숙, 손황배, 정영륜. 2002. *Bacillus stearothermophilus* YC4194에 의한 *Pythium* 모잘록병의 생물학적 방제. *한국식물병리학회지*. 8(4):234-328.
- 이경원. 2008년. 농촌진흥청 생물농약 등록현황.
- 이용선, 심송보. 2007. 농업·농촌경제동향 2006년 겨울호.
- 장병춘, 이주영, 이상엽, 권장식, 김완규. 2006. 유용미생물에 의한 작물체 양분 및 토양 이화학적 변화 구명. 농업과학기술원
- 정희경, 김상달. 2003. 고추역병균 *Phytophthora capsici*를 방제하는 길항균주 *Bacillus megaterium* KL39의 선발과 길항물질. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3): 235-241.
- 조용섭, 박창석, 이순구, 이영근, 임춘근, 차재순, 최용철, 최재울, 허성기, 황인규. 1999. 식물세균병학. 서울대학교출판부.
- 황지영, 심창기, 류경열, 최두희, 지형진. 2006. 상추 균핵병 생물적방제를 위한 *BreviBacillus brevis* B23과 *Bacillus stearothermophilus* B42의 선발. *한국식물병리학회지*. 12(3):254-259
- Bae, M. 1978. Present status and future of antibiotics of agriculture. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 141-148.
- Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, C. A., Saser, M. and MacFall, J. S. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* 73: 1148-1152.

- Becker, J. O. 1993. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pestic. Sci.* 37: 355-363.
- Chang, J. Y., H. H. Lee, I. C. Kim and H. C. Chang. 2001. Characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* cy2. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 30, 227-233.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.
- Cho, S. J., S. K. Lee, B. J. Cha, Y. H. Kim and K. S. Shin. 2003. Detection and characterization of the *Cloosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound irurin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 47-51.
- Chung, B. K. and S. B. Lee. 1986. Effects of conidial number and nutrition on the germination of conidia in *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsium* causing red pepper anthracnose. *Kor. J. Plant Prot.* 25, 41-46.
- Copping, L. G. 2004. The manual of biocontrol agents. The third edition of the biopesticide manual. BCPC. UK. 702.
- Dey, R., K.K. Pal, D.W. Bhatt and S.M. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological research* 159: 371-394.
- Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 : 337-359.
- Gamalero, E., L. Fracchia, M. Cavaletto, J. Garbaye, P. Frey-Klett, G.C. Varese, M.G. Martinotti. 2003. Characterization of functional traits of two fluorescent pseudomonads isolated from basidiomes of ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry.* 35 : 55-63.
- Hoffland, E., Pieterse, C. M. J., Bik, L., and van Pelt, J. A. 1995. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 46:309-320.
- Jeon, Y. H., S. P. Chang, I. Hwang and Y. H. Kim. 2003. Involvement of growth-promoting Rhizobacterium *PaeniBacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 881-891.
- Joo, G. J., Lee, I. H. and Kim, J. H. 2002. Chitinase production and Isolation of *Serratia plymuthica* AL-1 antagonistic to white rot fungi *Allium fistulosum* roots. *Kor. j. Microbiol. Biotechnol.* 30: 135-141.
- Jung, B. K. and S. H. Chang. 1984. An etiological study on the anthracnose fungus of pepper caused by *Colletotrichum dematium* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 12, 153-157.
- Jung, H. K. and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-pepper phytophthora blight disease. *Kor.*

- J. Microbiol. Biotechnol. 31, 235-241.
- Katz, E. and Demain, A. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible function. *Bacteriol. Rev.* 41: 449-474.
- Lange, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicide—the natural choice. *Pestic. Sci.* 39: 155-160.
- Kim, J. Y., E. A. Bae, M. J. Han and D. H. Kim. 1999. Inhibitory activity of *Bacillus licheniformis* AJ on the growth of diarrheal pathogens. *J. Appl. Pharm.* 7, 385-389.
- Kim, S. H., Y. D. Lee, W. S. Ha and H. M. Ro. 1998. A study on the transport phenomena of hydrophobic pesticides influenced by the interfaces of groundwater in unsaturated inorganic porous media. *J. of KSEE.* 20, 1545-1553.
- Lee, E. T. and S. D. Kim. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against red-pepper rotting *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 334-340.
- Lee, K. M., O. M. Lee, M. S. Cha, E. H. Park, G. T. Park, H. J. Son and S. J. Lee. 2002. Production and characteristics of environment friendly antimicrobial substance by *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM. *J. of the Environmental Science.* 11, 33-40.
- Lee, K. S. 1997. Evaluation on the effects of pesticide residues to agroecosystem in Korea. *Kor. J. Environ. Agric.* 16, 80-93.
- Lim, T. H., Lee, J. M., Chang, T. H. and Cha, B. J. 2000. Antifungal activity and identification of an Actinomycetes strain isolated from mummified peaches. *Kor. j. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 161-166.
- Lim, T. H. 2005. Antifungal activity of *Streptomyces griseofuscus* 200401 against pathogens causing late blight and anthracnose on pepper. *Korean J. Pestic. Sci.* 9: 102-107.
- Malamy, J., Sanchez-Casas, P., Henning, J., Guo, A., and Klessing, D. F. 1996. Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Molecular plant-Microbe Interactions* 9:474-482.
- Nagano, M. M., Marahiel, M. A. and Zuber, P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170: 5622-5668.
- Nguyen Thi Thu Hang, Soon-Ok Oh, Gyoung Hee Kim, Jae-Seoun Hur¹ and Young Jin Koh. 2005. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in Strawberries. *Plant Pathology. J.* 21: 59-63.
- Nielands, J. B. and S. A. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu. rev. Plant Physiol.* 37, 187-208.
- Oh, I. S., M. S. In, I. S. Woo, S. K. Lee and S. H. Yu. 1998. Anthracnose of pepper seedling caused by *Colletotrichum coccodes*(wallr.) hughes. *Kor. J. Mycol.* 16, 151-156.

- Oh, Y. K. and J. H. Kim. 1997. Effects of residual organochlorine pesticides in the coastal environment on the Cheju Island. *J. KSWQ* 13, 317-324.
- Oh, Y. J. 1992. Studies on the optimization of media composition and cultural conditions for kasugamycin production by *Streptomyces kasugansis*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 583-587.
- Okon, Y., and Y. Kapulnik 1986. Development and function of *Azospirillum* inoculated root., *Plant and Soil.* 90:3-16.
- Pan, B., Y. M Bai, S. Leibovitch and D. L. Smith. 1999. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote com growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy*, 11:179--186.
- Park, K. S. and C. H. Kim. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Kor. J. Plant Pathol.* 8, 61-19.
- Park, S. B. and D. W. Kim. 1995. Screening for phyllospherical antagonistic microorganism for control of red-pepper anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Kor. J. Myco.* 23, 190-195.
- Park, S. M., H. J. Jung., S. H. Han, S. H. Yeo, Y. W. Kim, H. G. Ahn, H. S. Kim and T. S. Yu. 2005. Antifungal activity of extract from *Xanthium strumarium* L. against plant pathogenous fungi. *J. of Life Science* 15, 692-695.
- Park, S. M., S. H. Han and T. S. Yu. 2005. Culture conditions and antifungal activity of *Bacillus licheniformis* KMU-3 against crop pathogenic fungi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 112-116.
- Park, R. D., K. J. Jo., Y. L. Jin, K. Y. Kim, J. H. Shim and Y. W. Kim. 2002. Variation of antifungal activities of chitosans on plant pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 84-88.
- Park, W. M., Y. S. Lee, S. H. Kim and Y. H. Ko. 1988. Biochemical investigation of resistance of green pepper fruit to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Kor. J. Plant Pathol.* 4, 290-296.
- Seoung-Hee Lee and Jae-Soon Cha. 1999. Ethyl Acetate Extract of *Bacillus pumilus* SH122 Induces Resistance Against Phytophthora Blight in Pepper Plant. *Kor. J. Plant Pathol.* 15(6): 319-322.
- Seon-Hee Park, Dong-Won Bae, Joon-Taek Lee, Sung-Ok Chung and Hee Kyu Kim. 1999. Integration of Biological and Chemical Methods for the Control of Pepper Gray Mold Rot Under Commercial Greenhouse Conditions. *Plant Pathology. J.* 15(3): 162-167
- Shun-Shan S. Ok-Hee Choi. Sun-Mi Lee. Chang-Seuk Park. 2002. In vitro and In vivo Activities of a Biocontrol Agent, *Serraria plymuthica* A21-4, Against *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology Journal.* 18(4): 221-224.
- Shun-Shan S. Ok-Hee Choi. Sun-Mi Lee. Chang-Seuk Park. 2005. Root Colonizing and Biocontrol Competency of *Serraria plymuthica* A21-4 against *Phytophthora* Blight of pepper. *Plant Pathology Journal.* 21(1): 64-67.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Metraus, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270.

- Sunwoo, J. Y., Lee, Y. K., and Hwang, B. K. 1996. Induced resistance against *Phytophthora capsici* in pepper plants in response to DL- β -amino-n-butyric acid. *European J. Plant Pathology*. 102:663-670.
- Uknes, S., Winter, A. M., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, G., Potter, S., Ward, E., and Ryals, J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 6:292-298.
- Yeoung-Seuk Bae, Kyungseok park and Choong-Hoe Kim. 2004. *Bacillus* spp. as biocontrol agents of root Rot and phytophthora Blight on Ginseng. *Plant Pathology*. J. 20: 63-66

주 의

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