



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0143023
(43) 공개일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 37/46 (2006.01) A01P 21/00 (2006.01)

C07K 11/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 37/46 (2013.01)

A01P 21/00 (2021.08)

(21) 출원번호 10-2023-0037776

(22) 출원일자 2023년03월23일

심사청구일자 2023년03월23일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

유나연

서울특별시 영등포구 여의대방로43라길 9, 111동 902호

강지은

서울특별시 성북구 안암로 145

정의환

서울특별시 서초구 방배로19길 67, 102동 505호

(74) 대리인

위병갑

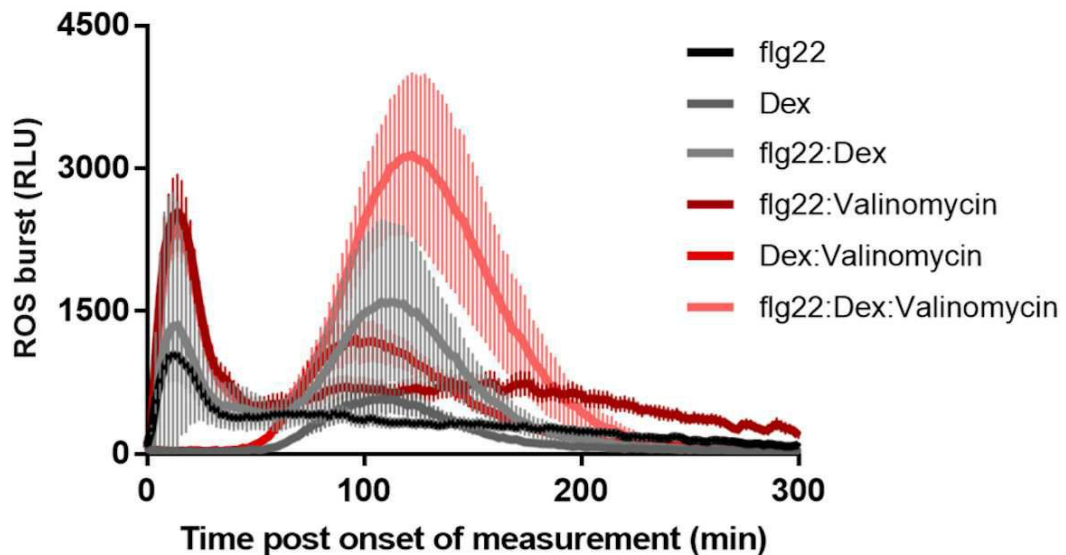
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 식물체 면역 증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 발리노마이신의 식물 면역 증진 효과에 관한 것으로, 본 발명의 방선균 추출물로부터 분리 및 정제한 발리노마이신은 항균 활성을 나타내지 않는 농도에서 식물 초기 선천 면역 반응을 증진시켜 식물 병원체에 대해 유도 저항성을 증진시킴으로써 식물병 방제의 효과를 보이므로, 천연물인 발리노마이신을 친환경적인 식물 면역 촉진제로 활용될 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C07K 11/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395073460
과제번호	PJ0158712022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농축산물 생산현장의안전관리기술개발
연구과제명	면역유도 미생물을 활용한 작물 환경·생물 스트레스 제어 기술 연구(3공동)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교(서울) 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

발리노마이신(valinomycin) 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 면역 증진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 식물에서 PTI(PAMP-triggered immunity) 또는 ETI(effector-triggered immunity)를 촉진하는, 식물체의 면역 증진용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 식물 병원체에 대한 저항성을 유도하는, 식물체의 면역 증진용 조성물.

청구항 4

제 4항에 있어서, 식물 병원체는 식물에 병원성을 나타내는 진균, 박테리아, 바이러스 또는 이들 유래의 물질인, 식물체의 면역 증진용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 식물 병원체는 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), 슈도모나스 시린게 피브이. 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000), 껍토박테리움 카로토보룸 아종 카로토보룸 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*), 잔토모나스 캄페스트리스 피브이. 베시카토리아 833 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 833), 잔토모나스 캄페스트리스 피브이. 베시카토리아 833 필라 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 833 pila), 껍토박테리움 카로토보룸 아종 아트로지티쿰 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *Atrosepticum*), 아시도보락스 콘자시 (*Acidovorax konjaci*), 잔토모나스 알빌리넨스 (*Xanthomonas albilineans*), 잔토모나스 오리자 피브이. 오리자 90 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 90), 잔토모나스 오리자 피브이. 오리자 599 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 599), 잔토모나스 오리자 피브이. 오리자 710 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 710), 자니박터 멜로니스 (*Janibacter melonis*), 랄스토니아 솔라나세아룸 레이스 1 (*Ralstonia solanacearum* race 1), 랄스토니아 솔라나세아룸 레이스 3 (*Ralstonia solanacearum* race 3), 캔디다 글라브라타 (*Candida glabrata*), 캔디다 크루세이 (*Candida krusei*), 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*), 사카로마이세스 세레비지애 5312(*Saccharomyces cerevisiae* 5312), 버크홀데리아 글루메 에스엘 2870 (*Burkholderia glumae* SL 2870), 버크홀데리아 글루메 에스엘 2399(*Burkholderia glumae* SL 2399), 버크홀데리아 글루메 R1(*Burkholderia glumae* R1), 파이토프thora 파라시티카 (*Phytophthora parasitica*), 플라스모파라 비티콜라 (*Plasmopara viticola*), 토바코 모자이크 바이러스 (*Tobacco mosaic virus*) 또는 포테이토 바이러스 엑스 (*Potato virus X*)인, 식물체의 면역 증진용 조성물.

청구항 6

발리노마이신(valinomycin) 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 식물병에 대한 유도 저항성을 증진시키는, 식물병 방제용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 식물병은 식물 병원체에 의해 발생하는 식물병인, 식물병 방제용 조성물.

청구항 9

제 9항에 있어서, 식물 병원체는 식물에 병원성을 나타내는 진균, 박테리아, 바이러스 또는 이들 유래의

물질인, 식물병 방제용 조성물.

청구항 10

제 1항의 조성물을 식물체에 처리하는 단계를 포함하는, 식물체의 면역을 증진시키는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 식물 병원체에 대한 식물체의 유도저항성(induced resistance)을 유도하는, 식물체의 면역을 증진시키는 방법.

청구항 12

제 6항의 조성물을 식물체에 처리하는 단계를 포함하는, 식물병 방제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발리노마이신의 식물 면역 증진 효과에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물은 병원균으로부터 자신을 보호하기 위해 진화적으로 면역 시스템을 발전시켜왔다. 식물 면역은 후천 면역 없이, 질병을 유발할 수 있는 미생물을 검출하고, 이에 대해서 보호하는 선천 면역을 보유하고 있다. 식물의 면역 시스템은 다양한 병원체에 대해 고도로 전문화된 인식 시스템을 기초로 하며, 이는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 병원체가 일반적으로 가지고 있는 분자적 패턴, 즉 PAMP(pathogen-associated molecular pattern)를 식물 세포막에 존재하는 수용체 PRR(pattern-recognition receptor)이 인식하여 활성화되는 PTI(PAMP-triggered immunity)와, 병원체가 PTI를 억제하기 위해 분비하는 특정 이펙터(effector) 단백질을 식물 세포 내 NLR(nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing) 단백질이 인식하여 활성화되는 ETI(effector-triggered immunity)가 식물 면역을 구성한다. 면역 시스템은 방어 유전자 전사 조절, 이차 대사산물 생성, 세포벽 강화, 세포사멸 등의 방어 기전을 활성화시켜 식물을 보호한다. 식물의 면역 시스템 PTI 및 ETI는 식물 면역 활성화의 가장 초기 단계를 구성하고, 활성화 이후 다양한 후속 신호전달 과정을 공유하고, 전신적 면역반응을 유도한다. 최근 연구결과에서, PRR과 PRR의 공수용체 돌연변이체에서 ETI 반응이 감소한다는 것이 밝혀졌다. 또한, 초기 면역반응 중 하나인 활성산소종 발생이 두 면역 반응을 잇는 중요한 연결고리라는 것이 밝혀졌다. 두 가지의 면역 반응은 서로를 강화하고 활성화하여, 식물이 보다 강한 저항성을 가질 수 있도록 한다. 따라서, PTI와 ETI 중 하나만 활성화되는 것은 효과적이지 않으며, PTI 활성화는 특히 효과적인 ETI 반응에 필수적이다 (Ngou, B. P. M., Ahn, H. K., Ding, P., & Jones, J. D. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*, 592(7852), 110-115., Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., ... & Xin, X. F. (2021). Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature*, 592(7852), 105-109.).

[0003] 식물의 기본 면역 수준은 적절한 자극에 의해 향상될 수 있다. 이를 위한 프라이밍(priming)은 식물의 면역능을 높여서 추가적인 외부 스트레스에 노출되었을 때, 더 강하고 빠르게 면역을 유도할 수 있도록 하는 것으로, 이를 통해 식물은 식물체 전신에서 저항성 반응을 유도하거나 침입하는 다양한 병원균에 대한 저항성 반응을 유도하는 유도 저항성(induced resistance)을 획득한다. 병원체, 근권세균의 접종과 적절한 물질의 처리 등이 성공적으로 식물 저항성을 유도할 수 있다고 알려져 있다. 면역 유도 상태에 있는 식물은 방어 작용에 관여하는 유전자를 발현 시키거나, 이차 대사물질 및 그 전구체를 저장하여 외부 스트레스에 대비한다. 이는 식물의 다유전자적 저항성을 증대시키고, 식물이 자기 자신을 더 효과적으로 보호할 수 있도록 한다. 예를 들어, BABA(β -amino butyric acid)는 잘 알려져 있는 식물 면역 유도제로, 넓은 범위의 작물의 병 저항성을 유도할 수 있다. 하지만, 식물 면역 유도 기전은 최근에 밝혀지기 시작했고, 아직 우리가 알지 못하는 부분이 많다 (Kang, J. E., Yoo, N., Jeon, B. J., Kim, B. S., & Chung, E. H. (2022). Resveratrol oligomers, a plant-driven natural product with anti-virulence and plant immune-priming roles. *Frontiers in Plant Science*, 1553.).

[0004] 다양한 식물병의 방제를 위해 합성 살균제가 가장 흔하게 사용되고 있지만, 부정적인 측면이 계속해서 제기되어 왔다. 이는 합성 살균제 살포 이후의 잔존으로 인한 문제, 그리고 약제 저항성 균주 출현 문제 때문이다. 합성 살균제의 대체제로 사용될 수 있는 것 중 하나가 천연물이고, 대표적으로 토양에서 발견되는 그람양성균인 방선균이 만들어내는 많은 천연물이 대체제로 사용되고 있다. 방선균은 항세균, 항진균, 항암 등의 효과를 가지는 다양한 물질을 생성하고, 과학자들은 이를 신약 개발에 적극적으로 활용하고 있다. 이와 같은 천연물 유래 대사산물을 기반으로 하는 식물 면역 유도제는 항생제 저항성 문제 및 환경에 대한 부작용을 감소시킬 수 있으므로, 신규 식물 면역유도제의 발굴이 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 식물체의 면역 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 식물병 방제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 식물체의 면역을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 아울러, 본 발명의 목적은 식물병 방제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 발리노마이신(valinomycin) 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 식물체의 면역 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 발리노마이신(valinomycin) 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명은 식물체의 면역을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 아울러, 본 발명은 식물병 방제 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 방선균 추출물로부터 분리 및 정제한 발리노마이신은 항균 활성을 나타내지 않는 농도에서 식물 면역 반응을 증진시켜 식물 병원체에 대해 유도 저항성을 가지게 함으로써 식물병을 방제하는 효과가 있으므로, 천연물인 발리노마이신을 친환경적인 식물 면역 촉진제로 활용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1는 방선균 에틸아세테이트 추출액에서 발리노마이신을 정제하는 과정을 나타낸 블록도이다.

도 2는 본 발명의 방선균 유래 발리노마이신의 분자량을 나타낸 도이다.

도 3는 본 발명의 방선균 유래 발리노마이신의 구조 분석 결과 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 방선균 유래 발리노마이신의 항세균 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 방선균 유래 발리노마이신의 식물 면역 반응 유도 효과를 PAMP에 의해 유도되는 활성산소 발생량을 통해 확인한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 방선균 유래 발리노마이신의 식물 면역 반응 유도 효과를 PAMP 및 이펙터에 의해 유도되는 활성산소 발생량을 통해 확인한 그래프이다.

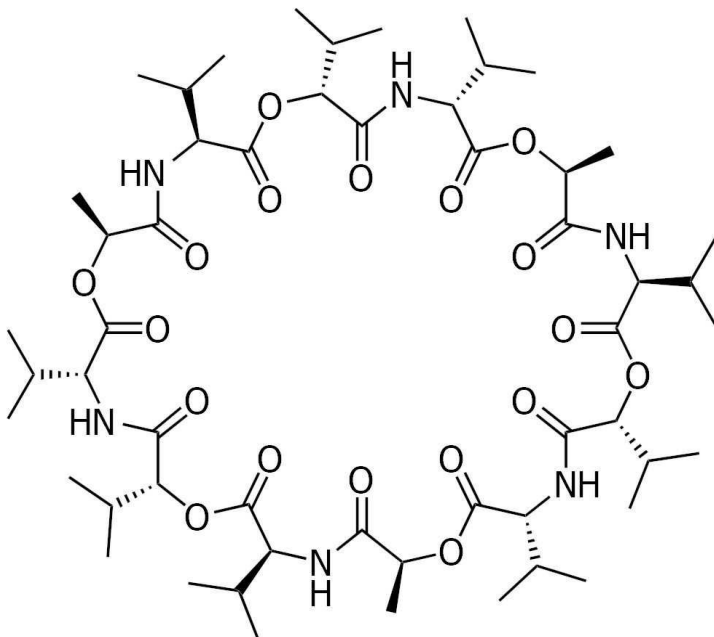
도 7은 본 발명의 방선균 유래 발리노마이신의 ETI의 세포 사멸 반응에 미치는 영향을 나타낸 그래프와 사진이다.

도 8은 본 발명의 방선균 유래 발리노마이신의 처리에 의해 면역이 유도된 식물 모델에서 병원균의 밀도를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0016] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0017] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.
- [0019] 일 측면에서, 본 발명은 발리노마이신(valinomycin) 또는 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 면역 증진용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 일 구현예에서, 발리노마이신은 분자식 $C_{54}H_{90}N_6O_{18}$ 을 가지며, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:

화학식 1



- [0021]
- [0022] 본 발명에서 사용된, 용어 "발리노마이신"은 12 개의 아미노산 및 에스테르가 교차적으로 거대환분자(macrocyclic molecule) 형성하여 만들어진 도데카덱시펩타이드(dodecadepsipeptide)이다. 이 화합물은 D- 및 L-발린, D-히드록시발레릭산(hydroxyvaleric acid) 및 L-락트산의 거울상이성질체로 구성되어 있으며, 아마이드 및 에스테르 결합으로 연결되어 있다. 발리노마이신은 다수의 스트렙토마이세스 균주(streptomyces strains), 예컨대, 스트렙토마이세스 sp. S8로부터 얻을 수 있다.
- [0023] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 식물에서 PTI(PAMP-triggered immunity) 반응을 촉진시킬 수 있다.
- [0024] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 식물에서 ETI(effector-triggered immunity)를 활성화시킬 수 있다.

- [0025] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 식물의 면역을 증진시킴으로써 식물 병원체에 대한 저항성을 유도(induced resistance)할 수 있다.
- [0026] 일 구현예에서, 식물 병원체는 식물에 병원성을 나타내는 진균, 박테리아, 바이러스 또는 난균류일 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 식물 병원체의 PAMP(pathogen-associated molecular pattern)는 식물의 면역을 유도할 수 있다.
- [0028] 일 구현예에서, PAMP(pathogen-associated molecular pattern)는 식물에 병원성을 나타내는 진균, 박테리아 또는 바이러스 유래의 지질 다당류, 다당류 및 올리고다당류, 내독소, 플라젤린 또는 플라젤린-연관된 폴리펩타이드 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, 상기 식물 병원체는 그람 양성 세균, 그람 음성 세균, 바이러스 및 난균류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), 슈도모나스 시린게 피브이. 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000), 펙토박테리움 카로토보룸 아종 카로토보룸(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*), 잔토모나스 캄페스트리스 피브이. 베시카토리아 833(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 833), 잔토모나스 캄페스트리스 피브이. 베시카토리아 833 필라(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 833 pila), 펙토박테리움 카로토보룸 아종 아트로지프티쿰(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *Atrosepticum*), 아시도보락스 콘자시(*Acidovorax konjaci*), 잔토모나스 알빌리니언스(*Xanthomonas albilineans*), 잔토모나스 오리자 피브이. 오리자 90(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 90), 잔토모나스 오리자 피브이. 오리자 599(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 599), 잔토모나스 오리자 피브이. 오리자 710(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 710), 자니박터 멜로니스(*Janibacter melonis*), 랄스토니아 솔라나세아룸 레이스 1(*Ralstonia solanacearum* race 1), 랄스토니아 솔라나세아룸 레이스 3 (*Ralstonia solanacearum* race 3), 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 캔디다 크루세이(*Candida krusei*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 사카로마이세스 세레비지애 5312(*Saccharomyces cerevisiae* 5312), 버크홀데리아 글루메 에스엘 2870(*Burkholderia glumae* SL 2870), 버크홀데리아 글루메 에스엘 2399(*Burkholderia glumae* SL 2399), 버크홀데리아 글루메 R1(*Burkholderia glumae* R1), 파이토프thora 파라시티카(*Phytophthora parasitica*), 플라스모파라 비티콜라(*Plasmopara viticola*), 토마코 모자이크 바이러스(*Tobacco mosaic virus*) 또는 포테이토 바이러스 엑스(*Potato virus X*)일 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 발리노마이신을 1 내지 100 μ M의 농도로 포함할 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 상기 조성물은 식물의 자가면역력을 높이도록 적용되므로, 식물의 자가면역 증강제로 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용된 용어, "플라젤린"은 그 자체로 중공 원통형으로 배열되어 박테리아 편모에서 필라멘트를 형성하는 구상 단백질이다. 플라젤린은 박테리아 편모의 주요 구성 요소이며, 박테리아에 존재한다. 식물은 보존된 에피토프, 예컨대, 전장 플라젤린 암호 서열의 N-말단에 위치한 22개 아미노산의 스트레치(flgl22)의 인식을 통해서 박테리아 미생물을 감지하고, 감염을 방제하고, 이에 대한 방어를 보유한다. 원형질막에 배치되고, 식물 세포 표면에서 입수 가능한 류신-풍부 반복부 수용체 카이나제인, 플라젤린 감응성 수용체로서 공지된 식물의 세포 표면에서 패턴 인식 수용체(PRR)를 통해서 박테리아 플라젤린을 감지할 수 있다. flgl22에 관여된 플라젤린 수용체 지각 매개는 다양한 식물 분류군에 걸쳐서 고도로 보존된다 (Taki et al., "Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice," *Molecular Plant Microbe Interactions* 21: 1635-1642, 2008).
- [0033] 본 발명에서 사용된 용어, "덱사메타손 (Dex)"은 코르티솔의 유도체로, 합성 프레그난 코르티코스테로이드이다. 일 실시예에서, 원하는 특정 시기에 단백질을 식물에서 발현시키기 위해, Dex에 의해 유도되는 프로모터를 이용하였다.
- [0034] 일 측면에서, 본 발명은 발리노마이신(valinomycin) 또는 그의 유도체를 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 일 구현예에서, 상기 조성물은 PTI(PAMP-triggered immunity) 및 ETI(effector-triggered immunity) 반응을 촉진시켜 식물병에 대한 유도 저항성을 증진시킴으로써 식물병을 방제할 수 있다.
- [0036] 일 구현예에서, 상기 식물병은 세균성 반점병일 수 있다.
- [0037] 일 구현예에서, 식물 병원체는 식물에 병원성을 나타내는 진균, 박테리아, 바이러스, 난균류 또는 이들 유래의

물질일 수 있다.

- [0038] 일 구현예에서, 식물 병원체의 PAMP(pathogen-associated molecular pattern)는 식물의 면역을 유도할 수 있다.
- [0039] 일 구현예에서, PAMP(pathogen-associated molecular pattern)는 식물에 병원성을 나타내는 진균, 박테리아 또는 바이러스 유래의 지질 다당류, 다당류 및 올리고당류, 내독소, 플라젤린 또는 플라젤린-연관된 폴리펩타이드 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0040] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 발리노마이신을 1 내지 100 μ M의 농도로 포함할 수 있으며, 상기 농도 범위에서 발리노마이신은 항균 효과를 가지지 않으면서 식물 병원체에 대한 유도저항성(induced resistance)만을 촉진하여 병원체에 대한 방제 효과를 가진다.
- [0041] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 식물체의 면역 증진용 조성물을 식물체에 처리하는 단계를 포함하는, 식물체의 면역을 증진시키는 방법에 관한 것이다.
- [0042] 일 구현예에서, 식물체의 식물 병원체에 대한 유도저항성(induced resistance)을 유도하여 식물체의 면역을 증진시킬 수 있다.
- [0043] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 식물병 방제용 조성물을 식물체에 처리하는 단계를 포함하는, 식물병 방제 방법에 관한 것이다.
- [0044] 일 구현예에서, PTI(PAMP-triggered immunity) 및 ETI(effector-triggered immunity) 반응을 촉진시켜 식물병에 대한 유도 저항성을 증진시킴으로써 식물병을 방제할 수 있다.
- [0045] 일 구현예에서, 텍사메타손(Dex)은 이에 의해 유도되는 프로모터에 의해 발현되는 이펙터(effector)를 갖는 식물에서 ETI를 유도하기 위해 사용될 수 있다.
- [0046] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 식물 병원체에 대한 유도저항성이 프라이밍(priming)된 식물체에 관한 것이다.

[0048] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0050] 실시예 1. 발리노마이신 분리 및 분석

[0051] 1-1. 발리노마이신 분리 및 정제

[0052] 방선균 추출물로부터 식물 면역 유도 활성을 갖는 물질인 발리노마이신을 분리 및 정제하고, 그 구조를 결정하였다. 구체적으로, 방선균이 생성해내는 대사산물을 효과적으로 추출하기 위해 *Streptomyces* sp. S8을 5일 동안 키운 TSB(tryptic soy broth) 배지에 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 에틸아세테이트 추출액을 얻은 뒤, 이를 38℃에서 감압 농축하고, C-18 sep-pak 크로마토그래피를 수행하였다. 각 분획은 물과 메탄올을 일정한 비율로 섞어 전개시켰으며, 그 중 활성 분획을 모아 감압 농축한 후, 유속 1 mL/min, UV 검출기 220 nm, 용매 20~95% 메탄올을 이용하는 분취 조건으로 PFP(pentafluorophenyl) 역상 column을 이용한 HPLC 시스템을 통해 발리노마이신을 분리 정제하였다 (도 1).

[0054] 1-2. 분자량 및 구조 분석

[0055] 상기 실시예 1-1에서 방선균으로부터 분리한 활성분자가 발리노마이신이 맞는지 확인하기 위해, 고분해능 질량 분석법으로 이의 분자량을 분석하고, 핵자기공명법으로 구조를 분석하였다. 구체적으로, 유속 0.3 mL/min, UV 220 nm, 용매 0.1% 포름산을 포함한 20~95% 메탄올을 이용하는 분취 조건으로 C18 역상 컬럼을 이용한 UPLC-Q/TOF Mass spectrometer를 통해 상기 실시예 1-1에서 HPLC 시스템을 통해 분리된 활성물질의 분자량을 측정하였다. 또한, 활성물질의 구조를 분석하기 위해, 활성물질을 감압농축기를 이용하여 38℃에서 농축한 후, 활성물질 3 mg을 600 μ L의 클로로포름에 용해시키고, 500 MHz의 ¹H-NMR 분석을 수행하였다.

[0056] 그 결과, 활성물질의 분자량이 positive mode에서 m/z 1111.6385로 나타났으며 (도 2), 활성물질의 ¹H-NMR의

chemical shift 값이 기존 문헌에 보고된 발리노마이신과 동일한 값을 갖는 것을 확인하였다 (도 3). 따라서, 본 발명에서 방선균으로부터 분리한 활성물질이 발리노마이신 (화학식 1)임을 확인하였다.

[0058] 실시예 2. 발리노마이신의 항세균 활성 확인

[0059] 본 발명에서 방선균으로부터 분리한 발리노마이신이 병원성 세균의 성장에는 영향을 미치지 않고 식물 면역을 유도하는 것임을 확인하기 위해서 발리노마이신의 항세균 활성 여부를 확인하였다. 구체적으로, 발리노마이신을 메탄올에 녹여서 96 well에 농도에 맞춰 분주하고, 슈도모나스 시린게 pv. 토마토 DC3000 균의 현탁액 (10^6 CFU/mL)을 각각의 well에 100 μ L씩 첨가하였다. 배지를 28°C에서 4일 배양한 후, 균이 자라는 것을 관찰하여 항세균 효과를 평가하였다.

[0060] 그 결과, 발리노마이신의 농도 1 μ g/mL 내지 64 μ g/mL에서 균 생장이 저해되지 않는 것으로 나타나 (도 4), 발리노마이신이 항세균 활성을 갖지 않으면서 식물 면역을 유도함으로써 식물병을 방제하는 것을 확인하였다.

[0062] 실시예 3. 발리노마이신의 식물 면역 유도 효과 확인

[0063] 3-1. 발리노마이신의 PTI(PAMP-triggered immunity) 유도 촉진 효과 확인

[0064] 발리노마이신이 식물 면역 반응 중 PTI 유도 효과가 있는지 확인하기 위해, PTI를 활성화하는 초기 면역반응인 활성산소 발생량을 확인하였다. 구체적으로, 애기장대 야생형 Col-0 잎에 발리노마이신 10 μ M 또는 1%의 메탄올을 첨가한 증류수를 주사기를 이용하여 주입하여 전처리한 뒤, 16시간 후 상처 반응을 최소화하도록 잎을 따서 white 96 well plate에 넣어 증류수에 3시간 동안 침지하였다. 증류수를 제거한 후, 새로운 증류수에 루미놀 30 μ g/mL 및 HRP(horseradish peroxidase) 20 μ g/mL를 넣고, 슈도모나스 아르기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 얻은 PAMP인 flg22(전장 플라젤린 암호 서열의 N-말단에 위치된 22개 아미노산)를 100 nM 넣은 용액을 만들어 200 μ L씩 분주하였다. 화학루미네센스 분석은 2분마다 한 번씩 진행되었고, 총 60분 동안 활성산소 발생량 변화를 측정하였다.

[0065] 활성산소 발생량 그래프에서 약 15분 정도에서 피크를 찍고 내려오는 곡선이 PTI에 의해 나타나는 활성산소 발생을 나타내며, 발리노마이신을 전처리하고 flg22를 처리한 군에서 flg22만 처리한 대조군보다 이 때 활성산소 발생량이 현저히 증가한 것으로 나타나, 발리노마이신이 PTI 유도 촉진 효과를 가지는 것을 확인하였다 (도 5).

[0067] 3-2. 발리노마이신의 PTI 및 ETI(effector-triggered immunity) 촉진 효과 확인

[0068] 발리노마이신이 식물 면역 반응 중 PTI 및 ETI를 모두 강화하는 효과가 있는지 확인하기 위해, PAMP 및 이펙터(effector) 단백질에 의해 유도되는 활성산소 발생량이 발리노마이신의 전처리에 의해 변화하는지 확인함으로써 ETI 활성화를 확인하였다. 구체적으로, Dex에 의해 유도되는 프로모터에 의해 발현되는 이펙터 단백질을 갖는 Dex::avrRpt2에 상기 실시예 3-1에서와 같이 발리노마이신을 전처리한 후, ETI를 활성화하기 위해 flg22와 함께 텍사메타손(Dexamethasone) 5 μ M을 처리하였다 (Dex에 의해 유도되는 프로모터에 의한 이펙터 단백질 발현을 위해). 화학루미네센스 분석은 2분 간격으로 5시간 동안 진행하였다.

[0069] PTI 및 ETI 활성화에 의한 활성산소 발생량을 측정한 결과, 발리노마이신을 전처리한 잎에서 PTI와 ETI에 의한 활성산소 발생량이 증가하여, 발리노마이신이 두 가지 면역반응을 동시에 활성화시키는 것을 확인하였다 (도 6).

[0071] 이를 통해, 발리노마이신이 flg22에 의한 PTI 반응을 촉진하며, 특히, ETI 반응을 촉진할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0073] 3-3. ETI에 의한 세포 사멸 증가 확인

[0074] 발리노마이신의 ETI 활성화를 통한 HR(hypersensitive response), 즉, 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해, 발리노마이신을 10 μ M 전처리한 담배 잎에서 세포 사멸에 의한 이온 누출량 변화를 이온 전도도로 확인하

였다. 구체적으로, 담배 잎에 각각 발리노마이신을 10 μ M 또는 1%의 메탄올을 첨가한 증류수를 주사기를 이용하여 주입하여 전처리한 후, 3시간 뒤에, 슈도모나스 시린게 pv. 토마토 DC3000 현탁액의 농도를 10^6 CFU/mL로 맞추어 담배 잎에 같은 방식으로 주입하여 접종하고 빛 아래에 식물을 두었다. 접종 40시간 후, 담배 잎을 일정한 크기로 잘라 증류수에 침지한 후, 이온 전도도를 2시간 간격으로 12시간 동안 측정하였다.

[0075] 그 결과, 담배 잎에서의 세포 사멸에 의한 이온 전도도가 대조구보다 발리노마이신을 전처리한 군에서 현저히 증가한 것으로 나타났다 (도 7).

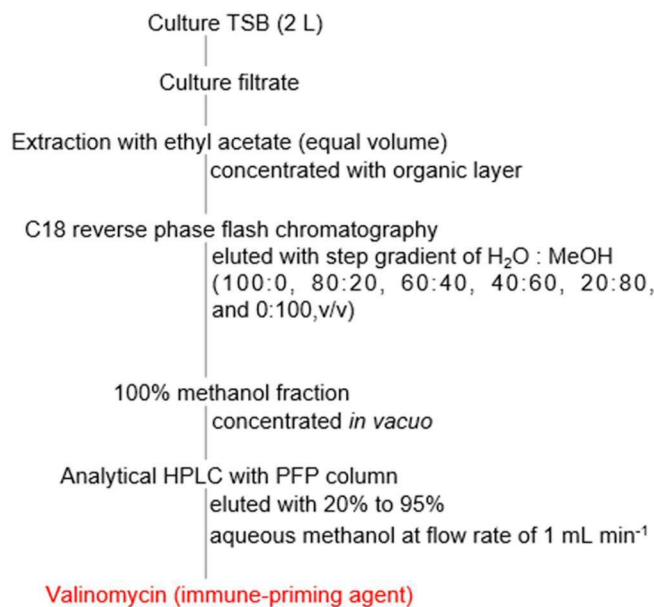
[0077] 실시예 4. 발리노마이신의 식물 면역 유도에 따른 식물병 방제 효과 확인

[0078] 애기장대 야생형 Col-0 종자를 혼합토양 (피트모스, 펄라이트 및 버미큘라이트가 4:3:3의 부피비로 혼합된 토양)에 파종하고, 3일 동안 춘화처리 한 후, 8시간 광조건 및 16시간 암조건의 생육 조건에서 재배하였다. 5주가량 재배한 애기장대 잎에 발리노마이신을 10 μ M 농도로 희석하여 주입하고, 대조군으로는 물을 주입하였다. 물질 처리 16시간 후, 슈도모나스 시린게 pv. 토마토 DC3000 Δ avrPto/avrPtoB 균주 현탁액 (10^6 CFU/mL)을 주입하여 투명한 플라스틱 박스에 넣어 습식 처리하였다. 접종 당일, 접종 2일 및 4일 후, 애기장대 잎을 일정한 크기로 잘라 2 mm 크기의 비드가 들어있는 튜브에 담아 잎을 파쇄하였다. 파쇄물에 물 1 mL을 첨가하고, 1/10 연속희석법으로 희석하여 10 μ L 씩 King's B 고체 배지에 점적하였다. 28°C에서 하루 동안 배양 후, 배지에서 자란 세균의 콜로니의 개수를 계산하여 병 피해를 평가하였다.

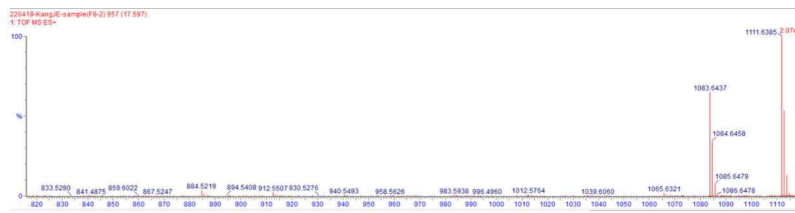
[0079] 그 결과, 발리노마이신을 처리한 잎에서의 병원균의 밀도가 대조군에 비해 현저히 적게 나타났다 (도 8). 이를 통해, 본 발명의 방선균 유래 발리노마이신이 애기장대에서 식물 면역 유도 효과를 가지는 것을 확인하였다.

도면

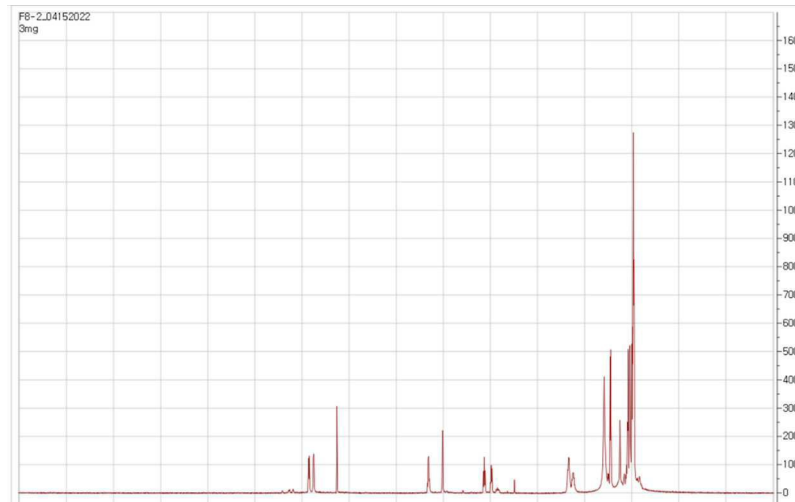
도면1



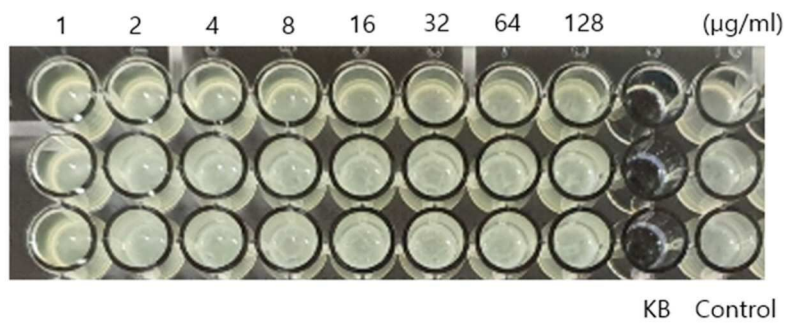
도면2



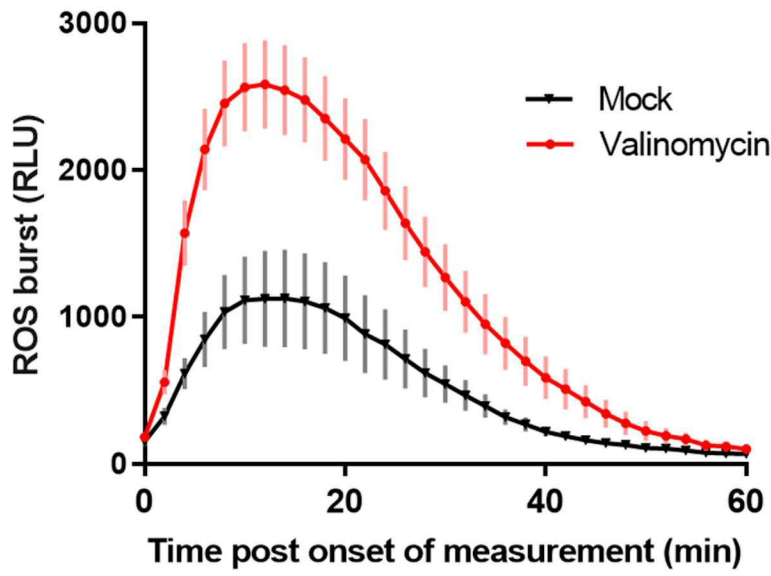
도면3



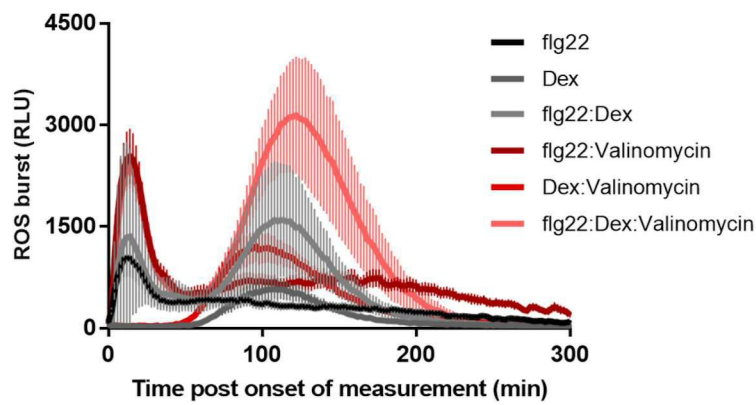
도면4



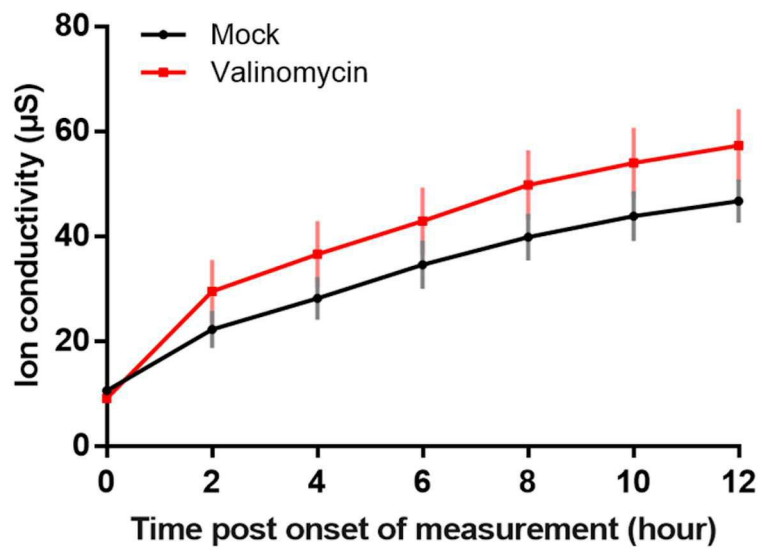
도면5



도면6



도면7



도면8

