



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0015309

(43) 공개일자 2015년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)

C12R 1/545 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0091222

(22) 출원일자 2013년07월31일

심사청구일자 2013년07월31일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

곽연식

경남 진주시 서장대로 235, 205동 305호 (이현동, 주공아파트)

차재율

경남 진주시 가호로 26, 201동 605호 (가좌동, 가좌주공2아파트)

이용복

경상남도 진주시 도동천로 310 하대대림A 915호

(74) 대리인

이원희

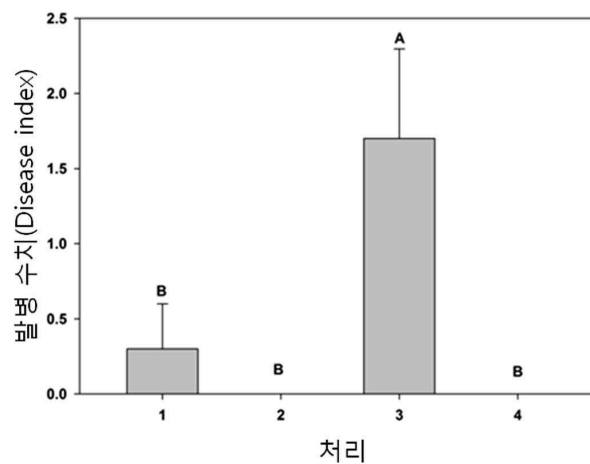
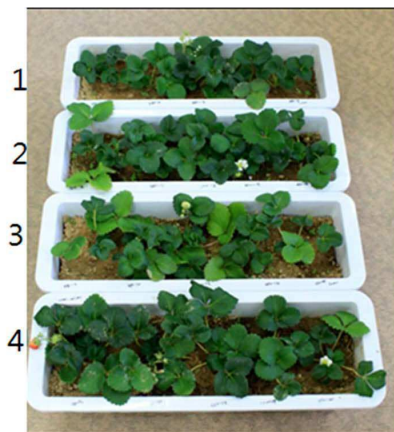
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물 병 방제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주 및 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 및 이의 배양액은 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)을 포함하는 다양한 식물 병원균에 대해 우수한 항진균활성을 나타내고, 식물의 생육에 유의한 활성을 가짐으로써, 상기 균주 또는 이의 배양액은 친환경적인 식물병 방제 및 식물 생장 촉진용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 균주는 식물 위황병균(*Fusarium oxysporum*) 및 역병균(*Phytophthora nocotianae* 또는 *Phytophthora cactorum*)에 대한 항균 활성을 가지는 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 식물은 딸기, 감자, 사탕수수, 강낭콩(garden bean), 동부콩(cowpea), 팬지, 아지랑이꽃(Baby's breath), 토마토, 사과, 배인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 식물병은 딸기 위황병 또는 역병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 농학적 허용 담체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 7

제 1항의 균주, 이의 배양액 또는 제 4항의 식물병 방제용 조성물을 토양, 식물 또는 식물의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 액체 상태로 식물에 관주, 작물의 종자에 침지 또는 분무하거나 종자에 코팅하여 이용하는 것을 특징으로 하는 식물병 방제방법.

명세서

기술분야

본 발명은 딸기 뿌리의 근권에서 분리한 신규한 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0002]

최근 자연계에 존재하는 물질, 생물체 및 이로부터 유래한 소재를 이용하여 농작물 생산 및 보존에 피해를 미치는 병원균, 해충 및 잡초 등을 방제하는 생물농약이 각광받고 있다. 사람 및 환경에 대한 안정성이 탁월하고, 시설, 원예, 수도 및 토양 병해충 방제뿐 아니라 저항성 병원균 및 해충의 방제에 대하여 지속적인 효과를 지니 선진국을 중심으로 친환경 농업에 관심 갖고 있다. 세계 생물농약 시장은 2005년 전체 농약시장의 약 2.5% 수준에 머물렀지만, 최근 연평균 증가율이 9.9%로 계속해서 고성장세를 기록하고 있다. 전세계 약 110개 회사에서 생물농약 사업을 추진하고 있으며, 대표적으로 Agra Quest, Verdera OY, 및 Certis USA, 상기 세 회사가 생물농약 시장의 약 5% 썩을 차지하고 있다.

[0003]

국내의 경우 미생물 자체를 이용하거나, 미생물이 생산하는 생리활성물질에 대한 국내의 연구 및 개발은 외국에 비해 30~50년 뒤늦은 1980년대부터 시작되었고, 최근 체계적인 연구실과 전문가들에 의한 꾸준한 노력의 결과, 연구역사에 비해 연구수준이 많이 향상되었다. 1985년부터 국가연구기관 및 대학의 병리학자를 주축으로 한 담배 모자이크병, 세균성 마름병, 오이의 시들음병, 고추의 역병, 딸기의 시들음병, 눈마름병, 사탕무의 입고병, 벼의 도열병, 문고병에 대한 병해방제용 미생물 연구가 보고되고 있다. 또한, 스트렙토마이세스 속을 이용한 대표적인 액제로는 (주)케이아이비씨의 스트렙토마이세스고시키엔시스더블유와이이324 액제 및 스트렙토마이세스콜롬비엔시스더블유와이이20 액제가 존재한다.

[0004]

현재 딸기(*Fragaria* × *ananassa* Duch.)의 국내 생산액은 연간 7,000 억원으로 전체 채소생산액의 9%를 차지하는 중요한 작물이다. 2004년도 국내의 딸기 재배면적은 7,600 ha, 생산량은 210,000 M/T으로 세계 8위를 차지하였고, 2010년에는 7,049 ha까지 이의 재배면적이 증가하는 등 계속하여 증가되는 추세이다. 2002년 이후에는 딸기품종에 대한 로열티 지불 문제가 크게 대두되면서 고령지농업연구소를 비롯하여 많은 국가 연구기관에서 품종육성 사업을 개시하였다. 이러한 활발한 육종사업으로 2005년에 9%에 불과하던 국내 딸기 육성품종의 재배비율이 2010년에는 61%로 급격히 증가하였다.

[0005]

딸기에 발생하는 시들음병 또는 위황병에 대한 병원균은 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로 호주에서 최초로 보고되었으며, 국내에서는 조와 문(1984년)에 의해 처음 보고되었다. 그 이후 VCG, RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석 및 RFLPs(rDNA restriction fragment length polymorphisms) 분석을 통한 유전적 다양성이 보고되었다. 딸기의 각종 병해 발생은 재배양식에 따른 품종과 관련이 깊은데, 국내에서는 1970~80년대 'Hokowase' 품종에서 시들음병 발생으로 큰 피해가 있었으나, 그 후 시들음병에 강한 'Nyoho', 'Akihime' 품종의 도입으로 한동안 문제가 되지 않았다. 그러나 최근 국내에서 육종된 '매향' 품종과 일본에서 육종된 'Dochiodome' 품종은 시들음병에 감수성으로 재배농가에서 30%의 큰 피해를 나타내고 있다. 딸기 시들음병에 사용되고 있는 살균제는 화학농약으로서 인축에 독성을 나타낼 뿐만 아니라 생태계의 파괴, 농산물의 잔류 독성, 병해충에 대한 약제 저항성 유발 등의 문제점을 안고 있다.

[0006]

푸사리움에 의한 발병은 토양 환경과 밀접한 관련이 있고, 토마토와 박과의 경우 사양토에서 발생이 심하며, 사질 토양이 식질 토양에 비해 푸사리움 옥시스포럼의 증식이 용이하다고 한다. 또한, pH는 관계없고 유기물, 인산, 양이온 함량이 높을 때 발생이 많다. 딸기 시들음병은 전염원인 후막포자가 토양 속에 생존하여 전염하는 토양전염성 병해이며, 또한 이병모주로부터 발생하는 런너를 통해 자묘로 침입하여 발병시키는 영양번식전염도 한다. 따라서 토양 병 방제를 위해 토양 훈증이나 약제 살포 방법을 사용할 경우 토양 미생물상의 파괴와 환경에 큰 영향으로 사용이 쉽지 않은 실정이다. 또한 무병묘를 확보하기 위해서는 조직배양을 통한 건진묘 육성이 되어야 하는데 이에 따른 많은 시간과 노력이 투입되어야 하는 문제점이 있다. 시들음병에 대한 생물학적 방제 연구는 오랜 역사를 가지고 있지만 실용화된 방제방법은 효과적이지 않거나, 처리하기 쉽지 않은 문제점이 있다. 그러나 환경보존을 위한 관점에서 생물학적 방제연구가 큰 관심을 가지고 진행되고 있다. 그 중 길항 미생물, 증복기생균, 비병원성 푸사리움 균, VAM(vesicular-arbuscular mycorrhizal) 균을 이용한 생물학적 방제가 시도되고 있다. 또한 바실러스(*Bacillus*) 균을 이용한 제품들로 Serenade®, BioYield® 등이 사용되고 있다.

[0007]

이에, 본 발명자는 작물에 악영향을 미치는 토양 병원균에 대하여 강력한 항균 활성을 가진 미생물을 찾기 위해

연구한 결과, 딸기 뿌리의 근권에서 분리된 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주가 딸기의 위황병, 시들음병, 역병 등에 대하여 강력한 항균 활성이 있고, 딸기의 생육을 촉진시키는 것을 확인함으로써, 상기 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 및 이의 배양액을 식물병 방제 및 식물 생장 촉진에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 본 발명은 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주, 이의 배양액 또는 상기 식물병 방제용 조성물을 토양, 식물 또는 식물의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 해결하기 위해, 본 발명은 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0013] 아울러, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주, 이의 배양액 또는 상기 식물병 방제용 조성물을 토양, 식물 또는 식물의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명은 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주 및 이의 배양액은 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)을 포함하는 다양한 식물 병원균에 대해 우수한 항진균 활성을 나타내고, 식물의 생육에 유의한 활성을 가짐으로써, 친환경적인 식물병 방제 및 식물 생장 촉진용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 시들음병(*Fusarium wilt*)에 대한 병원체를 여러 조건의 토양에 처리한 결과($P = 0.05$)를 나타낸 도이다:
A, B, AB: 통계적으로 유의미한 차이를 나타냄;
처리 1: 발병 억제(Suppressive) 토양;
처리 2: 발병(Conducive) 토양;
처리 3: 발병 억제 토양 10%를 발병 토양으로 옮겨 형성한 발병 억제 토양 및 발병 토양의 혼합물(S:C = 1:9); 및
처리 4: 열처리(80℃, 1 시간)에 의한 토양미생물 제거(Elimination) 토양.
도 2는 악티노박테리아(*Actinobacteria*) 클러스팅 트리를 나타낸 도이다.
도 3은 선발된 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주의 항균 활성을 나타낸 도이다.

도 4는 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주의 16S rRNA 염기서열을 나타낸 도이다.

도 5는 실내에서 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주의 식물병에 대한 생물적 방제 효과를 나타낸 도이다:

처리 1: 무처리군(0.1% 메틸 셀룰로오스(methyl cellulose)),

처리 2: 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 처리군(1×10^5 cfu/ml),

처리 3: 병원균(푸사리움 옥시스포럼 프라가리에(*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*))의 후막포자 2×10^5 cfu/ml) 처리군, 및

처리 4: 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 및 병원균 처리군.

도 6은 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주의 두 가지 실증 포장에서 발병 억제 활성을 검증한 결과를 나타낸 도이다:

경남 하동: 뿌리 침지 처리군(처리 1: 무처리(0.1% 메틸 셀룰로오스), 처리 2: 1×10^6 cfu/ml, 처리 3: 1×10^7 cfu/ml, 처리 4: 1×10^8 cfu/ml), 및

경남 진주: 관주 처리군(처리 1: 무처리(0.1% 메틸 셀룰로오스), 처리 2: 2,000 배 희석).

도 7은 다양한 식물병원균과 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7'를 대치배양한 후, 생성된 저지대(Inhibition zone)를 나타낸 도이다:

Streptomyces sp.: 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) BIG105 균주(기탁번호: KCTC11703BP); 및

Bacillus sp.: 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) GG95 (기탁번호: KACC91430P).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017]

본 발명은 신규한 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스(*Streptomyces griseus*) S4-7' 균주를 제공한다.

[0018]

상기 균주는 식물 위황병균(*Fusarium oxysporum*) 및 역병균(*Phytophthora nocotianae* 또는 *Phytophthora cactorum*)에 대한 항균 활성을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019]

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 딸기 위황병에 대한 발병 억제 활성이 있는 근권 토양 샘플로부터 균주를 분리하여 메타게놈 분석 및 염기서열 분석을 통해 신규한 스트렙토마이세스 그리시우스 균주를 동정하고, 상기 균주를 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주로 명명하고, 2012년 11월 23일 한국미생물보존센터에 기탁하여, 수탁번호 KCCM11339P를 부여받았다(도 1, 도 2 및 도 4 참조).

[0020]

또한, 본 발명자들은 상기 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주의 식물병원균에 대한 생육저지 효과를 확인한 결과, 상기 균주는 푸사리움 옥시스포럼을 포함하는 위황병균에 대한 유의적인 항균 활성을 가지고 식물 생장을 촉진하는 효과를 나타냄을 확인하였다(도 3, 및 도 5 내지 도 6 참조).

[0021]

또한, 본 발명자들은 본 발명의 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주와 기존에 위황병균에 대한 항균활성을 나타낸다고 알려진 스트렙토마이세스 속 균주 및 바실러스 속 균주와 위황병균에 대한 항균활성을 비교한 결과, 본 발명의 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주는 스트렙토마이세스 그리시우스 동종 균주 및 바실러스 속 균주와 비교하여 현저한 항균활성을 나타냄을 확인하였다(도 7 참조).

[0022]

즉, 본 발명의 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 및 상기 균주를 배양한 배양액은 위황병균에 대해 우수한 항균활성을 가지며, 상기 항균활성은 동일한 스트렙토마이세스 속 균주에 비해 현저히 높은 것을 알 수 있다.

[0023]

따라서, 본 발명의 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주는 기존에 보고된 스트렙토마이세스 속과는 다른 신규한 균주임을 확인하였다.

- [0024] 또한, 본 발명은 또한, 본 발명은 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 식물병은 식물 위황병균(*Fusarium oxysporum*) 및 역병균(*Phytophthora nocotianae* 또는 *Phytophthora cactorum*)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 상기 식물은 딸기, 감자, 사탕수수, 강낭콩(garden bean), 동부콩(cowpea), 팬지, 아지랑이꽃(Baby's breath), 토마토, 사과, 배인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 식물병 방제용 조성물은 농학적 허용 담체를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 딸기 위황병에 대한 발병 억제 활성이 있는 근권 토양 샘플로부터 균주를 분리하여 메타게놈 분석 및 염기서열 분석을 통해 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주를 동정하였고(도 1, 도 2 및 도 4 참조), 상기 균주는 푸사리움 옥시스포룸을 포함하는 위황병균에 대한 유의적인 항균 활성을 가지고 식물 성장을 촉진하는 효과를 나타냄을 확인하였다(도 3, 및 도 5).
- [0029] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주가 실제 농가 포장에서 생물농약으로서의 활용 가능 여부를 확인하기 위하여, 생물적 방제 실험을 수행한 결과, 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주를 처리한 농가 포장에서는 딸기 위황병의 발병이 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 6 참조).
- [0030] 또한, 본 발명자들은 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주와 기존에 위황병균에 대한 항균활성을 나타낸다고 알려진 스트렙토마이세스 속 균주 및 바실러스 속 균주와 위황병균에 대한 항균활성을 비교한 결과, 본 발명의 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주는 스트렙토마이세스 그리시우스 동종 균주 및 바실러스 속 균주와 비교하여 현저한 항균활성을 나타냄을 확인하였다(도 7 참조).
- [0031] 따라서, 본 발명의 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 또는 이의 배양액은 푸사리움 옥시스포룸을 포함하는 다양한 식물 병원균에 대해 우수한 항진균활성을 나타내고, 식물의 생육에 유의한 활성을 가짐으로써, 친환경적인 식물병 방제 및 식물 성장 촉진용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 식물병 방제용 조성물에 사용되는 배양액은 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주의 배양액에서 균주를 제거한 배양 상등액으로, 원심분리 또는 여과를 통해 얻을 수 있다.
- [0033] 상기 배양액은 액상 또는 건조 후 고체상으로 식물병 방제용 조성물에 포함될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주, 이의 배양액, 이의 배양액 추출물 또는 배양 여액을 포함할 수 있으며, 이외에 농약제제로 사용가능한 담체를 함께 사용하여 제조될 수 있다.
- [0035] 상기 담체로는 통상적으로 사용되는 농약 제형으로 허용 가능한 담체이면 모두 사용할 수 있으나, 특히 동결보존제 스킵밀크(skim milk), 효모 추출물(yeast extract), PG와 전착제 SOF70, 계면활성제 TD20A, AS65D 등을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0036] 본 발명에 따른 유효성분은 전체 식물병 방제용 조성물에 대하여 상기 균주 또는 이의 배양액을 0.001 ~ 90 중량%를 사용하는 것이 바람직하며, 0.01 ~ 50 중량%를 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 식물의 종자에 도포하는 처리, 식물의 종자를 침지시키는 처리, 식물의 재배 토양에 관주(灌注)하는 처리, 식물의 재배 토양 표면에 분무하는 처리, 식물의 경엽에 살포하는 처리, 및 식물의 부상부(付傷部)에 접촉시키는 처리로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 식물병 방제제, 종자 코팅제, 미생물 영양제, 토양 개량제 등의 전반적인 농약제로 사용될 수 있다.
- [0039] 아울러, 본 발명은 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주, 이의 배양액 또는

상기 식물병 방제용 조성물을 토양, 식물 또는 식물의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제방법을 제공한다.

[0040] 상기 방제방법은 하기 단계를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[0041] 1) 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주를 액체 배지에서 배양하여 배양물을 제조하는 단계; 및

[0042] 2) 상기 단계 1) 제조된 배양물을 건조 및 분말화하여 원제를 제조하는 단계.

[0043] 상기 단계 1)의 배지는 덱스트로스(dextrose) 0.1 내지 10.0 중량부 및 펩톤(peptone) 0.1 내지 10.0 중량부를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0044] 상기 단계 1)의 배양은 25 내지 35℃ 및 pH 5.5 내지 8.5에서 배양하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0045] 상기 단계 2)의 건조 및 분말화는 분무건조기 또는 동결건조기를 이용하여 배양액을 분말화하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0046] 상기 식물병 방제방법은 액체 상태로 식물에 관주, 작물의 종자에 침지 또는 분무하거나 종자에 코팅하여 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 상기 식물병은 식물 위황병균(*Fusarium oxysporum*) 및 역병균(*Phytophthora nocotianae* 또는 *Phytophthora cactorum*)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0048] 상기 식물은 딸기, 감자, 사탕수수, 강낭콩(garden bean), 동부콩(cowpea), 팬지, 아지랑이꽃(Baby's breath), 토마토, 사과, 배인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 본 발명의 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주가 실제 농가 포장에서 생물농약으로서의 활용 가능 여부를 확인하기 위하여, 생물적 방제 실험을 수행한 결과, 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주를 배양한 후, 2000배 희석하여 딸기 근권에 관주처리한 결과, 딸기 위황병의 발병이 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 6 참조).

[0050] 따라서, 본 발명의 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주, 이의 배양액은 푸사리움 옥시스포럼을 포함하는 다양한 식물 병원균에 대해 우수한 항진균활성을 나타내고, 식물의 생육에 유의한 활성을 가짐으로써, 상기 균주 또는 이의 배양액은 친환경적인 식물병 방제방법 및 식물 성장 촉진방법에 유용하게 사용될 수 있다.

[0051] 상기 식물 병원균 방제용 조성물을 이용한 방제방법은 통상 일반적으로 행하고 있는 방법, 즉 살포(예를 들면 분무, 미스팅, 아토마이징, 분말 살포, 과립 살포, 수면시용, 상시용 등), 토양시용(예를 들면 혼입, 관주 등), 표면시용(예를 들면 도포, 도말법, 피복 등), 침지, 혼연 시용 등에 의해 행할 수 있다. 그 사용량은, 피해상황, 적용방법, 적용장소 등에 따라 적절히 결정할 수 있다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0053] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0054] <실시예 1> 발병 억제 토양 및 일반 발병 토양에서 식물 병원균에 대한 발병률 비교 확인

[0055] 본 발명자들은 딸기 시들음병(*Fusarium wil*) 또는 위황병(chlorosis)에 대한 발병 억제 활성을 지닌 균주를 찾기 위하여, 딸기 위황병의 발병률이 현저히 낮은 농가의 포장으로부터 토양(발병 억제(Suppressive) 토양)을 확보하였다.

[0056] 또한, 추가적으로,

- [0057] 1) 일반 발병(Conducive) 토양,
- [0058] 2) 발병 억제 토양과 발병 토양을 1:9 비율로 섞은 혼합 토양, 및
- [0059] 3) 제거 토양을 준비하였다(도 1).
- [0060] 아울러, 발병에 대한 억제력을 확인하기 위하여 병원균인 푸사리움 옥시스포럼 프라가리에(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)의 후막포자를 2×10^5 cfu/ml로 딸기 근권에 접종하여, 45일 간격으로 병 발생 정도를 관찰하였다.
- [0061] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 딸기 위황병 발병 억제 토양에서 위황병 발병률이 현저히 낮았으며, 발병 토양에서는 위황병이 높게 발생한 것을 확인하였다. 또한, 혼합 토양에서는 발병 억제 토양과 유사한 수준으로 딸기 위황병의 발병이 억제됨을 확인하였다(도 1).

[0062] <실시예 2> 메타게놈(metagenome) 분석

- [0063] 발병 억제 토양의 식물 근권으로부터 메타게놈(metagenome) 분석을 수행하였다.
- [0064] 구체적으로, 근권 토양 시료로부터 토양 DNA 추출용 키트(MP Bio Fast DNA Kit; MP Biomedicals, Irvine, CA)를 이용하여 gDNA를 추출하였다. 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)을 하기 위해, 추출한 gDNA를 -20℃에 보관하였다. 세균의 16S rRNA 부분을 증폭하고, 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)을 Chunlab 회사(서울, 한국)에서 시퀀싱 분석을 실시하였고, 모든 염기서열은 EzTaxon 데이터베이스(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)를 이용하여 동정하였다.
- [0065] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 발병이 억제된 토양의 식물 근권으로부터 메타게놈(metagenome) 분석을 통하여 악티노박테리아(Actinobacteria) 문의 세균이 발병 억제력과 유의적으로 상관관계가 있음을 확인하였다(도 2).

[0066]

[0067] <실시예 3> 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7'의 동정

- [0068] 분리된 미생물의 분자생물학적 동정을 위하여 gDNA(genomic DNA)를 분리하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다.
- [0069] 구체적으로, 근권 토양 시료로부터 토양 DNA 추출용 키트(MP Bio Fast DNA Kit; MP Biomedicals, Irvine, CA)를 이용하여 gDNA를 추출하였다. 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)을 하기 위해, 추출한 gDNA를 -20℃에 보관하였다. 시퀀싱 분석에는 16S rRNA의 V1 내지 V3 영역을 타겟으로 하는 프라이머 27mF(서열번호 1: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 및 1492mR(서열번호 2: 5'-GGYTACCTGTTACGACTT-3')를 사용하였다. Chunlab 회사(서울, 한국)에서 시퀀싱 분석을 실시하였고, 모든 염기서열은 EzTaxon 데이터베이스(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)를 이용하여 동정하였다.
- [0070] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 확보된 16S rRNA에 대한 염기서열은 NCBI의 BLAST 검색을 통하여 스트렙토마이세스 그리시우스로 동정하였다. 또한, 상기 균주를 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주로 명명하고, 2012년 11월 23일 한국미생물보존센터에 기탁하여, 수탁번호 KCCM11339P를 부여받았다(도 4).

[0071] <실시예 4> 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7'의 배양

- [0072] 동정한 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7'의 배양은 하기 세 가지 배지 조건에서 실시하였다: PDK(감자한천배지(Potato dextrose) 10 g, 펩톤(Peptide) 10 g), IPS2 (효모 추출물(Yeast extract) 4 g, 맥아 추출물(Malt extract) 10 g, 포도당 4 g, pH 7.3), 및 TSA(트립틱 소이(Tryptic soy) 30 g). 살균된 루프를 이용하여, 단일 콜로니를 액체배지(5 mL)에 접종하여, 28℃에서 150 rpm으로 3 일간 진탕 배양한 후, 1 리터의 액체 배지에 배양된 5 mL의 접종원을 접종하여 10일 동안 동일 조건에서 배양하였다.

[0073] <실시예 5> 식물 병원균에 대한 길항력 확인

- [0074] 상기 <실시예 3>에서 분리 및 동정한 수탁번호 KCCM11339P로 기탁된 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주의

식물 병원균에 대한 생육저지 효과를 확인하기 위하여, 식물 병원균으로 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*) 및 파이토프토라 종(*Phytophthora* spp.)을 이용하였다. 항균활성을 검증하기 위하여 상기 <실시예 4>에 설명한 PDK 배지 상에서 대치배양을 실시하였다. 이때, 각종 병원균의 생육이 잘되는 온도인 28℃로 배양한 후, 저지대(Inhibition zone)를 관찰하였다. 또한, 위황병균(푸사리움 옥시스포럼 프라가리에)에 대하여, 기존에 알려진 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) BIG105 균주(기탁번호: KCTC11703BP) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) GG95 (기탁번호: KACC91430P) 균주를 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주와 대치 배양하였다.

그 결과, 도 3 및 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주는 대상 병원균에 대하여 강력한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 3). 또한, 상기 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주는 스트렙토마이세스 그리세우스 BIG105 균주 및 바실러스 서브틸리스 GG95 균주에 비하여(대한민국 공개특허 10-2012-0068674호 및 대한민국 공개특허 10-2010-0078419호 참고), 유사 농도에서 유의적인 길항력을 가지는 것을 확인하였다(도 7).

<실시예 6> 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7'의 미생물농약 효과 확인

<6-1> 실내 실험

동정한 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주의 식물병 방제 효능을 검증하기 위하여 먼저 실험실 내 성장실에서 생물적 방제 실험을 실시하였다.

구체적으로, 네 가지 처리군을 준비하였다: 무처리군(0.1% 메틸 셀룰로오스(methyl cellulose)), 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 처리군(10^5 cfu/ml), 병원균(푸사리움 옥시스포럼 프라가리에(*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*), 후막포자 2×10^5 cfu/ml) 처리군, 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 및 상기 병원균 처리군, 처리한지 50 일 후, 방제 수치를 조사하였다.

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 병원균을 처리한 처리 3에서는 발병 수치도 급증하였고, 반면에 병원균에 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주를 함께 처리하였을 경우(처리 4) 발병 수치가 현저히 감소하였을 뿐만 아니라, 무처리군(처리 1)이나 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주 처리군(처리 2)과 비교하여 식물 생장도 촉진되었음을 확인하였다(도 5).

<6-2> 농가 포장 실험

상기 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주가 실제로 농가 포장에서 생물농약으로서의 활용가능 여부에 대해 알아보기 위하여, 경남 하동군 및 경남 진주시 소재 농가에서 생물적 방제 실험을 실시하였다.

구체적으로, 경남 하동군 농가 포장의 경우, S4-7' 균주를 각각 10^8 , 10^7 , 10^6 cfu/ml 처리, 및 대조군으로 무처리(0.1% 메틸 셀룰로오스)하였다. 딸기의 뿌리를 본 포장 정식 직전에 2 분 동안 침지한 다음 정식하였다. 경남 진주시 농가 포장의 경우, 원액의 배양 균주를 2,000배 희석(최종농도: 10^5 cfu/ml)하여, 관주 방식으로 딸기의 근권에 공급하였다. 두 포장의 발병률 및 생물적 방제효과는 처리한지 40 일 후에 조사하였다.

그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 두 지역의 농가 포장에서 모두 무처리구에 비하여 스트렙토마이세스 그리시우스 S4-7' 균주를 처리한 처리구에서 딸기 위황병의 발병률이 통계적으로 유의적인 발병 억제 효과를 지님을 확인하였다(도 6).

수탁번호

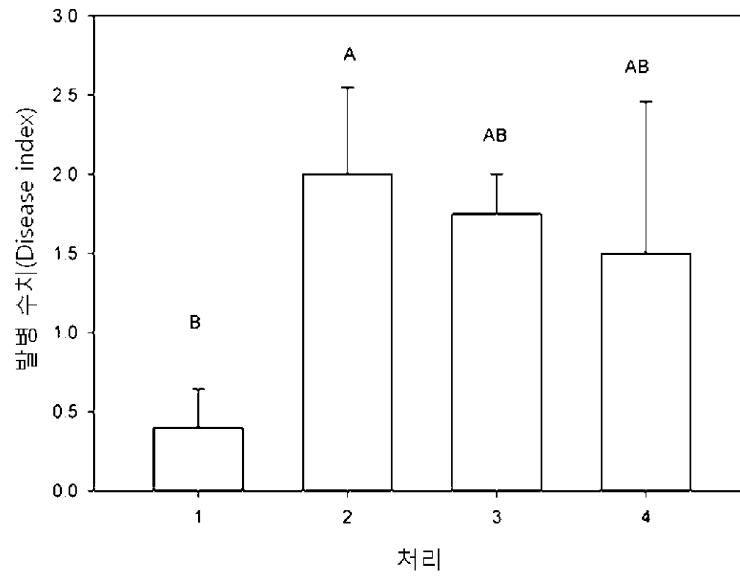
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11339P

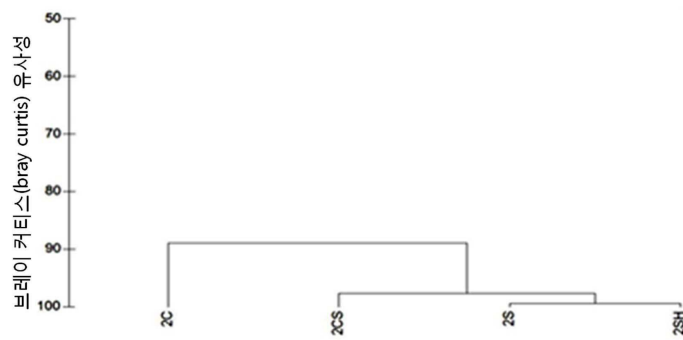
수탁일자 : 20121123

도면

도면1



도면2



도면3

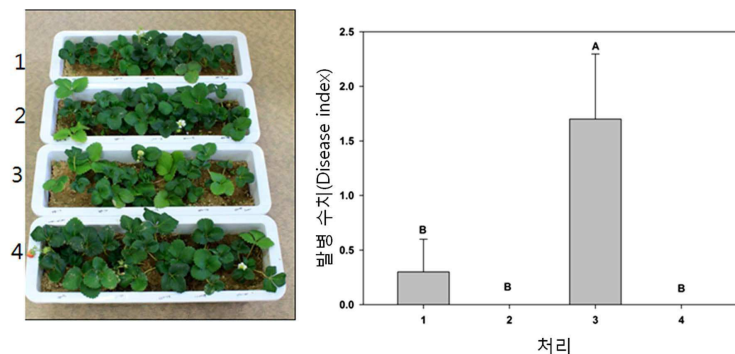


도면4

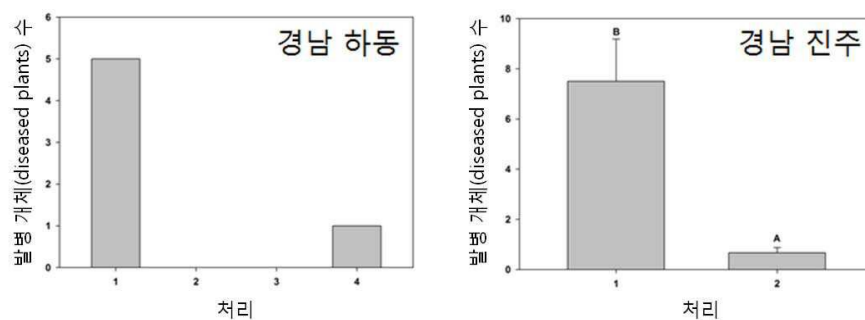
S4-7'균주의 16S rRNA 염기서열

```
CTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAA
GCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTGTCCCGCATG
GGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTA
TCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAG
CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGA
AAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCA
GAAGAAGCGCCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
CGGCTTGTCACGTCCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC
TGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAAT
TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGT
GGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAG
CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGC
AGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
AAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAGCAGCGGAGCATG
TGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAATCCTTACCAAGGCTTGACA
TCTACTCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCTCCCCCTTGTGGTCGGTA
TACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTGTCGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCAGCAACGAGCGTCA
```

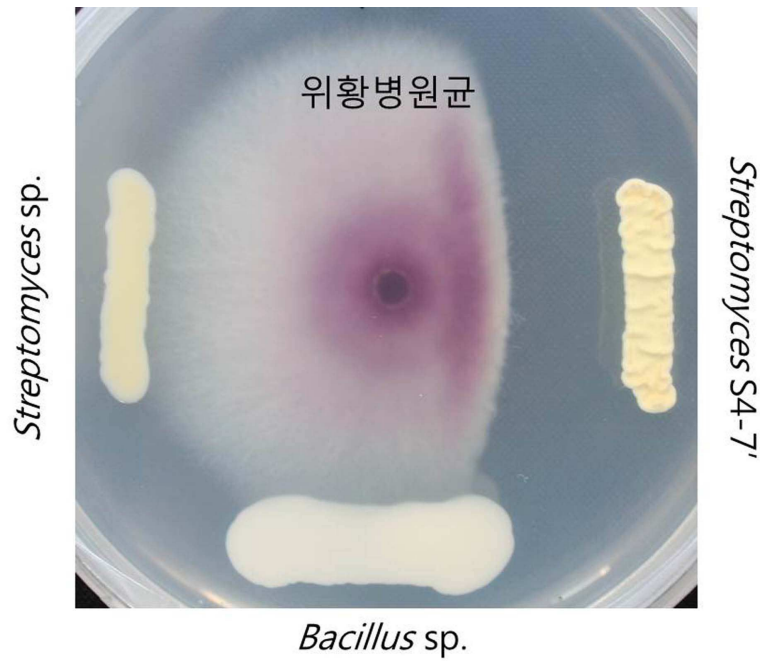
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Composition for plant disease control containing Streptomyces
griseus S4-7' or its culture fluid as an active ingredient
- <130> 13p-07-05
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 27mF
- <400> 1
- agagtttgat cmtggctcag
- <210> 2
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 1492mR

20

<400> 2

ggytaccttg ttacgactt

19