



등록특허 10-2177885



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월12일

(11) 등록번호 10-2177885

(24) 등록일자 2020년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01C 1/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01C 1/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0097499

(22) 출원일자 2019년08월09일

심사청구일자 2019년08월09일

(56) 선행기술조사문헌

CN106566784 A

KR1020140104704 A

KR1020190081185 A

KR101873359 B1

기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

곽연식

경상남도 진주시 진주대로 1317, 110동 901호(이현동, 이현하이클래스웰가아파트)

김민정

경기도 수원시 팔달구 권광로276번길 33-25, 802호(인계동, 아미힐)

김다란

경상남도 통영시 무전2길 36, 309호(무전동, 주영에이스빌5차)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 10 항

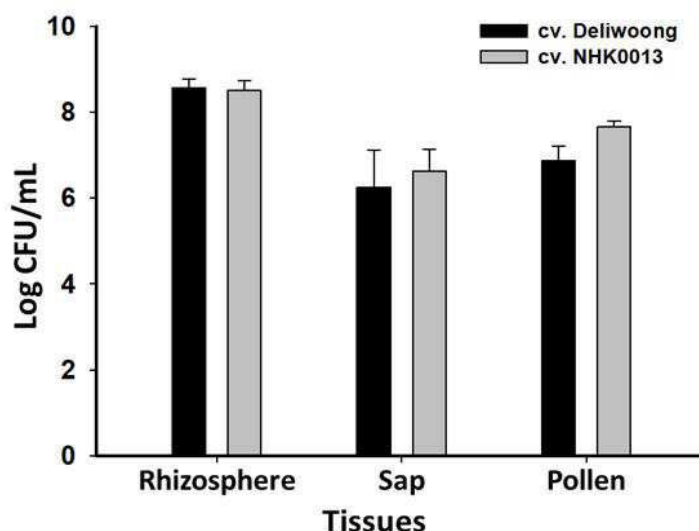
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 참다래 궤양병균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 참다래 궤양병균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 전 세계적으로 재배되고 있는 참다래에 발생하는 세균성 궤양병(병원균: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 효과적이고 친환경적으로 예방 및 방제 할 수 있는 생물적 방제 미생물(*Streptomyces racemochromogenes* W1SF4)을 선발하고 특성을 구명하였다. 따라서, 본 발명의 W1SF4 균주는 참다래 궤양병에 뛰어난 방제 효과가 있으므로, 미생물제제로 사용될 수 있으며 이는 산업적으로 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01N 63/10 (2020.01)

C12R 1/465 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ010904
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	신품종 지역적응연구_원예작물 로열티 대응기술개발
연구과제명	참다래 신육성 품종 보급촉진을 위한 지역별 재배적응성 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2015.01.01 ~ 2019.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

참다래 궤양병(kiwifruit canker)에 대해 방제 효과를 가지는 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스(*Streptomyces racemochromogenes*) W1SF4 균주(수탁번호: KCCM12562P).

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에(PSA; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)에 의한 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제 1항에 따른 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주 및 이의 배양물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 참다래 궤양병 방제용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 하는 참다래 궤양병 방제용 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 조성물은 농학적 허용 담체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 참다래 궤양병 방제용 조성물.

청구항 6

제 1항에 따른 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주를 배양하는 단계를 포함하는 참다래 궤양병 방제용 조성물의 제조 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 하는 참다래 궤양병 방제용 조성물의 제조 방법.

청구항 8

제 1항에 따른 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주, 이의 배양물 및 제 3항의 참다래 궤양병 방제용 조성물 중 어느 하나 이상을 토양, 참다래 또는 참다래의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 참다래 궤양병을 방제하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 하는 참다래 궤양병을 방제하는 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 처리하는 단계는 분말상태로 참다래에 살포, 액체 상태로 참다래에 관주, 참다래의 종자에 침지 또는 분무하거나 종자에 코팅하여 처리하는 것을 특징으로 하는 참다래 궤양병을 방제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 참다래 궤양병균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 전 세계적으로 재배되고 있는 참다래에 발생하는 세균성 궤양병 (병원균: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 효과적이고 친환경적으로 예방 및 방제 할 수 있는 생물적 방제 미생물 (*Streptomyces racemochromogenes* W1SF4)을 선발하고 특성을 구명하였다. 따라서, 본 발명의 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주는 참다래 궤양병에 뛰어난 방제 효과가 있으므로, 미생물제제로 사용될 수 있으며 이는 산업적으로 매우 유용하게 이용될 수 있다.

배경 기술

- [0002] 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에 (PSA; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)에 의해 발생하는 전염병으로 참다래 재배에 심각한 피해를 주는 치명적인 질병이다 (Serizawa 등, 1989; Takikawa 등, 1989). 1988년 국내에서 궤양병이 처음 발생한 제주도의 참다래 재배지는 해발 150-250 m에 이르는 한라산 중턱에 위치한 중산간 지역으로 겨울철에 동해가 상습적으로 발생하는 지역이기 때문에 궤양병에 대한 정보와 경험 이 전혀 없었던 재배자들은 단순한 동해로 판단하고 그 지역에서 참다래 재배를 포기했었다 (Koh, 1995; Koh와 Lee, 1992; Koh 등, 1994).
- [0003] 참다래 궤양병이 PSA라는 세균에 의해 발생하는 것이 밝혀진 후에도 궤양병 발생 초기에 적절한 대응에 실패할 경우에는 과수원이 폐원에 이를 정도로 심각한 피해를 주고 있어서 일단 궤양병이 발생하면 참다래 재배를 포기 하는 농가가 적지 않은 실정이다. 참다래 궤양병을 비롯하여 세균에 의해 발생하는 식물병들은 일단 발생하면 식물체 내에서 빠르게 진전되고 다른 식물체로 2차감염이 잘 되어 방제가 매우 어렵기 때문이다 (Kim 등, 2016a, 2016b; Son 등, 2016).
- [0004] 암수 판그루인 참다래의 암나무 품종은 2005년까지 국내에서는 그린참다래 품종인 헤이워드 (Hayward)가 대부분 이었다 (Huang, 2014). 따라서 헤이워드에서 궤양병이 주로 발생했지만 2004년부터 제주도에 재배되기 시작한 골드 참다래품종인 Hort16A에 2006년부터 궤양병이 발생하기 시작하면서 Hort16A도 피해를 받기시작했다 (Koh 등, 2010). 2010년까지 국내에서 참다래에 궤양병을 일으키는 PSA biovar는 PSA2뿐이었지만 2011년부터 골드참다래와 레드참다래 품종에 보다 큰 피해를 주는 PSA3가 국내로 유입되어 골드참다래와 레드참다래 품종을 재배 하는 농가들에게 더욱 심각한 피해를 주면서 확산되고 있다 (Kim 등, 2016a, 2016b; Koh 등, 2012a).
- [0005] 따라서 본 발명은 전 세계적으로 재배되고 있는 참다래에 발생하는 세균성 궤양병 (병원균: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 효과적이고 친환경적으로 예방 및 방제 할 수 있는 생물적 방제 미생물 (스트렙토 마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4)을 선발하고 이의 특성을 구명하였으며, 대상병인 참다래 궤양병의 방제 효과를 검증하여 미생물제제로의 산업화 가치가 우수한 균주를 확보하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) KR 10-2008-0089324 A

비특허문헌

(비특허문헌 0001) Biological Control Volume 116, January 2018, Pages 103-112, Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, using endophytic bacteria recovered from a medicinal plant

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 참다래의 농업현장에서 참다래 꽃봉오리, 잎 또는 줄기 등에 발생하는 궤양병 병원균에 대한 길항균으로서 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주를 선발하여 동정하고, 이의 참다래 궤양병에 대한 방제 효과를 검증함으로써 미생물제제로의 산업화 가치가 우수한 균주를 확보하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 참다래 궤양병 (kiwifruit canker)에 대해 방제 효과를 가지는 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 (*Streptomyces racemochromogenes*) W1SF4 균주 (수탁번호: KCCM12562P)를 제공한다.
- [0008] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에 (PSA; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)에 의한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0009] 또한 본 발명은, 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주 및 이의 배양물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 참다래 궤양병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 참다래 궤양병 방제용 조성물은 농학적 허용 담체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0012] 아울러 본 발명은, 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주를 배양하는 단계를 포함하는 참다래 궤양병 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0014] 마지막으로 본 발명은, 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주, 이의 배양물 및 상기 참다래 궤양병 방제용 조성물 중 어느하나 이상을 토양, 참다래 또는 참다래의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 참다래 궤양병을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 처리하는 단계는 분말상태로 참다래에 살포, 액체 상태로 참다래에 관주, 참다래의 종자에 침지 또는 분무하거나 종자에 코팅하여 처리하는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명은 참다래 궤양병균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 전 세계적으로 재배되고 있는 참다래에 발생하는 세균성 궤양병 (병원균: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 효과적이고 친환경적으로 예방 및 방제 할 수 있는 생물적 방제 미생물 (*Streptomyces racemochromogenes* W1SF4)을 선발하고 특성을 구명하였다. 따라서, 본 발명의 W1SF4 균주는 참다래 궤양병에 뛰어난 방제 효과가 있으므로, 생물 농약으로 사용될 수 있으며 이는 산업적으로 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 참다래 품종 (텔리옹, NHK0013)의 조직별 분리가능한 미생물의 밀도를 나타낸 도이다.
- 도 2는 참다래에서 분리된 미생물의 항궤양병 균주 스크리닝 과정을 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4의 분자생물학적 분류 동정을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4의 참다래 정착력을 나타낸 도이다(CK: 균주를 접종하지 않은 대조군, W1SF4: 본 발명에서 선발된 균주).

도 5는 본 발명의 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4의 참다래의 궤양병 발생 억제 효과를 나타낸 도이다(CK: 균주를 접종하지 않은 대조군, W1SF4: 본 발명에서 선발된 균주).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 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 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0020] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 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.
- [0021] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.
- [0022] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 참다래 궤양병 (kiwifruit canker)에 대해 방제 효과를 가지는 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 (*Streptomyces racemochromogenes*) W1SF4 균주 (수탁번호: KCCM12562P)를 제공한다.
- [0023] 일 측면에서, 본 발명에서 분리한 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주는 참다래에 발생하는 세균성 궤양병 (병원균: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)에 대한 항균활성을 가지는 특징이 있다. 따라서, 이를 이용하여 효과적이고 친환경적으로 참다래 궤양병을 예방 및 방제 할 수 있는 생물적 방제 미생물로 사용될 수 있다. 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 (*Streptomyces racemochromogenes*) W1SF4 균주는 한국미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 2019년 07월 16일자로 기탁하였다 (수탁번호: KCCM12562P).
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에 (PSA; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)에 의한 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 또한 본 발명은, 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주 및 이의 배양물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 참다래 궤양병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 참다래 궤양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 참다래 궤양병 방제용 조성물은 농학적 허용 담체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 일 측면에서, 본 발명의 상기 배양물은 배양 배지에서 배양하여 수득한 발효액, 농축 발효액, 발효액의 건조물, 배양 여과액, 농축 배양 여과액, 또는 배양 여과액의 건조물을 의미하는 것으로, 상기 균주를 포함하는 것 또는 배양한 후 균주를 제거한 배양 여액일 수 있다. 또한 상기 배양물은 그 제형이 제한되지 아니하고, 일 예로 액체, 에멀전 또는 고체일 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주는 통상의 배지에서 생육 가능하며, 일 예로 PDK (감자 한천배지 (Potato dextrose) 10g, 펩톤 (Peptone) 10g)배지에서 배양할 수 있다. 상기 배지는 특정 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다. 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주는 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있다.

- [0030] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로스의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 베타오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다.
- [0031] 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [0032] 아울러 본 발명은, 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주를 배양하는 단계를 포함하는 참다래 케양병 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다. 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주의 배양 방법 및 참다래 케양병 방제용 조성물의 제조 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 특정 방법에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 참다래 케양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 마지막으로 본 발명은, 상기 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주, 이의 배양물 및 상기 참다래 케양병 방제용 조성물 중 어느하나 이상을 토양, 참다래 또는 참다래의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 참다래 케양병을 방제하는 방법을 제공한다. 상기 참다래 케양병을 방제하는 방법은 하기 특징을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 참다래 케양병은 슈도모나스 시린가에 pv. 액티니다에에 의한 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 처리하는 단계는 분말상태로 참다래에 살포, 액체 상태로 참다래에 관주, 참다래의 종자에 침지 또는 분무하거나 종자에 코팅하여 처리하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험에는 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.
- [0040] **실시예 1. 참다래 과수원으로 부터 균주의 분리**
- [0041] 경남 남해에 위치한 참다래 유전자원 포장으로 부터 근권토양, 수액, 화분을 채집하여, 각 시료를 10^{-1} 에서 10^{-5} 까지 멸균 증류수에 희석하였다. 희석된 시료는 1/5 Tryptic Soy Agar (TSA: tryptic soy broth 6g, 1L 당 agar 20g)에 도말하였다. 시료가 도말된 TSA는 27℃ 배양기에서 3일 내지 5일간 배양하였고, 바람직하게는 5일간 배양하였다. 도 1에서와 같이 참다래 각 조직별 미생물의 농도는 $10^6 \sim 10^8$ cfu로 조사되었다.
- [0043] **실시예 2. 참다래 케양병원균과 진균성 병원균에 대한 항균활성 검증**
- [0044] 상기 실시예 1에 따른 미생물 단일 콜로니는 살균된 이쭉시개로 96-well plate (1/5 TSB)에 하나씩 옮겨 27℃

배양기에서 3일간 배양 하였다. 배양된 96-well plates는 참다래 병원균 (케양병원균 및 지하/지상/저장병원균)에 대치배양을 수행하였다. 도 2에서와 같이 대치배양은 (A) 1차 검증으로 96개의 균주를 옴니-플레이트 (omni-plate)에 접종 후 PSA에 대한 항세균 균주를 선발, (B)는 2차 검증으로 (A)에서 선발된 후보 균주를 PSA에 대한 항세균력 검증 및 (C)는 3차 검증으로 2차 검증에서 선발된 후보균주를 최종적으로 검증하여, 총 3차에 걸쳐 수행되었으며 최종적으로 참다래 케양병원균의 길항 미생물 (W1SF4 포함)을 선발 하였다. 모든 항세균력 활성 검증은 1/5 TSB 조건에서 27° C 배양기에서 3일간 배양 하여 수행하였다. 이때 항세균 미생물의 선발은 배지상에서 케양병의 성장을 우수하게 억제하는 정도에 의해 선발되었다.

[0046] 실시예 3. 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주의 동정

[0047] 분리된 미생물의 분자생물학적 동정을 위하여 gDNA (genomic DNA)를 분리하여 16S rRNA, atpD 및 recA 유전자의 염기서열을 분석하였다.

[0048] 더욱 구체적으로 염기서열 분석에서 16S rRNA 프라이머는 27F (서열번호 1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (서열번호 2: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'), atpD 프라이머는 atpDF (서열번호 3: 5'-ACCAAGGGCAAGGTGTTC-3')와 atpDR (서열번호 4: 5'-GCCGGGTAGATGCCCTTCTC-3'), recA 프라이머는 recAPF (서열번호 5: 5'-CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC-3')와 recAR (서열번호 6: 5'-ACCTTGTCTTGACCACCTT-3')을 사용하였다. 확보된 16S rRNA, atpD, recA 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 검색 사이트 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 통하여 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스와 유사성이 높은 것을 조사되었다. 염기서열 분석 결과를 바탕으로 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 속에 속하는 유사균들과 유사성을 이용하여 계통수를 그려본 결과 W1SF4 균주는 도 3에서와 같이 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 (*Streptomyces racemochromogenes*)로 동정 되었으며, 상기 균주를 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주로 명명하였다. 또한, 2019년 07월 16일 한국미생물보존센터에 기탁하여, 수탁번호 KCCM12562P를 부여받았다.

표 1

유전자(gene) 이름	프라이머 염기서열			
	서열번호	프라이머 이름	방향	서열
16S rRNA	1	27F	정방향(5'-3')	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	2	1492R	역방향(5'-3')	TACGGTTACCTTGTTACGACTT
atpD	3	atpDF	정방향(5'-3')	ACCAAGGGCAAGGTGTTC
	4	atpDR	역방향(5'-3')	GCCGGGTAGATGCCCTTCTC
recA	5	recAPF	정방향(5'-3')	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC
	6	recAR	역방향(5'-3')	ACCTTGTCTTGACCACCTT

[0052] 실시예 3. 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주의 배양

[0053] 동정한 참다래 케양병원균의 길항 미생물인 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4의 배양은 PDK (감자 한천배지 (Potato dextrose) 10g, 펩톤 (Peptone) 10g)배지에서 시행하였다. 살균된 루프를 이용하여 단일 콜로니를 액체배지 5 mL에 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 5일간 진탕 배양 하였다.

[0055] 실시예 4. 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주의 정착력

[0056] 선발된 W1SF4의 참다래 근권과 잎에서의 정착력을 검증하기 위하여 다음 실험을 실시하였다. (1) 근권 정착력 검증은 참다래 묘목 (12주 생육된 묘목, 품종: 텔리웅)을 원예용 상토가 들어 있는 포트에 심고 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주를 10⁶ cfu/mL (0.1% tween 20 함유)로 뿌리 부위에 처리하고 생육상에서 6주간 정착력을 관찰하였다. (2) 잎에서의 정착력 검증은 W1SF4 균주를 10⁷ cfu/mL (0.02% silwet L-77, 10 mM MgCl₂ 함유)로 참다래의 잎에 분무기를 이용하여 살포 하였다.

[0057] 그 결과 도 4(A)에서와 같이 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4는 참다래 근권에서 10⁷ cfu/ml의 농도로 관찰이 수행된 6주 까지 우수한 근권 정착력을 유지하였다. 또한 도 4(B)에서와 같이 참다래 잎에 살포된 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4는 10⁶ cfu/g의 농도로 역시 우수한 정착력을 나타냈었다.

[0059] 실시예 5. 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주의 참다래 궤양병 방제 효과

[0060] 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주의 생존능력 및 참다래 궤양병에 대한 방제 효과를 검증하기 위한 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주 처리 2일 후에 참다래 궤양병원균을 10^7 cfu/mL의 농도로 참다래 뿌리 부위에 분주 또는 참다래 잎에 살포하였다. 참다래 궤양병의 발생정도는 병발생도 (Disease index (DI), 0= 증상 없음; 1= 5% 미만; 2= 5 내지 15%; 3= 15 내지 30%; 4= 30-70%; 5= 70% 초과) 값을 산출하여 통계처리 하였다.

[0061] 그 결과 도 5에서와 같이 참다래 궤양병 병원균을 잎에 살포하였을시 균주를 접종하지 않은 대조구(C K)에서 발병도 평균 4.5 이상의 심각한 궤양병 증상이 발생하였다. 반대로, 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주가 예방적 차원에서 살포된 참다래 개체에서는 궤양병의 발생이 평균 발병도 0.5 이하로 우수한 궤양병 방제 효과를 나타냈다.

[0063] 이러한 결과를 토대로 본 발명의 스트렙토마이세스 레이스모크로모제네스 W1SF4 균주는 참다래 궤양병에 뛰어난 방제 효과가 있으므로, 미생물제제로 사용될 수 있으며 이는 산업적으로 매우 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0064]

[0065] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다.

[0066] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0067]

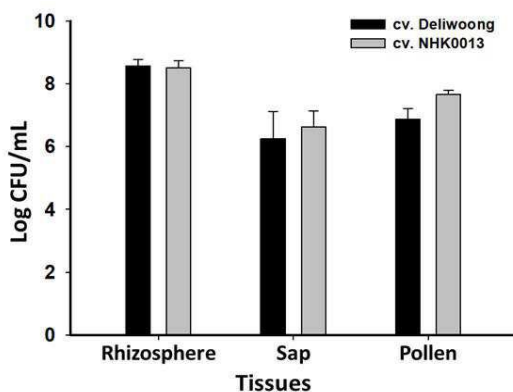
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12562P

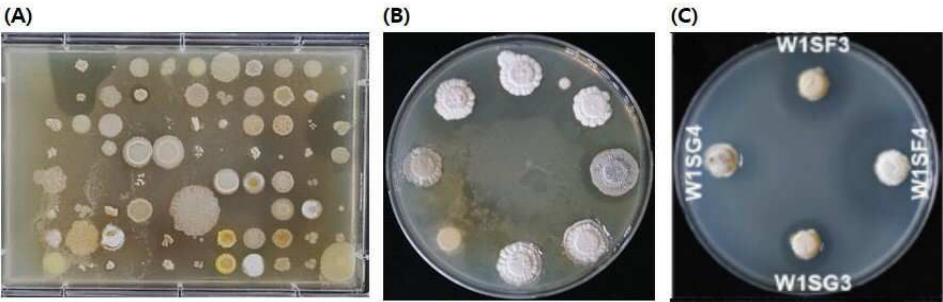
수탁일자 : 20190716

도면

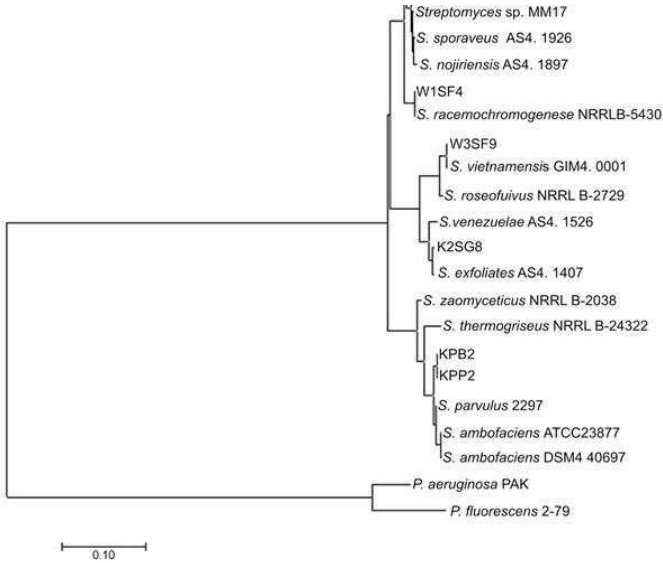
도면1



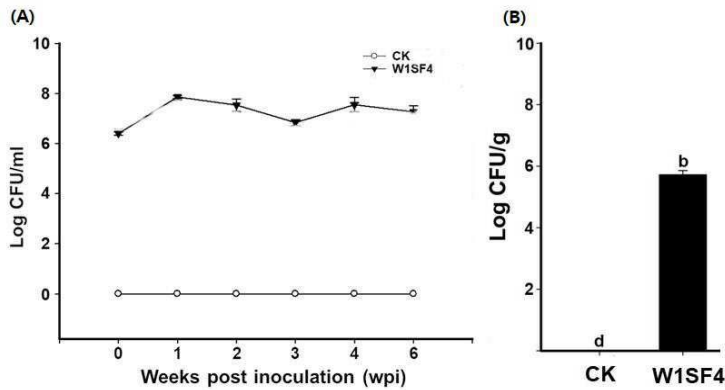
도면2



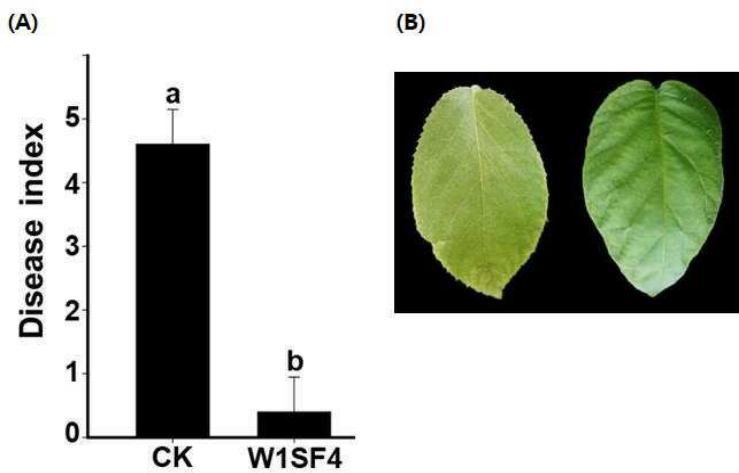
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

<110>	INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY	
<120>	Streptomyces racemochromogenes strain having antimicrobial activity against bacterial canker disease in kiwifruit and uses thereof	
<130>	PN1906-282	
<160>	6	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	27-F primer targeting Streptomyces racemochromogenes	
<400>	1	
	agagtttgat cctggctcag	20
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	1492-R primer targeting Streptomyces racemochromogenes	
<400>	2	
	tacggttacc ttgttacgac tt	22
<210>	3	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> atpD-F primer targeting Streptomyces racemochromogenes
 <400> 3
 accaagggca agtgttcaa 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> atpD-R primer targeting Streptomyces racemochromogenes
 <400> 4
 gccgggtaga tgcccttctc 20
 <210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> recAP-F primer targeting Streptomyces racemochromogenes
 <400> 5
 ccgcrcctgc acagattgaa cgscaattc 29
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > recA-R primer targeting Streptomyces racemochromogenes
 <400> 6
 accttgttct tgaccacctt 20