



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0013999
(43) 공개일자 2010년02월10일

(51) Int. Cl.

A01N 63/02 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2008-0075772

(22) 출원일자 2008년08월01일

심사청구일자 2008년08월01일

(71) 출원인

(주) 제일그린산업

경상남도 창원군 창년읍 직교리 369

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

정영륜

경상남도 진주시 가좌동 900번지 경상대학교 생명
과학부미생물학과

김근곤

경상남도 창원시 북면 외산리 586-2

박주황

경상남도 함양군 수동면 상백리 218

(74) 대리인

이숙열

전체 청구항 수 : 총 3 항

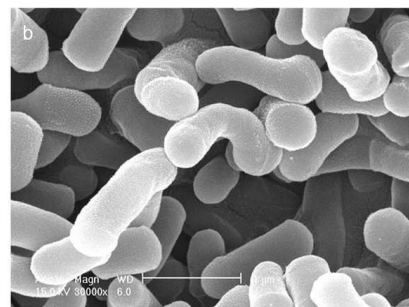
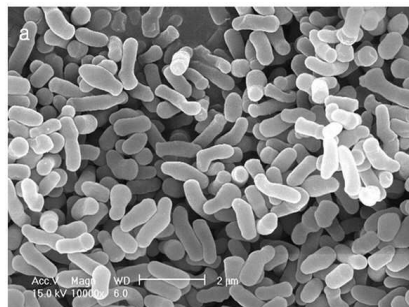
(54) 아쓰로박터 조이시에를 이용한 종자의 발아 및 생육억제능이 있는 생물 농약

(57) 요약

본 발명은 신균주 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) YC 6002 및 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 종자의 발아 및 생육 억제능이 있는 생물 농약에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 종자의 발아 및 생육 억제능이 탁월한 본 발명의 신균주 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*)를 이용하여 작물 재배지에서 잡초의 종자 발아 및 생육을 억제할 수 있고, 작물재배 시 잡초에 의한 피해를 줄여 농산물의 생산을 증대시킬 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 종자의 발아 및 생육 억제능이 있는 생물 농약.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC: Korean Collection for Type Cultures)에 기탁번호 KCTC 18127P로 기탁된 균주인 것을 특징으로 하는 생물 농약.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) 균주 또는 이의 배양액을 전분, 조단백질 또는 암석분 등 부재료와 혼합하는 것을 특징으로 하는 생물 농약.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신균주 아쓰로박터 조이시에를 이용한 종자의 발아 및 생육 억제능이 있는 생물 농약에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 종자의 발아 및 생육 억제능이 있는 생물 농약에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리나라는 지난 수십여 년 간 곡류, 채소, 과수 등 농작물의 수량을 증가시키기 위하여 해마다 병, 해충 및 잡초를 방제하는데 많은 양의 화학농약을 사용해 왔으며, 이와 같은 계속적인 농약사용에 의하여 환경오염과 생태계 파괴, 인축독성, 병해충 및 잡초의 농약에 대한 저항성 유발 등의 문제가 지속적으로 제기되고 있다.

[0003] 정부에서는 약 1조에 달하는 화학 농약의 사용량을 줄이고, 우리 농업의 경쟁력을 높이기 위한 방안으로 1999년 친환경농업 육성법을 제정하여 2013년까지 약 40% 정도의 화학농약 사용량을 줄이고자 노력하고 있으나, 현재 농약 사용량은 줄지 않고 있다.

[0004] 그러나 현재 국민의 생활수준 향상으로 안전 식품에 대한 요구가 증가되고 있고, 농업 생산 환경의 유지 보전 및 자연 생태계의 보존을 지향하는 유기농업이나 자연농법 등 친환경농업이 급속히 확대되고 있어, 화학농약을 대체할 수 있는 생물농약 개발에 대한 연구는 급격히 증가하고 있다.

[0005] 생물농약은 천적곤충이나 길항미생물 등을 대량배양하고 제제화하여 엽면 살포 또는 입체로 처리함으로써 병해충을 방제하는 것으로 잡초 방제의 경우 잡초병원균을 이용하기도 한다. 여기에 사용되는 미생물들은 자연계에 널리 분포되어 있으면서 그 종류가 다양하고 병해충, 잡초 억제효과를 나타내는 대사산물을 분비하기 때문에 많은 종류가 생물농약 개발에 이용되고 있다.

[0006] 이러한 미생물의 이용 방법으로는 크게 3가지로 나눌 수 있는데 미생물 자체를 이용하는 방법, 미생물 발효에 의해 생산되는 대사 물질을 이용하는 방법, 새로운 농약 합성을 위한 선도 화합물로 미생물 대사 물질을 이용하는 방법 등이다. 이 중에서도 식물병원균을 억제 할 수 있는 길항미생물, 식물생육을 촉진시키는 식물생육촉진 근권세균(PGPR) 및 식물 내생(endophytic) 세균에 의한 식물의 병 저항성 연구가 국내외적으로 많이 이루어지고 있다.

[0007] 식물 내생세균은 주로 살아있는 건강한 식물 조직 내에 살면서 식물에는 실질적인 해를 주지 않고, 여러 가지 이점을 주는 세균으로 정의되고 있으나, 일반적으로 식물 내생세균은 식물세포 사이의 공간에 대부분 모여 있지만, 일부 종류는 세포 내에 존재하기도 하며, 일부 내생세균은 직간접적으로 식물의 환경적인 스트레스에 대한 저항성을 유도하기도 하고, 식물 성장에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

- [0008] 식물 내생세균은 세포내에 존재하면서 증식하는데, 일반적으로 전체 밀도는 뿌리와 줄기의 시작 부분에서 가장 높고 줄기, 잎 등의 식물체 윗부분으로 갈수록 점점 줄어들며 옥수수 잎의 경우 그 밀도가 Log 3-7 CFU/g 정도이다. 현재까지 분리된 내생세균은 슈도모나스(Pseudomonas), 엔테로박터(Enterobacter), 바실러스(Bacillus), 아그로박테리움(Agrobacterium) 등 54개 이상의 속에서 129개 이상의 종이 알려져 있으며, 이들은 토마토와 상추, 감자, 옥수수, 벼와 같은 경제적으로 중요한 작물의 성장 및 병 발생을 억제하여, 작물의 생산을 증진시킨다.
- [0009] 그런데 이와는 달리 식물 생육을 억제하는 미생물이나 이를 이용한 미생물 제초제 연구는 상대적으로 적은 편이다. 특히 국내에서는 미생물 제초제에 관한 연구는 몇 연구자에 의하여 진행되었으나 아직 제품으로 개발된 것은 없고, 외국에서는 콜레고(Collego), 데바인(Devine) 등의 제품이 개발되어 판매되고 있으며, 이 외에도 여러 종류가 각 나라에서 등록 시험 중이다. 이들 미생물 제초제는 모두가 대상 잡초에 병을 일으키는 식물병원균을 이용한 것으로 아직 식물 내생세균을 이용한 제초제는 개발된 것이 없다.
- [0100] 한편, 미생물 제초제의 가장 큰 장점은 사용시 환경적으로 문제가 되지 않는 것이며, 대부분의 경우 대상 잡초에만 특이적으로 작용하여 선택성이 높다는 것이다. 그러나, 미생물 제초제는 화학농약에 비해 방제 스펙트럼이 좁고 효과가 늦게 나타나는 큰 단점이 있어 개발에 어려움을 겪고 있다.
- [0111] 이와는 다르게 본 발명의 내생세균은 대상 잡초와 작물의 생육을 모두 억제하므로 선택성이 없는 비선택성 제초제로 개발 할 수 있다.
- [0122] 이에 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 이를 보완할 수 있는 한 방법으로 잡초를 포함한 여러 식물의 종자 발아 및 생육을 광범위하게 억제할 수 있는 아쓰로박터 조이시에(Arthrobacter zoysiae)를 분리, 대량 배양하여 제제화 하므로써 새로운 형태의 미생물 제초제를 개발할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0013] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 잡초를 포함한 여러 식물의 종자 발아 및 생육을 광범위하게 억제할 수 있는 아쓰로박터 조이시에를 이용한 생물 농약을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 아쓰로박터 조이시에를 이용한 생물 농약을 이용한 작물 재배지에서 잡초의 종자 발아 및 생육을 억제할 수 있고, 작물재배 시 잡초에 의한 피해를 줄여 농산물의 생산을 증대시키는데 있다.

과제 해결수단

- [0015] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 아쓰로박터 조이시에(Arthrobacter zoysiae) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 종자의 발아 및 생육 억제능이 있는 생물 농약을 제공한다. 본 발명의 상기 균주는 대상 잡초와 작물의 생육을 모두 억제하므로 선택성이 없는 비선택성 제초제로 사용될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 생물 농약에서, 상기 아쓰로박터 조이시에(Arthrobacter zoysiae) 균주는 하기 표 1의 형태적 생리적 특성을 갖는다.
- [0017] [표 1] 아쓰로박터 조이시에(Arthrobacter zoysiae)YC 6002 균주의 형태적 및 생리적 특성

주요 특성	반 응
모 양	V-shape rod
그람염색	+
Catalase 검정	+
Oxidase 검정	-
Urea(요소) 분해	-

- [0018]
- [0019] 본 발명의 생물 농약에서, 상기 아쓰로박터 조이시에(Arthrobacter zoysiae) YC 6002는 모균주 및 변이 균주를 포함하나, 바람직하게는 서열번호 1의 16sRNA를 갖는 것이 좋고, 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC: Korean Collection for Type Cultures)에 기탁번호 KCTC 18127P 로 기탁된 균주인 것이 좋다.

- [0020] 본 발명의 생물 농약에서, 상기 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) 균주 또는 이의 배양액을 액상 및 분말화의 형태로서 당 업계에서 사용되는 공지의 방법에 의해 다양하게 변형하여 사용이 가능하나, 바람직하게 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) 균주의 배양액 또는 농축액을 전분, 조단백질 또는 암석분과 같은 담체에 흡착 건조시키는 것이 좋다. 본 발명의 균주의 배양액 또는 농축액과 혼합하여 사용될 수 있는 담체는 당 업계에서 사용되는 어떠한 담체도 될 수 있다. 구체적으로 본 발명에서 담체로서 사용될 수 있는 것들에는 쌀, 밀, 옥수수, 보리, 콩, 조, 수수, 기장, 메밀 등 곡류, 감자 등의 괴경류, 고구마, 카사바 등의 괴근류, 또는 이들의 가공물(예컨대, 분말), 이들로부터 유래된 전분과 그 유도체 등이 포함된다. 그밖에 한천, 젤라틴, 펙테이트(폴리갈락투로닌산염), 키토산, 카복시메틸 셀룰로즈 및 그의 유도체, 젤라이트, 천연왁스, 천연 검, 카올린, 벤토나이트 등의 점토 광물, 또는 지오라이트 등과 같은 규조토 물질이 사용될 수 있다. 이러한 각종 담체들은 개별적으로 사용될 수 있으며, 혹은 2 이상의 담체들을 적당비율로 혼합하여 개선된 물성의 담체를 얻을 수도 있다. 상기와 같은 담체들을 사용할 경우 미생물에 의하여 대사되어 영양원이 될 수 있고, 이들 담체들은 점성이 매우 높아 식물의 표면에 대한 점착성이 증가되어 좋다.
- [0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC: Korean Collection for Type Cultures)에 기탁번호 KCTC 18127P로 기탁된 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) YC 6002를 제공한다.
- [0022] 이하, 본 발명의 구성에 대해 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [0023] 본 발명에서는 식물 종자의 발아 또는 생육을 억제하는 내생세균을 분리, 동정하고 이 세균의 대량배양 및 체제화를 통하여 미생물 제초제를 개발하고자 하였다. 새로운 형태의 미생물 제초제 개발을 위하여 경남 진주 인근 지역의 20여종의 식물체 조직에서 식물의 종자 발아 및 생육을 억제하는 다양한 식물의 내생세균을 분리하였다. 1차로 분리한 여러 균주 중 300여 개 균주를 이용하여 식물의 종자 발아 억제력을 조사하였는데, 그 중에서 잔디의 뿌리 조직에서 가장 발아 억제력이 좋은 본 발명의 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) 균주를 선발하였다. 본 발명의 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) YC6002 균주 배양액을 이용한 종자 발아 억제 효과를 알기 위하여 쌍떡잎 식물인 무 종자 억제를 조사하였고, 그 결과 본 발명의 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) YC6002 균주의 종자발아 억제 효과를 확인하였다. 또한 본 발명 균주의 주요 외떡잎 및 쌍떡잎발잡초 및 작물 종자발아 억제 효과를 알기 위하여 균주의 배양액을 외떡잎 발잡초(수수, 피, 개밀, 바랭이, 미국개기장)와 쌍떡잎 발잡초(까마중, 자귀풀, 어저귀, 또꼬마리, 메꽃) 및 벼, 옥수수, 오이에 발아하기 전 처리한 결과 모든 종자의 발아 억제효과를 확인하였다.
- [0024] 본 발명의 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) YC6002 균주의 배양 온도별 종자 발아 억제효과는 20℃~30℃ 배양온도에서 72시간 배양시 모두 억제 효과가 있었고, 기간별 발아 억제 효과를 조사한 결과 1일 이후부터 대조구에 비해 확실한 발아 억제 효과를 보였다.
- [0025] 분리된 본 발명의 내생세균 YC6002 균주의 생리·생화학적 특성은 통성 혐기성균으로 15℃~37℃에서 성장하였고, 형태는 간균으로 그람양성 이었다. 16S rDNA의 염기서열 분석 결과 아쓰로박터 속(*Arthrobacter* sp.)의 표준균주와 96-98%의 유사도를 보였으며, YC6002의 확실한 동정을 위하여 예비 분석 결과 생리·생화학적 및 분자생물학적 특성이 YC6002와 유사한 아쓰로박터 (*Arthrobacter*) 균주를 이용하여 지방산, 인지질 분석 및 DNA-DNA hybridization 을 실시하여 분석한 결과 YC6002는 아쓰로박터 속(*Arthrobacter* sp.)의 새로운 종으로 최종 동정되었고, 이에 YC6002를 아쓰로박터 조이시에(*Arthrobacter zoysiae*) YC6002로 명명하였다.
- [0026] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0027] **실시예 1: 본 발명의 무 종자 발아 억제 세균 YC6002의 선발 및 동정**
- [0028] 1. 무 종자 발아 억제 세균의 선발
- [0029] 종자발아를 억제하는 내생세균을 분리하기 위하여 진주 및 사천 일대의 여러 곳에서 대두, 옥수수, 배추, 잔디 등의 20가지 식물을 채취하였다. 식물 조직 내에 공생하는 내생 세균의 분리를 위하여, 식물의 뿌리를 1g 정도 씩 잘라 흐르는 물에 깨끗이 씻은 후 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액에 1분간 담가 1차 표면살균 후 70% 에칠알코올 용액에 수 초간 넣어 2차 표면살균을 한 뒤 멸균증류수에 행귀 내었다.
- [0030] 상기와 같이 준비된 식물 뿌리 1g에 멸균증류수 5mL를 첨가하여 막자사발로 갈아 이 중 1mL를 취하여 105배까지 희석한 후 0.1트립틱 소이 아가(TSA, Tryptic Soy Broth 3g, agar 18g/살균증류수 1L)에 0.1mL 씩 배지 전면

고르게 도말 후 30℃ 항온기에 3일간 배양하면서 자라나는 세균의 단일 균종을 분리하였다.

[0031] 분리한 균주들을 0.1TSA 배지에 다시 키워 세균이 순수한 지 확인한 후, 사면배지에 배양하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

[0032] 이상의 방법에 의해 균종 형태와 색깔이 다른 여러 세균 집락 중 약 300여 개의 균주를 순수 분리하여 0.1트립틱 소이 브로스(TSB, Tryptic Soy Broth, 3g/살균증류수 1L)에 배양하여 무 종자 발아 억제력을 검정하였는데, 그중 YC5957, YC5965 및 YC6002 균주의 발아억제 효과가 좋았다. 특히 YC6002 균주의 경우 5일이 지나도 무 종자가 전혀 발아되지 않았다.

[0033] 또한, 이 균주들을 0.1TSA와 PDA배지에서 식물병원균광이 콜레토티리쿰 글로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*)와 대치 배양하여 병원균 억제 정도도 조사하였는데, YC5957과 YC5975 균주 등의 5개 균주의 병원균 억제 효과가 역시 우수하였다(표 2).

[0034] [표 2] 분리된 내생세균의 탄저병균 콜레토티리쿰 글로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*)의 균사생장 및 무 종자의 발아 억제 효과

분리 균주	지 역	기주 식물	억 제 력		
			균사생장	억제거리(mm) ^a	무 발아 ^b
			0.1TSA	PDA	0.1TSB
YC5956	사 천	대 두	6-7	1-2	-
YC5957			2-3	2-3	++
YC5958			4-5	-	+
YC5965			3-4	2-3	++
YC5975	진 주	옥수수	6-7	7-8	-
YC5982	진 주	배 추	2-3	0-1	-
YC5983			-	1-2	-
YC6001	진 주	잔 디	1-2	-	-
YC6002			-	-	+++
YC6006			-	-	-

a; 내생세균과 탄저병균 *C. gloeosporioides*를 대치배양시 탄저병균의 생장억제 길이.
b; + (무 종자 발아억제), - (무 종자 발아 무억제)

[0035]

[0036] 2. 무 종자 발아 억제 세균의 동정

[0037] (1) 종자 발아억제 내생세균 YC6002 균주의 생리·생화학적 특성

[0038] 먼저 광학 및 전자현미경에 의해 종자 발아억제 내생세균의 형태 관찰을 시도하였다. 균주를 그람염색 방법에 의해 염색한 후 그람 양성 또는 음성을 광학 현미경으로 관찰하였고, 전자현미경에 의한 관찰은 균주를 2.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), 오스미움 테트라옥사이드(osmium tetroxide)로 고정하여 주사전자현미경(Philips, XL30 S FEG)을 사용하여 관찰하였다. 시료의 전 처리는 경상대학교 공동실험실습관의 일상적인 주사현미경 시료 준비법으로 하였다.

[0039] 상기의 현미경 관찰 조사 결과, YC6002 균주는 그람 양성 간균 형태로 호기성이며, 25℃~35℃에서 생장 가능하고 최적 생장 온도는 30℃ 이었으며, 카탈라아제(catalase)가 양성, 옥시다아제(oxidase)는 음성 이었다(표 1, 도 1).

[0040] 다음으로 종자 발아억제 내생 세균의 생화학적 특성 조사하였다. 균주의 생리학적 검사는 스미베르트 & 크리그(Smibert, R. M. and Krieg, N. R. 1991. General characterization, p.409-433.; Murray et al(ed.), Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D. C.)가 제안한 방법에 따라 옥시다아제(oxidase), 카탈라아제(catalase), 우레아제(urease) 반응, 카세인(casein), 전분 분해 시험 등을 시행하였고, 생화학적 특성은 원핵 시스템의 화학적 방법[Chemical methods in prokaryotic systematics(Goodfellow, M. and O'Donell, A. G. 1994. Chemical methods in prokaryotic systems. John Wiley & Sons, New York, N.Y., p. 575)]'에 기재된 내용으로 조사하였다. 그리고 중요 생리·생화학적 특성은 API(Analytic Profile Index) ID 32E 키트 (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하여 조사하였다.

[0041] 여러 가지 생리·생화학적 특성을 ID32E 키트와 정해진 방법으로 조사한 결과는 하기 표 1 및 표 3과 같았다.

[0042] [표 1] YC6002 균주의 형태적 및 생리적 특성

주요 특성	반응
모양	V-shape rod
그람염색	+
Catalase 검정	+
Oxidase 검정	-
Urea(요소) 분해	-

[0043]

[0044] + ; 양성반응, - ; 음성반응

[0045] [표 3] 내생세균 YC6002에 의한 탄수화물 이용 반응

기질	반응 ^a
L-아라비톨	-
갈락트로닉산	-
포타슘 5 - 케토글루코네이트	-
5-브로모-3-인독실-노나노에이트	-
우레아	-
피루브산나트륨	-
4-나이트로페닐-βD-글루코피라노시드	-
D-마니톨	-
D-말토오스	-
아도니톨	-
팔라티노오스	-
말론산나트륨	-
L-트립토판	-
키틴	-
4-나이트로페닐-βD-갈락토피라노시드	+
D-글루코오스	-
D-사카로오스	-
L-아라비노오스	-
D-아라비톨	-
D-트레할로오스	-
L-람노오스	-
이노시톨	-
D-셀로바이오스	-
D-소비톨	-

[0046]

[0047] * API ID 32E 동정 시스템을 사용하여 37℃ 에서 24시간 배양 후 반응 확인.

[0048] +; 양성 반응, -; 음성 반응.

[0049] (2) 내생세균 YC6002 균주의 분자 생물학적 특성

[0050] 1) 내생세균 YC6002 균주의 16S rDNA 염기서열 결정

[0051] 분리된 균주들의 16S rDNA 증폭 및 염기서열 결정을 위한 프라이머(primer)들은 세균 동정에 사용되는 유니버설 프라이머 세트(universal primer set) 27F/1492R (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAAG-3' / 5'-GGYTACCTGTGACGACTT-3')을 사용하였다. 각 프라이머(primer)들을 100 μM로 희석하고 -20℃ 보관하면서 실험에 사용하였다. 위의 프라이머(primer)를 이용하여 PCR로 증폭시켰는데, 디네처레이션(denaturation), 어니얼링(annealing), 익스텐션

(extension)은 각각 94℃ 1분, 56℃ 1분, 72℃ 1분간의 반응을 30회 반복한 후 72℃에서 10분간 반응시켜 16S rDNA 유전자를 증폭시켰다. 이렇게 얻은 염기조각은 자동염기서열분석기(automatic sequencer)를 통하여 염기서열을 결정하였고, 데이터 베이스 검색은 NCBI 네트워크 서비스의 BLAST 프로그램 및 Ribosomal Database Project II 의 RDP 분석도구를 이용하여 수행하였다.

[0052] 내생세균 YC6002 균주의 16S rDNA 유전자의 염기서열을 결정한 결과(서열번호 1) 아쓰로박터 속(*Arthrobacter* sp.)의 표준균주와 96-98%의 유사도를 보였다.

[0053] 또한 상기 YC6002 의 16S rDNA 유전자 염기서열을 분리된 세균의 16S rDNA 염기서열 결과를 유전자 은행 데이터 베이스(Genebank Data base)를 사용하여 이들 염기서열과 유사한 균주와 다중 정렬하여 유사도(similarity)를 얻었다. 염기서열을 이용하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였으며, 분석을 위해 PHYLIP package을 사용하여 계통수를 작성한 결과는 도 2b 와 같다. 그리고 YC6002 균주는 도 2b 에서 아쓰로박터 속 (*Arthrobacter* sp.)의 표준 균주인 아쓰로박터 글로비포미스 (*Arthrobacter globiformis*)와 유사한 계통임을 알 수 있었다.

[0054]

[0055] 2) 무 종자 발아억제 세균 YC6002의 생화학적 특성 추가 분석

[0056] 분리된 식물내생 세균 중 YC6002가 종자 발아억제 효과가 가장 우수하여 YC6002의 정확한 동정을 위하여 추가분석을 수행하였다. 분리된 YC6002 균주와 비교분석 한 균주는 예비 실험에서 16S rDNA 유사도가 가장 높은 5균주로 Japan Collection of Microorganisms(JCM), Korean Collection for Type Cultures(KCTC) 및 Korean Agricultural Culture Collection(KACC)으로부터 분양받아 사용하였다(표 4). YC6002의 확실한 동정을 위하여 예비 분석 결과 생리·생화학적 및 분자생물학적 특성이 YC6002와 유사한 아쓰로박터(*Arthrobacter*) 균주를 이용하여 지방산, 인지질 분석 및 DNA-DNA hybridization을 실시하였다.

[0057] [표 4] 본 연구에 사용된 *Arthrobacter* 종의 표준 균주

표준 균주*	GeneBank No.(16S rDNA)
<i>Arthrobacter pascens</i> JCM 11606T	X80740
<i>Arthrobacter globiformis</i> KCTC 9101T	X80736
<i>Arthrobacter koreensis</i> KACC 20542T	AY116497
<i>Arthrobacter ramosus</i> KCTC 19355T	X80742
<i>Arthrobacter woluwensis</i> KCTC 9905T	X93353

[0058]

[0059] * JCM (Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan), KCTC (Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea), KACC (Korean Agricultural Culture Collection, Suwon, Korea)

[0060] 2)-a. YC6002 균주 및 유사 균주의 지방산 분석

[0061] YC6002와 비교 균주들의 지방산 분석을 위하여 MIDI(Microbial Identification System)법을 이용하여 지방산을 추출하였다. 시료의 전처리에는 harvesting, saponification, methylation, extraction 그리고 세정 순으로 수행하였다. TSA 고체배지에서 30℃, 24h 동안 배양한 각 균체 40mg을 screw cap 반응용 시험관에 넣었다. Saponification 용액[NaOH 15 g, methanol 50 ml, D.W. 50 ml]을 1 ml 첨가한 후 뚜껑을 단단히 닫고 100℃에서 5분간 반응시켰다. 5분 경과 후 5~10초 정도 잘 흔들어 주고 다시 100℃에서 25분간 반응시켰다. 그 후, 흐르는 물에 시험관 온도를 낮춘 다음 methylation 용액[6N HCl 130 ml, methanol 110 ml]을 2 ml 첨가하여 밀봉한 후 80℃에서 10분간 반응시켰다. 얼음물에 담가 재빨리 식힌 후 extraction 용매[hexane 100 ml, methyl-tert-butylether 100ml]를 1.25 ml첨가한 후 10분간 흔들어 주었다. 막이 형성되면 하층은 파스퇴르 파이펫으로 제거하고, 남은 용매층에 세정액[saturated NaCl]을 약 3 ml 첨가 후 5분간 교반하였다.그 후 용매층의 2/3만 덜어내서 GC vial에 넣어 시료를 준비하였다. 시료의 분석은 경상대학교 공동실험실습관의 미생물동정장치(Microbial identification system, Sherlock, USA)를 이용하였다.

[0062] 상기의 YC6002와 다른 5종의 균주에 대한 지방산 분석 결과는 표 5와 같다. YC6002의 지방산 중 가장 많은 것은 15:0ai가 36.54% 였고, 18:0가 8.77%, 16:0가 6.44%, 그리고 16:1i와 16:0i가 모두 5.07%였다. 나머지 5균주는 모두 YC6002와 같이 15:0ai 의 함량은 가장 높았으나, 2번째로 함량이 높은 A. globiformis는 15:0i 가 21%, A. koreensis는 15:0i가 34.44%, A. woluwensis는 15:0i 가 22% 로 서로 다른 수치를 나타내었다.

[0063] [표 5] 식물내생 세균 YC6002 와 유사한 아쓰로박터(Arthrobacter) 종들의 세포 지방산

지방산 유형*	지방산 (%)					
	YC6002	<i>A. globiformis</i> KCTC 9101 ^T	<i>A. ramosus</i> JCM 1334 ^T	<i>A. pascens</i> KCTC 3445 ^T	<i>A. koreensis</i> KACC 20542 ^T	<i>A. woluwensis</i> KCTC 9905 ^T
14:0i	1.02	2	1			1
14:0	1.18	1	1	1		
15:0i	4.7	21	6	6	34.44	22
15:0ai	36.54	48	63	59	40	38
16:1i	5.07		2	1		
16:0i	5.07	7	3	3		11
16:1ω7c		1	3	3		
16:0	6.44	4	2	3		4
17:0i	1.2	2	1	1		6
17:0ai	15	7	8	13		15
18:1ω7c	0.57	1	1	2		1
18:0	8.77	1		1		1

[0064]

[0065] * 1% 보다 낮은 값은 나타나지 않았음.

[0066] 2)-b. 생화학적 특성 비교 분석

[0067] YC6002와 다른 5종의 균주에 대한 생화학적 특성의 분석 결과는 표 6과 같다. YC6002는 밝은 노랑색의 균총 형태를 나타내었으며, 옥시다아제, 트립신 및 β - 글루코시다아제가 음성으로 나타나서 아쓰로박터 코리엔시스 (*A. koreensis*)와 유사했다. G+C 함량은 61.2(mol%)로 나머지 5 균주와 유사하였고, 매우 높은 G+C 함량을 보였다. 전체적으로 YC6002는 나머지 5 균주와 큰 차이를 나타내지 않았다.

[0068] [표 6] 식물내생 세균 YC6002 균주와 유사한 아쓰로박터(*Arthrobacter* sp.) 종 사이의 표현형질 비교

특 성*	1	2	3	4	5	6
균총 색깔	Shine-Y	C	Y	Shine-Y	C	Y
균총 생장 형태	smooth	mucoïd	mucoïd	smooth	mucoïd	smooth
배양액 점도	++	+	++	+	++	+
생장 여부 :						
pH4	-	-	-	-	-	-
EMB agar	++	+	++	++	+	++
MacConkey agar	-	-	-	-	-	-
효소 활성 :						
카타라아제	++	++	+++	++	+	+++
옥시다아제	-	-	-	-	-	-
에스테라아제 (C 4)	+	+	+	+	+	+
리파아제 (C 14)	-	-	-	-	-	+
트립신	-	+	-	+	+	+
α - 갈락토시다아제	+	+	-	+	+	+
β - 갈락토시다아제	+	+	-	+	+	+
β - 글루코시다아제	-	+	-	-	+	+
가수분해 :						
한천	-	-	-	-	-	-
키틴	-	-	-	-	-	+
우레아	-	-	-	-	+	+
G+C 함량 (mol%)	61.2	65.9	63	63.1	63.1	63.2

[0069]

[0070] * API ZYM, API ID 32E 동정 시스템을 사용하여 표현 형질을 비교함.

[0071] +; 양성 반응, -; 음성 반응, c; cream-colored, y; yellow, EMB; eosin methylene blue,

- [0072] 1: YC6002, 2: *A. globiformis*, 3: *A. koreensis*, 4: *A. pascens*, 5: *A. ramosus*, 6: *A. woluwensis*
- [0073]
- [0074] 2)-c. 이차원 TLC에 의한 인지질 분석
- [0075] 세균의 생화학 분류학적 지표로서 인지질이 가장 유효하게 활용되는 미생물은 그람 양성 세균이다. 인지질 추출 및 분석에는 여러 가지 방법이 있으나, 간편하다는 장점 때문에 용매분획을 통한 추출과 2차원 박층 크로마토그래피(2-Dimensional Thin Layer Chromatography, 2D TLC) 방법에 의해 인지질 분석을 수행하였다.
- [0076] 균체의 인지질 추출은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선 TSB 액체배지에서 30℃, 24h 동안 진탕 배양한 각 균체 500 mg을 0.3% NaCl 용액 2 ml를 넣고 잘 교반한 후, screw cap 반응용 시험관에 넣었다. 여기에 methanol 6.5 ml를 첨가한 후 뚜껑을 단단히 닫고 100℃에서 5분간 반응시켰다. 흐르는 물에 시험관 온도를 낮춘 다음 chloroform 3 ml과 0.3% NaCl을 넣고, 진탕 배양기에서 2~3시간 동안 잘 흔들어 주었다. 그리고 chloroform과 0.3% NaCl을 각 3 ml씩 넣고 잘 흔들어 주고, 막이 형성되면 하층의 2/3만 들어내어 회전감압농축장치(Rotary vacuum evaporator system, Eyela, Japan)로 농축하여 chloroform-methanol (2:1, v/v)용매 100 μ l에 녹여 인지질 분석에 사용하였다.
- [0077] 균체의 인지질 분석은 추출된 인지질 5 μ l를 가로 $\times$ 세로 10cm 실리카겔 TLC 플레이트(Silica gel 60F254, Merck, Germany)의 모서리(아래쪽과 왼쪽을 1cm 띄운 위치)에 점적한 후 TLC 전개조에서 chloroform-methanol-water(65:25:3.8, by vol.)로 일차원 전개를 하고 바람에 잘 건조시켜 전개방향을 90도 변환하여 chloroform-acetic acid-methanol-water(80:13:12:1.6, by vol.)로 이차원 전개를 하였다. 바람에 건조 시킨 후 발색시약(phosphomolybdic acid, Sigma, USA)을 골고루 분무한 다음 150℃에서 15분 이상 가열하여 발색된 인지질을 분석하였다.
- [0078] 상기의 인지질 분석결과 YC6002의 주요 인지질은 phosphatidylglycerol(PG), phosphatidylethanolamine(PE), 및 phosphatidyl-N-methylethanolamine(PME), ninhydrinphosphatidylglycerol (NPG)로 나타났다(도 3).
- [0079] 2)-d. YC6002와 *Arthrobacter* sp. 균주의 DNA-DNA hybridization
- [0080] Genomic DNA-DNA hybridization은 Ezaki 등의 fluorescence microplate method를 변형하여 실시하였다. 추출한 균주의 genomic DNA를 10 μ g/ml가 되도록 phosphate buffered saline-MgCl₂(PBS-Mg:PBS에 MgCl₂를 최종 0.1M의 농도로 첨가)로 희석하여 Nunc-Immuno Maxisorp™ 96 well microplate(NalgeNuncInternational, Rochester, NY, USA)의 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 30℃에서 2시간 정치하고, 45℃에서 건조하였다. Probe DNA의 제조는 YC6002 균주의 genomic DNA를 사용하였다. 10 μ l의 DNA와 동량의 photobiotin(Sigma, Madison, WI, USA)과 혼합한 후 400W 저압 수은램프에 30분간 화학적으로 표지한 후 동량의 1-butanol을 가하여 혼합하였다. 그 후 여분의 photobiotin을 1-butanol층으로 옮겨 제거하였다. Hybridization 반응은 각 well에 200 μ l의 pre-hybridization 용액[20 $\times$ SSC 1ml, 100 $\times$ Denhardt's 용액 0.5ml, 10mg/ml 열 변성 salmon DNA(Sigma) 0.1 ml, formamide 5.0 ml, D.W. 3.4ml]을 가하고 37℃에서 10분간 유지하여 blocking 하였다. 각 well 당 probe가 들어있는 hybridization 용액[pre-hybridization 용액 + Dextran sulfate 0.25 g]을 100 μ l씩 가하여 49℃에서 3시간 유지한 후 hybridization 반응을 수행하였다. Plate는 1 $\times$ SSC로 3회 세척하였고, 각 well에 100 μ l씩 streptavidin- β -galactosidase(Sigma) 용액을 분주하고 37℃에서 30분간 유지하였다. 반응이 종료된 후 수분을 제거하였고, 300 μ l의 1 $\times$ SSC로 well을 3회 세척하고, 여기에 기질로서 4-methylumbelliferyl -D -galatopyranoside (4MUF, Sigma) 100 μ l를 넣고, 15분 간격으로 2시간 동안 Fluoroskan Fluorescence Plate Reader(MTX Lab Systems, Vienna, VA, USA)에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 Microsoft Excel 2003을 이용하여 분석하였다. 결과의 판정은 비교 균주간의 DNA-DNA reassociation values가 70% 이상이거나 열안정도(ΔT_m)가 5℃ 또는 그 이하인 경우 동종으로 판정하였고, 최적 renaturation temperature(TOR)는 하기식에 따라 결정하였다.
- [0081] [식 1]
- [0082]
$$TOR = [0.41 \times (G+C \text{ content}) + 69.3] - 45(50\% \text{ formamide})$$
- [0083] YC6002와 비교 대상인 아쓰로박터 속(*Arthrobacter* sp.)균주들의 genomic DNA를 추출하여 DNA-DNA hybridization에 사용하였다. 61.2 mol%의 G+C 함량을 가진 YC6002의 hybridization 온도는 49℃로 하였다. 표 7 에서 YC6002와 비교 균주의 상동성이 4균주 모두 각각 55, 42, 27, 20% 로 70% 이하를 보여 내생세균 YC6002

는 아쓰로박터 속(*Arthrobacter* sp.)의 새로운 종으로 나타났다.

[표 7] 내생 세균 YC6002 균주와 유사한 *Arthrobacter* 종간의 DNA-DNA 상동성 수치

균 주	G+C 함량 (mol %)	YC6002 균주와 상동성 수치 (%)
YC6002	61.2	100
<i>Arthrobacter pascens</i> KCTC 3445 ^T	63.1	55
<i>Arthrobacter woluwensis</i> KCTC 9905 ^T	63.2	42
<i>Arthrobacter globiformis</i> KCTC 9101 ^T	65.9	27
<i>Arthrobacter ramosus</i> JCM 1334 ^T	63.1	20

따라서 생리생화학적 실험과 분자생물학적 실험 등을 기준으로 본 균주는 아쓰로박터(*Arthrobacter* sp.) 속의 새로운 종으로 동정하였다.

아쓰로박터 속(*Arthrobacter* sp.)의 새로운 종으로 동정된 YC6002를 2008년 3월 19일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC: Korean Collection for Type Cultures)에서 기탁번호 KCTC 18127P를 부여받았다.

실시예 2. 내생세균 YC6002의 발아억제 물질 생산

1. 무 종자 발아억제 물질의 생산 배지 선정

분리된 균주의 무 종자 발아억제 물질 생산에 적합한 배지를 선발하기 위하여 5개의 배지를 선정하여 실험을 수행하였다(표 8).

[0092] [표 8] 내생세균 YC6002 균주의 무 종자 발아억제 물질 생산용 배지 성분

배 양 기	구 성 분	
Glucose Starch Broth (GSB)	Soluble starch	5.0g
	Glucose	5.0g
	Aspartic acid	0.5g
	K ₂ HPO ₄	0.5g
	MgSO ₄	0.5g
	FeSO ₄	0.01g / 1L D.W.
Soybean Meal flour Medium	Yeast extract	4.0g
	Beef extract	1.0g
	Soluble starch	20.0g
	Soybean meal	25.0g
	Glucose	5.0g
	K ₂ HPO ₄	0.1g
	NaCl	2.0g / 1L D.W.
Soytone Glucose Broth	Glucose	15.0g
	Soytone	15.0g
	Yeast extract	5.0g
	Casamino acid	1.0g
	K ₂ HPO ₄	0.1g
	NaCl	2.0g
	FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ 6H ₂ O	0.05g
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1g / 1L D.W.
0.1TSB	Pancreatic digest of casein	1.7g
	Enzymatic digest of soybean meal	0.3g
	Dextrose	0.25g
	Sodium chloride	0.5g
	Dipotassium phosphate	0.25g / 1L D.W.
Czapek-dox Broth	Saccharose	30.0 g
	Sodium Nitrate	3.0 g
	Dipotassium phosphate	1.0 g
	Magnesium sulfate	0.5 g
	Potassium chloride	0.5 g
	Ferrous sulfate	0.01 g/1 ℓ D.W.

[0093]

[0094] 선정된 각 배지 500 ml에 YC6002 균주를 접종하였고, 30℃, 180 rpm으로 72시간 진탕 배양한 후, 이를 원심분리(Beckam J-2HS, 7000 rpm, 15min)하여 상등액만 회수하였다. 회수된 상등액으로 무 종자 발아억제 효과를 조사하기 위하여 petri plate에 가로 × 세로 2 cm의 멸균 건조된 키친 타올을 올려놓고 YC6002 배양상등액을 500 μl 분주한 뒤 무(청대 봄무, ㈜농우바이오) 종자를 5개씩 3반복으로 올려놓고, 25℃, 72h 후 발아율을 조사하였다. 이 중 종자 발아억제력이 가장 좋은 배지를 선정하여 무 종자 발아억제 물질의 구조 결정을 위한 대량 생산 배지로 이용하였다.

[0095] 물질 생산을 위한 배지 선정을 0.1 TSB와 4개의 배지로 조사한 결과 0.1 TSB에서 가장 발아억제 효과가 높았으며, Czapek-dox broth 배지에서는 대조구인 증류수 보다는 억제되었으나 0.1 TSB 보다는 덜 억제되었다(도 4). 따라서 이후 종자 발아 억제물질의 대량 생산을 위하여 0.1 TSB를 이용하였다.

[0096] 2. 배양온도에 따른 무 종자 발아억제 물질 생산

[0097] 무 종자 발아억제물질 생산배지로 선정된 0.1 TSB에 YC6002 균주를 접종하여 온도에 따른 발아억제물질 활성을 조사하기 위해 각각 20℃, 25℃, 30에서 180 rpm으로 3일간 배양하면서 처음 6시간은 3시간 간격으로 그 이후에는 12시간 간격으로 시료를 채취하여 세균의 밀도 조사와 함께 무 종자 발아억제력에 대해 위와 같은 방법으로 조사하였다.

[0098] 20℃, 25℃, 30℃에서 72시간 진탕 배양한 후 그 결과를 관찰하였다. YC6002는 30℃, 24h 배양에서 밀도가 가장

높았고, 그 이후 점차 감소하였으며, 또한 배양 12h 까지는 pH가 떨어졌으나 이후부터 계속 증가하였다(도 5). 배양 온도별 발아율 결과는 배양액과 그 상등액이 대조구들에 비해 확실한 억제 효과를 보였으며, 배양 온도에 따른 차이는 크지 않았다(도 6).

[0099] 그리고 세균 배양기간 별로 억제 물질 생산을 조사한 결과 위의 30℃ 온도 조건하에서 48h 동안 배양한 YC6002의 배양액과 상등액에서 발아억제 효과가 좋았다. 기간별 발아 억제 효과를 조사한 결과 1일 이후부터 대조구에 비해 확실한 발아 억제 효과를 보였다(도 7).

[0100] 실시예 3: 본 발명의 균주 또는 그 배양액을 함유하는 미생물 제제의 제조

[0101] YC6002 균주가 자연 환경생태계 또는 식물체에서 생존을 유지하면서, 종자발아 및 생육을 억제하기 위해서는 영양분 공급 (단기적, 중장기간 이용 가능한 영양분), 세균의 보호, 발아율 증진, 장 단기적 생장 등을 유지하는 것이 필요하다. 이를 위해 바이오 매트릭스(bio-matrix)를 제조하였다. 바이오 매트릭스는 식물자원 고분자 재료(biogel)와 영양제, 보조재료, 그리고 첨가제를 혼합하여 만들었다. 식물자원 고분자 재료로는 감자가루, 콩가루 등을 사용하였고, 영양제로는 포도당, 펩톤과 무기염류를 사용했다. 보조 재료로는 질석 또는 왕겨 태운가루를 사용하였다. 첨가제로는 증량제(장식 석영 혼합광물, 지오라이트 등), UV 차단제, 계면활성제를 사용했다. 바이오 매트릭스 제조용 조성 성분과 성분량을 표 9에 나타냈다.

[표 9] 바이오 매트릭스 조성 성분량

성분		성분량
식물자원 고분자 재료(감자가루, 콩가루)		400g
영양제	포도당	2g
	펩톤	2g
	MgCl ₂	0.04g
	CaCO ₃	2g
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	120mg
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	20mg
	KH ₂ PO ₄	0.1g
보조 재료(질석, 왕겨태운가루)		5~10g
첨가제(증량제, UV 차단제, 계면활성제)		미량
H ₂ O		1ℓ

[0104] 1. 입제 및 수화제 제조

[0105] 본 발명의 YC6002 균주를 발효기(1톤 이상)에서 배양하여 얻은 균배양액 또는 원심분리 후 얻은 균체를 농축하여 1% 카복시메틸셀룰로즈(CMC: carboxymethyl cellulose) 수용액과 섞어 피막화 하였다. 상기 제조된 바이오 매트릭스를 피막화된 YC6002 균체 수가 바이오 매트릭스 그람 당 10⁷ -10⁸ 개 정도 되게 호모지나이저(homogenizer)속에서 균일하게 섞었다. 이렇게 만들어진 YC6002 균주와 바이오 매트릭스 복합체를 건조하여 말린 후 균일하게 분쇄하여 펠렛화하여 입제로 제조하였다.

[0106] 2. 액제(현탁액) 제조

[0107] YC6002 균주를 대형 발효기(1톤 이상)에서 배양하여 얻은 균배양액 또는 원심 분리하여 얻은 균체를 각각 장식 석영 혼합광물과 1:10으로 혼합한 후 현탁액으로 만들어 액제로 제조하였다.

[0109] 실시예 4: 본 발명의 균주 또는 그 배양액을 함유하는 미생물 제제의 발잡초 발아 억제효과

[0110] 실시예 2의 방법으로 배양한 YC6002 균주 배양액을 주요 발잡초를 파종한 소 포트당 50ml 처리한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 시험방법은 한국화학연구원(대전시 유성구 소재)에서 개발된 방법을 사용하였다. 식물의 재배를 위하여 350 cm² 사각 플라스틱 포트에 발 흙을 충진한 후 작물 5종(옥수수, 대두, 목화, 밀, 벼)과 잡초 10종(화본과 잡초 5종-수수, 돌피, 개밀, 바랭이, 미국개기장 ; 광엽 잡초 5종-까마중, 자귀풀, 어저귀, 도꼬마리, 메꽃)을 각각 나누어 파종하여 온실 조건에서 관리하였다. 1차 시험으로 파종 1일 후에 균주 배양액 200, 100, 50 ml/2포트 량으로 spray gun(IWATA, Wider-61)을 이용하여 분무 처리 한 후 온실 조건에서 14일 후에

달관 조사하였다. 2차 시험으로는 파종을 포함한 모든 관리는 1차 시험과 동일한 방법으로 하였으며, 처리 미생물 현탁제제를 400, 200, 100 ml/2포트 양으로 포트에 관수하였다.

YC6002 균주를 배양한 배양액의 1차 처리 범위에서는 5종의 작물 및 10종의 잡초에 대하여 억제 효과가 없었으나 균배양체를 농축하여 광물질로 제제화 하여 처리 양을 증가시킨 2차 시험에서는 400ml를 처리하였을 때 일부 초종에서 제초 효과가 확인되었으며, 이때 외형적으로 나타나는 증상은 생육억제 이었다(표 10, 도 8). 이 결과로 볼 때 본 YC6002 균주를 제제화 한 미생물제제는 식물의 종자가 발아하기 전에 발에 뿌리는 비선택성 제초제로 활용함이 가장 효과적이다.

[표 10] YC5480 균주 미생물제제의 주요 발잡초 및 작물 발아억제 효과

처리량(ml)	억제 정도(%)*				
	옥수수	대두	목화	밀	벼
100	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0
400	30B	20B	0	0	0

처리량 (ml)	억제 정도(%)									
	수수	돌피	개밀	바랭이	미국 개기장	까마중	자귀풀	어저귀	도꼬마 리	메꽃
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	50B	0	30B	20	30	50B	0	30	0	0

* 0; 효과 없음, 10-30; 약간 억제, 40-60; 중간 정도 억제, 70-90; 심한 억제, 100; 완전 억제.

산업이용 가능성

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 신균주 아쓰로박터 조이시에(Arthrobacter zoysiae) YC 6002 및 아쓰로박터 조이시에(Arthrobacter zoysiae) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 종자의 발아 및 생육 억제 능이 있는 생물 농약을 제조할 수 있다.

본 발명의 신균주 아쓰로박터 조이시에(Arthrobacter zoysiae)를 이용한 생물 농약은 종자의 발아 및 생육 억제 능이 우수하여, 재배지에서 잡초의 종자 발아 및 생육을 억제하는 효과가 있는 바, 작물이 어느 정도 성장 된 후 새로 발생되는 잡초에 의해 방해받지 않고 지속적으로 성장할 수 있게 도와주는 뛰어난 장점이 있다. 이러한 특성으로 국내외 제초제 시장에서 반 이상을 차지하고 있는 비선택성 제초제로서의 개발이 가능하며, 특히 화학 합성 제초제 보다는 더욱 안전한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 내생세균 YC6002 균주의 주사전자현미경 사진이다.

도 2는 본 발명의 내생세균 YC6002 균주의 계통수를 나타내는 사진이다.

도 3은 본 발명의 내생세균 YC6002 균체 인지질의 이차원 박층크로마토그램 사진이다.

도 4는 본 발명의 내생세균 YC6002 균주의 배양액과 상등액을 이용한 무 종자 발아 및 생장 억제를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 내생세균 YC6002 균주의 0.1TSB, 30℃, 180rpm 조건에서 진탕 배양 기간별 YC6002의 개체수 밀도 및 pH 변화를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 내생세균 YC6002 균주를 배양 온도별 조건에서 무 종자 발아 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 본 발명의 내생세균 YC6002를 0.1TSB 배지에서 배양 기간을 달리하여 배양액의 무 종자 발아 억제 효과

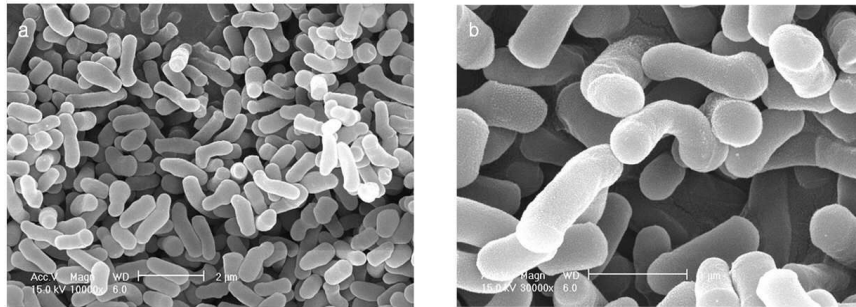
를 나타내는 그래프이다.

[0125] 도 7b는 본 발명의 내생세균 YC6002를 0.1TSB 배지에서 배양 기간을 달리하여 상등액의 무 종자 발아 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

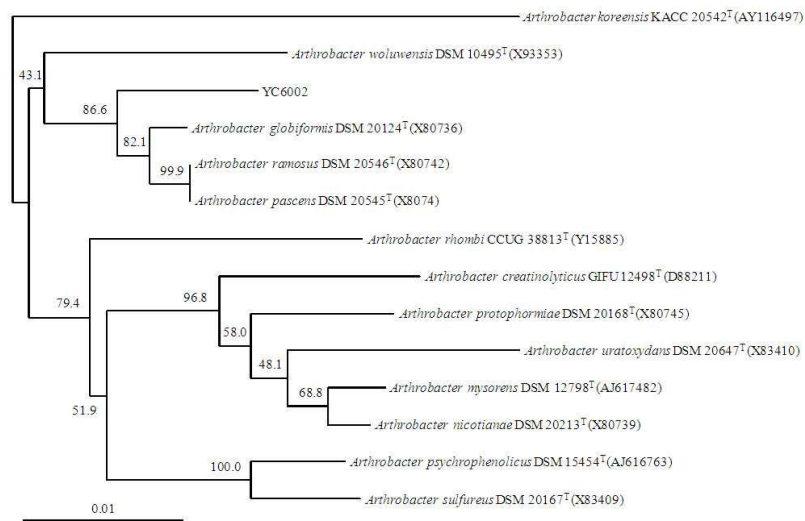
[0126] 도 8은 본 발명의 내생세균 YC6002를 0.1TSB 배지에서 배양한 후 원심분리하여 균체를 얻은 후 현탁액을 주요 작물 및 발잡초에 처리하여 억제 효과를 나타내는 사진이다 (왼쪽:무처리, 오른쪽:처리구)

도면

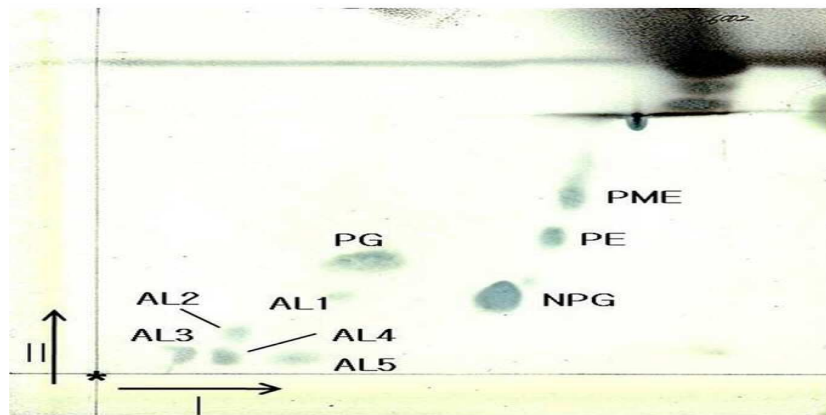
도면1



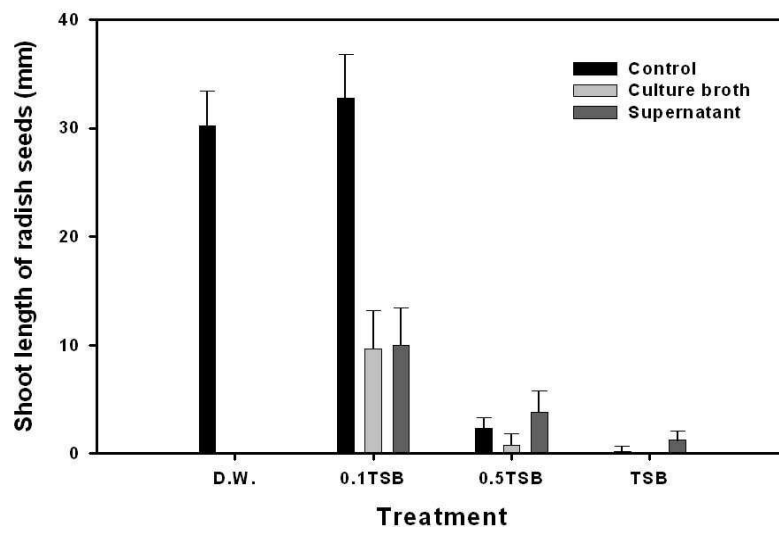
도면2



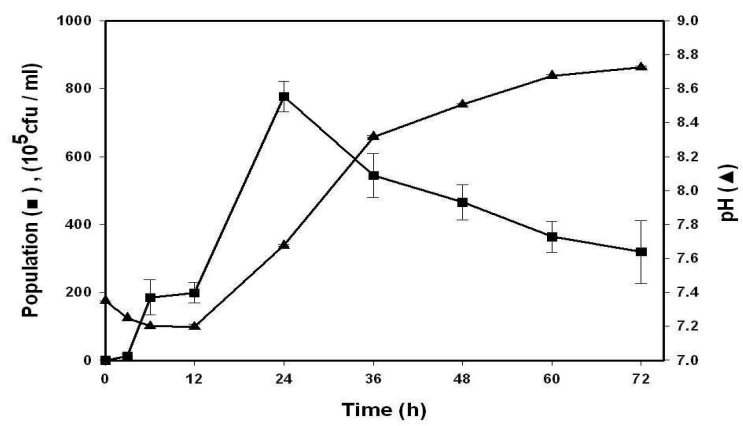
도면3



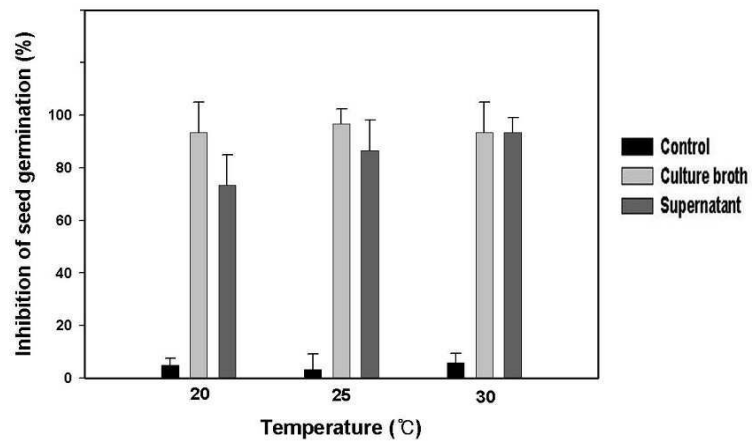
도면4



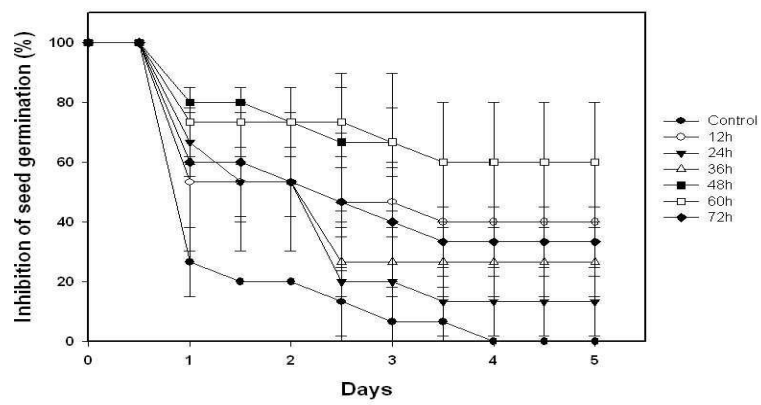
도면5



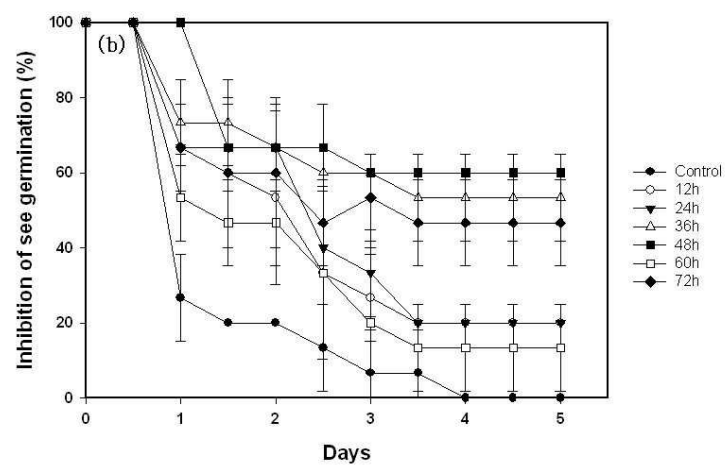
도면6



도면7a



도면7b



도면8



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
Jgreen Inc.

<120> Biotic pesticide using *Arthrobacter zoysiae* with inhibition
activity of germination and growth of seeds

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1390

<212> DNA

<213> *Arthrobacter zoysiae*

<400> 1

atgcagtcga acgatgaccc ggtgacttgc accggtgatt agtggcgaac gggtagtaa 60

cacgtgagta acctgccctt aactctggga taagcctggg aaactgggtc taataccgga 120

tatgactcct catcgcatgg tggggggtgg aaagctttat tgtggttttg gatggactcg 180

cggcctatca gcttgttggg gaggtaatgg ctaccaagg cgacgacggg tagccggcct 240

gagagggtag ccggccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca 300

gtggggaata ttgcacaatg ggcgaagcc tgaatgcagc acgccgcgtg agggatgacg 360

gccttcgggt tgtaaacctc tttagtagg gaagaagcga aagtacggt acctgcagaa 420

gaagcgccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtatac gtagggcgca agcggtatcc	480
cggaattatt gggcgtaaag agctcgtagg cggtttgcg cgtctgccgt gaaagtcgg	540
ggctcaactc cggatctgcg gtgggtacgg gcagactaga gtgatgtagg ggagactgga	600
attcctgggtg tagcggtgaa atgcgcagat atcaggagga acaccgatgg cgaaggcagg	660
tctctgggca ttaactgacg ctgaggagcg aaagcatggg gagcgaacag gattagatac	720
cctggtagtc catgccgtaa acgttgggca ctagggtggtg gggacattcc acgttttccg	780
cgccgtagct aacgcattaa gtgccccgcc tggggagtag ggccgcaagg ctaaaactca	840
aaggaattga cgggggcccc cacaagcggc ggagcatgcg gattaattcg atgcaacgcg	900
aagaacctta ccaaggcttg acatgggccc gaccgggctg gaaacagtcc ttcccctttg	960
gggccgggtc acaggtggtg catggttgc gtcagctcgt gtcgtgagat gtgggttaa	1020
gtcccgaac gagcgcaacc ctggttccat gttgccagcg cgtaatggcg gggactcatg	1080
ggagactgcc ggggtcaact cggaggaagg tggggacgac gtcaaatcat catgccctt	1140
atgtcttggg ctacacgat gctacaatgg ccggtacaaa gggttgcgat actgtgaggt	1200
ggagctaadc caaaaagcc ggtctcagtt cggattgggg tctgcaactc gaccccatga	1260
agtcggagtc gctagtaadc gcagatcagc aacgctgcgg tgaatacgtt cccgggcctt	1320
gtacacaccg cccgtcaagt cacgaaagt ggtaacaccc gaagccggtg gtacgtaacc	1380
ccttgtcgga	1390