



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A01N 63/00 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년01월02일 10-0663955 2006년12월26일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2006-7003199	(65) 공개번호	10-2006-0039021
(22) 출원일자	2006년02월16일	(43) 공개일자	2006년05월04일
심사청구일자	2006년02월16일		
번역문 제출일자	2006년02월16일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP2004/016597	(87) 국제공개번호	WO 2005/045004
국제출원일자	2004년11월09일	국제공개일자	2005년05월19일

(30) 우선권주장 JP-P-2003-00380231 2003년11월10일 일본(JP)

(73) 특허권자 샌트랄 글래스 컴퍼니 리미티드
일본국, 야마구치, 우베-시 오아자 오키우베 5253

(72) 발명자 타카하라 요시유키
일본국 사이타마 350-1151 가와고에-시 이마푸쿠나카다이 2805케미
컬 리서치 센터 오브 샌트랄 글래스 컴퍼니 리미티드 내

나카이 카츠타사
일본국 사이타마 350-1151 가와고에-시 이마푸쿠나카다이 2805케미
컬 리서치 센터 오브 샌트랄 글래스 컴퍼니 리미티드 내

(74) 대리인 신동준

심사관 : 류은경

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 평지과 식물 병해의 방제제 및 방제방법

(57) 요약

평지과 식물의 뿌리혹 병해에 대해 길항능을 가지는 바리오보락스속 세균 CGF4526을 유효성분으로서 포함하는 방제제를 평지과 식물과 접촉시킴으로써 평지과 식물 병해인 뿌리혹 병해에 대해 방제효과가 높고 환경오염이 없는, 평지과 병해의 방제제 및 방제방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

평지과 식물의 뿌리혹 병해에 대해 길항능을 가지는 바리오보락스속 세균 CGF4526주(Variovorax sp. CGF4526).

청구항 2.

평지과 식물의 뿌리혹 병해에 대해 길항능을 가지는 바리오보락스속 세균 CGF4526주(Variovorax sp. CGF4526)를 유효 성분으로 포함하는 방제제.

청구항 3.

바리오보락스속 세균 CGF4526주(Variovorax sp. CGF4526)를 평지과 식물에 접촉시키는 것을 특징으로 하는 평지과 식물의 뿌리혹 병해의 방제방법.

청구항 4.

제 3 항에 있어서,

평지과 식물이 배추, 양배추, 콜리플라워 또는 브로콜리인 것을 특징으로 하는 방제방법.

명세서

기술분야

본 발명은 학명 바리오보락스속(Variovorax)에 속하는 세균을 이용한 평지과 식물 병해의 방제제 및 방제방법에 관한 것이다.

배경기술

평지과 식물 병해의 주요한 토양 병해인 뿌리혹병은 배추, 양배추, 콜리플라워, 브로콜리와 같은 평지과 식물 300종 이상의 식물에 발생하는 토양사상균 병해이다. 뿌리혹병은 이들 평지과 작물의 안정된 생산에 지장을 초래하고 있다. 뿌리혹병의 병징은 심고 나서 20일 정도부터 뿌리에 혹이 생성되며, 초기부터 감염된 경우에는 배추나 양배추에서는 결구(結球)되지 않고, 후반 이후에 감염된 경우에도 수확물이 크지 않으며, 전혀 수확을 얻을 수 없는 경우도 있다.

현재, 평지과 식물의 뿌리혹병 병해의 방제를 위해 토양소독제로서 몇 종류의 화학약제가 사용되고 있다. 그러나, 이들 화학약제에는 환경상의 문제나 사용자 및 인근 주민의 안전성 문제, 나아가 근래 소비자의 저농약, 무농약을 지향하는 추세에 맞지 않는 문제가 있다. 또한, 병원균의 균밀도가 높은 경우에는 효과가 떨어지는 경우도 종종 볼 수 있다.

따라서, 이 병해의 방제에는 방제효과가 높고 수질오염 등의 환경오염 및 안전성을 만족하는 방제제의 개발이 요구되고 있다.

종래의 평지과 식물의 뿌리혹병에 대한 생물 방제법으로 사상균(일본 식물 질병 공보 제62권, 1996년, p281)이나 바실러스속 세균(일본 특허 공개 공보 평11-335217호)를 이용하는 방법이 알려져 있다. 또한, 본 출원과 관련된 기술로서, 일본 특허 공개 공보 제2003-231606호는 수도모나스속 베트나미엔시스(Pseudomonas vietnamiensis)에 속하는 미생물이 배추 등의 평지과 식물의 황화병(버티실리움 병해)에 방제효과를 가짐이 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 평지과 식물 병해인 배추 뿌리혹병, 양배추 뿌리혹병 등의 평지과 뿌리혹병에 대해 방제효과가 높고 환경오염이 없는 방제제 및 방제방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해 예의 검토를 한 결과, 배추 등의 평지과 식물의 뿌리혹병에 대해 높은 방제효과를 갖는 바리오보락스속 세균 CGF4526주(*Variovorax* sp. CGF4526)를 발견하였고, 본 발명의 세균을 유효성분으로 하는 방제제를 평지과 식물에 접촉시킴으로써, 뿌리혹 병해를 특히 효과적으로 방제할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

본 발명은 바리오보락스속(*Variovorax*) 균주 및 그 생균을 유효성분으로서 함유하는 것을 특징으로 하는 평지과 식물 뿌리혹병의 방제제 및 이것을 이용한 평지과 식물 뿌리혹 병해의 방제방법을 제공한다.

본 출원인은 평지과 식물의 뿌리혹병에 대해 높은 방제효과를 갖는 아시도보락스속 델라필디(*Acidovarx delafieldii*)에 속하는 미생물을 발견하여 이미 특허출원을 하였다(일본 특허출원 제2002-158565호(일본 특허 공개 공보 제2003-342109호)). 또한, 평지과 식물의 뿌리혹병에 대해 높은 방제효과를 갖는 수도모나스속 베타나미엔시스(*Pseudomonas vietnamiensis*)에 속하는 세균을 발견하여 특허출원하였다(일본 특허출원 제2003-171251호).

본 발명에 따른 바리오보락스속 세균 CGF4526주(*Variovorax* sp. CGF4526)는 평지과 식물의 뿌리혹 병해를 효과적으로 방제할 뿐만 아니라, 보존 안정성도 뛰어나며, 식물의 성장을 촉진하는 작용도 함께 가지고 있어, 농약으로서의 높은 실용성을 가지고 있다.

본 발명에 따른 평지과 식물 뿌리혹 병해의 방제제 또는 방제방법을 사용하면, 평지과 식물 뿌리혹병의 병해에 대해 발병을 강력하게 억제할 수 있으며, 현재 사용되고 있는 화학약제에 대해 동등 이상의 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 방제제의 사용은 기존의 화학약제와 같이 농약으로 인한 환경오염을 야기하지 않는다. 또한, 본 발명의 방제제는 시장에서 안정된 상태로 유통될 수 있다.

본 발명의 방제제는 과종시의 육묘 배토에 혼합하거나, 과종 전후의 종자에 관주할 수 있다. 또한, 정식(定植)(또는 아주심기) 전의 묘의 뿌리를 그 희석액에 침지하거나, 육묘중 또는 정식 직전의 묘에 관주하는 방법도 가능하다. 본 발명에 의해, 배추, 양배추, 콜리플라워, 브로콜리와 같은 평지과 식물의 뿌리혹 병해를 환경오염의 문제 없이 강력하게 방제할 수 있다.

본 발명의 미생물은 평지과 식물 뿌리혹 병해에 대해 높은 방제효과를 갖는 바리오보락스속 세균 CGF4526(*Variovorax* sp. CGF4526) 균주이다. 이 균주(미생물)는 하기의 기탁 정보에서 알 수 있는 바와 같이 기탁되었다.

1) 기탁기관의 명칭과 주소 : 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터 우편번호 305-8566 일본 이바라기켄 츠크바시 히가시 1쵸메1반지1 중앙 제6

2) 기탁일 : 2003년 10월 21일

3) 기탁번호 : FERM BP-10160

바리오보락스속 세균 CGF4526(*Variovorax* sp. CGF4526)은 벼나 야채에서 분리 수집한 약 7000균주의 세균으로부터, 사상균에 대한 항균 활성, 나아가 포트재배 배추를 이용한 병해방제검정시험에 의한 선발 결과로부터 얻어진 균주이다.

바리오보락스속 세균 CGF4526(*Variovorax* sp. CGF4526)은 광학현미경 및 전자현미경으로 형태를 관찰한 결과, 세포의 크기는 1~3 μ m의 간균이며, 세포의 다형성은 없으며, 모두 운동성을 가지고 있다. 그람 반응은 음성이며, 내포자는 형성하지 않았다.

이하, 기타 세균학적 성질에 대해 설명한다.

1. 배양적 성질

CGF4526의 영양 한천 배지에서의 생육상태를 나타내면 다음과 같다. 관찰은 30℃에서 3일간 배양 후에 실시하였다.

CGF4526의 콜로니 형태는 크림색이며, 원형이고, 전체 가장자리가 매끈하며, 낮은 돌출형태이고, 광택을 나타내었다.

2. 일반적 성질

[표 1]

세포 형태 : 간균(0.7~0.8×1.5~2.0 μm)
그람 염색 : -
포자 : -
운동성 : +
배양온도 37℃ : +
45℃ : -
카탈라제 : +
옥시다제 : +
OF 테스트 : -
질산염 환원 : -
인돌 생산 : -
포도당 산성화 : -
알기닌 하이드라타제 : -
우레아제 : +
에스쿨린 가수분해 : -
젤라틴 가수분해 : -
β-갈락토시다제 : -
사이토크롬옥시다제 : +
MacConkey 한천배지에서의 생육성 : +
용혈성 : -
자화성
포도당 : +
L-아라비노스 : +
D-만노스 : +
D-만니톨 : +
N-아세틸-D-글루코사민 : +
말토스 : -
글루콘산 칼륨 : +
n-카프르산 : +
아디핀산 : -
dl-사과산 : +
구연산나트륨 : -
초산페닐 : -

3. 16s-rRNA 분석

16s-rRNA의 염기서열 1530bp를 결정하였다. 해석을 위해 얻어진 16s-rRNA의 염기서열을 사용하여 상동성 검색을 실시한 결과, 상동율의 상위는 바리오보락스 파라독서스(*Variovorax paradoxus*)였다.

이상과 같은 세균학적 성질에 의해, CGF4526은 운동성을 갖는 그람음성의 간균이며, 카탈라제 활성 양성과, 옥시다제 활성양성을 나타내며, 내포자를 형성하지 않으므로, 슈도모나스 그룹에 속하는 세균으로 분류되고, 더 나아가 자화성에 의해 슈도모나스 그룹Ⅱ에 속하는 세균으로 분류되었다. 또한, 16s-rRNA 해석으로부터, 바리오보락스속 세균에 속함을 알 수 있었다. 또한, 바리오보락스속 중에서도 바리오보락스 파라독서스(*Variovorax paradoxus*)라고 생각되지만, 단정하기에는 이르기 때문에, 바리오보락스 에스피(*Variovorax sp.*)라 하였다.

본 발명의 균은 통상적인 방법에 따라 배양되고 방제제로서 제제될 수 있는데, 예를 들어 설명하면 다음과 같다. 여기서 사용하는 배지는 본 발명의 균이 증식될 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다. 생육에 가능한 탄소원, 질소원, 및 무기물을 적당히 함유하고 있는 배지이면, 천연 배지, 합성 배지 모두 사용할 수 있다. 배지로서는 부용(bouillon) 배지, 킹스 B 배지(King's B medium), PS 배지, PDB 배지 등을 예시할 수 있다. 이상과 같은 배지에서 15~42℃, 바람직하게는 28℃~35℃에서 12~48시간 배양하고 증식시킨 후, 원심분리기 또는 막농축기에 의해 농축하여 집균함으로써 배지성분

을 제거한다. 이 조작에 의해 균체의 농도는 통상 $1 \sim 50 \times 10^{10}$ cfu/ml 정도로 농축된다. 본 발명의 방제제는 배양 후의 생균을 그대로 사용하여도 되지만, 일반적으로는 농약으로서 사용가능한 고체 또는 액체의 제제로서 사용될 수 있다. 따라서, 배양한 습(濕)균체에 당류와 글루타민산나트륨, 인산나트륨 완충액으로 이루어진 보호제를 첨가하여 진공건조한다.

진공건조하기 전에 보호제와 혼합한 균체를 예비 동결하고, 동결한 채로 진공건조하는 것이 균의 생존율을 유지하기 위해서는 바람직하다. 또한, 보호제는 수용액 상태로 균체와 혼합하여도 좋으며, 고체상태 그대로 혼합하여도 좋다.

본 발명의 균체의 고정화는 보호제로서 수크로오스, 프룩토오스, 글루코오스 및 소르비톨의 1종 또는 2종 이상으로 이루어진 당류를 사용하여 수행하고, 균체와 혼합하여 진공건조 또는 동결 진공 등의 방법으로 건조시켜 수행할 수 있다.

여기서, 배양한 바리오보락스속 세균 CGF4526주는 적당한 담체와 혼합하여 분제(粉劑) 또는 입제(粒劑)로 제조될 수 있다. 이 경우의 담체로 탈크, 탄산칼슘, 규조토와 같은 광물성 분말이나, 피트모스(peat moss), 그리고 폴리비닐알콜과 같은 고분자 화합물, 크산탄검이나 알긴산과 같은 천연고분자화합물 등을 사용할 수 있다. 균체의 농도는 10^5 cfu/g 이상, 바람직하게는 10^7 cfu/g 이상으로 한다. 수화제의 경우에는 10^9 cfu/g 이상, 바람직하게는 10^{10} cfu/g 이상으로 한다.

일반적으로 배추, 양배추, 콜리플라워, 브로콜리와 같은 평지과 식물의 생산은 육묘 트레이에 파종하여 3~5주간 육묘한 후, 밭에 정식(아주심기)한다. 본 발명의 방제제는 약해(藥害)의 문제없이 사용될 수 있다. 본 발명의 방제제는 파종시의 육묘 배토에 혼합하거나, 파종 전후의 종자에 관주할 수 있다. 또한, 정식(아주심기) 전의 묘의 뿌리를 그 희석액에 침지하거나, 육묘중 또는 정식 직전의 묘에 관주하는 방법도 가능하다. 파종시 및 정식(아주심기)시의 양 처리를 조합하는 방법이, 본 발명에 따른 균의 뿌리 정착이 보다 효율적으로 이루어지기 때문에 더욱 바람직하다.

본 발명의 방제제를 상기의 방법으로 사용할 경우, 육묘 배토에 혼합처리할 경우에는 토양 1l당 1g 이상 혼합하여 균일해지도록 교반한다. 배토 중의 균농도는 10^6 cfu/g 이상, 바람직하게는 10^7 cfu/g 이상이 되도록 조정한다.

또한, 육묘된 묘를 파종 전후 또는 정식(아주심기) 전에 본 발명의 방제제 희석액에 침지 처리할 경우의 희석액의 균농도는 10^7 cfu/ml 이상, 10^8 cfu/ml 이상이 되도록 조정한다.

이하, 바리오보락스속 세균 CGF4526의 선발에 대해 상세히 기재한다. CGF4526은 버, 야채 및 잡초 등에서 분리 수집한 세균 중에서 사상균인 토마토 위조병균(*Fusarium oxysporum*) 및 배추 황화병균(*Verticillium daliae*)에 대한 항균활성, 나아가 배추묘를 사용한 황화병 및 뿌리혹병 포트 검정시험에 의한 선발 결과, 배추황화병 및 평지과 식물 뿌리혹병에 대해 방제효과를 가짐을 발견하여 선발되었다. 구체적으로는 포장에서 채취한 식물의 뿌리를 수돗물로 씻은 후, 뿌리를 잘게 잘라 멸균수에 넣고 믹서로 갈았다. 그 같은 액을 적당히 희석하고, 부용 한천 배지에 도포하여 배양하였다. 여기서 출현한 콜로니를 단리, 보존하여 공시균주로 삼았다.

토마토 위조병균(*Fusarium oxysporum*) 및 배추 황화병균(*Verticillium daliae*)에 대한 항균활성의 측정을 위해, 토마토 위조병균(*Fusarium oxysporum*) 및 배추 황화병균(*Verticillium daliae*)과 공시균주를 PDA배지(포테이토 텍스트로스 배지)상에서 대치 배양하였다. 배양은 25℃에서 1주간 또는 3주간 실시하였다.

또한, 대치 배양에서 얻어진 항균활성을 갖는 균주에 대해, 배추 황화병 및 배추 뿌리혹병에 대한 방제시험을 실시하였다. 방제 시험 방법은 공시균주의 10^8 cfu/ml 희석액에 배추묘의 뿌리를 24시간 침지 처리한 후, 오염토양에 이식한 후 4~5주째에 발병조사를 하였다. 그 결과, 뿌리혹병을 강력하게 억제함을 알 수 있었다.

실시에

하기 실시에는 본 발명을 예증하는 것이나, 본 발명은 하기의 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 또한, 실시예에 사용한 배지의 조성은 다음과 같다.

부용 배지 : 육즙 3g, 펩톤 10g, NaCl 15g, 물 1l, pH 7.0

PDA 배지(포테이토 텍스트로스 배지) : 포테이토 삼투액 200g, 포도당 20g, 물 1l, pH 5.6.

실시예 1: 배추 뿌리혹병에 대한 방제시험

바리오보락스속 세균 CGF4526주를 부용 액체 배지에서 24시간 배양하여, 얻어진 균체를 원심 분리하고 공시균의 현탁액을 조정하였다. 이 현탁액에 배추 묘(품종 : 신리소 메구미)를 침지하고, 현탁액에 침지한 채 24시간 두었다. 그 후, 배추묘를 오염토양에 옮겨심었다. 오염토양으로 배추 뿌리혹균에 감염된 배추뿌리(뿌리혹 부착)를 균질화(homogenize)하여 혼합한 발 토양을 사용하였다. 33일 후 발병의 유무를 조사하여 방제효과를 판정하였다. 그 판정 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

바리오보락스속 세균 CGF4526주의 현탁액의 균 농도는 1×10^8 cfu/ml로 하였다. 그 결과, 바리오보락스속 세균 CGF4526에 높은 방제효과가 확인되었다. 배추 뿌리혹병의 검정은 아래와 같이 뿌리부의 뿌리혹의 생성정도로 발병도를 산출하여 평가하였다.

뿌리부 발병지수 0 ; 건전, 뿌리부 발병지수 1 ; 뿌리의 10% 이하에서 뿌리혹의 부착 확인, 뿌리부 발병지수 2 ; 뿌리의 10%~50% 에서 뿌리혹의 부착 확인, 뿌리부 발병지수 3 ; 뿌리의 50% 이상에서 뿌리혹의 부착 확인

$$\text{발병도} = 100 \times \{ \sum(\text{뿌리부 발병지수의 값}) \times (\text{각 뿌리부 발병지수에 해당하는 고체수}) \} \div \{ 3 \times (\text{공시주수}) \}.$$

【표 2】

처리	공시주수	발병주수	발병도	방제가
무처리	8	100.0	66.7	-
CGF4526	8	25.0	12.5	81.3

실시에 2: 브로콜리 뿌리혹병에 대한 방제시험

바리오보락스속 세균 CGF4526주를 부용 액체 배지에서 24시간 배양하여, 얻어진 균체를 원심 분리하고, 공시균의 현탁액을 조정하였다. 이 현탁액에 브로콜리 묘(품종: 녹색(綠帝))를 침지하고, 현탁액에 침지한 채 24시간 두었다. 그 후, 브로콜리 묘를 배추 뿌리혹병에 걸린 뿌리의 파쇄액을 혼합한 오염토양을 채운 10.5cm의 폴리 포트에 이식하였다. 약 30일 후에 발병의 유무를 조사하여 방제효과를 판정하였다. 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 바리오보락스속 세균 CGF4526주의 현탁액의 균농도는 10^8 cfu/ml 로 하였다. 그 결과, 바리오보락스속 세균 CGF4526에 높은 방제효과가 인정되었다.

【표 3】

처리	공시주수	발병주율	발병도	방제가
무처리	8	87.5	50.0	-
CGF4526	8	25.0	8.3	83.4

실시에 3: 배추 뿌리혹병에 대한 방제시험(포장시험)

바리오보락스속 세균 CGF4526주를 부용 액체 배지에서 24시간 배양하여, 얻어진 균체를 원심 분리하고, 파종토양에 10^8 cfu/g의 균농도를 혼합하였다. 배추 종자(품종 ; 신리소 메구미)를 파종하고, 3주간 육묘하였다. 마찬가지로 배양한 바리오보락스속 세균 CGF4526주균의 현탁액(10^8 cfu/ml)를 조정하여 배추 묘를 침지하고, 현탁액에 침지한 채 24시간 두었다. 그 후, 배추 묘를 배추 뿌리혹병에 걸린 뿌리의 파쇄액을 혼합한 발에 정식하였다. 약 65일 후에 발병의 유무를 조사하여 방제효과를 판정하였다. 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다. 그 결과, 바리오보락스속 세균 CGF4526에 높은 방제효과가 인정되었다.

[표 4]

처리	공시주수	발병주수	발병도	방제가
무처리	16	68.8	37.5	-
CGF4526	16	12.5	4.2	88.8

산업상 이용 가능성

앞서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 바리오보락스속 세균 CGF4526주(Variovorax sp. CGF4526)는 평지과 식물의 뿌리혹 병해를 효과적으로 방제하였다

한편, 본 발명의 방제제는 화학약제를 사용하지 않으므로 배추, 양배추, 콜리플라워, 브로콜리와 같은 평지과 식물의 뿌리혹 병해를 환경오염의 문제 없이 효과적으로 방제할 수 있다.