



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0150821  
(43) 공개일자 2024년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) A01N 59/00 (2006.01)  
A01N 63/20 (2020.01) A01P 1/00 (2006.01)  
A01P 3/00 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12N 1/205 (2021.05)  
A01N 59/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0045408  
(22) 출원일자 2023년04월06일  
심사청구일자 2023년04월06일

(71) 출원인  
전북대학교산학협력단  
전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1가)

(72) 발명자  
이용훈  
전라북도 전주시 완산구 여울로 109, LG아파트 101-702호  
강준안  
서울시 서대문구 수색로 DMC레미안 303-604호  
스와나리 더타  
전북특별자치도 전주시 완산구 척동8길 9-1, 201호 (효자동3가)

(74) 대리인  
특허법인지담

전체 청구항 수 : 총 7 항

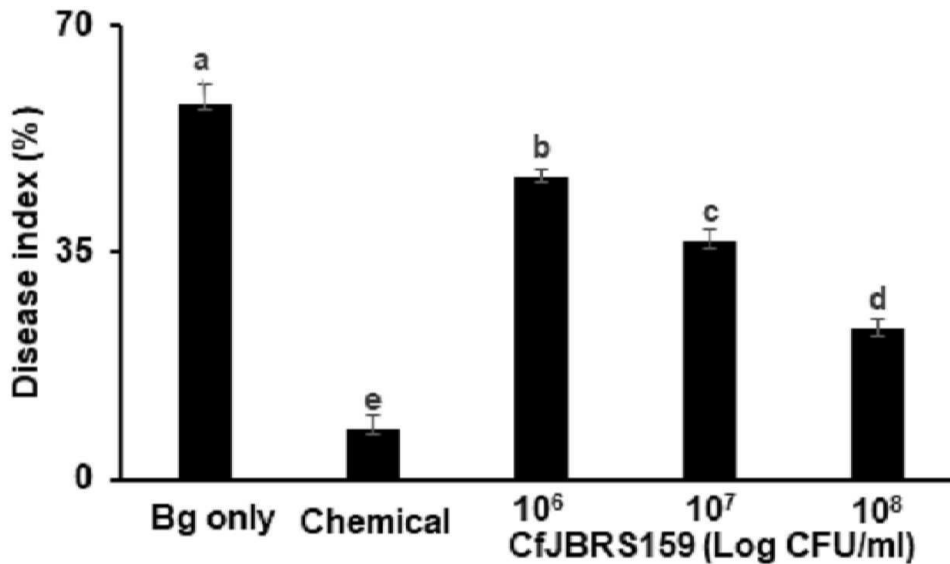
(54) 발명의 명칭 사이토바실러스 퍼머스 JBRS159 균주 및 균소를 이용한 벼 종자 전염병 방제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 사이토바실러스 퍼머스 JBRS159 균주 및 균소를 이용한 벼 종자 전염병 방제용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 세균벼알마름병 및 키다리병을 방제하고 식물 생장을 촉진하는 효과를 나타내는 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 사이토바실러스 퍼머스 (Cytobacillus firmus) JBRS159균주를 이용한 벼 종자 전염병 방제용 조성물은 세균벼알마름병 및 키다리병에 대한 우수한 방제효과를 나타내고, 식물의 생육을 촉진할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A01N 63/20* (2022.01)

*A01P 1/00* (2021.08)

*A01P 3/00* (2021.08)

*C12R 2001/01* (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395070194
과제번호	PJ015566042021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	신농업기후변화대응체계구축(R&D)
연구과제명	기후변화에 의한 벼 병원체 증식, 변이분석 및 피해저감 연구(3공동)
기여율	1/1
과제수행기관명	전북대학
연구기간	2021.01.01 ~ 2024.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

벼 종자 전염병 방제용 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBR5159균주 (수탁번호:KACC 92494P).

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 벼 종자 전염병은 세균 벼알마름병균 (*Burkholderia glumae*) 으로부터 발생하는 벼알마름병 및 키다리병원균 (*Gibberella fujikuroi*) 으로부터 발생하는 키다리병 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBR5159균주 (수탁번호:KACC 92494P).

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 1 의 염기서열을 포함하는, 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBR5159균주 (수탁번호:KACC 92494P).

#### 청구항 4

제1항의 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBR5159균주 (수탁번호:KACC 92494P), 이의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 벼 종자 전염병 방제용 조성물.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 조성물은 규소 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 벼 종자 전염병 방제용 조성물.

#### 청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 규소 화합물은 규산칼륨( $K_2SiO_3$ ) 또는 규소나노입자 ( $SiO_2$ ) 인 것을 특징으로 하는, 벼 종자 전염병 방제용 조성물

#### 청구항 7

제4항의 조성물을 벼 종자 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 벼 종자 전염병 방제방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

본 발명은 사이토바실러스 퍼머스 JBR5159 균주 및 규소를 이용한 벼 종자 전염병 방제용 조성물에 관한 것으로

[0001]

서, 더욱 상세하게는 세균벼알마름병 및 키다리병을 방제하고 식물 성장을 촉진하는 효과를 나타내는 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0003] 벼 농사에서 종자를 통하여 전염되는 벼 종자 전염병에는 세균벼알마름병, 키다리병, 세균 줄무늬병, 벼 흰잎마름병 등이 있다. 이러한 벼 종자 전염병은 직접적으로 농작물의 수확량을 감소시키고 품질에도 큰 영향을 미치기 때문에, 이러한 전염병을 방지하기 위하여 유기합성 농약인 화학 농약이 개발되어왔다. 그러나, 화학 농약의 사용으로 인하여 인축에 대한 독성, 꿀벌 등 천적에 대한 피해, 농산물 및 환경에의 잔류 등과 같은 문제가 대두되면서, 화학 농약을 대체할 수 있는 친환경 방제에 대한 연구가 진행중이며, 특히 농업 유용 미생물을 이용한 친환경 소재의 개발이 활발히 진행되고 있다.
- [0004] 사이드로포어(siderophore)는 식물 성장에 필수적인 원소인 철 이온과 특이적으로 결합하며, 식물 성장에 직접적 도움을 주는 물질이다. 또한 사이드로포어는 식물 병원균의 철 이온 흡수를 경쟁적으로 저해하여 식물 병원균의 생육을 억제할 수 있다. 따라서, 사이토바실러스 퍼머스 JBRS159 균주는 사이드로포어를 생성함으로써 식물 성장에 도움을 줌과 동시에 벼 종자 전염병 방제 효과를 나타낼 수도 있다.
- [0005] 규소는 식물에는 중요한 기능을 가지지 않는다고 알려져 있었으나, 일부 식물 종의 경우에는 토양으로부터  $Si(OH)_4$  의 형태로 규소를 흡수하여 다른 주요 영양 물질보다 더 많은 양을 축적하는 특성을 나타낸다. 특히, 벼의 경우 규소의 흡수율은 질소에 비해 매우 높은 것으로 알려져 있다. 규소가 식물의 성장, 발달, 수확량 및 질병 저항성에 미치는 효과는 다양한 식물 종에서 관찰되고 있다. 또한, 생물적 및 비생물적 스트레스를 견딜 수 있는 잠재력을 제공하며, 곤충 및 기타 해충의 공격으로부터 질병에 대한 저항성을 향상시키는 효과가 있는 것으로 알려졌다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 제10-2006-0114038호 (2006.11.03)

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 해결 과제는 벼 종자 전염병 방제용 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주 (수탁번호:KACC 92494P) 를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 해결 과제는 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주 (수탁번호:KACC 92494P), 이의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 벼 종자 전염병 방제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 해결과제는 상기 벼 종자 전염병 방제용 조성물을 벼 종자 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 벼 종자 전염병 방제방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 해결 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

#### 과제의 해결 수단

- [0013] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면에 따라, 벼 종자 전염병 방제용 사이토바실러스 퍼머

스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주 (수탁번호:KACC 92494P) 가 제공된다.

- [0014] 일 구현예에서, 상기 벼 종자 전염병은 세균벼알마름병균 (*Burkholderia glumae*) 으로부터 발생하는 세균벼알마름병 및 키타리병원균 (*Gibberella fujikuroi*) 으로부터 발생하는 키타리병 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0015] 일 구현예에서, 상기 균주는 서열번호 1 의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 측면에 따라, 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주 (수탁번호:KACC 92494P), 이의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 벼 종자 전염병 방제용 조성물이 제공된다.
- [0017] 일 구현예에서, 상기 조성물은 규소 화합물을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0018] 일 구현예에서, 상기 규소 화합물은 규산칼륨( $K_2SiO_3$ ) 또는 규소나노입자 ( $SiO_2$ ) 일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 벼 종자 전염병 방제용 조성물을 벼 종자 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 벼 종자 전염병 방제방법이 제공된다.

### 발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주를 이용한 벼 종자 전염병 방제용 조성물은 세균벼알마름병 및 키타리병에 대한 우수한 방제효과를 나타내고, 식물의 생육을 촉진시키는 효과를 갖는다.

### 도면의 간단한 설명

- [0023] 첨부된 도면은 해당 기술 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 내용을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로 본 발명의 기술적 사상이 이에 한정되는 것은 아니다.
- 도 1 은 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주의 농도별 세균벼알마름병 방제효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2 는 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주의 세균벼알마름병 방제효과를 나타낸 사진이다.
- 도 3 은 규소 화합물의 농도별 세균벼알마름병 방제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4 는 규소 화합물의 세균벼알마름병 방제효과를 나타낸 사진이다.
- 도 5 는 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주 단독 처리, 규소화합물 단독 처리, JBRS159 균주 및 규소화합물의 동시 처리시 세균벼알마름병 방제 효과를 비교한 그래프이다.
- 도 6 은 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주 단독 처리, 규소화합물 단독 처리, JBRS159 균주 및 규소화합물의 동시 처리시 세균벼알마름병 방제 효과를 나타낸 사진이다.
- 도 7 은 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주 단독 처리, 규소화합물 단독 처리, JBRS159 균주 및 규소화합물의 동시 처리시 키타리병 방제 효과를 비교한 그래프이다.
- 도 8 은 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주 단독 처리, 규소화합물 단독 처리, JBRS159 균주 및 규소화합물의 동시 처리시 키타리병 방제 효과를 나타낸 사진이다.
- 도 9 는 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주 단독 처리, 규소화합물 단독 처리, JBRS159 균주 및 규소화합물의 동시 처리시 애기장대의 생체중과 결뿌리 수의 변화를 비교한 그래프이다.
- 도 10 은 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주 단독 처리, 규소화합물 단독 처리, JBRS159 균주 및 규소화합물의 동시 처리시 벼의 생체중과 건조중을 비교한 그래프이다.
- 도 11 은 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주 단독 처리, 규소화합물 단독 처리, JBRS159 균주 및 규소화합물의 동시 처리시 벼의 생육상태를 나타낸 사진이다.

도 12 는 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159 균주의 사이드로포어(siderophore) 생산능 (도 12A), 인산 가용화능 (도12B), 규소 가용화능 (도 12C) 및 프로테아제 생성능 (도 12D) 실험 결과를 나타낸 사진이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0024] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 다만, 이는 예시로서 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되는 것은 아니며, 본 발명은 후술할 청구범위의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0025] 벼가 세균벼알마름균에 감염되어 세균벼알마름병에 걸리면, 벼 종자가 발아하지 못하고 부패증상을 보이거나, 잎이 전개되지 못하고 엽초가 갈변되며 생장이 불량하여 죽게 된다. 상기 균은 종자에서 월동하여 침종시 건전 종자로 전염되고, 벼짚 등에서 월동하여 다음 해 포장의 전염원이 된다. 그리고, 벼가 키다리병균에 감염되어 키다리병에 걸리면, 키다리병균이 벼 종자가 발아하면서 분비하는 영양원을 이용하여 쉽게 증식하고 지베렐린을 분비하여 육묘기에 벼의 키가 정상보다 1.5 배 이상 웃자라는 증상을 보인 후 1~2주 내에 위축되면서 말라 죽게 된다. 키다리병 또한 종자 전염되는 벼 종자 전염병에 해당한다.
- [0026] 세균벼알마름병을 방제하기 위하여 옥솔린산이나 가스가마이신 계통 등의 화학 약제를 사용하거나, 키다리병을 방제하기 위하여 프로클로라즈 등의 화학 약제를 사용할 수 있다. 그러나, 이러한 화학 농약의 사용은 잔류 문제, 독성 문제 등으로 인하여 이를 대체할 수 있는 친환경 방제의 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0027] 이에 따라 본 발명은, 세균벼알마름병, 키다리병 등의 벼 종자 전염병 방제효과를 나타내는 벼 종자 전염병 방제용 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주 (수탁번호:KACC 92494P) 를 제공한다.
- [0028] 상기 JBRS 159 균주는 벼알에서 분리 및 동정하여 얻을 수 있다.
- [0029] 본 발명에서, 상기 벼 종자 전염병은 세균벼알마름병균 (*Burkholderia glumae*) 으로부터 발생하는 세균벼알마름병 및 키다리병원균 (*Gibberella fujikuroi*) 으로부터 발생하는 키다리병 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서, 상기 균주는 서열번호 1 의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0031] [서열번호 1]
- [0032] AGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACGGATGGGAGCTTGCTCCAGACCATCAGCGGCGACGGGTGAGTAACACGTTGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAATCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATAAATCTTCCCTCATGAGGGAAAGCTGAAAAGATGGCATCTCGTATCACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAAGTCCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATCTCCTGACAACCCTAGAGATAGGGGTTCCCTTCGGGGACAGGATGACAGGTGGTGCATGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTTAAGCGAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCCGATTGACGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCGAAGTCCGTTGGGTAACCTTTTGAGCCAGCCGCTAAGGTGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT
- [0033] 상기 균주의 전체 염기서열은 NCBI GenBank (Acc. No. JAQZDS00000000)의 gene locus tag No. PUS82\_04120에서 확인할 수 있고, 16S rRNA의 염기서열은 서열번호 1과 같다.
- [0034] 본 발명은 또한, 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주 (수탁번호:KACC 92494P), 이의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 벼 종자 전염병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 명세서에서 “배양물” 은 세균을 배지에 접종하고 일정시간 배양하여 얻은 결과물 또는 이를 물리적 방법으로 여과한 것이다.

- [0036] 본 발명에서, 상기 조성물은 규소 화합물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서, 상기 규소 화합물은 규산칼륨( $K_2SiO_3$ ) 또는 규소나노입자 ( $SiO_2$ ) 일 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또한, 상기 벼 종자 전염병 방제용 조성물을 벼 종자 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 벼 종자 전염병 방제방법이 제공된다.
- [0040] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] **[실시예 1] 세균 벼알마름병균을 접종한 이병종자 제작**
- [0043] 이병 종자를 인위적으로 만들기 위하여 선행문헌 (Fang, Y., Xu, L.H., Tian, W.X., Huai, Y., Yu, S.H., Lou, M.M., Xie, G.L., 2009. Real-time Fluorescence PCR Method for Detection of *Burkholderia glumae* from Rice. *Rice Sci.* 16, 157-160.) 의 방법을 약간 변경하여 사용하였다. 먼저, 건전한 벼 종자만을 선별하여 2% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)을 이용해 2분 동안 표면소독한 후 증류수로 3회 세척하였다. 한편, 세균벼알마름병균 (*B. glumae*)은 LB broth에 28°C에서 24시간동안 180 rpm으로 진탕 배양 후 0.2% 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC)를 첨가한 멸균 증류수에  $1 \times 10^8$  CFU/mL로 농도를 희석하였다. 앞서 표면소독한 종자를 세균벼알마름병 현탁액에 넣은 후 (10g/100ml), 25°C와 150 rpm에서 12시간동안 배양하여 세균 세포가 종자에 붙도록 한 다음 종자들을 12시간 동안 상온에서 건조하여 방제효과 조사에 사용하였다.
- [0045] **[실시예 2] 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주의 분리 및 동정**
- [0046] 벼 포장에서 근권(rhizosphere) 토양을 채취하여 10배액의 멸균 증류수에 넣고, 180 rpm, 28°C에서 10분간 진탕한 후 현탁액을 10진 희석하여 LB에 도달한 후 24시간 동안 28°C에서 배양하였다. 여기서 자라난 콜로니를 새로운 LB배지에 계대배양한 다음 20% glycerol이 함유된 LB배지에 넣어 -70°C에 보관하면서 필요에 따라 실험에 사용하였다. 전 염기서열을 분석한 후 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) CfJBRS159로 동정하였다. 전 염기서열은 NCBI (Acc. No. JAQZDS000000000)에 등록하였으며, 균주는 농촌진흥청 국립농업과학원 씨앗은행 (Korean Agricultural Culture Collection; KACC)에 기탁 (균주번호 KACC 92494P)하였다.
- [0048] **실험예 1. 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주의 세균벼알마름병 방제효과 확인 시험**
- [0049] CfJBRS159 균주의 세균벼알마름병에 대한 방제효과를 조사하기 위하여 CfJBRS159균주를 LB broth에 넣어 28°C에서 24시간 동안 배양한 후 얻은 세포를 방제효과 검정에 사용하였다. 실시예 1 에서 세균벼알마름병균을 접종하여 만든 이병종자를 CfJBRS159 현탁액 ( $1 \times 10^6$ ,  $10^7$  및  $10^8$  CFU/ml)에 넣은 다음(10 g/100 ml), 28°C, 100 rpm에서 1시간동안 배양하여 이병종자의 표면에 세균이 잘 부착될 수 있도록 처리한 후 벼 육묘용 상토 (Pungnong, Korea)를 담은 포트에 파종하였다. 각각의 포트는 식물생장림 (light/dark, 16/8 hr, 28°C)에서 재배하면서, 매일 동일량의 물을 공급하였다. 균을 처리하지 않고 CMC만을 넣은 증류수에 처리한 종자를 대조구로 사용하였고, 세균벼알마름병 방제에 사용되고 있는 프로클로라즈-코퍼 클로라이드-테부코나졸 현탁액(Prochloraz-copper chloride-tebuconazole suspension)을 화학방제 대조구로 하여 비교하였다. 파종 21일 후 발병율은 0 = 무발병, 1 = 연노랑잎, 2 = 심한 황화 및 위축, 3 = 발아 후 고사한 유묘, 4 = 발아하지 못한 종자로 구분하여 조사한 후 다음과 같은 식을 이용하여 산출하였다; 발병지수 =  $(0n_0 + 1n_1 + 3n_2 + 5n_3 + 7n_4)/7N \times 100$ . 이 식에서  $n_{0-4}$ 는 각각의 발병정도 (0 to 4) 를 보이는 잎의 수를 나타내고, N은 조사한 총 유묘의 수를 나타낸다.
- [0050] 균주의 최적 처리농도를 찾기 위하여 인위적으로 병원균을 접종한 종자에 CfJBRS159균을  $1 \times 10^6$ ,  $10^7$  및  $10^8$  CFU/ml 농도로 처리하고, 증류수만으로 처리한 종자와 프로클로라즈-코퍼 클로라이드-테부코나졸 (prochloraz-copper chloride-tebuconazole) 액상수화제로 처리한 종자를 각각 무처리 및 화학제처리 대조구로 하여 비교한 결과, 일반적으로 처리 농도를  $1 \times 10^8$  CFU/ml까지 높여줄수록 방제효과가 증가하는 경향이었는데, CfJBRS159을

$1 \times 10^6$ ,  $10^7$  및  $10^8$  CFU/ml의 농도로 처리하였을 경우 발병지수는 각각 46.7%, 43.3% 및 26.7%로 병원균만을 처리한 구 (58.0%)에 비해 낮은 것을 확인하였다 (도 1). 한편, 프로클로라즈-코퍼 클로라이드-테부코나졸 (prochloraz-copper chloride-tebuconazole) 액상수화제를 처리한 경우에는 발병지수가 8.0%이었다. 상기 실험 결과에 의하면, CfJBRS159균주의 세균벼알마름병 방제효과가 비교적 우수하며,  $1 \times 10^8$  CFU/ml 농도를 처리하는 경우, 가장 큰 방제효과를 나타냈다.

[0052] **실험예 2. 규소 화합물의 세균벼알마름병 방제효과 확인 시험**

[0053] 수용성의 규산칼륨 (potassium silicate,  $K_2SiO_3$ ; Samchun chemicals, Seoul, South Korea) 용액과 이산화규소 나노입자 ( $SiO_2$  nanoparticle, <50 nm; Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 규소의 세균벼알마름병에 대한 영향을 조사하였다. 먼저, 방제에 적절한 농도를 확인하기 위하여 각각의 규소 현탁액 (50mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L 및 400 mg/L)에 실시예 1 의 이병종자를 넣어 (5 g / 20 ml) 4시간 동안 처리하였다. 처리한 종자를 멸균된 여과지 위에 놓고 약 15-20분 동안 건조시켰다. 이 종자를 육묘용 상토 (Pungnong Co, Korea)가 담긴 포트에 넣고, 식물생장룸 (light/dark, 16/8 hr, 27°C)에서 재배하면서, 매일 동일량의 물을 공급하였다. 균을 처리하지 않은 증류수만을 처리한 종자를 대조구로 사용하였고, 프로클로라즈-코퍼 클로라이드-트리사이클라졸 (prochloraz-copper chloride-tricyclazol)을 처리한 것을 화학약제 처리구로 하여 비교하였다. 파종 21일 후 발병율은 실험예 1 과 같은 방식으로 조사한 후 방제효과를 조사하였다. 처리당 100개의 종자 (100종자/포트)를 이용해 3반복으로 2회 실험하였다.

[0054] 규산칼륨과 이산화규소나노입자의 현탁액을 이용해 세균벼알마름병 방제효과를 조사한 결과, 규산칼륨이나 이산화규소나노입자 모두 50 mg/L의 농도로 처리하였을 경우에는 방제효과가 없었으나, 100 mg/L의 규산칼륨이나 이산화규소나노입자를 처리하면 무처리에 비해 세균벼알마름병의 발병이 유의성 있는 낮아지는 것을 확인할 수 있었고, 이산화규소나노입자를 처리하였을 경우 방제효과뿐만 아니라 생육도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (도 2 및 도 3). 한편, 규산칼륨이나 이산화규소나노입자의 세균벼알마름병 방제효과는 400 mg/L 농도까지 100 mg/L의 방제효과와 유사한 정도로 발현되었으며, 각각의 화합물을 200 mg/L 이상의 농도로 처리하면 벼의 생육이 약간 늦어지는 것을 확인하였다.

[0056] **실험예 3. 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주와 규소 화합물의 동시 처리시 세균벼알마름병 방제효과 확인 시험**

[0057] 균주와 규소화합물의 동시처리 효과를 확인하기 위하여 규산칼륨 또는 이산화규소나노입자를 최종 100 mg/L이 되도록 각각의 세균 현탁액에 넣고 실험예 1과 동일하게 처리하였다. 재배 21일 후 발병정도를 세균, 규산칼륨, 또는 이산화규소나노입자를 단독으로 처리한 것과 비교하였다.

[0058] 균주와 규소화합물을 동시에 처리할 경우의 세균벼알마름병 방제 효과를 확인하기 위하여 규산칼륨 또는 이산화규소나노입자를 각각의 세균 현탁액에 넣고 이병종자에 처리하고, 재배 21일 후 발병정도를 세균, 규산칼륨, 또는 이산화규소나노입자를 단독으로 처리한 것과 비교한 결과, 병원균만을 처리한 무처리에서의 발병율은 65.3%였으며, 프로클로라즈 코퍼 클로라이드-테부코나졸 액상수화제를 처리하였을 경우에는 11.3%였고, 세균, 규산칼륨, 또는 이산화규소나노입자를 단독으로 처리한 경우 발병율은 각각 23.5%, 32.0% 및 32.8%였고, CfJBRS159 현탁액에 규산칼륨 또는 이산화규소나노입자를 혼합하였을 경우의 발병율은 각각 21.0% 및 22.5%였다 (도 5 및 도 6). 결과적으로, CfJBRS159 균주에 규소화합물을 혼합하여 처리하였을 때 세균벼알마름병 방제효과가 증가하였다.

[0060] **실험예 4. 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주와 규소 화합물의 키다리병 방제효과 확인 시험**

[0061] 인위적으로 키다리병원균을 접종한 종자를 만들기 위하여 포테이토 수크로스 브로쓰 (potato sucrose broth)를 넣은 삼각플라스크에 키다리병원균(*Gibberella fujikuroi*)을 접종하고, 25° C, 120 rpm에서 4~5일간 배양하였다 이 배양액을 두 겹의 거즈로 걸러서 키다리병원균 포자를 모은 후에 1,600g에서 10분간 원심분리한 후 포자농도를  $10^5$  spores/ml로 조절하고, 포자 현탁액 10ml에 5g의 벼알 (약 120개)을 담고 진공하에서 1시간 처리하였



다. 이렇게 인위적으로 병원균을 접종한 종자를 실험에 사용하였고 증류수만을 처리한 것을 무처리로 하여 비교하였다. 인위적으로 감염시킨 종자를 앞에서와 같이 배양한 후 만든 CfJBRS159 현탁액(10 ml)에 규산칼륨 또는 이산화규소나노입자의 농도가 최종 100 mg/L이 되도록 첨가한 것 또는 균, 규산칼륨 또는 이산화규소나노입자를 단독으로 만든 현탁액에 실험에 1 에서와 같은 방법으로 이병종자를 침지하여 방제효과 검정에 사용하였다. 멸균증류수 또는 플루디옥소닐(fludioxonil) 분산성 액제로 처리한 종자를 무처리 대조구 또는 화학농약처리 처리구로 하여 방제효과를 비교하였는데, 처리한 각각의 종자를 15° C에서 24시간 배양한 후에 30° C에서 24시간 배양하여 발아가 촉진되도록 하였다. 이들 종자를 육묘용 상토를 넣은 포트에 파종한 다음 30° C, 100% 상대습도에서 3일간 배양한 후 온실에서 재배양하면서 키다리병 발병율을 조사하였다.

[0062] 벼 종자전염병균으로 피해가 큰 진균병인 키다리병의 방제가능 여부를 CfJBRS159균과 규소 화합물을 이용해 조사한 결과, CfJBRS159균 또는 규산칼륨을 처리하였을 경우 키다리병의 발생율이 각각 35.6% 및 38.8%로서 무처리(53.2%)에 비해 유의성 있는 감소효과를 나타내었다(도 7 및 도 8). 한편, CfJBRS159균에 규산칼륨을 혼합하였을 경우 발병율이 32.2%로 감소하여 단독으로 처리하였을 경우보다 방제효과가 증가하였다.

[0064] **시험예 5. 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주와 규소 화합물의 애기장대 생육 촉진 효과 확인 시험**

[0065] CfJBRS159균주와 규산칼륨 또는 이산화규소나노입자가 애기장대의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 표면 소독한 *A. thaliana* Col-0종자를 0.2% sterilized CMC가 첨가된 세균 현탁액( $1 \times 10^8$  CFU/ml)에 각각의 규소 용액(100 mg/L)을 혼합한 후 150 rpm에서 30분간 흔들어 주면서 처리하였다. 이들 종자를 멸균 필터에 올려 놓고, 상온(25° C)에서 30분간 표면이 마르도록 하였다. 이와 같이 처리한 종자를 패트리 디시(Petri dish)에 1.5% 수크로오스와 0.8% (w/v) 아가(agar)를 넣은 50% Murashige and Skoog (1/2MS)용액을 넣어 굳힌 배지의 표면에 파종하였다. 종자를 치상한 플레이트를 파라필름으로 밀봉한 후 약 70°의 각도로 식물생장상에 놓고,  $23 \pm 1^\circ$  C 및 광주조건(16-h light/8-h dark)에서 배양하였다. 배양 10일 후에 뿌리와 줄기의 길이를 측정하였다. 한편, 멸균증류수(0.2% CMC)에 처리한 종자를 대조구로 사용하였다. 실험은 5개의 종자를 함유한 3개의 플레이트(plate)를 대상으로 하여 3반복으로 조사하였다. 생육도(vigor index)는 다음 식, (뿌리 길이 평균 + 줄기 길이 평균) × 발아율(%)로 계산하였다. 한편, 표면 소독한 벼 종자를 0.2% sterilized CMC가 첨가된 CfJBRS159 및 규소화합물 현탁액에 넣어 위에서와 같이 처리하여 식물생장실에서 재배하였다. 균을 처리하지 않고 CMC만을 넣은 증류수에 처리한 종자를 대조구로 사용하였고, 식물의 배양한 21일 후에 벼 유묘의 생육 정도(생체중, 건조중)를 조사하였다.

[0066] 식물의 생육에 대한 영향을 조사하기 위하여 각각의 CfJBRS159균주, 규산칼륨과 이산화규소나노입자 또는 균주와 각각의 규소화합물을 혼합하여 애기장대에 처리한 후 생육정도를 조사한 결과, 균주 또는 규산칼륨이나 이산화규소나노입자(100 mg/L)를 처리하였을 경우 무처리에 비해 애기장대의 생체중이 유의성 있게 증가하였고, 균주에 각각의 규소화합물을 혼합하여 처리하면 애기장대의 생체중이 무처리에 비해 증가하나 각각을 단독으로 처리한 것에 비해 유의성 있게 증가하지는 않았다(도 9 및 도 10). 결뿌리의 숫자도 균주와 규소화합물을 처리하면 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. CfJBRS159균주와 규산칼륨을 동시에 처리하면 결뿌리의 수가 2배 이상 증가하였으며, 뿌리가 훨씬 많고, 건강하게 자라는 것을 확인할 수 있었다(도 11).

[0067] CfJBRS159균주, 규산칼륨 또는 이산화규소나노입자를 처리하면 벼의 생체중과 건조중이 무처리에 비해 유의성 있게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, CfJBRS159균주에 규산칼륨 또는 이산화규소나노입자를 혼합하여 처리하면, 단독으로 처리한 것에 비해 생체중이 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, 건조중은 혼합처리와 균 단독처리간의 건조중에는 큰 차이가 없었다. 균주와 규산칼륨을 혼합하여 처리하면, 벼의 생육이 월등히 증가한 것을 확인하였다.

[0069] **시험예 6. 사이토바실러스 퍼머스 (*Cytobacillus firmus*) JBRS159균주의 사이드로포어 생산능, 인산 가용화, 규소 가용화, 프로테아제 생산능 확인 시험**

[0070] 사이드로포어(Siderophore) 생산 조사: CfJBRS159균주의 siderophore 생산능은 변형된 chrome azurol S (CAS) 한천배지 방법(Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160, 47-56.)을 이용하여 조사하였다. 간략히 서술하면, LB 액체 배지에 밤새 배양한 균 배양액(20 µl)을 CAS plate위에 올려놓은 페이퍼 디스크(paper disk)에 접종한

다음 30° C에서 4일간 배양한 후 오렌지색을 나타내는 균주를 siderophore를 생산하는 균주로 간주하였다.

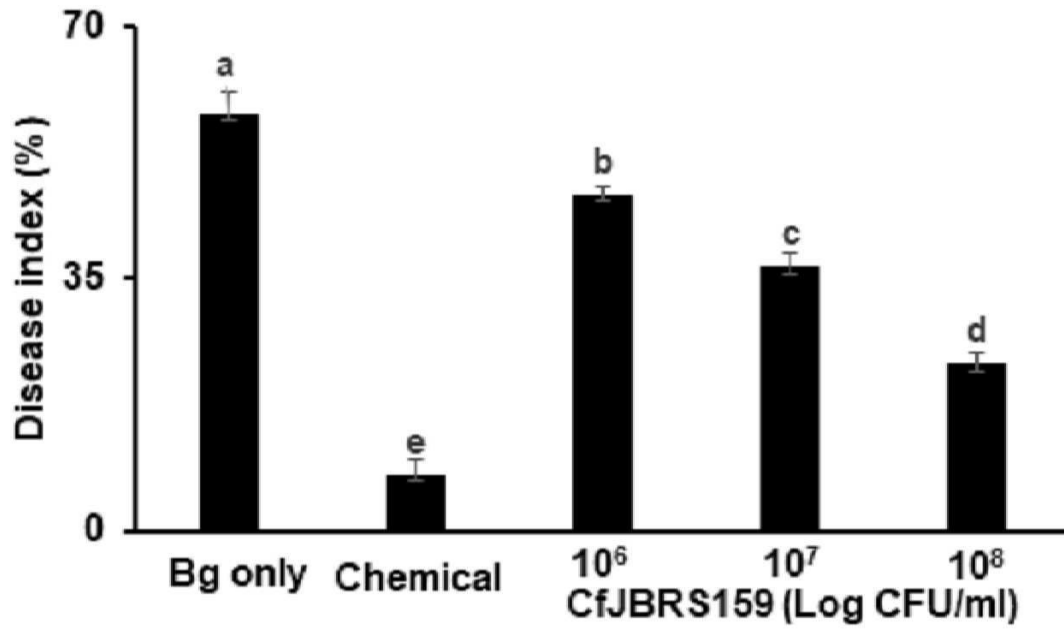
- [0071] 인산 가용화 검정 : 미생물의 인산가용화 능력은 Pikovskaya's 한천 배지 (Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activities by some microbial species. Microbiologia 17, 362-370.)에 접종하여 측정하였는데, 미생물을 접종한 후 28° C에서 3일간 배양한 다음 콜로니 주변에 투명대를 형성한 것을 인산가용화 능력이 있는 것으로 평가하였다.
- [0072] 규소 가용화 검정: 미생물의 규소가용능력은 glucose agar medium을 이용하여 조사하였다 (Lee, K.-E., Adhikari, A., Kang, S.-M., You, Y.-H., Joo, G.-J., Kim, J.-H., Kim, S.-J., Lee, I.- J., 2019. Isolation and characterization of the high silicate and phosphate solubilizing novel strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that promotes growth in rice plants. Agronomy 9, 144.). 먼저, glucose agar medium에 미생물을 접종한 뒤 28° C에서 3일간 배양한 후 콜로니 주변에 투명대를 형성한다면 규소가용능력이 있는 것으로 판단하였다.
- [0073] 프로테아제(Protease) 생산성 검정: Protease 생산 여부는 스킴 밀크 아가(skim milk agar)를 이용하여 조사하였다(Smibert, R.M., Krieg, N.R., 1994. Phenotypic characterization, in: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds), Methods for general and molecular bacteriology. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 607-654.). 밤새 배양한 세균 세포를 배지위에 눌러 놓은 paper disk에 점적하고, 콜로니 주변의 투명대 형성여부로 확인하였다.
- [0074] 균주의 식물 생육촉진 및 병 방제에 대한 기작을 보다 자세히 이해하기 위하여 CfJBRS159의 식물 생육촉진 및 병 방제효과와 관련된 여러 특성을 조사한 결과, CfJBRS159균은 CAS배지와 스킴 밀크 아가(skim milk agar)배지에서 생육을 통해 각각 사이드로포어(siderophore)와 프로테아제(protease)를 생산하는 것을 확인할 수 있었고, hydrogen cyanide (HCN)은 생산하지 않는 것으로 조사되었다. 한편, 인산 용해능은 있었으나, 규소를 가용화하지는 못하는 것으로 확인되었고, 식물호르몬 중에 indole-3-acetic acid (IAA)를 생산하는 것으로 조사되었다 (도 12).
- [0076] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

**수탁번호**

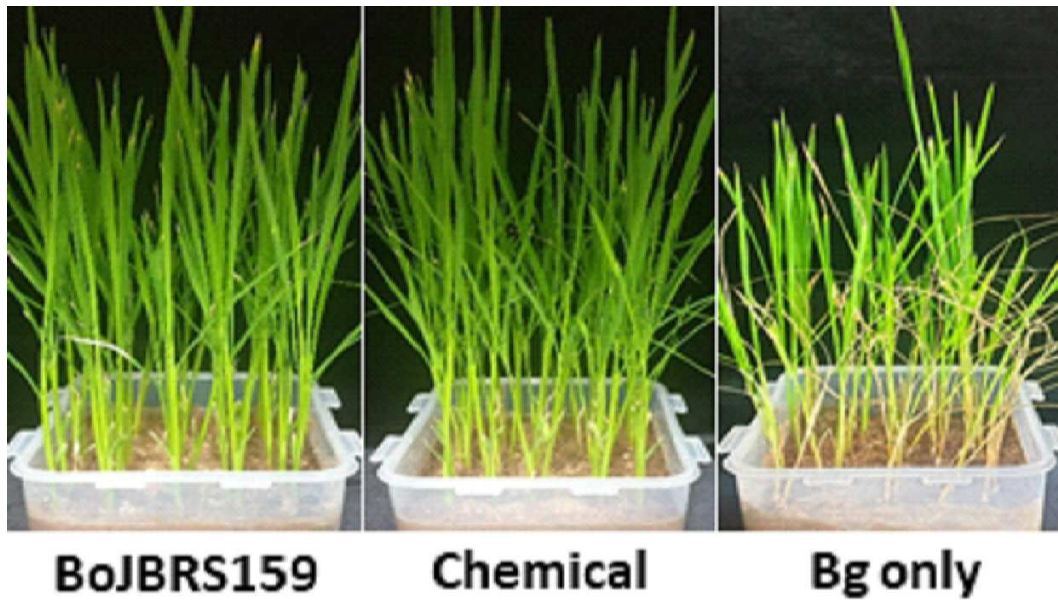
- [0080] 기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)
- 수탁번호 : KACC92494P
- 수탁일자 : 20230222

도면

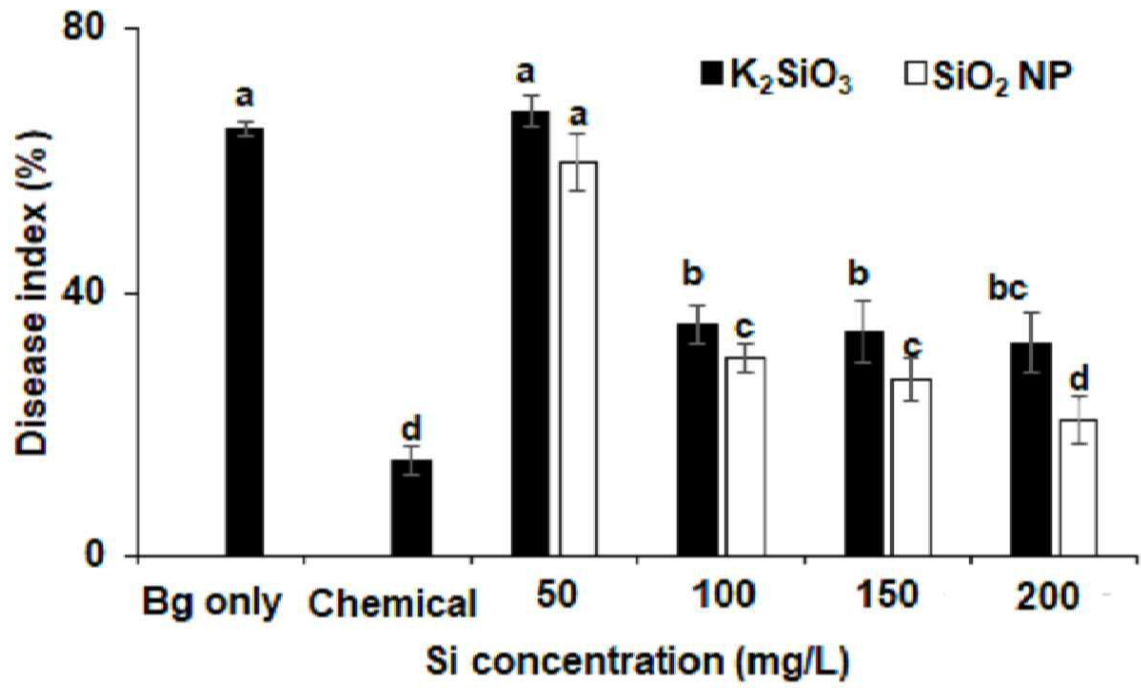
도면1



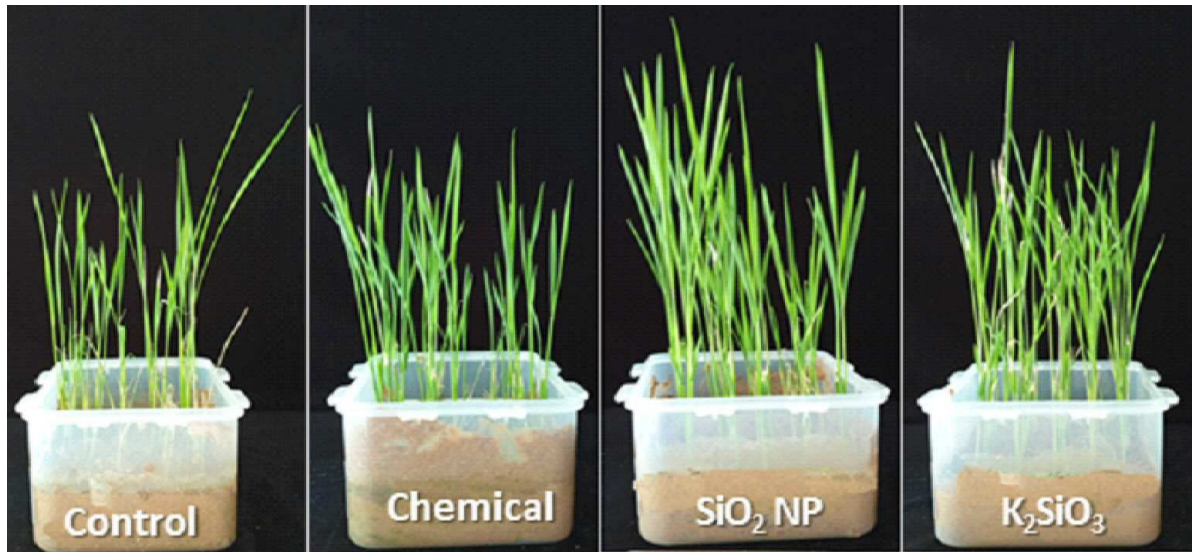
도면2



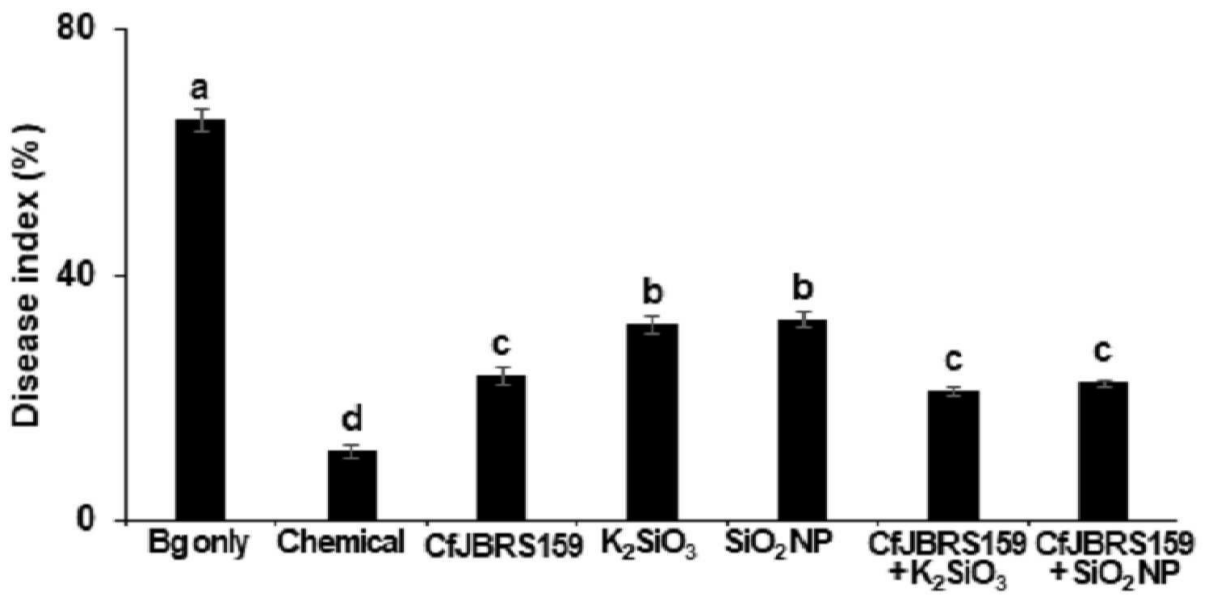
도면3



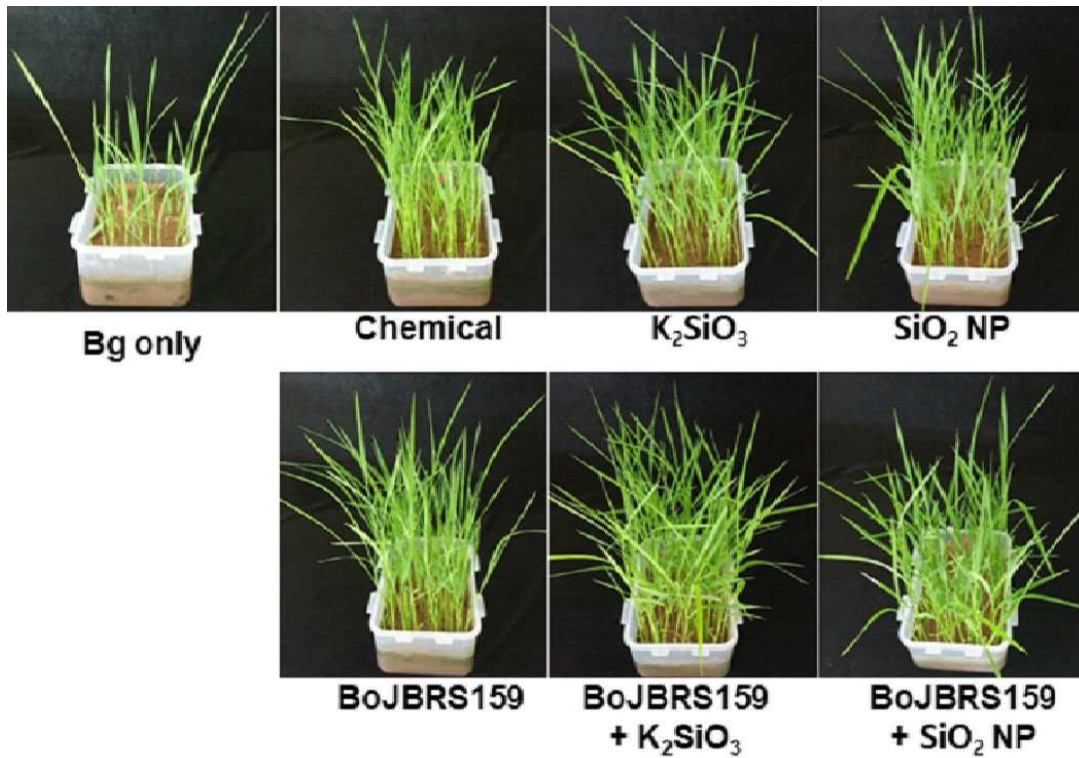
도면4



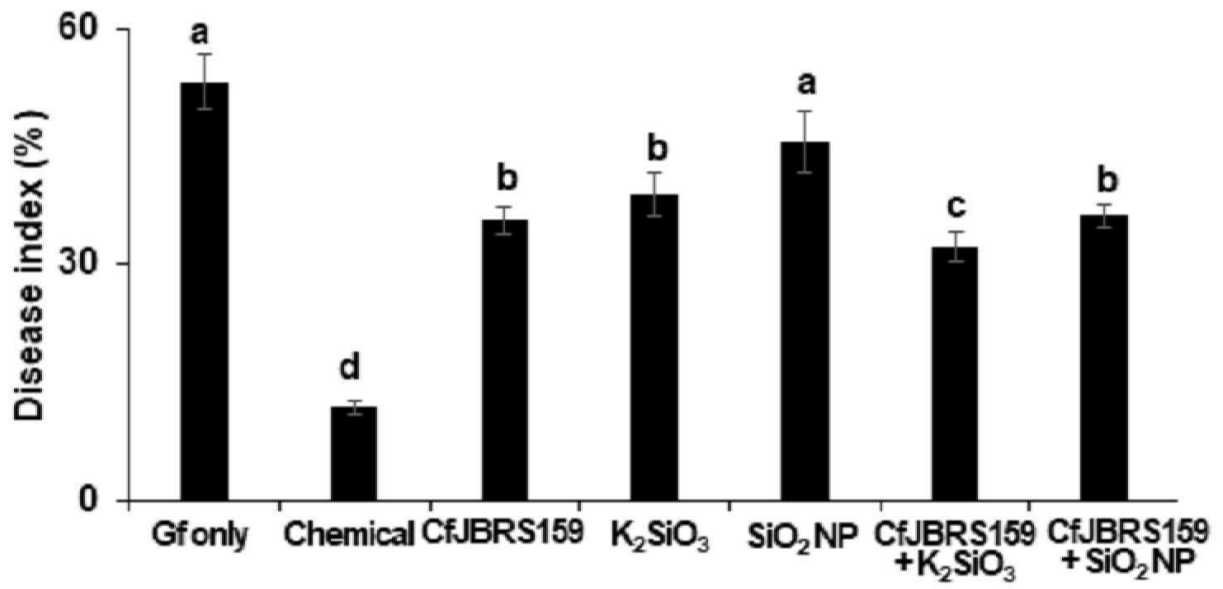
도면5



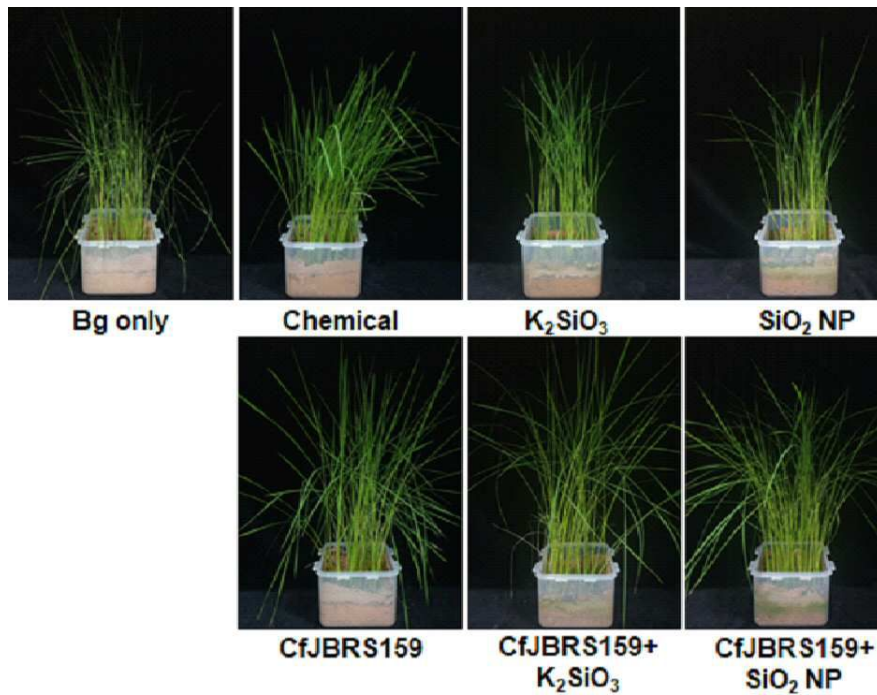
도면6



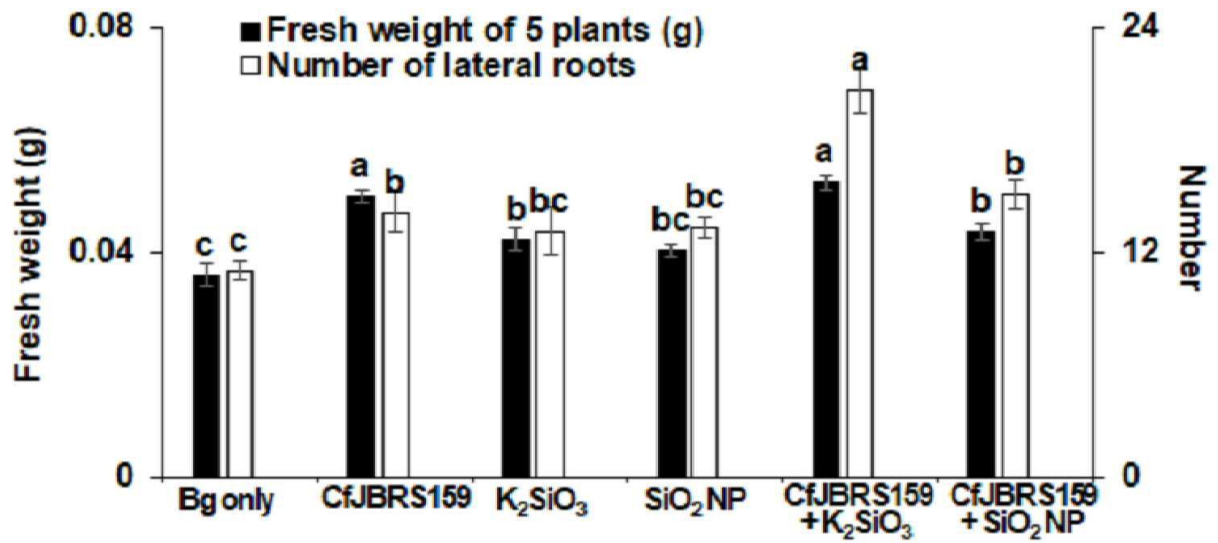
도면7



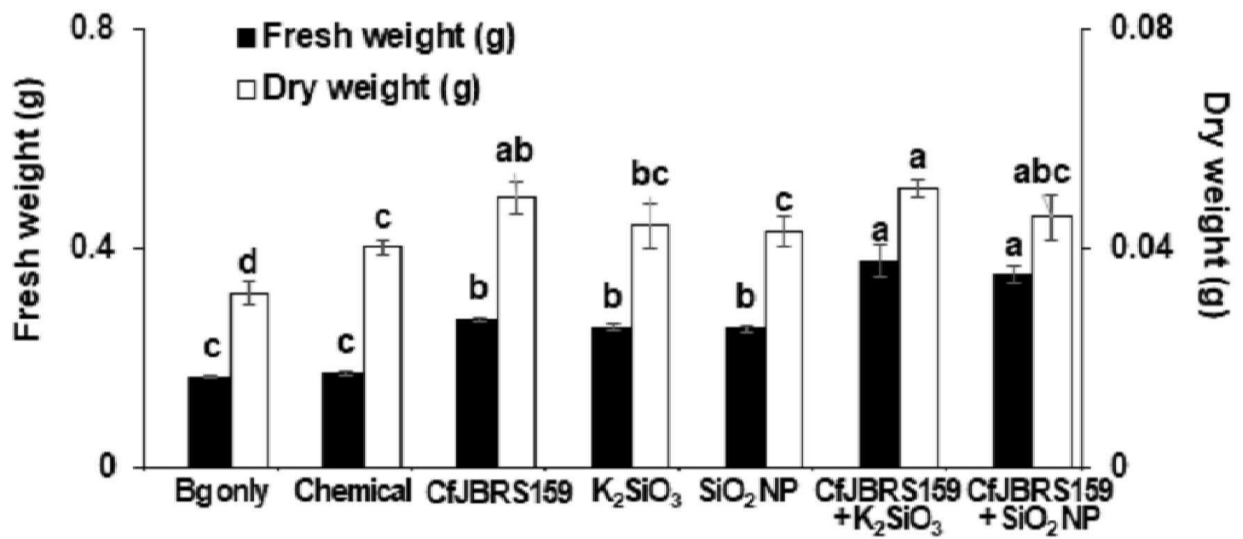
도면8



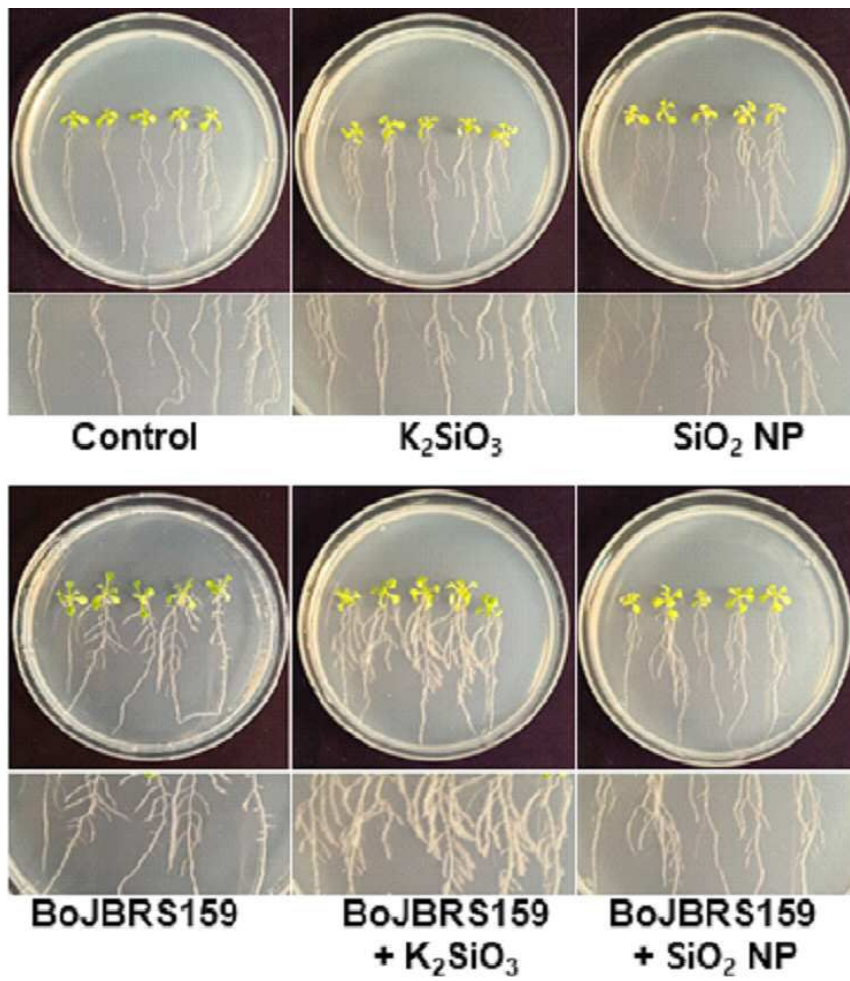
도면9



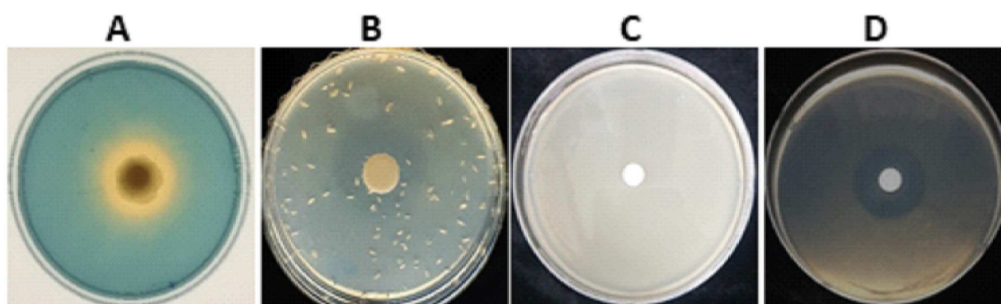
도면10



도면11



도면12





서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.