



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년10월08일
(11) 등록번호 10-0986653
(24) 등록일자 2010년10월04일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
C12R 1/38 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0028677
(22) 출원일자 2010년03월30일
심사청구일자 2010년03월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020010072767 A
KR1020010038285 A*
KR1020090105159 A
US6495362 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
정우일
경기 부천시 원미구 중1동 포도마을아파트 830동 404호
(72) 발명자
정우일
경기 부천시 원미구 중1동 포도마을아파트 830동 404호
(74) 대리인
백경업

전체 청구항 수 : 총 3 항

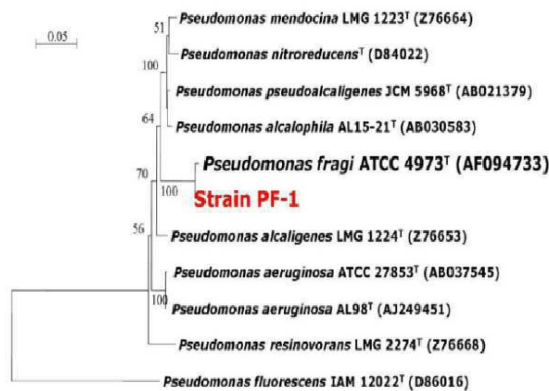
심사관 : 김민정

(54) 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주를 이용한 식물병 방제제

(57) 요약

본 발명은 작물에 발생하는 균핵병을 효과적으로 방제할 수 있는 슈도모나스 속 미생물 균주를 토양으로부터 분리하고, 슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas sp.* PF-1, 미생물기탁번호 KACC91536P)로 명명하였다. 상기 슈도모나스 에스피 피에프-1을 이용한 본 발명의 미생물제제는 딸기, 상추, 수박을 비롯한 여러 작물의 식물병에 대해 방제효과가 우수하며, 기존의 화학농약이 가지고 있는 잔류 독성, 환경 유해 등의 문제점을 해결할 수 있기 때문에 친환경 농가에 유용하게 적용할 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

마늘, 딸기 및 수박으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 식물에 대한 스크레로티움 세피보룸(*Sclerotium cepivorum*), 피시움 미리오틸룸(*Pythium myriotylum*) 및 스파에로테카 마쿠라(*Sphaerotheca macular*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 식물 병원균을 방제할 수 있는 슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas sp. PF-1*, 미생물기탁번호 KACC91536P).

청구항 2

슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas sp. PF-1*, 미생물기탁번호 KACC91536P) 균주의 균체 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 마늘, 딸기 및 수박으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 식물에 대한 스크레로티움 세피보룸(*Sclerotium cepivorum*), 피시움 미리오틸룸(*Pythium myriotylum*) 및 스파에로테카 마쿠라(*Sphaerotheca macular*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 식물 병원균의 방제를 위한 미생물 제제.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항의 균주 또는 제 2 항의 미생물 제제를 마늘, 딸기 및 수박으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 식물에 처리하여 스크레로티움 세피보룸(*Sclerotium cepivorum*), 피시움 미리오틸룸(*Pythium myriotylum*) 및 스파에로테카 마쿠라(*Sphaerotheca macular*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 식물 병원균을 방제하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 토양에서 분리한 슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas sp. PF-1*, 미생물기탁번호 KACC91536P)균주와 이를 배양한 배양물을 이용한 식물병 방제제에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 식물의 병해충에 대한 방제방법은 크게 유기합성 방제제 등을 이용한 화학적 방제법과 천적 등을 이용한 생물학적 방제법으로 나눌 수 있다. 1900년대 초부터 사용하기 시작한 유기합성 방제제는 근래까지 작물보호의 수단으로서 매우 유효하게 사용되어 식량 생산의 증대, 노동력 절감 등에 크게 기여하였다. 그러나 최근들어, 선진국을 중심으로 농식품의 안전성, 생태계의 환경 악화 등이 크게 인식되면서 친환경적 작물 생산에 관한 관심이 높아짐에 따라 이러한 합성 방제제에 대한 사회적 환경은 매우 엄격해지고 있다.

[0003] 따라서, 최근에는 식물병의 생물학적 방제에 대한 관심이 증대되고 있다. 생물학적 방제는 소비자의 안전한 농산물 요구증대에 부응하여 환경에 유해한 화학적 농약을 사용하는 대신에 미생물 또는 식물 추출물을 이용하여 환경, 다른 식물 및 인축에는 영향을 미치지 않으면서 대상 병을 선택적으로 방제한다. 이로 인해, 미생물 살균제를 이용한 친환경 농업을 추구하는 재배농가들이 급속히 증가하는 추세이고 효율적이며 보다 안전한 농산물

생산을 위한 방제기술 개발이 요구되고 있다(Dennis와 Davis, 1979; Hunter 등, 1987; Katan, 1980; Kim 등, 1995).

[0004] 국내에 보고된 딸기, 상추, 수박 등의 식물병은 방제가 까다로우면서도 그 효과가 그다지 높지 않다. 또한 방제 비용도 비싸고 반복적으로 사용할 때는 약제에 대한 저항성도 발생할 수 있다. 또한 화학농약 자체가 사람과 동물에게 유해하기 때문에 농약 잔류 문제 등의 문제점을 가지고 있다(Asari, et al., 1994; Erikson et al., 1998). 특히, 상추의 경우는 싹 등으로 이용되고 있기 때문에 소비자로부터 농약에 대한 안전성 문제가 계속 대두되고 있고 이로 인해 화학농약의 사용도 회피되고 있어 농가에서 많은 어려움을 겪고 있다.

[0005] 이를 위해 본 발명에서는 국내 부존자원인 유용 미생물을 분리, 선발, 이용하여 식물병원균의 발생을 억제함으로써 안전하고 품질이 좋은 딸기, 상추, 수박을 비롯한 작물들을 생산하고자 한다. 본 발명의 신규한 슈도모나스 에스피 피에프-1 (*Pseudomonas sp.* PF-1) 균주는 여러 식물 병원균의 성장 억제효과가 우수하며 화학농약을 대체할 수 있는 미생물로서, 잔류농약으로 인한 농업 생태계 문제점을 방지하고 친환경적 방제에 효과적으로 이용할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 식물 병원균에 대해 항균활성을 갖는 슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas sp.* PF-1, 미생물기탁번호 KACC91536P) 균주를 이용하여 환경 친화적으로 여러 가지 식물 병원균을 방제하는 미생물 제제를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 슈도모나스 에스피 피에프-1을 이용한 식물병 방제제와 방제 방법을 그 구성으로 한다.

[0008] 먼저 토양에서 균주를 분리하여, 생물검정을 통하여 식물병 진진 억제 효과가 우수한 균주를 선발하고 이 후에 형태적, 생리 생화학적 특성 및 DNA 프로파일(profiles) 비교 등을 통하여 균주를 동정하였고 상기 균주는 슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas sp.* PF-1, 미생물기탁번호 KACC91536P)으로 동정되었다.

[0009] 본 발명은 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주의 배양조건을 제공한다. 산업적 사용을 위해서는 상기 균주를 단시간 내에 대량으로 배양할 수 있는 방법이 필수적이다. 본 발명의 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주는 배양 배지로서 NA(Nutrient agar) 배지 상에서 잘 자라며, 15~37℃ 온도범위에서 생육이 가능하고, 생육 pH 범위는 5.0~7.5이고, 배양시간은 72시간에서 잘 자란다.

[0010] 본 발명은 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주를 이용한 식물 병원균 방제제 및 이를 이용한 식물 병원균의 방제 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주를 이용하여 방제할 수 있는 처리 대상균은 스크레로티움 세피보룸(*Sclerotium cepivorum*), 피시움 미리오틸룸(*Pythium myriotylum*), 콜레토티리움 글로에스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 파이토포thora 캡시시(*Phytophthora capsici*), 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*), 스크레로티니아 스크레로티오룸(*Sclerotinia sclerotiorum*), 스파에로테카 마쿠라(*Sphaerotheca macular*), 후사리움 옥시스포룸 프라가리에(*Fusarium oxysporum f. sp. fragariae*) 등이 해당된다. 상기 균주들은 딸기, 상추, 수박, 오이, 마늘, 배추, 고추를 비롯한 식물의 잿빛곰팡이병, 흰가루병, 시들음병, 탄저병, 역병, 균핵병, 흑색썩음균핵병, 뿌리썩음병을 비롯한 다양한 식물병을 유발한다.

[0012] 본 발명의 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주는 상기 식물 병원균의 생육을 저지하여 방제할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 이상에서 상세히 설명한 바와 같이 본 발명에 따른 신규 슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas sp.* PF-1, 미생물기탁번호 KACC91536P) 균주를 이용한 미생물 제제는 딸기, 상추, 수박을 비롯한 여러 작물의 식물 병원균들을 효과적으로 방제할 수 있었다.

[0014] 또한 안전한 농산물을 생산가능하게 함으로써 농가의 소득증대 및 소비자의 농약에 대한 문제 제기를 불식시키고 화학농약의 사용을 절감하거나 대체할 수 있기 때문에 환경오염을 줄일 수 있다.

[0015] 따라서 본 발명은 재배 중에 발생하는 각종 채소류의 균핵병 등에 대한 생물농약으로서 기능할 수 있어 농약 잔

류로 인한 문제점을 방지할 수 있고, 농업 생태계 보전과 병해 종합방제를 위한 획기적인 생물학적 방제방법을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주를 NA(Nutrient Agar)배지에 배양하였을 때의 콜로니 사진이다.
- 도 2는 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주의 16S rDNA gene의 염기서열이다.
- 도 3은 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주의 16S rDNA gene의 계통학적 위치를 나타내는 서식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하에서는 본 발명에 따른 슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas sp.* PF-1, 미생물기탁번호 KACC91536P)를 이용한 미생물 제제 및 이용방법의 바람직한 실시예를 참고하여 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 구체적으로 설명하고자 하는 것으로, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0018] <실시예 1 : 길항미생물의 분리 및 항균 활성 측정>

[0019] 본 발명의 길항미생물은 토양에서 분리하였다. 미생물의 분리를 위해 토양 시료를 잘 혼합한 후 멸균수에 희석하여 NA(Nutrient agar) 배지에 희석평판법으로 미생물을 분리하여 27℃에서 5일간 배양하였다. 이곳에서 분리된 세균을 NA 배지로 옮겨 순수분리하여 보관 후, 한천확산법(Paper disc method)을 이용하여 주요 식물병원균과 대치배양하여 균사생장을 억제하는 길항 미생물을 선별하였고 그 중 가장 우세한 길항미생물의 길항 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

균사생육저지정도	병 원 균
+	-
++	흑색썩음균핵병(<i>Sclerotium cepivorum</i>), 뿌리썩음병(<i>Pythium myriotylum</i>)
+++	탄저병(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>), 역병(<i>Phytophthora capsici</i>)
++++	갯빛곰팡이병(<i>Botrytis cinerea</i>), 균핵병(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>), 흰가루병(<i>Sphaerotheca macular</i>), 시들음병(<i>Fusarium oxysporum f. sp. fragariae</i>)
주) + : 10mm 이하, ++ : 10.1~20mm, +++ : 20.1~30, ++++ : 30.1mm 이상	

[0020] 표 1은 슈도모나스 에스피 피에프-1의 길항력을 측정한 결과를 나타낸다. 표 1의 결과를 확인하면, 본 발명의 길항미생물은 흑색썩음균핵병, 뿌리썩음병, 탄저병, 역병, 갯빛곰팡이병, 균핵병, 흰가루병, 시들음병에 우수한 항균활성 효과가 있는 것으로 조사되었다.

[0022] 균주의 장기 보관을 위해 상기 길항미생물 슈도모나스 에스피 피에프-1은 NB(Nutrient broth)에서 약 3일간 배양하여 배양액을 멸균된 20% 글리세롤(glycerol) 튜브에 넣고 잘 혼합하여 보존균주를 만들어 -70℃ 냉동고에 저장하였다.

- [0023] <실시예 2 : 길항미생물 슈도모나스 에스피 피에프-1의 16S ribosomal DNA (rDNA) gene 염기서열 분석>
- [0024] 분자생물학적 동정은 DNA를 분리(Benzyl chloride법을 변형한 방법 이용)하여 16S rDNA의 염기서열을 밝혀 계통 분류학적 위치를 확인하였다. 길항미생물 슈도모나스 에스피 피에프-1의 16S rDNA를 증폭하기 위해 27F(5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492r(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 프라이머를 사용하였다. 16S rDNA의 PCR 증폭산물은 PCR Product Purification Kit (Qiagen)를 사용하여 정제하였고, 16S rDNA 유전자의 염기서열은 Genetic analyzer 310A(Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다. 염기서열은 NCBI/Genebank와 Ribosomal Database Project II (RDP II)의 데이터베이스에서 상동성 검색을 수행하고, CLUSTAL X 프로그램 (Thompson et al., 1994) 및 PHYLIP 프로그램(Felsenstein, 1993)을 이용하여 계통학적 위치를 확인하였다. 16S rDNA의 염기서열(도 2 참조)에 기초한 분자계통학적 분석 결과, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 슈도모나스 프라기 ATCC4973(*Pseudomonas fragi* ATCC4973, AF094733)와 99.6%, 슈도모나스 싸이크로필라(*Pseudomonas psychrophila*, AB041885)와 99.4%의 유연관계를 나타내어 슈도모나스 에스피(*Pseudomonas* sp.)임이 확인되었다.(도 3 참조).
- [0025] 상기 결과에 따라, 본 발명의 길항미생물은 슈도모나스 에스피(*Pseudomonas* sp.)로 동정되었고 슈도모나스 에스피 피에프-1(*Pseudomonas* sp. PF-1)으로 명명하여 농촌진흥청 한국농업미생물자원센터에 미생물기탁번호 KACC91536P로 기탁하였다.
- [0026] <실시예 3 : 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주의 딸기 흰가루병 방제효과>
- [0027] 길항미생물 슈도모나스 에스피 피에프-1의 딸기 흰가루병 방제효과를 딸기에서 직접 확인하기 위해 330m²의 비닐하우스에 흰가루병 균주 스파에로테카 마쿠라(*Sphaerotheca macular*)를 밀곡립배지에서 25일간 배양한 병원균 접종원을 1m² 당 4.5g씩 접종하고, 24시간 후에 슈도모나스 에스피 피에프-1을 NB 배지에서 3일간 진탕배양한 후 배양을 종료하였다. 상기 배양물은 분무건조기(spray dryer) 또는 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 배양액을 분말화하였고, 분말화한 배양물 300g, 계면활성제(습윤제) 10g, 증량제 670g, 보존제 10g, 무기염 10g을 혼합 후 에어밀링(air milling)을 통해 수화제(WP) 제형을 제조하였다.
- [0028] 상기 제형제는 물에 500배로 희석하여 동력분무기로 7일 간격으로 흰가루병이 주로 발생하는 기간에 딸기에 3회 경엽처리하였다. 최종 약제처리 7일 후 딸기흰가루병의 발생정도를 시험구 전체에 있는 딸기과실수 대비 딸기흰가루병이 발생한 과실수인 이병과율로 조사하여 방제효과를 평가하였고 각 실험은 세 번 반복되었다. 대조약제로 화학약제인 Triflumizole 30% WP(일반명: 리프졸 수화제)를 사용하였다. 표 2의 결과는, 본 발명의 수화제가 딸기흰가루병에 91.4%의 방제효과를 보여 70.3%의 방제효과를 나타내는 대조약제인 화학농약 Triflumizole 30% 수화제보다 월등한 것을 나타낸다.

표 2

처 리 내 용	방제효과 (%)
슈도모나스 에스피 피에프-1를 이용한 수화제	91.4
Triflumizole 30% 수화제	70.3
무 처 리	-

- [0029]
- [0030] 상추 균핵병을 방제할 수 있는 미생물은 과종 전에 토양에 혼화처리해야 하기 때문에 토양 내 정착을 위해 당분야에서 통상적으로 사용하는 탈지강(85중량%)+피마자박(10중량%)+제올라이트(5중량%)의 혼합조건의 담체를 사용하였다.
- [0031] 길항미생물 슈도모나스 에스피 피에프-1의 균핵병 방제효과를 상추에서 직접 확인하기 위해 330m²의 비닐하우스에 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)을 밀곡립배지에서 25일간 배양한 병원균 접종원을 1m² 당 4.5g씩 접종

하고, 24시간 후에 슈도모나스 에스피 피에프-1을 NB 배지에서 3일간 진탕배양한 배양액(10^8 cfu/ml)을 원심분리 하였다. 이후 균체만 수확하여 멸균수에 10^8 cfu/ml 농도로 희석하여 담체(탈자강 85중량%, 피마자박 10중량%, 제올라이트 5중량%)에 처리하여 토양에 혼화처리 한 후 방제효과를 정식기부터 수확 직전까지 10일 간격으로 조사하여 표 3에 그 결과를 나타내었고 각 실험은 세 번 반복되었다.

표 3

처 리 내 용	방제효과 (%)
슈도모나스 에스피 피에프-1 처리	90.7
무 처 리	-

[0032]

[0033]

표 3의 결과를 확인하면 길항미생물 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주는 상추 정식전 토양혼화 처리하였을 때 발병주율이 현저하게 줄어들었으며 90.7%의 우수한 방제효과를 나타냈다. 생육기간 중 발병초기에 슈도모나스 에스피 피에프-1 균주 배양액을 1회 토양관주하면 방제효과는 더 높아질 것으로 판단된다. 또한 표 1의 결과를 참고로 슈도모나스 에스피 피에프-1를 이용하는 것이 상용화되면 균핵병 이외에도 각각의 식물 병해를 광범위하게 방제할 수 있으면서도 효과가 좋은 미생물 방제제로 농가에서 실용화될 것으로 판단된다.

수탁번호

[0034]

기탁기관명 : 국립농업과학원

수탁번호 : KACC91536P

수탁일자 : 20100302

도면

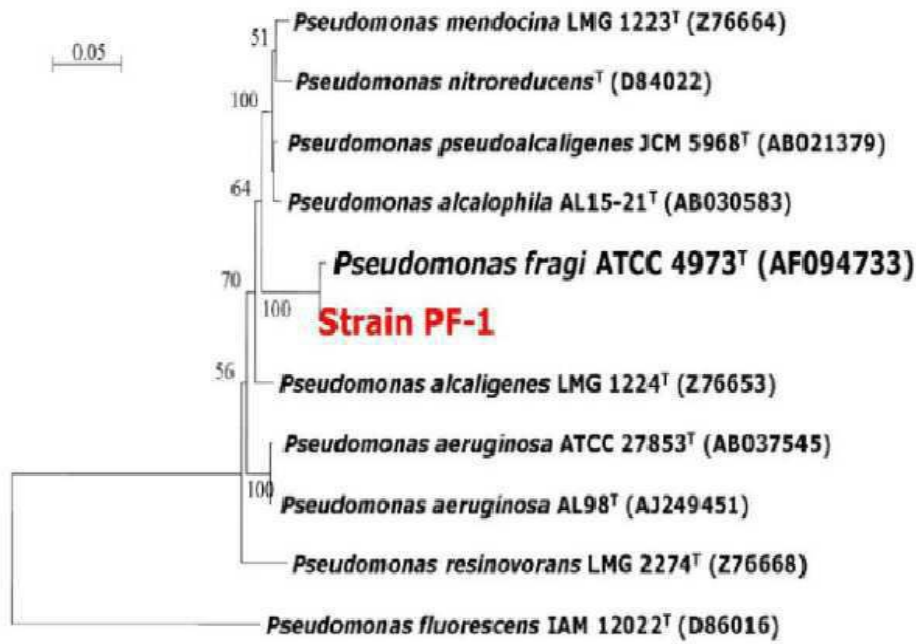
도면1



도면2

GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTA
 ATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCG
 GCGGTGCAGGATGAGCCC GCCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGT
 GGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCC
 AACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
 AGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAG
 CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA
 GCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
 GCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCG
 GGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGG
 TAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC
 AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACG
 CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
 GTCCACGCCGTAACCGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGT
 TGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACG
 GCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCG
 GCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG
 GCTTGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGT
 CGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATG
 TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTTGCCAG
 CAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAAC
 TCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCT
 TGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACC
 GNGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGG
 TCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC
 AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC//

도면3



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)