



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월07일
(11) 등록번호 10-2237327
(24) 등록일자 2021년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/22 (2020.01)
C12R 1/125 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/22 (2020.01)
(21) 출원번호 10-2020-0017232
(22) 출원일자 2020년02월12일
심사청구일자 2020년02월12일
(56) 선행기술조사문헌
JP2020515569 A
JP6182158 B2
WO2016128239 A1

(73) 특허권자
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
대한민국(산림청 국립산림과학원장)
서울특별시 동대문구 회기로 57 (청량리동)
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
(72) 발명자
김진철
광주광역시 북구 비엔날레로155번길 9 용봉동도나우타운 103동 1505호
박애란
충청남도 천안시 동남구 청수로 98 청솔LG아파트 111동 802호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **다양한 식물에 저항성을 유도하는 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주, 이를 이용한 소나무재선충병 방제용 조성물 및 방제방법**

(57) 요약

본 발명은 소나무 및 다양한 식물에 유도저항성 활성을 갖는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주 (수탁번호 KCTC 14084BP) 및 이를 유효성분으로 포함하는 살충제 또는 항균제 조성물, 식물병 또는 해충 방제용 조성물 및 이를 이용한 방제방법에 관한 것으로, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주는 기주에 저항성을 유도함으로써 다양한 식물병 원인 해충, 선충 및 균에 대한 방제 활성을 가지는 것을 실험적으로 확인하였다. 따라서, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주는 관련 식물병 방제 용도로 유용하게 사용될 수 있으며, 엽면살포를 통한 광범위 지역 살포가 가능하므로, 낮은 비용으로 소나무재선충병의 확산을 방지할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12R 1/125 (2013.01)

(72) 발명자

전희원

광주광역시 북구 반룡로6번길 34 클로버빌 205호

성민정

광주광역시 북구 서강로 160 우성아파트 103동 806호

정세인

광주광역시 동구 지호로70번길 29-6

서영수

부산광역시 금정구 금강로 502 롯데캐슬골드1단지 401-702

김남규

경상남도 창원시 성산구 원이대로 774 성원아파트 504-2501

김준현

경기도 동두천시 강변로296번길 19 건영아파트 101-401

이상현

서울특별시 중랑구 신내로21길 16 신내두산대림아파트 521-502

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 FE0702-2016-02

부처명 산림청

과제관리(전문)기관명 국립산림과학원

연구사업명 용역연구사업

연구과제명 유도저항성을 이용한 환경친화적 소나무재선충병 방제제 개발 및 검정

기 여 율 1/1

과제수행기관명 전남대학교

연구기간 2019.04.19 ~ 2019.11.29

명세서

청구범위

청구항 1

식물병에 대한 소나무, 고추, 잔디 및 토마토로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 유도저항성 (induced resistance)을 활성화하는 수탁번호 KCTC 14084BP의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 33의 *gyrA* 염기서열을 포함하는 것인, 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 균주는 소나무재선충병, 고추세균성점무늬병, 잔디동전마름병 및 토마토녹응애로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 식물병 또는 해충에 대한 방제 효과를 나타내는 것인, 균주.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

수탁번호 KCTC 14084BP의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 상기 균주의 배양 상등액으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 식물병 방제용 조성물에 관한 것으로서,

상기 식물병은 소나무재선충병, 고추세균성점무늬병 및 잔디동전마름병으로 이루어진 균으로부터 선택된 것인, 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 조성물은 합성 농약과의 합제용으로 사용되는 것인, 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 합성 농약은 테부코나졸 (tebuconazole), 이프로디온 (iprodione), 플루디옥소닐 (fludioxonil), 베노밀 (benomyl) 및 디페노코나졸 (difenoconazole)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 조성물.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 소나무 및 다양한 식물에서 저항성을 유도하는 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주, 이를 이용한 식물병 방제용 조성물 및 방제방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 소나무재선충 (*Bursaphelenchus xylophilus*)에 의한 소나무재선충병은 국내외적으로 소나무에 심각한 피해를 유발하고 있으며, 최근 기후변화에 따른 산림 생태계 환경의 변화와 함께 복잡한 양상을 보이며 급속히 확산되고 있다.
- [0003] 소나무재선충병의 주요 원인으로는 소나무재선충으로 알려져 왔으며, 기주, 병원체, 매개충, 환경요인간 복잡한 상호작용을 통해 소나무를 고사시키는 방제가 어려운 산림병해충으로, 일단 감염되면 치료가 되지 않고 거의 모든 소나무가 고사된다.
- [0004] 이러한 소나무재선충병의 방제를 위하여 여러 가지 방법이 제시되고 있으나, 예방 방법으로는 수간주입에 의한 방제 방법이 거의 유일한 방법이다. 하지만 수간주입용으로 많이 사용되고 있는 아바멕틴 (abamectin) 및 에마멕틴 벤조에이트 (Emamectin benzoate)의 경우 약효 지속 기간이 2년으로 짧고, 주입 시기도 제한적이며, 일본의 그린가드는 고가로 범용 적용에 한계가 있다.
- [0005] 또한, 수간주입의 경우 약제 가격의 문제뿐만 아니라 광범위 지역을 예방하는데 문제가 있고, 높은 산악지대에 있는 소나무림의 경우 접근성이 어려워 효과적인 방법이 되지 못한다. 게다가 Kuroda 및 Kenmochi (Pine Wilt Disease Conference, IUFRO, 2016)는 소나무재선충병을 방제하기 위한 살선충제의 반복적인 수간주입이 오히려 감염되지 않은 소나무를 죽이는 원인을 제공한다고 경고하였다.
- [0006] 이에 따라, 토양관주 또는 엽면살포 등을 통한 광범위 지역을 효과적으로 방제할 수 있는 친환경 약제의 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

(비특허문헌 0001) Kloepper J.W., Ryu CM. (2006) Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance. In: Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds) Microbial Root Endophytes. Soil Biology, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg.

(비특허문헌 0002) Kyungseok Park, et al., Induced Systemic Resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 Suppressed Bacterial Wilt in Tomato Caused by *Ralstonia solanacearum*, Plant Pathol. J. 23(1) : 22-25 (2007)

(비특허문헌 0003) Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94:1259-1266.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 소나무 및 다양한 식물에서 저항성을 유도하는 미생물 제제를 개발하고자 하였다. 그 결과, 본 발명의 신규한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주에 소나무재선충병의 원인 선충을 포함한 다양한 식물병원체에 대한 방제효과가 있으며 이 효과가 이 균주의 저항성 유도활성에 기인함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 병해충에 대한 식물의 유도저항성 (induced resistance)을 활성화하는 수탁번호 KCTC 14084BP의 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 균주의 배양 상등액 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 살충제 또는 항균제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 균주의 배양 상등액 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선

택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 식물병 또는 해충 방제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 균주의 배양 상등액 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 이용한 식물병 또는 해충 방제방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 소나무 및 다양한 식물에서 저항성을 유도하는 미생물 제제를 개발하고자 하였다. 그 결과, 본 발명의 신규한 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주에 소나무재선충을 포함한 다양한 식물병 원인 선충 및 균에 대한 유도저항성 활성이 있다는 것을 규명하였다.

[0013] 본 발명은 병해충에 대한 식물의 유도저항성 (induced resistance)을 활성화하는 수탁번호 KCTC 14084BP의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주, 상기 균주의 배양물 등을 유효성분으로 포함하는 살충제 또는 항균제 조성물, 및 식물병 또는 해충 방제용 조성물에 관한 것이다.

[0014] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0015] 본 발명의 일 양태는 수탁번호 KCTC 14084BP의 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주에 관한 것이다.

[0016] 상기 균주는 서열번호 33의 *gyrA* 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 서열번호 33의 염기서열은 공시 균주인 CP021892와 99%의 상동성을 가지고, 양 균주간 1%의 상이성이 인정되어 신규한 균주로 판명되었다.

[0018] 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주의 *gyrA* (Gyrase A subunit) 염기서열은 GenBank 데이터베이스와 NCBI 데이터베이스의 Blast 검색을 통해 확인되었다.

[0019] 상기 수득된 신규한 균주를 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주로 명명하고, 2019년 12월 19일자로 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 14084BP를 부여 받았다.

[0020] 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주는 토마토 식물체로부터 분리 및 동정하여 얻을 수 있으며, 상기 균주의 균체 성상은 다음과 같다:

[0021] 막대 모양의 원통형 간균으로 편모가 있어 활발히 운동하며, 균체의 중앙에 원형 또는 난원형의 아포 (spore)를 형성한다. 보통의 배양기에서도 잘 발육하며 회백색의 큰 취락을 형성하고 그 주위는 방사상을 이룬다. 아포를 갖고 있으므로 건조나 고온에 대한 저항력이 극히 강하며, 균체는 글리코젠을 함유하는 그람 양성균으로서 다수의 탄수화물을 분해하여 산을 생성한다. D-글루코오스, L-아라비노오스, 수크로오스 등의 탄소원을 에너지원으로 사용한다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주의 유도저항성 활성을 소나무 및 다양한 식물체를 이용한 실험을 통해 확인하였다 (도 3 내지 9).

[0023] 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주는 유도저항성(induced resistance) 활성을 통하여, 병해충 방제 활성을 가진다.

[0024] 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주는 식물병원성 선충, 해충, 또는 식물병원성 세균 및 진균 (곰팡이)이 유발하는 식물병 또는 해충 방제 활성을 가진다.

[0025] 상기 선충은 소나무재선충 (*Bursaphelenchus xylophilus*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 상기 해충은 토마토 녹응애 (*Aculops lycopersici*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 상기 세균 및 진균은 크산토모나스 유베시카토리아 (*Xanthomonas euvesicatoria*) 및/또는 스클레로티니아 호모에오카르파 (*Sclerotinia homoeocarpa*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 상기 식물병은 소나무재선충병, 고추세균성점무늬병 및/또는 잔디동전마름병일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 따라서, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주는 기주에 저항성을 유도하여 식물

병원성 선충, 세균, 진균, 해충의 성장을 저해하는 활성을 통하여 식물병 방제 활성을 가진다.

- [0030] 또한, 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주는 기존 유도저항성 물질과의 합제 시, 상승 효과를 유발하여 환경친화적으로 식물병을 방제하는 데 사용될 수 있다.
- [0031] 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주와 합제로 사용하는 유도저항성 물질은 아시벤졸라-에스-메틸 (Acibenzolar-S-methyl, ASM) 및/또는 메틸살리실레이트 (Methyl salicylate, MeSA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 또한, 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주는 기존 합성 살균제 (합성 농약)와의 합제 시, 상승 효과를 유발하여 상용 농도 이하의 합성 농약 사용 시에도 상용 농도 사용과 유사한 수준 또는 그 이상의 식물병 방제 효과를 가진다. 따라서, 합성 살균제의 상용 농도 사용량을 줄임과 동시에 환경친화적으로 식물병을 방제하는데 사용될 수 있다.
- [0033] 상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주와 합제로 사용하는 합성 농약은 테부코나졸 (tebuconazole), 이프로디온 (iprodisone), 플루디옥소닐 (fludioxonil), 베노밀 (benomyl) 및/또는 디페노코나졸 (difenoconazole)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 다른 일 양태는 수탁번호 KCTC 14084BP의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 균주의 배양 상등액 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 살충제 또는 항균제 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 따라서 본 발명은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 균주의 배양 상등액 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 살충제 또는 항균제 미생물 제제를 제공할 수 있는 것이고, 상기 미생물 제제를 처리함으로써 살충 또는 항균 방법을 제공할 수 있는 것이다.
- [0036] 상기 미생물 제제는 통상적인 방법으로 제형화할 수 있으며, 건조분말 형태 또는 액상비료 형태로 제조할 수 있는 것이다. 구체적으로, 본 발명에 의한 미생물 제제는 액상 형태로 제조될 수 있으며 이에 증량제를 첨가하여 가루분말의 형태로 이용하거나 이를 제형화하여 과립화시킬 수도 있다. 그러나 그 제형에 특별히 한정되지는 않는다.
- [0037] 본 발명에서 상기 미생물 제제는 균주 또는 이의 배양물에 첨가제, 증량제, 영양제 등의 부가제를 첨가하여 제조할 수 있다. 이때, 첨가제로는 폴리카복실레이트, 소듐 리그노설포네이트, 칼슘 리그노설포네이트, 소듐 다이알킬 설포석시네이트, 소듐 알킬 아릴 설포네이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 페닐 에테르, 소듐 트리폴리포스페이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 포스포릭 에스테르, 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 폴리머, 폴리옥시알킬은 알킬 페닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 노닐 페닐 에테르, 소듐 설포네이트 나프탈렌 포름알데히드, 트리톤 100 및 트윈 80으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있고, 증량제 및 영양제로는 skim milk (배지), 콩가루, 쌀, 밀, 황토, 규조토, 벤토나이트 (bentonite), 텍스트린, 포도당 및 전분으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상을 사용하며, 봉해제로는 벤토나이트 (bentonite), 탈크 (talc), 다이아라이트 (dialite), 카올린 (kaolin) 및 칼슘 카보네이트 (calcium carbonate)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 미생물 제제를 토양 또는 식물에 처리함으로써 식물체에 저항성을 유도시키는 방법을 제공한다. 이때, 처리방법에는 일반적으로 행하고 있는 방법, 즉 살포 (예를 들어, 분무, 미스팅, 아토마이징, 분말 살포, 과립 살포, 수면시용, 상시용 등), 토양시용 (예를 들어, 혼입, 관주 등), 표면시용 (예를 들어, 도포, 도말법, 피복 등), 침지, 독이, 혼연 시용 등에 의해 행할 수 있다. 그 사용량은, 그 제형, 피해상황, 적용방법, 적용장소 등에 따라 적절히 결정할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서, 상기 방법에 따라 처리되는 제제에 함유된 미생물의 유효량은 경작지 면적(m²) 당 1 내지 1 X 10¹⁰⁰의 미생물 수로 포함될 수 있다. 또한, 상기 방법 중 살포에 의해 처리되는 제제에 함유된 미생물의 유효량은 ml 당 1 내지 1 X 10¹⁰⁰의 미생물 농도로 포함될 수 있으며, 침지에 의해 처리되는 조성물에 함유된 미생물의 유효량은 ml당 1 내지 1 X 10¹⁰⁰의 미생물 농도로 포함될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 일 양태는 수탁번호 KCTC 14084BP의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 균주의 배양 상등액 및 이들의 조

함으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 식물병 또는 해충 방제용 조성물에 관한 것이다.

- [0041] 본 발명의 상기 각 조성물은 유효성분인 상기 균주, 이의 배양물, 배양물의 농축물, 배양물의 건조물 및/또는 상기 균주의 배양 상등액 외에 균체를 포함하는 배양물, 균체의 추출물, 이들의 농축액, 농축물, 건조물, 또한 필요에 따라서 희석액, 희석물 등을 포함할 수 있으며, 배양액, 배양물을 처리하여 얻어지는 모든 상태의 것을 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 균주의 배양법, 추출법, 분리법, 농축법, 건조법, 희석법 등은 특별히 한정되지 않는다.
- [0043] 상기 균주를 배양하기 위한 배지로는 통상적으로 탈지유, 웨이, 카제인 등의 우유 단백질, 당류, 효모 엑기스 등을 포함하고 있으며, 배양 방법으로는 일반적인 각종 호기적 또는 혐기적인 방법을 적당히 사용할 수 있다.
- [0044] 상기 균주를 배양한 후에는 필요에 따라 배양물이나 그 상층액을 농축, 건조, 희석할 수도 있다.
- [0045] 또한, 원심분리법이나 막분리법을 사용하여 배양물의 상층액과 균체를 분리하여 균체를 농축한 상태로 회수할 수도 있다. 그리고 균체에 초음파 처리나 효소 처리 등을 행하여 균체 내의 성분을 추출하거나, 배양물이나 그 상층액, 균체나 그 추출물 등을 건조할 수도 있다. 이들은 본 발명의 상기 조성물의 유효 성분으로서 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 균주 및 이를 포함하는 각 조성물의 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략한다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명은 소나무 및 다양한 식물에 유도저항성 활성을 갖는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주(수탁번호 KCTC 14084BP) 및 이를 유효성분으로 포함하는 살충제 또는 항균제 조성물, 식물병 또는 해충 방제용 조성물 및 이를 이용한 방제방법에 관한 것으로, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주는 기주에 저항성을 유도함으로써 다양한 식물병 원인 해충, 선충 및 균에 대한 방제 활성을 가지는 것을 실험적으로 확인하였다. 따라서, 본 발명의 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주는 관련 식물병 방제 용도로 유용하게 사용될 수 있으며, 엽면살포를 통한 광범위 지역 살포가 가능하므로, 낮은 비용으로 소나무재선충병의 확산을 방지할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주에 의한 유도저항성 관련 유전자의 발현을 확인한 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주의 *gyrA* 염기서열의 계통도 분석결과를 나타낸 도이다.
- 도 3a 및 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주의 소나무재선충병 방제 효과를 확인한 것으로, 도 3a는 적송 유묘에 대한 JCK-1398 균주 배양액의 유묘검정 결과를 병진전 곡선으로 나타낸 것이고, 도 3b는 JCK-1398 균주 배양액(a), 무처리구(b) 및 무접종구(c) 처리된 적송 유묘를 나타낸 것이다.
- 도 4a 및 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주의 소나무재선충병 방제 효과를 확인한 것으로, 도 4a는 JCK-1398 균주의 O.D₆₀₀=0.8에서의 배양액, 배양여액 및 세포 분획의 소나무재선충병 방제 효과를 나타낸 것이고, 도 4b는 JCK-1398 균주 배양액(a), JCK-1398 균주 배양여액(b), JCK-1398 균주 세포 분획(c), 무처리구(d) 및 무접종구(e) 처리된 적송 유묘를 나타낸 것이다.
- 도 5a 내지 5c는 본 발명의 일 실시예에 따라 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주 배양액의 처리 시기에 따른 소나무재선충병 방제 효과를 확인한 것으로, 도 5a는 적송 유묘에 대한 JCK-1398 균주 배양액의 유묘검정 결과를 병진전 곡선으로 나타낸 것이고, 도 5b는 소나무재선충 접종 60일 후 JCK-1398 균주 배양액 방제 효과를 나타낸 것이다. 도 5c는 소나무재선충 접종 2주 전-1주 전(a), 3주 전-1주 전 처리(b), 3주 전-1주 전 처리(c), 무처리구(d) 및 무접종구(e) 처리된 적송 유묘를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주 배양액의 처리 농도에 따른 소나무재선충병 방제 효과를 확인한 도이다.
- 도 7a 내지 7c는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주의 소나무

무재선충병 방제 효과를 확인한 것으로, 도 7a는 적송 성목에 대한 JCK-1398 균주 배양액의 유묘검정 결과를 병진전 곡선으로 나타낸 것이고, 도 7b는 1-2차 포장시험을 통한 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주의 방제효과를 나타낸 것이다. 도 7c는 JCK-1398 균주 분무건조 분말 50배 희석액(a), 에마벡틴 벤조에이트(b) 및 무접종구(c) 처리된 적송 성목을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 20% SC 제제와 유도저항성 물질인 ASM 및 MeSA 합제의 소나무재선충병 방제효과를 확인한 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주 배양액의 고추 세균성검무늬병 방제 효과를 확인한 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주 배양액의 잔디동전마름병 방제 효과를 확인한 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) JCK-1398 균주 20% SC 제제의 토마토 녹응애 방제 효과를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0051] **실시예 1. 유도저항성을 유도하는 균주의 선발**

[0052] 소나무재선충병에 대하여 유도저항성을 유도하는 균주를 찾기 위하여, 다양한 식물로부터 500여개의 식물유래 미생물 균주를 분리하였다. PR-1 promoter에 GUS가 표지된 vector가 형질전환 된 애기장대를 이용하여 분리한 500여개의 식물유래 미생물 균주로부터 유도저항성을 유도하는 균주 (25개 균주)를 선발하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

균주	활성	균주	활성	균주	활성	균주	활성
JCK-757	*	JCK-1180	*	JCK-1266	*	JCK-1320	*
JCK-758-1	*	JCK-1182	*	JCK-1287	*	JCK-1328	*
JCK-758-2	*	JCK-1187	*	JCK-1288	*	JCK-1333	*
JCK-761	*	JCK-1217	*	JCK-1307	*	JCK-1398	*
JCK-767	*	JCK-1222	*	JCK-1308	*		
JCK-947	*	JCK-1229	*	JCK-1309	*		
JCK-1005	*	JCK-1233	*	JCK-1318	*		

[0055] **실시예 2. 소나무 캘러스 (callus)를 이용한 인 비트로 (*in vitro*) 유도저항성 검정**

[0056] 상기 실시예 1을 통해 선발한 25개 균주에 대하여, 적송 소나무 캘러스의 유도저항성 관련 유전자의 발현을 확인하였다.

[0057] 구체적으로, 12-웰 마이크로플레이트에서 500 ul의 LM 배지로 소나무 유도저항성 균주를 600 nm의 흡광도 (OD 600)에서 0.8이 될 때까지 배양시킨 후, 배양액 500 ul를 100 mg의 적송 소나무 캘러스 표면에 처리하고, 암조건의 25℃, 50 rpm 진탕배양기에서 24시간 동안 캘러스 표면과 소나무 유도저항성 균주 배양액을 충분히 반응시켰다. 그 다음, 원심분리기를 이용해 600 xg, 5 내지 10분 원심분리하여 반응이 완료된 캘러스를 분리하였다. 분리된 캘러스에서 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하였고, RT-PCR 또는 qRT-PCR을 통해서 특이적으로 증가되는 유도저항성 유전자의 발현을 확인하여, 그 결과를 도 1 및 표 2에 나타내었다. qRT-PCR에 사용한 유도저항성 관련 유전자는 하기 표 3에 나타내었다.

표 2

순서	명명	발현량
1	PR-1b family	1.35
2	PR-2 family	1.02

3	PR-3 family class 1	0.70
4	PR-3 family class 4	2.84
5	PR-4 family	10.20
6	PR-5 family	2.21
7	PR-9 family	1.49
8	PR-10 family	1.56
9	Antimicrobial peptide	11.91
10	Cytochrome P450	1.06
11	Extensin	0.84
12	Hydroxyproline-rich glycoprotein precursor	0.50
13	Metallothionein-like protein	1.59
14	Xyloglucan endotransglycosylase	0.72

표 3

[0059]

서열번호	명명	서열목록 (5' -> 3')	Size (bp)
1	PR-1b family For	TGCCCTTCAGGTAATCGT	125
2	PR-1b family Rev	GCGGGTCGTAGTTGCAGATAA	
3	PR-2 family For	CGACAACATTCGCCCTTCT	130
4	PR-2 family Rev	CTGCAGCGCGTTTGAATAT	
5	PR-3 family class 1 For	ACCTACAGCGCTTCATTGC	120
6	PR-3 family class 1 Rev	TGTGGTTCATGCGACGTTT	
7	PR-3 family class 4 For	CCATCGAAGCCCAGGTAATTT	90
8	PR-3 family class 4 Rev	AGCCGGGAAGCAATATTATGGT	
9	PR-4 family For	CCCGTTACTGTCAATTGCAT	90
10	PR-4 family Rev	AAAGCGTGACGGTGCGTATT	
11	PR-5 family For	GAACCAGTGCCATACACAGTCT	96
12	PR-5 family Rev	CCTGCGGCAACGTTAAAAGTC	
13	PR-9 family For	ACACCACCGTCTGGACATT	118
14	PR-9 family Rev	GTGCGGGAGTCGGTGTAGAG	
15	PR-10 family For	TGTCTCAAGTGGAGGCAAGGA	90
16	PR-10 family Rev	AAGCGACAATTCAGGCAAAAC	
17	Antimicrobial peptide For	GCGTTGCTCATACCCGTTTT	90
18	Antimicrobial peptide Rev	GCAGCACTTAGCACTGGATGAA	
19	Cytochrome P450 For	AACATGTCTGCAGCACGAA	95
20	Cytochrome P450 Rev	GTGCACCGCAAGTAAACCAA	
21	Extensin For	CGAATGTAATCCGAAGTTGCA	110
22	Extensin Rev	CCATCCCAAACCACAGTCT	
23	Hydroxyproline-rich glycoprotein precursor For	GAGAAACTGGCACCCTTAGGA	140
24	Hydroxyproline-rich glycoprotein precursor Rev	ACCTCCCCTCCATCTCACA	
25	Metallothionein-like protein For	TCAGGCTGCTGCGTTATTTG	120
26	Metallothionein-like protein Rev	TGTCAGCGCAGTCACAATTTG	
27	Xyloglucan endotransglycosylase For	TCTGCGCCCTACTTTTCC	121
28	Xyloglucan endotransglycosylase Rev	AGCTGGCGATTGATCATGT	
29	Elongation factor-1 alpha For	GGGAAGCCACCCAAAGTTTT	160
30	Elongation factor-1 alpha Rev	TACATGGGAAGACGCCGAAT	

[0061]

도 1 및 표 2에서 확인할 수 있듯이, 선발한 25개 균주 중 본 발명의 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주가 PR-1b family, PR-3 family class 4, PR-4 family, PR-5 family, PR-9 family, PR-10 family, Antimicrobial peptide 및 Metallothionein-like protein 등의 단백질을 만드는 유전자를 특이적으로 증가시키는 것을 확인하였다.

[0063]

실험예 1. 분자생물학적 동정 및 계통학적 분류

[0064]

바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주를 TSA (Tryptic soy agar, Difco) 고체 배지에 스트리킹한 후, 30°C에서 1

일 동안 정치배양하였다. 수득한 단일 콜로니를 멸균된 루프를 이용하여 TSB (Tryptic soy broth, Difco) 액체 배지에 접종한 다음, 30℃에서 1일 동안 150 rpm으로 진탕배양하였다. 그 다음, ELPIS-Biotech의 DOKDO-프랩 박테리아 게놈 DNA 정제 키트를 이용하여 프로토콜에 따라서 균주의 gDNA (genomic DNA)를 추출하였다. 추출된 gDNA와 인트론 바이오테크놀로지 (iNtRON Biotechnology)의 PCR-프리믹스 (Polymerase chain reaction-premix) 및 *gyrA* (Gyrase A subunit) 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 혼합한 후, PCR을 통해 상기 JCK-1398 균주의 *gyrA* 유전자를 증폭하였다. PCR에 사용된 프라이머 세트는 다음 표 4에 나타내었다.

표 4

[0065]

서열번호	명명	서열목록 (5'→ 3')	비고
31	<i>gyrA</i> For	CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT	
32	<i>gyrA</i> Rev	CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT	

[0066]

PCR은 95℃에서 5분을 시작으로 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초를 30번 반복한 후, 72℃에서 7분, 12℃에서 증폭을 끝냈다. 증폭된 PCR 산물은 대한 염기서열 분석은 제노텍(대전, 대한민국)에 의뢰하였으며, JCK-1398 균주의 *gyrA* (서열번호 33) 유전자의 염기서열을 얻었다. 얻어진 *gyrA* 유전자의 염기서열을 NCBI의 nBlast 검색을 이용하여 GenBank 데이터베이스의 염기서열과 비교하였다. 또한, GenBank 데이터베이스로부터 유사성이 높은 *gyrA* 유전자 염기서열을 확보하여 BioEdit Sequence Alignment Editor를 이용하여 JCK-1398 균주의 *gyrA* 유전자 염기서열과 모든 염기서열을 정렬하였고, 메가 프로그램 버전 6.0을 사용하여 boot-strap trials set 1,000 조건에서 NJ (neighbour-joining) 알고리즘을 바탕으로 계통학적으로 분석하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

표 5

[0067]

서열번호	명명	서열목록 (5'→ 3')	비고
33	<i>Bacillus subtilis</i> JCK-1398 strain <i>gyrA</i> sequence	GATGTTTGTAGAGCAGTTTGTGTTGTACAGATTGTTAAGATGACATTCGCATTGGCATCGCGTCTGA TTTCAATGACAATTCTCATACCTGTACGATCTGACTCATCACGCAGATCTGTGATACCCCTCTATCTT TTTGTCCCTTACGAGATCAGCAATTTTCTCAATTAATTTGCGCTTATTTACTTGGTAAGGTAAGTCT GTAACGATAATTTCTTTTACCGAAGATGTTTGTTCGATCTCAGCTTTTGCCGGATCGTGATAG AGCCTCGCCTGATTGATGCTTTCCGGATACCGCTGCGGCCAAGATTGACCCGCAGTCGGGAA ATCAGGTCTGGAATGACTTCCATAAGCTCTGGAATGGTAATGTCCGGATTCTCACTGACAGCAAGT ACTCCGTCATGATTTCTCCAGCTGGTGGGAGGAATGTTTGTGCCATACCTACCGCAATGCCGG CAGCACCGTTCACGAGCAGATTCGGGAACCTTGAAGGCATAACGACAGGTCTCTTTCTGACCCGTC ATAGTTATCCTGGTAATCGATTGTGTCTTTTGTGATGTCACGGAAGAAATCTCCATTGAGATTTAGAC ATTCTTGCTTGTATAACGCATGGCCCGCTGAGTCTCCGTCACAGAACCGAAGTTTCCGTGAC CGTCAACGAGCATATAACGGTAGTTGAAATCTGAGCCATTCTGACCATGGATTCATATACCGCTGA ATCACCGTGGGGTGGTATTCCCGATAACTTCTCCAACGATACGCGCGGATTTTTATAAGGCTTG TCACTTGTATGCCTAAATCATTTCATTCATACAAAATCCGCTATGAACTG	

[0069]

도 2에서 확인할 수 있듯이, JCK-1398 균주는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 균주로 동정되었다.

[0070]

[0071]

실험예 2. 소나무재선충병 방제 효과 확인

[0072]

바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주 배양액의 소나무재선충병에 대한 방제 효과를 확인하기 위하여, 적송 (*Pinus densiflora*) 3 내지 4년생 유묘 (직경 5.5 mm 내외, 신장이 토양으로부터 약 35 내지 45 cm)를 이용하여 유묘검정을 수행하였다.

[0074]

2-1. JCK-1398 균주 배양액의 제조

[0075]

20%의 글리세롤 용액에 현탁하여 -80℃초저온 냉동고 (deep freezer)에 저장되어 있던 JCK-1398 균주를 TSA에서 30℃, 약 24시간 동안 정치배양 하였다. 그 다음, 시험관에 TSB를 넣어 입구를 면전으로 막고 멸균한 후, 배양된 JCK-1398 균주의 콜로니 하나를 백금으로 긁어 TSB에 접종한 후 30℃, 150 rpm에서 약 24시간 동안 호기 조건으로 추가 진탕배양하였다. 멸균한 50 ml의 TSB가 포함된 250 ml 삼각플라스크에 UV 스펙트로포토미터 600 nm에서 광학밀도(optical density)의 값이 1.0이 되도록 JCK-1398 균주 배양액을 넣어 현탁액을 제조하였다. 그 다음, 30℃, 150 rpm에서 약 24시간 동안 호기 조건으로 진탕배양하였다.

[0077] 2-2. JCK-1398 균주 배양액의 살포

[0078] 먼저, JCK-1398 균주 배양액이 잎에 잘 흡착될 수 있도록, 250 ug/ml Tween 20을 소나무당 5 ml씩 충분히 전처리한 후 2시간 동안 건조시켰다. 그 다음, 상기 실험예 2-1에서 배양된 JCK-1398 균주 배양액을 250 ug/ml Tween 20을 포함한 수용액에 광학밀도의 값이 0.8 수준이 되도록 용해한 후, 미세분사기에 넣어 소나무당 5 ml씩 엽면살포하였다.

[0080] 2-3. 소나무재선충 (*Bursaphelenchus xylophilus*)의 배양

[0081] PDA (Potato dextrose agar, Difco) 배지에 소나무재선충이 먹이로 하는 보트리티스 시네레아 (*Botrytis cinerea*)를 접종하고 25℃ 배양기에서 7일 동안 정치배양하였다. 배양된 보트리티스 시네레아 위에 소나무재선충 (*Bursaphelenchus xylophilus*, 국립산림과학원)을 접종한 뒤 25℃ 배양기에서 7일 동안 정치배양하였다. 배양된 소나무재선충은 깔대기법 (Baermann funnel method)을 이용하여 수확한 후 광학현미경 하에서 수를 조사하여 20,000 마리/ml 수준으로 조정하였다.

[0083] 2-4. 소나무재선충병 방제 효과 확인

[0084] 실험예 2-2의 JCK-1398 균주 배양액이 엽면살포로 전처리된 소나무의 목질부 1 cm 정도를 멸균된 칼로 내피 심층부위까지 절개한 후, 멸균된 탈지면을 가로 0.5 cm, 세로 1 cm로 만들어 절개부위에 삽입하고 분리한 소나무재선충을 100 u1씩 2,000 마리 접종 (JCK-1398 균주 배양액 등 약제 처리 1주일 후 접종), 접종된 부위는 파라필름으로 밀봉하여 건조되지 않도록 하였다 (수피박피접종법). 소나무재선충 접종 45일 후 마름정도를 관찰하여, 그 결과를 도 3a 내지 도 3b 및 표 6에 나타내었다.

표 6

접종 후 날짜		0일	34일	39일	42일	45일	50일
발병도(%)	JCK-1398	0	4	6	8	16	24
	무처리구	0	24	26	54	78	84

[0087] 도 3a 내지 3b 및 표 6에서 확인할 수 있듯이, JCK-1398 균주 배양액은 적송 유묘에서 소나무재선충병에 대하여 24%의 낮은 발병도를 나타냈으며, 무처리구 대비 71.4%의 방제가를 나타냈다.

[0089] 실험예 3. 인 비트로 (*in vitro*) 살선충 활성 평가

[0090] 3-1. JCK-1398 균주 배양여액 및 방제 대상 선충의 확보

[0091] 실험예 2-1과 동일한 방법으로 JCK-1398 균주를 배양한 후, 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 배양여액을 수확하였고, 배양여액을 멸균된 마이크로시린지 필터 0.2 um를 이용하여 제균하였다.

[0092] 고구마뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)은 광주광역시 전남대학교 친환경농업센터 온실에서 인위적으로 고구마뿌리혹선충에 감염된 토마토 뿌리로부터 알을 획득하고, 깔대기법을 이용하여 알로부터 부화된 유충 (2령 유충)을 분리하여 실험에 사용하였다. 소나무재선충은 실험예 2-3과 동일한 방법으로 수확하였다.

[0094] 3-2. JCK-1398 균주 배양여액 및 선충의 확보

[0095] 실험예 3-1에서 확보한 각 선충의 현탁액을 96-웰 마이크로플레이트의 각 웰에 각각 넣은 다음, JCK-1398 균주 배양여액을 0.625 내지 20% 농도가 되도록 처리하여 웰의 최종 부피가 100 u1가 되도록 하였다. 시료 처리 후, 96-웰 플레이트를 30초 동안 교반하여 상대습도 100% 플라스틱 통에 넣어 실온 보관하였다. 시료 처리 72시간 후, 광학 도립현미경하에서 하기 계산식을 이용하여 살선충률을 확인하였다. 모든 실험은 3회 반복하였으며, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

[0096] [계산식]

[0097] $\text{살선충율}(\%) = \frac{(\text{처리구의 치사율} - \text{대조군의 치사율})}{(100 - \text{대조군의 치사율})} \times 100$

표 7

선충	방제가					
	20%	10%	5%	2.5%	1.25%	0.625%
고구마뿌리혹선충	97.45	13.15	-	-	-	-

소나무재선충	-	-	-	-	-	-
--------	---	---	---	---	---	---

[0100] 상기 표 7에서 확인할 수 있듯이, 고구마뿌리혹선충의 경우 20% 배양여액 처리구에서는 97.45%, 10% 배양여액 처리구에서는 13.15%의 살선충 활성을 보였으며, 5% 이하의 농도에서는 살선충 활성이 나타나지 않는 것을 알 수 있었다.

[0101] 한편, 소나무재선충의 경우 어느 처리구에서도 살선충 활성이 나타나지 않았는데, 이는 바실러스 서브틸리스 JCK-1398의 소나무재선충병에 대한 방제 효과가 직접적인 살선충 활성이 아닌 유도저항성에 의한 효과임을 시사한다.

[0103] **실험예 4. 소나무재선충병 방제 효과를 나타내는 유도저항성 물질 확인**

[0104] 실험예 3의 결과에 기초하여, 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주의 소나무재선충병에 대한 방제 효과를 나타내는 유도저항성 물질의 존재 (배양액, 배양여액 및 세포 분획)를 확인하였다. JCK-1398 균주의 배양은 실험예 3-1과 동일한 방법으로 광학밀도의 값이 0.8이 되도록 조정하여 수행하였다.

[0105] JCK-1398 균주의 배양액을 원심분리 (1,300 rpm, 15분)하여 배양여액과 세포 분획으로 나누었다. 침전된 세포 분획은 원심분리 전 사용한 동일한 부피의 인산염완충식염수 (phosphate-buffered saline)를 첨가하여 현탁하였다. 각 시료 (배양액, 배양여액 및 세포 분획)가 잎에 잘 흡착될 수 있도록, 250 ug/ml Tween 20을 소나무당 5 ml씩 충분히 전처리한 후 2시간 동안 건조시켰다. 그 다음, 배양액, 배양여액 및 세포 분획을 250 ug/ml Tween 20을 포함한 수용액에 광학밀도의 값이 0.8 수준이 되도록 용해한 후, 미세분사기에 넣어 소나무당 5 ml씩 엽면 살포하였다. 이때, 대조군으로 살선충 물질인 에마멕틴 벤조에이트 (Emamectin benzoate)를 10% 메탄올을 포함하는 수용액에 20 mg/ml 수준으로 용해한 다음 수간주입하였다. 그 결과를 도 4a 내지 도 4b 및 표 8에 나타내었다.

표 8

처리구	배양액	배양여액	세포분획	EB
방제율(%)	61.7	64.2	42.0	97.0

[0108] 도 4a 내지 4b 및 표 8에서 확인할 수 있듯이, JCK-1398 균주 배양액 및 배양여액에서는 각각 61.7% 및 64.2%의 방제 효과를 나타내었으나, 세포 분획에서는 42%의 다소 낮은 방제 효과를 나타냈다.

[0109] 이러한 결과는, 본 발명의 JCK-1398 균주에 의한 소나무재선충병 방제 효과는 세포 외로 분비하는 분비물에 의한 효과임을 시사한다.

[0111] **실험예 5. 소나무재선충병 방제 효과를 나타내는 최적 처리 시기 확인**

[0112] 실험예 4의 결과에 기초하여, 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주 배양액의 소나무재선충병 인 비보 (*in vivo*) 검정을 통해 최적 처리 시기를 확인하였다. 인 비보 검정은 적송 3 내지 4년생 유묘 (직경 5.5 mm 내외, 신장 이 토양으로부터 약 35 내지 45 cm)를 이용하여 수행하였다.

[0113] 실험예 2-1과 동일한 방법으로 JCK-1398 균주를 배양하여 광학밀도 값이 0.8 수준이 되도록 조정한 후, 배양액을 소나무당 5 ml씩 엽면살포하였다. 이때, 배양액 처리는 그 시기를 달리하여 소나무재선충 접종 2주 전과 1주 전, 3주 전과 1주 전 및 4주 전과 1주 전으로 2회씩 수행하였으며, 소나무재선충의 접종은 상기 실시예 3-4와 동일한 방법으로 2회 차 배양액 처리 7일 후 수행하였다. 끝으로, 소나무재선충 접종 60일 후 마름정도를 관찰하여, 그 결과를 도 도 5a 내지 5c 및 표 9 내지 표 10에 나타내었다.

표 9

접종 후 날짜		0일 후	30일 후	35일 후	46일 후	49일 후	54일 후	57일 후	60일 후
발병도 (%)	2주 전 -1 주 전	0	16	29	30	32	40	40	40
	3주 전 -1주 전	0	14	20	28	28	58	70	78
	4주 전 -1주 전	0	10	14	26	28	48	58	60
	무처리구	0	32	46	58	68	84	88	98

표 10

[0115]	처리구	2주 전 - 1주 전	3주 전 - 1주 전	4주 전 - 1주 전
	방제가(%)	59.2	20.4	38.8

[0117] 도 5a 내지 5c 및 표 9 내지 표 10에서 확인할 수 있듯이, 접종 49일까지는 처리 시기와 상관없이 소나무재선충병 발병도가 비슷한 수준으로 유지되었으나, 그 이후에는 처리시기에 따라 크게 변화하는 것을 알 수 있었다 (도 5a). 결과적으로, 접종 2주 전-1주 전 (59.2%) 처리 시, 3주 전-1주 전 (20.4%) 및 4주 전-1주 전 (38.8%) 처리 시에 비하여 우수한 방제 효과를 나타내었다.

[0119] **실험예 6. 소나무재선충병 방제 효과를 나타내는 최적 처리 농도 확인**

[0120] 실험예 5의 결과에 기초하여, 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주 분무건조 분말의 소나무재선충병 인 비보 (*in vivo*) 검정을 통해 최적 처리 농도를 확인하였다. 마찬가지로, 인 비보 검정은 적송 3 내지 4년생 유묘를 이용하여 수행하였다.

[0121] 구체적으로, 하기 표 11의 방법으로 제조한 JCK-1398 균주의 분무건조 분말을 멸균수를 이용하여 50배, 500배 및 5,000배 희석액을 제조한 후, 상기 실시예 3-2와 동일한 방법으로 소나무에 7일 간격으로 2회 엽면살포하였다. 끝으로, 소나무 재선충은 상기 실시예 3-4와 동일한 방법으로 상기 희석액 2차 처리 7일 후 접종하였고, 소나무재선충 접종 55일 후 마름정도를 관찰하여, 그 결과를 도 6 및 표 12에 나타내었다.

표 11

[0122]	분무건조 공정과정	JCK-1398
	입구 및 출구 온도	190-198 °C / 90-98 °C
	분무율	10,000 rpm
	운반체	배양액 70 L
	분무건조 분말	11 kg
	QC	2.4×10^9 cfu/g
	CFU (x50)	4.8×10^7 cfu/g

표 12

[0123]	처리구	50배 희석액	500배 희석액	5000배 희석액
	방제가(%)	85.5	60.5	69.8

[0125] 도 6 및 표 12에서 확인할 수 있듯이, JCK-1398 균주 분무건조 분말의 50배 희석액 (85.5%) 처리 시, 500배 (60.47%) 및 5,000배 (69.77%) 희석액에 비하여 우수한 방제 효과를 나타내었다.

[0127] **실험예 7. 소나무재선충병 방제 효과 확인**

[0128] 상기 결과들에 기초하여, 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주의 성목에서의 소나무재선충병에 대한 방제효과를 확인하기 위하여, 추가적으로 15년생 적송 (근원직경 8 내지 11 cm, 높이 6 내지 8 m)을 이용하여 포장시험을 수행하였다. 포장시험은 2018년 (1차 포장시험) 및 2019년 (2차 포장시험)에 두 차례 수행하였다. 1차 포장시험은 JCK-1398 균주 배양액의 분무건조 분말을 사용 (실험예 7과 동일한 방법으로 제조)하였고, 2차 포장시험은 JCK-1398 균주 배양액의 분무건조 분말을 JCK-1398 20% SC (유제)로 제형화하여 사용하였다. JCK-1398 20% SC 제제는 JCK-1398 분무건조 분말 20.0%, CR-NF 135B 4.5%, 잔탄검 0.03%, 소포제 0.1%, 물 75.37%의 조성으로 제형화하였다.

[0129] JCK-1398 균주 배양액의 분무건조 분말 및 JCK-1398 20% SC 제제를 250 ug/ml Tween 20을 포함한 수용액에 각각 50배 및 2000배로 희석한 후 분무기에 넣어 소나무당 약 1L씩 엽면살포하였다. 엽면살포는 한 달 간격으로 2차례 처리하였다. 상기 2차 처리 일주일 후, 수간주입 방법으로 1차 포장시험에는 소나무당 20,000 마리씩, 2차 포장시험에는 10,000 마리씩 소나무재선충을 접종하였다. 이때, 대조군으로는 에이팜 (에마벡틴 벤조에이트

2.15%, 유제, 신젠타)을 흉고직경당 1ml씩 수간주입하였으며, 에이팜은 소나무재선충 접종 1주 전에 한차례 처리하였다. 무처리구는 약제 없이 250 ug/ml Tween 20만을 동일하게 처리하였다. 그 결과를 도 7a 내지 7c 및 표 13 내지 표 14에 나타내었다.

표 13

[0130]

접종 후 날짜		1달	2달	3달	4달	5달	6달
발병도 (%)	JCK-1398	0	0.5	12	25	20	25
	EB	0	1	2.5	7.5	7.5	10
	무처리구	0	16	48.5	72.5	72.5	72.5

표 14

[0131]

처리구	2018년도 포장시험		2019년도 포장시험	
	JCK-1398 분무건조 분말	EB	JCK-1398 20% SC 제제	EB
방제가(%)	65.5	86.2	68.8	75

[0133]

도 7a 내지 7c 및 표 13 내지 표 14에서 확인할 수 있듯이, JCK-1398 균주 배양액 분무건조 분말 50배 희석액 (JCK-1398) 및 JCK-1398 20% SC 제제 (20% SC 제제)는 무처리구 대비 각각 65.5% 및 68.8%의 방제 효과를 나타내었다. 2차례의 포장시험을 통해 JCK-1398 균주의 소나무재선충병에 대한 방제 효과 재현성을 확인하였다.

[0134]

따라서, 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주는 소나무 묘목뿐만 아니라 성목에 대해서도 소나무재선충병 방제 효과를 가지며, JCK-1398 균주의 항공 살포를 통한 광범위한 지역의 방제가 가능할 것으로 기대된다.

[0136]

실험예 8. 합제에 의한 소나무재선충병 방제 상승 효과 확인

[0137]

실험예들의 결과에 기초하여, 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주의 유도저항성 물질인 아시벤졸라-에스-메틸 (Acibenzolar-S-methyl, ASM) 및 메틸살리실레이트 (Methyl salicylate, MeSA)와의 합제의 성목에서의 소나무재선충병에 대한 방제효과를 확인하기 위하여, 추가적으로 15년생 적송 (근원직경 8~11 cm, 높이 6~8 m)을 이용하여 포장시험을 수행하였다.

[0138]

JCK-1398 20% SC 제제, ASM 5% SC 제제, MeSA 20% EC-LV 제제를 각각 2000배 희석, 0.1 mM, 0.5 mM로 제조하였다. JCK-1398 20% SC + ASM 5% SC 합제와 JCK-1398 20% SC + MeSA 20% EC-LV 합제는 최종농도가 각 단계 처리구 농도의 반량이 포함되도록 제조하였다. 각 시료는 분무기에 넣어 소나무당 약 1 L씩 한 달 간격으로 2차례 처리하였다. 상기 2차 처리 일주일 후, 수간주입 방법으로 10,000 마리씩 소나무재선충을 접종하였다. 이때, 대조군으로는 에이팜 (에마벡틴 벤조에이트 2.15%, 유제, 신젠타)을 흉고직경당 1 ml씩 수간주입하였으며, 에이팜은 소나무재선충 접종 1주 전에 한차례 처리하였다. 무처리구는 약제 없이 250 ug/ml Tween 20만을 동일하게 처리하였다. 그 결과를 도 8 및 표 15에 나타내었다.

표 15

[0139]

처리구	ASM 5% SC	MeSA 20% EC-LV	JCK-1398 20% SC	ASM 5% SC + JCK-1398 20% SC	MeSA 20% EC-LV + JCK-1398 20% SC	EB 2.15% EC
방제가(%)	27.3	33.9	23.1	46.2	53.8	61.5

[0141]

도 8 및 표 15에서 확인할 수 있듯이, JCK-1398 20% SC 제제, ASM 5% SC 제제, MeSA 20% EC-LV 제제는 무처리구 대비 각각 23.1%, 27.3% 및 33.9%의 방제 효과를 나타내었다. 하지만 JCK-1398 20% SC + ASM 5% SC 합제와 JCK-1398 20% SC + MeSA 20% EC-LV 합제는 무처리구 대비 각각 46.2%와 53.8%의 상승된 방제 효과를 보였다.

[0142]

따라서, 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주는 유도저항성 물질인 ASM 및 MeSA와 함께 처리되었을 때, 시너지 효과를 통해 소나무재선충병을 보다 효과적으로 방제할 수 있음을 확인하였다.

[0144]

실험예 9. 다양한 식물병 방제 효과 확인

[0145] 바실러스 서브틸리스 JCK-1398 균주의 유도저항성 효과에 근거하여, 적용 확대 실험을 위하여 JCK-1398균주 배양액의 분무건조 분말을 이용하여 다양한 식물병에 대한 방제 효과를 확인하였다.

[0147] **9-1. 고추 세균성 점무늬병 (병원균: *Xanthomonas euvesicatoria*) 방제 효과 확인**

[0148] 실험에 6과 동일한 방법으로 JCK-1398 균주의 분무건조 분말을 각각 500배 및 5,000배로 희석한 용액에 계면활성제 250 ug/ml Tween 20을 첨가한 후, 8-9엽기 고추 (홍농씨앗, 불탑고추)에 토양관주 및 엽면살포 방법으로 포트 당 20 ml씩 처리하였다. 각 시료는 모두 고추 세균성 점무늬병 균주 접종원 접종 4일 전에 처리하였다. 이때, 대조군으로는 합성 농약 살균제인 성보싸이클린 수화제 (oxytetracycline, (주)성보화학) 및 일품 수화제 (oxolinic acid 20% WP, (주)동방아그로)를 각각 정량 (1,000배 희석액)으로 처리하였으며, 무처리구는 약제 없이 250 ug/ml Tween 20만을 동일하게 처리하였다.

[0149] 그 다음, 고추 세균성 점무늬병 균주 (*Xanthomonas euvesicatoria*)를 TSA에서 30℃, 약 48시간 동안 정치배양한 후, 멸균수 2 ml를 사용하여 셀을 수확하였다. 수확한 고추 세균성 점무늬병원균은 UV 스펙트로포토미터를 사용하여 600 nm에서 광학밀도의 값이 0.1이 되도록 희석하여 접종원을 제조하였다. 접종원은 유묘 당 5ml씩 엽면살포하였다. 접종한 유묘는 25±2℃의 생육실에서 습도 95%를 3일간 유지하였다. 이후 일정 관수와 엽면에 물을 주며 발병도를 관찰하여, 그 결과를 도 9 및 표 16에 나타내었다.

[0150] 모든 처리는 3회 반복으로 진행되었으며, 모든 실험은 2회 반복하였다. Abbasi에 따라 발병 정도를 0-6의 지수로 측정하여 고추 잎에 형성된 고추 세균성 점무늬병 발병도를 확인하였다. 발병 정도의 지수 기준은 다음과 같다:

- [0151] 0 = 발병 전무,
- [0152] 1 = 1-2개의 작은 반점이 1-2개의 잎에서 발생,
- [0153] 2 = 여러 개의 반점이 다수의 잎에 발생,
- [0154] 3 = 많은 반점이 응집되어 잎에 발생,
- [0155] 4 = 많은 반점이 응집되어 많은 잎에 발생,
- [0156] 5 = 심각한 발병과 함께 탈엽 발생,
- [0157] 6 = 식물체 죽음.

표 16

처리구	JCK-1398 X500		JCK-1398 X5000		Oxolinic acid	Oxytetracyclin
	엽면살포	토양관주	엽면살포	토양관주	엽면살포	엽면살포
방제가 (%)	20.8	37.5	31.3	52.1	27.1	20.8

[0160] 도 9 및 표 16에서 확인할 수 있듯이, 바실러스 서브틸리스 JCK-1398의 분무건조 분말 5,000배 희석 용액을 토양관주 처리한 경우 52.1%의 방제 효과를 나타냈고, 엽면살포한 경우 31.3%의 방제 효과를 나타냈다. 또한, 500배 희석 용액을 토양관주 처리한 경우 37.5%의 방제 효과를 나타냈으며, 엽면살포한 경우 20.8%의 방제 효과를 나타냈다. 따라서, JCK-1398 균주 배양액을 고추에 처리할 경우, 저항성을 효과적으로 유도하여 고추 세균성 점무늬병 방제 시 유용할 것으로 기대된다.

[0162] **9-2. 잔디 동전마름병 (병원균: *Sclerotinia homoeocarpa*) 방제 효과 확인**

[0163] JCK-1398 배양액의 희석액은 실험에 2-1과 동일한 방법으로 JCK-1398 균주를 배양한 후 UV 스펙트로포토미터를 사용하여 600 nm에서 광학밀도의 값이 0.08이 되도록 희석한 것을 100배 희석용액으로, 0.008이 되도록 희석한 것을 1,000배 희석용액으로 이용하였다. JCK-1398 20% SC는 멸균수를 사용하여 100배 및 1,000배로 희석한 JCK-1398 배양액 희석액을 이용하여 제조하였다. 무처리구는 Tween-20이 250 ug/ml 수준으로 첨가된 용액을 사용하였으며, 대조군으로는 Tebuconazole 25% EC (호리쿠어 유제)를 정량 (2,000배 희석액) 및 반량 (4,000배 희석액) 사용하였다.

[0164] 각 시료는 모두 잔디 동전마름병 균주 접종원 접종 4일 전에 토양관주 처리하였으며, JCK-1398 배양액은 100배

및 1,000배 희석액으로 단제 처리하거나 각각 Tebuconazole 25% EC 4,000배 희석액과 합제 처리하였고, JCK-1398 20% SC는 100배 및 1,000배 희석액으로 단제 처리하거나 각각 Tebuconazole 25% EC 4,000배 희석액과 합제 처리하였다.

[0165] 그 다음, 잔디 동전마름병 균주 (*Sclerotinia homoeocarpa*)의 균총을 가로x세로 2x2 mm의 크기의 agar plug로 떼어 PDA 배지에 접종한 후, 5일 동안 25℃ 항온기에서 배양하였다. 두 차례 멸균된 밀기울-왕겨 배지(밀기울 9 g, 왕겨 1.5 g, 증류수 10 ml)에 배양된 균주의 균총을 가로x세로 1x1 cm의 크기로 잘라 5개씩 이식한 후, 바이오 실리스토퍼만으로 입구를 막고 25℃ 항온기에서 7일 동안 배양하였다. 그 다음, 배양된 균을 배지와 함께 분쇄기에 넣고 증류수 110 ml 및 1.1 ml의 스트렙토마이신 황산염 (streptomycin sulfate) 200 ug/ml을 넣고 마쇄하였다.

[0166] 끝으로, 파종 후 약 한 달 동안 성장시킨 크리핑 벤틀그래스 (creeping bentgrass) 포트 중앙에 1 cm 가량 구멍을 뚫은 후, 마쇄한 접종원을 포트당 3.3 ml씩 접종하였다. 접종된 잔디는 습도 95%, 온도 25℃에서 무처리구와 처리구 간의 차이가 보일 때까지 관찰을 진행하였다. 포트 전체 면적 대비 발병한 면적을 조사하여 발병도 (disease severity)를 산출하였으며, 처리구당 3포트 2반복으로 실험을 수행하여, 그 결과를 도 10 및 표 17에 나타내었다.

표 17

처리구		방제가(%)
JCK-1398 배양액 X100	단제	16.16
	합제	97.26
JCK-1398 배양액 X1000	단제	0.00
	합제	26.03
JCK-1398 20% SC X100	단제	2.19
	합제	84.93
JCK-1398 20% SC X1000	단제	34.25
	합제	73.97
Tebuconazole 25% EC X2000	단제	78.08
Tebuconazole 25% EC X4000	단제	41.10

[0169] 도 10 및 표 17에서 확인할 수 있듯이, JCK-1398 배양액 (100배 희석액 및 1,000배 희석액) 및 JCK-1398 20% SC (100배 희석액) 단제 처리한 경우 모두 무처리구와 유사한 발병도를 나타냈다. 반면, JCK-1398 배양액 (100배 희석액)을 Tebuconazole 25% EC 4,000배 희석액과 합제 처리한 경우 97.26%의 높은 방제 효과를 나타냈으며, JCK-1398 20% SC (100배 희석액 및 1,000배 희석액)를 Tebuconazole 25% EC 4,000배 희석액과 합제 처리한 경우 또한 각각 84.93% 및 73.97%의 방제 효과를 나타내어 농도 의존적으로 방제 효과가 나타남을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 JCK-1398 균주 배양액을 사용할 경우 잔디 동전마름병 방제 시 사용하는 화학농약 처리량을 월등히 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

[0171] 9-3. 토마토 녹응애 (해충: *Aculops lycopersici*) 방제 효과 확인

[0172] JCK-1398 20% SC는 멸균수를 사용하여 250배, 500배 및 1,000배로 희석한 JCK-1398 배양액 희석액을 이용하여 제조하였다. 무처리구는 Tween-20이 250 ug/ml 수준으로 첨가된 용액을 사용하였으며, 대조군으로는 선충탄 액제 (Fosthiazate 30% SL, ㈜팜한농)를 정량 (4,000배 희석액) 사용하였다.

[0173] 각 시료는 4-5엽기 서광 토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill)에 1 그루 당 20 ml씩 토양관주 처리하였다. 이때, JCK-1398 20% SC는 3일 간격으로 2회 처리하였고, 선충탄 액제는 1회 처리하였다. 그 다음, 녹응애의 발생 적정 온도 및 습도 (25-28℃ 30%)를 유지하여 녹응애를 자연발병 시켰다. 약제 2차 처리 2주 후에 녹응애가 발병하였으며, 녹응애 발병 2주 후 지상부의 길이를 측정하여 녹응애에 대한 방제 효과를 조사하여, 그 결과를 도 11 및 표 18에 나타내었다.

표 18

처리구	JCK-1398 20% SC			Fosthiazate 30% SL	무처리구
	X250	X500	X1000	X4000	
길이(cm)	26.13	21.75	15.88	32.00	16.83

[0176] 도 11 및 표 18에서 확인할 수 있듯이, JCK-1398 20% SC 250배, 500배 및 1,000배 희석액 처리구는 지상부의 길이가 각각 26.13 cm, 21.75 cm, 15.88 cm로서 농도가 높아질수록 지상부의 길이가 길어지는 것을 알 수 있었다. 한편, 대조군으로 사용한 Fosthiazate 30% SL 4,000배 희석액은 32 cm로 지상부의 길이가 가장 길었고, 무처리구는 16.83 cm로 가장 짧았다. 따라서, JCK-1398 균주 배양액을 토마토에 처리할 경우, 저항성을 효과적으로 유도하여 토마토 녹응애 방제 시 유용할 것으로 기대된다.

수탁번호

[0177]

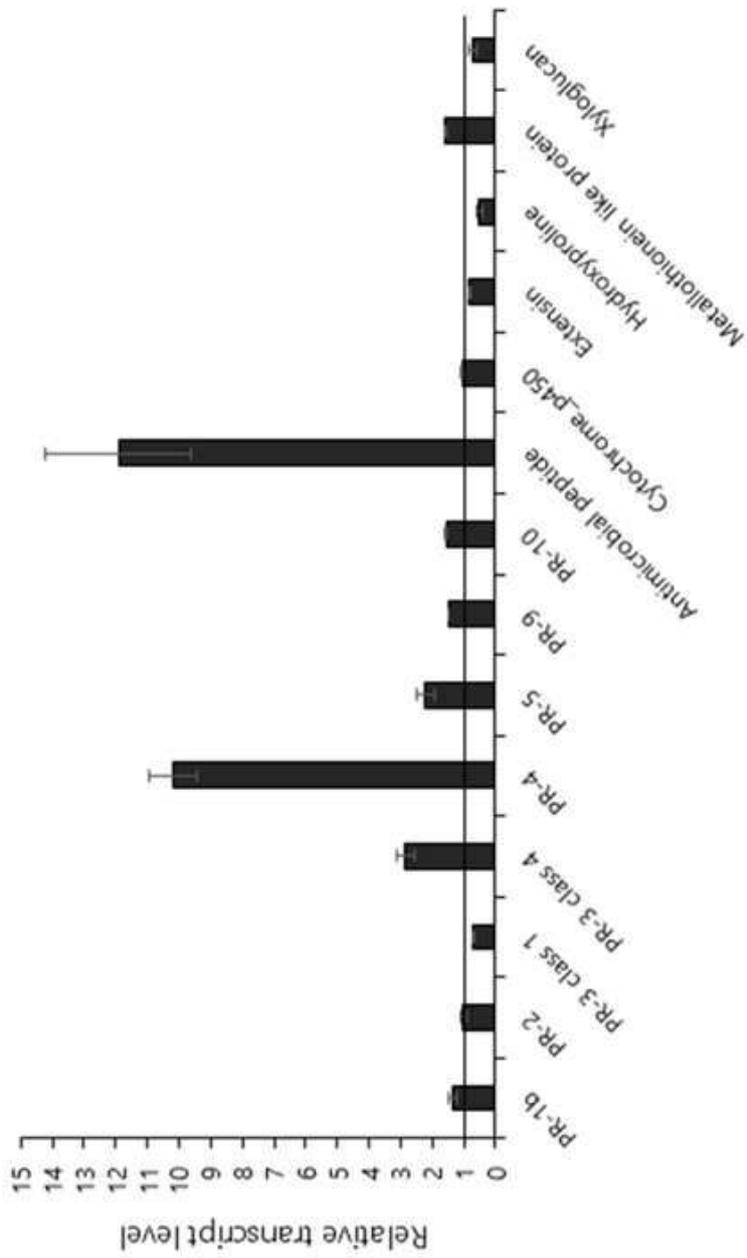
기탁기관명 : 생물자원센터

수탁번호 : KCTC14084BP

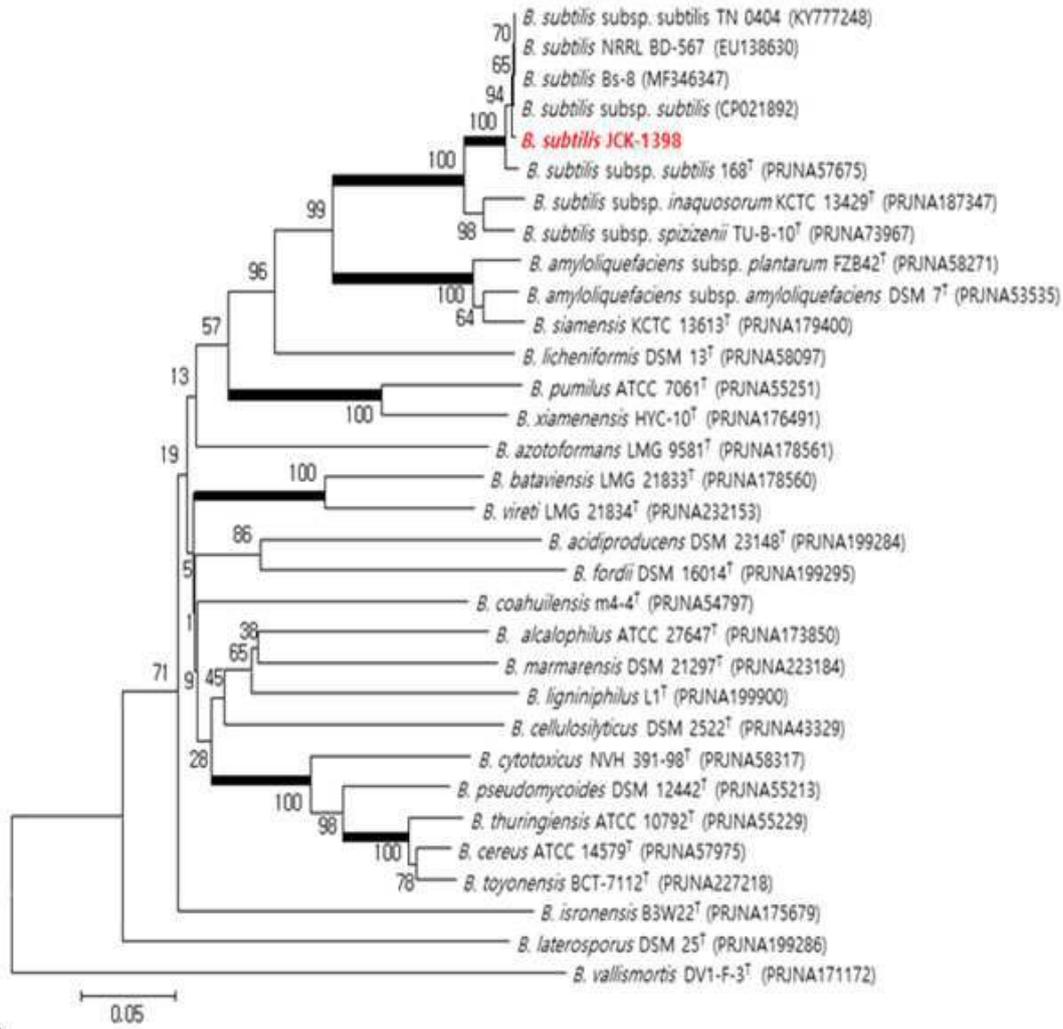
수탁일자 : 20191219

도면

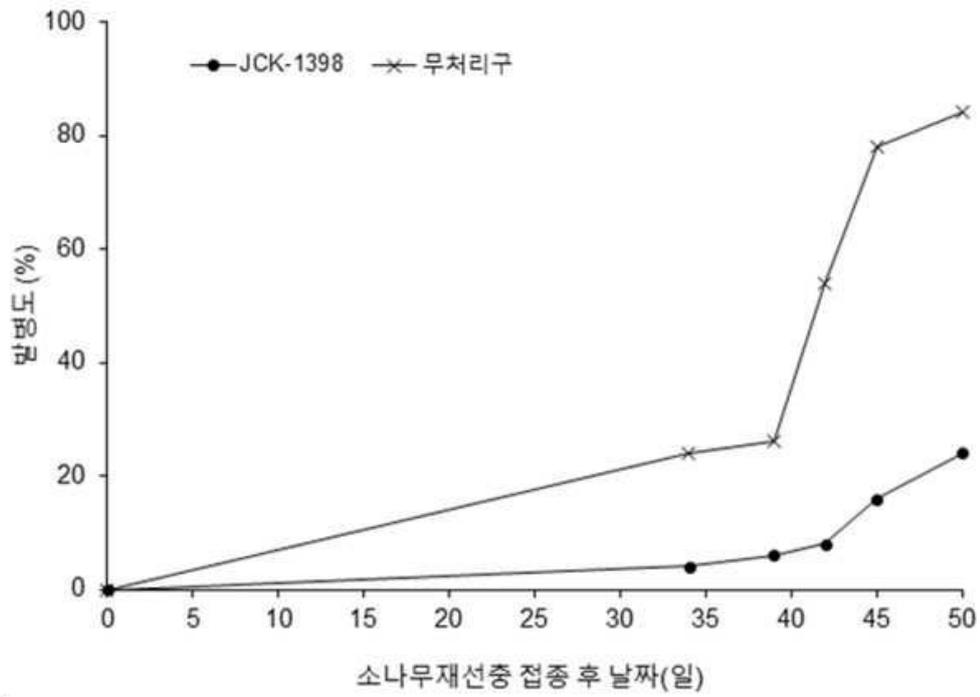
도면1



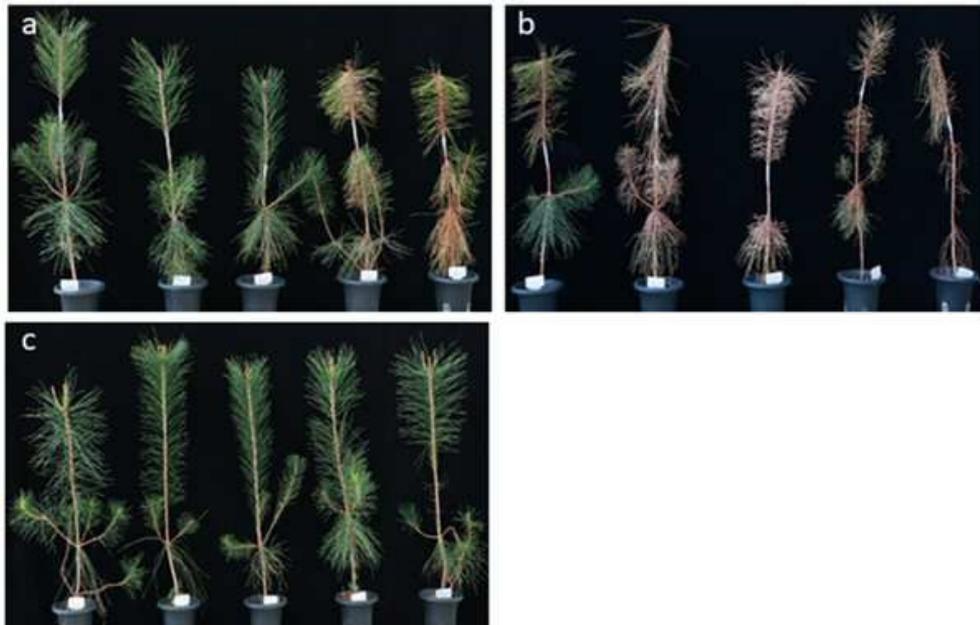
도면2



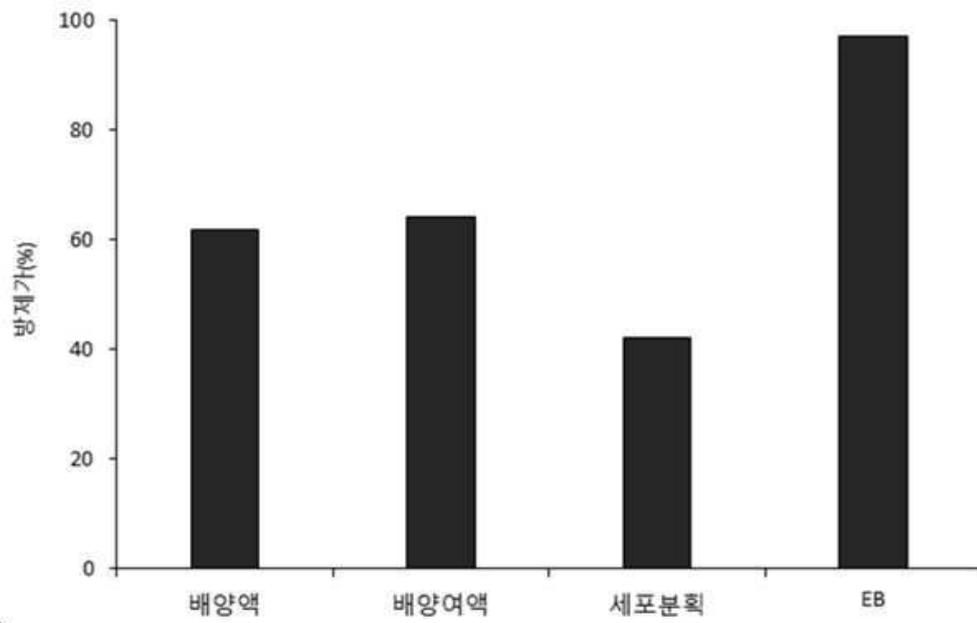
도면3a



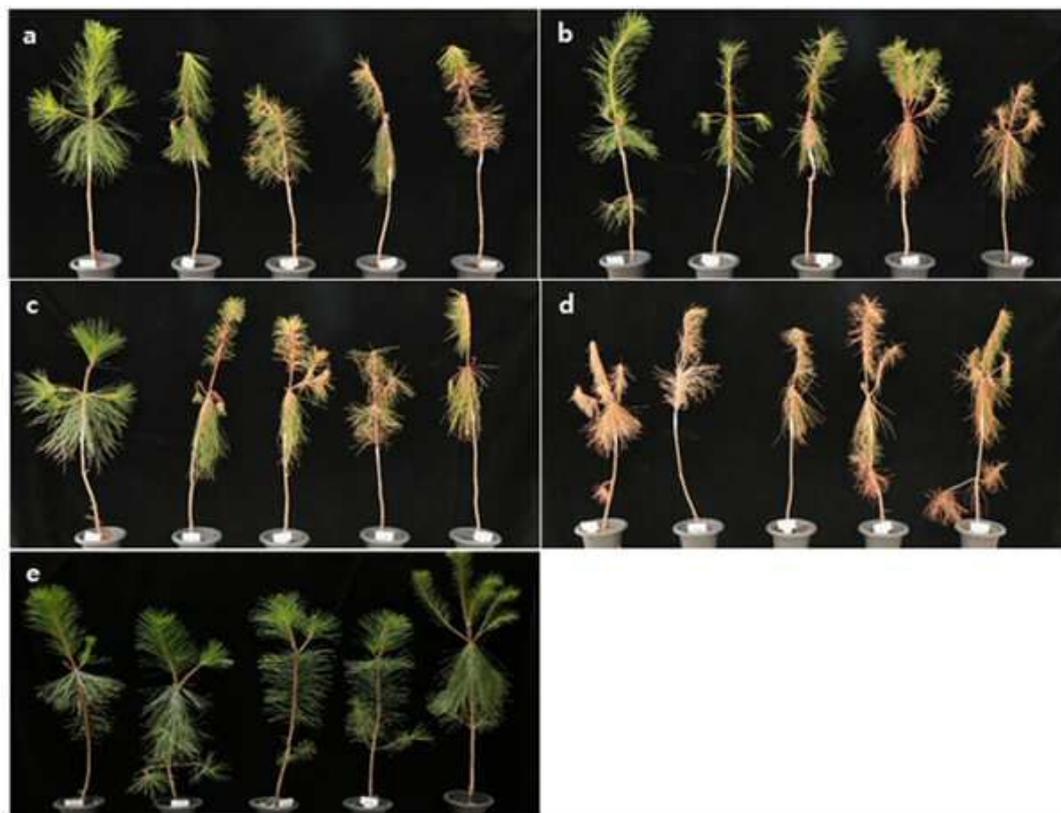
도면3b



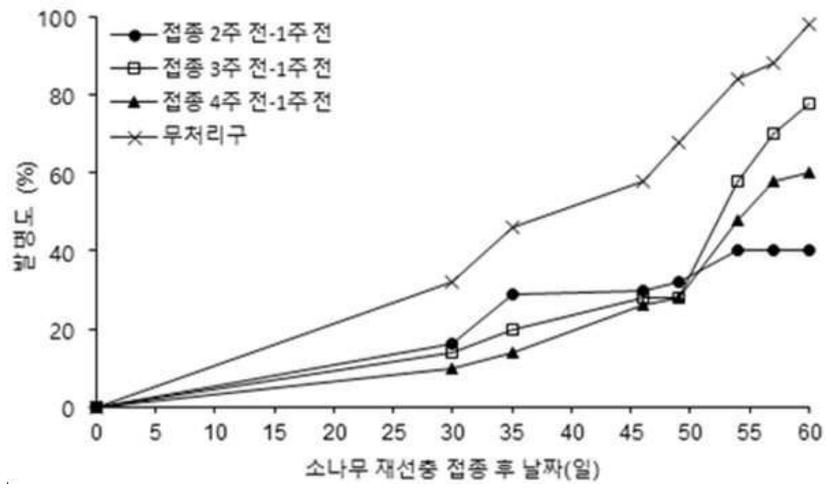
도면4a



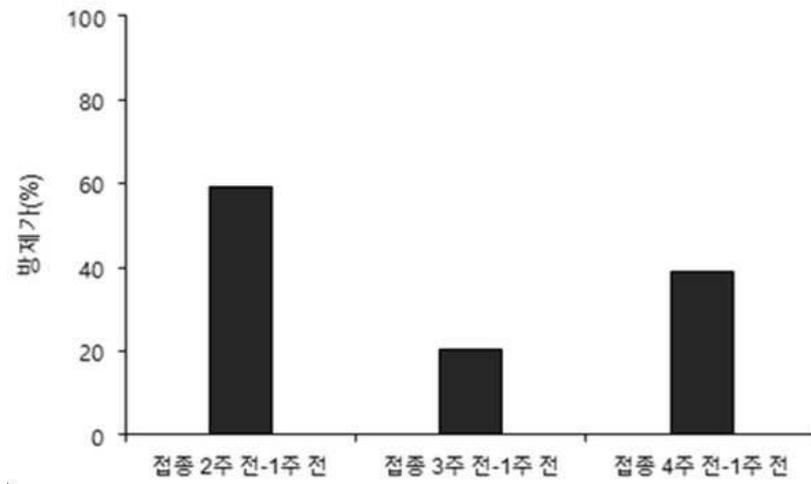
도면4b



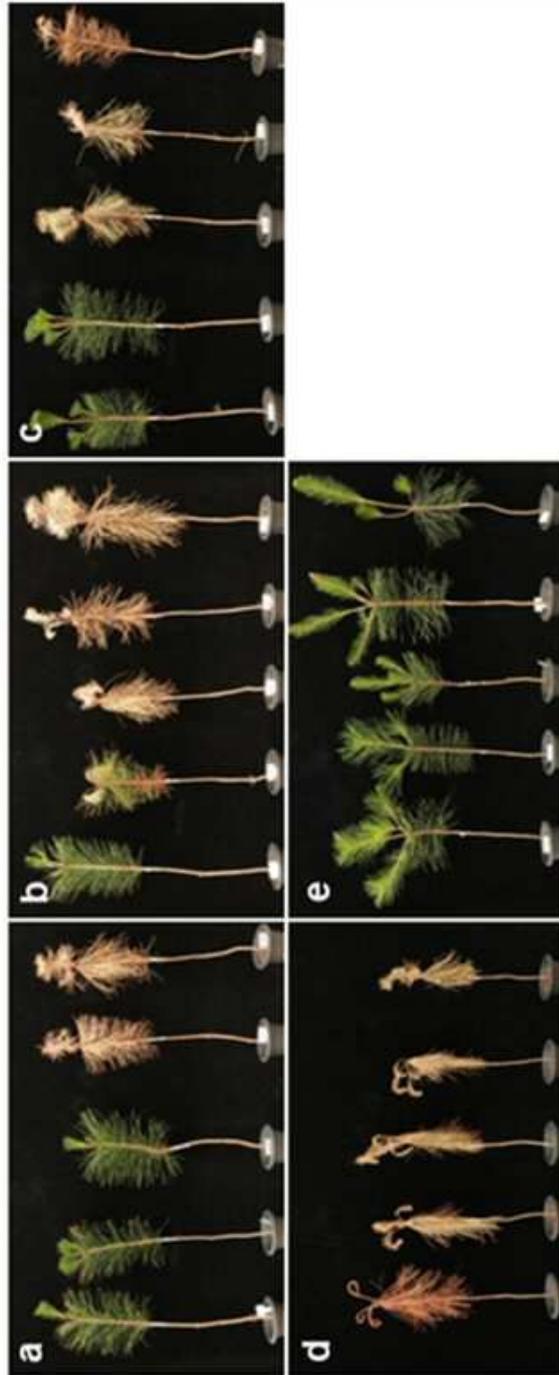
도면5a



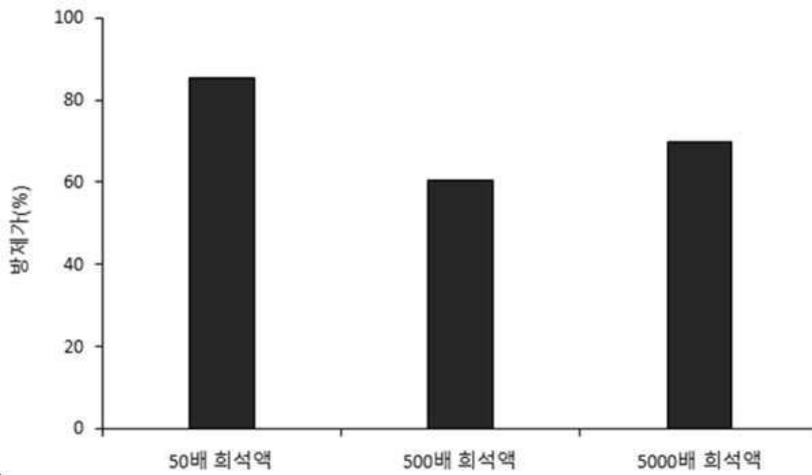
도면5b



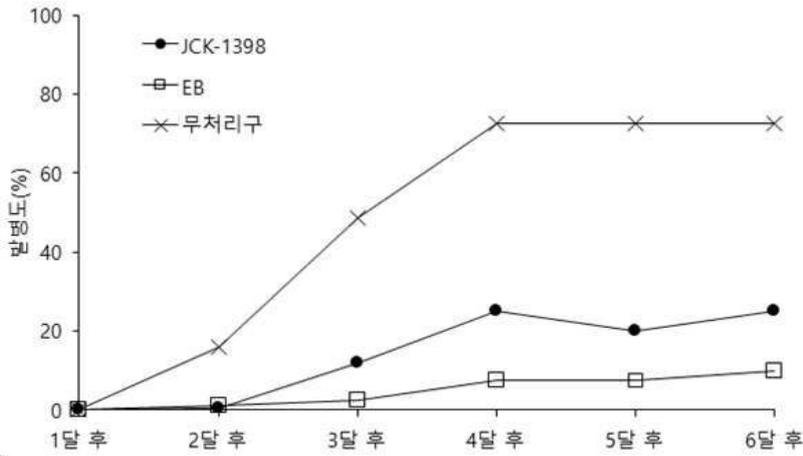
도면5c



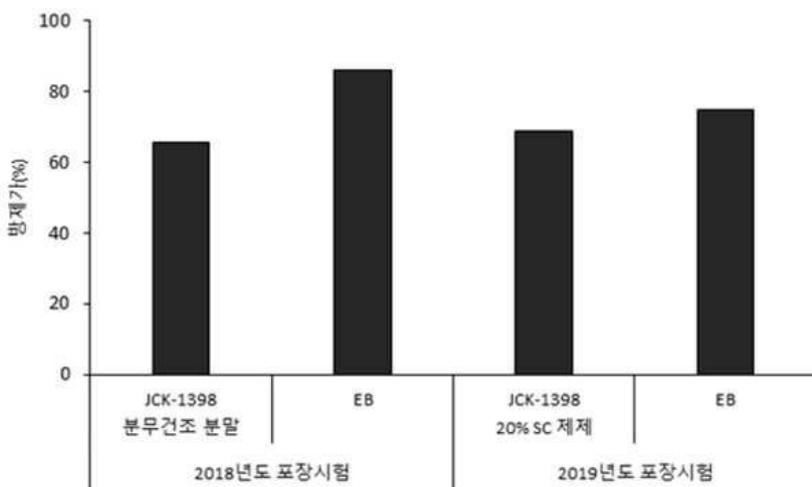
도면6



도면7a



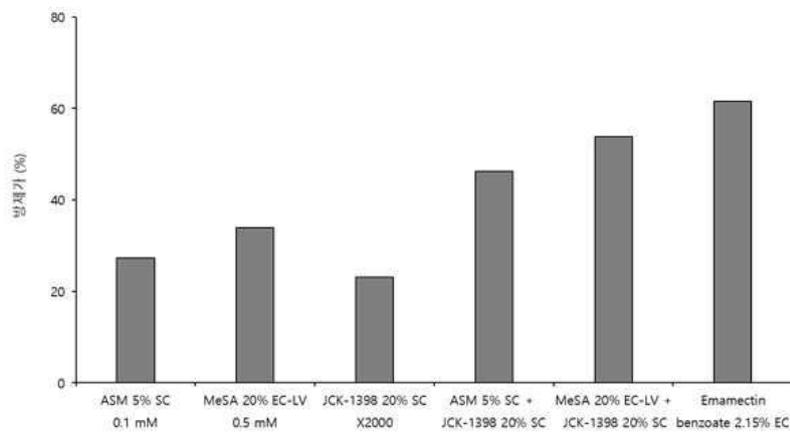
도면7b



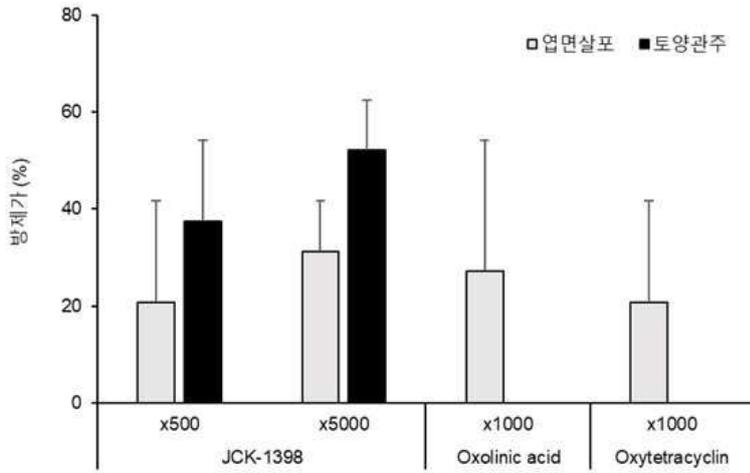
도면7c



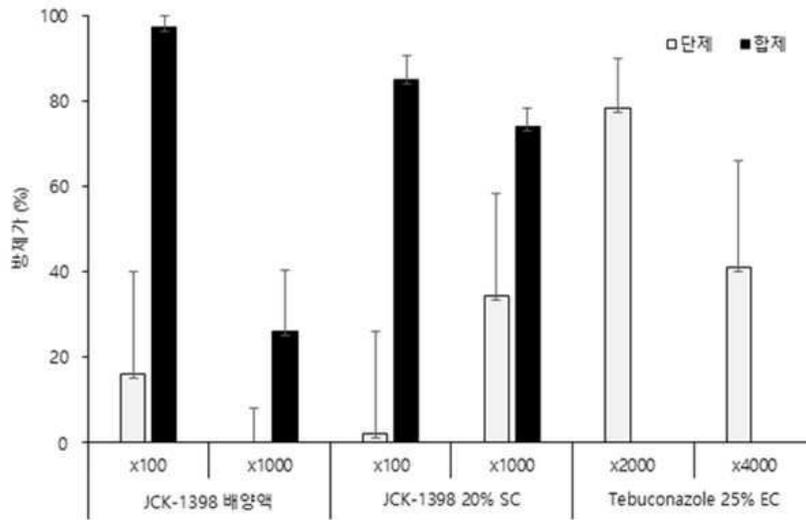
도면8



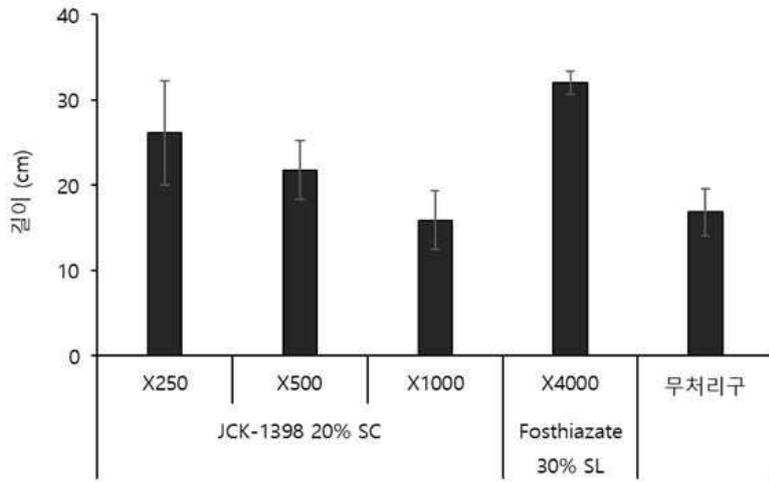
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY
National Institute of Forest Science
Pusan National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Bacillus subtilis JCK-1398 strain having induced resistance in various plant, composition for controlling pine wilt disease comprising the same and method used therein
- <130> PN190408
- <160> 33
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220><223> PR-1b family For
- <400> 1
tgccccttca ggtaaatcgt 20
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PR-1b family Rev
- <400> 2

gcgggtcgta gttgcagata a 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR-2 family For

<400> 3

cgacaacatt cgccccttct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR-2 family Rev

<400> 4

ctgcagcgcg gtttgaatat 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR-3 family class 1 For

<400> 5

acctacagcg cttcattgc 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR-3 family class 1 Rev

<400> 6

tgtggtttca tgcgacgttt 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR-3 family class 4 For
 <400> 7
 ccatcgaagc ccagtaatt t 21
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-3 family class 4 Rev
 <400> 8
 agccggaag caatattatg gt 22
 <210> 9

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-4 family For
 <400> 9
 ccccgttact gtcaattgca t 21
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-4 family Rev
 <400> 10
 aaagcgtgac ggtgcgtatt 20
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-5 family For
 <400> 11
 gaaccagtgc ccatacacag tct 23

 <210> 12
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-5 family Rev
 <400> 12
 cctgcggcaa cgttaaaagt c 21
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-9 family For
 <400> 13
 acaccaccgt gctggacatt 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-9 family Rev
 <400> 14

 gtgcgggagt cgtgtagag 20
 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-10 family For
 <400> 15
 tgtctcaagt ggaggcaagg a 21
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PR-10 family Rev
 <400> 16
 aagcgacaat ttcaggcaaa ac 22
 <210> 17

<211> 20
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antimicrobial peptide For
 <400> 17
 gcgttgctca taccggttt 20
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antimicrobial peptide Rev
 <400> 18
 gcagcactta gcactggatg aa 22
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cytochrome P450 For
 <400> 19
 aacatgtcct gcagcacgaa 20

 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cytochrome P450 Rev
 <400> 20
 gtgcaccgca agtaaaccaa 20
 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Extensin For
 <400> 21

cgaatgtaat tccgaagttg ca	22
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Extensin Rev	
<400> 22	
ccatcccaaa ccaccagtct	20
<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Hydroxyproline-rich glycoprotein precursor For	
<400> 23	
gagaaactgg caccgtctta gga	23
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Hydroxyproline-rich glycoprotein precursor Rev	
<400> 24	
acctccccct ccattcaca	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Metallothionein-like protein For	
<400> 25	
tcaggctgct gcgttatttg	20
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Metallothionein-like protein Rev
 <400> 26
 tgtcagcgca gtcacaatTT g 21
 <210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Xyloglucan endotransglycosylase For
 <400> 27
 tctgcgcccc tacttttcc 19
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Xyloglucan endotransglycosylase Rev
 <400> 28
 agctggcgga ttgatcatgt 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Elongation factor-1 alpha For
 <400> 29
 gggaagccac ccaaagtttt 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Elongation factor-1 alpha Rev
 <400> 30
 tacatgggaa gacgccgaat 20
 <210> 31
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gyrA For
 <400> 31
 cagtcaggaa atgcgtacgt cctt 24
 <210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gyrA Rev
 <400> 32

 caaggtaatg ctccaggcat tgct 24
 <210> 33
 <211> 856
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bacillus subtilis JCK-1398 strain gyrA sequence
 <400> 33
 gatgtttgta gagcagtttg tttgtacaga ttgtttaaga tgacattcgc attggcatcg 60
 cgtctgattt caatgacaat tctcatacct gtacgatctg actcatcagc cagatctgtg 120
 ataccctcta tctttttgtc ccttacgaga tcagcaattt tctcaattaa tttcgctta 180
 tttacttggg aaggtaactc tgtaacgata attctttctt taccgaaga tgtttgttcg 240

 atctcagctt ttgcccgat cgtgatagag cctcggcctg attcgtatgc tttccggata 300
 ccgctgccgc ccaagatttg acccgcagtc gggaaatcag gtccctggaat gacttcata 360
 agctctggaa tggtaatgtc cggattctca ctgacagcaa gtactccgtc aatgatttct 420
 cccagctggg gcggaggaat gtttgttgc atacctaccg caatgccggc agcaccgttc 480
 acgagcagat tcgggaacct tgaaggcata acgacaggtt ctctttctga cccgtcatag 540
 ttatctctggg aatcgattgt gtcttttgtg atgtcacgaa gaatctccat tgagatttta 600
 gacattcttg ctctctgata acgcatggcc gccgctgagt ctccgtcaac agaaccgaag 660

 tttccgtgac cgtcaacgag catataacgg tagttgaaat cctgagccat tctgaccatg 720
 gattcatata ccgctgaatc accgtgccggg tggtatttcc cgataacttc tccaacgata 780
 cgcgccgatt tttataagg cttgtcactt gtcatgccta aatcattcat tgcatacaaa 840

atccgtctat gaactg

856