

한반도 중부지방의 벼 뿌리로부터 내생 세균의 분리와 특성 분석

박수영^{1,2} · 양성현^{1,3} · 최수근¹ · 김지현¹ · 김종국² · 박승환^{1*}

¹한국생명공학연구원 시스템미생물연구센터, ²경북대학교 미생물학과

³한국해양연구원 바이오신소재연구사업단

Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from Rice Root Cultivated in Korea. Park Soo-Young^{1,2}, Sung-Hyun Yang^{1,3}, Soo-Keun Choi¹, Jong-Guk Kim², and Seung-Hwan Park^{1*}. ¹Laboratory of Microbial Genomics, Systems Microbiology Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea, ²Department of Microbiology, College of Nature Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ³Present address: Marine Biotechnology Research Center, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan 425-600, Korea – The 44 endophytic bacterial strains were isolated from surface-sterilized root of rice cultivated in seven different locations of Chungcheong province, Korea. Each isolate was introduced into rice seedlings grown gnotobiotically by inoculating scissor-cut first true leaf with cell suspensions, and the colonization capacity of each isolate in root tissue was analyzed at 7 days after inoculation. Sixteen out of 44 isolates were re-isolated from root successfully with the frequency of 10^{3-5} CFU/g tissue. Interestingly, seven out of 16 isolates were identified as *Burkholderia* species. The identity between inoculated strains and re-isolates was confirmed by genomic fingerprinting and 16S rDNA sequence analysis. By a confocal laser scanning microscopic observation it was revealed that KJ001 strain, one of the sixteen isolates tagged with *gfp* colonized in root tissue especially around xylem. Six out of seven *Burkholderia* strains obtained in this study showed antagonizing activities against seven different fungal pathogens, contain *nifH* gene, and five of them enhanced growth of cucumber over 30%. The isolates showed no hypersensitive response on tobacco leaves and no pathogenicity in rice. From these results it was found that the endophytic *Burkholderia* strains will be useful in agriculture to develop a biocontrol agent or a bio-fertilizer.

Key words: Rice endophyte, PGPR, *Burkholderia*

PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)은 식물의 뿌리 및 그 주변의 환경에서 서식하며 식물과 직간접적인 상호작용을 통하여 식물의 생장 촉진과 생산성 증대 효과를 나타내게 하는 근권 세균류를 총칭하는 것이다[22]. PGPR중에는 식물병원성 곰팡이, 세균, 곤충 및 바이러스 등의 병원성 인자로 인한 식물병 발생을 억제하거나 감소시키는 효과를 보이는 것들이 보고되고 있으며 이들로부터 식물병원균의 제어에 관련된 antibiotics, siderophore, hydrolytic enzyme 등에 대한 연구가 활발히 추진되어왔다[8, 21, 29-31]. 이런 연구로 식물병의 생물학적 방제에 있어서도 PGPR의 활용가능성은 매우 크다. 옥신(auxin), 지베렐린(gibberellin), 사이토키닌(cytokinin), 아세토인(acetoin)등 식물생장 호르몬의 생산, 대기중의 질소 고정, 유기인산이나 무기인의 용해에 의한 식물의 이용성 증진 등 PGPR이 식물의 생장촉진이나 생산성 향상에 기여하는 기작에 대해 많은 연구 결과가 보고되고 있으며[4, 14, 15, 32, 33], 최근에는

PGPR중 내생세균에 의한 유도 저항성이 식물의 병 방어 기작 중 중요한 부분을 차지하는 것으로 보고되었다[20, 23].

식물의 내생균(endophyte)은 건강한 식물체의 조직 내에서 숙주식물에 병을 일으키지 않으며 서식하는 미생물류를 총칭 한다[17]. 많은 종류의 내생세균들이 PGPR로서의 기능을 하는 것으로 보고되고 있으며 숙주식물의 조직 내에서 질소고정을 하고, 항생물질 및 식물 호르몬 등을 생산함으로써 식물의 생장촉진, 병 발생 억제, 생산성 증대 등 여러 측면에서 유용한 기능을 나타내는 이점이 있다[19, 20]. 또한 식물체 조직 내에서 서식하는 특성상 내생균은 외부 자 연환경으로부터의 각종 biotic, abiotic stress들로부터 보호 받을 수 있는 안정적인 서식처를 제공 받음으로써 식물체 외부에 서식하는 PGPR 보다 지속적인 효과를 가져올 수 있다. 따라서 내생성 PGPR의 발굴 및 활용연구는 유기합성 농약과 비료의 사용을 줄이면서 작물의 생산성 증대를 도모하려는 최근의 추세에 비추어 중요한 과제이다.

전세계의 주요 식량작물로는 벼, 보리, 밀 등이 있으며 특히 쌀은 세계 인구 절반의 주식이고, 한반도를 포함한 아시아 지역에서 사람들이 섭취하는 전체 칼로리의 절반을 차지하는 주곡으로 그 중요성이 매우 높다[25]. 따라서 벼의 생

*Corresponding author

Tel: +82-42-860-4410, Fax: +82-42-860-4488

E-mail: shpark@kribb.re.kr

산성 증대를 위한 연구는 여러 나라에서 오랜 역사를 두고 경쟁적으로 진행되어왔으며 근래에는 내생세균의 기능을 활용하는 연구가 중요한 과제 중 하나로 부각되고 있다. 이러한 경향은 환경 및 생태계에 문제를 일으키고 있는 유기합성소재의 사용을 줄이고 친환경농업을 진작시키려는 것과 맥을 같이한다. 특히 최근 10여 년 동안 다양한 벼 내생세균이 분리·보고되었으며[2, 9-11, 13, 16, 35], 내생세균의 게놈해독과 더불어 분자 생물학적 수준에서 이들의 특성, 특히 식물과의 상호작용을 이해하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[24]. 최근 본 연구팀은 벼 내생균에 병원성 세균의 신호전달 물질을 분해할 수 있는 효소유전자를 도입하고 이 재조합 내생균을 벼에 도입함으로써 병원균에 의한 병 발생을 성공적으로 감소시키는 결과를 보고한 바 있다[5]. 벼로부터 분리된 내생세균은 농용 미생물제 개발 및 유용유전자 발굴을 위한 자원으로 활용할 수 있으며 정착력이 우수한 내생균을 선발하고 식물의 성장 촉진, 내충성 및 내병성 부여, 품질향상 등에 대한 기능을 검증하여 기능성 농용 미생물제를 개발할 수 있을 것이다.

내생세균의 중요성에 비추어 볼 때 국내에서 벼를 대상으로 한 연구는 매우 부족하고 연구보고도 빈약하다. 본 연구에서는 한반도 중부지방에서 재배되는 벼 시료로부터 다양한 내생세균을 분리하고 그 특성을 조사하고자 하였으며 이 과정에서 내생균을 비교적 쉽게 확인할 수 있는 시스템을 구축하고자 하였다. 본 연구를 통해 식물 조직 내 정착력, 식물 성장 촉진 능력, 항진균 활성, 질소고정관련 유전자 보유 등 식물에 대한 유용한 성질을 지니는 벼 내생세균을 다수 확보하였기에 이에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 및 배지

본 실험에서 사용한 벼 시료는 지역 및 기후, 토양상태, 벼의 품종을 고려하여 충청도 일대 공주와 금산의 화신벼, 연기의 동안벼와 화영벼, 음성, 괴산, 예산의 대안벼, 청원의 화성벼 등 7개 지역의 논에서 출수 이전에 21점을 채집하였다. 내생균의 분리를 위해 사용된 배지는 Tryptic Soy Broth(TSB), Nutrient Broth(NB)와 Barraquio 등[2]이 사용한 배지를 이용하였고, 고체 배지로 사용할 경우 각 배지에 1.5% agar를 첨가하였다. 벼 유묘의 기내 성장 배지로는 1차 증류수에 agar powder만을 넣어 만든 water-agar (final 0.6%) 배지를 사용하였다.

내생세균의 분리

논에서 채집된 벼는 실험실 내에서 흐르는 수도물로 뿌리에 붙어있는 흙을 일차 제거하고 증류수로 남은 흙을 철저히 제거한 후 뿌리 부위를 잘라냈다. 페이퍼 타올을 이용하여 물기를 제거한 후 뿌리시료의 무게를 측정하였다. 준

비된 시료는 250 ml flask에 멸균수 50 ml과 직경 1mm grass bead 5그램을 넣고, 250 rpm으로 1시간 동안 shaking하여 뿌리의 표면에 있는 미생물을 제거 하였다. 벼 내생균의 분리를 위한 표면 살균은 NaClO (Sodium Hypochloride)를 이용한 방법[5, 27]을 사용하였다. 멸균수로 세척한 시료를 1% NaClO로 10분간, 70% 에탄올로 1분간 처리하고 멸균수 100 ml로 3번 세척 후 250 ml flask에 멸균수 20 ml과 glass bead 5그램을 넣고 250 rpm에서 1시간 동안 shaking하여 표면 박테리아를 제거하는 과정을 수행하였다. 이때 마지막 세척액 중 1 ml은 Nutrient Agar(NA) 배지에 도말하여 표면 살균의 완성도를 측정하는 control로 사용하였다. 표면 살균된 시료는 멸균수 3 ml과 함께 마쇄하여 적당량 희석한 후 배지에 도말하여 30°C에서 24-72시간 동안 배양하였다. 자라나온 colony를 최종적으로 NA 배지에 옮겨 순수 분리 배양을 하였다.

무균조작된 유묘로부터 재분리

내생세균의 재분리 실험을 위한 벼 종자는 대안 품종을 사용하였다. 종자의 표면살균은 껍질을 제거한 벼 종자를 5% NaClO에서 20분, 70% ethanol로 1분간 처리 후 적당량의 멸균수로 철저히 세척하는 방법을 이용하였고 무균 상태에서 건조하여 0.6% water agar plate(Petri dish; 87×15 mm)에 올려 암(暗)조건으로 30°C에서 2-3일 배양하였다. 각각의 1차 분리균주들은 3 ml NB 배지에 접종하여 OD₆₀₀=1(약 10⁸ CFU/ml)까지 배양 후 원심분리하고 50 mM PBS buffer에 현탁하여 세척한 후 50 mM PPB(Potassium Phosphate Buffer) 500 μl에 최종 현탁하였다. 이렇게 준비한 1차 분리균주들은 멸균된 면봉을 사용하여 무균 발아된 어린 잎의 1/3 정도를 가위로 절단한 단면에 감염 시켰다. Plant growth chamber(light:dark=16:8, 28°C)로 옮겨 7일간 배양 후 재분리를 시도하였으며 *E. coli* DH5α를 negative control 균주로 *Azoarcus indigenus* (ATCC 51398)를 positive control로 사용하였다. 유묘에 감염시킨 균주들의 재분리는 앞에서 언급한 분리과정 중 1% NaClO를 10분, 70% ethanol을 30초간 처리하여 표면살균하는 부분만 달리하였고 나머지는 같은 방법을 이용하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

분리균주의 16S rDNA는 Choi 등[6]이 사용한 GF1과 GR1 primer을 이용하여 PCR로 증폭 후 염기서열을 결정하여 분석하였고 *Burkholderia* 분리균들의 16S rDNA 염기서열 결정과 분석은 Cheong 등이 사용한 방법[7]과 Wilmotte 등이 사용한 방법[34]을 이용하여 수행하였다.

Gemomic DNA fingerprinting에 의한 재 분리균 검증
재분리균과 모균주와의 일치 여부는 OPERON사 (Operon Technologies, CA, USA)의 RAPD분석용 올리고 OPX-1,

OPX-2를 각각 10 pmol씩 100 ng의 genomic DNA와 혼합하여 94°C 1분, 36°C 1분, 72°C 2분, 45 cycle로 증폭된 산물의 pattern을 분석하여 확인하였고 최종 확보된 16주의 분리주는 Alam 등[1]이 사용한 방법으로 ERIC-, REP-PCR로 분석하여 서로 다른 균주임을 확인하였다.

GFP에 의한 내생성 확인

GFP 도입을 위한 플라스미드 벡터는 pGFPuv(Clontech, USA)를 사용하였고 형질전환용 내생균 숙주로는 플라스미드의 항생제 marker인 ampicillin에 민감한 KJ001균을 선택하였다. Electroporation용 competent cell은 KJ001을 LB 3 ml에 전배양하고 LB 100 ml에 전배양액 1%를 접종하여 37°C에서 180 rpm으로 배양하였다. OD₆₀₀ 값이 0.5에 도달하였을 때 원심분리(5000 rpm, 10분간)하여 균체를 모으고 4°C 멸균수 100ml로 2회 세척, 10% glycerol 50ml로 2회 세척을 하여 최종 2~3×10¹⁰/ml의 농도가 되도록 현탁하였다. KJ001 competent cell 50 µl에 pGFPuv 100ng을 넣고 10분간 얼음에 둔 후 electroporation cuvette (Bio-Rad, 0.2cm/ml)으로 옮겨 Bio-Rad gene pulse II를 이용하여 12.5kv/cm, 0.2kΩ, 25 µF의 조건으로 전기충격을 준 후 즉시 LB 1 ml을 가해 37°C, 180 rpm에서 1시간 배양하였다. 그 후 ampicillin (100 µg/ml)이 포함된 NA plate에 도말하여 37°C에서 배양하였다. GFP로 형질 전환된 KJ001은 ampicillin 100 µg/ml의 LB에 배양하여 플라스미드를 분리한 후 agarose gel 전기영동으로 확인하였다. KJ001-*gfp* recombinant는 앞의 재분리 실험에서와 동일한 방법으로 무균 생육된 벼 유묘에 감염시켜 7일 후 뿌리 조직을 관찰하였다. 표면 살균된 뿌리는 cryostat (model CM 3050; Leica)을 이용하여 횡단면 20 µm 두께로 cryosection 후 model LSM5 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany)를 이용하여 조직 내 KJ001-*gfp*균의 정착양상을 관찰하였다.

분리균에 대한 식물의 과민반응 및 병원성 검증

내생균들의 식물 병원성 여부를 검증하기 위해 Cho 등[5]이 사용한 방법으로 담배잎에 균주를 주입하여 과민반응 (Hypersensitive Response, HR)을 조사하였으며 7개의 *Burkholderia* 분리주에 대해서는 추가로 벼에 대한 병원성 여부를 조사하였다. 출수 직 후의 벼 이삭을 분리균 현탁액 (10⁷~10⁸ CFU/ml 농도)에 침지한 후 일주일 동안 발병여부를 살펴보았다.

질소고정 유전자(*nifH*)의 탐색

분리균들이 질소고정 능력을 가지고 있는지 파악하기 위한 한 방법으로 질소고정관련 유전자 중 하나인 *nifH* gene의 존재여부를 조사하였다. Choi 등(6)이 사용한 방법으로 PCR 증폭을 시도하였으며 예상 크기의 PCR 산물이 나오는 경우 이를 pGEM-T vector(Promega, USA)에 클로닝하여

염기 서열을 분석하였다.

내생균의 식물 병원 미생물에 대한 길항력

16주의 내생균을 NB배지에 배양하고 균체를 PBS buffer로 세척한 후 약 10⁸ CFU/ml의 농도로 현탁하여 PDA 배지 중심으로부터 3.5 cm 지점에 접종하였다. PDA 배지 중심부에는 *Rhizopus oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Mucor ambiguus*, *Sclerotium rolfii*, *Alternaria* sp, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, 또는 *Pythium aphanidermatum* 이 잘 자란 agar disk(직경 10 mm)를 각각 올려 28에서 배양하였다. *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*와 더불어, *Burkholderia glumae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 등의 bacterial pathogen들은 균기전의 NA에 현탁하여 plate를 만드는 방식으로 접종하고 그 위에 각각의 내생세균을 위에서 언급한 방법으로 치상하여 28°C에서 배양하였다. Positive control은 *P. polymyxa* E681균[29]을 사용하였다.

식물생장 촉진 효과

벼에서 분리된 16주의 분리균을 NB배지에서 배양하여 PBS buffer로 세척 후 약 10⁷ CFU/ml의 농도로 현탁하였다. 여기에 오이 종자를 넣어 3시간 침지하였다. 침지된 오이종자는 nursery soil과 vermiculite가 2:1로 혼합된 rectangular pot (5 cm×5 cm×8 cm)에 4 반복으로 심겨져 온실에서 배양하였다. 발아된 시점부터 매 10일마다 최종 40일까지 길이를 측정하면서 그 평균값으로 성장촉진 효과를 조사하였다. PBS buffer만 처리한 오이 유묘를 control로 사용하였다

결과 및 고찰

벼 뿌리 내생균의 분리

충청도 공주, 금산, 괴산, 연기, 음성, 예산, 청원 7개 지역의 벼 시료21점을 채집하여 뿌리를 표면 살균한 후 이로부터 1차로 44주의 내생균을 분리 하였다. 각 시료로부터 자라난 colony들의 형태, 색깔 및 그람 염색결과를 관찰 한 후 다수를 차지하면서 서로 다른 특성을 지니는 것들을 선별하였다. 1차 분리균들의 뿌리 생체중 1 그램 당 분리빈도는 10³-10⁵이었으며 각 분리주들은 16S rRNA 유전자 단편(약 350 bp)의 염기서열 결정 및 BLAST 분석에 의해 동정되었다. 분리균 44주는 분류상 다양한 분포를 보였는데 *Burkholderia* 12주, *Pseudomonas* 4주, *Microbacterium* 4주, *Mycobacterium* 3주, *Enterobacter* 2주 *Staphylococcus* 2주, *Leifsonia* 2주, *Serratia* 2주, *Paenibacillus* 2주, 그리고 *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea*, *Herbaspirillum*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Cellulomonas*속균 각 1주로 동정되었다.

이들은 근권 미생물로 자주 분리되는 세균들이며 특히 벼 내생세균으로 보고된 바 있는 *Burkholderia*, *Serratia* 등[28]을 포함하고 있다.

분리균의 내생성 확인

분리균들의 내생성을 확인하는 방법으로 숙주식물에 인위적인 처리 후 재분리 하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다. 기주 식물에 어떠한 해로운 증상을 보이지 않는다는 내생균의 특성[26]에 기초하여 44주의 1차 분리균에 대해 접종 및 재분리를 통해 그들의 내생성을 확인하였다. Water agar 배지상에서 무균조건으로 발아되어 생장한 벼 유묘를 이용하였다. 잎의 절단면에 분리균을 접종하여 7일간 배양한 후 뿌리에서 재 분리하는 방법으로 44주의 1차 분리주 중 정착력이 상대적으로 우수한 균주를 최종 16주 확보 하였다(Table 1). 이때 대조균으로서 내생균 *A. indigenes* (ATCC 51398)와 *E. coli* DH5 α 및 phosphate buffer를 사용하여 재분리 방법의 적합성을 확인 하였다. 대조 내생균 *A. indigenes*와 더불어 16분리주의 재분리 빈도는 뿌리 생체 중 1 g당 10^3 - 10^5 CFU로서 1차 분리 때와 비슷한 수준을 보였으며 phosphate buffer와 *E. coli* DH5 α 를 처리한 시료에서는 예상대로 미생물 콜로니가 나타나지 않았다. 1차 분리주와 접종 후 재 분리한 균주가 동일한 균인지의 여부는 염기서열 10개의 primer를 이용한 RAPD(Random Amplification of Polymorphic DNA)의 패턴 분석과 16S rDNA 염기서열 비교분석을 통해 확인하였다. 재 분리된 16주 모두 접종한 모 균주와 같은 RAPD 패턴을 보였고 16S rDNA 염

기서열 또한 일치하였다(Fig. 1A). 또한 REP-, ERIC-PCR에 의해 16주의 분리주는 대부분 서로 다른 균주임을 확인하였다(Fig. 1B). 내생성이 확인된 16 분리주는 *Burkholderia*속 7주, *Enterobacter*속 2주, *Serratia*속 2주, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*속 각 1 주로서 이들 속은 식물 내생균으로 보고된 바 있다[28]. Engelhard 등[11]에 의해 야생벼에서 분리된 내생균들의 분포를 살펴보면 proteobacteria 베타 그룹의 *Azoarcus*속 계열의 종들이 가장 높은 빈도로 분리되고 알파 그룹으로 다수의 *Sphingomonas* 종이 분리된 반면 베타 그룹 계열의 *Burkholderia*와 *Herbaspirillum*속의 분리 빈도는 높지 않았다. 본 연구 결과에서 16 분리주 중 *Burkholderia* 분리주가 7주를 차지하였는데 이는 기존의 벼 내생균 보고에서는 볼 수 없었던 흥미있는 결과이다. 16S rDNA의 부분 염기서열(약 350 bp) 분석 시 *Burkholderia* 분리주들은 그 염기서열이 일치하여 1419 bp로 연장하여 염기서열을 결정하였으며 KJ007을 제외한 6주의 *Burkholderia* 균주는 모두 같은 염기서열을 가지는 것으로 확인되었다(Accession number EF128227). *Burkholderia* 분리주는 다른 종들과의 염기서열 유사성 분석을 통해 *B. vietnamiensis* LMG 10929^T와 99.9%, *B. multivorans* LMG 13010^T와 99.6%, *B. cepacia* LMG 1222^T와는 99.5%의 염기서열 유사성을 보였다(Fig. 4).

KJ001 분리주의 뿌리조직 내 colonization 관찰

벼 뿌리 조직 내에서의 정착 양상을 관찰하기 위해 GFP로 형질전환된 내생균을 제작하였다. GFP 발현 시스템으로 pGFPuv(Clontech, USA)를 이용하였고 plasmid의 항생제 marker인 ampicillin에 대한 감수성, stable replication의 조건에 부합하는 *Enterobacter*속 균주인 KJ001 분리주를 선정하여 형질 전환체를 제작 하였다. *In vitro* 상에서 UV를 조사하여 GFP의 발현을 확인하였고 앞에서 언급한 접종 및 재분리 실험의 경우와 동일한 방법으로 무균 생육된 벼 유묘에 KJ001-*gfp* 형질 전환 내생균을 도입하였다(Fig. 2A). 접종 7일 후 20 μ m 두께의 뿌리 section 시료를 준비하였고 이를 confocal microscope를 통해 관찰한 결과 뿌리 조직의 관다발 주위에 균락을 이루어 정착하고 있음을 확인 하였다. 기존의 보고에 의하면 내생세균들은 뿌리 조직 내에서 관다발 조직, 목질부위, 내피부분에 정착하는 것이 통상적이다[26]. KJ001 내생균의 균락이 관다발 주위에 분포 하고 있음을 볼 때 접종균이 접종한 잎으로부터 관다발 조직을 통해 이동하여 뿌리에 정착 한 것으로 판단되며 GFP발현을 이용하여 벼 뿌리 조직 내에서 *Enterobacter*의 내생 균락을 살펴본 것으로는 본 보고가 처음인 것으로 사료된다(Fig. 2B).

내생균 분리주의 식물 병원성 조사

16주 벼 내생균의 식물체에 대한 병원성 여부는 비기주

Table 1. Strains confirmed endophytism by re-isolation procedure.

Isolate	Reisolation frequency ^a	Tentative identification ^b
KJ001	(2 \pm 0.02) \times 10 ⁴	<i>Enterobacter</i> sp.
KJ002	(1 \pm 0.05) \times 10 ⁴	<i>Enterobacter</i> sp.
KJ003	(3 \pm 0.12) \times 10 ⁴	<i>Burkholderia</i> sp.
KJ004	(1 \pm 0.02) \times 10 ⁴	<i>Klebsiella</i> sp.
KJ006	(1 \pm 0.10) \times 10 ⁵	<i>Burkholderia</i> sp.
KJ007	(1 \pm 0.21) \times 10 ⁴	<i>Burkholderia</i> sp.
KJ008	(1 \pm 0.03) \times 10 ⁴	<i>Burkholderia</i> sp.
YK011	(2 \pm 0.15) \times 10 ⁴	<i>Burkholderia</i> sp.
GS121	(3 \pm 0.05) \times 10 ³	<i>Sphingomonas</i> sp.
GS125	(1 \pm 0.02) \times 10 ⁴	<i>Pseudomonas</i> sp.
GS126	(1 \pm 0.11) \times 10 ⁴	<i>Burkholderia</i> sp.
CW130	(3 \pm 0.07) \times 10 ³	<i>Serratia</i> sp.
CW131	(4 \pm 0.32) \times 10 ³	<i>Pantoea</i> sp.
CW132	(1 \pm 0.25) \times 10 ⁴	<i>Serratia</i> sp.
YS135	(2 \pm 0.13) \times 10 ³	<i>Herbaspirillum</i> sp.
YS137	(3 \pm 0.25) \times 10 ³	<i>Burkholderia</i> sp.

^aCalculated from the numbers of the colonies grown on nutrient agar medium.

^bBased on analysis of partial 16S rDNA sequences (350 bp or 1419 bp in the case of *Burkholderia* spp.).

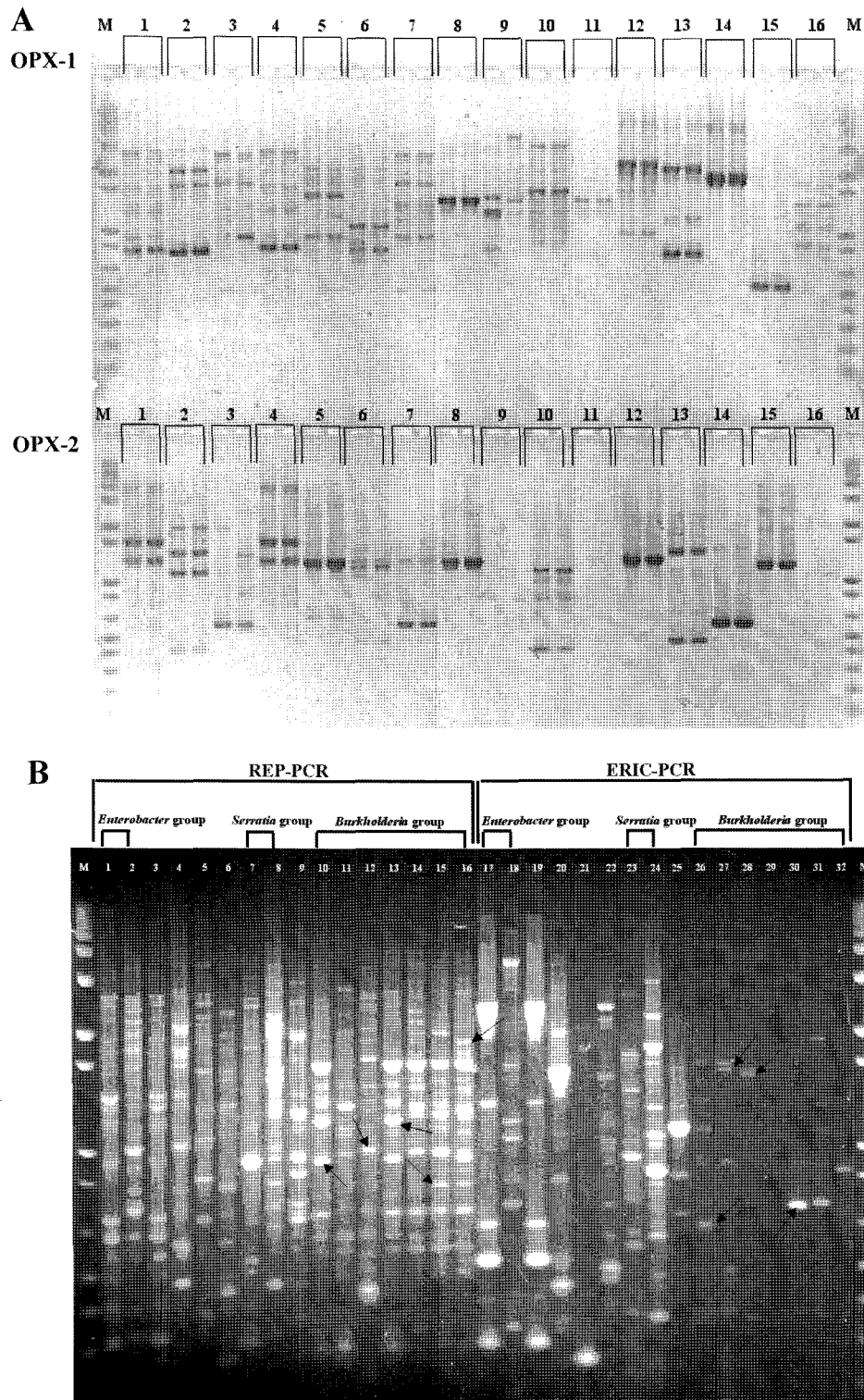


Fig. 1. Confirmation of identity between initial isolates and reisolates based on RAPD analysis (A) and diversity of 16 endophytes by analyses based on Rep and ERIC PCR (B). (A): Patterns of random primed PCR products with OPX-1 and OPX-2 between initial isolates and reisolates. Lane M: 1 kb ladder, 1: KJ001, 2: KJ003, 3: KJ003, 4: KJ004, 5: KJ006, 6: KJ007, 7: KJ008, 8: YK011, 9: GS121, 10: GS125, 11: GS126, 12: CW130, 13: CW131, 14: CW132, 15: YS135, 16: YS137. On each number, left is initial isolates and right is reisolates. (B): Patterns of Rep and ERIC PCR; lane 1~16: patterns of REP PCR, lane 17~32: patterns of ERIC PCR. Lane M: 1 kb ladder, 1: KJ001, 2: KJ002, 3: KJ004, 4: CW131, 5: GS121, 6: GS125, 7: CW130, 8: CW132, 9: CW135, 10~16: *Burkholderia* group, KJ003, KJ006, KJ007, KJ008, YK011, GS126 and YS137, lane 17~32: same order as REP PCR. The arrows indicate significant bands which showing *Burkholderia* isolates are different from each other.

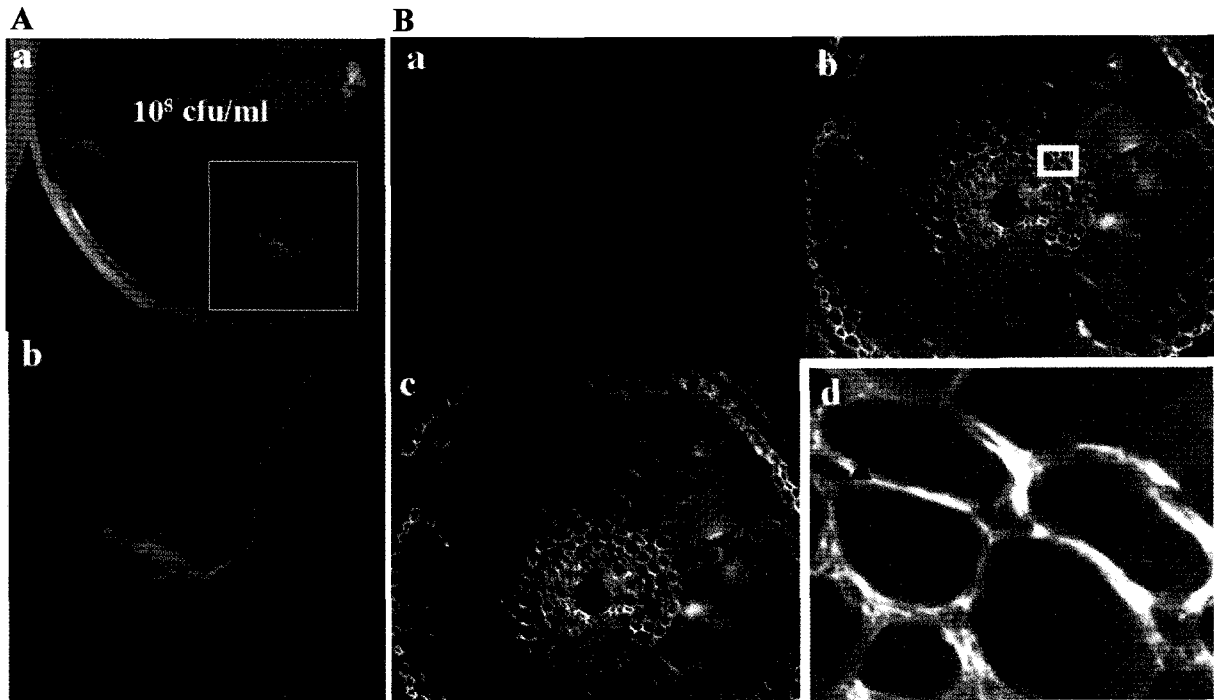


Fig. 2. Confocal microscopic image of the cut-across root of the rice seedling inoculated with KJ001 labeled with GFP (pGFPuv). A: Detection of GFP-labeled KJ001 mounted on a cut tip of the first true leaf under UV (a), (b): enlargement of square in (a) image. B: Image of the root section; (a) under the 488 nm laser light, (b) capture of real time scanning, (c) mix the image (a)+(b), (d) enlargement of square in (b) image.

식물인 담배잎의 조직괴사 여부로 확인하였다. 병원성 세균으로 알려진 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000과 *B. glumae*를 대조 병원균으로 사용하여 16주의 내생균을 10^8 CFU/ml의 농도로 infiltration 하였을 때 병원성 세균의 경우 24시간 이내에 잎의 괴사가 진행되는 반면 16주의 내생균은 3일이 지나도 조직 괴사가 진행되지 않았다(data not shown). 따라서 HR 결과로써는 분리된 16주 모두 식물에 대해 비병원성임을 확인하였다. HR 결과로는 비병원성이나 벼의 중요한 병원성 세균으로 *B. glumae* 균이 잘 알려져 있어 *Burkholderia* 분리주 7주에 대해 별도로 벼에 대한 병원성 여부를 확인하였다. 벼 알마름병의 원인균인 *B. glumae*를 대조균으로 사용하였다. *B. glumae*를 처리한 벼에서는 수일 뒤 grain rot 증상을 보인 반면 7주의 *Burkholderia* 내생균을 처리한 시료에서는 어떠한 병징이 관찰되지 않아 이들 분리균은 벼에 대한 비병원성임을 확인하였다.

내생균 분리주의 항진균 활성

벼 내생균의 식물병원균에 대한 길항력을 조사하기 위해 식물 병원성 세균과 곰팡이에 대한 대치배양을 수행하였다. 16종 모두 본 연구에서 사용한 세균성 병원균에 대한 길항력은 없었고 곰팡이 병원균에 대해서는 16주 중 6주가 우수한 길항력을 보여주었다. 이들 6주는 흥미롭게도 모두 *Burkholderia* spp.로서 *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Mucor ambiguus*, *Rhizopus oryzae*, *Alternaria*

sp. Fusarium oxysporum, *Phytophthora cactorum*, *Fusarium solani*에 대해 우수한 길항력을 보였다(Table 2). *Burkholderia* 속의 분리주들이 광범위하게 항진균 활성을 보이는 것은 기존의 보고에서도 발견되며 이들 6주의 *Burkholderia* 속 내생균들은 식물병의 생물적 제어를 위한 유용한 소재로 이용될 수 있을 것이다.

내생균 분리주의 질소고정 유전자(*nifH*) 분석

대기중의 질소를 고정하여 식물체에 공급하는 것은 일부의 내생균이 지니고 있는 중요한 기능이며 이에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다[10-13,19]. 16 분리주의 질소고정능을 가늠하는 지표로서 질소고정에 관련된 핵심 유전자인 *nifH* 유전자를 택하여 이 유전자의 유무를 확인하고자 하였으며 PCR방법을 이용하였다. 그 결과 16주의 내생균 중 KJ001, KJ004와 더불어 6종의 *Burkholderia* 분리균(KJ003, KJ006, KJ008, YK011, GS1265, YS137)이 *nifH* 유전자를 지니고 있음을 확인하였으며 PCR산물의 염기서열 분석 및 BLAST를 통해 상동성 검색을 하였다. KJ001과 KJ004의 *nifH* 유전자는 본 연구에서 분석한 336 bp 염기서열 중 2개의 서열만 서로 달라 상동성이 매우 높았으며 BLAST를 이용한 검색 결과 Choi등[28]이 보고한 *Pantoea agglomerans* KNUC123와 가장 높은 상동성인 99%의 상동성을 지니는 것으로 나타났다. 한편 *Burkholderia* 분리균들의 *nifH* 유전자 염기서열을 비교분석 한 결과

Table 2. Effect of endophytic *Burkholderia* spp. on suppression of plant pathogenic fungi *in vitro*.

Plant fungal pathogen	Antifungal activity ^a of <i>Burkholderia</i> isolates						
	KJ003	KJ006	KJ007	KJ008	YK011	GS126	YS137
<i>Rhizoctonia solani</i>	++	++	-	++	+++	+++	++
<i>Pythium aphanidermatum</i>	++	+++	-	++	++	++	++
<i>Mucor ambiguus</i>	++	++	-	++	+++	+++	++
<i>Rhizopus oryzae</i>	++	++	-	++	++	++	++
<i>Alternaria</i> sp.	+++	+++	-	++	+++	+++	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	++	++	-	++	++	++	++
<i>Fusarium solani</i>	++	++	-	++	++	++	++
<i>Sclerotium rolfsii</i>	-	-	-	-	-	-	-

^aThe activity was represented by the diametry of the growth inhibition zone
 -: ~6 mm, +: 6-10 mm, ++: 11-15 mm, +++: >16 mm.

KJ003과 KJ006이 서로 동일하였고 YK011, GS1261 및 YS137이 서로 동일한 염기 서열을 가지는 것으로 나타났으며 KJ008은 이들과 2~3개의 염기 서열이 달랐지만 아미노산 염기서열로는 모두 일치 하였다. KJ006의 *nifH* 염기

서열은 NCBI GenBank에 등록하였고(accession number: EF128226) BLAST 검색 결과 *B. tropicalis*, *B. vietnamiensis*의 *NifH* 아미노산 염기서열과 100% 일치하는 것으로 나타났다.

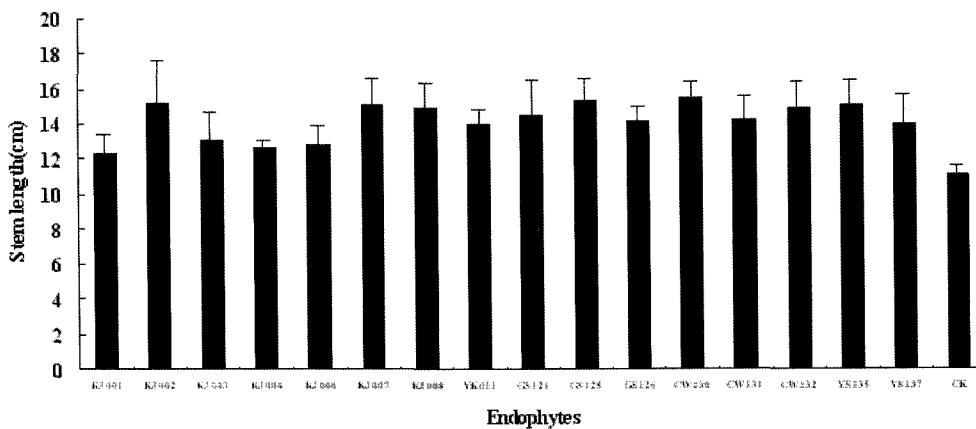
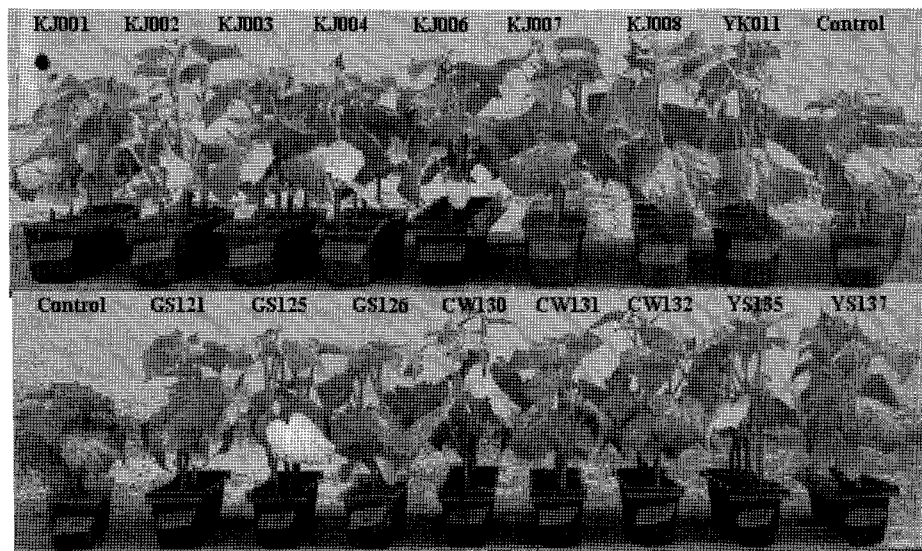


Fig. 3. Pant growth-enhancing effects. Scale bars indicate height of seedling in average 4 replications. Control; just treated with phosphate buffer.

내생균의 오이 성장 촉진 효과

16주의 내생균들이 식물생장을 촉진하는 효과가 있는지 조사하기 위해 오이 유묘를 이용하여 성장 촉진 효과를 관찰하였다. 분리 내생균 현탁액에 오이 종자를 침지처리 하였으며 pot에 심어 40일이 경과한 후 길이 생장을 측정하였다. 미생물 당 4개의 묘를 사용하여 관찰하였고 무처리구와 비교하여 식물생장촉진 효과를 분석한 결과 16주 모두 평균 10%~38% 범위에서 오이 유묘의 길이생장을 촉진하였음을 확인 하였다(Fig. 3). *Pseudomonas* sp. GS125, *Serratia* sp. CW130, *Serratia* sp. CW132 및 *Herbaspirillum* sp. YS135의 성장촉진 효과가 우수한 것으로 나타났다. KJ003과 KJ006을 제외한 5주의 *Burkholderia* 속 균들은 평균 30%이상 오이의 생장을 촉진하였으며 특히 KJ007과 KJ008의 효과가 탁월하였다(Fig. 3).

***Burkholderia* 속 내생균들의 유용성 고찰**

본 연구에서는 한반도 중부지방에서 채집한 벼 뿌리 시료에서 내생세균을 분리하고 식물병원균에 대한 길항력, 식물 성장 촉진 기능 등 주로 식물에 대한 유용성에 대해 살펴보았다. 본 실험에서 사용한 재 분리법으로 확보된 정착력이 우수한 16주의 내생균 중 *Burkholderia* 속 균이 7주로 다수를 차지한 것은 매우 흥미로운 결과이다. 벼의 근권에 *Burkholderia* 속이 많이 분포 하고 있음을 보고한 다른 연구 결과[36]와 다수의 *Burkholderia* 종들이 항진균 활성과 더불어 질소고정능력이 있음을 보고한 예가 있다[3, 12]. 본 연구에서 확보한 *Burkholderia* spp. 중 KJ007을 제외한 6 균주는 16S rDNA 염기서열 분석에서 *B. vietnamiensis*에 가장 가까운 종으로 나타났으며(Fig. 4) 이들은 벼 뿌리의 조직 내에서의 정착력, 항진균 활성과 더불어 *nifH* 유전자의 함유로 볼 때 식물생장 촉진 및 생물제어 목적으로의 유용성을 지닌

다. 보고에 의하면 지금까지 40여 종의 *Burkholderia* 속 균주들이 식물의 근권을 포함한 다양한 환경에서 분리되었고 이들 중 식물병 억제 기능을 하는 종들과 함께 인체 병원균 및 식물 병원균으로 보고된 사례도 많이 있어 응용을 위해서는 안전성에 대한 충분한 검토가 이루어져야 할 것이다 [18]. 본 연구에서 분리된 6종의 *Burkholderia* spp.들의 경우에는 담배에 대해 HR반응이 일어나지 않았고 벼에 대한 병원성도 없는 것으로 나타나 식물병원균의 가능성을 배제할 수 있었으며 추가 연구를 통해 인축에 대한 안전성을 확보할 경우 유용한 자원으로 이용 가능할 것이다.

요 약

한반도 중부지방인 충청남북도 7개 지역에서 재배되고 있는 벼 시료 21점을 채집하여 이들의 뿌리를 표면살균 한 후 내생균을 44주 분리하고 내생성 검정 시스템을 통해 정착력이 상대적으로 우수한 균주를 최종 16주 확보 하였다. 이들의 분리빈도는 뿌리 생체중 1g당 10^{3-5} CFU로 나타났다. 흥미롭게도 이중 7주가 *Burkholderia* 속 균으로 동정되어 기존의 다른 벼 내생세균 연구 결과와는 다른 특징을 보였다. 또한 GFP tagging 방법을 이용하여 분리균주 중 하나인 *Enterobacter* sp. KJ001 균주에 대해 뿌리조직 내 colonization 위치를 확인해본 결과 뿌리 조직 중 판다발 주변에 군락을 이루고 있음을 관찰하였다. *Burkholderia* 분리주들은 국내 재배 벼에서 높은 빈도로 분리되며 *in vitro*상에서 광범위한 진균성 식물병원균에 대해 우수한 길항력과 더불어 대부분 질소고정 관련 유전자인 *nifH*를 가지는 점으로 보아 질소고정에 의해 식물생육에 도움을 줄 수 있을 것으로 예측되며 실제로 오이 유묘의 생장을 30% 이상 촉진하는 효과를 보여 식물병 억제 및 감소와 더불어 작물의 성장 촉진 및 생

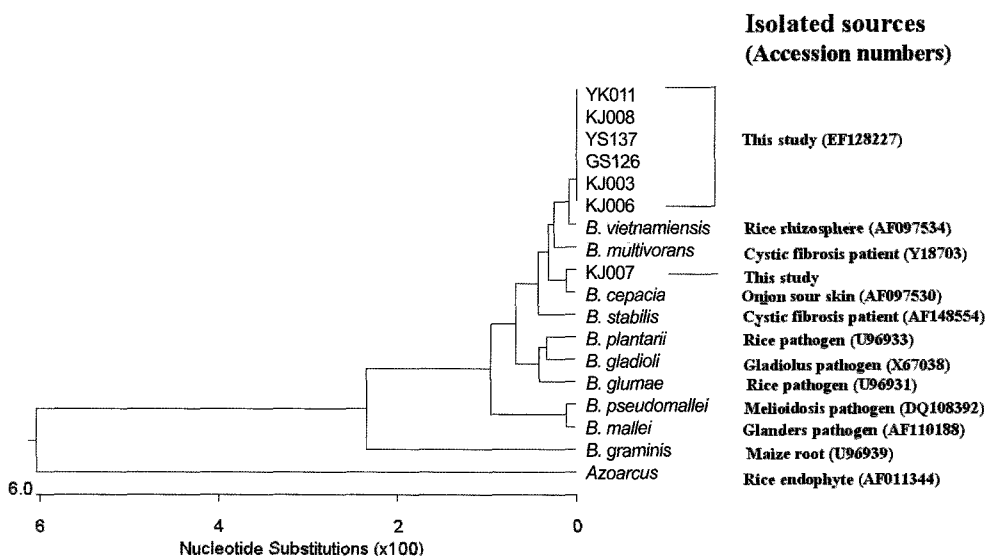


Fig. 4. Phylogenetic tree of *Burkholderia* isolates based on 16S rDNA analysis.

산성 증대에 활용가치가 높은 내생균으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 및 과학기술부 21C프론티어사업 작물유전체기능연구사업단의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Alam, S., S. R. Brailsford, R. A. Whaley, and D. Beighton. 1999. PCR-Based methods for genotyping viridans group streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2772-2776.
- Barraquio, W. L., L. Revilla, and J. K. Ladha. 1997. Isolation of endophytic bacteria from wetland rice. *Plant Soil.* **194**: 15-24.
- Bevivino, A., S. Sarrocco, C. Dalmastri, S. Tabacchioni, C. Cantale, and L. Chiarini. 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 225-237
- Chanway, C. P. 1997. Introduction of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. *Forest Sci.* **43**: 99-112.
- Cho, H. S., S. Y. Park, C. M. Ryu, J. F. Kim, J. G. Kim, and S. H. Park. 2007. Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 14-23.
- Choi, E. H., S. E. Lee, K. S. Yoon, D. K. Kwon, J. K. Sohn, S. H. Park, M. S. Han, and S. Y. Ghim. 2003. Isolation of nitrogen-fixing bacteria from gramineous crops and measurement of nitrogenase activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 18-24.
- Cheong, H., S.-Y. Park, C.-M. Ryu, J. F. Kim, S.-H. Park, and C. S. Park. 2005. Diversity of root-associated *Paenibacillus* spp. in winter crops from the southern part of Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 1286-1298.
- Compant, S., B. J. Nowak, C. Clément, and E. Ait Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4951-4959.
- Elbeltagy, A., K. Nishioka, H. Suzuki, T. Sato, Y. Sato, H. Morisaki, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil. Sci. Plant Nutr.* **46**: 617-629.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H., and Minamisawa, K. 2001. Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5285-5293.
- Engelhard, M., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* **2**: 131-141.
- Estrada, P., P. Mavingui, B. Cournoyer, F. Fontaine, J. Balandreau, and J. Caballero-Mellado. (2002). A N₂ fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Can. J. Microbiol.* **48**: 285-294.
- Fujie, T., Y. D. Huang, A. Higashitani, Y. Nishimura, S. Iyama, Y. Hirota, Y. Yoneyama, and R. A. Dixon. 1987. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. *Plant Soil.* **103**: 221-226.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.
- Glick, B. R. 1999. Overview of plant growth-promoting bacteria, p. 1-13. In B. R. Glick, C. L. Patten, G. Holguin, and D. M. Penrose (eds.) *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*, Imperial College Press, London.
- Gyaneshwar, P., E. K. James, N. Mathan, P. M. Reddy, B. Reinhold-Hurek, and J. K. Ladha. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **183**: 2634-2645.
- Halmann, J., A. Quadt-Hallmann, and J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**: 895-914.
- Holmes, A., J. Govan, and R. Goldstein. 1998. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? *Emerg. Infect. Dis.* **4**: 221-227.
- James, E. K. 1999. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Res.* **65**: 197-209.
- Kloepper, J. W. and C.-M. Ryu. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance, p. 34-52. In B. Schulz, C. Boyle, and T. N. Sieber (eds.), *Microbial Root Endophytes*. Springer-verlag, Berlin Heidelberg.
- Kloepper, J. W., C.-M. Ryu, and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.* **94**: 1259-1266.
- Kloepper, J. W. and M. N. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, p. 879-882. In Station de pathologie vegetale et phyto-bacteriologie (ed.), *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. II*. Gilbert-Clarey, Tours.
- Kloepper, J. W., S. Tuzun, and J. Kuc. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* **2**: 349-351.
- Krause, A., A. Ramakumar, D. Bartels, F. Battistoni, T. Bekel, J. Boch, M. Bohm, F. Friedrich, T. Hurek, L. Krause, B. Linke, A. C. McHardy, A. Sarkar, S. Schneiker, A. A. Syed, R. Thauer, F. J. Vorholter, S. Weidner, A. Puhler, B. Reinhold-Hurek, O. Kaiser, and A. Goesmann. 2006. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nature Biotechnol.* **24**: 1385-1391.
- Ladha J. K., F. J. de Bruijn, and K. A. Malik. 1997. Assessing

- opportunities for nitrogen fixation in rice: a frontier project. *Plant Soil*. **194**: 1-10.
26. Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* **6**: 139-144.
 27. Reinhold-Hurek B, T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanneyt, K. Kersters, and J. De Ley. 1993. *Azoarcus* gen. nov., Nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bact.* **43**: 574-584.
 28. Rosenblueth, M. and E. Martinez-Romero. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**: 827-37.
 29. Ryu, C.-M., J. Kim, O. Choi, S.-Y. Park, S.-H. Park, and C. S. Park. 2005. Nature of a root-associated *Paenibacillus polymyxa* from field-grown winter barley in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 984-991.
 30. Ryu, C.-M., J. Kim, O. Choi, S. H. Kim, and C. S. Park. 2006. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. *Biol. Control.* **39**: 282-289.
 31. Ryu, C.-M., J. F. Murphy, K. S. Mysore, and J. W. Kloepper. 2004. Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Plant J.* **39**: 381-392.
 32. Ryu, C.-M., M. A. Farag, C.-H. Hu, M. S. Reddy, H. X. Wei, P. W. Paré, and J. W. Kloepper. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 4927-4932.
 33. Timmusk, S., B. Nicander, U. Granhall, and E. Tillberg. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 1847-1852.
 34. Wilmotte, A., G. Van der Auwera, and R. De Wachter. 1993. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters.* **317**: 96-100.
 35. Yanni, Y. G., R. Rizk, V. Corich, A. Squartini, K. Ninke, S. Philip-Hollingsworth, G. Orgambide, F. de Bruijn, J. Stoltzfus, D. Buckley, T. Schmidt, P. Mateos, J. K. Ladha, and F. B. Dazzo. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil.* **194**: 99-114.
 36. Zhang, L., and G. Xie. 2007. Diversity and distribution of *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere of rice and maize. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**: 231-235.

(Received Feb. 8, 2007/Accepted Mar. 8, 2007)