ISSN 0367-6315
Korean J. Soil Sci. Fert. 45(6), 1100-1107 (2012)
http://dx.doi.org/10.7745/KJSSF.2012.45.6.1100

보문

파이로시퀀싱을 이용한 비료 장기 연용지의 벼 뿌리 내생세균의 군집 분석

김병용 · 안재형 · 송재경 · 김명숙[1] · 원항연*

국립농업과학원 농업미생물과, [1]토양비료과

Comparative Analysis of Endophytic Bacterial Communities in the Roots of Rice Grown under Long-term Fertilization Practice using Pyrosequencing Method

Byung-Yong Kim, Jae-Hyung Ahn, Jaekyeong Song, Myung-Sook Kim[1], and Hang-Yeon Weon*

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-853, Korea

[1]Soil & Fertilization Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea

Bacterial endophytes may be important factors in plant growth and ecologically relevant functions in rice. Using pyrosequencing technology, we analyzed the composition of endophytic bacterial communities that colonized the roots of rice cultivated in long-term fertilized (APK) and non-fertilized (NF) paddy soils. A total of 1,900 reads were obtained from 2 samples. All sequences were classified into 177 OTUs (APK sample) or 72 OTUs (NF sample) at a 97% similarity cut-off. Twenty-two OTUs were shared between the 2 samples, and these were also the most dominant OTUs in both samples. *Proteobacteria* was the most dominant phylum with 90.2%, followed by *Actinobacteria* (7.1%) and *Bacteroidetes* (1.1%). Furthermore, *Pseudomonas* was the most abundant genus in both samples. We observed clear differences in the structure of the endophytic bacterial community structure between the 2 samples. Notably, the distributions of *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* were markedly different. The diversity index of the APK sample was higher than that of the NF sample. These findings showed that the endophytic bacterial community of rice roots was affected by the presence of fertilizers in the rice field soil.

Key words: Pyrosequencing, Bacterial community, Rice, Endophytic, Long-term fertilization

서 언

벼는 전세계적으로 밀과 더불어 가장 중요한 식량 작물이다. 한국을 비롯한 많은 국가에서 벼와 관련된 다양한 연구들이 수행되고 있다. 최근에는 안전한 친환경 농산물에 대한 소비자들의 요구와 소비가 증가함에 따라 화학비료나 농약을 대체할 친환경 미생물제제에 대한 관심이 높아지고 있다. 미생물제제로 활용할 수 있는 주요 미생물 중에는 식물의 근권 혹은 체내에 존재하는 내생 미생물들이 있다 (Babalola, 2010). 이들 식물 연관 미생물들은 식물 체내 혹은 주변 환경에 서식하며 식물과 직·간접적인 상호 작용을 통해 식물의 생장을 촉진하고 생산성을 증대시킨다 (Compant et al., 2010). 특히 식물의 내생균 (endophytes)은 식물체 조직 내에서 기주 식물에 병을 유발하지 않으면서 서식하는 미생물로 식물체내에서 질소고정, 항생물질 생산, 식물 호르몬 생산 등의 유용한 기능을 수행한다 (Berg et al., 2005; Shin et al., 2007). 따라서 식물체내에 존재하는 내생균의 분포 및 생태에 대한 연구는 작물 생장 및 재배 환경의 조절, 미생물 활용 등의 중요한 농업연구의 기초자료로 활용될 수 있다.

최근 분자생물학적 기술의 발달은 배양에 의존하지 않고 식물체내 미생물 군집의 조성을 심도있게 구명할 수 있는 여건을 마련하였다. 최근까지 주로 16S rRNA 유전자를 cloning하여 library를 만든 후에 Sanger 방식으로 염기서열을 결정하는 방법이 많이 이용되어 왔다. 그러나 이 방법은 많은 노동력과 비교적 높은 분석비용 등으로 많은 수의 클론을 분석하기에는 한계가 있었다. 그러나 최근 도입된 차세대염기서열분석 기술 (NGS, next-generation sequencing)은 기존의 이러한 단점을 극복하고 저렴한 비용으로 단시간에 대용량의 염기서열을 생성하는 장점이 있어서 세계적으로 널

접수 : 2012. 11. 14 수리 : 2012. 12. 7
*연락저자 : Phone: +82312908478
E-mail: why@korea.kr

리 사용되고 있다. 특히, 파이로시퀀싱 기법은 적절한 길이의 염기서열 (400–700bp)을 수천 개에서 수만 개를 분석함으로써 미생물 생태 연구에 매우 적합한 방법으로 검증되었다 (Jones et al., 2009).

본 연구에서는 화학비료를 장기 시용한 논에서 재배한 벼 뿌리를 대상으로 최신 연구기법인 파이로시퀀싱 기술을 이용하여 세균의 군집구조를 분석함으로써, 재배환경이 벼 뿌리 내생균에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 채취 화학비료를 장기적으로 처리한 논에서 재배한 벼의 뿌리 내생세균에 대한 군집분석을 수행하기 위해서 경기도 수원시 서둔동 소재 국립농업과학원 장기 연용 시험 포장 (37 16' N, 126 59' E)을 선정하였다. 시험 포장은 1954년 이후로 각기 다른 조합의 비료 성분을 구획 (6.3 × 8.3 m) 별로 시용하였다 (Kim et al., 2011). 이들 처리구 중 3요소구 (APK)와 무비구 (NF)에서 시료를 채취하였다. 3요소구의 비료처리는 $(NH_4)_2SO_4$ (N, 110 kg ha^{-1} $year^{-1}$), P_2O_5 (P, 70 kg ha^{-1} $year^{-1}$), KCl (K, 80 kg ha^{-1} $year^{-1}$)을 매년 같은 비율로 장기간 처리하였다. 시험 재료를 위한 벼 품종은 삼광벼로서, 수확 후 남은 뿌리를 2012년 2월에 채취하였다.

시료 처리 및 DNA 추출 채취한 벼 뿌리는 수 차례 멸균수로 세척하여 남아 있는 토양을 완전히 제거 하였다. 뿌리 표면은 Qin et al. (2009)의 방법에 따라 3 단계의 표면 살균을 하였고 (5% NaOCl 5분, 2.5% $Na_2S_2O_3$ 10분, 75% ethanol 5분), 살균 후에는 멸균수와 $NaHCO_3$로 세척하였고, 마지막 세척액을 R2A (Difco) 배지에 접종하여 세균이 자라지 않는 것을 확인하였다. DNA를 추출하기 위해서는 표면 살균한 벼 뿌리를 액체 질소에 동결한 후에 멸균한 막자 사발로 분쇄한 시료를 이용하였다. 분쇄한 후 가루 형태의 시료 0.5 g에서 FastDNA SPIN Kit (MP Biomedicals, USA) 를 사용하여 제조사의 방법에 따라 metagenomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 미량분광 광도계 (ACTgene, USA)를 이용하여 정량 하였다.

16S rRNA 유전자 증폭과 파이로시퀀싱 분석 추출된 DNA에서 세균의 16S rRNA 유전자를 PCR 반응으로 증폭하였다. PCR 반응을 위한 50 μL의 mixture는 1X PCR buffer (Roche, Germany), 각각의 dNTP 0.2 mM, 각각의 primer 400 nM, bovine serum albumin (Sigma–Aldrich) 1 mg mL^{-1}, *Taq* DNA polymerase (Roche, Germany) 1.25 U, DNA (20–40 ng μL^{-1}) 1 μL를 혼합하여 제조하였다. PCR 반응은 touchdown 방식으로 다음과 같이 3 단계로 수행하였다. 초기 변성단계 (94℃, 5분)와 10회 반복 반응 (94℃ 30초, 60℃ 45초, 72℃ 90초) 을 하였으며, 각 반복마다 annealing 온도를 0.5℃ $cycle^{-1}$로 낮추었고, 이후에 20회 반복 반응 (94℃ 30초, 55℃ 45초, 72℃ 45초)을 하였다. Primer는 V1–9F (5′–barcode–AC (linker)–GAGTTTGATCMTGGCTCAG–3′)와V3–541R (5′–barcode–AC (linker)–WTTACCGCGGCTGCTGG–3′)를사용하였다 (Chun et al., 2010). 증폭된 PCR 산물은 QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 이용해서 정제하였다. 최종적으로 얻어진 시료를 서울대학교 농생명과학공동기기원 (NICEM, Korea)에 의뢰해서 454 GS FLX Titanium Sequencing System (Roche, Germany) 으로 염기서열을 결정하였다.

파이로시퀀싱 결과 분석 얻어진 염기서열들은 Mothur 프로그램 (version 1.23.1) (Schloss et al., 2009)를 이용해서 분석하였다. PyroNoise algorithm (Quince et al., 2011)과 UCHIME (Edgar et al., 2011)를 이용해서 낮은 품질의 염기서열과 키메라를 제거하였다. 얻어진 고품질의 염기서열은 silva taxonomy (Pruesse et al., 2007)를 이용해서 80% 이상의 cutoff 값과 Bayesian 방법으로 분류하였다. 미토콘드리아나 엽록체로 추정되는 서열들은 이후의 분석과정에서 제거하였다. 최종 얻어진 서열들은 97% 유사도 수준에서 average neighbor algorithm 방법으로 OTU (operational taxonomic units)를 결정하였다. 종 풍부도 지수 (Chao1, ACE), 종 다양성 지수 (Shannon, Inverse simpson), 벤다이어그램, rarefaction curve와 Good's coverage 등은 Mothur 프로그램을 통해 계산하였다.

염기서열의 계통분류 두 군집의 우점균 및 공유 염기서열을 대상으로 계통분류를 수행하였다. 해당되는 OTU의 대표 염기서열들과 근연 관계의 비교 염기서열들은 EzTaxon–e 서버 (http://eztaxon–e.ezbiocloud.net; Kim et al., 2012)에서 얻어 정렬하였다. ARB package 프로그램 (Ludwig et al., 2004)을 이용해서 전체 염기서열을 정렬한 후, MEGA 프로그램 (version 5.0) (Tamura et al., 2011)을 이용하여 분자 계통도를 작성하였다. 계통도 작성을 위한 알고리즘은 neighbor–joining 방법 (Saitou and Nei, 1987)을 적용하였다.

결과 및 고찰

벼 뿌리 내생 세균 군집 다양성 비교 파이로시퀀싱을 통해서 3요소구와 무비구 시료에서 각각 2,453개와 8,311개의 염기서열을 얻었으며, 염기서열의 평균 길이는 각각 413 bp와 443 bp였다 (Table 1). 낮은 품질과 키메라, 엽록

Table 1. Summary of the pyrosequencing data obtained from endophytic bacteria in rice roots cultivated in fertilized (APK) and non-fertilized (NF) paddy soils.

Sample[a]	Number of reads			Number of OTUs	Good's coverage	Richness estimator		Diversity index	
	Raw	Chimera removed	Analyzed			Chao1	ACE	Shannon	Inverse Simpson
Fertilization (APK)	2,453	950	950	177	0.91	273.2	406.6	3.85	13.2
Non-fertilization (NF)	8,311	3,551	950	72	0.95	240	453	2.04	3.65

[a]Symbols: NF, non-fertilized; APK, fertilized soil sample (A, ammonium sulphate; P, fused and superphosphate; K, potassium chloride)

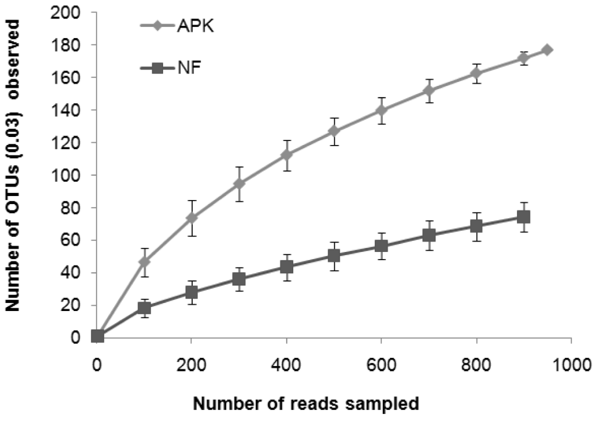

Fig. 1. Rarefaction curves for OTUs of endophytic bacteria of rice roots cultivated from fertilized (APK) and non-fertilized paddy soil (NF), clustering at a 97% similarity cut-off. The curves were generated using 1,000-random samplings without replacement.

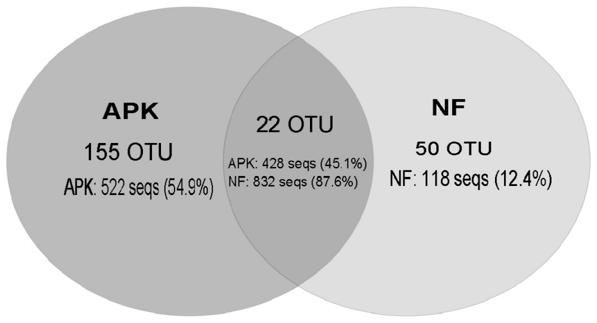

Fig. 2. Venn diagram at distance 0.03 of observed OTU groups obtained from each sample.

체 등을 제거한 후의 염기서열은 각각 3요소구 950개와 무비구 2,938개였으며, 종 풍부도와 다양성을 비교하기 위해서 3요소구 시료의 950개로 무비구 염기서열 수로 맞추어 표준화한 후 비교, 분석하였다. 각각의 OTU는 3요소구와 무비구의 시료에서 각각 177개와 72개가 관찰되어 비료 처리구의 벼 뿌리 내생 세균 군집이 더 다양한 것으로 나타났다. Good's coverage는 97% 유사도 cut-off로 계산한 결과, 3요소구 0.91, 무비구 0.95로 파이로시퀀싱 결과가 적절한 것으로 나타났다. 3요소구 시료와 무비구 시료에서 종 풍부도 추정치 (Richness estimator)와 다양성 지수 (Diversity index)를 비교할 때 Chao1 값과 Shannon, Inverse Simpson 지수는 무비구에 비해 3요소구 시료에서 높았다 (Table 1). 반면 ACE 값은 무비구 시료에서 더 높았다. Rarefaction curve분석으로 염기서열 수에 따른 각 시료의 종 풍부도를 계산하였다 (Fig. 1). 3요소구 시료에서 염기서열수가 증가함에 따라 무비구 시료보다 더 높은 OTU가 관찰되었으며, 이러한 경향은 다양성 지수와 유사하였다.

두 처리구 간의 OTU 분포를 벤다이어그램으로 도식화하였다 (Fig. 2). 서로 공유하는 OTU는 22개로 이 중 3요소구 시료는 428 개의 염기서열 (45.1%)이 공유 OTU에 포함되었고, 무비구 시료에서는 832개 염기서열 (87.6%)이 포함되었다 (Fig. 2). 이는 많은 동일한 세균 종이 두 시료에 서식하고 있다는 것을 의미한다. 한편 522개 염기서열 (54.9%)은 3요소구 시료에서만, 118개 염기서열 (12.4%)은 무비구 시료에서만 존재하였다 (Fig. 2). 이러한 결과는 3요소구 시료에만 특이적으로 서식하는 세균 종들이 더 많고, 그 결과 이 시료의 군집 다양성이 증가된 것으로 판단된다.

벼 뿌리 내생 세균 군집의 분류 벼 뿌리의 세균 군집의 문 (phylum) 수준에서 분포를 비교한 결과, 무비구 시료 (NF)보다 3요소구 (APK) 시료에서 다양하였다. (Fig. 2). 두 시료 모두 *Proteobacteria*가 우점하였고 (3요소구 84.6%, 무비구 91.7%), 강 (class) 수준에서 3요소구 시료의 경우 *Gammaproteobacteria* (39.3%), *Alphaproteobacteria* (28.9%), *Betaproteobacteria* (15.5%)가 우점하였다. 반면 무비구 시료에서는 *Gammaproteobacteria* (81.5%)가 대부분을 차지하였다. 한편 *Actinobacteria*가 두 시료에서 유사한 비율을 차지하였고 (3요소구 6.7%, 무비구 7.2%), Candidate division TM7과 *Bacteroidetes*는 3요소구 시료 (각각 3.8%, 3.6%)에서 일정 비율로 존재하였으나, 무비구 시료에서는 매우 낮았다 (0–0.4%).

동일한 시험포장의 비근권 토양에서 이전 연구 (Ahn et

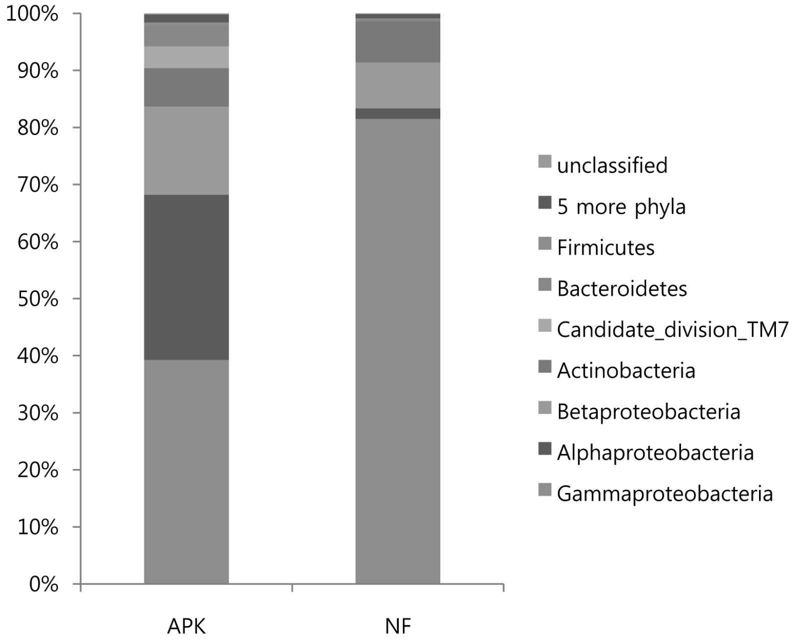

Fig. 3. Phylum distributions of endophytic bacteria of rice roots cultivated from fertilized (APK) and non-fertilized paddy soil (NF).

al., 2012)에서 우점하였던 *Chloroflexi* 문은 3요소구 시료의 벼 내생 세균으로 존재하지 않거나 무비구 시료에서는 매우 적은 비율 (0.3%)을 차지하였다. 또한, 비근권 토양 시료에는 *Chloroflexi* (20.8–27.7%)와 *Proteobacteria* (25.8–30.7%), *Actinobacteria* (4.7–14.8%)의 3개의 문이 우점하였으나, 벼 내생 세균의 군집에서는 *Proteobacteria* (84.6–91.7%)가 우점하는 것을 확인하였다. 세균 군집을 속 (genus) 수준에서 살펴보면 *Pseudomonas*가 우점하였다 (3요소구 32.1%, 무비구 79.6%).

비배양 방법을 이용한 식물체 내생 세균 군집에 대한 다른 연구들에서도 *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* 등이 우점하는 것으로 보고되었다. Ulrich et al. (2008)은 포플라 수목의 잎에서 741개의 16S rRNA gene clone library를 통해 *Proteobacteria* (82%)와 *Actinobacteria* (15%)가 가장 우점하는 것을 밝혔다. Manter et al. (2010)은 파이로시퀀싱 방법을 통해 감자 뿌리의 내생 세균 군집을 보고하였다. 감자 뿌리에서도 내생 세균의 우점균은 *Gammaproteobacteria* (21.4%), *Alphaproteobacteria* (19.9%), *Betaproteobacteria* (1.6%), *Bacteriodetes* (30.4%), *Actinobacteria* (4.9%) 등 이었다. Park et al. (2012)은 남극에 서식하는 이끼 (*Sanionia uncinata*)의 상층부와 하층부의 내생 세균 군집을 파이로시퀀싱 기법으로 조사한 결과 전체 3,957 개의 염기서열에서 *Proteobacteria* (65.6%), *Bacteriodetes* (29.1%), *Actinobacteria* (11.7%) 등이 우점하는 것으로 조사되었다. 이러한 연구결과들은 다양한 식물체에 내생하는 세균들이 분류학상 대체로 유사하다는 결과를 보여준다.

배양적 방법을 이용한 식물체 내생 세균에 관한 다른 연구에서도 *Proteobacteria*나 *Actinobacteria*가 주로 분리되었다. Park et al. (2007)은 충청도 7개 지역 벼 뿌리 시료 21점에서 44주의 내생균을 분리하였다. 가장 많이 분리되었던 것은 *Burkholderia* 속 (12주), *Pseudomonas* 속 (4주), *Microbacterium* 속 (4주), *Mycobacterium* 속 (3주) 등이었고, 이들은 *Proteobacteria* 나 *Actinobacteria*에 속하는 세균이었다. 이들 내생균은 식물병원균에 대한 항진균 효과와 질소고정능을 지니는 것으로 확인되었다. Kim and Lee (2011)는 벼 뿌리 내생균인 *Streptomyces* 속 균주를 분리하여 식물병원균에 대한 항진균 효과를 조사한 결과, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma* sp. 등에 매우 높은 길항 작용을 가지고 있다는 것을 확인하였다. 이러한 연구결과는 식물체 내생 세균이 미생물비료나 미생물 농약과 같은 미생물제제로서의 이용 가치가 높다는 것을 입증한다.

벼 뿌리 내생 우점종의 계통분류 3요소구와 무비구 시료의 우점균 (3요소구 45.1%, 무비구 87.6%)에 대해서 계통 분류학적 분석을 수행한 결과, 두 시료에서 공유하는 22개의 OTU는 *Actinobacteria*문의 2개 OTU (Otu174, Otu225)를 제외하면 모두 *Proteobacteria*에 속하였다 (Fig. 3). 이들 공유 OTU를 EzTaxon-e 서버에서 표준 균주와 비교했을 때, Otu187 (93.8%) 을 제외하면 대부분 염기서열 유사도는 97.1% 이상이었다 (97.1–100%). 공유하는 내생균 유래 염기서열은 *Pseudomonas* 속이 가장 많은 비율을 차지하였다. Otu227은 *Pseudomonas veronii*의 표준 균주와 100%의 염기서열 유사도를 보였고, 3요소구 시료와 무비구 시료에서 각각 25.5%, 2.1%를 점유하였다 (Table 2). 한편, Otu221은

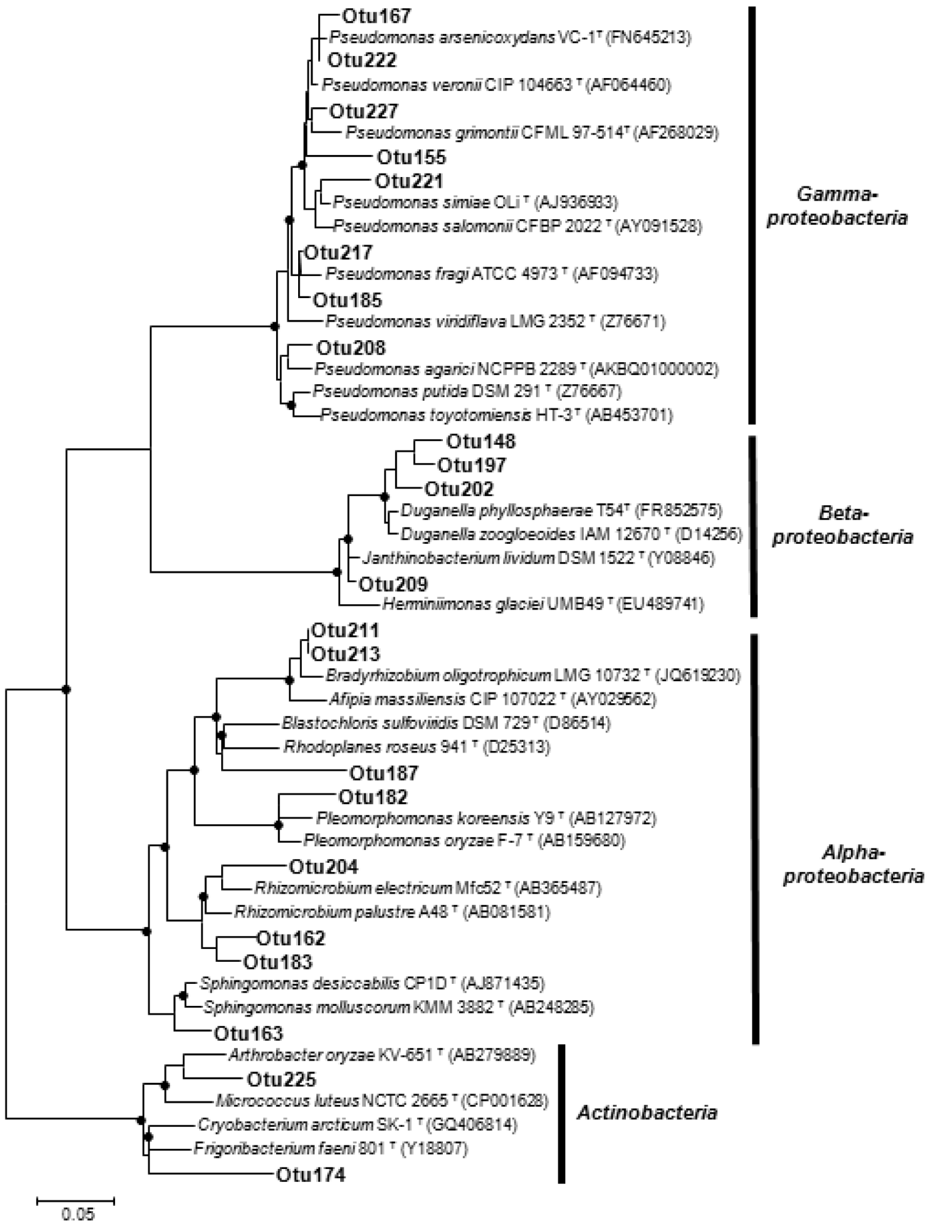

Fig. 4. Phylogenetic tree of 22 representative endophytic bacterial OTUs which were shared between two rice roots cultivated from fertilized (APK) and non-fertilized (NF) soils. Only one representative sequence for each OTU was included in the tree. The black spots on the tree nodes indicate bootstrap support above 80% based on 500 iterations inferred by neighbor-joining analysis. The scale bar indicates a 0.05 estimated change per nucleotide.

*Pseudomonas arsenicoxydans*와 100%의 유사도를 보였고, 3요소구 시료와 무비구 시료에서 각각 3.5%, 47.9%를 차지하였다. 이전 연구들에서 보고된 바와 같이, *Pseudomonas* 균들이 근권 시료 등에서 분리되었으며 이 균주들이 식물체 내에서 siderophore를 생산하거나, 길항작용, 정족수 인식 작용 (quorum-sensing) 등에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Mercado-Blanco and Bakker; 2007, Saravanakumar and Samiyappan 2007; Stockwell and Stack 2007). *Pseudomonas* 속 이외에도 질소 고정균으로 알려진 *Bradyrhizobium*속이나 *Rhizomicrobium*속과 높은 유연관계를 보이는 다수의 OTU들도 확인되었다. 이들 벼 뿌리에 우점균으로 서식하는 내생 세균들은 식물체내에 공생하면서 질소고정, 식물병 방어기작에 중요한 유도 저항성에 관여한다는 것은 여러 연구에서도 보고된 바 있다 (Lian et al., 2008; Strobel et al., 2004; Taghavi et al., 2010). 그러나, 식물체내 내생 세균이 다양하고 배양되지 않는 내생 세균이 많다는 점을 고려할 때, 이들 내생균의 중요한 생태학적 역할에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 생각된다. 따라서 향후 벼 뿌리 내생 우점균을 분리하여 벼의 생장과 관련된 상호작용을 밝히는 것은 매우 의미 있는 연구일 것이다.

Table 2. Nearest neighbors of the 22 representative endophytic bacterial OTU groups which are shared between two samples, fertilized (APK) and non-fertilized (NF) rice roots.

Group	APK	NF	Nearest type strain	Similarity	Difference/Total nt
	%*	%		%	
Otu221	3.5	47.9	*Pseudomonas arsenicoxydans*	100	0/440
Otu227	25.5	2.1	*Pseudomonas veronii*	100	0/446
Otu222	0.4	18.5	*Pseudomonas arsenicoxydans*	100	0/324
Otu217	0.1	6.4	*Pseudomonas viridiflava*	99.1	4/445
Otu225	0.2	6.0	*Arthrobacter oryzae*	99.8	1/450
Otu211	4.5	0.3	*Bradyrhizobium oligotrophicum*	99.8	1/446
Otu213	2.6	1.6	*Bradyrhizobium oligotrophicum*	99.8	1/446
Otu183	2.2	0.2	*Rhizomicrobium electricum*	99.6	2/444
Otu162	2.1	0.1	*Pseudomonas simiae*	98.3	7/442
Otu209	0.1	2.0	*Janthinobacterium lividum*	100	0/440
Otu182	1.4	0.1	*Pleomorphomonas oryzae*	100	0/443
Otu208	0.1	0.9	*Pseudomonas agarici*	98.7	6/449
Otu204	0.9	0.1	*Rhizomicrobium electricum*	97.5	11/438
Otu167	0.1	0.3	*Pseudomonas arsenicoxydans*	98.9	5/446
Otu185	0.3	0.1	*Pseudomonas fragi*	99.1	3/343
Otu174	0.1	0.2	*Cryobacterium arcticum*	99.4	2/354
Otu197	0.2	0.1	*Duganella zoogloeoides*	98	9/447
Otu202	0.2	0.1	*Duganella zoogloeoides*	98.9	5/453
Otu148	0.1	0.1	*Duganella phyllosphaerae*	98.2	8/434
Otu155	0.1	0.1	*Pseudomonas simiae*	98.3	7/422
Otu163	0.1	0.1	*Sphingomonas desiccabilis*	97.1	13/443
Otu187	0.1	0.1	*Blastochloris sulfoviridis*	93.8	27/434

*, The percentage of OTU group in all bacterial sequences obtained from each sample.

본 연구에서는 16S rRNA 유전자 기반의 파이로시퀀싱을 이용하여, 장기 비료 연용지의 3요소 처리구에서 재배한 벼 뿌리의 내생세균 군집이 무비구보다 훨씬 높았다는 것을 밝혔다. 이것은 양분 투입이 식물의 생장은 물론 식물체내 근권 미생물 군집 구조에도 영향을 미치는 것을 의미한다. 따라서 본 연구의 결과는 작물 내생 세균 군집을 토양의 양분 관리 및 작물 생장과 연관시켜, 향후 비료 시용을 포함한 최적 작물 재배 환경을 구축하는 데 기초적인 정보를 제공할 것으로 기대한다.

요 약

화학비료의 장기 시용이 벼 내생 세균 군집에 미치는 영향을 조사하기 위해서 국립농업과학원의 장기 비료 연용 포장에서 재배한 벼 뿌리의 내생균의 군집을 파이로시퀀싱 기법으로 분석하였다. 3요소구 (APK)와 무비구 (NF) 시료에서 직접 DNA를 추출하여 세균에 특이적인 barcode PCR을 수행한 후 454 파이로시퀀싱을 하였다. 두 시료 (3요소구, 무비구)에서 1,900개의 염기서열을 얻었으며, 각각 177개와 72개의 OTU로 분류하였다. 두 시료는 22개의 OTU를 공유하였으며, 이들 OTU는 두 시료에서 모두 우점하였다. 특히 *Pseudomonas*속에 속하는 OTU의 비율이 매우 높았다. 문 (phylum) 수준에서 우점하는 내생균은 두 시료 모두 *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* 등이었다. 처리구별로 계산한 다양성 지수는 3요소구 시료에서 더 높았다. 본 연구를 통해 장기간 비료 시용은 식물체내 존재하는 내생균 군집 구조에 영향을 주며, 벼 뿌리의 내생 세균의 군집 다양성을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (과제번호: PJ90712704)의 지원에 의해 이루어졌습니다. 관련 실험을 도와준 최혜영, 한지유와 논문을 검토해 준 김대훈 박사에게 감사드립니다.

인 용 문 헌

Ahn, J.H., J. Song, B.Y. Kim, M.S. Kim, J.H. Joa, and H.Y. Weon. 2012. Characterization of the bacterial and archaeal communities in rice field soils subjected to long-term fertilization practices. J. Microbiol. 50:754-765.

Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnol. Lett. 32:1559-1570.

Berg, G., A. Krechel, M. Ditz, R.A. Sikora, A. Ulrich, and J. Hallmann. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 51:215-229.

Chun, J., K.Y. Kim, J.H. Lee, and Y. Choi. 2010. The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. BMC Microbiol. 10:101.

Compant, S., C. Clément, and A. Sessitsch. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biol. Biochem. 42:669-678.

Edgar, R.C., B.J. Haas, J.C. Clemente, C. Quince, and R. Knight. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics. 27:2194-2200.

Jones, R.T., M.S. Robeson, C.L. Lauber, M. Hamady, R. Knight, and N. Fierer. 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. ISME J. 3:442-453.

Kim, J.H. and J.K. Lee. 2011. Identification and characterization of an endophytic strain of *Streptomyces* from rice roots (*Orysa sativa* L.). Kor. J. Microbiol. 47:375-380.

Kim, M.S., Y.H. Kim, B.K. Hyun, J.E. Yang, Y.S. Zhang, H.B. Yun, Y.K. Sonn, Y.J. Lee, and S.K. Ha. 2011. Rice yield and changes of available silicate in paddy soils from long-term application of chemical fertilizers and soil amendments. Korean J. Soil Sci. Fert. 44:1118-1123.

Kim, O.S., Y.J. Cho, K. Lee, S.H. Yoon, M. Kim, H. Na, S.C. Park, Y.S. Jeon, J.H. Lee, H. Yi, S. Won, and J. Chun. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:716-721.

Lian, J., Z. Wang, and S. Zhou. 2008. Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection. J. Gen. Appl. Microbiol. 54:83-92.

Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A.W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Konig, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K.H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Res. 32:1363-1371.

Manter, D.K., J.A. Delgado, D.G. Holm, and R.A. Stong. 2010. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. Microb. Ecol. 60:157-166.

Mercado-Blanco, J. and P.A. Bakker. 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. Antonie van Leeuwenhoek. 92:367-389.

Park, M., H. Lee, S.G. Hong, and O.S. Kim. 2012. Endophytic bacterial diversity of antartic moss, *Sanionia uncinata*. Antarct. Sci. 4:1-4.

Park, S.Y., S.H. Yang, S.K. Choi, J.G. Kim, and S.H. Park. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from rice root cultivated in Korea. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 35:1-10.

Pruesse, E., C. Quast, K. Knittel, B.M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies, and F.O. Glockner. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Res. 35:7188-7196.

Qin, S., J. Li, H.H. Chen, G.Z. Zhao, W.Y. Zhu, C.L. Jiang, L.H. Xu, and W.J. Li. 2009. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in xishuangbanna, China. Appl. Environ. Microbiol. 75:6176-6186.

Quince, C., A. Lanzen, R.J. Davenport, and P.J. Turnbaugh. 2011. Removing noise from pyrosequenced amplicons. BMC Bioinformatics. 12:38.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.

Saravanakumar, D. and R. Samiyappan. 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. J. Appl. Microbiol. 102:1283-1292.

Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn, and C.F. Weber. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75:7537-7541.

Shin, D.S., M.S. Park, S. Jung, M.S. Lee, K.H. Lee, K.S. Bae, and S.B. Kim. 2007. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. J. Microbiol. Biotechnol. 17:1361-1368.

Stockwell, V.O. and J.P. Stack. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. Phytopathology. 97:244-249.

Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo, and J. Harper. 2004. Natural

products from endophytic microorganisms. J. Nat. Prod. 67:257-268.

Taghavi, S., D. van der Lelie, A. Hoffman, Y.B. Zhang, M.D. Walla, J. Vangronsveld, L. Newman, and S. Monchy. 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. PLoS Genet. 6:e1000943.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739.

Ulrich, K., A. Ulrich, and D. Ewald. 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. FEMS Microbiol. Ecol. 63:169-180.