

Pseudomonas sp. G19에 의한 배추의 염 스트레스 경감 및 성장 촉진

이건웅¹ · 이귀재^{1,2} · 채종찬^{1,2*}

¹전북대학교 생명공학부, ²전북대학교 환경신기술연구소

Pseudomonas sp. G19 Alleviates Salt Stress and Promotes Growth of Chinese Cabbage

Gun Woong Lee¹, Kui-Jae Lee^{1,2}, and Jong-Chan Chae^{1,2*}

¹Division of Biotechnology, ²Advanced Institute of Environmental and Bioscience,
Chonbuk National University, Iksan 570-752, Republic of Korea

(Received October 27, 2014 / Accepted November 5, 2014)

A variety of abiotic stresses limit plant growth and crop productivity. Among the abiotic stress, salinity is one of the major harmful stresses to plants. Plant growth-promoting bacterium was isolated from reclaimed land soil of Kye-hwa-do and identified as *Pseudomonas*. *Pseudomonas* sp. strain G19 produced 7.5 µg/ml of indole acetic acid and solubilized 25% of insoluble phosphate after 36 h cultivation. Also, G19 was able to produce a protein that was structurally homologous to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase of *Pseudomonas fluorescens* KACC10070 playing a role in reduction of ethylene in plant. The strain G19 increased the biomass of Chinese cabbage seedlings grown in the presence of 150 mM NaCl. The results indicated that the strain G19 promoted the growth of Chinese cabbage seedling under salinity stress through microbe-plant interactions.

Keywords: *Pseudomonas*, Chinese cabbage, plant-growth promotion, salinity stress

식물의 생장은 다양한 환경적 요인들의 영향을 받게 되며, 특히 시설재배의 연작된 토양과 간척지 토양은 염류의 집적으로 인하여 식물에 스트레스를 유발하게 된다. 이와 같은 염 스트레스는 식물의 이온 불균형 및 노화를 가속화 시키고 생산성을 크게 저하시키게 된다. 따라서, 이러한 스트레스 환경에 노출되어 있는 식물의 성장촉진 및 스트레스 경감에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다(Rodríguez and Fraga, 1999; Penrose and Glick, 2003; Mayak *et al.*, 2004).

식물의 근권에서 분리된 미생물 중 일부는 식물의 성장을 촉진하며, 이러한 토양 미생물을 식물성장촉진 세균(PGPB; plant growth-promoting bacteria)이라고 한다(Dey *et al.*, 2004). 이러한 PGPB는 식물 성장 호르몬인 옥신을 생산하여 직접적으로 식물의 성장을 촉진하기도 하며, 이들 세균들이 생산하는 siderophore는 토양 내 Fe(III)과 결합하여 식물이 뿌리에서 Fe(III)를 쉽게 흡수할 수 있도록 유도함으로써 식물성장촉진에 영향을 준다(Glick, 1995; Liu *et al.*, 1995). 또한 토양의 인(P) 성분은 식물로 흡수되지 못하고 Fe, Al, Ca과 같은 양이온들과 결합하여 식물이 이용하기 어려운 불용성 형태로 축적되기도 하는데, 이러

한 불용성 인을 가용화 시킬 수 있는 인산가용화 활성을 통하여 식물의 성장을 촉진하기도 한다(de Freitas *et al.*, 1997; Narsian and Patel, 2000). 이와 같이 PGPB가 생산하여 제공하는 물질은 식물의 성장을 직·간접적으로 촉진하는 반면, 식물이 스트레스 환경에 노출되었을 때 증가되는 에틸렌의 전구체인 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)를 가수분해하여 에틸렌의 농도를 감소시키는 ACC deaminase를 발현함으로써 다양한 스트레스로 인한 식물피해를 경감시키는 작용이 보고되어 있다(Glick, 1995).

본 연구에서는 토양으로부터 다양한 세균 균주들을 분리하였으며, 식물의 성장을 촉진하고 스트레스를 경감시키는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 *Pseudomonas* sp. G19라고 명명하였으며, indole acetic acid (IAA) 생산, 인산가용화능, siderophore 생산 유무를 측정하였고, 항원 항체 반응을 이용하여 ACC deaminase 생산 여부도 판별하였다. 또한 선발된 균주를 이용한 실증 실험을 통하여, 염 스트레스 조건에서의 배추 성장촉진 효과를 검증하였다.

염 내성 미생물 선발을 위해 계화도 간척지의 토양 1 g을 채취하여 0.8% NaCl 용액으로 연속 희석한 후, Pikovskaya's 배지 (0.05% yeast extract, 1% glucose, 0.5% calcium phosphate, 0.05% ammonium sulphate, 0.02% potassium chloride, 0.01% magnesium sulphate 0.00001% manganese sulphate, 0.00001%

*For correspondence. E-mail: chae@jbnu.ac.kr; Tel.: +82-63-850-0840; Fax: +82-63-850-0834

ferrous sulphate, 1.5% agar)에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 그리고 불용성 인의 인산가용화 활성으로 인하여 균집락 주변에 투명대(halo zone)를 형성하는 균을 선발하였다(Lee *et al.*, 2013). 선발된 균주들은 Chrome-Azuro S (CAS) 배지 (Schwyn and Nciland, 1987)에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하고, 균집락 주변이 오렌지색으로 변하는 정도를 관찰하여 siderophore 생성을 확인하였으며(Schwyn and Nciland, 1987) 인산가용화 활성과 siderophore 생산능이 있는 7균주를 최종 선별하였다. 선발된 균주들은 식물 호르몬인 옥신의 생산능을 확인하기 위하여 indole acetic acid (IAA)의 전구물질인 L-tryptophan을 3 mM 첨가한 LB 액체배지를 이용하여 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 그리고 8,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후 상등액을 Salkowski 시약(35% perchloric acid 49 ml, 0.5 M ferric chloride 1 ml)과 1:2 (v/v)의 비율로 섞어 상온의 압 조건에서 30분 반응시키고 OD₅₃₅에서 흡광도를 측정하였으며 IAA의 정량은 표준 IAA (Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 정량하였다(Patten and Glick, 2002). 선발된 7균주는 모두 IAA의 생산능을 가지고 있었으며(자료 미제시), 그 중에서 생산능이 가장 높게 측정된 G19 균주를 이용하여 배양에 따른 IAA 생산과 인산가용화 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. IAA 측정을 위하여 1 × 10⁵ CFU/ml로 균 농도를 조정하여 접종하고, 12시간 마다 앞서 서술한 방법에 따라 IAA 생산량을 측정하였다. 그 결과, 균주의 생장이 증가됨에 따라 IAA의 생산량도 증가하였으며, 접종 36시간 이후에 IAA 생산량은 약 7.5 µg/ml로 최대치를 나타내었다(Fig. 2A). 또한 인산가용화 활성을 알아보기 위하여 Pikovskaya's 액체 배지를 만들고 난용성 tricalcium phosphate를 첨가하여 TDS (Total Dissolved solids, 총 용해성 고형물)를 800 ppm 수준으로 조정하였다. 그리고 IAA 측정에서와 동일하게 같은 밀도의 균 수를 접종한 후, MAFRA (2002)의 방법에 따라 배양 상등액 5 ml을 12시간 마다 채취하여 TDS meter (TDS 6, USA)로 총 용해성 고형물의 양을 측정하였다. 그 결과, 36시간 배양 이후 25%의 난용성 tricalcium phosphate가 감소하였으며 이것은 G19 균주에 의해 가용화되었음을 나타낸다(Fig. 2B).

다양한 스트레스로 인해 식물세포에서 증가되는 에틸렌은 식물노화를 촉진하는 요인으로 알려져 있으며 미생물이 발현하는 ACC deaminase는 에틸렌 전구체인 ACC를 가수분해시킴으로써 식물에 스트레스 저항성을 증가시킨다(Glick, 1995). 따라서 선발된 균주들의 ACC deaminase 발현을 알아보기 위해 선발된 균주들을 LB 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양

후, 3 mM ACC가 질소원으로 첨가된 Dworkin-Foster (DF) salt minimal 배지(4 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 1 mg FeSO₄·7H₂O, 10 µg H₃BO₃, 10 µg MnSO₄, 70 µg ZnSO₄, 50 µg CuSO₄, 10 µg MoO₃, 2 g glucose, 2 g gluconic acid, 2 g citric acid; Dworkin and Foster, 1958)에 재접종하여 30°C에서 48시간 동안 현탁배양하고 4,000 rpm에서 20분동안 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 균체로부터 총 단백질을 초음파 파쇄법으로 추출하였으며 *Pseudomonas fluorescens* KACC10070 균주의 ACC deaminase에 대한 polyclonal anti-ACC deaminase antibody (Soh *et al.*, 2014)를 이용한 western blotting으로 선발된 균주의 ACC deaminase 생산 여부를 확인하였다. 단백질 추출과 western blotting은 Soh 등(2014)이 사용한 방법에 따라 수행하였다. 그 결과, Fig. 1과 같이 선발된 균주 중 G19 균주에서만 ACC deaminase가 검출되었다. 이 결과는 Soh 등(2014)이 보고한 바와 같이 G19 균주가 ACC deaminase 활성을 나타내며 *P. fluorescens* KACC10070 균주의 ACC deaminase와 유사한 단백질 구조를 가지고 있다는 것을 의미한다. 따라서 실증연구를 위해 식물생장 촉진 활성(인산가용화 활성, siderophore 생산능, IAA 생산능)과 함께 식물의 스트레스를 경감시킬 수 있는 ACC deaminase를 발현하는 G19 균주를 최종 선발하였다.

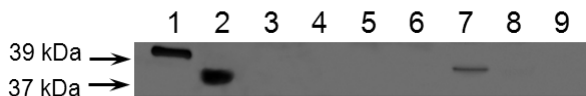


Fig. 1. Detection of ACC deaminase using polyclonal anti-ACC deaminase (anti-ACCD) antibody. Lanes: 1, purified recombinant ACCD (positive control); 2, *P. fluorescens* KACC10070 (positive control); 3, G1; 4, G6; 5, G10; 6, G11; 7, G19; 8, G30; 9, G33. Anti-ACCD antibody was produced with recombinant ACCD which was originated from *P. fluorescens* KACC10070 (Soh *et al.*, 2014).

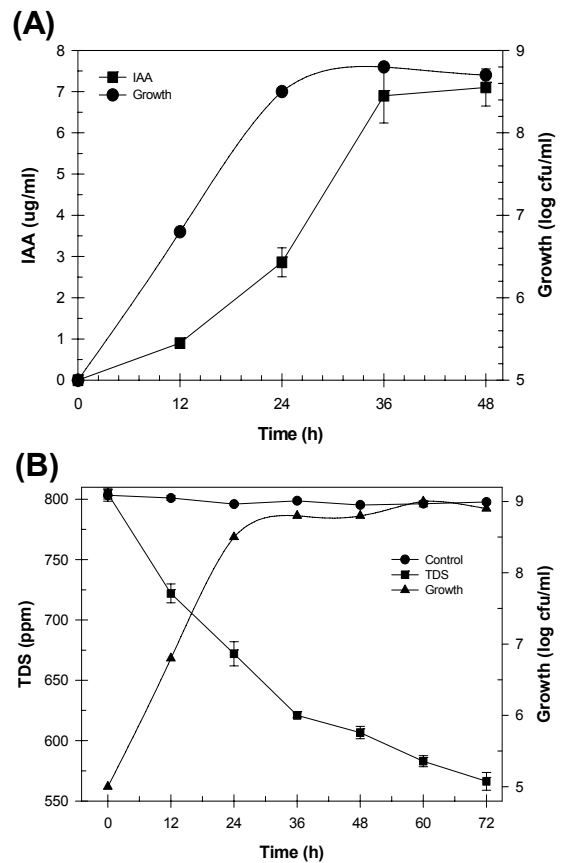


Fig. 2. IAA production (A) and phosphate solubilizing capability (B) on insoluble tricalcium phosphate by *Pseudomonas* sp. G19.

G19 균주를 동정하기 위해 LB 액체 배지에서 배양된 균체로부터 gDNA를 추출하고 universal primer인 27F와 1492R을 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool을 이용하여 상동성 비교 분석을 하였으며 *Pseudomonas* 속으로 동정할 수 있었다. 또한, API 20 NE kit를 이용하여 생화학적 특성을 조사하였으며 염기서열과 생화학적 특성을 바탕으로 *Pseudomonas* sp. G19로 명명하였다(자료 미제시).

선발된 G19 균주의 식물의 생장속진과 염 스트레스의 경감효과를 알아보기 위하여 일반 조건과 염 스트레스 조건 하에서 배추를 재배하는 실증실험을 실시하였다. 시판되는 상토(상토2호, Dongbu Farm Hannong, Korea)를 이용하여 포트(100×100×90 mm)를 제조하고 한 포트에 배추 종자를 6개씩 파종하였으며 7일 동안 28°C에서, 14시간 광조건과 10시간 암조건을 순환시키며 재배하였다. 염 스트레스 조건을 위해서 150 mM NaCl 용액에 48시간 동안 침지한 토양을 사용하였으며 동일한 조건으로 배추를 재배하였다. 선발된 균주 G19는 LB 액체배지를 이용하여 30°C에서 180 rpm으로 48시간 동안 진탕배양한 후, 4,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하고 1×10^8

CFU/ml로 조정하였다. 처리 방법은 파종 시기부터 10 ml씩 2일 간격으로 5회 처리하였으며, 발아된 이후에는 뿌리에 관주하는 방법으로 처리하였다. 처리구와 대조구는 10일 된 유묘 전체를 회수하여 지상부와 지하부의 생체중량과 전체중량, 그리고 지상부의 길이를 측정하였다. 그 결과, 염을 처리하지 않은 재배 조건에서는 G19를 접종한 처리구에서 대조구보다 전체중량이 26%, 생체중량이 27% 증가하였으며(Fig. 3A), 지상부 길이는 21% 증가하였다(Fig. 3B). 또한 150 mM NaCl 용액으로 염 농도를 조정된 염 조건의 재배에서는 G19를 접종한 처리구에서 대조구보다 전체중량이 206%, 생체중량이 87% 증가하였으며(Fig. 3C), 지상부 길이는 32% 증가하였다(Fig. 3D). 이와 같이 G19를 처리하였을 때 두 재배 조건 모두에서 유의한 수준($P < 0.05$)으로 배추의 생장이 증가되었다.

본 연구를 통하여 선발된 G19는 식물생장 촉진 인자들인 인산가용화 활성, siderophore 생산, IAA 생산을 통해 염이 처리되지 않은 조건에서도 배추의 생장을 촉진하였다고 판단되며, 염해 조건에서는 스트레스 저항성에 관여하는 ACC deaminase의 작용으로 배추 내에 축적되는 에틸렌의 양을 감소시킴으로써 염 스트레스 경감에 의한 생장속진을 유도하였다고 판단된다. 이러한 식물과의 상호작용을 통한 식물 생장속진 결과는 G19가 간척

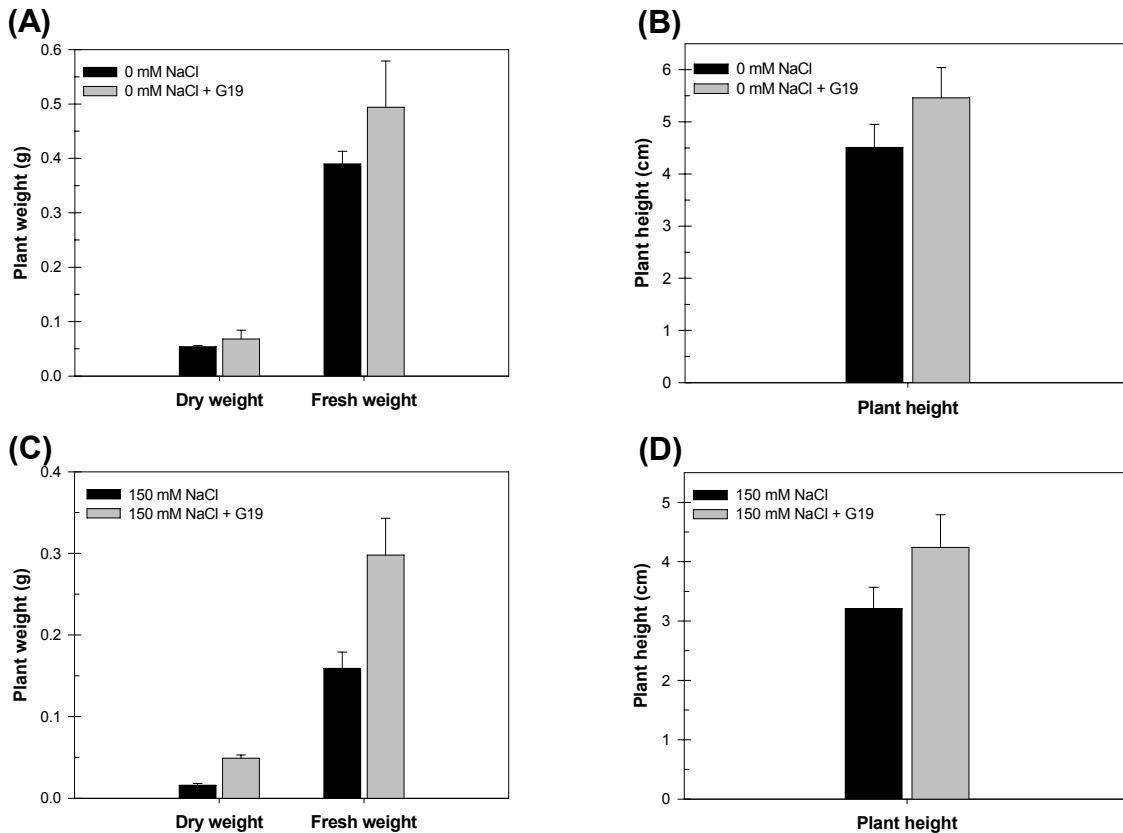


Fig. 3. Growth promoting effect of *Pseudomonas* sp. G19 on Chinese cabbage under 0 mM and 150 mM NaCl treatments. (A) dry and fresh weights under 0 mM NaCl; (B) plant height under 0 mM NaCl; (C) dry and fresh weights under 150 mM NaCl; (D) plant height under 150 mM NaCl. Data were analyzed by *t*-test using SPSS software ($P < 0.05$, $n = 5$).

지 및 염 집적토양에서의 식물재배에 활용할 수 있는 식물성장 촉진 균주라는 것을 의미한다.

적요

염 스트레스를 비롯한 다양한 비생물학적 스트레스는 식물의 성장저해와 작물 생산량을 감소시키는 요인으로 작용한다. 계화도 간척지 토양에서 식물성장 촉진 세균을 분리하여 *Pseudomonas* sp. G19로 명명하였다. G19 균주는 36시간 배양 후 7.5 µg/ml의 indole acetic acid를 생산하고 불용성인산을 25% 가용화시켰으며, 식물의 에틸렌 감소와 관련된 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase를 발현하였다. 또한 150 mM NaCl에 침지된 염 조건 의 토양에서 재배된 유묘기 배추를 이용한 실증실험에서 G19 균주는 배추의 생체중량을 증가시킴으로써 염 스트레스의 경감 및 성장 촉진에 기여함을 알 수 있었다.

감사의 말

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009801)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., and Chauhan, S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis phygaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* **159**, 371-394.
- Dworkin, M. and Foster, J.W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* **75**, 592-603.
- de Freitas, J.R., Banerjee, M.R., and Germida, J.J. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils* **24**, 358-364.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**, 109-117.
- Lee, G.W., Min, B.D., Park, S., Jheong, W., Go, E.B., Lee, K.J., and Chae, J.C. 2013. Biocontrol of red pepper using mixed culture of antagonistic bacterium and phosphate solubilizing yeast. *Korean J. Microbiol.* **49**, 398-402.
- Liu, L., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* **85**, 1064-1068.
- MAFRA (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs). 2002. Industrial development of environment-friendly bioremediating agents for the recovery of salt injury soil.
- Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B.R. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 565-572.
- Narsian, V. and Patel, H.H. 2000. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 559-565.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indol acetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3795-3801.
- Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant* **118**, 10-15.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**, 319-339.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56.
- Soh, B.Y., Lee, G.W., Go, E.B., Kim, B.R., Lee, K.J., and Chae, J.C. 2014. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas fluorescens* promoting the growth of Chinese cabbage and its polyclonal antibody. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 690-695.