

11-154300
0-002341-
01

동식물공생미생물의 군집유전체 분석 및 유용미생물 자원의 발굴 최종보고서

2018

농림축산식품부

포스트게놈다부처유전체사업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-002341-01

동·식물공생 미생물의 군집유전체 분석 및 유용 미생물 자원의 발굴 최종보고서

2018. 11. 09.

주관연구기관 / 중앙대학교
협동연구기관 / 단국대학교
한국과학기술원
부산대학교

농림축산식품부

<제출문>

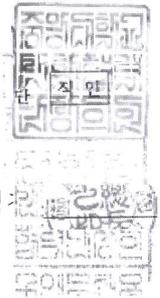
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식물의 유기물 분비에 따른 근권 미생물 커뮤니티 분석 및 유용 공생미생물 자원 발굴”(개발기간 : 2016.8.23 ~ 2018.8.22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 8. 22.

주관연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) 김원용
협동연구기관명 : 단국대학교 산학협력단 (대표자) 김철현
한국과학기술원 산학협력단 (대표자) 신성찬
부산대학교 산학협력단 (대표자) 윤석영



주관연구책임자 : 설우준

협동연구책임자 : 권지안, 윤석환, 이재훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	916007	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.08.23. ~ 2018	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	포스트게놈 다부처유전체사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	식물의 유기물 분비에 따른 근권 미생물 커뮤니티 분석 및 유용 공생미생물 자원 발굴			
연구책임자	설우준	해당단계 참여연구원 수	총: 25명 내부: 6명 외부: 19명	해당단계 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 0 천원 계: 20,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 56명 내부: 18명 외부: 38명	총 연구개발비	정부: 400,000천원 민간: 0 천원 계: 400,000천원
연구기관명 및 소속부서명	중앙대학교 산학협력단 시스템생명공학과			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당없음
-------------------------	------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물 자원	정보	실물
등록· 기탁 번호	10.3389/f micb.2017. 01820							NN-5074			
	10.1016/j.p bi.2017.07. 001							NN-5075			
	10.1007/s1 3258-017 -0622-8							NN-5076			
	10.1007/s1 1103-018 -0717-x							NN-5072			
	10.1016/j.b rc.2017.0 7.110							NN-5073			
	10.1007/s1 2374-018 -0075-x							NN-5071			
								NN-5065			
							NN-5070				
							NN-5062				
							NN-5067				
							NN-5069				
							NN-5061				

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

SCI 논문 게재 성과 6건, 메타지놈 분석 12건, 그에 해당하는 NABIC 등록 12건, 학술발표 21건, 전문연구인력 양성 5건의 성과가 발생하였음.

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 식물의 성장, 스트레스 반응에 관여하는 exocytosis에 결함이 있는 식물의 근권 메타지놈 분석을 통한 신규 생물자원 개발 기반 구축</p> <p>○ 식물의 성장, 스트레스 저항성을 강화시키는 국내 자생 유용 근권 미생물 발굴</p> <p>○ 식물의 exocytosis에 의해 분비되는 이차대사산물 분석을 통한 식물의 성장, 스트레스 저항성 강화에 유용한 식물 유래 이차대사산물 발굴</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 식물 병원성 박테리아인 <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000의 성장을 야생형(WT)과 exocytosis 분비 돌연변이체(<i>vamp721</i> 및 <i>vamp722</i>)에서 분석하여 돌연변이체에서 저항성이 약화됨을 확인함</p> <p>○ 이를 바탕으로 야생형(WT) 애기장대와 exocytosis 분비 돌연변이체(<i>vamp721</i> 및 <i>vamp722</i>)의 근권 샘플을 확보하여 근권 메타지놈 분석 진행하였고, 야생형(WT) 애기장대의 근권과 <i>vamp</i> 돌연변이체의 근권의 미생물 군집은 다름을 확인함</p> <p>○ 근권 메타지놈 분석과 식물 환경 스트레스 저항성 획득을 위한 식물과 공생미생물간의 상호작용 실험을 통해 환경 스트레스 내성 형질을 보이는 유용 미생물 후보군 선별함</p> <p>○ 돌연변이체 근권보다 야생형(WT) 애기장대 근권에서 많이 존재하고 환경 스트레스 내성 형질을 보이는 <i>Flavobacterium</i> 종을 대상으로 식물 면역에 미치는 영향을 분석 중임</p> <p>○ 또 야생형(WT)과 돌연변이체의 분비물 샘플을 수확하여 제2협동과제에서 미생물 대사에 미치는 영향 및 대사산물 조성을 분석하였으며, 그 결과를 바탕으로 식물 면역에 미치는 질소원의 효과를 분석함</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 식물 면역력 강화에 도움을 주는 근권 미생물 또는 이차대사산물을 발굴은 농약 절감으로 인한 간접적인 농가 소득 증대 뿐 아니라 토양 및 생태계 보존에도 기여할 것으로 기대함</p> <p>○ Exocytosis에 의한 근권 미생물 군집 조성 분석은 식물의 분비와 근권 미생물 생태와의 상관관계를 보여줌으로써 근권 미생물 생리활성 조절에 대한 가능성 및 새로운 연구방향을 제시할 것으로 기대함</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>근권 미생물</p>	<p>VAMP721/722</p>	<p>식물 면역</p>	<p>환경 스트레스</p>	<p>탈질화 반응/DNRA</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>rhizosphere microbe</p>	<p>VAMP721/722</p>	<p>plant immunity</p>	<p>environmental stress</p>	<p>denitrification/ DNRA</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구수행 내용 및 결과
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도
4. 연구결과의 활용 계획 등
붙임. 참고 문헌

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 연구개발 개요

- 식물의 exocytosis 분비 기작에 의해 서식이 결정되는 근권 미생물 생태 분석 및 이를 바탕으로 궁극적으로 식물의 면역력 및 환경 스트레스 저항성 향상에 도움을 주는 유용 근권 미생물을 발굴함 (그림 1)

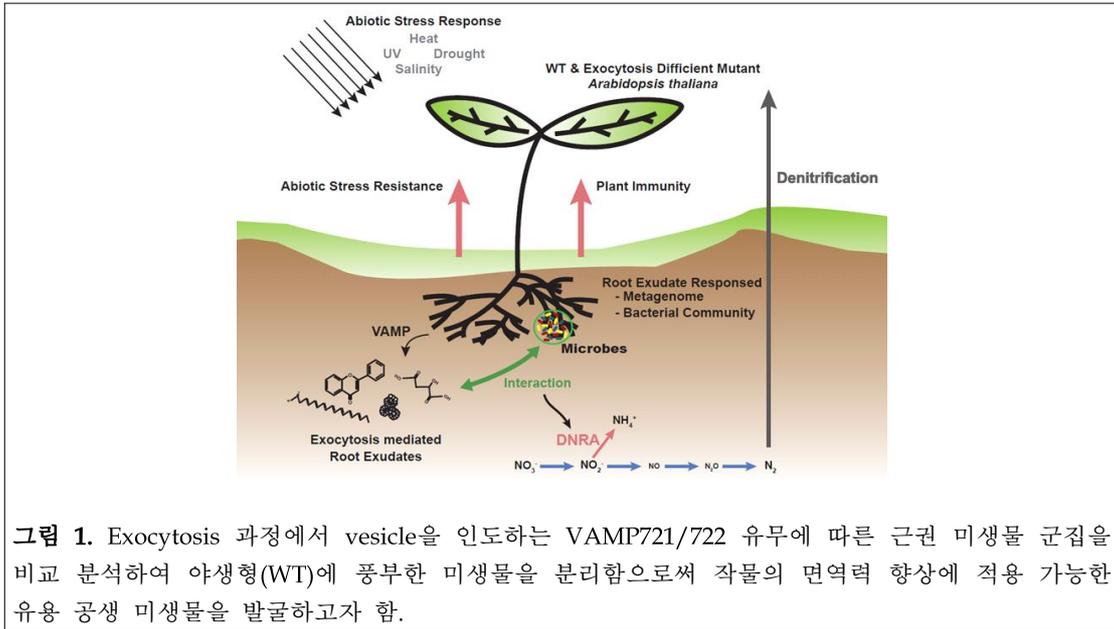


그림 1. Exocytosis 과정에서 vesicle을 인도하는 VAMP721/722 유무에 따른 근권 미생물 군집을 비교 분석하여 야생형(WT)에 풍부한 미생물을 분리함으로써 작물의 면역력 향상에 적용 가능한 유용 공생 미생물을 발굴하고자 함.

○ 핵심기술

- 식물 근권 메타지놈 분석을 통한 유용 공생 미생물 후보 선별
- 본 연구진은 식물에서는 최초로 면역반응에 관여하는 exocytosis를 유도하는 단백질 복합체 구성 단백질들을 모두 동정하였음: PEN1, SNAP33 및 VAMP721/722
- 이 중 VAMP721/722는 vesicle을 인도하는 단백질로 면역반응 뿐 아니라 식물의 성장 및 비생물학적 스트레스 반응에도 관여함
- 식물 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 유용 공생 미생물 확보

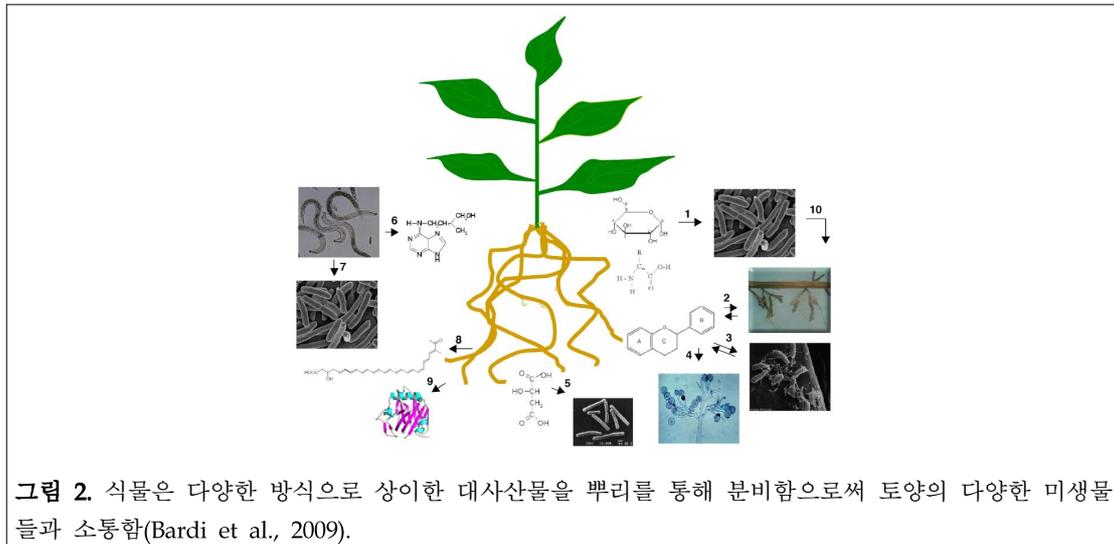
<p>최종목표</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물 면역반응에 관여하는 exocytosis 분비에 의해 결정되는 근권 미생물 생태 이해 ○ 식물 면역력을 향상시키는 근권 공생미생물 최소 1종 분리 및 동정 ○ 식물의 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 근권 공생미생물 선별 및 해당 과정의 분자생물학적 탐색을 통한 세부 기작을 규명함 ○ 식물의 삼출물이 미생물의 질소 순환 기작에 미치는 영향을 규명, 또한 이로 인해서 식물이 생존 및 생장에 얻을 수 있는 공생적 이익 관계 규명 ○ 질소 순환 기작에 영향을 미치는 삼출물의 화학적 구성요소를 탐색, 이를 활용하여 질소 유실을 방지하여 비료이용량을 감축할 수 있는 방안 마련
<p>세부목표</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최신 메타지놈 분석 기법을 이용한 근권 미생물 생태 이해 <ul style="list-style-type: none"> - 야생형(WT) 애기장대 근권과 vamp 돌연변이체 근권의 미생물 군집 차이 분석 - 본 연구진 소유 고성능 서버를 이용한 근권 메타지놈 분석과 유용 공생 미생물의 유전체 해독 - 유용 공생 미생물과 생물자원의 라이브러리 구축 ○ 식물의 면역력 및 환경 스트레스 저항성을 향상시키는 유용 공생미생물 분리 및 동정 <ul style="list-style-type: none"> - 근권 미생물 군집 비교분석을 통해 exocytosis 분비에 의해 식물의 성장 및 환경 스트레스 저항성 증진과 관련된 유용 공생미생물 발굴 - 배양한 미생물 처리에 따른 식물 성장/면역반응 변화 분석 - 배양한 미생물 처리에 따른 식물의 환경 스트레스 저항성 분석 및 유용 근권 미생물 발굴 ○ 식물 면역력을 향상시키는 이차대사산물 분리 및 동정 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 대사에 영향을 주는 이차대사산물 발굴을 통한 식물 병원성 박테리아 성장 분석 - 분리한 이차대사산물 처리에 따른 식물 성장/면역반응 변화 분석 ○ 식물의 삼출물이 미생물의 질소 순환 기작에 미치는 영향을 규명, 또한 이로 인해서 식물이 생존 및 생장에 얻을 수 있는 공생적 이익 관계 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 애기장대 (야생형 / VAMP 721/722 돌연변이)의 삼출물이 model organism (<i>Shewanella loihica</i> strain PV-4의 탈질화 반응 / DNRA 반응에 미치는 영향을 분석 - 배추밭 근권에서 분리된 <i>Flavobacterium</i> spp.의 탈질화 반응 / DNRA 반응 관련 유전체 분석 - 애기장대 (야생형 / VAMP 721/722 돌연변이)의 삼출물이 배추밭 근권에서 분리된 <i>Flavobacterium</i> spp.의 탈질화 반응 / DNRA 반응에 미치는 영향을 분석 ○ 질소 순환 기작에 영향을 미치는 삼출물의 화학적 구성요소를 탐색, 이를 활용하여 질소 유실을 방지하여 비료이용량을 감축할 수 있는 방안 마련 <ul style="list-style-type: none"> - 삼출물의 성분을 분석하여 탈질화 반응 / DNRA 반응의 활성 정도에 영향을 미치는 물질을 탐색

1-2. 연구개발의 필요성

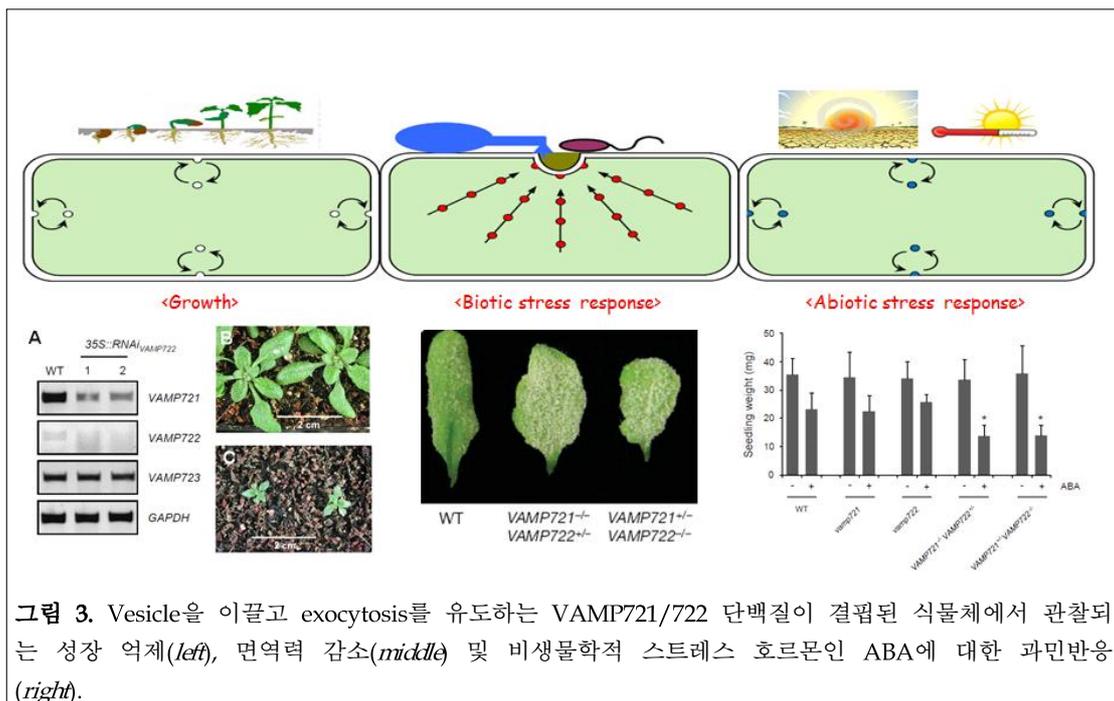
- 환경 스트레스 (가뭄, UV-B, 고온, 냉해, 고염)는 농작물의 생산성, 비료 수요, 온실 가스 발생 등과 밀접한 관련이 있으며, 특히 주요 작물인 벼의 경우, 전 세계적으로 벼 재배 면적의 50%에 해당하는 7천만 헥타르가 가뭄 스트레스의 영향을 받고 있음.
- 환경 스트레스에 대한 식물의 저항성 구축은 작물의 재배 지역 확대, 생산량 증진, 안정적 산출량 확보 등을 위하여 필수적인 요소임.

○ 이러한 식물의 환경 적응성(병원균에 대한 저항성, 환경 스트레스에 대한 저항성 및 성장 등)은 다분히 토양 내 공생 미생물에 의해 조절을 받음.

- 식물 근권의 미생물은 식물과 상호작용을 함으로써 식물의 성장 및 면역 증진과 관련됨.
- 식물은 광합성 산물의 30-40%를 뿌리를 통해 근권으로 분비할 뿐 아니라 다양한 대사산물의 분비를 통해 근권 미생물과 소통할 것으로 여겨짐. 이는 유전자형에 따른 식물의 분비능 차이로 인한 근권 미생물 군집(community)의 차이가 발생할 가능성을 보여줌 (그림 2).



- VAMP721/722는 secretory vesicle에서 exocytosis를 유도하는 단백질로, 실제 본 연구진이 보유한 돌연변이체(VAMP721/722-silenced 또는 haplo-insufficient)에서 식물 성장의 억제 및 생물학/비생물학적 스트레스에 대한 저항성 감소 현상을 관찰함 (Kwon et al., 2008; Yi et al., 2013) (그림 3).



- 그러나 현재까지 식물의 유전자형, 특히 분비가 근권 미생물 군집의 조성을 조절한다는 보고는 없는 상태임.

○ 따라서 본 연구진은 식물 면역반응에 관여하는 exocytosis를 통한 분비에 차이를 보이는 식물 재료를 이용하여 근권 메타지놈 분석을 바탕으로 작물 면역력 및 환경 스트레스 저항성 향상에 도움을 주는 유용 근권 공생 미생물을 발굴하고자 하며, 유전체 분석을 바탕으로 유용 유전자원을 확보하고자 함.

1-3. 연구개발 범위

연차	연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1차년도	○ 박테리아에 대한 식물 면역반응에서 exocytosis 분비기작의 중요성 확인	○ 토양 또는 액체배지에서 재배한 식물에서 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000의 성장 분석	○ 토양에서 4-5주 재배한 야생형과 exocytosis 분비 돌연변이체의 잎에 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000을 표면 접종한 후 3일 후 잎 내부에서 박테리아의 성장 정도를 분석함 ○ 액체배지에서 2주간 재배한 야생형과 exocytosis 분비 돌연변이체에 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000을 표면 접종한 후 3일 후 식물체 내부에서 박테리아의 성장 정도를 분석함
	○ 식물 면역반응에 관여하는 exocytosis 분비에 의해 결정되는 근권 미생물 군집 분석	○ 토양에서 재배한 식물 근권 샘플 확보	○ 고랭지 배추밭 및 실험용 토양에서 야생형(WT)과 exocytosis 분비 돌연변이체(<i>vamp721</i> 및 <i>vamp722</i>)를 4-5주 재배한 후 식물 뿌리 주변의 흙 샘플을 수확함
		○ 식물 면역반응에 관여하는 exocytosis 분비에 의해 결정되는 근권 미생물 군집 분석	○ 야생형(WT)과 exocytosis 분비 돌연변이체 근권 미생물 군집 차이를 분석함 ○ 유용 공생미생물 후보군의 유전체 해독
	○ 식물 면역반응에 관여하는 exocytosis 분비에 의해 분비되는 이차대사산물 분석	○ 액체배지에서 재배한 식물 분비 이차대사산물 샘플 확보	○ MS 액체배지에서 야생형(WT)과 exocytosis 분비 돌연변이체(<i>vamp721</i> 및 <i>vamp722</i>)를 2주 재배한 후, 증류수로 옮겨 식물에서 분비하는 이차대사산물 샘플을 수확함
	○ 식물의 환경 스트레스 저항성 획득을 위한 식물과 공생 미생물의 상호작용 분석	○ 식물의 환경 스트레스 저항성 향상 유용 공생 미생물 후보군 발굴	○ 꽃자왈 유래 500여종을 대상으로 애기장대의 환경 스트레스 저항성 여부를 탐색하여 환경 스트레스 내성 형질을 보이는 유용 미생물 후보군 선별함.
2차년도	○ <i>Flavobacterium</i> 에	○ 근권 미생물 군집 비교분	○ 토양에서 4-5주 재배한 야생형식물

<p>의한 식물면역 영향 분석</p>	<p>석을 통해 분리한 <i>Flavobacterium</i> 종을 선접종 후, 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000의 성장 분석</p>	<p>체의 뿌리에 각 <i>Flavobacterium</i> isolate 을 접종하고, 마커 유전자 발현을 분석 하였음 ○ 토양에서 4-5주 재배한 야생형식물체의 뿌리에 각 <i>Flavobacterium</i> isolate 을 접종하고, 1주일 후에 잎에 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000 을 표면 접종한 후 2-3일 후 잎 내부에서 박테리아의 성장 정도를 분석하는 중임</p>
<p>○ 식물 면역반응에 관여하는 exocytosis 분비에 의해 결정되는 근권 메타지놈 분석</p>	<p>○ 메타지놈 분석을 통한 근권 미생물의 생태 이해</p>	<p>○ 야생형(WT)과 exocytosis 분비 돌연변이체의 근권 메타지놈을 분석하여 기능적인 차이를 파악함 ○ 이는 1차년도에서 확인한 근권 미생물 군집 결과와 함께 근권에서의 미생물 생태를 이해함</p>
<p>○ 질소원 처리에 따른 식물면역 영향 분석</p>	<p>○ 액체 배지에서 재배한 식물에 질산(NO_3^-)을 전처리한 후, 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000의 성장 분석</p>	<p>○ 질산에 의해 발현이 증가하는 유전자 목록을 확보하였음 ○ 액체 배지에서 재배한 식물에 질산(NO_3^-)을 전처리한 후, 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000을 표면 접종한 후 2-3일 후에 박테리아의 성장을 분석하였음</p>
<p>○ 꽃자왈 유래 미생물에 의한 식물면역 영향 분석</p>	<p>○ 꽃자왈 토양에서 분리한 <i>Bacillus</i>를 선접종 후, 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000의 성장 분석</p>	<p>○ 토양에서 4-5주 재배한 야생형식물체의 뿌리에 각 <i>Bacillus</i> isolate을 접종하고, 1주일 후에 잎에 식물 병원성 박테리아인 <i>P. syringae</i> DC3000을 표면 접종한 후 2-3일 후 잎 내부에서 박테리아의 성장 정도를 분석하는 중임</p>
<p>○ 식물의 환경 스트레스 저항성 획득을 위한 식물과 공생 미생물의 상호작용 분석</p>	<p>○ 식물의 환경 스트레스 저항성 향상 유용 공생 미생물 후보군 발굴</p>	<p>○ 고랭지 배추 근권 유래 미생물을 대상으로 애기장대의 환경 스트레스 저항성 여부 탐색을 통한 유용 공생 미생물 선별</p>
<p>○ 애기장대 (야생형 / VAMP 721/722 돌연변이)의 삼출물이 model organism (<i>Shewanella loihica</i> strain PV-4)의 탈질화 반응 / DNRA 반응에 미치는 영향을 분석</p>	<p>○ 애기장대 (야생형 / VAMP 721/722 돌연변이)의 삼출물을 보다 고농도로 다량 확보하여 model organism 실험을 재현</p>	<p>○ NH_4^+, N_2O (C_2H_2 주입 시) 생성 속도를 측정하여 탈질화/DNRA 반응의 반응속도 측정 ○ <i>nrfA</i> / <i>nirK</i> 유전체의 발현량 변화를 RT-qPCR을 이용하여 측정</p>
<p>○ 배추밭 근권에서 분리된 <i>Flavobacterium</i> spp.의 탈질화 반응 /</p>	<p>○ 근권에서 분리된 <i>Flavobacterium</i> spp.의 탈질화 반응 / DNRA 반응 관련 유전체</p>	<p>○ 근권에서 분리된 약 10여 종의 <i>Flavobacterium</i> spp.가 보유한 <i>nirK</i>, <i>nrfA</i> 유전체를 기존 데이터베이스의</p>

DNRA 반응 관련 유전체 분석	분석	<i>Flavobacterium</i> 의 <i>nirK</i> , <i>nrfA</i> 정보를 활용하여 제작한 프라이머 세트를 이용하여 분석
○ 애기장대 (야생형 / VAMP 721/722 돌연변이)의 삼출물을 여러 개의 <i>Flavobacterium</i> 종으로 인위적으로 합성한 근권 미생물 혼합 배양액에 적용, 질소 환원반응의 정도 차이를 확인	○ 애기장대 (야생형 / VAMP 721/722 돌연변이)의 삼출물을 여러 개의 <i>Flavobacterium</i> 종으로 인위적으로 합성한 근권 미생물 혼합 배양액에 적용, 질소 환원반응의 정도 차이를 확인	○ NH ₄ ⁺ , N ₂ O (C ₂ H ₂ 주입 시) 생성 속도를 측정하여 탈질화/DNRA 반응의 반응속도 측정 ○ <i>nrfA</i> / <i>nirK</i> 유전체의 발현량 변화를 RT-qPCR을 이용하여 측정
○ 삼출물의 성분을 분석하여 탈질화 반응 / DNRA 반응의 활성 정도에 영향을 미치는 물질을 탐색	○ 삼출물의 성분 분석 ○ DNRA 반응이 나타나는 토양 샘플을 확보, 애기장대 (야생형 / VAMP 721/722 돌연변이)의 삼출물 (또는 인공 삼출물)로 DNRA 반응의 촉진 및 DNRA 반응경로 보유 미생물의 농화 여부를 확인	○ UC Davis에 LC/MS를 이용한 <i>Arabidopsis thaliana</i> 삼출물의 화학적 성분 분석을 의뢰 ○ 성분 분석 결과를 바탕으로 model organism의 탈질화/DNRA 반응에 영향을 미치는 물질을 탐색 ○ 인공적으로 root exudate를 합성, 탈질화/DNRA 반응에 대한 영향을 확인 ○ 탈질화/DNRA가 균형적으로 일어나는 토양 확보 ○ 삼출물을 포함한 배지가 토양의 탈질화/DNRA 반응에 미치는 영향을 NO ₃ ⁻ 로부터 NH ₄ ⁺ 가 생성되는 양, HiSeq / <i>nrfA</i> 유전체의 abundance 등을 관찰하여 측정

2. 연구수행 내용 및 결과

- 당초 계획한 exocytosis 분비 돌연변이체에서의 샘플 확보의 문제점
 - 야생형(WT) 및 단일 돌연변이체(*vamp721* 및 *vamp722*)와는 달리 *VAMP721*^{+/-} *VAMP722*^{-/-}, *VAMP721*^{-/-} *VAMP722*^{+/-} 돌연변이체의 경우 잎을 제거한 후 PCR 방법으로 유전형(genotype)을 확인해야 함.
 - 이 경우 잎이 제거된 부위에서 여러 물질이 누수될 가능성이 높음.
 - 이는 액체배지에서 재배한 식물에서 **이차대사산물 샘플의 오염**을 초래할 수 있고, 토양에서 재배한 식물의 경우 **스트레스에 의한 토양 미생물 군집 변화**를 야기할 수 있음.
- 근권 및 이차대사산물 샘플 확보를 위한 단일 돌연변이체의 이용 가능성
 - 따라서 단일 돌연변이체에서의 면역력 변화를 확인함으로써 단일 돌연변이체 식물 이용 가능성을 확인하였음.
 - 이를 위해서 단일 돌연변이체에 식물 병원성 박테리아인 *P. syringae* DC3000을 표면 접종하여 식물체 내에서 박테리아 성장 분석을 통해 박테리아에 대한 식물 면역력 변화를 분석하였음.

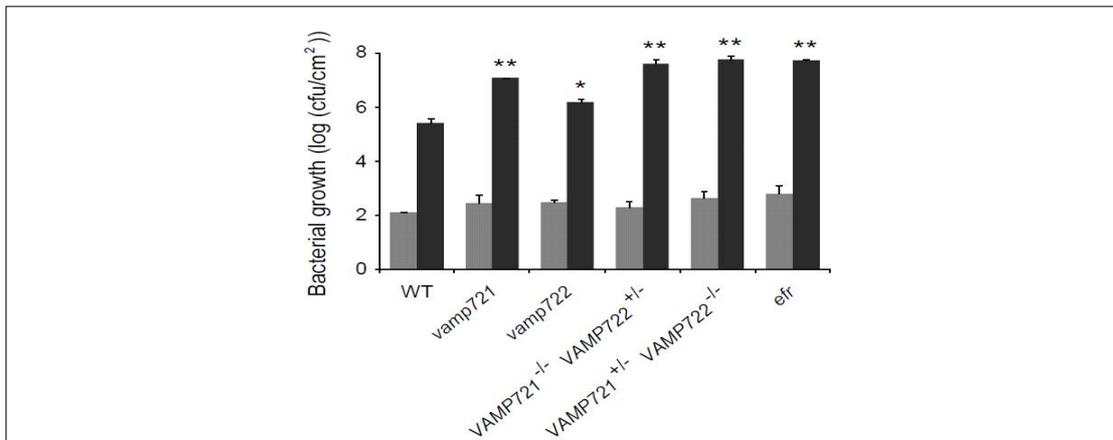


그림 4. 박테리아에 대한 식물 면역반응에 관여하는 VAMP721/22 관여 exocytosis 분비기작.
 4-5주간 토양에서 재배한 각 유전형 식물체의 잎을 *P. syringae* DC3000 현탁액에 담가 표면 접종한 후, 3시간 (grey) 또는 3일(black) 후 식물체 잎에서 박테리아 개체수를 측정하였음. 대조군으로 박테리아에 대한 면역반응이 상실된 *efr* 돌연변이체를 사용하였음. *, P<0.05; **, P<0.01.

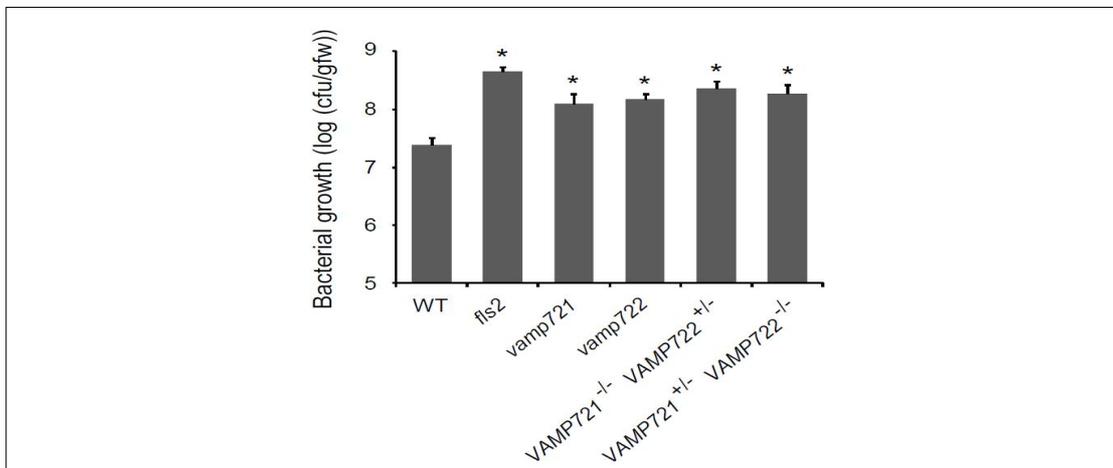


그림 5. 박테리아에 대한 식물 면역반응에 관여하는 VAMP721/22 관여 exocytosis 분비기작.
 2주간 액체배지에서 재배한 각 유전형 식물체에 *P. syringae* DC3000를 표면 접종한 후, 3일 후 식물체에서 박테리아 개체수를 측정하였음. 대조군으로 박테리아에 대한 면역반응이 상실된 *fls2* 돌연변이체를 사용하였음. *, P<0.05.

- 이 결과를 통해 단일 돌연변이체도 충분히 사용 가능함을 확인함.

○ 고랭지 배추밭 토양에서 재배한 식물을 이용하여 근권 샘플 확보

- 배추밭 및 실험실용 토양에서 야생형과 단일 돌연변이체 식물을 4-5주 재배한 후, 식물 뿌리에 존재하는 흙을 털어서 근권 토양만 획득함: 배추밭 토양은 점성이 너무 강해서 실험실용 토양도 사용해서 샘플을 확보하고자 하였음.

- 근권 흙이 남아있는 뿌리를 멸균된 물과 함께 튜브에 넣고 흔들어 준 후, 원심분리하여 근권 샘플을 확보함 (그림 6)

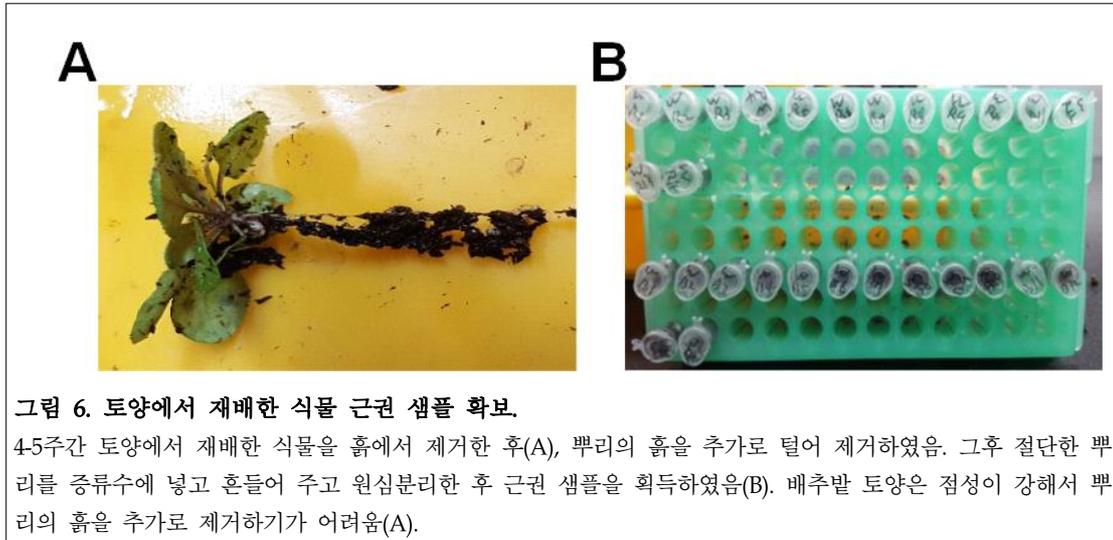


그림 6. 토양에서 재배한 식물 근권 샘플 확보.

4-5주간 토양에서 재배한 식물을 흙에서 제거한 후(A), 뿌리의 흙을 추가로 털어 제거하였음. 그후 절단한 뿌리를 증류수에 넣고 흔들어 주고 원심분리한 후 근권 샘플을 획득하였음(B). 배추밭 토양은 점성이 강해서 뿌리의 흙을 추가로 제거하기가 어려움(A).

- 야생형과 돌연변이체에서 서로 다른 근권미생물 조성이 형성됨을 확인함
 - 야생형과 돌연변이체 근권과 주변토양의 미생물 군집 분석함 (그림 7).

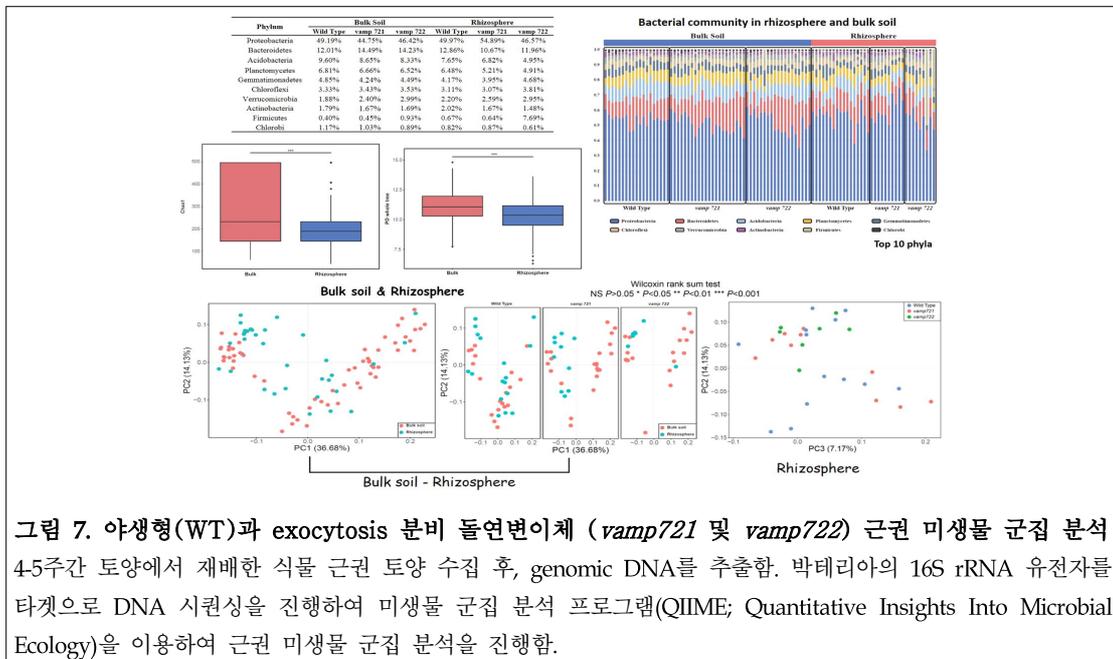
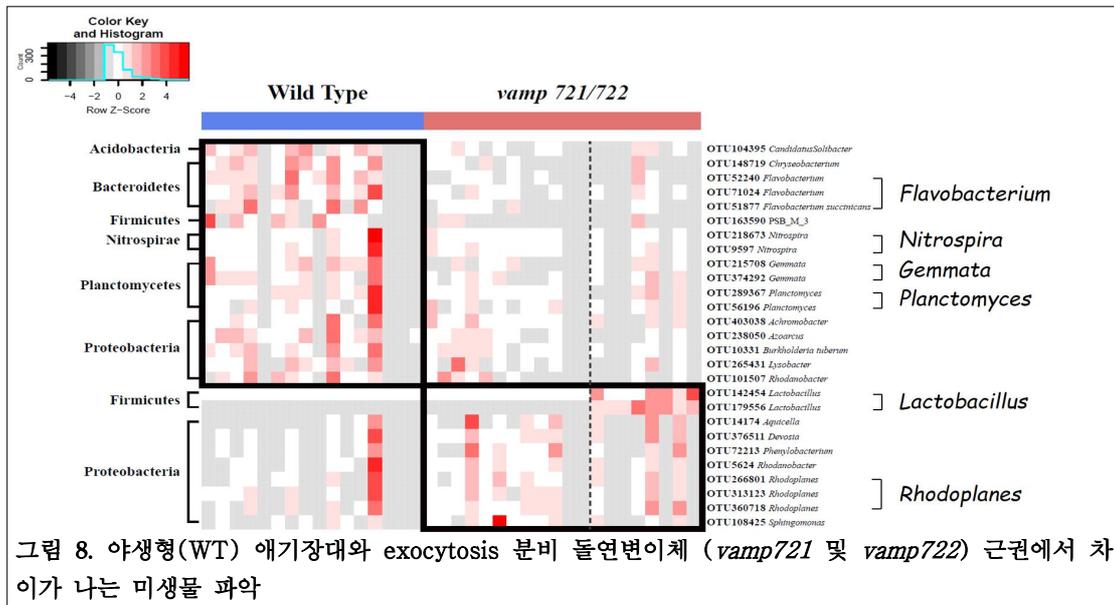


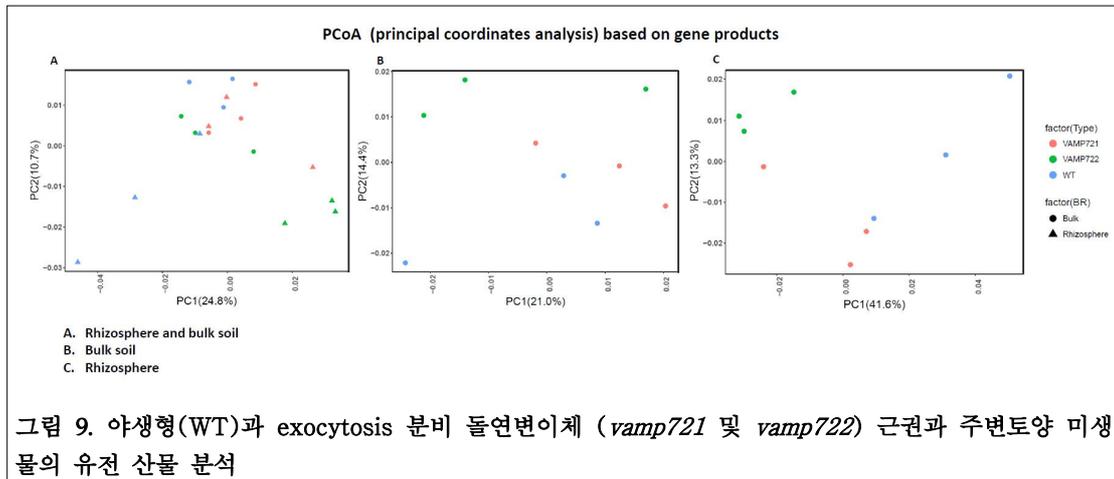
그림 7. 야생형(WT)과 exocytosis 분비 돌연변이체 (*vamp721* 및 *vamp722*) 근권 미생물 군집 분석
4-5주간 토양에서 재배한 식물 근권 토양 수집 후, genomic DNA를 추출함. 박테리아의 16S rRNA 유전자를 타겟으로 DNA 시퀀싱을 진행하여 미생물 군집 분석 프로그램(QIIME; Quantitative Insights Into Microbial Ecology)을 이용하여 근권 미생물 군집 분석을 진행함.

- 근권은 주변토양과 다른 미생물 군집을 구성하고 있었으며, 근권 내에서도 야생형(WT) 애기장대와 exocytosis 분비 돌연변이체의 미생물 군집 또한 차이가 있었음.
- 따라서 야생형 애기장대와 돌연변이체 근권에서 차이가 나는 미생물을 파악하기 위해 LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) 프로그램을 이용함 (그림 8).
- 야생형 애기장대 근권에서 *Flavobacterium*, *Nitrospira*, *Planctomyces* 등의 미생물이 돌연변이체 근권보다 유의하게 많이 존재함.



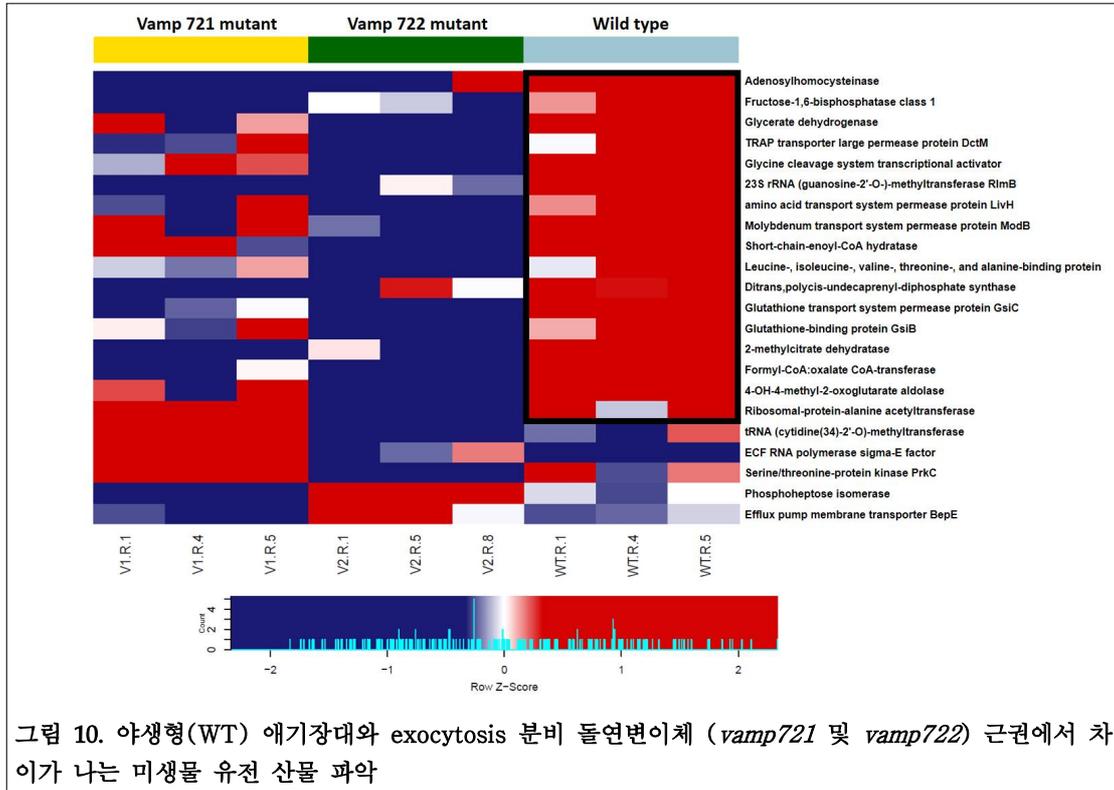
○ 근권 메타지놈 분석을 통한 근권에서 미생물의 기능 파악

- 야생형과 돌연변이체 근권과 주변토양 미생물의 유전 산물 분석 (그림 9)



- 야생형과 돌연변이체 (*vamp721* 및 *vamp722*) 근권과 주변토양 미생물의 유전 산물 분석을 위해 PCoA (principal coordinates analysis)를 진행함. 주변토양에서는 야생형과 돌연변이체 사이 유전산물에 큰 차이가 없었으나, 식물 근권에서는 유전형에 따라 미생물 유전 산물에 차이가 있다는 것을 확인 함.

- 야생형 애기장대와 돌연변이체 근권에서 차이가 나는 미생물의 유전 산물을 파악하기 위해 LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) 프로그램을 이용함 (그림 10).



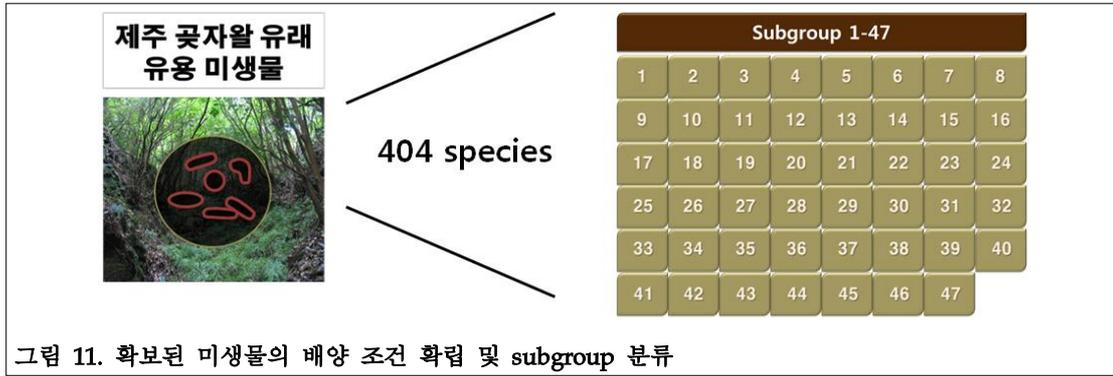
- 돌연변이체에 비해 야생형에서 nutrient transport나 carbon metabolism에 관련된 유전 산물이 많다는 것을 확인함.

○ 질소고정 관련 미생물의 유전체 해독 및 분석

- 제주도 4개 지역과 컨트롤 지역에서 샘플 6개씩 계절별로 확보 후 *nifH* 유전자를 타겟으로 분석.
- Random Forest로 분류를 진행하였으며 컨트롤 지역과 곳자왈 지역은 확연한 *nifH* 종의 차이를 보임.

○ 곳자왈 유래 500종 미생물을 대상으로 애기장대의 환경 스트레스 저항성 여부 탐색을 통한 유용 미생물 선별

- 확보된 곳자왈 유래 500종 미생물 중, 적절한 배양 조건이 확립된 총 404종의 미생물을 확보하고 본 연구에 사용함. 신속하고 효율적인 탐색을 위해 상기 미생물을 총 47개의 subgroup으로 나눈 후 각 subgroup 미생물들을 애기장대 야생종에 순차적으로 처리함 (그림 11).



- 상기 미생물 처리를 위한 세부 조건(적정 배양 시간, 적정 처리 농도)을 탐색하고 이를 확립함.
- 상기 미생물 처리 후 다양한 환경 스트레스(가뭄, 고온, UV-B, 고염) 마커 유전자의 발현 양상을 추적하기 위한 세부 조건을 확립함.
- 가뭄 & 고염 스트레스 마커 유전자 : *RD29*, *LEA*, *ABCG22*
 고온 스트레스 마커 유전자 : *HSP70*, *MBF1c*
 UV-B 스트레스 마커 유전자 : *HY5*, *CHS*, *DFR*
- 총 47개의 subgroup 중 마커 유전자의 유의미한 상향 조절이 관찰되는 다수의 subgroup 을 확보함 (그림 12, 13).

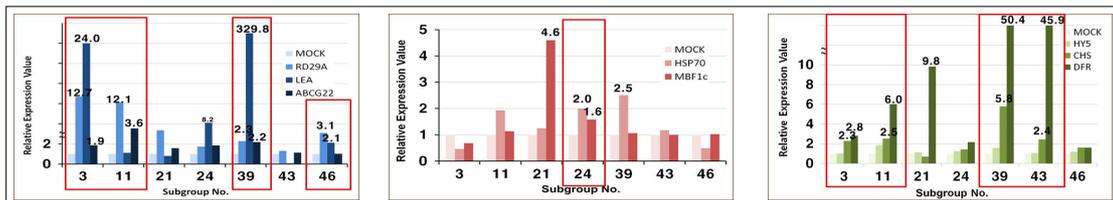


그림 12. 물부족(drought)/고염(high salt) 스트레스 (A), 고온(heat) 스트레스 (B), UV-B 스트레스 (C) 마커 유전자의 발현양상



그림 13. 스트레스 마커 유전자의 상향 조절이 일어나는 유력 subgroup의 확보 및 관련 정보

- 상기 subgroup 발현 양상에 근거하여, 각 subgroup내에 속한 개별 미생물에 처리(split test)에 의한 스트레스 마커 유전자의 발현 양상을 탐색함. 상기 스트레스 반응 유전자의 유의미한 발현량 변화를 보이는, 9종의 독립적인 유용 미생물 확보함.
- 미생물 처리에 의해 drought, UV-B 마커 유전자의 상향 조절이 일어나는 9종의 미생물 선별 (그림 14).

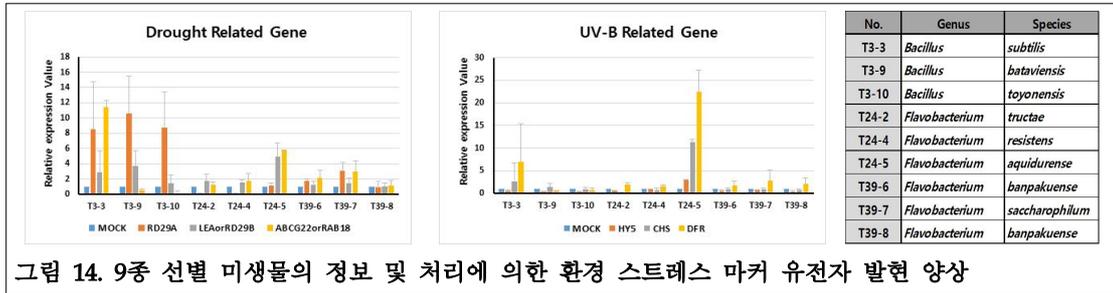


그림 14. 9종 선별 미생물의 정보 및 처리에 의한 환경 스트레스 마커 유전자 발현 양상

- 상기 후보 미생물을 대상으로 관련 스트레스 유무에 따른 스트레스 마커 유전자의 hyper-induction 여부를 탐색함. 일부 미생물과 특정 환경 스트레스를 동시 제공시 스트레스 저항성 유전자의 급격한 상향 조절이 일어남을 확인(그림 15).

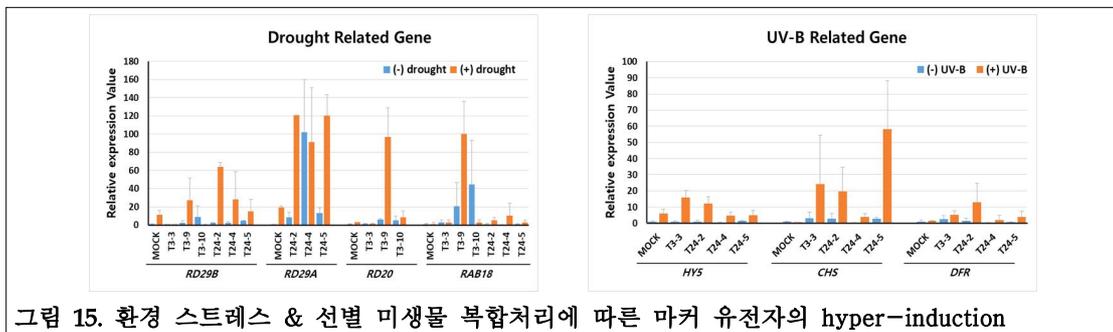


그림 15. 환경 스트레스 & 선별 미생물 복합처리에 따른 마커 유전자의 hyper-induction

- 야생형 애기장대와 exocytosis 분비 돌연변이체 근권에서 차이가 나는 미생물 중 *Flavobacterium*은 돌연변이체보다 야생형에 풍부하게 존재하였고, 식물의 환경 스트레스 마커 유전자의 hyper-induction 시키는 유용 공생 미생물 후보군에 선별됨.
- 따라서 *Flavobacterium*을 주요 타겟 유용 공생 미생물로 지정하여 실험을 진행함.

○ 유용 근권 공생 미생물 확보 및 선별

- 고랭지 배추 뿌리로부터 약 200여종의 미생물을 분리 동정함.
- 미생물의 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 통해 미생물 taxon을 파악하고, 총 6종의 *Flavobacterium*을 확인함.
- 고랭지 배추 뿐만 아니라 10여종의 *Flavobacterium*을 분양받아 추가적인 유용 공생 미생물 발굴에 이용함.
- 총 16종의 *Flavobacterium*을 대상으로 애기장대의 환경 스트레스 저항성 여부 탐색을 통한 유용 미생물을 선별함.
- 고랭지 배추 근권 유래 *Flavobacterium*의 경우, 상기 스트레스 반응 유전자의 유의미한 발현량 변화를 보이는, 6종의 독립적인 유용 미생물 후보 및 미생물 subgroup 1종 확보(그림 16).

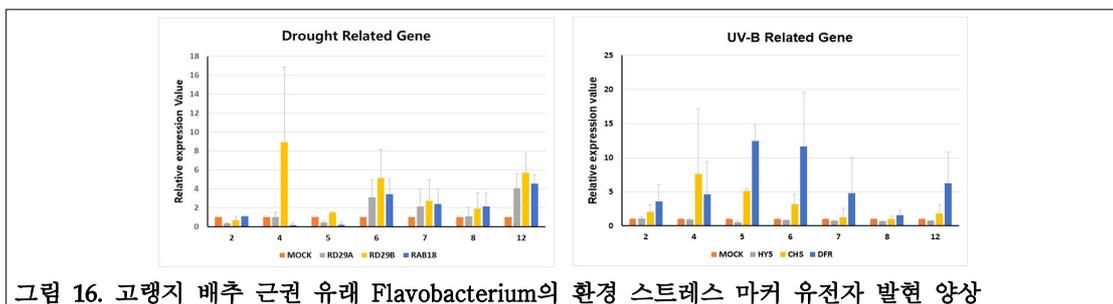


그림 16. 고랭지 배추 근권 유래 *Flavobacterium*의 환경 스트레스 마커 유전자 발현 양상

- 타겟 유용 공생 미생물을 대상으로 식물의 환경 스트레스 저항성 여부 탐색
 - 상기 선별된 개별 미생물을 우선적으로 연관된 환경 스트레스 처리에 의한 저항성 세부 형질을 탐색함.
 - 가뭄 스트레스 저항성 여부 탐색을 위해, 성체 애기장대를 대상으로 선별 미생물 유무에 따른 단수 & 재급수시 생존률, 기공 개폐율 등을 분석함.
 - 고염 스트레스 저항성 여부 탐색을 위해, 성체 애기장대를 대상으로 선별 미생물 유무에 따른 NaCl 처리시 생존률을 분석함.
 - 제주도 꽃자왈 유래 유용 미생물의 경우, 상기 스트레스 반응 유전자의 유의미한 발현량 변화를 보이는 9종 미생물 중 salt stress 혹은 drought stress에 저항성을 보이는 5종을 확보함 (그림 17).

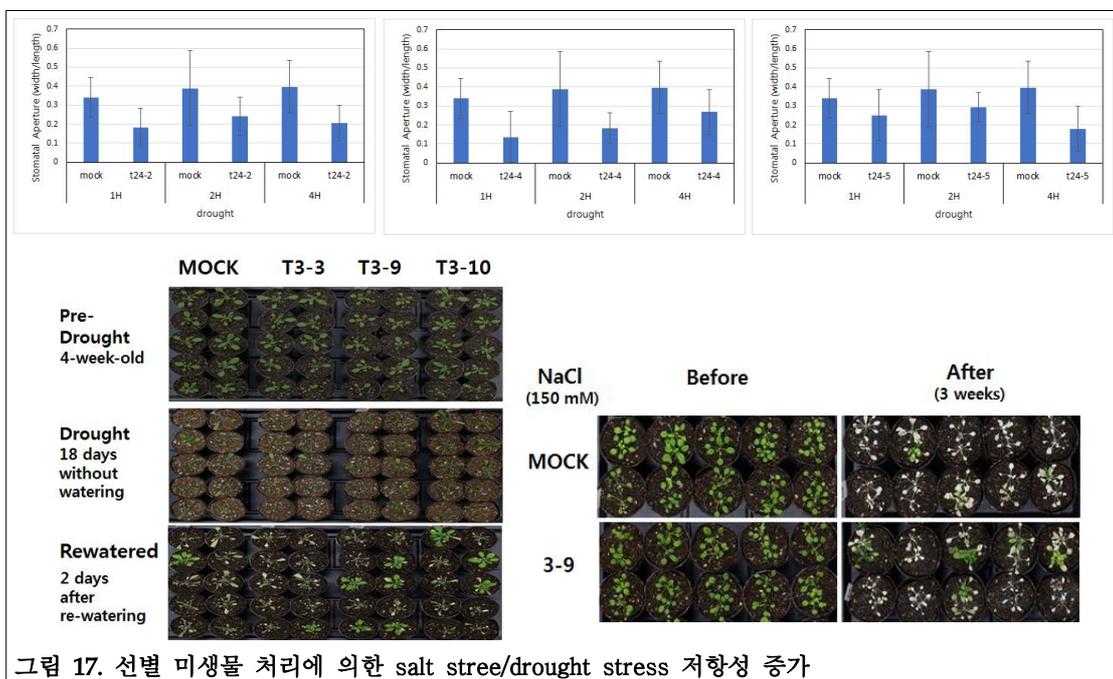


그림 17. 선별 미생물 처리에 의한 salt stress/drought stress 저항성 증가

- 타겟 유용 공생 미생물 (*Flavobacterium*, *Bacillus*)을 대상으로 식물의 면역 여부 탐색
 - 꽃자왈 및 고랭지 배추밭 토양 유래 유용 미생물 선별을 통해 *Flavobacterium*이 제1협동세부과체와 제3협동세부과체에서 공통으로 발굴됨.
 - 따라서 고랭지 배추밭에서 분리한 6종의 *Flavobacterium*를 접종한 후, 식물 병원성 박테리아인 *P. syringae* DC3000을 접종하고 마커 유전자인 PR1의 발현과 식물체 내에서의 박테리아 성장을 분석 중임.
 - 또한 꽃자왈 토양에서 분리한 미생물 중에서 *Bacillus*가 식물의 비생물학적 스트레스 저항성에 도움을 줌을 확인하여, 현재 2종의 *Bacillus*를 접종한 후, 식물 병원성 박테리아인 *P. syringae* DC3000을 접종하고 마커 유전자인 PR1의 발현과 식물체 내에서의 박테리아 성장을 분석 중임.

- antiSMASH를 이용한 타겟 유용 공생 미생물 (*Flavobacterium*)의 이차대사산물 예측
 - 미생물의 유전체에서 ORF(Open Reading Frame)을 찾아 그 미생물의 이차대사산물을 예

측해주는 바이오인포메틱스 도구인 antiSMASH를 이용하여 타겟 유용 공생 미생물인 *Flavobacterium*의 이차대사산물 예측함.

- Assembly된 *Flavobacterium*의 시퀀스로부터 공통된 이차대사산물 Terpene이 예측됨.
- Terpene은 미생물이 mevalonic acid (MVA) pathway를 통해 합성하는 물질로 미생물끼리 소통(communication)하는 데 필요하며, 식물이 성장하고 스트레스 완화 등에 관련된 것으로 알려짐.
- 따라서, 미생물에 의한 terpene 합성 및 분비가 근권 환경에서 중요한 물질로 예측됨.

○ 액체배지에서 재배한 식물을 이용하여 분비 이차대사산물 샘플 확보

- MS 액체배지에서 야생형과 단일 돌연변이체 식물을 2주 재배한 후, 증류수로 닦은 식물을 증류수에서 추가로 1일간 재배함
- 식물을 제거하고 남은 증류수를 수합함으로써 식물 분비 이차대사산물 샘플을 확보함 (그림 18).



○ 야생형과 돌연변이체에서 취합한 분비 산물은 모델 미생물의 질소 대사에 영향을 줌

- 식물 분비 산물은 미생물에서 탈질화(denitrification)을 억제함과 동시에 암모늄으로의 전환(DNRA)을 촉진함.
- 이 효과는 야생형에서 취합한 분비 산물이 돌연변이체에서 취합한 산물보다 큼.

○ 질소원은 식물의 성장에 결정적으로 작용함

- 따라서 식물의 면역에 작용할 가능성도 존재하므로, 기존에 발표된 질산(NO_3^-)에 의한 특이적인 유전자 발현 목록을 확보함(Ruffel et al., 2011) (표 1)

Gene	Function	Log ₂
AT4G39675	hypothetical protein	3.11
BT2	TAC1-mediated telomerase activation pathway protein BT2	2.87
AT2G21210	SAUR-like auxin-responsive protein	2.57
AT5G26200	mitochondrial substrate carrier family protein	2.35
NIA1	nitrate reductase [NADH] 1	2.11
AT1G49500	hypothetical protein	1.91
AT2G07520	pseudo	1.9
AT5G01740	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	1.75
HRS1	protein HRS1	1.66
AT5G10210	hypothetical protein	1.64
HB22	homeobox-leucine zipper protein ATHB-22	1.62
ACD6	protein ACCELERATED CELL DEATH 6	1.58

표 1. 애기장대에서 질산(NO₃)에 의해 발현이 3배 이상 증가하는 유전자들.

기존에 발표된 논문(Ruffel et al., 2011)에서 유전자 발현이 3배 이상 증가하는 유전자들을 취합하였음.

○ 그러나 질산은 박테리아에 대한 식물의 면역력에 영향을 미치지 않음

- 식물체에 질산을 전처리한 후 박테리아를 감염시키고, 식물체 내에서 박테리아 성장을 분석한 결과, 질산이 적어도 박테리아에 대한 식물의 면역력에는 효과가 없음을 확인함 (그림 20)

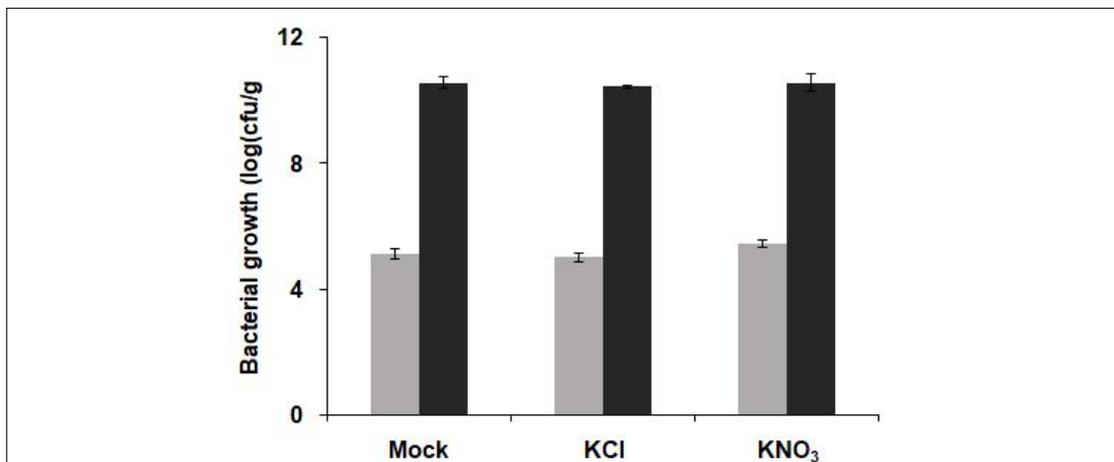


그림 20. 질산(NO₃)은 박테리아에 대한 식물 면역력에 효과가 없음.

액체 배지에서 2주간 재배한 야생형 식물체에 5 mM의 해당 시약을 처리한 후, 1일 후에 박테리아를 접종시켰음(grey). 접종 3일 후에 식물체를 갈아서 식물체 내부의 박테리아 수를 분석하였음(black).

- 최근 질산과 암모늄을 동시에 처리해야 식물의 성장이 촉진된다는 보고(Sato and Yanagisawa, 2014)가 있어서, 질산과 암모늄을 동시에 처리한 후 식물의 면역력을 분석할 필요가 있음

○ 모델 박테리아 (*Shewanella loihica* strain PV-4)의 혐기성 배양

- 연구실에 축적된 Hungate 기법 활용 혐기성 배양법을 이용. 정확한 질소화합물 측정을 위해 본 연구실에서 쓰이는 modified MR-1 미디어를 이용하여 *Shewanella loihica* strain PV-4 배양.
- NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺의 측정은 ion chromatography (IC) 또는 Humas사 제품을 이용한

colorimetric assay로 분석

- 탈질화 반응의 정도는 acetylene block technique을 이용. Headspace에 약 10% C₂H₂를 첨가하면 N₂O의 환원반응이 정지되어 N₂O의 발생량을 통해서 탈질화 반응의 추이를 측정할 수 있음. N₂O의 측정에는 ECD 디텍터가 장착된 GC나 GC/MS를 활용.

○ *Arabidopsis thaliana*로부터 수집한 삼출물의 DNRA 촉진효과 확인

- NO₃⁻/NO₂⁻를 기질로 하는 anaerobic respiration 반응인 DNRA와 탈질 반응 경로를 모두 가진 *Shewanella loihica* PV-4를 모델미생물로 이용, *Arabidopsis thaliana* 삼출물이 NO₃⁻/NO₂⁻ 환원 반응에 미치는 영향을 관찰하였음.
- 물과 삼출물을 1:1로 혼합하여 미디어를 준비하여 *S. loihica* PV-4를 혐기성 환경에서 NO₃⁻를 electron acceptor로 하여 배양하였을 때 NH₄⁺로 환원되는 비율이 유의적으로 상승하였음 (그림 21).
- C₂H₂을 주입하여 N₂O의 양을 측정하여 탈질화 반응의 정도를 측정했을 때 그 속도와 양이 크게 감소하였음을 확인할 수 있었음 (그림 21).
- *Arabidopsis thaliana*의 삼출물이 탈질화:DNRA의 경쟁에서 DNRA를 상대적으로 촉진한다는 것을 확인

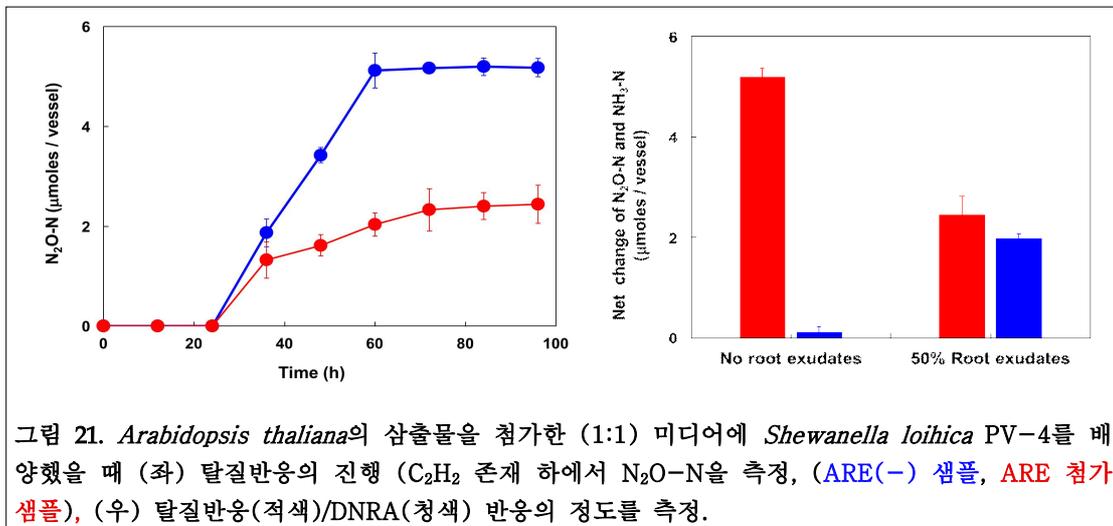


그림 21. *Arabidopsis thaliana*의 삼출물을 첨가한 (1:1) 미디어에 *Shewanella loihica* PV-4를 배양했을 때 (좌) 탈질반응의 진행 (C₂H₂ 존재 하에서 N₂O-N을 측정, (ARE(-) 샘플, ARE 첨가 샘플), (우) 탈질반응(적색)/DNRA(청색) 반응의 정도를 측정.

○ *Arabidopsis thaliana*의 삼출물 성분 분석

- UC Davis의 West Coast Metabolomics Center에 삼출물의 분석을 의뢰, HILIC (Hydrophilic interaction chromatography)를 이용한 반정량적 (semi-quantitative)한 삼출물의 성분분석 결과를 수령.

BinBase name		
<u>xylulose NIST</u>	<u>methionine</u>	<u>arachidic acid</u>
<u>xylose</u>	<u>maltose</u>	<u>allantoic acid</u>
<u>xanthine</u>	<u>malic acid</u>	<u>alanine</u>
<u>valine</u>	<u>lyxose</u>	<u>adenosine</u>
<u>urea</u>	<u>lyxitol</u>	<u>4-hydroxybutyric acid</u>

<u>uracil</u>	<u>lysine</u>	<u>4-aminobutyric acid</u>
<u>tyrosine</u>	<u>leucine</u>	<u>3-hydroxypropionic acid</u>
<u>tryptophan</u>	<u>lactic acid</u>	<u>3-hydroxy-3-methylglutaric acid</u>
<u>trehalose</u>	<u>isoleucine</u>	<u>3-aminoisobutyric acid</u>
<u>thymine</u>	<u>hydroxylamine</u>	<u>3,6-anhydro-D-glucose</u>
<u>threonine</u>	<u>hydroxycarbamate NIST</u>	<u>3,6-anhydro-D-galactose</u>
<u>threonic acid</u>	<u>hexadecane</u>	<u>2-hydroxyglutaric acid</u>
<u>threitol</u>	<u>glycolic acid</u>	<u>1-methylgalactose NIST</u>
<u>sucrose</u>	<u>glycine</u>	<u>1,3,5-trimethylcyanuric acid</u>
<u>succinic acid</u>	<u>glycerol-alpha-phosphate</u>	
<u>stearic acid</u>	<u>glycerol-3-galactoside</u>	
<u>shikimic acid</u>	<u>glycerol</u>	
<u>serine</u>	<u>glyceric acid</u>	
<u>salicylic acid</u>	<u>glutamine</u>	
<u>ribose</u>	<u>glutamic acid</u>	
<u>pseudo uridine</u>	<u>glucose-1-phosphate</u>	
<u>proline</u>	<u>glucose</u>	
<u>phosphate</u>	<u>galactose</u>	
<u>phenylalanine</u>	<u>galactinol</u>	
<u>palmitic acid</u>	<u>fumaric acid</u>	
<u>oxoproline</u>	<u>fuco</u>	
<u>ornithine</u>	<u>fructose</u>	
<u>nicotinic acid</u>	<u>erythritol</u>	
<u>N-acetylmannosamine</u>	<u>citric acid</u>	
<u>n-acetyl-d-hexosamine</u>	<u>beta-alanine</u>	
<u>myristic acid</u>	<u>aspartic acid</u>	

표 2 *Arabidopsis thaliana* 삼추출물의 성분 분석 결과

○ ARE (인공 삼추출물)을 합성

- 삼추출물의 성분분석 결과를 수령. 이를 Chaparro *et al* (2013)의 기존 분석 결과와 비교 결과 큰 차이가 없음을 확인.

- 표 1의 성분을 포함하는 인공삼추출물(ARE)를 합성하여 실험에 이용하였음. 크게 amino acids, sugars, other organic compounds로 구성하였음.

	Compound	Formula
<u>Amino Acid</u>	Aalanine	C ₃ H ₇ NO ₂
	Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂
	Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂
	Serine	C ₃ H ₇ NO ₃
	Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂
	g-Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂

<u>Sugar</u>	Fructose	$C_6H_{12}O_6$
	Galactose	$C_6H_{12}O_6$
	Glucose	$C_6H_{12}O_6$
	Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$
<u>Aliphatic hydrocarbons</u>	Cyclohexylamine	$C_6H_{13}N$
	Ethanolamine	C_2H_7NO
	Urea	CH_4N_2O
	Butyrolactam	C_4H_7NO
	Lactic acid	$C_3H_6O_3$
	Glycerol	$C_3H_8O_3$
	Propane-1,3-diol	$C_3H_8O_2$

표 3. 인공삼추출물 (ARE)의 조성. Chaparro *et al* (2013)의 성분 분석 결과와 본 연구의 분석 결과를 바탕으로 제조되었음.

○ 합성한 ARE (인공 삼추출물)를 이용하여, model organism (*S. loihica* PV-4)의 탈질화/DNRA 반응에 영향을 미치는 물질을 탐색

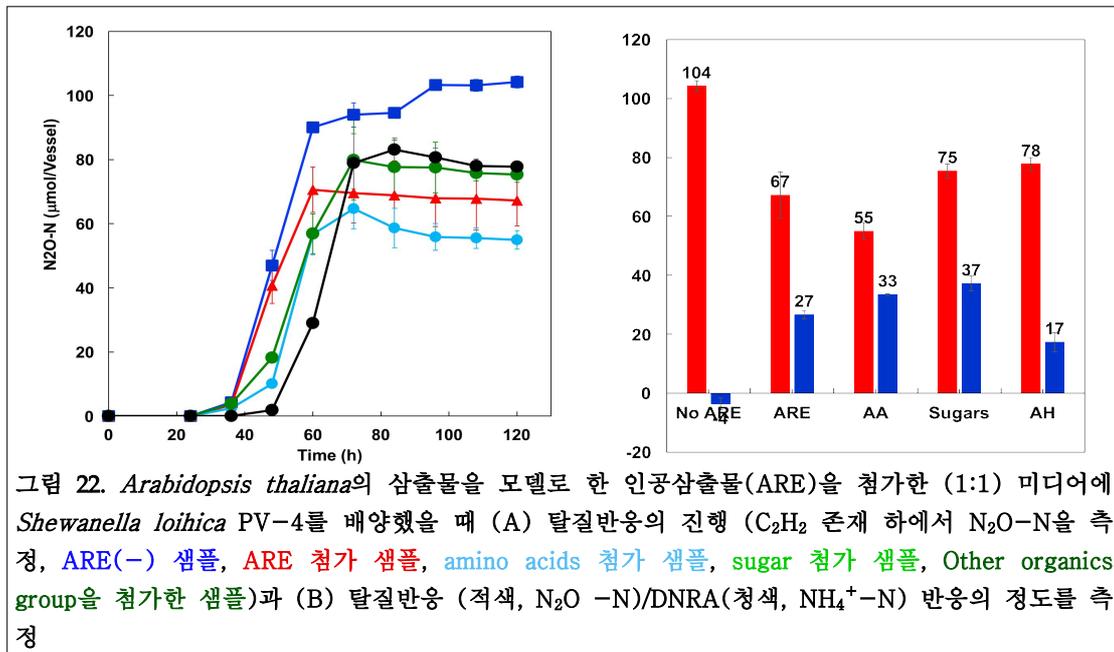
- 연구실에 축적된 Hungate 기법 활용 혐기성 배양법을 이용. 정확한 질소화합물 측정을 위해 본 연구실에서 쓰이는 modified MR-1 미디어 (pH 7.0, phosphate buffer 5mM)를 사용하였으며, 혐기 조건으로 5 mM의 latate NO_3^- 와 1 mM를 각각 전자공여체, 전자수용체로 이용하여 배양하였음.

- NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ 의 측정은 ion chromatography (IC) 또는 Humas사 제품을 이용한 colorimetric assay로 분석

- 탈질화 반응의 정도는 acetylene block technique을 이용. Headspace에 약 10% C_2H_2 를 첨가하면 N_2O 의 환원반응이 정지되어 N_2O 의 발생량을 통해서 탈질화 반응의 추이를 측정할 수 있음. N_2O 의 측정에는 ECD 디텍터가 장착된 GC를 활용.

- ARE(-) 샘플, ARE 첨가 샘플, amino acids 첨가 샘플, sugar 첨가 샘플, Other organics group을 첨가한 샘플로 나누어 각 물질의 농도는 100 μ M로 일정하게 유지하였으며, 탈질화/DNRA 반응에 영향을 주는 물질을 확인하였음.

- 세 그룹을 모두 포함하는 total ARE solution와 각각의 요소만을 포함하는 amino acids, sugars, 기타 유기물 합성액에서 모두 N_2O 발생량은 대조군 (ARE 미 첨가 샘플)에 비해 적게 발생되며, NH_4^+ 의 양은 증가한 것으로 확인되었음. 샘플간의 N_2O 및 NH_4^+ 에 양의 차이가 나타났지만 대조군에 비해 25 ~47 % 정도의 N_2O 가 줄어들었음을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 인공삼추출물을 첨가함에 따라 *S. loihica* PV-4의 DNRA 반응이 촉진되는 현상을 확인할 수 있었음 (그림 22).



○ 배추밭 근권에서 분리된 *Flavobacterium* spp.의 탈질화 반응 분석

- 토양에서 추출한 미생물 *Flavobacterium* 속의 미생물 (CN -10-4, CM-10-5, CR-7, BN-2) 배양 조건 탐색.
- Modified MR-1 미디어를 개량하여 *Flavobacterium*을 배양할 수 있는 minimal medium을 조성하고자 하였음.
- *Flavobacterium*을 배양할 수 있는 minimal medium을 조성하기 위하여, modified MR-1 미디어(pH 7.0, phosphate buffer 5mM)을 이용하여 배양을 시도했음.
- 혐기 조건으로 5 mM의 glucose와 1 mM의 NO₃⁻를 각각 전자공여체, 전자수용체로 이용하여 배양하였음.
- 배양 시작 후, 10일 경과 후 BN-2는 질산염이 0.067 mM, CN 10-4는 0.153 mM (아질산염: 0.94mM), CM10-5와 CR10-7은 각각 0.462 mM, 0.347 mM이 남아 있었음.
- 또한, 배양 23일 경과 후에도 아세트산을 넣은 배양체 (CN -10-4, CM-10-5, CR-7)에서 0.004 - 0.49 µmol의 N₂O-N이 측정되었음.
- 따라서, 혐기에서 phosphate-buffered minimal medium과 R2A medium에서 *Flavobacterium* 속 균주 중, BN-2를 제외한 탈질화균이 주입된 질산염을 모두 탈질화시키며 성장하기 어려운 것으로 판단됨.

○ *Flavobacterium*을 탈질화하며 배양할 수 있는 minimal medium을 조성하기 위하여, modified MR-1 미디어에 1/100 R2A가 희석되도록 미디어를 조성하여, 균주를 배양

- 호기 조건에서 R2A agar plate 및 R2A 액체 배지에서는 모두 빠른 성장을 보였음.
- Modified MR-1 미디어에 1/100 R2A가 희석되도록 미디어를 조성한 후, 5 mM의 glucose와 1 mM의 NO₃⁻를 각각 전자공여체, 전자수용체로 이용하여 배양을 시도 함.
- *Flavobacterium* 속 4개 종의 성장 속도는 약간의 차이를 보였지만, 모두 10시간 후에 최대 성장을 보였음, 이때의 남은 질산염 농도는 0.61-0.78 mM로 측정되어 초기에 첨가해준

1mM의 질산염을 모두 환원시키지 않는 것으로 판단됨 (그림 23).

- 따라서 OD가 증가하며 성장하는 것으로 보이지만, 탈질화가 완전히 일어나기 어려운 것으로 판단됨.

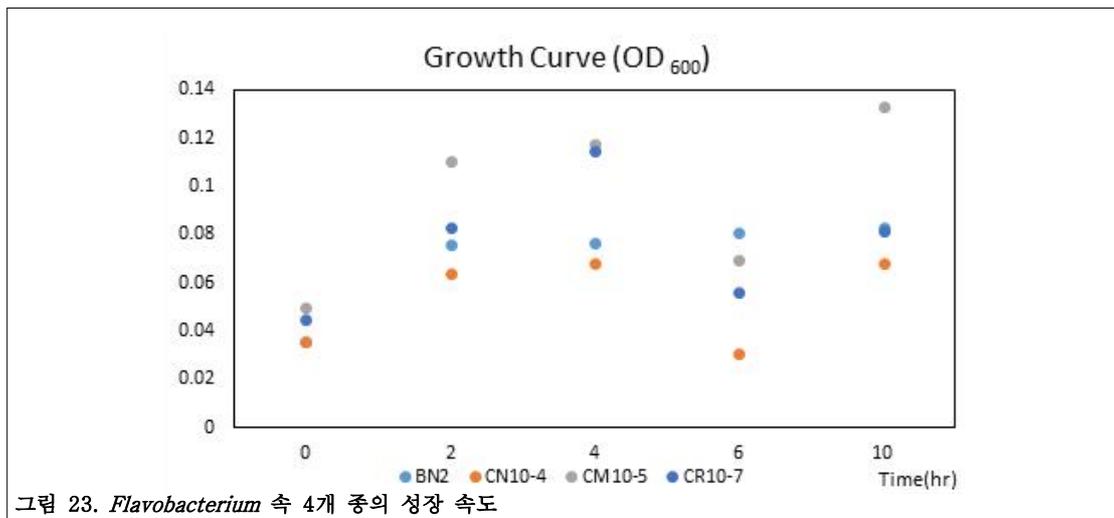


그림 23. *Flavobacterium* 속 4개 종의 성장 속도

○ *Flavobacterium* 속 중, strain C N-10-1와 BN-2를 배양시 NH_4^+ , N_2O (C_2H_2 주입 시) 생성 속도를 측정하여 탈질화/DNRA 반응을 관찰.

- 배양 조건은 modified MR-1 미디어 (pH 7.0, phosphate buffer 5mM)를 사용하였고, 혐기 조건으로 5 mM의 glucose와 1 mM의 NO_3^- 를 각각 전자공여체, 전자수용체로 이용하여 배양하였음.

- 배양 시간에 따라, 각 샘플에서 발생하는 N_2O -N과 NH_4^+ 를 측정하였고, Strain CN-10-1의 N_2O -N이 점차 증가하여 218 μmol s N_2O -N이 발생한 반면, strain BN-2은 최대 13.7 μmol s N_2O -N이 발생하였음. 반면에, NH_4^+ 의 양은 시간이 지남에 따라, Strain CN-10-1는 점차 감소하였으며 (21.3 μmol s NH_4^+ -N), strain BN-2의 경우에는 시간이 지남에 따라 점차 증가하여, 56.3 μmol s NH_4^+ -N를 나타내었음 (174시간 경과 후).

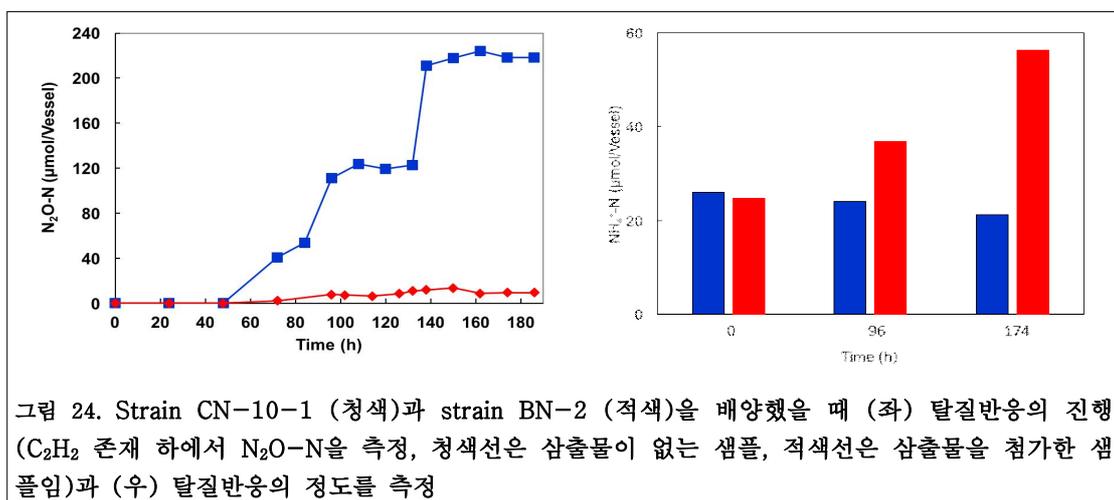


그림 24. Strain CN-10-1 (청색)과 strain BN-2 (적색)을 배양했을 때 (좌) 탈질반응의 진행 (C_2H_2 존재 하에서 N_2O -N을 측정, 청색선은 삼출물이 없는 샘플, 적색선은 삼출물을 첨가한 샘플)과 (우) 탈질반응의 정도를 측정

- 이 결과를 종합하여 보았을 때, Strain CN-10-1는 주입된 NO_3^- 가 모두 N_2O 로 환원되는 탈질화 반응을 보였고, strain BN-2는 주입된 NO_3^- 가 일부 NH_4^+ 로 생성되는 DNRA 반응을 하였음을 알 수 있음.

○ 배추밭 근권에서 분리된 *Flavobacterium* spp.의 DNRA 반응 관련 유전체 분석

- *Flavobacterium* 속의 strain CN-10-1, CN-10-4, CM-10-5, CR-7, BN-2의 지놈으로부터 각각 탈질반응, DNRA 반응과 관련된 유전체를 확인

	CN-10-1	CN-10-4	CM-10-5	CR-7	BN-2
<i>napA</i>	O	O	O	O	O
<i>narG</i>	X	X	X	X	X
<i>nirK</i>	O	O	O	O	X
<i>nirS</i>	X	X	X	X	X
<i>norB</i>	O	O	O	O	O
<i>nosZ</i>	X	X	O	X	O
<i>nrfA</i>	X	X	X	X	O

표 12 배추밭 근권에서 분리된 *Flavobacterium* spp.의 유전체 분석 결과

- 유전체 분석 결과, DNRA 반응이 가능한 균주는 *nrfA*를 가지고 있는 strain BN-2이며, *Flavobacterium* 속의 strain CN-10-1, CN-10-4, CR-7은 탈질화과정을 거쳐 질산염으로부터 아산화질소까지 환원이 되어 생성될 수 있으며, CM-10-5의 경우에 모든 탈질 과정을 거쳐 아산화질소에서 질소까지의 환원이 가능할 것으로 보여짐.

- 이를 통해, 앞선 실험에서 Strain CN-10-1과 strain BN-2이 각각 탈질화와 DNRA 촉진 반응을 나타내는 것이 각 균주의 유전체를 통해 (Strain CN-10-1: *napA*, *nirK*, *norB*, strain BN-2: *napA*, *nrfA*) 설명될 수 있음.

○ ARE (인공 삼출물)이 실제 환경 샘플에 미치는 영향 확인

- ARE (인공 삼출물)와 그 요소 그룹들을 실제 환경 샘플에 적용될 수 이 토양에 적용하여 질소 이화작용을 관찰함. (논 토양)

- 논 토양을 inoculum으로 하여 인공삼출물(ARE)을 첨가한 (1:1) 미디어에 NO₃⁻에 농화배양, 이를 접종액으로 하여 ARE 및 그 요소들의 첨가시와 ARE(-)에서의 탈질화/DNRA 반응을 관찰.

- 토양 샘플을 5 mM의 lactate와 1 mM 의 NO₃⁻를 각각 전자공여체, 전자수용체로 이용하고 0.2 mM의 NH₄⁺(N source)로 농화 배양하여 토양 입자를 가라앉힌 후 1 mL의 inoculum하여 배양하였음. 160 mL의 세럼병에 50 mL의 phosphate-buffered minimal medium와 50 mL의 인공삼추출물 (ARE)로 1:1 비율로 이루어진 미디어에서 수행. 질소로 headspace를 플라싱 한 후 headspace의 10%를 acetylene으로 교환하여 N₂O를 측정함.

시험 작물	pH (1:5)	OM (g kg ⁻¹)	Av. P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	Av. SiO ₂ (mg kg ⁻¹)	NH ₄ -N (mg kg ⁻¹)	Ex.Cations (cmol _c kg ⁻¹)					Soil texture
						K	Ca	Mg	Na	CEC	
벼	6.0	22	54	172.0	4.36	0.5	5.8	1.1	0.5	9.8	SiL

표 13 논 토양 이화학성

- 인공 삼추출물 (ARE)은 표 16의 조성대로 이용하였으며, 100 μM의 농도로 첨가하였음.

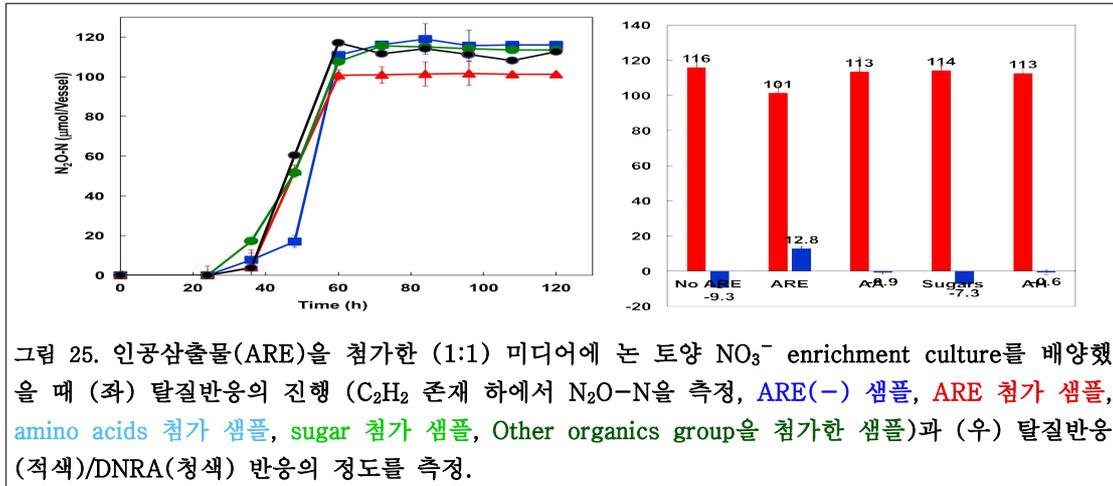


그림 25. 인공삼출물(ARE)을 첨가한 (1:1) 미디어에 는 토양 NO_3^- enrichment culture를 배양했을 때 (좌) 탈질반응의 진행 (C_2H_2 존재 하에서 $\text{N}_2\text{O}-\text{N}$ 을 측정, ARE(-) 샘플, ARE 첨가 샘플, amino acids 첨가 샘플, sugar 첨가 샘플, Other organics group을 첨가한 샘플)과 (우) 탈질반응(적색)/DNRA(청색) 반응의 정도를 측정.

- 이 결과 ARE에서만 DNRA 반응의 축진이 관찰되었음. 그 효과는 유의적이기는 하나 pure culture 실험결과에 비해서는 상대적으로 미미하였음 (그림 25). 단 sugars 그룹을 제외한 다른 요소 그룹이 첨가된 샘플에서 NH_4^+ deficit이 줄어든 것으로 볼 때 ARE 첨가 샘플에서 관찰된 DNRA 축진 현상은 amino acids와 other organics group의 효과가 합쳐진 것으로 볼 수 있음.

○ 논 토양을 inoculum으로 하여 인공삼출물(ARE)을 첨가(1 mL)한 미디어에 NO_3^- 에 농화 배양, 이를 접종액으로 하여 ARE 첨가시와 ARE(-)에서의 탈질화/DNRA 반응을 관찰.

- 토양 샘플을 5 mM의 lactate와 1 mM의 NO_3^- 를 각각 전자공여체, 전자수용체로 이용하고 0.2 mM의 NH_4^+ (N source)로 농화배양하여 토양 입자를 가라앉힌 후 1 mL의 inoculum 하여 배양하였음. 160 mL의 세럼병에 100 mL의 phosphate-buffered minimal medium에서 인공삼출물 1mL (최종 농도: 100 μM)를 추가하여 실험 수행. 질소로 headspace를 플러싱 한 후 headspace의 10%를 acetylene으로 교환하여 N_2O 를 측정함.

- 인공삼출물과 미디어를 1:1 비율로 첨가한 실험과 비슷하게, 초기 0.24, 0.3 mM의 NH_4^+ 에서 인공삼출물을 넣지 않았을 경우 NH_4^+ 이 거의 모두 소모되었지만, 인공삼출물을 넣어준 샘플에서는 0.44 mM로 NH_4^+ 이 증가함과 동시에 최종 $\text{N}_2\text{O}-\text{N}$ 발생량이 약 7.3 % 감소 (ARE 미 첨가시: 93.39 μmol , ARE 첨가 시: 86.57 μmol) 했음을 확인할 수 있음. 따라서 인공삼출물에 의해 DNRA 축진 반응이 형성되었음을 확인 (그림 26)

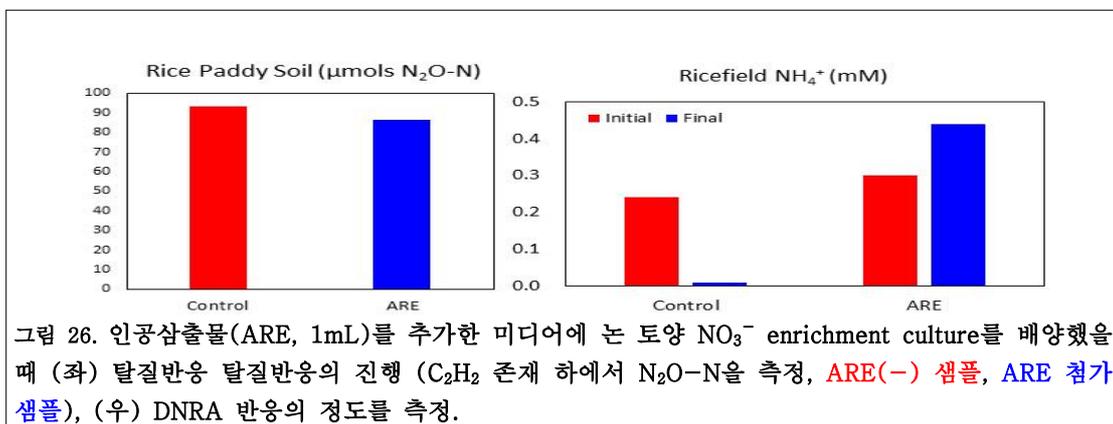


그림 26. 인공삼출물(ARE, 1mL)를 추가한 미디어에 는 토양 NO_3^- enrichment culture를 배양했을 때 (좌) 탈질반응 탈질반응의 진행 (C_2H_2 존재 하에서 $\text{N}_2\text{O}-\text{N}$ 을 측정, ARE(-) 샘플, ARE 첨가 샘플), (우) DNRA 반응의 정도를 측정.

○ ARE (인공 삼출물)이 실제 환경 샘플에 적용될 수 있는지 토양에 적용하여 질소 이화작용을 관찰함. (밭 토양)

- 밭 토양 (비료 미 처리)을 inoculum으로 하여 NO_3^- 에 농화배양, 이를 접종액으로 하여 ARE 첨가시와 ARE(-)에서의 탈질화/DNRA 반응을 관찰하였음. (ARE와 미디어 1:1 비율)

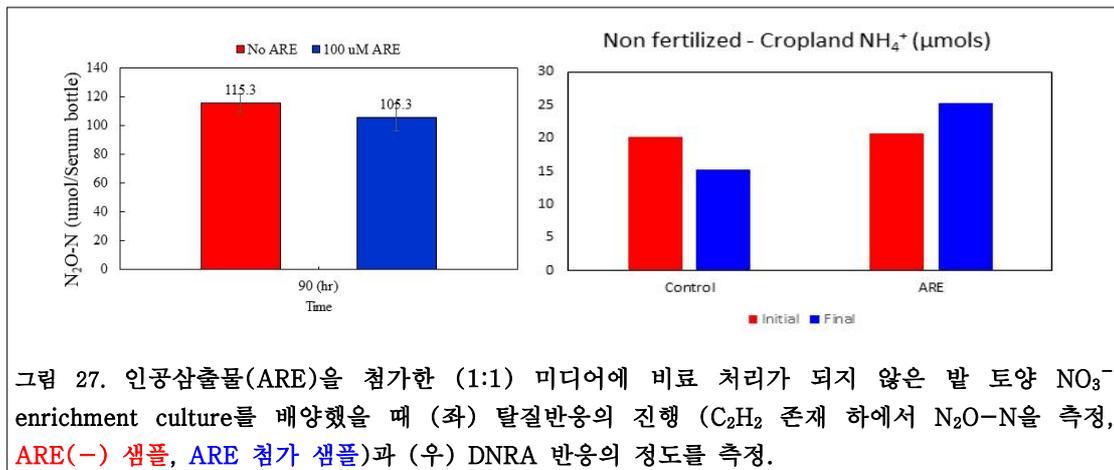
시험 작물	pH (1:5)	OM (g kg^{-1})	Av. P_2O_5 (mg kg^{-1})	$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg kg^{-1})	Ex.Cations ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)				EC (dS/m)	Soil texture
					K	Ca	Mg	Na		
고추	6.4	12	194	30.8	0.5	4.9	1.8	0.1	0.37	L

표 14 비료 처리가 되지 않은 밭 토양 이화학성

- 밭 토양 샘플도 같은 방법으로 160 mL의 세럼병에 50 mL의 phosphate-buffered minimal medium와 50 mL의 인공삼추출물 (ARE)로 1:1 비율로 이루어진 미디어에서 수행. 질소로 headspace를 플라싱 한 후 headspace의 10%를 acetylene으로 교환하여 N_2O 를 측정함. 논 토양의 경우 비료 처리가 된 토양과 비료처리가 되지 않은 토양 두 가지 토양 샘플을 사용하여 실험함.

- 인공 삼추출물 (ARE)은 표 16 의 조성대로 이용하였으며, 100 μM 의 농도로 첨가하였음.

- 비료 처리가 되지 않은 논 토양 샘플에 인공 삼추출물을 첨가한 후, N_2O 와 NH_4^+ 양을 측정하였을 때, $\text{N}_2\text{O-N}$ 의 양은 인공 삼추출물 처리 시, 약 9.7 %정도 감소함과 동시에 NH_4^+ 5 μmols 이 증가했음을 확인할 수 있고, 이는 인공 삼추출물을 첨가시 실제 토양환경 샘플에서도 DNRA 반응을 촉진 시킬 수 있음을 나타냄. (그림 27)



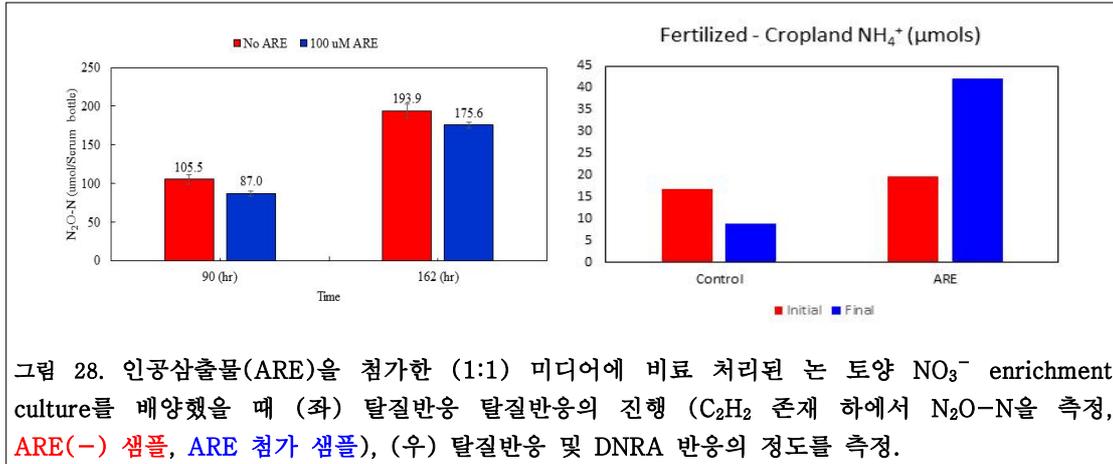
○ 밭 토양 (비료 처리)을 inoculum으로 하여 NO_3^- 에 농화배양, 이를 접종액으로 하여 ARE 첨가시와 ARE(-)에서의 탈질화/DNRA 반응을 관찰하였음. (ARE와 미디어 1:1 비율)

시험 작물	pH (1:5)	OM (g kg^{-1})	Av. P_2O_5 (mg kg^{-1})	$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg kg^{-1})	Ex.Cations ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)				EC (dS/m)	Soil texture
					K	Ca	Mg	Na		
고추	5.1	11	225	222.0	0.7	6.3	1.9	0.2	3.86	L

표 15 비료 처리가 된 밭 토양 이화학성

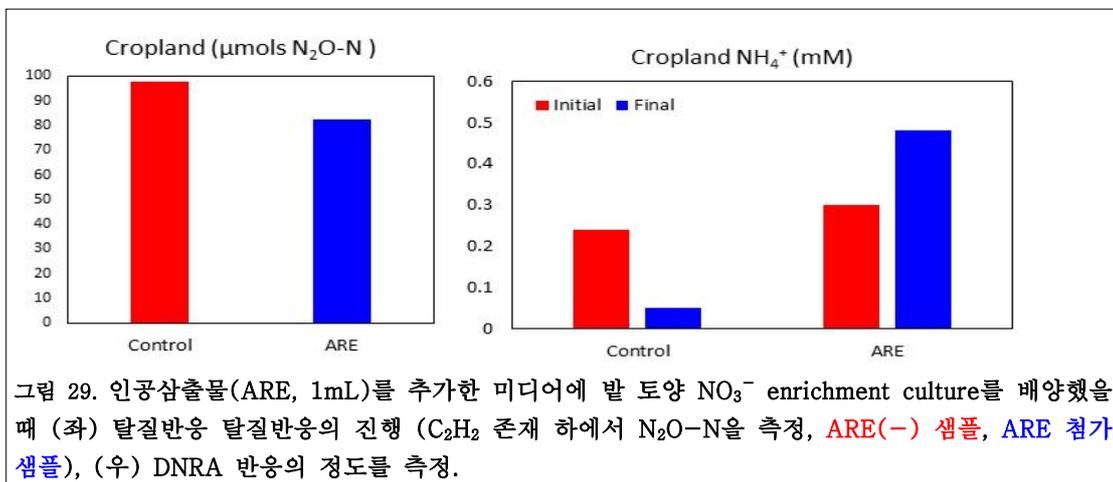
- 비료 처리가 되어 있는 밭 토양 샘플에 인공 삼추출물을 첨가한 후, N_2O 와 NH_4^+ 양을 측

정하였을 때, N_2O-N 의 양은 인공 삼추출물 처리 시, 약 9.4 %정도 감소함과 동시에 초기 값 대비 NH_4^+ 22.3 μmols 이 증가했음을 확인할 수 있음. 인공 삼추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해서는 33.2 μmols 의 NH_4^+ 이 더 높게 나타났음을 확인할 수 있고, 이는 인공 삼추출물을 첨가시 비료 처리의 유무에 상관없이 실제 토양환경 샘플에서도 일정한 비율로 DNRA 반응을 촉진 시킬 수 있음을 나타냄. (그림 28)



○ 밭 토양 (비료 처리)을 inoculum으로 하여 NO_3^- 에 농화배양, 이를 점종액으로 하여 ARE 첨가시와 ARE(-)에서의 탈질화/DNRA 반응을 관찰하였음. (ARE 1mL 접종)

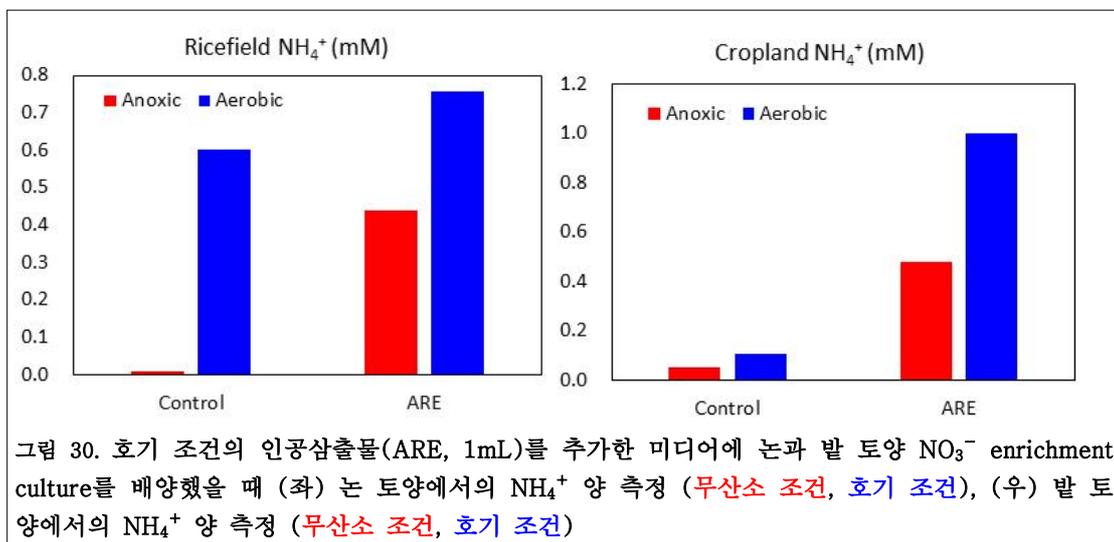
- 배양액 미디어와 인공삼추출물의 비율을 변화시켰을 때에도, 인공삼추출물을 추가한 밭 토양샘플의 경우에 비료 처리가 되어 있는 밭 토양 샘플에 인공 삼추출물을 첨가한 후, N_2O 와 NH_4^+ 양을 측정하였을 때에 N_2O-N 의 양은 인공 삼추출물 처리 시, 약 9.4 %정도 감소함과 동시에 초기 값 대비 NH_4^+ 22.3 mM (22.3 $\mu\text{mols/serum bottle}$) 이 증가했음을 확인할 수 있음. 인공 삼추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해서는 33.2 μmols 의 NH_4^+ 이 더 높게 나타났음을 확인할 수 있고, 이와 동시에 최종 N_2O-N 발생량이 약 15.6 % 감소 (ARE 미 첨가시: 97.55 μmols , ARE 첨가 시: 82.31 μmols) 했음을 확인할 수 있음. 따라서 DNRA 촉진 반응이 형성되었음을 확인. 이는 인공 삼추출물을 첨가 시 비료 처리의 유무에 상관없이 실제 토양환경 샘플에서도 일정한 비율로 DNRA 반응을 촉진 시킬 수 있음을 나타냄. (그림 29)



○ 실제 토양환경의 인공 삼추출물의 영향을 평가하기 위한 대조군 실험 (호기 조건 실험)

- 인공 삼추출물이 첨가됨에 따라 NH_4^+ 의 발생이 촉진되는 것이 미생물에 의한 반응인지, mineralization에 의한 것인지 확인하기 위한 실험으로 앞선 실험들과 같은 배양 조건에 호기 조건을 유지하여 실험을 진행하였음. (phosphate-buffered minimal medium, lactate: 5 mM, NO_3^- : 1 mM 주입)

- 호기 조건에서 수행된 실험의 경우, 논 토양과 밭 토양의 인공삼추출물 미 첨가시, 첨가시에 모두 NH_4^+ 이 증가된 것으로 관찰되었음. 기존 진행되었던 실험이 ARE 주입에 따른 mineralization에 의한 현상인지 확인하고자 하였으나, 산소가 모두 소모된 후 미디어에 첨가된 lactate와 NO_3^- 에 의해 DNRA 반응이 촉진되었을 가능성이 있기 때문에 추가적인 실험을 통해 재확인 필요.



3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 정성적 개발 성과 목표

구분	목표	가중치(%)
1년차	- 고랭지 배추밭 토양 샘플 확보를 통한 근권 미생물 군집 분석	35
	- 꽃자왈 유래 제주 자생 미생물을 이용한 식물의 환경 스트레스 저항성 분석 및 유용 공생 미생물 확보	35
	- 질소고정 관련 유전자 타겟 분석 및 유용 미생물의 이차 대사산물 분석	20
	- 분비 이상 식물체 분비물이 포함된 액체 샘플 확보	10
2년차	- 배추 근권 유래 미생물을 이용한 식물의 환경 스트레스 저항성 분석 및 유용 공생 미생물 확보	20
	- 식물 분비 의존 근권 미생물 처리 유무에 따른 식물 면역 반응 및 병저항성 분석	20
	- Exocytosis에 의해 분비되는 이차대사산물 기능 분석	10

	- 확보된 유용 공생 미생물 유전체 해독 및 이차대사산물 분석	5
	- 애기장대 (야생형/VAMP721/722 돌연변이)의 삼출물이 model organism (Shewanella loihica strain PV-4)의 탈질화 반응/DNRA 반응에 미치는 영향 분석	10
	- 배추밭 근권에서 분리한 Flavobacterium spp.의 탈질화 반응/DNRA 반응 관련 유전체 분석	10
	- 애기장대 (야생형/VAMP721/722 돌연변이)의 삼출물이 배추밭 근권에서 분리한 Flavobacterium spp.의 탈질화 반응/DNRA 반응에 미치는 영향 분석	5
	- 삼출물의 성분 분석을 통한 탈질화 반응/DNRA 반응의 활성 정도에 영향을 미치는 물질 탐색	10
	- 애기장대 (야생형/VAMP721/722 돌연변이)에 따른 근권 메타지놈 분석	10
최종	○ 식물 면역반응에 관여하는 exocytosis 분비에 의해 결정되는 근권 미생물 생태 이해 ○ 식물 면역력 강화 근권 공생 미생물 발굴 ○ 식물의 삼출물이 미생물의 질소 순환 기작에 미치는 영향을 규명, 또한 이로 인해서 식물이 생존 및 생장에 얻을 수 있는 공생적 이익 관계 규명	

○ 정량적 개발 성과 목표

성과목표	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표													
1차년도			1	1	3								
2차년도			3	2	3				3				
합계			4	3	6				3				

3-2. 목표 달성여부

○ 정성적 개발 성과

구분	목표	달성도(%)
1년차	- 고랭지 배추밭 토양 샘플 확보를 통한 근권 메타지놈 분석	90
	- 박테리아에 대한 exocytosis 돌연변이체 면역력 분석	100
	- 꽃자왈 유래 제주 자생 미생물을 이용한 식물의 환경 스트레스 저항성 분석 및 유용 공생 미생물 확보	100
	- 질소고정 관련 유전자 타겟 분석 및 유용 미생물의 이차	100

	대사산물 분석	
	- 분비 이상 식물체 분비물이 포함된 액체 샘플 확보	100
2년차	- 배추 근권 유래 미생물을 이용한 식물의 환경 스트레스 저항성 분석 및 유용 공생 미생물 확보	100
	- 식물 분비 의존 근권 미생물 처리 유무에 따른 식물 면역 반응 및 병저항성 분석	100
	- 질산 처리 유무에 따른 식물 면역 반응 및 병저항성 분석	100
	- 확보된 유용 공생 미생물 유전체 해독 및 이차대사산물 분석	100
	- 식물 면역력 강화 근권 공생미생물 발굴	100
	- 애기장대 (야생형/VAMP721/722 돌연변이)의 삼출물이 model organism (<i>Shewanella loihica</i> strain PV-4)의 탈질화 반응/DNRA 반응에 미치는 영향 분석	100
	- 배추밭 근권에서 분리한 <i>Flavobacterium</i> spp.의 탈질화 반응/DNRA 반응 관련 유전체 분석	90
	- 애기장대(야생형/VAMP721/722 돌연변이)의 삼출물이 배추밭 근권에서 분리된 <i>Flavobacterium</i> spp. 탈질화 반응/DNRA 반응에 미치는 영향 분석	80
	- 삼출물의 성분 분석을 통한 탈질화 반응/DNRA 반응의 활성 정도에 영향을 미치는 물질 탐색	70
	최종	○ 식물 면역반응에 관여하는 exocytosis 분비에 의해 결정되는 근권 미생물 생태 이해 ○ 식물 면역력 강화 근권 공생 미생물 발굴 ○ 식물의 삼출물이 미생물의 질소 순환 기작에 미치는 영향을 규명, 또한 이로 인해서 식물이 생존 및 성장에 얻을 수 있는 공생적 이익 관계 규명

○ 정량적 개발 성과

성과목표	특허출원	SCI 논문	비 SCI 논문	학술발표	인력양성	평가방법
1년차 성과목표		1	1	3	3	
1년차 산출성과		1	0	12		증빙자료
2년차 성과목표		3	2	3		
2년차 산출성과		5	0	9	5	증빙자료
최종목표		4	3	6	3	
최종성과		6	0	21	5	증빙자료
달성율(%)		150%	0	350%	166%	

<논문게재>

1. 2017년, pH Control Enables Simultaneous Enhancement of Nitrogen Retention and N₂O Reduction in *Shewanella loihica* Strain PV-4, *Frontiers in microbiology*, Hayeon Kim, Doyoung Park and Sukhwan Yoon*, 8: 1820 ~ 1828
2. 2017년, Vesicle trafficking in plant immunity. 2017. *Curr Opin Plant Biol.* 40:

34-42. (IF=7.349(상위 10% 이내))

3. 2017, Characterization and comparative expression analysis of CUL1 genes in rice, Sang-Hoon Kim, Og-Geum Woo, Hyunsoo Jang, Jae-Hoon Lee, Genes and Genomics, 40권 3호, 국제, SCIE
4. 2017년, DHU1 negatively regulates UV-B signaling via its direct interaction with COP1 and RUP1, Sang-Hoon Kim, Hani Kim, Sungran Chung, Jae-Hoon Lee, Biochemical and biophysical research communications, 491권 2호, 국제, SCI
5. 2018년, BPH1, a novel substrate receptor of CRL3, plays a repressive role in ABA signal transduction, Og-Geum Woo, Soon-Hee Kim, Seok Keun Cho, Sang-Hoon Kim, Han Nim Lee, Taijoon Chung, Seong Wook Yang, Jae-Hoon Lee, Plant Molecular Biology, 96권 6호, 국제, SCI
6. 2018년, Plant surface receptors recognizing microbe-associated molecular patterns. 2018. J Plant Biol. 61: 111-120.

<학술발표>

1. 구두 발표

1. CRT1/2 determine the abundance of VAMP721/722 under ER stress in Arabidopsis. 권지안. 2016 Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists. 2016. 11. 3-4. 충남 부여 롯데리조트부여.
2. GSRK stabilization in immune responses to secondary bacterial infection. 권지안. 한국식물병리학회 식물-미생물 상호작용 연구회. 2017. 02. 13. 부산 부산관광공사 아르피나.
3. The Effect of pH on Nitrogen Dissimilation of Shewanella loihica strain PV-4 and its Implication in N₂O Emission and Nitrogen Retention. 김하연. International meeting of the federation of korean microbiological societies. 2016.11.3. 일산 킨텍스
4. Plant immune exocytic pathway. 권지안. International Meeting of the Microbiological Society of Korea MSK2017. 2017. 04. 26-28. 부산 벡스코.
5. Unexpected but significant sources and sinks of nitrous oxide. 윤석환. International Meeting of the Microbiological Society of Korea MSK2017. 2017. 04. 26-28. 부산 벡스코.
6. Measuring SNP Patterns by Geographical Locations in Marine Metagenome Data Using Newly Adopted Genotyping by Sequencing. 설우준. International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies. 2017.11.02. 일산 킨텍스

2. 포스터 발표

1. Isolation of a novel substrate receptor for Cullin1-RING E3 ligase involved in ABA signaling. 2016.11.3. 충남 부여 롯데리조트
2. A beta-glucan-binding receptor-like kinase is required for Arabidopsis late

- immunity to *Pseudomonas syringae* DC3000. 2016 Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists. 2016. 11. 3-4. 충남 부여 롯데리조트부여.
3. ER stress-induced accumulation of VAMP721/722 is depending on CRT1/2. 2016 Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists. 2016. 11. 3-4. 충남 부여 롯데리조트부여.
 4. Effects of gender and body weight on the cecal microbiome of broiler chicken. 2016 Cole Spring Harbor Asia Conference. 중국, 쑤저우
 5. Secretion of CCOAOMT1 via VAMP721/722 vesicles. 2017 KSPB Winter Conference. 2017. 02. 17. 서울 서울대학교 문화관
 6. Study on the plant immunity-improving activity of Cu₂O. 2017 KSPB Winter Conference. 2017. 02. 17. 서울 서울대학교 문화관
 7. Study on an immune function of a protein kinase JINK in Arabidopsis. 2017 KSPB Winter Conference. 2017. 02. 17. 서울 서울대학교 문화관
 8. Calreticulin 1 and 2 determine VAMP721/722 abundance under ER stress in Arabidopsis. 2017 제8회 한국분자세포생물학회 스트레스와 샤페론분과 심포지엄. 2017. 07. 13-14. 단양 대명리조트
 9. Characterization and comparative expression analysis of CUL1 genes in rice. 2017 International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. 서울 코엑스
 10. DHU1 negatively regulates UV-B signaling via its direct interaction with COP1 and RUP1. 2017 International Symposium of Rice Functional Genomics & Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists. 2017.09.26. 수원 광고 경기도 경제과학진흥원
 11. Extreme antarctic environment causes drastic changes of human skin microbiome. BAGECO14, 영국, 애버딘
 12. A novel method for screening of fast-growing methanotrophs using chemostat principle. International Meeting of the Microbiological Society of Korea MSK2017. 2017. 04. 26-28. 부산 벡스코.
 13. Metagenomic analysis reveals potential of lignocellulose degrading bacteria in the Antarctic King Sejong Station. BAGECO 14. 영국, 애버딘
 14. CCOAOMT1, a potential cargo secreted via VAMP721/722 vesicles in Arabidopsis. 2018 KSPB Winter Conference. 2018. 02.02. 광주 전남대학교 용지관
 15. Characterization of Chloroplast-targeted tRNA Methyltransferases in Plant 2018 KSPB Winter Conference. 2018. 02.02. 광주 전남대학교 용지관

<인력양성>

1. 김상훈: 2017년 석사학위 취득
2. 배유원: 2017년 석사학위 취득
3. 이규찬: 2018년 석사학위 취득
4. 권혁진: 2018년 2월 박사학위 취득

5. 김수홍: 2018년 8월 박사학위 취득

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 메타지놈의 raw 데이터 자체가 용량이 매우 큼. 특히 토양의 경우 바닷물, 장내, 피부 등의 지역보다 훨씬 큰 데이터를 얻음. 따라서 이 데이터를 처리하는 데 시간이 걸리고 있으며 가급적 빠른 시간 내에 분석을 마무리하고자 함.
- 현재 고랭지 배추밭에서 분리한 *Flavobacterium* 및 꽃자왈 토양에서 분리한 *Bacillus*가 식물의 면역력에 미치는 효과를 분석 중임. 가급적 빠른 시간 내에 분석을 마무리하여 식물의 스트레스 저항성에 유용한 토양 미생물을 획득하고자 함.
- 단 식물과 미생물의 상호관계 분석 및 식물-미생물 간의 생리적 변화를 분석하여, 보다 근원적인 메카니즘 이해를 위해서는 향후 3-5 년 추가적인 연구지원이 반드시 필요함
- *Arabidopsis thaliana*의 삼출물을 첨가한 (1:1) 미디어에 model organism인 *Shewanella loihica* PV-4를 배양하여 탈질 및 DNRA에 미치는 영향을 확인하였음.
- 배추밭 근권에서 분리된 *Flavobacterium* 속의 strain CN-10-1, CN-10-4, CM-10-5, CR-7, BN-2의 지놈으로부터 각각 탈질반응, DNRA 반응과 관련된 유전체를 확인하였음. 관련 유전체는 확인하였으나, *Flavobacterium*의 *nirK*와 *nrfA*를 포괄적으로 amplify할 수 있는 프라이머 세트를 설계하는 부분이 수행되지 않았음.
- 삼추출물이 배추밭 근권에서 분리된 *Flavobacterium* spp.의 탈질화 반응 / DNRA 반응에 미치는 영향을 분석하였음. *Flavobacterium* 속 strain CN-10-1와 BN-2를 배양시 NH_4^+ , N_2O (C_2H_2 주입시) 생성 속도를 측정하여 탈질화/DNRA 반응을 관찰하였음. strain CN-10-1와 BN-2이외의 3개 균주의 경우 minimal medium에서 충분한 성장을 하며 탈질화가 일어나지 않았음.
- 삼출물의 성분을 UC Davis의 West Coast Metabolomics Center에 분석의뢰하여 HILIC (Hydrophilic interaction chromatography)를 이용한 반정량적 (semi-quantitative)한 삼추출물의 성분을 분석하였다. 이 성분과 비슷하게 인공 삼추출물을 사용하고 있는 논문을 인용하여, 인공 삼출물 (ARE)를 합성하여 model organism인 *Shewanella loihica* strain PV-4. 의 탈질/DNRA 반응에 미치는 영향 및 토양 샘플에 적용하여 탈질 및 DNRA 반응을 관찰하였음. 또한, 인공 삼출물을 크게 amino acids, sugars, other organic compounds의 종류별로 나누어 실험하여, 탈질 및 DNRA에 영향을 미치는 인자를 확인하였음. 호기 조건에서 control 실험을 통해 mineralization 여부를 추가적으로 확인해야함.
- 고랭지 배추에 직접 처리하여 작물 생장에 유용한 미생물 발굴 및 목록 작성의 연구가 수행되지 않음. 이에 따라 유용 미생물을 배추에 직접 처리하여 식물 생장에 유용한 미생물을 발굴하고 목록을 작성할 필요가 있음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

<활용방안>

- 식물에서는 최초로 exocytosis 분비 의존적인 근권 공생미생물 군집의 발굴
 - 근권 미생물 군집 형성 및 조성 변화 기작 이해가 가능한 단서 제공
 - 근권 미생물 생리 및 생태, 식물과의 상호작용 기작 이해에 도움
- 고랭지 배추밭을 이용한 국내 자생 유용 근권 미생물 발굴
 - 한국형 식량에 관련된 유용미생물과 유용 소재에 대한 목록을 제공하여 우수한 품질의 식량 자원 개발에 유용하게 활용
 - 환경 스트레스 내성 시스템 구축을 위한 연구 기반을 확립
- 차후 식물병 저항성 및 성장 등에도 영향성 유용성을 분석할 수 있는 연구 기반을 확립

<기대성과 및 파급효과>

- 기술적 측면
 - 식물 exocytosis 분비 의존적인 근권 미생물 데이터 구축
 - : 작물 특이적인 생리 조절 근권 미생물 개발 가능성 제공
 - 국내 자생 유용 근권 미생물 자원 개발
 - : 국내 작물 특이적인 근권 미생물 발굴 및 적용 가능성 제공
 - Exocytosis에 의해 분비되는 식물 이차대사산물 리스트 구축
 - : 작물 면역력을 강화시키는 유용 이차대사산물 개발 가능성 제공
- 경제적·산업적 측면
 - 식물 면역을 강화시키는 근권 미생물 제재 개발을 통한 신규 수익 창출
 - 이차대사산물 유래 친환경 식물 면역 강화제 개발
 - : 농약 대체를 통한 환경 보호, 생태계 보존 및 농가 소득 증대 효과

붙임. 참고문헌

- Bardi DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotech* 20: 642-650
- Kwon C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M et al. (2008) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature* 451: 835-840
- Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD, Coruzzi GM (2011) Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *PNAS* 108: 18524-18529
- Sato S, Yanagisawa S (2013) Characterization of metabolic states of *Arabidopsis thaliana* under diverse carbon and nitrogen nutrient conditions via targeted metabolomic analysis. *Plant Cell Physiol* 55: 306-319
- Yi C, Park S, Yun HS, Kwon C (2013) Vesicle-associated membrane proteins 721 and 722 are required for unimpeded growth of *Arabidopsis* under ABA application. *J Plant Physiol* 170: 529-533