

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001437-01

토착미생물을 이용한 건전육묘 생산용  
친환경 생물비료 개발

(Biofertilizer development using indigenous microorganisms  
for healthy seedling production)

충북대학교

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “토착미생물을 이용한 건전육묘 생산용 친환경 생물비료 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 7 월 9 일

주관연구기관명 : 충북대학교

주관연구책임자 : 사 동 민

세부연구책임자 : 이 이

연 구 원 : M. Melvin Joe

연 구 원 : 임 우 중

연 구 원 : Charlotte C. Shagol

연 구 원 : 김 기 윤

연 구 원 : 구 선 미

연 구 원 : 이 수 연

연 구 원 : 한 마 음

연 구 원 : 윤 세 진

연 구 원 : 엄 유 리

연 구 원 : 조 남 수

연 구 원 : 윤 현 응

연 구 원 : 이 상 석

연 구 원 : 조 성 상

연 구 원 : 함 완 식

협동연구기관명 : 서울바이오

협동연구책임자 : 박 민 영

# 요 약 문

## I. 제 목

토착미생물을 이용한 건전육묘 생산용 친환경 생물비료 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라는 90년대에 들어서는 급격한 산업화로 인한 농촌 노동력 부족과 노령화로 농작업에 대한 기계화와 자동화가 크게 요구됨에 따라 보다 효율적이고 경제적인 규격모종 대량 생산방식으로 공정육묘 기술이 개발되어왔으며, 최근에는 소비의 연중 요구와 이에 따른 시설재배면적의 확대 등 사회적 여건의 변화로 좋은 품질의 모종을 연중 안정적으로 생산 확보해야 할 필요성은 증가하고 있는 반면 노동력과 기술 수준은 낮아져 육묘능률의 향상이 필요하게 되었다. 따라서 본 연구에서는 토착미생물을 이용한 건전 육묘생산 기술을 과학적으로 확립하기 위하여 우수한 식물생장촉진미생물을 2차 선발하여 작물의 초기 생육을 촉진시키고, 또한 이러한 생육촉진효과를 과학적으로 설명하기 위하여 유전자 조작을 이용한 식물생장촉진 미생물의 형광 표지 및 도입 유전자의 안정성 검정, 접종된 미생물의 작물 내 분포 및 생존율을 기내 실험을 확인한다. 또한 온실 실험을 통해 선발된 토착미생물의 접종이 식물의 성장속도 및 PR 유전자 및 병원균방어효소 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하여 내병성 향상 정도를 측정한다. 최종적으로 선발된 토착미생물의 육묘접종체계를 확립하고, 내재해성 단백질을 생산하는 내병성 및 내충성에 강한 육묘를 생산하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1) 다기능 식물생장촉진미생물의 효능 규명 및 육묘 이용 방법 개발

#### - 우수식물생장촉진미생물의 2차 선발

보유 미생물 (*Methylobacterium*) 중 우수미생물을 2차 선발하고, 선발한 미생물의 육묘 생산 촉진 효과와 작물별 접종 효과를 확인한다.

#### - 내병성 강화를 위한 미생물 이용 방안 탐색

기내 실험을 통한 작물별 형질전환 미생물의 균집능과 밀도를 확인하고 선발 미생물 접종 시 작물의 PR-protein 및 병원균 방어 효소 활성화에 미치는 효과를 검정한다.

- 미생물의 육묘 응용 효과 규명 및 접종체계 확립

최종 토착미생물 선발 후 육묘에서의 성장촉진 효과와 내병성 증진 효과 확인 및 육묘 최적 접종 방법을 확립하고, 산업화를 위한 제형화 및 포장실험을 통한 효능 검정을 실시한다. 최종적으로 현장에서 균주 기능 향상을 위한 탄소원 첨가 효과를 탐색한다.

2) 표지를 통한 접종 미생물의 검정과 작물 내 분포와 내성관련 유전자 발현 규명

- 미생물 효능 규명을 위한 식물성장촉진 미생물의 형광 표지 및 도입 유전자의 안정성 검정

2차 선발된 식물성장촉진미생물의 *gfp* 형질 전환 및 형질전환 미생물의 *gfp* 활성을 측정하고, 세대 진행에 따른 도입 유전자의 안정성을 확인한다.

- 접종된 미생물의 작물 내 분포 및 생존율 측정

형질전환 미생물의 작물 내 분포 확인을 위한 기내 재배 실험을 실시하여 작물에서의 균집 패턴을 검정하고, 접종미생물의 작물 및 토양에서 생존율을 측정한다.

- 미생물의 접종이 PR 유전자 및 병원균방어효소 유전자 발현에 미치는 영향 규명

토착미생물의 접종으로 병원균 저항성을 보이는 작물에서 PR-유전자 및 병원균 방어 효소 유전자를 클로닝하고, 미생물 접종이 작물의 PR-유전자 및 병원균 방어 유전자의 발현에 미치는 효과를 검정한다.

3) 생물비료를 이용한 건전육묘 생산 기술 확립

- 초기 생육 촉진을 위한 육묘용 생물 비료 개발

작물별 미생물 제제 처리방법 개발 및 최적 미생물 조합을 선발하고 미생물 비료를 이용한 육묘활착률 향상 기술을 개발한다.

- 육묘용 미생물 비료의 활용증진 기술 개발

육묘용 미생물 비료 제품의 안정성 및 유해성을 검증하고 다양한 농자재 및 생물자재를 이용한 미생물 비료의 효율 증진 기술을 개발한다.



#### IV. 연구개발결과

실험을 수행하기 위하여 본 연구실에서 분리 및 동정한 다양한 *Methylobacterium* 균주들 중 ACC deaminase 활성 및 식물생장촉진능이 뛰어난 7종의 *Methylobacterium* 균주들을 선발하여, *Methylobacterium* 접종에 따른 작물의 생육 증진 효과를 규명하기 위해 온실실험을 수행하였다. 각각 선발한 *Methylobacterium* 균주 접종에 의한 토마토와 고추의 지상부 및 뿌리 길이를 측정 한 결과 대부분의 균주 처리구에서 대조구 대비 유의성 있는 길이 증진 효과를 확인 할 수 있었으며, 각 작물의 지상부 및 지하부 건물중 또한 이와 유사한 결과를 확인 할 수 있었다. 또한 온실실험 수행 중 토마토와 고추 잎의 에틸렌 발생량과 수확 후 전체 식물체의 에틸렌 발생량을 측정 한 결과 *Methylobacterium* 균주 처리구에서 유의성 있는 에틸렌 저감 효과를 확인 하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 식물생장촉진능과 에틸렌 제어 효과가 뛰어난 4종의 *Methylobacterium*을 병원균 기내 실험을 위해 선발하였다.

세균성 점무늬병, 세균성 풋마름병 및 역병에 감염된 토마토와 고추 잎에서 ACC deaminase를 생산하는 *Methylobacterium* 균주들의 접종이 각각 병원균의 병증과 에틸렌 발생량에 미치는 영향을 확인하기 위해서 기내 실험을 수행하였다. 선발된 4종의 *Methylobacterium* 균주들은 각각의 병원균에 대한 길항성은 없는 것으로 실험을 통해 나타났으나, 병원균에 감염된 토마토와 고추의 잎에서 유의성 있는 병증의 감소를 확인 할 수 있었다. 또한 병원균 감염에 의한 토마토와 고추 잎의 스트레스 에틸렌 수준을 측정 한 결과 *Methylobacterium* 균주들을 접종한 처리구에서 병원균 단일 접종 처리구에 비해 확연한 저감 효과를 나타내는 것으로 확인 되었다.

기내 실험을 바탕으로 세균성 점무늬병과 세균성 풋마름병에 감염된 토마토와 고추에서 4종의 *Methylobacterium* 균주의 접종 효과를 확인하기 위하여 온실실험을 수행하였다. *Methylobacterium* 균주들의 접종효과는 세균성 병원균에 노출된 작물의 성장, 병증의 발생, 에틸렌 발생량 및 에틸렌 생합성에 관여하는 효소 활성을 비교함으로써 확인하였다. 또한 미생물의 접종이 작물의 병원균방어효소 발현량과 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하였다. 그에 더하여 미생물 처리 효과를 과학적으로 규명하기 위해 유전자 조작 기술을 이용한 형광 표지 및 이를 이용한 작물 내 미생물의 군집을 확인하였다. 각각의 병원균에 노출된 토마토와 고추에서 *Methylobacterium* 균주의 접종은 병원균 단일 접종 처리구에 비해 작물의 생장촉진 뿐 아니라 스트레스 수준의 에틸렌 발생과 그에 관여하는 ACC와 ACO의 저감 효과를 가져왔으며, 그로 인해 병원균에 의한 병증이 확연히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 작물에 축적된 ACC가 *Methylobacterium*이 생산하는 ACC deaminase에 의해  $\alpha$ -ketobutyrate와 ammonia로 가수분해 되기 때문이다. 그에 더하여 작물의 병원균방어효소 ( $\beta$ -1,3-glucanase,

PAL, PO, PPO) 발현량 및 관련 유전자 발현을 확인한 결과에서도 *Methylobacterium* 균주 접종 처리구에서 유의성 있는 증가를 확인 할 수 있었다. 또한 형광 표지를 이용하여 *Methylobacterium* 균주들이 작물체내에 군집하면서 작물의 저항성을 향상시켰다는 결과를 확인 할 수 있었다.

미생물 효능 규명을 위한 식물생장촉진 미생물의 형광표지를 삽입하고 도입된 형광표지 유전자의 안정성을 검정하였다. 이때 사용된 유전자는 *gusA*, *nptII*, *gfp* 유전자가 minitransposon에 들어있어서 형질전환 된 미생물의 염색체에 들어감으로 인하여 안정한 형태로 존재하는 특성을 가지고 있었다. 형질전환 후 계대를 통한 안정성 검정에서 세대가 거듭하여도 안정적으로 지속되는 것을 확인하였다. 다음으로 식물생장촉진 미생물의 작물 내 분포 및 생존율 측정을 하였다. 형질전환 된 미생물을 고추, 벼, 상추, 토마토, 시금치에 종자침지 하였다. 미생물의 분포를 분석하기 위해 CLSM 으로 측정결과 미생물들이 주로 뿌리부분에 분포하는 것을 알 수 있었다. 또한 고추와 상추에서 식물생장촉진 미생물이 뿌리 길이신장에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

미생물의 접종이 병 관련 유전자인 PR 유전자 및 병원균방어효소 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하였다. 고추에 식물생장촉진 미생물을 종자침지 하여 유묘기에 병원균인 역병균을 감염시켰다. 무처리군과 미생물 처리군, 역병균 감염군, 역병균 감염 후 미생물 처리군으로 실험하였다. PR 유전자인 ACC-oxidase와 PAL 유전자의 발현량을 Real-time PCR 로 검정한 결과 역병균 감염 후 미생물 처리군에서 발현량이 증대됨을 알 수 있었다. 결과적으로 식물생장촉진 미생물인 *Methylobacterium* 속 미생물은 특정 작물에서 뿌리생장촉진에 영향을 미치며 병원균이 감염되었을 시 신호전달과정을 통하여 병원균에 저항하는 물질을 생산하도록 유도한다는 것을 알 수 있었다.

유박, 퇴비, 석회 처리 및 형질전환 *Methylobacterium* 접종이 고추의 생장에 미치는 영향을 확인한 결과, 고추 초장의 경우 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 200%, 균주 접종 처리구가 가장 높았으며, 고추 건물중의 경우는 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 100%, 균주접종 처리구와 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 200%, 균주 접종 처리구에서 가장 높게 나타났다. 고추의 근권과 잎에서 균밀도를 확인한 결과, 근권의 경우 퇴비와 석회 처리량, 잎은 퇴비의 처리량이 형질전환 *Methylobacterium*의 균밀도에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

*M. oryzae* CBMB20의 근권접종과 메탄올 엽면살포에 따른 고추의 생육촉진 효과를 유기질 비료의 시용 수준별로 조사한 결과, *M. oryzae* CBMB20의 근권접종과 메탄올 엽면살포는 각기 고추생육을 증대시켰으며, 이들을 동시에 혼합 처리하였을 경우에는 고추의 생장촉진 효과가 더욱 현저하게 나타났다. *M. oryzae* CBMB20와 메탄올을 혼합 처리한 경우 권장시비수준 100%와 300% 처리 사이에 고추생육과 수량에서 유의성 있는 차이가 없었다.

미생물 비료를 이용한 옥묘재배용 상토 개발을 위하여 두 가지 시험상토 (바로커 범용, 명품골드)에서 *Methylobacterium* 접종에 따른 배추, 고추 유묘의 생장을 측정하였다. 배추의 경우 ‘바로커 범용’ 상토에서는 CBMB12를 접종한 처리구에서 가장 높은 생장을 보였으며, ‘명품골드’ 상토에서는 CBMB27 균주 접종 처리구에서 배추의 생육 증가를 확인 할 수 있었다. 두 상토에서 균주 접종에 따른 고추의 생육을 측정한 결과, ‘바로커 범용’ 상토에서는 CBMB12를 접종한 처리구에서 고추의 생육이 가장 높았으며, ‘명품골드’ 상토에서는 CBMB12와 CBMB27을 접종한 처리구에서 고추의 생장이 가장 높게 나타났다.

따라서 건전옥묘 생산 및 병원균에 대한 작물의 방어반응 유도를 향상시키기 위해 본 균주의 활용이 가능하리라 사료되며, 향후 실제 농가 활용을 위해 에틸렌 민감 작물뿐 아니라 다양한 작물과 다양한 병원균을 이용한 필드 실험이 수행될 예정이다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

일정 규모를 갖춘 공정옥묘장의 증가 추세를 보아 옥묘산업은 점점 발전하고 있음을 알 수 있다. 하지만 국제유가의 급속한 상승과 옥묘에 대한 농업인들의 요구조건이 까다로워지고 있는 현실에서 기존의 방법으로는 경쟁력에 밀려 탈락하고 말 것이다. 이에 본 연구는 토양 처리 기술에 국한 되어있는 미생물의 과학적 효능이 검증된 신규미생물을 개발하고 이용하여 옥묘의 생장 촉진 효과와 내병성, 그리고 옥묘생산에서 비료의 효율이 증대되는 옥묘 생산기술을 개발하는 방향으로 연구를 수행한 결과 현재까지 국내학술지 3편의 논문이 게재되었고, 국제학술회의 8편, 국내학술회의 12편의 학술발표 성과가 있었으며, 3건의 특허를 출원하였다. 또한 국제 저명 학술지에 본 연구에서 수행한 결과를 활용하여 다수의 논문을 투고할 계획이다. 이러한 논문, 학술발표, 특허 성과 기술들을 재정리하여 산업화하는 기회가 주어진다면 다기능 식물생장촉진미생물을 응용하여 옥묘의 생장촉진과 내병성이 강화된 우수 옥묘 생산 기술의 산업화로 옥묘의 재배 기간 단축, 병해로부터 보호, 화학비료 사용저감 등으로 인한 경제적 옥묘 생산이 가능할 것이다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### Biofertilizer development using indigenous microorganisms for healthy seedling production

Biosynthesis of ethylene is usually enhanced with severity of pathogenic infection. Some ethylene synthesis inhibitors are known to significantly decrease the severity of pathogen infections in plants. Methylophilic bacteria have been found to stimulate plant growth and regulate ethylene emission in crop plants. A selective decrease of ethylene can be achieved by plant growth promoting bacteria, for instance *Methylobacterium*, producing ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase, which cleaves ACC into  $\alpha$ -ketobutyrate and ammonia in higher plants. This study was conducted to examine the effect of *Methylobacterium* inoculation on seedling development and ethylene emission in tomato and red pepper plants under greenhouse condition. *Methylobacterium* inoculation increased significantly seedling development and reduced the ethylene emission of tomato and red pepper plants. Bacterial inoculation reduced ethylene emission in tomato and red pepper leaves infected with bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) and Phytophthora blight (*Phytophthora capsici*). Although the *Methylobacterium* strains did not show antagonistic effects against the phytopathogens under *in vitro* condition, they accumulated the antimicrobial compound salicylic acid in culture medium. Tomato and red pepper leaves treated with *Methylobacterium* strains showed significantly reduced disease incidence and lowered ethylene emission. Bacterial salicylic acid production confers enhanced disease resistance in inoculated plants lowered ethylene emission and growth promotion. In greenhouse experiments, the disease index value observed in *Methylobacterium* strains treated tomato and red pepper plants were lower than that of uninoculated treatment. Plants treated with *Methylobacterium* strains challenge inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV) and *Ralstonia solanacearum* (RS) showed significantly reduced disease symptom and lowered ethylene emission under greenhouse condition. The ACC

and ACO (1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase) accumulated in the tomato and red pepper leaves were significantly reduced with *Methylobacterium* spp. inoculation compared to treatment with pathogen alone. Ethylene level is ultimately reduced by reducing the biosynthetic precursor, ACC. Based on these results, *Methylobacterium* strains could be used to reduce disease symptoms in plants by lowering stress ethylene. In addition PR proteins related to ISR (Induced systemic resistance) including  $\beta$ -1,3-glucanase, PAL, PO and PPO were increased in *Methylobacterium* strain inoculated tomato and red pepper plants. This study supports that the *Methylobacterium* strains might increase the activity of defense enzymes by modulating the ethylene biosynthesis pathway, suggesting the possibility of using Methylo-trophic bacteria as potential bio-control agents.

This study was performed to identify the effect of *Methylobacterium*, a growth inducing microorganism, on the growth of crops. *Methylobacterium* was transformed with *gusA*, *nptII*, and *gfp* genes and the stability of the introduced gene was confirmed. The genes were introduced with minitransposon and they were anchored on chromosome of microorganism. The stabilities of introduced genes were tested by colony PCR of the strains subsequently subcultured on antibiotics free medium. The transformed microorganism were treated to red pepper, rice, lettuce, tomato, and spinach. The location of the introduced microbes were analysed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The microbes were localized to roots of the crops and they enhanced the longitudinal growth of the roots of red pepper and lettuce. The effect of the microbe treatment on the gene expression of pathogenesis-related (PR) genes were studied. Microbes were treated to red pepper seeds and pathogens were treated at seedling stage. The expression of *1-aminocyclopropane-1-carboxylate* (ACC) oxidase and *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL) was analyzed using real-time PCR. The expression of the two genes were enhanced by the treatment of the microbes. In conclusion, *Methylobacterium* enhance the root growth of the treated crops and the microbe induce the expression of the pathogene resistant genes for produce anti-pathogenic substances.

To minimise the wastage of external application of organic and inorganic fertilizer, lime amendment for maintaining the pH, use of plant growth promoting bacteria (PGPB) in sustainable agricultural system is a focus area in 21<sup>st</sup> century crop

production. Among the different PGPB, pink pigmented methylophilic *Methylobacterium* has been investigated recently on many crop plants. In this paper, inoculation effect of *Methylobacterium suomiense* CBMB120-*gfp29* on red pepper growth at different level of compost and lime amendment has been reporting. It was found that inoculation of *M. suomiense* CBMB120-*gfp29* promoted plant height (0.96% to 24.76%) and dry matter accumulation (2.98% to 40.82%). Colonization study and leaf imprints confirmed the good colonization of the bacteria in red pepper plants. However, no colonization was found for the 200% lime amendment. Large scale field experiment with the strains will lead to developed biofertilizer for sustainable crop production without disturbing the native population.

Fertilizers, plant growth promoting microbes and plant growth regulators should be combined together and used in order to achieve a maximal plant growth and yield in modern sustainable and ecological agricultural systems. In this study rhizosphere inoculation of *Methylobacterium oryzae* CBMB20 and foliar application of methanol were tested for their ability to promote the growth of red pepper plant at different levels of organic fertilizer. Rhizosphere inoculation of *M. oryzae* CBMB20 and foliar spray of methanol could promote red pepper plant growth and yield, and the growth promoting effect induced by the combined treatment of *M. oryzae* CBMB20 inoculation and foliar spray of methanol was more distinctive. This result suggests that a synergistic growth promoting effect of methanol spray and *M. oryzae* CBMB20 inoculation can be obtained in the combined treatment of the two growth promoting factors. The growth promoting effect was more significant in the lower fertilization rate, and the plant growth was not significantly different between 100 and 300% fertilizer treatments where both *M. oryzae* CBMB20 inoculation and foliar spray of methanol were included. This result indicates that, with the plant growth promoting effect of *M. oryzae* CBMB20 and methanol, fertilizer application rate can be profoundly reduced without any significant decreases in biomass accumulation and yield of crops.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Abstract .....	2
Summary .....	7
Contents (English) .....	10
Contents .....	11
I. State of art and Research Goal .....	12
II. Research Scopes and Contents .....	18
III. Research Results and Discussion .....	21
IV. Contribution to related research area .....	194
V. Application plan .....	199
VI. New Research Information .....	200
VII. References .....	215

# 목 차

요 약 문 .....	2
Summary .....	7
Contents (영문) .....	10
목 차 .....	11
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	18
제 3 장 연구개발내용 및 결과 .....	21
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	194
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	199
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	200
제 7 장 참고문헌 .....	215



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

육묘는 종자를 파종에서부터 일정기간 동안 아주 심기까지 적합한 양질의 모종을 키워내는 작업과정이다. 일반 밭작물과 달리 대부분의 채소는 모종을 키워 본밭에 옮겨 심는 육묘 이식 재배가 보편화됨에 따라 예전부터 모종을 기르는 일은 ‘절반 농사’라고 할 정도로 모종을 기르기 (육묘)의 중요성이 강조 되어 왔다.

우리나라는 ‘60년대 이후 육묘재배가 본격화 되면서 여러 가지 육묘법이 개발되어 농가에서 활용되어 왔으며, 당시의 육묘는 대부분이 자가소비를 목적으로 하였다. 그러나 ‘90년대에 들어서는 급격한 산업화로 인한 농촌 노동력 부족과 노령화로 농작업에 대한 기계화와 자동화가 크게 요구됨에 따라 보다 효율적이고 경제적인 규격모종 대량 생산방식으로 공정육묘 기술이 개발되었다. 그리고 현재는 전국 200여 곳이 넘는 공정육묘장이 설치되어 재배와 육묘의 분업화가 가속화되고 있다.

대부분의 채소작물은 육묘기간 동안의 발육상태가 아주심은 후의 생육과 수량에 크게 영향을 미친다. 더구나 최근에는 시설재배 면적이 늘어나 환경이 불량한 시기에 육묘가 이루어지는 경우가 많아져 육묘기간 동안 환경관리가 더 중요하게 되었다.

이러한 육묘를 하는 주된 이유는 육묘기 동안 집약적인 관리에 의한 발아율 향상, 병해충이나 기상재해에 약한 어린묘의 보호와 초기생육의 촉진, 꽃눈분화 유기 또는 억제, 이 밖에 작기 확대, 관리 노력, 경영비 절감, 포장 이용률 향상 등에 있다. 최근에는 소비의 연중 요구와 이에 따른 시설재배면적의 확대, 농업 노동력의 부족 등 사회적 여건의 변화로 좋은 품질의 모종을 연중 안정적으로 생산 확보해야 할 필요성은 증가하고 있는 반면 노동력과 기술 수준은 낮아져 육묘능률의 향상이 필요하게 되었다. 이와 같은 여건변화에 따라 채소 육묘는 좀 더 전문적이고 생력화된 기술, 장치와 기계를 투입하고, 완비된 환경을 부여하여 규격화된 고품질의 모종을 계획적으로 공급할 수 있는 집단생산 및 상품화의 단계로 발전하게 되었으며, 앞으로 채소 육묘 산업은 고효율 시설, 자동화 등을 도입한 육묘 전문 업체에서 모종을 생산 판매하고, 작물 재배는 농업인이 하는 농작업의 분업화가 더욱 촉진될 전망이다.

그 중 플러그 육묘란 여러 개의 작은 용기 (셀, cell)가 연결된 ‘플러그 트레이’ 라고 불리는 육묘 전용 용기를 이용하여 묘를 키우는 것을 말한다. 양질 (良質)의 균일한 묘를 대량으로 생산하는 것을 목적으로 하여, 육묘 전용시설·장비 및 자재를 갖추고 상토 제조 및 충전 (充填), 파종, 관수, 시비 및 환경관리 등 파종 준비부터 육묘 종료까지의 작업이 유기적으로 연결되어 이루어지기 때문에 넓은 의미에서 공정육묘라고 하기도 한다.

또한 플러그 육묘를 통해 생산된 묘를 통칭하여 플러그묘라고 한다. 모종의 뿌리가 모여 있

는 모양이 아래쪽으로 뾰족하게 생겨 전기 콘센트에 꽂는 플러그 (plug)와 비슷하다고 하여 플러그묘란 이름을 얻었다. 플러그묘는 과거에는 셀 묘, 성형 묘, 공장 묘 등으로도 불리었으나 지금은 일반적으로 플러그묘로 불리고 있다.

*Methylobacterium*은 pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria로 알려진 미생물로 (Austin and Goodfellow 1979; Patt et al. 1976; Green and Bousifield 1982, 1983), 계통 발생적으로 그람 음성의  $\alpha$ -*Proteobacteria* 그룹에 속하며, 탄소원으로는 formate, formaldehyde, methanol, methylamine과 같은 one-carbon 화합물을 이용한다 (Lidstrom 2001). 따라서 메탄을 방출하는 식물의 조직에서 분리 및 동정이 가능하며, 작물에서의 메탄 생성 기작은 Fig. 1와 같다. 이들 methylotrophic bacteria는 탄소원으로 메탄올을 함유하는 선택배지를 이용하면 쉽게 분리할 수 있으며 (Corpe 1985), 핑크빛을 띄므로 쉽게 동정할 수 있고, 생육이 왕성한 조직에서 높은 개체수가 존재하여, 보통 생물중 (fresh weight) 1 g의 식물 조직에  $10^4 \sim 10^7$ 이 존재한다 (Dunleavy 1988; Corpe and Rheem, 1989; Holland and Polacco, 1992; Hirano and Upper 1991; Holland 1997). *Methylobacterium*이 처음 발견된 것은 우산이끼로부터 분리하여 *Bacillus extorquens*로 이름 붙인 Bassalik (1913)에 의해서였으며, Patt 등 (1974)은 *Methylobacterium*으로 새로 이름붙인 메탄 이용 능력을 갖춘 pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria에 대해 보고했다. *Methylobacterium*의 알려진 식물생장촉진효과는 Fig. 2와 같다. 이러한 *Methylobacterium*은 식물들의 성장을 증진시키는 질소를 공기 중의  $N_2$ 가스에서 고정할 수 있는 능력을 가지고 있다 (Sy et al. 2001; Madhaiyan et al. 2004). 또한 이 미생물들은 다른 대사과정을 통해 식물생장에 직, 간접적으로 긍정적인 영향을 끼치는데, 식물생장에 끼치는 직접적인 영향으로는 cytokinin의 유도체인 *t*-ZR, ZR, isopentenyladenosine (iPA)과 indole-3-acetic acid (IAA) (Ivanova et al. 2001; Koenig et al. 2002; Omer et al. 2004) 및 vitamin B<sub>12</sub> (Basile et al. 1985)의 합성이다. 간접적으로는 병원성 미생물의 영향을 줄여 병발생을 억제한다는 것이며 (Madhaiyan et al. 2006b), 식물의 광합성 활성을 높여준다는 것이다 (Cervantes-Martinez et al. 2004).

이러한 *Methylobacterium*에 의한 병원균 방어 작용 유도는  $\beta$ -1,3-glucanase와 같은 병생성 관련 (pathogenesis related, PR) 단백질, 페닐알라닌 암모니아-라이아제 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)와 같은 방어 효소, 및 퍼옥시다제 (peroxidase, PO) 및 폴리페놀 옥시다제 (polyphenyl oxydase, PPO)와 같은 산화 효소들의 생성과 대부분 관련되어 있다. 그러나, 이러한 효소들의 활성 증가 또는 축적은 주로 식물 호르몬 에틸렌에 의존한다. 에틸렌의 방출은 병원균의 공격에 대한 초기 반응이고, 식물과 미생물간의 상호작용 시 방어 작용을 위한 신호로서 작용하는 것으로 알려져 있다 (Boller T, The plant hormone ethylene, CRC Press, Boca Raton, FL, 293-314, 1991; Glick BR, et al., *J. Theor. Biol.*, 190:63-68, 1998; Huang

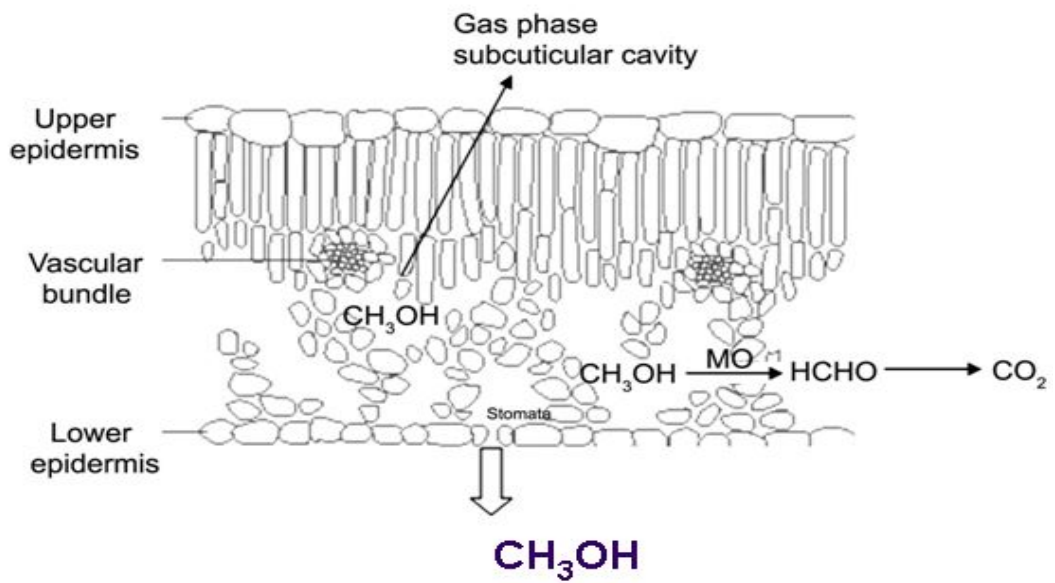
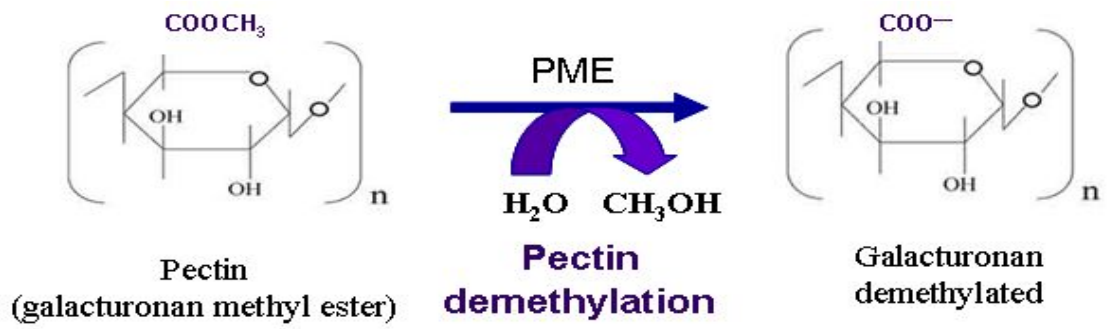


Fig 1. 작물에서의 메탄 생성 기작

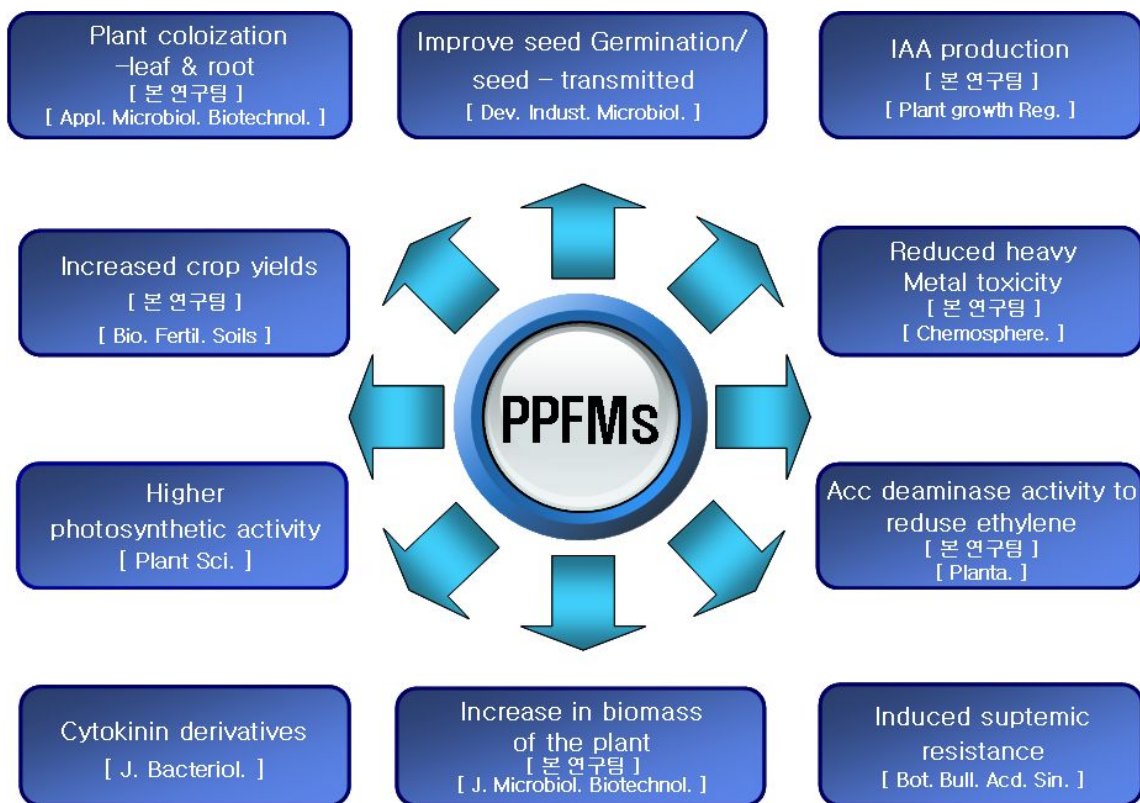


Fig. 2. 작물에서 PPFM의 식물생장촉진 효과

YF., *Plant Groth Regul.*, 12:79-82, 1993). 또한 에틸렌 방출이 증가하는 시간은 작물에서 질병의 증후가 나타나는 시기와 일치하며, 화학적 에틸렌 생합성 억제제인 AVG는 에틸렌 수준을 감소시키고 결과적으로 질병의 증후를 억제한다. 따라서 ACC deaminase 활성을 갖는 *Methylobacterium*은 에틸렌 생합성 전구체인 ACC를 가수분해하여 스트레스 에틸렌 수준을 감소시킬 뿐 아니라 (Glick BR, et al., 1998; Madhaiyan M., et al., *Planta*, 224:268-278, 2006a) 작물이 성장하는데 필요한 수준의 에틸렌을 유지하여 질병의 징후가 나타나지 않으면서도 작물이 잘 성장하도록 한다고 알려져 있다 (Fig. 3) (Robinson MM., et al., *Mol. Plant Pathol.*, 2:135-145, 2001; Wang C., et al., *Can. J. Microbiol.*, 46:898-907, 2000).

원예작물에 있어 육묘는 그해 농사의 절반이라 할 정도로 그 중요성이 인식되어 왔고 최근에는 농촌의 노동력 감소와 육묘의 전문화에 따라 전국에 공정육묘장이 설립됨에 따라 이제 채소작물의 육묘는 완전한 상업화 시대에 들어서게 되었다. 이제 우리의 육묘산업은 한 단계 더 발전하기 위한 중대한 기로에 서 있다고 할 수 있다. 최근 국제유가의 급속한 상승과 육묘에 대한 농업인들의 요구조건이 날로 까다로워지는 현실에서 기존의 방법으로는 경쟁력에서 탈락되고 말 것이기 때문이다.

따라서 본 연구에서는 경쟁력 있는 육묘의 생산 기술을 개발하고자, 보유하고 있는 식물생장 촉진 미생물 중 우수한 미생물을 2차 선발하여 작물에 처리함으로써 작물에서의 성장촉진효과와 미생물에 의해 작물에서 발현하는 PR-protein 활성을 규명하고, 또한 유전자 조작을 이용한 식물생장촉진 미생물의 형광 표지를 실시하여 접종된 미생물의 작물 내 분포 및 생존율을 기내 실험을 통해 확인하고자 한다. 또한 온실 실험에서는 선발된 토착미생물의 접종이 PR 유전자 및 병원균방어효소 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하고자 한다. 최종적으로 실제 육묘산업에서 활용 가능한 육묘접종체계를 확립함으로써, 토착미생물 (*Methylobacterium*) 접종 기술을 육묘생산 과정에 응용하여 비료의 효율이 증대되고 내병성이 강화된 육묘생산 기술을 개발하고자 한다.

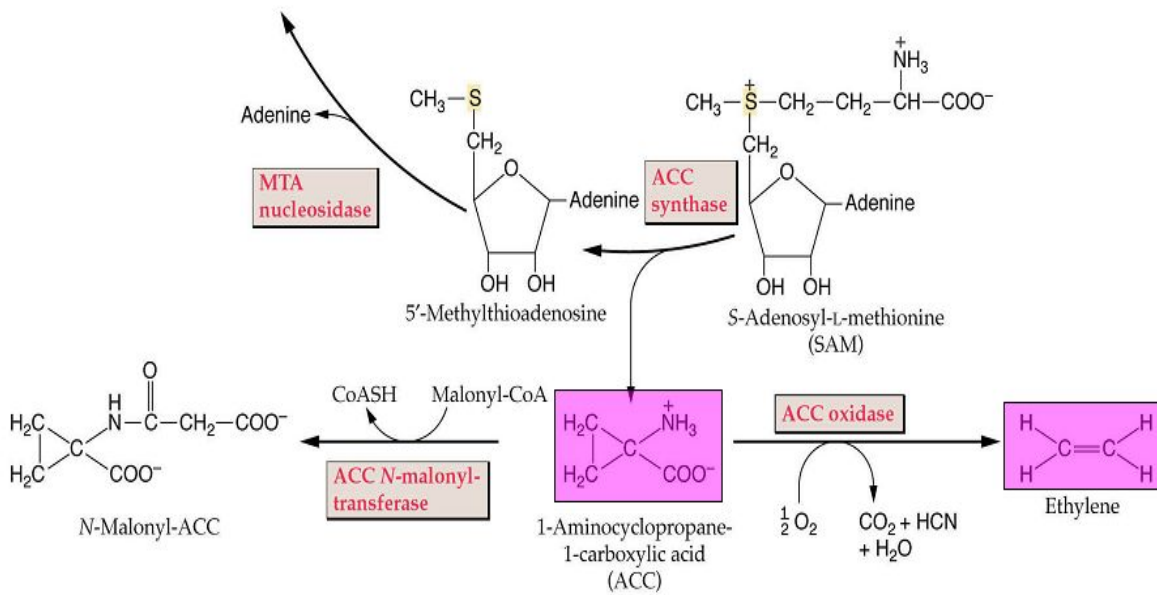


Fig. 3. 에틸렌 생합성 pathway

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

플러그묘 생산기술은 1960년 미국에서 개발되어 1965년에 묘목생산에 실용화되었으며, 1975년에 채소 및 화훼묘 생산에 이용되기 시작하면서 본격적으로 플러그묘가 생산, 판매되기 시작하였다. 1980년대에 들어서 플러그묘의 이용이 급격히 증가하였으며, 1980년대 후반에는 유럽 및 일본에 보급되었다. 우리나라는 농업기계화연구소 (현, 농촌진흥청 농업공학연구소)에서 1990년에 시험적으로 도입하였고, 1992년 생산, 판매하기 시작하였다. 이후 소비의 연중화에 따른 시설면적 확대 및 연중 묘 생산 증가, 농업 노동력의 감소 등 채소생산여건의 변화에 따라 채소 플러그묘를 전문적으로 생산하는 공정육묘장의 수가 지속적으로 증가하여, 2004년을 기준으로 138개소, 면적은 74 ha에 이르고 있다 (Fig. 1). 이렇게 일정 규모를 갖춘 공정육묘장의 숫자도 2000년 80개에서 현재는 150여개에 이를 정도로 급속히 발달하였는데 이는 농업선진국이라 할 수 있는 이웃 일본에 비해서도 오히려 앞서 있다고 할 수 있으며, 현재 우리나라 채소 작물의 육묘량은 연 190억 주에 이르고 이중 약 5억 주는 접목묘로 생산되는 것으로 추정하고 있으며 거의 대부분의 채소에서 작물 특성에 맞는 고유의 육묘관리가 이루어지고 있다.

이러한 작물 생육을 위한 미생물제제가 국외에서는 생물비료로 이해되고 있으나 우리나라에서는 이에 대한 개념정의는 아직 명확하지 않다. 미생물제제에는 작물의 생산성 향상 및 양분을 공급하는 질소고정균과 균근균, 토양식물양분을 가용화하는 질산화작용저해 미생물 혹은 인산가용균 그리고 토양의 물리적 특성을 개량하는 미세조류 등의 고유 미생물 또는 유전자 전환 미생물이 이용되고 있다. 이와 같이 미생물 제제에는 활성성분으로서 살아있는 미생물이 함유되어 있기 때문에 미생물비료 혹은 확대하여 생물비료 (biofertilizer)로 받아들여지고 있는 것이다.

따라서 이러한 미생물을 이용한 비효 증진 방법을 개발하려는 시도는 부단히 이루어져 왔다. 미국 Seattle에 있는 SCT tech에서 식물생육촉진미생물을 이용한 다양한 비료를 개발하여 농업은 물론 골프장, 정원용 비료로 개발하여 시판하고 있으며, 브라질에서 최근 질소고정균을 이용하여 Bio-ethanol 생산을 위한 사탕수수 및 옥수수용 미생물 제제 개발 및 실용화 하였다. 또한 인도, 이집트 및 필리핀에서도 화학비료를 대체하는 미생물 생물비료가 질소고정균, 인산용화균 및 광합성 세균을 이용하여 제조되어 실용화 되어있다. 최근 호주 및 미국에서 Azotobacter 및 Methylobacteria를 이용하여 벼 및 각종 엽채류 및 과채류용 생물비료가 생산, 판매되고 있는 것을 보면 미생물비료 개발 및 보급 확대에 대한 국제적인 인식 확산되고 있는 것이 사실이다. 하지만 이중 미생물은 토양에 접종 후 생존하기가 매우 어려우므로 국내에서 재배되는 작물의 근권 및 엽권에 서식하는 미생물을 선발 이용하는 것이 바람직하며 우리나라

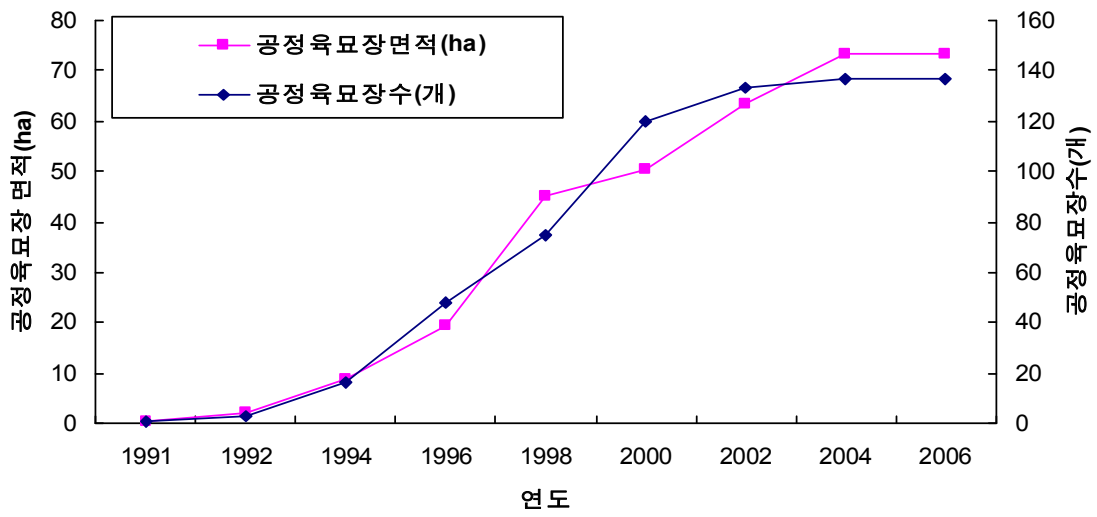


Fig. 1. 연도별 공정육묘장의 수 및 면적 변화



토양에서도 이미 많은 고기능성 미생물이 보고되고 있는 현실에 비추어 국내토양에 적합한 우리 균주를 이용하는 것이 효율적이다. 국내의 경우 토양미생물제제 비료 생산업체와 품목 수는 농업과학기술원 자체 조사된 자료에 따르면 123업체로 조사되었다 (2005년 기준). 이렇게 생산되고 있는 토양미생물제제비료의 연간 생산량은 약 2,930톤으로 비교적 전국적으로 생산되고 있으며 대전, 경기, 충북, 충남, 경북, 경남지역에서 다른 지역에 비해서 많은 수의 업체가 분포하고 있다. 하지만 이 중 현재 유통 중인 여러 미생물비료의 효과 재현 실패로 인하여 농가의 불신을 초래하고 있다.

또한 생물비료에는 작물의 내병성 강화 미생물, 미량원소 공급 미생물, 식물생육조절 미생물 (growth regulator) 혹은 작물생육촉진 근권미생물 (plant growing-promoting rhizobacteria) 등이 포함되어야 하는데, 그 이유는 생물비료가 화학물질을 대신하여 식물의 생육을 돕기 위해 사용되는 생물질이기 때문이다. 이와 같이 생물비료가 용도의 다양성과 치용성에 의해 많은 기대를 모으고 있지만, 생물비료가 가지고 있는 가장 큰 어려운 점은 화학물질에 비해 효과가 미흡하거나 속효성이 아니라는 것이다. 이러한 문제점을 해결하여 미생물의 기능을 높이고자 고유서식미생물과 경합하여 생존할 수 있을 뿐만 아니라 환경에 순기능을 제공하는 미지의 유효 미생물 혹은 형질전환 미생물의 도입이 적극 고려되고 있으며, 그에 더하여 개발된 고기능 미생물비료의 활용을 증진시킬 수 있는 기술의 개발 또한 매우 시급하다. 그러므로 이 분야는 생물공학을 이용하여 연구되어야 할 중요한 영역이라 할 수 있다.

## 제 3 장 연구개발내용 및 결과

### 제 1 절 다기능 식물생장촉진 미생물의 효능 규명 및 육묘 이용 방법 개발

#### 1. *Methylobacterium*의 1차 선발

본 실험실에서 전국 4개 지역 [밀양 (영남농업시험장), 익산 (호남농업시험장), 청원 (충북농업기술원), 수원 (농업과학기술원)] 벼 포장의 근권 및 엽권에서 분리하여 보유하고 있는 식물생장촉진 미생물을 대상으로 하여 식물생장촉진능을 측정하고 이 중 우수한 미생물로 판단되는 11개 균주를 선발하였다 (Table 1).

#### 2. *Methylobacterium*의 식물생장촉진능 확인

1차 선발한 *Methylobacterium*의 정량적 식물생장촉진능을 확인하기 위하여 ACC Deaminase 활성, IAA 생성능, 질소고정능을 측정하였다. 선발 균주의 ACC Deaminase활성은 균주를 30°C AMS 배지에서 배양 후 원심분리하여 균주펠렛을 얻고, pH 7.6의 0.1 M의 Tris buffer를 이용하여 2번 세척하였다. ACC deaminase activity를 유도하기 위해서, 3 mM의 ACC가 함유된 5 ml의 AMS 배지에서 현탁하고, 30°C의 shaking water bath에서 18 h동안 배양 하였다. pH 8.0의 0.1 M의 tris HCl를 이용하여 두 번 세척하고, AMS 배지에 재현탁 시킨 후 200  $\mu$ l의 박테리아 용액과 10  $\mu$ l의 toluene을 넣고 잘 섞어준 후, 그 중 50  $\mu$ l를 취하여 500 mM의 ACC 5  $\mu$ l와 혼합하였다. ACC deaminase 분석은 Honma and Shimomura (1978)의 방법에 따라 ACC deamination에 의한  $\alpha$ -ketpbutyrate의 생산된 양을 측정하였다.

선발 균주의 IAA의 생성능 측정은 Bric et al.의 방법에 따라 균주를 50 ml의 AMS 배지에서 배양 후, 100  $\mu$ l의 현탁액을 50 ml의 minimal media (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.025 g; and FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.002 g L<sup>-1</sup>; pH 7.2)에 0.5% methanol과 L-tryptophan이 첨가된 배지에서 7일 동안 배양 하였다. 배양 후 원심분리 (10000 rpm, 15 min)하여 얻은 2 ml의 상등액을 10 mM orthophosphoric acid 100  $\mu$ l와 4 ml의 salkowski's reagent (1 ml of 0.5 M FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O in 50 ml of 35% HClO<sub>4</sub>)를 넣은 튜브에 옮겨 실온에서 25분간 배양 하고, Spectrophotometer를 이용하여 530 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

Table 1. 벼의 근권 및 엽권에서 분리한 Methylo trophic bacteria 리스트 및 식물생장촉진능

Isolates	GeneBank Accession numbers	Nearest phylogenetic neighbour	IAA	Siderophore	ACCD
CBMB12	EF126740	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	+	+	+
CBMB13	EF126744	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	+	-	-
CBMB15	EF126745	<i>Methylobacterium</i> sp.	+	+	+
CBMB17	EF126752	<i>Methylobacterium</i> sp.	-	-	+
CBMB19	EF126754	<i>Methylobacterium</i> sp.	+	-	-
CBMB20	AY683045	<i>Methylobacterium oryzae</i>	+	-	+
CBMB27	EF126746	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>	+	-	-
CBMB31	EF126747	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	+	-	+
CBMB35	EF126741	<i>Methylobacterium</i> sp.	+	-	+
CBMB37	EF126742	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	+	-	+
CBMB38	EF165044	<i>Methylobacterium</i> sp.	+	-	+
CBMB45	EF126749	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	+	-	+
CBMB46	EF126743	<i>Methylobacterium</i> sp.	+	-	+
CBMB48	EF126750	<i>Methylobacterium</i> sp.	-	-	-
CBMB50	EF126751	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	-	-	-
CBMB53	EF165047	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	+	-	-
CBMB110	AY683046	<i>Methylobacterium oryzae</i>	+	-	+
CBMB120	AY683047	<i>Methylobacterium suomiense</i>	+	-	-
CBMB130	AY683048	<i>Methylobacterium rhodinum</i>	+	-	-

질소고정능 측정은 *Methylobacterium*을 N-free 액체배지에 접종하여 대수신장기까지 배양한 후 sealing 하였다. Sealing 되어진 배지에서 10% 공기를 뽑아낸 후, 10%의 아세틸렌가스를 주입한 후, 다시 4시간동안 배양하였다. 배양된 배지에서 30분 ~ 4시간동안 환원되어 나오는 에틸렌가스를 가스크로마토그래피로 정량한 후, 배지 내 균체생체량은 단백질 분석법을 이용하여 계산하였다.

건진육묘 생산을 위한 1차 선발 *Methylobacterium*의 정량적 식물생장촉진능을 확인하기 위하여 ACC deaminase 활성, IAA 생성능, 질소고정능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 선발 균주들의 ACC deaminase 활성은 육묘의 에틸렌 방출에 관여하는 것으로서, 에틸렌의 방출은 병원균의 공격에 대한 초기 반응이고, 식물과 미생물간의 상호작용 시 방어 작용을 위한 신호로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 ACC deaminase 활성을 갖는 *Methylobacterium*은 에틸렌 생합성 전구체인 ACC를 가수분해하여 스트레스 에틸렌 수준을 감소시킬 뿐 아니라 작물이 성장하는데 필요한 수준의 에틸렌을 유지하여 질병의 징후가 나타나지 않으면서도 작물이 잘 성장하도록 한다고 알려져 있다. 선발한 *Methylobacterium* 균주들은 모두 ACC deaminase 활성 나타냈으며, 그 중 CBMB46, CBMB20, CBMB110 균주가 233.5 ~ 494.7 nmol alpha-KB/mg protein/h의 범위로 높은 활성을 나타냈다. 하지만 CBMB38, CBMB45 균주는 활성이 11.1, 58.8 nmol alpha-KB/mg protein/h로 낮은 활성을 보여 향후 연구에서 제외하였다. 이 후 ACC deaminase 활성이 높은 9개 균주를 선발하여 식물생장 물질인 IAA와 질소고정능을 확인하였다. IAA 생성능 또한 선발한 9개 균주 모두 나타났으며, 그 중 CBMB27과 CBMB31균주에서 각각 7.05와 6.15  $\mu\text{g/ml}$ 로 높은 IAA 생성능을 확인 할 수 있었다. 또한 대기 중의  $\text{N}_2$  가스를 작물이 이용할 수 있는 형태로 전환시켜주는 질소고정능을 측정한 결과, CBMB110과 CBMB20 균주에서 각각 30.1과 19.9 nmol  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{mg protein/h}$ 로 높은 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 선발한 9개 *Methylobacterium* 균주들을 향후 연구에 사용하였다.

### 3. *Methylobacterium* 접종 시 육묘의 뿌리 신장 및 건물중 측정

선발한 *Methylobacterium* 균주 접종 시 작물의 뿌리 신장 및 건물중에 미치는 효과를 알아보기 위하여 pouch 실험을 수행하였다. 먼저 0.5% succinate를 첨가한 AMS 배지를 이용하여 *Methylobacterium* 균주를 배양하였다. 균주를 배양한 후 원심 분리하여 박테리아 cell pellet을 얻고, 다시 0.03 M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 희석하여 ( $\text{OD}_{600} = 0.8$ ) 접종 원을 준비하였다. 작물의 종자는 표면을 70% 에탄올과 NaOCl을 이용하여 표면을 멸균 시키고, 멸균한 씨앗을 5회 이상 멸균수에 세척한 후 *Methylobacterium* 균주의 세포현탁액에 담가 shaker에서 4시간 동안 균

Table 2. 1차 선발한 Methylo trophic bacteria의 ACC deaminase, IAA, ARA 활성검정

Isolates	Nearest phylogenetic neighbour	ACC deaminase <sup>a</sup>	IAA <sup>b</sup>	ARA <sup>c</sup>
CBMB12	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	87.9±9.2	3.10±0.4	6.8±0.2
CBMB15	<i>Methylobacterium</i> sp.	87.6±26.2	5.80±0.7	8.8±0.4
CBMB17	<i>Methylobacterium</i> sp.	187.1±29.4	5.81±1.2	10.4±1.3
CBMB20	<i>Methylobacterium oryzae</i>	306.3±4.3	5.30±0.5	19.9±0.8
CBMB27	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>	93.2±22.9	7.05±0.3	7.2±0.2
CBMB31	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	84.8±2.8	6.15±0.2	8.4±0.4
CBMB35	<i>Methylobacterium</i> sp.	151.9±31.4	4.98±0.2	8.1±0.9
CBMB38	<i>Methylobacterium</i> sp.	11.1±1.2	ND	ND
CBMB45	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	58.8±6.6	ND	ND
CBMB46	<i>Methylobacterium</i> sp.	494.7±51.7	3.70±0.4	5.2±1.0
CBMB110	<i>Methylobacterium oryzae</i>	233.5±15.5	5.93±0.7	30.1±1.4

<sup>a</sup> nmol alpha-KB/mg protein/h; <sup>b</sup> µg/ml; <sup>c</sup> nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg protein/h

Data are presented as mean±standard error (SE) of three replications. ND = Not determined.

주를 접종하였다. 균주 처리 씨앗은 무균의 growth pouches (CYGTM seed germination pouch, Mega International Manufacturer, USA)에 넣고 growth chamber에서 광과 암의 조건을 14/10시간 씩 주어  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 이후 이틀 안에 발아에 실패한 종자는 후에 발아가 되었어도 측정하지 않고, 처리 작물에 따라 다른 날짜로 뿌리의 길이와 건물중을 측정하였다.

선발한 *Methylobacterium* 균주 접종 시 무균 조건의 pouch에서 재배한 작물의 뿌리신장에 미치는 영향을 확인하였다 (Table 3). 그 결과 토마토의 경우 CBMB46을 제외한 모든 균주 접종 처리구에서 대조구 대비 높은 뿌리신장을 확인 할 수 있었다. 특히 CBMB20 접종 처리구에서 10.8 cm로 가장 높은 뿌리신장을 보였고, 이는 대조군 대비 31.4%의 뿌리신장 증가율로 유의성 있는 증진효과를 확인 할 수 있었다. CBMB12, CBMB31 또한 각각 21.4%, 20.5%의 증가율로 그 뒤를 따랐다. *Methylobacterium* 균주 접종에 따른 고추의 뿌리신장은 모든 균주 처리구에서 대조구에 비해 높은 뿌리신장을 나타냈다. 가장 높은 뿌리신장을 나타낸 처리구는 CBMB27로서 27.1%의 대조구 대비 증가율을 나타냈으며, 그 뒤로 CBMB17, CBMB110, CBMB15가 높은 고추 뿌리신장 촉진 효과를 확인하였다. 마지막으로 카놀라의 뿌리신장 촉진 효과는 CBMB15가 9.9 cm로 가장 높은 뿌리신장을 나타냈으며, 이는 대조구 대비 22.1%의 증가율을 나타낸 것이었다. CBMB31, CBMB12, CBMB20 또한 각각 13.2%, 8.4%, 8.2%의 증가율로 그 뒤를 따랐다. 무균 조건의 pouch에서 재배한 작물의 뿌리신장은 작물 마다 약간의 차이는 보이지만 모든 *Methylobacterium* 균주 접종 처리구에서 대조구 대비 뿌리신장 증진 효과가 있는 것을 확인 할 수 있었다.

선발한 *Methylobacterium* 균주 접종 시 무균 조건의 pouch에서 재배한 작물의 건물중에 미치는 영향을 확인한 결과 토마토의 경우 CBMB46을 제외한 모든 균주 접종 처리구에서 대조구 대비 높은 건물중을 확인 할 수 있었다 (Table 4). 특히 CBMB20 접종 처리구에서 2.51 mg/plant로 가장 높은 건물중을 보였고, 이는 대조군 대비 61.9%의 건물중 증가율로 유의성 있는 증진효과를 확인 할 수 있었다. CBMB31, CBMB12 또한 각각 44.5%, 37.4%의 증가율로 그 뒤를 따랐다. *Methylobacterium* 균주 접종에 따른 고추의 건물중은 모든 균주 처리구에서 대조구에 비해 높은 건물중을 나타냈다. 그중 CBMB15 균주 접종 처리구에서 대조구 대비 22%의 증가율로 가장 높은 성장촉진을 나타냈으며, 그 뒤로 CBMB27, CBMB20, CBMB12의 순서로 각각 19.3%, 18.4%, 16.7%의 증가율을 나타냈다. 카놀라의 건물중은 CBMB20의 처리구에서 대조구 대비 26.6% 증가율로 가장 높았으며, CBMB110, CBMB35, CBMB27이 그 뒤를 따랐다. 하지만 CBMB12 처리구에서는 대조구보다 낮은 건물중을 확인하였다. Pouch에서 재배한 유묘의 건물중은 CBMB20 균주 처리구에서 유의성 있는 촉진 효과를 확인 할 수 있었으나, CBMB17, CBMB46 균주 처리구에서는 두드러지는 건물중 증진 효과를 확인 할 수 없었다.

Table 3. *Methylobacterium* 접종이 파우치에서 재배한 토마토, 고추, 카놀라의 뿌리신장에 미치는 효과

Treatment	Tomato		Red pepper		Canola	
	Root elongation (cm)	Increase over control (%)	Root elongation (cm)	Increase over control (%)	Root elongation (cm)	Increase over control (%)
Control	8.2 ± 0.6cd	-	7.5 ± 1.1b	-	8.3 ± 0.3bc	-
CBMB12	10.0 ± 0.9ab	21.4	8.9 ± 0.5ab	19.2	8.9 ± 0.4abc	8.4
CBMB15	8.6 ± 0.4bcd	4.7	9.1 ± 0.3ab	20.8	9.9 ± 0.3a	22.1
CBMB17	9.6 ± 0.2abc	15.9	9.1 ± 0.1ab	21.2	8.2 ± 0.1bc	-0.5
CBMB20	10.8 ± 0.1a	31.4	8.3 ± 0.2ab	11.1	8.9 ± 0.3abc	8.2
CBMB27	8.3 ± 1.0bcd	0.5	9.5 ± 0.7a	27.1	8.4 ± 0.4bc	1.8
CBMB31	9.9 ± 0.4abc	20.5	8.7 ± 1.1ab	15.7	9.3 ± 1.1ab	13.2
CBMB35	8.5 ± 0.7bcd	3.5	7.9 ± 0.3ab	4.7	7.7 ± 0.6c	-7.3
CBMB46	7.8 ± 0.5d	-5.7	8.6 ± 0.2ab	14.0	8.8 ± 0.5abc	6.9
CBMB110	9.4 ± 0.3abcd	14.1	9.1 ± 0.4ab	20.8	7.8 ± 0.3c	-6.1
LSD ( $P \leq 0.05$ )	1.7		1.7		1.5	

Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

Table 4. *Methylobacterium* 접종이 파우치에서 재배한 토마토, 고추, 카놀라의 건물중에 미치는 효과

Treatment	Tomato		Red pepper		Canola	
	Dry weight (mg/plant)	Increase over control (%)	Dry weight (mg/plant)	Increase over control (%)	Dry weight (mg/plant)	Increase over control (%)
Control	1.54 ± 0.12f	-	3.1 ± 0.14c	-	2.48 ± 0.02cd	-
CBMB12	2.13 ± 0.1cb	37.4	3.6 ± 0.08ab	16.7	2.34 ± 0.07d	-5.6
CBMB15	1.96 ± 0.12bcd	26.5	3.7 ± 0.09a	22	2.79 ± 0.11abc	12.5
CBMB17	1.93 ± 0.08bcd	24.5	3.4 ± 0.33abc	12.5	2.67 ± 0.09bcd	7.7
CBMB20	2.51 ± 0.08a	61.9	3.6 ± 0.09ab	18.4	3.14 ± 0.34a	26.6
CBMB27	1.86 ± 0.11cde	20	3.6 ± 0.06ab	19.3	3.01 ± 0.15ab	21.4
CBMB31	2.24 ± 0.16ab	44.5	3.4 ± 0.09abc	11.5	2.87 ± 0.15ab	15.7
CBMB35	1.67 ± 0.14de	7.7	3.3 ± 0.03bc	8.2	3.11 ± 0.07a	25.4
CBMB46	1.27 ± 0.07f	-18.1	3.3 ± 0.01bc	8.9	2.91 ± 0.03ab	17.3
CBMB110	1.91 ± 0.18bcde	23.2	3.4 ± 0.14abc	12.1	3.11 ± 0.07a	25.4
LSD ( $P \leq 0.05$ )	0.37		0.4		0.4	

Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.



#### 4. *Methylobacterium* 접종 따른 유묘의 ethylene 발생량

Growth pouch에서 재배한 카놀라와 고추의 *Methylobacterium* 접종 따른 유묘의 ethylene 발생량을 측정하였다. Ethylene 발생량 측정을 위해 작물별 생육량을 측정한 pouch에서 작물을 수확하여 생체중 측정 후 120 ml GC bottle에 넣는다. Rubber serum stopper로 입구를 막은 후 4시간 정치시킨다. 정치 후 1 ml gas를 head space에서 채취하여 Gas Chromatography (DS 6200, Donam Instruments Inc.)을 이용해 ethylene을 측정하였다. ethylene을 측정 후 각 유묘의 건물중을 측정하였다.

식물의 ethylene 방출은 스트레스에 대한 초기 반응으로서, *Methylobacterium* 접종 따른 카놀라와 고추의 ethylene 발생량을 측정하였다. 카놀라유묘의 *Methylobacterium* 접종 처리별 ethylene 발생량은 CBMB17을 제외한 모든 접종 처리구에서 대보구 대비 낮은 ethylene 발생량을 나타냈다 (Fig. 1). 특히 카놀라에서는 CBMB20 처리구 (26.4 pmol ethylene/g dry weight of plant/h)가 가장 낮은 ethylene 발생량을 나타냈으며, 고추에서는 CBMB35와 CBMB110 처리구 (각각 8.0, 8.1 pmol ethylene/g dry weight of plant/h)에서 가장 낮았다. 또한 각각 작물 처리구의 ethylene 발생량 상관분석을 통하여 처리별 경향을 알아본 결과, 높은 상관성 ( $R^2 = 0.96$ )을 확인 할 수 있었다.

#### 5. *Methylobacterium* 접종에 따른 토마토, 고추 및 카놀라의 생육 증진 효과

Pouch 실험을 통해 선발한 *Methylobacterium* 접종에 따른 작물의 생육 증진 효과를 규명 및 건전육묘 생산을 위한 미생물 선발을 위해 온실실험을 수행하였다. 공시작물은 토마토, 고추, 카놀라를 선택하였다. 먼저 0.5% succinate를 첨가한 AMS 배지를 이용하여 *Methylobacterium* 7종 (CBMB12, CBMB17, CBMB20, CBMB27, CBMB31, CBMB35, CBMB110)을 배양하였다. 균주를 배양한 후 원심 분리하여 박테리아 cell pellet을 얻고, 다시 0.03M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 희석하여( $OD_{600} = 0.8$ ) 접종 원을 준비하였다. 토마토와 고추 종자는 표면을 70% 에탄올과 NaOCl을 이용하여 표면을 멸균 시켰다. 멸균한 종자를 5회 이상 멸균수에 세척한 후 *Methylobacterium*의 세포현탁액에 담가 shaker에서 4시간 동안 균주를 접종하였다. 접종된 토마토와 고추 종자는 상토가 담긴 50구 플러그 육묘 트레이에 파종하여 Growth chamber에서 광과 암 조건 (28 °C/ 22 °C)으로 14 h/ 10 h 재배하였다. 파종 21일 후 300 ml 부피의 pot로 이식하였고, 온실로 옮겨 재배하였다. Pot 이식 후 파종 23, 30, 37, 44일째 균주 현탁액 ( $10^8$  cfu/ml)을 처리하였다. 파종 45일과 55일째 각각 작물의 줄기 신장을 측정하였으며, 58일째 수확하여, 뿌리 길이와 뿌리, 줄기의 건물중을 측정하였다.

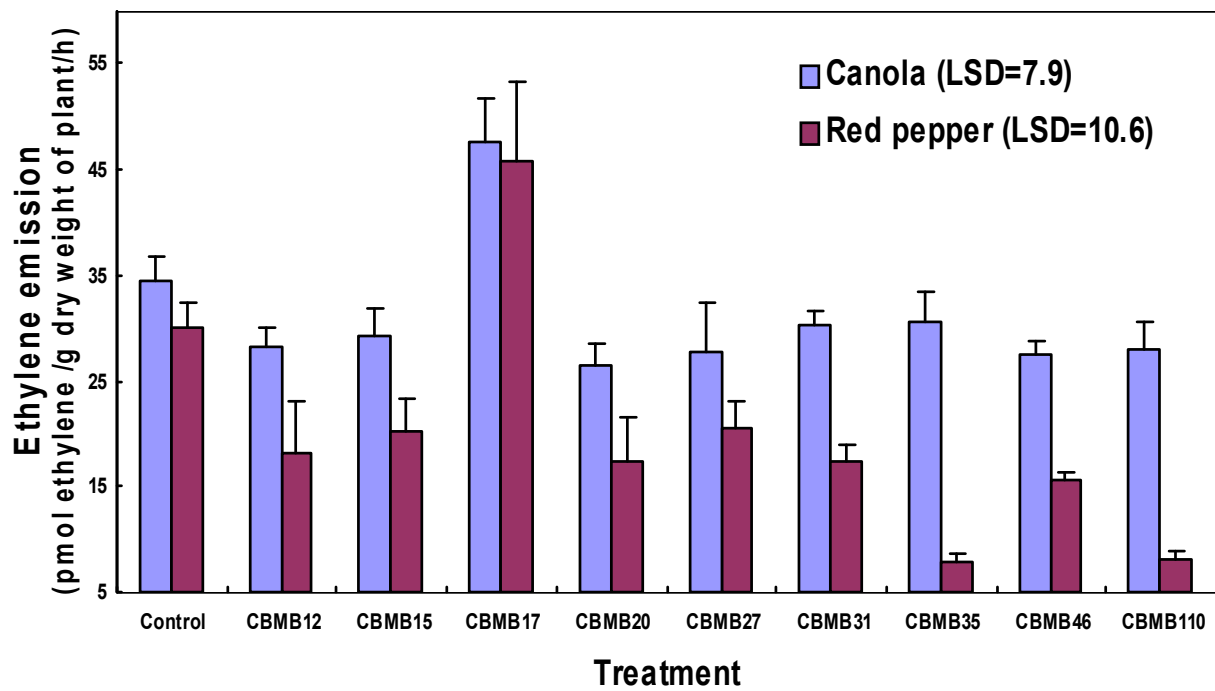


Fig. 1. *Methylobacterium* 접종이 파우치에서 재배한 고추, 카놀라의 에틸렌 발생량에 미치는 효과. Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

또한 접종된 카놀라 종자는 상토가 담긴 50구 플러그 육묘 트레이에 파종하여 Growth chamber에서 광과 암 조건 (28 °C/ 22 °C)으로 14 h/ 10 h 재배하였다. 파종 9일 후 300 ml 부피의 pot로 이식하였고, 온실로 옮겨 재배하였다. Pot 이식 후 파종 12, 19, 26, 34일 째 균주 현탁액 ( $10^8$  cfu/ml)을 처리하였으며, 파종 40일째 수확하여, 뿌리 길이와 뿌리, 줄기의 건물중을 측정하였다.

각각 선발한 *Methylobacterium* 균주 접종에 의한 토마토와 고추의 지상부 길이를 측정할 결과 대부분의 균주 처리구에서 대조구 대비 높은 길이를 확인 할 수 있었다 (Fig 2, 3). 파종 45일째 토마토의 경우 CBMB20 처리구에서 가장 높은 줄기 성장을 볼 수 있었으며, 파종 55일 째 토마토의 지상부 생장은 CBMB27 처리구에서 유의성 있는 증진효과를 확인 할 수 있었다 (Fig. 4). 이와 유사하게 고추의 지상부 생육 또한 파종 45일째 CBMB27 처리구에서 가장 높게 나타났으며, 파종 55일째 지상부 생육 또한 마찬가지로 CBMB27 균주 처리구가 가장 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 5). 이러한 결과를 볼 때 선발한 *Methylobacterium* 균주 중 CBMB27 균주가 토마토와 고추의 지상부 생육에 가장 큰 생육 촉진 효과가 있는 것으로 판명되었다. 하지만 지상부 생육에 있어 토마토에서 CBMB15 균주 처리와 고추에서 CBMB35 균주의 처리는 큰 성장 촉진 효과를 확인 하지 못했다. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 토마토, 고추, 카놀라의 뿌리생장에 미치는 효과를 확인하기 위하여 뿌리의 길이를 측정하였다 (Table 5). 측정된 결과 대부분의 *Methylobacterium* 균주 처리구에서 대조구 대비 증가된 뿌리길이를 확인 할 수 있었다. 토마토에서는 CBMB31, CBMB20, CBMB15 균주 처리구에서 유의성 있는 뿌리생장 증가를 확인 할 수 있었으며, 고추와 카놀라에서는 각각 CBMB20, CBMB27 균주 처리구와 CBMB12, CBMB20 균주 처리구에서 높은 뿌리생장을 보였다. 이를 종합하여 육묘의 뿌리 생장은 CBMB20이 가장 높은 식물생장 촉진을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 작물의 건물중에 미치는 효과를 확인 결과 토마토의 경우 모든 *Methylobacterium* 처리구에서 대조구 보다 높은 건물중을 확인 할 수 있었으며, 그 중 CBMB20 접종 처리구로부터 지상부, 지하부, 총건물중에서 유의성 있는 결과를 확인 할 수 있었다 (Table 6). 고추 건물중은 Table 7에서 보는바와 같이 모든 균주 접종 처리구에서 대조구 대비 높은 건물중 경향을 보였으며, CBMB27 접종 처리구에서 총건물중 3.15 g 으로 유의성 있는 결과를 확인 할 수 있었다. 그 뒤로 CBMB20, CBMB110 접종 처리구에서 높은 건물중을 확인 하였지만, 다른 균주 처리구에 비해 유의성을 띄지는 않았다. 이와 비슷하게 카놀라의 건물중 또한 비슷한 경향을 나타냈다 (Table 8). CBMB20, CBMB35, CBMB12, CBMB17 접종 처리구 순으로 높은 총건물중 을 나타냈으며, 이는 대조구 및 다른 균주 처리구에 비하여 유의성 있는 증가였다. 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 CBMB20 와 CBMB12 균주의 처리가 작물의 건물중에 큰 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

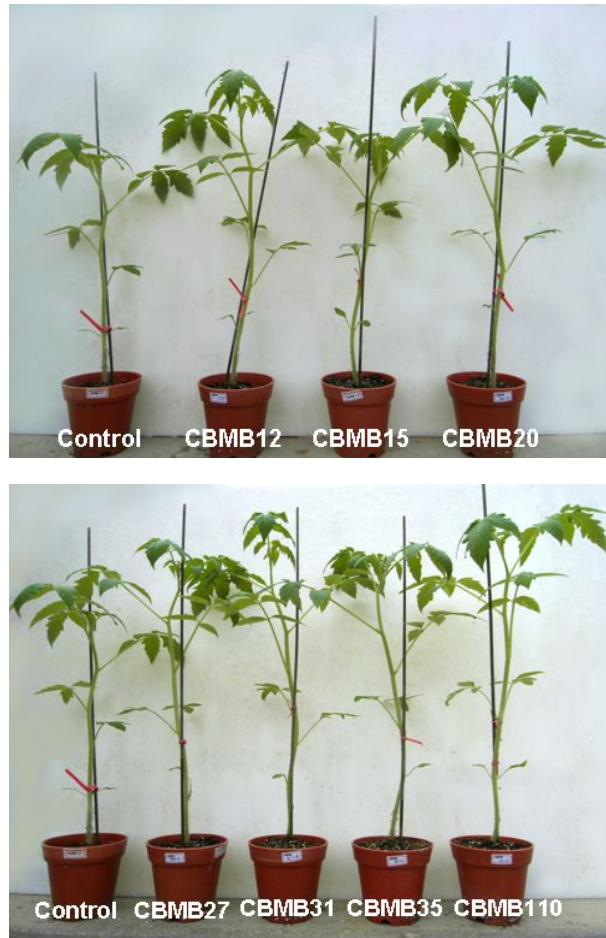


Fig. 2. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 토마토의 생장에 미치는 효과



Fig. 3. 온실조건에서 *Methylobacterium* 집종이 고추의 생장에 미치는 효과

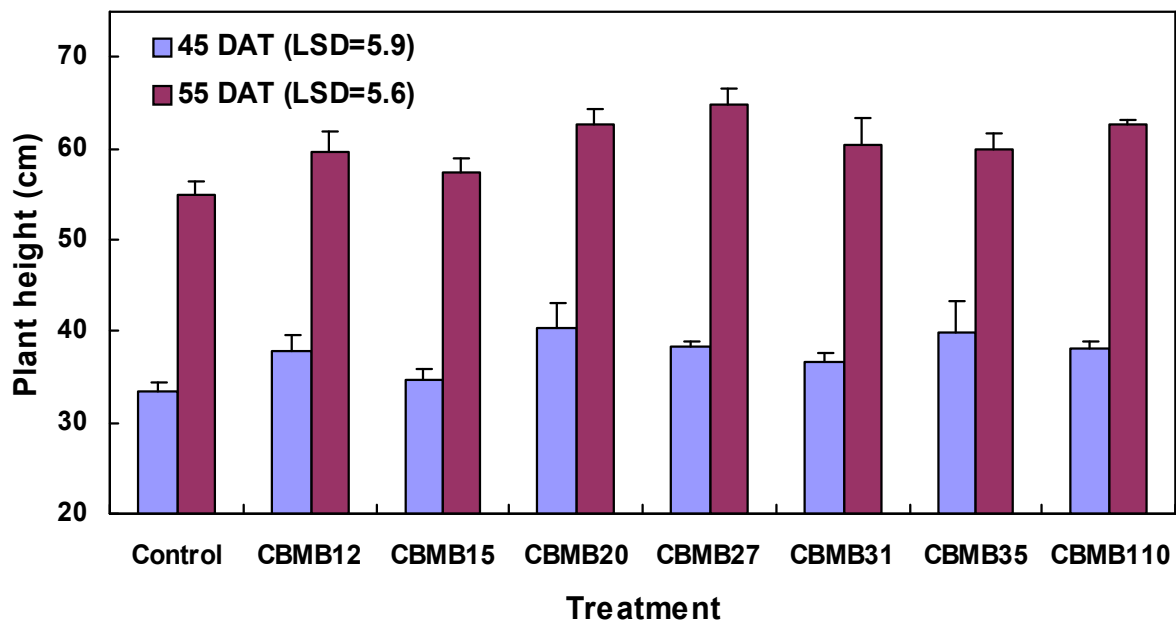


Fig. 4. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 토마토의 지상부 생장에 미치는 효과. Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

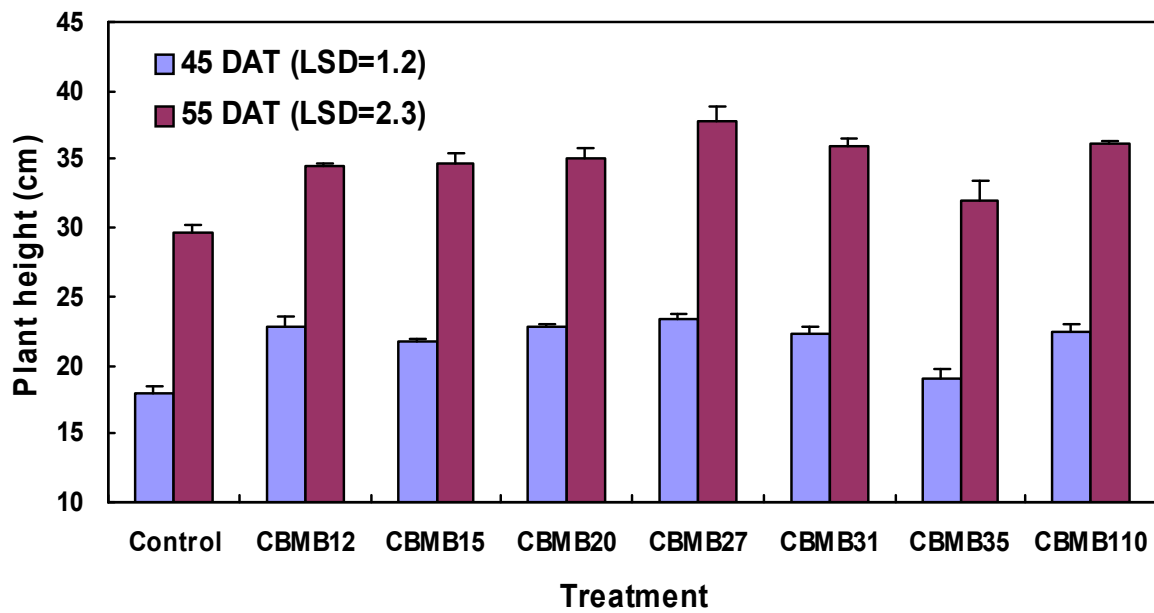


Fig. 5. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 고추의 지상부 생장에 미치는 효과  
 Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

Table 5. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 토마토와 고추의 뿌리생장에 미치는 효과

Treatment	Root length (cm)		
	Tomato	Red pepper	Canola
Control	19.9 ± 0.7bc	15.8 ± 0.2b	10.13 ± 1.70c
CBMB12	20.4 ± 0.5abc	18.3 ± 1.4ab	14.95 ± 1.22a
CBMB15	21.1 ± 0.5ab	16.8 ± 0.6ab	13.33 ± 1.54ab
CBMB20	21.3 ± 0.8ab	18.6 ± 1.5a	13.98 ± 0.69ab
CBMB27	19.0 ± 0.5c	18.4 ± 1.2ab	12.68 ± 1.01abc
CBMB31	22.0 ± 0.3a	17.7 ± 1.0ab	11.50 ± 0.87bc
CBMB35	20.3 ± 0.4abc	17.9 ± 0.8ab	12.70 ± 0.56abc
CBMB110	20.8 ± 0.9abc	17.9 ± 0.3ab	12.93 ± 0.47abc
LSD ( $P \leq 0.05$ )	1.9	2.7	3.0

Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.



Table 6. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 토마토의 건물중에 미치는 효과

Treatment	Dry weight (g)		
	Shoot	Root	Total
Control	1.64 ± 0.2b	0.19 ± 0.02bc	1.83 ± 0.11c
CBMB12	1.93 ± 0.2a	0.22 ± 0.01ab	2.16 ± 0.16ab
CBMB15	1.80 ± 0.01ab	0.20 ± 0.01bc	2.00 ± 0.02bc
CBMB20	2.06 ± 0.2a	0.24 ± 0.01a	2.29 ± 0.15a
CBMB27	1.83 ± 0.04ab	0.22 ± 0.02ab	2.06 ± 0.02abc
CBMB31	1.91 ± 0.03ab	0.17 ± 0.01c	2.08 ± 0.04abc
CBMB35	2.03 ± 0.1a	0.22 ± 0.01ab	2.26 ± 0.07ab
CBMB110	1.95 ± 0.1a	0.17 ± 0.01c	2.11 ± 0.06abc
LSD ( $P \leq 0.05$ )	0.3	0.04	0.3

Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

Table 7. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 고추의 건물중에 미치는 효과

Treatment	Dry weight (g)		
	Shoot	Root	Total
Control	1.71 ± 0.1c	0.45 ± 0.05c	2.16 ± 0.08c
CBMB12	2.04 ± 0.1bc	0.56 ± 0.03ab	2.60 ± 0.10b
CBMB15	1.94 ± 0.1bc	0.54 ± 0.04b	2.48 ± 0.08b
CBMB20	2.18 ± 0.2b	0.56 ± 0.04ab	2.74 ± 0.11b
CBMB27	2.53 ± 0.1a	0.62 ± 0.03a	3.15 ± 0.06a
CBMB31	2.07 ± 0.1b	0.57 ± 0.03ab	2.64 ± 0.11b
CBMB35	2.04 ± 0.1bc	0.45 ± 0.05c	2.49 ± 0.14b
CBMB110	2.16 ± 0.1b	0.56 ± 0.01ab	2.71 ± 0.10b
LSD ( $P \leq 0.05$ )	0.3	0.07	0.3

Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

Table 8. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종이 카놀라의 건물중에 미치는 효과

Treatment	Dry weight (g)		
	Shoot	Root	Total
Control	0.62 ± 0.14c	0.064 ± 0.005b	0.68 ± 0.13c
CBMB12	1.07 ± 0.04a	0.077 ± 0.005ab	1.15 ± 0.04a
CBMB15	0.96 ± 0.09ab	0.064 ± 0.012b	1.02 ± 0.08ab
CBMB17	1.01 ± 0.07a	0.102 ± 0.012a	1.11 ± 0.08a
CBMB20	1.14 ± 0.06a	0.112 ± 0.025a	1.25 ± 0.04a
CBMB27	0.91 ± 0.04ab	0.107 ± 0.012a	1.01 ± 0.04ab
CBMB31	0.91 ± 0.16ab	0.092 ± 0.017ab	1.00 ± 0.17ab
CBMB35	1.11 ± 0.03a	0.091 ± 0.009ab	1.20 ± 0.03a
CBMB46	0.72 ± 0.14bc	0.078 ± 0.008ab	0.80 ± 0.14bc
CBMB110	0.93 ± 0.08ab	0.087 ± 0.011ab	1.01 ± 0.08ab
LSD ( $P \leq 0.05$ )	0.29	0.04	0.29

Each values represents of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

## 6. 온실조건에서 *Methylobacterium* 접종에 따른 토마토와 고추 육묘의 에틸렌 발생량

*Methylobacterium* 접종에 따른 토마토와 고추육묘의 ethylene 발생량을 확인하기 위해, 파종 47일째 각 처리구의 토마토와 고추의 잎을 샘플링 하였다. 샘플링한 잎을 120 ml GC bottle에 넣고 Rubber serum stopper로 입구를 막은 후 4시간 정치시킨다. 정치 후 1 ml gas를 head space에서 채취하여 Gas Chromatography (DS 6200, Donam Instruments Inc.)을 이용해 ethylene을 측정하였다. ethylene을 측정 후 각 육묘의 건물중을 측정하였다.

또한 수확일인 파종 58일째 *Methylobacterium* 접종한 작물을 수확하여 500 ml GC bottle에 넣고, rubber serum stopper로 입구를 막는다. 4 시간 정치 후 1 ml gas를 head space에서 채취하여 Gas Chromatography (DS 6200, Donam Instruments Inc.)을 이용하여 ethylene을 측정하였다. 건물중은 ethylene 측정 후 70°C에서 건조하여 건조 무게가 변동이 없을 때까지 측정하였다.

식물의 ethylene 방출은 스트레스에 대한 초기 반응으로서, *Methylobacterium* 접종 따른 토마토와 고추의 ethylene 발생량을 측정하였다. 온실실험 수행 중 토마토와 고추 잎의 ethylene 발생량은 Fig. 6과 같다. 모든 *Methylobacterium* 균주 접종 처리구에서 대조구에 비해 낮은 ethylene 발생량을 나타냈다. 토마토 잎에서는 CBMB20, CBMB27, CBMB15, CBMB110 균주 처리구에서 유의성있는 ethylene 저감을 확인 할 수 있었으며, 고추 잎 또한 CBMB110, CBMB31, CBMB35, CBMB27 접종 처리구 순으로 ethylene 저감을 확인 할 수 있었다.

다음으로 수확 후 전체 식물체의 ethylene 발생량을 측정하였다. 전체 식물체의 ethylene 발생량 결과는 모든 *Methylobacterium* 균주 접종 처리구에서 대조구 대비 확연한 ethylene 저감 효과를 확인 할 수 있었다 (Fig. 7). 토마토에서 *Methylobacterium* 균주 접종 처리구의 ethylene 발생량은 7.2 ~ 12.0 pmol ethylene/g dry weight of plant/h로 24.5 pmol ethylene/g dry weight of plant/h의 ethylene 발생량을 보인 대조구에 비해 매우 낮았으며, 특히 CBMB20, CBMB27, CBMB110 균주 처리구에서 유의성 있는 ethylene 저감을 확인 하였다. 이와 비슷하게 고추 또한 3.5 ~ 13.9 pmol ethylene/g dry weight of plant/h로 31.9 pmol ethylene/g dry weight of plant/h의 ethylene 발생량을 보인 대조구에 비해 매우 낮았으며, 그 중 CBMB20 와 CBMB110 균주 처리구에서 유의성 있는 ethylene 저감을 확인 할 수 있었다. 이는 선발한 *Methylobacterium* 균주의 ACC deaminase 활성에 의해 식물의 스트레스 초기반응인 ethylene의 저감 효과를 가져왔다는 것을 알 수 있었다.

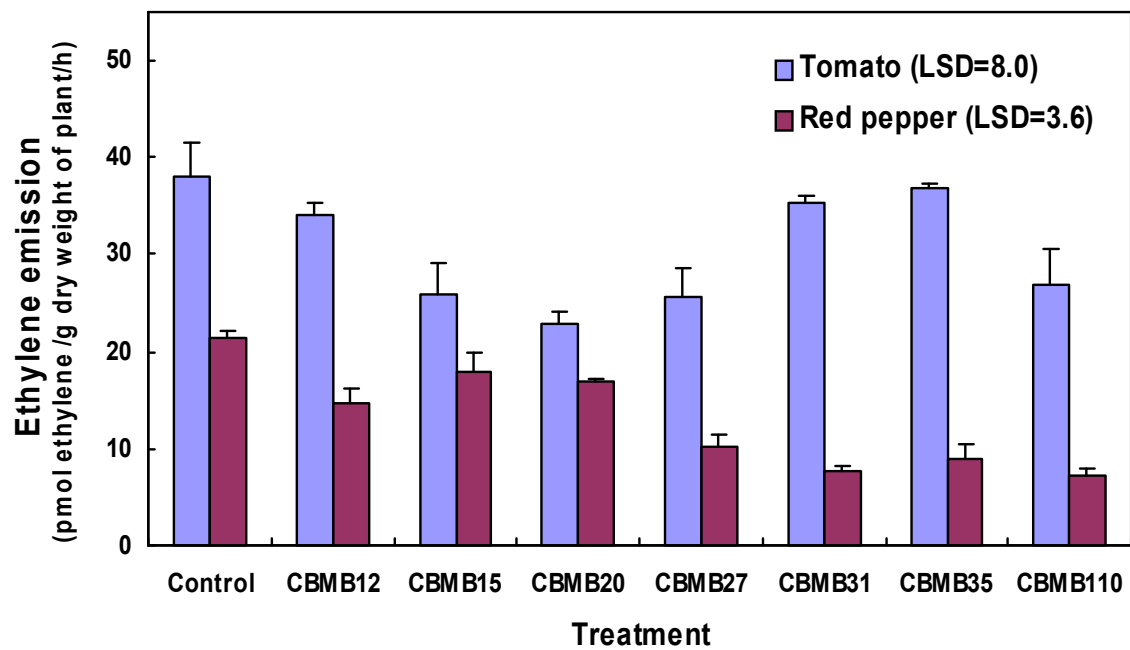


Fig. 6. 온실 조건에서 *Methylobacterium* 집종에 따른 토마토와 고추 잎의 에틸렌 발생량. Each values represents of three replicatates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

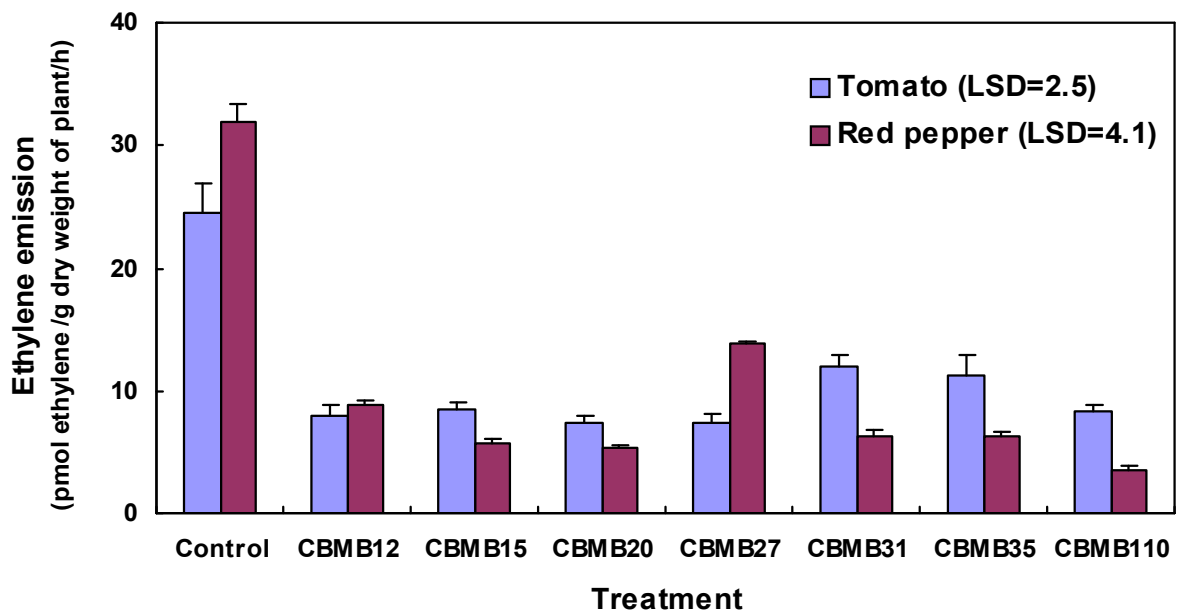


Fig. 7. 온실 조건에서 *Methylobacterium* 접종에 따른 토마토와 고추의 에틸렌 발생량. Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

## 7. *Methylobacterium* 접종에 따른 카놀라 유묘의 에틸렌 발생량

선발한 *Methylobacterium* 균주 접종 시 카놀라 유묘의 에틸렌 발생량에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 먼저 120 ml의 GC bottle에 여과지를 2장 깔고 2 ml의 증류수를 넣어준 뒤 autoclave에서 멸균하였다. 균주준비는 0.5% succinate를 첨가한 AMS 배지를 이용하여 *Methylobacterium* 균주를 배양하였다. 균주를 배양한 후 원심 분리하여 박테리아 cell pellet을 얻고, 다시 0.03 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 희석하여 ( $OD_{600} = 0.8$ ) 접종 원을 준비하였다. 작물의 종자는 표면을 70% 에탄올과 NaOCl을 이용하여 표면을 멸균 시키고, 멸균한 씨앗을 5회 이상 멸균수에 세척한 후 *Methylobacterium* 균주의 세포현탁액에 담가 shaker에서 4 시간 동안 균주를 접종하였다. 그 후 15개의 종자를 각각 멸균된 GC bottle에 파종하고 Growth chamber에서 20°C/25°C, 10/14시간, 밤/낮을 주기로 재배하였다. 발아 3일 후에 2 ml의 질소가 첨가되지 않은 Hoagland's solution과 분리한 균주 ( $OD_{600} = 0.7$ )를 첨가 및 접종하였다. 무처리의 경우 질소가 첨가된 Hoagland's solution을 첨가하였다. 발아 8일 후 2 ml의 염분용액 (0.5%, 1.0%, 1.5% NaCl)을 첨가하였고, 무처리군은 증류수를 첨가하였다. 염분용액의 첨가 4시간 후에는 GC bottle의 입구를 rubber septum으로 막고 6시간 정치 후에 1 ml gas를 GC bottle의 headspace에서 채취하여 Gas Chromatography (DS6200)으로 ethylene을 측정하였다.

선발한 *Methylobacterium* 균주 접종 시 카놀라 유묘의 에틸렌 발생량에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 카놀라는 에틸렌 감수성이 높은 작물로서 *Methylobacterium* 균주의 ACC deaminase에 의하여 제어되는 에틸렌의 발생량을 측정하였다 (Fig. 8). CBMB15, CBMB35, CBMB46 균주 접종 처리구의 경우 대조구에 비해 유의성 있는 에틸렌 저감을 확인 할 수 없었으나, CBMB27, CBMB12, CBMB31, CBMB20 균주 접종 처리구의 경우는 유의성 있는 에틸렌 저감 효과를 볼 수 있었다. 이와 같은 에틸렌 발생량 결과들을 종합하여 볼 때 CBMB20 과 CBMB27 균주가 에틸렌 제어에 있어 가장 큰 효과가 있는 것을 알 수 있었으며, 또한 *Methylobacterium* 균주 처리에 따른 작물별 에틸렌 발생량의 차이는 에틸렌 저항성 유도 기전의 작물별 차이에 의한 것으로 사료된다.

## 8. *Methylobacterium* 접종에 따른 카놀라의 엽록소 함량 측정

온실 조건에서 *Methylobacterium* 접종에 따른 카놀라의 엽록소 함량을 측정하기 위해 SPAD-502 엽록소 측정기를 사용하였다. 이 엽록소 측정기는 2 × 3 mm 면적 잎의 상, 하 양면을 센서로 접촉하여 잎의 부위가 외부와 차단된 상태로 650 nm의 투과율을 reference인 940

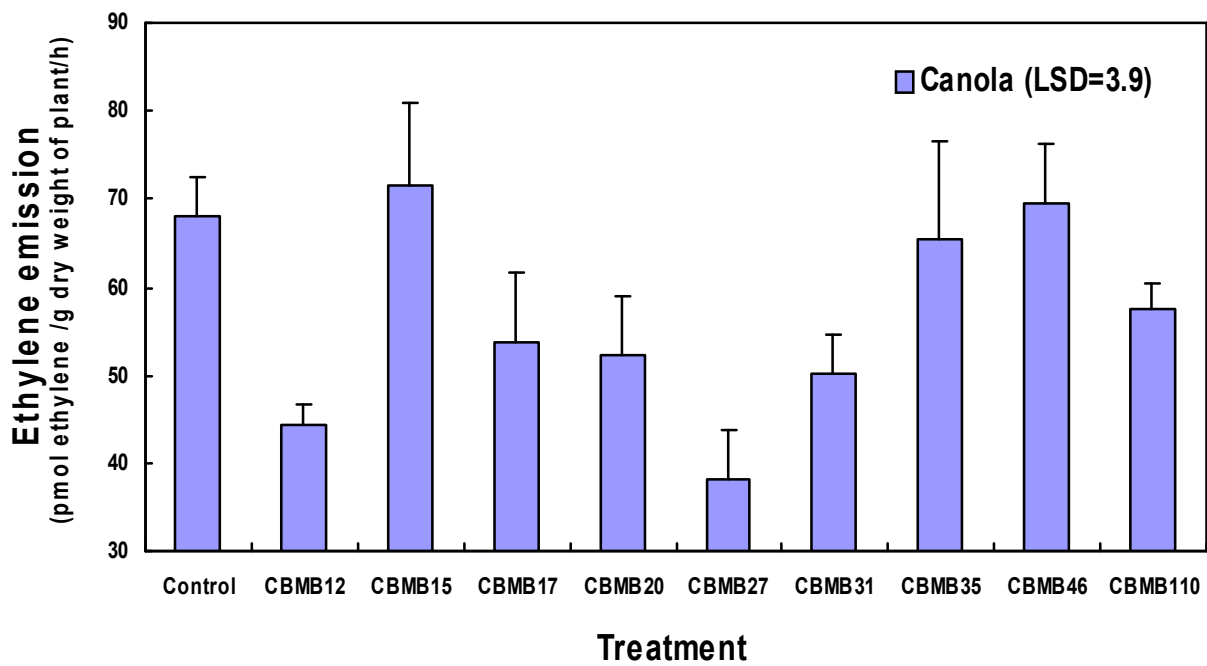


Fig. 8. *Methylobacterium* 접종에 따른 카놀라의 에틸렌 발생량

Each values represents of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.



nm의 투과율에 대한 비율로서 측정하였다. 엽록소 측정은 카놀라 파종 30, 40일째 측정하였으며, 본 실험에서는 반복당 완전엽으로 전개된 상위엽 3개를 선정하여 3회 반복 측정한 평균치를 이용하였다.

온실 조건에서 *Methylobacterium* 접종에 따른 카놀라의 엽록소 함량을 측정하였다. 엽록소 측정은 파종 30, 40일째 측정하였으며, *Methylobacterium* 접종 처리구는 대조구보다 모두 높은 엽록소함량을 확인 할 수 있었다. (Fig. 9). 이중 CBMB110, CBMB15, CBMB27, CBMB20 균주 처리구에서 유의성있는 엽록소 함량을 타나냈다. 또한 대조구와 CBMB46 균주 접종 처리구를 제외한 모든 균주 처리구에서 시간이 지남에 따라 엽록소 함량이 증가하는 경향을 보였다.

## 9. *Methylobacterium* spp.의 2차 선발 및 *gfp* 형질전환 *Methylobacterium* spp.의 성장 패턴 분석

Pouch와 온실실험을 통해 식물생장촉진능과 ACC deaminase 활성화에 의한 식물의 Ethylene 발생 저감효과를 측정하고 이 중 우수한 미생물로 판단되는 6개 균주를 선발하였다. 2차 선발한 균주들은 유전자 조작을 이용한 식물생장촉진 미생물의 형광 표지를 실시하여 접종된 미생물의 작물 내 분포 및 생존율을 기내 실험을 통해 확인하였다. Triparental conjugation을 이용하여 *gfp* 형질전환 시킨 2차 선발 *Methylobacterium* spp.의 형질전환에 따른 안정성을 확인하기 위하여 비 형질전환 균주와의 성장 패턴 비교 실험을 실시하였다. *gfp* 형질전환 및 비 형질전환 *Methylobacterium* spp.의 성장패턴을 확인하기 위하여 항생제를 첨가한 AMS (Ammonium mineral salt) 선택배지와 비 형질전환 균주를 위한 AMS 배지를 각각 준비하였다. 탄소원으로 0.5% succinate를 첨가 하였으며, 선택배지를 위한 항생제는 Kanamycin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Nalidixic acid 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가하였다. 각각의 평판 배지에서 자란 균주를 탄소원으로 0.5% succinate를 첨가한 AMS 액체배지에 접종한 뒤 30°C, 150 rpm으로 균주에 따라 72h ~ 96h 진탕 배양하였다. 배양액은 접종 시점부터 12시간 단위로 OD를 측정하였고, 배양액의 균밀도 측정을 위하여 AMS 배지에 Dot plate법을 이용하여 Colony forming unit (CFU)을 측정하였다.

측정한 결과 2차 선발한 6종의 *Methylobacterium*은 각 균주마다 상이한 성장 패턴과 성장 시간을 나타냈으나, 각각 균주의 *gfp* 형질전환 균주와 비 형질전환 균주간에는 서로 거의 비슷한 OD 경향을 나타냈다. 또한 각 시간별로 측정한 균밀도 역시 거의 비슷한 범위로 나타나는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 10 - 15). 이는 미생물 염색체 내의 *gfp* 형질전환이 2차 선발한 *Methylobacterium*의 성장 패턴에 영향을 주지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다.

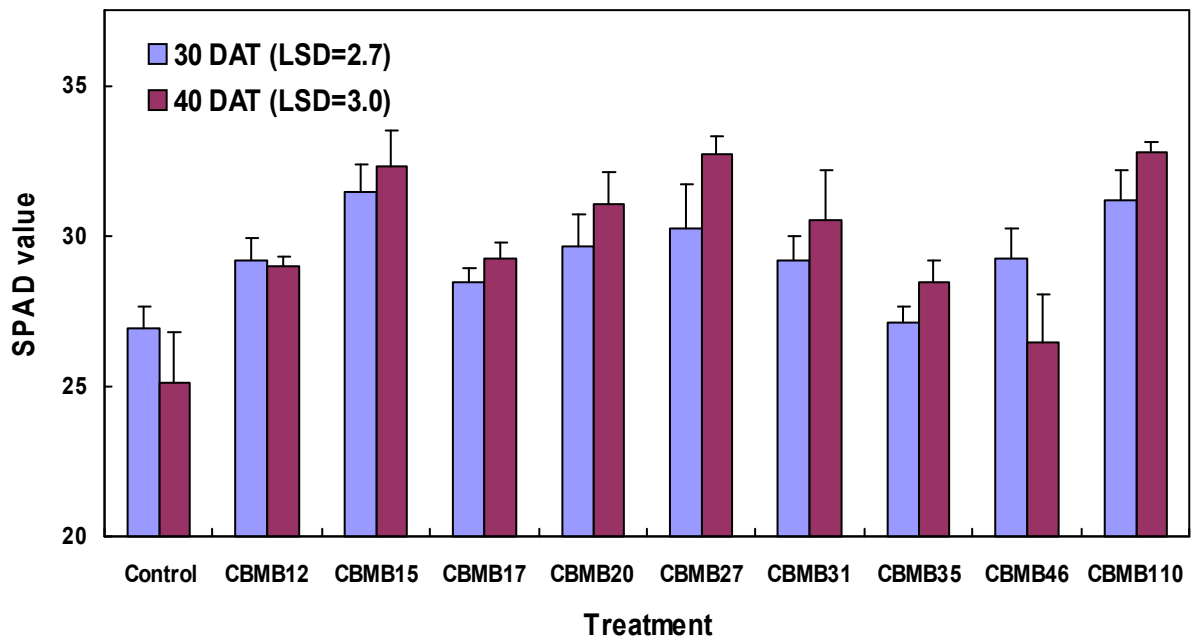
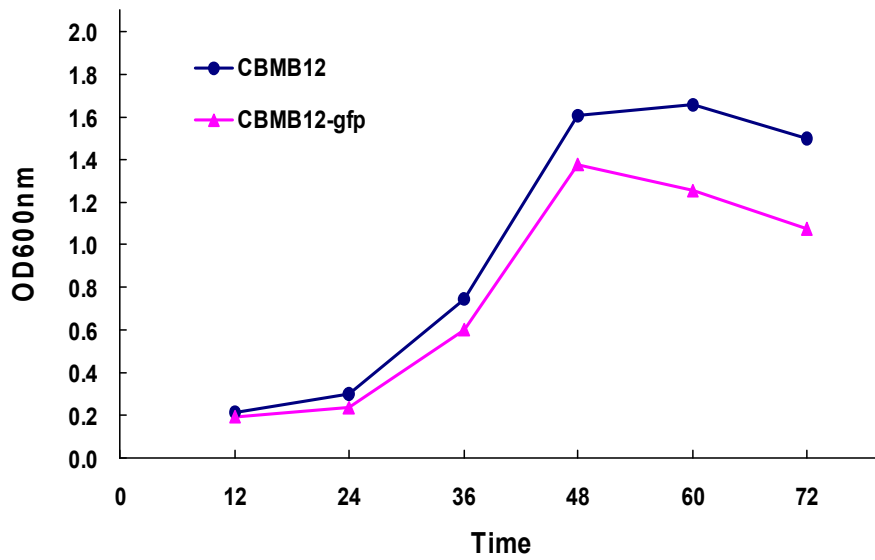


Fig. 9. 온실 조건에서 *Methylobacterium* 접종에 따른 카놀라의 엽록소 함량  
 Each values represents of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

### Growth pattern of CBMB12 and CBMB12-*gfp*



### Population of CBMB12 and CBMB12-*gfp*

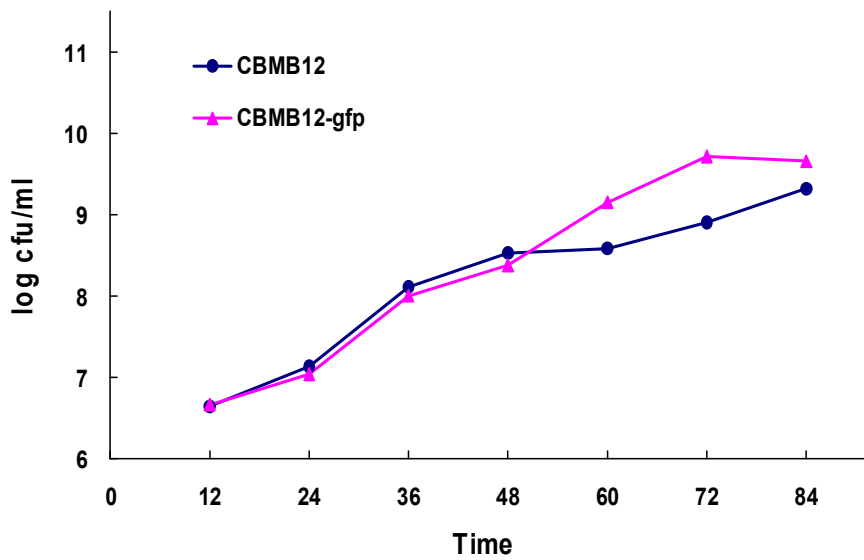
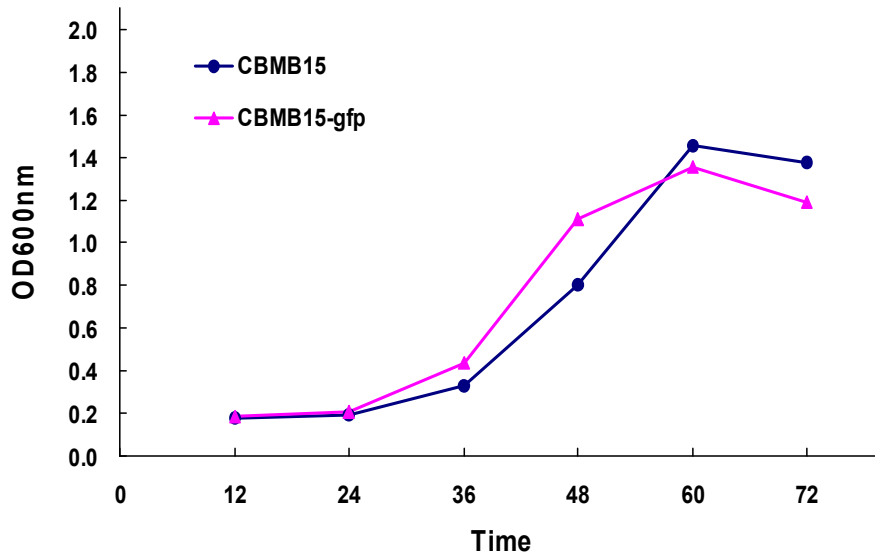


Fig. 10. AMS 배지에서 CBMB12와 CBMB12-*gfp*의 성장 패턴 비교

### Growth pattern of CBMB15 and CBMB15-gfp



### Population of CBMB15 and CBMB15-gfp

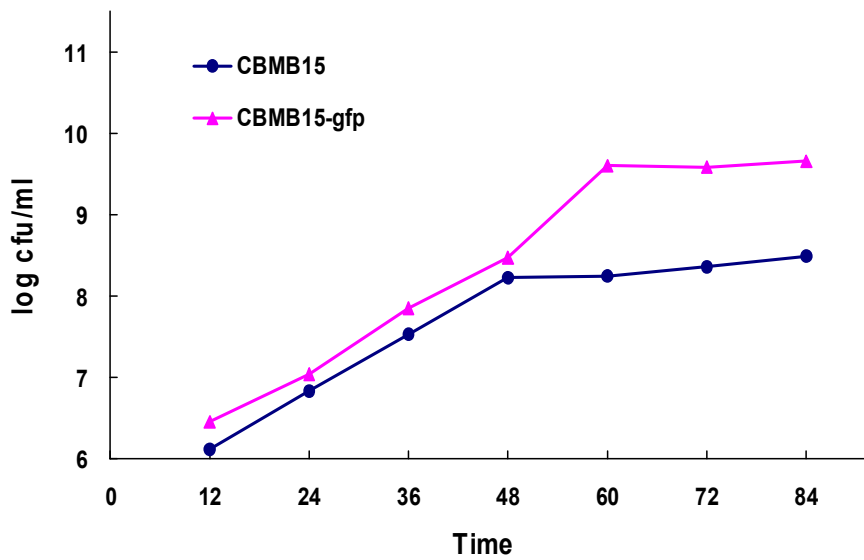
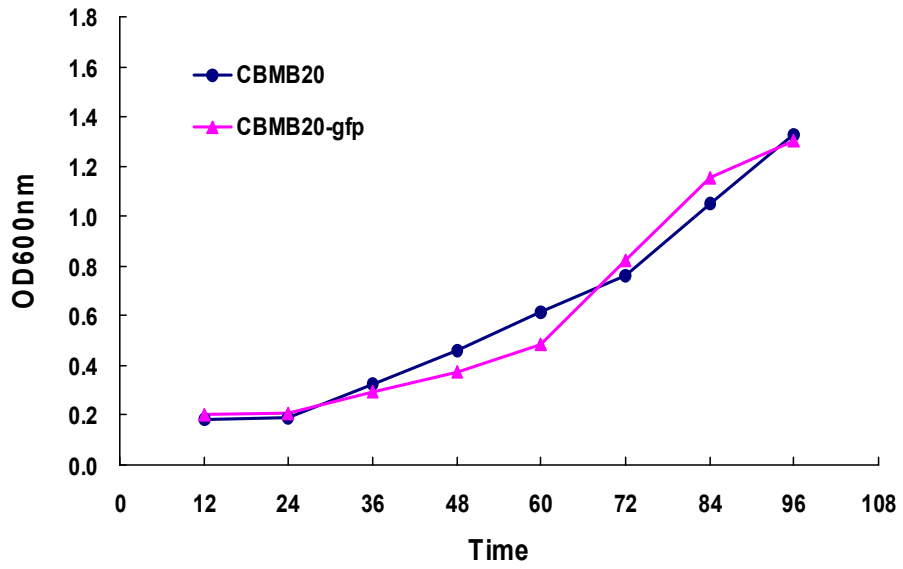


Fig. 11. AMS 배지에서 CBMB15와 CBMB15-gfp의 성장 패턴 비교

Growth pattern of CBMB20 and CBMB20-*gfp*



Population of CBMB20 and CBMB20-*gfp*

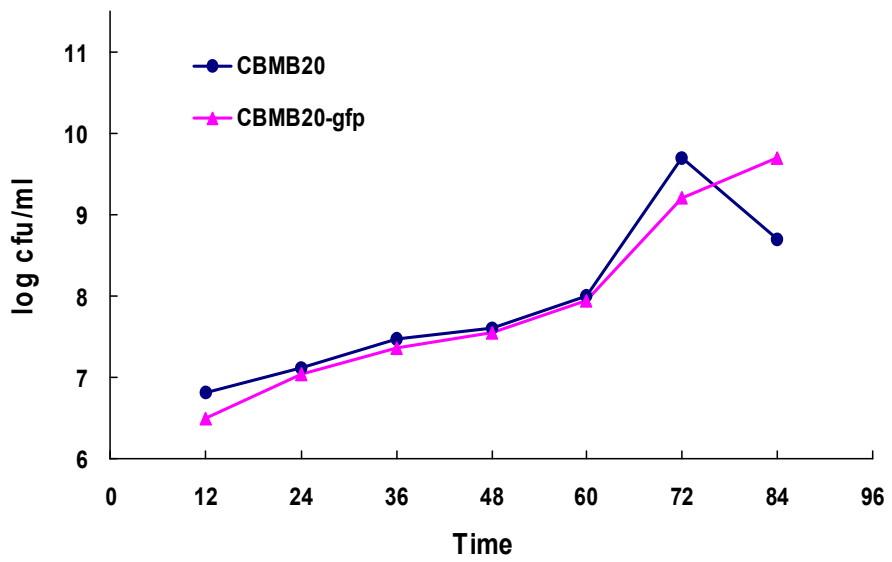
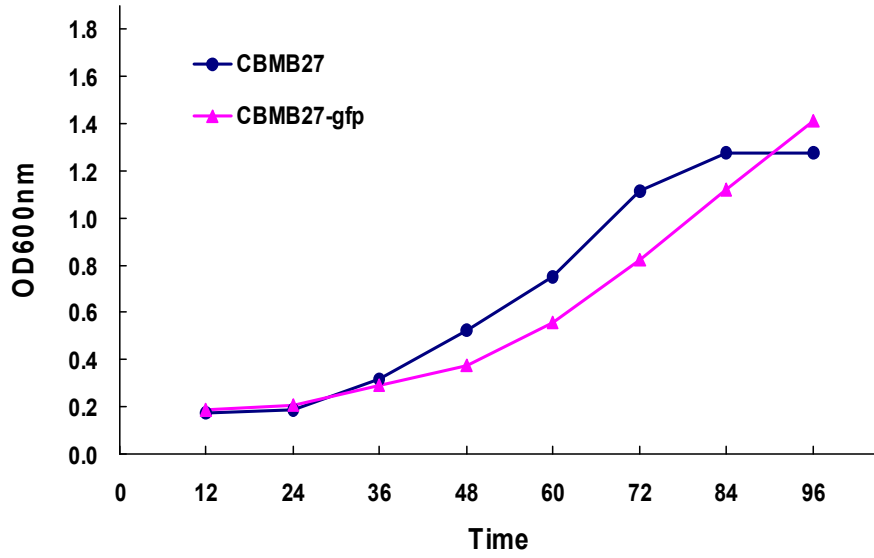


Fig. 12. AMS 배지에서 CBMB20과 CBMB20-*gfp*의 성장 패턴 비교

Growth pattern of CBMB27 and CBMB27-gfp



Population of CBMB27 and CBMB27-gfp

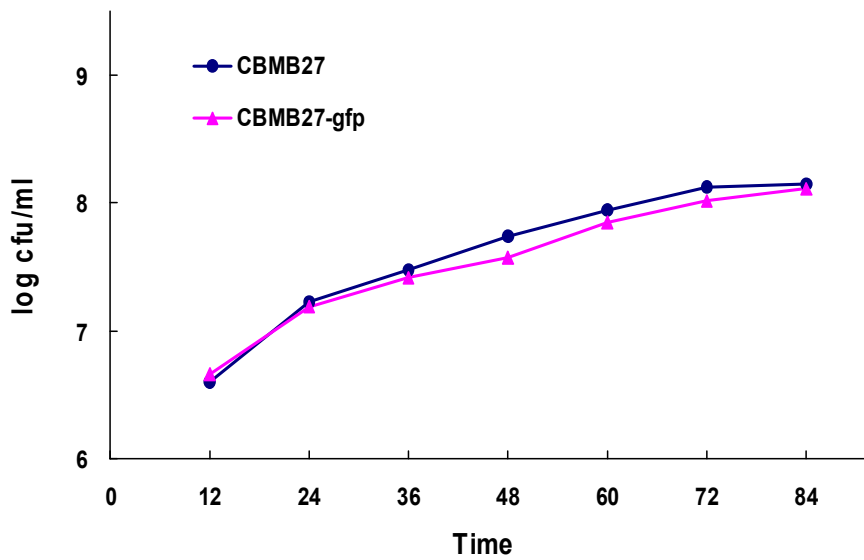
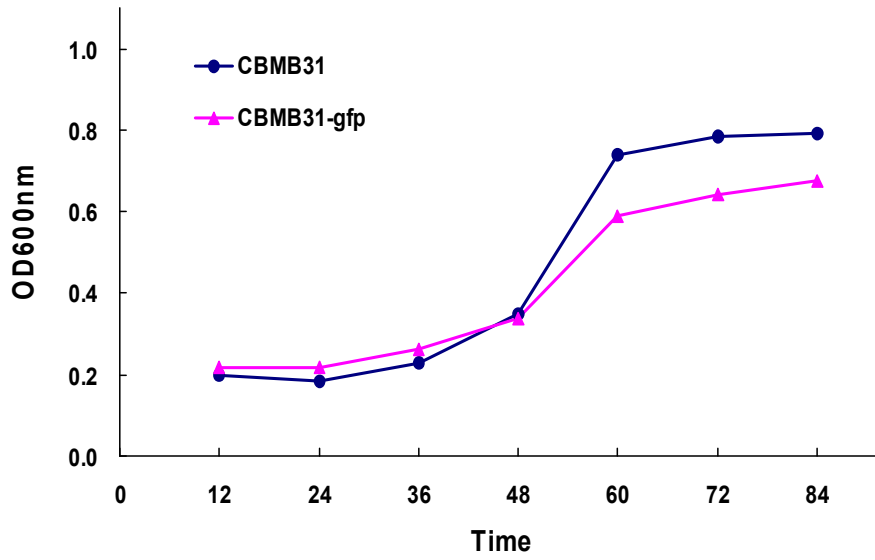


Fig. 13. AMS 배지에서 CBMB27과 CBMB27-gfp의 성장 패턴 비교

Growth pattern of CBMB31 and CBMB31-*gfp*



Population of CBMB31 and CBMB31-*gfp*

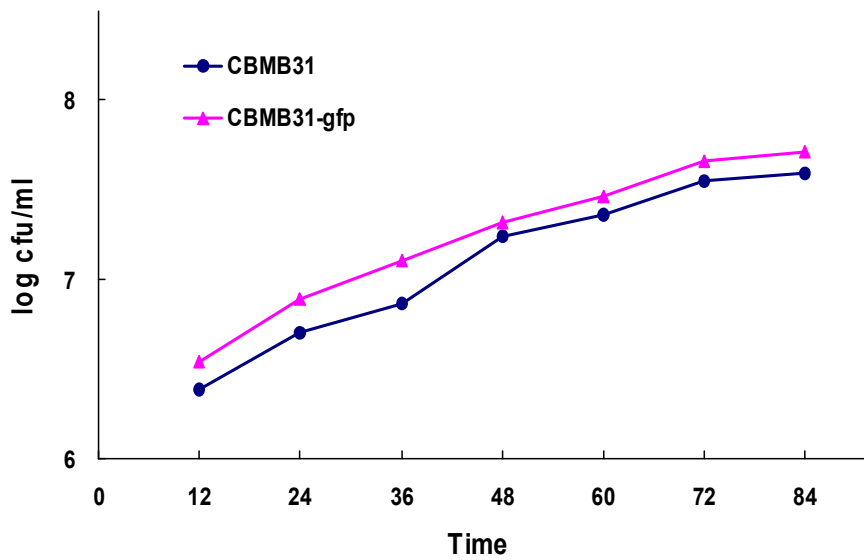
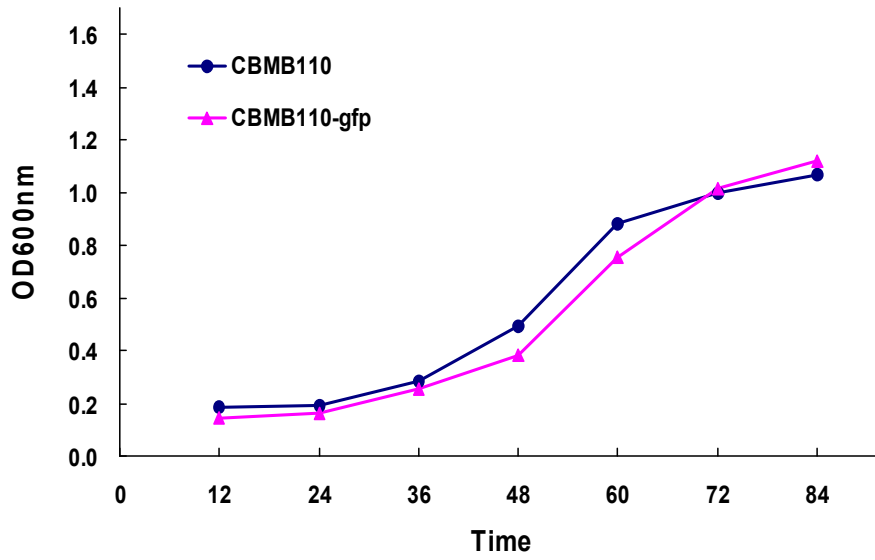


Fig. 14. AMS 배지에서 CBMB31과 CBMB31-*gfp*의 성장 패턴 비교

Growth pattern of CBMB110 and CBMB110-*gfp*



Population of CBMB110 and CBMB110-*gfp*

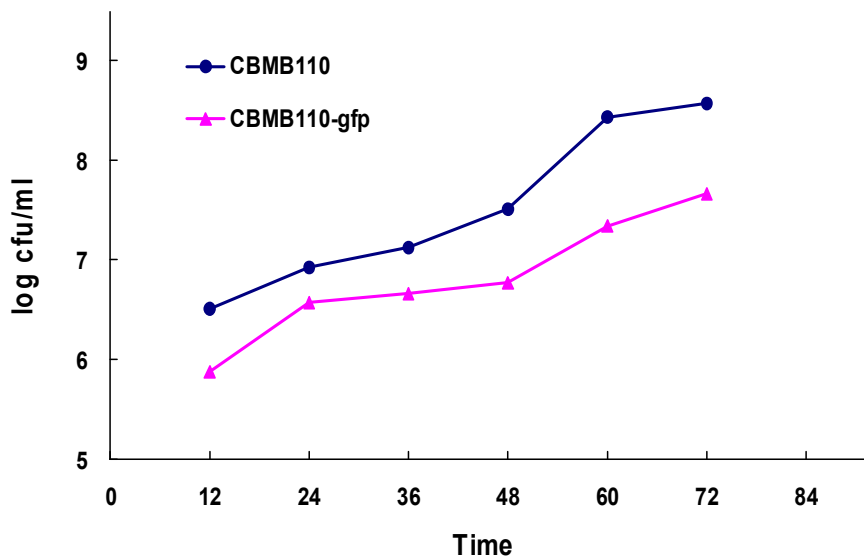


Fig. 15. AMS 배지에서 CBMB110과 CBMB110-*gfp*의 성장 패턴 비교



## 10. *gfp* 형질전환 *Methylobacterium* spp.의 식물생장촉진 효과 검증

2차 선발하여 *gfp* 형질전환 시킨 *Methylobacterium* 균주들의 식물생장촉진 효과를 확인하였다. 미생물의 염색체 내의 형질전환이 균주의 식물생장촉진능에 영향을 주는지 확인하고자 하는 안정성 검사의 일환으로 *gfp* 형질전환 균주와 비 형질전환 균주 접종 시 작물의 뿌리 신장 및 건물중에 미치는 효과를 pouch 실험을 통해 비교 확인하였다. 먼저 0.5% succinate를 첨가한 AMS 배지를 이용하여 *gfp* 형질전환 및 비 형질전환 *Methylobacterium* 균주들을 배양하였다. 균주를 배양한 후 원심 분리하여 박테리아 cell pellet을 얻고, 다시 0.03 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  로 희석하여 ( $OD_{600} = 1.0$ ) 접종 원을 준비하였다. 공시작물은 토마토를 사용하였으며, 종자는 표면을 70% 에탄올과 NaOCl을 이용하여 표면을 멸균 시키고, 멸균한 종자를 5회 이상 멸균수에 세척한 후 *Methylobacterium* 균주의 세포현탁액에 침지하여 shaker에서 4시간 동안 균주를 접종하였다. 대조군의 종자는 0.03 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 에 종자침지 하였다. 균주 처리 종자는 무균의 growth pouches (CYGTM seed germination pouch, Mega International Manufacturer, USA)에 넣고 growth chamber에서 광과 암의 조건을 14/10시간 씩 주어  $23 \pm 1^\circ C$ 에서 배양하였다. 이후 이틀 안에 발아에 실패한 종자는 후에 발아가 되었어도 측정하지 않고, 파종 14일 후 토마토 유묘의 뿌리길이와 건물중을 측정하였다.

Pouch 실험을 통해 *gfp* 형질전환 균주와 비 형질전환 균주의 식물생장촉진 효과를 비교 확인하였다. 토마토 유묘의 뿌리신장을 확인한 결과 균주 처리구에서 대조구 대비 높은 뿌리 신장을 확인 할 수 있었으며, 특히 *gfp* 형질전환 균주와 비 형질전환 균주간의 특이적인 차이는 발견할 수 없었다. (Fig. 16). 그 중 CBMB12 균주의 처리구에서 *gfp* 형질전환, 비 형질전환 균주 모두 가장 유의성 있는 증진 효과를 확인 할 수 있었다. 토마토 유묘의 건물중의 경우도 마찬가지로 비슷한 경향을 나타내었다 (Fig. 17). 모든 균주 처리구에서 대조구 대비 높은 건물중을 나타냈으며, *gfp* 형질전환 균주와 비 형질전환 균주간의 특이적인 차이는 발견할 수 없었다. 이러한 결과들로서 미생물 염색체 내의 *gfp* 형질전환은 2차 선발한 *Methylobacterium*의 식물생장촉진효과에 영향을 주지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다.

## 11. *gfp* 형질전환 *Methylobacterium* spp.의 접종이 유묘의 ethylene 발생량에 미치는 영향

Growth pouch에서 *gfp* 형질전환 및 비 형질전환 균주가 접종된 토마토 유묘의 ethylene 발생량을 측정, 비교하였다. Ethylene 발생량 측정을 위해 작물별 생육량을 측정한 pouch에서 작물을 수확하여 생체중 측정 후 120 ml GC bottle에 넣는다. Rubber serum stopper로 입구를 막은 후 4시간 정치시킨다. 정치 후 1 ml gas를 head space에서 채취하여 Gas Chromatography

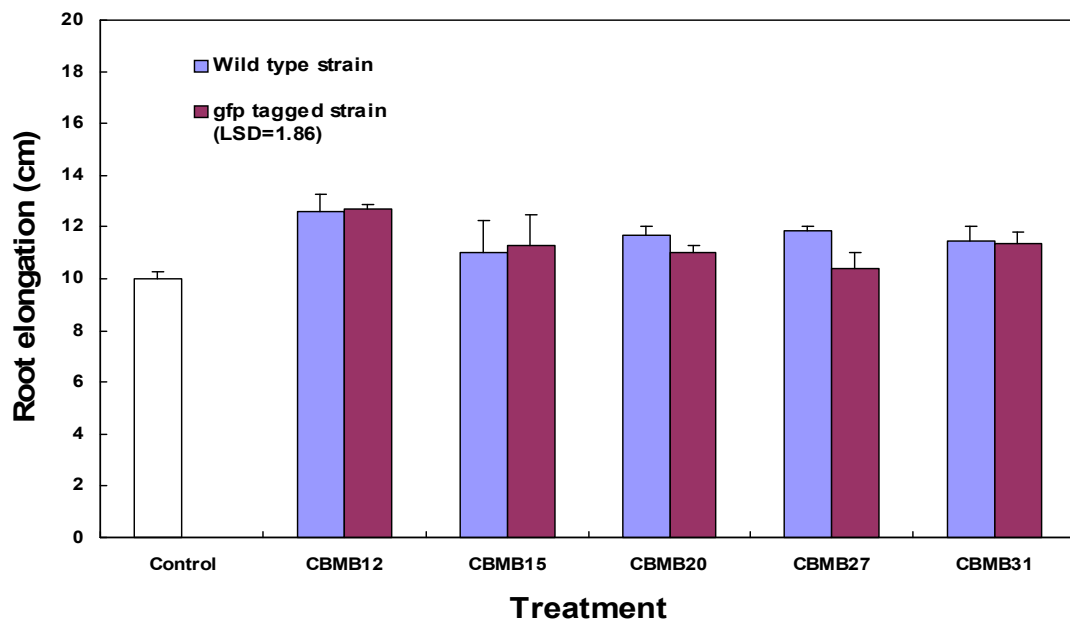


Fig. 16. 형질전환 및 비형질전환 *Methylobacterium* spp.집중이 토마토유묘의 뿌리신장에 미치는 효과. Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

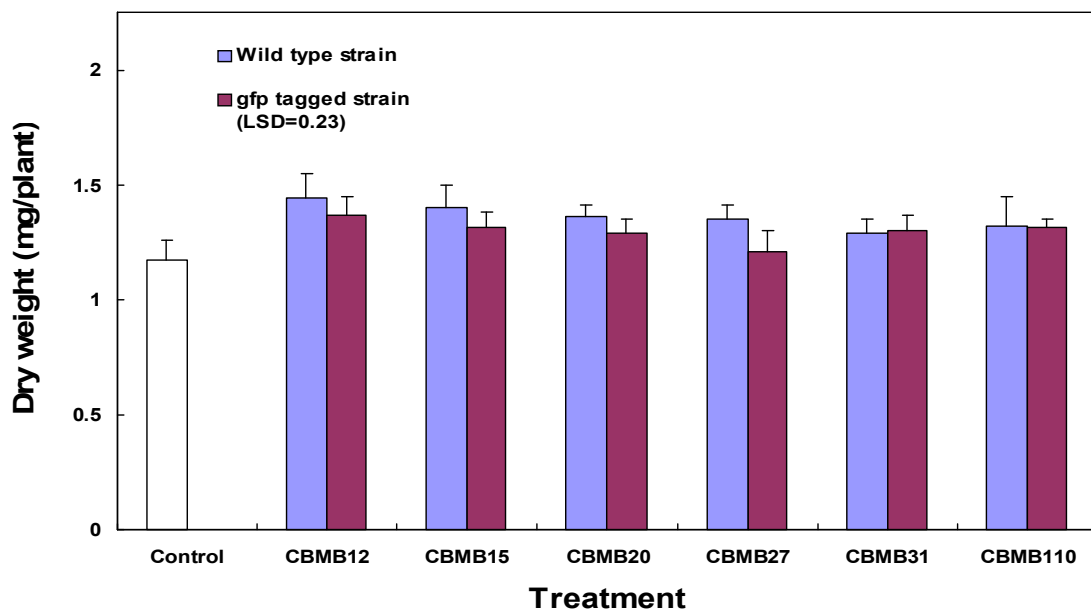


Fig. 17. 형질전환 및 비형질전환 *Methylobacterium* spp. 접종이 토마토유묘의 건물중에 미치는 효과. Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

(DS 6200, Donam Instruments Inc.)을 이용해 ethylene을 측정하였다. ethylene을 측정 후 각 유묘의 건물중을 측정하였다.

식물의 ethylene 방출은 스트레스에 대한 초기 반응으로서, *gfp* 형질전환 및 비 형질전환 *Methylobacterium* spp. 접종에 따른 토마토의 ethylene 발생량을 측정하였다. 토마토 유묘의 균주 접종 처리별 ethylene 발생량은 대조구 대비 낮은 결과를 확인 할 수 있었으며, 각 균주의 *gfp* 형질전환 처리구와 비 형질전환 처리구 간에도 큰 특이적 차이를 확인 할 수 없었다 (Fig. 18). 식물의 ethylene 발생 억제는 2차 선발한 *Methylobacterium* spp.가 생산하는 ACC deaminase에 의해 이루어지며, 이는 *Methylobacterium* spp.의 활용에 있어 매우 중요한 기능 중 하나이다. 따라서 본 결과에 의해 *gfp* 유전자의 삽입이 균주의 ACC deaminase 생산에 영향을 주지 않는다고 결론지을 수 있었으며, 이를 이용하여 우수 분리균주의 효능을 측정 할 수 있었다.

## 12. 작물별 형질전환 *Methylobacterium*의 균집능 확인

형질전환 *Methylobacterium*의 균집능을 확인하기 위하여 다양한 작물을 이용한 pouch 실험을 수행하였다. 실험 작물로서 오이, 고추 카놀라를 선택하였으며, 종자침지법을 사용한 접종을 위해 먼저 0.5% succinate와 항생제를 첨가한 AMS 선택 배지를 이용하여 형질전환 *Methylobacterium*을 배양하였다. 균주를 배양한 후 원심 분리하여 박테리아 cell pellet을 얻고, 다시 0.03M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 희석하여( $OD_{600} = 1.0$ ) 접종 원을 준비하였다. 오이, 고추, 카놀라 종자는 표면을 70% 에탄올과 NaOCl을 이용하여 표면을 멸균시켰다. 멸균한 종자를 5회 이상 멸균수에 세척한 후 형질전환 *Methylobacterium*의 세포현탁액에 담가 shaker에서 4시간 동안 균주를 접종하였다. 균주 처리 종자는 무균의 growth pouches (CYGTM seed germination pouch, Mega International Manufacturer, USA)에 넣고 growth chamber에서 광과 암의 조건을 12시간씩 주어  $20 \pm 1^\circ C$ 에서 재배하였다. 오이, 고추, 카놀라는 각각 파종 10일, 15일, 18일 후 뿌리의 길이와 생체중을 측정하였다. Biomass 측정 후 형질전환 *Methylobacterium*의 균집을 확인하기 위해 파우치에서 재배한 오이, 고추, 카놀라 유묘의 잎, 줄기, 뿌리 부분을 Confocal laser scanning microscope (CLSM)을 이용하여 분석하였다. 시료는 각각의 부분을 1cm 가량으로 잘라 슬라이드 글라스 위에 놓고, Vectashield mounting medium을 처리한 후 커버글라스를 덮어 준비하였다. 현미경 관찰은 Leica TCS SP2 confocal system (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany)과 Ar ion laser (Gfp: excitation, 488

nm; emission filter BP 500-530)를 사용하였고, CLSM system (version 2.5.1227a) 소프트웨어를 이용하여 40배율에서 2배, 4배, 8배 줌으로 확대하여 균주를 확인하였다.

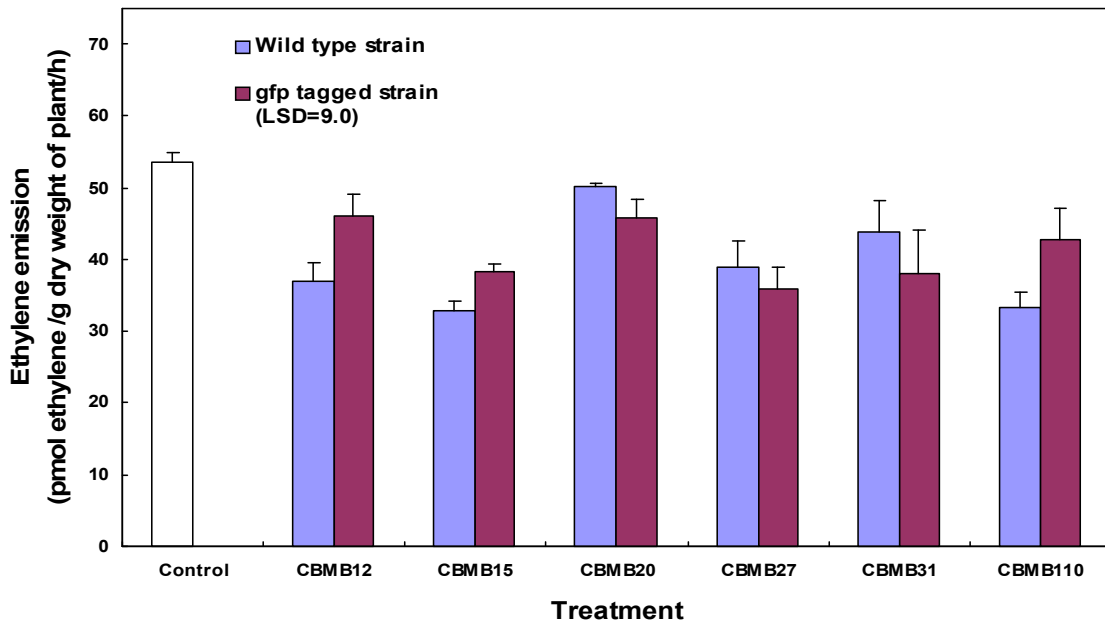


Fig. 18. 형질전환 및 비형질전환 *Methylobacterium* spp. 접종이 토마토유묘의 ethylene 발생량에 미치는 효과. Each values represents of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

파우치 파종 후 오이, 고추 카놀라를 각각 10일, 15일 18일 수확하여 접종 효과를 확인한 결과 형질전환 *Methylobacterium*의 접종은 오이, 고추, 카놀라 모두 뿌리 길이와 생체중을 증가시켰다. 오이와 고추는 각각 대조구에 비하여 20.2%, 15.6%의 뿌리 신장 증가율을 보였으며, 카놀라는 다른 작물에 비해 상대적으로 적은 6.6%의 증가율을 보였다. 또한 균주 접종에 의한 오이와 고추의 뿌리 신장은 대조구 대비 유의성 있는 차이를 확인하였다 (Table 9). Biomass 측정 후 Confocal laser scanning microscope (CLSM)을 이용하여 형질전환 *Methylobacterium*의 작물에서의 균집을 확인하였다. 각각 작물의 뿌리, 줄기, 잎, 마쇄시료를 확인 하였으며, 무처리 작물에서는 균주의 형광을 확인 할 수 없었다. 오이에서는 뿌리에서 형질전환 *Methylobacterium*의 형광이 확인 되었으며, 형질전환 *Methylobacterium*은 장대모양의 간상형으로, 균집을 이루고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 균집의 형태는 오이의 굵은 주근 표면을 따라 주로 균집을 이루고 있었으며, 표피 안쪽에서 길게 줄지어 있었다 (Fig. 19). 마쇄시료에서도 균주를 확인 할 수 있었으나, 시료를 마쇄하여 균집을 이루고 있지 않고, 식물체의 자가 형광으로 인해 매우 찾기 어려웠다. 고추에서 형질전환 *Methylobacterium*의 균집 또한 마찬가지로 뿌리에서 확인 할 수 있었다. 장대모양의 균주 형광들은 뿌리의 표면 뿐 아니라 안쪽 표면에서도 확인 되었으며, 표면을 따라 퍼져있는 균집을 이루고 있었다 (Fig. 20). 카놀라에서 형질전환 *Methylobacterium*의 균집은 뿌리와 잎에서 확인 되었다. 카놀라 뿌리에서의 균집은 뿌리의 표면뿐만 아니라 내부의 균집 또한 확인 할 수 있었으며, 퍼져 있지 않고 균집체를 이루고 있었다 (Fig. 21). 잎에서 형질전환 *Methylobacterium*의 형광은 기공세포 사이에서 확인이 가능하였다. 잎에서는 균집체를 이루고 있지는 않았으나, 단일 균주 세포들이 기공 사이에 존재 하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 22). 이처럼 각각 작물 무처리에서는 균주의 형광을 확인 할 수 없었지만, 균주 처리구에서는 형질전환 *Methylobacterium*의 단일 균주 세포 및 균집체들이 뿌리 표면에서 또는 안쪽에서 특정 위치에 국한되지 않고 쉽게 확인 가능하였다. 작물 잎에서의 균집은 카놀라에서만 확인 할 수 있었으며, 기공의 사이사이에 존재 하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 2차 선발한 *Methylobacterium*의 작물체 균집은 다양한 작물에서 가능하며, 이는 곧 다양한 작물에서의 활용 가능성을 증명한다.

### 13. 작물별 형질전환 *Methylobacterium*의 균집 밀도 확인

형질전환 *Methylobacterium*을 접종하여 파우치에서 재배한 오이, 고추, 카놀라 유묘의 체내 접종 균주 밀도를 측정하였다. 형질전환 *Methylobacterium*의 균집 밀도를 측정하기 위하여 각

각 작물의 표면을 70% 에탄올에서 1분, 2% NaOCl에서 1분 동안 멸균 후 멸균수로 세척하였다. 멸균한 유묘를 막자와 막자사발을 이용해 마쇄 하였고, 마쇄한 시료는 4°C에 보관하였다.

Table 2. 형질전환 *Methylobacterium*의 접종이 오이, 고추, 카놀라의 뿌리신장 및 생체중에 미치는 영향

Treatment	Root elongation (cm)	Increase over control (%)	Fresh weight (g)
<b>Cucumber</b>			
<i>Methylobacterium</i>	12.55 ± 0.4	20.2	21.47
Control	10.44 ± 0.6	-	18.74
LSD ( $P \leq 0.05$ )	1.41	-	-
<b>Red pepper</b>			
<i>Methylobacterium</i>	11.92 ± 0.5	15.6	3.89
Control	10.31 ± 0.4	-	3.24
LSD ( $P \leq 0.05$ )	1.42	-	-
<b>Canola</b>			
<i>Methylobacterium</i>	12.03 ± 0.6	6.6	5.25
Control	11.28 ± 0.6	-	4.83
LSD ( $P \leq 0.05$ )	2.17	-	-

Each value represents the average of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

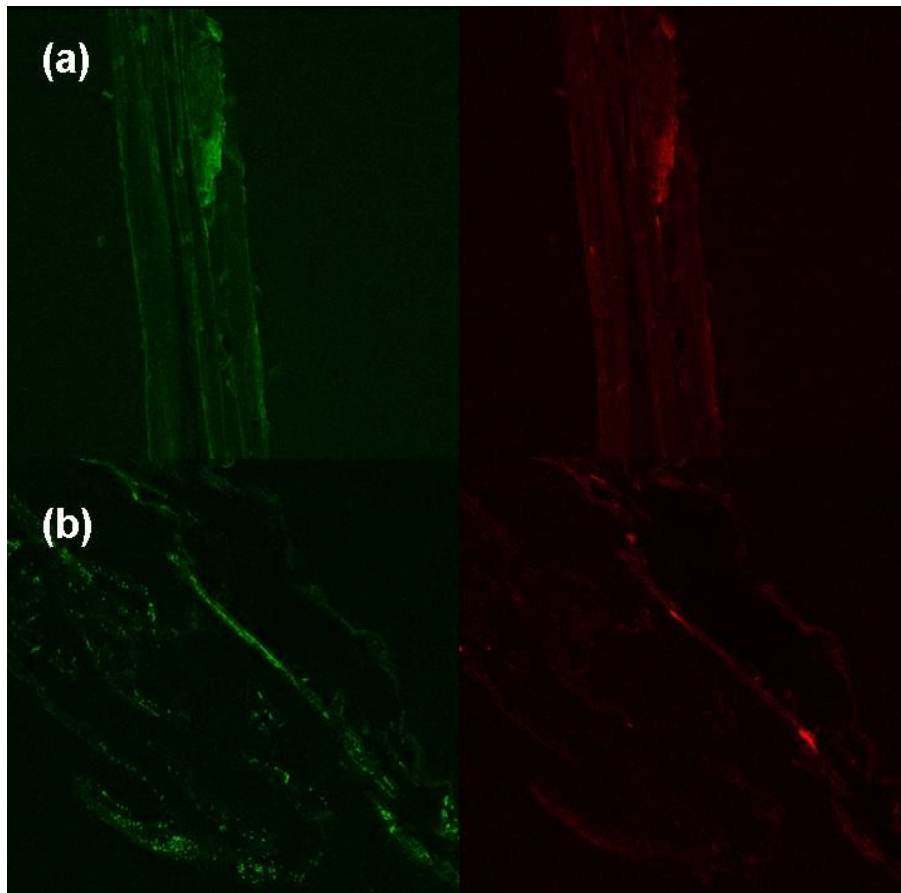


Fig. 19. 오이 뿌리에서의 형질전환 *Methylobacterium* 군집. (a) 무처리; (b) 형질전환 *Methylobacterium* 처리구



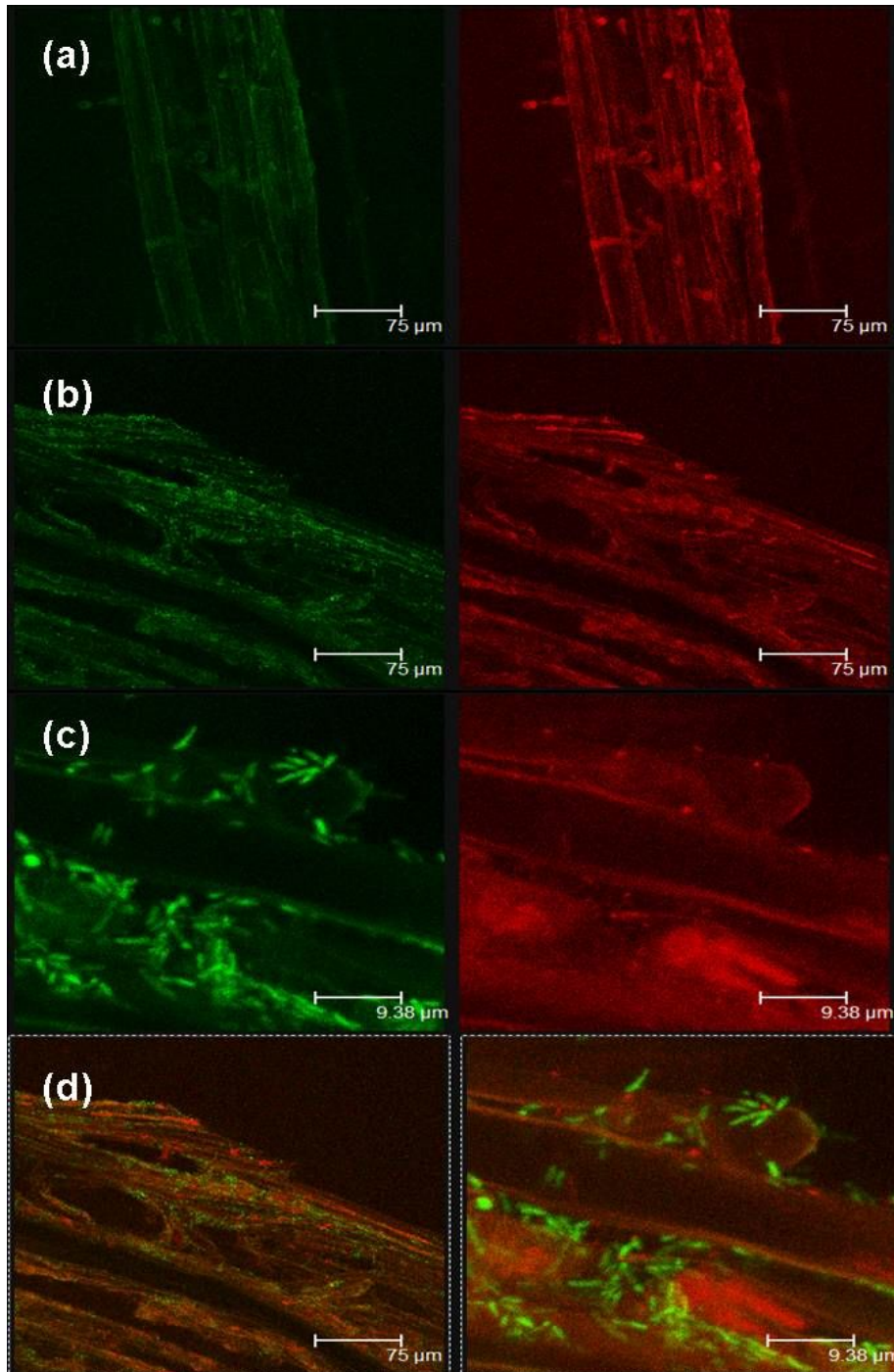


Fig. 20. 고추 뿌리에서의 형질전환 *Methylobacterium* 군집. (a) 무처리; (b) 형질전환 *Methylobacterium* 처리구, 40배율; (c) 형질전환 *Methylobacterium* 처리구, 8배 확대; (d) 형질

전환 *Methylobacterium* 처리구의 *gfp* 이미지와 optical 이미지의 overlap

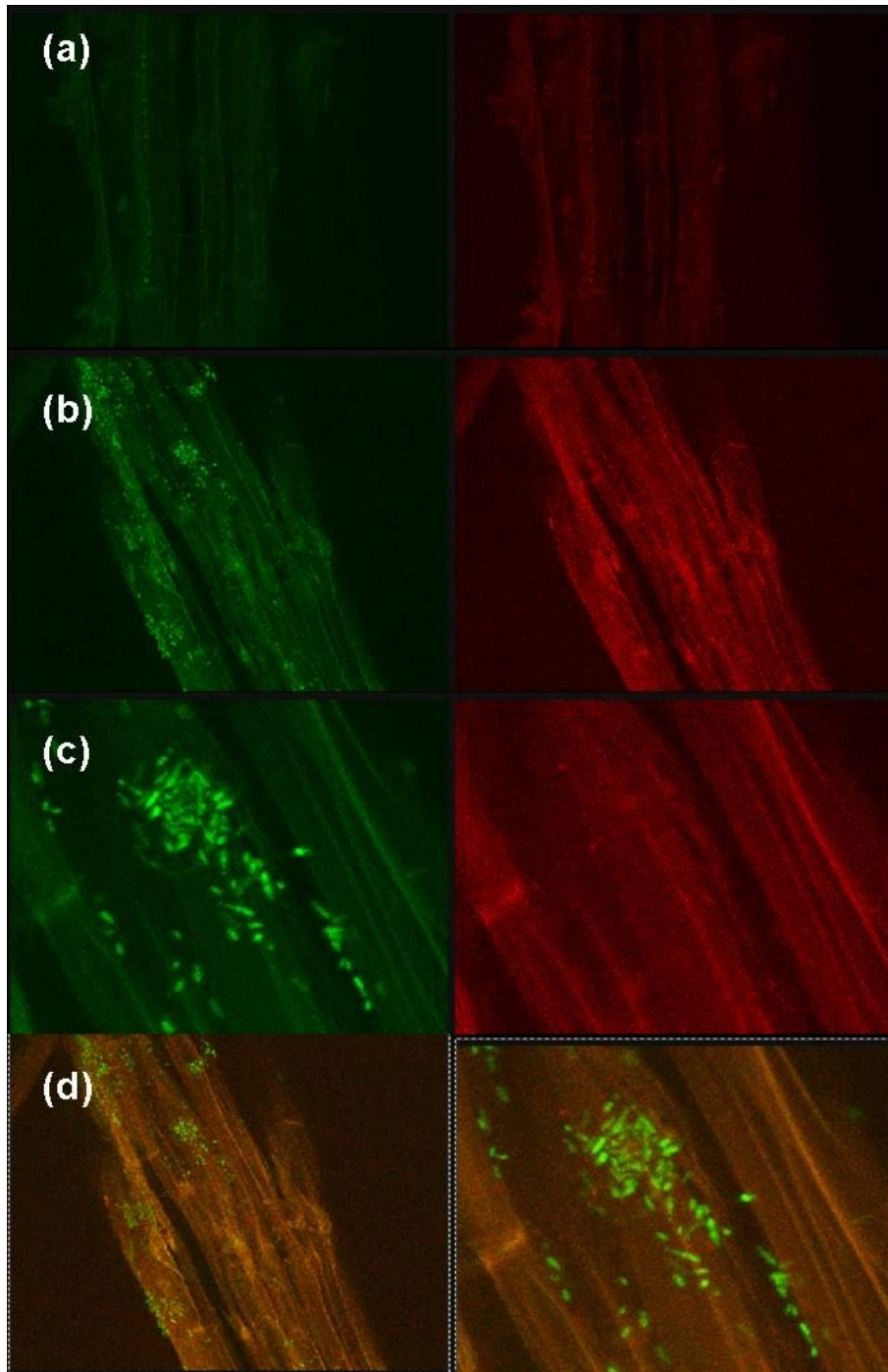


Fig. 21. 카놀라 뿌리의 형질전환 *Methylobacterium*의 군집. (a) 무처리; (b) 형질전환 *Methylobacterium* 처리구, 80배율; (c) 형질전환 *Methylobacterium* 처리구, 4배 확대; (d) 형질

전환 *Methylobacterium* 처리구의 *gfp* 이미지와 optical 이미지의 overlap

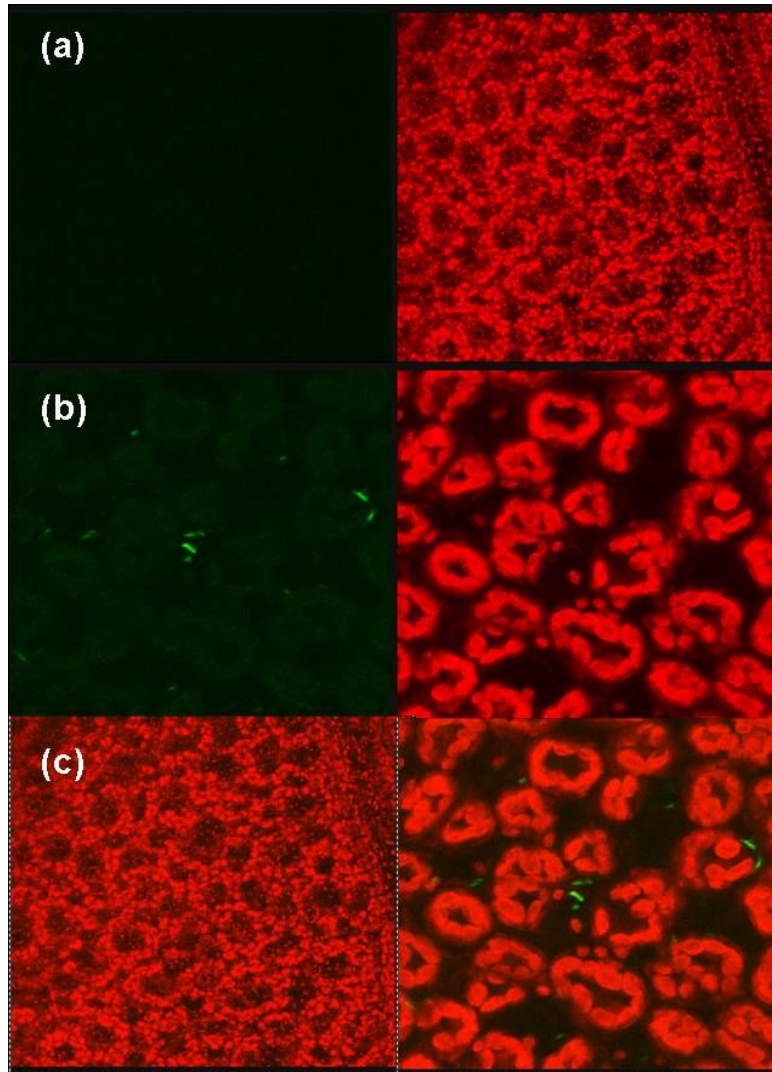


Fig. 22. 카놀라 앞에서의 형질전환 *Methylobacterium*의 군집. (a) 무처리; (b) 형질전환 *Methylobacterium* 처리구, 160배율; (c) 무처리 및 형질전환 *Methylobacterium*의 *gfp* 이미지와 optical 이미지의 overlap

균수 측정을 위해 마쇄시료 1 ml를 취하여 9 ml 멸균 튜브에 희석하고 30분간 진탕 시켰다. 진탕 후  $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 의 희석 배율로 0.5% succinate와 항생제 (Kanamycin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Nalidixic acid 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 를 첨가한 AMS 평판 배지에 도말하여 30°C에서 배양하였다. 배양 48 h 이후부터 새로운 콜로니가 더 이상 자라기 전까지 AMS 평판 배지에 자란 콜로니를 개수하였다.

형질전환 *Methylobacterium* 접종 후 파우치에서 재배한 오이, 고추, 카놀라 유묘에 균집하고 있는 접종 균주의 밀도를 측정한 결과 각 작물의 접종구에서 높은 형질전환 *Methylobacterium*의 밀도를 확인 할 수 있었으며, 무처리 대조구에서는 찾아볼 수 없었다 (Table 10).

#### 14. 기내 실험을 통한 선발 *Methylobacterium*의 식물 내병성 강화 효능 탐색

선발된 *Methylobacterium*의 식물 내병성 강화 이용 방안 탐색을 위해 선발균주의 salicylic acid (SA)와 Siderophore 생성능을 확인하였다. SA 생성능을 측정하기 위해 선발균주를 진탕배양 후 원심분리 (2800 g, 10 min, 4°C)하여 얻은 상등액을 1 M HCl (pH 1.5 - 2.0)로 산성화시킨 뒤 감압농축 하였다. 농축된 시료에 3 ml의 97% methanol을 첨가하여 희석 후 희석액 1 ml에 2 M  $\text{FeCl}_3$  5  $\mu\text{l}$ , 3 ml 증류수를 첨가하여 발색시켰다. UV-spectrophotometer를 이용하여 527 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다. Siderophore 생성능은 chrome azurol S (CAS) agar 배지에 선발 균주를 접종하여 확인하였다. 또한 선발균주의 다양한 병원균에 대한 길항능을 확인하기 위하여 영양배지와 potato dextrose agar 배지에 병원균과 선발균주의 동시접종을 수행하였다. 실험에 사용된 병원균은 반점세균병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, XCV), 세균성 풋마름병 (*Ralstonia solanacearum*, RS), 역병 (*Phytophthora capsici*, PC)을 사용하였다.

선발균주의 SA와 Siderophore 생성능 및 병원균에 대한 길항능을 확인한 결과 선발된 4종의 *Methylobacterium* 균주들 모두 SA를 생성하는 것으로 나타났다. 그 중 CBMB15가  $7.55 \pm 0.20 \mu\text{g ml}^{-1}$ 로 가장 높은 SA 생성능을 갖는 것으로 확인되었다 (Table 11). Siderophore 생성능의 경우 선발 균주들 중 CBMB12와 CBMB15에서 확인되었으며, 나머지 두 종의 *Methylobacterium*는 생성능이 없는 것으로 확인 되었다 (Table 11). 또한 선발균주의 병원균에 대한 길항능을 동시 배지 접종을 통해 inhibition-zone을 측정한 결과 모든 선발균주가 실험에 사용된 모든 병원균에 대한 길항능이 없다는 것을 확인하였다 (Table 11, Fig. 23).

#### 15. 기내 실험을 통한 선발 *Methylobacterium*의 식물 내병성 증진 효과 검증

기내 실험을 통해 선발 *Methylobacterium*의 식물 내병성 증진 효과를 검증하기 위하여 토

Table 3. 파우치에서 재배한 오이, 고추, 카놀라에서 형질전환 *Methylobacterium*의 균밀도

Treatment	Cucumber	Red pepper	Canola
	log cfu g <sup>-1</sup> FW		
Control	-	-	-
<i>Methylobacterium</i>	5.59 ± 0.02	4.36 ± 0.15	5.56 ± 0.02

Each value represents the average of three replicates per treatment.

Table 11. 선발 *Methylobacterium*의 식물 내병성 효능

Isolate	Nearest phylogenetic neighbour	Salicylic acid <sup>a</sup>	Siderophore production	Antagonistic effect <sup>b</sup>
CBMB12	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	4.95±0.21	+	-
CBMB15	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	7.55±0.20	+	-
CBMB20 <sup>T</sup>	<i>Methylobacterium oryzae</i>	6.66±0.15	-	-
CBMB27 <sup>T</sup>	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>	6.52±0.32	-	-

<sup>a</sup>  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; <sup>b</sup> Tested against *Phytophthora capsici*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*. Values are presented as mean±standard error (SE) of three replications.



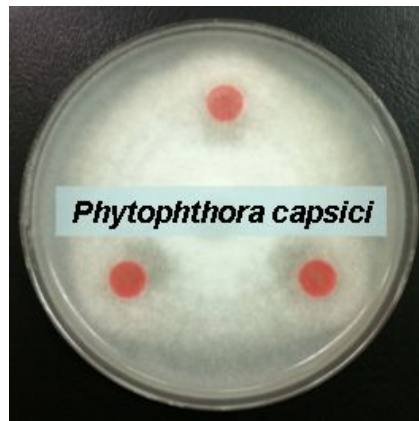


Fig. 23. *Phytophthora capsici*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*에 대한 선발 *Methylobacterium*의 길항능 확인

(*Lycopersicon esculentum* Mill.)와 고추 (*Capsicum annuum* L.)를 재배하였다. 토마토와 고추 종자는 표면을 70% 에탄올과 NaOCl을 이용하여 표면을 멸균시켰다. 멸균한 종자를 5회 이상 멸균수에 세척한 후 선발된 *Methylobacterium*의 세포현탁액에 담가 shaker에서 4시간 동안 균주를 접종하였다. 접종 후 상토가 담긴 트레이에 파종하여 growth chamber에서 광과 암의 조건으로 14/10시간 썩 25/20°C 온도에서 재배하였다. 각각 토마토와 고추의 잎을 채취하여 멸균된 여과지에 멸균수로 적신 플레이트에 올려놓은 후 각각 병원균과 선발된 *Methylobacterium*을 접종하였다. *Methylobacterium*을 접종하지 않은 플레이트를 대조구로 사용하였으며, 플레이트 덮개를 덮고 growth chamber에서 광과 암의 조건으로 14/10시간 썩 20°C 온도에서 배양하였다. 3일간 배양 후 병원균에 의한 병증 확인 및 질병의 발생 정도를 측정하였다. 질병의 발생 정도는 역병 및 세균성 풋마름병의 경우 0 - 4의 질병 지수 (0 - no symptoms; 1 - <25% of symptoms on leaf; 2 - 26-50% of symptoms on leaf; 3 - 51-75% of symptoms on leaf; 4 - 76-100% of symptoms on leaf)로 구분하였으며, 반점세균병의 경우 0 - 3의 질병 지수 (0 - signifies a leaf showing no symptom or spot; 1 - signifies 2-5 lesions / leaf; 2 - signifies 6-10 lesions; 3 - signifies more than 10 lesions together)로 구분하였다.

병원균에 감염된 토마토와 고추 잎의 질병 지수를 확인한 결과 선발 *Methylobacterium*을 처리한 처리구 모두 대조구 대비 유의성 있는 질병 지수의 저감 효과를 확인 할 수 있었다. 역병 처리 토마토와 고추 잎의 경우 *Methylobacterium*을 처리하였을 때 확인한 병증의 감소를 확인 할 수 있었으며 (Fig. 24), 실제로 질병 지수는 *Methylobacterium* 균주 종에 따라 토마토에서 14.7% ~ 39.7%, 고추에서 17.8% ~ 38.7%의 유의성 있는 질병 지수의 저감 효과를 나타냈다 (Table 12). 세균성 병원균에서도 이와 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 반점세균병의 경우 *Methylobacterium*을 처리하였을 때 황색의 반점이 확연히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 25). 특히 CBMB12의 처리에서 가장 유의성 있는 질병 지수 저감 효과를 확인 할 수 있었다 (Table 12). 또한 세균성 풋마름병의 경우도 마찬가지로 *Methylobacterium*을 처리하였을 때 대조구 대비 황색 병증의 감소를 확인 할 수 있었다 (Fig. 26). 세균성 풋마름병에 의한 질병 지수는 특히 CBMB20 접종 처리구에서 가장 유의성 있는 감소 효과를 나타냈다 (Table 12)

## 16. 기내 실험을 통한 *Methylobacterium* 균주 접종이 병원균에 감염된 잎의 에틸렌 발생에 미치는 영향 확인



병원균에 감염된 토마토와 고추 잎의 스트레스 에틸렌 수준을 측정하기 위해 각각 병원균에 감염된 토마토와 고추 잎의 질병 지수 측정 후 잎을 수확하여 120 ml GC bottle에 넣는다.

Table 12. *Methylobacterium* 접종이 병원균에 감염된 토마토와 고추 잎의 질병 지수에 미치는 영향

Treatment	Disease index (%)	
	Tomato	Red pepper
<i>Phytophthora capsici</i>		
Pathogen alone	94.4±5.6a	86.1±2.8a
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB12	80.5±2.8b	68.1±9.7ab
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB15	61.1±5.6c	52.8±2.8b
<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20	56.9±1.4c	52.8±2.8b
<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> CBMB27	75.0±4.2b	70.8±4.2ab
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
Pathogen alone	91.7±8.3a	80.6±2.8a
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB12	50.0±16.7b	55.6±11.1b
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB15	51.4±6.9b	56.9±1.4b
<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20	62.5±4.2ab	56.9±1.4b
<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> CBMB27	66.7±0.0ab	55.6±11.1b
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
Pathogen alone	83.3±16.7a	83.3±16.7a
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB12	44.4±11.1b	48.6±6.9b
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB15	43.1±1.4b	51.4±6.9ab
<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20	43.1±1.4b	38.9±5.6b
<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> CBMB27	48.6±6.9b	52.8±2.8ab

Values (mean ± S.E. n=3) with the same letters do not differ significantly at 0.05% (LSD).

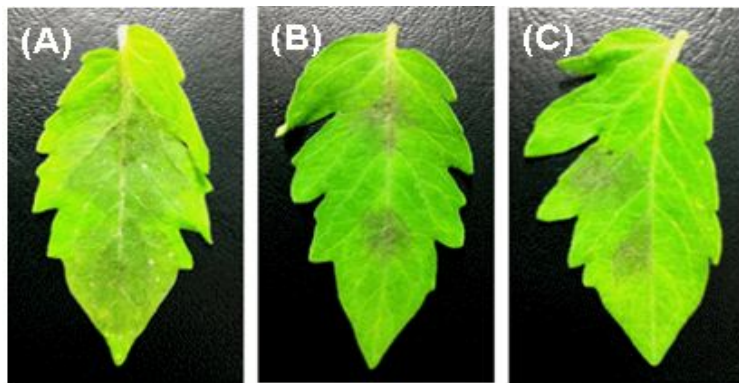


Fig. 24. *Methylobacterium* 접종이 *Phytophthora capsici* (PC)에 감염된 토마토 잎의 병증 발생에 미치는 영향. (A) PC alone; (B) CBMB15 + PC; (C) CBMB20 + PC

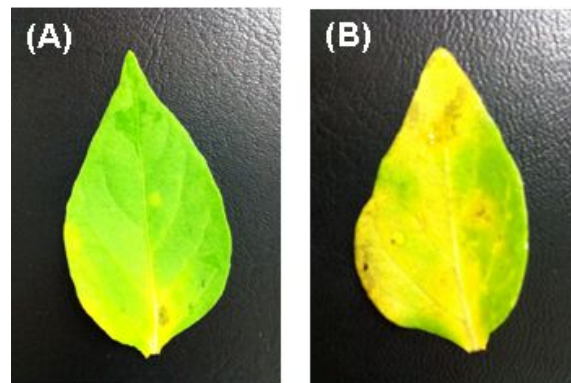


Fig. 25. *Methylobacterium* 집종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 고추 잎의 병증 발생에 미치는 영향. (A) CBMB12 + XCV; (B) XCV alone

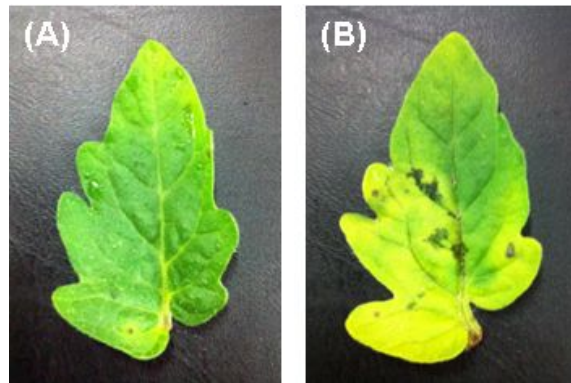


Fig. 26. *Methylobacterium* 접종이 *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 토마토 잎의 병증 발생에 미치는 영향. (A) CBMB27 + RS; (B) RS alone

Rubber serum stopper로 입구를 막은 후 4시간 정치시킨다. 정치 후 1 ml gas를 head space에서 채취하여 Gas Chromatography (DS 6200, Donam Instruments Inc.)을 이용해 ethylene을 측정하였다. ethylene을 측정 후 각 잎의 건물중을 측정하였다.

ACC deaminase를 생산하는 *Methylobacterium* 접종이 병원균에 감염된 토마토와 고추 잎의 스트레스 에틸렌 수준에 미치는 영향을 확인 하였다. 역병에 감염된 토마토와 고추 잎에서 *Methylobacterium*의 접종은 스트레스 에틸렌 수준을 유의성 있게 저감시키는 경향을 확인 할 수 있었다 (Fig. 27). 토마토 잎에서 *Methylobacterium* 처리구의 에틸렌 수준은 역병 단일 처리구 대비 61.5 ~ 85.5%의 저감율을 보였으며, 이 중 CBMB27의 접종이 가장 큰 에틸렌 저감 효과를 보이는 것으로 나타났다. 또한 고추 잎의 에틸렌 발생량 또한 이와 유사하였으며, CBMB20의 접종이 가장 큰 저감 효과를 보이는 것으로 확인 되었다. 반점세균병에 감염된 잎의 경우도 *Methylobacterium*을 접종하였을 때 유의성 있는 에틸렌 저감 효과를 확인 할 수 있었다 (Fig. 28). 각각 *Methylobacterium*의 접종은 반점세균병 단일 처리구 대비 토마토 잎에서 2.6 ~ 67.9%, 고추 잎에서 10.3 ~ 52.1%의 저감율을 보였다. 세균성 풋마름병에 감염된 잎의 스트레스 에틸렌 수준 또한 마찬가지로 *Methylobacterium* 처리구에서 유의성 있는 저감을 확인하였다 (Fig. 29). 각각 *Methylobacterium*의 접종은 세균성 풋마름병 단일 처리구 대비 토마토 잎에서 40.5 ~ 74.8%, 고추 잎에서 18.2 ~ 50.8%의 저감율을 보였으며, 이 중 CBMB12의 에틸렌 저감율이 가장 큰 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 *Methylobacterium*이 생산하는 ACC deaminase에 의하여 병원균에 의한 스트레스 에틸렌 수준이 감소한 것으로 생각되며, 그에 따른 병증 또한 감소하는 것으로 판명되었다.

## 17. 온실 실험을 통한 선발 *Methylobacterium*의 식물생장촉진 및 내병성 증진 효과 검증

ACC deaminase를 생산하는 *Methylobacterium* 균주들을 활용하여 반점세균병 (Bacterial spot)과 세균성 풋마름병 (Bacterial wilt)에 노출된 토마토와 고추의 스트레스 에틸렌 수준 조절에 의한 방어반응 유도를 규명하기 위해 온실 실험을 수행하였다. 온실 실험을 위해 72시간 동안 배양된 *Methylobacterium* 균주를 10,000 g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 수거한 다음, 0.03 M MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 2번 세척 후 에 현탁시켰다. 상기 현탁액의 농도를 O.D.600 nm = 1.0 (10<sup>8</sup> cfu ml<sup>-1</sup>)로 조정하였다. 토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)와 고추 (*Capsicum annuum* L.) 종자는 70% 에탄올 1분, 2% sodium hypochlorite 1분간 처리하여 표면을 멸균 시켰다. 멸균한 종자를 5회 이상 멸균수에 세척한 후 *Methylobacterium* 균주의 세포현탁액에 담

가 shaker에서 4시간 동안 균주를 접종하였다. 대조구는 0.03 M MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 진탕하였다. 일반상토와 무비상토를 1:1로 배합한 상토를 담은 50구 플러그 육묘 트레이에

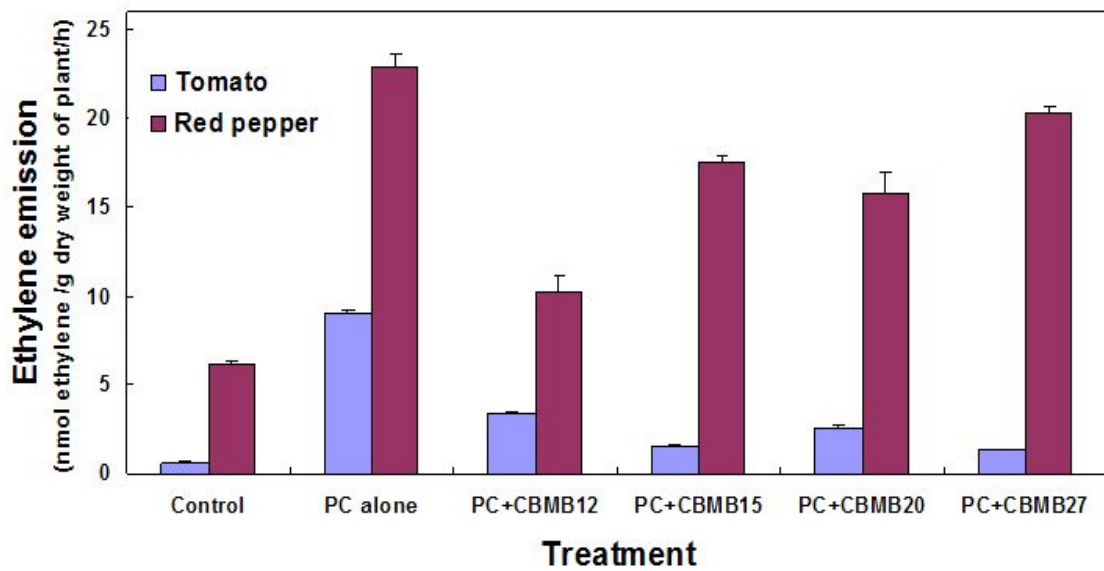


Fig. 27. *Methylobacterium*의 접종이 *Phytophthora capsici* (PC)에 감염된 잎의 스트레스 에틸렌 수준에 미치는 영향. Data are means of three replicates per treatment. Error bars represent standard error means of treatment values.

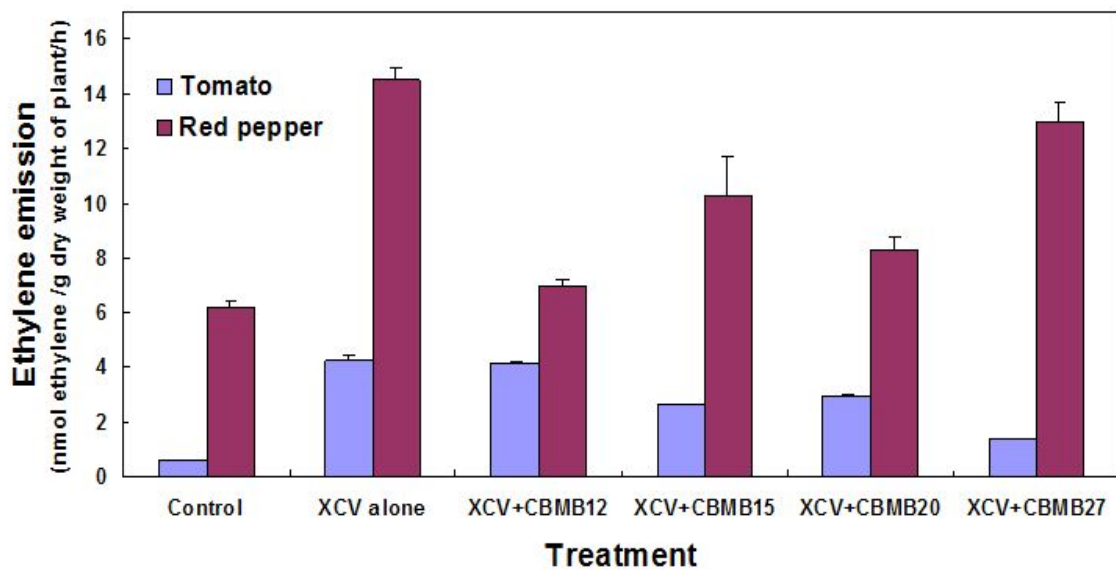


Fig. 28. *Methylobacterium*의 접종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 잎의 스트레스 에틸렌 수준에 미치는 영향. Data are mean of three replicates per treatment. Error bars represent standard error means of treatment values.

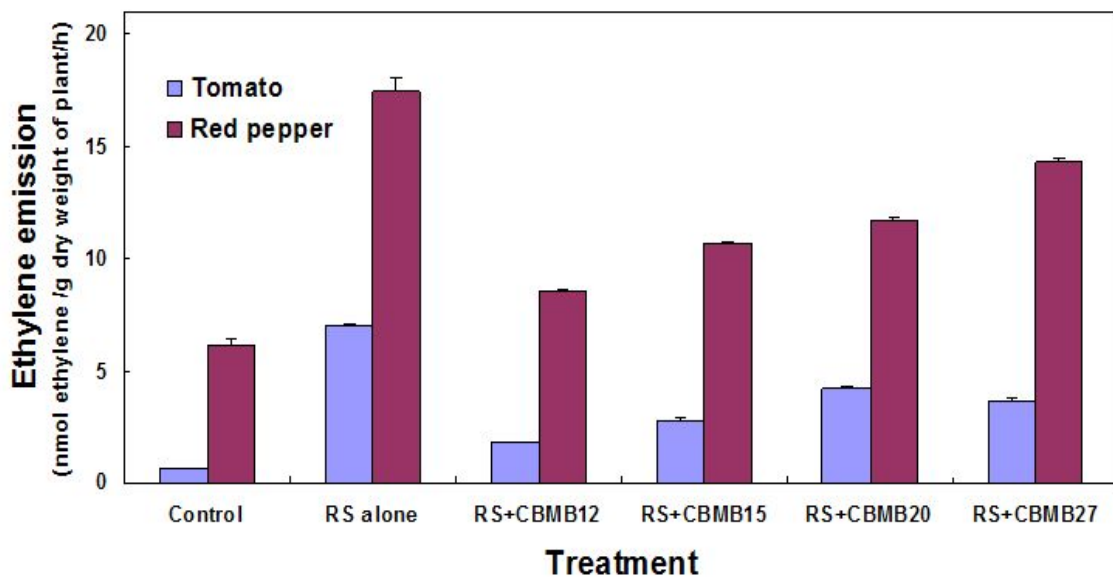


Fig. 29. *Methylobacterium*의 접종이 *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 잎의 스트레스 에틸렌 수준에 미치는 영향. Data are means of three replicates per treatment. Error bars represent standard error means of treatment values.



*Methylobacterium* 균주가 접종된 종자들을 파종하였다. 파종 후 식물 성장상에서 25°C, 14/10 시간 광/암 조건으로 발아시켰다. 발아 후 트레이를 온실로 옮겼으며, 육묘에 *Methylobacterium* 균주 현탁액을 5 ml 씩 근권 접종하였다. 파종 26일 째 토마토와 40일 째 고추를 원예용 일반상토가 담긴 400 ml 플라스틱 포트에 이식하였고, 주마다 10 ml Hoagland's 양액을 처리하였다. 각각의 처리구는 다음과 같으며, 각각의 처리구는 완전임의 배치법으로 8 반복하였다.

- (1) Control
- (2) Pathogen only (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*,  
*Ralstonia solanacearum*)
- (3) Pathogen + *Methylobacterium fujisawaense* CBMB12
- (4) Pathogen + *Methylobacterium* sp. CBMB15
- (5) Pathogen + *Methylobacterium oryzae* CBMB20
- (6) Pathogen + *Methylobacterium phyllosphaerae* CBMB27
- (7) Pathogen + Germicide {코사이드 (반점세균병), 밧사미드 (풋마름병)}

*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 균주 현탁액 (O.D. 600 nm = 0.4,  $3 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>)은 이식 3일 째, 17일 째 분무하여 접종하였으며, *Ralstonia solanacearum* 균주 현탁액 (O.D. 600 nm = 0.5,  $4.5 \times 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>)은 매주 근권 접종하였다. 또한 매주 마다 *Methylobacterium* 균주 현탁액 (O.D. 600 nm = 1.0,  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>)을 옆면과 근권 (10 ml)에 접종하였다. 매주 작물의 줄기 신장을 측정하였으며, 수확 후 뿌리 길이와 지상부 및 뿌리의 건물중을 측정하였다.

병원균에 노출된 작물에서 선발 *Methylobacterium* 균주의 접종이 작물 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 줄기신장, 뿌리길이, 지상부 및 뿌리 건물중을 측정한 결과 반점세균병에 노출된 토마토의 경우 선발 균주의 접종은 대조구 및 병원균 단일 접종 처리구에 비해 작물의 줄기신장촉진을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 30), 반점세균병에 감염된 토마토의 뿌리길이, 지상부 및 뿌리의 건물중 또한 대조구 및 병원균 단일 접종 처리구에 비해 유의성 있는 증가를 확인 할 수 있었다 (Table 13). 또한 세균성 풋마름병에 노출된 토마토에서 작물의 성장을 측정한 결과 선발 균주를 접종한 처리구에서 줄기신장, 뿌리길이, 지상부 및 뿌리 건물중이 병원균 단일 접종 처리구 대비 유의성 있는 증가를 확인 할 수 있었다 (Fig. 31, Table 14). 이와 유사하게 반점세균병에 노출된 고추의 성장 또한 선발 균주를 접종한 처리구에서 병원균 단일 접종 처리구 대비 유의성 있는 증가를 확인 할 수 있었으며 (Fig. 32, Table 15), 병원균을 처리

하지 많은 대조구와 특이적인 차이를 확인 할 수 없었다. 이는 병원균에 노출되었음에도 *Methylobacterium*의 접종에 의해 작물의 생장이 촉진되었음을 확인하였다.

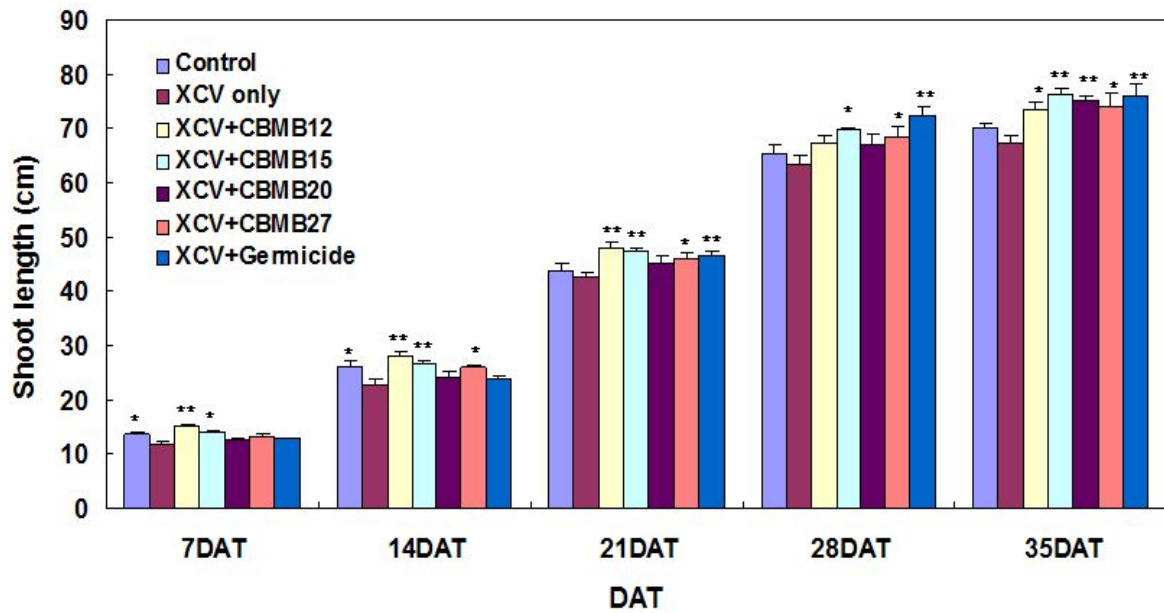


Fig. 30. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 토마토에서 *Methylobacterium* 균주의 접종이 줄기신장에 미치는 영향.

Table 13. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 토마토에서 *Methylobacterium* 균주의 접종이 작물의 뿌리길이, 지상부 건물중, 뿌리 건물중에 미치는 영향

Treatment	Root length (cm plant <sup>-1</sup> )	Shoot dry weight (g plant <sup>-1</sup> )	Root dry weight (g plant <sup>-1</sup> )
Control	24.0 ± 1.5b	10.0 ± 0.3b	0.45 ± 0.01d
XCV alone	19.9 ± 1.7c	8.2 ± 1.0c	0.39 ± 0.04d
XCV + CBMB12	29.5 ± 1.6a	12.3 ± 0.7a	0.58 ± 0.06bc
XCV + CBMB15	28.2 ± 1.1a	12.3 ± 0.2a	0.62 ± 0.02b
XCV + CBMB20	29.8 ± 1.0a	12.5 ± 0.3a	0.75 ± 0.05a
XCV + CBMB27	22.3 ± 0.8bc	10.5 ± 0.3b	0.48 ± 0.03cd
XCV + Germicide	31.6 ± 2.0a	9.7 ± 0.4bc	0.43 ± 0.01d

Values (mean ± S.E. n=8) with the same letters do not differ significantly at 0.05% (LSD).

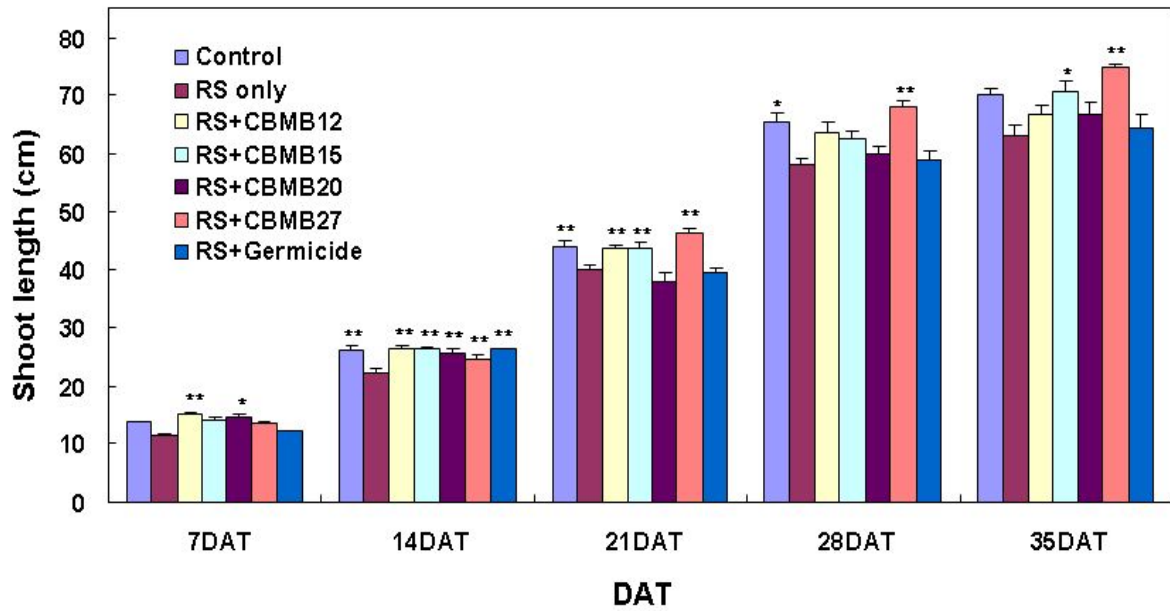


Fig. 31. *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 토마토에서 *Methylobacterium* 균주의 접종이 줄기신장에 미치는 영향.

Table 14. *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 토마토에서 *Methylobacterium* 균주의 접종이 작물의 뿌리길이, 지상부 건물중, 뿌리 건물중에 미치는 영향

Treatment	Root length (cm plant <sup>-1</sup> )	Shoot dry weight (g plant <sup>-1</sup> )	Root dry weight (g plant <sup>-1</sup> )
Control	27.7 ± 1.1a	13.0 ± 0.3b	0.45 ± 0.01c
RS alone	19.4 ± 1.6c	11.4 ± 0.3b	0.48 ± 0.04c
RS + CBMB12	27.7 ± 2.2a	16.1 ± 0.2a	0.74 ± 0.05b
RS + CBMB15	28.3 ± 0.6a	17.0 ± 0.5a	1.01 ± 0.04a
RS + CBMB20	24.7 ± 2.0ab	13.2 ± 1.4b	1.06 ± 0.10a
RS + CBMB27	24.3 ± 1.4ab	16.5 ± 0.6a	0.92 ± 0.06a
RS + Germicide	23.2 ± 0.9bc	11.8 ± 0.5b	0.55 ± 0.03c

Values (mean ± S.E. n=8) with the same letters do not differ significantly at 0.05% (LSD).

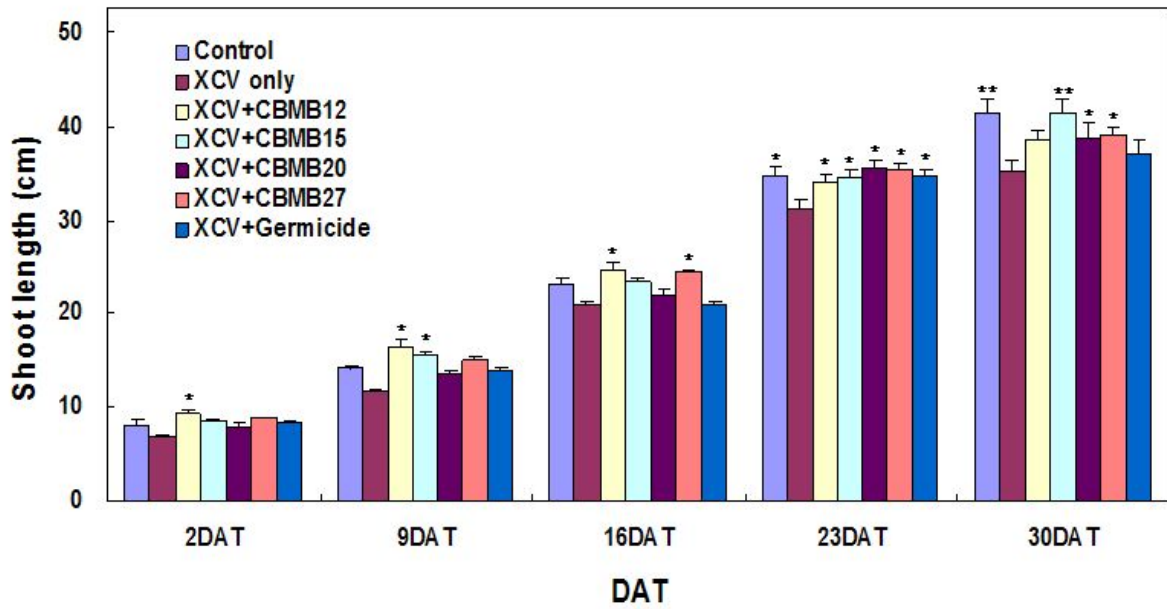


Fig. 32. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 고추에서 *Methylobacterium* 균주의 접종이 줄기신장에 미치는 영향.

Table 15. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 고추에서 *Methylobacterium* 균주의 접종이 작물의 뿌리길이, 지상부 건물중, 뿌리 건물중에 미치는 영향

Treatment	Root length (cm plant <sup>-1</sup> )	Shoot dry weight (g plant <sup>-1</sup> )	Root dry weight (g plant <sup>-1</sup> )
Control	24.9 ± 1.6ab	1.86 ± 0.21a	0.69 ± 0.07a
XCV alone	23.9 ± 0.7b	1.07 ± 0.08c	0.54 ± 0.03b
XCV + CBMB12	25.2 ± 1.0ab	1.46 ± 0.07b	0.68 ± 0.03a
XCV + CBMB15	25.8 ± 1.4ab	1.51 ± 0.11b	0.74 ± 0.03a
XCV + CBMB20	28.2 ± 1.2a	1.39 ± 0.11b	0.72 ± 0.03a
XCV + CBMB27	27.4 ± 1.1a	1.49 ± 0.13b	0.71 ± 0.03a
XCV + Germicide	25.3 ± 1.0ab	1.31 ± 0.05bc	0.58 ± 0.03b

Values (mean ± S.E. n=8) with the same letters do not differ significantly at 0.05% (LSD).

## 18. *Methylobacterium* 균주 접종이 병증 발생에 미치는 영향 확인

*Methylobacterium* 균주 접종이 병증 발생에 미치는 영향 확인하기 위하여 병원균 접종 7일 후 병원균에 의한 병증 확인 및 질병의 발생 정도를 측정하였다. 질병의 발생 정도는 다음과 같은 0 - 7의 질병 지수로 구분하였다.

- 0 - 병증 발생하지 않음;
- 1 - 잎의 반 이하 면적에 병증이 나타남;
- 2 - 병증이 나타난 잎들이 25% 미만으로 나타남;
- 3 - 병증이 나타난 잎들이 25%에서 49% 이하로 나타남;
- 4 - 병증이 나타난 잎들이 50%에서 74% 이하로 나타남;
- 5 - 4단계와 동일하나 새로 난 어린잎에서 병증이 나타남;
- 6 - 병증이 나타난 잎들이 75% 이상으로 나타남;
- 7 - 작물이 고사함 (Campbell and Madden 1990).

반점세균병에 감염된 토마토와 고추의 잎에서 발생한 병증과 질병 지수를 측정한 결과, *Methylobacterium* 균주의 접종은 병원균 단일 접종 처리구에 비해 황색 반점의 수가 유의성 있게 저감된 확연히 낮은 병증을 확인하였으며 (Fig. 33, 36), 특히 선발 균주 접종 처리구의 경우 토마토의 새로 난 어린잎에서 병원균 단일 접종 처리구에 비해 확연히 감소된 병증을 확인하였다 (Fig. 34). 병증 발생 정도 또한 병원균 단일 접종 처리구 대비 유의성 있는 질병 지수의 감소를 확인 할 수 있었다 (Fig. 35, 37). 이와 유사하게 세균성 풋마름병에 감염된 토마토의 병증과 질병 지수를 측정한 결과 *Methylobacterium* 균주 접종 처리구에서 병원균 단일 접종 처리구 대비 확연한 갈변 및 마름 현상이 감소하는 경향을 확인하였으며 (Fig. 38), 질병 지수 또한 병원균 단일 접종 처리구 대비 유의성 있는 저감을 확인하였다 (Fig. 39).

## 19. *Methylobacterium* 균주 접종이 병원균에 감염된 작물의 에틸렌 발생 및 에틸렌 생합성 효소에 미치는 영향 확인

ACC deaminase를 생산하는 *Methylobacterium* 접종이 병원균에 감염된 토마토와 고추의 스트레스 에틸렌 발생량에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 작물의 잎을 샘플링 하였다. 샘플링 한 잎을 120 ml GC bottle에 넣고 Rubber serum stopper로 입구를 막은 후 4시간 정치시킨다. 정치 후 1 ml gas를 head space에서 채취하여 Gas Chromatography (DS 6200, Donam



Instruments Inc.)을 이용해 에틸렌을 측정하였다. 에틸렌을 측정 후 각 유묘의 건물중을 측정하였다. 식물조직의 ACC 축적량의 측정은 Madhaiyan (2007) 방법으로 측정하였다. 식물 조직

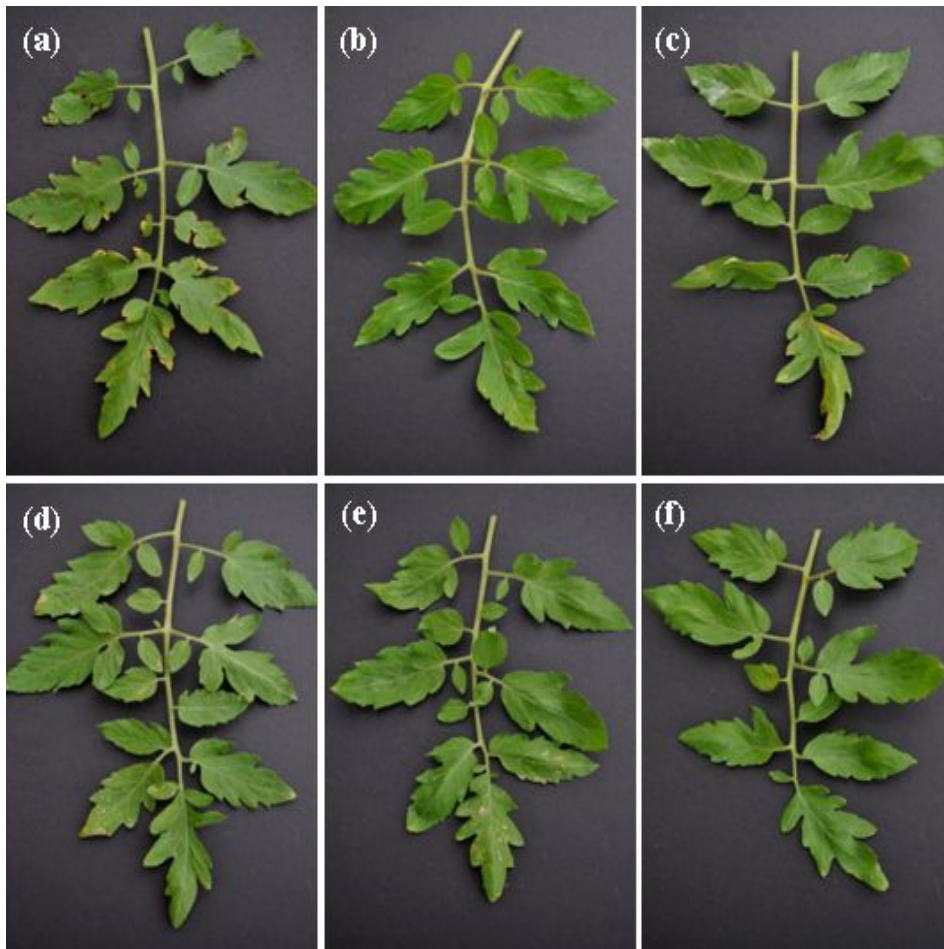


Fig. 33. *Methylobacterium* 균주의 접종이 반점세균병에 감염된 토마토의 병증 발생에 미치는 영향. (a) XCV alone; (b) XCV+ CBMB12; (c) XCV + CBMB15; (d) XCV + CBMB20; (e) XCV + CBMB27; (f) XCV + GER.

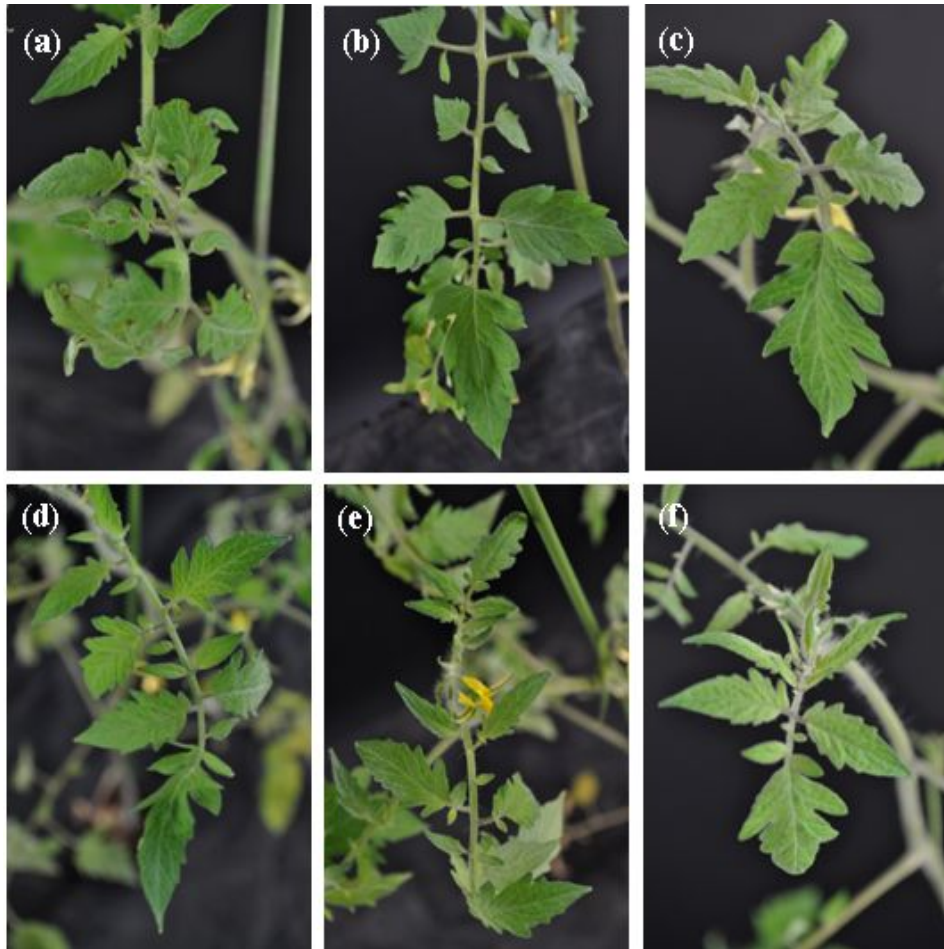


Fig. 34. *Methylobacterium* 균주의 접종이 반점세균병에 감염된 토마토의 새로 난 어린잎 병증 발생에 미치는 영향. (a) XCV alone; (b) XCV+ CBMB12; (c) XCV + CBMB15; (d) XCV + CBMB20; (e) XCV + CBMB27; (f) XCV + GER.

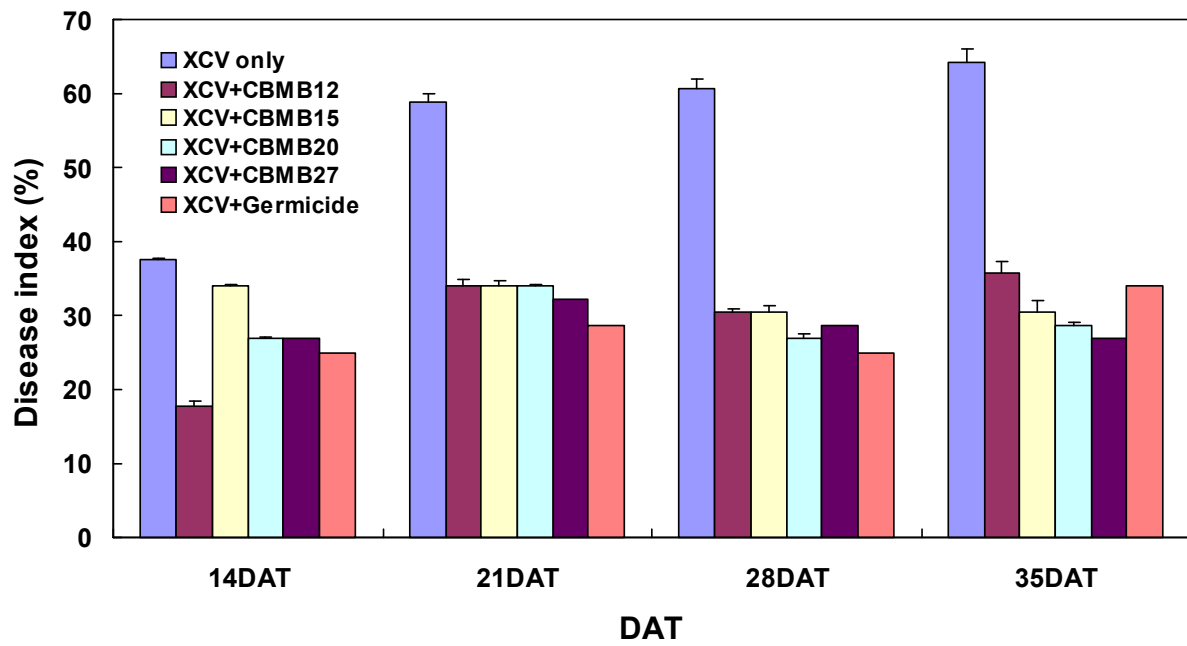


Fig. 35. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 토마토의 질병 지수에 미치는 영향.



Fig. 36. *Methylobacterium* 균주의 접종이 반점세균병에 감염된 고추의 병증 발생에 미치는 영향. (a) XCV alone; (b) XCV+ CBMB12; (c) XCV + CBMB15; (d) XCV + CBMB20; (e) XCV + CBMB27; (f) XCV + GER.

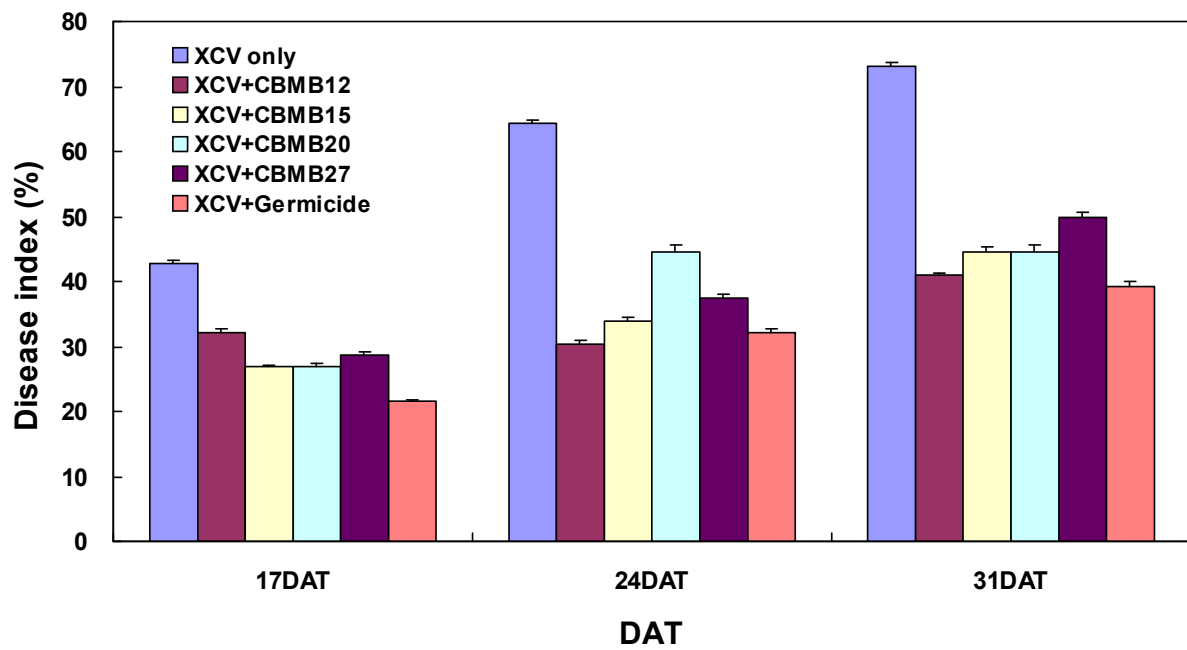


Fig. 37. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 고추의 질병 지수에 미치는 영향.

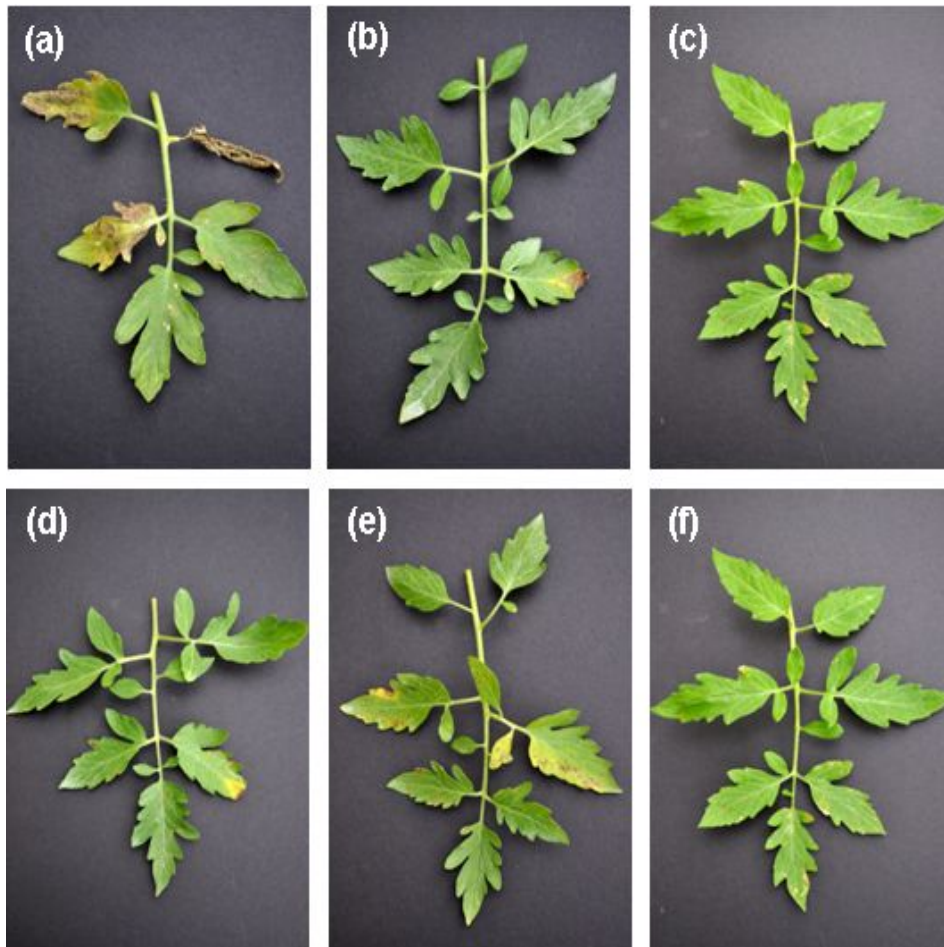


Fig. 38. *Methylobacterium* 균주의 접종이 세균성 풋마름병에 감염된 토마토의 병증 발생에 미치는 영향. (a) XCV alone; (b) XCV+ CBMB12; (c) XCV + CBMB15; (d) XCV + CBMB20; (e) XCV + CBMB27; (f) XCV + GER.

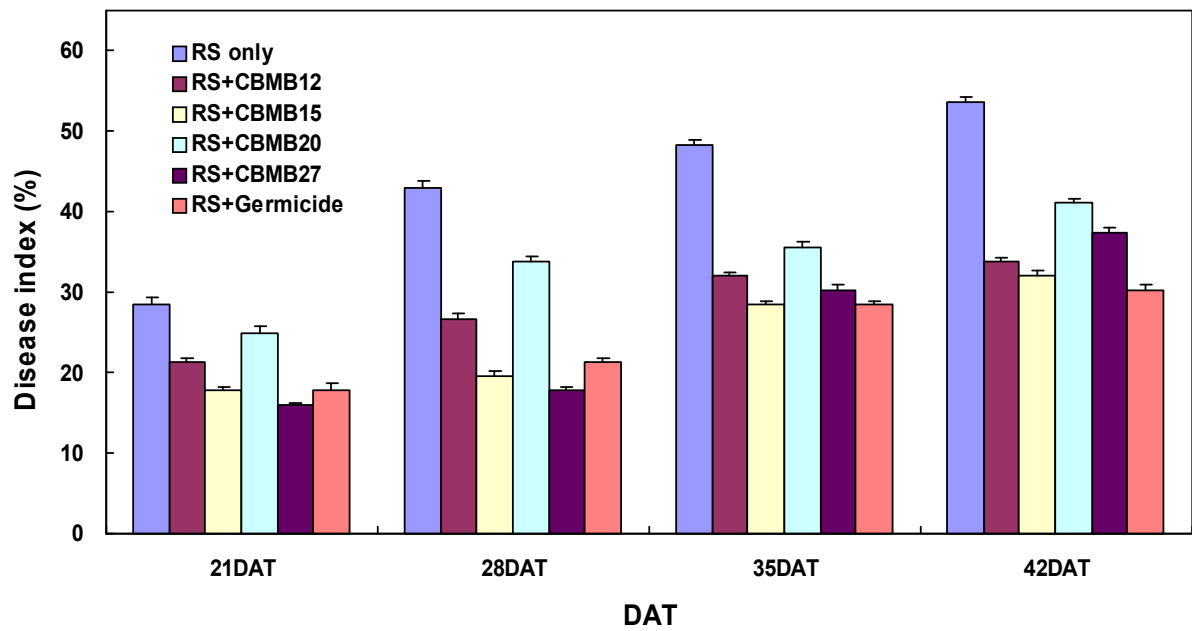


Fig. 39. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 토마토의 질병 지수에 미치는 영향.



1 g을 액체질소를 이용해 마쇄한 후 butylated hydroxytoluene (BHT,  $2 \text{ mg l}^{-1}$ )가 함유된 5 ml 80% methanol을 넣고 다시 원심분리 하였다. 상등액은 진공상태에서 증발시켜 농축하였다. ACC 농도는 Lizada와 Yang (1979)을 원리로 한 Wachter (1999) 방법으로 수행하였다. Dichloromethane을 제거한 aqueous phase (0.5ml)을 0.1ml  $\text{HgCl}_2$  (80mM)와 함께 test tube에 넣고 rubber septum으로 입구를 막았다. 0.2 ml NaOCl 용액을 tube에 주입하여 shaking 하여 8분 동안 정치하였다. 정치 후 1 ml gas를 head space에서 채취하여 Gas Chromatography (DS 6200, Donam Instruments Inc.)을 이용해 산화된 에틸렌을 측정하였다. 식물조직의 ACC 활성 분석은 동결된 조직을 액체 질소를 이용하여 마쇄 후 1 g 시료에 2 ml의 추출 용액 (30 mM sodium ascorbate, 10% (w/v) glycerol, 100 mM Tris-HCl (pH 7.2))을 첨가 후 원심분리 하였다 (15,000 rpm, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Test tube에 상등액 1.5 ml에 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , 1 mM ACC 첨가 후 rubber septum으로 입구를 막고  $30^\circ\text{C}$ 에서 15분간 정치하였다. 정치 후 1 ml gas를 head space에서 채취하여 Gas Chromatography (DS 6200, Donam Instruments Inc.)을 이용해 에틸렌을 측정하였다.

토마토와 고추에서 반점세균병 감염에 의한 스트레스 수준의 에틸렌 발생과 그에 관여하는 ACC와 ACO (ACC oxidase)의 축적량을 확인한 결과, *Methylobacterium* 균주 접종 처리구에서 유의성 있는 에틸렌 발생 저감 효과를 가져왔다 (Fig. 40, 41). 토마토의 경우 병원균처리 7 일째 (포트 이식 14일째) 대조구 대비 스트레스 에틸렌 발생량이 급격히 증가했으나 선발 균주 접종 처리구에서는 그 증가폭이 병원균 단일 처리구에 비해 유의성 있게 낮은 경향을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 토마토와 고추의 에틸렌 생합성 관여 효소인 ACC와 ACO 축적량을 측정한 결과 선발 균주 접종 처리구에서 병원균 단일 접종 처리구 대비 유의성 있는 감소를 확인할 수 있었으며, 특히 토마토에서는 병원균을 접종하지 않은 대조구와 비슷한 수준으로 효소 생합성이 이루어 졌음을 확인할 수 있었다 (Fig. 42, 43). 이와 유사하게 세균성 풋마름병에 노출된 토마토의 스트레스 에틸렌 수준 또한 병원균 처리 7일째 (포트 이식 14일째) 병증이 진전됨에 따라 대조구 대비 스트레스 에틸렌 수준이 증가했으나 선발 균주 접종 처리구에서는 그 증가폭이 병원균 단일 처리구 대비 유의성 있는 차이를 보였으며, 시간이 지남에도 그 차이를 유지하였다 (Fig. 44). 하지만 살균제를 처리한 처리구에서는 포트 이식 28일째 병원균 단일 처리구와 유의적인 차이를 확인하지 못하였다. 또한 세균성 풋마름병에 노출된 토마토의 ACC와 ACO 축적량을 측정한 결과 반점세균병의 경우와 유사하게 선발 균주를 접종한 처리구에서 병원균 단일 처리구 대비 유의성 있는 에틸렌 생합성 효소 저감 효과를 확인하였다 (Fig. 45). 이는 작물에 축적된 ACC가 *Methylobacterium*이 생산하는 ACC deaminase에 의해



$\alpha$ -ketobutyrate와 ammonia로 가수분해 되기 때문에 ACC 축적량이 감소되고 그에 따라 ACO와 스트레스 에틸렌 발생량 또한 저감되는 것이다.

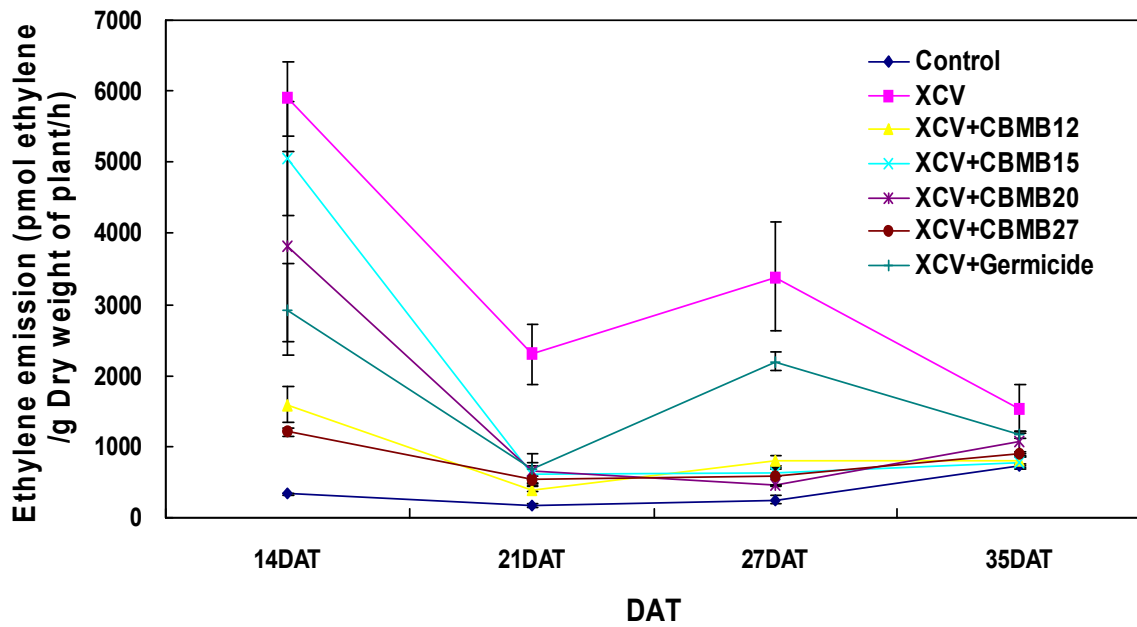


Fig. 40. *Methylobacterium* 균주 접종이 반점세균병에 감염된 토마토의 에틸렌 발생량에 미치는 영향.

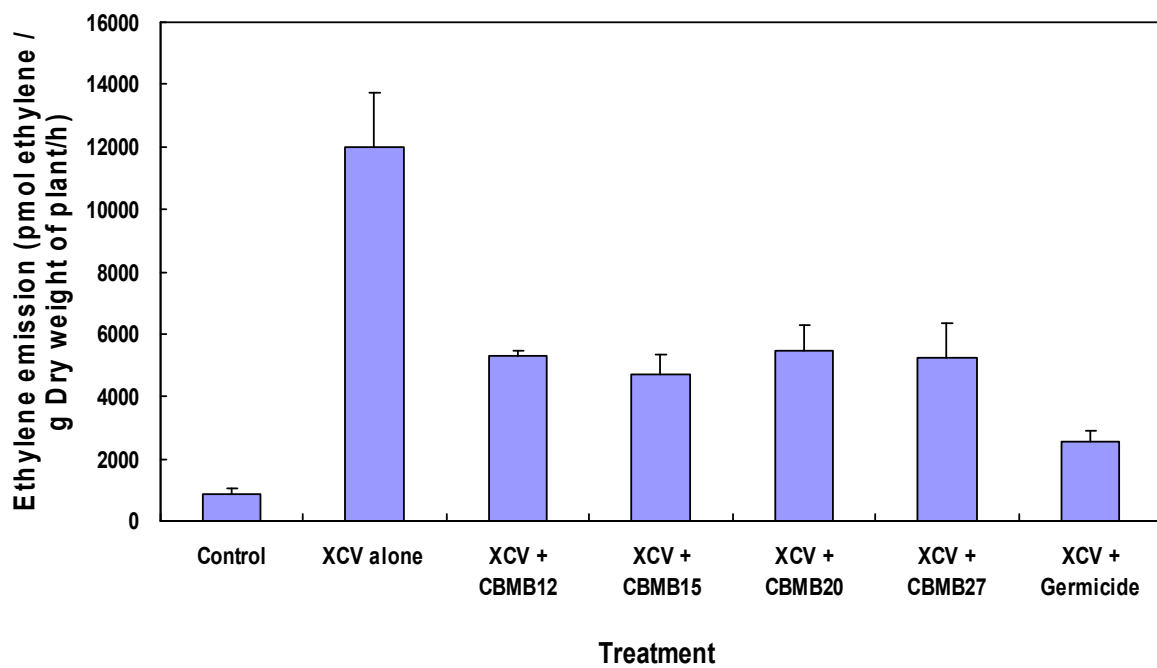


Fig. 41. *Methylobacterium* 균주 접종이 반점세균병에 감염된 고추의 에틸렌 발생량에 미치는 영향 (31 DAT).

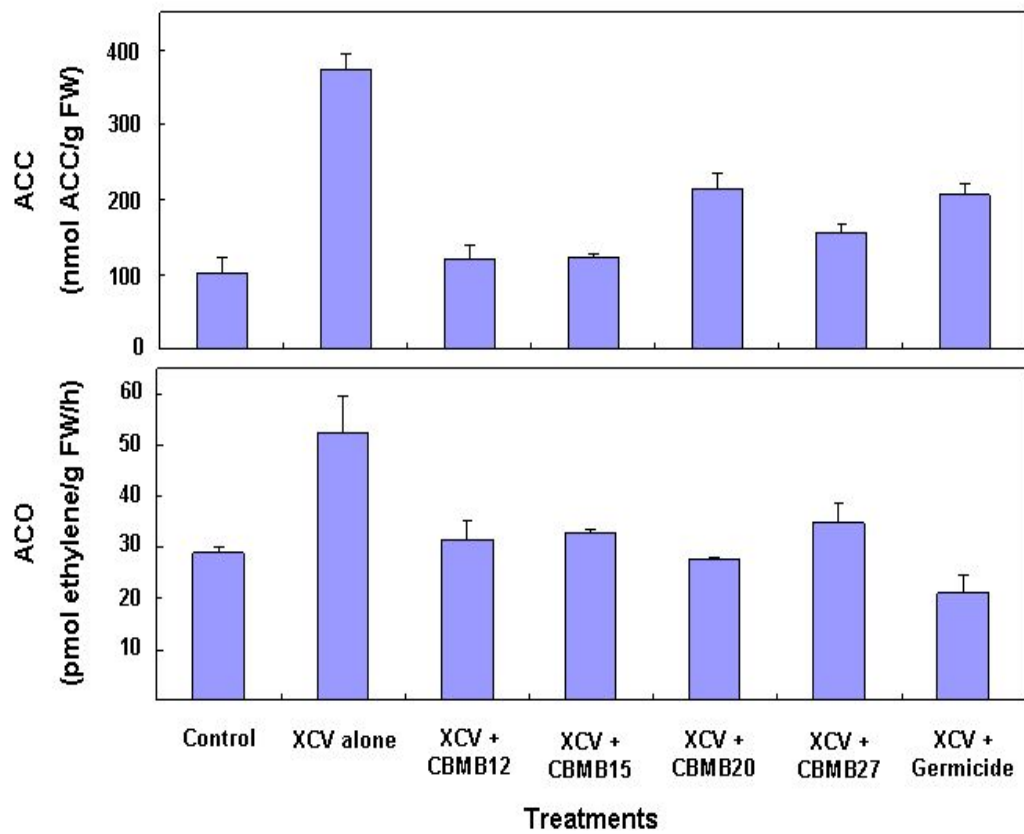


Fig. 42. *Methylobacterium* 균주 접종이 반점세균병에 감염된 토마토의 ACC와 ACO 축적에 미치는 영향.

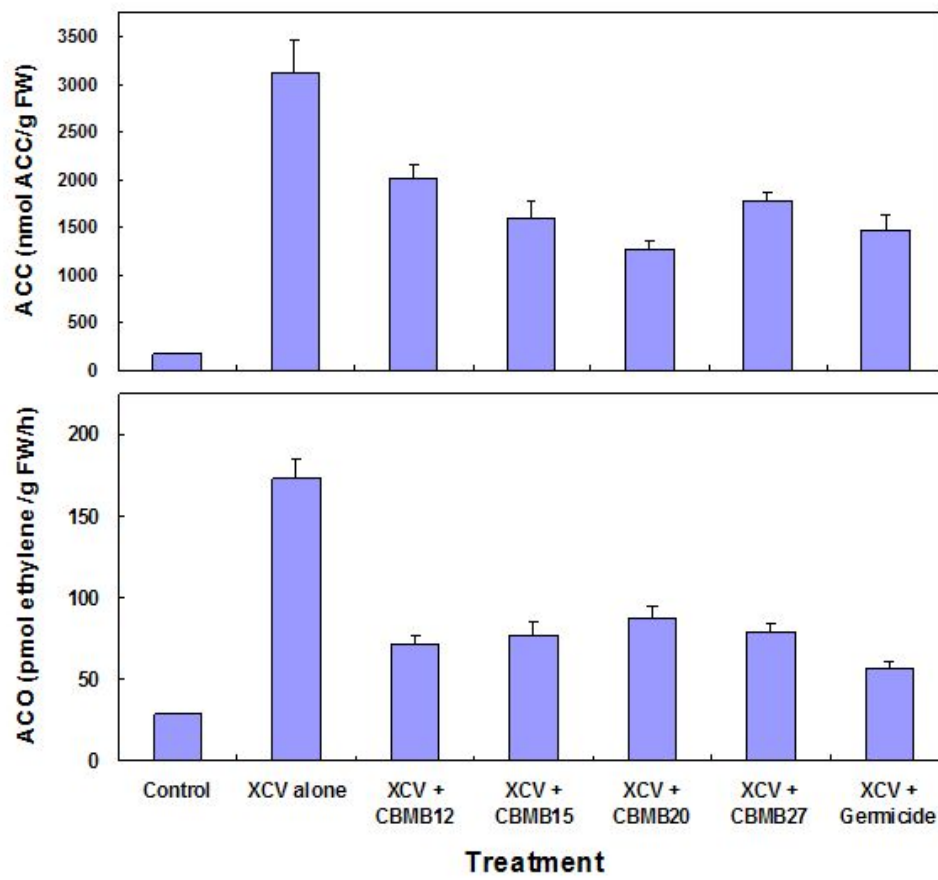


Fig. 43. *Methylobacterium* 균주 접종이 반점세균병에 감염된 고추의 ACC와 ACO 축적에 미치는 영향

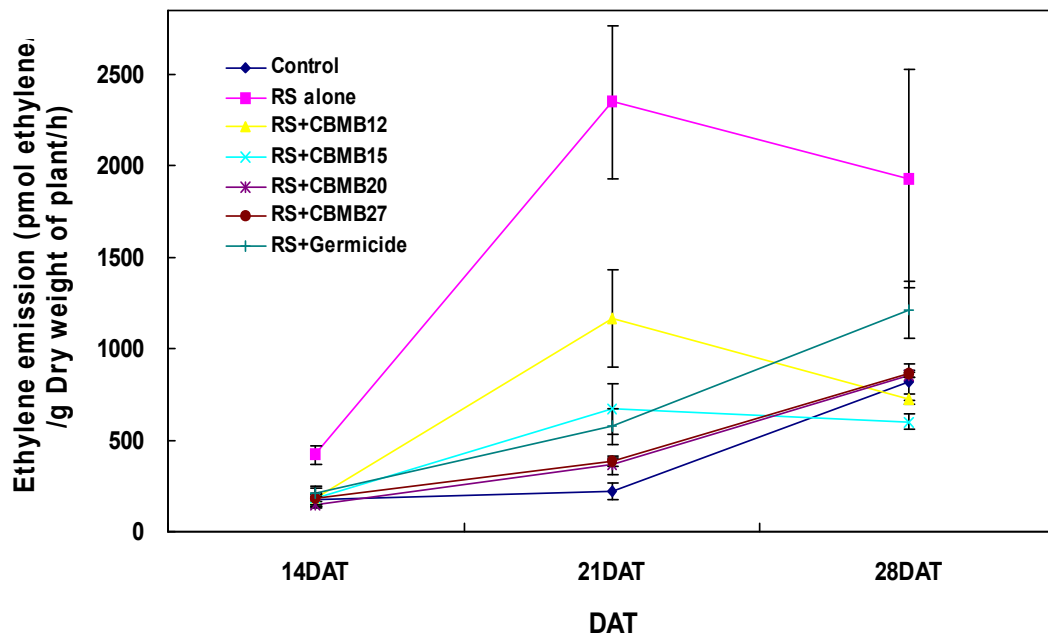


Fig. 44. *Methylobacterium* 균주 접종이 세균성 풋마름병에 감염된 토마토의 에틸렌 발생량에 미치는 영향.

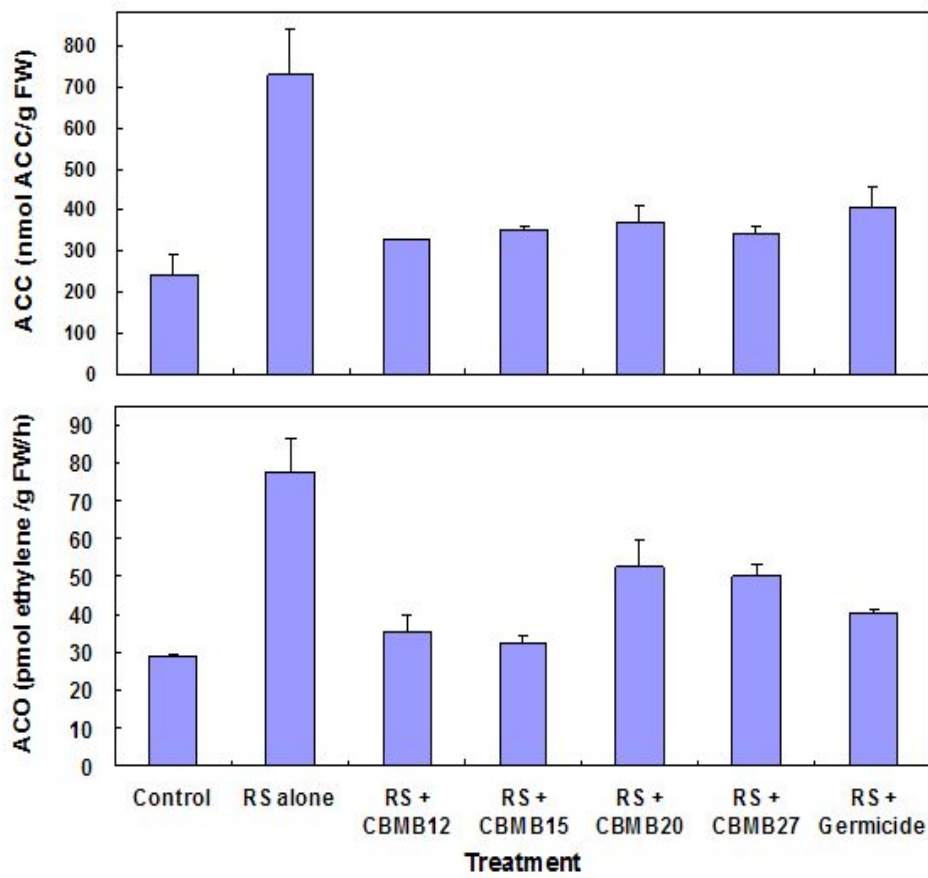


Fig. 45. *Methylobacterium* 균주 접종이 세균성 풋마름병에 감염된 토마토의 ACC와 ACO 축적에 미치는 영향

## 20. *Methylobacterium* 균주 접종이 병원균에 감염된 작물의 PR 단백질 활성화에 미치는 영향 확인

*Methylobacterium* 균주 접종이 병원균에 감염된 작물에서 자가 방어 유도를 위한 PR 단백질 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 샘플의 잎을 액체질소를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄 후 0.1 M Potassium phosphate buffer 1.25 ml 첨가하여 20000rpm, 4°C 조건에서 20분간 원심 분리하였다.  $\beta$ -1,3-glucanase 활성 측정을 위해 50  $\mu$ l의 enzyme extract에 Laminarin (10 mg/ml)을 첨가한 50 mM sodium acetate buffer 50  $\mu$ l를 넣어 섞은 후 (pH 5.0), 37°C에서 한 시간 정치하였다. 1.5 ml dinitrosalicylic acid (DNS)를 넣고, 100°C water bath에서 5분간 반응 후 530 nm 파장으로 UV-vis Spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. PAL 활성을 확인하기 위하여 100  $\mu$ l enzyme extract에 1.9 ml의 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)와 1 ml 15 mM L-phenylalanine을 첨가하였다. 30°C에서 15분간 정치 후 6 M HCl을 200  $\mu$ l 넣어 반응 시켜 290 nm 파장에서 측정하였다. PO 활성을 측정하기 위해 enzyme extract 50  $\mu$ l에 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) 2.85 ml, 20 mM guaiacol 50  $\mu$ l, 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20  $\mu$ l를 첨가하여 반응 시킨 후 470 nm 파장으로 측정하였다. PPO 활성을 측정하기 위해 enzyme extract 200  $\mu$ l에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 1.5 ml와 0.01 M catechol (pyrocatechol) 200  $\mu$ l를 첨가 후 voltex하였다. 420 nm 파장으로 UV-vis spectrophotometer를 이용해 흡광도를 측정하였다.

반점세균병에 감염된 토마토의 조직으로부터 PR 단백질인  $\beta$ -1,3-glucanase와 PAL의 활성을 측정한 결과 병원균을 처리한 처리구에서 대조구 대비 높은  $\beta$ -1,3-glucanase와 PAL 활성을 확인 할 수 있었으며, *Methylobacterium* 균주 접종 처리구에서 병원균 단일 처리구 대비 증가된  $\beta$ -1,3-glucanase와 PAL 활성을 확인하였다 (Fig. 46). 특히 CBMB12와 CBMB20 접종 처리구에서 매우 유의성 있는 증가를 확인 할 수 있었다. 마찬가지로 반점세균병에 감염된 고추의 PR 단백질 활성화는 병원균을 처리한 처리구에서 대조구 대비 높은 PR 단백질 활성을 나타냈으며, *Methylobacterium* 균주 접종 처리구 중 CBMB12 접종 처리구에서 병원균 단일 처리구 대비 유의성 있는 PR 단백질 증가를 확인 할 수 있었다 (Table 16). 또한 세균성 풋마름병에 감염된 토마토의 조직에 축적된 PR 단백질을 측정된 결과 이전 결과와 유사하게 병원균 처리구의 PR 단백질 활성이 대조구에 비해 높은 경향을 나타냈으며, 선발 균주 접종 처리구에서 병원균 단일 접종 처리구 대비 유의성 있는 PR 단백질 활성을 확인하였다 (Table 17). PR 단백질은 병원균에 노출된 작물이 병원균에 대한 자가 방어 유도를 위한 단백질로서 병원균에 감

염되었을 때 그 활성이 높아지며, ACC deaminase를 생산하는 *Methylobacterium* 균주의 접종이 PR 단백질의 활성을 촉진시켜 병원균에 대한 방어를 유도하는 것으로 확인되었다.

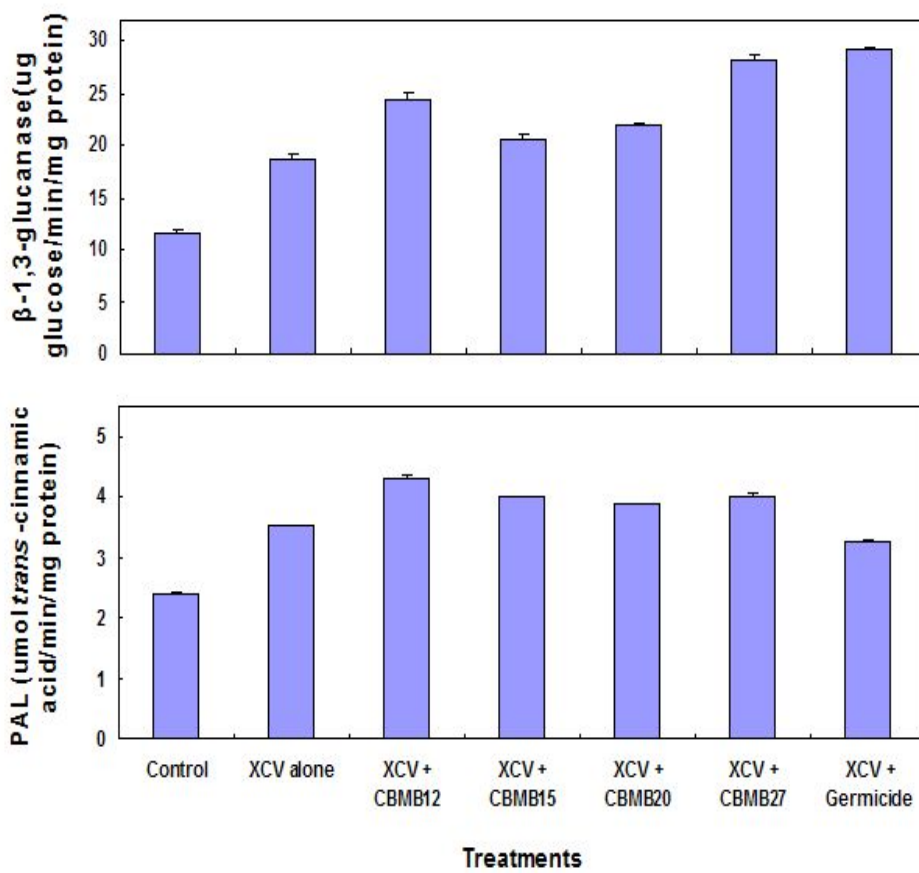


Fig. 46. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 토마토의  $\beta$ -1,3-glucanase와 PAL 발현량에 미치는 영향.



Table 16. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 고추의 PR 단백질 발현량에 미치는 영향

Treatment	$\beta$ -1,3-glucanase (ug glucose / min / mg protein)	Phenylalanine ammonia lyase (uM trans-cinnamic acid / min / mg protein)	Polyphenol oxidase (Changes in unit abs / min / mg protein)	Peroxidase (Changes in unit abs / min / mg protein)
Control	10.95±0.02e	6.43±0.02f	0.030±0.002ab	1.63±0.21d
XCV alone	22.18±0.27c	8.00±0.16d	0.035±0.002ab	5.89±0.60b
XCV + CBMB12	25.49±0.13a	10.59±0.25a	0.039±0.003a	9.44±0.52a
XCV + CBMB15	23.04±0.19b	9.99±0.09b	0.033±0.002ab	4.50±0.20c
XCV + CBMB20	22.79±0.11b	9.73±0.08bc	0.040±0.002a	6.51±0.14b
XCV + CBMB27	21.81±0.33c	9.43±0.09c	0.031±0.003ab	10.03±0.99a
XCV + Germicide	18.79±0.08d	7.52±0.21e	0.028±0.001b	3.88±0.49c

Values (mean ± S.E. n=8) with the same letters do not differ significantly at 0.05% (LSD).

Table 17. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 토마토의 PR 단백질 발현량에 미치는 영향

Treatment	$\beta$ -1,3-glucanase (ug glucose / min / mg protein)	Phenylalanine ammonia lyase (uM trans -cinnamic acid / min / mg protein)	Polyphenol oxidase (Changes in unit abs / min / mg protein)	Peroxidase (Changes in unit abs / min / mg protein)
Control	26.4±1.8e	2.39±0.03f	0.026±0.001d	2.91±0.35d
RS alone	46.1±0.9bc	3.53±0.03e	0.052±0.003c	3.95±0.26cd
RS + CBMB12	50.5±0.8a	3.88±0.01d	0.067±0.003b	6.38±0.25bc
RS + CBMB15	51.9±1.0a	4.12±0.02c	0.063±0.004b	6.89±0.66b
RS + CBMB20	42.3±1.6cd	4.25±0.04b	0.064±0.004b	5.83±0.32bc
RS + CBMB27	48.9±1.5ab	4.35±0.04a	0.082±0.006a	11.80±1.46a
RS + Germicide	41.8±0.2d	3.81±0.03d	0.076±0.005a	12.23±0.33a

Values (mean ± S.E. n=3) with the same letters do not differ significantly at 0.05% (LSD).

## 21. Real-Time PCR을 이용한 ACC-oxidase, $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL 관련 유전자 발현 측정

*Methylobacterium* 균주의 접종이 작물의 병원균방어효소 발현량과 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하였다. 액체 질소를 이용하여 마쇄한 식물 조직의 total RNA를 RNeasy plant mini kit (QIAGEN, Germany)을 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA를 Quant-it (Invitrogen, USA) 정량 kit을 이용하여 정량하였으며, 정량된 RNA에서 genomic DNA의 오염을 방지하기 위하여 DNase I (Invitrogen, USA)을 처리하였다. cDNA의 합성은 Superscript III first strand (Invitrogen, USA)의 oligo dT와 random hexamer를 함께 사용하여 cDNA 합성의 효율을 높이고자 하였다. Real-Time PCR은 SYBR green을 이용하여 분석하였으며 SYBR green super mix (Bio-rad, USA)를 사용하였고 iQ5 (Bio-rad, USA) 기기를 사용하여 분석하였다. 추출한 RNA를 cDNA 합성하여 한 개의 PCR tube에 10 ng의 total RNA에서 합성된 cDNA를 포함하도록 분주하고 각각의 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 정량분석하였다 (Table 18). 정량은 actin과 tubulin을 internal control로 사용하여 normalize된 상대정량 방법을 사용하였다.

반점세균병에 감염된 토마토에서 에틸렌 생성에 관여하는 효소인 ACO와 병원균 방어 효소인  $\beta$ -1,3-glucanase 및 PAL 활성 관련 유전자 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과, 대부분의 병원균 처리 처리구에서 대조구 대비 높은 유전자 발현을 확인 할 수 있었다 (Fig. 47, 48, 49). ACO 관련 유전자의 발현은 선발 *Methylobacterium* 균주를 처리하였을 때 병원균 단일 접종 처리구에 비해 유의성 있게 저감된 결과를 확인하였으며,  $\beta$ -1,3-glucanase 및 PAL 활성 관련 유전자 발현은 선발 균주를 처리하였을 때 병원균 단일 접종 처리구 대비 증가된 유전자 발현을 확인하였다. 이와 유사하게 세균성 풋마름병에 감염된 토마토의 ACO,  $\beta$ -1,3-glucanase, PAL 활성 관련 유전자 발현 또한 병원균 처리 처리구에서 대조구 대비 높은 유전자 발현을 확인 할 수 있었다 (Fig. 50, 51, 52). 세균성 풋마름병에 감염된 토마토의 ACO 관련 유전자 발현은 선발 균주를 처리하였을 때 병원균 단일 처리구 대비 유의성 있게 저감되는 유전자 발현을 확인하였으며,  $\beta$ -1,3-glucanase 및 PAL 활성 관련 유전자 발현은 선발 균주를 처리하였을 때 병원균 단일 접종 처리구 대비 유의성 있게 증가된 유전자 발현을 확인하였다. 이러한 대조구 대비 병원균 감염 처리구에서 높은 유전자 발현 결과는 상기 ACO 축적량 및 PR 단백질 활성 결과와 유사한 경향이며, 선발 *Methylobacterium* 균주를 처리하였을 때 결과 또한 유사한 경향을 나타냈다. 이는 ACC deaminase를 생산하는 *Methylobacterium* 균주

를 집중 처리하였을 때 에틸렌 생성을 촉진하는 ACO 활성은 저감되며, 병원균 방어 효소의 활성은 증가됨을 알 수 있다.

Table 18. ACC-oxidase,  $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL 관련 유전자 발현 측정을 위한 Real-Time PCR용 primer

Gene name	Host plants	Accession no.	Primer name	Primer sequence(5'→3')
ACC-oxidase	<i>Capsicum annuum</i> L.	AB434925	YL983	AGGAGTTACTGGACTTGCTCTGTG
			YL984	GGCATGGCGGATAATTGCTCAC
	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	AB013101	YL991	AAGATGGCACTAGGATGTCAATAG
			YL992	TCCTCTTCTGTCTTCTCAATCAAC
PAL	<i>Capsicum annuum</i> L.	EU616575	YL989	GAGGCTGCTGCTATTATGGAACAC
			YL990	ACGATCTTGCTTTGGTTTCTGGAG
	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	AB269917	YL993	CGCTATGCTCTCCGAACATCTC
			YL994	ATTCACCGAGTTAATCTCCCTCTC
$\beta$ -1,3-glucanase	<i>Capsicum annuum</i> L.	AF227953	YL985	GCGTGACATTTCTCTCTCCTATGC
			YL986	GCTGTAACGGAGTCCAACCTTTC
	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	FJ151171	YL995	GCGGTGTTTCAGCCTGGATG
			YL996	AGCATGAGCAAGAAGTATGTTGTG

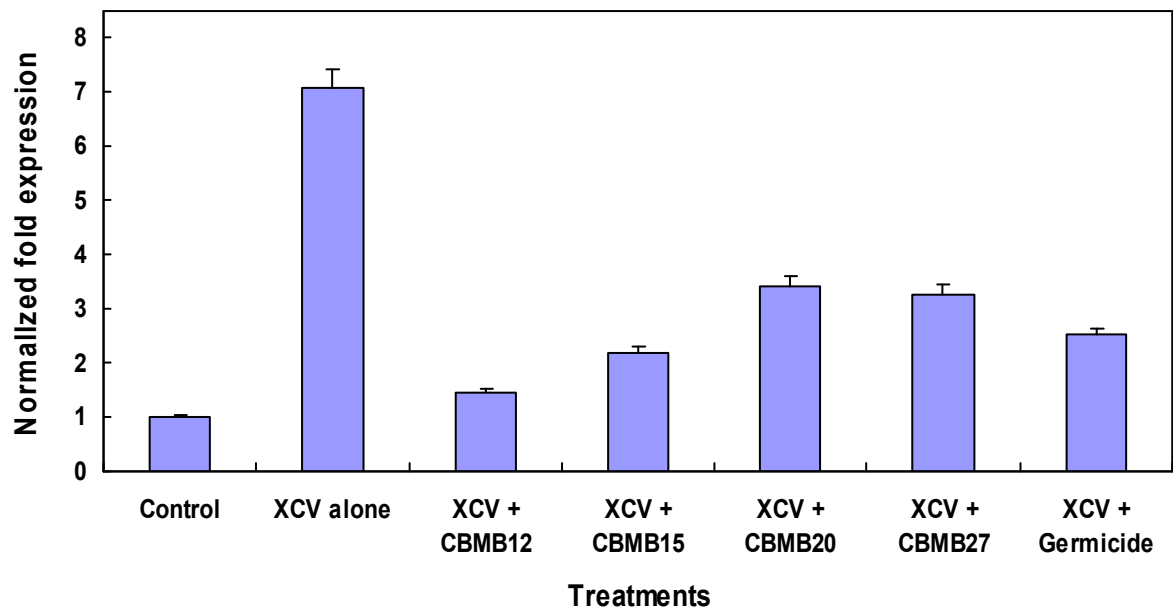


Fig. 47. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 토마토의 ACO 관련 유전자 발현에 미치는 영향.

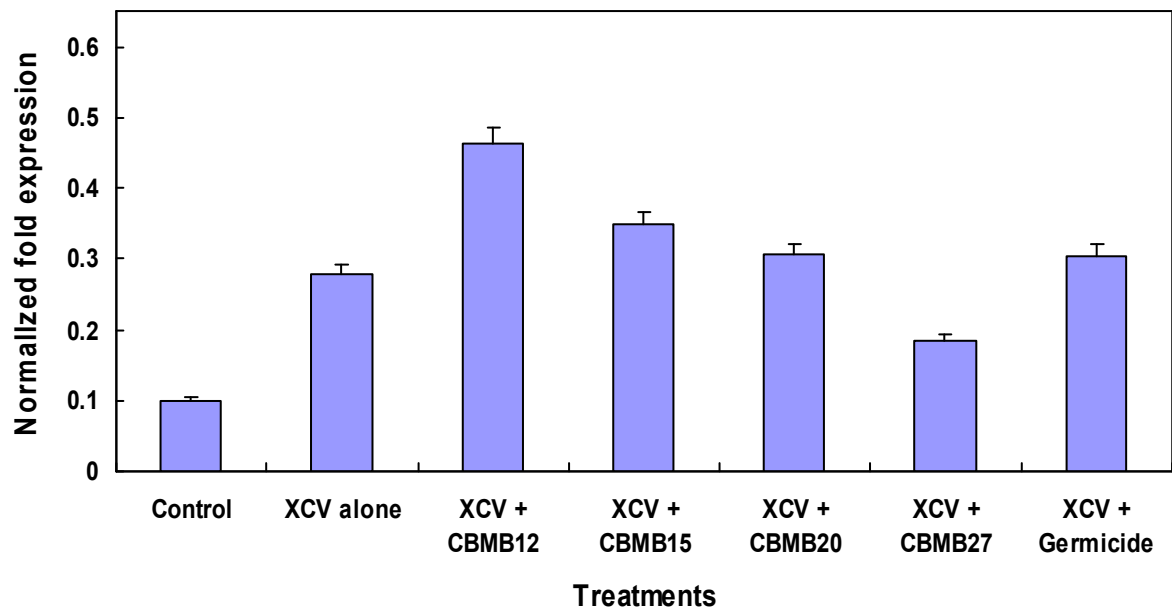


Fig. 48. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 토마토의  $\beta$ -1,3-glucanase 관련 유전자 발현에 미치는 영향.

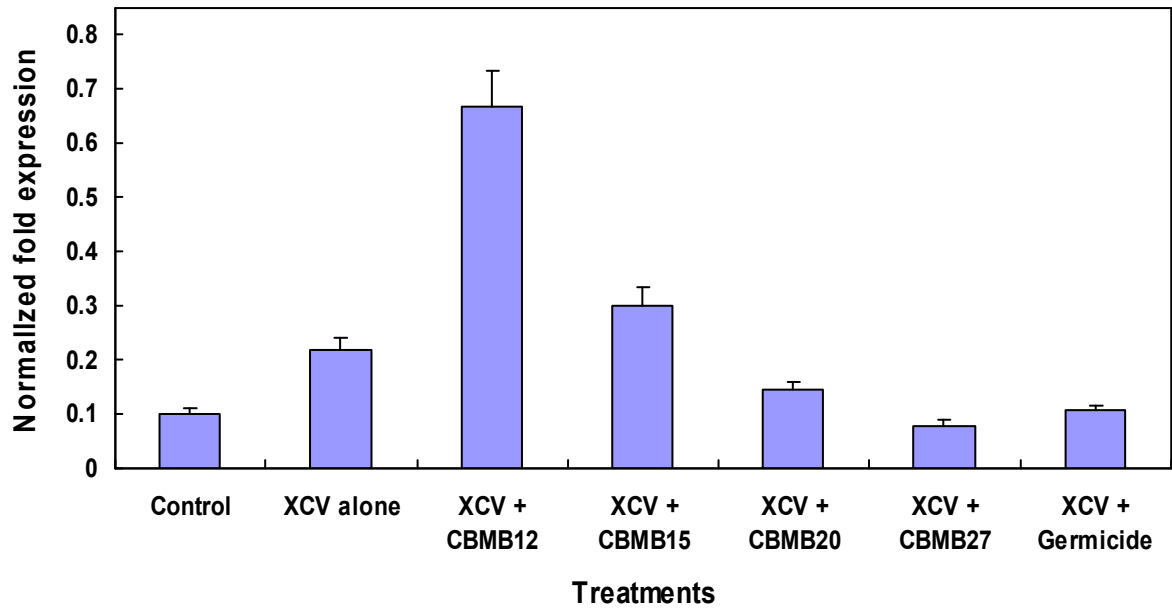


Fig. 49. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV)에 감염된 토마토의 PAL 관련 유전자 발현에 미치는 영향.

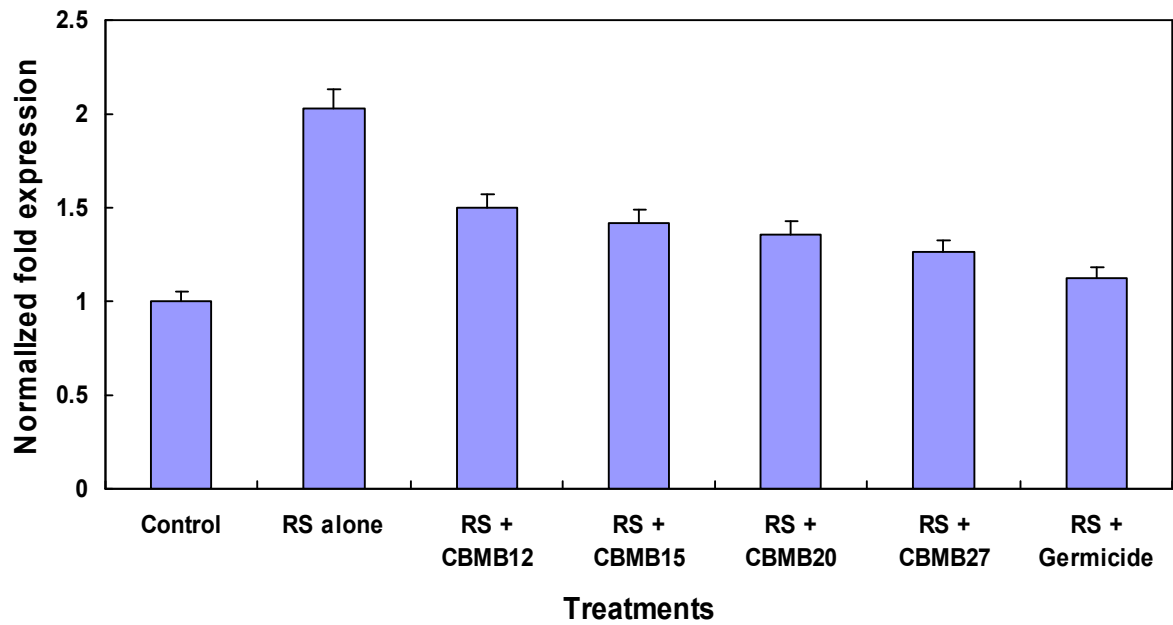


Fig. 50. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 토마토의 ACO 관련 유전자 발현에 미치는 영향.



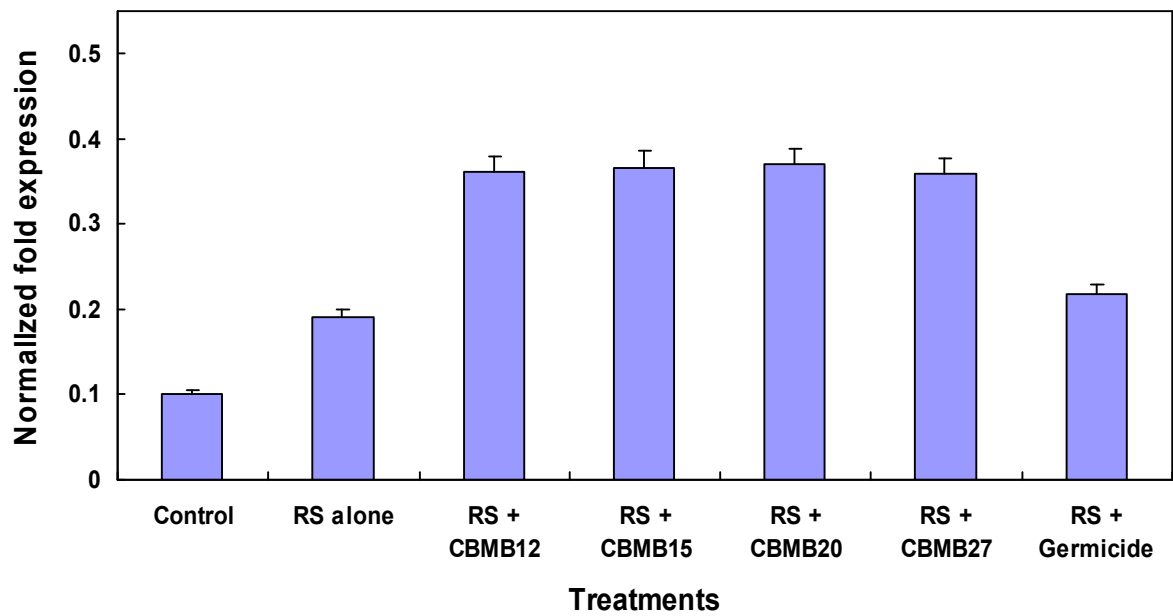


Fig. 51. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 토마토의  $\beta$ -1,3-glucanase 관련 유전자 발현에 미치는 영향.

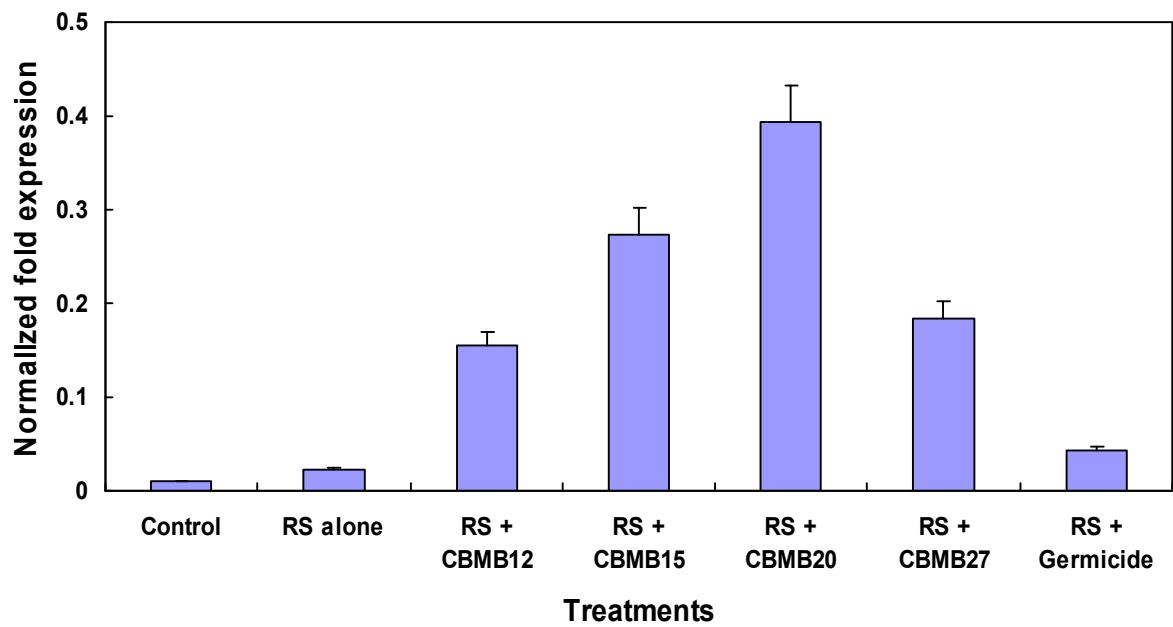


Fig. 52. *Methylobacterium* 균주의 접종이 *Ralstonia solanacearum* (RS)에 감염된 토마토의 PAL 관련 유전자 발현에 미치는 영향.

## 22. *gfp* 형질전환 *Methylobacterium*의 작물 군집능 확인

*Methylobacterium* 균주의 접종 효과를 과학적으로 규명하기 위해 유전자 조작 기술을 이용한 형광 표지 및 이를 이용한 작물 내 미생물의 군집을 확인하였다. *gfp* 형질전환 된 *Methylobacterium*의 군집을 확인하기 위해 Confocal laser scanning microscope (CLSM)을 이용하여 분석하였다. 채취된 잎을 1 cm<sup>2</sup> 가량으로 잘라 슬라이드 글라스 위에 놓고, Vectashield mounting medium을 처리한 후 커버글라스를 덮어 준비하였다. 현미경 관찰은 Leica TCS SP2 confocal system (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany)과 Ar ion laser (Gfp: excitation, 488 nm; emission filter BP 500-530)를 사용하였고, CLSM system (version 2.5.1227a) 소프트웨어를 이용하여 형광 표지된 균주를 확인하였다.

*Methylobacterium* 균주의 접종 효과를 가시적으로 확인하기 위해 *Methylobacterium* 균주를 *gfp*로 형질전환하여, 형광 표지를 이용한 작물 내 미생물의 군집을 확인하였다. CLSM을 이용하여 *gfp* 형질전환 *Methylobacterium* 군집의 형광 표지를 분석한 결과, *Methylobacterium* 균주가 토마토 및 고추 잎의 기공, 주맥, 옆맥 등의 표면 및 내부에 군집하면서 병원균에 감염된 토마토와 고추에 접종 효과를 나타냈다는 결과를 확인할 수 있었다 (Fig. 53, 54, 55).

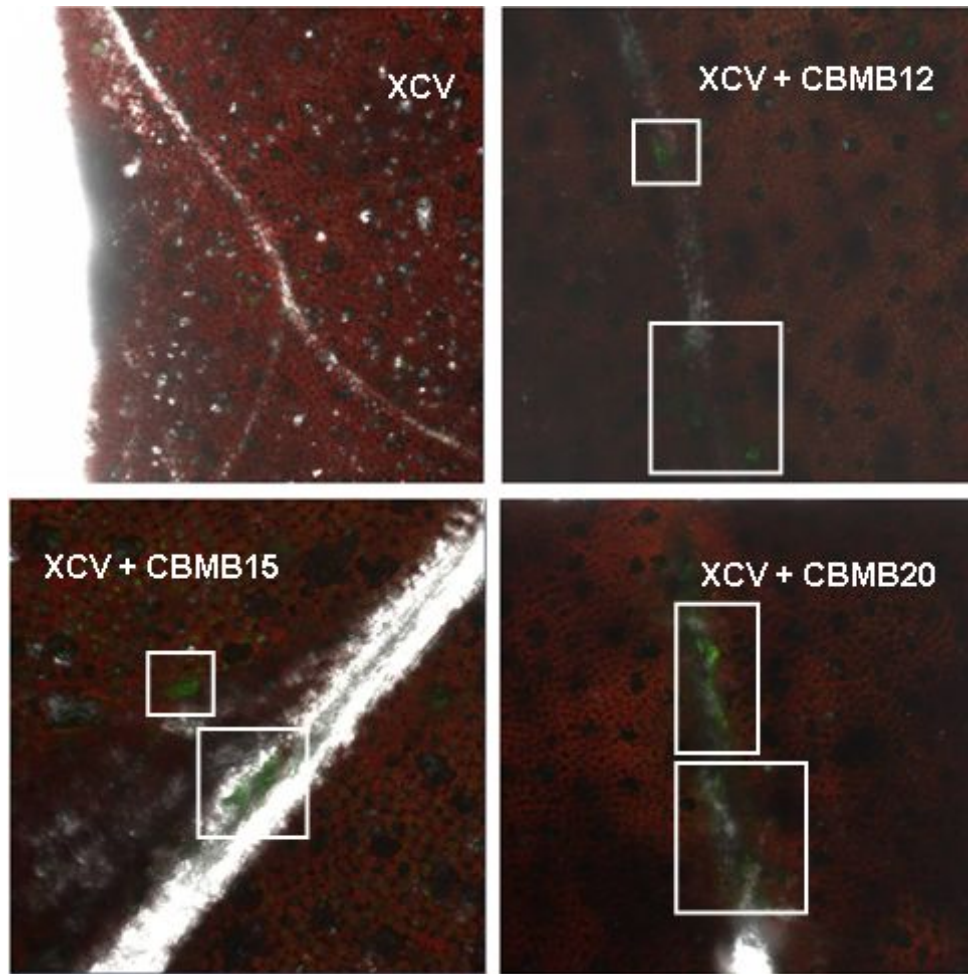


Fig. 53. Confocal 레이저 현미경을 이용한 형광 표지 *Methylobacterium* 균주의 토마토 균집 확인. XCV: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

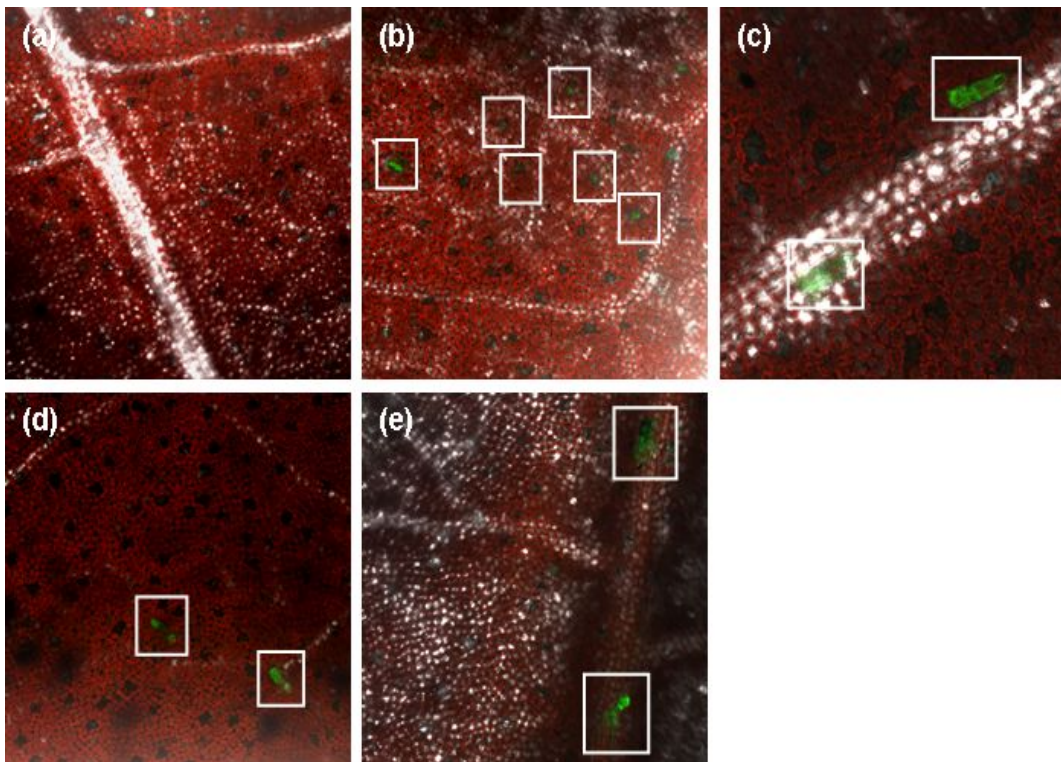


Fig. 54. Confocal 레이저 현미경을 이용한 형광 표지 *Methylobacterium* 균주의 고추 균집 확인. (a) XCV alone; (b) XCV + CBMB12; (c) XCV + CBMB15; (d) XCV + CBMB20; (e) XCV + CBMB27; XCV: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

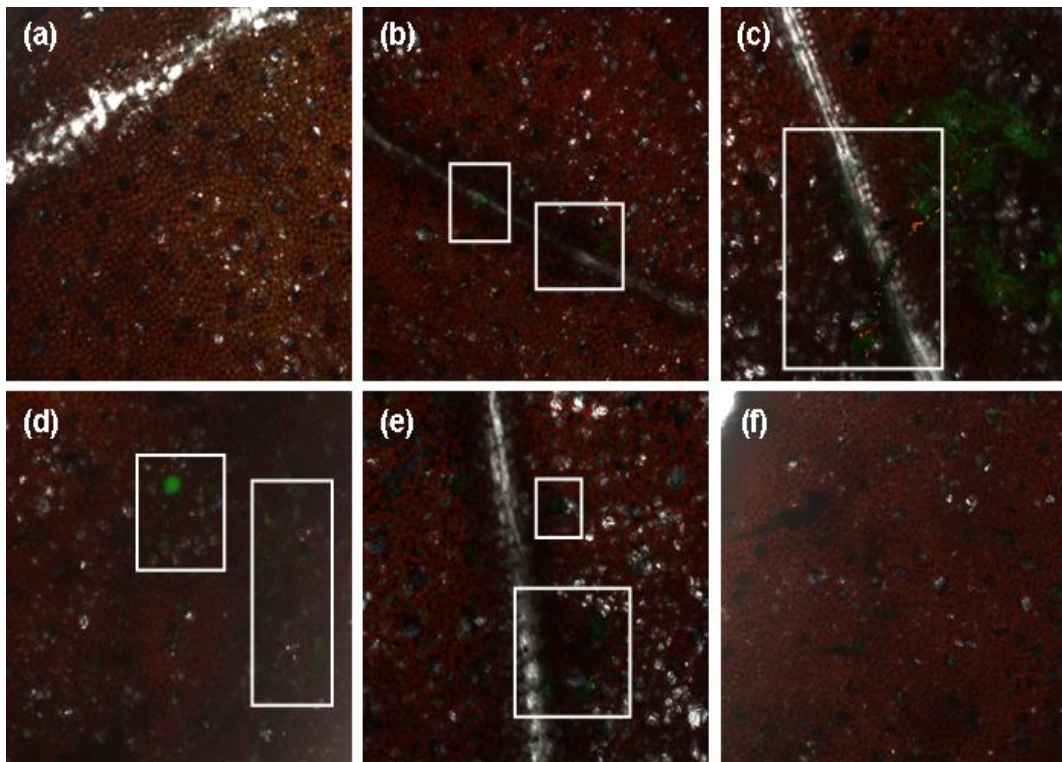


Fig. 55. Confocal 레이저 현미경을 이용한 형광 표지 *Methylobacterium* 균주의 토마토 균집 확인. (a) RS alone; (b) RS + CBMB12; (c) RS + CBMB15; (d) RS + CBMB20; (e) RS + CBMB27; (f) RS + GER; RS: *Ralstonia solanacearum*.

## 제 2 절 표지를 통한 접종 미생물의 검정과 작물 내 분포와 내성관련 유전자 발현 규명

### 1. 식물생장촉진미생물인 *Methylobacterium* 균주의 형질전환

#### 가. Tri-parental conjugation을 이용한 *Methylobacterium* 형질전환

식물체 접종 실험을 통하여 선발된 식물생장촉진미생물 (*Methylobacterium* CBMB12, CBMB15, CBMB17, CBMB27, CBMB31)을 *gfp* 형질전환을 하기 위하여 tri-parental mating 법 (Unge *et al.*, 1998)을 사용하였다. Recipient cell (*Methylobacterium*)은 5% succinate가 첨가된 TSB 고체배지에서 배양하였고 donor cell (pFAJ1820 을 가지는 *E. coli* S17-1) 그리고 helper strain (pRK2013을 가지는 *E. coli* HB101)은 kanamycin (50 µg/ml) 항생제를 첨가한 TSB 고체배지에서 배양하였다. Donor cell에 들어있는 pFAJ1820 vector는 *gusA*, *nptII*, *gfp* 유전자를 가지고 있어서 kanamycin에 저항성을 가지고 GUS와 함께 GFP 단백질을 만드는 vector이다. 그리고 그림 1A에서와 같이 *gusA*, *nptII*, *gfp* 유전자가 minitransposon에 들어있어서 형질전환 된 미생물에서 플라스미드의 형태로 따로 존재하지 않고 미생물의 염색체에 들어감으로 인하여 형질전환 된 미생물에서 안정한 형태로 존재하는 특성을 가지고 있다. 그 안정성은 선행연구를 통하여 *Methylobacterium* CBMB20에서 항생제가 들어있지 않은 배지에서 17회의 계대배양동안 각각 20개씩의 colony에서 100% 안정하게 전달되는 것을 확인한 바 있다. 각각의 고체배지에서 배양된 미생물을 표 1과 같이 준비하여 loop를 이용하여 recipient cell: helper strain: donor cell의 비율이 약 3: 1: 1 이 되게 섞어서 TSB 고체배지에 도말하였다. 도말된 배지의 미생물을 28°C에서 3일 동안 배양하였다. 3일 동안 배양된 배지에 자란 균을 loop를 이용하여 모아서 kanamycin (50µg/ml)과 nalidixic acid (20µg/ml) 항생제가 첨가되어 있는 TSB 배지에 도말하였다. 28°C에서 3일 동안 배양하여 colony를 얻을 수 있었다. 형질전환된 세포는 *Methylobacterium*이 가지는 nalidixic acid저항성과 도입된 minitransposon이 가지는 kanamycin 저항성으로 인하여 형질전환 된 미생물만이 두 가지 항생제가 첨가된 배지에서 살아남을 수 있는 성질을 이용하였다.

#### 나. 도입유전자 특이적 탐침을 이용한 PCR검정으로 도입유전자의 존속여부 측정

형질전환 미생물만을 선택할 수 있는 kanamycin (50 $\mu$ g/ml)과 nalidixic acid (20 $\mu$ g/ml) 항생제 TSB배지에 계대배양하여 도입 vector인 pFAJ1820의 *gusA* 영역과 *nptII*에 각각 결합하는 PCR

Table 1. Tri-parental mating에 쓰인 recipient cell, helper strain, donor cell

Recipient cell	Helper strain	Donor cell
<i>Methylobacterium</i> sp. CBMB15	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)
<i>Methylobacterium</i> sp. CBMB17	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)
<i>Methylobacterium</i> sp. CBMB27	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB12	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB31	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)



프라이머 YL121 (5'-TAAAGGAAGCGGAACACGTA)과 YL122 (5'-TCGCCAATTGGAGTATTTTG)를 이용하여 미생물의 형질전환 여부를 확인하였다. 본 연구에 사용된 프라이머를 제작하기 위하여 pFAJ1820의 sequencing 분석을 통하여 pFAJ1820의 *gusA* 영역과 *nptII* 영역의 염기서열을 분석하였고 pFAJ1820의 *gusA* 영역과 *nptII*에 결합하여 자연계에 존재하는 미생물의 유전자에 의하여 증폭될 가능성을 차단하였다 (Fig. 1A).

제작된 프라이머를 이용하여 형질전환 된 *Methylobacterium* 각각의 콜로니를 채취하여 콜로니 PCR하였고 negative control로 형질전환 하지 않은 *Methylobacterium* strain을 사용하고 positive control로 pFAJ1820을 가지는 S17-1의 콜로니를 사용하였다. PCR 조건은 3 step PCR로 pre-denaturation 94°C에서 5 분, denaturation 94°C에서 30 초, annealing 59°C에서 1 분, extension 72°C에서 1 분 (마지막 cycle은 5분 추가)의 조건으로 35 cycle 증폭하였으며 T-Gradient Thermoblock (Biometra, Germany)을 사용하였고 종료 후 1% agarose gel을 이용하여 PCR product를 100 V에서 전기영동 하였다. Agarose gel에 로딩된 DNA를 UV transilluminator (Corebio, Korea)와 image analyzer를 이용하여 분석하였다. 그 결과 Fig. 1B 에서와 같이 pFAJ1820의 *gusA* 영역과 *nptII* 영역특이적 증폭산물을 확인 할 수 있었다.

#### 다. Flow cytometry system (FACS)을 이용한 *gfp* 활성 측정

형질전환 미생물의 *gfp* 활성 측정을 위하여 *gfp* 가 삽입되어 PCR로 검증된 개체를 선별하고 액체배양을 하였다. 액체배양 된 형질전환 미생물을 Flow cytometry system (BD, USA)으로 *gfp*를 가지고 있는 미생물의 비율을 분석하였다.

#### 라. Confocal laser scanning microscope (CLSM) 를 이용한 *gfp* 활성 측정

형질전환 미생물의 *gfp* 활성을 시각적으로 확인하기 위하여 confocal laser scanning microscope (Leica, Germany)를 이용하였다. 형질전환 미생물을 active한 상태로 액체배양하여 슬라이드 글라스에 고정될 수 있도록 ProLong Gold Antifade Reagent (invitrogen)를 이용하여 mounting하였다. 세포를 mounting하기 전에 slide glass에 남아있는 습기를 완전히 제거한 후 ProLong Gold Antifade Reagents를 평평하게 고루 발랐다. Sample을 solution 위에 올려놓고 cover glass에도 동일한 조건으로 mounting solution을 처리하고 sample에 기포가 생기지 않도록 주의하면서 고정시켰다. Sample을 라벨하여 상온에서 24시간동안 암조건으로 incubation한 후

TCS-SPII-AOBS (Leica)를 이용하여 Excitation 488nm, Emission: 500-580 nm 조건에서 형광이미지를 측정하였다 (Fig. 2).

A



B

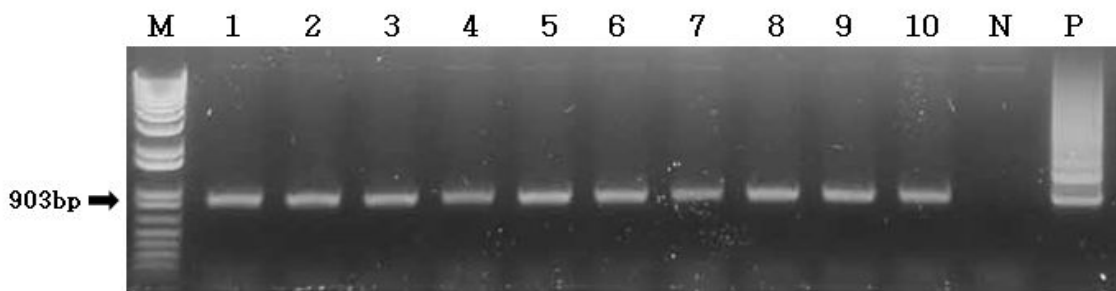


Fig. 1. 유전자 특이적인 primer 쌍을 제작하기 위한 primer의 위치(A)와 형질전환 된 *Methylobacterium* sp. CBMB15와 CBMB17 의 콜로니 PCR 전기영동 사진(B). 1-5 lane: *Methylobacterium* CBMB15; 6-10 lane: *Methylobacterium* CBMB17; N: netnegative control; P: positive control.

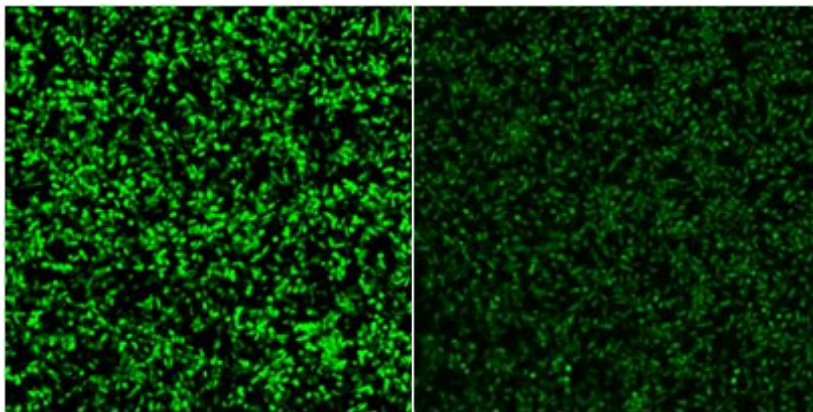


Fig. 2. 형질전환 된 *Methylobacterium* sp. CBMB15 (좌)와 CBMB17 (우) 의 CLSM 사진.

## 2. *Methylobacterium oryzae* CBMB20의 처리에 따른 작물의 생육

### 가. *Methylobacterium oryzae* CBMB20의 처리에 따른 벼의 생육

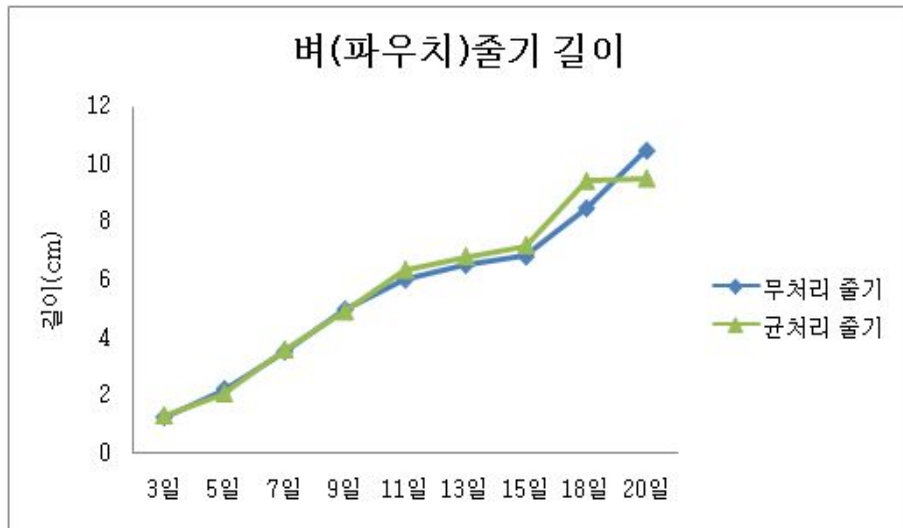
#### (1) 벼에 식물생장촉진미생물인 *Methylobacterium oryzae* CBMB20을 접종한 후 생육측정

식물생장촉진미생물인 *Methylobacterium oryzae* CBMB20을 종자침지로 처리한 벼와 미생물을 처리하지 않은 벼를 파우치와 포트에 파종하고 growth chamber 내에서 생육을 관찰하였다. 생육관찰 목록으로는 파우치 실험에서 미생물처리 벼종자를 파우치에 파종 후 3일, 5일, 7일, 9일, 11일, 13일, 15일, 18일, 20일 순으로 각 개체의 줄기와 뿌리의 전장을 측정하였으며, 5 L의 포트에 파종한 벼는 파종 후 150일이 경과된 후 수확하여 분얼수, 전장, 간장 등을 측정하여 미생물을 처리했을 때 벼의 생육에 미치는 영향을 분석하였다. 액체배지에서 배양된 *Methylobacterium oryzae* CBMB20을 상온에서 4,500 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 모아진 세포를 멸균수에 희석하였다. 희석된 현탁액이 spectrophotometer에서 OD<sub>600</sub>에 약 1.0 (균수 약  $1 \times 10^6$ /mL)이 되도록 하였다. 벼 종자는 2006년 수확한 동진벼를 사용하였으며 종자소독을 위하여 스포탁 0.05% 희석액에 24시간 침지하고 흐르는 물에 충분히 세척한 후 사용하였다. 준비된 *Methylobacterium oryzae* CBMB20 현탁액 5 ml를 petri-dish에 넣고 벼 종자 20립을 침지하였다. 침지된 종자는 상온에서 70 rpm으로 4시간동안 반응시켰다. 미생물을 처리 하지 않은 무처리구의 벼 종자 또한 멸균수에서 동일한 조건으로 반응시켰다. Growth pouch에 멸균수 20 ml을 넣고 121°C, 1기압으로 20분 고압멸균 하였다. 멸균된 pouch 1 개에 미생물 침지된 종자와 무처리 종자를 5립씩 넣고 온도 25°C, 광조건 16시간의 growth chamber에 배양하였다. 파종 후 3일부터 이틀 간격으로 줄기와 뿌리의 길이를 측정하여 생육조사를 실시하였다 (Fig. 3A, 3B).

미생물을 처리하여 파종한 벼는 파종 후 20일에 줄기의 길이가 균처리 된 벼는 9.5 cm, 무처리의 벼줄기 길이는 10.5 cm로 측정되어 차이를 보이지 않는다. 뿌리의 길이도 파종 후 20일에 미생물 처리구의 경우 18.9 cm이고 무처리 벼의 뿌리 길이는 17.4 cm로 큰 차이를 보이지 않았다. 균처리 된 벼의 분얼수 평균은  $15.6 \pm 2.6$  개 였고 무처리의 벼 분얼수는  $17.7 \pm 2.8$  )개로 나타나서 무처리의 경우에 분얼수가 약간 많았다 (Fig. 4A). 또한 균처리 벼의 전장은 평균  $93.8 \pm 9.6$  cm였고 무처리의 전장은 평균  $95.3 \pm 7.7$  cm였다. 간장은 균처리가  $67.4 \pm 5.8$  cm였고 무처리는  $66.4 \pm 8.1$  cm로 측정되었다 (Fig. 4B). 예비 실험의 일환으로 벼에서

CBMB20의 처리효과를 확인하였으나, 기존 벼에서의 실험결과와는 달리 실험설계 및 반복수 설정의 오차로 인하여 효과를 확인 하지 못하였다.

A



B

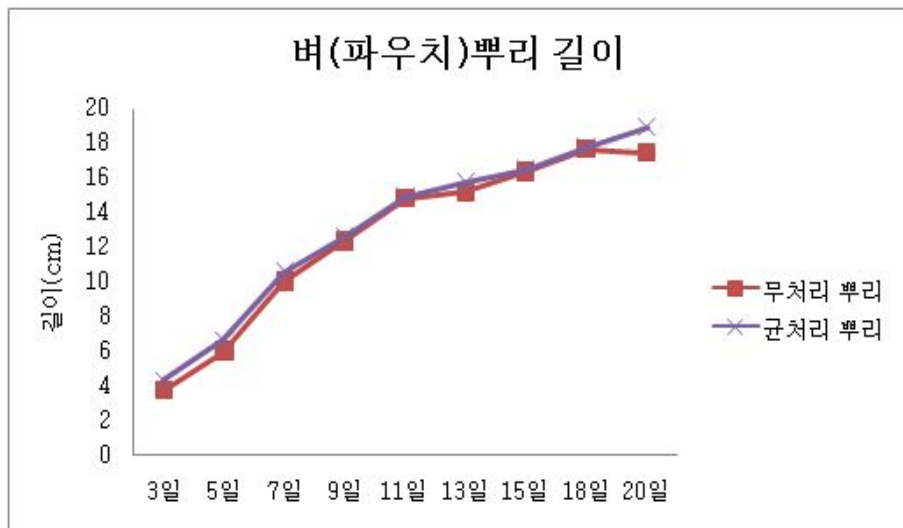
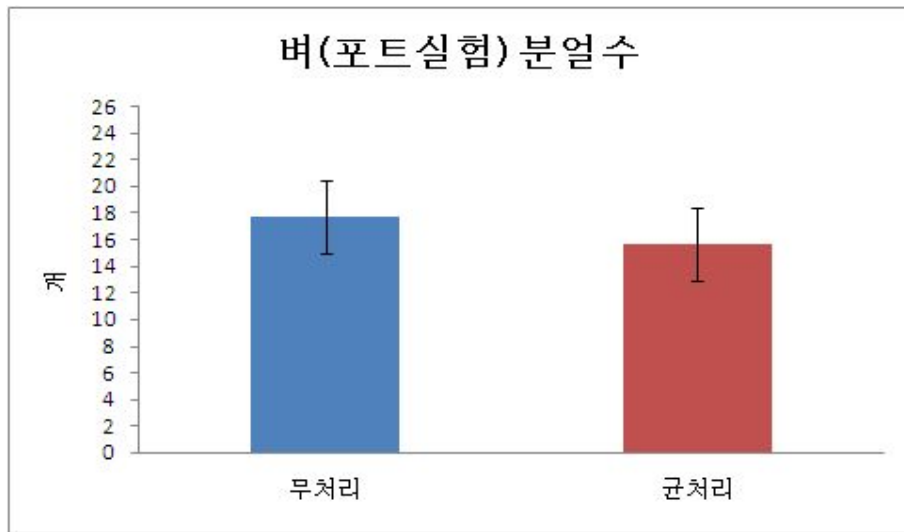


그림 3. *Methylobacterium oryzae* CBMB20처리에 따른 벼 유식물의 줄기 신장조사 (A)와 *Methylobacterium oryzae* CBMB20의 처리에 따른 벼 유식물의 뿌리 길이의 신장조사 (B).

A



B

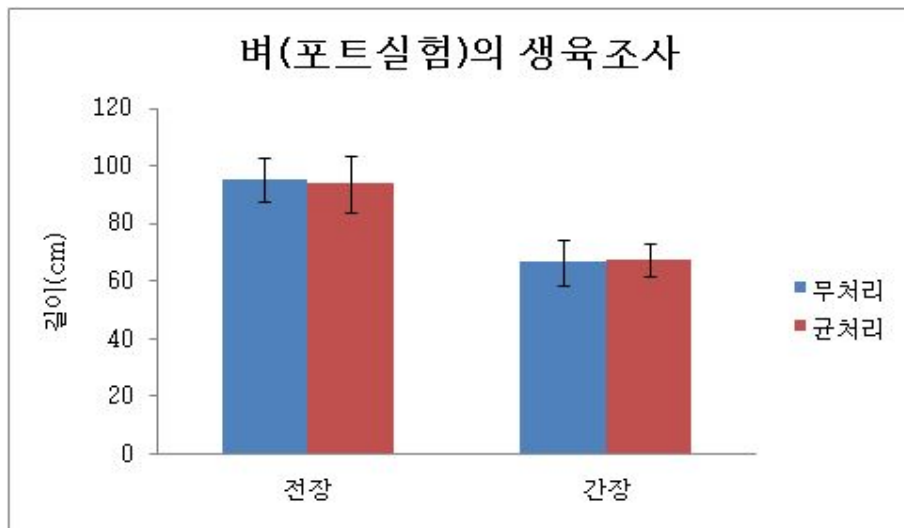


Fig. 4. *Methylobacterium oryzae* CBMB20처리에 따른 벼의 분얼수 (A)와 *Methylobacterium oryzae* CBMB20처리에 따른 벼의 전장과 간장의 비교 (B).

나. *Methylobacterium oryzae* CBMB20의 처리에 따른 토마토의 생육

액체배지에서 배양된 *Methylobacterium oryzae* CBMB20을 상온에서 4,500 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 모아진 세포를 멸균수에 희석하였다. 희석된 미생물 현탁액이 spectrophotometer에서 OD<sub>600</sub>에서 1.0 (균수 약  $1 \times 10^6$ /ml)이 되도록 하였다. 토마토 종자 (텐텐 미니토마토, 코레콘)에 처리되어 있는 코팅막을 제거하고 멸균하기 위하여 락스 1/4 희석액에 30초 동안 침지한 후 70% ethanol에 10초 침지하고, 다시 락스 1/4 희석액에 30초 침지하는 것을 3회 반복한 후 흐르는 물에 세척하였다. 준비된 *Methylobacterium oryzae* CBMB20 현탁액 5 ml을 petri-dish에 넣고 토마토 종자 20립을 침지하였다. 침지된 종자는 상온에서 70 rpm으로 4시간 동안 반응시켰다. 미생물을 처리 하지 않은 무처리구의 토마토 종자 또한 멸균수에서 동일한 조건으로 반응시켰다. Growth pouch에 멸균수 20 ml를 넣고 121°C, 1기압으로 20분 고압멸균 하였다. 멸균된 pouch 1 개에 미생물 침지된 종자와 무처리 종자를 5립씩 넣고 온도 25°C, 광조건 16시간의 growth chamber에 배양하였다. 파종 후 3일부터 이틀간격으로 줄기와 뿌리의 길이를 측정하여 생육조사를 실시하였다.

토마토의 뿌리 길이를 파종 후 4일부터 2일 간격으로 측정하였다. Fig. 5에서와 같이 미생물 처리된 뿌리의 길이는 14일이 경과된 후 10.9 cm로 측정되었으며 무처리 토마토의 뿌리길이는 5.8 cm로 *Methylobacterium oryzae* CBMB20의 처리가 토마토뿌리의 길이생장에 영향을 미치는 것으로 분석되었다.

다. 미생물의 처리에 따른 PR protein의 발현

*Methylobacterium*에 의한 병원균 방어 작용 유도는  $\beta$ -1,3-글루카나제와 같은 병생성 관련 단백질 (pathogenesis related protein, PR protein), 페닐알라닌 암모니아-라이아제 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)와 같은 방어 효소, 및 퍼옥시다제 (peroxidase, PO) 및 폴리페놀 옥시다제 (polyphenyl oxydase, PPO)와 같은 산화 효소들의 생성과 대부분 관련되어 있다. 그러나, 이러한 효소들의 활성 증가 또는 축적은 주로 식물 호르몬 에틸렌에 의존한다. 에틸렌의 방출은 병원균의 공격에 대한 초기 반응이고, 식물과 미생물간의 상호작용 시 방어 작용을 위한 신호로서 작용하는 것으로 알려져 있다 또한, 에틸렌 방출이 증가하는 시간은 작물에서 질병의 증상이 나타나는 시기와 일치하며, 화학적 에틸렌 생합성 억제제인 AVG는 에틸렌 수준을 감소시키고 결과적으로 질병의 증상을 억제한다. 따라서 ACC deaminase

활성을 갖는 *Methylobacterium*은 에틸렌 생합성 전구체인 ACC를 가수분해하여 스트레스 에틸렌 수준을 감소시킬 뿐 아니라 (Glick *et al.*, 1998) 작물이 성장하는데 필요한 수준의

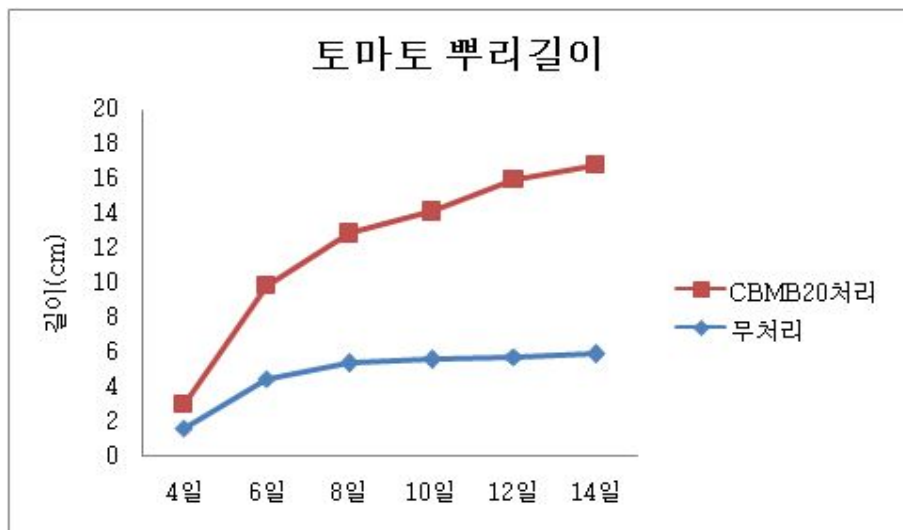


Fig. 5. *Methylobacterium oryzae* CBMB20처리에 따른 토마토 유식물의 뿌리 신장



에틸렌을 유지하여 질병의 징후가 나타나지 않으면서도 작물이 잘 성장하도록 한다고 알려져 있다 (Fig. 6).

생장 촉진 미생물의 처리에 따른  $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL (Phenylalanine ammonia lyase), PO (Peroxidase), PPO (Polyphenol oxidase), ACC oxidase, ACC synthase 등의 유전 발현양상을 조사하기 위하여 database를 검색하여 이들 유전자의 cDNA 염기서열을 확보한 후 이들 염기서열을 이용하여 그 유전자를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 Real-Time PCR 용 탐침을 제작하고 미생물을 접종한 작물과 미생물을 접종하지 않은 작물에서 RNA를 추출하고 cDNA로 합성하여 Real-Time PCR을 이용하여 분석하여 미생물을 접종한 작물과 미생물을 접종하지 않은 작물에서  $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO, ACC oxidase, ACC synthase 등의 유전자의 발현이 어떠한 양상을 보이는지 정량적으로 분석하였다.

(1) Database search 및 PCR을 통하여  $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO, ACC-oxidase 등의 유전자 염기서열 확보

NCBI (미국국립생물공학정보센터 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 database 검색을 통하여 고추 (*Capsicum annuum*), 토마토 (*Solanum lycopersicum*), 벼 (*Oryza sativa*), 상추 (*Lactuca sativa*), 브로콜리 (*Brassica oleracea*), 시금치 (*Spinacia oleracea*)에 대한 PR-protein의 유전자 염기서열을 확보하였다. PR-protein으로는  $\beta$ -1,3-glucanase (BG), Phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (PO), polyphenol oxidase (PPO), 1-aminocyclopropane carboxylic acid oxidase (ACC-oxidase)를 선정하여 검색하였다 (Table 2). 염기서열의 검색은 먼저 각각의 유전자의 이름을 이용하여 검색한 후 검색되지 않는 경우에는 이미 검색된 작물의 유전자 염기서열을 이용하여 BLAST 검색 프로토콜을 이용하여 아미노산 서열을 기준으로 검색하고 해당 염기서열을 이용하여 다시 database에서 검색하였을 때 가장 identity가 높은 경우에 해당 유전자로 인정하는 방법을 이용하였다.

(2) 프라이머 제작

고추와 토마토에서 확보한 BG, PAL, PO, PPO, ACC-Oxidase 유전자 염기서열을 이용하여 해당 유전자를 선택적으로 증폭시킬 수 있는 Reversetranscript-PCR용 프라이머를 제작하였다 (Table 3). Reversetranscript-PCR은 합성된 cDNA가 효율적으로 합성되었는지

설계된 프라이머가 특이적으로 반응하는 것에 대한 예비 실험과 더불어 PCR 반응 cycle 횟수를 조절함으로써 유전자 발현량을 확인할 수 있다. Reversetranscript-PCR 조건은 3 Step

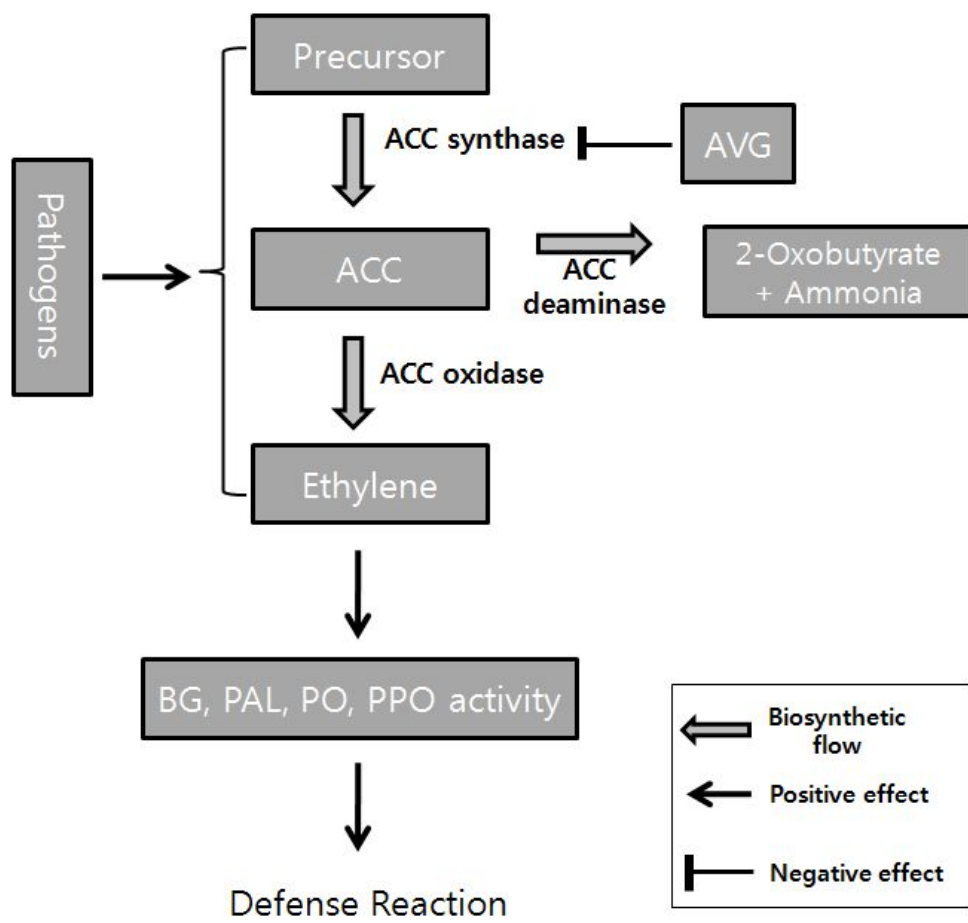


Fig. 6. PR protein의 작용 메카니즘 모식도

Table 2. Data base 검색을 통해 발견한 여러 가지 작물의 pathogen related gene에 대한 accession 번호

	ACC-oxidase	PAL	BG	PO	PPO
고추 ( <i>Capsicum annuum.</i> )	AB434925	EU616575	AF227953	AF442386	N/A
토마토 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	AB013101	AK327645	FJ151171	AK321353	AK247410
벼 ( <i>Oryza sativa</i> )	AK061064	AK120127	AK067001	EF444530	AK108237
상추 ( <i>Lactuca sativa</i> )	AB158347 AB158346 AB158345	AF411134 AF299330	N/A	N/A	N/A
브로콜리 ( <i>Brassica oleracea</i> )	X81628 X81629	AB281591	EF484879	N/A	N/A
시금치 ( <i>Spinacia oleracea</i> )	N/A	N/A	N/A	AF244921	Z66559 X90869

N/A, not available.

ACC-oxidase, 1-aminocyclopropane carboxylic acid oxidase; BG,  $\beta$ -1,3-glucanase; PAL, Phenylalanine ammonia lyase; PO, peroxidase; PPO, polyphenol oxidase.

Table 3. 고추와 토마토의 reversetranscript-PCR용 프라이머

Gene name	Species	Accession #	Primer name	Primer sequence(5'→3')	Tm (°C)
ACC-oxidase	<i>Capsicum annuum</i>	AB434925	YL983-1	TTGGGCTTGAAAAGGGTTAC	55
			YL984-1	CCTGAAACTTGAGTCCAGCA	57
	<i>Solanum lycopersicum</i>	AB013101	YL991-1	CAAAGGGTCCAACCTTTTGGT	55
			YL992-1	GCTCCTTAGCCTGGAATTTG	57
PAL	<i>Capsicum annuum</i>	EU616575	YL989-1	TGTCACACATTGCCACATTC	55
			YL990-1	GGGCTTTCCATTCATCACTT	55
	<i>Solanum lycopersicum</i>	AB269917	YL993-1	TGGCGAGAAACTTAATGCAG	55
			YL994-1	TGGATTGTCATTCACCGAGT	55
BG	<i>Capsicum annuum</i>	AF227953	YL985-1	TGGGTTCAAAGGAATGTCAA	53
			YL986-1	ACGGAGTCCAACCTTTCATC	57
	<i>Solanum lycopersicum</i>	FJ151171	YL995-1	TGGAGCTTCCACTTCTTCCT	57
			YL996-1	TTCATTGTTGCCCACTT	53
PO	<i>Capsicum annuum</i>	AF442386	YL987-1	TTTCTGGTTCTGGCACTGAG	57
			YL988-1	ATCCTCGAAGCGTAGGAAGA	57
	<i>Solanum lycopersicum</i>	GQ149350	YL997-1	TAACGGTGACCAAAACCAAA	53
			YL998-1	TAAGCACCGTTGCAATAAGC	55

ACC-oxidase, 1-aminocyclopropane carboxylic acid oxidase; BG,  $\beta$ -1,3-glucanase; PAL, Phenylalanine ammonia lyase; PO, peroxidase; PPO, polyphenol oxidase.

PCR로 pre-denaturation 94°C에서 5 분, denaturation 94°C에서 30 초, annealing 59°C에서 1 분, extension 72°C에서 1 분 (마지막 cycle은 5 분 추가)의 조건으로 35 cycle 증폭하였으며 T-Gradient Thermoblock (Biometra, Germany)을 사용하였고 종료 후 1% agarose gel을 이용하여 PCR product를 100 V에서 전기영동 하였다. Agarose gel에서 전기영동된 DNA를 UV transilluminator (Corebio, Korea)와 image analyzer를 이용하여 분석하였다.

Reversetranscript-PCR결과 고추에서는 PAL 유전자 (Fig. 7, 4번과 8번 lane)가 미생물 처리구에서 무처리구에 비해 발현이 강하게 보였으며, 토마토에서는 ACC-oxidase (Fig. 7, 3번과 13번 lane)와 BG (Fig. 7, 11번과 15번 lane) 유전자의 발현이 미생물 처리구에서 무처리구에 비해 낮게 나왔는데 이는 반복 실험을 통해 검증해야 할 것으로 사료된다.

미생물의 처리에 따른 PR-유전자의 발현을 정밀하게 정량하기 위하여 Real-Time PCR용 프라이머를 디자인 하였다 (Table 4). 길이는 20-25 mer로 제작하였으며, GC 함량은 40~60%로 서열 중에 염기의 편향이 없도록 제작되었다. 또한 product size는 80~150 bp로 설계하였고 internal control로는 actin과 tubulin을 사용하였다.

### (3) Real-Time PCR 분석

*Methylobacterium oryzae* CBMB20을 침지하여 접종한 고추종자와 접종하지 않은 고추를 파우치에 파종하고 파종 후 14일이 경과 된 뿌리를 채취하였다. 채취된 뿌리를 RNeasy plant mini kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 Quant-it (Invitrogen, USA) 정량 kit을 이용하여 정량하였다. 정량된 RNA에서 genomic DNA의 오염을 방지하기 위하여 DNase I (Invitrogen, USA)을 처리하였다. cDNA의 합성은 Superscript III first strand (Invitrogen, USA)의 oligo dT와 random hexamer를 함께 사용하여 cDNA합성의 효율을 높이고자 하였다.

(가) Real-Time PCR을 이용한  $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO, ACC-oxidase, ACC synthase 등의 유전자 발현 측정

Real-Time PCR은 SYBR green을 이용하여 분석하였으며 SYBR green super mix (Bio-rad, USA)를 사용하였고 iQ5 (Bio-rad, USA) 기기를 사용하여 분석하였다. 미생물을 침지하여 균처리한 고추와 토마토 종자를 파종 후 14일째 뿌리에서 추출한 RNA를 cDNA

합성하여 한 개의 PCR tube에 10 ng의 total RNA에서 합성된 cDNA를 포함하도록 분주하고 각각의 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 정량분석 하였다. 정량은 actin과 tubulin을

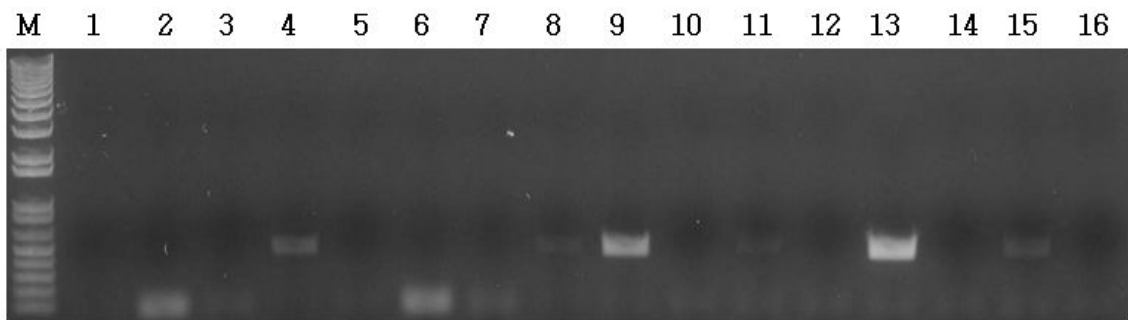


Fig. 7. 고추와 토마토에서 reversetranscript-PCR을 이용한 *Methylobacterium oryzae* CBMB20 처리에 따른 PR-protein 유전자 발현 분석. 1~8 lane, 고추; 9~16 lane, 토마토; 1~4 lane과 9~12 lane, *Methylobacterium oryzae* CBMB20 처리구; 5~8 lane과 13~16 lane, 무처리구; 1, 5, 9, 13 lane, ACC-oxidase; 2, 6, 11, 15 lane, BG; 3, 7, 12, 16 lane, PO; 4, 8, 10, 14 lane, PAL.

Table 4. 고추와 토마토에서 PR 유전자의 Real-Time PCR 분석용 프라이머

Gene name		Accession #	Primer name	Primer sequence(5'→3')
ACC-oxidase	<i>Capsicum annuum</i>	AB434925	YL983	AGGAGTTACTGGACTTGCTCTGTG
			YL984	GGCATGGCGGATAATTGCTCAC
	<i>Solanum lycopersicum</i>	AB013101	YL991	AAGATGGCACTAGGATGTCAATAG
			YL992	TCCTCTTCTGTCTTCTCAATCAAC
PAL	<i>Capsicum annuum</i>	EU616575	YL989	GAGGCTGCTGCTATTATGGAACAC
			YL990	ACGATCTTGCTTTGGTTTCTGGAG
	<i>Solanum lycopersicum</i>	AB269917	YL993	CGCTATGCTCTCCGAACATCTC
			YL994	ATTCACCGAGTTAATCTCCCTCTC
BG	<i>Capsicum annuum</i>	AF227953	YL985	GCGTGACATTTCTCTCTCCTATGC
			YL986	GCTGTAACGGAGTCCAACCTTTC
	<i>Solanum lycopersicum</i>	FJ151171	YL995	GCGGTGTTTCAGCCTGGATG
			YL996	AGCATGAGCAAGAAGTATGTTGTG
PO	<i>Capsicum annuum</i>	AF442386	YL987	CGCCAGGATTGCTGACAATGC
			YL988	GTGCCAGAACCAGAAATGAGGATG
	<i>Solanum lycopersicum</i>	GQ149350	YL997	ACCGCAATGGAAGAGTAATGGATC
			YL998	CCGAGGACATGGAGCATAGTACC
Actin	<i>Capsicum annuum</i>	AY572427	YL1003	CTTCACTCTCTGCTCTCTCCTCAG
			YL1004	CCAGCCTTAACCATTCCTGTTCC
	<i>Solanum lycopersicum</i>	AB199316	YL999	ACCCTGTTCTCCTGACTGAGG
			YL1000	AGCCTGGATAGCAACATACATAGC
Tubulin	<i>Capsicum annuum</i>	EF495259	YL1005	GAAGGAGCCGAGTTGATTGATGC
			YL1006	TGTTCCCATGCCAGATCCAGTC
	<i>Solanum lycopersicum</i>	DQ205342	YL1001	AGACAGGATGATGCTCACATTCTC
			YL1002	ACCATACATTCATCGGCATTCTCC

internal control로 사용하여 normalize된 상대정량 방법을 사용하였다.

분석결과 고추에서는 ACC-oxidase 유전자가 미생물 침지된 고추에서 16.0으로 무처리 고추에서의 4.9보다 더 큰 값을 나타내어 *Methylobacterium oryzae* CBMB20의 처리에 의해 유전자의 발현이 증가되는 것으로 나타났고 PAL도 대조군에 비해 발현량이 증가되는 것으로 나타났으나 토마토에서는 두 유전자 모두 대조군에 비해 유전자 발현량이 감소하는 것으로 나타나서 작물의 종류에 따라 *Methylobacterium oryzae* CBMB20처리의 효과가 다른 것으로 나타났다. 하지만 이번 실험은 예비실험의 성격으로 추후 반복 실험을 통하여 검증되어야 할 것이다.

#### (4) 미생물 접종이 작물의 PR-유전자 및 병원균 방어 유전자의 발현에 미치는 효과 검증

TSB 액체배지에서 배양된 *Methylobacterium oryzae* CBMB20을 상온에서 4,500 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 모아진 세포를 멸균수에 희석하였다. 희석된 현탁액이 spectrophotometer OD<sub>600</sub>에서 1.0 (균수 약  $1 \times 10^6$ /ml)이 되도록 하였다. 고추 종자 (바로따고추, 뉴서울종묘)에 처리되어 있는 코팅막을 제거하고 멸균하기 위하여 락스 1/4 희석액에 30초 동안 침지한 후 70% ethanol에 10초 침지하고 락스 1/4 희석액에 30초 침지하는 것을 3반복하여 흐르는 물에 충분히 세척하였다. 실험구의 설계는 *Methylobacterium oryzae* CBMB20 무처리 및 역병균 무접종구 20주, *Methylobacterium oryzae* CBMB20 무처리 및 역병균 접종구 20주, *Methylobacterium oryzae* CBMB20 처리 및 역병균 무접종구 20주, *Methylobacterium oryzae* CBMB20 처리 및 역병균 접종구 20주를 각각 파종하였다. *Methylobacterium oryzae* CBMB20 현탁액 5 ml을 petri-dish에 넣고 고추 종자 100립을 침지하였다. 침지된 종자는 상온에서 70 rpm으로 4시간동안 반응시켰다. 미생물을 처리 하지 않은 무처리구의 고추 종자 또한 멸균수에서 동일한 조건으로 반응시켰다. 미생물 처리구의 고추포트에는 TSB 액체배지에서 배양된 *Methylobacterium oryzae* CBMB20을 상온에서 4,500 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 모아진 세포를 멸균수에 희석하였다. 희석된 균액이 spectrophotometer를 이용하여 600nm에 OD가 1.0 (균수 약  $1 \times 10^6$  cfu/ml)이 되도록 하였으며 현탁액을 1공당 2 ml 씩 분주하였다. 파종 후 7일째 균액을 처리하고 그 이후 7일 간격으로 4번 미생물 현탁액을 접종하였다. 역병균주를 처리하기 전 미생물을 처리한 처리구와 무처리구의 포트를 비교하였다. Fig. 8 처럼 미생물을 처리한 처리구 고추의 발아율이 95% 이상으로 높은 것을 알 수 있었다.



고추 역병균은 *Phytophthora capsici*를 분양받아 접종하였다. 역병균 배양 방법으로는 20% V8 juice 고체배지에 분양받은 병원균 올려놓고 20°C에서 약 5일간 배양하였다. 역병균의 활성을 위해 동일한 배지에 2차 계대배양해서 약 5일간 배양 하였다.

Fig. 9A와 같이 V8 배지에서 계대배양한 균사를 agar 블럭까지 잘라서 오트밀 (oatmeal)배지에 균사가 배지에 닿도록 얹어서 4~5개정도 올려놓고 20°C 인큐베이터에서 약 7일간 배양하였다. 오트밀 배지에서 배양된 균사와 균액 등을 약수저로 배지가 손상되지 않도록 긁어서 버린 후 광 인큐베이터에서 약 2일간 배양하였다. 광 인큐베이터에서 배양시킨 배지에 멸균수를 5 ml 넣고 약수저로 긁어서 50 ml Falcon tube에 넣은 후에 모아진 병원균을 hemocytometer를 이용하여 균수를 측정을 하고 균수를  $1 \times 10^4$  cfu/ml 정도로 맞춘 뒤 약 1시간 가량 4°C 냉장고에 냉장보관 한 후 고추에 관주 처리하였다. 고추 역병균 접종은 고추의 생장시기 4~5엽기에 실시하였고 역병균 접종한 처리구는 병원균 접종이 잘 되도록 3 일 동안 투명한 비닐로 씌워놓았다 (Fig. 10A). 고추 역병균 관주처리 후 5 일째에 4 개 실험구에서 고추 5 개체씩 채취하여 뿌리길이, 최장엽길이, 전장 등을 생육조사 하였고 (Fig. 10, 11) RNA추출을 위하여 100 mg의 고추잎을 채취하였다.

### 3. Triparental conjugation을 이용한 *Methylobacterium* 형질전환

식물체 접종 실험을 통하여 선발된 식물생장촉진미생물 중 1차년도에 성공하지 못한 미생물 (*Methylobacterium* CBMB12, CBMB27, CBMB31)을 *gfp* 형질전환 하기 위하여 tri-parental mating 법 (Unge et al., 1998)을 사용하였다. Recipient cell (*Methylobacterium*)은 5% succinate가 첨가된 TSB 고체배지에서 배양하였고 donor cell (pFAJ1820을 가지는 *E. coli* S17-1) 그리고 helper strain (pRK2013을 가지는 *E. coli* HB101)은 kanamycin (50 µg/ml) 항생제를 첨가한 TSB 고체배지에서 배양하였다. Donor cell에 들어있는 pFAJ1820 vector는 *gusA*, *nptII*, *gfp* 유전자를 가지고 있어서 kanamycin에 저항성을 가지고 GUS와 함께 GFP 단백질을 만드는 vector이다. 그리고 *gusA*, *nptII*, *gfp* 유전자가 minitransposon에 들어있어서 형질전환 된 미생물에서 플라스미드의 형태로 따로 존재하지 않고 미생물의 염색체에 들어감으로 인하여 형질전환 된 미생물에서 안정한 형태로 존재하는 특성을 가지고 있다. 그 안정성은 선행연구를 통하여 *Methylobacterium* CBMB20에서 항생제가 들어있지 않은 배지에서 17 회의 계대배양동안 각각 20개씩의 colony에서 100% 안정하게 전달되는 것을 확인한 바 있다 (Table 5).

#### 가. 미생물의 형질전환

각각의 고체배지에서 배양된 미생물을 준비하여 loop를 이용하여 recipient cell: helper strain:



Fig. 8. 미생물을 처리하지 않고 파종한 고추 (좌)와 *Methylobacterium oryzae* CBMB20을 침지하여 파종한 고추 (우)의 포트사진



D

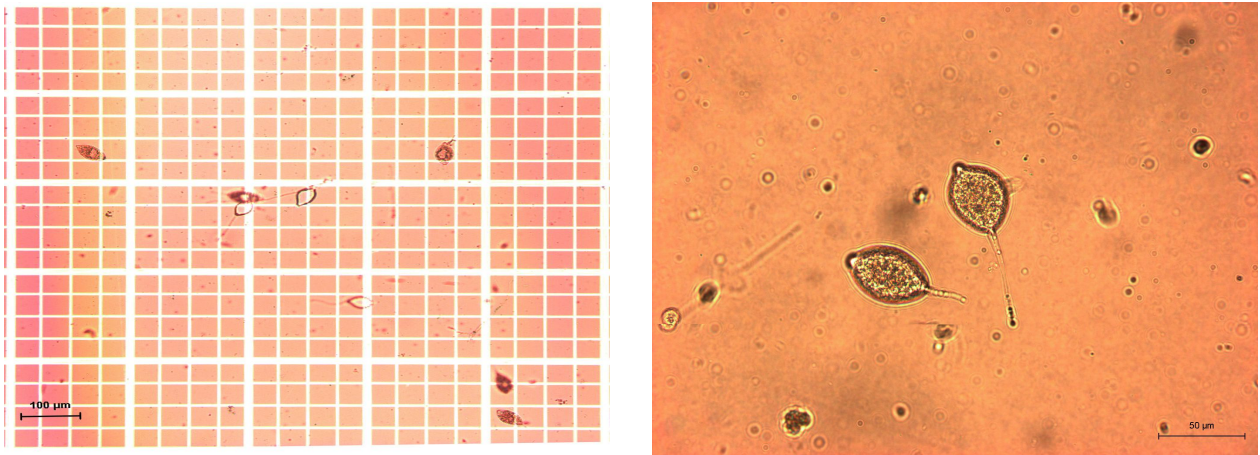


Fig. 9. *Phytophthora capsici* (A) V8주스배지 (B) Oatmeal배지 (C) 광인큐베이터 반응 후의 Oatmeal배지 (D) *Phytophthora capsici*의 Hemocytometer사진과 현미경으로 관찰한 고추 역병균의 포자낭

A



B



Fig. 10. 고추 역병균 처리구와 무처리구의 실험 (A)과 고추 역병균을 처리하지 않고 미생물을 접종하지 않은 고추 (CC)와 역병균을 처리하지 않고 미생물을 접종한 고추 (CI), 역병균을 처리 한 후 미생물 접종하지 않은 고추 (PC)와 역병균을 처리 한 후 미생물을 접종하지 않은 고 추 (PI)의 생육조사

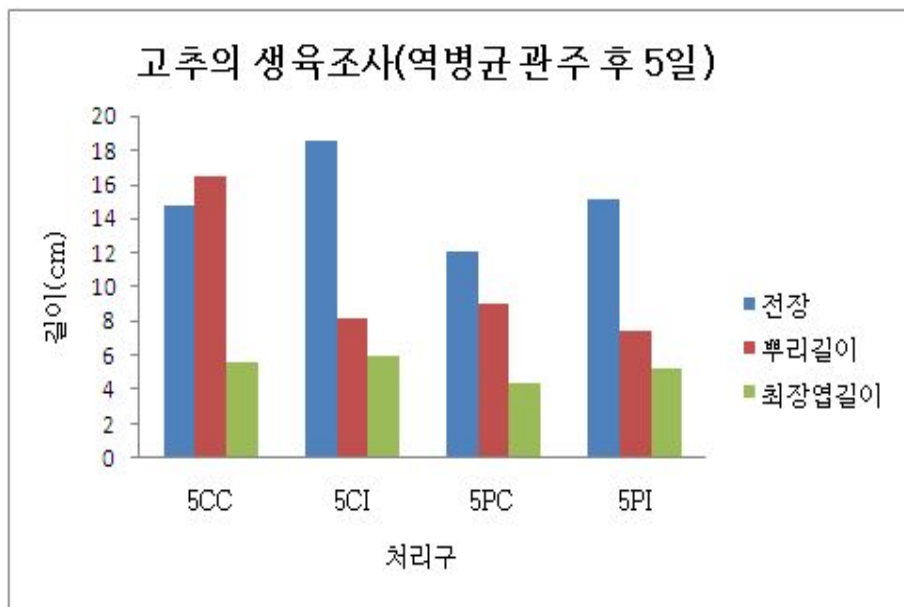


Fig. 11. 고추 역병균 관주 후 5일의 전장, 뿌리길이, 최장엽길이 생육조사그래프. 고추 역병균을 처리하지 않고 미생물을 접종하지 않은 고추 (CC)와 역병균을 처리하지 않고 미생물을 접종한 고추 (CI), 역병균을 처리 한 후 미생물 접종하지 않은 고추 (PC)와 역병균을 처리 한 후 미생물을 접종하지 않은 고추 (PI)

Table 5. Tri-parental mating에 쓰인 recipient cell, helper strain, donor cell list

Recipient cell	Helper strain	Donor cell	비고
<i>Methylobacterium</i> sp. CBMB15	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)	1차년도
<i>Methylobacterium</i> sp. CBMB17	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)	1차년도
<i>Methylobacterium</i> sp. CBMB27	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)	2차년도
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB12	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)	2차년도
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB31	HB101(pRK2013)	S17-1(pFAJ1820)	2차년도



donor cell의 비율이 약 3: 1: 1이 되게 섞어서 TSB 고체배지에 도말하였다. 도말된 배지의 미생물을 28°C에서 3일 동안 배양하였다. 이때 TSB 배지를 사용하는 이유는 recipient cell, helper strain, donor cell 3 종의 미생물이 모두 성장할 수 있는 조건을 갖추는 보통배지로 TSB 배지를 선택하여 사용하였다. 3일 동안 배양된 배지에 자란 균을 loop를 이용하여 모아서 kanamycin (50 µg/ml)과 nalidixic acid (20 µg/ml) 항생제가 첨가되어 있는 CHOI 배지(Choi et al., 1989)에 도말하였다. 28°C에서 3일 동안 배양하여 colony를 얻을 수 있었다. 형질전환된 세포는 *Methylobacterium*이 가지는 nalidixic acid 저항성과 도입된 minitransposon이 가지는 kanamycin 저항성으로 인하여 형질전환된 미생물만이 두 가지 항생제가 첨가된 배지에서 살아남을 수 있는 성질을 이용하였다. 형질전환 미생물만을 선택할 수 있는 kanamycin (50µg/ml)과 nalidixic acid (20µg/ml) 항생제 CHOI배지에 계대배양하여 도입 vector인 pFAJ1820의 *gusA* 영역과 *nptII*에 각각 결합하는 PCR 프라이머 YL121 (5'-TAAAGGAAGCGGAACACGTA)과 YL122 (5'-TCGCCAATTGGAGTATTTTG)를 이용하여 PCR 한 후 분리된 미생물의 형질전환 여부를 PCR product size 905 bp 로 확인하였다. 본 연구에 사용된 *gfp* 특이적인 프라이머를 제작하기 위하여 pFAJ1820의 sequencing 분석을 통하여 pFAJ1820의 *gusA* 영역과 *nptII* 영역의 염기서열을 분석하였고 pFAJ1820의 *gusA* 영역과 *nptII*에 결합하여 자연계에 존재하는 미생물의 유전자에 의하여 증폭될 가능성을 차단하였다. 제작된 프라이머를 이용하여 형질전환된 *Methylobacterium* 각각의 콜로니를 채취하여 콜로니 PCR하였고 negative control로 형질전환 하지 않은 *Methylobacterium* strain을 사용하고 positive control로 pFAJ1820을 가지는 S17-1의 콜로니를 사용하였다. PCR 조건은 3 step PCR로 pre-denaturation 94°C에서 5 분, denaturation 94°C에서 30 초, annealing 59°C에서 1 분, extention 72°C에서 1 분 (마지막 cycle은 5 분 추가)의 조건으로 35 cycle 증폭하였으며 T-Gradient Thermoblock (Biometra, Germany)을 사용하였고 종료 후 1% agarose gel을 이용하여 PCR product를 100 V에서 전기영동하였다. Agarose gel에 로딩 된 DNA를 UV transilluminator (Corebio, Korea)와 image analyzer를 이용하여 분석하였다.

본 연구에서 사용된 미생물의 strain 당 5개의 콜로니를 선별하여 콜로니 PCR 후 전기영동 분석 하였을 때 905 bp 로 증폭되는 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었다. 따라서 strain 마다 *gfp* 형질전환이 성공적으로 진행되었다는 것을 알 수 있었다.

나. Flow cytometry system (FACS)을 이용한 *gfp* 활성 측정

형질전환 미생물의 *gfp* 활성 측정을 위하여 *gfp* 가 삽입되어 PCR로 검증된 개체를 선별하고 kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 nalidixic acid (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 항생제를 첨가한 CHOI 액체배지에 미생물을 분주하여 28°C, 180 rpm에서 48시간 배양하여 활성이 강한 상태로 만들어 주었다. 액체 배양 된 형질전환 미생물을 Flow cytometry system (BD, USA)으로 *gfp*를 가지고 있는 미생물의 비율을 분석하였다.

Fig. 12 에서 FSC는 cell size를 , SSC는 cell의 granularity, FL은 형광을 가지는 세포의 크기, count는 형광을 가지는 cell 개수를 나타낸다. M1 영역에 해당하는 세포가 *gfp*를 가지는 세포로써 count table에서 살펴보면 2,000개의 세포를 FACS 분석하였을 때 Fig. 13에서 보는 바와 같이 형질전환 된 CBMB110은 10,423 (52%), CBMB12는 6,814 (34%), CBMB15는 14,342 (71%), CBMB27은 13,473 (71.7%), CBMB31은 9,764 (57.4%)로 분석되었다.

다. Confocal laser scanning microscope (CLSM) 를 이용한 *gfp* 활성 측정

형질전환 미생물의 *gfp* 활성을 시각적으로 확인하기 위하여 confocal laser scanning microscope (Leica, Germany)를 이용하였다. *gfp* 가 삽입되어 PCR로 검증된 개체를 선별하고 kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 nalidixic acid (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 항생제를 첨가한 CHOI 액체배지에 미생물을 분주하여 28°C, 180rpm에서 48시간 배양하여 형질전환 미생물이 active한 상태에서 슬라이드 글라스에 고정될 수 있도록 ProLong Gold Antifade Reagent (invitrogen)를 이용하여 mounting하였다. 세포를 mounting하기 전에 slide glass에 남아있는 습기를 완전히 제거한 후 ProLong Gold Antifade Reagents를 평평하게 고루 발랐다. Sample을 solution 위에 올려놓고 cover glass에도 동일한 조건으로 mounting solution을 처리하고 sample에 기포가 생기지 않도록 주의하면서 고정시켰다. Sample을 라벨하여 상온에서 24시간동안 암조건으로 incubation한 후 TCS-SPII-AOBS (Leica)를 이용하여 Excitation 488nm, Emission: 500-580nm 조건에서 63X oil 렌즈로 형광이미지를 측정하였다.

CLSM 분석결과 Fig. 13 에서와 같이 각각의 strain에서 *gfp*를 확인할 수 있었다. 각 strain 별 *gfp* 밝기의 차이가 있는 것처럼 보였지만 이것은 각 strain이 배양된 균수의 차이 때문이었다.

라. 도입유전자 특이적 탐침을 이용한 PCR을 이용하여 세대의 진행에 따른 도입유전자의 존속여부 측정

형질전환 된 형질전환체를 항생제가 없는 CHOI배지에 계대배양하면서 자라난 각 strain의



콜로니를 3개씩 선발하였다. 그리고 도입유전자인 pFAJ1820을 특이적으로 선택하는 PCR 프라이머 YL121 (5'-TAAAGGAAGCGGAACACGTA)과 YL122 (5'-TCGCCAATTGGAGTATTT

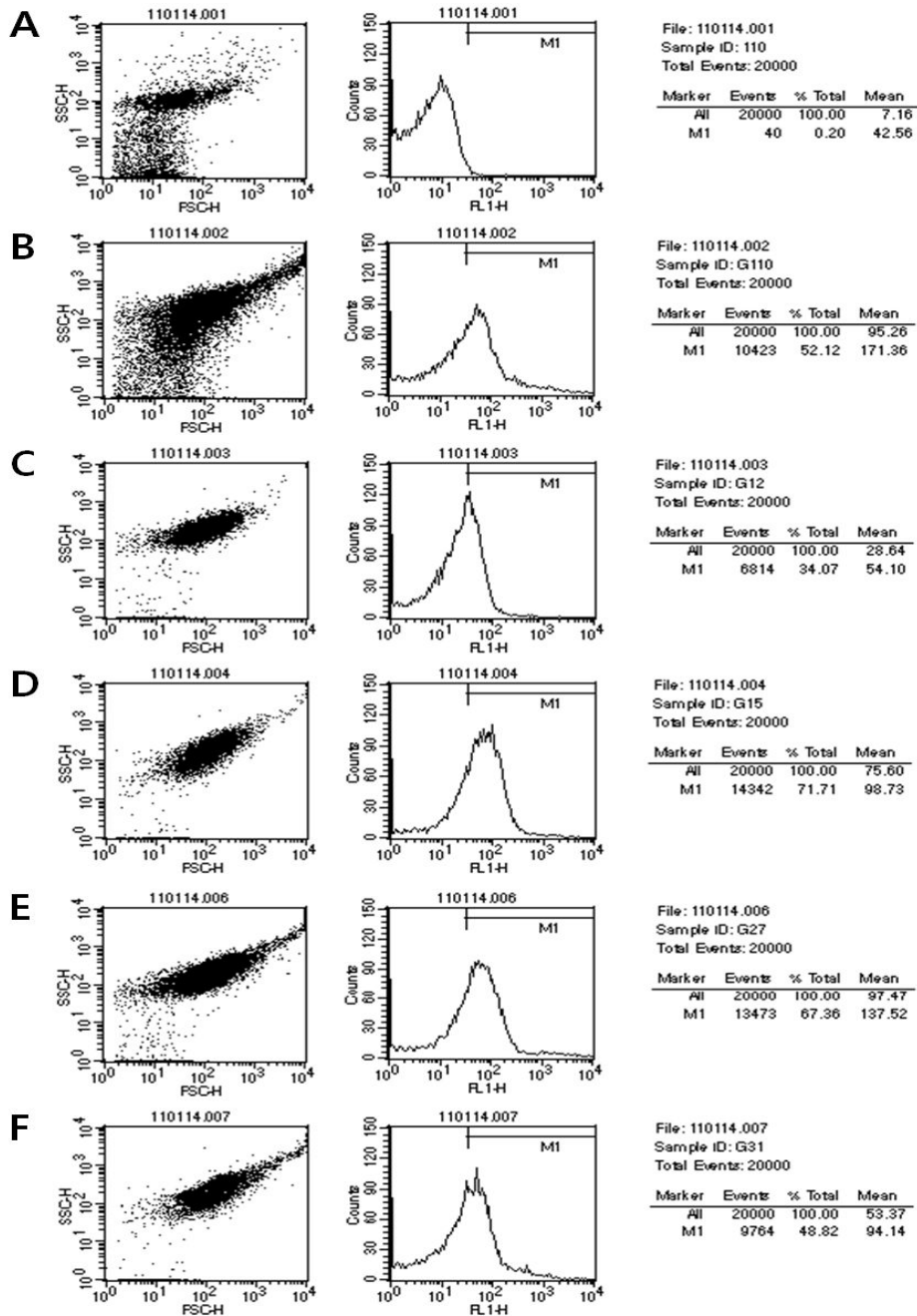


Fig. 12. Flow cytometry를 이용한 형질전환 미생물의 *gfp* 활성 검정. A, 형질전환 되지 않은 *M. oryzae* CBMB110 B, 형질전환 된 *M. oryzae* CBMB110 C, 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12 D, 형질전환 된 *M. sp.* CBMB15 E, 형질전환 된 *M. sp.* CBMB27 F, 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31

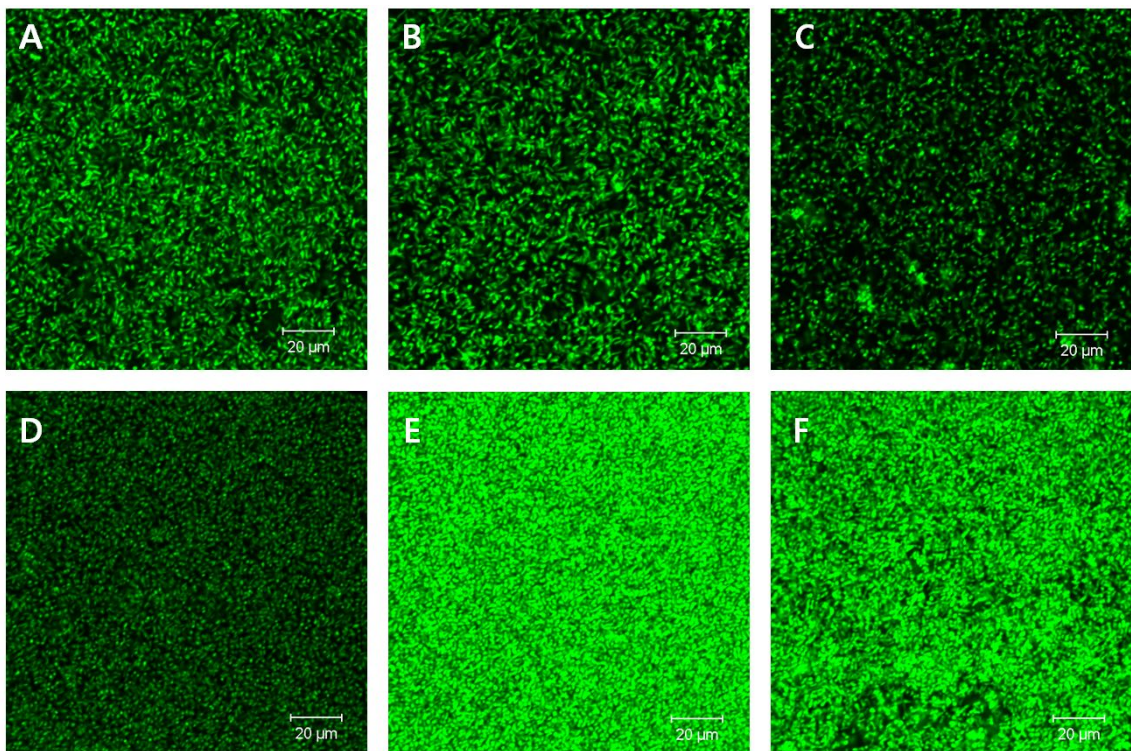


Fig. 13. *gfp* 형질전환 된 *Methylobacterium*의 CLSM 사진. A, *M. fujisawaense* CBMB12 B, *M. sp.* CBMB15 C. *M. oryzae* CBMB20 D, *M. sp.* CBMB27 E, *M. fujisawaense* CBMB31 F, *M. oryzae* CBMB110

TG)를 이용하여 형질전환 된 *Methylobacterium* 각각의 콜로니를 3개씩 채취하여 콜로니 PCR 하였다. PCR 조건은 3 step PCR로 pre-denaturation 94°C에서 5 분, denaturation 94°C에서 30 초, annealing 59°C에서 1 분, extention 72°C에서 1 분 (마지막 cycle은 5 분 추가)의 조건으로 35 cycle 증폭하였으며 T-Gradient Thermoblock (Biometra, Germany)을 사용하였고 종료 후 1% agarose gel을 이용하여 PCR product를 100 V에서 전기영동하였다. Agarose gel에 로딩된 DNA를 UV transilluminator (Corebio, Korea)와 image analyzer를 이용하여 분석하였다.

그 결과 15회에 걸친 계대배양에서 Fig. 14 와 같이 모든 strain의 형질전환체에서 삽입된 *gfp* 유전자가 안정적으로 존재한다는 것을 확인할 수 있었다(Table 6).

#### 4. 벼, 토마토, 고추, 상추, 시금치 등에 형질전환 미생물을 접종 후 생육 측정

##### 가. 작물에 미생물 접종 후 생육측정

식물생장촉진미생물인 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31, *M. oryzae* CBMB110을 종자침지로 처리한 벼, 토마토, 고추, 상추, 시금치와 미생물을 처리하지 않은 벼, 토마토, 고추, 상추, 시금치를 파우치에 파종하고 growth chamber 내에서 생육을 관찰하였다. 생육관찰 목록으로는 각각의 종자를 파우치에 파종 후 3일, 5일, 7일, 9일 순으로 각 개체의 뿌리와 줄기의 전장을 측정하였다.

Kanamycin (50 $\mu$ g/ml)과 nalidixic acid (20 $\mu$ g/ml) 항생제를 첨가한 CHOI 액체배지에 미생물을 분주하여 28°C, 180rpm에서 48시간 배양된 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31, *M. oryzae* CBMB110을 상온에서 4,500 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 모아진 세포를 멸균수에 희석하였다. 희석된 현탁액이 spectrophotometer에서 OD<sub>600</sub>에 약 1.0 (균수 약 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cfu/ml)이 되도록 하였다. 벼 종자는 2007년 수확한 동진벼를 사용하였으며 종자소독을 위하여 스포탁 0.05% 희석액에 24시간 침지하고 흐르는 물에 충분히 세척한 후 사용하였다. 토마토, 고추, 상추, 시금치 종자소독을 위해서 거즈를 준비하고 10립의 종자를 거즈로 감싸고 멸균수로 세척하였다. 70% Ethanol에 토마토, 고추, 상추, 시금치종자를 1분동안 담갔다가 토마토와 고추, 시금치는 2% NaOCl 에 30초간 살균하고 상추는 2.5% NaOCl 에 6분간 살균하여 멸균수로 세척하였다. 이와 같은 방법을 한 세트로 3 세트 반복하여 종자를 소독하였다. 준비된 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense*

CBMB31, *M. oryzae* CBMB110 현탁액 10 ml를 petri-dish에 넣고 벼 종자 10립을 침지하였다. 침지된 종자는 상온에서 70 rpm으로 4시간동안 반응시켰다. 미생물을 처리 하지 않은 무처

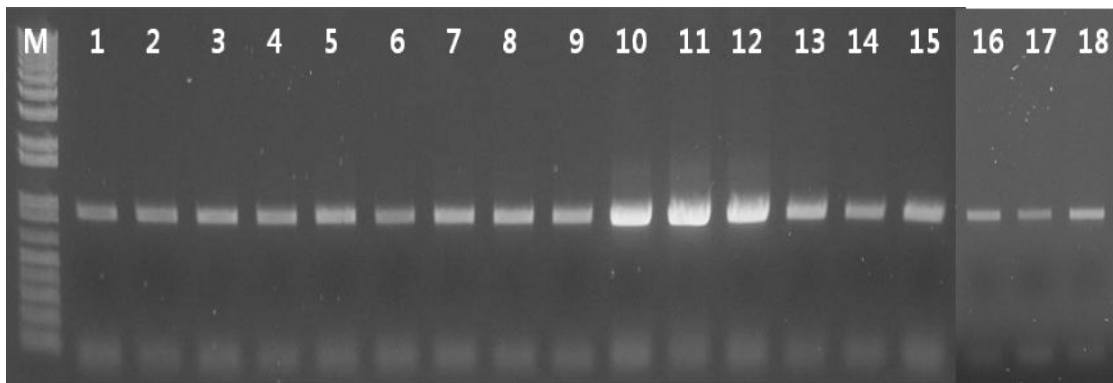


Fig. 14. 계대배양을 통한 도입유전자 pFAJ1820의 존속여부 검정. M. 1kb DNA marker 1-3. *M. fujisawaense* CBMB12 4-6. *M. sp.* CBMB15 7-9. *M. oryzae* CBMB20 10-12. *M. sp.* CBMB27 13-15. *M. fujisawaense* CBMB31 16-18. *M. oryzae* CBMB110

Table 6. 형질전환된 *Methylobacterium*에서 PCR을 이용한 각 계대배양 횟수에 따른 도입된 유전자의 안정성 확인

No of subculture <sup>a</sup>	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>		<i>Methylobacterium oryzae</i>		<i>Methylobacterium</i> sp.	
	CBMB12	CBMB31	CBMB20	CBMB110	CBMB27	CBMB15
	pFAJ1820	pFAJ1820	pFAJ1820	pFAJ1820	pFAJ1820	pFAJ1820
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100
8	100	100	100	100	100	100
9	100	100	100	100	100	100
10	100	100	100	100	100	100
11	100	100	100	100	100	100
12	100	100	100	100	100	100
13	100	100	100	100	100	100
14	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100

a, 형질전환된 colony를 항생제가 없는 배지에 계대하면서 PCR을 이용하여 *gfp* 유전자의 존재 여부 확인

리구의 벼, 토마토, 고추, 상추, 시금치 종자 또한 멸균수에서 동일한 조건으로 반응시켰다. Growth pouch에 멸균수 20 ml을 넣고 121°C, 1기압으로 20분 고압 멸균하였다. 멸균된 pouch 1 개에 미생물 침지된 종자와 무처리 종자를 5립씩 넣고 온도 27°C, 광주조건 16시간의 growth chamber에 배양하였다. 파종 후 3일부터 이틀 간격으로 줄기와 뿌리의 길이를 측정하여 생육 조사를 실시하였다.

그 결과 형질전환 된 각각의 미생물을 종자침지하여 파종한 고추유묘의 뿌리길이는 Fig. 15에서 보는 것과 같이 육안으로도 대조적인 차이를 볼 수 있었다. 무처리 된 고추 유묘의 뿌리 길이는 평균 3.1 ( $\pm 0.7$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 고추유묘의 뿌리 길이는 평균 6.3 ( $\pm 0.5$ ) cm, *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 고추유묘의 뿌리길이는 6.8 ( $\pm 0.3$ ) cm, *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 고추유묘의 뿌리길이는 6.0 ( $\pm 0.6$ ) cm, *M. sp.* CBMB27로 종자침지 된 고추유묘의 뿌리길이는 6.7 ( $\pm 0.5$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 고추유묘의 뿌리길이는 6.1 ( $\pm 0.43$ ) cm, *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 고추유묘는 5.5 ( $\pm 0.49$ ) cm로 분석하였다. 이러한 결과로 볼 때 각각의 *Methylobacterium* 은 고추유묘의 뿌리 성장을 촉진시키는데 영향을 미치는 것으로 사료된다.

형질전환 된 각각의 미생물을 종자침지하여 파종한 벼 유묘의 뿌리길이 (Fig. 16)는 무처리 된 벼 유묘의 뿌리 길이 평균 10.4 ( $\pm 0.6$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 벼 유묘의 뿌리 길이는 평균 8.3 ( $\pm 0.5$ ) cm, *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 벼 유묘의 뿌리길이는 8.4 ( $\pm 1.0$ ) cm, *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 벼 유묘의 뿌리길이는 3.0 ( $\pm 0.4$ ) cm, *M. sp.* CBMB27로 종자침지 된 벼 유묘의 뿌리길이는 3.5 ( $\pm 0.4$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 벼 유묘의 뿌리길이는 3.3 ( $\pm 0.9$ ) cm, *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 벼 유묘는 3.6 ( $\pm 0.3$ ) cm로 분석하였다.

형질전환 된 각각의 미생물을 종자침지하여 파종한 상추 유묘의 뿌리길이 (Fig. 17)는 무처리 된 상추 유묘의 뿌리 길이 평균 4.2 ( $\pm 0.7$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 상추유묘의 뿌리 길이는 평균 7.0 ( $\pm 0.9$ ) cm, *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 상추유묘의 뿌리 길이는 7.8 ( $\pm 0.4$ ) cm, *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 상추유묘의 뿌리길이는 8.0 ( $\pm 0.8$ ) cm, *M. sp.* CBMB27로 종자침지 된 상추유묘의 뿌리길이는 6.4 ( $\pm 0.6$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 상추유묘의 뿌리길이는 6.5 ( $\pm 0.7$ ) cm, *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 상추유묘는 7.8 ( $\pm 0.4$ ) cm 로 분석하였다.

형질전환 된 각각의 미생물을 종자침지하여 파종한 토마토 유묘의 뿌리길이 (Fig. 18)는 무처리 된 토마토 유묘의 뿌리 길이 평균 10.0 ( $\pm 0.7$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지

된 토마토 유묘의 뿌리 길이는 평균 9.7 ( $\pm 1.5$ ) cm, *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 토마토 유묘의 뿌리길이는 9.8 ( $\pm 1.0$ ) cm, *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 토마토 유묘의 뿌리길이

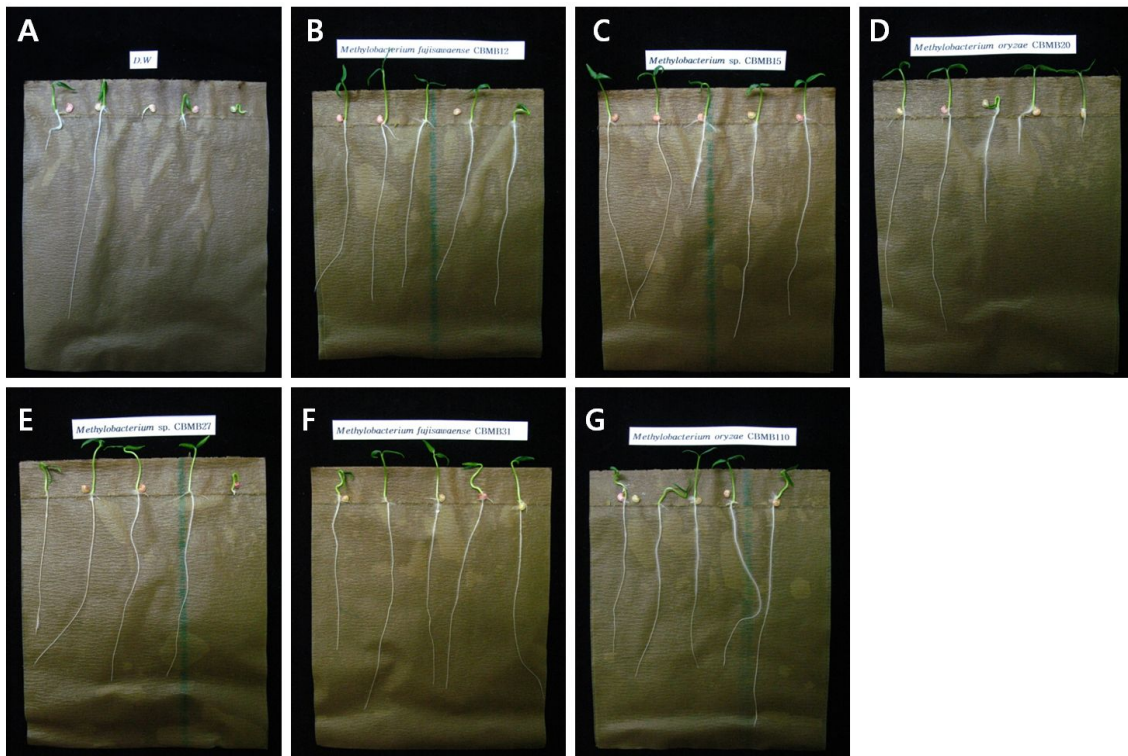


Fig. 15. *Methylobacterium* 을 종자침지한 고추를 파종한 후 5일의 생육사진 A. 무처리 된 고추 유묘, B. *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 고추유묘 C. *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 고추유묘 D. *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 고추유묘 E. *M. sp.* CBMB27로 종자침지 된 고추유묘 F. *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 고추유묘 G. *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 고추유묘



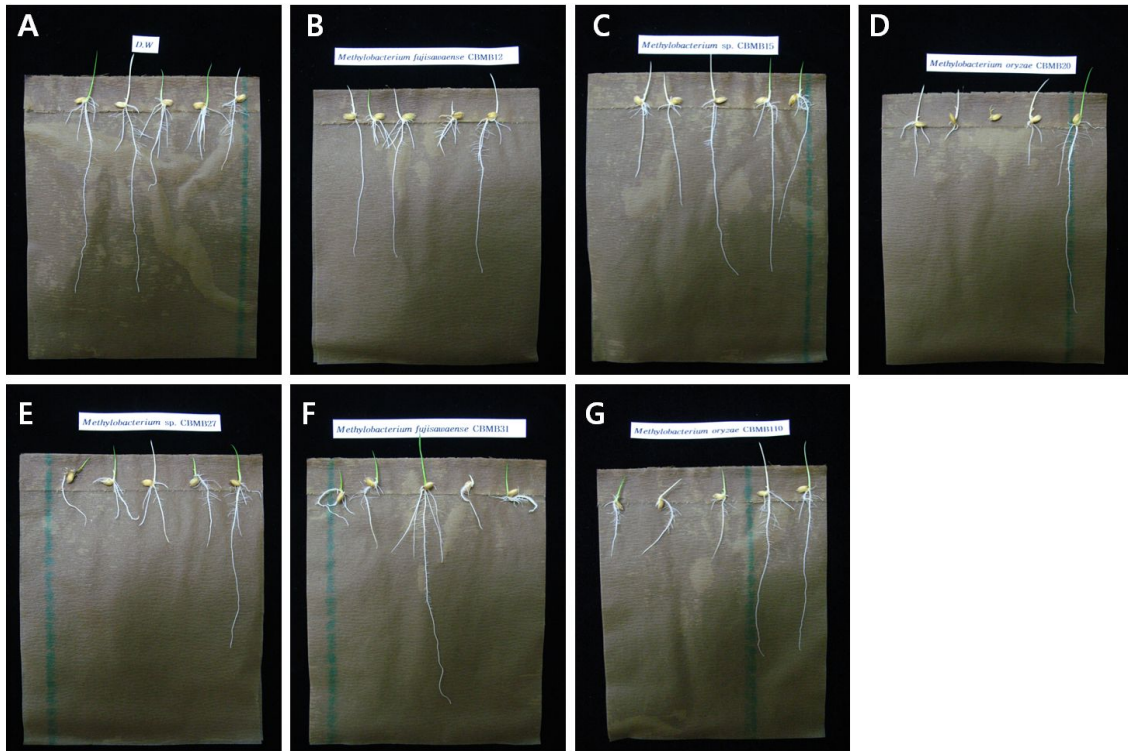


Fig. 16. *Methylobacterium* 을 종자침지한 벼를 파종한 후 5일의 생육사진 A. 무처리 된 벼 유묘, B. *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 벼 유묘 C. *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 벼 유묘 D. *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 벼 유묘 E. *M. sp.* CBMB27로 종자침지 된 벼 유묘 F. *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 벼 유묘 G. *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 벼 유묘



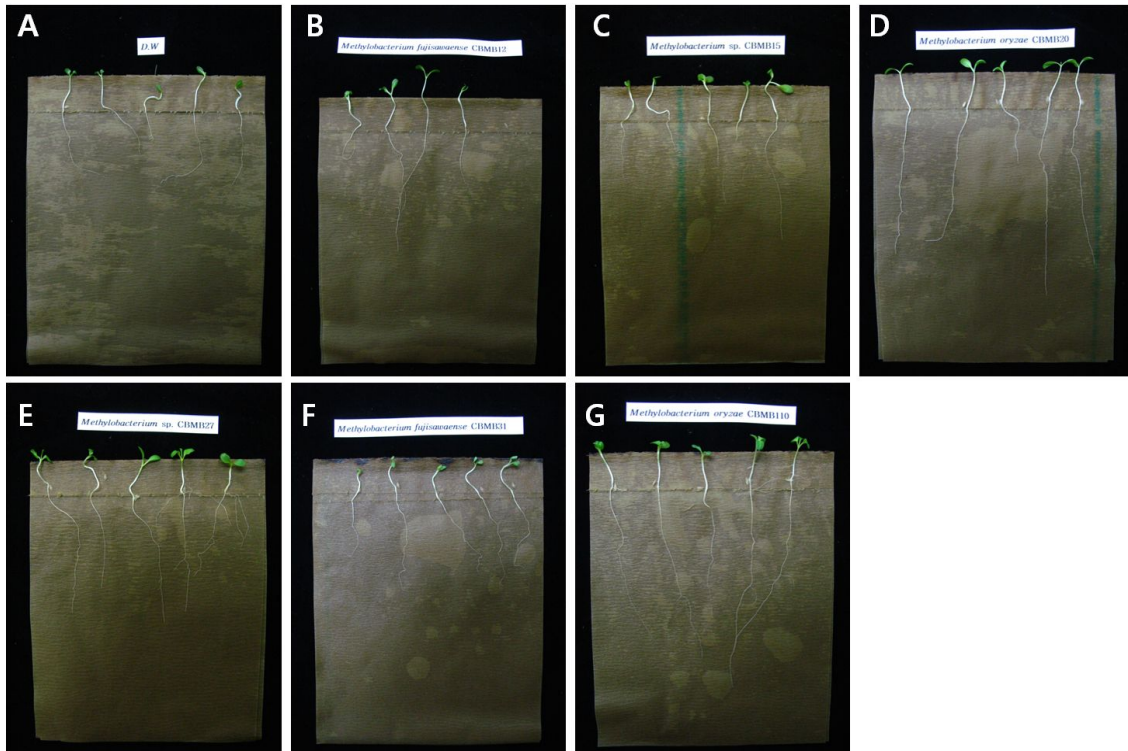


Fig. 17. *Methylobacterium* 을 종자침지한 상추를 파종한 후 5일의 생육사진 A. 무처리 된 상추유묘, B. *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 상추 유묘 C. *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 상추 유묘 D. *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 상추 유묘 E. *M. sp* CBMB27로 종자침지 된 상추 유묘 F. *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 상추 유묘 G. *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 상추 유묘

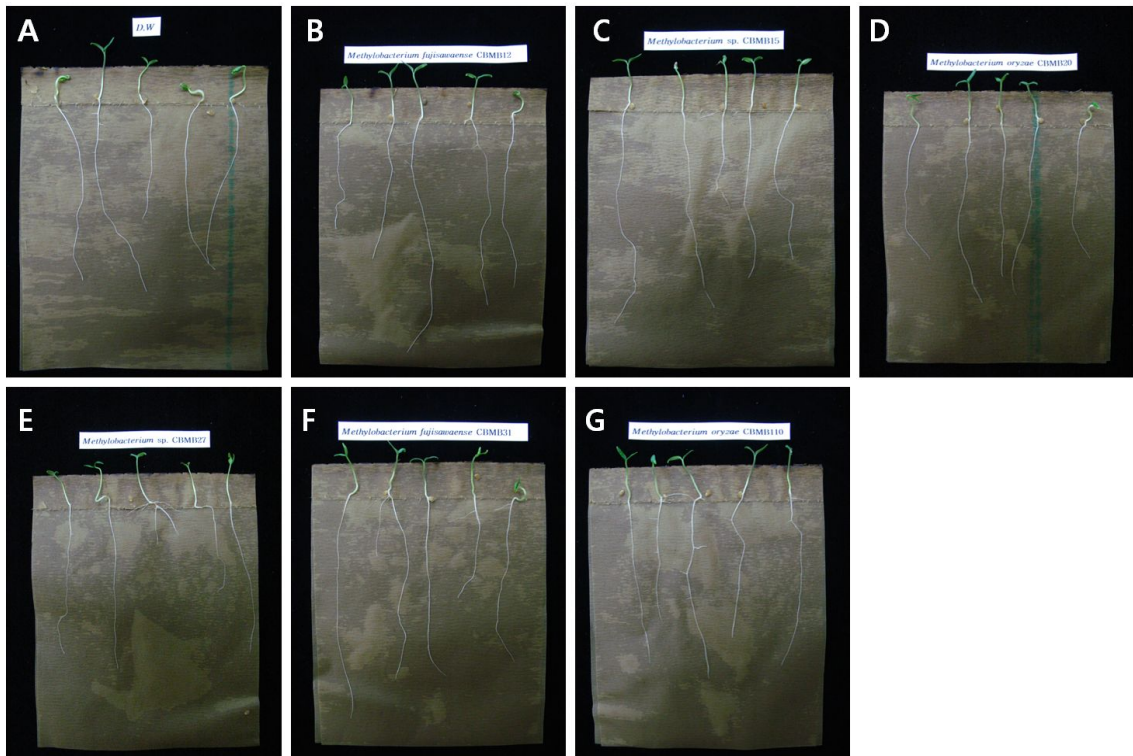


Fig. 18. *Methylobacterium* 을 종자침지한 토마토를 파종한 후 5일의 생육사진 A. 무처리 된 토마토 유묘, B. *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 토마토 유묘 C. *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 토마토 유묘 D. *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 토마토 유묘 E. *M. sp.* CBMB27로 종자침지 된 토마토 유묘 F. *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 토마토 유묘 G. *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 토마토 유묘

는 8.6 ( $\pm 0.9$ ) cm, *M. sp* CBMB27로 종자침지 된 토마토 유묘의 뿌리길이는 8.5 ( $\pm 1.7$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 토마토 유묘의 뿌리길이는 10.3 ( $\pm 0.7$ ) cm, *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 토마토 유묘는 9.4 ( $\pm 0.9$ ) cm 로 분석하였다.

형질전환 된 각각의 미생물을 종자침지하여 파종한 시금치 유묘의 뿌리길이 (Fig.19)는 무처리 된 시금치 유묘의 뿌리 길이 평균 4.5 ( $\pm 1.0$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 시금치 유묘의 뿌리 길이는 평균 5.9 ( $\pm 1.1$ ) cm, *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 시금치 유묘의 뿌리길이는 6.7 ( $\pm 1.4$ ) cm, *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 시금치 유묘의 뿌리길이는 4.1 ( $\pm 1.1$ ) cm, *M. sp* CBMB27로 종자침지 된 시금치 유묘의 뿌리길이는 4.9 ( $\pm 1.0$ ) cm, *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 시금치 유묘의 뿌리길이는 3.7( $\pm 0.4$ ) cm, *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 시금치 유묘는 6.8( $\pm 1.2$ ) cm로 분석하였다.

고추, 벼, 상추, 토마토, 시금치의 뿌리길이 데이터를 비교분석한 결과 고추유묘, 상추유묘에 미생물을 종자침지 하였을 때 뿌리길이가 무처리의 뿌리길이보다 더 긴 것으로 분석되었다. 또한 시금치 유묘에서 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. sp.* CBMB15 그리고 *M. oryzae* CBMB110를 종자침지한 뿌리의 신장이 더 활발한 것으로 나타났다 (Fig. 20).

나. Confocal laser scanning microscope (CLSM)를 이용한 작물별 (벼, 토마토, 고추, 상추, 시금치) 형질전환 미생물의 군집 확인

형질전환 미생물인 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31, *M. oryzae* CBMB110을 종자침지하여 기내배양 된 벼, 토마토, 고추, 상추, 시금치에서 공생하고 있는 형질전환 미생물의 군집을 시각적으로 확인하기 위하여 Confocal laser scanning microscope (CLSM) TCS-SPII-AOBS (Leica, Germany)를 이용하였다. 형질전환 미생물을 접종한 작물에서 부위별 (잎, 줄기, 뿌리) 시료를 채취하여 CLSM을 이용하여 *gfp* 영역인 Excitation 488 nm, Emission: 500-580 nm 조건에서 63X oil 렌즈로 형광이미지를 측정하면서 미생물의 군집을 확인할 수 있었다.

형질전환 미생물을 접종한 벼, 토마토, 상추, 고추, 시금치를 파종 후 3일에 잎, 줄기, 뿌리로 나누어 슬라이드 글라스에 고정될 수 있도록 ProLong Gold Antifade Reagent (invitrogen)를 이용하여 mounting하였다. 조직을 mounting하기 전에 slide glass에 남아있는 습기를 완전히 제거한 후 ProLong Gold Antifade Reagents를 평평하게 고루 발랐다. Sample을 solution 위에 올려놓고 cover glass에도 동일한 조건으로 mounting solution을 처리하고 sample에 기포가 생

기지 않도록 주의하면서 고정시켰다. Sample을 라벨하여 상온에서 24시간동안 암조건으로 incubation한 후 이미지를 측정하였다.

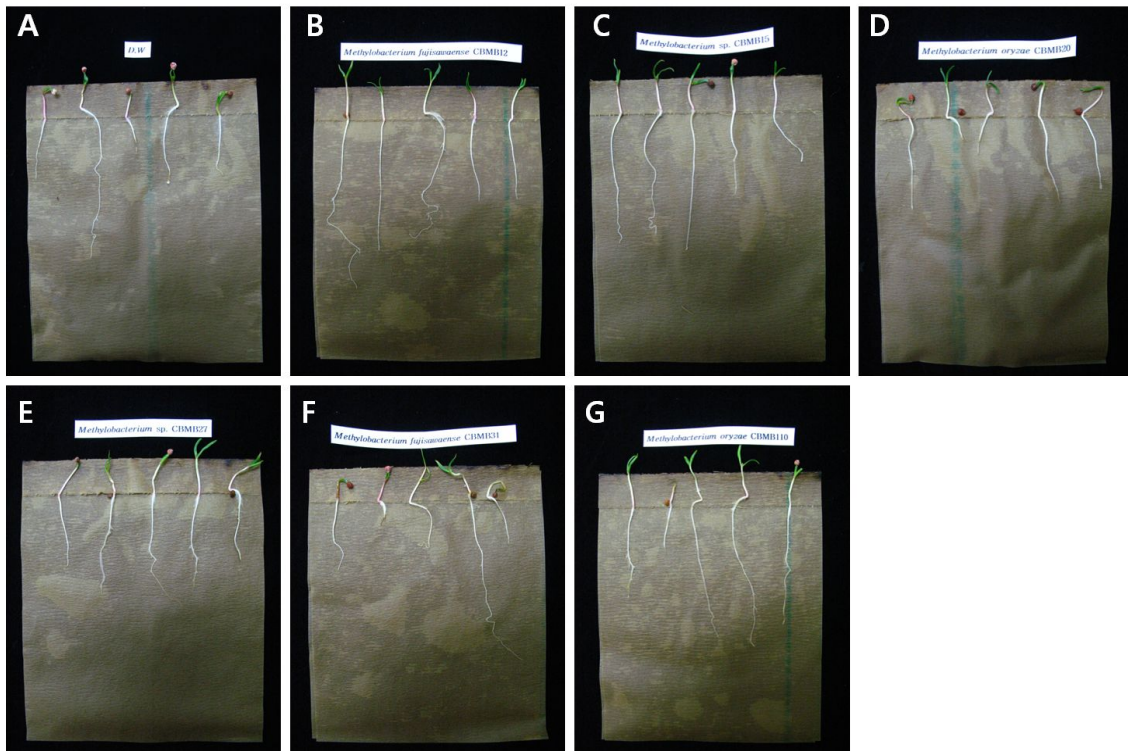


Fig. 19. *Methylobacterium* 을 종자침지한 시금치를 파종한 후 5일의 생육사진 A. 무처리 된 시금치 유묘, B. *M. fujisawaense* CBMB12로 종자침지 된 시금치 유묘 C. *M. sp.* CBMB15로 종자침지 된 시금치 유묘 D. *M. oryzae* CBMB20로 종자침지 된 시금치 유묘 E. *M. sp.* CBMB27로 종자침지 된 시금치 유묘 F. *M. fujisawaense* CBMB31로 종자침지 된 시금치 유묘 G. *M. oryzae* CBMB110로 종자침지 된 시금치 유묘

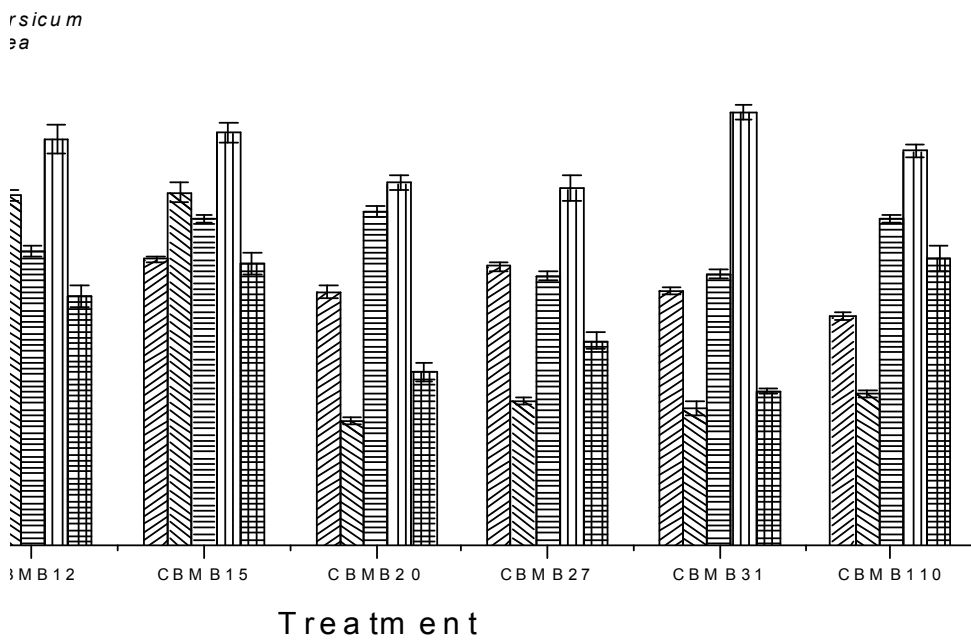


Fig.

20. 형질전환 된 *Methylobacterium* 종자침지처리에 따른 고추, 벼, 상추, 토마토, 시금치 유묘의 뿌리길이평균

### (1) 시금치에서 형질전환 *Methylobacterium*의 군집

시금치의 뿌리에 control로 형질전환 되지 않은 *M. oryzae* CBMB110과 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 후 3일이 경과한 뿌리 조직을 관찰하였다. CLSM 관찰에서는 식물조직의 자가형광 (autofluorescence)이 강하여 *gfp* 영역에서 식물자체의 형광을 완전히 배제하고 미생물이 가지고 있는 *gfp* 만을 관찰하기는 힘들었다. 형질전환 되지 않은 *M. oryzae* CBMB110과 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 후 3일이 경과한 뿌리 조직을 관찰한 결과 Fig. 21(A)에서 보는 바와 같이 시금치 뿌리조직의 자가형광을 관찰할 수 있었고 뿌리 주변에 공생하고 있는 형질전환 되지 않은 *M. oryzae* CBMB110은 검은색 점으로 확인할 수 있었다. 그리고 형질전환 미생물 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 시금치의 뿌리 조직을 관찰한 결과 *gfp*를 띄는 *M. fujisawaense* CBMB31 이 뿌리털 주변에 둘러싸여 군집하는 모습을 확인 할 수 있었다. 또한 본 연구에서 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. oryzae* CBMB110을 시금치의 종자에 침지하여 접종하였을 때 뿌리털 주변에 둘러싸여 군집하는 모습을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용된 유용미생물 균은 시금치에 종자침지하여 접종하였을 때 뿌리털 주변에서 군집하며 공생하는 것임을 알 수 있었다.

### (2) 상추에서 형질전환 *Methylobacterium*의 군집

상추의 뿌리에 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12를 접종한 후 5일이 경과한 뿌리와 줄기 조직을 관찰하였다. 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12를 접종한 후 5일이 경과한 뿌리 조직을 관찰한 결과 상추 뿌리조직의 뿌리털 주변에 공생하고 있는 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12를 관찰 할 수 있었고 광학이미지를 통하여 미생물의 공생위치를 확인할 수 있었다. 또한 형질전환 된 *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31, *M. oryzae* CBMB110을 시금치의 종자에 침지하여 접종하였을 때 뿌리털 주변과 줄기의 외피 주변에 둘러싸여 군집하는 모습을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용된 유용미생물 균은 시금치에 종자침지하여 접종하였을 때 뿌리털 주변과 줄기의 외피에서 군집하며 공생하는 것임을 알 수 있었다.

### (3) 토마토에서 형질전환 *Methylobacterium*의 군집

토마토의 뿌리에 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 후 3일이 경과한 줄기 조

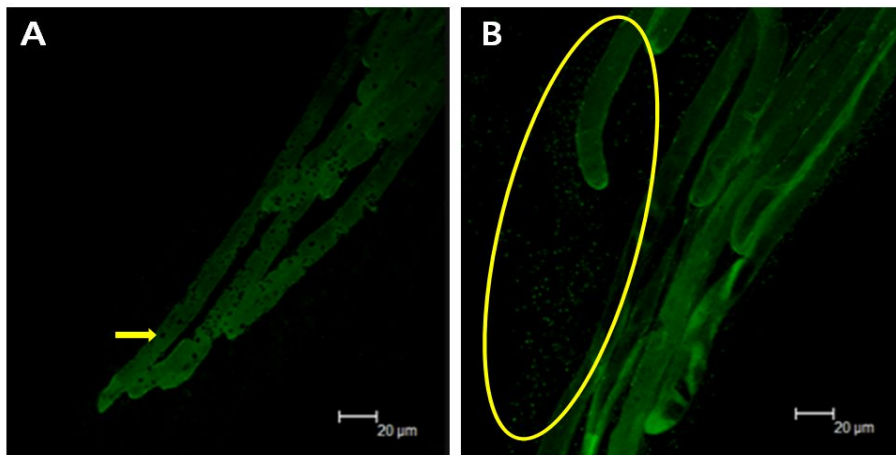


Fig. 21. 시금치 뿌리의 콘포칼영상 A, 형질전환 되지 않은 *M. oryzae* CBMB110 을 접종한 후 3 일째 시금치 뿌리 *gfp* 사진, B, 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31 을 접종한 시금치 파종 3 일째 뿌리 *gfp* 사진

직을 관찰하였다. 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 후 3일이 경과한 줄기 조직을 관찰한 결과 Fig. 22(A)에서 보는 바와 같이 토마토 줄기조직의 자가형광과 *gfp*를 가지는 미생물의 공생을 관찰할 수 있었다. 형질전환 미생물 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 토마토의 뿌리 조직을 관찰한 결과 *gfp*를 띄는 *M. fujisawaense* CBMB31 이 뿌리털 주변에 둘러싸여 군집하는 모습을 확인 할 수 있었다. 또한 본 연구에서 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. oryzae* CBMB110을 상추의 종자에 침지하여 접종하였을 때 줄기와 뿌리털 주변에 둘러싸여 군집하는 모습을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용된 유용미생물 균은 상추에 종자 침지하여 접종하였을 때 줄기와 뿌리털 주변에서 군집하며 공생하는 것임을 알 수 있었다.

#### (4) 벼에서 형질전환 *Methylobacterium*의 군집

벼의 뿌리에 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12를 접종한 후 4일이 경과한 뿌리와 줄기 조직을 관찰하였다. 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12를 접종한 후 4일이 경과한 벼의 뿌리 조직을 관찰한 결과 Fig. 23(A)에서 보는 바와 같이 벼 뿌리조직의 뿌리털 주변에 공생하고 있는 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12를 관찰 할 수 있었고 Fig. 23(B)에서 광학이미지를 통하여 벼에서의 미생물 위치를 확인 할 수 있었다. 또한 형질전환 된 *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31, *M. oryzae* CBMB110을 벼의 종자에 침지하여 접종하였을 때 뿌리털 주변과 줄기표면에 군집하는 모습을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용된 유용미생물 균은 벼에 종자침지하여 접종하였을 때 뿌리털과 줄기표면에서 군집하며 공생하는 것임을 알 수 있었다.

#### (5) 고추에서 형질전환 *Methylobacterium*의 군집

고추의 뿌리에 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 후 4일이 경과한 뿌리 조직을 관찰하였다. 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 후 4일이 경과한 뿌리 조직을 관찰한 결과 Fig. 24(A)에서 보는 바와 같이 *gfp*를 띄는 *M. fujisawaense* CBMB31 이 뿌리털 주변에 둘러싸여 군집하는 모습을 확인 할 수 있었다. 또한 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. sp.* CBMB15, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. oryzae* CBMB110을 고추의 종자에 침지하여 접종하였을 때 줄기와 뿌리털 주변에 둘러싸여 군집하는 모습을 확인



할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용된 유용미생물 균은 고추에 종자 침지하여 접종하였을 때 줄기와 뿌리털 주변에서 군집하며 공생하는 것임을 알 수 있었다.

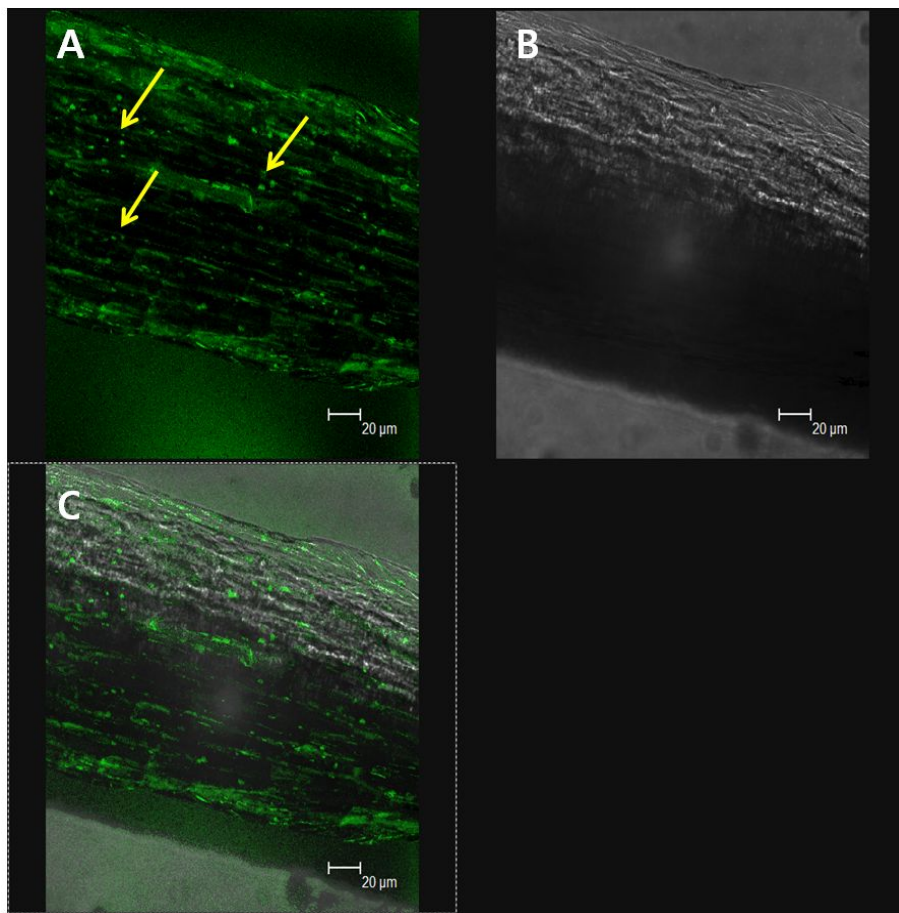


Fig. 22. 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31을 접종한 토마토 과종 3 일째 뿌리 모습. A. *gfp* 영역 이미지 B. 광학 이미지 C. *gfp* 이미지와 광학 이미지의 merge

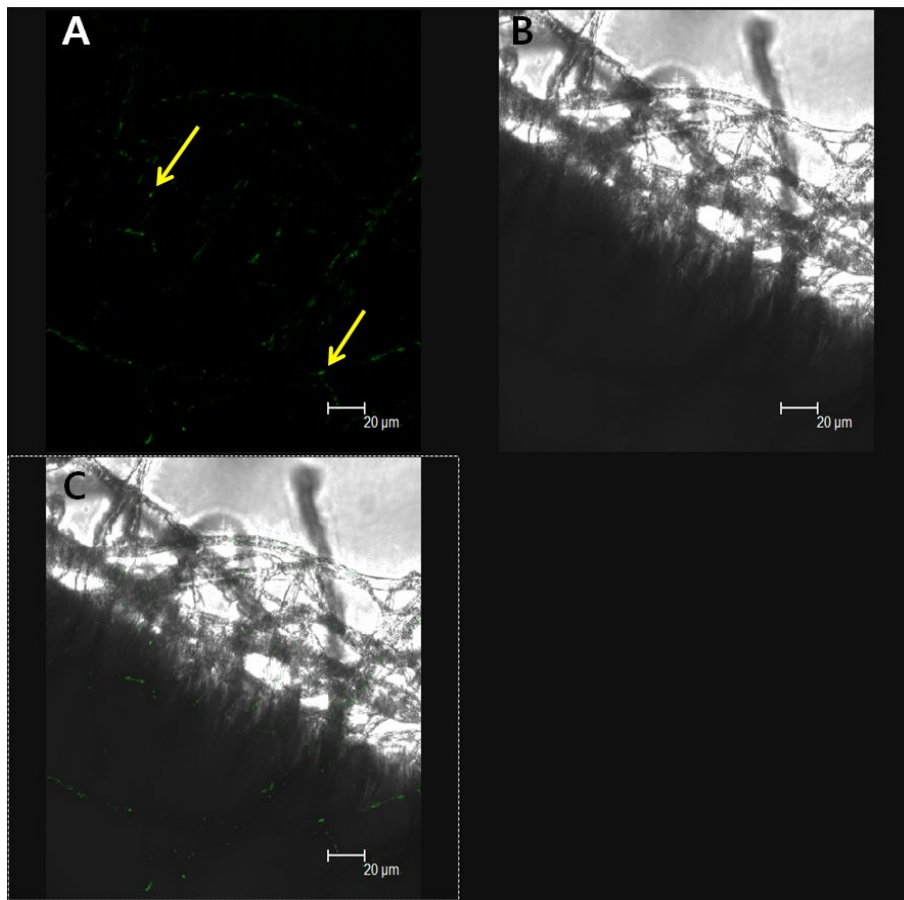


Fig. 23. 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB12 접종 후 4 일 쟈 벼 뿌리에서 관찰. A. *gfp* 영역 이미지 B. 광학 이미지 C. *gfp* 이미지와 광학 이미지의 merge

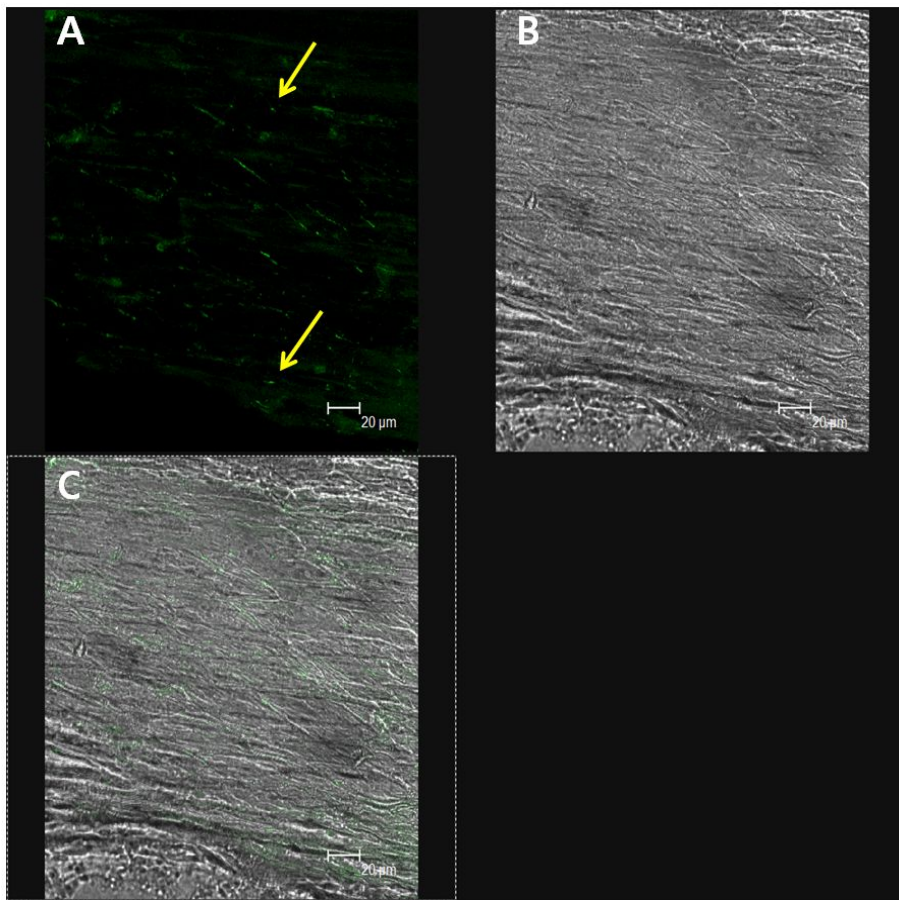


Fig. 24. 형질전환 된 *M. fujisawaense* CBMB31 접종 후 4 일 제 고추 뿌리에서 관찰. A. *gfp* 영역 이미지 B. 광학 이미지 C. *gfp* 이미지와 광학 이미지의 merge

## 5. 고추작물에 미생물을 접종 후 생육 측정

선행연구에서 선발된 토착미생물의 접종으로 병원균 저항성을 보이는 작물에서 PR-유전자 및 병원균 방어 효소 유전자를 클로닝하고, 미생물 접종이 작물의 PR-유전자 및 병원균 방어 유전자의 발현에 미치는 효과를 검정하였다. 2 차년도에 실시한 미생물처리가 유식물의 생장에 미친 결과를 참고하여 미생물을 처리한 고추와 미생물을 처리하지 않은 고추를 포트에 파종하고 growth chamber 내에서 생육을 관찰하고 엽장, 엽수, 지상부의 총 길이를 측정하여 형질전환 미생물을 처리했을 때 작물에 미치는 영향을 분석한다.

### 가. *Methylobacterium* 배양

이번 실험에서 유기비료로 사용한 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31 을 고체 CHOI배지에 계대한 후 29°C 조건으로 Incubator 에 2 일간 배양한다. 자란 미생물들을 긁어 액체 CHOI가 담긴 삼각플라스크에 덩어리가 생기지 않도록 잘 풀어 준 후 Shaking Incubator에서 29°C, 160 rpm으로 2 일간 배양한다. 배양한 미생물을 Conical tube에 넣은 후 원심분리기를 이용 4,500 rpm으로 10분간 원심분리를 한다. 분리된 미생물만 남기고 상등액은 버린 후 멸균수로 희석하여 준다. 희석 후 Spectrophotometer를 이용하여 600λ 0.800ABS를 기준으로 흡광도를 측정하였다.

### 나. 발아율 및 생육측정

Petri dish에 고추 및 토마토 종자와 희석시킨 미생물용액 5 ml를 회전식진탕기에서 2 시간 동안 70 rpm으로 종자를 침지시킨다. 포트를 잘라 각각의 미생물 처리구로 나눈 후 상토와 물을 반죽하여 채워 넣은 후 침지된 종자를 상토에 올린 다음 다시 상토로 보이지 않도록 덮어 준 후 25°C 온실에서 재배하였다. 재배하는 동안 매주 한번 미생물을 배양하여 근권에 2 ml씩 접종 해주었다.

고추는 파종 후 7 일 후에 발아확인을 하였으며, 최종 발아율은 무처리와 *M. fujisawaense* CBMB12, *M. oryzae* CBMB20 에서는 모두 발아하였으며 *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31 에서는 1 개씩을 제외한 11 개의 개체에서 발아를 하였다. 생육조사 결과로는 미생물 처리구와 미생물 무처리구의 전장, 엽장, 엽수를 비교시 큰 성장효과를 관찰할 수 없었다 (Fig.

25). 지상부 길이에서는 무처리한 개체군 (길이:13.4cm 편차:2.5cm)이 가장 크게 관찰되었으며, CBMB31을 처리한 개체군 (길이:9.5cm 편차:4.3cm)이 가장 작은 길이생장을 보여주었다. 엽장에서는 CBMB31처리군 (길이:13.3cm 편차:2.2cm)에서 가장 큰 것으로 관찰되었으며, CBMB12 처리군 (길이:8.2cm 편차:1.1cm)이 가장 작은 성장을 보여주었다. 엽수에서는 관찰기간동안 각 개체가 비슷한 수준을 나타내었다. 역병균을 투입 후 +1일 미생물 처리 및 미처리구에 있는 역병균 처리 개체에서 역병균의 증상인 시들음 현상을 관찰하였으며, +3일에는 미생물 처리 및 미처리구 개체의 반 이상이 고사하였으며 +6일에 모든 개체가 고사하였다. 육안관찰시의 미생물 처리구와 미처리구의 고사속도는 거의 일정하였다

## 6. 고추역병균주인 *Phytophthora capsici* 배양 및 처리

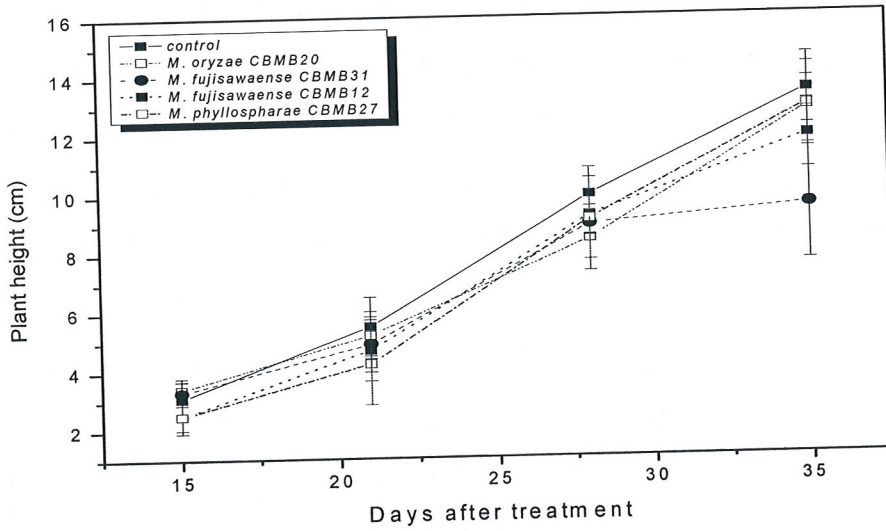
식물의학과 진균실험실에서 계대받은 *Phytophthora capsici* 병원균배지를 잘라 V8 주스 배지에 올려놓은 후 20°C Incubator에서 5일동안 배양을 하였다. 균사가 퍼진 V8 주스 배지를 다시 잘라 Oatmeal배지에 붙인 후 20°C 7일간 계대배양하였다. 배양 후 Oatmeal배지를 약수저로 배지가 손상되지 않도록 긁어 버린후 광인큐베이터에서 랩을 제거 후 2일간 배양하였다. 광인큐베이터에서 배양시킨 배지에 멸균수를 넣고 약수저로 긁어 모아 거즈를 댄 비커에 부었다. 이때에 거즈를 필터의 역할로 사용하였다. 이렇게 추출한 *Phytophthora capsici* 는 Hemocytometer를 이용하여  $5 \times 10^4$  zoospores/ml 로 희석하여 4°C 냉장고에 1시간 보관하였다. 파종 후 16일 째에 역병균 처리군과 비처리군으로 구분한 후 역병균 처리군에 균등하게 토양으로 처리하였다. 고추의 경우 병원균 투입 후 +1일에 *Phytophthora capsici* 의 병징인 시들음 증상이 나타났으며, 병 진행이 빠르게 진행되다 +6일에 작물이 모두 말라 죽었다. PR 단백질의 검정은 3 일차를 샘플링하여 실험하였다. 잎을  $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 의 크기로 잘랐으며, 역병균 처리 DW, *M. fujisawaense* CBMB12, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31과 역병균 무처리 DW, *M. fujisawaense* CBMB12, *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31 등 총 10개체의 샘플을 수집하였고 -70°C로 냉동보관 하였다.

## 7. Database search 및 PCR을 통하여 $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO, ACC oxidase, ACC synthase 등의 유전자 염기서열 확보

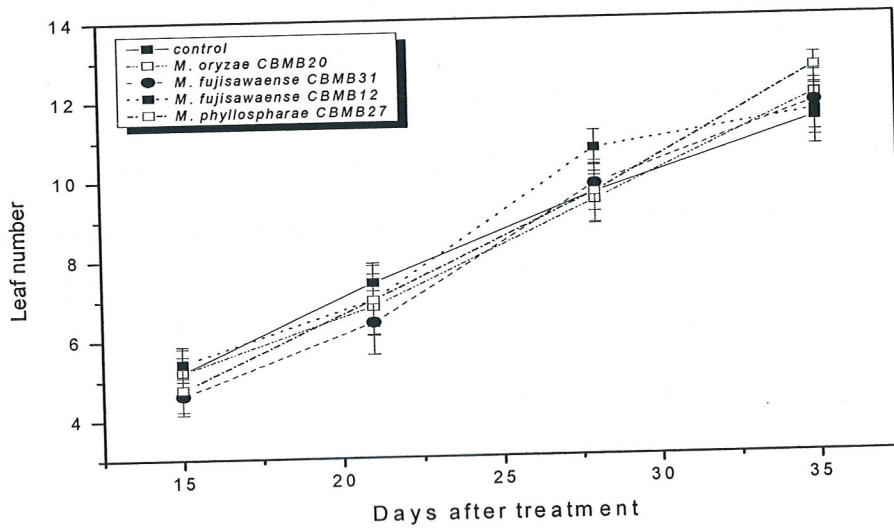
본 연구에서 선정된 벼 (*Oryza sativa*), 토마토 (*Solanum lycopersicum*), 상추 (*Lactuca sativa*), 고추 (*Capsicum annuum*), 시금치 (*Spinacia oleracea*)의 PR-protein인  $\beta$

-1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO와 에틸렌의 생합성에 관여하는 ACC oxidase, ACC synthase의 유전자 염기서열검색은 1, 2 차년도에 진행된 바 있었다. 하지만 NCBI의 data base에 업로

A



B



C

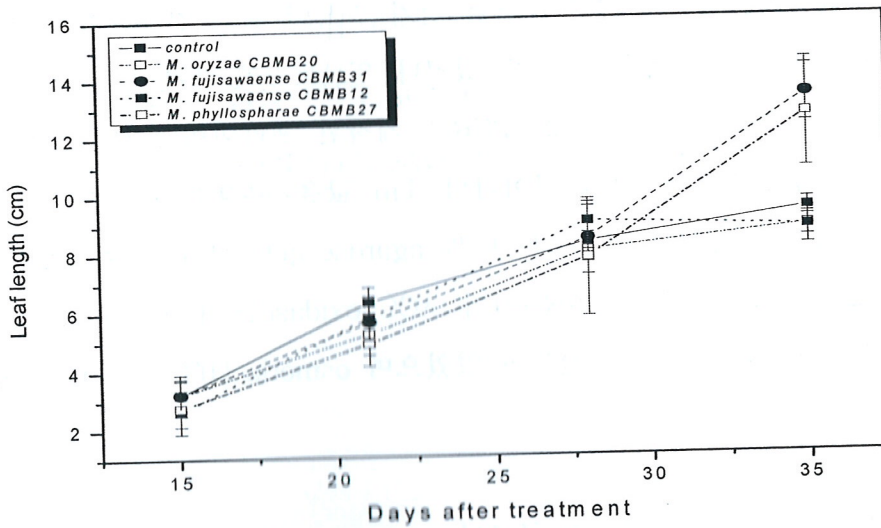


그림 25. 고추에 미생물 처리 후 15일부터 35일까지 생육측정 결과 A, 전장 B, 엽수 C, 엽장 D 되어 있지 않아 확보하지 못했던 유전자 염기서열이 다수 있었다. 이번 년도에 진행된 연구에서 고추의 PPO 유전자 염기서열과 상추의 PO 유전자 염기서열을 추가적으로 검색하였고 확보할 수 있었다. 상추의  $\beta$ -1,3-Glucanase, PPO 그리고 시금치의 ACC oxidase, PAL,  $\beta$ -1,3-Glucanase는 NCBI data base 상에 업로드 되어 있지 않아 유전자 염기서열을 확보하지 못하였다. 하지만 추가적으로 Osmotin과 Thaumatin을 검색하였다. Osmotin 유전자는 담배배양세포를 고농도의 염분스트레스를 주면 형성되는 단백질로 알려져 있으며 감자역병균에 대한 항균성에도 관여하는 단백질로 확인 된 바 있다. 그리하여 일반적으로 식물의 스트레스에 반응하여 생기는 단백질로 보고되어지고 있다 (Singh et al., 1987; Monteiro, 2003). 또한 Thaumatin은 담배잎에서 분리된 항균성단백질이며 유전자 변형된 작물들에서 발하는 다양한 곰팡이균에 대한 저항성이 있다는 연구가 보고되었다 (Xing et al., 2008). 또한 생존에 관련된 스트레스로 인해 발현정도가 달라지고 이에 따라 저항성을 보인다는 연구결과도 보고되었다 (Rajamet al., 2007). 아직까지 확보하지 못한 상추와 시금치 그리고 브로콜리의 PR protein 유전자 염기서열은 해당 유전자의 보존된 부위를 검색하여 그 염기서열을 이용해 degenerated primer를 제작할 것을 목표로 하고 있다. 제작되는 degenerated primer는 상추와 시금치 그리고 브로콜리의 total RNA를 추출하여 cDNA 합성 후 합성된 cDNA를 template로 PCR 한다. PCR 증폭산물을 이용하여 T-easy 벡터에 클로닝 하고 클로닝 된 염기서열을 분석하여 유전자 정보를 획득하기위한 연구를 하였다.

#### 가. 유전자염기서열 확보를 위한 degenerate PCR

검색되지 않은 유전자들의 염기서열 정보를 얻기 위하여 각 유전자들이 연구된 문헌을 통하여 degenerate PCR 용 프라이머를 찾을 수 있었다. Table 7과 같이 각 유전자들의 degenerate PCR 프라이머를 제작하였다. degenerate PCR은 제작된 프라이머와 PrimeStar Taq(TaKaRa, Japan)을 이용하여 실험하였다. 각 프라이머의 T<sub>m</sub> 값을 설정하기 위하여 30~50°C 사이로 gradient 를 주어 PCR 하였다. 전기영동은 1.5% agarose gel에서 100V로 loading 하였다.

그 결과 Fig. 26 과 같이 시금치 RNA에서 ACC-oxidase는 42.8°C과 46°C, PAL 36.4°C와 39.6°C, BG 와 thaumatin 은 증폭된 산물이 없었으며 osmotin 50°C와 51.6°C 에서 증폭산물이 확인되었다.

#### 나. 유전자염기서열 확보를 위한 유전자 클로닝



PCR 증폭산물의 정제는 SV purification kit(Promega, USA)를 사용하였다. Micro tube에

Table 7. PR-protein의 degenerate PCR 을 위한 프라이머 염기서열과 참고문헌 리스트

Gene name	Primer name	Primer sequence(5'→3')	Reference
ACC-oxidase	YL1361	TAG AGC TCG ATG CWT GYG ARA AMT GGG G	Wang et al., 2003
	YL1362	CGT CTA GAG CTT CRA ATC TTG GCT CCT T	
PAL	YL1363	TNC CNC TNT CNT ACA THG CCG G	Jiang et al., 2011
	YL1364	AAR CAY CAY CCN GGN CAR ATH	
BG	YL1365	GCT GGC ICA RGC ITA YGC	Montero et al., 2006
	YL1366	CCA IGG ICT ICC RAA IAT YTG	
Thaumatococin	YL1367	GCI ACI TTT ACI ATA GTI AAT CA	Zamani et al., 2004
	YL1368	ATA IGC CTG IGG ACA CTG IGC	
Osmotin	YL1369	TGY CAR ACN GGN GAY TGY GG	Zhang and Shin, 2007
	YL1370	AAN GTN SWN GTN GGR TCR TC	



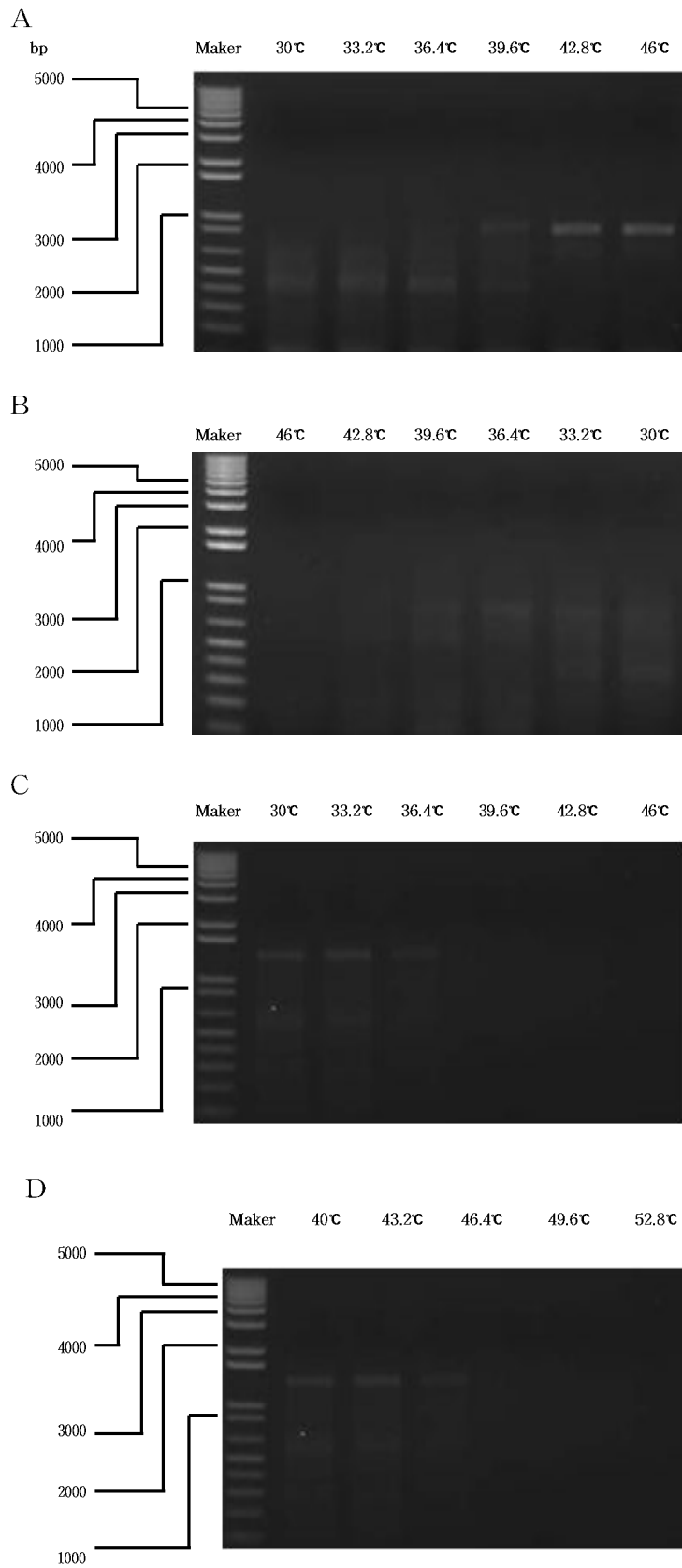


Fig. 26. 시금치 RNA 를 이용한 각 유전자의 gradient PCR product 전기영동사진 A, 시금치

의 ACC-oxidase B, 시금치의 PAL C, 시금치의 Osmotin D, 상추의 Osmotin

PCR product를 옮겨넣고 PCR product와 동일한 volume의 Membrane binding solution (PCR product가 20  $\mu\text{l}$ 면 Membrane binding solution 20  $\mu\text{l}$ )을 넣고 pipetting 하였다. Collection tube에 SV Minicolumn을 끼워 넣고 1번에 mixture를 피펫을 이용하여 SV Minicolumn에 넣고 1분간 방치하였다. 원심분리기 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 collection tube에 분리된 액체는 버렸다. Membrane Wash Solution 700  $\mu\text{l}$ 를 SV Minicolumn에 넣고 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. collection tube에 분리된 액체는 버렸다. Membrane Wash Solution 500  $\mu\text{l}$ 를 SV Minicolumn에 넣고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. Collection tube에 분리된 액체를 버린 후 SV Minicolumn을 다시 씻은 후 그 상태로 1분간 원심분리하여 column을 건조시켜 주었다. Micro tube에 SV Minicolumn을 끼워 넣었다. Nuclease-free water 50  $\mu\text{l}$ 를 SV Minicolumn에 넣고 1분간 방치한 후 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. SV Minicolumn을 버리고 뚜껑을 닫아  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 벡터클로닝에 사용된 벡터는 pGEM T-easy vector(Promega, USA)를 사용하였다. vector를 ligation 하기 위해 앞서 정제된 PCR product 를 얼음위에서 녹인 후 사용하였다. Micro tube 에 PCR product 3  $\mu\text{l}$  와 pGEM T-easy vector(50 ng) 1  $\mu\text{l}$  그리고 ligation buffer를 5  $\mu\text{l}$  넣고 pipetting 하였다. 마지막으로 ligase를 1  $\mu\text{l}$  넣고 spindown 하였다. 혼합액은 실온에서 1 시간동안 반응 시켜주었다. ligation vector 는 곧바로 대장균(*E. coli* DH5 $\alpha$ )에 형질전환 하였다. 형질전환은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관되어 있던 대장균 competent 세포를 얼음위에서 살짝 녹인 후 micro tube를 준비하고 100  $\mu\text{l}$  세포에 ligation 된 벡터 5  $\mu\text{l}$  를 혼합하여 얼음위에서 30분 동안 반응시켰다. 그리고 항온수조  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 30초간 반응시켰다. 또 얼음에서 5분간 반응시킨 후 클린벤치에서 LB 액체배지 1 ml를 tube에 넣어주었다.  $37^{\circ}\text{C}$  shaking incubator에서 100 rpm 으로 1시간 반응시켰다. 콜로니를 blue-white screening 하기위해 IPTG와 X-gal을 LB ampicilin 배지에 미리 도말하여 말렸다. 반응액은 1 시간 이후에 IPTG 와 X-gal 을 도말해 놓은 LB ampicilin 고체배지에 도말하였다. 도말한 배지는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 평판배양 하였다. 12시간 후 배양된 white 콜로니는 LB ampicilin 액체배지에 접종하여 12시간 배양하였다. 배양된 세포를 모아 plasmid DNA 추출하였다. 추출에는 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)를 사용하였다. 실험과정은 1.4 ml의 세포액을 e-tube 에 넣고 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 다시 1.4 ml의 세포액을 넣고 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 다시 spin down 후 피펫으로 상등액을 제거하였다. 250  $\mu\text{l}$ 의 cell resuspension 용액을 넣고 현탁시켰다. 250  $\mu\text{l}$ 의 cell lysis 용액을 넣고 4회정도 천천히 upside down해서 세포를 터뜨려 주었다. 뚜껑을 잠시 열어 두었다. 10  $\mu\text{l}$ 의 alkaline protease 용액을 넣고 4회 upside down 하였다. 5분간 실온에 방치하였다. 350  $\mu\text{l}$ 의 Neutralization용액을 넣고 4회 upside

down 하였다. 그리고 원심분리기 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. spin 컬럼을 collection tube에 넣고 라벨하였다. 원심분리 후 상등액을 spin 컬럼에 부었다. 다시 원심분리기 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 컬럼 밑으로 빠져나온 액체를 버리고 컬럼을 다시 tube에 넣었다. DNA 세척을 위해 750  $\mu$ l의 washing 용액을 넣고 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 컬럼 밑으로 빠져나온 액체를 버리고 컬럼을 다시 tube에 넣어 250  $\mu$ l의 washing 용액을 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. DNA 용출을 위해 새 micro tube를 준비하고 라벨하였다. 컬럼을 micro tube에 넣고 100  $\mu$ l의 DW를 넣었다. tube를 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 컬럼은 버리고 빠져나온 DNA를 -20°C에서 보관하였다. 클로닝 된 삽입DNA의 존재여부를 확인하기 위해서 제한효소 처리하여 전기영동으로 DNA를 확인하였다. 제한효소는 pGEM-t easy vector 삽입DNA 위치의 양 끝에 존재하는 Spe I 과 EcoR I 을 각각 0.5  $\mu$ l 씩 사용하였으며 2  $\mu$ l 의 buffer 4번과 0.2  $\mu$ l 의 B.S.A 그리고 11.8  $\mu$ l 의 D.W를 혼합하여 추출된 DNA 5  $\mu$ l 를 제한효소 절단하였다. 절단조건은 37°C에서 2시간 동안 반응시켜 주었다. 반응 후 전기영동은 1.5% agarose gel에서 100V로 loading 하였다.

전기영동 결과 Fig. 27 과 같이 삽입 DNA가 존재하는 것은 시금치의 ACC-oxidase임을 알 수 있었다.

삽입DNA 가 존재하는 시금치의 ACC-oxidase plasmid DNA 는 T7 과 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열 분석하였다. 염기서열 분석은 염기서열 분석은 PCR 후 얻어진 PCR 증폭산물 20  $\mu$ l를 이용하여 분석하였는데 분석은 Applied Biosystem사(USA)의 ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye terminator cycle sequencing kit를 이용하였다. MJ research사(USA)의 PTC-225 peltier thermal cyler를 사용하여 PCR 반응을 진행 하였으며 맨 처음 PCR 반응에 사용되었던 각각의 프라이머를 이용하였다. 반응이 끝나면 에탄올을 이용하여 dNTP 그리고 그 외 불순물과 순수한 PCR 산물을 분리하였다. 또 정제된 PCR 증폭산물은 3차 증류수에 희석하여 ABI PRISM 3730 XL analyzer에서 분석하였다. 시퀀싱 분석 소프트웨어로 분석된 염기서열은 텍스트 문서와 \*.ab1 형태의 문서로 얻을 수 있었다. 염기서열 분석에서 얻어진 염기서열 정보를 텍스트 파일로 입력하여 NCBI의 BLASTX 프로그램에서 단백질 검색하였다. 그 결과 분석된 염기서열이 ACC-oxidase로 해독됨을 알 수 있었고 Fig. 28 처럼 벼, 고추, 토마토, 상추의 ACC-oxidase의 단백질과 alignment 결과도 얻을 수 있었다. 여기서 분석된 염기서열 정보를 GenBank의 Bankit에 염기서열 등록하였다 (Table 8).

## 8. $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO, ACC oxidase, ACC synthase 등의 Real-Time PCR유전자 발현 측정용 탐침의 제작

분석된 작물의  $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO, ACC oxidase, ACC synthase 등의 유전자

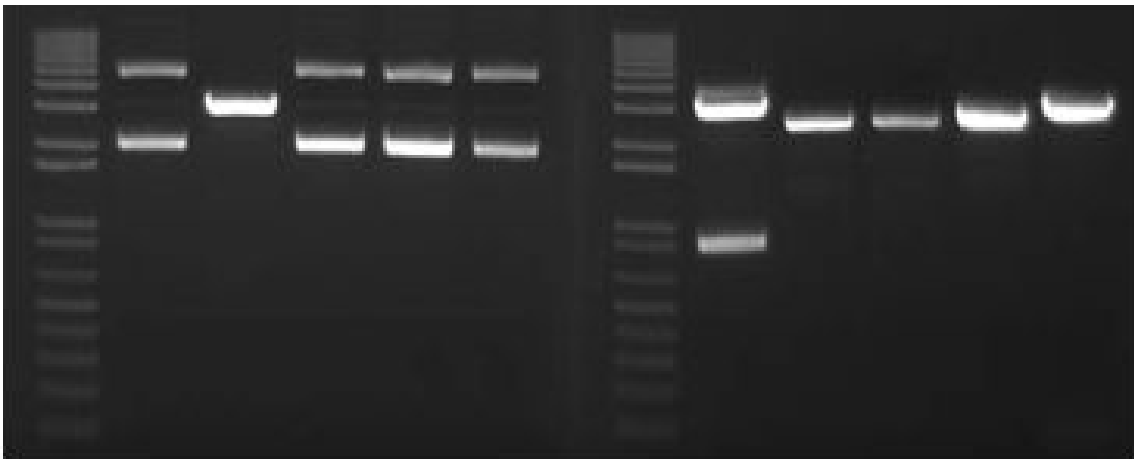


Fig. 27. 시금치의 ACC-oxidase insert DNA 확인을 위한 제한효소 절단 후 전기영동 사진

<i>Spinacia oleracea</i>	1	FFELVNHGISHDLMDTVERITKEHYKKCNEQRFKELVAS-----KGLENVSTET
<i>Capsicum chinense</i>	1	FFELVNHGIPHEVMDTVEKLTGKHYKKCMEQRFKELVAS-----KGLEAVQ--AE
<i>Solanum lycopersicum</i>	1	FFELVNHGISHELLDAVENLTGKHYKKCMEQRFKEMVAS-----KGLEAVQ--TE
<i>Oryza sativa</i>	1	FFEMLNHGIAHELMDEVERVSKAHYANCREEKFKEFAR-----RML EAGEKGA
<i>Lactuca sativa</i>	1	FFQLVNHGIPVELLERVKKVSSECYKLEREQNFNNSTPRKRLKELVEKKSGBK
<i>Spinacia oleracea</i>	55	ESTFYLRHLPDSNIASIPDLDEYRRVMKEFGLRLEKLAEDLLDLLCENLGLEK
<i>Capsicum chinense</i>	55	ESTFFLRHLPVSNISDVPDLDEYREVMRDFAKRLEKLAEEELDLLCENLGLEK
<i>Solanum lycopersicum</i>	55	ESTFFLKHLPVSNVYEV PDLDEYRKVMKDFALKLEKLAENLLDLLCENLGLEK
<i>Oryza sativa</i>	56	ESTFFVRHRPVSNLADLPDVDDHYRQVMKQFASETEKLSERVL DLLCENLGLEK
<i>Lactuca sativa</i>	61	EDVFL-----SDDSEWPSRTPGFKETMMEYRAQLKELAEKMMEVMDENLGLPK
<i>Spinacia oleracea</i>	115	FYGGRAPN--YGTKVSNYPPCPKPDLIKGLRAHTDAGGI ILLFQDDKVSGLQLL
<i>Capsicum chinense</i>	115	FYGTKGPN--FGSKVSNYPPCPKPDLIKGLRAHTDAGGI VLLFQDDKVSGLQLL
<i>Solanum lycopersicum</i>	115	FYGSKGPT--FGTKVSNYPPCPKPDLIKGLRAHTDAGGI ILLFQDDKVSGLQLL
<i>Oryza sativa</i>	116	FAGSNGPT--FGTKVSSYPPCPRPDLVDGLRAHTDAGGI ILLFQDDQVSGLQLL
<i>Lactuca sativa</i>	116	FNGGEGETAFFGTKVSHYPPCPHPPEMVTGLRAHTDAGGI ILLFQDEQVEGLEILL
<i>Spinacia oleracea</i>	173	DVPPMRHSIVINLGDQLEVISNGKYKSVLHRVVAQTGGTRMSIASFYNPASDAV
<i>Capsicum chinense</i>	173	DVPPMRHSIVVNLGDQIEVITNGKYKSVMHRVVAQTDGTRMSIASFYNPGSDAV
<i>Solanum lycopersicum</i>	173	DVPPMKHSIVINLGDQLEVITNGRYKSI EHRVVAQDQDTRMSIASFYNPGSDAV
<i>Oryza sativa</i>	174	DVPPMRHAIVANIGDQLEVITNGRYKSVMHRVLRTPDGNRMSIASFYNPGADAV
<i>Lactuca sativa</i>	176	DVQPLPNSIVINTGDQVEVLSNGRYKSVMHRVQAMPDRTRRSIASFYNPSSYNAI
<i>Spinacia oleracea</i>	233	LVEKDQQ--KQIYPKFVFDYDMKLYAGLKFQPKPRFEALE-----
<i>Capsicum chinense</i>	233	LVEKAKEES--KQVYPKFLFDYDMKLYAGLKFQAKEPRFEAMKAMEAEIKVDP I
<i>Solanum lycopersicum</i>	233	LIEKTEEDI--KLKYPKFVFDYDMKLYAGLKFQAKEPRFEAMKAVETT VNLGP I
<i>Oryza sativa</i>	234	LAG--ADAA-AAAYPRFVFDYMNLYVRHKFAAKEPRFEAMKSAAEV VHAAP I
<i>Lactuca sativa</i>	236	LLEKENDEIKELDYPFRVFGDYMSIYSELKFLPKPRFKAVRAV-----

Fig. 28. 염기서열분석으로부터 얻어진 시금치의 ACC-oxidase 아미노산 서열과 다른 작물의 아미노산 서열 alignment.

Table 8. 클로닝을 통해 얻어진 pathogen related gene에 대한 accession number

품종	ACC-oxidase	PAL	BG	PO	PPO	Osmotin	Thaumatococin
고추 ( <i>Capsicum annuum</i> )	AB434925	EU616575	AF227953	AF442386	AA840759 AA840758	AY262059	AF297646
토마토 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	AB013101	AK327645	FJ151171	AK321353	AK247410	L76632	N/A
벼 ( <i>Oryza sativa</i> )	AF049889	AK120127	AK067001	EF444530	AK108237	HM215149	U77657
브로콜리 ( <i>Brassica oleracea</i> )	X81628 X81629	AB281591	EF484879	N/A	N/A	N/A	AF355805
상추 ( <i>Lactuca sativa</i> )	AB158347 AB158346 AB158345	AF411134 AF299330	N/A	GW397557	HS586881.1	N/A	N/A
시금치 ( <i>Spinacia oleracea</i> )	submitted	N/A	N/A	AF244921	Z66559 X90869	N/A	N/A

염기서열을 이용하여 그 유전자를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 Real-Time PCR 용 탐침을 제작한다. 제작된 탐침은 해당 유전자의 PCR product (염기서열 결정에 사용된 클론)와 해당 유전자의 발현을 촉진시키는 조건에서 추출된 RNA를 이용하여 유전자 발현 측정 조건을 확립한다.

## 9. Real-Time PCR을 이용한 $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO, ACC oxidase, ACC synthase 등의 유전자 발현 측정

미생물을 접종한 작물과 미생물을 접종하지 않은 작물에서 RNA를 추출하고 cDNA로 합성하여 Real-Time PCR 후 미생물을 접종한 작물과 미생물을 접종하지 않은 작물에서  $\beta$ -1,3-Glucanase, PAL, PO, PPO, ACC oxidase, ACC synthase 등의 유전자의 발현이 어떠한 양상을 보이는지 정량적으로 분석한다.

### 가. RNA를 이용한 Real-time PCR 분석

각 채취한 잎을 액체질소로 얼린 후 막자사발을 이용하여 부순 후 Qiagen사의 RNeasy mini kit를 이용하여 식물체의 총 RNA를 추출한 후 각 채취한 RNA의 양을 일정한 수준으로 맞춰 주는 정량을 하였다.

정량된 단일가닥 RNA를 역전사효소를 이용하여 이중가닥인 cDNA로 합성을 한 후 ACC-oxidase, PAL, BG, PO, PPO, osmotin, thaumatin과 각 세포마다 일정한 발현량을 보이는 Actin, Tubulin을 Control gene으로 하는 9 개 Primer 세트 (Table 9)를 사용한 Real-time PCR 분석을 하였다. 총 3반복 실험을 하였으며, 각 발현량을 이용 평균과 표준오차를 구하였다. Real-time PCR에 사용된 시료는 iQ SYBR Green Supermix 10  $\mu$ l, 해당 유전자의 정방향과 역방향 Primer 0.5  $\mu$ l, DW 4.0  $\mu$ l와 1/10으로 희석시킨 cDNA 5  $\mu$ l 총 20  $\mu$ l로 만들어주었다. Real-time PCR의 조건으로 다음과 같이 진행하였다. 먼저 95°C에서 180초 유지하여 주었다. 이후 95°C에서 15초, 56°C에서 10초, 72°C에서 30초를 40 cycle를 반복하였다. 이후 95°C 10초, 65°C 5초, 95°C로 Melting curve 분석을 하였다. 총 3반복 실험하였다.

### 나. 고추에서 유전자 발현량

고추작물에 유용미생물인 *Methylobacterium*을 접종하여 생장을 관찰, 4-5엽기에 고추역병균

을 처리하여 병징을 관찰하고, 샘플링하여 병관련 유전자인 Acc-oxidase 와 PAL 발현량을 관

Table 9. Real-time RT PCR 에 사용된 유전자 특이적 primer sequence

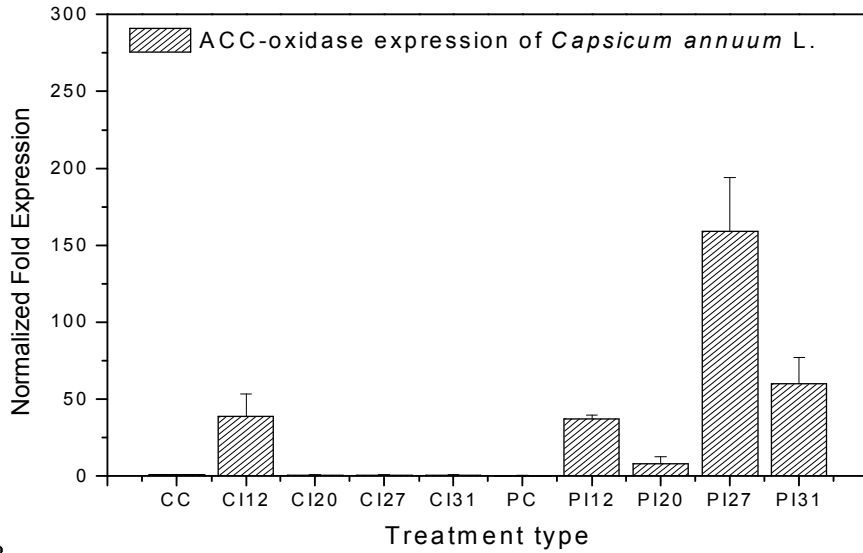
Gene name	Primer name	Primer sequence(5'→3')
ACC-oxidase	YL991	AAG ATG GCA CTA GGA TGT CAA TAG
	YL992	TCC TCT TCT GTC TTC TCA ATC AAC
PAL	YL993	CGC TAT GCT CTC CGA ACA TCT C
	YL994	ATT CAC CGA GTT AAT CTC CCT CTC
B.G	YL995	GCG GTG TTC AGC CTG GAT G
	YL996	AGC ATG AGC AAG AAG TAT GTT GTG
PO	YL1351	CAG GCT TTA CTG AGT CTG T
	YL1352	CAA CAA GGG TGA CGA GAT
PPO	YL1355	GTG GTC TGA ATG GAA AGC A
	YL1355	TGT ATG GGT TGC GGT TTC
Thaumatococin	YL1357	CTA CCC ACA AGA TGA TGC TAC
	YL1358	CCA GTA ACA CCA TTA GGA CAG
Osmotin	YL1359	GCA TAT AGT TAC CCT CAA GAT GAT
	YL1360	GAG TAG AAC CAT AAG GAC AGA AC
Actin	YL999	ACC CTG TTC TCC TGA CTG AGG
	YL1000	AGC CTG GAT AGC AAC ATA CAT AGC
Tubulin	YL1001	AGA CAG GAT GAT GCT CAC ATT CTC
	YL1002	ACC ATA CAT TCA TCG GCA TTC TCC



찰하였다.

그 결과 Fig. 29 와 같이 미생물 및 역병균 미처리구의 발현량을 1.0 을 기준으로 하였을 때, Acc-oxidase의 경우 미생물처리 *M. sp.* CBMB27 에서 평균 159.06 으로 가장 큰 발현량을 보였다. 발현량의 평균값으로 보았을 때 *M. fujisawaense* CBMB31 (평균:60.04) *M. fujisawaense* CBMB12 (평균:37.32)으로 발현량을 확인 하였다. *M. oryzae* CBMB20 은 실험결과 역병균 무처리군의 발현량이 높아 비교를 할 수 없었다. 무처리 역병균 처리구에서는 발현량이 평균 0.34 로 나타났는데, 대조군 보다 적게 발현된 것으로 미생물 처리구의 발현량이 높게 나타났으므로 병원균에 대처하는 능력을 보인 것으로 생각된다. PAL 의 발현량 결과, *M. oryzae* CBMB20 에서 평균91.64 로 가장큰 발현량을 보여주었다. 발현량은 *M. sp.* CBMB27 (평균 14.73). *M. fujisawaense* CBMB31 (평균2.85), *M. fujisawaense* CBMB12(평균1.60)순으로 나타났다. 미생물 무처리 역병균 처리구에서 발현량은 평균 1.39로 낮은 발현량을 보여주었으며, 미생물 처리구가 역병균에 효과적인 PR-protein의 증가량을 볼 수 있었다. PAL의 발현량 검정 결과 유용미생물인 *M. oryzae* CBMB20, *M. sp.* CBMB27, *M. fujisawaense* CBMB31 을 유기비료로 사용하였을 시 병원균에 대한 병 저항성이 유기비료를 사용하지 않았을 때 보다 증가된다고 판단되었다. 따라서 생육조사와 ACC-oxidase, PAL의 발현량분석 결과 *M. oryzae* CBMB20에서의 ACC-oxidase의 발현량을 적절히 조절하여 Ethylene의 적정수준을 유지하여주고 PAL의 높은 발현량을 보여 주어 식물의 성장뿐 아니라 병 저항에도 도움을 줄 것이라 사료된다.

A



B

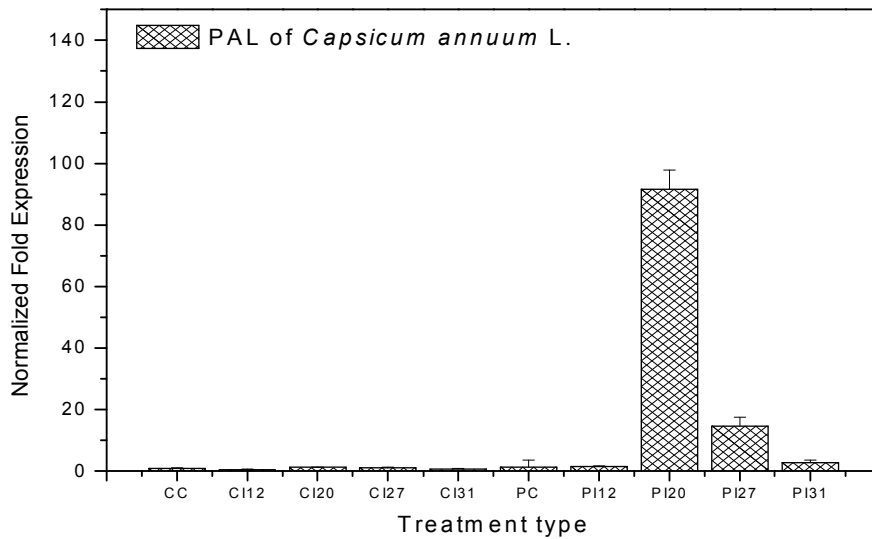


Fig. 29. 고추 RNA로부터 Real-time RT PCR 분석을 통한 각 유전자의 발현량 분석

A, ACC-oxidase B, PAL C, PO CC, 무처리 CI12, CBMB12 접종 CI20, CBMB20 접종 CI27, CBMB27 접종 CI31, CBMB31 접종 PC, 역병균처리 PI12, 역병균과 CBMB12 접종 PI20, 역병균과 CBMB20 접종 PI27, 역병균과 CBMB27 접종 PI31, 역병균과 CBMB31 접종

## 제 3 절 생물비료를 이용한 건전육묘 생산 기술 확립

### 1. 형질전환 *Methylobacterium* 균주의 배양 조건

실험에 사용된 형질 전환 *Methylobacterium* 균주의 배양을 위하여 항생제를 첨가한 AMS 선택 배지를 준비 하였다. 탄소원으로 0.5% succinate를 첨가 하였으며, 항생제는 Kanamycin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Nalidixic acid 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Cyclohexamide 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가하였다. 균주는 0.5% succinate와 항생제를 첨가한 AMS 평판 배지에서 자란 균주를 동일한 AMS 액체배지에 접종한 뒤 30°C, 150 rpm으로 72시간 동안 진탕 배양하였다.

### 2. 실험 토양 분석

Pot 실험에 사용된 토양은 5 mm 체에서 채질하여 사용하였다. 실험 전 토양의 이화학적 특성 분석은 농업과학기술원 토양 및 식물체 분석법 (National Institute of Agricultural Science and Techology, 2000)에 준하여 분석하였으며, 분석 결과는 Table 1과 같다.

### 3. 다양한 자재를 이용한 미생물비료 활용 효율 향상기술 개발

다양한 자재 (유박, 퇴비, 석회) 이용에 따른 고추에서 미생물비료 효율 향상을 확인하기 위하여 5 mm 체로 채질한 토양 11.5 kg이 담긴 pot에 유박, 퇴비, 석회를 시비하였다. 유박과 퇴비는 유기물 투입에 의한 미생물 비료의 효율을 증대하기 위한 일환으로 실험에 사용되었으며, 석회는 약산성 실험토양의 산성도 개량에 의한 미생물 비료 효율 증대를 위해 사용하였다. 유박, 퇴비, 석회의 처리량은 표준 시비량의 100%를 기본적으로 처리 하였으며, 각 처리구 별로 퇴비와 석회의 시비량을 달리 하여 처리하였다 (Table 2). 처리구는 모두 7 처리구로 각각 4반씩 28개의 pot를 준비 하였다. 공시작물은 고추로서 음성의 시설재배시험장으로부터 고추유묘를 분양 받았다. 유묘는 pot에 이식 전  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  상태의 growth chamber에서 재배 하였고, 분양 5일 후 온실의 pot에 이식하였다. 형질전환 *Methylobacterium* 균주의 접종을 위해 균주 배양액을 12000rpm으로 10분간 원심 분리하여 얻은 cell pellet을 S.D.W로 현탁하였다. 현탁액 ( $107 \text{ cfu ml}^{-1}$ ,  $\text{OD}_{600} = 1.0$ )을 이식 후 2주 간격으로 엽면시비 하였다. 고추는 이식 166일 후 수확하여 생육량과 균밀도를 측정 하였다. 줄기의 길이는 수확 전 측정 하였으며, 건물중은 70°C에서 72시간 동안 건조 시킨 후 측정하였다.

온실 실험에서 유박, 퇴비, 석회 처리 및 *Methylobacterium* 접종이 고추의 생장에 미치는 영향을 확인 하였다. 고추의 줄기 길이와 건물중 처리구별 평균값은 Table 3에서 확인 할 수 있다. 고추의 줄기 길이의 경우 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 200%, 균주 접종 처리구가  $78.1 \pm 2.9$  cm plant<sup>-1</sup> 로 가장 높은 값으로 나타났다. 고추의 줄기 길이에서는 *Methylobacterium* 접종에 따른 효과가 두드러지지 않았으며, 퇴비 사용량에 따른 결과 또한 100%와 200%, 200%와 300% 간의 유의성 있는 차이는 확인 할 수 없었다. 하지만 퇴비 사용 100% 처리구와 300% 처리구 간에는 유의성 있는 차이를 확인 할 수 있었다. 석회 사용량에 따른 고추 줄기 길이의 성장효과는 퇴비 사용 100% 처리구와 300% 처리구에서 두드러지게 나타났다. 고추의 건물중의 경우는 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 100%, 균주접종 처리구 ( $89.7 \pm 2.7$  g plant<sup>-1</sup>)와 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 200%, 균주 접종 처리구 ( $84.9 \pm 5.4$  g plant<sup>-1</sup>)에서 가장 높게 나타났으며, 처리구 간에 고도의 유의성이 있는 것으로 확인 되었다. 고추의 건물중 결과에서 *Methylobacterium* 접종에 따른 효과가 유의성 있게 확인 되었으며, 퇴비의 사용은 300% 처리구에서만 유의성을 확인 할 수 있었다. 고추의 건물중에 대한 석회의 성장효과는 퇴비 100% 처리구에서만 유의성 있는 결과를 확인하였다. 이러한 결과로 보아 유박, 퇴비, 석회 등의 친환경 농자재와 *Methylobacterium* 접종이 고추의 생육에 효과를 줄 수 있으며, 미생물 비료와의 혼합사용이 가능할 것으로 사료된다.

#### 4. 형질전환 *Methylobacterium*을 처리한 고추 근권의 균밀도 확인

고추 근권에서 total bacteria, methylotrophic bacteria, 형질 전환 *Methylobacterium*의 균밀도를 측정하였다. 근권 시료는 수확 후 채취하였다. 각각의 균밀도를 측정하기 위해 total bacteria는 Nutrient Agar 평판 배지를 사용하였고, methylotrophic bacteria는 탄소원으로 0.5% methanol을 첨가한 AMS 평판 배지를 사용하였다. 형질전환 *Methylobacterium* 균주는 탄소원으로 0.5% methanol을 첨가하고, 항생제 (Kanamycin 10 µg/ml, Nalidixic acid 5 µg/ml, Cyclohexamide 30 µg/ml)를 첨가한 AMS 선택 배지를 사용하였다. 균밀도 측정은 고추의 근권 토양 10 g을 90 ml S.D.W에 희석하고, 다시 단계적으로 희석 배수만큼 9 ml S.D.W tube에 희석한 후 배지에 도말하였다. 28°C에서 72시간 배양 후 균수를 카운팅하여 log cfu g<sup>-1</sup> dry soil 단위로 나타내었다.

온실 실험에서 퇴비, 석회, 형질전환 *Methylobacterium*의 처리가 고추 근권의 total bacteria, methylotrophic bacteria, 형질전환 *Methylobacterium*의 균밀도에 미치는 영향을 확인하였다 (Table 4). Total bacteria의 균밀도는 유박 100%, 퇴비 200%, 석회 200%, 균주접종 ( $8.30 \pm 0.05$  log cfu g<sup>-1</sup> dry soil) 처리구에서 가장 높았다. 하지만 유의성은 없는 것으로 확인되었다.

Mthylotrophic bacteria의 균밀도는 모든 균주 접종 처리구에서 균주 미접종 처리구에 비하여

Table 1. 온실 실험에 사용된 토양의 이화학적 특성

Soil texture	pH	EC	NO <sub>3</sub> -N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K	Ca	Mg
Loam	(1:5)	(dS/m)	mg L <sup>-1</sup>	--- mg kg <sup>-1</sup> ---	-----	-----	cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup>	-----
	5.13	0.14	3.9	2.02	7.1	0.123	1.26	0.73

Values in each column are the mean of five replications.

Table 2. 온실 pot 실험의 설계.

Treatments	1	2	3	4	5	6	7
Oil cake	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Compost	100%	100%	100%	200%	200%	300%	300%
Lime	100%	100%	200%	100%	200%	100%	200%
<i>gfp</i> tagged <i>Methylobacterium</i>	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes



Table 3. 퇴비, 석회 처리 및 *Methylobacterium* 접종이 고추의 생육에 미치는 영향.

Treatment				Shoot length (cm/plant)	Dry weight (g/plant)
Oil cake level	Compost level	Lime level	Inoculation		
100%	100%	100%	NO	62.6 ± 2.63 <sup>b</sup>	63.7 ± 0.88 <sup>c</sup>
100%	100%	100%	YES	63.2 ± 3.77 <sup>b</sup>	75.4 ± 5.14 <sup>b</sup>
100%	100%	200%	YES	70.6 ± 2.71 <sup>ab</sup>	65.6 ± 1.77 <sup>c</sup>
100%	200%	100%	YES	71.4 ± 1.23 <sup>ab</sup>	66.9 ± 1.35 <sup>bc</sup>
100%	200%	200%	YES	73.5 ± 5.78 <sup>ab</sup>	69.0 ± 1.84 <sup>bc</sup>
100%	300%	100%	YES	67.7 ± 4.74 <sup>ab</sup>	89.7 ± 2.7 <sup>a</sup>
100%	300%	200%	YES	78.1 ± 2.94 <sup>a</sup>	84.9 ± 5.4 <sup>a</sup>
LSD ( $P \leq 0.05$ )				10.9	9.0

Each value represents the average of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.



높은 값을 나타냈으며, 5% 유의 수준에서 유의성이 있는 것으로 확인되었다. 형질 전환 형질 전환 *Methylobacterium*의 균밀도는 유박, 퇴비, 석회 100%, 균주 미접종 처리구와 유박 100%, 퇴비, 석회 200%, 균주 접종 처리구에서는 나타나지 않았다. 균밀도를 확인한 처리구 중에서는 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 100%, 균주 접종 처리구가  $3.41 \pm 0.7 \log \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry soil}$  로서 균밀도가 가장 높았다. 이는 퇴비 처리량과 석회 처리량이 형질 전환 *Methylobacterium*의 균 밀도에 영향을 준다는 사실을 알 수 있었다. 이 실험에서 형질 전환 *Methylobacterium*의 균 밀도가 나오지 않은 이유로 유박, 퇴비, 석회 100%, 균주 미접종 처리구의 경우는 균주를 접종 하지 않았기 때문에, 그리고 나머지 처리구에서는 근권 토양 내의 낮은 균밀도와 선택배지에 의한 저해 등으로 사료된다.

## 5. 형질전환 *Methylobacterium*을 처리한 고추 잎의 균밀도 확인

형질전환 *Methylobacterium*을 접종한 고추 잎의 균밀도를 확인하기 위하여, 균주를 접종한 처리구 중 유박 100%, 퇴비 200%, 석회 100%를 처리한 처리구와 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 100%를 처리한 처리구의 잎을 채취 하였다. 대조구로서 균주를 접종하지 않은 처리구의 잎도 채취하였다. 채취한 고추 잎들은 동일 선상에 위치하는 싱싱하고, 육안으로 볼 때 깨끗한 잎을 채취 하였다. 고추 잎에서 *gfp* 형질전환 *Methylobacterium*의 균밀도를 확인하기 전 0.5% methanol과 항생제 (Kanamycin 10  $\mu\text{g/ml}$ , Nalidixic acid 5  $\mu\text{g/ml}$ , Cyclohexamide 30  $\mu\text{g/ml}$ )를 첨가한 AMS 평판 배지에 leaf imprinting을 실시하였다. 균밀도의 측정은 잎을 마쇄하여, S.D.W에 희석한 뒤 0.5% methanol과 항생제 (Kanamycin 10  $\mu\text{g/ml}$ , Nalidixic acid 5  $\mu\text{g/ml}$ , Cyclohexamide 30  $\mu\text{g/ml}$ )를 첨가한 AMS 평판 배지에 도말하였다. 28°C에서 72 h 배양 후 균수를  $\log \text{ cfu leaf}^{-1}$  단위로 나타내었다.

형질전환 *Methylobacterium*을 엽면시비 한 처리구의 미생물 군집을 확인하기 위해 고추 잎의 균밀도와 leaf imprinting을 실시하였다. 균밀도를 측정하기 전 항생제가 첨가된 AMS 선택 배지에 실시한 leaf imprinting으로 엽면시비로 인한 *gfp* 형질전환 *Methylobacterium*의 군집을 확인할 수 있었다. 반면, 균주를 처리하지 않은 대조구에서는 *gfp* 형질전환 *Methylobacterium*의 군집을 확인할 수 없었다 (Fig. 1). 고추 잎에서 *gfp* 형질전환 *Methylobacterium*의 균밀도는 Table 5와 같다. 균주를 접종하지 않은 대조구에서는 균주를 확인 할 수 없었으나, 균주를 접종한 처리구에서는 균주를 확인 할 수 있었다. 특히, 유박 100%, 퇴비 300%, 석회 100% 처리구에 비하여 유박 100%, 퇴비 200%, 석회 100%를 처리한 처리구에서 높은 균밀도를 확인한 결과 퇴비의 시용량에 따른 미생물 비료의 효율이 증가한 것을 확인하였다. 따라서 이러한 결과들은 미생물 비료의 효율 증진을 위해 유기농 자재의 활용가능성을 제시하였다.

Table 4. 퇴비, 석회 처리 및 *Methylobacterium* 접종이 고추 근권의 균밀도에 미치는 영향.

Treatment				Total bacteria	Methylotrophic bacteria	gfp tagged <i>Methylobacterium</i>
Oil cake level	Compost level	Lime level	Inoculation	(log cfu g <sup>-1</sup> dry soil)		
100%	100%	100%	NO	8.03±0.06 <sup>ab</sup>	0.98±0.98 <sup>b</sup>	-
100%	100%	100%	YES	8.05±0.18 <sup>ab</sup>	3.43±0.44 <sup>a</sup>	2.29±0.27 <sup>ab</sup>
100%	100%	200%	YES	8.15±0.09 <sup>ab</sup>	3.32±0.37 <sup>a</sup>	1.54±1.1 <sup>b</sup>
100%	200%	100%	YES	7.91±0.14 <sup>b</sup>	3.32±0.27 <sup>a</sup>	2.49±0.46 <sup>ab</sup>
100%	200%	200%	YES	8.30±0.05 <sup>a</sup>	3.41±0.42 <sup>a</sup>	-
100%	300%	100%	YES	8.08±0.11 <sup>ab</sup>	3.87±0.17 <sup>a</sup>	3.41±0.65 <sup>a</sup>
100%	300%	200%	YES	8.08±0.17 <sup>ab</sup>	3.94±0.17 <sup>a</sup>	2.94±0.21 <sup>a</sup>
LSD ( $P \leq 0.05$ )				0.28	1.33	0.68

Each value represents the average of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.



Control



*gfp* tagged *Methylobacterium*

Fig. 1. 고추 잎 표면 에서 *gfp* 형질전환 *Methylobacterium*의 군집.

Table 5. 고추 잎에서 *gfp* 형질전환 *Methylobacterium*의 균밀도.

Treatment				<i>gfp</i> tagged <i>Methylobacterium</i> (log cfu leaf <sup>-1</sup> )
Oil cake level	Compost level	Lime level	Inoculation	
100%	100%	100%	NO	-
100%	200%	100%	YES	2.80 ± 0.11 <sup>a</sup>
100%	300%	100%	YES	1.08 ± 0.08 <sup>b</sup>
LSD ( $P \leq 0.05$ )				0.23

Each value represents the average of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at  $P \leq 0.05$  levels are indicated by different letters.

## 6. 메탄을 살포와 *Methylobacterium*의 접종에 따른 고추의 생육촉진 효과 확인

Pot 실험에서 사용한 토양은 충청북도 농업과학기술원의 시험포장지에서 채취하였으며, 공시 토양의 이화학적 특성 분석은 Table 6에 나타냈다. 공시균주는 본 실험실에서 보유한 *Methylobacterium* 중에서 *Methylobacterium oryzae* CBMB20 균주를 선별하여 사용하였다. 유기질 비료 시비는 고추의 표준시비량 (N:P:K = 12.2:6.4:6.1, kg per 10 a)을 참고하여 100%와 300%로 구분하여 시비하였으며, 퇴비는 포트 당 14.93 g kg<sup>-1</sup> 씩 시비하였다. 각각의 비료 시비 처리구는 메탄을 살포와 *M. oryzae* CBMB20의 접종여부에 따라 나누어 처리구를 선정하였다. 파종 후 35일이 지난 고추 유묘 (*Capsicum annum* L.)를 다른 pot에 옮겨 심었으며, *M. oryzae* CBMB20 균주의 접종은 고추 유묘를 이식한지 12, 26, 40, 54, 68, 85, 96일 후에 20 ml 씩 근권에 접종하였고, 메탄을 살포 (5% methanol)는 유묘를 이식한지 31, 41, 52, 61, 73, 88, 99일 후에 고추의 엽면에 살포하였다. 고추의 성장측정은 유묘를 이식한지 20, 40, 60, 80, 113일 이후에 측정하였으며, 건물중은 이식한지 113일 이후에 수확하여 고추의 지상부, 지하부, 과실의 건물중을 각각 측정하였다.

메탄을 살포와 *M. oryzae* CBMB20의 접종에 따른 고추의 성장을 측정한 결과 100% 유기질 비료시비 수준의 경우, *M. oryzae* CBMB20를 접종한 처리구에서 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 고추의 생장이 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Table 7). 메탄을 엽면 살포한 처리구 또한 메탄을 살포하지 않은 처리구에 비해 고추의 생장이 유의성 있는 증가를 보였다. 메탄을 엽면 살포하고 *M. oryzae* CBMB20를 접종한 처리구에서 가장 높은 성장을 보였으며, 메탄을 살포하지 않고 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 고추의 생장이 4.8 ~ 24.9% 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 300% 유기질 비료시비 수준에서는 *M. oryzae* CBMB20의 접종에 따른 고추 생장의 유의성 있는 증가는 확인할 수 없었다. 메탄을 엽면 살포 처리구 또한 메탄을 살포하지 않은 처리구에 비해 유의성 있는 증가는 확인할 수 없었다. 그러나 메탄을 엽면 살포하고 *M. oryzae* CBMB20를 접종한 처리구에서 가장 높은 성장을 보였고 메탄을 살포하지 않고 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 고추의 생장이 12.0 ~ 22.3% 증가하였으며, 유의성 있는 증가 또한 확인할 수 있었다. 100%와 300% 유기질 비료시비 수준에서 메탄을 엽면 살포하고 *M. oryzae* CBMB20를 접종한 처리구가 가장 높은 고추 성장을 보였으나, 두 가지 유기질 비료시비 수준에 대한 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다.

메탄을 살포와 *M. oryzae* CBMB20의 접종에 따른 고추의 생물량을 측정한 결과는 Table 8에 나타냈다. 100% 유기질 비료시비 수준에서, *M. oryzae* CBMB20를 접종한 처리구에서 접종하지 않은 처리구에 비해 고추의 지상부, 지하부, 과실의 건물중이 유의성 있는 증가를 보이는

Table 6. 본 실험에 사용한 토양의 이화학적 특성

pH	EC	Organic C	Available P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Exchange cation				CEC
				K	Ca	Mg	Na	
(1:5)	ds m <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	----- cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> -----				
7.8	0.9	17.2	287	0.27	8.3	1.5	0.2	9.4

Table 7. 두 가지 비료 시비수준에서 메탄올 엽면 살포와 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 고추의 생장에 미치는 효과.

Fertilizer level	Methanol spray	<i>M. oryzae</i> CBMB20 inoculation	Plant height				
			20DAP	40DAP	60DAP	80DAP	113DAP
			----- cm -----				
100%	No	Uninoculated	39.9±2.9ab	63.3±4.9a	86.9±6.1a	92.8 ± 1.6a	101.6±8.0a
		inoculated	41.2±2.4ab	69.4±4.7b	96.8±5.2bc	100.0±5.2b	117.7±5.8
	Yes	Uninoculated	40.8±2.8ab	67.9±5.0ab	95.0±6.3b	100.7±5.2bc	114.2±8.7b
		inoculated	43.0±2.0bc	74.5±3.2c	103.5±4.9c	113.9±6.2d	126.9±6.3c
300%	No	Uninoculated	38.9±2.4a	63.9±2.3a	94.3±3.8b	103.2±4.7bc	118.7±4.0bc
		inoculated	42.7±1.3bc	71.9±4.1bc	100.3±5.9bc	106.1±6.3bc	127.5±7.9cd
	Yes	Uninoculated	40.0±4.9ab	70.2±5.2b	100.6±4.9bc	109.3±5.8c	122.9±3.4bc
		inoculated	45.4±4.8c	78.2±4.8c	105.6±6.5c	117.4±7.6d	134.1±6.9d

Each value represents mean ± standard deviation of 6 replicates. In the same column, significant differences at p=0.05 are indicated by different letters using Duncan's multiple range test.

Table 8. 두 가지 비료 시비수준에서 메탄올 엽면 살포와 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 고추의 생물량에 미치는 효과.

Fertilizer level	Methanol spray	<i>M. oryzae</i> CBMB20 inoculation	Plant biomass			
			Shoot	Root	Fruit	Total plant
			----- g -----			
100%	No	Uninoculated	46.2±2.3a	5.7±0.8a	19.0±2.8a	70.8±4.4a
		Inoculated	54.5±3.5bc	6.4±0.6b	23.1±3.7bc	83.9±5.6bc
	Yes	Uninoculated	51.0±2.9b	6.7±0.4bc	21.4±3.5ab	79.1±5.5b
		Inoculated	61.0±3.3d	7.3±0.7c	25.7±3.2bc	93.9±6.1d
300%	No	Uninoculated	53.3±3.1b	6.2±0.6b	22.7±2.6ab	82.1±5.2b
		Inoculated	60.5±3.2cd	7.0±0.7bc	26.6±3.2bc	94.1±5.5d
	Yes	Uninoculated	59.3±4.8cd	7.1±0.9bc	26.1±4.3bc	92.4±8.1cd
		Inoculated	65.6±2.9d	8.4±1.0c	30.1±3.4c	104.1±4.8d

Biomass data were collected at the time of harvest (113 days after transplant), and each value represents mean ± standard deviation of 6 replicates. In the same column, significant differences at p = 0.05 are indicated by different letters using Duncan's multiple range test.



것을 확인할 수 있었다. 메탄올 엽면 살포 여부에 따라 생물량을 측정된 결과 메탄올을 엽면 살포한 처리구에서 메탄올을 살포하지 않은 처리구에 비해 고추 지상부와 지하부의 건물중이 유의성 있는 증가를 보였다. 메탄올을 엽면 살포하고 *M. oryzae* CBMB20을 접종한 처리구에서 가장 높은 생물량을 확인하였으며, 메탄올을 살포하지 않고 *M. oryzae* CBMB20을 접종하지 않은 처리구에 비해 고추 지상부, 지하부, 과실, 전체 건물중이 각각 32, 28, 35, 35% 씩 유의성 있는 증가를 보였다. 300% 유기질 비료시비 수준의 경우, *M. oryzae* CBMB20 접종에 따른 고추의 생물량은 증가하였으나 처리구 간의 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다. 메탄올 엽면 살포 처리구 또한 메탄올을 살포하지 않은 처리구에 비해 고추 생물량은 증가하였으나 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다. 300% 비료시비 수준에서 메탄올을 엽면 살포하고 *M. oryzae* CBMB20를 접종한 처리구에서 가장 높은 생물량을 확인하였으며, 메탄올을 살포하지 않고 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 고추 지상부, 지하부, 과실, 전체 생물량이 각각 23, 35, 32, 27% 증가하였으며 유의성 있는 차이 또한 확인할 수 있었다. 100%와 300% 유기질 비료시비 수준 모두 메탄올을 살포하고 *M. oryzae* CBMB20를 접종한 처리구에서 가장 높은 생물량을 확인할 수 있었으나, 유기질 비료시비 수준간의 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다. 이러한 결과를 바탕으로, 유기질 비료의 시비량이 지나치게 많을 경우 생장촉진제의 처리효과를 거둘 수 없으며, 적정한 시비 수준에서 *M. oryzae* CBMB20와 메탄올을 혼합 처리함으로써 고추를 비롯한 작물의 생장과 수량을 유지하면서도 시비량을 크게 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

## 7. 근권에서 Methylophilic 균주의 균밀도 확인

고추 유묘를 이식한지 113일 이후에 뿌리에 부착된 근권 토양을 채취하고, 근권토 10 g을 90 ml의 증류수가 들어있는 삼각플라스틱에 넣은 후 30 분간 150 rpm으로 진탕하였다. 진탕액을 희석한 후 0.5% methanol을 첨가한 AMS 배지에 접종하였다. 접종한 plate는 28°C incubator에서 3~10일간 배양하여 균주의 균밀도를 확인하였다.

고추의 근권에서 Methylophilic 균주의 균밀도를 확인한 결과 *M. oryzae* CBMB20를 접종한 처리구에서 2.65 ~ 2.78 log cfu g<sup>-1</sup> soil 의 균밀도를 보였고, 반면 균주를 접종하지 않은 처리구에서는 1.0 log cfu g<sup>-1</sup> soil 미만의 균밀도를 확인할 수 있었다 (Table 9). 비료시비 수준과 메탄올 엽면 살포에 따른 균밀도 간의 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다.

실험에 사용한 Methylophilic 균주의 탄소원 즉 methanol의 첨가는 고추의 생육과 접종 미생물의 균밀도를 향상시켰으며, 이러한 결과는 현장에서 미생물 기능 향상을 위해 각 미생물에 적합한 탄소원의 공급이 매우 효과적임을 확인하였다.

Table 9. 두 가지 비료 시비수준에서 메탄올 엽면 살포와 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 methylotrophic 균주 개체수에 미치는 효과.

Fertilizer level	Methanol spray	<i>M. oryzae</i> CBMB20 inoculation	Total Methylotrophic bacterial population (log cfu g <sup>-1</sup> soil)
100%	No	Uninoculated	0.97 ± 0.08a
		Inoculated	2.65 ± 0.35b
	Yes	Uninoculated	0.82 ± 0.42a
		Inoculated	2.73 ± 0.20b
300%	No	Uninoculated	0.65 ± 0.51a
		Inoculated	2.78 ± 0.24b
	Yes	Uninoculated	0.59 ± 0.37a
		Inoculated	2.66 ± 0.28b

Bacterial populations were measured at the time of harvest (113 days after transplant), and each value represents mean ± standard deviation of 6 replicates. In the same column, significant differences at p = 0.05 are indicated by different letters using Duncan's multiple range test.

## 8. *Methylobacterium*의 접종에 따른 배추, 고추 유묘의 생육촉진 효과 확인

미생물 비료를 활용한 육묘재배용 상토를 개발하기 위하여 다양한 상토에 미생물 비료를 접종하여 다양한 작물의 육묘 생육촉진 효과를 확인 하였다. 실험에서 사용한 시험상토는 본 연구의 참여기업인 (주) 서울바이오 제품 ‘바로커 범용’ (배합비 : 피트모스 15%, 코코피트 65%, 질석 5%, 제올라이트 5%, 펄라이트 10%)과 ‘명품골드’ (배합비 : 피트모스 40%, 코코피트 35%, 질석 6%, 제올라이트 4%, 펄라이트 15%)를 사용하였다. 각각 상토는 비분의 차이가 있으며, 실험에 사용한 상토 중 ‘바로커 범용’ 상토가 ‘명품골드’ 상토에 비하여 높은 비분을 함유한 제품으로 이러한 상토 비분의 차이에 의한 미생물의 효과를 확인하였다. 공시작물은 고추와 배추를 사용하였고, 공시균주는 *Methylobacterium* 균주를 사용하였다. 생육 조사는 종자를 파종한지 35일과 65일 이후에 초장, 엽수, 엽록소, 생체중을 각각 측정하였다.

두 가지 상토에서 *Methylobacterium* 균주 접종에 따른 배추의 생육을 측정한 결과, ‘바로커 범용’ 상토의 경우 CBMB15와 CBMB17을 제외한 나머지 접종 처리구에서 대조구에 비해 유묘의 생장이 증가하였으며, 특히 CBMB12 접종 시 초장, 엽수, 엽록소 함량, 지상부 생체중이 가장 높았다 (Fig. 2A와 Table 10). 지하부 생체중은 CBMB20을 접종한 처리구에서 가장 높은 것을 확인하였다. ‘명품골드’ 상토 경우에는 *Methylobacterium* 균주 접종 처리구와 대조구를 비교한 결과 CBMB27 균주 접종 처리구에서 대조구 대비 확연한 생육의 증가를 확인 할 수 있었으며, 그 외 나머지 처리구에서는 접종에 따른 생육 증가를 확인할 없었다 (Fig. 2B와 Table 10). 고추의 생육을 측정한 결과, ‘바로커 범용’ 상토의 경우 CBMB20을 접종한 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 대조구에 비해 고추의 생장이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A와 Table 11). 특히 CBMB12를 접종한 처리구에서 초장, 엽록소 함량, 지상부와 지하부 생체중이 가장 높게 나타났다. 엽수는 CBMB15를 접종한 처리구에서 가장 높게 나타났다. ‘명품골드’ 상토의 경우, CBMB15를 제외한 나머지 처리구에서 대조구에 비해 고추의 생장이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B와 Table 11). 초장과 엽록소 함량은 CBMB12를 접종한 처리구에서 가장 높게 나타났고, 지상부와 지하부 생체중은 CBMB27을 접종한 처리구에서 가장 높게 나타났다.

이번 실험을 통해 기존 제품화된 상토에서 미생물 접종 효과를 확인할 수 있었으며, 특히 비분이 낮은 ‘명품골드’ 상토보다는 비분이 일정 수준 첨가된 ‘바로커 범용’ 상토에서 더욱 유의성 있는 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 미생물 비료 첨가 상토의 활용은 다양한 작물의 육묘 재배에 있어서 더욱 효과적일 수 있으며, 이러한 미생물 비료는 어느 특정 상토가 아닌 다양한 일반 상토에서 활용 가능할 것이다.

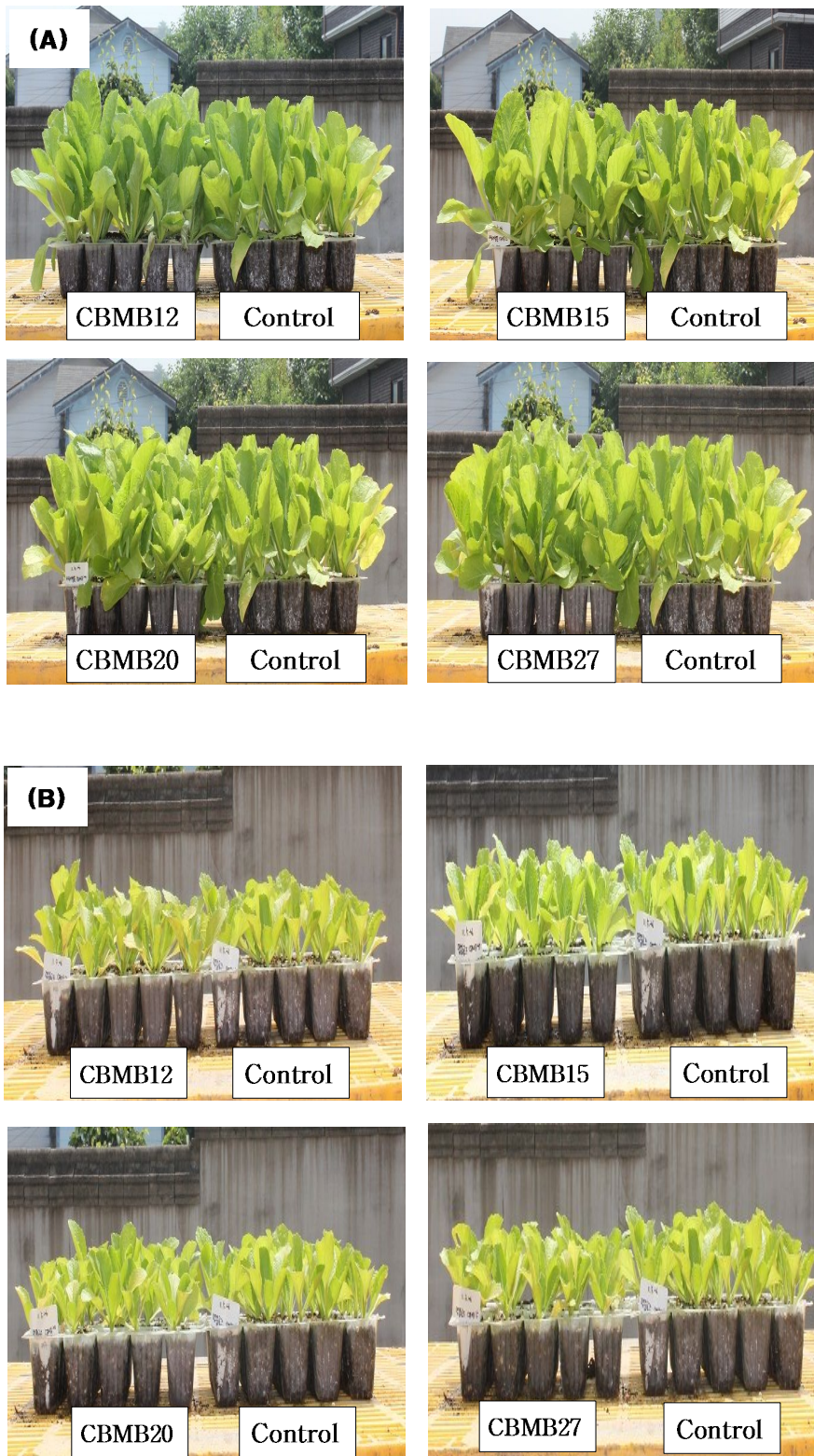


Fig. 2. 바로커 범용 상토 (A)와 명품골드 상토 (B)에서 *Methylobacterium*의 접종에 따른 배추의 성장 비교.

Table 10. 바로커 범용 상토와 명품골드 상토에서 *Methylobacterium*의 접종이 배추의 생장에 미치는 효과.

Treatments	Plant height (cm)	Number of leaf	Chlorophyll	Fresh weight (g)	
				Shoot	root
Control	15.6	7.0	24.9	8.6	21.3
CBMB12	16.9	7.8	25.4	11.6	21.0
바로커 범용 CBMB15	14.8	7.2	24.6	10.4	20.8
CBMB20	15.9	7.5	24.0	10.3	21.9
CBMB27	15.8	7.1	22.9	9.5	16.5
Control	8.2	6.2	17.8	4.5	13.8
CBMB12	7.9	6.0	18.0	4.0	14.0
명품골드 CBMB15	8.0	6.3	16.9	4.2	13.6
CBMB20	8.1	6.5	17.1	4.4	13.9
CBMB27	8.4	6.7	17.3	4.6	14.2



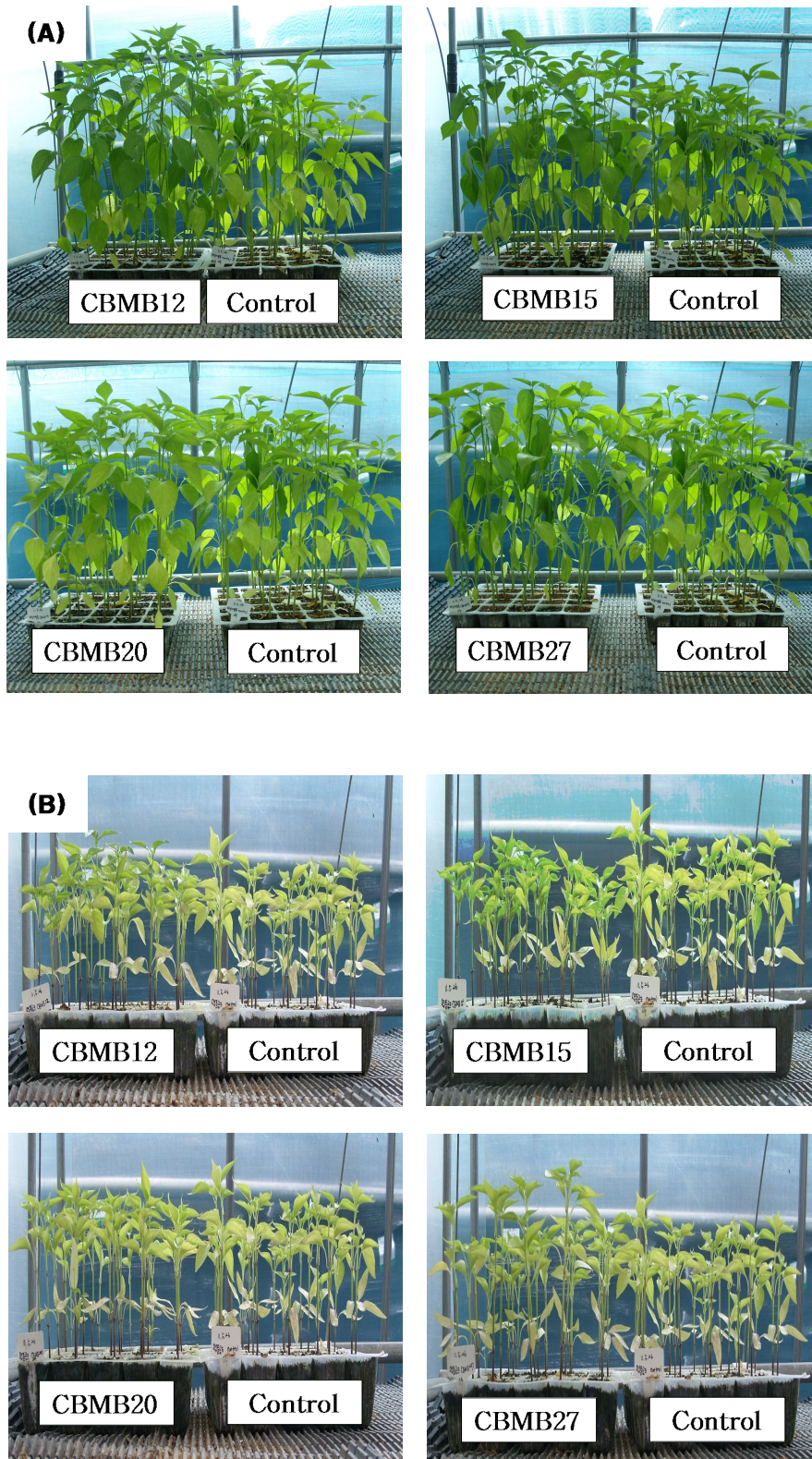


Fig. 3. 바로커 범용 상토 (A)와 명품골드 상토 (B)에서 *Methylobacterium*의 접종에 따른 고추의 성장 비교.

Table 11. 바로커 범용 상토와 명품골드 상토에서 *Methylobacterium*의 접종이 고추의 생장에 미치는 효과.

Treatments	Plant height (cm)	Number of leaf	Chlorophyll	Fresh weight (g)	
				Shoot	root
Control	37.6	7.8	30.5	40.2	31.2
CBMB12	43.6	8.9	31.7	52.5	35.6
바로커 범용 CBMB15	42.5	9.1	31.5	44.5	30.8
CBMB20	36.7	7.9	26.7	39.0	33.2
CBMB27	40.8	8.4	29.8	46.3	35.2
Control	14.5	5.5	17.5	9.6	26.1
CBMB12	16.3	6.1	24.3	11.5	28.3
명품골드 CBMB15	14.1	5.6	20.6	8.9	26.6
CBMB20	15.6	5.7	19.7	11.0	30.1
CBMB27	16.8	6.0	20.2	11.9	31.2

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구를 수행한 결과 현재까지 국내학술지 3편의 논문이 게재되었고, 국제학술회의 8편, 국내학술회의 12편의 학술발표 성과가 있었으며, 3건의 특허를 출원하였다. 또한 국제 저명 학술지에 본 연구에서 수행한 결과를 활용하여 다수의 논문을 투고할 계획이다. 이러한 논문, 학술발표, 특허 성과 기술들을 재정리하여 산업화하는 기회가 주어진다면 다기능 식물생장촉진미생물을 응용하여 육묘의 성장촉진과 내병성이 강화된 우수 육묘 생산 기술의 산업화로 육묘의 재배 기간 단축, 병해로부터 보호, 화학비료 사용저감 등으로 인한 경제적 육묘 생산이 가능할 것이다.

### <학술지 발표>

W.J. Yim, S.W. Woo, K.Y. Kim, T.M. Sa (2012) Regulation of Ethylene Emission in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Inoculated with ACC Deaminase Producing *Methylobacterium* spp., Korean J. Soil Sci. Fert., 45(1): 37-42.

P. S. Chauhan, G.S. Lee, M.K. Lee, W.J. Yim, G.J. Lee, Y.S. Kim, J.B. Chung, T.M. Sa (2010) Effect of *Methylobacterium oryzae* CBMB20 Inoculation and Methanol Spray on Growth of Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) at Different Fertilizer levels., Korean J. Soil Sci. Fert., 43(4): 514-521.

H.P. Deka Boruah, P.S. Chauhan, W.J. Yim, G.H. Han, T.M. Sa. (2010) Comparison of Plant Growth Promoting *Methylobacterium* spp. and Exogenous Indole-3-Acetic Acid Application on Red Pepper and Tomato Seedling Development., Korean J. Soil Sci. Fert., 43(1): 96-104.

### <특허 출원>

토마토의 반점세균병 방제 활성이 있는 메틸로박테리움 s p p. C B M B 12 균주 및 이의 용도

출원번호: 10-2012-0022347 (접수번호 1-1-2012-0177530-99)

출원일: 2012. 03. 05



토마토의 세균성 풋마름병 방제 활성이 있는 메틸로박테리움 s p p. C B M B 15 또는 C B M B 27 균주 및 이의 용도

출원번호: 10-2012-0022352 (접수번호 1-1-2012-0177551-47)

출원일: 2012. 03. 05

고추의 반점세균병 방제 활성이 있는 메틸로박테리움 오라이자 C B M B 20 균주 및 이의 용도

출원번호: 10-2012-0022350 (접수번호 1-1-2012-0177548-10)

출원일: 2012. 03. 05

#### <국제학술회의 발표>

M.K. Lee, W.J. Yim, I.S. Hong, P.S. Chauhan, H.P. Deka Boruah and T.M. Sa. (2009) Characterization of plant growth promoting traits of *Methylobacterium oryzae* CBMB20 isolated from rice and its effect in efficient use of organic manure for higher yield and growth promotion of red pepper, BioMicroWorld, December 2-4, Lisbon, Portugal.

M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, G.S. Lee, W.J. Yim, M.K. Lee, T.M. Sa. (2009) Characterization of cultivable methylotrophic bacterial communities associated with traditionally cultivated field-grown rice cultivars - population dynamics and potential for plant-growth promotion, Agricultural Biotechnology International Conference, september 22-25, Bangkok, Thailand, p120.

H.P. Deka Boruah, P.S. Chauhan, W.J. Yim, I.S. Hong, P. Palaniappan, M.K. Lee, T.M. Sa. (2009) Effect of phytohormone and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing *Methylobacterium* sp. on root growth and early seedling development of non-host crops red pepper, 9th ESAFS, October 27-30, Seoul, Korea, p565-566.

H.P. Deka Boruah, P.S. Chauhan, M. R. Islam, W.J. Yim, M.K. Lee, I.S. Hong, T.M. Sa. (2009) Inoculation Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate Deaminase Producing Diazotrophic Bacteria in Phytohormone Accumulation and Seedling Vigority of Rice Plants Under Gnotobiotic Condition, 9th ESAFS, October 27-30, Seoul, Korea, p567-568.

W.J. Yim, S. Poonguzhali, P.S. Chauhan, M.K. Lee, T.M. Sa. (2010) Plant colonization by plant-growth promoting *gfp* tagged *Methylobacterium suomiense* CBMB120 isolated from rice soil, 3rd International Students Academic Presentation, March 15~18, Yuanpei University, Taiwan.

W.J. Yim, S. Poonguzhali, H.P. Deka Boruah, P. Palaniappan, T.M. Sa (2010) Colonization pattern of *gfp* tagged *Methylobacterium suomiens* on rice and tomato plant root and leaf surfaces, 19th World Congress of Soil Science, August 1-6, Brisbane convention and exhibition centre, Australia.

W.J. Yim, P.S. Chauhan, M. Madhaiyan, S. C. Tipayno, T.M. Sa (2010) Plant growth promontory attributes by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase producing *Methylobacterium oryzae* strains isolated from rice 19th World Congress of Soil Science, August 1-6, Brisbane convention and exhibition centre, Australia.

W.J. Yim, M.M. Joe, C.C. Shagol, S.C. Tipayno, T.M. Sa. (2011) Induction of defense responses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium* spp. containing ACC deaminase, 2011 International Conference on Environment Science and Biotechnology ICESB, Maldives. November 25 - 27, Maldives.

#### <국내 학술회의 발표>

M.K. Lee, I.S. Hong, H.P. Deka Boruah, M. Madhaiyan, M.S. Park, T.M. Sa. (2009) Efficacy Methylo-trophic Bacteria in maintaining healthy Seedling Development of vegetables, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, May 14, at center, p106-107.

M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, G.S. Lee, W.J. Yim, M.K. Lee, T.M. Sa. (2009) Isolation and characterization of cultivable methylo-trophic bacterial communities associated with traditionally cultivated field-grown rice cultivars, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, May 14, at center, p108-109.

W.J. Yim, S.M. Woo, M.S. Park, B.H. Hong, S.C. Tipayno, T.M. Sa. (2010) Effect of Methylo-trophic bacterial inoculation on seedling development and ethylene emission under gnotobiotic condition, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, May 6~7, hongcheon vivaldipark, p339-340.

W.J. Yim, P.S. Chauhan, G.S. Lee, P.Palaniappan, M.A. Siddikee, T.M. Sa (2010) Characterization of plant growth promoting traits of *Methylobacterium* species isolates from rice, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, May 6~7, hongcheon vivaldipark, p343-344.

S.M. Woo, M.K. Lee, W.J. Yim, P.S. Chauhan, T.M. Sa (2010) Effects of inoculation methods for *Methylobacterium oryzae* CBMB20 on Red pepper growth and nutrient uptake, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, May 6~7, hongcheon vivaldipark, p174-175.

W.J. Yim, P.S. Chauhan, G.S. Lee, K.Y. Kim, C.C. Shagol, T.M. Sa (2010) Effect of Methylo-trophic bacterial inoculation on seedling development and ethylene emission under greenhouse condition, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, May 6~7, hongcheon vivaldipark, p167-168.

W.J. Yim, P.S. Chauhan, S.M. Woo, K.Y. Kim, B.H. Hong, T.M. Sa. (2010) Plant Colonization by Plant-growth Promoting *gfp* Tagged *Methylobacterium oryzae* CBMB20 Isolated from Rice Stem, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, Oct 28-29, Gyeongsangbuk-do Agricultural Research & Extension Services, p111-112.

W.J. Yim, P.S. Chauhan, S.M. Woo, K.Y. Kim, C.C. Shagol, T.M. Sa. (2011) Regulation of phytopathogen-induced stress ethylene in tomato and red pepper inoculated with ACC deaminase-producing *Methylovacterium* spp, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, May 19-20, Jeonbuk Muju resort, p129-130.

W.J. Yim, K.Y. Kim, S.M. Lee, S.J. Yoon, M.E. Han, T.M. Sa. (2011) Inhibitory effect of ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. on tomato (*Lycopersicon esculentum*

Mill.) infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, Oct 27-28, Chungcheongbuk-do institute for agriculture technology, p90-91.

W.J. Yim, K.Y. Kim, S.M. Woo, Y. Lee, Y.R. Um, J.M. Yoo, T.M. Sa. (2012) Inhibitory effect of ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infected by *Ralstonia solanacearum*, The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, June 7-8, International convention center Jeju, p41-42.

J.M. Yoo, S.Y. Lee, Y.R. Um, W.J. Yim, T.M. Sa, Y. Lee. (2012) Gene Expression Analysis of PR proteins in *Methylobacterium* Treated *Capsicum annuum* L., The Korean Society of Soil Science and Fertilizer, June 7-8, International convention center Jeju, p196.

W.J. Yim, K.Y. Kim, S.M. Woo, S.M. Lee, B.H. Hong, T.M. Sa. (2012) Stress ethylene reduction by ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infected by *Ralstonia solanacearum*, The Korean Society of Environmental Agriculture, July 5-6, Jeonbuk Muju resort, p139-154.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

일정 규모를 갖춘 공정육묘장의 증가 추세를 보아 육묘산업은 점점 발전하고 있음을 알 수 있다. 하지만 국제유가의 급속한 상승과 육묘에 대한 농업인들의 요구조건이 까다로워지고 있는 현실에서 기존의 방법으로는 경쟁력에 밀려 탈락하고 말 것이다. 이에 본 연구는 토양 처리 기술에 국한 되어있는 미생물의 과학적 효능이 검증된 신규미생물을 개발하고 이용하여 육묘의 성장 촉진 효과와 내병성 그리고 육묘생산에서 비료의 효율이 증대되는 육묘 생산기술을 개발하는 방향으로 연구를 수행한 결과들을 재정리하여 산업화하는 기회가 주어진다면 다기능 식물성장촉진미생물을 응용하여 육묘의 성장촉진과 내병성이 강화된 우수 육묘 생산 기술의 산업화로 육묘의 재배 기간 단축, 병해로부터 보호, 화학비료 사용저감 등으로 인한 경제적 육묘 생산이 가능할 것이다.

또한 개발된 고효율 미생물제제의 활용가능성을 키우기 위해서 관련 영농인 (단체), 기업 및 지자체 등과 협력하여 현장시험을 확대 실시하고 효능이 확인되면 후속연구를 통해 비료관리 법에서 정한 규정에 따른 시험결과를 확보하여 등록을 추진할 수 있다. 그에 더하여 친환경 농자재 등록 후 미생물비료의 산업화 및 현장적용모델을 개발하고 미생물비료의 품질 규격화와 효율증진으로 농가활용을 증대시키며, 대규모로 작물을 재배하는 활용주체를 발굴하여 산업화 방안 모색할 수 있을 것이다.

이러한 활용은 기존의 기술을 보완하고, 육묘 산업에서 화학 비료의 시비를 경감 시킬 수 있는 생물농업소재 기술 및 현장 적용기술 기반을 조성 할 수 있으며, 더 나아가 생물학적 방제의 측면까지 확장 가능하리라 생각된다. 결국 이는 화학 비료 사용의 감소뿐만 아니라 더 중요한 토양의 화학물질에 의한 부담을 최소화하고 농경지로서 활용이 힘든 척박한 토양 또는 오염된 환경을 회복할 수 있는 자원을 공급하여 토양의 구조와 비옥도를 지속적으로 유지하거나 개선해 나갈 수 있을 것이다. 또한 학문적으로 ACC deaminase를 생산하는 식물성장촉진 토착 미생물의 작물의 스트레스 에틸렌 수준을 조절하는 좀더 체계적인 메커니즘을 규명하여 향후 다양한 환경 및 작물 재배지에서 작물의 에틸렌 수준을 조절한 다양한 스트레스 피해 경감 연구에 응용이 가능할 것으로 사료된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E.Jr. 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd ed. Academic Press. New York. p:147-154.
- Adams D.O., and Yang S.F. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene, Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 170-174.
- Araki S., Matsuoka M., Tanaka M., Yoshida K., Atsuhiko S., Ogawa T. 2001. Expression of an ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* under the control of alcohol dehydrogenase gene promoter in tobacco roots. Biotechnol. Lett. 23:433-436.
- Audenaert K., Pattery T., Cornelis P., and Hofte M. 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeuginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin. Mol. Plant Microbe Interact. 15:147-156.
- Auyb R., Guis M., Ben Amor M., Gillot L., Roustan J., Latche A., et al. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. Nat. Biotechnol. 14:862-865.
- Babalola O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnol Lett 32:1559-1570.
- Babalola O.O., Osir E.O., Sanni A.I., Odhaimbo G.D., Bulimo W.D. 2003. Amplification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soils. African Journal of Biotechnology 2:157-160.
- Bashan Y., and de-Bashan L.E. 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol 68:2637-2643.
- Baskin J.M. and Baskin C.C. 1989. Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology; In: Leach M.A., Parker V.T. and Simpson R.L. (eds) Ecology of soil seed banks. Acad. Press, San Diego, California. p:53-66.
- Belimov A .A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Kluge C., Preisfeld A., Dietz K.J. and Stepanok V.V. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Canadian

Journal of Microbiology 47:642-652.

- Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Hontzeas N., Davies W.J. 2007. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany* 24:1-11.
- Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S., Glick B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* 37:241-250.
- Benediktyova Z. and Nedbal L. 2009. Imaging of multi-color fluorescence emission from leaf tissues. *Photosynth. Res.* 102:169-175.
- Benhamou N., Gagne S., Quere D.L., and Debhi L. 2000. Bacterial-mediated induction resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia phymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 90:45-56.
- Blaha D., Prigent-Combaret C., Mirza M.S., Moenne-Loccoz Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology* 56:455-470.
- Bloemberg G.V. and Lugtenberg B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* 4:343-350.
- Bora T., Ozaktan H., Gore E., and Aslan E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *J. Phytopathol.* 152:471-475.
- Brown M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annal Review of Phytopathology* 12:181-197.
- Bufler G., Mor Y., Reid M.S., Yang S.F. 1980. Changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-content of cut carnation flowers in relation to their senescence. *Planta* 150:439-442.
- Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3663-3668.
- Campbell B.G., Thomson J.A. 1996. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes from *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiology Letters* 138:207-210.

- Chen N., Goodwin P.H., and Hsiang T. 2003. The role of ethylene during the infection of *Nicotiana tabacum* by *Colletotrichum destructivum*. J. Exp. Bot. 54:2449–2456.
- Christopher L.M., Steckel E.L., Hayes R.M. and Mueller T.C. 2006. Biotic and abiotic factors influence horseweed emergence. Weed Sci. 54:1101–1105.
- Compant S., Duby B., Nowak J., Clément C. and Barka E.A. 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.
- Cox R.S. 1982. Control of bacterial spot of tomato in southern Florida. Plant Dis. 66:870.
- Davis B.D., and Mingioli E.S. 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. J. Bacteriol. 60:17–28.
- De Martinis D., Mariani C. 1999. Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants. Plant Cell 11:1061–1071.
- Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M., Chauhan S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiological Research 159:371–394.
- Domenech J., Reddy M.S., Kloepper J.W., Ramos B. and Gutierrez-Mañero J. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil borne diseases in pepper and tomato. Biocontrol. 51:245–258.
- Donate-Correa J., Leon-Barrios M. and Perez-Galdona R. 2005. Screening for plant growth promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree shrub legume endemic to the Canary Islands. Plant Soil. 266:261–272.
- Elad Y. 1988. Involvement of ethylene in the disease caused by *Botrytis cinerea* on rose and carnation flowers and the possibility of control. Ann. Appl. Biol. 113:589–598.
- El-Shora H.M. 2002. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. Plant Sci. 162:1–7.
- English P.J., Lycett G.W., Roberts J.A., Jackson M.B. 1995. Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. Plant Physiol. 109:1435–1440.
- Farwell A.J., Vesely S., Nero V., Rodriguez H., McCormack K., Shah S., Dixon D.G. and



- Glick B.R. 2007. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *Environ Pollut* 147:540–545.
- Ferro A.J., Bestwick R.K., Brown L.R. 1995. Inventors; Agritope, assignee. 1995/05/16. Genetic control of ethylene biosynthesis in plants using *S*-adenosylmethionine hydrolase. US Patent # 05416250;
- Flores F.B., Martinez-Madrid M.C., Sanchez-Hidalgo F.J., Romojaro F. 2001. Differential rind and pulp ripening of transgenic antisense ACC oxidase melon. *Plant Physiol. Biochem.* 39:37–43.
- Fluhr R., Mattoo A.K. 1996. Ethylene: biosynthesis and perception. *Crit Rev Plant Sci.* 15(5-6):479–523.
- Freyermuth S.K., Long R.L.G., Mathur S. 1996. Metabolic aspects of plant interaction with commensal methylotrophs. In: Lidstrom ME, Tabita FR (eds) *Microbial growth on C1 compounds*. Kluwer, The Netherlands, p:277–284.
- Fu J.M. and Huang B.R. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 45:105–114.
- Ghosh S., Penterman J.N., Little R.D., Chavez R., Glick B.R. 2003. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:277–281.
- Glick B.R, Patten C.L., Holguin G., Penrose D.M. 1999. *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria*. Imperial College Press, London.
- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41:109–117.
- Glick B.R. 2004. Bacterial ACC Deaminase and the Alleviation of Plant Stress. *Advances in Applied Microbiology* 56:291–312.
- Glick B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 251:1–7.
- Glick B.R., and Bashan Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* 15:353–378.
- Glick B.R., Cheng Z., Czarny J. and Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:329–339.

- Glick B.R., Karaturovic D.M., Newell P.C. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *pseudomonas*. Canadian Journal of Microbiology 41:533-536.
- Good X., Kellogg J.A., Wagoner W., Langoff D., 1994. Matsumura W., Bestwick R.K. Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing *S*-adenosylmethionine hydrolase. Plant Mol. Biol. 26:781-790.
- Goto M., Yaguchi Y. and Hyodo H. 1980. Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri* and its relation to defoliation. Physiol. Plant Pathol. 16:343-350.
- Gourioin B., Rosssignol M., and Vorholt J.A. 2006. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. Proc. Nat. Acad. Sci. 103:13186-13191.
- Greenwood D.J., Mckee J.M.T., Fuller D.P, Burns I.G. and Mulholland B.J. 2007. A novel method of supplying nutrients permits predictable shoot growth and root:shoot ratios of pre-transplant bedding plants. Ann. Bot. 99:171-182.
- Grichko V.P., Filby B., Glick B.R. 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. J. Biotechnol. 81:45-53.
- Hamilton A.J., Lycett G.W., Grierson D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. Nature 346:284-287.
- Hayward A.C., 1995. *Pseudomonas solanacearum*. In: Singh, U.S., Singh, R.P., Kohmoto, K. (Eds.), Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases, vol. 1. Elsevier, Tarrytown, p:139-151.
- Henzi M.X., McNeil D.L., Christey M.C., Lill R.E. 1999. A tomato antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase gene causes reduced ethylene production in transgenic broccoli. Aust. J. Plant Physiol. 26:179-183.
- Holguin G., Glick B.R. 2001. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. Microbial Ecology 41:281-288.
- Holguin G., Glick B.R. 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the Tetr gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. Microbial Ecology 46:122-133.
- Holland M.A. and Polacco J.C. 1994. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? Plant Physiol. 45: 197-209.
- Honma M. 1985. Chemically reactive sulfhydryl groups of 1-

- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Agricultural and Biological Chemistry* 49:567-571.
- Honma M. 1993. Stereospecific reaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. In: J.C. Pech, A. Latche, and C. Balague (eds) *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene*, pp:111-116 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hontzeas N., Richardson A.O., Belimov A., Safronova V., Abu-Omar M.M., Glick B.R. 2005. Evidence for horizontal transfer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes. *Applied and Environmental Microbiology* 71:7556-7558.
- Hontzeas N., Saleh S.S., Glick B.R. 2004. Changes in gene expression in canola roots induced by ACC-deaminase-containing plant-growth-promoting bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:865-871.
- Indiragandhi P., Anandham R., Kim K.A., Yim W.J, Madhaiyan M., and Sa T.M. 2008. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *World J. Microbiol. Biotech.* 24:1037-1045.
- Jacobson C.B., Pasternak J.J., Glick B.R. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology* 40:1019-1025.
- Ji P., Campbell H.L., Kloepper J.W., Jones J.B., Suslow T.V. and Wilson M. 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth promoting rhizobacteria. *Biol. Control.* 36:358-367.
- Jia Y.J., Ito H., Matsui H., Honma M. 2000. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase induced by ACC synthesized and accumulated in *Penicillium citrinum* intracellular spaces. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64:299-305.
- Jia Y.J., Kakuta Y., Sugawara M., Igarashi T., Oki N., Kisaki M., Shoji T., Kanetuna Y., Horita T., Matsui H. and others. 1999. Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63(3):542-549.

- Joardar V., Lindeberg M., Jackson R.W., Selengut J., Dodson R. and Brinkac L.M. et al 2005. Whole genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J. Bacteriol.* 187:6488–6498.
- John I., Drake R., Farrell A., Cooper W., Lee P., Horton P., Grierson D. 1995. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *Plant J.* 7(3):483–490.
- Jones L.B., Woltz, S.S., Jones, J.P., and Portier, K.L. 1991. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. *Phytopathology* 81:714–719.
- Klee H.J., Hayford M.B., Kretzmer K.A., Barry G.F., Kishore G.M. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3:1187–1193.
- Klee H.J., Kishore G.M. 1992. Control of fruit ripening and senescence in plants. International Patent No. WO 92/12249. European Patent Office, World Intellectual Property Organization.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablotowicz R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7:39–43.
- Kloepper J.W., Schroth M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter.* Gilbert-Clarey, Tours, France. Vol. 2, p:879–882.
- Knoester M., Linthorst H.J.M., Bol J.F., van Loon L.C. 1997. Modulation of stress-inducible ethylene biosynthesis by sense and antisense gene expression in tobacco. *Plant Sci.* 126:173–183.
- Koger C.H., Reddy K.N. and Poston D.H. 2004. Factors affecting seed germination, seedling emergence, and survival of texas weed (*Caperonia palustris*). *Weed Science* 52(6):989–995.
- Koopman V., and Kutschera U. 2005. In-vitro regeneration of sunflower plants: effects of a *Methylobacterium* strain on organ development. *J. App. Bot. Food Quality.* 79:59–62.
- Kousik C.S., and Ritchie, D.F. 1996. Mixed genotypes combined with copper sprays to manage bacterial spot of bell peppers. *Phytopathology* 86:502–508.
- Kumar A., Taylor M.A., Mad Arif S.A., Davies H.V. 1996. Potato plants expressing

- antisense and sense *S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)* transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J.* 9(2):147-158.
- Lacava P.T., Silva-stenico M.E., Araújo W.L., Simionato A.V.C, Carrilho E., Tsai S.M. and Azevedo J.L. 2008. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* sub sp. *pauca*. *Pesq. agropec. bras.* 43:521-528.
- Lamour K.H., and Hausbeck M.K. 2001. The dynamics of Mefenoxam insensitivity in a recombining population of *Phytophthora capsici* characterized with amplified fragment length polymorphism markers. *Phytopathology* 91:553-557.
- Lee H.S., Madhaiyan M., Kim C.W., Choi S.J., Chung K.Y., and Sa T.M. 2006. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N<sub>2</sub>-fixing methylo-trophic strains. *Biol. Fertil. Soils* 42:402-408.
- Lee K.J., Seralathan K.K., Han S. S., Cho K.S. and Lee G.W. 2008. Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1139-1145.
- Liang Z.C., Hseu R.S. and Wang H.H. 1995. Partial purification and characterization of a 1,3- $\beta$ -D-glucanase from *Ganoderma tsugae*. *J. Ind. Microbiol.* 14:5-9.
- Livak K.J., and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ C(T)</sup> method. *Methods* 25:402-408.
- Lizada M.C.C., and Yang S.F. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* 100:142-147.
- Lugtenberg B. and Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-556.
- Lynch J.M., Whipps J.M. 1991. Substrate flow in the rhizosphere. In: Keister DL, Cregan PB (eds) *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p:15-24.
- Ma J.H., Yao J.L., Cohen D. and Morris B. 1998. Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Rep.* 17:211-214.
- Ma W., Sebastianova S.B., Sebastian J., Burd G.I, Guinel F.C., Glick B.R. 2003. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83:285-291.

- Madhaiyan M., Poonguzhali S., and Sa T.M. 2007a. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). *Planta* 226:867–876.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., and Sa T.M. 2007b. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L). *Chemosphere* 69:220–228.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Kwon S.W. and Sa T.M. 2009. *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotrophs from the phyllosphere of rice. *Int. J. of Syst. and Evo. Microbiol.* 59:22–27.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sundaram S.P., Sa T.M. 2005. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Environ Exp Bot.*
- Main L.C., Steckel L.E. and Hayes R.M. 2006. Biotic and abiotic factors influence horseweed emergence. *Weed Sci.* 54:1101–1105.
- Malerba M., Crosti P., Armocida D. and Bianchetti R. 1995. Activation of ethylene production in *Acer pseudoplatanus* L. cultured cells by fusicoccin. *J. Plant Physiol.* 145:93–100.
- Maliti C.M., Basile D.V. and Corpe W.A. 2005. Effects of *Methylobacterium* spp. strains on rice *Oryza sativa* L. callus induction, plantlet regeneration, and seedling growth in vitro. *J. Torrey Bot. Soc.* 132:355–367.
- Mao W., Lewis J.A., Lumsden R.D. and Hebbar K.P. 1998. Biocontrol of selected soilborne disease of tomato and pepper plants. *Crop Prod.* 17: 535–542.
- Mattoo A.K., Suttle J.C.. 1991. The plant hormone ethylene. CRC Press, Boca Raton.
- Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. 2001. Stimulation of the growth of tomato, pepper and mung bean plants by the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL3. *Biological Agriculture and Horticulture* 19:261–274.
- Mayer A.M., Harel E. and Shaul R.B. 1965. Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods. *Phytochemistry* 5:783–789.
- Meyer G.D., and Hofte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induced resistance to leaf infection by *Botrytis*

- cinerea* on bean. *Phytopathology* 87:587–593.
- Meyer J.M., and Abdallah M.A. 1992. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107:319–328.
- Minami R., Uchiyama K., Murakami T., Kawai J., Mikami K., Yamada T., Yokoi D., Ito H., Matsui H., Honma M. 1998. Properties, sequence, and synthesis in *Escherichia coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *Journal of Biochemistry* 123:1112–1118.
- Mohamed H. Abd-Alla and Shymaa R.B. 2008. Bacterial wilt and spot of tomato caused by *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum* in Egypt. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:291–292.
- Morgan P.W., Drew M.C. 1997. Ethylene and plant response to stress. *Physiologia Plantarum* 100:620–630.
- Myung I.S., Hong S.G., Lee Y.G., Choi H.W., Shim H.S., Park J.W., Park K.S., Lee S.Y., See S.D., Lee S.H., Choi H.S., Kim Y.G., Shin D.B., Yae W.H., Han S.S., and Cho W.D. 2006. Review of disease incidences of major crops of the South Korea in 2005. *Res. Plant Dis.* 12:153–157.
- Nelson L.M. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. *Plant Management Network*.
- Nie L., Shah S., Rashid A., Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R. 2002. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiol. Biochem.* 40:355–361.
- Oeller P.W., Lu M.W., Taylor L.P., Pike D.A., Theologis A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254:437–439.
- Pandey P., Kang S.C. and Maheshwari D.K. 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr. Sci.* 89:170–180.
- Park K.Y., Drory A, Woodson W.R. 1992. Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Mol. Biol.* 18:377–386.
- Patten C.L., Glick B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42:207–220.

- Patten C.L., Glick B.R. 2002. The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3795–3801.
- Peiser G., Yang S.F. 1998. Evidence for 1-(malonylamino)cyclopropane- 1-carboxylic acid being the major conjugate of aminocyclopropane- 1-carboxylic acid in tomato fruit. *Plant Physiol.* 116:1527–1532.
- Pervaiz A.A., Diane A. Cuppels and George L. 2003. Effect of foliar applications of neem oil and fish emulsion on bacterial spot and yield of tomatoes and peppers. *Can. J. Plant Pathol.* 25:41–48.
- Petruzzelli L., Coraggio I., and Leubner-Metzger G. 2000. Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid oxidase. *Planta* 211:144–149.
- Pierik R., Tholen D., Poorter H., Visser E.J.W., Voeselek L.A.C.J. 2006. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science* 11:176–183.
- Pirttila A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R. and Hohtola A. 2000. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3073–3077.
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., Yim, W.J., Kim, K.A. and Sa, T.M. 2008. Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent-marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:1033–1043.
- Poorniammal R., Sundaram S.P., and Kumutha K. 2009. In *Vitro* Biocontrol Activity of *Methylobacterium extorquens* Against Fungal Pathogens. *International J. Plant Protection* 2:59–62.
- Rasche F., Marco-Noales E., Velvis H., Overbeek L.S., López M.M., Elsas J.D. and Sessitsch A. 2006b. Structural characteristics and plant beneficial effects of bacteria colonizing the shoots of fieldgrown conventional and genetically modified T4-lysozyme producing potatoes. *Plant Soil.* 298:123–140.
- Rasche F., Velvis H., Zachow C., Berg G., Van-Elsas J.D. and Sessitsch A. 2006a. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *J. Appl. Ecol.* 43:555–566.
- Reed A.J., Magin K.M., Anderson J.S., Austin G.D., Rangwala T., Linde D.C., et al. 1995.



- Delayed ripening tomato plants expressing the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase: 1. Molecular characterization, enzyme expression, and fruit ripening traits. *J. Agric. Food Chem.* 43:1954-1962.
- Ristaino J.B., and Johnston S.A. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Dis.* 83:1080-1089.
- Ritchie D.F., and Dittapongpitch, V. 1991. Copper- and streptomycin- resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Dis.* 75:733-736.
- Robison M.M., Griffith M., Pauls K.P., Glick B.R. 2001. Dual role of ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium wilt*. *J. Phytopathol* 2:385-388.
- Rombaldi C.V., Silva J.A., Wally L., Da Costa T.S., Zanuzo M.R. 2002. Characterization of transgenic melons expressing an apple ACC oxidase antisense gene. NATO advanced research workshop on biology and biotechnology of the plant hormone ethylene. Murcia Spain, April 23-27, 2002. p. 161. Abs # S8-P4.
- Ryu J., Madhaiyan M., Poonguzhali S., Yim W., Indireagandhi P., Kim K., Anandham R., Yun J., Kim K.H., and Sa T.M. 2006. Plant growth substances produced by *Methylobacterium* spp. and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and Red Pepper (*Capsicum annum* L.) growth. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1622-1628.
- Sahin F., and Miller, S.A. 1995. Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* 80:773-778.
- Saikia R., Kumar R., Arora D.K., Gogoi D.K., and Azad P. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* inducing rice resistance against *Rhizoctonia solani*: Production of salicylic acid and peroxidases *Folia Microbiol.* 51:375-380.
- Savin K.W., Baudinette S.C., Graham M.W., Michael M.Z., Nugent G.D., Lu C., et al. 1995. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence. *HortScience* 30(5):970-972.
- Schwyn B., and Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160:47-56.
- Scoggins H.L., Bailey D.A. and Nelson P.V. 2002. Efficacy of the press extraction method for bedding plant plug nutrient monitoring. *Hort. Sci.* 37:108-112.
- Shah S., Li J., Moffat B.A., Glick B.R. 1997. ACC deaminase genes from plant growth promoting bacteria. In: *Plant growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and*

- Future Prospects (A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds.). OECD, Paris, p:320–324.
- Shah S., Li J., Moffat B.A., Glick B.R. 1998. Isolation and Characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 44:833–843.
- Sheehy R.E., Honma M., Yamada M., Sasaki T., Martineau B., Hiatt W.R. 1991. Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Bacteriology* 173:5260–5265.
- Sonesson L.K. 1994. Growth and survival after cotyledon removal in quercus rabur seedlings, grown in different natural soil types. *Oikos*. 69:65–70.
- Spaink H.P. 1997. Ethylene as a regulator of *Rhizobium* infection. *Trends in Plant Science* 2:203–204.
- Stall R.E. and Hall C.B. 1984. Chlorosis and ethylene production in pepper leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 74:373–375.
- Stamps R.H. 2000. Management of nutrients in ornamental plant production systems in Florida: an overview. *Soil. Sci. and Crop. Sci. Soc. of Florida Proc.* 59:27–31.
- Stearns J.C. and Glick B.R., 2003. Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnol. Adv.* 21:193–210.
- Suzanne K. 1998. Effect of seed damage on germination in common vetch (*Vicia sativa* L.). *The Am. Mid. Natural.* 140:393–396.
- Sy A., Timmers A.C.J., Knief C., and Vorholt J.A. 2005. Methylo-trophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7445–7252.
- Theologis A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70:181–184.
- Theologis A., Sato T. 1998. Inventors; The United States of America as represented by the Secretary of the Agriculture, assignee. 1998/03/03. Control of fruit ripening through genetic control of ACC synthase synthesis. US #5723766;
- Todorovic B. and Glick B.R. 2008. The interconversion of ACC deaminase and D-cysteine desulphydrase by directed mutagenesis. *Planta* 229: 193–205.
- Toklikishvili N., Dandurishvili N., Vainstein A., Tediashvili M., Giorgobiani N., Lurie S.,

- Szegedi E., Glick B.R. and Chernin L. 2010. Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis*. *Plant Pathology*. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02326.x.
- Toraya T., Yongsmith B., Tanaka A. and Fukui S. 1975. Vitamin B12 production by a methanol-utilizing bacterium. *Appl. Microbiol.* 30:477-479.
- Trotsenko Y.A., Ivanova E.G., Doronina N.V. 2001. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology* 70:725 - 736
- Uchiumi T., Ohwada T., Itakura M., Mitsui H., Nukui N., Dawadi P., Kaneko T., Tabata S., Yokoyama T., Tejima K., Saeki K., Omori H., Hayashi M., Maekawa T., Sriprang R., Murooka Y., Tajima S., Simomura K., Nomura M., Suzuki A., Shimoda Y., Sioya K., Abe M., Minamisawa K. 2004. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *Journal of Bacteriology* 186:2439-2448.
- Van Iersel M. 1999. Fertilizer concentration affects growth and nutrient concentration of subirrigated pansies. *Hort. Sci.* 34:660-663.
- Van Loon L.C. 2000. Systemic induced resistance, in *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (A. Slusarenko, R.S.S. Fraser, L.C. Van Loon, Eds). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. p:521-574.
- VanLoon L.C. 1984. Regulation of pathogenesis and symptom expression in diseased plants by ethylene. In: Fuchs Y and Chalutz E (eds) *Ethylene: biochemical, physiological and applied aspects*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk, The Hague. p:171-180
- VanLoon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J.. 1997. Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. In: *Plant Growth- Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects* (A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds.): p:50-57. OECD, Paris.
- VanLoon L.C., Glick B.R. 2004. Increased plant fitness by rhizobacteria. In: *Molecular Ecotoxicology of Plants*. H. Sandermann. eds. Springer- Verlag, Berlin: p:177-207.
- Viterbo A., Landau U., Kim S., Chernin L. and Chet I. 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol. Lett.* 305:42-48.
- Vogelmann T.R. and Evans C.J. 2002. Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Environ.* 25:1313-1323.

- Wachter R., Fischer K., Gabler R., Kuhnemann F., Urban W., Bogemann G.M., Voesenek L.A.C.J., Blom C.W.P.M., and Ullrich C.I. 1999. Ethylene production and ACC accumulation *Agrobacterium tumefaciens* induced plant tumours and their impact on tumour and host stem structure and function. *Plant Cell Environ.* 22:1263–1273.
- Wang C., Knill E., Glick B.R., and De´fago G. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.* 46:898–907.
- Wang C., Ramette A., Punjasamarnwong P., Zala M., Natsch A., Moenne-Loccoz Y. and Defago G. 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop associated biological control *Pseudomonads* of worldwide origin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37:105–116.
- Wang C., Yoshida H., Lurin C., and Ecker J.R. 2004. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein, *Nature* 428:945–950.
- Whittenbury R., Davies S.L., and Wilkinson J.F. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61:205–218.
- Woodson W.R., Park K.Y., Drory A., Larsen P.B., Wang H. 1992. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.* 99:526–532.
- Xi C., Lambrecht M., Vanderleyden J., Michiels J. 1999. Bi-funcional *gfp*- and *gusA*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. *J. Microbiol. Methods* 35:85–92.
- Yang S.F. and Hoffman N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:155–189.
- Zabetakis I., 1997. Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria xananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant cell Tiss. Organ Cul.*, 50:179–183.
- Zahir Z.A., Arshad M., Frankenberger Jr. W.T. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Advances in Agronomy* 81:97–168.
- Zandstra J.W. and Liptay A. 1999. Nutritional effects on transplant root and shoot growth—a review. *Acta. Hort.* 504:23–31.

## 제 7 장 참고문헌

- Arezoo Zamani, Rona N. Sturrock, Abul K. M. Ekramoddoullah, Jun Jun Liu, and Xueshu Yu 2004. Gene Cloning and Tissue Expression Analysis of a PR-5 Thaumatin-Like Protein in *Phellinus weirii*-Infected Douglas-Fir. *Phytopathology*. vol.94, No. 11, 1235-1243.
- Basile D.V., Basile M.R., Li Q.Y. and Corpe W.A. 1985. Vitamin B12-stimulated growth and development of *Jungermannia leiantha* Grolle and *Gymnocola inflata* (Huds.) Dum. (Hepaticae). *The Bryol.*, 88:77-81.
- Boller T. 1991. Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Mattoo AK, Suttle JC (eds) *The plant hormone ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL, p:293 - 314.
- Campbell C.L. and Madden L.V., 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Choi, J.H., Kim, J.H., Daneial, M., Lebeault, J.M. 1989. Optimization of growth medium and poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production from methanol in *Methylobacterium organophilum*. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17:392-396.
- Corpe W.A. 1985. A method for detecting methylotrophic bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Methods* 3:215-221.
- Corpe W.A., and Rheem S. 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *Microbiol. Ecol.* 62:243-248.
- Glick B.R. Penrose, D.M. Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63-68.
- Glick B.R., Penrose D.M. and Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol* 190:63-68.
- Hermansson A. and Lindgren P.E. 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67:972-6.
- Hirano S.S. and Upper C.D. 1991. Bacterial community dynamics. In *Microbial ecology on 35 leaves*. Edited by J. H. Andrews & S. S. Hirano. New York: Springer-Verlag. p:271-294.
- Holland M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent Res Dev Plant Physiol* 1:207-212.
- Holland M.A. and Polacco J.C. 1992. Urease-null and hydrogenase null phenotypes of a

- phylloplane bacterium reveal altered nickel metabolism in two soybean mutants. *Plant Physiol* 98:942-948.
- Honma M., Shimomura T. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* 42:1825-1831.
- Hoppener-Ogawa S., Leveau J.H., Smant W., van Veen J.A. and de Boer W. 2007. Specific detection and real-time PCR quantification of potentially mycophagous bacteria belonging to the genus *Collimonas* in different soil ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 73:4191-7.
- Huang Y.F., Chen C.T., and Kao C.H. 1993. Salicylic acid inhibits the biosynthesis of ethylene in detached rice leaves. *Plant Growth Regul.* 12:79-82.
- Ivanova E.G., Doronina N.V. and Trotsenko Y.A. 2001. Aerobic methylotrophs are capable of synthesizing auxins. *Microbiology* 70:392-397.
- Lidstrom M.E. 2001. The aerobic methylotrophic bacteria. In: Dworkin M (ed) *The prokaryotes*. Berlin, Springer-Verlag, p:223 - 244.
- Madhaiyan M, Suresh Reddy B.V., Anandham R., Senthilkumar M., Poonguzhali S., Sundaram S.P., and Sa T.M. 2006b Plant growth promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot Pathogens. *Curr. Microbiol.* 53:270-76.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Ryu J.H., and Sa T.M. 2006a. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* 224:268-278.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Senthilkumar M., Seshadri S., Chung H., Yang J., Sundaram S., and Sa T.M. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:315-324.
- Monteiro, S., Barakat, M., Picarra-Pereira, M.A., Teixeira, A.R., Ferreira, R.B. 2003. Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 93:1505-1512.
- Monterol, M., L. Sanz, M. Rey, A. Llobell and E. Monte 2007. Cloning and characterization of bgn16Æ3, coding for a  $\beta$ -1,6-glucanase expressed during *Trichoderma harzianum* mycoparasitism. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

- Omer Z.S., Tombolini R., Gerhardson B. 2004. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylophilic bacteria (PPFBs). *FEMS Microbiol. Ecol.* 47:319-326.
- Rajam, M.V., Chandola, N., Goud, P.S. 2007. *Thaumatin* gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants, *Biol. Plant.* 51: 135-141.
- Robison M.M., Shah S., Tamot B., Pauls K.P., Moffatt B.A., and Glick B.R. 2001. Reduced symptoms of *Verticillium* wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Mol. Plant Pathol.* 2:135-145.
- Singh, N.K., Bracker, C.A., Hasegawa, P.M., Handa, A.K., Buckel, S., Hermodson, M.A. 1987. Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiol.* 85:529 - 536.
- Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C., and Dreyfus B. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* 183:214-220.
- Unge, A., Tombolini, R., Davey, M.E., Debruijn, F.J., Jansson, J.K. 1998. GFP as a marker gene. In: Akkermans, A.D., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J., (eds) *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer, Dordrecht, pp.1-16.
- Wang Z.Z., Li Y.R., Zhang S.Z., Lin J.F., Guo L.Q. 2003. Cloning and sequencing of ACC oxidase gene from sugarcane. *Yi Chuan Xue Bao.* 30(1):62-9.
- Xing, L.P., Wang, H.Z., Jiang, Z.N. 2008. Transformation of wheat thaumatin-like protein gene and analysis of reactions to powdery mildew and fusarium head blight in transgenic plants, *Acta Agron. Sin.* 34:349-354.
- Yuhua Zhang, Ding S. Shih 2007. Isolation of an osmotin-like protein gene from strawberry and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 164:68-77.
- Yumei Jiang, Nan Xia, Xiaodan Li, Wenbiao Shen, Lijian Liang, Chunyan Wang, Ren Wang, Feng Peng, Bing Xia. 2011. Molecular cloning and characterization of a *phenylalanine ammonia-lyase* gene (LrPAL) from *Lycoris radiata*. *Mol Biol Rep* 38:1935-1940.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.