Variovorax sp. PMC12 균주에 의한 토마토의 생물학 및 비생물학적 스트레스 저항성 증진

Enhancement of Tomato Tolerance to Biotic and Abiotic Stresses by *Variovorax* sp. PMC12

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-3042

Fax: +82-63-238-3834

E-mail: why@korea.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-9084-4316>김현수¹ · 이신애¹ · 김이슬¹ · 상미경¹ · 송재경¹ · 채종찬² · 원항연¹ ^{1*}¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과, ²전북대학교 환경생명자원대학 생명공학부Hyeon Su Kim¹, Shin Ae Lee¹, Yiseul Kim¹, Mee kyung Sang¹, Jaekyeong Song¹, Jong-Chan Chae², and Hang-Yeon Weon ^{1*}¹Agricultural Microbiology Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea²Division of Biotechnology, College of Environmental and Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

Rhizobacteria play important roles in plant growth and health enhancement and render them resistant to not only biotic stresses but also abiotic stresses, such as low/high temperature, drought, and salinity. This study aimed to select plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with the capability to mitigate biotic and abiotic stress effects on tomato plants. We isolated a novel PGPR strain, *Variovorax* sp. PMC12 from tomato rhizosphere. An *in vitro* assay indicated that strain PMC12 produced ammonia, indole-3-acetic acid (IAA), siderophore, and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase, which are well-known traits of PGPR. The aboveground fresh weight was significantly higher in tomato plants treated with strain PMC12 than in non-treated tomato plants under various abiotic stress conditions including salinity, low temperature, and drought. Furthermore, strain PMC12 also enhanced the resistance to bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Taken together, these results indicated that strain PMC12 is a promising biocontrol agent and a biostimulant to reduce the susceptibility of plants to both abiotic and biotic stresses.

Keywords: Abiotic stress, Biological control, Biotic stress, PGPR, Tomato

Received August 10, 2018

Revised August 30, 2018

Accepted September 2, 2018

서론

토마토는 양파, 수박과 함께 세계 3대 채소 중 하나이다. 2015년도 우리나라의 전체 토마토 재배면적은 6,975 ha로 주로

시설에서 재배되고 있으며, 충남의 재배면적이 1,604 ha로 가장 넓고, 그 다음 강원, 전남의 순이다(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2016). 토마토 재배 시 큰 피해를 주는 풋마름병은 시설재배지의 온도와 습도 등의 환경 요인에 따라 다양한 병 발생 양상을 보인다(Gallegly와 Walker, 1949). 토마토를 포함한 가지과 작물에 넓은 기주 범위를 가지고 있으며, 오염된 토양, 농기구, 물과 해충을 통하여 전파되며, 수년간 토양

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

에 생존할 수 있어서 토마토 생산에 지속적인 위협요인이 되고 있다(Tahat와 Sijam, 2010).

식물은 병원균뿐만 아니라 건조, 고온, 저온, 염 등 다양한 비생물적 환경 스트레스를 받고 있다(Bohnert 등, 2006; Boyer, 1982). 건조 스트레스로 식물은 팽압이 낮아져 광합성이 제한되고 지속적으로 광에 노출됨으로써 반응중심이 과도하게 환원되어 엽록체에 활성산소종의 생성이 증가한다(Allen, 1995; Smirnoff, 1993). 식물은 0–15°C의 온도에서 저온 스트레스를 받게 되고(Wang, 1989), 세포막의 구조와 조성의 변화, 원형질 분리 등의 세포 변화뿐만 아니라 이산화탄소, 에틸렌의 비정상적인 생성 등 대사과정도 변형된다. 아울러 식물의 활력 상실, 노화 가속, 병원균에 대한 감수성이 증가되어 생육이 감소되고 결국 죽게 된다(Satake와 Koike, 1983). 시설재배지에서 염류집적은 화학비료와 퇴비를 과도하게 시비하여 발생한다. 염류집적은 작물의 수분 및 양분 흡수장애, 영양장애, 품질저하 등의 원인이 될 뿐만 아니라 작물의 뿌리를 기형화하여 시들음병과 뿌리혹선충 등의 각종 병해를 일으킨다(Kang 등, 2011).

토양미생물은 직간접적으로 식물 생육에 영향을 미치고 있다(Gross와 Parthier, 1994; Schroth와 Hancock, 1982). 이 중 식물 생육 촉진 근권 세균(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)은 식물의 뿌리삼출액에 의해 유도되어 무기원소와 수분의 흡수 개선, 식물호르몬의 분비 등으로 식물의 생육을 촉진하고 병저항성과 염, 건조 등의 환경조건에서 내성을 증진시킨다(Dodd 등, 2010; Glickmann와 Dessaux, 1995; Tahat와 Sijam, 2010). PGPR은 화학농약 및 비료에 비해 효과 발현이 늦고 효과가 낮으며 지속기간이 짧아 적용범위가 제한적이라는 단점이 있다. 그러나 인축에 대한 독성이 낮고, 생태계에 미치는 영향이 적은 장점이 있다. 최근 토양개량, 병해충방제, 유해물질 분해, 양분흡수촉진, 작물생육촉진, 제초 등의 유용한 기능을 가진 PGPR을 선발하여 농업환경 및 생태계를 보존하면서 고품질의 농산물을 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Hassen 등, 2018; Jung 등, 2007; Mahanty 등, 2017).

본 연구는 토마토 근권에서 세균을 분리하여 작물의 생육촉진, 환경스트레스 내성 증강 및 병원균 억제력을 지닌 유용 균주를 선발하고, 이들 균주의 계통분류학 및 생리 생화학적 특성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 분류. 토마토 종자와 근권에서 균주를 분리하기 위해 상토(부농)를 고압살균기를 이용하여 121°C에서 90분간 2회 살균하고 상온에서 식혔다. 토마토 종자(*Solanum*

lycopersicum, 품종 주이켄)를 70% 에탄올에 1분, 3% 차아염소산나트륨에 3분간 살균한 후 살균증류수로 5회 세척하여 상토를 충전한 마젠타 박스에 파종하였다. 토마토는 28°C 생육상에서 1주일간 생육하였다. 토마토의 뿌리를 취하고 털어내어 비근권 토양을 제거한 뒤 0.85% NaCl에 담구어 15분간 진탕하였다. 8000 rpm으로 원심분리한 근권 시료 1 g을 0.85% NaCl에 10^{-1} 과 10^{-2} 로 희석하여 Reasoner's 2A (R2A) agar 및 tryptic soy agar (TSA)에 도말 후 28°C에서 7–10일간 배양하여 단일 콜로니를 순수분리 하였다. 순수분리한 56균주는 살균된 15% glycerol에 혼합하여 -70°C에 보존하면서 실험에 이용하였다. 균주의 분자계통학적 분류는 16S rRNA 유전자 시퀀스를 기반으로 EZ-BioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>)에 등록되어있는 표준 균주의 염기서열을 이용하였다. 염기서열을 SINA aligner (<http://www.arb-silva.de/aligner>)를 이용하여 정렬하고, MEGA6 프로그램을 이용하여 neighbor-joining법으로 bootstrap 1,000번 반복 실행하였고, Jukes-Cantor model로 계통간 거리를 계산하였다.

토마토 생육 촉진 및 비생물적 스트레스에 대한 토마토의 내성증강 효과 검정. 생육 촉진 검정은 9 cm 비닐포트에 상토를 충전하고 토마토를 파종한 후 2주 간 온실에서 재배하였다. 1엽이 전개되기 전 R2A배지에 액체배양한 균주를 8000 rpm에 15분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 살균증류수를 첨가하고 혼합하여 8000 rpm에서 15분간 원심분리를 2회 반복하여 배지성분을 제거한 후 10 mM $MgSO_4$ 에 5×10^6 cfu/ml로 희석한 세균현탁액을 20 ml씩 관주하고 무처리구는 10 mM $MgSO_4$ 를 처리하였다. 4엽기가 될 시기인 2–3주 후 지상부의 생체중을 측정하였다. 모든 실험은 처리구당 15주의 반복을 두었고 3번의 시기에 걸쳐 실시하였으며 배치는 임의배치를 하였다.

염 스트레스에 대한 토마토의 내성 증강 검정은 생육촉진 효과 검정과 동일한 방법으로 파종 후 2주차에 Yoo 등(2018)의 방법에 준하여 시험균주를 토마토 유묘에 관주처리 하고 1주일 후 Polonenko 등(1981)의 방법으로 제조한 -1000 kPa의 복합염 용액을 2일 간격으로 3회에 걸쳐 20 ml를 처리하고 2주 후 생육을 측정하였다.

온도 스트레스에 대한 토마토의 내성 증강 검정은 생육 촉진 효과 검정과 동일한 방법으로 파종 후 2주차에 시험균주를 토마토에 관주처리 하였다. Yoo 등(2018)의 방법을 변형하여 1주일 후 10, 25, 40°C의 생육상에서 4일간 유지한 후 1주일간 25°C의 환경에서 순화시키고 생육을 측정하였다.

건조 스트레스에 대한 토마토의 내성 증강 검정은 생육 촉진

효과 검정과 동일한 방법으로 파종 후 2주차에 균주를 관주처리하고 1주 후부터 15일간 관수를 하지 않고 건조한 환경을 조성하였다. 그 후 4일간 토마토가 회복될 수 있도록 관수하고 토마토 생존율을 측정하였다. 생존율은(죽은 개체수/처리 개체수) $\times 100\%$ 로 계산하였다.

토마토 풋마름병 억제력 검정. 9 cm 비닐 포트에 토마토를 파종하고 2주차에 시험균주, 10 mM $MgSO_4$ (대조구), 0.1 mM benzothiadiazole (BTH)을 토마토에 관주처리 하였다. BTH는 식물의 면역력을 유도하여 병에 대한 저항성을 증가시키므로 본 실험의 양성 대조구로 사용하였다. 관주처리 후 2주일이 지난 생육 4엽기의 토마토에 10 mM $MgSO_4$ 로 현탁하여 $OD_{600}=0.25$ 로 조절한 *Ralstonia solanacearum* 균주 현탁액 10 ml를 접종하고 15일이 경과한 후 토마토의 병 발생율을 확인하였다. *R. solanacearum*은 국립농업과학원 미생물은행(KACC)이 보유한 균주(KACC 10695)를 사용하였다. 병 발생률은 (발병 개체수/처리 개체수) $\times 100\%$ 로 계산하였다. 모든 실험은 처리구당 15주의 반복을 두었고 3번의 시기에 걸쳐 실시하였으며 배치는 임의배치를 하였다.

균주의 생리생화학, 형태학적 및 기능적 특성 분석. 생리생화학 특성 중 생육 배지실험은 미생물 균주를 R2A, TSA, nutrient agar (NA), potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종하여 28°C에 1주일간 배양한 후 생육 유무를 확인하였다. NaCl 생육 범위는 균주를 1–10% (1% 간격)의 NaCl을 첨가한 R2A 배지에 접종하여 28°C에 1주일간 배양한 후 생육 여부를 관찰하였다. 생육 온도 범위는 균주를 R2A 배지에 접종하여 5–50°C (5°C 간격)에서 1주일간 배양한 후 생육 유무를 관찰하였다. 형태학적 특성은 실체현미경(Carl Zeiss사, 모델 DE/MRC5)을 이용하여 관찰하였다.

PGPR 특성 분석 중 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) 탈 아민효소 활성은 Penrose와 Glick (2003)의 방법으로 DF salt minimal 한천배지를 제조하여 검정하였다. 0.5 M의 ACC solution은 0.2 μm membrane filter로 여과하여 DF salt minimal 배지에 150 μl 씩 도말하였다. R2A broth에서 배양된 세균은 10 mM $MgSO_4$ 에 현탁하여 $OD_{600}=0.25$ 의 농도로 맞춘 후 100 μl 씩 배지에 접종하고 28°C에 24시간 동안 배양한 후 생육했을 경우 양성으로 판정하였다. indole-3-acetic acid (IAA) 생성능은 L-tryptophan (100 $\mu g/ml$)을 첨가한 R2A broth에 28°C에서 1일 동안 배양한 후 세균 배양액을 3,000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 분석에 사용하였다. Salkowski reagent는 50 ml의 35% perchloric acid에 0.5 M

$FeCl_3$ 1 ml를 혼합하여 제조하였다. 상등액 1 ml와 Salkowski reagent 2 ml를 혼합하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 농도곡선은 0, 1, 2, 4, 8, 10 mM의 indole-3-acetic acid를 사용하여 작성하였다(Glickmann와 Dessaux, 1995; Gordon와 Paleg, 1957; So 등, 2009). 질소고정능은 Kang 등(2014)의 방법에 준하여 시험용 배지에 균주를 접종한 후 28°C에서 3일간 배양한 후 생육했을 경우 양성으로 판정하였다. 암모니아 생성능을 측정하기 위해 균주를 펩톤워터 10 ml에 접종한 후 28°C에서 4일간 배양하였다. 배양액을 8,000 g에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 0.2 μm membrane filter로 여과하였다. 여과액 5 ml에 Nessler 시약 1 ml를 첨가하여 황색에서 갈색으로 변색되었을 경우 암모니아성 질소가 생성된 것으로 판정하였다(Dey 등, 2004). 인산가용화능은 Pikovskaya 한천배지에 접종하여 28°C에 7일간 배양 후 생성된 투명환을 확인하였다(Onyia와 Anyanwu, 2013). 시토키닌 생성능 0.2% casamino acid, 0.01% thiamine, biotin 2 pg이 첨가된 M9 배지 100 ml에 균을 접종하고 28°C, 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 72, 96 및 120시간이 지난 후 665 nm에서 흡광도를 측정하였다(Patel와 Saraf, 2017). 시드로포아 생성능은 CAS diffusion assay를 이용하여 측정하였다(Shin 등, 2001). 살균된 메스를 이용하여 실험용 배지를 2등분하여 한쪽을 제거한 후 TSA를 분주하였다. 그리고 균주를 TSA면에 희선접종하여 28°C에 10일간 배양한 후 청색에서 황색으로 변색된 부분의 가로 직경을 측정하였다. 녹말 (1.0%, w/v), 섬유소(CM-cellulose, 0.1% w/v), 카세인(skimmed milk, 10% w/v), 지질(tributylin, 0.5% v/v)의 가수분해능은 Smibert와 Krieg (1994)의 방법에 준하여 평판에 균주를 희선 접종하여 28°C에 1주일간 배양한 후 생성된 투명환의 유무를 확인하였다.

통계분석. 식물체 생체중의 통계분석은 R 프로그램(R i386 3.3.1)의 "agricolae" packages를 이용하였다. 각 실험은 분산분석(ANOVA)을 실시하였고 다중검정은 $p < 0.05$ 에서 최소유의차 검정(least significant difference, LSD)을 이용하였다.

결 과

토마토 생육 촉진 균주 선발. 토마토 종자 및 근권에서 56 균주를 분리하였고 생육촉진 검정을 통해 대조구에 비해 토마토의 생체중이 통계적으로 유의적으로 증가한 PMC12, PMC17, PMC35 균주를 선발하였다($p < 0.05$). 토마토 지상부 생체중은 PMC12 균주 처리구에서 14.2 g으로 유의성 있게 높았고, PMC17 균주와 PMC35 균주의 경우는 12.7 g, 12.4 g으로 대조

Fig. 1. Growth promotion of tomato plants drenched with 10 mM MgSO_4 (control), PMC12, PMC17, and PMC35. A representative image (A) and relative shoot fresh weight (B). Experiments were conducted twice with 15 replications. Letters on the bars indicate significant differences by the least significant difference (LSD) test at $p < 0.05$.

구 9.7 g 보다 유의한 차이가 있었다(Fig. 1).

균주의 계통분류. 토마토 생육 촉진 검정으로 선발한 PMC12, PMC17, PMC35 균주의 16S rRNA gene sequence를 기반으로 계통분류를 하였다. PMC12 균주는 *Variovorax boronicumulans* BAM-48^T (AB300597)와 유사도가 99.66%로 유연관계가 가장 높았다(Fig. 2). PMC17 균주와 PMC35 균주는 *Bacillus siamensis* KCTC 13613^T (AJVF01000043)와 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도가 99.93%로 유연관계가 가장 높았다(Fig. 3).

균주의 생리생화학, 형태학적 및 기능적 특성 분석. PMC 균주는 R2A, TSA, NA, PDA 배지에서 모두 생육할 수 있었다. 생육온도 범위를 조사한 결과, PMC12 균주는 2–40°C, PMC17 균주와 PMC35 균주는 15–50°C에서 생육이 관찰되었다(Table 1).

NaCl 범위는 PMC12 균주는 3%까지, PMC17 균주와 PMC35 균주는 10%까지의 농도에서 생육할 수 있었다. PMC12 균주의 콜로니 크기는 0.63 mm, PMC17 균주는 1.42 mm, PMC35 균주는 3.33 mm였으며 PMC12 균주의 콜로니 색은 노란색, PMC17 균주와 PMC35 균주는 흰색이었다. 광학현미경으로 관찰한 PMC12 균주의 크기는 폭 0.5–0.6 μm , 길이 2.05 μm , PMC17 균주는 폭 0.7–0.8 μm , 길이 3.48 μm 이었고 PMC35 균주는 폭 0.7–0.9 μm , 길이 4.6 μm 이었다(Table 1). 녹말, 카제인, 섬유소, 지질, 인산 등의 가수분해 실험에서 PMC12 균주는 활성이 없었고 PMC17 균주와 PMC35 균주는 카제인과 지질 가수분해능이 있었다. 식물생육촉진 관련 특성을 분석한 결과, 세 균주 모두 IAA생성능과 ACC 탈아민효소 생성능, 질소고정 및 암모니아 생성능, 시토키닌 생성능과 시드로포아 생성능이 있는 것으로 나타났다. 시드로포아 생성능은 PMC17 균주(13 mm)가 가장 높았고 다음으로 PMC35 균주(5.67 mm), PMC12 균주(3.67 mm)

Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the taxonomic position of strain PMC12 among closely related taxa. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

Fig. 3. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the taxonomic position of strains PMC17 and PMC35 among closely related taxa. Bar, 0.002 substitutions per nucleotide position.

순으로 낮았다(Table 1).

비생물 및 생물 스트레스에 대한 토마토의 내성증강 효과. 염처리 2주 후 지상부 생체중을 측정한 결과, 세균현탁액을 관주 처리한 실험구에서 모두 대조구에 비해 생체중이 유의성 있게 높았다($p < 0.05$). 특히 PMC35 처리구에서 토마토의 생

체중은 10.2 g으로 가장 높았고, PMC12 처리구는 9.3 g, PMC17 처리구는 9.1 g으로 대조구인 7.4 g 보다 높았다. 따라서 PMC 균주를 처리하면 염 스트레스 조건에서 식물체의 생육이 대조구에 비해 증가됨을 확인하였다(Fig. 4).

온도 스트레스에 대한 토마토의 내성 증강 유무를 확인하기 위해 10, 25, 40°C의 배양기에 4일간 온도 스트레스를 처리한

Table 1. Physiological characteristics of strain PMC12, PMC17 and PMC35

Character	PMC12	PMC17	PMC35
Growth media	R2A, TSA, NA, PDA	R2A, TSA, NA, PDA	R2A, TSA, NA, PDA
Growth range for :			
Temperature (°C)	2–40	15–50	15–50
NaCl (%)	3	10	10
Cell morphology			
Colony size (mm)	0.63±0.15	1.42±0.22	3.33±0.26
Colony color	Yellow	White	White
Cell size (μm)	0.5–0.6×2.05±0.35	0.7–0.8×3.48±0.54	0.7–0.9×4.60±0.86
Hydrolysis for :			
Starch	–	–	–
Casein	–	+	+
Celullose	–	–	–
Lipid (tributyrin)	–	–	–
Plant growth promoting properties :			
IAA production	+	+	+
ACC deaminase production	+	+	+
Ammonia production	+	+	+
Cytokinin production	+	+	+
Siderophore production (mm)	3.67±0.47	13±0.82	5.67±1.25
Phosphate solubilization	–	+	+

결과는 Fig. 5과 같다. 10°C의 저온 스트레스 조건에서 PMC12 처리구에서 생체중이 9.8 g으로 대조구 6.6 g에 비해 생체중이 유의성 있게 증가되었다($p<0.05$). 그러나 PMC17 처리구는 7.5 g, PMC35 처리구는 7.4 g으로 대조구에 비해 생체중이 증가되었지만 통계적으로 유의하지 않았다. 25°C 조건에서는 PMC12 처리구와 PMC17 처리구는 10.6 g으로 생체중이 증가되었지만 PMC35 처리구는 유의한 차이는 없었다. 40°C의 고온 스트레스를 받은 토마토는 PMC 균주를 관주처리를 하여도 스트레스의 내성이 증진되지 않았다. PMC35 균주의 경우 6.4 g으로 8.2 g인 대조구보다 생체중이 오히려 감소되었다. PMC 균주는 저온과 중온 조건에서 대조구에 비해 생육이 증가되었지만 고온 조건에서는 토마토의 생육이 증가하지 않았다(Fig. 5B).

건조 스트레스에 대한 토마토의 내성 증강 유무를 확인하기 위해 15일간 건조 스트레스를 가한 결과는 Fig. 6과 같다. PMC 균주를 처리하였을 때 건조스트레스에 대한 내성이 증대

됨을 확인할 수 있었다. 토마토 생존율은 대조구 28.9%에 비해 PMC12 처리구는 71.1%, PMC17 처리구는 77.6%, PMC35 처리구는 55.6%로 유의성 있게 높았다(Fig. 6B).

토마토 풋마름병 억제 효과는 병 발생율이 BTH 처리구에서 29.2%로 가장 낮았고 PMC12 균주와 PMC17 균주 처리구에서는 각각 38.1%와 40.2%로 대조구 62.4% 보다 유의성 있게 낮았다($p<0.05$). 그러나 PMC35 처리구의 병 발생율은 54.9%로 대조구와 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 7).

고 찰

본 연구는 식물의 생육 촉진뿐만 아니라 다양한 생물 및 비생물 스트레스 내성을 증가시키는 기능을 가진 균주를 발굴하기 위하여 토마토 근권으로부터 균주를 분리하였다. 분리한 균주를 토마토에 관주처리 한 결과 PMC12, PMC17, PMC35 균주 처리구에서 토마토 생육이 증대되었다.

Fig. 4. Effect of the strains PMC12, PMC17, and PMC35 on growth of tomato plants treated with -1000 kPa complex salt solution. A representative image (A) and shoot fresh weight (B) of tomato plants after 1 week of salt stress. Letters on the bars indicate significant differences by the least significant difference (LSD) test at $p < 0.05$.

PMC12, PMC17, PMC35 균주의 식물 생육 촉진 관련 특성을 분석한 결과, 3 균주 모두 질소고정능, 암모니아 생성능, ACC 탈아민효소 활성, 시드로포아 생성능, 인산가용화능, IAA 및 시토키닌 생성능을 가지고 있었다(Table 1). 스트레스 조건하에서 식물 검정한 결과 PMC12 균주가 전체적으로 우수했다.

Variovorax 속은 난분해성 유기 화합물이나 중금속으로 오염된 환경에서 풍부할 뿐만 아니라 식물과 친밀도가 높아 근권 및 내생세균으로도 존재한다. 그 중 *V. paradoxus*는 식물 근권에서 흔히 발견되는 잘 알려진 PGPR로 식물의 스트레스를 줄이고, 양분을 가용화시키며, 식물 병원균의 성장을 억제하는 기능이 있다고 보고되었다(Han 등, 2013).

선발한 균주를 관주처리 하였을 때, 토마토의 생체중이 증가한 것은 균주가 생성한 암모니아 이온을 토마토가 질소원으로 사용했기 때문인 것으로 추정된다. Horchani 등(2010)은 토마토가 암모니아를 흡수하여 생육이 증가됨을 확인하였다. 인은 질소, 칼륨과 더불어 비료의 3대 요소로 식물이 다량으로 필요

로 하지만 대부분 이용하기 어려운 불용성으로 토양에 존재한다. 인산 가용화균은 유기산 등 킬레이트 물질을 분비하여 난용성 인산염을 분해하나 토양에는 일반적으로 근권에 존재하는 다른 미생물과 경쟁하기에는 밀도가 충분하지 못한 경우가 있다. 현재까지 인산가용화능이 있는 진균과 세균을 이용하여 작물의 생산량이 증가했다는 연구가 보고되었다(De Freitas 등, 1997; Viveganandan와 Jauhri, 2002). 본 연구에서 질소고정능, 암모니아 생성능, 인산가용화능을 가지고 있는 PMC 균주 처리 토마토는 비료의 흡수가 비교적 용이했기 때문에 대조구에 비해 생육이 증가된 것으로 추정된다.

염, 저온, 건조 등의 환경내성을 증가시킨 이유는 크게 두 가지로 볼 수 있다. 먼저 PMC 균주의 관주처리로 생육이 촉진되어 대조구보다 여러 스트레스에 비교적 내성을 지니게 되었을 것이라는 것과 PMC 균주가 생성한 식물호르몬으로 인하여 환경 스트레스가 감소되었을 것으로 추측된다. 식물은 체내에서 생육에 필요한 여러 가지 호르몬을 합성하고 미생물에게서 공

Fig. 5. Effect of the strains PMC12, PMC17, and PMC35 on growth of tomato plants treated at different temperatures. A representative image (A) and shoot fresh weight (B) of tomato plants after 4 days of temperature stress. Letters on the bars indicate significant differences by the least significant difference (LSD) test at $p < 0.05$.

급되는 여러 호르몬에 대해서도 생리적인 영향을 받는다(Kang 등, 2014). 예를 들어, 시토키닌을 생성하는 *B. subtilis*는 측백나무 내 ABA (abscisic acid)의 양을 조절하여 환경 스트레스에 대한 내성을 유도한다(Liu 등, 2013). 식물의 생육 및 뿌리생육을 유도하는 IAA는 유카(YUCCA) 단백질에 의해 합성, 조절되는데 식물체에서 발현량이 증가되면 환경적 스트레스 내성을 유도하는 것으로 알려져 있다(Vurukonda 등, 2016). IAA는 식물체가 환경 스트레스를 받을 때 세포 내의 활성산소의 양을 조절하여 환경 스트레스의 내성을 증가시키고 시토키닌에 의해서도 건조 등의 환경 스트레스에 대한 내성을 증가시켰을 것으로 생각된다.

스트레스 조건에서 에틸렌은 식물의 줄기 및 뿌리 생육을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Pierik 등, 2007). 일부 PGPR은 에틸렌의 전구체인 ACC를 분해하는 효소인 ACC 탈아민효소를

생성하여, 식물체 내 에틸렌 농도를 감소시켜 환경 스트레스에 대한 저항력을 높여준다(Glick, 2005). ACC 탈아민효소를 생성하는 *Pseudomonas*는 염이나 건조 조건에서 작물 열매의 성숙을 촉진시키며 수확량을 증가시키고, *Bacillus*, *Variovorax* 등 ACC 탈아민효소를 생성하는 다양한 PGPR이 식물의 환경 스트레스 완화 및 내성 유도와 연관이 있다고 보고되었다(Arshad 등, 2008; Saleem 등, 2007). ACC 탈아민효소에 의해서 에틸렌 생성이 감소되고 결과적으로 토마토가 받는 염, 온도, 건조 스트레스가 경감되었을 것으로 생각된다. 본 연구에서 이용한 PMC 균주는 *in vitro* 실험을 통해서 ACC 탈아민효소, IAA, 시토키닌 호르몬을 생성함을 확인하였다.

대부분의 생물학적 방제는 항균기작에 기초한 방법이었으나 생물학적 방제능력이 있는 근권세균 중 식물에 유도저항성을 일으키는 기작이 알려지면서 유도저항성 능력이 우수한 근

Fig. 6. Effect of the strains PMC12, PMC17, and PMC35 on the survival rate of tomato plants after 15 days of drought stress. A representative image (A) and survival rate (B) Experiments were conducted twice with 15 replications. Letters on the bars indicate significant differences by the least significant difference (LSD) test at $p < 0.05$.

권미생물을 선발하여 식물병의 생물학적 방제에 이용하기 위한 연구가 수행되었다(Van Loon 등, 1998). Leeman 등(1995)은 *Pseudomonas fluorescens* wc374를 이용하여 자연 감염된 비닐 하우스내의 무 시들음병을 50% 이상 억제할 수 있었다. PGPR을 관주처리 하면 토양 미생물 군집이 변하거나 근권 등에 우점하여 병원균의 침입을 억제할 수 있다(Mendes 등, 2013). 시드로포아 생성능 또한 병 발생억제에 기여한 것으로 추측된다. *Pseudomonas*를 이용한 일부 연구에서 철분에 대한 효과적인 경쟁이 질병 억제에 기여할 수 있다는 결과가 있었지만, Başar와 Bhat (2004)의 결과에 의하면 시드로포아 생산은 *R. solanacearum*에는 영향이 없었다. 아울러 *V. paradoxus*는 quorum sensing과 관련된 미생물 신호 전달 분자 N-acyl homoserine lactone (AHL)을 분해할 수 있다(Leadbetter와 Greenberg, 2000)는 결과가 있는데, 존재하는 병원성 균주의 독성을 감소시키는 quorum quenching으로 병원성 감염으로부터 기주 식물을 보호했다는 보고가 있다(Chen 등, 2013). 본

연구에서 병원균을 접종하기 1주일 전 PMC 균주를 관주처리 하였는데, PMC 균주에 의해 풋마름병균을 억제하는 효과를 가진 미생물 군집이 유도되거나, 근권에 우점하여 병원균이 식물체에 침입하기 어렵게 하였을 가능성이 있다.

현재 지구온난화로 인한 급격한 환경변화로 식물 환경 스트레스의 강도와 병해충의 발생빈도가 점차 늘어가고 있다. 본 연구에서 선발된 PMC12는 식물생육과 염, 온도, 건조 등의 비생물적 스트레스와 토마토 풋마름병 억제 등 넓은 효과 범위를 가진다. PMC12는 급변하는 농업환경에서도 생태계의 균형을 깨트리지 않고 안전한 농산물을 생산하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

근권세균은 식물 생육과 건강 증진에 중요한 역할을 하며 생물학적 스트레스뿐만 아니라 저온, 고온, 건조 및 염과 같은 비

Fig. 7. Effect of the strains PMC12, PMC17, and PMC35 on the survival of tomato plants treated with *Ralstonia solanacearum*. A representative image (A) and disease incidence (B) Experiments were conducted twice with 15 replications. Letters on the bars indicate significant differences by the least significant difference (LSD) test at $p < 0.05$.

생물적 스트레스에도 내성을 부여한다. 본 연구는 토마토에 생물적 및 비생물적 스트레스를 완화시키는 기능을 가진 식물 성장촉진 근권세균(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)을 선발하는 것을 목표로 하였으며 토마토 근권에서 *Variovorax* sp. PMC12균주를 분리하였다. PMC12균주는 *in vitro*에서 PGPR의 특성으로 알려진 암모니아, IAA, 시드로포아 및 ACC 탈아민효소를 생성하였다. PMC12 균주를 처리한 토마토는 대조구에 비해 염, 저온 및 건조 스트레스 조건에서 지상부 생체중이 유의적으로 높았다. 또한 PMC12 균주를 처리한 토마토는 *Ralstonia solanacearum*에 의한 세균성 시들음병에 대한 저항성이 증가되었다. 결과적으로 PMC12 균주는 식물의 비생물적 스트레스 및 생물적 스트레스에 대한 감수성을 감소시키는 유망한 생물학적 방제제 및 생물활성제로 사용될 수 있을 것으로 전망된다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This research was supported by a research grant (Project No. PJ01185002) from Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Allen, R. D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107: 1049-1054.
- Arshad, M., Shaharoona, B. and Mahmood, T. 2008. Inoculation with

- Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere* 18: 611-620.
- Başar, G. and Bhat, C. 2004. A parameterized consideration set model for airport choice: an application to the san francisco bay area. *Transport. Res. B Meth.* 38: 889-904.
- Bohnert, H. J., Gong, Q., Li, P. and Ma, S. 2006. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms-Getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 180-188.
- Boyer, J. S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z. and Li, X. 2013. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 17477-17500.
- De Freitas, J. R., Banerjee, M. R. and Germida, J. J. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fert. Soils* 24: 358-364.
- Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M. and Chauhan, S. M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 159: 371-394.
- Dodd, I. C., Zinovkina, N. Y., Safronova, V. I. and Belimov, A. A. 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann. Appl. Biol.* 157: 361-379.
- Gallegly, M. E. and Walker, J. C. 1949. Relation of environmental factors to bacterial wilt of tomato. *Phytopathology* 39: 936-946.
- Glick, B. R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 1-7.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793-796.
- Gordon, S. A. and Paleg, L. G. 1957. Observations on the quantitative determination of indoleacetic acid. *Physiol. Plant.* 10: 39-47.
- Gross, D. and Parthier, B. 1994. Novel natural substances acting in plant growth regulation. *J. Plant Growth Regul.* 13: 93.
- Han, J. I., Spain, J. C., Leadbetter, J. R., Ovchinnikova, G., Goodwin, L. A., Han, C. S. et al. 2013. Genome of the root-associated plant growth-promoting bacterium *Variovorax paradoxus* strain EPS. *Genome Announc.* 1: e00843-13.
- Hassen, W., Neifar, M., Cherif, H., Najjari, A., Chouchane, H., Driouich, R. C. et al. 2018. *Pseudomonas rhizophila* S211, a new plant growth-promoting rhizobacterium with potential in pesticide-bioremediation. *Front. Microbiol.* 9: 34.
- Horchani, F., Hajri, R. and Aschi-Smiti, S. 2010. Effect of ammonium or nitrate nutrition on photosynthesis, growth, and nitrogen assimilation in tomato plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173: 610-617.
- Jung, H. K., Kim, J. R., Woo, S. M. and Kim, S. D. 2007. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 23-28. (In Korean)
- Kang, B. G., Lee, S. Y., Lim, S. C., Kim, Y. S., Hong, S. D., Chung, K. Y. et al. 2011. Establishment of application level for the proper use of organic materials as the carbonaceous amendments in the greenhouse soil. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44: 248-255. (In Korean)
- Kang, S. M., Khan, A. L., You, Y. H., Kim, J. G., Kamran, M. and Lee, I. J. 2014. Environmental microbiology and engineering : gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 106-112.
- Leadbetter, J. R. and Greenberg, E. P. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 182: 6921-6926.
- Leeman, M., Van Pelt, J. A., Den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M. and Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 655-664.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z. and Ma, B. 2013. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in platycladus orientalis container seedlings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 9155-9164.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A. et al. 2017. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24: 3315-3335.
- Mendes, R., Garbeva, P. and Raaijmakers, J. M. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 634-663.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2016. Agriculture, Food and Rural Affairs Statistics Yearbook 2016. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, Korea. 559 pp.
- Onyia, C. E. and Anyanwu, C. U. 2013. Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil. *J. Yeast Fungal Res.* 4: 52-57.
- Patel, T. and Saraf, M. 2017. Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their in vitro plant growth-promoting efficacy. *J. Plant Interact.* 12: 480-487.
- Penrose, D. M. and Glick, B. R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.* 118: 10-15.
- Pierik, R., Sasidharan, R. and Voeseek, L. A. C. J. 2007. Growth control by ethylene: adjusting phenotypes to the environment. *J. Plant Growth Regul.* 26: 188-200.
- Polonenko, D. R., Mayfield, C. I. and Dumbroff, E. B. 1986. Microbial responses to salt-induced osmotic stress. *Plant Soil* 92: 471-425.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. and Bhatti, A. S. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 635-648.

- Satake, T. and Koike, S. 1983. Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants : I. the stage and organ susceptible to cool temperature. *Jpn. J. Crop Sci.* 52: 207-214.
- Schroth, M. and Hancock, J. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216: 1376-1381.
- Shin, S. H., Lim, Y., Lee, S. E., Yang, N. W. and Rhee, J. H. 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J. Microbiol. Methods* 44: 89-95.
- Smibert, R. M. and Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characterization. In: *Methods for general and molecular bacteriology*, eds. by R. G. E. Murray, W. A. Wood and N. R. Krieg, pp. 611-651. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Smirnov, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125: 27-58.
- So, J. H., Kim, D. J., Shin, J. H., Yu, C. B. and Rhee, I. K. 2009. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* A-139 producing auxin from east coast sand dunes. *Korean J. Environ. Agric.* 28: 447-452. (In Korean)
- Tahat, M. M. and Sijam, K. 2010. *Ralstonia solanacearum*: The bacterial wilt causal agent. *Asian J. Plant Sci.* 9: 385-393.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. and Pieterse, C. M. 1998. Systemic resistance induced by Rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- Viveganandan, G. and Jauhri, K. S. 2002. Efficacy of a rock phosphate based soil implant formulation of phosphobacteria in soybean (*Glycine max* Merrill). *Indian J. Biotechnol.* 1: 180-187.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M. and SkZ, A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 184: 13-24.
- Wang, C. Y. 1989. Chilling injury of fruits and vegetables. *Food Rev. Int.* 5: 209-236.
- Yoo, S. J., Shin, D. J., Weon, H. Y., Song, J. and Sang, M. K. 2018 . Selection of bacteria for enhancement of tolerance to salinity and temperature stresses in tomato plants. *Korean J. Org. Agric.* 26: 463-475.