



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월08일  
(11) 등록번호 10-1575666  
(24) 등록일자 2015년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)  
C12R 1/38 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 1/20 (2013.01)  
A01N 63/00 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-0009019  
(22) 출원일자 2015년01월20일  
심사청구일자 2015년01월20일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020090116920 A\*  
US20060041961 A1  
Annals of Microbiology. 2008, vol. 58, no. 4,  
pp. 561-568.\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
충북대학교 산학협력단  
충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)  
(72) 발명자  
사동민  
충청북도 청주시 흥덕구 내수동로 52  
수브라마니안 파르티반  
충청북도 청주시 흥덕구 내수동로 52  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
최규환

전체 청구항 수 : 총 5 항

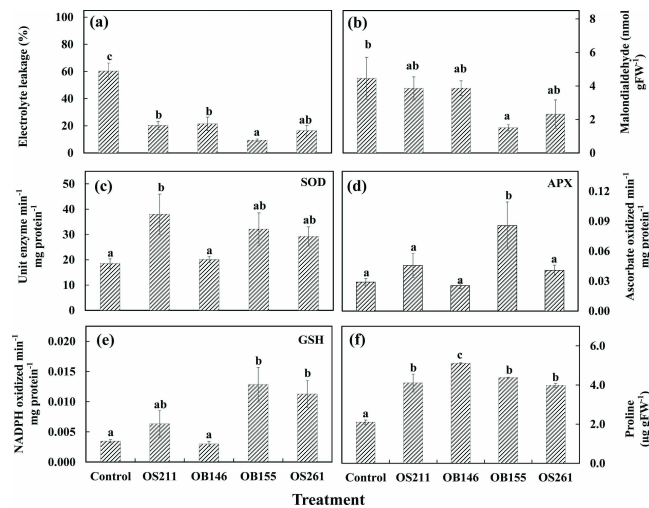
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 저온에서 식물의 성장을 촉진하는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 저온에서 식물의 성장을 촉진하는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 저온에서 식물의 성장 촉진용 미생물 제제, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 저온에서 식물의 성장 촉진용 생물비료, 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 생물비료를 제조하는 방법 및 상기 균주를 식물 또는 식물의 종자에 침지 또는 관주 처리하는 단계를 포함하는 저온에서 식물의 성장을 촉진시키는 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

**C12R 1/38** (2013.01)

(72) 발명자

**김기윤**

충청북도 청주시 흥덕구 내수동로 52

**이영욱**

충청북도 청주시 흥덕구 내수동로 52

**김재홍**

충청북도 청주시 흥덕구 내수동로 52

**이재강**

충청북도 청주시 흥덕구 내수동로 52

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 914004-4

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 포스트게놈다부처유전체사업(농림축산식품미생물유전체사업)

연구과제명 미생물 유전체, 기능분석 및 토성, 작물 맞춤형 생물비료 개발

기여율 1/1

주관기관 충북대학교

연구기간 2014.08.23 ~ 2018.08.22

공지예외적용 : 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

10~20℃의 저온에서 토마토 식물의 생장을 촉진하고, 항산화 상태를 개선시키는 슈도모나스 반코버런시스 OB155(*Pseudomonas vancouverensis* OB155) 균주(KACC92024P).

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 10~20℃의 저온에서 토마토 식물의 생장 촉진용 미생물 제제.

**청구항 5**

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 10~20℃의 저온에서 토마토 식물의 생장 촉진용 생물비료.

**청구항 6**

제1항의 균주를 배양하는 단계를 포함하는 생물비료를 제조하는 방법.

**청구항 7**

제1항의 균주로 토마토 식물 또는 토마토 식물의 종자를 침지시키거나 또는 관주 처리하는 단계를 포함하는 10~20℃의 저온에서 토마토 식물의 생장을 촉진시키는 방법.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001]

본 발명은 저온에서 식물의 생장을 촉진하는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 저온에서 식물의 생장을 촉진하는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 저온에서 식물의 생장 촉진용 미생물 제제, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 저온에서 식물의 생장 촉진용 생물비료, 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 생물비료를 제조하는 방법 및 상기 균주를 식물 또는 식물의 종자에 침지 또는 관주 처리하는 단계를 포함하는 저온에서 식물의 생장을 촉진시키는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002]

계절상의 강설 및 토양의 서리는 북반구의 55%를 덮게 되며, 그러한 지역의 냉동-해동 순환은 이후에 더욱 심화되며 더욱 빈번하게 늘어날 것으로 예측된다. 토양 온도의 간헐적 또는 계절적 강하를 일으키는 그러한 요인들은 식물 생장 및 여타 토양-생물적 활성에 크게 영향을 준다. 온대성 토양은 연간 과정 동안 온도 조건의 변화에 노출되기 때문에 저온발육성 및 중온성 박테리아를 보유하고 있다. 저온발육성 박테리아 상의 배양-기반의 연구들은 그들의 다양한 생리학적 및 유전학적 특성을 이해함에 있어 중요하며, 이는 그러한 박테리아에 특징적인 공통적 특징들을 추정할 수 있도록 해 준다. 그러한 특징들은 박테리아 그룹의 동정 또는 장래 응용 개발을 보조할 수 있다. 적합한 예시들은 신규한 박테리아 분류군을 기술하거나, 또는 근접 냉동 조건 하의 식물에 빙핵형성(ice-nucleating) 단백질 양성 박테리아의 적용을 피하게 한다. 과거에는, 온대성 또는 고산 토양으로부

터 분리된 몇가지 호냉성 및 저온발육성 박테리아가 그들의 생애, 구별되는 생리학적 적응성 및 지속가능한 농업적 적용에 이용된 바 있다.

[0003] 프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 악티노박테리아(Actinobacteria)의 구성원들은 식물 성장 촉진 저온발육성 박테리아 분리 이용 시 종종 고려된다. 프로테오박테리아의 구성원들 중, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속은 몇 가지 저온발육성 분리 균주를 보유하는 것으로 관찰되었으며, 그들 중 대다수가 저온 스트레스 조건 하의 식물 성장을 개선시키는 식물 성장 촉진 후보들로 제공되었다. 농업에서, 냉온 온도는 온대 지방에서 초봄인 계절 동안 일반적이며, 실질적으로 식물 생산성을 저해하는 비-냉동 온도(0 내지 15 °C)로 정의된다. 그러한 냉온 조건은, 토양 영양 순환을 교란할 뿐 아니라, 작물 손실을 유발하는 부패유기성 진균의 성장을 도모하게 된다. 냉온에 대한 노출은 식물에서 세포 항상성을 교란하며, 활성 산소종(ROS)은 스트레스로 유발되는 세포 변화의 주된 산물 중 하나이다. 식물에서 따로 또는 함께 전체 세포 사멸을 유도하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 및 HO<sup>-</sup> 과 같은 반응성 산소종(ROS)은 단백질, 지질, 탄수화물 및 DNA를 전부 손상되도록 한다.

[0004] 토마토(*Solanum lycopersicum*)는 온대 지방에서 온실 조건 하에 성장시키는 아열대 작물이다. 대부분의 시판 토마토 모종은 15°C 미만의 온도에 민감하며, 12°C 미만에서는 보통 그의 생장이 억제된다. 18°C 미만의 낮은 온도는 토마토에서 성장, 조직 형성, 개화 및 과실 성숙에 영향을 줄 수 있다. 냉온에서의 식물 성장을 개선하는 저온발육성 박테리아에 대한 최근 몇 년간의 보고에도 불구하고, 냉온 용인성에 원인을 제공하는 특정 식물 응답성 조절에서의 그러한 식물 성장 촉진 박테리아(PGPB)의 영향은 별로 연구된 바 없다. 본 발명에서, 동절기에 농지로부터 수집된 토양으로부터 저온발육성 박테리아를 분리해 내어, 저온에 대한 그들의 생리학적 적응성을 시험하고, 식물 내재성 ROS 소거 시스템을 개선하여 그들을 토마토 식물에서의 냉온 스트레스 완화에 적용하는 것을 목표로 하고 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0973168호에서는 '저온에서 식물 성장을 촉진하는 슈도모나스 코루가타돌연변이주 및 이를 이용한 식물 성장 촉진 방법'이 개시되어 있고, 한국특허등록 제0530885호에는 '슈도모나스 플로레센스 B16 균주 및 이를 이용한 작물의 성장촉진 방법 및 세균성 시들음병 방제 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 저온에서 식물의 성장을 촉진하는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 평균 최소 온도가 영하로 떨어지는 늦겨울에 채취한 토양으로부터 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주를 분리 동정하였고, 상기 균주 처리가 15°C에서 토마토 종자 발아 및 토마토 식물 성장에서 지속적 증가를 유발했다. 또한, 냉온 스트레스 하에 토마토 잎 조직에서 전해질 누출 및 지질 과산화물 현저히 감소시켰고, 프롤린 함량의 현저한 증가 및 항산화 효소 슈퍼옥시드 디스무타아제(SOD), 아스코르베이트 퍼옥시다아제 (APX) 및 글루타티온 리덕타아제(GSH)의 유도를 통해 식물의 항산화능을 증가시켜 생육이 촉진되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

#### 과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 저온에서 식물의 성장을 촉진하는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 저온에서 식물의 성장 촉진용 미생물 제제를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 저온에서 식물의 성장 촉진용 생물비료를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 생물비료를 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 균주를 식물 또는 식물의 종자에 침지 또는 관주 처리하는 단계를 포함하는 저온에서 식물의 성장을 촉진시키는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0012] 본 발명에서 분리한 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주를 처리하면 저온에서도 식물 생장이 촉진되므로, 본 발명의 균주 이용은 저온 성장능이 향상된 유용한 농경 작물의 생산량과 품질 향상 및 생산 효율 증대에 크게 기여할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0013] 도 1은 저온발육성 박테리아 분리 균주에서의 계통발생적 다변성을 나타낸다. 16S rRNA 유전자 서열을 근거로 한 이웃 결합 계통수(Neighbor joining tree)로 1000회의 재차 시료를 수집한 것에서 부트스트랩 값  $\geq 50$  을 분 지점에 표시하였다.

도 2는 5℃ 및 25℃에서 콜로니 외관에 대해 취해진 날 관찰된 분리 균주의 저온발육성 특징을 나타낸다. 생장 최대 온도 및 냉은 적응에 대한 마커로서 취해지는 지방산의 히트맵(heat map) 표시 분포.

도 3은 토마토에 7일간 저온(15℃) 처리한 후, 분리된 균주 4종을 처리한 토마토 식물을 대상으로 다음과 같은 물질 함량 변화를 관찰한 것이다. (a) 냉은 처리 1 주 후 잎에서의 전해질 누출; (b) 말론디알데히드 함량. 냉은 처리 종료 시 잎 시료에서의 항산화 효소 활성 (c) 수퍼옥시드 디스뮤타아제; (d) 아스코르베이트 퍼옥시다 아제; (e) 글루타티온 리덕타아제; (f) 저온 처리 후 프롤린 함량. 컬럼 위의 알파벳은  $p < 0.05$ 로 한 t-Test (LSD)를 기준으로 통계적으로 그룹을 나눈 것을 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 저온에서 식물의 성장을 촉진하는 슈도모나스 반코버런시스 OB155(*Pseudomonas vancouverensis* OB155) 균주를 제공한다.

[0015] 본 발명의 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주는 평균 최소 온도가 영하로 떨어지는 늦겨울에 채취한 토양으로부터 분리 동정되었다. 상기 균주를 농업생명공학연구원(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 2015년 1월 14일자로 기탁하였다 (기탁번호: KACC92024P).

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 저온은 10~20℃일 수 있고, 바람직하게는 15℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 식물은 토마토일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 저온에서 식물의 성장 촉진용 미생물 제제를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 저온에서 식물의 성장 촉진용 생물비료를 제공한다.

[0020] 상기 미생물 제제는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주를 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명에 의한 미생물 제제는 액상 비료 형태로 제조될 수 있으며 이에 증량제를 첨가하여 가루분말의 형태로 이용하거나 이를 제형화하여 과립화시킬 수도 있다. 그러나 그 제형에 특별히 한정되지는 않는다. 즉 화학비료 공급이 제한된 친환경 유기농업에서 이를 극복하기 위한 생물비료로 제형화가 가능하다.

[0021] 본 발명은 슈도모나스 반코버런시스 OB155를 이용하여 작물의 성장을 촉진시키는 생물비료로서의 이용법을 제공한다. 상기 균주를 배양한 배양액을 이용하여 이를 액체 상태로 그대로 관주하거나 작물의 종자에 침지 또는 분무하거나 종자에 코팅하여 이용할 수 있다.

[0022] 본 발명은 또한, 본 발명의 슈도모나스 반코버런시스 OB155를 배양하는 단계를 포함하는 생물비료를 제조하는 방법을 제공한다. 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주의 배양 방법 및 생물비료의 제조 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 특정 방법에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 균주를 식물 또는 식물의 종자에 침지 또는 관주 처리하는 단계를 포함하는 저온에서 식물의 성장을 촉진시키는 방법을 제공한다. 상기 식물의 성장을 촉진하는 방법으로는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주를 배양한 배양액 또는 상기 균주를 이용한 미생물 제제를 종자나 식물에 침지하거나 관주, 즉, 분무하여 수행할 수 있다. 침지하는 방법의 경우, 배양액 및 제제를 식물체 주변의 토양에 붓거나 또는 종자를 배양액 및 제제에 담가둘 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0025] **재료 및 방법**

[0026] **토양 시료채취 및 물리화학적 특성**

[0027] 토양 시료를 대한민국 오창(36° 43'N; 127° 27'E)에 위치한 전북 농업기술원의 들에서 수집했다. 대한민국에서 평균 최소 온도가 영하로 떨어지는 늦겨울에 시료채취를 실시했다(2012년 1월). 10 내지 15cm의 깊이의 토양을 3개씩 수집했고, 연구를 진행할 때까지 5°C에서 저장했다. 토양 pH, 전기 전도도(EC), 유기질 함량, 총 질소, 인 및 치환성 양이온들을 포함한 토양 물리화학적 특성을 조사했다.

[0028] **저온발육성 박테리아의 풍부화 및 분리**

[0029] 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (w/v), 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (w/v) 및 0.1% 글루코오스 (w/v) 및 0.2% (v/v) 미량 금속 용액으로 이루어진 변형 최소 (MM) 배지를 저온발육성 박테리아의 분리에 이용했다. 오토클레이브 후, 배지를 실온으로 냉각시켰을 때 여과 멸균된 10% (w/v) 펩톤을 리터 당 5 mL로 첨가했다. 미량 금속 혼합물은 (w/v)로 0.5% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.04% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.2% FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.4% MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.2% NH<sub>4</sub>MoO<sub>4</sub> 및 0.4% ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 을 함유했다. 분리를 위해, 10g의 토양 시료를 칭량하고, 신속히 미리 냉각시킨 멸균 MM 배지 브로쓰를 첨가하고, 5°C에서 48시간 동안 인큐베이션하여 저온발육성 박테리아의 풍부화를 도모했다. 풍부화 기간 종료시, 1mL의 브로쓰를 취해, 일련으로 희석하고, 미리 냉각시킨 MM 배지에 플레이팅하고, 5°C에서 인큐베이션 하였다. 외관상 형태적으로 구분되는 콜로니를 분리하여, 동일 배지 상에서 계대배양으로 정제했다.

[0030] **계통발생학적 특징분석**

[0031] 유전체 DNA를 분리하고, 16S rRNA 유전자를 범용 프라이머 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 서열번호 1) 및 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'; 서열번호 2)를 이용한 PCR로 증폭시켰다. 서열분석 후, 분리 균주를 그들의 16S rRNA 서열 데이터를 기반으로 하여 EzTaxon 서버(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)를 이용해 밝혀냈다. 계통발생학적 분석은 ClustalW를 이용한 서열들의 다중 정렬 생성 후 MEGA version 5.03을 이용해 실행했다. Jukes 및 Cantor의 모델에 따라 치환을 실시하고, 클러스터링은 이웃-결합 방법을 이용해 실행했다. 노드의 통계 신뢰성은 1000회 복제의 부트스트래핑에 의해 산출되었다.

[0032] **저온발육성 및 식물 성장 촉진 특성의 스크리닝**

[0033] 성장 온도 관계를 연구하기 위해, 분리 균주를 처음에 MM 배지 브로쓰에서 72시간 동안 5°C에서 성장시키고, 20 μL의 배양물을 아가 플레이트 상에 스팟팅한 후, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C 및 40°C에서 인큐베이션했다. 1주의 인큐베이션 후 콜로니 출현에 대해 플레이트를 관찰했다. 상대적인 성장 속도를 점검하기 위해, 균주들을 처음에는 MM 배지에서 성장시키고, 20μL를 동일 배지의 아가 플레이트 상에 스팟팅했다. 플레이트의 1 개 설정은 5°C에서의 인큐베이션이며, 다른 플레이트 설정은 25°C였다. 플레이트는 매 24시간 마다 그리고 육안으로 보이는 콜로니가 나타난 날 관찰했다. 막 지방산을 조사하기 위해, 분리 균주의 전체 세포 지방산을 메틸 에스테르로 추출하고, 기체 크로마토그래피(GC)를 이용해 조사했다. 분리 균주의 지방산 프로파일을, i) 단쇄 지방산; ii) 불포화 지방산; iii) 고리형 지방산의 존재 하에, 및 iv) 더 긴 장쇄 지방산의 부재 하에 조사했다.

[0034] 분리 균주에 의한 식물 성장 촉진 특성의 발현은 5°C에서 조사했다. 분리 균주에 의한 IAA의 생산은 트립토판의 존재 및 부재 하에 정량했다. 여과 멸균된 트립토판을 500μg/mL의 농도로 배지에 공급했다. 불용성 포스페이트를 가용화하는 능력을 NBRIP-BPB 플레이트에서 실시했다. 사이드로포어(siderophore) 생산을 Alexander 및 Zuberer의 문헌(1991, Biol Fertil Soils, 12:39-45)에 따라 제조된 CAS 아가 플레이트 상에서 조사했다. ACC 디아미니아제 활성은 질소원을 3mM ACC로 한 무질소 배지 상에서 박테리아 분리 균주를 성장시켜 결정되었고, ACC의 효소 가수분해로 제공되는 케토부티레이트의 양을 추정했다. 배양 상등액 중 살리실산 생산은 선행기술에

서 기재한 바와 같이 결정했다(Mercado-Blanco 등의 문헌, 2001, J Bacteriol 183(6): 1909-1920).

[0035] **저온 조건 하에서의 토마토 종자 발아 및 묘목 성장 시험**

[0036] 토마토 종자인 솔라눔 리코페르시쿰 (*Solanum lycopersicum*) cv Mill을 0.02% Tween20를 함유하는 2% 소듐 하이포클로라이트를 이용해 5 분간, 이어서 70% 에탄올로 1분간 표면 멸균시키고, 멸균 탈이온수로 3 분간 3회 헹구었다. 최종 세척물 유래의 분취액(100 $\mu$ l)을 영양 아가에 스프레딩하여, 멸균 효율을 확인했다. 종자 처리는, 멸균된 종자를 멸균 배지에 또는 분리 균주의 후기 로그상 (late log phase) 배양에 4시간 동안 담그는 것으로 이루어진다. 종자 처리 종료 시, 10개의 종자를 멸균 가슴 여과지를 포함하고 있는 각 페트리 접시에 이동시키고, 처리를 3개씩 유지했다. 이어서, 플레이트를 암실 조건 하에 15 $^{\circ}$ C에서 유지되는 식물 성장 챔버로 옮겼다. 10일 후, 발아 백분율을 산출했다.

[0037] 다른 실험 설정에서, 박테리아 처리 및 미처리 토마토 종자를 25 $^{\circ}$ C/25 $^{\circ}$ C (주/야) 조건에서 제어 식물 성장 챔버에서 발아시키고, 모든 식물이 발아한 것으로 나타난 6일 째에 온도를 15 $^{\circ}$ C/15 $^{\circ}$ C로 낮췄다. 저온 노출을 1주의 기간 동안 제공하고, 묘목을 신초 및 뿌리 성장에 대해 관찰했다.

[0038] **박테리아 프라이밍 및 토마토 식물에서의 냉온 내성 평가**

[0039] 토마토 종자를 표면 멸균하고, 박테리아 배양을 이용해 상기 기재된 바와 같이 슈도모나스 프레데릭스베르겐시스(*Pseudomonas frederiksbergensis*) OS211, 플라보박테리움 글라시에이 (*Flavobacterium glaciei*) OB146, 슈도모나스 반코버런시스(*P. vancouverensis*) OB155, 및 슈도모나스 프레데릭스베르겐시스(*P. frederiksbergensis*) OS261를 이용해 처리했다. 25 $^{\circ}$ C/25 $^{\circ}$ C (주/야)로 유지된 묘목 트레이에서 발아를 실시했다. 1주령의 묘목을 온실의 화분으로 옮기고, 동일 온도 조건 하에 2주간 더 유지하고, 21일 후 온도 제어 식물 성장 챔버로 옮겨 화분을 15 $^{\circ}$ C/15 $^{\circ}$ C의 냉온 냉각에 노출시켰다. 저온 처리 1주 후 식물을 수확했다.

[0040] **막 투과성**

[0041] 막 투과성은 잎에서의 전해질 누출 및 말론디알데히드 함량 측면에서 조사했다. 전해질 누출을 조사하기 위해, 6개의 완전히 성장한 잎을 행구고 물기를 닦아내어, 15mL의 2차 증류수를 포함하고 있는 원뿔형 관에 넣었다. 그 관을 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 후, 도전율계를 이용해 전도도(E1)를 측정했다. 후속하여, 조직을 100 $^{\circ}$ C 수조에 30분간 둔 후, 25 $^{\circ}$ C로 냉각시켰다. 두 번째 전도도 측정을 실시했다(E2). 탈이온수의 전기 전도도도 측정했다(E0). 상대적 전해질 누출 (REL)을 문헌(Mishra 등, 2011. Arch Microbiol 193: 497-513)에 따라 산출했다.

[0042] 상대적 전해질 누출(%)= (E1-E0)/(E2-E0) x 100

[0043] 말론디알데히드 함량은 Taulavuori 등의 문헌(2001, J Exp Bot 52(365): 2375-2380)의 프로토콜을 이용해 측정했다. 0.4g의 잎 조직을 막자사발을 이용해 액체 질소에서 균질화시키고, 균질화된 조직 분말을 6mL의 0.1% 트리클로로아세트산(TCA)에 현탁시켰다. 혼합물을 10000 $\times$ g에서 5분간 원심분리하고, 상등액을 각 튜브마다 1mL 분취액을 담아 2 개의 튜브에 나누었다. 첫 번째 튜브에는 4mL의 20% (w/v) TCA를 넣고, 두 번째 튜브에는 0.5% TBA (티오바르비탈산)를 함유하는 20% (w/v) TCA를 4mL 넣었다. 용액 혼합물을 95 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열한 후, 얼음 수조에서 신속히 냉각시켰다. 냉각 후 10000 $\times$ g 에서 10 분간 원심분리를 실시하고, 상등액의 흡광도를 440nm, 532nm 및 600nm 에서 검독했다. 말론디알데히드 함량은 그의 소광 계수 155mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> 를 이용해 측정했다.

[0044] **ROS 소거 활성**

[0045] Mishra 등의 문헌(2011, Arch Microbiol 193: 497-513)의 프로토콜에 약간의 변형을 가해 잎에서 프롤린 함량을 추정했다. 잎 조직(0.5 g)을 5 mL의 3% 술포살리실산에서 균질화시키고, 균질화물을 9000rpm에서 10분간 원심분리했다. 반응 혼합물은 2mL의 상등액, 2mL의 산 닌히드린 및 2mL의 빙초산으로 이루어졌다. 혼합물을 100 $^{\circ}$ C로 유지되는 수조에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 얼음 수조에서 냉각해 반응을 중단했다. 4mL의 톨루엔을 이

용해 수용액에 존재하는 착색된 구성성분들을 추출하고, 추출된 톨루엔의 흡광도를 520nm에서 측정했다. 프롤린 함량은 알고 있는 프롤린 농도로 만든 표준 곡선을 이용해 산출했다.

[0046]

항산화 효소 활성을 측정하기 위해, 막자사발을 이용해 신선한 잎 시료(약 500mg)를 액체 질소 중에 분말로 분쇄하여, -80℃에서 저장했다. 분말로 만든 시료(0.5g)를 50mM의 칼륨 포스페이트 완충액 및 1%(w/v) 폴리비닐피롤리돈 (pH 7.8)을 함유하는 용액 10mL 중의 얼음에서 균질화시키고, 4℃에서 10분간 유지했다. 균질화물을 여과한 후, 4,000×g에서 15분간 4℃로 원심분리했다. 상등액을 효소 추출물로 간주하여, 4℃에서 저장했다. 효소 추출물에서의 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(SOD), 아스코르베이트 퍼옥시다아제(APX) 및 글루타티온 신타아제(GSH)의 활성을 분광계로 결정했다. SOD 활성은 효소에 의한 니트로-블루 테트라졸륨(NBT) 광화학 환원 반응의 억제로 인한 흡광의 감소로 추정했다. APX 활성은 아스코르브산의 디히드로아스코르베이트로의 산화로 인해 일어나는 흡광에서의 감소를 측정하여 결정했다. APX 활성은 290nm에서의 소광 계수  $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  를 이용해 산출했다. 이어서, GSH 활성은 NADPH의 산화 측정치로서 취했으며, GSH는 340nm에서 소광 계수  $6.224 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  를 이용해 산출했다.

[0047]

**통계적 분석**

[0048]

무작위 블록 디자인을 종자 발아, 초기 생장 및 온실 실험에 이용했다. 결과로부터의 데이터를 정규화하여, 변량 분석(ANOVA)에 적용하고, 평균 유의차를 SAS package 9.1.3 service pack 4 을 이용하여  $P \leq 0.05$  에서의 t-Test (LSD) 로 비교했다. 막 지방산에 대한 히트맵은 MS Excel을 이용한 지방산의 백분율 데이터로부터 구축했다.

[0049]

**실시에 1. 토양 시료수집 및 물리화학적 특성**

[0050]

토양 물리화학적 특성을 표 1에 정리했다. 농지로부터 수집한 토양 시료는 대략 중성 pH였으며, 자연에서 염분이 없었고, 낮은 토양 온도를 시료에서 유일한 스트레스 요인으로 간주했다(표 1). 시료 수집 부위는 평균 토양 온도가 0.1 내지 2℃인 휴경 농경지이고, 1월 월평균 한국 대기 온도는 3.8℃였다.

**표 1**

수집된 토양 시료의 물리화학적 특징

Sampling Site	pH	EC ( $\text{dS m}^{-1}$ )	Organic matter (%)	N (%)	$\text{P}_2\text{O}_5$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	K	Ca	Mg Na Fe (extractable) ( $\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$ )		
								Mg	Na	Fe
Red Pepper	$7.0 \pm 0.02$	$0.8 \pm 0.04$	$1.06 \pm 0.03$	$0.05 \pm 0.0$	$844.4 \pm 78.6$	$0.2 \pm 0.02$	$7.2 \pm 0.24$	$0.8 \pm 0.03$	$0.3 \pm 0.02$	$7.9 \pm 0.07$
Field										
Soybean	$7.4 \pm 0.02$	$0.2 \pm 0.01$	$1.5 \pm 0.03$	$0.08 \pm 0.0$	$881.8 \pm 71.5$	$0.2 \pm 0.01$	$8.3 \pm 0.32$	$1.6 \pm 0.11$	$0.2 \pm 0.01$	$8.5 \pm 0.16$
Field										
Barley	$7.3 \pm 0.01$	$0.2 \pm 0.01$	$0.76 \pm 0.07$	$0.05 \pm 0.0$	$540.2 \pm 38.2$	$0.2 \pm 0.01$	$4.3 \pm 0.08$	$0.4 \pm 0.02$	$0.2 \pm 0.01$	$7.7 \pm 0.09$
Field										

[0051]

[0052]

**실시에 2. 저온발육성 박테리아의 분리 및 계통발생론**

[0053]

처음의 풍부화 후 MM 배지 상의 1 개의 선별 분리 균주에서, 육안으로 보이는 생장을 7 내지 28일 내의 아가 플레이트 상에서 수득했다. 40개의 표현형으로 구분되는 콜로니들을 집어내고, 정제하고 -80℃에서 저장했다. 16S rRNA 유전자 서열분석을 통한 계통발생적 분석은 분리 균주들이 아쓰로박터(*Arthrobacter*), 플라비박테리움(*Flavobacterium*), 플라비모나스(*Flavimonas*), 마실리아(*Massilia*), 페도박터(*Pedobacter*) 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속으로 구분되는 계통분기를 형성했다. 슈도모나스 속이 가장 많은 (22) 계통분기를 형성한 데 이어, 플라보박테리움(7), 아쓰로박터(5), 마실리아(3)가 그 뒤를 이었고, 플라비모나스 및 페도박터 속에서는 각각 1개씩 이었다 (도 1).



[0054]

실시예 3. 저온발육성 및 식물 성장 촉진 특징

[0055]

아쓰로박터, 플라보박테리움, 플라비모나스, 페도박터 및 슈도모나스 속을 나타낸 32개 분리 균주의 성장 온도 범위는 5 내지 35℃이고, 플라보박테리움 속의 2개 분리 균주는 5 내지 30℃의 범위를 나타냈고, 아쓰로박터, 플라보박테리움 및 마실리아 속의 6개 분리 균주들은 25℃ 미만의 온도에서는 성장하지 않았다. 배지 플레이트 상의 콜로니의 출현 비교 시, 5℃에서 콜로니 출현까지의 경과일수는 25℃에서의 것보다 상대적으로 더 길었다. 그러나 아쓰로박터 및 마실리아 속에 속하는 것들을 제외한 대부분의 균주들은 인큐베이션의 제 3일에 콜로니 출현을 나타냈다(도 2). 지방산 불포화효소의 구성적 발현을 조사하기 위한 지방산 분석은 모든 분리 균주에서 C<sub>16:1</sub> 불포화 지방산이 도처에 존재하며, 세포 지방산의 최고 백분율에 기여한다는 것을 보여줬다. 포화 C<sub>16:0</sub> 지방산의 비율은 모든 박테리아에서 불포화 지방산에 비해 더 낮았다. 지방산 및 불포화 C<sub>18:1</sub> 및 C<sub>17:1</sub> 지방산 유래의 분지형 이소 및 안테이소(anteiso)의 존재 유무를 또한 관찰했다. 분리 균주들 중 소수만이 스트레스 조건 하에 박테리아에 의해 생산되는 고리형 C<sub>17:cyc10</sub> 지방산을 보유했다. 유의한 백분율의 단쇄 지방산 (<C<sub>16</sub>)이 또한 존재했다(도 2).

[0056]

대다수의 균주(35가지의 균주)가 그람 음성이고, 분리 균주는 유일한 탄소원인 당 및 알코올을 이용할 수 있었다. 숙시네이트가 많이 가수분해 되었지만, 아세테이트는 그렇지 않았다. 페도박터(*Pedobacter*) 속을 제외한 거의 모든 분리된 아쓰로박터(*Arthrobacter*), 플라비모나스(*Flavimonas*), 플라비박테리움(*Flavobacterium*), 마실리아(*Massilia*) 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속은 말레이트를 이용하는 것으로 나타났다. 우레아를 가수분해하는 것으로 나타난 아쓰로박터 술폴레우스(*Arthrobacter sulfureus*) OB130의 경우를 제외하고는 우레아제 생산은 관찰되지 않았다. 5℃에서의 식물 성장 촉진 특징을 연구한 것은 그러한 생명유지 분자의 박테리아 발현에 대한 온도 스트레스의 영향을 보여줬다. 몇몇 분리 균주들은 인돌 아세트산, ACC 디아미나아제, 살리실산, 사이드로포어(siderophore)를 제공할 수 있고, 5℃ 미만의 온도 조건 하에 트리칼슘 포스페이트를 가용화시킨다. IAA 생산, ACC 디아미나아제 생산, 살리실산 생산, 사이드로포어 생산과 같은 식물 성장 촉진 특징들의 정량적 결과는 표 2 및 표 3에 제시한다.

표 2

5℃에서 분석된 분리물의 식물 성장촉진에 대한 특징

Strain	IAA production (µg/mL)		ACCD activity nmol α-KB mg <sup>-1</sup> protein h <sup>-1</sup>	Salicylic acid (mg/L)	P soublization	Siderophore production
	With trp	Without trp				
<i>Flavobacterium</i> sp. OR201	0.5 ± 0.04	0.2 ± 0	ND	1.1 ± 0.1	-	-
<i>Arthrobacter scleromae</i> OR302	1.1 ± 0.03	0.8 ± 0.09	ND	ND	-	-
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> OR204	1.6 ± 0.08	0.8 ± 0.01	ND	1.6 ± 0.5	+	+
<i>Arthrobacter oryzae</i> OR205	0.8 ± 0.03	0.4 ± 0.02	ND	ND	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp. OR306	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas migulae</i> OR307	1.1 ± 0.08	0.3 ± 0.03	ND	ND	+	+
<i>Pseudomonas moorei</i> OR108	1.0 ± 0.06	0.3 ± 0.03	ND	4.1 ± 0.3	+	+
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> OR309	2.7 ± 0.19	1.5 ± 0.05	ND	ND	+	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS210	0.3 ± 0.02	0.2 ± 0.02	ND	ND	-	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS211	ND	ND	ND	0.5 ± 0.1	+	-
<i>Pedobacter</i> sp. OS312	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas mohii</i> OS114	ND	ND	ND	ND	+	+
<i>Arthrobacter oryzae</i> OS115	6.2 ± 0.55	0.9 ± 0.15	ND	4.7 ± 0.5	-	-
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OS217	0.7 ± 0.09	0.4 ± 0.05	ND	0.3 ± 0.1	-	+
<i>Pseudomonas koreensis</i> OS319	3.2 ± 0.26	1.9 ± 0.03	0.20 ± 0.08	0.7 ± 0.1	-	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS320	ND	ND	ND	0.3 ± 0.1	+	-
<i>Massilia</i> sp. OS322	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Massilia</i> sp. OS123	0.4 ± 0.07	0.3 ± 0.05	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OS124	ND	ND	ND	ND	+	+

[0057]

표 3

표 2 계속

Strain	IAA production (µg/mL)		ACCD activity nmol α-KB mg <sup>-1</sup> protein h <sup>-1</sup>	Salicylic acid (mg/L)	P soubllization	Siderophore production
	With trp	Without trp				
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS225	ND	ND	ND	0.3 ± 0.1	+	+
<i>Arthrobacter sulfureus</i> OB130	2.7 ± 0.17	1.9 ± 0.09	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB133	1.3 ± 0.02	0.6 ± 0.1	ND	ND	+	+
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB134	ND	ND	ND	1.0 ± 0.1	+	+
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OB135	ND	ND	ND	1.4 ± 0.1	+	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB138	0.5 ± 0.01	0.4 ± 0.0	4.18 ± 1.20	ND	+	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB139	1.7 ± 0.01	1.1 ± 0.04	0.90 ± 0.39	ND	+	-
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OB342	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB243	2.9 ± 0.02	1.0 ± 0.03	1.73 ± 0.09	0.5 ± 0.1	+	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB145	6.1 ± 0.10	4.0 ± 0.05	1.56 ± 0.17	0.8 ± 0.1	+	-
<i>Flavobacterium sp.</i> OB146	ND	ND	ND	7.3 ± 0.2	-	-
<i>Flavobacterium sp.</i> OB148	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Arthrobacter scleromae</i> OB149	6.1 ± 0.08	1.8 ± 0.11	4.67 ± 0.06	ND	-	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS253	5.5 ± 0.09	2.4 ± 0.04	ND	ND	+	+
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> OB155	8.0 ± 0.05	3.1 ± 0.21	32.40 ± 0.55	1.0 ± 0.1	+	+
<i>Flavobacterium sp.</i> OS156	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.03	ND	ND	-	-
<i>Massilia sp.</i> OS258	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Arthrobacter scleromae</i> OS260	3.5 ± 0.04	1.6 ± 0.08	ND	2.1 ± 0.8	-	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS261	16.9 ± 1.15	13.7 ± 1.37	0.71 ± 0.16	0.6 ± 0.2	+	+
<i>Flavobacterium sp.</i> OS262	ND	ND	7.35 ± 0.44	ND	-	-
<i>Flavobacterium sp.</i> OS263	ND	ND	ND	ND	-	-

[0058]

[0059]

[0060]

실시예 4. 발아 검정 및 식물 분석

종자 발아 실험은 대조군 종자의 50%가 발아에 실패하는 발아에 대한 저온처리의 해로운 영향을 증명해왔다. 발아 실험의 결과는 저온 하에서의 조기 묘목 성장과 비교했다. 저온스트레스 조건에서 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주의 접종이 토마토 종자의 발아와 토마토의 성장에 미치는 효과를 측정한 결과, 종자발아의 경우 균주를 접종하지 않은 처리구의 경우 균주를 접종한 처리구에 비해 종자 발아율이 50% 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 균주를 접종한 처리구는 저온 (15°C)에서 종자가 모두 발아하는 것을 확인할 수 있었다. 신초와 뿌리 길이의 경우, 저온스트레스 조건에서 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주를 접종하였을 때, 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 신초와 뿌리의 길이가 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인하였으며, 각각 24.3%, 126.3% 증가하였다.

[0061]

두 실험 결과로부터, 15°C에서의 발아 및 식물 성장에서 지속적 증가를 나타냈던 균주는 슈도모나스 프레데릭베르겐 OS211, 플라보박테리움 글라시에 OB146, 슈도모나스 반코버런시스(*Pseudomonas vancouverensis*) OB155, 및 슈도모나스 프레데릭스베르겐시스 OS261였다. 그러한 균주는 온실 조건 하에 성장시킨 토마토에서의 그의 유효성 연구를 위해 선택했다.

[0062]

15°C/15°C(주/야)에서의 1주간 저온 처리 종결시, 식물의 냉해 및 항산화 구성 성분들의 정도를 설명할 식물 파라미터를 조사했다. 냉온 스트레스의 바이오마커인 전해질 누출 및 말론디알데히드 함량은, 저온 박테리아 처리의 토마토 잎에서 현저한 감소를 나타냈다(도 3a 및 3b). 그러한 처리들 중에서도, 균주 슈도모나스 반코버런시스 OB155는 냉온 스트레스 하에 잎 조직에서 전해질 누출 및 지질 과산화를 현저히 감소시켰다(도 3a 및 3b). 나아가, 슈도모나스 반코베렌시스 OB155 및 슈도모나스 페레데릭스베르겐시스 OS261 접종은 잎에서의 프롤린 함량의 현저한 증가 및 항산화 효소 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(SOD), 아스코르베이트 퍼옥시다아제 (APX) 및 글루타티온 리덕타아제(GSH)의 유도를 통해 증명되는 식물의 항산화 역량을 활성화시켰다(도 3c, 3d, 3e, 3f). 박테리아 처리는 일반적으로, 프롤린 함량 및 항산화 효소 발현의 증가를 통해 냉해를 줄이며 항산화 상태를 개선시키는 것으로 나타났다. 아스코르베이트 퍼옥시다아제 및 글루타티온 리덕타아제 발현은 대조군 식물에서보다 슈도모나스 반코베렌시스 OB155를 처리한 식물에서 현저히 더 높았다.

수탁번호

[0063]

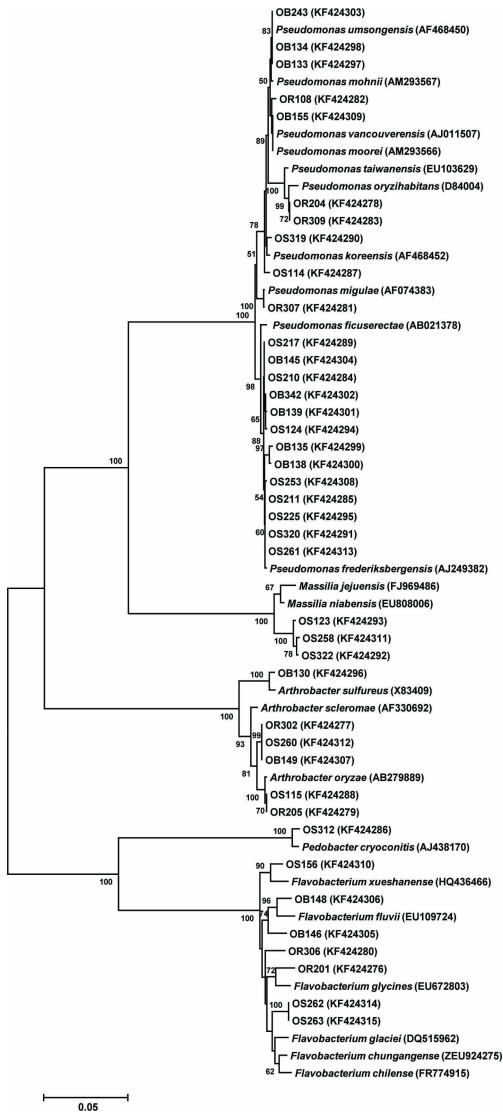
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC92024P

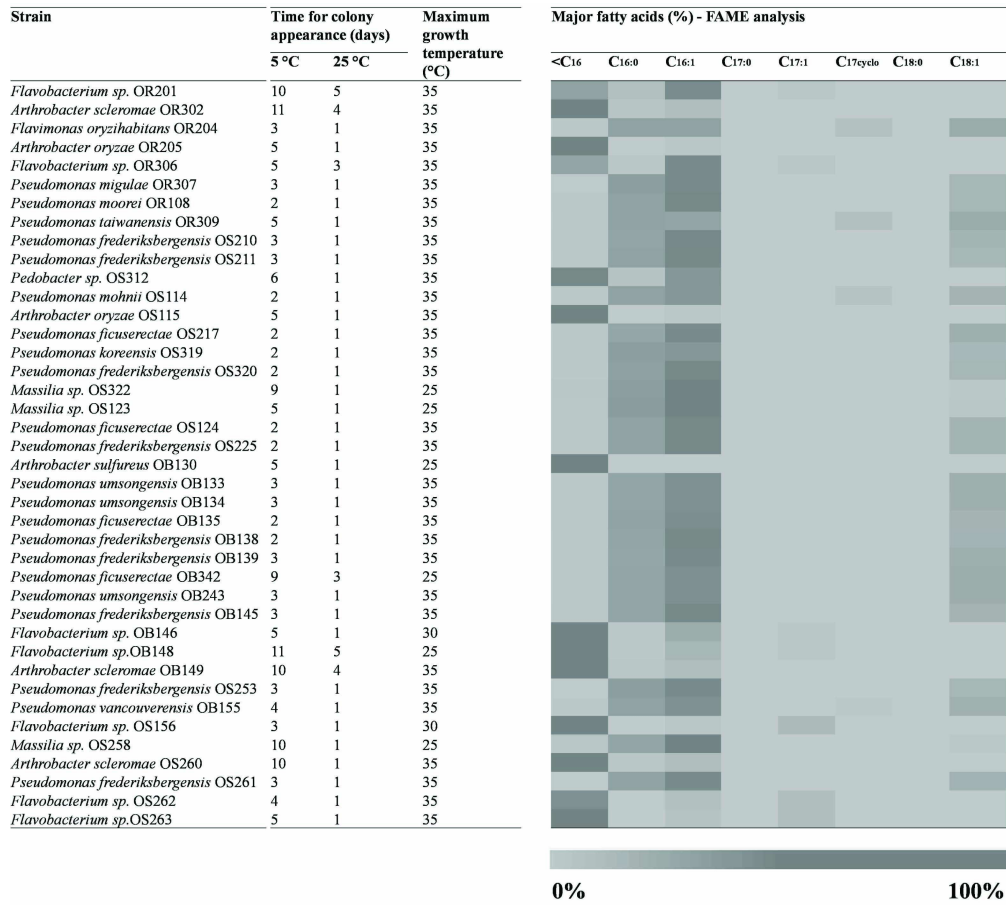
수탁일자 : 20150114

도면

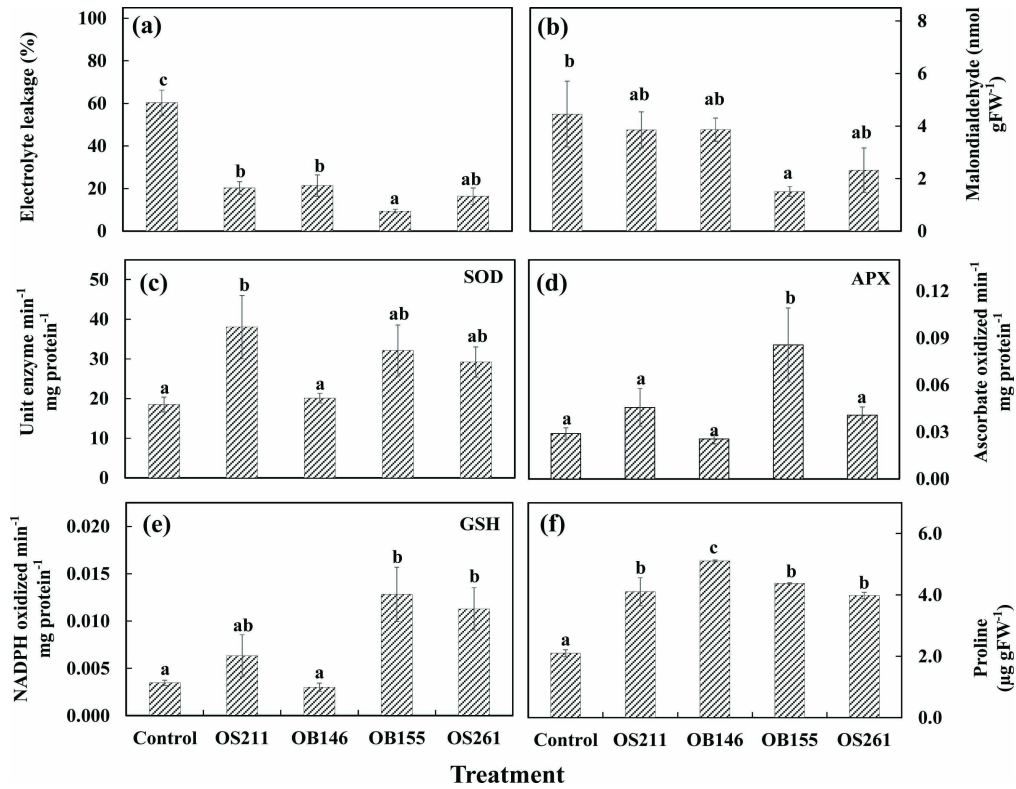
도면1



도면2



도면3



서열목록

- <110> Chungbuk National University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Pseudomonas vancouverensis OB155 strain promoting plant growth at low temperature and uses thereof
- <130> PN15012
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- agagtttgat cmtggctcag 20
- <210> 2
- <211> 22
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tacggytacc ttgttagcac tt

22