

Auxin과 항진균물질을 생산하는 식물생장촉진근권세균의 분리동정 및 특성

권도형 · 최준형 · 정희경 · 임종희 · 주길재¹ · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과, ¹경북대학교 농업과학기술연구소

(2003년 9월 4일 접수, 2003년 12월 11일 수리)

경작지 근권토양에서 식물생장촉진물질인 auxin과 항진균물질을 동시에 생산하는 농업용 미생물제제로 사용할 PGPR 균주를 선발하고 동정하였다. 경북 경산 일대의 다수확 밭토양의 근권토양에서 균주를 선발하고 그 중 auxin 생산성이 높은 2균주 K36, N21을 분리하였다. 이들 균주를 동정한 결과 K36은 *Pantoea agglomerans*이고 N21은 *Pseudomonas fulva*로 동정되었다. 선발된 균주의 식물생장촉진능을 *in vivo* 녹두발아촉진검사법으로 확인하였으며, 식물병원진균에 대한 길항력을 확인하였다. 배양조건에 따른 auxin 생산성을 조사한 결과 K36 균주는 pH 7.5, 35°C, 37시간에서 최대로 나타났고, N21 균주는 pH 7.5, 35°C, 20시간에서 최대값을 나타내었다.

Key words: auxin, 식물생장촉진, PGPR, *Pseudomonas fulva*, *Pantoea agglomerans*

서 론

식물은 체내에서 auxin을 합성할 수 있음에도 불구하고 재배 조건에 따라 외부에서 공급된 auxin에 대하여 생리적 반응을 크게 일으킬 수 있다. 1930년대 Thianmann과 Link는 *Rhizobium*에 의하여 auxin이 유도될 수 있다는 것을 최초로 보고하였고 그 후 많은 식물생장조절물질들과 그의 유도체들이 미생물에 의하여 생성될 수 있음이 보고되어 왔다.^{1,2)}

식물의 근권군서(rhizosphere community)를 구성하는 여러 근권미생물에는 식물의 생장에 많은 영향을 미치는 식물성장 촉진근권세균(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)이 존재한다는 사실이 주목 받게 되었으며, 이들 PGPR은 식물성장 촉진물질의 생산, 인 가용화, 질소 고정화 등 직접적인 성장 촉진영향과 식물병원성 미생물의 증식저해, 다른 근권미생물들과의 상호작용 등 간접적인 영향으로 식물의 생장에 큰 영향을 끼치고 있다.^{1,2,3)}

본 연구는 식물의 진균성병해를 억제하고 동시에 식물생장을 촉진하는 PGPR역할을 하는 근권토양미생물을 농업용 미생물 제제로 개발하기 위하여 경북 경산의 저병해 다수확 경작지의 토양에서 auxin과 병원진균 길항물질을 생산하는 근권미생물의 분리, 선발하고 이들을 분류학적으로 동정하였으며, 이들 균주의 auxin 생산에 관계하는 생리적 특성과 영향요인 등을 연구함으로써 식물생장촉진 근권미생물의 미생물제제로서의 이용가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

근권토양에서 Auxin 생산균의 분리. Auxin 생산균의 분리

원은 경북 경산시 남산면 일대의 다수확 대두경작지의 토양을 사용하였다. 균주의 분리방법은 토양 시료 1g을 멸균된 생리 식염수에 섞어 단계별로 희석하고 이들을 nutrient agar 배지, King's B medium(peptone No. 3 2%, K₂HPO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.15%, glycerol 1.5%, agar 1.5%)에 0.1 ml씩 도말하여 30°C에서 24시간 배양하여 colony를 분리하였다.

Auxin 생산능의 화학적 검정. 근권토양에서 분리한 균주 중 육안으로 형태가 다른 토양세균을 분리하여, L-tryptophan을 0.1% 첨가한 Nutrient broth 배지⁴⁾와 King's B broth 배지상에 1 loop씩 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 분리하여 상등액 2 ml와 Salkowski 시약⁵⁾ 4 ml를 섞어 30분간 반응시킨 후 반응액 3 ml를 분광광도계를 이용하여 535 nm로 확인하여 그 수치가 높은 균주를 auxin 생산 균주로 선발하였다.

선발된 균주의 동정. 최종적으로 auxin 생산성이 높고 식물 병원진균에 길항력이 있는 균주 2종을 선발하였다. 선발균주의 분류학적 동정을 위하여 *Bergey's manual of systematic bacteriology*의 세균분류동정지침서의 실험항목을 기준⁶⁾으로 하여 각 항목을 실험하였고, 최종적으로 *Biolog*사의 동정시스템인 *Microlog*TM3.01C system을 사용하여 검정, 동정실험을 하였다.

Auxin 생산 균주의 bioassay. Auxin류의 주요작용 중 하나가 발근촉진이며 이를 이용한 auxin생산 검정방법으로 실용면에서 가장 많이 이용되고 있는 녹두발근생검법(*Mungbean adventitious root induction method*)에 의해 수행되었다. 녹두 품종으로 선화녹두 종자를 사용하였으며 0.3% sodium hypochlorite 용액에 3분간 침지 소독 후 흐르는 수도물에 24시간 침종하고 무균토양에 파종하여 28°C, 5,000 Lux 광원 하의 식물배양실에서 5~7일간 배양한 후 제 1 본엽이 전개되고 첫 3소엽의 엽이가 다소 부풀어 있는 상태에서 녹두묘를 캐냈다. 균일한 크기로 선별된 녹두묘로부터 자엽을 제거하고 자엽 밑으로 하베축을 3 cm 남기고 예리한 칼로 절단한 후, Salkowski test에서 auxin 생산성이 높게 나타난 균주를 각 nutrient broth

*연락처

Phone: 82-53-810-2395; Fax: 053-811-4319

E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

와 King's B broth에 1 loop씩 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심분리한 상등액 50 µl와 멸균증류수 5 ml가 채워진 vial에 미리 위를 절단한 유묘 1개씩을 vial에 넣고 24시간마다 용액의 수준을 증류수로 일정수준까지 보충하여 동일한 환경조건하에서 연속조명으로 6일간 발근시킨 후 길이 1 mm 이상의 발근수를 계수하였다.^{7,8,9,10,11)}

TLC 이용한 IAA의 확인. Auxin 생산을 다시 확인하기 위해 Nutrient broth와 King's B broth에서 배양한 선발균주의 배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액을 ethyl acetate로 추출하여 silica gel 60 F₂₅₄를 이용한 thin layer chromatography (TLC)의 시료로 사용하였다. 이때 TLC의 전개액으로는 1-propanol, NH₄OH, H₂O를 6:3:1(v/v/v)로 혼합하여 사용하였고 발색분사시약은 Ehrlich시약¹²⁾을 사용하였다.

식물병원진균에 대한 선발균주의 방제력 검증. Auxin 생산 균주 K36과 N21을 *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* 등 식물병원진균을 시험대상균주로 하여 발육저지대 측정법(pairing plate culture)을 통하여 auxin 생산과 동시에 식물병해 방제력이 있는지를 검증하였다. PDA에서 식물병원진균과 선발균주의 발육저지거리를 측정하기 위하여 각각의 식물병원성 진균들을 6 mm 크기의 균체 disc로 접종하여 28°C에서 24시간 배양한 후 3 cm 떨어진 곳에 선발균주를 확선하여 28°C에서 계속 배양하여 병원진균의 성장이 억제되는지를 확인하였다.

Auxin 생산의 배양조건 조사. Auxin 생산성 균주를 nutrient broth와 King's B broth에 접종하여 배양시간(4~50시간), 배지 pH(pH 4.0~9.0), tryptophan 농도(0~0.2 g/l), 배양온도(20~50°C)에 따라 선발된 균주의 auxin 생산성과 균체량에 미치는 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

Auxin 생산균주의 선발. Auxin 생산성 식물성장촉진 근권미생물(PGPR)을 선발하기위해 경북 경산지역의 다수확 대두

Table 1. Auxin production in culture broth of selected microorganisms isolated from rhizosphere

Strain	Auxin concentration* (µg/ml)
N3	0.001
N4	0.001
N5	0.02
N11	0.02
N13	0.01
N14	0.03
N21	0.05
K2	0.01
K3	0.02
K17	0.02
K36	0.04
K50	0.01

*Estimated with calibration curve of Salkowski test results.

경작지의 근권토양에서 분리된 근권세균 528균주 중에서 auxin 생산능이 강한 N21 및 K36의 두 균주를 선발할 수 있었다 (Table 1).

Auxin 생산균주의 동정. Auxin 생산성이 높게 나타나고 식물병원진균에 대한 길항력이 있는 균주 2주 즉, K36 균주와 N21을 동정하기 위해 그람염색과 각종 배양학적, 생화학적 특성시험등과 Biolog사의 MicroLog 3.01C™ 동정시스템을 이용하여 확인 동정하여 본 결과 K36균주는 *Pantoea agglomerans*에 근연성을 보였으며, N21균주는 *Pseudomonas fulva*에 근연종으로 동정되었다(Table 2).

Auxin 생산 균주의 생물학적 검증. 근권토양으로부터 분리한 균주를 배양 후 원심분리한 상등액을 Salkowski 시약과 1:2(v/v) 반응시킨 후 535 nm에서 측정된 결과 K36균주와 N21균주의 배양 상등액의 흡광도 수치가 가장 높았다.

이 두 균주를 IAA와 함께 녹두발근생검법을 실시한 결과 (Table 3), K36은 평균발근수 16개가 확인되었고 N21은 평균발근수 5.5개가 확인되었다(Fig. 1, Fig. 2). 두 균주의 평균발근수는 IAA와 비교한 결과 시판 IAA(100 ppm)보다 더 많은 발근

Table 2. Identification of strain K36, N21 by their biochemical and cultural characteristics

Characteristics	K36	N21
Gram strain	-	-
Rod-Shaped/Endospore	(+)(-)	(+)(-)
Catalase test	+	+
Voges-Proskauer test	-	-
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of Casein	+	+
Gelatin	+	+
Utilization of Citrate	+	+
Formation of indole	-	-
Growth at pH 6.8, nutrient broth	+	+
5.7,	+	+
Growth at 30°C	+	+
40°C	+	+
50°C	-	-
Biolog (MicroLog 3.01C™)	<i>Pantoea agglomerans</i> (89%)	<i>Pseudomonas fulva</i> (91%)

Table 3. The effect of the auxin produced by strain *P. agglomerans* K36 and *P. fulva* N21 with *in vivo* mungbean adventitious root induction method

Strains	Number of adventitious roots in the mungbean rooting bioassay
K36	16.0 (ea)
N21	5.5
IAA (100 ppm)	4.5

Counting number of adventitious roots at 6 days after culture supernatant treatment.

All values are mean of four replicates.

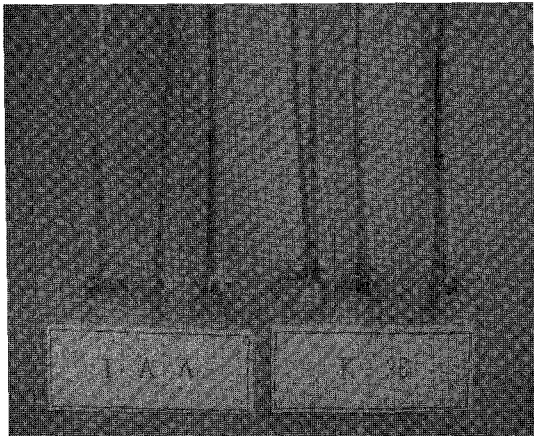


Fig. 1. Mungbean rooting bioassay of culture filtrate of selected *P. agglomerans* K36.

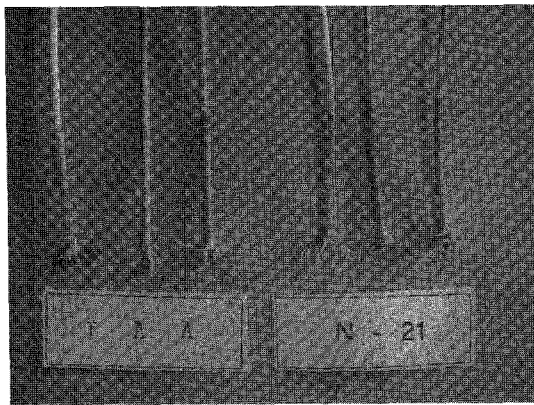


Fig. 2. Mungbean rooting bioassay of the culture filtrate of selected *P. fulva* N21.

수를 나타내었다. 이 결과로 보아 K36과 N21이 auxin 생산력이 뛰어난 PGPR임을 알 수 있었다.

TLC 이용한 auxin의 확인. 선발된 *P. agglomerans* K36 및 *P. fulva* N21 두 균주 배양액에서 auxin 생성을 확인하기 위해 표준 확인 물질로 indole acetic acid(IAA)를 이용해 TLC를 수행하였다. TLC상에서 IAA는 R_f값이 0.71 이었고 두 균주 배양생산물에서 동일 R_f치의 IAA유사의 auxin 물질이 확인되었다(Fig. 3). 이 결과를 Handbook of Thin Layer Chromatography^{13,14)}에 따라 두 균주가 생산한 식물생장촉진물질은 IAA와 동일하거나 유사한 auxin류 화합물임을 확인하였다.

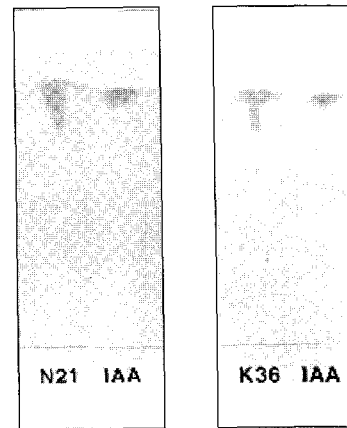


Fig. 3. TLC chromatogram of the auxin extracted from isolated strains.

Table 4. Antifungal antagonistic activity against plant pathogenic fungi by the selected auxin producing strains

Strain	<i>P. fulva</i> N21	<i>P. agglomerans</i> K36
<i>Fusarium oxysporum</i> (시드름병)	+	-
<i>Rhizoctonia solani</i> (줄기썩음병)	+	+
<i>Phytophthora capsici</i> (역병균)	-	+
<i>Monilinia fructicola</i> (잣빛곰팡이병)	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (균핵병)	-	-

선발된 auxin 생산균주의 식물병원진균 방제 spectrum. Auxin 생산균주 *P. agglomerans* K36과 *P. fulva* N21에 대한 발육저지대측정법으로 조사한 결과, *P. fulva* N21은 시드름병균 *F. oxysporum*과 근부병균 *R. solani*의 생육을 억제하였고, *P. agglomerans* K36은 *R. solani*과 역병균 *P. capsici*의 생육을 억제하였다.

배양조건에 따른 auxin 생산 영향. *P. agglomerans* K36은 20시간까지 대수 증식기를 보이고 20시간 이후에 정지기로 들어서는 것을 볼 수 있다. *P. fulva* N21은 유도기가 매우 짧았고, 15시간까지 대수증식기를 거쳐 그 후에 정지기로 들어서는 것을 볼 수 있었다. *P. fulva* N21, *P. agglomerans* K36 균주의 auxin 생산은 균주생장보다 지연이 되어 증가하다가 idiophase인 정지기에서 최고의 생산치에 이르렀다(Fig. 4, Fig. 5).

Auxin 생산에 미치는 배양온도의 영향. Auxin 생산과 균생육에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위해 여러 온도에서 배양한 결과 Fig. 6, Fig. 7에서 볼수 있는 바와 같이 *P. fulva* N21은 20~40°C에서 균생장이 이루어졌고 30°C에서 균생장율이 가장 높는데 반해 *P. agglomerans* K36은 20~45°C까지 비교적 넓은 범위에서 균생장이 이루어졌다. Auxin 생산은 두 균주 모두 35°C에서 가장 높게 나타났다(Fig. 6, 7).

Auxin 생산에 미치는 배지pH의 영향. 초기 배지pH에 따른 auxin 생산은 *P. agglomerans* K36 및 *P. fulva* N21 모두 pH 7.5 최대 생산치를 보여주었다. *P. fulva* N21은 pH 5.5와 9.5밖의 영역에서 생장을 하지 못하였고 *P. agglomerans* K36은 pH 4.0와 9.0 밖에서는 생장하지 못하였다(Fig. 8, 9).

Tryptophan 첨가가 auxin 생산에 미치는 영향. Tryptophan은 auxin 생성의 전구체로 알려져있다. 본 연구에서 선발한 균

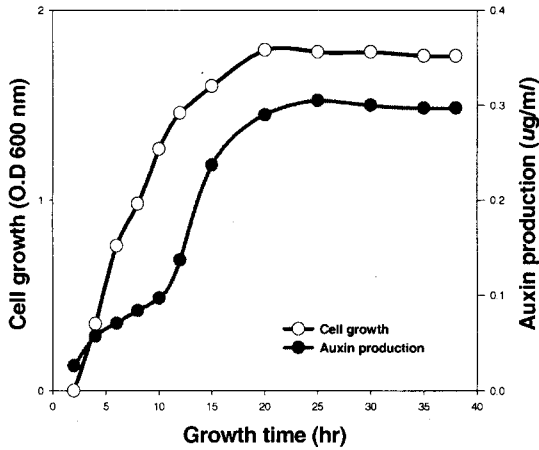


Fig. 4. The effect of incubation time on auxin production of *P. agglomerans* K36.

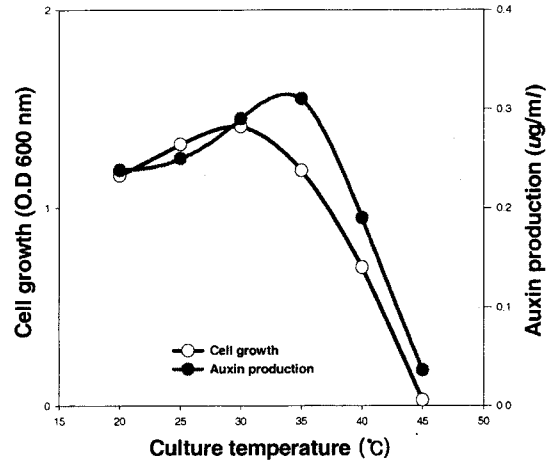


Fig. 7. The effect of culture temperature on auxin production of *P. fulva* N21.

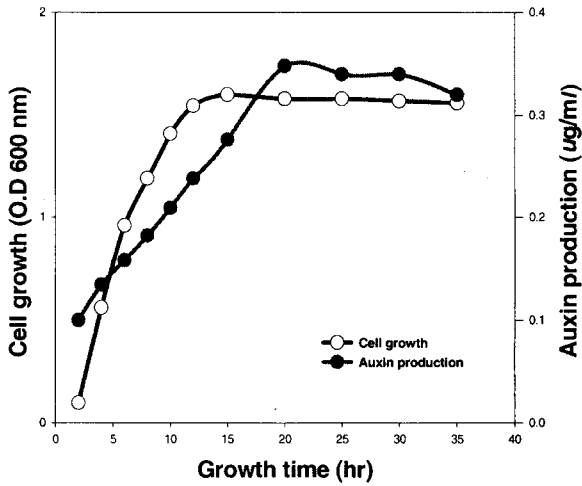


Fig. 5. The effect of incubation time on auxin production of *P. fulva* N21.

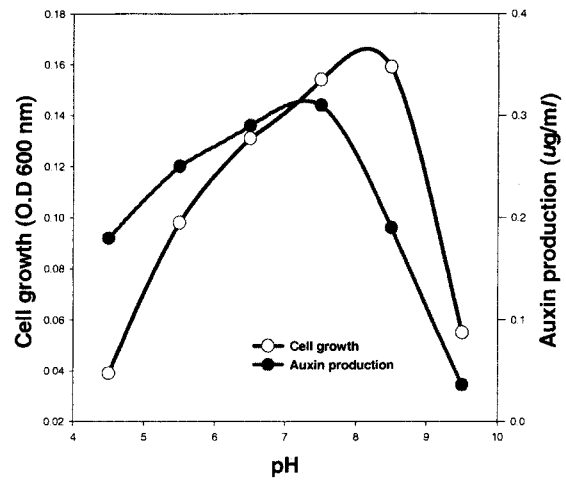


Fig. 8. The effect of initial pH on auxin production by *P. agglomerans* K36.

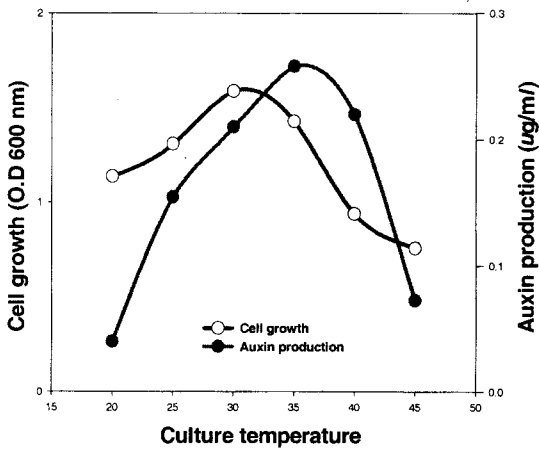


Fig. 6. The effect of culture temperature on auxin production of *P. agglomerans* K36.

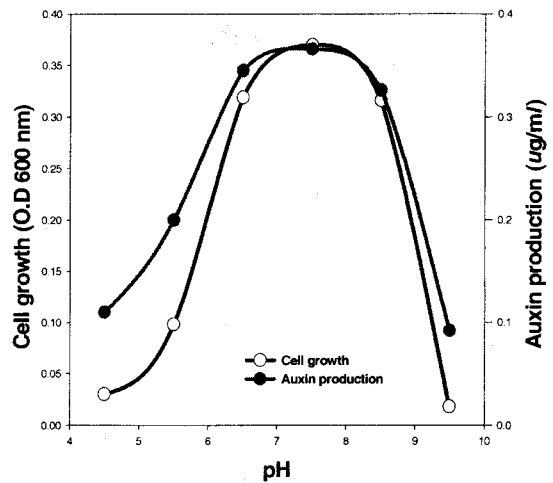


Fig. 9. The effect of initial pH on auxin production by *P. fulva* N21.

추가 auxin을 생산할 때 첨가된 tryptophan의 영향을 알아본 결과 Fig. 10에서 보는 것처럼 배지의 tryptophan 농도가 증가할수록 auxin 생산이 증가되는 것을 볼수 있다. Strzelczyk 등¹⁵⁾은

소나무의 균근으로부터 분리한 대부분의 미생물들은 auxin 생산에 기본적으로 배지에 tryptophan이 필요하였으며, 전구물질인 tryptophan이 없는 경우 auxin을 생산하지 못하였다고 보고

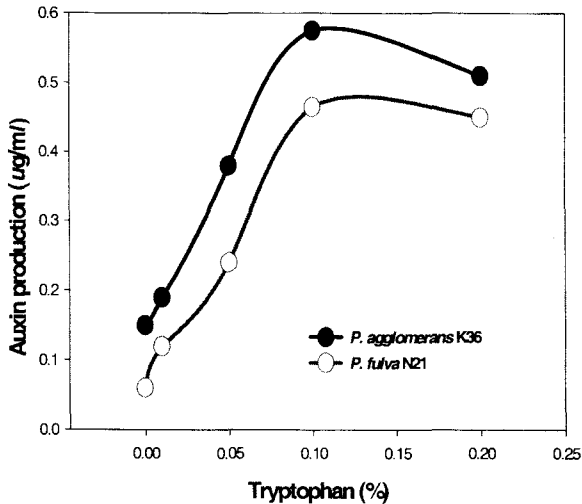


Fig. 10. The effect of L-tryptophan on auxin production by isolated strains.

하였다. *P. fulva* N21은 tryptophan 0.2% 첨가까지 auxin 생산이 높았고 *P. agglomerans* K36도 0.1% 첨가까지 auxin 생산이 가장 높았고 0.2%까지 아주 미비하게 감소되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen 21 사업(과제번호: 105649)에 의하여 수행되었으며 감사의 뜻을 표한다.

참고문헌

- Lumsden, R. D. (1981) In *The Fungal Community: Ecology of mycoparasitism*. D. T. Carroll (ed.), Marcel Dekker Inc, N. Y. pp. 295-328
- Meyer, F. H. (1966) In *Symbiosis: Mycorrhizae and other plant symbiosis*. S. M. Henry (ed.), Academic Inc, New York, USA. pp. 171-255.
- Shivanna, M. B., Meera, M. S. and Hyakumachi, M. (1994) Sterile fungi from zoysia grass rhizosphere as plant growth promoters in spring wheat. *Can. J. Microbiol.* **40**, 637-644.
- Sherma, J. and Fried, B. (1991) In *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. New York, pp. 795-800.
- Thomas, O., Dieter, G. D. and Dieter, H. (1991) IAA synthesis in the biocontrol strain CHO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2273-2279.
- Stowe, B. B. and Thimann, K. V. (1954) The paper chromatography of indole compounds and some indole containing auxins of plant tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **51**, 499-516
- John, P. B., Peter, H. A., Sneath, N. S. (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology*
- Blazick, F. A. and Heuser, C. W. (1979) The mungbean rooting bioassay: A reexamination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **104**, 117-120.
- Hess, C. E. (1961) The mungbean bioassay for the detection of root promoting substances. *Plant Physiol.* (suppl.) **36**, xxi.
- Hess, C. E. (1964) Naturally occurring substances which stimulate root initiation. *Cent. Natl. de la rech. Sci. Paris* **123**, 527.
- Lee, J. M. (1989) In *Bioassays of Plant Hormones and Plant Growth regulating substances*. Korean Society Crop Science, pp. 4-15.
- Lim, S. U., Lee, T. G., Sa, T. M. (1995) Isolation and physiological characteristics of auxin-producing soil bacteria. *J. Korean Soc. Soil.* **28**, 75-82.
- Lowell, E. W., Sylvan, H. W. and Harold, M. S. (1954) The detection of 3-indoleacetic acid in cauliflower heads. Chromatographic behavior of some indole compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 629-630.
- Loper, J. E. and Schroth, M. N. (1986) Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* **76**, 386-389.
- Strzelczyk, E., Kampert, M. (1984) Effect of pH on production of cytokinin-like substances by bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine. *Acta Microbiol Pol.* **33**, 77-85.

Selection and Identification of Auxin-Producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria having Phytopathogen-antagonistic activity

Do-Hyung Kwon, Jun-Hyung Choi, Hee-Kyung Jeung, Jong-Hui Lim, Gil Jae Joo¹ and Sang-Dal Kim (*Department of Natural Resource, Yeung Nam University, Kyoung San 712-749; ¹Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*)

Abstract: This study was investigated the physiological properties of auxin-producing bacteria that have plant growth promoting activity and plant pathogen antagonistic ability. Auxin-producing bacteria were isolated from field soils of Gyeongsan, Korea. Selected strains were identified as a *Pseudomonas fulva* N21 and a *Pantoea agglomerans* K35 by morphological and physiological test, and Biolog (Microlog) system. Auxins were determined by Salkowski *in vitro* test and mungbean adventitious root induction bioassay. Also produced indole-3-acetic acid (IAA) was identified by TLC. During cell growth, auxin production were highest in their idiophase after log phase and 35°C at pH 7.5.

Key words: auxin, antagonistic activity, PGPR, *Pseudomonans fulva*, *Pantoea agglomerans*