식물 생장 촉진 진균에 의한 담배의 생장 촉진과 뿌리 발달

홍은혜 · 이진옥 · 김수정 · Hualin Nie · 김영남 · 김지성 · 김선행

Growth promotion and root development of *Nicotiana tabacum* L. by plant growth promoting fungi (PGPF)

Eunhye Hong · Jinok Lee · Sujung Kim · Hualin Nie · Young-Nam Kim · Jiseong Kim · Sunhyung Kim

Received: 4 December 2020 / Revised: 18 December 2020 / Accepted: 18 December 2020

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Plant growth-promoting microorganisms promote plant growth by supplying nutrients to roots and interacting with the intrinsic factors in plants through volatile organic compounds (VOCs). In this study, we evaluated the effect of UOS, plant growth-promoting fungi (PGPF) isolated from previous study, on the growth of *Nicotiana tabacum* L. var Xanthi nc. Phylogenetic analysis and GC-MS were used to identify the fungal species and the VOCs emitted by the UOS, respectively. The fresh weight of UOS-treated *Nicotiana tabacum* L. was 3.8 and 4.2-fold higher than that of the control groups grown in vertical and I-plates, respectively. Moreover, in the UOS-treated plants, the length of the primary root was half and the number of lateral roots were twice compared to those in control plants. The UOS was identified as *Phoma* sp. by studying spore and mycelial morphology and using phylogenetic analysis. GC-MS revealed that the VOC emitted by the UOS was hexamethylcyclotrisiloxane (D3). These results suggest that the UOS of *Phoma* sp. influences plant growth and root development through D3. We expect this UOS and its VOC, D3 to be utilized in the future to increase growth and enhance yield for other plants.

Keywords Plant growth-promoting microorganism, Volatile organic compound, Hexamethylcyclotrisiloxane, *Phoma* sp., root development

서 언

토양 중에 존재하고 있는 미생물 중에는 식물에 병을 일으키는 병원성 미생물이 있고, 식물의 생장을 촉진하는 유용미생물도 존재한다. 이 중 식물 근권에서 서식하는 미생물을 근권미생물(rhizosphere microorganisms)이라고 하며, 이들 미생물 중에서 식물의 생장이나 생산성을 증가시키는 등 식물에게 이로운 작용을 하는 미생물들을 일반적으로 식물 생장 촉진 근권 미생물(Plant Growth-Promoting Microorganisms, PGPM)이라고 한다(Bhattacharyya and Jha 2012; Gray and Smith 2005).

이 식물 생장 촉진 미생물은 두 가지 기작을 통해 식물의 생장을 촉진시킨다고 알려져 있다. 첫 번째는 미생물들이 토양 및 식물의 근권에 존재하면서 식물 뿌리와의 상호작용을 통해 토양에 존재하는 영양성분의 공급을 원활하게 식물 내로 이동시켜서 식물의 생장을 촉진시키거나, 질소고정균과 같이 콩과식물의 뿌리에 뿌리혹을 형성시켜 공기 중의 질소를 고정하고 이를 통하여 식물의 생장을 촉진시킨다(Ashrafuzzaman et al. 2009; Bakker and Schippers 1987; Cakmakci et al. 2001; Datta et al. 2011; Egamberdiyeva 2007). 두 번째는 근권 미생물들이 특정 Volatile Organic Compound (VOC)를 분출하여 식물의 특정 내재 인자와 반응 및 상호작용을 하고, 이로 인해 식물 내 호르몬 변화, 유전자의 활성화 등의 현상이 일어나면서 식물 생장을 촉진시킨다(Jung et al. 2012; Kim et al. 2015; Ryu et al. 2003).

본 연구에서는 하르가이 배양 배지에서 분리한 UOS로 명명된 진균의 식물 생장 촉진 유도과 관련하여 식물 생장 촉진 진균(Plant Growth-Promoting Fungi, PGPF)과 담배(*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi nc.)간의 생장 촉진 반응성 탐색에 관한 연구를 수행하였다. 이는 UOS에 의한 지상부 생체중 증가

E. Hong · J. Lee · S. Kim · H. Nie · Y. Kim · J. Kim · S. Kim (✉)
서울시립대학교 환경원예학과
(Department of Environmental Horticulture, University of Seoul,
Seoul 02504, Korea)
e-mail: pge12006@gmail.com

와 뿌리의 특이적 발달과정에서 보듯이 UOS와 식물간의 직접적 또는 매개체를 이용한 간접적 식물 성장 유도가 작용한 것으로 보인다. PGPF에 의한 식물 성장 촉진, 뿌리의 측근발달 유도, 식물과의 상호작용 등의 정확한 기작은 추후 추가적인 연구가 필요할 것이다. 하지만 지상부 성장 촉진을 통하여 재배시기를 조절하거나, 측근의 발달을 유도하여 토양 영양분의 활용도를 증대시키는 등 농업적으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 VOC 물질로 분리된 hexamethyldisiloxane (D3)과 식물과의 직·간접적 상호작용을 연구하여 합성 및 산업적 이용도 가능할 것으로 판단된다.

그 동안의 Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) 또는 PGPF 연구는 식물과 미생물 간의 상호작용에 치중되어 있었다. 하지만 식물 성장 촉진 반응을 보이는 세균이나 곰팡이가 병원성을 나타내는 경우 농업에 직접적인 이용이 불가하여 직접적 이용이 가능한 식물성장 촉진 미생물로서 인정을 받지 못하였다. 하지만 식물에 병을 일으키는 병원균도 VOC의 분리를 통한 식물 성장촉진 반응 기작 연구나 포자체 이용을 통해 농업에 도움을 줄 수 있을 것이고, 이들이 식물의 성장을 촉진시키거나 다른 미생물과의 상호작용의 결과를 기초적으로 이용하게 된다면, 선발된 미생물이 병원성을 나타낸다고 하더라도 식물과의 상호작용을 이용하여 농업에 간접적으로 이용될 수 있을 것이다. 따라서 본 연구는 최초로 이러한 진균들에 대한 다각적 이용 가능성을 제시하고 있다.

재료 및 방법

균주의 분리

하르가이 기내 배양증식 중 하르가이의 생육 촉진 효과를 유도하는 특정 곰팡이를 선발하여 생육증진 효과를 보인 하르가이(*Urtica cannabina* L.) 배지의 일부를 채집하여 PDA배지에 배양하였다. 그리고 PDA배지에 나타난 미동정 진균을 단포자분리법으로 순수분리 하였다. 진균의 배지는 25°C의 항온기에 배양하면서 배지에 형성된 진균을 조사하였다. 형성된 진균의 포자를 살균수에 현탁하여 물한천배지(water agar)에서 발아시켰고, 현미경을 이용하여 단포자분리법으로 순수분리 하였다. 순수 분리된 진균은 PDA배지가 들어 있는 시험관에 이식 및 배양하여, PGPF 성능 검정 및 동정을 위한 실험에 사용하였다. 진균의 보관 및 변질 방지를 위해 일부는 멸균수를 넣은 바이알(vial)에 넣어 4°C 냉장고에 보관하였다.

본 연구에서는 식물 성장에 반응하는 분리된 진균을 UOS로 임의로 이름을 명명하여 실험을 진행하였다.

UOS의 식물 성장 촉진 효과 검증

UOS의 PGPF 효과를 확인하기 위해 성장 촉진 효과 조사와 성장상 조사 두 가지 방법으로 실험을 진행하였고, 식물은 실험에 모델 식물로 주로 쓰이는 담배, *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi nc.를 사용하였다.

성장 촉진 효과 확인을 위해 I-plate의 한쪽에는 담배 종자를 파종할 MS배지를, 다른 한쪽에는 진균을 키울 PDA배지를 분주하였다. MS배지에 파종할 담배 종자들은 1.5 ml 팔콘 튜브(falcon tube)를 이용하여 70% 알코올에 30초, 2% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)에 1분 30초간 소독한 후 멸균수로 5회 행구어 사용하였다. 소독한 종자는 I-plate의 MS배지 위에 10립 파종하였다. 28°C 기내배양 조건에서 10일 후 발아율을 측정하였고, 식물체의 균일성을 위해 발아된 식물체 중 5구만을 선별하여 사용하였다. 선별작업과 동시에 동일한 I-plate의 PDA 배지에는 아무것도 치상하지 않은 무처리구(control)와 UOS를 치상한 처리구와 같이 2그룹으로 구분하여 배양하였고, 14일째에 생체중을 측정하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

성장상 확인을 위해 Vertical plate에 PDA 배지를 분주하였다. 역시 배지에 파종할 담배 종자들은 1.5 ml 팔콘 튜브(falcon tube)를 이용하여 70% 알코올에 30초, 2% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)에 1분 30초간 소독한 후 멸균수로 5회 행구어 사용하였다. 소독한 종자는 Vertical plate의 PDA배지 윗부분에 22립 파종하였다. 28°C 기내배양 조건에서 10일 후 발아율을 측정하였고, 식물체의 균일성을 위해 발아된 식물체 중 10구만을 선별하여 사용하였다. 선별작업과 동시에 동일한 Vertical plate의 아래 부분에 아무것도 치상하지 않은 무처리구(control)와 UOS를 치상한 처리구와 같이 2그룹으로 구분하여 배양하였고, 14일째에 생체중을 측정하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

UOS 동정을 위한 Internal Transcribed Spacer (ITS) 분석과 형태학적 특성 파악

UOS의 ITS region을 확보하기 위해, Genomic DNA를 추출하였다. UOS를 PDA 배지상에 28°C에서 14일간 배양하여 형성된 포자를 소량 건어내어 breaking buffer 100 µL (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8)가 포함된 glass beads에 넣고 30초간 혼합 하였다. 60°C water bath에서 30분간 heating 하였으며, 매 10분마다 30초간 vortex한 뒤, phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)을 100 µL 첨가하여 5분 동안 vortex 하였다. 13,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하고, 상등액 80 µL을 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) 720 µL가 포함된 마이크로 튜브에 옮겨 gDNA를 확보하였다.

추출한 DNA는 PCR (Polymerase chain reaction : 중합효소 연쇄반응)을 위한 주형 DNA로 사용되었으며, ITS region 증폭을 위해 ITS1_Forward primer (5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3')과 IT-4_Rreverse primer (5'-GGTCCGTGTTTCAAGA CGG-3') 및 PCR mixture (MG 2X Taq PreMix)가 혼합되어 수행되었다. PCR 혼합물을 5분간 94°C로 이루어진 initial denaturation 단계, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 annealing 단계, 72°C에서 1분 extension 단계로 35번 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 3분 final extension 단계를 수행하였다.

증폭된 PCR산물은 Labopass™ PCR Purification Kit (CosmoGen, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 생성물은 TA클로닝 (rapid cloning)을 위해 pTOP TA V2 vector (Macrogen Co., Seoul, Korea)에 ligation 하였다. Ligation된 vector를 *Escherichia coli* DH5α (Macrogen Co., Seoul, Korea)로 형질전환시켜, ampicillin (100 µg mL⁻¹), kanamycin (50 µg mL⁻¹), isopropyl-β-D-thiogalactoside (0.2 mM), X-gal (50 µg mL⁻¹)가 함유된 Luria Agar 플레이트에 도말 하였다. 형질전환된 백색 콜로니만 선발하여, plasmid prep을 수행하였고, EcoRI 제한 효소 분해에 의해 확인된 band는 sequencing 되었다.

UOS의 ITS 서열을 분석하기 위해 DNA star software program (DNASTar Inc. WI., U.S.A)으로 분석하여 염기서열의 정렬을 수행하였다. 비교 표준 균주의 염기서열은 미국국립 생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에서 BLAST 네트워크 서비스를 이용하여 Gen Bank 데이터베이스에 등록된 균주의 정보를 이용하여 UOS의 ITS 유전자 서열의 계통 발생학적 분석을 계통 유연성 분석 (Phylogenetic Tree Analysis) 프로그램인 Mega software version 6.0과 neighbor-joining 방법(Kimura's two-parameter algorithm)에 따라 유연관계도(phylogenetic tree)를 분석하였다. 계통 건고성을 확인하기 위해서 1000회 반복으로 bootstrapping을 수행하였다.

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)를 이용한 UOS가 생산하는 Volatile Organic Compound (VOC) 분석

UOS가 생산하는 Volatile Organic Compound (VOC) 분석을 위해 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)를 이용하여 D3을 동정·확인 하였다.

VOC를 효과적으로 생산하기 위해, UOS를 PDA 배지 상에 28°C에서 14일간 배양하였다. 배양된 균주를 agar block 형태로 PDB 100 mL이 포함된 flask로 옮겨 7일간 28°C, 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양기간 동안 flask는 실리콘마개와 파라필름으로 밀봉하였다. VOC 분석을 위해, 배양된 flask의 실리콘마개 사이로 10 mL 주사기를 사용하여 기체를 10회 포집하여 헥산에 녹여 sample을 획득 하였다. Control sample은 PDA agar block을 사용하였으며 상기 방법과 동일하게 하

였다. GC-MS (6890N GC/5975C MSD)분석에는 DB-5MS 컬럼을 사용하였고 분석조건은 다음과 같다. Sample injection: 5 µL, solvent wash: 1 µL, sample wash: 5 µL, Mode: splitless, Scan parameters: 10 ~ 550, Flow rate: 1 mL/min, Post run temperature: 250°C로 설정되었고, Oven 설정은 초기에 30°C에서 3분 머물고, 10°C/min 속도로 180°C까지 승온 시키고 10분간 머물고, 다시 40°C/min 속도로 200°C까지 승온 시키고 2분간 머물러 총 30.5분으로 설정 되었다.

결 과

식물 생장 촉진 반응성 검증

식물 생장 촉진 미생물은 식물과의 직접적 접촉 또는 미생물에서 발생하는 VOC에 의해 식물 내재 인자와의 상호작용 (식물 생장 호르몬 분비 촉진, 식물의 질소 동화 능력 대사 과정 증진 등)에 의해 식물 생장의 생장을 촉진하게 된다(Kim et al. 2015; Orhan et al. 2006; Zou et al. 2010). 본 연구에서는 하르가이 배양 배지에서 분리한 UOS가 식물생장을 촉진시키는지에 대한 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 실험에 사용한 UOS를 이용하여 식물 뿌리와 상호작용을 통한 영양 공급에 따른 생장 촉진과 미생물로부터 생성된 특정 VOC에 의한 작용 중 UOS가 어떤 기작에 의해 식물 생장 촉진을 유도하는지 밝히고자 한다.

본 실험에서는 식물-UOS 간 식물생장 촉진 반응 실험을 위해 담배(*Nicotiana tabacum* L. var Xanthi nc.)를 사용하였고 위에서 언급한 두 가지 가설 중, UOS와 담배와의 상호작용 가능성을 증명하기 위해 담배-UOS의 직접적 반응 확인을 위한 Vertical plate 실험과, VOC 등 담배-UOS 간의 매개체에 의한 상호작용 확인을 위한 I-plate 실험을 병행하였다(Fig. 1).

담배를 10일간 MS 배지에서 생장시킨 후, PDA 배지에서 7일간 배양시킨 UOS를 병행배양 하였고, 병행배양 14일 후 생장차이를 확인하였다. UOS 처리구에서 식물의 생장이 control과 비교할 때 약 3.8배의 생장 차이를 나타내었다. 이는 UOS가 특정 상호작용에 의해 담배의 생장을 촉진시키는 것을 나타내고 있다.

Fig. 1A의 실험으로는 식물 생장 촉진 반응이 UOS에 의해 직접적으로 일어나는지, 매개체를 통해 간접적으로 일어나는지에 대한 확인이 불가능하기 때문에 식물의 생장 촉진 대사 경로를 확인하기 위해 Fig. 1B와 같이 식물과 UOS를 분리하여 식물 생장 촉진 실험을 수행하였다. 식물 생장 촉진 실험은 I-plate의 분리된 부분을 이용하여 UOS와 담배를 14일간 병행배양하여 식물의 생장상을 확인하였다. 그 결과 Fig. 1B와 같이 UOS 처리구에서 식물의 생장이 control에 비해 4.2배 증가하는 것으로 나타났다.

식물 생장 촉진 미생물과 식물과의 상호작용은 위에서 언급

Fig. 1 Tobacco growth reaction by UOS. (A) Growth effects of UOS interaction with plant in vertical plate. Fresh weight was investigated 14 days after sowing tobacco using PDA medium on a vertical plate. (B) Growth effects of UOS interaction with plant on an I-plate. Investigation of growth on the 14 days after sowing tobacco using MS medium on an I-plate. Control, no treatment; *Phoma*, UOS. The results are the mean $\pm$ standard error ($n=5$)

한 것처럼 두 가지 기작을 통해 식물-미생물 상호작용에 의한 생장촉진 반응이 나타나게 되는데, 본 실험에서는 두 가지 기작 모두가 가능성이 있다고 판단된다. UOS가 식물 뿌리 부분이나 줄기부분에 밀착하여 MS 배지상의 영양성분의 이용효율을 높일 수 있을 것이고, 현재까지 보고된 연구들과 같이 UOS가 특정 VOC를 분출하여 식물의 내재성 생장 촉진 요인 인자와의 상호작용을 통한 식물의 생장을 촉진시킬 수도 있을 것으로 보인다.

종자식물의 뿌리 발달은 초기 배에서 옥신의 내재 합성에 의해 주근(primary root)이 유도되고, 주근이 유도된 후 주근 안측의 내초(pericycle) 세포의 분화에 의해 측근(lateral root)이 발생된다(Hochholdinger and Zimmermann 2008; Hochholdinger et al. 2004; Peret et al. 2009). 내초세포에서 분화된 측근은 식물 주변의 토양으로부터 영양분, 수분 흡수의 주요 경로로 이용된다. 농업적 관점에서 측근의 발달 유도는 식물의 생장촉진 증대, 토양 중 영양성분 이용효율 향상 등에 활용될 수 있다. 토양 유용미생물 중 본 연구실에서 분리한 *Bacillus subtilis* strain JS를 처리한 담배의 뿌리에서도 대조구와 비교하여 측근이 발달되며 주근의 길이가 짧아지는 효과를 보이고 있다(Kim et al. 2015). 본 실험에서 사용한 UOS를 처리한 담배의 경우 역시 주근의 길이가 약 2배 정도 짧아지며, 측근의 개수가 약 2배정도 증가했다(Fig. 2). 측근의 증가는 옥신의 과다 외부 투여에 의해서도 나타나는 현상이다(Blakely et al. 1988). 따라서 UOS와 식물간의 상호 작용에 있어 특정 매개체 또는 직접적 영향에 의해 식물 내재성 옥신의 증가가

Fig. 2 Tobacco root development by UOS (Control, no treatment; *Phoma*, UOS)

동반되었다고 볼 수 있을 것이다. 식물이 환경 스트레스 내성을 극복하는 방법 중에서 측근의 수를 증가시켜 토양중의 수분을 보다 효율적으로 이용되는 방법은 이미 알려진 사실이다. 일부 토양 유용 미생물들이 식물의 측근 수를 증가시켜 스트레스 내성 부여 등을 하는 점을 이용하여 농업에 이용되어 왔다. 이러한 이용 방법은 토양 유용 미생물의 직접적 이용에 국한되어 있으나, 본 연구에서 나타난 것처럼 병원성을 나타내는 미생물의 경우도 작용 기작을 이용하여 농

업에 활용될 것으로 기대된다. 또한 이러한 측근과 뿌리털의 발달은 토양내의 뿌리 면적 증가를 통한 수분 및 영양분의 우위성을 가지게 하므로 스트레스 저항성을 부여할 수 있을 것으로 판단된다.

계통발생학 및 형태학적 특성

Malt extract agar에서 배양된 UOS의 morphology 및 현미경을 통한 포자 및 균사 관찰 결과, Sustainable mycology에서 search된 *Phoma* sp.와 같은 morphology를 보였다(Fig. 3A). 포자 및 균사 형태를 이용한 진균의 동정에서, 보다 더 정확한 분류속(genus) 내 종(species)을 결정하기 위해서 높은 신뢰도를 나타내는 Internal Transcribed Spacer (ITS) 유전자 염기서열분석 방법을 이용하였다.

UOS를 성장시킨 후, DNA를 추출하여 획득한 상등액을 PCR 수행한 결과, 균주의 전체 DNA 추출물로부터 513개의 nucleotide로 구성된 ITS 유전자 염기서열을 분석하였다. 분석된 ITS 유전자 염기서열과 NCBI GenBank database에 등록된 균주의 정보를 대상으로 계통 발생학적 분석 결과, *Phoma* sp.와 높은 상동성을 보였다. UOS의 16S rDNA 염기서열은 *Phoma herbarum* strain 12.02.21 (KP739881.1) (99%), *Phoma herbarum* strain TS08-56-3 (AB470886.1) (99%), *Phoma* sp. strain xz26 (KJ935027.1) (99%) 등 *Phoma* 속 균주들과 높은 상동성을 보였다(Table 1). 이 결과를 바탕으로 Neighbor-Joining 법, Maximum likelihood 법, Maximum parsimony 법으로 각각 계통도(phylogenetic tree)를 작성하여 그 결과를 Figure 3B에 나타내었다. 따라서 포자 및 균사의 형태, 유전적 분석의 결과를 종합하여 볼 때 UOS를 *Phoma* sp.로 동정하게 되었다.

Fig. 3 UOS identification by studying morphology and analyzing phylogenetic tree using ITS region. (A) Investigation of spores and mycelium morphology of isolated fungi for identification of PGPF. Culture type and picture of mycelium of *Phoma* spp. presented in Sustainable mycology (<http://sustainablemycology.blogspot.com/search?q=phoma>) and PGPF isolated in this study. (B) Genetic identification of fungal species through amplification of the ITS region. Bootstrap values expressed as percentage (over 1,000 replicates) are shown at the corresponding nodes

Table 1 Identification of UOS by analyzing the ITS region

Isolate	Organism ITS identified	% ITS identity	No. of ITS matches/ no. identified in GenBank
UOS	<i>Phoma herbarum</i> strain 12.02.21 (KP739881.1)	99%	536/542
	<i>Phoma herbarum</i> strain TS08-56-3 (AB470886.1)	99%	536/542
	<i>Phoma</i> sp. strain xz26 (KJ935027.1)	99%	535/542
	<i>Neodidymelliopsis</i> sp. strain 1 NV02016 (LT592957.1)	99%	528/534
	<i>Ascochyta</i> sp. strain AM2 (KF263920.1)	98%	534/544
	<i>Phoma herbarum</i> strain WAC:13435 (JQ282910.1)	98%	520/528
	<i>Neodidymelliopsis</i> sp. strain CF-286681 (MG065745.1)	99%	515/521

The ITS region of UOS was analyzed using LaserGene Software (DNASar Inc., Madison, WI, USA) and BLAST Network Services (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA).

Fig. 4 GC-MS analysis of VOCs emitted by UOS (Blue peak: Control, black peak: UOS treatment)

Volatile Organic Compound (VOC) 결정

토양 유용미생물의 식물 성장촉진 반응 중 식물 내재성 호르몬의 증가, 토양 유용성분의 효율 증진 등 여러 가지 결과들이 보고되었는데, 최근 연구에서는 식물 성장 촉진 미생물이 분출하는 VOC에 의한 식물 내재성 인자의 반응성 촉진 등의 결과가 보고되고 있다. 본 실험에서는, Figure 1B에서 I-plate에서의 식물 성장 촉진 반응성이 나타난 것으로 보아, UOS에서 특정 물질 분비에 의한 식물 성장 촉진이 나타났을 것으로 추측된다. 따라서 UOS가 분출하는 VOC를 포집하여 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) 분석을 수행하였다. 재료 및 방법에 제시한 방법으로 VOC를 분석한 결과, 7.3~7.4분 사이에 분자량 222.46 ($C_6H_{18}O_3Si_3$)을 갖는 D3을 확인하였다(Fig. 4).

D3은 *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*에 넓은 항생균 효과를 갖는다고 보고되어 있다(Dilek et al. 2012). 하지만 현재까지 식물 성장 촉진 반응에 대한 연구는 보고되지 않고 있다. 따라서 본 실험에서 동정된 D3의 직접적 처리에 의한 식물 성장 촉진 반응이 보여 진다면 미생물 유래 물질의 화학적 합성을 통한 화학적 비료로써의 이용도 가능해질 것으로 보인다. 이를 위해서는 D3의 어류 독성, 식물과의 반응성 등의 추가 실험이 필요할 것이다.

본 결과는 미생물에 국한되지 않고 파생 물질의 가능성을 보여줌으로써 UOS를 직접적으로 이용하지 않더라도 식물과의 반응성 등의 가능성을 제시하였다.

고 찰

PGPF 처리에 의한 식물 성장 촉진에 대한 기작은 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만 1) 작물의 근권 및 토양에 존재하는 해로운 미생물과의 경쟁이나 항생물질 생산에 의한 직접적 억제제를 통한 성장 촉진, 2) 생물 조절인자 생산에 의한 성장 촉진, 3) 뿌리에 정착하여 식물이 직접적으로 이용가능하게

하는 영양분의 분해를 통한 성장촉진 등의 결과들이 보고되고 있다(Shivanna et al. 1994).

Meera et al. (1994)는 잔디에서 분리한 PGPF 균주를 보리코립배지에 배양한 후 토양에 처리하여 오이의 성장 촉진 효과를 보고하였고, 이 성장 촉진 효과는 뿌리의 정착과 밀접한 관계가 있다고 하였다. 또한 이들 균주의 균사체 및 배양여액을 종자에 처리한 경우에도 성장 촉진 효과를 나타낸다고 하였다. Shivanna et al. (1994)는 PGPF가 생산하는 특정 VOC가 일부 식물에 성장 촉진 효과를 일으키며, 이 PGPF의 성장 촉진 능력은 성장 조절 물질 생산에 크게 작용한다고 보고하였다.

본 실험에서는 하르가이 배양 배지에서 분리한 UOS로 명명된 진균의 식물 성장 촉진 유도과 관련하여 PGPF와 담배간의 성장 촉진 기초연구를 수행하였다. 분리된 UOS에 의한 담배의 지상부 생체중 증가 및 뿌리의 특이적 발달로 추측하건대, 해당 PGP 효과는 UOS와 식물간의 직접적 상호작용에 의한 것이거나, 매개체를 이용한 간접적 식물 성장 유도가 작용한 것으로 보인다.

과거에 PGPF는 식물의 성장과 발달과정에 관여하는 것으로 보고되었다. 한 가지 예로, M3와 OSU-142의 현장적용은 보리, 사탕무 등의 작물에 수확량 증가와 품질 향상을 가지고 왔다(Cakmakci et al. 2001, 2006). PGPF에 의한 근권에서의 양분 이용활성도를 증가시켜 원예작물의 과실 크기 등을 증가시키는 보고가 있다(Orhan et al. 2006; Park et al. 2010). 그러나 현재까지의 연구에서는 PGPR과 다르게 PGPF에 대한 연구는 기내배양(in vivo) 조건 대상으로 적용되었고 실험 대상 식물은 필요한 영양분을 충분하게 공급받았기 때문에, 관찰된 긍정적인 성장 효과는 식물 호르몬 생성에 의한 결과라는 생각이 신빙성을 얻는다. PGPF에 의해 유도되거나 생성된 식물 호르몬에 의한 성장 촉진 효과는 식물의 동화-분배(assimilation-partitioning) 패턴을 변화시키고, 성장과 결실 과정을 변화시키는 것으로 생각된다. 본 연구의 결과 역시 *Phoma* sp.가 식물의 성장을 촉진시킬 가능성이 있다는 것을 제시하였다. 분리된 진균과 병행배양 실험(Vertical plate / I-plate 실험)에서 *Phoma* sp.는 담배 묘목의 지상부 생체중을 현저하게 증가시켰다. 이러한 관측은 *Phoma* sp.의 식물생장

촉진 효과가 *Phoma* sp.에 의해 생성된 휘발성 물질에 의한 것임을 시사한다. 또한 *Phoma* sp.를 처리함으로써 담배 묘목의 주근이 굵고 짧아지면서(Primary root) 곁뿌리, 뿌리털(Root hair)이 발달하는 현상이 발견 되었는데, 이러한 효과는 Auxin의 과다발현에 따른 식물뿌리의 발달 양상과 유사하다(Fukaki et al. 2007; Okushima et al. 2005; Wang et al. 2019). 이러한 식물 생장 촉진 과정 중의 뿌리 발달의 이상 변화는 분리된 진균이 지상부의 경우 생체중을 증가시키지만 뿌리 발달 과정 중에서는 내재성 옥신 함량 증가를 유발시켜 측근의 과발달을 유도시킨다고 추측된다.

본 연구에서는 선발된 PGPF 균주에 의한 식물 생장 촉진의 정확한 기작은 밝혀내지 못했으나, 다른 수행되어진 결과들을 통해 UOS에서 유래된 VOC의 휘발에 의한 식물의 신호전달에 의해 식물의 생장이 촉진되는 것으로 추측된다. 하지만 본 실험에서 분리된 D3가 직접적으로 식물 생장 촉진에 영향을 미치는지에 대한 여부는 추가 실험이 필요할 것이고, D3에 의한 식물 생장 촉진에 영향을 미치는 식물 내재 유전자군에 대한 기능성 연구 또한 필요할 것이다.

본 실험에서 분리된 PGPF가 식물 생장 촉진 및 뿌리의 측근발달 등을 유도하고 정확한 식물과의 상호작용을 연결하는 기작은 추후 연구가 필요하겠지만, 농업적 이용, 즉 측근의 발달을 유도시켜 토양 속 영양분의 활용도 증대 등을 추구할 수 있을 것이다. 또한 VOC 물질로 분리된 D3의 직·간접적 식물과의 상호작용을 연구하여 합성 및 이용도 가능할 것이다.

Phoma spp.는 식물 병원균으로 알려져 있다(Gao et al. 2013). 사과 무름병 등을 유발시키는 등 농작물에 피해를 입히는 병원균이지만, 균 자체의 이용이 아닌 균과 식물과의 상호작용 관계를 이용하여 길항작용, 생장 촉진, 뿌리의 발달과정 등에 대한 기초연구결과를 바탕으로 VOC 물질인 D3의 화학적 농약 물질로서의 이용가능성을 볼 수 있었다.

현재까지의 PGPR 또는 PGPF 연구는 식물과 미생물 간의 상호작용에 치중되어 있기 때문에 식물 생장 촉진 반응을 보이는 세균이나 진균들이 병원성을 나타내는 경우에는 직접적 이용이 불가하여 이용이 가능한 개체로써 인정을 받지 못하였다. 하지만 식물에 병을 일으키는 병원균일지라도 식물과의 상호작용에 초점을 둔다면 VOC 등의 이용, 병원성을 일으키지 않는 포자체의 자체 이용 등으로 농업에 도움을 줄 수 있을 것이다. 따라서 본 연구는 최초로 이러한 진균들에 대한 다각적 이용 가능성을 제시하였다.

적 요

식물생장촉진 미생물은 식물 뿌리에 영양을 원활하게 공급하거나 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Compound, VOC)를 이용하여 식물의 내재 인자와 상호작용을 통해 생장을 촉

진한다. 본 연구에서는 식물 생장 촉진 진균 UOS의 담배에서의 생장 촉진 효과를 평가하고, 계통발생학적 분석을 통해 동정하였다. 또한, UOS의 식물 생장 촉진 인자를 탐색하고자 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) 분석을 통해 UOS의 VOCs를 확인하였다. UOS를 처리한 담배는 무처리구에 비해서 3.8배의 생중량이 증가하였고, I-plate를 이용한 분리된 공간에서는 UOS처리구가 무처리에 비해 생중량이 4.2배 증가하였다. 또한, UOS 처리구의 식물은 주근의 길이가 약 2배 짧아지고 측근의 수가 약 2배 증가하였다. UOS은 포자 및 균사 형태와 Internal transcribed spacer (ITS) 유전자 염기서열을 통하여 *Phoma* sp.으로 동정되었으며, 이들은 GC-MS분석을 통해 UOS는 hexamethylcyclotrisiloxane (D3)라는 VOC를 갖고 있는 것이 밝혀졌다. 이 결과들은 *Phoma* sp.의 진균 UOS가 VOC물질인 D3을 통해서 간접적으로 식물 생장 촉진 및 뿌리 발달에 영향을 미치는 것을 나타낸다. UOS와 그의 VOC인 D3의 활용은 농업에서 생장량 증대에 기여할 것으로 판단된다.

References

- Ashrafuzzaman M, Hossen FA, Ismail MR, Hoque MA, Islam MZ, Shahidullah SM, Meon S (2009) Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afr J Biotechnol* 8:1247-1252
- Bakker AW, Schippers M (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol Biochem* 19:451-457
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microb Biot* 28:1327-1350
- Blakely LM, Blakely RM, Colowit PM, Elliot DS (1988) Experimental studies on lateral root formation in radish seedlings roots. Analysis of the dose-response to exogenous auxin. *Plant Physiol* 87:414-419
- Cakmakci R, Kantar F, Sahin F (2001) Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J Plant Nutr Soil Sci* 164:527-531
- Cakmakci R, Dönmez F, Aydın A, Sahin F (2006) Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol Biochem* 38:1482-1487
- Datta M, Palit R, Sengupta C, Pandit MK, Banerjee S (2011) Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annuum* L.) under field conditions. *Aust J Crop Sci* 5:531-536
- Egamberdiyeva D (2007) The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl Soil Ecol* 36:184-189
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M (2007) Auxin-mediated lateral

- root formation in higher plants. *Int Rev Cytol* 256:111–137
- Gao LL, Zhang Q, Sun XY, Jiang L, Zhang R, Sun GY, Zha YL, Biggs AR (2013) Etiology of moldy core, core browning, and core rot of Fuji apple in China. *Plant Dis* 97:510–516
- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biol Biochem* 37:395–412
- Hochholdinger F, Park WJ, Sauer M, Woll K (2004) From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci* 9:42–48
- Hochholdinger F, Zimmermann R (2008) Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr Opin Plant Biol* 11:70–74
- Jung BK, Lim JH, An CH, Kim YH, Kim SD (2012) Selection and identification of phytohormones and antifungal substances simultaneously producing plant growth promoting rhizobacteria from microbial agent treated red-pepper. *Korean J Microbiol Biotechnol* 40:190–196
- Kim JS, Lee J, Seo SG, Lee C, Woo SY, Kim SH (2015) Gene expression profile affected by volatiles of new plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* strain JS in tobacco. *Genes Genom.* 37:387–397
- Meera MS, Shivanna MB, Kageyama K, Hyakumachi M (1994) Plant growth promoting fungi from zoysiagrass rhizosphere as potential inducers of systemic resistance in cucumber. *Phytopathology* 84:1399–1406
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A (2005) Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell* 17:444–463
- Orhan E, Esitken A, Ercisli S, Turan M, Sahin F (2006) Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Hortic* 111:38–43
- Park JW, Jahaggirdar S, Cho YE, Park KS, Lee SH, Park KS (2010) Evaluation of *Bacillus subtilis* native strains for plant growth promotion and induced systemic resistance in tomato and red-pepper. *Korean J Pestic Sci* 14:407–414
- Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplace L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 14:399–408
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4927–4932
- Shivanna MB, Meera MS, Hyakumachi M (1994) Sterile fungi from zoysiagrass rhizosphere as plant growth promoters in spring wheat. *Can J Microbiol* 40:637–644
- Wang Y, Yang W, Zuo Y, Zhu L, Hastwell AH, Chen L, Tian Y, Su C, Ferguson BJ, Li X (2019) *GmYUC2a* mediates auxin biosynthesis during root development and nodulation in soybean. *J Exp Bot* 70:3165–3176
- Zou C, Li Z, Yu D (2010) *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *J Microbiol* 48:460–466