



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0113457
(43) 공개일자 2016년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0038984
(22) 출원일자 2015년03월20일
심사청구일자 2015년03월20일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
한방바이오 주식회사
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 2022 (상갈동)
새턴바이오텍 주식회사
강원도 횡성군 공근면 IT밸리길 62
(72) 발명자
양덕춘
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 111동 301호 (보라동, 현대모닝사이드2차아파트)
김연주
경기도 성남시 분당구 동판교로 275 107동 801호 (삼평동, 풍성신미주아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 9 항

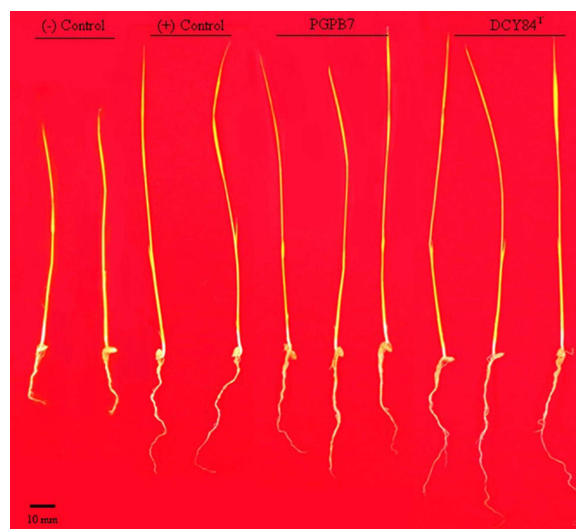
(54) 발명의 명칭 신규한 식물 생장 촉진 미생물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 수탁번호 KCTC 12768BP로 기탁된 식물 생장 촉진 또는 식물병 방제용 페니바실러스 용인엔시스 (*Paenibacillus yonginensis*) DCY84^T 균주; 상기 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 식물 생장 촉진 또는 식물병 방제용 조성물; 및 상기 조성물을 이용한 식물의 생장 촉진 또는 식물병 방제 방법에 관한 것이다.

본 발명의 DCY84^T는 다른 식물 생장 촉진 미생물보다 식물 생장 촉진 및 식물병 방제에 매우 우수한 효과를 가지므로, 생태계 파괴를 막을 수 있는 친환경적인 농업에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류

A01N 63/02 (2013.01)

C12R 1/01 (2013.01)

(72) 발명자

조안, 스즈키

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교
국제캠퍼스 생명과학대학

안홍반

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대 국제
캠퍼스 애지원 인삼 소재은행 (서천동)

양동욱

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 111동 301호
(보라동, 현대모닝사이드2차아파트)

김완중

서울특별시 서초구 명달로15길 24 202호 (서초
동, 대우서초로얄캐운티아파트)

강양순

경기도 성남시 분당구 불정로 397 312동 502호 (서현동, 효자촌임광아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0214183

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산학연합회

연구사업명 산학공동기술개발

연구과제명 미생물 수용성 규산 복합체를 이용한 종자처리기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.01 ~ 2015.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

식물 생장 촉진 또는 식물병 방제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 수탁번호 KCTC12768BP로 기탁된 페니바실러스 용인엔시스(*Paenibacillus yonginensis*) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 간척지에서 식물 생장을 촉진하는 것인, 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 균주는 흰잎마름병에 대한 방제 효과를 가지는 것인, 균주.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 식물 생장 촉진용 조성물.

청구항 5

제4항의 조성물을 식물 또는 상기 식물의 생육 환경에 투여하는 단계를 포함하는, 식물의 생장 촉진 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물은 간척지에서 재배되는 것인, 식물의 생장 촉진 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 식물병 방제용 조성물.

청구항 8

제7항의 조성물을 식물 또는 상기 식물의 생육 환경에 투여하는 단계를 포함하는, 식물병 방제 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식물병은 흰잎마름병인 것인, 식물병 방제 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 수탁번호 KCTC12768BP로 기탁된 식물 생장 촉진 또는 식물병 방제용 페니바실러스 용인엔시스(*Paenibacillus yonginensis*) 균주; 상기 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 식물 생장 촉진 또는 식물병 방제용 조성물; 및 상기 조성물을 이용한 식물의 생장 촉진 또는 식물병 방제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물 생장 촉진 미생물(Plant growth-promoting bacteria, PGPB)은 식물과 특정한 공생관계를 형성하고 있는 미생물(예를 들어, 리조비아(*Rhizobia*) 속 균주 및 프랑키아(*Frankia*) 속 균주), 식물 내부 조직에 콜로니를 형성할 수 있는 내부 기생 미생물 및 시아노박테리아를 포함한다. 구체적으로, PGPB에는 아조스피릴럼(*Azospirillum*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 아조토박터(*Azotobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아세토박터(*Acetobacter*), 벌크홀더리아(*Burkholderia*), 및 페니바실러스(*Paenibacillus*) 등이 있다. 이러한 PGPB는 직접 또는 간접적으로 식물의 생장이나 수확량에 유익한 영향을 끼친다. 또한, PGPB는 영양분 흡수를 촉진하거나, 식물 호르몬 수준을 조절하여 직접적으로 식물 생장을 촉진시키고, 식물 생장에 관여하는 다양한 병원균을 저해하여 간접적으로 식물의 생장을 촉진한다. 또한, PGPB는 식물의 비생물적 스트레스 증상을 감소시키고, 생물적 스트레스인 병원균의 생장을 억제하여, 식물을 다양한 스트레스로부터 보호한다. 이러한 PGPB의 보호 효과는 콩, 카네이션, 오이, 무, 담배, 토마토, 및 애기장대에서 보고되었다(Annu Rev Phytopathol, 1998, 36, 453-483).

[0003] 식물은 생장과 발달 조절에 관여하는 식물호르몬으로 불리는 다양한 화합물을 합성한다. 상기 식물호르몬의 일종인 인돌-3-아세트산(indole-3-acetic acid, IAA)는 천연 옥신으로써, 농도 의존적인 방법으로 식물 생장을 촉진시키는데, 식물 생장을 직접적으로 자극하거나 다른 미생물의 이차 대사산물과 협력하여 생장을 촉진시킨다. 한편, 옥신, 사이토키닌, 지베렐린, 앱시스산, 및 에틸렌 같은 주요 식물 호르몬들은 PGPB에 의해 만들어진다(Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76, 1145-1152).

[0004] 또한, 인은 식물의 주요한 영양성분 중 하나여서 식물은 인을 필요로 하지만, 토양에는 인이 용해되지 않는 인산염 형태로 존재하기 때문에 식물은 이를 이용할 수 없다. 따라서, 토양의 낮은 가용성 인 함량으로 인해 식물 생장이 제한된다. 그러나 일부 PGPB는 유기적 또는 무기적으로 결합된 인산염을 가용화하여 식물 생장을 촉진시킬 수 있다.

[0005] 또한, PGPB는 철-킬레이팅 사이드로포어(iron-chelating siderophore) 같은 금속-킬레이트 물질을 생산하는 능력이 있어 식물이 철, 아연 및 구리를 포함한 다양한 금속을 흡수하는데 도움을 준다. 상기 철-사이드로포어 복합체는 외떡잎 식물 및 쌍떡잎 식물에서 철의 원천으로 사용되기 때문에, 높은 중금속 농도를 갖는 환경에서 자란 식물이 보이는 철 결핍 증상을 예방할 수 있다(Can J Microbiol, 2008, 54, 163-172).

[0006] 또한, PGPB는 낮은 농도에서도 식물에게 유독한 중금속의 생물학적 이용가능성을 감소시키며, 식물 병원균이 중금속을 이용할 수 없게 한다.

[0007] 한편, 화학비료의 사용을 줄이는 것과 같이 환경 친화적인 방법을 이용하는 지속 가능한 농업에 대한 요구가 점차 증가하고 있기 때문에, 식물병 방제 또는 식물 생장 촉진 용도로 사용될 수 있는 PGPB의 중요성이 증가하고 있다. 그러나, 현재 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)를 제외하면 식물 생장 촉진 활성을 가진 미생물에 대한 연구는 아주 미미한 수준이다.

[0008] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 식물 생장 촉진 및 식물병 방제 활성을 가진 우수한 미생물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 용인 숲의 토양에서 IAA 생산, 인산염 가용화 및 시드로포어 생산과 같은 식물 생장을 촉진시키는 특성을 갖는 새로운 균주인 페니바실러스 용인엔시스(*Paenibacillus yonginensis*) DCY84^T를 분리하였고, 상기 균주가 식물의 내염성, 내건성 및 금속 저항성 증가시키고, 벼 흰잎마름병 방제 효과를 가지며, 간척지에서 식물생장 촉진 효과를 가짐을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 식물 성장 촉진 또는 식물병 방제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 수탁번호 KCTC12768BP로 기탁된 페니바실러스 용인엔시스(*Paenibacillus yonginensis*) 균주를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 식물 성장 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 식물 성장 촉진용 조성물을 식물 또는 상기 식물의 생육 환경에 투여하는 단계를 포함하는, 식물의 성장 촉진 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 식물병 방제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 식물병 방제용 조성물을 식물 또는 상기 식물의 생육 환경에 투여하는 단계를 포함하는, 식물병 방제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 과제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 식물 성장 촉진 또는 식물병 방제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 수탁번호 KCTC12768BP로 기탁된 페니바실러스 용인엔시스(*Paenibacillus yonginensis*) 균주를 제공한다.
- [0015] 본 발명에서 용어, "페니바실러스 용인엔시스(*Paenibacillus yonginensis*)"는 본 발명자들이 식물 성장 촉진 및 식물병 방제 활성을 가진 우수한 미생물을 개발하고자 노력한 결과 용인 숲의 토양에서 분리한 신규 균주로서, 한국미생물자원센터에 수탁번호 KCTC12768BP로 기탁되었다. 또한, 본 발명에서 상기 페니바실러스 용인엔시스는 DCY84^T와 혼용된다. 본 발명의 DCY84^T는 페니바실러스 속의 다른 식물 성장 촉진 미생물(Plant growth-promoting bacteria, PGPB)과 마찬가지로 IAA 생산, 인산염 가용화 및 시테로포어 생산 능력을 가질 뿐만 아니라, 다른 PGPB보다 식물의 내염성, 내건성 및 금속 저항성 증진 효과, 흰잎마름병 방제 효과 및 간척지에서 식물성장 촉진 효과가 매우 우수하므로, 일반 토양 및 간척지에서 식물 성장 촉진 및 식물병 방제에 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 DCY84^T는 0.7 - 0.9 μm 의 너비 및 3.4 - 4.7 μm 길이의 막대모양이며, 주모성의 편모를 가지고, 타원체 모양의 내생포자를 생산함을 확인하였다(도 1). 또한, DCY84^T 및 이의 생화학적, 생리학적 특징과 가장 가까운 페니바실러스(*Paenibacillus*) 균주들의 특성을 표 1에 비교하였다.
- [0017] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 DCY84^T와 다른 페니바실러스 균주들의 16S rRNA 서열을 비교한 결과, DCY84^T는 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T(96.86 %)와 가장 높은 유사성을 가지며, 다음으로 페니바실러스 티몬엔시스 KACC 11491^T(96.49 %), 페니바실러스 포에닉시스 NBRC 106274^T(95.77 %)와 유사성을 가짐을 확인하여, DCY84^T는 페니바실러스 속의 새로운 균주임을 알 수 있었다. 페니바실러스 속의 다른 균주들과 DCY84^T의 유사성은 91.87-96.49 %이었다. 또한, 페니바실러스 속에서 DCY84^T의 위치를 보여주는 16S rRNA 유전자 서열에 근거한 이웃결합 계통수(neighbour-joining tree) 및 최대 가능성 방법(maximum-likelihood method)을 사용하여 만든 계통수를 통해 DCY84^T는 페니바실러스에 속하는 새로운 균주임을 알 수 있었다(도 2 및 3).
- [0018] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 DCY84^T의 DNA G+C mol % 양을 분석한 결과, DCY84^T의 DNA G+C mol %은 62.6 mol%임을 확인하였다. 이를 통해, DCY84^T는 페니바실러스 속 안에서 높은 GC 계통(56 - 63 %)에 속함을 알 수 있었다.

- [0019] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 DCY84^T 및 페니바실러스 속의 DCY84^T와 가까운 균주들의 세포 지방산, 세포벽 당 및 폴리아민을 표 2에 비교하였다.
- [0020] 상기 계통적, 표현형적, 화학분류적 분석 결과를 통해, 페니바실러스 용인엔시스로 명명된 DCY84^T(KCTC12768B P)는 페니바실러스 속의 새로운 균주임을 알 수 있었다.
- [0021] 본 발명에서 용어, "식물 성장"은 식물의 씨앗이 발아하여 뿌리·줄기·잎을 내거나 또는 그 후 점차 크기와 무게를 더해가는 과정을 의미하므로, 본 발명에서 "식물 성장 촉진"은 식물의 씨앗의 발아 또는 발아된 식물의 크기와 무게의 증가를 촉진하는 것을 의미한다. 본 발명의 DCY84^T는 IAA 생산, 인산염 가용화 및 시테로포어 생산 능력을 가질 뿐만 아니라, 식물의 내염성, 내건성 및 금속 저항성 증진 효과 및 간척지에서 식물성장 촉진 효과를 가지므로, 일반 토양 및 간척지에서 식물 성장 촉진에 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "식물병 방제"는 식물에 질병을 일으키는 병해충을 예방하고 구제하는 것을 의미하는 것으로, 본 발명의 DCY84^T는 흰잎마름병 방제 효과를 가져 식물병 방제에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명에서 상기 흰잎마름병은 식물에 발생하는 질병으로서 잎의 가장자리가 하얗게 또는 노랗게 변하면서 건조되고 점차 잎이 말라죽게 되는 병을 의미한다. 구체적으로 상기 흰잎마름병은 벼에서 발생하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 DCY84^T가 IAA 생산, 인산염 가용화 및 시테로포어 생산 능력을 가짐을 확인하였다(표 3).
- [0025] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 DCY84^T가 접종된 애기장대의 식물 내염성, 내건성 및 금속 저항성 촉진 효과를 분석한 결과, DCY84^T를 처리한 애기장대는 PGPB를 접종하지 않고 스트레스 처리만 한 음성(-) 대조군, 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T를 처리한 양성(+) 대조군 및 PGPB7을 처리한 애기장대에 비해 염, 가뭄 및 금속 스트레스에 저항성을 보이며, 스트레스를 받지 않은 모크 식물과 유사한 잎과 뿌리 형태를 가짐을 확인하였다(도 6). 또한, 염, 가뭄 및 금속 스트레스와 관련된 유전자 발현을 분석한 결과, DCY84^T를 처리한 애기장대는 음성 대조군, 양성 대조군 및 PGPB7 보다 스트레스 처리시 발현이 증가되는 유전자들의 발현이 증가함을 확인하였다(도 7). 이를 통해, 본 발명의 DCY84^T는 다른 PGPB보다 매우 우수한 식물 내염성, 내건성 및 금속 저항성 촉진 효과를 가짐을 알 수 있었다.
- [0026] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 in vitro에서 벼 흰잎마름병 유발 미생물인 PX099에 대한 DCY84^T의 방제 효과를 분석한 결과, DCY84^T는 PX099에 대해 독성을 가짐을 확인하였다(도 8A). 또한, in vivo에서 PX099에 대한 DCY84^T의 방제 효과를 분석한 결과, DCY84^T를 처리한 벼는 대조군 및 PGPB7를 처리한 벼에 비해 PX099 감염 증상이 거의 나타나지 않음을 확인하였다(도 8B 및 8C). 이를 통해, 본 발명의 DCY84^T는 다른 PGPB보다 우수한 흰잎마름병 방제 효과를 가짐을 확인한바, 식물병 방제에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0027] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 한국 태안 지역의 해안가에서 수집한 토양을 이용하여 DCY84^T의 벼 성장 촉진 효과를 확인한 결과, DCY84^T를 처리한 경우, PGPB를 처리하지 않은 음성 대조군, 양성 대조군 및 PGPB7보다 싹의 길이, 싹의 수, 뿌리의 길이, 뿌리의 수, 순수 무게 및 건조된 무게와 관련하여 매우 유익한 효과를 가지며(표 6), 현저하게 벼의 성장을 촉진시킴을 확인하였다(도 9). 이를 통해, 본 발명에서 새롭게 동정된 DCY84^T는 간척지에서 매우 우수한 식물 성장 촉진 효과를 가짐을 확인한바, 간척지에서 식물 성장을 촉진하는데 매우 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0028] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 DCY84^T 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물을 유

효성분으로 포함하는, 식물 생장 촉진용 조성물을 제공한다.

- [0029] 본 발명의 DCY84^T는 IAA 생산, 인산염 가용화 및 시데로포어 생산 능력을 가질 뿐 만아니라, 다른 PGPB보다 식물의 내염성, 내건성 및 금속 저항성 증진 효과 및 간척지에서 식물생장 촉진 효과가 매우 우수하므로, DCY84^T를 유효성분으로 포함하는 조성물은 일반 토양 및 간척지에서 식물 생장 촉진에 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0030] 상기 DCY84^T 및 식물 생장 촉진은 전술한 바와 같다.
- [0031] 또한, 식물 생장 촉진활성을 나타내는 한, DCY84^T 균주뿐만 아니라, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물 역시 상기 조성물에 포함될 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명에서 용어, "포자"는 세균 등의 번식 세포를 말하며, 본 발명의 목적상 상기 포자는 DCY84^T의 번식 세포를 의미한다. 본 발명에서 상기 DCY84^T의 포자는 식물 생장 촉진 활성을 나타내어 식물병 방제용 조성물에 포함되어 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 용어, "배양물"은 상기 DCY84^T를 배양한 다음 수득한 산물을 의미하며, 배양된 DCY84^T를 포함하거나, 배양된 DCY84^T가 제거된 형태 모두 포함한다.
- [0034] 한편, 본 발명의 상기 DCY84^T는 생균제로 사용할 수 있으며, 구체적으로는 액상 생균제 또는 생균 분말의 형태로 사용할 수 있다.
- [0035] 이때, 본 발명의 DCY84^T를 포함하는 생균제 및 생균 분말은 부형제, 희석제를 더 포함할 수 있으며, DCY84^T는 단독으로 또는 다른 추출물, 부산물과 함께 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 DCY84^T는, 각각 통상의 방법에 따라 배양액, 분말의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서 상기 균주를 이용한 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 스테비아 추출물, 광물유 및 천연소재 추출물 등을 들 수 있다.
- [0037] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 식물 생장 촉진용 조성물을 식물 또는 상기 식물의 생육 환경에 투여하는 단계를 포함하는, 식물의 생장 촉진 방법을 제공한다.
- [0038] 상기 식물 생장 촉진용 조성물은 식물 생장 촉진 활성을 가진 DCY84^T를 유효성분으로 포함하고 있어, 이를 이용하여 식물의 생장을 촉진시킬 수 있다.
- [0039] 상기 식물 생장 촉진은 전술한 바와 같다.
- [0040] 구체적으로, 상기 식물은 간척지에서 재배될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 구체적으로, 상기 식물 생장 촉진용 조성물은 식물병 발병 전에 식물 또는 토양에 살포되거나, 또는 식물병 발병 후에 식물 또는 토양에 살포될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 DCY84^T 균주, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 DCY84^T는 흰잎마름병 방제 효과가 매우 우수하므로, DCY84^T를 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물병 방제에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [0044] 상기 DCY84^T, 포자, 배양물 및 식물병 방제는 전술한 바와 같다.
- [0045] 또한, 식물병 방제 활성을 나타내는 한, DCY84^T 균주뿐만 아니라, 상기 균주의 포자, 상기 균주의 배양물 또는 이들의 혼합물 역시 상기 조성물에 포함될 수 있다.
- [0046] 구체적으로, 상기 식물병은 흰잎마름병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 식물병 방제용 조성물을 식물 또는 상기 식물의 생육 환경에 투여하는 단계를 포함하는, 식물병 방제 방법을 제공한다.
- [0048] 상기 식물병 방제용 조성물은 식물병 방제 활성을 가진 DCY84^T를 유효성분으로 포함하고 있어, 이를 이용하여 식물병을 방제할 수 있다.
- [0049] 상기 식물병 방제는 전술한 바와 같다.
- [0050] 구체적으로, 상기 식물병은 흰잎마름병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 또한, 구체적으로, 상기 식물병 방제용 조성물은 식물을 정식하기 전 토양을 개간할 때 토양에 살포하거나, 또는 식물을 정식한 후 장마철과 발병 직전 시기에 식물체 지상부 또는 뿌리부분에 살포할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0052] 본 발명의 수탁번호 KCTC12768BP로 기탁된 페니바실러스 용인엔시스(*Paenibacillus yonginensis*) DCY84^T는 다른 식물 생장 촉진 미생물보다 식물 생장 촉진 및 식물병 방제에 매우 우수한 효과를 가지므로, 생태계 파괴를 막을 수 있는 친환경적인 농업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 페니바실러스 용인엔시스(*Paenibacillus yonginensis*) DCY84^T의 투과 전자 현미경 사진이다.
- 도 2는 16S rRNA 유전자 서열 분석을 통해 작성한 DCY84^T와 페니바실러스(*Paenibacillus*) 속 미생물의 계통적 관계를 보여주는 이웃결합 계통수(neighbour-joining tree)이다. 검은 원은 해당하는 교점(node)이 최대 절약 알고리즘(maximum-parsimony algorithm)으로 제작된 계통수에서도 나타나는 것을 의미한다. 분지 지점(branching point)은 1000개의 복제본(replication)에 대한 50 % 이상의 부트스트랩 값을 의미한다. 바실러스 서브틸리스 DSM10T(*Bacillus subtilis* DSM10T)는 외집단(out group)으로 사용되었다.
- 도 3은 16S rRNA 유전자 서열 분석을 통해 작성한 DCY84^T와 페니바실러스(*Paenibacillus*) 속 미생물의 계통적 관계를 보여주는 최대 가능성 계통수(maximum-likelihood tree)이다.
- 도 4는 DCY84^T(A) 및 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T(*P. barengoltzii* KACC 15270^T)(B)의 총 극성 지질에 대한 2차원의 TLC 결과를 보여주는 도이다(APL, 아미노포스포리피드(aminophospholipid); PE, 포스포파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine); AL1-6, 미동정된 아미노리피드(aminolipid); L1-5 미동정된 극성 지질)
- 도 5는 DCY84^T의 인 가용화 능력(A) 및 시테로포어 생산 능력(B)을 확인한 도이다.
- 도 6은 PGPB를 접종한 애기장대에 엽(A), 가문(B) 및 금속(C) 스트레스를 처리하고, 5일 후의 모습을 보여주는 사진이다(모크(Mock), PGPB 및 스트레스 미처리; (-) 대조군, PGPB 미접종; (+) 대조군, 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) KACC 10485^T 접종; PGPB7, 마이크로코커스 연난넨시스(*Micrococcus yunnanensis* YIM 65004) 접종; DCY84^T, 페니바실러스 용인엔시스 접종).

도 7은 PGPB를 접종한 애기장대에 엽(A), 가뭇(B) 및 금숙(C) 스트레스를 처리하고, 5일 후 유전자의 발현을 분석한 결과를 보여주는 도이다(모크(Mock), PGPB 및 스트레스 미처리; (-) 대조군, PGPB 미접종; (+) 대조군, 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T 접종; PGPB7, 마이크로코커스 연난넨시스 YIM 65004 접종; DCY84^T, 페니바실러스 용인엔시스 접종).

도 8은 산토모나스 오리재 pv. 오리재 필리핀 종 6(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Philippine race 6, PX099)에 대한 DCY84^T의 방제 효과를 보여주는 도이다.

A는 PX099를 포함한 TYE 배지에 DCY84^T를 떨어뜨린 결과를 보여주는 도이다(대조군, *E. coli* TOP10; PGPB7, 마이크로코커스 연난넨시스 YIM 65004 접종; DCY84^T, 페니바실러스 용인엔시스 접종).

B는 벼(*Oryza sativa* L. var. *japonica* cv. Chuchung)에서 DCY84^T의 PX099 방제 효과를 확인한 도이다(대조군, PX099 미접종; PGPB7, 마이크로코커스 연난넨시스 YIM 65004 접종; DCY84^T, 페니바실러스 용인엔시스 접종).

C는 PX099 감염 14일 후, PGPB를 처리한 벼의 병변 길이를 보여주는 사진이다(모크(Mock), PX099 미접종; xoo, PX099 접종; PGPB7, 마이크로코커스 연난넨시스 YIM 65004 접종; DCY84^T, 페니바실러스 용인엔시스 접종).

도 9는 간척지 토양에서 DCY84^T의 식물의 생장 촉진 효과를 보여주는 사진이다((-) 대조군, PGPB 미접종; (+) 대조군, 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T 접종; PGPB7, 마이크로코커스 연난넨시스 YIM 65004 접종; DCY84^T, 페니바실러스 용인엔시스 접종).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0055]

실시예 1. 신규 미생물의 분리

[0056]

식물 생장 촉진 및 식물병 방제 활성을 가진 우수한 신규 미생물을 분리하기 위해, 용인 숲의 임의적 장소에서 수집한 샘플 1 g을 0.85 % (w/v) 생리식염수에 용해시켜 연속해서 10⁻⁵까지 희석시켰고, 희석된 레조너스 2A(Reasoners 2A, R2A) 아가 플레이트(MB cell)에 5번 펼쳤다. 플레이트를 3일 동안 30 °C에서 배양하였다. 하나로 이루어진 콜로니들을 새로운 R2A 아가 플레이트로 옮겨 정제하였다. DCY84^T로 명명된 새로운 페니바실러스 (*Paenibacillus*)는 본 발명에서 처음으로 분리되었고, 이의 특성이 분석되었다. 분리물을 계속 30 °C, R2A 아가에서 배양하였고, 30 % (v/v) 글리세롤이 포함된 R2A 브로스(broth)의 현탁액을 사용하여 80 °C에 저장하였다. 그러나 이 후 상기 균주의 최적 생장 조건을 분석한 후, 트립티카아제 소야 아가(Trypticase Soya Agar, TSA, MB cell) 및 트립티카아제 소야 브로스(Trypticase Soya Broth, TSB)로 배지를 바꿨다.

[0057]

상기 DCY84^T를 한국미생물자원센터에 수탁번호 KCTC12768BP로 기탁하였다. 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T(*Paenibacillus barengoltzii* KACC 15270^T)와 페니바실러스 티몬엔시스 KACC 11491^T(*Paenibacillus timonensis* KACC 11491^T)은 한국농업미생물자원센터에서 분양받았고, 페니바실러스 포에니시스 NBRC 106274^T(*Paenibacillus phoenicis* NBRC 106274^T)는 National Institute of Technology and Evaluation(NITE) Biological Resource Center에서 분양받았다. 이 균주들은 DCY84^T와 같은 최적조건 아래 배양되었다.

[0058]

실시예 2. DCY84^T의 형태학적 특성 및 생리적 특성 분석

[0059] 실시예 2-1. 분석 방법

- [0060] DCY84^T의 형태학적 특성을 분석하기 위해, 혐기성, 내생포자 형성 박테리아의 기술에서 제안된 최소 기준을 근거로 기본 시험을 수행하였다. DCY84^T 콜로니를 48시간 동안 키운 후, 30 °C에서 TSA 아가 플레이트에 배양하였다. 그람반응을 bioMerieux Gram stain kit를 사용하여 수행하였다. 세포를 TSB에서 30 °C로 24시간 동안 배양하였고, 그 후 현적배양(hanging-drop) 기술을 사용하여 활주운동(gliding motility)을 분석하였다. 세포 형태와 편모를 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 상기 30 °C에서 48시간 동안 TSA에서 배양된 현탁 세포들을 탄소와 포름바(formvar)로 코팅된 니켈 격자판에 30초 동안 두었고, 아세트산 우라늄 수용액 0.1%(w/v) 한 방울(drop)을 떨어뜨린 후 이를 말려 칼자이스 전자현미경(LOE912AB)을 이용하여 표준 작동조건하에서 100 kV로 관찰하였다.
- [0061] 아울러, 다른 배지에서의 생장을 분석하기 위해, R2A, TSA, Nutrient agar(NA, MB 세포), Luria-Bertani(LB, MB 세포), Potato Dextrose agar(PDA, MB 세포), MacConkey Agar와 같은 배지를 사용하여 30 °C로 7시간 동안 배양하였다. 각각 4, 8, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45 °C의 온도에서 7시간 동안 생장을 확인하였다.
- [0062] 또한, 생장에 대한 염분의 효과를 확인하기 위해, 0.5 - 9.5 %(w/v) NaCl을 함유한 TSB를 사용하였다.
- [0063] 또한, 생장에 대한 pH의 효과를 확인하기 위해, pH 4 - 10의 TSB를 사용하였다. 구연산/구연산나트륨(citric acid/sodium citrate)(pH 4.0 - 6.0), Na₂HPO₄/NaH₂PO₄(pH 6.0 - 8.0), Na₂CO₃/NaHCO₃(pH 8.0 - 10.0), Na₂HPO₄/NaOH(pH 10.0)의 버퍼를 사용하여 pH를 조절하였다.
- [0064] 또한, 포자 형성을 확인하기 위해, 5 mg/l MnSO₄를 첨가한 트립톤 이스트 추출물(Tryptone Yeast Extract, TYE) 아가에서 30 °C로 7시간 동안 배양하였다. Becton-Dickinson(BD) GasPakTM EZ Gas Generating System을 혐기성 생장을 위해 사용하였다.
- [0065] 또한, 카탈라아제 활성을 확인하기 위해, 신선하게 자라고 있는 세포들이 섞여있는 3 %(v/v) H₂O₂ 용액의 기포형성을 분석하였다. 산화효소(oxidase) 활성을 1 %(w/v) N,N,N,N-테트라메틸-p-페닐렌디아민(N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylene diamine) 시약(sigma)을 사용하여 확인하였다.
- [0066] 또한, H₂S 생산을 확인하기 위해, TSI(Triple sugar iron agar) 배지를 사용하였다.
- [0067] 또한, 질산염 사용을 확인하기 위해, 0.2 % KNO₃를 포함하는 질산염 브로스(broth)에서 배양하였다.
- [0068] 또한, 인돌 생산을 확인하기 위해, 1 % 트립톤 브로스에서 Kovacs's reagent을 사용하였다.
- [0069] 또한, 젤라틴의 가수분해를 확인하기 위해, 12 % 젤라틴, 0.3 % 소고기 추출물 및 0.5 % 펩톤을 포함한 배지를 사용하였고, 에스쿨린의 가수분해를 확인하기 위해 0.3 % 에스쿨린 및 Fe³⁺를 포함한 TSA를 사용하였으며, Tween 20과 80의 가수분해를 확인하기 위해, 1 % Tween 20/80 및 0.02 % CaCl₂를 포함한 TSA를 사용하였고, 녹말의 가수분해를 확인하기 위해, 1 % 녹말을 포함한 TSA를 사용하였으며, 카제인의 가수분해를 확인하기 위해, 2 % 탈지우유가 첨가된 TSA를 사용하였다.
- [0070] 또한, 항생제 민감성을 확인하기 위해, 호기성 조건 아래 30 °C, 48시간 동안 Muller-Hinton(Difco) 아가에서 옥소이드(oxid) 항생제 페이퍼 디스크를 사용하였다. 항생제는 시그마알드리치사의 카베니실린(carbenicillin, CAR₁₀₀, 30 µg), 노보바이오신(novobiocin, NV₃₀, 30 µg), 네오마이신(neomycin, N₃₀, 30 µg), 테트라사이클린(tetracycline, TE₃₀, 30 µg), 세파졸린(cefazolin, KZ₃₀, 30 µg), 에리스로마이신(erythromycin, E₁₅, 15 µg), 올린도마이신(oleandomycin, OL₁₅, 15 µg), 린코마이신(lincomycin, L₁₅, 15 µg), 리팜마이신(rifampicin, RD₅, 5 µg)을 사용하였다.
- [0071] 또한, 기본적인 화학적 시험, 탄소 자원 흡수 및 효소활성을 분석하기 위해 API 20E(biomerieux), API 50CHB(bioMerieux), GP VITEK-2 compact system 버전 4.01(biomerieux) 및 API ZYM(biomerieux)을 사용하였다. API 20E, API 50CHB, GP VITEK-2 compact system 버전 4.01은 각 균주의 최적 조건 아래 48시간 동안 배양한 후 사용되었고, API ZYM은 10시간 동안 배양한 후 사용되었다.

[0072] 실시예 2-2. DCY84^T의 형태학적 특성 및 생리적 특성 분석 결과

[0073] DCY84^T의 형태학적 특성을 분석한 결과, DCY84^T는 0.7 - 0.9 μm 의 너비 및 3.4 - 4.7 μm 길이의 막대모양이며, 주모성의 편모를 가지고, 타원체 모양의 내생포자를 생산함을 투과전자현미경을 통해 확인하였다(도 1). 내생포자 형성은 바실라세에(Bacillaceae) 과(family)의 일반적인 특징이다. TSA에서 30 °C로 48시간 동안 배양한 후 형성된 콜로니는 하얀색의 등근모양을 나타내었고, 매끄러웠으며, 주변보다 높은 형태를 가지고 있었다. 또한, 콜로니는 2 - 5 mm의 지름을 가지고 있었고, 색소는 없었으며, 인타이어 에지(entire edge)를 보유하고 있었다.

[0074] 또한, DCY84^T는 LB, TSA, R2A, 및 NA에서는 자랐으나, PDA 및 MacConkey 아가에서는 자라지 않았다. 또한, DCY84^T는 TSA를 사용한 경우 15 - 40 °C, pH 5 - 9, 및 0.5 - 4.5 % NaCl의 조건에서 잘 자랐다. 최적성장 조건은 30 °C, pH 8 및 0.5 % NaCl의 조건이었다.

[0075] 또한, DCY84^T는 카제인과 DNA 아가는 가수분해하지 않지만 녹말, Tween20, Tween80, 젤라틴, 및 에스쿨린은 가수분해하였다. 또한, DCY84^T가 질산염을 분해하고, 산화효소와 H₂S를 생산함을 확인하지 못했지만, 카탈라아제, 인돌 및 아세트산을 생산함을 확인하였다.

[0076] 또한, 항생제 민감성을 확인한 결과, DCY84^T는 카베니실린(carbenicillin, CAR₁₀₀, 100 μg), 노보마이신(novobiocin, NV₃₀, 30 μg), 네오마이신(neomycin, N₃₀, 30 μg), 테트라사이클린(tetracycline, TE₃₀, 30 μg), 세파졸린(cefazolin, KZ₃₀, 30 μg), 올린도마이신(oleandomycin, OL₁₅, 15 μg), 린코마이신(lincomycin, L₁₅, 15 μg) 및 리팜피신(rifampicin, RD₅, 5 μg)에 민감하며, 특히 세프트라지딤과 에리스로마이신에 민감함을 알 수 있었다. 또한 DCY84^T는 바시트라신(bacitracin)과 옵토신(optochin)에 저항성을 가지지만, 노보바이오신(novobiocin), 2,4-디아미노-6,7-디아이소프로필프테리딘(2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine, 0/129) 및 폴리믹신 B(polymyxin B)에는 민감함을 알 수 있었다.

[0077] 또한, DCY84^T는 하기 탄소원에 대해 동화작용을 함을 확인하였다: D-자일로오스, D-리보오스, D-투라노오스, D-만니톨, D-아밀그달린, D-셀로바이오스, D-프럭토오스, D-갈락토오스, D-글루코오스, D-만노오스, D-말토오스, D-멜리바이오스, D-라피노오스, D-트레할로오스, D-락토오스, D-아라비노오스, 사카로오스 N-아세틸-D-글루코사민.

[0078] 그러나, DCY84^T는 하기 탄소원에 대해서는 동화작용을 할 수 없음을 확인하였다: D-멜레지토오스, D-아라비톨, D-푸코오스, D-솔비톨, D-아도니톨, D-아라비노오스, D-타가토오스, L-람노오스.

[0079] 아울러, DCY84^T는 메틸 α -D-글루코피라노사이드(Methyl α -D-glucopyranoside), 메틸 β -D-글루코피라노사이드(Methyl β -D-glucopyranoside), N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine), 트립토판디아미니아제(trypthandeaminase), α -글루코시데이즈(α -glucosidase), α -갈락토시데이즈(α -galactosidase), α -키모트립신(α -chymotrypsin), β -글루코시데이즈(β -glucosidase), β -갈락토시데이즈(β -galactosidase), β -갈락토피라노시데이즈(β -galactopyranosidase), 류신 아릴아미데이즈(leucine arylamidase), 알라닌 아릴아미데이즈(alanine arylamidase), 타이로신 아릴아미데이즈(tyrosine arylamidase), 라스팔레이트 아릴아미데이즈(Laspartate arylamidase), L-피롤리도닐 아릴아미데이즈(L-pyrrolidonyl arylamidase), N-아세틸-D-글루코사미니데이즈(N-acetyl-D-glucosaminidase), 에스테레이즈(esterase) 및 에스테레이즈 리페이즈(esterase lipase)를 생산함을 확인하였다.

- [0080] 그러나, 메틸 α -D-만노피라노사이드(methyl α -D-mannopyranoside), 리페이즈, 아미노엑소트리펩티데이즈(aminoexotriptidease), α -만노시데이즈(α -mannosidase), β -글루코시데이즈(β -glucuronidase), 우레이즈(urease), 트립신(trypsin), 알기닌 디하이드로레이즈(arginine dihydrolase), 알기닌 디하이드로레이즈 2(arginine dihydrolase 2), 알카라인 포스파테이즈(alkaline phosphatase), 발린 아릴아미데이즈(valine arylamidase), 시스틴 아릴아미데이즈(cystine arylamidase), L-프롤린 아릴아미데이즈(L-proline arylamidase), 라이신 디카르복실레이즈(lysine decarboxylase), 오르니딘 디카르복실레이즈(ornithine decarboxylase), 산 인산가수분해효소(acid phosphatase), 인산가수분해효소(phosphatase)와 포스파티딜이노시톨 포스포리페이즈 C(phosphatidylinositol phospholipase C)는 생산되지 않았다.
- [0081] 또한, DCY84^T는 나프톨-AS-BI-포스포하이드롤레이즈(Naphthol-AS-BI- phosphohydrolase), 메틸- β -D-자일로피라노사이드(methyl β -D-xylopyranoside) α -푸코시데이즈(α -fucosidase)를 약하게 생산하였다.
- [0082] 또한, DCY84^T는 알부틴(arbutin), 젠티오바이오스(gentiobiose), 살리신(salicin), 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 및 구연산염(citrate)을 이용할 수 있었지만, 이눌린(inulin), 글라이코젠(glycogen), 칼륨 글루코네이트(potassium gluconate), 덤시톨(dulcitol), 자일리톨(xylitol), 글라이세롤(glycerol), 에리스리톨(erythritol), 이노시톨(inositol), 풀루란(pullulan), 칼륨 2-케토글루코네이트(potassium 2-ketogluconate), 칼륨 5-케토글루코네이트(potassium 5-ketogluconate) 및 L-락테이트(L-lactate)는 이용할 수 없었다.
- [0083] DCY84^T의 생화학적, 생리학적 특징과 가장 가까운 페니바실러스(*Paenibacillus*) 균주들의 특성을 하기 표 1에서 비교하였다.

표 1

Characteristics	1	2	3	4
Bacitracin resistance	+	-	-	+
Hydrolysis of				
Cyclodextrin	+	-	+	-
Salicin	+	-	+	+
Inulin	-	+	+	-
Gelatin (bovine origin)	+	-	-	-
Glycogen	-	+	+	+
Potassium gluconate	-	+	+	+
Dulcitol	-	-	+	-
Xylitol	-	-	+	-
Enzyme activity				
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	w	w	+	w
Methyl β-D-xylopyranoside	w	w	+	+
Methyl β-D-glucopyranoside	+	-	+	+
Methyl α-D-mannopyranoside	-	w	w	+
α-fucosidase	w	-	-	-
β-galactopyranosidase	+	+	-	-
α-chymotrypsin	+	-	w	-
Lipase	-	+	+	w
Leucine arylamidase	+	+	+	-
Alanine arylamidase	+	-	-	-
Tyrosine arylamidase	+	+	+	-
Aminoxotripeptidase	-	+	-	-
L-Aspartate arylamidase	+	+	-	+
L-Pyrrolidonyl arylamidase	+	-	-	-
N-acetyl-D-glucosaminidase	+	-	+	w
Assimilation of				
D-Xylose	+	-	+	+
D-Ribose	+	-	+	-
D-Melezitose	-	-	w	-
D-Turanose	+	-	w	-
D-Lyxose	-	-	+	-
D-Arabitol	-	-	+	-
D-Mannitol	+	+	+	-
L-Fucose	-	-	w	w
L-Sorbose	-	-	+	-
D-Lactose	+	-	+	+
Saccharose/sucrose	+	+	+	-
N-acetyl-D-glucosamine	+	-	+	+
In vitro plant growth promoting traits				
IAA production w/o L-tryptophan (μg/ml)	52.96 ± 1.85	50.22 ± 0.45	12.27 ± 0.7	29.54 ± 1.05
IAA production with L-tryptophan (μg/ml)	72.83 ± 2.26	70.82 ± 1.91	32.87 ± 4.57	56.96 ± 3.55
Siderophore production	+	+	w	+
Phosphate solubilization	+	+	-	-

[0084]

[0085] (1, 페니바실러스 용인네시스 DCY84^T; 2, 페니바실러스 바렌콜트지 KACC 15270^T; 3, 페니바실러스 포에니시스 NBRC 106274^T; 4, 페니바실러스 티몬엔시스 KACC 11491^T)

[0086] 실시예 3. DCY84^T의 분자적 특성 분석

[0087] 실시예 3-1. 분석 방법

[0088] DCY84^T 계놈의 DNA를 DNA 분리 키트(Gene All Biotechnology, Republic of Korea)를 사용하여 분리하였다. 16S rRNA 유전자를 제노텍(대한민국, 대전)에서 구입한 공통 박테리아 프라이머 세트 27F/1492R과 518F/800R를 사용하여 증폭시켰다. 정제된 PCR 산물을 사용하여 제노텍에서 염기서열분석(sequencing)을 수행하였다. Seq-Man software 버전 4.1(DNASTAR, Inc.)을 사용하여 DCY84^T의 16S rRNA 서열을 분석하였다. DCY84^T의 16S rRNA 서열을 Seqman software를 사용하여 분석하였고, BioEdit program을 이용하여 편집하였다. 다중배치(Multiple alignment)는 CLUSTAL X program으로 수행하였고, 거리는 Kimura two-parameter model을 따라 계산하였다. 16S

rRNA 유전자 서열에 대해 94 % 이상 상동성을 가진 페니바실러스 균주들을 계통수에 포함하였다. MEGA 6 program package를 사용하여 이웃결합방법(neighbour-joining), 최대절약방법(maximum-parsimony), 최대 가능성 방법(maximum-likelihood)을 통해 계통수를 작성하였다. 각 분점의 신뢰수준을 확인하기 위해, 1000개의 복제본(replication)으로 이루어진 부트스트랩 분석(bootstrap analysis)을 수행하였다. DCY84^T 서열을 EzTaxon-e server(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)와 NCBI database(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)로부터 얻은 데이터베이스와 비교하였다. DCY84^T의 16S rRNA 유전자 서열에 대한 GenBank/EMBL/DDBJ 접근 번호(accession number)는 KF915796이다.

[0089] 실시예 3-2. DCY84^T의 분자적 특성 분석 결과

[0090] DCY84^T와 다른 페니바실러스 균주들의 16S rRNA 서열을 비교한 결과, DCY84^T는 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T(96.86 %)와 가장 높은 유사성을 가지며, 다음으로 페니바실러스 티몬엔시스 KACC 11491^T(96.49 %), 페니바실러스 포에닉시스 NBRC 106274^T(95.77 %)와 유사성을 가짐을 확인하여, DCY84^T는 페니바실러스 속의 새로운 균주임을 알 수 있었다. 페니바실러스 속의 다른 균주들과 DCY84^T의 유사성은 91.87-96.86 %이었다.

[0091] 아울러, 페니바실러스 속에서 DCY84^T의 위치를 보여주는 16S rRNA 유전자 서열에 근거한 이웃결합 계통수를 도 2에 나타내었다. 최대 절약 방법(maximum-parsimony)을 사용하여 만든 계통수를 통해 DCY84^T가 균주 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T와 함께 안정한 분기군을 형성하는 것을 확인하였다. 최대 가능성 방법(maximum-likelihood method)을 사용하여 만든 계통수를 도 3에 나타내었다.

[0092] 이를 통해, DCY84^T는 페니바실러스에 속하는 새로운 균주임을 알 수 있었다.

[0093] 실시예 4. DCY84^T의 DNA G+C mol % 양 분석

[0094] 실시예 4-1. 분석 방법

[0095] DCY84^T의 DNA G+C mol % 양을 분석하기 위해, DCY84^T 및 이와 가장 가까운 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T의 게놈 DNA를 Exgene TM Cell SV mini-kit(Gene All Biotechnology, 한국)를 사용하여 추출 및 정제하였다. 핵산가수분해효소와 알칼리성 인산가수 분해효소를 사용하여 상기 DNA를 하나의 뉴클레오타이드로 분해하였다. 그 후 뉴클레오타이드 혼합물을 HPLC를 사용하여 분리하였다[Model NS-6000A, Futecs, reversed-phase column YMC-Triart C18(4.6 X 205 mm X 5 μ m), 이동상(0.02 M (NH₄)H₂PO₄ 및 아세트오니트릴의 혼합물(20:1, v/v)), 유속(1.2 ml/min), 파장(270nm)]. 대장균(*Escherichia coli*) 균주 B의 게놈 DNA를 표준물질로 사용하였다.

[0096] 실시예 4-2. DCY84^T의 DNA G+C mol % 양 분석 결과

[0097] DCY84^T의 DNA G+C mol % 양을 분석한 결과, DCY84^T의 DNA G+C mol %은 62.6 mol%임을 확인하였다. 이를 통해, DCY84^T는 페니바실러스 솔리 DCY03^T(*Paenibacillus soli* DCY03^T, 56.8 $\pm$ 0.2 mol%), 페니바실러스 후미쿠스 PC-147^T(*Paenibacillus humicus* PC-147^T, 58.3 $\pm$ 0.3 mol%), 페니바실러스 파사데넨시스 NBRC 101214^T(*Paenibacillus pasadenensis* NBRC 101214^T, 63.4 $\pm$ 0.6 mol%)와 함께 페니바실러스 속 안에서 높은 GC

계통(56 - 63 %)에 속함을 알 수 있었다.

[0098] 실시예 5. DCY84^T의 화학분류적 특성

[0099] 실시예 5-1. 분석 방법

[0100] DCY84^T의 화학분류적 특성을 분석하기 위해, 먼저 퀴논의 함유 여부를 확인하였다. 세포를 TSB에서 30 °C로 하루 동안 160 rpm으로 셰이킹하면서 배양하였다. 호흡 퀴논을 Collins의 방법에 따라 추출하기 위해, 먼저 동결 건조한 100 mg 세포를 클로로포름/메탄올(2/1, v/v)을 사용하여 추출한 후, 헥산(hexane)으로 분리하였으며, 헥산/디에틸 에테르(98/2, v/v)로 용출시켰다. 그 후 용출액을 회전식 증발기를 사용하여 증발시켰고, 나머지는 아세톤에 용해시켰다. 메나퀴논(menaquinone)을 역상 HPLC(Model NS-6000A, Futecs, 파장 270 nm, solvent MeOH:Isopropanol = 7:3)를 사용하여 분석하였다.

[0101] 또한, DCY84^T과 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T의 극성 지방을 분석하기 위해, 각 샘플을 TLC Kiesel gel 60 F₂₅₄(Merck) 플레이트(10 cm X 10 cm)에 스팟팅(spotting)하고, 클로로포름/메탄올/물(65/25/4, v/v/v)을 사용하여 전개시킨 후, 다시 클로로포름/아세트산/메탄올/물(80/15/12/4, v/v/v)을 사용하여 두 번째 방향으로 전개시켰다. 또한, 총 지질을 확인하기 위해 몰리브다토포스포릭산(molybdato-phosphoric acid) 5 %, 아미노리피드(aminolipids)를 확인하기 위해 0.2 % 닐하이드린(ninhydrin), 글라이코리피드(glycolipid)를 확인하기 위해 15 % α-나프톨(α-naphthol)를 TLC 플레이트에 분사하였다. 그 후, 플레이트를 10분 동안 120 °C로 가열하였다. 인지질 검사를 위해 몰리브데넘 블루 시약을 TLC 플레이트에 분사하였다. 지방산 분석을 위해 DCY84^T를 30 °C로 24시간 동안 TSA에서 배양하였다. 지방산은 Sherlock Microbial Identification system(MIDI)에서 기술한 방법을 이용하여 추출, 메틸화 및 비누화되었고, TSBA library 버전 6.1을 사용하는 capillary GLC를 사용하여 분석되었다. 지방산 분석을 두 번 수행하였다.

[0102] 또한, DCY84^T과 페니바실러스 바렌골트지의 펩티도글라이칸을 분석하기 위해, 가수분해된 펩티도글라이칸을 셀룰로오스 Merck KGaA(20 X 20 cm) TLC 플레이트에 스팟팅하였고, 메탄올/피리딘/염산(12 N)/물(32/4/1/7 v/v/v/v)을 이용하여 전개시켰다.

[0103] 또한, DCY84^T과 페니바실러스 바렌골트지의 폴리아민을 분석하기 위해, 샘플을 추출한 후 60 % 메탄올과 234 nm 파장을 가지는 reversed-phase Eclipse C18 column(30 X 50 mm² X 2.7 mm)을 이용하여 분석하였다.

[0104] 또한, DCY84^T과 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T의 세포 총 당을 분석하기 위해, 동결 건조한 세포를 100 °C에서 2시간 동안 1 N H₂SO₄를 사용하여 가수분해하였다. 냉각 후, 포화된 Ba(OH)₂와 메틸레드 용액을 첨가하여 샘플의 pH를 조정하였다. 원심분리 후, 상등액을 동결건조하였다. 그 후 해리된 당을 확인하기 위해 10 μl 샘플 및 5 μl 당의 표준 물질을 TLC 플레이트(TLC cellulose Merck KGaA, 20 X 20 cm)에 스팟팅한 후 1-부탄올/피리딘/물(5/3/2, v/v/v)의 혼합용매를 사용하여 전개시켰다.

[0105] 실시예 5-2. DCY84^T의 화학분류적 특성 분석 결과

[0106] DCY84^T와 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T는 이소프레노이드 퀴논(isoprenoid quinine)에서만 검출되는 MK-7을 가짐을 확인하였다. 또한, 주요 극성 지질로서 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PE), 미동정된 아미노인지질(aminophospholipid, APL), 미동정된 아미노지질(aminolipids, AL1, AL2)) 및 미동정된 극성지질(L1)를 확인하였다(도 4). 상기 프로파일은 두 가지의 미동정된 극성 지질을 추가적으로 가진 페니바실러스 바렌골트지 KACC 15270^T의 극성 지질과 유사하였다.

- [0107] 또한, DCY84^T의 세포벽 펩티도글라이칸은 페니바실러스 바렌콜트지 KACC 15270^T와 유사한 D-글루탐산, 알라닌 및 메소디아미노피메릭산(mesodiaminopimelic acids)을 가짐을 확인하였다.
- [0108] 또한, DCY84^T의 주요 지방산은 branched chain anteiso-C_{15:0} (32.1 %), 포화된 C_{16:0}(20.1 %) 및 branched chain anteiso-C_{17:0}(18.3 %)임을 확인하였고, 상기 지방산은 페니바실러스 바렌콜트지 KACC 15270^T, 페니바실러스 티모넨시스 KACC 11491^T, 및 페니바실러스 포이에닉스 NBRC 106274^T에서도 확인되었다. anteiso-C_{15:0}, anteiso-C_{17:0} 및 C_{16:0}의 비율은 매우 가까운 중에서도 상당한 차이가 있다. DCY84^T의 anteiso-C_{17:0} 함량은 다른 균주들보다 높은 반면(18.3 %), DCY84^T의 iso-C_{16:0} 함량은 가장 낮았다(9.0 %).
- [0109] 또한, DCY84^T의 폴리아민 패턴은 페니바실러스 바렌콜트지 KACC 15270^T와 같음을 확인하였다. 이들 균주 모두 폴리아민의 주성분으로 스페르미딘을 가지고 있음을 확인하였다.
- [0110] 또한, DCY84^T의 세포벽 당은 리보오스, 갈락토오스, 및 자일로오스인 반면, 페니바실러스 바렌콜트지 KACC 15270^T는 리보오스, 람노오스, 및 글루코오스임을 확인하였다.
- [0111] 또한, DCY84^T와 관련된 참조 균주들의 세포 지방산, 세포벽 당 및 폴리아민을 표 2에 비교하였다.

표 2

	1	2	3	4
Fatty acid				
Saturated				
C _{12:0}	0.6	2.8	2.1	2.4
C _{14:0}	6.9	12.0	6.3	10.8
C _{16:0}	20.2	31.6	21.4	23.3
C _{18:0}	0.9	tr	tr	tr
Branched-chain				
iso-C _{14:0}	0.7	0.9	1.1	2.2
iso-C _{15:0}	4.9	2.6	5.1	3.5
iso-C _{16:0}	9.0	13.1	10.6	18.6
iso-C _{17:0}	3.6	2.7	3.7	3.5
anteiso-C _{13:0}	tr	tr	0.7	tr
anteiso-C _{15:0}	32.1	22.2	33.4	24.7
anteiso-C _{17:0}	18.3	9.8	13.0	8.9
C _{18:1} ω7c	0.5	—	tr	—
Summed feature 5*	0.9	tr	tr	—
Cell wall sugar	Ribose galactose xylose	Ribose rhamnose glucose	ND	ND
Major Polyamine	Spermidine	Spermidine	ND	ND

[0112]

[0113] (1, 페니바실러스 용인네시스 DCY84^T; 2, 페니바실러스 바렌콜트지 KACC 15270^T; 3, 페니바실러스 포에니시스 NBRC 106274^T; 4, 페니바실러스 티몬엔시스 KACC 11491^T)

[0114] 상기 표 2에서 Summed feature 5*는 anteiso-C_{18:0} 및/또는 C_{18:2} ω6,9c 및/또는 C_{18:1} ω9c을 의미하며, tr은 함량이 0.5 % 미만인 것을 의미한다.

[0115] 상기 형태학적, 생리적, 분자적 및 화학분류적 분석 결과를 통해, 페니바실러스 용인엔시스라고 명명된 DCY84^T(KCTC12768BP)는 페니바실러스 속의 새로운 균주임을 알 수 있었다.

[0116] 실시예 6. in vitro에서 DCY84^T의 식물 성장 촉진 효과 분석

[0117] 실시예 6-1. 분석 방법

[0118] in vitro에서 DCY84^T의 식물 생장 촉진 효과를 확인하기 위해, DCY84^T의 분리물을 사용하여 인돌-3-아세트산(indole-3-acetic acid, IAA) 생산을 분석하였다. 먼저, King B 브로스(카제인 10 g/l, 펩톤 no.3 10 g/l, 디포타슘 인산 1.5 g/l 및 마그네슘 황산염 1.5 g/l) 배지를 사용하여 L-트립토판 3 mg/ml 추가 유무에 따라 DCY84^T를 배양하였다. 배양 6일 후 IAA를 측정하였다.

[0119] 또한, DCY84^T의 인산 가용화 능력을 확인하기 위해, 플레이트 스크리닝 방법을 이용하였다.

[0120] 또한, DCY84^T의 시테로포어(siderophore) 생산 능력을 확인하기 위해, 크롬 아주롤 S 복합체(chrome azurol S complex)[CAS/철(III)/헥세이드실트리메틸 암모늄 브로마이드(hexadecyltrimethyl ammonium bromide)]를 함유한 Pseudomonas Agar F(Difco) 배지가 담긴 페트리디쉬를 사용하였다.

[0121] 실시예 6-2. in vitro에서 DCY84^T의 식물 생장 촉진 효과 분석 결과

[0122] DCY84^T의 IAA 생산을 분석한 결과, DCY84^T는 L-트립토판이 없을 때 $52.96 \pm 1.85 \mu\text{g/ml}$, L-트립토판이 있을 때 $72.83 \pm 2.86 \mu\text{g/ml}$ 의 IAA를 생산함을 알 수 있었다.

[0123] 또한, DCY84^T의 인산 가용화 능력을 분석한 결과, 오파케 피코브스카야(opaque Pikovskaya) 배지의 콜로니 주변에서 명확한 할로 영역(clear halo region)이 나타남을 확인하여, DCY84^T는 인산 가용화 능력을 가짐을 알 수 있었다(도 5).

[0124] 또한, DCY84^T의 시테로포어 생산 능력을 분석한 결과, 청색을 가진 배지에서 DCY84^T의 콜로니 주변의 노란 할로 영역(halo zone)의 발생을 확인하여, DCY84^T가 시테로포어 생산 능력을 가짐을 알 수 있었다(도 5).

[0125] 또한, DCY84^T와 페니바실러스 속의 대조군 균주들의 in vitro 식물 생장 촉진 효과를 상기 표 1에 비교하였다.

[0126] 이를 통해, DCY84^T는 IAA 생산 능력, 인산 가용화 능력 및 시테로포어 생산 능력을 가져 식물 생장 촉진 효과를 가짐을 확인한바, 식물 생장 촉진용 미생물 제제로서 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0127] 실시예 7. 식물생장 촉진 미생물(plant growth-promoting bacteria, PGPB) 후보종의 분자적 특성 및 식물 생장 촉진 효과 분석

[0128] 실시예 7-1. 분석 방법

[0129] 상기 용인 숲의 토양에서 분리된 미생물의 16S rRNA 서열을 실시예 3-1의 분석 방법을 통해 분석하였고, IAA 및 시테로포어 생산을 실시예 6-1의 분석 방법을 통해 분석하였다.

[0130] 실시예 7-2. PGPB 후보종의 분자적 특성 및 식물 생장 촉진 효과 분석 결과

[0131] 형태적인 차이로 콜로니를 구분하여 10개의 PGPB 후보종을 선택하였고, PGPB1, PGPB2, PGPB3, PGPB4, PGPB5, PGPB6, PGPB7, PGPB8, PGPB9 및 PGPB10으로 명명하였다. 분리된 16S rRNA 서열을 EzTazon 데이터베이스와 비교한 결과, 4개의 미생물은 바실러스 속, 3개의 미생물은 페니바실러스 속, 2개의 미생물은 브레비바실러스 속, 1

개의 미생물은 마이크로코커스 속에 속하였다(표 3).

표 3

Isolates	Pairwise similarity of the 16S rRNA sequence		IAA Production (μg/mL)		Phosphate Solubilization*	Siderophore Production*
	Nearest Strain	Similarity	w/o L-tryptophan	with L-tryptophan		
PGPB1	<i>Bacillus sonorensis</i> NRRL B-23154	99.9%	0.55 ± 0.17	1.17 ± 0.14	(-)	w
PGPB2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> BGSC3A28	99.9%	2.66 ± 0.32	12.24 ± 0.46	(-)	w
PGPB3	<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBNB 205	99.9%	1.13 ± 0.40	12.20 ± 0.50	(-)	w
PGPB4	<i>Bacillus oleronius</i> DSM 9356	99.0%	13.18 ± 2.48	22.63 ± 1.18	(-)	(+)
PGPB5	<i>Brevibacillus borstelensis</i> NRRL NRS-818	99.8%	24.25 ± 0.87	26.12 ± 0.92	(-)	w
PGPB6	<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 15304	98.8%	32.57 ± 1.85	39.09 ± 1.05	w	(+)
PGPB7	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004	99.4%	49.48 ± 1.05	52.94 ± 1.30	(+)	(+)
PGPB8	<i>Paenibacillus barengoltzii</i> KACC (DCY84 ^T) 15270 ^T	96.9%	69.96 ± 1.85	72.83 ± 2.26	(+)	(+)
PGPB9	<i>Paenibacillus cookii</i> LMG 18419	99.6%	36.76 ± 0.45	38.66 ± 2.64	(+)	w
PGPB10	<i>Paenibacillus macerans</i> IAM 12467	99.7%	31.47 ± 0.69	33.98 ± 2.71	(-)	(+)
<i>P. polymyxa</i> KACC 10485 ^T			80.14 ± 0.69	85.67 ± 5.70	(+)	(+)

((+), 양성; (-), 음성; w, 약한 양성; PGPB 8은 DCY84^T를 의미하는 것임)

상기 표 3에서 알 수 있듯이, PGPB 중 일부는 트립토판이나 다른 물질 없이 IAA를 생산하였고, L-트립토판이 첨가된 변형 배지에서는 IAA의 생산량이 증가함을 확인하였다. 그러나 일부 종들은 두 종류의 배지에서도 IAA를 생산하지 못함을 확인하였다. L-트립토판의 유무와 상관없이 IAA를 가장 많이 생산하는 것은 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T(*Paenibacillus polymyxa* KACC 10485^T)이었고, 각각의 조건에서 85.6±75.70 μg/mL(L-트립토판 첨가)과 80.1±40.69μg/mL(L-트립토판 무첨가)의 IAA를 생산하였다. 이어서 페니바실러스 용인엔시스 DCY84^T는 각각의 조건에서 72.8±32.26 μg/mL(L-트립토판 첨가)과 69.9±61.85 μg/mL(L-트립토판 무첨가)의 IAA를 생산하였으며, 마이크로코커스 연난네시스(*Micrococcus yunnanensis*) YIM 65004는 각각의 조건에서 52.9±41.30 μg/mL(L-트립토판 첨가)과 49.4±81.05 μg/mL(L-트립토판 무첨가)의 IAA를 생산함을 확인하였다.

또한, 인산 가용화 능력을 분석한 결과, 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T, DCY84^T, PGPB7, 및 PGPB9만이 인산을 가용화할 수 있으며, 모든 PGPB는 약하긴 하지만 시데로포어를 생산할 수 있음을 확인하였다.

실시예 8. in vivo에서 DCY84^T의 식물 내염성, 내건성 및 금속 저항성 촉진 효과 분석

실시예 8-1. 애기장대에 PGPB 접종

애기장대인 아라비도시스 탈리아나의 생태종 콜롬비아(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia, Col-0)의 씨앗을 1.125%(w/v) 치아염소산나트륨(NaOCL) 용액에 15분 동안 담궈 표면을 멸균시킨 후 멸균된 증류수로 5번 이상 세척하였다. 멸균된 토양에 씨앗을 심었고, 발아 이후, 각각의 식물을 다시 옮겨 심었으며, 16시간의 광 주

기를 갖는 22 °C 생장 챔버에서 2주 동안 생육하였다. 마이크로코커스 연난네시스인 PGPB7, DCY84^T인 PGPB8, 및 양성 대조군으로 사용된 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T를 애기장대에 각각 접종하였다. 각 미생물을 30 °C TSB 배지에서 late log 상태가 될 때까지 배양한 후 배양 브로스를 3000 x g에서 15분 동안 원심 분리하여 세포를 침전시키고, 세포 농도가 10⁸ CFU/mL에 도달할 때까지 식염수에 용해시켰다. 상기 2주 동안 키운 애기장대의 뿌리를 10⁸ CFU/mL의 미생물 현탁액에 24시간 동안 담궈 미생물을 접종시켰고, 모크(mock) 식물과 음성 대조군 식물을 식염수에 담겼다.

[0139] 실시예 8-2. PGPB가 접종된 애기장대에 스트레스 처리

[0140] PGPB가 접종된 애기장대의 식물 내염성, 내건성 및 금속 저항성 촉진 효과를 분석하기 위해, PGPB가 접종된 애기장대에 스트레스를 처리하였다. 먼저, 미생물 접종 1주일 이 지난 후, 모크 식물에는 어떤 스트레스도 처리하지 않고, 음성대조군, 양성대조군, PGPB7와 DCY84^T에는 비생물학적 스트레스(염, 가뭄 또는 중금속)를 처리하였다. 염 스트레스를 애기장대에 200 mM 염화나트륨 수용액을 주어 수행하였다. 가뭄 스트레스를 위해 애기장대에 물을 주지 않았고, 중금속 스트레스를 위해 1 M 황산알루미늄(Al₂(SO₄)₃)이 포함된 물을 애기장대에 주었다. 5일 동안 스트레스를 처리하였고, 각 처리 그룹별 5개의 화분을 사용하였다. 처리가 모두 끝난 식물을 즉시 액체질소를 이용하여 냉동하였고, 다음 분석 때까지 -70 °C에서 보관하였다.

[0141] 실시예 8-3. 정량적 실시간 PCR(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)

[0142] 스트레스가 처리된 애기장대의 유전자 발현을 분석하기 위해, 스트레스가 처리된 애기장대의 총 RNA를 RNeasy 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 분리하였다. RNA의 농도는 CE 나노값 분광계를 이용하여 측정하였다. cDNA의 첫번째 가닥을 얻기 위해, 2 µg의 전체 RNA를 사용하여 최종 반응액 20 µL을 Power cDNA 키트(Invitrogen)를 사용하여 역전사시켰다. 합성된 cDNA를 100 µL로 희석하였고, 희석된 3 µL를 qRT-PCR에 사용하였다. 유전자 특이적 프라이머(표 4) 및 SYBR Green Sensimix Plus Master Mix(Quantace, Watford, England)를 이용하여 10 µL 반응액으로 CFX Connect™ 실시간 PCR 시스템(Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA)을 통해 qRT-PCR을 수행하였다. 액틴을 암호화 하고 있는 하우스키핑(housekeeping) 유전자를 대조군으로 사용하였다. 하기와 같은 조건으로 PCR을 수행하였다:

[0143] 95 °C, 3분; 95 °C, 10초의 39 사이클; 각 프라이머 쌍의 어닐링 온도에서 30초; 95°C, 10초; 멜트 커브 분석을 위해 65 °C에서 95 °C까지 5초 동안 0.5 °C씩 증가.

[0144] 각 사이클의 마지막 단계에서 형광 생성물을 검사하였다. 증폭, 검출, 데이터 분석은 버전 3.1 CFX Manager™ 소프트웨어(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 각 샘플에 있는 템플레이트(template) 양의 상대적인 차이를 측정하기 위해, 각 유전자 발현의 Ct 값을 β-액틴에 대한 Ct 값으로 평준화하였고, formula 2^{-ΔΔCt}를 이용하는 캘리브레이터(calibrator)에 비례하여 계산하였다. 독립적인 세 번의 실험을 수행하였다.

표 4

Primer	Sequence (5'- 3')	Temp. (°C)	Annealing Temp. (°C)	서열 번호
<u>Real time PCR primer to determine transcript levels under salinity stress</u>				
<i>AtRSA1</i> -F	GAAGTTCAGTGAGTGGTGGCGCAGAAGGAG	65.1	58	1
<i>AtRSA1</i> -R	GGTGAATCAGGTAAAGTAGGGACATATC	56.5		2
<i>AtVQ9</i> -F	AATCACCGGTCTCTTCGTACAT	55.7	58	3
<i>AtVQ9</i> -R	GAGGTGAGACCAAAGGAGCTAA	56.2		4
<i>AtWRKY8</i> -F	ATGATCTCTTCCGTGTGCCA	56.3	58	5
<i>AtWRKY8</i> -R	ATCATCAAGGCTCTTGTTTGAAGA	54.7		6
<u>Real time PCR primer to determine transcript levels under drought stress</u>				
<i>AtERD15</i> -F	CCAGCGAAATGGGGAAACCA	58.2	60	7
<i>AtERD15</i> -R	ACAAAGGTACAGTGGTGGC	55.2		8
<i>AtRAB18</i> -F	CATGCCATGGCGTCTTACCAGAACCGTCC	65.8	60	9
<i>AtRAB18</i> -R	TTTACTGCAGTTAACAACGGCCACCACGGGAAGC	68.2		10
<i>AtLT178</i> -F	CTCAGAAACTTTCAAAGAGCTTAGAAAA	54.1	60	11
<i>AtLT178</i> -R	AAGAGAGCGTTGGTTTGTACTTTGT	57.0		12
<u>Real time PCR primer to determine transcript levels under aluminum stress</u>				
<i>AtAIP</i> -F	TCGTCGAGAAAAATCCATCC	52.4	55	13
<i>AtAIP</i> -R	CAATGGAACCTTGCCAACCTT	53.8		14
<i>AtALS3</i> -F	TGTTTCCCGATCGTTTCTTC	52.8	55	15
<i>AtALS3</i> -R	TAATCCGGCCACGTACTTTC	54.7		16
<i>AtALMT1</i> -F	GAGAGCTCGGTGAAAAGGTG	55.7	55	17
<i>AtALMT1</i> -R	CGTGGTTTTCTGGTGGATCT	55.0		18
<u>Housekeeping gene</u>				
<i>AtActin2</i> -F	GTGTGCTCTTGCTTATCTGGTTCG	55.5	55, 58, 60	19
<i>AtActin2</i> -R	AATAGCTGCATTGTCACCCGATAC	57.2		20

[0145]

[0146] 실시예 8-4. in vivo에서 DCY84^T의 식물 내염성, 내건성 및 금속 저항성 촉진 효과 확인

[0147] DCY84^T가 접종된 애기장대의 식물 내염성 촉진 효과를 분석하기 위해, DCY84^T가 접종된 애기장대에 염 스트레스를 처리한 결과, DCY84^T를 처리한 애기장대는 PGPB를 접종하지 않고 스트레스 처리만 한 음성(-) 대조군, 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T를 처리한 양성(+) 대조군 및 PGPB7을 처리한 애기장대에 비해 염 스트레스에 저항성을 보이며, 스트레스를 받지 않은 모크 식물과 유사한 잎과 뿌리 형태를 가짐을 확인하였다(도 6).

[0148] 또한, 염 스트레스와 관련된 *AtRSA1*, *AtVQ9*, 및 *AtWRKY8* 유전자 발현을 분석한 결과, DCY84^T를 처리한 애기장대는 아무런 PGPB도 처리하지 않은 음성 대조군에 비해 약 1.5배의 더 높은 *AtRSA1* 전사 수준을 보였다. 또한, *AtWRKY8*는 약 1.5배 증가하고, *AtVQ9*는 약 1/2배 감소하는 것을 확인하였다. 하지만, PGPB7를 처리한 애기장대는 음성 대조군보다 낮거나 약간 높은 *AtRSA1*, *AtWRKY8*, 및 *AtVQ9* 전사 수준을 나타내었다(도 7).

[0149] 이를 통해, 본 발명의 DCY84^T는 다른 PGPB보다 매우 우수한 식물 내염성 촉진 효과를 가짐을 알 수 있었다.

- [0150] 또한, DCY84^T가 접종된 애기장대의 식물 내건성 촉진 효과를 분석하기 위해, DCY84^T가 접종된 애기장대에 가뭄 스트레스를 처리한 결과, DCY84^T를 처리한 애기장대는 PGPB를 접종하지 않고 스트레스 처리만 한 음성 대조군, 양성 대조군 및 PGPB7을 처리한 애기장대에 비해 가뭄 스트레스에 저항성을 보이며, 스트레스를 받지 않은 모크 식물과 유사한 잎과 뿌리 형태를 가짐을 확인하였다(도 6).
- [0151] 또한, 가뭄 스트레스 처리시 발현이 증가되는 *AtERD15*, *AtRAB18* 및 *AtLT178* 유전자 발현을 분석한 결과, DCY84^T를 처리한 애기장대는 아무런 PGPB도 처리하지 않은 음성 대조군에 비해 약 1.4 내지 2.2배 더 높게 상기 유전자를 발현함을 확인하였다(도 8). 또한, PGPB를 처리한 양성 대조군 및 PGPB7을 처리한 애기장대보다도 매우 높게 *AtERD15* 및 *AtLT178*를 발현함을 확인하였다.
- [0152] 이를 통해, 본 발명의 DCY84^T는 다른 PGPB보다 매우 우수한 식물 내건성 촉진 효과를 가짐을 알 수 있었다.
- [0153] 또한, DCY84^T가 접종된 애기장대의 식물 금속 저항성 촉진 효과를 분석하기 위해, DCY84^T가 접종된 애기장대에 금속 스트레스를 처리한 결과, DCY84^T를 처리한 애기장대는 PGPB를 접종하지 않고 스트레스 처리만 한 음성 대조군, 양성 대조군 및 PGPB7을 처리한 애기장대에 비해 금속 스트레스에 저항성을 보이며, 스트레스를 받지 않은 모크 식물과 유사한 잎과 뿌리 형태를 가짐을 확인하였다(도 6).
- [0154] 또한, 가뭄 스트레스 처리시 발현이 증가되는 *AtAIP*, *AtALS3* 및 *AtALMT1* 유전자 발현을 분석한 결과, DCY84^T를 처리한 애기장대는 아무런 PGPB도 처리하지 않은 음성 대조군에 비해 약 1.5배 더 높게 상기 유전자를 발현함을 확인하였다(도 8). 또한, PGPB를 처리한 양성 대조군 및 PGPB7을 처리한 애기장대보다도 높게 *AtAIP*, *AtALS3* 및 *AtALMT1*를 발현함을 확인하였다.
- [0155] 이를 통해, 본 발명의 DCY84^T는 다른 PGPB보다 매우 우수한 식물 금속 저항성 촉진 효과를 가짐을 알 수 있었다.
- [0156] **실시예 9. DCY84^T의 식물병 방제 효과 분석**
- [0157] **실시예 9-1. in vitro에서 DCY84^T의 식물병 방제 효과 분석 방법**
- [0158] DCY84^T의 식물병 방제 효과를 확인하기 위해, in vitro에서 벼 흰잎마름병 유발 미생물인 산토모나스 오리재 pv. 오리재 필리핀 종 6(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Philippine race 6, PX099)에 대한 DCY84^T의 방제 효과를 분석하였다. 먼저, PGPB7와 DCY84^T를 late log 상태(10^8 CFU/mL)가 될 때까지 배양 후, 배양액 10 μ L를 10^8 CFU/mL의 PX099를 포함한 TYE 배지(트립톤 10g/L, 이스트 추출물 5g/L 및 염화나트륨 5 g/L; pH 7.5)에 떨어뜨렸다. *E.coli* TOP10 균주를 대조군으로 사용하였고, 모든 균주를 30 °C에서 16시간 동안 배양하였다.
- [0159] **실시예 9-2. in vivo에서 DCY84^T의 식물병 방제 효과 분석 방법**
- [0160] DCY84^T의 식물병 방제 효과를 확인하기 위해, in vivo에서 PX099에 대한 DCY84^T의 방제 효과를 분석하였다. 먼저, 벼(*Oryza sativa* L. var. *japonica* cv. Chuchung)를 6주 동안 온실에서 재배한 후, 접종을 위해 28 °C에서 14 시간의 낮, 24 °C에서 10 시간의 밤, 및 90 %의 상대 습도의 조건을 가진 생장 챔버로 이동시켰다. PGPB7와 DCY84^T를 late log 상태가 될 때까지 30 °C의 TSB에서 배양한 후, 배양 브로스를 원심분리하고 멸균 식염수에

다시 현탁시켜 10^8 CFU/mL의 농도로 맞추었다. PX099를 적당한 항생제가 첨가된 펩톤 수크로스 아가에서 28℃에서 72시간 동안 배양하였고, 멸균 증류수에 10^9 CFU/mL의 농도로 현탁하였다. PGPB7 또는 DCY84^T를 2시간 동안 디핑(dipping) 방법을 이용하여 각각 *O. sativa*에 접종하였고, 하루 동안의 회복 기간을 두었다. 회복 기간 후, 완전히 펼쳐진 잎의 끝으로부터 대략 4 cm지점을 가위로 자른 후, 박테리아 현탁액에 담그는, scissorclip 방법을 이용하여 상기 PGPB가 접종된 벼에 PX099종을 접종하였다. 14일 후 병변의 길이를 측정하였고, 결과를 각 군 주마다 3개 잎의 평균으로 나타내었다.

[0161] 실시예 9-3. DCY84^T의 식물병 방제 효과 분석 결과

[0162] in vitro에서 벼 흰잎마름병 유발 미생물인 PX099에 대한 DCY84^T의 방제 효과를 분석한 결과, PGPB7 및 DCY84^T의 콜로니 주변은 깨끗한 영역을 형성하지만, 대조군인 *E.coli* TOP10의 콜로니는 그렇지 않은 것을 확인하였다(도 8A).

[0163] 또한, in vivo에서 PX099에 대한 DCY84^T의 방제 효과를 분석한 결과, DCY84^T를 처리한 벼는 대조군 및 PGPB7를 처리한 벼에 비해 PX099 감염 증상이 거의 나타나지 않음을 확인하였다. DCY84^T를 처리한 벼의 병변 길이는 3.34 ± 0.21 cm인 반면, 대조군 및 PGPB7의 경우 각각 13.2 ± 0.64 cm 및 8.62 ± 0.35 cm이었다(도 8B 및 8C).

[0164] 이를 통해, 본 발명의 DCY84^T는 다른 PGPB보다 우수한 벼 흰잎마름병 방제 효과를 가짐을 확인한바, 식물병 방제에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0165] 실시예 10. DCY84^T의 간척지 토양에서 식물의 생장 촉진 효과 분석

[0166] 실시예 10-1. 분석 방법

[0167] DCY84^T의 간척지 토양에서 식물의 생장 촉진 효과를 분석하기 위해, 한국 태안 지역의 해안가에서 수집한 토양을 이용하여 DCY84^T의 벼 생장 촉진 효과를 확인하였다. 먼저, PGPB7, DCY84^T, 또는 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T를 30 ℃의 TSB에서 late log 상태가 될 때까지 배양한 후, 배양 브로스를 원심 분리하여 10^8 CFU/mL의 농도가 되도록 멸균된 식염수에 다시 현탁시켰다. 벼(*Oryza sativa* L. var. *japonica* cv. Chuchung)의 씨앗을 24 시간 동안 상기 미생물 현탁액에 담갔다. 대조군에는 식염수를 처리하였다. 각각 처리한 50개의 벼 씨앗을 화분에 심었고, 28℃에서 14시간의 낮, 24℃에서 10시간의 밤 및 90%의 상대 습도의 조건에서 재배하였다. 본 발명에서 사용된 토양은 한국의 태안 해안가에서 수집한 것이었다. 발아 속도를 씨앗을 심은 이틀 후에 측정하였고, 싹의 길이, 싹의 수, 뿌리의 길이, 뿌리의 수, 순수 무게 및 건조된 무게를 싹이 난 후, 2주 뒤에 측정하였다.

[0168] 또한, 태안 지역의 해안가에서 수집한 토양에 대한 화합물 분석을 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

pH	EC (dS/m)	Salinity (%)	Ex-cations (cmol/kg)				Cl (mg/kg)	SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	NO ₃ -N (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Al (mg/kg)	Organic Matter (g/kg)	Av. P ₂ O ₅ (mg/kg)	Av. SiO ₂ (mg/kg)
			K	Ca	Mg	Na										
6.1	0.43	0.03	0.18	5.06	0.69	0.23	58.87	17.09	9.03	66561.11	436.46	108.59	56870.00	23.0	344	90

실시예 10-2. DCY84^T의 간척지 토양에서 식물의 생장 촉진 효과 분석 결과

한국 태안 지역의 해안가에서 수집한 토양을 이용하여 DCY84^T의 벼 생장 촉진 효과를 확인한 결과, DCY84^T를 처리한 경우, PGPB를 처리하지 않은 음성 대조군, 양성 대조군인 페니바실러스 폴리믹사 KACC 10485^T 및 PGPB7보다 싹의 길이, 싹의 수, 뿌리의 길이, 뿌리의 수, 순수 무게 및 건조된 무게와 관련하여 매우 유의한 효과를 가짐을 확인하였다(표 6).

표 6

Growth Parameter	Treatment			
	(-) Control	(+) Control	PGPB7	DCY84 ^T
Germination Rate (%)	22	60	32	68
Longest Shoot (mm)	125.8 ± 14.19	172.0 ± 16.87	144.7 ± 9.64	183.4 ± 7.66
Number of Shoots	2.0 ± 0.10	2.1 ± 0.20	2.1 ± 0.07	2.1 ± 0.10
Longest Root (mm)	39.3 ± 3.88	64.9 ± 4.07	43.1 ± 4.23	71.3 ± 2.20
Number of Roots	6.6 ± 0.20	7.4 ± 0.29	7.1 ± 0.25	7.8 ± 0.15
Fresh Weight (mg)	79.74 ± 4.37	96.97 ± 3.59	84.56 ± 2.98	101.24 ± 2.59
Dry Weight (mg)	31.90 ± 3.76	38.79 ± 2.74	35.82 ± 2.11	40.49 ± 2.70

또한, DCY84^T는 음성 대조군, 양성 대조군 및 PGPB7보다 현저하게 벼의 생장을 촉진시킴을 확인하였다(도 9).

이를 통해, 본 발명에서 새롭게 동정된 DCY84^T는 간척지에서 매우 우수한 식물 생장 촉진 효과를 가짐을 확인한 바, 간척지에서 식물 생장을 촉진하는 데에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

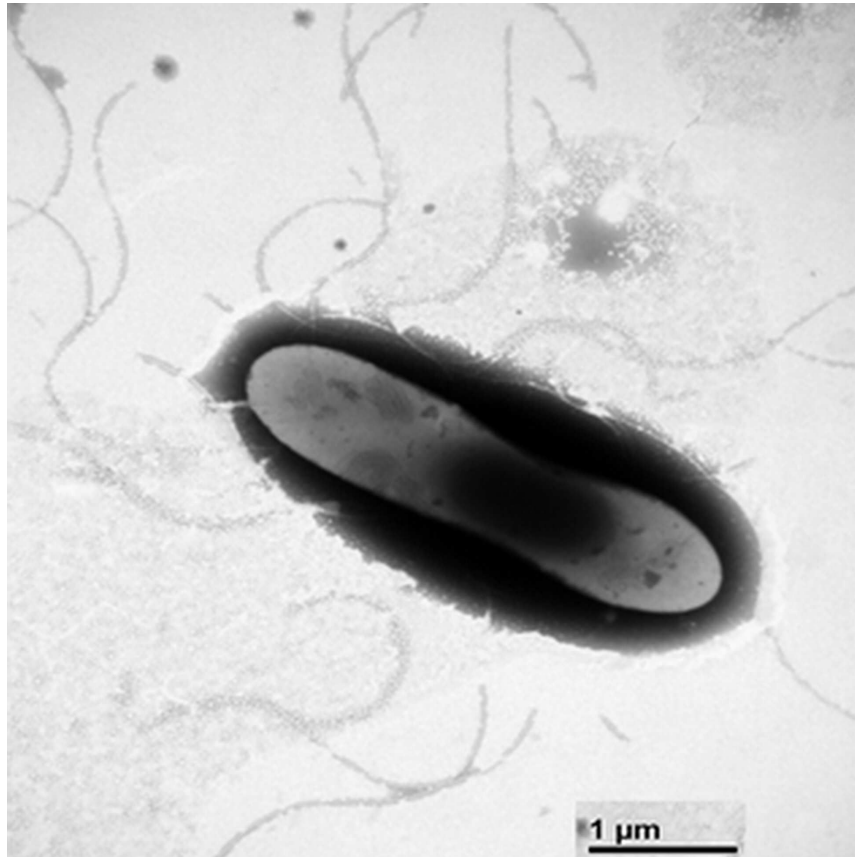
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12768BP

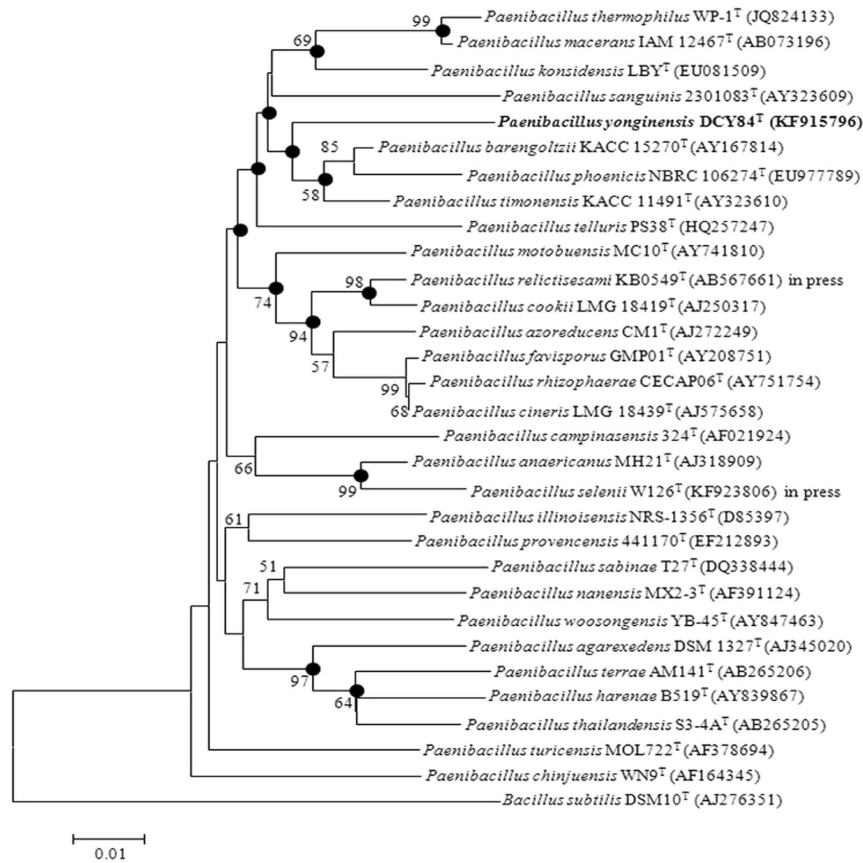
수탁일자 : 20150310

도면

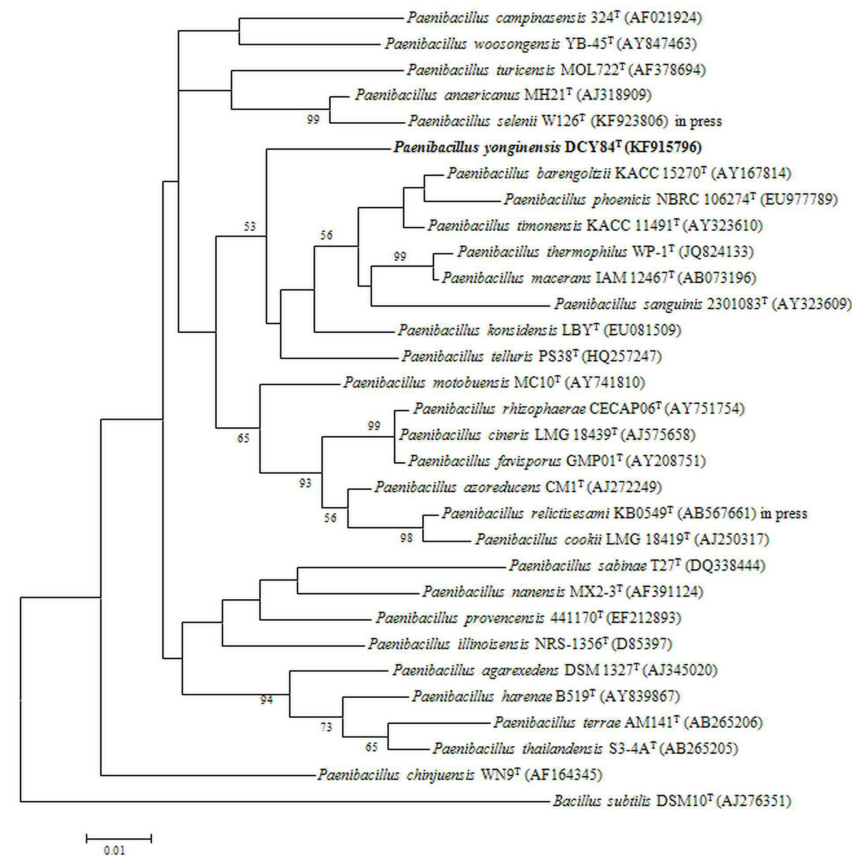
도면1



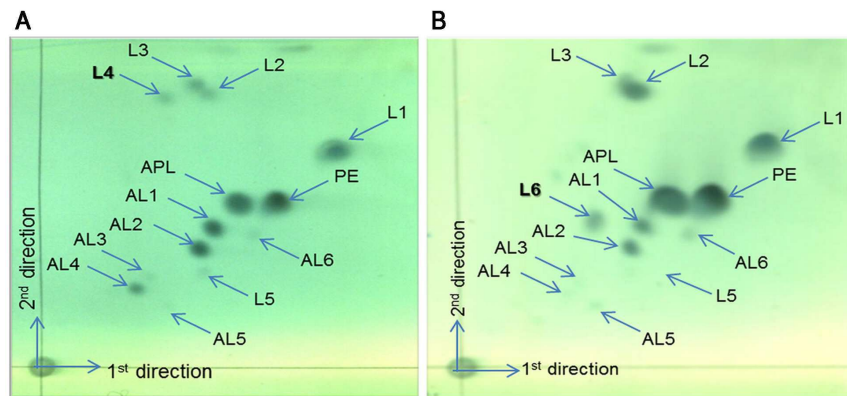
도면2



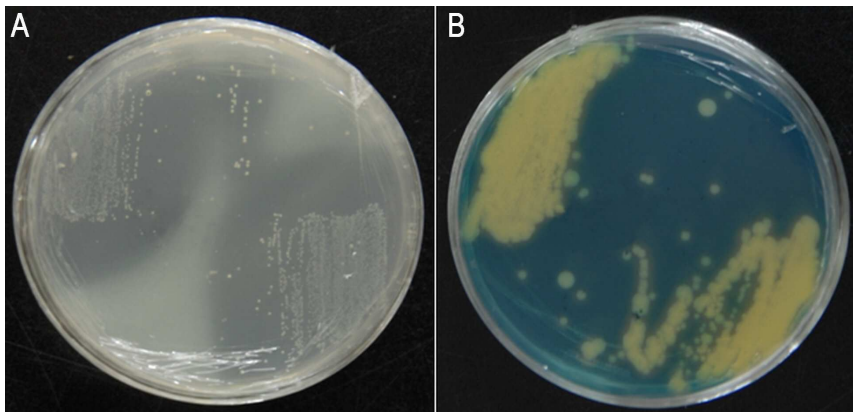
도면3



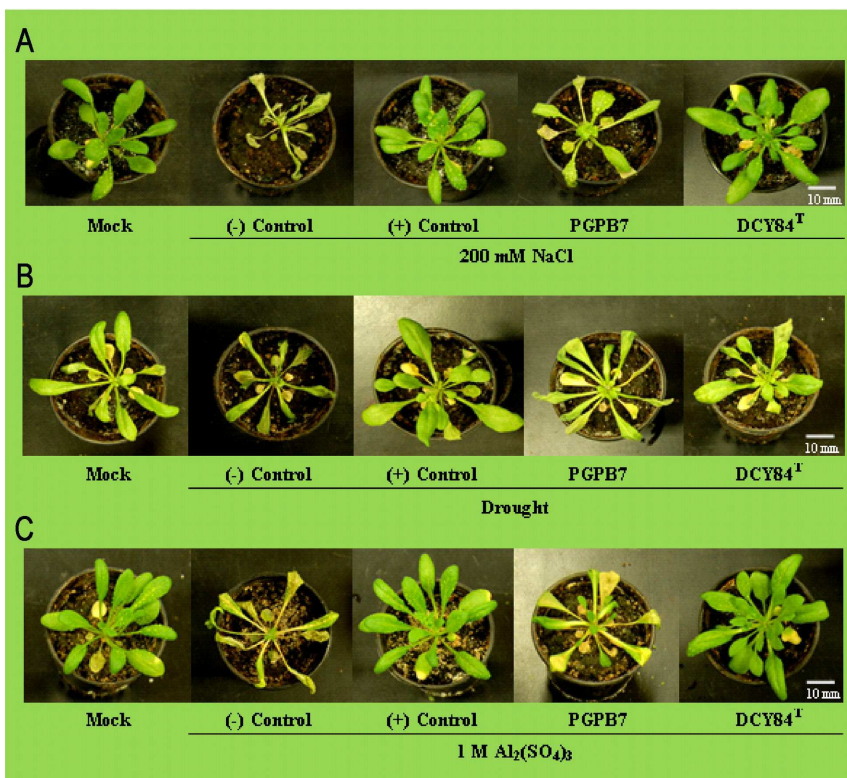
도면4



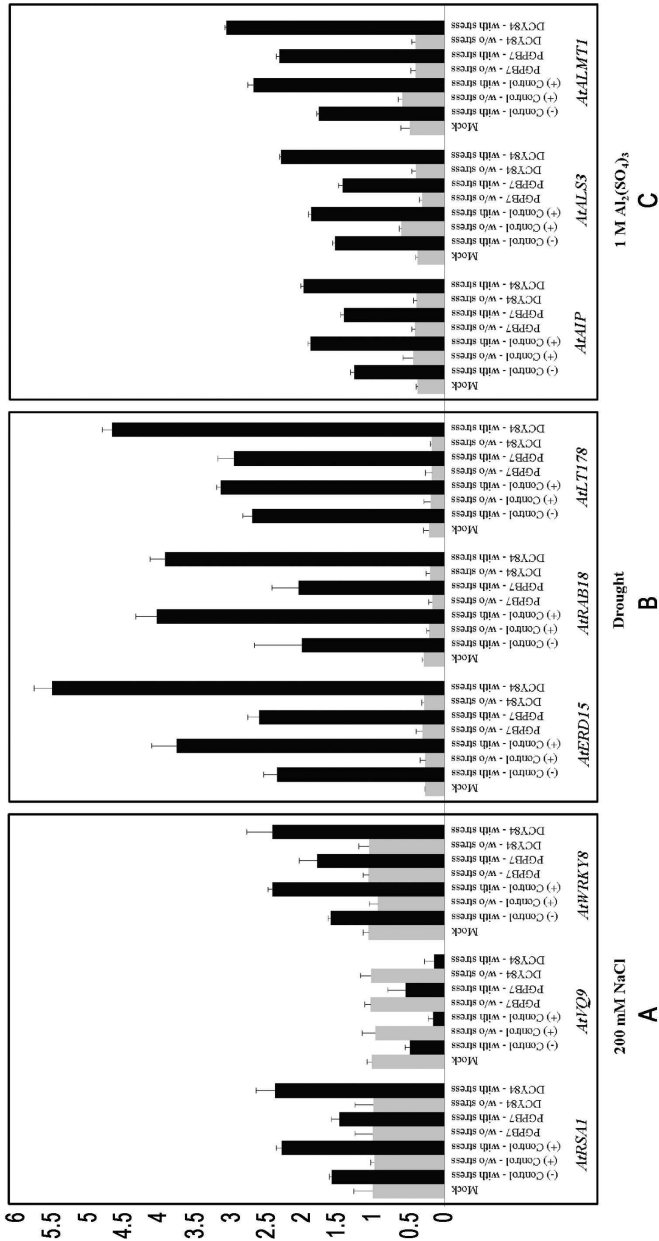
도면5



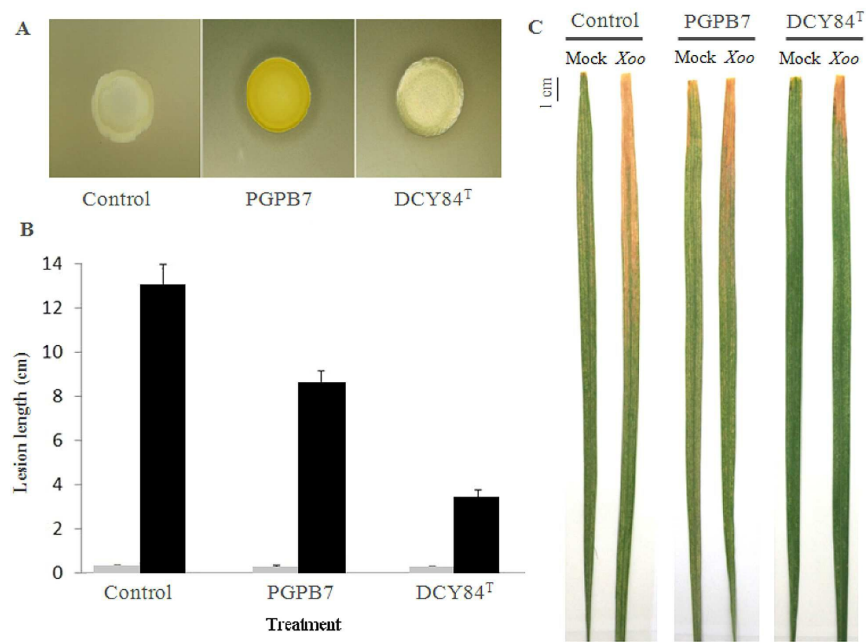
도면6



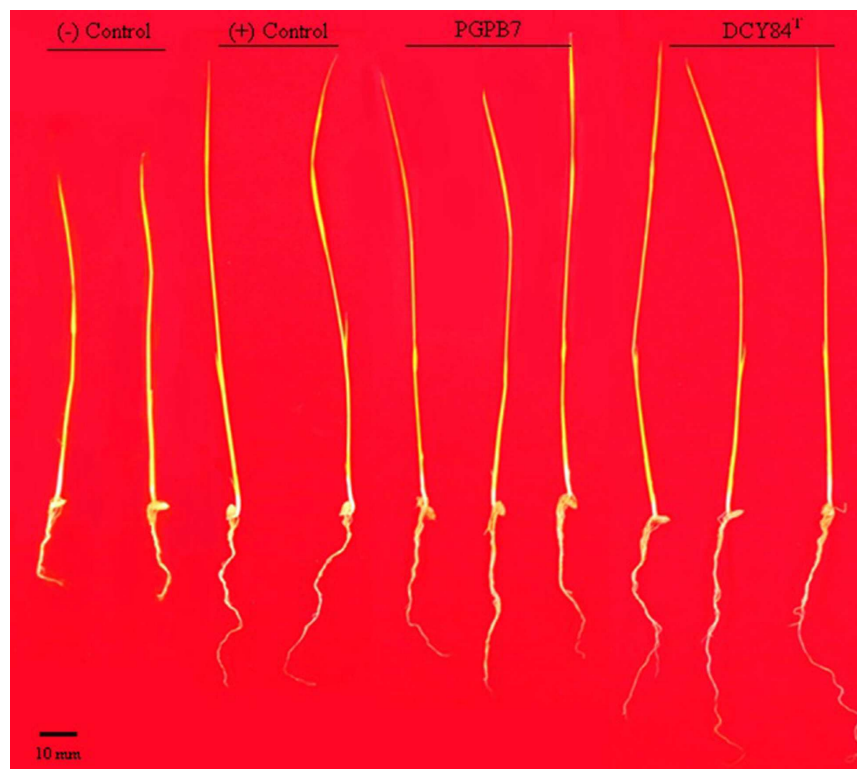
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 SETTURN BIOTECH CO., TLD
 HANBANG BIO

<120> Novel plant growth-promoting bacteria and use thereof

<130> KPA141416KR

<160> 20

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtRSA1-F

<400> 1

gaagttcagt gagtgggtggc gcagaaggag 30

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtRSA1-R

<400> 2

ggtgaatcag gtaaagtagg gacatatc 28

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtVQ9-F

<400> 3

aatcacgggt ctcttcgtac at 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtVQ9-R

<400> 4

gaggtgagac caaaggagct aa 22

<210> 5

<211>

20	
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	AtWRKY8-F
<400>	5
atgatactctt ccgtgtgcc	20
<210>	6
<211>	24
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	AtWRKY8-R
<400>	6
atcatcaagg ctcttggttg aaga	24
<210>	7
<211>	20
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	AtERD15-F
<400>	7
ccagcgaaat ggggaaacca	20
<210>	8
<211>	19
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	AtERD15-R
<400>	8
acaaaggtac agtggtggc	19
<210>	9
<211>	29
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	AtRAB18-F
<400>	9
catgccatgg cgtcttacca gaaccgtcc	29

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtRAB18-R
 <400> 10
 tt tactgcag ttaacaacgg ccaccaccgg gaagc 35

<210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtLT178-F
 <400> 11
 ctcagaaact ttcaaagagc ttagaaaa 28

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtLT178-R
 <400> 12
 aagagagcgt tggtttgtac tttgt 25

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtAIP-F
 <400> 13
 tcgtcgagaa aaatccatcc 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AtAIP-R

<400>	14	
caatggaacc ttgccaactt		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AtALS3-F	
<400>	15	
tgtttcccgga tcgtttcttc		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AtALS3-R	
<400>	16	
taatccggcc acgtactttc		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AtALMT1-F	
<400>	17	
gagagctcgg tgaaaaggtg		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AtALMT1-R	
<400>	18	
cgtggttttc tggatgatct		20
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> AtActin2-F

<400> 19

gtgtgtcttg tcttatctgg ttcg

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtActin2-R

<400> 20

aatagctgca ttgtcacccg atac

24