



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월12일

(11) 등록번호 10-2324981

(24) 등록일자 2021년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/20* (2020.01)
C12R 1/39 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A01N 63/20 (2020.01)

(21) 출원번호 10-2020-0070977

(22) 출원일자 2020년06월11일

심사청구일자 2020년06월11일

(56) 선행기술조사문헌
 Genbank Accession No.CP048408.1(2020.02.12.)*
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 연세대학교 원주산학협력단
 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자
 이태권
 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

니슈 수스미타 다스
 26493, 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
 특허법인 피씨알

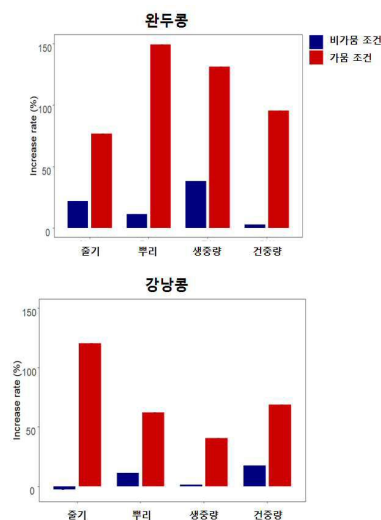
전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 신규한 슈도모나스 플루오레센스 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 신규한 슈도모나스 플루오레센스 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성 유도용 조성물, 이를 이용한 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 방법에 관한 것이다. 상기 균주는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도함으로써 물 부족 환경에서도 식물 성장을 지속하고 촉진하는 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3

(52) CPC특허분류
C12R 2001/39 (2021.05)

(72) 발명자
현혜림
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
노지현
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(56) 선행기술조사문헌
Acta agriculturae Slovenica, Vol.111(1),
pp.63-72(2018.04.)*
KR1020090048773 A
KR1020050116297 A
KR1020160121994 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062657
과제번호	PJ013176012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	콩과작물의 질소고정 균주 유전체 비교분석을 통한 가뭄 내성 기반 구축 및 활용
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 원주산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545020927
과제번호	918014043SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농림부)
연구과제명	기능성 단일세포 고속 분리 및 유전체 분석을 위한 라만분광법 기반 미생물 탈착 기
술 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 원주산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31
공지예외적용 : 있음	

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 16s rRNA 염기서열을 포함하며, 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주 (수탁번호: KCCM12710P).

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 균주는 인산 가용화, IAA 생산능 및 질소 고정능을 갖는 것인, 균주.

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1의 균주, 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성 유도용 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 조성물은 균주 1×10^7 내지 1×10^{11} cfu/mL, 또는 이의 배양물을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

식물체 또는 토양에 청구항 4의 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 신규한 슈도모나스 플루오레센스 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성 유도용 조성물, 이를 이용한 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 가뭄, 염, 저온 등과 같은 스트레스 조건들은 농업 작물 생산에 큰 피해를 입힌다. 특히, 가뭄은 비생물적 스트레스(abiotic stress) 중에서 식물의 성장과 작물의 수확량을 제한시키는 심각한 요소이다. 우리나라의 경우, 전통적으로 벼농사와 같이 물이 많이 필요한 농업이 많이 이루어지기 때문에 가뭄으로 인한 농작물 피해가 더 크다. 또한, 계절별, 연도별, 지역별 강수량의 차이로 인해 매년 가뭄이 발생하며, 특히 계절별 강수량의 차이

가 심해 비가 내리지 않는 계절에는 지역별로 심각한 가뭄이 발생하기도 한다. 2017년 농림 축산 식품부의 자료에 따르면, 2012년 이후 5년 간 서울 면적의 1.2배에 이르는 총 7만 1225 ha의 면적에서 가뭄 피해가 있었으며, 2016년에는 가뭄 피해 면적이 전년 대비 5배나 급증한 것으로 나타났다. 주요 피해 사례는 논물 마름과 밭작물 시듦과 같은 현상으로, 이는 농민들의 경제적 활동 터전인 논과 밭에서 대부분의 피해가 발생하였다.

[0004] 최근에는 가뭄에 의한 작물 피해를 예방하기 위해 유전공학기술을 이용한 가뭄 저항성 식물체의 개발이 진행되고 있다. 한국등록특허 제1219013호에는 'ABF3 유전자로 형질전환된 가뭄 저항성 조롱박 및 이의 제조 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1175102호에는 '벼 유래의 OsABF2 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있다. 그러나, 유전자 조작된 식물체 또는 이를 이용한 식품에 대해 알려지 반응이 일어날 수 있다는 보고가 있어, 많은 소비자들이 유전자 변형 식물 또는 식품에 대해 거부감이 강하다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 식물체가 유전자 조작 없이도 가뭄에 대한 저항성을 가지며, 물이 부족한 환경에서도 식물 성장을 촉진할 수 있는 새로운 방법을 모색한 결과, 토양 미생물 중에서 가뭄에 대한 내성을 유도하는 능력을 갖는 새로운 미생물을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 균주, 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성 유도용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 식물체 또는 토양에 상기의 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양상은 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주를 제공한다.

[0012] 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주는 본 발명자가 토양에 존재하는 미생물을 채취하여 배양한 결과, 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 능력이 가장 우수한 균주로 선별된 것으로, 균주의 16s rRNA 염기서열을 분석함으로써 기존 슈도모나스 플루오레센스 균주와 서열 상동성 99%를 가지는 것으로 확인되어 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas Fluorescens*)로 동정하였다. 상기 DR397 균주는 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 2020년 5월 6일자로 기탁되었다 (수탁번호: KCCM12710P).

[0013] 일 구체예에서, 상기 균주는 인산 가용화, IAA 생산능 및 질소 고정능을 가지는 것일 수 있다. 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 균주는 인산 가용화, 질소 고정능, IAA 및 사이드로포어 생산 측면에서 기존 공지 균주 또는 타 슈도모나스속 균주보다 활성이 우수하며, 작물 재배 실험 결과 가뭄 조건에서 식물 성장을 현저히 촉진할 수 있음이 확인되었다.

[0014] 일 구체예에서, 상기 균주의 16s rRNA 염기서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0015] 상기 균주는 식물 성장 촉진에 도움이 되는 균학적 성질로서 사이드로포어(siderophore) 생산능, ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) 탈아미노화 효소(ACC deaminase) 활성, 아세트인(acetoin) 합성능, 부탄디올(butanediol) 합성능, 페나진(phenazine) 생산능 및 키티나제(chitinase) 생산능으로 구성된 군에서 하나 이상의 성질을 더 보유할 수 있다.

[0016] 상기 가뭄 스트레스에 대한 내성은 토양 전체 중량 대비 20 내지 40 중량%, 25 내지 35 중량%, 또는 30 중량%의 수분 함량을 가지는 토양에서 식물 성장 촉진 활성을 나타내는 것일 수 있다. 예를 들면, 토양에 수분 공급을 7 일 동안 중단하여 토양 수분 함량이 20 내지 40%인 토양에서 식물 성장 촉진 활성을 나타내는 것일 수 있다.

[0017] 상기 가뭄 스트레스에 대한 내성은 평균 기온이 약 10 내지 30℃, 10 내지 25℃, 또는 10 내지 20℃인 토양에서 식물 성장 촉진 활성을 나타내는 것일 수 있다.

[0018] 상기 가뭄 스트레스에 대한 내성은 pH가 6.0 내지 8.0, 6.5 내지 8.0, 7.0 내지 8.0, 6.0 내지 7.5, 6.0 내지

7.0, 6.5 내지 7.5, 6.5 내지 7.0, 또는 7.0 내지 7.5인 토양에서 식물 성장 촉진 활성을 나타내는 것일 수 있다.

- [0019] 상기 가뭄 스트레스에 대한 내성은 한국의 토양에서 최적화되어 나타나는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 '가뭄 스트레스'는 식물 성장에 필요한 정상적인 수분 공급이 이루어지지 않는 상태를 의미하며, 식물 성장 및 생존에 피해를 나타내는 비생물적인 조건 (예를 들어, 건조 조건에 노출, 물 부족 조건에 노출)을 포함한다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 '내성' 또는 '저항성'은 가뭄과 같은 환경 스트레스에 대해 견디는 식물의 성질을 의미한다.
- [0023] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주, 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성 유도용 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 균주는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 다양한 분자의 발현을 증가시키므로, 물이 부족한 환경에서도 식물체의 성장을 지속시키며 촉진시킬 수 있다. 이때, 상기 균주는 인산 가용화 활성 및 IAA 생산 활성이 우수하며, 대기 중의 질소를 암모니아로 환원하는 질소 고정능을 가지므로 식물의 성장을 촉진할 수 있다. 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 균주는 기존 공지 균주 또는 타 슈도모나스속 균주보다 완두, 강낭콩 등과 같은 콩과 식물의 성장 촉진 효과가 우수함이 확인되었다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 가뭄 스트레스에 대한 내성이 유도되지 않은 경우에 비해 식물체의 성장 증가율을 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 이상일 수 있다.
- [0025] 일 구체예에서, 상기 조성물은 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주 1×10^7 내지 1×10^{11} cfu/mL, 1×10^8 내지 1×10^{10} cfu/mL, 또는 1×10^9 내지 5×10^9 cfu/mL를 포함하거나, 또는 이의 배양물을 포함하는 것일 수 있다. 이때, 상기 배양물은 균주와 증류수 또는 TSB 액체 배지(trypticase soy broth)가 혼합된 상태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 이러한 조성물은 다양한 형태로 제제화될 수 있으며, 구체적으로는 건조 분말 형태 또는 액상 비료 형태로 제조될 수 있다. 그 일례로는 액제, 입제, 분제, 유제, 오일제, 수화제, 도포제 등일 수 있으며, 이때 용매 또는 담체가 첨가되어 제조될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 다른 양상은 식물체 또는 토양에 상기 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 단계는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성 유도용 조성물을 식물체에 직접 또는 주변 토양에 처리하는 과정이다.
- [0030] 상기 식물체는 당업계에서 작물로 재배 가능한 식물이라면 특별히 제한되지 않으며, 일례로 밀, 벼, 옥수수, 수수, 기장 등의 곡류; 강낭콩, 팥, 완두콩, 작두콩, 대두 등의 콩류, 감자, 고구마, 토란, 마 등의 감자류와 같은 식용작물일 수 있다.
- [0031] 상기 조성물의 처리 방법은 식물 주변 토양의 표면에 도포하거나, 토양 내 혼입 또는 관주처리할 수 있으며, 식물의 줄기, 잎 또는 가지에 직접 분무 또는 살포하거나, 식물의 종자에 분무 또는 침지하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따른 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도함으로써 물 부족 환경에서도 식물 성장을 지속하고 촉진하는 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주의 계통수 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 DR397 균주가 보유한 스트레스 대응 관련 유전자의 종류 및 수를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 DR397 균주 배양물을 이용한 작물 재배 결과를 나타낸 것이다. 각 조건의

대조군은 균주 없이 배지만을 처리하고, 시험군은 DR397 균주액을 처리하여 물이 부족하거나 (가뭄 조건), 또는 물이 충분한 (비가뭄 조건) 조건에서 완두콩 및 강낭콩을 재배하였다. 이후, 각 군의 줄기 길이, 뿌리 길이, 전체 생중량 및 건중량을 측정하여 각 조건의 대조군 대비 시험군의 증가율(increase rate compared to control, %)을 계산하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

1. 균주 동정

2018년 6월 강원도 원주에 위치한 콩 재배 지역의 토양에서 시료 10 g을 채취하였다. 토양 시료에 멸균 생리식염수 90 mL를 첨가하고 150 rpm에서 30분간 진탕 배양하였다. 이후, 배양액을 연속 희석하여 준비하였다. 균주 배양용 배지로서 25%의 농도로 폴리에틸렌 글리콜 (PEG 6000) (-1.2 Mpa)을 포함하는 TSA 고체 배지(Tryptic Soy Agar) (BD Bacto™)를 준비하였다. TSA 고체 배지에 희석된 배양액을 100 μ L씩 도말하고 37°C에서 7일간 배양하였다. 이후, TSA 고체 배지에서 콜로니를 분리하고 새로운 TSA 고체 배지에서 계대 배양하여 순수 분리하였다. 분리된 8종의 균주(strain)에 대하여 기능성 시험을 수행하였다.

2. 균주 기능성 시험

2-1. IAA(Indole-3-Acetic acid) 생산 측정

트립토판 1%를 포함하는 YEM(Yeast-extract-mannitol) 액체 배지에 각 균주를 1%로 접종 후 30°C, 120 rpm에서 5일 동안 배양하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 Salkowski 시약 (0.5M FeCl₃ 2 mL, 70% 과염소산(perchloric acid) 49 mL 및 물 49 mL 함유)과 25분 동안 반응시켜 흡광도를 530 nm으로 측정하였다.

2-2. 질소고정능(nitrogen fixing ability) 측정

외부와 차단이 가능한 125 mL serum bottle에 질소 제한 배지 (Burk's medium) 25 mL와 각 균주 2.5 mL (10⁴ CFU/mL)를 주입하여 배양하였다. 이때, 상부 공간(head space) 내 가스 10%를 아세틸렌(acetylene) 가스로 대체하고 30°C, 180 rpm에서 6시간 배양하였다. 이후, 가스를 포집하고, 기체 크로마토그래피(gas chromatography)를 이용하여 아세틸렌이 에틸렌(ethylene)으로 환원된 정도를 측정하였다.

2-3. 인 가용화(P solubilization) 측정

PSB 액체 배지에 각 균주를 1%로 접종 후 28°C, 120 rpm에서 3일 동안 배양하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액 200 μ L를 vanadate-molybdate 시약 50 μ L와 30초 동안 반응시켜 흡광도를 530 nm으로 측정하였다.

2-4. 사이드로포어(siderophore) 생산 측정

CAS 고체 배지(chrome azurol sulfonate medium)에 각 균주를 100 μ L씩 도말하고 28°C에서 48일간 배양하였다. 이후, 콜로니 주변에 형성된 노란색 환을 확인하여 사이드로포어 생산 여부를 판단하였다.

2-5. 가뭄 스트레스에서의 식물 성장 촉진 확인

각 균주를 TSB 액체 배지에 접종하고 28°C에서 대수기까지 배양 후 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심 분리된 각 균주를 1:10로 희석된 TSB 액체 배지에 두 번 세척하여 균주액을 준비하였다. 시험군으로는 상기 균주액을 사용하였고, 대조군으로는 1:10로 희석된 TSB 액체 배지만을 사용하였다.

2.5% 차아염소산나트륨(NaClO)에 완두콩과 강낭콩 씨앗을 넣고 3분간 표면 세척하여 멸균 후 증류수에 5회 세척하였다. 50공 (각 73 cm³ ea.) 육묘용 트레이의 각 포트(pot)에 표준 토양 15 g과 균주액 또는 희석 배지 2 mL (1x10⁹ cfu/mL)을 혼합하여 분주 후 멸균된 씨앗을 각각 1립씩 총 20립을 파종하였다. 파종 후 첫 10일 동안 매일 1회씩 물을 주입하고, 이후 7일 동안 물을 제공하지 않고, 7일 후 다시 매일 1회씩 물을 주입하여 재배하였다. 24일 후 재배된 완두콩 및 강낭콩의 줄기 길이와 뿌리 건중량을 측정하여 대조군 대비 시험군의 증가율을 계산하였다.

[0058] 8종의 균주의 IAA 생산, 질소 고정능, 인 가용화 및 사이드로포어 생산 측정, 가뭄 스트레스 조건에서의 식물 성장 증가율을 분석한 결과는 하기 표 1과 같다.

[0059] 그 결과, DR397 처리균은 IAA 및 사이드로포어를 생산하며, 타균주 대비 질소 고정능 및 인 가용화가 우수할 뿐만 아니라 가뭄 스트레스 조건에서 완두콩과 강낭콩의 성장을 모두 높은 수준으로 촉진시키는 것으로 확인되었다.

표 1

균주	IAA 생산 (ug/mL)	N 고정 (nmol/mg/hr)	인 가용화 (ppm)	사이드로포어 생산 유무	완두콩		강낭콩	
					줄기 길이 (%)	뿌리 건중량 (%)	줄기 길이 (%)	뿌리 건중량 (%)
DR397	26.4	42.5	403.5	+	76.6	95.6	120.5	68.7
DR133	26.5	44.9	277.7	+	52.3	34.3	-20.2	21.7
DR205	72.9	26.4	397.3	+	74.3	156.5	194.6	51.3
DR208	12.9	21.5	332.5	+	18.1	152.2	147.8	5.8
DR312	16.3	21.7	345.4	+	21.3	178.3	135.9	47.6
DR408	22.9	27.7	418.8	+	5.1	178.3	180.3	60.3
DR822	28.9	23.6	285.5	+	3.8	52.2	114.5	71.3
DR048	28.4	65.5	216.4	+	61.4	15.9	146.4	5.9

[0062] 3. DR397 균주의 균학적 성질 및 유전자 분석

[0063] DR397 균주는 운동성이 있는 그람 음성의 무포자 간균으로, 호기성이며, 황록색의 형광성 색소를 생산하고, 최적 배양 온도 30 ~ 37℃ (mesophilic)인 것으로 확인되었다.

[0064] DR397 균주의 16s rRNA 염기서열 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. FastDNA™ SPIN Kit (MP Biomedicals)를 이용하여 균주의 genomic DNA를 추출한 후 PicoGreen™ dsDNA quantitation kit를 이용하여 추출된 DNA의 농도 및 순도를 측정하였다. 이후, 추출된 DNA를 프라이머 쌍으로 증폭하였다. QIAquick PCR Purification Kit를 이용하여 증폭된 PCR 산물을 정제한 후, 16S rRNA gene sequencing을 진행하였다. NCBI Blast을 사용하여 DR397 균주의 16s rRNA 염기서열을 분석하였다. DR397 균주의 16s rRNA 염기서열 분석 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

서열번호	구분	염기서열 (5'>3')
1	DR397 16s rRNA	AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGA GCTTGCTCCTGAATTACGCGGCGGACGGGTAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGT TTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGCGCTATCA GATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTG AGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATT GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTT AAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAA CTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCG TAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAGTGGCGAGCT AGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCACT GGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATA CCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTAGCTCTTAGTGGGCGAGCTAA CGCATTAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAAAATGAATTGACGGGGGCCGCAC AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCAATGAAT TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCAATGGCTGTCTGAGCTCGTGTCTG GAGATGTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACT CTAAGGAGACTGCCGTTGACAAACCGAGGAAGGTGGGATGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGGCCT GGGCTACACAGTGTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAA CCGATCGTAGTCCGATCGCAGTGTGAACTGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG AATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGACACCAG AAGTAGCTAGTCAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGTGAAGTCGTAACAA GGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCT
2	foreward primer	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
3	Reverse primer	GGTTACCTTGTACGACTT

[0067] 또한, 전체 유전체 분석은 다음과 같은 방법으로 진행하였다. PureLink® Genomic DNA Extraction mini kit를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후, PacBio RSII 플랫폼 (Pacific Biosciences Inc.)을 통해 whole genome 분석을 진행하였다. 분석을 통해 얻어진 long read 시퀀스를 de-novo assembler HGAP3를 통해 조립하고, Pilon (v1.21)을 이용하여 최종적으로 시퀀스 에러를 보정하였다. 이후, NCBI에서 제공하는 PGAP(Prokaryotic Genome Annotation Pipeline)를 활용하여 각 유전자를 분석하였다. 또한, EZBIOCLOUD를 이용하여 각 유전체 염기서열 평균 유사도를 분석하였다. Prokka 소프트웨어를 통해 각 유전자를 분석하고, 식물 성장 촉진과 연관성이 있는 유전자를 분류하였다. NCBI Blast을 사용하여 DR397 균주의 유용 유전자를 기존 균주들의 유전자와 비교하여 높은 상동성을 나타내는 유전자를 선별하였다.

[0068] NCBI Blast을 사용하여 DR397 균주의 계통수 분석을 실시하였다. 계통수 분석은 16s rRNA gene sequencing 및 whole genome sequencing으로부터 얻어진 시퀀스와 NCBI 데이터베이스에서 추출한 시퀀스를 수집하고, 수집된 시퀀스에 대해 MEGA7 소프트웨어를 통해 Maximum Likelihood 방법으로 계통학적 특성기반 예측 분석을 진행하였다. 계통수는 Kimura-2-parameter 진화모델을 사용하고, 신뢰성 확인을 위해 1,000회의 bootstrapping을 실시하였다.

[0069] 그 결과, 도 1과 같이, DR397 균주는 16s rRNA 염기서열을 기준으로 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)로 분류되었으며, 하기 표 3과 같이, DR397 균주는 기존 슈도모나스 플루오레센스 균주와의 유사성이 99%인 것으로 확인되었다.

표 3

비교 균주	상동성	Identity	Score	Accession
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2115	99%	97.2%	2575	NR115715
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM 12022	99%	96.7%	2536	NR043420
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> JCM2400	99%	96.9%	2542	NR074797
<i>Pseudomonas chlorophis</i> DSM 50083	97%	97.8%	2579	NR044974
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	97%	97.4%	2547	NR114479
<i>Pseudomonas marginalis</i> ATCC 10844	98%	97.1%	2547	NR112072

[0072] 또한, 도 2와 같이, DR397 균주는 다양한 스트레스 대응 관련 유전자를 보유한 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해, DR397 균주가 물 부족에 의한 식물의 스트레스에 대한 내성 효과도 나타낼 것으로 예상할 수 있다.

[0073] 본 발명자들은 슈도모나스 플루오레센스 DR397 균주를 2020년 5월 6일 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 기탁하여 수탁번호 KCCM12710P를 부여받았고, 이후 식물 성장 촉진 효과를 확인하는데 사용하였다.

[0075] 4. DR397 균주를 이용한 가뭄 스트레스에서의 식물 성장 촉진 효과 확인

[0076] DR397 균주를 TSB 액체 배지에 접종하고 28℃에서 대수기까지 배양 후 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리된 균주를 1:10로 희석된 TSB 액체 배지에 두 번 세척하여 균주액을 준비하였다. 시험군으로는 상기 균주액을 사용하였고, 대조군으로는 1:10로 희석된 TSB 액체 배지만을 사용하였다.

[0077] 2.5% 차아염소산나트륨(NaClO)에 완두콩과 강낭콩 씨앗을 넣고 3분간 표면 세척하여 멸균 후 증류수에 5회 세척하였다. 50공 (각 73 cm³ ea.) 육묘용 트레이의 각 포트(pot)에 표준 토양 15 g과 균주액 또는 희석 배지 2 mL (1x10⁹ cfu/mL)을 혼합하여 분주 후 멸균된 씨앗을 각각 1립씩 총 20립을 파종하였다. 가뭄 조건의 경우, 파종 후 첫 10일 동안 매일 1회씩 물을 주입하고, 이후 7일 동안 물을 제공하지 않고, 이후 7일 동안 매일 1회씩 물을 주입하여 재배하였다. 비가뭄 조건의 경우, 파종 후 매일 1회씩 물을 주입하여 재배하였다. 24일 동안 재배된 각 군의 완두콩 및 강낭콩의 줄기 및 뿌리의 길이와 전체 생중량 및 건중량을 측정하였고, 그 결과는 표 4와 같다.

표 4

	재배 조건		뿌리 길이 (cm)	줄기 길이 (cm)	생중량 (mg)	건중량 (mg)
	가뭄 조건	대조군	2.4±1.2	3.0±1.2	12.2±2.0	2.3±0.3
완두콩						

강낭콩	비가뭍 조건	시험군	6.0±2.0	5.3±1.3	28.2±12.1	4.5±1.3
		대조군	7.2±3.1	6.2±3.1	36.8±16.1	6.7±0.9
		시험군	8.1±2.6	7.6±1.2	51.0±8.0	6.9±1.6
	가뭍 조건	대조군	12.3±2.2	11.7±8.3	53.3±34.3	17.7±14.6
		시험군	19.9±2.0	25.8±2.6	74.9±7.0	24.9±2.3
		대조군	19.4±2.3	30.9±4.0	108.5±21.9	37.16±7.3
	비가뭍 조건	시험군	21.6±3.0	30.2±1.7	75.1±6.0	28.9±2.4

[0080] 그 결과, 물이 부족한 가뭍 조건에서 재배된 시험군은 물이 충분히 공급된 비가뭍 조건의 시험군에 비해 뿌리 길이, 줄기 길이, 생중량 및 건중량이 모두 증가하였다.

[0081] 이러한 결과는 DR397 균주가 이미 토양에 존재하는 미생물들과 경쟁하더라도 원활히 정착하여 활동할 수 있으며, 물 부족 환경에서 오히려 식물의 성장을 효과적으로 촉진할 수 있다는 점에서, DR397 균주가 식물체의 가뭍 스트레스에 대한 내성을 유도한다는 것을 뒷받침한다. 나아가, DR397 균주는 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 내성을 유도하는 식물 성장 촉진제로서의 활용 가능성이 높은 것으로 판단된다.

수탁번호

[0083]

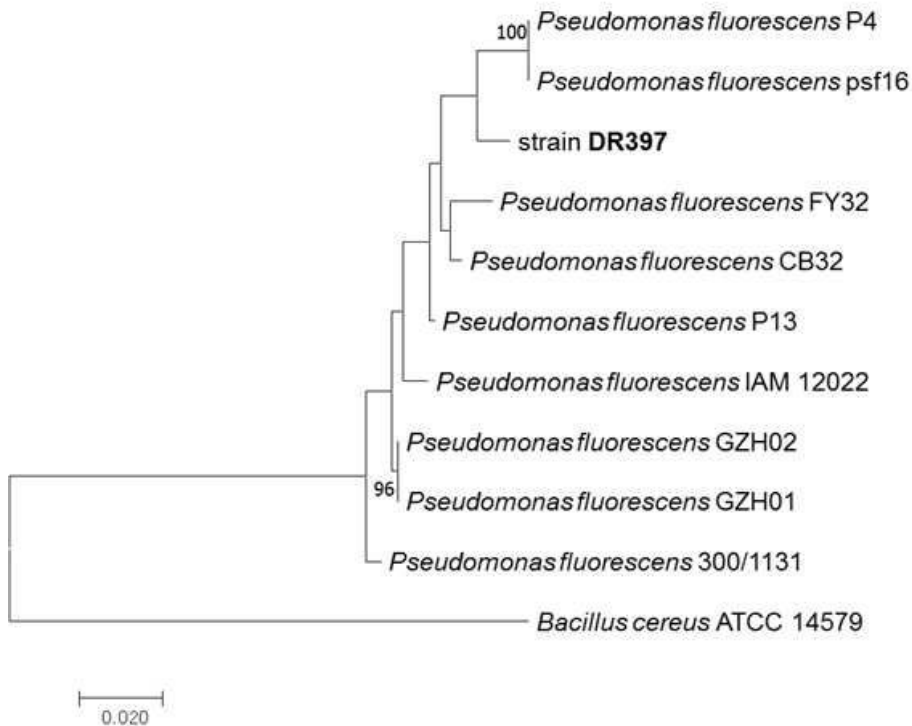
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12710P

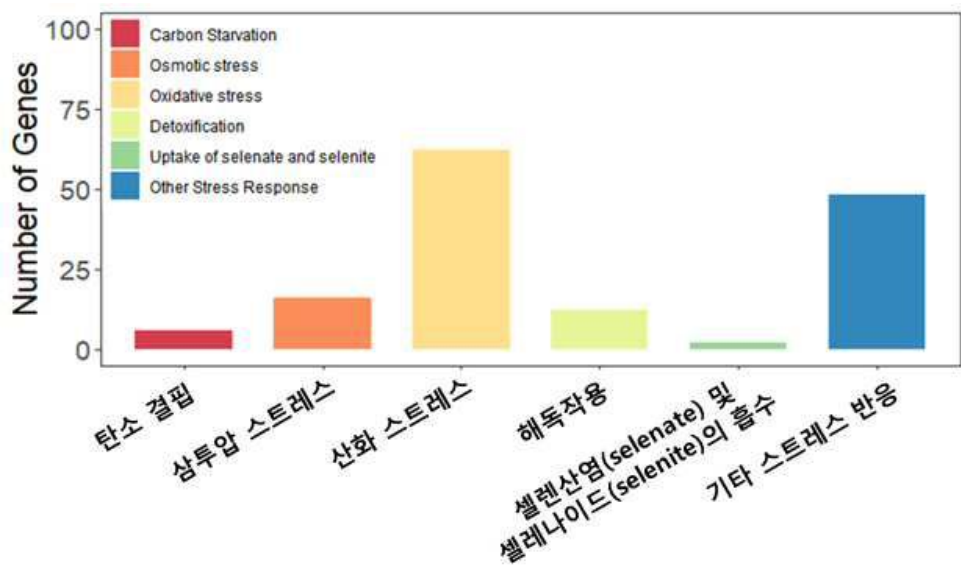
수탁일자 : 20200506

도면

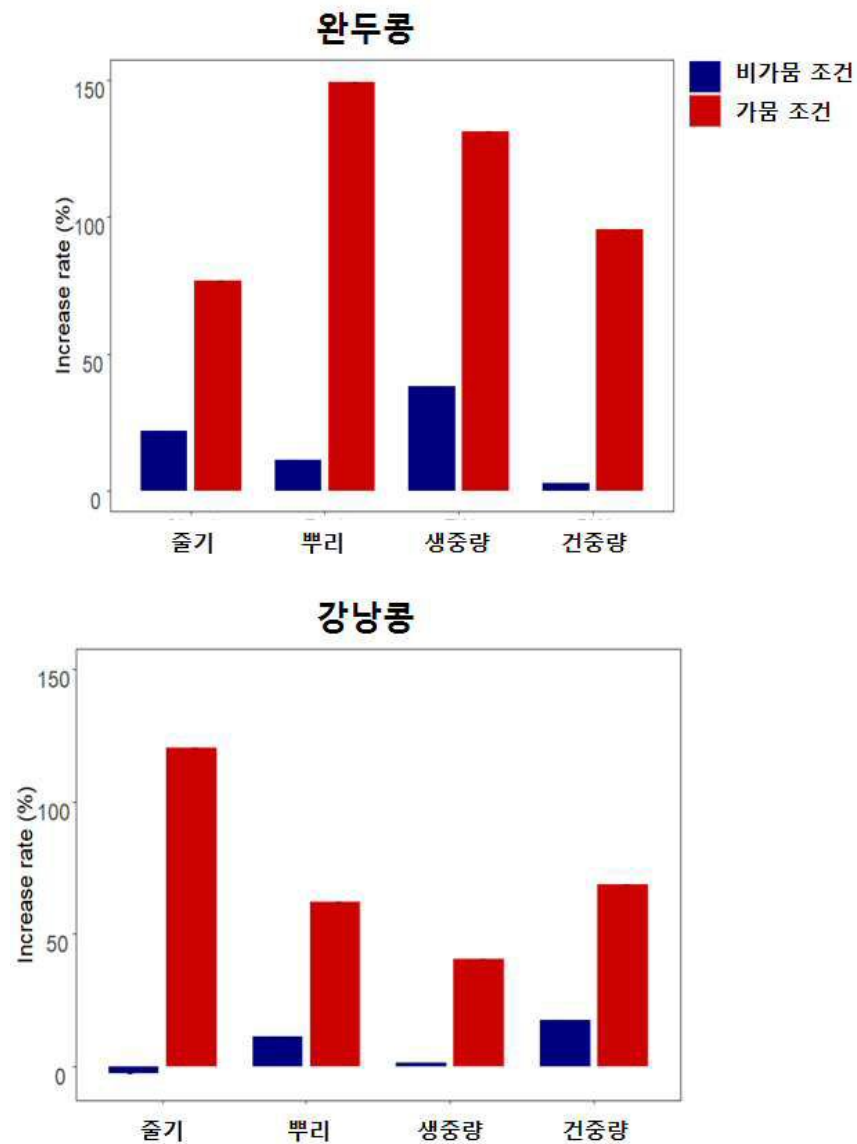
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY WONJU CAMPUS
- <120> Novel Pseudomonas Fluorescens Strain that Induces Resistance to Drought Stress in Plant and Uses Thereof
- <130> PN200115
- <160> 3
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1525
- <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DR397 16s rRNA

<400> 1

```

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggccggcaggc ctaacacatg caagtcgagc      60
ggatgaaggg agcttgctcc tgaattcagc ggccggcaggg tgagtaatgc ctaggaaatct      120

gcctggtagt gggggacaac gtttcgaaag gaacgctaata accgcatacg tcctacggga      180
gaaagcaggg gaccttcggg ccttgccgta tcagatgagc ctaggtcgga ttagctagtt      240
ggtgaggtaa tggtcacca aggccagcat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtea      300
cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca      360
atgggcgaaa gcctgatcca gccatgccgc gtgtgtgaag aaggtcttcg gattgtaaag      420
cactttaagt tgggaggaag ggtttagat taatactctg caattttgac gttaccgaca      480
gaataagcac cggctaactc tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggt gcaagcgtaa      540

atcggaatta ctgggcgtaa agccgcgcta ggtggttcgt taagtggat gtgaaatccc      600
cgggctcaac ctgggaactg catccaaaac tggcgagcta gattatggta gagggtggtg      660
gaatttcctg ttagcgggtg aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcgaaggcg      720
accacctgga ctgatactga cactgagggt cgaagcgtg gggagcaaac aggattagat      780
accctggtag tccacgccgt aaacgatgtc aactagccgt tgggagcctt gagctcttag      840
tggcgagct aacgcattaa gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca      900
aatgaattga cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg      960

aagaacctta ccaggccttg acatccaatg aactttccag agatggattg gtgccttcgg      1020
gaacattgag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa      1080
gtcccgtaac gagcgcaacc cttgtcctta gttaccagca cgttatgggt ggcactctaa      1140
ggagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tgggatgac gtcaagtcac catggccctt      1200
acggcctggg ctacacacgt gctacaatgg tcggtacaaa ggggttgcaa gccgcgaggt      1260
ggagctaata ccataaaacc gatcgtatgc cggatcgag tctgcaactc gactgcgtga      1320
agtcggaata gctagtaata gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc ccgggccttg      1380

tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtggt gttgcaccag aagtagctag tctaacttc      1440
gggaggacgg ttaccacggt gtgattcatg actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt      1500
aggggaacct gcggtggat cacct      1525

```

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foreward primer

<400> 2

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Reverse primer

<400> 3

ggttaccttg ttacgactt 19