

보 문

비생물적 스트레스 환경에서 *Enterobacter ludwigii* SJR3 처리 시 토마토의 성장과 스트레스-관련 유전자의 발현

김나은 · 송홍규*

강원대학교 생명과학과

Effects of treatment of *Enterobacter ludwigii* SJR3 on growth of tomato plant and its expression of stress-related genes under abiotic stresses

Na-Eun Kim and Hong-Gyu Song*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received February 3, 2016; Revised March 21, 2016; Accepted April 5, 2016)

ABSTRACT: This study examined effects of *Enterobacter ludwigii* SJR3 showing a high 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity, on growth of tomato plant and its expression of stress-related genes under drought and salt stress. SJR3 strain was inoculated at 10^6 cell/g soil to 4-week grown tomato plants, and drought and salt stresses were treated. After additional incubation for 1 week, root length, stem length, fresh weight and dry weight of tomato plants treated with SJR3 increased by 37.8, 37.2, 96.8 and 146.6%, respectively compared to those of uninoculated plants in drought stress environment, and they increased by 19.2, 25.4, 19.5, and 105.8%, respectively in salt stress environment. Proline content in tomato leaves increased significantly under stress conditions as one of a protecting substance against stresses, but proline contents in tomato treated with SJR3 decreased by 62.1 and 54.1%, respectively. Relative expression of genes encoding ACC oxidase, ACC1 and ACC4, ethylene response factor genes ERF1 and ERF4, and some other stress-related genes were examined from tomato leaves. Compared to the non-stressed tomato, expressions of all stress-related genes increased significantly in the stressed tomato, but gene expressions in the inoculated tomato were similar to those of no-stressed control tomato. Therefore, *E. ludwigii* SJR3 may play an important role in mitigating drought and salt stress in plants, and can increase productivity of crops under various abiotic stresses.

Key words: *Enterobacter ludwigii* SJR3, abiotic stress, stress-related genes, tomato growth

식물은 다양한 생물적 및 비생물적 스트레스에 항상 노출 되는데 특히 토양의 수분 부족과 높은 염분 농도는 육상식물의 성장과 발달을 저해하며 품질을 감소시키는 주요 요인이다 (Mahajan and Tuteja, 2005). 또한 식물이 스트레스 환경에 처하면 스트레스 호르몬인 에틸렌의 합성을 촉진하여 식물의 조기노화나 지나친 성숙을 유도해 식물을 시들게 한다(Abeles and Abeles, 1972). 식물들은 이와 같은 스트레스 환경에서 생존하기 위해 삼투 스트레스의 완화(Kishor *et al.*, 1995), 효소 활성의 안정화(Gill and Tuteja, 2010), 세포 내 구조물 안정화 (Ashraf and Foolad, 2007; Efeoğlu *et al.*, 2009) 등의 중요한

역할을 하는 proline을 축적하는 등 다양한 생리학적 변화 (Gomes *et al.*, 2010)와 스트레스-관련 유전자의 발현을 조절 하는 등 다양한 방어 기작을 이용하여 스트레스에 대한 내성을 발달시킨다(Chinnusamy *et al.*, 2005; Dawood *et al.*, 2014).

토양에서 독립생활을 하는 식물생장촉진 근권세균(plant growth promoting rhizobacteria; PGPR)은 식물의 근권에 서식 하며 질소 고정이나 인산염 가용화를 통한 영양분의 제공이나 식물호르몬 분비 등의 직접적인 방법과 식물병원체를 억제하는 등의 간접적인 방법으로 식물의 성장을 촉진하는 세균이다 (Bashan, 1998). 일부 PGPR이 분비하는 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase는 스트레스 에틸렌의 전구체인 ACC를 ammonia와 α -ketobutyrate로 분해하여 에틸렌의 수준을 낮춰 스트레스를 완화시켜 식물의 성장을 촉진한다

*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-259-5665

(Barnawal *et al.*, 2014).

한편 식물이 다양한 스트레스 환경에 처하면 여러 스트레스-관련 유전자의 발현이 조절된다. 그 중 스트레스 에틸렌 생합성 경로에서 에틸렌의 전구체인 ACC를 에틸렌으로 전환시키는 ACC oxidase의 유전자는 스트레스 환경에서 발현이 증가하여 에틸렌 합성을 촉진한다(Nakatsuka *et al.*, 1997). 또한 에틸렌에 반응하는 여러 전사인자들이 존재하며 ethylene response factor (ERF)가 대표적인데 ERF 유전자는 에틸렌에 반응하여 발현이 증가하여 식물의 여러 스트레스 방어 유전자의 발현을 조절한다(Park *et al.*, 2001; Gutterson and Reuber, 2004). 이외에도 건조와 염분 스트레스로 인해 유도되는 여러 유전자가 존재하며 대표적으로 late embryogenesis-abundant (LEA) 단백질의 유전자와 건조 스트레스로 유도되는 early responsive to dehydration (ERD) 단백질의 유전자(Yang *et al.*, 2009), 염분 스트레스로 인해 유도되는 K⁺/H⁺ 역수송체(NHX) 단백질의 유전자(Galvez *et al.*, 2012) 등이 있다.

본 연구에서는 건조와 염분 스트레스 환경에서 토마토 식물의 재배 시 ACC deaminase 활성이 높은 균주인 *Enterobacter ludwigii* SJR3 (Jo, 2014) 처리가 토마토 식물의 생장, 스트레스 영향 완화물질과 스트레스-관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하여 비생물적 스트레스 영향의 완화를 살펴 보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

Luria-Bertani (LB: NaCl 10 g, tryptone 10 g, yeast extract 5 g, 1 L DW) 배지 50 ml에 LB agar (LA) 배지에서 선배양한 *Enterobacter ludwigii* SJR3를 백금이를 이용하여 접종한 후 150 rpm, 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 균주는 원심분리(3,400 × g, 4°C, 20 min)하여 상등액과 균주를 분리하고 멸균 증류수로 2회 세척한 후 hemocytometer로 계수하여 토양 1 g 당 10⁶ cell이 접종되도록 계수하여 준비하였다.

스트레스 환경에서 토마토의 생장

E. ludwigii SJR3이 실제 토양에서 식물의 생장을 촉진하며 건조와 염분 스트레스에 대한 내성을 부여할 수 있는지 조사하기 위해 소규모 토양재배 실험을 진행하였다. 먼저 토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 종자[예광토마토, 다농(주)]를 70% ethanol을 이용하여 5분간 표면을 살균한 후 Whatman

filter paper (No. 4)를 넣고 멸균한 유리 살레에 멸균 증류수 5 ml과 토마토 종자를 넣고 약 5일간 plant growth chamber에서 발아시켜 사용하였다. 강원대학교 구내에서 채취한 토양은 2 mm 체로 거른 후 시판퇴비를 6:4 비율로 섞어 플라스틱 pot에 170 g씩 담아 사용하였고, 5일 발아시킨 종자 중 비슷한 길이로 발아한 토마토 유묘를 한 pot 당 3묘씩 이식하여 4주간 광조건(16 h, 25°C, 97.5 μmol photons/m²/sec)과 암조건(8 h, 20°C), 상대습도는 60%로 설정한 plant growth chamber에서 재배하였다.

토마토를 4주 배양 후 각각의 스트레스와 균주를 처리하였다. 건조 스트레스 처리는 7일간 물을 주지 않아 식물이 시드는 수준인 토양의 water holding capacity (WHC) 기준 약 15%를 유지하였으며 염분 스트레스로는 250 mM의 NaCl 용액을 처리하였으며 균주는 증류수 20 ml에 현탁하여 토마토를 심은 pot의 표층토에 접종하였다. 스트레스 처리를 1주일간 진행하면서 자라난 토마토 식물의 줄기와 뿌리 길이, 생중량과 건조중량을 측정하였으며 측정 결과는 Analysis of variance (ANOVA, SYSTAT ver 10, 2000, Systat Software, SPSS Inc.)를 이용하여 유의성을 분석하였다.

토마토 잎의 proline 함량

자라난 토마토의 잎에서 식물이 스트레스 환경에 처하면 축적되는 아미노산인 proline의 함량을 측정하였다. 토마토 잎 0.5 g을 파쇄한 후 3% sulfosalicylic acid 10 ml을 넣어 균질화하고 원심분리(3,400 × g, 4°C, 20 min) 후 상등액을 회수하였다. 상등액 2 ml에 acid-ninhydrin (glacial acetic acid 30 ml, 6 M phosphoric acid 20 ml, 1.25 g ninhydrin) 2 ml과 acetic acid 2 ml을 넣은 후 100°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 반응물을 바로 얼음으로 옮긴 후 toluene 4 ml을 넣고 15-20초 동안 vortexing하여 추출하였다. Toluene에 추출된 발색단을 수층으로부터 분리하고 상온에서 toluene을 blank로 하여 분광광도계를 이용해 520 nm에서 흡광도를 측정했다. 표준곡선은 L-proline을 사용하여 작성하고 정량하였다.

토마토 식물에서 스트레스-관련 유전자 발현

토마토에서 total RNA 분리 및 cDNA 합성: 스트레스 환경에서 자란 토마토 식물 내의 스트레스-관련 유전자 발현의 변화를 조사하였다. 소규모 재배 실험과 동일하게 토마토 종자를 발아시키고 pot로 옮겨 4주간 배양 후 토마토 식물에 각각 건조와 염분 스트레스를 처리하고 균주를 접종했다. Plant growth chamber에서 동일한 조건 하에 토마토를 재배하고 7

일째에 유전자의 상대적인 발현량을 조사하였다.

재배한 토마토 식물에서 변형시킨 TRIzol method를 이용하여 total RNA를 추출하였다(Sacchi and Chomczynski, 2006). 먼저 토마토 식물 10 g 이상을 액체질소를 이용하여 파쇄하여 0.1 g을 TRIzol reagent (Invitrogen Corp.) 1 ml을 넣고 15초간 vortexing한 뒤 상온에서 5분간 반응시켰다. 반응시킨 시료에 chloroform 200 μ l를 넣고 15초간 섞은 뒤, 원심분리(10,000 \times g, 4°C, 15 min) 하여 상등액을 회수하였다. 상등액에 4°C에 보관한 isopropyl alcohol 500 μ l를 넣고 15초간 섞은 후 얼음에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 원심분리(10,000 \times g, 4°C, 10 min) 하여 상등액을 제거하고 침전된 RNA pellet을 회수하여 세척을 위해 ethanol 70%와 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 용액(1 ml DEPC를 1 L 증류수에 혼합하고 overnight 후 고압멸균) 30%로 구성된 혼합액 1 ml을 넣어 원심분리(10,000 \times g, 4°C, 5 min) 했다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 RNA pellet을 상온에서 건조시키고 DEPC water 44 μ l를 추가하여 RNA를 녹였다. cDNA의 합성에는 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa Inc.)의 매뉴얼에 따라 oligo dT를 이용하였으며 추출한 토마토 RNA를 template로 넣어 cDNA를 합성하였다.

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현량 조사: 추출한 total RNA로부터 합성한 cDNA를 Infinite 200 PRO multimode reader (Tekan)를 이용하여 농도를 정량한 뒤, RNase free water를 사용하여 농도를 20 ng/ μ l로 보정하여 4 μ l을 real-time PCR 분석을 위한 template로 사용했다. 시료는 template 4 μ l와 forward와 reverse primer 각각 1 μ l, TOPreal™ qPCR 2 \times PreMIX (Enzynomics Inc.) 10 μ l를 혼합하고 RNase free water 4 μ l를 추가하여 최종적으로 20 μ l로 준비하였다. 분석기기는 StepONE™ Real-Time PCR Systems (AB Applied Biosystems)를 이용하였고 real-time PCR 조건은 holding stage (95°C, 10 min, 1 cycle), cycling stage (95°C, 15 sec/ 60°C, 1 min/ 72°C, 15 sec 40 cycles), melt curve stage (95°C, 15sec/ 60°C, 1 min/ 95°C, 15 sec)로 수행하였다. 각 시료는 triplicate로 수행하였으며 결과로 나온 유전자 증폭산물을 표준화하기 위해 *LeActin*을 사용하여 각 시료의 mRNA 양을 상대정량 하였다. 증폭된 산물은 전기영동을 통해 확인하였다.

실험에 사용한 primer는 앞서 보고된 연구들에서 인용하였으며, *LeACO1* 유전자의 발현량을 분석하기 위해 forward primer; 5'-GCAGGAGGCATCATACTTCTGTTC-3'와 reverse primer; 5'-ACAATAGAGTGGCGCATGGG-3'를 사용하였고, *LeACO4* 유전자의 발현량을 분석하기 위해 forward primer; 5'-AAGATGGCACTAGGATGTCAATAG-3'와 reverse primer;

5'-TCCTCTTCTGTCTTCTCAATCAAC-3'를 사용하였다(Yim *et al.*, 2014). *LeERF1* 유전자 발현량 분석을 위해 forward primer; 5'-GTTAGGCACTTTTGAGACAGCAGA-3'와 reverse primer; 5'-AAGATGTTTGTGGCATGTTTGG-3'를 사용하였고, *LeERF4* 유전자 발현량 분석을 위해 forward primer; 5'-CCGATGACATCTCCCCTGTTT-3'와 reverse primer; 5'-ATTGGGGAGTTGGGTTTCATTT-3'를 사용하였다(Tournier *et al.*, 2003). 또한 건조와 염분 스트레스로 유도되는 유전자인 *LeLE25* 유전자 발현량 분석을 위해 forward primer; 5'-GAGGGATCCGTTGAAGAAAGAGA-3'와 reverse primer; 5'-AGCTGCATGTTGTGCTTTTGC-3'를 이용하였고(Imai *et al.*, 1996), 건조 스트레스로 유도되는 유전자인 *LeERD15* 유전자 발현량 분석을 위해 forward primer; 5'-ATGTTGCTGATTTGCTTCCTGA-3'와 reverse primer; 5'-GCATCGCATTGACACCATAGA-3'를 이용하였다. 마지막으로 염분 스트레스로 인해 유도되는 유전자인 *LeNHX1* 유전자 발현량 분석을 위해 forward primer; 5'-GACAGTCCTGGAAAATCT-3'와 reverse primer; 5'-GGTTATCAGCCCAAACACC-3'를 사용하였다(Rodriguez-Rosales *et al.*, 2008).

균주의 항산화 활성 조사

균주의 항산화 활성을 조사하기 위해 안정한 자유 라디칼인 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 제거를 조사하였다. LB 배지 50 ml에 균주를 선배양(30°C, 150 rpm) 한 후, 배양액의 흡광도를 OD₆₀₀에서 1로 보정하였다. 보정한 배양액은 새로운 LB 배지 45 ml에 5 ml 접종하여 최종 부피를 50 ml로 보정하여 배양하였다(30°C, 150 rpm). 24시간마다 균주 배양액을 채취하여 항산화 활성을 측정하였다. 균주 배양액은 원심분리(8,000 \times g, 4°C, 10 min) 하여 상등액을 회수하였다. 상등액 0.5 ml에 0.1 mM DPPH 용액 1 ml과 증류수 2 ml을 함께 섞고 30분간 상온(20°C), 암조건에서 반응 후 517 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다(Abo-Elmagd, 2014). 그 후 아래 식에 대입하여 활성을 계산하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [A_0 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 10$$

A0 - 대조균의 흡광도 값(대조균은 배양액 대신 증류수)

A1 - 반응 혼합물의 흡광도 값

A2 - DPPH 용액을 넣지 않은 혼합물의 흡광도 값(DPPH 대신 증류수)

결 과

스트레스 환경에서 토마토의 생장

토마토 식물이 건조 스트레스에 노출되었을 때 SJR3 균주 접종 토마토의 지상부 길이는 비접종 대조군 보다 37.2% 증가했으며 습윤중량과 건조중량은 각각 96.8%와 146.6% 증가하였으며 모두 유의성이 있었다. 뿌리 길이에서는 비접종 대조군 보다 균주 접종군에서 37.8% 증가하였다(Fig. 1).

토마토 식물이 250 mM 농도의 염분 스트레스에 7일간 노출되었을 때 SJR3 균주 처리 토마토의 뿌리 길이와 지상부 길이는 대조군 보다 각각 19.2%와 25.4% 증가했으며 건조중량은 105.8% 증가하였고 모두 유의성이 있었다. 습윤중량은 비접종 대조군 보다 균주 접종군에서 19.5% 증가하였다(Fig. 2).

스트레스 환경에서 자란 토마토 잎의 proline 함량

건조 스트레스 처리 시 비접종 토마토 잎의 proline 함량은 대조군에 비해 약 6.5배 증가하지만 균주 접종 토마토 잎의 proline 함량은 4.05 $\mu\text{g/g}$ fresh wt로 비접종 토마토에 비해 약 62.1% 감소하였다(Table 1). 염분 스트레스 처리 시에도 비접

종 토마토 잎의 proline 함량은 대조군에 비해 4.8배 증가하였지만 균주 접종 토마토 잎의 proline 함량은 2.11 $\mu\text{g/g}$ fresh wt로 대조군에 비해 약 54.1% 감소하였다.

균주 처리 시 스트레스 관련 유전자 발현 조사

건조 스트레스 환경에서 토마토 식물체 내의 스트레스-관련 유전자들의 발현 양상을 real-time PCR을 이용하여 상대정량 하였다. 식물이 스트레스를 받으면 증가한다고 알려진 ACC oxidase 유전자인 *ACO1*과 *ACO4* 유전자는 비 건조 대조군에 비해 비접종 대조군에서 발현이 모두 크게 증가하였으나 SJR3 균주 접종군에서는 비접종 대조군에 비해 발현이 각각 84.5%와 74.2% 감소하였다(Fig. 3A and B). 또한 스트레스 시 에틸렌에 반응하는 전사인자인 ethylene response factor의 두 유전자 *ERF1*과 *ERF4*도 비접종 대조군에 비해 균주 접종군에서 각각 68.4%와 38.3% 감소하였다(Fig. 3C and D). 건조 스트레스에 반응하여 발현이 증가하는 유전자인 *LE25*와 *ERD15* 유전자도 비접종 대조군보다 균주 접종군에서 61.8%와 47.5% 발현이 감소하였다(Fig. 3E and F).

염분 스트레스 환경에서도 토마토 식물체 내의 스트레스-

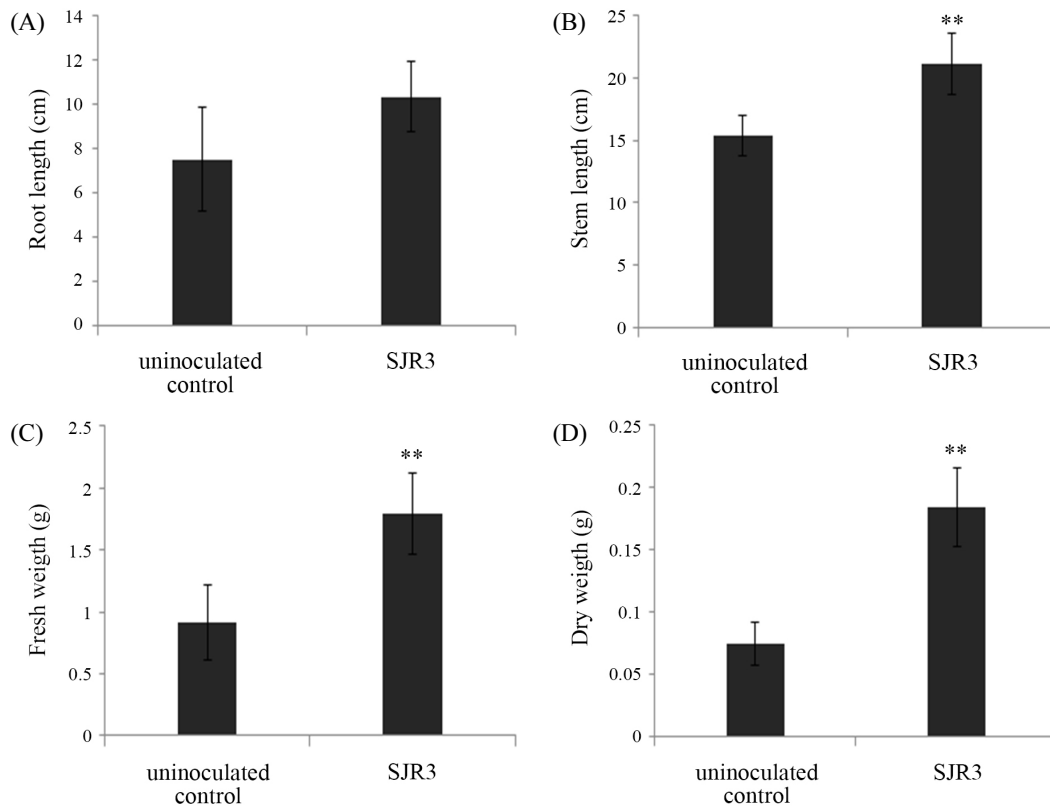


Fig. 1. Root length (A), shoot length (B), fresh weight (C), and dry weight (D) of tomato plants grown for additional 1 week under drought stress. Stress and inoculation of *E. ludwigii* SJR3 were treated on 4-week grown tomato plants (** $P < 0.005$).

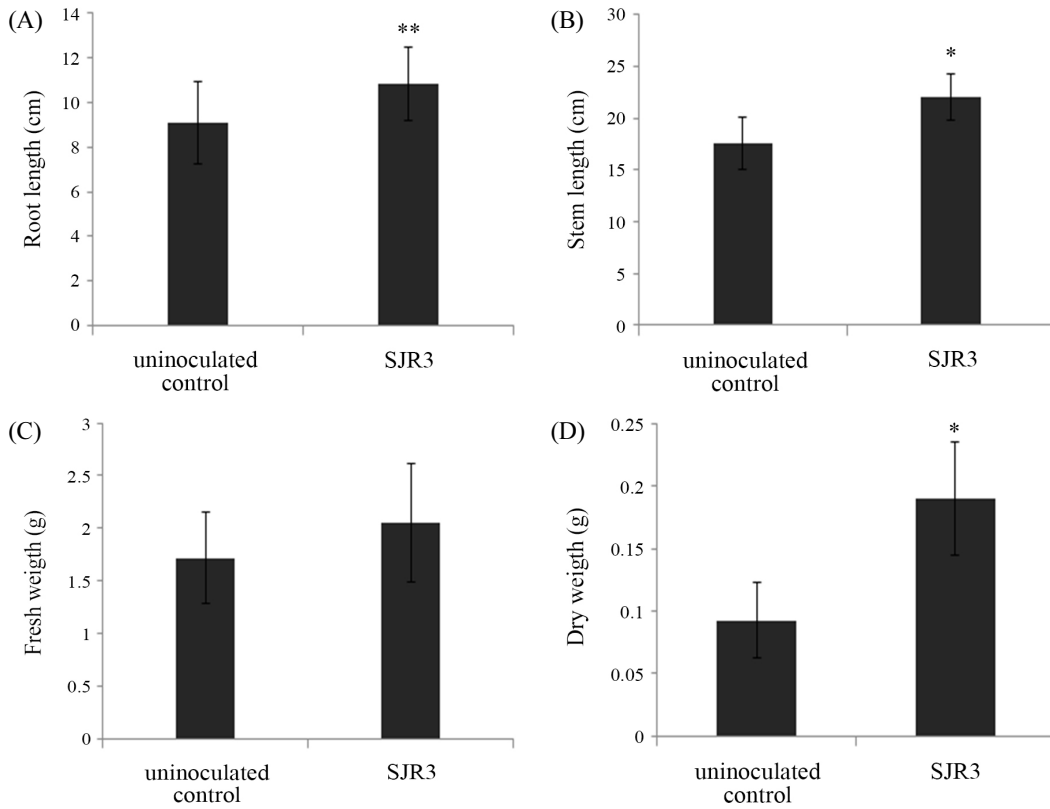


Fig. 2. Root length (A), shoot length (B), fresh weight (C), and dry weight (D) of tomato plants grown for additional 1 week under salt stress. Stress and inoculation of *E. ludwigii* SJR3 were treated on 4-week grown tomato plants (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$).

Table 1. Proline contents in tomato leaves grown for 1 week under drought and salt stresses. Stress and inoculation of *E. ludwigii* SJR3 were treated on 4-week grown tomato plants.

	Unit: $\mu\text{g/g}$ fresh wt		
	Uninoculated control	SJR3	No stress control
Drought stress	10.7 \pm 0.12	4.05 \pm 0.37	1.65 \pm 0.13
Salinity stress	4.6 \pm 0.51	2.11 \pm 0.1	0.95 \pm 0.13

관련 유전자들의 상대적 발현은 건조 스트레스와 유사하게 비 스트레스 대조군에 비해 모두 크게 증가하였다. *ACO1*과 *ACO4*는 비접종 대조군보다 SJR3 균주 접종군에서 발현이 각각 60.2%와 66.6% 감소하였으며(Fig. 4A and B), *ERF1*과 *ERF4*의 상대적 발현량은 비접종 대조군에 비해 균주 접종군에서 각각 60.2%와 82.0% 감소하였고(Fig. 4C and D), *LE25*와 *NHX1* 유전자의 상대적 발현량은 비접종 대조군보다 균주 접종군에서 각각 84.7%와 71.8% 발현이 감소하였다(Fig. 4E and F).

한편 *E. ludwigii* SJR3 균주의 항산화 활성 조사 결과 DPPH 자유 라디칼 제거 활성은 24시간째에 약 60%로 가장 높은 활성을 보였고 그 이후로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5).

고찰

본 연구에서는 식물에 대한 비생물적 스트레스 중 흔히 발생하는 건조와 염분 스트레스 환경에서 ACC deaminase 활성이 높고 여러 식물 호르몬을 분비한다고 알려진 *Enterobacter ludwigii* SJR3 (Jo, 2014) 처리 시 토마토 식물의 성장과 스트레스-관련 유전자의 발현을 조사하였다. 건조와 염분 스트레스 환경에서 토마토 식물은 균주 접종군이 비접종 대조군에 비해 뿌리와 지상부 길이 및 습윤중량과 건조중량이 모두 크게 증가하였다(Figs. 1 and 2). *E. ludwigii* SJR3 균주는 건조 스트레스 환경에서 토마토 식물에 대한 성장촉진능이 스트레스가 없는 환경에서 *E. ludwigii* BNM0357를 접종한 쥐보리 (*Lolium perenne*)에서 보다 더 우수한 성장 촉진능을 나타냈으며(Shoebitz *et al.*, 2009), 본 연구에서와 같은 1주일 건조 스트레스 처리 시 병아리콩(*Cicer arietinum*)에서의 뿌리와 지상부 길이 및 습윤중량과 건조중량을 각각 8.8, 8.8, 30.2와 40.0% 증가시킨 *Pseudomonas putida*의 성장촉진능보다 훨씬 높은 결과를 나타내었다(Tiwari *et al.*, 2016). 한편 염분 스트레스 환경에서는 균주 접종군이 비접종 대조군보다 성장을 각각

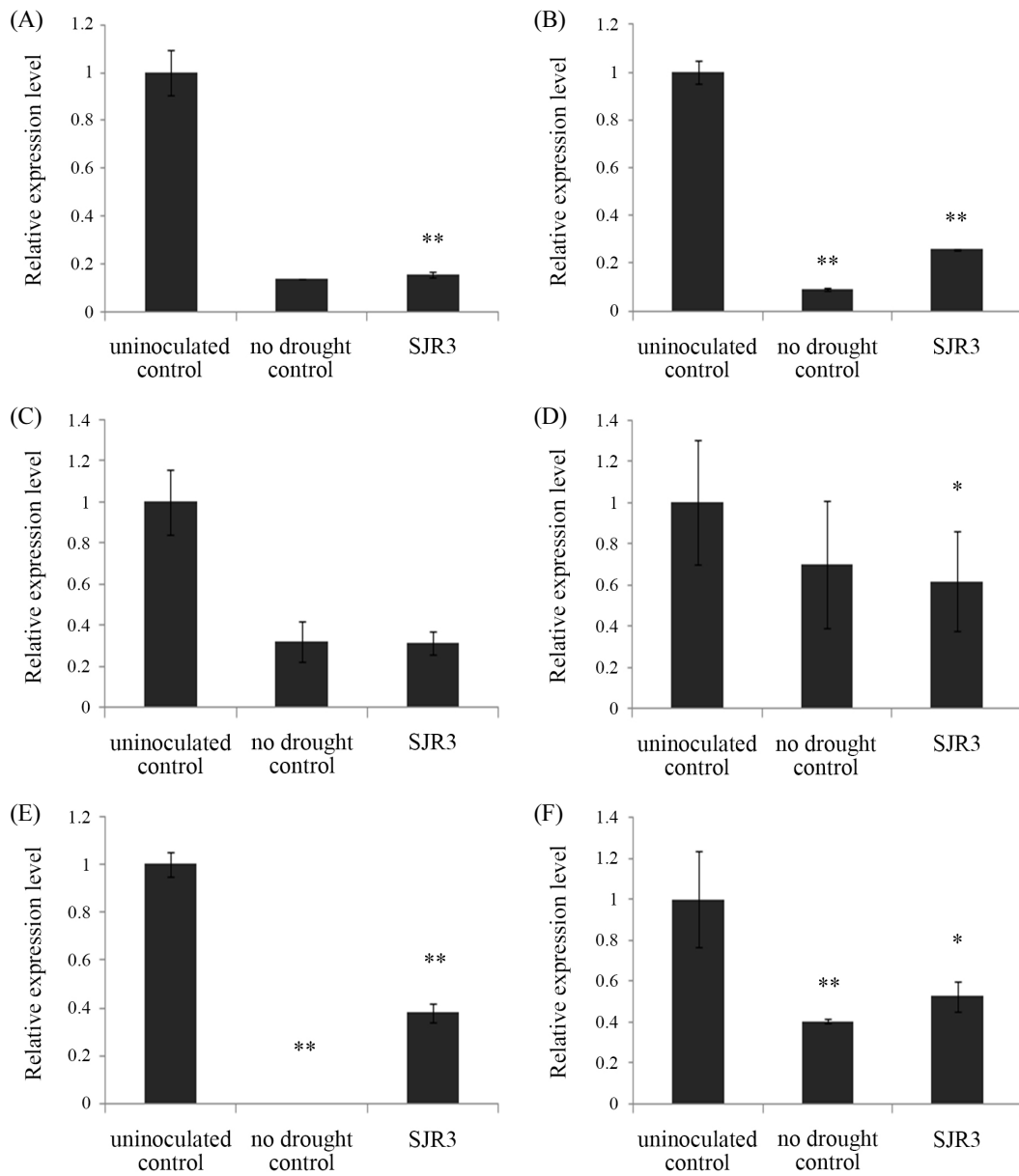


Fig. 3. Relative expressions of *LeACO1* (A), *LeACO4* (B), *LeERF1* (C), *LeERF4* (D), *LeLE25* (E), and *LeERD15* (F) genes in tomato leaves grown for 1 week under drought stress. Stress and inoculation of *E. ludwigii* SJR3 were treated on 4-week grown tomato plants (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$).

19.2, 25.4, 19.5와 105.8% 증가시켰는데 이는 *Arthrobacter protophormiae*가 200 mM 농도의 염분 스트레스 환경에서 자란 완두의 뿌리와 지상부 길이, 습윤중량과 건조중량을 각각 17.4, 26.5, 54.0와 33.2% 증가시킨 것보다 습윤중량을 제외하고 모두 높은 결과이다(Barnawal *et al.*, 2014). 이같이 SJR3 균주는 건조와 염분 스트레스 환경에서 식물의 생장을 효율적으로 촉진시킬 수 있었다.

식물 내 proline의 축적은 비생물적 스트레스에 대한 반응으로 나타나는데(Gomes *et al.*, 2010), 본 연구에서 토마토 식

물이 건조와 염분 스트레스를 받을 때 잎의 proline 함량은 각각 비접종 대조군 보다 균주 접종군에서 62.1%와 54.1% 감소되었다(Table 1). 이는 비름속(*Amaranthus*) 식물의 세 종 *A. hybridus*, *A. hypochondriacus*와 *A. tricolor*를 대상으로 건조 스트레스 처리 후 재수화 시켰을 때 proline의 함량이 평균 72.2% 감소한 결과(Slabbert and Kruger, 2014)에 비해 조금 낮지만 본 연구에서는 재수화 시키지 않고 균주만을 처리하였기 때문에 proline 함량이 상당히 크게 감소한 것으로 생각된다. 또한 염분 스트레스의 경우에도 *Arthrobacter protophormiae*

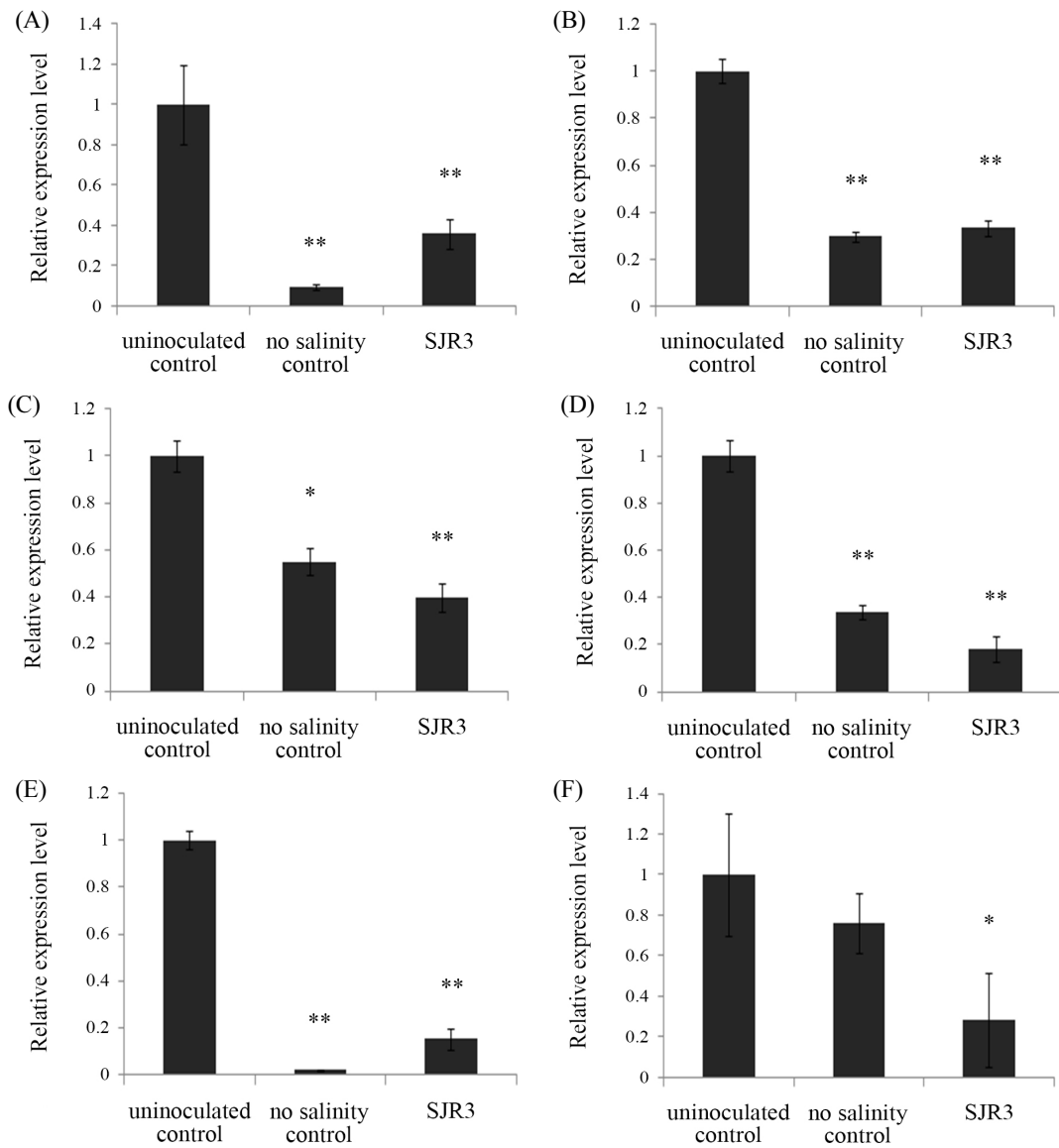


Fig. 4. Relative expressions of *LeACO1* (A), *LeACO4* (B), *LeERF1* (C), *LeERF4* (D), *LeLE25* (E), and *LeNHXI* (F) genes in tomato leaves grown for 1 week under salt stress. Stress and inoculation of *E. ludwigii* SJR3 were treated on 4-week grown tomato plants (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$).

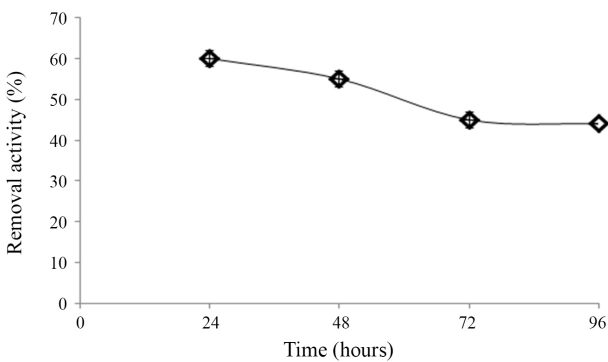


Fig. 5. Removal activity of DDPH free radical of *E. ludwigii* SJR3 strain in LB medium.

접종 시 200 mM 농도의 염분 스트레스 환경에서 자란 완두의 proline 함량이 약 12.0% 감소한 것보다 크게 감소하였다 (Barnawal *et al.*, 2014). 이러한 proline의 감소는 균주가 식물에 스트레스에 대한 내성을 부여하여 스트레스에 대한 식물 내 반응이 감소된 결과라고 볼 수 있다.

한편 식물이 실제 건조와 염분 스트레스 환경에 처했을 때 *E. ludwigii* SJR3 균주 처리 시 스트레스-관련 유전자의 상대적 발현 수준의 변화를 조사하였는데 이에 대한 보고가 이제까지 거의 없어서 본 연구에서는 스트레스와 균주를 처리하지 않은 식물을 음성 대조군으로 이용하여 결과를 비교하였다.

건조와 염분 스트레스 환경에서 SJR3 균주 접종군은 비접종군에 비해 조사한 6가지 스트레스-관련 유전자의 발현이 거의 대부분 유의성 있게 감소하였으며 비 스트레스-처리 대조군과 유사하거나 약간 높았다. 건조 스트레스의 경우에는 모든 유전자가 접종군에서 비접종 대조군 보다 38.3-84.5%의 범위로 발현량이 크게 감소하였으며(Fig. 3), 염분 스트레스에서도 6가지 유전자가 비접종군 보다 균주 접종군에서 60.2-84.7%의 범위로 발현이 감소하였다(Fig. 4). 이 결과는 이전 연구에서 스트레스 종류는 다르지만 작물의 시들음 병을 유발하는 *Ralstonia solanacearum*를 이용한 병원체 스트레스 하에서 ACC deaminase를 분비하는 *Methylobacterium phyllosphaerae* CBMB27 처리 시 *ACO* 유전자의 발현이 최대 약 37.5% 감소한 결과보다 더 큰 감소를 나타낸다(Yim *et al.*, 2013). 일부 유전자의 경우 균주 접종군이 비 스트레스-처리 대조군보다도 낮은 발현 수준을 보였는데 이는 균주 접종 시 식물에 가해지는 각종 스트레스를 완화시켜 스트레스-관련 유전자의 발현이 감소한 결과로 생각된다. 따라서 SJR3 균주 접종의 영향으로 스트레스 하의 식물에서 스트레스 반응이 감소되고 균주의 식물생장 촉진능에 의해 토마토의 생장이 촉진되었을 것이다.

건조와 염분 스트레스는 식물 내에 활성 산소의 생성을 증가시켜 또 다른 스트레스인 산화 스트레스를 유발한다고 알려져 있기 때문에 균주의 항산화 활성을 조사하였다. SJR3 균주는 배양 24시간째에 최대 59.6±2%의 DPPH 제거활성을 나타내었는데(Fig. 5), 이는 진균 *Chaetomium madrasense* AUMC 9376의 최대 70.21±0.30%의 제거활성 보다는 낮지만(Abo-Elmagd, 2014), 유산균인 *Lactobacillus bulgaricus* CCFM29와 *L. casei* CCFM30 균주들의 23.70±0.93%와 28.84±0.54% 보다는 2배 이상을 나타내므로(Zhai *et al.*, 2015) SJR3 균주가 비생물적 스트레스로 인해 생성되는 활성 산소종 제거에 큰 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 *E. ludwigii* SJR3 균주를 건조와 염분 스트레스를 받는 토마토 식물에 적용한 결과 스트레스에 대한 저항성을 부여하며 생장 촉진에 도움이 되는 것으로 나타났다. 한편 SJR3 균주 처리 시 토마토 근권에서 16일 후에도 균주가 잔류하는 것을 denaturing gradient gel electrophoresis 방법의 해 확인한 바 있다(Jo, 2014). 따라서 이 균주는 건조한 지역과 해안과 온실 같은 높은 염분 농도의 토양에서 식물의 생장을 촉진하고 농작물 생산량 증가에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

ACC deaminase 활성이 높은 균주인 *Enterobacter ludwigii* SJR3를 이용하여 건조와 염분 스트레스 환경에서 토마토 식물의 생장촉진 효과와 스트레스-관련 유전자의 발현을 조사하였다. 4주 키운 토마토 식물에 SJR3 균주 접종 후 건조 스트레스와 염분 스트레스를 처리하면서 1주일 후 식물의 생장을 비교하였다. 건조 스트레스 환경에서는 균주 접종군이 비접종군에 비해 뿌리와 줄기 길이 및 습윤과 건조중량이 각각 37.8, 37.2, 96.8과 146.6% 증가하였고 염분 스트레스 환경에서는 각각 19.2, 25.4, 19.5와 105.8% 증가하였다. 또한 스트레스에 반응하여 토마토 잎에 축적되는 proline의 함량은 크게 늘어나지만 건조와 염분 스트레스 처리 시 비접종 대조군 보다 균주 접종군에서 62.1%와 54.1% 감소되었다. 스트레스 환경에서 자라난 토마토 식물에서 스트레스-관련 유전자들인 ACC oxidase의 유전자 *ACO1*과 *ACO4*, ethylene response factor의 유전자 *ERF1*과 *ERF4* 등의 상대적인 발현량을 조사하였다. 비 스트레스 대조군과 비교해서 건조와 염분 스트레스 환경의 토마토 식물에서 모든 스트레스-관련 유전자들의 발현이 크게 증가하였으나 SJR3 균주를 접종한 식물의 유전자들은 대부분이 비 스트레스-처리 대조군과 유사한 정도의 유전자 발현량을 나타내었다. 따라서 *E. ludwigii* SJR3는 식물에서 건조와 염분 스트레스의 완화에 중요한 역할을 하여 작물의 생장을 촉진하고 생산성을 높일 수 있을 것으로 여겨진다.

References

- Abeles, A. and Abeles, F. 1972. Biochemical pathway of stress-induced ethylene. *Plant Physiol.* **50**, 496-498.
- Abo-Elmagd, H. 2014. Evaluation and optimization of antioxidant potentiality of *Chaetomium madrasense* AUMC 9376. *J. Gen. Engineer. Biotechnol.* **12**, 21-26.
- Ashraf, M. and Foolad, M. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* **59**, 206-216.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C., and Kalra, A. 2014. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol.* **171**, 884-894.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* **16**, 729-770.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., and Zhu, J. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* **45**, 437-448.

- Dawood, M., Taie, H., Nassar, R., Abdelhamid, M., and Schmidhalter, U.** 2014. The changes induced in the physiological, biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress. *S. Afr. J. Bot.* **93**, 54–63.
- Efeoglu, B., Ekmekci, Y., and Cicek, N.** 2009. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *S. Afr. J. Bot.* **75**, 34–42.
- Galvez, F., Baghour, M., Hao, G., Cagnac, O., Rodriguez-Rosales, M., and Venema, K.** 2012. Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiol. Biochem.* **51**, 109–115.
- Gill, S. and Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 909–930.
- Gomes, F., Oliva, M., Mielke, M., Almeida, A., and Aquino, L.** 2010. Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Sci. Hortic.* **126**, 379–384.
- Gutterson, N. and Reuber, T.** 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 465–471.
- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E., and Takagi, M.** 1996. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **170**, 243–248.
- Jo, Y.H.** 2014. Growth promotion of tomato by some ACC deaminase-producing rhizobacteria under drought stress. M. S. thesis. pp. 12–37, Kangwon National University, Chuncheon, Republic of Korea.
- Kishor, P., Hong, Z., Miao, G., Hu, C., and Verma, D.** 1995. Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **108**, 1387–1394.
- Mahajan, S. and Tuteja, N.** 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**, 139–158.
- Nakatsuka, A., Shiomi, S., Kubo, Y., and Inaba, A.** 1997. Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1103–1110.
- Park, J., Park, C., Lee, S., Ham, B., Shin, R., and Paek, K.** 2001. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* **13**, 1035–1046.
- Rodriguez-Rosales, M., Jiang, X., Galvez, F., Aranda, M., Cubero, B., and Venema, K.** 2008. Overexpression of the tomato K^+/H^+ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol.* **179**, 366–377.
- Sacchi, N. and Chomczynski, P.** 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**, 581–585.
- Shoebitz, M., Ribaud, C., Pardo, M., Cantore, M., Ciampi, L., and Cura, J.** 2009. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lorium perenne* rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 1768–1774.
- Slabbert, M. and Kruger, G.** 2014. Antioxidant enzyme activity, proline accumulation, leaf area and cell membrane stability in water stressed *Amaranthus* leaves. *S. Afr. J. Bot.* **95**, 123–128.
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P., and Nautiyal, C.** 2016. *Pseudomonas putida* attunes morphological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* **99**, 108–117.
- Toumier, B., Sanchez-Ballesta, M., Jones, B., Pesquet, E., Regad, F., Latche, A., and Bouzayen, M.** 2003. New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett.* **550**, 149–154.
- Yang, J., Kloepper, J., and Ryu, C.** 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* **14**, 1–4.
- Yim, W., Seshadri, S., Kim, K., Lee, G., and Sa, T.** 2013. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. *Plant Physiol. Biochem.* **67**, 95–104.
- Yim, W., Kim, K., Lee, Y., Sundaram, S., Lee, Y., and Sa, T.** 2014. Real time expression of ACC oxidase and PR-protein genes mediated by *Methylobacterium* spp. in tomato plants challenged with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Plant Physiol.* **171**, 1064–1075.
- Zhai, Q., Yin, R., Yu, L., Wang, G., Tian, F., Yu, R., and Chen, W.** 2015. Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food Control* **54**, 23–30.