

콩(*Glycine max*)의 공생균주 *Bradyrhizobium japonicum* SNU001의 특성

고세리 · 박용근* · 안정선
서울대학교 자연과학대학 생물학과
*고려대학교 이과대학 생물학과

Characteristics of *Bradyrhizobium japonicum* SNU001, a Symbiotic Strain of *Glycine max*

Ko, Serry, Yong-Keun Park* and Chung-Sun An
Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742
*Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

ABSTRACT: The root nodules and *Glycine max* were classified as determinate nodule based on their morphological characteristics, and isolated endosymbiont as a *Bradyrhizobium* based on its growth rate and single subpolar flagellum. The isolate was similar to *B. japonicum* USDA110 in utilization of carbon source, growth at 38°C and 2% NaCl, production of H₂S and especially in the restriction endonuclease digestion pattern of symbiotic genes, allowing them to be placed in sTI group together. The former, however, grew better than the later in broad pH range from 5.0 to 9.5. Infectivity and effectivity of the isolate were confirmed by inoculation of soybean seedlings with the isolates. Characteristics of the reisolated endosymbiont from induced root nodules were identical to those of the first isolate. From these results, it was confirmed that *Bradyrhizobium* strain isolated from the root nodules of *Glycine max* was a real symbiont, and was named *B. japonicum* SNU001.

KEY WORDS □ *Bradyrhizobium japonicum* SNU001, Root nodule, *Glycine max*, Symbiotic genes

다양한 콩과식물의 뿌리혹으로부터 분리한 공생 균주들은 주로 성장속도에 따라서 조생종을 *Rhizobium* 속으로 만생종을 *Bradyrhizobium* 속으로 분류하고 있으며, 이들은 숙주범위, 형태 및 생리적 특성에서도 많은 차이를 보이고 있다 (Jordan, 1984). *Bradyrhizobium* 속에는 현재 *B. japonicum* 한 종이 기재되어 있으나 지금까지 이 종으로 분류된 균주들은 DNA 유사성 (Hollis *et al.*, 1981), 독립생활에서의 질소고정능과 탄수화물 분비 (Huber *et al.*, 1981) 및 공생 관련 유전자의 구조 (Stanley *et al.*, 1985) 면에서 적어도 2개 이상의 집단으로 나눌 수 있음이 밝혀졌다. 본 연구에 사용된 콩(*Glycine max*)은 식물성 단백질의 중요한 공급원으로 세계적으로 대량 재배되고 있으며, 생산성을 증대시키기 위해 콩의 nodulin 유전자에 대한 연구 (Verma *et al.*, 1986)와 함께 공생

균인 *B. japonicum* 의 *nif*- 및 *nod*- 유전자에 대한 연구 (Martinez *et al.*, 1990)가 활발히 진행되고 있다.

이와 관련된 우리나라에서의 연구는 토양과 뿌리혹으로부터 *Bradyrhizobium*을 분리하고 (Choi *et al.*, 1975; Lee, 1991) 전자현미경으로 편모를 관찰한 보고 (Ahn, 1978) 등이 있지만 콩의 공생관계에 대한 체계적인 연구가 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 재배되는 콩의 질소 고정 능력을 효과적으로 이용하기 위한 연구의 첫 단계로 콩의 뿌리혹으로부터 내생균주를 분리하고, 분리균주의 형태적 생리적 특성을 조사하고, 감염성과 질소고정능을 조사하여 분리균주가 진정한 공생균주임을 확인하고, *B. japonicum* USDA110과 공생관련 유전자의 구조를 비교하고자 하였다.

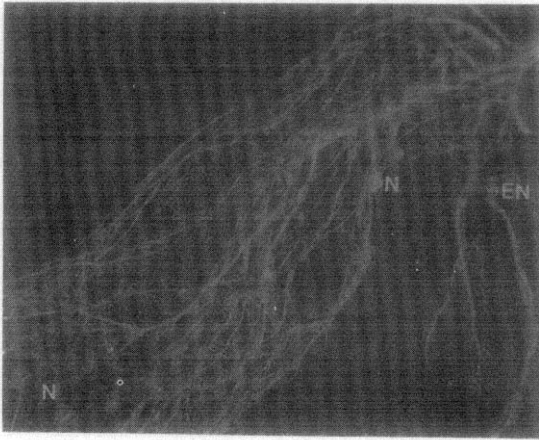


Fig. 1. Photograph of soybean root system showing nodule (N) and empty nodule (EN).

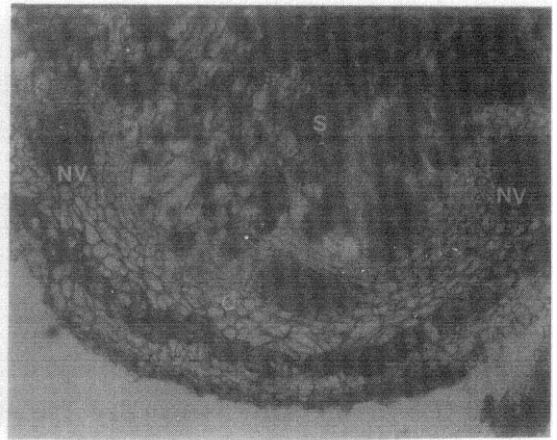


Fig. 2. Light micrograph of soybean nodule section. Nodule vascular bundles (NV) are scattered in the cortex (C) outside the infected cells in the steller (S).

재료 및 방법

뿌리혹 및 종자

경기도 과천에서 1989년 8월과 10월에 콩의 뿌리혹과 종자를 채취하여 얼음상자에 넣어 실험실로 옮긴 후 4°C 냉장실에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

뿌리혹의 형태 관찰

뿌리혹의 외부형태는 해부현미경으로 관찰하고 내부형태는 면도칼로 자른 절편을 lactophenol blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

내생균주의 분리

채집한 뿌리혹과 유도된 뿌리혹으로부터 내생균주 분리는 Jordan (1984)의 방법에 따라 행하였으며 균체의 선별과 보관은 Kim과 An (1989)의 방법에 따라 행하였다.

분리균주의 형태적 및 생리적 특성

YEM 평판배지에 형성된 균체의 형태적 특징은 육안으로 관찰하였고 분리균주의 형태는 1% phosphotungstic acid (pH 7.0)로 음영 염색하여 JEOL-200 CX로 100 kV에서 관찰하였다.

분리균주의 생리적 특성은 성장속도, 2% NaCl에 대한 내성, 배지의 pH와 온도에 따른 성장 및 탄소원의 이용을 조사하였으며 Vincent 등 (1979)과 Norris (1965)의 방법에 따라 행하였다.

유식물 배양 및 뿌리혹형성 유도

콩 종자의 발아와 유식물 배양 및 뿌리혹형성 유도 실험은 Kim과 An (1989)의 방법에 따라서 수행하였으나 유식물과 접촉시킨 식물은 hydroball 대신 vermiculite에서 배양하였다.

계능 혼성화 반응

분리균주 *B. japonicum* SNU001과 *B. japonicum*

USDA110의 총 DNA는 Russel 등 (1985)의 방법에 따라서 분리하였으며, *EcoRI*, *HindIII* 및 *PstI*으로 절단하여 0.7% agarose 겔에서 전기영동한 후 Southern (1975)의 방법에 따라서 나일론 막으로 옮겼다. 탐침은 *Frankia* Arl3의 *nif-H*, D 유전자가 클론된 pFQ148 (Normand *et al.*, 1988)을 *SacI*으로 절단하여 얻은 3.2 kb 절편과 *R. melliloti*의 *nod-ABCD* 유전자가 클론된 pRmSL26 (Long *et al.*, 1982)을 *EcoRI/HindIII*으로 절단하여 얻은 4.5 kb 절편을 ³²P로 방사선 표지하여 사용하였다.

혼성화반응은 Maniatis 등 (1982)의 방법에 따라 63°C에서 36시간 동안 수행하였으며 2xSSC, 0.1% SDS에서 막을 세척한 후 자가방사법에 의해 혼성화 반응을 보이는 제한효소 절편을 조사하였다.

결과 및 고찰

뿌리혹의 특성

육안으로 관찰한 콩의 뿌리혹은 직경이 7 mm 정도로 둥글고 흰색을 띠었으며 주로 측근에만 존재하였고 (Fig. 1N) 간혹 내부가 빈 터진 뿌리혹 (Fig. 1EN)이 발견되었다. 뿌리혹의 횡단 절편을 lactophenol blue로 염색하여 현미경으로 관찰한 결과 중심주의 세포들만이 염색되어 이들 세포에 내생균주가 존재함을 알 수 있었으며 (Fig. 2S) 뿌리혹 유관속은 피층에 산재하여 있었다 (Fig. 2NV). 이러한 뿌리혹의 외부 및 내부적 특성은 제한적으로 성장하는 뿌리혹인 구조와 일치하며 (Sprent, 1979), 따라서 콩의 뿌리혹이 땅콩, 해너콩 및 광저기의 경우처럼 제한적 성장을 함을 알

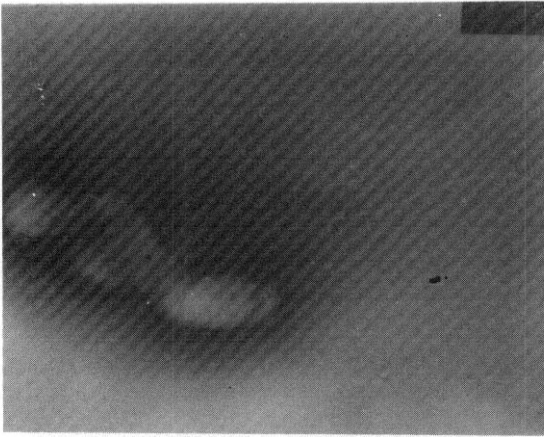


Fig. 3. Transmission electron micrograph of negative-stained isolate showing one subpolar flagellum.

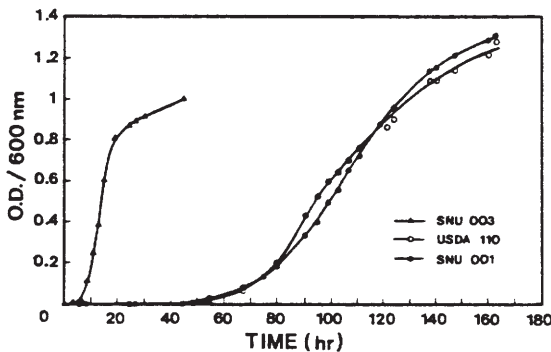


Fig. 4. Growth curve of *B. japonicum* SNU001 along with those of *Rhizobium* spp. SNU003 and *B. japonicum* USDA110.

수 있었다.

분리균주의 특성

분리균주는 Gram 음성으로 $0.9 \times 1.8 \mu\text{m}$ 의 간상이었으며 선택배지에서 직경이 1 mm 정도의 희고 불투명한 균체를 형성하였다. 음영 염색하여 전자현미경으로 관찰한 분리균주는 한 개의 편모를 정단 측면에 가지고 있었다 (Fig. 3). 이러한 형태적 특징은 전형적인 *Bradyrhizobium*의 특징과 일치하였다 (Jordan, 1984).

분리균주가 진정한 *Bradyrhizobium*인가를 확인하기 위해서 액체배지에서 배양한 결과 전형적인 조생종인 *R. spp.* SNU003균주가 하루만에 최대 성장을 보인데 비해 분리균주는 전형적인 만생종인 *B. japonicum* USDA110과 같이 6~7일에 최대 성장을 보여 (Fig. 4) 분리균주가 만생종인 *Bradyrhizobium*임을 알 수 있었다.

Bradyrhizobium 속에는 현재 *B. japonicum* 한 종만

Table 1. Comparison of characteristics of two *B. japonicum* strains

Characteristics	SNU001	USDA110
Flagella arrangement	subpolar monotrichous	subpolar monotrichous
Root nodule on soybean	induced	induced
Nitrogenase activity	yes	yes
Growth on YMA	slow	slow
H ₂ S production	no	no
Growth at 39°C	no	no
Growth at 2% NaCl	no	no
Utilization of carbon source		
succinate, citrate	yes, alkali	yes, alkali
arabinose	yes, acid	yes, acid
maltose, sucrose	no	no
Growth at pH		
4.0	no	no
5.0	good	moderate
6.0	good	good
7.0	good	good
8.0	good	moderate
9.0	good	weak
9.5	good	weak

기재되어 있으므로 (Jordan, 1984) 콩에서 분리된 만생균주는 일단 동일종으로 분류할 수 있으나, 이 종에는 2개 이상의 집단이 존재하므로 (Stanley *et al.*, 1985) 많은 연구가 진행된 *B. japonicum* USDA110을 선택하여 몇 가지 성질을 비교하였다.

조사된 생리적 특성을 비교하면 (Table 1) 성장속도, H₂S 생성, 39°C에서의 성장, 탄소원 이용 및 2% H₂S에 대한 내성면에서 모두 동일한 성질을 보였다. 즉, 선택배지에서 느린 성장을 하였으며, H₂S는 생성하지 않았고, 39°C와 2% NaCl에서 성장하지 않았으며, succinate, citrate를 이용하여 알칼리를 생성하나 arabinose인 경우는 산을 생성하였고 maltose와 sucrose는 이용하지 않았다. 이러한 성질을 전형적인 *Bradyrhizobium*의 특성과 일치하는 것이다 (Jordan, 1984). 그러나 배지의 pH에 따른 성장에서는 뚜렷한 차이를 보였다. 즉 *B. japonicum* USDA110은 pH 6~7에서 최적 성장을 보이며 그 밖의 조건에서는 급격히 성장이 저하되었으나, 분리균주는 pH 5~9까지 넓은 범위에 걸쳐 활발한 성장을 보였다 (Fig. 5). 이러한 pH에 대한 내성의 차이가 재배지 토양의 pH에 적응한 것인지 또는 분리균주 고유의 성질인지에 대해서는 새로운 연구가 필요하다고 생각된다 (Norris, 1965).

공생관련 유전자의 비교

B. japonicum 종에 존재하는 2개 이상의 집단은 *nif*-및 *nod*- 유전자와 같은 공생관련 유전자 주변의 제한 효소 인식부위의 차이에서도 확인되었으므로, 이들 유

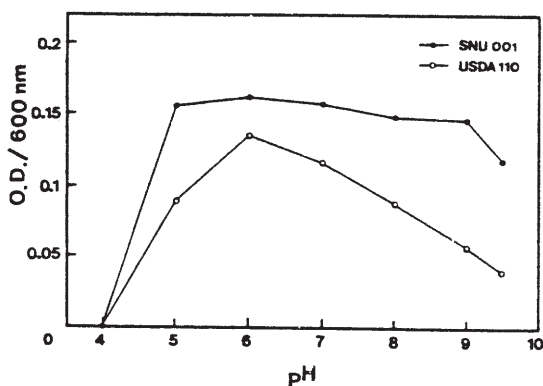


Fig. 5. Growth of two *B. japonicum* strains at different pH ranging from 4.0 to 9.5.

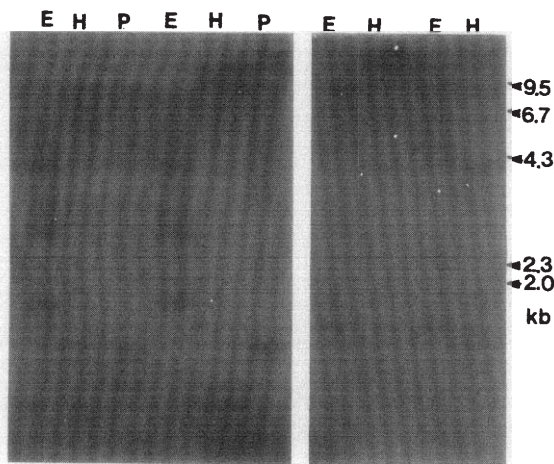


Fig. 6. Genomic blots of two *B. japonicum* strains hybridized to *nif-HD* (left panel) and *nod-ABCD* probe (right panel).

Left half of each panel represents SNU001 strain and right half USDA110 strain. E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*.

전자 주변의 제한효소 인식부위가 분리균주와 *B. japonicum* USDA110에서 동일한지를 *nif-HD*와 *nod-ABCD* 유전자를 탐침으로 한 게놈 혼성화 반응으로 조사한 결과 모두 동일한 양상을 보였다. 즉 *nif*-탐침의 경우 1.6, 2.8 및 4.2 kb의 *EcoRI* 절편, 0.7과 8.5 kb의 *HindIII* 절편, 1.1, 5.6 및 12.5 kb의 *PstI* 절편에서 혼성화 반응을 보였으며 (Fig. 6A), *nod*-탐침의 경우 1.6, 5.0, 5.3, 6.4 및 7.0 Kb의 *EcoRI* 절편, 4.0, 8.6, 12.5 및 19.0 Kb의 *HindIII* 절편에서 혼성화 반응을 보였다 (Fig. 6B) 이러한 결과로부터 이들 제한효소의 인식서열이 두 균주의 *nif*와 *nod*-유전자 주위에서 모두 보존되어 분리균주가 *B. japonicum* USDA110과 함께 sTI 집단에 속함을 알 수 있었다

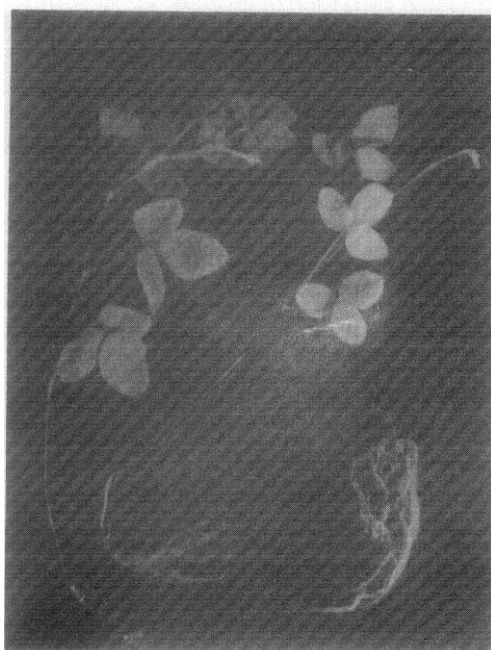


Fig. 7. Comparison of inoculated plant (left) with control plant (right) six weeks after inoculation.

(Stanley *et al.*, 1985). 본 실험에서는 3 종류의 제한효소를 사용하였으나 다양한 인식서열을 갖는 제한효소를 선택하고 *recA* 또는 *glnA*와 같은 탐침을 사용하면 같은 집단안에서도 소집단의 존재를 밝힐 수 있을 것이다 (Upholt, 1977; Stanley *et al.*, 1985).

뿌리혹형성 유도 및 내생균주의 재분리

분리균주를 발아된 콩의 유식물 뿌리에 접종하고 4주 후 뿌리를 관찰한 결과 재배지에서 채취한 뿌리 (Fig. 1)와 같이 주로 측근에 뿌리혹이 존재하였고, 뿌리혹을 가지는 식물체는 대조구에 비해 정상적인 성장을 보였다 (Fig. 7). 이러한 결과는 분리균주가 뿌리혹형성을 유도시키는 감염성과 함께 질소고정 능력을 가지고 있음을 보여주는 것이다.

또한 유도된 뿌리혹으로부터 내생균주를 재분리하여 형태 및 생리적 특성을 조사한 결과는 일차 분리균주의 특성 (Table 1)과 동일하여 접종된 식물체의 뿌리혹이 분리균주에 의해 유도되었음을 알 수 있었다.

Koch의 가설 (Kengcan, 1974)에 따라서 뿌리혹으로부터 내생균주를 분리하고, 유식물에 접종시켜 뿌리혹 형성을 유도하고, 형성된 뿌리혹에서 내생균주를 다시 분리하여 일차 분리균주의 특성과 비교한 이상의 결과는 콩의 뿌리혹에서 분리한 *B. japonicum* SNU 001이 진정한 공생균주임을 확인시켜 주었다. 또한 분리균주는 편모의 배열, 탄소원 이용, 39°C에서의 성장, H₂S생성, 2% NaCl에서의 성장면에서 *B. japonicum* USDA110과 동일한 성질을 보였고, 특히 공생관련

유전자 주변의 제한효소 인식부위면에서도 동일한 양상을 보여 *B. japonicum* USDA110, 58, 62, 140 및 122와 함께 sTI 집단에 (Stanley *et al.*, 1985) 속함을 알

수 있었다. 그러나 분리균주는 pH 5~9의 넓은 범위에서 활발한 성장을 보이는 면에서 *B. japonicum* USDA110과 차이를 보였다.

적 요

콩의 뿌리혹은 형태적 특징으로 보아 제한적 성장을 하였고 분리된 내생균주는 느린 성장속도와 한 개의 편모를 정단 측면에 가지고 있어 *Bradyrhizobium*으로 판단되었다. 분리균주는 탄소원 이용, 39°C에서의 성장, H₂S 생성, 2% NaCl에서의 성장 면에서 *B. japonicum* USDA110과 동일한 성질을 보였으며, 특히 공생관련 유전자 주변의 제한효소 인식면에서도 동일한 양상을 보여 sTI 집단에 속함을 알 수 있었다. 그러나 분리균주는 pH 5~9의 넓은 범위에서 활발한 성장을 보여 *B. japonicum* USDA110과는 차이가 있었다. 분리균주로 접종시킨 콩 유식물이 뿌리혹을 가지고 있고 대조구에 비해 정상적인 성장을 보여 분리균주의 감염성과 질소고정능을 확인하였다. 유도된 뿌리혹에서 재분리한 내생균주는 일차 분리균주와 동일한 성질을 가지고 있어 분리균주에 의해 뿌리혹이 유도되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 콩의 뿌리혹에서 분리한 *Bradyrhizobium* 균주가 진정한 공생균주임을 확인하였으며 *B. japonicum* SNU001로 명명하였다.

사 사

본 연구는 문교부의 1989년도 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Ahn, T.G., 1978. Identification and isolation of the genus *Rhizobium*. M.S. Thesis, Korea University, Seoul.
- Choi, Y.K., J.W. Kim, M.C. Park and H.T. Choi, 1975. Distribution of *Rhizobium* and development of useful strain. *Ann. Report of Min. Sci. Tech.*
- Hollis, A.B., W.E. Kloos and G.H. Elkan, 1981. DNA-DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. *J. Gen. Microbiol.*, **123**, 215-222.
- Huber, T.A., A.K. Agarwal and D.L. Keister, 1984. Extracellular polysaccharide composition, *ex planta* nitrogenase activity and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, **158**, 1168-1171.
- Jordan, D.C., 1984. Rhizobiaceae. In, Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, R.G.F. Murry *et al.*, (eds.), Williams Wilkins, Baltimore, pp. 234-242.
- Kenagan, C.B., 1974. Principles of Phytopathology. Balt. Pub. Lafayette, Indiana. pp. 29-30.
- Kim, S.C. and C.S. An, 1989. Isolation of symbiotic *Rhizobium* spp. strain from root nodule of *Canavalia lineata*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **27**, 398-403.
- Lee, K.H., 1991. Host specificity and taxonomical grouping of 28 *Rhizobium* isolates. M.S. Thesis. Korea Teacher's University, Chungju.
- Long, S.R., W.J. Buikema and F.M. Ausubel, 1982. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod-mutants. *Nature*, **298**, 485-488.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
- Martinez E., D. Romero and R. Palacios, 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **1**, 59-93.
- Normand, P., P. Simonet and R. Bardin, 1988. Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.*, **213**, 238-246.
- Norris, D.O., 1965. Acid production of *Rhizobium*; An unifying concept. *Plant and Soil*, **12**, 143-166.
- Russel, P., M.G. Schell, K.K. Nelson, L.J. Halverson, K.M. Sirotkin and G. Stacy, 1985. Isolation and characterization of DNA region encoding nodulation function in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, **164**, 1301-1308.
- Southern, E., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 371-380.
- Sprent, J.J., 1979. The Biology and Nitrogen Fixing Organisms. McGraw-Hill Co., New York, pp. 13-25.
- Stanley, J., G.G. Brown and D.P.S. Verma, 1985. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. *J. Bacteriol.*, **163**, 148-154.
- Upholt, W.B., 1977. Examination of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. *Nucl. Acid Res.*, **4**, 1257-1265.
- Verma, D.P.S., M.G. Fortin, J. Stanley, P. Mauro, S. Purohit and N. Morrison, 1986. Nodulins and nodulin genes of *Glycine max*. *Plant Mol. Biol.*, **7**, 51-61.
- Vincent, J.M., P.S., Nutman and F.A. Skinner, 1979. The identification and classification of *Rhizobium*. In, Identification Methods for Microbiologists. F.A.V. Skinner and L. Lovelock (eds.). *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser.* 14, Academic Press, New York, London.

(Received March 6, 1991)

(Accepted April 15, 1991)