



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

석사학위논문

제주도의 콩과식물과 공생하는 질소고정  
근류균의 분포에 대한 연구

제주대학교 대학원

생물학과

유 한 수

2013년 2월

제주도의 콩과식물과 공생하는 질소고정  
근류균의 분포에 대한 연구

지도교수 오 덕 철

유 한 수

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2013년 2월

유한수의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ ①

위 원 \_\_\_\_\_ ①

위 원 \_\_\_\_\_ ①

제주대학교 대학원

2013년 2월

# A study on the Distribution of Legume symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria on Jeju Island

Han-Su You

**(Supervised by Professor Duck-Chul Oh)**

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree  
of Master of Science

February, 2013

This thesis has been examined and approved

.....  
Thesis director, Moon-Hong Kim, Prof. of Biology  
.....  
.....

.....  
Date

**Department of Biology**  
**GRADUATE SCHOOL**  
**JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

# 목 차

목 차 .....	i
List of Tables .....	ii
List of Figures .....	iii
Abstract .....	iv
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
2.1. 시료채집 .....	4
2.2. 근류균의 분리 및 배양 .....	7
2.3. 순수분리한 균주의 DNA분석 .....	9
2.3.1. 16S rRNA 유전자 증폭 .....	9
2.3.2. 16S rRNA 유전자의 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 및 염기서열 분석 .....	10
2.4. 분리균주의 계통학적 분석 .....	10
III. 결 과 및 고찰 .....	11
3.1. 콩과식물 근류균의 순수분리 .....	11
3.2. 16S rRNA 유전자 증폭 및 PCR-RFLP .....	13
3.3. 계통학적 및 생태학적 분석 .....	19
3.3.1. 분리균주의 계통학적 분석 .....	19
3.3.2. 복수의 기주식물에 공생하는 근류균 .....	21
3.3.3. 복수의 근류균과 공생하는 기주식물 .....	25
3.3.4. 목본 콩과식물에 공생하는 근류균 .....	28
3.3.5. 초본 콩과식물에 공생하는 근류균 .....	30
3.3.6. 목본·초본 공통기주에 공생하는 근류균 .....	34
IV. 요약 .....	36
V. 참고 문헌 .....	38

## List of tables

Table 1. Classification of traditionally considered rhizobial genera and nodulating non-rhizobial genera .....	2
Table 2. Collection site of leguminous plant on the Jeju Island .....	5
Table 3. Formula of Yeast Mannitol Agar (YMA) .....	8
Table 4. Number of rhizobial isolates from host leguminous trees growing on the Jeju Island .....	11
Table 5. Number of rhizobial isolates from host leguminous herbs growing on the Jeju Island .....	12
Table 6. Number of rhizobial isolates of each RFLP type and closest species by comparing partial 16S rRNA gene sequence .....	17
Table 7. Number of RFLP type of <i>Hae</i> III and <i>Rsa</i> I digested rhizobial 16S rRNA gene and number of rhizobial isolates and host plant in genus level of rhizobia .....	20
Table 8. Symbiotic relationship between one rhizobial species and multi-host plants .....	23
Table 9. Symbiotic relationship between one host plant and multi-rhizobial species .....	27
Table 10. Leguminous tree host and symbiotic rhizobia .....	29
Table 11. Leguminous herb host and symbiotic rhizobia .....	33
Table 12. Rhizobia having symbiotic relationship to tree and herb legumes commonly .....	35

## List of figures

- Fig. 1. Map of legume collection sites. .... 4
- Fig. 2. Isolation procedure of root-nodule bacteria from leguminous plant. .... 7
- Fig. 3. Amplified 16S rRNA gene band of the isolated rhizobial strain. .... 9
- Fig. 4. Agarose gel electrophoresis patterns of *Hae*III (A) and *Rsa* I (B)  
digested amplified 16S rRNA genes of rhizobial strains isolated from  
leguminous plants, and number of isolates of each RFLP type (C). .. 15

## ABSTRACT

In This study, the diversity and host specificity of the rhizobia having symbiotic relationship will legumes were investigated on the Jeju island.

From 33 legume species, a total of 111 strains of the symbiotic rhizobia was isolated. The isolated rhizobia were Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) with restriction enzymes of *Hae*III and *Rsa* I band pattern and 16S rRNA gene sequencing.

All of 111 isolated strains were divided into 46 different types of RFLP band pattern on the gel electrophoresis, and were identified 19 species, and fifteen strains isolated from 7 species of tree legumes were identified as 7 species of rhizobia and were included in 3 genera; *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Mesorhizobium*. In 26 species of herb legumes, 96 isolated strains were identified as 17 species of rhizobia and were included in 4 genera; *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Ensifer*. Among all isolates, *R. leguminosarum* was as much as 48 strains.

Among 19 species of isolated rhizobia, ten species of *B. cytisi*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *B. pachyrhizi*, *M. opportunistum*, *R. lupini*, and *R. vallis* were symbiotic with 2~5 host plants. And surprisingly, *R. leguminosarum* showed the relationship with 15 different species of host plants. And nine species were symbiotic with only one host plant.

Twelve species were classified as host plants which symbiotic with several rhizobia. *Aeschynomene indica* showed symbiotic relationship with *R. leguminosarum* and *B. iriomotense*, *Amphicarpaea edgeworthii* with *R. leguminosarum* and *R. multihospitium*, *Indigofera pseudotinctoria* with *R. leguminosarum* and *R. viciae*, and *Lespedeza thunbergii* with *R. leguminosarum* and *R. larrymoorei*. *Trifolium pratense* and *Vicia angustifolia*



were common host of *R. leguminosarum* and *R. vallis*, *Albizia julibrissin* and *Pueraria thunbergiana* were the host of *B. pachyrhizi* and *B. jicamae*, and *B. pachyrhizi* and *R. lupini* respectively. *Sophora flavescens* was the host of *M. huakuii* and *M. opportunistum*, and *Cassia mimosoides* was that of *B. cytisi*, *B. jicamae*, and *R. leguminosarum*, and *Lespedeza cuneata* was that of *B. cytisi*, *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. lupini*, and *R. mesosinicum*, and *Kummerowia striata* was the partner of many species of rhizobia, *B. cytisi*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *R. lupini*, and *R. vitis*. The other 21 species of legumes were symbiotic with only one species of rhizobia.

The result of this investigation could be the having data for the study of the symbiotic rhizobia with legumes of Jeju Island. Considering that there are over 76 legume species on the Jeju Island, it would be expected that more meaningful study on the symbiotic rhizobia in many aspects could be established if further broad investigation would be done in the future on the Jeju Island.

## I. 서론

주로 콩과식물과 공생하는 근류균은 대부분 운동성이 있는 비포자성, 그람 음성, 호기적 간균으로 콩과식물과의 상호작용에 의해 식물뿌리에 새로운 기관인 뿌리혹을 형성하여 대기 중의 질소를 암모니아로 환원하여 식물이 사용할 수 있는 형태로 전환한다. 이와 같은 공생적 질소고정은 토양을 비옥화하고, 다른 생물체에 질소원을 공급하기 때문에 많은 연구가 이루어지고 있다 (Jordan, 1982; Min and Koh, 1998).

콩과식물과 공생하는 근류균은 지금까지 약 12속 129종이 알려져 있다. 근류균은 *Proteobacteria*문에 속하며  $\alpha$ -*Proteobacteria*강에는 *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Ochrobactrum*과 *Methlobacterium* 속들이 있고,  $\beta$ -*Proteobacteria*강에는 *Burkholderia*, *Cupriavidus* 속이 포함되어 있다 (Table 1). 종단위에서 보면, 가장 큰 속인 *Rhizobium* 속에는 *Rhizobium leguminosarum*을 포함한 56종, *Mesorhizobium* 속에는 *Mesorhizobium loti*를 포함한 24종, *Ensifer*속에는 *Ensifer fredii*를 포함하여 14종, 흔히 알려진 속 중 가장 적은 속으로 *Bradyrhizobium* 속에는 *Bradyrhizobium japonicum*을 포함한 13종이 있다. 또한 현재까지 콩과식물에 공생하는 근류균의 신종 연구가 활발히 계속되고 있다. (Graham *et al.*, 1991; Broughton, 2003; Young, 2003; Rivas *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; <http://www.bacterio.cict.fr/>).

공생적 질소고정에 관련된 연구는 대두를 비롯한 콩아과에 속하는 경제작물에 대해 중점적으로 이루어지고 있다. 콩과식물은 뿌리혹세균의 공생관계를 통해 뿌리혹을 형성하여 대기 중의 질소를 암모니아로 고정하여 식물체에서 공급한다. *Rhizobiaceae*과의 질소고정 세균 (*Bradythizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*)은 높은 기주 특이성을 가지고 콩과식물과 공생적 상호작용을 통하여 질소고정을 하는 뿌리혹을 형성한다. 이때 기주 특이성이 높고 낮음의 정도에 따라 공생관계가 좌우되고, 이것이 달라지면 뿌리혹 형성이 일어나지 않는다. 콩과식물이 분비한 저분자 화합물인 flavonoid는 세균을 뿌리로 유인하여 세균에 의한

뿌리혹 형성 인자인 Nod factor의 생성과 분비를 유도하고, Nod factor를 인지한 식물의 뿌리털은 변형 (curling 과 deformation)이 일어난다. 이렇게 변형된 뿌리털 내부에는 감염사가 생성되면 세포내로 뿌리혹 세균이 감염되어 이미 분화가 된 뿌리혹원기로 이동하여 뿌리 피층세포까지 전이되고 symbiosome을 생성하여 질소고정을 위한 bacteroid로 분화된다. 식물의 뿌리조직 내에서 피층세포의 과다 세포분열로 외관상의 뿌리혹이 형성되며, 이렇게 성숙된 뿌리혹 내의 bacteroid는 leghemoglobin을 생성하고 식물로부터 영양분을 공급받아 대기 중의 질소를 고정하고 고정된 질소를 식물에 제공하는 공생관계를 갖는다 (Gresshoff and Delvels, 1986; Day, 1989; Vasse *et al.*, 1990; Udvardi and Day, 1997; Crespi and Galvez, 2000; Esseling *et al.*, 2003; Rolfe *et al.*, 2003; Brewin, 2004; Muller and Schmidt, 2004; Geurt *et al.*, 2005; Ferguson, 2010).

**Table 1. Classification of traditionally considered rhizobial genera and nodulating non-rhizobial genera (Rivas *et al.*, 2009)**

Class	Family	Genus	
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i> <i>Ensifer</i>	
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i> <i>Phyllobacterium</i>	
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i> <i>Blastobacter</i> <i>Azorhizobium</i>	
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i> *	
	<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i> *	
	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i> *	
	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i> * <i>Cupriavidus</i> *

\*Non-rhizobia genus able to establish symbiosis and form nodules in legumes.

근류균은 대기중의 질소분자를 식물이 이용할 수 있는 질소화합물로 고정하여 토양에 공급함으로써 토양의 비옥도를 높이는 역할을 하여 특히 콩과식물 재배 작물에 질소 비료를 공급하지 않아도 됨으로써 경제적으로 그 중요성이 매우 높다.

제주도는 한반도에서 남쪽으로 약 83 km에 위치하고 있으며, 북동동~남서서 방향으로 가로 놓인 동서 길이 73 km, 남북길이 31 km, 면적 1,825 km<sup>2</sup>의 타원형의 화산섬으로서 섬 중앙에 한라산이 위치하고 있다 (Kim, 2011). 제주도는 화산회토와 비화산회토가 혼재된 지역으로 5개 목, 11개 아목, 13개의 대군과 63개 토양통으로 분류된다. 제주도의 화산회토는 염기성암인 현무암에서 유래된 화산회토를 모재로 하고 있으며 통기성, 투수성, 토양완충력과 같은 물리적 특성이 양호하다. 토양의 유기물 분해는 미생물 밀도, 분해효소활성, 토양 pH, 지온 등 여러 가지요인에 따라 영향을 미친다. 화산회토는 알루미늄 독성에 의하여 미생물 활성이 낮아 유기물 분해가 어려우며 이로써 자연비옥도가 낮다 (Moon, 2007; Joa *et al.*, 2012). 제주도는 면적에 비하여 1800 여종의 식물이 다양하게 분포되어 있는 것으로 알려져 있고, 그 중에 차풀, 칩, 쯤싸리 등 76 종의 콩과식물이 자생하고 있는 것으로 보고되어 있다 (Cho *et al.*, 1998; 한라산연구소, 2007).

본 연구는 이러한 지리적 특성과 토양학적인 특성 또한 생태학적 특성이 독특한 위치에 있는 제주도에 서식하고 있는 콩과식물 공생 질소고정세균의 다양성을 파악하고 기주식물과 세균간의 공생 특이성을 파악함으로써 생태적 기초자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 2.1. 시료채집

제주도에 자생하는 콩과식물 33종을 15지역 (강정동, 구좌읍, 남원읍, 대정읍, 삼양동, 성산읍, 아라동 (제주대학교 캠퍼스), 안덕면, 애월읍, 연동 (한라수목원), 우도면, 조천읍, 표선면, 하원동, 한림읍)에서 채집하였다 (Fig. 1). 만년콩은 멸종 위기식물이므로 제주한라수목원에서 조직배양한 식물을 사용하였다. 채집된 콩과 식물의 분류동정은 대한식물도감을 이용하였고 (Lee, 1979), 식물분류전문가에게 재차 확인하였다.

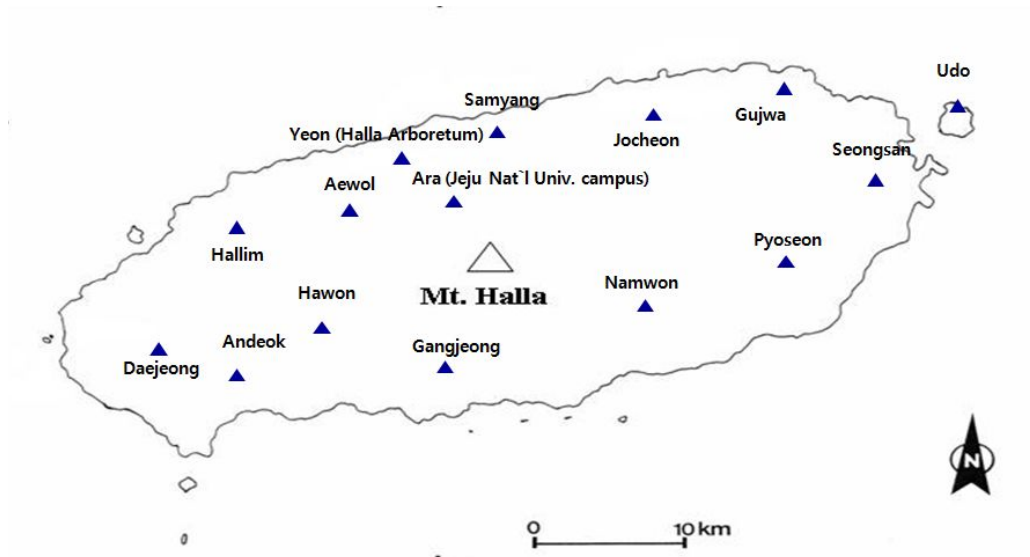


Fig. 1. Map of legume collection sites.

Table 2. Collection site of leguminous plants on the Jeju Island

Site	Plant Name (Korean Name)
Gangjeong-dong	<i>Lathyrus japonica</i> (갯완두)
Gujwa-eup	<i>Canavalia lineata</i> (해너콩) <i>Lespedeza virgata</i> (좀싸리)
Namwon-eup	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> (새콩) <i>Cassia mimosoides</i> (차풀) <i>Crotalaria sessiliflora</i> (활나물) <i>Kummerowia striata</i> (매듭풀) <i>Lespedeza cuneata</i> (비수리) <i>Phaselous nipponensis</i> (새팥) <i>Trifolium hybridum</i> (선토끼풀)
Daejeong-eup	<i>Trifolium dubium</i> (에기노랑토끼풀) <i>Trifolium repens</i> (토끼풀) <i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)
Samyang-dong	<i>Trifolium repens</i> (토끼풀) <i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)
Seongsan-eup	<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀) <i>Pueraria thunbergiana</i> (쑤)
Ara-dong (Jeju Nat'l Univ. campus)	<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀) <i>Lespedeza cuneata</i> (비수리) <i>Lespedeza thunbergii</i> (풀싸리) <i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴) <i>Sophora flavescens</i> (고삼) <i>Trifolium repens</i> (토끼풀)
Andeok-myeon	<i>Indigofera pseudotinctoria</i> (낭아초) <i>Trifolium repens</i> (토끼풀) <i>Vicia tetrasperma</i> (얼치기완두)
Aewol-eup	<i>Trifolium pratense</i> (붉은토끼풀)
Yeon-dong (Halla Arboretum)	<i>Euchresta japonica</i> (만년콩)
Udo-myeon	<i>Medicago lupulina</i> (잔개자리) <i>Lotus corniculatus</i> (별노랑이) <i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)

Table 2. Continued

Site	Plant Name (Korean Name)	
Jocheon-eup	<i>Desmodium caudatum</i> (된장풀)	
	<i>Glycine max</i> (대두)	
	<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)	
	<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)	
	<i>Phaseolus angularis</i> (팥)	
	<i>Robinia pseudoacacia</i> (아까시나무)	
	<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	
	<i>Trifolium compestre</i> (노랑토끼풀)	
	<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)	
	<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)	
	Pyoseon-myeon	<i>Albizzia julibrissin</i> (자귀나무)
		<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)
		<i>Glycine soja</i> (돌콩)
<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)		
<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)		
<i>Lespedeza pilosa</i> (팽이짜리)		
<i>Rhynchosia volubilis</i> (여우콩)		
<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)		
Hawon-dong		<i>Trifolium dubium</i> (애기노랑토끼풀)
	<i>Trifolium pratense</i> (붉은토끼풀)	
	<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)	
	<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)	
	<i>Vicia hirsuta</i> (새완두)	
Hallim-eup	<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)	
	<i>Albizzia julibrissin</i> (자귀나무)	
	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> (새콩)	
	<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)	
	<i>Pueraria thunbergiana</i> (취)	
	<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)	
	<i>Vicia hirsuta</i> (새완두)	
	<i>Trifolium dubium</i> (애기노랑토끼풀)	
	<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)	

## 2.2. 근류균의 분리 및 배양

채집된 콩과식물에서 뿌리혹 형성이 잘된 뿌리에서 뿌리혹을 분리하여 뿌리혹을 멸균된 증류수로 세척하고 70 % ethanol용액으로 3~5분간 침적한 다음, 0.1 % HgCl<sub>2</sub>용액에 5분간 표면을 소독하고 다시 멸균된 증류수로 4~5회 세척한 후 멸균한 핀셋으로 혹을 터트린 다음, 분리배지인 YMA배지 (Table 3)에서 2~7일간 28 °C에서 배양하여 순수분리 하였다 (Fig. 2). 분리된 근류균은 20 % glycerol에 현탁하여 초저온 냉동고 (-80 °C)에 보관하였다.

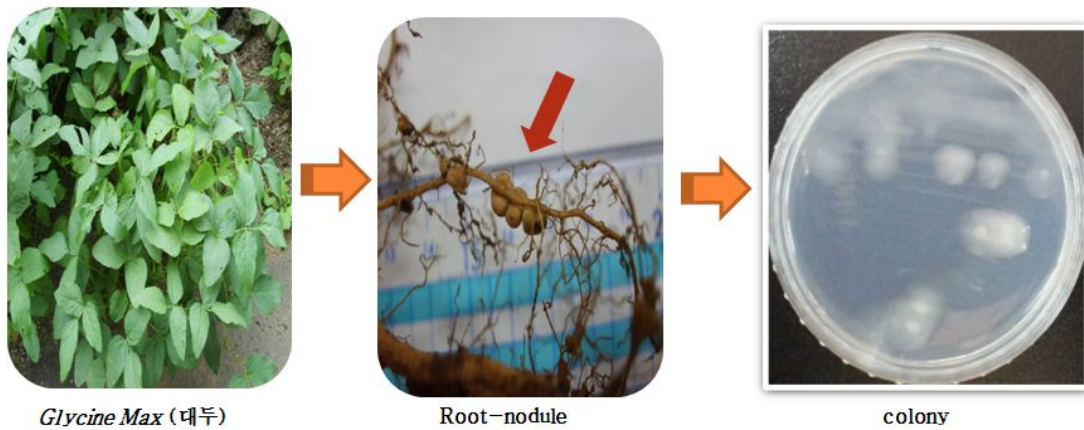


Fig. 2. Isolation procedure of root-nodule bacteria from leguminous plants.



Table 3. Formula of Yeast Mannitol Agar (YMA)

Ingredients	Amounts
Mannitol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
Yeast extract	0.4 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Agar	15 g
Distilled water	1 L (pH 7.0)

## 2.3. 순수분리한 균주의 DNA분석

### 2.3.1. 16S rRNA 유전자 증폭

분리된 균주는 Chelex (Biorad, USA)와 G-spin<sup>TM</sup>Genomic DNA Extraction kit (iNtRon, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 5 % Chelex에 분리된 균주의 집락을 넣고 100 °C에서 10분을 끓인 후 원심분리를 하여 -20 °C에 보관하였다.

16S rRNA 유전자 증폭은 27 Forward primer (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 와 1522 Reverse primer (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3')를 사용하였다. DNA 1 µL (50 ng/µL)에, 10 pmol/primer 1 µL, 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (CosmoGenetech, Korea), 멸균 증류수를 혼합하여 최종부피 25 µL로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 95 °C에서 초기 변성단계 5분간 반응한 다음 95 °C에서 변성단계 45초, 55 °C에서 결합단계 45초, 72 °C에서 합성단계 1분으로 30 회 수행한 후 72 °C 10분간 최종 합성단계의 조건으로 반응을 실시하였다. PCR 반응은 PTC-100<sup>Tm</sup> Peltier Thermal cycler (PharmaTech, USA) 이용하고, 증폭된 PCR 산물은 1 % agarose에서 전기영동 하여 확인하였다 (Fig. 3).

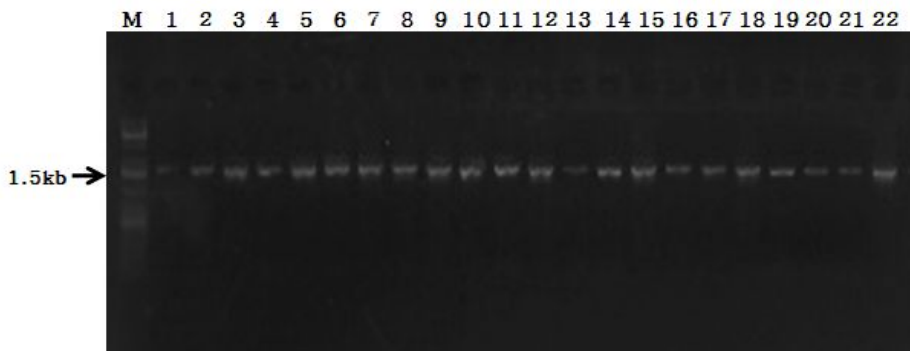


Fig 3. Amplified 16S rRNA gene band of the isolated rhizobial strain.

M: 1kb DNA ladder, 1~22 : Strains

### 2.3.2. 16S rRNA 유전자의 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 및 염기서열 분석

PCR 산물을 *Hae*III (5'...GG▼CC...3')와 *Rsa* I (5'...GT▼AC...3') (Promega, USA)의 두 가지 제한효소로 반응 시켰다. 이를 위한 효소 처리 시 최종 양을 10  $\mu$ L로 했을 때 PCR 산물을 5  $\mu$ L, 10 Unit *Hae*III를 0.5 Unit이 되도록 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$  reaction buffer 1  $\mu$ L, 멸균 증류수를 3.5  $\mu$ L로 37  $^{\circ}$ C incubator에서 2시간 30분 동안 반응 시켰다. 같은 방법으로 *Rsa* I 은 0.03 Unit가 되게 하여 37  $^{\circ}$ C에 24시간 반응시켰다. 반응시킨 10  $\mu$ L의 6 $\times$ gel loading buffer (0.25 % bromophenol blue, 40 % sucrose)를 넣고 2.5 % agarose에 loading 하여 50 vol 2시간 30분가량 전기영동 시켰다. UV illuminator로 관찰하여 111 균주의 PCR-RFLP 패턴을 비교 분석하였다. RFLP의 고유한 패턴에 따라 타입을 정하고 타입별로 균주를 선정하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다.

### 2.4 분리균주의 계통학적 분석

분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search program을 이용하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Genbank database와 EzTaxon server (Chun *et al.*, 2007)에서 유사한 염기서열을 비교하고, 가장 근연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 본 연구에 의해서 결정된 염기서열과 database에서 염기서열은 Mega 5.05 software (Tamura *et al.*, 2011)에 포함된 Clustal X 프로그램을 이용하여 multiple alignment 로 정렬하였다. 진화거리는 Jukes and Cantor (1969) 방법을 이용하여 계산하고 neighbor-joining 방법 (Saitou and Nei, 1987)을 이용하여 계통수를 작성하였다. Tree topology의 신뢰성을 평가하기 위하여 1000회의 replication을 적용한 bootstrap 분석을 하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 3.1. 콩과식물 근류균의 순수분리

제주도에서 자생하는 33종의 콩과식물의 뿌리혹에서 111개의 근류균을 분리하였다. 목본 7종에서는 15개의 균주가 분리되었고, 초본 26종에서는 96개의 균주가 분리되었다 (Table 4, 5).

Table 4. Number of rhizobial isolates from host leguminous trees growing on the Jeju Island

Host leguminous trees (Korean Name)	No. of rhizobial isolates
<i>Albizia julibrissin</i> (자귀나무)	3
<i>Desmodium caudatum</i> (된장풀)	1
<i>Euchresta japonica</i> (만년콩)	4
<i>Indigofera pseudotinctoria</i> (낭아초)	2
<i>Lespedeza thunbergii</i> (풀싸리)	2
<i>Lespedeza virgata</i> (좁싸리)	2
<i>Robinia pseudoacacia</i> (아까시나무)	1
Total	7

Table 5. Number of rhizobial isolates from host leguminous herbs growing on the Jeju Island

Host leguminous herb (Korean Name)	No. of rhizobial isolates
<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)	3
<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> (새콩)	5
<i>Canavalia lineata</i> (해너콩)	1
<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)	4
<i>Crotalaria sessiliflora</i> (활나물)	1
<i>Glycine max</i> (대두)	2
<i>Glycine soja</i> (돌콩)	1
<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)	10
<i>Lathyrus japonica</i> (갯완두)	2
<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)	8
<i>Lespedeza pilosa</i> (쟁이싸리)	1
<i>Lotus corniculatus</i> (별노랑이)	1
<i>Medicago lupulina</i> (잔개자리)	1
<i>Vigna angularis</i> (팥)	3
<i>Phaseolous nipponensis</i> (새팥)	1
<i>Pueraria thunbergiana</i> (취)	4
<i>Rhynchosia volubilis</i> (여우콩)	1
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	3
<i>Trifolium compestre</i> (노랑토끼풀)	2
<i>Trifolium dubium</i> (애기노랑토끼풀)	4
<i>Trifolium hybridum</i> (선토끼풀)	1
<i>Trifolium pratense</i> (붉은토끼풀)	4
<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)	16
<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)	13
<i>Vicia hirsuta</i> (새완두)	2
<i>Vicia tetrasperma</i> (얼치기완두)	2
Total	26

### 3.2 16S rRNA 유전자 증폭 및 PCR-RFLP

분리된 111개 균주의 16S rRNA 증폭산물은 46개의 RFLP type으로 분류되었다 (Fig. 4).

목본 콩과식물에서 분리된 15개의 균주는 11개의 RFLP type으로 구분되었다. 남아초에서 분리된 2개의 균주는 RFLP type 12, 13으로, 된장풀에서 분리된 1개의 균주는 type 27로, 만년콩에서 분리된 4개의 균주는 type 26으로, 아까시나무에서 분리된 1개의 균주는 type 18로, 자귀나무에서 분리된 3개의 균주는 type 1, 2, 43으로, 좁싸리에서 분리된 2개의 균주는 type 35로, 풀싸리에서 분리된 2개의 균주는 type 24, 32로 구분되었다 (Table 6).

초본 콩과식물에서 분리된 96개의 균주는 37개의 type으로 구분되었다. 갯완두에서 분리된 2개의 균주는 RFLP type 24로, 고삼에서 분리된 3균주는 type 3, 14, 15로, 팽이싸리에서 분리된 1개의 균주는 type 4로, 노랑토끼풀에서 분리된 2개의 균주는 type 6, 31로, 대두에서 분리된 2개의 균주는 type 7로, 돌콩에서 분리된 1개의 균주는 type 20으로, 매듭풀에서 분리된 10개의 균주는 type 4, 5, 7, 8, 9, 10, 46으로, 별노랑이에서 분리된 1개의 균주는 type 29로, 붉은토끼풀에서 분리된 4개의 균주는 type 24, 33, 41로, 비수리에서 분리된 8개의 균주는 type 6, 7, 10, 16, 17, 44로, 살갈퀴에서 분리된 13개의 균주는 type 24, 36, 37, 38, 42로, 새완두에서 분리된 2개의 균주는 type 33, 34로, 새콩에서 분리된 5개의 균주는 type 6, 23으로, 새팥에서 분리된 1개의 균주는 type 6으로, 선토끼풀에서 분리된 1개의 균주는 type 6으로, 애기노랑토끼풀에서 분리된 4개의 균주는 type 24로, 얼치기완두에서 분리된 2개의 균주는 type 30으로, 여우콩에서 분리된 1개의 균주는 type 45로, 자귀풀에서 분리된 3개의 균주는 type 24, 35로, 잔개자리에서 분리된 1개의 균주는 type 28로, 차풀에서 분리된 4개의 균주에서는 type 4, 6, 11로, 칩에서 분리된 4개의 균주는 type 39, 40으로, 토끼풀에서 분리된 16개의 균주는 type 6, 24로, 팔에서 분리된 3개의 균주는 type 21, 22로, 해너콩에서 분리된 1개의 균주는 type 25로, 활나물에서 분리된 1개의 균주는 type 19로 구분되었다.

RFLP 6과 24 type은 여러 식물에서 분리된 균주가 같은 패턴을 보였다. Type

6은 새콩, 차풀, 비수리, 새팥, 선토끼풀, 노랑토끼풀 7종의 식물에서와 type 24는 살갈퀴, 토끼풀, 풀싸리, 자귀풀, 애기노랑토끼풀, 갯완두, 붉은토끼풀 7종의 식물에서 분리된 균주에서 나타났다 (Table 6).

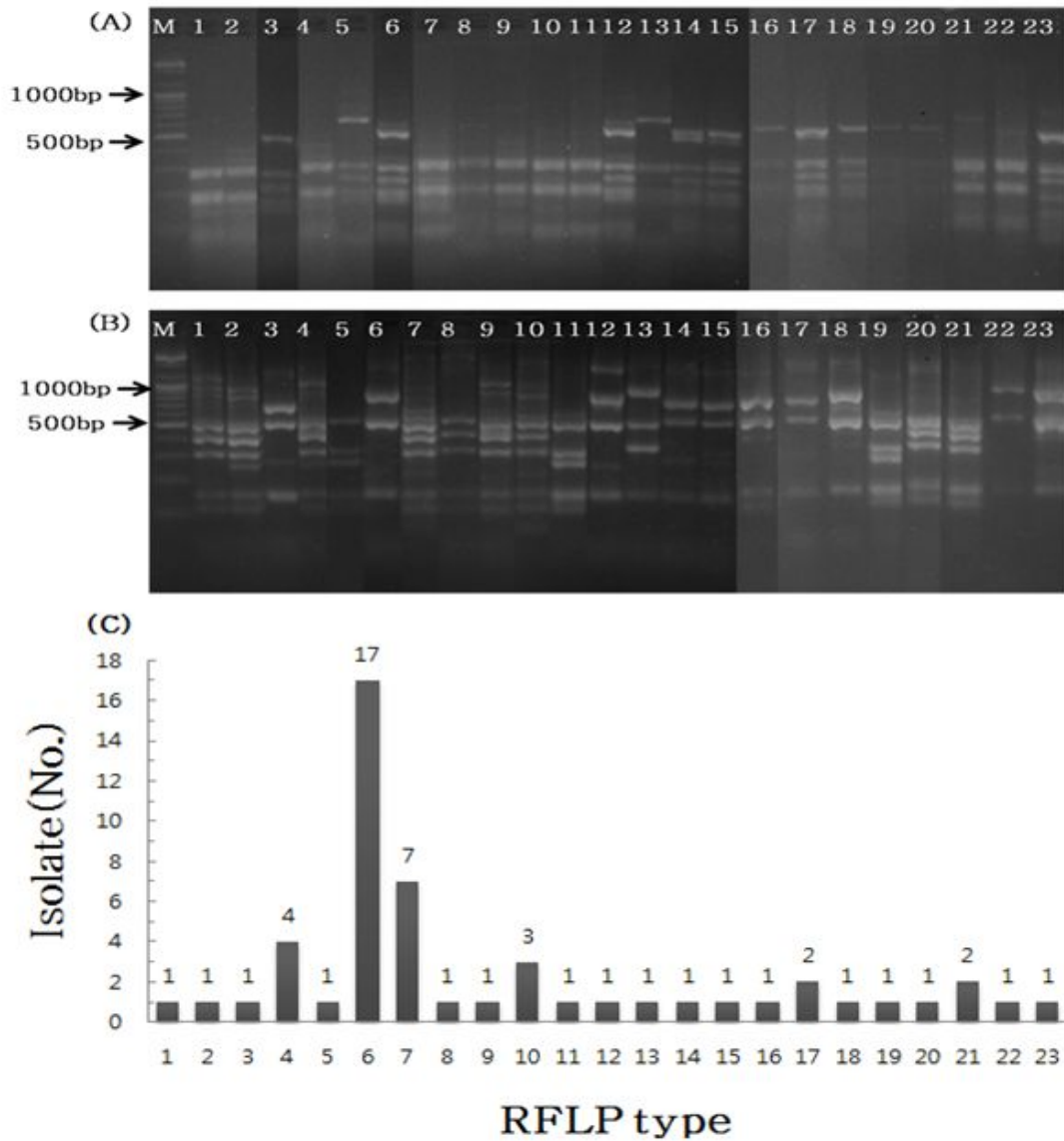


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis patterns of *Hae*III (A) and *Rsa*I (B) digested amplified 16S rRNA genes of rhizobial strains isolated from leguminous plants, and number of isolates of each RFLP type (C).



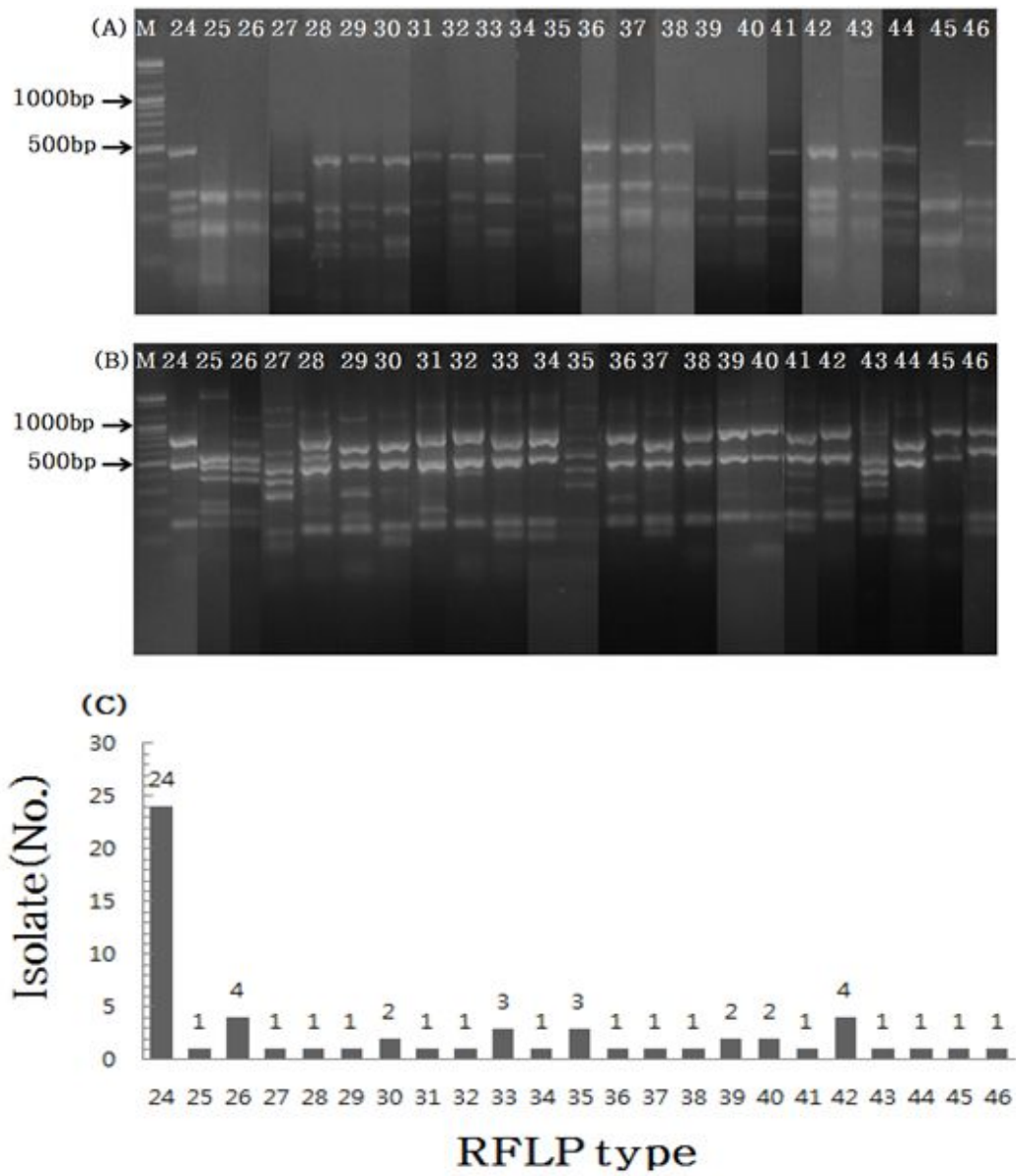


Fig. 4. Continued.

Table 6. Number of rhizobial isolates of each RFLP type and closest species by comparing partial 16S rRNA gene sequence

RFLP type	Strain (No.)	Closest species	Similarity (%)
1	1	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	99.7
2	1	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	100
3	1	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	100
4	4	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	99.6
5	1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	99.6
6	17	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99.6
7	7	<i>Rhizobium lupini</i>	100
8	1	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	99.8
9	1	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	99.7
10	3	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	100
11	1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	99.6
12	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99.5
13	1	<i>Rhizobium vigenae</i>	98.2
14	1	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	100
15	1	<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	99.8
16	1	<i>Rhizobium mesosinicum</i>	99.5
17	2	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	99.7
18	1	<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	99.6
19	1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	99.7
20	1	<i>Rhizobium lupini</i>	100
21	2	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	99.6
22	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99.6
23	1	<i>Rhizobium multihospitium</i>	98.4
24	24	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99.5

Table 6. Continued

RFLP type	Strain (No.)	Closest species	Similarity (%)
25	1	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	99.8
26	4	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	99.8
27	1	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	99.5
28	1	<i>Ensifer meliloti</i>	100
29	1	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	100
30	2	<i>Rhizobium pisi</i>	100
31	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99.6
32	1	<i>Rhizobium larrymoorei</i>	99.7
33	3	<i>Rhizobium vallis</i>	100
34	1	<i>Rhizobium vallis</i>	100
35	3	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	100
36	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99.6
37	1	<i>Rhizobium vallis</i>	100
38	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99.4
39	2	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	99.7
40	2	<i>Rhizobium lupini</i>	100
41	1	<i>Rhizobium vallis</i>	100
42	4	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99.5
43	1	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	100
44	1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	99.6
45	1	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	100
46	1	<i>Rhizobium vitis</i>	98.6

### 3.3 계통학적 및 생태학적 분석

#### 3.3.1. 분리균주의 계통학적 분석

분리균주의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭한 후 제한효소로 절단하여 전기영동을 한 결과 46가지 RFLP의 type으로 나누어졌다 (Table 6). 각 유형에서 대표 균주 1개씩을 선발하고 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열을 이용하여 EzTaxon Server에서 근연종을 찾은바 *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* 의 4개 속에 속하는 19종이 제주지역에서 서식하는 것으로 밝혀졌다. 분리된 균주는 가장 가까운 근연종과의 염기서열 유사도가 가장 낮은 것이 *R. vignae* 로서 98.2 % 이었고 나머지는 거의 99.5 % 이상 100 %였다 (Table 6). 이는 전 세계적으로 지금까지 알려진 120여종에 비하면 적음 종수이나 각 유형에서 한 균주씩만 골라 염기서열 분석을 한 것이므로 실제의 종수는 훨씬 더 다양할 수도 있을 것으로 보인다.

33종의 콩과식물에서 분리된 111개의 균주는 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석결과 21종의 콩과식물에서 분리된 73개의 균주는 21개의 RFLP type 으로 *Rhizobium* 속에 포함하였고, 14종의 콩과식물에서 분리된 32개의 균주는 19개의 RFLP type으로 *Bradyrhizobium* 속에 포함되었고, 1종의 콩과식물에서 분리된 1개의 균주는 1개의 RFLP type으로 *Ensifer* 속에 포함되었고, 3종의 콩과식물에서 분리된 5개의 균주는 5개의 RFLP type으로 *Mesorhizobium* 속에 포함되었다 (Table 7).

Table 7. Number of RFLP type of *Hae*III and *Rsa* I digested rhizobial 16S rRNA gene and number of rhizobial isolates and host plant in genus level of rhizobia

Genus	Number RFLP types	No. of rhizobial Isolates	Number Host plants
<i>Rhizobium</i>	21	73	21
<i>Bradyrhizobium</i>	19	32	14
<i>Mesorhizobium</i>	5	5	3
<i>Ensifer</i>	1	1	1
Total	46	111	-

### 3.3.2. 복수의 기주식물에 공생하는 근류균

기주식물과 공생균과의 상관관계를 살펴본바, *Bradyrhizobium* 속은 6종이 여러 종의 다른 기주 식물에서 분리되었다. *B. cytisi*는 차풀, 비수리, 활나물, 매듭풀 4종의 식물에서 분리되었는데 (Table 8) Chahboune *et al.* (2011)은 *Cytisus villosus*에서 분리되었다고 보고하였다. *B. cytisi*는 2011년에 발견된 종으로 아직 생태연구가 되어있지 않아, 본 연구의 결과는 중요한 자료가 될 것이다. *B. cytisi*는 제주도 동쪽의 남원읍, 표선면, 조천읍지역에서 채집된 4종의 식물에서 분리되었으나 타 지역의 분포는 불분명하다.

*B. iriomotense*는 새콩, 자귀풀, 줌싸리 2종의 식물에서 분리되었는데, Islam *et al.* (2008)은 *Entada koshunensis*에서 분리가 되었다고 보고하였다. 새콩, 자귀풀, 줌싸리 2종의 식물에서 분리된 *B. iriomotense*는 제주도 동서쪽에 있는 한림, 구좌, 조천 지역에서 분리되었다.

*B. japonicum*은 매듭풀, 비수리 2종 식물에서 분리되었는데, Lee and Lee (1992)은 땅콩과 대두에서도 분리되었다고 보고하였다. 중국의 Han *et al.* (2008)은 *Orobus (Lathyrus) luteus*에서 분리되었지만 중국의 Liu *et al.* (2007)에 의하면 대두, *Crotalaria pallida*, 토끼풀, *Trifolium fragiferum*, 미모사에서도 분리되었다. 지역에 따라 환경이 다르므로 공생하는 근류균이 다를 수도 있을지 모른다. 매듭풀, 비수리 2종 식물은 아라동, 남원읍, 성산읍 3곳에서 채집되었다.

*Bradyrhizobium* 속에 많이 차지하는 *B. jicamae*는 매듭풀, 팽이싸리, 자귀나무, 만년콩 4종의 식물에서 분리가 되었고, *B. pachyrhizi*은 팔, 자귀나무, 칩, 된장풀 4종의 식물에서 분리되었는데, 이 두 종은 *Pachyrhizus erosus*에서 분리가 되었다고 보고되었다 (Ramirez *et al.*, 2009). *B. jicamae*은 표선면지역에서 분리되었고 *B. pachyrhizi*은 한림읍, 조천읍에 분리되었다.

*B. liaoningense*는 해너콩, 매듭풀, 여우콩 3종에서 분리되었고, Xu *et al.* (1995)은 대두와 돌콩에서 분리하여 보고하였다. *B. liaoningense*은 표선면, 한림읍, 구좌읍지역에서 채집되었다.

*Mesorhizobium* 속은 *M. opportunistum*이 조천지역의 고삼, 아까시나무 2종의 식물에서 분리되었는데, Nandasena *et al.* (2009)는 *Biserrula pelecinus*에서 분

리하였다고 보고하였다.

*Rhizobium* 속은 3종이 여러 기주식물에서 분리되었다. *Rhizobium* 속에 가장 많이 차지하는 *R. legumiosarum*은 자귀풀, 새콩, 낭아초, 갯완두, 노랑토끼풀, 애기노랑토끼풀, 붉은토끼풀, 토끼풀, 살갈퀴, 차풀, 선토끼풀, 비수리, 풀싸리, 새팥, 팥 등 15종의 식물종에서 50균주가 분리되었다. Lee and Lee (1992)은 살갈퀴, 열치기완두, 완두, 벌완두 4종의 식물에서 분리되었다고 보고되었다. 중국 Han *et al.* (2008)은 *R. legumiosarum*는 살갈퀴외 9종의 식물에서 공생한다고 보고되었다. *R. legumiosarum*은 *Rhizobium* 속의 대표종으로 많은 식물에 공생하는 것으로 보인다. *R. legumiosarum*은 채집한 15곳 중에서 한림읍, 남원읍, 안덕면, 강정동, 아라동, 조천읍, 하원동, 대정읍, 우도면, 삼양동, 표선면 11곳에서 채집한 식물에서 분리가 되었다. 그래서 *R. legumiosarum*은 제주도 전 지역의 다양한 식물과 공생하고 있음을 알 수 있어 제주도에 분포한 근류균 중에 우점하는 종임을 나타내었다.

*R. lupini*는 돌콩, 대두, 매듭풀, 비수리, 칩 5종의 식물에서 분리되었는데. *R. lupini*는 북서아메리카에서 *Lupinus polyphyllus* (숙근풀등꽃)와 *Lupinus angustifolius* (가는잎미선콩)식물에서 오래전에 분리되었다고 보고하였다 (Eckhardt *et al.*, 1931).

*R. vallis*는 붉은토끼풀, 살갈퀴, 새완두 3종의 식물에서 분리되었는데, 중국의 Wang *et al.* (2011)은 강낭콩, 미모사, *Indigofera spicata*에서 분리되었다고 보고되어 본 연구에서 분리된 기주식물과 차이를 알 수 있었다. 이상의 내용으로 보아서 근류균의 기주특이성은 종류에 따라 매우 다양한 것으로 나타났다.

Table 8. Symbiotic relationship between one rhizobial species and multi-host plants

Rhizobial species	Host plant (Korean Name)
<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)
	<i>Lespedez acuneata</i> (비수리)
	<i>Crotalaria sessiliflora</i> (활나물)
	<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)
	<i>Lespedeza virgata</i> (좁싸리)
	<i>Phaseolus angularis</i> (팥)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)
	<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	<i>Albizzia julibrissin</i> (자귀나무)
	<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)
	<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)
	<i>Lespedeza pilosa</i> (팽이싸리)
	<i>Euchresta japonica</i> (만년콩)
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	<i>Canavalia lineata</i> (해녀콩)
	<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)
	<i>Rhynchosia volubilis</i> (여우콩)
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	<i>Albizzia julibrissin</i> (자귀나무)
	<i>Pueraria thunbergiana</i> (취)
	<i>Desmodium caudatum</i> (된장풀)



Table 8. Continued

Rhizobial species	Host plant (Korean Name)
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i> (아까시나무)
	<i>Sophora flavescens</i> (고삼)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)
	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> (새콩)
	<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)
	<i>Indigofera pseudotinctoria</i> (낭아초)
	<i>Lathyrus japonica</i> (갯완두)
	<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)
	<i>Lespedeza thunbergii</i> (풀싸리)
	<i>Phaseolus nipponensis</i> (새팥)
	<i>Phaseolus angularis</i> (팥)
	<i>Trifolium compestre</i> (노랑토끼풀)
	<i>Trifolium dubium</i> (애기노랑토끼풀)
	<i>Trifolium hybridum</i> (선토끼풀)
	<i>Trifolium pratense</i> (붉은토끼풀)
	<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)
	<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)
	<i>Rhizobium lupini</i>
<i>Pueraria thunbergiana</i> (취)	
<i>Glycine max</i> (대두)	
<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)	
<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)	
<i>Rhizobium vallis</i>	<i>Trifolium pratense</i> (붉은토끼풀)
	<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)
	<i>Vicia hirsuta</i> (새완두)

### 3.3.3. 복수의 근류균과 공생하는 기주식물

한 기주 식물종에 여러 종류의 근류균이 공생하는 식물은 12종으로 분류되었다 (Table 9). 자귀풀, 차풀, 낭아초, 풀싸리, 붉은토끼풀, 살갈퀴는 각각 *R. leguminosarum* 외 1종이 공생하고, 자귀나무, 칩은 각각 *B. pachyrhizi* 외 1종이, 고삼은 *M. huakuii* 외 1종이, 새콩은 *B. irionmotense* 외 2종이, 매듭풀은 *B. cytisi* 외 5종이, 비수리는 *B. japonicum* 외 4종이 공생한다는 것으로 나타났다.

대부분 공생하는 근류균은 한 식물에 2~3종이 있는데, 매듭풀 같은 경우는 공생하는 근류균이 6종이 되었다 (Table 9). 매듭풀에 공생하는 근류균은 Min and Koh (1998)에 의하면 *Bradyrhizobium* sp.가 *B. japonicum* 특성이 비교하여 유사하다고 하였다. Yao *et al.* (2012)에 의하면 *R. taibaishanense* 이, Lin *et al.* (2007)은 *B. elkani*, *B. yuanmingense*, *B. japonicum*, *B. liaoningense* 이 분리되었다고 보고하였다. 매듭풀에서 식물에서 6종이 분리되었다고는 보고되어 있지 않다. 매듭풀은 특히 많은 근류균이 분리되었으나 그 이유는 불분명하다.

붉은 토끼풀은 *R. leguminosarum* 과 *R. vallis* 가 분리되었는데, 브라질 Menna *et al.* (2006)에 의하면 *R. leguminosarum* 종만 분리되었다고 보고하였다. 자귀풀은 한림읍에서 채집한 식물로 식물 개체의 근접한 거리에 있음에도 불구하고 공생하는 근류균이 *B. irionmotense* 와 *R. leguminosarum* 이 분리되었다. 또한 낭아초는 안덕면, 풀싸리는 아라동, 팔은 조천읍에서 한 지역에서 채집한 식물임에도 불구하고 2종의 근류균이 분리되었다. 자귀나무는 제주도 동쪽에 있는 표선면 채집한 식물에서는 *B. jicamae*가, 제주도 서쪽에 있는 한림읍에서 채집한 식물에서는 *B. pachrhizi*가 분리되어 차이가 있었다.

새콩은 한림읍과 남원읍에서 채집한 식물에서 *R. leguminosarum*이 분리되었지만 남원읍에서 채집한 식물 중에서 *R. multihospitium*이 분리되었다. 차풀은 제주도 동쪽 남원읍에서 채집한 식물에서 *B. cytisi*와 *R. leguminosarum* 이, 표선면에서 채집한 식물에서 *B. jicamae*가 분리되어 분리된 근류균의 차이가 있음을 보였다.

매듭풀은 조천읍에서 *B. cytisi*가, 성산읍에서 *B. japonicum*이, 표선면에서 *B. jicamae*와 *R. lupini*가, 한림읍에서 *B. liaomigense*이, 아라동에서 *R. lupini*가. 남

원읍에서 *R. vitis*가 분리되어 채집한 7곳 지역에 다양하게 근류균이 분포함은 알 수 있었다. 살갈퀴는 하원동에서 *R. vallis*가 분리되었고, 아라동, 조천읍, 대정읍, 한림, 우도에서 *R. leguminosarum*이 분리되어 다양한 지역에 근류균의 분포는 단순함을 보였다.

한 기주 식물중에 공생하는 여러 종류의 근류균은 분리된 지역에 차이를 보임을 알 수 있었다. 지역적인 특징에 대하여 더 조사할 필요가 있다고 사료된다.

Table 9. Symbiotic relationship between one host plant and multi-rhizobial species

Host plant (Korean Name)	Rhizobial species
<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Albizia julibrissin</i> (자귀나무)	<i>Bradyrhizobium jicamae</i> <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>
<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> (새콩)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium multihospitium</i>
<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> <i>Bradyrhizobium jicamae</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Indigofera pseudotinctoria</i> (낭아초)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium vignae</i>
<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Bradyrhizobium jicamae</i> <i>Bradyrhizobium liaoningense</i> <i>Rhizobium lupini</i> <i>Rhizobium vitis</i>
<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium lupini</i> <i>Rhizobium mesosinicum</i>
<i>Lespedeza thunbergii</i> (풀싸리)	<i>Rhizobium larrymoorei</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Phaseolus angularis</i> (팥)	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Pueraria thunbergiana</i> (췌)	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> <i>Rhizobium lupini</i>
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	<i>Mesorhizobium huakuii</i> <i>Mesorhizobium opportunistum</i>
<i>Trifolium pratense</i> (붉은토끼풀)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium vallis</i>
<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium vallis</i>

### 3.3.4. 목본 콩과식물에 공생하는 근류균

자귀나무에서는 *R. tropici*이 분리되었다고 보고하였는데 (Kang, 2003), 본 연구에서 *B. jicamae*와 *B. pachyrhizi*가 분리되어 차이가 있었다 (Table 10). 그리고 아까시나무에서는 *Mesorhizobium* 속 *M. huakuui*, *M. amorphae*, *M. plurifarum*이 분리되었다고 보고하였는데 (Kang, 2003), 본 연구에서는 *M. opportunistum*이 분리되었다. Han *et al.* (2008)은 *R. tropici*와 *M. tianshanense*, *M. spetentrionale*, *E. meliloti*가 분리되었다고 보고하였는데, 제주도에 자생하는 아까시나무의 근류균 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

*Lespedeza* (싸리나무)들은 *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* 3가지 속에서 다양하게 분리되었다고 (Kang, 2003)보고하였는데, 본 연구에서는 싸리나무인 풀싸리, 좁싸리는 *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* 2가지 속에서 *R. larrymoorei*, *R. leguminosarum*, *B. iriomotense*가 분리되었다. 그리고 중국의 Gu *et al.* (2007)은 좁싸리에서 *B. japonicum*, *M. amorphae*, *R. tropici* 가 분리되었다고 보고하였는데 본 연구에서는 *B. iriomotense* 분리되어 중국과 제주도의 지리적인 차이로 인하여 공생하는 근류균이 차이가 있음을 보였다.

만년콩은 우리나라의 멸종위기야생식물이며 일본, 중국에 서식하며 우리나라에서는 제주도 돈네코에 분포한다 (Kim, 2007). 멸종위기야생식물이어서 한라수목원에서 조직배양된 식물에서 뿌리혹을 분리하였다. 만년콩에서 분리된 균주는 *Bradyrhizobium jicamae*로 밝혀졌다. 만년콩의 공생균은 처음 밝혀지는 것으로 보인다. 낭아초에서 분리된 균주는 *Rhizobium leguminosarum*과 *R. vignae*로 나타났다. Lee and Lee (1992)은 낭아초에서 근류균은 분리를 하였으나 동정하지 못하여 이 연구가 기초자료가 될 것이라 사료된다. 된장풀에서 분리된 균주는 *B. pachyrhizi* 였다.

본 연구에서는 목본 콩과식물에서 분리된 15개의 균주 중 *B. jicamae*가 7균주가 분리되어 제주도의 비옥하지 않은 토양에서는 자생하는 목본들에서 우점하고 있었다. 그리고 공생하는 근류균은 *Rhiozbium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium* 3개 속에 모두 포함되는 다양한 균주들이 있었다.

Table 10. Leguminous tree host and symbiotic rhizobia

Host tree (Korean Name)	No.of Isolate	Rhizobial species
<i>Albizzia julibrissin</i> (자귀나무)	1	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>
	2	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>
<i>Desmodium caudatum</i> (된장풀)	1	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>
<i>Euchresta japonica</i> (만년콩)	4	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>
<i>Indigofera pseudotinctoria</i> (낭아초)	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	1	<i>Rhizobium vignae</i>
<i>Lespedeza thunbergii</i> (풀싸리)	1	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Lespedeza virgata</i> (좁싸리)	2	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>
<i>Robinia pseudoacacia</i> (아까시나무)	1	<i>Mesorhizobium opportunistum</i>

### 3.3.5. 초본 콩과식물에 공생하는 근류균

매듭풀에서 분리된 10개의 균주는 *B. cytisi*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *R. lupini*, *R. vitis* 분류되었다 (Table 11). 채집한 식물들 중에서 가장 다양한 종이 분리되었다. Min and Koh (1998)은 매듭풀에서 분리한 *Bradyrhizobium* sp.는 *B. japonicum*과 특성이 유사하다고 하였다. 본 연구에서는 *Rhizobium* 속 균도 분리되어 차이가 있음을 알 수 있었다.

별노랑이에서 분리된 균주는 *M. amorphae*와 100 %의 유사도를 갖는 동일종으로 분류되었다. 대전에 자생하는 별노랑이는 *M. loti*가 근연종으로 보고되어 차이가 있음을 알 수 있었다 (Koh, 2009). 그리고 Menna *et al.* (2006)은 *Mezorhizobium* sp.가 분리되었다고 보고하고 있어 별노랑이 기주 식물에서는 *Mezorhizobium* 속 근류균이 분포할 것이라고 사료된다.

얼치기완두에서 분리된 균주는 *R. pisi* 였다. 대전에서 자생하는 얼치기완두에서 분리된 균주는 *R. leguminosarum*의 근연종으로 보고되어 차이가 있음을 알 수 있었다 (Koh, 2006).

살갈퀴에서는 *Rhizobium leguminosarum* 과 *R. vallis*가 분리되었다. 대전에서 자생하는 살갈퀴에서 분리된 균주는 *R. leguminosarum*의 근연종으로 보고되었다 (Koh, 2006). 그리고 창원에서 자생하는 살갈퀴에서 분리된 균주는 *R. leguminosarum*이 근연종으로 보고되었다 (Lee and Lee, 1992). 중국에 자생하는 살갈퀴는 *R. leguminosarum*과, *R. gallicum*, *Ensifer meliloti*가 분리되었다고 보고되었다 (Lei, 2008). 살갈퀴에 분리된 균주 *R. leguminosarum*는 다른 지역들과 같은 분포를 보임을 알 수 있었다. *Vicia* 속은 *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* 속에서 다양하게 나타나났지만. 본 연구에서는 *Vicia* 속 (살갈퀴, 새완두, 얼치기완두)에서 분리된 균주는 *Rhizobium* 속에서만 3종이 근연종임을 알 수 있었다.

대두와 돌콩에서 분리된 균주는 *R. lupini* 였다. Lee and Lee (1992)는 대두에서 *B. japonicum*이, Yun *et al.* (1987)은 *R. fredii*이, Xu *et al.* (1995)은 대두와 돌콩에서는 *B. liaoningense* 가 분리되었다고 보고하였다. Menna *et al.* (2006)은 *B. elkanii*가 대두에서 분리되었고, Yoon *et al.* (2007)은 돌콩에서

*Bradyrhizobium* sp.를 분리하였다. 주로 대두에서는 *B. japonicum*이 분리되었다고 보고되는데, 제주도의 지리적인 특성과 토양의 특성에 차이로 본 연구에서 분리된 근류균 다름을 알 수 있었다.

해녀콩에서는 *B. lianoningense*가 분리되었다. Kim (1989)은 해녀콩에서 분리한 *Rhizobium* sp. 는 *R. leguminosarum* 과 *E. meliloti*의 특성을 비교하였을 때 유사하다고 보고하였다. 해녀콩에서 분리된 균주는 *Bradyrhizobium* 속으로 보고된 종들과 다른 속에 속하여 차이를 알 수 있었다. 본 연구에서는 1개의 균주만 분리되었으므로 Kim (1989)과 비교할 수 있게 제주도에 자생하는 해녀콩의 근류균을 더 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

비수리에서는 *B. cytisi*, *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. lupini*, *R. mesosinicum* 의 5종이 분리되었다. 중국의 Gu *et al.* (2007)은 *B. japonicum*, *B. yuaanmingense*, *M. amorphae*, *E. meliloti*, *R. tropici* 등이 보고되었다. 제주도에 자생하는 비수리에서 분리된 근류균은 *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* 2개의 속에 분포하는데 중국의 비수리에서는 4개의 속에 분리되어 다양성의 차이를 알 수 있었다. 꿩이싸리에서 *B. jicamae*가 분리되었다. 중국의 Gu *et al.* (2007)은 *B. elkanii*, *R. tropici*가 분리되었다고 보고하였다. 비수리와 꿩이싸리는 *Lespedeza* 속의 목본인 풀싸리, 좁싸리와 공생하는 근류균이 차이가 있음을 알 수 있었다.

*Trifolium*속 노랑토끼풀, 애기노랑토끼풀, 선토끼풀, 붉은 토끼풀, 토끼풀은 본 연구에서는 *R. leguminosarum*이 우점을 하고 있었다. 그중 붉은 토끼풀 *R. vallis*가 두 종의 근류균이 공생하였다. Liu *et al.* (2007)은 *Trifolium*속 토끼풀과 *Trifolium fragiferum* 은 *R. leguminosarum*과 *B. japonicum* 이 보고되어 *Trifolium*속은 *R. leguminosarum*이 우점종임을 알 수 있었다.

새팥에서는 *R. leguminosarum*이 팥에서는 *B. pachyrhizi*가 분리되었다. Lee and Lee (1992)은 *R. trifolii* 또는 *R. phaseoli*가 공생하는 근류균이라고 보고하였다. 자귀풀과 새콩에서는 *B. iriomotense*, *R. leguminosarum*이 분리되었다. 차풀에서는 *B. cytisi*, *B. jicamae*, *R. leguminosarum*이 분리되었는데, Lee and Koh (1997)은 *Bradyrhizobium* sp. 가 공생하는 근류균이라고 보고하였다. 활나무에서는 *B. cytisi*, 갯완두에서는 *R. leguminosarum*, 잔개자리에서는 *E.*



*meliloti*, 여우콩에서는 *B. liaoningense*, 새완두에서는 *R. vallis*, 고삼에서는 *M. hyakuii*와 *M. opportunistum*이 분리되었다.

본 연구에서는 초본 콩과식물에서 분리된 96개의 균주 중 *R. leguminosarum*이 48균주가 분리되어 제주도 비육하지 않은 토양에는 자생하는 초본 콩과식물들에서 우점하고 있었다. 그리고 공생하는 근류균은 *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer* 4개 속에 모두 포함되는 다양한 균주들이 있었다.

Table 11. Leguminous herb host and symbiotic rhizobia

Host herb	No. of Isolate	Rhizobial species
<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)	1	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>
	2	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> (새콩)	4	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>
	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Canavalia lineata</i> (해녀콩)	1	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>
<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)	1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>
	2	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>
	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Crotalaria sessiliflora</i> (활나물)	1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>
<i>Glycine max</i> (대두)	2	<i>Rhizobium lupini</i>
<i>Glycine soja</i> (돌콩)	1	<i>Rhizobium lupini</i>
<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)	1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>
	2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	2	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>
	2	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>
	3	<i>Rhizobium lupini</i>
	1	<i>Rhizobium vitis</i>
<i>Lathyrus japonica</i> (갯완두)	2	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)	2	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>
	2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	2	<i>Rhizobium lupini</i>
	1	<i>Rhizobium mesosinicum</i>
<i>Lespedeza pilosa</i> (팽이싸리)	1	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>
<i>Lotus corniculatus</i> (벌노랑이)	1	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
<i>Medicago lupulina</i> (잔개자리)	1	<i>Ensifer meliloti</i>
<i>Phaselous angularis</i> (팥)	3	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>
<i>Phaselous nipponensis</i> (새팥)	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Pueraria thunbergiana</i> (췌)	2	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>
	2	<i>Rhizobium lupini</i>
<i>Rhynchosia volubilis</i> (여우콩)	1	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	2	<i>Mesorhizobium huakuii</i>
	1	<i>Mesorhizobium opportunistum</i>
<i>Trifolium compestre</i> (노랑토끼풀)	2	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Trifolium dubium</i> (애기노랑토끼풀)	4	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Trifolium hybridum</i> (선토끼풀)	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Trifolium pratense</i> (붉은토끼풀)	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	2	<i>Rhizobium vallis</i>
<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)	16	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)	12	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	1	<i>Rhizobium vallis</i>
<i>Vicia hirsuta</i> (새완두)	2	<i>Rhizobium vallis</i>
<i>Vicia tetrasperma</i> (얼치기완두)	2	<i>Rhizobium pisi</i>

### 3.3.6. 목본·초본 공통기주에 공생하는 근류균

목본과 초본 콩과식물 동시에 공생하는 근류균은 분리된 근류균 19종 중에서 5종이 분리되었다 (Table 12). *B. iriomotense*는 목본 줍싸리에서와 초본 자귀나무, 팔에서 분리되었다. 그리고 *B. jicamae*는 목본 자귀나무, 만년콩과 초본 차풀 매듭풀 팽이싸리에서 분리되었다. *B. pachyrhizi*는 목본 자귀나무, 된장풀과 초본 칩에서 분리되었다. *M. opportunistum*는 목본 아까시나무와 초본 고삼에서 분리되었다. *R. leguminosarum*은 목본 낭아초, 풀싸리와 초본 자귀풀, 새콩, 차풀, 갯완두, 비수리, 새팥, 팥, 노랑토끼풀, 애기노랑토끼풀, 선 토끼풀, 붉은토끼풀, 토끼풀, 살갈퀴에서 분리되었다. 목본과 초본 콩과식물에 공생하는 근류균 5종은 기주식물 공생에 넓은 범위를 갖고 있다고 사료된다. 목본 콩과식물을 좀 더 많은 채집을 하여 근류균을 분리하여 초본 콩과식물에서 분리된 근류균과 비교하면 다양한 근류균이 목본과 초본 콩과식물에 공생하는 것을 알 수 있을 것이라 사료된다.

제주도에 76종의 콩과식물이 자생을 하는데 본 연구에서는 33종의 콩과식물을 채집하여 근류균을 분리하여 19종의 근류균이 분리되었다. 더 많은 콩과식물을 채집하고 근류균을 분리한다면 더 많은 근류균이 공생하고 있음을 알 수 있을 것이라고 사료된다. 또한 콩과식물을 한 장소가 아닌 여러 장소에서 채집을 하여 근류균이 지리적으로 넓은 분포를 하는지 장소에 제한적인지를 연구해볼 필요가 있다.

Table 12. Rhizobia having symbiotic relationship to tree and herb legumes commonly

Bacterial species	Host tree (Korean Name)	Host herb (Korean Name)
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	<i>Lespedeza virgata</i> (좀싸리)	<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)
		<i>Phaseolus angularis</i> (팥)
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	<i>Albizzia julibrissin</i> (자귀나무)	<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)
		<i>Kummerowia striata</i> (매듭풀)
		<i>Lespedeza pilosa</i> (팽이싸리)
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	<i>Albizzia julibrissin</i> (자귀나무)	<i>Pueraria thunbergiana</i> (취)
		<i>Desmodium caudatum</i> (된장풀)
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i> (아까시나무)	<i>Sophora flavescens</i> (고삼)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Indigofera pseudotinctoria</i> (낭아초)	<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)
		<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> (새콩)
		<i>Cassia mimosoides</i> (차풀)
		<i>Lathyrus japonica</i> (갯완두)
		<i>Lespedeza cuneata</i> (비수리)
		<i>Phaseolus nipponensis</i> (새팥)
		<i>Phaseolus angularis</i> (팥)
		<i>Trifolium compestre</i> (노랑토끼풀)
		<i>Trifolium dubium</i> (애기노랑토끼풀)
		<i>Trifolium hybridum</i> (선토끼풀)
		<i>Trifolium pratense</i> (붉은토끼풀)
		<i>Trifolium repens</i> (토끼풀)
		<i>Vicia angustifolia</i> (살갈퀴)

#### IV. 요약

본 연구는 제주도에 서식하는 콩과식물에 공생하는 근류균의 다양성을 조사하고, 기주 특이성을 분석하였다.

총 33 종의 콩과식물에서 111개의 근류균주를 분리하였다. 분리된 근류균의 16S rRNA 유전자를 증폭하고, 제한효소 *Hae*III 와 *Rsa* I 로 절단하여 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석하고, 유전자 염기서열을 분석하였다.

분리된 111균주는 46개의 RFLP 유형으로 나누어졌고, 16S rRNA 유전자의 서열을 분석한 결과, 총 19종으로 동정되었고, 7종의 목본 콩과식물에서 분리된 15개의 균주는 7종의 근류균으로 동정되었으며, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* 3개의 속에 분포하였다. 26종의 초본 콩과식물에서는 분리된 96개의 균주는 17종의 근류균으로 동정되었고, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* 4개의 속에 분포하였다. 이 중에서 가장 많이 분리된 종은 *R. leguminosarum* 으로 48균주였다.

동정된 19종의 근류균 중 한 종의 근류균이 여러 기주 식물에 공생하는 종은 10종이었고, 그 중에서 *B. cytisi*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *B. pachyrhizi*, *M. opportunistum*, *R. lupini*, *R. vallis* 는 2~5 종의 기주식물과 공생하였고, 놀랍게도 *R. leguminosarum*은 15종의 기주식물에 공생하여 가장 넓은 기주 범위를 나타냈었다. 그리고 그 외의 9종은 한 식물에만 공생하였다.

한 기주 식물에 여러 종류의 근류균이 공생하는 식물은 12종으로 분류되었다. 자귀풀은 *R. leguminosarum* 과 *B. iriomotense*, 새콩은 *R. leguminosarum* 과 *R. multihospitium*, 냥아초는 *R. leguminosarum* 과 *R. vignae*, 풀싸리는 *R. leguminosarum* 과 *R. larrymoorei* 와 공생하였고, 붉은토끼풀과 살갈퀴는 모두 *R. leguminosarum* 과 *R. vallis*이 공생하며, 자귀나무는 *B. pachyrhizi* 와 *B. jicamae*, 칩은 *B. pachyrhizi* 와 *R. lupini*이 공생하며, 고삼은 *M. huakuii*와 *M. opportunistum* 과, 차풀은 *B. jicamae*, *B. cytisi*, *R. leguminosarum*이, 매듭풀은

*B. cytisi*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *R. lupini*, *R. vitis*의 6종이, 비수리는 *B. cytisi*, *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. lupini*, *R. mesosinicum*이 공생하는 것으로 나타났다. 그리고 그 외의 기주 식물은 한 종과 공생한다는 것을 알 수 있었다.

본 연구의 결과는 제주도에 서식하는 콩과식물과 공생하는 근류균 연구에 기초자료가 될 것이다. 제주도의 다양한 지역에서 더 많은 콩과식물을 조사한다면 더 많은 근류균 종류가 발견될 수 있을지도 모른다.

## V. 참고 문헌

- Brewin, N.J. 2004. Plant cell wall remodelling in the Rhizobium legume symbiosis. *Crit Rev Plant Sci.* 23: 293-316.
- Broughton, W.J. 2003. Roses by other names : Taxonomy of the Rhizobiaceae. *J Bacteriol.* 185: 2975-2979.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrial, S., Velazquez, E. and Bedmar, E.J. 2011. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61: 2922 - 2927.
- Cho, N.K., Kang, Y.K., Took, W.B. and Kim, B.H. 1998. Distribution, Standing Crpo, and Nutritive Value of Native Legumes in Cheju Island. *Jf Anim Sci Tech.* 40(6): 681-690.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K. and Lim, Y.W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2259-2261.
- Crespi, M. and Galvez, S. 2000. Molecular mechanisms in root nodule development. *J Plant Growth Regul.* 19:155-166.
- Day, D.A., Price, G.D. and Udvardi, M.K. 1989. Membrane interface of the *Bradyrhizobium japonicum*-*Glycine max* symbiosis: peribacteroid membrane unit from soybean nodules. *Aust J Plant Physiol.* 16 : 69-84.

- Eckhardt, M.M., Baldwin, I.R. and Fred, E.B. 1931. : Studies on the root-nodule bacteria of *Lupinus*. *J Bacteriol.* 21(4): 273-285.
- Esseling, J.J., Lhuissier, F., Emons, A.M.C. 2003. Nod factor induced root hair curling: continuous polar growth toward the point of Nod factor application. *Plant Physiol.* 132:1982-1988.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E. and Gresshoff, P.M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol.* 52(1): 61-76.
- Geurts, R., Fedorova, E. and Bisseling, T.. 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 346-352.
- Graham, P.H., Sadowsky, M.J., Keyser, H.H., Barnett, Y.M., Bradley, R.S., Cooper, J.E., Deley, D.J., Jarvis, B.D.W., Roslycky, E.B., Strijdom, B.W. and Young, J.P.W. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-nodulating and stem-nodulating bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 41: 582-587.
- Gresshoff, P.M. and Delvels, A.C. 1986. Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Plant Gene Research* 3: 159-206.
- Gu, C.T., Wang, E.T., Sui, X.H., Chen, W.F. and Chen, W.X. 2007. Diversity and geographical distribution of rhizobia associated with *Lespedeza* spp. in temperate and subtropical regions of China. *Arch Microbiol.* 118(4): 355-365.



- Han, T.X., Wang, E.T., Han, L.L., Chen, W.F., Sui, X.H. and Chen, W.X. 2008. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with wild legumes native to Xinjiang, China. *Int J Syst Appl Microbiol.* 31: 287-301.
- Islam, M.S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. and Seki, T. 2008. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(6): 1416-1429.
- Joa, J.H., Moon, D.G., Koh, S.W. and Hyun, H.N. 2012. Effect of Temperature Condition on Nitrogen Mineralization and Soil Microbial Community Shift in Volcanic Ash Soil. *Korean J Soil Sei Fert.* 45(4): 467-474.
- Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root-nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol.* 32: 136-139.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press. p.132.
- Kang, J.W. 2003. Diversity and Phylogeny of Rhizobia Isolated from Leguminous Trees Growing on Suwon, Korea. Seoul National University Graduate school.
- Kim, C.S. 2007. Studies on the Distribution and Vegetation of the Endangered Wild Plants in Jeju Island. Jeju National University Graduate school.

- Kim, S.C. and An, C.S. 1989. Isolation of Symbiotic *Rhizobium* spp. Strain from Root Nodule of *Canavalia lineata*. *Korean journal of microbiology*. 27(4): 398-403.
- Kim, T.H. 2011. Volcanic Landforms in Korea. *Journal of the Korean geomorphological association*. 18(4): 79-96.
- Koh SK. 2009. Sequencing and analysis of 16S rRNA gene from *Lotus* rhizobia. *Institute of Basic Science Taejon University*. 20(1): 107-115.
- Koh, S.K. 2006. Characterization of the endosymbiotic rhizobia isolated from *Vicia tetrasperma* root nodules. *Institute of Basic Science Taejon University*. 17(1): 83-93.
- Lee, K.L. and Koh, S.K. 1997. Isolation and characterization of Bradyrhizobium sp. from Cassia nomame root nodules. *Institute of Basic Science Taejon University*. 8(2): 115-124.
- Lee, S.S. and Lee, K.H. 1992. Taxonomic Groupings of Rhizobial Species Isolated from Legumious Plants in Korea. *Plant Pathology J*. 8(3): 195-203.
- Lee, T.B. 1979. Illustrated Flora of Korea. Hyangmoon. Publishing Co., Seoul, Korea. pp463-495.
- Lei, X., Wang, E.T., Chen, W.F., Sui, X.H. and Chen, W.X. 2008. Diverse

- bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Arch Microbiol.* 190(6): 657-671.
- Lin, D.X., Man, C.X., Wang, E.T. and Chen, W.X. 2007. Diverse rhizobia that nodulate two species of *Kummerowia* in China. *Arch Microbiol.* 188(5): 495-507.
- Liu, X.Y., Wang, E.T., Li, Y. and Chen, W.X. 2007. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown the subtropical regions of China. *Archives of microbiology.* 188(1): 1-14.
- Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F.G., Bangel, E.V., Hess, P.N. and Martinez-Romero, E. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Int J Syst Appl Microbiol.* 29(4): 315-332.
- Min, D.K. and Koh, S.K. 1998. Isolation and Characterization of Microsymbionts from *Kummerowia triata* Root Nodules. *Institute of Basic Science Taejon University.* 9(2): 45-54.
- Moon, K.H., Lim, H.C. and Hyun, H.N. 2007. Distribution of Soil Series in Jeju Island by Proximity and Altitude. *Korean J Soil Sci Fert.* 40(3): 221-228.
- Müller, M. and Schmidt, W. 2004. Environmentally Induced Plasticity of Root Hair Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 409-419.
- Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A. and Howieson, J.G.

2009. *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(9): 2140-2147.
- Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Willems, A. and Velázquez, E. 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(8): 1929-1934.
- Rivas, R., Naranjo, M., Mateos, P.F., Oliveira, S., Martinez-Molina, E. and Velazquez, E. 2007. Strains of *Mesorhizobium ampouphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Lett Appl Microbiol.* 44: 412-418.
- Rivas, R., Garcia-Fraile, P. and Velazquez, E. 2009. Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. *Microbiology Insights* 2: 51-69.
- Rolfe, B.G., Mathesius, U., Djordjevic, M., Weinman, J., Hocart, C., Weiller, G. and Bauer, W.D. 2003. Proteomic analysis of legume-microbe Interactions. *Comp Funct Genome.* 4(2): 255-228.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4, 406-425.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony

- Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739.
- Udvardi, M.K. and Day, D.A. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48: 493–523.
- Vasse, J., Billy, F., Camut, S. and Truchet, G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol*. 172(8): 4295–4306.
- Wang, F., Wang, E.T., Wu, L.J., Sui, X.H., Li, Y. Jr. and Chen, W.X. 2011. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *Int J Syst Evol Microbiol*. 61(11): 2582–2588.
- Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J. and Fan, H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Sys Bacteriol*. 45: 706–711.
- Zhang, Y.M., Li, Y. Jr., Chen, W.F., Wang, E.T., Sui, X.H., Li, Q.Q., Zhang, Y.Z., Zhou, Y.G. and Chen, W.X. 2012. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62(8): 1951–1957
- Yao, L.J., Shen, Y.Y., Zhan, J.P., Xu, W., Cui, G.L. and Wei, G.H. 2012. *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62(2): 335–341.
- Yun, H.D., Cho, M.J. and Lee, K.H. 1987. Isolation and Characterization of

Rhizobia From Soybean Cultivated in Korea *J Korean Agricultural Chemical Society*. 30(2): 153-161

Yoon, B.J., Lee, D.H., Kang, B.J. and Oh, D.C. 2007. Isolation and Characterization of Root-Nodule Bacteria from Root Nodules of Wild Soybean and Cultivated Cowpea on Jeju. *J of Basic Sciences Cheju Nat'l univ*. 20(2): 139-146

Young, J.M. 2003. The genus name *Ensifer Casida* 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol*. 53(6): 2107-2110.

한라산연구소. 2007. 한라산 데이터 북(한라산의 식물목록). 한라산연구소. pp90-92.

## 감사의 글

지난 4년간의 대학원 생활은 저에게 많은 것을 경험하며 배울 수 있는 시기였습니다. 대학원에 입학하면서 긴장도 되고 걱정도 많았지만 많은 분들이 옆에서 도와주시고 격려와 조언을 해주셔서 이렇게 논문을 쓰게 되었습니다. 일일이 찾아가 감사의 마음을 전해야하지만 지면으로나마 인사를 드리고자 합니다.

먼저, 논문이 완성되기까지 부족한 저를 아낌없는 지도와 사랑으로 보살펴주신 오덕철 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 미흡한 논문을 심사해주신 김문홍 교수님과 고석찬 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 여러 해 동안 저에게 생물학에 많은 가르침을 주신 김원택 교수님, 이화자 교수님, 김세재 교수님, 이선령 교수님, 김명숙 교수님께도 진심어린 감사의 마음을 전합니다.

실험실에서 많은 조언을 아끼지 않으셨던 이동현 선생님과 윤병준 선생님, 늘 걱정해주시고 챙겨주신 지영이언니, 같이 고생 많이 한 대학원 입한 동기이자 졸업 동기가 된 후돈 오빠, 실험을 도와준 학부생 지현이, 가영이에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 채집한 식물을 동정해주신 송관필 박사님과 은영이 언니에게도 감사의 마음을 전합니다. 저를 아껴주고 항상 걱정해주는 제 친구들과 저를 아는 지인들께도 감사드립니다.

제 인생에 가장 큰 의미이자 희망, 원동력, 무한한 믿음을 주신 부모님과 바빠서 자주 찾아뵙지도 못하고 살갑게 대하지 못하는 며느리지만 이해해주시고 응원해주신 시부모님께도 말로 표현할 수 없는 감사의 마음을 전합니다. 동생 공부 열심히 하라고 힘을 준 우리 오빠에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 공부에 전념할 수 있게 도와주고 힘을 북돋아 준 사랑하는 남편과 엄마 졸업을 위해 고생한 딸 소현이에게도 고마움을 전합니다.

모든 분들에게 좋은 일만 가득하시길 바라며 항상 행복하셨으면 좋겠습니다. 앞으로 모든 일에 열심히 하고 최선을 다하는 모습을 보여드리겠습니다. 다시 한번 진심으로 감사드립니다.