

제주산 들콩과 동부의 뿌리혹으로부터 뿌리혹세균의 분리 및 특성규명

윤병준¹, 이동현¹, 강봉조², 오덕철^{1*}

¹제주대학교 생명과학과, ²제주도 수산자원연구소

I. 서 론

질소는 식물의 성장에서 필수적인 다량원소로서 농업에서는 비료의 형태로 많이 공급되고 있다. 그러나 질소비료의 효과는 좋은 반면 산성화와 같은 토양오염을 일으킬 뿐만 아니라 질소비료의 생산과정에서 발생하는 이산화탄소에 의한 환경오염으로 인하여 질소비료 사용에 대한 자제가 요구되고 있다 (Stoltzfus *et al.*, 1997). 콩과(Leguminosae) 식물은 질소고정미생물과의 상호작용에 의해 식물뿌리에 새로운 기관인 뿌리혹을 형성하여 그 안에서 공생하는 질소 고정 미생물에 의해 대기 중에 있는 질소를 암모니아 형태로 환원하여 식물이 이용할 수 있는 형태로 전환한다. 질소 고정 세균인 *Rhizobium*이 1888년 Beijerinck에 의해 최초로 분리된 이후 콩과식물의 생물학적 질소 고정에 관한 연구가 시작되었다(Burns and Hardt, 1975). 콩과식물과 공생하는 뿌리혹 세균은 기주식물에 대한 친화성에 따라 *Rhizobium*속으로 분류되어왔으나 YMA(yeast mannitol agar) 배지에서 증식이 느리고 알칼리를 생성하는

것을 *Bradyrhizobium*속으로 분류하였다 (Dowdle and Bohlool, 1985; Elkan 1984). *Bradyrhizobium*속은 넓은 범위의 콩과식물의 뿌리에 공생하여 근류를 형성한다고 하였으며 *B. japonicum*은 IAA(indole-3-acetic acid)의 생산 유무에 따라 IAA를 생산하는 그룹과 생산하지 않는 그룹으로 분류되었다 (Minamisawa and Fukai 1991). 농경생태계에 있어서 질소고정미생물의 역할은 토양미생물 상호간의 경합, 길항 혹은 공생작용 등에 따라 식물생장에 기여도가 현저하게 다르며 미생물상과, 토양의 종류, 재배작물, 경작 방법 등에 의해 크게 지배를 받고 있다. 뿌리혹세균은 콩과식물과 특이한 공생관계를 형성하여 대기 중의 질소가스를 고정하여 콩과식물에 공급함과 동시에 토양 비옥도를 높임으로써 농업에 막대한 이득을 줌과 동시에 생태학적으로 큰 의미를 갖는다(O'Hara *et al.*, 2003). 전 세계적으로 많은 종류의 뿌리혹세균이 다양한 콩과식물과 공생하는 것이 밝혀지고 있다(Mutch and Young 2004). 뿌리혹 세균과 기주인 콩과식물과의 공생 특이성은 세균의 종류나 기주의 폭이 매우 좁은

* 교신저자 / Tel : 82-64-754-3524, Fax : 82-64-756-3541, E-mail: duckoh@cheju.ac.kr

종류가 있는 반면 넓은 폭을 가진 세균도 있다. 제주도는 화산회토로 구성되어 있어 토양비옥도가 매우 낮은 편인데 질소고정세균의 토양 분포는 토양의 비옥도와 관련하여 큰 의미를 가지고 있다. 아직 제주도에 서식하는 콩과식물에 공생하는 뿌리혹 세균은 연구된 바가 없는 것으로 보인다. 제주도에 서식하는 두종의 콩과식물에 공생하는 뿌리혹 세균을 처음으로 분리하여 동정하고 이들 세균이 재배용 대두에 뿌리혹을 형성하는지 여부를 확인하고 뿌리혹을 형성했을 때와 그렇지 않을 때의 생장을 비교하였다.

II. 재료 및 방법

사용배지 및 기주식물

콩과식물 뿌리혹 세균의 분리 및 보관용 배지는 yeast extract mannitol(YMA)배지를 사용하였으며(Vincent, 1970) 뿌리혹 세균의 분리원으로 제주도 일대에 자생하는 야생 들콩(*Glycine soja*)과 재배되는 동부(*Vigna sinensis*)를 사용하였으며 분리 동정된 세균의 뿌리혹 형성력과 식물의 성장촉진을 위해 재배용 대두(*Glycine max*)를 사용하였다.

뿌리혹 세균의 분리

채집한 콩과식물의 뿌리혹을 잘라낸 후 멸균 증류수로 세척하고 이것을 70% 에탄올에 침적한 다음, 0.1% HgCl₂ 용액에 5분간 표면을 소독하고 다시 70% 에탄올에 처리한 후 멸균 생리식염수에서 압착하여 세균을 누출시킨 후 YMA 배지에 도말하여 순수집락을 얻었다.

분리균주의 형태 및 생리생화학적 특징

분리 균주의 형태관찰은 bioMe'rieux Gram stain kit을 사용하여 염색한 후 광학 현미경(Nicon, Japan)으로 관찰하였으며 catalase 활성은 3% H₂O₂를 분리균주에 혼합 시 생기는 기포로 측정하였으며 oxidase 활성은 1 % N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine 용액을 사용하여 발색 여부를 통해 측정하였다. 생리적인 특징은 Biolog Kit을 사용하여 측정하였다

뿌리혹 세균의 동정

분리된 세균의 16S ribosomal DNA염기서열 분석을 위해 각각의 분리 균주의 genomic DNA를 분리하고 Polymerase Chain Reaction (PCR)으로 부분적으로 증폭시켰다. 16S rDNA 증폭용 Universal primer인 16S forward primer(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 16S reverse primer(5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다. PCR은 먼저 95°C에서 5분간 변성시킨 후, 95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min의 열 반응주기를 30 cycles 진행하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 연장반응 마친 후 4°C에 보관하였다. PCR 반응물을 DNA purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 순수 분리한 후, automatic sequencer를 통해 염기서열을 결정하였다. 미국 NIH 산하 NCBI 홈페이지에서 제공하는 nucleotide blast search program을 이용하여 근연종에 대한 조사를 하였다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

분리균주의 인공감염

대두 종자를 70% 에탄올에 10분간 침적 살균한 다음 증류수로 세척하고 0.01N HCl 용액에 10분간 침적한 다음 다시 멸균 증류수로 7-8회 세척 후 멸균된 인공토양(vermiculite)이 담긴 화분에 깊이 20cm로 심은 후 전 배양된 뿌리혹세균을 감염시켰고, 뿌리혹 세균을 접종하지 않은 대조군으로 사용된 화분에는 질소가 포함된 영양액을 살포하였다. 각각의 화분을 light incubator에서 오전 7시(25℃)에 빛이 들어오게 하고 오후 10시(18℃)에 빛이 차단되도록 하여 33일간 배양 후 자란 식물의 길이와 중량을 측정하여 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

뿌리혹 세균의 분리

뿌리혹 세균의 분리원을 채집하기 위하여 2006년 8월 제주도 경작지 및 초지에서 돌콩과 동부를 채집하여 뿌리혹 세균은 분리하였다(Table. 1).

분리 선발된 균주는 YMA 배지상에서 colony 생육이 5-7일로 전형적인 slow-growing type이었으며 점액성분이 많이 분비되었다.

분리균주의 형태적 및 생리생화학적 특성

분리된 두 균주 JR8과 JR9는 모든 Gram 음성이었으며, 간균형태를 나타냈고 배양속도가 느렸다. 균의 배양학적 특징을 두 균주 모두 white 혹은 clear white를 나타내었으며 colony 형태는 circular 형태를 나타냈으며 colony 직경이 0.5-2 mm로서 비교적 작았고 배양일 수가 늘어나면서 slime 혹은 mucoid 상태로 되었다. 생리생화학적 특성은 두 균주 모두 catalase, oxidase에서 양성이었으며 JR8은 L-arabinos, D-arabitol 음성이었으나 JR9는 양성이었고 JR8에서 D-psicose, L-rhamnose, truanose, D-serine, lactic acid, mannose, treholose, xylitol, D-galcturoinic acid, glucuronamide, L-leucine, L-phenylalanine, urocanic acid,에서는 양성이었으나 JR9는 음성이었다(Table 2).

분리균주의 동정

16S rDNA 염기서열 분석결과 분리된 JR8균주와 JR9균주는 전형적인 늦은 생장을 하는 *Bradyrhizobium*속에 속하는 균주들로 나타났으며 JR8은 *Bradyrhizobium lianoingense*와 유사도가 99.2%로 JR9는 *Bradyrhizobium elkanii*와 99.9%로 나타났다. Neighbor-joining method로 염기서열의

Table 1. Location of the plant sampling sites on Jeju.

Scientific name(Korean name)	Location	Altitude	Habitat	Soil pH
<i>Glycine soja</i> (돌콩)	N 33 27 2.6	284m	Cultivated land	5.57
	E126 33 54.6			
<i>Vigna sinensis</i> (동부)	N 33 29 4.7	118m	Cultivated land	6.63
	E126 33 1.1			

Table 2. Physiological and biochemical characterization of strain JR8 and JR9 using BIOLOG Analysis System

Biolog test	JR8	JR9	Biolog test	JR8	JR9
Water	-	-	β -Hydroxybutyric acid	+	+
α -cyclodextrin	-	-	ρ -Hydroxyphenylacetic acid	-	-
Dextrin	-	-	γ -Hydroxybutyric acid	±	+
Glycogen	-	-	α -Ketobutyric acid	-	-
Tween 40	+	+	α -Ketoglutaric acid	±	±
Tween 80	+	+	α -Ketovaleric acid	-	-
N-Acetyl-D-galactosamine	-	-	D,L-Lactic acid	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	Malonic acid	±	-
Adonitol	-	-	Propionic acid	+	±
L-Arabinose	-	+	Quinic acid	±	-
D-Arabitol	-	+	D-Saccharic acid	+	+
Cellobiose	-	-	Sebacic acid	±	+
i-Erythritol	-	-	Succinic acid	+	+
D-Fructose	+	±	Bromo-succinic acid	+	+
L-Fructose	±	+	Succinamic acid	+	+
D-Galactose	+	+	α -D-Glucose	±	-
meso-Inositol	-	-	α -D-Lactose	-	-
Lactulose	-	-	Maltose	-	-
Mannitol	+	+	Mannose	+	-
D-Melibiose	-	-	β -Methyl-D-glucoside	-	-
D- Psicose	±	-	D-Raffinose	-	-
L-Rhamnose	±	-	D-Sorbitol	±	±
Sucrose	-	-	D-Trehalose	±	-
Turanose	±	-	Xylitol	±	-
Methylpyruvate	+	+	Mono-methylsuccinate	+	+
Acetic acid	±	-	cis-Aconitic acid	-	-
Citric acid	+	+	Formic acid	+	±
D-Galactonic acid lactone	+	±	D-Galacturonic acid	+	-
D-Gluconic acid	+	+	D-Glucosaminic acid	+	±
D-Glucuronic acid	±	-	Glucuronamide	±	-
α -hydroxybutyric acid	-	-	Itaconic acid	-	-
Alanineamide	+	±	D-Alanine	+	±
L-Alanine	-	-	L-Alanyl-glycine	-	-
L-asparagine	+	±	L-Aspartic acid	+	±
L-Glutamic acid	±	±	Glycyl-L-aspartic acid	±	-

Table 2. Continued

Biolog test	JR8	JR9	Biolog test	JR8	JR9
Glycyl-L-glutamic acid	-	-	L-Histidine	-	-
Hydroxy L-proline	±	-	L-Leucine	+	-
L-Ornithine	-	-	L-Phenylalanine	+	-
L-Proline	±	-	L-Pyroglutamic acid	+	+
D-Serine	+	-	L-Serine	-	-
L-Threonine	-	-	D,L-Carnitine	-	-
γ-Aminobutyric acid	-	-	Urocanic acid	±	-
Inosine	-	-	Uridine	-	-
Thymidine	-	-	Phenylethylamine	-	-
Putrescine	-	-	2-Aminoethanol	-	-
2,3-Butanediol	-	-	Glycerol	+	±
D,L-α-Glycerol phosphate	-	-	Glucose-1-phosphate	-	-
Glucose-6-phosphate	-	-	Gentiobiose	±	-

유전적 거리와 phylogenetic tree(Felsenstein, 1993)로 나타낸 결과 JR8은 *B. liaoningense* 와 *B. yuanmingense*에 속하는 그룹으로 JR9

는 *B. elkanii*와 거의 일치함을 보였다(Fig 1.) 분리된 뿌리혹 세균들은 형태학적, 배양학적, 생리생화학적 특성과 phylogenetic

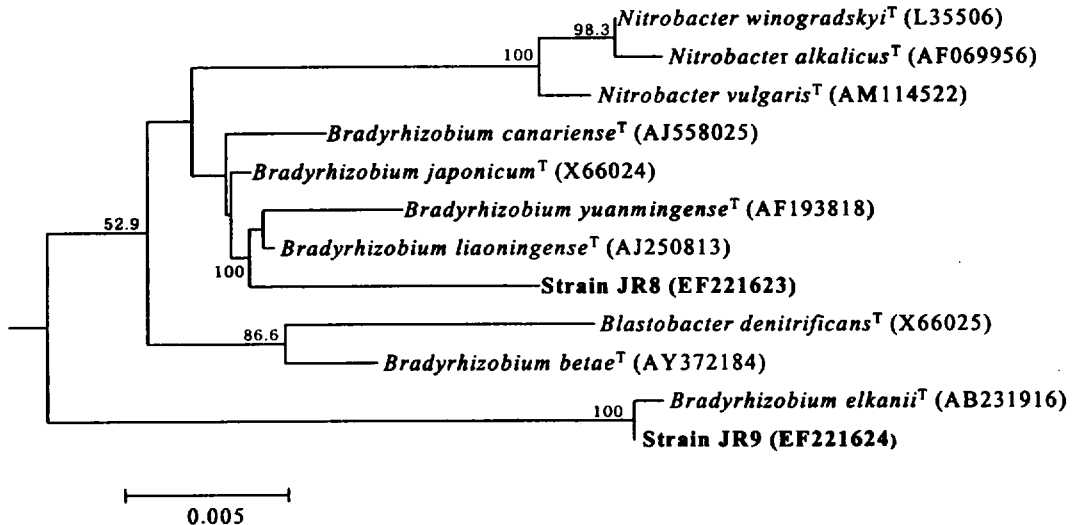


Fig. 1. Neighbour-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationships of strain JR8, strain JR9 and related taxa. Bootstrap percentages (based on 1000 replicates) greater than 50% are shown at branch points. Bar, 0.005 changes per nucleotide

tree에 따라 조사한 결과 slow-growth 뿌리혹 세균으로 JR8 균주를 *Bradyrhizobium* sp. JR8(EF221623)로 동정하였으며, JR9 균주는 *Bradyrhizobium ekanii* strain JR9 (EF221624)로 동정하였다.

분리균주의 인공 감염

돌콩과 동부에서 분리된 뿌리혹세균을 JR8과 JR9로 표시하였으며 각각의 세균의 뿌리혹 형성능력은 대두를 파종하고 33일간 배양 후 JR8에서 평균 60.3개의 뿌리혹이 형성되었으며, JR9에서는 28.5개가 형성되었으나 각각의 뿌리혹세균을 감염시키지 않은 대조구에서는 하나의 뿌리혹도 생성되지 않았다. 분리된 뿌리혹 세균이 콩과식물의 뿌리혹을 형성하며 특이적이 공생관계에 있음을 나타냈으며 뿌리혹 수와 식물의 생장에 있어 뿌리혹 수와 식물의 생장이 비례관계가 아님을 나타냈으나 돌콩에서 보다 많은 뿌리혹이 형성된 것은 돌콩이 대두와 같은 속 식물로 콩과식물과 뿌리혹세균의 종류에 따라 서로의 공생효율에 차이에 기인되는 것으로 판단된다. 뿌리혹 형성과 식물의 생장과의 관계에서는 식물의 생장에 있어서 영양분을 주지 않고 단지 뿌리혹 형성 세균만을 접종했음에도 질소원을 영양분으로 준 식물보다 식물의

길이와 건조중량이 비슷하거나 더 잘 자랐다. 이는 식물 뿌리에서 뿌리혹 세균의 질소 고정능이 매우 우수함을 나타내며 콩과식물의 생육에 있어 뿌리혹 형성은 필수적인 미생물과 식물의 상호작용으로 보여지며 이는 토양 내 잔존하는 질소성분의 양에 의존적일 가능성을 제시한다.

본 연구를 통하여 제주산 콩과식물인 돌콩과 동부에서 분리한 뿌리혹세균은 대두에 접종시켰을 경우 뿌리혹을 형성하였고 뿌리혹 형성능과 식물의 생장관계는 연관성이 없었으나 질소 영양분이 없이 질소고정을 통하여 콩과식물의 생육함을 나타냈다. 비록 채집한 식물의 개체수와 분리된 균주가 적어 콩과식물과 각 콩과식물에 특이적인 뿌리혹 세균과의 관계를 명확하게 규명하지는 못하였으나 콩과식물의 숙주 특이적 뿌리혹 세균의 연구 과정에서 기초자료로서의 가치는 있다고 사료된다.

IV. 결 론

제주에서 야생하는 콩과식물인 돌콩과 재배하는 동부에서 공생하는 뿌리혹세균 2균주를 분리하였다. 분리균주는 *Bradyrhizobium*

Table 3. Comparison of inoculated *Glycine max* with control 33 days after inoculation with root nodule bacteria

Bacterial strain	Treatment	Plant length	Plant dry-wight	Average number of nodules
JR8	Inoculation	27.30	0.23	60.3
	Control	23.30	0.22	0
JR9	Inoculation	27.73	0.25	28.5
	Control	N.D	N.D	0

N.D indicates 'Not Determined'.

속 세균과 동일하게 그람 음성이었으며 생육 속도가 느렸다. 분리된 세균은 재배용 대두에 인공감염 시켰을 때 뿌리혹을 형성하였다. 분리균주들의 형태학적, 생화학 특징, 16S rDNA 염기서열을 조사한 결과 JR8은 *Bradyrhizobium* sp. JR8로 동정하였으며, JR9는 *Bradyrhizobium elkanii* strain JR9로 동정하였다.

【참 고 문 헌】

- Böckman, O. C. 1997 Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plants : perspectives for future agriculture. *Plant Soil* 194: 11-14*
- Dowdle, S. F. and Bohlool, B. B. 1985 Predominance of fast-growing *Bradyrhizobium japonicum* in a soybean field in the people's Republic of China. *App. Env. Microbiol.* 50: 1171-1176
- Downie, J. A., G. Hombrecher, Q. S. Ma, C. D. Knight, B. Wells and W. B. Johnston, 1983 Cloned nodulation genes of *R. leguminosarum* determine host range specificity. *Mo. Gen. Genet.* 190: 359-365
- Elkan, G. H. 1984 Taxonomy and metabolism of *Rhizobium* and its genetic relationships. In: Biological Nitrogen Fixation, Ecology, Technology and Physiology, pp. 1-38, ed. by M. Alexander. *Plenum Press, New York.*
- Felsenstein, J. 1993 PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington. Seattle, USA.
- Keyser, H. H., Bohlool, B. B., Hu, T. S. and Weber, D. F. 1982 Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science* 215: 1631-1632
- Minamisawa, K. and Fukai, K. 1991 Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: A correlation with genotype grouping and rhizobiotoxin production. *Plant Cell Physiol.* 32: 1-9
- Mutch L. A., and Young, P. W. 2004 Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae on wild and cultivated legumes *Mol. Ecol.* 13: 2435-2444
- O'Hara G. W., Howieson J. G., and Graham P. H. 2003 Nitrogen fixation and agricultural practice. In: Nitrogen Fixation in the Millennium(ed. Leigh GJ), pp. 391-410. Elsevier Press, London
- Park, K. S., and Choi, J. E. 1996 Physiological and Biochemical Properties of Isolates of Rhizobia from Soybean *Korean J. Plant Pathol* 12: 351-357
- Stoltzfus, J. R., R. So, P. P. Malarvithi, J. K. Ladha, and F. J. de Bruijn. 1997 Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* 194: 25-36
- Vincent, J. M. 1970 In 'A manual for practical study of the rootnodule bacteria. International Biological Programme, Blackwell Scientific Publ., Oxford, England

Isolation and Characterization of Root-Nodule Bacteria from Root Nodules of Wild Soybean and Cultivated Cowpea on Jeju

Byoung-Jun¹, Dong-Heon Lee¹, Bong-Jo Kang², and Duck-Chul Oh^{1*}

¹*Department of Life Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea,*

²*Jeju Province Fisheries Resources Research Institute, Jeju 699-810, Korea*

Abstract

Root-nodule bacteria were isolated from root nodules of wild soybean and cultivated cowpea which had been grown on Jeju. Two strains of the gram negative, slow-growing root-nodule bacteria were selected on YMA medium. Infectivity and effectivity of the isolates were confirmed by inoculation of soybean seedlings with the isolates. Two strains were identified based on morphological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis, and designated *Bradyrhizobium* sp. JR8, and *Bradyrhizobium ekanii* strain JR9.

* To whom correspondence should be addressed.

Tel : 82-64-754-3524, Fax : 82-64-756-3541, E-mail : duckoh@cheju.ac.kr