

大豆接種劑 開發을 위한 優秀根瘤菌의 選拔 및 plasmid 特性

金昌鎭 · 金聖勳 · 李 潤 · 俞益東 · 閔泰益

韓國科學技術院, 微生物工學研究室
(1985년 8월 8일 수리)

Selection of *R. japonicum* Strains for Developing Soybean Inoculant and Plasmid Characterization

Chang-Jin Kim, Sung-Hoon Kim, Yoon Rhee, Ick-Dong Yoo
and Tae-Ick Mheen

KAIST, Microbial Technology Laboratory, Seoul, Korea

Abstract

590 strains of *Rhizobia* were isolated from root nodules of the legumes collected at 223 sites in Korea. According to their host specificities they were classified into *R. japonicum*(218 strains), *R. phaseoli*(101 strains), *R. trifolii*(97 strains), *R. meliloti* (4 strains), *R. leguminosarium*(1 strain), *Rhizobium* species(101 strains), and unidentified species(159 strains).

3 potent strains R-138, R-168, and R-214 of *R. japonicum* have been selected based on the infectivity to soybean cultivar and efficiency of nitrogen fixation.

It was observed that the fast-growing strains of *R. japonicum* contained 1 to 4 plasmids of M.W. of 35-300 Md. However, plasmids were hardly detected for the slow-growing strains.

緒 論

根瘤菌은 豆科作物의 뿌리에 棲息하며 根瘤를 形成하고 그 속에서 增殖하여 bacteroid라고 불리우는 形態로 變換된 後, 光合成產物을 일으켜 부터 供給받아 分子狀 空中窒素를 固定, 植物에 供給한다. 한편 植物은 供給된 암모니아態 窒素를 利用하여 蛋白質, 核酸 등 많은 含窒素成分을 合成하여 豆科作物-根瘤菌간의 共生系가 維持된다.

이와같은 豆科作物-根瘤菌간의 共生窒素固定系는 이미 오래 전부터 그 共生機作에 關하여 많은 研究가 實施되어져 根瘤形成에 關與하는 諸因子들의 解析¹⁾, 根瘤形成過程²⁾, 또는 固定된 窒素化合物의 移動과 豆科作物의 生育 및 收量에 미치는 影響³⁾등 많은 研究가 報告된 바 있다.

한편 豆科作物의 生産性增大를 위하여는 多收穫品種의 育成 및 栽培技術改善 등의 農耕學的인 側面에서 뿐만 아니라 根瘤菌의 接種에 의한 收量增收도 크게 기대어진다. 그에 따라 根瘤菌

의 接種效果에 관한 많은 研究^{4,5)}가 수행되어 이 미 외국에서는 Nitragin, Unico, Hi-Rhize 등 大豆 接種劑가 개발되어 實用化되고 있다.

最近에는 分子生物學 및 遺傳子操作技術의 발달과 더불어 遺傳工學的인 方法을 利用하여 窒素 固定에 關與하는 各種遺傳子(nif, nod, hup gene)의 役割과 그 위치들이 解明되게 되었고 有用根瘤菌의 改良 및 育種에 관한 研究도 활발히 進行되고 있는 實情이다⁶⁾.

國內에서도 일찌기 林⁷⁾에 의해 우리나라에 棲息되고 있는 根瘤菌에 對한 生理, 生化學的 研究를 시작한 것을 선두로, 金 등⁸⁾의 大豆 根瘤菌의 分離, 柳 등에 의한 窒素 施用量에 따른 根瘤菌의 活動⁹⁾, 接種效果¹⁰⁾, 金¹¹⁾ 및 趙 등¹²⁾에 의한 根瘤菌의 生化學的 特性과 農耕學的인 側面에서의 研究가 實施되어져 왔다.

以上과 같은 觀點에서 筆者들은 大豆 接種劑 개발을 목표로 全國各地에서 各種 根瘤菌을 收集, 分離한 後, 우수균주를 選拔하고, 選拔菌株의 窒素 固定活性 및 plasmid의 特性, 장려 大豆 品種과의 宿主親和性, 接種效果 등을 調查하였다. 本報에서는 各種 根瘤菌株의 選拔과 大豆 根瘤菌의 plasmid 特性을 調查한 結果를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1. 供試 豆科作物의 採取場所

밭土壤에 棲息하고 있는 豆科 根瘤菌中 大豆 接種劑로 이용하기 위한 우수균주를 選拔하고자 全國 88個郡, 223個地域에서 各種 豆科作物의 根瘤를 採取하여 供試하였다. 試料 採取場所는 Fig. 1 과 같다.

2. 根瘤菌의 分離方法

1982년부터 1984년까지 3年間に 걸쳐 每年 6月 中旬頃 根瘤形成이 잘 된 대두, 녹두, 팥, 크로버 등의 豆科作物 뿌리를 蒐集하여 멸균된 비닐봉투에 넣은 후 實驗室에 運搬, 低溫室(4°C)에 보존하며 다음과 같은 方法으로 分離하였다.

즉, 뿌리로부터 根瘤를 떼어낸 다음, 5% hypochlorite 용액으로 根瘤表面을 잘 세척하고 70% ethanol, 0.1% HgCl₂로 약 3분간씩 차례로 표면을 살균 한 후 멸균수를 이용하여 4~5회 再次 水洗한 다음, 根瘤를 無菌의으로 切斷, Yeast extract manitol agar배지(YM 배지)에 移植하였다. 移植

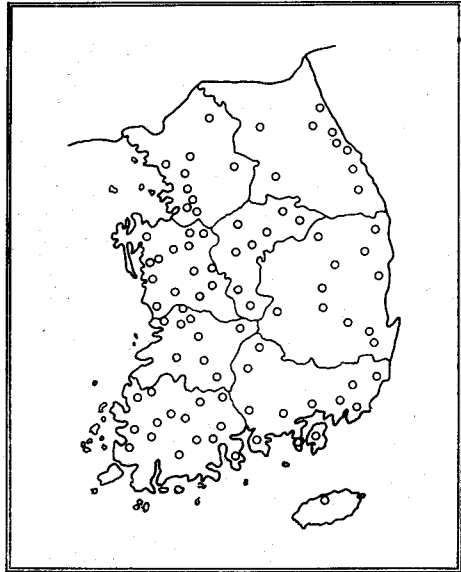


Fig. 1. Sampling sites of *Rhizobia* isolated from legumes in Korea.

後 28°C에서 fast-growing group 菌株는 2~3일, slow-growing group 菌株는 4~5일 培養하여 얻어진 colony는 다시 2~3회 single colony isolation하여 순수한 根瘤菌을 分離하였다.

3. 分離菌株의 培養 및 窒素 固定力 調查

窒素 固定活性 調查는 分離된 根瘤菌 中 一次로 *R. japonicum* 菌株만을 대상으로 調查하였고, 宿主作物로는 현재 장려품종으로 보급, 재배되고 있는 長葉콩을 사용하였다.

1) 菌株의 培養: 分離選拔된 *R. japonicum* 菌株들을 各各 YM 배지에 接種하고 28°C에서 약 3일간 진탕배양(120 strokes/min)하였다. 이때의 生育細胞濃度는 1~5×10⁹ cells/ml이었다.

2) 宿主大豆(長葉콩)의 種子殺菌 및 生育, 接種方法: 精選된 長葉콩은 먼저 水洗하고, 70% ethanol과 0.1% HgCl₂ 溶液으로 약 3분간씩 表面殺菌한 後 멸균수를 利用하여 再次 水洗한 다음, 25°C 暗條件에서 3일간 發芽시켰다. 發芽程度가 均一한 長葉콩을 미리 殺菌 준비된 vermiculite가 充填된 시험관(28×180mm)에 1株씩 移植한 後, 無窒素培養液¹³⁾을 가하고 各 菌株를 시험관當 1ml씩 뿌리 주위에 接種하였다. 대조구로는 長葉콩만을 移植하고 菌株는 接種치 않은 無接種區를 두었다. 대두의 生育은 온도 25±1°C, 습도 70±5%, 明 15시간, 暗 9시간으로 調節된 plant growth chamber

(Shimazu model SGA-213S)內에서 재배하였으며 photon flux density는 $450\mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ 이었다. 各處理는 6 반복으로 실시한 後 平均 값으로 나타냈다.

3) 根瘤形成能 및 窒素固定能 調査

根瘤菌接種 後 4週日째에 植物體를 수거하여 根瘤形成程度 및 窒素固定活性을 調査하였다. 窒素固定活性은 Williams의 방법¹⁴⁾에 준하였다.

4. Plasmid의 確認과 分子量의 決定

R. japonicum 菌株들의 plasmid 確認은 주로 Kado 法¹⁵⁾에 의해 실시하였다. 즉, 5ml의 YM배지에 各 菌株를 接種하여 late exponential phase 까지 배양한 다음 배양액 200 μl 를 1.5ml容 microcentrifuge tube에 取한 후, 200 μl 의 E buffer(40 mM Tris·base, 5 mM Na·acetate, 1 mM Na₂·EDTA, pH 7.9)로 씻어낸 후 다시 100 μl E buffer를 加하여 완전히 현탁시켰다. 여기에 200 μl lysis buffer(Tris·base 1.21g, SDS 6g, 2N fresh NaOH 3.2ml, Total volume 200ml)를 加하여 잘 混合하였다. 이 용액을 60°C water bath 상에서 20~30분간 加溫後, 10 μl 2M Tris(pH 7.0)를 재차 加하고 증류수로 미리 포화시켜 놓은 phenol/chloroform(1 : 1 v/v) 용액 400 μl 를 加하였다. 그 후 microcentrifuge를 이용하여 15,000rpm, 3분간 원심분리 한 후, 그 上澄液을 취하여 電氣泳動(0.7% agarose gel, vertical type)을 실시하였다. 各 菌株의 分子量測定은 Meyer¹⁶⁾와 Casse법¹⁷⁾에 의해 기존의 plasmid 크기를 알고 있는 *A. tumefaciens* C58, *R. phaseoli* 8401, *R. phaseoli* 4292 菌株의 plasmid를 對照로 하여 산출하였다.

結果 및 考察

1. 各種 根瘤菌株의 收集 및 分離

全國 밭土壤에 棲息되고 있는 根瘤菌中 窒素固定能 및 根瘤形成能이 우수한 窒素固定菌을 收集, 分離하기 위하여 總 590株의 根瘤菌을 分離, 選拔하였다.

그 結果, 分離된 菌株는 Table 1에 나타낸 바와 같이 大豆에서 *R. japonicum* 218種, 녹두, 강낭콩에서 *R. phaseoli* 101種, 크로버 등에서 *R. trifolii* 97種, 알팔파에서 *R. meliloti* 4種, 완두에서 *R. leguminosarum* 1種, 땅콩등에서 *Rhizobium* sp. 101種이었으며 그 外 未分類 同定된 菌

Table 1. Tentative Classification of *Rhizobia* isolated from legumes in Korea

Classification	Host	No. of strains
<i>R. japonicum</i>	<i>Glycin max</i>	218
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus angularis</i>	101
	<i>Phaseolus vidissimus</i>	
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	97
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i>	4
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum sativum</i>	1
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Arschis hypogaea</i>	10
Not classified	<i>Vigna senensis</i> etc.	159
Total		590

株가 159株로 總 590菌株를 分離 選拔하였다.

특히 選拔된 *R. japonicum* 218種 中에는 既 報告¹¹⁾된 바와 같이 generation time이 2時間 內外이며 培養後 酸을 生成하는 fast-growing group의 特性을 나타내는 菌株(*R. japonicum* R-4, R-247, R-271, R-278, R-289 strains)들이 發見되었으며 이 菌株들은 最近 발표되고 있는 fast-growing *R. japonicum*¹⁸⁻²⁰⁾들과 類似한 性質을 나타내고 있는 것이 確認되었다.

2. 大豆 根瘤菌株의 根瘤形成能 및 窒素固定能 調査

收集 分離된 各種 根瘤菌 中 一次로 218種의 *R. japonicum* 을 대상으로 根瘤形成能 및 窒素固定能을 調査하여 比較的 우수하다고 判斷된 菌株들의 結果를 Table 2에 나타냈다.

各 菌株의 根瘤形成程度를 보면 몇 菌株를 除外한 大部分의 菌株들은 미국에서 選拔되어 우수하다고 인정된 *R. japonicum* L-259 株보다 根瘤形成能이 높았다. 이들 菌株 中 特別히 根瘤形成能이 우수하다고 판단된 菌株는 *R. japonicum* R-138, R-168, R-214 菌株로 *R. japonicum* L-259株보다 約 2倍 以上の 높은 根瘤形成能을 보였다.

또 窒素固定能도 *R. japonicum* L-259 接種區의 1.67 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{root}/\text{hr}$ 에 比較하여 R-138, R-214 집단에서 各 各 3.08, 3.15 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{root}/\text{hr}$ 로 아주 높은 活性을 나타냈다.

以上的 調査結果들로부터, 蒐集 分離한 大豆 根

Table 2. Effectiveness of *Rhizobium japonicum* strains

Strains	Nodule No. (/plant)	Nodule fresh weight (mg/plant)	Nodule size* (mm)	Nodule color	ARA ($\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{root/hr}$)	Group***
<i>R. japonicum</i> L-259**	26	145	M	dark pink	1.67	S
<i>R. japonicum</i> R-4	43	243	L	dark pink	2.49	F
<i>R. japonicum</i> R-13	6	15	L	pale pink	0.17	S
<i>R. japonicum</i> R-67	54	287	L	dark pink	3.08	S
<i>R. japonicum</i> R-97	49	205	L	dark pink	2.28	S
<i>R. japonicum</i> R-138	80	304	L	dark pink	3.08	S
<i>R. japonicum</i> R-158	7	61	L	pale pink	0.34	S
<i>R. japonicum</i> R-168	61	249	M. L	dark pink	2.42	S
<i>R. japonicum</i> R-214	62	282	M. L	dark pink	3.15	S
<i>R. japonicum</i> R-221	31	195	L	pink	1.57	S
<i>R. japonicum</i> R-224	12	57	L	pink	0.87	S
<i>R. japonicum</i> R-228	56	208	M. L	pink	2.14	S
<i>R. japonicum</i> R-240	54	240	L	dark pink	2.76	S
<i>R. japonicum</i> R-247	49	195	L	dark pink	2.48	F
<i>R. japonicum</i> R-254	3	24	L	pale pink	0.22	S
<i>R. japonicum</i> R-256	10	20	L	pink	0.24	S
<i>R. japonicum</i> R-264	12	79	L	pink	0.66	S
<i>R. japonicum</i> R-271	36	157	M. L	dark pink	0.38	F
<i>R. japonicum</i> R-278	25	129	M. L	dark pink	1.29	F
<i>R. japonicum</i> R-289	53	281	M. L	dark pink	3.08	F

*Nodule size S : small (2mm > ϕ), M : medium (2~4mm ϕ), L : large (4mm < ϕ)

**Obtained from NRRC, Peoria, Illinois, U.S.A.

***F : fast-growing group

S : slow-growing group

瘤菌 中 *R. japonicum* R-138, R-168, R-214 株들이 根瘤形成能 및 窒素固定能 이 우수한 菌株들 로 判斷되었다.

3. 優秀選拔 大豆 根瘤菌株의 plasmid 特性和 分子量決定

選拔된 우수 根瘤菌株들의 plasmid 含有여부 및 含有 plasmid의 分子量을 調査하여 Fig. 2, 3 및 Table 3 에 나타냈다.

R. japonicum 菌株들의 plasmid 數 및 分子量은 各 菌株에 따라 아주 相異하여 一般的으로 plasmid를 含有하고 있는 菌株들은 1~4個의 plasmid를 含有하고 있었고, 그 크기는 35~300Md 이상의 巨大 plasmid로 確認되었다. 그러나 fast-growing *R. japonicum*과 slow-growing *R. japonicum*과는 큰 차이점을 보여 fast-growing group

菌株들은 供試菌株 모두 1개 以上의 plasmid를 含有하고 있음에 비하여 (Fig. 2), slow-growing group 菌株들은 R-221 및 R-224 菌株를 除外하고는 plasmid를 含有치 않고 있는 것이 특징적이었다 (Fig. 3).

특히 fast-growing group 菌株 중 *R. japonicum* R-247 菌株는 90, 330, 425, 600Md 以上의 plasmid를 4개나 含有하고 있었고, R-271 菌株는 135, 425, 550Md 정도의 3個의 plasmid를 가지고 있었다. 그 반면 slow-growing group strains 中 plasmid의 存在가 確認된 *R. japonicum* R-221, R-224 菌株는 各各 80 및 60Md의 比較的 작은 plasmid를 가지고 있는 것이 確認되었다.

最近 *Rhizobium*의 *nod* gene 및 *nif* gene 등 窒素固定에 관련된 遺傳子들은 *Rhizobium*이 가지고 있는 巨大 plasmid에 存在한다는 사실이 報告되고

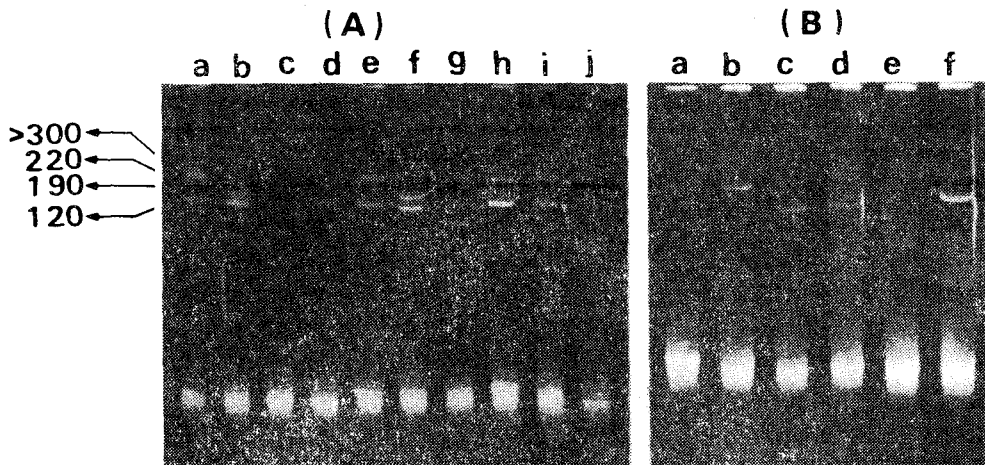


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of crude lysates from selected fast-growing *R. japonicum*.
 (A) a) *R. phaseoli* 4292 b) *Agrobacterium* sp. T-4 c) *R. japonicum* USDA 191
 d) *R. japonicum* R-271 e) *R. phaseoli* 8401 f) *Agrobacterium* sp. T-7
 g) *R. japonicum* R-247 h) *A. tumefaciens* C58 i) *R. phaseoli* 8401
 j) *R. japonicum* R-234
 (B) a) *A. tumefaciens* C58 b) *R. japonicum* R-271 c) *R. japonicum* R-217
 d) *R. japonicum* R-247 e) *R. japonicum* R-41 f) *R. japonicum* R-99

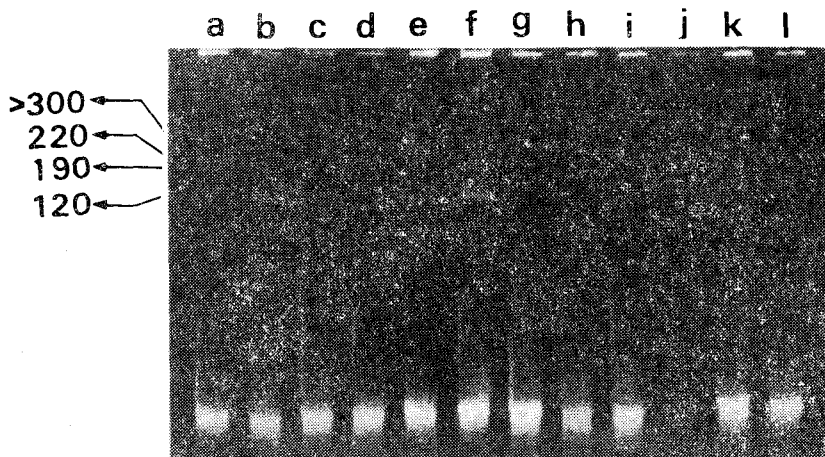


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of crude lysates from selected slow-growing *R. japonicum*.
 a) *R. phaseoli* 4292 b) *R. japonicum* R-67 c) *R. japonicum* R-168
 d) *R. japonicum* R-138 e) *R. japonicum* R-168 f) *A. tumefaciens* C58
 g) *R. japonicum* R-214 h) *R. japonicum* R-221 i) *R. japonicum* R-256
 j) *R. japonicum* R-228 k) *R. japonicum* R-224 l) *R. japonicum* USDA191
 Single plasmid band was shown in lane h) and k) but other slow-growing *Rhizobium* strains did not show any plasmid band.

있으며^{21,22)}, 특히 Nuti 등²²⁾은 slow-growing *Rhizobium*보다 fast-growing *Rhizobium*들이 이와 같은 遺傳子들을 plasmid에 含有하고 있다고 보고하였다. 本 研究에서도 fast-growing group 菌株들은 대부분 plasmid를 1~4개씩 가지고 있음

에 비하여 slow-growing group 菌株들은 R-221, R-224 菌株를 除外하고는 plasmid를 함유치 않은 것으로 나타나 Nuti 등의 결과와 一致하고 있다고 판단되었다. 그러나 *Rhizobium*이 가지고 있는 plasmid는 대부분 巨大 plasmid로 이를 檢出하기

Table 3. Molecular weight of plasmids from *R. japonicum* strains

Strain	Plasmid		Strain	Plasmid	
	Designation	Mol. mass(M dal)		Designation	Mol. mass(M dal)
<i>R. japonicum</i>			<i>R. japonicum</i>		
R-41	pRja41	55±5	R-247	pRja247 a	90±5
R-99	pRja99 a	35±5		pRja247 b	330±10
	pRja99 b	105±5		pRja247 c	425±10
R-217	pRja217 a	75±5		pRja247 d	600
	pRja217 b	205±5	R-271	pRja271 a	135±5
R-221	pRja221	80±5		pRja271 b	425±10
R-224	pRja224	60±5		pRja271 c	500
R-234	pRja234	45±5			

위하여는 技術的으로 세심한 주의를 필요로 하고 특히 各 菌株에 따라서 條件設定이 매우 重要한 要因이 되고 있다²³⁾. 또한 mucoid를 많이 내고 있는 菌株들은 cell lysis가 잘 안되어 plasmid의 檢出이 어려운 단점도 있다. 따라서 本 調査結果 slow-growing group 菌株들이 plasmid를 가지고 있지 않은 것으로 나타난 結果에 대해서는 금후 더욱 검토해 볼 필요가 있을 것으로 사료되었다.

이상과 같은 사실은 plasmid가 extrachromosomal replication unit라는 점과 이들 plasmid는 chromosome보다 훨씬 작은 分子量으로 구성되어 있다는 點등으로 genetic study를 용이하게 해 주고 있고 실제 이와 같은 이유로 fast-growing *Rhizobium*에 관한 研究가 集中되고 있다.

摘 要

全國 223個 地域에서 蒐集한 豆科作物의 根瘤에서 總 590株의 根瘤菌을 分離하여 宿主特異性에 따라, *R. japonicum* 218種, *R. phaseoli* 101種, *R. trifolii* 97種, *R. meliloti* 4種, *R. leguminosarum* 1種, *Rhizobium* species 101種, 未分類된 菌株 159種으로 分類하였다.

分離된 *R. japonicum* 218 種의 根瘤形成能과 窒素固定能을 比較하여 *R. japonicum* R-138, R-168, R-214 菌株를 優秀菌株로 하였다.

分離 選拔된 *R. japonicum* 中 窒素固定能이 優秀한 菌株의 plasmid를 確認한 結果, fast-growing group 菌株들은 1~4個의 巨大 plasmid를 含有하고 있었으며 그 分子量은 約 35~300Md 程度이었

다. 반면 大部分의 slow-growing group 菌株들은 plasmid가 檢出되지 않았다.

引用 文 獻

1. Quispel, A.: In "The biology of nitrogen fixation," Quispel, A. (ed.), Chap. 11, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, (1974).
2. Meijer, E.G.M.: In "Molecular biology of plant tumors," Günter, K. (ed.), Chap. 4, Academic press, N.Y. (1975).
3. 日本土壤肥料學會(編): 根粒の窒素固定, p. 182, 博友社, 東京(1982).
4. 中村道徳(編): 生物窒素固定, p. 213, 學會出版センター, 東京(1980).
5. Iruthayathas, E.E., Gunasekaran, S. and Vlassak, K.: Scientia Horticulturae, 20 : 231 (1983).
6. Ausubel, F.M. and Ruvkun, G.B.: In "Genetic engineering of symbiotic nitrogen fixation and conservation of fixed nitrogen," Lyons, J.M. (ed.), Chap. 3, Plenum press, N.Y. (1981).
7. 임선옥: 한국농화학회지, 13 : 51(1970).
8. 金聖烈, 崔宇永: 충남대학교 농업기술연구보고, 5 : 136(1978).
9. 柳震彰, 尹錫權, 李容錫: 한국토양비료학회지, 7 : 221(1974).
10. 柳震彰, 李相奎, 李赫浩, 洪鍾雲, 趙武濟: 한국토양비료학회지, 16 : 188(1983).

11. Kim, C.J., Kim, S.H. and Mheen, T.I.: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 13 : 13(1985).
12. Cho, M.J., Yang, M.S., Yun, H.D. Cheo, Z.R., Choe, Y.L. and Kang, K.Y.: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 13 : 79(1985).
13. Broughton, W.J. and John, C.K.: In "Somiplan Symposium paper No. 9," Symposium Soil Microbiology and plant Nutrition, (1976).
14. Williams, W.M. and Broughton, W.J.: Rhizobial experimentation and supply in Malaysia, p.1 (1976).
15. Kado, C.I. and Lim, S.T.: J. Bacteriol., 145 : 1365(1981).
16. Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. and Falkow, S.: J. Bacteriol., 129 : 1171(1976).
17. Casse, F.C., Boucher, J.S. Julliot, M.M. and Denarie, J.: J. Gen. Microbiol., 113 : 229(1979).
18. Keyser, H.H., Bohlool, B.B., Hu, T.S. and Weber, D.F.: Science, 215 : 1631(1982).
19. Sadowsky, M.J.: Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 716(1983).
20. Martinez-Dedrets, G.: Can. J. Microbiol., 20 : 605(1974).
21. Hirsh, P.R. Montagu, V.M. Johnston, A. W.B., Brewin, N.J. and Schell, J.: J. Gen. Microbiol., 120 : 403(1980).
22. Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Prakash, R.K., Schilperoot, R.A. and Cannon, F.C.: Nature 282 : 533(1979).
23. 矢野圭司 : 蛋白質 核酸 酵素, 26 : 499(1981).