

Flavonoids와 근류균의 상호작용

서상현* · 강상재 · 박우철

경북대학교 농화학과

초 록 : 본 연구는 숙주특이적인 근류형성에 두과작물의 뿌리분비물에 포함된 기주특이적인 flavonoids와 근류균의 상호작용에 대해 실험하였다. Flavonoid 화합물에 대한 근류균의 생물학적 활성은 *B. japonicum*의 경우 대두의 뿌리분비물에 포함된 flavonoid 화합물인 daidzein과 genistein에서는 생장 증진 효과가 나타났으며, alfalfa의 뿌리분비물에 포함된 flavonoid인 luteolin에서는 생장 저해 효과가 나타났으며, *R. meliloti*의 경우 luteolin의 경우 생장 증진 효과가 나타났으며, daidzein과 genistein의 경우 생장 저해 효과가 나타났다. 각 근류균의 흡수 특이성은 *B. japonicum*에서 daidzein과 genistein이 각각 14.95 µg/g와 14.20 µg/g로 가장 높고 luteolin이 가장 낮게 나타났으며, *R. meliloti*의 경우 luteolin이 18.31 µg/g로 가장 높고 daidzein과 genistein이 가장 낮게 나타났다. 이와 같은 사실로 숙주특이적인 flavonoids가 근류균의 숙주특이성에 깊은 관련이 있을 것으로 사료된다. (1997년 12월 5일 접수, 1997년 12월 16일 수리).

서 론

두과작물과 근류균은 공생질소고정으로 대기중의 질소를 고정·동화하며, 농업적으로 중요한 공생질소고정은 *B. japonicum*/soybean, *R. meliloti*/alfalfa, *R. leguminosarum*/pea, *R. trifolii*/clover 등이 있다.

이와 같은 두과작물과 근류균의 공생에서 상호인지 과정과 근류 형성에 뿌리가 분비하는 분비물이 작용하고 두과작물의 종류에 따라 각각 특이한 물질이 분비되며 두과작물의 뿌리 분비물을 분석한 결과, 이 물질의 대부분이 flavonoids 유도체이고 각 숙주에 따라 분비되는 flavonoids의 종류와 그 양에 현저한 차이가 있다는 것 즉, alfalfa에서는 luteolin, 대두에서는 daidzein과 genistein이 다른 flavonoids에 비하여 더 많은 양이 분비된다는 것이 보고^{3,4,7)}되고 있다.

한편, 두과작물의 뿌리가 근류균에 노출됨으로 해서 뿌리 분비물 중에 포함된 flavonoids의 양적 증가를 유도하며, 이러한 flavonoid는 각종 biotic 및 abiotic stress시 식물체내의 방어반응의 하나로 생성되는 생리 활성 물질이면서 근류균이 숙주식물에 침입할때 생성되는 flavonoids와는 근본적으로 그 함량과 종류 및 역할에서 큰 차이가 있으며 또한, 두과작물의 뿌리 분비물에 포함된 flavonoid 화합물이 숙주 특이적인 근류균에게는 활성을 촉진하고 그렇지 않은 근류균에게는 활성을 저해하는 현상 즉, phytoalexin의 기능을 나타내는 것으로 보고^{6,8,10,14,15)}되었으며 또한, 두과작물에서 분비되는 flavonoid는 숙주특이적인 근류균에 대해서는 화학주성^{2,5,13)} 및 근류형성유전자의 발현을 촉진한다는 것이 보고^{1,9,11,12)}되고 있다.

이러한 사실은 특이할 만한 것이며, 숙주특이적인 근류형

성에 flavonoid 화합물이 깊은 연관성을 가질것으로 생각되어진다.

위와 같은 연구결과를 근거로 하여 본 연구에서는 두과작물의 뿌리에서 분비되는 flavonoid 화합물이 *B. japonicum*과 *R. meliloti*의 생장에 미치는 영향과 근류균에 대한 흡수 특이성을 조사하여 두과작물이 분비하는 flavonoid 화합물이 근류균의 숙주특이성에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 균주

본 실험에 사용한 flavonoids중 apigenin, flavone, naringenin은 Fluka사의 제품을, genistein은 Sigma사의 제품을 사용하였으며, daidzein과 luteolin은 경북대학교 농화학과 천연물화학 연구실에서 제공 받아 사용하였다.

표준균주는 한국 과학기술원 유전자 은행으로부터 분양 받은 *Bradyrhizobium japonicum* KCTC 1539와 *Rhizobium meliloti* KCTC 2353을 사용하였으며 Yeast Extract Mannitol(YEM)배지에 접종하여 대수증식기까지 배양한 후, 재차 배양액 0.1 ml 취하여 YEM배지에 접종하여 일정 시간 배양한 후 실험용 균주로 사용하였다.

Flavonoids 처리시 생물학적 활성

250 ml 삼각 플라스크에 미리 0.45 µm membrane filter를 사용하여 여과한 YEM배지 50 ml를 넣고 여기에 각각 flavonoids를 10⁻⁶M의 농도로 배지에 첨가하여 생장 실험용 배지를 조제하였다. 여기에 실험용 균주를 대수증식기 까지 배양한 후, 생장 실험용 배지에 *B. japonicum*는 0.2 ml, *R. meliloti*는 0.1 ml씩 접종하여 27°C에서 진탕배양(130 rpm)

찾는말 : nitrogen fixation, flavonoids, rhizobium

*연락처

하면서 10시간 간격으로 배양액을 채취하여 OD₆₀₀에서 생육도를 관찰함으로써 각 flavonoid 화합물의 근류균에 대한 생물학적 활성을 측정하였다.

Flavonoids 동시처리시 생물학적 활성

YEM 배지에 daidzein 및 genistein을 10⁻⁶M로 동시에 배지에 첨가하여 이를 생장 실험용 배지로 조제한 후, 실험용 균주를 대수증식기 까지 배양한 후 생장 실험용 배지에 각각 *B. japonicum* KCTC 1539는 0.2 ml, *R. meliloti* KCTC 2353는 0.1 ml씩 접종하여 27°C에서 진탕배양(130 rpm)하면서 10시간 간격으로 배양액을 채취하여 OD₆₀₀에서 생육도를 관찰함으로써 각 flavonoid 화합물의 근류균에 대한 생물학적 활성을 측정하였다.

Flavonoid 흡수량 측정

250 ml 삼각 플라스크에 80 ml의 YEM배지를 넣은 후 여기에 각각의 flavonoid화합물을 10⁻⁶M로 첨가하여 실험용 배지로 조제한 후, 실험용 균주를 대수증식기까지 배양한 후, *B. japonicum* KCTC 1539는 0.2 ml, *R. meliloti* KCTC 2353는 0.1 ml씩 접종하여 27°C에서 OD600가 0.8 될때까지 진탕배양(130 rpm)하였다.

이 배양액을 4°C에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상징액을 조심스럽게 버린 후 침전 균체를 0.9% NaCl (pH 7.4)로 세척한 후, 다시 4°C에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상징액을 버린 후 0.9% NaCl로 (pH 7.4) 재차 세척하였다. 세척한 침전균체를 5 ml의 ethanol에 현탁하여 2분간 끓여주어 균체를 파쇄한 후, 이를 감압상태에서 증발·건조하고 1 ml의 ethanol을 사용하여 재현탁한 후, 0.22 μm membrane filter로 여과하였다.

이와 같이 조제한 추출액을 근류균이 흡수한 flavonoids의 정량에 사용하였으며, 이 ethanol 추출액을 HPLC를 사용하여 분석함으로써 flavonoid 화합물의 흡수량 지표로 삼았다.

HPLC 분석

근류균의 flavonoids 흡수량은 HPLC를 사용하여 정량하였다. 본 실험에 사용한 HPLC는 Waters model 510, column은 Bondapak C₁₈ Column(4.6 × 300 mm), detector는 Waters 996 photodiode array detector를 사용하였으며 flow rate는 1 ml/min로 사용하였다. 기타의 조건들은 Table 1에 나타내었으며, ethanol 추출액을 Table 1의

용매조건으로 elution하여 분석하였다.

균주별 flavonoid 흡수량 분석은 peak 면적법에 근거하여 각각의 flavonoid 화합물에 대한 표준곡선을 작성한 후, sample을 injection하여 나타난 peak의 면적으로 그 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

Daidzein 처리시 균주별 생물학적 활성

본 연구에서는 각 flavonoid 화합물의 처리농도에 따른 생물학적 활성에 대한 결과를 나타내지 않았지만 flavonoids 모두 10⁻⁶M에서 가장 높은 생물학적 활성이 관찰되어 공히 이 농도에서 본 연구를 진행하였다.

Daidzein은 Fig. 1에 나타난 것과 같이 *B. japonicum*은 60시간 배양시 대조구에 비해 9.8%의 성장증진효과가, *R. meliloti*의 경우 50시간 배양시 대조구에 비해 11.9% 성장

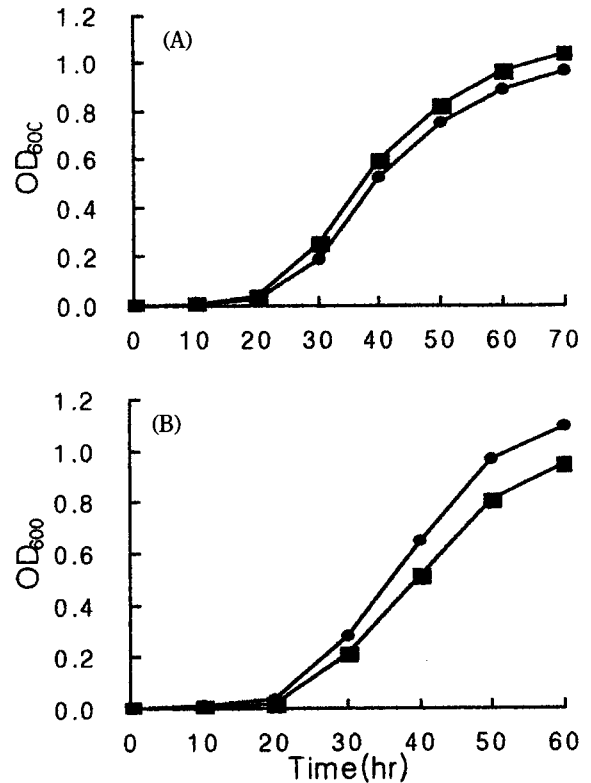


Fig. 1. Effect of daidzein treatment on growth of *Bradyrhizobium japonicum* KCTC 1539(A) and *Rhizobium meliloti* KCTC 2353(B). ●—●, Control; ■—■, Daidzein treatment.

Table 1. HPLC conditions for analysis of flavonoids

| Flavonoids | Mobile Phase | Retention Time | Detection |
|------------|---|----------------|------------|
| Apigenin | Initially, 40% MeOH for 7 min and a linear gradient of 40 to 90% MeOH | 15.9 min | UV340.0 nm |
| Daidzein | 53% EtOH | 4.2 min | UV250.0 nm |
| Flavone | 80% MeOH | 6.1 min | UV297.0 nm |
| Genistein | 80% MeOH | 4.1 min | UV262.8 nm |
| Luteolin | Linear gradient of 40 to 95% MeOH (adjusted to pH 2.6 with glacial acetic acid) | 19.1 min | UV351.6 nm |
| Naringenin | Initially, 10% MeOH for 10 min and then a linear gradient of 10 to 90% MeOH (adjusted to pH 2.6 with acetic acid) | 14.3 min | UV285.0 nm |

저해 효과가 관찰되었다. 또한, 이러한 생장 저해 및 증진 효과는 생육초기단계부터 나타나기 시작하는 것으로 관찰되었다.

대두의 뿌리 분비물에 포함되어 있는 물질의 하나인 daidzein이 *R. meliloti*에서는 생장 저해 효과가 나타난 것은 숙주특이적인 근류균이 아니라서 저해활성을 나타낸 것으로 생각되며, 숙주특이적인 근류균인 *B. japonicum*에서는 이와 반대로 생장 증진 효과가 관찰된 것으로 생각되어진다. 그러나 *B. japonicum*의 경우 숙주식물에서 분비되는 뿌리 분비물의 구성성분인 daidzein에 대해 큰 활성을 나타내지 않아 의외의 결과라고 생각되었다.

Khan 등¹³⁾ 및 Kosslak 등¹²⁾의 보고에 의하면 daidzein이 *B. japonicum*에 대해 화학주성 및 근류형성 유전자의 inducer로서 강하게 작용하는 것이 보고되었는데, 이와 같은 보고로 보아 daidzein은 *B. japonicum*의 생장활성에 미치는 영향보다는 화학주성 및 근류형성 유전자의 활성화에 더 큰 영향을 미치는 것으로 추정된다.

Genistein 처리시 생물학적 활성

Genistein의 경우는 Fig. 2에 나타난 것과같이 *B. japonicum*은 60시간 배양시 대조구에 비해 11.2%의 생장증진 효과가 관찰되었으며, *R. meliloti*의 경우는 50시간 배양시 대조구에 비해 11.6%의 생장저해효과가 관찰되었다.

앞에서도 언급한 바와 같이 genistein은 daidzein과 같이 soybean의 뿌리 분비물에 다량 함유되어 있는 flavonoid 화

합물로서 대두에 숙주특이적인 근류균인 *B. japonicum*에서는 높은 생물학적 활성을 나타내는데 반하여, 대두에 대해 숙주특이적이지 않은 근류균인 *R. meliloti*에 대해서는 생장 저해 효과를 나타내었다.

한편, daidzein과 genistein이 공히 soybean의 주요한 flavonoid 화합물임을 감안하여 실제 soybean의 뿌리 분비물과 비슷한 조건 즉, 두 물질이 공존할 때의 각 균주별 생물학적 활성을 검토할 필요가 있을 것으로 사료되었다.

Daidzein과 genistein 처리시 생물학적 활성

앞에서도 언급한 바와 같이 daidzein과 genistein이 soybean의 주요한 flavonoid 화합물임을 감안하여 실제 soybean의 뿌리 분비물과 비슷한 조건 즉, 두 물질이 공존할 때의 각 균주별 생물학적 활성을 측정하였다.

B. japonicum 및 *R. meliloti*에 daidzein과 genistein을 처리하였을때 생장곡선은 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에 나타난 것과 같이 *B. japonicum*에 daidzein과 genistein을 동시처리시 생물학적 활성은 60시간 배양시 대조구에 비해 14.8%의 생장 증진 효과가 관찰되었으며 *R. meliloti*에서는 50시간 배양시 대조구에 비해 18.6%의 생장 저해 효과가 관찰되었다.

또한, *B. japonicum*에서는 soybean의 뿌리 분비물에 포함된 물질인 daidzein과 genistein이 대두의 숙주특이적인 근류에게는 큰 생장증진효과를 보인 반면에 숙주특이적인 근류균이 아닌 *R. meliloti*에는 큰 생장 저해 효과를 나타내

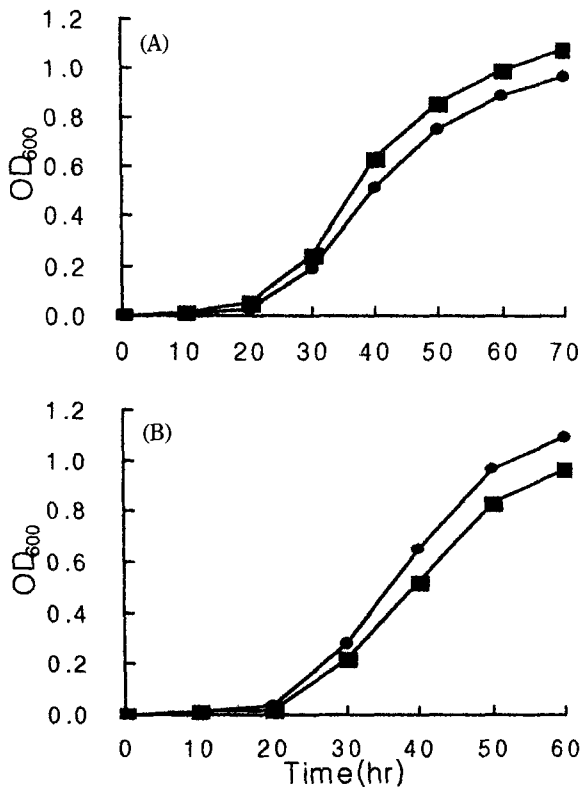


Fig. 2. Effect of genistein treatment on growth of *Bradyrhizobium japonicum* KCTC 1539(A) and *Rhizobium meliloti* KCTC 2353(B). ●-●, Control; ■-■, Genistein treatment.

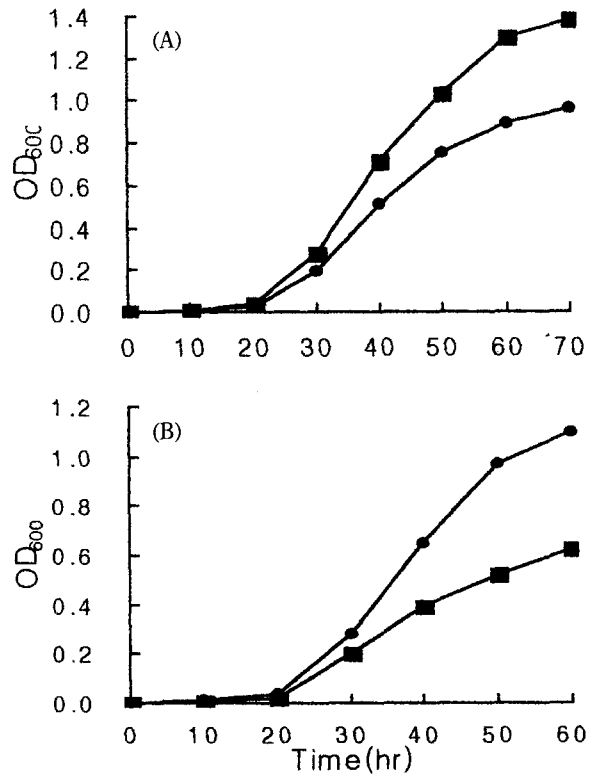


Fig. 3. Effect of daidzein and genistein treatment on growth of *Bradyrhizobium japonicum* KCTC 1539(A) and *Rhizobium meliloti* KCTC 2353(B). ●-●, Control; ■-■, Daidzein & genistein treatment.

었다.

이 결과로 대두의 뿌리 분비물에 다량 포함된 daidzein과 genistein은 단일성분 존재시 보다 공존할 때 즉, soybean의 뿌리 분비물에서 분비되는 것과 비슷한 상태일 경우 활성이 가장 높은 것이 관찰되었다.

Luteolin 처리시 균주별 생물학적 활성

B. japonicum 및 *R. meliloti*에 각각 luteolin을 처리하였을 경우의 성장곡선은 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 4에 나타난 것과 같이 *B. japonicum*에 luteolin을 처리하였을 때 대조구에 비해 15.5% 성장저해효과가 관찰되었으며, *R. meliloti*에 luteolin을 처리하였을 때는 50시간 배양시 대조구에 비해 13.1%의 성장 증진 효과가 관찰되었다.

Luteolin은 alfalfa의 뿌리 분비물에 다량 포함되어 있는 flavonoid 화합물로서 alfalfa에 숙주특이적인 근류균인 *R. meliloti*에 대해 큰 활성 즉, 성장 증진효과를 나타내었고 그렇지 않은 *B. japonicum*에서는 강한 저해효과를 나타낸 것으로 생각된다.

이상과 같은 결과로 luteolin은 alfalfa와 *R. meliloti* 사이의 숙주특이적인 근류형성에 작용하는 특이적인 flavonoid 화합물로 생각된다.

근류균에 의한 flavonoids 흡수량

B. japonicum 및 *R. meliloti*에 각각의 flavonoid 화합물을 처리하였을 경우 근류균의 flavonoid 흡수량은 균체로부터

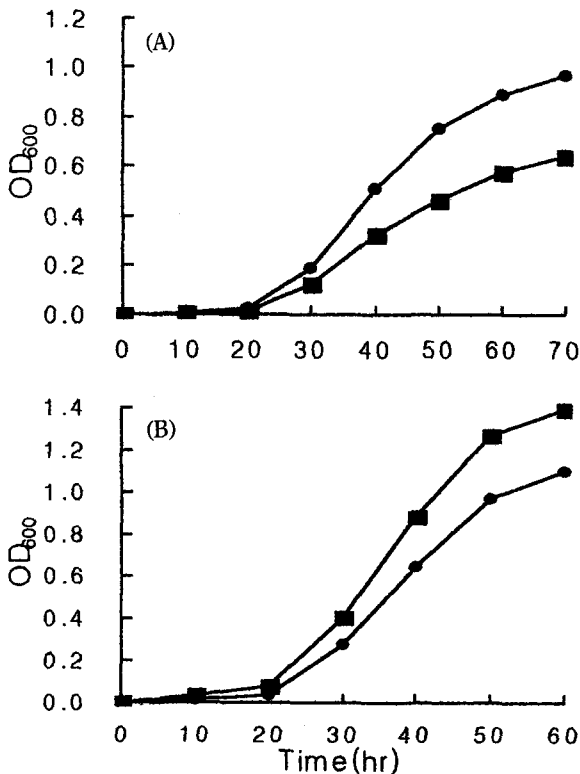


Fig. 4. Effect of luteolin treatment *Bradyrhizobium japonicum* KCTC 1539(A) and *Rhizobium meliloti* KCTC 2353(B).

●—●, Control; ■—■, Luteolin treatment.

Table 2. Absorption content of flavonoids in *B. japonicum* and *R. meliloti*

| | Absorption Content ($\mu\text{g/g}$ dry cells) | |
|------------|--|--------------------|
| | <i>B. japonicum</i> | <i>R. meliloti</i> |
| Apigenin | 4.28 | 4.72 |
| Daidzein | 14.95 | 1.71 |
| Flavone | 5.42 | 2.06 |
| Genistein | 14.20 | 1.68 |
| Luteolin | 1.08 | 18.31 |
| Naringenin | 1.16 | 1.82 |

ethanol 추출물을 얻고 이 추출물을 HPLC에 의하여 분석·정량하였으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

근류균의 flavonoids 흡수 특이성은 *B. japonicum*에서 daidzein과 genistein이 각각 14.95 $\mu\text{g/g}$ 와 14.20 $\mu\text{g/g}$ 로 가장 높은 흡수량을 나타내었으며 flavone, apigenin, naringenin, luteolin순으로 나타났으며, *R. meliloti*의 경우 luteolin이 18.31 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높은 흡수를 보였으며 apigenin, flavone, naringenin, daidzein, genistein순으로 나타났다. 또한, flavonoid 화합물 중 daidzein과 genistein이 *B. japonicum*에 대해 가장 큰 흡수량을 나타내어 성장실험에서 나타난 바와 같이 그 특이성이 인정됨을 알 수 있었으며, luteolin의 경우 성장실험에서 저해효과를 나타낸 것과 같이 1.08 $\mu\text{g/g}$ 으로 그 흡수량이 가장 낮게 관찰되었으며, *R. meliloti*에서 daidzein과 genistein의 경우 성장실험에서 저해효과를 나타낸 것과 같이 그 흡수가 가장 낮음이 관찰되었다.

균주별 flavonoid 화합물의 흡수가 위와 같은 특이성을 나타낸 것은 기주특이적인 flavonoid 화합물들이 근류균의 근류형성 초기단계의 근류형성 유전자의 발현에 신호전달 물질로서 작용하는 것으로 보고되고 있는데, 이러한 숙주특이적인 flavonoid 화합물이 근류균에게 특이적으로 흡수되어 유전자의 발현에 작용하는 것으로 생각되어진다.

참고문헌

- Bassam B. J., M. A. Djordjevic, J. Redmond, M. Batley, B. G. Rolfe. (1988) Induction of *nodD*-dependent locus in the *Rhizobium* strain NGR234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other legumes., *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**, 161-168
- Caetano-Anoll s G., D. K. Christ-Estes, W. D. Bauer. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* **170**, 3164-3169
- Dakora F. D., C. M. Joseph, D. A. Phillips. (1993) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudate contain isoflavonoids in presence of *R. meliloti*. *Plant Physiol.* **101**, 819-824
- D'Arcy-Lameta A. (1986) Study of soybean and lentil root exudates. II. Identification of some polyphenolic compounds, relation with plant physiology. *Plant Soil.* **92**, 113-123

5. Dharmatilake A. J., W. Bauer. (1992) Chemotaxis of *R. meliloti* towards nodulation gene inducing compounds from alfalfa roots, *Appl. and Environ. Microbiol.* **58**, 1153-1158
6. Firmin J. L., K. E. Wilson, L. Rossen, A. W. B. Johnston. (1986) Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants., *Nature.* **324**, 90-92
7. Fisher R.F., S.R. Long. (1992) *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature.* **357**, 655-660
8. Hartwig UA, C.M. Joseph, D.A. Phillips. (1991) Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. **95**, 797-803
9. Kang, S.J. & W.C. Park. (1994) Effect of chemotaxis on nodulation in *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis, *The J. of Kor. Soc. Soil Sci. and Fert.* **27**, 136-147.
10. Karen J.M., Jill A.H., L.G. David. (1994) Cyclic β -1,6-1,3-glucans of *B. japonicum* USDA110 elicit Isoflavonoid production in the soybean(*Glycine max.*) host. *Plant Physiol.* **104**, 917-923
11. Kossalak R.M., R. Bookland, J. Barkei, H.E. Paaren, E.R. Appelbaum. (1987) Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max.* *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **84**, 7428-7432
12. Kossalak R.M., R.S. Joshi, B.A. Bowen, H.E. Paaren, E.R. Appelbaum. (1990) Strain-specific inhibition of *nod* gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1333-1341
13. Khan M.M.A., W.D. Bauer. (1988) Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* toward flavones and isoflavones from soybean. *Plant Physiol.* **86**, S-127
14. Peter N.K., S.R. Long. (1988) Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol.* **88**, 396-400
15. Parniske M., Ahlborn B., D. Werner. (1991) Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean *rhizobia*, *J. Bacteriol.* **173**, 3432-3439

Interactions between Rhizobia and Flavonoids

Sang-Hyun Seo*, Sang-Jae Kang, Woo-Churl Park(Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 701-702, Korea:)

Abstract : This experiment was carried out to elucidate the biological activity and absorption characteristics of flavonoids in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and to obtain basic information on host specific nodulation by flavonoids in *rhizobium*-legume symbiosis. The purpose of the present study was to explore the biological activity and the flavonoid absorption indicates that host-specificity is induced by flavonoids in symbiotic nitrogen fixation. Biological activity increased by daidzein and genistein treatment on *B. japonicum* KCTC 1539 whereas decreased by luteolin treatment but increased by luteolin treatment on *R. meliloti* whereas decreased by daidzein and genistein treatment. Daidzein and genistein are absorbed by *B. japonicum*, KCTC 1539 at higher rate than other flavonoids. Especially, luteolin was absorbed at a least rate. Luteolin are absorbed by *R. meliloti* KCTC 2353 at higher rate than other flavonoids. Especially, daidzein and genistein was absorbed at a least rate.

Key words : nitrogen fixation, flavonoids, *rhizobium*

*Corresponding author