

***Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135의 *nodDI* 유전자의 크로닝과 염기서열 분석**

최순용¹ · 고상균^{*}

대전대학교 이과대학 생명과학부, ¹한남대학교 이과대학 미생물학과

차풀(*Cassia nomame*)의 뿌리혹 공생세균인 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135의 *nodDI* 유전자를 중합효소 연쇄반응을 통해 크로닝하여 그 염기서열을 조사하였다. 염기서열로부터 유추된 *NodD1* 단백질은 *Bradyrhizobium elkanii*와 가장 높은 95%의 상동성을 나타내었다. 뿐만 아니라 *nodDI*와 *nodD2* 사이의 intergenic space 부위의 염기서열도 *B. japonicum*을 포함한 다른 *bradyrhizobia*에는 상동성이 거의 없었으나 *B. elkanii*와는 88%의 높은 상동성을 나타내었다. 우리의 실험 결과는 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*)가 *B. elkanii*와 매우 근연한 관계임을 보여 주고 있다.

Key words □ *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*), *Cassia nomame*, *nodDI*, PCR

리조비아(rhizobia)라 총칭하여 부르는 토양세균 *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*은 콩과식물과 질소고정능을 갖는 상호호혜적인 관계, 즉 공생적 질소고정을 통해 식물의 생산성에 상당히 공헌하고 있다(17). 리조비아 중에서 생장 속도가 느린(slow-growing) *bradyrhizobia*에는 *B. elkanii*, *B. japonicum* 그리고 *B. liaoningense*(18)의 세 개의 종이 있으며 이들은 모두 대두의 뿌리혹으로부터 분리된 세균이다. 이 이외에도 종까지 동정되지 않은 많은 *bradyrhizobia*들이 알려져 있다(3,12).

뿌리혹(root nodule)은 식물의 flavonoid와 공생세균의 NodD가 함께 작용하여 *nod* 유전자들이 발현되어, 이들에 의해서 합성된 올리고당의 Nod인자(Nod factor)에 의해 형성된다. 이와 같이 flavonoid와 Nod인자 등과 같은 공생적 신호들이 콩과식물과 리조비아 사이에 교환되어 뿌리혹 형성이 이루어진다(6,11).

*B. japonicum*을 포함한 대부분의 리조비아에서 *nod* 유전자들 중, Nod 인자의 기본골격 합성에 관여하는 공통(common) *nod* 유전자라고 부르는 *nodABC* 유전자와 전사활성자(transcriptional activator)로서의 기능을 가진 *nodD* 유전자는 서로 인접하여(Fig. 1) 있으나 전사는 서로 반대 방향으로 일어난다(1). *nodABC*를 포함하여 다른 여러 *nod* 오페론의 발현은 flavonoid와 LysR 균에 속하는 NodD를 필요로 한다. NodD 단백질은 각 *nod* 오페론의 상부에 있는 47 bp의 DNA motif인 *nod box*라는 보존된 DNA 서열에 결합한다(16). 식물의 신호인 flavonoid가 inducer로 NodD 단백질과 결합하여 형성된 NodD-flavonoid 복합체가 *nod* 오페론들의 전사를 활성화시킨다. 현재까지 조사된 바에 따르면 NodD에 의한 이런 조절시스템은 모든 리조비아에서 나타난다.

하지만 *nodD*의 개수는 종마다 차이가 있어(1), *Rhizobium leguminosarum* bv. trifoliis는 한 개, *Sinorhizobium meliloti*는 2개, *Rhizobium tropici*의 경우 가장 많은 5개의 *nodD* 유전자를 갖고 있다. *Bradyrhizobia*에 있어서 *nodD* 유전자는 *B. elkanii*, *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*), *Bradyrhizobium* sp. (*Arachys*)에서 공히 두 개를, 즉 *nodDI*과 *nodD2*를 가지고 있다. *nodDI*과 *nodD2*는 인접해 있으며 그 사이에는 600 bp가 조금 넘는 intergenic space가 존재한다. 또한 *nodDI*과 *nodABC* 사이에는 각각 *nodA*와 *nodD1*의 *nod box*(Fig. 1)가 각각 위치하고 있다(8).

콩과(Leguminosae) 식물은 콩아과(Papilionoideae), 미모사아과(Mimosoideae), 실거리나무아과(Caesalpinoideae)의 세 아과로 나뉘며, 이들 중에서 실거리나무아과의 콩과식물이 가장 덜 진화된 식물이다. 실거리나무아과에 속하는 *Cassia* 속은 600여종의 식물로 이루어져 있으며, 특히 일부만이 뿌리혹을 형성하는데 차풀(*Cassia nomame*)이 그 중 하나이다. 국내에서 서식하는 차풀의 공생균주가 분리되었고 그 특성에 대하여 조사된 바 있는데(2, 10), 이 공생균주의 콜로니의 모양은 *B. japonicum*과 뚜렷하게 다르며, 서로의 식물에 뿌리혹을 형성하지 못하였다.

본 연구에서는 차풀의 공생균주인 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*)와 대두의 공생균주인 *B. japonicum*의 *nodDI* 유전자와 차이를 알아보기 위해 *B. japonicum* USDA110의 *nodDI* 부위의 서열을 참고로 하여 *Bradyrhizobium* sp. CN9135의 *nodDI* 유전자를 중

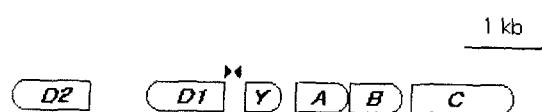


Fig. 1. Common *nod* gene region of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. The filled arrowhead between *nodD1* and *nodYABC* marks the location and orientation of the *nod box*.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-280-2437, Fax: 042-280-2608
E-mail: skkoh@dragon.daejon.ac.kr

폭하고 크로닝하여 그 염기서열을 조사하고 다른 *bradyrhizobia*들과 비교 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주

차풀의 공생균주로 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135(10)를 사용하였으며, 공시균주로는 대두의 공생세균인 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110을 사용하였다. 이 균주들은 YM 액체배지(15)에 접종하여 28°C에서 5일 배양하였다.

염색체와 프라스미드 DNA분리

*Bradyrhizobia*의 염색체 DNA는 guanidine isothiocyanate cell lysis 방법을 사용하였고(14), 플라스미드 DNA는 Jetstar plasmid miniprep kit(Genomed)를 사용하였다.

Primer의 제작과 PCR

Bradyrhizobium sp. CN9135의 *nodD1* 유전자 부위를 증폭하기 위해 *B. japonicum* USDA110의 서열(8)을 토대로 *B. japonicum*의 *nodA* *nod box* 내의 22-mer 서열 5'TGGTAAAATCGATTG-TTCGAT3'와 *B. japonicum*의 *nodD1*과 상동성을 지닌 N말단 부위에 해당하는 *B. japonicum*의 *nodD2*의 염기서열 5'GCGA-CCAGAAAGATTAGATC'를 선정하여 각각 forward와 reverse primer로 사용하였다(Fig. 3). PCR은 보통의 방법을 사용하였으며 증폭기의 운행조건은 95°C에서 3분 예열 시킨 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 3분 씩 35회 반복하고 마지막에는 72°C에서 3분 처리하여 반응을 완료하였다.

염기서열결정과 자료분석

PCR 산물을 Wizard PCR Preps(Promega)를 사용하여 순수 분리한 후 pGEM-T vector에 크로닝한 후 dideoxy chain termination 방법(13)으로 서열을 조사하였다. 6개의 크론을 무작위로 선별하여 200 bp 정도의 염기서열을 조사하여 그 서열이 동일함을 확인한 후 그중 하나를 택해 약 1.7 kb의 전체 서열을 조사하였다. 또한 *nodA*와 *nodD1* 사이에 위치하고 있는 두 *nod box*의 완전한 서열을 조사하기 위해 *B. japonicum*과 *B. elkanii*의 *nodA*의 보존된 서열(5,8)을 primer로 사용하여 얻은 크론으로부터 약 170 bp 정도의 염기서열을 더 밝혀 총 1,836 bp 염기서열을 결정하였다. 아미노산 서열 비교는 Clustal program을 사용하였으며 Dendrogram은 PAUP*4.02를 사용하여 작성하였다.

결과 및 고찰

nodD1 유전자의 크로닝

*B. japonicum*의 염기서열로부터 결정한 두 primer를 사용하여 PCR로 증폭한 바, *B. japonicum*에서와 마찬가지로 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135에서도 약 1.7 kb의 크기의 단일 랜드를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 이것은 *B. japonicum*의 염기 서열로부터 예상되는 크기와 일치하였다(8). *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135의 증



Fig. 2. PCR amplification of *nodD1* gene from bradyrhizobial DNA. lane 1, λ DNA /HindIII size markers(23, 9.4, 6.6, 2.3, 2.0, 0.6 kb); lane 2, *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135; lane 3, *B. japonicum* USDA110.

1	GCACCTACAAGAGGGCCAACCTGGGTGCGGCAGAGATAGCCACTTCGCACACGGATTCCG	60
61	CGCGCAAGCTGGCAGGATTCTCTGGGAGGCCGCTGGCAGACAAAAGCCCATGCTGGCGA	120
121	TACCLAAATCTTCAACATTTCTGATGTTGCTATCCAACTTCGCGAGTTTGTAATAATC	180
181	GATTGTTTCGATAGAACACATCCACAGATGGATAGACTCACGCAATGGGGTCAAGGGA	240
1	M R F K G	5
241	CTTGATCTAAACCTCTCTGTTGGCTGCTGATGCTGATGCGAGGCCAACCTTACAGCG	300
6	L D N L E V A L D A M T E R N L T A	25
301	CGGGCGGCGAAATAATTAAACCTTGAGCCACGCCGATGAGCGCTGGGATGCCGGCTGGC	360
26	A A R K I N N L S Q P A M S A A I A R E	45
361	ACCTACTTTCGGATGAAATTGTTACGATGAGAGGTGGGAACCTGTCGGACACCOGCC	420
46	T Y F R D E L G F T T M R G R E L L P T P G	65
421	GGGAACTGGTGTGGCGGGTCCAGTGGGAGGCCCTGCTGACATCCAACTCTCATGATT	480
66	A E V L A G P V R E A L L H I L Q I S I	85
481	TCTCGGGATGGCTTCGACCCGACCCAGTCGAGGCCAGCTTCAAGGGTCACTCTCCGAT	540
86	S R D A F D P T Q S S R F R T I L S D	105
541	TTCTGATGACATGCTGTTTCGCGGATTTCTGATGCTATTGCAAGGAGGCCCTGGG	600
106	F M T I V F F R R I V D R I A Q E F A P A	125
601	GTCCGGCTTCAAAITGCTGCCAATTTCGGATGAAACCCGTGAGCTGCTTCGGCGGGCGAA	660
126	V R F E L L L P F S D E P G E L L R R G E	145
661	GTGGATTTCCTTTGGCGGAATTGTCATGTCAGGGGCCATCTAACGGGAGGCTA	720
146	V D F L I L P E L F M S S G H P K A T L	165
721	TTCTGATGAGACCTCTGTAAGCTGGATGCCGCAACAAACAGGCTTATTCGGGACACTT	780
166	F D C Q N K Q E L L R P	185
781	ACATTGATAAAATCAATTCTGATGGGGCACGTCACGGGAACTTCCGGACGGGCCCTGGG	840
186	V Q G F S L I N S M R R I V S I R G T M	205
841	CCCAACCTCGAGGAGTCTCTGAGCACCGTTGAAAAGCCGCATCGAGGTGTT	900
206	P X L E E W F L L E H G L K R R I V V	225
901	GTGCAAGGGCTTACGCTGATTTGGAGACAGACGCCATAGGGACAATG	960
226	V Q G F S L I N S M R R I V S I R G T M	245
961	CCCTTACGTCGCCAGAACACTGCGAAATTGCGGATACCCCTGCGATGCGAACCCA	1020
246	P L R P T F T E M L L E H G L K R R I V V	265
1021	CTTCCCACCTGCCACAACTTCCGGAGGCCGCTGAGTGGCTCGCTCACAAACCGATCGG	1080
266	I P L P T F T E M L L E H G L K R R I V V	285
1081	GGGACGATTTGGATGCGGGGATATTGTTGGAGGAGCATCCACATGGGATCTGGACAT	1140
286	A S I W R R I L L E E A S N M G S A H	305
1141	CGGGAGAGTCCAACGCCAGGGCGCTGCTAGGTTACCCAGACGCCGCCCGAGGGCAA	1200
306	R E I P T R R R C R * 314	314
1201	ATACCCACTCATATTGCGATGCTGCTGATTCATTTAACCTCCGGACGGGCGATGC	1260
1261	TGTAAACCGCCGGAGCCCGCCCGCTGATTTGCAAGATTTCCGGCCGGCTGCGCTAA	1320
1321	ATCAACGGCTTACTGGCTGTTGATGCAAGGGAAAGTCCAAACCGGAAAGACGAG	1380
1381	ACGCTTGGATTACGATGTTACGAAACCAATTAACTTCTGACCCGACCGCTG	1440
1441	CAGGTGTTGATTTCGCTCTGACCAACTGCCAGGGCGCGCTGATGGGGCACATCGGTG	1500
1501	ATTCCTGGCTTACGGCGGATACGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	1560
1561	TGCTGTTAGAGCTGGCGGAAATTCGCAAGATGCAATGAGTTGCTGCTCCGAGCTG	1620
1621	CGAGCGCTAGGTCTGCTCATCCGGAGGACTGCCGGCCTTCTGGATGTTGGCGAGCTTC	1680
1681	TTGCAAGGGCACAGGATTAACAGATGTTGCAAGGGAGGCCAATCACACGGCTCAGA	1740
1741	TGCAAGGGCTTGGCTGCTCATTTGATGCAATGAGATGGCGCTGGATATAAGATAT	1800
1	CGCTTCAACGGCTGGATCTAAATCTCTGGCG	1836
2	R F N G L D E N L E V	12

Fig. 3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of fragment containing the *nodD1* and partial *nodD2* genes. *nodD1* extends from positions 226 to 1,170 and *nodD2* starts from position 1,779. The predicted amino acid sequences are given below the nucleotide sequence. The two PCR primer sequences are indicated by shading. The *nodA* and *nodD1* *nod box* is underlined and double-underlined, respectively.

폭된 이 DNA 절편을 크로닝하여 무작위로 선정한 5개의 크론의 첫 200 bp 정도의 염기서열을 조사한 결과 모두 동일함을 확인한 후, 이중 하나의 크론을 택해 전체 서열을 조사하였다.

nodD1 유전자의 염기서열 분석

Bradyrhizobium sp.(*Cassia*) CN9135의 이 DNA 절편은 총 1,666 bp(Fig. 3의 171번부터 1,836번까지)이었으며 예전에 CN9135의 *nodD1*의 ORF는 226번부터 1,170번까지, *nodD2*의 ORF는 1,799번부터 시작되었고, *nodD1*과 *nodD2* 사이의 inter-

genic space는 628 bp로 이루어져 있었다(Fig. 3). CN9135의 NodD1 단백질은 *B. japonicum* USDA110과 *B. elkanii* USDA94 와 마찬가지로 314개의 아미노산으로 구성되어 있었다(5, 8). CN9135의 NodD1은 primer 염기서열을 결정하는 근거로 사용했던 *B. japonicum*의 NodD1과는 90%의 상동성을 나타내었다. 그러나 오히려 *B. elkanii*의 NodD1과는 95%로 가장 높은 상동성을 나타내었으며, 그 다음으로는 비콩과식물에서 유일하게 형성된 뿌리혹에서 분리된 *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) ANU289의 NodD1과는 94%의 상동성을 나타내었다. *Brady-*

BsC D1	1	MRFKGLDLNL LVALDALMTE RNLTAAARKI NLSQPAMSA IARLRTYFRD ELFTMRGREL	60
Bel D1		Q. S.	
Bja D1		V. A.	
BsA D1		H. V. G.	
BsP D1		S. S.	
Bel D2	.. N.	S.	A. K.
Bja D2		I. SS.	G. C.
Sm D1	R.	R.	S. Q.
Sm D2	R.	RV K.	S. Q.
BsC D1	61	VPTPGAEVLA GPVREALLHI QLSIISRDAF DPTQSSRRFR VILSDFMIV FFRRIVDRIA	120
Bel D1		A. L.	M.
Bja D1		A. A.	V.
BsA D1	R. G. A. I.	A. E. I.	I. V.
BsP D1	L. A.	A.	V.
Bel D2	SR. G. A. M. E. A.	N. I. G. C. I. HVAE V.	V.
Bja D2	LSSR. G. A. M. E. MA. HP. ARLN.	IV. V. V. L. NV. A. VT	
Sm D1	I. R. A. PA. D.	V. AW. PL. N. A. D.	I. LL. A. E. V.
Sm D2	I. R. A. PA. D.	V. AWEPI. N. A. D.	TL. E. V. E. L.
BsC D1	121	QEAPAVRPEL LPFSDEPGEL LRRGEVDFLI LPELFMSSGH PKATLFDETL VCVGCRTNKQ	180
Bel D1		A. A.	A.
Bja D1		DD. V. F.	E. S.
BsA D1	R. HD.	A. A.	P.
BsP D1	R. S.	A. A.	G. GE
Bel D2	R. S.	VALA. HD.	R. A. E. R.
Bja D2	R. S.	AAPT. HEL.	R. A. E. R.
Sm D1	R. G. S.	PLD. D. H.	D. F. DV. A.
Sm D2	R. G. S.	PLD. D. Y.	D. V. D. A.
BsC D1	181	LLRPPLTFDKY NSMGHVTAKF GRALRPNLLE WFLLEHGLKR RIEVVVQGFS LI PPPMLLETS	240
Bel D1		E. R.	I. FD. G
Bja D1	S. Q. EQ. I.	R.	L. LD.
BsA D1	S. Q. VE. M. A.	I.	G. M. V. VD. V
BsP D1	S. E. Q.	DR. N.	I. D.
Bel D2	R. R. R. MT. AV. L. V. RM. P.	DIL. HSYG. M. MG.	
Bja D2	QPR. R. M. AV. H. G. P. TPV. H. S. TDL. PT.	DIL. S. M. LIVG. N	
Sm D1	GNIS. ET. M. A. Q. EMK. SV. Q. L. FN.	L. P. T. RL. SG. N	
Sm D2	GE. S. E. M. A. Q. K. SF. Q. L. F.	V. L. P. T. L. PH. N	
BsC D1	241	RIGTMPLRLA RHFEKRIPLR IVEPPLPLPT FTEAVQWPAF HNTDPASIWWM RRILLEEASN	300
Bel D1		WM.	
Bja D1		RM.	
BsA D1	K. QML. K.	S.	I. Q. A.
BsP D1	M. Q.	A. K.	
Bel D2	V. K. TTM. A. L. R. F.	VL. Q. S. E.	E. Q. AR
Bja D2	G. V. QRTM. L. H. F. A.	SL. S. G. L. D. FQ. TR	
Sm D1	A. L. V. KY. QT. TS. PLF.	I. L. E. GN. L. E. Q. R	
Sm D2	AII. V. KY. QA. KH. SLW.	L. K. GN. E. Q. R	
BsC D1	301	MGSAHREIPT RRRC	338
Bel D1		D. KL.	
Bja D1	A. GDQ. P.		
BsA D1	A. EAARH. H.		
BsP D1	A. E. P. PQARLDSRPR RCKNLINHS TAWPASSF		
Bel D2	T. TSDDCSM SYASEQADTE GRLTSVASRL S		
Bja D2	ATT-Q. LRV TSSPEDAEPP GHFVRVSPL P		
Sm D1	1DPQSDTC		
Sm D2	SEFOGETSLE		

Fig. 4. Amino acid sequence alignment of different NodD proteins of bradyrhizobia. All of these sequences are available in the databases. NodD proteins from *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135(Bs D1), *B. elkanii*(Bel D1, D2), *B. japonicum* USDA110(Bja D1, D2), *Bradyrhizobium* sp.(*Parasponia*) ANU289(BsP D1, D2), *Bradyrhizobium* sp.(*Arachis*) NC92(BsA D1, D2), *Sinorhizobium meliloti* 41(Sm D1, D2) are shown.

rhizobium sp.(*Arachis*) NC92의 NodD1과는 84%의 상동성을 갖는 것으로 나타났다. 한편 CN9135의 NodD1 단백질은 *B. elkanii*와 *B. japonicum*의 NodD2와는 각각 58%와 50%의 상동성을, 반면 *Sinorhizobium meliloti* 41의 NodD1과 NodD2와 각각 59%와 58%의 상동성을 나타내어, bradyrhizobia의 NodD2나 다른 rhizobia의 Nod 단백질과는 상동성이 제법 큰 차이를 보이고 있다. 이들을 NodD1과 NodD2를 함께 비교 배열하여 보면(Fig. 4), N 말단으로부터 첫 100개의 아미노산에 비해 flavonoid recognition과 관계 있는 나머지 200여 아미노산 서열은 NodD 내에서도 그 보존 정도가 낮은 것을 확인할 수 있었으며, 이것은 공생세균의 숙주 특이성을 잘 반영하고 있었다. CN9135의 NodD1를 다른 bradyrhizobia와 생장속도가 빠른 *Sinorhizobium meliloti*의 NodD의 서열로부터 얻어진 dendrogram(Fig. 5)을 통해 CN9135의 NodD1의 서열은 다른 bradyrhizobia의 NodD1과 clustering됨을 알 수 있다.

nodD1과 nodD2 사이의 intergenic space 비교

CN9135의 nodD1과 nodD2 사이의 intergenic space는 628 bp

BsC	1	GTTCACCAAGCCGCCCGGAGGTGCAAATACCCCACCTCATCATTGACGTGCTGCC	60
BeI	1	GTCCACCACAAGCTGCTCCGGCAGATGCAAATATCCCACTCATCATTGACGTGCTGCC	60
BsC	61	TTGTCACTTTAACCTCCGGACGGCCATGCTGTAAACGCACCGG-GAGCCGCCGTGA	119
BeI	61	TTGTCACTTTAGCTTCCGGACGGCCATGCTGCAAAACGCACGCCGAGCCGCCGGGA	120
BsC	120	TTGTGAAAGATTGCCGGCCGTGCGC-TAACGATC---AAAGCGTTAGTGCCTTGTA	174
BeI	121	TTGTGAAAGATTGCCGGCCGTGCGCTAACGATCCGAAACCGTGTAGTGCCTGTA	180
BsC	175	TTGCAGGGAAAGTCCTAA-GCCATCGCGGAAAGACGAGAGCTTCGATTACGATGGTATTT	233
BeI	181	CTGCACGGAGGTCCGACGCCATCGCGGAAGGACGCCGAGCTTCGAGTACGATGGTATTT	240
BsC	234	G-CGAAGCCAATTAAATTGCTTGAACCCGACACTGCGTCAGGTTGTAATTGCTCCTGA	292
BeI	241	GGCGAAGCCAATTAAATCGCTTGAACCTGACACTGCGTCAGGTTGTAATTGCTCCTGA	300
BsC	293	CCAA--CTGC-CAGGCAGGCCCTGATGGGCACATCGGGTCAA-TTCTGGCTATTGGCGG	348
BeI	301	CCAATGCTGCGCAGGCCGACGTCACATCGCGTAACCTGGCTA-TGGCAG	359
BsC	349	GATAGGCACTAAGGCTGTTGCAATGGCAGCTCGACTAAATCGTTACGAGAGTGCC	408
BeI	360	GATAGGCACTAAGGCTGTTGCAATGGCAGCTCGACTAAAGTCGAGTTGCGAGAGTGCC	419
BsC	409	GGAAATCGACGAGATCGATGAGGTTGGCTCTCCGACGAGCTCGAGCCGTAGGTCGTAT	468
BeI	420	GGAAATCGACGAGATCGATCAGGTTGGCCTCCGACG-GCTCGAGCCGAGGTGTCGT	478
BsC	469	CCCGGA-CG-ACTCGCGCCATTCTGCGATGTTGCGAGCTTCTTGCAAGCCACGAG	526
BeI	479	CCCGAGCGCACTGCGTGCCATTCTGCGATGCTCCGAGCTTCTCGCAATCCACGAG	538
BsC	527	ATTAACAGAGTTGATTGCGGGAGCCAATCACACCGCTTCAGATGCAAGCCGTTGTCGT	586
BeI	539	AGGAAGCTGAGTTGATTGCG-GCGAGCCAATGACACCCGCTTCAGATGCAAGCCGTTGTCGT	597
BsC	587	CATTGTATGCAATGT-AAAGACGATCGCGTCGGATAATAAGAT	628
BeI	598	CATCGTATGCACTGAAAAGACGAGCCGCTGGATAATGAGAT	640

Fig. 6. Alignment of sequences for the intergenic space from *Bradyrhizobium* sp. CN9135 and *B. elkanii*.

인데 그 크기는 *B. japonicum*의 633 bp(8), *B. elkanii*의 640 bp(5) 보다 약간 작으나 *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. NC92의 600 bp(7) 보다는 약간 길다. 이들의 상동성을 조사한 바, *B.*

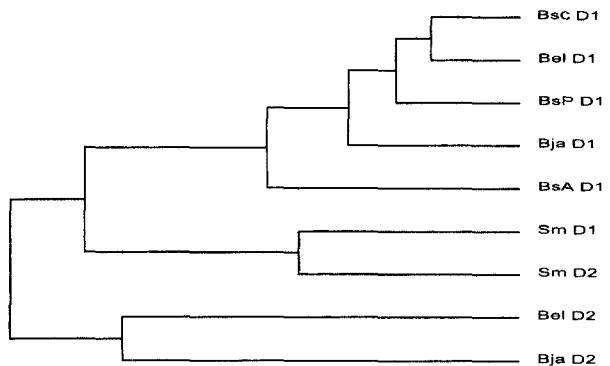


Fig. 5. Dendrogram showing relative distances among NodD proteins of different rhizobia. The new NodD1 protein of *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135, which was deduced from the nucleotide sequence shown in Fig. 3, is shown in boldface.

*japonicum*과 *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. NC92와는 상동성이 거의 없었고(<5%), 오직 *B. elkanii*와 만 88%의 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 6).

CN9135의 nod box

CN9135에서도 다른 bradyrhizobia와 마찬가지로 두 nod box의 존재를 확인하였다(Fig. 3). CN9135의 *nodD1*과 *nodA*의 각 nod box의 염기서열은 *nodA* nod box의 경우 *B. elkanii*와 *B. japonicum*과는 100%의 상동성을, *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) NC92와 *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) ANU289과는 94%의 상동성을 나타내었다. 반면에 CN9135의 *nodD1* nod box의 경우는 *B. elkanii*와 *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) ANU289과는 각각 96%와 85%의 높은 상동성을 보였으나, *B. japonicum*과 *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) NC92와는 각각 37%와 43% 정도의 아주 낮은 상동성을 나타내었다.

NodD1의 아미노산 서열, *nodD1*과 *nodD2* 사이의 intergenic space의 염기서열 그리고 nod box 서열의 상동성 비교를 통해 *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135는 *B. japonicum*보다는 *B. elkanii*와 근연관계를 가짐을 알 수 있었다. 하지만 *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135는 대부분 뿌리혹을 형성하지 못하며(10), 그 반대의 경우도 마찬가지로 *B. elkanii*는 차풀에 뿌리혹을 형성하지 못한다(9). 따라서 rDNA나 *nif* 유전자 등의 다른 유전자의 서열을 폭넓게 조사해 봄으로써 bradyrhizobia 내에서 *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135의 위치를 보다 명확하게 밝힐 수 있을 것이다.

참고문헌

1. 고상균. 1996. Rhizobia 와 식물의 상호작용: nod 유전자와 Nod 인자. 분자생물학뉴스 8, 13-20.
2. 고상균. 1999. 시험관내 뿌리혹 생성 실험의 개선된 방법. 한국미생물학회지 35, 169-172.
3. Abaidoo, R.C., H.H. Keyser, P.W. Singleton, and D. Borthakur. 2000. *Bradyrhizobium* spp. (TGx) isolates nodulating the new soybean cultivars in Africa are diverse and distinct from bradyrhizobia that nodulate North American soybeans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 225-234.
4. Allen, O.N. and E.K. Allen. 1981. The Leguminosae. University of Wisconsin Press, Madison.
5. Dober R.C., B.T. Breil, and E.W. Triplett. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *MPMI* 7, 564-572.
6. Ferro M., J. Lorquin, S. Ba, K. Sanon, J.C. Prome, and C. Boivin. 2000. *Bradyrhizobium* sp. strains that nodulate the leguminous tree *Aacacia albida* produce fucosylated and partially sulfated Nod factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5078-5082.
7. Gillette, W.K. and G.H. Elkan. 1996. *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. strain NC92 contains two *nodD* genes involved in the repression of *nodA* and a *nolA* gene required for the efficient nodulation of host plants. *J. Bacteriol.* 178, 2757-2766.
8. Gotterfert, M., D. Holzhauser, D. Bani, and H. Hennecke. 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *MPMI* 5, 257-265.
9. Koh, S.K. 2000. Personal data.
10. Lee, K.L. and S. K. Koh. 1997. Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. from *Cassia nomame* root nodules. *Natural Science*(Taejon University) 8, 115-124.
11. Mergaert, P., M. van Montagu, and M. Holsters. 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* 25, 811-817.
12. Parker, M. A. 1999. Relationships of bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4914-4920.
13. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
14. Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. Handbook for rhizobia, Springer-Verlag, New York.
15. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
16. Wang, S.P. and G. Stacey. 1991. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum* *nodD1* promoter: a repeated structure for the nod box. *J. Bacteriol.* 173, 3356-3365.
17. Werner, D. 1992. Symbiosis of plants and microbes, 1st ed. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
18. Xu, L.M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706-711.

(Received November 24, 2000/Accepted December 8, 2000)

ABSTRACT: Cloning and Sequence Analysis of the *nodD1* Gene from *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135

Soon-Yong Choi¹ and Sang Kyun Koh*(Division of Life Science, Daejon University, Daejon 300-716 and ¹Department of Microbiology, Hannam University, Daejon 306-791, Korea)

A 1.7-kb fragment containing the *nodD1* genes of *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135 was amplified by PCR with primers based on *B. japonicum* USDA110. This fragment was cloned and sequenced. Analysis of the sequence showed open reading frames highly homologous to *nodD1* from other bradyrhizobial sources. The sequence showed higher homology to *nodD1* gene of *B. elkanii* than to those from *B. japonicum*. Our results suggest that *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135 may be more closely related to *B. elkanii* than to *B. japonicum*.