

해너콩(*Canavalia lineata*) 뿌리혹으로부터 공생균주 *Rhizobium* spp.의 분리

김성천 · 안정선

서울대학교 자연과학대학 식물학과

Isolation of Symbiotic *Rhizobium* spp. Strain from Root Nodule of *Canavalia lineata*

Kim, Sung Chun and Chung Sun An

Department of Botany, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT: The root nodule of *Canavalia lineata* was classified as a determinate nodule and the symbiont as a *Rhizobium*-bacteroid based on their morphological characteristics. Isolated endosymbiont was similar both to *R. leguminosarum* and *R. meliloti* in its peritrichous arrangement of flagella and some of the physiological characteristics. Compared to control plants, *Canavalia* seedlings inoculated with the isolate grew normally due to induced root nodules, confirming isolate's infectivity and effectivity. Characteristics of the reisolated endosymbiont from induced root nodule were identical to those of the first isolate, indicating the nodules were induced by the first isolate. From these results, it was confirmed that *Rhizobium* strain isolated from the root nodules of *Canavalia lineata* was a real symbiont, and was named *Rhizobium* sp. SNU003.

KEY WORDS □ Symbiotic *Rhizobium* spp. SNU003, Root nodule, *Canavalia lineata*

콩과식물과 *Rhizobium* 사이의 공생관계에 대해서는 형태학적(Rolf and Shine, 1984), 미생물학적(Graham, 1964; Deley and Rassel, 1965; Gibbons and Gregory, 1972; Jordan, 1984) 및 분자생물학적(Puhler, 1983; Rolf and Gresshof, 1988) 연구들이 많이 진행되어 오고 있다. 그러나 14,000여종에 달하는 콩과식물들 중에서 8-9%에 대해서만 뿌리혹 유도실험이 실시되었고 더욱이 0.5% 이하의 숙주식물에서만 내생균주와의 공생관계에 대한 연구가 진행되었으며 최근에는 고정능력이 높은 야생 열대 콩과식물에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Jordan, 1984). 본 연구에 사용된 해너콩은 열대식물로 동남아시아 일부 및 우리나라의 제주도 일원에 분포되어 있고(Sauer, 1964), canavanine이라는 비단백질 아

미노산을 생합성하여 천연적인 방어기작을 갖는 식물이다(Rosenthal, 1982). 지금까지 보고된 *Canavalia* 속의 질소고정 공생관계에 대한 연구로는 *Canavalia*로부터 3종 7균주가 분리되었다는 보고(Norris, 1965)와 작두콩(*Canavalia gladiata*)의 내생균주는 조생균과 만생균의 중간형태라는 보고(Lin and Ng, 1979)외에는 별로 없는 실정이며 우리나라에서는 해너콩의 발아와 성장시 canavanine의 이용과 canavanase의 활성에 대한 보고(Kwon *et al.*, 1986)가 있을 뿐 공생관계에 대한 체계적인 연구는 전혀없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 해너콩과 *Rhizobium* 간의 질소고정 공생관계에 대한 연구의 일환으로 해너콩의 뿌리혹으로부터 내생균주를 분리하고 분리균주가 진정한 공생균주임을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

뿌리혹 및 종자

제주도 토끼섬에 자생하는 해너콩 근락을 '87년 8월 중순, '87년 12월 하순 및 '88년 7월 중순에 현장답사하여 뿌리혹 및 씨앗을 채집하여 얼음상자에 넣고 실험실로 운반한 후, 씨앗은 4°C 인 냉장실에 보관하여 실험에 사용하였다.

뿌리혹의 형태 관찰

뿌리혹의 외부 형태는 해부현미경으로 관찰하고 내부구조는 뿌리혹을 파라핀에 매립하여 마이크로 톰으로 자른 후 뿌리혹 절편을 aniline blue 로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 뿌리혹 내부에 존재하는 내생균주의 형태는 Tu(1975)의 방법에 따라서 뿌리혹 절편을 마련하여 Cambridge stereoscan S4 SEM 으로 10 kw 에서 관찰하였다.

내생균주의 분리

채집한 해너콩의 뿌리혹 및 유도된 뿌리혹으로부터 내생균주의 분리는 Jordan(1984)의 방법에 따라 행하였다. 선택배지인 YEM 평판배지(mannitol 10g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, yeast extract 0.4g, agar 15.0g, per liter, pH 6.8)에 형성된 균체들 중에서 선별된 잠정균주는 사면배지(YEM 배지에 Na.Fe.EDTA 8mg, $CaCO_3$ 40g 을 첨가한 배지)에 옮겨 4°C에서 보관하였다.

분리균주의 형태적 및 생리적 특성

YEM 평판배지에서 형성된 균체의 형태적인 특징은 육안으로 관찰하였고 분리균주의 형태적인 특징은 1% phosphotungstic acid (pH 7.0)로 negative staining 하여 JEOL-120 CXII 로 80 kw 에서 관찰하였다. 분리균주의 생리적인 특징은 Jordan의 동정표(1984)의 일부에 대하여 조사하였는데 생장속도, 염에 대한 내성 및 배지의 pH 와 온도에 따른 생장은 Vincent *et al.* (1979)의 방법에 따라 조사하였으며 탄소원 이용실험은 Norris(1965)의 방법에 따라 행하였다.

종자 발아 및 유식물 배양

해너콩의 종자는 멸균 증류수로 세척한 후 95% ethanol에서 5분, 10% sodium hypochloride에 10분간 처리하고 멸균 증류수로 세번 세척하여 표면 살균하였다. 이 종자를 5ml의 멸균 증류수와 멸균 여과지가 있는 페트리 접시(9×1.5cm)에 옮겨 28°C의 암소에서 3일간 발아시켰다. 발아된 유식물은 1.5cm 길이로 틸을 낸 스폰지에 끼워 멸균된 Hoagland's 용액을 채운 비이커에 옮겨 뿌리

부분의 빛을 차단하여 15일간 배양하였다. 2엽이 나온 해너콩은 hydroball로 채워진 화분(10.5×13cm)에 옮겨 배양액을 매일 일회씩 공급하면서 온실에서 배양하였다(Lee and Kwon, 미발표 자료). 배양액은 McKnight 용액[$CaSO_4 \cdot H_2O$ 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.3g, Na.Fe.EDTA 8mg, 1 ml / micronutrient solution (H_3BO_4 2.86g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2.08g, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.08g, Na_2MoO_4 0.11g, D.W. 1/) D.W. 1/ pH 6.8]을 4배 희석하여 사용하였다.

뿌리혹 형성 유도

뿌리혹의 형성을 유도하는 실험은 해너콩을 화분으로 옮긴 후 4일째에 실시하였다. 질소원이 결핍된 배양액 1/에 현탁배양한 분리균주 1ml을 섞어서 화분에 부어 주어서 접종시켰으며 질소원이 결핍된 배양액을 매일 1회씩 공급하면서 식물의 성장과 뿌리혹의 형성을 1주일 간격으로 조사하였다.

결과 및 고찰

뿌리혹 및 내생균주의 특성

해너콩 근락에서 채집한 뿌리혹은 거의 둥근형태이며 최대 크기는 10mm×10mm였다(Fig. 1A). 자생지에서 관찰한 해너콩은 여름에는 완전한 뿌리혹과 속이 빈 뿌리혹을 함께 가지고 있었으나 겨울에는 속이 빈 뿌리혹만을 가지고 있었다. 속이 빈 뿌리혹은 뿌리혹 유도실험에서 접종 후 6주만에 관찰할 수 있었다(Fig.1B). 채집한 뿌리혹의 종단면은 감염부위가 중심부에만 편재되어 있었고 유관속계가 이 부위를 둘러싸고 있음을 보여주었다(Fig.2). 이러한 조직의 배열은 제한적 성장을 하는 뿌리혹의 특징(Sprent, 1979)과 동일하여 해너콩의 뿌리혹이 대두, 땅콩, 광저기의 뿌리혹처럼 제한적인 성장을 하고 있음을 알 수



Fig. 1. Dissect micrographs of collected nodules(A) and empty nodule(B) six weeks after inoculation ($\times 6$).

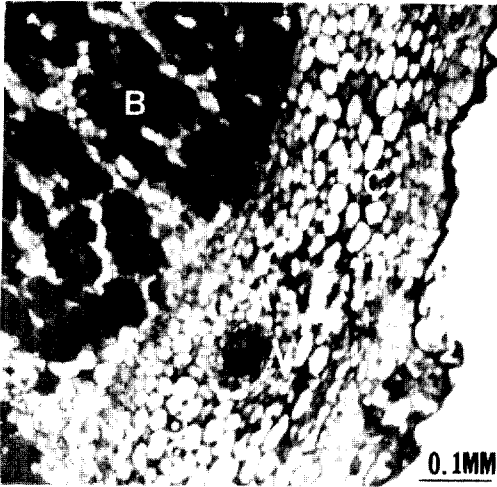


Fig. 2. Light micrograph of nodule section. Vascular bundle(V) is in the cortex(C) outside the infected tissue whose bacteroid-containing cells are stained densely(B).

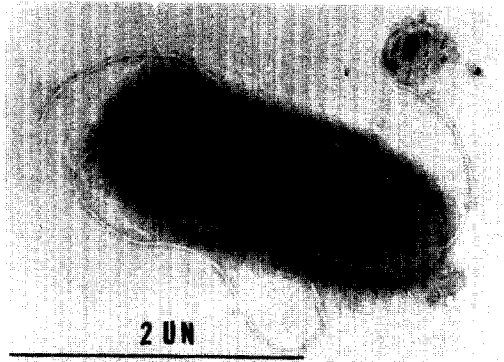


Fig. 4. Transmission electron micrograph of negative stained isolate, showing three peritrichous flagella.

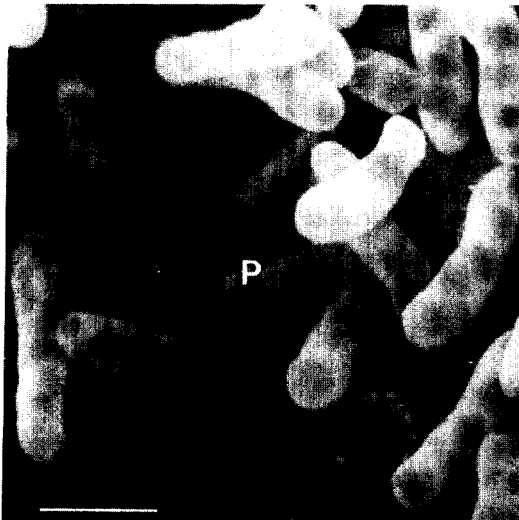


Fig. 3. Scanning electron micrograph of root nodule showing rod or swollen rod bacteroids in an infected cell. Each bacteroid contains large polyhydroxybutyrate-like granules(P).

있었다. 내생균주는 0.3-0.7 μm 정도인 간상 및 곤봉형이었으며 내부에는 polyhydroxybutyrate (PHB)로 보이는 결정체가 있었다(Fig.3). 이러한 형태적인 특징은 bacteroid와 유사하여 내생균주가 *Rhizobium*임을 알 수 있었다.

분리균주의 형태적 특징

분리균주는 Gram 음성으로 0.9×0.3 μm의 간

상이었으며 이들이 형성한 균체는 1.5-2.5mm로 불록하고 둥글며 크림색을 띠면서 불투명하였고 접액성이 있었다. 이러한 특징들은 *Rhizobium*과에 속하는 균주들의 특징과 동일하였다. 한편 분리균주는 세개의 편모가 세포전면에 분포하는 peritrichous 형의 편모배열을 하고 있어서(Fig.4) 분리균주가 monotrichous 형을 갖는 *Bradyrhizobium*이 아니며 *Rhizobium* 속에 속하는 균주임을 알 수 있었다.

분리균주의 생리적 특성

*Rhizobium*속에서 분리균주의 분류학적 위치를 조사하기 위하여 몇 가지 생리적 특성을 조사하였으며 이 결과를 이미 기재된 3종의 특성과 비교하였다(Table 1). 분리균주는 YEM 평판배지에서 산을 형성하면서 지름이 약 2mm인 균체를 형성하는데 이들이 걸렸으며 액체배지에서의 doubling time은 2-3시간이었다. 이러한 특징으로 분리균주가 만생종인 *Bradyrhizobium*이 아니고 조생종인 *Rhizobium*이라는 것을 확인할 수 있었다. YEM 평판배지에 접종한 분리균주는 39°C에서는 성장하지 못했으며 배지의 pH가 4.0 이하에서는 생장이 저해되며 5.0 이상에서 생장이 일어났으나 대조구인 6.8에서 보다는 9.5에서 생장이 촉진되었다. 또한 탄소원 이용실험에서는 glucose와 같은 단당류, sucrose와 같은 이당류 및 citrate와 같은 TCA의 중간대사산물을 모두 이용하였다. 일반적으로 *Rhizobium*균주는 0.9M의 염농도에서는 성장할 수 없는데(Jordan, 1984; Moflet and Colwell, 1968) 분리균주의 최적 염농도는 14 mM이었으며(자료는 제시하지 않았음) 340 mM(2%)의 염도에서 성장할 뿐 아니라 평판배지에서

Table 1. Characteristics differentiating *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, and *R. SNU003*

Characteristics	<i>R. leguminosarum</i> *	<i>R. meliloti</i> *	<i>R. loti</i> *	<i>R. SNU003</i>
Flagella arrangement				
Monotrichous	-	-	d	-
Peritrichous	+	+	-	+
Rapid growth on YEM				
with acid production	+	+	+	+
Growth at 39°C	-	d	-	-
Utilization of carbon sources				
glucose, arabinose, lactose, maltose	+	+	d	+
sucrose				
citrate	+	+	d	+
Growth in presence of 2% NaCl	-	d	-	+
Growth at pH;				
4.0	-	-	d	-
5.0	+	d	+	d
8.0	+	+	+	+
9.0	d	+	d	+
9.5	-	+	d	+

*From Jordan, D.C. (1984).

+ : 90% or more of strains are positive, - : 90% or more of strains are negative, d : 11-89% of strains are positive.

는 1.6M의 염에서도 비록 잠복기가 길어지지만 균체를 형성하였다. 이와 같이 고농도의 염에 대하여 내성을 갖는 균주들이 보고되었으며 (Sauvage *et al.*, 1983) 해너콩의 경우는 공생균주가 해너콩의 생태적 지위에 적응한 결과로 추측할 수 있겠다.

뿌리혹의 형성 유도

발아된 해너콩의 유식물에 분리균주를 접종한 결과 4주 후에 해너콩의 뿌리에는 최대 17개의 뿌리혹이 형성되었으며 (Fig.5) 유도된 뿌리혹들은 자생지의 뿌리혹들과 같이 측근에만 붙어 있었다 (Figs. 1A, 5). 이러한 특징은 *Rhizobium*이 틈새 (crack)로 침입하여 형성한 뿌리혹의 분포양상 (Rolf and Shine, 1984)이므로 해너콩의 경우도 틈새로 침입할 가능성이 있으나 이를 확인하기 위해서는 별도의 실험이 요구된다. 접종 후 3주까지는 대조구도 떡잎으로부터 질소원을 공급받아 이



Fig. 5. Root nodules four weeks after inoculation with the isolate.

H; hydroball, N; nodule

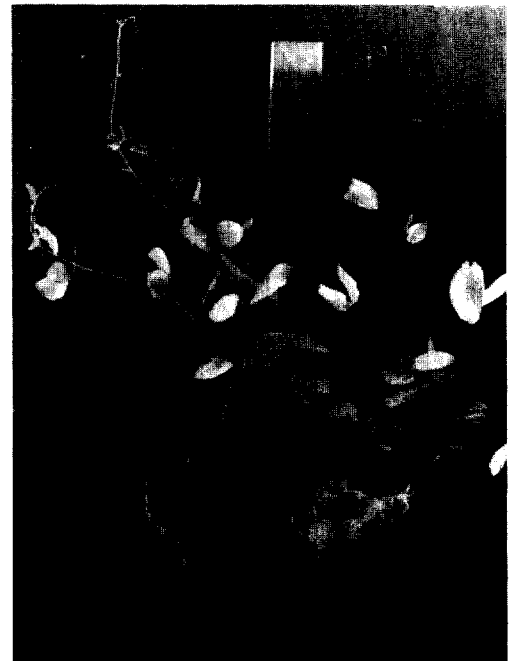


Fig. 6. Comparison of inoculated plant(left) with control plant(right), six weeks after inoculation. The ruler is 100 cm long.

용하므로 성장에 있어서 집중된 유식물과 별 차이가 없으나 비교구는 대조구에 비해 뿌리혹이 달리고 잎들은 보다 진한 녹색을 띠고 있었다. 그러나 시간이 경과함에 따라 성장에 현저한 차이가 있어 6주 후에는 뿌리혹을 가지는 식물은 100 cm 이상 성장하였고 잎들은 진한 녹색을 띠었으나 대조구는 60 cm 정도 성장하는데 그쳤으며 잎들은 노랗게 변하였다 (Fig.6). 이러한 결과로부터 접종에 사용한 분리균주에 의해서 뿌리혹이 유도되었으며 유도된 뿌리혹에서는 질소를 고정하고 식물체가 이를 이용하여 정상적인 성장을 하고 있음을 알 수 있었다.

내생균주의 재분리

유도된 뿌리혹으로부터 내생균주를 재분리하여 형태적 특성을 조사한 결과는 일차 분리균주의 특성과 동일하여 분리균주가 뿌리혹을 유도하였음을

알 수 있었다 (자료는 제시하지 않았음).

이상의 결과로부터 해너콩의 뿌리혹으로부터 분리한 *Rhizobium* 균주가 진정한 공생균주임을 확인할 수 있었으며 *Rhizobium* sp. SNU003으로 명명하였다.

지금까지 살펴본 분리균주의 형태적 및 생리적 특징을 기재된 3종의 *Rhizobium*의 특성과 비교해 보면 분리균주는 편모배열로 보아서는 *R. leguminosarum*, *R. meliloti*와 가까우나 39°C에서 성장하지 못하는 면에서는 *R. leguminosarum*의 특성을, 염에 대한 내성과 pH 9.5의 배지에서 성장하지 못하는 면에서는 *R. meliloti*의 특성을 가지고 있다. 따라서 분리균주의 분류적 위치를 확립하기 위해서는 보다 많은 생리적 특성조사, 숙주범위 조사 및 DNA-DNA 혼성화 실험 등이 필요하다고 하겠다.

적 요

형태적 특징으로 판단한 결과 해너콩 뿌리혹은 제한적 성장을 하였고 내생균주는 *Rhizobium*-bacteroid였다. 분리된 내생균주는 세포전면에 걸쳐서 편모를 갖는 점과 몇 가지 생리적 특성면에서 *R. leguminosarum*과 *R. meliloti* 모두와 유사하였다. 분리균주로 접종시킨 해너콩 유식물이 유도된 뿌리혹을 가지고 있고 대조구에 비해 정상적인 성장을 보여서 분리균주의 감염성과 질소고정 능력을 확인하였다. 유도된 뿌리혹으로부터 재분리한 내생균주의 형태적 특성은 일차 분리균주와 동일하여 일차 분리균주에 의해 뿌리혹이 유도되었음을 확인하였다. 이상의 결과로부터 해너콩의 뿌리혹에서 분리한 *Rhizobium* 균주가 진정한 공생균주임을 확인하였으며 *Rhizobium* sp. SNU003으로 명명하였다.

사 사

본 연구는 목격기초연구비 (870514)의 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. Deley, J. and A. Rassel. 1965. DNA base composition, flagellation, and taxonomy of the genus *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* **41**, 85-91.
2. Gibbons, A.M. 1980. Methods for legumes in glass house and controlled environment cabinets. In, *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. F.J. Bergerson. (ed.). Wiley, New York. pp.139-184.
3. Gibbons, A.M. and K.F. Gregory. 1972. Relations among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *J. Bacteriol.* **111**, 129-141.
4. Graham, P.H. 1964. Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by *Rhizobia* using an agar plate method. *Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **30**, 68-72.
5. Jordan, D.C. 1984. Rhizobiaceae. In, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. R.G.F. Murry, et al. (eds.). Williams Wilkins, Baltimore. pp.234-242.
6. Kwon, Y.M., H.C. Chung, S.C. Koh and Y.N. Hong. 1986. On utilization of canavanine and activity of canavanase during germination and growth of *Canavalia lineta* (L.) DC., *Korean J. Bot.* **29**, 85-94.
7. Lim, G. and H.L. Ng. 1977. Root nodules of some tropical legumes in singapore. *Plant and Soil.* **46**, 317-327.
8. Moflet, M. and R.R. Colwell. 1969. Adansonian analysis of the Rhizobiaceae. *J. Gen. Microbiol.* **51**, 245-266.
9. Norris, D.O. 1965. Acid Production by *Rhizobium*; An unifying concept. *Plant and Soil.*, **12**, 143-166.
10. Puhler, A. 1983. *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Springer-Verag. New York. pp.164-219.
11. Rolf, B.G. and J. Shine. 1984. *Rhizobium*-Leguminosae symbiosis. In, *Genes Involved in Microbe-Plant Interaction*. D.P.S. Verma and T. Hohn (eds.). Springer-Verlag. New York. pp. 95-121.
12. Rolf, B.G. and P.M. Gresshof. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant*

- Physiol.* **39**, 297-319.
13. **Rosenthal, G.A.** 1982. Toxic constituents and their related metabolites. In, *Plant Nonprotein Amino and Imino Acids*. (ed.). Academic Press. London and New York. pp. 56-156.
 14. **Sauer, J.** 1964. Reversion of *Canavalia*. *Brittonia*. **16**, 106-181.
 15. **Sauvage, D., J. Hamelin and F. Larher.** 1983. Glycine betaine and other structurally related compounds improve salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Plant Sci. Let.* **31**, 291-302.
 16. **Sprent, J.I.** 1979. The biology of nitrogen fixing organisms. McGraw-Hill Co., New York. pp.13-25.
 17. **Tu, J.C.** 1975. Rhizobial root nodules of soybean as revealed by scanning and transmission electron microscopy. *Phytopathology*. **65**, 447-454.
 18. **Vincent, J.M., P.S. Nutman and F.A. Skinner.** 1979. The identification and classification of *Rhizobium*. In, *Identification Methods for Microbiologists*. F.A.V. Skinner and L. Lovelock (eds.). *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser.* **14**, Academic Press. New York. London.

(Received September 27, 1989)