

별노랑이로부터 *Rhizobium loti*의 분리 동정 및 그 특성

소병인¹ · 이강련 · 윤경하¹ · 고상균* · 이영록²

¹대전대학교 미생물학과

²순천향대학교 생물학과

*고려대학교 생물학과

대전 지역에서 자생하는 별노랑이(*Lotus corniculatus* var. *japonicus*)의 뿌리혹으로부터 생장속도가 빠른(fast-growing) 5균주를 분리하였다. 분리된 공생균주들의 형태적, 생리적 특성 및 뿌리혹형성 실험을 통하여 이 균주들은 *Rhizobium loti*로 동정되었다. 분리균주로 접종시킨 별노랑이 유식물에서 뿌리혹을 형성하였으며, 대조구와 비교하였을 때 정상적인 성장을 하는 것으로 보아 질소고정능을 갖는(effective) 뿌리혹을 형성함을 알 수 있었다. 유도된 뿌리혹으로부터 재분리된 공생균주의 형태적 특성 및 항생제 내성에 대한 조사로부터 이들 뿌리혹은 1차 분리균주에 의해 형성된 것임을 알 수 있었다. 또한 이들은 *Lotus corniculatus*에서도 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하였다. 분리균주 중 *R. loti* TUS2, TUS5 그리고 TUS8은 calcofluor-binding exopolysaccharide(EPS)를 생성하였다.

KEY WORDS □ *Lotus corniculatus* var. *japonicus*, *Rhizobium loti*, nodulation test, calcofluor-binding EPS

척박한 토양에서도 잘자라는 콩과식물인 birds-foot trefoil(*Lotus corniculatus*)은 목초로서 그 이용 가치가 높아 우리나라에서도 도입되어 사용되고 있다. 한편 국내에는 이와 유사종인 별노랑이(*Lotus corniculatus* L. var. *japonicus*)가 자생하고 있으며 이 별노랑이 역시 전초를 사료로서 사용하고 있다. *Lotus corniculatus*의 뿌리혹으로부터 생장속도가 빠른(fast-growing) 것과 생장속도가 느린(slow-growing) 두 종류의 공생균주가 분리되었는데, 그 중 생장속도가 빠른 *Lotus Rhizobium*을 *Rhizobium loti*로 동정하였다(12). *R. loti*는 여러종의 *Lotus*에서 질소고정능을 갖는 뿌리혹(Nod⁺ Fix⁻)을 형성하는가 아니면 질소고정능이 결여된(ineffective) 뿌리혹(Nod⁻ Fix⁻)을 형성하느냐에 따라 2개의 군으로 나뉜다(24). 전자에 해당하는 제 1군의 표준균주인 NZP2037은 여러 종의 *Lotus* 식물에서 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하지만 후자에 해당하는 제 2군의 표준균주인 NZP2213은 *Lotus corniculatus* 와 *Lotus tenuis*에서만 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하며 다른 *Lotus* 종에서는 질소고정능이 결여된 뿌리혹을 형성한다. 최근에는 이 *R. loti*가 한정형(determinate) 뿌리혹을 형성하는 *Lotus* 외에도 지속형(indeterminate) 뿌리혹을 형성하는 *Leucaena leucocephala*에서도 뿌리혹 형성이 가능한 것으로 밝혀졌다(25).

Lotus corniculatus-Rhizobium loti 체제는 뿌리혹 특이 식물 단백질(nodulin)을 만드는 유전자 발현의 조절연구에 가장 적합한 체제로 여겨지고 있다(13).

*Lotus corniculatus*는 뿌리로부터 완전한 식물체로의 재생이 가능하여 *Agrobacterium rhizogenes*를 매개로 뿌리혹 특이 식물 단백질의 유전자를 이 식물에 이입하여 이들 유전자 발현의 조절 등을 규명할 수 있는 좋은 재료로 사용할 수 있다.

*Rhizobium*에 의해서 생산되는 외세포성 다당류(extracellular polysaccharide, EPS)와 표면성 다당류(surface polysaccharide)는 세균세포와 이들이 처한 환경사이의 경계면을 이루는 복합 거대분자이다. *Rhizobium-legume*의 공생관계를 이루기 위한 복잡한 일련의 상호작용과정에서 이들 다당류 중 일부가 질소고정능을 갖는 뿌리혹 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 중 *Rhizobium meliloti*에서는 산성의 calcofluor-binding EPS(8, 20)가, 다른 *Rhizobium*의 경우 산성의 EPS(2-4, 6)와 lipopolysaccharide(LPS)(22) 그리고 β -1,2-glucan(10) 및 peptidoglycan-bound polysaccharide(14) 등이 알려져 있다. 최근에 *R. loti* NZP2037에 있어서 calcofluor-binding EPS의 생성능이 결여된 돌연변이는 한정형 뿌리혹을 형성하는 숙주식물인 *Lotus pedunculatus*에서 야생균주와 마찬가지로 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하였으나 지속형 뿌리혹을 형성하는 숙주식물인 *Leucaena leucocephala*에서는 질소고정능이 결여된 뿌리혹을 형성하는 것으로 밝혀졌다(11). 이것은 *R. loti*의 calcofluor-binding EPS는 지속형 숙주에서만 질소고정능을 갖는 뿌리혹 형성에 관여함을 의미한다.

우리나라에서는 콩과식물과 *Rhizobium* 사이의 공

생관계에 관한 연구(17, 18)가 활발하지 않으며, 특히 뿌리혹의 형성 및 *Rhizobium*과 콩과식물사이의 상호역할에 대해서는 그 연구가 전무한 실정이다. 몇 안되는 재분화 가능한 콩과식물 중의 하나인 *Lotus corniculatus*와 *R. loti*가 그와 같은 연구를 수행 가능하게 해주는 체제이다.

본 연구는 국내 서식하고 있는 벌노랑이의 뿌리혹으로부터 공생하는 세균을 분리하고, 이로부터 분리된 공생균주의 형태적, 생리적 특성을 조사하고 뿌리혹 형성 실험을 통하여 동정하고, 또 다른 특성으로 이들 분리균주들의 calcofluor-binding EPS 생성여부를 조사하였다.

재료 및 방법

식물채집

대전근교의 들과 야산에 자생하는 벌노랑이를 채집하여 배양실에서 키우고 종자는 채취하여 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다.

공생균주의 분리

채집한 벌노랑이 뿌리혹을 수확하여 표면에 붙어 있는 토양을 제거하기 위해 증류수로 깨끗이 씻어낸 후 95% 에탄올에 잠시 담구어 둔 후 0.1% HgCl₂-HCl 용액으로 옮겨 15분간 표면을 살균하였다. 곧 이어 멸균증류수로 여러번 세척한 다음 이 뿌리혹을 잘게 부수어 YMA(Yeast Manitol Agar) 배지(26)에 도말하여 28°C에서 배양한 후 단일 균락을 얻어 순수 분리한 후 YMA에 보존하여 이 실험에서 사용하였다.

분리균주의 동정

분리균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(15)에 따라 형태적 생리적 특성을 조사하고, 염에 대한 내성 및 배지의 pH와 온도에 따른 성장은 Vincent의 방법(26)에 따라 조사하였으며, 탄소원 이용실험은 Norris의 방법(23)에 따라 행하였다.

항생제 내성측정

실험에 사용한 항생제는 단백질합성을 억제하는 클로람페니콜(chloramphenicol)과 스트렙토마이신(streptomycin) 그리고 테트라사이클린(tetracycline)과 핵산합성을 억제하는 날리딕산(nalidixic acid), 세포벽 합성을 억제하는 암피실린(ampicillin)과 페니실린(penicillin), 세포투과성이나 단백질합성을 방해하는 네오마이신설페이트(neomycin sulfate)과 카나마이신(kanamycin) 등이었으며, 이들의 여러 농도에 대한 내성을 조사하여 공생균주 재분리시 표지로 사용하였다.

뿌리혹 형성실험

뿌리혹 형성실험은 시험관 방법 및 변형된 Leonard jar(26)를 사용하였는데, 먼저 종자를 95% ethanol에서 5분, 2% sodium hypochlorite에 10분간 처리한 다음 멸균 증류수로 여러번 세척하여 종자의 표면을 살균하였다. 이 종자를 분리균주의 배양액을 물린 후 멸균된 vermiculite가 든 시험관 또는

Leonard jar에 옮겨 심었다. 이것을 26°C ~ 16시간-명상상태와 22°C ~ 8시간-암상상태의 주기를 갖는 식물생장기에서 키웠다. 시험관이나 Leonard jar에 주기적으로 N-free 배양액(watering solution)(26)을 공급하였고 질소원 첨가 대조구에는 10 mM NaNO₃이 첨가된 N-free 배양액을 공급하였다.

공생균주 재분리

뿌리혹 형성실험에서 생성된 뿌리혹으로부터 위에서 서술된 방법으로 공생균을 분리하여 형태학적 특징 및 항생제 내성을 표지로 사용하여 동일한 균주에 의해 생성된 뿌리혹인지 그 여부를 확인하였다.

Calcofluor-binding EPS의 생성조사

calcofluor-binding EPS 생성여부는 0.02%의 calcofluor가 함유된 S20 한천배지(5)에서 확인하였으며 액체배양시는 5 ml TY배지(1)에서 2일 진배양한 후 이 진배양액을 5 ml의 S20 배지에 100배 희석되게 접종하여 2일 배양하였다. 이렇게 배양한 배양액의 각각 1 ml/을 원심분리한 후 상등액과 침전물을 따로 수확하여 Calcofluor의 최종농도가 0.02%가 되도록 첨가하여 형광여부를 조사하였다. 형광검출은 자외선을 조사하여 형광빛을 발하는지 여부로 판별하였다.

전자현미경 관찰

주사전자현미경은 YM액체배지에서 자란 균주를 수확하여 2% glutaraldehyde로 1시간 전 고정시킨 후 1% OsO₄로 고정한 후 alcohol 탈수시킨 다음 gold coating하여 Akashi Selsakusho 주사전자현미경으로 관찰하였고, 투과전자현미경은 2% phosphotungstic acid로 음영염색하여 JEOL 10DS형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

분리균주의 형태학적 특징

직경이 1~2 mm의 전형적인 한정형의 벌노랑이 뿌리혹으로부터 5균주를 순수분리하였으며 이들 분리한 균주의 형태적 특성을 조사하였다. 분리균주 모두 약 1.0×2.0 μm 크기의 막대형(Fig. 1A)이었고 gram-negative로 나타났다(Table 1). 이들은 운동성을 갖는 polar 또는 subpolar형의 편모를 갖고 있었다(Fig. 1B). YMA에서 이들 내지 삼일 배양하였을 때 직경이 약 1.5 mm 정도되는 우유빛의 둥글고 볼록한 균총을 형성하였으며 많은 점액성 물질을 지니고 있었다(Table 1). 이러한 특징은 *Rhizobium*과에 속하는 균주들의 특징과 동일하였다.

분리균주의 생리적 특징

분리된 균주의 생리적 특성은 표준균주인 *Rhizobium loti* NZP2213(12)을 대조구로 사용하여 조사하였다. 분리된 균주들은 호기적 성장을 하였고, YM액체배지에서 48시간에 최대생장율을 보였으며 doubling time은 3~4시간이었다. YMA 평판배지에 접종한 균주는 39°C 이상에서는 성장하지 못하였고, pH 4.0 이하에서 성장하지 못하였으나 TUS2는 pH 4.

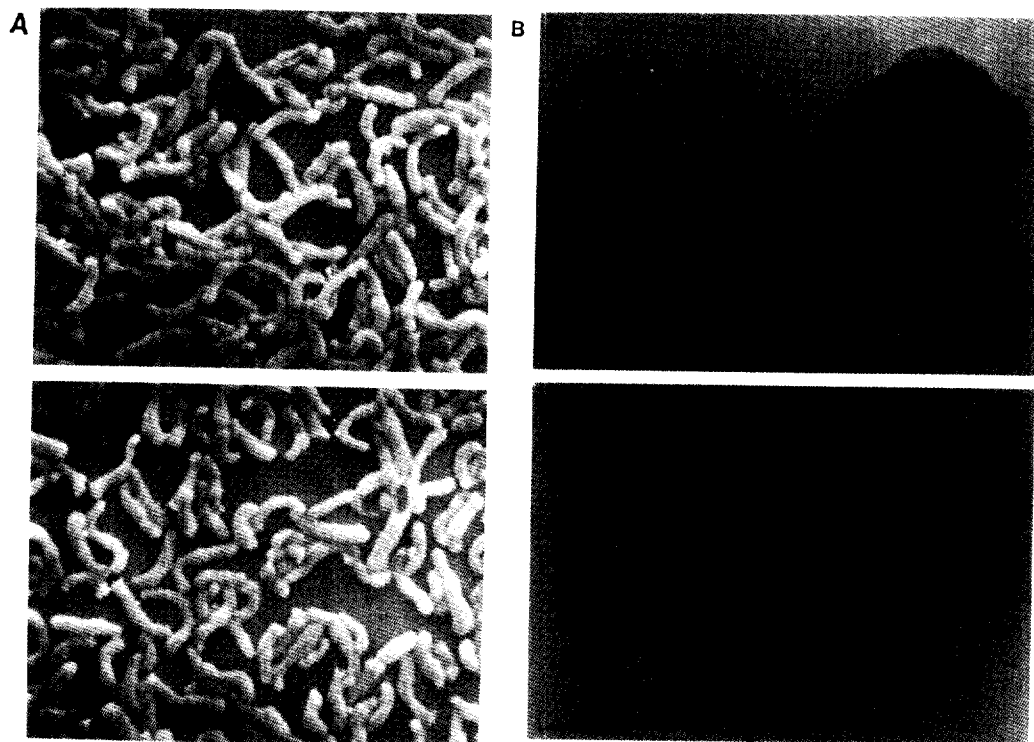


Fig. 1. Scanning electron micrograph(A) and transmission electron micrograph(B) of the cell of the isolated strain TUS6(a) and *R. loti* NZP2213(b). Bar is equivalent to 1 μ m.

Table 1. Morphological characteristics of the isolated strains

Content	Characteristics
Shape	rod
Gram stain	negative
Flagellum	polar(TUS2) or subpolar(TUS1,5,6,8)
Motility	positive
Capsule production	positive

0에서도 성장을 하였다. 또한 TUS5와 TUS8을 제외한 나머지 균주들은 2% NaCl에서 성장하지 못하였다 (Table 2). 그리고 탄소원 이용실험에서는 포도당과 같은 단당류를 모두 이용하였으며 유당과 같은 이당류는 TUS6를 제외한 나머지 균주들은 이용하였다 (Table 2). 분리 균주의 형태 및 생리적인 특성은 fast-growing *Rhizobium loti*와 거의 일치하는 것으로 나타났다.

항생제 내성실험

Table 2. Physiological characteristics of the isolated strains

Content	Strain No.					
	TUS1	TUS2	TUS5	TUS6	TUS8	NZP2213
Rapid Growth on YMA	+	+	+	+	-	+
Growth at 39~40°C	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.0	-	+	-	-	-	-
11.0	-	-	-	-	-	-
Utilization of Glucose	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	-	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	-	+	+
Sucrose	-	+	+	+	-	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Growth in presence of 2% NaCl	-	-	+	-	+	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-
3-Ketolactose production	+	+	+	+	+	+

Table 3. Antibiotic resistances of the isolated strains

Antibiotics	TUS1	TUS2	TUS5	TUS6	TUS8	NZP2213
Ampicillin	R*	R	R	R(25)***	R	R
Chloramphenicol	S**	S	S	S	S	S
Kanamycin	R	R	R	R(6.25)	R	R
Nalidic acid	R	R	R	R	R	R
Neomycin sulfate	R	R	R	R	R	R
Penicillin	R(6.25)	R(6.25)	R	S	S	S
Streptomycin	R	R	R	R	R	R
Tetracyclin	S	S	S	S	S	S

*: Resistance, **: Sensitive(3.125 µg/ml), ***: Minimal inhibitory concentration(µg/ml)

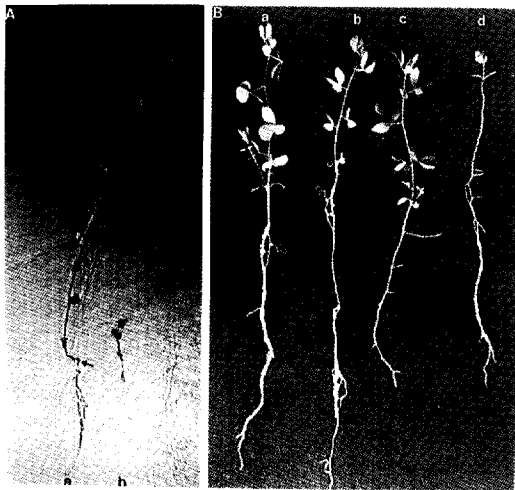


Fig. 2. Nodulations and growth responses of *Lotus corniculatus* var. *japonicus* inoculated with strain TUS2(A) in test tube and *Lotus corniculatus* inoculated with strain TUS6(B) in Leonard jar. Plants were photographed at 28 days(A) and at 21 days(B) after inoculation.(A-a: TUS2, A-b: uninoculated control; B-a: NZP 2213, B-b: TUS6, B-c: +N control, B-d: uninoculated control)

분리 균주의 항생제에 대한 내성은 테트라사이클린과 클로람페니콜에 대해서는 3.125 µg/ml의 농도에서 전혀 내성을 나타내지 않았고, 암피실린에 대해서는 50 µg/ml, 스트렙토마이신에 대해서는 12.5 µg/ml, 네오마이신 셀웨이트에 대해서는 12.5 µg/ml, 날리딕식산에 대해서는 >200 µg/ml, 카나마이신에 대해서는 12.5 µg/ml의 농도에서 대부분 내성을 나타내었다(Table 3).

뿌리혹 형성실험

발아된 벌노랑이 유식물에 분리균주를 접종하여 뿌리혹 형성을 유도한 바 뿌리혹이 형성됨을 확인할 수 있었으며 유도된 뿌리혹은 측근에 주로 붙어 있었고 분리된 균주를 접종하지 않은 식물과의 성장을

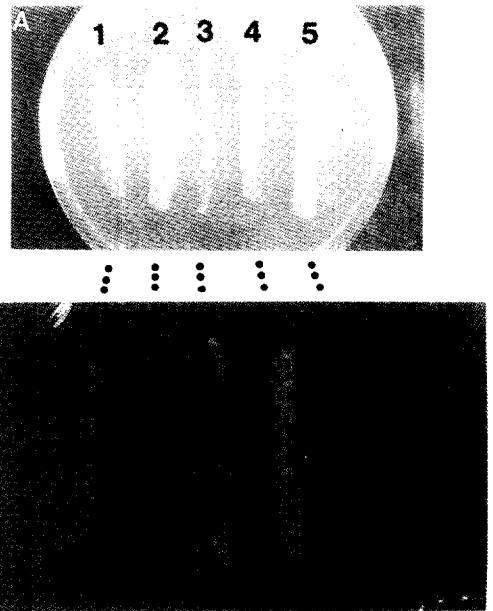


Fig. 3. Fluorescence of the isolated strains on S20-calcofluor agar viewed under visible light(A) and shortwave UV-light(B).(1: TUS1, 2: TUS2, 3:TUS5, 4: TUS6 and 5: TUS8)

비교하여 볼때 이들은 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하였다(Fig. 2A). 또한 이들은 *Lotus corniculatus*의 유식물에 접종하여 뿌리혹 형성여부를 조사한 바 이 식물에서도 뿌리혹이 형성되었으며, *Rhizobium*을 감염시키지 않고 대신 질소원(NaNO₃)을 공급한 대조구와 비교하였을 때 성장의 정도가 비슷한 것으로 보아 질소고정능을 갖는 뿌리혹이 형성된 것이라고 여겨진다(Fig. 2B).

공생균주의 재분리

유도된 뿌리혹으로부터 재분리한 균주의 형태적 특성과 항생제 내성을 조사한 결과 일차 분리균주의 특성과 동일하여 분리균주가 뿌리혹을 유도한 진정한 공생균주임을 알 수 있었다(자료 제시하지 않음).

Calcofluor-binding EPS의 생성

분리균주들 중 calcofluor-binding EPS를 생성하는 균주가 있는지 조사하기 위해 S20 calcofluor 한천배지와 S20 액체배지에 접종하여 배양후 형광을 발하는지 조사하였는데, S20 calcofluor 한천배지에서 TUS1과 TUS5 그리고 TUS6 만이 자외선하에서 형광을 발하였고(Fig. 3), 이들을 액체배양하였을 때는 상등액에서만 형광이 검출되었다. 따라서 이 3균주만이 calcofluor-binding EPS를 생성하는 것으로 나타났다.

고 찰

별노랑이로부터 분리된 공생균주들의 형태적 특성, 생리적 특성, 뿌리혹 형성실험 등의 결과 이들은 *Lotus corniculatus*로부터 분리된 표준균주 *Rhizobium loti* NZP2213의 특성과 대부분 일치하는 것으로 나타나 이들을 *Rhizobium loti*로 동정하였다. 이들 분리 균주들은 별노랑이 뿐만 아니라 *Lotus corniculatus*에서도 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하였다. 이들이 여러종의 *Lotus*와 *Leucaena leucocephala*에서 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하는 *R. loti* NZP2037 균에 속하는지, 아니면 *Lotus tenuis*와 *Lotus corniculatus*에서만 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하고 다른 *Lotus*종과 *Leucaena leucocephala*에서는 질소고정능이 결여된 뿌리혹을 형성하는 *R. loti* NZP2213 균에 속하는지는 이들 식물에서의 뿌리혹 형성실험을 통해서 알 수 있을 것이다.

별노랑이로부터 분리된 5균주 중 3균주 TUS1, TUS5 그리고 TUS6은 calcofluor-binding EPS를 생성하였고 나머지 두 균주들은 생성하지 못하였다. 몇몇 예외는 있지만(4, 19), EPS 합성은 지속형의 숙주식물의 뿌리혹 형성에 필요(7, 10, 20, 21)하나 한정형의 숙주식물에서는 필요하지 않다(2, 6, 16)는 연구 결과들이 있다. 한정형의 뿌리혹을 갖는 *Lotus corniculatus*에서 분리된 *R. loti* NZP2037은 calcofluor-binding EPS를 생성하며 이들의 생합성에 일어난 Tn5 돌연변이의 경우에서 있어서 한정형의 숙주에서는 야생형과 동일하게 질소고정능을 갖는 뿌리혹을 형성하나 지속형의 숙주에서는 야생형과는 달리 질소고정능이 결여된 뿌리혹이 형성되었다(11). 이것은 calcofluor-binding EPS가 별노랑이나 *Lotus corniculatus* 뿌리혹 형성에 있어서는 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 1990년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 지방대육성 학술연구조성비에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

1. Beringer, J.E., 1974. R factor transfer in *Rhizo-*

2. Borthakur, D., C.E. Barber, J.W. Lamb, M.J. Daniels, J.A. Downie and A.W.B. Johnston, 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans by *R. phaseoli* and is corrected by cloned DNA from *Rhizobium* or the phytopathogen *Xanthomonas*. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 320-323.
3. Chakravorty, A.K., W. Zurkowski, J. Shine and B. G. Rolfe, 1982. Symbiotic nitrogen fixation: molecular cloning of *Rhizobium* genes involved in exopolysaccharide synthesis and effective nodulation. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 585-596.
4. Chen, H., M. Batley, J. Redmond and B.G. Rolfe, 1985. Alternation of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host range *Rhizobium* due to changes in exopolysaccharide synthesis. *J. Plant Physiol.* **120**, 331-349.
5. Chua, K.Y., C.E. Pankhurst, P.E. Macdonald, D. H. Hoperoff, B.D.W. Jarvis and D.B. Scott, 1985. Isolation and characterization of transposon Tn5-induced symbiotic mutants of *Rhizobium loti*. *J. Bacteriol.* **162**, 335-343.
6. Diebold, R. and K.D. Noel, 1989. *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analyses and symbiotic behavior on three hosts. *J. Bacteriol.* **171**, 4821-4830.
7. Djordjevic, S.P., H. Chen, M. Batley, J.W. Redmond and B.G. Rolfe, 1987. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **169**, 53-60.
8. Finan, T.M., A.M. Hirsh, J.A. Leigh, E. Johansen, G.A. Kuldau, S. Deegan, G.C. Walker and E.R. Signer, 1985. Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell* **40**, 869-877.
9. Geremia, R.A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares and R.A. Ugalde, 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form β -(1,2) glucan. *J. Bacteriol.* **169**, 880-884.
10. Glazebrook, J. and G.C. Walker, 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* **56**, 661-672.
11. Hotter, G.S. and D.B. Scott, 1991. Exopolysaccharide mutants of *Rhizobium loti* are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host. *J. Bacteriol.* **173**, 851-859.
12. Jarvis, B.D.W., C.E. Pankhurst and J.J. Patel, 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 378-380.
13. Jensen, J.S., K.A. Marcker, L. Otten and J. Schell,

1986. Nodule-specific expression of a chimeric leghemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* **321**, 669-674.
14. Jones, W. T., P.E. MacDonald, S.D. Jones and C.E. Pankhurst, 1987. Peptidoglycan-bound polysaccharide associated with resistance of *Rhizobium loti* strain NZP2037 to *Lotus pedunculatus* root flavon. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2617-2629.
 15. Jordan, D.C., 1984. Family III. Rhizobiaceae, p. 234-242. In N.R. Krieg and J.G. Holt(ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 16. Kim, C.H., R.E. Tully and D.L. Keister, 1989. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium fredii* HH303 which are symbiotically effective. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1852-1854.
 17. Kim S.C. and An C.S., 1989. Isolation of symbiotic *Rhizobium* spp. strain from root nodule of *Canavalia lineata*. *Kor. Jour. Microbiol.* **27**, 398-403.
 18. Koh, S., 1992. Isolation of symbiont from root nodule of soybean(*Glycine max*) and molecular cloning of its *nod* genes. MS Thesis. Seoul National University.
 19. Law, I.J., Y. Yamamoto, A.J. Mort and W.D. Bauer, 1982. Nodulation of soybean by *Rhizobium japonicum* mutants with altered capsule synthesis. *Planta* **154**, 100-109.
 20. Leigh, J.A., E.R. Signer and G.C. Walker, 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6231-6235.
 21. Napoli, C. and P. Albersheim, 1980. *Rhizobium leguminosarum* mutants incapable of normal extracellular polysaccharide production. *J. Bacteriol.* **141**, 1454-1456.
 22. Noel K.D., K.A. Vandebosch and B. Kulpaca, 1986. Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead arrested development of infection threads. *J. Bacteriol.* **168**, 1392-1401.
 23. Norris, N.O., 1965. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. *Plant and Soil.* **22**, 143-166.
 24. Pankhurst, C.E. and W.T. Jones, 1979. Effectiveness of *Lotus* Root nodules. *J. Exp. Bot.* **30**, 1095-1107.
 25. Pankhurst, C.E., D.H. Hopcroft and W.T. Jones, 1987. Comparative morphology and flavolan content of *Rhizobium loti* induced effective and ineffective root nodules on *Lotus* species, *Luceana leucocephala*, *Carmichaelia flagelliformis*, *Ornithopus sativa* and *Cilianthus puniceus*. *Can. J. Bot.* **65**, 2676-2685.
 26. Vincent, J.M., 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

(Received September 2, 1992)

(Accepted October 7, 1992)

ABSTRACT: Isolation and Characterization of *Rhizobium loti* from *Lotus corniculatus* var. *japonicus*

So, Byung In¹, Kang Lyen Lee, Kyung Ha Yoon¹, Sang Kyun Koh* and Yung-Nok Lee²(Department of Microbiology, Taejon University, Taejon 300-716, Korea. ¹Department of Biology, Soonchunhyang University, Onyang 336-600, Korea and ²Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Five strains of the fast-growing endosymbionts were isolated from the nodules of *Lotus corniculatus* var. *japonicus* inhabited in Taejeon. From morphological and physiological characteristics and nodulation test, the isolated strains were identified as *Rhizobium loti*. Compared to the control plant, both *Lotus corniculatus* var. *japonicus* and *Lotus corniculatus* seedlings inoculated with the isolated strains, grew normally due to effective root nodule. The reisolated endosymbiont from the induced root nodule was confirmed identical to those of the first isolates by investigating antibiotic resistance and morphological characteristics. Three strains among the isolates, *R. loti* TUS1, TUS5 and TUS6 produced a calcofluor-binding exopolysaccharide.