

## 大豆-根瘤菌 共生에서 뿌리分泌物과 化學走性이 宿主認識에 미치는 影響\*

姜相載 · 朴愚喆

慶北大學校 農化學科

The Effect of Root Exudate and Chemotaxis on Host Recognition in  
Soybean-*Bradyrhizobium* Symbiosis

Sang Jai KANG · Woo Churl PARK

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

### Abstracts

This study was carried out to research the effect of the chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* KCTC 2422 and its mutant toward soybean root exudate and to elucidate the effect of the lectin of host specificity (Host Recognition) in soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis.

The results obtained were as follows:

The homogeneities of the purified lectins from soybean and pea seed was ascertained chromatographically and electrophoretically.

Gel electrophoresis of soybean lectin in the presence of sodium dodecyl sulfate appeared a single protein band, whereas pea lectin appeared two protein bands. Soybean lectin from 2 cultivars formed immunoprecipitin arcs at same position with anti-soybean lectin rabbit IgG, but pea lectin did not form immunoprecipitin lines with anti-soybean lectin rabbit IgG.

Chemotactic responses of KCTC 2422, LPN-100 and LCR-101 toward proline in capillary assays were 3.1, 1.3 and 1.0-fold above background, respectively.

The chemotactic responses of KCTC 2422, LPN-100, and LCR-101 toward Paldal crude root exudate in capillary assays were 3.5, 1.4 and 1.4-fold above background, respectively.

The present work shows that *B. japonicum* and its mutants are capable of very different responses toward root exudate fraction.

The chemotactic responses of KCTC 2422 was most with neutral fraction, least with anionic fraction and intermediate with cationic fraction.

The nitrogenase activity of soybean nodule was shown in 15days after inoculation with LCR-101. However, we couldn't find out the nodules when soybean was inoculated with

\* 본 연구는 1991년도 학술진흥재단 지방대학 육성 연구비의 지원에 의한 것임.

From these result we can suppose that the chemotaxis of *Bradyrhizobium* plays important the role of forming the nodule (host recognition) in the soybean-*B. japonicum* symbiosis.

## 緒 論

豆科作物-根瘤菌 共生에서 窒素固定の 機構 確立은 宿主細胞의 根瘤菌 兩者間의 生理 및 生化學의 特性을 밝힘에 있다고 생각된다.

生物學的 窒素固정에 對한 많은 研究 報告가 있었으나 根瘤菌과 豆科植物間 宿主 特異性을 갖는 初期 根瘤形成 段階가 아직까지 明確하게 밝혀져 있지 못한 實情이며, Bohool과 Schmidt(1974) 등이 單純한 細胞 表面 認識모 델을 提示하였으며, 또한 Bauer(1981)와 Dazzo(1976, 1980, 1984)는 宿主細胞와 根瘤菌間 Multiple signal의 相互交換을 強調한 complex모 델을 提案하였다.

한편, Ames(1980, 1981) 등은 Behavioral mutant인 *R. meliloti*는 宿主認識-感染-根瘤形成 過程에서 運動性 및 化學走性이 반드시 必須 不可缺한 要素는 아니나, 運動性 및 化學走性이 根瘤形成에 매우 有利하다고 報告한 바 있다.

또한 Caetano-Anollés(1988) 등은 根瘤菌의 運動性 및 化學走性이 根瘤形成에 미치는 影響을 報告하였는데 Wild type과 Nonmotile(Mot-), Nonchemotactic(che-)Mutant와 根瘤形成 比較 試驗한 結果, 同量의 根瘤形成을 爲하여서는 10-30배 더 많은 細胞數를 接種해 주어야 하며, 宿主 根毛 細胞에 接着된 根瘤菌細胞數도 Wild type이 Mutant보다 5-20배 더 많았다고 하였다. 이는 運動性 및 化學走性이 뿌리細胞와의 物理化學的 接觸을 有利하게 하여 感染에 適當한 部位를 提供받게 되고 그 結果, 効果的인 根瘤形成을 하도록 하는 役割을 가졌다고 할 수 있다. Halverson과 Sfacey(1986)는 根瘤形成 能力이 不振한 變異株에 Seed Lectin과 뿌리 分泌物을 處理한 結果 根瘤形成 能力이 相當히 回復된 結果를 보였으며 Currier와 Strobel(1976)은 뿌리에서 化學走性을 誘導하는 물질이 존재함을 報告하였다. Götz(1982) 등은 *R. meliloti*의 Amino acid 對한 化學

走性을 報告하였으며, Bowra(1992) 등은 *R. leguminosarum*의 糖에 對한 化學走性을 가지고 있음을 確認 報告하였다.

根瘤菌은 運動性이 있는 細菌이므로 運動性이 土壤 環境內에서 다른 微生物보다 더 有利하게 宿主植物에서 分泌된 誘引物質에 依해 誘導되어 宿主를 認識하게 되며, 이로서 宿主 特異性을 確立하는데 決定的 役割을 함이 分明하다.

따라서 本 研究는 Seed Lectin에 依한 宿主 特異性 形成 與否와 운동성 및 화학주성이 근 류형성에 미치는 영향과 lectin에 의한 숙주친 화성을 확인하기 위하여 뿌리 分泌物에 對한 化學走性이 根瘤形成 能力(宿主認識 過程)에 어떤 影響을 미치는가를 調査하여 몇가지 結果를 얻었기에 報告하고자 합니다.

## 材料 및 方法

### 1. Seed Lectin의 分離 및 精製

#### 가) 大豆의 Seed Lectin의 分離 및 精製

Seed Lectin의 分離는 Lis와 Sharon(1972)의 方法으로 다음과 같이 分離하였다. 즉, 脫脂 大豆粉 50g을 Phosphate buffered saline(PBS; NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/L, pH 7.2)液 250ml로 12時間 抽出한 後 10,000rpm에서 10分동안 遠心分離하여 沈澱物을 除去한 上澄液에 黃酸 암모늄을 少量씩 加하면서 30%로 飽和시키고 一夜 放置하였다. 遠心分離하여 上澄液을 다시 黃酸 암모늄을 70%로 同一한 方法으로 飽和시킨 後 4°C에서 日夜 放置한 後 遠心分離하여 沈澱物을 少量의 증류수로 용해시켜 蒸溜水와 PBS(pH 7.2)에서 各各 透析한 後 不溶物을 除去하고 上澄液을 精製用 粗Lectin으로 하였다.

上記의 方法으로 얻은 粗Lectin을 Sepharose-ε-aminocaproyl-β-Galactosamine Column (10cm×1cm)에 PBS(pH7.2)로 平衡시킨 後

PBS(pH7.2)로 Column을  $A_{280} < 0.02$ 가 될 때까지 充分히 洗滌하고 0.5M D-Galactose로 溶出시켜 Liener(1955)의 方法으로 血球凝集 反應을 測定하였다. 이때 溶出 速度는 24ml/hr였으며 分割當 4ml씩 모아 280nm에서 吸光度를 測定하였다.

#### 나) 豌豆 seed Lectin의 分離 및 精製

豌豆의 seed Lectin은 Diaz(1986) 등의 方法으로 다음과 같이 分離하였다. 즉 脫脂 粉末 50g을 250ml의 E Buffer(50mM Tris, 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 8.2)로 12時間 抽出하고 10,000rpm에서 遠心分離한 後 上澄液을 pH 5.0으로 調節하여 1次沈澱物을 除去하고 pH를 다시 7.3으로 調節한 後 黃酸 암모늄으로 55%로 飽和시켜서 沈澱物을 少量의 E buffer에 녹이고 蒸溜水와 同一 buffer에서 完全히 透析한 後 不溶物을 除去하고 上澄液을 精製用 粗 Lectin으로 하였다.

上記의 方法으로 分離한 粗 Lectin을 Sephadex G-75(4×20cm) affinity column chromatography를 行하여 0.2M D-glucose(50mM Tris, 150mM NaCl)로 溶出시켜 吸光度를 測定하고 溶出된 分割을 모아 凍結 乾燥하여 -20℃에서 保管하였다.

## 2. Root Exudate의 分離

均一한 大豆 種子를 精選하여 먼저 sodium hypochlorite溶液에서 5分間 殺菌하고 滅菌水로 깨끗이 洗滌한 後 殺菌된 vermiculite가 채워진 Pot에서 發芽시켰다. 幼根이 5cm程度 자랐을 때 Fähræus N-Free(表 1) 營養液 300ml가 들어 있는 小型 용기에서 無菌狀態로 10日, 20日, 30日間 培養한 後 溶液을 0.22 $\mu$  milipore로 濾過하고 凍結 乾燥하여 crude root exudate로 하였으며 Dowex 40(H<sup>+</sup>)과 Dowex 1(acetate)을 通過시켜 나온 分割을 Fraction I, Dowex 50(H<sup>+</sup> from)으로 부터 1M NH<sub>4</sub>OH溶液으로 溶출시킨 分割을 Fraction II, Dowex 1(acetate from)으로 부터 溶출시킨 分割을 Fractin III으로 各各 命名하였다.

## 3. Polyacrylamide겔 電氣泳動 및 SDS係 polyacrylamide 電氣泳動

Polyacrylamide겔 전기영동은 Davis(1964)의 方法에 따라 다음과 같이 行하였다. 즉 Separating gel은 7.5% acrylamide, stacking gel은 2.5% acrylamide로 하였으며 bromo phenol blue (BPB)를 tracking dye로 使用하여 電氣泳動하였다. SDS係 polyacrylamide電氣泳動은 Laemmli(1969)의 方法으로 하였다. 0.4% SDS를 含有하는 Tris-HCl buffer (pH 8.8)로 7.5% acrylamide gel을 調製하였으며 stacking gel은 Tris buffer(pH6.8)로 2.5% acrylamide gel을 調製하여 使用하였다. 試料는 0.1% SDS와 1% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol이 含有된 0.0625M Tris-HCl(pH0.8)에 녹여서 100℃에서 5分間 處理한 後 遠心分離하여 沈澱物을 除去하고 上澄液을 電氣泳動하였다.

電氣泳動 後 蛋白質 band는 coomssie brilliant R-250(以下 CBB)液으로 2時間 染色한 脫色시켜 確認하였다.

## 4. 免疫 電氣泳動 및 Ouchterlony Double Diffusion

免疫 電氣泳動은 Grabar와 Williams(1955)의 方法으로 다음과 같이 行하였다. Barbitone buffer(Na-barbital 12g, barbituric acid 4.40g, merthiolate 0.15g pH 8.2)로 1% agarose gel을 調製한 後 3mm 썸에 試料 20 $\mu$ l<sup>■</sup> 注入하여 100V에서 電氣泳動하였다. 電氣泳動後 中央홀을 만들어 anti-lectin rabbit IgG(2 $\mu$ g/ml)를 넣고 30℃에서 48時間 反應시킨 後 saline液으로 24時間 洗滌하여 amido black으로 染色하였다. 또한 이중면역확실행은 Baily(1984)의 方法으로 行하였다.

## 5. 根瘤菌과 Lectin의 結合性

根瘤菌과 Lectin의 結合 特異性を 알아보기 爲하여 Hudson(1989) 등의 方法으로 미리 Lectin에 fluorescence isothiocyanate(FITC)를 conjugation시켜 놓은 複合體(F/P=5.26)를

Bhuvanewari(1977) 등의 방법을若干變形하여結合시키고 螢光顯微鏡으로 確認하였다.

### 6. 標準菌株 및 變異株 分離

本 研究에 使用된 標準菌株 및 韓國科學技術院 遺傳子銀行에서 分讓받은 *Bradyrhizobium japonicum* KCTC 2422를 標準菌株로 使用하였으며 yeast extract mannitol(YEM)培地에서 菌株의 繼代 및 生理實驗을 行하였고 特異株 分離에는 *Rhizobium minimal medium*(RMM)을 使用하였으며 各各 그 組成은 表 1과 같다.

근류를 형성하지 않는 變異株의 分離는 Cannon(1980)의 方法에 따라 RMM基本培地에서 N-methyl-N'-nitrosoguanidin(NTG. 10mg/ml)을 培養液 10ml當 0.2ml를 添加하여 30分間 Incubation한 후 RMM固體培地에 100-300colony가 形成되도록 稀釋하여 塗抹하였다. 7日 培養한 後 良好한 colony를 選拔하여 Maier(1976) 등의 方法으로 根瘤形成 試驗을 行하여 根瘤를 전혀 形成하지 않은 菌株을 (Nod-) 選拔하였다. 化學走性이 없는 變移株의 分離는 Napoli와 Albershein(1980)의 方法으로 分離하여 各各 LPN-100과 LCR-101로 命名하였다.

### 7. Chemotaxis測定

根瘤菌의 化學走性은 Adler(1973)의 方法을 應用하여 Palleroni(1976)가 提案한 chemotaxis chamber(그림 1)를 自體 製作하여 使用하였다.

根瘤菌 培養體를 YEMG培地(表 1)에서 代數末期까지 培養한 遠心分離하여 3-4回 滅菌한 Saline液으로 洗滌하고 Chemotaxis buffer (10mM K-phosphate, 0.1mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH7.0)로 一定濃度(OD<sub>600</sub>=0.7)로 再 懸濁시켰다. 1 μl capillary tube를 利用하여 一定期間 incubation하여 滅菌數로 外部의 培養體를 除去한 後 capillary tube內로 들어온 細胞를 YEM-congo red 培地上(表 1)에 塗抹하여 colony를 計測하였다.

Table 1. Composition of media used this Experiment(g/L)

Components	YEM	RMM	YEMG	Fähraeus	PBS
Mannitol	10	2.0	5		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.44			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.34		0.1	0.20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>				0.15	1.15
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	0.25	0.2	0.12	
NaCl	0.1	0.01	0.1		8.0
KCl					0.20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		2.0			
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O		0.002			
Yeast extract	0.4	0.2	0.5		
Sodium gluconate			5.0		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O			0.16	0.1	
Fe-citrate					0.005
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0.001		2.86	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0.001		0.22	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O		0.0005		0.08	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O		0.0005		2.08	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0.0001		0.11	
FeNa-EDTA		0.001			
Agar	16	16			
pH	6.8	6.8	6.8	6.5	7.2

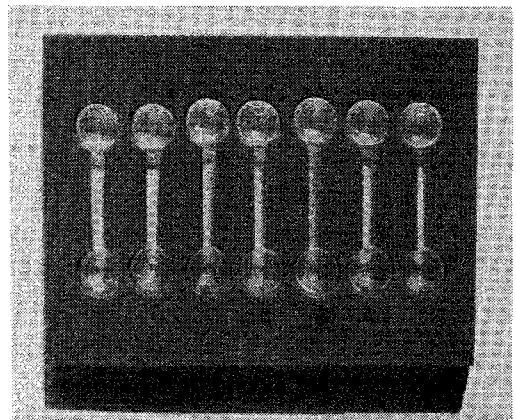


Fig. 1. Chemotaxis chamber for this experiments

### 8. 根瘤形成 試驗 및 Nitrogenase 活性度 測定

根瘤形成 試驗은 小型 pot를 利用하여 1週日 間隔으로 連續 殺菌한 土壤을 채우고 均一한

大豆 種子를 選別하여 殺菌 處理한 後 播種하였다. 7日 後 分離한 菌株을 ( $OD_{600}=0.8$ ) 適當하게 稀釋하여 10ml씩 接種하고 接種한지 7日, 15日, 20日, 30日 後 根瘤形成 程度 및 nitrogenase 活性도를 測定하였다. nitrogenase activity는 Acetylene 還元法(Hardy *etal* 1973)으로 porapak Q가 充鎮된 gas chromatograph (FID)에서 測定하였다.

## 結果 및 考察

### 1. Seed Lectin의 分離 및 精製

脫脂 大豆粉 50g에서 抽出한 粗 lectin을 Sepharose- $\epsilon$ -aminocaproyl galactosamine affinity column chromatography를 行한 結果는 그림 2와 같다. 30-70%로 沈澱시킨 粗蛋白質液을 affinity column으로 溶出시켰을 때 大部分의 蛋白質은 column에 吸着되지 않고, hemagglutination activity가 거의 나타나지 않았으며 0.5M D-galactose로 流出시킨 分劃은 5000-6000HU 程度의 hemagglutination activity를 나타내었다. 血球凝集 反應을 나타내는 分劃을 收集하여 透析하여 糖을 除去시키고 凍結 乾燥하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 保管하였으며 大豆 seed lectin은 0.89%수율로 얻었다. 分離된 seed lectin을 polyacrylamide 겔 電氣泳動한 結果는 그림 3과 같다. 標準 seed lectin(sigma社, 分子量 120,000)과 同一한 位置에 Band가 確認되었다.

이 結果 seed lectin은 affinity chromatography로 어느정도 純粹 分離 精製되었음을 確認할 수 있었고 大豆 品種間(八達, 白雲) 差異가 없이 同一한 위치에 단백질 band를 나타내어 品種間 同一한 lectin이었다.

한편 豌豆의 seed lectin은 Sephadex G-75 affinity column chromatography를 行하여 0.2M D-Glucose로 溶出시켜 얻은 結果는 그림 4와 같다.

80-90番 分획中 血球 凝集反應을 나타내는 分劃을 모아 蒸溜水로 完全히 透析하여 糖을 除去하고 凍結 乾燥하여 1.3% 程度의 收率로 Lectin을 얻었다. Polyacrylamide겔 電氣泳動 結果는 그림 5와 같다.

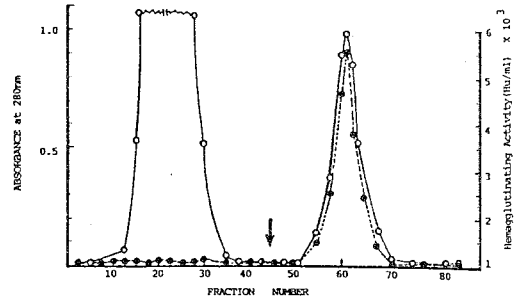


Fig. 2. Affinity chromatography of partially purified soybean agglutinin (SBA) on a column of sepharose- $\epsilon$ -aminocaproyl- $\beta$ -D-galactosamine.

The column was washed 0.15M PBS(pH 7.2) and SBA eluted with 0.5M D-galactose in PBS. Chromatography was performed at  $4^{\circ}\text{C}$ . Fractions were 4ml collected at rate of 24ml/hr.

Arrow denotes application of D-galactose.  $\circ$ - $\circ$ , protein( $A_{280}$ );  $\bullet$ - $\bullet$ , hemagglutinating activity(HU/ml)

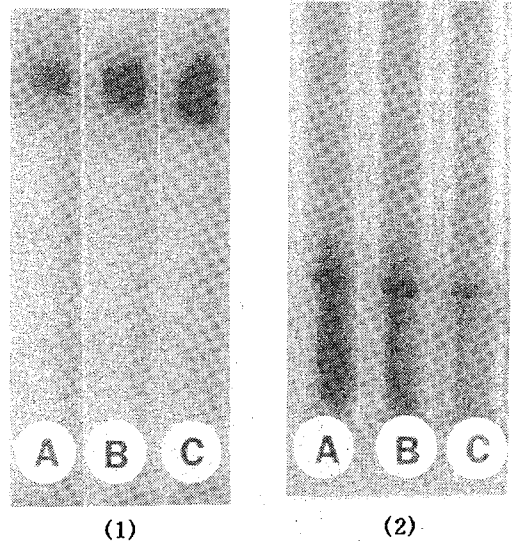


Fig. 3. Disc gel electrophoresis of purified soybean seed lectin on acrylamide gel.

The direction of migration was from the top. Electrophoresis was performed with  $100\mu\text{g}$  of purified soybean seed lectin in 7.5% polyacrylamide gel at pH 8.8 at 2mA per tube for 4hrs (1), and in 7.5% pH 8.8 at 2mA per tube for 4hrs (2)

A, S, and C were standard Lectin, Paldal and Baekwoon, respectively.

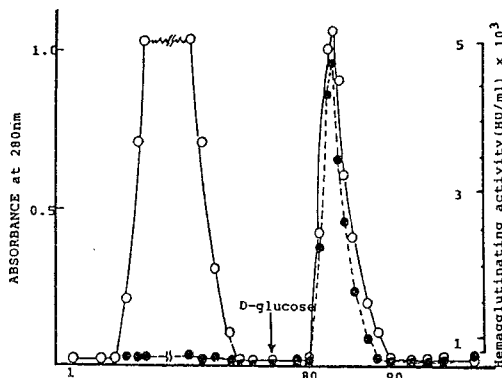


Fig. 4. Affinity chromatography of partially purified pea lectins on a column Shephadex G-75. Dialyzed lectins was applied previously equilibrated with E buffer at a rate 24ml/hr. Pea Lectin was eluted with D-glucose(0.2M in E buffer devoid Mg and Ca ions. Arrow denotes application of 0.2M D-glucose. ○-○, protein( $A_{280}$ ); ●-●, hemagglutinating activity(HU/ml)

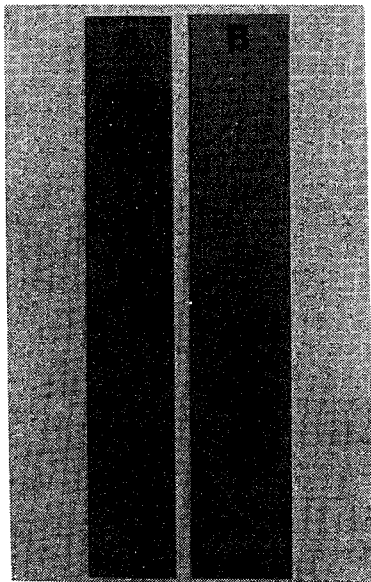


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified Pea agglutinin. The direction of migration was from the top. Electrophoresis was performed with 100 $\mu$ g of purified pea agglutinin in 10% polyacrylamide gel at pH 8.8 at 200V for 4hrs. (A) and in 10% acrylamide gel in the presence of 0.4% sodium dodecyl sulfate at pH 8.8 at 200V for 4hrs.

大豆의 Lectin은 120,000정도의 분자량을 가지는糖蛋白質이며(Lotan 1967), 豌豆의 lectin은 46,000정도의 분자량을 가지고 있다는 Trowbridge(1974)의 報告와 比較해볼때 分離한 大豆와 豌豆의 lectin은 서로 同一하지 않았다. 大豆 Lectin은 單一蛋白質 띠를 形成하였고 豌豆의 Lectin은 두개의蛋白質 띠가 나타났으며 acrylamide겔上 移動距離도 서로 달랐다. Lotan(1974) 등의 報告에 依하면 大豆의 lectin은 同一한 4개의 subunit로 構成되어 있으며 그 분자량이 約 30,000dalton정도의 분자량을 가진다고 하였다. 한편 Trowbridge(1974)의 報告에서도 豌豆의 lectin은 분자량이 15,000-18,000dalton정도와 8,000dalton정도의 분자량을 가지는 각각의 두개의 同一한 subunit로 構成되어 있다고 하였다. 大豆의 lectin과 豌豆의 lectin에 對한 結課와 比較해 보면 同一한 結課를 얻었으며 두 Lectin은 서로 相異한 物質로서 이 差異點으로 宿主特異성을 形成하는 것으로 推定할 수 있다.

## 2. 免疫 電氣泳動

Grabar와 Williams(1953)方法에 따라 分離精製된 seed lectin을 免疫 電氣泳動한 그림 6과 같다.

分離한 2개 大豆 品種(八達, 白雲)間 差異는 없었으며 標準 seed lectin(sigma社)과 同一한 位置에 單一 抗原-抗體 反應 沈降線을 形成하였다. 2種의 大豆 品種으로부터 分離 精製한 物質이 同一한 lectin임을 證明할 수 있었다. 또한 大豆의 lectin과 豌豆의 lectin과의 동일성 여부를 확인한 결과는 그림 7과 같다.

大豆의 lectin은 標準 Lectin의 抗體와 沈降線을 形成하였으나 豌豆 Lectin의 抗原이 되지 못하였으므로 두 lectin은 서로 다른 물질이었다.

## 3. 根瘤菌과 lectin의 結合性

分離한 lectin과 根瘤菌과의 結合特異성을 알아보기 爲하여 FITC-lectin의 複合體와 根瘤菌과의 結合성을 螢光顯微鏡으로 確認한 결과는 表2와 같다.



Fig. 6. Immunoelectrophoresis patterns of purified soybean lectins on agarose gel. The direction of migration was from left(-) to right(+). Immunoelectrophoresis was performed in 1% agarose gel with 20 $\mu$ l of purified soybean seed lectins(1mg/2ml) at pH 8.6 at 100 V for 6hrs. A, B and central trough were paldal Baekwoon seed lectin and antilectin rabbit IgG.

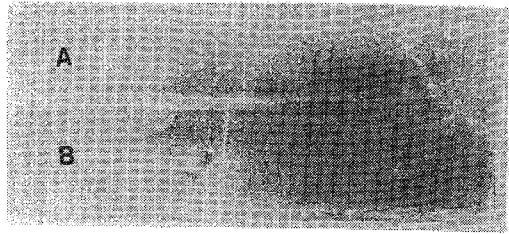


Fig. 7. Ouchterlony double immunodiffusion patterns of purified seed Lectins. A, B, C and D were paldal lectin, Baekwoon lectin, Pea lectin, Mungbean lectin, respectively.

Table 2. Binding of *Rhizobium* strains with lectins and infectivity.

Strains	Lec-SBL <sup>a</sup>	Lec-PL <sup>b</sup>	Infectivity <sup>c</sup>			
			Soybean	Pea	Alfalfa	Colver
KCT2422	+	-	+	-	-	-
LPN-100	-	-	-	-	-	-
LCR-101	+	-	+	-	-	-

<sup>a</sup> Fluorescence isothiocyanate labelled soybean Lectin

<sup>b</sup> Fluorescence isothiocyanate labelled pea Lectin

<sup>c</sup> nodulating activity of bacterial strains

*R. japonicum* RCR 3407과 *B. japonicum* KCTC 2422는 大豆와 正常的인 根瘤形成을 하는 菌株로서 大豆 Lectin과 結合하였으나 豌豆의 lectin과는 結合하지 않는 結合 特異성을 가지고 있었다. 大豆와 根瘤形成을 하지 못하는 LPN-100變異株는 大豆 Lectin과 結合하지 않았고 化學走性은 없으나 根瘤形成을 하는 變異株 LCR-101은 大豆의 Lectin과 特異성을 가지고 結合하였다.

이 結果는 豌豆의 seed lectin과 大豆의 Seed Lectin은 서로 다른 物質로서 宿主細胞의 Lectin과 根瘤菌이 宿主特異성을 가지고 結合하여 自己宿主를 認識하여 相互接種群(Cross Inoculation)을 形成할 수 있도록 하는 物質이라는 假說을 證明할 수 있었으며 lectin과 根瘤菌의 特異的 結合에 對한 研究가 앞으로 더

進行되어야 할 것으로 思料된다.

#### 4. 使用菌株 및 特性

*Bradyrhizonium japonicum* KCTC2422는 YEM 培地에서 最終 pH 7.1로써 alkali를 生成하며, 宿主植物에 對하여 根瘤를 形成하고 抗生劑에 내성을 가지며 gram(-), flagella(+)이고 colony의 形態는 典型的인 slow growing type의 特性을 가지고 있었으며 이는 Bergey's Manual 의 *Bradyrhizobium*屬의 特性과 一致하였다.

Nod<sup>-</sup> mutant는 NTG處理 後 Effectiveness試驗 結果, 根瘤를 전혀 形成하지 않은 代表的 菌株로 選拔하였다. Che<sup>-</sup> mutant는 2mM proline에 對한 化學走性이 없는 菌株를 選拔하였으며 그 特性은 表 3과 같다.

Table 3. Characteristics of Isolated Mutants

strain	No. of cell/cap. ( $\times 10^{-5}$ )	Chemotactic response*	swarm size(mm)	Gram staining	Flagella	Phenotype
KCTC2422	265 $\pm$ 16	3.1	<2mm	-	+	wild type
LPN-100	66 $\pm$ 10	1.3	<2mm	-	+	Nod <sup>-</sup> Che <sup>+</sup>
LCR-101	49 $\pm$ 6	1.1	<2mm	-	-	Che <sup>-</sup> Nod <sup>+</sup>

\* Chemotactic response between bacteria in capillary tube with and without 2mM proline.

標準菌株로 사용한 KCTC2422와 LCR-101은 八達에 對해서 正常的인 根瘤形成을 하였으며 개체당 3500nmole 程度의 窒素固定能力을 나타내었고 LPN-100 變異株은 전혀 根瘤形成을 하지 못하였고 窒素固定力도 전혀 나타나지 않은 菌株이었다.

分離된 變異株은 swarm size 2mm以下이고, Gram(-)이며, 最終 pH 7.2로 alkali를 生成하는 典型的 slow growing type *rhizobia*이며(그림 8), 2mM proline에 對한 化學走性은 wild type은 chemotactic response가 3.1 程度이며, LPN-100은 1.7, LCR-101은 化學走性을 나타내지 않은 菌株이었으며, 其他 生理的 特性은 모두 親株과 類似하였다.

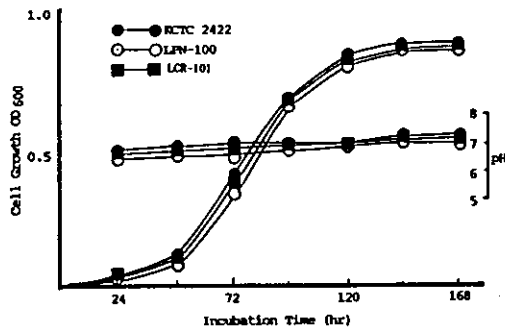


Fig. 8. Growth curves and pH changes of *B. japonium* KCTC 2422 and its mutant.

### 5. 化學走性 測定

根瘤菌의 化學走性은 Adler(1973)의 方法을 若干 變形하여 1 $\mu$ l capillary tube를 利用하여 自體製作한 化學走性 chamber(그림 1)에서 行하였다.

KCTC 2422를 標準 菌株로 하여 2mM proline에 對한 根瘤菌의 化學走性을 確認해 본

結果는 그림 9와 같으며, 30分 내지 45分 程度 incubation하였을때 높은 化學走性이 一定하였으며 以下 모든 化學走性 試驗은 30 $^{\circ}$ C에서 45分 incubation하여 測定하였다.

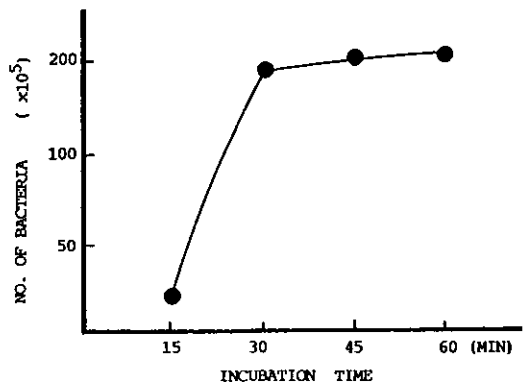


Fig. 9. Relationship between incubation time and attraction of KCTC 2422 to the 2mM proline.

뿌리 분비물중의 구성성분이 근류균을 유인하는 물질이 포함되어있을 것으로 추정하여 뿌리 분비물의 구성성분에 대한 근류균의 유인을 확인하기 위하여 팔달 및 백운을 수경재배하여 수집 시간별 crude exudate에 對한 根瘤菌의 化學走性 程度는 그림 10과 같다.

유인물질임이 확인된 crude root exudate를 Dowex column을 通過하여 나온 中性 分劃 Fraction I에 對한 化學走性 試驗 結果는 그림 11과 같다.

중성분획의 구성성분은 중성당이며 glucose를 비롯한 單糖류들이 근류균을 유인하는 유인물질이었다.



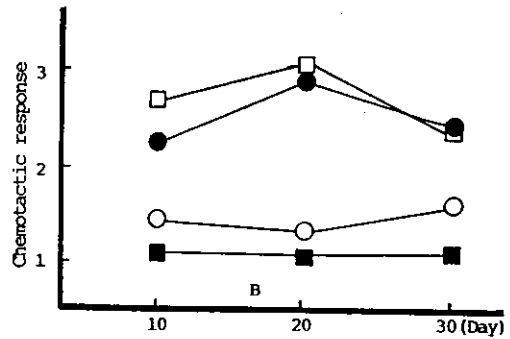
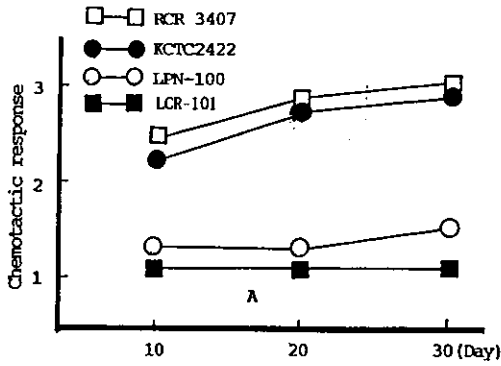


Fig. 10. Chemotactic response of *B. japonicum* and its Mutant to Paldal(A) and Baekwon(B) Root Exudate.

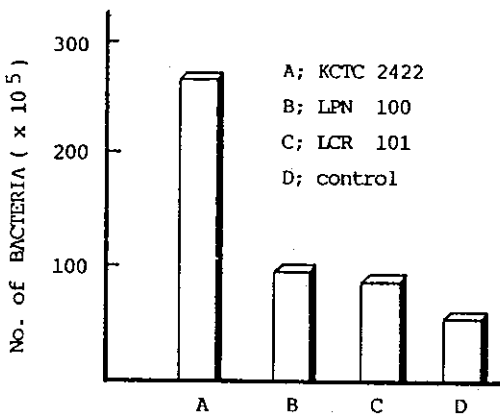


Fig. 11. Chemotaxis of *B. japonicum* and Mutant to PALDAL Root Exudate Fraction I.

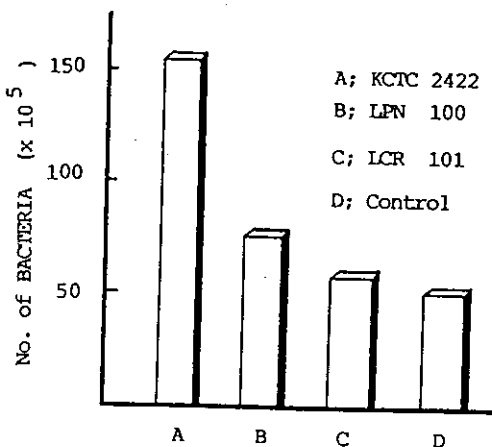


Fig. 12. Chemotaxis of *B. japonicum* and Mutant to PALDAL Root Exudate Fraction II.

Fraction II는 Dowex×50(H<sup>+</sup>form)으로 부터 얻은 양성분劃으로서 化學走性 程度는 그림 12와 같다.

Fraction II의 구성성분은 유리 아미노산이며 아미노산에 대한 근류균의 化學走性이 비교적 높게 나타나 유인물질임을 추론할 수 있었다.

Dowex×1(acetate form)으로 부터 얻은 陰性分劃인 Fraction III에 대한 근류균의 化學走性 試驗 結果는 그림 13과 같다. Fraction III의 구성성분은 유기산이며 以上の 結果를 보면 뿌리 分泌物의 分劃中 根瘤菌을 誘引하는 程度는 中性分劃이 가장 좋은 誘引物質이며 그 다음이 양성分劃이며 陰性分劃에 對한 化學走性 程度가 가장 낮았다. 豆科作物의 뿌리 分泌物는 glucose를 비롯한 單糖類와, succinic acid를 비롯한 有機酸 및 陽이온 形態 가지는 아미노酸 등으로 構成되어 있음을 알수 있고 이들 構成성분은 根瘤菌을 誘引하는 物質임을 알수 있다.

이 結果는 Gaworzewska(1982) 등이 報告한 *R. leguminosarum*에 對한 化學走性 結果와 Götze(1982) 등이 報告한 *R. meliloti*에 對한 糖과 아미노酸의 化學走性 試驗 結果와 비슷한 傾向을 보였다.

#### 6. 根瘤形成 試驗 및 Nitrogenase活性度 測定

Wild Type인 KCTC 2422 및 그 變異株의 根瘤形成 試驗을 한 그림 14와 같다.

## 要 約

KCTC 2422는 根瘤菌을 接種한지 約 7日 頃 부터 nitrogenase activity를 나타내었으며, Nod<sup>-</sup>인 LPN-100은 전혀 根瘤를 形成하지 않았고 nitrogenase activity도 없었으며 LCR-101 變異株는 15日 頃 以後 nitrogenase Activity가 나타나기 시작하였다.

結果에서 보면 LCR-101은 初期에는 根瘤形成이 이루어지지 않으나 15日 以後에 nitrogenase activity가 나타나기 시작하므로 化學走性이나 根瘤菌의 運動性이 宿主認識에 影響을 주어 窒素固定 能力이 向上된 것으로 類推되어진다.

따라서 根瘤菌의 宿主植物에로의 認識에는 뿌리 分泌物에 對한 菌의 化學走性이 重要한 役割을 한다는 것을 確認할 수 있었다.

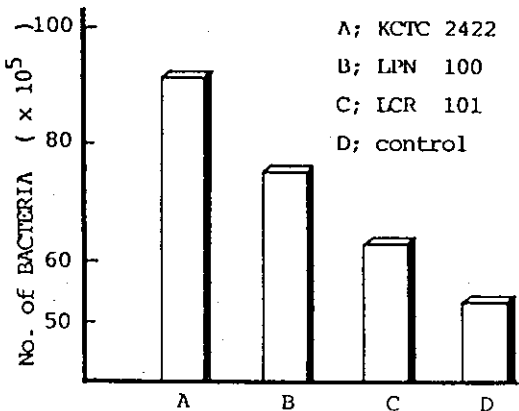


Fig. 13. Chemotaxis of *B. japonicum* and mutant to Paldal root exudate fraction III.

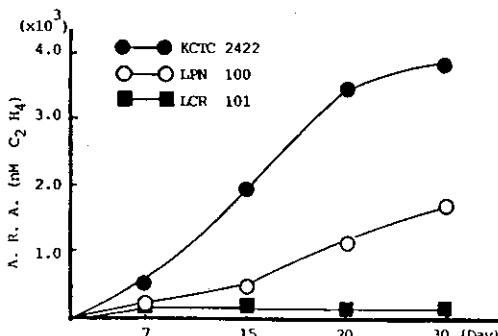


Fig. 14. Acetylene reduction activity of Paldal host plant inoculated with rhizobia.

大豆-根瘤菌의 共生에서 宿主植物의 Root Exudate에 對한 根瘤菌의 化學走性이 根瘤形成(宿主植物)에 미치는 影響을 밝히기 위해 研究한 結果는 다음과 같다.

大豆 Seed Lectin은 品種間 差異가 없었으며 分子量 120,000程度의 4個의 同一한 subunit를 가지는 物質이며, Pea Seed Lectin은 分子量 44,000程度이며 15,000과 7,000程度의 두 種類의 subunit를 가지는 物質이며 大豆 lectin은 표준 lectin 항체와 침강선을 형성하였다. 그러나 완두의 lectin은 표준 lectin과 항원-항체 반응이 없었으므로 두 lectin은 동일 항원이 되지 않아 서로 다른 물질이었다.

팔달의 Crude Root Exudate에 對한 根瘤菌의 化學走性 比는 KCTC 2422는 各各 3.5이고 LPN-100은 1.4이며 LCR-101은 各各 1.4이었다.

뿌리분비물의 각 fraction에 대한 근류균의 화학주성은 중성분획이 가장 높고 양성분획이 그다음이며 음성분획이 가장 낮은 화학주성을 나타내어 각물질에 대한 근류균의 친화도에 차이가 있었다.

根瘤形成의 程度는 KCTC 2422의 境遇는 接種後 7日경부터 Nitrogenase Activity가 나타났으며 LCR-101는 15日 以後에 Nitrogenase Activity를 나타내었다. LPN-100은 Nitrogenase Activity가 전혀 나타나지 않아 根瘤菌의 化學走性이 宿主認識過程에 影響을 미쳤음을 確認할 수 있었다.

## 參 考 文 獻

1. Adler, J.(1973) A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *E. coli*. J. Gen. Microbiol., 74:77-91.
2. Ames. P., and K. Bergmen(1981) Competitive advantage provided by Bacterial motility in the formation of Nodules by *R. meliloti*. J. Bacteriol., 148L728-729
3. Ames. P., S. A. Schluenderberg, and K.

- Bergman(1980) Behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol., 141:722-727.
4. Bauer, W. D. (1981) Infection of legumes by *Rhizobia*. Annu Rev. Plant Physiol. 32:407-449
  5. Bhuvaneswari, T. V., S. G. Pueppke and W. D. Bauer: 1977, Role of lectins in plant-microorganism interaction. I. Binding of soybean lectin to *rhizobia*. Plant Physiol., 60:486-491.
  6. Bohool, B. B., and E. L. Schmidt(1974) Lectins : a possible basis for specificity in the *rhizobium*-legume root nodule symbiosis. science, 185:269-271
  7. Bowra B. J., M. J. Dilworth(1982) Motility and Chemotaxis toward sugars in *R. Leguminosarum*. J. of Gen. Microbiol., 126: 231-235
  8. Caetano-Anollés, G., L. G. Wall., A. T. De Micheli, E. M. Macchi, W. D. Bauer(1988) Role of motility and chemotaxis in efficiency of Nodulation by *R. meliloti*. Plant physiol., 86:1228-1235
  9. Cannon F. C. : Genetic studies with Diazotroph. In, Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation.(ed) F. J. Bergersen, John Willey and sonc Ltd. pp. 394-396(1980)
  10. Currier W. W. and G. A. Strobel(1976) Chemotaxis of *Rhizobium* spp to plant root exudate. Plant physiol., 57:820-823
  11. Currier W. W., and G. A. Strobel(1976) Chemotaxis of *Rhizobium* spp to a glyco protein produced by bird four trefoil roots. science, 196:434-435
  12. Davis, B. J.(1964) Disc Electrophoresis, Ann N. Y Acad. sic., 121:404-427
  13. Dazzo, F. B., C. A. Napoli, and D. H. Hubbell (1976) Adsorption of bacteria to roots related to host specificity in the *rhizobium* clover symbiosis. Appli.
  14. Dazzo, F. B.(1980) Determinants of host specificity in the *rhizobium* Clover symbiosis. P. 165-187. In, W. E. Newton and W. H. Orme-Johnson(ed). nitrogen fixation Vol. II. University Park, Baltimore Environ. Microbiol., 32:166-171
  15. Dazzo, F. B., G. L., Truchet, J. E., Sherwood, E. M. Hrabak, M. Abe, and S. H. Pankrata (1984) Specific Phases of root hair attachment in the *rhizobium trifolii*-clover symbiosis. Appli. and Environ. Microbiol., 48:1140-1150
  16. Diaz, C. L., P. C. van Spronsen, R. Bakhuizen, G. J. J. Logman, E. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne(1986) Correlation between infection by *R. leguminosarum* and Lectin on the surface of *pisum sativum* L. roots. planta 168:350-359
  17. Gaworzewska, E. t., and M. J. Carlile(1982) Positive chemotaxis of *R. leguminosarum* and other Bacteria towards Root exudate from legumes and other plant. J. of Gen. Microbiol., 128:1179-1188
  18. Gotz, R. N. Limmer, K. Ober, and R. schmidt (1982) Motility and Chemotaxis in two strains of *rhizobium* with complex Flagella. J. of Gen. Microbiol., 128:789-798
  19. Grabar, P., Williams, C. A. Jr(1953) Biochim. Biophys. Acta 10:193
  20. Halverson L. J., and G. Stacey(1986) Effect of Lectin on Nodulation by wild type *B. japonicum* and Nodulation defective mutant. Appli. and Environ. Microbiol., 51:753-760
  21. Hardy, R. W. F., R. C. Burns, and R. D. Holsten(1973) Application of the acetylene-ethylene assay for measurements of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem., 5:47-81
  22. Hudson, L. and F. C. Hay Antibody as probe (preparation of fluorochrome-conjugated antisera) In Practical Immunology 3rd ed., pp. 34-37 Blackwell sci. Publications.
  23. Lamml, U. K. : 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
  24. Liener, I. E.(1955) The photometric Determi-

- nation of the Hemagglutinating Activity of soyin and Crude soybean extracts. Arch Biochim. Brophys., 54:223-231
25. Lis, H., N. Sharon and E. Katchaski : 1966, Soybean agglutinin, a glycoprotein I. Isolation of a glycopeptide. J. of Biol. Cehm., 241: 684-689
  26. Ljunggren, H., and G. Fahraeus(1961) The Role of polygalacturonase in root hairs Invasion of root hairs of leguminous plant by *Rhizobium* species. Can. J. of microbiol., 14:617-625
  27. Lotan, R., W. H. Siegelman, H. Lis, and N. Sharon(1973) Subunit structure of Soybean Agglutinin. J. of Biol. Chem., 12919-1224.
  28. Maier, R. J., and W. J. Bill(1976) Ineffective and nonnodulating mutant strain of *Rhizobium japonium*. J. Bacteriol., 127:763-769
  29. Noel, R. K., and J. G. Hol(1984) Bergeys manual of systematic bacteriology Williams and Wilkines Co. U. S. A. p. 235-240
  30. Palleroni, N. J. (1976) Chamber for bacterial chemotaxis experiments. Appli. and Environ. Microbiol., 32:729-730
  31. Trowbridge I. S. (1974) Isolation and chemical characterization of a Mitogenic Lectin from *pisum sativam*. J. Biol. chem. 249:6004-6012