

## *Rhizobium japonicum*에 있어서 變異株의 選拔 및 特性

朴 昶 東 · 姜 相 載 · 朴 愚 喆

慶北大學校 農化學科

Screening and Physiological Characteristics of Mutants in *Rhizobium japonicum*

Chang Dong PARK · Sang Jai KANG · Woo Churl PARK

Dept. of Agricultural chemistry, Kyungpook National University.

### Abstracts

This experiment was conducted to isolate the mutants from S118 and to investigate the physiological characteristics of *R. japonicum* mutants.

The results obtained were as follows;

Based on nodulation and acetylene reduction, nodulation of *rhizobia* was divided into 4 groups, i.e. slow-nodulation, earlier-nodulation, infrequent-nodulation and non-nodulation. At 5% significant level, the growth of inoculated plant with SM255 was bad, but that of HP277 was good.

Root-hairs curling was induced by strains S118 and HP277 on soybean, but not by strain SM255. S118 and SM255 were found to be slow-growers and produced alkali, whereas strain HP277 was fast-grower and produced acid in YEM broth.

In litmus milk reaction, all strains indicated alkaline reaction, and serume-zone was induced weakly by HP277.

All of the strains tested in this experiment utilized sucrose.

HP277 and LP268 utilized xylose, whereas S118 and SM255 did not.

SM255 showed bad growth in nitrogen carriers however utilization of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  by HP277 was possible at 25mM and 10mM level.

To compare with S118, the protein band of SM255's cell protein electrophoresis was not developed at 0.62 Rm position.

Key word: *R. japonicum*, nodulation, acetylene reduction activity.

## 緒 論

根瘤菌과 寄生植物의 共生關係는 細菌과 植物體와의 相互反應이라는 特異性때문에 그 共生의 複雜性を 分析하고 충분히 理解하기란 그리 쉽지 않다. 根瘤着生에서 根瘤菌의 機能을 研究하기 위해서는 根瘤變異體가 必要하게 되는데, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*와 같은 fast-growing型 屬은 많은 研究가 이루어진 반면 *R. japonicum*와 같은 slow-growing型的 共生的 變異株에 대한 研究는 미흡한 실정이다.

Maier와 Brill(1976)은 非共生的으로 acetylene을 還元시킬수 있으나 leghemoglobin이 缺如된 根瘤를 形成하는 變異株와 非共生的으로 acetylene을 還元시킬 수 없으나 非效率的인 根瘤를 形成하는 變異株를 分離하여 調査한 結果 非共生的인 nitrogenase活性은 大豆根瘤의 窒素固定力과 同一함을 報告하였다.

Stacey等(1982)은 *nod*<sup>-</sup>와 *nif*<sup>-</sup>變異株를 各各 分離하여 wild type과 比較한 結果 *nod*<sup>-</sup>變異株의 細胞膜 蛋白質에서 分子量 128,000 dalton과 37,500 dalton의 蛋白質이 SDS電氣泳動에서 檢出되지 않았으며, *nif*<sup>-</sup>變異株의 二次元電氣泳動 結果에서 nitrogenase 構成要素인 component II의 蛋白質은 缺如되어 있다고 報告하였다.(Noel等 1982) 根瘤菌은 自體의 遺傳的인 狀態외에도 土壤의 條件, 施肥 및 栽培環境등에 따라서도 接種效果는 서로 差異가 있다고 報告되어 있으므로(Talbott等 1972, Eaglesham等 1983, Munevar와 Wollum 1982), 共生複合體를 理解하기에는 아직도 더 많은 生化學的, 遺傳學的인 研究가 필요한 형편이다. 또한 根瘤變異株 分離 및 特性研究는 多樣하지만, 變異가 일어난 후 菌의 生理的인 狀態變化, 環境의 變化에 따른 適應能力, 植物體와의 相互關係等을 調査한 研究는 매우 不足한 實情이다.

따라서 本 實驗에서는 보다 效果的인 共生變

異 研究를 遂行하기 위한 基礎資料를 얻고져 變異株와 母株間의 生理的인 特性과 生育環境의 適應 및 接種時 植物의 生育變化等을 調査하여 몇가지 結果를 얻었기에 報告하고자 한다.

## 材料 및 方法

### 菌株 및 培地

本 實驗에서 母株로 使用한 菌株는 李(1985)가 大豆로 부터 分離한 slow-growing形인 S118을 使用하였다. 菌株의 繼代와 生理實驗을 위해서는 yeast-extract mannitol培地(以下 YEM)를 使用했으며 變異株 分離에는 *Rhizobium* minimal培地(以下 RMM)와 tryptone-yeast extract(以下 TYC)를 使用하였고, 炭素源과 窒素源 利用性 實驗에는 Graham과 Parker(1970)가 報告한 基本培地를 利用했으며, 菌接種用 培地와 菌體蛋白質 分離用 培地로는 YEM을 使用하였다. 그리고 植物의 水耕液은 窒素源이 缺如된 Broughton과 Dillworth가 報告한 stock nutrient 液을 使用하였다.(Somasegaran과 Hoben 1985)

### 變異株의 分離

*Rhizobium japonicum* S118을 後期 對數增殖期까지 培養한 YEM培養液 1ml을 9ml의 RMM培地에 接種하여 30℃에서  $3-5 \times 10^8$  cells/ml되게 振湯培養한 後, 이 培養液에 0.1ml의 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine液(以下 N.T.G液 16mg/ml)을 添加하여 다시 30℃에서 60分間 暗培養시켜 培養液을 3,000g에서 10分間 遠心分離하여 集菌하였다.

集菌된 沈澱物을 生理食鹽水(0.85% NaCl)으로 2回 洗滌하여 RMM培地 10ml로 再顯濁시켜 30℃에서 36時間 培養한 後, 約 100 colony가 形成되도록 生理食鹽수로 稀釋하여 RMM

agar plate에 塗抹하였다. 다시 28°C에서 7日間 培養 後 良好한 colony를 取해 TYC agar plate에 塗抹培養하여 YEM培地에 繼代를 하면서, Maier와 Brill(1976)의 方法에 의하여 根瘤形成 試驗을 行하였다.

### 根瘤形成 試驗

慶北地方의 獎勵品種인 白雲을 0.1%  $HgCl_2$ 와 70% 에탄올에 各各 3分間 殺菌하여, 미리 殺菌된 Vermiculite를 채운 pot에 (7×8cm) 2粒씩 播種하였다. 播種7日째 繼代시킨 菌을 YEM 液體培地에서  $10^8$  cells/ml 되게 培養하여 各各의 pot에 接種하였고, 2-5日 間隔으로 水耕液을 充分히 供給하였다.

接種 15日, 28日後 植物體를 採取하여 根瘤形成 狀態를 調査하고, 뿌리部分을 切斷하여 Gas Chromatograph(Hitachi model 663-50, F.I.D)를 利用하여 acetylene 還元法(Hardy 등 1973)에 準해서 nitrogenase活性을 測定하였으며, 4-7日 후 뿌리털의 curling 현상을 관찰하였다.

### 菌株의 生理的 特性

Litmus milk 試驗 및 methylene blue還元 試驗은 Graham과 Parker(1970)의 方法에 準하였고, 窒酸 및 亞窒酸 還元實驗은 Griess-Ilosvay reagent法(Harrigan과 McCance 1976)에 따랐다. Oxidase, Catalase생성 試驗은 Kovac(1958)의 方法에 따랐고, NaCl 耐性實驗은 基本培地에 NaCl을 2% 되게 添加하여 30°C에서 96時間 振湯培養시켜 比色計로 600nm에서 吸光度를 測定하였다.

### 生育도와 pH變化

培養 플리스크에 YEM培地 200ml을 取하여

種培養液 1ml을 接種한 後, 28°C에서 120strokes/min로 振湯培養시키면서 生育狀態를 12時間마다 無菌의으로 20ml씩 採取하여 600nm에서 吸光度를 測定하였고, 同一한 方法으로 培養한 培養液의 pH變化를 測定하였다.

### 炭素源과 窒素源의 利用性

基本培地에 炭素源을 mannitol 代身 添加하여 96時間 培養시켜 生菌數를 比較하였고 窒素源 利用은 基本培地에 有機態, 無機態 窒素源을 各各 10mM, 25mM, 50mM 程度로 添加한 各 培養液 10ml을 96時間 培養시킨 後 吸光度를 測定하여 利用性을 調査하였다.

### 菌體 蛋白質의 電氣泳動

菌體 蛋白質의 分離는 尹等(Yun等 1987)의 方法에 準하여 後期 對數增殖期까지 培養한 YEM培養液 10ml을 8,000g에서 10分間 遠心分離하여 沈澱物을 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)으로 洗滌하였다. 再遠心分離하여 沈澱物을 同一緩衝液 1ml로 顯濁시켜 70 $\mu$ m에서 1分間 超音波處理하였다. 이 溶液에 1ml의 SDS sample buffer(10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 3% SDS in 62mM Tris-HCl, pH 6.8)를 添加하여 100°C에서 2.5分間 處理시킨 後, 濃縮하여 전기영동하였다. 電氣泳動은 Laemmli(1970)의 方法에 따라 10% acrylamide gel을 使用하여 tube當 2.5mA의 電流로 行하였으며, gel의 染色은 0.1% Coomassie brilliant blue R-250, 25% methanol, 10% acetic acid液을 使用하였고 脫色은 7% acetic acid, 5% methanol液을 使用하였다.

電氣泳動用 緩衝液은 1% SDS를 含有한 tris-glycine緩衝液을 使用하였다.

## 結果 및 考察

### 變異株의 分離

*Rhizobium japonicum* S118에 대한 N.T.G 處理 時間別 生菌數는 N. T. G의 濃度가 0.16mg/ml 되게 處理했을때 處理時間 約 60-70分에 菌體의 90%가 死滅되었다. 이러한 結果는 Maier와 Brill(1976)의 報告와 一致하는 것으로서 本 實驗에서 變異株分離를 N.T.G濃度 0.16mg/ml, 處理時間 60分으로 準하였다.

約 450個의 pot實驗으로 根瘤形成을 調査한

結果, 表 1과 같이 4個群으로 分類할 수 있었다. 根瘤의 形成이 母株와 같이 느린 群을 Group I, 根瘤의 形成이 빠른 菌을 Group II, 根瘤가 아주 빈약한 菌을 Group III, 根瘤가 形成되지 않은 것을 Group IV로 分類하여 各各의 대표적인 菌을 S118, HP277, LP268, SM255로 名命하였다.

이들 菌株는 根瘤의 形成能力이 서로 다르므로 根瘤形成 研究에 좋은 材料가 될것으로 생각된다.(表1 참조)

Table 1. Nodulation states of mutants inoculated on soybean

Group	Nodulation		Acetylene reduction activity at 28 days (nmole C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /plant)	Strains
	15 Days	28 Days		
Slow nodulation	—	+	792 ± 247	Wild type, HP003, etc. 270 strains
Earlier nodulation	+	+	2196 ± 380	HP227, HP002, HP007, etc. 120 strains
Infrequent nodulation	+	+	130 ± 109	LP268, LP119, LP206, etc. 40 strains
	—	+	—	SM303, SM015, SM286, etc. 17strains
Non-nodulation	—	—	—	SM255, SM077, SM092, SM309, SM297

HP; High producing nodules, LP; Low producing nodules, SM; Non-nodulation

植物의 生育에 各 菌株들이 미치는 影響을 調査하기 위하여 2次接種實驗을 한 結果는 그

림1과, 表2에서와 같이 生育에 미치는 影響이 있음을 알 수 있었다.

Table 2. The plant growth states and acetylene reduction activity as caused by inoculation with mutant *R. japonicum* strains in Backwoon

Strains	stem length(cm)	fresh wt(g)	nodule number	nodule wt(g)	nmole C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / Plant	nmole C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / nodule no.
S 118	31.2±0.8	4.38±0.3	51±12	0.35±0.12	868±74	17.02
SM 255	29.5±1.0	3.05±0.3	-	-	-	-
HP 277	33.3±1.1	4.60±0.5	83±22	0.406±0.15	1855±294	22.35
SM 303	29.8±0.6	3.21±0.3	2±1	0.001±0	-	-
LP 268	30.7±0.8	3.97±0.6	30±26	0.26±0.19	476±192	15.90
Control	31.5±0.9	4.03±0.2	-	-	-	-
L. S. D*	1.3	0.62	-	-	-	-

# Non inoculation, but KNO<sub>3</sub>(0.05%) is added giving an N concentration of 70ppm in SN plant nutrient solution

\* Significant at 5%



Fig. 1 Plant growth of soybean inoculated with *R. japonicum* mutants.

A, B and C were S118, SM255 and HP277, respectively.

生體重과 草長の 경우 菌株의 接種으로 有意性이 認定되었는데 HP277은 植物의 生育을 良好하게 한 變異株였으나, SM255는 生育에 影響을 미치지 못한 菌株임을 알 수 있었다. 따라서, 根瘤의 形成은 植物의 生育과 密接한 關係가 있다고 하겠다. 또한, SM255를 接種한 植物體는 뿌리의 生長이 單純하였고, 葉色이 S118에 비해 養分缺乏狀態인 것으로 思料되었다. 한편 窒素原으로 70ppm의 nitrate(KNO<sub>3</sub>)가 添加된 水경液을 使用한 對照區는 S118을 接種한 植物體와 비슷한 生育을 보였다. 이로써 根瘤는 植物의 生育에 있어서 窒素原의 利

用과 關聯이 있음을 推測할 수 있었다. 이러한 結果는 Maier와 Brill(1976)의 報告와 一致하였다.

表 3은 各 菌株들을 接種한 후 植物體에 形成되는 根瘤의 形態의 特性을 나타낸 것으로, S118과 HP277은 3mm 以上の 큰 根瘤가 形成되었고 LP268은 1-3mm의 根瘤를, SM303은 1mm 以下の 根瘤를 形成하였다. SM303은 1-2個의 根瘤가 觀察되었으나 acetylene 환원력은 測定되지 않았다. 이는 nitrogenase 活性이 아주 적거나 構成要素에 變化가 생긴 것으로 思料된다.

Table 3. Description of nodule appearance in Backwoon inoculated with mutant strains of *Rhizobium japonicum* S118

Strain	Description
S 118	Large nodules; inside is pink, nodules reduced C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
HP 277	Large nodules; inside in pink, nodules reduced C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
SM 255	No nodules formed
LP 268	Small nodules; inside is pink, nodules reduced C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
SM 303	Very small nodules; inside in pink, nodules not reduced C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>

#### 뿌리털의 Curling 現象

그림 3은 SM255와 S118을 接種한 뿌리털의 curling 狀態를 光學顯微鏡으로 觀察한 것이다. S118을 接種한 植物體의 뿌리털은 強한 curling 現象을 보여주는 반면, SM255는 觀察할 수 없었고 뿌리털이 肥大生育을 하였다. 이러한 現象은 Nigel등(1983)의 熱 curling으로 共生關係 plasmid를 除去한 變異株가 curling 現象을 일으키지 않는다는 報告와 結果는 一致하지만 plasmid의 檢出을 할 수 없었다.

한편, SM303을 接種한 植物體의 뿌리털에는 드물게나마 curling 現象을 觀察하였는데 細菌의 感染絲는 찾아 볼 수 없었다. S118을 接種한 뿌리털의 curling 部分에서 根瘤形成段階의 感染絲가 形成됨을 觀察하였다.

#### 生理的 特性

表4는 各 菌株들의 生理的인 變化를 나타내고 있다.

Litmus milk 反應은 菌株 모두가 alkali 反應을 나타내었는데 HP 277은 serume zone을 形成하였다. 이는 Buchman 等(Buchman과 Gibbons 1974)의 報告에 의하면 slow-growing 型의 反應이라고 할 수 있다.

Oxidase 生成反應과 catalase 生成反應은 모두가 陽性으로 나타났으며, 窒酸 및 亞窒酸 還元反應은 LP268이 陰性, 陰性 SM255는 陽性, 陽性, S118, HP277, SM303은 陽性, 陰性으로 나타났다.

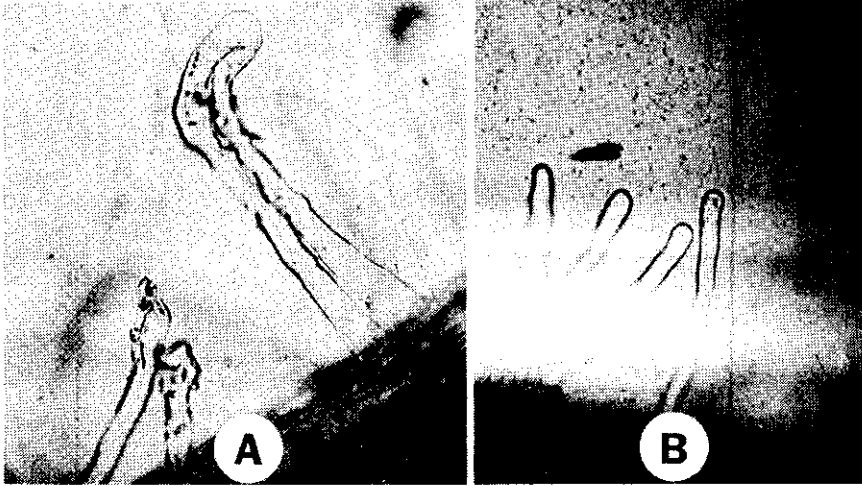


Fig. 2 Morphology of root hair curling and infection threads by S118(A) and SM255(B)

Table 4. Physiological characteristics of *R. japonicum* mutants

Strain	Litmus milk reaction	Nitrate reduction	Nitrate reduction	Oxidase production	Catalase production	Methylene Blue reduction	2% NaCl tolerance
S 118	ALKALI	+	-	+	+	+	-
HP277	ALKALI	+	-	+	+	+	-
	serume zone						
SM255	ALKALI	+	+	+	+	+	-
LP268	ALKALI	-	-	+	+	+	-
SM303	ALKALI	+	-	+	+	-	-

2% NaCl에는 菌株 모두가 耐性を 가지지 못하였고 methylene blue還元反應은 SM303이 陰性を 보였으나, 다른 菌株는 모두 陽性으로 나타났다. Lim(1978)의 報告에 依하면 Hydrogenase는 窒素固定作用중의 H<sup>+</sup>反應에 關與하므로 methylene blue還元反應에서 陰性を 보인 SM303을 除外한 4個 菌株는 窒素固定能이 있을 것으로 思料된다.

#### 生育도와 pH變化

分離한 菌株들의 YEM培地上에서의 生育速

도와 pH의 變化를 調査한 結果는 表5와 그림 4와 같았다. S118과 SM255는 生育速度와 pH變化가 거의 비슷한 傾向을 보여주고 있으나, HP277은 서로 다른 結果를 나타내어 N.T.G의 影響으로 fast-growing 型으로 바뀐 것으로 思料된다. SM255, S118은 生育速度가 느리면서 alkali 生育反應을 일으켜 pH가 알칼리성이 되는 slow-growing型, HP277은 生育速度가 빠르고 酸生成反應을 하는 fast-growing型이었다.

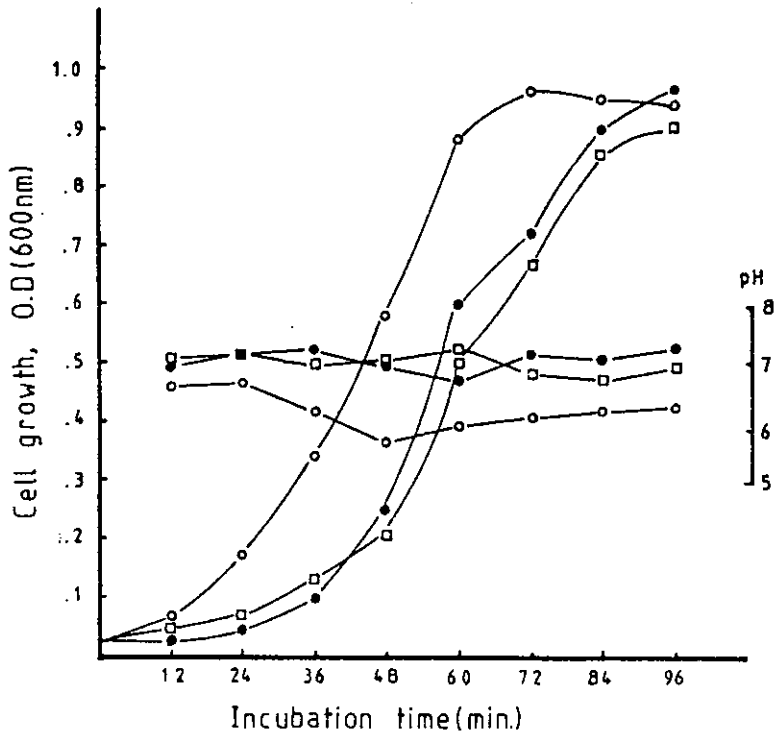


Fig. 3 Growth curves and pH changes of *R. japonicum* mutants and wild type.

Table 5. Growth and pH changes of *R. japonicum* mutants in YEM broth OD<sub>600</sub>/pH change

Time(hrs)	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Strain									
S 117	0.02/ 6.8	0.05/ 7.0	0.06/ 7.1	0.10/ 7.1	0.21/ 7.0	0.51/ 7.11	0.67/ 6.9	0.86/ 6.8	0.87/ 6.9
HP 277	0.02/ 6.8	0.06/ 6.6	0.17/ 6.7	0.34/ 6.2	0.59/ 5.8	0.88/ 6.0	0.96/ 6.1	0.95/ 6.2	0.95/ 6.3
SM 255	0.02/ 6.8	0.04/ 6.9	0.05/ 7.1	0.12/ 7.2	0.25/ 7.0	0.63/ 7.0	0.72/ 7.1	0.90/ 7.0	0.96/ 7.1
LP 268	0.02/ 6.8	0.05/ 6.7	0.15/ 6.4	0.30/ 5.9	0.60/ 5.4	0.80/ 5.6	0.94/ 5.5	0.94/ 5.4	0.90/ 5.3
SM 303	0.02/ 6.8	0.03/ 6.8	0.06/ 6.9	0.08/ 7.0	0.18/ 6.8	0.45/ 6.7	0.70/ 6.9	0.82/ 7.0	0.83/ 6.7



### 形態的인 變化

Congo red가 添加된 培地에서 生育한 菌들 중 HP277을 除外하고는 모두 白色의 colony를 形成하여 HP277은 congo red를 弱하게 吸收하는 것으로 나타났다. B.T.B가 添加된 YEM培地에서 7日間 恒溫培養했을 때 모두가 2mm以下의 colony를 形成하였고 HP277과 LP268은 酸生成反應을 나타냈다.

### 炭素源의 利用性

多糖類인 starch를 모든 菌株가 利用할 수 없는 것으로 나타났고, xylose에 있어서 S118과 SM255, SM303은 利用할 수 없으나 LP268과 HP277菌株는 利用할 수 있었다. S118에게는 利用率이 보통이었던 galactose, inositol, maltose가 SM255와 HP277에게는 높은 利用性을 보였다. 한편, SM303은 他菌株에 비해 炭素源의 利用能이 떨어짐을 알 수 있다.

Table 6. Carbohydrate utilization of *R. japonicum* mutants

	S 118	SM 255	SM 303	LP 268	HP 277
Xylose	-	-	-	+	++
Galactose	+	++	+	+	++
Sucrose	++	++	+	++	++
Arabinose	++	+	+	++	++
Inositol	+	++	++	+	++
Maltose	+	++	+	++	++
Glucose	++	++	++	++	++
Mannose	++	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-
Fructose	++	++	+	++	++

本 實驗에서는 모든 菌株가 sucrose를 利用하는 것으로 나타나, Glenn과 Dilworth(1981)의 報告와는 差異가 있었다. 따라서 slow-growing型도 二糖類인 sucrose를 利用할 수 있음을 알 수 있었다.

### 窒素源의 影響

窒素源의 利用性 및 影響을 調査하기 위하여 基本培地에 各種 有機態 및 無機態 窒素源을 10mM, 25mM, 50mM의 3가지 濃度로 各各 添加하여 培養한 結果는 表 7과 같았다.

S118은 無機態 窒素源에는 커다란 影響을 받지 않으나 glutamine, asparagine, allantoin 등의 有機態 窒素源의 添加로 生育이 상당히

促進되었다. SM255의 경우 生育에 특별히 影響을 받는 窒素源은 없었고 各 窒素源의 濃度가 25mM일때 가장 良好한 生育을 보였다. HP277은 S118과 비슷한 傾向이었으나  $KNO_3$ 를 利用할 수 없었다. 그러나,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 가 10mM, 25mM의 濃度로 添加될때는 利用이 가능한 것으로 나타났다.  $HNO_3$ 는 모든 菌株가 利用할 수 없었는데 이러한 結果는 濃度 혹은 이온의 影響때문인 것으로 思料된다.

### 菌體 蛋白質의 電氣泳動

S118, SM255 및 HP277의 菌體 蛋白質을 分離하여 電氣泳動을 한 結果는 그림 3과 같이 나타났다.

Table 7. N-source utilization of *R. japonicum* mutants(OD at 600nm)

	S 118			SM 255			HP 277		
	10	25	50	10	25	50	10	25	50*
HNO <sub>3</sub>	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
KNO <sub>3</sub>	0.35	0.31	0.23	0.23	0.44	0.25	0.01	0.02	0.04
NH <sub>4</sub> Cl	0.37	0.40	0.25	0.18	0.01	0.31	0.48	0.45	0.40
NaNO <sub>2</sub>	0.25	0.06	0.03	0.17	0.01	0.03	0.35	0.29	0.24
Urea	0.35	0.40	0.23	0.21	0.41	0.39	0.24	0.23	0.09
Glutamine	1.00	1.00	1.00	0.22	0.43	0.21	0.51	0.60	0.06
Asparazine	1.00	1.00	1.00	0.35	0.47	0.35	0.80	0.75	1.00
Allantoin	0.75	0.95	0.90	0.23	0.48	0.22	0.48	0.61	1.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.45	0.15	0.22	0.25	0.21	0.15	0.31	1.00	0.46
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.16	0.10	0.15	0.34	0.05	0.06	0.50	0.51	0.12

\* ; The concentration of N-source(nmole)

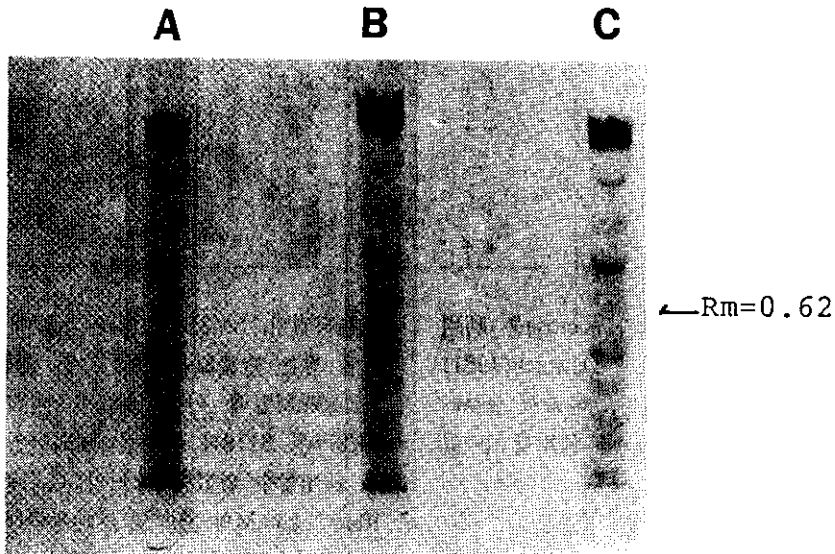


Fig. 4 SDS-gel electrophoresis of *R. japonicum* mutants A, B and C were SM255, HP277 and S118, respectively.

HP277과 S118의 경우 band數에는 差異가 없었으며 SM 255에서는 Rm=0.62의 band가 缺如되어 있었다. 한편 菌體 蛋白質의 電氣泳動은 band數가 많고 連續的으로 이어져 있기

때문에 濃縮을 하여 代表적인 band만을 比較하였다. 따라서 위의 結果는 蛋白質의 濃度差異가 있을 可能性도 排除할 수 없다고 思料된다.

Jordan(1962)에 따르면 *Rhizobium*이 豆科作物의 뿌리 内部로 侵入하는 과정에서 細胞의 表面構造가 變化되어 植物體로의 侵入 및 成長에 阻害를 받기 때문에 根瘤가 着生되기 위해서는 細胞의 蛋白質 및 細胞壁의 構造가 매우 중요한 의의를 가진다고 報告하였다. 따라서, SM255에 缺如된 band의 精確한 확인 및 아미노酸의 組成과 根瘤에 미치는 影響 등은 앞으로의 研究課題가 될 것으로 思料된다.

## 要 約

*Rhizobium japonicum* S118로부터 變異株를 選拔하고 生理的인 特性 및 植物體와의 相互關係등을 調査한 結果는 아래와 같다.

N. T. G를 處理한 S118로부터 根瘤를 形成하지 않는 SM255, 根瘤着生이 아주 좋고 acetylene還元力도 높은 HP277, 根瘤着生이 S118보다 떨어진 LP268 그리고 根瘤가 아주 드물게 形成되는 SM303을 選別하였다.

SM255를 接種한 植物體는 生育이 低調하였고, 뿌리털의 curling 現象도 觀察되지 않았다. 반면 HP277은 SM255와 서로 다른 結果를 나타내었다.

Litmus milk 反應에서 HP277이 alkali性, serume zone을 形成하였고, congo red를 弱하게 吸收하였다. YEM培地에서 SM255는 生育이 S118과 비슷한 slow-growing型이지만 HP277은 fast-growing型이었다.

窒酸 및 亞窒酸 還元은 LP268이 陰性, 陰性, SM255는 陽性, 陽性, 外 菌株는 陽性, 陰性으로 나타났다.

SM255는 無機態와 有機態 窒素源의 影響을 받아 生育이 低調하였다. 그러나 HP277은 Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O의 10mM, 25mM 濃度에서 生育이 가능하였고, 有機態 窒素源의 利用이 높은 것으로 나타났다.

모든 菌株가 starch를 利用하지 못하였고 arabinose의 경우 SM255와 SM303은 他菌株에 비해 利用性이 낮음을 알 수 있었다. 그러나 sucrose는 모든 菌株가 利用할 수 있었다.

HP277과 S118은 菌體 蛋白質의 組成에 差異가 없었고, SM255는 Rm 0.62의 band가 缺如되어 있었다.

## 參 考 文 獻

1. Maier, R.J and Brill: 1976, Ineffective and nonnodulating mutant strains of *Rhizobium japonicum*, J. Bacteriol., 127: 763-769
2. Stacey, G., Alan, S., Paucy, K., Noel, D., Maier, R.J. and W.J. Brill: 1982, Mutants of *Rhizobium japonicum* defective in nodulation, Arch. Microbiol., 132: 219-224
3. Noel, K. D., Stacey, G., Tanbon, S. R. and W. J. Brill: 1982, Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* population, Appli. Environ. Microbiol., 4: 931-938
4. Talbott, H. J., Kenworthy, W. J. and J. O. Leag: 1972, Field comparison of the N-15 and difference method of measuring nitrogen fixation, Agronomy J.74:769-804.
5. Eaglesham, A. R. Hassouna, S. and R. Seeger: 1983, Fertilizer-N effects on N<sub>2</sub>-fixation by cowpea and soybean, Agronomy J., 75: 61-66.
6. Munevar, F. and A.G. Wollum: 1982, Response of soybean plants to high root temperature as effected by plant cultivar and Rhizobium strain, Agronomy J., 74:138-144.
7. Lee, K. H. : 1985, Isolation and physiological characteristics of soybeans root nodule bacteria, 경북대학교 석사학위논문
8. Graham, P. H. and C. A. Parker: 1970,

- Diagno-stic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes, *Plant and Soil*, 20: 383-396.
9. Somasegaran, P. and H. J. Hoben: 1985, *Methods in Legume-Rhizobium technology*, Niftal press, PP. 273-280.
  10. Hardy, R. W. F., Burns, R. C. and R. D. Holsten: 1973, Application of the acetylene-ethylene assay for measurements of nitrogen fixation, *Soil Biol. Biochem.*, 5:47-81.
  11. Harrigan, W. F. and M. E. McCance: 1976, *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Academic Press, pp. 66-76.
  12. Kovacs, N.: 1958, Identification of *Pseudomonas Pyocyance* by the oxidase reaction, *Nature*, 178:703-709.
  13. Yun, H. D., Cho, M. J. and K. H. Lee: 1987, Isolation and characterization of *rhizobia* from soybean cultivated in Korea, *J. Kor. Chem. Soc.*, 30:153-168.
  14. Laemmli, U. K.: 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage *T<sub>4</sub>*, *Nature*, 227:680-685.
  15. Buchman, R. E. and N. E. Gibbons: 1974, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th. ed. Williams and Willkins, Baltimore, pp. 261.
  16. Lim, S.T.: 1978, Determination of hydrogenase in free-living cultures of *Rhizobium* soybean nodules, *Plant Physiol.*, 62:609-611.
  17. Glenn, A.R. and M.J. Dilworth: 1981, The uptake and slow-growing species of *Rhizobium*, *Arch. Microbiol.*, 129: 233-239.
  18. Jordan, D. C.: 1962, The bacteroids of the genus *Rhizobium*, *Bacteriol. Rev.*, 26:119-141.