

## *Rhizobium japonicum*의 生理的 特性 및 Plasmid DNA의 分離

吳世憲·姜相載·朴愚喆

慶北大學校 農化學科

Isolation of Plasmid DNA and Physiological Characteristics of *Rhizobium japonicum*

Seh Heun OH · Sang Jai KANG · Woo Churl PARK

Dept. of Agricultural chemistry, Kyungpook National University

### Abstracts

This study was conducted to investigate the physiological characteristics and to isolate plasmid DNA of *R. japonicum* strains

The results obtained were as follows;

Strains S117, S118, 005, 011 and DY-1 were slow-growers and showed alkaline reaction, whereas strains S110, S111, S114, S116, S120 and 010 were fast-growers and produced acid reaction in YEM broth.

All the fast- and slow-growing *R. japonicum* showed gram negative and formed mucous white colony on agar plate.

After 7 days, the colonies of the fast-growers were between 2.0 and 4.0mm in diameter, whereas those of slow-growers were approximately between 0.5 and 1.5mm. The fast-growers were uniformly sensitive to the pH of 4.5 and tolerant of the pH of 9.5, whereas the reverse was found for the slow-growers. All the fast-growers were able to grow in the presence of 2 % NaCl however the slow-growers were not grown.

All the microorganisms grew rapidly in simple mineral salt medium containing as the sole source of carbon. Starch was rarely utilized. All the fast-growers utilized sucrose.

The slow-growing *R. japonicum* strains examined usually contained 1 to 3 plasmid DNA ranging between 15Kb and 250 Kb, whereas the fast-growing *R. japonicum* strains contained 1 to 3 plasmid DNA ranging from 20 Kb to 250Kb.

Key word: *R. japonicum*, plasmid DNA, fast-grower, slow-grower.

## 緒 論

根瘤菌은 *Rhizobiceae*科에 속하는 好氣性, 非胞子性, 鞭毛性, 그람 陰性的 桿菌으로 宿主特異성에 따라 6種으로 分類하고 있으며, yeast extract mannitol 培地에서의 生育速度와 pH 變化에 의하여 fast-growing *rhizobia*와 slow-growing *rhizobia*로 兩分되기도 하며(noel과 Hol 1984), 近來에 와서는 slow-growing *rhizobia*인 *R. japonicum*을 slow-growing型和 fast-growing型으로 區分해서 說明하기도 한다.(Keyser 등 1981)

Graham과 Parker(1970)는 根瘤菌의 生理實驗 結果 *R. japonicum*의 경우 litmus milk反應은 鹼性이고 serum zone을 形成하지 않았고 2% NaCl에서 耐性이 없었다고 報告하였으며, Elkan(1971)에 의하면 *R. japonicum*은 YEM培地에서의 生育速度가 느리고 rhamnose와 xylose培地에서 酸을 生成하지 않았다고 報告하였다. 그러나 Sadowsky等(1983)은 *R. japonicum* 中 slow-growing型은 2% NaCl과 pH 9.0 및 pH 9.5에서 生育耐性이었으며, 炭素源으로써 二糖類를 전혀 利用하지 못하였고 pH 4.5에서만 耐性을 나타낸 반면 fast-growing型은 正반대의 結果를 나타내었다고 報告하였다. 根瘤菌에 대한 初期 遺傳學的 研究에서는 共生系를 維持시키는 遺傳子의 일부가 plasmid DNA와 關聯이 있다고 示唆하였다.(Higashi 1967, Dunican과 Tierney 1974) 지금까지 研究된 報告에 의하면 fast-growing *rhizobia*에 存在하는 large plasmid DNA(Casse 등 1979, Nuti 등 1977, Prakash 1981)는 *nod* gene(Masterson 등 1982, Lee 1985, Stower과 Eaglesham 1984, Boucher와 Bergeron 1977) *nif* gene(Luyindula 등 1975, Hahn 1966, Kado와 Liu 1981)을 가지고 있으며 fast-growing *rhizobia*는 特性이 細明되지 않은 large plasmid DNA를 갖고 있다고 하였다.(Nuti 등 1977,

Klein 등 1975, Luyindula 등 1975)

한편 Masterson等(1982)은 *R. japonicum* 中 slow-growing型은 1개의 large plasmid DNA를, fast-growing型은 1-3개의 large plasmid DNA를 갖고 있으며, fast-growing型에 存在하는 large plasmid DNA에는 *nif* gene이 含有되어 있으나 slow-growing型에 存在하는 large plasmid DNA에는 *nif* gene이 含有되어 있지 않았다고 報告하였다.

그러나 *R. japonicum*의 경우 plasmid DNA 操作상의 가장 큰 難點인 效率인 細胞壁 溶解는 現在까지도 未洽한 狀態에 있다.

이에 本實驗은 이러한 觀點에서 大豆로 부터 分離된 17개 菌株의 生理的 特性을 調査하고, 효율적인 plasmid DNA 分離를 위하여 研究한 結果 몇가지 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 菌株 및 培地

使用菌株는 慶北大學校 植物營養學 研究室에서 李(1985)가 施肥 및 接種條件을 달리하여 栽培한 6개 品種의 大豆에 着生한 根瘤로부터 分離된 根瘤菌으로 寒天 斜面培地에 1개월 繼代培養하면서 4℃에 保管하였다.

Plasmid 確認用 標準菌株는 嶺南大學校 醫科大學 微生物 教室로 부터 *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 15955菌株를 分讓받아서 使用하였다.

菌株의 保管과 生理實驗에 使用된 培地는 YEM培地와 MM-M배지(Stower와 Eaglesham 1984)를, 炭水化合物의 利用性實驗에는 Graham과 Parker(1970)가 報告한 基本培地를, plasmid DNA의 分離에 使用된 培地는 Boucher와 Bergeron(1977)이 開發한 tryptone, yeast-extract培地에 CaCl<sub>2</sub>를 添加한 培地(이상 TYC라

略함)를 使用하였다.

### 生育度 및 pH 변화 測定

菌의 種 培養은 20ml의 YEM 배지에 寒天 斜面 培地로 부터 1 白金耳를 接種하여 對數 增殖期( $OD_{600}=0.8$ )까지 培養한 다음 本 培養은 種培養液을 2% 되게 接種하여 各 實驗을 行하였다.

菌의 生育度は YEM培地를 利用하여 種培養 方法과 同一하게 行하여 600nm에서 12時間 間隔으로 吸光度를 測定하였으며, pH의 變化는 MM-M 培地에서 fast-growing型은 60時間, slowing growing型은 96時間이 經過될때 培養液의 pH를 測定 하였다.

### Colony形態와 Congo red處理

Hahn(1966)의 方法에 따라 YEM 培地에 Bromothymol blue (25mg/ℓ)와 Congo red (25 mg/ℓ)를 添加하여, 28℃에서 7일간 恒溫培養 하면서 生育狀態를 觀察하였다.

### NaCl 耐性 및 初期 pH의 影響

MM-M培地의 初期 pH를 4.5와 9.5로 맞추고 fast-growing型은 60時間, slow-growing型은 96時間 동안 培養한 후 600nm에서 吸光度를 測定하였다.

### 炭水化物的 利用性

YEM 基本培地에  $10^8$  cell/ml를 接種하여 28℃에서 7일간 恒溫培養하면서 生育狀態를 調査하였다.

### Plasmid DNA의 存在確認

使用 菌株들의 Plasmid DNA存在 確認은 Kado와 Liu(1981)法에 準하여 實施하였다.

TYC 液體培地 1ml에서 後期 對數增殖期 ( $OD_{600}=0.8-1.2$ )까지 培養한 細胞를 遠心分離하여 集菌한 다음, 500 $\mu$ ℓ E 緩衝液(40mM Tris-base, 5mM tris-base, 1mM Na-acetate, 1mM  $Na_2$ -EDTA, pH7.9)로 懸탁한 菌液을 200 $\mu$ ℓ 취하여 여기에 400 $\mu$ ℓ lysis buffer(tris-base 1.21g, SDS 6g,  $Na_2$ -EDTA 1.489g, pH 12.45, Total volume 200ml)를 加하고, 56℃에서 30분간 溫置하였다. 이 용액에 20 $\mu$ ℓ 2M tris-HCl (pH7.0)을 加하고 증류수로 미리 포화시켜 놓은 phenol/chloroform (1:1 v/v)용액을 2배 加하여 혼합한 다음 원심분리하여 그 상등액을 粗 plasmid DNA로 하였다.

### Plasmid DNA의 分離

Plasmid DNA의 分離는 Casse等(1979)의 方法을 基準으로 하여, Portnoy法(Dillon과 Nestmann 1985)에 따라 buffer량을 調節하고, Kado와 Liu(1981)의 方法에 따라 熱處理시켰으며, slow-growing型의 경우 Masterson等(1982)의 方法에 따라 3% NaCl로 pre-washing하는 단계를 添加하였다. TYC 液體培地 10 ml에서 後期 對數增殖期( $OD_{600}=0.8-1.2$ )까지 세포를 培養한 다음 遠心分離하여 集菌하였다. 集菌한 세포는 2ml TE buffer(50mM Tris-base, 20mM  $Na_2$ -EDTA, pH8.0)로 2回 洗滌하고, 100 $\mu$ ℓ TE buffer를 加하여 완전 懸탁한 다음, lysis buffer 1,200 $\mu$ ℓ 를 添加하고 56℃에서 60분간 溫置하면서 3-4회 tube를 反轉하였다. 그후 2M Tris-Cl(pH7.0) 100 $\mu$ ℓ 를 加하고, 곧 5M NaCl 300 $\mu$ ℓ 를 加한 다음 4℃에서 60분간 冷藏하였다. 이 용액에 3% NaCl로 미리 飽和시켜 놓은 phenol용액 1,800 $\mu$ ℓ 를 添加하여 遠心分離한 後, 상등액을 殺菌 tube로 옮기고 여기에 3M Na-acetate(pH 5.0)가 최종 농도 0.3M이 되도록 加하고, 2.5배 cold ethanol (-20℃)을 加하여 -20℃에서 4시간 放置한 後,

遠心分離 하였다. 이 沈澱物을 眞空乾燥器에서 乾燥시킨 後, TES buffer(50mM Tris-base, 5mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 50mM NaCl, pH8.0) 50 $\mu$ ℓ 에 녹여 4°C 냉장고에 保管하였다.

### 電氣泳動

Plasmid DNA試料를 Meyer等(1976)의 方法으로 0.6% agarose gel (100×125×5mm)을 사용하여 水平 電氣泳動하였다. 電氣泳動液은 TES buffer (Tris-base 10.8g, boric acid 5.5g, Na<sub>2</sub>-EDTA 0.93g, pH 8.3, total volume 1 ℓ)를 使用하였으며, plasmid DNA시료 25 $\mu$ ℓ 에 染料溶液 [0.05% bromphenol blue, 40% (w/v)sucrose]을 添加하고, 存在 確認時에는 10V/cm로 3시간, 分離時에는 2V/cm로 15시간 展開 시킨 後, ethidium bromide(1 $\mu$ g/ml로 30분간 染色하여 UV-transilluminator 上에서 띠를 確認하였다.

### 結果 및 考察

#### 生育速度 및 pH 變化

*Rhizobium*은 YEM培地에서 生育速度와 pH變化에 따라 fast-growing *rhizobia*와 slow-growing *rhizobia*로 分類되는데 fast-growing *rhizobia* (*R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*)는 YEM培地에서 世代時間이 2-4時間이고 酸을 生成하며, slow-growing *rhizobia* (*R. japonicum*, *R. cowpea*)는 同一한 培地에서 世代時間이 6時間 또는 그 以上이고 alkali를 生成하는 特徵이 있으나, 근래 slow-growing *R. japonicum*을 slow-growing型和 fast-growing型으로 區分해서 說明하기도 한다(Keyser, 1981).

本 實驗에서 使用한 菌株들의 YEM培地에서의 生育速度와 pH 變化를 調査한 結果는 그림 1, 2 표1, 2에 나타나 있다.

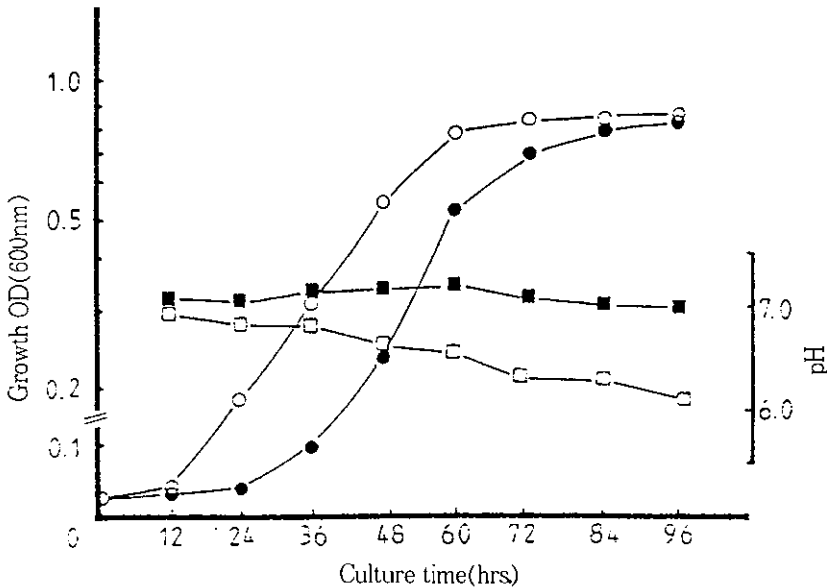


Fig. 1 Growth curves and pH changes of two strains of *R. japonicum* in YEM broth  
Growth: ○-○; S115 ●-●; S117, pH changes: □-□; S115, ■-■; S117

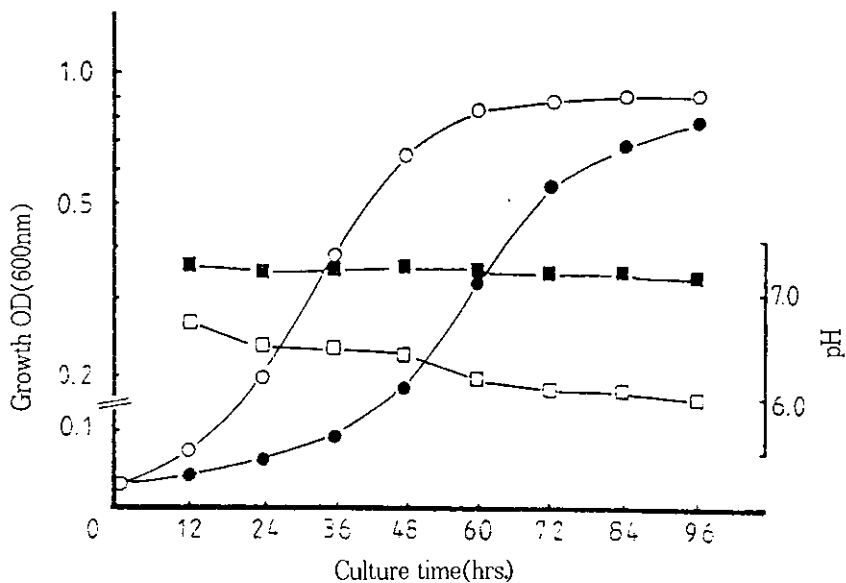


Fig. 2 Growth curves and pH changes of two strains of *R. japonicum* in YEM broth  
 Growth: ○-○;S010 ●-●;S011, pH changes: □-□;S010, ■-■;S011

Table 1. Growth and pH changes of *R. japonicum* in YEM broth OD(600nm)/pH changes

strain No.	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108(hr.)
S110	0.02	0.04	0.11	0.34	0.59	0.78	0.88	0.94	0.96	0.97
	6.80	6.90	6.70	6.70	6.72	6.71	6.70	6.69	6.55	6.51
S111	0.02	0.04	0.15	0.35	0.59	0.74	0.78	0.80	0.83	0.85
	6.80	5.92	5.84	5.80	5.59	5.57	5.44	5.30	0.83	0.85
S114	0.02	0.03	0.17	0.34	0.55	0.78	0.83	0.85	0.87	0.87
	6.80	7.02	6.96	6.72	6.60	6.51	6.37	6.31	6.31	6.30
S116	0.02	0.04	0.15	0.36	0.59	0.75	0.83	0.86	0.86	0.87
	6.80	7.05	6.90	6.80	6.66	6.62	6.46	6.31	6.22	6.22
S120	0.02	0.04	0.11	0.28	0.45	0.66	0.82	0.88	0.90	0.92
	6.80	6.97	6.75	6.65	6.55	6.45	6.40	6.40	6.30	6.30
S118	0.02	0.03	0.03	0.06	0.20	0.49	0.65	0.78	0.82	0.83
	6.80	7.15	7.10	7.02	7.00	6.97	6.95	6.95	6.95	6.90
005	0.02	0.02	0.03	0.06	0.13	0.27	0.40	0.63	0.75	-
	6.80	7.15	7.15	7.05	7.03	7.05	7.00	6.95	6.95	-
117	0.02	0.08	0.23	0.46	0.74	0.90	0.96	0.97	0.96	-
	6.80	6.80	6.75	6.75	6.60	6.50	6.31	6.21	5.74	-
201	0.02	0.05	0.25	0.41	0.78	0.92	0.97	0.97	0.97	-
	6.80	5.95	5.81	5.66	5.62	5.40	5.32	5.21	5.20	-
321	0.02	0.03	0.05	0.21	0.33	0.47	0.70	0.82	0.83	0.83
	6.80	7.69	7.67	7.55	7.46	7.36	7.10	7.03	6.62	6.62
606	0.02	0.08	0.18	0.34	0.59	0.72	0.83	0.94	1.10	-
	6.80	7.45	7.40	6.68	6.62	6.51	6.05	5.84	5.52	-

Table 2. pH changes in YEM broth of *R. japonicum*<sup>a</sup>

strain No.	final pH	OD(600nm)
fast-growers		
S34	5.9	0.84 <sup>b</sup>
S61	5.6	0.75
S62	5.8	0.88
S63	5.5	0.92
S80	6.4	0.85
S103	5.6	0.73
S104	5.4	0.79
S110	6.5	0.96
S111	5.2	0.83
S112	5.7	0.90
S114	6.3	0.87
S115	6.1	0.85
S116	6.3	0.86
S120	6.3	0.90
010	6.0	0.94
other fast-grower		
117	6.5	0.90
201	5.4	0.92
220	5.2	0.90
606	6.5	0.72
slow-growers		
S117	7.0	0.84
S118	6.9	0.82
S119	6.3	0.83
005	6.9	0.75
007	6.8	0.72
008	7.1	0.72
011	7.2	0.78
019	6.9	0.98
3407	4.5	0.73
DY-1	7.0	0.95

a: The initial pH of YEM media was adjusted to 6.8

b: The cell densities of fast-growers and slow-growers were determined at 600nm after 60 and 96 hrs, respectively.

調査한 菌株 中 S110, S111, S114, S115, S116, S120, 010은 生育速度가 빠르고 酸을 生育하는 Fast-growing *R. japonicum*으로 나타났으며, S117, S118, S005, 011, DY-1은 生育速度가 느리고, alkali를 生成하는 Slow-growing

*R. japonicum*으로 나타났는데 이러한 效果는 Keyser 等(1981)의 結果와 一致하였다.

또한 TYC培地에서 菌의 生育速度를 調査한 結果는 그림 3과 표 3에 나타나있다.

Table 3. Growth in TYC broth of fast- and slow-growing *R. japonicum*

strain No.	0	6	12	18	24	30	36	40(hr.)
S110	0.06	0.13	0.20	0.61	0.87	0.95	1.00	1.02
S111	0.00	0.10	0.18	0.72	0.87	0.95	1.00	1.02
S114	0.06	0.15	0.37	0.80	0.87	0.93	1.00	1.00
S116	0.06	0.19	0.40	0.78	0.92	0.95	1.00	1.00
S120	0.06	0.10	0.18	0.56	0.84	0.97	1.10	1.20
S118	0.06	0.08	0.12	0.32	0.76	0.90	0.20	0.20
005	0.06	0.10	0.14	0.45	0.80	0.85	0.89	0.90
117	0.06	0.16	0.24	0.82	0.86	0.87	0.89	0.89
201	0.06	0.10	0.24	0.50	0.80	0.85	0.87	0.90
321	0.06	0.17	0.20	0.40	0.90	2.26	1.42	1.60
606	0.06	0.17	0.50	0.80	0.95	1.20	1.40	1.50

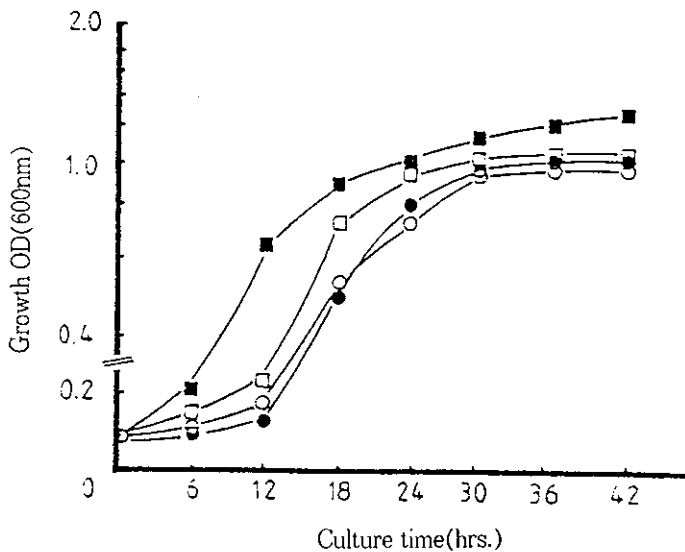


Fig. 3 Growth curves in YEM broth of fast and slow growing *R. japonicum*

○-○; S117, ●-●; 011, □-□; S115, ■-■; 010

### 形態의 特性

使用한 菌株들은 모두 그람 陰性 桿菌으로 colony는 粘液性이 있는 白色 또는 乳白色을 나타내었다.

BTB가 含有된 YEM培地에서 7日間 恒溫 培養하였을때, fast-growing型은 直徑이 2.0mm以上の colony를 形成하였고 酸生成反應을 나타낸 반면, slow-growing型은 直徑이 1.5mm以上の colony를 形成하였고 alkali성 反應을 나타내었는데 이러한 結果는 Sadowsky等(1983)의 結果와 一致하였다.

Congo red가 添加된 YEM培地에서 자란菌들 모두는 백색 또는 연한 분홍색의 colony를 形成하였다.

### 生理的 特性

使用菌株들의 NaCl과 pH抵抗성에 대한 結果는 표 4에 나타나있다. Fast-growing型은 pH4.5에서 耐性を 나타내지 않았고, pH9.5와 2% NaCl에서 耐性を 나타낸 반면, slow-growing型은 정반대의 結果를 나타내었다. 그러나 pH4.5에서 fast-growing型 菌株010은 다른 fast-growing型에 비하여 感受性이 다소 낮고, slow-growing型에 비하여 상대적으로 높은 耐性を 나타내었다.

pH9.5에서는 fast-growing型 S114가 다른 fast 型에 비하여 耐性이 다소 낮았고, slow-growing型 3470과 DY-1菌株는 다른 slow-growing型에 비하여 상대적으로 높은 耐性を 나타내었다.

Table 4. Salt and pH tolerance of *R. japonicum*<sup>a</sup>

strain No.	OD(600nm)		
	2% NaCl	pH 9.5	pH 4.5
(fast-growers)			
S110	0.62	0.67	0.09
S111	0.65	0.92	0.14
S114	0.35	0.52	0.12
S115	0.48	0.61	0.08
S116	0.53	0.64	0.07
S120	0.38	0.78	0.10
010	0.45	0.70	0.28
(slow-growers)			
S117	0.09	0.15	0.63
S118	0.08	0.12	0.58
005	0.23	0.18	0.15
011	0.22	0.24	0.65
3407	0.78	0.82	0.12
DY-1	0.05	0.37	0.52
(Other fast growers)			
117	0.37	0.53	0.14
201	0.54	0.61	0.07
321	0.50	0.26	0.38
606	0.57	0.45	0.17

a: Bacteria were grown in MM-M medium. The cell densities of fast-growers were measured with absorbance at 600nm after 60 hrs and those of slow-growers were determined after 96 hrs.



2% NaCl의 存在下에서, fast-growing 型 S114, S120은 다른 fast-growing型에 비하여 낮은 耐性を 나타내었고, 使用된 菌株들 中 3407菌株가 가장 높은 耐性を 나타내었다. 이러한 結果는 Sadowsky 等(1983)의 結果와 거의 一致하였다.

### 炭水化物的 利用性

基本培地에 菌을 接種하여 炭素原으로 어떤 炭水化물을 利用할수 있는지 여부를 調査한 結果는 표 5에 나타내었다.

菌株들 모두 glucose를 利用하여 生育할 수 있었으며, starch는 010, 321菌株만이 利用하였

다. fast-growing型은 모두 sucrose를 利用하였고, slow-growing型 S117, S118은 전혀 利用하지 못하였다. maltose는 S116菌株를 除外한 나머지 fast-growing型과 slow-growing型 005, 001이 이용하였다. 이러한 結果는 Sadowsky 等(1983)의 結果와 거의 一致하였다. 生理的 實驗으로 부터 fast-growing型은 slow-growing型 보다 더 다양하게 炭水化물을 利用하고 있음이 나타났고, Glenn과 Dilworth(1981)가 報告한 slow-growing型은 二糖類를 利用할 수 있는 up-take system 과 catabolic enzymes가 缺如되어 있다는 事實을 다소 뒷받침할 수 있었다.

Table 5. Carbohydrates utilization of *R. japonicum*<sup>a</sup>

strain No.	Glucose	Arabinose	Sucrose	Maltose	Starch
(fast-growers)					
S110	+	+	+	+	-
S111	+	+	+	+	-
S114	+	+	+	+	-
S115	+	+	+	+	-
S116	+	+	+	-	-
S120	+	+	+	+	-
010	+	+	+	+	+
(slow-growers)					
S117	+	+	-	-	-
S118	+	+	-	-	-
005	+	-	+	+	-
011	+	+	+	+	-
3407	+	-	+	-	-
DY-1	+	+	+	-	-
(other fast-growers)					
117	+	+	+	-	-
201	+	+	+	+	-
321	+	+	+	+	+
606	+	+	+	-	-

a: Quadruple plates of each carbohydrate were incubated at 28°C for 7days. Bacteria were grown in basal medium (B-M) used by Graham et al. (+ : Growth, - : No growth)

Plasmid DNA의 存在確認 및 分離

Plasmid DNA의 存在가 確認된 菌株들은 Casse等(1979)의 方法에 準하여 plasmid DNA

의 分離를 實施하였으며, 201, S110, S119, 15955菌株와 007, S104, S34 와 S63 대한 結果는 그림4에 나타내었다.

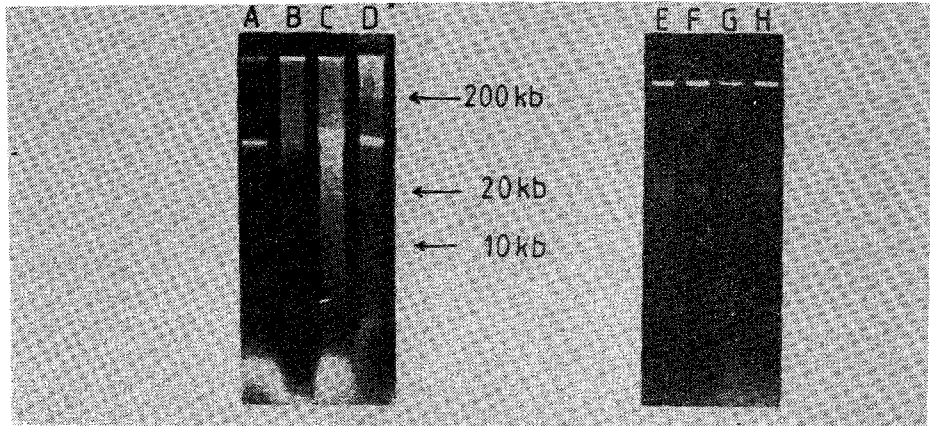


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of ethanol-precipitated DNA from crude lysate of *R. japonicum*.

Samples from strains 201(A), S110(B), S119(C) and ATCC 15955(D) were subjected to the electrophoresis for 8hrs at 40V and those from strains 007(E), S104(F), S34(G) and S63(H) for 2.5hrs at 100V.

\* *Agrobacterium tumefaciens* ATCC15955

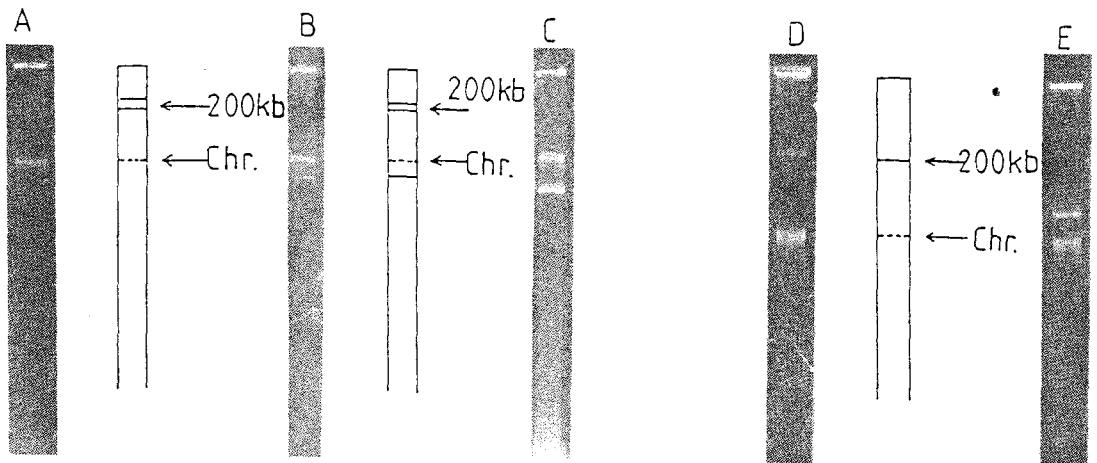


Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of ethanol-precipitated DNA from crude lysate of *R. japonicum*.

Samples from strains 011(A), 010(B), 308(C) were subjected to the electrophoresis for 9hrs at 40V and those from strains 321(D) and DY-1(E), for 5hrs at 60V.

.....; Chromosomal DNA, .....; Plasmid DNA

plasmid DNA의 存在確認實驗에서 띠가 나타나지 않았던 S34, S63, S103, S007菌株는 分離過程에서도 그 存在가 確認되지 않았다.

細胞培養液과 添加하는 buffer량을 調節하고, lysis의 條件을 수정하여 分離된 plasmid DNA

띠(band)는 그림 5에 나타나 있다.

Plasmid DNA의 명명은 Sciaky等(1978)에 의하여 報告한 命名法을 따랐으며, 各 菌株들의 plasmid DNA명명은 表 6에 나타내었다.

Table 6. Plasmids from fast- and slow-growing *R. japonicum*

strain No.	plasmid designation	
	large plasmid	small plasmid
S34	-	
S61	pRj61a	pRj61b
S62	pRj62a	pRj62b
S63	-	-
S80	pRj80a	pRj80b
S103	-	-
S104	-	-
S110	pRj110a	pRj110b, pRj110c
S111	pRj111a	pRj111b
S112	-	pRj112
S114	pRj114a	pRj114b
S115	pRj115a, pRj115b	pRj115c
S116	pRj116a	pRj116b
S120	pRj120	-
S117	pRj117a, pRj117b	pRj117
S118	pRj118a, pRj118b	pRj118c
S119	-	pRj119a, pRj119b
010	pRj010a, pRj010b	pRj010c
005	pRj005a	pRj005b(?)
007	-	-
008	-	pRj008
011	pRj011a	pRj011b
019	-	pRj019
DY-1	pRjDY-1a	pRjDY-1b(?)
3407	pRj3407a	pRj3407b
117	pRt117a, pRt117b	pRt117c
201	pRm201a	pRm201b
220	pRm220a	pRm220b
308	-	pRc308
321	pRc321	-
606	-	pRp606a, pRp606p

(-:Not detected)

## 要 約

本實驗에 使用된 菌株들의 plasmid DNA의 數와 相對的인 mobility는 아주 類似하였고 일반적으로 1-3個의 plasmid DNA 를 含有하고 있었다. 그러나 지금까지 보고된 *rhizobia*의 共通的인 特性은 이들 細胞內에 large plasmid DNA가 存在하고 있다는 것이지만, 本實驗에서 plasmid DNA가 確認된 菌株들은 1-2個의 large plasmid DNA와 1個의 small plasmid DNA를 含有하거나, 단지 類似한 mobility를 나타내는 1-2個의 small plasmid DNA만을 含有하고 있었다.

分離過程에서 특히 관심을 集中시킨 菌株는 fast-growing型 S11, S115와 slow-growing型 S117, S118이었으며, 標準菌株로는 117, 010, 011, 005, 3407, 321菌株이었다.

S115, S117, S118, 117菌株들은 모두 2個의 large plasmid DNA와 1個의 small plasmid DNA를 共通적으로 含有하였고, S111, S114, S116, S61, S62菌株는 1個의 large plasmid DNA와 1個의 small plasmid DNA를 公同적으로 含有하고 있었으며 019와 S112菌株는 同一한 位置에 단 1個의 small plasmid DNA 만을 含有하고 있었다. 本實驗에서는 단 1個의 large plasmid DNA만을 含有하고 있는 S120을 除外한 全菌株들이 large plasmid DNA와 small plasmid DNA를 公同적으로 含有하고 있거나, small plasmid DNA만을 含有하고 있다는 사실은 *rhizobium*의 分子 遺傳學的 側面에서 새로운 研究課題를 提示할 수 있다고 判斷되었다.

이러한 事實로 부터 關心이 集中된 菌株들에 存在하는 plasmid DNA의 特性을 紮明하고 small plasmid DNA를 利用하여 宿主-vector system의 開發을 試圖함으로써 再組合 DNA 操作을 農業分野에 直接 反應할 수 있는 具體的인 研究가 繼續 進行되어야 할 것으로 생각된다.

6個 品種의 大豆로 부터 分離된 大豆 根瘤菌의 生理的 特性 및 plasmid DNA의 分離를 調查한 結果는 다음과 같다.

YEM 培地에서 S117, S118, 011, DY-1菌株는 生育速度가 느리고 alkaline 反應을 나타내었으며, S110, S111, S114, S115, S116, S120, 010菌株들은 生育速度가 빠르고 酸反應을 나타내었다.

fast-growing型과 slow-growing型 *R. japonicum*은 모두 극모성 또는 주모성 鞭毛를 가진 그람 陰性 桿菌이며, 한천 평판에서 粘液性이 있는 乳白色 colony를 形成 하였다. 接種 7일後, fast-growing型의 colony는 直徑이 2.0-4.0mm였고, slow-growing 型의 colony는 대체로 0.5-1.5였다. fast-growing型은 pH4.5에서 한결같이 感受性이 있고, pH9.5에 耐性이 있는 반면 slow-growing 型은 正반대로 나타났다. 調查된 菌株들은 모두 生育을 위한 炭素源으로써 glucose를 利用하였으며, 010과 321을 제외하고 모든 균주는 starch는 전혀 利用하지 못하였으며 fast-growing型 만이 sucrose를 利用하였다.

調查된 slow-growing *R. japonicum*은 일반적으로 15-250kb 程度의 1-3個의 plasmid DNA를 함유하는 반면, fast-growing *R. japonicum*은 20-250kb程度의 1-3個의 plasmid DNA를 含有하고 있었다.

## 參 考 文 獻

1. Noel, R. K., and J. G. Hol: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins co., U. S. A. (1984) pp. 235-240
2. Keyser, H. H., Bohlool, B. B., Huk T. S. and

- D. F. Weber : 1981, Fast-growing *Rhizobia* isolated from root nodules of soybean, Science., 215:1631-1632
3. Graham, P. H. and C. A. Parker: 1964, Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes, Plant and soil., 20:383-396
  4. Elkan, G. H. : 1971, Biochemical and genetical aspects of the taxonomy of *rhizobium japonicum*. Plant and soil., Special Vol. 1:85-104
  5. Sadowsky. M. J., Keyser, H. H. and B. B. Bohlool : 1983, Biochemical characterization of fast- and slow-growing *rhizobia* that nodulate soybeans, Int. J. Syst, Bacteriol., 33:716-722
  6. Higashi, S. : 1967, Transfer of clover infectivity of *R. trifolii* to *R. phaseoli* as mediated by an episomic factor, J. Gen, Appl, Microbiol., 13:391-403
  7. Dunican, L. K. and A. B. Tierbey : 1974, Genetic transfer of nitrogen fixation genes on indigenous *rhizobium* plasmid, Biochem. Biophys. Res. Commun., 57:62-72
  8. Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M. and J. Denarie:1979, Identification and characterization of large plasmids in *rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis, J. Gen. Microbiol., 113:229-242
  9. Nuti, M. P., Ledebøer, A. M., Lepid, A. A. and R. A. Schilperoort:1977, Large plasmids in different *rhizobium* species, J. Gen. Microbiol., 100:241-248
  10. Prakash, R. K., Schilperoort, R. A., and M. P. Nuti:1981, The large plasmids of fast growing *rhizobia* ; Homology studies and location of structural nitrogen fixation(*nif*) genes, J. Bacteriol., 145:1129-1136
  11. Klein, G. E., Jemison, P., Haak, R. A. and A. G. Mathysse:1975, Physical evidence of a plasmid in *rhizobium japonicum*, Experientia., 31:532-533.
  12. Luyindula, N., Tahitenge, G., Lurquin, R. and L. Ledoux:1975, Etude des plasmides de *rhizobium japonicum*, Archives enterationales de physiologie et biochimie., 83:199-200.
  13. Masterson, R. V., Russell, P. R. and A. G. Atherly:1982, Nitrogen fixation(*nif*) genes and large plasmids of *rhizobium japonicum*, J. Bacteriol., 152:928-931
  14. Lee, K. H. : 1985, Isolation and physiological characteristics of soybean root nodule bacteria, 석사학위논문
  15. Stowers, M. D. and A. R. J. Eaglesham: 1984, Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *rhizobium japonicum*, Plant and soil., 77:3-14
  16. Boucher, C. and B. B. Bergeron: 1977, Introduction of bacteriology phage Mu into *pseudomonas solanacearum* and *rhizobium meliloti* using the R factor R 4, J. Gen. Microbiol., 98, 253-263
  17. Hahn, N. J. : 1966, the congo red reaction in bacteria and its usefulness in the identification of *rhizobium*, Canadian, J. of Microbiol., 12:725-733
  18. Kaeo, C. I. and S. J. Liu : 1981, Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid, J. Bacteriol., 145:1365-1373
  19. Dillon, J. A. R., and E. R. Nestmann: Recombinant DNA methodology, John Willey and Sons, Inc., New York, (1985) pp. 147-

20. Meyers, I. A., Sanchez, D., and L. P. Elwell: 1976, Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid, *J. Bacteriol.*, 1529-1573
21. Glenn, A. R. and M. J. Dilworth: 1981, The uptake and hydrolysis of disaccharide by fast - and slow-growing species of *rhizobium*, *Arch. Microbiol.*, 129:233-239
22. Sciaky, D., Montoya, A. and M. D. Chilton: 1978, Fingerprints of *agrobacterium* Ti plasmids, *Plasmid.*, 238-253