

## 보 문

# 콩 근권의 핵심 세균 군집

이영미<sup>1,3</sup> · 안재형<sup>1</sup> · 최유미<sup>2</sup> · 원항연<sup>1</sup> · 윤정훈<sup>3</sup> · 송재경<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립농업과학원 농업미생물과, <sup>2</sup>국립농업과학원 농업유전자원센터, <sup>3</sup>성균관대학교 식품생명공학과

## Bacterial core community in soybean rhizosphere

Youngmi Lee<sup>1,3</sup>, Jae-Hyung Ahn<sup>1</sup>, Yu-Mi Choi<sup>2</sup>, Hang-Yeon Weon<sup>1</sup>, Jung-Hoon Yoon<sup>3</sup>, and Jaekyeong Song<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Jeonju 55365, Republic of Korea

<sup>2</sup>RDA-Genbank, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 54874, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon 24233, Republic of Korea

(Received October 30, 2015; Accepted November 12, 2015)

**ABSTRACT:** Soybean is well known to be originated from Korea and far-east Asian countries, and studies of many root nodule bacteria associated with soybean have mainly focused on nitrogen fixation, but much less study was carried out on bacterial community in the rhizosphere of soybean. In this study, we analyzed the bacterial community in rhizosphere of Korean soybean, Daepungkong using the pyrosequencing method based on the 16S rRNA gene to characterize the change of the rhizosphere community structure according to the growth stages of soybeans and to elucidate bacterial core community in rhizosphere of soybean. Our results revealed that bacterial community of rhizosphere soil differed from that of bulk soil and was composed of a total of 21 bacterial phyla. The predominant phylum in the rhizosphere of soybean was *Proteobacteria* (36.6–42.5%) and followed by *Acidobacteria* (8.6–9.4%), *Bacteroidetes* (6.1–10.9%), *Actinobacteria* (6.4–9.8%), and *Firmicutes* (5.7–6.3%). The bacterial core community in soybean rhizosphere was mainly composed of the operational taxonomic units (OTUs) belonging to the phylum *Proteobacteria* throughout all growth stages. The OTU00006 belonged to the genus *Bradyrhizobium* had the highest abundance and *Steroidobacter*, *Streptomyces*, *Devosia* were followed. These results show that bacterial core community in soybean rhizosphere was mainly composed of OTUs associated with plant growth promotion and nutrient cycles.

**Key words:** bacteria, community, core, pyrosequencing, rhizosphere, soybean

근권(Rhizosphere)은 뿌리의 영향을 받는 좁은 영역으로 미생물이 상호작용하는 놀이터이자 전쟁터라고도 하고, 지구 상에서 미생물의 가장 역동적인 공간이라 할 정도로 미생물 군집 다양성과 변화가 큰 곳이다(Raaijmakers *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013). 일반적인 토양 1 g에는 대략  $10^8$  cfu 미만의 세균이 서식하나 근권 토양에는  $10^{10}$ 에서  $10^{12}$  정도의 세균이 존재한다고 알려져 있다(Foster, 1988). 이들 근권 미생물은 식물의 제2의 유전체라고 불릴 정도로 식물의 건강에 필수적이고, 식물과의 상호작용하면서 성장과정에 중요한 역할을 하기 때문에 많은 연구자들의 관심분야이다(Berendsen *et al.*, 2012; Chaparro *et al.*, 2014; Prashar *et al.*, 2014). 토양 미생물

은 토양의 물리화학적 특성, 경작형태 등 다양한 요인에 의해 영향을 받으며(Girvan *et al.*, 2003; Frey *et al.*, 2004; Fierer and Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Faoro *et al.*, 2010; Rousk *et al.*, 2010), 근권 미생물의 경우 토양의 특성뿐만 아니라 식물의 발달 단계에 의해서도 영향을 받는다(Baudoin *et al.*, 2002; Mougél *et al.*, 2006; Houlden *et al.*, 2008; Gottel *et al.*, 2011; Chaparro *et al.*, 2014). 근권과 같은 특정서식지와 관련되어 안정적이고 일정하게 유지되는 미생물 집합체를 핵심군집이라고 하며 서식지 내 생태계 기능에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다(Shade and Handelsman, 2012).

미생물 군집의 분석은 크게 배양 의존적인 방법과 비의존적인 방법으로 나눌 수 있으며, 대부분(>99%)의 미생물들은 실험실에서 배양되지 않기 때문에 배양 의존적 분석은 그 한계가 존재한다(Amann *et al.*, 1995). 배양 비의존적 방법을 통한

\*For correspondence. E-mail: mgjksong@korea.kr;  
Tel.: +82-63-238-3041; Fax: +82-63-238-3834

군집분석은 주로 16S rRNA 유전자를 이용한 DGGE, TGGE, t-RFLP, SSCP 등을 사용하였다. 최근 클로닝(cloning)에 비해 비용이나 노동력 면에서도 절감이 되며, 미숙한 조작으로 인한 에러를 줄여 줄 수 있는 차세대 염기서열분석 방법(next generation sequencing, NGS)으로 빠르게 대체되고 있다(Su et al., 2012).

콩(*Glycine max* (L.) Merr.)은 단백질과 지질이 풍부하고, 전 세계적으로 가장 넓은 재배면적을 갖는 작물들 중 하나이며, 경제적으로 중요한 작물이다(Schmutz et al., 2010). 콩의 광범위한 유용성으로 인해 식품의 기능성 물질 연구뿐 아니라 질소 고정균 연구 등 다양한 분야에서 진행되었으며, 콩의 전체 유전체 분석도 완료되었다(Graham, 2008; Isanga and Zhang, 2008; Schmutz et al., 2010). 콩의 근권 미생물에 대한 연구는 주로 뿌리혹과 질소 고정에 대하여 많은 연구가 이루어졌으나, 최근 들어 식물의 건강과 밀접하게 관련된 것으로 알려진(Berendsen et al., 2012; Philippot et al., 2013) 근권 미생물 군집의 구조와 기능, 토성, 품종, 성장단계 등에 따른 영향에 대한 연구가 수행되었다(Xu et al., 2009; Mendes et al., 2014; Sugiyama et al., 2014). 콩의 근권에는 *Proteobacteria*와 *Actinobacteria*가 우점하였으며, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Firmicutes* 등은 연구결과에 따라 우점하는 순위가 다르게 나타났다(Sugiyama et al., 2014).

콩의 원산지로 알려진 한국의 콩에 대한 연구는 많이 이루어졌으나 콩의 근권미생물 연구는 거의 이루어지지 않아 이에 대한 미생물 생태학적인 접근이 필요하다. 본 연구에서는 NGS를 사용하여 한국에서 많이 재배되고 있는 대풍콩을 대상으로 근권에 어떠한 세균이 서식하며, 어떠한 분포를 이루고 있는지를 알아보고자 하였으며, 콩의 근권에 서식하는 핵심 세균 군집을 구명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 종자 전처리, 파종 및 재배

콩 종자는 재배종인 대풍콩(CM3-004, 국립식량과학원)을 2014년 5월 27일에 파종하였다. 파종 전 종자 표면에 상주하고 있는 미생물의 살균을 위해 Clough와 Bent (1998)의 방법에 따라 표면 세척을 실시하였다. 먼저 종자를 50 ml falcon tube에 담아 95%의 에탄올로 30초에서 60초 정도 침지하였다. 그 다음 2.3%의 sodium hypochlorite와 0.05% Tween 20이 포함되어 있는 50% 표백제로 5분간 침지시킨 후 시약잔류물을 제거하기 위해 멸균 증류수로 세 번 세척하였다. 이렇게 세척

한 종자는 잘 풍건하여 물기를 제거한 후, 콩의 자주무늬병 예방과 조류기피의 기능이 있는 종자처리 액상수화제인 새총(Yonezawa)을 건종자 1 kg당 30 ml 기준으로 종자에 골고루 묻혀주고 그늘에서 건조했다. 이 종자를 2014년 5월 23일에 수원시 권선구 서둔동에 위치한 (구)농업생물부 내 연구용 시험포장(37° 15' 46.42" N, 126° 59' 15.24" E)에 이랑형태로 비닐피복한 토양에 30 cm 정도의 간격으로 한 구멍에 2립씩 파종하였다. 파종 후에는 조류나 동물에 의한 종자의 유실을 막기 위해 한랭사로 방조망을 설치하였다. 한랭사는 종자가 발아하여 새싹이 나와 더 이상 종자 유실을 막을 필요가 없을 때까지 한달 동안 유지하였다. 재배기간 중 토양이 건조되지 않도록 관리하고 지속적으로 잡초를 제거하였다. 재배기간 중에는 비료나 살충제를 사용하지 않았다.

### 토양시료 채취 및 분석

시료는 작물의 생산성과 밀접하게 관련되어 있다고 알려져 있는 콩의 생식생장기 중에서도 개화기[max flowering (MF), R2], 착합기[max pod (MP), R4], 협비대기[max seed (MS), R6], 성숙기[max maturity (MM), R7] 4 단계를 대상으로 근권 토양(RS)과 비근권토양(BS)을 3반복으로 채취하였다(Fehr and Caviness, 1977). 채취한 시료는 신속히 실험실로 옮겨와 토양을 잘 섞은 후 2 mm 체로 걸러 균질화하여 토양 100 g을 사각플라스틱병과 Eppendorf-tube에 나누어 담아 -80°C 냉동고에 보존하여 DNA 추출에 사용하였다. 건토의 보존은 균질화시킨 토양 100 g을 3일간 음건하여 토양화학성 분석에 사용하였다.

### DNA 추출 및 파이로시퀀싱 분석

DNA 추출을 위해서 토양 0.25 g을 PowerSoil DNA isolation kit (Mo Bio)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였다. 추출된 DNA는 Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies Inc.)을 통해 정량하였다. 추출된 DNA의 파이로시퀀싱 분석은 Chunlab에 의뢰하여 Roche 454 GS-FLX+ 장비를 사용하였다.

정방향 프라이머로는 V1-9F (5'-AC-GAGTTTGATCMTGGGCTCAG-3')로 adaptor-linker-primer의 순서로 구성되어 있다, 역방향 프라이머로는 V3-541R (5'-X-AC-WTTACC GCGGCTGCTGG-3')로 adaptor-barcode-linker-primer의 순서로 구성되어 있다. X는 시료를 구분하기 위하여 7-11개의 뉴클레오타이드로 구성된 바코드를 나타낸다.

### 파이로시퀀싱 결과 분석

파이로시퀀싱 결과로 얻어진 염기서열들은 Mothur (version 1.27.0) 프로그램을 이용하여 분석하였다(Schloss *et al.*, 2009). 염기서열 데이터는 고품질의 시퀀스 데이터를 얻기 위해 길이가 짧거나 혹은 프라이머가 일치하지 않는 염기서열을 제거한 후 PyroNoise 알고리즘을 이용하여 파이로시퀀싱을 통해 발생한 에러를 수정하였다(Quince *et al.*, 2011). 키메라 시퀀스는 UCHIME 프로그램을 사용하여 제거하였다(Edgar *et al.*, 2011). RDP database (version 9)를 이용해 세균 이외의 다른 생물, 즉 진핵생물, 고세균, 엽록체, 미토콘드리아와 계(kingdom) 수준에서 분류가 안된 염기서열들을 제거하였다(Cole *et al.*, 2009). 총 105,048개의 염기서열을 얻은 후 각 시료의 염기서열을 1,994개로 표준화하였으며, SINA Aligner (version 1.1)를 이용해 정렬하였다(Pruesse *et al.*, 2012). Average-neighbor 알고리즘을 이용하여 97% 유사도를 기준으로 operational taxonomic unit (OTU)를 분류하였다. Good의 coverage, 종 풍부도 추정치, 다양성지수 및 Venn diagram은 Mothur 프로그램을 이용하여 계산하였다(Schloss *et al.*, 2009). 시료간의 유사성 기반의 베타다양성 분석은 unweighted UniFrac 분석(Lozupone and Knight, 2005)을 이용하였다.

## 결 과

### 파이로시퀀싱 결과 요약

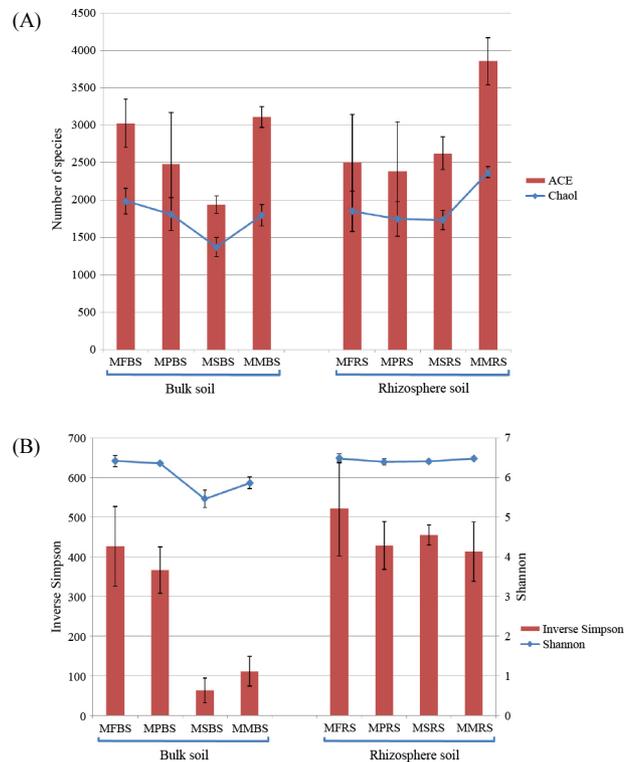
파이로시퀀싱 결과, 콩의 생육 4단계와 각 단계당 3반복으로 총 12개의 토양시료로부터 149,048개의 염기서열을 얻은 후 trimming 과정, chimera 제거과정 등을 통해 총 105,048개의 염기서열을 얻었으며, 가장 낮은 수의 염기서열을 가진 시료(1,994개)로 맞추어 최종적으로 47,856개의 염기서열을 얻었다. 이렇게 얻어진 염기서열은 Mothur 프로그램을 이용한 분석경로(pipeline)를 활용하여 군집분석에 사용하였다.

종 풍부도는 비근권과 근권 사이에 큰 차이를 확인할 수는 없었다(Fig. 1). 생육 단계별로는 근권의 경우 개화기에서 협비대기까지 큰 차이를 보이지 않다가 마지막 성숙기에서 종 풍부도가 급격히 증가하여 최대값을 나타냈으나 다양성 지수는 단계에 따라 약간 감소하였다. 비근권의 경우 종의 풍부도가 협비대기까지 감소하다 성숙기에 증가하였으며 다양성 지수는 협비대기와 성숙기에 뚜렷하게 감소하였다.

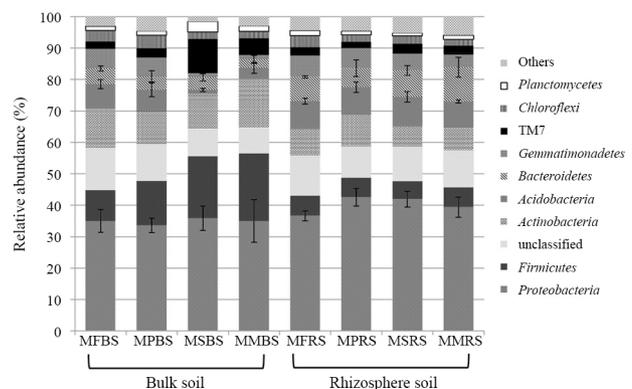
### 근권 세균 군집분석

콩의 근권과 비근권 토양의 세균 문 수준의 분포는 Fig. 2와

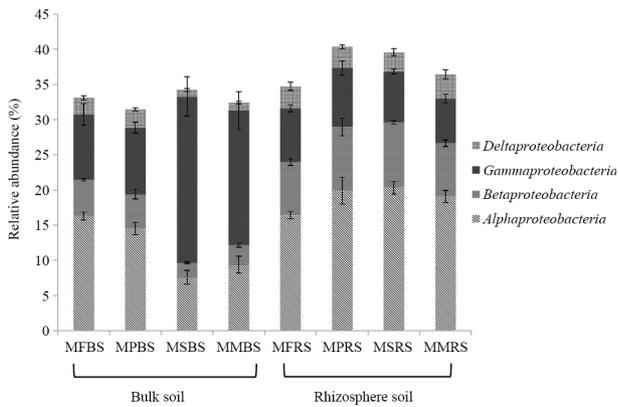
같이 인정되지 않은 그룹을 포함하여 총 21개의 세균 문이 존재하였다. 비근권과 근권 토양 모두 *Proteobacteria*가 가장 우점하였고 비근권(33.6-35.8%)보다 근권(36.6-42.5%)에서 상



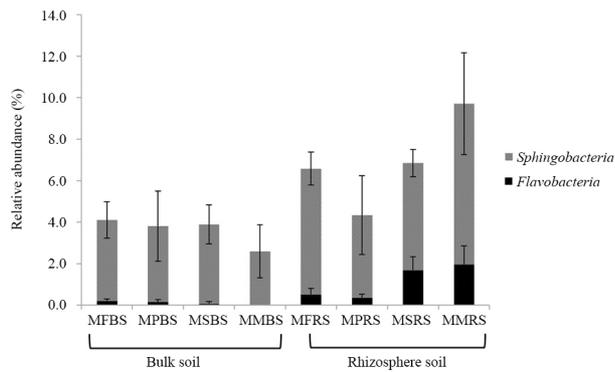
**Fig. 1.** Species richness (A) and diversity indices (B) of the pyrosequencing data from bulk soil (BS) and rhizosphere soil (RS) of *Glycine max*. MF, max flowering; MP, max pod; MS, max seed; MM, max mature.



**Fig. 2.** Bacterial distribution at the phylum level. Samples were collected by triplicates for getting relative abundance of major bacterial phyla distributed in bulk and rhizosphere soil of soybean which were cultivated in an upland field. Error bars indicate standard deviation (n=3). Others contain 12 phyla such as *Verrucomicrobia* (1.18%), *Nitrospira* (0.92%), *Cyanobacteria* (0.84%), *Armatimonadetes* (0.48%), OD1 (0.38%), *Deinococcus-Thermus* (0.12%), WS3 (0.05%), OP11 (0.03%), BRC1 (0.02%), *Chlorobi* (0.02%), *Deferribacteres* (0.004%), and *Fusobacteria* (0.004%).



(A) Relative abundance of classes belonged to the phylum *Proteobacteria*

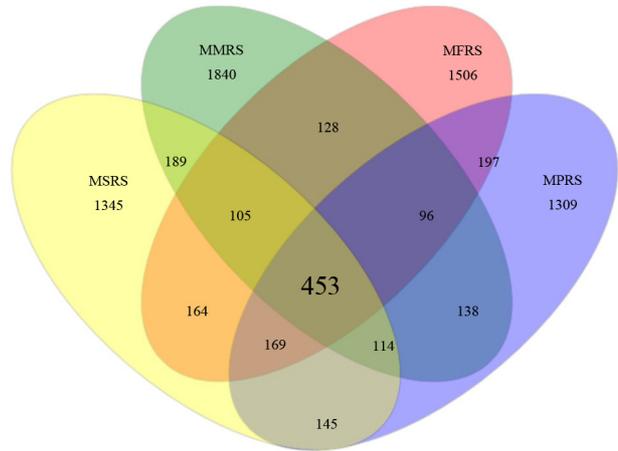


(B) Relative abundance of classes belonged to the phylum *Bacteroidetes*

**Fig. 3.** Relative abundance of bacterial class composition of *Proteobacteria* (A) and *Bacteroidetes* (B) presents in BS and RS from soybean field on the basis of 97% 16S rRNA gene sequence similarity. Error bars indicate standard deviation (n=3).

대풍부도가 높았으며, *Firmicutes* (5.7-21.5%)와 *Actinobacteria* (6.4-15.5%), *Bacteroidetes* (2.7-10.9%), *Acidobacteria* (1.4-9.4%) 등의 순으로 우점하였다. *Firmicutes*는 비근권보다 근권에서 그 비율이 평균 10% 정도 낮았고, 비근권의 경우는 성숙단계로 갈수록 점차 증가(9.8-21.5%)하는 양상을 보였으나, 근권에서는 큰 변화가 없었다. *Bacteroidetes*는 비근권(2.7-5.0%)에 비해 근권(6.0-10.9%)에서 상대풍부도가 높았고, 생장 단계가 지남에 따라 감소(5-2.7%)하는 비근권에서와 달리 근권에서는 개화기와 착형기(6.1-7.7%) 보다 협비대기와 성숙기(8.4-10.9%)에서 그 비율이 더 높았다. 전체적으로 근권의 문 수준의 상대풍부도의 변화는 비근권에 비해 크지 않았다.

문 수준에서 가장 우점하였던 *Proteobacteria* (37.5%)를 강 수준에서 확인한 결과, 비근권에서는 *Gammaproteobacteria* (15.4%)가 우점하였고, 근권에서는 그 비율(8%)이 낮았다 (Fig. 3A). 반면에 *Alphaproteobacteria*와 *Betaproteobacteria*는 비근권(11.9%, 3.7%)에 비해 근권(18.9%, 8.4%)에서 우점



**Fig. 4.** Core bacterial 453 OTUs merged triplicates of each sample. Venn diagram showing variable overlap between four growth stages of soybean. 453 operational taxonomic units (OTUs) were co-existed in four growth stages.

하였다. 비근권에 비해 근권에서 우점하였던 *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*는 개화기와 성숙기보다 착형기와 협비대기에서 상대풍부도가 더 높았고, 비근권에서 상대풍부도가 더 높았던 *Gammaproteobacteria*는 개화기와 착형기보다 협비대기와 성숙기에서 상대풍부도가 더 높았다. 근권에서 높은 비율을 차지하였던 *Bacteroidetes*의 강 수준에서는 *Sphingobacteria*와 *Flavobacteria*가 우점하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이들은 개화기와 착형기에 비해 협비대기와 성숙기에서 상대풍부도가 높았다.

### 핵심 세균 군집 분석

콩의 개화기, 착형기, 협비대기, 성숙기 모든 생육 단계에서 공통으로 존재하는 근권 세균 구성원을 핵심 세균 군집이라고 정의할 수 있다(Shade and Handelsman, 2012). 이 군집을 벤다이어그램을 이용하여 분석한 결과, 총 16,655개의 염기서열을 포함한 453개의 OTU가 모든 생육 단계에서 존재하였다 (Fig. 4). 453개의 OTU 중 상대적인 풍부도가 높고(0.5% 이상) 모든 생육 단계에서 비근권 토양보다 높은 비율로 존재하는 OTU를 콩 근권의 핵심 세균 군집으로 결정하였다(Table 1). 가장 우점하는 균주는 *Bradyrhizobium*에 속한 OTU로 확인되었으며, 그 외에 *Burkholderiales*와 *Rhizobiales*에 속한 OTU, *Steroidobacter*, *Streptomyces*, GP1, GP4, *Devosia* 등에 속한 OTU가 우점하는 것을 확인할 수 있었다.

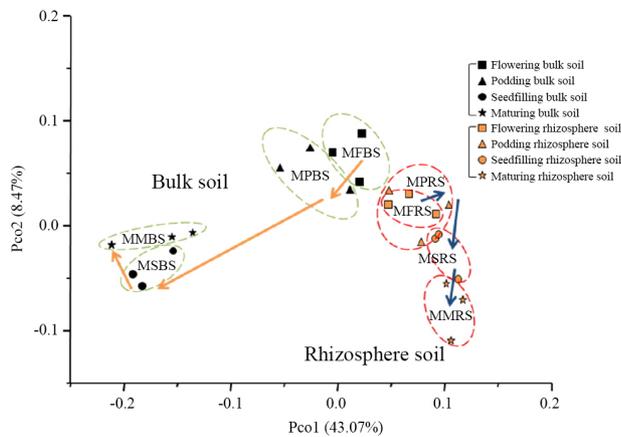
### 전체 군집 구조 비교

콩의 근권 및 비근권 토양의 전체 세균 군집 변화는 16S

**Table 1. The bacterial core community associated with rhizosphere of soybean**

OTUs	Genus(or higher)	Phylum	MFBS	MPBS	MSBS	MMBS	MFRS	MPRS	MSRS	MMRS
OTU00006	<i>Bradyrhizobium</i>	Proteobacteria	1.62%	1.42%	0.47%	0.37%	1.69%	1.86%	2.37%	3.06%
OTU00025	<i>Burkholderiales</i>	Proteobacteria	0.84%	0.74%	0.24%	0.15%	1.93%	1.00%	0.77%	0.36%
OTU00028	<i>Rhizobiales</i>	Proteobacteria	0.42%	0.90%	0.13%	0.13%	0.56%	1.00%	0.95%	1.58%
OTU00034	<i>Rhizobiales</i>	Proteobacteria	0.67%	0.49%	0.09%	0.07%	0.88%	1.07%	0.81%	0.65%
OTU00048	<i>Steroidobacter</i>	Proteobacteria	0.36%	0.22%	0.04%	0.04%	0.88%	0.95%	1.05%	0.44%
OTU00039	<i>Streptomyces</i>	Actinobacteria	0.45%	0.33%	0.30%	0.15%	0.86%	0.79%	0.51%	1.04%
OTU00052	Gp1	Acidobacteria	0.47%	0.35%	0.00%	0.00%	0.56%	0.48%	0.70%	1.27%
OTU00067	Gp4	Acidobacteria	0.14%	0.08%	0.00%	0.02%	0.46%	0.50%	0.70%	1.32%
OTU00046	<i>Devosia</i>	Proteobacteria	0.59%	0.30%	0.19%	0.13%	0.78%	1.13%	0.63%	0.31%
OTU00042	<i>Dokdonella</i>	Proteobacteria	0.70%	0.57%	0.11%	0.11%	0.86%	0.75%	0.67%	0.52%
OTU00072	<i>Novosphingobium</i>	Proteobacteria	0.03%	0.03%	0.00%	0.00%	0.22%	0.32%	1.37%	0.73%
OTU00074	<i>Rhizobium</i>	Proteobacteria	0.00%	0.11%	0.00%	0.00%	0.34%	0.20%	0.88%	1.14%
OTU00063	<i>Gammaproteobacteria</i>	Proteobacteria	0.45%	0.35%	0.06%	0.02%	0.56%	0.75%	0.12%	1.12%
OTU00056	<i>Rhodocyclaceae</i>	Proteobacteria	0.84%	0.22%	0.04%	0.13%	0.83%	0.36%	0.46%	0.73%
OTU00084	<i>Massilia</i>	Proteobacteria	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.20%	0.95%	1.14%
OTU00057	Gp1	Acidobacteria	0.56%	0.3%	0.02%	0.33%	0.68%	0.48%	0.58%	0.57%
OTU00082	<i>Polyangiaceae</i>	Proteobacteria	0.03%	0.16%	0.02%	0.00%	0.56%	0.68%	0.46%	0.47%

\*Percent indicates relative abundance to 16,655 reads of 453 OTUs which present in rhizosphere of all growth stages.



**Fig. 5. Principal coordinate analysis (PCoA) plot of samples using the unweighted UniFrac distance matrix.** The percentage of variation explained by the plotted principal coordinates is indicated on the axes.

rRNA 유전자 염기서열간의 계통분류학적 유사도를 고려한 방법인 unweighted UniFrac 분석으로 수행하였다(Fig. 5). 이 방법은 변수를 통해 시료 간 유사도를 살펴볼 수 있는 주좌표 분석(Principal Coordinate Analysis, PCoA) 방법이다. 첫 번째 principal coordinate (PCo1, 43.07%)는 비근권과 근권 토양간의 미생물 군집 차이를 나타내었다. PCo2 (8.47%)는 생육단계와 관련된 비근권과 근권에서의 세균 군집의 변화를 보여주었다. 비근권에서는 개화기와 착엽기에서 혐비대기와 성숙기로

의 단계별 변이가 뚜렷하게 나타나는 반면, 근권은 단계별 세균 군집구조의 변이가 크지 않았다.

## 고찰

식물은 다양한 미생물들과 공생관계를 이루며 살아간다. 특히 뿌리 주변 즉, 근권에는 다양한 미생물이 서식한다고 잘 알려져 있다. 콩을 포함한 여러 식물들은 다양한 화학물질을 분비하고 이들 분비물의 종류와 비율은 식물의 종과 식물의 발달 단계에 따라 달라지며 근권미생물 군집에 영향을 미친다 (Chaparro *et al.*, 2014). 따라서 콩의 생육 단계 동안 콩의 근권에 어떠한 세균이 서식하며, 어떠한 분포를 이루고 있는지를 알아보고자 하였으며, 콩의 근권에 서식하는 핵심 세균 군집이 무엇인지 밝히고자 하였다. 콩의 개화기, 착엽기, 혐비대기, 성숙기를 대상으로 파이로시퀀싱 분석을 통해 콩의 근권 세균 군집의 다양성 및 구조를 분석하였다. 콩 근권의 세균 종 풍부도는 개화기와 착엽기보다 혐비대기와 성숙기에서 더 높았고 다양성지수는 낮아지는 것으로 나타났다. 이는 다양한 뿌리 삼출물에 의한 영향으로 판단된다(Chaparro *et al.*, 2013). 비근권 토양의 다양성지수의 급격한 저하는 계절의 변화에 따른 온도의 변화에 기인한 것으로 추정된다.

PCoA의 분석 결과, 비근권 군집과 근권 군집이 뚜렷이 구

분되어 근권과 비근권의 세균 군집 구조의 차이를 확인할 수 있었다. 비근권의 생육 단계에 따른 군집의 변화에 비해 근권에서의 생육 단계에 따른 변화가 크지 않은 것을 볼 때 근권에서 세균의 군집은 외부 환경의 영향보다 콩의 생육에 따른 뿌리 주변의 변화, 즉 삼출물 등에 의한 영향일 것으로 판단된다.

일반적으로 토양에 우점하는 *Proteobacteria*가 콩의 모든 생육 단계의 근권과 비근권 토양에서 상대풍부도가 가장 높았다(Schloss and Handelsman, 2006). *Acidobacteria*와 *Bacteroidetes*는 비근권에 비해 근권에서 높은 비율을 차지하였다. *Acidobacteria*는 지구 생태계에서 가장 풍부한 세균 문 중 하나(Barns et al., 1999), 셀룰로오스나 리그닌과 같은 다당류와 식물 유래 복합체를 분해할 수 있는 능력이 있어 탄소순환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ward et al., 2009). 근권에는 일반적으로 뿌리가 분비하는 삼출물이 풍부하기 때문에 *Acidobacteria*가 그 물질들을 분해하기 위해 비근권에 비해 점유 비율이 높았던 것으로 추측된다. 또한 근권에서 *Bacteroidetes*의 역할은 아직 명확하게 입증되지 않았지만, 근권 토양에서 양분 전환에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Yousuf et al., 2012). 또한 *Bacteroidetes*에 속하는 세균 중은 질소 순환과 관련된 탈질소 유전자를 가지고 있다고 보고되기도 하였다(Van Spanning et al., 2005). 따라서 *Bacteroidetes*는 콩의 근권에서 *Proteobacteria* 다음으로 양분 전환 및 질소 순환에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다. 비근권에 비해 근권에서의 *Proteobacteria*의 증가는 *Alphaproteobacteria*와 *Betaproteobacteria*의 증가에 의한 것으로 나타났으나 비근권에서 보여지는 단계별 뚜렷한 변화는 보이지 않아 근권의 *Proteobacteria*에 속한 세균 분류군은 비근권보다 콩의 생육 단계 동안 상대적으로 안정하다는 것을 알 수 있었다. 근권에서의 *Bacteroidetes*의 증가는 *Sphingobacteria*와 *Flavobacteria*에 의한 것이라는 것을 확인하였으며, 이들은 유기물 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 것처럼 콩의 뿌리 유기물 및 삼출물과 밀접하게 관련되어 있을 것으로 판단된다(Kirchman, 2002; Gómez-Pereira et al., 2012).

콩의 모든 생육단계 동안 항상 존재하며, 근권에 0.5% 이상 분포하고, 모든 생육 단계에서 비근권보다 상대적인 풍부도가 높았던 총 17개의 OTU를 확인하였다(Table 1). 17개의 OTU 중 13개의 OTU가 *Proteobacteria*에 속하였으며, 이들 중 가장 점유비율이 높았던 OTU는 *Bradyrhizobium*에 속하였다. 속이 분류되지 않은 OTU를 제외하면 *Steroidobacter*, *Streptomyces*, *Devosia*, *Dokdonella*, *Novosphingobium*, *Rhizobium*, *Massilia* 등이 콩의 핵심세균 군집에 속하는 것으로 나타났다. *Bradyrhizobium*은 콩과식물 뿌리혹에 우점하는 속이기 때문에

콩 근권에도 많이 존재하는 것으로 추측되며, 콩 뿌리 삼출물에 대해 화학성을 보여 뿌리 근처에 많이 서식하였기 때문에 점유 비율이 높았을 것으로 생각된다(Barbour et al., 1991). *Bradyrhizobium*에 속한 OTU00006은 성숙기에 상대풍부도가 줄어드는 Sugiyama 등(2014)의 결과와는 달리 근권에서 생육단계 동안 지속적으로 증가했던 것은 성숙기의 시료채취 시기가 달랐기 때문일 것으로 판단된다. *Novosphingobium*에 속한 OTU00072는 콩의 뿌리에서 방향족 화합물의 분해를 담당하는 것으로 판단된다(Sohn et al., 2004). *Gammaproteobacteria*인 *Steroidobacter*에 속한 OTU00048은 콩의 근권에 많이 분포하는 *Rhizobiales*에 속한 세균의 대사산물로 인해 *Steroidobacter*의 생육이 증가되어 콩의 근권에 많이 분포하는 것으로 판단된다(Sakai et al., 2014). *Betaproteobacteria*인 *Massilia*에 속한 OTU00084는 뿌리에 정착하여 서식하는 고영양세균(copiotroph)으로 비근권에서는 나타나지 않았으며, 콩 근권의 혐비대기와 성숙기에 많이 존재하였다(Ofek et al., 2012). *Gammaproteobacteria*인 *Devosia*에 속한 OTU00046은 수생 콩과식물의 뿌리에 뿌리혹을 생성하여 공생하며 질소를 고정하는 것으로 알려진 것처럼 콩의 근권에도 잘 정착할 수 있다는 것을 의미한다(Rivas et al., 2002). 식물이 토양으로부터 유용한 세균을 모집(recruitment)한다고 알려진 것처럼 콩은 질소고정, 유기물분해 등에 밀접하게 관련된 *Proteobacteria*에 속한 균주들을 모집하여 콩의 생육 및 건강에 중요한 역할을 할 수 있는 근권 핵심 세균 군집을 구성하는 것으로 판단된다(Bakker et al., 2013).

결론적으로 본 연구는 파이로시퀀싱 분석을 통하여 한국에서 많이 재배되고 있는 대풍콩의 근권 세균의 군집 구조를 밝혔으며, 근권 세균 군집이 비근권과는 다르게 콩의 생육 단계에 따라 변화된다는 것을 알 수 있었다. 아울러 생육촉진 능력이 있을 것으로 추측되는 *Proteobacteria*에 속한 세균들이 콩 근권의 핵심 세균 군집을 구성하고 있다는 것을 확인하였다. 향후 핵심 세균 군집에 속한 균주들의 분리와 그들의 생육촉진관련 기능성 검정 및 대사물질 활성 검정 등의 연구를 통해 실제 콩의 재배 현장에 적용하는 연구가 추진될 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

콩은 우리나라와 극동아시아가 원산지로 알려져 있으나 국산 콩의 근권 세균 군집에 대한 연구는 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 국산 재배콩을 대상으로 차세대 염기서열 분석 방법

인 파이로시퀀싱 방법을 사용하여 콩 근권 세균 군집 구조를 해석하고 생육단계별 군집의 변화 및 콩 근권의 핵심 세균 군집을 구명하고자 하였다. 세균 군집 분석 결과, 근권 세균의 군집은 근권과 비근권간에 뚜렷한 차이를 보였으며, 총 21개의 문으로 구성되었다. *Proteobacteria*가 가장 우점(36.6–42.5%)하였고, *Acidobacteria* (8.6–9.4%), *Bacteroidetes* (6.1–10.9%), *Actinobacteria* (6.4–9.8%), *Firmicutes* (5.7–6.3%) 등의 순으로 상대풍부도가 감소하였다. 모든 생육단계에 걸쳐 콩 근권의 핵심 세균 군집에는 *Proteobacteria*에 속한 OTU들이 가장 많이 분포하였으며, 이들 중 *Bradyrhizobium*에 속한 OTU의 상대 풍부도가 가장 높았다. 본 연구결과는 콩 근권의 핵심 세균 군집은 주로 생육 촉진 기능과 유기물 순환에 관련된 OTU로 구성되어 있다는 것을 보여주었다.

### 감사의 말

본 논문은 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ010035)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 대풍콩 종자를 분양해 주신 국립식량과학원의 문중경 박사님께 감사를 드립니다.

### References

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–169.

Bakker, P.A.H.M., Berendsen, R.L., Doornbos, R.F., Wittermans, P.C.A., and Pieterse, C.M.J. 2013. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Front Plant Sci* **4**, 165.

Barbour, W., Hattermann, D., and Stacey, G. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2635–2639.

Bams, S.M., Takala, S.L., and Kuske, C.R. 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1731–1737.

Baudoin, E., Benizri, E., and Guckert, A. 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Appl. Soil Ecol.* **19**, 135–145.

Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., and Bakker, P.A.H.M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* **17**, 478–486.

Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., and Vivanco, J.M. 2013. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally

programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One* **8**, e55731.

Chaparro, J.M., Badri, D.V., and Vivanco, J.M. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.* **8**, 790–803.

Clough, S.J. and Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.

Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A., McGarrell, D., Marsh, T., and Garrity, G.M. 2009. The ribosomal database project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, D141–D145.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. 2011. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200.

Faoro, H., Alves, A., Souza, E., Rigo, L., Cruz, L., Al-Janabi, S., Monteiro, R., Baura, V., and Pedrosa, F. 2010. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the southern brazilian atlantic forest. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4744–4749.

Fehr, W.R. and Caviness, C.E. 1977. Stages of soybean development, Cooperative Extension Service; Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University of Science and Technology.

Fierer, N. and Jackson, R.B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 626–631.

Foster, R. 1988. Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fert. Soils* **6**, 189–203.

Frey, S.D., Knorr, M., Parent, J.L., and Simpson, R.T. 2004. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecol. Manag.* **196**, 159–171.

Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., and Ball, A.S. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1800–1809.

Gómez-Pereira, P.R., Schüller, M., Fuchs, B.M., Bennke, C., Teeling, H., Waldmann, J., Richter, M., Barbe, V., Bataille, E., Glöckner, F.O., et al. 2012. Genomic content of uncultured bacteroidetes from contrasting oceanic provinces in the north atlantic ocean. *Environ. Microbiol.* **14**, 52–66.

Gottel, N.R., Castro, H.F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D.A., Podar, M., Karpinets, T., Uberbacher, E., Tuskan, G.A., Vilgalys, R., et al. 2011. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of populus deltoides roots across contrasting soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5934–5944.

Graham, P.H. 2008. Ecology of the root-nodule bacteria of legumes, pp. 23–58. In Dilworth, M., James, E., Sprent, J., and Newton, W. (eds.), Nitrogen-fixing leguminous symbioses, Springer Netherlands.

- Houlden, A., Timms-Wilson, T.M., Day, M.J., and Bailey, M.J. 2008. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**, 193–201.
- Isanga, J. and Zhang, G.N. 2008. Soybean bioactive components and their implications to health—a review. *Food Rev. Int.* **24**, 252–276.
- Kirchman, D.L. 2002. The ecology of cytophaga–flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**, 91–100.
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., and Fierer, N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 2407–2415.
- Lozupone, C. and Knight, R. 2005. Unifrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8228–8235.
- Mendes, L.W., Kuramae, E.E., Navarrete, A.A., van Veen, J.A., and Tsai, S.M. 2014. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *ISME J.* **8**, 1577–1587.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C., and Lemanceau, P. 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. Cv. Jemalong line J5. *New Phytol.* **170**, 165–175.
- Ofek, M., Hadar, Y., and Minz, D. 2012. Ecology of root colonizing *Massilia* (*Oxalobacteraceae*). *PLoS One* **7**, e40117.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., and van der Putten, W.H. 2013. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 789–799.
- Prashar, P., Kapoor, N., and Sachdeva, S. 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **13**, 63–77.
- Pruesse, E., Peplies, J., and Glöckner, F.O. 2012. Sina: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**, 1823–1829.
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R.J., and Turnbaugh, P.J. 2011. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* **12**, 38.
- Raaijmakers, J., Paulitz, T., Steinberg, C., Alabouvette, C., and Moënné-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **321**, 341–361.
- Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N.S., Mateos, P.F., Gillis, M., Dazzo, F.B., and Martínez-Molina, E. 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5217–5222.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., and Fierer, N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* **4**, 1340–1351.
- Sakai, M., Hosoda, A., Ogura, K., and Ikenaga, M. 2014. The growth of *Steroidobacter agariperforans* sp. nov., a novel agar-degrading bacterium isolated from soil, is enhanced by the diffusible metabolites produced by bacteria belonging to rhizobiales. *Microb. Environ.* **29**, 89–95.
- Schloss, P.D. and Handelsman, J. 2006. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol.* **2**, e92.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., and Robinson, C.J. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.
- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., et al. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **463**, 178–183.
- Shade, A. and Handelsman, J. 2012. Beyond the venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* **14**, 4–12.
- Sohn, J.H., Kwon, K.K., Kang, J.H., Jung, H.B., and Kim, S.J. 2004. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1483–1487.
- Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K.Q., and Yang, J. 2012. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 993–1003.
- Sugiyama, A., Ueda, Y., Zushi, T., Takase, H., and Yazaki, K. 2014. Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field. *PLoS One* **9**, e100709.
- Van Spanning, R., Delgado, M., and Richardson, D. 2005. The nitrogen cycle: Denitrification and its relationship to N<sub>2</sub> fixation, pp. 277–342. Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment, Springer.
- Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Wu, M., Xie, G., Haft, D.H., Sait, M., and Badger, J. 2009. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2046–2056.
- Xu, Y., Wang, G., Jin, J., Liu, J., Zhang, Q., and Liu, X. 2009. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 919–925.
- Yousuf, B., Keshri, J., Mishra, A., and Jha, B. 2012. Application of targeted metagenomics to explore abundance and diversity of CO<sub>2</sub>-fixing bacterial community using *cbfL* gene from the rhizosphere of *Arachis hypogaea*. *Gene* **506**, 18–24.