

## Bradyrhizobium sp.(Cassia) CN9135의 nodD1 유전자의 크로닝과 염기서열 분석

최순용<sup>1</sup> · 고상균\*

대전대학교 이과대학 생명과학부, <sup>1</sup>한남대학교 이과대학 미생물학과

차풀(*Cassia nomame*)의 뿌리혹 공생세균인 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135의 *nodD1* 유전자를 중합효소 연쇄반응을 통해 크로닝하여 그 염기서열을 조사하였다. 염기서열로부터 유추된 NodD1 단백질은 *Bradyrhizobium elkanii*와 가장 높은 95%의 상동성을 나타내었다. 뿐만 아니라 *nodD1*과 *nodD2* 사이의 intergenic space 부위의 염기서열도 *B. japonicum*을 포함한 다른 *bradyrhizobia*와는 상동성이 거의 없었으나 *B. elkanii*와는 88%의 높은 상동성을 나타내었다. 우리의 실험 결과는 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*)가 *B. elkanii*와 매우 근연한 관계임을 보여 주고 있다.

**Key words** □ *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*), *Cassia nomame*, *nodD1*, PCR

리조비아(rhizobia)라 총칭하여 부르는 토양세균 *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*은 콩 과식물과 질소고정능을 갖는 상호호혜적인 관계, 즉 공생적 질소 고정을 통해 식물의 생산성에 상당히 공헌하고 있다(17). 리조비아 중에서 성장 속도가 느린(slow-growing) *bradyrhizobia*에는 *B. elkanii*, *B. japonicum* 그리고 *B. liaoningense*(18)의 세 개의 종이 있으며 이들은 모두 대두의 뿌리혹으로부터 분리된 세균이다. 이 이외에도 종까지 동정되지 않은 많은 *bradyrhizobia*들이 알려져 있다(3,12).

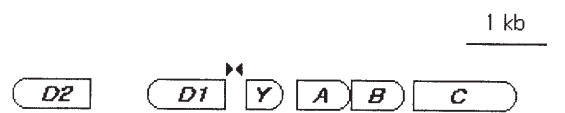
뿌리혹(root nodule)은 식물의 flavonoid와 공생세균의 NodD가 함께 작용하여 *nod* 유전자들이 발현되어, 이들에 의해서 합성된 올리고당의 Nod인자(Nod factor)에 의해 형성된다. 이와 같이 flavonoid와 Nod인자 등과 같은 공생적 신호들이 콩과식물과 리조비아 사이에 교환되어 뿌리혹 형성이 이루어진다(6,11).

*B. japonicum*을 포함한 대부분의 리조비아에서 *nod* 유전자들 중, Nod 인자의 기본골격 합성에 관여하는 공통(common) *nod* 유전자라고 부르는 *nodABC* 유전자와 전사활성자(transcriptional activator)로서의 기능을 가진 *nodD* 유전자는 서로 인접하여(Fig. 1) 있으나 전사는 서로 반대 방향으로 일어난다(1). *nodABC*를 포함하여 다른 여러 *nod* 오페론의 발현은 flavonoid와 LysR 군에 속하는 NodD를 필요로 한다. NodD 단백질은 각 *nod* 오페론의 상부에 있는 47 bp의 DNA motif인 *nod box*라는 보존된 DNA 서열에 결합한다(16). 식물의 신호인 flavonoid가 inducer로 NodD 단백질과 결합하여 형성된 NodD-flavonoid 복합체가 *nod* 오페론들의 전사를 활성화시킨다. 현재까지 조사된 바에 따르면 NodD에 의한 이런 조절시스템은 모든 리조비아에서 나타난다.

하지만 *nodD*의 개수는 종마다 차이가 있어(1), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*는 한 개, *Sinorhizobium meliloti*는 2개, *Rhizobium tropici*의 경우 가장 많은 5개의 *nodD* 유전자를 갖고 있다. *Bradyrhizobia*에 있어서 *nodD* 유전자는 *B. elkanii*, *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*), *Bradyrhizobium* sp. (*Arachys*)에서 공히 두 개를, 즉 *nodD1*과 *nodD2*를 가지고 있다. *nodD1*과 *nodD2*는 인접해 있으며 그 사이는 600 bp가 조금 넘는 intergenic space가 존재한다. 또한 *nodD1*과 *nodABC* 사이에는 각기 *nodA*와 *nodD1*의 *nod box*(Fig. 1)가 각각 위치하고 있다(8).

콩과(Leguminosae) 식물은 콩아과(Papilionoideae), 미모사아과(Mimosoideae), 실거리나무아과(Caesalpinoideae)의 세 아과로 나뉘며, 이들 중에서 실거리나무아과의 콩과식물이 가장 덜 진화된 식물이다. 실거리나무아과에 속하는 *Cassia* 속은 600여종의 식물로 이루어져 있으며, 극히 일부만이 뿌리혹을 형성하는데 차풀(*Cassia nomame*)이 그 중 하나이다. 국내에서 서식하는 차풀의 공생균주가 분리되었고 그 특성에 대하여 조사된 바 있는데(2, 10), 이 공생균주의 콜로니의 모양은 *B. japonicum*과 뚜렷하게 다르며, 서로의 식물에 뿌리혹을 형성하지 못하였다.

본 연구에서는 차풀의 공생균주인 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*)와 대두의 공생균주인 *B. japonicum*의 *nodD1* 유전자와 차이를 알아보기 위해 *B. japonicum* USDA110의 *nodD1* 부위의 서열을 참고로 하여 *Bradyrhizobium* sp. CN9135의 *nodD1* 유전자를 증



**Fig. 1.** Common *nod* gene region of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. The filled arrowhead between *nodD1* and *nodYABC* marks the location and orientation of the *nod box*.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-280-2437, Fax: 042-280-2608  
E-mail: skkoh@dragon.daejeon.ac.kr

폭하고 크로닝하여 그 염기서열을 조사하고 다른 *bradyrhizobia* 들과 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

차풀의 공생균주로 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135(10)를 사용하였으며, 공시균주로는 대두의 공생세균인 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110을 사용하였다. 이 균주들은 YM 액체배지 (15)에 접종하여 28°C에서 5일 배양하였다.

### 염색체와 플라스미드 DNA분리

*Bradyrhizobia*의 염색체 DNA는 guanidine isothiocyanate cell lysis 방법을 사용하였고(14), 플라스미드 DNA는 Jetstar plasmid miniprep kit(Genomed)를 사용하였다.

### Primer의 제작과 PCR

*Bradyrhizobium* sp. CN9135의 *nodD1* 유전자 부위를 증폭하기 위해 *B. japonicum* USDA110의 서열(8)을 토대로 *B. japonicum*의 *nodA* *nod* box 내의 22-mer 서열 5'TGGTAAATCGATTG-TTTCGAT3'와 *B. japonicum*의 *nodD1*과 상동성을 지닌 N말단 부위에 해당하는 *B. japonicum*의 *nodD2*의 염기서열 5'GCGA-CCAGAAGATTTAGATC3'를 선정하여 각각 forward와 reverse primer로 사용하였다(Fig. 3). PCR은 보통의 방법을 사용하였으며 증폭기의 운행조건은 95°C에서 3분 예열 시킨 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 3분 씩 35회 반복하고 마지막에는 72°C에서 3분 처리하여 반응을 완료하였다.

### 염기서열결정과 자료분석

PCR 산물을 Wizard PCR Preps(Promega)를 사용하여 순수 분리한 후 pGEM-T vector에 크로닝한 후 dideoxy chain termination 방법(13)으로 서열을 조사하였다. 6개의 크론을 무작위로 선별하여 200 bp 정도의 염기서열을 조사하여 그 서열이 동일함을 확인한 후 그중 하나를 택해 약 1.7 kb의 전체 서열을 조사하였다. 또한 *nodA*와 *nodD1* 사이에 위치하고 있는 두 *nod* box의 완전한 서열을 조사하기 위해 *B. japonicum*과 *B. elkanii*의 *nodA*의 보존된 서열(5,8)을 primer로 사용하여 얻은 크론으로부터 약 170 bp 정도의 염기서열을 더 밝혀 총 1.836 bp 염기서열을 결정하였다. 아미노산 서열 비교는 Clustal program을 사용하였으며 Dendrogram은 PAUP\*4.02를 사용하여 작성하였다.

## 결과 및 고찰

### *nodD1* 유전자의 크로닝

*B. japonicum*의 염기서열로부터 결정한 두 primer를 사용하여 PCR로 증폭한 바, *B. japonicum*에서와 마찬가지로 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135에서도 약 1.7 kb의 크기의 단일 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 이것은 *B. japonicum*의 염기 서열로부터 예상되는 크기와 일치하였다(8). *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135의 증



Fig. 2. PCR amplification of *nodD1* gene from bradyrhizobial DNA. lane 1,  $\lambda$  DNA /HindIII size markers(23, 9.4, 6.6, 2.3, 2.0, 0.6 kb); lane 2, *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135; lane 3, *B. japonicum* USDA110.

1	GCACCTACAAGAGGGCCAACTCGGTCGGCGAGAGATAGCCACTTCGACACGGATTCCGG	60
61	CGGCTCGCAGTCCAGGATTTCTTTCGGAGCCCGGTCGACCAAAAGCCATCGTGCCA	120
121	LACCTAATTCATTTCGAAAGTGATGTTGCTATCCACATTCGGAGTTTGGTAAATC	180
181	GATTGTTTCGATAGAACACATCCACAGATGGATAGACTCAGGACATCGGTTCAAGGA	240
241	CTTGATCTAAACCTTCTCGTTCGGTCGATGCTCTGATGACGAGGCGCAACCTTACAGCG	300
301	CGGCGGGGCAAAATTAACCTGAGCGAGCCGCGCATGAGCGCTCGGATCGCGCGGCTCGGC	360
361	ACCTACTTTCGGATGAATTTTACGATGAGAGGTCGGCACTCGTCCGACACCCGGC	420
421	CGGGAAGTGTGGCGGTTCCAGTTCGGAGGCGCTGCTGCACATCCAACTCTCGATCATT	480
481	TCTGGGATGCGTTCGACCCGACCCAGTCGAGCGGACGCTTCAGGTCATTCTCTCGAT	540
541	TTGATGACAATCGCTTTTTCGGGAATTCGATGCTATTCGACAGGAGGCGCTCGG	600
601	GTCGCTTCGAATTCGCTGCTTTTCGATGAACCGGTCGCTGCTTCGGCGGCGGAA	660
661	GTCGCTTCGAATTCGCTGCTTTTCGATGAACCGGTCGCTGCTTCGGCGGCGGAA	720
721	TTGATGACAATCGCTTTTTCGGGAATTCGATGCTATTCGACAGGAGGCGCTCGG	780
781	ACATTCGATAAATACAAATTCGATGGGCGAGTACCGCCAAAGTCGACGCGGCTGAGG	840
841	CCCAACCTCGAGGAGTGGTTCTTCTGCTGAGCAGCGTTTGAAGAAGCGCATGAGGTCGTT	900
901	TCGACGGGCTTTCGCTGATTCGCGGCAATGTTGTTGAGCAGCGCCGATAGGAACAATG	960
961	CCCTTACGTCGCGCAGACACTTCGAAAGCGGATACCCCTGCGGATCGTCAACCCACCA	1020
1021	CTCCCATGCCACATTACCGAGGCGGTCGATGCGCTTCGCAATACCGATCGG	1080
1081	CGGAGCATTCGATGCGCGGATATGTTGAGGAGGATCCAAATCGGATTCGACAT	1140
1141	CGGAGATCCCAACGCGCAGGCGCTGCTAGGTTACCAACAGCGCGCCCGGAGGTGCAA	1200
1201	ATACCCCACTCATTCGACGCTGCTGCTTTCATTTAACTTCCCGGACGGCCATGC	1260
1261	TGTAAACGCAAGCGGAGCCCGCCGCTGATTTGTAAGATATGCGCGCCGTCGCTAACG	1320
1321	AGCTTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGAT	1380
1381	AGCTTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGAT	1440
1441	CAGGTTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGAT	1500
1501	ATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGAT	1560
1561	TCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGAT	1620
1621	CGAGCGTTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGAT	1680
1681	TTTGAACGCGCAGGATTAACAGGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGAT	1740
1741	TTCAGCGCTTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGAT	1800

Fig. 3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of fragment containing the *nodD1* and partial *nodD2* genes. *nodD1* extends from positions 226 to 1,170 and *nodD2* starts from position 1,779. The predicted amino acid sequences are given below the nucleotide sequence. The two PCR primer sequences are indicated by shading. The *nodA* and *nodD1* *nod* box is underlined and double-underlined, respectively.

genic space는 628 bp로 이루어져있었다(Fig. 3). CN9135의 NodD1 단백질은 *B. japonicum* USDA110과 *B. elkanii* USDA94와 마찬가지로 314개의 아미노산으로 구성되어 있었다(5, 8). CN9135의 NodD1은 primer 염기서열을 결정하는 근거로 사용했던 *B. japonicum*의 NodD1과는 90%의 상동성을 나타내었다. 그러나 오히려 *B. elkanii*의 NodD1과는 95%로 가장 높은 상동성을 나타내었으며, 그 다음으로는 비공과식물에서 유일하게 형성된 뿌리혹에서 분리된 *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) ANU289의 NodD1과는 94%의 상동성을 나타내었다. *Brady-*

*Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135의 이 DNA 절편은 총 1,666 bp(Fig. 3의 171번부터 1,836번까지)이었으며 예전된 CN9135의 *nodD1*의 ORF는 226번부터 1,170번까지, *nodD2*의 ORF는 1,799번부터 시작되었고, *nodD1*과 *nodD2* 사이의 inter-

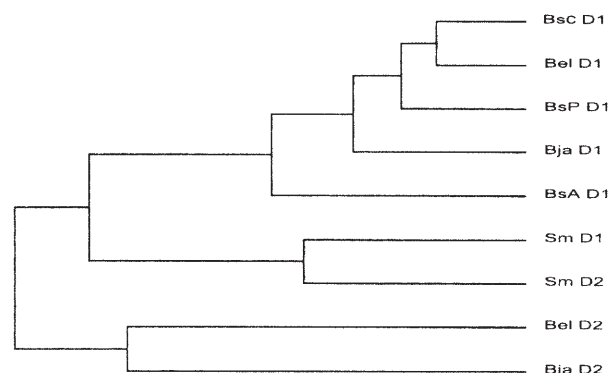
**Fig. 4.** Amino acid sequence alignment of different NodD proteins of bradyrhizobia. All of these sequences are available in the databases. NodD proteins from *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135(Bsc D1), *B. elkanii*(Bel D1, D2), *B. japonicum* USDA110(Bja D1, D2), *Bradyrhizobium* sp.(*Parasponia*) ANU289(BsP D1, D2), *Bradyrhizobium* sp.(*Arachis*) NC92(BsA D1, D2), *Sinorhizobium meliloti* 41(Sm D1, D2) are shown.

*rhizobium* sp.(*Arachis*) NC92의 NodD1과는 84%의 상동성을 갖는 것으로 나타났다. 한편 CN9135의 NodD1 단백질은 *B. elkanii*와 *B. japonicum*의 NodD2와는 각각 58%와 50%의 상동성을, 반면 *Sinorhizobium meliloti* 41의 NodD1과 NodD2와 각각 59%와 58%의 상동성을 나타내어, bradyrhizobia의 NodD2나 다른 rhizobia의 Nod 단백질과는 상동성이 제법 큰 차이를 보이고 있다. 이들을 NodD1과 NodD2를 함께 비교 배열하여 보면(Fig. 4), N 말단으로부터 첫 100개의 아미노산에 비해 flavonoid recognition과 관계 있는 나머지 200여 아미노산 서열은 NodD 내에서 그 보존 정도가 낮은 것을 확인할 수 있었으며, 이것은 공생세균의 숙주 특이성을 잘 반영하고 있었다. CN9135의 NodD1을 다른 bradyrhizobia와 생장속도가 빠른 *Sinorhizobium meliloti*의 NodD의 서열로부터 얻어진 dendrogram(Fig. 5)을 통해 CN9135의 NodD1의 서열은 다른 bradyrhizobia의 NodD1과 clustering됨을 알 수 있다.

#### *nodD1*과 *nodD2* 사이의 intergenic space 비교

CN9135의 *nodD1*과 *nodD2* 사이의 intergenic space는 628 bp

인데 그 크기는 *B. japonicum*의 633 bp(8), *B. elkanii*의 640 bp(5) 보다 약간 작으나 *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. NC92의 600 bp(7) 보다는 약간 길다. 이들의 상동성을 조사한 바, *B.*



**Fig. 5.** Dendrogram showing relative distances among NodD proteins of different rhizobia. The new NodD1 protein of *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135, which was deduced from the nucleotide sequence shown in Fig. 3, is shown in boldface.

BsC	1	GTTCACCACAAGCCGCCCCGAGGTGCAAATACCCCACTCATCATTCGACGTGTCTGCC	60
Bel	1	GTCCACCACAAGCTGCTCCGGCAGATGCAAATATCCCACTCATCATTCGACGTGTCTGCC	60
BsC	61	TTGTCATTTTAACTTCCCGGACGGCCATGCTGTAAAACGCACGCG-GAGCCCGCCCGTGA	119
Bel	61	TTGTCATTTTAGCTTCCCGGACGGCCATGCTGTAAAACGCACGCGGAGCCCGCCCGGA	120
BsC	120	TTGTGAAAGATTGCCGGCCCGTGCGC-TAACGATC----AAAGCGTTTAGTGCGCTTGT	174
Bel	121	TTGTGAACGATTGCCGGCCCGTGCGCTAACGATCCCGCAAACCGTGTAGTGCGCTGT	180
BsC	175	TTGCAGGGAAGGTCCAA-GCCATCGCGAAAGACGAGAGCTTTCGATTACGATGGTATTT	233
Bel	181	CTGCACGCGAGGTCCGACGCCATCGCGAAGGACGCGAGCTTTCGAGTACGATGGTATTT	240
BsC	234	G-CGAAGCCAATTAAATTGCTTGAACCCGACACTGCGTCAGGTTGTAATTGCCTCCTGA	292
Bel	241	GGCGAAGCGAATTAAATCGCTTGAACCTGACACTGCGTCAGGTTGTAATTGCCTCCTGA	300
BsC	293	CCAA--CTGC-CAGGCGGGCGTCGATGGGGCACATCGGGTGAA-TTCTGGCTATTGGCGG	348
Bel	301	CCAATGCTGCGCAGGCGGACGTCAACGGGTACATCGCGTGAACCTCTGGCTA-TGGCAG	359
BsC	349	GATAGGCACTAAGGCTGGTTTCGCAATGGCGACTCGACTAAATCGTGTTACGAGAGTGCC	408
Bel	360	GATAGGCACTAAGGCTGGTTTCCCAATGGCGGCTCGACTAAGTCGAGTTGCGAGAGTGCC	419
BsC	409	GGAAATCGACGAGATCGATGAGGTTGGCTCTCCCGACGAGCTCGAGCCGTAGGTCGTCAT	468
Bel	420	GGGAATCGACGAGATCGATCAGGTTGGCGCTCCCGACG-GCTCGAGCCGAGGTCGTCGT	478
BsC	469	CCCGGA-CG-ACTGCGCGCCATTCTGCGATGTTTCGCGAGCTTCTTTGCAAGCGCACGAG	526
Bel	479	CCCCGAGCGCACTGCGTGCCATTCTGCGATGCTCCCGAGCTTCTTCGCAATCGCACGAG	538
BsC	527	ATTAACAGAGTTGATTGCGGGCGAGCCAATCACACCGCTTCAGATGCAGCCGTTGTCGCT	586
Bel	539	AGGAACAGAGTTGATTGCGC-GCGAGCCAATGACACCGCTTCAGATGCAGCCGTTGTCGCT	597
BsC	587	CATTGTATGCAATGT-AAAGACGATCGCGTCGGATAATAAGAT	628
Bel	598	CATGGTATGCACTGTAAAAGACGAGCGCGTCGGATAATGAGAT	640

**Fig. 6.** Alignment of sequences for the intergenic space from *Bradyrhizobium* sp. CN9135 and *B. elkanii*.



*japonicum*과 *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. NC92와는 상동성이 거의 없었고(<5%), 오직 *B. elkanii*와 만 88%의 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 6).

#### CN9135의 nod box

CN9135에서도 다른 bradyrhizobia와 마찬가지로 두 *nod* box의 존재를 확인하였다(Fig. 3). CN9135의 *nodD1*과 *nodA*의 각 *nod* box의 염기서열은 *nodA* *nod* box의 경우 *B. elkanii*와 *B. japonicum*와는 100%의 상동성을, *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) NC92와 *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) ANU289와는 94%의 상동성을 나타내었다. 반면에 CN9135의 *nodD1* *nod* box의 경우는 *B. elkanii*와 *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) ANU289와는 각각 96%와 85%의 높은 상동성을 보였으나, *B. japonicum*과 *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) NC92와는 각각 37%와 43% 정도의 아주 낮은 상동성을 나타내었다.

NodD1의 아미노산 서열, *nodD1*과 *nodD2* 사이의 intergenic space의 염기서열 그리고 *nod* box 서열의 상동성 비교를 통해 *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135는 *B. japonicum*보다는 *B. elkanii*와 근연관계를 가짐을 알 수 있었다. 하지만 *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135는 대두에 뿌리혹을 형성하지 못하며(10), 그 반대의 경우도 마찬가지로 *B. elkanii*는 차풀에 뿌리혹을 형성하지 못한다(9). 따라서 rDNA나 *nif* 유전자 등의 다른 유전자의 서열을 폭 넓게 조사해 봄으로써 bradyrhizobia 내에서 *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135의 위치를 보다 명확하게 밝힐 수 있을 것이다.

#### 참고문헌

- 고상균. 1996. Rhizobia 와 식물의 상호작용: *nod* 유전자와 Nod인자. 분자생물학뉴스 8, 13-20.
- 고상균. 1999. 시험관내 뿌리혹 생성 실험의 개선된 방법. 한국미생물학회지 35, 169-172.
- Abaidoo, R.C., H.H. Keyser, P.W. Singleton, and D. Borthakur. 2000. *Bradyrhizobium* spp. (TGx) isolates nodulating the new soybean cultivars in Africa are diverse and distinct from bradyrhizobia that nodulate North American soybeans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 225-234.
- Allen, O.N. and E.K. Allen. 1981. The Leguminosae. University of Wisconsin Press, Madison.
- Dobert R.C., B.T. Breil, and E.W. Triplett. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *MPMI* 7, 564-572.
- Ferro M., J. Lorquin, S. Ba, K. Sanon, J.C. Prome, and C. Boivin. 2000. *Bradyrhizobium* sp. strains that nodulate the leguminous tree *Aacacia albida* produce fucosylated and partially sulfated Nod factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5078-5082.
- Gillette, W.K. and G.H. Elkan. 1996. *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. strain NC92 contains two *nodD* genes involved in the repression of *nodA* and a *nolA* gene required for the efficient nodulation of host plants. *J. Bacteriol.* 178, 2757-2766.
- Gotterfert, M., D. Holzhauser, D. Bani, and H. Hennecke. 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *MPMI* 5, 257-265.
- Koh, S.K. 2000. Personal data.
- Lee, K.L. and S. K. Koh. 1997. Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. from *Cassia nomame* root nodules. *Natural Science(Taejon University)* 8, 115-124.
- Mergaert, P., M. van Montagu, and M. Holsters. 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* 25, 811-817.
- Parker, M. A. 1999. Relationships of bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4914-4920.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. Handbook for rhizobia, Springer-Verlag, New York.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wang, S.P. and G. Stacey. 1991. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* promoter: a repeated structure for the *nod* box. *J. Bacteriol.* 173, 3356-3365.
- Werner, D. 1992. Symbiosis of plants and microbes, 1st ed. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Xu, L.M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706-711.

(Received November 24, 2000/Accepted December 8, 2000)

---

**ABSTRACT: Cloning and Sequence Analysis of the *nodD1* Gene from *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135**

**Soon-Yong Choi<sup>1</sup> and Sang Kyun Koh\***(Division of Life Science, Daejeon University, Daejeon 300-716 and <sup>1</sup>Department of Microbiology, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea)

A 1.7-kb fragment containing the *nodD1* genes of *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135 was amplified by PCR with primers based on *B. japonicum* USDA110. This fragment was cloned and sequenced. Analysis of the sequence showed open reading frames highly homologous to *nodD1* from other bradyrhizobial sources. The sequence showed higher homology to *nodD1* gene of *B. elkanii* than to those from *B. japonicum*. Our results suggest that *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135 may be more closely related to *B. elkanii* than to *B. japonicum*.