

시험관내 뿌리혹 생성 실험의 개선된 방법

고 상 균*

대전대학교 이과대학 미생물학과

한천 사면배지 대신 한지를 사용하여 시험관내 뿌리혹생성 실험 방법을 개선하였다. 개선된 이 방법은 기존의 한천-시험관 방법에 비해 전체 과정이 간단하며, 특히 굵고 단단한 유근을 갖는 콩과식물에서도 효과적으로 사용할 수 있다. 이 방법을 사용하여 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135를 접종한 차풀에서 접종후 7일째부터 조사된 식물개체의 6%에서 뿌리혹이 생기기 시작하여 14일째에 조사된 모든 식물개체에서 뿌리혹이 생성되었다.

KEY WORDS □ *Bradyrhizobium* sp., *Cassia nomame*, Hanji(Korean paper), nodulation test, tube method

콩과식물과 리조비아(rhizobia) 사이의 공생적 질소고정은 생물권에 가용한 형태의 질소원을 제공한다는 점때문에 오랫동안 중요하게 인식되어 왔으며(1), 또한 식물과 세균 사이의 상호교환의 기구를 밝히기 위한 이상적인 시스템으로 여겨져 최근에는 이에 초점을 맞춘 연구가 활발히 진행되고 있다. 한편 뿌리혹생성 실험은 예를들면 리조비아의 숙주범위 조사, 뿌리혹의 생성 및 발달과정, 뿌리혹 생성능의 변화, 질소고정능의 활성조사, 뿌리혹에 특이적인 식물유전자에 관한 연구 등과 같이 콩과식물과의 공생적 질소고정에 관련된 연구에서 필수 수행되어야 할 실험중의 하나이다.

뿌리혹생성 실험은 실험목적에 따라 몇가지 방법이 개발되었는데, 식물영양 한천사면배지가 든 시험관을 사용하는 방법(8), 페트리디쉬를 사용하는 방법(2), 생장백(growth pouch)을 사용하는 방법(7), 레오나드 병(Leonard jar)을 사용하는 방법(8)들이 있다. 페트리디쉬를 사용하는 방법은 유식물의 장착, 영양배지 용액의 재보충, 주기적인 관찰시에 불편한 점이 많으며, 레오나드 병을 사용한 방법은 식물의 성장에 있어서는 유리하지만 특정 시점의 뿌리혹만이 관찰가능하므로 뿌리혹생성 속도(nodulation kinetics)는 조사할 수 없다. 생장백을 사용하는 방법은 제조회사로부터 구입하여야 하며 습도가 유지되지 않은 생장실(growth chamber)에서는 한천-시험관법에서도 마찬가지지만 작은 식물의 경우에 있어서는 초기의 유식물이 제대로 성장치 못하는 경우가 많다.

일반적으로 작은 종자의 콩과식물의 경우 일반적으로 한천-시험관 방법을 널리 사용하고 있다. 영양한천 사면배지를 사용한 한천-시험관 방법은 유근의 근단부위를 식물영양 한천배지에 접하게 하므로서 식물의 뿌리를 통하여 지속적인 수분 및 영양분의 공급을 가능케 한다. 토끼풀, 자주개자리, 벌노랑이 등과 같은 작은 종자의 유근은 유연하기 때문에 유식물의 근단부위를 사면배지에 손상없이 장착시키는데 별 문제가 없지만, 차풀(*Cassia nomame*)과 같이 약간 큰 종자의 발아된

유식물은 위에서 언급한 작은 종자의 유식물들과는 달리 경직된 유근을 갖기 때문에 근단을 사면배지 표면에 장착시키기가 어려울 뿐만아니라 초기에 유식물이 잘 장착시켰더라도 운반이나 관찰 과정에서의 움직임에 의해 근단이 배지 표면으로부터 이탈하여 근단이 시들어 버리거나 유식물이 이탈되어 시험관 바닥쪽으로 떨어지는 경우가 빈번히 일어난다. 따라서 경직된 유근을 갖는 콩과식물의 경우 기존의 한천-시험관 방법으로 성공적인 뿌리혹생성 실험을 기대하기 어렵다.

본 연구는 차풀의 뿌리혹생성 실험을 하면서 봉착된 이와 같은 문제점들을 한천대신 한지를 사용하므로써 해결할 수 있었다. 이에 개선된 이 방법을 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 균주의 배양

차풀의 공생균주 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135(6)를 접종 균주로 사용하였다. 이 균주를 YM 액체배지(8)에 접종하여 28°C에서 5일 배양하여 접종배양액으로 사용하였다.

한지-시험관법의 과정

한천 대신 한지를 사용한 한지-시험관 방법의 전체 과정은 Fig. 1과 같으며 각 단계는 아래와 같은 순서로 실행한다.

(1) 20×150 mm 크기의 시험관(Sigma C-1048)에 14×2 cm 크기의 한지(Fig. 1-a)를 길게 반을 접어 시험관(Fig. 1-I)에 넣는다.

(2) 이 시험관에 질소원이 첨가되지 않은(N-free) 식물영양 액체배지 10 ml을 넣은 다음 뚜껑(Fig. 1-b, Sigma C-1173)을 씌운다(Fig. 1-II).

(3) 식물영양 액체배지가 든 한지-시험관을 121°C에서 20분간 멸균한다(Fig. 1-III).

(4) 시험관의 뚜껑을 열고 유식물(Fig. 1-c)을 한지의 접은 선 부위에 장착하고 공생세균을 접종한 다음, 자른 쪽 반으로 유근을 덮는다(Fig. 1-IV).

(5) 시험관의 윗쪽을 2×20 cm 크기의 멸균된 투명한 폴리카

*To whom correspondence should be addressed

Tei : 042-280-2437, Fax : 042-280-2436

E-mail : skkoh@dragon.taejon.ac.kr

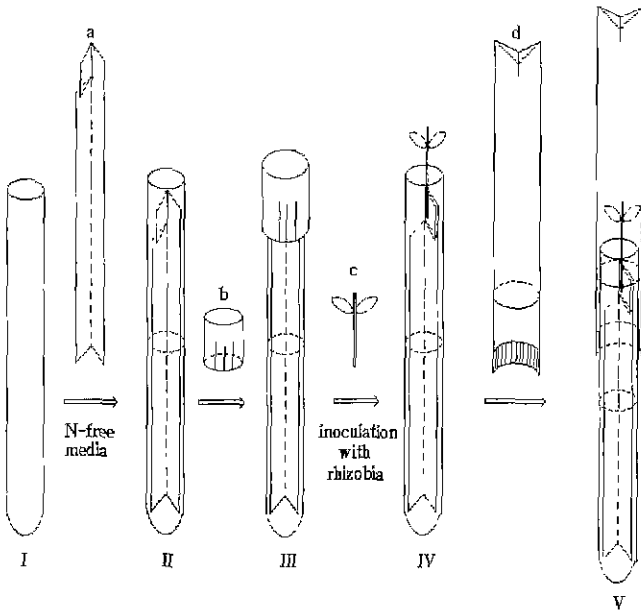


Fig. 1. Schematic diagram of the procedures in the improved test tube method for nodulation. (I) test tube(16.5×1 cm). (II) test tube inserted with Korean paper. (III) test tube capped with stopper, then autoclaved, (IV) inserted radicles, (V) covered the planted tube with polypropylene bag. a, Korean paper of size 15 2cm; b, cap; c, legume seedling; d, polypropylene bag (long side: 5×22 cm, short side: 5×18 cm).

로펠렌백(Fig. 1-d)으로 씌운다(Fig. 1-V).

(6) 시험관 블록에 옮겨 성장실(growth chamber)에서 키운다.

뿌리혹 생성실험

차풀(*C. nomame*) 종자를 진한 황산에 20분간 담궈 표면 살균을 한 후 멸균중류수로 10번 세척한 다음 멸균중류수에 담긴 상태로 냉장고에서 4시간 불렸다. 0.8% 한천-물 평판배지(water agar plate)당 표면 살균된 종자 40개를 올려 놓은 후, 유식물의 뿌리가 곧게 자랄 수 있도록 이 배지평판을 뒤집어 암 상태에서 발아시켰다. 2-3일된 유식물을 한지-시험관에 장착시킨 후 유근에 배양액 50 μl를 접종하여 20°C-암상태-8시간, 26°C-명상태-16시간 주기의 성장실에서 키우면서 1-2 일 마다 뿌리혹생성 여부를 관찰하였다. 식물 영양배지로는 질소원이 없는(N-free) Hoagland 용액(4)을 4배 희석하여 사용하였다. 공생균주를 접종하지 않은 것과 질소원으로 10 mM KNO₃를 첨가한 것을 각각 대조구로 사용하였다.

뿌리혹생성 속도조사

한지-시험관법으로 30개의 시험관을 사용하여 1-2일마다 관찰하여 뿌리혹의 생성여부를 조사하였으며 뿌리혹이 생성된 시험관의 수를 백분율로 표시하였고 세 번의 독립적인 실험결과를 평균 내어 표시하였다.

결과 및 고찰

차풀의 유식물

차풀(*C. nomame*)의 종자는 토끼풀(*Trifolium repens*)이나 자주개자리(*Medicago sativa*)에 비해서는(토끼풀 : 2,000,000개/kg, 자주개자리 : 500,000개/kg) 훨씬 크며, 대두(*Glycine max*)에 비해서는(대두 : 5,000개/kg) 작은(7). 그 크기가 2×2.5 mm 인 편평한 평행사변형 모양을 하며, 종자의 무게는 약 75,000 개/kg 이었다 차풀 종자를 진한 황산으로 표면 살균하여 2-3 일 발아 시킨 유식물의 크기는 1.5-2.5 cm 정도였으며, 유식물은 유연한 유근을 갖는 자주개자리나 토끼풀과는 달리 단단한 유근을 가지고 있었다.

한지 - 시험관 방법

뿌리혹생성 실험에 사용되는 기존의 한천-시험관법에서 한천은 식물뿌리의 지지체, 식물에 영양분 및 수분공급 대체로서의 역할을 한다.

먼저 한천을 대신할 만한 값싸고 다루기 쉬운 대체물로서 종이를 생각하였고, 어떤 종류의 종이 가 가능한지를 조사하였다. 숙주식물과 그의 공생균주에 무독성이며 액체배지에 오래 젖어 있어도 풀어지지 않고 그 원형을 유지하는 종이를 찾기 위해 국내에서 생산되는 여러 종류의 종이를 대상으로 조사하였다. 화선지, 누런 포장지 등의 종이는 영양액을 첨가하여 멸균하면 pH가 1.5이상 낮아졌으며, 이들을 사용한 경우 식물이 제대로 성장하지 못하고 죽었다. 이런 현상은 이들 종이의 제작과정에 사용된 화학약품이 완전히 제거되지 않아 영양액 첨가후 용출됨으로 인해 식물의 정상적인 성장을 저해하기 때문인 것으로 추측된다. 반면 다펀을 재료로 하여 만든 한지의 경우 영양 액체배지 첨가후 pH의 변화가 거의 없었으며, 뿐만 아니라 식물도 정상적으로 성장하였다. 따라서 시험관 방법에 있어 한천의 역할을 대신 할 수 있는 대체물로서 한지가 그 가능성을 보여주었다.

다음으로 한지를 사용한 시험관법의 전체적인 과정을 간편하게 고안하였다. I단계에서 차풀과 같이 작은 종자의 경우 시험관의 크기는 20×150 mm 짜리가 적당하였다. 이 시험관에 알맞는 한지의 크기는 14×2 cm이며(Fig. 1-a), 한지 전지(90×56 cm) 한장을 잘라서 약 150개를 만들 수 있었다. 이 크기로 자른 한지를 길게 반을 접은 다음, 한쪽 끝(이 부분이 시험관에 넣을 때 윗쪽이 됨)의 1 cm 아래쪽을 짧은 쪽과 평행하게 반만 잘랐다. 이것은 나중에 유식물을 안정되게 고정시키기 위해 필요하다. 만약 다른 크기의 시험관을 사용할 경우 그 크기에 알맞게 한지를 잘라 사용하면 될 것이다. II단계에서 10 ml의 식물영양 액체배지는 성장실에서 3-4주간 사용가능하며 증발되면 폴리프로필렌백을 옆으로 살짝 눌러 열려진 시험관 입구를 통해 영양액을 재보충하면 된다. III단계에서의 한지-시험관은 적어도 3개월 후에 사용하여도 무방하다. 따라서 사용 직전에 만들어야 한천-시험관 방법(8)과는 달리 미리 준비해 놓아도 되는 편리함이 있다. IV단계에서 유식물의 뿌리를 한지로 덮어 유식물이 안정하게 지지되도록 하였다. 공생균주의 접종은 실험목적에 따라 유식물을 장착하기 전에 유식물의 뿌리에 접종하거나 아니면 장착후 뿌리에 접종할 수 있다. 기존의 방법은 실험의 사용 균주 이외의 다른 균주이외의 오염을 방지하고 영양액의 빠른 증발을 방지하기 위해 시험관 입구를 식물의 줄기부분이 밖으로 나올 수 있도록 고안

된 특정 마개를 사용하거나(8) 이의 변형으로 긴 시험관을 사용하여 식물체를 완전히 시험관 내에서 키우므로써 이 문제를 해결하고 있다(7). 앞의 경우 유식물 장착시, 후자의 경우 질소 고정능 측정시 어려움이 뒤따른다. 따라서 이런 문제를 해결하기 위해 V단계에서처럼 멸균이 가능한 폴리프로필렌백을 사용하였다. 제빵용 포장지로 사용하는 폴리프로필렌백 시제품은 한쪽면이 다른쪽 면에 비해 길며(긴쪽 : 10×22 cm, 짧은 쪽 : 10×18 cm) 긴쪽면의 안쪽 하단 1 cm 영역에 접착제가 칠해져 있다. 이것의 가로 크기는 본 실험에서 사용된 시험관의 직경에 알맞은 크기인 5 cm비해 2배나 크기 때문에 실제 이 방법에서 사용된 백은 이 시제품을 세로로 반을 잘라(긴 쪽 : 5×22 cm, 짧은 쪽 : 5×18 cm) 자른면을 셀러로 붙여 사용하였다. 시험관에 이 백을 장착할 때 짧은 쪽면 하단이 시험관 입구에서 1 cm 아래 위치에 오도록 하여 긴쪽 하단의 접착제 면을 이용하여 시험관 표면에 이 백을 부착하여 고정시킨다. 시험관과 폴리프로필렌백 사이의 틈새를 통해 통기가 가능하며, 시험관입구가 노출되지 않아 다른 미생물의 오염을 막을 수 있다. 이 백은 습윤 멸균이 가능하며 멸균해서 사용하였다. 이와 같이 유식물이 장착된 한지-시험관은 뿌리 부위에 광이 조사되는 것을 막기 위해 시험관의 외경의 크기보다 0.1 mm 크며 길이가 시험관보다 1 cm 짧은 표면이 검은 종이 원통에 넣어 시험관 볼록에 끼운다. 따라서 관찰시 시험관만 살짝 들어 올려 뿌리혹생성 여부를 쉽게 관찰할 수 있다 (Fig. 2).

이 방법을 사용한 실험에서 공생균주를 접종하지 않은 무접종 시험관에서는 뿌리혹이 전혀 생성되지 않았을 뿐만 아니라 식물체의 크기도 4주째는 접종한 시험관과 질소원을 첨가한

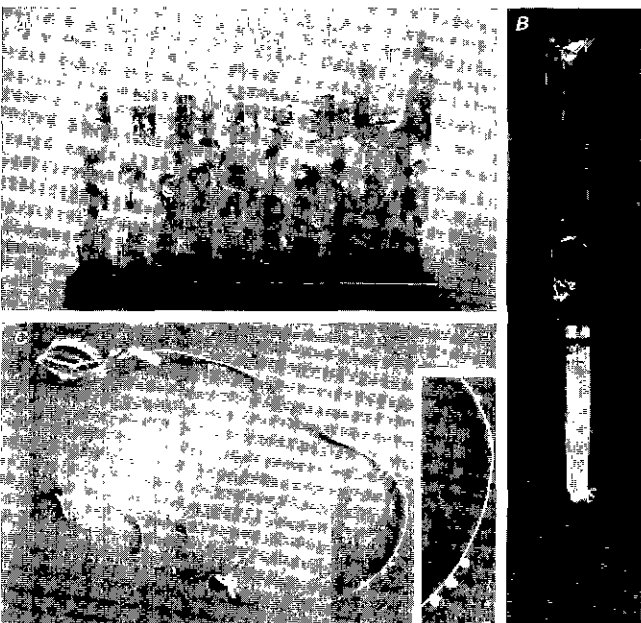


Fig. 2. Nodulation test of *C. nomame* with *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135 by the improved test tube method. A, test tube set for nodulation in test tube block; B, test tube set; C, *C. nomame* root nodules grown 4 weeks. The nodulated area shows in detail in the inset. Arrow heads indicate nodules

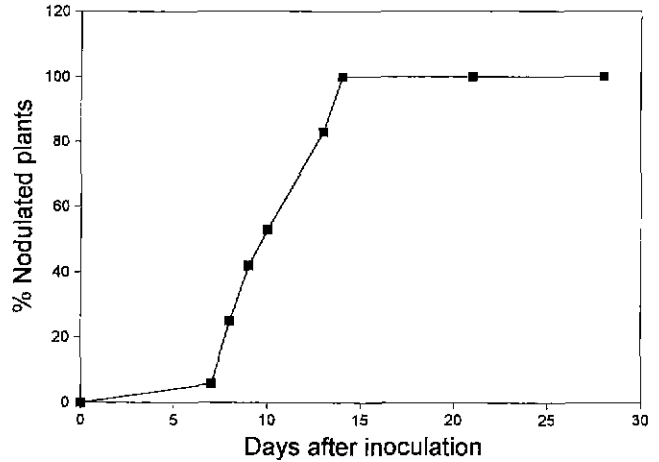


Fig. 3. Nodulation kinetic of nodule appearance on *C. nomame* infected by *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135.

대조구에 비해 육안으로도 차이를 구분할 수 있을 정도로 작았다. 따라서 식물체의 크기와 뿌리혹 내부가 분홍색을 띠는 것으로 보아 이들 뿌리혹이 질소고정능을 지니고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다.

차풀의 뿌리혹생성 속도

이 한지-시험관 방법을 사용하여 한천-시험관 방법으로는 실험하기 어려웠던 차풀의 뿌리혹생성 속도를 조사한 결과(Fig. 3), *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135를 접종한 차풀에서 접종 후 7일째부터 조사된 식물개체의 6%에서 뿌리혹이 생기기 시작하여 14일째에 조사된 모든 식물개체에서 뿌리혹이 생성되었다.

참고문헌

- Allen, O.N. and E.K. Allen. 1981. The Leguminosae. University of Wisconsin Press, Madison.
- Dudley M.E., T.W. Jacobs, and S.H. Long. 1987. Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* **171**, 289-301
- Graham, P.H., M.J. Sadowsky, H.H. Keyser, Y.M. Barnett, R.S. Bradley, J.E. Cooper, D.J. De Ley, B.D.W. Jarvis, E.B. Roslycky, B.W. Strijdom, and J.P.W. Young. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 582-587.
- Hotter G.S. and D.B. Scott. 1991. Exopolysaccharide mutants of *Rhizobium loti* are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminating host. *J. Bacteriol.* **173**, 851-859.
- Jordan, D.C. 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321^{AL}, p.235-244. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 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.

7. Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. Handbook for rhizobia, nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Springer-Verlag
8. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root- (Received February 1, 1999/Accepted May 3, 1999)

ABSTRACT: An Improved Method for Nodulation Test in Test Tube

Sang Kyun Koh (Department of Microbiology, College of Science, Tajeon University, Taejon 300-716, Korea)

Small-seeded legumes can be cultured enclosed in slant agar tubes if these plants are to be used for authenticating rhizobia or for enumerating rhizobia by the plant-infection technique. An improved method has been developed with substituting agar slant for Korean paper(Hanji). This method was particularly useful for legumes with rigid radicle such as *Cassia nomame*. With this method *Bradyrhizobium* sp. strain CN9135 on *C. nomame* induced root nodules beginning at day 7 of the nodulation period in 6% of the plants, and all of the plants nodulated 14 days after inoculation by strain CN9135.