

물오리나무의 뿌리혹으로부터 *Frankia* 共生菌株의 分離

權錫胤·安正善

(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Isolation of Symbiotic *Frankia* Strain from the Root Nodule of *Alnus hirsuta*

Kwon, Seok Yoon and Chung Sun An

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

An endophyte was isolated from the root nodule of *Alnus hirsuta*. The isolated endophyte was identified as a *Frankia* sp. through morphological characteristics. Their infectivity and effectivity were confirmed by nitrogen-fixing root nodules induced on inoculated *Alnus* seedlings. Reisolated endophyte from the induced nodule showed identical morphological characteristics as the first isolate, showing the nodule was induced by the first isolate. Consequently, the first isolate was confirmed as a true symbiont of *Alnus hirsuta* root nodule. The isolate was designated as a *Frankia* SNU 014201 strain.

서 론

오리나무, 보리수나무 등 비콩과목본식물과 *Frankia*의 공생관계를 actinorhizal symbiosis라 하는데, 이 공생관계에 있어서의 숙주식물은 7목 8과 20속에 속하는 178종의 비콩과목본식물이며 (Moiroud and Pearson, 1984), 공생균주는 Becking (1970)에 의해 새로운 속으로 분류된 토양 방선균의 일종인 *Frankia*이다. *Frankia*는 그람 양성이고 분지하는 균사의 형태이며 포자를 방출하는 세균으로, 공생상태 혹은 질소원이 없는 상태에서 질소고정 장소로 알려진 소낭(vesicle)을 형성한다(Lechevalier, 1984).

숙주식물은 질소고정능력을 가지므로 습지나 파괴된 지역에서 개척식물로서 중요하며 (Torrey, 1978), 토양손실 방지 및 토양을 활성화하는 데 사용되어지고 있다(Kalaskustkii and Pariiskay, 1983). 이들 숙주식물의 분포에 대한 조사는 국제적으로 행하여 졌고(Bond, 1976), 한국에서는 오리나무 등 7종이 존재한다고 보고되었다(An, 1986).

숙주식물로부터 공생균주를 분리하는 것은 공생관계의 연구에 기초가 되는 단계이지만, 우리나라에서는 아직까지 공생균주를 분리하고 확인하였다는 보고가 없었다. 따라서 본 연구에

본 연구는 1987년 서울대학교 발전기금 대우 학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임.

서는 An (1986)의 보고에서 숙주식물로 확인된 물오리나무의 뿌리혹으로부터 내생균주를 분리하고 분리균주가 진정한 공생균주임을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료. 관악산에서 자생하는 물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 뿌리혹을 채취하여 냉장고에 보관하면서 재료로 사용하였고, 물오리나무의 종자는 1987년 11월에 뿌리혹을 채취한 동일한 식물로부터 채취하여 4°C 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 내생균주를 배양하기 위해서 A-1, mDPM, Qmod 그리고 S배지 (Table 1)를 사용하였다. 탄소원으로 제공되는 Na-

Table 1. Mineral and organic nutrients of actinorhizal endophyte culture media

Constituents	Medium	mg/l			
		mDPM ¹ (pH 6.8)	A-1 ²	S ³ (pH 6.8)	Qmod ⁴ (pH 6.8)
CaCl ₂ · 2H ₂ O		10	100	100	
MgSO ₄ · 7H ₂ O		100	200	200	20
NH ₄ Cl		250	430		
KCl					200
K ₂ HPO ₄			890	500	300
KH ₂ PO ₄		1000	680		
NaH ₂ PO ₄				500	
FeSO ₄ · EDTA		0.005			
Na ₂ · EDTA					200
H ₃ BO ₃		2.86		1.5	1.5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		0.2		0.6	0.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0.08		0.1	0.1
MnSO ₄ · H ₂ O		4.5		0.8	0.8
H ₂ MoO ₄		0.1			
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 2H ₂ O				0.2	0.2
CoSO ₄ · 7H ₂ O				0.01	0.01
Ferric citrate				10	10
Citric acid				10	10
Thiamine HCl		0.1			
Nicotinic acid		0.5			
Pyridoxin HCl		0.5			
Na-propionate		1200	300		500
Yeast extract					500
Bacto-peptone					5000
Glucose					10000
Casamino acids		5000			
Casein hydrolysate				4000	
Cycloheximide			0.4		
Nystatin			0.015		

1. Modified-defined propionate medium (Baker and O'Keefe, 1984)
2. Medium A-1 (Lechevalier, personal communication)
3. S medium (Lechevalier *et al.*, 1983)
4. Qmod medium (Lalonde and Calvert, 1979)

propionate는 막 멸균법(filter sterilization)으로 배지에 첨가하였다. A-1배지에는 주 오염원인 곰팡이의 성장을 억제하기 위하여 cycloheximide와 nystatin을 첨가하였다.

내생균주의 분리. 채취한 뿌리혹이나 유도된 뿌리혹으로부터 내생균주의 분리는 Benson (1982)의 방법으로 행하였다. 20 μm 의 막에서 얻은 소낭 송이(vesicle cluster)를 주입 평판(pour plating)하여 균사의 성장이 확인된 균체를 취하여 액체배지에 옮겨 배양하였다. 액체배지에서의 계대배양은 균체를 마쇄하여 얻은 현탁액을 접종액으로 사용하였다.

뿌리혹 형성 유도. 물오리나무의 유식물은 질소원이 없는 Crone's solution (Lalonde, 1979a)에서 낮/밤이 16시간, 26°C/8시간, 22°C인 배양기에서 배양하였다. 액체배지에서 얻은 균체를 주사기로 마쇄하여 식물 배양액에 직접 첨가하거나 또는 유식물의 뿌리만을 균주 현탁액에 5-10분간 방치하여 감염시킨 후 뿌리혹 유도과정을 관찰하였다.

분리균주 및 뿌리혹의 형태관찰. 뿌리혹의 내부구조 및 분리균주의 형태는 lactophenol cotton blue용액으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였으며, 분리균주의 균사 및 포자낭은 주사전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

내생균주 분리. 관악산에서 채취한 물오리나무의 뿌리혹은 많은 뿌리혹염을 가지고 있는 *Alnus*형이었으며, 피층세포만이 감염되어 있어(Fig. 1a) *Frankia*에 의해 감염되어 있음을 추정할 수 있었고 소낭 송이가 존재함(Fig. 1b)을 알 수 있었다. 이 뿌리혹을 마쇄하면 갈색의 현탁액이 만들어 지며, 3회의 세척과정에서 갈색의 물질들은 20 μm 막에서 제거되었다. 갈색의 물질들이 제거된 후 pasteur pipette으로 20 μm 의 막으로부터 소낭 송이를 얻을 수 있었다. 이것을 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과, 이는 약 30-50 μm 크기였고 중앙의 균사 덩어리(hyphal mass)외부로 2-3 μm 의 많은 소낭이 존재하며 소낭은 균사의 끝에 형성되어 있음을

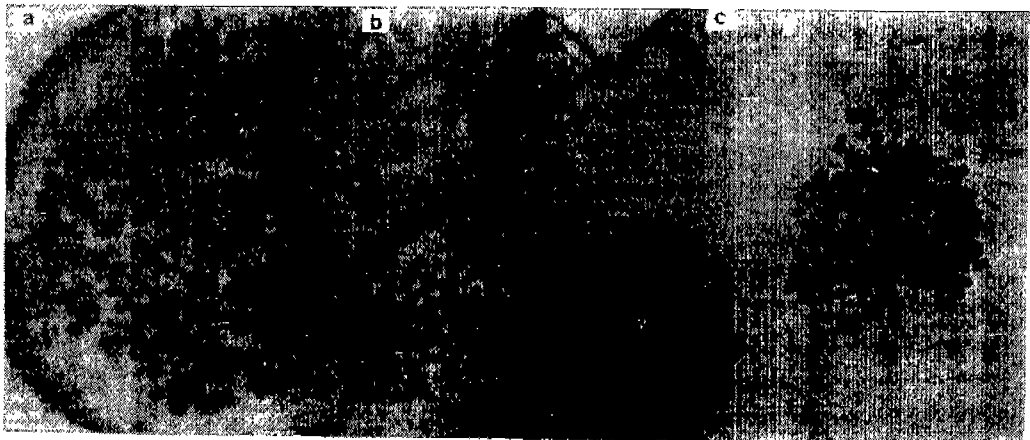


Fig. 1. Light micrographs of nodule sections (a, b) and isolated vesicle cluster (c) from *Alnus hirsuta*.

- a, vascular bundle (VB) and vesicle cluster in the cortical cell (CC), $\times 200$.
- b, seperated vesicle (V), hyphal mass (HM), and starch grain (S), $\times 1000$.
- c, arrow indicate individual vesicles (V), $\times 400$.

알 수 있었다(Fig. 1c). 이 소낭 송이를 4×10^6 소낭 송이/평판의 농도로 희석되도록 주입 평판하여 배양을 시작한 약 2주일 후에는 소낭 송이로부터 균사가 성장하는 것이 관찰되었다(Fig. 2a). 약 4주 후에는 왕성히 성장하는 균사가 관찰되었고(Fig. 2b), 약 6주 후에는 포자낭 유사구조가 관찰되었다.

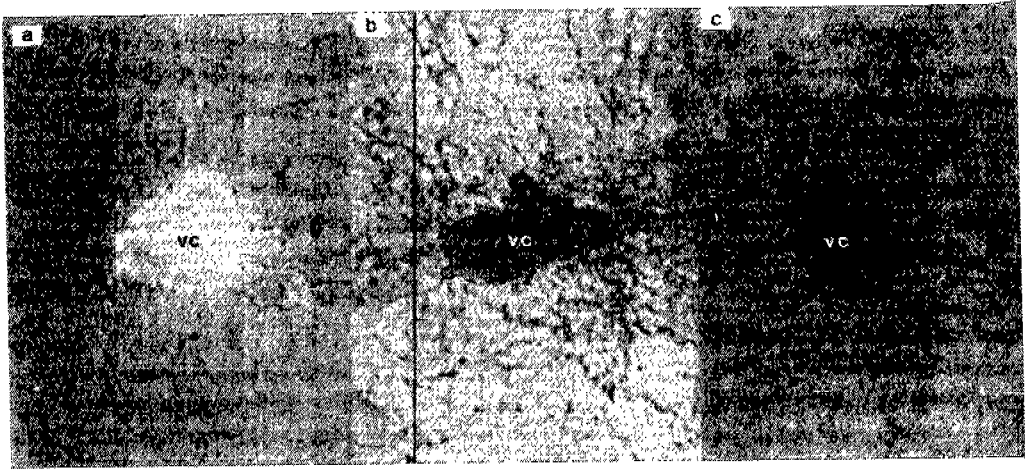


Fig. 2. Light micrographs of vesicle cluster growing on agar plate.

- a, 2 weeks later, hyphac (H) grow-out from vesicle culster (VC), $\times 400$.
- b, 4 week incubation, propersely growing hyphac, $\times 400$.
- c, 6 weeks later, sporangia-like structure (arrow), $\times 400$.

왕성히 성장하는 균체를 액체배지에 옮겼을 때, 분리균주의 생장은 느렸으나 고체배지에서 보다는 빠른 성장을 볼 수 있었다. 액체배지의 세포는 분지하는 균사를 가지고 있었고(Fig. 3a), 많은 포자를 가진 다양한 형태의 포자낭을 형성하였다(Fig. 3a). 성장하는 균사는 $0.8-1.0 \mu\text{m}$ 의 굵기이고 포자낭은 $60-80 \mu\text{m}$ 의 크기였다.

분리균주의 주사전자현미경 관찰 결과, 광학현미경의 관찰 결과와 마찬가지로 $2-3 \mu\text{m}$ 직경의 많은 포자가 포자낭에 존재하고 있었으며(Fig. 3b), 또한 포자낭은 균사보다 굵어진 분지(약 $2.5 \mu\text{m}$)에 형성되어 있음을 확인 할 수 있었다.

뿌리혹 형성 유도. 물오리나무의 종자는 발아율이 20-30%로 낮아 파종전에 충실한 종자를 골라 사용하거나 hexane(밀도: $0.062\text{g}/\text{cm}^3$)을 사용하여 불충실한 종자를 제거하고 파종하였다. 파종 7일 후 종자의 발아를 확인할 수 있었고, 발아된 종자를 질석이나 배양병에 옮겨 제일엽이 나올 때까지 성장하도록 하였다. 제1엽이 형성된 유식물은 몇 개의 측근을 가지고 있었으며 육안으로도 확인되는 많은 뿌리털이 존재하였다.

접종 2일 후부터 유식물 뿌리털의 꼬부라짐(curling)이 일어나기 시작하여(Fig. 4a) 1주일 후에는 감염 부위에 붉은 점으로 보이는 초기 뿌리혹이 유도되었다(Fig. 4b). 약 8주 후에는 2-6개의 뿌리혹엽을 갖는 성숙한 형태의 뿌리혹이 형성되었다(Fig. 4c). 질소원이 없는 상태에서 뿌리혹을 가진 식물체는 대조구와는 달리 정상적으로 성장하였으며(Fig. 4d), 이러한 결과

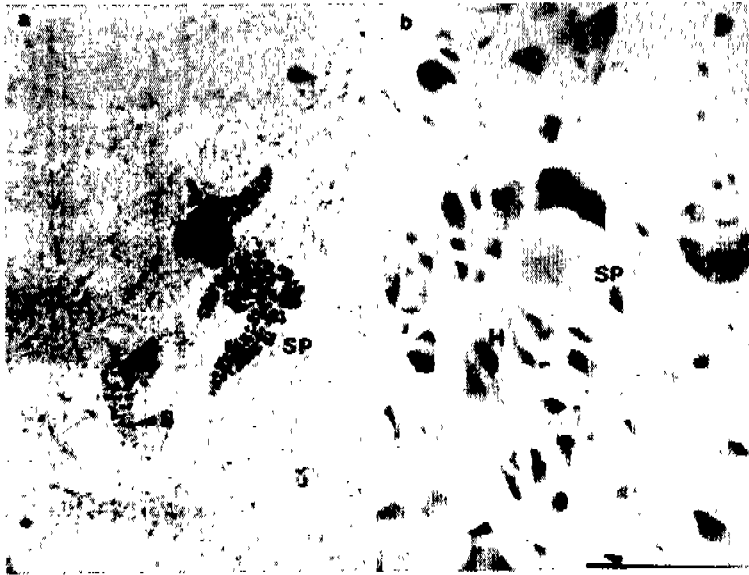


Fig. 3. Photomicrograph (a) and electronmicrograph (b) of sporangium in liquid medium.
a, sporangia (SP) having many spores (S), $\times 400$.
b, growing hyphae (H) and sporangium (SP),
bar = $10 \mu\text{m}$.



Fig. 4. Photomicrographs showing various stages of nodule formation.
a, curling of root hair, $\times 400$. b, pre-nodule, $\times 100$.
c, multilobed mature nodule, arrow indicate each lobe.
d, inoculated seedlings (1, 2) with root nodule (arrow) and control plant (3).

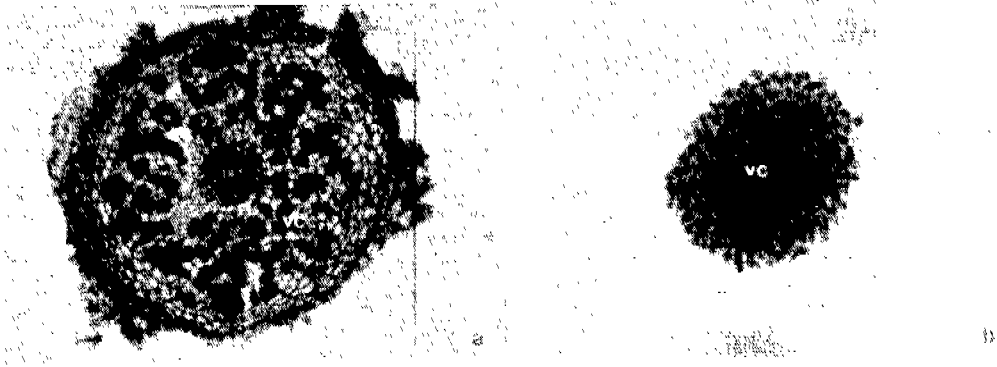


Fig. 5. Photomicrographs of cross-section of induced nodule (a) and isolated vesicle cluster from the induced nodule (b).

a, infected cortical cells (CC) filled with vesicle cluster (VC), $\times 100$.

b, isolated vesicle cluster (VC) from induced nodule with numerous vesicles (V), $\times 400$.

로부터 유도된 뿌리혹이 질소를 고정하고 있음을 확인 할 수 있었다.

내생균주의 재분리. 유도된 뿌리혹의 절편을 현미기술법(microtechnique)으로 얻고 염색하여 관찰한 결과, 내생균주의 소낭 송이가 피층세포에만 존재하고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5a).

유도된 뿌리혹으로부터 재분리한 소낭 송이(Fig. 5b)는 자연상태의 뿌리혹에서 얻은 것과 형태 및 크기가 동일하였다. 또한 주입 평판한 소낭 송이로부터 성장속도는 느리지만 균사의 성장을 확인할 수 있었다. 따라서 유도된 뿌리혹은 분리균주에 의하여 형성되었음을 알 수 있었다.

고 찰

내생균주를 분리하는데 사용한 Benson (1982)의 여과법은 $20\mu\text{m}$ 막과 항생제를 사용함으로써 식물에서 유래한 케놀화합물과 오염원 및 식물체의 조직을 손쉽게 배제할 수 있었다는 점에서 물오리나무 뿌리혹의 내생균주 분리에 적당한 방법이라 판단된다.

분리균주는 균사의 크기, 형태 및 분지 양상, 포자낭의 형태 및 형성위치 그리고 구형의 포자등 형태적 특징으로 *Frankia*임을 확인할 수 있었고, 이러한 분리균주의 형태적 특징은 이미 분리된 *Frankia*균주의 형태적 특징(Bond, 1983; Lalonde, 1979b; Newcomb *et al.*, 1979; Horrierc *et al.*, 1983)과 동일하였다. 분리균주는 Tween-80, pyruvate, succinate, propionate, casamino acids 그리고 peptone등 다양한 탄소원을 이용하여 성장할 수 있었으며 (결과는 제시하지 않았음) Tween-80이 있는 배지에서 가장 빠른 성장을 보였다. 이는 *Frankia*가 다양한 탄소원을 사용할 수 있다는 보고(Blom *et al.*, 1980; Blom, 1981; Tjepkema and Schwintzer, 1986)와 일치한다.

공생균주-숙주식물의 상호관계에서 숙주식물의 유전자형이 중요하다고 인식된 이래 (Dawson and Sun, 1981; Tremblay *et al.*, 1984; Simon *et al.*, 1985), 기내배양법으로 얻은 숙

주식물의 클론이 뿌리혹 유도 실험에 사용되었다(Perinet and Lalonde, 1983a; Perinet and Lalonde, 1983b; Tremblay *et al.*, 1984; Bertrand and Lalonde, 1985; Simon *et al.*, 1985). 그러나 본 연구에서는 뿌리혹을 채취한 동일한 숙주식물의 종자물로부터 발아시킨 유식물들을 뿌리혹 유도 실험의 재료로 사용하였으며, 뿌리혹이 유도된 식물체들은 생장이나 뿌리혹의 내·외부 형태적인 측면에서 차이를 나타내지 않았다.

*Frankia*의 감염경로는 뿌리털의 꼬부라짐을 통한 경우(Callaham *et al.*, 1979; root hair infection, RHI)와 숙주식물 뿌리의 세포간극을 통과하여 감염되는 경우 (intracellular penetration, PI)가 있는 것으로 알려져 있으며 뿌리털의 꼬부라짐에 관여할 것으로 여겨지는 cytokinin이 *Frankia*에 의해 분비되는 것이 확인되었다(Stevens and Berry, 1988). 물오리나무의 감염경로는 뿌리털이 많이 존재하고 접종 직후 뿌리털의 꼬부라짐이 일어나는 것으로 보아 뿌리털을 통하여 이루어지는 것으로 생각된다.

유도된 뿌리혹의 내부구조를 보면 중심에 관다발계가 존재하고 그 외부의 피층세포만이 감염되어 있었고 감염된 피층세포에 많은 수의 소낭이 존재하고 있었다(Fig. 5ab). 이는 질소고정능력을 갖는 뿌리혹은 피층세포에 소낭이 존재하고, 질소고정능력이 없는 것은 세포가 균사로만 채워져 있다는 보고(Baker *et al.*, 1980; Hahn *et al.*, 1988; Baker and Torrey, 1980)에서 확인되듯이 유도된 뿌리혹이 질소고정능력을 가지고 있음을 나타내 준다.

유도된 뿌리혹으로부터 내생균주를 재분리한 결과 일차분리균주와 동일한 형태의 내생균주를 얻을 수 있었다. 이는 유도된 뿌리혹이 분리균주에 의하여 형성되었음을 증명하는 것이다.

이상과 같은 실험, 즉, 뿌리혹에서의 내생균주 확인, 내생균주의 분리, 뿌리혹 형성유도 및 유도된 뿌리혹으로부터 내생균주의 재분리는 Koch의 가설(Kenagn, 1974)에서 공생균주의 확인에 필요한 과정들이다. 따라서 본 실험에서 분리한 *Frankia*균주는 물오리나무의 진정한 공생균주임을 확인할 수 있고, 이 균주를 Lechevalier (1983)의 방법에 따라 *Frankia* SUN 014201 균주로 명명하였다. 여기서 SUN는 보관 장소를 나타내고, 01은 오리나무 속, 42는 중명으로 물오리나무, 01은 채집번호를 나타낸다.

적 요

물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 뿌리혹으로부터 분리한 내생균주는 형태적 특징으로 미루어 *Frankia* 균주임을 확인하였고, 물오리나무 유식물에 감염시켰을 때 질소고정능력을 갖는 뿌리혹 형성이 유도되어 분리균주의 감염성 및 질소고정능력을 확인할 수 있었으며, 유도된 뿌리혹으로부터 재분리된 내생균주는 일차분리균주와 형태적으로 동일하여 유도된 뿌리혹이 일차분리균주에 의해 형성됨을 알 수 있었다. 따라서 분리균주가 물오리나무의 진정한 공생균주임을 확인하였으며, *Frankia* SNU 014201 균주로 명명하였다.

참 고 문 헌

- An, C.S. 1986. Studies on the nitrogen-fixing symbiosis in actinorhizal plants. I. Survey of the actinorhizal root nodules and collection of the root nodules. *Korean J. Bot.* **29**: 109-115.
- Baker, D. and D. O'Keefe. 1984. A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae

- from actinorhizal root nodules and soil samples. *Plant and Soil* **28**: 141-146.
- Baker, D., W. Newcomb and J.G. Torrey. 1980. Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont *Frankia* sp. Eu11 (Actinomycetes). *Can. J. Microbiol.* **26**: 1072-1089.
- Becking, J.H. 1970. Frankiaceae fam. nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886. *Intl. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 201-220.
- Benson, D.R. 1982. Isolation of *Frankia* strains from alder actinorhizal root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 461-465.
- Bertrand, L.J. and M. Lalonde. 1985. *In vitro* propagation and nodulation by *Frankia* of actinorhizal Russian Olive (*Elaeagnus angustifolia* L.). *Plant and Soil* **87**: 143-152.
- Blom, J. 1981. Utilization of fatty acids and NH_4^+ by *Frankia* Avcl1. *FEMS Microbiol. Lett.* **10**: 143-145.
- Blom, J., W. Roelofs and A.D.L. Akkermans. 1980. Growth of *Frankia* Avcl1 on media containing Tween-80 as carbon-sources. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 131-135.
- Bond, G. 1976. The results of the IBP survey of root-nodule formation in nonleguminous angiosperms. In, *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, P.S. Nutman (ed.). Cambridge Univ. Press, Cambridge pp. 443-474.
- Bond, G. 1983. Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixing systems. In, *Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystem*, J.C. Gordon and C.T. Wheeler (eds.). the Hauge, Nijhoff. pp. 55-87.
- Callahan, D., W. Newcomb, J.G. Torrey and R.L. Peterson. 1979. Root hair infection in actinomycete-induced root nodule initiation in *Casuarina*, *Myrica*, and *Comptonia*. *Bot. Gaz.* **140**(Supl.): 1-9.
- Dawson, J.O. and S.H. Sun. 1981. The effect of *Frankia* isolates from *Comptonia peregrina* and *Alnus crispa* on growth of *Alnus glutinosa*, *A. cordata* and *A. incana* clones. *Can. J. For. Res.* **11**: 758-762.
- Hahn, D., M.J.C. Strarrenburg and A.D.L. Akkermans. 1988. Variable compatibility of cloned *Alnus glutinosa* ecotype against ineffective *Frankia* strains. *Plant and Soil* **107**: 233-243.
- Horriere, F., M.P. Lechevalier and H.A. Lechevalier. 1983. *In vitro* morphogenesis and ultrastructure of a *Frankia* sp. Ar13 (Actinomycetes) from *Alnus rubra* and a morphologically similar isolates (Ar12) from *Alnus incans* subsp. *rugosa*. *Can. J. Bot.* **61**: 2843-2854.
- Kalakutskii, L.V. and A.N. Pariiskaya. 1983. Nitrogen-fixing symbiosis of actinomycetes with plants. *Biol. Bull.* **9**: 171-185.
- Kenagn, C.B. 1974. *Principles of Phytopathology*. (2nd ed.). Balt Publishers, Lafayette, Indiana. pp. 29-30.
- Lalonde, M. 1979a. Techniques and observations of the nitrogen-fixing *Alnus* root nodule symbiosis. In, *Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation*, N.S. Subba (ed.). Oxford and IBH Publs., New Dehli. pp. 425-434.
- Lalonde, M. 1979b. Immunological and ultrastructural demonstration of nodulation of the European *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. host plant by an actinomycetal isolate from the North American *Comptonia peregrina*(L.) Coult, root nodule. *Bot. Gaz.* **140**(suppl.)35-43.
- Lalonde, M and E.H. Calvert. 1979. Productin of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. In, *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests*, J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry (eds.). Forest Research Lab., Oregon State Univ. Press, Corvallis, Oregon. pp. 95-100.
- Lechevalier, M.P. 1983. Cataloging *Frankia* strains. *Can. J. Bot.* **61**: 2964-2967.

- Lechevalier, M.P. 1984. The taxonomy of the genus *Frankia*. *Plant and Soil* **24**: 1-6.
- Lechevalier, M.P., D. Baker and F. Horrierc. 1983. Physiology, chemistry, serology and infectivity of two *Frankia* isolates from *Alnus incana*(L.) Moench. subsp. *rugosa*(Duroi) Clausen. *Can. J. Bot.* **61**: 2826-2833.
- Moiroud, A. and V.G. Pearson. 1984. Symbiotic relationships in actinorhizae. In, Genes Involved in Microbe-Plant Interactions, D.P.S. Verma and T.H. Hohn (eds.). Springer-Verlag, New York, NY. pp. 205-223.
- Newcomb, W., D. Callahan, J.G. Torrey and R.L. Peterson. 1979. Morphogenesis and fine structure of the nodule of *Comptonia peregrina*. *Bot. Gaz.* **140**(Suppl.): 22-34.
- Perinet, P. and M. Lalonde. 1983a. *In vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa*(L.) Gaertn. *Plant Science Lett.* **29**: 9-17.
- Perinet, P. and M. Lalonde. 1983b. Axenic nodulation of *in vitro* propagated *Alnus glutinosa* plantlets by *Frankia* strains. *Can. J. Bot.* **61**: 2883-2888.
- Simon, L., A. Stein, S. Cote and M. Lalonde. 1985. Performance of *in vitro* propagated *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. clones inoculated with *Frankia*. *Plant and Soil* **87**: 125-133.
- Stevens, G.A. and A.M. Berry. 1988. Cytokinin secretion by *Frankia* sp. HFPAr13 in defined medium. *Plant Physiol.* **87**: 15-16.
- Tjepkema, J.D. and C.R. Schwintzer. 1986. Physiology of actinorhizal nodules. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**: 209-232.
- Torrey, J.G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *BioScience* **28**: 596-592.
- Tremblay, F.M., X. Nesme and M. Lalonde. 1984. Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa*(Ait.) Pursh. *Plant and Soil.* **78**: 171-178.

(1988.11.8 接受)