

木本植物에 있어서 窒素固定 共生關係(Actinorhizal symbiosis)에 관한 研究

I. 宿主植物의 뿌리혹 分布調査 및 뿌리혹 採取

安 正 善
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Studies on the Nitrogen-fixing Symbiosis in Actinorhizal Plants

I. Survey of the actinorhizal root nodules and collection the root nodules

An, Chung Sun

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Actinorhizal plants being capable of fixing atmospheric nitrogen in symbiotic association with *Frankia* were surveyed for their root nodules, and the root nodules were collected for further studies. Three species of *Alnus* and *Elaeagnus* (*A. hirsuta*, *A. firma*, *A. japonica*; *E. glabra*, *E. umbellata*, *E. macrophylla*) and one species of *Myrica* (*M. rubra*) were confirmed to bear the root nodules of typical external shape. Morphological studies using light microscope and scanning electron microscope revealed the presence of vesicle clusters in the cortex region of the root. Two tentative endophyte colonies were isolated from the root nodule of *A. hirsuta*.

緒 論

木本植物 共生關係(Actinorhizal symbiosis)에서의 宿主植物은 오리나무, 보리수나무와 같은 雙子葉植物에 속하는 8目 200餘種이며(Bond, 1983), 그들의 뿌리에서 大氣窒素를 固定하는 菌株는 放射線菌의 일종인 *Frankia*로 알려져 있다(Torrey, 1978). 宿主植物 分布에 대한 조사는 이미 국제적(한국 제외)으로 행하여졌으며(Bond, 1976) 최초로 共生菌株 分離에 성공한 후(Calaham *et al.*, 1978) 분리된 균주를 사용하여 공생관계에 대한 形態學的(Newcomb *et al.*, 1979), 生理學的(Akkerman *et al.*, 1981), 分類學的(Lechevalier, 1984; An *et al.*, 1985) 研究와 함께 分子生物學的 研究(Simonet *et al.*, 1984)도 수행되고 있다.

숙주식물들은 질소고정능력을 갖는 뿌리혹 덕분에 生態的으로는 開拓植物로서 중요하며

본 연구는 1985년도 문교부 대학원 육성 연구비의 지원으로 이루어졌음.

自然이나 人間에 의해 파손된 土壤의 活性化 및 토양손실을 방지하기 위해서도 이용되어지고 있다(Kalakutskii and Pariiskaya, 1983). 따라서 우리나라와 같이 산악지대, 광산지대 및 해변가 등의 生産性이 낮은 지역이 많은 곳에서는 질소고정 공생관계 전반에 대한 基礎的인 研究 외에도 國土의 保存과 버려진 땅의 效率的인 活用計劃을 수립하기 위해서도 목본식물 공생관계에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

그러나 우리나라에서는 이들에 대한 연구가 체계적으로 이루어지지 않고 있으며 더우기 우리나라에서 생육하는 숙주식물로부터 공생균주를 분리하여 연구한 예는 보고된 바 없다. 따라서 본연구에서는 우리나라에 생육하는 숙주식물을 대상으로 현지조사를 통하여 뿌리혹의 존재를 확인하였으며, 이를 채취하여 그들의 외부 및 내부구조를 조사하고 대표적인 숙주식물의 뿌리혹으로부터 공생균주의 분리를 시도하였다.

材料 및 方法

숙주식물의 조사 및 뿌리혹의 채집. 1985년 5월부터 10월에 걸쳐서 설악산, 관악산, 입암산 및 제주도에서 생육중인 숙주식물을 대상으로 뿌리혹의 존재여부를 확인하였으며, 토양을 채취하여 pH를 조사하고 숙주식물과 뿌리혹을 채집하였다. 숙주식물은 잎, 줄기, 열매를 채집하여 표본을 만들고 뿌리혹은 일음상자에 보관하여 실험실로 운반, 냉동실에 보관하였다.

형태적 관찰. 뿌리혹의 외부 형태는 현미경과 암실에서 촬영하였으며, 내부형태는 광학현미경과 주사전자현미경을 이용하여 관찰, 촬영하였다. 광학현미경 관찰을 위해서는 뿌리혹을 면도칼로 자른 절편을 lactophenol blue(Grimstone and Skaer, 1972)로 염색하여 사용하였다. 주사전미경 관찰은 Lalonde와 Devoe(1975)의 방법을 따랐으며, 뿌리혹 절편을 50 mM sodium phosphate 완충액에서 6% glutaraldehyde로 30분, 1% O_2O_4 로 45분 고정시킨 후 탈수과정과 critical point 건조방법을 거쳐서 gold-palladium을 입힌 후 사용하였다.

공생균주 분리. Baker 등(1979)의 방법을 따랐으며 뿌리혹으로부터 절단한 4~5개의 염을 1.25% (v/v) sodium hypochlorite(Clorox Co.)용액에서 10분간 표면살균한 후, 멸균 증류수로 4회 세척하고 4 ml의 멸균 증류수와 함께 마쇄하여 뿌리혹 현탁액을 만들었다. 현탁액을 Sephadex G-50 Coarse(3 ml bed volume)에 옮긴 후 멸균 증류수로 용출시켜, 초기 4 ml의 용출액을 채취한 후 이를 농도별로 희석, 선택배지에 pour-plate 방법으로 접종하였다. 28°C 암소에서 배양하면서 주단위로 현미경 관찰을 하였다. 선택배지로는 Baker와 O'keefe(1984)의 DPM 배지와 Baker와 Torrey(1979)의 FB 배지를 사용하였다.

結 果

우리나라에서 생육하고있는 비공과 목본식물 가운데 오리나무屬, 보리수나무屬, 소귀나무屬에 해당되는 식물들의 뿌리혹 존재여부를 현지조사를 통해 조사하였으며 그 결과는 Table 1과 같다.

오리나무屬의 식물은 설악산, 관악산, 입암산 및 제주도의 12개 지역에서 몰(산)오리나무, 오리나무, 사방오리의 3種, 72個體를 조사하였으며 이들은 모두 뿌리혹을 갖고 있었다.

보리수나무屬의 식물은 관악산 입암산, 제주도의 12개 지역에서 보리수나무, 보리장나무,

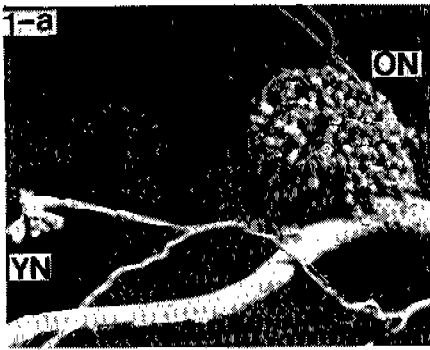
Table 1. Actinorhizal plants surveyed in Korea

Genus	Species	Place (pH, # of site)	# of plants examined	% of nodulated plants
<i>Alnus</i>	<i>A. hirsuta</i>	M. Kwank (5.5, 4)	27	100
		Mt. Sulak (6.0, 2)	12	100
	<i>A. firma</i>	Mt. Kwanak (5.6, 3)	18	100
		Mt. Ibam (5.8, 2)	10	100
	<i>A. japonica</i>	Cheju Island (6.0, 1)	5	100
<i>Elaeagnus</i>	<i>E. umbellata</i>	Mt. Kwanak (5.6, 2)	5	100
		Mt. Ibam (5.8, 2)	3	100
		Cheju Island (6.0, 3)	15	100
	<i>E. glabra</i>	Cheju Island (6.4, 2)	8	100
	<i>E. macrophylla</i>	Cheju Island (6.2, 3)	8	100
<i>Myrica</i>	<i>M. rubura</i>	Cheju Island (6.1, 2)	6	100

보리밥나무의 3種, 39個體를 조사하였는데, 이들도 모두 뿌리혹을 갖고 있었으며, 제주도 의 1개지역에서 조사한 소귀나무屬, 소귀나무種에 속하는 6個體도 모두 뿌리혹을 갖고 있었다. 이들 숙주식물들이 생육하고있는 토양의 pH는 5.5에서 6.4에 이르는 비교적 일정한 값이었다.

오리나무屬과 보리수나무屬에서 조사된 대표적인 뿌리혹은 많은 뿌리혹엽 (nodule lobe)으로 이루어진 구상의 형태였으며 크기는 대체로 2.0~3.5 cm였다. 이러한 뿌리혹은 비교적 굽은 뿌리에서 관찰되었으며, 최근에 형성된 측근에서는 차상분지를 하는 소수의 뿌리혹엽이 발견되어서 이들의 年次的인 성장단계를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1-a). 소귀나무의 뿌리혹은 그 옆으로부터 유래한 가는 뿌리혹뿌리 (nodule root)를 갖고 있는 것이 특징이며 이는 다시 분지할 수 있는 것이 관찰되었고 뿌리혹은 차상분지를 통하여 연차적인 성장을 함으로써 더 큰 뿌리혹을 형성하는 것도 관찰되었다 (Fig. 1-b). Lactophenol blue로 염색한 뿌리혹 절편의 광학현미경 관찰을 통하여, 푸른색으로 염색된 공생균주가 뿌리혹 내부의 부피가 커진 피층세포에만 존재함을 관찰할 수 있었으며, 뿌리혹 내부에서 공생균주의 균사는 질소고정 장소로 알려진 vesicle을 형성하고 이들이 세포내부를 채우고 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 뿌리혹 과편을 주사전자현미경으로 관찰하여 거듭 확인할 수 있었으며, 특히 분지된 균사와 3 μ m 크기의 구형 vesicle들이 피층세포의 내부를 채우고 있는 것이 입체적으로 관찰되었다 (Fig. 3).

뿌리혹 현탁액으로부터 얻은 vesicle cluster를 배양한 결과 FB배지에서 약 2주 후 두개의 잠정적인 공생균주 균체를 관찰할 수 있었으며, 이들은 형태적인 특징으로 보아 각각 독립적인 vesicle cluster로부터 유래되었고 발생 초기 단계의 포자낭을 갖고 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 4).



1-b

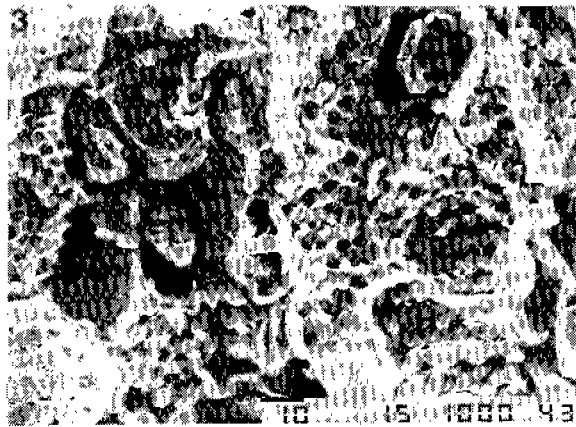
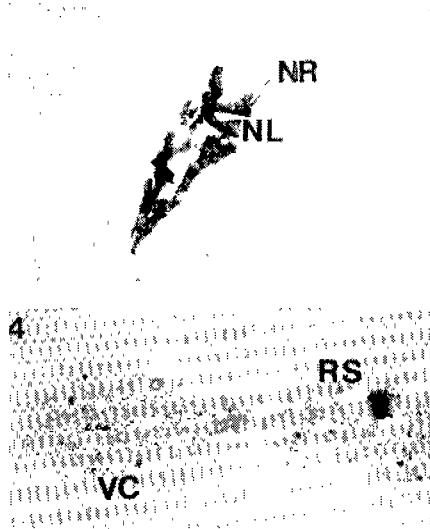
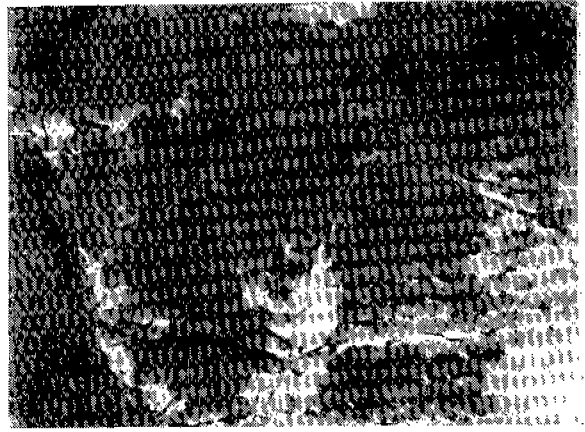


Fig. 1. Typical nodule morphology of *Alnus hirsuta* showing coralloid old nodule (ON) and young nodule with a few nodule lobe (YN) (1-a), and nodule of *Myrica rubra* showing nodule lobes (NL) with miniature branched nodule root (NR) (1-b). $\times 1.5$.

Fig. 2. Light microscopic photograph of nodule section from *Elaeagnus umbellata* showing blue vesicle (V), clustered in the cortical cell (CC): lactophenol blue stain. $\times 600$.

Fig. 3. Scanning electron microscopic photograph of nodule fragment from *Myrica rubra* showing hyphal mass (H), individual vesicle (V) and vesicle cluster in the cortical cell (CC). $\times 1,000$.

Fig. 4. Two tentative endophyte colonies isolated from nodule suspension of *Alnus hirsuta* showing vesicle cluster (VC) and rudimentary sporangium-like structure (RS). $\times 300$.

考 察

뿌리혹을 갖고 있는 17屬의 식물 중에서 우리나라에는 오리나무屬에 9種, 보리수나무屬에 7種, 소귀나무屬에 1種이 생육하고 있는 것으로 보고되었으며 (Lee, 1982) 본 연구에서 조사한 오리나무屬의 3種, 보리수나무屬의 3種, 소귀나무屬의 1種은 모두 뿌리혹을 가지고

있었다(Table 1). 이러한 사실은 지금까지 세계적으로 조사된 34種의 오리나무屬, 17種의 보리수나무屬, 및 26種의 소귀나무屬의 식물들이 모두 뿌리혹을 갖고있다는 보고(Moiroud and Pearson, 1984)와 일치하며 아직 조사되지 않은 오리나무屬의 6種, 보리수나무屬의 4種도 뿌리혹을 갖고 있을 가능성이 높음을 시사하고 있다.

또한 이들이 pH 4.0~8.2의 토양에서 생육하며, 2,000m까지의 고산에서도 생육한다는 보고(Bond, 1976)는 본 연구에서 조사한 토양의 산성도(pH 5.5~6.4)와 설악산, 한라산에서 각각 채집된 물오리나무와 보리수나무가 뿌리혹을 갖고 있다는 사실과도 일치하고 있다. 오리나무屬과 보리수나무屬에서 관찰된 뿌리혹의 형태는 전형적인 오리나무형으로서(Fig. 1-a) 많은 뿌리염으로 구성된 구상의 형태를 취하며 대부분 2.0cm~3.5cm의 크기였다. 그러나 소귀나무의 뿌리혹은 뿌리혹의 각 염에서 지상부쪽으로 향하는 측근의 일종인 뿌리혹뿌리(nodule root)가 발생하는 특징을 갖고 있다(Bowie *et al.*, 1977). 본 연구에서 조사된 소귀나무 뿌리혹(Fig. 1-b)은 뿌리혹뿌리는 갖고 있었으나 그 길이가 짧고 방향도 다양하였는데 그것이 자연상태의 형태인지 또는 비정상적인 생장과정의 결과인지 또는 채집과정에서 손상된 결과인지는 판단할 수 없었다. 그러나 뿌리혹의 상단에 존재하는 점은 papillae로 미루어보아 뿌리혹뿌리의 생장이 억제된 것으로 생각된다.

광학현미경과 주사전자현미경으로 관찰한 뿌리혹의 내부 구조(Figs. 2, 3)는 공생균주가 뿌리의 皮層에만 존재하며, 질소고정을 하기 위해서는 菌絲가 vesicle 구조를 형성하여 뿌리의 피층세포를 메우는 vesicle cluster를 이루어야만 한다는 보고(Torrey, 1978)와 일치하며 따라서 본 연구에서 사용한 뿌리혹들은 질소고정능력을 갖고있는 뿌리혹으로 사료된다. 이들의 질소고정 능력은 acetylene 환원력 실험을 통하여 확인할 수 있을 것이다.

공생균주의 분리실험에서는 FB배지에서만 두개의 균체를 얻을 수 있었는데 이는 DPM 배지에 유기영양원이 없고 FB배지에는 glucose, yeast extract 및 casamino acid의 유기물이 포함되어있기 때문인 것으로 생각된다. 두개의 균체는 형태적으로는 vesicle cluster에서 유래되었다고 판단되지만 균체로부터 새로운 균사의 형성과 특정형태의 포자낭을 형성하지 않았으므로 잠정적인 *Frankia*로 생각된다. 성공적인 균체 분리를 위해서는 식물세포, phenol 성분 및 오염 미생물을 제거한 vesicle cluster를 분리하여 배양하는 것과 함께 균주에 따라서 특정한 영양원 및 최적 생장 조건을 찾아내는 것이 필요하며(Benson, 1982), 따라서 잠정적으로 *Frankia*라고 생각되는 두개의 균체를 다른 영양 조성을 갖는 배지에 옮겨서 균사형성과 포자형성을 유도하는 실험이 필요하다고 생각된다.

본 연구는 우리나라에서 목본식물 질소고정 공생관계에 대한 연구의 기초자료를 제공하였으며, 본 연구 결과를 토대로 숙주식물의 분포조사 및 균주 분리에 대한 지속적인 연구와 함께 숙주식물과 공생균주간의 상호작용에 대한 진반적인 연구가 필요하다고 생각된다.

摘 要

Frankia 균주와 共生關係를 갖고 대기질소를 固定할 수 있는 木本植物을 대상으로 뿌리혹의 존재를 조사하였으며 대표적인 宿主植物들로부터 뿌리혹을 채취하였다. 오리나무屬에서는 오리나무, 물오리, 사방오리의 3種, 보리수나무屬에서는 보리수나무, 보리참나무, 보리장나무의 3種, 소귀나무屬에서는 소귀나무 1種이 각각 特有한 형태의 뿌리혹을 갖고 있는 것이 확인되었다. 광학현미경과 주사전자현미경

을 이용한 형태학적 연구로 뿌리혹의 피층에만 vesicle cluster가 존재하는 것을 확인하였으며 불(산)오리나무의 뿌리혹으로부터 두개의 잠정적인 공생균주의 군체를 분리하였다.

參 考 文 獻

- An, C.S., W.S. Riggsby and B.C. Mullin. 1985. Relationships of *Frankia* isolates based on DNA homology studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35(2): 140-146.
- Akkermans, A.D., K. Huss-Danell and W. Roelofsen. 1981. Enzymes of the tricarboxylic cycle and malate aspartate shuttle in the N₂-fixing endophyte of *Alnus glutinosa*. *Physiol. Plant.* 53: 289-294.
- Baker, D., G.H. Kidd and J.G. Torrey. 1979. Separation of actinomycetes nodule suspensions by Sephadex fractionation. *Bot. Gaz.* 140 (suppl.): s49-s51.
- Baker, D. and J.G. Torrey. 1979. The isolation and cultivation of actinomycetous root nodule endophytes. In, J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry (ed.). Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests. Oregon State Univ. Press, Oregon. pp. 38-56.
- Baker 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.
- Benson, D.R. 1982. Isolation of *Frankia* strains from alder actinorhizal root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(2):461-465.
- Bond, G. 1976. The results of the IBP survey of root-nodule formation in nonleguminous angiosperms. In, P.S. Nutman (ed.). Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 443-474.
- Bond, G. 1983. Taxonomy and distribution of non-logume nitrogen-fixing systems. In, J.C. Gordon and C.T. Wheeler (ed.). Biological Nitrogen Fixation in Forset Ecosystem. pp. 55-87.
- Bowie, B., D. Callaham and J.G. Torrey. 1977. Time-lapse photographic observations of morphogenesis in root nodules of *Comptonia peregrina* (Myricaceae). *Amer. J. Bot.* 64(5): 516-525.
- Callaham, D., P. De Tredici and J.G. Torrey. 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* 199: 899-902.
- Grimstone, A.V. and R.J. Skaer. 1972. A guide book to microscopical methods. Cambridge University Press, England. p.134.
- Kalakutskii, L.V. and A.N. Pariiskaya. 1983. Nitrogen-fixing symbiosis of actinomycetes with plants. *Biol. Bull.* 9: 171-185.
- Laloue, M. and I.W. Devoe. 1975. Scanning electron microscopy of *Alnus crispa* var. *mollis* Fern. root endophyte. *Archiv. Microbiologie* 105: 87-94.
- Lechevalier, M.P. 1984. The taxonomy of the genus *Frankia*. *Plant and Soil* 24:1-6.
- Lee, T.B. 1982. Illustrated flora of Korea. Hyang Moon Sa, Seoul, Korea.
- Moiroud, A. and V.G. Pearson. 1984. Symbiotic relationships in actinorhizae. In, D.P.S. Verma and TH. Hohn (ed.). Genes involved in Microbe-Plant Interactions. Springer-Verlag Wien, New York. pp. 205-223.
- Newcomb, W., D. Callaham, J.C. Torrey and R.L. Peterson. 1979. Morphogenesis and fine structure of actinomycetous endophyte of nitrogen-fixing root nodules of *Comptonia peregrina*. *Bot. Gaz.* 140 (Suppl): 22-34.

- Simonet, P., A. Capellano, E. Havasso, R. Bardin, and A. Moiroud. 1984. An improved method for lysis of *Frankia* with achromopeptidase allow detection of new plasmids. *Can. J. Microbiol.* 30: 1292-1295.
- Torrey, J.G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *Bioscience* 28: 586-592.

(1986. 5. 10. 接受)