

보리수나무 뿌리혹으로부터 *Frankia* EuIK1 공생균주의 분리

金 聖 千·具 昌 德*·朴 敏 哲**

金 俊 鎬·宋 承 達***·安 正 善

(서울대학교 생물학과, *임업연구원 산림미생물학실,

성심여자대학교 생물학과, *경북대학교 생물학과)

Isolation of Symbiotic *Frankia* EuIK1 Strain from Root Nodule of *Elaeagnus umbellata*

Kim, Sung Chun, Chang Duck Ku*, Min Chul Park**,
Chun Ho Kim, Seung Dal Song*** and Chung Sun An

(Department of Biology, Seoul National University, Seoul,

*Department of Forest Microbiology, Forest Research Institute, Seoul,

**Department of Biology, Sungsim Women's University, Puchon, and

***Department of Biology, Kyungpook National University, Daegu)

ABSTRACT

The root nodules of *Elaeagnus umbellata* were coralloid-shape due to repeated dichotomous branching of nodule meristem. The filamentous endophyte with vesicle cluster ranging from 30 μ m to 60 μ m in diameter was present only in the cortical cells. The isolated endophytes *in vitro* culture showed typical *Frankia* morphology, consisting of highly branched hyphae ranging from 0.8 μ m to 1.0 μ m in diameter, terminal and intrahyphal sporangia varying in shape and size up to 60 μ m in length and laminated vesicles. Its infectivity and effectivity were confirmed by induction of nitrogen-fixing root nodules on the inoculated seedlings of two *Elaeagnus* species. Consequently, the isolate was confirmed as a true symbiont of *Elaeagnus umbellata* root nodule and named *Frankia* EuIK1.

서 론

보리수나무, 오리나무 등 7목 8과 20속에 속하는 178종의 비콩과 북본식물(Moiroud and Pearson, 1984)과 방선균의 일종인 *Frankia*의 공생관계를 actinorrhizal symbiosis라 하는데(Torrey, 1978), 이들 식물은 질소고정능력을 가지므로 습지나 파괴된 지역에서 개척식물로서 중요하며, 토양의 양분 유실 방지 및 토양을 활성화하는데 사용되어지고 있다(Kalaskustkii and Pariiskay, 1983). *Frankia*는 그람양성균이고 분지하는 균사의 형태이며 포자를 방출하는 세균으로, 공생상태 혹은 질소원이 없는 상태에서 질소고정 장소로 알려진 소낭(vesicle)을 형성한다(Lechevalier, 1984). 보리수나무과에는 지구상에는 45종이 있는데 그 중에서 39종이

뿌리혹을 형성하고 있음이 보고되었고(Baker and Mullin, 1992), 한국내에는 6종의 자생종과 1종의 외래종이 있다(Lee, 1982). 이 중에서 보리수나무는 한반도 전체에 가장 흔하게 자생하고, 뜰보리수(일본산)는 원상용으로 식재하고, 나머지 5종류는 남부의 해안과 도서에 자생한다.

우리나라에서 이 분야에 대한 연구로 숙주식물 분포조사(An, 1986), 들오리나무의 뿌리혹으로부터 공생균주 분리(Kwon and An, 1989) 및 *nifH*, *D* 유전자의 클로닝(Kwon et al., 1990) 등이 있을 뿐이며, 보리수나무와 소귀나무에 대한 연구는 전혀 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라의 보리수나무속 식물의 질소고정을 효율적으로 이용하기 위한 기초연구의 일환으로 보리수나무의 뿌리혹으로부터 내생균주를 분리하고 분

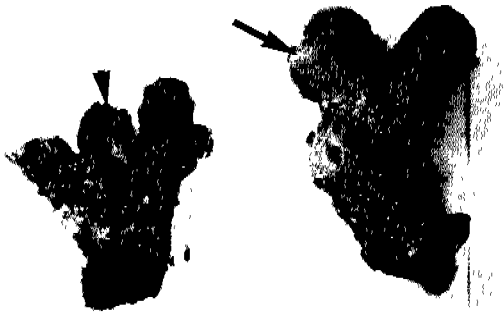


Fig. 1. Photographs of dichotomously branched nodule lobes taken from *E. umbellata* roots, showing empty, old lobe (left, arrow head) and newly growing lobe (right, arrow) with whitish appearance.

리균주가 진정한 공생균주임을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료. 서울 홍릉에서 자생하는 보리수나무 (*Elaeagnus umbellata* Thunb.)의 뿌리혹을 채취하여 냉장고에 보관하면서 재료로 사용하였고, 보리수나무의 유식물은 1991년 4월에 남한산성에서 채취하였고 보리수나무 및 뜰보리수나무 종자는 1991년 10월에 채집하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

내생균주의 분리 및 배양. 뿌리혹의 뿌리혹염을 표면 살균하고 끝 부분 2mm 정도를 조직마쇄기에 용액없이 넣어서 가볍게 부순 후 얻은 파편들(Diem and Dommergues, 1983) 또는 표면살균된 뿌리혹염을 조직마쇄기에서 마쇄하고 20 μm와 50 μm의 나이론 막을 이용하여 20 μm의 막에서 소낭 송이를 얻어(Benson, 1982) mDPM 한천배지에 pour plating하여 28°C에서 6주 동안 배양했다. 내생균주를 배양하기 위해서 mDPM, Q Mod 배지(Kwon and An, 1989) 및 FB 배지(Baker and Torrey, 1979)를 사용하였고 탄소원으로 제공되는 탄소화합물은 막 멸균법(filter sterilization)으로 배지에 첨가하였다.

뿌리혹 형성 유도. 보리수나무 및 뜰보리수나무의 유식물을 vermiculite에 심어 낮에는 광이 16시간, 26°C이며 밤은 8시간, 22°C인 배양기에서 질소원이 없는 Hoagland solution을 공급하며 배양한(Bond and Wheeler, 1980) 후, 유식물의 뿌리를 액체배지에서 얻은 균체를 주사기로 마쇄하여 30 mL 균주현탁액에 15분간 방치하여 감염시켜 뿌리혹 형성을 유도하였다.

뿌리혹 및 분리균주의 형태 관찰. 뿌리혹의 내부구조는 뿌리혹을 0.1 M phosphate 완충액(pH 6.8)의 0.2 M glutaraldehyde로 14시간 고정된 후 동일한 완충액으로

세척하고 에탄올을 사용한 탈수과정을 거친 후 Epon에 포매시켜 microtome으로 15~20 μm로 절단한 후 safranin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다(Berlyn and Miksche, 1976). 분리균주는 염색하지 않고 위상차 현미경으로 관찰하였다.

결 과

뿌리혹 형태. 보리수나무의 뿌리혹은 오리나무속의 뿌리혹에 비하여 형성빈도가 적었다. 뿌리혹의 외부형태는 크기가 뿌리혹의 생성 연도에 따라서 다양하게 나타났는데 수 mm에서 50 mm까지였다. 색깔은 흑갈색 또는 고동색이나 올해 생장한 부분은 뿌리혹의 상단이 흰색이었다. 뿌리혹염은 1 mm 내외의 굵기, 1~2 mm 길이이고 오래된 뿌리혹은 죽어 속이 빈 것도 있었다(Fig. 1).

뿌리혹의 종단면(Fig. 2A)을 보면 내생균주는 중심주 바깥의 피층세포에만 편재되어 있는데, 피층세포는 균사가 침입하여 세포의 일부분에만 소낭을 형성하고 있는 부분, 균사의 끝에 소낭이 형성된 내생균주가 가득 차 있는 부분, 소낭 송이와 균사의 잔해가 있는 부분, 그리고 백색체 등이 있는 비감염된 부분으로 나눌 수 있었다. 피층세포내의 소낭 송이의 크기(Fig. 2B)는 30~70 μm이었고 매우 엷은 황색이며 Benson(1982)의 방법에 따라 마쇄하여 분리한 소낭 송이(Fig. 2C)는 약 30~50 μm 크기였다. 이들은 약 1 μm 굵기의 균사가 뭉쳐져 있고 이로부터 분지된 균사의 끝에 2~3 μm 크기의 구형인 소낭을 형성하여 전체적으로는 마치 포도송이 모양을 하고 있었다.

내생균주의 분리. 뿌리혹의 표면 살균 효과는 조직을 마쇄한 후 한천배지에 pour plating하여서 오염 여부를 조사하여 결정하였는데 3.7 mM HgCl₂로 2.5분 혹은 0.19 M NaClO로 5분간 표면 살균한 것이 효과적이었다. 표면 살균한 뿌리혹의 끝 부분 2 mm 정도를 조직마쇄기에서 가볍게 부순 후 한천배지에 pour plating하여 배양한 결과 약 2주일 후에는 균사가 생장하는 것을 관찰할 수 있었고 약 4주 후에는 왕성히 생장하는 균사가 관찰되었으며(Fig. 3) 약 6주 후에는 포자낭 유사 구조가 관찰되었다. 그러나 멸균된 뿌리혹염을 마쇄하여 50 μm 스크린을 통과하고 20 μm 스크린에 모은 소낭 송이로부터는 균사가 생장하지 않았다.

분리균주의 형태. 한천배지에서 분리균주(Fig. 4A)는 2~3 μm 직경의 포자를 가지는 포자낭을 균사보다 굵어진 가지(약 2.5 μm)에 형성하였다. 왕성하게 생장하는 균체를 액체배지에 옮겼을 때, 분리균주의 생장은 느렸으나 고체 배지에서 보다는 빠른 생장을 볼 수 있었다. 액체배지에서 균주(Fig. 4B)는 분지하는 0.8~1.0 μm의 굵기인 균사를 가지고 있었고, 다양한 모양과 크기인 포자낭을 형성하였



Fig. 2. Light micrographs of longitudinal section of nodule lobe (A), infected cells (B) and isolated vesicle cluster (C) from *E. umbellata*. a, Infected site (I) whose vesicle clusters are stained densely, growing cortical cells (G) invaded by thin hyphae and oldest region (O) with remains of vesicle cluster and hyphae, can be seen in the cortex outside stele (S) $\times 65$; b, Cortical cells filled with vesicle cluster (VC) $\times 260$; c, Isolated vesicle cluster with numerous vesicles (V) developed at the tips of branched hyphae (H) $\times 260$.



Fig. 3. Numerous hyphae (H) with vesicle (V) grew out from cells of the nodule piece (dark area at upper left corner) after four week's culture $\times 320$.

현상이 뚜렷하여 접종 5개월 후에 잎은 탈색되어 황색으로 변하여 거의 고사하였고(Fig. 5A, right), 뿌리에는 뿌리혹이 전혀 형성되지 않았다(Table 1). 그러나 접종한 식물은 한 달 후부터는 녹색의 새로운 잎이 줄기의 하부에서부터 돋기 시작하고 기존의 황색잎도 기부부터 녹화하기 시작하였으며, 접종 5개월 후에는 묘고가 250 mm 정도이고 잎은 매우 짙은 녹색이며(Fig. 5A, left) 뿌리에는 평균 9~12개의 뿌리혹이 형성되었으며 상단부는 흰색을 띠고 있었다(Fig. 5B, Table 1). 이러한 결과는 분리균주에 의해 뿌리혹 형성이 유도되었으며 형성된 뿌리혹은 질소고정 능력을 가지고 있음을 증명하는 것으로 분리균주가 질소고정 능력이 있는 뿌리혹 형성을 유도하였음을 알 수 있었다.

이상의 실험, 즉 뿌리혹에서의 내생균주 확인, 내생균주의 분리, 분리균주에 의한 뿌리혹 형성 유도 등은 Koch의 가설(Kenagn, 1974)에서 공생균주의 확인에 필요한 과정들이다. 따라서 이 연구에서 분리한 *Frankia* 균주는 보리수나무의 진정한 공생균주임을 확인할 수 있었고, 이 균주를 EuIK1이라고 명명하였다.

고 찰

보리수나무의 뿌리혹은 오리나무 뿌리혹 유형에 속하나 (Bond and Wheeler, 1980) 오리나무와는 달리 새로 성장한 부위가 흰색을 띠고 있었다. 내생균주를 분리하기 위하여 Benson(1982)의 여과법과 Diem과 Dommergues(1983)의 microdissection 방법을 모두 사용하였으나, 후자의 방법이 효율적이었다. 이 결과는 뿌리혹에서 내생균주를 분리할 때 root extract와 같은 식물체의 성분을 요구하는 경우도

는데 성숙한 것은 60 μm 정도의 크기를 보였다. 구형인 소낭은 3~5 μm 크기이고 소낭 외막으로 인해 다른 부위보다 빛을 심하게 굴절시켰다(Fig. 4A). 고체 및 액체 배지 모두에서 포자낭과 소낭을 관찰할 수 있었는데 고체배지가 액체배지보다 형성빈도가 높았다.

뿌리혹 형성 유도. 분리균주의 감염성 및 질소고정 능력을 확인하기 위해 뿌리혹을 유도하였다. 접종하지 않고 배양한 보리수나무 및 뽕보리수나무 유식물은 질소 결핍

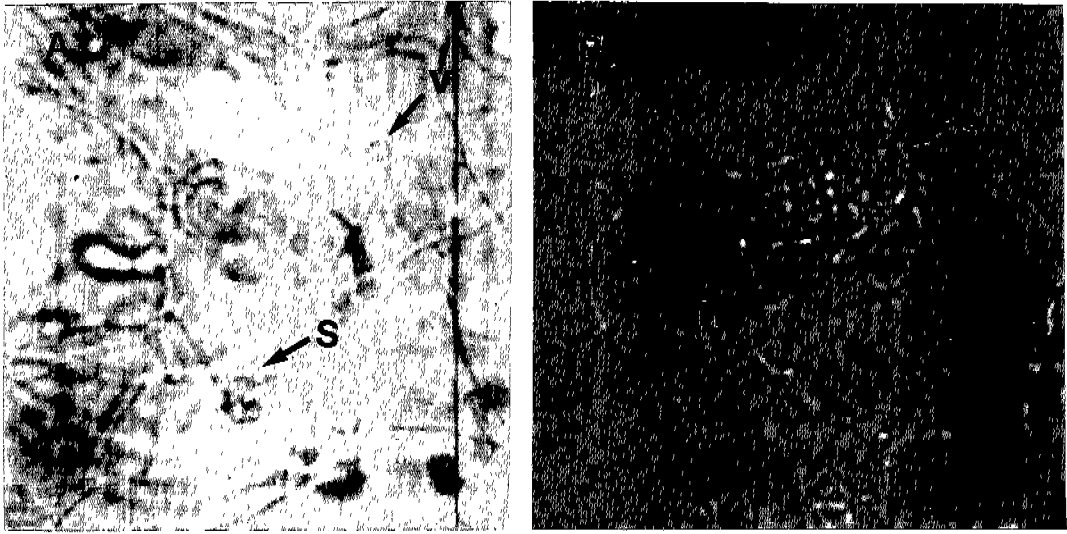


Fig. 4. Phase contrast microscopy of isolates grown on N-mDPM agar plate (A) and Q Mod liquid medium (B). Note the branched hypae (H) with large irregular shaped sporangium (S) and spherical vesicle (V) $\times 740$.

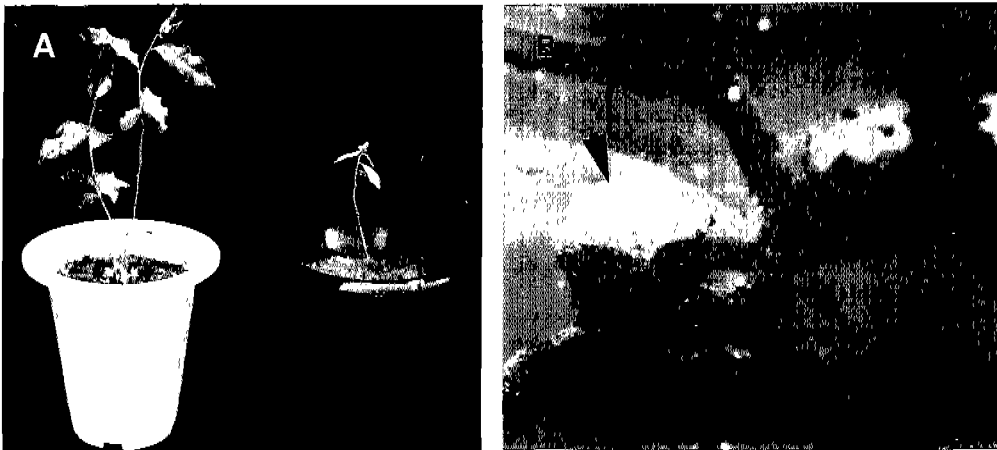


Fig. 5. Photographs of control (A, right) and inoculated plants (A, left), and roots of inoculated plant with nodules (B) five months after inoculation. Arrow head indicates white top area of the young nodule.

Table 1. Comparison of inoculated plants with control plants 5 months after inoculation

Host plant	Treatment	Leaf color	Leaf length ^a	Seedling height ^a	Nodules/seedling ^a
<i>E. umbellata</i>	Inoculation	Green	65~35 mm	250 mm	9
	Control	Yellow	10~21	92	0
<i>E. multiflora</i>	Inoculation	Green	5~35	80	12
	Control	Yellow	3~23	65	0

^aValues are means of seven plants.

있다는 보고(Quispel et al., 1989)와 일치하였다. 여과법으로 채취한 소낭 송이는 물오리나무 뿌리혹의 경우에 비해서 그 수가 적었고 온전한 것도 드물었으며 소낭 송이나 피층세포들로부터 *Frankia*가 전혀 성장하지 않았다. 따라서 여과법으로는 다른 보리수나무 뿌리혹에서도 *Frankia*를 분리하기가 어려움을 간접적으로 시사한다고 생각된다.

분리균주는 균사의 크기, 형태 및 분지 양상, 포자낭의 형태 및 형성위치 그리고 구형의 포자 등 형태적 특징은 이미 분리된 *Frankia* 균주의 특징(Newcomb et al., 1979; Horriere et al., 1983)과 동일하여 *Frankia*임을 확인할 수 있었다. 일반적으로 *Frankia*의 생리적인 특징에 따라서 Group A와 B로 분리하는데(Lechevalier and Lechevalier, 1989), 본 실험에서 분리한 균주는 탄소원으로 propionate와 같은 유기산을 이용할 뿐만 아니라 glucose을 첨가한 Q Mod 배지에서 왕성한 생장을 하여 Group A에 속하는 것으로 생각된다.

보리수나무에서 *Frankia*의 감염경로는 채집 및 유도된 뿌리혹(Fig. 5B)이 뿌리의 중간에만 붙어 있고, 오리나무와 달리 뿌리의 외피세포 간극에 침입하여 생장한 후 피층세포를 감염시킨다(Miller and Baker, 1985)는 보고 등으로 미루어 보아 분리균주가 세포간극을 통하여 침입되는 경우로 생각되나 구체적인 실험이 수행되어야 명확한 기작을 규명할 수 있을 것이다.

뿌리혹의 피층세포내에 존재하는 *Frankia*(Fig. 2) 뿐만이 아니라 순수 배양한 *Frankia*(Fig. 4A)에도 질소고정 장소인 소낭들이 많이 존재하고 있었다. 이는 질소고정 능력을 갖는 뿌리혹은 피층세포에 소낭이 존재하고 있으나, 질소고정 능력이 없는 것은 균사로만 채워져 있다는 보고(Baker et al., 1980)와 소낭 외막이 지질 또는 당지질인 다층구조체로 이루어져 산소로부터 nitrogenase를 보호하여 질소고정을 가능케 한다는 보고(Benson and Schultz, 1990)로 미루어 보아 분리균주는 뿌리혹내에서 뿐만이 아니라 순수 배양시에도 질소고정 능력을 가지고 있음을 알 수 있었다.

*Frankia*는 숙주범위에 따라 4종류로 분류하는데, 그 중에서 보리수나무 뿌리혹에서 분리된 내생균주는 소귀나무과와 보리수나무과에 모두 감염되는 종류와 보리수나무과에만 감염되는 종류로 나눌 수 있다(Baker, 1987). 본 분리균주는 숙주식물인 보리수나무와 동속인 뜰보리수나무에 감염되었으나, 앞으로 소귀나무에 접종함으로써 뿌리혹 형성 유도실험을 실시하여 숙주범위를 규명하여야 할 것이다.

적 요

보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunb.)의 뿌리혹은 곤봉상의 뿌리혹엽이 모여 둥글거나 불규칙한 형태를 하고

있고, 약 ϕ 1 μ m인 균사와 ϕ 30~70 μ m인 소낭송이를 갖는 내생균주가 피층세포에만 편재되어 있었다. 분리된 내생균주는 고체 및 액체 배지에서 ϕ 0.8~1.0 μ m인 균사, 다양한 모양과 ϕ 60 μ m까지인 크기를 갖는 포자낭 및 소낭을 형성하는 전형적인 *Frankia*였다. 분리균주를 보리수나무와 뜰보리수나무의 유식물에 접종한 결과 질소고정능을 가지는 뿌리혹이 유도되어 분리균주의 감염성과 질소고정능을 확인하였다. 이상의 결과로 이 분리균주가 *Frankia* 공생균주임이 확인되었으며, 이를 EuIK1이라고 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.D. 1987. Relationships among pure culture strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol. Plant.* **70**: 245-248.
- Baker, D.D. and B.C. Mullin. 1992. Actinorhizal symbiosis. In, Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G., H.J. Evans, and R.H. Burris (ed.). Chapman and Hall, Inc., New York. pp. 259-292.
- 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.
- Baker, D. and J.H. Torrey. 1979. The isolation and cultivation of actinomycetous root nodule endophytes. In, Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests, J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry (eds.). Forest Laboratory, Oregon State University, Corvallis. pp. 38-56.
- Benson, D.R. 1982. Isolation of *Frankia* strains from alder actinorhizal root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 461-465.
- Benson, D.R. and N.A. Schultz. 1990. Physiology and Biochemistry of *Frankia* in Culture. In, The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Schwintzer, C.R. and J.D. Tjepkema (eds.). Academic Press, Inc., San Diego. pp. 107-127.
- Berlyn, G.P. and J.P. Miksche. 1976. Botanical microtechnique and Cytochemistry. Iowa State Univ., Ames, Iowa. pp. 24-120.
- Bond, G. and C.T. Wheeler. 1980. Non-legume Nodule System. In, Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation, F.J. Bergersen (ed.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. pp. 185-212.
- Diem, H.G. and Y. Dommergues. 1983. The isolation of *Frankia* from nodules of *Causuarina* sp. *Can. J. Bot.* **61**:

- 2822-2825.
- Horriere, F., M.P. Lechevalier and H.A. Lechevalier. 1983. *In vitro* morphogenesis and ultrastructure of a *Frankia* sp. ArI3 (Acinomyces) from *Alnus rubra* and a morphologically similar isolates (ArI2) from *Alnus incans* subsp. *rugosa*. *Can. J. Bot.* **61**: 2843-2854.
- Kalaskustkii, L.V. and A.N. Pariiskay. 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.
- Kwon, S.W. and C.S. An. 1989. Isolation of symbiotic *Frankia* strain from the root nodules of *Alnus hirsuta*. *Kor. J. Bot.* **32**: 1-9.
- Kwon, S.W., M.S. Kang and C.S. An. 1990. Cloning of *nif-H*, *D* gene from *Frankia* SNU014201. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 135-142.
- Lechevalier, M.P. 1984. The taxonomy of the genus *Frankia*. *Plant and Soil* **24**: 1-6.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. 1989. Genus *Frankia* *Brunchorst* 1886, 174^{AL}. In, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. S.T. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, (eds.). Vol. 4, Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 2410-2417.
- Lee, C.B. 1982. Illustrated Flora of Korea. Yang-Mun Co., Seoul. pp. 561-563.
- Miller, I.M. and Baker, D.D. 1985. The initiation, development and structure of root nodule in *Elaeagnus angustifolia* L. (Elaeagnaceae). *Protoplasma* **128**: 107-119.
- Moiroud, A. and V.G. Pearson. 1984. Symbiotic relationships in actinorhizae. In, Genes Involved in Microbes-Plant Interactions, Verma, D.P.S. and T.H. Hohn (eds.). Springer-Verlag, New York, pp. 205-223.
- Newcomb, W., D. Callaham, J.G., Torrey and R.L. Peterson. 1979. Morphogenesis and fine structure of the nodule of *Comptonia peregrina*. *Bot. Gaz.* **140** (Suppl.): 22-34.
- Quispel, A., Svendsen, A.B., Schripsema, J., Baas, W.J., Erkelens, C. and J. Lugtenburg. 1989. Identification of dipterocarpol as isolation factor for the induction of primary isolation of *Frankia* from root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**: 107-112.
- Torrey, J.G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *BioScience.* **28**: 596-592.

(1993. 5. 4 接受)