

한라산 구상나무(*Abies koreana*)의 외생균근의 다양성

심미영¹ · 어주경² · 엄안흠^{1*}

¹ 충북 청원군 강내면 한국교원대학교 생물교육과

² 서울시 관악구 신림동 서울대학교 산림과학부

Diversity of Ectomycorrhizal fungi of *Abies koreana* at Mt. Halla

Mi-Young Sim¹, Ju-Kyeong Eo² and Ahn-Heum Eom^{1*}

¹Department of Biology Education, Korea National University of Education, Chungbuk 363-791, Korea.

²Department of Forest Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received December 3, 2009. Accepted December 29, 2009)

ABSTRACT: This study was conducted to investigate colonization of ectomycorrhizal fungi(ECM) in roots of *Abies koreana* which is an endemic and endangered species in Korea. Roots of *A. koreana* were collected at Mt. Halla. ECM root tips were classified using morphotyping and identified using sequences of internal transcribed spacer (ITS) region of the fungal rDNA. Total 8 species of ECM fungi were identified from roots of 11 seedlings of *A. koreana* : *Cenococcium geophilum*, *Russula brevipes*, 2 species of *Russula*, 2 species of *Thelephora*, *Cortinarius camphorates* and 2 species of Helotiales. These species were known to be typical ectomycorrhizal fungi found in coniferous mature forests.

KEYWORDS : *Abies koreana*, Ectomycorrhiza, Fungal community, Mt. Halla

구상나무(*Abies koreana* E. H. Wilson)는 한국 고유종이자 멸종위기종으로, 덕유산, 지리산, 한라산의 해발 1,000 m 이상의 고산지대에서만 제한적으로 분포한다(이, 1970; 이와 흥, 1995). 과거에는 무등산, 백양산, 가지산, 백운산 등에도 분포한다고 보고되었으나 최근에는 발견되지 않고 있다(이, 1970). 이와 같은 구상나무의 국지적인 분포는 유전적 고립에 의한 동계교배의 확률을 높일 뿐만 아니라 그에 따른 유전다양성의 감소와 낮은 적응도를 유발하기 때문에 현재 멸종될 가능성이 매우 높은 수준으로 여겨진다(김과 현, 2000). 더욱이 최근에는 한라산과 지리산의 구상나무림에서 고사목의 증가와 함께, 구상나무 우점율의 감소가 중·하층에서 현저하게 나타나면서 구상나무의 쇠퇴가 확대되고 있다(김과 추, 2000). 구상나무림 쇠퇴의 원인으로는 겨울기온의 상승에 따른 수분 공급의 불균형으로 인한 구상나무의 성장저해나 고사(구 등, 2001), 겨울의 한랭·건조 기후로 인한 상해 등의 생리적인 요인, 토심이 얇고 척박한 고산지대에서 강한 바람에 의한 풍도목의 발생, 그리고 지구 온난화에 따른 기후의 변화와 대기 오염(김, 1994)도 구상나무림의 쇠퇴 원인으로 보고되고 있다. 이와 같은 멸종위기종인 구상나무의 종 보존을 위하여 종자 발아와 유묘의 성장촉진 등에 대한 연구가 이루어지고 있으나 구상

나무는 포지 양묘시 고사되는 빈도가 매우 높으며, 유묘의 생장이 저조하고 더욱이 양묘에 매우 장기간이 소요되어(김, 1993) 구상나무의 종 보존을 위한 기초적 연구에 어려움을 겪고 있다.

외생균근균은 소나무류의 성장과 생존에 매우 중요한 역할을 하는 공생균이다(Smith and Read, 2008). 외생균근은 균사가 식물 뿌리의 외부에 발달하여 균투(fungal mantle)를 형성하며, 균사가 뿌리의 피층세포 사이에 그물망 구조인 균사망(hartig net)을 형성한다. 균투는 뿌리의 표면적을 증가시켜 식물의 흡수력을 증가시켜주고, 뿌리의 분지를 두 갈래 혹은 여러 갈래로 형성하여, 바람직한 뿌리의 형태를 갖도록 하며(Read *et al.*, 2004), 균과 숙주식물의 조합에 따라 두께, 색깔 그리고 표면의 성질 등이 다양하게 나타난다(Goodman *et al.*, 1998-2009). 따라서 이러한 외생균근균의 외부 형태적 특징은 육안으로 식별이 가능하기 때문에 이를 바탕으로 많은 연구들이 이루어졌다(Goodman *et al.* 1998-2009). 더욱이 분자적인 기술의 도입은 더욱 많은 외생균근균의 종을 밝혀내고 있다(Gardes and Bruns, 1993). 근래에는 외생균근균의 균집과 종 특성을 파악하여 가장 적합한 균주를 선별하고 이를 분리·집중하여 식생을 복원하거나, 유묘의 성장촉진에 사용하게 되면서, 이러한 연구들이 조림사업과 산림생태계의 자연적 복원에 중요한 역할을 수행하고 있다(St. John, 1998).

구상나무는 소나무과 전나무속 (*Abies* Mill.)에 속하는

*Corresponding author <E-mail : eomah@knu.ac.kr>

식물로 외생균근균과 공생관계를 형성하고 있는 종으로 추정되나 이에 대한 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 한국 고유종이며 멸종위기종인 구상나무의 보존에 적용하고자 구상나무의 뿌리에 공생하는 외생균근균의 균집을 형태 및 분자적 방법으로 동정하였다.

재료 및 방법

외생균근의 채집 및 형태관찰

구상나무는 한라산 정상을 중심으로 해발 1,300 m 이상의 지역에 넓게 분포하고 있다(이와 흥, 1995). 본 연구에 필요한 구상나무 외생균근균의 채집은 구상나무가 균락을 이루고 있는 제주도 한라산 주변지역(33°21'N, 126°30'E)에서 이루어졌다. 우선 구상나무 유묘의 뿌리를 채취하여 지퍼백에 넣어 실험실로 운반하였으며 관찰 시까지 4°C에서 보관하였다. 채집한 뿌리는 외생균근이 떨어지지 않도록 체에 받쳐 약하게 흐르는 물로 세척한 후, 해부현미경 하에서 관찰하였다. 각각의 개체에서 외생균근균은 분지 모양과 형태, 그리고 균투의 표면과 출현한 균사의 특징 등으로 구분하였다(Rambold and Agerer, 1997). 분리된 외생균근은 microtome을 이용하여 횡단면으로 절단하고, 광학현미경(×100) 하에서 내·외부 맨틀의 특성, 균사망 등의 형태를 관찰하였다(Goodman et al., 1996-2009). 외생균근균의 출현 빈도를 계산하기 위해 구상나무 한 개체에 나타나는 외생균근균의 수를 형태별로 측정하였다.

외생균근의 분자적 동정

형태적으로 분류한 외생균근은 Plant mini kit (GeneAll, Korea)을 이용하여 형태형에 따라 한 개의 뿌리 끝에서 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 균 특이적 primer인 ITS1F와 ITS4를 사용하여 5.8s rDNA 지역을 포함하는 Internal Transcribed Spacer (ITS) 지역을 증폭시켰다(Gardes and

Bruns, 1993). PCR 수행시, 반응조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation의 3단계를 1cycle로 하여 총 30회를 진행하였으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 안정화시킨 다음, 전기영동하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 증폭된 PCR 산물은 1×TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 사용하여 0.7% agarose gel에서 약 20분간 전기영동을 하였으며, 0.5 μg/ml ethidium bromide로 5분간 염색한 후 UV transilluminator 상에서 밴드를 확인하였다.

분석된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 상에서 BLAST를 수행하여 유사도를 비교하였다. 분석된 염기서열간의 유사도를 통해 계통관계를 추론하였으며, 이를 통하여 외생균근균간의 유연관계를 분석하였다. 각 분지의 신뢰도를 계산하기 위하여 bootstrap 분석은 1000 replicates를 수행하였고, outgroup으로 *Rhizopus oryzae*를 사용하였다. 최종적으로 형태·분자적으로 동정된 종들은 출현빈도와 상대도수를 구하여 구상나무의 외생균근균 균집을 분석하였다.

결과 및 고찰

외생균근의 형태

총 11 개체의 구상나무에서 외생균근을 형성한 뿌리 끝을 모두 93개 분리하여 관찰하였고, 한 개체당 1~3종류의 외생균근 형태가 나타났다. 구상나무 외생균근의 외부 형태와 내부 형태를 고려하여 8종류의 형태로 구분할 수 있었다 (Fig. 1 and 2). 가장 많이 나타나는 외생균근의 형태는 검은색 머리카락과 같은 균사 모양에 주로 한 갈래로 분지되는 형태의 균근이었다 (Fig. 1A). 이 균근의 횡단면의 관찰 결과, 외부 균투에 검고 두꺼운 세포벽을 가진 균사체가 그물 형태를 이루고 있었고, 내부 균투는 밝은 노란색으로 내부가 선명하게 보이며, 얇은 세포벽으로 이루어져 있었다. 또한 검고, 격벽이

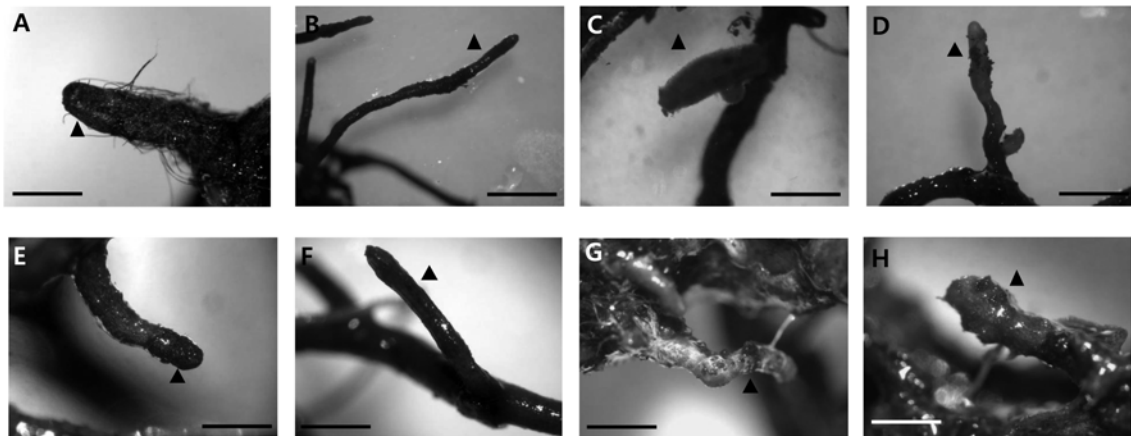


Fig. 1. Morphological characteristics of ectomycorrhizal roots tip (arrow head) of *Abies koreana* from Mt. Halla. A. *Cenococcum geophyllum*, B. *Tomentella* sp. 1, C. *Russula brevipes*, D. *Russula* sp., E. *Tomentella* sp. 2, F. Helotiales 2, G. *Cortinarius camphoratus*, H. Helotiales1 (bar = 1mm).

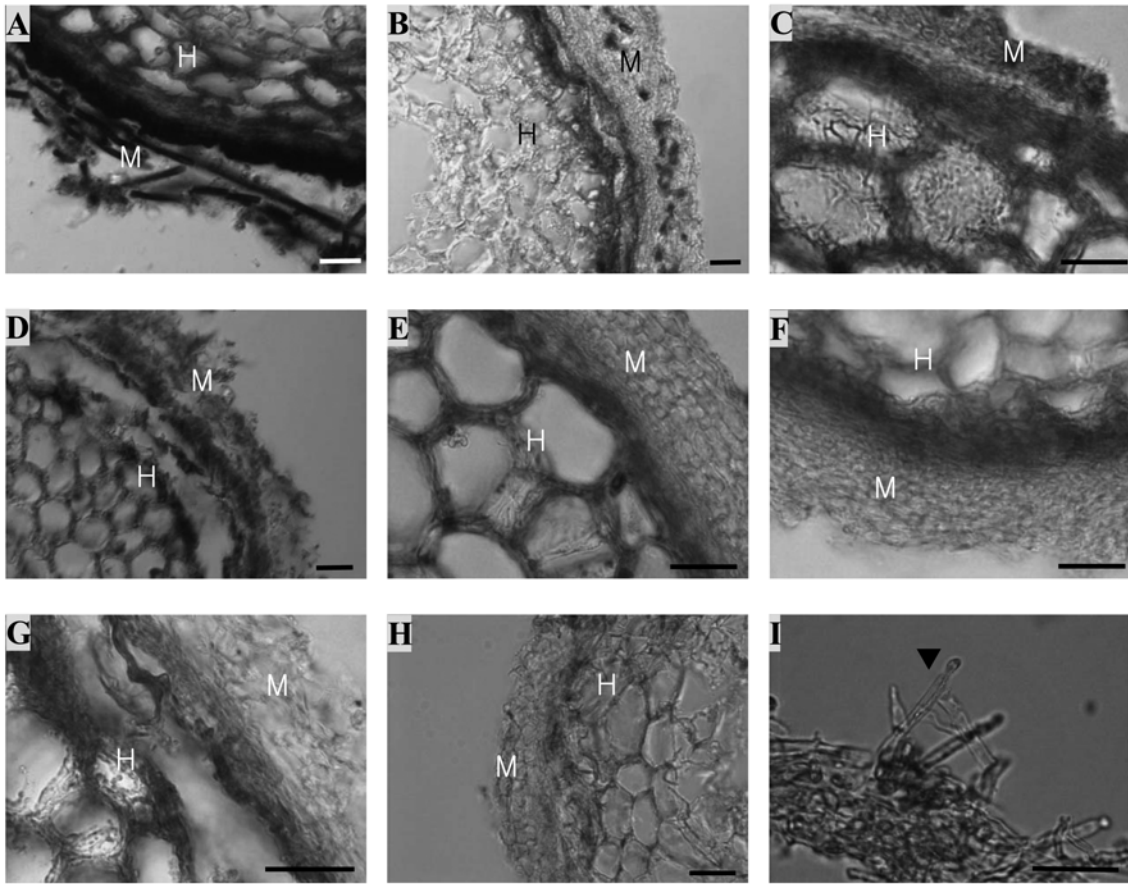


Fig. 2. Cross-section of ectomycorrhizal roots of *Abies koreana* collected from Mt. Halla. A. *Cenococcum geophilum*, B. *Tomentella* sp. 1, C. *Russula brevipes*, D. *Russula* sp., E. *Tomentella* sp. 2, F. Helotiales 2, G. *Cortinarius camphoratus*, H. Helotiales 1, I. Cystidia of *Russula brevipes* (triangle) (bar = 50, H : Hartig net, M : Mantle, C : Cystidia)

있는 외부균사가 출현한 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2A). 이와 같은 구조는 전형적인 *Cenococcum geophilum*의 형태로, 외부 형태만으로도 종 동정이 가능하였다(Goodman *et al.*, 1996-2009). 균근의 끝부분이 갈색이고, 표면에 검은색 점이 나타나며, 길이가 긴 형태형은 (Fig. 1B), 갈색의 불규칙적인 외부 균투와, 두꺼운 구형이며, 구슬 형태의 내부 균사를 가지고 있었다(Fig. 2B). 황토색에 균투가 투명하고, 가지와 같은 균사가 발달하며, 1~2 분지로 나타나는 형태형은 (Fig. 1C) Russulaceae의 형태로, 내·외부 균투에서는 망상방추조직이 나타나며(Fig. 2C), 끝이 둥근 병모양의 낭상체를 가지고 있었다(Fig. 2I). 밝은 갈색에 곤봉형이며 균근의 끝이 투명한 형태형 (Fig. 1D)도 Russulaceae의 형태로, 식물 형태의 방추조직으로 이루어져 있으며, H자 형태의 균사연결이 나타나는 외부 균투와 망상방추조직이 나타나는 내부 균투가 관찰되었다(Fig. 2D). 곤봉형에 흰색의 균사가 나타나는 형태 (Fig. 1E)는 외부 균투에 격벽이 있는 망상방추조직이 나타나고, 내부 균투는 불규칙한 방추조직이었으며, 균사망에서는 앞 모양의 구조가 관찰되었다(Fig. 2E). 회색이 도는 갈색에 긴 곤봉형의 형태형은(Fig. 1F), 식물 형태의 방추조직으로 이루어지고, 격쇄(clamp)가 있는 H자 형태의 균사 연결이 관찰되

는 외부 균투와, 망상방추조직으로 이루어진 내부 균투, 두껍고 넓은 형태의 균사망을 가지고 있었다(Fig. 2F). 갈색에 흰 균사가 나타나며 흰 근상균사속(rhizomorph)이 나타나는 구불구불한 곤봉형의 형태형에서는 (Fig. 1G), 식물 형태의 방추조직으로 이루어진 외부 균투와, 망상방추조직으로 이루어진 내부 균투를 관찰할 수 있었다(Fig. 2G). 체리색에 두꺼우며 곤봉형이고 체리색 근상균사속이 나타나며 끝이 각진 형태형에서는(Fig. 1H) 규칙적인 형태의 방추조직으로 이루어진 외부 균투와, 결합성이 없는 불규칙한 형태의 방추조직으로 이루어진 내부 균투를 관찰할 수 있었다(Fig. 2H).

분자동정

형태적으로 분류된 8종류의 외생균근 뿌리 끝에서 11개의 염기서열을 분석하였으며 계통분석을 통해 다음 8 종으로 동정하였다 - *Cenococcum geophilum*, *Russula brevipes*, *Russula* sp. 2 종, *Tomentella* sp. 2 종, *Cortinarius camphoratus*, 그리고 *Helotiales*에 속하는 2 종 (Fig. 3, Table 1). 이들 중 3 종은 자낭균류, 5 종은 담자균류였으며, 구상나무에서 외생균근을 형성하는 비율은 담자균류가 더 높았다. *C. geophilum*은 가장 높은 빈도로 발견되었으며, *Helotiales*는 두 번째로 높은 출현

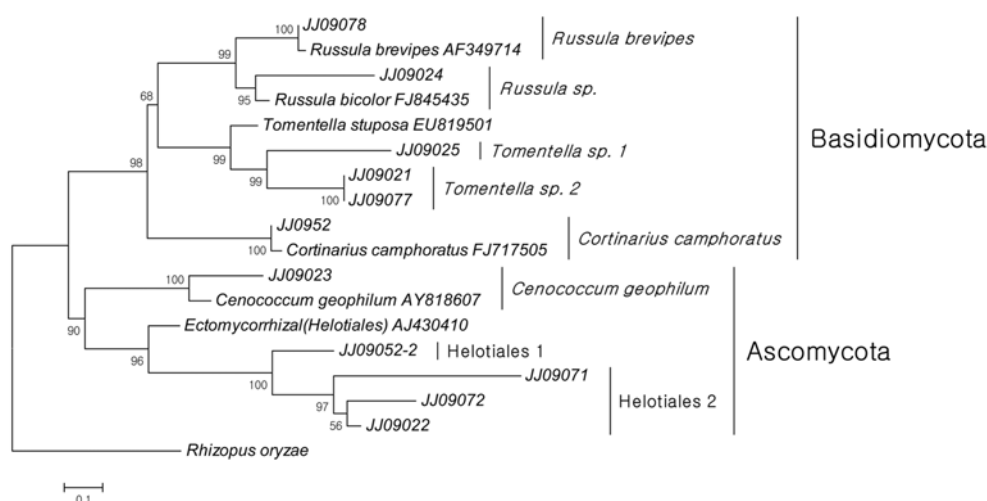


Fig. 3. Phylogenetic tree of sequences obtained from ectomycorrhizal fungi colonizing *Abies koreana* collected from Mt. Halla. *Rhizopus oryzae* was used as an outgroup.

Table 1. Identified taxa of ectomycorrhizal fungi on roots of *Abies koreana* seedlings collected from the Mt. Halla.

ECM Root tips	Identified Fungal taxa	Closest BLAST sequences	Matches/similarity
JJ09013	<i>Cenococcum geophilum</i>	<i>Cenococcum geophilum</i> AY818607	280/312 (89%)
JJ09078	<i>Russula brevipes</i>	Uncultured ectomycorrhiza (Russulaceae) EU645647	693/704 (98%)
JJ09025	<i>Tomentella</i> sp.1	Uncultured ectomycorrhiza (Thelephoraceae) FJ807969	166/180 (92%)
JJ09052	<i>Cortinarius camphoratus</i>	<i>Cortinarius camphoratus</i> FJ717505	667/683 (97%)
JJ09052-2	Helotiales 1	Mycorrhizal fungal sp. EU880593	167/188 (89%)
JJ09024	<i>Russula</i> sp.	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Russula</i>) EU057106	241/259 (93%)
JJ09021	<i>Tomentella</i> sp. 2	Uncultured ectomycorrhizal fungus FM999509	236/277 (85%)
JJ09071	Helotiales 2	Uncultured Helotiales FJ475664	245/254 (96%)

빈도를 나타냈으나, 다른 종들에 비해 많지는 않았다(Table 2). 또한 *Tomentella* 속의 종들은 Helotiales에 비해 출현 빈도가 낮으나 개체 당 더 많은 수가 외생균근을 형성하였다.

구상나무에 외생균근을 형성하는 것으로 나타난 *C. geophilum*, *Tomentella* sp., *Helotiales* 에 속하는 종들은 자실체를 형성하지 않는 종이거나 고약균류(corticoid fungi)이다 (Agerer, 1987-2006, Goodman *et al.*, 1996-2009). 특히 *C. geophilum*과 *Tomentella* sp.는 균사에 멜라닌 색소를 형성하여 건조와 같은 스트레스에 저항성을 갖는다(Butler and Day, 1988). *C. geophilum*은 *Abies*, *Quercus*, *Picea*, *Pinus* 등의 다양한 식물과 다양한 토양층에서 발견되는 외생균근균이며 (Agerer, 1987-2006; Goodman *et al.*, 1996-2009; Cullings and Makhija, 2001), 구상나무 역시 *C. geophilum*과 공생함으로 인해 구상나무 균집의 형성에 기여하는 것으로 생각된다.

Russula 속에 속하는 균들은 천이 후기의 성숙하고 안정된 온대림에서 발견되는 외생균근균으로 (Mason *et al.*, 1987; Kernaghan *et al.*, 1997; Goodman and Trofymow, 1998; Bergemann and Miller, 2002; Smith *et al.*, 2005), 구상나무림 또한 안정된 온대림으로 이와 같은 외생균근균들이

Table 2. Relative abundance and frequency of ectomycorrhizal fungi in *Abies koreana* seedlings collected in Mt. Halla.

Fungal species	Relative abundance (%)	Frequency
<i>Cenococcum geophilum</i>	32.2	5
<i>Russula brevipes</i>	14.0	1
<i>Tomentella</i> sp.1	12.9	2
<i>Cortinarius camphoratus</i>	11.8	1
Helotiales 1	10.8	2
<i>Russula</i> sp.	7.5	1
<i>Tomentella</i> sp. 2	5.4	1
Helotiales 2	5.4	2

구상나무와 공생하고 있는 것으로 나타났다. 본 연구에서 분자적으로 동정된 *Russula* 속의 종은 2 종임에도 불구하고 아직까지 한라산에서 이 속에 속하는 균이 발견이 보고된 것은 없었다 (김 등, 2000). 또한 2 종의 Helotiales를 분자적으로 확인하였는데, Helotiales는 자낭균에 속하고 *Piceirhiza bicolorata*은 *Pinus sylvestris*의 뿌리에 외생균근을 형성하고 (Agerer, 1987-2006), *Hymenoscyphus ericae*는 진달래과

식물에서 균근을 형성하는 균으로 알려져 있다 (Smith and Read, 2008).

본 연구를 통해 밝혀진 구상나무의 외생균근균들은 대부분 일반적인 침엽수림에서 발견되는 외생균근균이다. 특히 높은 고도의 환경에서 식물은 균근균과의 공생관계에 더욱 의존적이 되는데 (Haselwandter, 1987; Vestberg and Ohtonen, 1997), 이러한 외생균근균과 숙주식물과의 상호작용을 고려하면, 서식지 환경의 변화에 따른 공생관계의 단절이 숙주식물에 미치는 영향 또한 클 것으로 보인다. 따라서 구상나무의 쇠퇴현상에 이들의 관계가 영향을 미칠 수 있으므로, 이들 사이의 공생관계에 대한 심층적 연구를 통해 멸종 위기종인 구상나무의 복원을 위한 생태학적인 분석이 지속적으로 수행되어야 할 것이다.

적요

본 연구는 우리나라 고유종이며 멸종위기종인 구상나무의 외생균근균에 관한 연구이다. 한라산 주변에서 구상나무의 뿌리를 채취하였으며, 균근을 형성한 뿌리는 형태적 특징을 이용하여 구분하였다. 각각의 형태형은 외생균근균의 rDNA의 ITS지역을 염기서열을 이용하여 동정하였다. 총 11개의 구상나무 유묘의 뿌리에서 다음과 같은 8종의 외생균근균이 동정되었으며 이들 구상나무에 형성된 외생균근균은 침엽수림에서 일반적으로 발견되는 종으로 알려져 있다: *Cenococcium geophilum*, *Russula brevipes*, *Russula* 속 2종, *Thelephora* 속 2종, *Cortinarius camphorates*, Helotiales 2종.

참고문헌

- 구경아, 박원규, 공우석. 2001. 한라산 구상나무(*Abies koreana* W.)의 연륜연대학적 연구·기후변화에 따른 성장변동 분석. 한국생태학회지 24:281-288.
- 김갑태, 추갑철. 2000. 지역별 구상나무 생육현황 비교. 한국환경생태학회지 14:80-87.
- 김수철, 이정배, 오덕철. 2000. 한라산 자생버섯의 서식분포와 유용성에 관한 연구. 기초과학연구. 제주대학교기초과학연구소 15:49-68.
- 김은식. 1994. 환경변화와 고산지대 수목생장 쇠퇴현상과 상관성 해석. 한국과학재단 연구보고서 KOSEF 921-1500-081-2:89.
- 김인식, 현정오. 2000. RAPD 분석에 의한 구상나무 천연집단의 유전적 다양성. 한국육종학회지 32:12-18.

- 김찬수. 1993. 비음 및 토양훈증제 처리가 구상나무의 생장특성에 미치는 영향. 임목육종연구소 연구보고서 29:165-169.
- 이윤원, 홍성천. 1995. 구상나무림의 균락생태학적 연구. 한국임학회지 84:247-257.
- 이창복. 1970. 구상나무와 새로 발견된 품종. 한국임학회지 10:5-6.
- Agerer, R. 1987-2006. Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Berlin, Germany.
- Bergemann, S. E. and Miller, S. L. 2002. Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phytol.* 156:313-320.
- Butler, M. J. and Day, A. W. 1998. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* 44:1115-1136.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.
- Goodman, D. M., Durall, D., Trofymow, J. A., and Berch, S. 1996-2009. A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 8:57-59.
- Goodman, D. M. and Trofymow, J. A. 1998. Distribution of ectomycorrhizas in micro-habitats in mature and old-growth stands of Douglas-fir on southeastern Vancouver Island. *Soil Biol. Biochem.* 30:2127-2138.
- St. John 1998. Mycorrhizal inoculation in habitat restoration. *Land and Water* 42:17-19.
- Kemaghan, G., Currah, R. S. and Bayer, R. J. 1997. Russulaceous ectomycorrhizae of *Abies lasiocarpa* and *Picea engelmannii*. *Can. J. Bot.* 75:1843-1850.
- Mason, P. A., Last, F. T., Wilson, J., Deacon, J. W., Fleming, L. V. and Fox, F. M. 1987. Fruiting and succession of ectomycorrhizal fungi. In: Fungal infection of plants. Eds. G. F. Pegg and P. G. Ayres. Cambridge University Press, New York.
- Rambold, G. and Agerer, R. 1997. DEEMY-the concept of a characterization and determination system for ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 7:113-116.
- Read, D. J., Leake, J. R. and Perez-Moreno, J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Can. J. Bot.* 82:1243-1263.
- Smith, J. E., McKay, D., Brenner, G., McIver, J. and Spatafora J. W. 2005. Early impacts of forest restoration treatments on the ectomycorrhizal fungal community and fine root biomass in a mixed conifer forest. *J. Appl. Ecol.* 42:526-535.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd edition. *Acad. Press*, London.
- Vestberg, M. and Ohtonen, R. 1997. Shifts in mycorrhiza and microbial activity along an oroarctic altitudinal gradient in northern Fennoscandia. *Arctic Alpine Res.* 29:93-104.