

충남 섬 지역 근권 토양의 수지상균근균 군집 구조

이정윤¹ · 이은화¹ · 가강현² · 엄안흠^{1*}

¹한국고원대학교 생물교육과, ²국립산림과학원

Community Structure of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Islands of Chungnam, Korea

Jeong-Youn Lee¹, Eun-Hwa Lee¹, Kang-Hyeon Ka² and Ahn-Heum Eom^{1*}

¹Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea

²Wood Chemistry and Microbiology Division, Korea Forest Research Institute, Seoul 02455, Korea

ABSTRACT : Five islands (Sinjindo, Mado, Daenanjido, Wonsando, and Sapsido) and the coastal area (Muchangpo) in Chungnam, Korea, were selected to determine the diversity of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. Soil-inhabiting AM fungi were isolated and identified on the basis of morphological characteristics and sequence analyses of 18s rDNA. The differences in the fungal community structures were compared among sites. As a result, 24 species of AM fungi were identified, of which two species of AM fungi, *Acaulospora brasiliensis* and *Redeckera fulvum*, were isolated for the first time in Korea. This study revealed that AM fungal spore abundance was low and the genus *Acaulospora* was dominant in most of the islands. AM fungal community structures in five islands were highly similar. However, the coastal area, Muchangpo, had different AM fungal community structure from the islands.

KEYWORDS : Arbuscular mycorrhizal fungi, Community structure, Species diversity, *Acaulospora*, Island

서론

육상 식물의 약 80%는 수지상균근균(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)과 공생 관계를 형성한다[1]. 식물은 수지상균근균과의 공생관계를 통해 물과 무기양분의 흡수 효율을 높이고 대신 균류에게 광합성 산물인 고정된 탄소를 제공한다[2]. 식물과 수지상균근균의 공생 관계는 식물 개체 뿐 아니라 식물 군집과 식물의 천이에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다[3].

국내에서도 지난 40여 년간 수지상균근균의 생태적 특

성과 종 다양성에 대한 연구가 이루어져왔으며 그 결과 전 세계적으로 밝혀진 수지상균근균 중 약 40% 정도가 국내에서 보고되었다[4]. 그러나 이와 관련된 기존의 연구는 내륙 지역을 대상으로 한 연구가 대부분을 차지하였으며, 우리나라 서해안과 남해안에 기후 및 식생의 다양성을 보유한 많은 섬들이 분포하고 있지만 이 지역들의 수지상균근균 군집은 거의 연구되지 않았다. 일반적인 산림 토양 또는 경작지를 제외한 근권 내 수지상균근균 종 다양성 및 군집구조에 관한 연구로는 단일 섬 내의 수지상균근균 분포 연구가 일부 수행되었으며 해안사구 등 독특한 환경 구배를 가지는 지역의 수지상균근균 다양성 연구 등에 그쳐왔다[5, 6]. 이미 해외에서는 인공으로 조성된 섬[7], 산호섬[8] 및 파나마에 있는 호수 속 섬들의 수지상균근균 연구[9]가 보고되었으며, 이들 연구에서 육지와 고립된 도서 지역의 수지상균근균 군집간 차이가 확인되었고, 도서 지역의 토양 환경과 식물상이 수지상균근균의 분포와 밀접한 관련이 있음도 알려졌다. 따라서 국내에서도 도서 지역의 수지상균근균에 대한 연구를 통해 도서지역의 독특한 식생구조와 토양환경에 의한 수지상균근균의 군집구조와 종 다양성을 파악하고, 이를 통해 국내 수지상균근균의 다양성에 대해 새로운 이해를 넓힐 필요가 있다.

수지상균근균은 공기 중으로 포자가 이동하지 않으며 도

Kor. J. Mycol. 2016 March, 44(1): 16-22
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.1.16>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: eomah@knue.ac.kr

Received March 19, 2016
 Revised March 24, 2016
 Accepted March 25, 2016

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 지역은 고립된 환경의 특성상 도서 지역별 생태계의 특성이 있어 그와 관련하여 수지상균근균의 군집도 영향을 받을 것으로 생각된다. 다만 최근 도서 지역의 관광객과 위락 시설의 증가로 육지와 교류가 잦아지므로 수지상균근균의 군집 역시 이에 의한 영향도 받고 있을 것으로 여겨진다. 특히 이와 관련해서는 충남 도서 지역의 관광지 개발과 연륙교 건설 증가가 활발하므로 본 연구에서는 고유의 생태계 다양성을 잃기 전에 충남 도서 지역을 중심으로 수지상균근균 군집 분포를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

채집 지역 및 채집 방법

토양 채집은 2014년 4~5월 충청남도 지역의 무창포, 신진도, 마도, 대난지도, 원산도, 삼시도에서 실시하였다(Fig. 1). 육지로부터 떨어진 거리는 가장 가까운 곳부터 순서대로 신진도, 마도, 대난지도, 원산도, 삼시도 순이었으며, 각 지역의 넓이는 마도 0.25 km², 신진도 1.06 km², 삼시도 3.78 km², 대난지도 5.08 km², 원산도 7.04 km²이다. 섬과의 대조군으로 육지 해안인 무창포를 연구지역에 포함시켰으며 섬 내에서도 방위와 거리를 고려하여 토양 채집지가 고르게 분포될 수 있도록 하였다. 단, 토양 채집지의 고른 분포를 위하여 기주 식물을 따로 선정하지는 않았다. 기주 식물 뿌리가 포함되도록 뿌리 주변 토양을 1 kg 정도 채집한 뒤 섞이지 않도록 밀봉이 가능한 비닐 봉투에 담아 보관한 후 분석에 이용하였다.

포자 추출 및 형태적 동정

실험실로 운반한 토양 샘플들은 4°C의 cold room에서 보관하였으며, 각 샘플의 100 g 정도는 따로 분리하여 종이 봉투에 담은 뒤 건조기를 이용하여 65°C에서 72시간 동안

건조하였다. 이후, 수지상균근균의 포자 추출을 위해 건조된 토양을 잘 섞은 후 10 g을 정량한 뒤 wet sieving and sucrose density gradient centrifugation method를 이용하여 토양 내 수지상균근균 포자를 추출하였다[10]. 포자는 광학현미경(AXIO Imager. A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하면서 포자벽의 수, 포자벽의 구조, 포자 표면 특징, 부착 균사의 형태 및 Melzer's reagent 상에서 포자벽 반응 등을 기록하고 INVAM (International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi)의 종 기재를 참고하여 종을 동정하였다.

분자 생물학적 동정

형태적으로 동정된 포자 중 표면이 깨끗하고 형태가 양호한 포자 한 개를 골라 여러 차례 멸균수로 세척한 뒤 0.2 mL polymerase chain reaction (PCR) 튜브에 넣고 멸균수와 70% 에탄올로 표면 살균한 곤충핀을 이용하여 포자를 깨뜨리고 PCR 반응을 진행하였다. 포자의 18S rDNA부분의 염기서열 증폭을 위해 nested PCR을 진행하였다. 1차 PCR은 진핵 생물의 universal primer인 NS1/NS4를 이용하였다[11]. 1차 PCR 반응이 끝난 반응물은 1/10로 희석하여 2차 PCR의 주형 DNA로 이용하였으며 2차 PCR은 수지상균근균 특이 primer인 AML1/AML2를 이용하였다[12]. 2차 PCR 반응의 결과물은 1.5% agarose gel에 loading하여 전기영동 실시하였으며, 염기서열 증폭이 확인된 PCR 결과물은 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 일치도가 높은 종을 확인하고 MEGA 5 프로그램을 사용하여 neighbor-joining 계통수를 그리고 유연관계를 파악해 분자계통학적으로 종을 동정하였다[13]. 토양에서 추출된 수지상균근균 포자의 종은 앞서 언급한 형태적 동



Fig. 1. Collection sites of soil samples in this study.

정과 분자생물학적 동정에서 얻은 BLAST 결과, 계통수 분석 결과들을 종합하여 동정하였다.

결과 및 고찰

무창포와 서해안의 섬 5곳을 포함한 전체 지역에서 확인된 수지상균근균은 모두 14개 속 24 종이었다(Fig. 2). 지역

별로는 무창포에서 13종(*Acaulospora longula*, *Acaulospora mellea*, *Ambispora leptoticha*, *Ambispora* sp.2, *Claroideoglomus lamellosum*, *Diversispora aurantium*, *Funneliformis caledonium*, *Glomus iranicum*, *Paraglomus occultum*, *Racocetra gregaria*, *Redeckera fulvum*, *Scutellospora gilmorei*, *Septoglomus constrictum*), 원산도에서 7종(*Acaulospora brasiliensis*, *A. mellea*, *A. leptoticha*, *C. lamellosum*, *F. caled-*

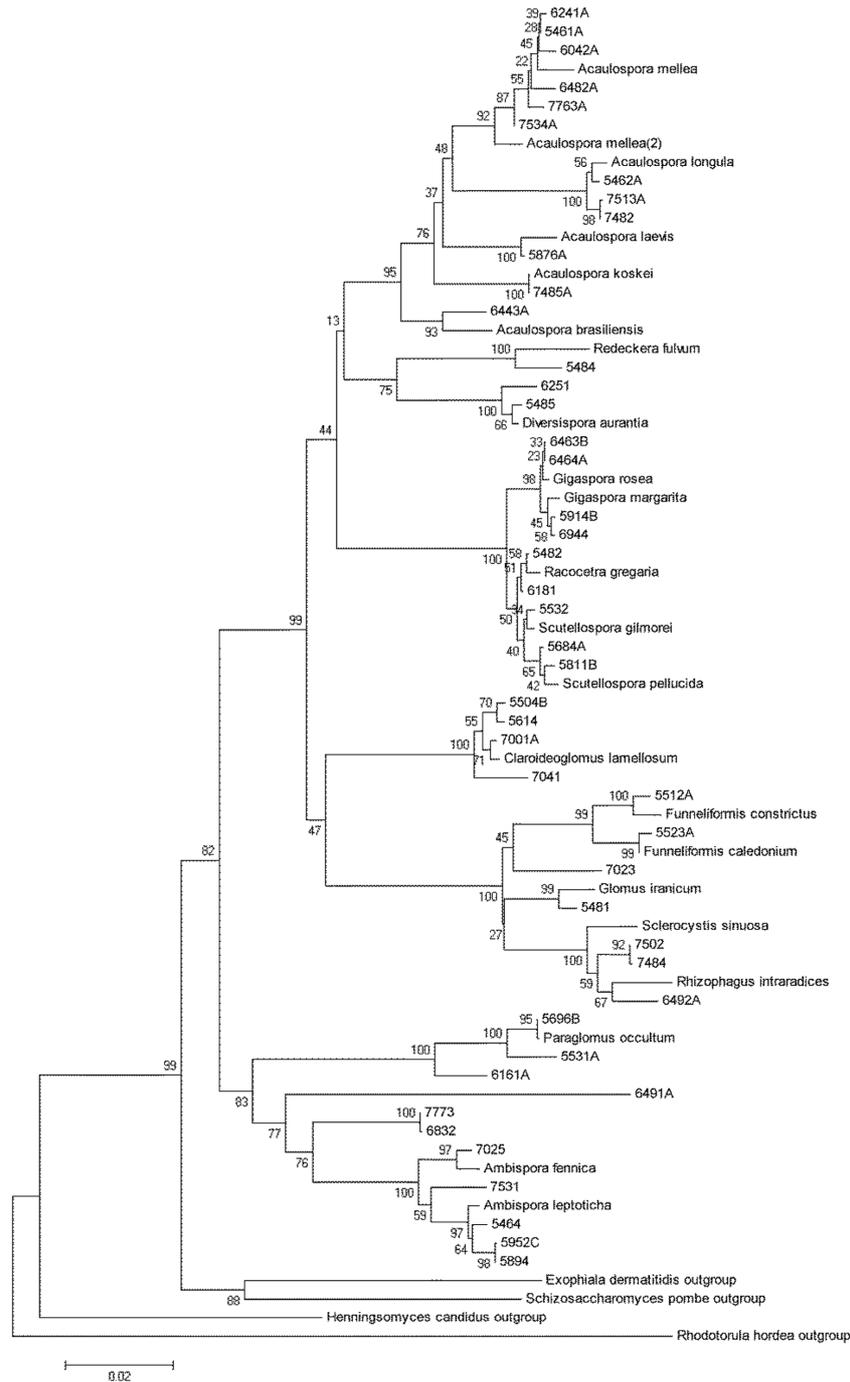


Fig. 2. The phylogenetic tree (neighbor-joining) of arbuscular mycorrhizal fungi collected in this study. Numbers at nodes indicates bootstrap support values (1,000 repeats).

onium, *Gigaspora margarita*, *Sclerocystis sinuosa*), 신진도에서 6종 (*A. mellea*, *A. fennica*, *Ambispora* sp.2, *C. lamellosum*, *Funneliformis* sp., *G. margarita*), 마도에서 4종 (*A. mellea*, *Ambispora* sp.1, *Rhizophagus intraradices*, *S. constrictum*), 대난지도에서 7종 (*Acaulospora koskei*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. leptoticha*, *Ambispora* sp.2, *G. margarita*, *S. sinuosa*), 원산도에서 9종 (*A. brasiliensis*, *A. koskei*, *A. leavis*, *A. mellea*, *A. leptoticha*, *S. pellucida*, *C. lamellosum*, *G. margarita*, *P. occultum*) 삽시도에서 6종 (*A. brasiliensis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. leptoticha*, *D. aurantium*, *G. rosea*) 이 확인되었다(Table 2). 이 중에서 *Ambispora* 속의 2종, *Funneliformis* 속의 1종은 속 수준까지만 동정할 수가 있어 각각 *Ambispora* sp.1, *Ambispora* sp.2, *Funneliformis* sp.로 표기하여 분석을 수행하였다. 이 중에는 국내에 아직 보고되지 않았던 2종의 수지상균근균이 있었고 각각의 DNA 염기서열은 NCBI의 GenBank에 등록하였으며, 등록된 *A. brasiliensis*의 accession number는 KU359227, *R. fulvum*의 accession number는 KU359228이다. 포자 특징은 다음

과 같다.

***Acaulospora brasiliensis* B.T. Goto, L.C. Maria & Oehl**

Saccule에 연결된 균사의 끝에서 짧은 자루가 생기고 다시 이 끝에서 단독으로 포자가 형성된다(Fig. 3). Saccule 및 짧은 자루 부분은 부풀어 있지만 포자의 기저에서 멀어질수록 좁아지는 모양으로 연결되어 있으며 성숙한 포자에서는 일반적으로 분리되나 일부는 종종 계속 포자에 붙어 있기도 하다. Saccule의 벽은 2층으로 이루어지며 투명한 흰색에서 밝은 노란색을 띠고 대부분 빠르게 사라져 버린다. 포자는 탁한 노란색에서 빛 바랜 노란색을 띠기도 하며 구형이나 계란형의 모양을 나타낸다. 특히 PVLG 용액 상에서는 포자의 색이 좀 더 진한 황토색으로도 보인다. 포자의 크기는 보통 65~115 μm이며, 포자의 겉표면은 불규칙한 형태의 주름막이 형성되어 있는 점이 특징이다. 포자벽은 3층으로 구성되어 있다(Fig. 2C, 2D). 가장 바깥벽은 유리질로 이루어지고 가운데 포자벽이 두 층으로 나누어지는 등 각각의 벽은 다시 여러 층으로 구분된다. 가장 바깥 벽

Table 1. Spore communities of arbuscular mycorrhizal fungi collected from islands and a coastal area in Korea*

	Sinjindo	Mado	Daenanjido	Wonsando	Sapsido	Muchangpo
H'	0.08 ± 0.05 ^a	0.11 ± 0.11 ^a	0.28 ± 0.12 ^{ab}	0.22 ± 0.18 ^a	0.13 ± 0.06 ^a	0.53 ± 0.14 ^b
Evenness	0.11 ± 0.07 ^a	0.08 ± 0.08 ^a	0.27 ± 0.11 ^a	0.29 ± 0.11 ^a	0.19 ± 0.08 ^a	0.61 ± 0.16 ^b
Species richness	1.06 ± 0.13 ^a	0.53 ± 0.27 ^a	1.20 ± 0.29 ^a	0.90 ± 0.20 ^a	1.10 ± 0.14 ^a	1.89 ± 0.39 ^b
Spore number	24.52 ± 10.21	29.93 ± 23.19	14.85 ± 6.56	20.35 ± 9.06	27.00 ± 8.12	25.11 ± 9.21

*Values with different letters indicate significant difference among study sites ($p < 0.05$).

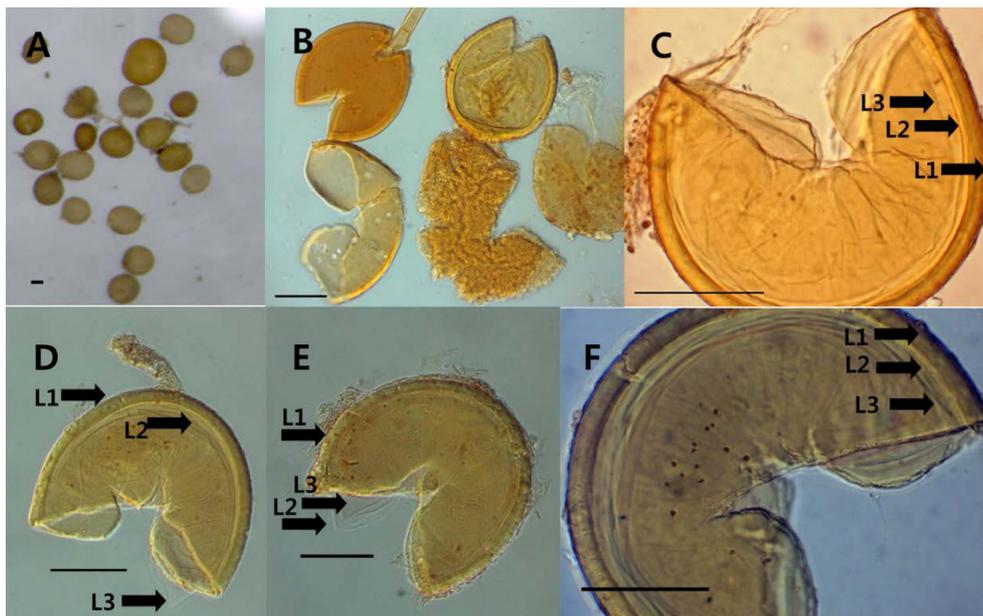


Fig. 3. Spores of *Acaulospora brasiliensis*. A, Spores in water; B, Spores in polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol; C~F, Spores unstained with Melzer's reagent; L1~L3, Spore wall (scale bars = 50 μm).

Table 2. Relative abundances of AM fungal communities in islands and a coastal area (Muchangpo) in Korea

AM fungi	Sinjindo	Mado	Daenanjido	Wonsando	Sapsido	Muchangpo
<i>Acaulospora brasiliensis</i>	0.00	0.00	0.00	40.54	25.56	0.00
<i>Acaulospora koskei</i>	0.00	0.00	2.02	1.23	0.00	0.00
<i>Acaulospora leavis</i>	0.00	0.00	0.00	2.46	0.00	0.00
<i>Acaulospora longula</i>	0.00	0.00	44.11	0.00	1.48	4.42
<i>Acaulospora mellea</i>	78.42	82.85	44.78	13.76	27.41	9.29
<i>Ambispora fennic</i>	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Ambispora leptoticha</i>	0.00	0.00	0.34	4.18	0.19	3.98
<i>Ambispora</i> sp.1	0.00	3.34	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Ambispora</i> sp.2	0.72	0.00	3.70	0.00	0.00	17.70
<i>Claroideoglossum lamellosum</i>	20.14	0.00	0.00	16.71	0.00	25.66
<i>Diversispora aurantium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	14.16
<i>Funneliformis caledonium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.98
<i>Funneliformis</i> sp.	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Gigaspora margarita</i>	0.24	0.00	3.37	0.74	0.00	0.00
<i>Gigaspora rosea</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	25.93	0.00
<i>Glomus iranicum</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.44
<i>Paraglomus occultum</i>	0.00	0.00	0.00	17.69	19.07	7.08
<i>Racocetra gregaria</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	1.77
<i>Redeckera fulvum</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.85
<i>Rhizophagus intraradices</i>	0.00	9.35	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Sclerocystis sinuosa</i>	0.00	0.00	1.68	0.00	0.00	0.00
<i>Scutellospora gilmorei</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.44
<i>Scutellospora pellucida</i>	0.00	0.00	0.00	2.70	0.00	0.00
<i>Septoglossum constrictum</i>	0.00	4.45	0.00	0.00	0.00	2.21

AM, arbuscular mycorrhizal.

된다. 관찰 균주는 6443A이며, 충남 삼시도에 서식하는 팔배나무(*Sorbus alnifolia*) 근권에서 분리하였다.

***Redeckera fulvum* (Berk. & Broom) Walker & Schüßler**

크기는 다른 종의 포자에 비해 작은 편이며 밝은 갈색을 띠고 있고 모양은 구형에서 계란형이다(Fig. 4). 지름은 150~200 μm 이고, 균사는 포자벽의 구조와 함께 이어지며 격막과 분리되어 투명한 색을 띠고 있다. 균사의 모양은 일반적으로 불안정하거나 부풀어 있다. 균사의 벽은 얇은 편이다. 포자벽은 대부분이 2개의 벽으로 구성되며 바깥 포자벽은 얇고 투명하여 프레파라트 제작시에 쉽게 부스러지기도 한다. 포자와 균사가 이어진 부분은 부풀어 있기도 하며, 안쪽의 포자벽이 균사의 입구 짧은 부분까지 이어져 있다. 포자 기저는 넓은 격막으로 pore가 닫히고 크고 촘촘한 군집으로 모여 포자가 형성되기도 하나 단독으로 형성되는 경우도 있다. 관찰 균주는 5484이며, 충남 무창포에 서식하는 억새(*Miscanthus sinensis*) 근권에서 분리하였다.

도서 지역별 수지상균근균 군집 분석

연구 지역별 포자 군집의 다양성 차이를 확인하기 위해 수지상균근균의 종다양성 지수(Shannon's index), 균등도(evenness), 풍부도(richness) 및 지역별 수지상균근균 포자 수를 비교하였다(Table 1). 종다양성 지수, 균등도, 풍부도는 육지(무창포)와 섬 지역 사이에서 유의미한 차이를 보였으나 섬들 간에는 차이가 나타나지 않았고, 상대수도(relative abundance)와 상대빈도(relative frequency)로부터 중요도(importance)를 구하였을 때 대부분의 지역에서 *Acaulospora* 속이 우점하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

지역간 수지상균근균의 군집차이를 확인하기 위해 군집 분석을 수행한 결과, 섬 지역간에는 근권 내 수지상균근균 군집 구조가 서로 유사한 것으로 나타났고, 대조군인 육지(무창포) 근권과는 종 구성의 차이가 있는 것이 확인되었다(Fig. 5). 특히 지리적으로 가까운 신진도와 마도가, 그리고 원산도와 삼시도가 수지상균근균 군집간에 유사도가 높은 것으로 보아 수지상균근균의 군집은 지역의 기후와 식생 뿐 아니라 분리된 지역간의 거리에 의해서도 영향을 받는 것으로 보인다[8]. 종 풍부도에 있어서는 육지 환경인 무창

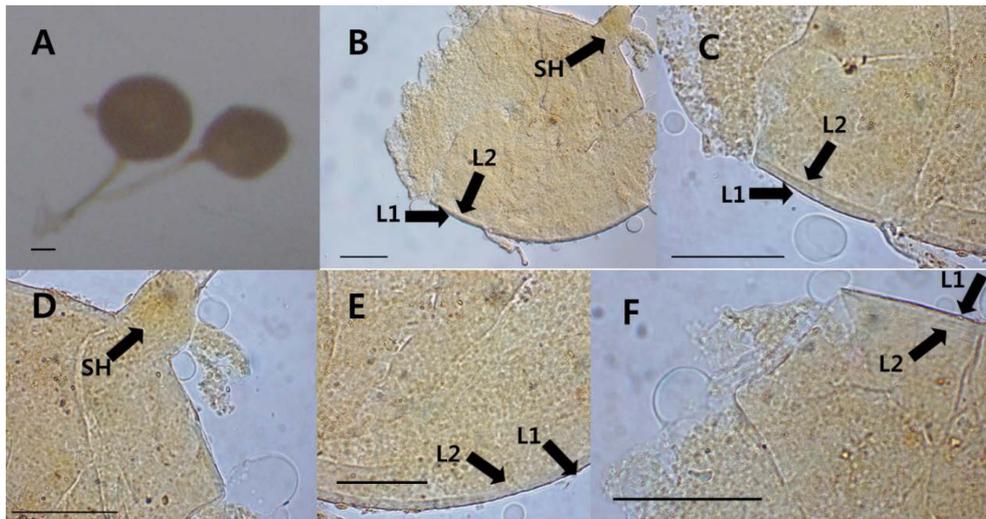


Fig. 4. Spores of *Redeckera fulvum*. A, Spores in water; B~F, Spores in polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol; L1, L2, Spore wall; SH, Subtending hyphae (scale bars = 50 μm).

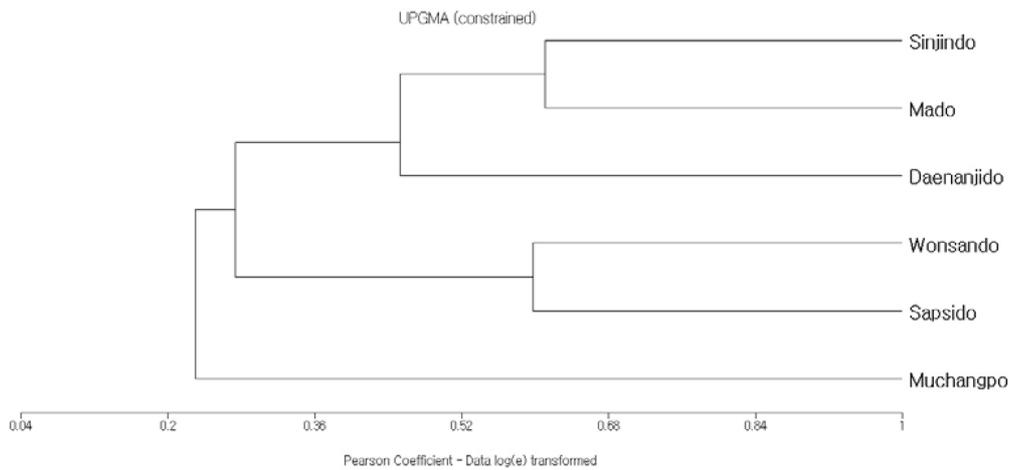


Fig. 5. Cluster analysis of spore communities of arbuscula mycorrhizal fungi collected from islands and coastal area.

포에서 가장 많은 종이 발견되었으며, 섬 지역들은 고립되고 분리된 생태 환경의 특성상 수지상균근균의 종 풍부도가 감소하는 것으로 나타났다. 특히 신진도와 마도는 섬의 면적이 상대적으로 작아 수지상균근균 종 풍부도 역시 영향을 받은 것으로 보인다. 섬들 중에서도 원산도와 삼시도에만 *A. brasiliensis*와 *P. occultum*이 분포하였고, 마도와 신진도는 우점종인 *A. mellea*의 상대 수도가 유사하여 이들 섬이 수지상균근균의 군집 구성에서 더 유사하게 묶일 수 있었다. 연구를 통해 충남 도서지역에서 거리상으로는 가까운 섬과 육지 사이의 수지상균근균 군집 유사성보다 오히려 멀리 떨어져 있더라도 섬과 섬 사이의 군집 구성이 유사함을 알 수 있었다.

적 요

본 연구에서는 충남 서해안에 분포하는 5개의 섬 지역(신진도, 마도, 대난지도, 원산도, 삼시도)과 육지 해안 지역인 무창포의 근권 토양내 수지상균근균 군집 구조의 차이점을 확인해보았다. 그 결과 충남 지역에서 국내 미기록종인 *Acaulospora brasiliensis*, *Redeckera fulvum*를 포함하여 14개 속 24종의 수지상균근균을 확인하였다. 또한 대부분의 섬 지역에서 *Acaulospora* 속이 우점하고 있음을 확인할 수 있었으며, 섬 지역의 근권에서는 육지 지역과는 다른 수지상균근균 군집 구조가 발달함을 보여주었다. 특히 섬 간의 수지상균근균 군집은 섬들 사이의 물리적 거리가 가까울수록 더 유사하게 발달하는 것을 확인하였다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant (FP 0801-2010-01) from the Korea Forest Research Institute of the Republic of Korea.

REFERENCES

- Schüßler A. *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* 2000;10:15-21.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol* 2003;131:1496-507.
- Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal symbiosis*. San Diego: Academic Press; 1997.
- Eo JK, Park SH, Lee EH, Eom AH. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:255-61.
- Koh SD, Park JY. Study to species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) at Shinduri sand-dune in Boryung district, Chungnam province. *Bull Sci Educ* 2003;19:189-203.
- Lee EH, Ka KH, Eom AH. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in rhizospheres of *Camellia japonica* and neighboring plants inhabiting Wando of Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:34-9.
- Nielsen KB, Kjølter R, Bruun HH, Schnoor TK, Rosendahl S. Colonization of new land by arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecol* 2016;20:22-9.
- Alguacil MM, Torrecillas E, Lozano Z, Roldán A. Arbuscular mycorrhizal fungi communities in a coral cay system (Morrocoy, Venezuela) and their relationships with environmental variables. *Sci Total Environ* 2015;505:805-13.
- Mangan SA, Eom AH, Adler GH, Yavitt JB, Herre EA. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi across a fragmented forest in Panama: insular spore communities differ from mainland communities. *Oecologia* 2004;141:687-700.
- Daniels BA, Skipper HD. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schenck NC, editor. *Methods and principles of mycorrhizal research*. St. Paul: American Phytopathological Society; 1982. p. 29-36.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
- Lee J, Lee S, Young JP. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 2008;65:339-49.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-9.