

멸종위기종 구상나무 서식지별 세균 군집 구조 변이 조사

Investigation of Variation in Bacterial Community Structure in Endangered Korean Fir Tree by Habitats

*Corresponding author

Tel: +82-55-772-1922

Fax: +82-55-772-1929

E-mail: kwak@gnu.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0003-2139-1808>[†]These authors contributed equally to this work.고영민^{1†} · 강근혜^{2†} · 정대호² · 곽연식^{1,3*} ¹경상대학교 식물학과, ²국립공원야생생물보전원, ³경상대학교 응용생명과학(BK21Plus) 및 생명과학연구소Young Min Ko^{1†}, Geun-Hye Gang^{2†}, Dae Ho Jung², and Youn-Sig Kwak^{1,3*} ¹Department of Plant Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea²National Park Institute for Wildlife Conservation, Muju 55557, Korea³Division of Applied Life Science (BK21Plus) and Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

The Korean fir tree (*Abies koreana*), an endemic species of South Korea, is experiencing a severe decline in population due to climate change. Studies on the conservation of Korean fir have been extensive, yet research regarding its correlation with rhizosphere bacterial communities remains scarce, warranting further investigation. In this study, metagenome amplicon sequencing targeting the 16S rRNA V4 region was conducted to examine the presence of specific bacterial communities in Korean fir and to investigate potential differences based on habitat types (rhizosphere of native or cultivated trees, soil of dead trees, and bulk soil) and seasonal variations (April, June, September, November). Here we show that although we could not identify specific taxa highly specifically with Korean fir, the rhizosphere bacterial community in native trees exhibited less variability in response to seasonal changes compared to that in bulk soils. Suggesting the establishment of relatively stable bacterial populations around the Korean fir natural habitat. Further research on other types of rhizosphere and/or microbes is necessary to investigate the distinct relationship of Korean fir with microbial communities.

Keywords: Bacterial communities, Korean fir, Microbiome, Rhizosphere

Received March 9, 2024

Revised April 1, 2024

Accepted April 3, 2024

서론

구상나무(*Abies koreana*)는 소나무과 전나무속으로 분류되는 한라산, 지리산, 덕유산 등의 해발고도 1,000-1,900 m의 아고산대에 주로 서식하는 한국의 고유종이다(Wilson, 1920). 구상나무는 특유의 외형으로 인해 주로 크리스마스 트리나 장식

용나무로 사용되며, 사전 연구에 따르면 침엽에 존재하는 정유(essential oils)의 구성 성분인 bornyl ester, camphene은 향산화, 항생 효과 등의 유용한 기능을 가지고 있다(Lee와 Hong, 2009). 그러나 구상나무는 최근 심한 개체수 감소로 인하여 국제자연보전연맹에서 멸종위기종으로 지정하였다(Han 등, 2022). 구상나무는 한국의 고유종이면서 제한적인 서식 범위를 가지고 있기 때문에 개체수 감소에 취약한 특성을 가지고 있다(Song 등, 2021). 구상나무 개체수 감소의 원인 중 하나는 기후 변화에 의해 발생한 겨울철 적설량의 감소로 인한 수분 부족인 것으로 알려졌다(Gwon 등, 2013). 그 이외에도 온도

Research in Plant Disease

eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

© The Korean Society of Plant Pathology

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

상승으로 인한 온대수종과의 경쟁, 일사량의 변화 등이 구상나무 개체수 감소의 요인으로 작용하는 것으로 알려졌다(Ahn과 Yun, 2020; Kim 등, 2011). 이렇듯 기존의 구상나무 개체수 감소의 원인에 대한 연구는 대부분 비생물적 요인 위주로 진행되었다. 그러나 구상나무의 생존에 영향을 끼치는 생물적인 요인은 아직까지 비교적 연구가 미진한 편이다. 다양한 생물적인 요인들 중에서도 식물 주변에 항상 존재하여 식물과 밀접한 관련이 있는 미생물의 상호작용에 대한 중요성이 높다. 식물의 뿌리에서 분비되는 삼출물의 영향을 강하게 받는 영역인 근권에 서식하는 미생물 마이크로바이옴 연구를 통하여 구상나무의 생존에 영향을 미치는 요인들에 대한 추가적인 연구 진행이 필요하다(Lladó 등, 2017). 선행 연구에 따르면 식물은 수분, 양분이 부족한 환경에 처했을 때 근권에 서식하는 미생물에 의한 수분 또는 양분공급에 의해 더 잘 살아남을 수 있다는 사실이 보고되어 있다(Yang 등, 2009). 근권에 존재하는 세균은 다른 서식 환경에 비해서 높은 풍부도와 다양성을 가지고 있기 때문에 세균을 대상으로 하여 군집의 구조 분석이 중요하다는 사실이 알려져 있다(Prashar 등, 2014). 구상나무의 생존에 근권 미생물 군집이 영향을 미친다면 살아있는 구상나무의 근권과 고사한 구상나무의 뿌리에 있는 미생물 군집의 구조 차이가 있을 가능성이 높다(Oppenheimer-Shaanan 등, 2022; Smalla 등, 2006). 본 연구에서는 구상나무의 자생지와 구상나무 개체수 복원을 위해 조성된 대체서식지, 구상나무의 고사지, 구상나무 비서식 토양에서 근권 토양시료를 4계절에 걸쳐 채집하여 자생지와 비재배토양의 세균 군집 변화와 재배지와 대체서식지, 고사지 간의 세균 군집의 차이와 변화에 대한 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

구상나무의 근권 및 토양 세균 군집 분석 시료 채집. 구상나무 근권 토양 채집은 대한민국 경상남도 산청군 시천면 지리산 국립공원의 세석대피소 근처에서 진행하였다(35°19'4"N 127°41'36"E). 구상나무의 근권 및 토양 미생물 분석 시료는 2023년 4월 20일, 6월 23일, 9월 13일, 11월 11일에 채집하였고,



Fig. 1. Appearance of the sample collection area. Soil samples from the rhizosphere of native, rhizosphere of cultivate, and soil of dead Korean fir were collected from soil in direct contact with the roots, and bulk soil was collected from a location more than 1 m away from the Korean fir. Fifty ml of soil was collected from three Korean fir per in rhizosphere of native, rhizosphere of cultivate, and soil of dead Korean fir using a conical tube, and for non-cultivated soil, 50 ml of soil was collected three times using a conical tube ($n=3$). (A) Rhizosphere of native sample collection area (35.318944, 127.694556). (B) Rhizosphere of cultivate sample collection area (35.317861, 127.693306). (C) Soil of dead Korean fir sample collection area (35.316556, 127.692944). (D) Bulk soil sample collection area.

시료 채집 지역은 구상나무의 자생지(rhizosphere of native trees), 대체서식지(rhizosphere of cultivated trees), 고사지(soil of dead trees), 구상나무 비재배토양(bulk soil) 총 4종류의 지역에서 채집하였다(Table 1, Fig. 1). 구상나무의 자생지, 대체서식지 및 고사지에서의 토양 시료는 구상나무 뿌리와 직접적으로 접촉하는 토양을 채취하였고, 구상나무 비재배토양은 구상나무로부터 1 m 이상 떨어진 위치에서 채취하였다. 구상나무의

Table 1. Location where sample was collected and sample information

Location	GPS	Sampling date
Bulk soil	-	Apr 20, 2023
Rhizosphere of cultivate	N35.317861, E127.693306	June 23, 2023
Rhizosphere of native	N 35.318944, E 127.694556	Sep 13, 2023
Soil of dead Korean fir	N 35.316556, E 127.692944	Nov 11, 2023

자생지, 대체서식지, 고사지에서는 각 서식지당 3개체의 구상나무에서 50 ml의 토양을 conical tube를 이용해 채취하였고, 구상나무 비재배토양은 50 ml의 토양을 conical tube로 3회 채취하였다($n=3$). 따라서 1회 시료 채집당 총 12개의 구상나무 근권 및 토양 시료를 채집하였고 최종적으로 48개의 시료를 확보하였다. 확보한 모든 시료들은 -80°C 에서 저온 보관하였다.

구상나무의 근권 및 토양 DNA 추출 및 polymerase chain reaction (PCR). 구상나무의 근권 및 토양 미생물 분석을 위해 채집한 토양 샘플의 DNA는 Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA)을 사용하여 추출하였다. Fast DNA SPIN Kit for Soil을 이용한 토양 DNA 추출은 토양 0.5 g을 제조사의 지침에 따라 진행하였다. 추출한 DNA의 품질과 추출량은 NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 기기를 사용하여 측정했다. 추출한 DNA는 -30°C 에서 저온 보관하였다.

확보된 구상나무 근권 시료의 DNA는 16S rRNA V4 영역을 증폭하기 위한 중합효소연쇄반응(PCR)을 진행하였다. PCR의 진행은 다음과 같다. 먼저 같은 시료를 3회 반복해서 PCR하여 DNA의 농도를 높였고 PCR 기기는 T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 기기를 사용하였다. DNA 1 μl , MISeq 515F 1 μl , MISeq 805R 1 μl , KAPA HiFi Hot Start ReadyMix (Roche, Basel, Switzerland) 12.5 μl , 멸균수 4.5 μl 를 혼합해 전체 용량을 20 μl 로 맞춘 후 PCR 기기의 설정을 95°C 에서 3분(1 cycle), 95°C 에서 30초, 58°C 에서 30초, 72°C 에서 30초(30 cycle), 72°C 에서 3분(1 cycle)으로 하여 PCR을 진행하였다. 프라이머는 MISeq 515F(5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG YCA GCM GCC GCG-3')와 MISeq 805R(5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3') 10 pmol/ μl 를 사용하였다.

PCR이 완료된 후 PCR 산물 20 μl 와 $10\times$ loading buffer 2 μl 를 혼합하여 2% agarose gel (ethidium bromide 0.004%)에 투입하여 100 V에서 25분 동안 전기영동을 진행하였다. 정제가 완료된 DNA는 -30°C 에서 저온 보관하였다.

구상나무 근권 세균 군집 분석. 근권 세균 DNA의 차세대 염기서열 분석은 마크로젠사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. Metagenome amplicon sequencing 기기는 Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), Nextera XT Index V2 Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하였고 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Part # 15044223

Rev. B 방법에 의거해 분석을 진행하였다. Sequencer type은 Illumina system을 이용하였다(Latif 등, 2020). Bacteria data의 FASTQ 형식의 raw sequencing data는 R software (version 4.0.3)의 DADA2 (version 1.28.0) 패키지를 사용하여 분석하였다. 두 종류의 시료는 Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2)를 사용하여 오류율을 측정하고 평균 품질 점수가 30점 이하인 sequence를 trimmed하였다. 따라서 DNA의 forward reads는 240 bp, reverse reads는 200 bp 길이로 잘라냈다. 다음으로 DADA2 알고리즘을 사용하여 forward reads와 reverse reads를 병합하고 Amplicon Sequence Variants (ASVs)로 클러스터링한 이후 chimeric ASVs를 제거하고, 미토콘드리아와 엽록체 ASVs를 제거하였다. 가공이 완료된 데이터의 분류학적인 분류는 SILVA_SSU_r138_2019.RData (https://figshare.com/articles/dataset/SILVA_SSU_r138_2019_binder_RData/12622571) 데이터베이스를 참조하여 IDTAXA 알고리즘을 사용하여 수행하였다. 미생물 군집 구축(microbiota community construction)은 vegan (version 2.6.4), phyloseq (version 1.44.0), ggplot2 (version 3.4.2), dplyr (version 1.1.4) 등의 R 패키지를 사용하여 진행하였다(Cho 등, 2022). 그 후 샘플 또는 분류학적 그룹에서 유전자의 상대적 풍부함(relative abundances)을 결정하기 위해 SILVA_SSU_r138_2019.RData 데이터베이스에서 얻은 정보를 PICRUST2를 이용하여 whole-metagenome shotgun sequencing 결과로 변환하였다. 이후 MISeq 515F, MISeq 805R primer와 barcode sequence를 제거하고 only bacteria% 수치를 확인한 결과 48개로 구성된 모든 시료가 60% 이상이 세균의 DNA인 것을 확인하였다(Table 2). 다음으로 DADA2 platform을 통해 filtering된 track file 결과 중 input file과 비교하여 세균이 60% 이상으로 확인된 경우 추후 분석의 사용 가능 여부를 재판단하기 위해 Good's coverage, Chao's coverage 분석을 시행하였다. 그 결과 모든 시료의 Good's coverage, Chao's coverage 수치가 99% 이상임을 확인하였고, 따라서 전체 데이터가 세균 군집 분석이 가능한 데이터임을 확인하였다(data not shown).

데이터 시각화 및 통계 분석. 데이터의 가공 이후 데이터의 시각화 및 통계 분석은 R software를 사용하여 진행하였다. 시각화한 데이터 중 희박화 곡선(rarefaction curve), 알파 다양성(alpha diversity), 베타 다양성(beta diversity) 분석은 ggplot2 (version 3.4.2), ggh4x (version 0.2.6) 등의 R 패키지를 사용하여 시각화하였고, 주성분 분석(principal component analysis)은 vegan (version 2.6.4) 등의 R 패키지를 사용하여 시각화하

Table 2. Results of numerical analysis of only bacteria in the sample

Season	Sample ID	Sample	Only bacteria (%)	
Spring	Bulk soil	D_1101	83.08	
		D_1102	85.54	
		D_1103	87.78	
	Rhizosphere of cultivate	B_1101	83.47	
		B_1102	81.52	
		B_1103	83.32	
	Rhizosphere of native	A_1101	66.16	
		A_1102	74.14	
		A_1103	62.99	
	Soil of dead Korean fir	C_1101	75.1	
		C_1102	68.71	
		C_1103	72.4	
	Summer	Bulk soil	D_1201	80.01
			D_1202	85.65
			D_1203	80.35
Rhizosphere of cultivate		B_1201	83.69	
		B_1202	84.26	
		B_1203	86.73	
Rhizosphere of native		A_1201	71.45	
		A_1202	79.21	
		A_1203	76.94	
Soil of dead Korean fir		C_1201	79.07	
		C_1202	69.32	
		C_1203	76.27	
Fall		Bulk soil	D_1301	81.95
			D_1302	77.92
			D_1303	73.83
	Rhizosphere of cultivate	B_1301	82.82	
		B_1302	81.82	
		B_1303	79.64	
	Rhizosphere of native	A_1301	74.54	
		A_1302	77.23	
		A_1303	66.73	
	Soil of dead Korean fir	C_1301	75.3	
		C_1302	74.44	
		C_1303	74.03	

Table 2. Continued

Season	Sample ID	Sample	Only bacteria (%)
Winter	Bulk soil	D_1401	79.49
		D_1402	80.87
		D_1403	80.56
	Rhizosphere of cultivate	B_1401	81.04
		B_1402	79.88
		B_1403	71.7
	Rhizosphere of native	A_1401	74.08
		A_1402	70.54
		A_1403	68.29
	Soil of dead Korean fir	C_1401	73.62
		C_1402	78.42
		C_1403	79.38

였다. 먼저 희박화 곡선 분석으로 샘플의 수가 증가함에 따라 분류된 종의 다양성이 증가하는 정도를 파악하였다. 희박화 곡선 그래프의 x축은 분석한 DNA의 길이이고, y축은 클러스터링된 ASVs의 개수이다. 알파 다양성 분석의 경우 Observed index, Shannon index, Simpson index 분석을 4월, 6월, 9월, 11월 데이터에서 각각 진행하였다. 다음으로 정규성과 등분산을 모두 만족하는 데이터는 analysis of variance (ANOVA) 통계 분석을 진행하였고 그렇지 않은 데이터는 Kruskal-Wallis test를 진행하였다. 이후 *P*-value가 0.05 미만의 수치를 보이는 데이터는 Conover-Iman test를 사용하여 사후검정을 진행하였다. Conover-Iman test는 Benjamini-Hochberg procedure 방법을 사용하여 데이터를 분석하였다. 사후검정 결과 통계적으로 유의미한 차이가 없는 데이터들은 동일한 알파벳으로 분류하였고 통계적으로 유의미한 차이가 있는 데이터들은 서로 다른 알파벳으로 분류하였다. 베타 다양성 분석은 SILVA_SSU_r138_2019.RData 데이터베이스와 ASVs 간의 유사성이 100%인 분류군을 그룹화하여 상대적 풍부도 상위 10개의 분류군의 비율을 시각화하였다. 모든 분류군의 상대적 풍부도는 백분율로 변환하였고, 상위 10개의 상대적 풍부도를 가진 분류군 이외의 분류군과 'not applicable'로 분류되는 분류군들은 others로 분류하였다. 마지막으로 주성분 분석은 Bray-Curtis Dissimilarity 분석법을 사용하여 지역의 차이에 따른 세균 군집의 변화의 유무를 분석하였다. 이후 pairwise Adonis (version 0.4.1) R 패키지를 사용하여 permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) 통계 분석법을 이용해 지역

변화에 따른 세균 군집 간의 차이가 통계적으로 유의미하게 발
생하는지를 분석하였다. 구상나무의 서식지 차이는 노드 색깔
의 차이로 구분하였고, 계절의 차이는 노드의 형태로 구분하였
다. 또한 각각의 구상나무 서식지에서 3회 반복하여 채취한 시
료의 노드의 평균 좌표는 진한색의 노드로 표현하였다.

결과 및 고찰

구상나무의 자생지, 대체서식지, 고사지, 비재배토양의 계
절 변화(4월, 6월, 9월, 11월)에 따른 세균 군집 변화를 파악하
기 위해 토양에 존재하는 세균의 16s rRNA V4 region을 타겟
으로 한 PCR을 진행하였고, 그 결과 그룹화한 ASVs를 SILVA_
SSU_r138_2019.RData 데이터베이스와 비교하여 분류군 분석
결과를 바탕으로 데이터를 시각화 및 통계 분석하였다. 분석 결
과 지역과 계절에 따라 최소 약 2,000개에서 최대 약 6,000개의
ASVs가 그룹화되었고 그 이상의 ASVs는 분석한 DNA가 더 증
가하여도 더 이상 증가하지 않았기 때문에 세균 군집을 구성하
는 거의 모든 세균의 그룹화가 완료된 것을 확인하였다(Fig. 2).
이후 구상나무의 서식지에 따른 토양의 세균 군집 구조 차이의
유무를 분석하기 위해 분류군 동정을 완료한 시료 내에서 알파
다양성(alpha diversity) 분석을 진행하였다.

구상나무 근권 세균 군집의 다양성. 알파 다양성 분석의
경우 동정이 된 분류군의 개수만 고려하여 분석한 Observed
index와 분류군의 개수와 분류군의 풍부도, 균일도를 같이
고려한 Shannon index, Simpson index를 모두 사용하여 시
료를 분석하였다(Hunter와 Gaston, 1988; Shannon, 1948).
그 결과 6월의 Simpson index (P -value=0.02862), 9월의
Simpson index (P -value=0.141), 11월의 Simpson index (P -
value=0.09867)에서 지역 간 세균 군집의 차이가 통계적으로
유의미하게 나타나지 않았다. 6월의 Simpson index, 9월의
Simpson index, 11월의 Simpson index을 제외한 시료들
에서는 모두 통계적으로 유의미한 지역 간 세균 군집 구성의 차
이(P -value<0.05)가 발생하였다(Fig. 3). 4월 채집 시료의 경우
전체적으로 비재배토양과 대체서식지의 세균 군집 구성이 자
생지와 고사지의 세균 군집 구성보다 더 다양한 종류의 세균
이 균일한 풍부도를 가지고 있었다(Fig. 3A). 6월 채집 시료는
통계적으로 지역 간 유의미한 차이가 보이는 Observed index
에서 대체서식지의 세균 분류군의 다양성이 가장 높았고 그
다음으로 비재배토양의 다양성이 높았다(Fig. 3B). 그에 반해
서 자생지와 고사지는 하나의 그룹으로 묶이면서 가장 낮은
세균 다양성을 보였다. 6월 채집 시료의 Shannon index의 경
우 4월 채집시료의 경향성과 유사하게 비재배토양과 대체서

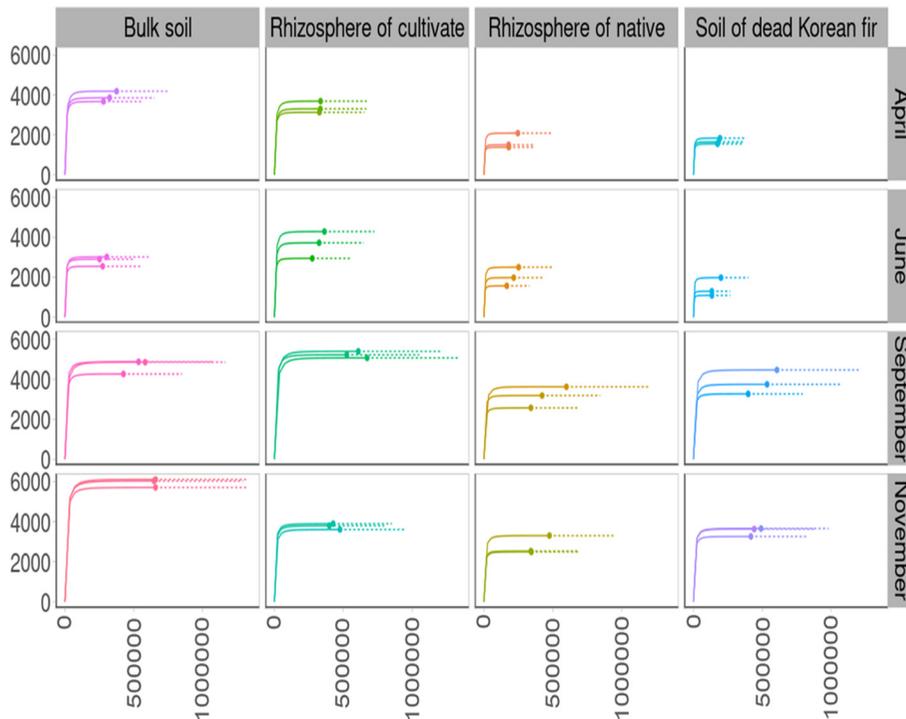


Fig. 2. Analysis of changes in species diversity according to changes in habitat type and season of Korean fir. To analyze the diversity of the microbial community, the 16S rRNA V4 region was sequenced using the Illumina system, and the sequences with an average quality score of 30 or less were trimmed using the Divisive Amplicon Denoising Algorithm (DADA). Rarefaction curve shows the degree of increase in species diversity as the number of samples increases. The x-axis is reads and the y-axis express clustered Amplicon Sequence Variants.

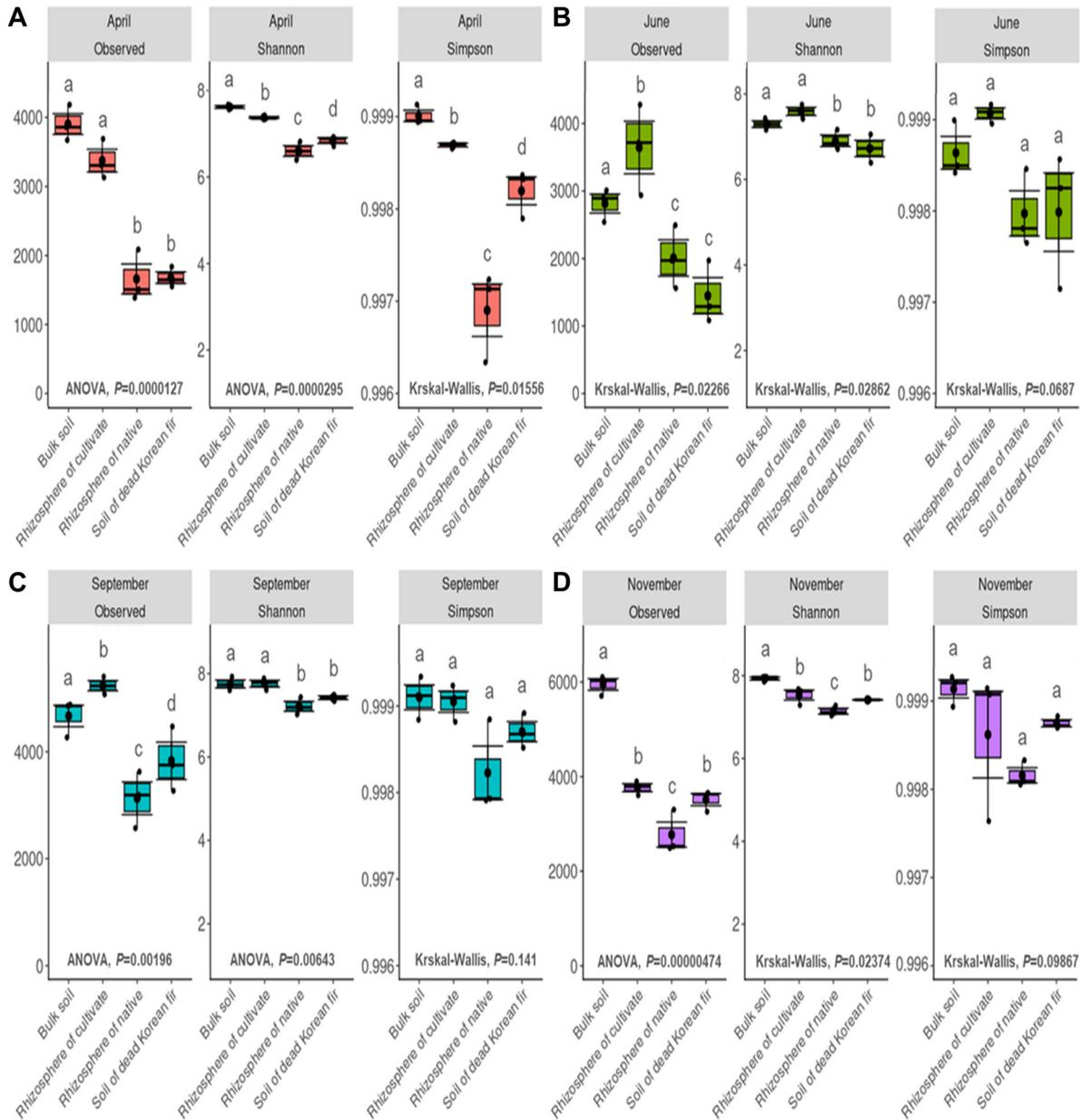


Fig. 3. Alpha diversity was compared and analyzed with the SILVA_SSU_r138_2019.RData database after clustering the samples into Amplicon Sequence Variants (ASVs) using the Divisive Amplicon Denoising Algorithm (DADA). Alpha diversity shows the Observed, Shannon, and Simpson diversity indices of microbial communities in (A) April, (B) June, (C) September, and (D) November. Statistical analysis of alpha diversity used analysis of variance (ANOVA) habitat types had both normality and homoscedasticity, and Kruskal-Wallis test otherwise. Afterwards, data with a *P*-value of less than 0.05 and statistically significant differences between groups were *post-hoc* analysis using the Conover-Iman test. The Conover-Iman test was analyzed using the Benjamini-Hochberg procedure. The *post-hoc* analysis results were indicated with the same alphabet for groups without statistically significant differences, and with different alphabets for groups with significant differences.

식지의 세균 군집 다양성과 균일도가 자생지와 고사지의 세균 군집 다양성보다 통계적으로 유의미하게 높았다(Fig. 3B). 9월 채집 시료의 분석 결과는 4월과 6월 채집 시료와 유사한 결과가 도출되었는데 지역 간 통계적으로 유의미한 차이가 있는 Observed index, Shannon index에서 비재배토양과 대체서

식지의 세균 군집의 구성이 자생지와 고사지의 세균 군집 구성보다 다양하면서 균일한 풍부도를 가지고 있었다(Fig. 3C). 11월 채집 시료의 경우 통계적으로 유의미한 지역 간 차이를 보이는 Observed index, Shannon index에서 비재배토양의 세균 군집이 다른 지역보다 통계적으로 유의미하게 다양하고 균일한

풍부도를 가지고 있었고 자생지의 세균 군집이 모든 지역 중 가장 낮은 세균 다양성과 풍부도를 가지고 있었다(Fig. 3D). 대체 서식지와 고사지의 경우 서로 같은 그룹으로 묶이면서 비재배토양보다는 낮고 자생지보다는 높은 세균 다양성을 가지고 있었다(Fig. 3). 따라서 알파 다양성 분석 결과 4종류의 지역 중 구상나무 비재배토양의 세균 군집이 계절이 변화하더라도 가장 다양한 분류군들로 구성된 군집 상태를 유지하는 것으로 밝혀졌다. 반면에 구상나무 자생지의 경우 다른 지역들보다 세균의 분류군 다양성이 낮으면서 세균의 풍부도가 균일하지 않았다. 또한 상대적으로 구상나무 비재배토양과 대체 서식지의 세균 군집이 서로 유사한 다양성을 보였고, 자생지와 고사지의 세균 군집이 서로 유사한 다양성을 보였다. 이와 같은 결과에 의거하여 구상나무 자생지 근권 토양의 세균 군집은 계절이 변화하더라도 일정한 환경이 유지되어 안정적이기 때문에 특정 분류군이 우점하는 정도가 다른 지역보다 높다고 판단하였다. 또한 자생지와 고사지의 경우 자연 상태의 토양 시료이기 때문에 해당 지역에서 오랫동안 유지된 토양이라 서로 유사한 세균 군집 구성을 보이는 것으로 판단된다. 반면에 비재배토양과 대체서식지의 세균 군집 구성의 상대적 유사성은 비재배토양의 경우 식생이 거의 존재하지 않은 구역에서 채집하였고, 대체서식지는 인공적으로 조성된 지역이다. 때문에 두 토양의 환경 변화가 계절에 따라 변화하는 정도가 상대적으로 심해서 두 지역이 유사하게 나타난 것으로 판단된다.

구상나무 근권 세균 군집의 분류군. 베타 다양성(beta diversity) 분석의 경우 세균의 분류체계 중 문(Phylum), 과(Family) 단계에서 지역과 계절별로 상위 10개의 상대적 풍부도를 가진 분류군의 목록을 분석하였다. 그 결과 문에서는 모든 지역에서 Proteobacteria문, Acidobacteriota문, Actinobacteriota문이 가장 풍부하게 존재하였다. Proteobacteria문은 약 35% 이상의 가장 높은 풍부도로 존재하였고 그 다음으로 Acidobacteriota문이 약 20%, Actinobacteriota문이 약 15% 정도의 풍부도로 존재하였다. 따라서 상위 3개 문이 전체 풍부도의 약 70%가량을 차지하였다. 이러한 경향성은 계절이 변화해도 유사하게 유지되었다(Fig. 4A). 결과적으로 세균의 분류체계 중 문 단계의 분석에서는 지역과 계절 변화에 따라서 세균 군집을 구성하는 분류군에 큰 변화가 일어나지 않았다. 다음으로 과 단계의 분류체계에서의 분석 결과 풍부도 상위 10개의 분류군들 중 Xanthobacteraceae과가 전 지역에서 약 5% 정도의 풍부도로 가장 풍부하였고 두 번째로 풍부한 Nitrosomonadaceae과는 모든 지역에서 4월에 1% 이하의 낮은 풍부도를 보였다

6월, 9월, 11월에 약 5% 정도로 풍부도가 증가하는 형태를 보였다. 그 이외의 나머지 분류군들은 모두 풍부도의 차이가 크지 않았고 others로 분류된 분류군들이 전체의 약 70% 정도를 차지하는 것으로 분석되었다(Fig. 4B). 과 단계의 분류체계 분석에서는 문 단계의 분류체계 분석과 마찬가지로 지역, 계절의 변화에 따른 세균 분류군의 풍부도에 별다른 변화가 일어나지 않았다. 또한 과 단계의 분석에선 다양한 종류의 분류군들이 세균 군집을 구성하지만 분류군 각각의 풍부도는 매우 낮은 특징을 보이기 때문에 전체 군집을 구성하는 분류군의 약 70% 정도가 others로 분류되는 결과가 산출되었다(Fig. 4). 따라서 베타 다양성 분석 결과에서는 지역이나 계절의 변화에 따라서 변화하는 세균 군집을 구성하는 분류군들의 유의미한 변화를 찾을 수 없었다.

구상나무 자생지 근권 세균 군집 상관관계. 주성분 분석(principal component analysis)의 경우 구상나무의 근권 및 토양 채집 지역의 계절 변화에 따라서 세균 군집에 어떠한 차이가 발생하는지 파악하기 위하여 분석을 진행하였다. 분석은 세균의 계통 수준에서 동정이 된 군집 내의 차이를 Bray-Curtis Dissimilarity 분석법을 사용하여 수치적 차이로 변환하였다(Fig. 5). 그 결과 구상나무 자생지, 대체서식지, 고사지에서는 노드의 위치 변화가 계절이 변화하더라도 크지 않은 반면에 구상나무 비재배토양에서는 계절이 변화했을 때 노드의 위치가 나머지 지역들에 비해서 크게 변화하였다(Fig. 5). 이후 모든 유형의 시료를 PERMANOVA 분석법을 사용하여 지역 간에 유의미한 차이가 있는지 통계적으로 검증하였다(Anderson, 2017). 전체 데이터의 PERMANOVA 분석의 경우 지역 간의 세균 군집 구성에 매우 유의미한 차이가 발생하였다(P -value=0.001). 이후 전체 데이터에서 어떤 지역 혹은 계절의 변화가 이러한 차이를 발생시켰는지 알아보기 위하여 한 가지 유형의 지역만 분리하여 각각의 지역에서 PERMANOVA 분석을 진행하였다. 그 결과 구상나무 비재배토양에서만 계절 변화에 따른 통계적으로 유의미한 차이가 발생했다(P -value=0.019). 반면 자생지, 대체서식지, 고사지에서는 계절이 변화해도 통계적으로 유의미한 세균 군집의 차이가 발생하지 않았다. 결론적으로 구상나무의 세균 군집의 계절의 변화에 따른 세균 군집 구조 차이는 유일하게 비재배토양에서만 확인되었고 나머지 지역에서는 차이가 확인되지 않았다. 이는 구상나무의 근권에 존재하는 세균 군집이 식물과 밀접한 상호작용을 하여 온도, 습도 등의 환경 변화에 덜 민감하게 반응하는 반면에 식물이 존재하지 않는 토양에서는 환경 변화가 세균 군집의 변화를 야기하기 때문인 것으로 추정된다(Chaparro 등, 2014). 또한 이러한 세균 군집의 변화는 식물이 존재하는 토양에서는 유의미하게

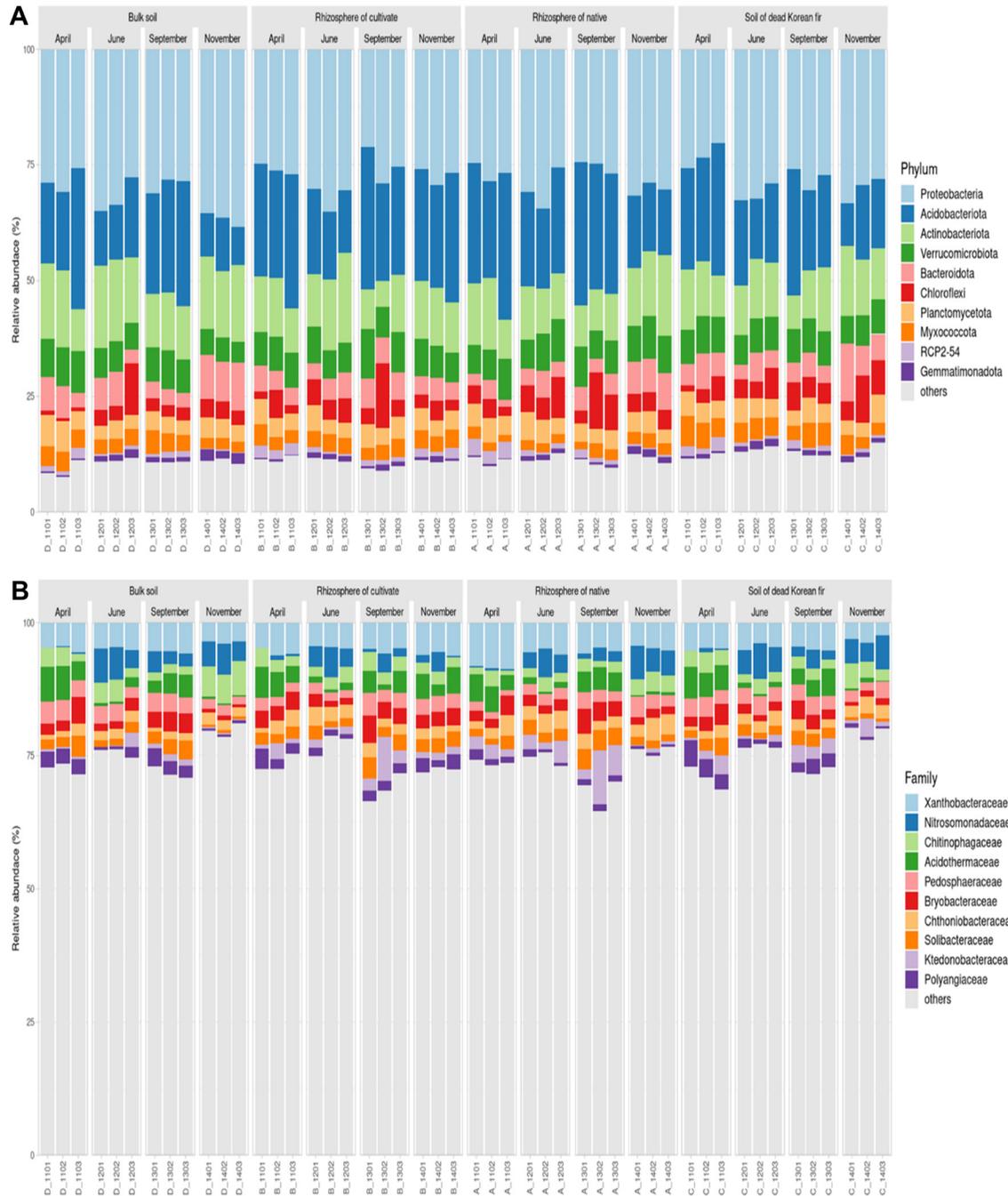


Fig. 4. Analysis of the top 10 taxa with relative abundance by Korean fir habitat type. Data processing grouped taxa based on 100% similarity between the database and Amplicon Sequence Variants. Afterwards, the relative abundance of all taxa in each region was converted into percentages. Taxa other than the top 10 relative abundance taxa were classified as others, and data classified as not applicable were removed. (A) Top 10 taxa by phylum level. (B) Top 10 taxa by family level.

확인되지 않으므로 후속 연구에서의 근권 세균 군집 분석시 계절적인 영향력은 다소 낮게 반영해야 할 것으로 판단된다(Bei 등, 2021). 추가적으로 구상나무와의 상호작용을 하는 근권의 세균 군집을 구성하는 특정 분류군의 존재 유무를 분석한 결과 구상나무 자생지와 대체서식지에서 특이적으로 높은 풍부도를 보이는 분류군은 찾을 수 없었다.

결론적으로 본 연구에서 구상나무와 밀접한 상호작용을 하는 특정한 세균 분류군이 존재하는지는 명확하게 알 수 없었고, 구상나무 비재배토양을 제외한 나머지 지역 간의 세균 군집의 구조의 차이도 크게 나지 않았다. 이와 같은 결과가 도출된 원인은 세균 군집을 구성하는 세균의 종 다양성이 매우 높아 특정 분류군이 우점하는 비율이 높지 않기 때문인 것으로 추

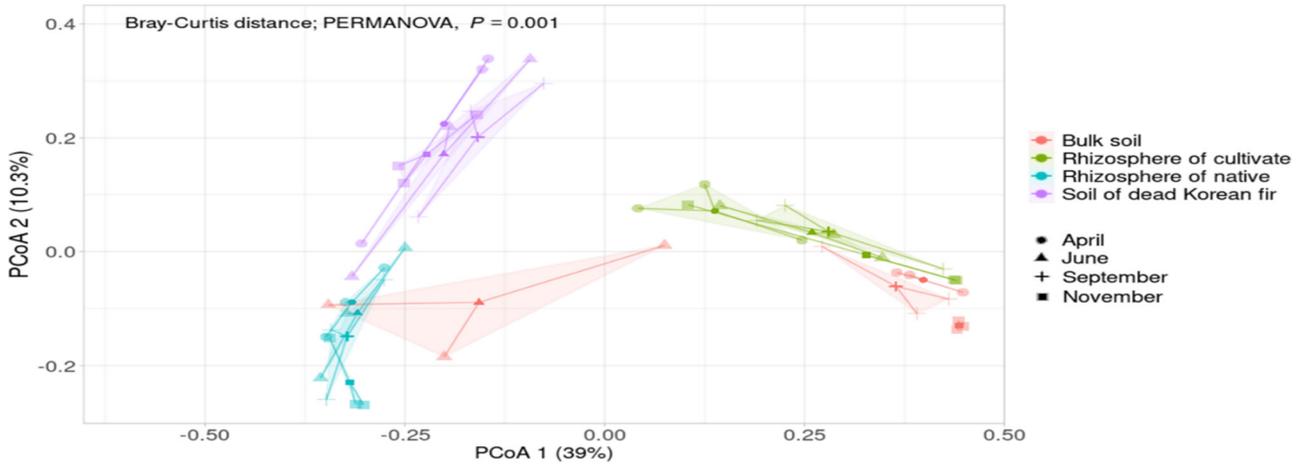


Fig. 5. Principal coordinates analysis (PCoA) to analyze microbial community differences between Korean fir habitat types. PCoA analyzed the Amplicon Sequence Variants composition of the microbial communities of Korean fir habitat types using the Bray-Curtis Dissimilarity method and then analyzed the presence or absence of differences between communities using the Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) statistical analysis method. Differences in the types of Korean fir habitat were classified by the color of the nodes, and differences in seasons were classified by the shape of the nodes. The closed nodes are the average coordinates of the nodes of samples collected three times from each Korean fir habitat type.

측된다(Alawiye와 Babalola, 2019). 또한 보호종인 구상나무의 특성상 식물체의 손상을 최소화하기 위해 근권 시료 채집 시 구상나무와 밀접한 상호작용을 하는 세균이 존재할 가능성이 높은 뿌리 끝부분에 위치한 잔뿌리의 근권을 채집하지 못하였다(Hawes 등, 2002; Ji 등, 2022). 때문에 시료 채집 위치의 문제로 구상나무와 상호작용하는 특정한 분류군을 찾지 못했을 가능성이 있다. 추가적으로 4종류의 지역에서 한 지역당 3회의 시료 채집 반복수를 가지고 연구를 진행하였는데 너무 적은 반복수로 인하여 채취한 시료가 해당 구역의 세균 군집 구조에 대한 대표성을 가지기에 어려웠을 수 있고, 서로 다른 지역의 세균 군집 간의 통계적인 차이를 불분명하게 했을 가능성이 있다. 그러나 구상나무의 자생지와 구상나무 세균 군집이 계절이 변화해도 유사한 군집 구성을 유지하는 것에 비해 비재배토양의 세균 군집의 구성은 계절 변화에 더 민감하게 변화하였기 때문에 근권 세균 군집의 구성이 구상나무와 완전히 무관하다고 판단하기에는 다소 어려울 것이다(Xu 등, 2023). 또한 근권에 존재하는 세균의 종류는 매우 다양하기 때문에 낮은 풍부도를 가지면서 구상나무와 높은 상호작용을 하는 특정 세균이 존재할 가능성이 있다(Dawson 등, 2017; Dohrmann 등, 2013). 다양한 종류의 근권 세균이 식물의 건강에 도움을 줄 수 있으므로 이러한 세균 분류군에 대한 연구는 구상나무의 보존에 기여할 것이다(Xu 등, 2018). 선행 연구에 따르면 *Azospirillum*, *Nitrospirillum* 과 같은 구상나무의 생존에 도움을 줄 수 있는 특정한 세균이 실제 존재한다(Mannaa 등, 2023). 반면에 다른 사전 연구에 따르면 구상나무의 자생지와 고사지 간의 미생물 군집 구조의 차

이가 세균 군집보다 진균 군집에서 더 유의미하게 나타나는 것으로 알려졌다(Jeong 등, 2023). 때문에 세균 군집이 식물과 상호작용하는 정도가 상대적으로 낮아 시료 채집 지역에 따른 특이적인 세균 군집이 발견되지 않았을 가능성이 있다(Burke 등, 2006). 그러므로 구상나무 근권에 존재하는 다양한 미생물들 중에서 상당히 많은 비중을 차지하는 진균 군집에 대한 추가적인 연구도 진행할 필요성이 있다(Liu 등, 2019; Phillips와 Fahey, 2006). 이러한 결과를 바탕으로 추후 구상나무의 근권 및 토양 세균 군집 분석을 진행하여 구상나무의 존속을 위한 새로운 미생물 자원을 확보하고자 한다면 상기한 문제점들을 개선하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

구상나무(*Abies koreana*)는 한국의 고유종이지만 기후 변화로 인한 심각한 개체수 감소 현상이 일어나고 있다. 구상나무의 보존을 위한 다양한 연구가 기존에 진행되었지만 구상나무와 근권 세균 군집의 상관관계에 대한 연구는 비교적 미진한 편이기 때문에 추가적인 연구 진행이 필요하다. 식물의 근권 미생물 군집을 구성하는 일부 세균은 식물이 수분, 양분 등이 부족한 환경에서 살아남을 수 있게 돕는다. 또한 계절 변화에 의한 급격한 환경 변화에 대한 식물의 적응력을 향상시켜 줄 가능성이 있다. 본 연구에서는 이러한 세균 군집이 구상나무의 근권에 존재하거나 구상나무의 서식지 유형(자생지, 대체서식지, 고사지, 비재배토양)과 계절 변화(4월, 6월, 9월, 11월)에 따른 군집 구조

의 차이가 발생하는지 파악하기 위해 세균의 16S rRNA V4 영역을 대상으로 한 metagenome amplicon sequencing을 진행하였다. 그 결과 우리는 구상나무와 매우 특이적으로 상호작용하는 근권 세균 군집이나 특정 분류군은 찾을 수 없었지만 구상나무 비재배토양에 비해서 구상나무 자생지의 근권 세균 군집이 계절 변화에 의한 변동성이 적게 나타난다는 사실을 알아냈다. 이러한 결과는 구상나무의 근권의 환경이 비재배토양에 비해 상대적으로 안정하다는 것을 보여준다. 그러나 구상나무와 명확하게 상호작용하는 세균 군집이나 분류군을 찾을 수 없었기 때문에 세균 군집 이외의 진균과 같은 기타 근권 미생물 군집들에 대한 추가 연구의 필요성이 제시된다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This research was supported by the National Park Institute for Wildlife Conservation.

References

- Ahn, U. S. and Yun, Y. S. 2020. Causes of decline in the Korean fir based on spatial distribution in the Mt. Halla region in Korea: a meta-analysis. *Forests* 11: 391.
- Alawiye, T. T. and Babalola, O. O. 2019. Bacterial diversity and community structure in typical plant rhizosphere. *Diversity* 11: 179.
- Anderson, M. J. 2017. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). In: Wiley StatsRef: Statistics Reference Online, eds. by N. Balakrishnan, T. Colton, B. Everitt, W. Piegorisch, F. Ruggeri, J. L. Teugels, pp. 1-15. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK.
- Bei, Q., Moser, G., Müller, C. and Liesack, W. 2021. Seasonality affects function and complexity but not diversity of the rhizosphere microbiome in European temperate grassland. *Sci. Total Environ.* 784: 147036.
- Burke, D. J., Kretzer, A. M., Rygielwicz, P. T. and Topa, M. A. 2006. Soil bacterial diversity in a loblolly pine plantation: influence of ectomycorrhizas and fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57: 409-419.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V. and Vivanco, J. M. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.* 8: 790-803.
- Cho, G., Gang, G. H., Jung, H. Y. and Kwak, Y. S. 2022. Exploration of mycobiota in *Cypripedium japonicum*, an endangered species. *Mycobiology* 50: 142-149.
- Dawson, W., Hör, J., Egert, M., van Kleunen, M. and Pester, M. 2017. A small number of low-abundance bacteria dominate plant species-specific responses during rhizosphere colonization. *Front. Microbiol.* 8: 975.
- Dohrmann, A. B., Küting, M., Jünemann, S., Jaenicke, S., Schlüter, A. and Tebbe, C. C. 2013. Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt- and conventional maize varieties. *ISME J.* 7: 37-49.
- Gwon, J. H., Sin, M. K., Kwon, H. J. and Song, H. K. 2013. A study on the forest vegetation of Jirisan National Park. *J. Korean Soc. Environ. Rest. Technol.* 16: 93-118.
- Han, G., Mannaa, M., Jeon, H., Jung, H., Kim, J. C., Park, A. R. et al. 2022. Dysbiosis in the rhizosphere microbiome of standing dead Korean fir (*Abies koreana*). *Plants (Basel)* 11: 990.
- Hawes, M. C., Bengough, G., Cassab, G. and Ponce, G. 2002. Root caps and rhizosphere. *J. Plant Growth Regul.* 21: 352-367.
- Hunter, P. R. and Gaston, M. A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-2466.
- Jeong, M., Tagele, S. B., Kim, M. J., Ko, S. H., Kim, K. S., Koh, J. G. et al. 2023. The death of Korean fir (*Abies koreana*) affects soil symbiotic fungal microbiome: preliminary findings. *Front. For. Glob. Change* 5: 1114390.
- Ji, R. Q., Xie, M. L., Li, G. L., Xu, Y., Gao, T. T., Xing, P. J. et al. 2022. Response of bacterial community structure to different ecological niches and their functions in Korean pine forests. *PeerJ* 10: e12978.
- Kim, H. S., Lee, S. M. and Song, H. K. 2011. Actual vegetation distribution status and ecological succession in the Deogyusan National Park. *Korean J. Environ. Ecol.* 25: 37-46.
- Latif, S., Bibi, S., Kouser, R., Fatimah, H., Farooq, S., Naseer, S. et al. 2020. Characterization of bacterial community structure in the rhizosphere of *Triticum aestivum* L. *Genomics* 112: 4760-4768.
- Lee, J. H. and Hong, S. K. 2009. Comparative analysis of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from *Abies holophylla* and *Abies koreana*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 372-377.
- Liu, G. Y., Chen, L. L., Shi, X. R., Yuan, Z. Y., Yuan, L. Y., Lock, T. R. et al. 2019. Changes in rhizosphere bacterial and fungal community composition with vegetation restoration in planted forests. *Land Degrad. Dev.* 30: 1147-1157.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R. and Baldrian, P. 2017. Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81: e00063-16.
- Mannaa, M., Han, G., Jung, H., Park, J., Kim, J. C., Park, A. R. et al. 2023. *Aureobasidium pullulans* treatment mitigates drought stress in *Abies koreana* via rhizosphere microbiome modulation. *Plants (Basel)* 12: 3653.
- Oppenheimer-Shaanan, Y., Jakoby, G., Starr, M. L., Karliner, R., Eilon,

- G., Itkin, M. et al. 2022. A dynamic rhizosphere interplay between tree roots and soil bacteria under drought stress. *eLife* 11: e79679.
- Phillips, R. P. and Fahey, T. J. 2006. Tree species and mycorrhizal associations influence the magnitude of rhizosphere effects. *Ecology* 87: 1302-1313.
- Prashar, P., Kapoor, N. and Sachdeva, S. 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev. Environ. Sci. and Bio/Technol.* 13: 63-77.
- Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27: 379-423.
- Smalla, K., Sessitsch, A. and Hartmann, A. 2006. The rhizosphere: 'soil compartment influenced by the root'. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56: 165.
- Song, J. H., Han, S. H., Lee, S. H. and Yun, C. W. 2021. Ecological characteristic of *Abies koreana* stand structure of Mt. Jirisan and Mt. Hallasan. *J. Korean Soc. Forest Sci.* 110: 590-600.
- Wilson, E. H. 1920. Four new conifers from Korea. *J. Arnold Arbor.* 1: 186-190.
- Xu, J., Zhang, Y., Zhang, P., Trivedi, P., Riera, N., Wang, Y. et al. 2018. The structure and function of the global citrus rhizosphere microbiome. *Nature Commun.* 9: 4894.
- Xu, T., Shen, Y., Ding, Z. and Zhu, B. 2023. Seasonal dynamics of microbial communities in rhizosphere and bulk soils of two temperate forests. *Rhizosphere* 25: 100673.
- Yang, J., Kloepper, J. W. and Ryu, C. M. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14: 1-4.