

금산의 인삼 재배 토양에 분포하는 수지상균근균의 다양성

길리종¹ · 어주경² · 엄안흠^{1*}

¹한국고원대학교 생물교육과
²서울대학교 산림과학부 산림환경과

Diversities of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Cultivated Field Soils of Korean Ginseng

Yi-Jong Kil¹, 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 29, 2011. Revised January 12, 2012. Accepted February 12, 2012)

ABSTRACT : In this study, soil samples were collected from cultivated fields of 1-5 year old Korean ginseng in Geumsan, Korea. Spores of arbuscular mycorrhizal fungi were extracted from soils and identified using morphological characteristics and 18s rDNA sequences of the spores. Total 10 species of AMF were identified: *Acaulospora longula*, *Archaeospora trappei*, *Glomus caledonium*, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Glomus* sp., *Paraglomus occultum*, *Paraglomus brasilianum*, and *Scutellospora heterogama*. Relative abundance of spores of *A. trappei* were increased with increase of cultivation period of the ginseng. However, relative abundance of other species of AMF and Shannon diversity (H') of AMF were significantly decreased with the increase of cultivation periods of the ginseng.

KEYWORDS : AMF, *Acaulospora trappei*, Cultivation period, *Panax ginseng*, Species diversity

서 론

수지상균근균(arbuscular mycorrhizal fungi; AMF)는 지구상에 가장 넓게 퍼져있는 공생체이며 육상식물 중 70~90%에 이르는 대부분의 식물이 AMF와 공생관계를 이루고 있으며 생물생장에 중요한 역할을 하고 있다(Smith and Read, 2008). AMF는 식물 뿌리에 침투하여 숙주식물로부터 광합성 산물인 탄소원을 제공 받는 반면 외부균사를 통해 토양의 영양물질을 흡수하여 식물체에 전달하는 공생관계를 이룬다. 또한 AMF는 불리한 환경 속에서도 식물이 성장할 수 있도록 도움을 주는 것으로 보고되고 있는데 특히, 중금속, 염분, 건조, 병원균과 같은 식물체에 불리한 환경에 대한 저항성을 증가시킨다. 이러한 AMF가 식물생장에 주는 이점은 결국 식물들의 군집 변화와 생태계 천이 과정에도 영향을 끼치고 있다(van der Heijden, 2002).

인삼(*Panax ginseng* C. A. Mey.)은 고려인삼이라고도 하며 두릅나무과(Araliaceae), 인삼속(*Panax*)에 속하는 다년생 초본이다. 아시아에서는 그 뿌리를 인삼이라 하여 수천 년 전부터 약용으로 사용되어 왔으며 세계적으로 널리 사용되고 있는 대표적인 약용작물 중 하나이다(Attele

et al., 1999; Chang and Sung, 2006; Zeuske and Weber, 2000). AMF는 인삼을 포함한 다양한 약용식물과 공생관계를 형성하고 있으나, 이들의 공생관계에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 기존의 연구들은 주로 인삼에서 AMF의 형성(Whitbread et al., 1996; Zeuske and Weber, 2000), 인삼의 재배기간과 토성이 AMF 감염에 미치는 영향(Lee et al., 2004), 인삼의 생장에 미치는 영향, 인삼의 뿌리에 감염되어 있는 AMF의 분자생물학적 확인 등의 연구가 이루어져 왔다(Eom et al., 2004; Eo and Eom 2009). 인삼은 밭에서 3~5년간 동일 포장에서 장기간 재배되는데, 이 기간 동안 토양 내 AMF의 군집은 숙주 뿐만 아니라 토양의 다양한 환경요인에 영향을 받게 된다. 따라서 본 연구에서는 금산지역의 인삼 재배지 토양에서 재배기간에 따른 토양 내 AMF 다양성을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

토양채집

토양과 인삼의 채집은 충청남도 금산지역 일대(N36°03' -05' E127°32')의 인삼(*P. ginseng*) 재배지에서 수행하였다. 채집지의 인삼은 재배기간이 1~5년이었으며 각 재배기

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

간별 4곳의 인삼 재배지에서 채집하였다. 인삼 재배지에서의 채집방법은 채집지 전체를 대표할 수 있도록 임의적으로 선택하였으며, 각 재배지별 채집할 인삼을 3개체씩 선택하여 인삼뿌리 주변의 토양을 약 30~50 cm 정도의 깊이로 채집하였다. 채집한 토양은 밀폐 가능한 비닐봉지에 함께 넣어 실험실로 운반하였다. 실험실로 옮겨온 토양은 4°C에서 냉장보관 하였다.

포자추출 및 형태동정

채집한 토양은 50°C에서 72시간 건조시킨 후 건조중량 10 g의 토양을 wet sieving과 sucrose density gradient centrifugation method를 사용하여 포자를 분리하였다 (Daniels and Skipper, 1982). 망의 틈새가 300 µm, 150 µm, 90 µm, 63 µm 크기의 체를 사용하여 위에서부터

차례로 겹쳐놓아서 포자를 대략적인 크기별로 분리할 수 있도록 하였다. 각 체에 걸러진 포자는 페트리디쉬에 각각 담아 해부현미경상에서 관찰하였다. 포자 추출은 채집 토양별로 진행하였으며 색깔, 크기, 모양이 비슷한 것끼리 모아서 동정에 이용하였다. 해부현미경 상에서 관찰된 포자의 특징, 크기, 색깔과 함께 광학현미경 상에서 관찰된 포자 벽의 수, 색깔, 두께, 그리고 부착구조의 형태 등을 주요 식별형질로 삼아 종을 동정하였다. 그 후 동일종의 다른 포자 한 개를 0.2 ml PCR 튜브에 넣고 90% 에탄올과 멸균수로 세척 후 PCR 반응에 이용하였다.

rDNA분석

포자로부터 genomic DNA를 분리 하고, 18S rDNA 영역을 target으로 하여 진핵생물 universal primer인 NS1/

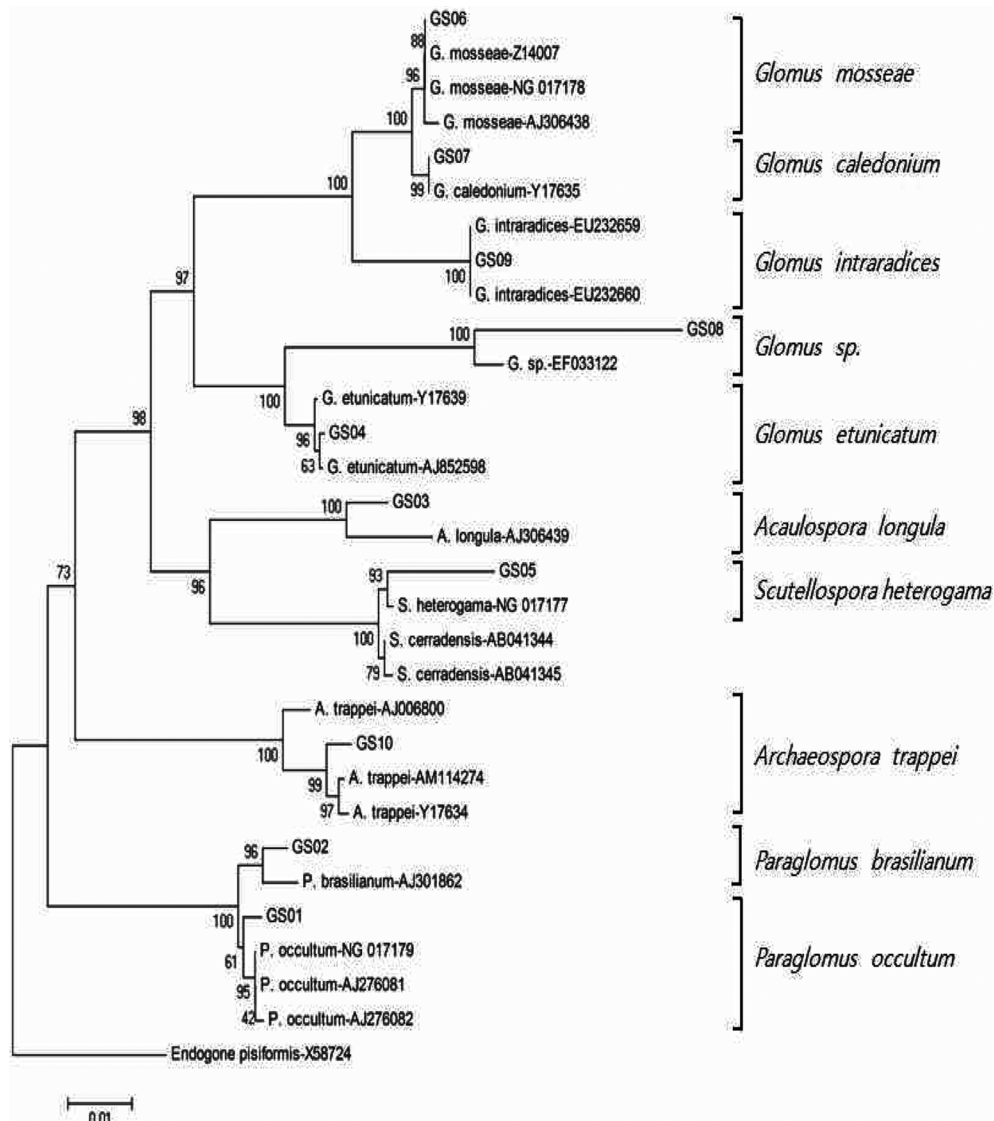


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree for partial 18S rDNA sequence of arbuscular mycorrhizal fungal spores collected from cultivated field of *Panax ginseng*. Numbers at nodes indicate percent bootstrap support (1000 replicates).

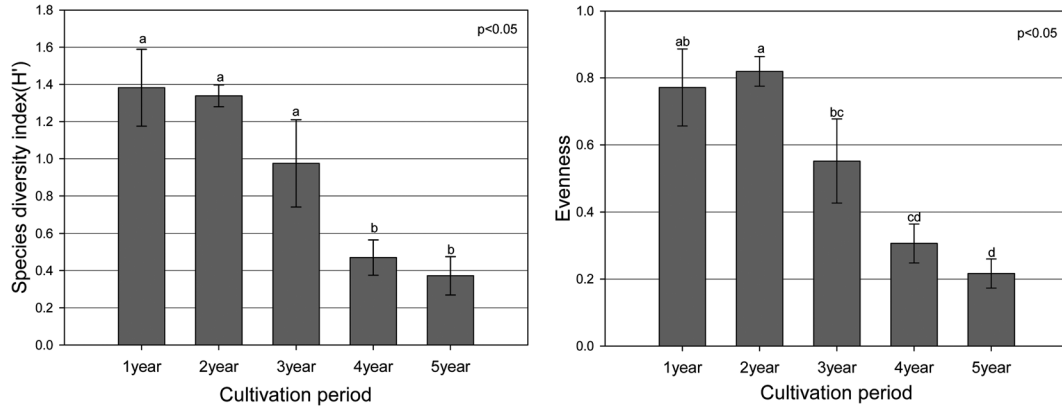


Fig. 2. Relative abundance of AM fungal spores in the cultivated field of *Panax ginseng* according to cultivation periods.

NS4을 이용하여 PCR 증폭을 수행 하였다(van Tuinen *et al.*, 1998). 1000 ng의 genomic DNA와 NS1/NS4 primer를 Taq Premix(SolGent, Korea)를 넣고 PCR(2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA)을 수행하였다. PCR 반응물은 멸균수를 이용하여 1/100로 희석한 후 두 번째 단계에서 주형 DNA로 사용하였다. 두 번째 단계의 PCR은 AMF에 특이적인 primer인 AML1/AML2를 이용하여 첫 번째 단계의 PCR과 동일한 방법으로 수행하였다(Lee *et al.*, 2008). PCR 증폭산물은 염기서열 분석을 진행하였으며(SolGent, Korea), 분석된 염기서열은 NCBI에서 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)하여 일치도가 가장 높은 종을 확인하였다. 또한 근연종의 염기서열을 NCBI로부터 내려 받아 본 연구를 통해 얻은 염기서열과 함께 MEGA 4(Tamura *et al.*, 2007)를 이용하여 alignment 후 분자계통학적 유연관계를 분석 하였다.

결과 및 고찰

인삼재배지 토양에서 AMF의 다양성

인삼 재배지에서 채집한 건조 토양 10 g에서 관찰된 AMF 포자는 형태적 차이를 이용하여 구분한 후, 각각의 형태종(morphotypes)에 대하여 18 rDNA 염기서열을 비교 분석한 결과 총 5속 10종이 확인되었다(Fig. 1). 가장 많은 종이 발견된 속은 *Glomus* 속으로 *G. mosseae*, *G. intraradices*, *G. etunicatum*, *G. caledonium*, *Glomus* sp. 등 5종이 동정되었다. *Paraglomus* 속으로는 *P. occultum*, *P. brasilianum*의 2종이 관찰되었으며, *Acaulospora longula*, *Scutellospora heterogama*, *Archaeospora trappei* 가 동정되었다. *Paraglomus* 속의 종들은 이전의 연구에서 뿌리에서 우점하는 것으로 알려진 종으로 이번 연구에서는 토양에서도 관찰되었다. *Glomus* sp.는 염기서열 분석결과 *G. etunicatum* 유사하나 계통수 상에서 다른 분지를 나타내고 있고, 형태적으로도 차이가 있다고 여겨지기 때문에 다른 분류군이라고 판단된다. 따라서 이 종의 동정을 위해서는 순수배

양을 통한 후속연구가 필요할 것으로 생각되며, 현재 순수배양 중에 있다. *A. trappei*는 국내에서는 처음으로 보고되는 종이며, 나머지 8종은 우리나라의 농업 및 산림토양에서 보고되어왔다(Park, 2011; Lee and Eom, 2009; Lee *et al.*, 2006).

인삼의 재배기간이 토양 내 AMF 다양성에 미치는 영향

인삼의 재배기간에 따른 토양 내 AMF 군집의 차이를 알아보기 위해 상대수도를 이용하여 One-Way ANOVA를 실시한 결과 0.05 유의수준에서 유의미한 차이를 보였다. 재배기간이 길어질수록 *A. trappei*의 상대수도가 급격히 증가하는 반면 다른 종의 상대수도는 감소하여 5년 재배지에서 가장 큰 차이를 보였다(Fig. 2). 재배기간에 따른 인삼재배토양의 AMF 군집을 분석한 결과 재배기간에 따른 AMF의 종수는 유의수준 0.05에서 유의미한 값이 나오지 않았으나 종다양성 지수는 재배기간이 길어질수록 감소하는 결과가 나왔으며 유의수준 0.05에서 유의

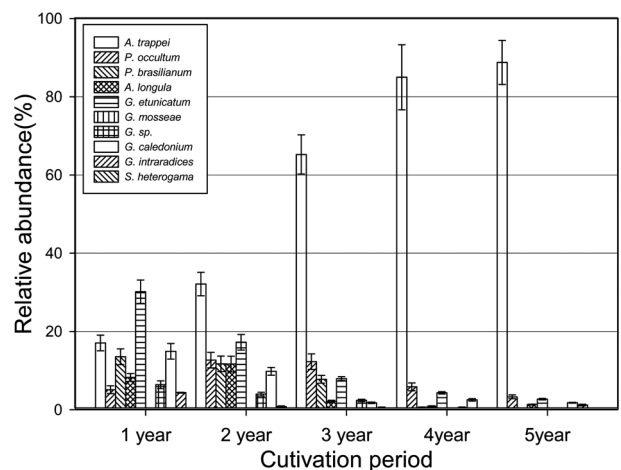


Fig. 3. Shannon diversities and evenness of AM fungal spores in the cultivated field of *Panax ginseng* according to cultivation periods (mean $\pm$ SE, n = 4). Different letters on each bar indicate significant differences at $P < 0.05$.

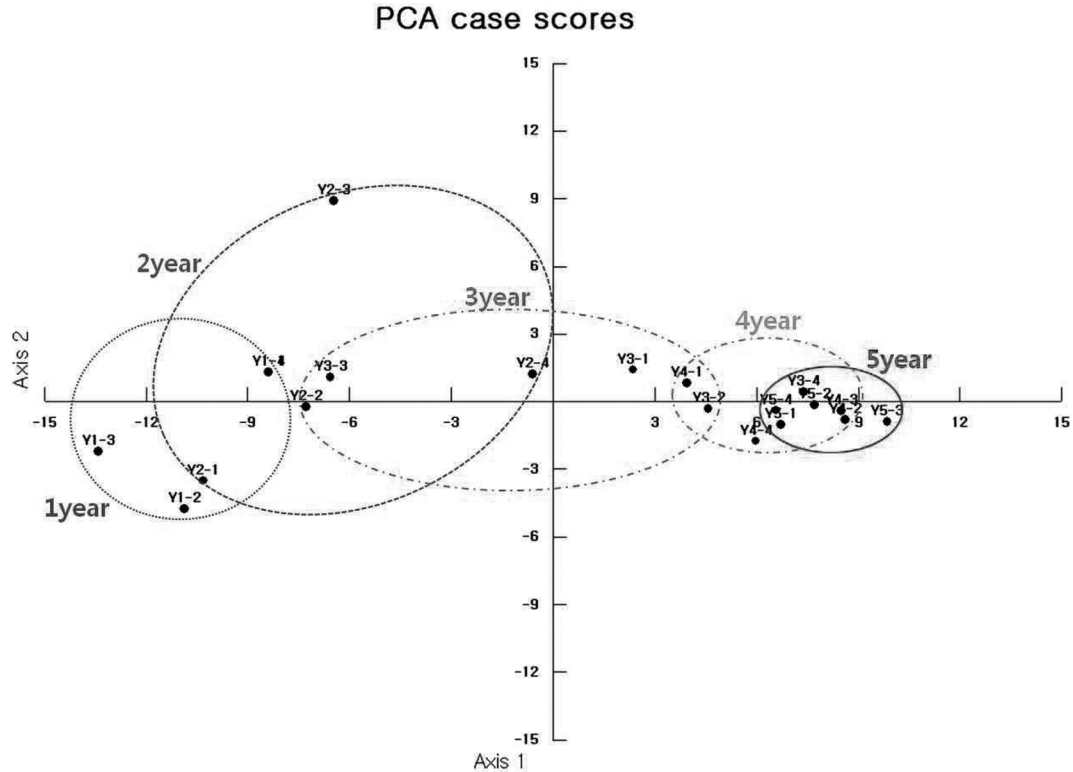


Fig. 4. Ordination of AMF communities in the cultivated field of *Panax ginseng* according to the cultivation period by principle component analysis.

미한 차이를 보였다(Fig. 3). AMF의 종 균등도 역시 재배 기간이 길어질수록 감소하였으며 유의수준 0.05에서 유의 미한 차이를 나타냈다. 따라서 재배기간에 따라 나타나는 토양 내 종 다양성의 차이는 *A. trappei*는 토양 내에서 우점하게 되는데 반해서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 재배기간이 오래된 재배지일수록 *A. trappei*의 상대 수도가 증가하나, 종다양성 지수와 균등도는 감소하였다.

토양내 포자의 군집 구조는 재배기간에 따라 서로 유사 하게 나타났으며 시기에 따라 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 결과적으로 재배기간에 따른 AMF의 군집구조의 변화 양상은 뚜렷하게 나타났으며, 재배기간 이 오래 될수록 군집 사이의 유사도가 커지는 것으로 나 타났다. 이 또한 재배기간이 긴 토양의 군집에서 *A. trappei*이 역할이 큰 것으로 볼 수 있는데 상대수도, 종 다양성지 수, 균등도, 군집구조 변화의 결과를 종합해 보면 인삼의 재배기간이 오래될수록 특정 AMF 종인 *A. trappei*의 포 자가 우점 할 수 있는 환경조건으로 바뀌어간다는 것을 알 수 있다. 이는 *A. trappei*가 인삼 뿐만 아니라 토양 내 다양한 환경요인의 지속적인 영향에 의한 것으로 생각된 다. 농경지는 기본적으로 단일작물의 생장에 초점이 맞춰 져 있기 때문에 농업활동에 의해 지속적으로 농경지를 침 입한 식물들을 제거해 나간다. 따라서 숙주식물의 감소가 예측될 수 있으며, 이는 AMF의 군집구조를 의미있게 변화시켰을 가능성이 있다. 다른 하나는 대부분의 경작지

는 인간에 의한 시비활동이 일어나는 지역이라는 점이다. 이는 일반 초지 및 산림토양보다 영양의 과공급이 유발된 다는 의미로써 생태학적인 관점에서 접근이 고려된다. 일 반적으로 생태계에서의 자원경쟁은 각 종의 생장에 충분 할 정도로 자원이 공급되지 않기 때문에 종간에 대칭적인 경쟁에 의해서 종 다양성이 유지될 수 있다. 이는 우점종 이 될 수 있는 종들이 낮은 양분 가용성으로 인해 생물량 과 밀도가 저하되고 그로 인해서 각 종간에 덜 경쟁적인 상태를 만들어낸다는 것이다. 그렇지만 높은 양분 가용성 은 이와는 반대의 현상을 만들어 내고 따라서 특정 지역 에 일부 종만이 우점하여 종 다양성이 낮아지는 현상들이 일어난다(Bazzaz and Harper, 1976; Huston, 1994).

또 다른 설명으로는 *A. trappei*와 인삼과의 특이적 관 계에 대하여 생각해 볼 수 있다. AMF와 숙주 식물과의 특이성에 관한 그 동안의 연구결과에서 식물은 다른 균류 의 포자 형성율, 생장 및 생존율을 다르게 하여 AMF 군 집의 구성과 구조를 확실히 변화시킨다고 보고하였다 (Giovannetti *et al.*, 1994; Giovannetti *et al.*, 1988; Westover *et al.*, 1997). 또한, 기주 식물은 뿌리에 대한 탄 소 분배 조절, 2차 대사산물의 생산, 토양 환경 조건의 변 화에 의해 직접적으로 AMF 구성에 영향을 줄 수 있다. 그리고 AMF의 생활사(포자 발아, 균사의 발달과 감염, 포자 형성)의 모든 단계가 식물 뿌리의 영향을 받기 때문 에 기주 식물은 토양 내 AMF 종 구성을 조절하는 가장

중요한 요인으로 보고하고 있다(Bever *et al.*, 1996; Eom *et al.*, 2000; Hetrick and Bloom, 1986; Sanders and Fitter, 1992). 따라서 인삼은 동일 장소에서 장기간 재배 되기 때문에 인삼 재배 토양의 AMF는 수년에 걸쳐 숙주 식물인 인삼의 영향을 받게 되며 그에 따라 인삼 재배 토양의 AMF 군집구조가 인삼에 특이성적인 AMF 군집구조로 변해간다고 볼 수 있다.

결론적으로 농경지라는 외부 환경요인과 숙주식물과 AMF의 특이적인 공생관계라는 내부 요인 모두 이와 같은 군집에 영향을 미쳤다고 생각된다. 그러나 어떤 요인이 군집구조에 더 큰 영향을 미쳤는지에 대한 정량적인 분석은 현재로서는 확인할 수 없으며, 추후 이들의 관계를 규명할 수 있는 실험을 통해서 각 요인들의 성격 및 규모를 정량화 하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구에서는 인삼(*Panax ginseng* C. A. Mey.) 재배 토양에서 수지상균근균(AMF)의 포자를 분리하여 동정하고 재배기간 별 AMF 다양성을 확인하였다. 충남 금산지역의 재배 기간 1~5년의 인삼 재배지에서 토양을 채집하였다. 인삼 재배지에 분포하는 AMF의 포자를 분리하여 형태 및 분자생물학적 동정을 한 결과, *Acaulospora longula*, *Archaeospora trapei*, *Glomus caledonium*, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Glomus* sp., *Paraglomus occultum*, *Paraglomus brasilianum*, *Scutellospora heterogama* 등 총 5속 10종이 동정되었다. 연구 결과 재배기간이 오래 될수록 토양 내에 분포하는 수지상균근균의 종 다양성지수와 균등도는 유의미한 차이를 보이며 감소하였다. 그러나 *A. trapei* 는 재배 기간이 오래될수록 상대수도가 증가하였다.

감사의 글

이 연구는 2010년도 KNUE 학술연구비를 받아 수행하였음.

참고문헌

- Attele, A. S., Wu, J. A. and Yuan, C. S. 1999. Ginseng pharmacology: Multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol.* 58:1685-1693.
- Bazzaz, F. A. and Harper, J. L. 1976. Relationship between plant weight and numbers in mixed populations of *Sinapsis alba* (L.) Rabenh. and *Lepidium sativum* L. *J. Appl. Ecol.* 13:211-216.
- Bever, J. D., Morton, J. B., Antonovics, J. and Schultz, P. A. 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J. Ecol.* 84:71-82.
- Chang, Y. S., Chang, Y. H. and Sung, J. H. 2006. The effect of ginseng and caffeine products on the antioxidative activities of mouse kidney. *J. Ginseng Res.* 30:15-21.
- Daniels, B. A. and Skipper, H. D. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In Schenck, N. C. (Ed.), *Methods and principles of mycological research* (pp. 29-35). Saint Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Eo, J. K. and Eom, A. H. 2009. The effect of benomyl treatment on ginsenosides and arbuscular mycorrhizal symbiosis in roots of *Panax ginseng*. *J. Ginseng Res.* 33:256-259.
- Eom, A. H., Hartnett, D. C. and Wilson, G. W. T. 2000. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia.* 122:435-444.
- Eom, A. H., Eo, J. K., Kim, D. H., and Jeong, H. S. 2004. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Panax ginseng* using 18S rDNA sequence. *J. Kor. Sci. Appl. Biol. Chem.* 47:182-186.
- Giovannetti, M. and Gianinazzi-Pearson, V. 1994. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 98:705-715.
- Giovannetti, M., Schubert, A., Cravero, M. C. and Salutini, L. 1988. Spore production by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus monosporum* as related to host species, root colonization and plant growth enhancement. *Biol. Fertil. Soils.* 6:120-124.
- Hetrick, B. A. D. and Bloom, J. 1986. The influence of host plant on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia.* 78:32-36.
- Huston, M. A. 1994. Biological diversity: the coexistence of species on changing landscapes. Cambridge Univ Press.
- Lee, K. J., Park, H. and Lee, I. S. 2004. Morphology of arbuscular mycorrhizal roots and effects of root age and soil texture on the mycorrhizal infection in *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Ginseng Res.* 28:149-156.
- Lee, J., Lee, S. and Young, J. P. W. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65:339-349.
- Lee, J., Park, S. H., and Eom, A. H. 2006. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungal spores collected in Korea. *Mycobiology* 34:7-13.
- Lee, J. E. and Eom, A. H. 2009. Effect of organic farming on spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil. *Mycobiology* 37:272-276.
- Park, S. H., Eo, J. K., Ka, K. H., and Eom, A. H. 2011. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of woody plants in Mt. Munan. *Kor. J. Mycol.* 39:1-6.
- Sanders, I. R. and Fitter, A. H. 1992. Evidence for differential responses between host-fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. *Mycol. Res.* 96:415-419.
- Smith, S. E. and Read, D. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*: UK: Academic Press.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- van der Heijden, M. G. A. and Sanders, I. R. 2002. *Mycorrhizal Ecology*. Springer, Berlin.
- van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A. and Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol. Ecol.* 7:879-887.
- Westover, K. M., Kennedy, A. C. and Kelley, S. E. 1997.

- Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *J. Ecol.* 85:863-873.
- Whitbread, F., Peterson, R. L. and McGonigle, T. P. 1996. Vesicular-arbuscular mycorrhizal associations of American ginseng (*Panax quinquefolius*) in commercial production. *Can. J. Bot.* 74:1104-1112.
- Zeuske, D. and Weber, H. C. 2000. Growth stimulation of *Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliaceae) arising from AMF-isolate inoculation. *Symbiosis* 29:213-230.