

식물 근권토양에서 분리한 수지상균근균

이은화¹ · 이정윤¹ · 아주경^{1,2} · 가강현³ · 엄안흠^{1*}¹한국교원대학교 생물교육과, ²국립생태원, ³산림과학원

Notes on Some Unrecorded Species of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Collected from Rhizospheres of Plants in Korea

Eun-Hwa Lee¹, Jeong-Yoon Lee¹, Ju-Kyeong Eo^{1,2}, Kang-Hyeon Ka³ and Ahn-Heum Eom^{1*}¹Korea National University of Education, Cheongju 363-791 Korea²Bureau of Basic Ecological Research, National Institute of Ecology, Seoecheon 325-813, Korea³Division of Wood Chemistry and Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

ABSTRACT : In this study, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were isolated and cultivated from rhizospheres of various plants in Korea. Five species belonging to four genus were identified based on spore morphology and 18S rDNA sequence analysis: *Acaulospora cavernata*, *Claroideoglossum luteum*, *Diversispora aurantium*, *D. trimurales*, *Rhizophagus irregularis*. These fungal species have not been cultivated or reported to date in Korea. Morphological description and phylogenetic analysis for each species were presented. This result could be useful for research of AMF diversity in Korea.

KEYWORDS : *Acaulospora*, *Claroideoglossum*, *Diversispora*, *Glomeromycota*, *Rhizophagus*

서 론

수지상균근(arbuscular mycorrhizas)은 식물과 균류 사이의 공생 관계에 있어서 가장 대표적인 형태 가운데 하나이다[1]. 수지상균근을 형성하는 균은 모두 Glomeromycota 문에 속하는 것으로 알려져 있으며, 전 세계적으로 현재 240여종의 수지상균근균이 기록되어 있으나 현재까지 국내에서는 90여종이 보고되었다. 그러나 그 중 대부분은

야외 토양에서 추출한 포자의 형태적 특징을 이용하여 종을 동정하였다. 수지상균근균의 형태적 동정에 이용할 수 있는 형질의 수가 많지 않고, 형질의 특징이 불분명하기 때문에 포자의 형태를 이용한 종 수준의 동정에는 많은 어려움이 있다. 특히 야외 토양에서 수집한 포자는 대부분 포자의 외관이 손상되어 형태적 특징을 뚜렷하게 관찰하기 어려워 과거에 보고된 국내 수지상균근균에 관해서는 배양체를 통한 형태적, 분자생물학적 동정 결과가 보완되어야 할 것으로 보인다. 그러나 수지상균근균은 식물과의 공생 관계를 통해서만 생장이 가능하기 때문에 현재까지 이 균의 단독 배양이 불가능한 점도 수지상균근균의 연구의 제한점이다. 그러나 생태계에서 수지상균근균의 역할과 생태적 중요성을 생각해 볼 때, 토양의 중요 미생물인 수지상균근균을 수집하고 배양하여 순수 균주를 확보하는 것은 수지상균근균의 생물적 특성을 파악할 뿐만 아니라 식물과 수지상균근균의 공생 관계를 이해하는데도 중요한 과제이다. 본 연구에서는 우리나라의 다양한 지역으로부터 식물근권에서 토양을 수집하여 식물과 함께 배양한 후, 5속 8종의 형태적 특징을 기재하고 분자생물학적 종 동정을 수행하였다.

Kor. J. Mycol. 2014 December, 42(4): 306-311
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.4.306
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

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

Received December 16, 2014
Revised December 22, 2014
Accepted December 22, 2014

©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.

재료 및 방법

토양채취 및 배양

근권 토양의 수집은 경상북도과 충청남도 지역에서 수행하였다. 채집지역에서 다양한 기주식물과 기주식물의 근권 토양을 수집하였다. 기주식물의 뿌리가 상하지 않도록 조심하여 채집한 후 근권 토양을 1 kg 정도 함께 채취하여 밀폐 가능한 비닐백에 함께 옮겨 담아 실험실로 옮겨왔다. 실험실로 가져온 야외 토양은 121°C에서 20분간 멸균한 모래와 1:1의 부피로 섞어 포트에 옮겨 담아 다양한 수지상균근균에 감염될 수 있는 식물로 알려진 수수(*Sorghum bicolour*) 종자를 파종한 후 약 3개월간 일정한 온도의 배양실에서 배양하였다. 물은 1일 1회 충분히 급수하였다. 3개월 후 기주식물과 수수가 충분히 자란 후 급수를 중지하고 4주간 자연 건조하였으며 건조가 끝난 후 4°C의 저온실에 토양을 저장한 후 포자 추출에 이용하였다.

포자추출

수지상균근균 포자의 추출은 wet sieving and sucrose density gradient centrifugation 방법 [2]을 이용하였으며 추출한 포자 중 포자의 크기, 색깔, 표면의 특징이 동일한 포자를 모아 순수배양에 이용하였다. 멸균한 모래를 깨끗한 포트에 옮겨 담고 무균 발아한 수수의 어린 식물을 옮겨 심었다. 이때 수수의 뿌리에 순수배양에 이용할 포자를 멸균수와 함께 마이크로 파이펫을 이용하여 부착시킨 후 옮겨 심고 3개월 간 일정한 온도 조건에서 배양하였다. 배양 기

간 동안 물은 1일 1회 급수하고 1/20 농도의 인산을 포함하는 Hoagland solution을 1주일에 1회 200 mL 공급하였다 [3]. 3개월 후 수수의 뿌리를 trypan blue로 염색하여 수지상균근균 감염 여부를 확인하고 [4], 감염이 확인된 포트의 토양은 멸균한 모래와 섞어 다시 대량 배양에 이용하였다.

포자의 형태적 특징을 이용한 동정

대량배양에 성공한 종은 슬라이드 표본을 제작하여 각 종의 형태적 특징을 관찰하였다. 슬라이드 글라스에 포자를 두 그룹으로 나누어 모아놓고 한쪽에는 PVLG(polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol)를, 그리고 다른 쪽에는 PVLG와 Melzer's reagent를 1:1로 섞은 고정액을 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮고 적당한 압력을 주어 포자를 깨뜨리고 슬라이드 표본을 제작하였다. 슬라이드 표본은 광학현미경 (AXIO Imager. A1, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하면서 포자벽의 수와 구조, 포자벽 표면 장식(ornament) 및 부착 균사의 유무와 특징을 관찰하여 기재하였다 [5-8].

rDNA염기서열을 이용한 계통분석

정확한 동정을 수행하기 위해 각 포자의 18S rDNA 염기서열을 분석하였다. 육안상 깨끗한 포자를 골라 0.2 mL의 PCR 튜브에 옮겨 담아 포자를 파쇄한 후 nested PCR을 수행하였다 [9]. 1차 PCR은 universal 프라이머인 NS1/NS4를 이용하였고 1차 PCR 반응물을 1/10으로 희석하여 2차 PCR의 주형으로 사용하였다. 2차 PCR은 수지상균근균 특이 프라이머인 AML1/AML2를 이용하였고 2차 PCR 반응

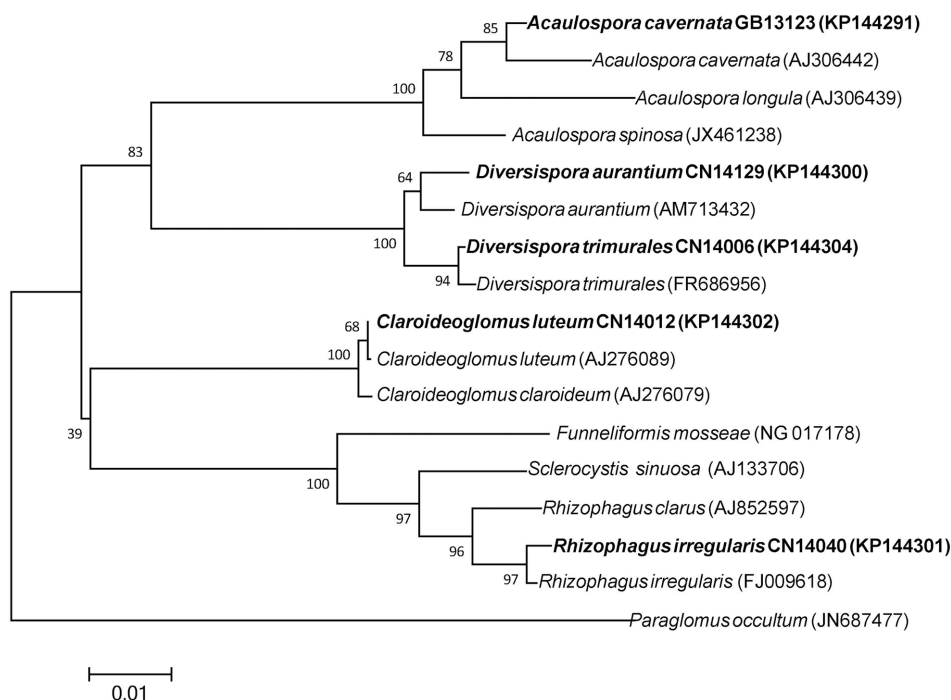


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree for partial 18S rDNA sequence of arbuscular mycorrhizal fungal spores in this study. Numbers at nodes indicate bootstrap support (1,000 replicates). Bold letters indicate the sequences from this study.

물을 1.5% agarose gel상의 전기 영동(100V, 25분)을 이용하여 약 780 bp의 PCR 반응물을 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea). 염기서열 정보는 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 일치도가 가장 높은 종을 확인하였다. 확인된 종들에 대한 염기서열을 NCBI로부터 내려 받아 MEGA 5를 이용하여 alignment한 후 유연관계 계통도를 작성하여 종을 동정하였다[10].

결과 및 논의

본 연구에서 4속 5종의 수자상균근균을 동정하였다: *Acaulospora cavernata*, *Claroideoglossum luteum*, *Diversispora aurantium*, *D. trimurales*, *Rhizophagus irregularis* 18S rDNA를 이용하여 계통분석을 수행하였으며(Fig. 1), 각 종의 포자의 형태적 특징은 아래와 같다.

Acaulospora cavernata Blaszsk.

연한 갈색-갈색 빛을 띠는 회색을 띠는 포자를 형성한다(Fig. 2). 이 종의 포자들은 해부현미경 하에서도 *Acaulospora spinosa*의 포자처럼 표면이 사포와 같은 거친 느낌을 준다. 포자벽에는 특이한 형태의 홈이 있는데(Fig. 2A), 이런 홈을 갖는 다른 *Acaulospora* 속 포자들에 비해 *A. cavernata*의 홈은 상대적으로 크기가 크다. *A. cavernata*는 3개의 벽으로 구성된 포자벽(SW)과 두 개의 발아벽(GW1, GW2)으로 구성되어 있다(Fig. 2B and 2C). 첫 번째 포자벽 L1은 시간이 지남에 따라 분해되어 사라지기도 한다. L2는 여러 층의 벽이 매우 가깝게 겹쳐 있는 laminate층인데, L2의 표면에 규칙적인 홈이 존재한다. GW1은 거의 하나로 붙어 있는 것처럼 보이는 2개의 층(L1, L2)으로 구성되며 GW2는 세 개의 층(L1, L2, L3)으로 구성되어 있다. GW2의 첫 번째 층(L1)은 표면이 고르지 못한 울퉁불퉁한 층이고 두 번째 층(L2)은 상대적으로 두꺼운 유리질 층이다.

가장 안쪽의 세 번째 층(L3)은 거친 표면을 가지며 Melzer's reagent에 검붉은색으로 반응하는 약간 단단한 벽이다(Fig. 2C). 관찰표본은 GB13123이며 경북 문수산의 팔배나무(*Sorbus alnifolia*) 근권에서 분리하였다.

Claroideoglossum luteum (Kenn., Stutz & Morton) Walker & Schüßler

포자의 색은 옅은 노란색이나 옅은 갈색 빛을 띤 노란색이다(Fig. 3). 포자의 형태는 거의 대부분이 구형이며 직경은 60~180 μm 이다. 포자벽은 4개의 벽(L1, L2, L3, L4; Fig. 3B)으로 구성되며 이 벽들은 모두 함께 붙어 있지만 포자에 압력을 주어 깨트리면 L4는 다른 벽들과 분리되기도 한다. 어린 포자에서는 주로 L1, L2층만 존재하다가 성숙하면서 점차 나머지 층들이 순서대로 형성되고, L1, L2층은 점차 사라지기도 한다. *C. luteum*의 포자벽들은 Melzer's reagent에 의한 염색 반응은 나타나지 않는다. L4는 발아벽처럼 보이기도 하지만 발아과정에서 역할을 하지는 않는 것으로 보인다. L1, L2, L3는 부착균사와도 연결되어 있지만 L4는 폐쇄적인 구조를 갖는 것으로 보인다. *C. claroideum* 및 *Rhizophagus clarus*와 포자의 형태가 유사하나 포자벽의 비교를 통해 이들을 구분할 수 있다. 관찰표본은 CN14012이며, 충남 원산도에서 서식하는 광릉개밀(*Agropyron yezoense*) 근권에서 분리하였다.

Diversispora aurantium (Błaszk., Blanke, Renker & Buscot) Walker & Schüßler

어린 포자는 흰 빛에 가까운 노란색이지만 성숙한 포자는 진한 오렌지 색이나 금빛을 띠는 노란색이다(Fig. 4). 포자벽은 3개의 벽(L1, L2, L3; Fig. 4C)으로 구성된다. 가장 바깥의 L1은 유연하고 부드러운 PVLG 상에서 부풀어 오르기도 한다. L1에는 토양 내 유기물들이 붙어 있어 지저분해 보이기도 한다. L2는 흰 빛이나 금 빛을 띠는 노란색이며 L3와 밀착되어 있어 잘 떨어지지 않는다. *D. aurantium*

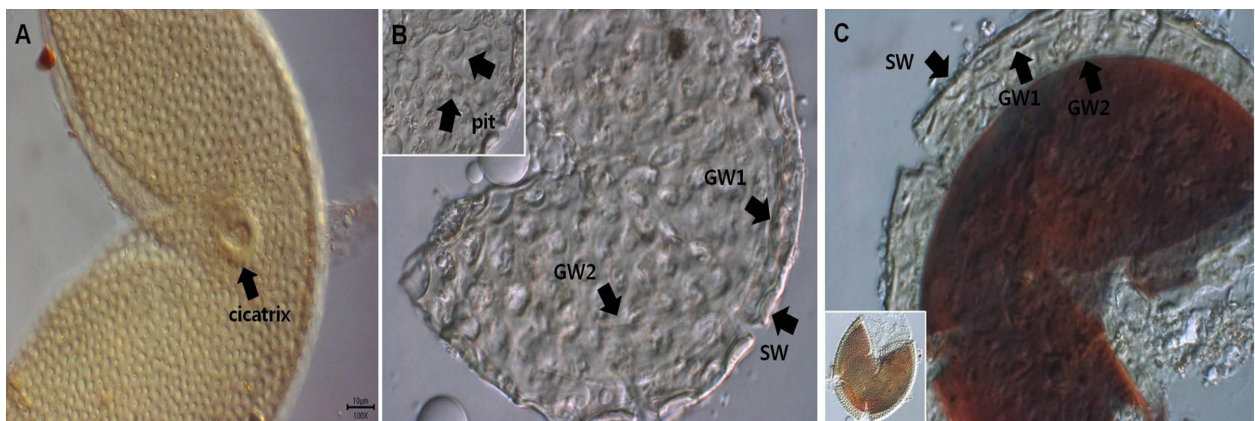


Fig. 2. *Acaulospora cavernata* (CN14101). A, B, spores in PVLG; C, spore in Melzer's reagent. GW: germination wall, SW: spore wall.

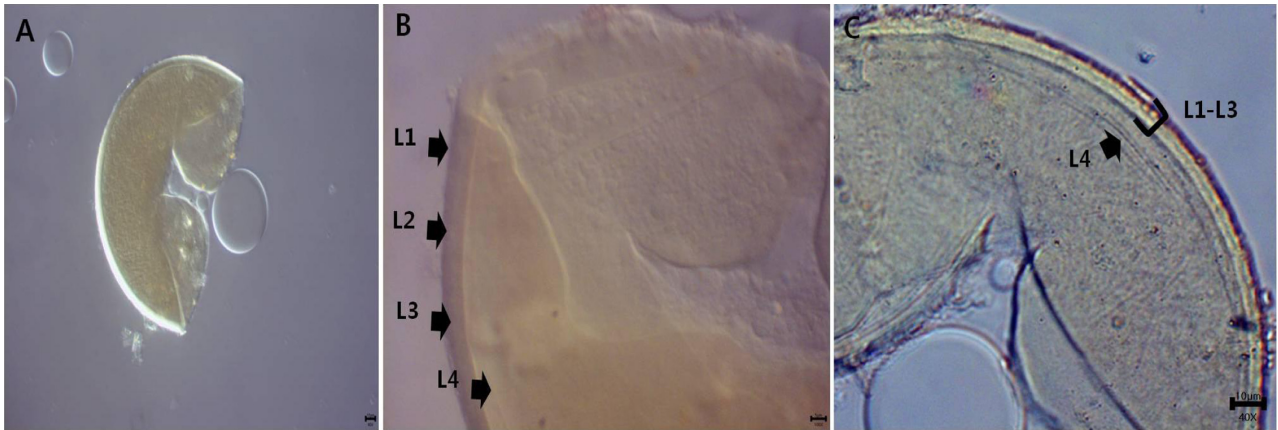


Fig. 3. *Claroideoglomus luteum* (CN14012). A, spore in PVLG; B, C, spore wall structure. L1~L4 indicate each layers of spore wall.

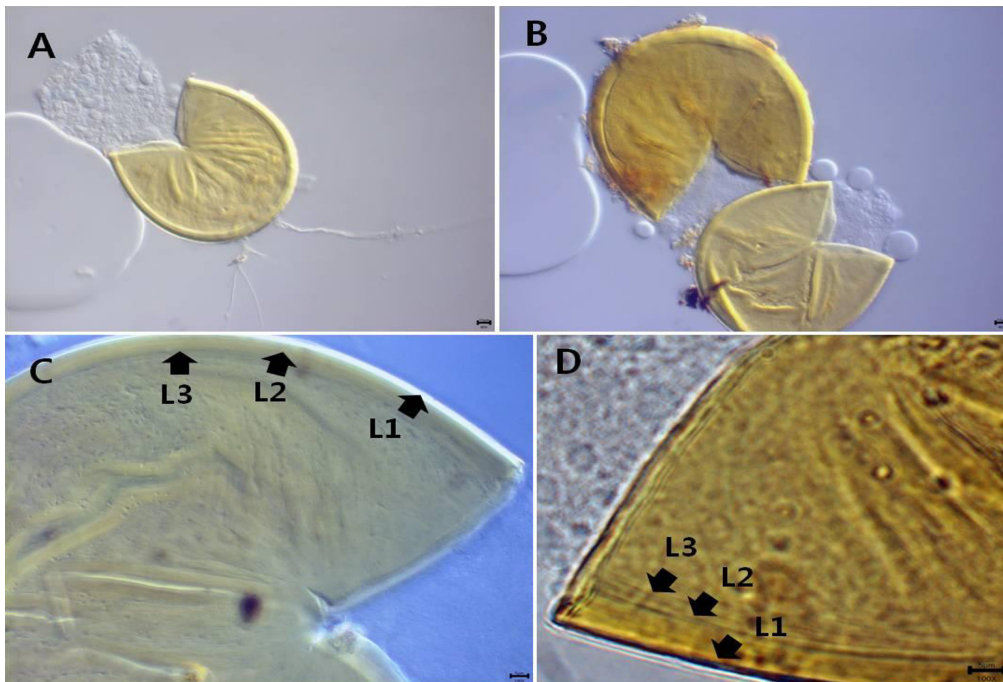


Fig. 4. *Diversispora aurantium* (CN14129). A, B, spore and subtending hyphae; C, D, spore wall structure. L1~L4 indicate each layers of spore wall.

의 포자벽들은 Melzer's reagent에서 반응하지는 않는다. 부착균사는 원통형 혹은 부풀어 오른 모양으로 곧거나 뒤로 휘어가며 뻗어나간다. 부착균사의 벽은 기저부에서 포자의 3개의 벽과 이어져 있다. 관찰균주는 CN14129이며, 충남 대난지도에 서식하는 초파나무(*Zanthoxylum bungeanum*)의 근권에서 분리하였다.

***Diversispora trimurales* (Koske & Halvorson) Walker & Schüßler**

포자는 토양 내에서 독립적으로 형성되며 옅은 노란색이

나 옅은 황갈색을 띠고 포자의 형태는 거의 구형이나 타원 형에 가깝다(Fig. 5). 포자벽은 3개(L1, L2, L3; Fig 5C)로 구성된다. 가장 바깥쪽 벽인 L1은 여러 겹의 층으로 구성된 laminate 벽으로 연한 노란색-노란 빛을 띠는 갈색을 띤다. L3 역시 매우 얇은 층들로 이루어져 있으나 경계가 희미하거나 불분명한 경우가 있어 하나의 층으로 보이기도 한다. 부착균사는 대개 곧게 뻗거나 부착지점에서 약간 수축되어 있으며 옅은 노란색을 띤다. 부착균사의 벽과 포자 벽의 세 개의 벽은 서로 이어져 있다. 관찰균주는 CN14006이며, 충남 대천에 서식하는 쥐똥나무(*Ligustrum obtusifol-*

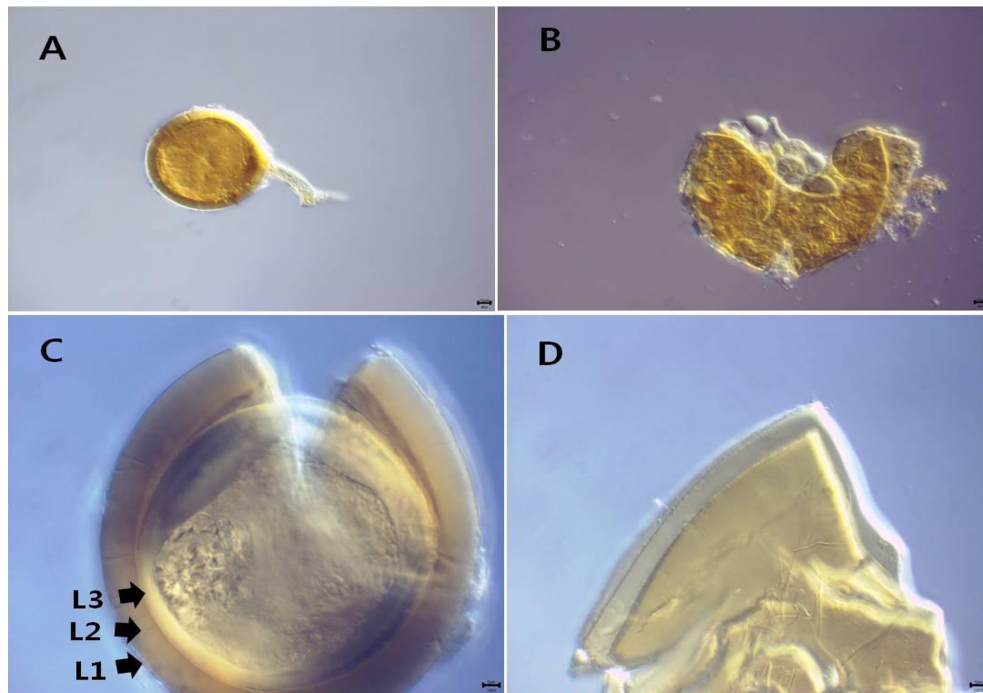


Fig. 5. *Diversispora trimurales* (CN14129). A, B, spores in PVLG. C, D, spore wall structure. L1~L3 indicate each layers of spore wall.

lium)의 근권에서 분리하였다.

Rhizophagus irregularis (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) Walker & Schüßler

포자의 색은 투명하거나 연한 갈색을 띤다(Fig. 6). 포자는 독립적으로 혹은 cluster로 함께 발생하기도 하지만 식물의 뿌리 내부에서도 발생한다. 포자의 형태는 대부분 구형이나 일부는 타원형이나 불규칙하게 울퉁불퉁한 형태를 갖기도 한다. 포자벽은 세 개의 벽(L1, L2, L3; Fig. 6Band 6C)으로 이루어진다. 가장 바깥쪽의 L1은 포자가 성숙하면 사라지며 Melzer's reagent에서 반응하지 않는다. L2와 L3는 포자가 성숙하면서 순차적으로 형성되는데, L3는 Melzer's reagent에서 진한 붉은색-검붉은색으로 염색된다(Fig. 6D). 부착균사는 대개 원통형이나 나팔형(flared)이며 3개의 포자벽이 부착균사까지 이어져 있다. 부착균사의 L3가 Melzer's reagent에서 반응하여 진한 붉은색-검붉은색으로 염색된다. *R. intradices*와 형태적으로 매우 유사하여 비교적 최근 새롭게 동정되었다[11]. 포자벽의 구조는 유사하지만 *R. intradices*의 L1이 Melzer's reagent에 반응하여 붉은색으로 염색되는데 비해 *R. irregularis*는 L3가 염색되기 때문에 서로 구분 가능하다. 관찰균주는 CN14040이며, 충남 삼시도에 서식하는 쥐뚝나무(*Ligustrum obtusifolium*)의 근권에서 분리하였다.

수지상균근균의 생물자원으로서의 높은 중요성에도 불구하고 인공배양의 어려움 때문에 수지상균근균의 연구에 많

은 제한점을 갖고 있다. 하지만 지속적으로 수지상균근균을 수집하고 배양하는 것은 국내 생물자원의 확보뿐만 아니라 친환경 농업기술의 개발이나 훼손된 지역의 생태적 복원기술개발을 위해서도 반드시 필요한 과정이다. 현재까지 국내에는 전 세계적으로 기록된 수지상균근균 가운데 일부만이 보고되었으며, 단일 종 배양은 거의 없는 실정이다. 따라서 유용한 생물자원으로서의 수지상균근균 이용 가치를 높이고 국내 산림 생태계에서의 수지상균근균의 다양성과 기능을 이해하기 위해 수지상균근균의 수집·분류와 배양기술의 개발이 시급하다고 생각된다. 최근의 생물 다양성에 대한 높은 관심은 미개척 생물군에 이르기까지 확장되고 있는 실정이다. 따라서 이와 같은 순수배양을 통한 균주의 수집은 생물자원 확보 및 생물주권에 기여할 수 있으며, 응용 분야에도 긍정적인 파급효과를 생산할 수 있기 때문에 지속적인 관심과 연구가 필요하다.

적 요

본 연구에서는 우리나라 목본식물의 근권에서 수지상균근균을 분리하여 배양하였다. 형태 및 18S rDNA 염기서열 분석을 통해 총 4개 속 5개 종의 수지상균근균을 동정하였으며 이들 균은 현재까지 국내미기록종이다; *Acaulospora cavernata*, *Claroideoglossum luteum*, *Diversispora aurantium*, *D. trimurales*, *Rhizophagus irregularis*. 각 종의 형태적 특징 및 계통관계를 제시하였다. 본 연구는 우리나라 수지상균

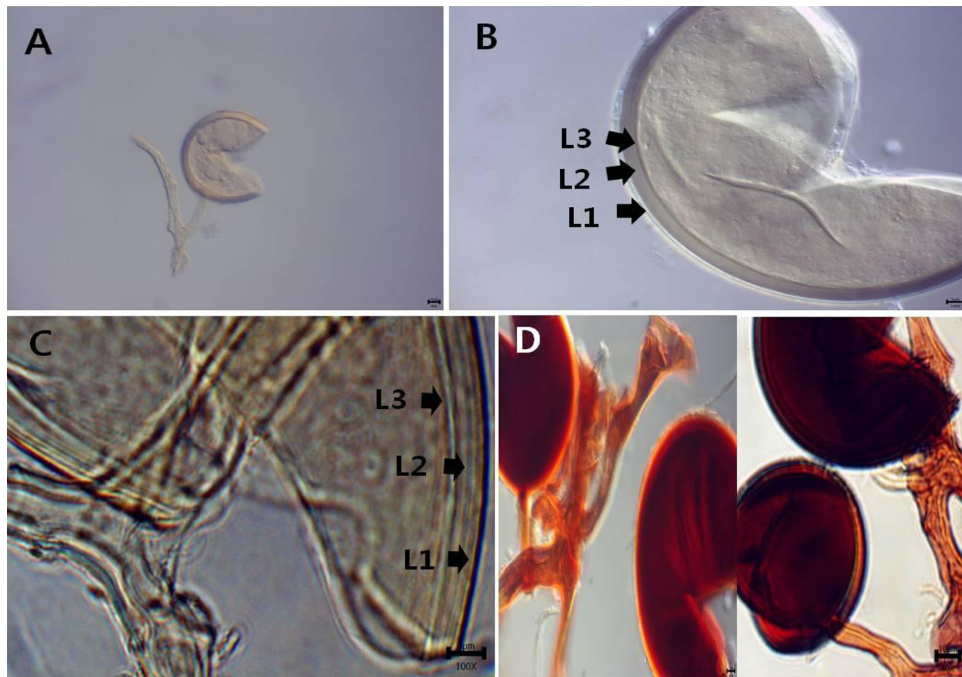


Fig. 6. *Rhizophagus irregularis* (CN14040). A, spore and subtending hyphae; B, C, spore structure in PVLG; D, spores and subtending hyphae in Melzer's reagent. L1~L3 indicates each layers of the spore wall.

근균의 다양성 연구에 유용할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국립산림과학원 (FP0801-2010-01)과 환경부 국립생물자원관의 지원을 받아 수행된 연구의 결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Smith S, Read D. Mycorrhizal symbiosis. 3rd. Academic Press, San Diego; 2008.
2. Daniels BA, Skipper HA. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schenck NC, editor. Methods and principles of mycorrhizal research. St. Paul, Minn: American Phytopathological Society; 1982. p. 29-35.
3. Millner P, Kitt D. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 1992;2:9-15.
4. Koske R, Gemma J. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. Mycol Res 1989;92:486-8.
5. Gerdemann JW, Trappe JM. The endogonaceae in the Pacific Northwest: New York Botanical Garden in collaboration with the Mycological Society of America; 1974.
6. Morton JB. Variation in mycorrhizal and spore morphology of *Glomus occultum* and *Glomus diaphanum* as influenced by plant host and soil environment. Mycologia 1985;192-204.
7. Morton J. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. Mycotaxon 1988;32:267-324.
8. Morton JB. Three new species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from high aluminum, low pH soils in West Virginia. Mycologia 1986;641-8.
9. Lee J, Lee S, Young JPW. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol Ecol 2008;65:339-49.
10. 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.
11. Stockinger H, Walker C, Schüßler A. '*Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. New Phytol 2009;183: 1176-87.