

폐광산 지역의 근권 토양에 분포하는 수지상균근균 포자의 다양성

박혁¹ · 이은화¹ · 가강현² · 엄안흠^{1*}

¹한국교원대학교 생물교육과, ²국립산림과학원 화학미생물과

Spore Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in a Post-mining Area in Korea

Hyeok Park¹, Eun-Hwa Lee¹, Kang-Hyeon Ka² and Ahn-Heum Eom^{1*}

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

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

ABSTRACT : In this study, we investigated the spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in rhizospheres of a post-mining area and a natural forest area in Jecheon, Korea. The rhizospheres of the post-mining areas were dominated by *Acaulospora mellea*, while those of the natural forest area were dominated by *Ambispora leptoticha*. The number of AMF spores in rhizospheres of the post-mining area was significantly higher than that in the rhizospheres of the natural forest area. Although the diversity index of each area showed no significant difference, the community similarity of AMF within the rhizospheres of natural forest area was significantly higher than that observed within those of post-mining area. These results showed that AM fungal communities in rhizospheres could change because of the degree of disturbance.

KEYWORDS : AMF, Diversity, Glomeromycota, Mining, Mycorrhizas

서 론

수지상균근균(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)은 육상 식물과 공생 관계를 이루는 가장 대표적인 균근균이다 [1]. 선태식물에서 중차식물에 이르기까지 80% 이상의 다양한 육상식물이 AMF와 공생하여 수지상균근을 형성하는 것으로 알려져 있다 [2]. 수지상균근을 형성함으로써 AMF는 기주식물의 무기 양분, 그 중에서도 인산의 흡수 능력을

증가시키고, 식물 뿌리 병원체에 대한 저항성을 제공하며 수분 및 염분 스트레스, 중금속 오염 등에 대한 내성을 증가시키는 대신 기주식물로부터 광합성 산물을 공급받는다 [3]. 따라서, 식물과 수지상균근의 공생은 일반적인 산림 토양 내의 생태계뿐만 아니라 해안 사구나 사막 등 척박한 환경의 토양 혹은 교란이 심한 광산, 벌목지 등의 토양 생태계에서 식물의 생존과 적응에 매우 중요한 요인이 된다 [4, 5].

한국에는 약 5,000여 개의 크고 작은 광산들이 존재하며, 이 중 40% 정도에 해당하는 2,000여 개는 금속광산이고, 나머지는 비금속광산 및 탄광이다 [6]. 2,000여 개의 금속광산 중 대부분은 폐광 및 휴광 이후에 적절한 주변환경 복구 조치가 실행되지 않아 주변의 생태계에 영향을 주고 있다. 특히 폐금속 광산은 방치된 광산 채굴장비들뿐만 아니라 선광 과정에서 남은 폐석들과 제련 중에 방출된 폐수 등에 함유된 중금속 성분으로 인해 토양 오염이 심각한 상태이다.

교란으로 인해 양분이 부족한 토양에 존재하는 AMF는 비옥한 토양에 존재하는 AMF 보다 식물에 인을 효과적으로 전달한다고 알려져 있으며 [7], 이러한 이유로 척박한 토

Kor. J. Mycol. 2016 June, 44(2): 82-86
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.2.82>
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

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

Received June 13, 2016
Revised June 22, 2016
Accepted June 28, 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.

양 생태계에서 서식하는 식물과 AMF의 공생은 식물이 생존하는 데 있어 매우 중요한 요인으로 생각된다. 또한 식물 군집의 측면에서 볼 때, 토양 내 AMF의 종 구성과 종 다양성은 식물 군집의 밀도와 군집 구조를 결정하는 잠재적인 요인이 될 수 있다[8]. 이와 같은 AMF의 생태적인 가치를 고려할 때, 중금속 오염으로 인한 인위적인 교란이 가해졌던 지역인 폐광산 지역의 토양에서 AMF의 종 다양성을 확인하고 교란이 상대적으로 덜한 일반 산림 토양과의 군집의 차이를 조사하는 것은 중요한 과제로 생각된다. 본 연구에서는 충북 제천 지역의 폐광산 지역을 대상으로 폐광산 지역 토양 내 AMF의 군집 구조를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

기주식물 및 근권 토양의 수집은 2015년 5월 충북 제천 서보 광산 주변에서 이루어졌다. 서보 광산은 충북 제천시 수산면 계란리(N36°55'33.3", E128°13'25.6")에 위치하는 폐광된 광산으로, 텅스텐의 원료가 되는 중석을 채굴하다가 1970~80년 사이에 폐광되었다. 폐광산 지역 근권토양의 수집은 광미로부터 반경 20 m 내의 토양에서, 일반 산림 지역 근권토양의 수집은 광미에서 200 m 정도 떨어진 산림 토양에서 대상법(belt transect method)을 이용하여 수행되었다. 폐광산 지역 토양 10점과, 일반 산림 지역 토양 10점을 채집하였다. 토양 내 중금속 성분의 분석을 위해 채집한 20개의 토양 샘플에서 각각 100 g씩을 이용하여 토양 내 중금속 성분을 분석하였다.

채집된 야외 토양은 실험실에서 건조한 후 건조된 토양 10 g에서 포자를 추출하였다[9]. 추출한 포자는 현미경 상에서 형태적 특성을 관찰하였다. 포자벽의 수와 구조 및 두께, 부착근사, 표면에 나타나는 무늬 등을 관찰하여 형태적 동정을 하였다[10]. 또한 건조한 포자를 골라 genomic DNA를 뽑은 후에 2차래의 nested polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 1차 PCR은 universal primer인 NS1/NS4를 이용하였으며[11], 1차 PCR 후 1.5% agarose gel 상에서 22분간 전기 영동한 후 밴드를 확인하여 밴드가 선명하게 표시된 PCR 산물을 2차 PCR의 주형으로 이용하였다. 2차 PCR은 AMF 특이적인 primer인 AML1/AML2를 이용하여 진행하였으며[12] 2차 PCR이 끝난 후에 다시 한번 1차 PCR 산물과 같은 조건으로 전기 영동을 하여 밴드를 확인하고 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열은 NCBI의 BLAST를 이용하여 일치도가 가장 높은 종을 기준으로 분자생물학적 동정

을 실시한 후 MEGA5 프로그램을 이용하여 유연관계 계통도를 작성하였다[13]. 근권 내 AMF 포자 군집 분석을 위해 상대 수도와 빈도, Shannon 다양성 지수, AMF 군집 내 및 군집 간의 유사도 지수를 계산하고[14], nonmetric multidimensional scaling (NMS) 분석을 수행하였다[15].

결과 및 고찰

폐광산 지역과 산림 지역 토양의 중금속 성분을 분석한 결과, 폐광산 지역 토양에서 비소(As), 카드뮴(Cd), 납(Pb), 아연(Zn) 등 4가지의 중금속 성분 함량이 산림 지역 토양보다 높은 수치를 보이는 것으로 나타났다(Table 1).

총 20개의 근권 토양 중 폐광산 지역 토양에서는 4속 7종, 일반 산림 지역 토양에서는 3속 6종의 AMF 포자가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1, Table 2). 전체 포자의 개수는 일반 산림 지역 근권보다 폐광산 지역 근권에서 높게 나타났다. 또한 포자의 상대 수도 및 빈도를 계산하여 종합적으로 비교한 결과, 폐광산 지역 근권에서는 *Acaulospora mellea*가 우점하는 것을 확인하였고, 일반 산림 지역 근권에서는 *Ambispora leptoticha*가 우점하는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 관찰된 AMF 포자들 중 *Diversispora aurantia*의 경우에는 폐광산 지역 근권에서만 발견되었고, 일반 산림 지역 근권에서는 특히 *Am. leptoticha*의 상대 수도가 폐광산 지역 근권에 비해 유의미한 수준으로 높게 나타나는 것을 확인하였다.

Shannon's index와 species evenness는 두 지역에서 유의미한 차이가 보이지 않았으나(Table 2), 군집의 유사도 지수의 경우에는 산림 지역의 근권 토양이 폐광 지역의 근권 토양보다 유의미하게 높았으며($p < 0.05$), 두 지역 간 근권의 유사도는 폐광 지역 근권 토양의 유사도에 비해 낮은($p < 0.05$) 것으로 나타났다(Fig. 2). AMF 군집 사이의 유사도를 NMS 분석을 수행하여 비교한 결과, 일반 산림 근권 토양의 AMF 군집은 서로 근거리에 모여서 위치하는 반면, 폐광산 지역 근권 토양의 AMF 군집은 서로 멀리 떨어져 위치하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

국내에서 진행된 대부분의 AMF 관련 연구는 경작지 토양이나 일반 산림 토양에서 이루어진 것이 많으나[14, 16-18], 본 연구에서는 강한 수준의 인위적 교란이 가해졌던 장소인 폐광산 지역 근권에서 AMF의 분포를 확인하였다. 폐광산 지역이 일반 산림 지역보다 AMF 포자 수가 많은 것은 교란이 있었던 척박한 환경에서 중금속에 대한 내성과 높은 양분 흡수 능력을 제공하는 AMF의 장점으로 인해

Table 1. Heavy metal contents in soils of post-mining areal and natural forest

Soil sampling area	Heavy metal component (mg/kg, mean $\pm$ SE)			
	As	Cd	Pb	Zn
Post-mining area	14.18 $\pm$ 0.43	0.49 $\pm$ 0.02	3.80 $\pm$ 0.11	35.63 $\pm$ 1.07
Natural forest area	5.26 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.01	1.98 $\pm$ 0.06	12.22 $\pm$ 0.37

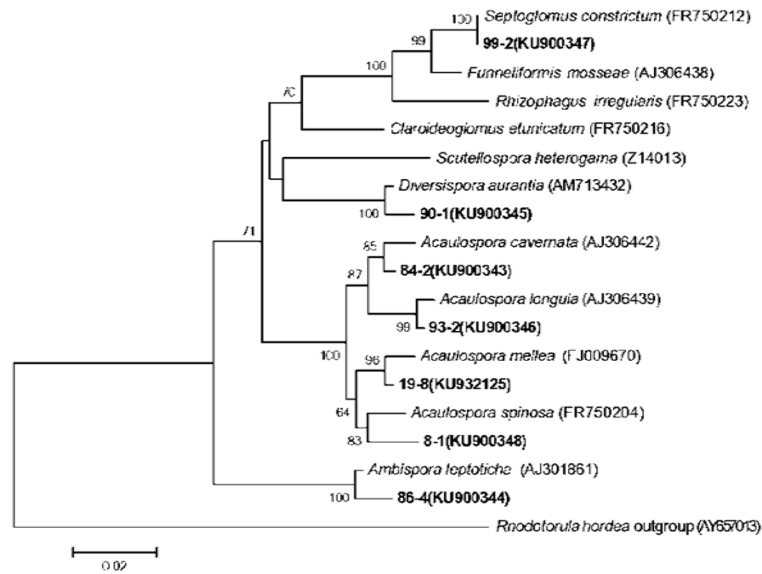


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree for partial 18S rDNA sequence of arbuscular mycorrhizal fungal spores in this study. *Rhodotorula hordea* was used as an outgroup and bootstrap values (> 50) were shown at the nodes. Bold characters indicate fungal strains isolated in this study.

Table 2. Relative abundance of arbuscular mycorrhizal fungal spores in this study

AMF species	Relative abundance (Mean ± SE)		P value
	Post-mining area	Natural forest area	
<i>Acaulospora cavernata</i>	9.61 ± 3.60	2.20 ± 1.48	0.09
<i>A. longula</i>	5.46 ± 4.32	1.95 ± 0.80	0.43
<i>A. mellea</i>	34.20 ± 4.90	22.58 ± 3.63	0.07
<i>A. spinosa</i>	11.85 ± 3.68	17.59 ± 5.06	0.37
<i>Ambispora leptoticha</i>	17.99 ± 4.88	42.13 ± 6.05	0.01
<i>Diversispora aurantia</i>	11.76 ± 3.22	0	0.00
<i>Septoglomus constrictum</i>	9.09 ± 4.01	13.55 ± 3.95	0.44
Shannon's index	1.28 ± 0.08	1.17 ± 0.07	0.27
Species evenness	0.92 ± 0.24	0.86 ± 0.23	0.06
Number of spores	31.50 ± 6.34	22.20 ± 2.34	0.18
Number of species	4.10 ± 0.28	4.00 ± 0.30	0.80

식물이 AMF와 공생 관계를 보다 많이 형성하기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 해외에서는 중금속에 의해 오염된 토양에서 식물과 AMF와의 공생이 중요하다는 연구 결과들이 보고되었다[19, 20].

두 지역의 근권에서 근권 내 유사도의 차이가 발생하는 것은 폐광산 지역의 AMF 군집이 교란에 의해 변화가 일어났다는 것을 의미한다. 폐광산 지역 근권 토양의 높은 중금속 함량이 토양 내 AMF 군집 구조를 결정하는 요인으로 작용한 것이다[21]. 즉, 일반 산림 지역의 토양과 폐광산 지역의 토양이 받는 교란의 차이로 인해 이러한 유사도의 차이가 나타나는 것으로 보여진다. 즉, 교란의 수준에 따라

근권 토양 내 AMF의 군집 구조가 달라진다고 볼 수 있다 [22].

국내의 선행 연구에 따르면 우리나라의 산림 토양에서는 *Acaulospora*속과 *Ambispora*속에 의한 우점 현상이 나타난다[14, 16]. 본 연구의 결과에서도 일반 산림 지역의 근권 토양에서는 *Am. leptoticha*가 우점하여 근권 토양 AMF 군집 내의 유사도가 높게 나타났으나, 폐광산 지역-일반 산림 지역 토양의 AMF 군집 간 유사도가 일반 산림 지역 AMF 군집 내의 유사도보다 유의미한 수준으로 낮은 것으로 보아, 폐광산 지역 근권 토양이 일반 산림 토양과는 다른 AMF 군집 구조를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

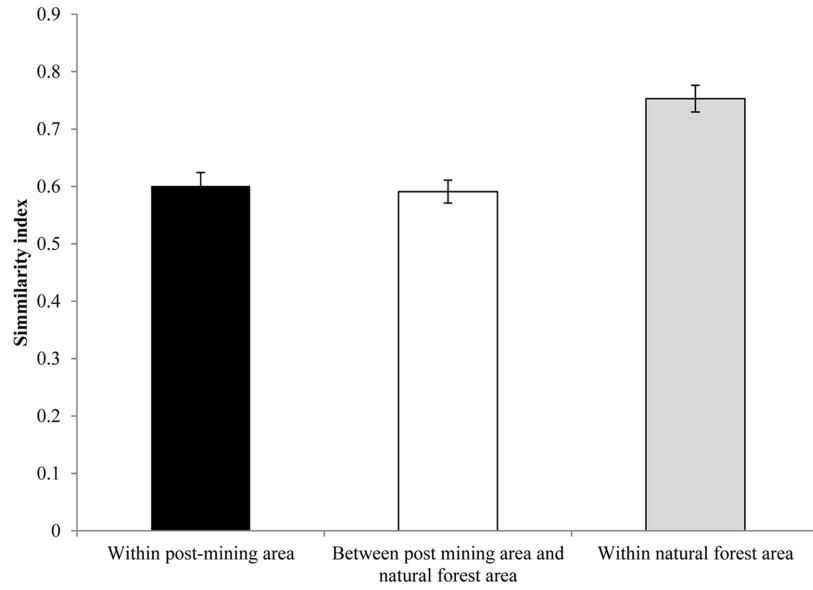


Fig. 2. Similarity index (Mean $\pm$ SE) of arbuscular mycorrhizal fungal communities in study sites ($p < 0.05$).

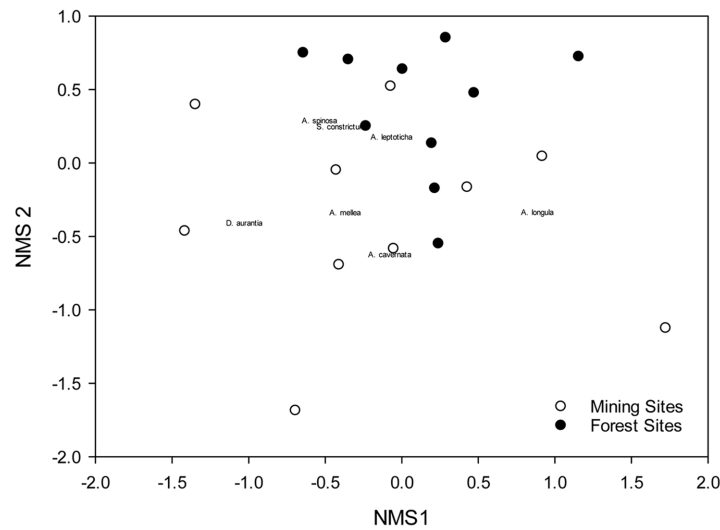


Fig. 3. Non-metric multidimensional scaling (NMS) plots of the arbuscular mycorrhizal fungal communities. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) species and communities in different sampling sites are shown.

단, 두 지역 근권 토양의 AMF 군집을 전체적으로 보았을 때 속 수준에서 *Acaulospora*속이 우점하며, *A. mellea*의 경우 폐광산 지역에서는 중 수준의 우점을 보이고 일반 산림 지역에서도 *Am. leptoticha* 다음으로 높은 빈도로 발견되는 것으로 보아, *Acaulospora*속에 속하는 종들은 교란의 정도와 관계없이 산림토양에 가장 널리 분포하는 것으로 보여진다. 이전의 연구 결과에 따르면, *Acaulospora* 속에 속하는 종들은 분포하는 토양의 pH에 관계없이 넓은 범위의 pH 조건 하에서 서식할 수 있으며, 양분이 부족한 토양 내 근

권에서도 다른 AMF 종에 비해 많이 분포한다는 보고가 있다[23]. 또한 *Acaulospora* 속에 속하는 종이 교란된 환경에서도 보편적으로 많이 발견된다는 연구 결과 역시 존재한다[24].

인위적으로 교란이 가해진 곳의 AMF 군집에 변화가 일어나는 현상에 대한 연구는 생태계의 종 다양성과 군집 구조 변화의 확인에 있어 매우 중요한 측면 중 하나이다. 국내 연구에서도 이러한 교란, 특히 경작으로 인한 토양 내 AMF 군집의 변화에 초점을 맞춘 연구들이 존재한다[17,

18, 25]. 그러나 농업 외에도 국내의 토양 생태계에 교란을 주는 인위적 요인은 본 연구에서 제시된 폐광이나 벌목지, 간척지 등 상당수 존재하며, 아직까지 명확하게 AMF의 군집 구조가 밝혀지지 않은 지역이 남아 있다. 따라서 본 연구와 같이 인위적인 교란이 가해진 토양 지역에서 AMF 군집의 구조가 변할 수 있음을 밝히는 연구는 국내 생태계의 근권 토양 AMF의 다양성에 대해 보다 수준 높은 접근을 위한 초석이 될 수 있음을 시사한다.

적 요

충북 제천의 폐광산 지역의 근권 토양과 인근 일반 산림 지역의 근권 토양을 수집하여 토양 내의 수직상균근균 (AMF)의 다양성 및 군집 구조를 확인하였다. 폐광산 지역의 근권 토양은 *Acaulospora mellea*, 일반 산림 지역의 토양은 *Ambispora leptoticha*가 우점하는 것을 확인하였다. 군집 구조를 분석한 결과, 폐광산 지역의 근권 토양에서 일반 산림 지역의 근권 토양보다 AMF 포자 수가 많은 것을 확인하였고, 두 지역의 종 다양성 지수에는 유의미한 차이가 존재하지 않았으나 일반 산림 토양의 군집 내 유사도 지수가 폐광산 지역의 근권 토양보다 유의미한 수준으로 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구는 교란의 차이에 의해 AMF의 군집이 달라질 수 있음을 보여준다.

REFERENCES

- Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. New York: Academic Press; 2008.
- Wang B, Qiu YL. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 2006;16:299-363.
- Newsham KK, Fitter AH, Watkinson AR. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends Ecol Evol* 1995;10:407-11.
- Willis AJ. Coastal sand dunes as biological systems. *Proc R Soc Edinb Biol Sci* 1989;96:17-36.
- Miller RM. Some occurrences of vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural and disturbed ecosystems of the Red Desert. *Can J Bot* 1979;57:619-23.
- Mine Reclamation Corporation. Yearbook of MIRECO statistics (2012). Seoul: Mine Reclamation Corp; 2013.
- Henkel TW, Smith WK, Christensen M. Infectivity and effectiveness of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from contiguous soils in southwestern Wyoming, USA. *New Phytol* 1989;112:205-14.
- van der Heijden MG, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 1998;79:2082-91.
- 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. 29-35.
- Gerdemann JW, Trappe JM. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Bronx: Published by the New York Botanical Garden in collaboration with the Mycological Society of America; 1974.
- Jacquot E, van Tuinen D, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. *Plant Soil* 2000;226:179-88.
- Lee J, Lee S, Young J. 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.
- 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.
- Bainard L, Koch AM, Gordon AM, Newmaster SG, Thevathasan NV, Klironomos JN. Influence of trees on the spatial structure of arbuscular mycorrhizal communities in a temperate tree-based intercropping system. *Agric Ecosyst Environ* 2011;144:13-20.
- Park SH, Eo JK, Ka KH, Eom AH. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of woody plants in Mt. Munan. *Kor J Mycol* 2011;39:1-6.
- Lee SW, Lee EH, Eom AH. Effects of organic farming on communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycobiology* 2008;36:19-23.
- Kil YJ, Eo JK, Eom AH. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mey.) seedlings. *Kor J Mycol* 2013;41:81-4.
- Javaid A. Importance of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. In: Khan MS, Zaidi A, Goel R, Musarrat J, editors. *Bio-management of metal-contaminated soils*. New York: Springer; 2011. p. 125-41.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 2007;68:139-46.
- Long LK, Yao Q, Guo J, Yang RH, Huang YH, Zhu HH. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with five selected plant species from heavy metal polluted soils. *Eur J Soil Biol* 2010;46:288-94.
- Violi HA, Barrientos-Priego AE, Wright SE, Escamilla-Prado E, Morton JB, Menge JA, Lovatt CJ. Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentrations but not fungal spore composition in montane rainforests in Veracruz and Chiapas, Mexico. *For Ecol Manage* 2008;254:276-90.
- Maia LC, Trufem SF. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils in Pernambuco State, Brazil. *Rev Bras Bot* 1990;13:89-96.
- da Silva DK, Coutinho FP, Escobar IE, de Souza RG, Oehl F, Silva GA, Cavalcante UM, Maia LC. The community of arbuscular mycorrhizal fungi in natural and revegetated coastal areas (Atlantic Forest) in northeastern Brazil. *Biodivers Conserv* 2015;24:2213-26.
- Lee JE, Eom AH. Effect of organic farming on spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil. *Mycobiology* 2009;37:272-6.