

RESEARCH NOTE

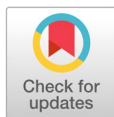
청미래덩굴의 근권에서 분리된 2종의 Glomeromycota
미기록종박혁¹, 가강현², 엄안흠^{1*}¹한국교원대학교 생물교육과²국립산림과학원 산림소득자원연구과Two Unreported Glomeromycota Fungi
Isolated from Rhizospheres of *Smilax china*Hyeok Park¹, Kang-Hyeon Ka², Ahn-Heum Eom^{1*}¹Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea²Special Forest Products Division, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

*Corresponding author: eomah@knue.ac.kr

ABSTRACT

We isolated fungal spores belonging to the phylum Glomeromycota from the rhizospheres of *Smilax china*, cultured in a greenhouse. We identified the isolated spores using sequence analysis of 18S partial rDNA region, internal transcribed spacer and 28S rDNA regions. We confirmed 2 unreported spores of Glomeromycota fungal species, *Diversispora eburnea* and *Paraglomus laccatum*. Here, we described the morphological characteristics and results of phylogenetic analysis of the confirmed species.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, *Diversispora eburnea*, *Paraglomus laccatum*



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2019 September, 47(3): 275-80
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190032>

Received: August 20, 2019

Revised: September 24, 2019

Accepted: September 25, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



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.

Glomeromycota문에 속하는 균류는 일반적으로 식물의 근권(rhizosphere) 토양 내에서 무성 포자로 존재하다가 식물의 뿌리를 만나면 뿌리 피층 세포 속으로 균사를 침투시켜 수지상균근(arbuscular mycorrhiza)을 형성하여 공생 관계를 이루며[1], 이렇게 수지상균근을 형성하는 균류를 수지상균근균(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)이라고 한다. Glomeromycota에 속하는 종들은 cyanobacteria와 공생하는 *Geosiphon pyriformis* 한 종을 제외하고는[2] 모두 식물과 수지상균근을 형성하고 있으며, 균류의 동정은 주로 AMF가 형성하는 무성 포자의 형태적, 분자적 분석을 통해 수행된다. Phylum Glomeromycota가 2001년 C. Walker와 A. Schüßler에 의해 Zygomycota로부터 단계통으로 분리된 이래[3] 전 세계적으로 300여 종의 AMF가 현재까지 기록되었으나[4], 현재 우리나라에서는 그 3분의 1인 100여종 정도의 AMF만이 기록되어 있으며, 단독 배양이 어렵고 식물과의 공생을 통해서만 생장이 가능한 AMF의 특성으로 인해 대부분 배양되지 않은 야외 토양에서 AMF 포자의 형태적 특성만을 이용한 동정이 주로 수행되어 왔다[5, 6]. 따라서 AMF 포자의 정확한 생물적 특성을 파악하기 위해서는 배양된 토양에서 AMF의 분리가 필요하고, 형태적 특성과 더불어 분자적인 분석이 병행되어야 한다. 본 연구에서는, 온실에서 배양된 토양에서 포자를 분

리하던 중 확인된 국내 미기록종 Glomeromycota 균류 포자 2종의 형태적 특성 및 분자적 분석 결과에 대해 서술하고자 한다.

연구에 사용된 근권 토양의 수집은 충북 제천의 구진산(N37°04'47.0", E128°13'35.4")과 경남 산청의 백마산(N 35°19'24.6", E127°58'08.3") 일대에서 이루어 졌다. 백합과의 식물인 청미래덩굴 (*Smilax china* L.)의 근권에서 토양을 채취하였으며, 근권 토양은 기주식물의 뿌리에서 10cm 이상 깊이로 파내어 500~1,000g 정도를 채집하였다. 채집된 토양은 기주식물과 함께 폴리에틸렌 백에 담아 밀봉한 후 24시간 내에 실험실로 운반하였다. 포자의 증식을 위해 야외토양과 121°C로 20분간 멸균된 모래를 1:1의 비율로 섞은 뒤, 원 기주식물인 청미래덩굴과 더불어 수수(*Sorghum bicolor*)명명자를 기주식물로 하여 포트에 담아 온실에서 3개월 이상 1일 1회 급수하면서 배양하였다[6]. 배양이 끝난 후 자연건조 시킨 토양에서 10g씩을 덜어내어 wet sieving 방식으로 균류의 포자를 추출하였다[7]. 추출된 포자는 해부현미경 및 광학현미경 상에서 관찰하여 형태적 특성을 확인하였다. 해부현미경 상에서 형태가 비슷하게 확인되는 포자를 그룹으로 구분하여 슬라이드 글라스에 올려 놓고 고정 및 염색 용액인 PVLG(polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol)와 Melzer's reagent를 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮고 적당한 힘을 주어 포자를 깨뜨려 광학현미경(AXIO Imager A1, Carl Zeiss, Germany) 상에서 포자의 크기, 형태, 표면 등[8, 9]을 관찰하였다(Fig. 1).

형태적 특성으로 구분된 포자들 중 건강한 포자를 0.2ml tube에 한 개씩 넣고 깨뜨려 genomic DNA를 추출한 뒤 분자적 분석을 위해 특이 프라이머인 AML1, AML2를 이용하여 18S partial rDNA영역을 Polymerase Chain Reaction(PCR)로 증폭하였으며, annealing 온도는 58°C로 설정하여 수행하였다[10]. 보다 정확한 종의 동정을 위해 Glomeromycota의 DNA barcoding에 이용되는, 18S rDNA의 일부와 internal transcribed spacer(ITS) 영역, 그리고 28S rDNA의 일부 영역을 포함하는 Krüger fragment[11]의 1500bp 길이의 DNA절편을 증폭하였다. PCR과정은 nested PCR로 2회에 걸쳐 진행되었으며, 1차 PCR은 SSUmAf, LSUmAr 프라이머를 이용하였고, annealing 온도는 60°C로 설정하여 수행하였다[11]. 1차 PCR 산물을 1/10로 희석한 DNA를 2차 PCR의 template DNA로 사용하였으며, 2차 PCR은 SSUmCf, LSUmAr 프라이머를 이용하였고 annealing 온도는 63°C로 설정하여 수행하였다[11]. PCR이 완료된 후 agarose gel에서 20분간 전기영동하여 1500bp 부근의 염기서열 단편을 확인하여 DNA 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열은 미국 국립생물정보센터(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)상에서 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)하여 일치도가 가장 높은 종을 확인하고, MEGA7 프로그램을 이용하여[12] neighbor-joining phylogenetic tree를 작성하였다. 연구에 이용된 균주의 DNA 염기서열은 NCBI의 GenBank에 제출하여 등록번호를 획득하였다.

***Diversispora eburnea* (L.J. Kenn., J.C. Stutz & J.B. Morton) C. Walker & A. Schüßler, The Glomeromycota: a species list with new families and new genera: 43 (2010)**

온실에서 배양된 청미래덩굴의 근권 토양에서 분리되었다. 포자는 토양 내에서 단독으로 형성되고, 해부현미경 상에서 전체적인 형태는 불규칙한 구형 혹은 계란형으로 확인된다. 포자의 크기는 40~120 µm 정도이며, 포자의 색은 투명한 흰색 혹은 아이보리색에 가깝다(Fig. 1A). 포자벽은

L1과 L2의 두 hyaline 층으로 이루어지며, 포자를 깨뜨렸을 때 두 벽이 서로 떨어지지 않는다. 포자의 가장 바깥쪽에 있는 L1층에는 이물질이 많이 달라붙어 있어 지저분한 느낌이며, Melzer's reagent에서 별다른 반응이 확인되지 않는다(Fig. 1B, 1C). L2층은 laminae층으로 되어 있는 경우도 간혹 확인되고, 부착 균사(substending hyphae)는 확인되지 않는다.

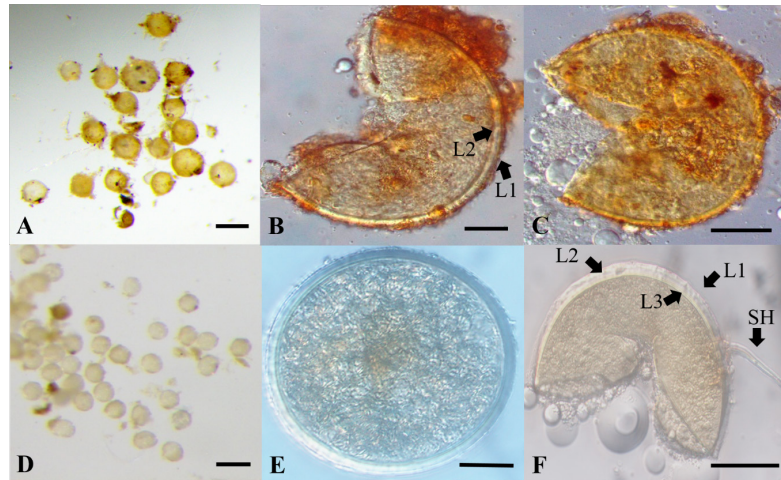


Fig. 1. Spores of *Diversispora eburnea*(A), in polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol (PVLG)(B), in Melzer's reagent(C). Spores of *Paraglomus laccatum*(D), in PVLG(E), in Melzer's reagent(F). (scale bars: A, D = 100 μ m; B, C, E, F = 20 μ m).

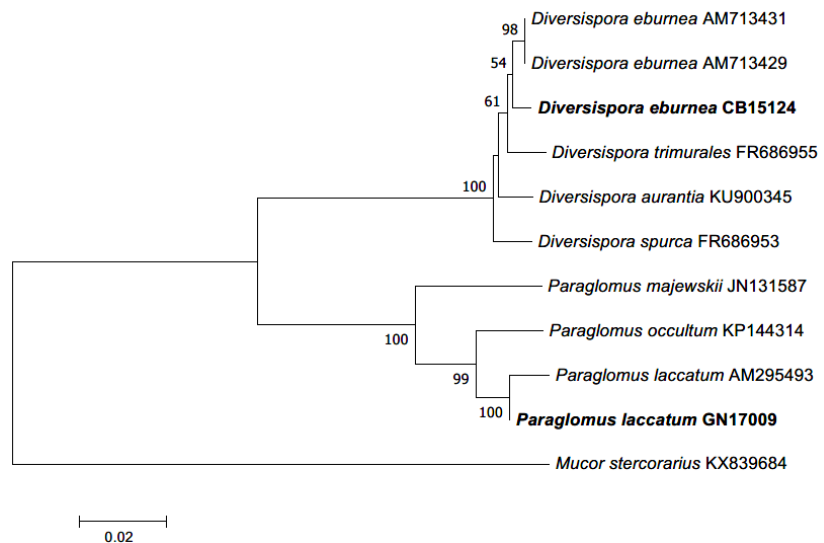


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial 18S rDNA sequences. *Mucor stercorearius* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strains isolated in this study are in bold.

Specimen examined: Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea, N37°04'47.0", E128°13'35.4", September 16, 2015, *Diversispora eburnea*, isolated from cultured rhizosphere, with *Smilax china* and *Sorghum bicolor*, strain CB15124, GenBank No. MN006953(18S partial rDNA), MN517119(18S partial/ITS/28S partial rDNA).

Notes: *D. eburnea*는 2010년 C. Walker & A. Schüßler에 의해 수정된 종명으로, 원 기재문에 명명된 종명은 *Glomus eburneum*(1999)이다. 상아색(ivory)을 뜻하는 라틴어 'eburneus'에서 종소명이 유래 되었으며[13], 18S rDNA의 분자적 분석 결과에 기반하여 *Glomus*에서 *Diversispora*로 속이 변경되었다[14]. 투명한 흰색 혹은 옅은 상아색의 구형 포자(40~140 µm)를 토양 내에서 단독으로 형성하고 두꺼운 두 층의 포자벽을 갖고 있는 것이 특징이며[13], 본 연구에서 확인된 포자의 색과 크기, 포자벽의 구조는 원 기재문의 *D. eburnea*에 대한 기술과 대부분 일치하였다. DNA 염기서열 분석 결과 18S rDNA 지역의 염기서열은 *D. eburnea* AM713431.1과 99.05%의 일치도를, Krüger fragment의 DNA 염기서열은 *D. eburnea* AM713412.1과 99.43%의 일치도를 보였으며 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 3).

***Paraglomus laccatum* (Blaszk.) Renker, Blaszk. & Buscot, Nova Hedwigia 84 (3-4): 400 (2007)**

온실에서 배양된 청미래덩굴의 근권 토양에서 분리되었다. 포자는 토양 내에서 단독으로 발생하며, 대부분 구형의 hyaline이고 드물게 타원형이며 무색 투명하고 광택이 있다(Fig. 1D). 해부현미경 상에서 포자 안에 기름방울이 차 있는 것을 확인할 수 있으며, 포자의 크기는 50~100 µm 정도로 매우 작은 포자를 형성한다. 포자벽은 L1, L2, L3의 세 층으로 형성되는데, 무색 투명한 L1은 1 µm 이하로 매우 두께가 얇으며 성숙된 포자에서는 일반적으로 탈락되기도 한다. L2층은 5 µm 이상의 두꺼운 laminae층으로 이루어지며 Melzer's reagent에서 진한 베이지색 혹은 노란색으로 반응한다(Fig. 1E, 1F). 부착균사(SH)는 laminae층 안쪽의 L3에서부터 발생하며, 길쭉한 원통형으로 자란다(Fig. 1F).

Specimen examined: Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do, Korea, N 35°19'24.6", E127°58'08.3", September 14, 2017, *Paraglomus laccatum*, isolated from cultured rhizosphere, with *Smilax china* and *Sorghum bicolor*, strain GN17009, GenBank No. MN006954(18S partial rDNA), MN517120(18S partial/ITS/28S partial rDNA).

Notes: *P. laccatum*은 2007년 *Glomus laccatum*에서 종명이 수정되었다. 토양 내에서 단독으로 포자를 형성하며, 외부 균사(extra-radical hyphae)의 끝에서 출아하듯이 포자가 형성된다. 포자의 색은 투명하고 광택이 있으며, 대부분 구형이나 간혹 계란형도 존재하고 포자의 크기는 50~130 µm 정도이다[15]. 본 연구에서도 투명한 구형 혹은 계란형의 포자를 확인할 수 있었으며, 3층으로 되어 있는 포자벽 중 L2층이 laminae로 이루어져 있는 것이 원 기재문과 일치하였다. *Paraglomus*에 속하는 종들은 경작지, 중금속 오염 토양, 습지 등 다양한 교란 지역에서 분리되며[16], *P. laccatum* 원 기재문에서도 본 연구와 같이 포트에 배양된 토양에서 포자를 다수 형성한 것을 확인할 수 있었다[15]. DNA 염기서열 분석 결과 18S rDNA 지역의 염기서열은 *P. laccatum* AM295493.1과 98.53%의 일치도를, Krüger fragment의 DNA 염기서열은 *P. laccatum* FJ769330.1과 98.10%의 일치도를 보였으며 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 4).

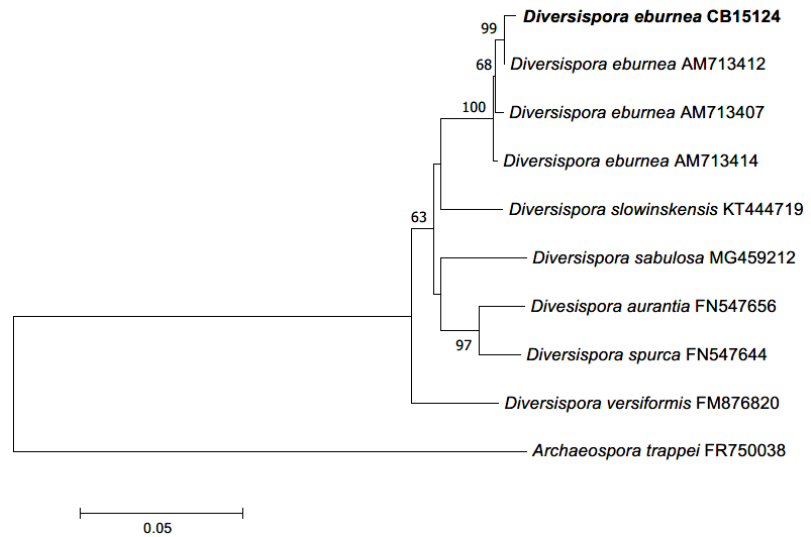


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree based on the Krüger fragment sequences. *Archaeospora trapei* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). The fungal strain isolated in this study is in bold.

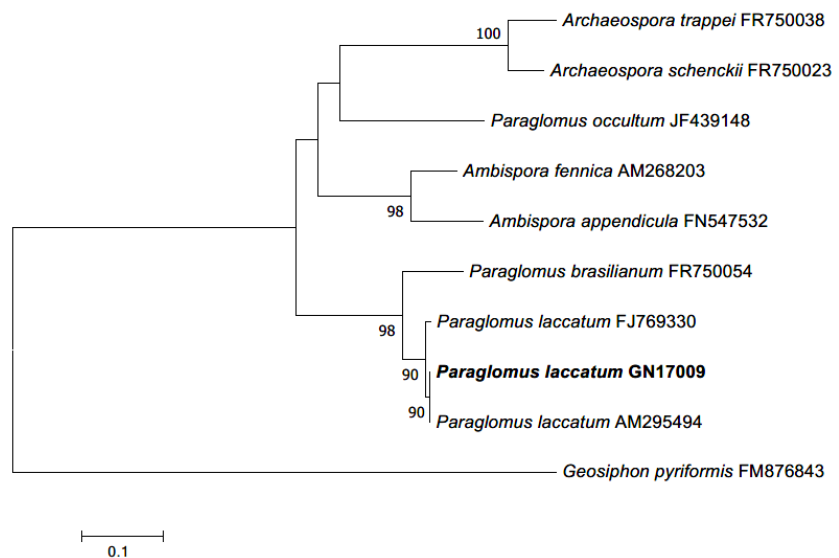


Fig. 4. Neighbor-joining phylogenetic tree based on the Krüger fragment sequences. *Geosiphon pyriformis* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). The fungal strain isolated in this study is in bold.

적 요

청미래덩굴의 근권 토양을 온실에서 배양하여 Glomeromycota에 속하는 균류의 포자를 분리하였다. 분리된 포자는 18S partial rDNA 영역의 DNA 염기서열 분석과, 더 정확한 동정을 위해 추가적으로 ITS 영역과 28S rDNA 영역까지 포함하는 Krüger fragment 지역의 염기서열을 분석하여 동정하였다. 동정 과정에서 2종의 국내 미기록종 Glomeromycota 균류의 포자를 확인하였으며, 확인된 종은 *Diversispora eburnea*, *Paraglomus laccatum*이다. 확인된 미기록종 포자의 형태적 특성 및 계통적 분석의 결과에 대해 기술하였다.

REFERENCES

1. Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. London: Academic Press; 2008.
2. Schüßler A. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. Diversity and Integration in Mycorrhizas: Springer; 2002. p. 75-83.
3. Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol Res 2001;105:1413-21.
4. Tedersoo L, Sánchez-Ramírez S, Koljalg U, Bahram M, Döring M, Schigel D, May T, Ryberg M, Abarenkov K. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. Fungal Divers 2018;90:135-59.
5. Eo JK, Park SH, Lee EH, Eom AH. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in Korea. Kor J Mycol 2014;42:255-61.
6. Lee EH, Lee JY, Eo JK, Ka KH, Eom AH. Notes on some unrecorded species of arbuscular mycorrhizal fungi collected from rhizospheres of plants in Korea. Kor J Mycol 2014;42:306-11.
7. Daniels BA, Skipper HA. Methods of 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.
8. Morton JB. Variation in mycorrhizal and spore morphology of *Glomus occultum* and *Glomus diaphanum* as influenced by plant host and soil environment. Mycologia 1985;77:192-204.
9. Trappe JM, Gerdemann J. The endogonaceae in the Pacific Northwest. 1974.
10. 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.
11. Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 2009;183:212-23.
12. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 2016;33:1870-4.
13. Kennedy LJ, Stutz JC, Morton JB. *Glomus eburneum* and *G. luteum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi, with emendation of *G. spurgum*. Mycologia 1999:1083-93.
14. Schüßler A, Walker C. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University; 2010. p. 19.
15. Renker C, Błaszkowski J, Buscot F. *Paraglomus laccatum* comb. nov.-a new member of Paraglomeraceae (Glomeromycota). Nova Hedwigia 2007;84:395-407.
16. de Mello CMA, da Silva GA, de Assis DMA, de Pontes JS, de Almeida Ferreira AC, Leão MPC, Vieira HEE, Maia LC, Oehl F. *Paraglomus pernambucanum* sp. nov. and *Paraglomus bolivianum* comb. nov., and biogeographic distribution of *Paraglomus* and *Pacispora*. J Appl Bot Food Qual 2013;86.