

광릉요강꽃과 복주머니란의 뿌리에 감염된 난균근균의 특성

심미영¹ · 염재영¹ · 정재민² · 이병천² · 구창덕³ · 엄안흠^{1*}

¹ 한국교원대학교 생물교육과, ² 국립수목원 산림자원보존과, ³ 충북대학교 산림학과

Characteristic of Orchid Mycorrhizal Fungi from Roots of *Cypripedium japonicum* and *C. macranthum*

Mi-Yeong Sim¹, Jaeyoung Youm¹, Jaemin Chung², Byungchun Lee², Chang-Duck Koo³ and Ahn-Heum Eom^{1*}

¹Department of Biology Education, Korea National University of Education, Chungbuk 363-791, Republic of Korea

²Department of Forest Resources Conservation, Korea National Arboretum, Gyeonggi 487-821, Republic of Korea

³Department of Forestry, Chungbuk National University, Chengju 361-763, Korea

(Received June 17, 2010. Accepted June 21, 2010)

ABSTRACT: Orchid mycorrhizal fungi(OMF) were examined in roots of the two threatened orchid species, *Cypripedium japonicum* and *C. macranthum*. The morphological characteristics of mycorrhizal colonization in the roots of two orchid species were observed. OMF colonized in the roots of two species were identified using molecular analysis. DNA from the root was extracted and amplified internal transcribed spacer(ITS) region using basidiomycete ITS primers, ITS1-OF and ITS4-OF. Four species belonging to *Tulasnellaceae* in roots of *C. japonicum* and two species of *Tulasnellaceae* and one basidiomycetous species was found in roots of *C. macranthum*.

KEYWORDS : *Cypripedium japonicum*, *Cypripedium macranthum*, OMF, Orchid mycorrhizal fungi, Peloton, *Tulasnellaceae*

난과는 세계적으로 25,000종 이상이 기록된 식물계에서 가장 큰 과 중의 하나이다(Cribb *et al.*, 1993). 그 중에서 복주머니란속(*Cypripedium*) 식물은 세계적으로 40여종이 분포하고 있으며, 우리나라에는 광릉요강꽃(*Cypripedium japonicum*), 복주머니란(*C. macranthum*), 털복주머니란(*C. guttatum*), 노랑복주머니란(*C. calceolus*) 등 4종 1변종이 보고되어 있으며(김과 이, 1997), 백두산 지역에는 꽃의 색이 다양한 변이체들이 보고되어 있다(이, 2006). 광릉요강꽃은 한국을 비롯한 중국 남부, 대만, 일본에, 복주머니란은 한국을 비롯하여 중국 북부, 일본, 캄차카 반도, 시베리아 및 동유럽에 분포하고 있다(Cash, 1991).

복주머니란속의 식물은 다른 난과 식물들에 비해 꽃이 크고 모양과 색깔이 독특하여 관상가치가 높으며, 자생식물의 재배에 대한 관심이 높아짐에 따라 남획에 의한 피해가 급증하고 있다. 또한 산림훼손과 지구 온난화는 자생지 파괴와 생태계를 변화를 일으켜 이들 식물들의 개체수 감소로 멸종위기에 처해 있다. 난과 식물의 종자는 영양분을 가진 배유가 없고 조직화되지 않은 세포로 구성되어 있기 때문에 자연 상태에서는 난균근균(orchid mycorrhizal fungi) 없이는 발아가 실질적으로 불가능하다(Smith and Read, 2008).

난과 식물은 일반적으로 난균근균과 공생관계를 맺고 있

는데, 이들은 탄소화합물 등의 양분을 난에게 공급하여 종자의 발아를 도와주고, 초기 엽록소 생성 및 생장에 영향을 주고 있어 둘 사이의 공생관계가 매우 중요하다고 여겨진다(Smith and Read, 2008). 난과 식물과 난균근균의 공생관계의 중요성 때문에 다양한 난과 식물들에서 난균근균이 연구되어 왔다. 난균근균의 대부분은 불완전세대인 *Rhizoctonia*에 속하며, 완전세대는 *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Tulasnella* 속으로 동정되고 있다(Sneh *et al.*, 1991). 그러나 난의 뿌리에서 분리 배양할 수 없는 *Rhizoctonia*가 아닌 담자균류에 속하는 난균근균의 존재가 알려지고 있으며, 이에 따라 뿌리에서 직접 분자생물학적 방법을 통한 난균근균의 동정이 필요한 실정이다(Zelmer, 1996).

복주머니란속에 속하는 두 종인 광릉요강꽃과 복주머니란은 산림청 지정 멸종위기식물(Critically Endangered; CR)이며(산림청 국립수목원, 2009), 광릉요강꽃은 환경부 특정 야생 식물 제40호로 지정되어 있을 뿐만 아니라 야생동식물 보호법에 따른 멸종위기식물 1급으로 지정되어 보호되고 있다. 이 종들은 멸종위기에 처해 있으며, 증식 및 발아가 매우 어렵고, 또한 종 보존에 대한 요구가 시급한 식물로, 이들 종에 공생하는 난균근균에 대한 연구 및 발아 조건, 생리적 특성, 자생 환경 등에 대한 연구가 시급하다. 특히 일본에서는 보호가 필요한 복주머니란속의 난과 난균근균과의 공생관계에 대한 다양한 연구가 진행되어 왔으나(Shimura *et al.*, 2009), 국내

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

에서는 이에 대한 연구가 거의 이루어지고 있지 않다. 따라서 난균근균과 난과 식물의 특이적 관계 상 위기에 처한 복주머니란과 광릉요강꽃의 보존 및 보호를 위해서는 난균근균에 대한 기초적인 연구가 필요하다. 본 연구는 멸종위기식물로 지정된 복주머니란속의 광릉요강꽃과 복주머니란에 공생하는 난균근균의 형태적 및 분자적 특성을 구명하여, 이들 두 난과 식물 종의 보존을 위한 기초자료로 활용하고자 수행되었다.

재료 및 방법

난균근의 관찰

경기도 포천시 국립수목원 주변에 서식하고 있는 광릉요강꽃 6개체와 복주머니란 5개체에서 뿌리를 채취하였다. 난의 뿌리는 2~3 cm 길이로 잘라 증류수로 여러 번 행군 후 다음과 같은 방법으로 염색하여 관찰하였다(Koske and Gemma, 1989). 각각의 뿌리 절편을 2.5% KOH 용액에 넣어 121°C에서 15분간 고압멸균하여 뿌리를 연화시킨 후 여러 번 물로 행군하여 KOH를 제거하였다. 1%의 HCl 용액에 24시간 담가둔 후, 0.05% trypan blue에 넣어 121°C에서 10분간 고압멸균하여 염색하고 acidic glycerol에서 탈색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

DNA 추출

난의 뿌리는 무작위적으로 선택하여 100 mg씩 나누어 멸균수로 깨끗이 씻어낸 뒤, 1.8 ml tube에 AP1 buffer 속에서 micropestle로 충분히 갈아 균질하게 만든 후, DNeasy Plant mini kit(GeneAll, Korea) 제품의 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 20 ng/ μ l로 농도를 맞춘 후 PCR 반응에 사용하였다.

PCR

실험에 사용된 PCR 반응액은 0.2 ml microtube에 Prime Taq DNA Polymerase 1 units/10 μ l, 2 \times reaction buffer, 4 mM MgCl₂, enzyme stabilizer, 칩강제, loading dye, 2 mM dNTP를 모두 혼합한 pH 9.0의 용액인 (주)GENET BIO사의 Prime Taq Premix(G-2000) 제품을 사용하였고, 담자균류에 특이적 primer인 ITS1-OF(5'-AACTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3')와 ITS4-OF(5'-GTTACTAGGGGAATCCTTGTT-3')를 쌍으로 사용하여 rDNA의 internal transcribed spacer(ITS) 지역을 증폭시켰다(Taylor and McCormick, 2008). Prime Taq Premix에 10 pM의 ITS1-OF primer와 ITS4-OF primer를 각각 2 μ l, 20 ng의 template DNA 2 μ l에 4 μ l의 멸균수를 넣어 전체 부피가 20 μ l이 되도록 맞춘 후 이를 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)를 이용하여 PCR 하였다. PCR의 반응 조건은 다음과 같다. 먼저 96°C에서 2분간 predenaturation 하였다. 다음으로 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation 하였고, 이 3단계를 1 cycle로 하여 총 35 cycles을 진행하였다. 마지막으

로 72°C에서 10분간 안정화시킨 다음, 전기영동하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 증폭된 PCR 산물은 1XTAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 1.5% agarose gel에서 약 20분간 전기영동을 실시하였으며, 0.5 mg/ml ethidium bromide로 1분간 염색하고 흐르는 물에서 5분간 탈색한 후 UV transilluminator 상에서 밴드를 확인하였다.

Cloning

PCR 반응물은 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 DNA band를 확인하고, insert로 사용할 700~800 bp의 DNA를 gel과 함께 오려내어 정제하였다. 이를 pGEM-T Easy Vector (50 ng/ μ l; Promega Co., USA)에 ligation하고, competent cell(Promega Co., USA)에 transformation하여 X-gal이 첨가된 LB 배지에 배양하였다. Transformation된 colony를 위해 LB/ampicillin 배지에 배양한 후, 배양액을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 DNA는 정제하여 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer(Perkin-Elmer, USA)에서 염기서열을 얻었다.

Sequence 분석 및 계통 분석

클로닝을 통해 얻은 난균근균의 염기서열은 BLAST를 통하여 가장 유사한 서열을 찾았다(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). 본 연구를 통해 얻은 난균근균의 염기서열은 NCBI에서 얻은 유사한 다른 서열과 함께 Clustal X(ver. 1.83)를 이용하여 align한 후 njplotWin95와 TreeView(ver. 1.6.6)를 이용하여 계통수로 나타내었다. 분석된 염기서열간의 유사도를 통해 계통을 추론하였으며, 이를 통하여 난균근균 간의 유연관계를 분석하였다. 계통도에서 각 분지의 신뢰도를 계산하기 위하여 실행한 bootstrap 분석은 1000 replicates를 선택하였고, 계통 분석을 위한 outgroup으로 목이(*Auricularia auricula-judae*)를 사용하였다.

결과 및 고찰

광릉요강꽃과 복주머니란의 뿌리 세포를 염색하여 관찰한 결과 두 난의 뿌리 세포에 난균근균이 공생하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 균사는 균구(peloton)를 형성하고 있었으며, 균구의 생성과 분해 단계가 다양하게 관찰되었다(Fig. 1). 그러나 현미경적 관찰을 통해 나타난 형태의 다양성이 서로 다른 균을 의미하는지를 판단할 수는 없었다. 따라서 본 연구에서는 뿌리에서 DNA를 추출하여 균 특이 프라이머를 이용하여 rDNA의 ITS 지역을 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 분자적인 분석은 배지에서 배양하기 어려운 균들의 분류를 돕고, 따라서 많은 연구자들이 난과 균 연합체의 생태학을 조사하는데 분자적인 분류 기술을 사용하고 있다(Dearnaley, 2007).

광릉요강꽃과 복주머니란의 뿌리에서 얻어진 총 11개 서열을 분자분석에 사용하였다. 대부분의 난균근균은 Tulasnellaceae

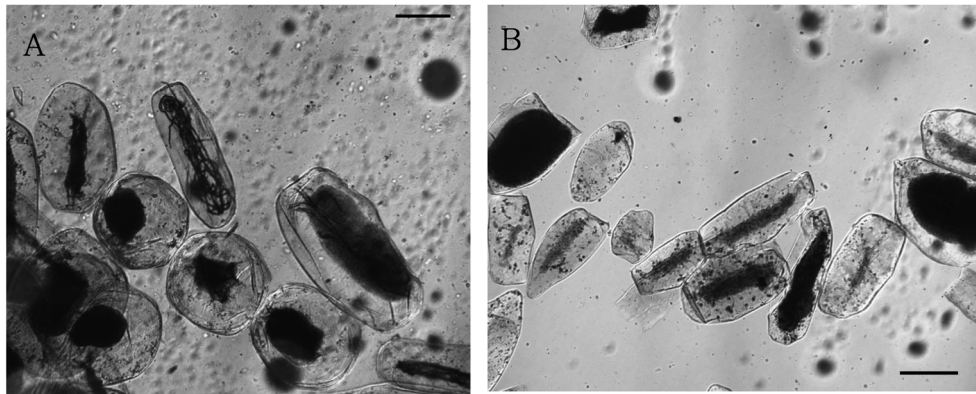


Fig. 1. Pelotons in root cells of *Cyripedium japonicum* (A) and *C. macranthum* (B). Bars, 100 μ m.

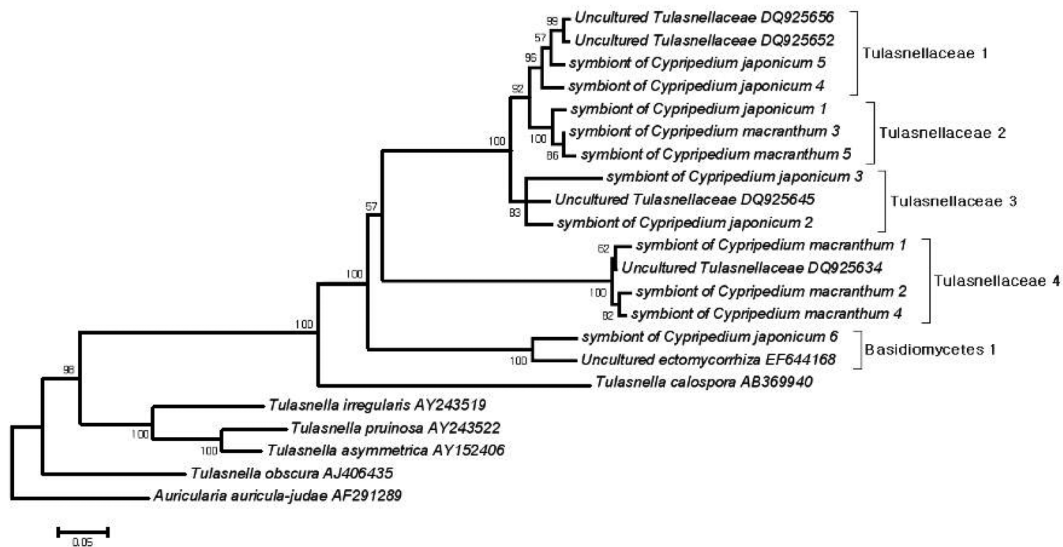


Fig. 2. Phylogenetic tree of orchid mycorrhizal fungi colonizing roots of *Cyripedium japonicum* and *C. macranthum* collected in Korea. *Auricularia auricula-judae* was used as an outgroup.

에 속하는 균으로 나타났으며, 광릉요강꽃에서는 추가로 외생 균을 형성하는 담자균류 1종(uncultured ectomycorrhiza)을 확인할 수 있었다(Table 1). 총 4종류의 Tulasnellaceae와 1종류의 담자균류가 동정되었다. 광릉요강꽃에 감염되어 있는 난균근균은 3종류의 Tulasnellaceae와 한 종류의 담자균류가 감염되어 있는 것으로 나타났으며, 복주머니란에는 2종류의 Tulasnellaceae가 나타났다. 한 종류의 균(Tulasnellaceae 3)만이 광릉요강꽃과 복주머니란 모두에서 나타났다. 이러한 결과는 몇몇 복주머니란에 속하는 종들의 nrLSU와 mtLSU의 서열을 기초로 한 연구(Shefferson *et al.*, 2005; 2007)에서 Tulasnellaceae에 속하는 균들과 강하게 연합되어 있다는 결론과 일치하는 것이다. 마찬가지로 이전의 다른 연구 결과에서도 복주머니란속에 속하는 종의 뿌리에서 Tulasnellaceae, Thelephoraceae, Sebacinaceae, Ceratobasidaceae와 같이 일반적인 난균근균이 발견되었으며, 특히 Tulasnellaceae에 속하는 균은 공통적으로 발견되는 것으로 알려지고 있다 (Smith and Read, 2008). 또한 이 식물들은 무당버섯류 같은 외생균근을 형성하는 버섯류와도 공생관계에 있다는 것이 보고되는데

Table 1. Molecular analysis of orchid mycorrhizal fungi colonizing roots of *Cyripedium japonicum* and *C. macranthum* collected in Korea

| Host species | Sample No. | Blast match | Accession No.(Similarity) |
|----------------------|------------|---|---------------------------|
| <i>C. japonicum</i> | 1 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925644 (97%) |
| | 2 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925645 (88%) |
| | 3 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925652 (91%) |
| | 4 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925652 (98%) |
| | 5 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925656 (93%) |
| | 6 | Uncultured ectomycorrhiza (Basidiomycota) | EF644168 (70%) |
| <i>C. macranthum</i> | 1 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925634 (97%) |
| | 2 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925634 (98%) |
| | 3 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925634 (98%) |
| | 4 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925656 (92%) |
| | 5 | Uncultured Tulasnellaceae | DQ925656 (93%) |

일반적으로 독립영양을 하는 난은 *Rhizoctonia* 형태의 균이 공생하는 반면 종속영양을 하는 난의 경우는 외생균근균과 공생하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 2종의 복주머니란속에 속하는 난과 식물들이 *Tulasnellaceae*와 관련되어 있다는 것을 확인할 수 있었으나 다른 종류의 *Rhizoctonia* 형태의 종은 발견되지 않았다. 또한 본 연구결과에서 광릉요강꽃에서 외생균근을 형성하는 균이 1종 발견되었으며 이 균과 광릉요강꽃과의 관련성에 관한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 특히 본 연구결과에서 나온 염기서열과 비교 가능한 Genbank 염기서열들은 대부분 뿌리 샘플로부터 얻어진 서열들이며, 따라서 종 수준에서 동정이 불가능하였다. 이들의 정확한 동정을 위해서는 뿌리로부터 균사를 분리, 배양하여 다양한 특성을 이용하여 분류학적 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서는 두 종류의 복주머니란속 식물에서 다양한 난균근균을 확인하였다. 따라서 본 연구결과와 더불어 이들 균을 분리 배양하여 두 종류의 난에서 종자의 발아, 원피체(protocorm)의 발달 및 성체의 생장에 특정 공생균이 미치는 영향을 확인하는 후속 연구는 위기에 처한 이들 난의 보존 및 복원 노력에 중요한 정보를 제공할 것이다.

적요

광릉요강꽃(*Cypripedium japonicum*)과 복주머니란(*C. macranthum*)의 뿌리에서 난 균근균이 확인되었다. 두 종의 난 뿌리에서 균근의 형태적인 특성을 관찰하였다. 분자적인 분석을 통하여 두 종의 뿌리로부터 난균근균을 확인하였다. 뿌리에서 DNA를 추출하여, 담자균류 ITS 지역에 특이적인 프라이머인 ITS1-OF와 ITS4-OF를 사용하여 ITS 지역을 증폭한 후 염기서열을 분석하여 두 식물의 뿌리에 공생하는 난균근균을 동정하였다. 광릉요강꽃의 뿌리에는 3종류의 *Tulasnellaceae*와 1종의 담자균류가 발견되었고, 복주머니란의 뿌리에서는 2종류의 *Tulasnellaceae*에 속하는 균이 발견되었다.

참고문헌

- 김수남, 이경서. 1997. 한국의 난초. 교학사. 서울.
 산림청 국립수목원. 2009. 한국 희귀식물 목록집. 지오북. 서울.
 이영노. 2006. 한국식물도감. 교학사. 서울.
 Cash., C. 1991. The slipper orchids. Christopher Helm A & C Black. London.
 Cribb, P. J., Lell, S. P., Dixon, K. W. and Barrett, R. L. 2003. Orchid conservation: a global perspective. Natural History Publication, Kota Kinabalu, Malaysia.
 Dearnaley, J. D. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17:475-486
 Koske, R. E. and Gemma, J. N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92:486-488.
 Shefferson, R. P., Taylor, D. L., Weiß, M., Garnica, S., McCormick, M. K., Adams, S., Gray, H. M., McFarland, J. W., Kull, T. and Tali, K. 2007. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* 61:1380-1390.
 Shefferson, R. P., Weiss, M., Kull, T. and Taylor, D. L. 2005. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Mol. Ecol.* 14:613-626.
 Shimura, H., Sadamoto, M., Matsuura, M., Kawahara, T., Naito, S. and Koda, Y. 2009. Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threatened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetically distinct fungi associated with the orchid. *Mycorrhiza* 19:525-534.
 Smith, S. E. and Read, D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, NY.
 Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press. St. Paul, MN, USA.
 Taylor, D. L. and McCormick, M. K. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytol.* 177:1020-1033.
 Zelman, C. D., Cuthbertson, L. and Currah, R. S. 1996. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience* 37:439-448.