

함백산의 난초과 식물의 뿌리에서 난균근균의 분리 및 동정

이봉형 · 한한결 · 엄안흠*

한국교원대학교 생물교육과

Identification of Orchid Mycorrhizal Fungi Isolated from Terrestrial Orchids in Mt. Hambaek, Korea

Bong-Hyung Lee, Han-Kyeol Han and Ahn-Heum Eom*

Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 363-791, Korea

ABSTRACT : In this study, orchid mycorrhizal fungi (OMF) were isolated from four terrestrial orchids on Mt. Hambaek, *Platnathera chlorantha*, *Platnathera mandarinorum*, *Cephalanthera falcate*, and *Cephalanthera longibracteata*. OMF were identified using morphological and sequences analysis of fungal internal transcribed spacer (ITS) regions by specific primer of basidiomycetous orchid mycorrhizas; ITS1-OF and ITS4-OF. Four species of orchid mycorrhizal fungi were identified as *Ceratobasidium* sp, *Epulorhiza anaticula*, *Tulasnella calospora* and *Tulasnella* sp.

KEYWORDS : *Ceratobasidium*, *Epulorhiza anaticula*, Orchid mycorrhizal fungi, *Tulasnella calospora*

전세계적으로 난초과 식물은 생태계의 변화와 개발로 인한 자생지 파괴, 관상학적 가치와 약용적 가치의 상승에 따른 남획 등으로 개체 수가 급격히 감소하여 다수의 종들이 멸종 위기에 처해 있다[1]. 자생 식물의 멸종은 거시적인 관점에서 개체가 자생지에서 사라지는 것이라고 볼 수 있지만, 미시적인 관점에서는 그 식물과 공생관계를 형성하는 특이적인 미생물의 동시적인 멸종으로 이어질 수 있다. 실제로 대다수의 난초과 식물은 난균근균(orchid mycorrhizal fungi)이라는 곰팡이와 공생관계를 형성하는 것으로 알려져 있다[2]. 난균근균은 계통학적으로 담자균류에 속하며, 완전세대인 *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Tulasnella*속과 불완전세대인 *Rhizoctonia*속이 있다[3]. 난균근

균의 대다수를 차지하는 불완전세대인 *Rhizoctonia*속은 핵의 개수와 격막의 초미세구조에 따라 *Ceratohiza*, *Epulorhiza*, *Moniliopsis* 등으로 분류된다[4]. 이러한 난균근균은 난초과 식물의 뿌리에 공생하면서, 질소와 인과 같은 무기양분의 흡수를 촉진시키며[5], 초기 발아와 유묘의 생장 시 탄소도 제공하는 것으로 알려져 있다[6]. 또한 100여 종의 비광합성 난초들은 난균근균에 영양학적으로 완전히 의존한다[7]. 우리나라에서도 닭의난초와 보춘화, 타래난초, 새우난초, 자란, 방울새란 등의 난초과 식물에서 *Sebacina*, *Tulasnella* 등의 난균근균을 분리 및 동정한[8, 9] 연구가 있으며, 난균근균의 접종 시 난의 생장에 미치는 영향 등에 관한 연구[10]가 진행되고 있으나 아직까지 연구가 미미한 실정이며, 제비난초속과 은대난초속의 난초과 식물에 공생하는 난균근균에 관한 연구는 현재까지 이루어지지 않았다. 이에 본 연구에서는 강원도 함백산에서 제비난초속(*Platanthera*) 난초인 제비난초(*Platanthera chlorantha*), 산제비난초(*Platanthera mandarinorum*) 2종과 은대난초속(*Cephalanthera*) 난초인 금난초(*Cephalanthera falcate*), 은대난초(*Cephalanthera longibracteata*) 2종을 채집하여 난균근균을 순수 분리 하였고, 형태적인 관찰과 분자생물학적인 방법을 통해 동정하였다.

채집한 4종의 난초 뿌리는 실험실에서 24시간 이내에 균 분리를 진행하였다. 균 분리는 Richardson 등[11]의 방법을 변형하여 사용하였다. 뿌리에 외관상 병증이 없는지 확인

Kor. J. Mycol. 2015 June, 43(2): 129-132
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.2.129>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received June 14, 2015
 Revised June 15, 2015
 Accepted June 19, 2015

© 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.

한 후, 흐르는 수돗물로 표면을 세척하였다. 70% 에탄올과 3% NaClO 용액을 차례로 처리하고, 항생제인 streptomycin과 chloramphenicol 용액을 처리하여 표면을 살균하였다. 뿌리 표면의 물기를 제거한 후 약 5 mm 길이로 잘라, 4개 조각을 water agar에 치상하였다. 25°C 암소에서 배양한 후 균사가 뻗어 나오는지 관찰하였으며, 뻗어 나온 균사는 potato dextrose agar (PDA) 배지로 계대하여 배양하였다.

PDA 배지에 계대한 균주는 균총의 색과 모양, 성장속도, 균사의 형태 등을 육안 및 광학현미경(AXIO Imager A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다. 또한 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)을 사용하여 Genomic DNA를 추출하였으며, 이 DNA를 주형으로 하여 polymerase chain reaction (PCR) 반응을 수행하였다. PCR 반응 시 난균근균 특이적인 프라이머 ITS1-OF와 ITS4-OF를 사용하여 rDNA의 internal transcribed spacer (ITS) 지역을 증폭하였다[12]. PCR 산물은 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)로 염기 서열을 분석하였다. 염기 서열은 NCBI 상에서 BLAST를 하여 유사도를 확인하였고, MEGA5 [13]를 이용하여 neighbor-joining 계통수를 완성하였다. 염기 서열 자료는 NCBI의 GenBank에 등록하였다.

형태학적인 관찰 결과 균주 13O004 (NIBR No., NIBRFG 0000128307)의 균총은 전체적으로 연노랑의 크림색이었으며, PDA 배지에서 28일 배양하는 동안 성장속도가 매우 느렸다. 또한 곤봉형의 염주상세포(monilioid)가 관찰되었으며, 균사는 짧고 긴 형태를 가지고 있었다(Fig. 1A, Table 1). Filipello Marchisio 등[14]은 선행 연구에서 난에서 분리한 내생균의 형태학적 특징을 기술하였다. 분리된 내생균은 미색을 띠며 털이 없고 상대적으로 느린 성장 속도를 보이며, 작고 긴 염주상세포를 가지고 있고 짧고 긴 균사를 가지고 있다고 하였다. 후에 Moore 등[4]은 이러한 특징을 보이며, 이핵체(binucleate)와 폐쇄된 격벽공 구조의 균사를 지닌 속을 *Epulorhiza*라고 정의하였다. 본 연구에서 분리한 균주 13O004는 *Epulorhiza*속의 형태학적 특징과 매우 유사한 특징을 보였다. 또한 *Rhizoctonia*에 속하는 균들은 포자를 생성하지 않는 것으로 알려져 있으며[15], 이 균주 역시 포자가 관찰되지는 않았다. 14O006 균주를 PDA 배

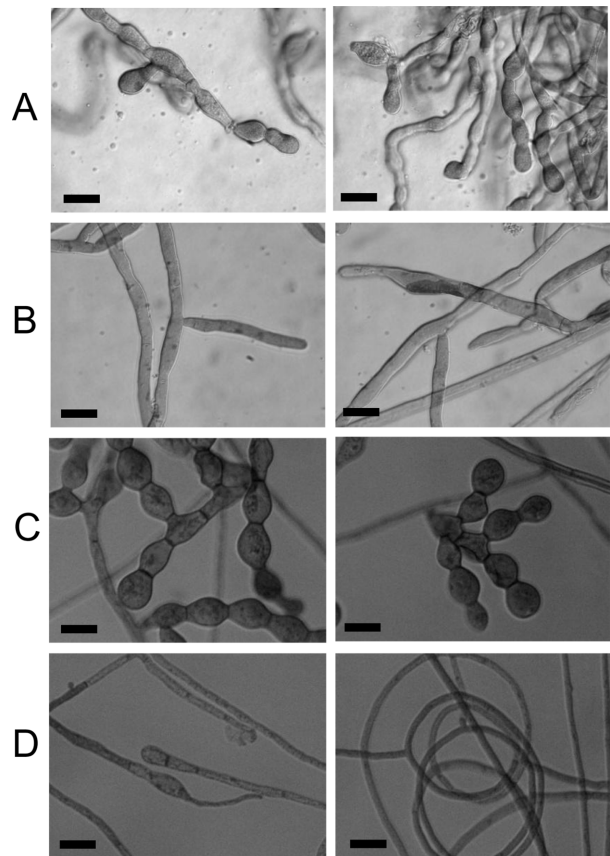


Fig. 1. Mycelial colony and hyphae of orchid mycorrhizal fungi. Colonies of strain 13O004 (*Epulorhiza anaticula*) grown on potato dextrose agar (PDA) (A) for 28 days at 25°C. Colonies of strain 14O006 (*Ceratobasidium* sp.) grown on PDA (B) for over 50 days at 25°C. Strain 14O007 (*Tulasnella calospora*, C) and Strain 14O010 (*Tulasnella* sp., D) were grown in the same conditions. (scale bar = 10 μm)

지에서 배양한 결과, 균총은 회색을 띠며 염주상세포는 관찰되지 않았고, 3~7 μm 크기의 균사만 관찰되었다(Fig. 1B, Table 1). 14O007 균주를 PDA 배지에서 배양한 결과, 크고 구형에 가까운 염주상세포를 가지고 있었고, 그 지름은 약 10 μm로 관찰되었다(Fig. 1C, Table 1). 균주 14O010을 PDA 배지에서 배양한 결과 균총은 불규칙한 형태를 띠었으며, 성장속도가 매우 느렸다. 또한 짧고 긴 균사를 가지고

Table 1. Morphological and cultural characteristics of fungal strains isolated from four species of orchid roots in this study

Characteristics	Fungal isolates			
	13O004	14O006	14O007	14O010
Colony appearance	Slightly waxy	Cottony	Cottony	Glabrous
Color of colony (surface)	Cream yellow	Yellow ivory	Ashy white	White
Color of colony (reversed)	Cream yellow	Yellow ivory	Ashy white	White
Shape of monilioid cells	Clavate	Absent	Nearly spherical	Absent
Dimension of monilioid cells (μm)	(7×10)×(8~10)	Absent	(8×11)×(7~12)	Absent
Diameter of hyphae (μm)	3~4	3~7	2~3	2~3

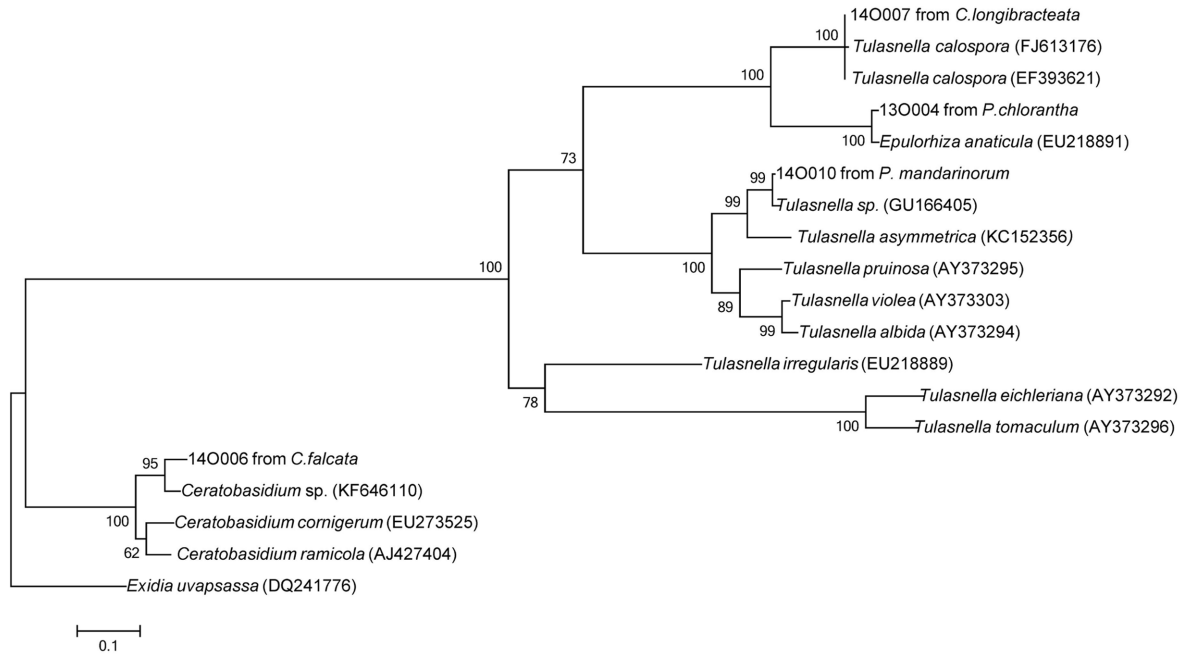


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree of orchid mycorrhizal fungal strains isolated from four species of orchid roots. *Exidia uvapsassa* was used as an outgroup.

있었고, 염주상세포는 관찰되지 않았다(Fig. 1D, Table 1).

분리된 4개의 균주는 형태학적으로 서로 다른 특징을 가지고 있었고, 이를 분자적으로 분석한 결과 4개의 종으로 동정하였다(Fig. 2, Table 2). *P. chlorantha*에서 분리한 균주 13O004는 *Epulorrhiza anaticula*로 *Platanthera obtusata*, *Platanthera hyperborea* 등의 제비난초속의 난초로부터 처음 분리되어 신종보고 되었다[16]. *Epulorrhiza*는 *Rhizoctonia*의 한 종류로 *Tulasnella*의 무성대세로 알려져 있으며, *Epulorrhiza repen*은 난초과 식물의 종자발아 및 생장에 중요한 영향을 미친다는 선행 연구가 많이 있다[17]. *E. anaticula*는 형태학적으로 *E. repen*과 매우 유사하여 같은 종으로 생각되기도 하나, 균사가 매우 좁고(2~3 μm), 사각형 이거나 평행한 세포벽을 가지고 있으며 균사의 마디가 부풀어 오른 것이 특징이다.

*Cephalanthera falcate*에서 분리한 균주 14O006은 *Ceratobasidium sp.*로 동정되었다. 국내 연구에서는 *Cymbidium cornigerum*이 *Cymbidium sinense*으로부터 분리되었다는 보고가 있으며[18], Warcup [19]은 호주에 자생하는 지생란인 *Pterostylis*속과 *Prasophyllum*속의 난초로부터 *C. cor-*

*nigerum*과 *Ceratobasidium sp.* 등을 분리하였고, 북호주에 자생하는 지생란과 착생란에 가장 흔하게 공생하는 난균근균이라고 하였다. 또한 Hadley [20]는 *C. cornigerum*이 *Dactylorhiza purpurella*의 종자발아와 생장에 도움을 준다고 하였다[20]. *C. falcate*에서 분리한 균주 14O006가 은 대난초속의 난초과 식물의 발아와 생장에 어떤 영향을 미치는지 후속 연구를 통해 확인할 필요가 있다.

*C. longibracteata*에서 분리한 균주 14O007과 *P. mandarinorum*에서 분리한 균주 14O010는 *Tulasnella*속에 속하는 종으로 동정되었다. *Tulasnella*속은 난초과 식물에서 가장 자주 발견되는 난균근균으로 알려져 있다[21]. 균주 14O007는 *Tulasnella calospora*로 동정되었는데 국내에서는 *Bletilla striata*, *Cymbidium goringii*, *Epipactis thunbergii* 등의 난초과 식물에서 분리되었다는 보고가 있다[8, 9]. 또한 Warcup [22]은 *T. calospora*가 *Thelymitra aristata*와 *Tulasnella longifolia*의 종자발아의 각 단계에 미치는 영향을 확인하였고, 발달단계에 따라 형성되는 숙주와 난균근균의 상호작용에 따라 종자발아와 protocorm의 발달이 달라짐을 확인하였다.

Table 2. Molecular analysis of orchid mycorrhizal fungi colonizing roots of orchids

Fungal isolates	GenBank accession No.	Host species	The closest GenBank taxa (accession No.)
13O004	KT164598	<i>Platanthera chlorantha</i>	<i>Epulorrhiza anaticula</i> (EU218891.1)
14O006	KT164599	<i>Cephalanthera falcate</i>	<i>Ceratobasidium sp.</i> (KF646110.1)
14O007	KT164600	<i>Cephalanthera longibracteata</i>	<i>Tulasnella calospora</i> (EF393621.1)
14O010	KT164601	<i>Platanthera mandarinorum</i>	<i>Tulasnella sp.</i> (GU166405.1)

본 연구에서는 제비난초속 난초와 은대난초속 난초에서 4종의 난균근균을 처음으로 순수 분리하였다. 국외에서는 제비난초속 난초에서 분리한 *Epulorhiza inquilina*와 *Epulorhiza* sp.를 이용하여 제비난초속인 *Platanthera clavellata*의 종자발아를 촉진시켰다는 연구가 있고 [23], 은대난초속의 난초에 공생하는 난균근균의 밀도와 공간적 분포에 관한 연구 [24]가 있을 정도로 분리 동정 이후 후속 연구가 활발히 진행되고 있다. 이번 연구에서 분리한 4종의 난균근균을 활용하여 난의 종자발아와 protocorm의 발달에 미치는 영향 등에 관한 후속 연구가 이루어진다면, 난균근균을 이용한 난초와 식물의 보존과 서식지 파괴에 따른 멸종위기의 난초와 식물의 복원에 활용할 수 있을 것이다.

적 요

본 연구에서는 강원도 함백산에서 제비난초속(*Platanthera*) 난초인 제비난초(*Platanthera chlorantha*), 산제비난초(*Platanthera mandarinorum*) 2종과 은대난초속(*Cephalanthera*) 난초인 금난초(*Cephalanthera falcata*), 은대난초(*Cephalanthera longibracteata*) 2종을 채집하였고, 식물 뿌리에서 균근균을 순수 분리 하였다. 분리한 균주는 형태적인 관찰과 난균근균 특이적 primer 인 ITS1-OF 와 ITS4-OF를 이용하여 분자생물학적인 방법을 통해 동정하였다. 그 결과 *P. chlorantha*에서 분리된 균주는 *Epulorhiza anaticula*로 동정되었는데, 이는 국내에서 처음으로 보고되는 종이며, 그 외 각 난초에서 *Ceratobasidium* sp., *Tulasnella calospora*, *Tulasnella* sp. 등을 분리하여 동정하였다.

Acknowledgements

This study was supported by Korea National Arboretum (KNA 1-2-10, 10-1) and National Institute of Biological Resources (NIBR No 2013-02-001) of Korea.

REFERENCES

- Swarts ND, Dixon KW. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Ann Bot* 2009;104:543-56.
- Rasmussen HN. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 2002;244:149-63.
- Sneh B, Burpee L, Ogoshi A. Identification of *Rhizoctonia* species. St. Paul (MN): APS Press; 1991.
- Moore RT. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratohiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon* 1987;29:91-9.
- Dearnaley JD. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 2007;17:475-86.
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol* 2006;171:405-16.
- Leake JR. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol* 1994;127:171-216.
- Youm JY, Han HK, Chung JM, Cho YC, Lee BC, Eom AH. Identification of orchid mycorrhizal fungi isolated from five species of terrestrial orchids in Korea. *Kor J Mycol* 2012;40:132-5.
- Han HK, Chung JM, Cho YC, Kim DS, Eom AH. Identification of orchid mycorrhizal fungi isolated from *Epipactis thunbergii* in Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:9-13.
- Lee SS, Hong SW, Lee JK, Kim U, Park SY, Paek KY. Isolation of the orchid mycorrhizal fungi from the Korean native orchid in Cheju. *Mycobiology* 2000;28:97-102.
- Richardson KA, Currah RS, Hambleton S. Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic Orchidaceae. *Lindleyana* 1993;8:127-37.
- Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993;2:113-8.
- 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.
- Filipello Marchisio V, Berta G, Fontana A, Marzetti Mannina F. Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterization. *New Phytol* 1985;100:623-41.
- Pope EJ, Carter DA. Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates belonging to AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia* 2001;712-9.
- Currah RS, Smreciu EA, Hambleton S. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coelogyssum* (Orchidaceae). *Can J Bot* 1990;68:1171-81.
- Nontachaiyapoom S, Sasirat S, Manoch L. Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. *Sci Hortic* 2011;130:303-8.
- Lee SS, You JH. Identification of the orchid mycorrhizal fungi isolated from the roots of Korean native orchid. *Mycobiology* 2000;28:17-26.
- Warcup JH. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New Phytol* 1981;87:371-81.
- Hadley G. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytol* 1970;69:1015-23.
- Yuan L, Yang ZL, Li SY, Hu H, Huang JL. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China. *Mycorrhiza* 2010;20:559-68.
- Warcup J. Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. *New Phytol* 1973;72:387-92.
- Zettler LW, Hofer CJ. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environ Exp Bot* 1998;39:189-95.
- Matsuda Y, Amiya A, Ito S. Colonization patterns of mycorrhizal fungi associated with two rare orchids, *Cephalanthera falcata* and *C. erecta*. *Ecol Res* 2009;24:1023-31.