

한국에 자생하는 5종의 지생란에서 분리한 난균근균의 동정

염재영¹ · 한한결¹ · 정재민² · 조용찬² · 이병천² · 엄안흠^{1*}

¹한국교원대학교 생물교육과, ²국립수목원 산림자원보존과

Identification of Orchid Mycorrhizal Fungi Isolated from Five Species of Terrestrial Orchids in Korea

Jae-Young Youm¹, Han-Kyeol Han¹, Jae-Min Chung², Yong-Chan Cho², Byung-Chun Lee²
and Ahn-Heum Eom^{1*}

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

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

(Received 25, July 2012., Revised 13, July 2012., Accepted 8, September 2012)

ABSTRACT: This study was performed to isolate and identify the orchid mycorrhizal fungi (OMF) from roots of five species of terrestrial orchids in Korea; *Cymbidium goeringii*, *Spiranthes sinensis*, *Calanthe discolor*, *Bletilla striata*, *Pogonia minor*. DNA was extracted from isolated OMF and ITS region was amplified using primers, ITS1-OF and ITS4-OF. Four species of OMF belong to Tulasnellaceae and Sebacinaceae were identified; *Tulasnella calospora*, *Tulasnella irregularis*, *Tulasnella* sp., *Sebacina vermifera*.

KEYWORDS : *Cymbidium goeringii*, ITS, OMF, Orchid, Sebacinaceae, Tulasnellaceae

서 론

난과 식물은 전세계적으로 대략 25,000종이 분포하고 있으며, 현화식물의 10분의 1에 가까운 매우 큰 과이다(Cribb *et al.*, 2003). 이 중 우리나라에는 2아과, 46속에 속하는 약 100종의 난과 식물이 분포하는 것으로 알려져 있다(Kim and Lee, 1997). 최근 몇 년간 많은 야생란들은 상업적, 원예적 수요에 따른 남획과 서식지 파괴로 위협 받거나 멸종위기에 처해있다. 자연환경보전법 제 3조 4호의 규정에 고시된 야생 동식물 중 식물은 126종이고, 이 중 난과 식물은 약 17%에 해당하는 20종이 포함된다. 우리나라 자생란의 약 1/2은 동아시아 특산종이며, 특정 지리나 영역에서만 서식하기도 한다. 이러한 난과 식물의 복원과 보존은 우리에게 닥친 긴급한 과제이다(Liu *et al.*, 2010).

난균근균(Orchid Mycorrhizal Fungi, OMF)과의 공생 관계는 모든 난과 식물에게서 발견되는데 뿌리의 피층 세포 내부에서 코일상태로 꼬여 있으며, peloton이라고 한다(Smith and Read, 2008). Peloton은 일반적으로 피층 세포 속의 균사에 해당하고, 이 균사가 식물체에 의해 소화되어 난과 식물에 영양분을 제공한다(Zhao and Liu, 2008). 난과 식물은 종자 발아, 초기 엽록소 생성 및 생장 등에서

뿌리에 공생하는 난균근균의 영향을 받으며, 특히 난과 식물의 종자가 배유가 없거나 조직화 되지 않은 세포로 이루어져 있어 야생에서는 난균근균 없이는 발아가 불가능하다(Peterson *et al.*, 1998; Smith and Read, 2008).

난균근균은 대부분 불완전 세대인 *Rhizoctonia*속에 속하지만 완전세대의 경우는 *Tulasnella*, *Sebacina*, *Ceratobasidium*속에 속하는 것으로 알려져 있다(Sneh *et al.*, 1991). 그러나 특정 균근균이 난균근균인지 보다 정확하게 확인하기 위해서는 종자나 성체란에 균주를 접종하여 종자 발아에 영향을 주는 지, protocorm의 발달을 개선하는 지, 성체란의 성장 또는 개화에 도움을 주는 지 등의 여부를 비교해야 한다(Liu *et al.*, 2010).

본 연구에서는 우리나라의 제주도과 완도에서 자생하는 난의 뿌리를 채집하여 난균근균의 감염여부를 확인하고 분리하였으며 분자적으로 동정하였다. 또한, 각 난과 식물 뿌리에서 발견되는 난균근균들과 난초 사이의 관계를 분석하여 추후 난과 식물과 난균근균과의 특이성에 대한 연구의 기초자료로서 수행되었다.

재료 및 방법

난과 식물 뿌리의 채집

2010년 8월 완도, 2011년 7월 제주도의 각 지역에서 보춘화(*Cymbidium goeringii*), 타래난초(*Spiranthes sinensis*),

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

새우난초(*Calanthe discolor*), 자란(*Bletilla striata*), 방울새란(*Pogonia minor*) 총 5종의 난과 식물의 뿌리를 채집하였다. 채집한 뿌리들은 냉장 보관하였고 48시간 이내에 실험실에서 균 분리 과정에 들어갔다.

뿌리염색

난의 뿌리를 2 cm 길이로 잘라 흐르는 수돗물로 1차 세척하고 증류수로 여러 번 세척한 후에 Youm 등(2011)에서 사용한 방법대로 염색하였다. 2 cm 길이의 각 뿌리 절편을 2.5% KOH 용액에 담가 121°C에서 10분간 고압 멸균하여 뿌리를 연화시킨 후 증류수로 세척하였다. 세척한 뿌리를 1%의 HCl 용액에 24시간 동안 담가둔 후, 0.05% trypan blue에 넣어 121°C에서 10분간 고압 멸균하여 염색시킨 후 acidic glycerol에 담가 탈색시켰다. 염색이 완료된 뿌리 절편들은 광학현미경(AXIO Imager A1, Zeiss)으로 관찰하였다.

균분리 및 순수배양

뿌리에서의 균 분리 방법은 Youm 등(2011)의 방법을 사용하였다. 먼저, 채집한 뿌리를 흐르는 수돗물로 표면을 세척한 후 증류수로 두세 번 더 세척하였다. Clean bench 내로 씻은 뿌리를 옮겨 온 후 50% Ethanol 용액에서 1분, 5% NaClO 용액에서 1분간 담가 표면살균 하였다가 멸균수로 세척하여 표면에 남은 용액을 제거하였다. 뿌리 표면의 물기를 제거한 후 약 5 mm 길이로 자른 4개 조각을 WA 배지에 이식하였다. 뿌리를 이식한 petri dish는 25°C에 보관하면서 매일 균사가 뻗어 나오는 지 관찰하였으며, 뻗어 나온 균사는 PDA 배지로 옮겨서 3회 정도 계대 배양하여 순수 분리하였다.

분자마커를 이용한 동정

계대배양으로 순수 분리한 균의 genomic DNA를 DNeasy Plant mini kit(Quigen, USA) 사용법에 따라 추출하였다. 추출한 DNA를 PCR 반응에 사용하였으며, rDNA의 ITS 지역을 ITS1-OF, ITS4-OF primer를 사용하여 증폭하였다 (Taylor and McCormick, 2008). PCR 반응액은 총 20 µl

였으며 반응물 조성 비율은 다음과 같다. Solg™ 2X Taq PCR Smart-mix 2(Solgent, KOREA) 10 µl, genomic DNA 추출물 2 µl, 각 primer 2 µl, 4 µl ddH₂O.

PCR 반응은 2720 Thermal cycler(Applied Biosystems, USA)를 사용했으며 각 반응의 단계는 먼저 96°C에서 2분간 predenaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 64°C에서 40초간 annealing하였다. 그 후 72°C에서 1분간 elongation한 후 35cycle 반복하였다. 최종적으로 72°C에서 10분간 안정화시킨 후 4°C에서 보관하였다.

PCR 산물은 1X TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 1.5% agarose gel에서 20분간 전기영동 하였다. PCR 반응을 완료한 DNA는 정제하여 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer (Perkin-Elmer, USA)로 염기 서열을 분석하였다. 분석한 염기서열은 NCBI에서 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)하여 일치도가 가장 높은 종을 확인하였고, 각 종들의 염기서열을 MEGA 5에서 alignment한 후 계통수로 나타내었다.

결과 및 고찰

난균근균의 분리 및 동정

Genomic DNA의 염기 서열을 분석하여 동정한 결과 총 5종의 난과 식물에서 총 4종 9개의 균주가 분리되었으며(Table 1, Fig. 1), 이 중 4개의 균주는 *Tulasnella calospora*로 제주도의 자란과 완도의 보춘화에서 분리되었다. 1개는 완도의 방울새란에서 분리된 *Tulasnella irregularis*, 제주도의 새우난초에서 분리된 1개의 *Tulasnella* sp., 1개의 Uncultured *Tulasnella*가 제주도 타래난초에서 분리되어 총 7개의 균주가 *Tulasnella*속에 속하였다.

분리된 균주 중 O9 균주는 Uncultured *Tulasnella*로 BLAST검색만으로는 동정되지 않았으나, 계통수(Fig. 1)를 고려해 보았을 때 O9 균주도 *T. calospora*일 것이라고 분석하였다. 그러므로 완도와 제주도에서 분리된 *Tulasnella* 속의 균주는 또 하나의 미동정 균주 *Tulasnella* sp.를 포함하여 총 3종이다. *Sebacina*속에 속하는 J5, J7 균주는

Table 1. Orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of five species of orchids collected in Korea

Fungal isolates	Host species	Collect site	The closest genebank taxa	Genebank accession No.	Maximum identity
J5	<i>Cymbidium goeringii</i>	Jeju island	<i>Sebacina vermifera</i>	EU625994	87%
J7	<i>Cymbidium goeringii</i>	Jeju island	<i>Sebacina vermifera</i>	EU625991	86%
O9	<i>Spiranthes sinensis</i>	Jeju island	Uncultured <i>Tulasnella</i>	HM230652	95%
O14	<i>Calanthe discolor</i>	Jeju island	<i>Tulasnella</i> sp.	GU166416	97%
W8	<i>Bletilla striata</i>	Wando	<i>Tulasnella calospora</i>	DQ388041	90%
W9	<i>Bletilla striata</i>	Wando	<i>Tulasnella calospora</i>	DQ388041	90%
W10	<i>Bletilla striata</i>	Wando	<i>Tulasnella calospora</i>	DQ388041	91%
O2	<i>Pogonia minor</i>	Wando	<i>Tulasnella irregularis</i>	GU166413	86%
O7	<i>Cymbidium goeringii</i>	Wando	<i>Tulasnella calospora</i>	GU166418	99%

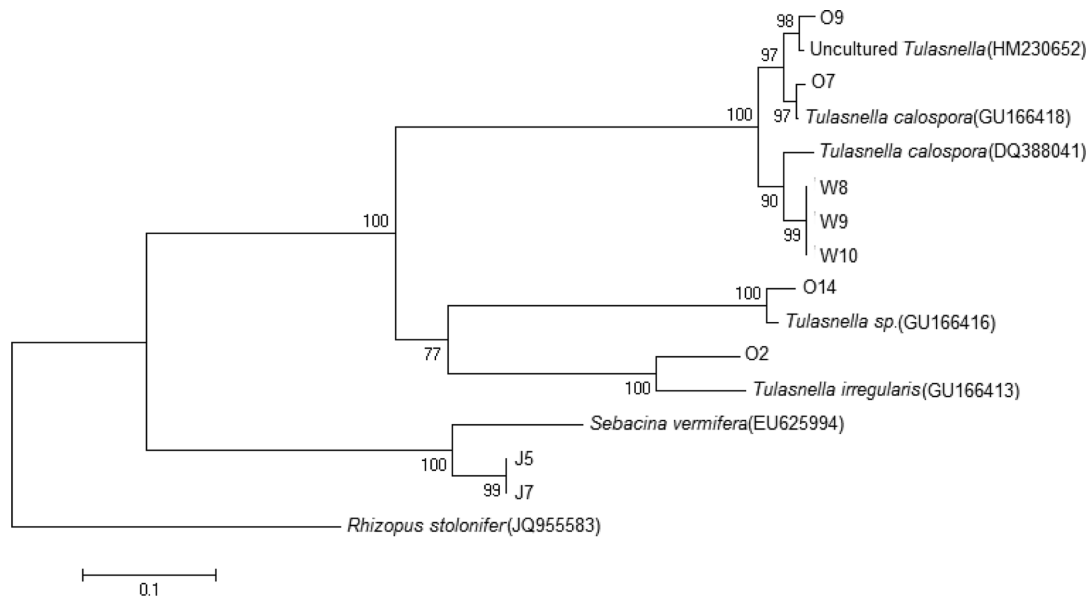


Fig. 1. Neighbor-Joining Phylogenetic tree based on ITS rDNA sequences of orchid mycorrhizal fungi isolated from orchid plant's roots of Wando and Jeju island. Numbers on nodes indicate the percent bootstrap values.

모두 *S. vermifera*로 제주도의 보춘화에서 분리 되었다.

분석 결과를 종합해 보면 제주도에서 채집한 보춘화를 제외한 나머지 5종 7개체의 난과 식물에서 모두 *Tulasnella* 속의 균주가 분리되었다. 이러한 결과는 *Spiranthes* 속 난초를 비롯한 다양한 난과 식물에서 *Tulasnellaceae*에 속하는 균들이 관찰된다는 결과와 유사하다고 볼 수 있다(Smith and Read, 2008; Dearnaley, 2007).

선행 연구결과에서는 제주도에서 채집된 보춘화에서 분리된 8개의 균주 중 4개의 균주가 모두 *Tulasnella repens*, *Tulasnella* sp.와 같은 *Tulasnella*속에 속하는 균주들이었고(Lee et al., 2003), 대만에서 채집한 *Cymbidium*속의 난초와 식물 6종 모두에서 *Tulasnella* 속의 균이 분리된 바 있다(Nontachaiyapoom et al., 2010). Youm 등(2011)의 연구결과에서도 마찬가지로 울릉도에 자생하는 보춘화에서 *T. calospora*가 분리되었다. 이와 같은 선행연구 결과들을 보면 대부분의 *Cymbidium*속에 속하는 난과 식물들은 *Tulasnella*속의 균과 공생관계를 맺고 있다는 것을 알 수 있다. 이번 연구에서 완도에서 채집한 보춘화의 뿌리에서는 *T. calospora*가 발견되어 선행연구의 결과들과도 일치한다.

그러나 선행연구와는 달리 이번 연구에서는 제주도에서 채집한 보춘화에서 *Sebacina vermifera*가 분리되었다. 이는 *Cymbidium*속의 난과 식물들이 많은 비율로 *Tulasnella*속 난균균과 공생관계를 형성하기는 하지만 항상 *Tulasnella*속과 공생하는 것은 아니라는 것을 보여준다. 또한, 이번 연구에서 완도와 제주도에서 채집된 보춘화의 뿌리에서는 같은 종의 난초에서 분리한 것임에도 불구하고 다른 균주가 발견됨으로서 지역별 난균균의 분포양상과 숙주별 특이성이 다를 수 있음을 시사한다.

난균균의 존재는 난과 식물의 생활사 전반에 걸쳐 생존 및 번식에 영향을 미치므로 자생란의 개체수와 분포에 큰 영향을 준다. 특히 앞서 살펴본 것처럼 같은 종의 난뿌리에서도 지역별로 상이한 난균균과의 공생관계가 형성될 수 있다는 연구결과는 난과 식물의 생태 복원에 중요한 자료를 제공해 주며, 이에 대한 보다 체계적인 연구가 더해져야 할 것이다. 하지만 국내에서의 이러한 난균균에 관한 연구들은 국외에 비해 상대적으로 미미한 편이다. 난균균에 관한 연구를 기초자료로 하여 우리나라 고유의 생태에서 다양한 난과 식물의 복원과 보존이 이루어져야 할 것이다.

적 요

제주도와 완도에서 채집한 총 5종의 자생란의 뿌리에서 미동정 1종을 포함한 총 4종의 균을 순수분리하였으며, 추출한 DNA를 ITS지역을 증폭하여 분자적 동정하였다. 이 중 3종이 *Tulasnella*속이었으며, 1종은 *Sebacina vermifera*로 일반적인 난균균이었다. 제주도와 완도에서 모두 채집한 보춘화(*Cymbidium goeringii*)의 경우 제주도에서 채집한 뿌리에서는 *Sebacina vermifera*가, 완도에서 채집한 뿌리에서는 *Tulasnella calospora*가 분리되어 같은 종의 난과 식물에서도 서식지에 따라 공생하는 난균균이 다를 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

- Cribb, P. J., Lell, S. P., Dixon, K. W. and Barrett R. L. 2003. Orchid conservation: a global perspective. In: Orchid

- Conservation, pp. 1-24. Eds. K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett and P. J. Cribb. Natural History Publication, Kota Kinabalu, Malaysia.
- Dearnaley, J. D. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17:475-486.
- Kim, S. N. and Lee, K. S. 1997. Orchids in Korea. Kyohaksa, Seoul. 495p. (in Korean).
- Lee, J. K., Lee, S. S., Eom, A. H. and Paek, K. Y. 2003. Interactions of newly isolated orchid mycorrhizal fungi with Korean *Cymbidium kanran* hybrid 'Chungsu'. *Mycobiology* 31:151-156.
- Liu, H., Luo, Y. and Liu, H. 2010. Studies of mycorrhizal fungi of Chinese orchids and their role in orchid conservation in China-a review. *Bot. Rev.* 76:241-262.
- Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S. and Manoch, L. 2010. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. *Mycorrhiza* 20: 459-471.
- Peterson, R. L., Uetake, Y. and Zelmer, C. 1998. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis*. 25:29-55.
- Smith, S. E. and Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edition, pp. 419-457. Academic Press, New York.
- Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press. St. Paul, MN, USA. 133p.
- 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.
- Youm, J. Y., Chung, J. M., Lee, B. C. and Eom, A. H. 2011. Molecular identification of orchid mycorrhizal fungi of native orchids in Ulleung Island. *Kor. J. Mycol.* 39:7-10. (in Korean).
- Zhao, J. and Liu, H. 2008. Effects of fungal elicitors on the protocorm of *Cymbidium eburneum*. *Ecol. Sci.* 27:134-137.