

닭의난초 (*Epipactis thunbergii*)에 공생하는 난 균근균의 분리 및 동정

한한결¹ · 정재민² · 조용찬² · 김대신³ · 엄안흠^{1*}

¹한국교원대학교 생물교육과, ²국립수목원 산림자원보존과, ³제주특별자치도 한라산 연구소

Identification of Orchid Mycorrhizal Fungi Isolated from *Epipactis thunbergii* in Korea

Han-Kyeol Han¹, Jae-Min Chung², Yong-Chan Cho², Dae-Shin Kim³ 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

³Research Institute for Hallasan, Jeju 690-816, Korea

ABSTRACT : In this study, roots of *Epipactis thunbergii* were collected from Chujado on the north of Jeju-do. Six fungal isolates were isolated from surface-sterilized roots of the orchid and classified with groups based on morphological characteristics. Fungal DNA was extracted from each isolate and amplified ITS region using ITS1-OF/ITS4-OF primer pair. Three species of orchid mycorrhizal fungi were identified as *Tulasnella calospora*, *Tulasnella* sp. and *Sebacina* sp. based on molecular and morphological characteristics.

KEYWORDS : *Epipactis thunbergii*, Orchid mycorrhizal fungi, *Sebacina*, *Tulasnella calospora*

서 론

난 균근균(Orchid Mycorrhizal Fungi, OMF)은 난초과 식물 뿌리의 피층 세포에 peloton이라는 구조물을 만들어 공생관계를 형성한다. 난 균근균은 숙주식물의 발생초기에 탄소화합물 등의 양분을 공급함으로써 종자 발아를 돕고, 초기 엽록소 생성 및 생장에 영향을 주므로 둘 사이의 공생관계는 난초과 식물에 있어 필수적이라고 알려져

있다(Peterson *et al.*, 1998; Smith and Read, 2008). 난과 식물의 종자는 영양분을 가진 배유가 없거나 조직화되지 않은 세포로 구성되어 있기 때문에 자연 상태에서는 난 균근균 없이는 실질적으로 발아가 불가능하다(Smith and Read, 2008). 뿐만 아니라 난 균근균은 난의 생존과 분포, 그리고 경쟁관계에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Batty *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 1993).

닭의난초(*Epipactis thunbergii*) 또한 다른 난초들처럼 난 균근균에 의존하여 탄소 화합물 등의 양분 공급과 종자 발아, 초기 발달단계를 이루어낼 수 있다. 닭의난초는 유전적 변이의 특징으로 계산한 결과, 우리나라에서 20 × 20 km²의 면적에 약 8개의 개체군이 분포한다는 연구결과(Chung and Chung, 2007)가 있다. 닭의난초속 식물들은 개체수가 적고 다른 난초과 식물들과 달리 타기수정보다는 자가수정을 주로 한다. 이러한 점에서 유전적 다양성의 확보 면에서 다른 난초과 식물보다 불리한 면이 있다(Lee, 2011).

대다수의 난 균근균은 무성세대인 *Rhizoctonia* 속이며 완전세대형은 *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Tulasnella* 속으로 알려져 있다(Sneh *et al.*, 1991). *Rhizoctonia*에 속하는 균들은 균핵과 포자를 생성하지 않는 것으로 알려져 있으므로 형태

Kor. J. Mycol. 2013 March 41(1): 9-13
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.1.9
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

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

Received March 5, 2013
Revised March 19, 2013
Accepted March 20, 2013

Ⓢ 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.

적 분류가 어려워 생물학적 연구가 필수적이다(Pope and Carter, 2001).

본 연구에서는 닭의난초의 뿌리를 채취하여 뿌리에 감염된 균근균을 광학 현미경을 통해 확인하고, 표면 살균한 뿌리에서 균근균을 분리하여 형태적 특징 및 분자생물학적 방법을 이용하여 동정하였다. 닭의난초와 공생하는 난균근균의 종류를 확인하여 닭의난초의 개체수 보존 및 복원에 난균근균을 활용할 수 있는 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

뿌리 채집

2012년 6월 제주도의 북쪽에 위치한 추자도에서 닭의난초의 뿌리를 채집하였다. 채집한 뿌리들은 플라스틱 상자에 토양과 함께 냉장 보관하였고 48시간 이내에 균을 분리하였다.

뿌리 염색

닭의난초의 뿌리는 흐르는 수돗물과 증류수로 여러 번 세척한 후에 Youm 등(2012)에서 사용한 방법을 이용하여 염색하였다. 염색이 완료된 뿌리 절편들은 광학현미경 (AXIO Imager A1, Zeiss) 으로 관찰하여 뿌리내 균근의 구조를 확인하였다.

균분리 및 순수배양

뿌리로부터 균 분리 방법은 Youm 등(2012)의 방법을 변형하여 사용하였다. 채집한 뿌리는 흐르는 수돗물과 증류수로 세척한 후, 70% 에탄올과 3% NaClO 용액, streptomycin과 ampicillin을 이용하여 표면살균 하였다. 뿌리를 약 5 mm 길이로 자른 4개의 조각을 water agar에 이식하였다. 뿌리를 이식한 배지는 25°C에 보관하였으며 뿌리에서 자란 균사를 PDA 배지에서 3회 계대 배양하여 순수 분리하였다. 순수 분리하여 얻은 균의 균사 형태를 관찰하기 위

해 암소에서 4일간 배양한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

분자적 동정

순수 분리한 균사의 genomic DNA는 DNeasy Plant mini kit(Quigen, USA)의 매뉴얼에 따라 추출하였고 추출한 DNA를 PCR 반응에 사용하였다. ITS1-OF, ITS4-OF primer를 사용하여 rDNA의 internal transcribed spacer (ITS) 지역을 증폭하였다(Taylor and McCormick, 2008). PCR 반응액은 총 20 μ L로 반응물 조성 비율은 다음과 같다; SolgTM 2X Taq PCR Smart-mix 2(Solgent, KOREA) 10 μ L, genomic DNA 추출물 2 μ L, 각 primer 2 μ L, 4 μ L ddH₂O. PCR 반응은 2720 Thermal cycler(Applied Biosystems, USA)를 사용하였고, 96°C에서 2분간 predenaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 64°C에서 40초간 annealing하였다. 그 후 72°C에서 1분간 elongation하고 총 35cycle 반복하였으며 72°C에서 10분간 안정화시킨 후 4°C에서 보관하였다. PCR산물은 1.5% agarose gel에서 20분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. PCR 산물은 정제하여 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer (Perkin-Elmer, USA)로 염기 서열을 분석하여 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 BLAST하였다. 일치도가 가장 높은 종을 확인하여 계통수로 나타내었다. bootstrap 분석은 1,000회 반복하였고 outgroup으로는 *Xylaria polymorpha*를 선택하였다.

결과 및 고찰

뿌리염색 결과 세포에서 다양한 형태의 peloton을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 코일 상태가 분명하게 관찰되는 단계에서부터 분해되기 직전 단계의 peloton이 다양하게 관찰되었으며, 하나의 세포 안에 각각 다른 분해단계에 해당하는 두 개의 peloton이 들어있는 상태도 관찰할 수 있었다. 난균근균과 난초과 식물과의 공생관계는 매우 복잡한 것으로 알려져 있는데, 선행연구에서는 단일 peloton이나 하나의 뿌리 또는 한 개체 안에서도 복잡하고 다각적 공생

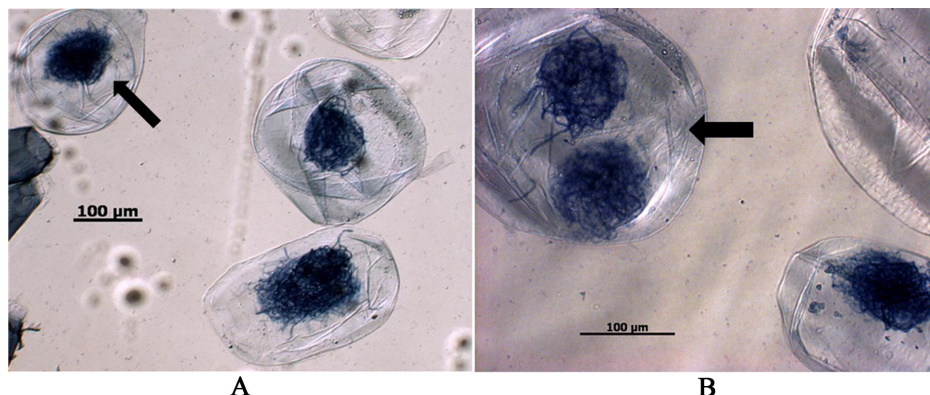


Fig. 1. Pelotons stained with trypan blue in cortical cells of root of *Epipactis thunbergii* collected from Chujado. Arrow indicates digested hyphae. A, hyphal coils in diverse stages. B, showing two pelotons in a cell of the orchid root. Bars = 100 μ m.

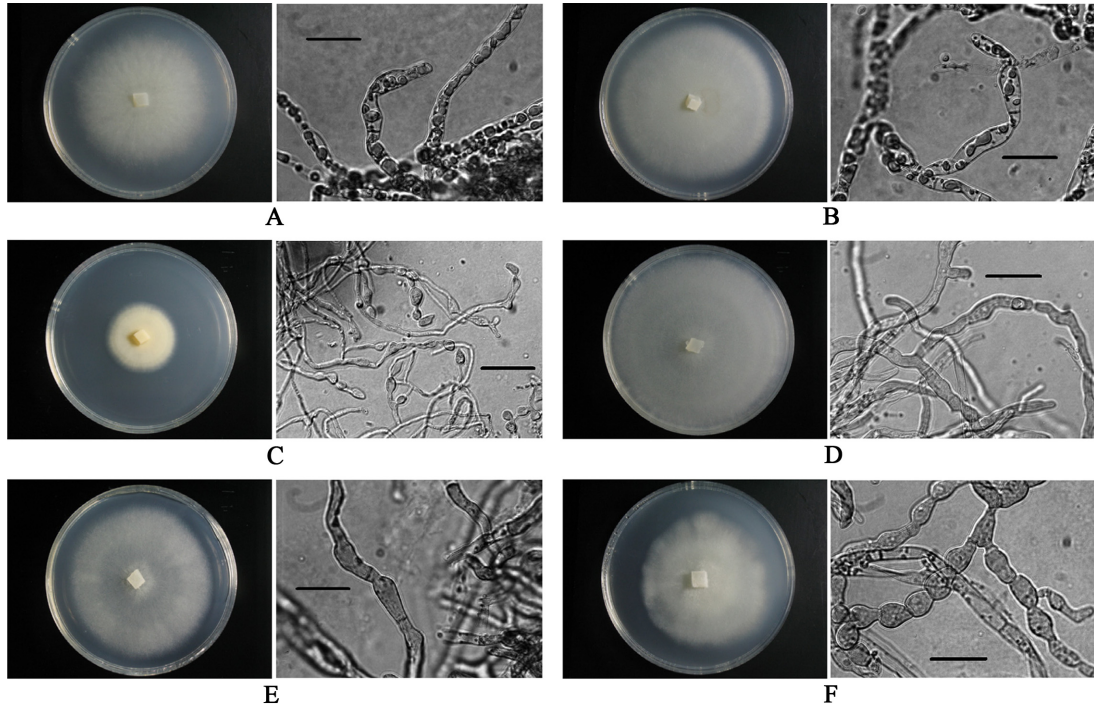


Fig. 2. Mycelial colony and hyphae of orchid mycorrhizal fungi isolated from root of *Epipactis thunbergii* on PDA. A, isolate D9; B, isolate D15; C, isolate D16; D, isolate D20; E, isolate D21, F, isolate D26. Bars = 20 μ m.

체들을 가지는 것으로 알려져 있다(Taylor *et al.*, 2003).

PDA배지에서 4일간 배양한 균사는 분지균사의 격벽이 본래 균사로부터 멀리 떨어져 있고, 분지되는 지점이 잘록하여 난균근균의 불완전세대인 *Rhizoctonia solani*의 특징을 나타내었다(Fig. 2; Pope and Carter, 2001). D9와 D15는 균사의 형태가 유사하였으며, 염주상세포(monilioid cells)는 관찰되지 않았다(Fig. 2 A&B). D16균주는 다른 다섯 개의 균주와는 형태적 차이를 보였는데, 배지에서의 균총색이 노란색이었으며, 균총의 표면은 매우 매끈하고, 밀랍과 유사하였다(Fig. 2C). D20과 D21균주는 균사의 지름이 불규칙적인 특성이 Warcup 등(1967)의 선행연구에서 기술한 *Tulasnella*속의 균사들과 유사하였다(Fig. 2D, E). D26 균주는 균사의 끝에서 완전한 구형에 가까운 염주상세포를 가지고 있었고, 염주상 세포의 지름은 약 10 μ m로

관찰되었다(Fig. 2F).

본 연구에서는 총 6개의 균주를 분리하였으며 균사의 형태와 균사의 내부 색깔, 균사의 벽 두께를 비교하여 네 개의 그룹으로 나누었으며(Table 1), 분자적 분석의 결과를 종합하여 총 세 개의 종으로 동정하였다(Fig. 3). D20, D21, D26 균주는 형태적 특징에서는 약간의 차이를 보였으나, 분자적 분석을 통해 모두 *Tulasnella calospora*로 동정하였다(Table 2). D9과 D15는 형태적 특징에서 다른 균주와 약간의 차이를 보이며 Blast 결과 *Epulorhiza* sp.의 염기서열과 가장 유사한 것으로 나타났으나 이 속은 *Tulasnella* 속의 무성세대로 알려져 있어(Smith and Read, 2008) *Tulasnella* 속의 종으로 동정하였다. 이 균주들은 계통수에서 *T. calospora*와 가장 유사한 것으로 나타났으나 후속 연구를 통해서 확인해야 할 필요가 있다. D16 균주의

Table 1. Cultural and morphological characteristics of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of *Epipactis thunbergii*

Morphological characteristics	Fungal isolates			
	D9, D15	D16	D20, D21	D26
Color of colony (surface)	White	Light yellow	White	White
Color of colony (reversed)	White	Light yellow	White	White
Colony appearance	Fluffy	Glabrous	Flat or cottony	Cottony
Color of hyphae	Hyaline	Hyaline	Hyaline	Hyaline
Diameter of hyphae (μ m)	5-7	2-4	4-7	4-7
Shape of monilioid cells	Absent	Ellipsoidal or elongate Barrel shape	Nearly spherical	Nearly spherical
Dimension of monilioid cells (mm)	Absent	(3-7) $\times$ (2-8)	(6-9) $\times$ (6-10)	(5-9) $\times$ (6-10)

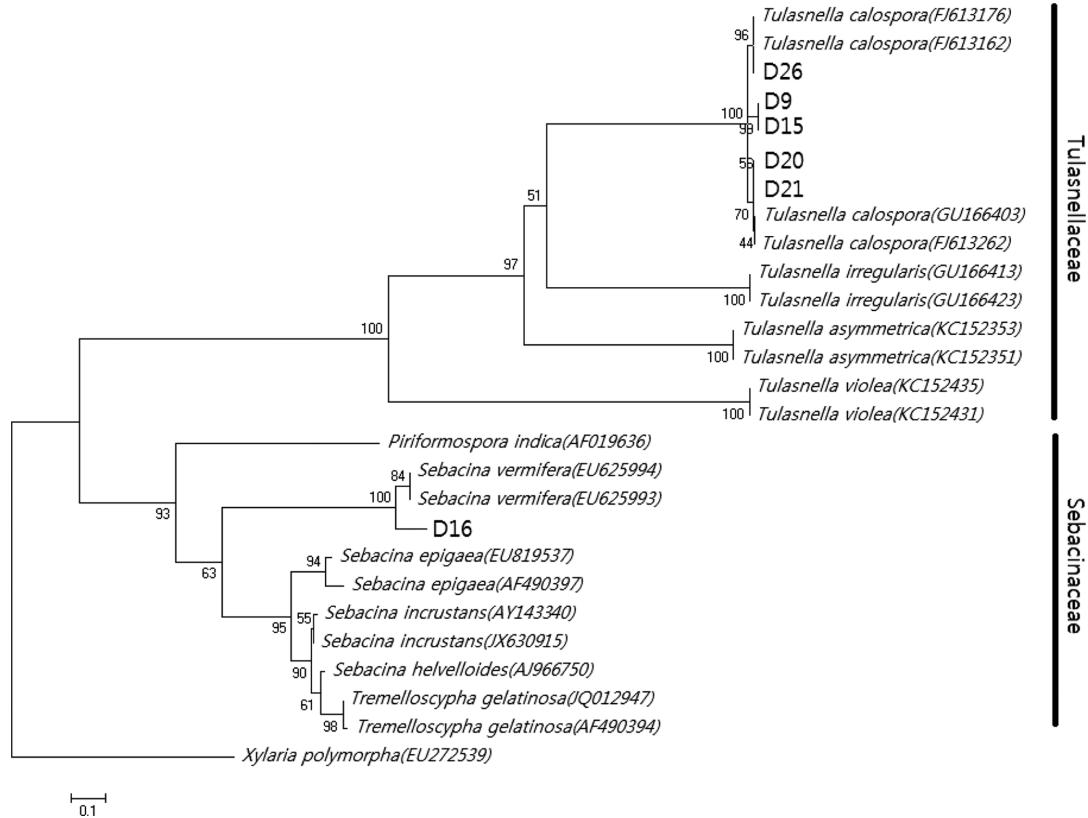


Fig. 3. Neighbor-Joining phylogenetic tree based on a fragment of ITS rDNA sequences of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of *Epipactis thunbergii*.

Table 2. Three species of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of *Epipactis thunbergii*

Fungal isolates	Collect site	The closest genebank taxa	Genebank accession No.	Maximum identity
D9	Chujado	<i>Epulorhiza</i> sp.	EF393628	620/627 (99%)
D15	Chujado	<i>Epulorhiza</i> sp.	EF393628	620/627 (99%)
D16	Chujado	<i>Sebacina vermifera</i>	EU625992	930/1064 (87%)
D20	Chujado	<i>Tulasnella calospora</i>	GU166407	648/657 (99%)
D21	Chujado	<i>Tulasnella calospora</i>	GU166407	648/657 (99%)
D26	Chujado	<i>Tulasnella calospora</i>	FJ613176	615/619 (99%)

균사 지름은 2~4 μm 였고 *T. calospora*와 유사한 염주상세포를 가지고 있었다. 염주상세포의 지름은 약 2~8 μm 로 Warcup 등(1967)이 기술한 *S. vermifera*의 형태적 특징과 유사했으며, 염기서열의 Blast 결과 *Sebacina vermifera*와 가장 유사한 것으로 나타났으나 유사도가 87%로 나타나 *S. vermifera*로 확정하지는 못하였다. 그러나 형태 및 생태적 특성, 그리고 Sebacinaceae과에 속하는 다른 종들과의 계통관계를 비교한 결과(Fig. 3), 이 균주는 *S. vermifera*와 가장 관련된 균주로 판단되며, 이 균주에 대한 보다 자세한 계통분류학적인 연구가 필요하다.

D16을 제외한 다섯 개의 균주는 모두 *Tulasnella* 속에 속하며 이 균은 난초와 식물의 뿌리에서 가장 자주 발견되는 *Rhizoctonia* 균으로 알려져 있다(Yuan et al., 2010). 특히 *Tulasnella calospora*는 우리나라에서 난과 식물에서 자주

분리되는 종이다(Sim et al., 2010; Youm et al., 2011, Youm et al., 2012). *T. calospora*를 제주한란(*Cymbidium kanran*)에 접종한 연구에서는 접종 후 난의 뿌리 생장이 촉진되는 결과를 통해 두 생물체사이의 공생관계를 알 수 있다(Lee et al., 1998). *S. vermifera*를 비롯한 *Sebacina*속 균류들은 난초와 식물 뿐 아니라 다른 여러 육상식물과 균근을 형성하는 특징이 있으나(Selosse et al., 2002), *Sebacina*속과 균근관계를 형성하는 식물은 생장이 촉진되며 근계의 면적이 증가하였다(Declerck et al., 2005). Sebacinaceae과에 속하는 종은 대부분 배양이 가능하지 않은 것으로 알려져 있으며 *Piriformospora indica*, *S. vermifera*만이 배양 가능한 것으로 알려져 있다(Declerck et al., 2005).

본 연구에서는 닭의난초 뿌리에서 총 3종의 난 균근균을 분리하였으며 이는 우리나라에서 닭의난초에 공생하는 난

균근균을 최초로 분리하는 것이다. 국외의 연구에서는 *Epipactis*속의 난초과 식물의 뿌리에서 다양한 균근균을 발견하였는데, *E. atrorubens*에서는 *Sebacinoid*와 *Tulasnella*를, *E. helleborine*의 뿌리에서는 *Ceratobasidium*, *Sebacinoid*가 발견되었으며 *E. palustris*에서는 *Ceratobasidium*, *Sebacinoid*, *Tulasnelloid*가 분리되었다(Bidartondo *et al.*, 2004). 이러한 연구를 통하여 *Epipactis*속에서 *Sebacina*속은 일반적으로 발견되는 난균근균임을 알 수 있다. 닭의난초속 식물들의 주된 번식 방법은 자가 수정으므로 유전적 변이가 적어 개체수의 유지가 서식환경의 변화에도 종을 번식시킬 수 있는 중요한 요인이 될 수 있다. 이에 따라 다른 난초과 식물보다도 닭의난초속 식물과 난 균근균의 공생관계는 생존과 개체수 조절 및 분포에 영향을 주는 요인이 될 것으로 판단된다. 따라서 향후 난 균근균을 활용한 난초과 식물의 개체수 보존과 서식지로의 복원 방법의 개발에 본 연구의 결과를 기초자료로 사용할 수 있을 것이다.

적 요

제주도의 북쪽에 위치한 추자도에서 닭의난초 뿌리를 채취하였고, 표면 살균한 뿌리에서 6개의 균주를 분리하였다. 각 균주는 형태적 특징을 기초로 그룹을 나누었고, 난 균근균에 특이적인 프라이머인 ITS1-OF/ITS4-OF를 이용하여 균주의 rDNA의 ITS지역을 증폭하였다. 형태적 특징과 분자적 분석을 통하여 6개의 균주를 *Sebacina* sp., *Tulasnella calospora*, *Tulasnella* sp. 총 3종의 난 균근균으로 동정하였다.

참고문헌

Batty, A. L., Brundrett, M. C., Dixon, K. W. and Sivasithamparan, K. 2006. New methods to improve symbiotic propagation of terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil. *Aust. J. Bot.* 54:367-374.

Bidartondo, M. I., Burghardt, B., Gebauer, G., Bruns, T. D. and Read, D. J. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271:1799-1806.

Chung, M. Y. and Chung, M. G. 2007. Extremely low levels of genetic diversity in the terrestrial orchid *Epipactis thunbergii* (Orchidaceae) in South Korea: implications for conservation.

Bot. J. Linn. Soc. 155:161-167.

Declerck, S., Strullu, D. G. and Fortin, A. 2005. In vitro culture of mycorrhizas, 4th edition, pp. 291-312. Springer, France.

Lee, N. S. 2011. Illustrated flora of Korean Orchids. Ewha Womans University Press, Seoul. (in Korean).

Lee, S. S., Oh, C. H., Paek, K. Y. and Lee, T. S. 1998. Isolations of the orchid mycorrhizal fungi from the roots of the Korean native orchids and inoculations of the isolates to four different orchids. *Kor. J. Plant Pathol.* 14:536-542. (in Korean).

Peterson, R. L., Uetake, Y. and Zelmer, C. 1998. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* 25:29-55.

Pope, E. J. and Carter, D. A. 2001. Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates belonging to AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia* 93:712-719.

Rasmussen, H. N. and Whigham, D. F. 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *Am. J. Bot.* 80:1374-1378.

Selosse, M. A., Bauer, R. and Moyersoen, B. 2002. Basal Hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytol.* 155:183-195.

Sim, M. Y., Youm, J. Y., Chung, J. M., Lee, B. C., Koo, C. D. and Eom, A. H. 2010. Characteristic of orchid mycorrhizal fungi from roots of *Cypripedium japonicum* and *C. macranthum*. *Kor. J. Mycol.* 38:1-4. (in Korean).

Smith, S. E. and Read, D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, New York.

Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul.

Taylor, D. L., Bruns, T. D., Szaro, T. M. and Hodges, S. A. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata*(Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *Am. J. Bot.* 90:1168-1179.

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).

Youm, J. Y., Han, H. K., Chung, J. M., Cho, Y. C., Lee, B. C. and Eom, A. H. 2012. Identification of orchid mycorrhizal fungi isolated from five species of terrestrial orchids in Korea. *Kor. J. Mycol.* 40:132-135. (in Korean).

Yuan, L., Z. I. Yang, S. Y. Li, H. Hu and J. L. Huang. 2010. Mycorrhizal specificity, preference and plasticity of six slipper orchids from South Western China. *Mycorrhiza* 20:559-568.

Warcup, J. H. and Talbot, P. H. B. 1967. Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytol.* 66:631-641.