

## RESEARCH NOTE

## 한국 자생 난초 뿌리에서 분리한 미기록 내생균 5종

이봉형, 엄안흠\*

한국교원대학교 생물교육과

## Five Species of Endophytic Fungi Isolated from Roots of Native Orchid Plants from Korea

Bong-Hyung Lee, Ahn-Heum Eom\*

Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea

\*Corresponding author: eomah@knue.ac.kr

## Abstract

In this study, endophytic fungi were isolated from the roots of three native orchid species from Korea: *Bletilla striata*, *Oreorchis patens*, and *Cephalanthera longibracteata*. The isolated fungal endophytes were identified based on the morphological and molecular characteristics including sequence analysis of internal transcribed spacer (ITS) and 28S ribosomal DNA regions. As a result, we discovered 5 species of fungal endophytes that have not been previously reported in Korea: *Phialocephala bamuru*, *Coniochaeta mutabilis*, *Phialophora foetens*, *Calonectria canadensis*, and *Neonectria ramulariae*.

**Keywords:** Orchid, Fungal endophytes, *Bletilla striata*, *Oreorchis patens*, *Cephalanthera longibracteata*

## OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 December, 45(4): 355-361  
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170041>

pISSN : 0253-651X  
 eISSN : 2383-5249

Received: 21 November, 2017

Revised: 27 November, 2017

Accepted: 28 November, 2017

© The Korean Society of Mycology



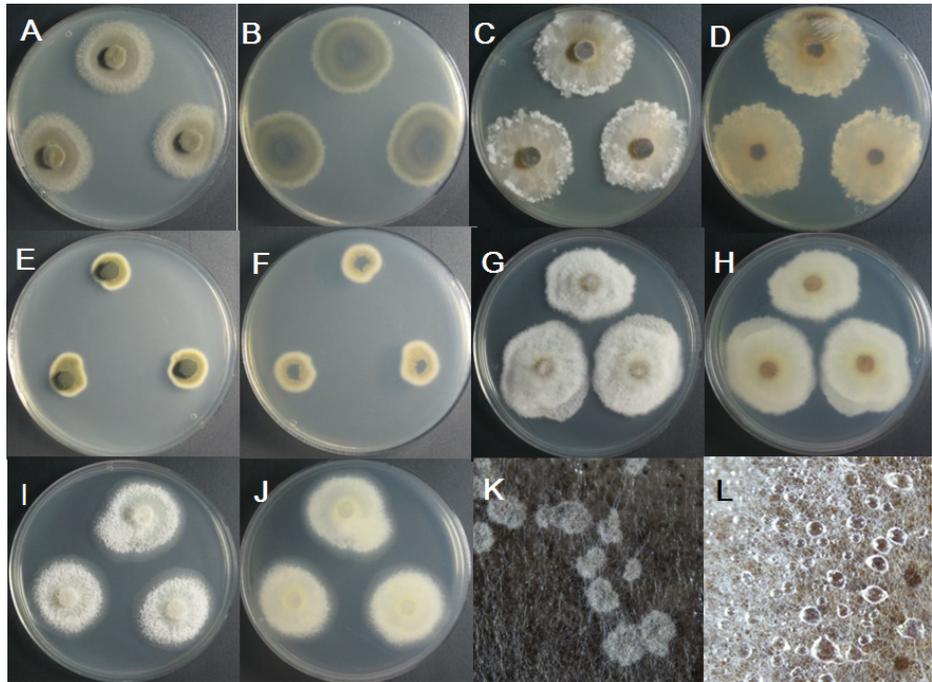
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

난초과 식물은 다른 육상식물과는 달리 특이적 균근균(mycorrhizal fungi)과 공생관계를 형성하고 있다[1]. 난초와 공생관계를 형성하는 난균근균(orchid mycorrhizal fungi)은 계통학적으로 담자균류에 속하여, 완전세대인 *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Tulasnella*속과 불완전세대인 *Rhizoctonia*속이 있다[2]. 반면 대부분의 육상생물들은 Glomeromycota문에 속하는 수지상균근균(arbuscular mycorrhizal fungi)과 공생관계를 형성하고 있다[3]. 가장 원시적 형태의 난초인 *Apostasia*속 식물 뿌리에는 수지상균근균 대신 담자균류인 *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Botryobasidium* 등의 난균근균이 초기부터 공생관계를 형성하고 있다고 알려져 있다[4]. 특히 100여종의 비광합성 난초들은 난균근균에 영양학적으로 완전히 의존(mycoheterotrophic)하며, 일반 난초들도 종자 발아와 초기 엽록소 생성 과정에 난균근균이 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[5].

난초과 식물의 뿌리에는 비균근성 내생균(non-mycorrhizal fungal endophytes)도 서식하는 것으로 보고되어 왔다[6]. 그러나 내생균의 생물활성에 대한 연구는 거의 없는 실정이며, 난초 뿌리에서 분리된 dark septate endophytes (DSE)의 특성에 관한 일부 연구만 진행되었

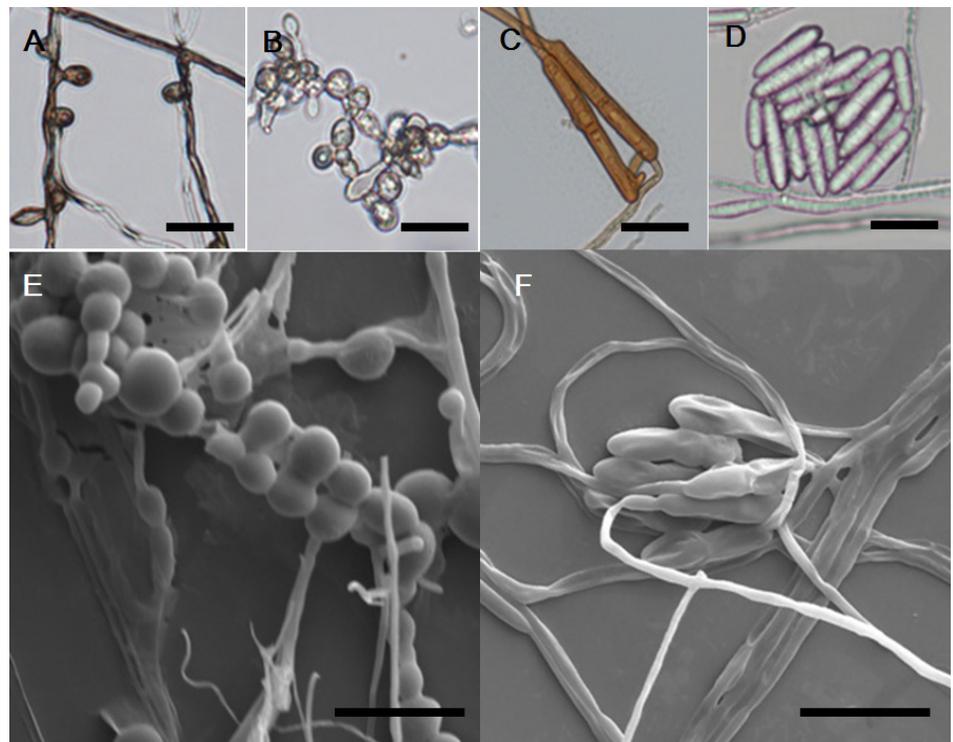
대[7]. 그러나 내생균 역시 난초의 종자발아와 생장에 중요한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 난초 뿌리에서 분리한 *Phialocephala fortinii*는 자생란인 *Dactylorhiza praetermissa*의 종자 발아와 유묘 생장을 촉진시키는 등 내생균의 생물학적 기능에 대한 잠재성을 생각해 볼 수 있다[8]. 우리나라에서도 멸종위기 1급 난초과 식물인 광릉요강꽃(*Cypripedium japonicum* Thunb.)과 복주머니란(*Cypripedium macranthum* Sw.)에서 분리한 내생균의 다양성에 대한 연구[9]가 진행되었으나, 관련 연구는 거의 미미한 실정이다. 이에 한국 자생 난초인 자란, 감자난초, 은대난초 등에서 내생균을 분리하고 다양성을 연구하던 중 국내 미기록으로 확인된 5종의 균류를 보고하고자 한다.

전라남도 진도군(N34°48', E126°25')에서 자란(*Bletilla striata* (Thunb. ex Murray) Reichb. fil), 강원도 정선군 함백산(고도 1,572 m, N37°09', E128°55')에서 감자난초(*Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl.)와 은대난초(*Cephalanthera longibracteata* Blume)의 뿌리를 채집하였다. 48시간 이내 병징이 없는 뿌리를 무작위적으로 선별하여 Richardson 등 [10]의 방법을 변형하여 균을 분리하였다. 뿌리를 표면 살균하기 위해 70% 에탄올과 3% 차아염소산나트륨(NaClO) 용액을 차례로 처리하고, streptomycin과 chloramphenicol 항생제를 처리하였다. 표면 살균된 뿌리는 멸균된 거름종이로 물기를 제거한 후, 5 mm 크기로 잘라 water agar (WA)에 4개씩 치상하였다. 25°C 암소에서 배양하면서 뿌리에서 자라나온 균주를 potato dextrose agar (PDA)와 malt extract agar (MEA)에 각각 계대배양하였다. 순

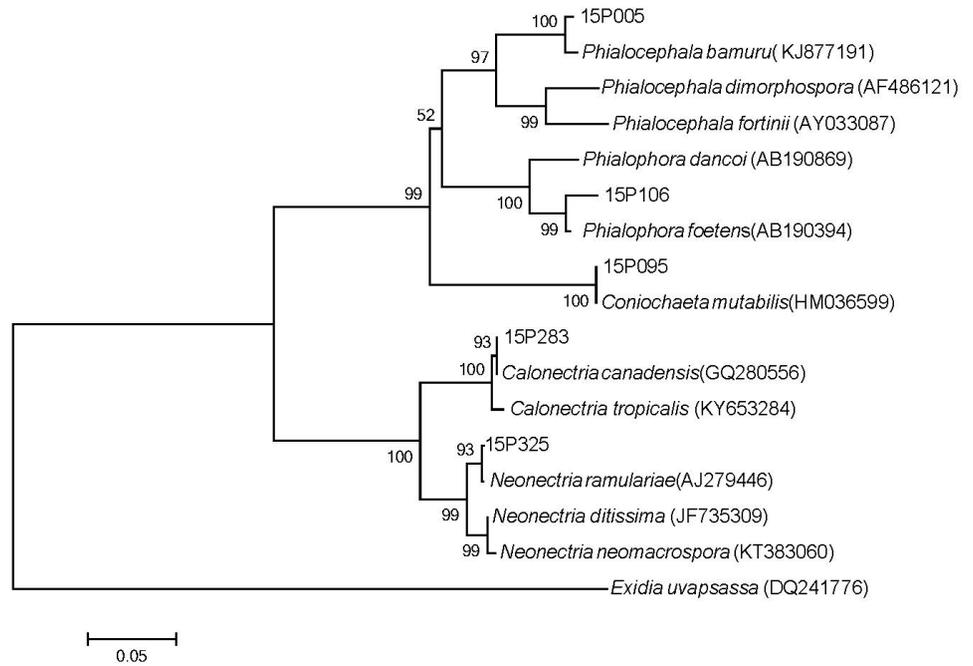


**Fig. 1.** Colony of strain 15P005 (*Phialocephala bamuru*) grown on potato dextrose agar (PDA) for 7 days at 25°C, front (A) and back (B); Colony of strain 15P095 (*Coniochaeta mutabilis*) grown on PDA for same conditions, front (C) and back (D); Colony of strain 15P106 (*Phialophora foetens*) grown on PDA for same conditions, front (E) and back (F) and conidiomata (K); Colony of strain 15P283 (*Calonectria canadensis*) grown PDA for same conditions, front (G) and back (H) and pure exudates (L); Colony of strain 15P325 (*Neonectria ramulariae*) grown on PDA for same conditions, front (I) and back (J).

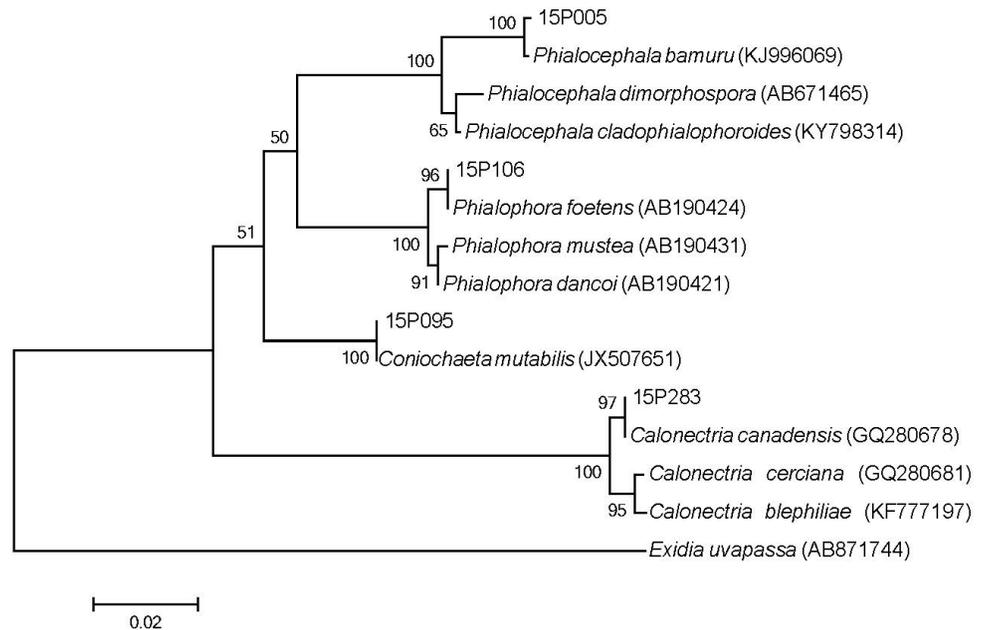
수 분리된 균주는 25°C 암소에서 7일간 배양하며, 균총의 성장속도, 색, 모양, 고도 등의 형태학적 특징을 관찰하였으며(Fig. 1), 이후 슬라이드 배양법을 통해 균사와 포자를 광학현미경과 전자현미경을 통해 관찰하였다(Fig. 2). 분자생물학적 동정을 위하여 DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)을 사용하여 균주의 Genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 주형으로 PCR을 수행하였으며, Primer ITS1F와 ITS4를 이용하여 internal transcribed spacer (ITS) 영역[11]을, primer LR0R과 LR16을 이용하여 ribosomal DNA의 large subunit (LSU) 영역[12]을 증폭하였다. PCR 조건 중 annealing 온도는 ITS 영역은 58°C, LSU 영역은 54°C를 설정하여 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 20분간 전기영동하였으며, 예상되는 크기의 band를 추출하여 정제한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열은 NCBI 상에서 BLAST를 이용하여 유사도를 확인한 후 각 종들 간의 계통관계 분석을 통한 taxonomic position을 확인하기 위해 MEGA6 [13]를 이용하여 neighbor-joining 방법으로 계통수를 완성하였다(Figs. 3~4). 분리된 균주는 국립생물자원관(NIBR)에 기탁하였으며, 염기서열은 GenBank에 제출하였다.



**Fig. 2.** Hyphae and conidiospore of strain 15P005 (*Phialocephala bamuru*) (A); aggregation spore of strain 15P106 (*Phialophora foetens*) optical microscope image (B) and scanning electron microscopes (SEM) image (E); macroconidia of strain 15P283 (*Calonectria canadensis*) (C); conidiospores of strain 15P325 (*Neonectria ramulariae*), optical microscope image (D) and SEM image (F) (scale bars: A~D = 10  $\mu$ m, E~F = 20  $\mu$ m).



**Fig. 3.** Neighbor-joining tree of endophytic fungal strains isolated from roots of native orchid plants. The internal transcribed spacer (ITS) region were used for sequence analysis. *Exidia uvapassa* was used as an outgroup.



**Fig. 4.** Neighbor-joining tree of endophytic fungal strains isolated from roots of native orchid plants large subunit (rDNA) region was used for sequence analysis. *Exidia uvapassa* was used as an outgroup.

***Phialocephala bamuru* P.T.W.Wong & C. Dong, Australasian Plant Pathology 44: 55 (2015)**

PDA 배지에서 7일간 배양 시 직경 28~32 mm 크기로 균총을 형성하였으며(Fig. 2A), 풍부한 공중균사는 형성 초기 회백색을 띠고 있었으나, 시간이 지남에 따라 검은색에서 암갈색으로 변화하였고, 균총의 뒷면 역시 암갈색을 띠었다(Fig. 2B). 균사의 뒷면은 동심원 모양의 띠가 여러 개 나타났으며, 가장자리로 갈수록 띠의 색은 밝아졌다. 균사는 격벽이 뚜렷이 관찰되었으며, 짙은 갈색의 균사에서 가지가 나와 3~5 × 4~6 µm 크기의 포자를 형성하였다(Fig. 1A). 이 균주의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 *P. bamuru* KJ877191과 99.0% 유사도를 보였으며, LSU 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *P. bamuru* KJ996069와 99.0% 유사도를 보였다.

관찰표본: 전라남도 진도, N34°48', E126°25', 2015년 6월 1일, 자란(*Bletilla striata* (Thunb. ex Murray) Reichb. Fil)의 뿌리, 15P005 (NIBRFG0000499913)

***Coniochaeta mutabilis* (J.F.H. Beyma) Z.U. Khan, Gené & Guarro, Antonie van Leeuwenhoek 104 (2): 250 (2013)**

PDA 배지에서 7일간 배양 시 직경 30~35 mm 크기의 균총을 형성하였으며, 중심부는 옅은 갈색, 가장자리는 백색의 환을 형성하였다(Fig. 2C). 시간이 지남에 따라 옅은 갈색의 중심부는 검은색으로 변화하였으며, 가장자리는 계속 회백색을 띠었다. 또한 머리털 형태의 공중균사가 표면에 형성되어 있었으며, 검은색으로 변한 중심부는 방사형의 여러 개의 깊은 홈이 형성되었다. 균총의 뒷면은 중심부는 옅은 갈색, 가장자리는 아이보리색을 띠었다(Fig. 2D). 이 균주의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 *C. mutabilis* HM036599과 99.0% 유사도를 보였으며, LSU 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *C. mutabilis* JX507651와 99.0% 유사도를 보였다.

관찰표본: 강원도 정선 함백산, N37°09', E128°55', 2015년 7월 17일, 감자난초(*Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl.)의 뿌리, 15P095(NIBRFG0000500059)

***Phialophora foetens* W. Gams & Domsch, Nova Hedwigia 18: 16 (1970)**

PDA 배지에서 7일간 배양 시 직경 15~19 mm 크기의 균총을 형성하였으며, 중심부는 균청색의 균사 위에 회백색의 공중균사가 솟아있어 덮여 있다(Fig. 2E). 균총의 가장자리에는 흰색의 환이 형성되며, 균총의 뒷면은 짙은 균청색을 띤다(Fig. 2F). 균총의 가장자리에는 균사가 모여 분생자과(conidiomata) 형태의 구조물이 나타난다(Fig. 2K). 효모처럼 생긴 구형의 분생포자는 여러 개가 모여 군집을 이루고 있으며, 크기는 3~5 × 4~5 µm이다(Fig. 1B, 1E). 이 균주의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 *P. foetens* AB190394과 99.0% 유사도를 보였으며, LSU 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *P. foetens* AB190424와 98.0% 유사도를 보였다.

관찰표본: 강원도 정선 함백산, N37°09', E128°55', 2015년 7월 17일, 감자난초(*Oreorchis patens* (Lindl.))의 뿌리, 15P106(NIBRFG0000500058)

***Calonectria canadensis* (J.C. Kang, Crous & C.L. Schoch) L. Lombard, M.J. Wingf. & Crous, Studies in Mycology 66: 56 (2010)**

PDA 배지에서 7일간 배양 시 직경 35~45 mm 크기의 균총을 형성하였으며, 흰색의 균사가 성기게 형성되며, 공중균사가 발달하였다(Fig. 2G). 균총의 뒷면은 옅은 아이보리 색을 띠고 있으며, 가장자리에는 솜털 모양의 균사가 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 2H). 표면에는 시간이 지나며 투명한 물방울 모양의 삼출물이 관찰되었다(Fig. 2L). 균총은 시간이 지나며 아래쪽 균사부터 짙은 갈색으로 변하였고, 이후 뒷면은 암갈색을 띠었다. 균사의 색이 변하는 과정에서도 표면은 솜털 모양의 흰색 균사가 덮고 있으며, 흰색 균사 내에 조그마한 구멍이 전체에 고르게 형성된다. 포자는 긴 원통형을 띠고 있으며, 크기는  $3\sim4 \times 19\sim23 \mu\text{m}$ 이다(Fig. 1C). 이 균주의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 *C. Canadensis* GQ280556과 99.0% 유사도를 보였으며, LSU 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *C. Canadensis* GQ280678 99.0% 유사도를 보였다.

관찰표본: 강원도 정선 함백산, N37°09', E128°55', 2015년 7월 17일, 은대난초(*Cephalanthera longibracteata* Blume)의 뿌리, 15P283 (NIBRFG0000499914)

***Neonectria ramulariae* Wollenw., Annales Mycologici 15 (1-2): 52 (1917)**

PDA 배지에서 7일간 배양 시 직경 32~40 mm 크기의 균총을 형성하였으며, 중심부에는 조밀하게 흰색의 균사가 균총을 형성하고 있고, 가장자리는 균사의 밀도가 낮아진 형태로 흰색의 환을 형성하고 있다(Fig. 2I). 균총의 뒷면은 연한 미색을 띠고 있다(Fig. 2J). 시간이 지나면 균총의 중심부는 수직층의 아래부터 옅은 갈색으로 변한다. 긴 타원형의 포자는 크기가  $2\sim4 \times 10\sim18 \mu\text{m}$ 이며, 가운데 격벽이 뚜렷이 관찰된다(Fig. 1D, 1F). 이 균주의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 *N. ramulariae* AJ279446과 99.0% 유사도를 보였다.

우리나라에서 자생하는 난초과 식물에 공생하는 내생균에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 특히 내생균의 다양성과 군집 분석에 대한 연구는 조금씩 진행되고 있으나, 분리된 균주의 생리활성과 숙주와의 상호작용에 대한 연구는 거의 전무하다. 그러나 내생균은 생물자원으로서 종 다양성을 확보하는 측면에서뿐만 아니라, 다양한 약리활성 기능을 가지고 있기 때문에 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것이다.

## 적 요

본 연구는 전라북도 진도에서 자란(*Bletilla striata*), 강원도 정선군 함백산에서 감자난초(*Oreorchis patens*)와 은대난초(*Cephalanthera longibracteata*)의 뿌리에서 내생균을 분리하고 이들의 형태 및 분자생물학적 방법을 통해 동정하였다. 각 균주의 형태학적 특징을 분석하기 위해 포자의 모양과 특징을 관찰하였고, 분자생물학적 동정을 위해 ITS1F와 ITS4 primer를 이용하여 internal transcribed spacer (ITS) 및 large subunit (LSU) rDNA 영역을 분석하였다. 그 결과 *Phialocephala bamuru*, *Coniochaeta mutabilis*, *Phialophora foetens*, *Calonectria Canadensis*, *Neonectria ramulariae* 5종의 국내 미기록 내생균이 동정되어 이를 보고하고자 한다.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea.

## REFERENCE

1. Rasmussen HN. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 2002;244:149-63.
2. Sneh B, Burpee L, Ogoshi A. Identification of *Rhizoctonia* species. St. Paul: APS Press; 1991.
3. Wang B, Qiu YL. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 2006;16:299-363.
4. Yukawa T, Ogura-Tsujita Y, Shefferson RP, Yokoyama J. Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *Am J Bot* 2009;96:1997-2009.
5. Leake JR. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol* 1994; 127:171-216.
6. Currah RS, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA. Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J, Pridgeon AM, editors. *Orchid Biology*. Dordrecht: Springer; 1997. p. 117-70.
7. Bayman P, Otero JT. Microbial endophytes of orchid roots. In: Schulz BJ, Boyle CJ, Sieber TN, editors. *Microbial root endophytes*. Berlin: Springer; 2006. p. 153-77.
8. Zimmerman E, Peterson RL. Effect of a dark septate fungal endophyte on seed germination and protocorm development in a terrestrial orchid. *Symbiosis (Rehovot)* 2007;43:45-52.
9. Lee BH, Han HK, Kwon HJ, Eom AH. Diversity of endophytic fungi isolated from roots of *Cypripedium japonicum* and *C. macranthum* in Korea. *Kor J Mycol* 2015; 43:20-5.
10. Richardson KA, Currah RS, Hambleton S. Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic Orchidaceae. *Lindleyana* 1993;8:127-37.
11. 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.
12. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 1990;172: 4238-46.
13. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.