

RESEARCH ARTICLE

새우난초와 은대난초 뿌리에서 분리한 내생균의 다양성

이봉형, 엄안흠*

한국교원대학교 생물교육과

Diversity of Endophytic Fungi Associated with Roots of *Calanthe discolor* and *Cephalanthera longibracteata* in Korea

Bong-Hyung Lee, Ahn-Heum Eom*

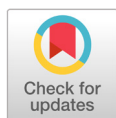
Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea

*Corresponding author: eomah@knue.ac.kr

ABSTRACT

In this study, endophytic fungi were isolated from the surface-sterilized roots of *Calanthe discolor* and *Cephalanthera longibracteata* collected from the Chungnam, Jeju, Kyungnam and Chungbuk provinces in Korea. The morphological characteristics of the obtained isolates were examined and their sequences of the internal transcribed spacer (ITS) rDNA region were analyzed using the ITS1F and ITS4 primers for species identification. *Leptodontidium orchidcola* showed the highest species abundance and frequency among the isolated endophytic fungi. Additionally, the community analysis revealed a high specificity between the host plants and the endophytic fungal species.

Keywords: Fungal diversity, Host specificity, *Leptodontidium orchidcola*, Orchid



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X

eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2018 December, 46(4): 427-435

<https://doi.org/10.4489/KJM.20180047>**Received:** November 01, 2018**Revised:** November 20, 2018**Accepted:** November 22, 2018

© 2018 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.

서론

난초의 종자 발아와 초기 생장에 뿌리에 서식하는 내생균류가 중요한 역할을 한다고 밝혀지면서, 내생균의 군집 및 접종 효과에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[1,2]. 특히 난초과 식물의 뿌리는 난균근균(orchid mycorrhizal fungi), 난내생균(orchid endophytic fungi) 등과 공생관계를 형성하는 것으로 알려져 있다[3]. 균근성인 난균근균은 뿌리 피층에 peloton이라는 코일 형태의 구조물을 형성하며[4], 질소와 인과 같은 무기양분을 토양으로부터 흡수하여 숙주에게 제공한다[2]. 난초 종자의 발아 시 형성되는 원괴체(protocorm)는 땅 속에서 광합성을 할 수 없기 때문에, 유기 탄소의 획득을 난균근균에 의존하는 것으로 알려져 있다[4]. 난초의 분포와 다양성, 풍부도는 주변 서식지 내 상호작용이 가능한 균근성 균류의 존재 유무에 따라 큰 영향을 받을 뿐만 아니라, 그외 난내생균 군집의 다양성에 높은 상관관계를 나타내는 것

으로 알려져 있다[5]. 반면 난내생균은 뿌리에 서식하는 비병원성균인데 숙주와의 상호작용과 그 역할에 대해서는 아직 연구가 많이 되어있지 않은 실정이다. 최근 연구에서 난초 뿌리에서 분리된 내생균 *Phialocephala fortinii*가 지생난인 *Dactylorhiza praetermissa*의 종자 발아와 유묘의 생장을 촉진시킴이 보고되었다. 이러한 연구 결과를 통해 난초의 초기 생장에 난내생균도 무언가 중요한 역할을 하고 있을 것임을 시사한다[6].

난초와 식물 뿌리에 서식하는 균류와 숙주 사이에 특이성이 있는지에 대한 논쟁은 오랫동안 계속되어왔다[4]. 난균근균의 경우 관련 연구가 활발히 진행되어 숙주 특이성이 높게 나타난다는 연구결과가 있지만[7,8], 난내생균의 경우 숙주 특이성에 관한 연구는 매우 미미한 실정이다. 특히 본 연구에서 채집한 새우난초 뿌리에 서식하는 내생균류에 대한 국내 연구는 거의 진행된 적이 없으며, 은대난초의 경우도 지역별 차이에 따라 균류의 군집을 비교한 정도의 연구만 진행된 실정이다[9]. 이에 따라 본 연구에서는 환경부 지정 멸종위기 2급 식물로 지정된 새우난초 뿌리를 서로 다른 두 지역에서 채집하고 내생균을 순수분리 하였으며, 은대난초 뿌리 역시 서로 다른 두 지역에서 채집하고 내생균을 순수분리 하였다. 분리된 균주를 대상으로 희귀 난초인 새우난초와 우리나라 전역에 흔히 서식하는 은대난초의 뿌리의 내생균류의 군집 및 다양성을 비교하여 희귀난초 특이적 내생균류가 있는지 확인해 보고자 한다. 이를 통해 희귀 난초의 보존과 복원을 위한 과정에서 공생 내생균류를 활용하는 방안을 마련하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 채집 및 내생균류 분리

본 연구에서 새우난초 뿌리는 충남 태안군 안면도(N 36°49', E 126°36')에서 4개체, 제주도 제주시 조천읍(N 33°44', E 126°56')에서 4개체를 채집하였으며, 은대난초 뿌리는 충남 가야산(N 36°50', E 126°51')에서 4개체, 충북 조령산(N 36°77', E 128°04')에서 4개체를 채집하여 뿌리에 서식하는 내생균류를 순수분리하였다. 채집한 난초의 뿌리는 24시간 이내 균 분리를 실시하였다. 균 분리는 Richardson 등[10]의 방법을 변형하여 사용하였다. 먼저 외관상 식물병원균에 의한 병증이 없는 뿌리를 흐르는 물로 세척한 후, 70% 에탄올과 3% 차아염소산나트륨(NaClO) 용액으로 차례로 처리하고, streptomycin과 chloramphenicol 용액을 처리하여 표면을 살균하였다. 뿌리 표면의 물기를 제거한 후 약 5 mm 길이로 잘라 4조각을 water agar에 치상하였다. 25°C 암소에서 배양한 후 균사가 뻗어 나오면 potato dextrose agar (PDA) 배지로 계대배양하였다. PDA 배지에 계대배양한 균주는 형태학적 동정을 위해 균총의 색과 모양, 생장 속도, 균사의 형태 등을 육안과 광학현미경(AXIO Imager A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 통해 관찰하였다.

분자 마커를 이용한 동정 및 군집 분석

분자생물학적 동정을 위해 순수 분리된 균주의 Genomic DNA를 DNeasy Plant Mini Kit (Quagen, Germantown, MD, USA)를 이용하여 추출하였고, 이 DNA를 주형으로 하여 polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였다. PCR 반응 시 균특이적 프라이머인 ITS1F와 ITS4를 사용하여 rDNA의 internal transcribed spacer (ITS) 부위를 증폭하였다[11]. PCR 조건은 predenaturation 94°C에서 5분 후, denaturation 94°C 30초, annealing 50°C에서 30초, elongation 72°C에서 1분을 1 cycle로 하여 총 30회 진행하였으며, 예상되는 band를 전기영동으로 확인 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon,

Korea). 분석된 염기서열은 NCBI 상에서 BLAST하여 similarity를 확인한 후 각 종들 간의 계통을 분석하였다. 계통수 작성을 위해 bootstrap analysis를 통해 1,000 replicates를 선택하고 MEGA6 [12]를 이용하여 neighbor-joining (NJ) tree를 완성하였다.

새우난초와 은대난초에서 분리된 내생균류의 상대수도와 빈도를 구하였으며, 서로 다른 지역 간 내생균류의 유사도지수와 다양성지수(Shannon diversity), 균등도(evenness)를 계산하였으며, 군집 간 종다양성지수와 종 균등도 등은 SPSS-WIN ver. 12 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 독립표본 t 검정 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

충남 태안군 안면도에서 채집한 4개체의 새우난초의 뿌리에서 152개의 균주를 순수 분리하였으며, 분자생물학적으로 동정한 결과 17속 23종의 서로 다른 내생균류를 확인하였다. 제주도에서 채집한 4개체의 새우난초의 뿌리에서는 168개의 균주가 순수분리 되었으며, 15속 19종의 내생균류를 확인하였다 (Table 1, Fig. 1). 서로 다른 두 지역에서 채집한 새우난초의 종 균등도(species evenness)와 종 다양성지수(Shannon's index, H'), 종 균등도(species evenness)는 유의미한 차이가 없었다($p > 0.05$). 군주별로 살펴보면 두 지역 새우난초에서 모두 분리되었고, 높은 상대빈도(relative frequency)를 보인 종은 *Camposporium cambrense*와 *Leptodontidium orchidicola*으로 나타났다. *L. orchidicola*는 난초에 가장 흔히 존재하는 내생균류로 알려져 있으며, 숙주의 뿌리에서 길이생장을 촉진시킨다는 연구결과가 있다. 그외 동정된 군주 중 *Phialocephala fortinii*는 dark separate endophytes의 일종으로 식물 뿌리 사이에 mycelial connection을 형성하여 광합성 산물을 균사를 통해 운반해 주는 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며[13], 지생란인 *Dactylorhiza praetermissa*의 종자 발아와 유묘의 생장을 촉진시켰다는 연구 결과가 있다[6]. 숙주의 질소, 인 등의 무기양분의 흡수 과정을 촉진하는 2종의 난균근균도 발견되었다. *Tulasnella* sp.는 우리나라 은대난초, 산제비난초 등에서 분리되어 보고된 적이 있으며[9], 지생란에서 가장 많이 발견되는 난균근균 중 하나이다. *Thanatephorus* sp.는 국내 난초에서 분리된 난균근균 중 처음으로 보고되는 미기록종이며, 국외에서는 *Orchis provincialis* 등에서 보고되었다[1].

충남 가야산에서 채집한 4개체 은대난초의 뿌리에서 193개의 균주를 순수분리 하였으며, 분자생물학적으로 동정한 결과 16속 23종의 서로 다른 내생균류를 확인하였다. 충북 조령산에서 채집한 4개체를 뿌리에서는 141개의 균주가 순수분리 되었으며, 12속 13종의 내생균류를 확인하였다 (Table 2, Fig. 2). 충남 가야산에서 채집한 은대난초에서 분리한 종다양성지수(Shannon's index, H')가 충북 조령산에서 채집한 은대난초에서 분리한 내생균류보다 높게 나타났다($p = 0.058$). 군주별로 살펴보면 두 지역 은대난초에서 모두 분리되었고 높은 상대빈도(relative frequency)를 보인 종은 *Ilyonectria cyclaminicola*이다. *Ilyonectria*속은 인삼 등에서 뿌리 썩음병을 일으키는 병원균으로 알려져 있다[14]. 그 외 분리된 군주 중 *Oidiodendron maius*은 진달래과 식물에서 공생관계를 형성하는 ericoid mycorrhiza로 알려져 있으며[15], *Rhododendron fortune*에서 뿌리 내 균근을 형성하며 질소의 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다[16]. 실험을 통해 추후 종자 발아 및 유묘의 생장을 촉진시키기 위한 내생균류를 순수분리를 통해 다양하게 확보하였다. 가야산 은대난초 4개체, 조령산 은대난초 4개체, 안면도 새우난초 4개체, 제주도 새우난초 4개체의 군집의 유사성을 비교하기 위해 PCA 군집 분석을 실시한 결과, 숙주에 따라 군집의 유사도가 높게 나타났다 (Fig. 3). 장소에 관계 없이, 새우난초 8개체에서 분리된 내생균의 군집이 은대난초 8개체에서 분리된 내생균의 군집보다 유사한 특징을 나타내었다. 이를 통해 내생균류의 군집의 차이는 지역적

차이에 의한 영향보다 숙주의 차이에 의한 영향이 더 큰 관계가 있음을 알 수 있다.

희귀난초의 생존과 생장에 밀접한 관계가 있는 내생균류의 확인은 일반 난초보다 희귀 난초가 서식지에서 더 빨리 멸종하는 이유에 대한 중요한 단서를 제공하게 될 것이다. 따라서 희귀 난초와 일반 난

Table 1. Relative abundances and relative frequency for endophytic fungi isolated from roots of *Calanthe discolor*

Endophytic fungi	Accession no.	Relative abundance ^a		Relative frequency (%) ^b
		Anmyeon-do	Jeju-do	
<i>Camposporium cambrense</i>	KY853428.1	0.05 ± 0.10	0.10 ± 0.12	38
<i>Castanediella couratarii</i>	KX960789.1	0.04 ± 0.07		13
<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	AY442322.1	0.10 ± 0.07		38
<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	JF735305.1		0.25 ± 0.12	50
<i>Dendryphion nanum</i>	GU934517.1		0.03 ± 0.06	13
<i>Fusarium oxysporum</i>	LT746253.1		0.08 ± 0.10	25
<i>Fusarium proliferatum</i>	KU847857.1	0.02 ± 0.05	0.03 ± 0.06	13
<i>Fusarium solani</i>	KR350652.1	0.05 ± 0.10	0.05 ± 0.10	25
<i>Glomerella septospora</i>	AB738849.1		0.08 ± 0.10	25
<i>Hypoxyton fragiforme</i>	KX611646.1		0.03 ± 0.05	13
<i>Hypoxyton rubiginosum</i>	DQ223758.1		0.04 ± 0.07	13
<i>Ilyonectria cyclaminicola</i>	MF440369.1	0.05 ± 0.10	0.04 ± 0.05	25
<i>Ilyonectria robusta</i>	JF735266.1		0.04 ± 0.07	13
<i>Leptodontidium orchidicola</i>	GQ302678.1	0.07 ± 0.10	0.05 ± 0.10	38
<i>Nemania serpens</i>	KM215616.1		0.02 ± 0.04	13
<i>Nemania</i> sp.	LC062622.1	0.02 ± 0.05		13
<i>Nodulisporium</i> sp.	GQ906963.1		0.03 ± 0.06	13
<i>Penicillium canescens</i>	KX359603.1	0.04 ± 0.07		13
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	KU847877.1	0.04 ± 0.07		13
<i>Phanerochaete conrescens</i>	KP994380.1	0.04 ± 0.08		13
<i>Phialocephala fortinii</i>	KX440140.1	0.02 ± 0.05		13
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	KM357306.1	0.02 ± 0.05		13
<i>Podospira</i> sp.	EF495232.1		0.03 ± 0.05	13
<i>Psathyrella</i> sp.	KR155054.1		0.03 ± 0.06	13
<i>Rhexodenticulaacaciae</i>	KY173442.1	0.02 ± 0.05		13
<i>Setophoma terrestris</i>	KY561336.1	0.05 ± 0.09		13
<i>Setophoma vernoniae</i>	KJ869141.1		0.02 ± 0.04	13
<i>Talaromyces subinflatus</i>	NR_137080.1	0.04 ± 0.07		13
<i>Thanatephorus</i> sp.	KJ495966.1	0.08 ± 0.17		13
<i>Trichoderma gamsii</i>	KM491887.1	0.04 ± 0.08	0.03 ± 0.06	25
<i>Trichoderma harzianum</i>	KT351797.1	0.05 ± 0.09		13
<i>Trichoderma spirale</i>	NR_077177.1	0.04 ± 0.07		13
<i>Trichoderma tomentosum</i>	AY605737.1	0.04 ± 0.08		13
<i>Tulasnella</i> sp.	AY373306.1	0.05 ± 0.10	0.03 ± 0.06	25
Species richness		6.50 ± 1.91	6.50 ± 1.73	
Shannon's index (H')		1.82 ± 0.28	1.78 ± 0.32	
Species evenness		0.99 ± 0.02	0.97 ± 0.03	

^aRelative abundance indicates the percent ratio of the isolate numbers for each fungal species to the total numbers of isolates in each study site.

^bRelative frequency indicates the percent percentages of samples from which each fungal species was isolated to the total number of samples.

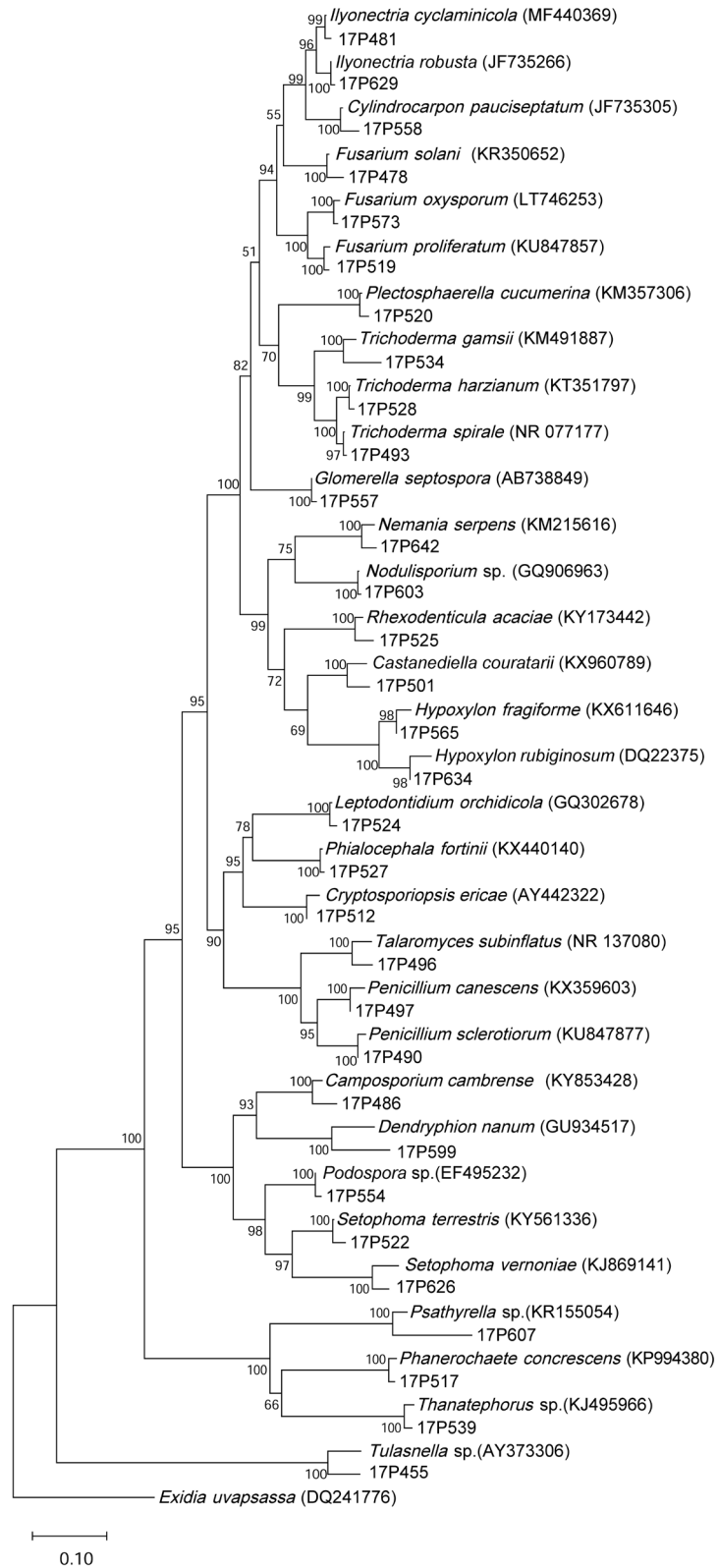


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree of orchid endophytic fungi isolated from *Calanthe discolor* roots. *Exidia uvapsassa* was used as an outgroup.

초의 뿌리에 서식하는 내생균류의 군집의 다양성 확인은 매우 중요한 기초연구가 될 수 있을 것이다. 희귀난초인 새우난초를 비롯하여, 다양한 난초에 대한 내생균 군집에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

적요

본 연구에서는 충남, 제주, 경남, 충북 등에서 새우난초(*Calanthe discolor*)와 은대난초(*Cephalanthera longibracteata*)의 뿌리를 채취하여 표면살균한 후 내생균을 순수분리 하였다. 분리된 내생균의 형태학 특징을 관찰하고 internal transcribed spacer (ITS) rDNA 영역의 염기서열을 ITS1F와 ITS4 프라이머를 이용하여 분석하였다. 서로 다른 지역에서 채집한 새우난초와 은대난초이지만, 공통적으로 *Leptodontidium*

Table 2. Relative abundances and relative frequency for endophytic fungi isolated from roots of *Cephalanthera longibracteata*

Endophytic fungi	Accession no.	Relative abundance ^a		Relative Frequency (%) ^b
		Mt. Gayasan	Mt. Jonyeongsan	
<i>Absidia glauca</i>	EU484257.1	0.02 ± 0.04		13
<i>Bionectria ochroleuca</i>	EU326186.1	0.02 ± 0.04		13
<i>Coniochaeta cymbiformispora</i>	LC146726.1		0.03 ± 0.06	13
<i>Chaetosphaeria</i> sp.	HQ630994.1	0.02 ± 0.04		13
<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	GU934585.1		0.20 ± 0.21	38
<i>Diaporthe eres</i>	FJ478132.1	0.02 ± 0.04		13
<i>Fusarium oxysporum</i>	KU931553.1	0.02 ± 0.04		13
<i>Fusarium solani</i>	KJ562369.1	0.04 ± 0.08	0.15 ± 0.18	38
<i>Ilyonectria cyclaminicola</i>	NR_121495.1	0.20 ± 0.10	0.14 ± 0.12	88
<i>Leptodontidium orchidicola</i>	GU479910.1	0.02 ± 0.04	0.07 ± 0.09	38
<i>Nemania serpens</i>	KP050687.1		0.03 ± 0.06	13
<i>Oidiodendron maius</i>	HQ608115.1		0.05 ± 0.10	13
<i>Paecilomyces</i> sp.	GU453921.1	0.04 ± 0.08		25
<i>Penicillium chermesinum</i>	KJ767051.1		0.04 ± 0.07	13
<i>Penicillium janthinellum</i>	KM268710.1		0.04 ± 0.07	13
<i>Penicillium nodositatum</i>	KU986773.1	0.02 ± 0.04		13
<i>Phialocephala fortinii</i>	EU888627.1	0.02 ± 0.04	0.06 ± 0.07	38
<i>Pochonia rubescens</i>	AB709859.1	0.02 ± 0.04		13
<i>Pochonia suchlasporia</i>	FJ439582.1	0.02 ± 0.04		13
<i>Tolypocladium album</i>	KU516596.1	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.07	25
<i>Trichoderma hamatum</i>	KF856960.1	0.04 ± 0.08	0.06 ± 0.07	38
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	KY225651.1	0.04 ± 0.08		25
<i>Trichoderma spirale</i>	NR_077177.1	0.06 ± 0.04		38
<i>Umbelopsis dimorpha</i>	LC206602.1	0.10 ± 0.08	0.10 ± 0.08	75
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	HQ608138.1	0.08 ± 0.07		38
<i>Umbelopsis versiformis</i>	KR085966.1	0.16 ± 0.18		38
Species richness		8.5 ± 0.58	5.75 ± 1.26	
Shannon's index (H')		2.36 ± 0.15	1.98 ± 0.30	
Species evenness		0.94 ± 0.03	0.95 ± 0.01	

^aRelative abundance indicates the percent ratio of the isolate numbers for each fungal species to the total numbers of isolates in each study site.

^bRelative frequency indicates the percent percentages of samples from which each fungal species was isolated to the total number of samples.



Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree of orchid endophytic fungi isolated from *Cephalanthera longibracteata* roots. *Exidia uvapsassa* was used as an outgroup.

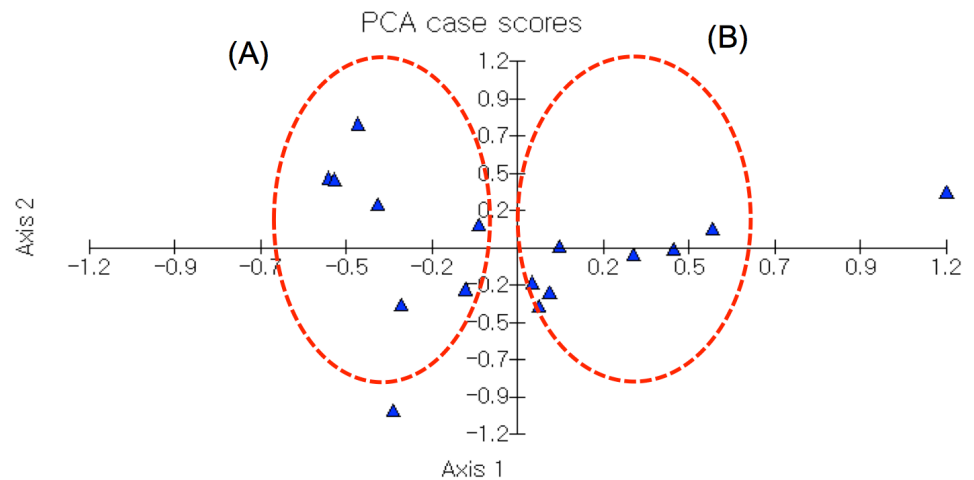


Fig. 3. PCA analysis of endophytic fungi communities isolated roots of *Calanthe discolor* and *Cephalanthera longibracteata*. Triangles represent fungal communities associated with the roots of the two orchid species analyzed in this study. A, *C. discolor*; B, *C. longibracteata*.

*orchidcola*가 높은 상대수도와 빈도를 나타냈으며, 내생균류의 군집 차이를 분석할 결과, 지역적 차이보다는 숙주에 의한 차이가 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2017R1D1A3B03029962).

REFERENCES

1. Pecoraro L, Caruso T, Cai L, Gupta VK, Liu ZJ. Fungal networks and orchid distribution: new insights from above-and below-ground analyses of fungal communities. *IMA Fungus* 2018;9:1-11.
2. Dearnaley JD. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 2007;17:475-86.
3. Rasmussen HN. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 2002;244:149-63.
4. Rasmussen HN. *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
5. Oja J, Kohout P, Tedersoo L, Kull T, Kõljalg U. Temporal patterns of orchid mycorrhizal fungi in meadows and forests as revealed by 454 pyrosequencing. *New Phytol* 2015;205:1608-18.
6. Zimmerman E, Peterson RL. Effect of a dark septate fungal endophyte on seed germination and protocorm development in a terrestrial orchid. *Symbiosis* 2007;43:45-52.
7. Warcup JH. Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. *New Phytol* 1971;70:41-6.
8. Taylor DL, Bruns TD, Szaro TM, Hodges SA. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexaletris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *Am J Bot* 2003;90:1168-

- 79.
9. Lee BH, Kwon WJ, Kim JY, Park JS, Eom AH. Differences among endophytic fungal communities isolated from the roots of *Cephalanthera longibracteata* collected from different sites in Korea. *Mycobiology* 2017;45:312-7.
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. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
13. Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 1997;388:579-82.
14. Seo MW, Soong JY, Park JY, Kim N, Kim S, Kim HG. Analysis of genetic diversity and PCR assay for the detection of ginseng root rot pathogen, *Ilyonectria radicola*. *Res Plant Dis* 2015;21:121.
15. Couture M, Fortin JA, Dalpe Y. *Oidiodendron griseum* Robak: an endophyte of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium* spp. *New Phytol* 1983;95:375-80.
16. Wei X, Chen J, Zhang C, Pan D. A new *Oidiodendron maius* strain isolated from *Rhododendron fortunei* and its effects on nitrogen uptake and plant growth. *Front Microbiol* 2016;7:1327.