

## 한국 자생란에서 난 균근균의 분리와 유묘난에 접종

이상선\* · 오창호 · 백기엽<sup>1</sup> · 이태수<sup>2</sup>

한국교원대학교 대학원(생물교육전공), <sup>1</sup>충북대학교 농과대학 첨단 원예기술개발 연구센터  
<sup>2</sup>인천대학교 생물학과

### Isolations of the Orchid mycorrhizal Fungi from the Roots of the Korean native Orchids and Inoculations of the Isolates to Four different Orchids

Sang-Sun Lee\*, Chang-Ho Oh, Kee-Yoeup Paek<sup>1</sup> and Tae Soo Lee<sup>2</sup>

Graduate School(Biological Science and Education), Korea National University of Education,  
Cheong-Won Kun, Chung-Puk 363-791, Korea

<sup>1</sup>Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology,  
Chung-Buk National University, Chung-Ju, Chung-Puk 360-763, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Incheon, Incheon 402-749, Korea

**ABSTRACT:** Ten isolates of the orchid mycorrhizal fungi were isolated from the roots of Korean native orchid plants (*Cymbidium goeringii*) which inhabit mainly in southern and western areas of Korea. The growth rates and color of the isolates in potato dextrose agar (PDA) were various. Microscopic observations of the hyphae isolated were identified as *Rhizoctonia repens* and *R. endophytica* var *endophytica* or their related species. *R. repens* was isolated from the roots of the Korean native orchids, but *R. endophytica* var *endophytica* was only isolated from the roots of the commercial orchids introduced from foreign countries. Also, the polymorphic patterns of genomic DNA extracted from selected isolates were compared with those of DNA extracted from the orchid mycorrhizal fungi isolated previously and similar band patterns were observed among those isolates. Five isolates of *R. repens* were selected and cultured at the oatmeal agar for investigating their symbiosis with orchid plants. The symbiotic specificity between orchid plants and isolated orchid mycorrhizal fungi was observed by growing orchids about six months in the greenhouse. The symbiotic responses of the commercial orchid plants with selected isolates were quite different from different isolates due to the genetic variations.

**Key words:** orchid, PCR, RAPD, *Rhizoctonia endophytica*, *Rhizoctonia repens*, symbiosis.

공생 혹은 기생균이 식물의 뿌리에서 발견된 이후 균과 식물의 상호관계에 관한 연구가 계속되어 왔다. 과거, 식물의 뿌리에서 공생균인 AM 혹은 ETM이 발견되기 전까지는 대부분이 기생 균으로 인식되어 왔지만(2, 24), 콩과식물에서 뿌리 흑박테리아의 발견은 식물 생리에 대한 질소 고정(17, 18)의 공생 개념과 함께, 두 종의 서로 다른 생물들이 함께 살아가는 공생관계가 알려지게 되었다. 그 후 공생균으로 AM(9)과 외생균근 버섯균(2, 11, 14)이 식물의 뿌리에서 발견되어 식물과의 공생관계를 확인해 주었다. 그러므로 어려운 환경 속에서 자라는 식물에게 외생 혹은 내생균근이라는 공생균이 필요하다는 것이 인식되게 되었다(32). 이 공생균이 난 식물에서 무기영양원인 질소 대사와 관련되어 있다는 것이 밝혀진

후(20), 최근에 난과 식물과 균과의 상호관계에 대한 새로운 연구가 시작되고 있다(19, 21). 또한, 최근의 난 재배에 있어서 조직 배양된 유묘를 토양으로 옮겨 심을 때에 많은 유묘가 죽는 것이 관찰되고 있다. 이러한 현상을 해결하기 위해서는 난 자생지의 토양을 사용하여 난과 균근과의 공생 관계를 복원하면 가능할 것으로 생각되어 많은 연구가 진행되고 있다(33). 최근에 난 공생균은 난 뿌리에 균구(peleton)를 형성하여(10) 난의 성장을 증진시켜 난 재배에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(6, 7). 이러한 의미에서 난 공생균에 대한 연구는 학문적인 면에서는 식물뿌리와 상호작용의 규명과 실제적인 면에서는 난 재배의 경제성을 높이는 데 크게 기여할 수 있다고 생각된다.

난 균근균의 대부분은 불완전세대인 *Rhizoctonia*속 속하며, 완전세대는 *Tulasnella*속(*Tulasnelles*)으로 동정

\*Corresponding author.

되고 있다. 이러한 불완전세대의 균으로 알려진 균들은 식물체의 토양병원균으로도 알려져 연구의 대상이 되고 있다(26). 벼과 식물에서 분리된 *R. cerealis*, *R. fumigata*, *R. oryzae*, *R. oryzae-sativae*, *R. solani* 등은 이들 식물에 균핵병(rice sclerotial diseases) 등을 일으킨다(15, 26). 이제까지 주로 난 균근에서 보고된 균은 *R. repens*(7, 25, 29, 30; Telomorph=*Tulasnella calospora*), *R. goodyerae-repenstis*(7), *R. solani*(12, 25), *R. endophytica*(=*Ceratobasidium cornigerum*; 10, 29) 등으로 이들은 다양한 난과 식물들에서 분리되었다. 그러나 이들 난 균근균과 난과의 상호관계는 지역마다, 그 특성이 다르기 때문에 다양한 실험이 실시되었다(27, 28). 그러므로, 어떤 특정한 난과 식물과 균의 공생 여부에 대한 연구는 계속되고 있다. 따라서 본 실험에서는 우리 나라에서 자생하는 춘란의 뿌리에서 난의 공생균을 분리하여 조직배양한 난과 식물에 접종한 후 난과의 공생여부와 난의 생장에 미치는 영향에 대해서 연구하였다.

## 재료 및 방법

난. 1996년 6~8월 사이에 우리 나라 자생난인 보춘화(춘란)의 자생지인 전남 해남(대흥사주변), 경남 충무, 전북 남원과 고창, 충남 서산과 안면도 등의 지역에서(Table 1), 춘란(*Cymbidium goeringii*)과 춘란이 자라는 그 주변의 토양을 채집하였다. 채집한 춘란은 온실에 식재하였고, 토양은 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 한란(*C. kanran*)과 옥화(*C. niveomargonatum*)는 각각 제주와 일본에서 수집하였으

며, 수집한 난은 한국교원대학교 생물교육학과의 온실에서 재배하면서, 필요에 따라서 난 뿌리를 채취, 염색하여 균구(peleton)형성을 확인하였고, 난 뿌리로부터 직접 난 균근균의 분리를 시도하였다

뿌리. 난뿌리 세포의 균구(peleton)를 관찰하기 위해 채집된 난으로부터 뿌리부분을 2~3 cm 정도의 길이로 잘라내어 증류수로 여러 번 헹군 다음 trypan blue로 염색하였다(9, 16); 각각의 뿌리절편은 2.5%의 KOH 용액에 넣어 121°C에서 10분간 고압살균하여 뿌리를 연화시킨 후 여러 번 물로 씻어 KOH를 제거하였다. 뿌리의 색이 진할 경우에는 alkaline H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 30분간 담가 탈색하였으며, 균사에 trypan blue가 잘 결합되게 하기 위해 1%의 HCl 용액에 24시간 담가두었다. 뿌리는 acidic glycerol/0.05% trypan blue에 넣어 121°C에서 3분간 고압살균하여 염색하고 glycerol에 넣어 탈색하여 현미경으로 관찰하였다.

난 균근균의 분리. 난 뿌리를 직접 표면살균하고 적당한 배지를 사용하여 난 뿌리 속에 있는 공생균을 다음과 같이 분리하였다(19); 뿌리 절편을 50% 알콜 용액으로 표면살균하고 증류수로 여러 번 헹구어 낸 다음 여러 조각으로 자른후 2%의 NaClO 용액에서 1분간 표면살균하고 살균 증류수로 2~3번 헹구었다. 채집된 뿌리는 5 mm 정도 길이로 자른 4조각을 GS agar, 또는 WA(agar 20 g, tap water 1 l)위에 이식하여, 25°C의 어두운 곳에서 배양하였다. 뿌리 조각으로부터 균사가 성장하면, potato dextrose agar(PDA) 평판 배지에서 재 분리하였다. 각각 분리된 균사는 여러 배지에서 균총의 형태를 관찰하여 형태적인 차이점이 있는 것을 다른 균으로 고려

Table 1. The fungal isolates isolated from the roots of the various orchids<sup>a</sup>

Isolates	Host plants	Descriptives
P1	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Seo-San, Jun-Puk <sup>b</sup>
P2	<i>C. sinense</i>	isolated from the cultivated roots in Mu-Ju, Jun-Puk <sup>b</sup>
P3	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Ko-Chang, Jun-Puk <sup>b</sup>
P6	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Dam-Yang, Jun-Nam <sup>c</sup>
P7	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Hae-Nam, Jun-Nam <sup>c</sup>
P8	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Kum-San Sa, Jun-Puk <sup>c</sup>
P9	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Young-Kwang, Jun-Puk <sup>c</sup>
P10	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Nam-Won, Jun-Puk <sup>c</sup>
P11	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Nam-Won, Jun-Puk <sup>c</sup>
P12	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Jeong-Up, Jun-Puk <sup>c</sup>
P13	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Ko-Chang, Jun-Puk <sup>c</sup>
P14	<i>Denderobium moniforme</i>	isolated from the cultivated roots in Green house <sup>c</sup>
P15	<i>C. goeringii</i>	isolated from the roots in Nae-Ju, Jun-Nam <sup>c</sup>
P16	<i>C. kanran</i>	re-isolated from the cultivated roots inoculated with P2 <sup>d</sup>
F21	<i>C. niveomargonatum</i>	re-isolated from the cultivated roots inoculated with P2 <sup>d</sup>
K21	<i>C. kanran</i>	re-isolated from the cultivated roots inoculated with P2 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>The fungus directly isolated from the roots of the host plants under the sterilized conditions.

<sup>b</sup>Identified as a species of *Rhizoctonia repens* (P1, P2), *R. endophytica* var *endophytica* (P2) and see in detail Lee *et al.* (19).

<sup>c</sup>Isolated from the roots of the host plants at the sites of natural habitat.

<sup>d</sup>Isolated from the roots of the host plants artificially reinoculated with P2.

하여 분리하였다.

**분리균의 동정.** PDA 평판 배지에서 재 분리된 균을 3회 정도 연속적으로 계대 배양하여 균을 순수 분리하였다. 분리한 균사들의 현미경적 특징과 핵의 유무를 관찰하기 위해, Herr(13)가 고안한 염색 방법을 사용하였다. 광학 현미경하에서 균사의 형태, 균총의 덩어리, 포자(spore)와 분생자(conidia)를 관찰하였으며, 포자낭병(sporangiophore) 및 분생자병(conidiophore)의 모양, 색깔, 크기들을 관찰하였다(8). 분리된 균사들은 속(genus)을 먼저 분류했고, 다시 그들의 종 분류를 위해 속의 특성에 따라 2.5% oat meal agar(OMA), water agar(WA), corn meal agar(CMA), carnation leaf agar(CLA) 등의 적당한 배지를 사용하여 배양하였다(19, 21, 23). 각 배지에서 배양했을 때, 나타난 균총의 형태, 색깔들의 특징은 육안 및 해부 현미경으로 관찰하고 기록하여 균의 동정에 이용하였다(5, 22, 26).

**균근균의 PCR.** 멸균된 막자사발에 냉동 보관된 균사체를 넣고 액체질소를 넣은 후 갈아 분말로 만들고 1g 당 3 ml의 extraction buffer(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% SDS)를 넣고 잘 혼합하여 원심분리한 상등액에 1/6부피의 2-propanol을 넣고 -20°C에서 30분 동안 침전시켰다. 이 침전물에 5 ml의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하고, proteinase K와 RNase A를 35°C에 50 min 간 처리한 후, 동일 부피의 PCI(phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)에 1회, CI 용액(chloroform:isoamylalcohol=24:1)에 3회 처리한 후, 1/10 부피의 3 M sodium acetate와 2부피의 ethanol을 가하여 -20°C에서 30분간 침전시켰다(3). 이를 원심 분리하여 얻은 침전물을 70%의 ethanol로 세척하고 건조시킨 후 500 µl의 TE buffer를 넣어 DNA를 용해시켜 -20°C에 보관하고 필요할 때마다 이용하였다. 이렇게 만들진 genomic DNA는 UV로 농도 확인한 후에, 각각 1.0% agarose 전기영동을 통하여 단일 밴드를 확인하였다. Taq™ polymerase와 dNTP는 한국생공(주)에서 Tenmer primer-28(5' GGGC CCGTTG 3')과 primer-36(5' GGGCCC-GAGG '3)를 구입하였고, OPD series primer를 사용하였다. PCR 반응은 일반적인 방법(3, 31)을 기준하여 약간의 변형을 가하였다; 각각의 용량이 25 µl인 PCR 반응액은 10×reaction buffer 2.5 µl, dNTP 10 nM, Taq™ polymerase 1 unit, primer 0.2 pM, DNA 25 ng 등을 혼합하였다. 반응조건은 94°C에서 전 반응시킨 후, 94°C에서 1분→35°C에서 1분→72°C에서 2분간 반응시킨 것을 1 cycle로 하여 총 35 cycle을 진행시켰고, 최종적으로 72°C에서 5분간 반응시킨 후 4°C에서 보관하였다(4).

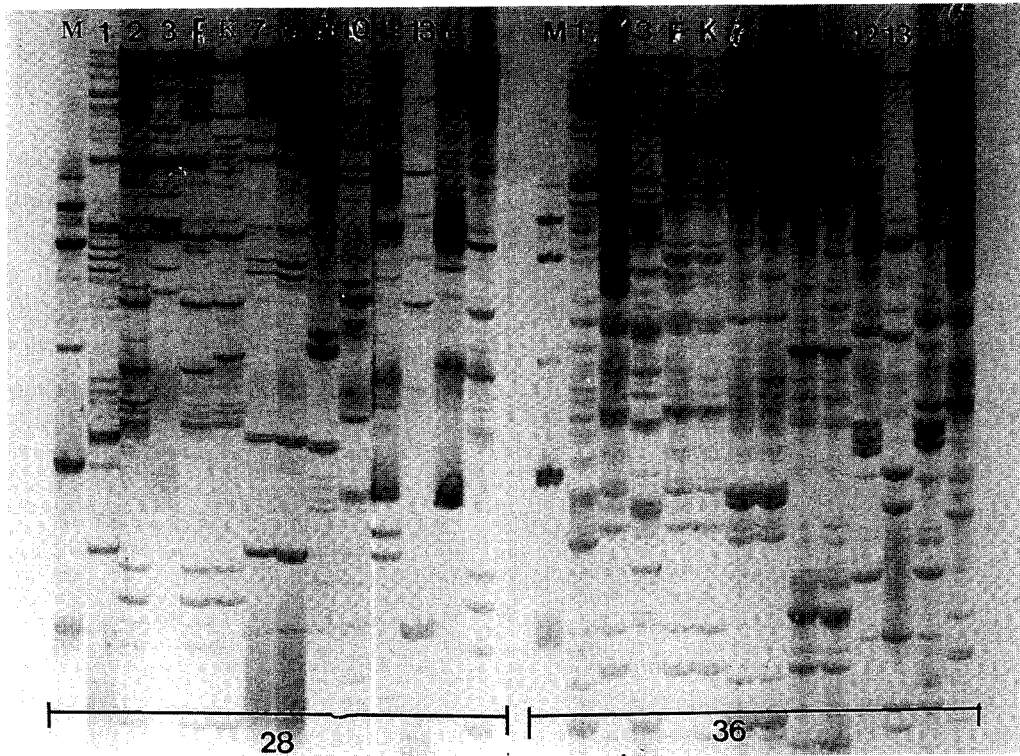
**균근균의 접종.** 난 묘목의 조직 배양 병(직경 7 cm, 높이 16 cm)에 OMA 배지 160 ml를 넣고, 분리 균을 접

종하여 1주일 정도 배양하여 균이 배지 위에 넓게 퍼졌을 때 조직배양 중인 한란(*C. karnan*), 소란(*C. soran*), 옥화(#32, *Cymbidium hybrid husky-honey*) 및 호접난(*Phalaenopsis aphrodite*) 등 상업적으로 많이 재배되는 동양란과 서양란의 난의 유묘를 이식하여 6개월간 온실의 배양실에서 배양하였다(19). 우선, 각각 다른 균인 P7, P8, P12, P14의 분리 균사를 선정한 후, P1 분리 균사를 대조균으로 하여 공생관계를 만들었다. 난의 생장을 조사하기 위해서 줄기의 수와 잎의 길이 및 무게를 측정하였고, 뿌리의 수와 길이 무게도 측정하여 일원배치로 통계처리를 하였다(Least Squared Difference). 식물의 총건중량은 줄기와 뿌리를 합하여 계산한 결과이며, 모든 통계자료는 95% 신뢰도에서 검증하였다. 각각 배양한 후 난의 생장과 관련된 자료인 생체량과 건량은 전자저울로 측정하였다. 자라난 뿌리는 FAA로 고정시킨 후 염색하여 관찰하였다(9, 16).

## 결 과

**난 균근균의 분리.** 각지역에서 채취된 자생 춘란과 재배 난의 뿌리에서 난 공생균을 직접 분리하기 위해서 여러 종류의 배지를 사용한 결과 GS 배지에서 가장 많은 균이 분리되었으며, 다른 종류의 분리 배지에서도 균이 분리되었다. 각각의 지역에서 최소한 10~20개의 균들이 분리되어, 현미경으로 관찰한 결과 *Rhizoctonia*로 동정되는 균만을 분리하였으며, 그 외의 다른 균들은 제거하였다. 분리된 균중 가장 대표적인 균사만을 선정하여, Table 1과 같이 기록하였다. 난 뿌리로부터는 균의 분리와 동시에 뿌리를 염색하여 난 공생균을 관찰하였다. 난 공생균과의 공생으로 인해 뿌리세포에서 균구가 많이 관찰된 식물은 건강하고, 전혀 병징이 없었다. 또한, 난 균근이 공생하는 것으로 인정되는 뿌리에서는 대부분 동일한 균이 분리되었다. 난 공생균은 우리 나라에 자생하는 대부분의 춘란의 뿌리에서 분리되었고, 몇몇 균들은 인위적으로 접종한 난의 뿌리에서 재 분리되었다(Table 1).

**분리균의 동정.** 현미경 관찰에서 균은 PDA상에서 monilioid 형태를 갖고있는 것과 염색을 통해서 2핵성 균사가 관찰되었으며, Sneh(26)의 분류기준에 속하는 것 중에서 대표적인 분리균만을 하나씩 기록하였다. 또한 석곡(P14)과 한란(K21, P16) 및 옥화(F21)에서도 균을 분리하였으나, 분리된 균사 K21과 P21은 인공적으로 접종한 P2균사였다. 이는 균을 접종하고 2~3개월 정도 토양에 재배한 후, 재 분리한 것으로 생리적인 비교와 DNA-PCR을 통하여 재 검정을 하였다. 대부분의 분리 균사는 건강한 춘란의 뿌리에서 분리되었으며, 춘란의 생장을 증진시켰다. PDA상에서 각각의 균사와 생장과 균총의 형태 현미경으로 관찰한 결과, 균총을 형성할때



**Fig. 1.** Polymorphic patterns of the thirteen fungal isolates' genomic DNA made with the primer 28 (5'GGGCCCCGTTG3', left) and the primer 36 (5'GGGCCCCGAGG3', right). The fungal isolates marked 1 for P1, 2 for P2, 3 for P3, F for F21, K for K21, 7 for P7 and so on. The standard molecular weight marked M was 900, 800, 700, 600, 500, respectively.

균사가 배지의 밑으로 성장하는 매물균사 형과 배지 위로 성장하는 기중균사 형의 균사체가 발견되었다. 기중균사의 균총은 적거나 같은 균사의 덩어리를 형성하였고, 특이한 균사의 형태나 포자의 형성은 확인할 수 없었다. 균사의 성장(mm/day)에서는 분리 균사마다 차이가 있었으나, 대체로 5 이하, 10 가까운 값과 20 이상의 균사 성장 속도를 나타내는 것으로 대별되었다. 이러한 것은 균사의 두께와 관련되어 있었다. 또한, 이러한 균사는 연한 갈색을 띄고, 균사의 생장이 빠른 분리 균은 주로 P16, K21 및 F21 분리 균사도 포함하는 P6 및 P16로 나타났고, 이들은 동정 결과 *R. endophytica*(P2)로 판명되었다. 이와 반면에 다른 분리균사는 P3, P7, P8, P12, P14, 및 P15로 가장 많이 분리된 것으로 매물형의 균사를 갖고, 균사의 폭도 좁은 것으로 나타났으며 *R. repens*(P1 및 P3)로 동정되었다. 이와 반면에 균사의 성장 형태가 중간인 P6, P10, 및 P11은 다른 형의 균총을 만들기 때문에 동정 기준에 따라 동정할 수는 없었으나, 두 종의 중간형태를 나타내는 특징을 보여주어서 두종의 중간종으로 사료되었다.

**균근균의 PCR.** 각각의 균들을 PDA에서 배양한 다음, 균사만을 취하여 균사의 genomic DNA를 분리하였으며, 이들을 PCR-RAPD 방법을 통하여 비교하였다. 우

**Table 2.** The characteristics of the fungal isolates on PDA isolated from orchid roots<sup>a</sup>

Isolates	Color of colony	Growth		Nuclei per cell <sup>b</sup>	Thickness of hyphae (µm)
		State	Rate (mm/day)		
P1	Pale white	submerged	4.0	2	2.5~3.5
P2	Brown	cotton puffy	20~25	2	3.0~7.0
P3	Crystal buff	submerged	3.0	2	2.0~3.0
P6	White	cotton puffy	15	2	- <sup>c</sup>
P7	Pale white	submerged	4.0	2	3.0
P8	Pale white	submerged	4.0	2	3.0
P9	White	aerial	12	2	5.0
P10	White	aerial	12	2	7.0
P11	Purple brown	aerial	13	2	7.0
P12	Pale white	submerged	4.0	2	2.0
P13	White	aerial	13	2	5.0
P14	Crystal buff	submerged	4.0	2	2.0
P15	Pale white	aerial	3.0	2	2.0
P16	Brwon	cotton puffy	20~25	2	3.0~7.0
F21	Brwon	cotton puffy	20~25	2	3.0~7.0
K21	Brown	cotton puffy	20~25	2	3.0~7.0

<sup>a</sup>The mycelia of each isolate was grown on PDA at 25°C for observations.

<sup>b</sup>Nuclei per cell and thickness of hyphae were observed by staining hyphae with tryphan blue at higher concentration and slide culture on PDA.

<sup>c</sup>Not observed because the isolate was contaminated.

선, 언급되지 않은 다른 tenmer primer OPD 및 OPO series를 이용하여 균사간의 차이점을 파악한 결과 앞의 결과와 같이 균의 균총 형성과 관련된 결과를 얻었다. 그리고, 바오니어(주)에서 판매되고 있는 primer 28과 36을 사용하여 얻어진 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 각각의 균에서 (P2, K21, F21, P16), (P1, P3, P7, P8, P12, P13, P14), (P6, P10, P11, P13)와 같은 균사의 묶음에서는 매우 유사한 결과가 나타났다. 이러한 결과는 앞의 Table 2에서 균사의 생장 비교에서 얻어진 결과와 일치

하였다. 특히 인공적으로 접종 후 재분리된 P2 계열의 균사는 거의가 동일한 PCR 결과를 나타냈으나, 다른 분리 균에서는 거의 일치되는 PCR의 결과를 얻지 못 하였다.

**균근균의 접종.** 대부분 난의 뿌리부분의 중량은 다른 부분에 비하여 많이 증가하였으며, 심비디움 계통의 난들이 접종한 균사와 공생하는 것이 관찰되었다. 접종한 각각의 균들은 각각 서로다른 반응을 나타내어서 어떤 일정한 특징을 나타내는 것이 없었다. 일반적으로 P1과 P7의 경우는 심비디움 계통의 난에 뿌리 생장을 촉진하

**Table 3.** Growth of the various orchids for six months on the oatmeal agar after being inoculated with several fungal isolates<sup>a</sup>

Orchid cultivars <sup>b</sup>	Isolates <sup>c</sup>	Shoots			Roots			Total dry weight (g)
		No.	Length, (mm)	Dry weight (g)	No.	Length, (mm)	Dry weight (g)	
<i>Cymbidium husky-honey</i>	P 1	6.0	38.3	.56	7.6	33.3	.95	1.51
	P 7	6.6	48.3	.72	6.6	33.3	1.10	1.82
	P 8	6.6	43.3	.79	7.0	20.0	1.05	1.84
	P12	5.0	46.6	.50	5.6	25.0	.73	1.24
	P14	7.3	36.6	.57	7.3	25.0	.81	1.38
	Control	5.6	35.0	.38	6.6	20.0	.74	1.12
	LSD	1.2	3.9 <sup>e</sup>	.17	1.5 <sup>e</sup>	6.6	.29	.62 <sup>e</sup>
<i>Cymbidium soran</i>	P 1	4.2	17	.10	4.6	31.0	.66	.76
	P 7	4.6	22	.23	5.8	29.0	.80	1.03
	P 8	5.2	21	.26	8.2	30.0	1.08	1.34
	P12	10.6	24	.48	3.8	16.0	.76	1.24
	P14	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>
	Control	3.5	17	.17	6.3	23.2	1.03	1.23
	LSD	1.4 <sup>e</sup>	5.7 <sup>e</sup>	.10 <sup>e</sup>	2.6 <sup>e</sup>	6.5 <sup>e</sup>	.41 <sup>e</sup>	.47 <sup>e</sup>
<i>C. kanran</i>	P 1	8.4	46	.65	6.0	53.0	1.91	2.57
	P 7	7.8	54	.50	5.0	32.0	1.58	2.09
	P 8	7.6	49	.58	5.8	46.0	1.91	2.50
	P12	9.4	42	.71	4.6	27.0	1.38	2.10
	P14	8.8	40	.59	5.2	31.0	1.24	1.84
	Control	8.1	41	.73	4.3	27.5	1.41	2.16
	LSD	2.3	11 <sup>e</sup>	.28	1.3 <sup>e</sup>	10.3 <sup>e</sup>	.61 <sup>e</sup>	.84
<i>C. kanran</i>	P 1	8.7	51.2	.75	9.1	25.0	2.15	2.9
	P 7	8.2	48.7	.73	8.2	21.2	1.54	2.2
	P 8	11.8	43.7	.83	7.5	16.2	1.50	2.3
	P12	11.0	52.5	.68	4.7	20.0	1.80	2.5
	P14	10.2	56.8	.87	3.8	31.8	1.32	2.1
	Control	10.0	43.7	.48	5.5	20.0	1.20	1.6
	LSD	1.8 <sup>e</sup>	8.7 <sup>e</sup>	.23 <sup>e</sup>	2.6 <sup>e</sup>	9.3 <sup>e</sup>	.66	.74 <sup>e</sup>
<i>Phalaenopsis</i>	P 1	2.3	34.1	.81	5.3	50.0	2.41	3.22
	P 7	3.5	30.8	1.11	4.0	52.5	1.91	3.02
	P 8	3.8	34.1	1.37	4.8	45.0	1.67	3.04
	P12	3.6	25.8	.98	4.8	47.5	2.50	3.48
	P14	3.3	32.5	.89	5.0	70.8	2.90	3.79
	Control	2.8 <sup>f</sup>	28.0 <sup>f</sup>	.87 <sup>f</sup>	3.2 <sup>f</sup>	61.0 <sup>f</sup>	1.59 <sup>f</sup>	2.47 <sup>f</sup>
	LSD	1.3	10.3	.60	1.4 <sup>a</sup>	24.8	0.92 <sup>e</sup>	1.32

<sup>a</sup> Averaged values from six or five replicates measured for six months of cultivation on the oatmeal agar under the laboratory conditions.

<sup>b</sup> The orchids of *Cymbidium* hybrid employed from Lab of Dr. Paek.

<sup>c</sup> The fungal isolate isolated from the roots of Korean native orchid plants.

<sup>d</sup> All orchids were dead during the experimental periods.

<sup>e</sup> The difference between two means is significant at the confidence level of 95%, if that > the LSD mentioned above.

<sup>f</sup> The one third of the orchids were dead. Thus, the means of the growth were calculated from the survived orchids.

였으나, 호접란의 경우는 줄기의 생장을 증진시켰다. 분리균인 P12와 P14는 심비디움 계통의 난에 대해서는 생장효과를 나타내지 않았으나 호접란에서는 뿌리의 생장을 증진시켰다.

## 고 찰

이제까지 난 공생균의 대부분은 *Rhizoctonia*속으로 밝혀졌으나(26), 최근 완전 세대에 대한 연구결과는 불완전 세대의 *Rhizoctonia*와는 다른 담자균의 屬으로 밝혀지고 있다(5). 특히 포자가 형성되지 않는 대부분의 *Rhizoctonia*의 경우에는 분자 생물학적인 특징들이 규명되어, 자연적인 분류에 가까운 분자 생물학적 접근이 시도되고 있다(22). 난 공생균에 대한 종 분류에서 균사의 모양과 균사의 덩어리를 비교하고, 균사내의 핵상을 관찰하는 것이 중요한 기준으로 알려져있다. 본 실험에서 분리된 균을 형태적으로 분류한 결과 *R. repens*(RR; *Tulasnella calospora*; 1, 29, 30)와 *R. endophytica* var. *endophytica* (RE; *Ceratobasidium cornigerum*; 1, 29)로 동정되었다(19). 우리나라 자생 난뿌리에서 분리한 대부분의 균들이 *R. repens*로 나타났으며, 이는 다른 연구자들이 여러 난에서 분리한 균과 동일한 것으로 나타났다. 그러나, 캐나다의 재배난에서 분리된 RE가 우리나라의 재배난에서 분리된 것을 보면 RE는 외국에서 도입된 난에서 전파된 균으로 생각되며 RR은 우리나라에 토양 속에 있는 자생 난의 공생균으로 사료된다. 이러한 면에서 난 공생균의 분리는 난 재배와 관련되어 중요하다고 생각된다.

우선 본 연구실에서 배양한 한국 자생 춘란의 뿌리에서 분리된 공생균의 모두가 동일한 종으로 생각된다. 우선, 배지에서 균의 생장 양상과 균사의 현미경적 관찰 결과 3개의 그룹으로 나타나고 있었다. 이러한 것을 다시 PCR-RAPD 방법을 통한 단순화 작업으로 시도한 결과 Fig. 1에서 나타난 것과 같이, P2와 관련된 균사는 모두 쉽게 구분할 수 있었다. 전혀 다른 PCR-RAPD의 DNA band에서 다르게 분화된 면을 관찰할 수가 없었으며, RR의 PCR-RAPD의 DNA band 차이와는 다르게 나타났다. 여기서, PCR반응에 대한 유사도를 작성할 수 있었으나, 본 실험의 목적은 난 공생균에 대한 차이점을 관찰하는 것이어서 생략하였다. 우리나라의 자생 난에서 분리된 RR은 오랫동안 춘란과 공생관계를 유지해 오면서, 다양한 형태의 변이 균사가 만들어졌을 것으로 생각되며, RE는 분리균의 수와 PCR-RAPD의 DNA band의 다양성이 떨어지는 것을 볼때, 최근에 외국에서 난의 수입과 함께 우리 나라에 도입된 것으로 사료된다.

분리 균사인 P1 및 P3와 관련된 여러 난 공생균들은 서로 다른 PCR-RAPD의 DNA band들이 보였다. 또한,

여러 난 유묘에 대한 반응도 차이가 나타났다(17, 18). 본 실험에서 춘란의 유묘를 구하지 못하였기 때문에, 다양한 난 유묘를 사용하여, 유묘에 대한 공생균의 생물학적인 반응을 관찰하고자 하였다. 본 실험에서는 직접 난 용토에서 키운 결과는 아니었지만, 인공적인 환경에서 6개월 동안 난이 자란 결과로는 다양한 반응을 나타낸 것으로 생각된다. 우선, 균사의 생장과 PCR-RAPD의 양상이 난의 반응과 유사하게 나타났다. 과거 실험에서는 RE는 춘란 혹은 심비디움 계통의 난에서는 생장의 촉진효과를 나타내지 않았고, 약간의 병원성을 띠고 있었다(19, 21). 그러나 호접란과 자란에서는 RR과 비슷한 생장 증진효과를 나타내서, 난의 공생균인 것으로 나타났다. 현재 얻어진 자료에서는 같은 종내의 분리균은 지역에 따라서 유전적인 성격이 다르고, 식물에 대한 반응도 다른 것으로 나타났다(Fig. 1). 우리 나라에 자생하는 춘란은 유전적으로 다양한 변이를 나타내는 RR균과 공생하고 있는 것으로 나타나서 앞으로는 연구 결과에 따라서는 새로운 많은 공생균을 발견할 수 있으리라 사료되며, 이러한 연구 결과는 난의 재배는 물론 난의 공생과 관련된 원에 산업에 도움을 줄 수 있는 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

## 요 약

한국의 춘란 자생지의 춘란(*Cymbidium goeringii*) 뿌리에서 공생하는 10개의 균근균을 분리하였다. 분리된 난 균근균을 PDA에서 배양한 결과 균총은 다양한 색깔을 나타내었으며, 생장 속도도 달랐다. 분리된 난 균근균을 현미경으로 관찰한 결과 *Rhizoctonia repens* 또는 *R. endophytica* var. *endophytica*로 동정되었다. *R. repens*는 자생란인 춘란의 뿌리에서 많이 분리되었으며, *R. endophytica* var. *endophytica*는 상업적으로 재배되는 외국산의 난 뿌리에서 분리되었다. 분리된 균들 중에 *R. repens*와 유사한 5개의 분리균을 oatmeal agar에 접종하고 배양한 후 여러종의 난 유묘를 이식하여 난의 생장을 관찰하였다. 그 결과 난의 생장은 분리 균에 따라서 다양하였으나 대부분의 난은 생장촉진 반응을 나타내서, 분리균과 각각의 난과의 공생 관계를 관찰할 수 있었다.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant from the Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, at College of Agriculture, in Chung-Buk National University (Chung-Ju, Chung-Puk 360-763), Republic of Korea

## 참고문헌

1. Arditti, J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley & Sons, Inc. N.Y.
2. Atlas, R. M. and Bartha, R. 1993. *Microbial ecology*. 3rd eds. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. California.
3. Clapp, J. P. 1996. *Species diagnostics Protocols. PCR and other Nucleic Acid Method*. Hamana Press. New Jersey.
4. Cook, D. E. L., Kennedy, D. M., Guy, D. C., Russell, J., Unkles, E. and Duncan, J. M. 1996. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 100:297-303.
5. Currah, R. S. and Zelmer, C. 1992. A key and notes for the genera of mycorrhizal fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. Rept. *Tottori Mycol. Inst.* 30:43-59.
6. Currah, R. S., Smreciu, E. A. and Hambleton, S. 1989. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). *Can. J. Bot.* 68:1171-1181.
7. Currah, R. S., Sigler, L. and Hambleton, S. 1987. New records and taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Can. J. Bot.* 65:2473-2482.
8. Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. 1980. *Compendium of soil fungi*. Volume 1. Academic Press, London.
9. Eom, A. H., Lee, S. S., Ahn, T. K. and Lee, M. W. 1994. Ecological roles of arbuscular mycorrhizal fungi in two wild legume plants. *Mycoscience* 35:69-78.
10. Hadley, G. and Williamson, B. 1972. Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. *New Phytol.* 71:1111-1118.
11. Harley, J. L. and Smith, S. E. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. pp.267-295.
12. Harvais, G. and Hadley, G. 1967. The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 66:205-215.
13. Herr, L. J. 1979. Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia* like fungi. *Phytopathology* 69:958-961
14. Jonsson, L. and Nylund, J. E. 1979. *Favolaschia dybowskyana* (Singer) Singer (Aphyllophorales), a new orchid mycorrhizal fungus from tropical Africa. *New Phytol.* 83:121-128.
15. Kim, W. G. 1993. Morphological and cultural characteristics of fungi causing rice sclerotial disease. *Korean J. Mycology.* 21:16-22.
16. Koske, R. E., and Gemma, J. N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92:486-505.
17. Lee, S. S. and Lee, K. H. 1992. Identifications and Taxonomic groupings of rhizobial species isolated from leguminous plants in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 8:195-203.
18. Lee, S. S. and Lee, K. H. 1992. Interactions between legume plants and Korean native rhizobial isolates. *Korean J. Plant Pathol.* 8:254 - 263..
19. Lee, S. S., Riew, H. K. and Paek, K. Y. 1997. Isolations of orchid mycorrhizal fungi from the Korean native orchid plants. *Korean J. Mycology* 25:101-110.
20. Lee, S. S., Oh, C. H., Seon, J. H. and Paek, K. Y. 1998. *Cultivations of the Orchid Plants on the Soils of Korean Native Orchids*. The Flower Dome '98. Aichi Flower Festival · The Nagoya International Orchid Show. In press.
21. Lee, S. S., Park, S. S., Kim, T. J. and Paek, K. Y. 1997. Effect of orchid habitat soil on growth of tissue cultured *Cymbidium kanran* and *C. goeringii*, and root infection of orchid mycorrhizal fungus. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 38:176-182.
22. Moore, R. T. 1987. The genera of Rhizoctonia-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon* 29:91-99.
23. Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasa, W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press.
24. Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. M. 1992. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. see pp.115-128 and 157-165. The American Phytopathological Society.
25. Smith, S. E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* 65:488-499.
26. Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society Press.
27. Taylor, L. and Brum, T. D. 1994. A view of specificity in orchid mycorrhizae using molecular symbiont identification. Poster presented at the Fifth International Mycological Congress, August, 1994 Vancouver, British Columbia, Canada.
28. Taylor, L. and Brum, T. D. 1997. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two non-photosynthetic orchids. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 94:4510-4515.
29. Warcup, J. H. 1981. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New Phytol.* 87:371-381.
30. Warcup, J. H. and Talbot, P. H. B. 1967. Perfect stages of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytol.* 66:631-41.
31. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
32. Yang, W. Q. and Goulart, B. L. 1997. Aluminum and phosphorus interactions in mycorrhizal and nonmycorrhizal highbush blue plantlets. *J. Amer. Hort. Sci.* 122:24-30.
33. Zettler, L. W. and McInnis, T. M. Jr. 1993. Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana* 8:155-162.

(Received June 25, 1998)