

광릉요강꽃과 복주머니란의 뿌리에서 분리한 내생균의 다양성

이봉형¹ · 한한결¹ · 권혜진² · 엄안흠^{1*}

¹한국고원대학교 생물교육과, ²국립수목원 산림자원보존과

Diversity of Endophytic Fungi Isolated from Roots of *Cypripedium japonicum* and *C. macranthum* in Korea

Bong-Hyung Lee¹, Han-Kyeol Han¹, Hye-Jin Kwon² and Ahn-Heum Eom^{1*}

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

²Plant Conservation Division, Korea National Arboretum, Pocheon 487-821, Korea

ABSTRACT : This study was conducted to investigate diversity of orchid endophytic fungi from roots of two terrestrial orchids, *Cypripedium japonicum* and *Cypripedium macranthum* in Korea. The endophytic fungi were identified using morphological and DNA sequences isolated from the roots. Totally, 11 taxa of the endophytic fungi were identified from the roots of *C. japonicum* and 15 taxa from *C. macranthum*. Three species of the fungi were common in both host species; *Leptodontidium orchidicola*, *Humicola fuscoatra* var. *fuscoatra*, *Umbelopsis dimorpha*. Six species of the fungal isolates were the first report in Korea; *Oidi dendron echinulatum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Geomyces vinaceus*, *Cryptosporiopsis ericae*, *U. dimorpha*, *Chaetomium cupreum*.

KEYWORDS : *Cypripedium japonicum*, *Cypripedium macranthum*, Fungal Endophytes, Orchid Roots

서론

과거에는 난초의 특별한 수분과정과 수분을 위한 적응 과정에 초점을 맞추어 연구를 진행하였다. 그러나 난의 생존과 종자 발아에 곰팡이가 중요한 영향을 미친다는 사실이 밝혀지면서 이와 관련된 난균근균(orchid mycorrhizal fungi)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 난균근균은 담자균류에 속하는 균으로 난과식물 뿌리 피층에 peloton이

리는 구조를 형성한다[1]. 이와 더불어 난과식물은 난균근균과의 상호작용을 통해 종자 발아와 초기 엽록소 생성 및 성장 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 특히 100여종의 비광합성 난초들은 영양학적으로 공생관계에 있는 난균근균에 완전히 의존(myco-heterotrophic)하고 있음이 밝혀짐에 따라 숙주와 난균근균과의 상호작용에 관한 관심도가 높아지고 있다[2].

난초과 식물의 뿌리에는 난균근균과 더불어 다양한 비균근성 내생균(endophytes)도 서식하는 것으로 보고되어 왔다[3]. 내생균은 숙주식물의 잎이나 뿌리 등에 서식하는 비병원성 균을 의미하며, 이차대사산물을 분비함으로써 식물에게 이득을 제공하는 상리공생관계로 알려져 있다[4]. 난초과 식물의 뿌리에서 균근균의 역할에 대한 연구는 활발하게 진행되고 있는 반면 내생균에 관한 연구는 아직 미미한 실정이다. 그러나 일부 내생균이 난의 종자발아를 촉진시킨다는 사실은 100여년 전부터 알려져 왔다[5]. 실제로 *Cypripedium reginae*의 종자에서 분리된 균류(*Fusarium* sp.)가 *in vitro* 환경에서 이 식물의 종자발아를 촉진시켰다[6]. 또한 균 다양성의 측면에서 내생균에 대한 연구는 매우 중요하다. 난초과 식물은 피자식물의 10%를 차지하며,

Kor. J. Mycol. 2015 March, 43(1): 20-25
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.1.20>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received March 2, 2015
 Revised March 7, 2015
 Accepted March 7, 2015

©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.

이 식물의 뿌리는 다른 식물과 해부학적, 형태학적, 생태학적으로 많은 차이를 보이고, 열대지역에 있는 난들에 공생하는 내생균은 균 다양성에 거의 포함되어 있지 않기 때문이다[7].

복주머니란속(*Cypripedium*)의 식물은 40~50종이 우리나라를 포함한 북반구 온대에 대부분 분포하고 있으며, 꽃이 크고 아름다워 관상학적 가치가 매우 큰 식물이다. 특히 이 속의 대표식물인 광릉요강꽃(*Cypripedium japonicum*)과 복주머니란(*Cypripedium macranthum*)은 자생식물 재배에 대한 관심이 높아짐에 따라 남획에 의한 피해가 급증하고 있고, 산림훼손으로 인한 자생지 파괴와 생태계 변화 등으로 멸종위기에 처해 있다. 두 종 모두 산림청 지정 멸종위기식물로 지정되었으며 [8], 광릉요강꽃은 환경부 지정 멸종위기 식물 1급으로 지정되어 보호가 시급한 실정이다. 아울러 광릉요강꽃이 속하는 복주머니란속의 식물은 이식할 경우 대부분이 수년에 걸쳐 도태과정인 진행되며 결국 죽는 것으로 알려져 있고, 인위적인 증식이 매우 까다로워 현재까지 인공증식 기법이 개발되지 않고 있다. 이러한 어려움에도 불구하고 이들 종의 증식과 복원에 공생하는 균 균을 활용하고자 하는 연구가 국내에서도 진행되고 있으나 [9], 난초과 식물의 뿌리에 공생하는 비균근성 내생균에 대한 연구는 현재까지 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 광릉요강꽃과 복주머니란의 뿌리에서 내생균을 분리하고 형태학적분자적으로 동정을 수행하여, 이들 두 난의 보존과 증식을 위한 균주를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 채집 및 내생균 분리

경기도 포천에 서식하는 광릉요강꽃 4개체의 뿌리와 강원도 춘천에 서식하는 광릉요강꽃 2개체의 뿌리를 채집하였고, 강원도 삼척시에서 복주머니란 6개체의 뿌리를 채집하였다. 채집한 뿌리는 냉장보관하였고, 48시간 이내에 균 분리를 수행하였다.

뿌리에서 균 분리 방법은 Richardson 등 [10]의 방법을 변형하여 사용하였다. 먼저 채집한 뿌리를 흐르는 수돗물로 표면을 세척한 후 증류수로 한 번 더 세척하였다. 70% 에탄올과 3% NaClO 용액을 차례로 처리하고, streptomycin과 chloramphenicol을 이용하여 표면을 살균하였다. 뿌리 표면의 물기를 제거한 후 약 5 mm 길이로 자른 4개 조각을 water agar (WA) 배지에 치상하였다. 25°C 항온기에 보관하면서 매일 균사가 뻗어 나오는지 관찰하였으며 뻗어 나온 균사는 potato dextrose agar (PDA) 배지로 옮겨서 3회 이상 계대배양하여 순수 분리하였다.

분자마커를 이용한 동정

순수 분리되어 배양된 내생균은 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)을 사용하여 genomic

DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 주형으로 하여 polymerase chain reaction (PCR) 반응을 수행하였으며, 균 특이적인 프라이머 ITS1F와 ITS4를 사용하여 rDNA의 internal transcribed spacer (ITS) 지역을 증폭하였다 [11]. 프라이머는 사용 전 10 pmol의 일정한 농도로 맞추었으며, ITS1F와 ITS4를 각각 1 µL, 주형 DNA를 1 µL, 멸균수 7 µL, 2X Taq Premix (SolGent, Daejeon, Korea) 10 µL를 넣어 최종 반응 용량을 20 µL로 맞추었다. 각 반응의 단계는 먼저 95°C에서 5분간 pre-denaturation, 95°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 20초간 annealing하였다. 그 후 72°C에서 1분간 elongation한 후 35 cycle 반복하였다. 최종적으로 72°C에서 10분간 안정화시킨 후 4°C에서 보관하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 20분간 전기영동하였고, 예상되는 크기의 band를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다 (SolGent). 분석된 염기서열들은 NCBI상에서 BLAST를 이용하여 유사도를 확인한 후 각 종들간의 계통관계 분석을 통한 topological position을 보기 위해 MEGA5 [12]를 이용하여 neighbor-joining 계통수를 완성하였다.

결과 및 고찰

경기도 포천과 강원도 춘천에서 채집한 광릉요강꽃에서 내생균을 분리하여 ITS 지역의 염기서열을 통해 동정한 결과 총 11종의 균주를 확인하였다 (Table 1, Fig. 1). 또한 강원도 삼척에서 채집한 복주머니란에서 동일한 방법으로 동정한 결과 15종의 균주가 확인되었다 (Table 1, Fig. 2).

두 지역의 광릉요강꽃과 삼척에서 채집한 복주머니란의 뿌리에서 모두 발견된 균주는 *Leptodontidium orchidicola* 이었다. 포천의 광릉요강꽃과 삼척의 복주머니란에서 모두 분리된 균주는 *Humicola fuscoatra* var. *fuscoatra*와 *Umbelopsis dimorpha* 이었고, 그 외의 균주는 한 지역에서 채집된 개체에서 분리되었다. 광릉요강꽃과 복주머니란에서 분리된 각각의 균주들은 비교하면, 유사성이 높지 않은 것으로 보이나, 일부 종은 Zelmer [13]가 복주머니란속 난초과 식물에서 분리한 내생균 관련 선형연구와 비슷한 내생균으로 생각된다. Zelmer [13]는 캐나다에 자생하는 복주머니란속 난초과 식물 뿌리에서 내생균을 분리하여, *Alternaria* sp., *Chaetomium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Epicoccum purpureum*, *Phialocephala* sp., *Phoma* sp., *Acremonium killense*, *Humicola* sp., *Fusarium* sp. 등을 보고하였다. 이들 균주 중 *Phialocephala* sp.가 가장 높은 빈도로 발견되었던 내생균인데, 본 연구에서도 삼척에서 채집한 복주머니란에서 같은 속에 속하는 *Phialocephala fortinii*가 발견되었다. *P. fortinii*는 지생란의 뿌리에서 가장 흔하게 볼 수 있는 내생균으로 알려져 있다 [3]. 이 균주는 난초과 식물뿐만 아니라 다른 식물의 뿌리에서도 흔하게 발견되는 dark separate endophytes이다. *P. fortinii*는 식물 뿌리 사이에 균사연결 (mycelial connection)을 통하여 광합성 산물과 유기물을

Table 1. Endophytic fungi isolated from roots of *Cypripedium japonicum* and *Cypripedium macranthum*

Host Species	Collect site	Specimen no. of NIBR	Fungal Isolates	Closest taxon	Accession No.	
<i>C. japonicum</i>	Chuncheon	KOSPF0000126167	13P041	<i>Neonectria radicola</i>	GU479904.1	
		KOSPF0000126116	13P043	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	GQ302678.1	
		KOSPF0000125946	13P045	<i>Penicillium janthinellum</i>	HM214448.1	
		KOSPF0000126197	13P048	<i>Geomyces vinaceus</i>	AJ608972.1	
		Pocheon	KOSPF0000126135	13P001	<i>Scytalidium lignicola</i>	GU934579.1
			KOSPF0000126161	13P002	<i>Oidiodendron echinulatum</i>	NR_119423.1
			KOSPF0000126198	13P004	<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	FJ590607.1
			-	13P010	<i>Aspergillus ruber</i>	AY373891.1
			KOSPF0000126113	13P012	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	GU479910.1
		KOSPF0000126195	13P016	<i>Geomyces vinaceus</i>	AJ608972.1	
	KOSPF0000125988	13P157	<i>Humicola fuscoatra</i> var. <i>fuscoatra</i>	KF981440.1		
	KOSPF0000126296	13P158	<i>Umbelopsis dimorpha</i>	KC489478.1		
	KOSPF0000125995	13P200	<i>Phlebia tremellosa</i>	KF313123.1		
	<i>C. macranthum</i>	Samcheok	KOSPF0000126048	13P053	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF439462.1
			KOSPF0000126003	13P054	<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	AY853167.1
KOSPF0000126169			13P059	<i>Ceriporia lacerate</i>	KF850375.1	
KOSPF0000126117			13P062	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	GQ302678.1	
KOSPF0000126291			13P065	<i>Umbelopsis dimorpha</i>	KC489478.1	
-			13P069	<i>Chaetomium cupreum</i>	JQ676206.1	
KOSPF0000126130			13P072	<i>Phialocephala fortinii</i>	AB671499.2	
KOSPF0000125958			13P074	<i>Penicillium spinulosum</i>	AY373933.1	
-			13P087	<i>Oidiodendron maius</i>	HQ608115.1	
KOSPF0000126132			13P110	<i>Phialocephala</i> sp.	KF313098.1	
KOSPF0000126297			13P122	<i>Umbelopsis isabellina</i>	JN943789.1	
-			13P129	<i>Humicola fuscoatra</i> var. <i>fuscoatra</i>	KF981440.1	
KOSPF0000126105			13P139	<i>Leohumicola verrucosa</i>	AY706320.1	
KOSPF0000125948			13P142	<i>Penicillium montanense</i>	HQ157959.1	
KOSPF0000125949			13P147	<i>Penicillium restrictum</i>	GU565105.1	

운반해주는 등의 역할을 하는 외생균근성 특징을 보이는데 [14] 난 뿌리에서도 동일한 역할을 하는지는 아직 밝혀지지 않았다[15]. 또한 선행연구의 복주머니란속에서 분리된 *Humicola* sp.와 같은 속의 균주인 *Humicola fuscoatra* var. *fuscoatra*가 포천의 광릉요강꽃과 삼척의 복주머니란에서 모두 분리되었으며, *Chaetomium*속의 *Chaetomium cupreum*는 삼척의 복주머니란에서 분리되었다.

두 지역의 광릉요강꽃과 삼척에서 채집한 복주머니란에서 모두 분리된 *L. orchidicola*의 경우 난 뿌리에서 처음 분리되어 국제적으로 신종 보고가 되었다[16]. 또한 *Calypso bulbosa*, *Coeloglossum viride*, *Platanthera hyperborea* 등의 지생란에서 분리되었다는 보고가 있고[13,16], 균종속영양 (myco-heterotrophic) 난초과 식물인 *Corallorhiza maculate*

에서도 분리되었다[13]. 이를 통해 *L. orchidicola*는 난초과 식물의 뿌리에 밀접한 관계를 맺고 있는 내생균이라고 생각되며, 국내에 자생하는 다른 난초과 식물에도 공생관계를 형성하고 있는지 그리고 난초과 식물과의 공생관계에서 어떤 역할을 하고 있는지 확인할 필요가 있을 것이다. *L. orchidicola*는 리그닌을 분해하는 polyphenol oxidases 효소를 만드는 것으로 알려져 있으나[17], 실제 숙주 내에서 유기물을 분해하기 위한 효소활성을 나타내는지에 대해서는 아직까지 명백히 밝혀지지 않았다. 그 외 분리된 균주의 특징을 살펴보면 삼척에서 채집한 복주머니란에서 분리된 *C. ericae*는 난초과 식물을 비롯하여, 진달래과 식물과 침엽수, 활엽수의 뿌리까지 넓은 영역의 식물과 공생관계를 형성하는 내생균으로 알려져 있다[18]. 난과식물에서는 *Max-*

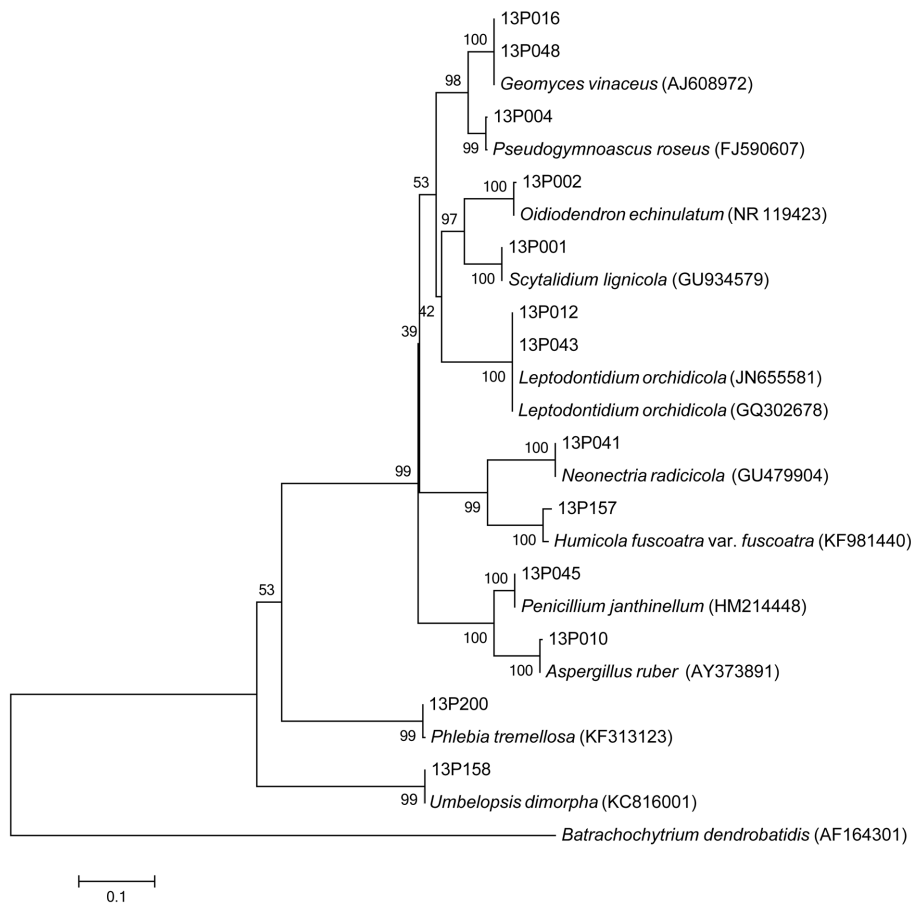


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree for endophytic fungal strains from *Cypripedium japonicum*. Internal transcribed spacer region was used to analyze a topological position and *Batrachochoytrium dendrobatidis* was used as an outgroup.

illaria uncata, *Pleurothallis corniculata* 등의 착생란에서 분리되었다는 보고가 있다[10].

동정된 균주들을 강(class) 수준에서 보면 Leotiomycetes 가 약 40%로 가장 높은 비율을 차지였으며, 이 강에 속하는 균주인 *Oidiodendron echinulatum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Geomyces vinaceus*, *Cryptosporiopsis ericae* 등은 국내 미기록 종으로 확인되었다. 또한 *U. dimorpha*와 *C. cupreum* 등도 분리되었는데 이 역시 국내 미기록종으로, 이 연구를 통해 총 6종의 국내 미기록종을 확인하였다. 분리된 균주의 수가 적음에도 불구하고 국내 미기록 종의 비율이 높은 것은 국내의 균 다양성 연구에서 난초과 식물의 중요성을 시사한다고 볼 수 있다.

난초과 식물의 뿌리에 공생하는 내생균의 숙주 특이성과 숙주에서의 역할에 대한 논쟁은 계속되고 있다. 앞에서 분리된 많은 균주들이 복주머니란속의 식물들과 숙주 특이성이 있는지 또는 어떤 역할을 하는지에 대한 논의도 한계가 있을 수 있으나, 국내 희귀 난초과 식물의 난 내생균 연구의 첫 걸음이 될 수 있는 균주의 다양성을 확인하는 시도가 되었다는 점에서 본 연구의 의미를 찾을 수 있다. 아직까지 국내에서는 난초과 식물에 공생하는 내생균의

다양성에 대한 연구가 미미한 실정이다. 또한 이런 내생균이 숙주에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 찾아볼 수 없다. 광릉요강꽃과 복주머니란을 비롯하여 많은 자생란들이 멸종의 위기에 처해있는 상황에서 난초과 식물의 보존을 위해 난균근균 뿐만 아니라 내생균에 대한 연구가 더욱 필요한 시점이다.

적 요

본 연구에서는 경기도 포천과 강원도 춘천에 자생하는 광릉요강꽃과 강원도 삼척에서 자생하는 복주머니란의 뿌리에서 내생균을 순수 분리하였고, 분리된 균주의 ITS 부위의 염기서열을 이용하여 계통 분석하였다. 그 결과 광릉요강꽃에서는 11종의 균주가 분리되었고, 복주머니란에서는 15종의 균주가 분리되었으며, *Leptodontidium orchidicola*, *Humicola fuscoatra* var. *fuscoatra*, *Umbelopsis dimorpha* 등의 균주는 공통으로 분리되었다. 분리된 균주 중 *Oidiodendron echinulatum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Geomyces vinaceus*, *Cryptosporiopsis ericae*, *Umbelopsis dimorpha*, *Chaetomium cupreum* 은 국내 미기록종으로 확인하였다.

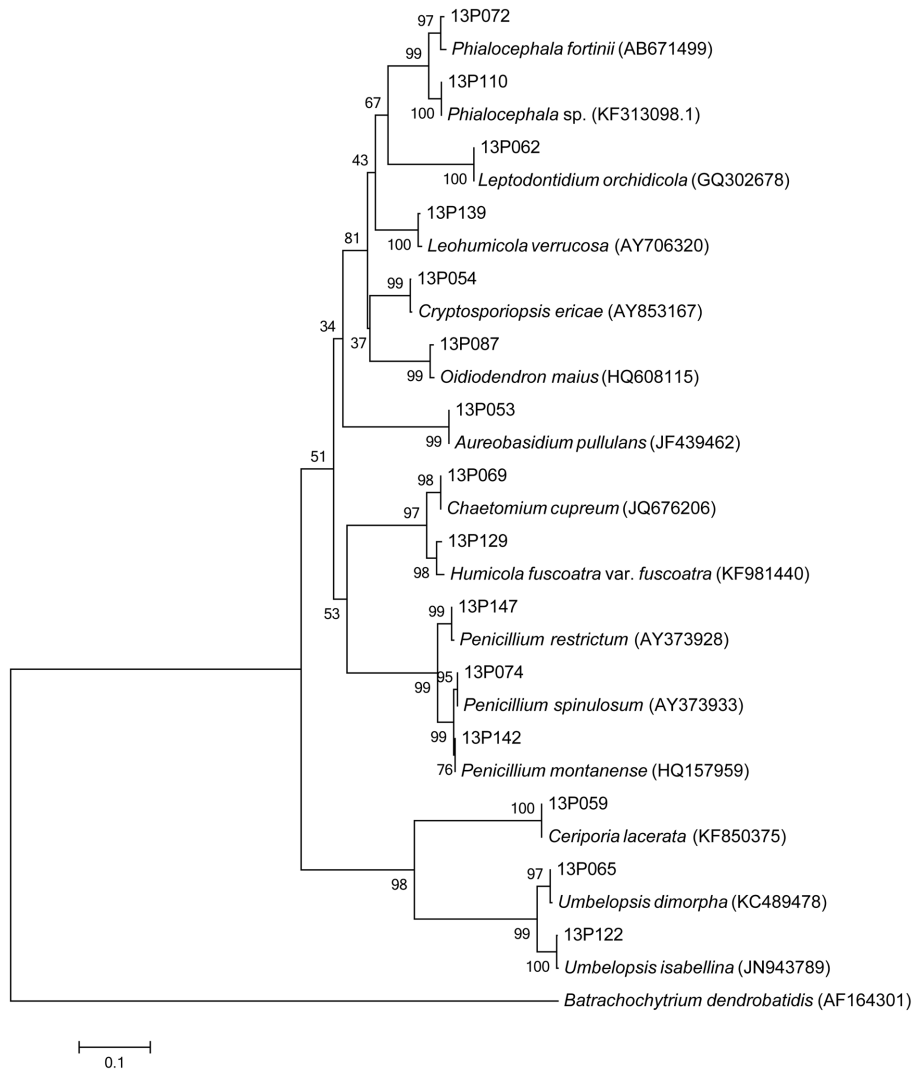


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree for endophytic fungal strains from *Cypripedium macranthum*. Internal transcribed spacer region was used to analyze a topological position and *Batrachochytrium dendrobatidis* was used as an outgroup.

Acknowledgements

This study was supported by Korea National Arboretum (KNA 1-2-10, 10-1) and National Institute of Biological Resources (NIBR No 2013-02-001) of Korea.

REFERENCES

1. Rasmussen HN. Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant. New York: Cambridge University Press; 1995.
2. Leake JR. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. New Phytol 1994;127:171-216.
3. Currah RS, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA. Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J, Pridgeon A, editors. Orchid biology: reviews and perspectives, VII. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1997. p. 117-70.
4. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 1988;69:2-9.
5. Bernard N. L'évolution dans la symbiose: les orchidées et leurs champignons commensaux. Paris: Masson et Cie, Éditeurs; 1909.
6. Vujanovic V, St-Arnaud M, Barabé D, Thibeault G. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. Ann Bot 2000;86:79-86.
7. Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. Mycol Res 2001;105:1502-7.
8. Lee BC, Yang HH, Kim JS. Rare plants data book in Korea. Pocheon: Korea National Arboretum; 2009.
9. Sim MY, Youm J, Chung J, Lee B, Koo CD, Eom AH. Characteristic of orchid mycorrhizal fungi from roots of *Cypripedium japonicum* and *C. macranthum*. Kor J Mycol 2010;38:1-4.
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 T. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993;2:113-8.
 12. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-9.
 13. Zelmer CD. Interactions between northern terrestrial orchids and fungi in nature [dissertation]. Edmonton (AB): University of Alberta; 1994.
 14. 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.
 15. Rasmussen HN. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 2002;244:149-63.
 16. Currah RS, Sigler L, Hambleton S. New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Can J Bot* 1987;65:2473-82.
 17. Fernando AA, Currah RS. *Leptodontidium orchidicola* (Mycelium radialis atrovirens complex): aspects of its conidiogenesis and ecology. *Mycotaxon* 1995;54:287-94.
 18. Gorzelak MA, Hambleton S, Massicotte HB. Community structure of ericoid mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. *Fungal Ecol* 2012;5:36-45.