

감자난초 뿌리에서 분리한 내생균의 동정

이봉형 · 김동여 · 박혁 · 엄안흠*

한국교원대학교 생물교육과

Notes on Endophytic Fungi Isolated from Roots of *Oreorchis patens* in Korea

Bong-Hyung Lee, Dong Yeo Kim, Hyeok Park and Ahn-Heum Eom*

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

ABSTRACT : Endophytic fungi were isolated from surface-sterilized roots of a species of orchid, *Oreorchis patens*, in Korea. The isolated strains were identified based on morphological characteristics and sequence analyses of the internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) of rDNA regions. Two species, *Thelonectria veuillotiana* and *Phialocephala humicola*, are first reported in Korea with their descriptions.

KEYWORDS : Endophytes, Orchid roots, *Phialocephala humicola*, *Thelonectria veuillotiana*

난초과(Orchidaceae)는 식물을 구성하는 과(family) 중 가장 큰 그룹에 속하며, 개화식물의 약 1/10에 가까운 25,000여종이 전 세계적으로 분포하고 있다[1]. 한반도에 현재 2아과, 5속, 46속에 속하는 100여종의 야생난들이 보고되고 있으며[2], 그 중 환경부 지정 멸종위기 1급 식물 9종 중 6종이 난초과 식물일 정도로 심각한 멸종 위기에 처해 있다. 이러한 난초과 식물에 공존하고 있는 다양한 미세 균류는 거의 연구가 이루어지지 않았다. 그러나 난초의 뿌리는 형태학적, 생태학적 특징이 다른 식물들과 구별되고, 열대 지역에 있는 좋은 균 다양성 연구에 많이 포함되어 있지 않기 때문에, 균 다양성 연구에 매우 중요한 숙주이다[3].

난 뿌리에 존재하는 균류는 균근성 균(orchid mycorrhizal fungi)과 비균근성인 내생균(endophytes)으로 나눌 수

있다[4]. 난균근균은 뿌리 피층에 peloton이라는 구조를 형성하며[5], 무기염류의 흡수 촉진과 종자발아에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[6]. 반면 내생균은 식물 뿌리조직 내에 살고 있으나 병을 일으키지 않는 균류를 말한다. 내생균의 역할에 대한 연구는 아직 미미한 실정이나, 뿌리에서 분리한 *Fusarium* 속의 내생균이 난의 종자 발아를 촉진시킨다는 사실은 100여년 전부터 알려져 왔다. 또한 난초 뿌리에 공생하는 내생균류는 주로 *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Chaetomium*속으로 토양 균류와 밀접한 관련이 있으며 때로는 난초과 식물에게 약한 병원성을 나타내기도 하지만, 항생제와 같은 2차 대사산물을 만들어 숙주를 병원균으로부터 보호하기도 한다[7]. 최근 광릉요강꽃(*Cypripedium japonicum*)과 복주머니란(*Cypripedium macranthum*) 뿌리에서 분리한 내생균의 군집에 관한 연구가 보고되기도 하였으나[8], 희귀 난초에 공생하는 내생균에 대한 국내 연구는 전무한 실정이며, 감자난초(*Oreorchis patens*)에서 분리한 연구는 현재까지 이루어지지 않았다. 이에 감자난초의 뿌리에서 내생균을 분리하던 도중 국내 미기록으로 확인된 2종의 곰팡이를 보고하고자 한다.

강원도의 함백산(고도 1,572 m, N 37° 09', E 128° 55')에서 감자난초의 뿌리를 채집하였으며, 48시간 내에 실험실로 운반하여 Richardson 등[9]의 방법을 이용하여 균을 분리하였다. 난초의 뿌리를 증류수로 세척한 다음, 70% 에탄올과 3% NaClO 용액을 차례로 처리하고, streptomycin과 chloramphenicol을 처리하여 표면 살균하였다. 이후 멸

Kor. J. Mycol. 2016 September, 44(3): 184-187
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.3.184>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received September 8, 2016
 Revised September 20, 2016
 Accepted September 22, 2016

©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.

균된 거름종이로 물기를 제거한 후 약 5 mm 길이로 잘라, 4개 조각을 water agar 배지에 치상하였고, 25°C 암소에서 배양한 후 균사가 뺏어나오면 potato dextrose agar (PDA) 배지로 계대하였다. 순수 분리된 균주는 형태학적 특징을 관찰하였으며, 이 후 슬라이드 배양법을 통해 균사와 분생 포자를 관찰하기 위하여 25°C에서 7일간 배양하였고, lactophenol aniline blue 용액으로 시료를 염색하여 광학현미경 (AXIO Imager A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

균주는 DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)을 사용하여 Genomic DNA를 추출하였으며, 이 DNA를 주형으로 하여 polymerase chain reaction (PCR) 반응을 수행하였다. 모든 균주의 DNA는 진균 특이적 primer ITS1F와 ITS4를 이용하여 ribosomal DNA의 internal transcribed spacer (ITS) 영역을 증폭하였고[10], LR0R과 LR16 프라이머를 이용하여 large subunit (LSU) 영역을 증폭하였다[11]. PCR 조건 중 annealing 온도는 ITS 영역은 58°C, LSU rDNA 영역은 54°C를 각각 사용하였으며, PCR 최종 산물은 1.5% agarose gel에서 20분 간 전기영동 하였고, 예상되는 크기의 band를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다 (SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열은 NCBI상에서 BLAST를 이용하여 유사도를 확인한 후 각 종들 간의 계통관계 및 위치를 확인하기 위해 MEGA6 [12]를 이용하여 neighbor-joining 계통수를 완성하였다 (Fig. 1). 염기서열 자료는 Genbank에 등록하였고, 균주 15P115의 ITS 영역의 염기서열은 KX831448, LSU 영역의 염기서열은 KX831450의 accession number를 부여 받았고, 균주 15P146의 ITS 영역의 염기서열은 KX831449, LSU 영역의 염기서열은 KX831451을 부여 받았다.

***Thelonectria veuillotiana* (Sacc. & Roum.) P. Chaverri & C. Salgado, Studies in Mycology 68: 77 (2011)**

함백산에서 채집한 감자난초의 뿌리에서 분리하였으며, malt extract agar (MEA) 배지에서 7일간 배양한 균총은 직경 35~40 mm이고 (Fig. 2A), PDA 배지에서 7일간 배양한 균총은 직경 41~43 mm이다 (Fig. 2B). 균총의 중심부는 크림색을 띠는 균사체가 공중으로 뺏어 있고, 변연부에는 미색의 환대가 형성되어 있다. 균총의 경계 부위는 균사가 식물 뿌리형의 형태로 뺏어 있다. 삼출물은 관찰되지 않았다. 현미경으로 관찰한 결과 대형분생자와 분자포자가 관찰되었으며, 대형분생자의 크기는 45~75 × 4~5 μm 정도이다 (Fig. 2C). 이 균주의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 *T. veuillotiana* JQ734922과 99% 상동성을 보였으며, LSU 영역에 대해서는 *T. veuillotiana* KJ022038과 99% 상동성을 보였다. *T. veuillotiana*는 교목이나 관목의 나무껍질에 넓게 분포하고 있으며, 때로는 병원균으로 작용하기도 한다[13].

관찰표본: 강원도 함백산, N 37° 09', E 128° 55', 2015년 6월 5일, 감자난초 (*Oreorchis patens*)의 뿌리, 15P115 (NIB RFG000141267, ITS 영역 GenBank accession No. KX831448, LSU 영역 GenBank accession No. KX831450)

***Phialocephala humicola* S.C. Jong & E.E. Davis, Mycologia 64 (6): 1352 (1972)**

함백산에서 채집한 감자난초의 뿌리에서 분리하였으며, MEA 배지에서 7일간 배양한 균총은 직경 32~35 mm이고 (Fig. 2D), PDA 배지에서 7일간 배양한 균총은 직경 33~37 mm이다 (Fig. 2E). PDA에서 자란 균총은 중심부가 옅은 갈색을 띠고 있으나, 시간이 지남에 따라 짙은 갈색으로 변한

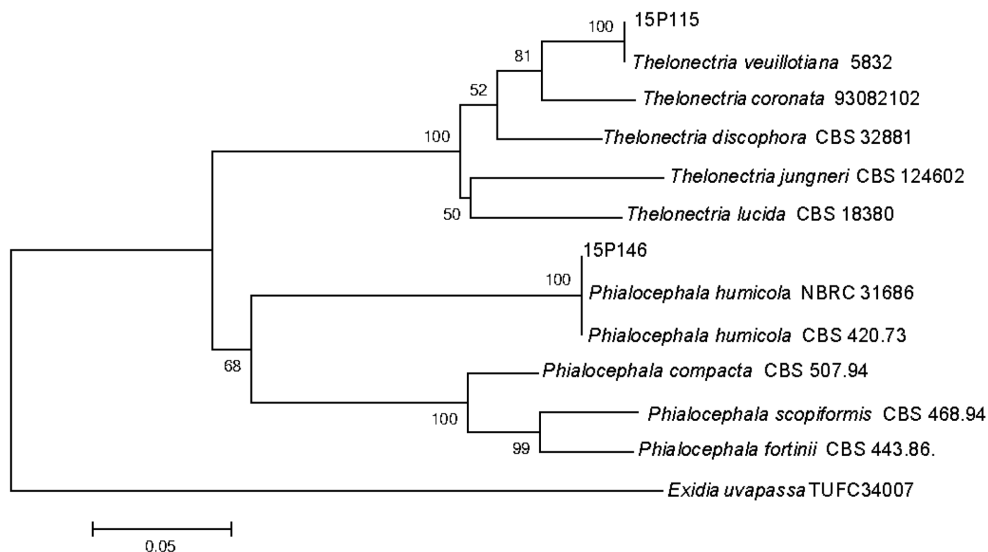


Fig. 1. Neighbor-joining tree of *Thelonectria veuillotiana* and *Phialocephala humicola* isolates based on a combined alignment of internal transcribed spacer and large subunit sequence of ribosomal DNA. *Exidia uvapassa* was used as an outgroup.

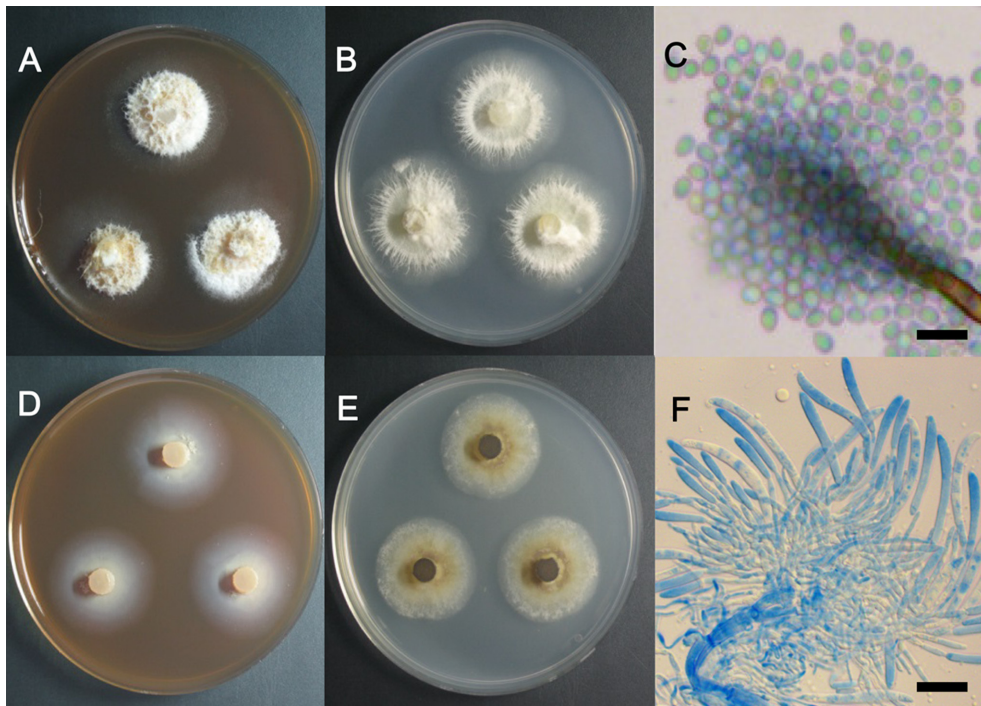


Fig. 2. Colonies of strain 15P115 (*Thelonectria veuillotiana*) grown on malt extract agar (MEA) (A) and potato dextrose agar (PDA) (B) at 25°C for 7 days, conidia (C); Colonies of strain 15P146 (*Phialocephala humicola*) grown on MEA (D) and PDA (E) at 25°C for 7 days, conidia (F) (scale bars: C = 5 μ m, F = 20 μ m).

다. *Phialocephala*속은 dark separate endophyte 특성을 보이며, *P. fortinii*는 지생란(terrestrial orchids) 뿌리에서 가장 흔하게 볼 수 있는 내생균으로 알려져 있다[4]. 분생포자는 구형이며 크기는 2.5~3.0 μ m 정도로 분생자경 주변에 다수 관찰되었다(Fig. 2F). 이 균주의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 *P. humicola* AB671502와 99% 상동성을 보였으며, LSU 영역에 대해서는 *P. humicola* AB671470과 99% 상동성을 보였다.

관찰표본: 강원도 함백산, N 37° 09', E 128° 55', 2015년 6월 5일, 감자난초(*Oreorchis patens*)의 뿌리, 15P146 (NIB RFG000141270, ITS 영역 GenBank accession No. KX831449, LSU 영역 GenBank accession No. KX831451)

생물다양성 협약 이후, 국제사회에서는 자국의 생물종 다양성을 확보하기 위한 다양한 노력들이 진행되고 있다. 우리나라도 2012년 “생물다양성 보전 및 이용에 관한 법률”을 제정하고, 생물 주권 강화를 위한 각고의 노력을 기울이고 있다. 균류 분야에서도 종 다양성 확보를 위한 다양한 노력들이 진행되고 있다. 난초과 식물에 공생하는 내생균은 국내에서 연구가 미흡한 균류 분야로, 특히 종 다양성 확인 및 균류 확보 측면에서의 연구가 시급한 실정이다. 또한 이러한 내생균은 향균작용을 하는 2차 대사산물을 만든다는 보고[14]가 있듯이 약리 활성물질을 찾고자 할 때 중요한 유용미생물로 활용될 수도 있다. 따라서 다양한 희귀

난초에서 미개척 내생균을 발굴하기 위한 노력이 지속적으로 된다면, 식물과 균류의 공생관계에 대한 이해뿐만 아니라, 생물 다양성 확인 및 균주 확보에도 기여할 수 있을 것이다.

적 요

본 연구에서는 강원도 함백산에서 감자난초(*Oreorchis patens*)의 뿌리를 채집하여 내생균을 순수분리하였고, 분리된 균주의 형태학적 특징 및 분생포자 등을 관찰하였다. 또한 진균 특이적 primer인 ITS1F와 ITS4를 이용하여 internal transcribed spacer rDNA 영역의 염기서열을 분석하고, primer LR0R과 LR16을 이용하여 large subunit rDNA 영역의 염기서열 분석하여 분자적으로 균을 동정하였다. 그 결과 *Thelonectria veuillotiana*, *Phialocephala humicola* 등의 2종의 국내 미기록 내생균을 동정하였고, 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.

REFERENCES

1. Jones DL. A complete guide to native orchids of Australia, including the island territories. 2nd ed. London: New Holland; 2006.
2. Kim S, Lee K. The orchid in Korea. Seoul: Kyohaksa; 1997.
3. Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol Res* 2001;105:1502-7.
4. Currah RS, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA. Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J, Pridgeon AM, editors. *Orchid Biology: reviews and perspectives*, VII. Dordrecht: Springer Netherlands; 1997. p. 117-70.
5. Rasmussen HN. *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
6. Dearnaley JD. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 2007;17:475-86.
7. Domsch KH, Gams W, Anderson TH. *Compendium of soil fungi*. London: Academic Press; 1980.
8. 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.
9. Richardson KA, Currah RS, Hambleton S. Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic Orchidaceae. *Lindleyana* 1993;8:127-37.
10. 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.
11. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 1990;172:4238-46.
12. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
13. Salgado-Salazar C, Rossmann A, Samuels GJ, Capdet M, Chaverri P. Multigene phylogenetic analyses of the *Thelonectria coronata* and *T. veuillotiana* species complexes. *Mycologia* 2012;104:1325-50.
14. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res* 2002;106:996-1004.