

한국의 잣나무에서 분리한 내생균의 다양성

서상태^{1*} · 김경희¹ · 김명주¹ · 홍진성¹ · 박종한² · 신상철¹

¹ 국립산림과학원, ² 국립원예특작과학원

Diversity of Fungal Endophytes from *Pinus koraiensis* Leaves in Korea

Sang-Tae Seo^{1*}, Kyung-Hee Kim¹, Myoung-Ju Kim¹, Jin Sung Hong¹, Jong-Han Park² and Sang-Chul Shin¹

¹Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

²National Institute of Horticultural and Herbal Science, Suwon 441-440, Korea

(Received December 4, 2008. Accepted January 6, 2009)

ABSTRACT: The composition of endophytic fungal species from *Pinus koraiensis* was studied in two areas (Yeongwol and Jincheon), Korea. To identify 113 isolates, rDNA ITS regions were sequenced. On the basis of the ITS sequence, *Pestalotiopsis* sp. was the most frequently isolated species in both areas. *Pestalotiopsis* sp. (68.5%) and *Lambertella* sp. (12.4%) were isolated frequently in Yeongwol, whereas *Pestalotiopsis* sp. (41.7%), *Hypoxylon* sp. (20.8%) and *Phomopsis* sp. (12.4%) were dominant in Jincheon. *Hypoxylon* sp. and *Phomopsis* sp. were not found in Yeongwol.

KEYWORD: Endophytic fungi, *Pestalotiopsis* sp., *Pinus koraiensis*

내생균은 비병원성이거나 기주식물들과 공생 관계에 있는 균들이다(Carroll, 1988). 또한, 내생균은 항생물질을 포함한 여러 가지 2차 대사산물을 생성하여 생물적 방제에 이용되기도 한다(Fisher 등, 1984). 잣나무에는 많은 병해들이 보고되어 있으며(한국식물병명목록, 2004), 특히 *Armillariella mellea*에 의한 아밀라리아뿌리썩음병, *Cenangium ferruginosum*에 의한 피목가지마름병, *Cronartium ribicola*에 의한 털녹병 등이 심한 피해를 주고 있다. 그러나, 이러한 병해들에 대한 특별한 방제대책이 마련되지 못하고 있는 실정이라서 생물적 방제에 접근하고자 내생균들을 이용한 연구가 증가하고 있다(Clay, 1990; Fisher 등, 1984). 그렇지만, 이러한 내생균들과 병원균과의 상호작용 등에 관한 부분은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 현재 침엽수에서의 내생균에 대한 연구는 보고되어 있으나(Kowalski, 1993; Stone, 1987), 잣나무에 대한 내생균의 연구는 아직 미미한 실정이다.

국내에서 잣나무 내생균에 대한 연구는 보고된 바 없으며, 이에 본 연구에서는 강원도 영월과 충청북도 진천 지역의 잣나무로부터 내생균을 분리하여 rDNA ITS 지역을 이용하여 동정하였고, 지역별 나타난 내생균의 다양성 결과를 보고한다.

내생균 분리는 2007년 가을 영월과 진천 지역(Table 1)에서 외간상 건전한 잣나무 3주를 선택하여 1주당 3개씩

Table 1. Location of the two collection sites

Local	Geographic coordinates	Altitude(m)
Yeongwol	N37°16'50.7", E128°18'05.5"	450
Jincheon	N36°48'02.6", E127°30'54.9"	90

신초부위 가치를 채집 한 후, 실험실에서 당년생 침엽부위를 0.5 cm 크기로 절단하였다. 자른 부위를 70% 에틸알콜에서 30초, 2% NaOCl에서 2분간 살균한 후 멸균수로 세척한 다음 감자한천배지(PDA)에 치상하였다. 내생균은 25°C에서 2주간 배양 한 후 분리하였으며, 분리된 균들은 4°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

DNA 분리 및 유전적 특성조사는 건전한 잣나무의 침엽으로부터 분리된 총 113개 균주에서 DNeasy tissue kit (Qiagen)를 이용하여 추출 분리하였으며, rDNA ITS로 지역의 염기서열 분석을 위하여 universal primer인 ITS1과 ITS4를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 용액의 조성은 최종농도 10 mM Tris-HCl(pH 8.5), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs이었으며, 각 10 pmole의 primer와 10 ng의 주형 DNA를 첨가하고 *Taq* DNA polymerase (Takara) 0.1 unit를 사용하여 총 반응용량을 50 µl로 맞추었다. PCR 조건으로는 DNA 변성(94°C에서 5분) 후, 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분에서 30 cycles 반응시킨 후 72°C에서 7분간 처리하였다. 증폭된 산물은 4°C에 보관하면서 실험에 이용하였다. PCR 산물인 ITS 유전자의 정제는 PCR purification kit(QIAGEN)를 이용하였으며,

*Corresponding author <E-mail : stseo@forest.go.kr>

Table 2. Occurrence of endophytic fungi from *Pinus koraiensis* leaves in two areas

Endophytes	Number of isolates (%)	
	Yeongwol	Jincheon
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	61(68.5)	10(41.7)
<i>Lambertella</i> sp.	11(12.4)	—
<i>Epicoccum</i> sp.	4(4.5)	—
<i>Trichoderma</i> sp.	2(2.3)	—
<i>Fusarium</i> sp.	1(1.1)	—
<i>Cytospora</i> sp.	1(1.1)	—
<i>Botryotinia</i> sp.	1(1.1)	—
<i>Sphaeropsis</i> sp.	1(1.1)	—
<i>Phoma</i> sp.	1(1.1)	—
<i>Hypoxyton</i> sp.	—	5(20.8)
<i>Phomopsis</i> sp.	—	3(12.4)
<i>Biscogniauxia</i> sp.	—	2(8.3)
<i>Xylaria</i> sp.	—	1(4.2)
<i>Entonaema</i> sp.	—	1(4.2)
<i>Chaetomium</i> sp.	—	1(4.2)
Unidentified fungi	6(6.8)	1(4.2)

이 정제된 PCR 산물을 염기서열 분석에 이용하였다. 염기서열 분석은 ALF-Express automatic sequencer(Pharmacia biotech, Lyon, France)를 이용하였으며, 염기서열 비교분석은 NCBI BLAST search 프로그램을 이용하여 동정하였다.

영월 지역의 잣나무에서는 89개, 진천 지역의 잣나무에서는 24개의 내생균이 분리되었다(Table 2). 총 113개의 내생균으로부터 DNA를 분리하여 ITS1과 ITS4 primer를 이용하여 rDNA ITS 유전자의 PCR을 실시한 결과 모든 균주로 부터 증폭산물을 얻을 수 있었다. 이들 증폭산물을 이용하여 염기서열을 분석한 결과 *Pestalotiopsis* sp.가 영월과 진천지역에서 가장 높은 빈도로 분리되었다. *Pestalotiopsis* sp.는 내생균으로나 외생균으로 흔히 우점하여 분리되는 균으로 보고되어져 있다(Santamaria and Bayman, 2005). 영월에서는 *Pestalotiopsis* sp. 68.5%, *Lambertella* sp. 12.4%, *Epicoccum* sp. 4.5%, *Trichoderma* sp. 2.3%로 분리되었고, 그 밖에 *Fusarium* sp., *Cytospora* sp., *Botryotinia* sp., *Phoma* sp. 각각 1균주씩 분리되었다. 진천에서는 *Pestalotiopsis* sp. 41.7%, *Hypoxyton* sp. 20.8%, *Phomopsis* sp. 12.4 %, *Biscogniauxia* sp. 8.3%로 분리되었고, 그 밖에 *Xylaria* sp., *Entonaema* sp., *Chaetomium* sp.가 각각 1균주씩 분리되었다. 진천에서 분리된 *Hypoxyton* sp., *Phomopsis* sp., *Biscogniauxia* sp., *Xylaria* sp., *Entonaema* sp., *Chaetomium* sp.는 영월에서 분리되지 않았다. 이러한 내생균의 다양성 차이는 지역별 습도, 강수량, 바람 등의 기후적인 영향이 크게 작용 한다는 보고가 있었다(Carroll and Carroll, 1978; Petrini *et al.*, 1992). 이번 연구에서 2지역간 분리된 내생균은 큰 차이를 나타내었는데, 이는 기후적인 영향과 더불어 2지역의 잣나무 연령, 토양성분, 해발 등도 영향을 주었을 것이라고 판단

되었다. Petrini 등(1992)은 다양한 내생균들중 소수의 균들에 의해 우점하는 결과를 보고하였는데, 이번 연구에서도 단 몇 종이 우점하는 경향을 나타내었다. 이것은 우점하는 균들이 그 지역의 특별한 기후와 환경에 다른 균들보다 잘 적응한 결과로 생각되었다.

*C. ferruginosum*균은 일반적으로 침엽수에 내생균으로서 자주 관찰된(Kowalski, 1993). 특히, 2007년 시료를 채취한 영월과 진천지역은 이 균에 의한 피목가지마름병의 피해가 심하게 발생하였던 지역이었지만, 이번 연구에서 병원균이 분리되지 않았다. 이는 실제로 이 균이 존재하지 않았거나, 분리방법 중에, 살균용액의 농도, 살균시간, 배지종류, 배양기간 등에 따라 다르게 나타날 수 있다고 판단되었다.

이번 연구에서는 시료를 가을에 채취하여 조사하였다. 그러나, Gore와 Bucak(2007)는 봄에 채취한 시료가 가을에 채취한 시료보다 내생균의 다양성이 보다 크게 나타난다고 보고하였는데, 이는 온도, 습도 등이 영향을 준 것이라고 하였다. 또한, 당년지 보다는 오래된 침엽일 수록 다양한 내생균이 분리되는 것으로 보고되었다(Bernstein and Carroll, 1977; Stone, 1987). 또한, 내생균을 이용한 생물적 방제에 관한 연구(Clay, 1990; Fisher 등, 1984)가 증가되고 있는 실정이기 때문에 분리된 내생균을 이용하여 생물적 방제에 적용하는 연구가 필요하다고 생각한다.

적요

영월과 진천의 2지역에서 잣나무로부터 내생균의 다양성을 조사하였다. 총 113개의 내생균을 분리하여 rDNA ITS 부위의 염기서열 분석으로 균을 동정하였다. 염기서열 분석결과 *Pestalotiopsis* sp.가 2지역에서 가장 높은 빈도로 분리되었다. 영월에서는 *Pestalotiopsis* sp. 68.5%, *Lambertella* sp. 12.4%로 분리되었으며, 진천에서는 *Pestalotiopsis* sp. 41.7%, *Hypoxyton* sp. 20.8%, 그리고 *Phomopsis* sp.가 12.4% 분리되었다. *Hypoxyton* sp.와 *Phomopsis* sp.는 영월에서 분리되지 않았다.

참고문헌

- 한국식물병명목록. 2004. 정행사. p. 512-515.
- Bernstein, M. and Carroll, G. C. 1977. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. *Can. J. Bot.* 55:644-653.
- Carroll, G. C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69:2-9.
- Carroll, G. C. and Carroll, F. E. 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can. J. Bota.* 56:3032-3043.
- Clay, K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 21:275-295.
- Fisher, P. J., Anson, A. E. and Petrini, O. 1984. Novel antibiotic activity of an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. isolated from

- Vaccinium myrtillus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83:145-148.
- Gore, M. E. and Bucak, C. 2007. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. *For. Path.* 37:281-288.
- Kowalski, T. 1993. Fungi in living symptomless needles of *Pinus sylvestris* with respect to some observed disease processes. *J. Phytopathol.* 139:129-145.
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L. and Viret, O. 1992. Ecology metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1:185-196.
- Santamaria, J. and Bayman, P. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Micro. Ecol.* 50:1-8.
- Stone, J. K. 1987. Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas fir. *Can. J. Bot.* 65:2614-2621.