

곰솔(*Pinus thunbergii*)의 침엽에서 분리한 내생균의 분자적 동정

김창균 · 어주경 · 엄안흠*

한국고원대학교 생물교육과

Molecular Identification of Endophytic Fungi Isolated from Needle Leaves of *Pinus thunbergii*

Chang-Kyun Kim, Ju-Kyeong Eo and Ahn-Heum Eom*

Department of Biology Education, Korea National University of Education, Chungbuk 363-791, Korea

(Received 16, November 2012., Revised 22, November 2012., Accepted 27, November 2012)

ABSTRACT : Endophytic fungi were isolated from needle leaves of *Pinus thunbergii* distributed in Boryeong of Korea. Total 7 species of fungi were identified using partial sequences of ITS and LSU regions of nuclear DNA *Anthostomella sepiabilis*, *Beltrania* sp., *Cladosporium* sp., *Coniochaeta velutina*, *Entonaema pallida*, *Lophodermium* sp. and *Nigrospora sphaerica sphaerica*. The endophytic fungi, *Beltrania* sp. was the most dominant species isolated from *P. thunbergii* in this study. Results indicate that the distribution of endophytic fungi in the leaves of *P. thunbergii* could be influenced by environments of the fungal habitat.

KEYWORDS : *Beltrania*, Endophyte, ITS, LSU, *Pinus thunbergii*

서 론

내생균(endophytic fungi)은 식물조직에 서식하며 병원성을 나타내지 않는 균을 가리킨다(Arnold *et al.*, 2007; Carroll, 1988). 내생균의 연구는 주로 숙주식물로 초본류를 대상으로 많이 이루어져 왔으나, 근래에는 목본에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다(Gao *et al.*, 2005; Rubini *et al.*, 2005). 특히 침엽수에서는 소나무속(Hata *et al.*, 1996; Hata *et al.*, 1998; Kil *et al.*, 2009)과 주목속(Huang *et al.*, 2006)등에 대해서 연구가 일부 이루어져 왔다. 분류학적으로 내생균은 대부분 자낭균류에 속하는 것으로 알려져 있으나, 일부 담자균류나 접합균류에 속하는 균류가 분리되기도 한다(Huang *et al.*, 2006). 이러한 다양한 균류는 온도, 수분과 같은 비생물학적 환경 스트레스 뿐만 아니라 다른 생물들에 의한 스트레스에 대해서도 저항성을 높여주어 숙주식물의 적응도를 높여 주는 것으로 알려져 있다. 또한 Huang 등(2006)은 목본식물인 *Taxus mairei*에서 항암치료에 효과적인 텍솔(taxol)을 분비하는 몇 종의 내생균을 분리하여 보고하는 등, 분류와 생태와 같은 기초연구뿐만 아니라 농업 및 산업적 응용과 같은 다양한 관점에서 내생균에 대한 연구가 진행되고 있다.

곰솔(*Pinus thunbergii* Parl.)은 한국의 해안가에 서식하고 있는 대표적인 침엽수이며, 한국과 일본에 분포하고 있다. 곰솔은 해풍에 강하며, 사질 토양이나 척박지에서도 생육이 좋은 수종이다(Hong *et al.*, 1998). 따라서 내륙에 서식하는 침엽수종과는 그 분포 환경이 다르며, 그렇기 때문에 환경적 측면에서 내생균의 군집에 영향을 줄 가능성이 크다고 생각된다. 그러나 우리나라에서는 다양한 식물에 공생하는 내생균에 대한 연구가 부족한 실정이다(Kil *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2008). 따라서 본 연구에서는 우리나라에 분포하는 침엽수에 공생하는 내생균에 대한 조사의 일환으로 우리나라 서해안에 널리 서식하고 있는 곰솔의 잎에 공생하는 내생균을 분리하여 형태적, 분자생물학적으로 동정하고, 이들의 분포 양상을 파악하고자 한다.

재료 및 방법

시료채집

충남 보령시 웅천읍 해안가(N36°14'56.8" E126°32'24.6")에 서식하는 곰솔 군락에서 질병의 증상이 나타나지 않는 4 개체를 선별하여 각 개체 간에 최소 100 m 이상의 간격을 두고 채집하였다. 채집된 침엽은 냉장 보관하였으며, 48시간 이내에 균 분리를 수행하였다.

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

균 분리

모든 침엽은 표면에 있는 이물질들을 제거하기 위해서 흐르는 물로 세척 후 1% 차아염소산나트륨(NaOCl)용액에 3분, 70% 에탄올에 2분간 처리하고 멸균수로 2회 세척하는 표면 살균과정을 수행하였다(Arnold *et al.*, 2007). 표면 살균된 침엽은 물기를 제거한 후 멸균된 가위를 이용하여 약 5 mm 길이로 절단하여 potato dextrose agar (PDA), malt extract agar(MEA), water agar(WA) 배지에 각각 4개의 절편씩 치상한 다음, 25°C의 암소에서 배양하였다. 배양하는 동안에 침엽 절편에서 균사가 형성되어 나오면 균사 조각을 잘라 새로운 PDA 배지에 옮겼으며, 3회 정도 계대 배양함으로써 균을 순수 분리 하였다.

내생균의 동정

분리된 내생균의 genomic DNA를 DNeasy Plant mini kit(GeneAll, Korea)의 방법에 따라 추출하였다. ITS 영역의 증폭을 위해 primer ITS1F와 ITS4를 사용하였다(Gardes and Bruns, 1993). 반응조건으로는 94°C에서 5분

간 predenaturation 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation을 1cycle로 하여 총 30회를 진행하였으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 증폭된 산물을 안정화시켜 4°C에 보관하였다. 또한 LSU 영역의 증폭을 위해 primer LR0R과 LR16을 사용하였다(Vilgalys and Hester, 1990; White *et al.*, 1990). 반응조건으로는 94°C에서 3분간 predenaturation 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 54°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation을 1cycle로 하여 총 36회를 진행하였으며, 최종적으로 72°C에서 10분간 증폭된 산물을 안정화시켜 4°C에 보관하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5%(w/v) agarose gel에 1 µl씩 loading하여 100 V로 22분간 전기영동한 뒤에 UV 상에서 밴드를 확인하였다. 분석된 염기서열은 NCBI에서 BLAST프로그램을 이용하여 가장 유사한 염기서열의 종을 확인하였다. 확인된 종들에 대한 염기서열은 MEGA 5를 이용하였으며, 균외균으로 *Morchella esculenta*를 사용하여 maximum parsimony analysis를 통해 유연관계를 계통도

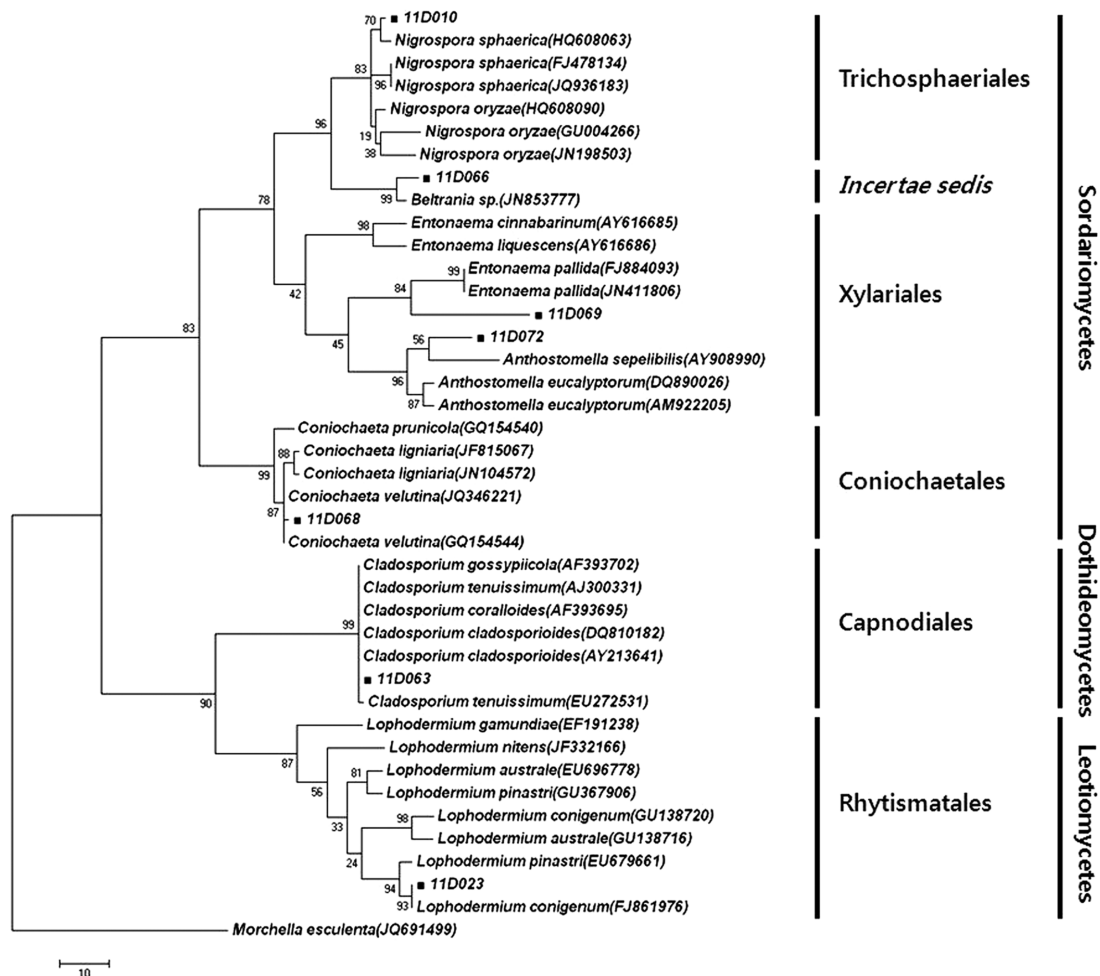


Fig. 1. Phylogenetic tree of endophytic fungi using ITS sequence. *Morchella esculenta* was used as an outgroup.

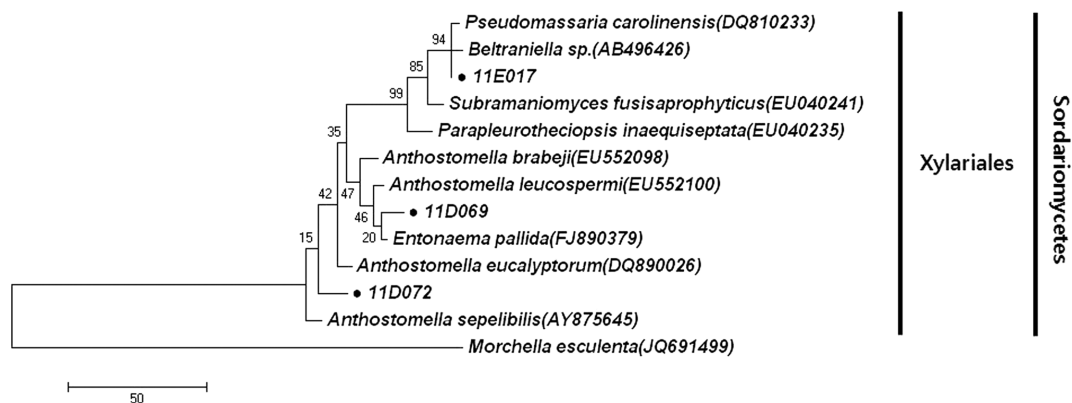


Fig. 2. Phylogenetic tree of endophytic fungi using LSU sequence. *Morchella esculenta* was used as an outgroup.

Table 1. Blast results of endophytic taxa from *Pinus thunbergii* using ITS and LSU sequences of rDNA

Isolates	ITS		LSU	
	The Closest Taxa	Similarity	The Closest Taxa	Similarity
11D072	Fungal endophyte EU360460	473/497 (95%)	<i>Anthostomella sepelibilis</i> AY875645	552/571 (97%)
11E066	<i>Beltrania</i> sp. JN853777	564/590 (96%)	<i>Beltraniella</i> sp. AB496426	527/532 (99%)
11D063	<i>Cladosporium</i> sp. HQ696044	538/541 (99%)		
11D068	<i>Coniochaeta velutina</i> JQ346221	551/556 (99%)		
11D069	Foliar endophyte AY561198	495/592 (84%)	<i>Entonaema pallida</i> FJ890379	591/605 (98%)
11D023	<i>Lophodermium</i> sp. AB512302	700/704 (99%)		
11D010	<i>Nigrospora sphaerica</i> HQ608063	542/551 (98%)		

로 나타내었다(Tamura *et al.*, 2011).

결과 및 고찰

충남 보령에서 채집한 총 4 개체의 곰솔의 침엽에서 내생균을 분리한 결과 총 19개의 균주가 분리되었으며, ITS와 LSU 지역의 염기서열을 이용하여 분석한 결과 총 7종을 확인 할 수 있었다(Fig. 1, Fig. 2, Table 1). ITS의 염기서열을 이용하여 Blast를 수행해 본 결과 종의 동정에 어려움이 있었다. 특히 균주 11D072와 11D069는 속 수준에서도 동정이 어려웠으며, 11D066, 11D036 그리고 11D023도 계통수 상에서 그 분류학적인 위치를 확인하기 쉽지 않았다. 분리된 균들 중 11D072와 11D069, 그리고 11D066에 대해서는 LSU 지역에 대한 염기서열 분석을 수행하였으며 이들은 참고서열과 모두 97% 이상의 유사도를 보였다. 따라서 두 염기서열 분석을 종합하여, 균주 11D072, 11D069, 11D063에 대하여 각각 *Anthostomella sepelibilis*, *Cladosporium* sp., *Entonaema pallida*로 잠정적으로 동정하였으나, 계통수 상에서 이들의 정확한 위치의 결정하기에는 부족한 것으로 판단된다. 그 이유로는 Genbank의 데이터베이스에 본 연구에서 분리한 내생균과 비교 가능한 분류군이 적기 때문인 것으로 생각된다. 이는 현재까지 이들 분류군에 대한 연구가 부족한 것으로 생각되며 이 균들에 대하여 형태적, 분자생물학적 연구가

더 필요할 것으로 판단된다. 특히 해송의 분포지역을 생각할 때 동일한 분류군이라 하더라도 내륙에 분포하는 내생균과 해변에 분포하는 내생균의 환경이 다르기 때문에 이러한 지역에 적응된 분류군일 가능성도 존재한다(Li *et al.*, 2012).

전체적으로 본 연구에서 분리된 내생균의 상대빈도를 살펴보면 *Beltrania* sp.가 57.9%, 그리고 *Lophodermium* sp.가 15.8%로 두 균주가 이 지역의 곰솔 잎에서 가장 높은 비율로 발견되었다(Table 2). 곰솔의 잎에서 내생균을 분리하여 보고한 Hata 등(1998)의 연구와 본 연구를 비교해 보면, 본 연구에서 분리된 균주 11D063과 11D010을 제외하고는 모두 다른 종임을 알 수 있었으며, 3년에 걸

Table 2. Endophytic fungi isolated from needle leaves of *Pinus thunbergii*

Isolates	Endophytic fungi	Number of isolates (%)
11D072	<i>Anthostomella sepelibilis</i>	1 (5.3)
11D066	<i>Beltrania</i> sp.	11 (57.9)
11D063	<i>Cladosporium</i> sp.	1 (5.3)
11D068	<i>Coniochaeta velutina</i>	1 (5.3)
11D069	<i>Entonaema pallida</i>	1 (5.3)
11D023	<i>Lophodermium</i> sp.	3 (15.8)
11D010	<i>Nigrospora sphaerica</i>	1 (5.3)

친 연구 결과이기도 하나, 발견된 분류군의 수에 있어서도 본 연구보다도 약 2.5배 이상 많은 분류군을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 분리된 11D063과 11D010의 경우를 고려할 때, 이번 연구와 Hata 등(1998)의 연구는 동일한 숙주식물에 대해서 시간과 공간을 달리하여 연구한 결과 동일한 내생균의 분류군이 존재하는 것으로 나타나며 그렇기 때문에 이들 간의 숙주특이성의 가능성이 상당히 높다고 생각된다. 그 외의 다른 분류군들은 선행연구와 비교한 결과, 환경적인 영향에 따라 내생균의 군집이 다르게 구성됨을 보여주고 있으므로 다양한 변수를 고려한 내생균의 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.2011-0014236).

적 요

곰솔(*Pinus thunbergii* Parl.)의 잎에 서식하는 내생균의 다양성을 확인하기 위하여 충남 보령의 해안가에 서식하는 곰솔에서 잎을 채취하여 총 19개의 균주를 분리하였다. 분리된 내생균을 ITS 지역과 LSU 지역의 염기서열을 분석하여 동정한 결과 *Anthostomella sepelibilis*, *Beltrania* sp., *Cladosporium* sp., *Coniochaeta velutina*, *Entonaema pallida*, *Lophodermium* sp., *Nigrospora sphaerica* 등 총 7개 분류군의 내생균을 확보할 수 있었다. 이들 중 *Beltrania* sp.에 속하는 종이 가장 높은 빈도로 분리되었으며 내생균의 서식 환경이 곰솔의 잎에 서식하는 내생균의 분포에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

- Arnold, A., Henk, D., Eells, R., Lutzoni, F. and Vilgalys, R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*. 99:185-205.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69:2-9.
- Gao, X., Zhou, H., Xu, D., Yu, C., Chen, Y. and Qu, L. 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiol. Lett.* 249:255-266.
- Gardes, M. and Bruns, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.
- Hata, K. and Futai, K. 1996. Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. *Can. J. Bot.* 74:103-114.
- Hata, K., Futai, K. and Tsuda, M. 1998. Seasonal and needle age-dependent changes of the endophytic mycobiota in *Pinus thunbergii* and *Pinus densiflora* needles. *Can. J. Bot.* 76:245-250.
- Hong, S. C., Byun, S. H. and Kim, S. S. 1998. Colored illustrations of trees and shrubs in Korea. Seoul: Geymyeongsa. (in Korean).
- Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z. and Su, W. 2006. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 31:163-167.
- Kil, Y. J., Eo, J. K. and Eom, A. H. 2009. Molecular identification and diversity of endophytic fungi isolated from *Pinus densiflora* in Boeun, Korea. *Kor. J. Mycol.* 37:130-133. (In Korean).
- Kim, C. K., Eo, J. K. and Eom, A. H. 2012. Diversity of foliar endophytic fungi isolated from *Lindera obtusiloba* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 40:136-140. (in Korean).
- Kim, C. S., Park, M. S. and Yu, S. H. 2008. Two species of endophytic *Penicillium* from *Pinus rigida* in Korea. *Mycobiology*. 36:222-227.
- Li, H. Y., Shen, M., Zhou, Z. P., Li, T., Wei, Y. and Lin, L. 2012. Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China. *Fungal Divers.* 54:79-86.
- Rubini, M., Silva-Ribeiro, R., Pomella, A., Maki, C., Araujo, W., dos Santos, D. and Azevedo, J. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 1:24-33.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.
- Vilgalys, R. and Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172:4239-4246.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications, pp. 315-322. Eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Academic Press, New York.