

민주지산에 서식하는 침엽수의 잎에서 분리한 내생균의 다양성

김창균¹ · 어주경^{1,2} · 엄안흠^{1*}

¹한국교원대학교 생물교육과, ²국립생태원

Diversity of Endophytic Fungi Isolated from Leaves of Coniferous Trees on Mt. Minjuji, Korea

Chang-Kyun Kim¹, Ju-Kyeong Eo^{1,2} and Ahn-Heum Eom^{1*}

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

²National Institute of Ecology, Seoecheon 325-813, Korea

ABSTRACT : We investigated the biodiversity of endophytic fungi isolated from leaves of three coniferous species (*Pinus densiflora*, *P. koraiensis*, *Larix kaempferi*) on Mt. Minjuji, Korea. A total of 39 isolates were discovered from 17 host plants and their homology with the ITS region was searched. They were then identified as 22 taxa; 64% of fungal isolates belong to Sordariomycetes, 33% of isolates to Leotiomycetes, and 3% isolates to Agaricomycetes.

KEYWORDS : *Larix kaempferi*, *Pinus densiflora*, *Pinus koraiensis*, Endophytic fungi, Diversity

내생균(endophytic fungi)은 숙주식물에 침투하고 있으면서도 특별한 병증을 나타내지 않는 공생체로써 내생균의 생활사 전체 또는 일부에서 이러한 현상을 보이고 있다[1]. 내생균의 중요성은 날로 증대되고 있음에도 불구하고 아직까지 연구가 매우 미진한 분야라고 할 수 있다. 내생균에 대한 연구는 다양한 분야에서 이루어지고 있는데, 기초적인 동정과 분류학에서부터 이들의 진화적인 의미를 찾는 연구 그리고 인류가 이용할 가능성을 가진 2차 대사산물에 이르기까지 내생균의 연구분야는 매우 다양하다고 말할 수 있다. 내생균은 지형이나 기후 그리고 특이적인 숙주식물의 존재유무에 상관없이 전 세계적으로 분포하는 종이 있

는가 하면, 이와는 반대로 지역적으로 고립되어 분포하는 종이 있기도 하다[2]. 현재 약 100만 여 종 이상이 있을 것으로 추정하고 있으며, 이는 연구자마다 상이한 보고를 하고 있다[3,4].

숙주식물 중 한반도에 분포하는 침엽수는 대부분 상록성이며, 도입종과 자생종을 비롯하여 약 54종 정도가 보고되었다[5]. 특히, 기후변화, 침엽수의 산림쇠퇴 등과 같은 부정적인 요인은 전세계적으로 발생하고 있으며, 이로 인해 감소 추세 및 멸종위기에 처한 침엽수와 관련 공생균의 생물다양성에 대한 연구가 매우 요구된다[6]. 국내에서도 내생균의 생물다양성을 규명하고자 하는 연구들이 증가추세에 있으며, 더불어 다양한 숙주식물에서 분리한 연구결과들도 발표되고 있다[7,8]. 따라서 본 연구에서는 충북 민주지산에 서식하고 있는 소나무(*Pinus densiflora* Siebold et Zucc.)와 잣나무(*P. koraiensis* Siebold et Zucc.) 그리고 일본잎갈나무(*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière)에서 공생하고 있는 내생균을 분리하여 숙주식물에 따른 내생균의 다양성을 확인하고자 하였다.

충북지역의 민주지산(N36°02', E127°50')에서 건강한 소나무 5개체, 잣나무 4개체 그리고 일본잎갈나무 8개체를 선별하여 각 개체에서 소지를 채집하였다. 채집된 소지에서 무작위적으로 침엽을 채취한 후 표면살균과정을 수행하였다. 먼저 이물질을 제거하기 위하여 흐르는 물로 세척한 다음

Kor. J. Mycol. 2014 June, 42(2): 174-177
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.2.174
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: eomah@knu.ac.kr

Received June 20, 2014

Revised June 23, 2014

Accepted June 24, 2014

©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.

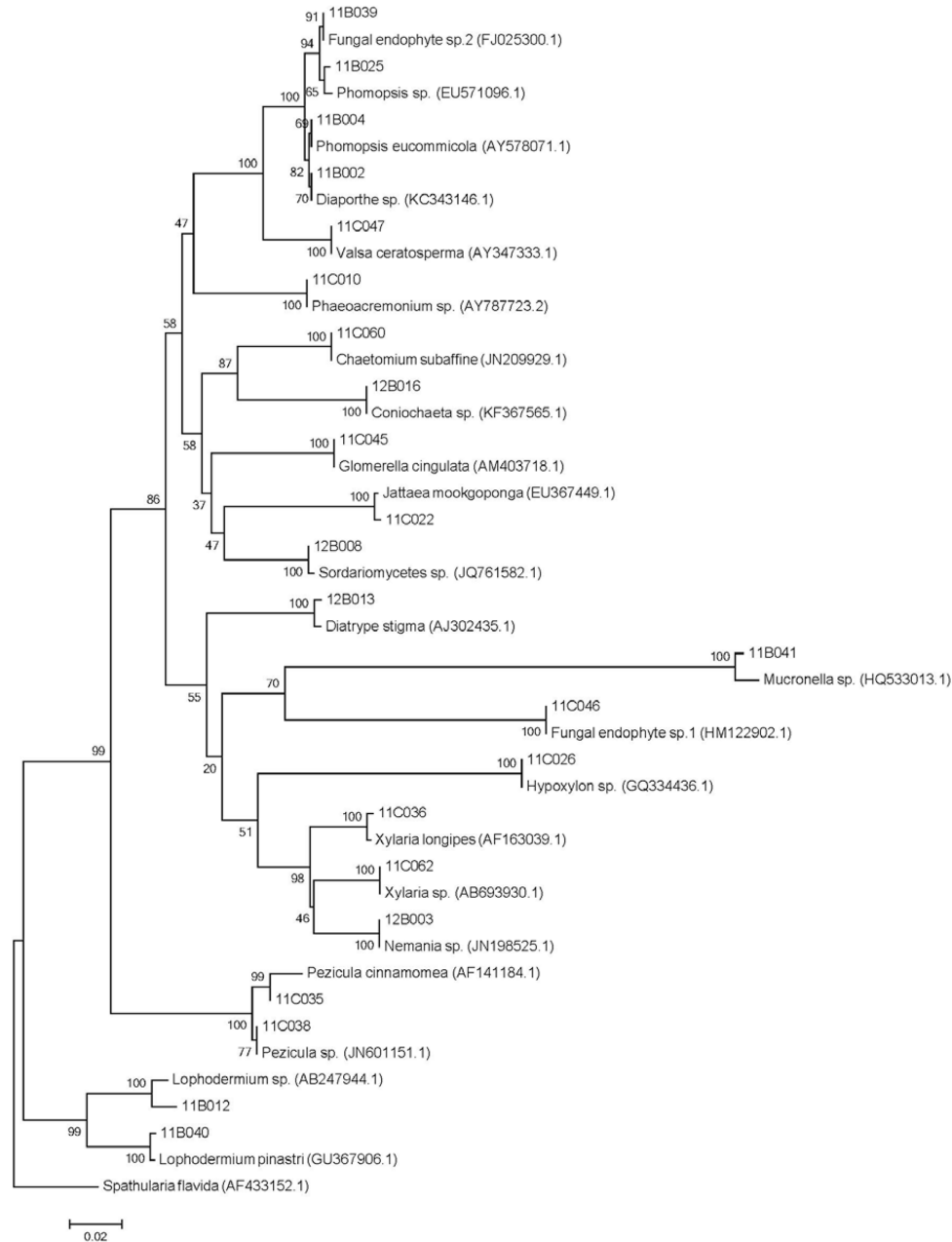


Fig. 1. Phylogenetic tree of endophytic fungi from *P. densiflora*, *P. koraiensis* and *L. kaempferi* in Mt. Minjuji. ITS and 5.8S rDNA region were used these sequence analysis to confirm the topological appropriation of isolates. *Spathularia flavida* was used as an outgroup.

무균 실험대 내에서 1% 차아산화소산나트륨(NaOCl) 용액에 3분, 70% 에탄올에 2분간 처리한 후, 멸균수로 2회 세척하고 다음 과정을 진행하였다. 그 후 표면 살균된 침엽은 가위를 이용하여 약 5 mm 정도의 길이로 자른 후 PDA 배지에 각각 4개의 절편을 치상하고, 25°C의 암소에서 배양 후 계대배양을 통해 순수한 균주를 분리하였다[7]. 각각의 내생균은 DNeasy Plant SV mini kit (GeneAll, Korea)의 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 ITS1F와 ITS4를 이용하여 증폭하였다[9]. PCR은 predena-

turation 94°C에서 5 min 후, denaturation을 94°C 30 sec, annealing을 50°C에서 30 sec, elongation을 72°C에서 1 min을 1cycle로 해서 총 30회를 진행하였으며, 예상되는 크기의 band를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Korea). 분석된 염기서열들은 NCBI 상에서 BLAST한 후, MEGA5[10]를 이용하여 계통수를 작성하였다. 최종적으로 분자생물학적 방법으로 검출된 내생균의 분류군들은 숙주식물에 따른 종 다양성과 분포양상을 분석하였다.

총 17개체의 숙주식물로부터 39개의 균주를 분리하였다.

분리된 균들의 염기서열 분석결과 모두 22개의 그룹으로 나눌 수 있었다(Table 1). BLAST한 결과 NCBI 상의 참고 서열들과 유사도가 대부분 99%이상 일치되는 결과를 보여 동일한 분류군으로 간주되었다[11]. 또한 강(class) 수준에서는 크게 3개의 강(Sordariomycetes, Leotiomycetes, Agaricomycetes)으로 분리되었으며, 전체적으로는 Sordariomycetes가 약 64%, Leotiomycetes가 33%, 그리고 Agaricomycetes가 약 3%의 비율로 관찰되었다. 즉, 대부분의 내생균이 자낭균에 속하였으며, 소수가 담자균에 속함을 알 수 있었는데, 이와 같은 비율은 선행연구 결과들과 유사한 양상을 띄고 있었다.

충북의 다른 산지에 분포하는 소나무류(*Pinus* spp.)와 일본잎갈나무에서 내생균을 분리한 결과와 마찬가지로 본 연구에서도 동일하게 소나무류에서만 *Lophodermium* 속의 종들이 분리되었고, 잎갈나무속에서는 *Lophodermium* 속의 종들은 발견되지 않았다. 내생균의 분포에 영향을 미치는

요인은 일차적으로 숙주식물의 존재여부이기 때문에 유사한 미기후 상태를 나타낸다고 한다고 하더라도 동일한 숙주식물이 분포하지 않는다면, 숙주식물에 특이적으로 분포하는 내생균에게 필요한 생태적 지위를 만들어 낼 수 없게 된다. 따라서 본 연구결과는 숙주식물과 내생균을 바탕으로 소나무류에 대한 *Lophodermium* 속의 관계를 생각할 때 추후 후속연구를 통해 종특이적인 균주에 대한 규명뿐만 아니라 다양한 조건에서 이루어지는 배양을 통해 포자 형성을 촉진하고 이에 대한 분류학적인 접근도 요구된다.

일부 균주들(11B012, 11B039, 11C046)에 있어서는 분자적으로 속 수준에서도 종을 확인하기 어려웠으며, 전체적으로 분자 분석을 수행한 내생균의 약 50% 이상에서 ITS 지역만을 통해서는 종 수준에서 명확한 동정이 어려웠다. 그러나, 분지도 상에서 참고서열(reference sequence)과의 비교를 통해서 차지한 각 분류군의 위치는 서로가 다른 분류군임을 확인할 수 있게 해주었으며, 그러한 결과를 바탕

Table 1. Molecular identification and the closest taxa of representative isolates using ITS region from *P. densiflora*, *P. koraiensis* and *L. kaempferi* in Mt. Minjuji

Strains	Accession No.	The Closest Genbank taxa	Maximum identity (%)	Relative abundance*		
				<i>P. densiflora</i>	<i>P. koraiensis</i>	<i>L. kaempferi</i>
11B012	AB247944.1	<i>Lophodermium</i> sp.	96	0.87		
11E040	GU367906.1	<i>Lophodermium pinastri</i>	99		0.25	
11C038	JN601151.1	<i>Pezicula</i> sp.	100	0.13		
11C035	AF141184.1	<i>Pezicula cinnamomea</i>	99			0.06
12B003	JN198525.1	<i>Nemania</i> sp.	99			0.04
11C062	AB693930.1	<i>Xylaria</i> sp.	99		0.25	
11C036	AF163039.1	<i>Xylaria longipes</i>	99			0.04
11C026	GQ334436.1	<i>Hypoxylon</i> sp.	99			0.04
12B013	AJ302435.1	<i>Diatrype stigma</i>	98			0.04
11C046	HM122902.1	Fungal endophyte sp. 1	99			0.04
11B041	HQ533013.1	<i>Mucronella</i> sp.	97		0.25	
12B008	JQ761582.1	<i>Sordariomycetes</i> sp.	99			0.04
11C022	EU367449.1	<i>Jattaea mookgoponga</i>	99			0.10
11C045	AM403718.1	<i>Glomerella cingulata</i>	99		0.25	
12B016	KF367565.1	<i>Coniochaeta</i> sp.	99			0.04
11C060	JN209929.1	<i>Chaetomium subaffine</i>	99			0.04
11C010	AY787723.2	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	100			0.04
11C047	AY347333.1	<i>Valsa ceratosperma</i>	96			0.04
11B002	KC343146.1	<i>Diaporthe</i> sp.	99			0.26
11B004	AY578071.1	<i>Phomopsis eucommicola</i>	99			0.10
11B025	EU571096.1	<i>Phomopsis</i> sp.	98			0.04
11B039	FJ025300.1	Fungal endophyte sp. 2	99			0.04
Total Number of isolates				8	4	27
Shannon diversity index (H')				0.37	1.38	2.49
Species richness				2	4	16

*Relative abundance indicates the percentages of the number of isolates in the study sites of the total numbers of isolates.

**Frequency indicates the percentages of the number of trees isolated the fungal species of the total number of trees.

으로 분석한 결과 일본잎갈나무에서 가장 높은 종 다양성을 보였다.

대부분 내생균 연구를 통해서 종 다양성이 밝혀진 균들은 일반적인 자연환경에 존재하는 균들로 부생성을 보이거나 숙주식물에 따라 병원성을 보임에도 불구하고, 거의 다 의료적인 관점에서는 인간에게 해를 끼치는 분류군이 매우 드문 편이다. 본 연구에서도 그와 같은 경향성을 볼 수 있는데, 분석된 22개의 분류군 중에서 단지 균주 11C060이 속한 *Chaetomium* 속만이 인간에서 병원성을 나타내며, 우발적인 감염으로 인체에 감염되는 것으로 보고되었다[12]. 이러한 현상은 다른 연구들과의 비교를 통해 더욱 확인할 필요가 있으며, 의생물학적인 관점의 접근을 통해 내생균 간의 상호작용 및 유용성을 검증할 필요가 있다.

감사의 글

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

REFERENCES

1. Wilson D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 1995;73:274-6.
2. Saikkonen K, Wali P, Helander M, Faeth SH. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends Plant Sci* 2004;9:275-80.
3. Cannon PF. Diversity of the Phyllachoraceae with special reference to the tropics. In: Hyde KD, editor. *Biodiversity of Tropical Microfungi*. Hong Kong: Hong Kong University Press; 1997. p. 255-78.
4. Dreyfuss M, Chapela IH. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. *Biotechnology (Reading, Mass)* 1994;26:49-80.
5. Lee TB. Gymnosperms in Korea. *Bull Kwanak Arbor* 1983;4: 1-22.
6. Kong WS. Biogeography of Native Korean Pinaceae. *J Kor Geogr Soc* 2006;41:73-93.
7. Eo JK, Kim CK, Lee HB, Eom AH. Diversity of Endophytic Fungi Isolated from *Pinus densiflora* and *Larix Kaempferi* in Mt. Oser, Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:137-41.
8. Kim CK, Eo JK, Eom AH. Diversity of Foliar Endophytic Fungi Isolated from *Lindera obtusiloba* in Korea. *Kor J Mycol* 2012;40:136-40.
9. 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.
10. 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.
11. Arnold AE. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol Rev* 2007;21:51-66.
12. Campbell CK, Johnson EM. *Identification of pathogenic fungi*. 2nd ed. London: John Wiley & Sons; 2013.