

울릉도에서 분리한 미기록 진균 종 보고

안금란 · 김성환*

단국대학교 미생물학과

Undescribed Fungal Species Found in Ulleungdo, Korea

Geum Ran Ahn and Seong Hwan Kim*

Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

ABSTRACT : Ulleungdo is a volcanic island inhabited by a variety of animals and plants in an oceanic climate in the East Sea. The presence of filamentous fungi has been rarely reported in Ulleungdo. Thus, in this study some plants in the Nari basin and soils in the Dodong region were sampled. Fungi were isolated from the soil and identified by microscopical and molecular biological methods. *Coniothyrium aleuritidis*, *Hypocrea valdunensis*, *Pestalotiopsis uvicola* and *P. caudate* were identified and found to be undescribed species in Korea.

KEYWORDS : *Coniothyrium aleuritidis*, *Hypocrea valdunensis*, *Pestalotiopsis caudate*, *Pestalotiopsis uvicola*, Ulleungdo

경상북도 울릉군에 속하는 울릉도는 신생대의 중신세로부터 홍적세에 걸쳐 동해의 대륙붕에서 일어난 대규모의 화산활동으로 형성된 총 44개의 섬으로 구성되어 있는 화산섬이다. 울릉도는 식물 구계 지리상상으로 한국구의 울릉도아구에 속하며, 기후적으로는 온난다습한 해양성 기후로 동 위도상에 위치하는 내륙지역과는 다르게 여름은 시원하고 겨울은 온난한 해양성 기후대를 형성하고 있다. 이와 같은 기후적 특성에 따라 울릉도는 생태적으로 난대 및 온대식물이 혼생하고, 향나무(*Juniperus chinensis*), 후백나무(*Machilus thunbergii*), 동백나무(*Camellia japonica*) 등 750종의 다양한 식생을 형성하고 있어 식물지리학적으로 매우 중요한 지역이다[1-4].

이러한 중요성에 따라 울릉도의 동·식물과 지질 등에 대한 보고가 간간히 있었다. 진균과 관련하여서는 최근에

들어서 야생화에서 분리한 효모[5]와 울릉도 자생란에서 분리한 난균근균[6]에 대한 보고가 있는 정도이다. 따라서 아직 전반적으로 진균에 대한 보고는 매우 미미한 실정이다. 이에 따라 본 연구팀은 이 지역에 존재하는 자생 진균 발굴을 위한 노력으로 2013년 6월 나리분지와 도동에서 식물 병반과 토양 시료를 채집하여 분석하였다. 본 논문에서는 분석 결과의 일부로서 채집시료로부터 분리된 진균 중 국내 미기록으로 파악된 종에 대하여 보고하고자 한다.

울릉도 나리분지에서 섬말나리(*Lilium hansonii*)와 큰두루미꽃(*Maianthemum dilatatum*)에 형성된 병반과 도동에서 채취한 곰취(*Ligularia fischeri*)에 형성된 병반을 채집하였다(Fig. 1). 채집한 식물 병반을 실험실로 가져와 갈반의 병징이 존재하는 부분을 생물안전작업대에서 멸균된 수술용 칼을 이용하여 일정한 면적($1 \times 1 \text{ cm}^2$)으로 잘라 절편 시료를 준비하였다. 절편시료는 5% 차아염소산나트륨 용액에 담가 30초간 표면 소독 후 멸균수에 1분간 담가 두 차례 세척하였다. 세척한 시료를 표면의 물기가 증발하도록 자연 건조시킨 다음 암피실린($50 \mu\text{g/mL}$)이 첨가된 potato dextrose agar (PDA) 배지에 올려놓은 후 25°C 에서 72시간 배양 후 자라난 진균을 순수분리하였다.

토양시료는 울릉도 나리분지의 토양을 표면 5 cm 밑에서 채취한 후 실험실로 가져와 분석하였다. 분석을 위해서 1 g의 토양을 20 mL의 멸균수에 넣고 1분간 진탕하여 현탁액을 얻고, 단계별로 희석하여 암피실린($50 \mu\text{g/mL}$)이 들어있는 PDA 배지에 도말하여 25°C 에서 72시간 배양 후 자라난 균사로부터 진균을 순수분리하였다(Fig. 1). 순수분

Kor. J. Mycol. 2015 March, 43(1): 53-57
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.1.53>
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: piceae@naver.com

Received December 31, 2014

Revised February 21, 2015

Accepted February 21, 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.

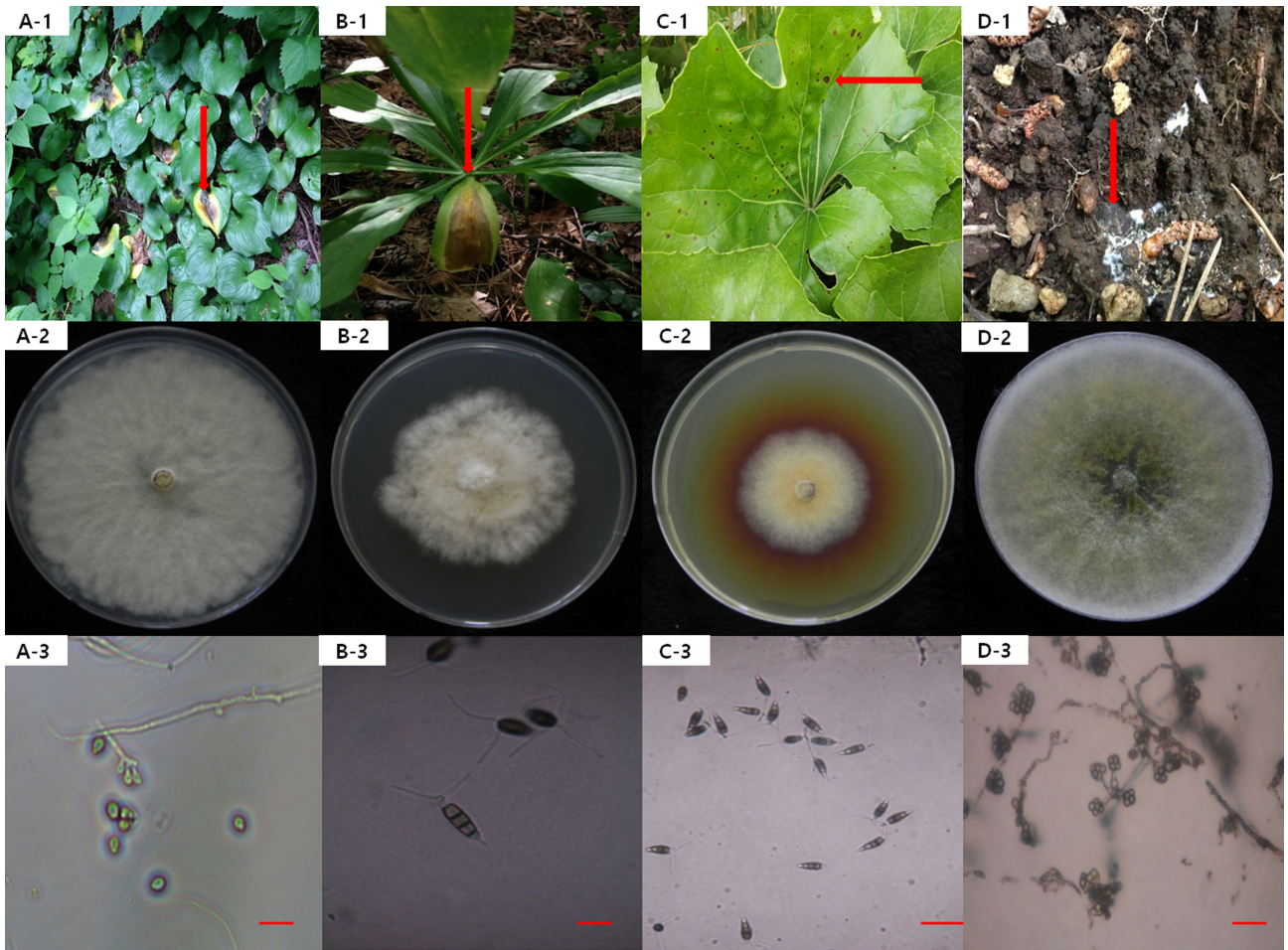


Fig. 1. *Maianthemum dilatatum* (A-1), *Lilium hansonii* (B-1), *Ligularia fischeri* (C-1) and a soil part (D-1), sampled for fungal isolation in this study. Colony morphology on potato dextrose agar (PDA) (middle) and light microscopic features (bottom) of the isolated fungi. DUCC 5057 *Coniothyrium aleuritis* (A-2, A-3), DUCC 5059 *Pestalotiopsis uvicola* (B-2, B-3), DUCC 5060 *P. caudate* (C-1, C-2), and DUCC 5058 *Hypocrea valdunensis* (D-1, D-2). (scale bar = 10 μ m). Arrows point the sampled sites.

리된 균주는 2 mL 튜브에 10% 글리세롤과 함께 넣어준 후 -80°C 냉동기에 보관시키면서 본 실험에 사용하였다. 분리한 진균을 DUCC5057번부터 DUCC5060번으로 균주 번호를 부여하였다.

분리한 균주의 미세구조는 광학현미경(Axioskop40, Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 관찰하였다. 유전자 분석을 위해서는 Kim 등[7]의 drilling 방법에 따라 genomic DNA를 추출 후 internal transcribed spacer 1 (ITS1) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGC TTATTGATATGC-3')[8] primer를 사용하여 ITS rDNA 영역을 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 균총의 성장과 현미경 관찰 결과로 볼 때 균사와 포자의 형태가 *Trichoderma* 속인 DUCC5058번 균주는 추가로 translation elongation factor 1 alpha(TEF-1 α) gene DNA를 TEF728 (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')과 TEF1 (5'-GCCATCCTTGAGATACC AGC-3')[9] primers를 이

용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 열변성과정 94°C 5분 후 변성단계 94°C 30초, 결합단계 56°C 30초, 연장단계 72°C 30초로 하여 총 30 cycle 진행하였으며, 최종 연장단계는 72°C에서 10분간 진행하였다. PCR 증폭된 DNA는 1% (w/v) 아가로스겔 전기영동을 수행하여 확인하였고, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Basel, Swiss)를 사용하여 정제하였다. 정제된 DNA의 염기서열 결정은 마크로젠사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 분석된 염기서열들은 미국 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 웹에 있는 BLAST 프로그램을 사용하여 GenBank 데이터베이스에 등록되어 있는 진균들의 ITS 및 TEF-1 α 유전자 염기서열과 비교하여 PCR 산물의 진위여부를 판단하였다. 결정된 염기서열과 reference 서열은 Cluster X program[10]을 이용하여 다중염기서열정렬(alignment)을 진행하였고 MEGA 6.0 프로그램[11]을 이용하여 염기서열의 유사도와

더불어 계통수를 분석하였다. 계통수는 neighbor joining 방법 [12]으로 1,000번의 bootstrapping 분석을 수행하여 작성하였다.

PDA에 7일간 배양 후 균총의 형태를 관찰하였을 때, 큰 두루미꽃(Fig. 1A-1)에서 분리된 DUCC5057 균주는 흰색의 균사로 균일하게 자라나는 모양을 나타냈고(Fig. 1A-2) 토양(Fig. 1D-1)에서 분리된 DUCC5058 균주는 생장이 매우 빠르며 균사의 색은 녹색에서 노란색으로 숨 구조처럼 부유하여 자랐다(Fig. 1D-2). 섬말나리(Fig. 1B-1)에서 분리된 DUCC5059 균주는 생장이 느리고 아이보리색을 띄며 균사가 불규칙하게 자랐다(Fig. 1B-2). 곰취(Fig. 1C-1)에서 분리된 DUCC5060 균주는 DUCC5059 균주와 같이 생장이 느리며 균총의 색이 중앙은 노란색이며 끝은 흰색이고 갈색 색소를 분비하였다(Fig. 1C-2).

광학현미경으로 관찰하였을 때 DUCC5057 균주는 $3.4 \pm 0.1 \times 1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 크기의 타원형 형태 분생포자가 균사에서 분지되어 있었고 뚜렷한 형태의 분생자경은 잘 관찰되지 않았다(Fig. 1A-3). DUCC5058 균주는 4~5개의 작은 구형의 $0.9 \pm 0.1 \times 1.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 크기인 분생포자들이 다발로 있고 그 다발들이 삼지창 모양으로 분지되어 나오는 전형적인 *Trichoderma* 속의 특징을 가지고 있었다(Fig. 1D-3). 분생자경은 원뿔형으로 $2.3 \pm 0.1 \times 1.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 크기를 나타내었다. DUCC5059 균주는 $9.3 \pm 0.2 \times 1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 크기의 타원형 포자에 3개의 격벽이 존재하고 두 개의 부속지를 지닌 전형적인 *Pestalotiopsis* 구조를 가지고 있었다(Fig. 1B-3). DUCC5060 균주 또한 DUCC5059 균주와 유사하게 $8.5 \pm 0.1 \times 1.1 \times 0.1 \mu\text{m}$ 크기의 타원형 포자에 3개의 격벽이 존재하고 두 개의 부속지를 지닌 *Pestalotiopsis* 구조를 가지고 있었다(Fig. 1C-3). DUCC5059와 DUCC5059 균주는 모두 격벽의 색이 짙은 갈색이었으며 포자는 투명하였다. DUCC5060번은 부속지로 갈수록 포자의 색이 짙은 갈색으로 분포하였다(Fig. 1).

분리된 균주를 ITS 염기서열에 기반하여 분자생물학적 방법으로 동정한 결과 DUCC 5057 균주는 *Coniothyrium aleuritis*와 DUCC5059번 균주는 *Pestalotiopsis uvicola*와 DUCC 5060번 균주는 *P. caudate*와 100% 상동성을 가지고 있었다(Table 1). 그리고 *Trichoderma* 속 형태를 보였던 DUCC 5058 균주는 TEF-1 α 유전자 염기서열을 기반하여 동정한 결과 완전세대인 *Hypocrea valdunensis*와 100% 상동성을 가지고 있었다. MEGA 6.0 프로그램을 이용하여

분리된 균주들을 계통학적으로 분석한 결과 각각의 균주들이 동정된 균주들과 같은 분기를 형성하였다. 그리하여 형태적, 분자생물학적 분석 결과를 바탕으로 DUCC 5057 균주는 *C. aleuritis*, DUCC 5058 균주는 *H. valdunensis*, DUCC 5059 균주는 *P. uvicola*, DUCC5060 균주는 *P. caudate*로 각각 동정하였다(Fig. 2). 동정된 균주는 국립생물자원관에 기탁하여 NIBRFGC 000130021 (DUCC 5057), NIBRFGC 000130020 (DUCC 5058), NIBRFGC 000130019 (DUCC 5058), NIBRFGC 000130015 (DUCC 5060) 등의 기탁번호를 각각 부여 받았다.

한반도 전역 깊은 산중에 자라는 것으로 알려진 큰두루미꽃은 어린잎을 살짝 데쳐 양념에 무쳐 먹거나 된장국의 국거리로 쓰기도 하며 데친 뒤 햇볕에 말려 목나물로도 쓰이는 풀이다 [13]. 국내에 아직 큰두루미꽃에 대한 병해 보고는 없는 실정이다. 섬말나리의 경우에도 아직까지 식물병 보고가 없지만 같은 나리과에 속하는 나리에서는 점무늬병이 식물병으로 보고되었다 [14]. 어린 잎을 나물로 먹는 곰취는 국화과에 딸린 여러해살이 풀로서 깊은 산에서 나는 식물이다. 곰취는 흰가루병, 역병, 잘록병이 식물병으로 보고되어 있다 [14]. 동정된 *C. aleuritis*는 2013년 이란의 포도나무에서 분리하여 보고가 되었으며 [15], *P. uvicola*는 2005년 이탈리아 시칠리아의 월계수에서 잎반점병과 줄기마름병을 일으키는 것으로 보고되었다 [16]. *P. caudate*는 2007년 중국에서 보고한 논문에 의하면 중국잣나무에서 분리한 내생균 중 하나로 알려졌다 [17]. *H. valdunensis*는 Jaklitsch [18]에 의하여 2011년 처음 보고가 되었다. 이들 울릉도에서 분리 동정한 진균들은 이처럼 해외에서 보고가 되어 있으나 아직 국내에서는 보고가 되어 있지 않아 미기록종으로 보고하는 바이다.

진균이 분리된 나리분지는 울릉도에 있는 유일한 분지로 성인봉의 화산 폭발로 만들어진 칼데라이다. 수 천년 전 성인봉에 강력한 분화가 있었고, 그 후 봉우리 아래 부분이 함몰되어 생겨난 곳으로 지금은 나리분지 안에서 농사를 짓고, 사람들이 집을 지어서 살고 있는 곳이다. 이곳에서의 사상성 진균 분리는 처음이며 앞으로 분리된 진균 종들이 국내의 다른 지역에도 분포하는지 여부와 더불어 병반처럼 보이는 부분에서 분리되었기에 향후 이들 4종의 진균종 식물에 병원성을 가지는 종이 있는지 여부에 대해서는 조사가 더 필요하다.

Table 1. Molecular identification of mold using ITS rDNA or TEF-1 α gene sequences

Isolates	Nucleotide sequence	GenBank accession No.	The Closest genbank taxa	Maximum identity (%)
DUCC5057	ITS rDNA	EU622266.1	<i>Coniothyrium aleuritis</i>	100
DUCC5059	ITS rDNA	JN198506.1	<i>Pestalotiopsis uvicola</i>	100
DUCC5060	ITS rDNA	JN198508.1	<i>Pestalotiopsis caudate</i>	99
DUCC5058	TEF-1 α gene	FJ860717.1	<i>Hypocrea valdunensis</i>	100

ITS, internal transcribed spacer; TEF, translation elongation factor.

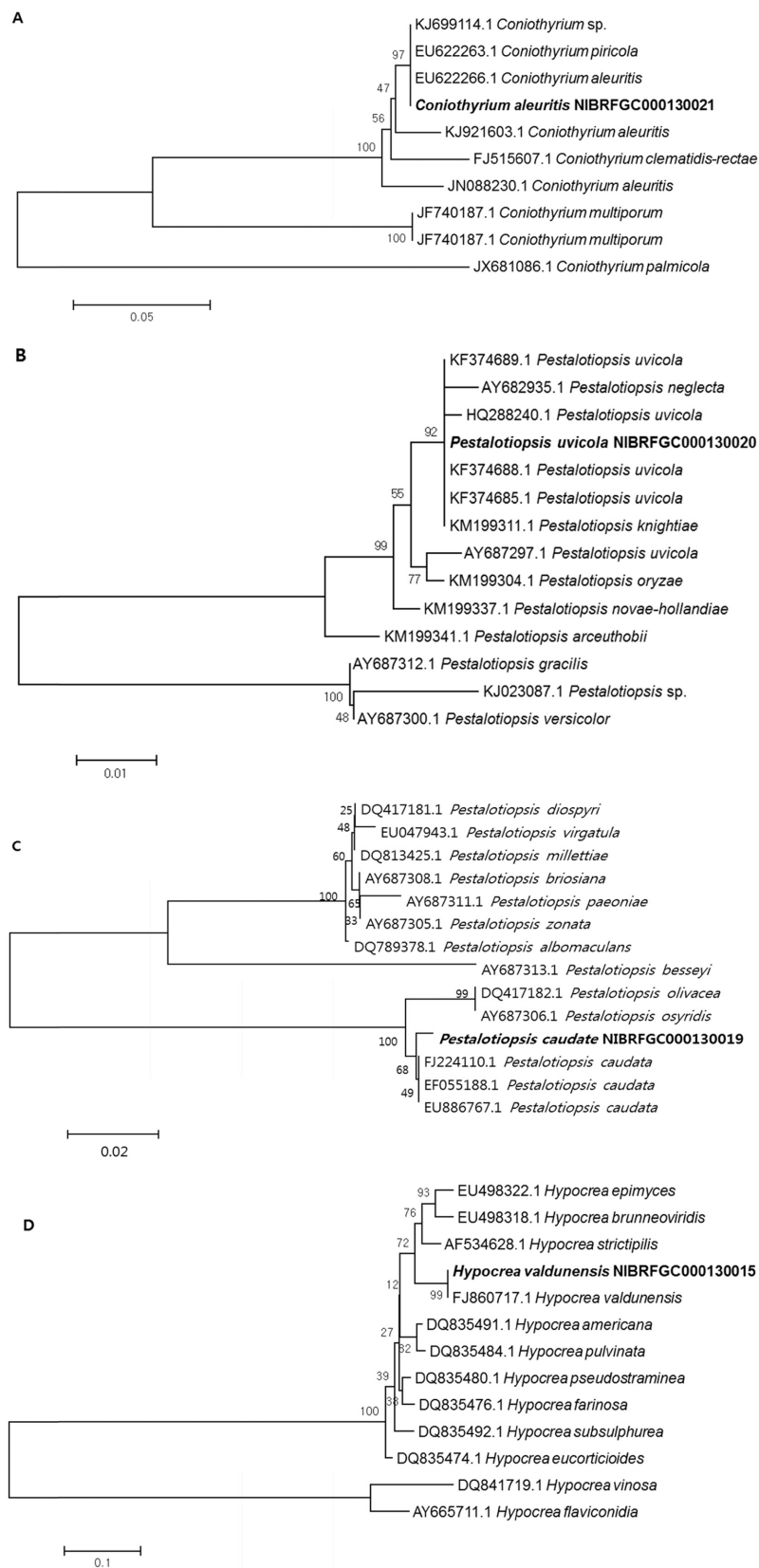


Fig. 2. Phylogenetic relationships of DUCC 5057 *Coniothyrium aleuritidis* (A), DUCC 5059 *Pestalotiopsis uvicola* (B), DUCC 5060 *P. caudate* (C) and DUCC 5058 *Hypocrea valdunensis* (D) inferred by the neighbor joining analysis based on internal transcribed spacer (ITS) rDNA (A-C) or translation elongation factor (TEF)-1 α (D) sequence data. Bootstrap value is given above the node. Species clades are indicated by vertical bars.

적 요

울릉도는 동해에 위치한 화산섬으로 해양성기후이며 생태적으로 다양한 식물들이 존재하는 곳이다. 이 지역에서 진균에 대한 보고가 미진하여 나리분지의 식물과 도동의 흙 시료로부터 진균을 분리하고 형태학적 방법과 분자생물학적 방법으로 동정하였다. 그 결과 *C. aleuritis*, *H. valdensis*, *P. uvicola* 와 *P. caudate*가 분리 동정되었다. 이들 진균은 국내에서 처음 보고되는 것이다.

Acknowledgements

This study was support by National Institute of Biological Resources (NIBR No 2013-02-001) of Korea.

REFERENCES

1. Ulleung-gun. Welcome to mystery island Ulleung-do [Internet]. Ulleung-gun (Korea): Ulleung-gun Office; 2011 [cited 2011 Dec 30]. Available from: <http://www.ulleung.go.kr/Woo-reumoe/main.htm>.
2. Lee JH. An ecological approach for the effective conservation and management of forest vegetation in Ulleung Island, Korea [dissertation]. Daegu (Korea): Kyungpook National University; 2005.
3. Park SJ. Endemic plants native to Ulleungdo, naturalized impact on environmental protection. J Daegu Gyeongbuk Stud 2006;179-205.
4. Yim YJ, Jeon ES. Distribution of naturalized plants in the Korean Peninsula. Korean J Bot 1980;23:69-83.
5. Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of yeasts from wild flowers in Ulleungdo and Yokjido, Korea. Kor J Mycol 2014;42:28-33.
6. Youm JY, Chung JM, Lee BC, Eom AH. Molecular identification of orchid mycorrhizal fungi of native orchids in Ulleung Island. Kor J Mycol 2011;39:7-10.
7. Kim SH, Uzunovic A, Breuil C. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. Appl Environ Microbiol 1999;65:287-90.
8. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
9. Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA, Petrini O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 2002;94: 146-70.
10. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997;25:4876-82.
11. 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.
12. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987;4:406-25.
13. Lee JM. Relax and know each other, we will be okay wild plants 421. Seoul: Hwan creative company; 2009. p. 145.
14. Rural Development Administration. RDA-Genebank Information Center. [Internet]. Jeonju (Korea): Rural Development Administration (RDA); 2011 [cited 2011 Dec 30]. Available from: <http://www.genebank.go.kr>.
15. Hergholi N, Javan-Nikkhah M, Ghosta Y, Campisano A, Pancher M. First report of new endophytic fungi in grapevine trees (*Vitis vinifera* L.) in West Azerbaijan province. In: 11th Iranian Mycological Congress; 2013 Sep 3-5; Rasht, Iran.
16. Vitale A, Polizzi G. Occurrence of *Pestalotiopsis uvicola* causing leaf spots and stem blight on Bay Laurel (*Laurus nobilis*) in Sicily. Plant Dis 2005;89:1362.
17. Hu HL, Jeewon R, Zhou DQ, Zhou TX, Hyde KD. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ries* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. Fungal Divers 2007;24:1-22.
18. Jaklitsch WM. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. Fungal Divers 2011;48:1-250.