

침엽수의 잎에서 분리한 국내 미기록 내생균 3종에 대한 보고

여주경^{1,2} · 이봉형¹ · 엄안흠^{1*}

¹한국교원대학교 생물교육과, ²국립생태원 기초생태연구실

First Report of Three Species of Endophytic Fungi Isolated from Needle Leaves of Conifers in Korea

Ju-Kyeong Eo^{1,2}, Bong-Hyung Lee¹ and Ahn-Heum Eom^{1*}

¹Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea

²Bureau of Basic Ecological Research, National Institute of Ecology, Seoecheon 33657, Korea

ABSTRACT : We examined endophytic fungi from the needle leaves of three species of conifers in Korea: *Abies nephrolepis*, *Thuja koraiensis*, *Pinus koraiensis*. Endophytic fungi were isolated from the surface-sterilized leaves and identified based on morphological characteristics and Internal transcribed spacer sequences of rDNA. Three species of endophytic fungi isolated in this study were the first reported in Korea: *Cryptosporiopsis actinidiae*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Pyrenochaeta cava*.

KEYWORDS : *Abies nephrolepis*, Endophytic fungi, *Pinus koraiensis*, *Thuja koraiensis*, Unrecorded species

내생균(endophytic fungi)은 일반적으로 식물에 병증을 나타내지 않고 식물 조직 내에 서식하는 균류를 말한다[1]. 일반적으로 내생균은 이차대사산물을 분비하여 병원균과 초식동물 등으로부터 식물을 보호하며, 고온이나 가뭄에 대한 내성을 통해 식물에게 도움을 주는 것으로 알려져 있다[2-4]. 내생균은 주로 자낭균류나 담자균류에 속하는 균류로써 식물체의 지하부로부터 지상부에 이르기까지 다양한 식물 조직에서 발견되고 있으며, 거의 모든 식물에서 분리되고 있어서 다양성 또한 매우 높은 것으로 알려져 있다[5].

침엽수는 세계적으로 약 600여 종이 분포하는 것으로 알려져 있으며[6], 우리나라에서는 약 54종이 서식하고 있다.

내생균과 숙주식물 사이에 특이적인 관계가 크지는 않으나 겉씨식물인 침엽수는 속씨식물과는 상당히 다른 내생균과 진화해온 것으로 알려져 있다[7]. 특히 최근에는 침엽수 내생균으로부터 택솔(Taxol)과 같은 다양한 물질을 분리하여 활용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다[8, 9]. 본 연구에서는 침엽수에 공생하는 내생균의 다양성을 확인하기 위하여 경기도 및 강원도의 산림에 서식하는 3종의 침엽수에서 내생균을 분리하여 동정하였으며 3종의 내생균이 국내 미기록종으로 확인되어 보고하고자 한다.

경기도의 명지산(고도 1,252 m, N 37° 57', E 127° 25')에서 소나무속(*Pinus* L.)에 속하는 잣나무(*P. koraiensis* Siebold et Zucc.), 경기도 화악산(고도 1,468 m, N 37° 59', E 127° 30')에서 잣나무속(*Abies* Mill.)에 속하는 분비나무(*A. nephrolepis* (Traut.) Maxim.), 그리고 강원도의 설악산(고도 1,708 m, N 38° 07', E 128° 22')에서 측백나무속(*Thuja* L.)에 속하는 눈측백(*T. koraiensis* Nakai)등의 소지를 채취하였으며 48시간 내에 실험실로 운반하여 균 분리를 수행하였다. 채집된 식물의 침엽은 수돗물로 세척 후 1% 차아산염소산나트륨(NaOCl)에서 3분, 70% 에탄올에서 2분간 처리하고 멸균수로 세척하여 표면살균을 진행하였다. 그 후 침엽은 약 1 cm 정도의 크기로 준비한 후 potato dextrose agar (PDA)배지에 치상하였으며, 25°C의 배양기에서 관찰하면서 발생한 균주들을 분리하여 계대배양하였다.

Kor. J. Mycol. 2015 December, 43(4): 272-276
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.4.272
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: eomah@knu.ac.kr

Received December 1, 2015

Revised December 10, 2015

Accepted December 10, 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.

분리된 균주는 형태적 특징을 확인하기 위해 균총의 생장과 크기, 색 등을 포함한 형태형질을 육안으로 관찰하였다. 이후 균사 및 포자의 형태형질은 광학현미경(AxioImager A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다(Fig. 1). 염기서열 분석을 위해서 균사의 DNA를 Exgene Plant SV mini kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용해서 추출하였으며, 추출된 DNA 시료를 주형으로 하여 균 특이적인 primer인 ITS1F와 ITS4를 사용하여 rDNA의 internal transcribed spacer (ITS)지역을 증폭하였다[10]. Polymerase chain reaction (PCR) 수행 조건은 다음과 같다. 94°C에서 5분 간 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초 간 denaturation과 50°C에서 30초 간 annealing 단계를 거치고 72°C에서 1분 간 신장시켰다. 이러한 과정을 총 30회 수행하였으며, 최종적으로 72°C에서 5분 간 처리하여 증폭산물을 안정화시켰다. 최종적인 PCR산물은 agarose gel 상에서 전기영동방법을 이용하여 밴드를 확인한 후 염기서열 분석은 솔젠트(Daejeon, Korea)에 의뢰하였다. 분석된 염기서열들은 NCBI 상에서 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 사용하여 가장 유사도가 높은 분류군들을 선택하

였다. 선택된 분류군들은 염기서열 정렬을 거쳐 계통수 상에서 염기서열의 유사도를 바탕으로 각 분류군의 위상을 확인하였다. Bootstrap 분석은 1,000회 반복으로 수행되었으며, outgroup은 치마버섯(*Schizophyllum commune*)을 사용하여 MEGA6 [11]에서 수행하였다(Fig. 2). 본 연구에서 사용된 염기서열은 GenBank에 등록하였으며, 균주 13C019는 KU194425, 균주 13C145는 KU194426, 균주 13C319는 KU194427을 부여받았다.

***Cryptosporiopsis actinidiae* P.R. Johnst., M.A. Manning & X. Meier, Mycotaxon 89: 132 (2004)**

PDA배지에서 28일간 배양된 균총은 반경이 약 30~33 mm 정도이며, 균사의 밀도는 다소 조밀하고, 공중균사가 발달하였다(Fig. 1A, 1B). 균총의 변연부는 원형으로 비교적 일정한 형태를 유지하고 있으나 PDA배지에서 28일 이상 배양 시에 반경 30~33 mm 정도에서 균사의 밀도가 매우 희박해지며, 7.5 mm 정도 넓이의 환대를 형성한 후 다시 다소 조밀한 균사가 발달한다. 표면의 색상은 흰색이나 환대에서는 옅은 미색이 나타나며, 표면에는 삼출물이 없

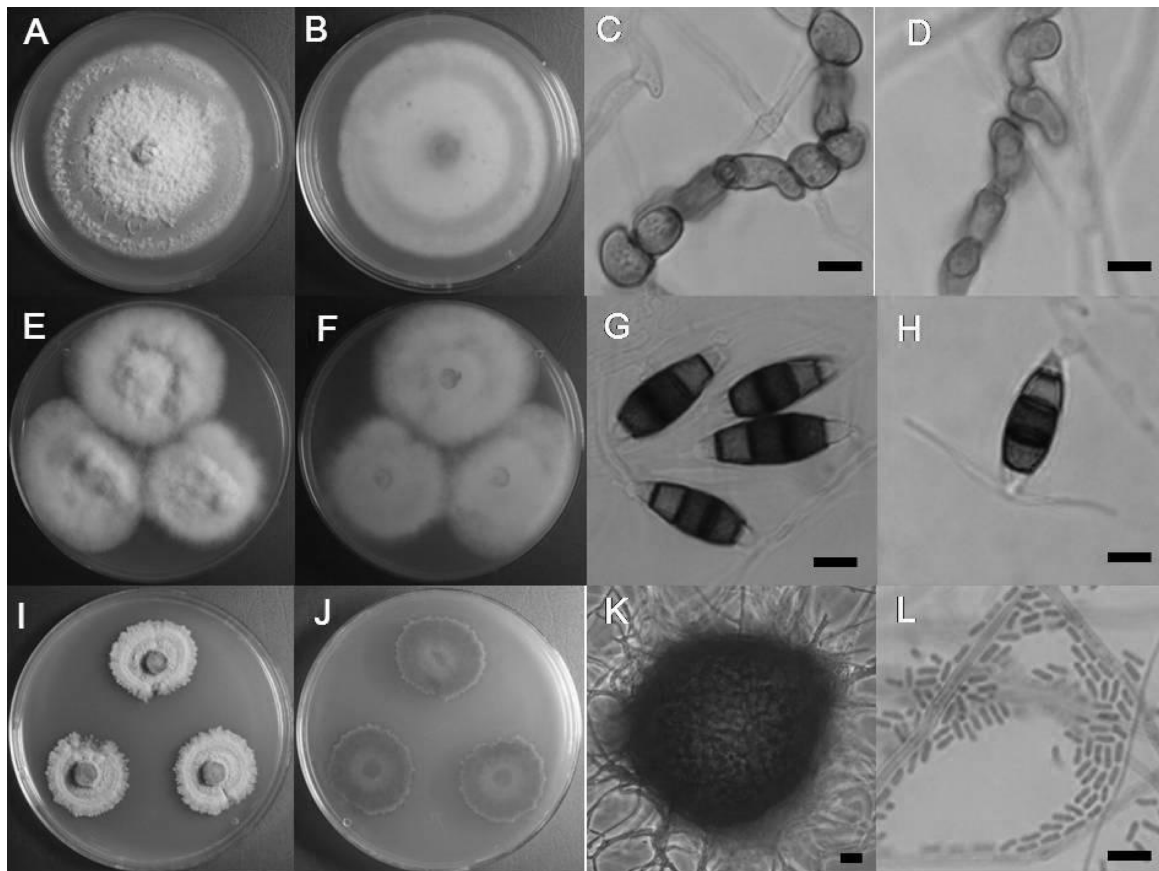


Fig. 1. Colony of strain 13C019 (*Cryptosporiopsis actinidiae*) grown on potato dextrose agar (PDA) (A, B) for 28 days and spores (C, D); 13C145 (*Pestalotiopsis mangiferae*) grown on PDA for 7 days (E, F) and spores (G, H); 13C319 (*Pyrenochaeta acava*) grown on PDA for 7 days (I, J) and a brown microsclerotium (K) and hyaline allantoid spores (L). (scale bars: C, D, G, H, L = 5 μ m, K = 10 μ m).

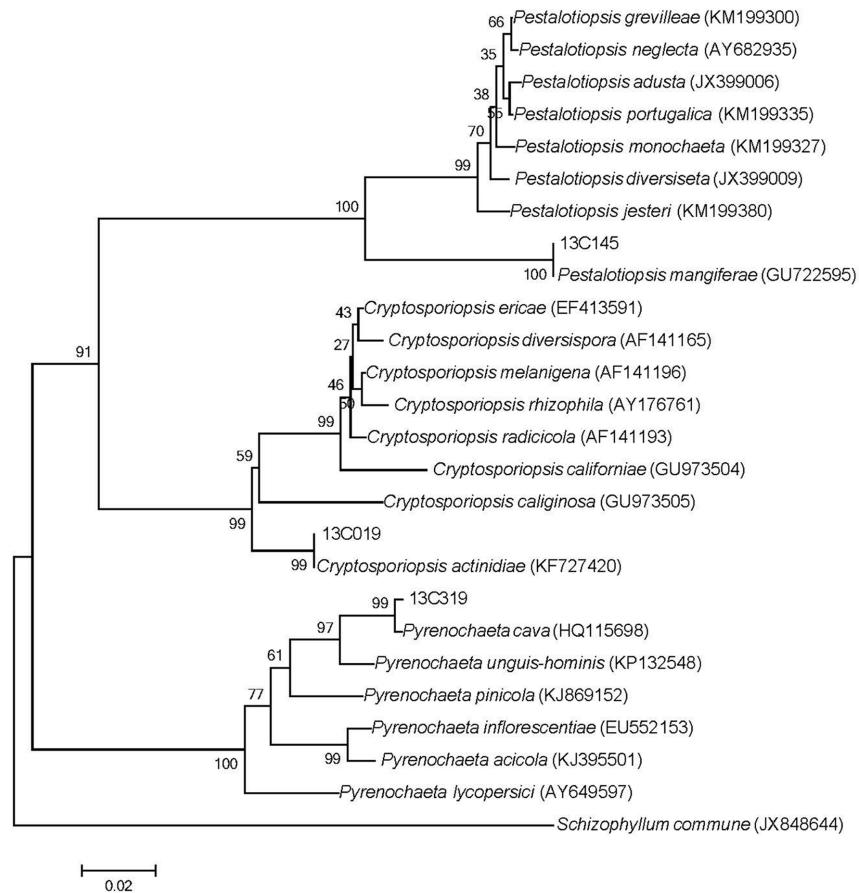


Fig. 2. Phylogenetic tree of unrecorded endophytic fungi, *Cryptosporiopsis actinidiae*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Pyrenochaeta cava* from conifer trees in the Korean peninsula. Internal transcribed spacer and 5.8S rDNA region were used to confirm the topological appropriation of the isolates. *Schizophyllum commune* was used as an outgroup.

다. 포자의 크기는 $5\sim 10 \times 2.5\sim 5 \mu\text{m}$ 정도이다. 포자의 전체적인 형태는 직사각형의 원통형 모양이며, 양 말단은 반구형의 둥그스름한 형태이다(Fig. 1C, 1D). 포자는 염주상의 연속된 균사형태를 확인할 수 있었다. 포자의 색은 전체적으로 투명하면서 연한 갈색을 띠었다. 이 균주의 rDNA 중 ITS지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *C. actinidiae* KF727420과 100%의 상동성을 보였다.

*C. actinidiae*는 키위(*Actinidia* spp), 사과(*Malus domestica*) 등 과실에 병을 일으키는 경제적으로 중요한 병원균으로 2004년 처음 보고된 종으로[12], 내생균으로는 나한송과(*Podocarpaceae*)의 다양한 종에서 분리된 것으로 보고되었다[13].

관찰표본: 강원도 설악산, N $38^{\circ} 07'$, E $128^{\circ} 22'$, 눈썹백(*Thuja koraiensis*)의 침엽, 13C019 (NIBRFG0000137509, GenBank accession no. KU194425)

***Pestalotiopsis mangiferae* (Henn.) Steyaert, Bulletin du Jardin Botanique de l'at Bruxelles 19: 320 (1949)**

PDA배지에서 7일간 배양한 균총의 직경은 약 30 mm 정

도이며, 균사의 밀도는 다소 성기고, 공중균사가 발달하였다(Fig. 1E, 1F). 균총의 변연부는 비교적 일정한 형태를 유지하고 있으나 변연부에서 균사의 발달이 다소 불규칙한 형태를 보이며, PDA배지에서 7일 이상 배양 시에는 변연부가 매우 불규칙한 형태를 띠며 발달한다. 표면의 색상은 흰색과 미색이 불규칙하게 나타나며, 표면에는 삼출물이 없다. 뒷면은 표면과 비슷하게 미색을 띤다. 포자의 크기는 약 $14.5\sim 17.5 \times 4.1\sim 6.5 \mu\text{m}$ 정도이며, 포자의 전체적인 형태는 타원형의 단지 모양으로, 양 말단에는 투명한 부속지가 부착되어 있다(Fig. 1G, 1H). 포자의 색은 전체적으로 갈색을 띠었으나 격벽의 색은 그보다 더 짙은 갈색을 띠고 있다. 이러한 타원형 단지 모양의 포자는 *Pestalotiopsis* spp.의 대표적인 특징이며, 격벽의 개수와 부속지의 형태와 수 등은 종에 따라 차이를 보인다[14]. ITS 지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *Pestalotiopsis mangiferae* GU722595와 100%의 상동성을 보였다.

Pestalotiopsis spp.는 주로 식물에서 병증을 일으키는 것으로 알려져 있으며[15], *P. versicolor*는 주목(*Taxus cuspidata*)에서 항암물질인 Taxol을 생산하는 것으로 보고되고

있다[9]. 우리나라에서도 여러 식물에서 병을 일으키는 것으로 보고되고 있으며[16], 소나무(*Pinus densiflora*) 등에서 내생균으로 보고된 바 있다[17]. *Pestalotiopsis mangiferae*는 내생균으로 여러 가지의 이차대사산물을 생산하는 것으로 알려져[18] 활용 가능성이 높은 균주이다.

관찰표본: 경기도 화악산, N 37° 59', E 127° 30', 분비나무(*Abies nephrolepis*)의 침엽, 13C145 (NIBRFG0000137639, GenBank accession no. KU194426)

Pyrenochaeta cava* (Schulzer) Gruyter, Aveskamp & Verkley, Mycologia 102: 1076 (2010)=*Phoma cava

PDA배지에서 7일간 배양한 균총의 직경은 약 24 mm 정도이며, 균사의 밀도는 매우 조밀하고 촘촘하다(Fig. 1I, 1J). 공중균사는 발달하지 않았다. 균총의 변연부는 비교적 일정한 형태를 유지하고 있으나 변연부에서 균사의 발달이 다소 불규칙한 형태를 보이며 대체적으로 파형을 나타내고 있다. 표면의 색상은 미색을 띄고 있으며, 표면에는 삼출물이 없다. 뒷면의 중심부는 미색을 띄고 있으나, 그 외의 변연부로 갈수록 황갈색을 띄고 있으며, 가장 외층은 밝은 주황색을 띤다. 소핵균의 크기는 약 85.1~100 μ m 정도이며, 소핵균의 전체적인 형태는 원형으로 진한 갈색으로 관찰되었다(Fig. 1K). 포자는 투명하며 단세포로서 원통형이며 크기는 약 $2\sim3 \times 1.0\sim1.5 \mu$ m 정도이다(Fig. 1L). ITS지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *Pyrenochaeta cava* HQ1156 98와 100%의 상동성을 보였다.

관찰표본: 경기도 명지산, N 37° 57', E 127° 25', 잣나무(*Pinus koraiensis*)의 침엽, 13C319 (NIBRFG0000137680, GenBank accession No. KU194427)

본 연구에서는 우리나라 중부지역인 경기도와 강원도의 산림에 서식하는 침엽수로부터 내생균을 분리하였으며, 우리나라에서는 처음으로 3종의 균을 확인하였다. 내생균은 식물의 생장에 도움을 줄 뿐만 아니라 다양한 물질을 생산함으로써 병원균에 대한 생물제제 등에 활용가능성이 높은 것으로 생각된다. 따라서 침엽수를 포함한 다양한 숙주식물을 기반으로 지속적인 내생균류의 발굴을 수행할 필요가 있으며, 이러한 노력을 통하여 침엽수에 공생하는 다양한 내생균 확인과 자원의 확보뿐만 아니라 침엽수와 내생균과의 특이적 관계 및 상호작용을 파악하여 우리나라 생물자원의 보존에 기여할 수 있을 것이다.

적 요

경기도와 강원도에 위치한 화악산, 명지산 그리고 설악산에서 침엽수를 채집하여 균 분리를 수행하였다. 특히, 눈썹백과 분비나무의 내생균에 대한 연구가 최초로 수행되었으며, 본 연구를 통해 이들로부터 분리한 균에 대한 형태적, 유전적 동정을 수행하였다. 그 결과 *Cryptosporiopsis actinidia*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Pyrenochaeta cava*가 확인

되었으며, 이에 대해 최초로 국내에서 눈썹백과 분비나무에 분포함을 보고하였다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant (NIBR2014-01205) from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea.

REFERENCES

- Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988;69:2-9.
- Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. *Mycol Res* 2005;109:661-86.
- Arnold AE, Herre EA. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 2003;95:388-98.
- Bae H, Sicher RC, Kim MS, Kim SH, Strem MD, Melnick RL, Bailey BA. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J Exp Bot* 2009;60:3279-95.
- Cuadros-Orellana S, Leite LR, Smith A, Medeiros JD, Badotti F, Fonseca PL, Vaz AB, Oliveira G, Ges-Neto A. Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. *Fungal Genom Biol* 2013;3:110.
- Farjon A. World checklist and bibliography of conifers. 2nd ed. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew; 2001.
- Sieber TN. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol Rev* 2007;21:75-89.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 1993;260:214-6.
- Wei JG, Xu T, Guo LD, Liu AR, Zhang Y, Pan XH. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of *Podocarpaceae*, *Theaceae* and *Taxaceae* in southern China. *Fungal Divers* 2007;24:55-74.
- 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.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
- Beever RE, Parkes SL. Vegetative compatibility groups in the fungus *Cryptosporiopsis actinidia*. *N Z J Crop Hortic Sci* 2007;35:67-72.
- Joshee S, Paulus BC, Park D, Johnston PR. Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand *Podocarpaceae*. *Mycol Res* 2009;113:1003-15.
- Jeewon R, Liew EC, Hyde KD. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Mol Phylogenet Evol* 2002;25:378-92.
- Hyde K, Frhlich J. *Mycosphaerella palmicola* associated with

- leaf spots of *Cocos nucifera* in Australia, Irian Jaya and Papua New Guinea. *Mycol Res* 1995;99:704-6.
16. Chang TH, Lim TH, Chung BK, Kim BS. Studies on cultural characteristics *Pestalotiopsis theae* causing leaf blight on oriental persimmon tree. *Plant Pathol J* 1997;13:232-8.
17. Kim CK, Eo JK, Eom AH. Diversity and seasonal variation of endophytic fungi isolated from three conifers in Mt. Taehwa, Korea. *Mycobiology* 2013;41:82-5.
18. Subban K, Subramani R, Johnpaul M. A novel antibacterial and antifungal phenolic compound from the endophytic fungus *Pestalotiopsis mangiferae*. *Nat Prod Res* 2013;27:1445-9.