

# 한국에 서식하는 침엽수의 잎과 난초과 식물의 뿌리에서 분리한 5종의 국내 미기록 내생균

박혁 · 이봉형 · 배유라 · 김동여 · 엄안흠\*

한국교원대학교 생물교육과

## Notes on Five Unrecorded Endophytic Fungi Isolated from Coniferous Leaves and Orchid Roots in Korea

Hyeok Park, Bong-Hyung Lee, Yu-Ra Bae, Dong-Yeo Kim and Ahn-Heum Eom\*

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

**ABSTRACT :** We collected leaves of *Pinus koraiensis* and *Thuja koraiensis* and roots of *Bletilla striata* from various sites in Korea. The leaf and root samples were surface-sterilized and endophytic fungi were isolated. Fungal isolates were identified based on their morphological characteristics and a phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions, large subunit regions, and the  $\beta$ -tubulin gene. Consequently, we identified five species of endophytic fungi, namely *Colletotrichum simmondsii*, *Fusarium sterilihyphosum*, *Diatrypella pulvinata*, *Ochroconis globalis*, and *Sphaeria chrysoasperma*. These species have not been previously reported in Korea and we report them here with descriptions and illustrations.

**KEYWORDS :** *Colletotrichum simmondsii*, *Diatrypella pulvinata*, *Fusarium sterilihyphosum*, *Ochroconis globalis*, *Sphaeria chrysoasperma*

식물 공생균인 내생균(endophytic fungi)은 식물의 뿌리, 잎, 줄기 등의 조직 내에 살고 있으나 명백한 병을 일으키지 않는, 즉 기주 식물에 피해를 주지 않는 균류를 말한다[1]. 내생균은 잠재적으로 병원균이 될 가능성은 있으나 식물의 상태가 건강할 때에는 병원성을 극히 제한하고 식물을 보호하는 역할을 한다[2]. 이들은 기주 식물 내에서 존재하며 다른 식물체로 전달될 수 있다[3]. 내생균은 식물의 종자 발아에 도움을 주기도 하고[4], 기주 식물에 유해하게 작용할 수 있는 병원체에 대한 저항성을 제공하기도 한다[5]. 내생균은 육상의 초본 및 목본식물, 그리고 수생

식물에 이르기까지 다양한 식물체 내에서 공생하며 기주 식물에게 유익한 도움을 제공하므로[6], 내생균의 연구에는 다양한 기주 식물을 대상으로 한 연구가 필수적이라고 생각된다. 따라서 본 단보에서는 국내의 다양한 초본 및 목본식물의 잎과 뿌리에서 내생균을 분리하던 중 발견된 5종의 국내 미기록 균류에 대해 보고하고자 한다.

본 연구에서 분리된 균주는 잣나무(*Pinus koraiensis*), 눈쭈백(*Thuja koraiensis*) 등 2종의 침엽 및 난초과(Orchidaceae) 식물의 한 종인 자란(*Bletilla striata*)의 뿌리에서 분리되었으며, 대상 식물체를 채취하여 실험실에서 각각 다음과 같은 처리 과정을 거쳤다. 침엽의 경우 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 표면 살균하여 potato dextrose agar (PDA)에 치상한 뒤 25°C에서 7일간 배양하면서 치상된 침엽에서 균사가 뺀어 나오는 순서대로 계대 배양하여 순수한 균주를 확보하였다. 자란 뿌리의 경우 Richardson 등[7]의 방법을 이용하여 균을 분리하였다. 뿌리를 증류수로 세척한 후 70% EtOH와 3% NaClO 용액을 차례로 처리하고, 항생제인 streptomycin과 chloramphenicol 용액을 처리하여 표면을 살균하였다. 이후 멸균된 거름종이로 물기를 제거한 후 약 5 mm 길이로 잘라, 4개 조각을 water agar 배지에 치상하였고, 25°C 암소에서 배양한 후 균사가 뺀어나오면 PDA 배지로 계대하였다. 순수 분리된 균주는 형태학적 특징을 관찰하였으며, 이후

Kor. J. Mycol. 2016 December, 44(4): 365-370  
<https://doi.org/10.4489/KJM.2016.44.4.365>  
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249  
 © The Korean Society of Mycology

\*Corresponding author  
 E-mail: eomah@knu.ac.kr

Received November 26, 2016  
 Revised December 10, 2016  
 Accepted December 13, 2016

© 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.

슬라이드 배양법을 통해 균사와 분생포자를 관찰하기 위하여 샘플 처리 후 25°C에서 7일간 배양하였고, lactophenol aniline blue 용액으로 시료를 염색하여 광학현미경 (AXIO Imager A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다. 또한 분자생물학적 동정을 위하여 DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)을 사용하여 균주의 DNA를 추출하였으며, 이를 주형으로 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. Primer ITS1F와 ITS4를 이용하여 internal transcribed spacer (ITS) 영역[8]을, primer LR0R과 LR16을 이용하여 ribosomal DNA의 large subunit (LSU) 영역[9]을, 그리고 primer Bt2a과 Bt2b를 이용하여  $\beta$ -tublin 영역을 증폭하였다[10]. 또한 *Fusarium*속의 경우 ITS영역과  $\beta$ -tublin 영역과 translation elongation factor (EF1) primer를 이용하여[11] 추가적인 PCR을 수행하였다. PCR 조건 중 annealing 온도는 ITS 영역은 50°C, LSU 영역은 44°C,  $\beta$ -tublin 영역은 58°C, EF1 영역은 55°C로 설정하여 수행하였으며, PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 22분간 전기 영동을 수행하고 band가 선명하게 표시되는 sample을 선택하여 DNA 염기서열 분석을 의뢰하였다 (SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열은 NCBI 상에서 BLAST를 이용하여 유사도를 확인한 후 각 종들 간의 계통관계 분석을 위해 MEGA6 program을 이용하여 계통수를 완성하였다[12]. 연구 결과, 총 5종의 미기록 내생균 균주가 분리되었다(Table 1).

***Colletotrichum simmondsii* R. G. Shivas & Y. P. Tan, Fungal Diversity 39: 119 (2010)**

충북 음성군의 수정산 잣나무 (*Pinus koraiensis*)의 침엽에서 분리하였다. Malt extract agar (MEA) 배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 41~42 mm 정도이고, PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 39~41 mm 정도이다. 불규칙하게 집락을 형성한 균사체가 배지 전체에 펼쳐져 있으며, 균사의 성장속도가 빠르다. 집락의 색은 우윳빛이며 뒷면은 조금 더 진한 크림색 혹은 연어살 색을 띠고 있다. 고도는 배지에 납작하게 밀착되어 있고, 가장자리의 형태는 전체적으로 원형을 띠고 있다(Fig. 1A~1D). *Colletotrichum*

속의 균주들은 풍부한 분생자과(conidiomata)에서 반원통형의 분생자(conidium)를 형성하는데 [13], 본 연구에서도 *C. simmondsii*의 분생자가 관찰되었다. 분생자는 반원통형 혹은 장타원형으로, 크기는 3.0~3.7 × 0.7~1.3  $\mu$ m 정도이다(Fig. 1U). 본 균주의 ITS 1, 2 지역과  $\beta$ -tublin 지역의 염기서열을 분석하고 NCBI에서 BLAST하여 분리한 균주와의 상동성을 확인한 결과 ITS 지역은 *C. simmondsii* JN12125와 99%의 유사도를 확인하였으며,  $\beta$ -tublin 지역의 분석 결과 *C. simmondsii* GU183305와 97%의 유사도를 확인하였다. *Colletotrichum*속의 균류는 초본과 목본식물을 가리지 않고 식물의 잎에서 흔히 발견되는 내생균이며[14], 난초과 식물의 잎에서 발견되기도 한다[15]. *Colletotrichum*속의 속하는 종들은 식물의 잎에 탄저병을 일으키는 병원체가 되기도 하는 것으로 보고되고 있다[16].

***Ochroconis globalis* Samerpitak, Duarte, Attili-Angelis & de Hoog, Mycological Progress 14 (2/6): 3 (2015)**

전남 진도에서 채집한 자란 (*Bletilla striata*)의 뿌리에서 분리하였으며, MEA 배지에서 7일간 배양한 균총은 직경이 15~17 mm이고, PDA 배지에서 7일간 배양한 균총은 직경이 17~18 mm이다. 균총의 색은 중심부에서 카키색을 띠고 가장자리는 올리브색을 띠었으며, 집락의 고도는 중심부에서 볼록 융기된 형태이며 가장자리의 형태는 둥근 형태이다(Fig. 1E~1H). 염기서열 분석은 ITS 1, 2 지역에서 *O. globalis* KF961085와 99%의 유사도를 확인하였고, LSU 지역에서 *O. globalis* KF961096과 99%의 유사도를 확인하였다. 본 균주가 속하는 *Ochroconis*속 균주들의 경우 주로 수서 변온 동물에 기회 감염(opportunistic infection)의 항원으로 작용하는 것으로 알려져 있으며[17], 식물에서는 생강과(Zingiberaceae) 식물에 내생균으로써 공생한다는 보고가 존재한다[18].

***Fusarium sterilihyphosum* Britz, Marasas & M. J. Wingf., Mycologia 94(4): 726 (2002)**

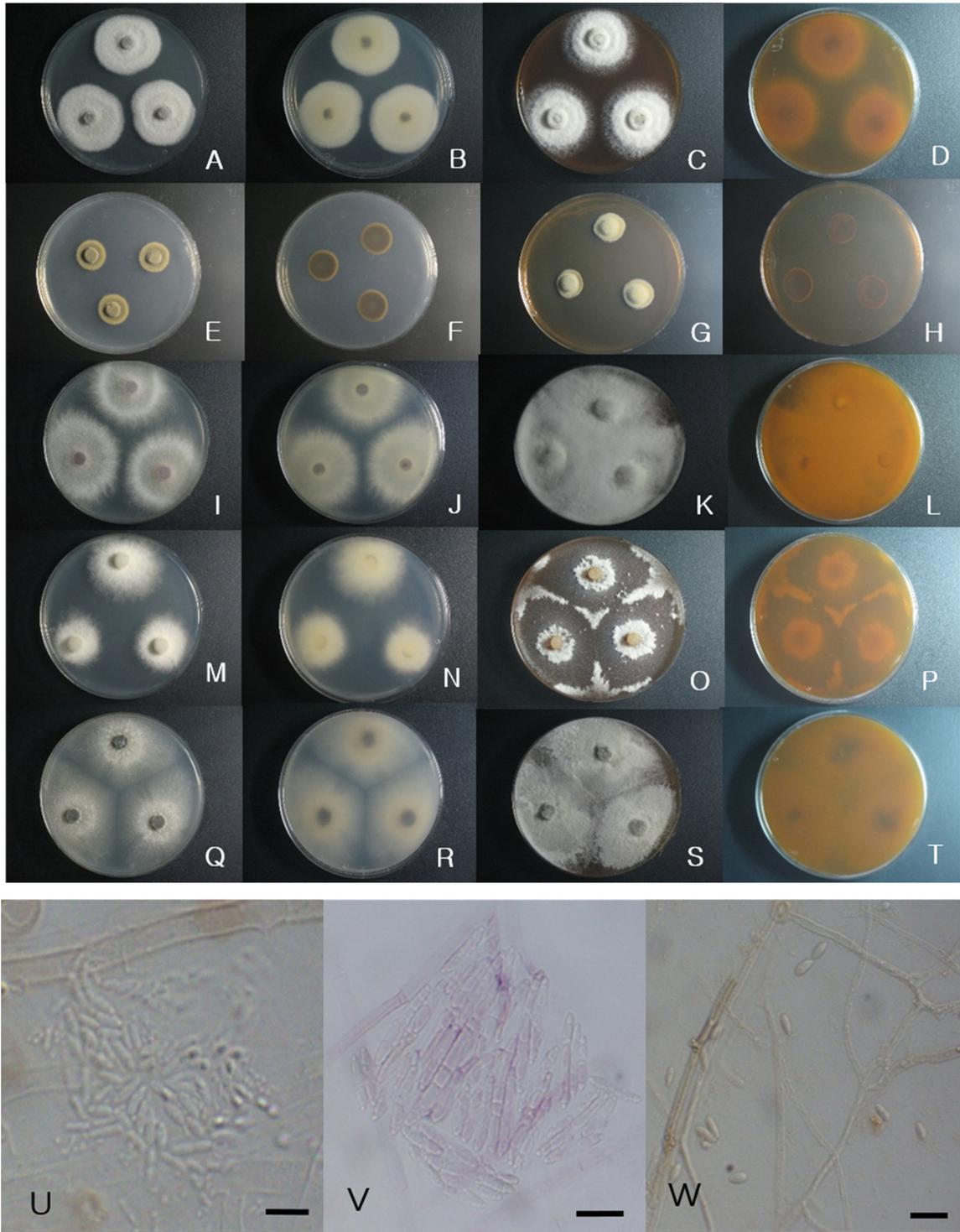
전남 진도에서 채집한 자란 뿌리에서 분리하였으며, MEA 배지에서 7일간 배양한 균총은 직경 45~47 mm이고, PDA

**Table 1.** Endophytic fungi isolated from leaves and roots of host plants collected in this study

| Host Plants             | Fungal Isolates | NIBR specimen no. <sup>a</sup> | Fungal Species                   | NCBI accession no. |          |                 |
|-------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------|----------|-----------------|
|                         |                 |                                |                                  | ITS                | LSU      | $\beta$ -tublin |
| <i>Pinus koraiensis</i> | 15B028          | NIBRGR0000194863               | <i>Colletotrichum simmondsii</i> | JN121205           | -        | GU183305        |
| <i>Bletilla striata</i> | 15P053          | NIBRGR0000141037               | <i>Ochroconis globalis</i>       | KF961085           | KF961096 | -               |
|                         | 15P063          | NIBRGR0000194915               | <i>Fusarium sterilihyphosum</i>  | KF576628           | -        | DQ445785        |
| <i>Thuja koraiensis</i> | 13E073          | NIBRGR0000194911               | <i>Diatrypella pulvinata</i>     | FR715523           | FR715523 | -               |
|                         | 13E156          | NIBRGR0000194912               | <i>Sphaeria chrysosperma</i>     | KJ739458           | KF765689 | -               |

ITS, internal transcribed spacer; LSU, large subunit.

<sup>a</sup>Specimen were deposited with the numbers from National Institute of Biological Resources (NIBR).



**Fig. 1.** Colonies of strain 15B028 (*Colletotrichum simmondsii*) grown on PDA (A, B) and MEA (C, D), conidia (U); Colonies of strain 15P053 (*Ochroconis globalis*) grown on PDA (E, F) and MEA (G, H); Colonies of strain 15P063 (*Fusarium sterilihyphosum*) grown on PDA (I, J) and MEA (K, L), conidia (V); Colonies of strain 13E073 (*Diatrypella pulvinata*) grown on PDA (M, N) and MEA (O, P); Colonies of strain 13E156 (*Sphaeria chrysosperma*) grown on PDA (Q, R) and MEA (S, T), conidia (W). PDA, potato dextrose agar; MEA, malt extract agar (scale bars: U = 5  $\mu$ m, V, W = 10  $\mu$ m).

배지에서 7일간 배양한 균총은 직경 40~43 mm이다. PDA에서 자란 균총은 중심부가 시간이 지남에 따라 짙은 자주

빛을 띠었으며, 변연부는 흰색의 균사체가 공중으로 뻗어 자란다(Fig. 1I~1L). *Fusarium*속 균주는 분생자루로부터 대

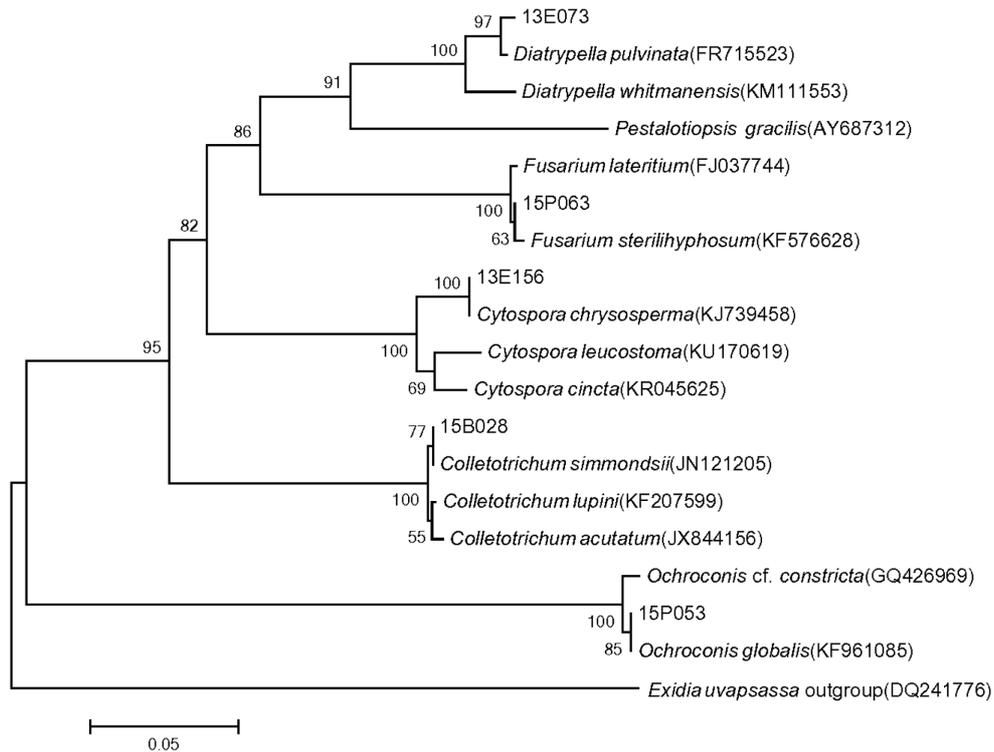


Fig. 2. Neighbor-joining tree of endophytic fungal strains isolated from plant leaves and roots. 18S partial rDNA were used to analyzed in this study. *Exidia uvapsassa* was used as an outgroup.

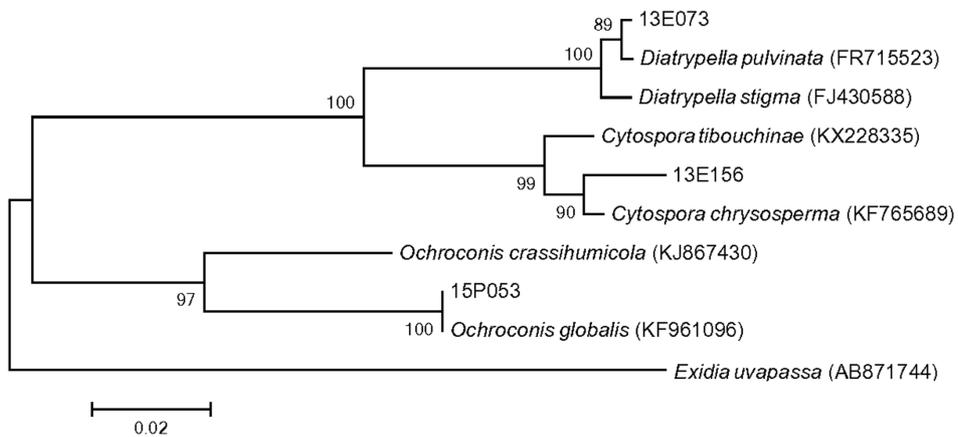


Fig. 3. Neighbor-joining tree of endophytic fungal strains isolated from plant leaves and roots. Large subunit (28S partial rDNA) region was used to analyzed in this study. *Exidia uvapsassa* was used as an outgroup.

분생자(macroconidium)와 소분생자(microconidium)를 형성하는데 [19], 본 연구에서는 소분생자가 관찰되었다(Fig. 1V). 소분생자는 무격막으로, 모양은 도란형 또는 타원형이며, 크기는 9.0~9.5 × 12.5~13.5 μm 정도이다. ITS 1, 2 지역의 염기서열을 분석한 결과 *F. Sterilihyphosum* KF576628 과 99% 유사도를 보였으며, β-tublin 서열 분석 결과 *F. Sterilihyphosum* DQ445785와 97% 유사도를 확인하였다.

또한 EF1 서열 분석 결과 *F. sterilihyphosum* KF422729와 98%의 유사도를 확인할 수 있었다(Fig. 5). *Fusarium*속 균주는 제비난속(*Platanthera*)인 *P. Praeclara* [20]과 자란(*Ble-tilla*)속의 *B. ochracea* 등에서 분리되었다는 보고가 있으며 [21], *Fusarium* 속의 대부분의 균류는 난초과의 착생란에서 내생균으로 공생한다고 보고된 바 있다[22]. 다만, 콩과 식물에 속하는 농경 작물들에서는 뿌리 썩음병이 일어난 부

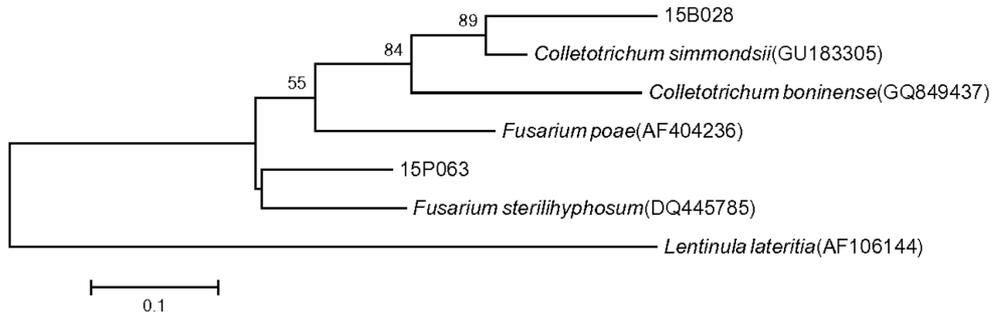


Fig. 4. Neighbor-joining tree of endophytic fungal strains isolated from plant leaves and roots.  $\beta$ -tublin region was used to analyzed in this study. *Lentinula lateritia* was used as an outgroup.

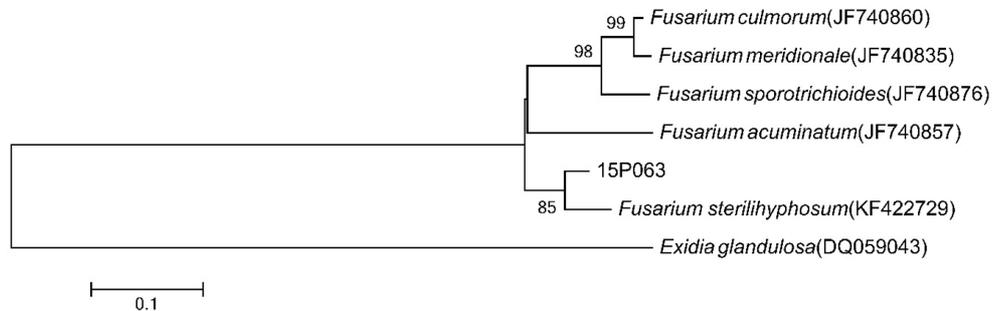


Fig. 5. Neighbor-joining tree of *Fusarium sterilihyphosum*. Elongation factor (EF-1) region was used to analyzed in this study. *Exidia glandulosa* was used as an outgroup.

위에서 본 균주가 분리되었다는 기록들이 존재한다[23].

***Diatrypella pulvinata* Nitschke, Pyrenomycetes Germanici 1: 72 (1867)**

경기도 가평 화악산에 자생하는 눈썹백(*Thuja koraiensis*)의 침엽에서 분리한 균주이다. MEA 배지에서 7일간 배양된 균총은 직경 54~60 mm 정도이고 PDA에서 7일간 배양된 균총은 직경 32~45 mm 정도이다. 배양된 균 집락은 우윳빛을 띠며 뒷면은 크림색을 띠고 있다. 집락의 고도는 불룩하게 융기된 convex형이다(Fig. 1M~1P). 염기서열 분석은 ITS 1, 2 지역에서 *D. pulvinata* FR715523와 99%의 유사도를 확인하였으며, LSU 지역에서 *D. pulvinata* FR715523과 99%의 유사도를 확인하였다. *Diatrypella*속에 속하는 종의 균류들은 가지과(Solanaceae) [24], 참나무과(Fagaceae) [25] 등의 식물에서 내생균으로 공생하는 것으로 알려져 있다.

***Sphaeria chrysosperma* Pers., Neues Magazin für die Botanik 1: 82 (1794)**

강원도 속초시 설악산에 자생하는 눈썹백의 침엽에서 분리한 균주이다. MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 60~68 mm 정도이고 PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 55~68 mm 정도이다. 배양된 균 집락의 윗면은

열은 갈색을 띠고 뒷면은 진한 갈색이다. 집락의 고도는 불룩하게 융기된 형태이며 가장자리는 물결모양이다(Fig. 1Q~1T). 무격막(aseptate)의 유리질로 된 소시지 모양의 분생자를 형성하며, 분생자의 크기는 4.1~4.7 × 1.6~2.3  $\mu$ m 정도이다(Fig. 1W). 염기서열은 ITS 1, 2 지역 분석 결과 KJ739458과 99%의 유사도를 확인하였고, LSU 지역의 분석 결과 KF765689와 98%의 유사도를 확인하였다. *Sphaeria*속의 균류는 벼과(Gramineae) 식물에 내생균으로써 공생한다는 보고가 있으며 [26], 우루과이에서는 유칼립투스(*Eucalyptus globulus*)에서 본 종의 균류가 내생균으로써 분리되었다는 기록이 존재한다[27].

내생균의 식물에 대한 전파에서 수평적인 전달보다 수직적인 전달이 우세하다는 연구 결과로 미루어 볼 때 [28], 내생균은 특정 기주 식물에 대한 선호성을 갖고 있는 것으로 보여진다. 따라서 이후의 국내의 내생균 연구에서는 다양한 기주 식물에서 내생균을 분리하여 다양성을 확인하고 순수 분리된 내생균의 균주를 확보하는 것이 중요하다고 생각된다.

**적 요**

본 연구에서는 잣나무, 눈썹백의 침엽과 자란의 뿌리에서

식물에 공생하는 내생균을 분리하여 동정하였다. 이를 위해 specific primer인 ITS1F와 ITS4를 이용하여 internal transcribed spacer (ITS) rDNA 영역과 primer LR0R과 LR16을 이용하여 large subunit rDNA 영역을, primer Bt2a과 Bt2b를 이용하여  $\beta$ -tubulin 영역을, 그리고 EF-1 primer를 이용하여 translation elongation factor 지역의 염기서열을 동시에 분석하였다. 연구 결과 *Colletotrichum simmondsii*, *Fusarium sterilihyphosum*, *Diatrypella pulvinata*, *Ochroconis globalis*, *Sphaeria chryso sperma* 등 국내 미기록 균주 5종을 분리하여 형태적, 분자생물학적 동정 결과를 서술하였다.

### Acknowledgements

This work was supported by the Project on Survey and Discovery of Indigenous Species of Korea funded by NIBR of the Ministry of Environment (MOE), Republic of Korea.

### REFERENCES

- Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS, editors. Microbial ecology of leaves. New York: Springer; 1991. p. 179-97.
- Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 1988;69:2-9.
- Saikkonen K, Wälä P, Helander M, Faeth SH. Evolution of endophyte-plant symbioses. Trends Plant Sci 2004;9:275-80.
- Clay K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. Oecologia 1987;73:358-62.
- Eo JK, Kim CK, Eom AH. Fungal endophytes isolated from needle leaves of three coniferous species on Mt. Seodae of Korea. Kor J Mycol 2015;43:133-6.
- Kai W, Zhiwei Z. Occurrence of arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in hydrophytes from lakes and streams in southwest China. Int Rev Hydrobiol 2006;91:29-37.
- Richardson KA, Currah R, Hambleton S. Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic Orchidaceae. Lindleyana 1993;8:127-37.
- 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.
- Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bacteriol 1990;172:4238-46.
- Koenraadt H, Somerville SC, Jones AL. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. Phytopathology 1992;82:1348-54.
- Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WF, Wingfield MJ. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. Mycologia 2002;94:722-30.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013;30:2725-9.
- Shivas RG, Tan YP. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. Fungal Divers 2009;39:111-22.
- Lima JS, Figueiredo JG, Gomes RG, Stringari D, Goulin EH, Adamoski D, Kava-Cordeiro V, Galli-Terasawa LV, Glienke C. Genetic diversity of *Colletotrichum* spp. an endophytic fungi in a medicinal plant, Brazilian pepper tree. ISRN Microbiol 2012;2012:215716.
- Tao G, Liu ZY, Liu F, Gao YH, Cai L. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. Fungal Divers 2013;61:139-64.
- Yang YL, Liu ZY, Cai L, Hyde KD, Yu ZN, McKenzie EH. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. Fungal Divers 2009;39:123-46.
- Samerpitak K, Gerrits van den Ende AH, Menken SB, de Hoog GS. Three new species of the genus *Ochroconis*. Mycopathologia 2015;180:7-17.
- Putra IP, Rahayu G, Hidayat I. Impact of domestication on the endophytic fungal diversity associated with wild Zingiberaceae at Mount Halimun Salak National Park. Hayati 2015;22:157-62.
- Steinkellner S, Mamerler R, Vierheilig H. Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. J Plant Interact 2005;1:23-30.
- Zelmer CD. Interactions between northern terrestrial orchids and fungi in nature [dissertation]. Edmonton (Canada): University of Alberta;1994.
- Tao G, Liu ZY, Hyde KD, Lui XZ, Yu ZN. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). Fungal Divers 2008;33:101-22.
- Chen J, Hu KX, Hou XQ, Guo SX. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae). World J Microbiol Biotechnol 2011;27:1009-16.
- Nash SM, Snyder WC. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 1962;52:567-72.
- Vieira ML, Hughes AF, Gil VB, Vaz AB, Alves TM, Zani CL, Rosa CA, Rosa LH. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). Can J Microbiol 2012;58:54-66.
- Kaneko R, Kaneko S. The effect of bagging branches on levels of endophytic fungal infection in Japanese beech leaves. For Pathol 2004;34:65-78.
- White JF Jr. Endophyte-host associations in grasses. XIX. A systematic study of some sympatric species of *Epichloë* in England. Mycologia 1993;85:444-55.
- Bettucci L, Alonso R, Tiscornia S. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. Mycol Res 1999;103:468-72.
- Eo JK, Lee BH, Eom AH. Diversity of endophytes isolated from *Thuja koraiensis* Nakai in the Korean Peninsula. Kor J Mycol 2016;44:113-7.