

RESEARCH ARTICLE

토천궁의 뿌리에서 분리된 2종의 국내 미기록 내생균: *Pithomyces chartarum* and *Plectosphaerella niemeijerum*

박혁¹, 정충렬², 엄안흠^{1,*}¹한국교원대학교 생물교육과, ²국립산림과학원 산림약용자원연구소

Two Unrecorded Endophytic Fungi Isolated from Root of *Ligusticum chuanxiong* in Korea: *Pithomyces chartarum* and *Plectosphaerella niemeijerum*

Hyeok Park¹, Chung Ryul Jung², Ahn-Heum Eom^{1,*}¹Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea²Forest Medicinal Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Yeongju 36040, Korea

*Corresponding author: eomah@knue.ac.kr

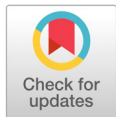
ABSTRACT

Endophytic fungal strains were isolated from the sterilized roots of a medicinal plant, *Ligusticum chuanxiong* and identified based on morphological characteristics and molecular analysis of internal transcribed spacer, large subunit rDNA, and beta-tubulin DNA regions. Our results confirmed the presence of *Pithomyces chartarum* and *Plectosphaerella niemeijerum* in the fungal strains. To the best of our knowledge, the fungal strains have not been reported in Korea. In this report, we describe morphological characteristics and phylogenetic trees of these endophytic fungal strains.

Keywords: Endophytic fungi, *Ligusticum chuanxiong*, *Pithomyces chartarum*, *Plectosphaerella niemeijerum*

서론

토천궁(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)은 산형과(Umbelliferae)에 속하며, 뿌리를 약재로 이용하는 중국 원산의 약용식물로, 민간요법에서 한약재로 오랫동안 이용되어 왔고 현대에도 건강식품의 원료로 많이 이용된다[1]. 토천궁이 갖고 있는 화학성분에는 식물정유(essential oil), 알칼로이드, 페놀산 등이 있는데, 이러한 성분들은 인간 암 세포에 대한 세포독성 효과, 항산화 효과 및 지질개선 효과를 보인다고 알려져 있다[1-3].



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2019 December, 47(4): 329-34
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190038>

Received: December 16, 2019

Revised: December 17, 2019

Accepted: December 18, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

내생균(endophytic fungi)은 식물과 공생하는 균류로[4], 식물체 내에 침투하여 살아가지만 균근과 같은 특이한 구조를 형성하지 않으며[5], 외부적으로 병증을 나타내지 않는 특성을 보인다[6, 7]. 내생균은 식물의 뿌리, 잎 등 모든 조직 내에 서식하며, 내생균이 분비하는 2차 대사산물은 독소로 작용함으로써 병충해에 대한 내성 혹은 포식자에 대한 화학적 방어기작을 기주식물에게 제공할 수 있다[8,9]. 이러한 2차 대사산물 중에는 항균, 항암 작용[10,11]을 보일 수 있는 물질들이 존재하기 때문에, 내생균과 그 대사산물에 대한 연구가 점점 중요해지고 있다. 본 연구에서는 토천궁 뿌리에서 분리된 내생균 중 국내 미기록종으로 확인된 2종의 내생균에 대해 형태적 특성 및 분자생물학적 계통분석의 결과를 기술하고자 한다.

재료 및 방법

연구에 사용한 토천궁의 뿌리는 2017년 9월, 경북 영주에 위치한 산림약용자원연구소(경북 영주시 풍기읍 소백로 2009)의 시험림 (N36°52'40.5", E128°32'11.5")내에서 채취하였고, 채집된 시료는 폴리에틸렌 백에 담아 24시간 이내에 실험실로 운반하였다. 뿌리는 증류수로 씻어 흙을 완전히 제거한 후에 3% NaClO 용액으로 3분, 70% EtOH로 1분간 차례로 표면살균하고, 100 µg/mL 농도의 streptomycin 에서 10분간 처리하였다[12]. 표면살균된 뿌리는 filter paper를 이용하여 물기를 완전히 제거한 뒤 0.5 cm 길이로 잘라 water agar (WA) 배지의 네 귀퉁이에 치상하였다. 25°C의 암소 (dark side)에서 배양하면서 매일 관찰하여 군사가 뻗어 나오는 것이 확인되면 메스를 이용하여 potato dextrose agar (PDA)배지로 계대 배양하였으며, 순수 분리된 균주는 PDA배지와 더불어 malt extract agar (MEA)배지에서 7일간 배양하여 해부현미경 및 광학현미경 상에서 형태적 특성을 관찰하였다. 균주의 분자생물학적 동정을 위해 DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)의 protocol에 따라 군사에서 genomic DNA를 추출한 뒤 PCR을 수행하였다. Ribosomal DNA의 5.8S 지역을 포함하는 internal transcribed spacer (ITS) 영역을 ITS1F와 ITS4 프라이머[13]를 이용하여 증폭하였으며, large subunit (LSU) 영역의 DNA를 LR0R과 LR16 프라이머[14]를 이용하여 증폭하였고, beta-tubulin (TUB) 영역을 Bt2a와 Bt2b 프라이머[15]를 이용하여 증폭하였다. ITS영역은 50°C,

Table 1. Morphological characteristics of fungal strains isolated in this study, compared to original description references.

Strain	<i>P. chartarum</i> 17E033	<i>P. chartarum</i> [17,18]	<i>P. niemeijerum</i> 17E028	<i>P. niemeijerum</i> [21]
Colony	PDA, 25° C, 7 days	PDA, 24° C, 8 days	PDA, 25° C, 7 days	PDA, culture condition unrecorded
Color	Light brown in center, margin yellowish-green; reverse reddish-brown to blackish brown in center, further away from the center, the closer to yellowish-brown, margin greenish-white	Zonate, pigmented, dark brown in center, white in margin	Brightly white	white
Size	32-33 mm in diameter	Quick growing, covering the surface of a petri dish in 8 days	38-41 mm in diam.	Unrecorded
Shape	Flat, margin irregular undulate	Flat, sometimes fluccose	Raised, white and fluffy aerial mycelium	Mycelium appressed, slimy, with sparse, white and fluffy aerial mycelium.
Conidia	3-6 septate, muriform, pigmented, translucent, yellowish-brown to blackish-brown, (16.03-)21.27(-29.91) × (7.38-)8.34(-9.16) µm in diam(n=20).	3-5 septate, pigmented, muriform, vary in size from 16-35 × 13-20 µm; 16-27 × 8-14.50 µm in summer, 22.5-32 × 14.5-17.5 in autumn, 25.5-45 × 14.5-17.5 µm in winter.	Fusiform to ellipsoid, hyaline and thin wall, 0-1 septate, (3.97-)5.55(-6.61) × (2.12-)2.77(-3.67) µm in diam.	Fusiform to ellipsoid, tapering to rounded apex and base, hyaline, smooth, 0-1-septate, (3-)4-6 × 2-3 µm in diam.

LSU 영역은 44°C, TUB 영역은 55°C의 annealing 온도를 각각 설정하였다. PCR이 끝난 DNA는 1.5% agarose gel에 20분간 loading하여 각각 DNA 단편의 크기를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon, Korea). DNA 염기서열은 미국 국립생물정보센터(NCBI) 상에서 BLAST하여 유사도를 확인하고, MEGA7 프로그램을 이용하여[16] 두 영역 혹은 세 영역의 염기서열을 이어 neighbor-joining 방식으로 계통수를 작성하였다. 분자생물학적 분석 및 원기재문에 기록된 균주와의 형태 비교를 통해(Table 1) 최종적으로 확인된 미기록종 균주는 국립생물자원관(NIBR)에 기탁하였으며, BLAST 및 계통도 작성에 이용된 염기서열은 NCBI에 등록하였다.

결과 및 고찰

Pithomyces chartarum (Berk. & M.A. Curtis) M.B. Ellis, Mycological Papers 76: 13 (1960)

PDA배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 32-33 mm 정도이고, 균총의 앞면은 중앙부에서는 연한 갈색이고 가장자리는 황록색을 띠며, 중앙부와 가장자리 사이에는 간간히 흰 빛이 도는 것이 확인된다(Fig. 1A). 뒷면은, 중앙부는 적갈색 혹은 흑갈색을 띠며 중앙부에서 멀어질수록 황갈색을 띠다가 가장자리에서는 녹색빛이 감도는 흰색을 띤다(Fig. 1E). 균총의 고도는 배지에 납작하게 붙어있는 형태이며 균총의 가장자리는 불규칙한 물질 형태이다. MEA배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 29-32 mm 정도이고, 균총의 색은 앞·뒷면 모두 중앙부에서는 황록색을 띠며 가장자리는 밝은 흰색을 띤다(Fig. 1B, 1F). 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기된 형태이고 가장자리는 공중균사가 조밀하게 뻗어 나가 방사형을 이룬다. 균사의 측면에서 갈색으로 부풀어오른 분생자경(conidiophore)이 형성되며, 하나의 분생자경은 하나의 분생자(conidium)로 발생해 간다. 분생자는 반투명한 황갈색 혹은 흑갈색이고 형태는 둔한 원통형 혹은 도란형(ovovate)이며, 횡으로 된 격막(septate)과 종으로 된 격막이 무작위로 분포하는 망상포자(dictyospore)의 형태를 띤다(Fig. 1H, 1I). 분생자의 크기는 $(16.03\text{--}21.27\text{--}29.91) \times (7.38\text{--}8.34\text{--}9.16) \mu\text{m}$ ($n=20$) 정도로 크기가 매우 다양하게 분포하였다.

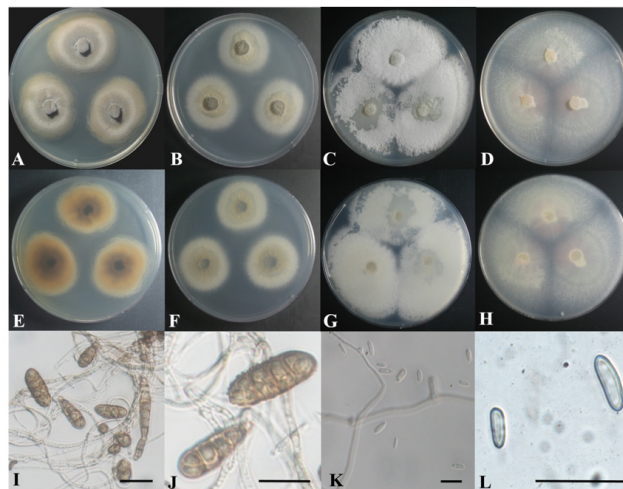


Fig. 1. Colonies of strain 17E033 (*Pithomyces chartarum*) grown for 7 days on potato dextrose agar (PDA) (A, E) and malt extract agar (MEA) (B, F) and conidia (I, J). Colonies of strain 17E028 (*Plectosphaerella niemeijerum*) grown for 7 days on PDA (C, G) and MEA (D, H) and conidia (K, L). (scale bars: I, J=20 μm , K, L=10 μm).

Specimen examined: Youngju-si, Gyeongsangbuk-do, Korea, N36°52'40.5", E128°32'11.5", September 20, 2017, *Pithomyces chartarum*, isolated from root of *Ligusticum chuanxiong*, strain 17F033, NIBRFG0000503357, GenBank No. MN814832 (ITS), MN814833 (LSU).

Notes: *P. chartarum* 은 1960년 Ellis에 의해 *Pithomyces* 속으로 옮겨졌으며, 이전 종명은 *Sporidesmium chartarum*이었다[17]. 이 종은 분지되지 않는 하나의 분생자경에서 형성되는 muriform (횡방향과 종방향의 격막이 모두 존재하여 벽돌이 쌓인 듯한 구조) 형태의 분생자를 갖고 계절에 따라 분생자의 크기가 달라지는 특성이 있는데 여름에서 겨울로 갈수록 분생자의 크기가 커지며[18], 본 연구에서 확인된 균주 역시 원 기재문과 같이 격막에 의해 분리된 분생자를 형성하는 것을 확인할 수 있었고 분생자의 크기는 원 기재문에서 가을에 확인된 분생자의 크기와 비슷했다(Table 1). 인도에서 약용식물인 앵무새나무(*Butea monosperma*)의 가지와 잎, 꽃 등에서 내생균으로 분리되었고[19], 이렇게 분리된 *P. chartarum* 균주가 항진균효과를 보이며 아밀레이스, 셀룰레이스, 펙틴 등의 효소를 생산한다는 결과 또한 함께 보고되었다[20]. ITS 영역과 LSU 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS 영역은 *P. chartarum* MK370420.1과 99.5%의 일치도를, LSU 영역은 *P. chartarum* MK347969.1과 100%의 일치도를 보였고 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 2).

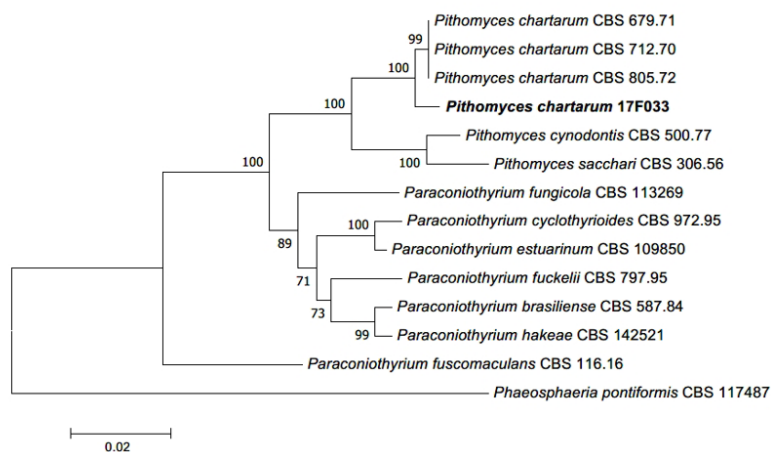


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) sequences. *Phaeosphaeria pontiformis* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in bold.

Plectosphaerella niemeijerorum L. Lombard, Persoonia 39: 459 (2017)

PDA배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 38-41 mm 정도이고, 균총의 앞-뒷면 모두 전체적으로 밝은 흰색을 띠며, 앞면은 전체적으로 공중 균사가 수북하게 덮여 있다. 중앙부에서 나오는 삼출 물에 의해 이 공중 균사가 습기를 머금어서 중앙부에는 마치 공중 균사가 일부 사라진 듯이 보이 기도 한다(Fig. 1C, 1G). 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기된 형태이며 균총의 가장자리는 공중 균사가 뻗어 나감에 의해 조밀한 방사형을 이룬다. MEA배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 39-40 mm 정도이고, 균총의 색은 앞-뒷면 모두 전체적으로 흰색이나 중앙부에는 옅은 자주색 혹은 분홍색을 띤 얇은 균사들이 분포하며, 가장자리 쪽으로 흰색의 털실 같은 공중 균사가 뻗어 나

간다(Fig. 1D, 1H). 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기된 형태이고 가장자리는 공중 균사가 뻗어나가 방사형을 이루는데, PDA에서보다는 덜 조밀하게 자란다. 분생자경은 균사의 측면에서 형성되며, 매끈하고 얇은 벽으로 이루어진 짧은 방추형 혹은 원통형의 무색 투명한 분생자를 형성한다(Fig. 1J, 1K). 분생자의 크기는 $(3.97\text{--}5.55\text{--}6.61) \times (2.12\text{--}2.77\text{--}3.67) \mu\text{m}$ ($n=50$) 정도이다.

Specimen examined: Youngju-si, Gyeongsangbuk-do, Korea, N36°52'40.5", E128°32'11.5", September 20, 2017, *Plectosphaerella niemeijerum*, isolated from root of *Ligusticum chuanxiong*, strain 17F028, NIBRFG0000503367, GenBank No. MN818607 (ITS), MN818610 (LSU), MN836372 (TUB).

Notes: *P. niemeijerum* 은 2017년 Lombard에 의해 토양에서 분리된 자낭균으로 최초 기록되었다. 배지에 배양 시 솜털 같은 느낌의 공중 균사로 덮이는 것이 특징이며[21], 본 연구에서도 이와 같은 배양체를 확인하였다. 분생자는 무색 투명한 방추형 혹은 원통형이고, 격막이 없거나 하나만 있는 것으로 확인되는 것[21] 역시 본 연구에서 확인된 분생자의 형태와 일치하였다(Table 1). ITS 영역과 LSU 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS 영역은 *P. niemeijerum* MG386080.1과 99.11%의 일치도를, LSU 영역은 *P. niemeijerum* NG_0662029.1과 99.41%의 일치도를, TUB 영역은 *P. niemeijerum* MG386172.1과 99.06%의 일치도를 보였으며 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 3).

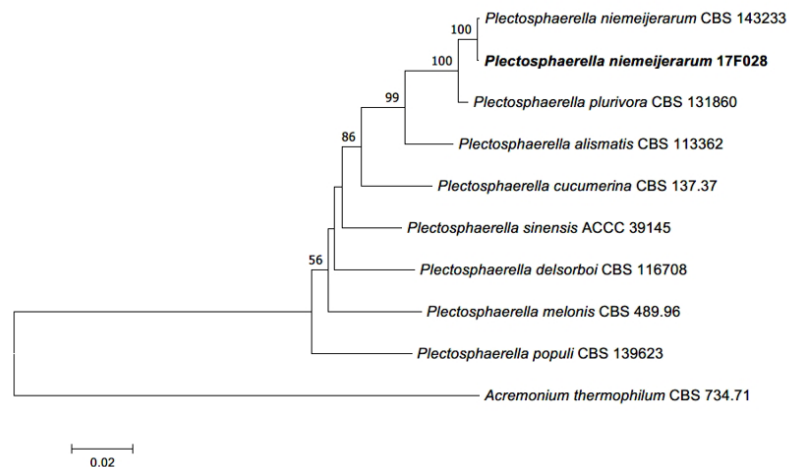


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS), large subunit (LSU) and beta-tubulin (TUB) sequences. *Acremonium thermophilum* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in bold.

적요

경북 영주의 산림약용자원연구소에서 재배된 토착균의 뿌리에서 내생균을 분리하였다. 분리된 균주는 형태적 특성의 분석과 internal transcribed spacer, large subunit rDNA, beta-tubulin 영역의 분자 생물학적 계통분석을 이용해 동정하였다. 연구 과정에서 2종의 국내 미기록종 내생균 균주를 확인하였고, 확인된 종은 *Pithomyces chartarum* 과 *Plectosphaerella niemeijerum*이다. 미기록종 내생균 균주의 형태적 특성 확인 및 분자계통 분석의 결과에 대해 기술하였다.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR2-1902202).

REFERENCES

1. Ran X, Ma L, Peng C, Zhang H, Qin LP. *Ligusticum chuanxiong* hort: a review of chemistry and pharmacology. Pharm 2011;49:1180-9.
2. Heo YY, Ha BJ. Effect of *Ligusticum chuanxiong* Hort extracts on the bioactivity in high-fat diet-fed obese rats. J Food Hyg Saf 2011;26:370-6.
3. Sim Y, Shin SW. Study on cytotoxic activities of the essential oil compounds from *Ligusticum chuanxiong* against some human cancer strains. YakhakHoeji 2011;55:398-403.
4. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 1988;69:2-9.
5. Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annu Rev Ecol Evol Syst 1998;29:319-43.
6. Bills GF. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution. St Paul, Minnesota: APS Press; 1996. p. 31-65.
7. Sinclair JB, Cerkaskas RF. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution. St Paul, Minnesota: APS Press; 1996. p. 3-29.
8. Peters S, Dammeyer B, Schulz B. Endophyte-host interactions. I. Plant defense reactions to endophytic and pathogenic fungi. Symbiosis 1998;25:193-211.
9. Breen JP. Acremonium endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. Annu Rev Entomol 1994;39:401-23.
10. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. Fungal Divers 2010;41:1-16.
11. Peláez F, Collado J, Arenal F, Basilio A, Cabello A, Matas MD, Garcia J, Del Val AG, González V, Gorrochategui J. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. Mycol Res 1998;102:755-61.
12. Park H, Jung CR, Eom AH. Three novel endophytic fungal species isolated from roots of medicinal crops in Korea. Kor J Mycol 2019;47:113-20.
13. 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.
14. Moncalvo JM, Lutzoni FM, Rehner SA, Johnson J, Vilgalys R. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Syst Biol 2000;49:278-305.
15. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol 1995;61:1323-30.
16. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 2016;33:1870-4.
17. Ellis MB. Dematiaceous hyphomycetes: 1. Mycol Papers 1960;76:1-36.

18. Dingley JM. *Pithomyces chartarum*, its occurrence morphology, and taxonomy. New Zeal J Agr Res 1962;5:49-61.
19. Tuppad DS, Shishupala S. Endophytic mycobiota of medicinal plant *Butea monosperma*. Int J Curr Microbiol Appl Sci 2013;2:615-27.
20. Tuppad DS, Shishupala S. Evaluation of endophytic fungi from *Butea monosperma* for antimicrobial and enzyme activity. J Med Plants Stud 2014;2:38-45.
21. Crous PW, Wingfield MJ, Burgess T, Carnegie A, Hardy GSJ, Smith D, Summerell BA, Cano-Lira JF, Guarro J, Houbraken J. Fungal planet description sheets: 625–715. Persoonia 2017;39:270.