

침엽수의 잎에서 분리한 5종의 국내 미기록 내생균

이봉형¹ · 어주경^{1,2} · 엄안흠^{1*}

¹한국고원대학교 생물교육과, ²국립생태원 기초생태연구실

Notes on Five Endophytic Fungal Species Isolated from Needle Leaves of Conifers in Korea

Bong-Hyung Lee¹, Ju-Kyeong Eo^{1,2} 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 : Diverse endophytic fungi were isolated from surface-sterilized leaves of three species of conifers inhabiting various sites in Korea: *Abies nephrolepis*, *Pinus koraiensis* and *Taxus cuspidate*. The isolates were identified based on morphological characteristics and sequences analysis of both internal transcribed spacer and large subunit regions of rDNA. In this paper, we report on five previously unreported species of endophytic fungi isolated from conifers: *Biscogniauxia maritime*, *Nemania diffusa*, *Pezicula carpinea*, *Phomopsis juglandina* and *Sydowia polyspora*.

KEYWORDS : *Biscogniauxia maritime*, *Nemania diffusa*, *Pezicula carpinea*, *Phomopsis juglandina*, *Sydowia polyspora*

침엽수를 비롯한 대부분의 육상식물의 건강한 조직에는 내생균(endophytic fungi)이 서식하고 있으며, 균 다양성 또한 매우 높은 것으로 알려져 있다[1]. 일반적으로 내생균은 식물의 조직 내에서 병증을 나타내지 않고 서식하는 균류를 말하며[2], 이차대사산물을 분비하여 병원균이나 초식동물로부터 식물을 보호하는 것으로 알려져 있다[3, 4]. 또한 침엽수로부터 분리한 내생균인 *Taxomyces andreanae*, *Periconia* sp., *Monochaetia* sp. 등으로부터 항암치료제인 택솔 등이 분리됨에 따라[5], 내생균을 통한 다양한 생리활성 물질을 찾기 위한 노력이 진행되고 있다. 실제 Karsten 등은 12년간 초본과 목본 식물로부터 6,500 균주 이상의 내생균을 분리하여, 내생균이 분비하는 생리활성 물질의 기

능과 구조 등을 확인하였고, perylene derivatives, palmarumycin 등과 같은 전구물질을 확보하기도 하였다[6].

국제자연보호연맹(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN)에 따르면 침엽수는 형태학적 특징과 유전적 특징에 따라 8과 68속 600여 종으로 분류할 수 있으며, 그 중 355종은 보전이 필요하고, 약 35%인 200여 종은 심각한 멸종 위기에 처해 있다고 하였다[7]. 한반도 전역에도 Lee [8]의 분류 기준에 따라 5과 17속 54종의 침엽수가 분포하고 있으며, 그 중 고유종이자 멸종 위기에 처한 눈썹백이나 구상나무 등은 인간의 간섭에 의한 훼손과 기후 변화 등의 요인으로 인해 개체수가 현저히 감소하고 있다. 따라서 한반도뿐만 아니라, 전 세계적으로 발생하고 있는 침엽수의 산림 쇠퇴와 함께 미시적인 관점에서는 공진화 과정을 거쳐 공생관계를 형성해 온 다양한 균류에 대한 연구가 필요한 시점이며, 이를 통해 생물자원으로써 내생균을 분리, 확보하는 것은 매우 중요한 연구 주제이다. 생물다양성협약을 계기로 국가 간 생물종 다양성 확보를 위한 다양한 노력이 진행되고 있으며, 선진국 수준의 응용 연구를 추진하기 위해서는 무엇보다도 국내외의 생물자원을 확보하는 것이 매우 시급한 상태이다. 본 연구에서는 한반도에 자생하는 3종의 침엽수로부터 내생균을 분리하였고, 형태학적, 분자생물학적인 방법을 통해 확인된 5종의 국내 미기록 내생균을 보고하고자 한다.

강원도의 설악산(고도 1,708 m; N 38° 07', E 128° 22')

Kor. J. Mycol. 2016 March, 44(1): 51-56
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.1.51>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received March 2, 2016
 Revised March 9, 2016
 Accepted March 16, 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.

에서 주목(*Taxus cuspidata* Siebold & Zucc.)과 잣나무(*Pinus koraiensis* Siebold & Zucc.), 경기도 화악산(고도 1,468 m; N 37° 59', E 127° 30')에서 분비나무(*Abies nephrolepis* (Traut.) Maxim.), 경북 울릉도(N 37° 29, E 130° 54)에서 주목 등의 잎을 채취하여, 48시간 이내에 균 분리를 수행하였다. 이 때 잎은 병증이 없는 것을 무작위적으로 선택하여 사용하였으며, 이물질 제거를 위해 흐르는 물로 세척한 다음 무균 실험대로 옮겨 표면살균을 진행하였다. 표면살균은 1% 차아염소산나트륨(NaOCl)에서 3분, 70% 에탄올에서 2분간 처리하고 멸균수로 세척하였다. 이후 침엽은 멸균된 가위를 이용하여 1 mm 길이로 자른 후 potato dextrose agar (PDA) 배지에 치상하였으며, 25°C 암소에서 배양하면서 발생한 균주들을 분리하여 계대배양하였다.

분리된 균주의 형태학적 특징을 알아보기 위하여 25°C 암소에서 14일간 배양하며 균총의 성장속도를 측정하였고, 균총의 크기와 색, 모양, 균사의 자라나는 형태 등을 육안으로 관찰하였다. 이후 슬라이드 배양법을 이용하여 25°C 암소에서 7일간 배양한 후 lactophenol aniline blue 용액으로 시료를 염색하여 광학현미경 (AXIO Imager A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 분생포자의 크기와 모양, 분생포자경 등을 관찰하였다. 각각의 내생균은 DN easy Plant SV Mini Kit (GeneAll, Seoul, Korea)의 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 모든 균주의 DNA는 균 특이적인 primer ITS1F와 ITS4를 이용하여 internal transcribed spacer (ITS) 지역을 증폭하였고 [9], NCBI 상에 염기서열이 등록되어 있는 종에 한 해, PCR primer LR0R과 LR16을 이용하여 ribosomal DNA 의 large subunit (LSU)

지역을 증폭하였다 [10]. PCR 조건 중 annealing 온도는 ITS지역은 58°C, LSU rDNA지역은 54°C를 각각 사용하였으며, 예상되는 크기의 band를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다 (SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열들은 NCBI 상에서 BLAST를 하여 similarity를 확인한 후, 염기서열의 유사도를 바탕으로 계통수를 작성하였다. 이 때 bootstrap 분석은 1,000회 반복으로 수행되었으며, MEGA6 [11]를 이용하여 neighbor-joining (NJ) 계통수를 완성하였다 (Figs. 1, 2). 염기서열 자료는 Genbank에 등록하였고, 균주 13C005는 KU837233의 accession number를, 균주 13C026는 KU837234를, 균주 13C137는 KU837235를, 균주 13C148는 KU837236을, 균주 13C261는 KU837237를 부여 받았다.

***Biscogniauxia maritima* Lar. N. Vassiljeva, Mikol. Fito-patol. 22(5): 393 (1988)**

설악산에서 채집한 잣나무의 침엽에서 분리하였으며, PDA 배지에서 7일간 배양된 균총은 반경이 약 15~20 mm 정도이다. 흰색의 균사체가 중앙부에 공중 균사를 형성하고 있으며, 변연부로 갈수록 성긴 균사가 직접 관찰된다 (Fig. 3A). 균총의 뒷면은 아이보리색을 띠고 있다 (Fig. 3B). 이 균주의 rDNA 중 ITS지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *B. maritima* JQ247198과 99% 상동성을 보였다.

관찰표본: 강원도 설악산, N 38° 07', E 128° 22', 잣나무 (*P. koraiensis*)의 침엽, 13C026 (NIBRFG0000137451, Gen Bank accession no. KU837234)

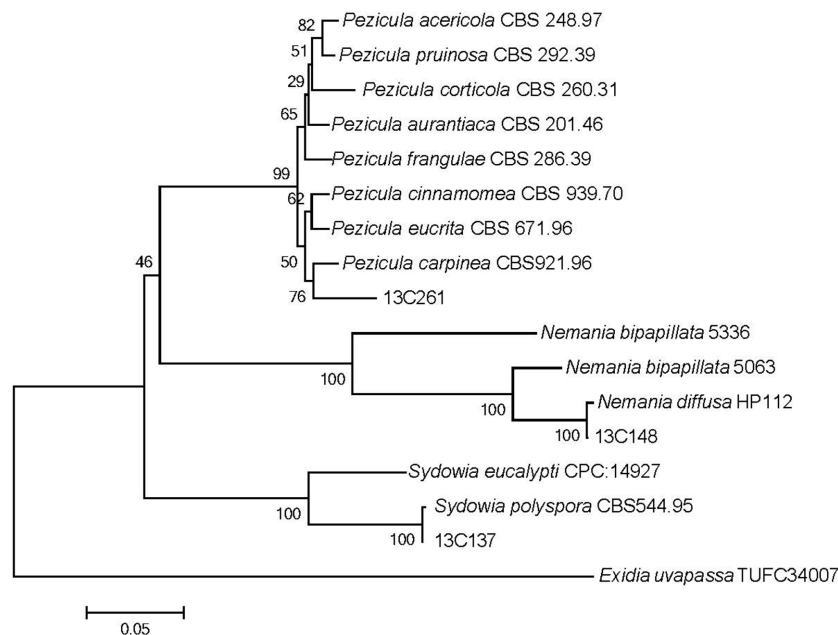


Fig. 1. Neighbor-joining tree of *Sydowia polyspora*, *Nemaniam diffusa*, *Pezicula carpineae* isolates based on a combined alignment of internal transcribed spacer and large subunit rDNA sequences. *Exidia uvapassa* was used as an outgroup.

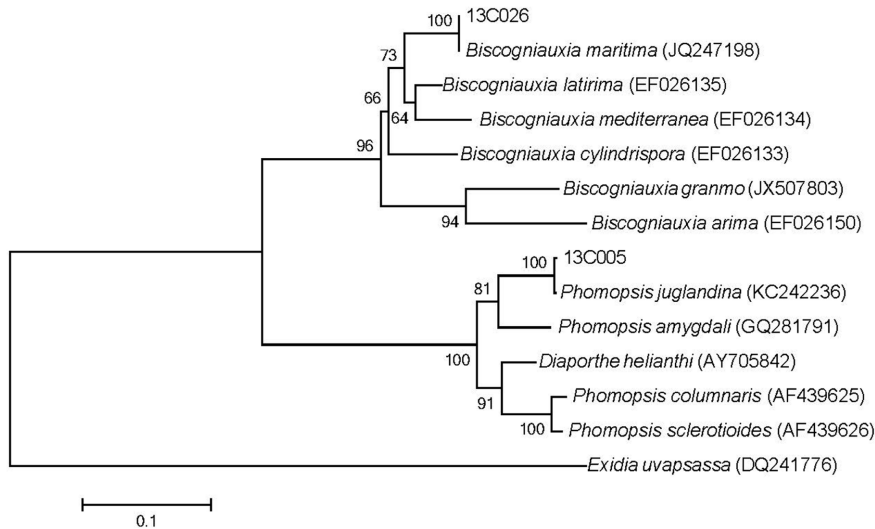


Fig. 2. Neighbor-joining tree of *Biscogniauxia maritime*, *Phomopsis juglandina* isolates based on internal transcribed spacer and 5.8S rDNA region. This region was used to confirm the topological appropriation of the isolates. *Exidia uvapassa* was used as an outgroup.

***Nemania diffusa* (Sowerby) Gray, Nat. Arr. Brit. Pl. (London) 1: 517 (1821)**

화악산에서 채집한 분비나무의 침엽에서 분리하였으며, PDA 배지에서 14일간 배양된 균총은 반경이 약 37~42 mm 정도이다. 표면은 흰색의 균사체가 물결모양을 형성하고 있으며, 변연부는 불규칙한 형태를 띠고 있다. 균총의 표면은 광택을 가지고 있다(Fig. 3C, 3D). 흰색의 균사체는 시간이 지나면서 일부가 검은색으로 변하며, 앞 뒷면에서 검은색의 반점을 확인할 수 있다. 투명한 균사 사이로 옅은 갈색의 타원형 포자가 형성되고, 여러 개의 포자가 뭉쳐 있다. 포자의 크기는 3.0~3.5 × 10.5~12.5 μm 정도이다(Fig. 3K). 이 균주의 rDNA 중 ITS 지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *N. diffusa* KC354594과 99% 상동성을 보였으며, LSU rDNA 지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *N. diffusa* DQ840076.1와 99% 상동성을 보였다. *Nemania* 속의 종들은 일반적으로 피자식물의 목부를 부패하는데 관여하는 것으로 보고되고 있으며, *N. diffusa* 역시 차나무의 부패에 관여한다는 연구 보고가 있다[12].

관찰표본: 경기도 화악산, N 37° 59', E 127° 30', 분비나무(*A. nephrolepis*)의 침엽, 13C148 (NIBRFG0000137590, GenBank accession no. KU837236)

***Pezicula carpinea* (Pers.) Tul. ex Fuckel, Jb. nassau. Ver. Naturk. 23-24: 279 (1870)**

울릉도에서 채집한 주목의 침엽에서 분리하였으며, PDA 배지에서 21일간 배양된 균총은 반경이 약 18~20 mm 정도이다. 균총은 짙은 갈색의 원형을 띠며, 중앙부에는 균사체 위에 연한 미색의 균사가 형성되어 있고, 가장자리로 갈

수록 색이 짙어진다. 또한 중앙부에는 6~7개의 방사형의 홈이 형성되어 있다. 변연부는 5mm 두께의 환대가 형성되어 있고, 삼출물은 보이지 않는다(Fig. 3E). 배지의 뒷면은 중심부는 짙은 갈색이며, 변연부는 옅은 갈색의 환대가 형성되어 있다(Fig. 3F). 포자 관찰 결과 균사의 끝에서 포자가 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 그 크기는 1.5~5.0 μm 정도이며(Fig. 3L), 성숙한 포자 형성 시 20 μm 정도 크기의 포자가 형성되는 것으로 알려져 있다. 이 균주의 rDNA 중 ITS지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *P. carpinea* AF169306과 99% 상동성을 보였으며, LSU rDNA 지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *P. carpinea* KR858897와 97% 상동성을 보였다. *Pezicula* 속의 종들은 온대 북부 지역에 서식하는 관목과 나무들에 공생하는 내생균으로 알려져 있으며, 일부 종은 항생작용을 하는 2차대사 산물을 분비하는 것으로 알려져 있다[13]. 특히 이번에 분리된 *P. carpinea*도 2차대사 산물을 만들어 분비한다는 연구 보고가 있으며[14], 국내에서도 이러한 전구물질에 대한 후속연구가 필요한 시점이다.

관찰표본: 울릉도, N 37° 29', E 130° 54', 주목(*T. cuspidata*)의 침엽, 13C261 (NIBRFG0000137645, GenBank accession no. KU837237)

***Phomopsis juglandina* (Sacc.) Höhn., Sber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. Kl., Abt. 1 115: 680 (1906)**

설악산에서 채집한 주목의 침엽에서 분리하였으며, PDA 배지에서 14일간 배양된 균총은 반경이 약 35~40 mm 정도이다. 균총의 변연부는 불규칙한 형태를 띠고, 흰색의 균사가 꽃잎 모양을 형성하며, 가장자리로 퍼져 있다(Fig.

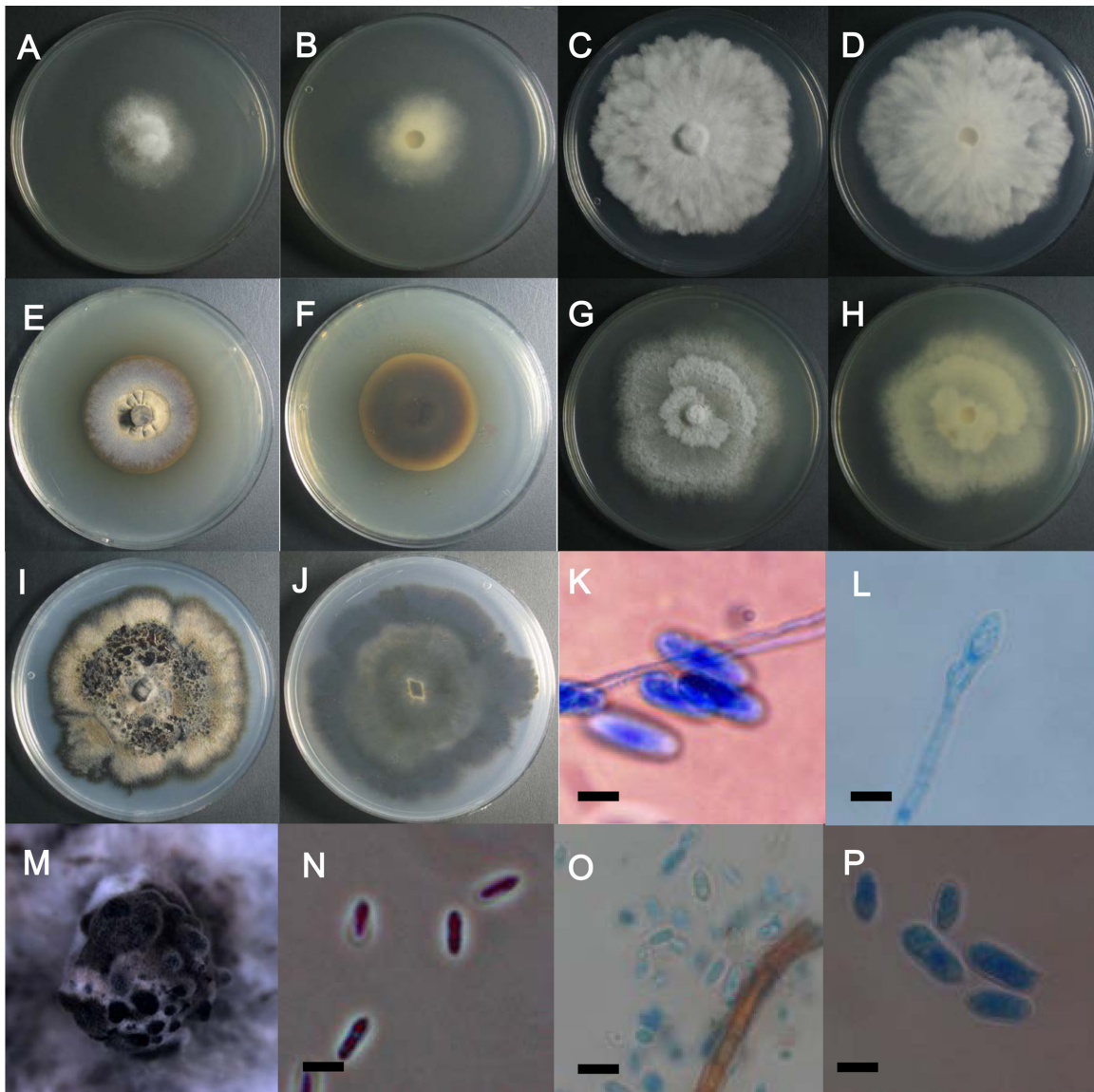


Fig. 3. Colony of strain 13C026 (*Biscogniauxia maritima*) grown on PDA (A, B) for 7 days at 25; 13C148 (*Nemanium diffusa*) grown on potato dextrose agar (PDA) for 14 days (C, D) and spore (K); 13C261 (*Pezicula carpinea*) grown on PDA for 21 days (E, F) and spore (L); 13C005 (*Phomopsis juglandina*) grown on PDA for 14 days (G, H) and conidiomata (M), α -conidia (N); 13C137 (*Sydowia polyspora*) grown on PDA for 21 days (I, J) and conidia (O, P) (scale bars: K, L, N, P = 5 μ m, O = 10 μ m).

3G). 균총의 뒷면은 전체적으로 연한 미색을 띠고 있다(Fig. 3H). 표면에 삼출물은 없다. *Phomopsis* 속의 가장 중요한 형태학적 특징은, alpha 형 포자와 beta 형 포자를 만드는 원통형의 경자(phialide)가 들어 있는 검은색의 분생자과(conidiomata)를 가지고 있다는 것이다[15]. 본 연구에서는 분생자과 안에서 alpha 형의 포자가 관찰되었으며, 포자의 크기는 2.0~2.5 \times 3.5~4.5 μ m 정도이고 모양은 끝이 뾰족한 타원형을 띠고 있다(Fig. 3M, 3N). 이 균주의 rDNA 중 ITS 지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *P. juglandina* KC 242236과 99% 상동성을 보였다. *Phomopsis* 속은 전 세계적으로 다양한 숙주에서 발견되는 중요한 식물 병원균이자,

건강한 식물 조직에서 발견되는 대표적인 내생균이다[15, 16]. 또한 일부는 사람과 포유동물에게도 병을 일으키는 것으로 알려져 있다[17, 18]. *P. juglandina*는 호두(*Juglans regia*)에 병을 일으키는 병원균으로도 보고되어 있다[19].

관찰표본: 강원도 설악산, N 38° 07', E 128° 22', 주목(*T. cuspidata*)의 침엽, 13C005 (NIBRFG0000137673, GenBank accession no. KU837233)

***Sydowia polyspora* (Bref. & Tavel) E. Müll., *Sydowia* 7 (5-6): 342 (1953)**

화악산에서 채집한 분비나무의 침엽에서 분리하였으며,

PDA 배지에서 21일간 배양된 균총은 반경이 약 35~40 mm 정도이다. 표면은 옅은 갈색의 균사체가 형성되어 있으며, 변연부에는 짙은 갈색의 환대가 형성되어 있고, 불규칙한 형태를 띠고 있다. 균사의 밀도는 매우 조밀하며, 표면에 짙은 갈색의 삼출물이 있다(Fig. 3I). 균총의 뒷면은 중앙부와 변연부는 짙은 갈색을 띠고 있으며, 중심에는 옅은 갈색의 환대가 형성되어 있다(Fig. 3J). 갈색의 균사 사이로 타원형의 포자가 높은 빈도로 뭉쳐져 있으며(Fig. 3O), 분생포자벽은 뚜렷하게 관찰되지 않는다. 성숙한 포자의 크기는 3.5~4.5 × 8.5~11.5 μm 정도이며, 색은 투명하다(Fig. 3P). 이 균주의 rDNA 중 ITS지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *S. polyspora* FR717223과 99% 상동성을 보였으며, LSU rDNA지역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *S. polyspora* DQ678058과 99% 상동성을 보였다. *S. polyspora* 는 잣나무속(*Abies* Mill.)에 속하는 침엽수의 침엽에 괴사를 일으키는 흑색의 반점을 만드는 병원균으로 알려져 있다 [20].

관찰표본: 경기도 화악산, N 37° 59', E 127° 30', 분비나무(*A. nephrolepis*)의 침엽, 13C137 (NIBRFG0000137693, GenBank accession no. KU837235)

지구 온난화 등의 기후변화와 인간에 의한 훼손으로 인해 우리나라 침엽수의 개체수가 급격히 감소하고 있다. 침엽수의 감소는 미시적인 관점에서는 더불어 살아가는 많은 균류의 멸종으로도 이어질 수 있다. 이에 본 연구에서는 우리나라 중부지역인 경기도와 강원도, 섬 지역인 울릉도 등에서 침엽수를 채집하여 내생균을 분리하였고, 국내 미기록 내생균 5종을 확인하였다. 이번에 분리한 균주 중 *Pezizula carpinea* 종은 항균작용을 하는 2차 대사산물을 만든다는 보고가 있듯이 내생균은 다양한 약리활성 물질을 만들 수 있는 전구물질을 생산할 수 있다. 이러한 경제적 가치와 더불어 국내 생물 종 다양성의 확보 측면에서도 내생균에 대한 연구가 필요한 시점이다. 따라서 침엽수를 포함한 다양한 숙주 식물에서 내생균류를 발굴하기 위한 노력이 진행된다면 식물과 균류의 상호작용에 대한 이해뿐만 아니라, 생물자원의 보존에도 기여할 수 있을 것이다.

적 요

본 연구에서는 강원도의 설악산에서 주목(*Taxus cuspidata* Siebold & Zucc.)과 잣나무(*Pinus koraiensis* Siebold & Zucc.), 경기도 화악산에서 분비나무(*Abies nephrolepis* (Traut.) Maxim.), 경북 울릉도에서 주목 등의 침엽을 채취하여 내생균을 분리하였고, 분리된 균주의 형태학적 특징을 관찰하고, ITS rDNA와 LSU rDNA지역의 염기서열 분석하여 균을 동정하였다. 그 결과 *Biscogniauxia maritime*, *Nemania diffusa*, *Pezizula carpinea*, *Phomopsis juglandina*, *Sydowia polyspora* 등의 5종의 국내 미기록 내생균을 확인

하였고, 이를 보고하고자 한다.

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

1. Cuadros-Orellana S, Leite LR, Smith A, Medeiros JD, Badotti F, Fonseca PL, Vaz AB, Oliveira G, Góes-Neto A. Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. *Fungal Genom Biol* 2013;3. <http://dx.doi.org/10.4172/2165-8056.1000110>.
2. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988;69:2-9.
3. Kimmons CA, Gwinn KD, Bernard EC. Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Dis* 1990;74:757-61.
4. Gwinn KD, Gavin AM. Relationship between endophyte infestation level of tall fescue seed lots and *Rhizoctonia zeae* seedling disease. *Plant Dis* 1992;76:911-4.
5. Gangadevi V, Muthumary J. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnol Appl Biochem* 2009;52:9-15.
6. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res* 2002;106:996-1004.
7. Farjon A. World checklist and bibliography of conifers. 2nd ed. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew; 2001.
8. Lee TB. Gymnosperms in Korea. *Bull Kwanak Arbor* 1983;4: 1-22.
9. 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.
10. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 1990;172:4238-46.
11. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
12. Balasuriya A, Adikaram NK. Some spatial, temporal and spatio-temporal considerations of wood decay of tea (*Camellia sinensis*), caused by *Nemania diffusa* (Syn. *Hypoxylon vestitum*). *Crop Prot* 2009;28:273-9.
13. Noble HM, Langley D, Sidebottom PJ, Lane SJ, Fisher PJ. An echinocandin from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. and *Pezizula* sp. in *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Mycol Res* 1991;95:1439-40.
14. Schulz B, Sucker J, Aust HJ, Krohn K, Ludewig K, Jones PG, Döring D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycol Res* 1995;99:1007-15.
15. Uecker FA. World list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. Berlin: J. Cramer; 1988.

16. Udayanga D, Liu X, McKenzie EH, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Divers* 2011;50:189-225.
17. Van Warmelo KT, Marasas WF, Adelaar TF, Kellerman TS, Van Rensburg IB, Minne JA. Experimental evidence that lupinosis of sheep is a mycotoxicosis caused by the fungus *Phomopsis leptostromiformis* (Kühn) Bubak. In: Purchase IF, editor. Symposium on mycotoxins in human health. London: Macmillan; 1971. p. 185-93.
18. Garcia-Reyne A, López-Medrano F, Morales J, Garcia Esteban C, Martin I, Erana I, Meije Y, Lalueza A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez-Tudela J, et al. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transpl Infect Dis* 2011;13:204-7.
19. Belisario A. The principal diseases of walnut in Italy. *Inf Fitopatol* 1996;46:20-5.
20. Talgø V, Chastagner G, Thomsen IM, Cech T, Riley K, Lange K, Klemsdal SS, Stensvand A. *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.). *Fungal Biol* 2010;114:545-54.