

## 보은 지역의 소나무(*Pinus densiflora*)에서 분리한 내생균의 동정과 다양성

길이종<sup>1</sup> · 어주경<sup>2</sup> · 엄안흠<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국교원대학교 생물교육과, <sup>2</sup>서울대학교 산림과학부 산림환경

### Molecular Identification and Diveristy of Endophytic Fungi Isolated from *Pinus densiflora* in Boeun, Korea

Yi-Jong Kil<sup>1</sup>, Ju-Kyeong Eo<sup>2</sup> and Ahn-Heum Eom<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology Education, Korea National University of Education, Chungbuk 363-791, Korea

<sup>2</sup>Department of Forest Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received December 9, 2009. Accepted December 24, 2009)

**ABSTRACT:** The endophytic fungi were isolated from red pine trees (*Pinus densiflora*) that were distributed in three sites of Chungbuk, Korea. Twenty fungal isolates were isolated from 16 trees and divided into 8 groups by morphological characters. The fungal isolates were identified using the sequences of ITS region of rDNA; *Lophodermium* complex, *Sydowia polyspora*, *Hymenula* sp., *Sistotrema brinkmannii*, *Septoria pini-thunbergii*, *Earliella* sp. *Lophodermium* spp. were the most frequently found fungal species the across sites and firstly detected from *Pinus* species in Korea by molecular work.

**KEYWORDS:** Endophytic fungi, *Lophodermium* complex, *Pinus densiflora*, Species diversity

소나무(*Pinus densiflora*)는 한국에서 가장 넓은 면적에서 자라고 있는 수종으로서, 그 분포영역이 한국뿐만 아니라 일본 전역과 만주지역에 이르고 있다 (Farjon, 2005). 소나무는 양수이며, 척박하고 건조한 지역에서도 생장이 좋은 수종이다. 한국의 소나무는 크게 6가지의 생태형으로 구분하기도 하는데 (Uyeki, 1928), 이와 같은 기준에 따르면 보은 지역의 소나무는 중남부고지형에 해당한다.

내생균은 숙주식물의 잎과 줄기의 조직 내에 서식하는 비병원성의 균으로 정의 한다 (Carroll, 1988). 내생균은 숙주식물로부터 광합성산물을 흡수할 뿐만 아니라 이차대사산물을 분비함으로써 식물에게 다양한 이득을 제공하는 상리공생관계로 알려져 있다. 내생균의 역할에 대한 연구는 다양한 분야에서 진행되어 왔는데, 초본식물에서 내생균이 합성한 독성 알카로이드를 이용한 식물체의 보호 기작(Clay *et al.*, 1993; Latch, 1993), 수분스트레스에 대한 내생균의 역할(Bouton *et al.*, 1993) 그리고 병원균 억제(Burpee and Bouton, 1993; Christensen, 1996)에 대한 연구결과 등이 보고되고 있다. 그러나 침엽수에서 내생균에 대한 연구는 초본식물에 비하면 적은 편이다. 국내의 침엽수에 대한 내생균의 연구는 최근 Kim *et al.* (2008)이 리기다소나무(*Pinus rigida* Mill.)에서 그리고 서등 (2009)이 잣나무(*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.)에서 다양한 내생균을 분리하기도 하였으며, 잣나무로부터 분리

된 내생균 균주로부터 추출한 물질의 식물병원균에 대한 저항성 연구 (Park *et al.*, 2005) 등이 활발하게 이루어지고 있다. 소나무에 서식하는 내생균의 다양성에 관한 연구는 현재까지 일부 이루어지고 있으나 (Paul and Yu, 2008), 보다 다양한 지역에서 많은 연구가 필요한 실정이다. 따라서, 본 연구는 우리나라 산림의 주요 수종인 소나무에 대한 내생균의 다양성을 조사하기 위하여 수행되었으며, 연구의 첫 단계로 보은 지역의 소나무에 공생하고 있는 내생균을 분리 · 동정하고 그에 따른 내생균의 다양성을 살펴보고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균 분리

보은 지역 소나무 군락(N 36°26'~31', E 127°34'~44')에서 건강한 소나무 16 개체를 선별하여 각각의 개체에서 3개씩 소지를 채집하였다. 채집지역은 해발고도와 거리에 따라 3개의 소지역(A, B, C)으로 나누어 채집하였다. A지역은 채집 지역 내에서 가장 높은 지역으로 해발 약 380 m 부근이며, 그로부터 약 8.5 km정도 떨어져 있으며 해발 280 m 부근지역이 B지역이다. 마지막으로 C지역은 B지역으로부터 약 6.7 km 정도 떨어져 있으며 해발 150 m 부근에 이르는 지역이다. 보은 지역은 전체적으로 평균 온도가 10.7°C이고, 연 강수량이 1260.2 mm에 이르는 지역으로 전형적인 중부지방의 기후를

\*Corresponding author <E-mail : eomah@knue.ac.kr>

나타낸다(기상청, www.kma.go.kr). 각 지역에서 채집된 소나무 침엽은 내생균 분리를 위해 준비된 소지에서 2년생 침엽을 채취 후 10mm의 크기로 4등분하였다. 다른 균들을 제거하기 위하여 1% NaOCl에 3분, 70% 에탄올수용액에 2분 간 처리하고 멸균수로 2회 세척하여 표면 살균을 수행하였다 (Arnold *et al.*, 2001). 표면 살균된 침엽 조각은 MEA배지 (Maltextract 1%, Agar 1.5%)에 각각 치상하여 25°C에서 배양 하고, PDA배지(Potato Dextrose Agar 3.9%)로 옮겨 계대배 양 하여 최종적으로 균 종 별로 순수분리 하였다.

**DNA 추출과 계통분석**

각각의 내생균은 DNeasy Plant mini kit (GeanAll, Korea)의 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3')와 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer를 이용하여 ITS 지역을 증폭하였다(Gardes and Bruns, 1993). 반응조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 50에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation을 1cycle로 하여 총 30회를 진행하였으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 증폭된 rDNA를 안정화켜 4°C에서 보관하였다. 증폭된 rDNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였으며, ethidium bromide로 5분간 염색하여 UV transilluminator 상에서 밴드를 확인하였다.

분석된 염기서열은 NCBI에서 BLAST하여 종을 동정하였다. 각 종들 간의 계통관계를 분석하기 위하여 bootstrap 분석은 1000 replicates를 선택하였고, *Spathularia flavida*를 outgroup으로 설정하고 MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2008)를 이용하여 계통수를 완성하였다. 최종적으로 형태와 분자생물학적인 방법으로 동정된 내생균은 Shannon Index (H') 등을 사용하여 내생균의 다양성과 분포양상을 파악하였다.

**결과 및 고찰**

**균분리**

총 16개체의 소나무 잎으로부터 총 20개의 균주를 분리하

였다. 소나무 개체별로 1-3종의 균이 분리되었으나, 일부 소나무 개체에서는 어떠한 균도 분리되지 않았다. Arnold *et al.* (2007)의 *Pinus taeda*에 서식하는 내생균 분포에 관한 연구에 의하면 배지를 통해 분리된 내생균의 수와 침엽에서 직접 총 DNA를 추출한 후 클로닝을 통해 분자적으로 확인한 내생균의 수에서 차이를 보인다. 이는 현재까지 내생균 중 분리 · 배양할 수 없는 균이 상당히 다양하다는 것을 나타낸다. 따라서 내생균의 다양성에 관한 연구는 이와 같은 분자적인 방법을 이용하는 것이 자연상태에 부합되는 내생균 분포 양상을 파악할 수 있는 방법이라고 생각된다.

**내생균의 분자적 동정 및 분포**

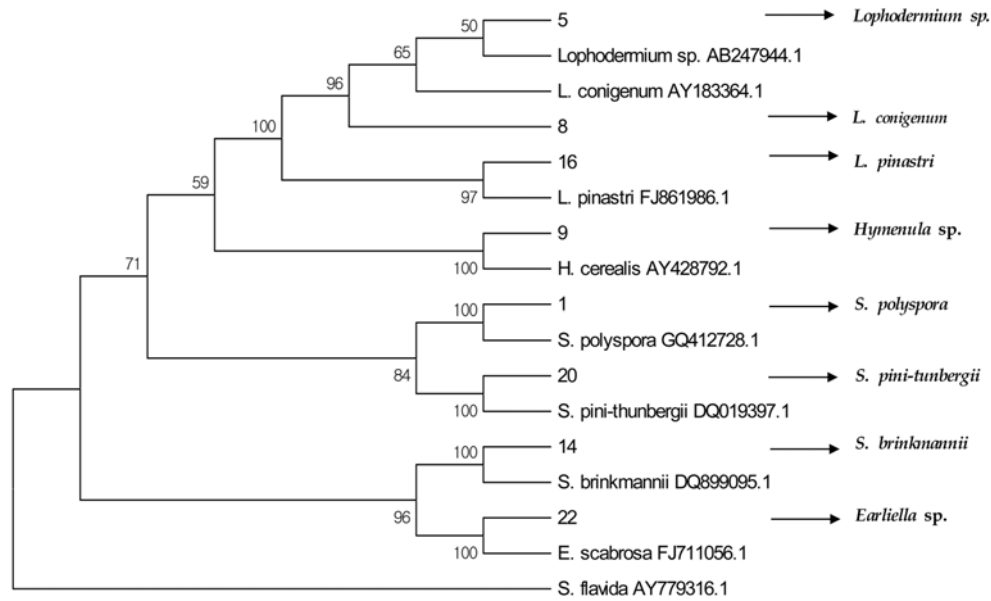
20개의 균 분리주들에 대한 분자적 동정을 위해 ITS 지역의 염기서열을 분석하였다. 염기서열의 BLAST 결과 가장 많은 비율을 차지하는 것은 *Lophodermium* 속이 전체 분리된 균 중에 절반이 넘는 약 60%를 차지하고 있었으며, 그 다음으로 *Sydowia polyspora*가 20%를, 그리고 그 외의 균들 - *Hymenula* sp., *Sistotrema brinkmannii*, *Septoria pini-thunbergii*, *Earliella* sp. - 이 나머지 20% 정도를 차지하고 있었다(Table 1). 채집된 소나무 표본에서 내생균의 발견빈도를 살펴보면 *Lophodermium* 속은 내생균이 발견된 모든 소나무에서 발견되어 사실상 채집지역 전 구간에 걸쳐 고르게 분포하고 있는 것으로 생각된다. 그 외의 내생균들은 소나무 1-2개에 서만 분리되어 채집지역 내에 국지적으로 분포하는 것으로 생각된다. 채집지역은 크게 3부분으로 나눌 수 있는데, A지역과 B지역의 두 소 지역간의 종 다양성은 각각 0.95와 0.97로 서로 큰 차이를 보이지 않았으나 고도가 가장 낮은 C지역의 경우에는 H' 이 1.55에 달해 위의 두 지역보다는 높은 다양성을 나타냈다 (Table 1). 이와 같이 지역에 따라 내생균의 분포와 다양성에 차이를 보였는데, 이는 고도와 같은 환경요인 외에도 주변에 서식하는 식물의 군집과도 관련될 수 있는 것으로 보고되고 있다 (Joshee *et al.* 2009). 본 연구에서 A지역과 B지역은 식생이 거의 비슷하여 주로 오동나무, 물오리나무, 굴피나무, 떡갈나무, 상수리나무 등의 교목과 국수나무, 개울

**Table 1.** Molecular identification of endophytic fungi using ITS sequences of rDNA.

Isolates	Genbank Accession No.	The Closest Genbank Taxa	Maximum Identity	Relative Abundance (%)*	Relative Frequency (%)**
Isolate 1	Gq412728.1	<i>Sydowia Polyspora</i> (Bref. & Tavel) E. Müll.	99%	20	15
Isolate 2	Ab247944.1	<i>Lophodermium</i> Sp.	98%	40	46.7
Isolate 3	Ay183364.1	<i>Lophodermium Conigenum</i> (Brunaud) Hiltizer	99%	10	6.7
Isolate 4	Ay428792.1	<i>Hymenula</i> Sp.	92%	5	3.3
Isolate 5	Dq899095.1	<i>Sistotrema Brinkmannii</i> (Bres.) J. Erikss.	99%	5	5
Isolate 6	Fj861986.1	<i>Lophodermium Pinastri</i> (Schard.) Chevall.	99%	5	5
Isolate 7	Dq019397.1	<i>Septoria Pini-thunbergii</i> S. Kaneko	100%	10	13.3
Isolate 8	Fj711056.1	<i>Earliella</i> Sp.	90%	5	5

\* Relative abundace indicates the percentages of the number of isolates in the study sites of the total numbers of isolates

\*\* Frequency indicates the percentages of the number of trees isolated the fungal species of the total number of trees.



**Fig. 1.** Phylogenetic tree of endophytic fungi using ITS rDNA sequences. Each number is a representative sequence of the isolates; 1(isolate 1 = *S. polyspora*) 5(isolate 2 = *Lophodermium* sp.) 8(isolate 3 = *L. conigenum*) 9(isolate 4 = *Hymenula* sp.) 14(isolate 5 = *S. brinkmannii*) 16(isolate 6 = *L. pinastri*) 20(isolate 7 = *S. pini-thunbergii*) 22(isolate 8 = *Earliella* sp.)

나무 등의 관목이 소나무 인접지역에 서식함으로 인해 연속적인 소나무의 분포를 확인할 수 없었다. 그에 반해서 C지역에는 상수리나무, 떡갈나무 등의 참나무류를 제외하고는 거의 대부분이 소나무 집단으로 구성되어 있고, 연속적인 소나무의 분포를 확인할 수 있다. 따라서 주변식생과 내생균 군집의 분포에 관한 후속연구가 필요할 것으로 생각된다.

분류학적인 측면에서 분리된 균들을 살펴보면 담자균류(Basidiomycetes)는 2종으로 각각 Sistotremataceae에 속하는 *S. brinkmannii*와 Polyporaceae에 속하는 *E. scabrosa*이다. 그 외의 균들은 모두 자낭균류(Ascomycetes)에 속하는 균들로 Rhytismataceae에 속하는 *Lophodermium* complex와 Valsaceae에 속하는 *Hymenula cerealis* 그리고 Mycosphaerellaceae에 속하는 *Septoria pini-thunbergii*가 있다. *Lophodermium*에 속하는 종들은 본 연구에서 가장 많은 종이 발견된 내생균 일뿐만 아니라 가장 많은 비율로 소나무 감염되어 있는 것으로 나타났다. 해외의 연구에서도 본 연구결과와 유사하게 Rhytismataceae에 속하는 *Elytroderma*과 *Lophodermium* 등이 소나무속의 침엽에 가장 많이 감염되어 있는 것으로 보고하고 있다 (Deckert and Peterson, 2000; Ganley and Newcombe, 2006). 지금까지 한국에서는 잣나무(*P. koraiensis*)와 리기다소나무(*P. rigida*) 그리고 소나무(*P. densiflora*)에서 총 21종의 내생균을 분리하였다고 보고하였으나, 이번 연구결과와 같은 *Lophodermium* 속의 내생균들을 분자적으로 확인하지는 못하였다(서 등, 2009; Kim *et al.*, 2008; Paul and Yu, 2008). 이는 조사지역의 지리적, 기후적 차이와 더불어 숙주식물에 따른 내생균의 선호도 차이일 수도 있을 것이다(Saikkonen *et al.*, 1998).

이번 연구결과 얻어진 내생균에 대한 계통수는 크게 3부분

으로 나누어질 수 있다(Fig. 1). 첫 번째 그룹은 자낭균 중 Rhytismataceae에 속하는 *Lophodermium* 그룹이고, 두 번째는 자낭균 중 비 Rhytismataceae 그룹 그리고 마지막은 담자균류 그룹이다. 그 중에서도 *Lophodermium* complex 내에서 *L. pinastri*와 *L. conigenum*은 BLAST와 계통수를 통해서 확인할 수 있었지만 *Lophodermium* sp.의 경우에는 동정이 어려웠으며 이는 추후 후속연구를 통해 보완하고자 한다. 내생균의 분리 및 동정에는 기후적인 요인에 따른 내생균의 증감도 고려해야 되므로 (Gao *et al.*, 2005), 계절적 요인과 더불어 형태형질 및 염기서열의 변이 정도를 고려하여 종 내의 한계를 설정해야 할 것이다.

끝으로 본 연구를 통해서 밝혀진 보은 지역 소나무에 대한 내생균의 다양성을 보다 명확히 하기 위한 분류학적 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히 Maximum identity가 다른 종들에 비해 낮았던 *Hymenula* sp.와 *Earliella* sp.이 다른 종일 수 있는 가능성을 검토하고자 하며 이를 위해서 형태학적 연구와 분자적 연구를 심도 있게 진행하고자 한다.

## 적요

충북 보은 지역에 분포하는 3 곳 연구지에서 소나무에 서식하는 내생균을 분리하였다. 소나무 총 16개체로부터 20개의 균주를 분리하였으며 형태적 특징을 비교하여 8개의 그룹으로 나누었다. 각 균주의 rDNA ITS 지역의 염기서열을 이용하여 동정하였다. 보은 지역 소나무에서 분리된 내생균은 *Lophodermium* complex, *Sydowia polyspora*, *Hymenula* sp., *Sistotrema brinkmannii*, *Septoria pini-thunbergii*, *Earliella* sp.였다. 본 연구에서 *Lophodermium* complex는 가장 높은

빈도로 발견되었으며, 우리나라에서는 처음으로 분자적인 방법으로 소나무에서 확인된 내생균이다.

### 참고문헌

- 서상태, 김경희, 김명주, 홍진성, 박종한, 신상철. 2009. 한국의 잣나무에서 분리한 내생균의 다양성. 한국균학회지 37: 108-110.
- Uyeki, H. 1928. 水原高等農林學教學術報告. 第三號. 朝鮮總督府水原高等農林學教.
- Arnold, A., Henk, D., Eells, R., Lutzoni, F. and Vilgalys, R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* 99:185-205.
- Arnold, A., Maynard, Z. and Gilbert, G. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol. Res.* 105:1502-1507.
- Bouton, J., Gates, R., Belesky, D. and Owsley, M. 1993. Yield and persistence of tall fescue in the southeastern coastal plain after removal of its endophyte. *Agron. J.* 85:52-52.
- Burpee, L. and Bouton, J. 1993. Effect of eradication of the endophyte *Acremonium coenophialum* on epidemics of *Rhizoctonia* blight in tall fescue. *Plant Disease* 77:157-159.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69:2-9.
- Christensen, M. 1996. Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloe* endophytes. *Aust. Plant Pathol.* 25:186-191.
- Clay, K., Marks, S. and Cheplick, G. 1993. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology* 74:1767-1777.
- Deckert, R. and Peterson, R. 2000. Distribution of foliar fungal endophytes of *Pinus strobus* between and within host trees. *Can. J. For. Res.* 30:1436-1442.
- Farjon, A. 2005. Pines: drawings and descriptions of the genus *Pinus*. Brill Academic Publishers Leiden, Netherlands.
- Ganley, R. and Newcombe, G. 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycol. Res.* 110:318-327.
- Gao, X., Zhou, H., Xu, D., Yu, C., Chen, Y. and Qu, L. 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiol. Letters* 249:255-266.
- Gardes, M. and Bruns, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.
- Joshee, S. B., Paulus, B. C., Park, D. and Johnston, P. R. 2009. Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. *Mycol. Res.* 113:1003-1015.
- Kim, C. S., Park, M. S. and Yu, S. H. 2008. Two species of endophytic *Penicillium* from *Pinus rigida* in Korea. *Mycobiology* 36:222-227.
- Latch, G. 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agric., Ecosyst. Environ* 44:143-156.
- Park, J.-H., Choi, G.-J., Lee, S.-W., Kim, K.-M., Jung, H.-S., Jang, K.-S., Cho, K. -Y. and Kim, J. -C. 2005. Criseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *J. Microbiol. Biotech.* 15:112-117.
- Paul, N. and Yu, S. -H. 2008. Two species of endophytic *Cladosporium* in pine trees in Korea. *Mycobiology* 36:211-216.
- Saikkonen, K., Faeth, S., Helander, M. and Sullivan, T. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29:319-343.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2008. MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 4.0. Center for Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute Arizona State University.