

## Genetic Diversity of Culturable Endophytic Fungi Isolated from Halophytes Naturally Growing in Muan Salt Marsh

Young-Hyun You<sup>1</sup>, Hyeokjun Yoon<sup>1</sup>, Yeonggyo Seo<sup>1</sup>, Miae Kim<sup>1</sup>, Myung Suk Kang<sup>2</sup>, Changmu Kim<sup>2</sup>, Sang Chul Ha<sup>3</sup>, Ga Youn Cho<sup>2</sup> and Jong-Guk Kim<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Life Sciences and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea<sup>2</sup>National Institute of Biological Resource, Incheon 404-708, Korea<sup>3</sup>Department of Confectionary and Decoration, Daegu Mirae college, Gyongsan 712-716, Korea

Received May 12, 2012 / Revised July 18, 2012 / Accepted July 19, 2012

Native halophytes, such as *Suaeda maritima*, *Limonium tetragonum*, *S. japonica*, *Zoysia sinica*, and *Phragmites australis* were collected from the Muan salt marsh. Ninety endophytic fungi were isolated from the roots of the collected halophytes. Molecular insights inferred by internal transcribed spacer containing ITS1, 5.8s, and the ITS2 region showed that all the fungal strains belong to ten orders, i.e., Capnodiales (4.44%), Cystofilobasidiales (1.11%), Dothideales (3.33%), Eurotiales (53.33%), Glomerellales (3.33%), Hypocreales (8.89%), Mucorales (1.11%), Pleosporales (15.56%), Sordariales (1.11%), and Trichosphaerales (1.11%). The rest (6.67%) of all fungal isolates were not identified. Ninety fungal strains were confirmed at the genus level, containing *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cryptococcus*, *Didymella*, *Dothideomyces*, *Emericellopsis*, *Epicoccum*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Gongronella*, *Macrophoma*, *Microspheeropsis*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Paraconiothyrium*, *Penicillium*, *Phaeomyces*, *Phoma*, *Pleosporales*, *Purpureocillium*, and *Talaromyces*. Of all the endophytic fungi identified from the various halophytes, *Aspergillus* and *Penicillium* of Eurotiales had the highest abundance.

**Key words** : Endophytic fungi, genetic diversity, halophyte, salt marsh

## 서 론

습지(Marsh)는 물에 따라 동식물의 생활과 주변 환경이 결정되는 지역으로서 1년의 일정기간 이상 물에 잠겨있는 지역을 말하며, 다양한 생물종이 서식하고 있는 것으로 알려져 있다[12]. 그리고 습지의 정의는 세계적으로 잘 알려진 람사르(Ramsar) 협약의 조항 1.1에서는 “습지는 자연적이든/인공적이든, 영구적이든/임시적이든, 물이 정체되어 있든/흐르고 있든, 담수이든/기수이든/염수이든 관계없이 소택지, 습원, 이탄지 또는 물로 된 지역을 말한다. 습지는 여기에 간조시에 수심이 6 m를 넘지 않는 해역을 포함한다”라고 규정하고 있다. 그리고 습지는 크게 내륙습지, 인공습지, 염습지로 분류된다.

염습지는 육상 생태계와 해상생태계의 전이대로서, 바다와 강으로부터 유기물이 침전되어서 이루어진 하구와 해변에 주로 발달하며, 해수의 영향을 많이 받는 지역으로 관속식물이 주로 분포하고 있다[2]. 우리나라의 서·남해안에는 경사가 완만하고 수심이 얕으며 조석간만의 차가 크기 때문에 염습지가 잘 발달해 있다. 그리고 우리나라의 대표적인 해안 염습지 중

에 하나인 무안갯벌은 2008년에 람사르 습지로 등록되었고, 다양한 염생식물(Halophyte) 및 미생물의 다양성이 높은 지역으로 알려져 있다[7]. 염습지의 미생물연구는 주로 갯벌의 토양에 대한 연구가 대부분이며[3,11], 최근에는 해안식물 및 염생식물을 이용한 내생진균과 같은 해양성 곰팡이(Marine fungi) 연구가 이루어지고 있다[9,24].

내생진균은 식물호르몬인 GA, IAA, ABA등을 생산하여 식물생장에 영향을 준다고 알려져 있다[4,5,6,9]. 그리고 내생진균은 염분, 고온, 건조 등과 같은 환경조건에 대하여 식물생장의 저항성에 기여하고, 항균효과 및 영양분 습득으로 인한 면역 활성을 가지는 것이 알려져 있다[1,14-16,20].

본 연구에서는 우리나라 해안 염습지에 자생하고 있는 염생식물의 뿌리로부터 형태적으로 다양한 내생진균을 순수 분리하여 동정하였으며, 다양한 염생식물에 따른 내생진균류의 분포 및 다양성을 확인하여 유연관계를 확인하였다.

## 재료 및 방법

## 내생진균 및 식물시료

본 연구에서 사용된 식물시료는 전라남도 무안의 염습지에서 채취하였다. 식물시료는 염습지 자생식물인 해홍나물(*Suaeda maritima*), 갯질경(*Limonium tetragonum*), 칠면초

## \*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5379, Fax : +82-53-955-5379

E-mail : kimjg@knu.ac.kr

(*Suaeda japonica*), 갯잔디(*Zoysia sinica*), 갈대(*Phragmites australis*)이며, 무안 염습지의 다양한 지역에서 염생식물을 채취하였다(Table 1). 그리고 각 염생식물들은 채취지역에 따라 식물코드(plant code)로 분류하여 사용하였다.

#### 배양조건 및 내생진균의 분리

해안 염습지에서 채취한 염생식물 시료의 토양을 제거하고, 계면활성제(Tween 80)를 10 분간 처리한 후에 멸균증류수로 세척하였다. 그리고 과염소산(Perchloric acid) 1%로 10분간 2 회 처리한 후에 멸균증류수로 세척하였으며 3~4 cm 길이로 절단하여 수분을 제거하였다[17]. 내생 진균의 분리와 배양을 위하여 스트렙토마이신(streptomycin) 80 ppm이 함유된 hagem minimal medium을 사용하여 25°C 조건에서 배양하였다[19,21]. 그리고 potato dextrose agar (PDA)에 계대배양하여 순수 분리하였다[8,10,22].

염생식물의 뿌리에서 순수 분리한 내생진균들을 배양하기 위하여 Czapek's liquid medium에서 7일 동안 180 rpm으로 25°C조건하에서 진탕배양(shake culture) 하였으며[9], 여과 후에, 내생진균의 균체(mycobiont)를 균류의 동정을 위하여 7일 동안 동결건조를 수행하여 사용하였다[23].

#### Genomic DNA추출과 PCR 조건

동결건조 상태의 내생진균들은 DNeasy Plant mini kit (QIAgen)를 사용하여 genomic DNA의 추출을 수행하였다[4,9]. Genomic DNA는 universal primer인 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')를 사용하여 rDNA-ITS영역을 증폭하여 수행하였다[9]. 그리고 polymerase chain reaction (PCR) 조건은 최종농도 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTPs, 40 mM KCl이고, 10 pmol의 primer와 0.1 unit의 Ex-Taq DNA polymerase (Takara, Japan)를 사용하였다. PCR 조건은 (95°C, 2min) predenaturation, (95°C, 30 sec) denaturation, (54.5°C, 1 min) annealing, (72°C, 1 min)

extension, (35 cycles) total cycles, (72°C, 7 min) final extension 으로 수행하였고, 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium bromide (EtBr)을 사용하여 15 분 염색한 후, UV transilluminator로 전기영동밴드를 확인하였다[9,22]. 전기영동 단편들은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Germany)를 사용하여 정제하였으며, ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였다. 그리고 DNA 단편들은 ABI 310 DNA sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다[9,22].

#### 내생진균의 계통학적 분석 및 다양성 분석

내생진균의 염기서열을 ClustalX 프로그램으로 다중정렬을 수행한 후, Lasergene 7과 BioEdit 프로그램을 사용하여 염기서열을 확인하였다. 그리고 분석된 내생진균의 계통학적 분석은 MEGA 4.1프로그램 Neighbor-Joining (NJ: 1000 bootstrap replicates) 방법을 이용하여 분석하였다[18]. 그리고 내생진균들의 유전적인 동정을 위하여 rDNA-ITS 영역의 염기서열을 blastn (NCBI) 프로그램으로 분석하였다.

내생진균의 다양성 분석을 위하여 동정된 진균류의 속 (Genus)을 확인하여 Shannon's diversity index (*H'*)를 적용하였고[13], 각 식물에 대한 내생진균의 다양성을 분석 및 확인하였다.

## 결 과

#### 내생진균의 동정 및 계통학적 분석

해안 염습지에 자생하고 있는 9개체의 염생식물로부터 형태적으로 다른 내생진균 90종을 분리하였다. 염생식물 SM으로부터 9종, LT로부터 9종, SJ로부터 7종, SMI으로부터 5종, LTI으로부터 12종, SJI로부터 2종, SMII로부터 18종, ZS로부터 10종, 그리고PA로부터 18종으로 모두 90종을 선별하여 동

Table 1. Geographic coordinates of the native plants in Muan salt marsh

Scientific name <sup>a</sup>	Plant code	Site of collection <sup>b</sup>	Habitat <sup>c</sup>
<i>Suaeda maritima</i>	SM	N 35°04'55.41" / E 126°23'26.09"	Halophytic
<i>Plantago camtschatica</i>	LT	N 35°04'56.44" / E 126°23'23.39"	Halophytic
<i>Suaeda japonica</i>	SJ	N 35°05'48.23" / E 126°20'05.31"	Halophytic
<i>Suaeda maritima</i>	SMI	N 35°05'47.96" / E 126°20'03.99"	Halophytic
<i>Plantago camtschatica</i>	LTI	N 35°05'47.87" / E 126°20'03.33"	Halophytic
<i>Suaeda japonica</i>	SJI	N 35°07'23.71" / E 126°20'24.10"	Halophytic
<i>Suaeda maritima</i>	SMII	N 35°07'24.56" / E 126°20'21.41"	Halophytic
<i>Zoysia sinica</i>	ZS	N 35°07'24.60" / E 126°20'21.41"	Halophytic
<i>Phragmites australis</i>	PA	N 35°07'24.91" / E 126°20'21.43"	Halophytic

<sup>a</sup>Scientific name of native plants in salt marsh

<sup>b</sup>Geographic coordinates of native plants in salt marsh

<sup>c</sup>The habitat of native plants in salt marsh

정을 수행하였으며, GenBANK로부터 accession number를 제공받았다(Table 2).

내생진균 계통군의 분석을 수행하였을 때, SM에서 자낭균문(Ascomycota)에 속하는 Eurotiales목(Order)의 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속, Hypocreales목에 속하는 *Gibberella*속, Glomerellales목에 속하는 *Acremonium*속, Pleosporales목에 속하는 *Phoma*속 그리고 Capnodiales목에 속하는 *Cladosporium*속을 확인하였으며, 담자균문(Basidiomycota)인

Cystofilobasidiales목에 속하는 *Cryptococcus*속이 분석되었다. 염생식물 LT에서는 자낭균문에 속하는 Eurotiales목의 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속 및 *Talaromyces*속이 확인되었고, Pleosporales목에 속하는 *Alternaria*속과 *Paraconiothyrium*속, Capnodiales목에 속하는 *Cladosporium*속의 균류가 분석되었다. SJ에서는 자낭균문에 속하는 Eurotiales목의 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속, Dothideales목의 *Aureobasidium*속, Trichosphaeriales목의 *Nigrospora*가 확인되었다. SMI으로부터

Table 2. The identification of endophytic fungi isolated in this study

Plant code	Fungal isolates	Closest relative based on sequence homology	Similarity (%)	Accession No.
SM	1-M-1-2-1	<i>Aspergillus niger</i> (JN561274)	100	JX040971
	1-M-1-4-1	<i>Gibberella zeae</i> (HQ333204)	100	JX040972
	1-M-2-10-1	<i>Aspergillus</i> sp. Lf357 (HQ000002)	99	JX040973
	1-M-2-6-1	<i>Penicillium minioluteum</i> E3 (GU566240)	99	JX040974
	1-M-2-6-3	<i>Penicillium ochrochloron</i> PO1 (JF303855)	99	JX040975
	1-M-2-8-1	<i>Acremonium implicatum</i> OUCMBI (HQ914932)	99	JX040976
	1-M-2-9-2	<i>Phoma betae</i> 17 (EU594572)	99	JX040977
	1-M-3-3-1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (JQ619815)	100	JX040978
	1-M-3-4-1	<i>Cryptococcus aureus</i> G7a (DQ640764)	99	JX040979
LT	2-M-1-1-1	<i>Penicillium</i> sp. CCF3828 (FJ430753)	99	JX040980
	2-M-1-2-1	<i>Penicillium citrinum</i> SCSAAF0015 (JQ647899)	99	JX040981
	2-M-1-3-2	<i>Aspergillus niger</i> (JN561274)	100	JX040982
	2-M-1-8-1	<i>Penicillium purpurogenum</i> 119 (DQ681328)	97	JX040983
	2-M-1-9-1	<i>Alternaria brassicae</i> (JN108903)	99	JX040984
	2-M-1-9-2	<i>Aspergillus niger</i> CICC 2487 (HQ170509)	100	JX040985
	2-M-2-5-1	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i> (JF439492)	99	JX040986
	2-M-2-9-1	<i>Talaromyces helicus</i> NRRL 2106 (AF033396)	99	JX040987
	2-M-3-4-1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (JQ619815)	100	JX040988
SJ	3-M-1-3-1	<i>Aureobasidium pullulans</i> (GQ911532)	100	JX040989
	3-M-1-6-1	<i>Penicillium</i> sp. TR052 (HQ608086)	99	JX040990
	3-M-2-1-1	<i>Nigrospora</i> sp. ZJ-2008018 (JF694936)	100	JX040991
	3-M-2-4-1	<i>Penicillium brasilianum</i> (AB455514)	99	JX040992
	3-M-2-10-1	<i>Aspergillus terreus</i> (JN634877)	99	JX040993
	3-M-3-3-5	<i>Aureobasidium</i> sp. TMS-2011 (HQ631013)	99	JX040994
	3-M-3-5-1	<i>Aspergillus calidoustus</i> (FR733862)	99	JX040995
SMI	4-M-1-2-2	<i>Macrophoma</i> sp. TXc4-6 (HQ262514)	99	JX040996
	4-M-1-4-1	<i>Macrophoma</i> sp. NBCHE-6 (JQ234977)	99	JX040997
	4-M-2-2-2	<i>Epicoccum sorghi</i> (JN198478)	99	JX040998
	4-M-2-2-3	<i>Penicillium pinophilum</i> CB42 (JQ228239)	99	JX040999
	4-M-3-2-1	<i>Dothideomycetes</i> sp. 11376 (GQ153260)	100	JX041000
LTI	6-M-1-4-1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (JQ417213)	100	JX041001
	6-M-1-4-2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (JF923828)	100	JX041002
	6-M-1-7-1	<i>Aspergillus niger</i> (JN561274)	100	JX041003
	6-M-1-8-1	<i>Penicillium</i> sp. MS-2011-F37 (HE608803)	99	JX041004
	6-M-1-8-2	<i>Penicillium urticae</i> JZ-56 (HQ637345)	99	JX041005
	6-M-1-10-1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (JN084017)	100	JX041006
	6-M-2-5-3	<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 12238 (JQ070071)	99	JX041007
	6-M-2-9-1	<i>Aspergillus clavatus</i> ATCC 1007 (HQ026749)	99	JX041008
	6-M-2-9-2	<i>Penicillium oxalicum</i> SCSAAF0017 (JQ647900)	100	JX041009
	6-M-2-9-3	<i>Aspergillus tubingensis</i> Uf125-1 (JQ693399)	100	JX041010
	6-M-3-1-1	<i>Penicillium</i> sp. 4 JJK-2011 (HM469422)	99	JX041011
6-M-3-3-1	<i>Penicillium</i> sp. LF41 (GU951765)	100	JX041012	

Table 2. Continued.

Plant code	Fungal isolates	Closest relative based on sequence homology	Similarity (%)	Accession No.
SJI	7-M-2-8-1	<i>Aspergillus flavus</i> NIOCC 107 (JQ269826)	100	JX041013
	7-M-2-10-1	<i>Penicillium pinophilum</i> (AB606412)	100	JX041014
SMII	8-M-1-4-1	<i>Aspergillus niger</i> P1AL1b (JN672584)	99	JX041015
	8-M-1-9-1	<i>Penicillium janthinellum</i> (JF311912)	99	JX041016
	8-M-1-9-2	<i>Aspergillus flavus</i> TFR-7 (JQ675308)	100	JX041017
	8-M-2-2-2	<i>Eupenicillium javanicum</i> (U18358)	100	JX041018
	8-M-2-3-2	<i>Pleosporales</i> sp. UM98 (JQ619818)	99	JX041019
	8-M-2-3-3	<i>Cladosporium</i> sp. zzz409 (HQ696079)	100	JX041020
	8-M-2-3-4	<i>Penicillium janthinellum</i> (AJ608945)	99	JX041021
	8-M-2-4-1	<i>Aspergillus niger</i> (JN561274)	99	JX041022
	8-M-2-4-2	<i>Penicillium</i> sp. OY18307 (FJ571475)	99	JX041023
	8-M-2-5-1	<i>Phoma betae</i> 17 (EU594572)	99	JX041024
	8-M-2-6-1	<i>Penicillium</i> sp. MS-2011-F44 (HE608809)	99	JX041025
	8-M-2-7-1	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (FJ765021)	99	JX041026
	8-M-2-8-2	<i>Penicillium herquei</i> CBS 336.48 (JN626101)	100	JX041027
	8-M-2-9-1	<i>Didymella</i> sp. DB 20102009 (GU128503)	99	JX041028
	8-M-3-2-1	<i>Pleosporales</i> sp. DoF24 (JQ388269)	96	JX041029
	8-M-3-3-1	<i>Phoma herbarum</i> (AY864822)	95	JX041030
	8-M-3-4-1	<i>Microsphaeropsis arundinis</i> (JN851034)	100	JX041031
	8-M-3-5-1	<i>Penicillium</i> sp. H20 (GU566283)	100	JX041032
ZS	9-M-1-5-2	<i>Paecilomyces lilacinus</i> MY683 (GU980015)	100	JX041033
	9-M-1-6-1	<i>Aspergillus niger</i> TFR-4 (JQ675305)	100	JX041034
	9-M-2-2-3	<i>Phaeomyces kuwaitiensis</i> (AJ716159)	94	JX041035
	9-M-2-3-1	<i>Pleosporales</i> sp. r011 (HQ649770)	94	JX041036
	9-M-2-8-1	<i>Pleosporales</i> sp. DoF24 (JQ388269)	96	JX041037
	9-M-2-8-4-1	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (FJ765021)	99	JX041038
	9-M-2-8-4-2	<i>Aspergillus tubingensis</i> YMCHA 69 (JF436887)	99	JX041039
	9-M-2-9-2	<i>Purpureocillium lilacinum</i> PAK-1 (FJ765021)	100	JX041040
	9-M-2-10-2	<i>Cephalosporium curtipes</i> (JN089761)	100	JX041041
9-M-3-5-1	<i>Microsphaeropsis arundinis</i> (JN851034)	100	JX041042	
PA	10-B-2-7-1	<i>Aspergillus iizukae</i> (FR733809)	100	JX041043
	10-M-1-1-1	<i>Penicillium brasilianum</i> KUC1433 (HM469396)	100	JX041044
	10-M-1-1-2	<i>Penicillium menonorum</i> NRRL:50410 (HQ646591)	100	JX041045
	10-M-1-6-2	<i>Emericellopsis humicola</i> (GU390691)	100	JX041046
	10-M-1-8-1	<i>Penicillium janthinellum</i> (AJ608945)	99	JX041047
	10-M-1-8-2	<i>Penicillium verruculosum</i> (JN676121)	100	JX041048
	10-M-2-2-1	<i>Phoma</i> sp. P15E4 (JN207289)	99	JX041049
	10-M-2-2-2	<i>Penicillium oxalicum</i> SCSAAF0017 (JQ647900)	100	JX041050
	10-M-2-3-2	<i>Phoma</i> sp. P17E3 (JN207293)	99	JX041051
	10-M-2-4-1	<i>Aspergillus niger</i> 91718 (JN565296)	100	JX041052
	10-M-2-8-4	<i>Gongronella butleri</i> CBS 415.67 (JN942999)	100	JX041053
	10-M-2-9-2	<i>Aspergillus japonicus</i> (JN676110)	100	JX041054
	10-M-2-9-5	<i>Chaetomium piluliferum</i> NRRL 38180 (GU183112)	100	JX041055
	10-M-2-9-6	<i>Aspergillus terreus</i> JAS 1 (JQ361749)	100	JX041056
	10-M-3-2-1	<i>Fusarium</i> sp. NRRL 52796 (JF740934)	100	JX041057
	10-M-3-3-1	<i>Phoma putaminum</i> SCSAAF0022 (JQ647901)	100	JX041058
	10-M-3-3-2	<i>Phoma</i> sp. 27AT1704 (FJ985695)	99	JX041059
10-M-3-4-1	<i>Aspergillus niger</i> (GU951769)	99	JX041060	

Table 3. Diversity index and distribution of endophytic fungi isolated from native plants in Muan salt marsh

Fungal taxonomic	SM	LT	SJ	SMI	LTI	SJI	SMII	ZS	PA	Total
<i>Acremonium</i>	1									1
<i>Alternaria</i>		1								1
<i>Aspergillus</i>	2	2	2		4	1	3	2	5	21
<i>Aureobasidium</i>			2							2
<i>Cephalosporium</i>								1		1
<i>Chaetomium</i>									1	1
<i>Cladosporium</i>	1	1			1		1			4
<i>Colletotrichum</i>					2					2
<i>Cryptococcus</i>	1									1
<i>Didymella</i>							1			1
<i>Dothideomycete</i>				1						1
<i>Emericellopsis</i>									1	1
<i>Epicoccum</i>				1						1
<i>Eupenicillium</i>							1			1
<i>Fusarium</i>									1	1
<i>Gibberella</i>	1									1
<i>Gongronella</i>									1	1
<i>Macrophoma</i>				2						2
<i>Microsphaeropsis</i>							1	1		2
<i>Nigrospora</i>			1							1
<i>Paecilomyces</i>								1		2
<i>Paraconiothyrium</i>		1								1
<i>Penicillium</i>	2	3	2	1	5	1	6		4	24
<i>Phaeomyces</i>								1		1
<i>Phoma</i>	1						2		4	7
<i>Pleosporales</i>							2	2		4
<i>Purpureocillium</i>							1	2		2
<i>Talaromyces</i>		1								1
Total	9	9	7	5	12	2	18	10	18	90
Shannon's diversity index	1.8892	1.6770	1.3518	1.3322	1.2367	0.6931	1.9560	1.8867	1.6882	

터는 자낭균문의 Eurotiales목인 *Penicillium*속, Dothideales목의 *Dothideomyces*속 및 분류체계가 명확하지 않은 *Epicoccum*속과 *Macrophoma*속이 확인되었다. LTI로부터는 자낭균문에 속하는 Eurotiales목인 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속, Capnodiales목에 속하는 *Cladosporium*속, Glomerellales목의 *Colletotrichum*속이 확인되었다. SJI로부터는 자낭균문에 속하는 Eurotiales목인 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속이 확인되었다. SMII로부터는 자낭균문에 속하는 Eurotiales목인 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속 및 *Eupenicillium*속, Capnodiales목의 *Cladosporium*속, Hypocreales목인 *Purpureocillium*속, Pleosporales목에 속하는 *Didymella*속과 *Pleosporales*속 및 *Phoma*속이 확인되었으며, 분류체계가 명확하지 않은 *Microsphaeropsis*속이 확인되었다. ZS로부터는 Eurotiales목인 *Aspergillus*속, Hypocreales목에 속하는 *Paecilomyces*속과 *Purpureocillium*속, Pleosporales목에 속하는 *Pleosporales*속 및 분류체계가 명확하지 않은 *Microsphaeropsis*속이 확인되었다. 그리고 PA로부터는 자낭균문의 Eurotiales목에 속하는

*Aspergillus*속과 *Penicillium*속, Hypocreales목인 *Emericellopsis*속과 *Fusarium*속, Pleosporales목에 속하는 *Phoma*속, Sordariales목의 *Chaetomium*속과 그리고 털곰팡리아문 (Mucoromycotina; Subphylum)에 속하는 Mucorales목의 *Gongronella*속이 확인되었다. 본 연구에서 분리 동정된 내생진균의 유연관계를 확인하기 위하여 계통수를 작성하였다(Fig. 1).

염생식물의 내생진균 다양성분석

내생진균의 유전학적 다양성을 확인하기 위하여 Shannon's diversity index를 확인하였다. 분리된 모든 내생진균은 SM에서 7속 9종, LT에서 6속 7종, SJ에서는 4속 5종, SMI에서는 4속 3종, LTI에서는 4속 9종, SJI에서는 2속 2종, SMII에서는 9속 10종, ZS에서는 7속 8종, 그리고 PA에서는 7속 14종이 확인되었으며, 분리된 내생진균류들의 목과 속으로 분류하여 각 구성비(%)를 나타내었다(Fig. 2). 그리고 염생식물에 따른 내생진균의 다양성 지수는 SM (1.8892), LT (1.6770), SJ (1.3518), SMI (1.3322), LTI (1.2367), SJI (0.6931),

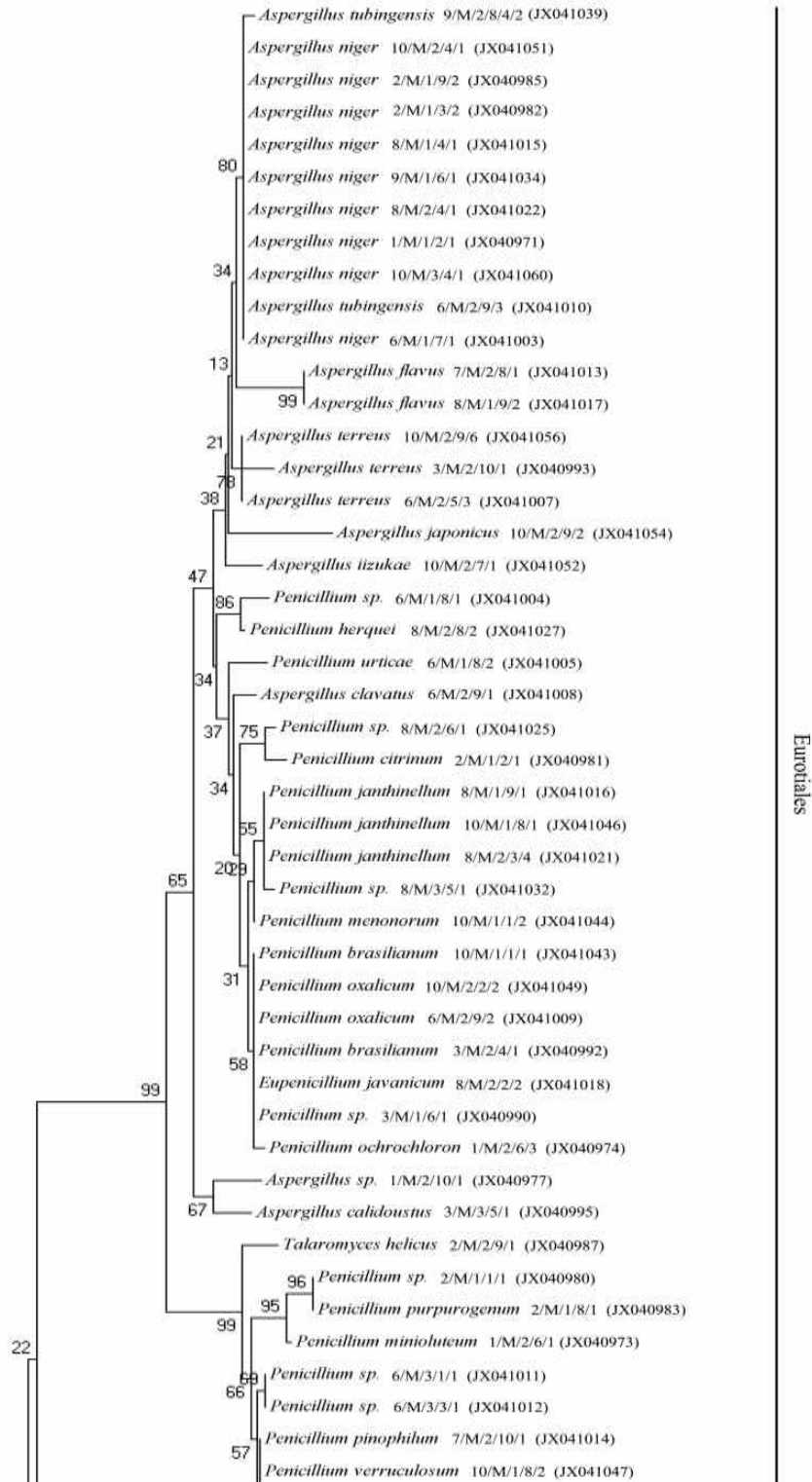


Fig. 1. Phylogenetic analysis of endophytic fungi using rDNA-ITS sequences. A phylogenetic tree was constructed using 90 taxa with NJ (1000 bootstrap replications). Phylogenetic tree showed that all isolated endophytic fungi belong to the phylum and Order. *Chytridium lagenaria* belonging to the chytridiomycota was used as the outgroup for rooting the phylogenetic analysis.

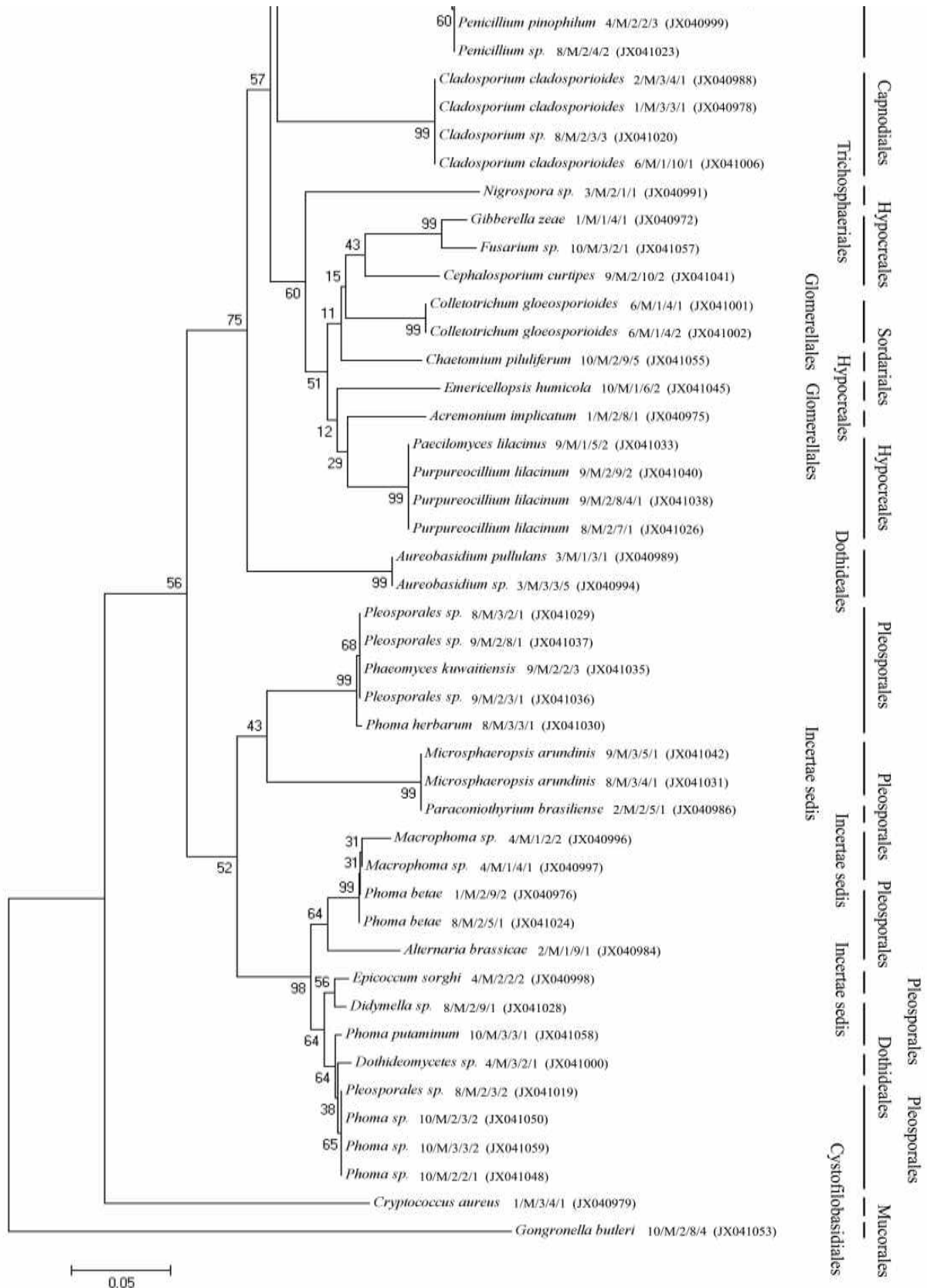
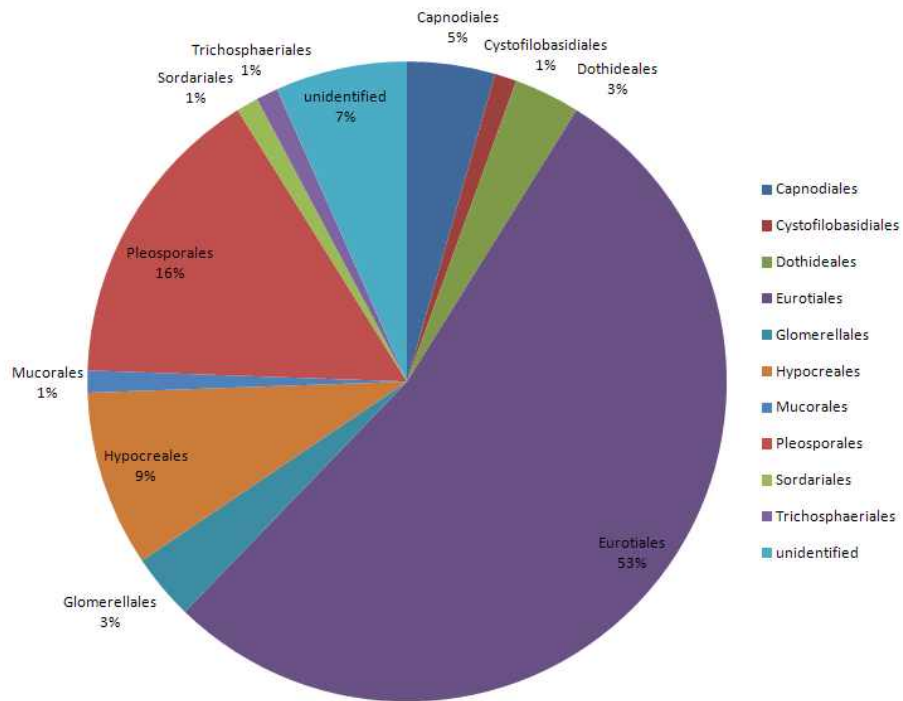


Fig. 1. Continued.

A)



B)

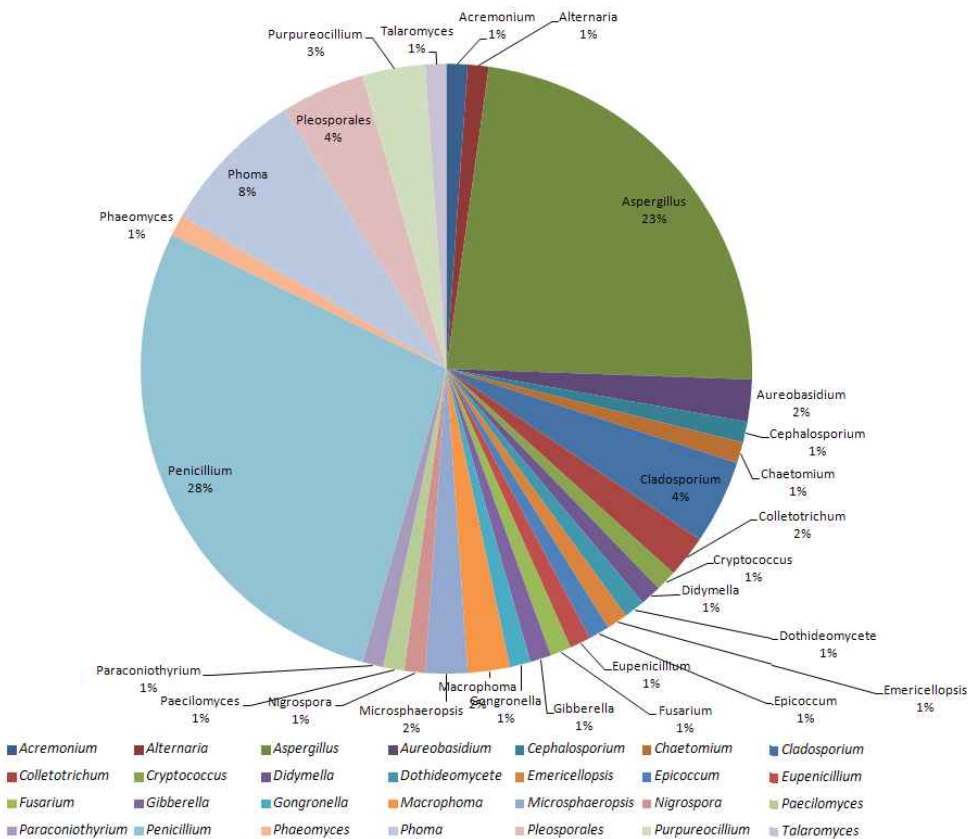


Fig. 2. Composition of all isolated endophytic fungi. The graph expressed that all isolated endophytic fungi belong to the genus (%). A) Fungal taxonomic (Order), B) Fungal taxonomic (Genus)



SMII (1.9560), ZS (1.8867), 그리고 PA (1.6882)로 확인되었다 (Table 3).

### 고찰

본 연구에서는 무안갯벌에 자생하고 있는 염생식물과 공생하고 있는 내생진균류를 분리 동정하여 균주들간의 계통분석을 확인하였고, 염생식물 9개체에 따른 내생진균류의 다양성 및 다양성지수를 확인하였다. 그리고 내생진균류는 자낭균문의 Capnodiales목, Dothideales목, Eurotiales목, Glomerellales목, Hypocreales목, Pleosporales목, Sordariales목, Trichosphaeriales목에 속하는 다양한 목의 내생진균류들이 분포하는 것을 확인 할 수 있었고, 담자균문에 속하는 Cystofilobasidiales목과 털곰팡리아문에 속하는 Mucorales목에 속하는 내생진균류 및 모두 10목에 해당하는 것을 확인하였다. 그리고 내생진균류 중에서 분류체계가 명확하지 않은 *Epicoccum*속, *Macrophoma*속, *Microsphaeropsis*속 그리고 *Phaeomyces*속이 확인되었다. 다양성 지수는 염생식물들 중에서 SMII로부터 분리된 내생진균의 다양성 지수가 1.9560으로 가장 높은 수치를 나타내었고, SJI으로부터 분리된 내생진균의 다양성 지수는 0.6931으로 가장 낮은 수치를 나타내었다. 그래서 SMII에서의 내생진균류 다양성이 가장 높은 것으로 생각된다.

고창갯벌에 자생하는 염생식물의 내생진균류 연구와 비교하였을 때[23], 자낭균문 Eurotiales의 분포비율이 가장 높고, Pleosporales목, Hypocreales목, Glomerellales목, Sordariales목 순으로 나타나는 분포는 유사하였고, 분류체계가 명확하지 않은 Incertae sedis (unidentified)에 포함되는 내생진균류의 분포비율 또한 유사하였다. 그리고 고창갯벌 연구에서는 Xylariales목이 출현하였고, 본 연구에서는 Cystofilobasidiales목, Dothideales목, Mucorales목, Trichosphaeriales목에 해당하는 내생진균류가 확인되었다. 그리고 염생식물의 속 수준에서 비교분석을 하였을 때, 고창갯벌 SJ에서는 *Pleosporales*속, *Coniothyrium*속, *Pseudozyma*속, *Cladosporium*속, *Talaromyces*속, *Gibberella*속 그리고 *Fusarium*속이 확인되었으며, 무안갯벌 SJ에서는 *Aureobasidium*속, *Nigrospora*속이 나타나는 것을 확인하였다. 염생식물 SM에서는 *Alternaria*속, *Pleosporales*속이 고창갯벌 에서 확인되었고, *Aspergillus*속, *Gibberella* 속, *Acremonium* 속, *Phoma* 속, *Cladosporium* 속, *Cryptococcus* 속, *Macrophoma* 속, *Epicoccum* 속, 그리고 *Dothideomycetes* 속이 확인되었다. 염생식물 LT에서는 *Dothideomycete*속, *Pestalotiopsis*속, *Fusarium* 속, *Chaetomium*속이 고창갯벌에서 확인되었고, 무안갯벌에서는 *Aspergillus*속, *Talaromyces* 속, *Cladosporium*속, 그리고 *Paraconiothyrium* 속이 확인되었다. 그리고 PA에서는 *Macrophoma* 속, *Colletotrichum* 속, *Phaeosphaeria* 속, *Gibberella* 속, *Termitomyces*속이 확인 되었고, 무안갯벌에서는

*Emericellopsis* 속, *Gongronella* 속, 그리고 *Chaetomium*속이 확인되었다. 고창갯벌과 무안갯벌에 자생하는 염생식물에 따른 내생진균류의 차이점은 조금씩 나타났고, 자낭균문인 *Penicillium*속에 포함되는 균류들이 공통적으로 많은 것을 확인하였으며, 고창갯벌에서는 *Fusarium*속 균류가 그 다음으로 빈도가 높았지만, 무안갯벌에서는 *Aspergillus*속에 포함되는 균류의 분포빈도가 높았다. 두 지역에 자생하는 내생진균류에 대하여 비교분석을 하였을 때, 비슷한 균류들이 공통적으로 확인이 되었지만, 지리적으로 환경적인 차이에 의하여 조금씩 다른 균류들이 확인되었고, 이들 균류들은 다양성지수 빈도에 대하여 영향을 준 것으로 생각된다[23].

본 연구에서는 우리나라 무안갯벌에 자생하는 염생식물과 공생하는 내생진균류의 분포 및 다양성을 확인하였고, 본 연구를 토대로 다른 응용 연구 및 분류체계가 명확하지 않은 내생진균류의 연구가 필요할 것이며, 염 농도가 높은 환경을 가지는 염습지의 자생 균류자원연구에 기초자료가 되고자 한다.

### 감사의 글

본 연구는 국립생물자원관 “자생 미생물자원 배양체 확보 및 최적 배양기법 연구” 으로부터 지원받은 연구이며, 연구비 지원에 감사를 드립니다.

### References

1. Arnold, E. A., Mejia, L. C., Kylo, D., Rojas, E., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E. A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 15649-15654.
2. Chapman, V. J. 1974. Salt Marshes and Salt Deserts of the World. In *Ecology of Halophytes*. pp. 3-22, Academic Press, New York.
3. Gomes, N. C. M., Cleary, D. F. R., Pinto, F. N., Egas, C., Almeida, A., Cunha, A., Mendonça-Hagler, L. C. S. and Smalla, K. 2010. Taking root: enduring effect of rhizosphere bacterial colonization in mangroves. *PLoS ONE* **5**, e14065.
4. Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, M. A., Khan, A. L., Kang, S. M., Kim, S. K., Joo, G. J. and Lee, I. J. 2009. Gibberellin production by pure cultures of a new strain of *Aspergillus fumigatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1785-1792.
5. Khan, A. L., Hamayun, M., Ahmad, N., Hussain, J., Kang, S. M., Kim, Y. H., Adnan, M. D., Tang, S., Waqas, M., Radhakrishnan, R., Hwang, Y. H. and Lee, I. J. 2011. Salinity Stress Resistance Offered by Endophytic Fungal Interaction Between *Penicillium minioluteum* LHL09 and Glycine max. *L. J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 893-902.
6. Khan, A. L., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., Jung, H. Y., Lee, J. H. and Lee, I. J. 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of

- Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiol.* **12**, 3.
7. Kim, B. S., Oh, H. M., Kang, H., Park, S. and Chun, J. 2004. Remarkable bacterial diversity in the tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 205-211.
  8. Khan, S. A., Hamayun, M., Rim, S. O., Lee, I. J., Seu, J. C., Choo, Y. S., Jin, I. N., Kim, S. D., Lee, I. K. and Kim, J. G. 2008. Isolation of endophytic fungi capable of plant growth promotion from monocots inhibited in the coastal sand dunes of Korea. *J. Life Sci.* **18**, 1355-1359.
  9. Khan, S. A., Hamayun, M., Kim, H. Y., Yoon, H. J., Lee, I. J. and Kim, J. G. 2009. Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 829-833.
  10. Kil, Y. J., Eo, J. K. and Eom, A. H. 2009. Molecular identification and diversity of endophytic fungi isolated from *Pinus densiflora* in Boeun, Korea. *Korean J. Mycol.* **37**, 130-133.
  11. Mohamed, D. J. and Martiny, J. B. 2011. Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient. *ISME J.* **5**, 379-88.
  12. Park, K. H. and Lee, H. K. 2006. Establishment of the wetland ecosystem information system based on Web-GIS in Gyeongnam region. *J. Environ. Res.* **6**, 99-103.
  13. Pielou, E. C. 1975. Ecological diversity. p 165. John Wiley, New York.
  14. Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J. and Henson, J. M. 2002. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. *Science* **298**, 1581.
  15. Rodriguez, R. J., Redman, R. S. and Henson, J. M. 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* **9**, 261-272.
  16. Rodriguez, R. J., Henson, J., Van, V. E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y. and Redman, R. S. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J.* **2**, 404-416.
  17. Seo, S. T., Kim, K. H., Kim, M. J., Hong, J. S., Park, J. H. and Shin, S. C. 2009. Diversity of fungal endophytes from *Pinus koraiensis* leaves in Korea. *Korean J. Mycol.* **37**, 108-110.
  18. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* **24**, 1596-1599.
  19. Vazquez M. M., Cesar, S., Azcon, R. and Barea, J. M. 2000. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* **15**, 261-272.
  20. Waller, F., Achatz, B., Baltruscha, T. H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D. V., Franken, P. and Kogel, K. H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to saltstress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13386-13391.
  21. Yamada, A., Takeo, O., Yosuke, D. and Masatake, O. 2001. Isolation of *Tricholoma matsutake* and *T. bakamatsutake* cultures from field-collected ectomycorrhizas. *Mycoscience* **42**, 43-50.
  22. You, Y. H., Yoon, H., Lee, G. S., Woo, J. R., Shin, J. H., Lee, I. J., Rim, S. O., Choo, Y. S. and Kim, J. G. 2011. Diversity and plant growth-promotion of endophytic fungi isolated from the roots of plants in Dokdo islands. *J. Life Sci.* **21**, 992-996.
  23. You, Y. H., Yoon, Woo, J. R. Seo, Y., Kim, M. Lee, G. and Kim, J. G. 2012. Diversity of endophytic fungi from the roots of halophytes growing in go-chang salt marsh. *Korean J. Mycol.* **40**, 86-92.
  24. Zhang, X. Y., Bao, J. G., Wang, H., He, F., Xu, X. Y. and Qi, S. H. 2012. Diversity and Antimicrobial activity of culturable fungi isolated from six species of the South China sea gorgonians. *Microbiol. Ecol.* In press. DOI 10.1007/s00248-012-0050-x.

초록 : 무안 염습지에 자생하는 염생식물(halophyte)의 뿌리로부터 분리된 내생진균(endophytic fungi)의 유전학적 다양성

유영현<sup>1</sup> · 윤혁준<sup>1</sup> · 서영교<sup>1</sup> · 김미애<sup>1</sup> · 강명석<sup>2</sup> · 김창무<sup>2</sup> · 하상철<sup>3</sup> · 조가연<sup>2</sup> · 김종국<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>경북대학교 생명과학부, <sup>2</sup>국립생물자원관 미생물자원과, <sup>3</sup>대구미래대학교 제과테코레이션과)

90종의 내생진균(endophytic fungi)은 염습지에 자생하고 있는 염생식물(halophyte)의 뿌리에서 분리하였다. 자생식물 샘플은 해홍나물, 갯질경, 칠면초, 갯잔디, 갈대가 염습지로부터 분리하였다. 그리고 분리된 내생진균들은 ITS1, 5.8S와 ITS2를 포함하는 ITS-rDNA 영역에 의해 분석하였다. 다양한 내생진균은 Capnodiales (4.44%), Cystofilobasidiales (1.11%), Dothideales (3.33%), Eurotiales (53.33%), Glomerellales (3.33%), Hypocreales (8.89%), Mucorales (1.11%), Pleosporales (15.56%), Sordariales (1.11%), Trichosphaeriales (1.11%), unidentified (6.67%) 등 10종류 목에 속하는 것이 확인되었다. 90종의 내생진균은 속(genus)단계에서 *Acremonium*속, *Alternaria*속, *Aspergillus*속, *Aureobasidium*속, *Cephalosporium*속, *Chaetomium*속, *Cladosporium*속, *Colletotrichum*속, *Cryptococcus*속, *Didymella*속, *Dothideomycete*속, *Emericellopsis*속, *Epicoccum*속, *Eupenicillium*속, *Fusarium*속, *Gibberella*속, *Gongronella*속, *Macrophoma*속, *Microsphaeropsis*속, *Nigrospora*속, *Paecilomyce*속, *Paraconiothyrium*속, *Penicillium*속, *Phaeomyces*속, *Phoma*속, *Pleosporales*속, *Purpureocillium*속, 그리고 *Talaromyces*속으로 모두 28속이 확인되었다. 그리고 동정된 모든 내생진균은 Eurotiales목의 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속이 가장 많이 분포하고 있는 것이 확인되었다.