

생강나무(*Lindera obtusiloba*)의 잎에서 분리한 내생균의 다양성

김창균 · 어주경¹ · 엄안흠*

한국고원대학교 생물교육과
¹서울대학교 산림과학부

Diversity of Foliar Endophytic Fungi Isolated from *Lindera obtusiloba* in Korea

Chang-Kyun Kim, Ju-Kyeong Eo¹ and Ahn-Heum Eom*

Department of Biology Education, Korea National University of Education, Chungbuk 363-791, Korea

¹Department of Forest Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received 13, September 2012., Revised 17, September 2012., Accepted 19, September Month 2012)

ABSTRACT: Leaves of *Lindera obtusiloba* were collected from four sites in Gangwon Province, Korea. Endophytic fungi were isolated from the leaves and identified using ITS sequences of rDNA. Total twelve species belonging of endophytic fungi were identified; *Alternaria alternata*, *Annulohyphoxylon annulatum*, *Creosphaeria sassafras*, *Diaporthe eres*, *Discosia* sp., *Epicoccum nigrum*, *Glomerella acutata*, *Glomerella cingulata*, *Paraconiothyrium brasiliense*, *Pestalotiopsis neglecta*, *Phomopsis amygdali*, *Xylaria* sp. The endophytic fungus, *Phomopsis amygdali*, was the most dominant species isolated from *L. obtusiloba* in this study and the fungal diversities varied in the different sites.

KEYWORDS: Endophytes, *Lindera obtusiloba*, *Phomopsis amygdali*, Species diversity

서 론

녹나무과(Lauraceae Juss.)에 속하는 생강나무속(*Lindera* Thunb.) 식물들은 주로 북반구의 열대지역에서부터 온대 지역에 걸쳐 분포하고 있다. 약 100여종이 있는 것으로 파악되나, 우리나라에는 이에 속하는 식물은 4종이 알려져 있다. 그 중 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)는 온대지역에 서식하는 수종으로서 주로 한국과 중국 그리고 일본에 널리 분포하고 있다(Park, 2005). 대체로 산의 양지나 바위틈의 건조지뿐만 아니라 음지에서도 잘 생장하는 식물로 특유의 방향성 성분인 monoterpenoid와 sesquiterpenoid를 가지고 있으며 이들 성분에 대한 산업적 이용과 함께 정유의 성분과 화학조성에 대한 연구가 계속적으로 이루어지고 있다(Kwon *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2011). 뿐만 아니라 생강나무는 북통이나 해열 그리고 차의 대용품으로 사용되기도 하였으며, 열매의 기름은 두발용이나 등화용으로 사용되어 왔으며, 현재에도 생강나무 추출물에 대한 항산화와 항균 작용 그리고 염증반응 억제 등에 대한 응용 연구가 이루어지고 있다(Hwang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009).

내생균(Endophytic fungi)은 주로 식물의 잎이나 줄기 등

에 서식하며 비병원성을 나타내는 균을 의미한다(Carroll, 1988). 내생균에 대한 연구는 주로 방목지역의 초지에 대한 연구에서 시작되어, 주로 초본 식물에 대한 연구가 북미와 유럽에서 다양하게 이루어졌다(Burpee and Bouton, 1993; Clay, 1990). 오늘날에는 이들 식물체에 대한 내생균의 보호 기작, 병원균 억제 등에 대한 결과를 토대로 난등과 같은 희귀성과 원예적 가치를 지니고 있는 식물뿐만 아니라 침엽수와 열대 상록성 식물에 이르기까지 다양한 관점에서 내생균에 대한 연구가 진행되고 있다(Arnold *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2005; Rubini *et al.*, 2005). 내생균이 생산하는 2차 산물에 대한 관심이 고조되고 있으며, 주목과 공생하는 내생균의 일종인 *Gliocladium* sp.에서 항암물질인 Taxol도 발견되어 산업적인 응용 가능성에 고무되고 있다(Srekanth *et al.*, 2011). 따라서 숙주식물과 내생균 간의 공진화와 유전자의 전이 등에 대한 연구와 함께 생물자원화에 대한 새로운 관점으로 내생균에 대한 연구가 이루어지고 있으나, 국내에서는 다양한 식물에 공생하는 내생균에 대한 연구가 부족한 실정이다(Kil *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009). 따라서 본 연구에서는 다양한 식물 중에 대한 내생균 탐색의 일환으로 우리나라에 널리 분포하고 있는 생강나무에 공생하고 있는 내생균을 분리하고 동정하여 다양성을 파악하고자 한다.

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

재료 및 방법

시료채집

강원도의 영서지역인 어답산과 좌방산 그리고 영동지역인 죽변산과 칠성산 등 총 4개의 산에서 생강나무의 병증이 없는 건강한 잎을 채집하였다(Fig. 1). 각 지역 산림에서 외관상 건강한 생강나무를 3개체씩 선별한 다음, 각각의 개체에서 3개씩 잎을 채취하여 냉장 보관하여 균 분리에 사용하였다.

균 분리

채집된 생강나무의 잎은 48시간 이내에 균 분리 과정을 진행하였다. 모든 잎은 표면에 있는 이물질들을 제거하기 위해서 흐르는 물로 세척한 다음, 1% NaOCl에 3분, 70% 에탄올수용액에 2분간 처리하고 멸균수로 2회 세척하는 표면 살균과정을 수행하였다(Arnold *et al.*, 2001). 표면 살균된 잎은 12 개의 조각(10 × 10 mm)으로 절단한 뒤에

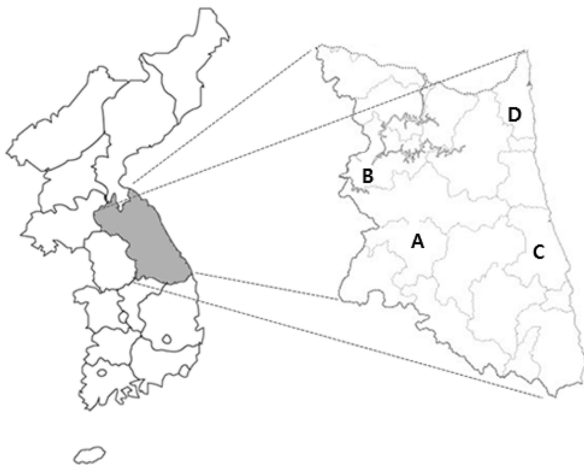


Fig. 1. Sampling sites of leaves of *L. obtusiloba* in Gangwon province, Korea. (A, Mt. Eodap; B, Mt. Jwabang; C, Mt. Chilseong; D, Mt. Jukbyun) .

potato dextrose agar (PDA), malt extract agar(MEA), water agar(WA) 에 각각 4개의 절편씩 치상하여 25°C 의 암실에서 배양하였다. 배양하는 동안에 잎 절편에서 균사가 형성되어 나오면 균사 조각을 잘라 새로운 PDA 배지로 옮겨 계대 배양함으로써 내생균을 순수분리 하였다.

DNA 추출과 유전자 증폭

순수 분리되어 배양된 내생균은 DNeasy plant mini kit (GeneAll, Korea)의 방법에 따라 내생균의 균사에서 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 균특이적인 primer ITS1F와 ITS4를 사용하여 ITS영역을 포함하는 rDNA를 선택적으로 증폭시켰다(Gardes and Bruns, 1993). 반응에 사용된 primer들은 사용 전에 모두 10pmol의 농도로 조정하여 사용하였으며, primer ITS1F와 ITS4를 각각 1 µl, 주형 DNA 1 µl, 멸균수 7 µl, 2X Taq Premix (SolGent, Korea) 10 µl를 넣어 최종 반응용량을 20 µL로 맞추었다. 반응조건으로는 94°C에서 5분간 predenaturation 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation을 1 cycle로 하여 총 30회를 진행하였으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 증폭된 산물을 안정화시켜 4°C에서 보관하였다. 증폭된 산물은 RedSafe™ nucleic acid staining solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가한 1.5%(w/v) agarose gel에 1 µl씩 loading하여 100 V로 20분간 전기영동한 뒤에 UV transilluminator 상에서 밴드를 확인하였다.

염기서열 분석

분석된 염기서열은 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.gov>) 에서 BLAST 프로그램을 이용하여 종을 확인하였다. 계통수 작성은 bootstrap을 1000번 반복으로 설정하고, *Spathularia flavida*를 outgroup으로 사용하여 나타내었다(Kil *et al.*, 2009).

Table 1. The closest taxa for ITS sequences of rDNA of endophytic fungi isolated from *L. obtusiloba*

Isolates	The Closest Taxa	Similarity	Accession NO.
11A003	<i>Alternaria alternata</i>	599/599(100%)	FJ228163
11A006	<i>Annulohyphoxylon annulatum</i>	633/636(99%)	FJ481153
11A012	<i>Glomerella acutata</i>	584/591(99%)	AJ301905
11A001	<i>Glomerella cingulata</i>	566/570(99%)	HM575266
11A009	<i>Creosphaeria sassafras</i>	559/562(99%)	JF502457
11A005	<i>Diaporthe eres</i>	574/582(99%)	HQ533144
11A010	<i>Discosia</i> sp.	546/546(100%)	AB594788
11A002	<i>Epicoccum nigrum</i>	528/533(99%)	HQ728258
11A004	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	587/592(99%)	JF439492
11A008	<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	600/604(99%)	EF055215
11A007	<i>Phomopsis amygdali</i>	585/592(99%)	AF102998
11A011	<i>Xylaria</i> sp.	552/553(99%)	HM595549

결과 및 고찰

총 15개체의 생강나무 잎으로부터 총 59개의 균주를 분

리하여 ITS지역의 염기서열을 이용하여 동정한 결과 총 12종이 확인되었다(Table 1; Fig. 2). *Phomopsis amygdali* 는 모든 지역의 생강나무에서 발견되었고 어답산을 제외

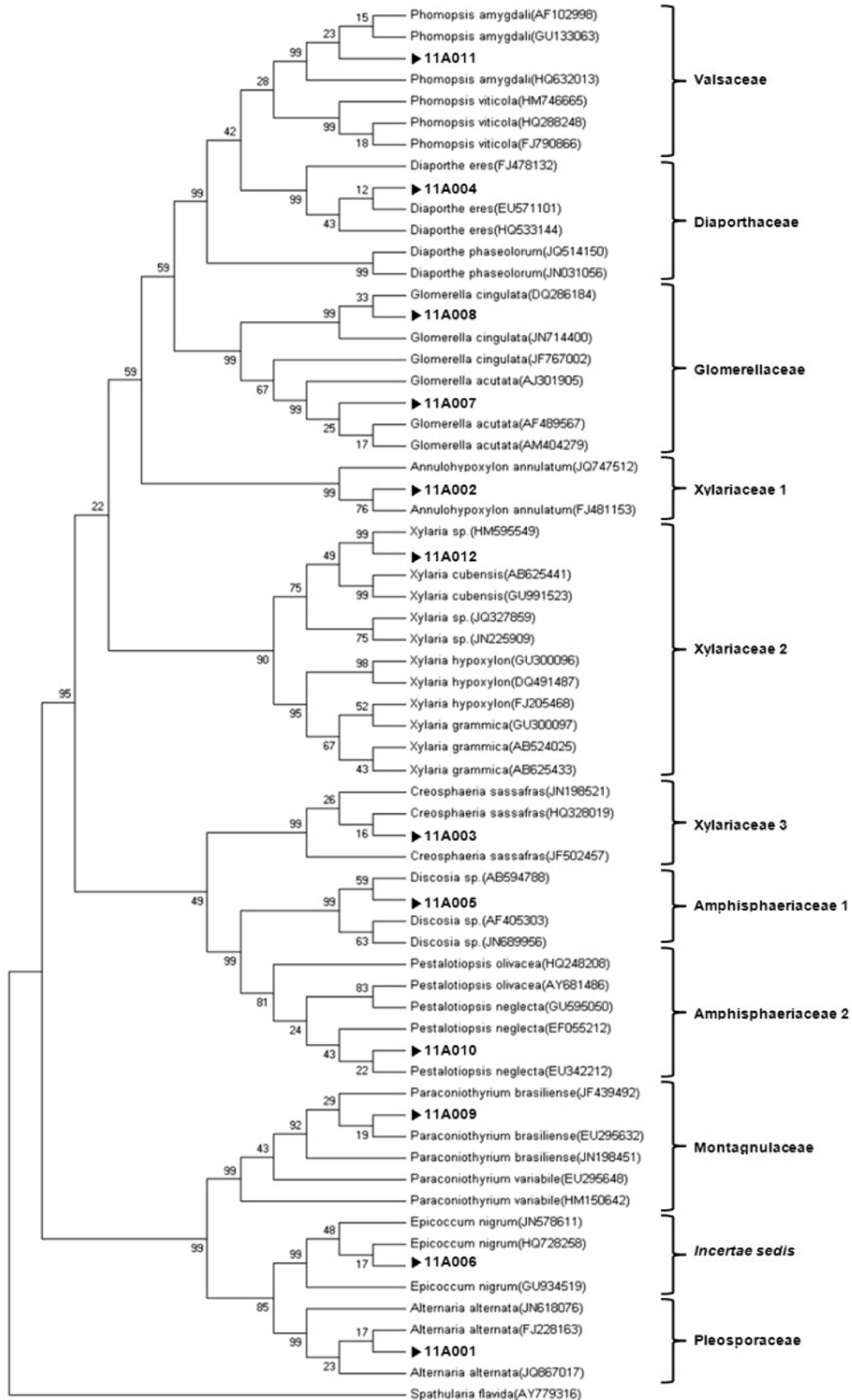


Fig. 2. Phylogenetic tree of foliar endophytic fungi isolated from *L. obtusiloba* using ITS rDNA sequences in this study. Numbers in bold indicate the isolate numbers in Table 1.

Table 2. Isolate numbers of endophytic fungi from *L. obtusiloba* according to the sampling sites

Endophytic fungi	Mt.	Mt.	Mt.	Mt.
	Eodap	Jwabang	Jukbyun	Chilseong
<i>Alternaria alternata</i>	4			
<i>Annulohyphoxylon annulatum</i>		1		
<i>Glomerella acutata</i>			4	1
<i>Glomerella cingulata</i>		1		
<i>Creosphaeria sassafras</i>	1			
<i>Diaporthe eres</i>		3	5	
<i>Discosia</i> sp.	1		2	
<i>Epicoccum nigrum</i>		1		
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>			1	
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	1			
<i>Phomopsis amygdali</i>	1	10	14	7
<i>Xylaria</i> sp.	1			

한 세 지역의 생강나무잎에서 우점하는 내생균 종으로 나타났다(Table 2). 일반적으로 *Phomopsis*속을 포함하여 *Colletotrichum*, *Phyllostica*, *Xylaria* 등의 속에 속하는 균은 부생균으로 보고된 적은 없으며 일반적으로 식물의 잎에 우점하는 내생균으로 알려져 있다(Photita *et al.*, 2005; Wong and Hyde, 2001). 그러나 *Xylaria*속에 속하는 균은 어답산에서 한 개의 균주만이 분리되었으며, *Colletotrichum*과 *Phyllostica*에 속하는 균은 분리되지 않았다. *Glomerella cingulata*는 일반적으로 과일이나 채소의 탄저병에 원인으로 알려져 있으며(Kwon *et al.*, 2002), *Pestalotiopsis neglecta*는 향나무류와 옥수수 등에서는 잎마름병 등을 유발하는 것으로 보고되고 있으나, 나한송과(Podocarpaceae), 차나무과(Theaceae), 주목과(Taxaceae) 등에서 일반적으로 발견되는 내생균으로 알려져 있다(Wei *et al.*, 2007).

이와 같은 내생균이 숙주식물에 대한 영향에 관한 연구는 많이 이루어지고 있는데, 일반적으로 초식이나 가뭄, 질병에 대한 저항성 식물생장효과 등에 대한 연구가 이루어져 왔다. 본 연구에서 생강나무에서 분리된 내생균 중 많은 종들이 다른 식물에서는 병원균이나 부후균으로 알려진 균인데, 이는 내생균이 숙주에 따라 다른 역할을 한다고 볼 수 있으며, 이 경우 다른 식물에서와는 달리 생강나무에서는 상리공생의 역할을 할 수 있다. 또는 아직 병원성이 유발되기 전단계인 상태라고도 생각할 수 있으며(Wei *et al.*, 2007), 병원성이 유발되었으나 숙주식물에 의해 억제되고 있는 상태라고도 가정할 수 있다. 또한 동일한 종이지만 다른 계통 즉, 병원성과 비병원성의 계통이 있을 수도 있다. 따라서 이를 검증하기 위해서 분리한 균주를 생강나무에 접종하여 관찰하는 연구가 필요하며 분리된 내생균의 분류 및 생태에 대한 연구와 더불어 이러한 생강나무에서 내생균의 역할에 대한 후속 연구가 진행

Table 3. Number of isolates of endophytic fungi from *L. obtusiloba* according to the culture medium

Endophytic fungi	Culture medium		
	PDA	MEA	WA
<i>Alternaria alternata</i>		2	3
<i>Annulohyphoxylon annulatum</i>	1		
<i>Glomerella acutata</i>		1	
<i>Glomerella cingulata</i>	4		3
<i>Creosphaeria sassafras</i>			3
<i>Diaporthe eres</i>		1	
<i>Discosia</i> sp.	2	2	2
<i>Epicoccum nigrum</i>		3	
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	1		
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	1		
<i>Phomopsis amygdali</i>	7	12	13
<i>Xylaria</i> sp.		1	

되어야 할 것이다.

지역적으로는 어답산에서 6종의 내생균이 분리되었으며, 좌방산과 죽변산에서 각각 5종, 그리고 칠성산에서 2종의 내생균을 분리할 수 있었다(Table 2). 영서지역인 어답산과 좌방산에서는 총 10종, 평균 5종의 내생균을 분리할 수 있었으나 영동지역인 죽변산과 칠성산에서는 총 5종, 평균 3.5종의 내생균을 분리하였다. 따라서 전체적으로 영서지방의 생강나무에서 영동지역보다 다양한 내생균을 분리할 수 있었다. 숙주식물의 종과 성숙도뿐만 아니라 강우량, 온도, 습도와 같은 환경요인도 잎에 서식하는 내생균의 다양성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Chareprasert *et al.*, 2006). 본 연구에서는 강원도의 영동과 영서지역에서 두 개의 산을 선택하여 시료를 채취하였는데 기후 요인에 있어서 영동과 영서 지역은 평균 온도 및 강수량에 있어 큰 차이를 보이며 이러한 환경적 차이는 본 연구에서 나타난 지역 간 다양성의 차이를 어느 정도 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

또한 본 연구에서는 3개의 서로 다른 배지에서 균 분리를 수행하였다. 총 12종의 내생균이 분리되었으나 각각의 배지에서는 최소 5개에서 최대 7개의 균주가 분리되었다(Table 3). 모든 배지에서 분리된 내생균은 *Glomerella acutata*, *P. amygdali* 로 2종이 확인되었다. PDA배지에서만 분리된 내생균은 *Annulohyphoxylon annulatum*, *Paraconiothyrium brasiliense*, *P. neglecta* 로 3종이며, MEA배지에서는 *G. cingulata*, *Creosphaeria sassafras*, *Epicoccum nigrum*, *Xylaria* sp. 이 분리되었다. 내생균에 대한 연구는 균의 분리방법에 의존적인데 잎의 표면살균 방법과 사용배지가 균의 분리에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Hyde and Soyong, 2008). 숙주 식물과 조직의 종류에 따라 내생균의 분리에 효과적인 살균 방법과 처리시간을 결정하여야 한다. 또한 일반적으로 사용하는 배지에서는 배양할 수 없는 균들이 존재하며 많은 내생균

들은 성장이 느려 배양에 어려움이 있다. 따라서 내생균의 배양을 위해서는 다양한 배지를 사용하고, 잎에 서식하는 내생균의 다양성의 확인을 위해서는 클로닝, tRFLP, DGGE 등과 같이 분자생물학적 방법을 이용한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 KNUE 학술연구비를 받아 수행하였음.

적 요

생강나무에 공생하는 내생균의 다양성을 확인하기 위하여, 강원도 4 개 지역에서 병증이 없는 생강나무 잎을 채집하여 내생균을 분리하였다. 분리된 내생균의 rDNA의 ITS 지역을 분석한 결과, *Alternaria alternata*, *Annulohyphoxylon annulatum*, *Creosphaeria sassafras*, *Diaporthe eres*, *Discosia* sp., *Epicoccum nigrum*, *Glomerella acutata*, *Glomerella cingulata*, *Paraconiothyrium brasiliense*, *Pestalotiopsis neglecta*, *Phomopsis amygdali*, *Xylaria* sp. 의 총 7과 11속 12종이 확인되었으며 *Phomopsis amygdali* 가 모든 연구 지역의 생강나무 잎에서 가장 높은 빈도로 분리되었으며 채집지에 따라 내생균의 종 다양성에 차이가 있음을 확인하였다.

참고문헌

Arnold, A., Maynard, Z. and Gilbert, G. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol. Res.* 105:1502-1507.

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.

Chareprasert, S., Piapukiew, J., Thienirun, S., Whalley, A. J. S. and Sihanonth, P. 2006. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World J. Microb. Biot.* 22:482-486.

Clay, K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 21:275-297.

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. Lett.* 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.

Hwang, K. A., Shin, S. R. and Kim, K. S. 2003. Changes on the flavor components in the leaf teas of *Lindera obtusiloba* BL. by processing methods. *Kor. J. Food Preserv.* 10:488-492. (In Korean).

Hyde, K. D. and Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers.* 33:163-173.

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. *Kor. J. Mycol. Soc.* 37:130-133. (In Korean).

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.

Kim, S. H., Son, J. H. and Lee, S. H. 2009. Inhibitory effects of water extract of *Lindera obtusiloba* on the mast cell-mediated allergic inflammation. *Kor. J. Pharmacogn.* 40:233-237. (In Korean).

Kwon, D. J., Kim, J. K. and Bae, Y. S. 2007. Essential oils from leaves and twigs of *Lindera obtusiloba*. *J. Kor. For. Sci.* 96:65-69. (In Korean).

Kwon, J. H., Kang, S. W., Kim, J. S. and Park, C. S. 2002. Anthracnose of *Achyranthes japonica* caused by *Glomerella cingulata* in Korea. *Res. Plant Dis.* 8:59-62. (In Korean).

Park, C. W. 2005. The genera of vascular plants of Korea. Academy Publishing, Seoul.

Photita, W., Taylor, P. W. J., Ford, R., Hyde, K. D. and Lumyong, S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Divers.* 18:117-133.

Rubini, M., Silva-Ribeiro, R., Pomella, A., Maki, C., Araujo, W., dos Santos, D. and Azevedo, J. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 1:24-33.

Seo, K. H., Baek, M. Y., Lee, D. Y., Cho, J. G., Kang, H. C., Ahn, E. M., Baek, N. I. and Lee, Y. H. 2011. Isolation of flavonoids and lignans from the stem wood of *Lindera obtusiloba* Blume. *J. appl. Biol. Chem.* 54:178-183. (In Korean).

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. *Kor. J. Mycol.* 37:108-110. (In Korean).

Sreekanth, D., Sushim, G. K., Syed, A., Khan, B. M. and Ahmad, A. 2011. Molecular and morphological characterization of a taxol-producing endophytic fungus, *Gliocladium* sp., from *Taxus baccata*. *Mycobiology* 39:151-157.

Wei, J. G., Xu, T., Guo, L. D., Liu, A. R., Zhang, Y. and Pan, X. H. 2007. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. *Fungal Divers.* 24:55-74.

Wong, M. K. M. and Hyde, D. M. 2001. Diversity of fungi on six species of Gramineae and one species of Cyperaceae in Hong Kong. *Mycol. Res.* 105:1485-1491.