

강원도 함백산에 서식하는 목본식물의 잎에서 분리한 4종의 내생균

여주경 · 이봉형 · 엄안흠*

한국교육대학교 생물교육과

Four Species of Endophytic Fungi Isolated from Leaves of Woody Plants in Mt. Hambaek

Ju-Kyeong Eo, Bong-Hyung Lee and Ahn-Heum Eom*

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

ABSTRACT : In this study, endophytic fungi were isolated from leaves of four species of woody plants, *Acer tagmentosum*, *Larix kaempferi*, *Abies holophylla*, and *Pinus koraiensis*, on Mt. Hambaek, Gangwondo, Korea. The endophytic fungi were identified using morphological and sequences analysis of ITS regions. The fungal endophytes were identified as *Talaromyces radicus*, *Myceliophthora verrucosa*, *Cryptosporiopsis diversispora*, and *Sphaerulina berberidis*, which are the first record in Korea. The morphological and molecular phylogenetic characteristics of each strain were described.

KEYWORDS : *Cryptosporiopsis diversispora*, *Myceliophthora verrucosa*, *Sphaerulina berberidis*, *Talaromyces radicus*

내생균(endophytic fungi)는 숙주식물의 잎, 줄기, 뿌리 등에 서식하며 병원성을 나타내지 않는 균류를 말하며 숙주식물과 상리공생관계를 형성하고 있는 것으로 알려져 있다[1]. 이들은 다양한 숙주식물에서 매우 폭넓게 분포하고 있으며, 현재 우리나라에서도 이들의 종 다양성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[2, 3]. 본 연구는 강원도 함백산에 분포하고 있는 잣나무(*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.), 전나무(*Abies holophylla* Maxim.), 일본잎갈나무(*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière) 등 침엽수 3종과 활엽수인 산겨릅나무(*Acer tagmentosum* Maxim.) 1종에서 잎을 채집하여 내생균의 분리를 수행하였다. 그 결과 총 4종

의 국내 미기록종을 발견하였으며, 이에 대한 특징을 기술하고 보고하고자 한다.

강원도 함백산(1,573m; N 36°10', E 128°55')에서 목본식물의 소지를 채집하였다. 채집된 소지는 비닐백에 밀폐해서 실험실로 운반하여 48시간 내에 균분리를 진행하였다. 채집된 소지에서 외관상 병증이 없는 잎을 무작위적으로 채취한 후 표면살균과정을 수행하였다. 먼저 이물질을 제거하기 위하여 흐르는 물로 세척한 다음 무균 실험대 내에서 1% 차이산염소산나트륨(NaOCl) 용액에 3분, 70% 에탄올에 2분간 처리한 후, 멸균수로 2회 세척하고 다음 과정을 진행하였다. 그 후 표면 살균된 잎은 멸균된 가위를 이용하여 약 5 mm 정도의 길이로 자른 후 PDA 배지에 각각 4개의 절편을 치상하고, 25°C의 암소에서 배양 후 계대배양을 통해 순수한 균주를 분리하였다.

분리된 4개 균주의 형태학적 특징을 알아보기 위하여 PDA 배지에 계대배양 후 25°C 암소에서 배양하였다. 균주의 생장속도에 따라 균총의 생장속도를 측정하였으며, 적당한 크기로 자란 균총의 크기와 색, 모양, 균사의 자라나는 형태 등을 육안으로 관찰하였다. 이후 균사와 분생포자를 관찰하기 위하여 슬라이드 배양법을 이용하여 25°C에서 3일간 배양하였고 Lactophenol aniline blue 용액으로 시료를 염색하여 광학현미경 (AXIO Imager A1, Carl Zeiss) 하에서 분생포자의 크기와 모양, 분생포자경 등을 관찰하였다.

Kor. J. Mycol. 2014 September, 42(3): 239-242
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.3.239>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received September 18, 2014
 Revised September 23, 2014
 Accepted September 23, 2014

©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.

각각의 내생균은 DNeasy Plant SV Mini Kit (GeneAll, Korea)의 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 균 특이적인 primer ITS1F와 ITS4를 이용하여 증폭하였다[4]. PCR 조건은 predenaturation 94°C에서 5분 후, denaturation을 94°C 30초, annealing을 50°C에서 30초, elongation을 72°C에서 1분을 1cycle로 하여 총 30회를 진행하였으며, 예상되는 크기의 band를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Korea). 분석된 염기서열들은 NCBI상에서 BLAST를 하여 similarity를 확인한 후 각 종들간의 계통관계 분석을 통한 topological position을 보기 위해 bootstrap analysis를 1,000 replicates를 선택하고, MEGA5[5]를 이용하여 maximum-likelihood (ML) 계통수를 완성하였다. 염기서열 자료는 Genbank에 등록하였고, 균주13B011은 KM527250의 accession number를, 균주13B014는 KM527251을, 균주13B022는 KM527252를, 균주 13B032는 KM527253을 부여받았다.

산겨릅나무를 제외하고 대부분이 한국에 분포하는 목본식물과 내생균의 다양성에 관한 선행연구들[6, 7]에서 사용한 동일한 숙주식물임에도 불구하고 미기록종인 다른 내생균이 분리되었으며, 이는 내생균 분포에 지역성을 고려해야 함을 의미한다고 볼 수 있다. 분리된 균들의 염기서열을 BLAST한 결과 NCBI 상의 reference sequence들과 유사도가 대부분 97% 이상 일치되는 결과를 보였다[8]. 또한 강(class) 수준에서는 4개의 강(Sordariomycetes, Leotiomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes)에서 각각 발견되었다. Maximum-likelihood (ML)방법을 이용하여 계통수를 작성한 결과는 Fig. 1과 같다.

균주 13B011 (*Talaromyces radicus*). 일본잎갈나무의 앞에서 PDA 배지를 이용하여 분리하였다. PDA 배지에

25°C에서 7일 동안 배양한 결과 균총의 직경은 약 25 mm 정도이며, 균사의 밀도가 조밀하며, 1~4개 정도의 방사형 홈이 발생한다(Fig. 2A). 표면의 색상은 흰색, 노란색, 푸른색이 혼합되어 나타나며, 가장자리는 1 mm 정도 너비이며 흰색으로 둘러져 있다. 균총은 불규칙한 원형을 띄고 있으며, 표면에 삼출물은 보이지 않는다. 뒷면의 중앙은 노란색이며 가장자리로 갈수록 옅은 미색을 띤다(Fig. 2E). 분생포자와 분생포자경을 관찰한 결과, *Penicillium* 속의 특징인 돌기가 있는 분생포자경이 관찰되었다(Fig. 2I and 2J). 이는 이전의 연구에서 *Talaromyces* 속의 무성세대가 *Penicillium* 속에 속한다는 연구[9]와 일치한다. 또한 같은 속인 *Talaromyces columbines*의 분생포자와 분생포자경의 형태와 매우 유사하다[10]. 분생포자의 크기는 (2.5~) 3.0 (~4.1) μm이다(Fig. 2K). 이 균주의 ITS지역의 염기서열은 *T. radicus* HM469413과 98%의 유사도를 보였다.

균주 13B014 (*Myceliophthora verrucosa*). 잣나무의 칩엽에서 PDA 배지를 이용하여 분리하였으며, PDA 배지에서 25°C에서 7일 동안 배양한 결과 균총의 직경은 약 40 mm 이상으로 성장할 수 있을 것으로 판단되며, 균사는 밀도가 조밀하나 홈이 발생하지는 않는다. 표면의 색상은 푸른색에서 옅은 푸른색을 띤다(Fig. 2B). 본 성장조건하에서 균총은 타원형을 띄고 있으나, 3일 동안 배양한 균총의 모양은 원형을 보이며, 이것이 기본형으로 생각된다. 또한 표면의 중앙부에는 투명한 삼출물이 보인다. 뒷면은 전체적으로 옅은 미색을 띤다(Fig. 2F). 균사 사이로 연쇄상 구형의 포자가 높은 빈도로 형성되며, 분생포자경은 뚜렷하게 관찰되지는 않는다. 구형의 분생포자의 크기는 약 3.5 μm 정도이다(Fig. 2L, 2M). 이 균주의 ITS영역의 염기서열은 *M. verrucosa* JQ246353.1와 97%의 유사도를 나타내었다.

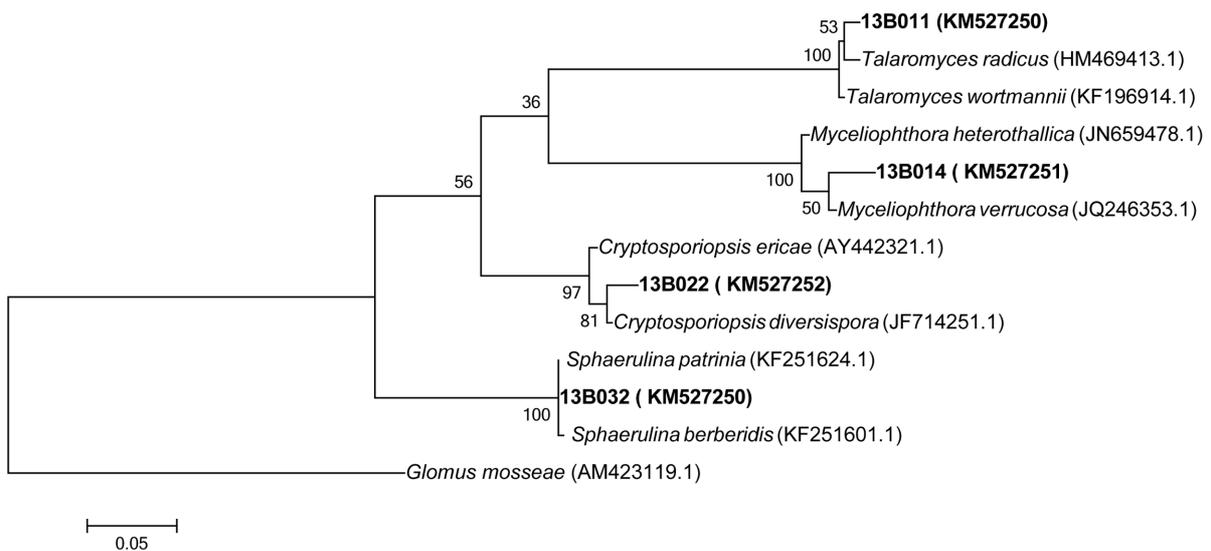


Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree for endophytic fungal strains from 4 woody plants; Sequences for strains 13B011, 13B014, 13B022 and 13B032 were obtained from this study. ITS region was used to analyze a topological position and *Glomus mosseae* was used as an outgroup.

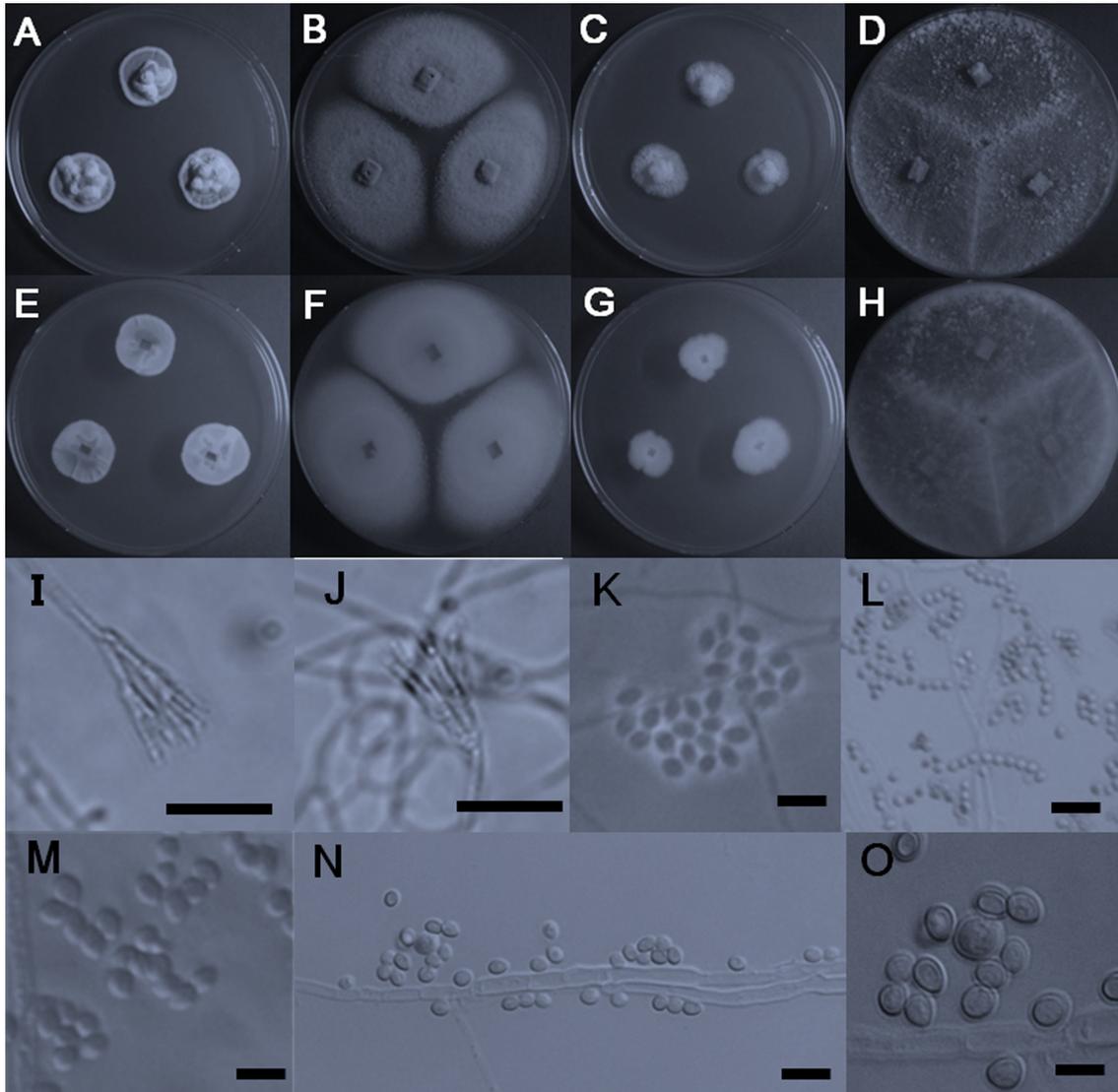


Fig. 2. Colonies of strain 13B011 (*T. radicus*) grown on PDA (A,E) for 7 days at 25°C. Strain 13B014 (*M. verrucosa*) (B, F), and strain 13B022 (*C. diversispora*) (C, G) were grown in the same conditions. Colonies of strain 13B032 (*S. berberidis*) (D, H) grown on PDA for 3 days at 25°C. Conidiophores (I, J) and conidia (K) of strain 13B011 (*T. radicus*). Conidia of strain 13B014 (*M. verrucosa*) (L, M). Conidia of strain 13B032 (*S. berberidis*) (N, O). Scale bars : I, J=20 μ m, L, N=10 μ m, K, M, O=5 μ m.

균주 13B022 (*Cryptosporiopsis diversispora*). 산겨릅나무의 잎에서 PDA 배지를 이용하여 분리하였다. PDA 배지에 25°C에서 7일 동안 배양한 결과 균총의 직경은 15~20 mm 정도이며, 균사의 밀도는 성긴 편이며, 공중균사가 발달하였으며, 흡이 발생하지는 않는다(Fig. 1C). 표면의 색상은 흰색에서 미색을 띤다. 균총의 모양은 불규칙한 원형을 보이며, 표면에는 삼출물이 보이지 않는다. 뒷면은 표면의 색상과 동일하다(Fig. 1G). 이 균주의 ITS영역의 염기서열은 *C. diversispora* JF714251.1와 98%의 유사도를 나타내었다.

균주 13B032 (*Sphaerulina berberidis*). 전나무의 침엽에서 PDA 배지를 이용하여 분리하였다. PDA 배지로 25°C에서 3일 동안 배양한 결과 균총의 직경은 약 45 mm 정도이

며, 균사의 밀도는 조밀하며 중앙부는 배지에 매우 밀착되어 있으나 가장자리에는 공중균사가 발달한다(Fig. 1D). 다른 균주에 비해 성장속도가 매우 빠른 편이다. 흡은 발생하지 않는다. 표면의 색상은 흰색을 띠고 있다. 균총의 모양은 본 실험 조건에서는 타원형을 보이고 있으나, 1~2일간 배양한 균총의 모양은 원형을 띠고 있는 것으로 보아 기본형은 원형으로 생각된다. 뒷면은 앞면과 마찬가지로 흰색과 연한 미색을 띠고 있다(Fig. 1H). 분생포자는 구형이며, 동시에 무리지어 형성되어 있고 분생포자경은 관찰되지는 않는다(Fig. 2N, 2O) 분생포자의 크기는 약 4.5 μ m 내외이다. 이 균주의 ITS지역의 염기서열은 *Sphaerulina berberidis* KF251601.1과 99%의 유사도를 보였다.

적 요

본 연구에서는 강원도 함백산에 서식하는 잣나무, 전나무, 일본잎갈나무, 산겨릅나무 등 4종의 목본식물의 잎에서 내생균을 분리하여 균의 형태적 특징과 ITS 부위의 염기서열을 이용하여 분자계통 분석을 실시하였다. 그 결과, 국내 미기록종인 *Talaromyces radicus*, *Myceliophthora verrucosa*, *Cryptosporiopsis diversispora*, *Sphaerulina berberidis*로 동정되었으며, 각 균주의 형태학적, 분자계통학적 특징을 기술하였다.

감사의 글

본 연구는 환경부 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행된 연구 결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988;69:2-9.
2. Eo JK, Choi MS, Eom AH. Diversity of endophytic fungi isolated from Korean ginseng leaves. *Mycobiology* 2014;42:147-

- 51.
3. Kim CK, Eo JK, Eom AH. Diversity and seasonal variation of endophytic fungi isolated from three conifers in Mt. Taehwa, Korea. *Mycobiology* 2013;41:82-5.
4. Gardes M, Bruns T. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993;2:113-8.
5. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-9.
6. Kim CK, Eo JK, Eom AH. Diversity of endophytic fungi isolated from leaves of coniferous trees in Mt. Minjuji, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:174-7.
7. Hoffman MT, Arnold AE. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycol Res* 2008;112:331-44.
8. Arnold AE. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol Rev* 2007;21:51-66.
9. Ailsa DH, Melanie W, Terence JH. *Penicillium radicum* sp. nov. from the rhizosphere of Australian wheat. *Mycol Res* 1998;102:801-6.
10. Stephen W. P, Željko J. *Talaromyces columbinus* sp. nov., and genealogical concordance analysis in *Talaromyces* Clade 2a. *PLoS ONE* 2013;8(10):e78084. doi:10.1371/journal.pone.0078084