

RESEARCH ARTICLE

구상나무의 잎에서 분리한 두 종의 국내 미기록 내생균

박혁, 김동여, 엄안흠*

한국교원대학교 생물교육과

Two Unreported Species of Endophytic Fungi Isolated from Leaves of *Abies koreana* in Korea

Hyeok Park, Dong-Yeo Kim, Ahn-Heum Eom*

Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea

*Corresponding author: eomah@knue.ac.kr

ABSTRACT

We isolated endophytic fungal strains from the leaves of *Abies koreana* growing in Korea. The fungal strains were identified as *Coleophoma parafusiformis* and *Coniochaeta ligniaria*, based on morphological characteristics and sequence analysis of the internal transcribed spacer region and large subunit region of ribosomal DNA. These species have not been previously reported in Korea. In this study, we report the morphological characteristics and results of phylogenetic analysis of the two novel fungal strains.

Keywords: *Abies koreana*, *Coleophoma parafusiformis*, *Coniochaeta ligniaria*, Endophytes

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2018 March, 46(1): 22-27
<https://doi.org/10.4489/KJM.20180003>

pISSN : 0253-651X
 eISSN : 2383-5249

Received: February 13, 2018

Revised: February 22, 2018

Accepted: February 24, 2018

© The Korean Society of Mycology



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

내생균(endophytic fungi)은 식물에 공생하는 균류로, 숙주식물의 조직 내에서 서식하며 병 원성을 띠지 않는 균류이다[1]. 내생균은 초본, 혹은 목본 식물체의 조직 내에서 독성 알칼로 이드를 합성하여 포식자로부터의 보호 기작을 제공하기도 하고[2], 수분 스트레스[3], 식물 병원균 등에 대한 저항을 제공하기도 한다[4]. 본 연구에서는 제주도 한라산에 서식하는 구상 나무(*Abies koreana*) 내생균의 다양성을 조사하던 중 구상나무의 침엽에서 두 종의 국내 미 기록종을 분리하였으며, 그 특징을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

한라산의 해발 1,800 m 주변에 서식하는 구상나무의 잎을 채취하였으며, 병증이 없는 건강한 침엽을 선별한 후 실험실로 운반하였다. 종류수로 세척된 침엽을 30%의 H₂O₂로 30초간 표

면 살균한 뒤, potato dextrose agar (PDA) 배지에 4조각씩 치상하였다. 25°C의 암소에서 3~7일간 배양하면서 균사가 뻗어 나오면 새로운 PDA 배지에 계대하여 순수 분리하였고, 확보된 균주를 다시 PDA 배지와 malt extract agar (MEA) 배지에 삼점 계대하여 7일간 동일한 조건으로 배양한 뒤 형태적 특징을 관찰하였다(Fig. 1). 염기서열 분석을 위하여 DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)의 protocol에 따라 균사에서 genomic DNA를 추출한 뒤 균 특이적인 프라이머인 ITS1F와 ITS4를 이용하여 internal transcribed spacer (ITS) 지역을 증폭하였고[5], 프라이머 LR0R과 LR16을 이용하여 rDNA의 large subunit (LSU) 지역을 증폭하였다[6]. Annealing 온도는 ITS 지역은 50°C, LSU rDNA 지역은 44°C로 설정하여 수행하였으며, PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 22분간 전기영동을 실시하였고, 예상되는 크기의 DNA band를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열은 NCBI 상에서 BLAST를 이용하여 유사도를 확인한 후 각 종들 간의 계통 분석을 통한 유연 관계를 확인하기 위해 MEGA6 [7]를 이용하여, ITS 지역의 DNA 염기서열과 LSU 지역의 염기서열을 combined-sequences로 align하여 neighbor-joining 방법으로 phylogenetic tree를 작성하였다(Figs. 2, 3). 분리된 균주는 국립생물자원관(NIBR)에 기탁하였다.

결과 및 고찰

Coleophoma parafusiformis Crous, Fungal Biol 120: 1405 (2016)

PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 12~13 mm 정도이며, 균총의 색은 앞면은 밝은 크림색이고 뒷면은 적갈색을 띤다. 고도는 배지에 납작하게 붙어 있고, 가장자리는 불규칙한 방사형으로 뻗어 있다(Fig. 1A). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 10~12 mm 정도이며, 균총의 색은 앞면은 전체적으로 흰색을 띠고 뒷면은 중앙부에서 적갈색을, 가장자리

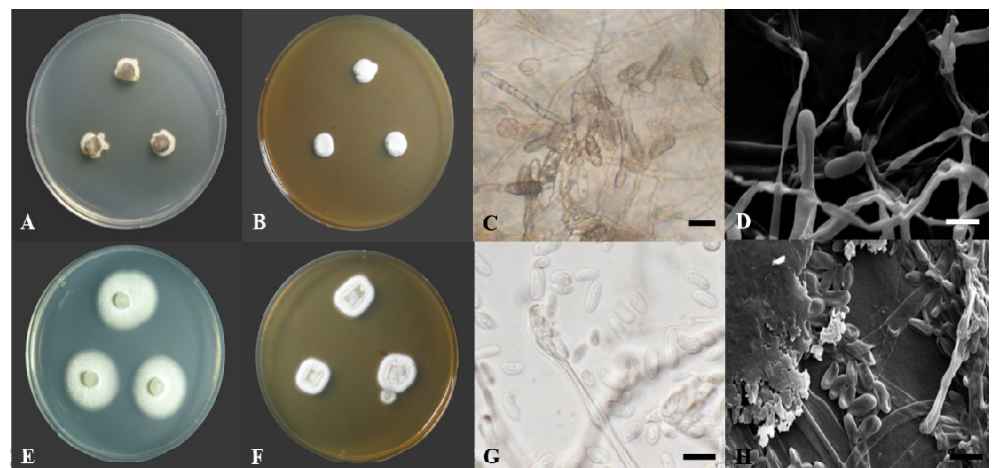


Fig. 1. Colonies of *Coleophoma parafusiformis* 17E082 grown on PDA (A) and MEA (B), conidiophore (C, optical microscope image; D, scanning electron microscope image). Colonies of *Coniochaeta ligniaria* 16H328 grown on PDA (E) and MEA (F), conidiophore and conidia (G, optical microscope image; H, scanning electron microscope image). PDA, potato dextrose agar; MEA, malt extract agar (scale bars = 10 µm).

에서 흰색을 띤다. 균총의 고도는 중앙부에서 볼록 융기되어 있으며, 가장자리의 형태는 얇은 균사들이 방사형으로 뻗어 나가는 형태이며 간혹 불규칙하게 파여 있는 가장자리의 형태를 확인할 수 있다(Fig. 1B). 분생자경의 형태는 부드러운 타원형 혹은 원통형으로 균사 끝에서 솟아오른 형태이고, 격벽이 없는 것에서부터 2~3장의 격벽을 가진 것까지 다양한 형태가 존재한다. 분생자경의 크기는 (22.7~28.4) × (8.6~11.1) μm 정도이며, 색은 짙은 갈색 혹은 검은색이다(Fig. 1C).

Specimen examined: Mt. Hallasan, Jeju-do, Korea, N 33°21'47.9", E 126°32'06.1", April 18, 2017, isolated from leaves of *Abies koreana*, strain 17E082, NIBRFG0000502338, GenBank no. MG905602.

Note: *C. parafusiformis*는 2016년 Crous [8]에 의해 신종으로 명명된 종이다. 균사의 성장방향 측면에 방추형(fusiform)의 길쭉한 분생자경(conidiophore)을 갖는 것이 특징이며, 동유럽 라트비아의 진달래속(*Rhododendron*) 식물의 잎에서 내생균으로 분리되었다[8]. 균총 및 분생포자의 형태적 특징은 대체로 원 기재문과 일치하였으며(Table 1), ITS 지역과 LSU 지역의 염기서열의 분석 결과 ITS 지역의 DNA 염기서열은 *C. parafusiformis* KU728494.1과 99%의 일치도를 보였고, LSU 지역의 염기서열은 *C. parafusiformis* KU728534.1과 98%의 일치도를 보였으며, 모두 같은 계통을 형성하고 있었다(Fig. 2).

***Coniochaeta ligniaria* (Grev.) Masee, Grevillea 16: 37 (1887)**

PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 20~23 mm 정도이며, 균총의 색은 앞면은 분홍빛이 감도는 옅은 베이지색을 띠고, 뒷면은 베이지색 혹은 노란색이다. 중앙부에는 균사가 밀집하여 살짝 융기한 형태이며, 가장자리는 둥근 형태이다(Fig. 1E). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 18~20 mm 정도이며, 균총 앞면의 색은 중앙부에서 연분홍색을 띠고 가

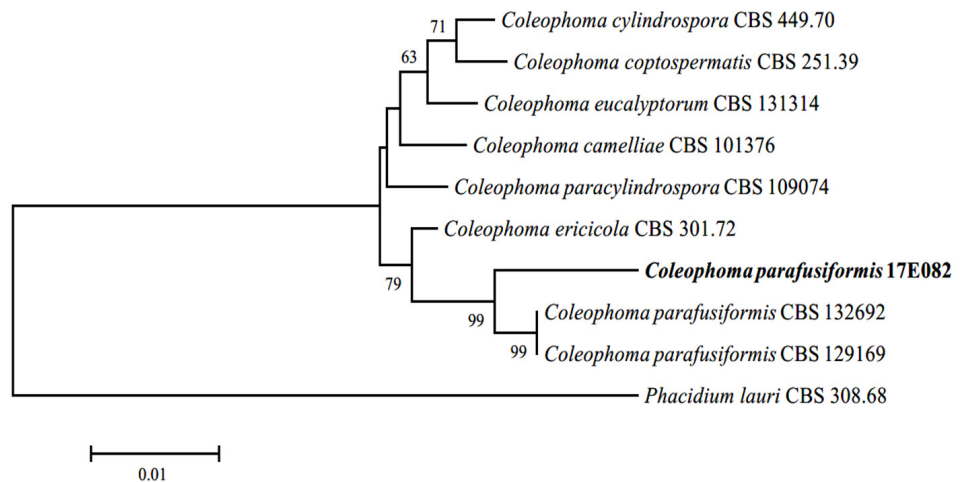


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a combined alignment of both internal transcribed spacer (ITS), large subunit (LSU) sequences. *Phacidium lauri* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study are in bold.

장자리는 베이지색이고, 균총 뒷면의 색은 흰색에 가깝다. 균총의 고도는 배지에 납작하게 붙어 있으며, 가장자리는 방사형으로 조밀한 균사가 뻗어 나가는 형태이다(Fig. 1F). 균사 끝이 비대해져서 형성된 분생자경에서 원통형의 분생자가 형성되며, 분생자는 투명한 유리질이고 크기는 $(17.4\sim 22.3) \times (6.6\sim 8.6) \mu\text{m}$ 정도이다(Table 2, Fig. 1G).

Specimen examined: Mt. Hallasan, Jeju-do, Korea, N 33°22'22.1", E 126°33'03.1", August 23, 2016, isolated from leaves of *Abies koreana*, strain 16H328, NIBRFG0000502332, GenBank no. MG905601.

Note: *C. ligniaria*는 1887년 Masee에 의해 최초로 기록된 종이다[9]. 본 종은 자낭균류에

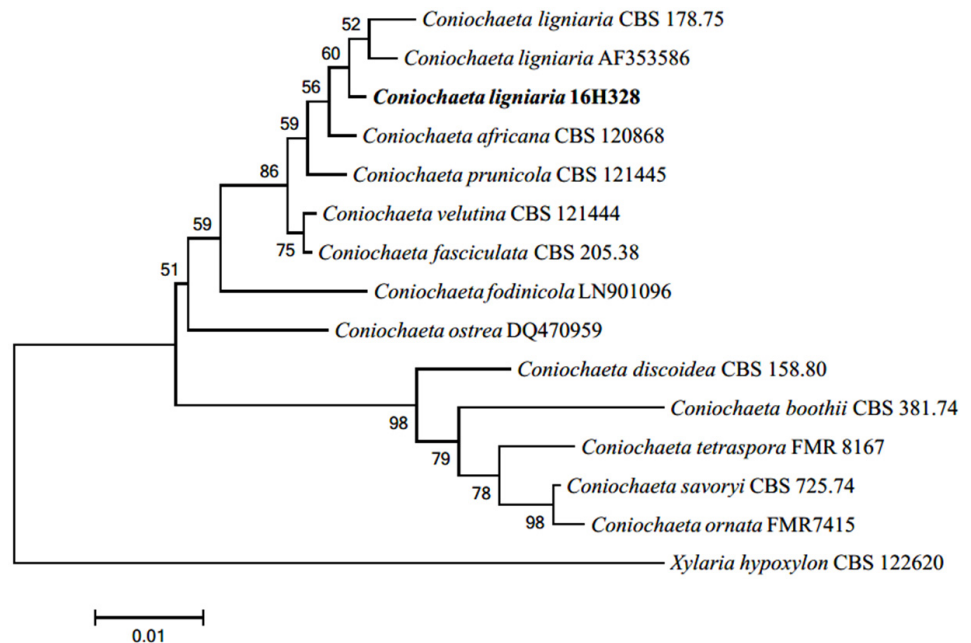


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a combined alignment of both internal transcribed spacer (ITS), large subunit (LSU) sequences. *Xylaria hypoxylon* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study are in bold.

Table 1. Morphological characteristics of *Coleophoma parafusiformis* strain isolated from this study

Strain	<i>Coleophoma parafusiformis</i> strain 17E082	<i>Coleophoma parafusiformis</i> [8]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 25°C, 2 weeks
Color	Light cream, reverse sepia	Greyish sepia, reverse isabelline
Size	12~13 mm in diam	20~30 mm in diam
Shape	Convex, hypha erumpent from core to margin with fusiform, margins lobate	Erumpent, folded, spreading with moderate aerial mycelium, margins lobate to feathery
Conidiophores	Hyaline, smooth, fusiform to subcylindrical, 0~3-septate, $(22.7\sim 28.4) \times (8.6\sim 11.1) \mu\text{m}$ in diam	Hyaline, smooth, subcylindrical, branched, 0~3-septate, $(13\sim 35) \times (3\sim 5) \mu\text{m}$ in diam

PDA, potato dextrose agar.

Table 2. Morphological characteristics of *Coniochaeta ligniaria* strain isolated from this study

Strain	<i>Coniochaeta ligniaria</i> strain 16H328	<i>Coniochaeta ligniaria</i> [10]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 25°C
Color	Pinkish beige, reverse beige or yellow	Yellowish orange to reddish orange, uncolored or slightly brown
Size	20~23 mm in diam	Unrecorded, covering the plate in 15~20 days
Shape	Hyphae concentrated in core, raised, margin circular to undulate	Smooth, slimy, occasionally with short tufts of white hyphae
Conidia	Hyaline, subcylindrical, smooth, uncolored, (17.4~22.3) × (6.6~8.6) μm in diam	Hyaline, elliptical to oblong-elliptical to reniform, (2~)4~10(~13) × (1~)2~4(~7) μm in diam

PDA, potato dextrose agar.

속하는 균 중 perithecium을 갖는 Pyrenomycetes에 속하며, 일반적으로 목본식물에 서식하는 내생균이다[10]. 항진균성을 갖는 지방산 화합물을 생성하여 식물병의 원인이 되는 진균에 대한 내성을 제공하는 것으로 연구된 바 있다[11]. ITS 지역과 LSU 지역의 분자적 분석 결과 ITS 지역의 DNA 염기서열이 *C. ligniaria* AY198390.1과 99%의 일치도를 보였고, LSU 지역의 염기서열은 *C. ligniaria* AY198388.1과 100%의 일치도를 보였으며, 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 3).

적 요

제주도 한라산 구상나무의 앞에서 내생균을 분리하여 다양성을 확인하는 과정에서 두 종의 국내 미기록 균주를 확인하였다. 분리된 균주는 형태적 특징과 internal transcribed spacer (ITS) 지역, large subunit (LSU) rDNA 지역 염기서열의 계통분석을 통해 동정하였다. 확인된 두 미기록종 균주는 *Coleophoma parafusiformis*와 *Coniochaeta ligniaria*이며, 두 균주에 대한 형태적 특징과 염기서열의 분석 결과를 제시하였다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Project on Survey and Discovery of Indigenous Fungal Species of Korea funded by NIBR of the Ministry of Environment and by the Project on Conservation and Adaptation of Forest Plant Species Vulnerable to Climate Changes funded by National Arboretum of Korea Forest Service.

REFERENCES

1. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988;69:2-9.
2. Latch GC. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agric Ecosyst Environ* 1993;44:143-56.
3. Bouton JH, Gates RN, Belesky DP, Owsley M. Yield and persistence of tall fescue in the

- southeastern coastal plain after removal of its endophyte. *Agronomy* 1993;85:52-5.
4. Christensen M. Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloë* endophytes. *Australas Plant Pathol* 1996;25:186-91.
 5. 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.
 6. Moncalvo JM, Lutzoni FM, Rehner SA, Johnson J, Vilgalys R. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst Biol* 2000;49:278-305.
 7. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
 8. Crous PW, Groenewald JZ. They seldom occur alone. *Fungal Biol* 2016;120:1392-415.
 9. Masee GE. British pyrenomycetes. *Grevillea* 1887;16:34-9.
 10. Rogers JD. The conidial stage of *Coniochaeta ligniaria*: morphology and cytology. *Mycologia* 1965;57:368-78.
 11. Rosa LH, Queiroz SC, Moraes RM, Wang X, Techen N, Pan Z, Cantrell CL, Wedge DE. *Coniochaeta ligniaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smilax sonchifolius* (Asteraceae). *Symbiosis* 2013;60:133-42.