

RESEARCH ARTICLE

고랭이류에서 분리한 내생균의 생물다양성 및 지리적 양상

어주경¹, 박은수

국립생태원 생태연구본부

Geographical Patterns and Biodiversity of Endophytic Fungi Isolated from *Scirpus* L. s.l. in Korea

Ju-Kyeong Eo¹, Eunsu Park

Bureau of Basic Ecological Research, National Institute of Ecology, Seocheon 33657 Korea

*Corresponding author: abiesendo@gmail.com

ABSTRACT

We investigated the biodiversity of endophytic fungi of *Bolboschoenus planiculmis* and *Schoenoplectus triqueter* in Korea. Twenty five of these host plants were collected from six sampling sites. Internal transcribed spacer analysis identified a total of eighty five isolates from the collected plants. The isolates comprised nineteen taxa; most of the isolates (92%) belonged to class Dothideomycetes, followed by Sordariomycetes (4.8%), Agaricomycetes (1.6%), and Eurotiomycetes (0.8%). The most prevalent fungus was *Cladosporium perangustum* in *B. planiculmis* and *Macrospora scirpicola* in *S. triqueter*. There are very few studies of endophytic fungi in halophytes and these have reported biodiversity patterns different from those of previous studies in Korea. Our results should provide useful information for future research in Korea.

Keywords: Biodiversity, *Bolboschoenus planiculmis*, Endophytic fungi, *Schoenoplectus triqueter*



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X

eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2019 March, 47(1): 43-50
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190006>

Ju-Kyeong Eo
<https://orcid.org/0000-0001-8376-5575>

Received: February 1, 2019

Revised: March 18, 2019

Accepted: March 19, 2019

© 2019 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

갯벌은 육상 생태계와 해양 생태계를 잇는 접이지대로 물이 들고 남에 의해서 나타나는 독특한 생태적 특성을 지닌다. 간조로 인한 해수면의 하강과 만조로 인한 해수면의 상승은 갯벌에 염생식물이나 어패류 그리고 철새 등 다양한 생물들이 서식할 수 있게 한다. 그러나 지금까지 갯벌은 인간의 개발에 노출되어 왔으며, 농경지나 산업단지 조성과 같은 국토개발이라는 이름 아래 진행된 간척과 매립으로 인해 급격히 감소되었다[1].

한반도의 서·남해안의 갯벌은 호주와 뉴질랜드에서 출발한 도요새 등과 같은 철새들의 중간 기착지로써 철새들이 에너지를 보충하는 국제적으로도 유명한 지역이다[2]. 그 중 매자기류(*Bolboschoenus*

spp.)나 고랭이류(*Schoenoplectus* spp.)는 고니(Tundra swan; *Cygnus columbianus* Ord.)나 개리(Swan goose; *Anser cygnoides* L.) 등의 개체군을 지탱하는 먹이식물 임에도 불구하고 이들의 서식지는 감소 추세에 있어 한반도의 갯벌을 중간 기착지로 사용하는 철새들에게 위협적이다[3].

내생균의 경우 식물에 어떠한 병증도 나타내지 않고 존재하는 균으로 정의되는데[4], 이들은 숙주 식물의 생장에 부정적인 환경스트레스를 조절하기도 하며, 숙주식물의 생산량이나 종자 산포 등에도 긍정적으로 기여한다[5, 6]. 그 외에도 새로운 2차 대사산물을 탐색하기 위한 생물 재료로서도 각광받고 있다[7]. 우리는 갯벌 생태계에서 중요한 위치를 차지하지만 현재 급격한 감소추세에 있으며, 지금까지 균학적인 관점에서 전혀 연구되지 않은 사초과의 다년생 초본인 새섬매자기와 세모고랭이에서 내생균을 탐색하고 이들의 종 다양성과 숙주식물에 따른 군집 구조의 차이를 확인해보고자 한다.

재료 및 방법

채집 및 균분리

2015년 8월부터 9월까지 새섬매자기(*Bolboschoenus planiculmis* (F. Schmidt.) T. V. Egorova)는 제주도 서귀포시 서귀동(A, N33°14', E126°33')과 제주도 제주시 한경면 용수리(B, N33°19', E126°11')에서 그리고 강화군 길상면 동검리(C, N37°36', E126°32')와 부산광역시 강서구 명지동(D, N35°5', E128°44')을 포함해서 총 4지역에서 각각 5개체씩 채집하였다. 세모고랭이(*Schoenoplectus triquetus* (L.) Palla)는 부산광역시 사하구 하단동 을숙도(E, N35°3', E128°56')와 서천군 장항읍 송림리(F, N36°1', E126°39')를 포함해서 총 2지역에서 각각 5개체씩 채집하였다(Fig. 1).

채집한 식물체는 48시간 이내에 실험실로 운반하여 건강한 잎을 선별한 후 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액에 3분, 70% 에탄올에 2분간 처리한 후 최종적으로 멸균수로 2회 세척하는 표면살균 과정을 진행하였다. 그 후 멸균한 가위를 이용해 5mm 정도로 절단하여 Potato Dextrose Agar (PDA; MCell, Seoul, Korea) 배지에 각각 3개의 절편을 치상한 다음 25°C 암소에서 배양하였다. 배양 중에 출현한 균주는 다른 PDA 배지에 옮겨가며 배양을 하였고, 2~3회 정도 계대배양을 통해 순수 균주를 분리하였다[8].

DNA 추출, 증폭 및 분석

분리·배양된 모든 내생균은 Plant tissues genomic DNA extraction kit (Xi'an Tianlong Science & Technology, Xi'an, Taiwan)의 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 primer ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')와 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 이용하여 증폭하였다[9]. PCR은 primer ITS1F와 ITS4를 각각 1μl, DNA template를 2μl, Rnase free water (Welgene, Gyeongsan, Korea)를 11μl, 2X Taq Pre-Mix (SolGent, Daejeon, Korea)를 15μl 넣고 총 부피를 30μl로 맞추어 수행하였다. PCR의 온도조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation을 실행하는 조건으로 총 30cycle을 수행하였으며, 이후에 final extension을 72°C에서 5분간 진행하였다. PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기영동을 통해 확인한 후 SolGent (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>)에서 BLAST하여 종 동정을 실시한 후 MEGA7[10]에서 Kimura-2 parameter distance model을 바탕으로 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하여 neighbor-joining tree를 작성하였다.

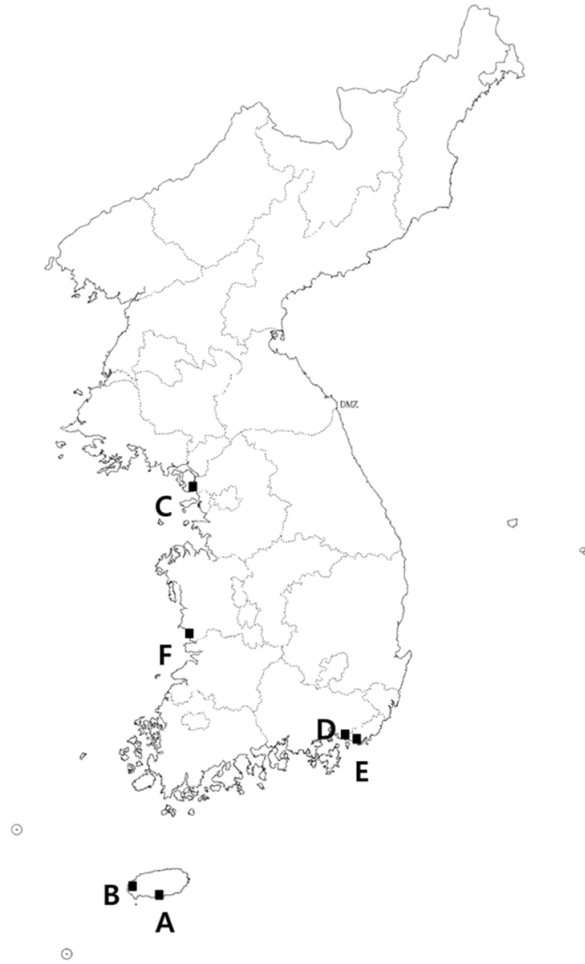


Fig. 1. Sampling sites of *Bolboschoenus planiculmis* (A: Saeseom, B: Youngsu, C: Donggeom, D: Myeongji) and *Schoenoplectus triqueter* (E: Eulsukdo, F: Songlim).

결과 및 고찰

내생균의 다양성

새섬매자기에서는 20개체의 숙주식물로부터 총 60개의 내생균 균주가 분리되었으며, 세모고랭이의 경우 10개체의 숙주식물로부터 총 25개의 내생균 균주가 분리되었다(Fig. 2, Table 1, 2). 분리된 모든 내생균들은 ITS 지역의 유전자를 증폭하여 염기서열 분석을 수행하였다. 그 결과 새섬매자기에서 분리된 내생균의 경우 ITS 지역의 염기서열 유사도는 최저 97%에서 최고 100%에 이르렀다. 네 지역에서 모두 공통적으로 발견된 내생균은 *Alternaria* sp. 1종으로 확인되었다. 서귀동 새섬(A)과 한경면 용수리(B) 그리고 강서구 명지(D) 지역에서는 *Cladosporium perangustum*이 우점하였고, 동검리(C)에서는 *Stagonospora paludosa*가 우점하였다. 세모고랭이에서 분리된 내생균을 참조서열과 비교한 결과 염기서열의 유사도가 최저 94%에서 최고 100%에 이르렀다. 하단동 을숙도(E)와 장항읍 송림리(F)의 두 지역 모두에서 *Macrospora scirpicola*와 *C. perangustum*이 발견되었으며, 그중 *M. scirpicola*는 공통적으로 가장 우점하는 내생균으로 확인되었다.

본 연구에서 약 92%의 비율로 발견된 것은 Dothideomycetes이다. 그에 속하는 내생균으로 *Cladosporium* spp.와 *Alternaria* spp.가 높은 빈도로 발견되었다. 그 외에는 비교적 낮은 비율로 발견되었는데, Sordariomycetes가 4.8%의 비율로, Agaricomycetes가 1.6%의 비율로 그리고 Eurotiomycetes가 0.8%의 비율로 발견되었다. 우리나라의 목본식물에서 연구된 내생균의 다양성과 비교해보면, *Cladosporium* spp. 이나 *Alternaria* spp.는 목본이나 초본식물 모두에서 공통적으로 발견되었지만 *Xylaria* spp.나 *Lophodermium* spp. 등은 새섬매자기나 세모고랭이에서는 전혀 발견되지 않았다[11].

새섬매자기와 세모고랭이는 염생식물로, 이들이 어떠한 내생균과 상호작용을 하는지에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 따라서 직접적인 비교 보다는 한반도의 갯벌에 서식하는 다른 염생식물인 통

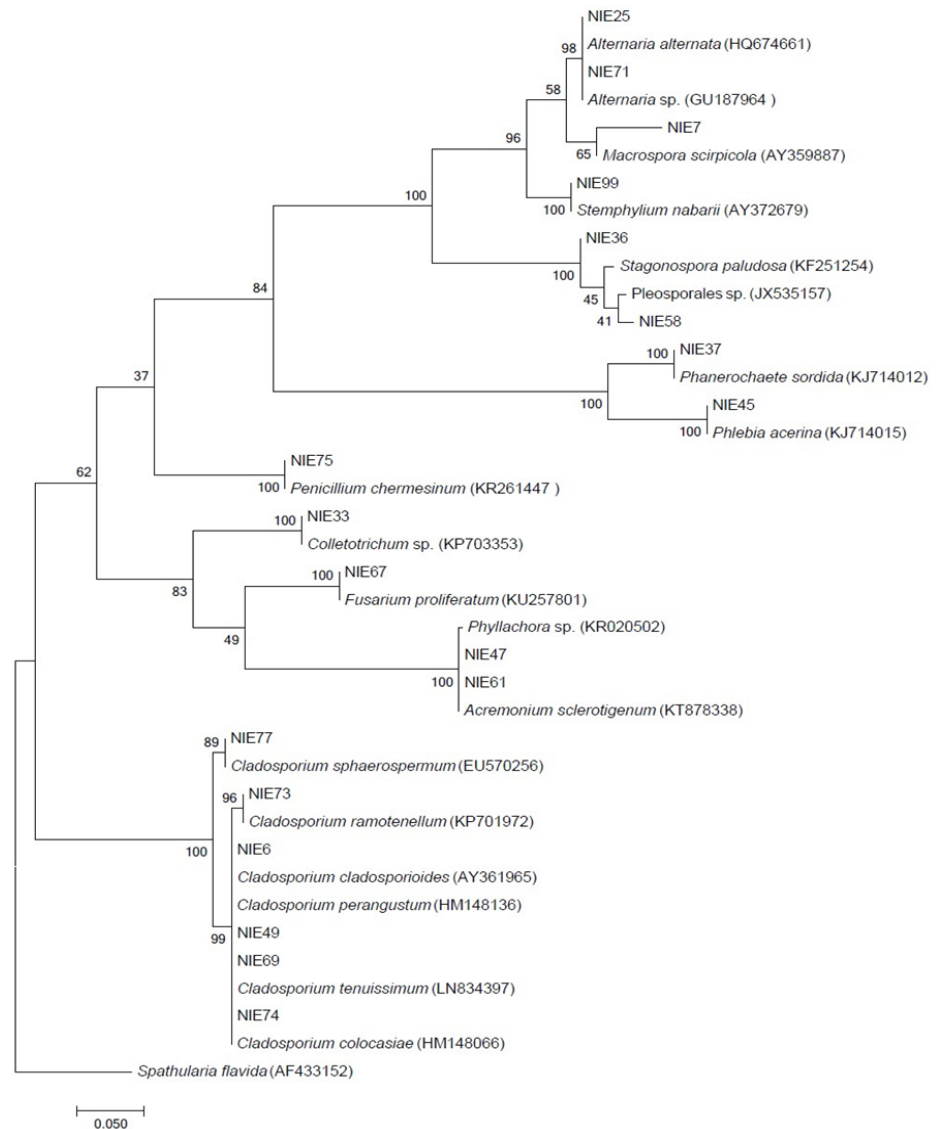


Fig. 2. Phylogenetic tree of endophytic fungi from *Bolboschoenus planiculmis* and *Schoenoplectus triquerter* in seaboard of western and southern sea in Korea. ITS 1, ITS 2 and 5.8S rDNA region were used for the sequence analysis to confirm the topological appropriation of isolates. *Spathularia flavida* was used as an out-group.

툽마디(*Salicornia europaea L.*)에서 확인된 내생균의 생물다양성과 비교해 보았다. 그 결과, 속 수준에서는 *Cladosporium*, *Stemphylium*, *Penicillium* 등이 공통적으로 존재하였다[12]. 특히, *Cladosporium spp.* 는 목본식물에서도 그리고 다른 염생식물 등에서도 공통적으로 발견된 것으로 보아 광범위하며 다양한 숙주식물에서 존재할 수 있는 것으로 보인다.

염생식물에서 내생균에 대한 연구는 매우 드물다. 한반도의 삼면이 바다인 점을 고려하면 염생식물에 존재하는 내생균에 대한 연구는 보다 광범위하게 지속되어야 한다. 특히, 기후 변화에 관한 정부

Table 1. Molecular identification of endophytic fungi isolated from *Bolboschoenus planiculmis* in Korea. A: Saeseom, B: Youngsu, C: Donggeom, D: Myeongji. Relative abundance indicates the percentages of the number of isolates in the study sites of the total numbers of isolates.

Strain	Accession n.	The Closest Genbank taxa	Similarity (%)	Relative abundance*			
				<i>Bolboschoenus planiculmis</i>			
				A	B	C	D
NIE49	HM148136.1	<i>Cladosporium perangustum</i>	100	0.90	0.37		0.25
NIE73	KP701972.1	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	99	0.05	0.05		
NIE71	GU187964.1	<i>Alternaria sp.</i>	99	0.05	0.16	0.15	0.50
NIE47	KR020502.1	<i>Phyllachora sp.</i>	99		0.05		
NIE61	KT878338.1	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	99		0.11		
NIE67	KU257801.1	<i>Fusarium proliferatum</i>	99		0.05		
NIE74	HM148066.1	<i>Cladosporium colocasiae</i>	100		0.05		
NIE75	KR261447.1	<i>Penicillium chermesinum</i>	99		0.05		
NIE77	EU570256.1	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	100		0.05		
NIE69	LN834397.1	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	99		0.05		
NIE36	KF251254.1	<i>Stagonospora paludosa</i>	96			0.46	
NIE25	HQ674661.1	<i>Alternaria alternata</i>	99			0.08	
NIE58	JX535157.1	<i>Pleosporales sp.</i>	97			0.15	
NIE33	KP703353.1	<i>Colletotrichum sp.</i>	99			0.08	
NIE37	KJ714012.1	<i>Phanerochaete sordida</i>	99			0.08	
NIE99	AY372679.1	<i>Stemphylium nabarii</i>	100				0.13
NIE6	AY361965.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100				0.13
Total number of isolates				20	19	13	8
Shannon diversity index (H')				0.39	1.98	1.52	1.21
Species richness				4	10	6	4

Table 2. Molecular identification of endophytic fungi isolated from *Schoenoplectus triquerter* in Korea.

Strain	Accession number.	The Closest Genbank taxa	Similarity (%)	Relative abundance*	
				<i>Schoenoplectus triquerter</i>	
				E	F
NIE7	AY359887.1	<i>Macrospora scirpicola</i>	94	0.79	0.64
NIE6	AY361965.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	0.07	
NIE49	HM148136.1	<i>Cladosporium perangustum</i>	100	0.14	0.09
NIE45	KJ714015.1	<i>Phlebia acerina</i>	99		0.09
NIE47	KR020502.1	<i>Phyllachora sp.</i>	99		0.09
NIE71	GU187964.1	<i>Alternaria sp.</i>	99		0.09
Total number of isolates				14	11
Shannon diversity index (H')				0.66	1.16
Species richness				3	5

* E: Eulsukdo, F: Songlim, Relative abundance indicates the percentages of the number of isolates in the study sites of the total numbers of isolates.

간 협의체(Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)의 보고서에 따르면 온실가스 증가에 따라 지구의 평균 기온이 지난 100년간 약 0.74°C 상승하였고, 그로 인해 지구온난화는 가속화되고 있다 [13]. 갯벌은 이러한 변화에 대해서 연안생태계를 보존하는 완충자의 역할을 한다. 그렇지만 한반도에서 진행된 대규모 간척사업과 같은 연안 지역의 개발은 갯벌의 생물다양성에 막대한 영향을 끼쳤으며, 중요한 생태적 기능이 상실되기도 하였다[3]. 더욱이 점증하는 기후변화에 따른 위기는 갯벌 생태계의 변화를 촉진하기 때문에 아직 알려지지 않은 염생식물에서 내생균의 생물다양성이 상실되기 전에 이들에 대한 다층적인 연구가 지속되어야 한다.

고랭이류와 내생균의 분포 양상

다수의 문헌조사를 통해서 1994년 이후로부터 약 178개 지역에서 고랭이류의 지리정보를 확인하고, 이를 바탕으로 고랭이류를 채집하였다. 기존의 문헌과 많게는 20년 정도의 간격이 있기에 그 동안 간척이나 도로 건설 등의 개발 행위로 인해 고랭이류의 분포지는 상당 부분 소실되었다. 본 연구에서는 그 중 6개 지역에서 고랭이류의 채집을 수행하였다. 그 결과 새섬매자기 집단은 세모고랭이 집단에 비해 분포 면적이 상대적으로 협소하였고 낮은 분포 밀도를 보였다[14]. 특히, 본 연구에서는 동해안에서 새섬매자기의 분포를 확인할 수 없었으며, 이는 갯벌의 발달 유무와 무관하지 않다[15]. 추후 새섬매자기와 세모고랭이 집단들의 유전자형과 유전적 다양성을 확인한다면 이들의 생태적 복원에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 예상된다. 특히, 동아시아-대양주 철새이동경로 상의 중요한 먹이식물인 고랭이류의 발생에 대한 무생물적인 요인[16] 뿐만 아니라 생태학적인 관점에서 내생균을 통한 환경스트레스 조절 등에 대한 연구도 반드시 필요하다.

내생균의 분포에 영향을 미치는 요인은 일차적으로 숙주식물의 존재여부이지만 숙주식물의 분포역에 따른 영향도 있다[17]. 본 연구결과에서 동일한 숙주식물이라고 해도 채집지에 따라서 우점종 및 내

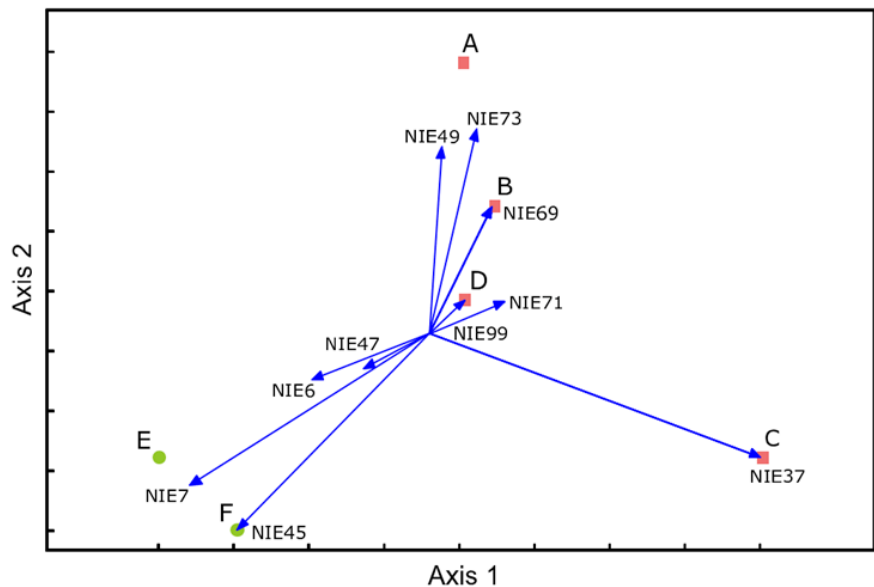


Fig. 3. Bray-Curtis ordination analysis to describe relationships of host plants, endophytic fungi and locality. Radiating lines indicate endophytic fungi species vector that affected locality heavily. Rectangles indicate individual sampling sites of *Bolboschoenus planiculmis* and Circles indicate the ones of *Schoenoplectus triquerter*.

생균의 군집 구조가 차이가 있는데, 제 1축과 2축에 의해서 크게 A~D 지역과 E~F 지역 간의 구별이 가능하며 이는 각 내생균들의 존재유무와 상대빈도가 이러한 구별에 큰 영향을 미쳤다. 따라서 숙주식물의 지리적 분포에 수반되는 생물적·무생물적 요인의 차이는 서로 다른 내생균이 존재할 수 있는 다양한 생태적 지위를 만들어 낸다고 할 수 있다(Fig. 3). 특히, 선행연구들에서 보는 바와 같이 종자를 통해 산포·전달되어 우점하는 내생균[4]이 있는가 하면 환경요인에 따라 기회적으로 감염되는 분류군도 있다. 이를 고랭이류에서도 규명하기 위해서는 숙주식물의 생활사에 따른 지속적인 모니터링이 요구된다. 내생균의 숙주특이성에 대해서는 초본식물에서 많은 연구가 수행되어 *Festuca arundinacea* Schreb.와 *Neotyphodium coenophialum*의 공진화 관계에 대해서 잘 알려져 있다[18]. 고랭이류에서도 내생균이 관련된 유사한 공진화 현상이 확인될 것으로 추측된다. 특히, 숙주식물의 종자를 통해서 분리되는 내생균과 숙주식물체에서 분리된 내생균 간의 차이를 규명하는 것과 함께 염도가 있는 갯벌에서 내생균이 고랭이류의 산포에 미치는 영향 등과 관련해서 내생균의 생태적 기능에 대한 비교 연구도 기대된다.

적요

고랭이류의 숙주식물인 *Bolboschoenus planiculmis*와 *Schoenoplectus triqueter*에서 내생균을 조사하였다. 총 25개체의 숙주식물에서 85개의 내생균을 분리하였고, ITS 지역을 사용하여 동정한 결과 19개의 분류군을 확인하였다. 그 중 92%는 Dothideomycetes에 속하였고, 4.8%는 Sordariomycetes, 1.6%는 Agaricomycetes, 0.8%는 Eurotiomycetes에 속하였다. *B. planiculmis*에서 가장 많이 분리된 내생균은 *Cladosporium perangustum*이고 *S. triqueter*에서는 *Macrospora scirpicola*였다. 염생식물에서 내생균의 연구는 매우 드물며, 이전에 목본식물들을 대상으로 수행된 선행연구들과는 다른 내생균의 군집 구조를 확인하였다. 향후 본 연구결과는 내생균의 생물다양성 연구에 매우 유용할 것으로 생각된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported with funds from the National Institute of Ecology under project No. NIE-C-2018-19 and Ministry of Environment of Korea as a part of basic ecological research.

REFERENCES

1. Yoo JC, Lee KS. Current status of birds on the west coast of Korea and a recommendation for conservation. *Ocean Polar Res* 1998;20:131-43.
2. Koo BH. Wetland ecology. Paju, Korea: Publishing House Jokeyong; 2009.
3. Kim GY, Lee CW, Yoon HS, Joo GJ. Changes of distribution of vascular hydrophytes in the Nakdong river estuary and growth dynamics of *Schenoplectus triqueter*, waterfowl food plant. *Korean J Ecol Environ* 2005;28:335-45.
4. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988;69:2-9.
5. Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araujo WL, Dos Santos DR, Azevedo JL. 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* 2005;1:24-33.

6. Christensen M. Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloe* endophytes. *Australas Plant Pathol* 1996;25:186-91.
7. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Rommert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res* 2002;106:996-1004.
8. Eo JK, Kim CK, Eom AH. Fungal endophytes isolated from needle leaves of three coniferous species on Mt. Seodae of Korea. *Mycobiology* 2015;43:133-6.
9. 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.
10. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
11. Eo JK, Eom AH. Diversity of foliar endophytic fungi inhabiting coniferous trees in Korea. *Kor J Mycol* 2018;46:205-11.
12. Park JM, Park JH, Kim JG, You YH. Securing and analysis of fungal endophytic diversity from roots of *Salicornia europaea* L. *J Agric Life Sci* 2016;50:89-98.
13. Stocker T, Qin D, Plattner G, Tignor M, Allen S, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley P. Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press; 2013.
14. Yoo SH, Kang TH, Kim HJ, Lee KS, Lee SM, Lee HS, Kim IK. Population decline and distribution change of the swan gees *Anser cygnoides* and white-naped cranes *Grus vipio* by habitat loss the *Scirpus planiculmis* at the Hanriver estuary. *Korean J Orinthol* 2010;17:55-66.
15. Yi YM, Yeo US, Oh DH, Sung K. Annual changes in *Scirpus planiculmis* and environmental characteristics of the Nakdong river estuary. *J Wet Res* 2011;13:567-79.
16. Choi SH, Shon YG, Ju GS, Choi JH, Kim MH, Yu YM, Lee JJ. Sprouting and growth characteristics of sea club rush (*Scirpus planiculmis*). *Kor J Weed Sci* 2000;20:276-83.
17. Hoffman MT, Arnold AE. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycol Res* 2008;112:331-44.
18. Bacon CW, White JF. *Microbial endophytes*: New York, USA: Marcel Dekker Inc.; 2000.