

RESEARCH ARTICLE

표주박이끼(*Funaria hygrometrica*)에서 분리된 2종의 국내 미기록 내생균

최현숙, 박혁, 엄안흠*

한국교원대학교 생물교육과

Two Unrecorded Endophytic Fungi Isolated from *Funaria hygrometrica* in Korea

Hyun-Sook Choi, Hyeok Park, Ahn-Heum Eom*

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

*Corresponding author: eomah@knue.ac.kr

ABSTRACT

In the present study, we isolated endophytic fungal strains from the rhizoids of the moss *Funaria hygrometrica*. The isolated strains were identified based on morphological characteristics and analysis of the internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) rDNA sequence regions. Consequently, we confirmed the presence of two endophytic fungal species, *Curvularia protuberata* and *Didymella anserina*, which have not been reported in Korea previously. Here, we describe the morphological characteristics and molecular analysis results of these fungal species.

Keywords: *Curvularia protuberata*, *Didymella anserina*, Endophytic fungi



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2019 December, 47(4): 313-18
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190036>

Received: October 28, 2019
Revised: December 11, 2019
Accepted: December 12, 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

내생균(endophytic fungi)은 건강한 식물 조직 내에 서식하며 숙주에게 어떠한 손상도 입히지 않는 균류로 모든 육상식물에서 발견된다[1]. 대부분의 작물을 포함하여 현존하는 육상식물 내에는 Mucoromycota, Ascomycota, Basidiomycota에 속하는 내생균이 많은 양을 차지한다[2,3]. 내생균은 식물체 내에서 2차 대사산물을 합성하여 포식자 또는 병원체로부터의 방어기작을 식물에게 제공하고[2], 식물의 영양획득과 생물적, 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 높여 각종 질병에 감염되지 않도록 도와준다[3]. 침엽수에 서식하는 내생균은 taxol 같은[4] 항생 혹은 항암 작용을 할 수 있는 물질을 분비하기도 하며[5], Xylariaceae에 속하는 균류에서는 고농도의 methyl ester가 합성된다는 것이 확인되어 바이오 연료로써의 가치가 부각되고 있다[6]. 한편 내생균은 식물 종자 발아에도 도움을 주고[7], 숙주식물이 가뭄에 내성을 가질 수 있게 하며[8], 제약 및 농업 산업에 항균, 살조류(algicidal), 제초활성 관련 신제품을 제공해 줄 수 있는 2차 대사산물의 저장고로써도 각광받고 있다[9]. 이처럼 내생균은 다양한 기능을 수행하며 생태학적으로도 매우 중요하지

만, 그 특성에 대한 연구는 충분히 이루어지고 있지 않다. 대부분의 연구는 관다발 식물에 서식하는 내생균에 한하여 이루어지고 있으며, 선태식물을 포함한 비관다발 식물에서는 매우 미흡하다. 선태식물에 서식하는 내생균에 대한 연구는 균류와 육상식물 공생의 진화와 그들의 생태적 기능을 이해하기 위한 중요한 의미들을 제시해 줄 수 있다. 본 연구에서는 표주박이끼의 헛뿌리에서 내생균을 분리하던 중 확인된 2종의 국내 미기록 내생균에 대한 형태적 특성과 계통분석의 결과를 기술하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 채집은 2018년 4월, 대전광역시 유성구 구성동 인근(N36°37'44", E127°36'74")에서 진행되었다. 선류(moss)에 속하는 표주박이끼(*Funaria hygrometrica*)를 채집하여 48시간 이내에 실험실로 운반하였다. 헛뿌리는 증류수로 씻어 흠을 완전히 제거한 후에 75% EtOH에 1분, 2% NaClO 용액에 3분, 75% EtOH에 0.5분간 차례로 처리하여 표면 살균하였고, 100 µg/mL 농도의 streptomycin 용액에 10분간 처리한 뒤 멸균수로 3회 씻어주었다[10]. 표면 살균된 뿌리는 filter paper를 이용하여 물기를 완전히 제거한 뒤 0.5 cm 길이로 잘라 water agar (WA) 배지의 네 귀퉁이에 치상하였다 [11]. 25°C의 암소에서 배양하면서 매일 관찰하여 균사가 뻗어 나오는 것이 확인되면 살균된 메스를 이용하여 potato dextrose agar (PDA) 배지로 계대 배양하였으며, 순수 분리된 균주는 PDA배지와 더불어 malt extract agar (MEA)배지에서 7일간 배양하여 해부현미경 및 광학현미경 상에서 형태적 특성을 관찰하였다(Table 1). 형태적으로 분류된 균주의 동정을 위해 DNeasy plant mini kit (Qiagen, USA)의 protocol에 따라 균사에서 DNA를 추출한 뒤, ribosomal DNA의 5.8S 지역을 포함하는 internal transcribed spacer (ITS)영역을 균류 특이적 primer인 ITS1F와 ITS4 [12]를 이용하여 증폭하였으며, 보다 정확한 동정을 위하여 rDNA의 large subunit (LSU)영역을 primer LR0R과 LR16 [13]을 이용하여 증폭하였다. PCR반응의 annealing 단계에서 ITS 영역은 50°C, LSU 영역은 44°C로 설정하였다. PCR이 끝난 후 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에 20분간 loading하여 각각 DNA 단편의 크기를 확인한 후 SolGent (Daejeon, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. DNA 염기서열은 미국 국립생물정보센터(NCBI) 상에서 BLAST 프로그램으로 GenBank database에 존재하는 유사한 염기서열을 가진 종을 찾고 유사도를 확인하였다. 계통분석은 MEGA7 프로그램을 이용하

Table 1. Morphological characteristics of *Curvularia protuberata* 18S001 and *Didymella anserina* 18S002

Strain	<i>C. protuberata</i> 18S001	<i>C. protuberata</i> [15]	<i>D. anserina</i> 18S002	<i>D. anserina</i> [19]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 25°C, 7 days	MEA, 25°C, 7 days	MEA, 22°C, 7 days
Color	Dark gray, margin light gray; reverse black to reddish brown, margin beige	Gray to olive-green to black; reverse mottled black and white or reddish	Pale brown to gray, deep gray in center, pale gray in margin; reverse generally brown, gray in core, white in margin	Greenish-olivaceous to gray-olivaceous or olivaceous-black; reverse gray-olivaceous, olivaceous-black
Size	35-38 mm in diameter	Reaching 75 mm in diam., a few isolates grow slowly and reaching 30-40 mm in diam.	35-36 mm in diam.	57-73 mm in diam.
Shape	Radial-striped pattern in mycelium, convex, margin irregular	Aerial mycelium growth, velvety	Convex, undulate margin	Regular margin, aerial mycelium
Conidia	Hyaline, brown, 4-septate, (16.92-) 21.50 (-27.17) × (7.60-) 8.09 (-8.54) µm in diam.	Hyaline, slightly to moderately curved, 4-septate, (24.5-) 32.5 (-40.8) × (8.0-) 10.6 (-13.6) µm in diam.	Hyaline, ellipsoid to cylindrical, aseptate, (3.92-) 5.14 (-5.68) × (1.18-) 1.69 (-1.93) µm in diam.	Broadly ellipsoid, (2.4-) 3.2 (-5.5) × (1.8-) 2.4 (-3.0) µm in diam.

여[14] neighbor-joining 방식으로 계통도를 작성하였다. 확인된 미기록종 균주는 국립생물자원관 (NIBR)에 기탁하였으며, BLAST 및 계통도 작성에 이용된 염기서열은 NCBI에 등록하였다.

결과 및 고찰

Curvularia protuberata R.R. Nelson & Hodges, *Mycologia* 57 (5): 823 (1965)

표주박이끼의 헛뿌리에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 35-38 mm 정도이고, 균총의 앞면은 전체적으로 연한 회색이나 부챗살처럼 균데균데 방사형으로 고랑이 나 있으며, 중앙부는 짙은 회색을 띤다. 뒷면은 전체적으로 붉은 갈색을 보이고, 앞면에서 관찰된 것처럼 방사형의 줄무늬가 있으며 가장자리로 갈수록 균총의 색이 옅어져 테두리가 흰색을 띤다. 균총의 고도는 배지에서 볼록 융기된 형태이고 균총의 가장자리는 잔물결 형태를 이룬다 (Fig. 1A). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 31-34 mm 정도이며, 균총의 앞면은 전체적으로 옅은 회색을 띠고 가장자리로 갈수록 색이 옅어져 흰색에 가까워지고, 중앙부는 짙은 회색을 띤다. 뒷면은 황록색을 보이거나 가장자리로 갈수록 흰색에 가까워지며 중앙부는 짙은 초록색을 보인다. 균총의 고도는 살짝 융기되었으며 둥근 모양을 이룬다 (Fig. 1B). 분생자는 격벽에 의해 4부분으로 나뉘어지고 가운데 두 부분은 진한 갈색을 보이며 양끝으로 갈수록 갈색이 옅어져 투명에 가까워진다 (Fig. 1C). 분생자의 크기는 (16.92-)21.50 (-27.17) × (7.60-)8.09 (-8.54) μm (n=20) 정도이다.

Specimen examined: Yuseong-gu, Daejeon, Korea, N36°37'44.3", E127°36'74.0", April 27,

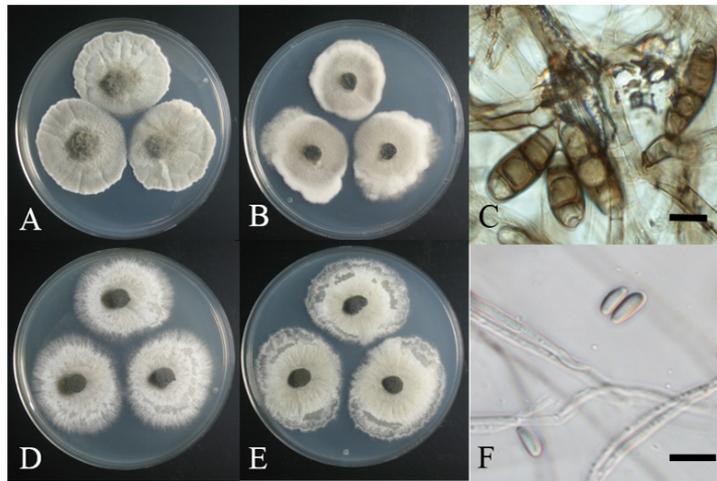


Fig. 1. Colonies of strain 18S001 (*Curvularia protuberata*) grown for 7 days on PDA (A) and MEA (B), C, conidia; D&E, colonies of strain 18S002 (*Didymella anserina*) grown for 7 days on PDA (D) and MEA (E); F, conidia. (scale bars = 10 μm). PDA, potato dextrose agar; MEA, malt extract agar.

2018, *Curvularia protuberata*, isolated from rhizoids of *Funaria hygrometrica*, strain 18S001, NIBRFG0000503368, GenBank No. MN611095 (ITS), MN368298 (LSU).

Notes: *C. protuberata* 는 1965년 Nelson & Hodges에 의해 보고된 종이다. 갈색 반투명의 방추형 분생자가 일반적으로 4개의 격막에 의해 나뉘지는 것이 특징이고[15], 이러한 특성은 본 연구에서 분리된 균주의 분생자에서도 확인되었다. *C. protuberata*의 균사에서는 균사를 온도 변화로부터 보호하는 mannitol이 확인되며[16], 이 종이 식물에 내생균으로써 공생할 때 식물을 극한 온도의 토양으로부터 보호하는 역할을 한다는 연구 결과 역시 존재한다[17]. 염기서열의 분석 결과 ITS 영역의 염기서열은 *C. protuberata* HG778998.1과 100%의 일치도를, LSU 영역의 염기서열은 *C. protuberata* LT631400.1과 100%의 일치도를 보였고 tree 상에서 같은 계통을 형성함을 확인하였다 (Fig. 2).

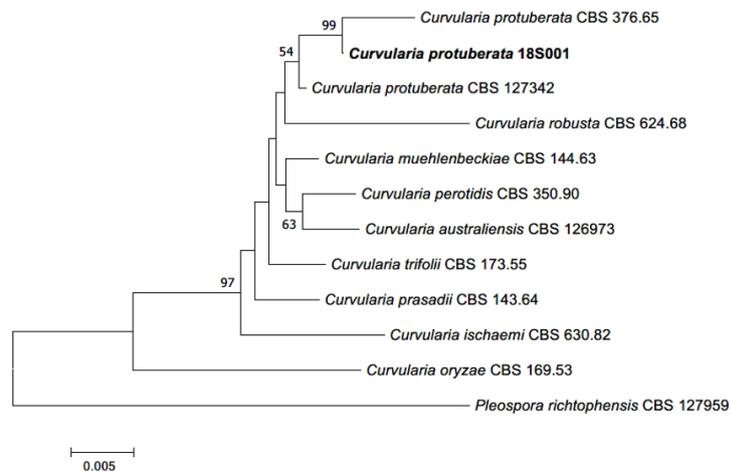


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) sequences. *Pleospora rosae* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in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

***Didymella anserina* (Marchal) Qian Chen & L. Cai, Studies in Mycology 82: 173 (2015)**

표주박이끼의 헛뿌리에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 35-38 mm 정도이며, 균총은 전체적으로 흰색을 띠고 중앙부만 짙은 회색을 띠며 가장자리로 갈수록 균사의 밀도가 줄어든다. 뒷면 역시 중심부는 회색을 보이고, 중심부의 주변은 갈색을 띠며 가장자리로 갈수록 흰색을 보인다. 균총의 고도는 배지에서 볼록 융기된 형태이고 가장자리는 등근 모양에 가깝다(Fig. 1D). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 35-36 mm 정도이며 앞면은 연한 갈색을 띠고 가장자리로 갈수록 회색을 보인다. 중심부는 짙은 회색을 띠며, 가장자리 부분에서 균사의 밀도가 줄어들고 군데 군데 투명해 보이는 것이 확인된다. 뒷면은 중앙부는 회색을 띠고 중간부분까지 갈색을 보이며 가장자리는 흰색을 띤다. 균총의 고도는 배지에서 볼록 융기되어 있고, 가장자리는 잔물결 형태를 이룬다(Fig. 1E). 분생자는 길고 투명한 원통형이며, 격막은 확인되지 않는다. 분생자의 크기는 (3.92-) 5.14 (-5.68) × (1.18-) 1.69 (-1.93) μm (n=20) 정도이다(Fig. 1F).

Specimen examined: Yuseong-gu, Daejeon, Korea, N36°37'44.3", E127°36'74.0", April 27, 2018, *Didymella anserina*, isolated from rhizoids of *Funaria hygrometrica*, strain 18S002, NIBRFG0000503358, GenBank No. MN368300 (LSU).

Notes: *Didymella*에 속하는 종은 배양 시에 후벽포자(chlamydospore)를 형성하는 것이 특징이다[18]. *D. anserina*는 Gruyter & Noordeloos의 기술에서는 후벽포자가 확인되지 않아서 *Phoma*로 수정되었으나[19], 2015년 Chen & Cai의 분자적 분석에서는 다시 *Didymella*로 재분류되었다[18]. 본 연구에서도 후벽포자는 확인되지 않았고, 확인된 분생자는 원통형 혹은 타원형의 형태와 크기가 Gruyter & Noordeloos의 기술과 대부분 일치하였다[19]. 염기서열의 분석 결과 ITS 영역의 염기서열은 *D. anserina* MH858633.1과 100%의 일치도를, LSU 영역의 염기서열은 *D. anserina* MH866534.1과 100%의 일치도를 보였으며 tree 상에서 같은 계통을 형성함을 확인하였다(Fig. 3).

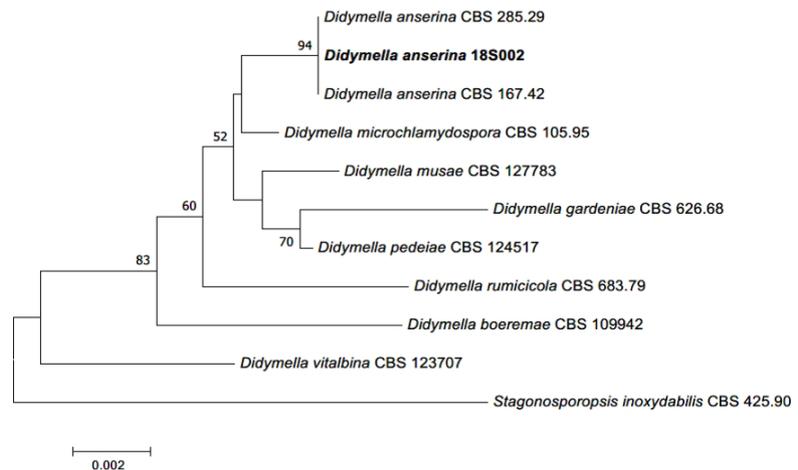


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) sequences. *Stagonosporopsis inoxydabilis* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this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

적요

표주박이끼의 헛뿌리(rhizoid)에서 내생균을 분리하였다. 분리된 균주는 형태적 특성 및 internal transcribed spacer, large subunit rDNA 영역의 분자적 분석을 토대로 동정하였다. 연구 과정에서 2종의 국내 미기록종 내생균 균주를 확인하였고, 확인된 종은 *Curvularia protuberata*, *Didymella anserina*이다. 미기록종 내생균 균주의 형태적 특성 및 계통 분석 결과에 대해 기술하였다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR 201902202)

REFERENCES

1. Petrini L. Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia* 1985;38:216-34.
2. Clay K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 1988;69:10-6.
3. Partida-Martinez LPP, Heil M. The microbe-free plant: fact or artifact? *Front Plant Sci* 2011;2:100.
4. Strobel GA, Hess WM, Ford E, Sidhu R, Yang X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *J Ind Microbiol* 1996;17:417-23.
5. Findlay JA, Buthelezi S, Lavoie R, Peña Rodriguez L, Miller JD. Bioactive isocoumarins and related metabolites from conifer endophytes. *J Nat Prod* 1995;58:1759-66.
6. Santos-Fo F, Fill TP, Nakamura J, Monteiro MR, Rodrigues-Fo E. Endophytic fungi as a source of biofuel precursors. *J Microbiol Biotechnol* 2011;21:728-33.
7. Park JH, Choi GJ, Lee HB, Kim KM, Jung HS, Lee SW, Jang KS, Cho KY, Kim JC. Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *J Microbiol Biotechnol* 2005;15:112-7.
8. Sherameti I, Tripathi S, Varma A, Oelmüller R. The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 2008;21:799-807.
9. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res* 2002;106:996-1004.
10. Zhang T, Zhang YQ, Liu HY, Wei YZ, Li HL, Su J, Zhao LX, Yu LY. Diversity and cold adaptation of culturable endophytic fungi from bryophytes in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. *FEMS Microbiol Lett* 2013;341:52-61.
11. Kim JH, Kim DY, Park H, Cho JH, Eom AH. *Neocosmospora rubicola*, an unrecorded endophytic fungus Isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis* in Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:63-7.
12. 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.
13. 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.
14. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
15. Nelson R, Hodges CS. A new species of *Curvularia* with a protuberant conidial hilum. *Mycologia* 1965;57:822-5.
16. Isenor M, Kaminskyj SG, Rodriguez RJ, Redman RS, Gough KM. Characterization of mannitol in *Curvularia protuberata* hyphae by FTIR and Raman spectromicroscopy. *Analyst* 2010;135:3249-54.
17. Morsy MR, Oswald J, He J, Tang Y, Roossinck MJ. Teasing apart a three-way symbiosis: transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;401:225-30.
18. Chen Q, Jiang J, Zhang G, Cai L, Crous PW. Resolving the *Phoma* enigma. *Stud Mycol* 2015;82:137-217.
19. De Gruyter J, Noordeloos M. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)—I. 1. Section *Phoma*: Taxa with very small conidia in vitro. *Persoonia* 1992;15:71-92.