

## RESEARCH ARTICLE

# 꼬마초롱이끼(*Mnium heterophyllum*)와 가는털깃털이끼(*Hypnum plumaeforme*)에서 분리한 국내 미기록 내생균: *Biscogniauxia* *petrensis*, *Cercophora thailandica*

최현숙<sup>1</sup>, 박혁<sup>1</sup>, 어주경<sup>2</sup>, 엄안흠<sup>1\*</sup><sup>1</sup>한국교원대학교 생물교육과, <sup>2</sup>국립생태원 생태연구본부

## Unrecorded Endophytic Fungi Isolated from *Mnium heterophyllum* and *Hypnum* *plumaeforme* in Korea: *Biscogniauxia* *petrensis* and *Cercophora thailandica*

Hyun-sook Choi<sup>1</sup>, Hyeok Park<sup>1</sup>, Ju-Kyeong Eo<sup>2</sup>, and Ahn-Heum Eom<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea<sup>2</sup>Bureau of Basic Ecological Research, National Institute of Ecology, Seocheon 33657, Korea

\*Corresponding Author: eomah@knue.ac.kr



### OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X

eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 March, 48(1): 55-61

<https://doi.org/10.4489/KJM.20200006>

Received: February 27, 2020

Revised: March 25, 2020

Accepted: March 26, 2020

© 2020 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.

### ABSTRACT

In this study, we isolated endophytic fungal strains from the rhizoid and the leaf of *Mnium heterophyllum* and *Hypnum plumaeforme*, respectively. The isolated strains were identified based on morphological characters and molecular analysis of the internal transcribed spacer, large subunit rDNA,  $\beta$ -tubulin, and RNA polymerase II subunit regions. From the results, we confirmed two endophytic fungal species, *Cercophora thailandica*, and *Biscogniauxia petrensis*, which to the best of our knowledge, have not yet been reported in Korea. We further describe the morphological characteristics and the results of the molecular analyses of these isolated fungal strains.

**Keywords:** *Biscogniauxia petrensis*, *Cercophora thailandica*, Endophytic fungi, *Hypnum plumaeforme*, *Mnium heterophyllum*

### 서론

내생균은 식물의 뿌리, 줄기, 잎 등 살아있는 식물 조직 내에서 숙주에게 질병을 일으키지 않으며 공생하는 자낭균, 담자균, 난균, 접합균들과 같은 진균류들을 말하며[1,2], 모든 육상 식물 즉, 초본류, 목본류 및 조류에서 발견된다[3]. 이들이 생산하는 8,600가지 이상의 생리활성 화합물인 2

차 산물은 숙주를 외부 공격으로부터 방어하는 항바이러스, 항박테리아, 항암 기능을 보이며[4], gibberellins (GA), abscisic acid (ABA), auxin (IAA)과 같은 식물생장 호르몬을 생성하여 생장을 촉진하는[5-7] 등 다양한 기능을 수행한다. 내생균은 생태계의 중요한 구성요소이며, 기생 균류나 초식동물에 대한 저항력을 높이는 것 외에도 가뭄, 염분, 토양의 온도 등 환경적인 스트레스로부터 저항성을 갖도록 하여 열악한 환경에서도 숙주식물이 번성할 수 있도록 한다[8]. 선택식물은 약 18,000 종이 분포하며[9], 한국에는 그 중 900 여 분류군이 보고되었으나[10], 아직까지 선택식물에 서식하는 내생균에 대한 분류·생태학적 연구는 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 선류(moss)에 속하는 꼬마초롱이끼(*Mnium heterophyllum*)의 헛뿌리(rhizoid)와 가는털깃털이끼(*Hypnum plumaeforme*)의 앞에서 내생균의 생물다양성을 확인하던 중 분리된 2종의 국내 미기록 내생균에 대한 형태적 특성과 분자계통 분석의 결과를 기술하고자 한다.

## 재료 및 방법

꼬마초롱이끼(*Mnium heterophyllum*)는 2018년 4월 대전광역시 유성구 구성동 인근(N36°37'44", E127°36'74")에서, 그리고 가는털깃털이끼(*Hypnum plumaeforme*)는 2019년 7월 전남 여수시에 위치한 돌산(N34°41'15.25", E127°46'32.48")에서 각각 채집되었다. 채집된 시료는 48시간 이내 실험실로 운반하였다. 증류수로 씻어 흙을 완전히 제거한 후에 잎과 줄기, 헛뿌리의 조직별로 나누고 이들을 75% 에탄올에 1분, 2% 차아염소산나트륨 용액에 3분, 75% 에탄올에 0.5분간 차례로 처리하여 표면 살균하였다. 이후 멸균된 여과지를 이용하여 물기를 완전히 제거한 뒤, 잎은 50 mg L<sup>-1</sup>의 tetracycline과 50 mg L<sup>-1</sup>의 streptomycin sulfate를 넣은 potato dextrose agar (PDA, 1.5%) 배지에 치상하였으며[11], 헛뿌리의 경우 100 µg mL<sup>-1</sup> 농도의 streptomycin 용액에 10분간 처리하고 멸균수로 3회 씻은 후 멸균된 여과지를 이용하여 물기를 완전히 제거한 뒤 0.5 cm 길이로 잘라 water agar (WA) 배지에 치상하였다[12]. 25°C의 암조건에서 배양하면서 매일 관찰하여 균사가 뻗어 나오는 것이 확인되면 메스를 이용하여 PDA배지로 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, Hilden, Germany)의 protocol에 따라 균사에서 DNA를 추출한 뒤, ribosomal DNA의 5.8S 지역을 포함하는 internal transcribed spacer (ITS)영역을 균류 특이적인 ITS1F/ITS4 프라이머 세트[13]를 이용하여 증폭하였으며, 보다 정확한 동정을 위하여 LR0R/LR16 프라이머 세트[14]를 이용하여 rDNA의 large subunit (LSU) 영역을, Bt2a/Bt2b 프라이머 세트[15]를 이용하여 β-tubulin (TUB) 영역을, rRPB2-5f/rRPB2-7cr 프라이머 세트[16]를 이용하여 RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) 영역을 각각 증폭하였다. PCR반응은 SolGent PCR smartmix (SolGent Co., Ltd., Daejeon, Korea)의 protocol에 따라 ITS, LSU, TUB는 95°C에서 2분(95°C 20초, annealing 40초, 72°C에서 1분)을 35 cycle 반복, 72°C 5분, 8°C에서 종료로 진행하였으며, RPB2는 95°C에서 5분, (95°C 1분, annealing 2분, 72°C에서 90초)를 35 cycle 반복, 72°C 10분, 8°C에서 종료로 진행하였다. Annealing 단계에서 ITS 영역은 50°C, LSU 영역은 44°C, TUB 영역은 55°C, RPB2 영역은 52°C로 온도를 설정하였다. PCR이 끝난 DNA는 1.5% agarose gel에 20분간 loading하여 각각 DNA 단편의 크기를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent Co., Ltd., Daejeon, Korea). DNA 염기서열은 미국 국립

생물정보센터(NCBI)의 nucleotide BLAST를 이용하여 유사도를 확인하고, MEGA7 [17] 을 이용하여 세 영역의 염기서열을 이어 neighbor-joining 방식으로 계통수를 작성하였다. 확인된 미기록종 균주는 국립생물자원관에 기탁하였으며, BLAST 및 tree 작성에 이용된 염기서열은 NCBI에 등록하였다.

**Table 1.** Morphological characteristics of *Cercophora thailandica* 18S004 and *Biscogniauxia petrensis* 19S021.

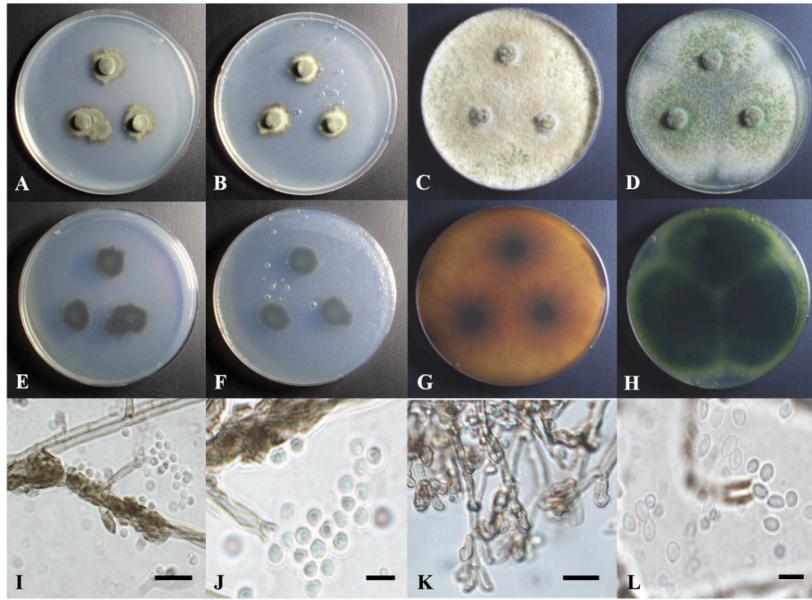
Characters	Strains			
	<i>C. thailandica</i> 18S004	<i>C. thailandica</i> [18]	<i>B. petrensis</i> 19S021	<i>B. petrensis</i> [22]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 25-32°C, 45 days	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 23-25°C, 10 days
Color	Dark brown, olive to olive-brown	Dark brown, olive to olive-brown	Whitish to light brown, reverse reddish-brown	Whitish to light pink, reverse yellowish to reddish-brown
Size	17 mm in diameter	40 mm in diameter	45 mm in diameter	40-43 mm in diameter
Shape	Circular, floccose, slow growing	Circular, even margin, floccose, fast growing	Cottony to woody, fast growing	Cottony to woody, aerial mycelia abundant, fast growing
Conidia	Globose to sub-globose, translucent, blue-colored, aseptate, 4.69~7.24× 4.72~6.52 μm in diam (n=20)	unrecorded	Hyaline, smooth, aseptate, ovoid to obovate, 7.01~11.19× 4.23~7.46 μm in diam(n=20)	Holoblastic, unicellular, hyaline, smooth, ovoid to clavate, 4.5~7.5× 2.5~4.5 μm (n=35), with obtuse tip and acute truncated base

## 결과 및 고찰

### *Cercophora thailandica* D.Q. Dai & K.D. Hyde, Fungal Diversity 82: 57 (2016)

[MB#552034]

꼬마초롱이끼의 헛뿌리에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 17 mm 정도이며, 앞면은 올리브색이 도는 진갈색을 띤다. 균사의 밀도가 전체적으로 균일하며, 다른 균주에 비해 자라는 속도가 느리다. 균총의 고도는 용기되어 있으며, 가장자리는 균사의 밀도가 줄어들며 방사형을 이룬다. 중앙의 균총을 제외하면 균사의 밀도는 전체적으로 균일하다(Fig. 1A). 뒷면은 불투명한 진갈색이며 균사의 밀도는 전체적으로 균일하나 가장자리부분만 낮다(Fig. 1E). 이러한 형태적 특징은 원기재문에서 서술된 특징과 유사하였다. MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 15-16 mm 정도로 PDA 배지에서의 성장속도보다 더 느리다. 앞면은 전체적으로 밝은 올리브색을 띠나 테두리 부분은 진갈색을 나타내며 띠를 이룬다. 균총의 고도는 용기되어 있었고 양털 모양의 공중균사가 덮고 있다. 중앙 부위를 제외하면 균총은 밀착된 카페트와 같이 전체적으로 편평하게 자라며 가장자리는 균사의 밀도가 줄어들며 방사형을 이룬다(Fig. 1B). 뒷면은 PDA 배지에서보다 좀 더 밝은 진회색이며 불투명하다(Fig. 1F). 균사의 말단 부위에서 구형의 반투명한 분생포자(conidia)가 형성되어 방사형으로 퍼져 나가며(Fig. 1I), 분생포자의 색은 옅은 푸른색을 띠고 크기는 4.69-7.24×4.72-6.52 μm 정도(n=20)이다(Fig. 1J).



**Fig. 1.** Colonies of strain 18S004 (*Cercophora thailandica*) grown for 7 days on (A, E) PDA and (B, F) MEA, (I) conidiophores and (J) conidia. Colonies of strain 19S021 (*Biscogniauxia petrensis*) grown for 7 days on (C, G) PDA and (D, H) MEA, (K) conidiophores and (L) conidia. PDA, potato dextrose agar; MEA, malt extract agar (scale bars: I, K=20  $\mu$ m, J, L=10  $\mu$ m).

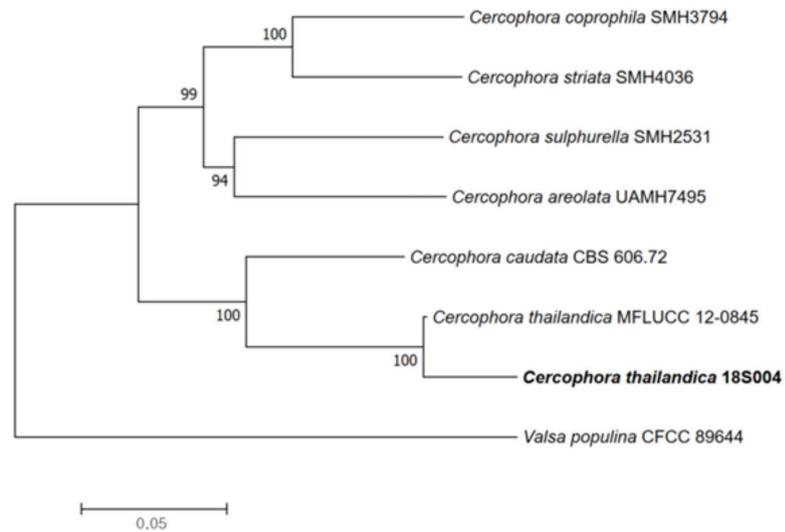
**Specimen examined:** Yuseong-gu, Daejeon, Korea, N36°37'33.9", E127°36'94.9", April 27, 2018, *Cercophora thailandica*, isolated from rhizoids of *Mnium heterophyllum*, strain 18S004, NIBRFG0000503362, GenBank No. MN611097 (ITS), MN368304 (LSU), (RPB2).

**Notes:** *C. thailandica*는 2016년 Dai & Hyde에 의해 기록된 종이며, 태국의 대나무 줄기에서 최초로 분리되었다[18]. *Cercophora*에 속하는 종들은 동물의 분변이나 나무 줄기에서 주로 분리되며[19], 중국에서 난초과의 *Dendrobium* 속 식물에서 *Cercophora*에 속하는 종들이 내생균으로 분리된 기록이 존재한다[20]. 원 기재문에서는 자낭 포자(ascospore)의 형태적 특성만이 기록되어있으며 분생포자는 확인되지 않았으나[18], 본 연구에서는 푸른 빛이 감도는 구형의 분생포자가 형성되는 것을 확인하여 추가로 기록하였다. 분생포자는 균사의 말단 부위에서 구형으로 형성되며, 이것은 다른 *Cercophora*에 속하는 종들의 분생포자 형태와 비슷하다[21]. 염기서열의 분석 결과 ITS 영역의 염기서열은 *C. thailandica* KU940139.1과 98.90%의 일치도를, LSU 영역의 염기서열은 *C. thailandica* KU863127과 99.32%의 일치도를, RPB2 영역의 염기서열은 *C. thailandica* KU940176과 97.16%의 일치도를 보였으며 tree 상에서 같은 계통을 형성함을 확인하였다(Fig. 2).

***Biscogniauxia petrensis* Z.F. Zhang, F. Liu & L. Cai, Persoonia 39: 11 (2017)**

[MB#818247]

가는털깃털이끼(*Hypnum plumaeforme*)의 잎에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 45 mm 정도이고 앞면은 연한 갈색이다. 균총의 밀도는 중심부에서 주변부로 갈수록



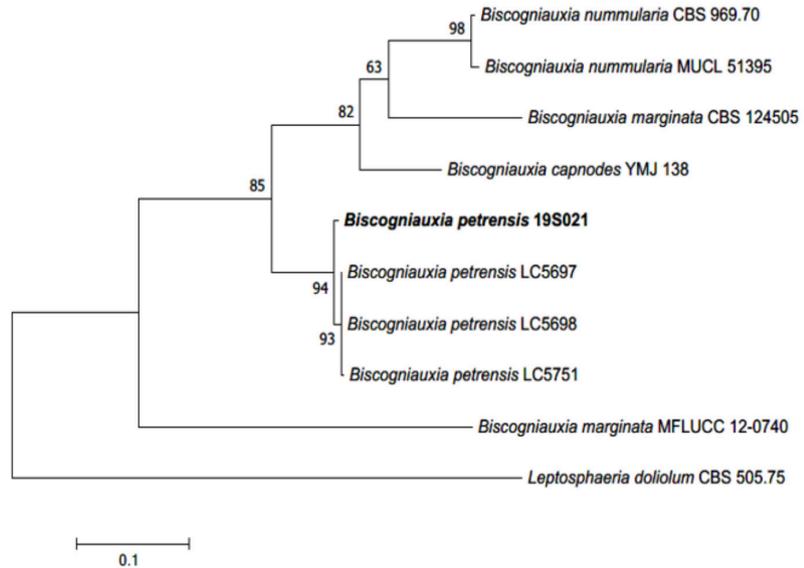
**Fig. 2.** Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS), large subunit (LSU), and RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) sequences. *Valsa populina* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate percent bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in a bold.

록 낮아진다. 균총의 고도는 용기되어 있으며, 가장자리로 갈수록 초록색 균사들이 흩뿌린 점처럼 관찰된다(Fig. 1C). 뒷면은 전체적으로 붉은 갈색이며 균총 중앙부는 검은색에 가까운 붉은 색을 나타낸다. 균사는 균총의 중앙에서 주변으로 방사형의 검붉은색 띠를 이룬다(Fig. 1G). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 43-45 mm 정도이고, 앞면은 밝은 갈색 바탕에 균총의 고도 중심부는 초록색 점들이 모인 초록빛을 나타내며 주변부로 갈수록 밝은 갈색을 보인다(Fig. 1D). 뒷면은 전체적으로 짙은 녹색을 보이며, 경계면은 밝은 갈색을 나타낸다. 균총의 고도는 불룩하게 용기되어 있으며, 균사들이 뒤덮여 둥근 형태를 이룬다(Fig. 1H). 균사가 나뭇가지 형태로 분지된 갈색의 분생자경(conidiophore)이 형성되고(Fig. 1K), 분생자경의 측면 가지로부터 난형 혹은 도란형의 분생포자가 형성된다. 분생포자는 무색 투명하며, 크기는 7.01-11.19×4.23-7.46  $\mu\text{m}$  정도 (n=20)이다(Fig. 1L).

**Specimen examined:** Dolsan-eup, Yeosu-si, Korea, N34°41'15.25", E127°46'32.48", July 16, 2019 *Biscogniauxia petrensis*, isolated from rhizoids of *Grimmia pilifera*, strain 19S021, GenBank No. MT072201 (LSU),

**Notes:** *B. petrensis*는 2017년 Z.F. Zhang, F. Liu & L. Cai에 의해 기록된 종이며, 중국 쑤이양 현의 석회암 동굴 내 바위에서 분리되었다[22]. 원 기재문에서 확인된 분생자경은 *Biscogniauxia* 속에서 일반적으로 관찰되는 것과 같이 표면이 거칠고 무사마귀 형태가 여러 개 달린 듯한 형태로 갈색을 띠며, 분생포자가 방출되면서 생긴 분열구를 지닌 부푼 생장부위를 가진다[22]. 또한 분생포자는 노란색부터 갈색을 띠는 *B. capnodes*와는 다르게 투명하거나 약간 노란색을 띠며, 폭이 좀 더 넓다[23]. 본 연구에서는 분생자경과 분생포자를 모두 확인할 수 있었으며, 원기재문과 형태가

일치하였으나 본 연구에서 확인된 분생포자의 크기가 조금 더 크다(Table 1). 염기서열의 분석 결과 ITS 영역의 염기서열은 *B. petrensis* KU746669.1과 99.21%의 일치도를, LSU 영역의 염기서열은 *B. petrensis* KU746715.1과 99.84%의 일치도를, TUB 영역의 염기서열은 *B. petrensis* KU746761.1과 98.66%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), large subunit (LSU) and  $\beta$ -tubulin (TUB) sequences. *Leptosphaeria doliolum* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate percent bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in a bold.

### 적요

꼬마초롱이끼의 헛뿌리와 가는털깃털이끼의 앞에서 내생균을 분리하였다. 분리된 균주는 형태적 특성과 internal transcribed spacer, large subunit rDNA, Beta-tubulin 영역 및 RNA polymerase II second largest subunit gene의 분자적 분석을 토대로 동정하였다. 연구 과정에서 2종의 국내 미기록종 내생균인 *Cercophora thailandica*와 *Biscogniauxia petrensis*를 확인하였다. 분리된 미기록종 내생균 균주의 형태적 특성 확인 및 계통 분석 결과에 대해 기술하였다.

### REFERENCES

1. Unterseher M. Diversity of fungal endophytes in temperate forest trees. In: Pirttilä AM, Frank AC editors. Endophytes of forest trees. Berlin: Springer; 2011. p. 31-46.
2. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 1988;69:2-9.
3. Rajamanikyam M, Vadlapudi V, Upadhyayula SM. Endophytic fungi as novel resources of

- natural therapeutics. *Braz Arch Biol Technol* 2017;60:1-26.
4. Barkodia M, Joshi U, Rami N, Wati L. Endophytes: A hidden treasure inside plant. *IJCS* 2018;6:1660-5.
  5. Khan SA, Hamayun M, Kim HY, Yoon HJ, Lee IJ, Kim JG. Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;25:829-33.
  6. Khan SA, Hamayun M, Yoon HJ, Kim HY, Suh SJ, Hwang SK, Kim JM, Lee IJ, Choo YS, Yoon UH. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiol* 2008;8:231.
  7. Khan SA, Hamayun M, Kim HY, Yoon HJ, Seo JC, Choo YS, Lee IJ, Rhee IK, Kim JG. A new strain of *Arthrinium phaeospermum* isolated from *Carex kobomugi* Ohwi is capable of gibberellin production. *Biotechnol Lett* 2009;31:283-7.
  8. Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytol* 2009;182:314-30.
  9. Vanderpoorten A, Goffinet B. Introduction to bryophytes, Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
  10. National Institute of Biological Resources. National list of species of the Korea (Moss, Livewort). Incheon: NIBR; 2011.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1323-30.
  16. Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* 1999;16:1799-808.
  17. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
  18. Dai DQ, Phookamsak R, Wijayawardene NN, Li WJ, Bhat DJ, Xu JC, Taylor JE, Hyde KD, Chukeatirote E. Bambusicolous fungi. *Fungal Divers* 2017;82:1-105.
  19. Miller AN, Huhndorf SM. Neotropical Ascomycetes 10. New and interesting *Cercophora* species. *Sydowia* 2001;53:211-26.
  20. Chen J, Hu KX, Hou XQ, Guo SX. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae). *World J Microb Biot* 2011;27:1009-16.
  21. Chang JH, Wang YZ. The genus *Cercophora* (Lasiosphaeriaceae) in Taiwan. *Fungal Sci* 2005;20:19-25.
  22. Zhang Z, Liu F, Zhou X, Liu X, Liu S, Cai L. Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. *Persoonia* 2017;39:1.
  23. Ju YM, Rogers JD, San Martin F, Granmo A. The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon* 1998;66:1-98.