

RESEARCH ARTICLE

Sordariomycetes에 속하는 5종의 미기록 내생균

차재의, 김은주, 김윤정, 엄안흠*

한국교원대학교 생물교육과

Five Unrecorded Endophytic Fungal Species in Sordariomycetes from Korea

Jae-Eui Cha, Eun-Ju Kim, Yun-Jeong Kim, and Ahn-Heum Eom*

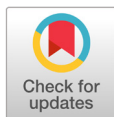
Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea

*Corresponding author: eomah@knue.ac.kr

ABSTRACT

Sordariomycetes is the second largest class of Ascomycota, distributed throughout various habitat including terrestrial and aquatic environments and also existing as endophytes. We isolated endophytic fungal strains in Korea, identifying them based on their morphological characteristics and molecular analyses, using eight specific DNA regions for accurate genus identification. We identified five previously unrecorded endophytic fungal species in Korea: *Chaetomium subaffine*, *Colletotrichum jiangxiense*, *Colletotrichum sydowii*, *Diaporthe vacuae* and *Neurospora tetraspora*. In this study, we describe the morphological characteristics and present our phylogenetic analyses of these five fungal species.

Keywords: *Chaetomium subaffine*, *Colletotrichum jiangxiense*, *Colletotrichum sydowii*, *Diaporthe vacuae*, *Neurospora tetraspora*



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2023 December, 51(4): 335-347
<https://doi.org/10.4489/kjm.20230034>

Received: November 15, 2023

Revised: November 27, 2023

Accepted: December 04, 2023

© 2023 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

Sordariomycetes은 자낭균문(Ascomycota)에서 두 번째로 큰 분류군으로 32목 107과가 포함된다 [1]. Sordariomycetes은 지의류를 형성하지 않고, 플라스크 형태의 자낭과를 가지며, 원시적인 자낭벽을 갖거나 하나의 자낭벽을 갖는 자낭을 형성한다[2]. Sordariomycetes에 속하는 대부분의 분류군은 육상 환경에서 분포하지만, 몇몇 분류군은 수중에서 서식할 수 있으며, 병원균이나 내생균으로 식물 내부에서 분리되기도 한다[3]. Sordariomycetes에 속하는 분류군 중 *Colletotrichum* 속, *Diaporthe* 속, *Chaetomium* 속은 내생균으로 빈번하게 발견되며, *Neurospora* 속도 내생균으로 보고된 바 있다[4].

내생균(Endophytic fungi)은 식물의 조직 내에서 서식하며 식물에게 부정적인 영향을 나타내지 않는 곰팡이이다[5]. 내생균은 식물에게 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대한 내성을 제공하며, 내생균이 생성하는 항균 물질은 병원균으로부터 식물을 보호한다[6]. 내생균이 생성하는 효소와 이차 대사산물은 농업과 산업에서 활용 가능성이 있으며, 바이오 연료, 생물 정화 등의 분야에도 활용하기 위한 연구가 수행되고 있다[7]. 따라서 내생균에 대한 연구는 곰팡이와 식물의 관

계를 파악하고 새로운 미생물 자원을 발굴할 가능성을 높인다. 본 연구는 국내 내생균을 분리하던 중 확인된 Sordariomycetes에 속하는 4속 5종의 국내 미기록 내생균에 대한 형태적 특징을 기술하고 분자계통학적 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채집과 균주 분리

시료의 채집은 2021년 9월부터 2023년 4월까지 진행하였다. 충청남도 보령시, 충청남도 태안군, 경상북도 경주시, 경상북도 울진군, 대전광역시에서 목본 식물의 잎과 줄기를 채집하여 24시간 이내에 실험실로 운반하였다.

식물 잎과 줄기 시료는 증류수로 세척한 후 1% NaClO 용액에 1분간 살균하고, 다시 70% 에탄올로 2분간 표면을 살균하였다. 살균이 완료된 시료들을 1.5 cm 크기로 잘라 potato dextrose agar (PDA; Difco Lab., Detroit, USA)에 치상하고, 시료의 내부에서부터 자란 균사를 계대배양하여 순수한 균주를 분리하였다.

형태적, 분자생물학적 분석

균주는 PDA배지를 이용하여 25°C, 암소에서 배양하였다. 균총의 형태는 PDA배지에서 7일간 배양한 후 관찰하였다. 미세구조의 관찰을 위해 slide culture 방법[8]을 이용하여 균주를 배양하였으며, *Diaporthe* 속 균주의 분생포자과(conidiomata) 형성을 유도하기 위해 소나무(*Pinus densiflora* Siebold & Zucc.) 잎을 멸균하여 2% water agar 배지에 균주와 함께 치상하였다[9]. 배양한 균주의 미세구조는 광학현미경(Axio Imager A1, Carl ZWISS, Overkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

균사에서 HiGene Genomic DNA Prep Kit (BioFACT, Daejeon, Korea)를 이용하여 DNA를 추출한 후, 각 속의 분자생물학적 동정을 위한 6개 DNA 지역을 Polymerase Chain Reaction (PCR)으로 증폭하였다. 증폭한 DNA 지역과 primer, PCR 조건은 Table 1에 기술하였다. 증폭된 DNA는 1.5% 아가로스 겔에서 20분간 전기영동하여 DNA 절편의 크기를 확인하고, Sanger 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon, Korea). DNA 염기서열은 National Center for Biotechnology Information에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용해 유사 서열을 탐색하였다. 동정을 위해 MEGA7 프로그램으로[18] DNA 서열을 결합하여 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성하였으며, bootstrap 방법을 이용해 1,000회 반복하여 계통수를 검증하였다. 미기록종 균주는 국립생물자원관(National Institute of Biological Resources, NIBR)에 기탁하였으며, 계통학적 분석에 이용한 DNA 염기서열은 NCBI에 등록하였다.

Table 1. DNA region, primer sets and PCR condition for molecular phylogenetic analysis.

DNA region	Primer pair	PCR condition
Internal transcribed spacer (ITS)	ITS1F/ITS4 [10]	2 min at 95°C; 35 cycles (20 s at 95°C, 40 s at 50°C, 1 min at 72°C); 5 min at 72°C
Large subunit ribosomal RNA gene (LSU)	LR0R/LR16 [11]	2 min at 95°C; 35 cycles (20 s at 95°C, 40 s at 44°C, 1 min at 72°C); 5 min at 72°C
β -tubulin (TUB2)	Bt2a/Bt2b [12]	2 min at 95°C; 35 cycles (20 s at 95°C, 40 s at 55°C, 50 s at 72°C); 5 min at 72°C
	T1/Bt2b [13]	4 min at 95°C; 35 cycles (30 s at 95°C, 30 s at 59°C, 45 s at 72°C); 7 min at 72°C
RNA polymerase II second largest subunit (RPB2)	fRPB2-5/fRPB2-7cR [14]	5 min at 95°C; 35 cycles (1 min at 95°C, 2 min at 52°C, 90 s at 72°C); 10 min at 72°C
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GDF/GDR [15]	2 min at 95°C; 35 cycles (20 s at 95°C, 40 s at 60°C, 50 s at 72°C); 5 min at 72°C
Chitin synthase (CHS1)	CHS-79F/CHS-354R [16]	2 min at 95°C; 35 cycles (20 s at 95°C, 40 s at 58°C, 50 s at 72°C); 5 min at 72°C
Calmodulin (CAL)	CAL-228F/CAL-737R [16]	2 min at 95°C; 35 cycles (20 s at 95°C, 40 s at 55°C, 50 s at 72°C); 5 min at 72°C
Histone H3 (HIS3)	CYLH3F/H3-1b [17]	2 min at 95°C; 35 cycles (20 s at 95°C, 40 s at 57°C, 50 s at 72°C); 5 min at 72°C

결과 및 고찰

Chaetomium subaffine Sergeeva ex X. Wei Wang & Houbraken, Studies in Mycology 101: 167 (2022) [MB#842311]

형태적 특징: PDA배지에서 25°C에서 7일간 배양했을 때 균총의 크기는 53.87-66.58 mm이고, 흰색 공중 균사가 발달하며, 배지 표면의 균총은 녹회색이고, 솜털 같은 질감을 나타낸다. 배지의 뒷면은 올리브색이며, 중앙으로 갈수록 점점 색이 진해진다(Fig. 1A and B). 분생포자경(conidiophore)은 분지된 균사의 끝에서 발달한다. 분생자(conidia)는 달걀 형태이고, 유리질이며, 세포벽의 질감은 부드럽다. 격벽(septate)이 없고, 사슬형태로 연결되며 사슬의 끝에서 말린 형태를 나타낸다. 분생자의 크기는 약 $(2.72-) 3.19 (-3.59) \times (1.77-) 2.17 (-2.53) \mu\text{m}$ ($n=20$)이다(Fig. 1D and E). 자낭과(ascomata)의 균사는 밝은 갈색이며, 돌기가 있고, 곧거나 휘어 있다(Fig. 1C). 완전히 발달한 자낭과와 자낭포자(ascospore)는 관찰되지 않았다.

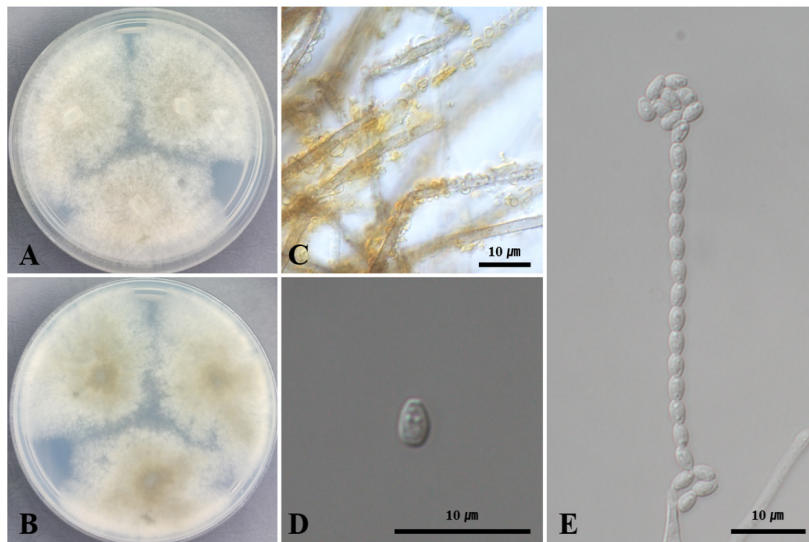


Fig. 1. Morphological characteristics of *Chaetomium subaffine* KNUE 22N617. Colonies grown for 7 days on potato dextrose agar (PDA) (A, B), ascomatal hairs (C), conidium (D), conidiophore and conidia (E).

Specimen examined: Wonsando island, Boryeong-si, Chungcheongnam-do, Korea, 36° 23'05.2"N 126°25'30.2"E, April 8, 2022, isolated from leaf of *Juniperus rigida*, strain KNUE 22N617, NIBRFGC000510081, GenBank No. OQ271280 (ITS), OR794364 (LSU), OR805129 (TUB2) and OR805130 (RPB2).

Notes: *C. subaffine*는 1961년에 Sergejeva에 의해 최초 보고되었으나 특징 기술의 부족으로 인해 2022년 Wang 등에 의해 다시 보고되었으며, 자낭과를 덮고 있는 흰색의 풍부한 균사체와 *Acremonium* 속의 무성포자와 유사한 형태의 분생자를 갖는다고 기술되었다[19,20]. 이는 *C. subaffine* KNUE 22N617의 형태적 특징과 일치하였다(Table 2). *C. subaffine*는 곡물에서 분리된 바 있으며[20], 식물 병원성 곰팡이에 대한 항생 효과가 보고되었다[21]. ITS, LSU, TUB2, RPB2 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS는 *C. subaffine* MN264617과 99.62%, LSU는 *C. subaffine* MH877811과 100%, TUB2는 *C. subaffine* MK026424와 99.50%, RPB2는 *C. subaffine* KF001817과 98.57% 일치하였으며, neighbor joining 계통수에서 *C. subaffine* CBS 637.91과 같은 그룹으로 형성되었다(Fig. 2).

Table 2. Morphological characteristics of *Chaetomium subaffine* KNUE 22N617.

Strain	<i>C. subaffine</i> KNUE 22N617	<i>C. subaffine</i> [18]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	OA
Color	White aerial hyphae, gray-green at the surface of medium; reverse olive green, darkness at the center, gradations of colour from center to edge	White aerial hyphae without coloured exudates; reverse uncoloured
Size	53.87-66.58 mm diam	No observation
Shape	Cottony	Abundant, floccose
Conidia	Ovate, hyaline, smooth-walled, aseptate, linked in chain and curled at the end, (2.72-) 3.19 (-3.59) × (1.77-) 2.17 (-2.53) μm	Formed in basipetal succession, aseptate, smooth, hyaline, ovate or spherical, usually attenuated into a narrowly truncate base, (3-) 3.5 (-5) × 2-3 μm

PDA: potato dextrose agar; OA: oatmeal agar.

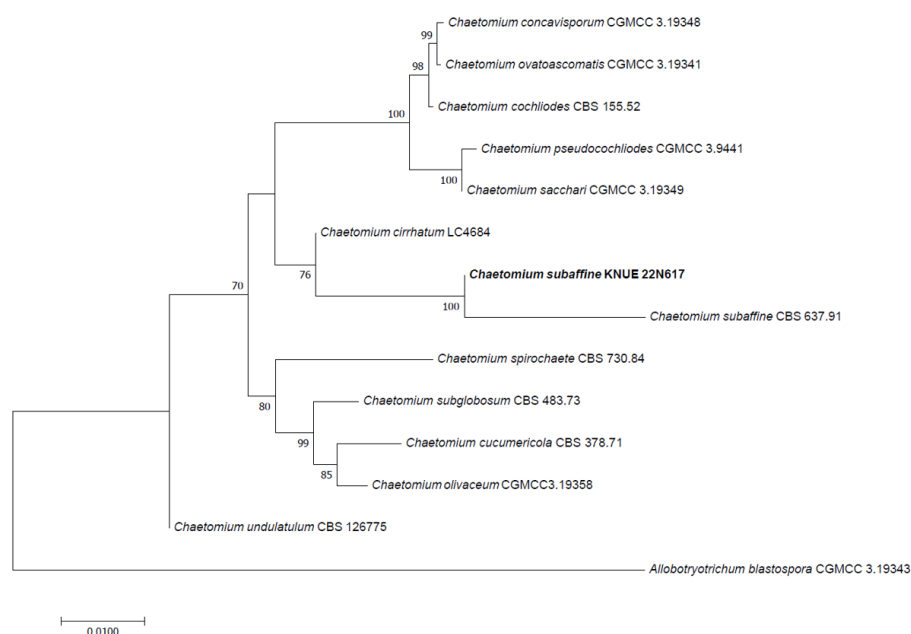


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree of *Chaetomium subaffine* KNUE 22N617 based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS), β -tubulin (TUB2), RNA polymerase II second largest subunit (RPB2), and large subunit ribosomal RNA gene (LSU) sequences. *Alloblotryotrichum blastospora* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates) upper than 50%. Fungal strain isolated in this study is in a bold.

***Colletotrichum jiangxiense* F. Liu & L. Cai, Persoonia 35: 82 (2015)
[MB#809161]**

형태적 특징: PDA배지에서 25°C에서 7일간 배양했을 때 균총의 크기는 46.07-47.73 mm이고, 원형이며, 가장자리는 매끄럽고, 고도는 납작하다. 균총의 색은 중앙이 회녹색, 가장자리는 흰색을 띠며, 솜털 같은 질감을 나타낸다. 배지의 뒷면은 연한 회색 또는 아이보리색을 띠며, 가장자리는 흰색이다(Fig. 3A and B). 분생포자경은 가지를 치며 분지하고, 유리질이며, 분생자생성세포(conidiogenous cell)는 원통형이고, 유리질이다(Fig. 3E). 분생자는 원통형이고 양쪽 말단은 둥글며, 세포벽의 질감은 부드럽고, 격벽이 없다(Fig. 3D). 내부에 과립이 관찰되며 크기는 약 $(11.06-12.95(-15.29) \times (4.53-5.50(-6.91) \mu\text{m}$ ($n=20$)이다. 부착기는 불규칙하고, 나뉘지 않거나 2가닥으로 나뉘지며, 검정색을 띠고, 세포벽은 두껍다(Fig. 3C).



Fig. 3. Morphological characteristics of *Colletotrichum jiangxiense* KNUE 22N642. Colonies grown for 7 days on potato dextrose agar (PDA) (A, B), appressorium (C), conidia (D), conidiophore and conidiogenous cell (E).

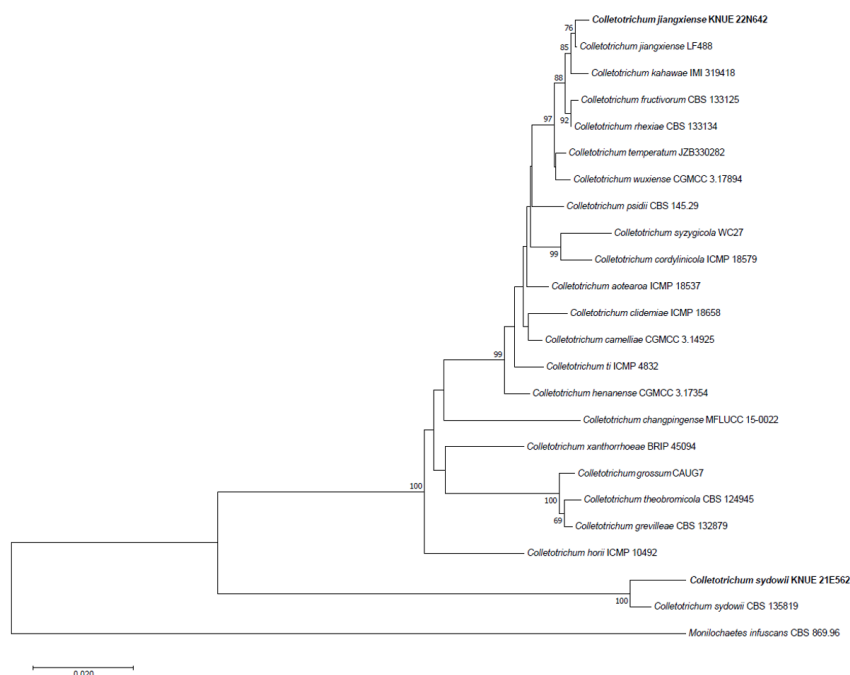
Specimen examined: Anmyeondo island, Taean-gun, Chungcheongnam-do, Korea, 36°29'30.9"N 126°21'37.4"E, April 8, 2022, isolated from leaf of *Daphniphyllum macropodum*, strain KNUE 22N642, NIBRFGC000510044, GenBank No. OR085434 (ITS), OR826299 (TUB2), OR826297 (GAPDH) and OR826295 (CHS1).

Notes: *C. jiangxiense*는 2015년에 Liu 등에 의해 최초 보고되었으며, 콜로니 가장자리가 평평하고 밀집된 공중 균사는 솜털 같은 질감에 백색에서 회색을 띠며 분생자는 투명하거나 무색으로 원통형, 매끄러운 세포벽과 양쪽 끝이 둥근 형태적 특징을 나타낸다[22]. *C. jiangxiense* KNUE 22N642도 같은 특징을 나타내었다(Table 3). 중국의 차나무에서 분리된 균주가 최초 보고되었으며[22], 고추와 아보카도에서 탄저병(anthraco)를 일으키는 병원균으로 보고된 바 있다[23,24]. ITS, TUB2, GAPDH, CHS1 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS는 *C. jiangxiense* MN744288과 99.42%, TUB2는 *C. jiangxiense* KX009039와 100%, GAPDH는 *C. jiangxiense* OM684529와 100%, CHS1은 *C. jiangxiense* MZ457431과 99.60% 일치하였으며, neighbor joining 계통수에서 *C. jiangxiense* LF 488과 같은 그룹으로 형성되었다(Fig. 4).

Table 3. Morphological characteristics of *Colletotrichum jiangxiense* KNUE 22N642.

Strain	<i>C. jiangxiense</i> KNUE 22N642	<i>C. jiangxiense</i> [22]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 7 days
Color	Gray-olive green at center, white at margin; reverse light gray or ivory, white at edge	White to gray, orange conidial masses near the margin; reverse olivaceous with pale orange near the margin
Size	46.07-47.73 mm diam	50-53 mm diam
Shape	Flat, entire edge, cottony	Flat with entire edge, aerial mycelium dense, cottony
Conidia	cylindrical, round end, smooth-walled, aseptate, granules inside, (11.06-) 12.95 (-15.29) × (4.53-) 5.50 (-6.91) μm	Hyaline, aseptate, smooth-walled, cylindrical, both ends bluntly rounded, or one end bluntly rounded and one end acutely rounded, 13-19 × 4-6 μm, L/W ratio=2.9

PDA: potato dextrose agar; L/W: length/width.

**Fig. 4.** Neighbor-joining phylogenetic tree of *Colletotrichum jiangxiense* KNUE 22N642 and *Colletotrichum sydowii* KNUE 21E562 based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), chitin synthase (CHS1), and β -tubulin (TUB2) sequences. *Monilochaetes infuscans* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates) upper than 50%. Fungal strain isolated in this study is in a bold.

***Colletotrichum sydowii* Damm, Studies in Mycology 86: 152 (2017) [MB#820688]**

형태적 특징: PDA배지에서 25°C에서 7일간 배양했을 때 균총의 크기는 62.53-65.60 mm이고, 백색에서 회색을 가진 솜털 질감의 균사가 짙은 회색의 균사로 구성된 중앙부를 둘러싼 모습이 관찰되었다. 고도는 평평하고 가장자리는 불규칙하며 섬유상의 형태로 발달하였다. 배지의 뒷면은 짙은 회색이다(Fig. 5A and B). 검정색 또는 회색의 부착기가 관찰되었고(Fig. 5C), 분생자는 투명하고 원통형이며 양 끝이 둥근 모양으로 직경은 (13.50-) 17.09 (-18.52) × (4.87-) 5.52 (-6.40) μm (n=20)이다(Fig. 5D).

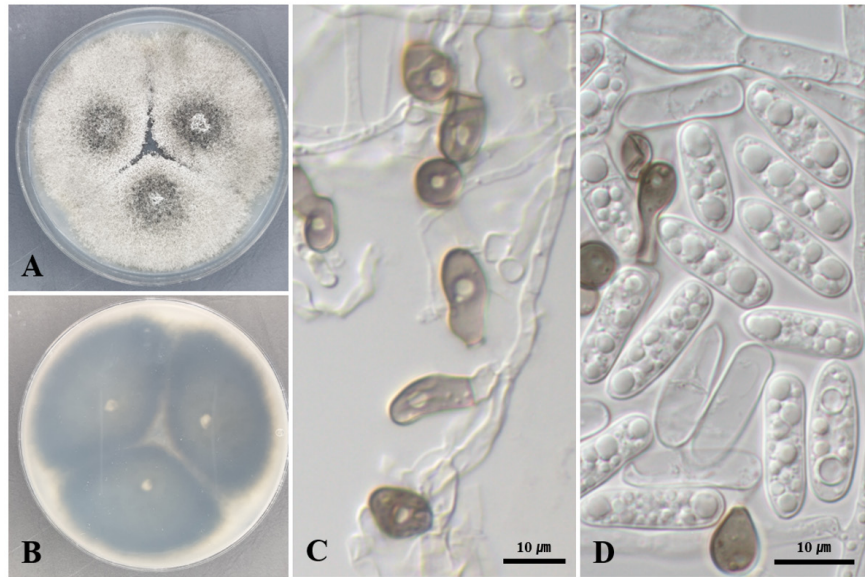


Fig. 5. Morphological characteristics of *Colletotrichum sydowii* KNUE 21N562. Colonies grown for 7 days on potato dextrose agar (PDA) (A, B), appressoria (C), conidia (D).

Specimen examined: Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, Korea, 35°41'52.7"N 129°21'04.0"E, September 2, 2021, isolated from leaf of *Albizia julibrissin*, strain KNUE 21E562, NIBRFGC000509078, GenBank No. OR 805364 (ITS) OR826300 (TUB2), OR826298 (GAPDH) and OR826296 (CHS1).

Notes: *C. sydowii*는 2017년에 Marin-Felix 등에 의해 최초로 보고되었으며, 분생자가 투명하고 부드러운 세포벽을 가지며 원통형의 특징을 나타낸다[25]. *C. sydowii* KNUE 21E562도 동일한 특징을 나타내는 분생자가 관찰되었다(Table 4). 딱충나무 속의 잎에서 분리된 것이 최초로 보고되었으며[25], 이후 *Bergenia ciliata*의 잎에서 내생균으로 분리되었다[26]. ITS, TUB2, GAPDH, CHS1 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS는 *C. sydowii* ON631989와 99.82%, TUB2는 *C. sydowii* KY263793과 99.72%, GAPDH는 *C. sydowii* MZ330608과 100%, CHS1은 *C. sydowii* MZ330610과 99.19% 일치하였으며, neighbor joining 계통수에서 *C. sydowii* CBS 135819과 같은 그룹으로 형성되었다(Fig. 4).

Table 4. Morphological characteristics of *Colletotrichum sydowii* KNUE 21N562.

Strain	<i>C. sydowii</i> KNUE 21N562	<i>C. sydowii</i> [25]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 7days
Color	White to light gray hyphae, dark gray at the center;reverse light black	Hyaline to honey, agar medium partly covered with short felty whitish aerial mycelium, reverse similar
Size	62.53-65.60 mm diam	27.5-29.5 mm diam
Shape	Flat with irregular and filiform margin	Flat with entire margin
Conidia	Hyaline, cylindrical, round end, granules inside, (13.50-) 17.09 (-18.52)×(4.87-) 5.52 (-6.40) μm	hyaline, smoothwalled, aseptate, straight, slightly clavate to cylindrical, with one end round and the other truncate, 18.3±0.9×5.2±0.2 μm, L/W ratio=3.5

PDA: potato dextrose agar; L/W: length/width.

***Diaporthe vacuae* S. Hilário, L. Santos & A. Alves, Mycologia 112 (2): 303 (2020) [MB#831440]**

형태적 특징: PDA배지에서 25°C에서 7일간 배양했을 때 균총의 크기는 90 mm 펠트리 접시를 모두 채웠으며, 중앙은 회색, 가장자리로 갈수록 흰색을 띤다. 균총의 고도는 배지에 납작하게 붙어 있으며 양털 같은 질감을 나타낸다. 배지 뒷면의 중앙은 짙은 회색 및 노란색이 관찰되며, 가장자리는 흰색을 띤다(Fig. 6A and B). 분생포자과는 연한 베이지에서 노란색을 띠며 구형이다(Fig. 6C). Alpha-분생자는 투명하고 매끄러운 타원형으로 크기는 약 $(4.33\text{--}5.16(-8.27) \times (2.30\text{--}3.09(-3.68)) \mu\text{m}$ ($n=20$) 정도이다(Fig. 6D). Beta-분생자와 gamma-분생자는 관찰되지 않았다. 분생포자과(Conidiomata) 주변으로 검은색에서 짙은 살구색의 삼출물이 분비된다.

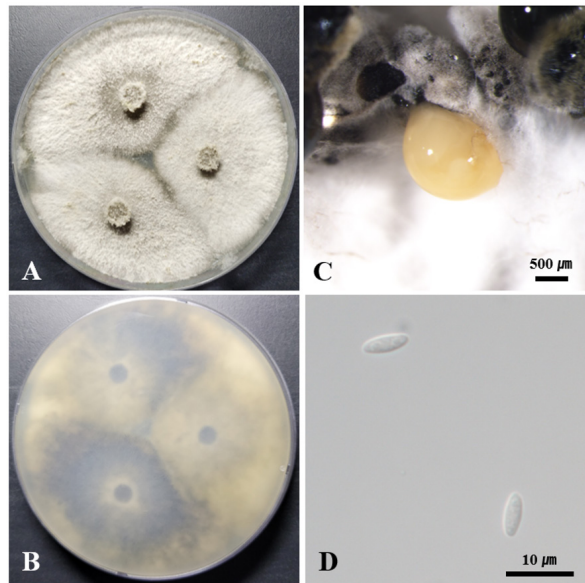


Fig. 6. Morphological characteristics of *Diaporthe vacuae* KNUE 23N743. Colonies grown for 7 days on potato dextrose agar (PDA) (A, B), conidiomata (C), alpha conidia (D).

Specimen examined: Mt. Gaphasan, Daejeon, Korea, 36°21'43.5"N 127°17'7.6"E, April 28, 2023, isolated from stem of *Stephanandra incisa*, strain KNUE 23N743, NIBRFGC000510477, GenBank No. OR805471 (ITS), OR826301 (TUB2), OR826293 (CAL) and OR826294 (HIS3).

Notes: *D. vacuae*는 2020년에 Hilário 등에 의해 신종으로 보고되었으며, 진달래과 식물인 *Vaccinium corymbosum*의 줄기 병변에서 최초로 분리되었다[27]. *D. vacuae*는 *D. eres* 및 *D. celeris*와 계통적으로 가까우나 더 큰 alpha-분생자와 beta-분생자를 가지며, PDA배지에서의 배양 특징이 다르다(Table 5). *D. vacuae*는 앞면은 흰색에서 회색 균사체가 관찰되고 뒷면은 노란색인 반면 *D. eres*는 흰색의 솜털같은 균사체가 나타나고 뒷면은 어둡고, *D. celeris*는 흰색 균사체가 점점 크림에서 갈색으로 변화하며 뒷면은 하얀색 또는 크림색이다[28,29]. *D. vacuae* KNUE 23N743은 분생자의 크기는 Hilário 등이 기술한 것보다 작게 측정되었으나 PDA배지에서 배양체의 특성이 일치하였다. ITS, TUB2, CAL, HIS3 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS는 *D. vacuae* OM950742와 100%, TUB2는 *D. vacuae* MT309458과 99.59%, CAL은 *D. vacuae* MT309449와 100%, HIS3은 *D.*

vacuae MK871446과 99.33% 일치하였으며, neighbor joining 계통수에서 *D. vacuae* CAA 830과 같은 그룹으로 형성되었다(Fig. 7).

Table 5. Morphological characteristics of *Diaporthe vacuae* KNUE 23N743.

Strain	<i>D. vacuae</i> KNUE 23N743	<i>D. vacuae</i> [27]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 7 days
Color	Gray at center, white at margin	White to gray surface mycelium, reverse with yellowish zone
Size	Fully grow in 90 mm petri dish	4.7±0.4 mm diam
Shape	Flat, woolly	Apressed mycelium
Conidia	Alpha-conidia: hyaline, smooth, (4.33-) 5.16 (-8.27)×(2.30-) 3.09 (-3.68) µm Beta-conidia and gamma-conidia were not observed	Alpha-conidia: infrequent, hyaline, smooth, 9.3±1.1×2.6±0.3 µm Beta-conidia: hyaline, 1-celled, aseptate, smooth, filiform, frequently hooked in apical part, apex acute, 27.4±2.3×1.6±0.2 µm Gamma-conidia were not observed

PDA: potato dextrose agar.

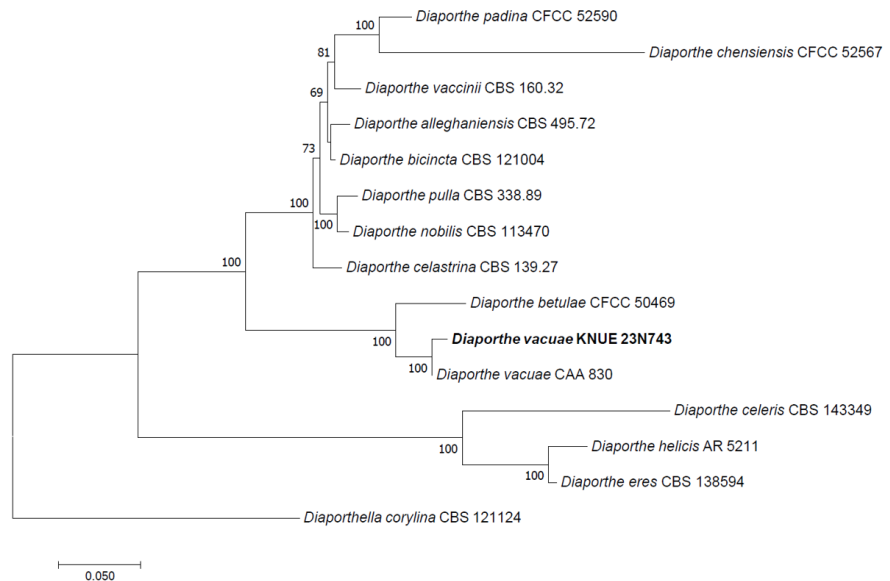


Fig. 7. Neighbor-joining phylogenetic tree of *Diaporthe vacuae* KNUE 23N743 based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS), β -tubulin (TUB2), calmodulin (CAL) and histone H3 gene (HIS3) sequences. *Diaporthella corylina* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates) upper than 50%. Fungal strain isolated in this study is in a bold.

***Neurospora tetraspora* Dania García, Stchigel & Guarro, Mycological Research 108 (10): 1134 (2004) [MB#488632]**

형태적 특징: PDA배지에서 25°C에서 7일간 배양했을 때 균총의 크기는 90 mm 페트리 접시를 모두 채웠으며, 중앙은 연한 회색이며, 가장자리와 중앙 사이에 회갈색의 균사가 발달하고, 고도는 배지에 납작하게 붙어 있다. 배지 뒷면의 중앙은 노란빛을 띄는 회색이며, 가장자리는 짙은 회색이다(Fig. 8A and B). 자낭과는 검은색의 균사로 덮힌 구형이며, 자낭에는 4개의 자낭포자가 발달한다(Fig. 8D and E). 자낭포자는 타원형이며 매끄럽고 검은색이며 크기는 약 (20.84-) 24.08 (-28.78)×(11.70-) 13.64 (-15.40) µm (n=20) 정도이다(Fig. 8C).

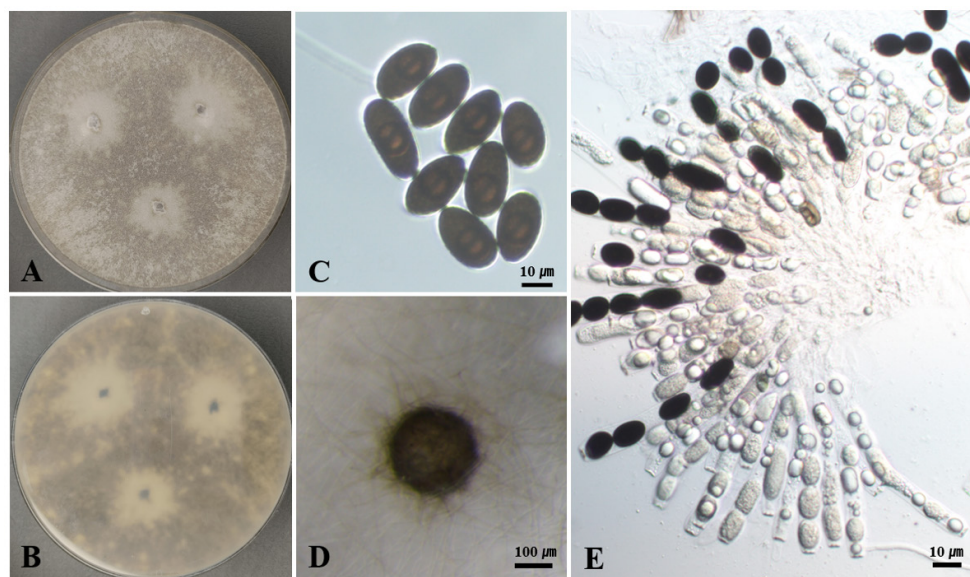


Fig. 8. Morphological characteristics of *Neurospora tetraspora* KNUE 22N2526. Colonies grown for 7 days on potato dextrose agar (PDA) (A, B), ascospores (C), ascumata (D), asci and ascospores (E).

Specimen examined: Uljin-gun, Gyeongsangbuk-do, Korea, 37°02'03.6"N 129°23'27.5"E, July 7, 2022, isolated from leaf of *Quercus mongolica*, strain KNUE 22N2526, NIBRFGC000510053, GenBank No. OQ271307 (ITS), and OR059183 (LSU).

Notes: *N. tetraspora*는 최초에 *Gelasinospora* 속으로 분류되었으나 유성생식 구조의 유사성과 28S rDNA 서열 정보를 바탕으로 2004년에 *Neurospora* 속으로 재분류되었다[30]. 4개의 포자가 든 자낭과 타원형으로 길쭉한 자낭포자를 형성하며, *N. tetraspora* KNUE 22N2526도 동일한 특징을 나타냈다(Table 6). 주요 분포는 배설물과 토양이며, 재분류된 이후 보고는 2018년 이집트에서 비근권성 토양에서 분리한 것이 있다[30,31]. 따라서 *N. tetraspora* KNUE 22N2526은 식물 내생균으로 보고된 최초의 균주이다. ITS, LSU 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS는 *N. tetraspora* MH859381과 100%, HIS3은 *N. tetraspora* NG_068996과 100% 일치하였으며, neighbor joining 계통수에서 *N. tetraspora* CBS 178.33과 같은 그룹으로 형성되었다(Fig. 9).

Table 6. Morphological characteristics of *Neurospora tetraspora* KNUE 22N2526.

Strain	<i>N. tetraspora</i> KNUE 22N2526	<i>N. tetraspora</i> [30]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	No observation
Color	Ligh gray at center, grayish brown between center and margin; reverse yellowish gray, dark gray at margin	No observation
Size	Fully grow in 90 mm petri dish.	No observation
Shape	Flat	No observation
Asci	4-spored	4-spored
Ascospores	Ellipsoidal, smooth, black, (20.84-) 24.08 (-28.78)×(11.70-) 13.64 (-15.40) μm	Ellipsoidal or elongate, 21-33×12-20 μm, often slightly flattened on one side

PDA: potato dextrose agar.

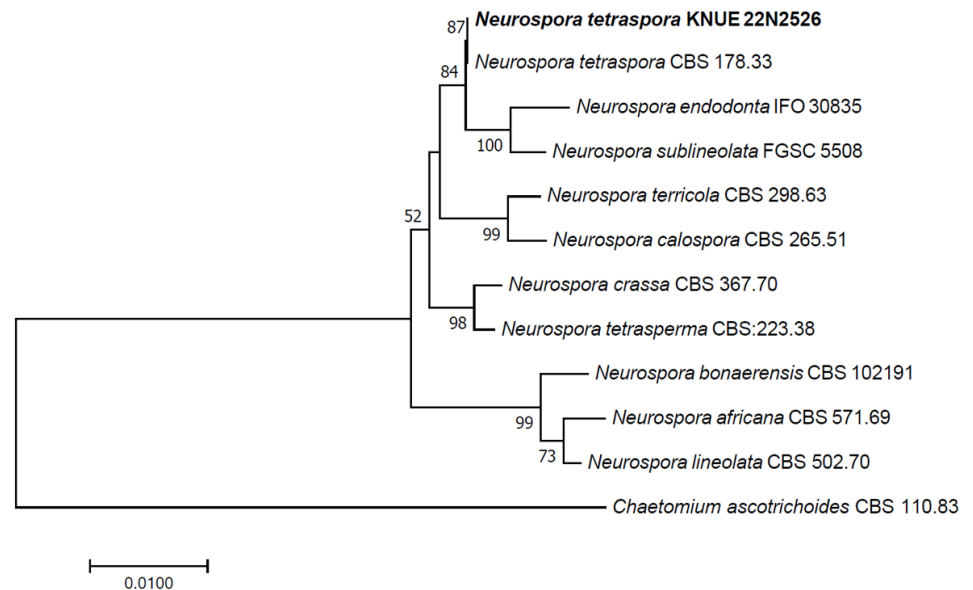


Fig. 9. Neighbor-joining phylogenetic tree of *Neurospora tetraspora* KNUE 22N2526 based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS) and large subunit ribosomal RNA gene (LSU) sequences. *Chaetomium ascotrichoides* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates) upper than 50%. Fungal strain isolated in this study is in a bold.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests

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 .

REFERENCES

1. Van Oorschot CA. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. *Stud Mycol* 1980;1:89.
2. Zhang N, Castlebury LA, Miller AN, Huhndorf SM, Schoch CL, Seifert KA, Rossman AY, Rogers JD, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* 2006;98:1076-87.
3. Hongsanan S, Maharachchikumbura SS, Hyde KD, Samarakoon MC, Jeewon R, Zhao Q, Al-Sadi AM, Bahkali AH. An updated phylogeny of Sordariomycetes based on phylogenetic and molecular clock evidence. *Fungal Diversity* 2017;84:25-41.
4. Rashmi M, Kushveer J, Sarma V. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. *Mycosphere* 2019;10:798-1079.
5. Stone JK, Polishook JD, White JF. Endophytic fungi. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods* 2004;241:270.
6. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* 2010;41:1-16.

7. Rana KL, Kour D, Sheikh I, Dhiman A, Yadav N, Yadav AN, Rastegari AA, Singh K, Saxena AK. Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications. *Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi: Diversity and Enzymes Perspectives* 2019;1:1-62.
8. Harris JL. Modified method for fungal slide culture. *J Clin Microbiol* 1986;24:460-1.
9. Dos Santos GD, Gomes RR, Gonçalves R, Fornari G, Maia BH, Schmidt-Dannert C, Gaascht F, Glienke C, Schneider GX, Colombo IR. Molecular identification and antimicrobial activity of foliar endophytic fungi on the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*) reveal new species of *Diaporthe*. *Curr Microbiol* 2021;78:3218-29.
10. 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.
11. Moncalvo J-M, 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.
12. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *AEM* 1995;61:1323-30.
13. Wang Y, Chen J-Y, Xu X, Cheng J, Zheng L, Huang J, Li D-W. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of *Camellia oleifera* in China. *Plant Dis* 2020;104:474-82.
14. Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* 1999;16:1799-808.
15. Templeton MD, Rikkerink EH, Solon SL, Crowhurst RN. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 1992;122:225-30.
16. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 1999;91:553-6.
17. Pintos C, Redondo V, Costas D, Aguín O, Mansilla P. Fungi associated with grapevine trunk diseases in nursery-produced *Vitis vinifera* plants. *Phytopathol Mediter* 2018;57:407-24.
18. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
19. Sergejeva K. Species novae generis Chaetomium III. *Bot Mater Inst Bot Acad Sci URSS* 1961;14:139-50.
20. Wang X, Han P, Bai F, Luo A, Bensch K, Meijer M, Kraak B, Han D, Sun B, Crous P. Taxonomy, phylogeny and identification of Chaetomiaceae with emphasis on thermophilic species. *Stud Mycol* 2022;101:121.
21. Liu C, Zhao J, Cao H. Study on the antifungal effect and mycolytic activity of the biocontrol agent *Chaetomium subaffine* LB-1. *Plant Prot Sci* 2021;57:289-96.
22. Liu F, Weir B, Damm U, Crous PW, Wang Y, Liu B, Wang M, Zhang M, Cai L. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Pers Mol Phylogeny Evol Fungi* 2015;35:63-86.
23. Ayvar-Serna S, Díaz-Nájera JF, Vargas-Hernández M, Camacho-Tapia M, Valencia-Rojas GA, Lima NB, Tovar-Pedraza JM. First report of *Colletotrichum jiangxiense* causing avocado anthracnose in Mexico. *Plant Disease* 2021;105:502.

24. Zhang Y, Zhu Z, Xu Y, Yang L, Wang Y, Chen C, Zheng P, Sun S, Zhou E, Shu C. First report of *Colletotrichum jiangxiense* causing anthracnose on chili in Yunnan Province, China. *Plant Disease* 2023;107:568.
25. Marin-Felix Y, Groenewald J, Cai L, Chen Q, Marincowitz S, Barnes I, Bensch K, Braun U, Camporesi E, Damm U. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in mycology* 2017;86:99-216.
26. Prasai JR, Sureshkumar S, Rajapriya P, Gopi C, Pandi M. Morphological and molecular characterization of endophytic fungi isolated from the leaves of *Bergenia ciliata*. *Ann Romanian Soc Cell Biol* 2021:2239-57.
27. Hilário S, Amaral IA, Gonçalves MF, Lopes A, Santos L, Alves A. *Diaporthe* species associated with twig blight and dieback of *Vaccinium corymbosum* in Portugal, with description of four new species. *Mycologia* 2020;112:293-308.
28. Udayanga D, Castlebury LA, Rossman AY, Chukeatirote E, Hyde KD. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Divers* 2014;67:203-29.
29. Guarnaccia V, Crous PW. Species of *Diaporthe* on camellia and citrus in the Azores Islands. *Phytopathol Mediterr* 2018;57:307-19.
30. García D, Stchigel AM, José C, Guarro J, Hawksworth DL. A synopsis and re-circumscription of *Neurospora* (syn. *Gelasinospora*) based on ultrastructural and 28S rDNA sequence data. *Mycol Res* 2004;108:1119-42.
31. Moubasher A, Abdel-Sater M, Soliman Z. *Neurospora tetraspora* D. Garcia, Stchigel & Guarro (= *Gelasinospora tetrasperma* Dowding) as a first record to Egypt. *Eur J Biol Res* 2018;8:14-20.