

감나무 부엽토에서 분리한 *Phialophora sessilis*에 대한 보고

박상규¹ · 이승열¹ · 이항범² · 정희영^{1*}

¹경북대학교 농업생명과학대학, ²전남대학교 농업생명과학대학

First Report on *Phialophora sessilis* Isolated from Leaf Mold of *Diospyros kaki* in Korea

Sangkyu Park¹, Seung-Yeol Lee¹, Hyang-Burm Lee² and Hee-Young Jung^{1*}

¹College of Agricultural & Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²College of Agriculture & Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

ABSTRACT: An unrecorded fungus was isolated from the leaf mold of *Diospyros kaki* in Sangju, Korea. Morphological and phylogenetic analyses were performed for the isolated fungus, which was ultimately identified as *Phialophora sessilis*. This is the first report of *P. sessilis* in Korea.

KEYWORDS : *Diospyros kaki*, Leaf mold, *Phialophora sessilis*

Phialophora sessilis de Hoog는 *Phialophora*속에 속해있는 진균류로서 de Hoog 등에 의해 네덜란드의 가문비나무(*Picea abies*) 수액에서 분리된 것이 최초 보고이다[1]. *Phialophora*속에 속해 있는 진균류의 대부분은 토양이나 부엽토에서 주로 발견되는 부생성 균으로서 병원성은 거의 없는 것으로 알려져 있으나 일부 종에서 식물에 대한 병원성이 보고되어 있다[2]. 또한 *Phialophora*속의 진균류 중 최초로 보고된 *P. verrucosa*를 비롯한 일부 종은 동물의 피부에서도 발견되는 것으로 알려져 있다[3]. 최근 *Phialophora*속과 *Cyphellophora*속의 연관성에 대한 연구가 활발히 진행되면서 해당 속의 진균류에 대한 분류학적 재검토가 이루어지고 있는 상태이다[4].

*P. sessilis*는 유럽 지역의 삼림토양이나 석회질 토양, 지의

류 등에서 분리된 보고가 있지만, 지금까지 자세한 대사작용이나 생태학적인 조사는 이루어지지 않고 있다[1, 5]. 다만 미국과 독일, 스페인을 비롯한 유럽의 사과 과실에 발생한 그늘음병(sooty blotch), 그늘음점무늬병(flyspeck)의 병반에서 발견된 바 있으며, 최근에는 중국에서 대나무에 발생한 점무늬병에서도 분리된 바 있다[5-9]. *P. sessilis*와 관련된 그늘음병과 점무늬병은 주로 줄기 외피나 과실의 표면 왁스 층에서 발생하여 식물체 내부로 침투하지 않는 성질을 띠고 있어 식물의 생육에는 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 알려져 있으나, 표면에 생긴 병반으로 인해 작물의 경제적 가치가 떨어지는 영향이 있다[6, 9]. 본 연구에서는 국내에 서식하는 진균류의 다양성을 조사하는 과정에서 아직 국내에 기록되어 있지 않은 종인 *P. sessilis*가 발견되어 그 형태 및 계통학적 특징을 분석하여 보고하고자 한다.

토양의 진균류를 분리하기 위해, 경북 상주시의 감나무 뿌리 주변의 부엽토를 채취하였다. 채취한 부엽토를 24시간 이내에 실험실로 운반하고 멸균수에 희석한 뒤 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)에 도말하여 25°C로 암배양하였다[10]. 배양 후 4일 뒤부터 검은색의 작고 조밀한 균총이 형성되었으며, 순수배양을 위해 단일 균총을 배지로부터 분리하여 새로운 PDA에 치상하였다. 분리한 균은 배양 후 30일이 지난 시점에서 균총의 지름이 22 mm로서 매우 느리게 성장하였으며 검은색을 띠는 조밀한 균총을 형성하였다(Fig. 1A). 균총 모양은 대략적으로 원형에 가까웠으며 중앙 부분부터 지름이 지면서 위로 부풀어오르는

Kor. J. Mycol. 2016 June, 44(2): 118-121
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.2.118
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
E-mail: heeyoung@knu.ac.kr

Received June 17, 2016
Revised June 21, 2016
Accepted June 21, 2016

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

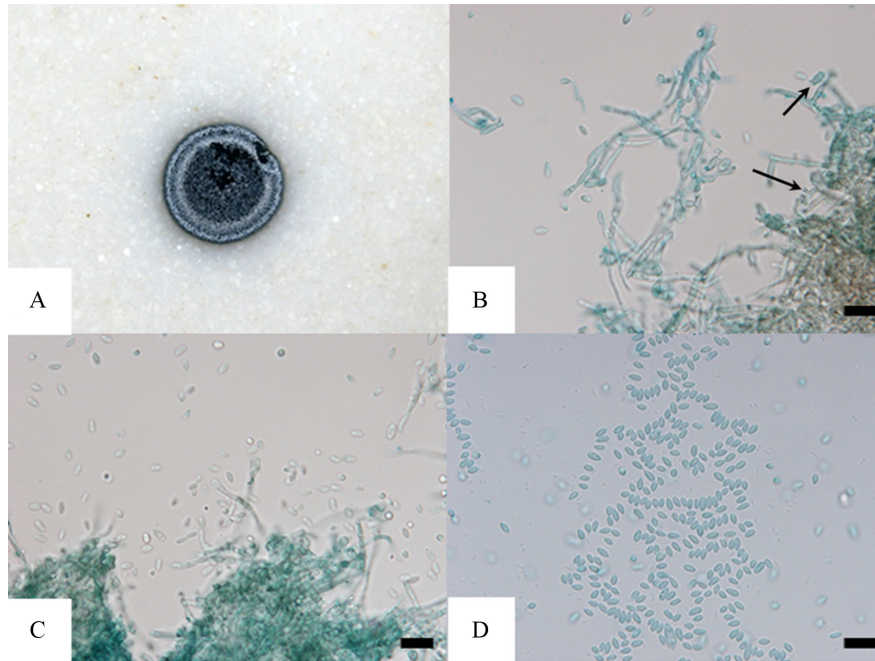


Fig. 1. Stereo and light photographs of *Phialophora sessilis* isolated from *Diospyros kaki*. A, Colonies on potato dextrose agar after 30 days; B~C, Observed hyphae and conidia. Sessile collarettes were observed on the hyphae and conidia (arrow); D, Conidia (scale bar = 10 μ m).

Table 1. Morphological characteristics of *Phialophora sessilis* isolated in this study

Characteristics		<i>P. sessilis</i> isolated in this study	<i>P. sessilis</i> ^a
Colony	Texture	Circular cerebriform, slow growth	Cerebriform, slow growth
	Color	Olivaceous black	Olivaceous black
Conidia	Shape	Subhaline, obovoidal to ellipsoidal	Subhaline, obovoidal to ellipsoidal
	Size	2.1~4 × 1.2~2 μ m	2.3~4.1 × 1.5~2.2 μ m

^aSource of description [5].

모양을 형성하였다. 배양 중에 기증균사는 형성되지 않았으며, 균총 가장자리의 감자한천배지를 침식하면서 성장하는 양상을 보였다. 분리한 균주의 형태적 특징을 확인하기 위해 광학현미경을 이용하여 균사와 포자의 형태를 관찰하였다. 그 결과 균사와 일부 분생포자에서 *P. sessilis*의 특징인 갈래 모양의 부착성 collarette가 관찰되었다[5](Fig. 1B). 또한 분리배양을 시작한 뒤 10일 이후부터 다량의 분생포자가 발생하기 시작하였으며, 현미경으로 관찰하였을 때 무색의 작은 타원형 내지는 달걀모양으로 확인되었다. 분생포자의 크기는 평균적으로 2.1~4 × 1.2~2 μ m였고 격벽이나 균핵, 강모는 관찰할 수 없었다(Fig. 1D).

분리한 균주의 동정을 위해 배양한 균으로부터 DNA를 추출한 뒤 polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였다. 동정의 정확성을 높이기 위해서 진균류의 동정에 주로 쓰이는 internal transcribed spacer (ITS) 영역에 추가로 β -tubulin과 large ribosomal subunit (LSU) 유전자의 염기서

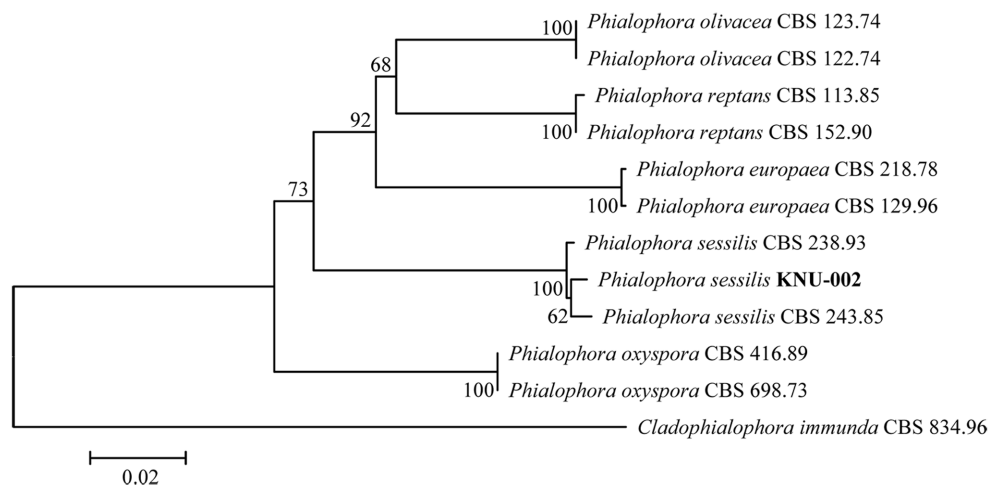
열을 분석하였다. ITS 영역의 증폭에는 ITS1F/ITS4 [11]를 이용하였으며, β -tubulin은 Bt2a/Bt2b [12], LSU는 LR0R/LR5 [13]의 primer set을 각각 사용하였다. PCR의 수행조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 먼저 진행한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 49~55°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여 총 35회 진행하였다. 이후 마지막으로 72°C에서 final extension을 7분간 진행하여 PCR 산물을 안정화하였다. Annealing 온도는 ITS 52°C, β -tubulin은 55°C, LSU는 49°C로 각각 진행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV로 확인하였다. 증폭된 PCR 산물을 EXoSAP-IT으로 정제하고 솔젠트(SolGent, Daejeon, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였고, 분석된 염기서열은 NCBI의 BLAST search를 통해 GenBank에 등록되어 있는 염기서열들과의 유사도를 확인하여 분리한 균의 종을 확인하였다. 그 결과 본 연구에서 분

Table 2. Sequences of *Phialophora* and allied species considered in this study

Species	Isolate No.	GenBank Accession No.		
		ITS	LSU	β -Tubulin
<i>Phialophora sessilis</i>	CBS 238.93	AY857541	KC455264	KC455235
<i>P. sessilis</i>	CBS 243.85	AY857542	EU514700	KC455234
<i>P. oxyspora</i>	CBS 416.89	JQ766449	JQ766497	JQ766374
<i>P. oxyspora</i>	CBS 698.73	JQ766450	KC455262	KC455232
<i>P. europaea</i>	CBS 218.78	JQ766441	JQ766488	JQ766366
<i>P. europaea</i>	CBS 129.96	JQ766440	KF928531	JQ766364
<i>P. olivacea</i>	CBS 123.74	KC455248	KC455261	KC455231
<i>P. olivacea</i>	CBS 122.74	KC455247	KC455260	KC455230
<i>P. reptans</i>	CBS 113.85	JQ766445	JQ766493	KC455233
<i>P. reptans</i>	CBS 152.90	JQ766446	JQ766494	JQ766371
<i>Cladophialophora immunda</i>	CBS 834.96	EU137318	KC809990	EU137203
<i>P. sessilis</i>	KNU-002 ^a	KX431941 ^a	KX431943 ^a	KX431943 ^a

^aThe sequences obtained in this study.

ITS, internal transcribed spacer; LSU, large ribosomal subunit.

**Fig. 2.** Phylogenetic tree of members of the genus *Phialophora* based on the combined sequence of internal transcribed spacer, large ribosomal subunit and β -tubulin. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 1,000 replicates. *Cladophialophora immunda* was used as outgroup. Bootstrap values (>50) were shown above/below the branches.

리한 균주의 ITS 영역 염기 서열은 *Phialophora sessilis*와 99%의 유사도를 지니는 것으로 확인되었으며, β -tubulin, LSU 유전자 역시 모두 99%의 유사도를 나타내어 본 연구에서 분리한 균주가 *P. sessilis*임을 확인할 수 있었다.

계통분석은 본 연구를 통해 얻은 *P. sessilis*의 염기서열과 NCBI에 등록된 여러 근연종의 염기서열을 GenBank로부터 조사하여 수행하였다. GenBank로부터 얻은 염기서열들 및 본 실험으로부터 얻은 염기서열들을 유전자 별로 비교, 정렬하였다. 정렬한 염기서열을 trimming 작업을 통해 다듬고 ITS, LSU, β -tubulin의 순서로 연결하여 결합염기서열

을 작성하였다(Table 2). 작성한 결합 염기서열을 바탕으로 MEGA6 프로그램을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성하였다[14]. 분석 결과, 부엽토에서 분리한 균주는 *P. sessilis*와 같은 클러스터를 형성하였으며, *Phialophora*속에 속하는 다른 종과 명확하게 구분되는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 연구에서 분리한 균은 *P. sessilis*임이 확인되었다(Fig. 2). 본 실험으로 분리한 *P. sessilis* 균주는 국립생물자원관(National Institute of Biological Resources, <http://www.nibr.go.kr>)에 기탁하여(표본번호 KOSPFGC00003251) 향후 추가적인 연구에 활용할 수 있도록 하였다.

본 연구에서는 상주시에서 서식하고 있는 감나무 근처의 부엽토로부터 국내에 아직 기록되지 않은 진균을 분리하여 그 형태학적 및 계통학적 분석을 수행하였다. 분리한 균은 *P. sessilis*로 확인되었으며 해당 미생물은 몇몇 작물에 부생성 그을음병 및 점무늬병 병반을 형성하는 것으로 알려져 있으므로 *P. sessilis*에 대한 보다 심도 있는 연구가 필요할 것이다.

적 요

경상북도 상주시에 서식하는 감나무 주변의 부엽토로부터 국내에 아직 기록되지 않은 진균을 분리하였다. 형태학적 및 계통학적 분석을 통해 분리한 균의 동정을 실시하였으며, 분석 결과 해당 균은 *Phialophora sessilis*로 확인되었다. 본 연구를 통해 *P. sessilis*가 국내에 존재함을 최초로 보고하였다.

Acknowledgements

This research was supported by a grant (NIBR 2015-01 205) from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea for projects on the survey and discovery of indigenous Korean fungal species.

REFERENCES

- de Hoog S, Weenink XO, van den Ende BG. Taxonomy of the *Phialophora verrucosa* complex with the description of two new species. *Stud Mycol* 1999;43:107-22.
- Gams W. *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent ascomycetes. *Stud Mycol* 2000;45:187-99.
- Medlar EM. A new fungus, *Phialophora verrucosa*, pathogenic for man. *Mycologia* 1915;7:200-3.
- Feng P, Lu Q, Najafzadeh MJ, van den Ende AH, Sun J, Li R, Xi L, Vincente VA, Lai W, Lu C, et al. *Cyphellophora* and its relatives in *Phialophora*: biodiversity and possible role in human infection. *Fungal Divers* 2014;65:17-45.
- Caretta G, Tosi S, Piontelli E, de Hoog GS. *Phialophora sessilis*, a lithobiont fungus. *Mycotaxon* 2006;95:281-4.
- Diaz Arias MM, Batzer JC, Harrington TC, Wong AW, Bost SC, Cooley DR, Ellis MA, Hartman JR, Rosenberger DA, Sundin GW, et al. Diversity and biogeography of sooty blotch and flyspeck fungi on apple in the eastern and midwestern United States. *Phytopathology* 2010;100:345-55.
- Batzer JC, Weber RW, Mayfield DA, Gleason ML. Diversity of sooty blotch and flyspeck complex on apple in Germany. *Mycol prog* 2016;15:2.
- Miñarro M, Blázquez, MD, Muñoz-Serrano A, Dapena E. Susceptibility of cider apple cultivars to the sooty blotch and flyspeck complex in Spain. *Eur J Plant Pathol* 2013;135:201-9.
- Zhuang J, Zhu M, Zhang R, Lin H, Lei Y, Sun G, Gleason ML. *Phialophora sessilis*, a species causing flyspeck signs on bamboo in China. *Mycotaxon* 2010;113:405-13.
- Davet P, Rouxel F. Detection and isolation of soil fungi. Enfield: Science Publishers; 2000.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
- 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.
- Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 1990;172:4238-46.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.