

감나무 잎에서 분리한 *Phialocephala piceae*에 대한 보고박상규¹ · 이승열¹ · 이재진¹ · 강인규¹ · 이항범² · 정희영^{1*}¹경북대학교 농업생명과학대학, ²전남대학교 농업생명과학대학A New Report on *Phialocephala piceae* Isolated from Leaf of *Diospyros kaki* in KoreaSangkyu Park¹, Seung-Yeol Lee¹, Jae-Jin Lee¹, In-Kyu Kang¹, Hyang Burm Lee² and Hee-Young Jung^{1*}¹College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea²College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

ABSTRACT: A previously unrecorded fungus was isolated from the persimmon (*Diospyros kaki*) leaf phyllosphere in Korea. The isolated fungus was characterized by morphological and phylogenetic analyses. The typical morphological characteristics of *Phialocephala piceae*, including dark brown colonies and short, thick conidiophores, were observed on the isolated fungus. A phylogenetic analysis based on the internal transcribed spacer (ITS) region and RNA polymerase II largest subunit (*RPB1*) also confirmed the identification of the isolated fungal species as *P. piceae*. Therefore, this is the first report of *P. piceae* in Korea.

KEYWORDS : *Diospyros kaki*, *Phialocephala piceae*, Phyllosphere

엽권(phyllosphere)은 식물체의 지상부 표면, 그 중에서도 가장 많은 면적을 차지하는 잎의 표면부를 지칭하며, 식물체의 지하부에 해당하는 뿌리의 표면인 근권(rhizosphere)과 함께 식물체와 외부환경의 활발한 상호작용이 일어나는 장소이다. 엽권은 근권과 마찬가지로 식물의 생태에 직접적으로 연관되어 있는 영역임과 동시에 근권보다 넓은 영역을 차지하고 있기 때문에, 그 중요성이 높다 할 수 있다. 엽권은 토양과 더불어 세균 및 진균류와 같은 미생물의 주요 서식지이며, 지구상을 통틀어 약 4억 제곱킬로미터에 달하는 광범위한 면적을 가지고 있으나, 서식하고 있는 미생물의 다양성이나 그 역할에 비해 연구는 근권에 비해 미진한 상태이다[1]. 엽권이나 근권에 서식하고 있는 미생물들

은 그 서식장소의 특성상, 식물과 매우 밀접한 관계를 가질 수밖에 없는데, 이는 병해와 같은 부정적인 방향으로 나타나기도 하지만 반대로 병해를 일으키는 미생물을 억제하고 식물의 생장에 도움을 주는 방향으로 나타나기도 한다[2]. 따라서, 엽권에 서식하고 있는 미생물의 다양성을 조사하고 그 역할을 밝혀내는 연구는 향후 유용한 작물의 재배와 병충해 방제에 활용될 수 있는 가능성이 매우 크다. 이러한 추세에 따라 최근에는 엽권에서 서식하고 있는 미생물 중 식물 병을 방제할 수 있는 미생물을 찾아내고 이를 기존의 화학농약을 대체하는 친환경 방제법의 수단으로 활용하려는 연구가 진행되고 있다[3].

이에 본 연구에서는 감나무의 엽권미생물을 조사하는 과정에서 아직 국내 미기록종인 *Phialocephala piceae*를 분리하여 그 형태 및 계통학적 특징을 보고하고자 한다.

감나무의 엽권에 서식하는 곰팡이를 분리하기 위해, 경북 상주시에 재식된 감나무의 잎을 채집하여, 멸균된 시험관에 넣고 즉시 밀봉하였다. 그 후 채집된 잎에 멸균수 10 mL를 넣고, 진탕배양기에서 30분간 150 rpm으로 진탕하였다. 30분 후, 현탁액을 멸균수에 10배씩 희석하여 희석액을 제작하고, 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)에 100 µL씩 각각 도말하여, 25°C에서 암배양하였다. 배양 3일 후, 배양된 균사는 새로운 PDA에 계대배양하여 25°C에서 배양하였다. 그 결과 분리된 균은 20일간 배양하였을 때, 직경 70 mm 원형으로 성장하였으며, 기준균사는 약 2~3

Kor. J. Mycol. 2016 September, 44(3): 188-192
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.3.188
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

***Corresponding author**

E-mail: heeyoung@knu.ac.kr

Received September 5, 2016

Revised September 20, 2016

Accepted September 23, 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.

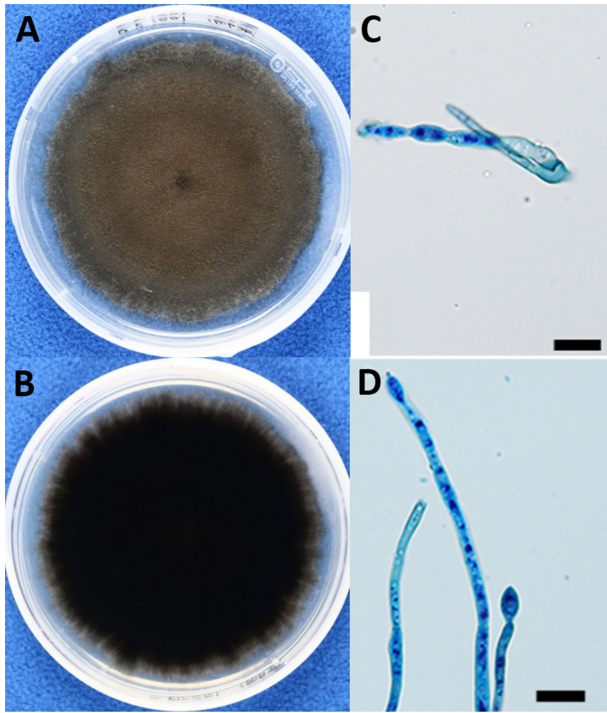


Fig. 1. Stereo and light photographs of *Phialocephala piceae* KNU-003. A, B, Colonies on PDA after 20 days; C, D, Observed hyphae and *Phialocephala*-like conidiophores showing typical type of *P. piceae* (scale bar = 10 μ m).

mm 가량으로 매우 짧았고, 표면은 솜털모양을 띠고 있었다. 배양 20일 후, 균총의 가장자리 약 1 mm 가량은 백색이었으나 안쪽부터는 매우 짙은 갈색을 나타냈고, 균총의 배면은 흑색이었다(Fig. 1A, 1B). 분리한 균의 형태적 특징을 알아보기 위해 광학현미경을 이용하여 균사와 포자의 형태를 관찰하였다. 관찰 결과, 짧고 굵은 형태의 분생자경(*Phialocephala*-like conidiophores) 유사조직이 관찰되었는데, 이는 *Phialocephala piceae*에서 관찰되는 형태적인 특징으로 알려져 있다(Fig. 1C, 1D)[4]. 분생자경 유사조직은 8~11 μ m $\times$ 3~4 μ m의 크기를 가지며 균사의 끝부분 또는 중간에서 갈라져 나오는 형태를 가지고 있었다(Table 1).

계통학적 분석을 위해 배양한 균주로부터 DNA를 추출한 뒤 polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였다. 계통학적 유연관계 분석에는 *Phialocephala*속의 분류에 사용

되는 internal transcribed spacer (ITS) 영역 및 RNA polymerase II largest subunit (RPB1) 유전자의 염기서열을 분석하였다. ITS 영역의 증폭에는 ITS1F/ITS4 primer pair를 이용하였으며 RPB1 유전자의 경우, RPB1-Af/RPB1-6Rlasc의 primer pair를 각각 사용하였다[5-7]. PCR 반응의 조건은 먼저 94°C에서 2분간 pre-denaturation을 진행한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 50~55°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여 총 35회 진행하였다. 이후 72°C에서 final extension을 5분간 수행하였다. Annealing 온도는 ITS 영역과 RPB1 유전자 증폭을 위하여, 55°C 및 50°C에서 수행되었다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 한 후 ethidium bromide로 염색하고 UV illuminator상에서 목적하는 DNA 단편의 증폭 여부를 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 EXOSAP-IT (GE Healthcare, Amersham, UK)을 이용하여 정제 후 염기서열 분석(SolGent, Daejeon, Korea)을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 NCBI의 BLAST search를 통해 GenBank에 등록되어 있는 종들과의 유사도를 확인하였다. 분석된 분리 균주의 ITS 영역과 RPB1 유전자의 염기서열(KX431944, KX431945)은 모두 *P. piceae*와 99%의 유사도를 지니는 것으로 나타났다(Data not shown). 계통학적 분석을 수행하기 위하여, NCBI에 등록된 여러 근연종의 염기서열을 수집하고 결합염기서열을 작성하였으며(Table 2), MEGA6 프로그램으로 근연종과의 유연관계 분석을 수행하였다[8]. 분석 결과 감나무의 앞에서 분리한 균주는 국외에서 보고된 *P. piceae*와 같은 클러스터를 형성하였으며, *Phialocephala*속에 속하는 다른 종과 명확하게 구분되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 따라서, 형태학적 특징 및 계통학적 유연관계 분석결과, 감나무 앞의 표면에서 분리된 균주는 *P. piceae*인것으로 확인되었다(Figs. 1, 2). 또한 본 연구에서 확보한 *P. piceae* 균주는 국립 생물자원관(National Institute of Biological Resources)에 기탁(표본번호 NIBRFGC000004562)하여 향후 추가적인 연구에 활용할 수 있도록 하였다.

*Phialocephala*속은 분생포자 형성의 차이를 바탕으로 1961년 Kendrick에 의해 *Leptographium*속에서 재분류되었다[9]. *Phialocephala*속은 대표종인 *P. dimorphospora*를 포함하여 37종의 균류가 속해 있으며 이 속에 속하는 곰팡이들은 주로 고산지대나 냉대기후의 침엽수림에 서식중인 나무의 잎이나 죽은 나무의 조직에서 발견되고 있다[10, 11].

Table 1. Morphological characteristics of *Phialocephala piceae* isolated in this study

Characteristics		<i>Phialocephala piceae</i> isolated in this study	<i>P. piceae</i> ^a
Colony	Texture	woolly, slight convex and margin diffuse	woolly, flat to convex in center
	Color	olive brown, reverse olivaceous black	olive brown, reverse olivaceous gray
Conidiophore	shape	short, thick	short, thick
	size	8~11 $\times$ 3~4 μ m	7~13 $\times$ 3.5~4.5 μ m

^aSource of description [4].

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

Identity	Isolates	Accession No.	
		ITS	RPB1
<i>Phialocephala piceae</i>	NB-249-1C	KP768377	KP965560
<i>P. piceae</i>	NB-392-3J	KP768379	KP965559
<i>P. piceae</i>	NB-115-4A	KP768376	KP965558
<i>P. nodosa</i>	NB-475	KP768357	KP965537
<i>P. nodosa</i>	NB-105-2B	KP768355	KP965541
<i>P. nodosa</i>	NB-452	KP768358	KP965539
<i>P. catenospora</i>	NB-432	KP768360	KP965534
<i>P. catenospora</i>	NB-578	KP768359	KP965536
<i>P. mallochii</i>	NB-611	KP768363	KP965543
<i>P. mallochii</i>	NB-430	KP768362	KP965544
<i>P. oblonga</i>	NB-548	KP768374	KP965545
<i>P. oblonga</i>	NB-377	KP768373	KP965546
<i>P. oblonga</i>	NB-565	KP768371	KP965547
<i>P. dimorphospora</i>	NB-423	KP768365	KP965550
<i>P. dimorphospora</i>	DAOM87232	KP972464	KP965549
<i>P. aylmerensis</i>	NB-544	KP768367	KP965552
<i>P. aylmerensis</i>	NB-543	KP768366	KP965551
<i>P. scopiformis</i>	NB-506	KP768330	KP965563
<i>P. scopiformis</i>	NB-481	KP768333	KP965564
<i>P. scopiformis</i>	NB-441	KP768339	KP965562
<i>Loramycetes macrosporus</i>	CBS 235.53	JN033383	KP965570
<i>P. piceae</i> ^a	KNU-003	KX431944	KX431945

ITS, internal transcribed spacer; RPB1, RNA polymerase II largest subunit gene.

^aThe sequence obtained in this study.

*Phialocephala*속에 속하는 곰팡이의 다수는 토양에서 식물체의 뿌리와 공생하며 식물체의 생장을 돕고 면역력을 활성화시키고 있다는 결과가 보고되어 있다[12, 13]. 지금까지 국내에서는 *Phialocephala*속에 속하는 진균류가 2종 보고되어 있다[14].

*P. piceae*는 Grünig 등[4]에 의해 가문비나무(*Picea abies*)의 잎으로부터 분리된 것이 최초 보고이다. 최초 보고 당시에는 *Mollisia*속과 유사한 유성세대의 형태적 특징을 바탕으로 새로운 속명 및 종명을 제안하여 *Phaeomollisia piceae*라는 이름으로 보고되었다[4]. 이후, *Phaeomollisia piceae*가 ITS영역의 유전자를 이용한 계통분석에서 *Phialocephala*속에 속하는 여러 종의 근연종과 동일한 클러스터를 형성하고 있다는 점과 형태학적으로 *Phialocephala*속과 유사점이 있다는 점을 근거로 Johnston 등[15]이 *Phialocephala piceae*라는 이름을 제안하여 현재까지 쓰이고 있다. 지금까지 *P. piceae*에 대한 연구는 스위스 등 유럽지역에 국한되어 있었으며, 현재까지 북미나 아시아 지역에서의 보고는 이루어진 바가 없다[16]. 또한 앞서 언급한 바와 같이 침엽수의

잎이나 뿌리 등에서 내생균으로 존재하며 생장 및 면역력 강화에 영향을 주는 것으로 예상되나, 정확한 생태, 기주와의 상호관계에 대한 체계적인 연구는 아직까지 수행되지 않았다.

본 연구에서는 상주시에서 서식하고 있는 감나무의 엽권에 서식하고 있는 곰팡이 중, 국내 미기록종을 분리하여 그 형태학적 및 계통학적 분석을 수행하였다. 그 결과, 분리된 균은 *P. piceae*로 확인되었으며, 위 균에 대한 연구는 현재까지 주로 침엽수에 부생하는 성질을 지니는 것으로 알려져 있으나 자세한 생태는 아직 알려져 있지 않다. 다만 목본류 식물의 생장에 도움을 주는 보고가 수 차례 보고되어 있으므로 보다 심도 있는 연구를 통해 여러 작물의 효과적인 재배에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

경상북도 상주시에 재식된 감나무 잎의 표면에서 국내 미기록종인 곰팡이를 분리하여 형태학적 및 계통학적 분석

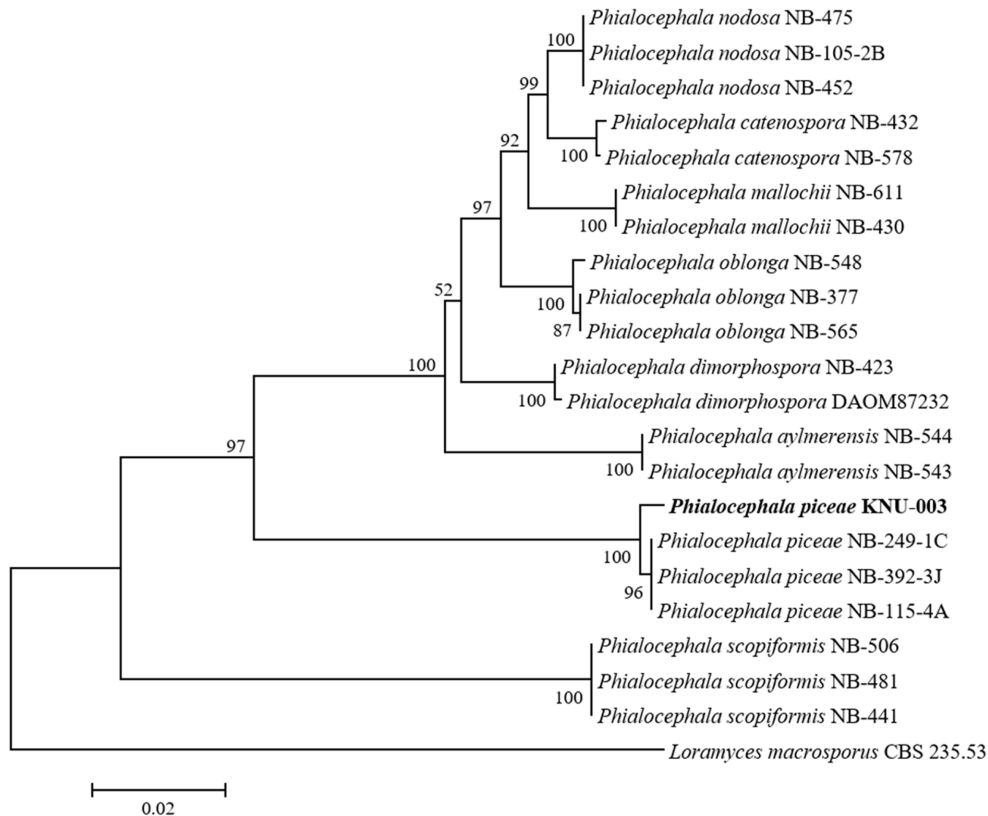


Fig. 2. Phylogenetic tree of members of the genus *Phialocephala* based on the combined sequence of internal transcribed spacer (ITS) region and partial of RNA polymerase II largest subunit (RPB1) gene. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 1,000 replicates. *Loramyces macrosporus* was used as outgroup. Sequence obtained in the study is shown in boldface.

을 수행하였다. 분리된 곰팡이는 *Phialocephala piceae*의 형태적 특징인 암갈색 균총과 굵고 짧은 분생자경 유사조직을 관찰할 수 있었다. *Phialocephala*속의 동정에 사용되는 internal transcribed spacer 영역과 RNA polymerase II largest subunit 유전자를 이용한 계통학적 분석을 통해 해당 균이 *P. piceae*임이 확인되었고, 이를 통해 최초로 국내에 *P. Piceae*가 존재함을 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

- Kim M, Singh D, Lai-Hoe A, Go R, Abdul Rahim R, Ainuddin AN, Chun J, Adams JM. Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees. *Microb Ecol* 2012;63:674-81.
- Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:828-40.
- Oh SO, Kim GH, Lim KM, Hur JS, Koh YJ. Disease progress of gray blight on tea plant and selection of a biocontrol agent from phylloplanes of plant. *Res Plant Dis* 2005;11:162-6.
- Grünig CR, Queloz V, Duò A, Sieber TN. Phylogeny of *Phaeomollisia piceae* gen. sp. nov.: a dark, septate, conifer-needle endophyte and its relationships to *Phialocephala* and *Acephala*. *Mycol Res* 2009;113(Pt 2):207-21.
- 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.
- Stiller JW, Hall BD. The origin of algae: implications for plastid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4520-5.
- Hofstetter V, Miadlikowska J, Kauff F, Lutzoni F. Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Mol Phylogenet Evol* 2007;44:412-26.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
- Kendrick WB. The *Leptographium* complex. *Phialocephala* gen. nov. *Can J Bot* 1961;39:1079-85.

10. Wang CJ, Wilcox HE. New species of ectendomycorrhizal and pseudomycorrhizal fungi: *Phoialophora finlandia*, *Chloridium paucisporum*, and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia* 1985;77: 951-8.
11. Hambleton S, Currah RS. Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae. *Can J Bot* 1997;75:1570-81.
12. Tellenbach C, Sieber TN. Do colonization by dark septate endophytes and elevated temperature affect pathogenicity of oomycetes? *FEMS Microbiol Ecol* 2012;82:157-68.
13. Terhonen E, Keriö S, Sun H, Asiegbu FO. Endophytic fungi of Norway spruce roots in boreal pristine mire, drained peatland and mineral soil and their inhibitory effect on *Heterobasidion parviporum* in vitro. *Fungal Ecol* 2014;9:17-26.
14. Johnston PR, Seifert KA, Stone JK, Rossman AY, Marvanová L. Recommendations on generic names competing for use in Leotiomyces (Ascomycota). *IMA Fungus* 2014;5:91-120.
15. Adhikari M, Kim SW, Kin HS, Um YH, Lee YS. Morphological and molecular characterization of a new fungal isolate *Phialocephala lagerbergii* (KNU14-11) from crop field soil in Korea. *KSM News Lett* 2016;28:62.
16. Tanney JB, Douglas B, Seifert KA. Sexual and asexual states of some endophytic *Phialocephala* species of *Picea*. *Mycologia* 2016;108:255-80.