**RESEARCH NOTE** 

# 토양에서 분리한 Diaporthe tectonae에 대한 보고

#### 박상규<sup>1</sup>, 이승열<sup>1</sup>, 이재진<sup>1</sup>, 백창기<sup>2</sup>, 이향범<sup>3</sup>, 정희영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 농업생명과학대학, <sup>2</sup>국립원예특작과학원, <sup>3</sup>전남대학교 농업생명과학대학

# First Report of Diaporthe tectonae Isolated from Soil in Korea

Sangkyu Park<sup>1</sup>, Seung-Yeol Lee<sup>1</sup>, Jae-Jin Lee<sup>1</sup>, Chang-Gi Back<sup>2</sup>, Hyang Burm Lee<sup>3</sup>, Hee-Young Jung<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>College of Agricultural and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea <sup>2</sup>National Institute of Horticultural and Herbal Science, Waniu 55365, Korea <sup>3</sup>College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

\*Corresponding author: heevoung@knu.ac.kr

## Abstract

An unrecorded fungal species in Korea, Diaporthe tectonae was isolated from soil in Jeon-ju of Korea. The isolate was characterized morphologically, and a phylogenetic analysis using a combined dataset of internal transcribed spacer,  $\beta$ -tubulin, and elongation factor 1- $\alpha$  sequences indicated its similarity to D. tectonae strains reported previously. To our knowledge, this is the first report of D. tectonae in Korea.

Keywords: Diaporthe tectonae, morphology, phylogeny, soil fungi

Diaporthe속(Diaporthaceae, Diaporthales)은 주로 목본계 식물에서 발견되는 진균류로 서, 많은 종류의 식물병원균 및 내생균을 포함하고 있다. 특히, 이 균은 다양한 기주식물에 가 지 및 줄기마름병. 점무늬병이나 뿌리썩음병 등을 일으키는 것으로 알려져 있는 중요한 분류 군이다[1]. 또한 Diaporthe속의 진균류는 다양한 식물에서 내생균으로 발견되기도 하는데 느 릅나무나 소나무, 티크, 눈측백 등과 같이 다양한 목본류 식물로부터 분리된 보고가 있다 [2-5]. 이렇게 내생균으로서 존재하는 Diaporthe속의 진균류는 항균효과나 항암효과를 가지 는 효소 또는 2차 대사산물을 생성하여 숙주식물에 유해한 생물 및 무생물적 요인에 대한 저 항성을 제공하기도 한다[6, 7]. Diaporthe속은 Nitschke에 의해 최초로 명명된 이후 지금까 지 880여 종의 균류가 보고되었으며, Phomopsis속의 유성세대명으로 잘 알려져 있다[8]. 이 전까지 Diaporthe 또는 Phomopsis에 속하는 균류의 분류 및 명명은 균학적 특징과 발견된 기 주식물의 종류에 따라 이루어지는 것이 일반적이었으나 최근의 연구는 Diaporthe속의 단일



Kor. J. Mycol. 2017 March, 45(1): 83-89 https://doi.org/10.4489/KJM.20170010

pISSN: 0253-651X eISSN: 2383-5249

Received: 19 February, 2017 Revised: 23 February, 2017 Accepted: 24 February, 2017

© The Korean Society of Mycology



work is properly cited.

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 종이 여러 종류의 기주로부터 발견되거나 또는 하나의 기주가 *Diaporthe*속의 여러 종에 의해 감염되어 있는 사례가 보고되고 있다[9-11]. 따라서 *Diaporthe*속에 속하는 진균류의 분류학 적 재 고찰의 필요성이 제기되고 있으며, 균학적 형태 분석과 더불어 분자생물학 기법을 활용 한 계통학적 유연관계 분석이 활발하게 진행되고 있다[12]. 분자생물학적 계통분석이 이루어 짐에 따라 유성세대 *Diaporthe*속과 무성세대 *Phomopsis*속 간의 상관관계에 대한 분석이 이 루어지고 있으며. 이러한 계통학적 유연관계 분석에는 진균류의 분석에 주로 사용되는 유전 자인 internal transcribed spacer (ITS) 영역과 함께 β-tubulin (BT), translation elongation factor 1-α (EF1-α), actin (ACT), calmodulin (CAL) 등 다양한 유전자를 활용하는 다자위 염기서열 분석 (multi-locus sequence analysis)이 주로 사용되고 있다[8]. 본 연구에서는 국 내의 토양에 존재하는 균류의 다양성을 조사하는 과정에서 국내에 아직 보고되지 않은 *Diaporthe tectonae*를 분리하여 그 형태 및 계통학적 특성을 보고하고자 한다.

토양에 서식하는 균류를 분리하기 위해, 전북 전주시 완산구에서 토양시료를 채집하여 멸 균된 conical tube에 넣고 밀봉하여 실험실로 운반하였다. 채집한 토양 1 g을 멸균수 10 mL에 넣고, 진탕배양기에서 30분간 150 rpm으로 진탕하여 미생물이 충분히 이탈하도록 하였다. 토양 현탁액을 멸균수에 10배씩 순차적으로 희석하여 희석액을 제작하고, 감자한천배지 (potato dextrose agar, PDA)에 100 μL 도말하여, 25°C에서 암배양하였다. 배양 3일 후 자라 난 직경 1 mm가량의 균총을 새로운 PDA에 치상하고 25℃에서 암배양하여 순수한 균주를 확보하였다. 분리된 균은 7일간 배양하였을 때 직경 80 mm의 크기로 생장하였으며, 기중균 사는 5 mm 이상으로 백색의 양털 모양을 가지고 있었다. 균총의 표면은 백색이었다가 시간 이 지남에 따라 갈색으로 변하였으며 중심으로부터 기중균사가 파도와 같은 모양을 그리며 풍성하게 생장하였다(Fig. 1A). 균총의 배면은 배양 초기 백색이었으나 3일 후부터 갈색을 띠 기 시작하여 20일 후에는 전체적으로 옅은 갈색에서 짙은 갈색까지 불규칙한 무늬를 가지는 모양을 나타내었다(Fig. 1B). 배양 40일 후부터 균총의 표면에 검은 색의 울퉁불퉁하고 단단 한 표면을 가진 구형의 분생자과(conidiomata)가 형성되기 시작하였으며 크기는 약 0.8~1.2 mm 정도였다(Fig. 1C). 분리한 균의 형태적 특징을 알아보기 위해 형성된 분생자과를 채취 하여 1% 메틸렌 블루 용액으로 염색한 후 광학 현미경(BX50; Olympus, Tokyo, Japan)을 이 용하여 분생자경(phialide)과 포자를 관찰하였다. 관찰 결과, 분생자경은 길이 14~23 µm, 폭 1~2 um의 크기에 끝부분으로 갈수록 가늘어지는 원통형의 다발로 형성되었고, 끝부분에 분 생포자 형성세포(conidiogenous cells)가 생성되었다(Fig. 1D, 1E). 분생포자는 단생으로 격 막은 존재하지 않았으며, 내부에 2개의 물방울 모양의 무늬를 가진 타원형 또는 원통형이었 고, 길이는 4~7 μm, 폭은 2~3 μm였다(Fig. 1F). 이러한 형태적 특징은 이전에 보고된 D. tectonae의 형태와 일치한다 (Table 1)[13].

분리한 균을 분자생물학적으로 동정하기 위해 균총의 일부를 채취하여 HiGene Genomic DNA prep kit (BIOFACT, Daejeon, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출 된 DNA 시료를 주형으로 하여 진균 특이적인 프라이머 조합인 ITS1F/ITS4[14], Bt2a/Bt2b [15], EF1-728F/EF1-986R[16]를 사용하여 각각 internal transcribed spacer (ITS) 영역,  $\beta$ -tubulin (BT), translation elongation factor 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) 유전자를 증폭하였다. 유전자의 증폭을 위해 수행한 PCR의 조건은 95°C에서 2분간 pre-denaturation을 진행하고, 95°C에서 30초간의 denaturation, 유전자마다 정해진 온도에서 30초간 annealing, 그리고 72°C에서 1



**Fig. 1.** Stereo and light photographs of *Diaporthe tectonae* isolated in this study. A, colony on potato dextrose agar (PDA) after 20 days; B, reverse side of colony on PDA; C, conidiomata; D~E, phialides and conidiogenous cells; F, conidia (scale bars: D~F = 10 µm).

Characteristics		isolated in this study	Diaporthe tectonae <sup>a</sup>	Diaporthe tulliensis <sup>b</sup>
Colony	Color	white top, brown bottom	white top, olive brown bottom	white top, reverse white~gray
	Size	5.8~9.0 cm after 4 days on PDA	7.0~8.0 cm after 7 days on PDA	9.0 cm after 2 weeks on PDA
	Form	irregular edge, wooly, dense aerial mycelium	irregular edge, fluffy medium dense aerial mycelium	flat with no aerial mycelium
Conidio	$Length\left(\mu m\right)$	14.0~23.0	11.0~18.0	15.0~20.0
-phores	Width (µm)	1.0~2.0	1.0~2.0	1.5~2.5
	Color	hyaline	hyaline	hyaline
	Shape	cylindrical, tapering towards the apex, straight	cylindrical, tapering towards the apex	cylindrical, tapering towards the apex
Conidia	Length (µm)	4.0~7.0	4.0~6.8	5.0~7.5
	Width (µm)	2.0~3.0	2.0~2.9	2.0~2.5
	Color	hyaline	hyaline	hyaline
	Shape	ellipsoid, 1~2 guttulate, apex bluntly rounded	oblong to ellipsoid, 1~2 guttulate, apex bluntly rounded	cylindrical, rounded at the apex, obconically truncate at base

Table 1. Morphological characteristics of Diaporthe tectonae isolated in this study

**D** ·

.

PDA, potato dextrose agar.

<sup>a</sup>Source of description[8].

<sup>b</sup>Source of description[17].

분가 extension을 1 cycle로 하여 총 35회 반응을 진행하였다. 마지막으로 72°C에서 5분가 final extension을 진행하여 반응물을 안정화하였다. Annealing 온도는 ITS영역 55℃, β -tubulin 58°C, EF1-α는 52°C에서 각각 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 0.7% agarose gel 에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 뒤 UV illuminator를 이용하여 목적한 유전 자의 증폭 여부를 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 EXoSAP-IT을 이용하여 정제하였 으며 이후 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석한 염기서열들을 NCBI GenBank database에 등록하였으며(Accession no. LC215944, LC215945, LC215946) BLAST 검색을 통하여 GenBank의 database와 비교하여 다른 종들과의 유사도를 확인하였다. 분석 결과, 본 연구에 서 분석된 염기서열들은 ITS,  $\beta$ -tubulin, EF1- $\alpha$  세 유전자 모두 D. tectonae MFLUCC-14-1139와 99%의 유사도를 가지는 것으로 나타났다. 계통학적 유연관계를 분석하기 위해 NCBI의 GenBank에 등록된 여러 근연종의 염기서열 자료를 수집하였다(Table 2). 수집한 여러 근연종의 염기서열들을 MEGA6 프로그램을 사용하여 각 유전자별로 정렬한 뒤 정렬한 염기서열들을 ITS,  $\beta$ -tubulin, EF1- $\alpha$ 의 순서로 연결하여 결합염기서열을 작성하고, neighbor-joining 알고리즘을 통해 계통수를 작성하였다[17]. 계통분석을 위한 외집단 (outgroup) 으로는 Diaporthella corvlina를 사용하였다. 분석 결과 토양에서 분리한 균주는 국외에서 보고된 D. tectonae와 같은 그룹을 형성하였으며, Diaporthe속의 다른 근연종과 명 확히 구분되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 따라서, 형태학적 특징과 계통학적 유연관계의 분석 결과를 종합하여 판단할 때, 본 연구를 통해 토양에서 분리된 균주는 D. tectonae인 것으로 확 인되었다. 본 연구에서 확보한 D. tectonae 균주는 국립생물자원관(National Institute of

	Isolates	GenBank accession no.		
Species		ITS	eta -tubulin	EF1- $\alpha$
Diaporthe tectonae	14-1139	KU712438	KU743985	KU749366
D. tectonae	14-1132	KU712434	KU743981	KU749363
D. tulliensis	BRIP 62248a	KR936130	KR936132	KR936133
D. schini	CBS 133181	KC343191	KC344159	KC343917
D. terebinthifolii	CBS 133180	KC343216	KC344184	KC343942
D. longicolla	FAU 599	KJ590728	KJ610883	KJ590767
D. sojae	FAU 635	KJ590719	KJ610875	KJ590762
D. eres	CBS 439.82	KC343090	KC344058	KC343816
D. eres	AR5193	KJ210529	KJ420799	KJ210550
D. helianthi	CBS 592.81	KC343115	KC344083	KC343841
D. neoarctii	CBS 109490	KC343145	KC344113	KC343871
D. stewartii	CBS 193.36	FJ889448	JX275421	GQ250324
D. batatas	CBS 122.21	KC343040	KC344008	KC343766
Diaporthella corylina	CBS 121124	KC343004	KC343972	KC343730
Diaporthe tectonae <sup>a</sup>	KNU16-003	LC215944	LC215945	LC215946

 Table 2. Diaporthe and Diaporthella strains used in this study and their GenBank accession numbers

ITS, internal transcribed spacer; EF1-  $\alpha$ , elongation factor 1- $\alpha$ .

<sup>a</sup> Isolated in this study.



0.02

**Fig. 2.** Neighbor-joining tree of the members of the genus *Diaporthe* based on a combined alignment of internal transcribed spacer region,  $\beta$ -tubulin gene and elongation factor 1- $\alpha$  gene sequences. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. The fungal strain isolated in this study is boldfaced.

Biological Resources, http://www.nibr.go.kr)에 기탁하여 향후 추가적인 연구에 활용할 수 있도록 하였다(표본번호 KZITFG0000000591).

D. tectonae는 2016년 태국 북부의 티크(Tectona grandis)에서 발생한 줄기마름 병반으로 부터 분리된 것이 최초 보고이다[13]. D. tectonae는 Diaporthe에 속한 진균류 중에서는 최근 에 보고된 종으로서, 아직까지 생태나 특징에 대해서는 밝혀진 바가 매우 미미하다. 계통학적 으로 D. tectonae는 카카오나무(Therbroma cacao)의 새싹마름 병반으로부터 분리된 D. tulliensis와 가장 가까운 것으로 나타나고 있으나, 균학적 특징에서 분생포자의 모양이 D. tectonae가 좀더 짧고 굵은 모양을 띠고 있다. D. tectonae의 균총의 색이 갈색인데 비해 D. tulliensis의 균총은 회색이고, 기중균사가 적다는 특징을 갖고 있어 구분된다[18]. Diaporthe 속의 진균류는 다양한 목본계 식물의 내생균으로 존재하며, 식물을 보호하는 한편, 식물병원 균으로서 여러 작물에 피해를 주기 때문에 그 연구 가치가 매우 큰 진균류이다. 본 연구에서 분리한 D. tectonae는 최근에 발견된 균주로서 향후 연구 가치가 크다고 할 수 있다.

#### 적요

전북 전주시 완산구의 토양으로부터 국내 미기록종인 균류를 분리하였다. 형태학적 특징 및 ITS 영역, β-tubulin, EF1-α 유전자를 이용한 계통학적 분석 결과, 토양에서 분리한 균류 는 *Diaporthe tectonae*인 것으로 확인되었으며, 본 연구를 통해 *D. tectonae*가 국내에 존재함 을 최초로 보고하였다.

### Acknowledgements

This research was supported by a grant (NIBR 2015-01205) from the National Institute of Biological Resources, funded by the Ministry of Environment of the Republic of Korea for projects on the survey and discovery of indigenous Korean fungal species.

### REFERENCES

- 1. Udayanga D, Castlebury LA, Rossman AY, Hyde KD. Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytosporella*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. Persoonia 2014;32:81-101.
- Brayford D. Variation in *Phomopsis* isolates from *Ulmus* species in the British Isles and Italy. Mycol Res 1990;94:691-7.
- 3. Eo JK, Lee BH, Eom AH. Diversity of endophytes isolated from *Thuja koraiensis* Nakai in the Korean peninsula. Kor J Mycol 2016;44:113-7.
- 4. Murali TS, Suryanarayanan TS, Geeta R. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. Can J Microbiol 2006;52:673-80.
- Botella L, Diez JJ. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus* halepensis. Fungal Divers 2011;47:9-18.
- 6. Kobayashi H, Meguro S, Yoshimoto T, Namikoshi M. Absolute structure, biosynthesis and anti-microtubule activity of phomopsidin, isolated from a marine derived fungus *Phomopsis* sp. Tetrahedron 2003;59:455-9.
- 7. Lin X, Huang Y, Fang M, Wang J, Zheng Z, Su W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. FEMS Microbiol Lett 2005;251:53-8.
- 8. Gomes RR, Glienke C, Videira SI, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia 2013;31:1-41.
- 9. Crous PW, Groenewald JZ. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. Australas Plant Pathol 2005;34:463-70.
- van Niekerk JM, Groenewald JZ, Farr DF, Fourie PH, Halleer F, Crous PW. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. Australas Plant Pathol 2005;34:27-39.
- 11. Diogo EL, Santos JM, Philips AJ. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. Fungal Divers 2010;44:107-15.
- Rossman AY, Adams GC, Cannon PF, Castlebury LA, Crous PW, Gryzenhout M, Jaklitsch WM, Mejia LC, Stoykov D, Udayanga D, et al. Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use. IMA Fungus 2015;6:145-54.
- 13. Doilom M, Dissanayake AJ, Wanasinghe DN, Boonmee S, Liu JK, Bhat DJ, Taylor JE, Bahkali AH, McKenzie EH, Hyde KD. Microfungi on *Tectona grandis* (teak) in northern Thailand. Fungal Divers 2017;82:107-82.
- 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.
- 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. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 1999;91:553-6.
- 17. 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.
- 18. Crous PW, Carris LM, Giraldo A, Groenewald JZ, Hawksworth DL, Hernández-Restrepo M, Jaklitsch WM, Lebrun MH, Schumacher RK, Stielow JB, et al. The genera of fungi - fixing the application of the type species of generic names -- G 2: *Allantophomopsis, Latorua, Macrodiplodiopsis, Macrohilum, Milospium, Protostegia, Pyricularia, Robillarda, Rotula, Septoriella, Torula,* and *Wojnowicia.* IMA Fungus 2015;6:163-98.