

RESEARCH ARTICLE

한산도에 서식하는 식물의 잎에서 분리된 5종의 국내 미기록 내생균

박혁, 이종철, 엄안흠*
한국교원대학교 생물교육과

First Reports of Five Endophytic Fungi Isolated from Leaves of Plants Inhabiting the Hansando Island in Korea

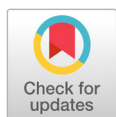
Hyeok Park, Jong-Chul Lee, and Ahn-Heum Eom*
Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheonju 28173, Korea

*Corresponding Author: eomah@knue.ac.kr

ABSTRACT

Endophytic fungi were isolated from the leaves of plants inhabiting the Hansando Island in Korea. We identified the fungal strains based on their morphological characteristics and on the phylogenetic analysis using DNA sequences of the internal transcribed spacer, small subunit rDNA, large subunit rDNA, and translation elongation factor 1- α regions. In this study, we isolated five endophytic fungi that have not been recorded in Korea, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Beltraniella humicola*, *B. portoricensis*, *Microxiphium theae*, and *Piceomphale pinicola*. Their morphological characteristics as well as the results of molecular phylogenetic analysis are reported here.

Keywords: *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Beltraniella humicola*, *Beltraniella portoricensis*, *Microxiphium theae*, *Piceomphale pinicola*



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 September, 48(3): 217-228
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200023>

Received: August 26, 2020

Revised: September 22, 2020

Accepted: September 22, 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.

서론

내생균(fungal endophytes)은 식물에 균류가 공생하는 형태 중 하나로, 식물체의 건강한 조직 내에 서식하고 있는 균류이다[1]. 내생균은 식물체 내에서 특별한 스트레스 상황이 없다면[2] 식물체에 병증을 유발하지 않으며[3], 식물체 내에서 알칼로이드와 같은 2차 대사산물(secondary metabolites)의 생성 및 분비를 통해 병원체 혹은 포식자로부터 식물을 보호하는 역할을 할 수 있다[4,5]. 내생균은 주로 수직적 전달을 통해 전파되는 것으로 추측되며, 이는 내생균이 숙주식물과 특이적인 관계를 형성할 수 있음을 보여준다[6].

한려 해상 국립공원 내의 한산도(N34°46'55", E128°29'05")는 행정구역상 경남 통영시에 속하며, 통영시의 육지에서 남쪽 바다로 2 km 정도 떨어진 섬이다. 한산도의 면적은 약 14.8 km² 정도로 국내 섬 면적 순위 20위권 밖에 위치하는 매우 작은 섬이다. 한산도와 500 m 정도 인접한 추봉도(N34°45'39.88", E128°31'25.59")는 본래 약 3.835 km²의 작은 면적을 가진 별개의 섬이었으나, 2007년 다리를 통해 한산도와 연결되었다. 한산도 및 추봉도에는 고란초 등의 희귀식물과 더불어 후박나무 군락, 곰솔 군락 등의 노거수 군락이 분포하고 있어[7] 고유한 식생을 갖고 있는 것이 특징이다. 본 연구에서는 한산도 및 그 부속 도서인 추봉도의 목본 식물에 공생하는 내생균에 대해 연구하던 과정에서 확인된 국내 미기록종 내생균 균주에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물 시료는 2019년 4월 한산도 일대에서 채집하였다. 한산도에 자생하는 왕대(*Phyllostachys bambusoides* S. et Z.)와 곰솔(*Pinus thunbergii* Parl.), 그리고 산철쭉(*Rhododendron yedoense* var. *poukhanense* (Lév.) Nakai)의 병증이 나타나지 않은 건강한 잎을 채취하여 폴리에틸렌 백에 담아 24시간 이내에 실험실로 운반하였다. 채취한 잎을 증류수로 깨끗이 세척한 후 1%의 NaOCl 용액에서 1분, 70% EtOH에서 2분 동안 처리하여 표면살균하였고[8], 잎의 크기와 두께에 따라 시간은 적절히 조절하였다. 표면살균된 잎을 적당한 크기로 등분하여 potato dextrose agar (PDA)배지에 치상하였다. 배지를 25°C 암소에서 배양하면서 균사가 뻗어 나오면 새로운 PDA배지로 계대배양하였으며, 순수 분리된 균주는 PDA배지와 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 GmbH, Hilden, Germany)의 protocol에 따라 균사에서 genomic DNA를 추출한 뒤, 분자생물학적 동정을 위해 DNA의 여러 지역을 다양한 프라이머를 이용하여 증폭하였다(Table 2). PCR이 끝난 DNA는 1.5% agarose gel에서 20분간 전기 영동을 진행하여 각각의 DNA 단편 크기를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다(SolGent, Daejeon, Korea). 분석된 염기서열은 미국 국립생물정보센터(NCBI) 상에서 BLASTn하여 각각 유사도 및 참고 서열의 존재 여부를 확인하였으며, MEGA7 프로그램을 이용하여[9] 두 영역 혹은 세 영역의 염기서열을 이어서 neighbor-joining 방식으로 계통수를 작성하여 동정하였다. 동정된 균류 중 미기록종 내생균 균주는 국립생물자원관(NIBR)에 기탁하였고, BLASTn 유사도 분석 및 계통수 작성에 이용된 DNA 염기서열은 NCBI에 등록하였다.

Table 1. Morphological characteristics of endophytic fungal strains isolated in this study.

Strains	Colonies			Conidia	
	Cultural condition	Color	Size	Shape	
<i>Arthrinium camelliae-sinensis</i>					
Wang et al. [10]	MEA, 25°C, 7 day	Surface dirty white; reverse pale luteous	Reaching 90 mm in diam (1-point inoculation)	Flat, margin circular, with sparse aerial mycelium	Brown to dark brown, smooth, globose to subglobose, 9.0-13.5×7.0-12.0 µm in diam.
19E157	MEA, 25°C, 7 day	Surface white, with ivory aerial mycelium; reverse pale yellow	42-45 mm in diam (3-points inoculation)	Raised, margin circular, with sparse aerial mycelium	Bright brown to yellowish-brown, uniseptate, globose to subglobose, (6.83-) 8.63(-9.96)×(6.66-)8.39(-10.82) µm in diam.
<i>Beltraniella humicola</i>					
Ramarao [12]	PDA, 25°C	White at first, turning pale grey green	Uncertain	Blackish stromatic layer	Hyaline to greyish-brown, fusiform, a paler band in the middle, 1-celled, (1.5-22.5)×(6.2-8.5) µm in diam.
19E355	PDA, 25°C, 7 day	Surface dark ivory; reverse bright beige	40-45 mm in diam.	The density of mycelia decreases from center to margin, margin undulate	Rhomboid or fusiform, a paler band in the middle, 0-1 septate, (24.72-) 27.72(-32.82)×(6.03-)7.18(-9.04) µm in diam.
<i>Beltraniella portoricensis</i>					
Rajeshkumar et al. [16]	PDA, 25°C	Dark brown	Uncertain	Forming irregular patches, velutinous	Smooth, lageniform to navicular, subhyaline to olivaceous with a hyaline transverse band, (20-)25(-31)×5.5-7 µm in diam.
19E061	PDA, 25°C, 7 day	Surface pale white; reverse pale yellow	40-45 mm in diam.	Raised in center, flat in margin	Fusiform, uniseptate, hyaline to pale beige, (19.45-)25.15(-32.28)×(4.71-) 6.52(-9.93) µm in diam.
<i>Microxiphium theae</i>					
Ván Beyma [18], Lim [19]	Uncultured	Gray to black	Uncertain	Uncertain	Pycnidiospore hyaline, elliptic to bacillar, 3-8×1-5 µm in diam.
19E345	PDA, 25°C, 7 day	Generally black	10-12 mm in diam.	Convexed, margin irregular	Pycnidiospore globose, hyaline to pale brown, (3.03-)4.20(-5.82)×(2.58-) 3.49(-5.15) µm in diam; arthroconidia globose to cylindrical, brown, (6.25-) 7.68(-8.90)×(6.01-)7.04(-7.96) µm in diam.
<i>Piceomphale pinicola</i>					
Zhao [22]	PDA, 25°C	Initially grayish, becoming darker in age; reverse dark brown, margin grayish	Covering the whole plate after 4 weeks	Aerial mycelium partly developed; margin entire	Ascospore reported only
19E314	PDA, 25°C, 7 day	Surface pale beige; reverse dark indigo to black, margin beige	11-14 mm in diam.	Flat, margin irregular	Globose to subglobose, pale yellowish brown to reddish brown, 0-1 septate, (7.44-)8.72(-10.68)×(6.37-)7.76(-10.49) µm in diam.

MEA: Malt extract agar; PDA: Potato dextrose agar.

Table 2. Primer sets and PCR conditions used in this study.

Locus	Primers	Nucleotide sequences (5'-3')	Annealing Temp. (°C)	References
Internal transcribed spacer (ITS)	ITS1F ITS4	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA TCCTCCGCTTAATGATATGC	50	Gardes & Bruns [23]
Small subunit of rDNA (SSU)	NS1 NS4	GTAAGTCATATGCTTGTC CTTCCGTCGAATTCCTTAAG	40	White et al. [24]
Large subunit of rDNA (LSU)	LROR LR16	ACCCGCTGAACCTAAGC CACCAAGACTCGC	44	Moncalvo et al. [25]
Translation elongation factor 1-α (TEF)	EF1-668F EF1-1251R	CGGTCACTTGATCTACAAGTGC CCTCGAACTCACCAGTACCG	55	Alves et al. [26]

결과 및 고찰

본 연구에서는 경남 한산도 지역에 서식하는 곰솔, 왕대, 산철쭉의 잎에서 내생균을 분리하였다. 분리된 균주 중에서 총 4속 5종이 국내 미기록 종으로 확인되었다. 각 종의 형태적 특성 및 분자생물학적 분석 결과는 다음과 같다.

***Arthrinium camelliae-sinensis* M. Wang, F. Liu & L. Cai, Mycokeys 34:11 (2018) [MB#824907]**

왕대의 잎에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 45 mm 정도로 매우 빠르게 자라며, 앞면은 노란 빛이 감도는 흰색이고 뒷면은 어두운 노란색을 띤다. 균총의 표면에는 전체적으로 공중균사가 수북하게 덮여서 중앙부가 볼록 융기된 것처럼 보인다(Fig. 1A). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 42-45 mm 정도이며, 앞면은 전체적으로 흰색을 띠나 중앙부에 밝은 상아색의 공중균사가 분포하고, 뒷면은 옅은 노란색을 띤다. 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기되어 있으며 가장자리는 둥근 형태이다(Fig. 1F). 균사 생장 말단에서 짙은 갈색 구형의 분생포자경(conidiophore)이 깔때기 형태로 부풀어 오르듯이 형성되어 구형의 분생포자(conidia)로 발생한다(Fig. 2A). 분생포자는 밝은 갈색 혹은 황갈색의 구형 혹은 타원형이며, 단일 격막을 갖고 크기는 $(6.83\text{--}8.63\text{--}(9.96) \times (6.66\text{--}8.39\text{--}(10.82)) \mu\text{m}$ 이다(Fig. 2B).

Specimen examined. Hansando Island, Tongyoung-si, Gyeongsangnam-do, Korea, N34°46'2.38", E128°30'20.15", April 5, 2019, *Arthrinium camelliae-sinensis*, isolated from leaf of *Phyllostachys bambusoides*, strain 19E157, NIBRFG0000506590, GenBank No. MT893326 (ITS), MT893327 (LSU),

Notes. *A. camelliae-sinensis*는 2018년 중국에서 차나무(*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)에서 분리되어 기록된 것이 최초이며 그 외에 배추속(*Brassica*) 식물이나 대나무의 잎에서도 확인되었다[10]. 균사 끝에서 갈색 구형의 분생포자를 형성하는 것이 특징이며[10], 본 연구에서 확인된 균주 19E157의 분생포자는 *A. camelliae-sinensis* 외에도 *Nigrospora camelliae-sinensis*와 분생포자의 형태가 상당 부분 일치하나[11], 분자생물학적 분석에서 *Nigrospora* 속과는 구분되는 계통을 이룬다(Fig. 2). ITS (internal transcribed spacer), LSU (large subunit), TEF (translation elongation factor) 영역의 분자생물학적 분석 결과 ITS 영역은 *A. camelliae-sinensis* KY494761.1과 99.83%, LSU 영역은 *A. camelliae-sinensis* KY494837.1과 99.83%, TEF 영역은 *A. camelliae-sinensis* KY705157.1과 99.09%의 일치도를 확인하였고 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 3).

***Beltraniella humicola* P. Rama Rao, Current Science 31: 479 (1962) [MB#326963]**

한산도 곰솔의 침엽에서 분리되었다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 40-45 mm 정도이고, 앞면은 전체적으로 어두운 미색을 띠며 뒷면은 전체적으로 밝은 베이지색을 띤다. 균총은 중앙부에서 가장자리를 향해 파도 형태로 층을 이뤄 자라며, 중앙부에서는 균사의 밀도가 높고 가장자리로 갈수록 밀도가 낮아진다(Fig. 1B). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 24-26 mm 정도로 PDA 배지에 비해 상당히 느리게 자라며, 앞면은 전체적으로 진한 베이지색을 띤다.

고 뒷면은 중앙부에서는 검은색을, 가장자리에서는 어두운 베이지색을 띤다(Fig. 1G). 화살촉처럼 생긴 능형(rhomboid) 혹은 방추형의 분생포자가 확인되었으나 어느 위치에서 발생하는지는 확실히 관찰되지 않았다. 분생포자는 중앙부에 존재하는 고리에 의해 장축과 단축으로 나누어지며, 분생포자의 색이 연갈색인 것에 반해 고리 부분은 흰색 혹은 미색을 띠어 확실히 구분된다. 분생포자는 무격막 혹은 단일 격막이고, 분생포자의 크기는 $(24.72\text{--}27.72\text{--}32.82) \times (6.03\text{--}7.18\text{--}8.04) \mu\text{m}$ 이다(Fig. 2C).

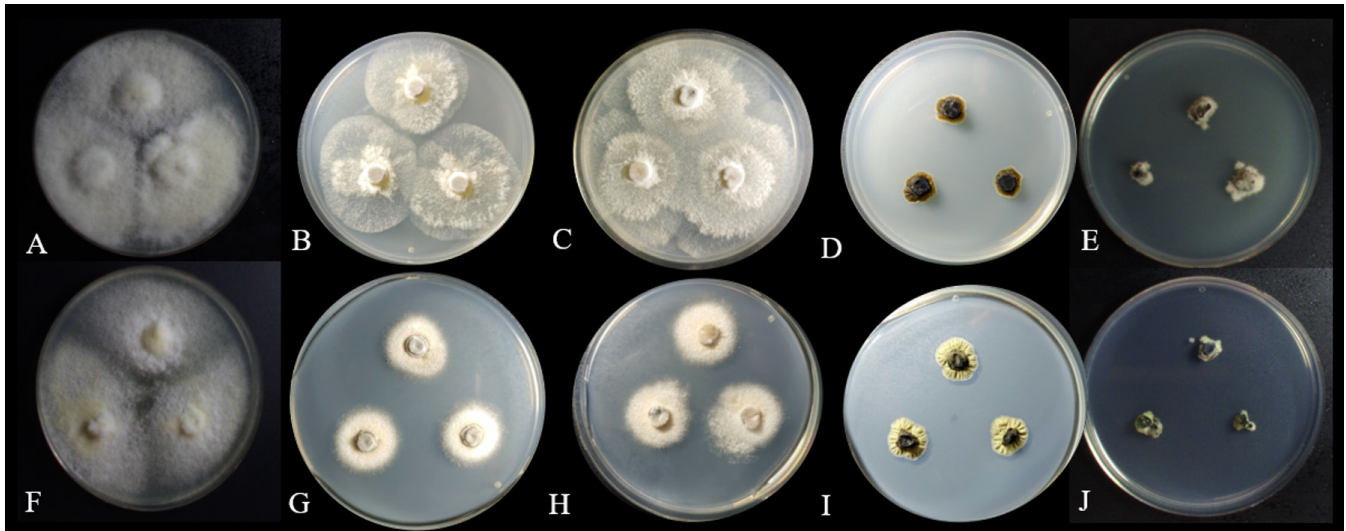


Fig. 1. Cultural characteristics of five endophytic fungal strains. Colonies of *Arthrinium camelliae-sinensis* 19E157 grown for 7 days on potato dextrose agar (PDA) (A) and malt extract agar (MEA) (F); Colonies of *Beltraniella humicola* 19E355 grown for 7 days on PDA (B) and MEA (G); Colonies of *Beltraniella portoricensis* 19E061 grown for 7 days on PDA (C) and MEA (H); Colonies of *Microxiphium theae* 19E345 grown for 7 days on PDA (D) and MEA (I); Colonies of *Piceomphale pinicola* 19E314 grown for 7 days on PDA (E) and MEA (J).

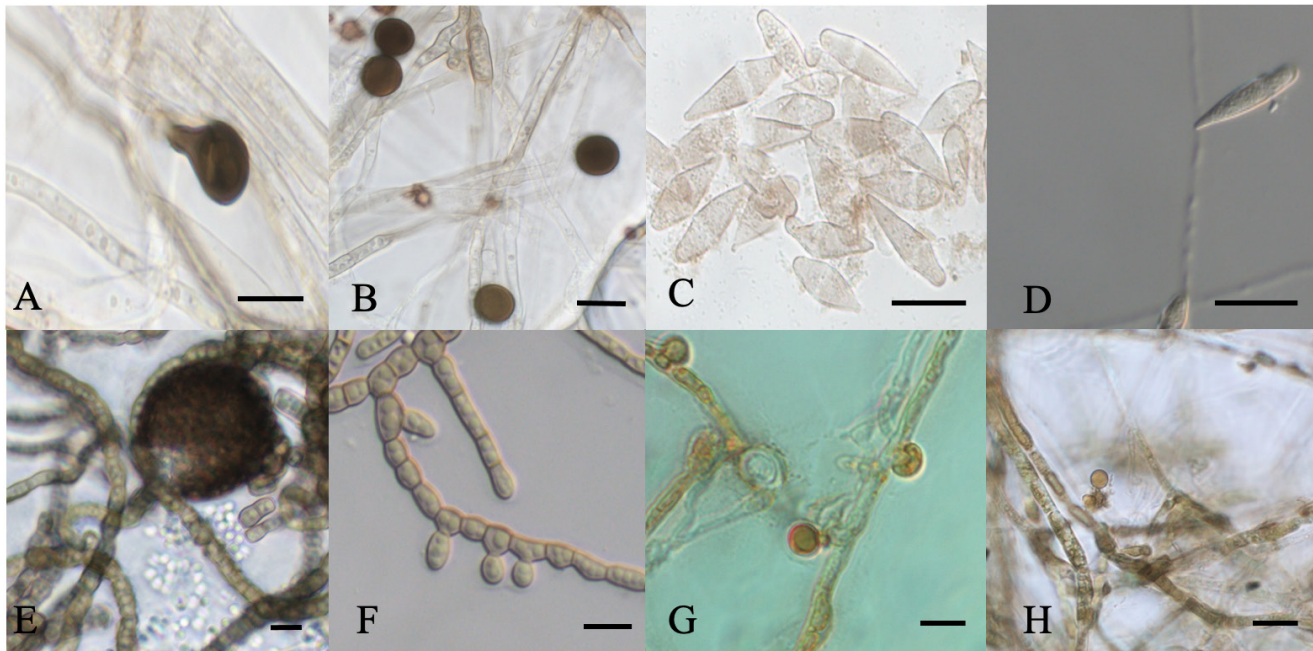


Fig. 2. Microscopic characteristics of five endophytic fungal strains. Conidiophore (A) and conidia (B) of *Arthrinium camelliae-sinensis* 19E157; conidia (C) of *Beltraniella humicola* 19E355; conidia (D) of *Beltraniella portoricensis* 19E061; pycnidium and conidia (E), arthroconidia (F) of *Microxiphium theae* 19E345; conidia (G, H) of *Piceomphale pinicola* (scale bars: A, B, E, F, G=10 μm ; C, D, H=20 μm).

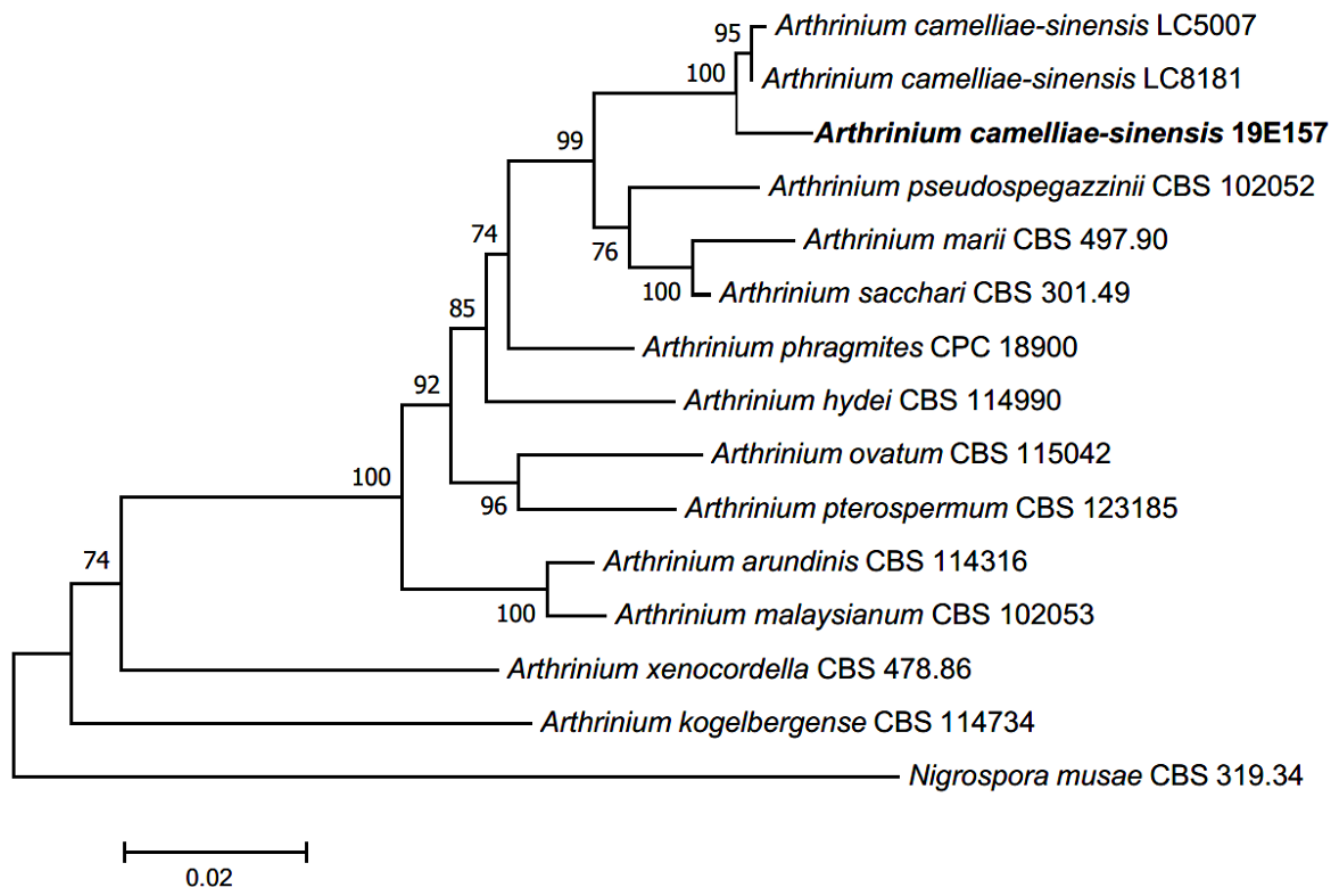


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree of based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS), large subunit (LSU) rDNA and translation elongation factor (TEF) sequences. *Nigrospora musae* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in a bold.

Specimen examined. Hansando Island, Tongyoung-si, Gyeongsangnam-do, Korea, N34°46'16.45", E128°30'25.83", April 5, 2019, *Beltraniella humicola*, isolated from conifer leaf of *Pinus thunbergii*, strain 19E355, NIBRFG0000506595, GenBank No. MT893328 (ITS), MT893329 (LSU).

Notes. *B. humicola*는 1962년에 토양에서 최초로 보고되었으며, 원 기재문에서는 *B. humicola*의 분생포자가 쉽게 탈락되며, 중앙부에 연한 색의 밴드가 존재하는 방추형의 팽이 형태(top-shaped)인 것으로 기록하였다[12]. 본 연구에서 확인된 분생포자의 형태는 크기, 형태, 색깔 등이 원 기재문에 기록된 것과 대부분 일치하였다. ITS, LSU 영역의 분자생물학적 분석 결과 ITS 영역은 *B. humicola* MH858416.1과 99.82%, LSU 영역은 *B. humicola* MH870044.1과 99.12%의 일치도를 확인하였고 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 4).

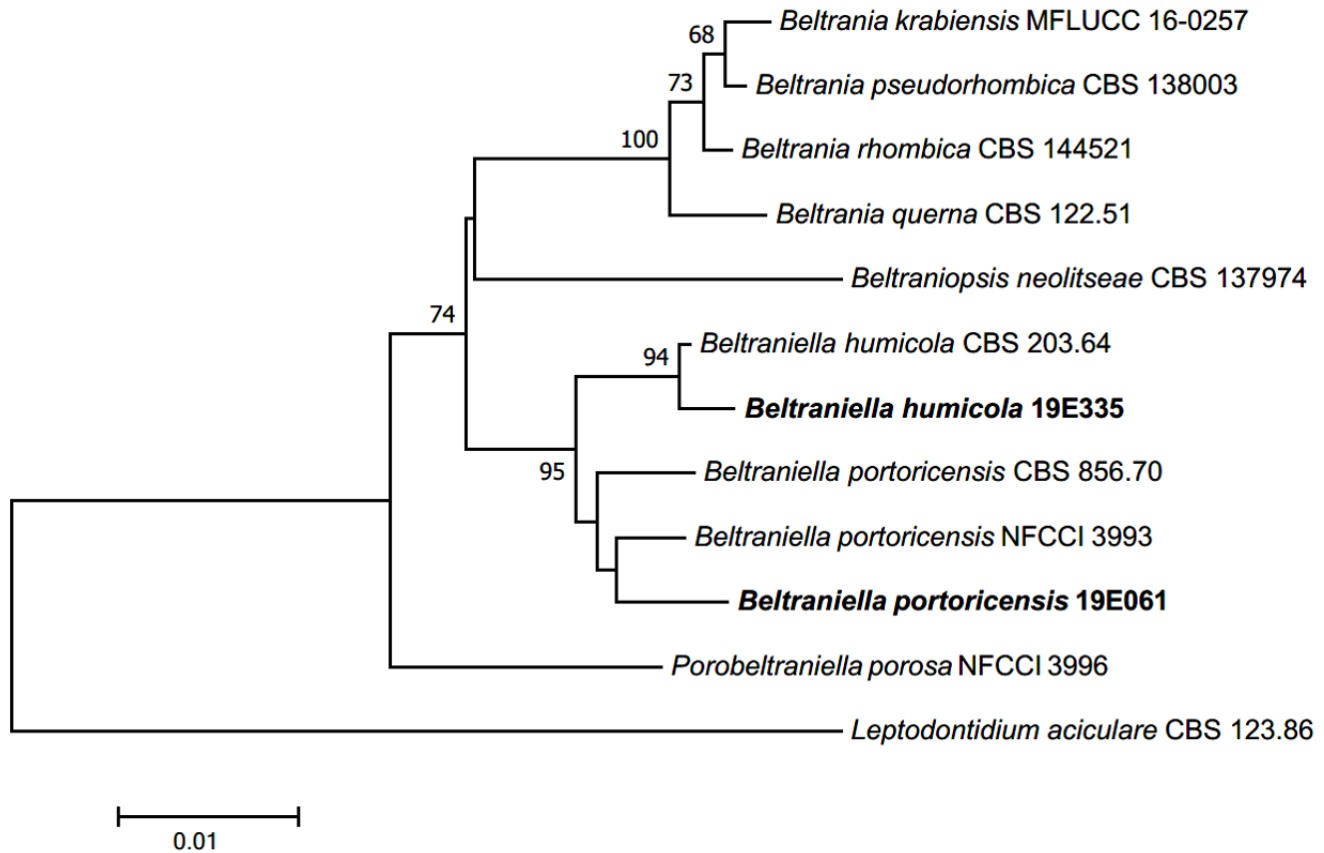


Fig. 4. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) sequences. *Leptodontidium aciculare* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strains isolated in this study are in bold.

***Beltraniella portoricensis* (F. Stevens) Piroz. & S.D. Patil, Canadian Journal of Botany 48: 575 (1970) [MB#309530]**

곰솔의 침엽에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 40-45 mm 정도로 빠르게 자라며, 균총의 앞면은 옅은 흰색을 띠고 뒷면은 옅은 노란색을 띤다. 균총의 가장자리 부분으로 갈수록 공중균사의 밀도가 낮아지며, 따라서 가운데는 살짝 융기된 형태이고 가장자리는 배지에 납작 붙어있는 형태이다(Fig. 1C). MEA배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 29-33 mm 정도로 PDA 배지에 비해 느리게 자라며, 균총의 색은 PDA배지에서와 마찬가지로 앞면은 옅은 흰색, 뒷면은 옅은 노란색을 띤다. 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기되어 있고, 균총의 가장자리 부분은 불규칙한 방사형이다(Fig. 1H). 균사의 측면 부분으로부터 한쪽 끝은 뾰족하고 한쪽 끝은 둥근 방추형의 분생포자가 형성된다. 분생포자는 단일 격막이며 무색 투명하거나 옅은 베이지색이고, 분생포자의 크기는 $(19.45\text{--}25.15\text{--}(32.28) \times (4.71\text{--}6.52\text{--}(9.93) \mu\text{m}$ 이다(Fig. 2D).

Specimen examined. Hansando Island, Tongyoung-si, Gyeongsangnam-do, Korea, N34°46'16.45", E128°30'25.83", April 5, 2019, *Beltraniella portoricensis*, isolated from conifer leaf of *Pinus thunbergii*, strain 19E061, NIBRFG0000506587, GenBank No. MT893330 (ITS), MT893331 (LSU).

Notes. *B. portoricensis*는 푸에르토 리코(Puerto Rico)에서 최초 보고된 것[13]에서 종소명이 유래하였고 본래 *Ellisiella portoricensis* [13]와 *Ellisiopsis gallesiae* [14]로 각각 기록되었으나, 1970년 군사의 측면에서부터 분생포자경이 형성되는 것을 근거로 두 종이 서로 이명(synonym)인 것이 제시되었고, *Beltraniella* 속의 특성을 갖는 것에 근거하여 *B. portoricensis*로 합치되었다[15]. 분생포자의 기저부는 부리처럼 뾰족하고 먼 쪽 말단부는 둥글게 잘린 듯한 형태이며[16], 본 연구에서 확인된 분생포자의 형태 및 크기는 이러한 서술과 일치하였다. *B. humicola*의 분생포자와 전체적인 형태가 비슷하나, *B. humicola*의 분생포자보다 크기가 작고 색이 전체적으로 무색 투명하므로 중간부의 고리 형태가 잘 확인되지 않았다. ITS, LSU 영역의 분자생물학적 분석 결과 ITS 영역은 *B. portoricensis* KX519516.1과 98.06%, LSU 영역은 *B. portoricensis* MH871777.1과 99.27%의 일치도를 확인하였고 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 4).

***Microxiphium theae* J.F.H. Beyma, Verhandelingen Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Afdeling Natuurkunde 29: 19 (1931) [MB#540226]**

산철쭉 잎에서 분리되었다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 10-12 mm 정도로 느리게 자라며, 균총의 앞면과 뒷면 모두 검은색을 띤다. 균총의 고도는 약간 융기된 형태이며, 균총의 가장자리는 불규칙한 형태이다(Fig. 1D). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 12-14 mm 정도로 자라며, 균총의 앞면과 뒷면 모두 검은색을 띤다. 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기된 형태이다(Fig. 1I). 분생포자는 분포자기(pycnidium)와 분생포자경(conidiophore)의 두 가지 방식으로 형성된다. 첫 번째 방법은 군사가 비대해 지고 구형의 분포자기가 형성되며, 분포자기의 한쪽 방향이 터져 수백개~수천개의 분생포자가 나온다. 분포자기는 대부분 검은색이고 일부 흑자색이며, 크기는 (86.89-)112.15(-128.17) × (82.67-)102.77(-118.67) μm 정도이다. 분생포자는 대부분 구형으로 무색 투명하거나 옅은 갈색이고, 크기는 (3.03-)4.20(-5.82) × (2.58-)3.49(-5.15) μm이다(Fig. 2E) 두 번째 방법은 갈색 원통형의 분생포자경이 분절되어 각각의 분절포자(arthroconidia)로 발달하는 방식이다. 분절포자는 구형 혹은 원통형이고, 크기는 (6.25-)7.68(-8.90) × (6.01-)7.04(-7.96) μm 이다(Fig. 2F).

Specimen examined. Chubongdo Island, Tongyoung-si, Gyeongsangnam-do, Korea, N34°45'15.07", E128°32'29.32", April 5, 2019, *Microxiphium theae*, isolated from leaf of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*, strain 19E345, NIBRFG0000506603, GenBank No. MT893332 (ITS), MT893334 (LSU).

Notes. *M. theae*에 대한 기록은 1915년에 대만의 차나무에서 분리된 *Zukalia theae*에 대한 보고가 최초이며[17], 차나무의 원 기재명인 *Thea sinensis*로부터 종소명이 유래했다. *Z. theae*는 1931년 Beyma에 의해 *Microxiphium*(≡*Microxyphium*) 속으로 재조합되었으며[18], *Microxiphium* 속은 일반적으로 다양한 형태의 분포자기에서 분생포자를 만드는 것이 특징이다[19]. 본 연구에서 분리된 균주도 구형의 검은색 분포자기에서 분생포자를 형성하는 것을 확인하였으며, 이것

은 *Microxiphium* 속의 특성과 일치한다[19]. 참고문헌에서는 확인되지 않았으나, 본 연구에서는 분포자기에서 나온 분생포자 외에 균사가 분절되어 형성되는 분절포자 역시 확인되었다. ITS 및 LSU 영역의 분자생물학적 분석 결과 ITS 영역은 *M. theae* MH855113.1과 100%, LSU 영역은 *M. theae* MH866561.1과 99.68%의 일치도를 확인하였고 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 5).

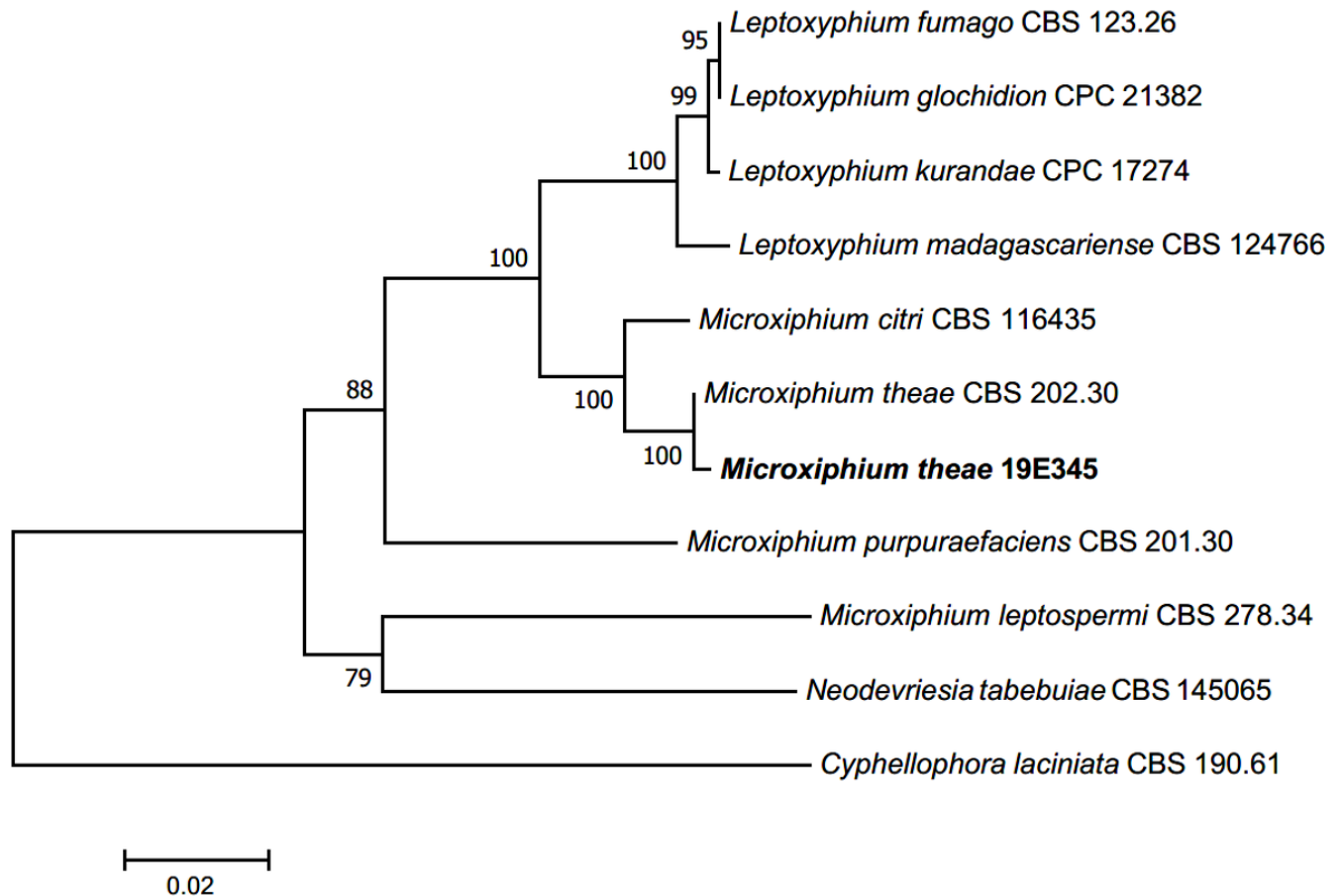


Fig. 5. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS), and large subunit (LSU) sequences. *Cyphellophora laciniata* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in a bold.

***Piceomphale pinicola* (Y. Otani) Y.J. Zhao & Hosoya, Mycological Progress 15: 1223 (2016) [MB#817712]**

곰솔의 침엽에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 11-14 mm 정도로 매우 느리게 자라며 배지에 납작 붙어있는 형태이다. 앞면은 연한 베이지색을 띠고 뒷면은 전체적으로 짙은 남색 혹은 검은색을 띠나 가장자리에 베이지색의 테두리가 확인된다(Fig. 1E). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 9-12 mm 정도이며, 색과 형태는 PDA 배지에서 자란 균총과 대부분 일치한다(Fig. 1J). 균사 사이의 절간(internode) 부위에서 구형의 반투명한 분생포

자가 1-3개씩 형성된다. 분생포자는 옅은 황갈색 혹은 적갈색을 띠고 매끈하며 무격막이거나 단일 격막이다. 분생포자의 크기는 $(7.44\text{--}8.72\text{--}10.68) \times (6.37\text{--}7.76\text{--}10.49) \mu\text{m}$ 이다(Fig. 2G and 2H).

Specimen examined. Hansando Island, Tongyoung-si, Gyeongsangnam-do, Korea, N34°46'16.45", E128°30'25.83", April 5, 2019, *Piceomphale pinicola*, isolated from conifer leaf of *Pinus thunbergii*, strain 19E314, NIBRFG0000506601, GenBank No. MT896825 (SSU), MT896820 (ITS), MT896826 (LSU).

Notes. *P. pinicola*는 본래 1979년에 *Moellerodiscus pinicola*로 최초 보고되었다가[20], 분자생물학적 분석의 결과 2016년에 다시 *Piceomphale* 속으로 재분류되었다[21]. 원 기재문이나 참고 문헌에는 유성세대의 형태 및 자낭포자에 대한 설명만이 기술되어 있었으나[22], 본 연구에서는 무성세대 및 분생포자의 형태를 확인할 수 있었다. *P. pinicola*는 주로 일본에서 많이 연구되었으며, 본 연구에서와 같이 곰솔(*Pinus thunbergii*)이나 혹은 소나무(*P. densiflora*)의 침엽에서 분리된 기록들이 존재한다[20,22]. SSU, ITS, LSU 영역의 분자생물학적 분석 결과 SSU 영역은 *P. pinicola* LC434564.1과 98.16%, ITS 영역은 *P. pinicola* AB926076.1과 99.40%, LSU 영역은 *P. pinicola* AB926162.1과 99.50%의 일치도를 확인하였고 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 6).

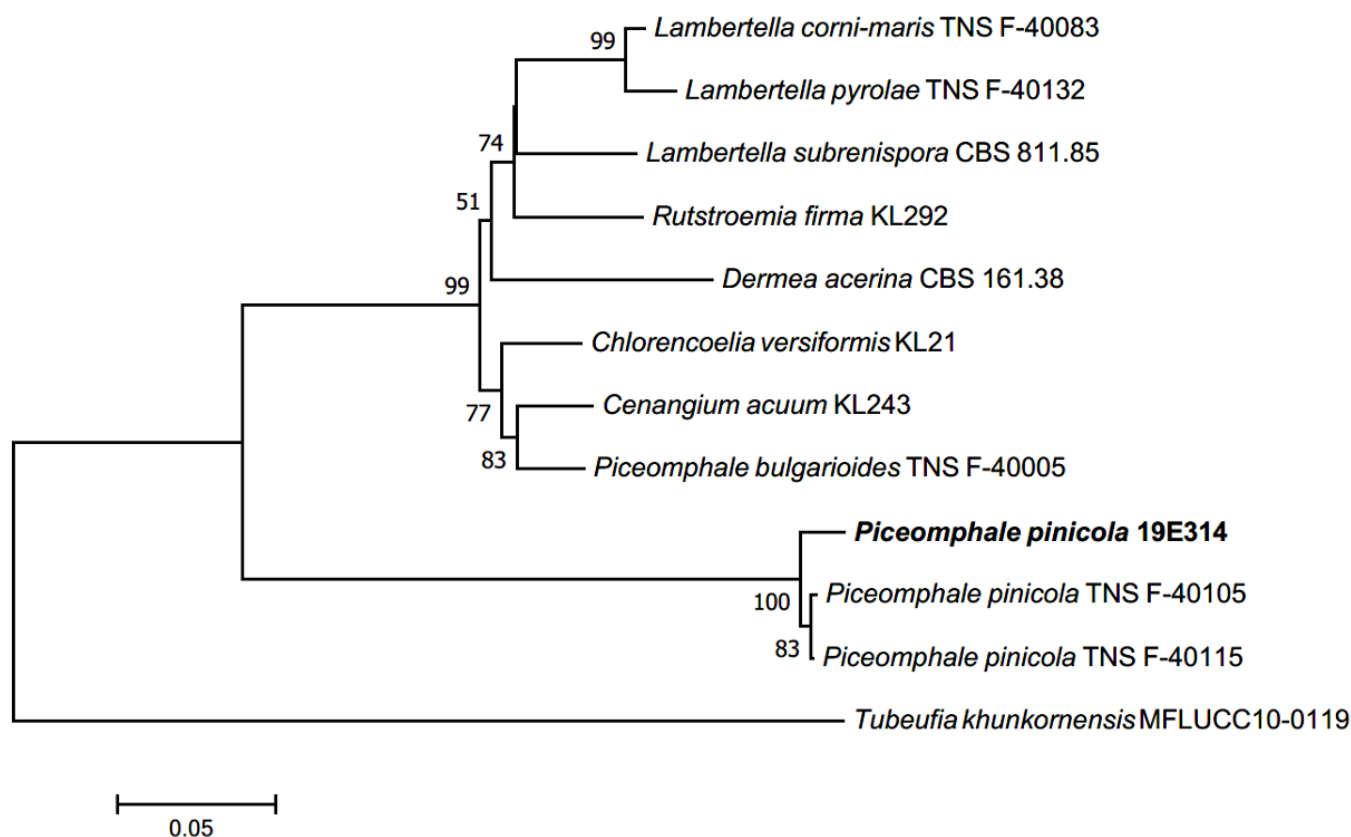


Fig. 6. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of small subunit of rDNA (SSU), internal transcribed spacer (ITS), and large subunit (LSU) sequences. *Tubeufia khunkornensis* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in a bold.

적요

본 연구에서는 경남 통영시의 한산도에서 서식하는 식물의 잎을 채취하여 내생균을 분리하였다. 분리한 균주는 배양특성과 포자등의 형태성특성 및 rDNA의 internal transcribed spacer 영역, small subunit 및 large subunit 영역, 그리고 translation elongation factor 1- α 영역의 DNA 염기서열을 분석하여 동정하였다. 연구결과 5종의 국내 미기록 내생균 균주를 확인하였으며, 확인된 종은 *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Beltraniella humicola*, *B. portoricensis*, *Microxiphium theae*, *Piceomphale pinicola*이다. 확인된 미기록 균주의 형태적 특성 및 분자생물학적 계통분석의 결과에 대해 서술하였다.

ACKNOWLEDGEMENT

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 (NIBR201902202).

REFERENCES

1. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988;69:2-9.
2. Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. *Mycol Res* 2005;109:661-86.
3. Gao FK, Dai CC, Liu XZ. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr J Microbiol Res* 2010;4:1346-51.
4. Bouton J, Gates R, Belesky D, Owsley M. Yield and persistence of tall fescue in the southeastern coastal plain after removal of its endophyte. *Agron J* 1993;85:52-5.
5. Rowan DD, Latch GCM. Utilization of endophyte-infected perennial ryegrasses for increased insect resistance. In: Bacon CW, White JF, editors. *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. Boca Raton, Fla.: CRC; 1994. p. 169-83.
6. 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.
7. Kim IT, Lee JH, Jin YG. The Vegetations of Hansan and Chubong Islet. *Korean J Ecology and Environment* 2000;23:391-5.
8. Park H, Choi YJ, Eom AH. Characterization of six novel endophytic fungi isolated from leaves of plants inhabiting Jeju island. *Kor J Mycol* 2018;46:405-14.
9. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
10. Wang M, Tan XM, Liu F, Cai L. Eight new *Arthrinium* species from China. *MycKeys* 2018;34:1.
11. Wang M, Liu F, Crous P, Cai L. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia* 2017;39:118.
12. Ramarao P. *Beltraniella Humicola* Sp. Nov. *Curr Sci* 1962;31:479-80.
13. Stevens F. Porto Rican fungi, old and new. *Trans Illinois Acad Sci* 1917;10:162-218.
14. Batista AC. Systematic revision of the genera *Ellisiella* Sacc. and *Ellisiellina* Camara, and the new genus *Ellisiopsis*. *Annaes da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 1956;14:16-25.

15. Pirozynski K, Patil S. Some setose Hyphomycetes of leaf litter in south India. *Can J Bot* 1970;48:567-81.
16. Rajeshkumar KC, Crous PW, Groenewald JZ, Seifert KA. Resolving the phylogenetic placement of *Porobeltraniella* and allied genera in the Beltraniaceae. *Mycol Prog* 2016;15:1119-36.
17. Sawada K. Two new species of the genus *Phytophthora* causing diseases of onion and eggplant. *Spec Bull Agr Exp Sta Gov Formosa* 1915;11:1-139.
18. Van Beyma J. Untersuchungen über Russtaupilze. *Verh K Ned Akad Wet Afd Natuurkd* 1931;29:1-40.
19. Lim G. Some sooty moulds and black mildews from Singapore and the Malay Peninsula. *Reinwardtia* 1975;9:197-213.
20. Otani Y. Notes on some interesting cup-fungi in Tsukuba Academic New Town. *Bull Natl Mus Nat Sci Ser B Bot* 1979;5:51-60.
21. Zhao YJ, Hosaka K, Hosoya T. Taxonomic re-evaluation of the genus *Lambertella* (Rutstroemiaceae, Helotiales) and allied stroma-forming fungi. *Mycol Prog* 2016;15:1215-28.
22. Zhao YJ. Taxonomic Study of *Lambertella* (Rutstroemiaceae, Helotiales) and Allied Substratal Stroma Forming Fungi from Japan. Tsukuba: University of Tsukuba; 2014.
23. 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.
24. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 1990;18:315-22.
25. 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.
26. Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips A. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers* 2008;28:1-13.