

## 시설하우스에서 *Corynespora cassiicola*에 의해 발생하는 오이 갈색무늬병

권미경<sup>1</sup> · 양광열<sup>2</sup> · 조백호\*

전남대학교 응용식물학부, <sup>1</sup>농촌진흥청 농업과학기술원, <sup>2</sup>유타주립대학교 생물학과

### A Target Leaf Spot Disease Caused by *Corynespora cassiicola* on Cucumber Cultivated in Green House

Mi Kyung Kwon<sup>1</sup>, Kwang Yeol Yang<sup>2</sup> and Baik Ho Cho\*

Applied Plant Science Division, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>1</sup>National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, Utah State University, Logan, UT 84322-5305, USA

(Received on February 23, 2004)

An epidemic of target leaf spot of cucumber (*Cucumis sativus*) occurred in commercial greenhouses in Korea in 2000/2001. The early symptoms on the leaves were small brown spots with yellow halos. These lesions became irregular enlarging in diameter and eventually defoliation resulted. The causal agent was a fungus with morphological characteristics matching *Corynespora cassiicola*. The sequence of the ITS region of *C. cassiicola* CM2000-1 was identical to that of an authentic strain of *Corynespora cassiicola*. Optimal germination of spores and mycelial growth on plate was at 30°C. A long dew period on the leaf surface and high temperatures were the main contributing factors for disease development and the greenhouse epidemic. Artificial inoculation of the Korean isolate of *C. cassiicola* revealed resistance in some Korean cucumber cultivars.

**Keywords :** *Corynespora cassiicola*, Cucumber, Environmental factors for disease epidemic, Target leaf spot disease

*Corynespora cassiicola*(Berk & Curt)는 토마토, 오이 및 강낭콩 등에 갈색무늬병을 일으키는 병원균으로, 특히 토마토와 오이에 매우 심한 괴사, 시들음 및 낙엽현상을 초래한다(Olive 등, 1945; Blazquex, 1967, 1972). 오이 갈색무늬병의 발생은 Trinidad(Balba 등, 1993)와 미국(Wyszogrodzka 1987)에서 보고 되었으며, 국내에서는 1991년 3월, 경남 진주지방의 시설재배 단지 내 오이에서 갈색무늬병 유사증상이 관찰되었다. 그러나, 강 등(1993)은 균의 형태적 특성 및 병원성 검정을 통해 진주지방의 오이에 발생하는 갈색무늬병 유사증상이 *Corynespora*의 또 다른 종인 *Corynespora melonis*에 의해 발생됨을 보고하였다.

최근 2000년 가을과 겨울에, 전남의 구례, 곡성, 영암 지역의 일본 수출용 시설재배단지에서 오이 잎에 갈색반

점을 형성하는 이상증상이 발생하였는데, 심한 잎은 낙엽이 되었고 발생 후 약 일주일만 지나면 시설안의 오이를 전부 제거해야할 만큼 큰 피해를 주었다. 본 연구에서는 상기의 오이 갈색무늬 증상 병원균의 small ribosomal RNA 유전자의 internal transcribed spacer(ITS)를 분석하여 이 증상이 *C. cassiicola*에 의해 발생되는것을 밝혔다. 뿐만 아니라, 병 발생에 영향을 주는 환경적 요인들을 검토하였으며, 이 병원균이 일본품종 재배단지에서 발생하였지만 국내품종에도 주요 병원균이 되어 피해를 줄 잠재적 가능성을 지니고 있으므로 국내품종들을 대상으로 저항성품종을 선발하였다. 본 연구의 선행(preliminary) 결과는 이미 Plant Pathology의 New Disease Report를 통해 보고한 바 있다(Kwon 등, 2003).

### 재료 및 방법

**병원균의 분리.** 2000년도와 2001년도에 전남 구례, 별

\*Corresponding author

Phone)+82-62-530-2075, Fax) +82-62-530-0207

E-mail)chobh@chonnam.ac.kr

교, 영암 지방의 시설재배지에서 오이 잎에 발생한 병반 부위를 4 mm<sup>2</sup>의 크기로 절단하여 70% ethanol에 5초간 침지 후, 1% NaClO 용액에 1분간 표면살균하고, 멸균수로 5회 세척 후, 멸균된 여과지에서 물기를 완전히 제거하고 감자한천배지(PDA)상에 치상하여 28°C 항온기에서 2-3일간 배양하였다. 자라난 균사의 선단을 떼내어 다시 PDA상에 배양하여 이로부터 단포자 분리하고 사면배지에서 배양한 후 4°C에 보존하였다. 이들 중에 CM2000-1로 명명한 균주를 Korean Agricultural Culture Collection (KACC40941)에 위탁 보존하였고 나머지 모든 실험에 이 균주를 사용하였다.

**병원균의 균학적 특성조사.** 병원균의 형태적 특성을 조사하기 위하여 광학현미경을 이용하여 암상에서 PDA 상에 10일간 배양 후 형성된 분생포자와 분생자경의 형태 및 크기 등을 50개씩 조사하였다. 또한 배양적 특성을 조사하기 위하여 potato dextrose agar(PDA), Green bean agar(GBA), V-8 juice agar, Czavek solution agar(CSA)등을 사용하여 28°C에서 배양하였으며 실험은 3반복으로 수행하였다. GBA는 green bean baby food 220 g을 homogenizer로 갈아 그 즙액을 걸러낸 다음 여기에 증류수를 가하여 1 liter로 만들고 다시 분말한천 15 g을 첨가하여 조제하였다(Wasilwa 등, 1993). V-8 배지는 CaCO<sub>3</sub> 3 g을 첨가하고 잘 섞어 녹인 후 증류수를 첨가하여 1 liter로 만들고 다시 분말한천 15 g을 첨가하여 조제하였다.

**병원균의 ITS 염기서열 분석.** CM2000-1과 *C. cassiicola* ATCC64204균주의 균총 및 분생포자를 약 100 mg씩 20 µl의 TE buffer(pH 8.0)에 각각 가하여 Quiagen Inc.(Valencia, USA)의 DNeasy Plant Mini Kit Protocol에 준하여 fungal DNA를 추출하였다. ITS sequence와 5.8S rDNA gene을 포함한 rRNA region을 증폭하기 위하여 ITSF(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')와 ITSr(5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3') 2가지 primer가 사용되었다(Gardes와 Burns, 1993; White 등, 1990). PCR반응은 AccPower PCR Premix(Bioneer Inc., Korea) 20 µl에 1 µl의 template DNA와 2가지 primer ITSF 및 ITSr 각각 1 µM씩을 섞어 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer Inc., USA)에서 실시하였다. 이 때 반응조건은 (i) 95°C에서 3분간 denaturation (ii) 95°C 1분, 40°C 2분, 72°C 2분, 40 cycle (iii) 72°C 2분간으로 하였다.

PCR로 얻은 산물을 전기영동한 다음, band가 형성된 gel block을 Elu-Quick(Schleicher & Schnell Inc., USA)을 이용하여 추출하였고, pGEM-T easy vector system I (Promega Co., USA)을 이용하여 cloning 하였다. PCR 산물의 염기서열은 Applied Biosystem(ABI) 373 DNA

automated sequencer를 이용하여 분석한 다음, *C. cassiicola* 분리균주 CM2000-1과 ATCC로부터 분양받은 *C. cassiicola* ATCC 64204 균주의 ITS sequence를 각각 AY238605와 AY238606의 accession number로 GenBank database에 등록하였다. GenBank database의 *C. cassiicola* CBS296.08과 IMI056007(AF163087, U95173), *C. olivacea* CBS291.74 (AF163088) 및 *Alternaria solani* AS3(AF314576)의 내용과 Biology Workbench의 CLUSTAL-W program(<http://workbench.sdsc.edu>)을 이용하여 *C. cassiicola* CM2000-1과 ATCC 64204 sequence의 phylogenetic analysis를 수행하였다.

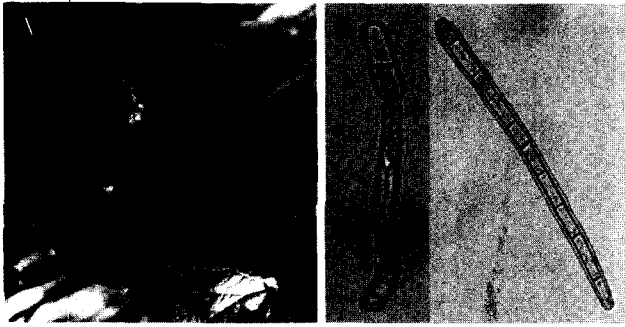
**병원성 검정 및 병 발생 환경요인 조사.** 병원성 검정을 위한 많은 분생포자를 얻기 위하여, 30°C 항온기내 PDA배지 상에서 10일간 배양한 기중균사를 흐르는 수돗물에서 멸균한 붓으로 균총을 완전히 제거한 후 음건하였다. 그 후 형광등을 조사한 30°C 항온기에 4일간 더 배양하여 형성된 분생포자를 이용하였다. 이 때 현탁액의 포자농도는 광학현미경과 haemocytometer를 이용하여 10<sup>4</sup>/ml로 하였다.

오이(품종:백성3) 잎이 완전히 전개한 3엽에 분생포자 현탁액이 흘러내리도록 뿌려준 다음 20, 25, 30°C의 mist chamber에서 각각 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36시간씩 배양하였다. 대조구로는 동일한 조건에서 식물 잎에 멸균수만을 살포하였다. Mist chamber에서 일정시간 처리한 식물을 꺼내어 25°C에서 유지하면서 처리 3일 후에 나타난 작은 갈색 병반들을 계수하였다. 병 발생율은 한 잎당 나타난 병반수로 조사하였다(N, no spot: L, 1-40 spots/ leaf: M, 40-80 spots/leaf: S, over 81 spots/leaf).

국내에서 재배되고 있는 오이품종들에 대한 감수성을 알아보기 위하여 원예용 상토(Premix; peat moss 4: vermiculite 1; v/v)에 15가지 품종을 정식하여 제3분엽이 완전 전개할 때까지 생장상(25°C, 30,000 Lux, 12hr photoperiod, RH50-60%)에서 생육시켰다. 병원균 접종전 식물체에 멸균수를 살포하여 식물표면을 세척하였고 멸균수가 완전히 마른 후 CM2000-1 포자현탁액(10<sup>4</sup> spores/ml)을 식물 전체에 살포한 다음, 30°C에서 24시간 dew chamber에 정지하였다. 그 후 식물체를 25°C로 옮겨 일주일 후 잎에 나타난 병반수를 세어 발병율을 조사하였다. 이 논문에 제공된 모든 data는 9개의 식물에서 얻어진 평균값이며 적어도 2번 이상의 서로 다른 실험을 통해 얻어졌다.

## 결과 및 고찰

**병징.** 2000년도에 남부지방인 구례, 벌교, 영암의 수



**Fig. 1.** Foliar symptom of the leaf spot disease of cucumber and spore of the isolated *Corynespora cassiicola* CM 2000-1. (A) Leaf spot symptom occurring on naturally infected leaf of the cultivar BaekSung 3. (B) Conidia of *Corynespora cassiicola* CM 2000-1 from 10-day-old culture grown on PDA agar at 30°C.

출용오이 시설재배단지에서 발생초기에 잎 표면에 수침상의 병반이 형성된 후, 0.2-0.3 cm의 작은 갈색점무늬로 시작하여 차츰 확대되었으며 yellow halo를 지닌 1-2.5 cm의 원형내지는 다각형 병반을 형성하였다. 병이 상당히 진전된 후에는 병반이 형성된 부위가 찢어져 부서지고 잎이 황화되고 나중에는 잎 전체가 말라죽는다(Fig. 1A). 병진전속도도 굉장히 빨라 잎에 작은 반점들이 육안으로 관찰된 후 일주일 내 온실전체의 오이를 제거해야하는 경우도 목격되었다. 균사는 배지상에서 처음에 올리브색 균총을 형성한 후 차츰 회흑색의 균총으로 변화하였다. 이 병의 발생 초기에 세균성 반점병, 탄저병, 노균병과의 구분이 어려워 무엇보다 초기에 정확한 진단이 필요하다고 생각된다.

**균학적 특성 조사.** 병원균의 동정을 위하여 광학현미경을 이용하여 형태학적 특성을 조사하였다. 분생자경은 짧은 갈색의 직립형으로 크기는 205-725 × 5-7.5 μm이었

고, 2-21(평균 9)개의 격벽을 지니고 있었다. 분생포자는 분생자경에서 단일 혹은 연쇄상으로 형성되었고 역곤봉형, 원통형 등의 모양으로 기부에는 뚜렷한 배꼽(hilum)을 가졌다(Fig. 1B). 색깔은 거의 무색에서 옅은 올리브갈색을 띠었고 크기는 22.5-300 × 5-10 μm로 0-19(평균 7-11)개의 pseudosepta를 가지고 있었다. 이와 같은 병원균의 형태적 특징으로 보아 이 균은 *Corynespora cassiicola* (Ellis와 Holliday, 1971)로 동정되었다(Table 1).

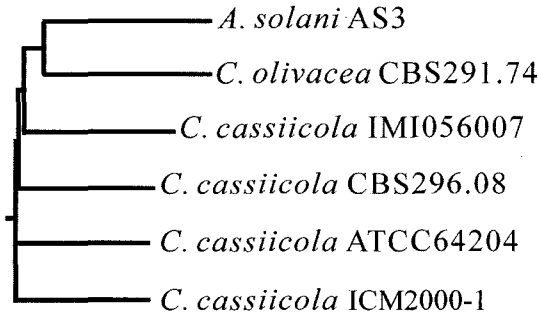
유전학적으로 이 균의 종을 동정하기 위하여 CM2000-1 균주로부터 genomic DNA를 추출하였고 이로부터 small rRNA repeat region의 ITS 영역을 PCR에 의해 증폭한 결과, 582 bp의 PCR product를 얻을 수 있었다. Template로 *C. cassiicola* AT64204(Wyszogrodzka 등, 1987)를 사용하였을 때에도 위와 동일한 크기의 PCR product가 얻어졌고 염기서열도 동일하였다. ATCC64204 균주는 Florida의 포장에서 자란 오이의 갈색무늬 증상으로부터 분리되었다. CM2000-1의 ITS 염기서열은 *C. cassiicola* CBS296.08 균주와 97% 상동성(484/486)을 나타내었고 *C. cassiicola* IMI056007과는 92%의 상동성을 나타내었다. Silva 등(1997)은 *C. cassiicola* 계통들의 ITS 염기서열 간에 매우 높은 상동성을 가지고 있다고 하였는데, 본 연구의 phylogenetic analysis에 의해서 *Corynespora* 한국균주의 rDNA 염기서열이 다른 *Corynespora* 균주와 매우 유사함이 밝혀졌다. 뿐만 아니라, *C. cassiicola*의 ITS 염기서열이 *C. olivacea*의 염기서열과 구분됨이 밝혀졌다(Fig. 2). 그러나 GenBank database의 어느 곳에서도 *C. olivacea*의 기원(origin)이나 병원성에 대한 정보는 얻을 수 없었다.

**병원성 검정 및 병 발생 환경요인.** 전형적인 병반으로부터 13가지 균주를 분리하여 각각 백성 3품종에 접종하여본 결과, 모든 균주가 Koch의 법칙에 따라 최초 분

**Table 1.** Morphological comparison of *Corynespora cassiicola* CM2000-1 isolated from lesions of target leaf spot with description on *Corynespora cassiicola*

Characteristics		Cucumber isolate (CM2000-1)	<i>Corynespora cassiicola</i> <sup>a</sup>
Conidiophore	Shape	erect, simple	erect, simple
	Color	pale to mild brown	pale to mild brown
	Size	205-725 × 5-7.5 μm	110-850 × 4-11 μm
	No. of septa	2-21 (9)	1-9
Conidia	Shape	obclavate, cylindrical	obclavate, cylindrical
	Color	subhyaline to pale olivaceous brown	subhyaline to pale olivaceous brown
	Size	22.5-300 × 5-10 μm	40-220 × 4-11 μm
	No. of pseudosepta	0-19 (7-11)	4-20
	Conidium formation	singly or in chain	singly or in chain

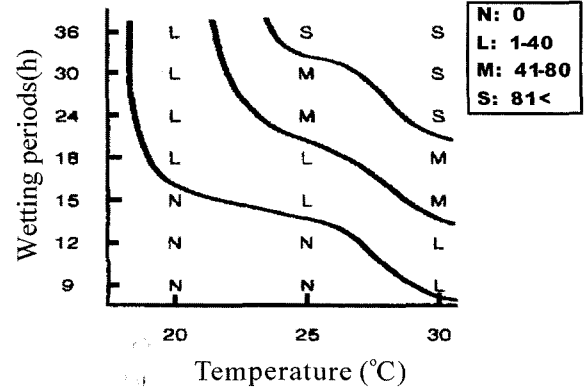
<sup>a</sup> Described by Ellis and Holliday (1971).



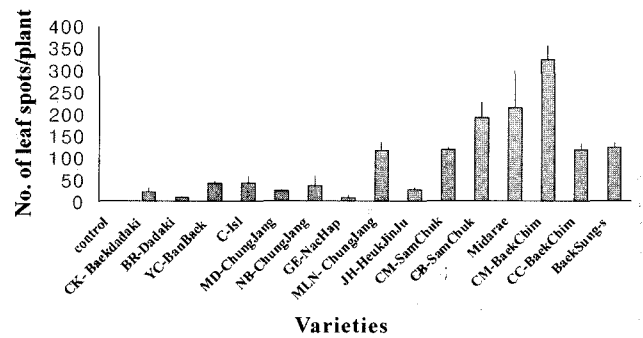
**Fig. 2.** Phylogenetic relationship among ITS sequences of *Corynespora* species. ITS sequence data were used from following sources in construction of the phylogenetic tree using CLUSTAL-W program: from accession numbers from GenBank for *C. cassiicola* CM2000-1, AY238605; *C. cassiicola* ATCC64204, AY238606; *C. cassiicola* CBS296.08, AF163087; *C. cassiicola* IMI056007, U95173; *C. olivacea* CBS291.74, AF163088; and *Alternaria solani* AS3, AF314576.

리했던 병반과 똑같은 병반을 형성하였다. 이 중 CM2000-1 분리균주를 선정하여 모든 실험에 이용하였다. CM2000-1 균의 생태적인 특성을 파악하기 위하여 온도별 생육조사를 하였다. PDA 배지에 0.6 cm의 균총 디스크를 접종한 후 15, 20, 25, 30, 35°C에서 시간이 경과함에 따라 균사생육 정도를 측정된 결과 25-30°C 사이에서 가장 빠른 생육을 보였으며 20°C 이하와 35°C 이상에서는 생육이 억제되었다. 또한 배지별 생육정도를 알아본 결과 GBA와 V8 배지보다 CSA와 PDA배지 상에서 생육이 왕성하였다(결과 미제시). 분생포자의 발아율은 25-35°C에서 95% 이상이었는데 이 모든 결과는 강 등(1993)에 의해 기술된 *C. melonis*균과 잘 일치하였다.

오이 갈색무늬병은 감염된 오이가 높은 온도에서 젖어 있는 기간이 길수록 심하게 발생한다. 따라서 시설 내 환경을 조절하여 조기 방제의 자료로 이용하고자 병발생에 영향을 주는 매우 중요한 요인인 온도와 식물체의 습전 시간 사이의 관계에 대해 살펴보았다. 감염된 오이를 온도 25°C에서 36시간 100% 습실처리 하였을 때나, 30°C에서 24시간 100% 습실처리 하였을 때, 한 잎당 80개 이상의 병반이 형성되었다(Fig. 3). 20°C에서 15시간 동안 100% 습실처리 하였을 때는 감염된 잎에 병반이 형성되지 않았으나 20°C에서 36시간 이상 습실처리하면 한 잎당 1-40개의 병반이 형성되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 고온에서 오랫동안의 습전시간을 갖는 것이 오이 갈색무늬병의 대 발생에 영향을 미치는 가장 중요한 요인임을 암시하며, 강 등(1993)의 결과와도 잘 일치한다. 본 연구결과는 환경요인들을 monitoring하여 오이 갈색무늬병의 진전을 예측하는데 유용하게 사용될 것이다.



**Fig. 3.** Effect of dew period and temperature on development of target leaf spot disease by *C. cassiicola* CM2000-1. Cucumber plants grown to have fully expanded third leaves were spray-inoculated with conidial suspension ( $10^4$  spores/ml) and incubated in a mist chamber for various times at 20, 25, and 30°C. Severity of target leaf spot was rated as following ; N, no spot; L, 1-40 spots/leaf; M, 41-80 spots/leaf; S, over 81 spots/leaf. This experiment was repeated two times under same conditions.



**Fig. 4.** Target leaf spot symptoms on Korean cucumber cultivars. Plants with completely developed third leaves were spray-inoculated with conidial suspension ( $10^4$  spores/ml) and incubated in a mist chamber for 24 h at 30°C. The disease incidence of the pathogen-challenged cucumber was measured after placing at 25°C for one week and represented as numbers of spot per leaf.

최근 오이 갈색무늬병이 수출용 오이를 생산하는 재배단지에서 주로 발생하였지만 국내산 오이단지에서는 발병을 아직 확인하지 못한 상태이다. 하지만 이 병원균이 국내산 오이품종에도 주요 병원성이 될 잠재적 가능성을 지니고 있기 때문에 국내산 여러 오이품종을 대상으로 품종별 저항성 검정을 실시하였다(Fig. 4). 품종별로 많은 차이가 있었으나 백침그룹(미다래, CM-백침, CC-백침)과 사엽그룹(CB-삼척, CM-삼척)에 속하는 오이 품종들은 *C. cassiicola* CM2000-1을 인위적으로 접종하였을 때 매우 감수성을 나타내었다. 그러나 반백그룹(CK-백다다기, BR-다다기, YC-반백)과 청장그룹(MB청장, NB-청장)은 *C. cassiicola*에 고도의 저항성을 나타내었다. 따라서 육종에

의해 반백 및 청장그룹에 있는 저항성 유전자가 다른 오이 품종 육종에 이용될 수 있을 것이다. 전남지방에 존재하는 오이 갈색무늬병균은 흰가루병, 노균병, 잿빛곰팡이병, 검은별무늬병과 같은 다른 종류의 오이 병원균의 방제에 사용되고 있는 살균제에 매우 높은 저항성을 나타내었다(결과미제시). 이 병원균이 현재 시판되고 있는 살균제에 저항성을 가지고 있으므로 육종에 의한 저항성 품종의 육성이 시급하다고 하겠다.

강 등(1993)은 질소시비량의 증가가 이 병의 진전에 매우 중요한 요인임을 밝혔는데 따라서 질소시비의 제한 혹은 작물에 저항성을 유발시키는 화학제재의 사용 등과 같은 방제방법도 고려해 볼 수 있을 것이다.

### 감사의 말씀

이 논문은 한국 농촌진흥청 바이오그린 21 연구비에 의해 수행한 것으로 감사를 표합니다.

### 요 약

2000년도와 2001년도에 남부지방(구례, 별교, 영암)의 시설내 오이재배지에서 갈색무늬병에 피해가 심하였다. 잎에서 전형적인 수침상 병반이 생기고 초기에 황색 halo를 지닌 갈색반점이 생긴 후 점차 불규칙하고 큰 병반으로 진전되어 때때로 낙엽을 유발하였다. 감염으로부터 분리한 병원균은 분생자경에 연쇄상 혹은 단일 분생포자를 형성하였고 분생포자는 거의 무색에서 올리브 갈색내지는 갈색을 띠었으며 모양은 7-11개의 위격벽을 지닌 원통형, 역근봉형, 직립형, 만곡형 등이었다. 또한 분리 병원균의 ITS영역의 염기서열은 *Corynespora cassiicola*와 일치하였다. 형태적, ITS영역 분석을 기초로 분리된 병원균은 *C. cassiicola*로 동정하였다. 병원균의 생육은 30°C Czapek Solution Agar 배지에서 가장 좋았으며, 발병환경 조사 결과 30°C에서 18시간 이상 습전시간이 유지될 때 발병이 높아, 고온과 식물의 긴 습전시간이 발병량의 증가를 가져오는 요인이었다. 또한 국내 품종들을 대상으로 오이 갈색무늬병에 대한 감수성과 저항성 품종들을 선발하였다.

### 참고문헌

- Balba, G., Hosein, G., Rajnauth, G., Dilba, A., Hill, St. A. and Parbu, S. 1993. First report of target leaf spot disease caused by *Corynespora cassiicola* on vegetable crops in Trinidad. *Plant Dis.* 77: 210.
- Blazquez, C. H. 1967. *Corynespora* leaf spot of cucumber. *Proc. Florida State Horticult. Soc.* 80: 177-182.
- Blazquez, C. H. 1972. Target spot of tomato. *Plant Dis. Rep.* 56: 243-245.
- Ellis, M. B. and Holliday, P. 1971. *Corynespora cassiicola*. *C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, No 303. Kew, UK: CAB International Mycological Institute.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- 강수용, 권진혁, 정부근, 조재규, 이유식, 김희규. 1993. 축성배 배 오이에서 *Corynespora melonis*에 의한 갈색무늬병 발생. *농업논문집* 35(1): 332-336.
- Kwon, M. K., Kang, B. R., Cho, B. H. and Kim, Y. C. 2003. Occurrence of target leaf spot disease caused by *Corynespora cassiicola* on cucumber in Korea. *Plant Pathol.* 52: 424.
- Olive, L. S., Bain, D. C. and Lefevbre, C. L. 1945. A leaf spot of cowpea and soybean caused by an undescribed species of *Helminthosporium*. *Phytopath.* 50: 263-266.
- Silva, W. P. K., Deverall, B. J. and Lyon, B. R. 1998. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathol.* 47: 267-277.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. in M. Innis (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.
- Wasilwa, L. A., Correll, J. C., Morelock, T. F. and MxNew, R. F. 1993. Reexamination of races of the cucurbit anthracnose pathogen *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathol.* 83: 1190-1198.
- Wyszogrodzka, A. J. 1987. Multiple-pathogen inoculation of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Plant Dis.* 71: 275-280.