

Note	Open Access
------	-------------

*Cristulariella moricola*에 의한 네군도단풍 등근무늬낙엽병

조성은 · 박지현 · 이상현¹ · 이항범² · 신현동*고려대학교 환경생태공학부, ¹국립산림과학원 산림병해충연구과, ²전남대학교 응용생물공학부

Zonate Leaf Spot of *Acer negundo* Caused by *Cristulariella moricola* in Korea

Sung-Eun Cho, Ji-Hyun Park, Sang-Hyun Lee¹, Hyang Burm Lee² and Hyeon-Dong Shin*

Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

¹Division of Forest Diseases and Insect Pests, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea²Division of Applied Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received on November 24, 2011; Revised on February 19, 2012; Accepted on March 9, 2012)

In early August of 2011, following a prolonged period of cool and moist weather, several trees of boxelder maple (*Acer negundo*) planted in Mt. Soyo located in Dongducheon, Korea, were found to be heavily damaged by premature defoliation with zonate leaf spot symptoms. Numerous number of cone-shaped, white sporophores (conidia) were observed on lesions of the abaxial leaf surface. The morphological characteristics of conidia are of typical *Cristulariella moricola*, which was supported by analyzing sequences of internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. Pathogenicity of the fungus was proved by artificial inoculation in the condition of relative humidity 100% and $18 \pm 2^\circ\text{C}$. This is the first report of the occurrence of zonate leaf spot caused by infection of *C. moricola* on *A. negundo* in Korea.

Keywords : *Acer negundo*, Boxelder maple, *Cristulariella moricola*, *C. pyramidalis*, Zonate leaf spot

네군도단풍(*Acer negundo* L.)은 북아메리카 원산의 낙엽활엽 교목으로서 전 세계의 온대지방에 널리 보급되어 있다. 추위에 잘 견디고 환경적응성이 뛰어나므로 우리나라에서도 정원수나 가로수로 널리 식재되며, 목재는 장식용재와 가구재로 쓰인다. 지금까지 우리나라에서 보고된 네군도단풍의 병해로는 *Sawadaea negundinis*에 의한 흰가루병이 유일하며(The Korean Society of Plant Pathology, 2009), 실제 저자들의 현장 조사에서도 흰가루병 이외의 병해를 관찰한 바 없었다. 이와 같이 네군도단풍에서 발생하는 병해가 거의 없으므로 정원수 또는 공원수로서 이용가치가 높다고 판단된다.

2011년 8월 초순에 경기도 동두천시 소요산 지역의 네군도단풍에서 심한 겹등근무늬 증상과 더불어 조기낙엽이 관찰되었다(Fig. 1A). 여러 그루의 나무 전체가 감염되었으며 병든 잎의 비율은 거의 100%였고, 약 50%의 잎은 이미 떨어진 상태였다. 이러한 피해의 원인을 규명

하기 위하여 병든 잎을 수거하여 병원균을 동정하였고, 단포자를 분리 배양하여 균주를 획득하였으며, 인공접종을 통하여 병원성을 확인하였기에 이를 우리나라에서 발생한 네군도단풍의 미기록병으로 보고한다.

병징. 초기에는 잎 양면에 수침상의 병반이 회색 내지 회갈색으로 나타나는데, 차츰 확대되고 진전되면서 짙은 부분과 엷은 부분이 차례로 나타났고, 결과적으로는 회백색 내지 회갈색을 띤 과녁 모양의 겹등근무늬로 발전하였다(Fig. 1B–C). 개개의 병반은 대체로 직경 10 mm를 넘지 않았으나, 발병이 심해지면 인접한 병반과 융합되면서 잎의 대부분을 차지하는 큰 병반으로 진전되기도 하였다. 이러한 증상을 가진 잎은 일찍 떨어졌으며, 병반 위에 원뿔형의 분생포자가 모여 있는 모습을 맨눈 또는 돋보기로 쉽게 관찰할 수 있었다(Fig. 1D).

병원균의 특징. 이 곰팡이를 동정하기 위하여 수술칼을 이용하여 분생포자를 병반에서 절취하였으며, 이를 물에 넣어 검경하였다. 이 균의 분류학적 특성을 파악하고 크기를 측정하기 위하여 명시야광학현미경(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 현미경사진은 미분간섭현미

*Corresponding author

Phone) +82-2-3290-3063, Fax) +82-2-921-1715

E-mail) hdshin@korea.ac.kr

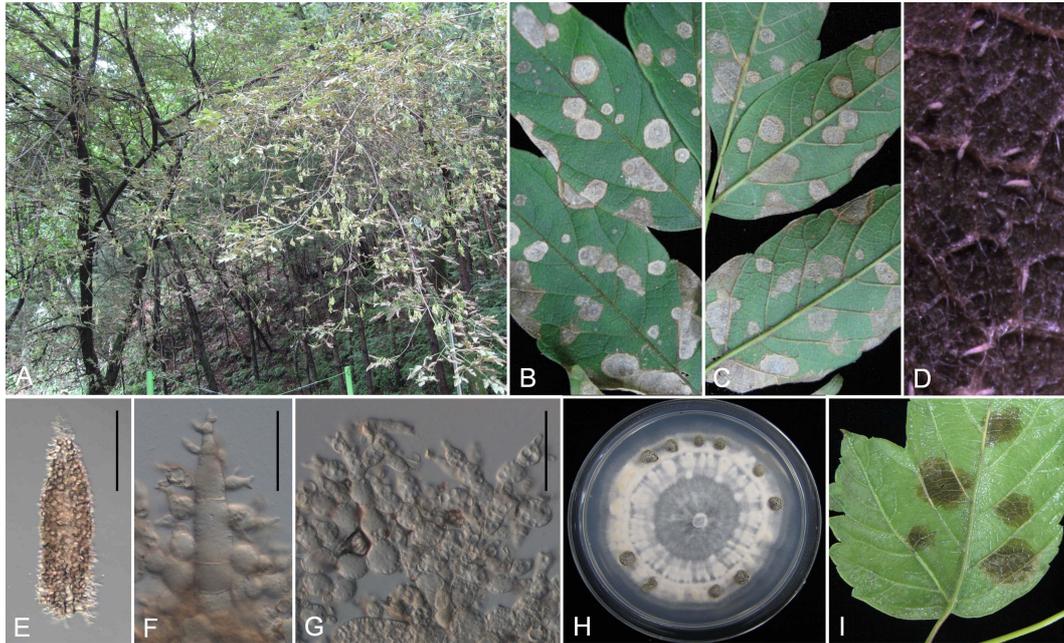


Fig. 1. Zonate leaf spot of boxelder maple (*Acer negundo*) infected with *Cristulariella moricola*. **A:** Premature defoliation due to heavy infection on early August, 2011. **B & C:** Close-up of symptoms on the adaxial (**B**) and abaxial (**C**) surfaces of a leaf. **D:** Many sporophores formed on the abaxial surface of a leaf lesion. **E:** Sporophore (bar = 200 μm). **F:** Upper portion of a sporophore (bar = 50 μm). **G:** Part of a sporophore showing globose cells (bar = 50 μm). **H:** Four-week-old colony of *C. moricola* forming immature sclerotia on a potato dextrose agar. **I:** A leaf showing large lesions 7 days after artificial inoculation.

경(Axio Imager, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)을 이용하여 촬영하였다. 각 특징의 기재는 최소 20개 이상의 관찰결과를 바탕으로 결정하였다. 본 연구는 신선시료(동두천, 소요산, 2011년 8월 3일, 신현동 채집)에 근거하여 동정되었으며, 이 시료는 건조표본으로 제작되어 고려대학교 식물표본실에 보존하였다(수장번호 KUS-F25949).

분생포자(conidia, sporophores)는 대부분 병든 잎의 뒷면에 형성되었으나 때로는 앞면에서도 관찰되었으며, 단생하며, 곧추 서며, 쉽게 탈락하며, 중심주(central stipe)에 구형세포(globose cells)들이 붙어있는 모습이였다. 중심주를 이루는 대는 직경 14–18 μm 정도로 균일하였다. 윗부분의 세포들은 위로 갈수록 폭이 점차 좁아지는 원뿔형이며, 무색이며, 길이는 340–650 μm , 폭은 110–180 μm 이었다(Fig. 1E). 구형세포는 향정단성(acropetal) 방식으로 형성되었다(Fig. 1F). 개개의 구형세포는 직경 9–22 μm 이며, 분아형(blastic) 방식으로 2–3개의 분지를 형성하였다(Fig. 1G). 이와 같은 방식으로 전체적인 분생포자의 모양이 형성되었으므로 성숙한 분생포자는 특징적인 원뿔형을 나타냈다(Fig. 1E). 이러한 형태적 특징은 앞선 연구(Waterman과 Marshall, 1947; Niedbalski 등, 1979; Redhead, 1979; Lee와 Kim, 2002a)에서 보고된 *Cristulariella moricola* (Hino) Redhead (= *C. pyramidalis* Waterman & R.P. Marshall)

의 기재와 일치하였다(Table 1).

병원균의 배양. 이 균을 순수배양하기 위하여 Hirano와 Iida(1975)의 방법에 따라 병반 위에 형성된 분생포자를 감자한천배지에 접종하여 항온기($18 \pm 2^\circ\text{C}/12:12$ 광주기)에서 배양하였다. 순수분리된 균주를 감자한천배지에서 배양하면 약 7일 후에 균총의 직경은 약 90 mm에 이르며, 약 2주일 후에는 균핵을 형성하기 시작하여 약 4주일 후에는 뚜렷한 형태의 균핵을 관찰할 수 있었다(Fig. 1H). 한 개의 단포자 분리균주를 농업미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection of the National Academy of Agricultural Science)에 기탁하였다(수장번호 KACC46383).

병원성 검정. 병원성을 검정하기 위하여 병든 잎에서 떼어낸 분생포자를 네균도단풍 잎에 접종하였다. 건전한 네균도단풍 잎은 어떠한 병도 전혀 발생하지 않은 경기도 수원시 서둔동 (구)서울대학교 수원캠퍼스에 식재된 건강한 그루에서 채취하였다. 각 잎(소엽)에 병반에서 분리한 분생포자를 1개씩 5군데에 올려놓고 상대습도 100%의 습실 조건을 부여하였으며, 이렇게 접종된 잎은 Su와 Leu(1983)의 연구에 근거하여 $18 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 항온기에 보관하면서 매 24시간마다 발병여부를 관찰하였다. 분생포자를 접종하지 않은 대조구의 잎도 같은 조건에 보관하면서 함께 관찰하였다. 그 결과 24시간 후에 작은 병반이

Table 1. Comparison of morphological characteristics of *Cristulariella moricola* examined by different authors

Characteristics	Waterman and Marshall (1947)	Niedbalski <i>et al.</i> (1979)	Lee and Kim (2002a)	Present isolate
Sporophores				
length×width of head (μm)	250–450×80–120	330–627×90–190	495–534×210–290	340–650×110–180
shape of head	pyramidal	pyramidal to cone-shaped	pyramidal	pyramidal to cone-shaped
Central stripe				
color	hyaline	hyaline	hyaline	hyaline
width (μm)	–*	–	–	14–18
shape of apex	more and less acute	tapering to an acute apex	tapering toward an acute apex	tapering to an acute apex
septum	septate	septate	septate	septate
Globose cells				
shape	di- or trichotomously branched	di- or trichotomously lobed	di- or trichotomously branched	di- or trichotomously branched
Host plants				
	<i>Acer negundo</i>	<i>Acer negundo</i>	<i>Vigna vexillata</i> var <i>tsusimensis</i>	<i>Acer negundo</i>

*Not described

나타났고, 48시간 후에는 병반의 직경이 5 mm에 이를 정도로 급속하게 진전되었다(Fig. 1I). 한편, 대조구에서는 이러한 증상이 전혀 나타나지 않았다. 따라서 Koch의 가설을 만족시킴으로써 *C. moricola*의 병원성이 확인되었다. 이 접종실험에서 발현된 병반은 옅은 암녹색(pale olivaceous) 내지 갈색(brown)이고 대체로 둥근 모양이나 가장자리는 불규칙하였다. 이는 자연 상태의 병반이 회백색(ash gray) 내지 회갈색(grayish brown)이고 특징적인 둥근 모양으로 가장자리에 건전부와 경계가 뚜렷한 것과는 사뭇 다른 모습이었다. 이러한 차이의 주요 원인은 이 병원균의 저온 성장성과 연관된다. 즉, 이 균은 25°C에서 생장이 둔화되고 28°C에서는 극히 미미한 성장을 보이며, 31°C에서 생장이 정지된다고 한다(Su와 Leu, 1983). 따라서 자연 상태에서 야간의 저온에서는 균이 성장하고 주간的高温에서는 균의 생장이 정지되면서 특징적인 겹등근무늬가 나타나며 대기습도가 낮아지면(실제는 지속적인 강우가 정지하면) 병반의 진전은 정지되면서 가장자리가 뚜렷한 병반이 형성된다. 그러나 인공접종 실험은 18±2°C의 항온기에서 이루어졌으며 지속적으로 상대습도 100%를 유지하였으므로 이러한 병징이 발현되었다.

균주의 분자적 분석. 단포자 분리한 균주의 동정을 확인하고, 기초적인 유전자 정보를 제공하기 위하여 분자분석을 실시하였다. Lee와 Taylor(1990)의 방법에 따라 균주에서 끊어낸 균사 집단으로부터 rDNA를 추출하였다. 프라이머 ITS1과 ITS4를 이용하여 ribosomal DNA의 internal transcribed spacer (ITS) 영역을 증폭하였으며(White

등, 1990), 증폭된 것은 전기영동을 통해 확인한 후에 QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제하였다. 얻어진 염기서열은 DNASTAR computer package 5.05 (Lasergene, Madison, WI, USA)를 이용하여 정리한 뒤, GenBank에 등록하여 Accession number JQ036181을 부여받았다. 이 염기서열을 NCBI에서 BLAST해 본 결과 콩에서 발생한 *C. moricola*와는 100% 일치하였고, *Juglans* 속에서 발생한 *Grovesinia pyramidalis* (무성세대 = *Cristulariella pyramidalis*)와는 99% 일치하는 것으로 나타났다. 균핵병균과(*Sclerotiniaceae*)에 속하는 분류군들과의 관계를 알아보기 위하여 MEGA 4.0 프로그램을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성한 결과, *C. moricola*와 같은 clade에 속함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 이러한 분자계통학적 특성을 바탕으로 우리나라에서 발생한 네군도단풍의 등근무늬낙엽병의 병원균이 *C. moricola*임을 재확인하였다.

고찰. Waterman과 Marshall(1947)은 *C. pyramidalis*를 신종으로 기재하면서 *Acer negundo*, *A. saccharum* 및 *A. pseudoplatanus*를 기주식물로 제시하였다. 그 후 Redhead(1979)는 균학적 연구를 통하여 *C. pyramidalis*를 *C. moricola*의 동물이명(synonym)으로 처리하였다. 따라서 본 연구에서는 Redhead(1979)의 개념을 수용하여, 이 균을 *C. moricola*로 결정하였다. 한편, 단풍나무류(*Acer* spp.)에 기생하는 *Cristulariella* 속 곰팡이로는 *C. depraedans*가 잘 알려져 있는데(Farr와 Rossman, 2011), *C. moricola*(*C. pyramidalis*로 보고된 경우까지 포함)가 단풍나무류의 병

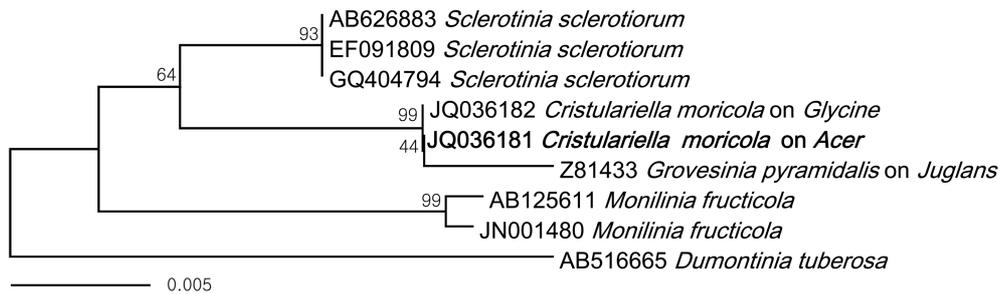


Fig. 2. Phylogenetic relationship between *Cristulariella moricola* (teleomorph: *Grovesinia pyramidalis*) and some reference isolates of sclerotiniaceous fungi retrieved from GenBank, inferred by neighbor-joining method using the ITS rDNA region. Numbers above the branches represents the bootstrap value. Bar = Number of nucleotide substitutions per site.

원균으로 기록된 것은 지금까지 북미(Farr와 Rossman, 2011) 및 일본(Suto, 1976)에 국한되었다. 따라서 네군도 단풍에 *C. moricola*가 병원균으로 기록된 것은 우리나라에서 최초일 뿐만 아니라 지리적으로도 세계에서 세 번째이다. 이 병은 병징의 특징에 따라, 또한 과거의 병명 기록(Lee와 Kim, 2002a, 2002b)에 맞추어 ‘등근무늬낙엽병(環紋葉枯病, zonate leaf spot)’으로 제안한다.

요 약

저온다습한 날씨가 지속된 후의 2011년 8월 초순에 경기도 동두천시 소요산에서 겹등근무늬와 조기낙엽 증상을 나타내는 네군도단풍이 발견되었다. 병든 잎의 뒷면에서 원뿔 모양이며 흰색의 분생포자가 다수 관찰되었다. 현미경 검경을 통하여 형태적 특징을 검토한 결과, 이 증상의 원인균은 *Cristulariella moricola*로 동정되었다. 상대 습도 100% 및 18±2°C의 조건에서 인공접종을 통하여 이 균의 병원성을 증명하였다. 한편, 분리 균주의 internal transcribed spacer 영역의 염기서열을 분석하고 NCBI에 등록된 균의 염기서열과 비교함으로써 이 균이 *C. moricola*임을 증명하였다. 네군도단풍에 *C. moricola*의 감염에 의해 발생한 등근무늬낙엽병은 우리나라에서 최초의 기록이다.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from Regional Subgenebank Support Program of Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

Farr, D. F. and Rossman, A. Y. 2011. Fungal Databases, Systematic Mycology & Microbiology Laboratory, ARS,

- USDA. Retrieved November 22, 2011, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Hirano, K. and Iida, W. 1975. Zonate leaf spot disease of crapemyrtle caused by *Cristulariella pyramidalis* Waterman and Marshall. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.* 23: 53–61.
- Lee, H. B. and Kim, C. J. 2002a. First report of zonate leaf spot of *Vigna vexillata* var. *tsusimensis* caused by *Cristulariella moricola*. *Plant Dis.* 86: 440.
- Lee, H. B. and Kim, C. J. 2002b. First report of zonate leaf spot of *Cocculus trilobus* caused by *Cristulariella moricola* in Korea. *Plant Pathol.* 51: 799.
- Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, pp. 282–287. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Niedbalski, M., Crane, J. L. and Neely, D. 1979. Illinois Fungi 10. Development, morphology, and taxonomy of *Cristulariella pyramidalis*. *Mycologia* 71: 722–730.
- Redhead, S. A. 1979. Mycological observations: 1, on *Cristulariella*; 2, on *Valdensinia*; 3, on *Neolecta*. *Mycologia* 71: 1248–1253.
- Su, H. J. and Leu, S. C. 1983. Zonate leaf spot of Indian jujube caused by *Cristulariella moricola*. *Plant Dis.* 67: 915–916.
- Suto, Y. 1976. Zonate leaf spot of broad-leaved trees in Shimane prefecture, Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42: 353 (Abst.)
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Diseases in Korea. 5th ed., Suwon, Korea. 853 pp. (In Korean)
- Waterman, A. M. and Marshall, R. P. 1947. A new species of *Cristulariella* associated with a leaf spot of maple. *Mycologia* 39: 690–698.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, pp. 315–322. Academic Press, San Diego, CA, USA.