

*Sclerotium rolfii*에 의한 시클라멘 흰비단병

Sclerotium Rot of *Cyclamen europaeum* Caused by *Sclerotium rolfii*

권진혁^{1*} · 이흥수¹ · 김진우² · 김원일³ · 심흥식³ · 신순선⁴¹경상남도농업기술원, ²경상대학교 농업생명과학연구원, ³국립농업과학원, ⁴중국 허남농업대학교Jin-Hyeuk Kwon^{1*}, Heung-Su Lee¹, Jinwoo Kim², Won-Il Kim³, Hong-Sik Shim³ and Shun-Shan Shen⁴¹Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services, Jinju 660-360, Korea²Institute of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea³National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 565-851, Korea⁴College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China***Corresponding author**

Tel : +82-55-254-1323

Fax: +82-55-254-1319

E-mail: kwon825@korea.kr

Sclerotium rot caused by *Sclerotium rolfii* occurred on *Cyclamen europaeum* grown at the experimental greenhouse of Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services in April 2013. Infected plants showed water-soaked appearance, wilting, and rotting; severely infected plants eventually died. White mycelial mats spread over lesions, and sclerotia were formed on leaves, petioles, and flower stalks near soil line. On the basis of mycological characteristics, ITS rDNA sequence analysis, and pathogenicity to host plants, this fungus was identified as *S. rolfii* Saccardo. This is the first report of sclerotium rot on *C. europaeum* caused by *S. rolfii* in Korea.

Keywords: *Cyclamen europaeum*, *Sclerotium rolfii*, Sclerotium rot

Received June 17, 2014

Revised August 21, 2014

Accepted August 25, 2014

2013년 4월 경상남도농업기술원 유리 온실에 심어 놓은 시클라멘에서 잎과 잎자루, 꽃자루 부위가 시들면서 부패되는 이상 증상을 관찰하였다. 온실에서 조사한 결과 시클라멘 잎자루 부분이 토양 표면에 닿는 부위에서 흰색의 곰팡이와 갈색의 작은 둥근 균핵이 관찰되었다. 병든 식물체를 채집하여 병원균을 순수 분리하여 균학적 특징과 병원성을 검정하였고, ITS(internal transcribed spacer) ribosomal RNA(rRNA) 유전자 염기서열을 분석하여 동정하였다. 그 결과 *Sclerotium rolfii* Saccardo에 의한 시클라멘 흰비단병으로 동정되었다.

지금까지 우리나라에서 시클라멘 흰비단병에 대한 병해 발생 보고는 없다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 따라서 본 연구에서는 시클라멘에 발생한 흰비단병의 병징, 병원균의 균학적 특징, 병원성 검정 및 ITS 염기서열 분석 결과를 보고한다.

병징과 발병환경. 시클라멘의 잎과 잎자루, 꽃자루에 발생하며 수침상으로 물리지면서 썩는다. 감염된 식물체는 누렇게 시들어 결국 말라 죽는다(Fig. 1A, B). 식물체 잎자루 부위와 상토 표면에 닿는 부분에서 흰색의 곰팡이가 생기고 균사체는 시간이 경과함에 따라 갈색의 작은 둥근 균핵을 많이 형성하였다. 2013년 경상남도농업기술원 유리 온실에서 시클라멘을 상토와 토양 절반씩 섞은 다음 포트(10×10×8 cm)에 재배하였다. 심어 놓은 시클라멘은 고온 다습한 환경 조건에서 통풍과 채광이 좋지 않은 상태로 관리되었다. 온실내 식물체에 관수를 할 경우 위에서 살수를 하므로 온도와 습도가 알맞게 유지되어 병이 발생하기 좋은 환경이었다. 시클라멘이 상토 표면과 닿는 잎자루 부분이 수침상으로 물리지는 증상이 나타났다. 심하게 발생할 경우 식물체가 누렇게 시들면서 말라 죽었다. 병든 식물체에서 흰색의 균사체와 갈색의 작은 둥근 균핵이 형성되기 때문에 육안으로 쉽게 관찰이 가능하다.

병원균 분리 및 균학적 특성. 시클라멘에서 발생한 흰비단병의 병원균을 분리하기 위하여 병든 식물체를 채집하여 건진

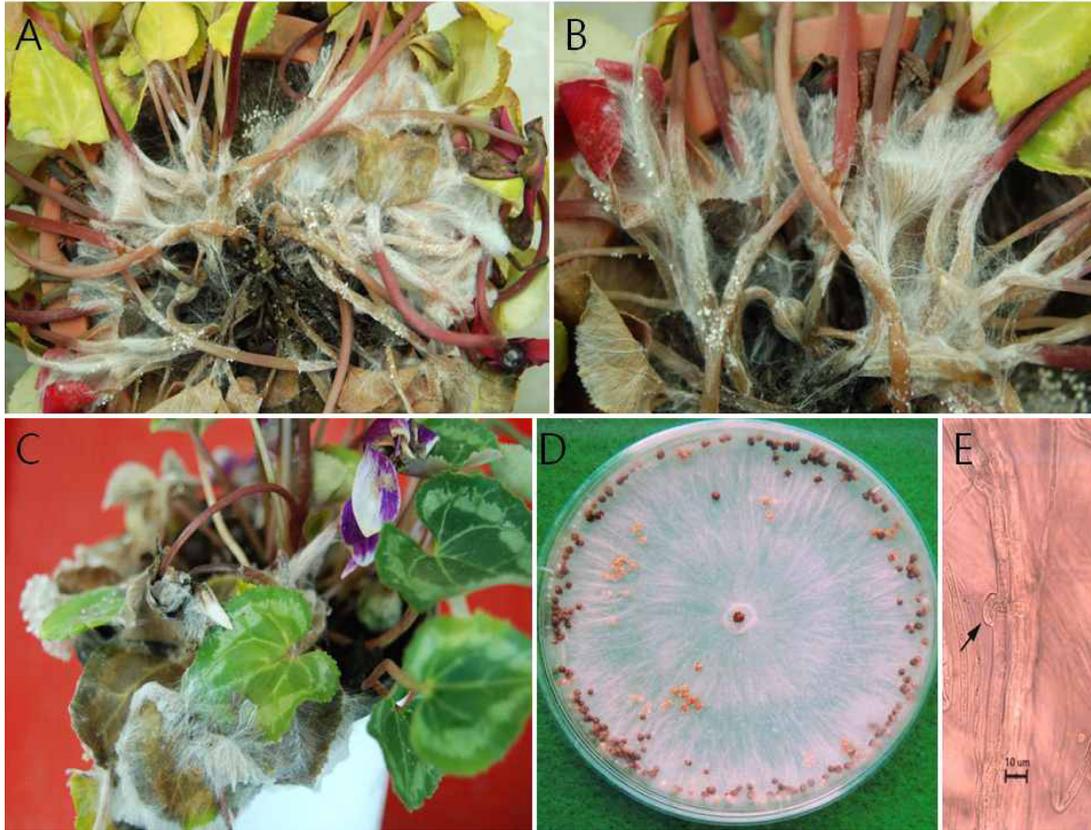


Fig. 1. Symptoms on *Cyclamen europaeum* and mycological characteristics of the pathogenic fungus, *Sclerotium rolfsii*. A and B, Typical symptom; C, Symptoms induced by artificial inoculation; D, Mycelial mats and sclerotia produced on PDA 20 days after inoculation; E, Clamp connection (arrow).

Table 1. Comparison of mycological characteristics of an isolate obtained from *Cyclamen europaeum* L. and *Sclerotium rolfsii* described previously

Characteristics		Present isolate	<i>S. rolfsii</i> ^a
Colony	color	white	white
Hypha	size	4–9 µm	4.5–9 µm
	clamp connection	present	present
Sclerotium	shape	globoid	spherical
	size	1–3 mm	1–2 mm
	color	white to brown	brown

^aDescribed by Mordue (1974).

부와 병반부 경계 부위의 잎자루 조직을 5×5 mm 크기로 30개 잘랐으며, 각 시료를 1% NaOCl 용액으로 1분간 표면소독한 후 멸균수에 3회 세척하였다. 알콜램프에 화염 소독한 필터 종이 펄 이용하여 물기를 완전히 제거한 후 무균상 안에서 페트리 디쉬에 넣고 24시간 보관하면서 시료를 건조시켰다. 감자한천배지 위에 옮겨 25°C 항온기내에서 4일간 배양한 후 자라 나온 균사를 다시 감자한천배지 위에 옮겨 30°C 항온기에서 20일 동안 배양하면서 분리균의 균핵적 특성을 조사하였다(Table 1).

감자한천배지 위에서 균충은 흰색이며 균사가 솜털처럼 왕성하게 자라며 흰색의 균핵 시원체가 형성되고 배양시간이 길어짐에 따라 지름 1–3 mm의 작은 둥근 갈색 균핵을 많이 형성하였다(Fig. 1D). 균사 생육 및 균핵 형성 적온은 30°C이었다. 5일간 배양한 균충에서 광학현미경으로 균사 특유의 clamp connection 형태를 관찰하였으며(Fig. 1E), 균사의 폭은 4–9 µm이었다.

병원성 검정. 2013년 4월에 시중에 판매하고 있는 건전한 시클라멘을 구입하여 농업기술원 유리 온실에서 1년간 재배한 후 이상 없는 식물체를 선정하여 2014년 5월 상순에 병원성을 검정하였다. 접종원은 가는 체(2.0 mm)로 친 토양을 고압 멸균기에 30분간 5일 간격으로 3회 멸균하였다. 감자한천 배지에 7일간 배양한 균충 30개를 수거하여 플라스틱 용기(56×35×13 cm)에 넣고 멸균한 흙 3 kg과 잘 섞은 다음 골고루 잘게 마쇄하였다. 유리 온실에서 10일간 건조시킨 후 상온에 보관하면서 필요시 접종원으로 사용하였다. 접종은 포트(12×10×8 cm) 내 재배중인 시클라멘 잎자루 사이에 미리 만들어 놓은 전염원 100 g을 넣은 다음 포트내 상토가 건조하지 않게 하기 위해 물 500 ml로 충분히 준 다음 비닐봉지 안에 플라스틱 용기(56×35

×13 cm)를 넣고 그 위에 접종한 포트를 놓고서 공기가 잘 통하도록 끝부분을 느슨하게 묶은 다음 30°C 접종상에 두고 발병을 유도하면서 관찰하였다. 접종 5일 후 시클라멘 잎자루와 꽃자루 부분이 수침상으로 물러지면서 시들어지고 부패되어졌다. 접종부위에 솜털모양의 흰색 균사가 왕성하게 자라면서 균핵 시원체가 생기고 시간이 경과됨에 따라 갈색의 작은 둥근 균핵이 많이 형성되었으며 흰비단병 특유의 병징이 나타났다(Fig. 1C).

ITS 염기서열 분석. 병원균 동정을 확정하기 위해 White 등(1990)이 사용한 프라이머 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 ITS rDNA 부분을 PCR로 증폭하였다. PCR 조건은 최종 농도 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs이고 10 pmol의 프라이머와 0.1 unit의 Taq DNA polymerase(TaKaRa)를 사용하였으며, 최종반응용량을 50 µl로 맞추었다. PCR 반응조건은 predenaturation(98°C, 2분), denaturation(98°C, 30초), annealing(60°C, 30초), extension(72°C, 30초), total cycle(30 cycles), final extension(72°C, 4분) 등이었으며, 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 밴드를 확인하였다. 확인된 밴드는 QIAquick PCR purification kit(Qiagen)를 사용하여 분리 정제하였고 pGEM-T Easy 클로닝 벡터(Promega)에 클로닝하였다. 클로닝된 플라스미드는 pOR149로 명명하였고 M13F와 M13R 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 ITS 염기서열(684 bp)은 National

Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank에 등록(기탁번호 KJ944394)하였고 BLAST를 이용하여 complete ITS 영역의 염기서열을 비교 분석한 결과, GenBank에 등록되어 있는 옥잠화 흰비단병을 일으키는 *S. rolfsii*(기탁번호 HM355751)의 ITS 염기서열과 100% 일치하였다. 시클라멘에서 분리한 균의 유전적 유연관계 분석(phylogenetic analysis)은 MEGA 4.0 프로그램(Tamura 등, 2007)을 이용하여 neighbor-joining(NJ) 방법으로 작성하였고 그 결과, 분리 균은 *S. rolfsii* 분기군에 포함되었다(Fig. 2).

이상과 같이 병원균의 균학적 특성, 병원성, ITS 염기서열 분석 결과, Mordue(1974)가 보고한 *S. rolfsii*와 일치하였으며, 최근에 수세미오이 흰비단병(Kwon 등, 2012), 오이 흰비단병(Kwon 등, 2013)에 발생 보고한 병징과 균학적 특징이 일치하였다. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과를 가지고 이 병을 *S. rolfsii* Saccardo에 의한 시클라멘 흰비단병으로 명명하고자 한다. 시클라멘에서 분리한 *S. rolfsii*은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전 자원정보센터 미생물은행(KACC 47748)에 균주등록을 하였다.

요 약

2013년 4월 경상남도농업기술원 유리 온실에서 *Sclerotium rolfsii*에 의한 시클라멘 흰비단병 증상이 발생하였다. 병징은 시클라멘의 잎과 잎자루, 꽃자루 부분이 수침상으로 물러지고 부패되면서 시들어 말라 죽는다. 병반부와 토양 표면에 흰색의 곰팡이가 발생하며 갈색의 작은 둥근 균핵이 많이 형성되었다. 감자한천배지에서 균충은 흰색이고 잘 자라며 배양기간이 경과

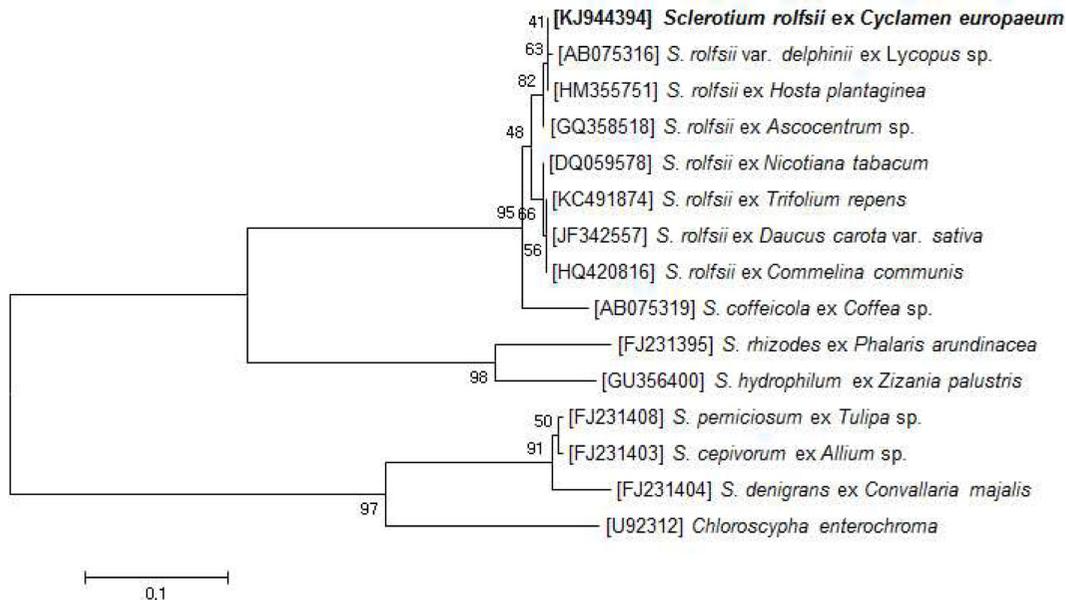


Fig. 2. Phylogenetic tree produced using internal transcribed spacer sequences, showing the closest known relatives of *Sclerotium rolfsii*. DNA sequences from the NCBI nucleotide database were aligned using Clustal W program, and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method, visualized with TreeView. The numbers above branches indicate bootstrap values. Bars indicate the number of nucleotide substitutions per site. The isolate studied in the present study is marked in bold.

됨에 따라 갈색의 작은 둥근 균핵을 많이 형성하였다. 시클라멘에서 발생한 병징과 병원균의 균학적 특징, 그리고 ITS rDNA 염기서열 비교분석 결과, 이 병을 *S. rolfsii* Saccardo에 의한 시클라멘 흰비단병으로 명명하고자 제안한다.

Acknowledgement

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009192)” Rural Development Administration, Korea.

References

- Kwon, J. H., Kim, J., Lee, Y. H. and Shim, H. S. 2012. Sclerotium rot of sponge gourd caused by *Sclerotium rolfsii*. *Res. Plant Dis.* 18: 54–56. (In Korean)
- Kwon, J. H., Lee, S. D., Choi, O. R., Shen, S. S. and Shim, H. S. 2013. Occurrence of sclerotium rot of cucumber caused by *Sclerotium rolfsii*. *Res. Plant Dis.* 19: 229–232. (In Korean)
- Mordue, J. E. M. 1974. *Sclerotium rolfsii*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 410. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea, 5th ed. 853 pp.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. 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, eds. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, pp. 315–322. Academic Press Inc., New York, USA.