

## *Sclerotium rolfii*에 의한 할미꽃 흰비단병

# Sclerotium Rot of *Pulsatilla koreana* Nakai Caused by *Sclerotium rolfii*

권진혁<sup>1\*</sup> · 황갑춘<sup>1</sup> · 이슬비<sup>1</sup> · 최용조<sup>1</sup> · 이상대<sup>1</sup> · 응원레민<sup>2</sup>

<sup>1</sup>경상남도농업기술원, <sup>2</sup>베트남 동나이성 식물보호지국

Jin-Hyeuk Kwon<sup>1\*</sup>, Gap-Chun Hwang<sup>1</sup>, Seol-Bi Lee<sup>1</sup>, Yong-Jo Choi<sup>1</sup>, Sang-Dae Lee<sup>1</sup> and Le-Minh Nguyen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services, Jinju 660-360, Korea

<sup>2</sup>Plant Protection Subdepartment of Dongnai, Dongnai Province 710000, Vietnam

**\*Corresponding author**

Tel : +82-55-254-1322

Fax: +82-55-254-1319

E-mail: kwon825@korea.kr

Sclerotium rot on *Pulsatilla koreana* was observed in the exhibition field of Jinju Agriculture Technology Center in July 2013. The infected plants showed water-soaked, blighted and rotted symptoms. White mycelial mats spread over lesions, and then numerous sclerotia were formed on flower stalk and flower stem near the soil line. The sclerotia were globoid in shape, 1–3 mm in size and white to brown in color. The optimum temperature for mycelial growth and sclerotia formation on PDA was 30°C and the hyphal width was 4–8 μm. The typical clamp connections were observed in the hyphae of the fungus grown on PDA. For molecular identification, the complete ITS rDNA sequence of the causal fungus was sequenced and analyzed. On the basis of mycological characteristics, ITS rDNA sequence analysis, and pathogenicity to host plants, this fungus was identified as *Sclerotium rolfii* Saccardo. This is the first report of sclerotium rot on *Pulsatilla koreana* caused by *S. rolfii* in Korea.

**Keywords :** *Pulsatilla koreana*, *Sclerotium rolfii*, Sclerotium rot

Received August 5, 2015

Revised September 3, 2015

Accepted September 11, 2015

할미꽃(*Pulsatilla koreana* Nakai)은 건조한 양지에 자라는 다년초로서 미나리아재비과(*Ranunculaceae*)에 속하며, 뿌리는 굵고 검은색이고 윗부분에 많은 잎이 나온다. 흰 털로 덮인 열매의 모습이 할머니의 흰머리 같기 때문에 할미꽃이라고 부르며 뿌리는 이질 등의 지사약으로 사용하고 있으며 민간에서는 학질 및 신경통에 사용한다(Lee, 2003).

2013년 경상남도 진주시농업기술센터 양묘장 전시포에 재배중인 할미꽃이 시들어 말라 죽는 이상 증상을 관찰하였다. 현장에서 병든 식물체를 채집하여 실험실에 가져와 병원균을 순수 분리하고 병원균의 균학적 특징을 조사한 결과 *Sclerotium*

*rolfii* Saccardo에 의한 할미꽃 흰비단병으로 동정되었다.

지금까지 우리나라에서 할미꽃 흰비단병에 대한 병해 발생 보고는 없었다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 따라서 본 연구에서는 할미꽃에 발생한 흰비단병의 병징과 병원균의 균학적 특징 및 병원성 조사 결과를 보고한다.

**병징.** 할미꽃의 꽃줄기와 꽃자루에 발생을 하며 수침상으로 물러지면서 썩는다. 감염된 식물체는 서서히 시들면서 결국 말라 죽는다. 감염된 식물체는 토양표면에 닿은 할미꽃의 꽃줄기와 꽃자루에서 흰색의 곰팡이가 생기고 흰 균사체는 시간이 경과함에 따라 갈색의 작은 둥근 균핵을 많이 형성하였다(Fig. 1A, B).

**Research in Plant Disease**

©The Korean Society of Plant Pathology

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

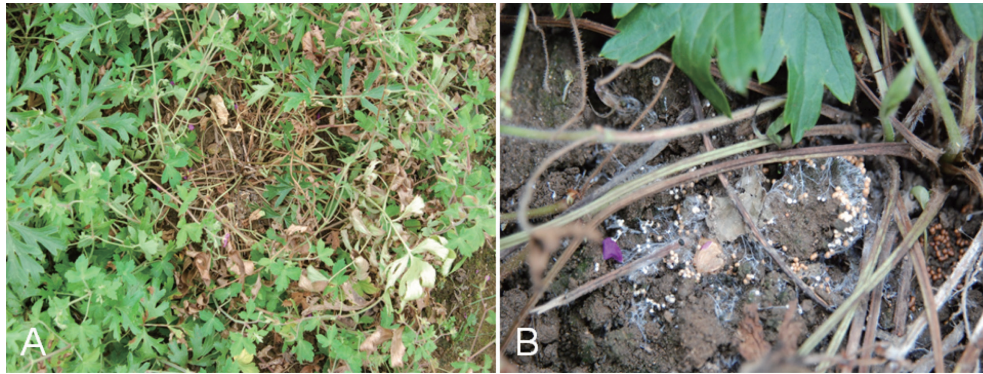


Fig. 1. Symptoms of sclerotium rot caused by *Sclerotium rolfsii* in *Pulsatilla koreana*. A, The infected plant eventually died in the field; B, The typical symptom of sclerotium rot of *Pulsatilla koreana*.

**발생환경.** 2013년 7월 경상남도 진주시농업기술센터 양묘장 전시포에 재배중인 할미꽃이 남부지방 장마기동안 통풍과 채광이 부족한 상태에서 할미꽃의 꽃줄기와 꽃자루가 토양표면 닿은 부분이 수침상으로 물러지면서 시드는 이상증상이 나타났다. 장마기간 온도와 습도가 알맞게 유지되었을 때 더 심하게 발생하였다. 병이 발생한 식물체는 서서히 시들면서 결국 말라 죽었다. 병든 식물체의 꽃줄기와 꽃자루에서 흰색의 균사체와 갈색의 작은 둥근 균핵이 형성되었고 서서히 시들어 말라 죽기 때문에 포장에서 육안으로 쉽게 관찰되었다.

**병원균 분리 및 균학적 특성.** 할미꽃에서 발생한 흰비단병의 병원균을 분리하기 위하여 병든 식물체를 채집하여 건전부와 병반부 경계 부위의 조직을 5×5 mm 크기로 50개를 잘랐다. 1% NaOCl 용액으로 1분간 표면소독한 후 멸균수에 3회 세척하였다. 알콜 램프에 화염 소독한 필터 종이를 이용하여 물기제거한 후 크린 벤치에서 일회용 페트리디쉬 안에 넣고 24시간 시료를 건조시켰다. 감자한천배지(PDA) 위에 옮겨 25°C 항온기내에서 4일간 배양한 후 자라 나온 균사를 다시 떼어 내어 PDA 위에 옮긴 후 30°C 항온기내 18일 배양하면서 병원균의 균학적 특성을 조사하였다(Table 1).

PDA 위에서 균충은 흰색이며 균사가 솜털처럼 왕성하게 자

Table 1. Comparison of mycological characteristics of an isolate obtained from *Pulsatilla koreana* and *Sclerotium rolfsii* described previously

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

<sup>a</sup>Described by Mordue (1974).

라며 흰색의 균핵 시원체가 형성되고 배양시간이 길어짐에 따라 지름 1–3 mm의 작은 둥근 갈색 균핵을 많이 형성하였다 (Fig. 2A). 균사생육 및 균핵 형성 적온은 30°C이었다. 5일간 배양한 균충에서 광학현미경으로 균사 특유의 clamp connection 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 균사의 폭은 4–9 μm이었다.

**병원성 검정.** 2015년 4월 꽃집에서 판매하는 건전한 할미꽃 9개 포기기를 구입하여 와그너 포트(1/5,000a)에 심은 후 기술원 유리온실에서 격리재배를 하였다. 5월 중순 식물체가 정식

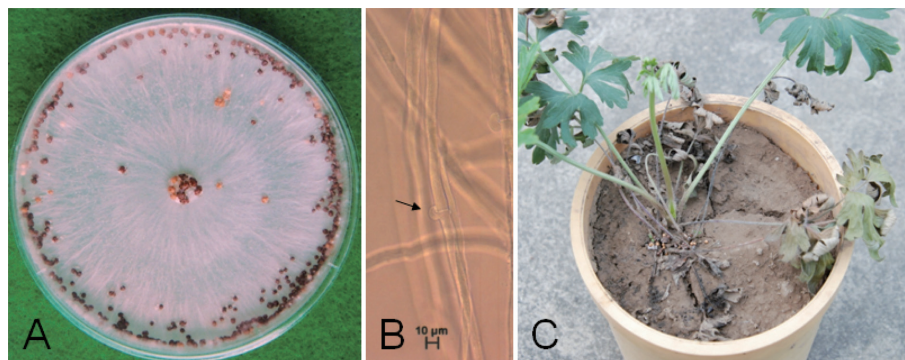


Fig. 2. Morphological characteristics of the pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. A, mycelial mats and sclerotia produced on PDA after 18 days of incubation; B, clamp connection (black arrow); C, symptoms induced by artificial inoculation.

후 45일 정도 자랐을 때 병원성을 검정하였다. 접종원은 직경 2.0 mm의 가는 체로 친 토양을 고압 멸균기에 3일 간격으로 30분간 3회 멸균하였다. 감자한천배지에 7일간 배양한 균총 30 개를 수거하여 플라스틱 용기(56×35×13 cm)에 넣고 멸균한 흙 3 kg과 손으로 잘 섞은 다음 골고루 잘게 마쇄하였다. 유리 온실에서 2주간 건조시킨 후 상온에 보관하면서 필요시 접종원으로 사용하였다. 접종하기 전에 와그너 포트내 토양이 건조하지 않게 하기 위해 포트당 500 ml씩 물을 준 다음 식물체 주변에 전염원 100 g씩 9포트 접종하였다. 수분증발 방지하기 위해 A4 종이 한 장을 위에 놓고 유리 온실에서 격리재배하여 발병을 관찰하였다.

접종 6일 후 할미꽃의 꽃줄기와 꽃자루가 수침상으로 물러지고 부패되면서 흰색의 균사가 왕성하게 자라고 식물체는 서서히 시들어 말라 죽었다. 병반부위에 흰색의 균사와 갈색의 작은 둥근 균핵을 형성하였으며 흰비단병 특유의 병징이 나타났다 (Fig. 2C).

**ITS 염기서열 분석.** 병원균 동정을 확정하기 위해 White 등(1990)이 사용한 프라이머 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 ITS(internal transcribed spacer) rDNA 부분을 PCR로 증폭하였다. PCR 조건은 최종농도 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTPs이고 10 pmol의 프라이머와 0.1 unit의 rTaq DNA polymerase(Takara)를 사용하였으며, 50 µl로 반응용량을 맞추었다. PCR 반응조건은 pre-denaturation(98°C, 2 min), denaturation(98°C, 30 sec), annealing(60°C, 30 sec), extension(72°C, 30 sec), total cycle(30 cycles), final extension(72°C, 4 min) 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 클로닝한 후 M13F와 M13R 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다(Macrogen). 병원 곰팡이의 분자적인 동정을 위해 ITS rDNA 영역의 염기서열(684 bp)을 BLASTN 프로그램을 이용하여 분석하였으며 닭의장풀 흰비단병(GenBank accession no. HQ3420816)과 난 흰비단병(KJ546416)을 일으키는 *S. rolfsii*와 99%의 상동성을 나타내었다. 이미 보고된 흰비단병균들과의 높은 상동성으로 인하여 유전적 유연관계 분석을 실시하지 않았다.

이상과 같이 병원균의 균학적 특성, 병원성, ITS 염기서열 분석 결과, Mordue(1974)가 보고한 *S. rolfsii*와 일치하였으며, 최근에 오이 흰비단병(Kwon 등, 2013), 시클라멘 흰비단병(Kwon 등, 2014)에 발생 보고한 병징과 균학적 특징이 일치하였다. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과를 가지고 이 병을 *S. rolfsii* Saccardo에 의한 할미꽃 흰비단병으로 명명하고자 한다. 할미꽃

에서 분리한 *S. rolfsii*은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전 자원센터 미생물은행(KACC 47992)에 균주등록을 하였다.

## 요 약

2013년 7월 경상남도 진주시농업기술센터 양묘장 전시포에 재배중인 할미꽃에서 흰비단병 증상이 발생하였다. 병징은 할미꽃의 꽃줄기와 꽃자루 부분이 수침상으로 물러지면서 부패되어지고 서서히 시들면서 포기 전체가 말라 죽었다. 병반부와 토양 표면에 흰색의 곰팡이가 발생하며 갈색의 작은 둥근 균핵이 많이 형성되었다. 감자한천배지에서 균총은 흰색이고 배양 기간이 경과됨에 따라 갈색의 작은 둥근 균핵을 많이 형성하였다. 균핵의 크기는 1–3 mm이며 균사의 폭은 4–9 µm였다. 균사생육과 균핵 형성 적온은 30°C이었다. 균사특유의 clamp connection이 관찰되었다. 할미꽃에서 발생한 병징과 병원균의 균학적 특징, 그리고 ITS rDNA 염기서열 비교분석 결과, 이 병을 *S. rolfsii* Saccardo에 의한 할미꽃 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., 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)
- Kwon, J. H., Lee, H. S., Kim, J. W., Kim, W. I., Shim, H. S. and Shen, S. S. 2014. Sclerotium rot of *Cyclamen europaeum* caused by *Sclerotium rolfsii*. *Res. Plant Dis.* 20: 223–226. (In Korean)
- Lee, T. B. 2003. Coloured flora of Korea (1). Hyangmoonsa. 914 pp. Seoul, Korea. (In Korean)
- Mordue, J. E. M. 1974. *Sclerotium rolfsii*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 410. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea, 5th ed. 853 pp. (In Korean)
- 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.