

*Stemphylium lycopersici*에 의한 고려엉겅퀴 점무늬병의 발생

최효원^{1*} · 김석구² · 홍성기³ · 이영기¹ · 이재금¹ · 김효원¹ · 이은형¹

¹국립농업과학원 작물보호과, ²영월군 농업기술센터, ³국립농업과학원 유해생물팀

Occurrence of Leaf Spot Caused by *Stemphylium lycopersici* on *Cirsium setidens* in Korea

Hyo-Won Choi^{1*}, Seok Gu Kim², Sung Kee Hong³, Young Kee Lee¹, Jae Guem Lee¹, Hyo Won Kim¹ and Eun Hyeong Lee¹

¹Crop Protection Division, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea

²Yeongwol Agricultural Technology Center, Yeongwol 26231, Korea

³Microbial Safety Team, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea

ABSTRACT : In August 2015, leaf spot symptoms were observed on Korean gondre thistle (*Cirsium setidens*) in Yeongwol, Korea. During the early stage, the symptoms appeared as one or more small gray-brown to brown spots on plant leaves. The spots showed extensive enlargement over time and eventually became large dark brown to black lesions on the whole leaf. *Stemphylium* species were consistently isolated from affected leaves. All isolates were identified as *S. lycopersici*, *S. solani*, or *S. xanthosomatis* based on morphological and cultural characteristics. The isolates were confirmed as *S. lycopersici* based on a multi-locus sequence analysis using the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region, elongation factor 1, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), and the noncoding region between the vacuolar membrane ATPase catalytic subunit A gene and a gene involved in vacuolar biogenesis. Pathogenicity was tested by spore suspension inoculation on wounded or unwounded gondre leaves. The lesions were observed on inoculated leaves within 3 days after inoculation, regardless of wound. To our knowledge, this is the first report of the leaf spot on gondre thistle caused by *S. lycopersici* in Korea or elsewhere.

KEYWORDS : Gondre, Leaf spot, *Stemphylium lycopersici*

‘곤드레’라는 이름으로 잘 알려진 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens* L.)는 ‘도깨비엉겅퀴’ 또는 ‘구멍이’라고 불리며 국화과에 속하는 다년생 초본식물로 전국 각지에 분포하는 우리나라 자생식물이다[1]. 주로 강원도 지역에서 재배되며,

특히 영양적으로 우수하고, 다양한 약리성분이 있는 것으로 알려져 있어 식용으로 이용되거나 지혈, 소염, 해열 및 고혈압의 치료에 이용되어왔다. 2015년 8월경, 강원도 영월 지역의 고려엉겅퀴 재배 농가에서 잎에 점무늬 증상이 발생하였다. 작은 점무늬 증상이 있는 잎을 수확한 뒤 3~4일이 지나면 잎 전체가 검게 변하여 상품성을 떨어뜨리는 피해를 나타냈다. 병든 잎에서 병원균을 순수 분리하여 균학적 특성 및 DNA 염기서열 분석을 수행한 결과, *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamam.으로 동정되었으며, 고려엉겅퀴 잎에 접종하여 병원성을 확인하였다.

국내에서 고려엉겅퀴에 발생하는 병으로는 *Septoria cirsii* Niessie에 의한 점무늬병과 *Sphaerotheca fusca* (Fr.) S. Blumer에 의한 흰가루병 등 2개의 진균병이 보고되어 있다[2]. *Stemphylium lycopersici*는 전 세계적으로 토마토, 가지, 고추, 상추, 마늘, 감자 등 다양한 채소 작물을 가해하는 병원균으로 알려져 있고[3], 국내에서는 고추[4], 토마토[5], 갈

Kor. J. Mycol. 2016 September, 44(3): 201-205
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.3.201>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: hyon338@korea.kr

Received August 24, 2016
 Revised September 17, 2016
 Accepted September 24, 2016

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

랑코에 [6], 가지 [7], 큰조롱(백하수오) [8] 등의 작물에 주로 점무늬 증상 혹은 잎마름 증상을 나타내는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 고려엉겅퀴 잎에 발생한 점무늬병의 병징과 병원균의 균학적 특성, 염기서열 분석 결과 및 병원성 검정에 대한 결과를 보고하고자 한다.

병징

초기에는 고려엉겅퀴 잎에 회갈색 내지 갈색의 작은 점이 찍히며, 병이 진전되면 부정형의 진한 갈색의 병반으로 커지면서 병반 중앙부가 흰색 내지 회색으로 변하면서 움푹 파이거나 구멍이 생긴다(Fig. 1A). 반점 주변에는 황색의 달무리(halo) 증상이 나타나기도 하고, 계속해서 병이 진행되면 병반이 크게 확대되면서 합쳐지고, 결국 잎 전체가 진한 갈색 내지 흑색으로 변하며 수침상으로 물러지는 등 상품성이 전혀 없게 된다(Fig. 1B).

균학적 특성 및 염기서열 분석

병원균을 분리하기 위하여 시료의 병든 조직과 건전 조직의 경계부위를 5 × 5 mm 크기로 절단하여 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액으로 표면살균하고, 멸균수로 3회 세척한 후 물기를 제거하고 물한천 배지(water agar)에 치상하였다. 치상 3~5일 후, 자라난 균총에서 포자를 관찰하여 *Stemphylium* 균을 확인하였고, 이 중 5개 균주를 단포자 분리하여 감자한천 배지(potato dextrose agar, PDA)에 옮

겨 배양하고, 이 균주를 10°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 분리한 *Stemphylium* 균의 균학적 특성은 V8 juice agar (V8A)배지에서 25°C, near ultra-violet(NUV)/암조건(12시간/12시간)으로 배양하여 조사하였고, 배양적 특성은 PDA배지와 V8A배지에서 25°C, 암조건으로 7일간 배양하여 조사하였다.

분생포자경은 직선형으로, 단생하거나 다발로 형성되고, 여러 개의 격막이 있고, 매끄러우며, 담갈색 내지 갈색으로 원통형이며, 분생포자 형성세포(conidiogenous cells)의 정단부위는 약간 부풀어 있다. V8A 배지에서 형성된 분생포자경의 크기는 130.7~242.2 × 4.6 μm으로 조사되었다(Fig. 1E). 분생포자는 단생으로 주로 장타원형이며, 선단부분은 대체로 둥근 편이지만 간혹 뾰족한 경우도 있고, 담갈색 내지 갈색이고, 매끄러운 편이며, 횡격막은 5~7개, 종격막은 1~3개 있고, 크기는 34.5~56.1 × 15.7~23.5 μm이었다(Fig. 1D). 각각의 크기는 20개의 분생포자경과 30개의 분생포자를 대상으로 조사하였다. 균총은 25°C에서 7일간 암상태로 배양했을 때, PDA배지에서는 43~49 mm, V8A 배지에서는 41~47 mm로 성장하였다. 균총 색깔은 연황색 내지 연회색을 나타내었고, 색소는 두 개의 배지 모두에서 연황색을 나타내었다(Fig. 1F, 1G). 이전에 보고된 *Stemphylium* 종과 비교해볼 때, 포자 및 분생포자경의 크기 등 형태적 특성에 의해 *S. lycopersici*, *S. solani*, *S. xanthosomatis* 종과 비슷한 형태적 특성을 나타내었으며, 연황색 색소를 형성하는 배양적 특징으로는 *S. lycopersici* 종과 유사하였다(Table 1).

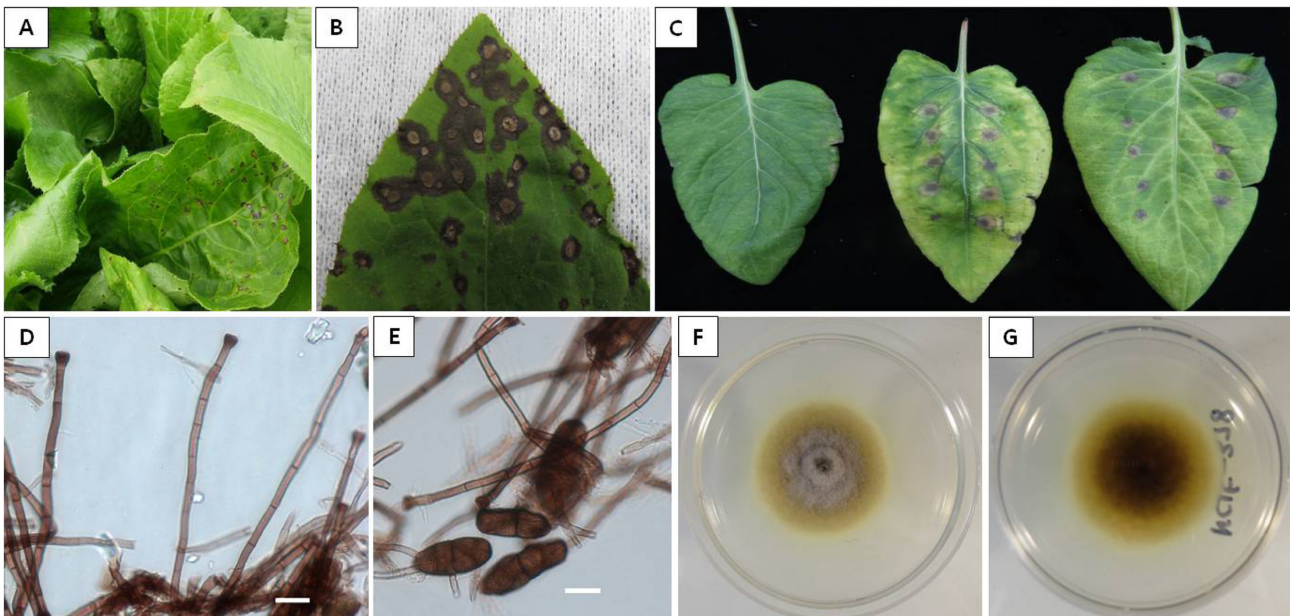


Fig. 1. Symptoms and mycological characteristics of leaf spot of *Cirsium setidens* leaves caused by *Stemphylium lycopersici*. A, Small spots on leaves at the early stage; B, Enlarged lesions at the late stage; C, Symptoms on wounded (left side of the leaf) or unwounded (right side of the leaf) gongre leaves artificially inoculated with two *S. lycopersici* isolates (middle: NC15-393 and right: NC15-378) and control (left); D, Conidiophores arising in fascicles; E, Conidia with transversal and longitudinal septa produced on V8 juice agar (V8A); F, G, Seven-day-old colonies grown on potato dextrose agar at 25°C (scale bar = 20 μm).

Table 1. Comparison of morphological characteristics between the present isolate obtained from infected leaves of *Cirsium setidens* and *Stemphylium* species described previously

Structure ^a	Characteristics ^b			
	Present isolate NC15-378	<i>Stemphylium lycopersici</i>	<i>Stemphylium solani</i>	<i>Stemphylium xanthosomatis</i>
Conidia size (µm)	34.5~56.1 × 15.7~23.5	50~74 × 16~23	35~55 × 18~28	30~57.5 × 11~17
L/W Ratio ^c	2.3:1	3:1 or more	2:1	2.9:1
No. of transverse septa	5~7	1~8	3~6	-
Conidiophore length (µm)	130.7~242.2	67~285	104~234.5	73~312

^aAll structures were investigated on V8 juice agar (V8A) plates incubated in alternating cycles of 12 hr near ultra-violet (NUV) light and 12 hr darkness at 25°C for 7 days.

^b*Stemphylium* species described by CMI description [5] and Câmara et al. [9].

^cRatio of length (L) to width (W).

Table 2. Isolates and GenBank accession numbers used in the phylogenetic analysis of *Stemphylium* species and *Alternaria alternata*

Species	Isolate	Genbank accession number ^a			
		<i>gpd</i>	<i>vma</i>	ITS	EF-1α
<i>S. lycopersici</i>	KuNBY4	AB704322*	AB828251	AB704311	AB828256
<i>S. lycopersici</i>	NAAS12164	KC160509	KC160512	JX845138	KC160506
<i>S. solani</i>	EGS 41-135	AY317018	AY329290	AY329214	AY324759
<i>S. xanthosomatis</i>	EGS 17-137	AT317010	AT329284	AT329206	AT324758
<i>S. trifolii</i>	EGS 12-142	AY317022	AY329292	AY329218	AY324744
<i>S. botryosum</i>	EGS 08-069	AY316968	AY329271	AY329168	AY324751
<i>S. herbarum</i>	EGS 36-138	AF081398	AY329272	AF442785	AY324675
<i>S. vesicarium</i>	ATCC 18521	AY278821	AB828248**	AF229484	JQ672392
<i>A. alternata</i>	EGS 34-016	AF081400	AY329324	FJ17729	AH013339

gpd, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; *vma*, vacuolar membrane ATPase catalytic subunit; ITS, internal transcribed spacer; *EF-1α*, elongation factor 1 alpha.

^aAB704322* and AB828248** indicated Genbank accession numbers of the relevant genes of *S. lycopersici* MAFF306895 and *S. vesicarium* EGS 37-067, respectively.

이와 같은 균학적 특성에 의한 종 동정의 한계로 최근에는 DNA 염기서열 분석에 의한 계통분류를 사용하고 있기 때문에 본 연구에서는 분리 균주의 정확한 동정을 위하여 다자위 염기서열 분석(multi-locus sequence analysis)을 수행하였다[8, 9]. Potato dextrose broth (PDB) 배지에서 배양한 균사를 동결 건조하여 마쇄한 후 CTAB-phenol법으로 genomic DNA를 분리하였다[10]. 염기서열 분석을 위한 유전자 부위는 ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 영역, elongation factor 1 alpha (*EF-1α*), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*), vacuolar membrane ATPase catalytic subunit A gene (*vmaA*)와 vacuolar biogenesis gene (*vpsA*) 사이의 noncoding 영역을 대상으로 하였으며, 각각 ITS1/ITS4 [11], EF1-688F/EF1-1251R [12], *gpd f/gpd r* [9], *ATPF2/GTP r* [13] 프라이머를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 증폭하였다. 증폭된 산물은 Wizard SV Gel & PCR Clean-up System kit (Promega,

San Luis Obispo, CA, USA)로 정제한 후, direct sequencing을 통해 염기서열 분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 Clustal W 소프트웨어를 이용하여 정렬하였고, nucleotide의 유사도를 계산하였으며, 4개 유전자 부위의 염기서열을 종합하여 MEGA 6.0 프로그램을 이용하여 neighbor-joining법을 통해 계통수를 작성하였다(Fig. 2). 계통수 작성을 위해 사용된 관련 균주와 유전자 정보는 Table 2에 기재하였으며, 계통분석을 위한 outgroup으로는 *Alternaria alternata*를 사용하였다. 그 결과, 고령영경귀 분리균은 *S. lycopersici*, *S. xanthosomatis*와 하나의 그룹을 이루었으며, 형태적, 배양적 특성이 유사한 *S. solani*와는 구분되는 것으로 나타났다. 국내 큰조롱에서 분리한 *S. lycopersici* 균주는 *S. xanthosomatis*와 염기서열에 차이가 많지 않아, 이들 두 종은 종내(intra-species) 변이가 하나의 같은 종으로 판단된다고 하였으며[8], 이는 본 연구 결과에서도 일치하는 것으로 나타나 두 종에 대해 면밀한 분류학적 연구가 필요할

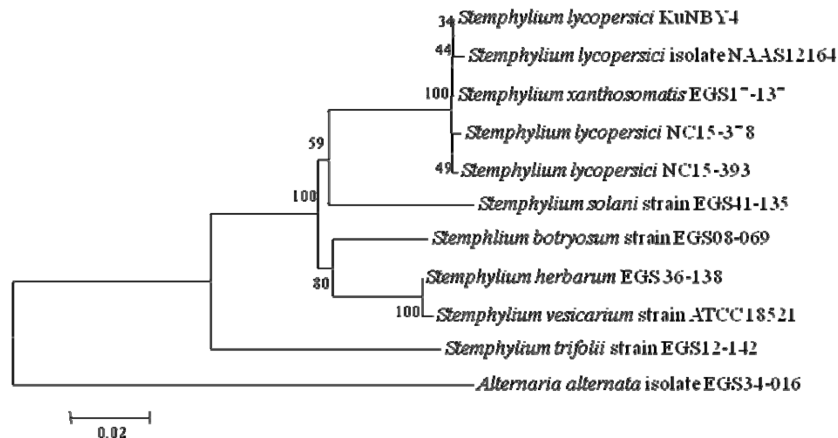


Fig. 2. Phylogenetic tree based on a combined alignment of internal transcribed spacer, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, elongation factor 1 alpha, and vacuolar membrane ATPase catalytic subunit A gene-gene involved in vacuolar biogenesis sequence data for *Stemphylium lycopersici* and related species. The tree was generated using neighbor-joining analysis, with Kimura 2-parameter model. Bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

것으로 생각된다. 여기서 분석된 NC15-378과 NC 15-393 균주의 각 유전자 부위는 NCBI GenBank에 KU59 9917~KU599924의 accession number로 등록하였다.

병원성 검정

고려영경귀 잎을 대상으로 병원성을 확인하기 위하여 건전한 고려영경귀 잎에 70% 에탄올을 뿌려 무균대에서 건조시켰다. 고려영경귀에서 분리한 NC15-378과 NC15-393 균주를 각각 V8A 배지에 10일간 배양하고, 멸균수로 포자를 회수하여 1×10^6 spores/mL의 농도로 포자현탁액을 만들었다. 멸균한 비늘로 고려영경귀 잎을 찢어 상처를 낸 잎과 상처가 없는 잎에 포자현탁액 20 μ L를 떨어뜨려 접종하였고, 대조구는 상처 및 무상처 잎에 멸균수를 처리하였다. 접종한 잎을 습실처리한 플라스틱 박스에 넣고 25°C의 배양기에 두면서 습도와 온도를 유지시켰다. 접종 3일 후부터, 상처의 유무에 관계없이 병원균을 접종한 부위에서 병반이 관찰되었고, 7일 후에는 갈색의 점무늬 병반이 1 cm 이상 진전되었으며, 대조구에서는 병징이 나타나지 않았고, 병반 부위로부터 *Stemphylium*균이 재분리됨을 확인하였다(Table 3, Fig. 1C). 큰조롱에서 분리한 *S. lycopersici* 균주를 대상으로 고추, 토마토, 담배에 대한 병원성을 조사한 결과, 고추와 토마토 잎에 병원성이 있었고 담배에는 병원성이 없는 것으로 나타났으며, 따라서 본 연구에서 분리한 균주에 대해서도 기주범위를 조사하기 위하여 다른 작물에 대한 병원성 검정을 수행할 필요가 있을 것으로 생각된다[8].

고려영경귀는 다른 영경귀류와는 달리 식용으로만 이용되는데, 특히 잎과 줄기가 그 대상이 된다. 잎에 발생하는 점무늬병과 같은 병해는 고려영경귀 재배 농가에 직접적인 피해를 주게 되므로 이 병해에 대한 발생생태와 친환경 방제법에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 3. Pathogenicity of *Stemphylium lycopersici* isolates on leaves of *Cirsium setidens* by artificial inoculation

Isolate	Pathogenicity ^a of tested isolates on gondre leaves	
	Wounded	Unwounded
NC15-378	+	++
NC15-393	++	++
Control	-	-

++, above 10 mm lesion diameter; +, 5~8 mm lesion diameter; -, no symptom.

^aPathogenicity was carried out by inoculation on detached leaves of gondre plants with 20 μ L of spore suspensions of two *Stemphylium* isolates. The rated based on the lesion diameter seven days after inoculation.

이상과 같이 고려영경귀 잎에 발생한 점무늬 증상에서 분리한 병원균은 형태적, 배양적 특성 및 DNA 염기서열 분석에 의해 *S. lycopersici*로 동정되었고, 인공 접종을 통해 고려영경귀에 병원성이 있음이 확인되었다. 따라서 본 결과를 토대로 국내 고려영경귀 잎에 발생하는 점무늬병균으로 *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamam.를 보고하고자 한다.

적 요

2015년 8월경 강원도 영월군의 고려영경귀 재배 농가에서 잎에 소형 점무늬 증상이 발생하였다. 초기에는 고려영경귀 잎에 회갈색 내지 갈색의 작은 점이 나타나며, 병이 진전되면 부정형의 진한 갈색의 병반으로 커지면서 크게 확대되고 결국 잎 전체가 진한 갈색 내지 흑색으로 변하였다. 병든 잎에서 *Stemphylium*균이 분리되었으며, 분생포자 크

기와 분생포자경의 길이 등을 고려한 균학적 특성에 의해 *Stemphylium lycopersici* 혹은 *Stemphylium solani*, *Stemphylium xanthosomatis*와 유사한 것으로 나타났다. Ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 영역, elongation factor 1 alpha (*EF-1 α*), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*), vacuolar membrane ATPase catalytic subunit A gene (*vmaA*)와 vacuolar biogenesis gene (*vpsA*) 사이의 noncoding 영역을 대상으로 한 다자위 염기서열 분석에 의해 분리균은 모두 *S. lycopersici*로 확인되었다. 고령영경귀 잎을 대상으로 상처구와 무상처구로 나누어 분리균의 포자 현탁액을 접종하여 병원성을 확인한 결과, 접종 3일 후부터 상처의 유무에 관계없이 분리균을 접종한 부위에서 병반이 관찰되었다. 따라서 본 결과를 토대로 본 병을 *S. lycopersici*에 의한 고령영경귀 점무늬병으로 명명하며, 고령영경귀 점무늬병의 발생을 국내 최초로 보고한다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (Project No. PJ01 0004) from Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Chang SY, Song JH, Kwak YS, Han MJ. Quality characteristics of Gondre tofu by the level of *Cirsium setidens* powder and storage. *J Korean Soc Food Cult* 2012;27:737-42.
2. The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.
3. Nasehi A, Kadir JB, Esfahani MN, Mahmodi F, Golkhandan E, Akter S, Ghadirian H. Cultural and physiological characteristics of *Stemphylium lycopersici* causing leaf blight disease on vegetable crops. *Arch Phytopathol Plant Prot* 2014;47:1658-65.
4. Kim BS, Yu SH, Cho HJ, Hwang HS. Gray leaf spot in peppers caused by *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*. *Plant Pathol J* 2004;20:85-91.
5. Min JY, Kim BS, Cho KY, Yu SH. Grey leaf spot caused by *Stemphylium lycopersici* on tomato plants. *Korean J Plant Pathol* 1995;11:282-4.
6. Kwon JH, Jeong BR, Yun JG, Lee SW. Leaf Spot of Kalanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana*) caused by *Stemphylium lycopersici*. *Res Plant Dis* 2007;13:122-5.
7. Yu SH, Cho HS. Korean species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Suwon: National Institute of Agricultural Science and Technology; 2001.
8. Hong SK, Choi HW, Lee YK, Shim HS, Lee SY. Leaf spot and stem rot on Wilford Swallowwort caused by *Stemphylium lycopersici* in Korea. *Mycobiology* 2012;40:268-71.
9. Câmara MP, O'Neill NR, Van Berkum P. Phylogeny of *Stemphylium* spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 2002;94:660-72.
10. Choi HW, Kim JM, Hong SK, Kim WG, Chun SC, Yu SH. Mating types and optimum culture conditions for sexual state formation of *Fusarium fujikuroi* isolates. *Mycobiology* 2009; 37:247-50.
11. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
12. Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJ. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers* 2008;28:1-13.
13. Inderbitzin P, Harkness J, Turgeon BG, Berbee ML. Lateral transfer of mating system in *Stemphylium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:11390-5.