

*Epicoccum sorghinum*에 의한 국화 점무늬병 발생

First Report of Leaf Spot Disease on White Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) Caused by *Epicoccum sorghinum* in Korea

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-6312

Fax: +82-63-238-6305

E-mail: kala74@korea.kr

ORCID

<https://orcid.org/0009-0005-8229-2223>

<https://orcid.org/0000-0002-6043-2775>

<https://orcid.org/0000-0002-9734-8702>

<https://orcid.org/0009-0001-1479-3959>

<https://orcid.org/0000-0003-3035-7775>

[†]These authors contributed equally to this work.

김시은^{1†} · 신종환^{2†} · 이하경¹ · 이성찬¹ · 한유경^{1*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구소

Sieun Kim^{1†}, Jong-Hwan Shin^{2†}, Ha-Kyoung Lee¹, Seong-Chan Lee¹, and You-Young Han^{1*}

¹Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

²Research Institute of Climate Change and Agriculture, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Jeju 63240, Korea

Received July 21, 2024

Revised September 9, 2024

Accepted September 9, 2024

In September 2023, a leaf spot disease occurred on chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) in Insil-gun Agricultural Technology Center, Korea. A fungal species was isolated from the diseased plant and identified as an ascomycete *Epicoccum sorghinum* based on morphological characteristics and phylogenetic analyses using the sequences of the ITS, *TUB2*, and *ACT* genes. A pathogenicity test revealed that the isolate was the causal agent of leaf spot disease on chrysanthemum. This is the first report of leaf spot disease caused by *E. sorghinum* on chrysanthemum in Korea.

Keywords: Chrysanthemum, *Epicoccum sorghinum*, Identification, Leaf spot

국화(*Chrysanthemum morifolium* Ramat)는 초롱꽃목 국화과의 쌍떡잎 여러해살이 식물로 사용 목적에 따라 관상용, 식용, 약용 등 다양하게 이용되고 있다(Ham 등, 2014). 국화는 일본과 중국 등 동아시아 지역을 중심으로 대규모로 재배되고 있는데, 중국과 일본이 각각 8,475 ha (2013), 5,230 ha (2009)로 전 세계에서 재배면적이 가장 넓다(Eisa 등, 2022). 한국은 2021년 기준 747 ha의 재배면적으로 2000년 이후 730 ha에서 800 ha 수준을 유지하고 있으며, 경남 지역에서 가장 많이 생산되고 있다(Suh 등, 2010).

국화에는 곰팡이, 세균, 바이러스, 해충 등 다양한 병해충이 발생하여 생산량 및 품질을 감소시키고 있는데, 재배 기간 중에 발생하는 곰팡이병으로 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 흰가루병(*Erysiphe cichoracearum*), 흰녹병(*Puccinia horiana*), 반쪽시들음병(*Verticillium dahliae*), 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*), 점무늬병(*Epicoccum sorghinum*) 등이 보고되고 있다(Back 등, 2019; Chen 등, 2021; De Backer 등, 2011; Mekapogu 등, 2021).

국화에서 *E. sorghinum*에 의한 점무늬병은 중국에서 2021년 처음 보고되었는데, 33 ha의 국화 재배면적에서 약 65%의 국화가 감염된 것으로 보고되었다(Chen 등, 2021). 고온다습한 환경에서 병 발생이 심하며, 식물체 전체 잎 수의 30-80%까지 감염된 것으로 확인되었다. 국내에서는 이전까지 *E. sorghinum*에 의한 국화 점무늬병에 대한 보고가 없었는데, 2023년 9월

Research in Plant Disease

eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

© The Korean Society of Plant Pathology

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

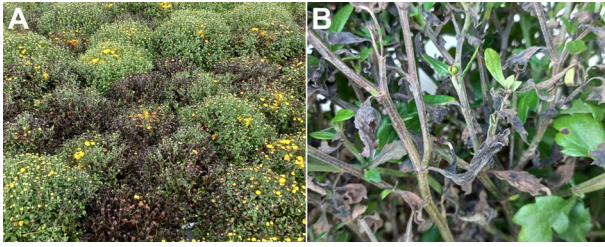


Fig. 1. (A, B) Symptoms of leaf spot disease caused by *Epicoccum sorghinum* on leaves of *Chrysanthemum morifolium*.

임실군농업기술센터에서 전시용으로 재배 중인 국화에서 *E. sorghinum*에 의한 점무늬병과 유사한 증상이 나타났다. 전체 약 20,000포트의 Tribeca 품종 국화에서 약 80% 정도가 이러한 증상이 나타나 피해를 주고 있었는데, 주로 잎 끝에서 갈색에서 검정색의 점무늬가 형성되고 시간이 지날수록 병반이 확대되는 증상이 관찰되었다(Fig. 1).

국화 점무늬병 증상의 원인균을 밝혀내기 위하여 우선 점무늬병 증상을 나타내는 국화 잎을 3 mm 정도 크기로 잘라 70% 에탄올과 1% 차아염소산나트륨을 이용하여 소독하고 멸균수로 3회 세척하였다. 이후 소독한 잎을 potato dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 치상하여 25°C에서 5일간 배양하였고, 자라나는 균사 끝을 떼어내어 새로운 PDA 배지에 옮겨 점무늬병균을 순수 분리하였다. 분리된 병원균은 internal transcribed spacer (ITS) region, beta tubulin (*TUB2*), actin (*ACT*) 유전자 지역의 염기서열 분석을 통해 동정하였다. 병원균의 genomic DNA는 HiGene Genomic DNA Prep Kit (BIOFACT, Daejeon, Korea)를 사용하여 추출하였으며, ITS, *TUB2*, *ACT* 유전자 지역은 각각 ITS5/4, Bt2a/Bt2b, ACT-512F/ACT-783R primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR) 증폭하였다 (Table 1) (Carbone과 Kohn, 1999; Glass와 Donaldson, 1995; White 등, 1990). 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동 후 밴드를 확인하였고, 염기서열 분석 서비스(BIOFACT)를 이용하여 각 유전자 지역의 염기서열을 해독하였다. 이후 확

인된 염기서열과 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Genbank database에 있는 근연종과의 유사도를 바탕으로 계통수를 작성하여 계통학적 유연관계를 분석하였다 (Table 2). 계통수는 수집한 3개 유전자 지역의 염기서열을 MEGA 6 프로그램을 사용하여 융합 및 정렬하고, maximum-likelihood 방법(1,000 bootstrap)을 사용하여 작성하였다 (Tamura 등, 2013; Thompson 등, 1997). 검출된 PCR 산물의 염기서열 분석 및 NCBI BLAST search한 결과 분리된 균주 23-279는 *E. sorghinum*과의 유사도가 ITS (450 bp)와 *TUB2* (255 bp) 유전자 지역은 100%, *ACT* (192 bp) 유전자 지역은 98%였으며, 계통수를 그려서 확인한 결과 분리된 *E. sorghinum*과 가장 가까운 유연관계에 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Epicoccum sorghinum 23-279의 배양적 특성은 PDA, V8 juice agar (V8A; 80 ml V8 juice [Campbell Soup Company, Camden, NJ, USA], 310 µl 10 M NaOH, 15 g agar per L), oatmeal agar (OMA) (Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 접종하여 광 조건으로 3일간 배양하여 조사하였다. PDA, V8A, OMA 배지에서 배양하였을 때 *E. sorghinum* 23-279는 각각 직경 36-39 mm, 39-42 mm, 37-39 mm로 성장하였다. 균총의 색깔은 PDA 배지에서는 연황색을 나타내었고, V8A 배지와 OMA 배지에서는 연회색을 나타내었다(Fig. 3A-C). 균학적 특성은 Ma 등(2021)에 기술된 내용을 참고하여 PDA 배지에서 3일간 암 조건에서 배양한 뒤 12시간 동안 ultra-violet (UV) 광을 조사하고 다시 암실에서 배양하여 조사하였다. UV 광을 조사하고 암실에서 2일간 배양하였을 때, 균사체 위에 병자각(pycnidia)이 형성되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3D). 분생포자는 무색에 투명(hyaline)하였고, 격벽이 없는(aseptate) 타원형(ellipsoidal)의 단세포(unicellular)로 크기는 3.2-6.0×1.7-3.0 µm ($n=100$)였다(Fig. 3E). 후막포자(chlamydospore)는 구형(globose) 혹은 불규칙한 모양의 단세포(unicellular) 또는 사슬(chain) 형태로 연결된 다세포(multicellular) 형태로 확인되었다(Fig. 3F). 이러한 병원균의 형태학적 특성은 이전에 기술된 *E. sorghinum*의 형태학적 특성

Table 1. Primers used in this study

| Primer | Primer sequences (5'-3') | Target | Reference |
|----------|--------------------------|-------------|----------------------------|
| ITS5 | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG | ITS | White et al. (1990) |
| ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC | | |
| Bt2a | GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC | <i>TUB2</i> | Glass and Donaldson (1995) |
| Bt2b | ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC | | |
| ACT-512F | ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC | <i>ACT</i> | Carbone and Kohn (1999) |
| ACT-783R | TACGAGTCCTTCTGGCCAT | | |

ITS, internal transcribed spacer; *TUB2*, beta tubulin; *ACT*, actin.

Table 2. Genbank accession numbers of fungal strains used in phylogenetic analyses

| Species | Strain | GenBank accession no. | | |
|------------------------------|----------------|-----------------------|------------|----------|
| | | ITS | TUB | ACT |
| <i>Epicoccum tritici</i> | MFLUCC 16-0276 | KX926426 | KY197979 | - |
| <i>Epicoccum mackenziei</i> | MFLUCC 16-0335 | KX698039 | KX698032 | - |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | CBS 125.82 | FJ426995 | FJ427106 | FJ426888 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | CBS 173.73 | MH860655 | FJ427107 | FJ426889 |
| <i>Epicoccum pimprinum</i> | CBS 246.60 | MH857973 | MH643937 | FJ426939 |
| <i>Epicoccum pimprinum</i> | PD 77/1028 | FJ427050 | FJ427160 | FJ426940 |
| <i>Epicoccum sorghinum</i> | CBS 627.68 | FJ427072 | FJ427178 | FJ426958 |
| <i>Epicoccum sorghinum</i> | 23-279 | OR936235 | OR939944 | OR939943 |
| <i>Epicoccum brasiliense</i> | CBS 120105 | GU237760.1 | GU237588.1 | - |
| <i>Epicoccum plurivorum</i> | CBS 558.81 | MH861377.1 | GU237647.1 | - |
| <i>Epicoccum henningsii</i> | CBS 104.80 | GU237731.1 | GU237612.1 | - |

ITS, internal transcribed spacer; TUB2, beta tubulin; ACT, actin.

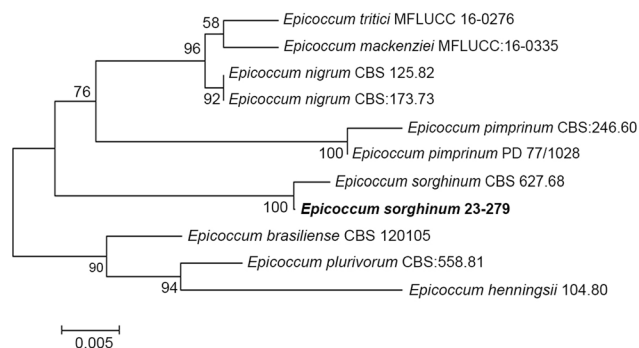


Fig. 2. Maximum-likelihood tree based on combined ITS, TUB2, and ACT sequences of *Epicoccum sorghinum* 23-279 and related species. Numbers at nodes are bootstrap values for 1,000 replicates. The scale bar represents 0.005 nucleotide substitutions per site. ITS, internal transcribed spacer; TUB2, beta tubulin; ACT, actin.

과 일치하였다(Ma 등, 2021; Yu 등, 2023; Zhou 등, 2018).

기내에서 병원성을 검정하기 위하여 *E. sorghinum* 23-279를 PDA 배지에 접종 후 25°C에서 5일간 배양하였고, 균사의 agar plug를 잘라내어 국화 잎에 접종하였다. 이후 국화 잎을 밀폐 용기에 담아 습식처리하고 실온에서 4일 후 발병 여부를 확인 하였다. 실험 결과 병원균을 접종한 국화 잎에서 담갈색에서 검은색으로 불규칙한 모양의 병반이 형성되었으며, 병든 부위에서 동일한 병원균이 재분리 되었다(Fig. 4A). PDA agar plug를 접종한 대조구에서는 아무런 병반이 형성되지 않았으며, 병원 균도 분리되지 않았다(Fig. 4B).

Epicoccum sorghinum (former *Phoma sorghina*)은 자낭균류

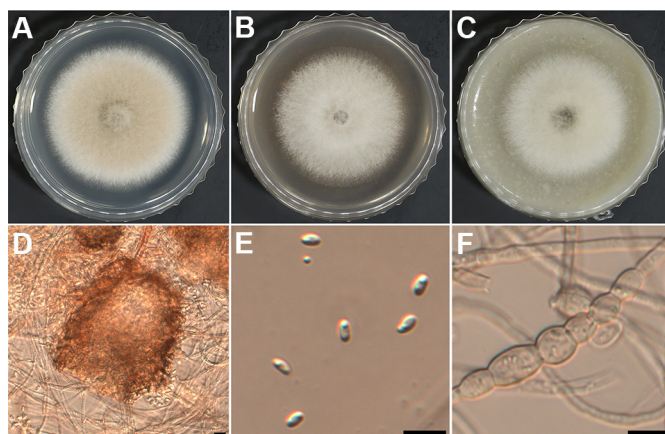


Fig. 3. Characteristics of *Epicoccum sorghinum* 23-279 causing leaf spot disease on leaves of *Chrysanthemum morifolium*. The isolate was grown on PDA (A), V8A (B), and OMA (C) at 25°C under continuous light. The photographs were taken at 3 days after inoculation. For sporulation, a 3-day-old PDA culture was exposed to UV light for 12 hr and grown in the dark for 1-2 days. (D) Pycnidia, (E) conidia, and (F) chlamydospore. Scale bars=10µm. PDA, potato dextrose agar; V8A, V8 juice agar; OMA, oatmeal agar; UV, ultra-violet.

(Ascomycetes)에 속하는 식물병원성 진균으로 수수에서 점무늬병(leaf spot)과 sorghum grain mold disease를 일으켜 생산량을 감소시키는 병원균으로 잘 알려져 있으며, 담배, 국화, 생강, 토란, 배추, 국화 등 다양한 식물에 감염하여 점무늬병을 일으키고 있다(Chen 등, 2021; de Oliveira 등, 2018; Yu 등, 2023). 국내에서는 아직까지 *E. sorghinum*에 의한 국화 점무늬병에 대해 보고된 적이 없다(Choi 등, 2024). 본 연구에서는 병든 식물

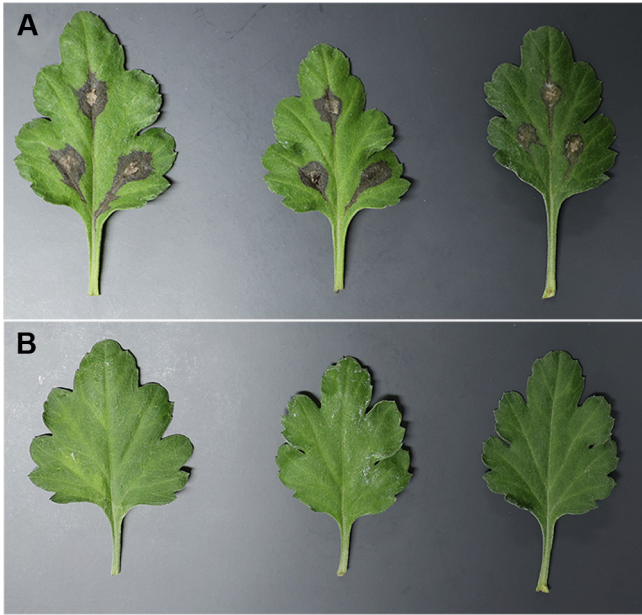


Fig. 4. Pathogenicity test of *Epicoccum sorghinum* 23-279 on leaves of *Chrysanthemum morifolium*. (A) Mycelial agar plugs of the isolate was inoculated on leaves of *Chrysanthemum morifolium* and incubated in a moistened plastic box. (B) Control. Photographs were taken 4 days after inoculation.

체로부터 병원균을 순수 분리하여 형태적 특성 및 유전자 염기서열 분석을 통하여 균주를 동정하였으며, 국화 잎에서의 병원성 검정을 통해 국화 점무늬병의 원인균 *E. sorghinum*을 최종 확인하였다. 따라서 *E. sorghinum*에 의한 국화 점무늬병의 발생을 국내 처음으로 보고하고자 한다.

요 약

임실군농업기술센터에서 전시용으로 재배 중인 국화 잎에 갈색에서 검은색의 반점이 형성되고, 시간이 지날수록 병반이 확대되며 심하면 식물체가 고사하는 증상이 나타났다. 국화의 병든 잎 부위에서 병원균을 분리하여 ITS, *TUB2*, *ACT* 유전자 염기서열 분석을 통해 동정한 결과 *Epicoccum sorghinum*으로 확인되었다. 분리된 균의 균학적 특성을 확인해 본 결과, PDA 배지에서 배양한 균을 UV 광에 12시간 동안 노출 후 암실에 두었을 때 병자각이 형성되었으며, 격벽이 없는 타원형의 무색 투명한 분생포자($3.2\text{--}6.0 \times 1.7\text{--}3.0 \mu\text{m}$)가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. PDA 배지에서 배양한 균주의 agar plug를 국화 잎에 접종하여 병원성을 검정한 결과, 접종한 국화 잎에서 담갈색에서 검은색의 불규칙한 모양의 병반이 형성되었다. 따라서 *E. sorghinum*에 의한 국화 점무늬병을 국내 처음으로 보고하고자 한다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of the Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ01509501), and supported by (2023) the RDA Fellowship Program of the National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Back, C.-G., Park, M.-J., Han, K.-S. and Park, J.-H. 2019. Development of a loop-mediated isothermal amplification detection assay for *Verticillium dahliae* infection in Chrysanthemum. *Kor. J. Mycol.* 47: 437-441. (In Korean)
- Carbone, I. and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Chen, Q. H., Li, J. X., Qi, Y., Liu, D. H. and Miao, Y. H. 2021. First report of leaf spot on white chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) caused by *Epicoccum sorghinum* in Hubei Province, China. *Plant Dis.* 105: 1212.
- Choi, J., Kim, S.-H., Choi, Y.-J., Kim, G.-H., Yoon, J.-Y., Park, B.-Y. et al. 2024. Yearly update of the list of plant diseases in Korea (6.2 edition, 2024). *Res. Plant Dis.* 30: 103-113. (In Korean)
- De Backer, M., Alaei, H., Van Bockstaele, E., Roldan-Ruiz, I., van der Lee, T., Maes, M. et al. 2011. Identification and characterization of pathotypes in *Puccinia horiana*, a rust pathogen of *Chrysanthemum x morifolium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 130: 325-338.
- de Oliveira, R. C., Carnielli-Queiroz, L. and Correa, B. 2018. *Epicoccum sorghinum* in food: occurrence, genetic aspects and tenuazonic acid production. *Curr. Opin. Food Sci.* 23: 44-48.
- Eisa, E. A., Tilly-Mándy, A., Honfi, P., Shala, A. Y. and Gururani, M. A. 2022. Chrysanthemum: a comprehensive review on recent developments on *in vitro* regeneration. *Biology* 11: 1774.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1323-1330.
- Ham, E. H., Park, J. K., Choi, Y. S., Lee, J. S. and Choi, Y. C. 2014. Biological control of *Frankliniella occidentalis* Pergande by *Orius laevigatus* (Fieber) and new banker plants on chrysanthemum greenhouse. *J. Seric. Entomol. Sci.* 52: 33-38. (In Korean)

- Ma, Y. M., Zhou, J. L., Hu, Z., Zhong, J. and Zhu, J. Z. 2021. First report of *Epicoccum sorghinum* causing leaf spot on *Hemerocallis citrina* in China. *Plant Dis.* 105: 2251.
- Mekapogu, M., Jung, J. A., Kwon, O. K., Ahn, M. S., Song, H. Y. and Jang, S. 2021. Recent progress in enhancing fungal disease resistance in ornamental plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 7956.
- Suh, W. M., Leem, J. W., Kim, Y. J., Min, Y. B., Kim, H. T., Huh, M. R. et al. 2010. Heating effect by electric radiator in greenhouse of chrysanthemum cultivation. *J. Agri. Life Science* 44: 79-85.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press., San Diego, CA, USA. 315-322 pp.
- Yu, X., Li, Z., Han, R., Zhang, W., Zhang, J., Cao, W. et al. 2023. *Epicoccum sorghinum* as leaf spot disease-causing pathogen in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) in China. *Crop Prot.* 170: 106263.
- Zhou, H., Liu, P. P., Qiu, S., Wei, S. J., Xia, K. and Gao, Q. 2018. Identity of *Epicoccum sorghinum* causing leaf spot disease of *Bletilla striata* in China. *Plant Dis.* 102:1039.