RESEARCH NOTE

*Fusarium oxysporum*에 의한 황칠나무 묘목 뿌리썩음병 발생 보고

마혜린[1,2], 최선규[3], 상현규[3,*], 김현준[1,*]
[1]전남대학교 농업생명과학대학 산림자원학과, [2]전라남도산림자원연구소, [3]전남대학교 융합식품바이오공학과

First Report of Root Rot of *Dendropanax trifidus* Caused by *Fusarium oxysporum* in Korea

Hyerin Ma[1,2], Sungyu Choi[3], Hyunkyu Sang[3,*], and Hyun-Jun Kim[1,*]
[1]Department of Forest Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
[2]Jeollanamdo Forest Resources Research Institute, Naju 58213, Korea
[3]Department of Integrative Food Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

[*]Corresponding authors: hksang@jnu.ac.kr, hjkim0837@jnu.ac.kr

ABSTRACT

Dendropanax trifidus belonging to the family Araliaceae, is a warm-temperate evergreen tree distributed in Jeju Island, Bogil Island, Geomun Island, Geoje Island, Wando, and Haenam in Korea. In June 2021, a root rot disease in which branches of *Dendropanax trifidus* seedlings turned brown and shrunk was discovered at the seedling cultivation facility in Naju-si, Republic of Korea. To identify the root rot fungus, three strains were isolated from the diseased tissues of seedlings and their mycological characteristics were investigated on potato dextrose agar. In addition, a molecular phylogenetic analysis was performed using sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region and translation elongation factor 1-α (*EF1-α*) gene. The fungus was identified as *Fusarium oxysporum*. For pathogenicity test, the roots of seedlings were immersed in the conidia suspension of the strains and planted. After 20 days inoculation, root rot and browning symptoms were confirmed in the inoculated plants. This is the first report of *F. oxysporum* on *D. trifidus* in Korea.

Keywords: *Dendropanax trifidus*, *Fusarium oxysporum*, Fusarium root rot, Korean dendropanax

Check for updates

OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2023 March, 51(1): 51-56
https://doi.org/10.4489/KJM.20230005

Received: December 06, 2022
Revised: March 26, 2023
Accepted: March 28, 2023

© 2023 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.

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.

황칠나무(*Dendropanax trifidus*)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 난대성 상록활엽수로 한국 특산식물이며, 우리나라 온대남부와 난대지역인 제주도, 보길도, 거문도, 거제도, 완도, 해남 등 남서해안과 일부 도서지역에 분포한다[1]. 황칠나무는 잎에 광택이 있고 단아한 수형 때문에 관상수로의 이용이 증가되고 있으며, 황칠나무의 잎 추출물은 면역활성, 줄기 추출물은 높은 고혈압 억제 효과가 보고되어 있고[2,3], 황칠나무 잎·가지·수액 추출물은 항균 작용이 있다고 알려져 있다[4].

국내 황칠나무에서 잎에 발생하는 병으로는 *Alternaria panax, A. dendropanacis*에 의한 2종의 진균병이 보고되어 있다[5,6]. 식물의 뿌리썩음에 관여하는 모잘록병을 일으키는 병원균으로는 *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp. 등이 있으나[7,8], 황칠나무의 뿌리썩음에 관여하는 병은 보고된 바 없다. 나무 묘목에서 뿌리썩음을 일으키는 병으로는 국내에서 낙엽송 묘목에 *Fusarium oxysporum*에 의한 모잘록 증상이 보고되어 있고[9], 국외에서는 Douglas-Fir (미송) 묘목에 *F. oxysporum*에 의한 모잘록 증상이 보고된 바 있다[10]. 이에 따라 본 연구에서는 병든 황칠나무 유묘 뿌리에서 병원균을 분리하여 동정하고, 건전한 황칠나무 유묘에 인공접공하여 병원성을 확인하였다.

병징

2021년 6월 전라남도 나주의 양묘장에서 파종하여 재배 중인 황칠나무 1년생 유묘의 30% 정도에서 발아율의 감소 및 유묘가 시들어 죽는 모잘록병과 유사한 피해가 발생하였다. 식물체의 지제부가 갈변하고 잘록해지는 증상이 관찰되었으며 뿌리도 갈변하여 생육이 저해되었다(Fig. 1A). 감염된 식물체 대부분은 서있지 못하고 쓰러졌으며, 식물체를 뽑아 보면 뿌리 끝부분이 썩어 있거나 잔뿌리가 거의 없고, 잎이 시들고 갈변하는 증상이 나타나기도 하였다(Fig. 1B).

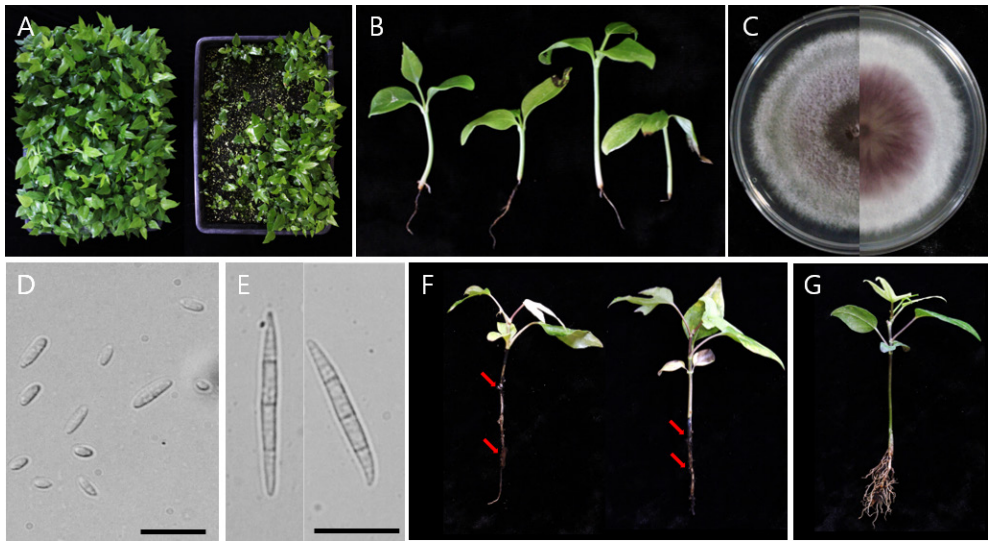

Fig. 1. Symptoms and mycological characteristics of Fusarium root rot on seedling of *Dendropanax trifidus* caused by *Fusarium oxysporum*. (A) *Dendropanax trifidus* seedlings exhibiting low germination rate and root rot symptoms (right). (B) Brown necrosis appearing on stems and roots. (C) Top and bottom view of *F. oxysporum* cultured on potato dextrose agar after 7 days. (D) Microconidia. (E) Macroconidia. Scale bars=20 μm. (F) Symptoms on stems and roots artificially inoculated with *F. oxysporum*. (G) Untreated control.

균학적 특성 및 염기서열 분석

병원균 분리를 위하여 이병묘목 15본의 뿌리와 줄기를 0.5-1 cm 길이로 잘라 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액으로 1분간 표면 살균하고, 멸균증류수로 3회 세척하여 무균작업대에서 건조하였다. 건조된 조직들은 감자한천 배지(potato dextrose agar, PDA)에 치상하고, 인큐베이터에서 25℃, 암실 환경에 5일간 배양되었다. 흰색 내지 연한 보라색을 띠는 *Fusarium* 균총이 뿌리 및 줄기 조직 주변으로 성장하였으며, 균총의 끝 부분을 떼어 새로운 PDA에 옮겨 총 9개의 균주를 획득하고, 각기 다른 이병묘목에서 3개 대표 균주를 선발하였다(CMML21-54, CMML21-55, CMML21-56). 모두 PDA에서 7일간 생장하여, 균총의 앞면은 연한 보라색 솜 같은(cottony) 형태를, 그리고 뒷면은 어두운 보라색을 띠었다(Fig. 1C). 분생포자 형성을 유도하기 위해 PDA에서 7일간 생장한 균총의 절편을 Mung bean broth 30 mL과 함께 50 mL conical tube에 넣고 25℃에서 150 rpm으로 4일간 배양하였다. 분생포자의 크기와 모양을 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰한 결과 소형분생포자(microconidia)는 신장(kidney) 모양으로 크기는 6.67±0.40×2.87±0.16 μm이며 격막이 없었다(Fig. 1D). 대형분생포자(macroconidia)는 낫(sickle) 모양으로 크기는 43.03±2.89×3.57±0.22 μm이며 주로 3개의 격막을 가졌다(Fig. 1E). 균학적 특성조사 결과, 세 균주의 배양적, 형태적 특성은 *Fusarium oxysporum*과 일치하였다[11].

분리된 균주의 분자생물학적 동정을 위해 PDA에서 7일간 생장한 균사를 각각 0.5 g 채취하여 CTAB DNA 추출법으로 genomic DNA를 추출하였다[12]. 추출된 DNA 시료를 주형으로 하여 internal transcribed spacer (ITS) 영역과 translation elongation factor (EF) gene을 증폭하기 위해, 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')/ITS4 (5'-TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')와 EF-1 (5'-ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC-3')/EF-2 (5'-GGA RGT ACC AGT SAT CAT G-3') 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다[13]. PCR은 GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Massachusetts, USA)을 사용하였으며, Takara Ex *Taq*® DNA polymerase를 활용한 PCR 조건은 pre-denaturation (95℃, 2분) 후, denaturation (95℃, 30초), annealing (ITS 50℃ 또는 *EF1-α* 52℃, 30초), extension (72℃, 1분)을 1 cycle로 하여 35회 반복 진행하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 ExoSAP-IT Kit (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) 처리한 후, 마크로젠(Macrogen, Daejeon, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 PHYDIT 프로그램을 이용하여 정렬하였고[14], GenBank에 등록된 염기서열과 비교한 결과 *Fusarium oxysporum* NRRL 43542 (ITS>99%, *EF1-α*>97%) 와 높은 상동성을 확인하였다. MEGA X 프로그램으로 Maximum Likelihood 계통수를 작성하였고[15], 3개 균주 모두 *F. oxysporum* 참고균주(NRRL 43542, NRRL 43466, CBS: 255.52)와 높은 bootstrap value (96%)로 군집을 이루었으며, 외집단(outgroup)은 *F. biseptatum*을 대상으로 하였다(Fig. 2). 계통분류학적 분석에 의해서 황칠나무에서 분리된 3균주는 *F. oxysporum*으로 동정되었다. 분석된 CMML21-54, CMML21-55, CMML21-56 균주의 ITS 염기서열과 *EF1-α* 염기서열은 NCBI GenBank에 accession number OP623453, OP623454, OP623455, OP651776, OP651777, OP651778로 등록하였다.

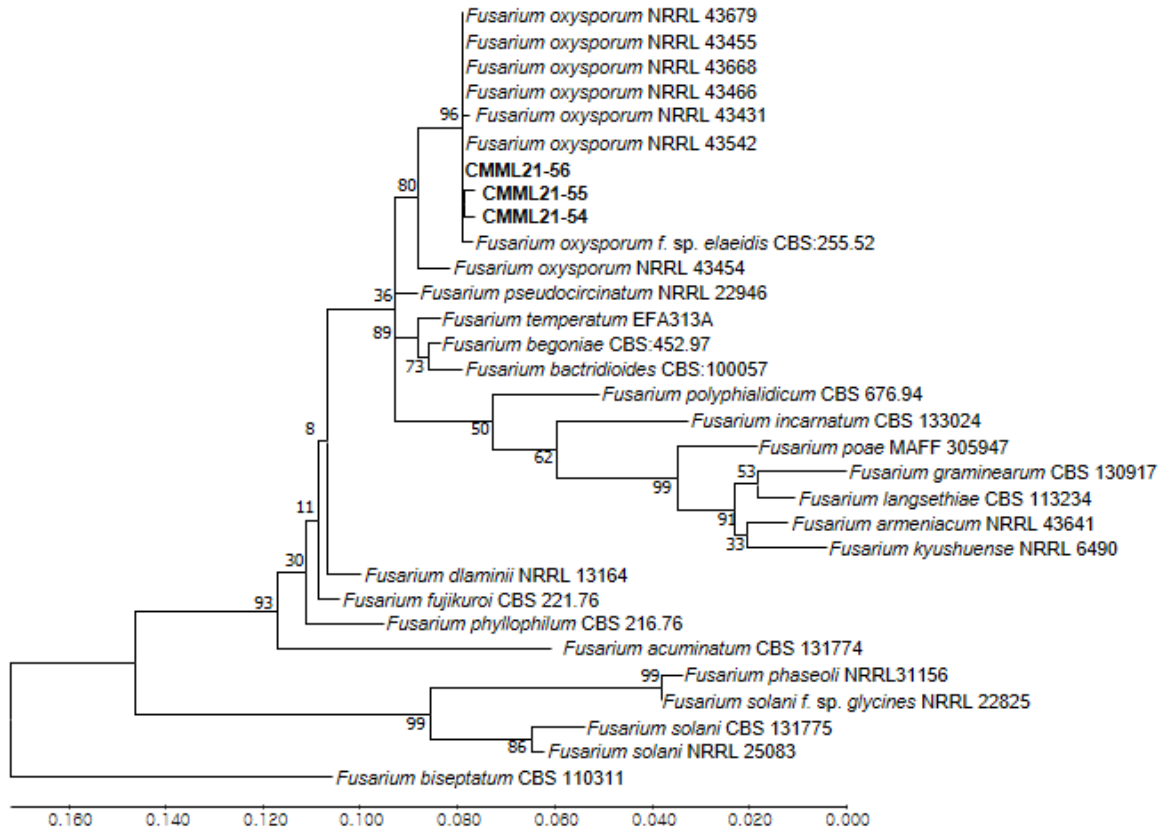

Fig. 2. Phylogenetic tree of *Fusarium* oxysporum strains isolated from stems and roots of *Dendropanax trifidus* and their related reference strains based on combined sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region and translation elongation factor 1-α (*EF1-α*) gene. The tree was generated using Maximum Likelihood analysis. The number in each branch indicates bootstrap values obtained after a bootstrap test with 1,000 replications. Bold type font indicates fungal strains in this study.

병원성 검정

황칠나무에 대한 병원성 확인을 위해 1년생 황칠나무 유묘에서 분리한 두 균주(CMML21-54, CMML21-55)의 분생포자 현탁액을 각각 준비하였다. 상처를 통한 병원균의 침입을 유도하기 위해 뿌리 말단을 0.3-0.5 cm 절단하여 1×10^7 spores/mL 농도의 분생포자 현탁액을 1시간 침지 처리한 후 10 cm 지름의 포트에 1주씩 정식하였다. 균주당 3반복 처리하였으며, 대조구에는 멸균 증류수를 1시간 침지 처리하였다. 식물체는 플라스틱 컨테이너에 넣고 95±3%의 높은 습도를 유지하면서 25±2℃로 식물 배양실에서 20일간 유지되었다. 관찰 결과, CMML21-54와 CMML21-55 접종구에서 지제부와 줄기의 갈변 및 잘록한 현상을 확인하였다. 또한, 접종구에서 뿌리 조직이 고사하여 흑갈색의 병징과 함께 잔뿌리가 제거되는 현상을 확인하였다(Fig. 1F). 대조구에서는 상처부위의 뿌리조직이 정상적으로 회복되었으며, 지제부 및 지상부의 병징은 나타나지 않았다(Fig. 1G). 접종구 줄기의 병반을 떼어, 현미경으로 관찰하였을 때 2종류의 병원균 모두 *F. oxysporum*의 분생포자가 형성된 것을 확인하였다.

황칠나무는 수형이 아름답고, 약리 효과가 우수하여 국내 양묘 재배가 늘어나고 있으나, 재배 중 발생하는 병해에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 따라서 황칠나무에 피해를 주고 있는 병해에 대한 발생조사와 체계적인 관리방법에 관한 연구가 필요한 실정이다.

이상과 같이 황칠나무 뿌리썩음 증상에서 분리한 병원균은 형태적, 배양적 특성 및 DNA 염기서열 분석에 의해 *F. oxysporum*으로 동정되었고, 인위적 접종을 통해 황칠나무에 병원성이 있음이 확인되었다. 따라서 본 결과를 바탕으로 국내 황칠나무에 발생하는 뿌리썩음병균으로 *F. oxysporum*을 처음으로 보고하고자 한다.

적요

황칠나무는 두릅나무과에 속하는 난대성 상록활엽수로 우리나라 제주도, 보길도, 거문도, 거제도, 완도, 해남 등에 분포한다. 2021년 6월 전라남도 나주에서 황칠나무 유묘의 지제부가 갈변하고 잘록해지는 뿌리썩음병을 국내 최초로 발견하였다. 황칠나무 뿌리썩음병균을 분리 및 동정하기 위해, 유묘의 병든 조직에서 3개의 균주를 분리하였고, PDA 배지에서 형태적, 균학적 특성 조사한 결과 *Fusarium oxysporum*으로 동정되었다. Internal transcribed spacer (ITS) 및 translation elongation factor 1-α (*EF1-α*) 염기서열을 통한 분자계통학적 분석을 수행하여 한국의 황칠나무 뿌리썩음병균은 *F. oxysporum*임을 확인하였다. 병원성 테스트를 위해 유묘의 뿌리를 분생포자 현탁액에 침지하여 정식하였고, 접종 20일 후 처리구에서 뿌리썩음 및 지제부의 갈변 증상을 확인하였다. 본 연구는 한국의 황칠나무 유묘에서 뿌리썩음병균 *F. oxysporum*의 첫 보고이다.

CONFLICT OF INTERESTS

No conflict of interest was reported by the authors.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Korea Forest Service (Grant No. 2020183C10-2022-AA02 and Grant No. 2022464B10-2224-0201) and the Rural Development and Administration, Republic of Korea (PJ01690602).

REFERENCES

1. Lee TB. Coloured Flora of Korea (1, 2). Seoul: Hayangmunsa; 2003.
2. Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. Korean J Medicinal Crop Sci 2002;10:109-15.
3. Jo YB, Lee JH. A study on the effect of the *Dendropanax mobifera* extract on anti-hypertensive. JKAIS 2016;17:708-15.
4. Lee JY, Park TH, Park SH, Yang SA, Jhee KH. The antimicrobial activity of fermented extracts from Korean *Dendropanax morbifera*. J Life Sci 2019;29:29-36.

5. Deng JX, Kim CS, Oh ES, Yu SH. First report of foliar blight on *Dendropanax morbifera* caused by *Alternaria panax*. Mycobiology 2010;38:316-20.
6. Deng JX, Li MJ, Paul NC, Lee JH, Cho HS, Lee HB, Yu SH. *Alternaria* species associated with araliaceous plants in Korea. Mycol Prog 2015;14:31.
7. Mao W, Lewis JA, Hebbar PK, Lumsden RD. Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. Plant Dis 1997;81:450-54.
8. Stephens CT, Herr LJ, Schmitthenner AF, Powell CC. Characterization of *Rhizoctonia* isolates associated with damping-off of bedding plants. Plant Dis 1982;66:700-3.
9. Hassan O, Lim TH, Chang T. Damping-off of larch (*Larix kaempferi*) caused by *Fusarium oxysporum* in Korea. Plant Dis 2019;103:1038.
10. Bloomberg WJ. Diseases of Douglas-fir seedlings caused by *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 1971;61:467-70.
11. Lombard L, Denis MS, Lamprecht SC, Crous PW. Epitypification of *Fusarium oxysporum*–clearing the taxonomic chaos. Persoonia 2019;43:1-47.
12. Cubero OF, Crespo A, Fatehi J, Bridge PD. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbariumstored, lichenized, and other fungi. Plant Syst Evol 1999;216:243-9.
13. O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:2044-9.
14. Chun J. Computer-assisted classification and identification of actinomycetes [dissertation]. Newcastle Upon Tyne: University of Newcastle; 1995.
15. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 2018;35:1547-9.