

RESEARCH NOTE

형태적 특징 및 분자적 분석에 의한 밤나무 흰가루병균 *Erysiphe castaneigena*의 확인

조성은¹, 이상현², 이선근³, 신현동^{1*}

¹고려대학교 환경생태공학부, ²국립산림과학원 난대·아열대산림연구소, ³국립산림과학원 산림병해충연구과

Confirmation of Chestnut Powdery Mildew, *Erysiphe castaneigena*, in Korea with Morphological Characteristics and Molecular Analyses

Sung-Eun Cho¹, Sang-Hyun Lee², Sun Keun Lee³, Hyeon-Dong Shin^{1*}

¹Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 02841, Korea

²Warm-Temperate and Subtropical Forest Research Center, National Institute of Forest Science, Jeju 63582, Korea

³Division of Forest Diseases and Insect Pests, National Institute of Forest Science, Seoul 02455, Korea

*Corresponding author: hdshin@korea.ac.kr

Abstract

The powdery mildew on *Castanea crenata* in South Korea was first recorded as *Microsphaera alni* in 1958. On the basis of its morphological characteristics and host range, the mildew was determined as *Microsphaera sinensis* in 1988. According to the rules of *The International Code of Botanical Nomenclature*, *M. sinensis* was renamed *Erysiphe castaneigena* in 2006. Nevertheless, taxonomic re-consideration of the morphological and molecular characteristics for the *Castanea* powdery mildew in Korea has not been performed. In the present study, we studied 34 powdery mildew samples collected from *C. crenata* in the Korea University Herbarium. On the basis of microscopic examinations of the holomorph and phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer regions, we confirmed the powdery mildew fungus as *E. castaneigena*. In addition, sequence comparison between *E. castaneigena* and *E. alphitoides* ex *Castanea* sp. suggested a close phylogenetic affinity.

Keywords: Chestnut, Erysiphaceae, Molecular analysis, Morphology, Phylogeny

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 June, 45(2): 145-152
https://doi.org/10.4489/KJM.20170018

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Received: 14 April, 2017

Revised: 5 May, 2017

Accepted: 8 May, 2017

© 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.

밤나무는 참나무과(Fagaceae)의 밤나무속(*Castanea*)에 속하는 수목을 가리키며, 전 세계적으로는 약 10종이 알려져 있다. 계통학적으로는 동아시아 원산의 *C. crenata* Siebold & Zucc. (일본밤나무), *C. mollissima* Blume (중국밤나무), *C. seguinii* Dode (세구이니밤나

무), 북미 원산의 *C. dentata* (Marsh.) Borkh. (미국밤나무), 유럽 원산의 *C. sativa* Mill. (유럽 밤나무)로 나뉜다[1].

세계적으로 밤나무(*Castanea* spp.)에서 기록된 흰가루병균은 *Cystotheca*, *Erysiphe*, *Phyllactinia* 등 3속이 있다[2]. 이 중에서 *Erysiphe* sect. *Microsphaera*에는 *E. alphitoides* (Griff. & Maubl.) U. Braun & S. Takam., *E. castaneae* U. Braun, *E. seguinii* (Y.N. Yu & Y.Q. Lai) U. Braun & S. Takam., *E. castaneigena* U. Braun & Cunningham 등 4종이 기록되어 있다[2, 3]. 첫째, *E. alphitoides*는 주로 참나무과의 참나무속(*Quercus* spp.) 기주를 감염하는 흰가루병균으로 알려져 있으나, *Castanea* 속의 3종에서도 보고된 바 있다. 즉, 일본밤나무와 미국밤나무의 흰가루병균으로 뉴질랜드에서, 유럽밤나무의 흰가루병균으로 유럽에서 알려져 있다[2]. 최근에 프랑스의 *Castanea* sp.에서 채집한 흰가루병균을 *E. alphitoides*로 동정한 근거로서 internal transcribed spacer (ITS) rDNA 염기서열이 NCBI에 등록되었지만, 해당 논문에서는 밤나무류의 흰가루병균에 대한 분류학적 검토를 다루지 않았다[4]. *E. alphitoides*는 종 개념이 모호하고 기주 범위가 매우 넓어서 참나무과를 비롯한 여러 과의 식물에서 보고되었으므로[2, 3], 밤나무속과 참나무속 식물을 감염하는 흰가루병균이 실제로 동일한 종인지 형태적 및 분자적 검토가 필요한 실정이다[3]. 둘째, *E. castaneae*는 미국밤나무를 비롯한 6종의 밤나무류의 흰가루병균으로서 미국과 캐나다에서만 기록되어 있으므로[2] 북미에만 분포하는 고유종으로 여겨진다[3]. 셋째, *E. seguinii*는 중국 원산의 세구이니밤나무에서 기록된 종으로서 지금까지 중국에서만 보고된 고유종이다[3]. 이 흰가루병균은 유성세대의 형태적 특징이 *E. alphitoides*와 유사하며, 무성세대의 특징은 알려진 바 없다. 더구나, 이 종은 분자적 정보가 보고된 바 없으므로 독립된 종으로서의 지위를 확정하기는 아직 이르다. 넷째, *E. castaneigena*는 일본밤나무와 중국밤나무의 흰가루병균으로서 일본과 중국에서 보고되었다. 이 종의 객관적 동물이명(nomenclatural synonym)으로 *Microsphaera sinensis* Yu가 있다. 즉, 2000년에 *Microsphaera*가 *Erysiphe*의 동물이명으로 간주됨으로써 학명이 *E. sinensis*로 바뀌었으나[5], “*E. sinensis*”는 이미 다른 흰가루병균의 학명으로 선점되어 있었다. 따라서 Braun 등[6]이 *E. castaneigena* U. Braun & Cunningham이라는 신명(nom. nov.)을 부여하였다.

밤나무[한국의 밤나무(*Castanea crenata*)를 ‘일본밤나무’로 불러 다른 종의 밤나무와 구분 짓는 것이 옳다는 의견이 있으나, 본 논문에서는 국가표준식물목록(국립수목원)에 근거해서 ‘밤나무’로 표기한다.]의 흰가루병균에 관한 국내 최초의 기록으로는 1940년 ‘선만실용임업편람’에 기록된 *Microsphaera alni* (Wallr.) Salm.이 있으나, 채집장소 등 관련 정보가 없으며 흰가루병균의 학명만 기록되었다[7]. 그 후 Park [8]이 1957년 성환(천안시 성환읍)과 수원에서 채집한 밤나무 흰가루병균의 형태적 특징을 기재하고 *Microsphaera alni*로 기록하였다. 그 당시, *M. alni*는 넓은 개념의 종으로서 밤나무뿐만 아니라 여러 목본식물의 흰가루병균을 포함하였다. 한편, 2000년에 Shin [9]은 한국의 밤나무 흰가루병균을 *M. sinensis* Yu로 동정하였다. 즉, 1982년 중국의 Yu와 Lai [10]가 중국밤나무 흰가루병균을 *M. alni* complex에서 분리하여 독립된 종으로서 *M. sinensis*로 도입하였는데, Shin [9, 11]은 한국의 밤나무 흰가루병균도 중국의 기재와 형태적으로 일치함을 근거로 제시하면서 *M. sinensis*로 동정하였다. 그 후 한국의 밤나무 흰가루병균은 *M. sinensis*로 알려져 왔으나[12], 후속 연구는 이루어지지 않았다.

그러나 Farr와 Rossman [2] 및 Braun과 Cook [3]의 자료에 의하면, 과거에 *M. sinensis*로 알려졌던 한국의 밤나무 흰가루병균이 현재는 *E. castaneigena*로 기록되어 있다. 이는 동아시아(일본, 중국, 한국)에서 기록되었던 *M. sinensis*를 2003년에 *E. sinensis*로 변경하고[13], 2006년에는 ‘식물명명에 관한 국제규약(ICBN)’의 규칙에 따라 *E. castaneigena*로 개명하는 [6] 과정에서 검증을 거치지 않은 채로 한국의 밤나무 흰가루병균도 함께 처리된 결과이다. 다시 말해, 한국의 밤나무 흰가루병균을 *E. castaneigena*로 결정하는 것이 옳은 것인가에 대한 균학적 검토는 이루어진 바 없다. 더구나, 전 세계적으로 *E. castaneigena*에 관한 분자계통학적 정보는 일본 시료 1점에서 분석된 ITS 영역의 염기서열이 있을 뿐이다. 특히, *E. castaneigena*의 정기준표본(중국, HMAS40689) 또는 그에 준하는 중국 시료에서도 분자적 정보는 아직 보고된 바 없다.

저자들은 국내에서 발생하는 밤나무 흰가루병균에 대한 정확한 검토와 학술적 기록이 필요하다고 판단하였다. 고려대학교 진균표본실(KUS-F)에 보존 중인 표본시료에서 밤나무 흰가루병균의 형태적 특징을 상세히 검경하고 현재의 흰가루병균 분류체계[3]에 근거하여 기재하였다. 또한, 이들 시료의 ITS 영역의 염기서열을 분석함으로써 분자계통학적으로 이 흰가루병균에 대한 명확한 동정 자료를 제공하고자 본 연구를 실시하였다.

시료

1990년부터 2016년까지 국내 전역에서 채집한 밤나무 흰가루병균 시료는 고려대학교 진균표본실에 보존되어 있으며 총 34점의 시료가 보존 중이다. 다음은 소장된 시료의 내역이다. KUS-F10552 (15 Oct 1990, 강릉시, 강릉원주대학교), F10608 (24 Oct 1990, 강릉시, 지변동), F11208 (3 Oct 1991, 강릉시, 강릉원주대학교), F11812 (7 Jul 1992, 강릉시, 강릉원주대학교), F12468 (22 Jul 1993, 강릉시, 강릉원주대학교), F12636 (25 Sep 1993, 강릉시, 유천동), F12899 (25 Jun 1994, 강릉시, 강릉원주대학교), F12965 (4 Sep 1994, 강릉시, 회산동), F13229 (26 Oct 1994, 강릉시, 포남동), F13685 (20 Sep 1994, 강릉시, 회산동), F13706 (8 Oct 1996, 강릉시, 강릉원주대학교), F16980 (8 Oct 1999, 안양시, 관악수목원), F17107 (15 Oct 1999, 청원군, 충북산림환경연구소), F18314 (28 Aug 2001, 삼척시, 원덕읍), F18701 (20 Oct 2001, 강릉시, 성산면), F22942 (27 Sep 2007, 속초시, 경동대학교), F24350 (22 Jul 2009, 대전광역시, 성두산), F26045 (29 Aug 2011, 강릉시, 강릉원주대학교), F26869 (2 Sep 2012, 고성군, 토성면), F28255 (25 Sep 2014, 부산광역시, 장산), F28333 (8 Oct 2014, 오산시, 물향기수목원), F28372 (11 Oct 2014, 익산시, 전북농업기술원), F28489 (7 Nov 2014, 수원시, 광교산), F28492 (9 Nov 2014, 남양주시, 진접읍), F28539 (20 Nov 2014, 나주시, 금성산), F28562 (27 Nov 2014, 여주시, 전남대학교 여수캠퍼스), F28640 (15 Jun 2015, 삼척시, 근덕면), F28676 (24 Jun 2015, 익산시, 전북농업기술원), F28682 (28 Jun 2015, 남양주시, 진접읍), F28761 (29 Jul 2015, 남원시, 어현동), F28794 (30 Aug 2015, 화성시, 동탄면), F28830 (13 Sep 2015, 광주시, 백마산), F28837 (15 Sep 2015, 남원시, 어현동), F29627 (27 Oct 2016, 양평군, 용문산).

형태적 특징

밤나무 흰가루병균의 무성세대와 유성세대를 검경하였다. 분류학적 특성을 파악하고 크기를 측정하기 위해서 명시야광학현미경(BX51; Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 현미경 사진은 미분간섭현미경(Axio Imager; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 촬영하였다. 무성세대와 유성세대의 현미경 사진은 기본적으로 신선시료를 사용하여 이루어졌으며, 추가적인 검경이 필요한 경우에는 건조시료를 3% KOH에 충분히 불려서 사용하였다.

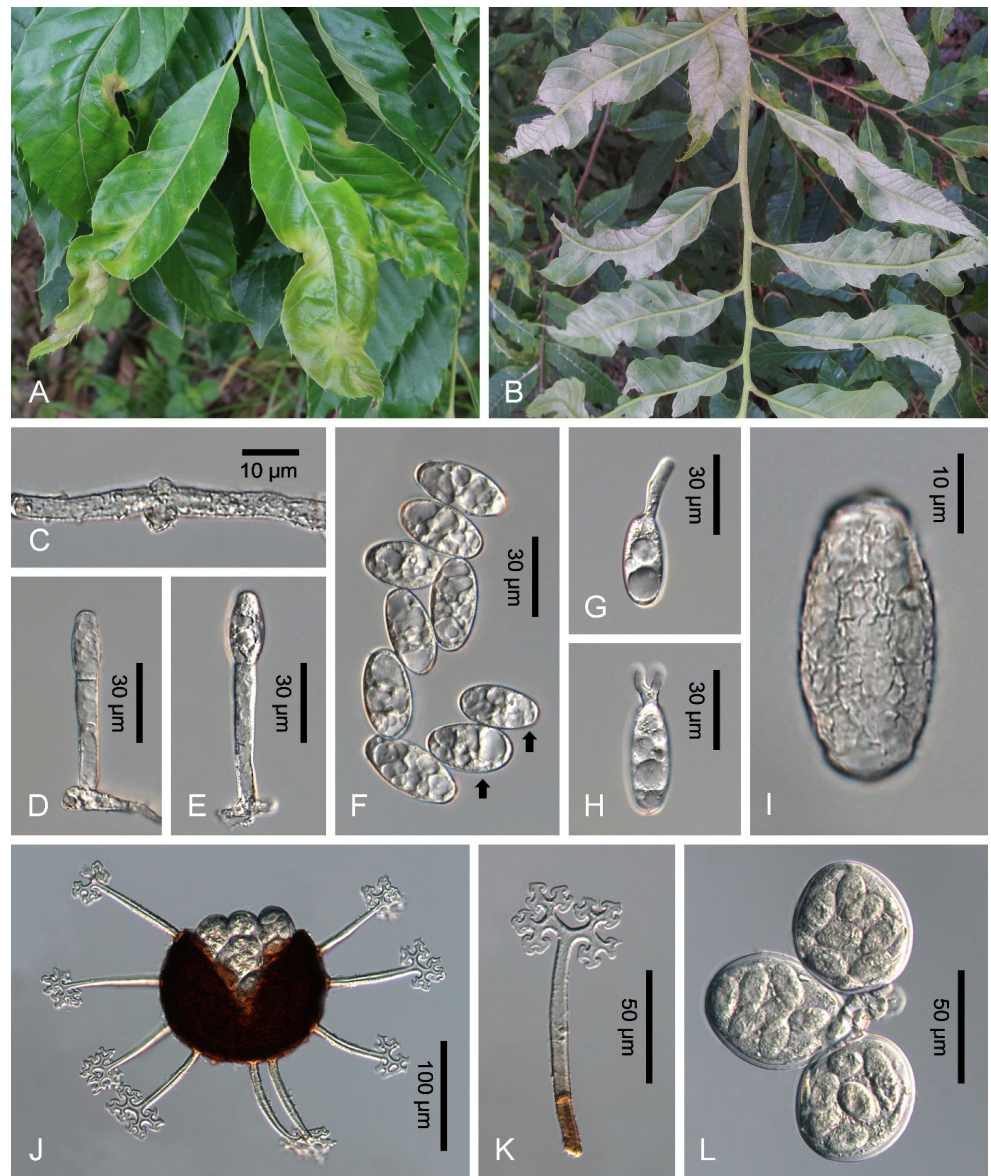


Fig. 1. *Erysiphe castaneigena* on *Castanea crenata*. A, symptoms on adaxial leaf surface; B, symptoms on abaxial leaf surface; C, hypha with lobed appressoria; D, E, conidiophores; F, primary conidia (arrows) and secondary conidia; G, H, germinating conidia; I, conidium showing the angular/rectangular pattern of outer wall; J, chasmothecium with asci; K, appendage; L, asci containing 6 to 8 ascospores.

밤나무 흰가루병균은 잎과 어린 줄기에서 발견되었다. 국부적 감염에서는 병반 부위의 생장이 크게 위축되어 잎 모양이 기형으로 되면서 뒤틀렸으며, 병반의 주변부가 누렇게 변하였다(Fig. 1A, 1B). 잎 전체에 큰 병반을 형성할 경우에는 잎이 왜소해지면서 생장이 크게 위축되었다.

균사는 잎 양면에 존재하지만 뒷면에 발생하는 경우가 더 흔하며, 식물 조직의 바깥쪽에 존재하였다. 균사는 대부분 파상이며, 때로는 결절을 형성하며, 폭은 4~8 μm 였다. 균사의 부착기는 굴곡상이며, 단생하거나 쌍을 이루며, 잘 발달하였다(Fig. 1C). 분생포자경은 균사의 윗부분으로부터 발달하며, 60~100 $\times$ 7~9 μm 이며, 3~4개의 세포로 구성되며, 정단세포가 분생포자로 발달하였다(Fig. 1D, 1E). 기부세포의 아래쪽은 곧고, 길이는 20~35 μm 였다. 1차 분생포자는 윗쪽은 둥글고 아랫쪽은 뭉툭하며, 크기는 27~35 $\times$ 14~18 μm 이며, 기타 다른 특성은 2차 분생포자에 준하였다(Fig. 1F). 2차 분생포자는 무색의 단세포이며, 피브로신체를 갖지 않으며, 타원형 내지 달걀형이며, 크기는 30~42 $\times$ 15~20 μm 이며, 대부분 포자의 배꼽테두리에서 발아하였다(Fig. 1G, 1H). 또한 분생포자의 표면구조는 다각격자형(angular/rectangular)이었다(Fig. 1I).

자낭구는 잎과 줄기에 흩어지거나 모여서 형성되며, 직경은 80~120 μm 이며, 벽세포는 직경 8~25 μm 의 불규칙한 세포로 구성되며, 4~8개의 자낭을 가졌다(Fig. 1J). 부속사는 8~14개이며, 자낭구의 위쪽에 분포하며, 길이는 80~130 μm 이고, 폭은 6~10 μm 이며, 끝은 4~6회 이차 분지되어 있으며, 아래쪽은 갈색을 띠지만 위쪽으로 갈수록 무색이었다(Fig. 1K). 자낭은 타원형으로서 아랫부분에 꼭지를 가지며, 크기는 57~75 $\times$ 42~50 μm 이며, 6~8개의 자낭포자를 지녔다(Fig. 1L). 자낭포자는 타원형 내지 달걀형이며, 크기는 17~23 $\times$ 12~15 μm 이며, 무색이었다. 이러한 균학적 특징은 앞선 연구[3]에서 보고된 밤나무류(*Castanea* spp.)의 흰가루병균 *Erysiphe castaneigena* U. Braun & Cunnington과 일치하였다.

분자적 분석

고려대학교 표본실에 보존되어 있는 *E. castaneigena* 시료 중에서 KUS-F17109, F18701, F28676, F28682, F28761, F28837 등 6점의 ITS 영역의 염기서열을 분석하였다. Genomic DNA 추출을 위해서 Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하였고, ITS5와 P3 프라이머를 이용하여 ITS 영역을 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭시켰다[14]. 전기영동을 통하여 PCR 산물을 확인한 후에 염기서열 분석을 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 그 결과, 6점의 시료에서 얻은 염기서열은 서로 100% 일치하였으며, 이들을 GenBank에 기탁하였다(KY926842~KY926847). NCBI BLAST를 이용하여 ITS 영역의 염기서열을 비교한 결과, 한국의 *E. castaneigena* 시료 6점의 염기서열은 GenBank에 등록되어 있는 일본의 일본밤나무 흰가루병균 *E. castaneigena* (LC010079)와 100%의 상동성을 나타냈다. 이들의 분자계통학적인 관계를 확인하기 위하여 계통수를 작성하였으며, MEGA7 프로그램[15]을 이용하여 maximum likelihood 방법으로 분석하였다. 그 결과, 한국의 밤나무 흰가루병균 시료 6점과 일본 시료 1점은 같은 계통군에 속하였으며, 97%의 높은 신뢰도 지수(bootstrap value)를 나타냈다(Fig. 2). 또한, 프랑스의 *Castanea* sp.에서 채집된 흰가루병균 *E. albitoides*가 *E. castaneigena*의 가장 가까운 근연종임을 확인하였다. 2003년 Cunnington

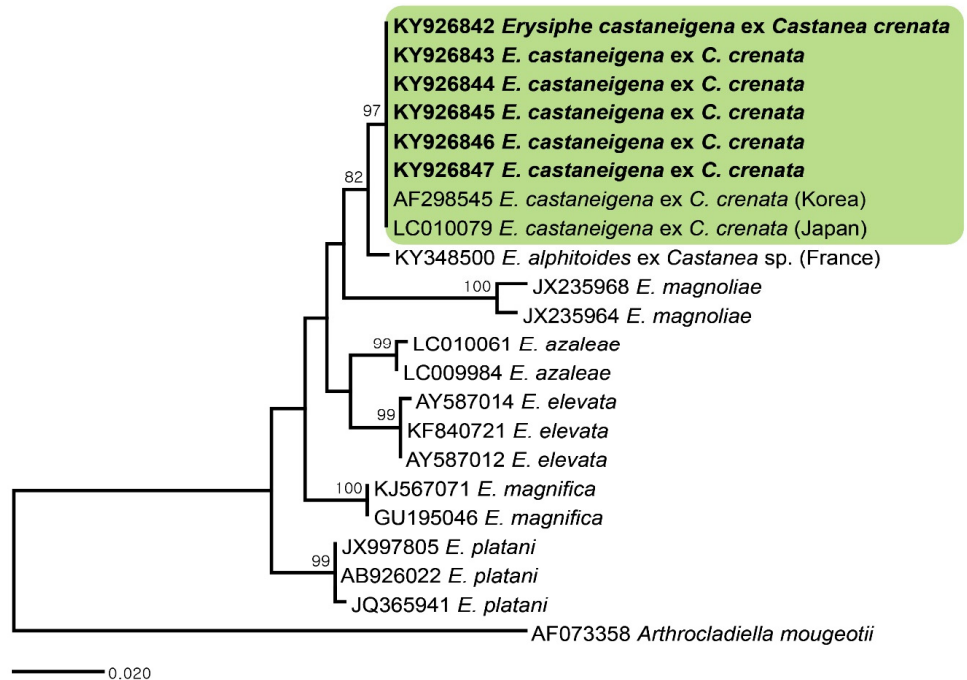


Fig. 2. Phylogenetic relationship between *Erysiphe castaneigena* isolates and some reference isolates retrieved from GenBank, inferred by maximum likelihood method using the ribosomal internal transcribed spacer regions. Bootstrap values based on 1,000 replications are indicated above the branches. The scale bar represents 0.02 nucleotide substitutions per site. The Korean isolates presented in this study are indicated in bold.

등[16]이 처음으로 한국의 밤나무 흰가루병균 시료의 ITS 영역을 분석하여 NCBI에 기탁하였으나, 지금까지 이 종은 *M. sinensis*로 알려져 왔다. 따라서, 이 연구를 통해 한국의 밤나무 흰가루병균은 *E. castaneigena*로 확인되었다.

고찰

본 연구를 통하여 국내 밤나무 흰가루병균을 정확히 동정하고, 그 증거 자료를 제시하였다. 특히, *E. castaneigena*의 무성세대의 특징 중에서 1차 분생포자의 특징과 분생포자의 표면 구조는 지금까지 알려진 적이 없었는데, 한국의 밤나무 흰가루병균 시료를 가지고 이러한 특징을 처음으로 기재하였다. 이로써 국내에서 발생하고 있는 밤나무 흰가루병균은 형태적 특징 및 분자적 분석을 통하여 *E. castaneigena*로 확인되었다. 이 종은 지금까지 동아시아의 밤나무류의 기주를 감염하는 흰가루병균으로서 일본과 중국에서 기록되어왔다[2]. 현재까지 NCBI에 등록된 *E. castaneigena*의 ITS 염기서열 정보는 일본 시료와 중국 시료 각각 1점이지만, 중국 시료는 논문으로 출판되지 않아서 본 연구에서는 제외되었다.

앞으로 일본과 중국의 밤나무류 시료가 재검토 되어 *E. castaneigena*가 동아시아의 밤나무류에서만 발견되는 고유종을 확인하는 후속 연구가 필요하다. 또한 북미에서만 알려진 *E. castaneae*가 국내 밤나무류에 발생하는지 여부에 대한 모니터링, 중국의 세구이니밤나무에서만 채집된 *E. seguinii*의 균학적 특징에 대한 기초 연구, 그리고 유럽에서 몇 종의 밤나무류에서 채집된 *E. alphitoides*에 대한 모니터링이 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

적 요

국내에서 밤나무 흰가루병균은 1958년에 *Microsphaera alni*로 처음 기록되었다. 1988년에는 이 흰가루병균의 형태적 특징과 기주를 고려하여 *M. sinensis*로 동정되었다. 이 학명은 ‘식물명명에 관한 국제규약’의 규칙에 따라 2006년에 *E. castaneigena*로 변경되었다. 그럼에도 불구하고, 국내의 밤나무 흰가루병균의 형태적 특징 및 분자적 분석에 의한 분류학적 재검토가 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 고려대학교 진균표본실에 보존된 34점의 밤나무 흰가루병균 시료를 대상으로 수행되었다. 무성세대와 유성세대의 형태적 특징을 현미경으로 관찰하고 ITS 영역의 염기서열을 분석함으로써, 한국의 밤나무 흰가루병균은 *E. castaneigena*로 확인되었다. 또한, 염기서열 분석을 통하여 *E. castaneigena*와 밤나무 유래의 *E. alphitoides*는 계통학적으로 근연 관계임을 제시하였다.

Acknowledgements

This work was financially supported by a grant from the National Institute of Forest Science. Additional funding was received by a grant from Korea University to HDS.

REFERENCES

1. Yousefzadeh H, Colagar AH, Akbarzadeh F, Tippery NP. Taxonomic status and genetic differentiation of Hyrcanian *Castanea* based on noncoding chloroplast DNA sequences data. *Tree Genet Genomes* 2014;10:1611-29.
2. Farr DF, Rossman AY. Fungal databases, U.S. National Fungus Collections [Internet]. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory; 2017 [cited 2017 Apr 3]. Available from: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>.
3. Braun U, Cook RT. Taxonomic manual of the *Erysiphales* (powdery mildews). Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2012.
4. Feau N, Decourcelle T, Husson C, Desprez-Loustau ML, Dutech C. Finding single copy genes out of sequenced genomes for multilocus phylogenetics in non-model fungi. *PLoS One* 2011;6:e18803.
5. Braun U, Takamatsu S. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (*Erysiphaceae*) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (*Cystothecaceae*) inferred from rDNA ITS sequences - some taxonomic consequences. *Schlechtendalia* 2000;4:1-33.
6. Braun U, Delhey R, Dianese JC, Hosagoudar VB. Miscellaneous notes on biotrophic micromycetes. *Schlechtendalia* 2006;14:85-97.
7. Korea Forestry Laboratory. Practical handbook of forestry for Korea and Manchuria. Tokyo: Yokken-do; 1940.
8. Park JS. Fungous diseases of plants in Korea (1). Daejeon: Chungnam National University; 1958.
9. Shin HD. Erysiphaceae of Korea. Suwon: National Institute of Agricultural Science and Technology; 2000.
10. Yu YN, Lai YQ. Taxonomic studies on the genus *Microsphaera* of China. IV: new and

- known species of *Microsphaera* on family *Fagaceae*. J North East For Inst 1982;4:24-36.
11. Shin HD. Erysiphaceae of Korea [dissertation]. Seoul: Seoul National University; 1988.
 12. The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.
 13. Braun U, Cunnington JH, Brielmaier-Liebetanz U, Ale-Agha N, Heluta V. Miscellaneous notes on some powdery mildew fungi. Schlechtendalia 2003;10:91-5.
 14. Takamatsu S, Heluta V, Havrylenko M, Divarangkoon R. Four powdery mildew species with catenate conidia infect *Galium*: molecular and morphological evidence. Mycol Res 2009;113:117-29.
 15. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 2016;33:1870-4.
 16. Cunnington JH, Takamatsu S, Lawrie AC, Pascoe IG. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). Australas Plant Pathol 2003;32:421-8.