

RESEARCH NOTE

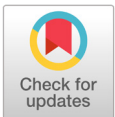
참싸리 겹둥근무늬병균 *Grovesinia moricola* 동정박지현¹, 정복남¹, 이상현¹, 신현동^{2,*}¹국립산림과학원 산림병해충연구과, ²고려대학교 환경생태공학부Identification of *Grovesinia moricola* Causing Zonate Leaf Spots on *Lespedeza cyrtobotrya* in KoreaJi-Hyun Park¹, Bok-Nam Jung¹, Sang-Hyun Lee¹, and Hyeon-Dong Shin^{2,*}¹Division of Forest Insect Pests and Diseases, National Institute of Forest Science, Seoul 02455, Korea²Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 02841, Korea

*Corresponding author: hdshin@korea.ac.kr

ABSTRACT

In September 2017, a heavy damage by premature defoliation with the zonate leaf spots was observed in several shrubs of *Lespedeza cyrtobotrya* growing at Mt. Obongsan in Chuncheon, Korea. Numerous cone-shaped, white sporophores of a fungus were observed on lesions of the abaxial leaf surface. A similar fungus was isolated in September 2019 from the leaves of *L. cyrtobotrya* growing at Mt. Taegisan in Hoengseong, Korea. The morphological characteristics of the sporophores were consistent with those of *Grovesinia moricola*. The species identification was confirmed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA from the two isolates (KACC48417 and KACC48934). The fungal pathogenicity was determined by an artificial inoculation in conditions of relative humidity and temperature of 100% and 15±2°C, respectively. This is the first report of association of *G. moricola* with *L. cyrtobotrya* in Korea.

Keywords: *Cristulariella moricola*, *Grovesinia pyramidalis*, *Hinomyces moricola*, *Lespedeza cyrtobotrya*, Sporophore



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 March, 48(1): 69-74
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200008>

Received: November 25, 2019
Revised: December 15, 2019
Accepted: December 16, 2019
© 2020 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.

참싸리(*Lespedeza cyrtobotrya* Miq.)는 콩과(*Fabaceae*), 싸리속(*Lespedeza*)에 속하는 낙엽성 관목으로서 우리나라를 비롯하여 일본, 중국, 러시아(극동)에 분포한다[1]. 싸리속의 대부분 종과 같이 참싸리는 뿌리혹박테리아가 있어 땅을 기름지게 만들면서 잘 자라고, 산성토양에도 강하여 토양 복원이나 사면 녹화에 이용된다[1, 2]. 꽃은 중요한 밀원이 되고, 잎은 가축의 먹이로, 잔가지는 바구니를 만드는 재료로 쓰였다[1].

우리나라에서 참싸리에 서식하는 곰팡이로는 흰가루병균(*Erysiphe lespedezae*), 점무늬병균(*Pestalotia* sp.), 그리고 녹병균(*Uromyces lespedezae-procumbentis*)가 알려져 있다[3]. 한편, 일본에서는 *Grovesinia moricola*가 환문엽고병균(環紋葉枯病菌)으로 기록되었다[4]. 여기서는 우리나라에서 참싸리에 발생하는 *Grovesinia* 곰팡이를 처음으로 채집하여 균학적 검사와 병리학적 검정을 거쳐 *G. moricola*로 동정하였으므로 이에 보고한다.

시료 및 균주

참싸리에서 2회 채집되었으며, 고려대학교 식물표본보관소(KUS)에 영구보존 되었다. 2017년 9월 12일 강원도 춘천시 동산면 오봉산에서 채집한 시료는 수장번호 KUS-F29985이며, 2019년 9월 24일 강원도 횡성군 둔내면 태기산에서 채집한 시료는 수장번호 KUS-F31171이다. 각각의 시료에서 단포자 분리된 균주는 농촌진흥청 농업미생물은행(KACC, Korean Agricultural Culture Collection)에 KACC48417 및 KACC48934로 각각 보존되었다.

이 곰팡이를 순수배양하기 위하여 Hirano와 Iida [5]의 방법에 따라 병반 위에 형성된 포자체(sporophore)를 감자한천배지(Difco, MD, USA)에 접종하여 항온기($15 \pm 2^\circ\text{C}/12:12$ 광주기)에서 배양하였다(Fig. 1E). 순수분리된 균주를 감자한천배지에서 배양하면 약 1주 후에 균총의 직경은 약 90 mm에 이르며, 약 2주 후에는 균핵을 형성하기 시작하여 약 4주 후에는 뚜렷한 형태의 균핵을 관찰할 수 있었다(Figs. 1F and 1G).

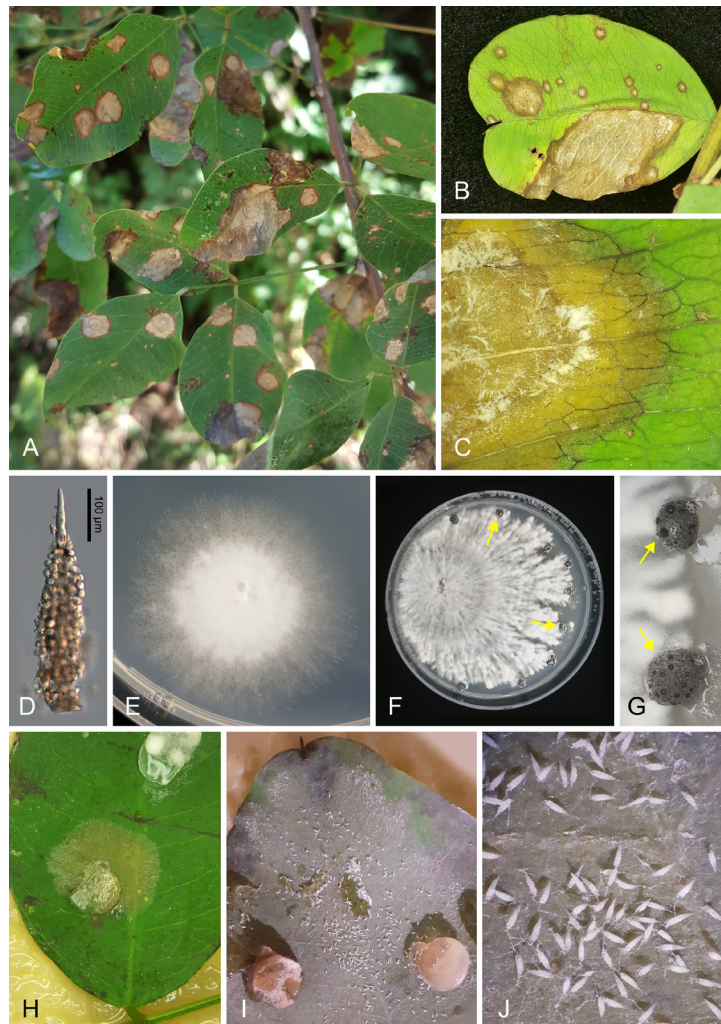


Fig. 1. Zonate leaf spots of *Lespedeza cyrtobotrya* infected with *Grovesinia moricola*. **A**, heavy infection in September, 2019; **B**, **C**, close-up of symptoms; **D**, a sporophore formed on the abaxial surface of a leaf lesion; **E**, five-day-old colony of *G. moricola* on potato dextrose agar (PDA); **F**, three-week-old colony of *G. moricola* with formation of sclerotia (arrows) on PDA; **G**, close-up of sclerotia (arrows); **H**, a leaf showing small lesions 3 days after artificial inoculation; **I**, appearance of many sporophores on a leaf lesion 2 weeks after artificial inoculation; **J**, close-up of sporophores on a leaf lesion.

병징

초기에는 잎 양면에 수침상의 병반이 회록색 내지 회갈색으로 나타나는데, 차츰 확대되고 진전되면서 짙은 부분과 옅은 부분이 차례로 나타났고, 결과적으로는 회백색 내지 회갈색을 띤 과녁모양의 겹동근무늬로 발전하였다(Figs. 1A-1C). 개개의 병반은 대체로 직경 10 mm를 넘지 않았으나, 발병이 심해지면 인접한 병반과 융합되면서 잎의 대부분을 차지하는 큰 병반으로 진전되기도 하였다. 이러한 증상을 가진 잎은 뒤틀리며 일찍 떨어졌으며, 병반 위에 원뿔형의 포자체가 모여 있는 모습을 맨눈 또는 돋보기로 쉽게 관찰할 수 있었다(Figs. 1C and 1D).

형태적 특징

이 곰팡이를 동정하기 위하여 수술칼을 이용하여 포자체를 병반에서 절취하였으며, 이를 물에 넣어 검경하였다. 이 곰팡이의 분류학적 특성을 파악하고 크기를 측정하기 위하여 명시야광학현미경(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 현미경사진은 미분간섭현미경(Axio Imager, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)을 이용하여 촬영하였다. 각 특징의 기재는 최소 10개 이상의 관찰 결과를 바탕으로 결정하였다.

포자체는 대부분 병든 잎의 뒷면에 형성되었으나 때로는 앞면에서도 관찰되었으며, 단생하며, 곧추 서며, 쉽게 탈락하며, 중심주(central stipe)에 구형세포(globose cell)들이 붙어있는 모습이었다. 중심주를 이루는 대는 직경 12-18 μm 로 막대 모양이었다. 윗부분의 세포들은 위로 갈수록 폭이 점차 좁아지는 원뿔형이며, 무색이며, 길이는 300-620 μm , 폭은 100-170 μm 이었다(Fig. 1D). 구형세포는 향정단성(acropetal) 방식으로 형성되었다. 개개의 구형세포는 직경 10-22 μm 이며, 분아형 방식으로 2-3개의 분지를 형성하였다. 이와 같은 방식으로 전체적인 포자체의 모양이 형성되었으므로 성숙하면 특징적인 원뿔형을 나타냈다(Fig. 1D). 이러한 형태적 특징은 앞선 연구[6-8]에서 보고된 *Grovesinia moricola* (I. Hino) Redhead [= *Cristulariella moricola* (I. Hino) Redhead]의 기재와 일치하였다.

병원성 검정

배양 균주(KACC48934)의 균사체를 이용하여 병원성 검정을 실시하였다. 즉, 약 1주일 배양한 균사체를 직경 6 mm의 코르크보어러로 채취하여 건전한 잎에 올려놓아 접종하였다. 건전한 참싸리 잎은 어떠한 병도 발생하지 않은 건강한 나무에서 채취하였다. 각 잎(소엽)에 균사체 디스크를 4 군데에 올려놓고 상대습도 100%의 습실 조건을 부여하였으며, 이렇게 접종된 잎은 Su와 Leu [9]의 연구에 근거하여 $15 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 항온기에 보관하면서 매 24시간 마다 발병여부를 관찰하였다. 분생포자를 접종하지 않은 대조구의 잎도 같은 조건에 보관하면서 함께 관찰하였다. 그 결과 24시간 후에 작은 병반이 나타났고, 48-72시간 후에는 병반의 직경이 10 mm를 넘을 정도로 급속하게 진전되었다. 이러한 병반에 다수의 포자체가 형성되었으며, 형태적으로 자연 상태의 포자체와 일치하였다(Figs. 1I and 1J). 한편, 대조구에서는 이러한 증상이 전혀 나타나지 않았다. 따라서 코흐의 가설을 만족시킴으로써 이 균주의 병원성이 확인되었다.

균주의 염기서열 분석

균주의 동정을 확인하고, 유전자 정보를 제공하기 위하여 분자분석을 실시하였다. Lee와 Taylor [10]의 방법에 따라 균주에서 긁어낸 균사 집단으로부터 genomic DNA를 추출하였다. ITS1과 ITS4 프라이머를 이용하여 ribosomal DNA의 internal transcribed spacer (ITS) 영역을 증폭하였으며 [11], QIAquick PCR purification kit (Qiagen, CA, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 전기영동을 통하여 확인한 후에 염기서열을 분석하기 위하여 마크로젠(Macrogen, Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 DNASTAR Lasergene 10 Seqman Pro8 (Madison, WI, USA)을 이용하여 정리하였으며, GenBank에 등록하였다(Accession number MN971614 and MN971615). 이들의 염기서열을 NCBI에서 Blast 해 본 결과 담쟁이덩굴, 팔, 환삼덩굴, 콩, 네군도단풍에서 유래한 *Grovesinia moricola*와 99% 이상의 상동성을 보였다. 균핵병균과(*Sclerotiniaceae*)에 속하는 분류군들과의 관계를 알아보기 위하여 MEGA7 프로그램[12]을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성한 결과, *G. moricola*와 같은 계통군에 속함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 이러한 분자계통학적 특성을 바탕으로 우리나라에서 발생한 참싸리 겹등근무늬병의 병원균이 *G. moricola*임을 확인하였다.

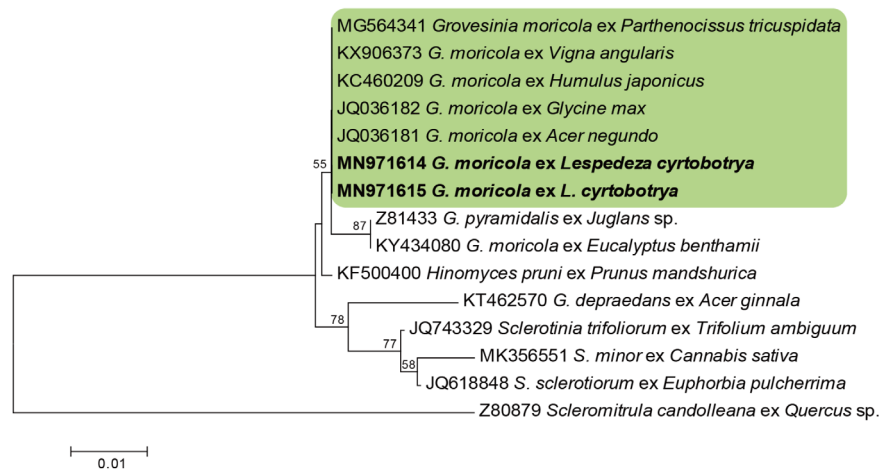


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Grovesinia* and allied genera, including *G. moricola* on *Lespedeza cyrtobotrya*, inferred from neighbor-joining analysis using sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region. The numbers above the branches are the bootstrap values obtained from 1,000 replications. The isolates presented in this study are indicated in bold. The scale bar represents 0.01 nucleotide substitutions per site.

고찰

이 곰팡이는 1929년 Hino에 의해 *Botrytis moricola*로 기록된 이후, *Cristulariella moricola* (1979), *Hinomyces moricola* (2006)로 개명되었고, *Grovesinia moricola* (2014)가 정명으로 결정되었다[13, 14]. 참싸리에서 *G. moricola*가 기록된 것은 1986년 일본에서 Noro 등[4]이 최초이다. 이들은 일본식물 병리학회 학술발표를 통하여 25종의 식물을 *G. moricola*의 새로운 기주식물로 보고하였는데, 식물 명만 나열하였고 균학적 특징이나 병리학적 기재는 없었다. 이후에도 이 곰팡이와 참싸리의 관계에 대한 균학적 및 병리학적 연구보고는 없었다.

한편, 한국에서는 2009년 ‘조경수병해충도감’[15]에 참싸리 겹동근무늬병이 소개되어 있으며, 병원균은 *Grovesinia pyramidalis* (불완전세대 *Cristulariella moricola*)로 기록하였다. *G. moricola*와 *G. pyramidalis*에 대하여, 균학적으로는 서로 다른 종으로 취급하기도 하지만 식물병리학적으로는 같은 종으로 여긴다(<http://www.indexfungorum.org>). 따라서, 이 기록은 식물병리학적 입장에서 보면 실질적으로 참싸리에서 발생한 *G. moricola*에 관한 최초의 자료이다. 다만, 표본이 보존되지 않았고 균주가 기탁되지 않았으므로 공식적인 기록으로 인정되기는 어렵다. 따라서, 본 연구를 통하여 세계 최초로 참싸리 겹동근무늬병균으로 *G. moricola*를 기록하였으며, 병원균에 대한 균학적 검토를 제공하였다. 이 자료가 *Grovesinia*속 곰팡이의 종 분류에도 기여할 수 있으리라 기대한다.

싸리속에는 60종 이상이 속하며, 동아시아부터 인도까지와 북미 대륙에 분포한다[1]. 우리나라의 싸리속으로는 자생식물 39종(변종 포함)에 귀화식물 3종을 포함하여 총 42종이 분포한다 [<http://www.nature.go.kr/kpni/index.do>, 국립수목원 국가표준식물목록]. 그런데 한국과 일본에서 오직 참싸리 종에서만 이 곰팡이가 기록된 것도 흥미로운 사실이다[3, 4]. 앞으로 지속적인 모니터링과 식물병원성 곰팡이 조사를 통하여 참싸리 이외의 싸리속을 포함한 많은 기주식물이 발견되고 많은 균주가 확보되어 이러한 현상에 대한 과학적 해석이 도출되기를 기대한다.

적 요

2017년 9월 춘천의 오봉산에서 참싸리 잎에 겹동근무늬가 생기고 조기낙엽이 일어나는 등 큰 피해가 발견되었다. 병든 잎의 뒷면에는 원뿔형의 흰색 포자과가 다수 발견되었다. 2019년 9월 황성의 태기산에서도 참싸리 잎에서 유사한 증상이 발견되었다. 이러한 증상에서 발견된 포자과의 형태적 특징으로 보아 이 곰팡이는 *Grovesinia moricola*와 일치하였다. 확보된 두 균주(KACC48417 및 KACC48934)의 ITS rDNA 염기서열 분석을 통해 동정을 확인하였다. 이 곰팡이의 병원성은 상대습도 100%와 $15\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 조건에서 인공접종을 통하여 확인하였다. 이는 한국에서 참싸리와 *G. moricola*의 관계를 연구한 최초의 보고이다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by the National Institute of Forest Science (EF0100-2018-01) and by a grant (K1907991) from the Korea University to HDS.

REFERENCES

1. Wu Z, Raven PH, Hong D. Missouri Botanical Garden. Flora of China [Internet]. Beijing: Science Press; 2008.
2. Yu BD, Shim SR. The optimal seeding quantity of *Lespedeza cyrtobotrya* Miquel and *Indigofera pseudo-tinctoria* Matsumura as leguminous woody plants for the cut-slope revegetation. J Korean Env Res Tech 2016;19:61-71.
3. The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.

4. Noro S, Sugiyama S, Matsunaka K, Harada Y. Perfect stage of *Cristulariella moricola* and its host plants in Japan. *Ann Phytopath Soc Japan* 1986;52:539.
5. Hirano K, Iida W. Zonate leaf spot disease of crapemyrtle caused by *Cristulariella pyramidalis* Waterman and Marshall. *Tech Bull Fac Hort Chiba Univ* 1975;23:53-61.
6. Cho SE, Park JH, Lee SH, Lee HB, Shin HD. Zonate leaf spot of *Acer negundo* caused by *Cristulariella moricola* in Korea. *Res Plant Dis* 2012;18:45-8.
7. Cho SE, Hong SB, Choi IY, Oh HT, Shin HD. First report of zonate leaf spot caused by *Grovesinia moricola* on adzuki bean in Korea. *Plant Dis* 2017;101:1677.
8. Shin HD, Choi YJ, Hong SH, Lee YH. *Grovesinia moricola* occurring on *Parthenocissus tricuspidata*. *Korean J Mycol* 2019;47:271-4.
9. Su HJ, Leu SC. Zonate leaf spot of Indian jujube caused by *Cristulariella moricola*. *Plant Dis* 1983;67:915-6.
10. Lee SB, Taylor JW. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc; 1990. p. 282-7.
11. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc; 1990. p. 315-22.
12. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
13. Narumi-Saito T, Hosoya T, Sano T, Harada Y. *Nervostroma*, gen. nov. in the Sclerotiniaceae, the teleomorph of *Cristulariella*, and *Hinomyces* anam. gen. nov. to accommodate the anamorph of *Grovesinia*: Reassessment of the genus *Cristulariella*. *Mycoscience* 2006;47:351-9.
14. Johnston PR, Seifert KA, Stone JK, Rossman AY, Marvanová L. Recommendations on generic names competing for use in Leotiomycetes (Ascomycota). *IMA Fungus* 2014;5:91-120.
15. La YJ, Woo KS, Lee KJ. Diseases, insect pests, and abiotic disorders of landscape trees in Korea. Seoul National University Press; 2009.