RESEARCH NOTE

형태적 특징 및 다좌위 염기서열 분석에 의한 산철쭉 모무늬병균 *Sphaerulina azaleae* 동정

최인영[1,2], 최영준[3], 이귀재[4], 주호종[1,2], 조성완[5], 신현동[6,*]
[1]전북대학교 농생물학과, [2]전북대학교 농업과학기술연구소, [3]군산대학교 생물학과, [4]전북대학교 환경생명자원대학, [5]건양대학교 제약생명학과, [6]고려대학교 환경생태공학부

Identification of *Sphaerulina azaleae* on Korean Azalea in Korea Based on Morphological Characteristics and Multilocus Sequence Typing

In-Young Choi[1,2], Young-Joon Choi[3], Kui-Jae Lee[4], Ho-Jong Ju[1,2], Seong-Wan Cho[5], and Hyeon-Dong Shin[6,*]
[1]Department of Agricultural Biology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea
[2]Institute of Agricultural Science and Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea
[3]Department of Biology, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea
[4]Division of Biotechnology, College of Environmental and Bioresource Sciences, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Korea
[5]Department of Pharmaceutics & Biotechnology, Konyang University, Daejeon 35365, Korea
[6]Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 02841, Korea

*Corresponding author: hdshin@korea.ac.kr

Check for updates

OPEN ACCESS
pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 September, 48(3): 329-335
https://doi.org/10.4489/KJM.20200032

Received: August 25, 2020
Revised: September 19, 2020
Accepted: September 21, 2020

© 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.

ABSTRACT

From 2008 to 2017, Korean azalea (*Rhododendron yedoense* f. *poukhanense*) showing angular, necrotic leaf spots were found in Jeju and Hongcheon, Korea. The lesions occurred frequently, detracting from the beauty of the glossy green leaves of the plant and causing premature defoliation. Therefore, to identify the fungus associated with the lesions, morphological characterization and molecular phylogenetic analysis of actin (Act), translation elongation factor 1-alpha (EF), internal transcribed spacer (ITS), 28S nrDNA (LSU), and RNA polymerase II encoding the second largest subunit (RPB2) of the two representative isolates were performed. The phylogenetic tree inferred from the neighbor-joining method showed the isolates clustering in the *Sphaerulina azaleae* group. Therefore, the fungus associated with the angular leaf spots on the Korean azalea was identified as *Sphaerulina azaleae*.

Keywords: Angular leaf spot, Korean azalea, *Rhododendron yedoense* f. *poukhanense*, *Sphaerulina azaleae*

서론

산철쭉(Korean azalea; *Rhododendron yedoense* f. *poukhanense*)은 우리나라가 원산지로 함경도를 제외한 우리나라 전역의 산지에서 자라는 낙엽활엽관목으로 일본에도 분포한다(http://www.nature.go.kr). 저자들은 2008년 11월 제주의 산철쭉에서 괴저를 동반한 모무늬 증상을 처음으로 발견하였고, 이후 홍천 등에서 추가적으로 확인하였다. 산철쭉에 발생하는 모무늬 증상은 어린 잎에서는 잘 나타나지 않고 성숙한 잎에 잘 나타나며, 저온다습 조건에서 발생이 심하며, 부정형 또는 각진 적갈색 또는 흑갈색의 점무늬가 생긴 후 병반이 황색 띠를 형성하여 건전부와 뚜렷이 구분되었다. 하엽에서 먼저 감염되어 다른 잎으로 확산되고 감염된 잎은 조기낙엽되는 특징에서, 기존에 철쭉속(*Rhododendron*)에서 보고된 *Pestalotiopsis, Phyllosticta, Pseudocercospora, Rhytisma*에 의한 점무늬병과는 구분되었다[1]. 따라서 본 연구는 한국의 산철쭉 모무늬 증상에 관여하는 곰팡이에 대한 형태적 특징과 다좌위 염기서열분석 정보를 제공하고자 한다.

표본 내역

2008년부터 2017년도에 제주, 홍천 등에서 채집한 총 3점의 산철쭉 모무늬 증상 시료는 고려대학교 식물표본보관소(Korea University Herbarium, KUS)에 보존되어 있다. 보존된 시료 내역은 KUS-F23958 (4 Nov. 2008, 제주 비자림), KUS-F24762 (18 Oct. 2009, 홍천 자연생태공원), KUS-F29729 (20 Apr. 2017, 제주 서귀포) 등이다. 감염된 잎에서 곰팡이를 분리하여 대표균주를 국립농업과학원 농업미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 기탁(KACC 44227, KACC 44865)하였으며, 염기서열 분석에 사용하였다.

모무늬 증상 및 곰팡이의 형태적 특징

모무늬 증상을 나타내는 신선한 잎을 육안 및 루페로 관찰하여 변색부의 증상을 확인하였고, 실험실에서 해부현미경으로 정확하게 다시 검경하였다. 분생포자의 분류학적 특징을 파악하고 크기를 측정하고자 명시야광학현미경(BX51; Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 광학현미경 사진은 미분간섭현미경(Axio Imager; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 촬영하였다. 단포자 분리를 위해 모무늬 증상에 감염된 신선한 잎을 플라스틱백에 넣어 습기를 유지한 채 실온에 2-3일간 보관하였다. 변색부의 조직에서 올라온 분생포자뿔의 일부를 핀으로 떼어 멸균수가 들어있는 1.5 mL eppendorf 튜브에 넣고, 10초 동안 vortex mixer를 사용하여 흔들어 주었다. 루프를 이용하여 eppendorf 튜브 안에 있는 표자현탁액을 감자한천배지(Difco, MD, USA)에 도말했다. 5일 후 단포자에서 자라나온 균총의 끝부분을 떼어 다시 감자한천배지에 옮긴 후 25℃ 항온기에 암배양하며, 배양적 특성을 관찰했다.

산철쭉 모무늬 증상은 빈번하게 잎에만 발생하며, 식물의 관상가치를 떨어트리고 조기낙엽을 일으켰다(Fig. 1A). 잎의 윗면에서의 증상은 작고 담갈색 또는 흑자색의 점무늬가 나타나며, 점무늬 주변은 연한 색상을 띄었다. 변색부는 점점 어두운 자줏빛의 경계가 있거나 없이 확대되었다. 각 변색부는 잎의 세맥으로 경계가 구분되어 변색부의 외형이 대부분 각진 모양을 하고 있으며, 때론 부

정형이나 원형인 경우도 있었다(Fig. 1B and 1C). 또한, 검은색의 분생포자과(conidiomata)가 변색부 표면에 형성되었다(Fig. 1B). 습한 조건이나 생육상에서 습실 처리했을 때 분생포자과에서 흰색-크림색의 포자뿔(conidial horn)이 형성되었다(Fig. 1D and 1E).

분생포자과는 병자각(pycnidium) 형으로 잎 표면에 발생하며, 군데군데 흩어져 있고, 암갈색~녹갈색의 구형으로 조직 내에 묻혀 있거나 약간은 돋아났으며, 직경은 45-90 (-120) μm였다. 분생포자과에서 흰색-크림색의 포자뿔을 분출하는 포자분출구(ostiole)는 직경이 15-30 μm였다(Fig. 1E). 분생포자는 긴 원통형으로 정부는 둥글며, 기부는 뭉뚝한 모양으로 직선 또는 약간 굴곡된 1-5개(주로 3개) 격벽을 이루며, 세포당 1-3개의 뚜렷한 기름방울(oil drop)이 있었으며, 무색으로 크기는 18-35×2.5-4 μm였다(Fig. 1F). 25℃ 항온기에서 단포자를 감자한천배지에 5주 동안 암배양했을 때 흑갈색을 띠었으며, 12시간의 형광등 광 조건 하에서는 무수히 많은 분생포자가 형성되었다(Fig. 1G). 이상과 같은 형태적 특징을 기초로 산철쭉에 모무늬 증상을 일으키는 곰팡이를 *Sphaerulina azalea* (Voglino) Quaedvlieg, Verkley & Crous로 동정했다[2,3].

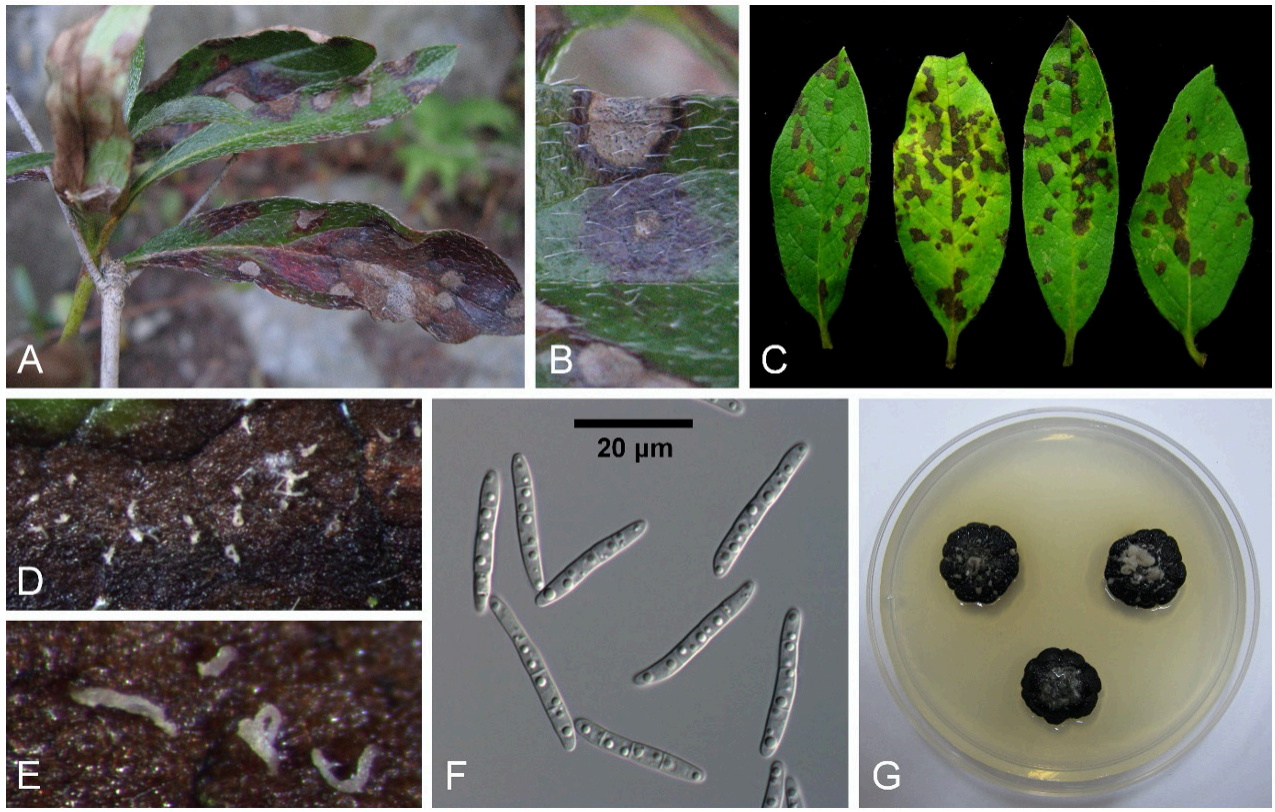

Fig. 1. Angular leaf spot of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense* infected with *Sphaerulina azaleae*. (A) Heavy infections detracting from the beauty of the plant. (B) Close-up symptoms in the later stage of disease development. Note the pycnidial conidiomata showing as small black dots on the lesions. (C) Symptoms of angular leaf spot on current-year leaves. (D) White conidial horns being extruded through the ostioles of pycnidial conidiomata. (E) Close-up of white conidial horns. (F) Conidia. (G) Five-week old colonies of *Sp. azaleae* growing on potato dextrose agar. Note plentiful production of conidia on the colonies.

염기서열 분석

형태적 특징을 기초로 동정한 균주를 재확인하고자 KACC에 기탁된 대표균주(KACC 44227, KACC 44865)를 대상으로 actin (Act), translation elongation factor 1-alpha (EF), internal transcribed spacer (ITS), 28S nrDNA (LSU), RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) 등의 유전자에 대한 염기서열을 분석했다. Genomic DNA는 감자한천배지에서 2주 동안 배양된 균사체를 메스로 긁어 1.5 mL eppendorf tube에 채취하여 액체질소를 넣고 파쇄한 후, DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 추출했다. Genomic DNA의 Act, EF, ITS, LSU, RPB2 유전자는 Table 1의 primer를 사용하여 PCR로 증폭시켰다[4-11].

Table 1. Primer combinations used in this study for PCR amplification and sequencing, and GenBank accession numbers.

Locus	Primer	Primer sequence 5′ to 3′	Orientation	Annealing temperature (°C)	Reference	GenBank Accession no.	
						KACC 44227	KACC 44865
Translation elongation factor-1α	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Forward	52	Carbone & Kohn (1999) [4]	MK584563	MK584564
	EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	Reverse	52	O'Donnell et al. (1998) [5]		
RNA polymerase II second largest subunit	fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Forward	49	Liu et al. (1999) [6]	MK584567	MK584568
	fRPB2-414R	ACMANNCCCCARTGNGWRTTRTG	Reverse	49	Quaedvlieg et al. (2011) [7]		
LSU	LSU1Fd	GRATCAGGTAGGRATACCCG	Forward	52	Crous et al. (2009) [8]	MK578201	MK578202
	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	Reverse	52	Vilgalys & Hester (1990) [9]		
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Forward	52	White et al. (1990) [10]	MK578199	MK578200
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse	52	White et al. (1990) [10]		
Actin	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Forward	52	Carbone & Kohn (1999) [4]	MK584565	MK584566
	ACT2Rd	ARRTCRCGDCCRGCCATGTC	Reverse	52	Groenewald et al. (2013) [11]		

증폭된 산물은 정제를 위해 1.5% agarose gel에서 분리한 후 PCR purification kit (Core-one™, Core-bio, Seoul, Korea)를 사용했다. ABI 3130 auto sequencer를 이용하여 5개 유전자의 염기서열을 분석했으며, 분석된 염기서열은 GenBank database (National Centre for Biotechnology Information [NCBI], US National Institute of Health Bethesda, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)에서 확인했다. 계통학적 분석은 MEGA 6.06 program [12]을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 작성했으며, 염기서열의 유전자 거리는 Tamura-Nei parameter model로 계산하였고, bootstrap analysis은 1,000반복으로 수행했다.

산철쭉 모무늬 증상에 관여하는 대표균주에 대한 NCBI의 GenBank 등록번호는 Table 1과 같다. 즉, Act 영역의 염기서열은 MK584566, MK584565이며, EF 영역의 염기서열은 MK584564, MK584563, ITS 영역의 염기서열은 MK578200, MK578199, LSU 영역의 염기서열은 MK578202, MK578201, RPB2 영역의 염기서열은 MK584568, MK584567이다. NCBI에서 Blastn search한 EF 영역의 염기서열은 GenBank에 *Sp. azaleae*로 등록된 KF253546, KF253547 등과 > 99% 상동성을 보였다. ITS, LSU, RPB2 영역의 염기서열은 GenBank에 *Sp. azaleae*로 등록된 MH865035, MH876472, KF252592와 각각 100% 상동성을 보였다. 그러나, Act 영역의 염기서열은 GenBank에 등록된 다수의 *Septoria* 종들과 높은 상동성을 보이므로 *Sphaerulina* 동정에 유용한 유전자가 아니었다.

또한, 산철쭉 모무늬 증상에 관여하는 대표균주의 Act, EF, ITS, LSU, RPB2 등 5개 유전자의 염기서열에 대한 dataset을 만들어 계통수 작성 결과 *Rhododendron*속에서 분리하여 등록한 *Sp. azaleae*의 염기서열, KF253901 (Act) - KF253546 (EF) - KF251599 (ITS) - KF252104 (LSU) - KF252592 (RPB2)과 같은 그룹으로 묶였으며, *Septoria* 속과는 다른 그룹으로 분리되었다(Fig. 2).

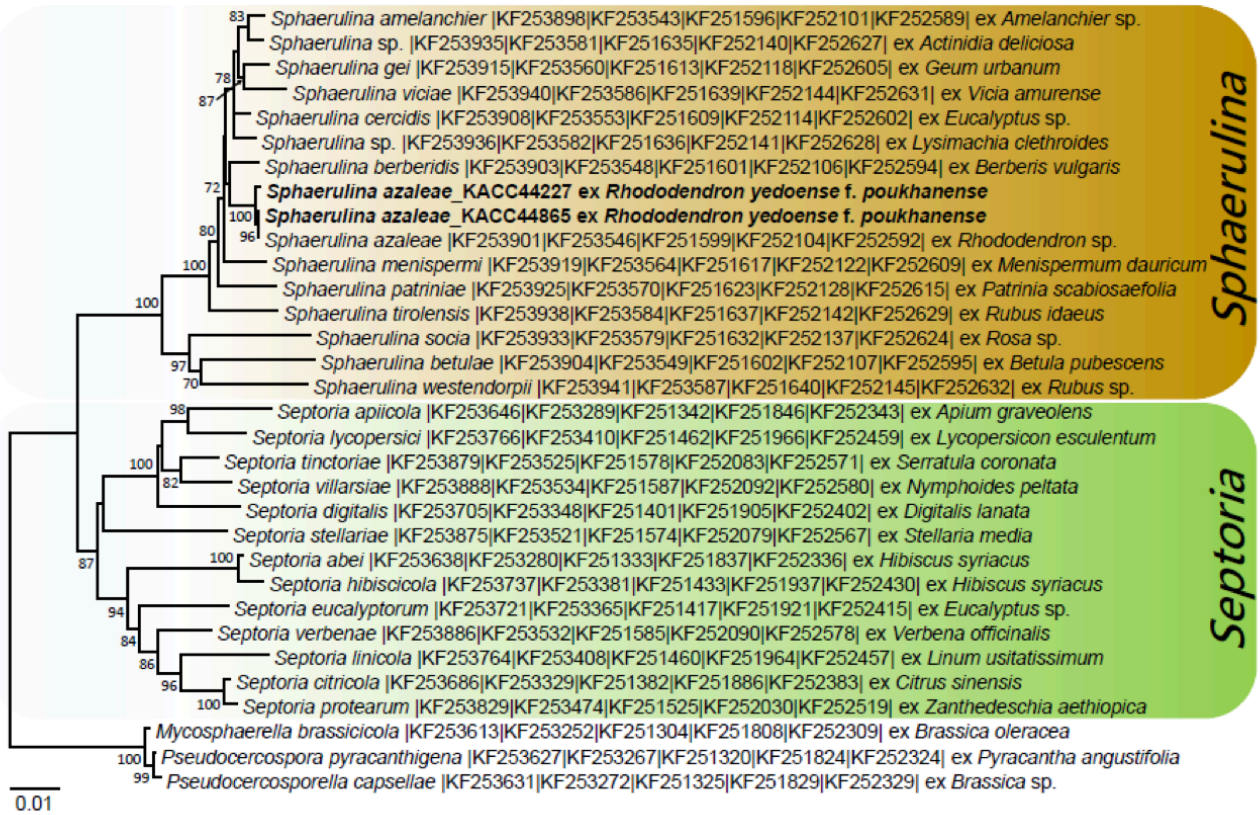

Fig. 2. Phylogenetic tree on *Sphaerulina* and *Septoria* species by a neighbor-joining method from the multigene dataset based on partial sequences of the actin (Act), translation elongation factor 1-alpha (EF), internal transcribed spacer (ITS), 28S nrDNA (LSU), and RNA polymerase II second largest subunitt (RPB2). The numbers above the nodes are the bootstrap values obtained from 1,000 replications. The Korean isolates presented in this study are indicated in bold.

고찰

1898년 이탈리아에서 *Azalea indica*의 잎에서 *S. azaleae*가 처음 보고되었다[13]. 1933년에는 미국 뉴저지주의 조경용 철쭉류 육묘장에서도 이 곰팡이의 감염으로 인한 심각한 피해가 보고되었다[14]. 아시아에서는 1931년 일본에서 최초로 보고되었다[15].

*S. azaleae*는 Priest [16]에 의해 *Phloeospora* 속으로 편입된 바 있으며, 최근에는 Quaedvlieg 등[2]이 *Sphaerulina* 속으로 소속시켰다. 결과적으로, 산철쭉 모무늬 증상에 관여하는 곰팡이는 *Sp. azaleae*가 정명으로 여겨진다.

*Sphaerulina*속은 220여 종이 있으며(Index Fungorum, http://www.indexfungorum.org), 점무늬 증상을 유발하는 다른 속과 비교할 때 형태적으로는 *Septoria*와 유사하지만 자낭포자 형태에 있어 차이를 보인다[17]. 분자적으로는 Verkley 등[3]과 Quaedvlieg 등[2]에 의해 ITS, LSU, RPB2, Btub, EF 유전자 dataset으로부터 *Septoria*와 이와 관련 속으로 분류되었다.

우리나라에서 산철쭉에는 모무늬 증상에 관여하는 곰팡이로 *Sphaerulina*속은 기록되지 않았다[1,18]. 본 연구를 통해 우리나라 산철쭉에서 모무늬 증상을 일으키는 곰팡이가 *Sp. azaleae*임이 확인되었다. 따라서, 산철쭉에 모무늬 증상에 관여하는 *Sp. azaleae*에 대한 병원성 검정이 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

적요

2008년부터 2017년도에 제주, 홍천 등에서 산철쭉에서 모무늬 증상을 나타내는 잎을 채집하였다. 산철쭉 모무늬 증상은 빈번하게 잎에만 발생하여 식물의 관상가치를 떨어트리고 조기낙엽을 유발하였다. 변색부는 잎의 윗면에 작고 담갈색 내지 흑자색 점무늬가 먼저 나타나며, 잎의 세맥으로 경계가 구분되어 모무늬 또는 부정형의 증상을 나타냈다. 산철쭉에서 분리한 균주를 동정하고자 형태적 특징과 actin (Act), translation elongation factor 1-alpha (EF), internal transcribed spacer (ITS), 28S nrDNA (LSU), RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) 염기서열을 분석하였다. 형태적 특징을 재확인한 염기서열 분석결과 *Sp. azaleae*와 99~100%의 상동성을 나타냈으며, 계통수를 작성하였을 때도 *Sp. azaleae* 계통군에 속하였다. 따라서 산철쭉에 모무늬 증상에 관여하는 곰팡이는 *Sp. azaleae*로 동정되었다.

ACKNOWLEDGMENT

This study was conducted with the support of the "Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry" (Project No. 320043-05), Republic of Korea.

REFERENCES

1. Farr DF, Rossman AY. Fungal databases. Systematic mycology & microbiology laboratory, ARS, USDA. Internet Resource; 2020 [cited 2020 Jul 24] Available from: http://ntars-gringov/fungaldatabases/.
2. Quaedvlieg W, Verkley GJN, Shin HD, Barreto RW, Alfenas AC, Swart WJ, Groenewald JZ, Crous PW. Sizing up *Septoria*. Stud Mycol 2013;75:307-90.
3. Verkley GJM, Quaedvlieg W, Shin HD, Crous PW. A new approach to species delimitation in *Septoria*. Stud Mycol 2013;75:213-305.
4. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 1999;91:553-6.
5. 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 Nat Acad Sci 1998;95:2044-9.

6. Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerse II subunit. Mol Biol Evol 1999;16:1799-808.
7. Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ, Verkley GJM, Seifbarghi S, Razavi M, Gohari AM, Mehrabi R, Crous PW. *Zymoseptoria* gen. nov.: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia: Mol Phylog Evol Fungi 2011;26:57-69.
8. Crous PW, Schoch CL, Hyde KD, Wood AR, Gueidan C, De Hoog GS, Groenewald JZ. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. Stud Mycol 2009;64:17-47.
9. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bacteriol 1990;172:4238-46.
10. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications 1990;18:315-22.
11. Groenewald JZ, Nakashima C, Nishikawa J, Shin HD, Park JH, Jama AN, Groenewald M, Braun U, Crous PW. Species concepts in *Cercospora*: Spotting the weeds among the roses. Stud Mycol 2013;75:115-70.
12. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013;30:2725-9.
13. Saccardo PA, Sydow P. *Septoria azaleae* Vogl. Italy: In Sylloge Fungorum XIV Patavii; 1898; p. 976.
14. White RP. The insects and diseases of rhododendron and azalea. J Econ Entomol 1933;26:631-40.
15. Hemmi T, Kurata S, Nakamura H, Hirayama S, Satoh S. Studies on septorioses of plants. II. *Septoria azaleae* Voglino causing the brown-spot disease of the cultivated azaleas in Japan. Memoirs Coll Agr Kyoto Imp Univ 1931;13:1-22.
16. Priest MJ. Fungi of Australia: *Septoria*. Canberra: ABRS CSIRO Publishing; 2006.
17. Crous PW, Tanaka K, Summerell BA. Additions to the *Mycosphaerella* complex. IMA Fungus 2001;2:49-64.
18. The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.