

RESEARCH ARTICLE

한국 내 *Alternaria alternata*에 의한 토마토 과실 검은곰팡이병

김완규^{1,2*}, 류제택², 최효원³¹글로벌농업컨설팅, ²부농종묘, ³국립농업과학원 작물보호과

Black Mold on Tomato Fruits Caused by *Alternaria alternata* in Korea

Wan-Gyu Kim^{1,2*}, Jae-Taek Ryu² and Hyo-Won Choi³¹Global Agro-Consulting Corporation, Hwaseong 18330, Korea²Bunong Seed Corporation, Suwon 16372, Korea³Crop Protection Division, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea

*Corresponding author: wgkim5121@naver.com

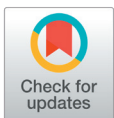
ABSTRACT

Black mold was frequently observed on tomatoes grown in a greenhouse in Suwon, Korea in July 2018. The incidence of the disease was 5.0-25.0% (average 12.3%) and 2.0-7.0% (average 3.7%) in the context of tomato and cherry tomato fruits, respectively. Sixteen single-spore isolates of *Alternaria* sp. were obtained from the diseased fruits and investigated for their morphological characteristics. Among the isolates, eight were used for sequencing analysis. All of the isolates were identified as *Alternaria alternata* based on their morphological and molecular characteristics. The pathogenicity of four isolates of *A. alternata* was investigated using three varieties each of tomato and cherry tomato via artificial inoculation. All of the isolates induced black mold symptoms on the inoculated tomato fruits. Notably, the symptoms were similar to those observed in the greenhouse. However, the pathogenicity tests revealed that different tomato varieties presented distinct patterns of susceptibility to the isolates. This is the first report of *A. alternata* causing black mold on tomato fruits in Korea.

Keywords: *Alternaria alternata*, Black mold, Pathogenicity, Tomato

서론

토마토는 남아메리카에서 기원하여 여러 대륙으로 전래되었으며, 중요한 과채류의 일종으로 온대 지역을 중심으로 많이 재배되고 있다[1]. 일반적으로 재배되는 토마토는 대과종인 일반토마토(*Solanum lycopersicum* L.)와 소과종인 방울토마토(*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) D. M. Spooner, G. J. Anderson & R. K. Jansen)로 나누어진다. 한국에서도 이 두 종류의 토마토가 전국적으로 재배되고 있으며, 상품용은 대부분 온실에서 재배되고, 일부 자가 소비인 경우에는 노지포장에서도 재배되고 있다.



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2020 December, 48(4): 369-379
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200036>

Received: September 01, 2020

Revised: November 01, 2020

Accepted: November 10, 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.

토마토에는 바이러스, 세균, 균류 등에 의해 세계적으로 80 여종의 병이 발생하는 것으로 보고되어 있다[1]. 한국에서는 토마토에 30 여종의 병이 발생하는 것으로 기록되어 있으며[2], 이 중에서 토마토의 과실에 발생하는 주요 병으로는 잿빛곰팡이병, 겹무늬병, 탄저병 등이다.

저자들은 수원의 부농종묘 본사에 있는 토마토 시험재배 온실에서 수확기의 일부 토마토 과실에 약간 물러쓰는 증상과 함께 검은곰팡이가 많이 발생한 것을 발견하고 시료를 채취하여 조사한 결과, 병반에는 *Alternaria*균의 분생포자가 밀생하고 있었다. *Alternaria*균에는 많은 종이 존재하고, 다양한 식물에서 발생하고 있는 것으로 보고되었으며[3,4], 대부분 기주식물의 과, 속 혹은 종에 대한 특이성에 따라 병을 일으키나, 어떤 종은 비병원성 계통 혹은 기주식물의 품종 저항성으로 인해 병을 일으키지 못하는 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 저자들은 토마토 재배 온실에서 발생한 검은곰팡이병 증상이 토마토 과실에 일차적으로 발생하여 피해를 일으키는 병인지, 아니면 생리장애 혹은 환경장애와 더불어 *Alternaria*균이 부생적으로 발생한 증상인지 밝히고자 본 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

병 발생 조사

2018년 7월 중 한국의 수원에 위치한 부농종묘 회사의 온실에서 재배 중인 토마토의 과실에 검은곰팡이병 증상이 발생하여 채집한 시료를 해부현미경과 광학현미경으로 관찰한 결과, *Alternaria*균이 밀생하고 있었다. 검은곰팡이병 증상은 토마토 과실의 수확기에 이르러 심하게 발생하여 저자들은 이 병의 발생 양상을 조사하고, 일반토마토 및 방울토마토를 대상으로 각 종류 별로 과실 100개를 대상으로 3반복으로 발생률을 조사하였다.

병원균의 분리, 형태적 및 배양적 특성 조사

채집한 시료의 병반상에 형성된 *Alternaria*균의 형태적 특성을 광학현미경(Nikon Eclipse Ci-L, NIKON Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 조사하고, 고압멸균된 증류수로 분생포자현탁액을 만들어 water agar(WA, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan)에서 분산배양한 다음, 단포자를 분리하였다. 단포자 분리 균주는 potato dextrose agar (PDA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)에서 배양 후 저온항온기에 보존하면서 동정 및 병원성 검정을 위해 사용하였다.

분리 균주의 형태적 및 배양적 특성을 조사하기 위하여 각 균주를 PDA에 이식 후 매일 12시간 주기의 형광등이 조사되는 26°C 항온기 내에서 15일간 배양하였다. 배양후 형성된 분생포자의 형태와 크기를 광학현미경으로 조사하고, 균총의 형태를 관찰하였다. 또한 PDA 배지에서 자란 균총을 직경 6 mm 크기로 떼어내어 WA에 이식 후 26°C 항온기 내에서 7-10일간 배양하면서 분생자경과 분생포자의 형성 양상과 형태를 광학현미경으로 조사하였다. 조사한 결과는 전 연구자들[3,4]이 기술한 *Alternaria*균의 형태적 특성과 비교하여 공시균주의 동정에 참고하였다.

분리 균주의 DNA 추출 및 염기서열 분석

분리한 *Alternaria* sp. 균주 중에서 선발한 8개 균주의 genomic DNA를 추출하기 위하여 potato dextrose broth (PDB) 배지에 각 균주를 이식하여 25°C에서 정치배양하였다. 배양 7일 후, miracloth를 이용하여 균사체를 회수하고 동결건조 후, 곱게 마쇄하여 Choi 등[6]의 방법으로 genomic DNA를 추출하고, -20°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

공시균주의 DNA 염기서열 분석은 Woudenberg 등[7]의 방법을 참고하여 internal transcribed spacers and intervening 5.8S rDNA (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), *Alternaria* major allergen gene (Alt a 1), RNA polymerase second largest subunit (RPB2), endopolygalacturonase (endoPG) 부위를 대상으로 실시하였다.

각 부위의 PCR 증폭은 각각 ITS1F/ITS4 4[8], gpd1/gpd2[9], Alt-for/Alt-rev[10], RPB2-5F2/fRPB2-7cR[11,12], PG3/PG2b[13] 프라이머쌍을 사용하였다. PCR 반응액은 100 ng/μL의 template DNA, 10 × Taq buffer, 2 mM dNTPs, 10 pmole/μL의 각 프라이머쌍, 0.5 unit의 Taq DNA polymerase를 총량 50 μL로 조제하였고, PCR 증폭된 밴드는 1% agarose gel에 전기영동한 후 염색하여 관찰하였다. 밴드가 확인된 PCR 산물은 Wizard SV Gel & PCR Clean-up System kit (Promega, San Luis Obispo, CA, USA)를 사용하여 정제한 후, direct sequencing을 통해 염기서열을 분석하였다.

분석된 염기서열은 각각 Clustal W 소프트웨어를 이용하여 정렬하였고, nucleotide의 유사도를 계산하고, MEGA 6.0 프로그램을 이용하여[14] 5개 부위의 염기서열을 중합한 다음, Maximum Likelihood 분석법으로 계통수를 작성하였다. 계통수 작성을 위한 reference 균주 및 염기서열 정보는 Table 1에 표기하였으며, outgroup으로는 *Porri* section에 속하는 *A. solani* CBS 109157을 사용하였다.

병원성 검정

분리한 *Alternaria* sp. 균주 중에서 일반토마토와 방울토마토 분리 각 2균주씩 공시하여 일반토마토와 방울토마토 과실에 대한 병원성 검정을 수행하였다. 접종원을 만들기 위해 각 공시균주를 PDA에 이식 후 26°C 항온기 내에서 15일간 배양 후 형성된 분생포자를 고압멸균된 증류수에 현탁하여 분생포자현탁액을 만들었다. 각 분생포자현탁액의 분생포자 농도는 혈구계산기 (hemocytometer)를 사용하여 3.4×10^5 개/mL로 조정하였다.

접종용 토마토 과실은 완숙기에 수확한 각 3품종의 일반토마토와 방울토마토의 건전한 과실을 사용하였다. 각 품종의 과실을 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액에 5분간 침지 후 고압멸균된 증류수로 세척한 다음 물기를 제거하고, 습식처리된 플라스틱상자(29.0×22.5×12.0 cm)에 측면을 상하로 하여 넣고, 공시균주의 각 분생포자현탁액을 과실의 중간 부위에 20 μL씩 떨어뜨려 맺히게 하였다. 접종은 무상처접종과 상처접종으로 나누어 실시하였으며, 상처접종인 경우에는 과실에 떨어뜨려 맺힌 분생포자현탁액의 중앙 부위를 바늘 끝으로 약 1 mm 깊이로 찔러 상처를 유발하였다. 접종한 토마토 과실이 든 상자는 26°C의 항온기 넣고 7일간 배양 후 꺼내어 과실 표면에 형성된 병반의 형태 및 크기를 조사하였다. 병원성 검정 실험은 3반복으로 수행하였으며, 대조구의 토마토 과실에는 고압멸균된 증류수를 사용하여 접종을 실시하였다.

Table 1. Strains and Genbank accession number used in the phylogenetic analysis of *Alternaria* species in this study

Species/strain number ^a	Locality, host	Genbank accession number ^a				
		ITS	GAPDH	RPB2	Alt a 1	endoPG
<i>A. alternata</i>						
CBS 916.96 ^T	India, <i>Arachis hypogaea</i>	AF347031	AY278808	KC584375	AY563301	JQ811978
CBS 966.95(<i>A. tenuissima</i>)	India, <i>Solanum lycopersicum</i>	KP124324	KP124179	KP124792	KP123873	KP124024
CBS 918.96(<i>A. tenuissima</i> ^R)	UK, <i>Dianthus chinensis</i>	AF347032	AY278809	KC584435	AY563302	KP124026
CBS 113013(<i>A. tenuissima</i>)	South Africa, <i>Malus domestica</i>	KP124341	KP124195	KP124809	KP123889	KP124042
CBS 117143	Italy, <i>Capsicum annuum</i>	KP124355	KP124209	KP124823	KP123903	KP124056
CBS 118814(<i>A. tomaticola</i> ^T)	USA, <i>Solanum lycopersicum</i>	KP124357	KP124211	KP124825	KP123906	KP124059
<i>A. arborescens</i> species complex						
CBS 102605 ^T	USA, <i>Solanum lycopersicum</i>	AF347033	AY278810	KC584377	AY563303	AY295028
<i>A. burnsii</i>						
CBS 107.38 ^T	India, <i>Cuminum cyminum</i>	KP124420	JQ646305	KP124889	KP123967	KP124124
CBS 879.95(<i>A. tenuissima</i>)	UK, <i>Sorghum</i> sp.	KP124422	KP124272	KP124891	KP123969	KP124126
<i>A. gaisen</i>						
CBS 632.93 ^R	Japan, <i>Pyrus pyrifolia</i>	KC584197	KC584116	KC584399	KP123974	AY295033
CBS 118488 ^R	Japan, <i>Pyrus pyrifolia</i>	KP124427	KP124278	KP124897	KP123975	KP124132
<i>A. longipes</i>						
CBS 121332 ^R	USA, <i>Nicotiana tabacum</i>	KP124443	KP124292	KP124913	KP123989	KP124149
CBS 121333 ^R	USA, <i>Nicotiana tabacum</i>	KP124444	KP124293	KP124914	KP123990	KP124150
<i>A. tomato</i>						
CBS 103.30	Unknown, <i>Solanum lycopersicum</i>	KP124445	KP124294	KP124915	KP123991	KP124151
CBS 114.35	Unknown, <i>Solanum lycopersicum</i>	KP124446	KP124295	KP124916	KP123992	KP124152
<i>A. solani</i> (<i>Porri</i> section)						
CBS 109157	USA, <i>Solanum tuberosum</i>	KJ718238	KC584139	KJ718413	KJ718746	KY561992 ^b

^a T: ex-type isolate; R: representative isolate; species names in parentheses refer to the former species name. ITS: internal transcribed spacers and intervening 5.8S rDNA; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; RPB2: RNA polymerase second largest subunit; Alt a 1: *Alternaria* major allergen gene; endoPG: endopolygalacturonase.

^b KY561992 indicated Genbank accession number of the relevant gene of another *A. solani* strain.

결과 및 고찰

병 발생 및 병원균 분리

2018년 7월에 한국의 수원에 있는 온실 재배 토마토의 과실에 발생한 검은곰팡이병 증상은 초기에는 과실의 표면이 약간 움푹 들어가며 수침상으로 썩고, 진전되면 병반이 원형 내지 부정형으로 확대되며, 병반에는 검은곰팡이가 우단 모양으로 밀생하였다(Fig. 1). 심하게 병든 과실은 전체적으로 물러 썩었다. 이 병은 대과종인 일반토마토와 방울토마토에서 모두 발생하였으며, 병 증상도 유사하였다.

토마토 과실에 발생한 검은곰팡이병의 발생률을 조사한 결과, 일반토마토에서는 5.0-25.0%(평균 12.3%)였으며, 방울토마토에서는 2.0-7.0%(평균 3.7%)였다. 병든 과실을 광학현미경으로 조사한 결과, 모든 병반에서는 *Alternaria*균이 관찰되었다. 각 병반으로부터 *Alternaria*균의 분생포자현탁액을 만들어 WA에서 단포자를 분리하여 일반토마토 분리 10균주, 방울토마토 분리 6균주를 확보하였다.



Fig. 1. Symptoms of black mold on fruits of tomatoes observed in the greenhouse. A and B, symptoms produced on tomato fruits; C and D, symptoms produced on cherry tomato fruits.

병원균의 형태적 및 배양적 특성

토마토 과실의 병반에서 분리한 *Alternaria*균의 분생포자는 난형 내지 타원형 또는 곤봉형이고, 담황갈색을 띠며, 횡격막 2-9개, 종격막 1-4개를 가지고 있었다(Fig. 2A). 분리 균주를 WA에서 배양하여 관찰한 결과, 분생포자가 분생자경의 끝에서 연쇄적으로 형성되었다(Fig. 2B). PDA에서 형성된 균총은 회색 내지 흑색이고, 균총에서는 균사와 함께 분생자경과 분생포자가 많이 형성되었다(Fig. 2C).

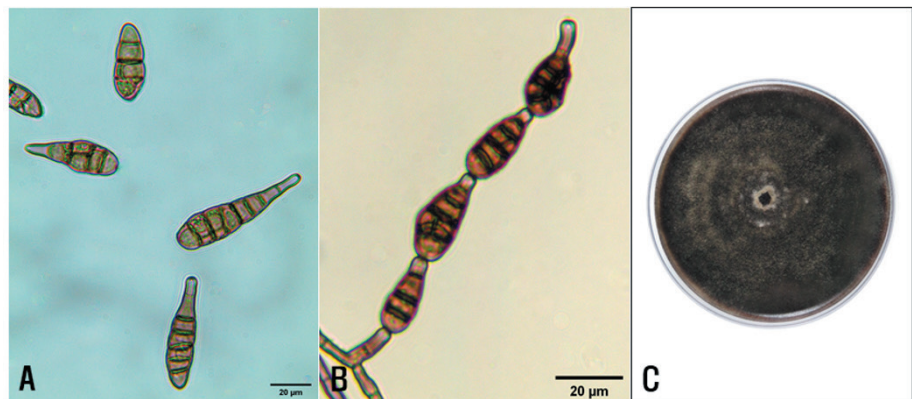


Fig. 2. Morphology and cultural appearance of *Alternaria* sp. isolated from tomato fruits. A, conidia isolated from a lesion of black mold; B, a conidial chain produced on a conidiophore in WA culture; C, a colony of an isolate grown on PDA at 26°C for 15 days in alternating cycles of 12 hr fluorescent light and 12 hr darkness.

병반에서 분리한 분생포자의 크기는 $29.0\text{--}82.2 \times 11.7\text{--}19.0 \mu\text{m}$ (평균 $47.8 \times 14.0 \mu\text{m}$) 이고, 비크 (beak)는 없거나 있는 경우 짧은 원추형 내지 원통형으로 그 크기는 $2.0\text{--}16.0 \times 3.2\text{--}5.6 \mu\text{m}$ (평균 $8.7 \times 4.6 \mu\text{m}$)였다. 분생자경은 곧거나 굴곡성이고, 그 폭은 $3.2\text{--}5.2 \mu\text{m}$ (평균 $4.5 \mu\text{m}$)였다. PDA에서 형성된 분생포자의 크기는 $13.0\text{--}57.5 \times 7.3\text{--}17.5 \mu\text{m}$ (평균 $31.0 \times 11.6 \mu\text{m}$)로 병반에서 분리된 분생포자에 비해 크기가 작았다. 분리 균주들의 PDA에서 형성된 분생포자와 분생자경의 형태적 특성은 전 연구자들[3, 4]이 기술한 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.의 형태적 특성과 매우 유사하였다(Table 2). 따라서 본 연구에서 분리한 *Alternaria*균은 형태적으로 *A. alternata*와 같은 종으로 동정되었다. 저자들의 조사 결과와 마찬가지로 합성배지에서 형성된 *A. alternata*의 분생포자 크기는 자연서식지에서 형성된 분생포자 크기보다 작고, 합성배지의 종류에 따라 분생포자의 크기에 차이가 있는 것으로 보고되었다[5, 15].

Table 2. Morphological characteristics of *Alternaria alternata* isolates from diseased tomato fruits and the fungal morphology described by previous researchers

Structure	Present isolates	Ellis [3]	Simmons [4]
Conidiophores	Simple or branched, straight or flexuous, sometimes geniculate, $8.4\text{--}107.5 \times 3.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$ (average $33.6 \times 4.5 \mu\text{m}$)	Simple or branched, straight or flexuous, sometimes geniculate, up to $50 \mu\text{m}$ long, $3\text{--}6 \mu\text{m}$ thick	Simple or 1-3 branched, geniculate, comparatively short, $40\text{--}70 \times 3\text{--}4 \mu\text{m}$
Conidia	Formed in long chains, obclavate, ovoid or ellipsoidal, pale to dark brown, with 1-7 transverse septa, 1-4 or no longitudinal septa, $13.0\text{--}57.5 \times 7.3\text{--}17.5 \mu\text{m}$ (average $31.0 \times 11.6 \mu\text{m}$) on potato dextrose agar	Formed in long chains, obclavate, obpyriform, ovoid or ellipsoidal, pale to mid golden brown, with up to 8 transverse septa, several longitudinal septa, $20\text{--}63 \times 9\text{--}18 \mu\text{m}$ (average $37 \times 13 \mu\text{m}$)	Formed in chains, ovoid, ellipsoid or subsphaeroid, olivaceous, dull grey-green-brown, with 1-7 transverse septa and 1-2 or no longitudinal septa, $13\text{--}43 \times 8\text{--}14 \mu\text{m}$ on V8 juice agar
Beak of conidia	Short conical or cylindrical, pale brown, $2.0\text{--}12.2 \times 3.2\text{--}5.6 \mu\text{m}$ (average $5.1 \times 4.3 \mu\text{m}$)	Short conical or cylindrical, pale, not more than one third the length of the conidium, $2\text{--}5 \mu\text{m}$ thick	No description

병원균의 염기서열 분석 결과

형태적 특성에 의해 *A. alternata*로 동정된 16균주 중에서 8균주를 선발하여 염기서열 분석 실험에 공시하였다. 공시균주들에 대한 염기서열 분석을 위하여 ITS, *gapdh*, Alt a 1, *rpb2* 및 endoPG 유전자 부위를 PCR로 증폭한 결과, 각각 약 530 bp, 510 bp, 420 bp, 730 bp 및 450 bp의 크기로 증폭되었다. 5개 유전자 부위의 염기서열을 정렬하여 분석한 결과, 공시균주는 모두 *A. alternata* reference 균주들과 같은 group에 속하였다. 공시한 8균주 중 2균주(ALS-3, ALS-7)는 *A. alternata* CBS 918.96 등 5균주와 같은 group으로 나타났고, 6균주(ALS-1, ALS-5, ALS-11, ALS-12, ALS-14, ALS-15)는 *A. alternata* CBS 118814와 같은 group으로 나타났다(Fig. 3). 따라서 본 연구의 공시균주들은 *A. alternata* reference 균주들과의 유사성 분석 결과, 2개의 유전적 group으로 나누어졌다. 이 결과는 토마토 잎마름증상에서 분리한 *A. alternata* 균주를 대상으로 *gapdh*, Alt a 1, *rpb2* 유전자로 계통 분석을 했을 때, 여러 개의 subgroup으로 구분되는 연구 결과[16]와 유사하였다. 추후 본 연구 결과 구분된 *A. alternata* 균주들의 2개 유전적 group에 대한 특성 구명 연구가 필요할 것으로 생각된다.

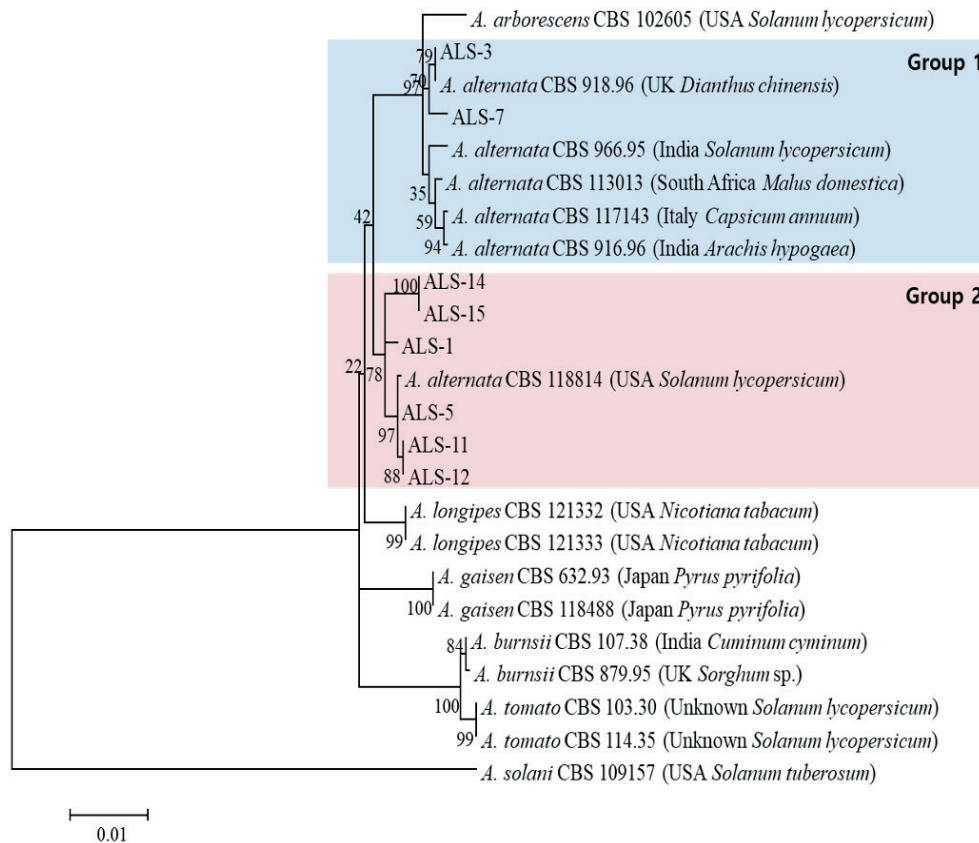


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the internal transcribed spacers and intervening 5.8S (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*), *Alternaria* major allergen gene (Alt a 1), RNA polymerase second largest subunit (*rpb2*), and endopolygalacturonase (endoPG) genes sequence data for *Alternaria alternata* isolates from diseased tomato fruits and reference species. Sequence data were obtained from the NCBI GenBank database. The tree was generated using Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model. The bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

Alternaria section에 속하는 종들은 ITS 영역의 염기서열 분석에 의해서는 다른 종과 구분이 되지 않는 것으로 알려져 있으며[16], Woudenberg 등[7]에 의하면 *rpb2*, OPA10-2(anonymous gene region), Alt a 1, endoPG, KOG1058(eukaryotic orthologous group protein loci) 등 5개 유전자에 의해 종이 구분된다고 하였다. 이와 유사하게 본 연구에서도 ITS 영역 분석 결과, 공시균주와 *Alternaria* section에 속하는 종들은 99.2-100.0%의 유사도를 나타내어 종간 구분이 불가능하였다. *gapdh*, endoPG 유전자의 경우, 공시균주와 *A. alternata* reference 균주들은 99.1-100.0%의 유사도를 보였으나, 다른 종인 *A. arborescens* CBS 102605와도 98.9-100.0%의 유사도를 나타내어 두 종을 구분할 수 없었다. *rpb2* 유전자의 경우에는 공시균주가 *A. alternata* reference 균주와 98.2-100.0%의 유사도를 보였다. 한편 공시균주 중 ALS-3과 ALS-7은 Alt a 1 유전자의 경우 *A. alternata* reference 5개 균주와 100.0%의 유사도를 나타냈으며, 나머지 6개 공시균주는 *A. alternata* CBS 118814와 99.5-99.8%의 유사도를 나타냈다. 이와 같이 *A. alternata*가 속한 *Alternaria* section은 유전적으로 매우 높은 다양성을 보이고, 1-2개의 마커에 의한 계통유전 분석으로는 종간 구분이 명확하지 않기 때문에 이 분류군에 속하는 종에 대해서는 적어도 3개 이상의 유전자 영역 염기서열 분석이 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 분석된 각 균주의 염기서열은 NCBI Genbank에 등록하였고, accession number는 Table 3에 기술하였다.

Table 3. List of *Alternaria alternata* isolates from diseased tomato fruits and GenBank accession numbers in this study

Isolate	Location	Source	GenBank accession number ^a				
			ITS	Alt a 1	endoPG	gapdh	rpb2
ALS-1	Suwon	<i>Solanum lycopersicum</i>	MT322777	MT333535	MT333543	MT333551	MT333558
ALS-3	Suwon	<i>Solanum lycopersicum</i>	MT322778	MT333536	MT333544	-	MT333559
ALS-5	Suwon	<i>Solanum lycopersicum</i>	MT322779	MT333537	MT333545	MT333552	MT333560
ALS-7	Suwon	<i>Solanum lycopersicum</i>	MT322780	MT333538	MT333546	MT333553	MT333561
ALS-11	Suwon	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	MT322781	MT333539	MT333547	MT333554	MT333562
ALS-12	Suwon	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	MT322782	MT333540	MT333548	MT333555	MT333563
ALS-14	Suwon	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	MT322783	MT333541	MT333549	MT333556	MT333564
ALS-15	Suwon	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	MT322784	MT333542	MT333550	MT333557	MT333565

^aITS: internal transcribed spacers and intervening 5.8S nrDNA; Alt 1 a: *Alternaria* major allergen gene; endoPG: endopolygalacturonase gene; gapdh: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; rpb2: RNA polymerase II subunit gene.

병원성

토마토 과실의 검은곰팡이병 증상으로부터 분리한 4균주의 *A. alternata*를 공시하여 일반토마토와 방울토마토 과실에 대한 병원성 검정을 수행한 결과, 4균주 모두 병원성을 나타냈으며, 토마토의 품종에 따라 병반 형성의 정도에 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 4). 접종실험에 의해 형성된 병반은 조사 온실에서 관찰된 병반과 유사하였으며(Fig. 4), 대조구의 토마토 과실에서는 병반이 형성되지 않았다. 접종 병반에서는 접종한 병원균과 동일한 *A. alternata*가 분리되었다.

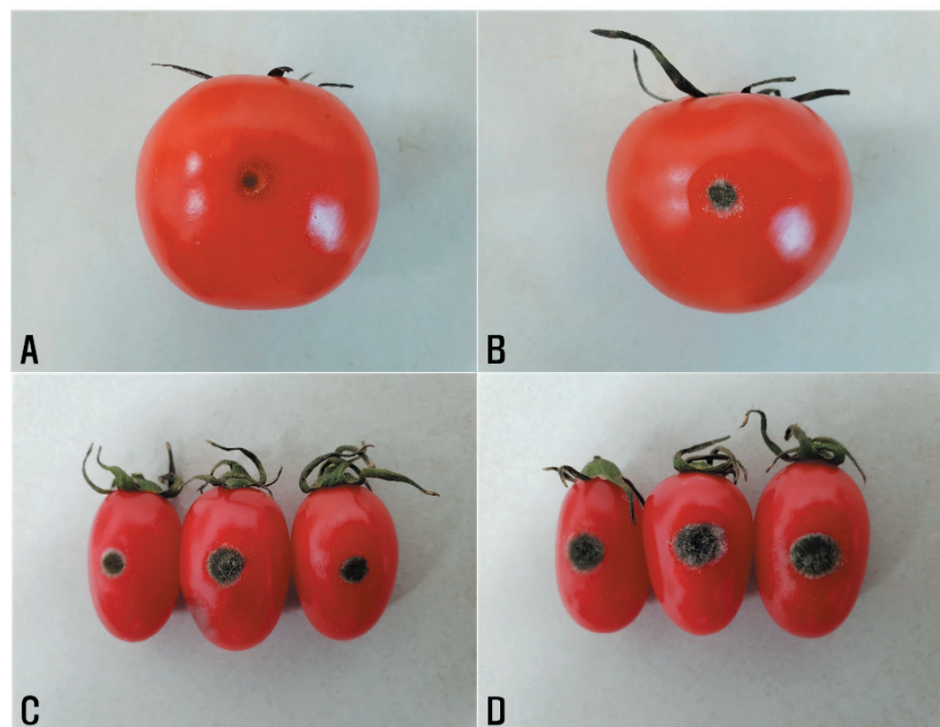


Fig. 4. Symptoms of black mold on fruits of tomatoes induced by artificial inoculation with isolates of *Alternaria alternata*. A and B, symptoms of black mold produced on a non-wounded fruit (left) and a wounded fruit (right) of tomato inoculated, respectively; C and D, symptoms of black mold produced on non-wounded fruits (left) and wounded fruits (right) of cherry tomato inoculated, respectively.

Table 4. Result of pathogenicity tests of *Alternaria alternata* isolates on fruits of tomato and cherry tomato

Isolate No.	Virulence of isolates on fruits of tomato varieties						Virulence of isolates on fruits of cherry tomato varieties					
	BNL-1802		BNL-1807		BNL-1822		BNS-1802		BNS-1810		BNS-1812	
	Non-wounded	Wounded	Non-wounded	Wounded	Non-wounded	Wounded	Non-wounded	Wounded	Non-wounded	Wounded	Non-wounded	Wounded
ALS-1	+++ ^a	+++	+++	+++	-	+	-	+++	+	+++	-	+++
ALS-5	+	+++	++	+++	-	+	++	++	++	+++	+	+
ALS-11	+	+	+	++	-	++	+	++	++	++	+	+++
ALS-12	-	+	+	++	+	++	+	++	++	+++	-	++
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aPathogenicity was rated based on the lesion formation seven days after inoculation. +++, above 10 mm of lesion diameter; ++, 6~9 mm of lesion diameter; +, 3~5 mm of lesion diameter; -, no symptom.

병원성 검정 결과, 공시균주 중 ALS-1은 토마토 품종 BNL-1802와 BNL-1807에 대해서는 상처 접종과 무상처접종 모두 병반 형성을 잘하였으나, 대부분의 균주는 무상처접종보다는 상처접종에 의해서 병반 형성을 잘하는 것으로 나타났다. 공시균주들의 일반토마토와 방울토마토 과실에 대한 발병 특이성은 없는 것으로 나타났다.

*A. alternata*에 의한 토마토 과실의 검은곰팡이병은 포장이나 온실에서 햇빛 혹은 곤충 등에 의한 상처 부위나 조직의 쇠약한 부위에서 잘 발생하는 것으로 알려져 있다[1,5]. 본 연구의 병원성 검정 결과에서도 무상처접종보다는 상처접종에 의해 발병이 촉진되는 것으로 나타났다. 또한 이 병은 토마토 과실의 저장 중에도 발생하며, 본 연구의 병원성 검정 결과에서 나타난 바와 같이 이 병에 대한 토마토 과실의 감수성은 품종간에 차이가 있는 것으로 보고되었다[5].

*A. alternata*는 많은 종류의 식물에 병을 일으키나, 일부 식물에는 병을 일으키지 못하는 이차감염균으로 알려져 있으며, 어떤 계통은 기주 특이적 독소 형성과 함께 작물의 품종에 대한 발병 특이성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[5]. 이 균은 외국에서 토마토의 과실에서는 검은곰팡이병을 일으키고, 줄기에서는 줄기마름병을 일으키는 것으로 보고되었으며[1], 줄기마름병을 일으키는 계통은 AAL-toxin이라는 기주 특이적 독소를 생성하는 것으로 보고되었다[17].

한국에서는 *A. alternata*에 의한 토마토 줄기마름병 발생이 보고되었으나[18], 토마토 과실의 검은곰팡이병 발생은 보고된 바 없다. 본 연구를 통하여 토마토의 검은곰팡이병 발생은 한국에서 처음으로 확인되었으며, 저자들이 이 병이 발생한 토마토 재배온실에서 병 발생을 조사하는 동안 이 균에 의한 줄기마름병은 관찰되지 않았다. 따라서 앞으로 이 균의 토마토 과실에 대한 발병 특이성 및 줄기에 대한 병원성 구명이 필요할 것으로 생각된다.

적요

2018년 7월에 한국의 수원에 있는 온실 재배 토마토의 과실에서 검은곰팡이병이 빈번하게 관찰되어 발생률을 조사한 결과, 일반토마토에서 5.0-25.0%(평균 12.3%), 방울토마토에서 2.0-7.0%(평균 3.7%)였다. 병든 과실의 병반에서 16개의 *Alternaria* 균을 단포자 분리하여 형태적 특성을 조사하고, 이 중에서 8균주를 공시하여 염기서열 분석을 실시하였다. 분리 균주들에 대한 형태적 및 분자생물학적 특성을 조사한 결과, 모두 *Alternaria alternata*로 동정되었다. 4균주의 *A. alternata*를 공시하여 각각 3품종의 일반토마토와 방울토마토 과실에 대한 병원성 검정을 실시한 결과, 접종 균주 모두 온실에서 관찰된 것과 같은 검은곰팡이병 증상을 유발하였다. 또한 병원성

검정 결과, 공시 토마토 품종들의 과실은 접종 균주들에 대한 감수성에 있어서 차이가 있는 것으로 나타났다. 본 연구 결과, 한국 내 *A. alternata*에 의한 토마토 과실의 검은곰팡이병 발생을 처음으로 보고한다.

REFERENCES

1. Jones JB, Zitter TA, Momol TM, Miller, SA. Compendium of Tomato Diseases and Pests. Second edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA: APS Press; 2014.
2. The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. Fifth edition. Suwon, Korea: The Korean Society of Plant Pathology; 2009.
3. Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute; 1971. p. 465-6.
4. Simmons EG. *Alternaria*, An Identification Manual. Utrecht, the Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre; 2007. p. 582-4.
5. Rotem, J. The Genus *Alternaria*, Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA: APS Press; 1994.
6. Choi HW, Kim JM, Hong SK, Kim WG, Chun SC, Yu SH. Mating types and optimum culture conditions for sexual state formation of *Fusarium fujikuroi* isolates. Mycobiology 2009;37:247-50.
7. Woudenberg JHC, Seidl MF, Groenewald JZ, de Vries M, Stielow JB, Thomma BPHJ, Crous PW. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, *formae speciales* or pathotypes? Stud Mycol 2015;82:1-21.
8. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and application. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
9. Berbee M, Pirseyedi M, Hubbard S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 1999;91:964-77.
10. Hong SG, Cramer RA, Lawrence CB, Pryor BM. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. Fungal Genet Biol 2005;42:119-29.
11. Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. Mol Phylogenet Evol 2007;44:1204-23.
12. Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. Mol Biol Evol 1999;16:1799-808.
13. Andrew M, Peever T, Pryor BM. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. Mycologia 2009;101:95-109.
14. Tamura K, Stecher G, Peteson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013;30:2725-9.

15. Misaghi RG, Grogan RG, Duniway JM, Kimble KA. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 1978;68:29-34.
16. El Gobashy SF, Mikhail WZA, Ismail AM, Zekry A, Moretti A, Susca A, Soliman AS. Phylogenetic, toxigenic and virulence profiles of *Alternaria* species causing leaf blight of tomato in Egypt. *Mycol Prog* 2018;17:1269-82.
17. Gilchrist DG, Grogan RG. Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 1976;66:165-71.
18. Choi TJ, Chung HS, Lee YW. Occurrence of tomato stem canker in Korea and phytotoxin production by the pathogen. *Korean J Plant Pathol* 1989;5:32-9.