

*Lasiodiplodia pseudotheobromae*에 의한 장미 가지썩음병의 발생 보고

First Report of Die-Back on Rose (*Rosa hybrida*) Caused by *Lasiodiplodia pseudotheobromae* in Korea

위정인^{1,2} · 백창기¹ · 박미정¹ · 장태현² · 박종한^{1*}

¹국립원예특작과학원 원예특작환경과, ²경북대학교 생태환경시스템학과

Jung-In Wee^{1,2}, Chang-Gi Back¹, Mi-Jeong Park¹, Taehyun Chang², and Jong-Han Park^{1*}

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-6310

Fax: +82-63-238-6305

E-mail: pjhn@korea.kr

¹Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Wanju 55365, Korea

²School of Ecology & Environmental System, College of Ecology & Environmental Sciences, Kyungpook National University, Sangju 37224, Korea

In 2015, symptoms of die-back on *Rosa hybrida* were observed in Taean, Korea. The aims of this study were to determine the cause of die-back on *Rosa hybrida* and characterize the pathogen. The fungal isolates were obtained and used for pathogenicity test, morphological and molecular analyses. The pathogenicity test on healthy branches of *Rosa hybrida* produced die-back, as the original symptoms. For the morphological study, the isolates were inoculated onto potato dextrose agar and incubated for 7 days at 25°C. The colonies grew up quickly and turned white to gray in color. Conidia were observed under an optical microscope. The features of conidia were ellipsoidal, grayish brown in color, 20–31×11–17 μm in size and had one septum. Molecular analyses of the ITS region, TEF and TUB genes were conducted to confirm the identity of the pathogen. The phylogenetic tree of the multi-gene sequences indicated that the causal agent was *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. This study is the first report of die-back caused by *Lasiodiplodia pseudotheobromae* on Rose (*Rosa hybrida*).

Keywords: Botryosphaeriaceae, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, Rose die-back, *Rosa hybrida*, Rose pathogen

Received August 10, 2017

Revised September 7, 2017

Accepted September 19, 2017

장미(*Rosa hybrida*)는 장미과의 다년생 식물로 세계적으로 인기 있는 작물 중 하나이다. 장미는 주로 정원의 관상식물과 긴 저장성을 가지고 있어 절화용으로 많이 이용되며 향수 산업에서도 에센셜 오일의 재료로 사용되어 수요가 많다(Madhu와 Kanwar, 2015; Marchant 등, 1998). 이로 인해 새로운 품종의 요구도도 높아 장미에 대한 연구가 계속적으로 진행되고 있다

(Han 등, 2006). 장미에 발생하는 주요 병해로는 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병, *Colletotrichum gloeosporioides*에 의한 탄저병, *Pestalotiopsis longisetula*에 의한 점무늬병, *Diplocarpon rosae*에 의한 검은무늬병, *Sphaerotheca pannosa*에 의한 흰가루병, *Coniothyrium fuckelii*에 의한 가지마름병, *Fusicoccum* sp.에 의한 줄기마름병이 보고되어 있다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 2015년 12월에 충청남도 태안군의 장미 재배하우스에서 품종 '오션송'의 가지가 갈변되어 썩고 검은 포자체가 형성되어 있는 증상이 발견되었으며 재배하는데 큰 피해를 주고 있었다. 발병된 장미가지를 원인균을 찾기 위해 채

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

© The Korean Society of Plant Pathology

© 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.

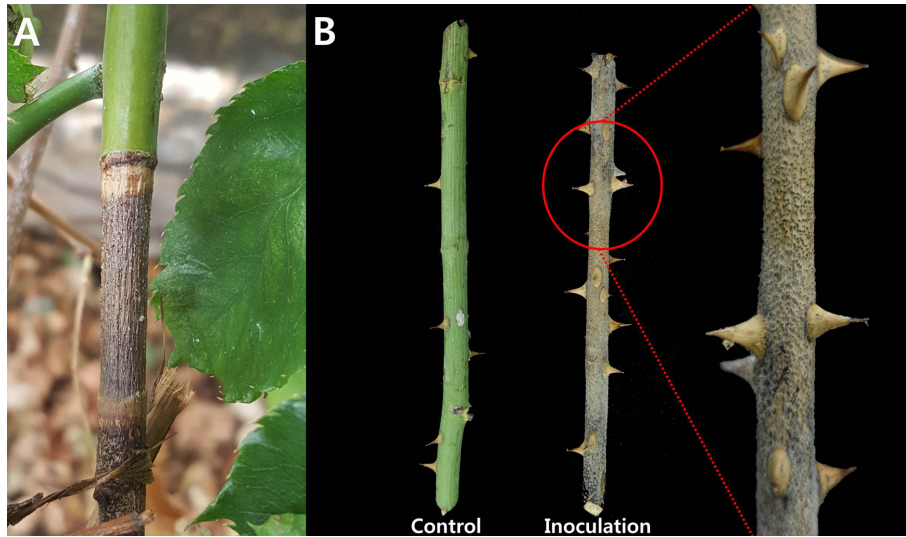


Fig. 1. Symptoms of die-back on *Rosa hybrida*. (A) Typical symptoms in a greenhouse. (B) Symptoms of artificial inoculation using branches.

집하였으며 병든 장미가지에서 자라난 균사체를 순수 분리하였다. 그 결과, 앞서 보고된 병원균과는 균종이 다르게 배양되었으며, 분리 균주가 병원성이 있음을 확인하였다. 이에 병원균을 동정하기 위하여 균학적 특성을 조사하고 곰팡이 동정용 프라이머를 이용한 유전자의 염기서열 분석을 통해 분자계통학적 유연관계를 분석하였다.

병징 및 병원균의 분리. 2015년 12월에 충청남도 태안군의 장미 재배하우스에서 장미의 가지가 갈변되어 썩고 표면에 검은색 포자체가 붙어 있는 것을 발견하였다(Fig. 1A). 이와 같은 증상이 지속적으로 관찰되었으며 이 병의 원인을 찾고자 병원균을 분리하였다.

병원균을 분리하기 위해 병든 가지에서 병반을 잘라 1% 차아염소산나트륨용액으로 1분간 침지하여 소독을 하고, 멸균수로 씻어낸 후 물 한천배지(water agar, WA)와 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)에 치상하여 온도가 25°C로 설정된 인큐베이터에 배양을 하였다. 3일 후 치상한 병반에서 형성된 균사체를 새로운 PDA에 옮겨 순수배양 하였다. 이 분리 균주를 사용하여 병원성 검정을 실시하였다.

병원성 검정. 분리 균주의 병원성을 검정하기 위하여 장미 품종 '오션송'의 건전한 가지를 1% 차아염소산나트륨용액으로 표면소독을 한 후 균총을 잘라 치상하였다. 처리 구는 3반복으로 실시하였고 무 처리구는 PDA를 사용하였다. 접종된 장미가지를 플라스틱박스에 습실 처리한 후 25°C 인큐베이터에 두어 경과를 지켜봤다. 3일 후 접종 부위가 갈변되었고, 7일 후에는

장미가지가 전체 고사하였다. 14일 후에는 고사된 장미 가지에 검은 포자체가 형성되었다. 처음 발견된 가지마름증상과 일치하였으며 접종 균주가 재분리 되어 병원성이 있음을 확인하였다(Fig. 1B).

병원균의 균학적 특성 및 유연관계 분석. 병원균의 균학적 특성을 확인하기 위해서 분리 균주를 PDA에 25°C로 설정된 인큐베이터에 7일간 배양하였다. 분리 균주는 PDA상에서 균사 생육이 매우 빠르며 배양 3일차에 균총은 불투명한 백색을 띠다가 7일차에는 백색 균사가 잿빛으로 변하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 광학현미경으로 분생포자를 100개 관찰하였으며 분생포자의 형태는 회갈색의 타원형이며 끝이 둥글다. 분생포자 중간에 진한갈색의 격막이 하나 있다. 분생포자의 크기는 20–31×11–17 μm이다(Fig. 2B).

균학적 특성을 기초로 하여 병원균의 동정을 수행하고자 염기서열 분석을 하였다. PDA에서 7일 간 배양한 분리 균주로부터 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit (BIOFACT, Korea)를 이용하여 total genomic DNA를 추출하고 internal transcribed spacer (ITS) 영역과 translation elongation factor 1-alpha (TEF) 유전자와 beta-tubulin (TUB) 유전자를 증폭하기 위하여 각각 ITS1F/ITS4 (White 등, 1990), EF-688F/EF-1251R (Alves 등, 2008), bt2a/bt2b (Glass와 Donaldson, 1995) 프라이머 세트를 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였고 ExoSAP-IT (Affymetrix, USA)를 이용하여 정제한 뒤 염기서열 분석을 의뢰하였다(BIOFACT). 각각의 염기서열 분석결과는 미국생물공학정보센터(National Center for

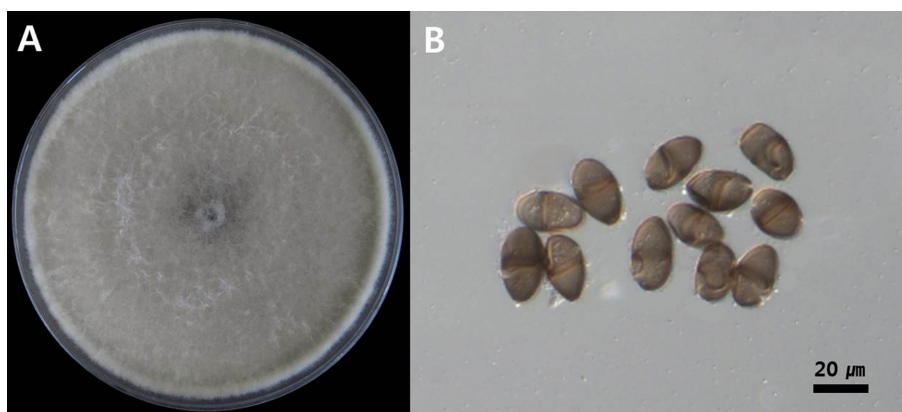


Fig. 2. Morphological characteristics of isolates (A) Colony growth at 25°C on PDA after 5 days of incubation, (B) Spores (Scale bars: 20 μm).

Table 1. Sequences of *L. pseudotheobromae* and allied species included in this study for phylogenetic analyses

Species	Culture	Accession number		
		ITS	TEF	TUB
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW 8000	AY236949	AY236898	AY236927
<i>Diplodia corticola</i>	CBS 112549	AY259100	AY573227	DQ458853
<i>D. cupressi</i>	CBS 168.87	DQ458893	DQ458878	DQ458861
<i>D. mutila</i>	CBS 112553	AY259093	AY573219	DQ458850
<i>D. rosulata</i>	CBS 116470	EU430265	EU430267	EU673132
<i>D. sapinea</i>	CBS 393.84	DQ458895	DQ458880	DQ458863
<i>D. scrobiculata</i>	CMW 189	AY253292	AY624253	AY624258
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	AY259094	AY573220	DQ458856
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	IMI 63581b	AY573212	AY573235	EU673102
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	CBS 110492	EF622086	EF622066	EU673134
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	AY639595	DQ103566	DQ458860
<i>L. lignicola</i>	CBS 134112	JX646797	JX646862	JX646845
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	EF622077	EF622057	EU673111
	17-002	LC270864	LC270867	LC314723
	17-003	LC270865	LC270868	LC314724
	17-004	LC270866	LC270869	LC314725
<i>L. rubropurpurea</i>	CBS 118740	DQ103553	EU673304	EU673136
<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96	AY640255	AY640258	EU673110
<i>L. venezuelensis</i>	CBS 118739	DQ103547	EU673305	EU673129
<i>L. viticola</i>	CBS 128313	HQ288227	HQ288269	HQ288306

Biotechnology Information, NCBI, USA)에 저장되어 있는 염기서열들과 비교를 하였으며 *Botryosphaeriaceae* 과의 *Lasiodiplodia pseudotheobromae*로 동정되었다. 분리 균주의 ITS영역, TEF와 TUB유전자의 염기서열은 NCBI GenBank database

에 각각 등록하였다(Accession numbers, ITS:LC270864-6; TEF:LC270867-9; TUB:LC314723-5).

장미 가지썩음병균의 분자 계통학적 유연관계를 분석하기 위해 병원균의 염기서열과 *Lasiodiplodia* 속의 다른 종들과 근

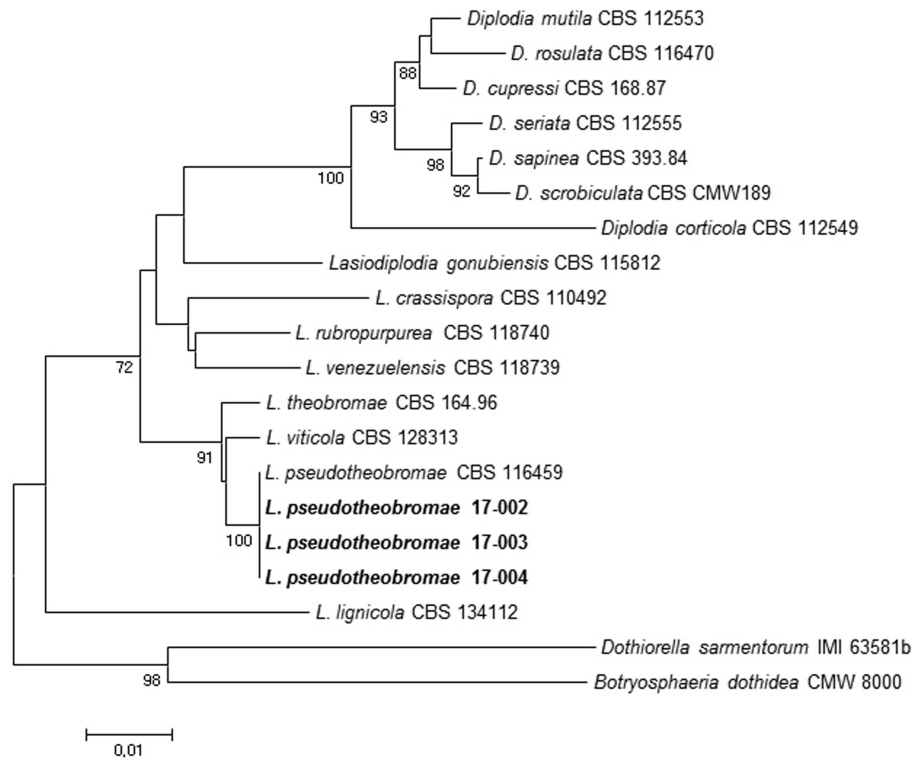


Fig. 3. Phylogenetic relationship between *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and other *Lasiodiplodia* species, constructed using the neighbor-joining tree analysis, based on the combined ITS region, TEF and TUB gene sequences. The numbers above the branches represent the bootstrap values obtained for 1,000 replicates (values smaller than 80 are not shown).

연종의 시퀀스를 NCBI의 Genbank database에서 수집한 후 ITS 영역, TEF 유전자, TUB 유전자의 염기서열들을 순서대로 결합하였다(Table 1). 계통수는 MEGA 6.0 프로그램에서 neighbor-joining method을 사용하여 작성하였다(Phillips 등, 2013; Tamura 등, 2013; Úrbez-Torres 등, 2016). 장미 가지썩음병균의 분자 계통학적 유연관계를 분석한 결과 *Lasiodiplodia pseudotheobromae*로 동정하였다(Fig. 3). *L. pseudotheobromae*는 국내에서 망고 줄기마름병으로 보고된 바 있으며, 중국에서는 유럽종포도의 가지마름병, 호두나무의 줄기마름병이 보고되어 있다(Dissanayake 등, 2015; Kwon 등, 2017; Li 등, 2016). 이와 같이 장미에서 발생한 *L. pseudotheobromae*에 의한 병은 우리나라에 보고되지 않았으며 국내 최초로 장미 가지썩음병으로 명명하여 보고하고자 한다.

요 약

2015년에 태안에서 장미의 가지 썩음 증상과 검은 포자체가 붙어 있는 새로운 증상이 관찰되었다. 이 증상의 원인을 찾기 위해 장미 가지의 썩음 증상에서 균사체를 분리하였다. 분리 균주의 병원성을 검증하였더니 건전한 장미 가지가 썩었으며 처

음 발견했던 병징과 일치하였다. 형태학적 특성을 조사하고 분자생물학적 분석을 위하여 병원균을 25°C에 7일간 배양하였다. 병원균의 균사 생장은 빠르며 균층의 색깔은 흰색에서 잿빛으로 변했다. 광학현미경으로 관찰한 분생포자는 회갈색의 타원모양에 격막이 하나 있으며 크기는 20–31×11–17 μm이다. 병원균의 ITS 영역, TEF와 TUB 유전자의 염기서열을 결합하여 근연종과 유연관계를 분석한 결과 *Lasiodiplodia pseudotheobromae*로 동정되었다. 이에 따라 장미에서 *L. pseudotheobromae*이 발생시키는 가지 썩음 증상을 장미 가지썩음병으로 명명하여 보고하고자 한다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing and commercial interests in this work.

Acknowledgement

This work was supported by the “Research Program for Agriculture Science and Technology Development” (Project title: Diagnosis of horticultural and herbal crops diseases and insect

pests, Project No. PJ011368022017) Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. and Phillips, A. J. L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers.* 28: 1-13.
- Dissanayake, A. J., Zhang, W., Liu, M., Chukeatirote, E., Yan, J. Y. and Hyde, K. D. 2015. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes pedicel and peduncle discolouration of grapes in China. *Australian Plant Dis. Notes* 10: 21.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1323-1330.
- Han, K. S., Park, J. H., Lee, J. S. and Seo, S. T. 2006. Plant diseases occurring on rose stem. *Res. Plant Dis.* 12: 65-68. (In Korean)
- Kwon, J. H., Choi, O., Kang, B., Lee, Y., Park, J., Kang, D. W., Han, I. and Kim, J. 2017. Identification of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing mango dieback in Korea. *Can. J. Plant Pathol.* 39: 241-245.
- Li, G. Q., Liu, F. F., Li, J. Q., Liu, Q. L. and Chen, S. F. 2016. Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from English walnut in China. *J. Phytopathol.* 164: 348-353.
- Madhu, B. and Kanwar, P. S. 2015. *In vitro* mutagenesis in rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Raktima for novel traits. *Indian J. Biotechnol.* 14: 525-531.
- Marchant, R., Davey, M. R., Lucas, J. A., Lamb, C. J., Dixon, R. A. and Power, J. B. 1998. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Mol. Breed.* 4: 187-194.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. and Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Stud. Mycol.* 76: 51-167.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Diseases in Korea. 5th ed. The Korean Society of Plant Pathology, Suwon, Korea. 339 pp.
- Úrbez-Torres, J. R., Castro-Medina, F., Mohali, S. R. and Gubler, W. D. 2016. Botryosphaeriaceae species associated with cankers and dieback symptoms of *Acacia mangium* and *Pinus caribaea* var. *hondurensis* in Venezuela. *Plant Dis.* 100: 2455-2464.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Shinski and T. J. White, pp. 315-322. Academic Press, San Diego, CA, USA.