

PLANT&FOREST

Phylogenetic analysis and biological characterization of *Stemphylium* species isolated from *Allium* crops

Chang-Gi Back^{1*}, You-Kyung Han¹, Walftor Bin Dumin¹, Jong-Han Park¹, Ji-Won, Han², Yeoung-Seok Bae¹

¹Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

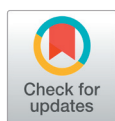
²Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Corresponding author: plantdoctor7@korea.kr

Abstract

Leaf blight disease caused by *Stemphylium* species is an important disease in *Allium* crops, specifically onion, garlic and welsh onion. In 2018, leaf blight symptoms were severe and damaged onion and garlic in Jeonnam province in Korea. In addition, small purple spots on garlic burbs were observed in a post-harvest storage warehouse. Several *Stemphylium* isolates were isolated from diseased leaves from the field and from garlic bulb samples and were analyzed in terms of homology and the phylogenetic relationship based on the internal transcribed spacer region and calmodulin gene sequence. The results showed that among three *Stemphylium* species identified, *S. vesicarium* is most prevalent on onion and garlic. *S. eturmiunum* was for the first time identified as pathogenic to onion and garlic, whereas *S. solani* was found in welsh onion crops. Although these isolates grew well at the optimum temperature at 20 - 25°C, they could also grow at low temperatures of 10 - 15°C. A pathogenicity test was conducted using *S. vesicarium* and *S. eturmiunum* on onion and garlic respectively. These results showed that two *Stemphylium* species were highly virulent with cross pathogenicity in onion and garlic. The results of this study can support the biological characterization of *Stemphylium* species in Korea. Moreover, further research will need to develop fungicide application strategies for onion and garlic crops.

Key words: *Allium* species, leaf blight, optimum temperature, pathogenicity, *Stemphylium* spp.



OPEN ACCESS

Citation: Back CG, Han YK, Dumin WB, Park JH, Han JW, Bae YS. Phylogenetic analysis and biological characterization of *Stemphylium* species isolated from *Allium* crops. Korean Journal of Agricultural Science 49:113-120. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20220008>

Received: December 10, 2021

Revised: February 23, 2022

Accepted: February 28, 2022

Copyright: © 2022 Korean Journal of Agricultural Science



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.

Introduction

파속식물은 백합과(Lilaceae)의 파속(*Allium*)에 속하는 식물로 우리에게 잘 알려진 양파(*Allium cepa*), 마늘(*Allium sativum*), 파(*Allium fistulosum*) 등이 있으며, 주로 양념채소로 부르고 있다(Lee and Hong, 2016). 2021년도 통계청 농작물생산조사 결과에 따르면 우리나라 양파,

마늘의 생산량은 각각 157만 6천톤, 30만 8천톤이며, 2020년 우리 국민 1인당 양파, 마늘의 소비량은 각각 24.1, 7.9 kg에 달하는 수준이다. 양파와 마늘에 발생하는 주요 곰팡이병은 *Alternaria porri*에 의한 검은무늬병, *Stemphylium* spp.에 의한 잎마름병과 자주점무늬병, *Sclerotium cepivorum*에 의한 흑색썩음균핵병, *Botrytis* spp.에 의한 잿빛곰팡이병, *Fusarium oxysporum*에 의한 시들음병과 마른썩음병이 있다(Korean Society of Plant Pathology, 2009). 이 중, 양파와 마늘 잎에서 동시에 문제가 되는 병해는 *Stemphylium* spp.에 의한 잎마름병이다. 2018년 농촌진흥청 주요 농산물 수급정보 조사 결과에 따르면 봄철 잦은 강우와 높은 기온으로 인해 전남 무안, 해남, 함평 등에서 잎마름병이 대발생하여 수확기 양파, 마늘에 큰 피해를 끼친 바 있다. 또한 *Stemphylium* spp.에 의한 병으로 채소류에서는 잎곰팡이병, 점무늬병 등으로 알려져 있고, 과수류에서도 저장병으로도 최근 보고되고 있다(Spadoni et al., 2020). 본 연구에서는 양파, 마늘 등에 발생하는 잎마름병 감염 시료를 채집하여 병원균을 분리배양하고, 그 원인균의 분자계통학적 유연관계를 분석하였다. 또한, 이들 잎마름병균의 최적 생육조건을 조사하고 병원성을 검정하였다.

Materials and Methods

잎마름병균 균주수집과 분자계통학적 유연관계 분석

균주 수집 및 염기서열 분석

우리나라 양파, 마늘 재배지인 전남 무안군, 신안군, 함평군과 경남 창녕군, 함양군에서 잎마름병에 감염된 시료를 채집하였고, 양파, 마늘, 파 잎에 발생한 잎마름병균 65 균주를 수집하였다. 수집 균주의 분자계통학적 유연관계 분석을 위해 잎마름병균의 total genomic DNA를 추출(HiGene™ Genomic DNA prep Kit, BIOFACT, Daejeon, Korea)하였고, internal transcribed spacer (ITS) 유전자 단편 염기서열을 분석하기 위해 ITS1F/ITS4 primer set (White et al., 1990)로, polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였다. PCR반응의 조건은 ITS 영역은 99°C에서 5분간 pre-denaturation을 하고 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension을 1 cycle로 하여 총 35회 진행하였다. 이후 72°C에서 final extension을 5분간 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 한 후 SYBR safedye로 염색하고 UV illuminator에서 증폭된 PCR 산물을 확인하였다. 증폭산물은 EXOSAP-IT (GE Healthcare, Amersham, UK)으로 정제하고 염기서열 분석(BIOFACT, Daejeon, Korea)을 의뢰하였다. 추가적인 유전자 분석을 위해 각 지역과 작물별을 고려하여 총 12 균주를 선발하여 calmodulin (cmdA) 유전자를 CAL-228F/CAK-737R primer set로 증폭시킨 후 분석하였다(Carbone and Kohn, 1999).

잎마름병균의 분자계통학적 유연관계 분석

ITS 유전자 염기서열 분석결과를 바탕으로 분자계통학적 유연관계를 분석하기 위해서 NCBI에 등록된 *Stemphylium*속 근연종의 염기서열을 수집하고 MEGA 7.0 프로그램을 사용(Tamura et al., 2013)하여 잎마름병균과 근연종 간의 유연관계 분석을 수행하고자 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성하였다(Saitou and Nei, 1987; Back et al., 2014). 계통분석을 위한 outgroup으로는 *Stemphylium lucomagnoense*를 사용하였다.

잎마름병균의 생물학적 특성

잎마름병균의 최적 균사생장온도 조사

과속작물에 발생하는 잎마름병균에 대한 생물학적 특성을 조사하였다. 첫번째로 양파, 마늘, 파에서 각각 분리 배양한 잎마름병균 5 균주에 대한 최적 균사생장 온도를 조사하였다. Potato dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 5 mm 크기의 균사디스크를 치상하고, 온도범위를 5 - 40°C로 설정하고 5°C 간격으로 배양기 온도를

맞춰 배양하였다. 각각의 설정된 온도범위 중 PDA배지에 균사가 모두 생장한 것을 기준으로 하여, 균사생장 길이를 측정하였다. 각 시험구는 최소 4반복 이상씩 수행하였다.

잎마름병균의 병원성 검정

양파와 마늘에서 각각 분리한 *Stemphylium vesicarium*과 *S. eturmiunum*을 25°C에서 15일간 배양하고, 15°C에서 7일간 배양하여 분생포자를 수거하여 포자현탁액을 제조(1×10^5 cfu·mL⁻¹)하여 분무접종을 실시하였다. 그 결과, 상처 접촉한 시험구에서는 접종 5일차부터 잎 끝이 마르는 증상이 확인되었다. 마늘에서는 잎과 중구에서도 병원성을 보이기 때문에, 마늘 중구를 이용하여 병원성 검정을 수행하였다. 마늘 중구를 준비하고 침으로 상처를 낸 뒤 3 mm 크기의 균사조각을 치상하고 25°C 배양기에서 7일간 방치한 후 병원성 유무를 확인하였다.

Results and Discussion

국내 수집 잎마름병균의 분자계통학적 유연관계 분석 결과

균주 수집 및 염기서열 분석

우리나라에서 파속작물에서 발생하는 잎마름병균을 양파에서 44균주, 마늘에서 15균주, 파에서 4균주 수집하였다. 수집 균주의 ITS 영역 유전자 염기서열 분석결과를 GENETYX 프로그램을 이용하여 각각의 상동성을 비교한 결과, 64균주 중 53균주의 *Stemphylium* sp.가 모두 100%의 상동성을 보인 반면 나머지 11균주는 우점하고 있는 균주와 98 - 99%의 상동성에 차이를 보였다. 따라서 우리나라 양파, 마늘, 파에 발생하는 잎마름병균은 1종 이상이 존재하는 것으로 판단되었다. 각각의 유전자 염기서열 분석결과를 NCBI의 BLAST search를 통해 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 근연종들과의 유사도를 확인한 결과, 53균주의 우점종은 미국, 유럽 등에서 보고된 양파, 마늘의 잎마름병균 *Stemphylium vesicarium*과 99 - 100% 유사도를 보였다. 반면, 양파, 마늘에서 분리한 균주 중 7균주(양파 2, 마늘 5)는 국내에서는 보고된 바 없었던 *S. eturmiunum*균과 99% 이상의 높은 유사도를 보였고, 파에서 발견된 4균주는 *S. solani*와 99% 이상의 높은 유사도를 보였다. 이 중 ITS 유전자 염기서열 분석결과를 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank에 등록하였다(*S. vesicarium* ITS-LC592362~LC592371, *S. eturmiunum* ITS-MW800165~MW800168).

64 균주의 잎마름병균 중 12 균주를 선발하여 cmdA 유전자 염기서열을 분석한 결과, 우점하고 있는 *S. vesicarium*은 미국 등에서 보고한 *S. vesicarium*과 99% 이상의 유사도를 보였고, 나머지 *S. eturmiunum*과 *S. solani*도 기존에 GenBank에 보고되어 있는 종들과 99% 이상의 높은 유사도를 보였다.

잎마름병균의 분자계통학적 유연관계 분석

ITS 유전자 염기서열을 이용하여 국내 발생하는 잎마름병균의 분자계통학적 유연관계를 분석한 결과, 양파, 마늘에서 우점하고 있는 53균주(양파 42, 마늘 10, 부추 1)의 잎마름병균은 *S. vesicarium*에 속하였다(Fig. 1). 또한, 양파, 마늘에 발생하는 또 다른 종인 *S. eturmiunum*은 최근 마늘 중구에서 발생하고 있는 잎마름병균과 동일한 그룹으로 확인되었다. 마지막으로 파에 발생하는 잎마름병균은 기존에 알려진 *S. botryosum*이 아닌 토마토 등에서 잎마름병으로 보고된 *S. solani* 그룹으로 확인되었다. 따라서, 2종의 유전자 염기서열의 상동성 비교결과와 ITS 유전자 염기서열 분석결과를 이용한 분자계통학적 유연관계를 분석한 결과를 종합해볼 때, 국내 양파, 마늘 등 파속작물에 발생하는 잎마름병균은 3종이 존재하는 것으로 확인되었다. 실제로 국내에서는 *S. solani*에 의한 파 잎마름병과 *S. eturmiunum*에 의한 마늘 잎마름병 발생을 최근에 국내에서도 보고하고 있으며 중국에서도 저장 중 마늘 중구에 발생하는 *S. eturmiunum*에 대해 보고하고 있다(Fu et al., 2019; Dumin et al., 2021a; Dumin et al., 2021b).

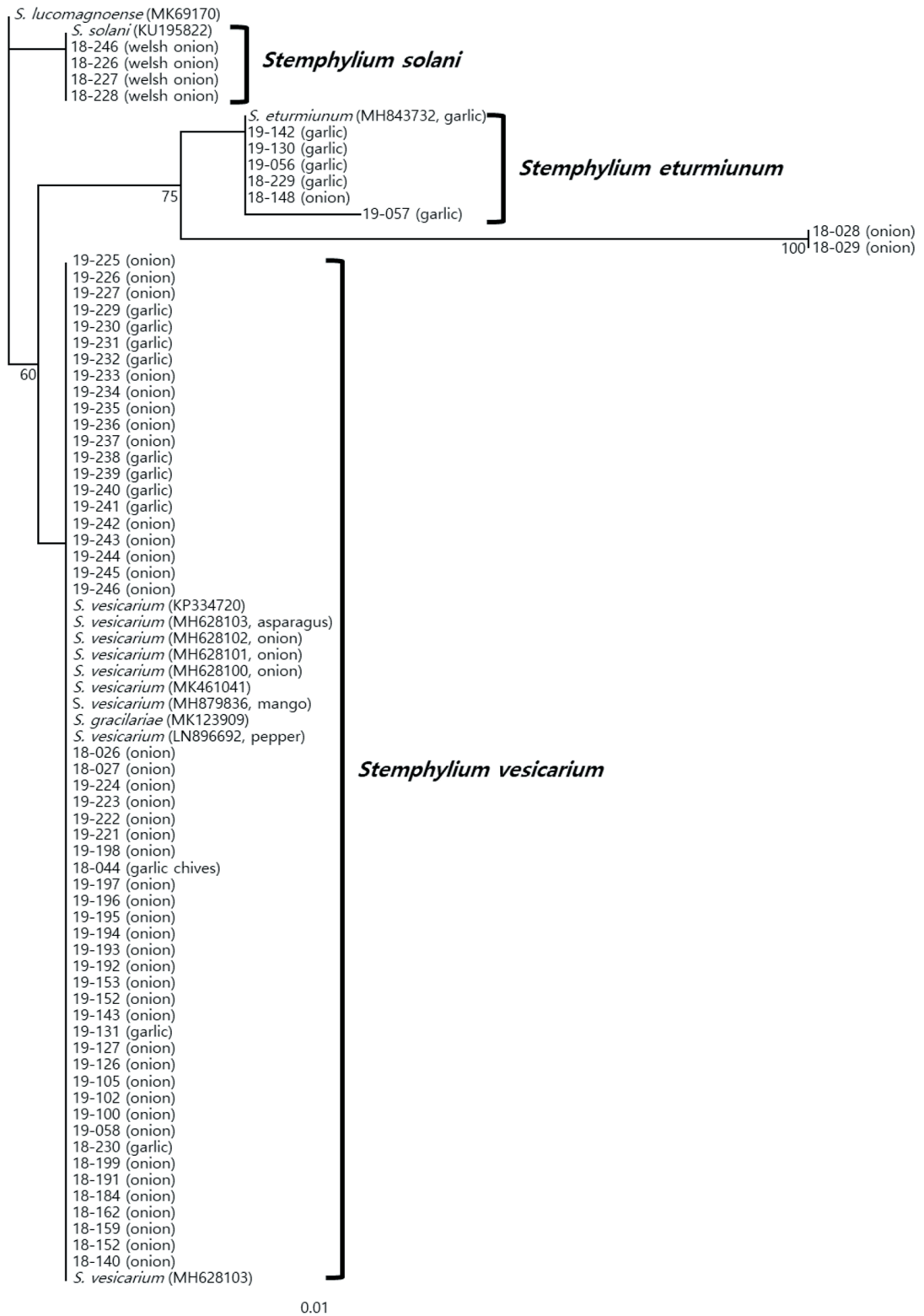


Fig. 1. Phylogenetic tree of members of *Stemphylium* species based on the internal transcribed spacer (ITS) region. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 100 replicates. *S. lucomagnoense* (MK69170) was used as an outgroup.

잎마름병균의 생물학적 특성조사 결과

잎마름병균의 최적 군사생장온도 조사

양파, 마늘, 파에서 분리한 3종의 *Stemphylium* 균에 대한 최적 군사생장 온도를 조사하였다. 그 결과, 3종의 *Stemphylium* 균의 군사생장이 가능한 온도 범위는 5 - 30°C였으며, 이 중 최적 생장온도 범위는 20 - 25°C로 확인되었다(Fig. 2A). 그리고 5°C 저온이나 30°C의 온도조건에서도 잎마름병균들 모두 더디지만 성장하는 것으로 나타났다. 온도별로 성장양상을 살펴보면 양파, 마늘의 우점종인 *S. vesicarium*은 다른 2종의 *Stemphylium* 균에 비해서 30°C에서도 군사생장이 가능하였다. 반면 양파, 마늘에서 새롭게 발견된 *S. eturmiunum* 균은 다른 *Stemphylium* 균에 비해서 상대적으로 저온인 10 - 15°C에서 군사생장 길이가 길게 나타났다. 또한, 10 - 15°C의 저온조건에서는 잎마름병균의 포자를 형성이 다른 온도에 비해 많이 형성되는 것으로 확인되었다. 양파는 겨울 월동을 하기 전인 10 - 11월 사이에 어린 묘에서부터 잎마름병이 발생하게 되는데 이때 충분히 감염이 가능한 환경적 조건이 갖춰지게 된다. 실제로 어린묘에 옷자람을 방지하기 위해서 잎을 자르게 되는데, 이렇게 생긴 상처를 통해서 잎마름병균이 감염되고, 월동 전까지 발병하는 것으로 전남 무안군, 경남 함양군 등에서 조사되었다. 전 세계적으로 잎마름병의 최적 생육온도는 기주에 따라 달라지는데, 배나무에 감염되는 *S. vesicarium* 균의 최적 감염온도는 21 - 23°C이며, 아스파라거스에 발생하는 *S. vesicarium* 균은 14°C, 양파에 발생하는 *S. vesicarium* 균은 10 - 26°C의 온도범위를 가진다(Menzies et al., 1991; Montesinos et al., 1995; Basallote-Ureba et al., 1999). 이처럼 *Stemphylium* 속 병원균은 기주나 재배환경에 따라 최적 생육온도가 다르게 나타나는 것을 알 수 있으며, 국내의 양파와 마늘에 발생하는 잎마름병균은 10 - 25°C의 온도범위를 갖는 것으로 확인되었다.

잎마름병균의 병원성 검정

양파와 마늘에서 각각 분리한 2종 *Stemphylium* 균(*S. vesicarium*, *S. eturmiunum*)을 이용하여 마늘 종구에 병원성을 검정한 결과, 양파와 마늘에서 분리한 균주 모두 마늘 종구에서 강한 병원성을 보였다(Fig. 2B). 특히, 국내에서 재배하는 남도, 대서, 홍산 마늘 품종에 상관없이 모두 병원성을 나타내었다. 최근, 마늘의 수확시기에 잦은 비로 인해서 수확 이후 충분히 건조시키지 않고 저장한 마늘에서 잎마름병 증상이 많이 발생하고 있는 실정이다. 따라서, 양파와 마늘에서 잎마름병에 대한 방제가 필요할 것으로 판단된다. 최근 미국에서도 잎마름병의 발생으로 인해 그 위험성을 다시 재기하고 있으며, 특히, 파속작물에서는 잎에 병을 일으켜 광합성량을 줄여 양파, 마늘 구의 크기를 줄여들게 하고 품질을 나쁘게 하는 것으로 보고하고 있다(Frank et al., 2021).

우리나라에서는 마늘 등 파속작물에 발생하는 잎마름병의 원인으로 기존에 알려진 *S. botryosum* 이외에 *S. vesicarium*이 발생을 보고하고, 균학적인 특성을 연구한 바 있다(Cho and Yu, 1998). 최근에는 *Stemphylium vesicarium*에 의한 아스파라거스 점무늬병, *S. solani*에 의한 파 잎마름병, *S. eturmiunum*에 의한 마늘 잎마름병 등이 국내에서도 보고되었다(Han et al., 2019; Dumin et al., 2021a; Dumin et al., 2021b). 또한, 중국, 이란 등의 파속작물을 재배하는 나라에서도 *Stemphylium* 균에 의한 피해를 보고하고 있으며, 특히 이탈리아 체리 과실에 병 발생도 보고하고 있어, *Stemphylium* 균의 기주범위가 점점 늘어가는 것을 알 수 있다(Fu et al., 2019; Spadoni et al., 2020; Razak and Abass, 2021). 앞서 연구에서 확인한 것과 같이 이 병원균은 군사생육온도 범위가 넓은 병원균이므로 앞으로는 기후변화와 같은 환경적 요인에 따라서 병 발생이 충분히 증가할 가능성이 있으므로 병 방제 연구 및 관리방안에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

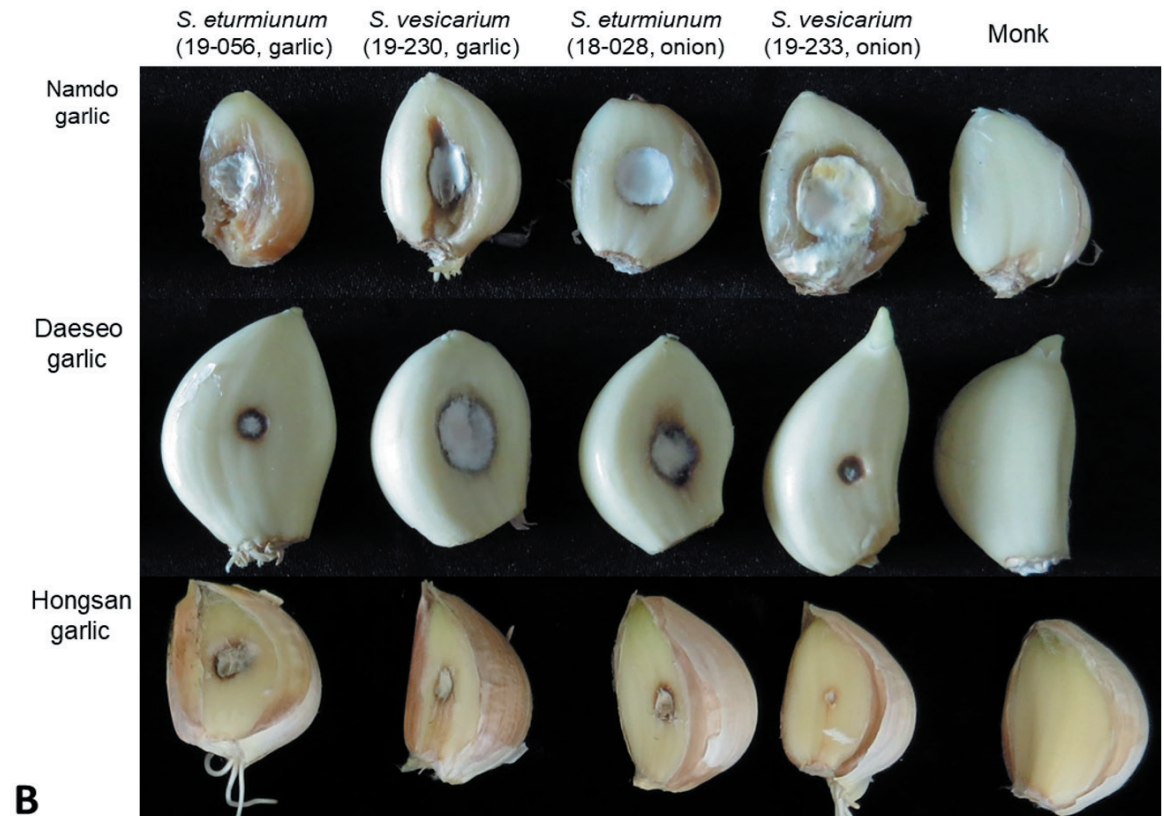
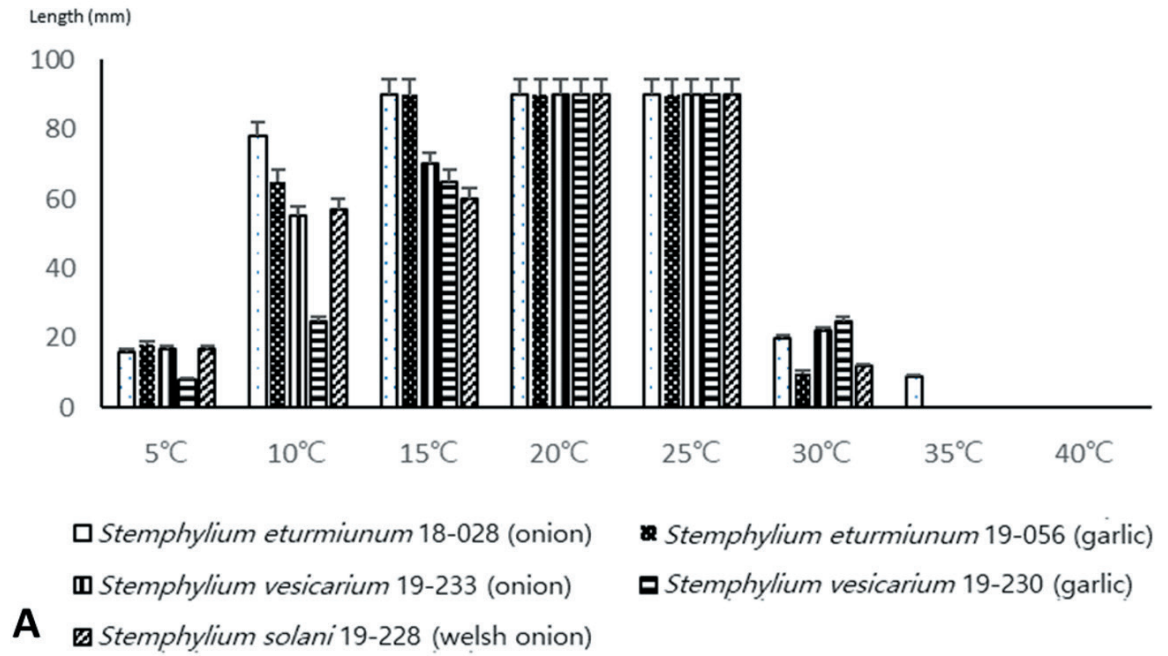


Fig. 2. Biological characteristics of *Stemphylium* species. Optimum temperatures each 5 isolates *Stemphylium* spp. (A) and pathogenicity test of *S. vesicarium* and *S. eturmiunum* inoculated in garlic burb (B).

Conclusion

우리나라 양파, 마늘 등 파속작물에서 발생하는 주요 곰팡이병인 잎마름병의 원인균 *Stemphylium* spp.를 채집하여, ITS영역, Calmodulin 유전자 염기서열을 분석하여 상동성 비교와 분자계통학적 유연관계를 분석하였다. 그 결과, 양파, 마늘, 파에 발생하는 잎마름병균은 3종으로 확인되었다. 이 중 *Stemphylium vesicarium*균이 우점하고 있으며, *S. eturmiunum*이 양파와 마늘에서 모두 새롭게 발견되었다. 또한, 파에서는 *S. solani*에 의한 잎마름병도 확인되었는데 병징은 파의 잎 끝이 마르고 월동 이후 갈색으로 마른 잎에서 주로 많이 관찰되었다. 이들 잎마름병균의 최적 생육온도는 20 - 25°C 이지만 10 - 15°C 저온에서도 생장이 가능하였다. 양파, 마늘에서 분리한 2종의 잎마름병균 *S. vesicarium*과 *S. eturmiunum*은 양파와 마늘 모두에서 병원성이 확인되었다.

Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (Project No. PJ01428801)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

Authors Information

Chang-Gi Back, <https://orcid.org/0000-0001-5665-4730>

You-Kyung Han, NIHHS, RDA, Researcher

Walftor Bin Dumin, NIHHS, RDA, Post-doctor

Jong-Han Park, NIHHS, RDA, Senior researcher

Ji-Won Han, NIHHS, RDA, researcher

Yeoung-Seok Bae, NIHHS, RDA, Senior researcher

References

- Back CG, Lee SY, Jung HY. 2014. Molecular phylogenetic analysis of *Botrytis cinerea* occurring in Korea. Korean Journal of Mycology 42:138-143. [in Korean]
- Basallote-Ureba MJ, Prados-Ligero AM, Melero-Vara JM. 1999. Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. Plant Pathology 48:139-145.
- Carbone I, Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91:553-556.
- Cho HS, Yu SH. 1998. *Stemphylium vesicarium* on garlic and other *Allium* spp. in Korea. Korean Journal of Plant Pathology 14:567-570.
- Dumin WB, Han YK, Park JH, Han JW, Back CG. 2021a. First report of leaf blight disease caused by *Stemphylium solani* on welsh onion in Korea. New Disease Reports 43:e12010.
- Dumin WB, Park MJ, Han YK, Bae YS, Park JH, Back CG. 2021b. First report of leaf spot disease caused by *Stemphylium eturmiunum* on garlic in Korea. Plant Disease 106:318. doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0674-PDN

- Frank H, Sara S, Bruce DG, Mary RM, Daniel H, Christy H, Sandeep S, Sarah P. 2021. *Stemphylium* leaf blight: A re-emerging threat to onion production in eastern north America. *Plant Disease* 105:3780-3794. doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0903-FE
- Fu L, Jin Y, Zhang GF, Qu JL, Fan K, Wu YY. 2019. First report of *Stemphylium eturmiunum* causing postharvest rot of garlic sporot in China. *Plant Disease* 103:1041. doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1553-PDN
- Han JH, Shin JH, Fu T, Kim KS. 2019. A new record and characterization of asparagus purple spot caused by *Stemphylium vesicarium* in Korea. *Mycobiology* 47:120-125.
- Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Korean Society of Plant Pathology, Seoul, Korea. [in Korean]
- Lee E, Hong S. 2016. Analysis of the relationship between garlic and onion acreage response. *Korean Journal of Agricultural Science* 43:136-143. [in Korean]
- Menzies SA, Bansal RK, Broadhurst PG. 1991. Effect of environmental factors on severity of *Stemphylium* leaf spot on asparagus. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 19:135-141.
- Montesinos E, Moragrega C, Llorente I, Vilardell P, Bonaterra A, Ponti I, Bugiani R, Cavanni P, Brunelli A. 1995. Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology* 85:586-592.
- Razak NJ, Abass MH. 2021. First report of *Stemphylium eturmiunum* EG simmons and *S. vesicarium* causing early blight on tomato plants in Iraq. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 2021:5013-5015.
- Saitou N, Nei M. 1987. Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Spadoni A, Ippolito A, Sanzani SM. 2020. First report of *Stemphylium eturmiunum* causing postharvest rot of sweet cherry in Italy. *Crop Protection* 132:105112.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. pp. 315-322. Academic Press, San Diego, USA.