

RESEARCH NOTE

***Botrytis cinerea*에 의한 산딸기 잿빛곰팡이병의 발생**김승한¹, 박상규², 이승열², 곽연식³, 정희영^{2*}¹경상북도 농업기술원, ²경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부,³경상대학교 농업생명과학대학 식물의학과**Occurrence of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on *Rubus crataegifolius* in Korea**Seung-Han Kim¹, Sangkyu Park², Seung-Yeol Lee², Youn-Sig Kwak³, Hee-Young Jung^{2*}¹Gyeongbuk Agricultural Research and Extension Service, Daegu 41404, Korea²School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea³Department of Plant Medicine, College of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

*Corresponding author: heeyoung@knu.ac.kr

Abstract

The occurrence of gray mold on *Rubus crataegifolius* has recently been reported in Pohang, Gyeongbuk province, Korea. The initial symptom was the appearance of small brown spots on the leaves, and these lesions became later covered with a gray fungus as the disease progressed. A fungus was isolated from symptomatic leaves and incubated. Through morphological and phylogenetic analyses, the causal agent of the disease was identified to be *Botrytis cinerea*. The fungal isolate was then used to inoculate on the leaves of healthy plants to determine its pathogenicity as the causal agent of gray mold as per Koch's postulates. The inoculated leaves showed the same symptoms as the originally infected plant, and the fungal pathogen re-isolated from the lesions showed the same morphological characteristics as the original pathogen. This is the first report on the occurrence of gray mold on *R. crataegifolius* caused by *B. cinerea* in Korea.

Keywords: *Botrytis cinerea*, Combined sequence, Gray mold, Phylogenetic analysis, *Rubus crataegifolius*

 OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 September, 45(3): 251-257
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170031>

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Received: 14 August, 2017

Revised: 22 August, 2017

Accepted: 24 August, 2017

© 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.

산딸기(*Rubus crataegifolius* Bunge)는 장미과에 속하는 다년생 목본식물로서, 한국 및 일본, 중국 북동부의 야산에서 자생하고 있다. 국내에서는 예전부터 열매를 수확하여 식용이나 약용으로 활용하여 왔으며 최근에는 항산화 효과와 면역증진 효과가 보고되어 재배면적이 점차 늘어가는 추세이다[1]. 이에 따라 산딸기에 발생하는 주요 병에 대한 관심이 높아지고

있는데, 현재 국내에 보고된 산딸기의 진균병은 *Phragmidium griseum*에 의한 녹병, *Septoria rubi*에 의한 점무늬병 및 *Rhizopus stolonifer*에 의한 무름병 등이 있으며[2], 추가로 *Botryosphaeria parva*에 의한 줄기마름병이 2016년에 보고되었다[3]. 최근 경북 포항의 산 딸기 재배지역에서 잎과 과실이 수침상으로 물러지다가 표면에 회색 곰팡이가 발생하는 증상이 발견되었다. 잎에 발생하는 경우 주로 가장자리부터 감염이 일어났는데, 감염부위가 갈색으로 변하면서 잎의 안쪽으로 진행되는 양상을 보였다. 병이 진행됨에 따라 병반부가 회색으로 변하면서 찢어 들어가는 모양을 보이게 되며, 병반부와 건전부의 경계부위는 붉은색 내지 짙은 갈색으로 변하는 모습이 관찰되었다(Fig. 1A). 줄기와 과실부위에서도 감염이 관찰되었는데, 주로 과경부위에서 병반이 발생하여 과실부위로 번져나가는 모습을 보였다. 감염된 줄기와 과실부분은 짙은 갈색으로 변하면서 수침상으로 물러지기 시작하였고, 병이 진행됨에 따라 줄기와 과실의 표면이 회색의 포자로 완전히 덮이는 모습이 관찰되었다(Fig. 1B).

이상증상을 일으키는 병원균을 동정하기 위하여 병반으로부터 병원균을 분리 배양하였다. 병든 잎을 채집하여 이병부와 건전부의 경계부위를 5 × 5 mm 크기로 절단하고 1% 차아염소산나트륨 용액으로 1분간 표면 살균하였다. 살균한 시료를 멸균수로 3회 세척한 후 여과지를 사용하여 물기를 완전히 제거하고 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)에 치상하여 3일간 25°C에서 배양하였다. 3일 배양 후 자라난 균사의 끝부분을 떼어내어 새로운 PDA에 옮겨 순수분리하고 25°C에서 14일간 배양하여 균학적 특징을 관찰하였다. 분리된 균은 배양 4일만에 직경 90 mm PDA plate를 모두 덮을 정도로 빠르게 자랐으며, 균총의 색깔은 회색이었다(Fig. 2A, 2B). 배양 10일 후부터 회색 균사체가 뭉쳐지면서 작은 소립의 균핵을 형성하

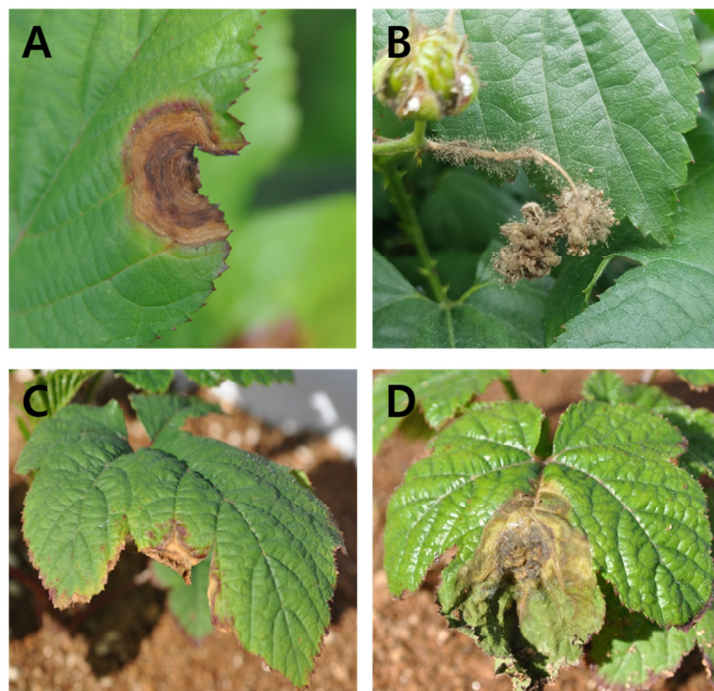


Fig. 1. Symptoms of gray mold on *Rubus crataegifolius* caused by *Botrytis cinerea*. A, symptoms on leaf; B, symptoms on fruits; C, D, symptoms after artificial inoculation by spraying (C) and colony disc (D).

기 시작하였으며, 21일경에는 약 2~4 mm 정도의 균핵이 배지 표면에 10~15개 가량 형성되었다. 형성된 균핵을 떼어내어 멸균수에 희석하고 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 수직상으로 분지된 분생포자경 위에 많은 양의 분생포자가 달려있는 모양을 관찰하였다(Fig. 2C). 분생포자는 무색의 타원형 또는 계란형으로서 크기는 $10.4\sim11.2 \times 6.9\sim8.8 \mu\text{m}$ 이고 격막은 존재하지 않았다(Fig. 2D). 이러한 형태적 특징은 이전에 보고된 *B. cinerea*의 특징과 거의 일치하여(Table 1) 산딸기에서 분리한 병원균은 *B. cinerea*일 것으로 추측되었다[4]. 분리한 병원균의 계통학적 분석을 위해 배양한 균으로부터 DNA를 추출한 뒤 polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였다. 계통학적 유연관계 분석에는 곰팡이의 분류에 일반적으로 사용되는 internal transcribed spacer (ITS) 영역과 함께 최근 *Botrytis*속 진균류의 분자 지표로 사용되는 3가지 유전자, 즉 RNA polymerase subunit II (RPB2) 유전자, heat-shock protein 60 (HSP60) 유전자 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 유전자가 사용되었다[5]. ITS 영역의 증폭에는 ITS1F/ITS4 primer pair를 이용하였으며[6], RPB2 유전자는 RPB2for/RPB2rev, HSP60 유전자는 HSP60for/HSP60rev, G3PDH 유전자는 G3PDHfor/G3PDHrev primer pair를 사용하여 증폭하였다[4]. PCR반응의 조건은 ITS 영역의 경우

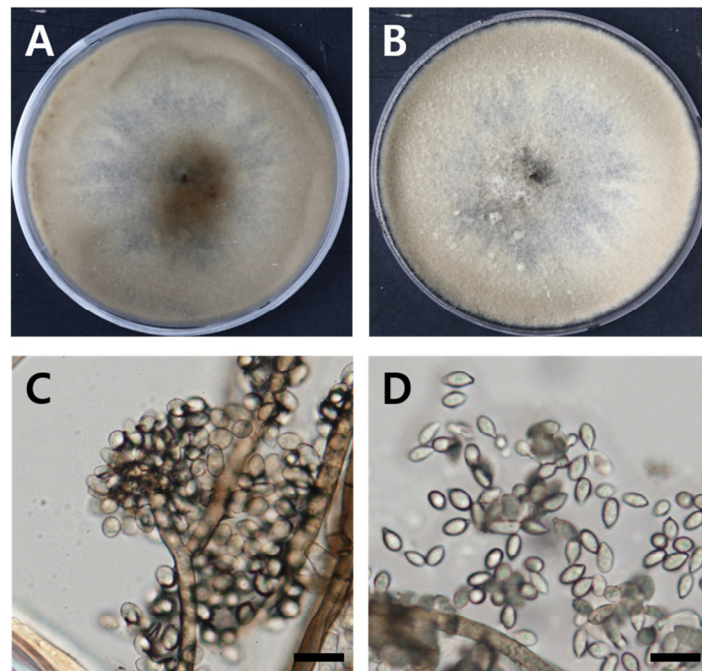


Fig. 2. Stereo and light photomicrographs of *Botrytis cinerea*. A, B, colonies on potato dextrose agar after 7 days; C, D, conidia and conidiophores (scale bars = 20 μm).

Table 1. Morphological characteristics of *Botrytis cinerea* isolated in this study

Characteristics		<i>Botrytis cinerea</i> isolated in this study	<i>B. cinerea</i> ^a
Conidia	Shape	ellipsoid-ovoid	ellipsoid-ovoid
	Size	$10.4\sim11.2 \times 6.9\sim8.8 \mu\text{m}$	$9.7\sim10.8 \times 6.8\sim8.3 \mu\text{m}$

^aSource of description[4].

먼저 94°C에서 2분간 pre-denaturation을 진행한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여 총 35회 진행하였다. 이후 72°C에서 final extension을 5분간 수행하였다[7]. HSP60과 RPB2 유전자의 경우 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 진행하고 94°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 1 cycle로 하여 총 35회 진행하였다. 이후 72°C에서 final extension을 5분간 수행하였다. G3PDH 유전자는 HSP60, RPB2 유전자와 동일한 조건에서 annealing 온도만 64°C로 조정하여 진행하였다[4]. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 한 후 ethidium bromide로 염색하고 UV illuminator 상에서 목적하는 DNA 단편의 증폭여부를 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 EXOSAP-IT (GE Healthcare, Amersham, UK)을 이용하여 정제 후 염기서열 분석(SolGent, Daejeon, Korea)을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 NCBI의 BLAST search를 통해 GenBank에 등록되어 있는 종들과의 유사도를 확인하였다. 분석 결과, 산딸기에서 분리한 균주의 ITS 영역, HSP60, RPB2, G3PDH 유전자의 염기서열은 모두 *B. cinerea*의 해당 유전자의 염기서열과 99% 이상의 유사도를 지니고 있었다. 계통학적 분석을 수행하기 위해 NCBI에 등록된 여러 근연종의 염기서열을 수집하고 HSP60, RPB2, G3PDH 유전자의 3개 유전자 부위의 염기서열을 연결하여 결합염기서열을 작성하였다. MEGA 6.0 프로그램을 사용하여 산딸기에서 분리한 균

Table 2. Sequences of *Botrytis cinerea* and allied species considered in this study

Identity	Strain no.	Accession no.		
		RPB2	HSP60	G3PDH
<i>Botrytis cinerea</i>	Rubus-PPL01	MF741317	MF741316	MF741315
<i>B. cinerea</i>	cucumber isolate	AB971655	AB971650	AB971645
<i>B. cinerea</i>	apple isolate	AB971654	AB971649	AB971644
<i>B. cinerea</i>	GarlicBC-5	EU514475	EU514485	EU519212
<i>B. cinerea</i>	LeekBC-8	FJ169676	FJ169655	FJ169648
<i>B. cinerea</i>	SAS56	AJ745677	AJ716067	AJ705006
<i>B. cinerea</i>	BC7	AJ745675	AJ716064	AJ705003
<i>B. pelargonii</i>	MUCL1152	AJ745701	AJ716090	AJ705029
<i>B. pelargonii</i>	CBS497.50	AJ745662	AJ716046	AJ704990
<i>B. fabae</i>	MUCL98	AJ745686	AJ716075	AJ705014
<i>B. porri</i>	MUCL3234	AJ745704	AJ716093	AJ705032
<i>B. aclada</i>	PRI006	AJ745665	AJ716051	AJ704993
<i>B. paeoniae</i>	0003	AJ745699	AJ716088	AJ705027
<i>B. elliptica</i>	BE9714	AJ745684	AJ716073	AJ705012
<i>B. sinoallii</i>	OnionBC-23	EU514479	EU514488	EU519217
<i>B. convoluta</i>	9801	AJ745679	AJ716068	AJ705007
<i>B. polyblastis</i>	CBS287.38	AJ745702	AJ716091	AJ705030
<i>B. tulipae</i>	BT9830	AJ745713	AJ716102	AJ705041
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	484	AJ745716	AJ716048	AJ705044

RPB2, RNA polymerase subunit II; HSP60, heat-shock protein 60; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

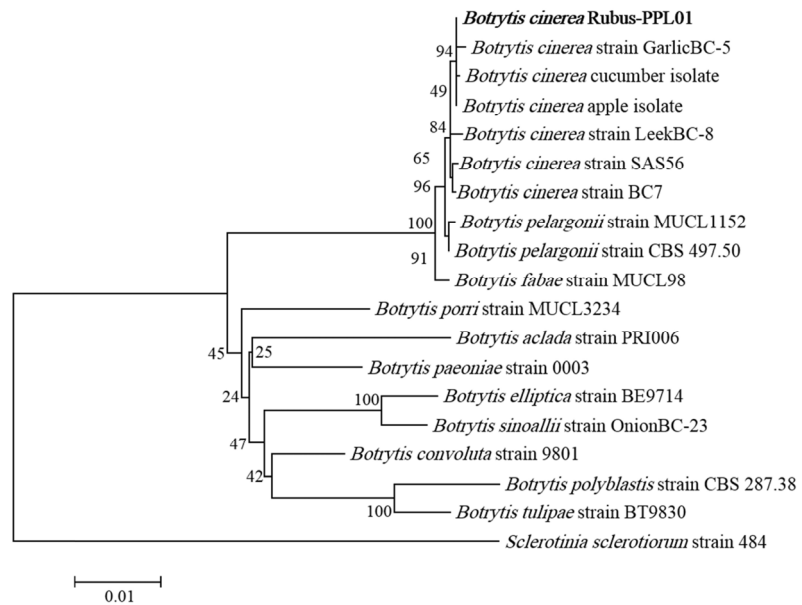


Fig. 3. Phylogenetic tree of members of the genus *Botrytis* based on the combined sequence of internal transcribed spacer region, RNA polymerase subunit II, heat-shock protein 60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase sequence data. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 1,000 replicates. *Sclerotinia sclerotiorum* was used as outgroup. Sequence obtained in the study is shown in boldface.

주와 근연종들 간의 유연관계 분석을 수행하고, neighbor-joining 알고리즘을 사용한 계통수를 작성하였다[7]. 계통수 작성을 위해 사용한 근연종 균주의 유전자 정보는 Table 2에 기재하였으며, 계통분석을 위한 outgroup으로는 *Sclerotinia sclerotiorum*을 사용하였다. 분석 결과, 산딸기 분리균은 국내 및 국외에서 보고되어 있는 *B. cinerea*와 같은 그룹을 형성하였으며, 다른 근연종과 확실하게 구분되었다(Fig. 3). 따라서, 형태학적 특징 및 계통학적 유연관계 분석 결과를 종합하여 판단한 결과, 산딸기 분리균은 *B. cinerea*인 것으로 최종 확인되었다. 산딸기에 대한 병원성을 확인하기 위해 건전한 산딸기 식물체를 대상으로 분무접종과 균총디스크 접종실험을 실시하였다. 분무접종 실험을 위해 병원균을 10일간 배양한 배지를 사용하여 포자 현탁액을 제작하고, 건전한 산딸기의 잎을 70% 에탄올로 세척하여 살균 및 건조한 뒤 포자 현탁액을 분무하였다. 대조구로는 멸균수를 분무하였으며, 시험구와 대조구 모두 접종 후 48시간 동안 비닐로 밀봉하여 습도를 유지하고 비닐을 제거한 뒤 발병 및 진행을 관찰하였다. 균총디스크 접종은 7일간 배양한 균총으로부터 지름 3 mm 크기의 균총디스크를 제작하고 건전한 산딸기 잎의 표면을 70% 에탄올로 소독한 뒤 균총디스크를 얹어 접종하였다. 대조구에는 균을 배양하지 않은 PDA 디스크를 접종하였으며, 접종 후 비닐로 48시간 동안 밀봉하여 습도를 유지한 뒤 비닐과 디스크를 제거하고 병의 진행을 관찰하였다. 접종실험 결과, 분무접종 실험에서는 잎의 선단부위부터 병반이 관찰되었고, 이후 잎의 안쪽을 향해 병반이 진행되는 양상이 관찰되었다(Fig. 1C). 균총디스크 접종 실험에서는 균총디스크를 중심으로 병반이 발생하여 진행되는 모습을 관찰할 수 있었으며, 분무접종에 비해 병의 진행속도가 더 빠른 양상을 보였다(Fig. 1D). 분무접종 실험과 균총디스크 접종 실험 모두 대조구에서는 병이 발생하지 않았으며, 시험구에서 발생한 병반으로부터 *B. cinerea*가 재분리 되는 것을

확인하였다.

이와 같이 산딸기에서 발생한 이상증상으로부터 분리한 병원균의 균학적 특성 및 DNA 염기서열을 분석한 결과 *Botrytis cinerea*로 동정되었으며, 분리한 병원균을 산딸기의 잎과 열매에 접종하여 병원성을 확인하였다. *B. cinerea*는 딸기, 고추, 인삼을 포함하여 국내 80여종, 해외까지 포함하면 약 200여종에 이르는 각종 경제작물에서 발생한다고 보고되어 있으며, 이러한 작물들의 저장 및 유통 중에 발생하여 큰 경제적 손실을 일으키는 병원균이다[4]. 또한, *B. cinerea*는 기주의 범위도 넓을 뿐만 아니라 잎과 줄기, 과실 등 침투하는 경로 역시 다양하기 때문에 전염성이 강하고 방제가 까다롭다[8]. 이러한 특징 때문에 *B. cinerea*의 특성 및 방제에 대한 연구가 국내외적으로 매우 활발히 진행되고 있다[9, 10]. 따라서 *B. cinerea*의 기주범위에 대한 보고 역시 매우 중요한 정보라 할 수 있다. 본 연구를 통해 산딸기에 발생하는 잣빛곰팡이병의 병원균으로 *Botrytis cinerea*를 국내 최초로 보고하고자 한다.

적 요

최근 경북 포항의 산딸기 재배지역에서 잣빛곰팡이병 증상이 발생하였다. 초기에는 잎의 가장자리나 과경 부위에 갈색 반점이 나타나며 병이 진전되면 병반 부위가 확대되고 수침상으로 물러지면서 표면이 회색 곰팡이로 덮이는 것이 관찰되었다. 이러한 증상이 발생한 잎으로부터 병원균을 분리하고 균학적 특성을 조사하고 계통학적 분석을 수행하였다. 분석 결과 산딸기에서 발생한 잣빛곰팡이병의 병원균은 *Botrytis cinerea*로 확인되었으며, 건전한 산딸기 식물체를 대상으로 접종실험 한 결과 산딸기에 대한 병원성을 확인하였다. 지금까지 국내에서 *B. cinerea*에 의한 산딸기 잣빛곰팡이병이 보고되지 않았으므로 본 연구결과를 바탕으로 이 병을 국내 최초로 보고한다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Agenda Project (Grant No. Agenda project No. PJ0108232017) of the Rural Development Administration (RDA), Republic of Korea. This work was also supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPET) through Export Promotion Technology Development Program funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (114095-03-1-CG000).

REFERENCES

1. Ni W, Zhang X, Bi H, Iteku J, Ji L, Sun C, Fang J, Tai G, Zhou Y, Zhao J. Preparation of a glucan from the roots of *Rubus crataegifolius* Bge. and its immunological activity. Carbohydr Res 2009;344:2512-8.
2. Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.
3. Park SK, Kim SH, Back CG, Lee SY, Kang IK, Jung HY. First report of *Botryosphaeria*

- parva* causing stem blight on *Rubus crataegifolius* in Korea. Res Plant Dis 2016;22:111-5.
4. Back CG, Lee SY, Jung HY. Molecular phylogenetic analysis of *Botrytis cinerea* occurring in Korea. Kor J Mycol 2014;42:138-43.
 5. Staats M, van Baarlen P, van Kan JA. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. Mol Biol Evol 2005;22:333-46.
 6. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
 7. 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.
 8. Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JA. *Botrytis cinerea*: the cause of gray mould disease. Mol Plant Pathol 2007;8:561-80.
 9. Nam MH, Kim HS, Lee WK, Gleason ML, Kim HG. Control efficacy of gray mold on strawberry fruits by timing of chemical and microbial fungicide applications. Korean J Hort Sci Technol 2011;29:151-5.
 10. Yoon CS, Yeoung YR, Kim BS. The suppressive effects of calcium compounds against *Botrytis cinerea* in paprika. Korean J Hort Sci Technol 2010;28:1072-7.