

체리 잣빛무늬병에 관여하는 *Monilinia fructicola*의 특성

최효원* · 홍성기 · 이영기 · 남영주 · 이재금 · 심홍식

농촌진흥청 국립농업과학원

Characterization of *Monilinia fructicola* Associated with Brown Rot of Cherry Fruit in Korea

Hyo-Won Choi*, Sung Kee Hong, Young Kee Lee, Young Ju Nam, Jae Guem Lee and Hong Sik Shim

National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

ABSTRACT : In August 2013, brown rot was observed on cherry fruits (*Prunus avium* L.) in Hwaseong city, Korea. Fruit rot first appears as small, circular brown spots that increase rapidly in size causing the entire fruit to rot. Grayish spores appear in tufts on rotted areas. Based on these morphological characteristics, the two isolates were identified as *Monilinia fructicola*. Molecular analysis of 5.8S subunit and flanking internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) was performed to confirm the identification. The ITS sequences had 100% identity with those of other reference *M. fructicola* isolates of NCBI GenBank. Pathogenicity was tested using spore suspension inoculation on wounded or unwounded cherry fruits. The lesions were observed on wounded and unwounded fruits after inoculation for 7 days. This is the first report on *M. fructicola* causing brown rot on cherry fruits in Korea.

KEYWORDS : Brown rot, Cherry fruit, *Monilinia fructicola*

체리(*Prunus avium* L.)는 장미과 벚나무속 식물의 열매로 양앵두, 단체리, 단벚나무, 단버찌 등 다양한 이름으로 사용되고 있다. 국내에는 1920년대 일본인에 의해 경주 지역에서 처음으로 과원이 조성되어 재배되기 시작했으며, 최근 재배면적이 꾸준히 증가하여 2013년에는 120 ha에 이르렀고, 총생산량은 586톤이었다[1,2]. 2013년 8월, 경기도 화성시에 위치한 과수원에서 체리 과실에 회색의 포자 덩어리가 밀생하여 상품가치가 떨어지는 잣빛무늬병 증상이 관찰되었다. 병든 과실에서 병원균을 순수분리하여 균학적 특성 및 DNA 염기서열을 조사한 결과 *Monilinia fructicola*로 동정되었으며, 체리 과실에 인공접종하여 병원성을 확

인하였다.

국내에서 체리에 발생하는 진균병으로는 *Monilinia laxa*에 의한 잣빛무늬병을 비롯하여 *Botryosphaeria dothidea*에 의한 줄기썩음병, *Botrytis cinerea*에 의한 잣빛곰팡이병 등 8가지의 병이 보고되어 있다[3]. *Monilinia*균은 체리, 복숭아, 자두, 사과, 배 등 여러 가지 과수류에 잣빛무늬병을 일으키는 병원균으로, 전세계적으로 *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa* 등 3종이 주요 병원균으로 알려져 있다[4]. 국내의 경우, *M. fructicola*는 매실, 복숭아, 자두, 살구 등에서 보고되었고, *M. fructigena*는 사과와 배, *M. laxa*는 체리에서 보고되었다[3].

본 연구에서는 체리 과실에 발생하는 잣빛무늬병의 병징과 병원균의 균학적 특성, 염기서열 분석 결과 및 병원성 검정에 대한 결과를 보고하고자 한다.

병징

과실에 갈색의 수침상 원형 병반이 나타나고, 진전되면 과실전체가 부패한다. 부패된 과실에 회갈색이나 연갈색의 포자덩어리가 관찰된다(Fig. 1A). 감염된 과실은 결국 쪼글쪼글해지고, 검게 말라 땅에 떨어지거나 가지에 남아있게 된다(Fig. 1B). 특히 과실에 발생된 *M. fructicola*에 의한 병징은 *M. laxa*에 의한 병징과 매우 유사하나, *M. fructicola*에 감염될 경우 어린 과실에서는 병징이 나타나지 않다가

Kor. J. Mycol. 2014 December, 42(4): 353-356
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.4.353>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: hyon338@korea.kr

Received October 14, 2014
 Revised December 12, 2014
 Accepted December 17, 2014

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

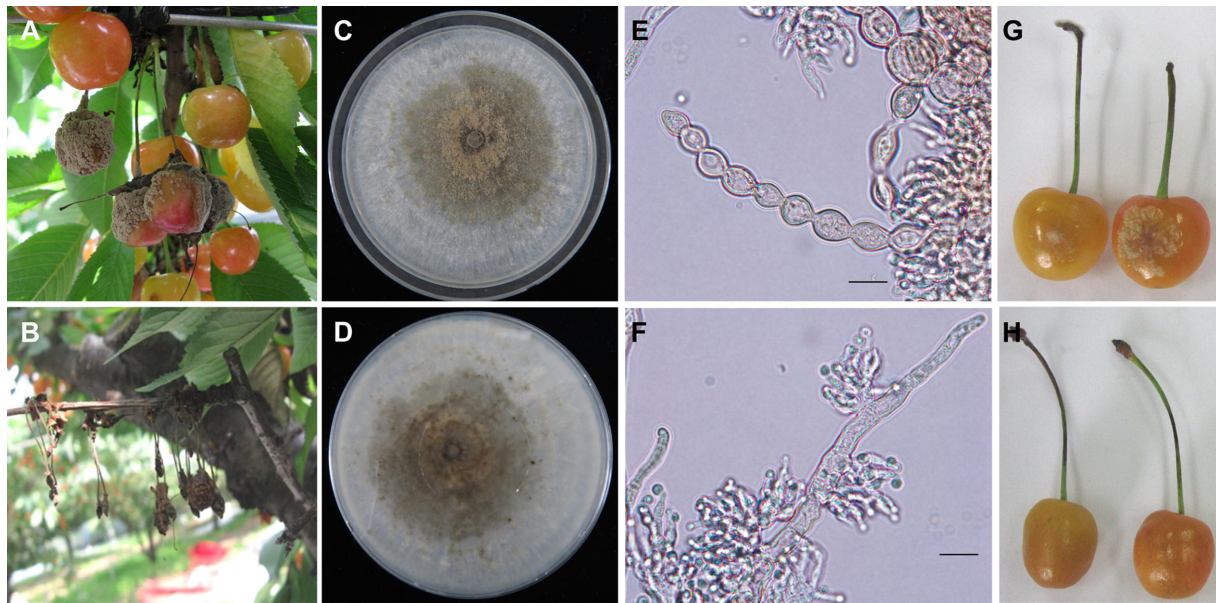


Fig. 1. Symptoms and mycological characteristics of brown rot of cherry fruits caused by *Monilinia fructicola*, A and B indicated brown rotted fruits covered with the grayish spore mass and dark black mummified fruits, respectively. C and D indicated top and bottom view of *M. fructicola* cultured on PDA after 7 days. E, lemon shaped conidia of *M. fructicola* are produced in beads like strings; F, asymmetric phialides and microconidia on old colony, scale bars = 10 μm. G and H indicated symptoms on wounded cherry fruit artificially inoculated with *M. fructicola* and control, respectively.

과실이 성숙되면 균사가 관찰되는 것으로 알려져 있다[5].

균학적 특성 및 염기서열 분석

병원균을 분리하기 위하여 병든 조직과 건전한 조직의 경계부위를 5×5 mm 크기로 잘라 1% NaOCl 용액에 표면 살균하고 멸균수로 세척한 후 화염소독한 여과지를 이용하여 물기를 제거하고 물한천배지(water agar)에 치상하였다. 치상 5~7일 후, 자라난 균총으로부터 *Monilinia*균을 단포자 분리하여 사면 감자한천배지(PDA)에 옮겨 배양하고, 이 균주를 10°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 분리한 *Monilinia*균의 균학적 특성은 PDA배지, 25°C의 NUV/암조건(12시간/12시간)하에서 7일간 배양한 후 조사하였다.

PDA에서 균총은 3일간 56~70 mm 성장하였고, 기중균사는 흰색 내지 회색에서 갈색을 나타내었다. 또한 PDA상에서 균총의 모양은 가장자리가 매끄러운 형태였으며, 포자를 풍부하게 형성하고, 포자형태는 염주상으로 시슬모양을 나타내었다(Fig. 1C-1F). 유럽, 미국 등에서는 핵과류에 잿빛무늬병을 일으키는 *Monilinia*균 가운데 병징으로 구분이 어려운 *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*의 동정을 위한 여러 연구가 수행되었다. 이들 균주에 대해 균사생장율을 조사한 연구에 의하면 *M. laxa*가 *M. fructigena*와 *M. fructicola*보다 생육이 느린 것을 보고하였고, *M. laxa*의 균총 형태는 나머지 두 종과 달리 가장자리가 갈라져 있는 것이 대표적인 차이점으로 알려져 있다[6]. 또한 발아관의

Table 1. Comparison of morphological and cultural characteristics between the present isolates obtained from infected cherry fruits and *Monilinia* species described previously

Structure ^a	Characteristics ^b			
	Present isolates	<i>M. fructicola</i>	<i>M. fructigena</i>	<i>M. laxa</i>
Conidia size in culture (μm)	8.6-13.4 × 6.4-9.4	14.5-16 × 9.5-11	18-21 × 11.5-13	11.5-17 × 8-11
Hypthal diameter	Relatively narrow	Relatively narrow	Relatively wide	Relatively narrow
Sporulation	Abundant	Abundant	As <i>M. fructicola</i> but much less abundant	Virtually none
Colony shape	Margin entire	Margin entire	Margin entire	Lobed margin

^aAll structures were investigated on PDA plates incubated in alternating cycles of 12 h NUV light and 12 h darkness at 25°C for 10 days.

^b*Monilinia* species described by EPP0/CABI[12].

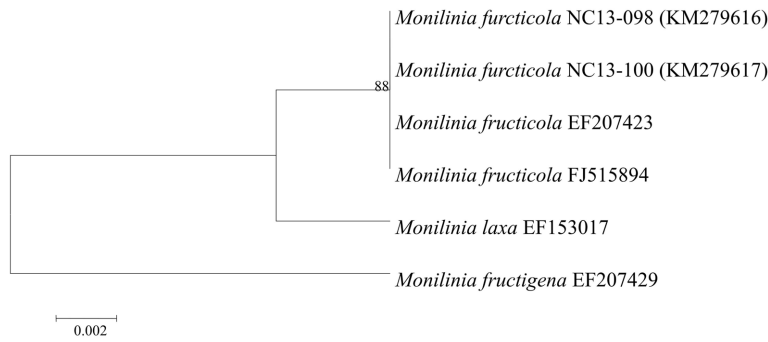


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Monilinia* isolates from cherry fruits based on the ITS and 5.8S rDNA sequences. The tree was generated using Neighbor-Joining analysis and Kimura 2-parameter model. Bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

길이 역시 *M. laxa*의 경우 *M. fructigena*, *M. fructicola*에 비해 현저히 짧은 것으로 보고된 바 있다[7]. 이와 같은 균학적 특성을 고려하여 체리 병반에서 분리한 2개의 *Monilinia*균을 *M. fructicola*로 동정하였다(Table 1).

*M. fructicola*로 동정된 균주의 ITS 영역의 염기서열 분석을 수행하였다. PDB 배지에 키운 균사를 동결건조한 후 마쇄하여 CTAB법으로 genomic DNA를 분리하였다[8]. rDNA ITS 영역의 염기서열 분석을 위하여 프라이머 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하여 PCR 증폭하였다[9]. 증폭된 PCR산물은 Wizard SV Gel & PCR Clean-up System kit(Promega)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector와 ligation하고, heat shock방법으로 형질전환시켜 blue-white screening법으로 형질전환체를 선발하였다. 선발된 형질전환체로부터 Wizard Plus SV Minipreps(Promega)를 이용하여 plasmid를 추출하였고, ABI 3730 DNA analyzer(Applied Biosystems)로 염기서열 분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 Clustal W 소프트웨어를 이용하여 정렬하였고, nucleotide의 유사도를 계산하였다. 계통수는 MEGA 4.0 프로그램을 이용하여 neighbor-joining법에 의해 작성하였다. 균학적 특성 조사에서 *M. fructicola*로 동정되었던 균주는 ITS 염기서열 분석에 의하여 스페인의 핵과류에서 분리한 *M. fructicola*(NCBI accession number EF207423, FJ515894)와 상동성이 100%로 나타났다(Fig. 2). 분리된 NC13-098, NC13-100 균주는 각각 KM279616과 KM279617의 accession number로 GenBank에 등록하였다.

병원성 검정

체리 과실에 대한 병원성을 확인하기 위하여 외관상 건전한 체리 과실을 70% 에탄올로 상처가 생기지 않도록 닦은 후, 1% NaOCl 용액에 10분간 침지하여 부생균을 제거하고, 멸균수로 3회 세척하여 무균대에서 건조시켰다. 분리한 병원균 *M. fructicola* NC13-098과 NC13-100 균주는

PDA배지에서 7일간 배양한 후, 멸균수로 포자를 회수하여 1×10^5 spores/mL의 농도로 포자현탁액을 만들었다. 멸균한 바늘로 체리 과실을 찢어 상처를 낸 과실과 상처가 없는 과실에 포자현탁액 10 μ L를 떨어뜨려 접종하였고, 대조구는 상처 및 무상처 과실에 멸균수로 처리하였다. 각각의 과실을 습실처리한 플라스틱 박스에 넣고 25°C의 배양기에 두면서 습도와 온도를 유지시켰다. 접종 7일 후, 상처의 유무에 관계없이 병원균을 접종한 부위에서 수침상의 둥근 병반이 관찰되었고, 특히 상처구에서는 균사가 형성된 것을 확인할 수 있었으며, 대조구에서는 병징이 나타나지 않았다(Fig. 1G, 1H, Table 2). *M. fructicola*에 의한 잣빛무늬병은 세계적으로 핵과류에 발생하는 중요한 병으로 알려져 있으며, 미국 캘리포니아 지역에서는 이 균의 살균제 저항성을 보고한 바 있다[10]. 우리나라에는 체리 잣빛무늬병균으로 *M. laxa*만이 보고되어 있으나 미국에서는 이 병에 주로 *M. fructicola*가 관여하며, *M. laxa*도 병을 일으킨다고 보고된 바 있다[11]. 따라서 국내에서도 체리를 재배하는 다양한 지역에서 잣빛무늬병균을 분리하여 *M. fructicola*와 *M. laxa*의 분포비율을 조사할 필요가 있을 것으로 생각된다.

이상과 같이 체리 과실에 발생한 잣빛무늬증상에서 분리한 병원균은 균학적 특성과 DNA 염기서열 분석에 의해 *M. fructicola*로 동정되었으며, 이 균은 체리에 병원성이 있음이 확인되었다. 따라서 본 결과를 토대로 국내 체리 잣빛

Table 2. Pathogenicity of *Monilinia fructicola* isolates to cherry fruits by artificial inoculation

Isolate	Pathogenicity ^a of tested isolates on cherry fruits	
	Wounded	Unwounded
NC13-098	++	+
NC13-100	++	+
Control	-	-

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

무늬병에는 현재 알려져 있는 *M. laxa* 이외에 *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey가 관여하는 것을 처음으로 보고한다.

적 요

2013년 8월, 경기도 화성시에 위치한 과수원에서 체리 과실에 회색의 포자 덩어리가 발생하는 잣빛무늬병 증상이 관찰되었다. 과실에 갈색의 수침상 원형 병반이 나타나고, 진전되면 과실 전체가 부패하였다. 부패된 과실에 회갈색 내지 연회색의 포자덩어리가 관찰되었다. 병든 체리 과실에서 2개의 *Monilinia* 균을 분리하여 균학적 특성을 조사한 결과 *M. fructicola*로 동정되었다. 이러한 결과를 확인하기 위하여 ITS 영역의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 분리균은 모두 *M. fructicola*로 확인되었다. 체리 과실을 상처구와 무상처구로 구분하고, 포자현탁액을 접종하여 병원성을 확인한 결과, 접종 7일 후 상처의 유무에 관계없이 분리균을 접종한 부위에서 수침상의 둥근 병반이 관찰되었다. 따라서 본 병을 *Monilinia fructicola*에 의한 체리잣빛무늬병으로 명명하며, 이 균에 의한 잣빛무늬병의 발생을 국내 최초로 보고한다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호 : PJ010004)의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Ahn S, Ryu H, Kang D, Jung I, Sohn H. Antimicrobial and antioxidant activity of the fruit of *Prunus avium*. Kor J

Microbiol Biotechnol 2009;37:371-6.
 2. The FTA Implementation Support Center. KREI FTA issue report No. 3. Seoul: Korea Rural Economic Institute;2014.
 3. The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.
 4. Shim MY, Jeon YJ, Kim SH. Characterization of a brown rot fungus isolated from dwarf flowering almond in Korea. Mycobiology 2007;35:30-5.
 5. Gell I, De Cal A, Torres R, Usall J, Melgarejo P. Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia* spp. and the incidence of brown rot of peach fruit; factors affecting latent infection. European J Plant Pathol 2008;121: 487-98.
 6. Batra L. First authenticated North American record of *Monilinia fructigena*, with notes on related species. Mycotaxon 1979;8:476-84.
 7. Hrustic J, Mihajlovic M, Grahovac M, Delibasic G, Bulajic A, Krstic B, Tanovic B. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species. Pestic Phytomed 2012;27:283-97.
 8. 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.
 9. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols, a guide to methods and applications. New York: Academic Press; 1990. p. 315-22.
 10. Zhounghua M, Yoshimur MA, Michailides TJ. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. Appl Environ Microbiol 2003;69:7145-52.
 11. Chen F, Liu X, Schnabel G. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in sweet cherry in Maryland. Plant Dis 2013;97:145.
 12. EPPO/CABI. Data sheets on quarantine pests : *Monilinia fructicola*; 2010.