

*Aspergillus tubingensis*에 의한 샤인머스켓 포도송이썩음병(가칭)의 발생

Occurrence of Bunch Rot Disease Caused by *Aspergillus tubingensis* on Shine Muscat Grape

***Corresponding author**

Tel: +82-54-820-5507

Fax: +82-54-820-6320

E-mail: yongbac@andong.ac.kr

김영수¹ · 권혁태¹ · 홍승범² · 전용호^{1*}¹국립안동대학교 식물학과, ²국립농업과학원 농업미생물과Young Soo Kim¹, Hyeok Tae Kwon¹, Seung-Beom Hong², and Yongho Jeon^{1*}¹Department of Plant Medicals, Andong National University, Andong 36729, Korea²Korean Agricultural Culture Collection, Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

During the year 2018, the symptoms of bunch rot on Shine Muscat (*Vitis vinifera* L.) were observed in Kimcheon-si, Gyeongbuk province in Korea. The disease appears on the Shine Muscat as a black rot due to prolific fungal sporulation after it has invaded into the Shine Muscat which look completely empty and dryness. Colonies of these fungi are present on the Shine Muscat skin from fruit setting and increase in amount from early season to harvest, while become peak at ripening stage. To isolate the causal agent, small fragments (2 to 3 mm) of decayed tissue from the lesion margin were placed onto potato dextrose agar (PDA) plates. Fungal colonies on PDA produced dense white aerial mycelium and then covered with dark black conidial heads. These heads were large and radiate, and vesicles were globose (2.12–32.0×2.0–3.1 μm). Based on morphological and cultural characteristics, this fungus was identified as *Aspergillus tubingensis*. To confirm its identity, the internal transcribed spacer, β-tubulin, and RNA polymerase II was sequenced for molecular identification. BLAST search indicated 99% identity with *A. tubingensis*. The pathogenicity test on healthy grape of Shine Muscat produced bunch rot, as the original symptoms. To select effective fungicides for the control of bunch rot, an *in vitro* antifungal activity of seven fungicides were evaluated against the growth of *A. tubingensis*. Five fungicides (diphenconazole, tebuconazole, metconazole, iminoctadine, and captan) exhibited significantly strong suppression of the mycelial growth of *A. tubingensis*.

Keywords: *Aspergillus tubingensis*, Bunch rot, Fungicide, Grape, Shine Muscat

Received December 18, 2019

Revised December 24, 2019

Accepted December 24, 2019

포도는 우리나라 5대 과실 중 하나로 국내 과실 산업에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다(Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea, 2012). 국내 포도 재배 현장에서 보고된 병은 곰팡이, 바이러스, 세균과 선충에 의한 병이 총 26종이 보고되어 있으며, 이 중 21종이 곰팡이

에 의한 병이다(Korea Society of Plant Pathology, 2009). 포도를 재배하는 기간 동안 발생하는 주요 병은 *Plasmopara viticola*에 의한 노균병, *Phomopsis viticola*에 의한 꼭지마름병, *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병, *Elsinoe ampelina*에 의한 새눈무늬병, *Uncinula necator*에 의한 흰가루병, *Colletotrichum gloeosporioides*에 의한 탄저병 및 *Pseudomonas vitis*에 의한 포도나무 균핵병 등이다(Kim 등, 2001; Korea Society of Plant Pathology, 2009; Park 등, 2009; Yun 등, 2001, 2003).

포도 재배 시 높은 수분과 20–30°C 범위인 경우에 포도

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

에 발생하는 가장 일반적인 곰팡이는 *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Rhizopus* 등이 다(Belli 등, 2004; Sage 등, 2002). 그 중 *Aspergillus* 감염의 주요 경로는 곰팡이 질병, 해충 및 환경요인을 포함한 많은 요인에 의해 발생하며, 병 발생 후 독소 생산에 영향을 미친다(Somma 등, 2012).

본 연구에서는 2018년 김천 지역에서 발생되고 있는 샤인머스켓 포도의 포도송이썩음병을 일으키는 병원균을 분리, 동정하였고, 이를 효과적으로 방제하고자 방제 약제 선발 실험을 수행하였다.

병징 및 병원균 분리. 2018년 6월-8월에 경상북도 김천시 갑문면 포도 재배 농가(36.12012N, 128.12589E)에 있는 포도(샤인머스켓)에서 초기증상은 과실이 무르며 병이 심한 경우 검은색 포자들로 뒤덮여져 있고, 포도 알맹이가 모두 떨어지는 증상을 관찰하였다. 특히 꼭지 부분과 무름 증상이 있는 과실 주위로 검은색 포자가 많이 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이 병으로 인하여 포도는 정상적인 생장이 어렵고 포도 과실에 직접적인 영향을 주어 생산량 감소와 함께 상품성을 떨어뜨리고 있었다.

병원균을 분리하기 위해 발병과실의 안쪽에 있는 과육을 1% NaOCl, 70% 에탄올 용액에 15초간 침지하여 표면 살균하였다. 이후 시료를 멸균수를 이용하여 충분히 세척 후 여과지로 남은 물기를 제거하고 1-2 mm 크기로 잘라 물 한천배지(water agar)와 감자 한천배지(potato dextrose agar, PDA)에 치상하여 25°C

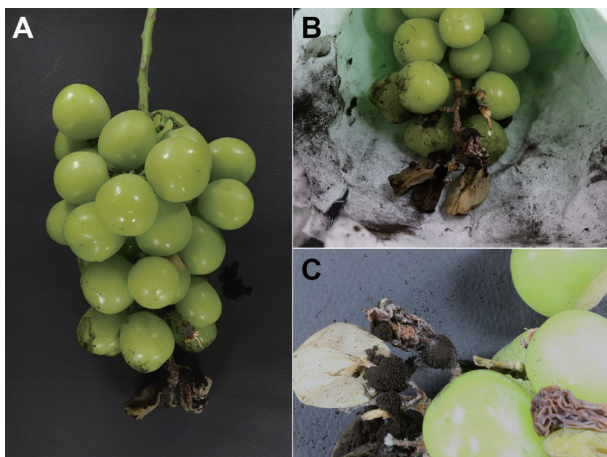


Fig. 1. Occurrence of bunch rot disease caused by *Aspergillus tubingensis* in grape (Shine Muscat) under greenhouse conditions. (A) The grape bunch infected with disease directly through their skins during warm temperatures (20–30°C) in the presence of moisture. (B, C) Infected berries appear initially as pale to brown in color, but are soon covered with masses of brown or black spores.

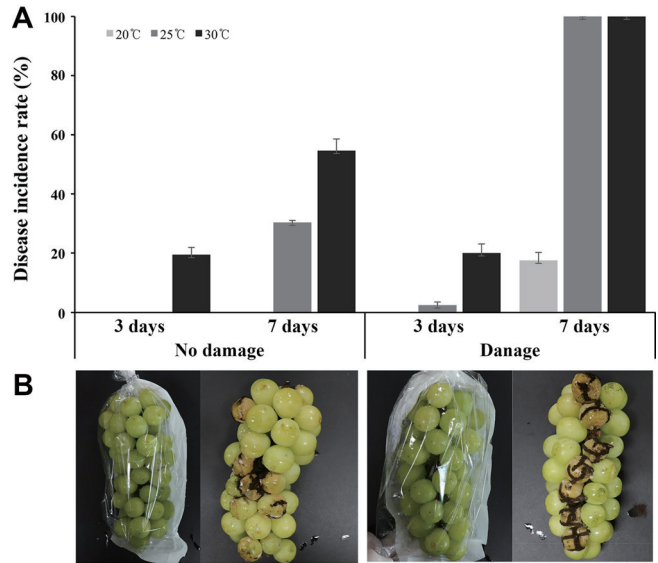


Fig. 2. Pathogenicity test. The spore suspension (10^5 spores/ml) of pathogenic fungal isolate *Aspergillus tubingensis* (cultured on potato dextrose agar plates at 25°C for 7 days) were inoculated on the surface-sterilized grape fruits and incubated at different temperature conditions (20–30°C) for 7 days, and the disease incidence (%) was recorded (A). The disease incidence was not observed on 3rd day, while the incidence was observed on 7th day at 30°C). However, the disease incidence was not observed at the incubation temperature of 20°C (B).

에서 3일 동안 배양하였다. 시료로 사용한 10개의 조직 모두에서 동일한 패턴으로 곰팡이가 자라는 것을 확인하였다. 3일 후 발병 시료에서 자라난 곰팡이 균사 선단을 취하여 다시 PDA 배지에서 7일 동안 순수 배양하였다. 또한 무르고 있는 포도의 단면에 형성된 포자를 이쑤시개를 이용하여 PDA에 치상하여 2-3일 후 형성된 균총을 새로운 PDA에 옮겨 순수 분리하였다. 이와 같은 방법을 통하여 2018년 채집시료로부터 총 12개의 곰팡이를 분리하였다.

병원성 검정. 병원성 검정은 시중에 판매되고 있는 포도를 실험에 사용하였다. 포도송이 썩음병 병반에서 분리한 *Aspergillus tubingensis* 균주를 PDA 배지에서 치상하여 25°C에서 7일간 배양 후, 형성된 포자를 멸균수에 현탁하여 포자밀도를 10^5 conidia/ml로 조정하여 사용하였다. 접종 방법은 건전한 포도 열매(샤인머스켓)에 멸균된 채혈침을 이용하여 상처를 유도한 것과 무상처로 구분하였으며, 각각 10 ml씩 포자현탁액을 atomizer (F100, Meiji Air Mfg. Co., Osaka, Japan)를 이용하여 분무접종하였다. 대조구로 멸균수를 접종하여 실험을 실시하였다. 접종 후 플라스틱통(25×15×6 cm)에 2겹의 키친타올을 깔고 여분의 물이 흐르지 않을 정도 젖도록 물기를 주어 습도를 유지하였다.

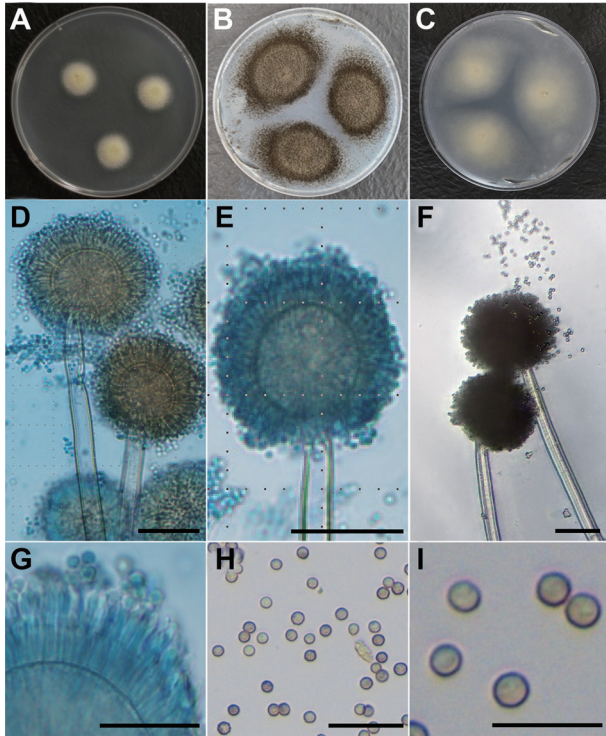


Fig. 3. Morphological description of *Aspergillus tubingensis* ANU-F094 isolated from fruit of *Vitis vinifera* (Shine Muscat). The isolate *A. tubingensis* ANU-F000 was cultured onto potato dextrose agar plate and incubated for 7 days (A–C). Later, the development of conidiophores and conidia were observed using a microscope (D–G). The individual conidia were observed under microscope (H, I). Scale bars: D, E, F, H=20 μ m, G, I=10 μ m.

20, 25, 30°C 배양기에서 7일간 유지하며 병징을 관찰하였다. 접종한 과실은 3일 후부터 병이 나타나기 시작하였으며, 7일 후에는 자연 감염과 같은 정도의 병징과 표징이 관찰되었다(Fig. 2). 병징은 연노랑계 무르는 증상이었으며 표징으로는 검은 곰팡이 포자가 포도송이를 뒤덮었다. 또한 상처 여부와 상관없이 병이 진전됨을 확인 할 수 있었으나, 온도에 따른 병 발생이 다름을 관찰하였다. 하우스에서 봉지에 싸여져 재배가 되는 샤인머스켓 특성상 외부 상처 없이도 25°C 이상의 온도에서는 포도송이 썩음 증상이 관찰되었다(Fig. 2B). 이 곰팡이는 습도와 온도가 높은 조건에서 포자가 많이 형성되면서 포도 표면에서 부생적으로 생장함에 따라 포도 조직을 연약하게 하여 무르게 하는 증상을 유도한다고 생각된다. 병 발생이 된 부위에서는 병원균을 분리한 결과 처음과 같은 곰팡이가 균일하게 분리되었으며, 염기서열 분석을 통해 같은 곰팡이임을 확인하였다.

병원균의 균학적 특성 및 분자계통학적 유연관계 분석. 분리한 곰팡이를 PDA 배지에서 균주의 배양적 특성을, 광학현미

경을 이용하여 분생포자경과 분생포자를 관찰하였다. PDA 배지에서 배양 3일까지는 흰색과 갈색의 균사를 형성하다가(Fig. 3A), 5일 후 어두운 갈색 내지 검은색의 소낭 및 분생포자가 균사를 뒤덮고, 배지 뒷면은 연한 노란색을 띄었다(Fig. 3B, C). 분생포자 50개를 광학현미경으로 관찰 결과 갈색이거나 투명하며, 크기는 (2.12–32.0)×(2.0–3.1) μ m의 크기로 격막이 없으며 구형이거나 타원형(ellipsoid)이었다(Fig. 3H, I). 이러한 병원균의 형태적 특징은 *A. tubingensis*와 일치하였다(Majid 등, 2015; Simões 등, 2013). 병원균의 형태적 특성을 바탕으로 유전자 염기서열 분석으로 분자계통학적 유연관계를 분석하였다. PDA 배지에 7일간 배양한 4개의 균주로부터 Genomic DNA prep kit (Solgent Co., Daejeon, Korea)을 이용하여 total genomic DNA를 추출하였다. ITS1/ITS4 primer를 이용하여 internal transcribed spacer (ITS) (Choi 등, 2000; White 등, 1990)와 bt2a/bt2b primer를 이용한 β -tubulin (Glass와 Donaldson, 1995) 유전자 그리고 RNA polymerase II (RPB2) (Peterson과 Jurjević, 2013) 유전자를 증폭하였다. 증폭시킨 PCR product를 Gel & PCR purification system (Solgent Co.)를 사용, 정제하여 Solgent사에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 sequence정보를 NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST search를 통해 *A. tubingensis*의 염기서열 (KM594388)과 모두 99% 이상 일치하는 것을 확인하였다. 분리한 균주의 ITS region, β -tubulin, RPB2 유전자 염기서열 각각을

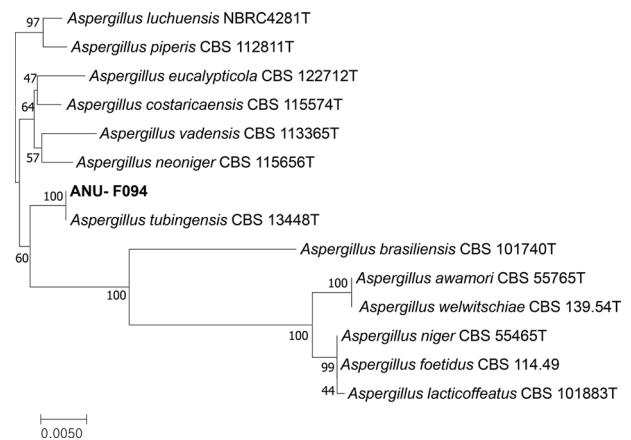


Fig. 4. Phylogenetic dendrogram constructed from the comparative analysis of combined internal transcribed spacer, β -tubulin, and RNA polymerase II gene sequenced showing the relationships between *Aspergillus tubingensis* strain ANU-F094 and other *Aspergillus* species. Bootstrap values (expressed as percentage of 5,000 replications) greater than 40% are shown at branch points and the species names are followed by the GenBank accession numbers. Maximum parsimony phylogenetic tree was generated by the MEGA 8.0 program.

연결하여 *Aspergillus*와 인근 속 곰팡이의 해당 염기서열과 함께 정렬한 후 MEGA 6.0 프로그램의 neighbor joining 방법을 사용하여 계통수를 작성하였다. 계통학적 분석은 *Aspergillus* section Nigri에 속하는 표준균주와 참고균주를 사용하여 유연관계를 확인하였다(Varga 등, 2011). 분류학적인 위치를 확인하였을 때 APEC-F094 균주는 *A. tubingensis* CBS 13448T 균주와 일치하였다(Fig. 4).

한천희석법을 통한 병원균의 군사 성장 억제 효과 조사. 포도송이 썩음병의 방제 실험에 사용될 약제의 선발을 위하여, 포도에 발생하는 곰팡이 병해(젓빛곰팡이병, 갈색무늬병, 탄저병) 약제로 등록된 7종의 단제를 실험에 이용하였다(Table 1). 포도에서 분리한 *A. tubingensis* APEC-F094를 대표균주로 선별하여 시험에 사용하였다. PDA를 약 60°C로 식힌 다음 각 살균제의 유효성분이 5,000배(권장량)와 10,000배(반량)가 되도록 첨가하고 magnetic bar로 골고루 혼합한 다음 petri dish당 20 ml씩 분주하였다. 병원균은 5일간 PDA 배지에서 배양한 후, 멸균수를 이용하여 포자현탁액(10^5 conidia/ml)을 제조하여 살균제가 첨가된 PDA의 정 중앙에 20 μ l씩 접종하고 25°C 암상태

Table 1. Fungicides used in this study

Chemical fungicides name	Dilution fold-1 (/20 l)	Dilution fold-2 (/20 l)
Dipenoconazole 10%, WP (g)	10	5
Tebuconazole 25%, WP (g)	10	5
Metconazole 20%, WP (ml)	6.7	3.35
Iminoctadine tris(albesilate) 40%, WP (g)	20	10
Dithianon 75%, WP (g)	20	10
Pyraclostrobin 20%, WP (g)	6.7	3.35
Captan 50%, WP (g)	40 g	20

WP, wettable powder.

배양기에서 7일간 배양하였다. 각 배지에서 균총의 직경을 측정하여 약제 배지와 약제를 첨가하지 않은 무처리 배지의 균총 직경을 비교하여 군사 성장 억제율(%)을 계산하였다. 모든 처리는 3반복으로 실험하였다. 포도송이 썩음병 방제를 위한 약제 선발을 실시한 결과 총 7종의 살균제 중 5개 약제(dipenocon-

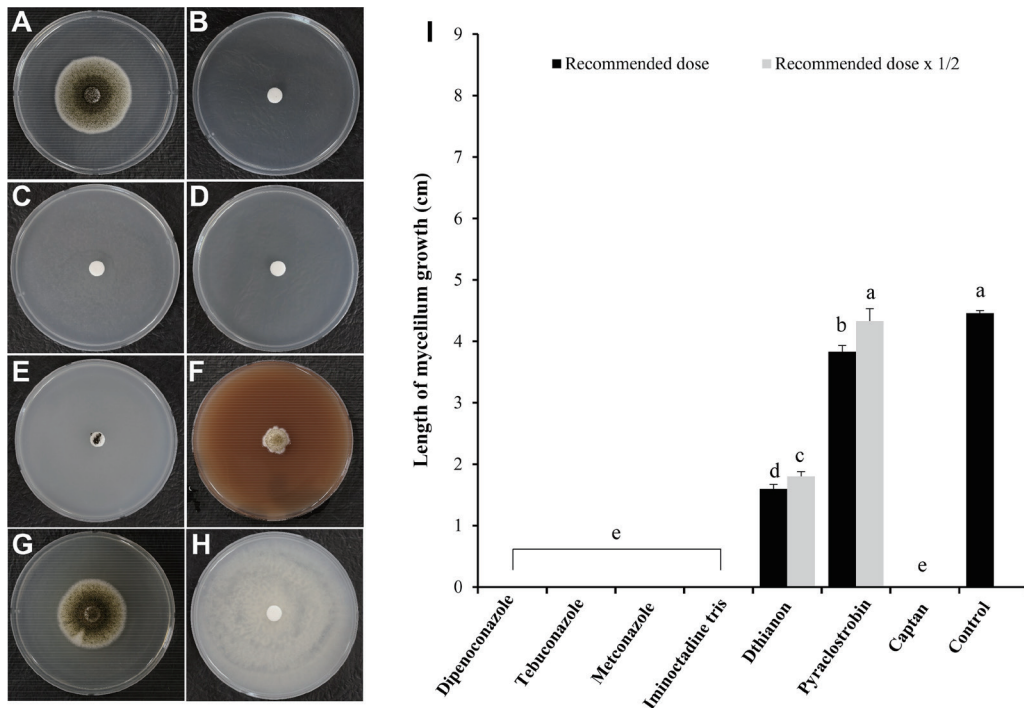


Fig. 5. Effect of different fungicides on inhibition of mycelial growth of *Aspergillus tubingensis* APEC094. The pathogenic fungal isolate *A. tubingensis* APEC-000 was cultured on potato dextrose agar (PDA) plates with or without fungicide. (A) Untreated control without any fungicides. (B) Dipenoconazole. (C) Tebuconazol. (D) Metconazole. (E) Iminoctadine tris. (F) Dthianon. (G) Pyraclostrobin. (H) Captan. (I) The growth inhibition of mycelia in each PDA plate against each fungicide was noted 14 days after incubation at 25°C. Bars followed by the same letters represent no significant difference according to the least significant difference test at $P=0.05$.

Table 2. Mycelial growth of *Aspergillus tubingensis* isolated from Shine Muscat on potato dextrose agar amended with fungicides

Active ingredient	Mycelial growth (mm) ^a	
	Dilution fold-1	Dilution fold-2
Dipenoconazole 10%, WP	0 ^b	0
Tebuconazole 25%, WP	0	0
Metconazole 20%, WP	0	0
Iminoctadine tris(albesilate) 40%, WP	0	0
Dithianon 75%, WP	1.6±0.07	1.8±0.08
Pyraclostrobin 20%, WP	3.83±0.1	4.33±0.2
Captan 50%, WP	0	0
Control	4.46±0.04	4.46±0.04

WP, wettable powder.

^aColony diameters after cultured on PDA with fungicides for 7 days at 25°C.

^bThe average of colony diameter, which was calculated with 3 replicates.

azole, tebuconazole, metconazole, iminocadine, captan)에서 균사생장을 완전히 억제하였으며(Fig. 5), dithianon은 무처리보다 50% 이상의 균사생장 억제효과를 나타냈다. Pyraclostrobin은 5,000배 희석액에서 미약한 균사 생장 억제효과를 나타냈다(Table 2). 이러한 한천희석법에 의한 결과는 균사억제 효과를 보는 것이므로 보호 살균제의 경우 포자의 발아 억제 실험을 추가하여야 할 것이며 또한 포장에서의 효과를 검증해 봐야 할 것으로 생각된다.

요 약

2018년 경북 김천 지역 포도 하우스 재배 농가에서 포도송이가 무르고 마른 포도 과실이 낙과되는 피해가 발생하였다. 병반 표면에는 검갈색의 곰팡이 포자가 형성된 것을 확인할 수 있었으며, 이병과실에서 병원균을 분리하여 균학적 특징 및 염기서열 분석결과 병원균은 *Aspergillus tubingensis*로 동정하였다. 이 증상의 원인균을 증명하기 위해 이병과실에서 병원균을 분리하여 병원성 검정을 수행한 결과, 고온으로 갈수록 급격히 병이 진전되고 하우스에서 발생한 병징과 일치하였다. 또한, 포도송이 썩음 병원균에 대하여 화학농약 약제의 선발을 통해 병원균의 확산을 막고 예방을 하고자 단계 7종 균사생장 억제 효과 검정을 실시하였다. Dipenoconazole, tebuconazole, metconazole, iminocadine, captan 5가지의 약제에서 균사생장 억제

효과가 확인되었다. *A. tubingensis*에 의한 포도송이썩음병(가칭)은 2018년도부터 국내 샤인머스켓 포도에 처음 발생되고 있음을 보고하고, 효과적으로 포도송이썩음병의 발생을 예방할 수 있는 5종의 약제를 보고한다.

Conflicts of Interest

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

Acknowledgments

This work was supported by a grant from Research Fund of Andong National University.

References

- Belli, N., Pardo, E., Marin, S., Farré, G., Ramos, A. J. and Sanchis, V. 2004. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *J. Sci. Food Agric.* 84: 541-546.
- Choi, I.-Y., You, Y.-J., Choi, J.-S. and Lee, W.-H. 2000. Genetic relationships of internal transcribed spacer (ITS) region on entomopathogenic fungi by RELP. *Korean J. Mycol.* 28: 112-117.
- 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.
- Kim, S.-H., Choi, S.-Y., Lim, Y.-S., Yoon, J.-T. and Choi, B.-S. 2001. Etiological characteristics and chemical control of ripe rot in grape cultivar Campbell Early. *Res. Plant Dis.* 7: 140-144. (In Korean)
- Korea Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Disease in Korea. The Korea Society of Plant Pathology, Seoul, Korea. 210 pp.
- Majid, A. H. A., Zahran, Z., Rahim, A. H. A., Ismail, N. A., Rahman, W. A., Zubairi K. S. M. et al. 2015. Morphological and molecular characterization of fungus isolated from tropical bed bugs in Northern Peninsular Malaysia, *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5: 707-713.
- Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea. 2012. Food, agriculture, forestry and fisheries statistical yearbook. URL <http://www.mifaff.go.kr> [2 November 2019].
- Park, J.-H., Han, K.-S., Han, Y.-K., Lee, J.-S., Kim, D.-H. and Hwang, J.-H. 2009. *Sclerotinia* shoot rot of grapevine (*Vitis* spp.) caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Korea. *Res. Plant Dis.* 15: 259-261. (In Korean)
- Peterson, S. W. and Jurjević, Ž. 2013. *Talaromyces columbinus* sp. nov., and genealogical concordance analysis in *Talaromyces* clade 2a. *PLoS ONE* 8: e78084.

- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, É., Seigle-Murandi, F. and Creppy, E. E. 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1306-1311.
- Simões, M. F., Santos, C. and Lima, N. 2013. Structural diversity of *Aspergillus* (Section Nigri) spores. *Microsc. Microanal.* 19: 1151-1158.
- Somma, S., Perrone, G. and Logrieco, A. F. 2012. Diversity of black *Aspergilli* and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathol. Mediterr.* 51: 131-147.
- Varga, J., Frisvad, J. C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. et al. 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. *Stud. Mycol.* 69: 1-17.
- Yun, H.-K., Park, K.-S., Rho, J.-H., Jeong, S.-B. and Kim, W.-C. 2001. Downy mildew resistance of grape cultivars (*Vitis* spp.) under greenhouse and field condition. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 19: 54-59.
- Yun, H. K., Park, K. S., Rho, J. H., Kwon, B. O. and Jeong, S. B. 2003. Development of an efficient screening system for anthracnose resistance in grapes. *J. Korean Soc. Hortic. Sci.* 44: 809-812.
- 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. Sninsky and T. J. White, pp. 315-322. Academic Press Inc., New York, USA.