

잣빛곰팡이병원균 *Botrytis cinerea* 균주 종류별 장미 발병 정도의 차이

Difference of Gray Mold Severity at Roses Caused by *Botrytis cinerea* Strains

*Corresponding author

Tel: +82-31-229-5794

Fax: +82-31-229-5963

E-mail: hkhtak@gg.go.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-4510-1222>

황규현^{1*} · 홍승민¹ · 이영순² · 이현주³ · 서명훈¹

¹경기도농업기술원 원예연구과, ²경기도농업기술원 버섯연구소, ³경기도농업기술원 환경농업연구과

Kyu-Hyon Hwang^{1*}, Seung-Min Hong¹, Young-Soon Lee², Hyun-Ju Lee³, and Myeong-Whoon Seo¹

¹Division of Horticulture Research, Gyeonggido Agricultural Research & Extension Services, Hwaseong 18388, Korea

²Mushroom Research Institute, Gyeonggido Agricultural Research & Extension Services, Gwang-ju 12805, Korea

³Division of Environmental Agricultural Research, Gyeonggido Agricultural Research & Extension Services, Hwaseong 18388, Korea

Botrytis cinerea is the pathogen for a gray mold generating problems during the cultivation and transportation of roses. But there is little information about the difference of the symptom severity caused by gray mold on rose varieties and pathogen strains. 16 strains were collected from the rose cultivation area to confirm the degree of disease occurrence against strains and each variety. Collected 16 strains were identified based on the sequences analysis of ITS region of ribosomal DNA by using specific primers. The sequence analysis was performed by comparing the sequences to find a difference. To confirm the difference in disease occurrence for each strains, the difference was classified from 0 to 5 stages using charmant variety as a control. The data was confirmed through Kruskal-Wallis ANOVA. The result showed the significant difference in the pathogenicity caused by strains. WNG6_5 showed the lowest pathogenicity with 0.24 and WNG6_3 showed the highest with 3.20. The difference between two strains were almost 3.0. In addition, nine varieties of roses were more investigated with three strains such as the strains of WNG6_5, Hwa_1, and WNG6_3. The result showed that the Love Letter variety showed resistance and the Ice Bear variety was sensitive to three strains. Taken together, this study showed the significant difference by the interactions of rose varieties and gray mold strains.

Keywords: *Botrytis cinerea*, Pathogenicity, Rose, Strain, Variety

Received January 12, 2019

Revised March 26, 2019

Accepted March 26, 2019

서론

절화장미의 유통 중 잣빛곰팡이병 발생은 상품성을 현저하게

떨어뜨리고, 여름철 수출 시 내외부 온도 차이에 의해 더욱 피해가 증가한다(Elad, 1988; Kwon 등, 2014). 잣빛곰팡이병은 병원균의 한 종류인 *Botrytis cinerea*에 의해서 발생하며 퇴화된 화경에서 쉽게 발병한다. 앞에서 발병할 경우 잎의 가장자리나 선단부가 데친 것 같이 변색된 병반이 생기고 잎이 오그라들며, 오래 되면 잣빛곰팡이 포자가 형성된다(Kwon 등, 2014; Williamson 등,

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.

2007). *Botrytis cinerea*에 의해 발병하는 잣빛곰팡이병은 여러 균주별로 유전적, 형태학적인 구명과 발병도 등을 조사한 결과가 이 발표되었다(Amselem 등, 2011; Fu 등, 2017; Keressies 등, 1997; Kumari 등, 2014; Mirzaei 등, 2009; Van Der Vlugt-Bergmans 등, 1993). 또한, 잣빛곰팡이병의 발병정도의 차이는 유전적으로 여러가지 요인이 밝혀져 있고(Fu 등, 2017; Keressies 등, 1997; Mirzaei 등, 2009), 균주와 기주(품종)간의 상호작용에 의하여 달라진다고 보고된 바 있다(Choquer 등, 2007; Nakajima 와 Akutsu, 2014). 이러한 발병정도의 차이를 나타나게 하는 원인 물질로 BcSAK1, NADPH oxidases 등이 보고되었다(Movahedi 와 Heale, 1990; Nakajima 와 Akutsu, 2014; Segmüller 등, 2007, 2008; Siewers 등, 2005). 온실 내부와 외부에서 수집한 균주간의 차이를 구명한 결과는 보고된 바 있으나(Asadollahi 등, 2013), 장미에서 분리한 균주를 사용하여 발병정도를 균주 및 기주(품종)별로 구명한 연구는 보고된 바가 없었다. 본 연구는 장미에서 잣빛곰팡이병의 발병정도가 균주와 숙주 사이의 상호작용에 따라 차이를 나타내는지를 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

병원균 수집. 서울시립대에서 WNG 1_1등 11개 균주, 국립

원예특작과학원에서 11_172 등 3개 균주를 분양 받았으며, 경기도농업기술원 장미재배하우스에서 Hwa_1 등 2개 균주를 수집하였다(Table 1).

병원성 검정을 위한 장미 품종. 잣빛곰팡이병 균주별, 장미 품종별 병원성 검정을 위하여 사용한 장미 품종은 경기도농업기술원 장미재배하우스에서 재배되고 있는 샤만트 품종 외 9 품종을 사용하였고, 병원성 검정에 사용한 꽃잎은 30% 개화한 화경에서 채취한 꽃잎을 사용하였다.

병원균 동정. 잣빛곰팡이병원균을 PDA 평판배지에 24°C에서 배양하여 분생포자의 형태와 분생자경 형태 등 균학적 특징을 조사하여 동정하였으며, 유전적으로는 곰팡이의 ITS (Internal Transcribed Spacer)부분을 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 통해 확인하였다. 곰팡이 유전자 추출은 QUIGEN사의 genomic DNA 추출용 키트를 사용하였으며, 기존에 *Botrytis cinerea* 동정에 사용하였다고 보고된 C729primer (F 5'-AGCTC-GAGAGAGATCTCTGA-3'; R 5'-CTGCAATGTTCTGCGTGAA-3') 와 BC108 (F 5'-ACCCGCACCTAATTCGTCAAC-3'), BC563 (R 5'-GGGTCTTCGATACGGGAGAA-3') primer를 이용하여 동정하고(Rigotti 등, 2006), C729 primer를 사용하여 증폭된 부분은

Table 1. Information of collected *Botrytis Cinerea* strains

Strain	Collected area	Separation source	Source of Strain
11_172	Suwon	Rose	National Institute of Horticultural and Herbal Science
13_270	Suwon	Rose	National Institute of Horticultural and Herbal Science
13_278	Suwon	Rose	National Institute of Horticultural and Herbal Science
Hwa_1	Hwaseong	Rose	Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services
Hwa_2	Hwaseong	Rose	Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services
WNG1_1	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG1_2	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG3_1	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG4_1	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG4_2	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG5_1	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG6_1	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG6_2	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG6_3	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG6_4	Wonju	Rose	University of Seoul
WNG6_5	Wonju	Rose	University of Seoul

sequencing을 통하여 최종적으로 확인하였다.

병원균 접종액 준비. 병원균 접종을 위한 *Botrytis cinerea*는 PDA (Potato Dextrose Agar) 평판 배지에 24°C에서 암조건으로 10시간, 청색광 조건에서 14시간 배양하였다. 배양 후 14일 정도 지난 배지에 Tween20가 5%정도 첨가된 멸균수를 넣고 스프레더를 이용하여 균사와 포자를 긁어모았다. 모아진 원액을 거즈를 겹친 곳에 통과시켜 균사를 걸러내었다. 원액을 광학현미경을 사용하여 3회 정도 포자 수를 측정하고, 원액에 멸균수를 첨가하여 포자농도 2×10^7 개/ml solution이 되도록 희석하였다. 여기에 동일한 양의 40% Glycerol을 넣어 1×10^7 개/ml stock solution을 만들었다. Stock solution 1 ml과 PDB (Potato Dextrose Broth) 9 ml을 섞어 포자농도 1×10^6 개/ml 용액을 만들고 이 용액 1 ml과 PDB 2.3 ml을 섞어 포자농도 3×10^5 용액을 만들어 접종하는데 사용하였다(Fu 등, 2017).

병원성 검정방법. 습도를 유지할 수 있는 플라스틱박스에 김타올을 깔고 증류수를 30 ml씩 적서준 뒤, 품종별로 장미 꽃잎 20개씩을 꽃잎의 바깥 부분이 위를 향하도록 올린 후 꽃잎의 중앙 부분에 병원균 현탁액(포자농도 3×10^5 개/ml)을 피펫을 이용하여 2 ul씩 접종하였다. 병원균을 접종한 플라스틱 상자는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 인큐베이터에 두고 24 hr 간격으로 병반의 크기를 발병도 0~5로 조사하였다(Fu 등, 2017).

통계분석. 실험으로부터 얻은 결과는 R 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 군주별 병원성의 차이는 처리구간의 유의성 $P < 0.05$ 수준에서 Bonferroni correction을 한 LSD (Least Significant Difference) 검정을 통해 확인하고 그룹화하여 표시하였다. 품종에 따른 *Botrytis cinerea*의 발병정도의 차이는 자료를 alignment와 ranking과정으로 변형하여 분석하는 Aligned Rank Transform 방법을 활용하여 $P < 0.05$ 수준에서 분석하였다(Wobbrock 등, 2011).

결과 및 고찰

젓빛곰팡이 병원균 수집 및 분리 동정. 수집한 16개 군주를 PDA배지를 이용하여 병원균을 배양하였을 때 형태적으로 동일한 모습을 관찰하였고(Fig. 1), 유전적으로 C729primer와 BC108, BC563primer를 사용하여 확인한 결과 모든 군주가 *Botrytis cinerea*임을 확인하였다. C729primer를 사용하여 ITS 영역을 증폭한 PCR 산물을 sequencing하고 그 결과를 multiple alignment를 통해 비교해본 결과 수집된 군주간의 큰 차

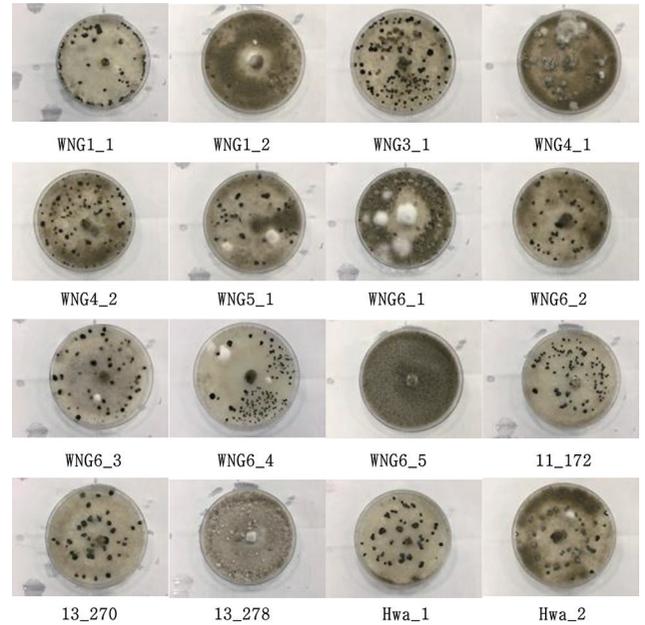


Fig. 1. Morphological characteristics of collected *Botrytis cinerea* strains.

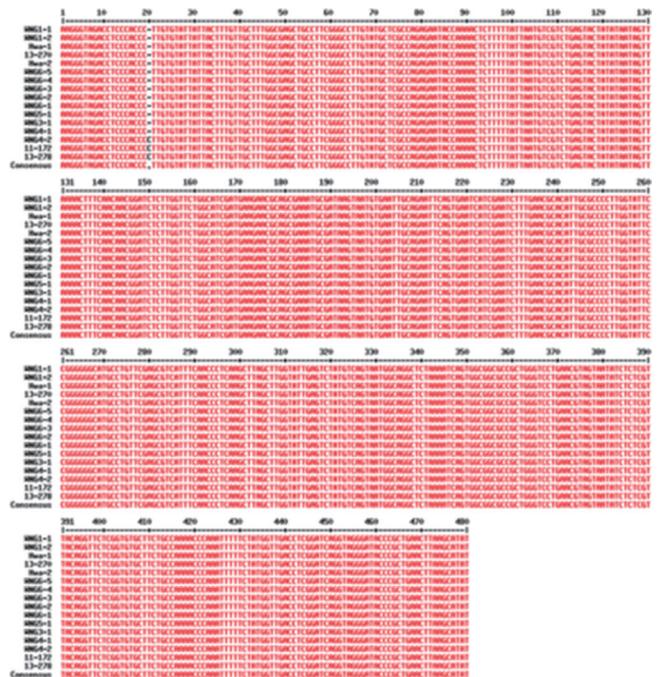


Fig. 2. Multiple alignment result of collected *Botrytis cinerea* strains. 이가 없었으며, Botrytis cinera와 ITS영역의 염기서열이 일치하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Botrytis cinerea 군주별 병원성. 수집된 *Botrytis cinerea* 16군주를 장미 품종인 샤만트 품종에 접종하고 군주간의 차이를 72시간까지 확인하였다. 수집된 군주 간에는 병원성의 차이가 나타났으며, 병은 72시간까지 진행속도의 차이가 있

Table 2. Difference of severity by *Botrytis cinerea* strains

strain	Hour Per Inoculation (HPI)		
	24	48	72
WNG6_3	0	1.16±0.97*	3.2 ^a ±1.46
WNG6_4	0	0.53±0.90	2.4 ^b ±1.46
13_270	0	0.17±0.49	2.13 ^b ±1.57
WNG1_2	0	0.1±0.36	1.43 ^c ±1.37
Hwa_2	0	0.11±0.31	1.33 ^{cd} ±1.46
WNG6_1	0	0.14±0.43	1.14 ^{cde} ±1.41
Hwa_1	0	0.09±0.32	1.01 ^{cdef} ±1.37
WNG1_1	0	0.17±0.47	1.01 ^{cdef} ±1.25
WNG5_1	0	0.05±0.22	1.00 ^{cdef} ±1.33
WNG3_1	0	0.22±0.52	0.99 ^{cdef} ±1.37
WNG6_2	0	0.08±0.34	0.93 ^{cdef} ±1.29
11_172	0	0.02±0.14	0.83 ^{cdefg} ±1.30
WNG4_1	0	0.35±0.69	0.71 ^{defg} ±1.12
13_278	0	0.07±0.26	0.68 ^{efg} ±0.97
WNG4_2	0	0.02±0.14	0.45 ^{fg} ±0.91
WNG6_5	0	0.02±0.14	0.24 ^g ±0.64

Values are expressed as the mean ± standard error of the mean. Different superscripts, a~g, within columns denote a significant difference by LSD test at p < 0.05.

* Disease score rate (0 = clear drop, no visible infection, 1 = <25% infection, 2 = 25-50% infection, 3 = 50-75% infection, 4 = 75-90% infection, 5 = >90% infection)

었으나 지속적으로 증가하였다. 발병정도의 통계분석을 위하여 shapir-wilk 검정을 통해 정규성을 확인한 결과 정규성을 만족하지 않아 비모수검정인 Kruskal-Wallis ANOVA (Analysis of variance)를 수행하였고, 균주에 따른 발병정도가 0.05 수준에서 유의적으로 차이가 있었다(Table 2). 이러한 균주간의 차이를 Bonferroni correction을 한 LSD검정을 통해 확인하고 그룹화하여 표시하였다(Table 2). 균주 간 발병정도의 차이는 WNG6_3의 경우 3.20로 가장 발병정도가 심하였으며, WNG6_4, 13_270 균주가 2.4, 2.13으로 다음으로 발병정도가 심하였고, WNG6_5 균주가 0.24로 발병정도가 가장 약해 균주의 차이로 인한 병원성의 차이는 거의 3.0 정도의 차이를 보였다(Table 2). 이러한 균주간 발병정도의 차이를 바탕으로 품종간의 차이를 확인할 시험에 균주 WNG6-5, Hwa-1 및 WNG6-3을 선발하여 사용하였다. 이러한 결과는 온실의 내부와 외부에서 수집한 균주에서 병원성의 차이 및 균주간의 유전적인 차이를 확인한 Kerssies 등(1997)의 결과와 비슷하였다.

품종에 따른 *Botrytis cinerea* 병원성 차이. 샤만트 품종에 대한 병원성의 차이를 기준으로 병원성을 상, 중, 하 단계로 나누어 3종의 균주 WNG6_3, Hwa_1, WNG6_5를 선발하고 볼라레 등 9개의 장미 품종 및 계통에 대하여 품종 및 병원균주에 따른 병원성의 차이를 확인하였다. 그 결과 샤만트 품종을 기준으로 선발된 3개의 균주에 대하여 리브레터 품종이 저항성을 나타내었으며, 아이스베어 품종이 감수성을 보였다(Fig. 3). 발병정도의 차이를 통계적으로 분석한 결과, 품종 및 병원균의 종류에 따른 차이가 0.001 수준에서 유의적으로 존재하였으며, 교호작

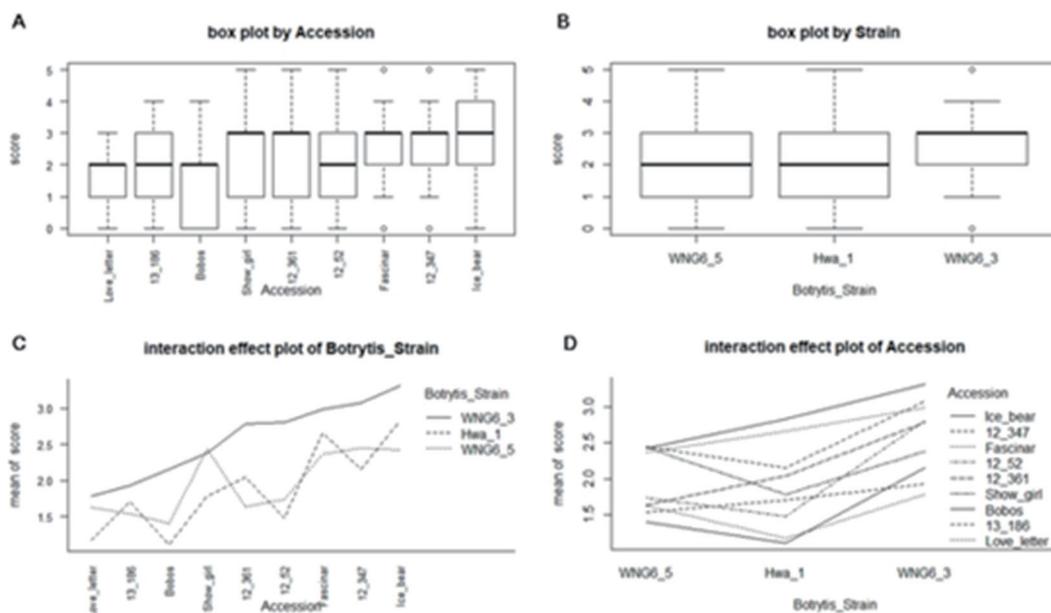


Fig. 3. Boxplot by accession A) and Strain B), Interaction effect plot of Strain C) and Accession D).

Table 3. Result of Aligned Rank Transform(ART) ANOVA table factored by rose accession and *Botrytis cinerea* strains

Variable	Df ^a	Df.res ^b	F value	Pr(>F)
Accession	8	2,673	60.0308	2.22e-16 ***
Botrytis_Strain	2	2,673	113.5039	2.22e-16 ***
Accession:Botrytis_Strain	16	2,673	4.9051	4.5784e-10 ***

^aDf = Degrees of Freedom

^bDf.res = Residual Degrees of Freedom

*p<.05, **p<.01, ***p<.001

용의 효과가 존재하였다(Table 3). 이러한 결과는 기존에 보고되었던 논문에서 제시한 장미 품종과 병원균간의 상호작용에 따라 달라진다는 결과와 크게 다르지 않았다. 잣빛곰팡이병 병원성의 차이는 기존 문헌에 MAP kinase, NADPH oxidase, Pectin methylesterase, botrydial, oxalic acid 등에 따라 나타난다고 보고된 바 있으며, 이러한 물질들이 장미 품종과 병원균 균주에 따른 병원성의 차이를 나타내는데 기여하고 있을 것으로 추정된다 (Nakajima 와 Akutsu, 2014; Segmüller 등, 2007, 2008; Siewers 등, 2005; Zimand 등, 1996). 본 연구의 결과에서는 병원성의 차이를 나타나게 하는 원인물질은 밝히지 못하였으며 향후 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

적 요

잣빛곰팡이병은 *Botrytis cinerea*가 원인균으로 알려져 있으며 장미 재배와 유통 시에 문제가 되고 있다. 그러나 병원균 균주와 장미 품종에 따른 발병정도의 차이를 연구한 결과가 없어 이를 구명하고자 하였다. 장미 재배 지역에서 분리한 균주를 수집하고 병원 균주별 장미 품종별 발병정도를 확인한 결과는 다음과 같다. 서울시립대에서 11종, 국립원예특작과학원에서 3종, 경기도농업기술원 장미재배온실에서 2종을 분리하였으며, 분리한 균주를 ribosomal DNA의 ITS region에 특이적인 primer를 사용하여 동정하였고, sequencing을 통해 염기서열을 비교한 결과 큰 차이가 없음을 확인하였다. 잣빛곰팡이 균주별 발병정도의 차이를 확인하기 위해 장미 품종인 샤망트 품종에 대하여 *Botrytis cinerea* 균주별 발병정도의 차이를 0-5의 단계로 나누어 조사하고, Kruskal-Wallis ANOVA를 통해 분석한 결과, 균주에 따라 병원성이 유의적으로 차이를 나타냈다. WNG6_5의 경우 0.24로 병원성이 가장 낮았으며, WNG6_3의 경우 3.20로 병원성이 가장 높아, 균주별 병원성의 차이는 거의 3.0 정도의 차이를 보였다. 장미 9품종에 대한 발병정도의 차이를 확인하기 위해 균주 WNG6_5, Hwa_1, WNG6_3을 선발하여 분석한 결과 러브레터 품종이 3가지 균주에 대해 저항성을 보였으

며, 아이스베어 품종이 감수성을 나타내었다. 본 연구를 통해 장미 품종 및 병원균의 종류에 따라 발병정도의 유의적인 차이와 교호작용의 효과가 존재함을 확인할 수 있었다.

Acknowledgement

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ012793)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A. et al. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* 7: e1002230.
- Asadollahi, M., Fekete, E., Karaffa, L., Flipphi, M., Árnayasi, M., Esmaeili, M. et al. 2013. Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two open-field cultivated host plants. *Microbiol. Res.* 168: 379-388.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A. et al. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 277: 1-10.
- Elad, Y. 1988. Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. *Crop Prot.* 7: 361-366.
- Fu, Y., van Silfhout, A., Shahin, A., Egberts, R., Beers, M., van der Velde, A. et al. 2017. Genetic mapping and QTL analysis of *Botrytis* resistance in *Gerbera hybrida*. *Mol. Breed.* 37: 13.
- Kerssies, A., Bosker-van Zessen, A. I., Wagemakers, C. A. M. and van Kan, J. A. L. 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Dis.* 81: 781-786.
- Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E. and Kapoor, R. 2014. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. *Microbiol. Res.* 169: 862-872.
- Kwon, S., Choi, G., Kim, K. and Kwon, H. 2014. Control of *Botrytis cinerea* and postharvest quality of cut roses by electron beam

- irradiation. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 32: 507-516.
- Mirzaei, S., Mohammadi Goltapeh, E., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N. and Chaichi, M. 2009. Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. *J. Phytopathol.* 157: 474-482.
- Movahedi, S. and Heale, J. B. 1990. The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 303-324.
- Nakajima, M. and Akutsu, K. 2014. Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 15-23.
- Rigotti, S., Viret, O. and Gindro, K. 2006. Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Phytopathol. Mediterr.* 45: 253-260.
- Segmüller, N., Ellendorf, U., Tudzynski, B. and Tudzynski, P. 2007. BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot. Cell* 6: 211-221.
- Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., van Kan, J. and Tudzynski, P. 2008. NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 808-819.
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I. G., Gronover, C. S., Pradier, J. M. et al. 2005. Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 602-612.
- Van Der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., Vant't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M. and van Kan, J. A. L. 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 97: 1193-1200.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. and van Kan, J. A. L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8: 561-580.
- Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D. and Higgins, J. J. 2011. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. In: *Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems*, pp. 143-146. Vancouver, BC, Canada.
- Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86: 1255-1260.