

백합 잎마름병에 관여하는 *Botrytis elliptica*와 *Botrytis cinerea*의 형태적, 분자적 특성과 병원성

김원기¹ · 박명수¹ · 함수상² · 유승현^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과, ²충남농업기술원 태안백합시험장

Morphological, Molecular and Pathogenic Characteristics of *Botrytis elliptica* and *Botrytis cinerea* Associated with Leaf Blight of Lily

Won Ki Kim¹, Myung Soo Park¹, Soo Sang Hahm² and Seung Hun Yu^{1*}

¹Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, 305-764, Korea

²Tae'an Lily Experiment Station, Chungnam Agricultural Research and Extension Services, Tae'an 357-952, Korea

(Received December 14, 2007)

ABSTRACT: The seventy nine isolates of *Botrytis* spp. were obtained from leaf blight lesions of lily in Korea, Japan and Netherlands. Morphological and cultural characteristics of them were investigated and molecular characteristics of them were determined using sequence analysis of RNA polymerase II (*RPB2*) and heat-shock protein 60 (*HSP60*) gene. A selection of *Botrytis* isolates were evaluated for their pathogenicity to lily. Based on morphological and cultural characteristics, the *Botrytis* isolates were divided into two groups, and identified as *B. elliptica* (n=54) and *B. cinerea* (n=25). Based on analysis of *RPB2* and *HSP60* sequences, the *Botrytis* isolates were also divided into two groups and well supported morphological groupings. Spore suspensions of *B. elliptica* showed significant pathogenicity on lily leaves and flowers, however those of *B. cinerea* showed pathogenicity only on flowers but not on leaves. The latter showed pathogenicity on lily leaves only when spore suspensions amended with PDB were used as inocula.

KEYWORDS: *Botrytis cinerea*, *Botrytis elliptica*, Leaf blight, Lily, Sequence analysis

백합은 백합과(Liliaceae), 나리속(Lilium)에 속하는 식물로서 국화, 장미, 카네이션, 안개초와 함께 국내 5대 화훼 작목 중 하나이다. 국민소득의 향상과 더불어 백합은 화분 식재용, 절화용 및 화단용 등으로 생산과 소비가 증가하고 있으며, 수출 또한 '90년대 초부터 확대되기 시작하여 현재는 장미 다음으로 선인장과 함께 수출 유망작목으로 평가 받고 있다. 백합의 수출은 1998년 3,388천불이었으나 2004년에는 13,337천불로 증가하였고 2007년에는 10월까지 11,117천불을 기록하며 해마다 증가하고 있다.

국내에 발생하는 백합의 병해로는 *Botrytis elliptica*에 의한 잎마름병 외 12종이 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004). 이 중 *B. elliptica*에 의한 잎마름병은 재배중인 백합은 물론 절화생산에도 큰 피해를 주며 잎, 줄기 및 꽃에 갈색의 점무늬를 비롯한 다양한 병징을 나타낸다(Cotton, 1933; 함, 2007). 백합 잎마름병은 세계 각국에서 그 발생이 보고되었으며(Farr et al., 1989; Toshiko et al., 2005; Wright, 1928; Hsieh and Huang, 1998), 우리나라에서도 백합의 재배 면적이 증가되면서 피해면적이 계속

증가하고 있는 실정이다.

백합에서 분리되는 *Botrytis*속은 세계적으로 *Botrytis elliptica*, *B. cinerea*(완전세대: *Botryotinia fuckeliana*), *B. squamosa* 및 *B. tulipae* 등 4종이 보고 되어 있다(Ellis, 1971; Farr et al., 1989; Ward, 1888; Wright, 1928). 국내에서는 유 등(1988)에 의해 *B. elliptica*에 의한 잎마름병이 처음 보고되었고, 그 후 이 등(1989)은 잎마름 병반에서 *B. elliptica* 외에 *B. cinerea*도 분리된다고 보고하였다. *B. elliptica*는 세계 각국의 백합 절화생산에 큰 피해를 주는 병원균으로 나리속에 속하는 대부분의 식물 종에 병을 일으키는 것으로 알려져 있고(Wright, 1928; Cotton, 1933; Lorbeer et al., 2004), *B. cinerea*는 200종 이상의 많은 식물에 병을 일으키는 다범성 균으로서 특히 노화 또는 상처난 조직을 통하여 발병하는 것으로 알려져 있다(Jarvis, 1977; MacFarlane, 1968).

*Botrytis*속의 완전세대는 *Botryotinia*이며, 이 속에는 22종, 1 hybrid가 보고되어있다(Hennebert, 1973; Yohalem et al., 2003). *Botrytis*속의 분류는 전통적으로 분생자경의 형태 및 분자 특성, 포자나 균핵의 크기 등 형태적 특징에 기초하며 기주와의 관계에 따라 명명되었으나, 많은 종들

*Corresponding author <E-mail: shunyu@cnu.ac.kr>

의 형태적 특성이 유사하여 분류, 동정이 쉽지 않다. 최근 *Botrytis*속 형태적 분류의 어려움을 극복하기 위하여 분자생물학적 기법을 이용한 계통발생학적 분석에 의한 종의 분류, 동정에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다.

*Botrytis*속의 분자 분류에는 heat-shock protein 60 (*HSP60*), RNA polymerase subunit II(*RPB2*)와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*G3PDH*)의 single-copy nuclear DNA(nDNA) 유전자들이 유용하게 이용되고 있으며(Berbee *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Staats *et al.*, 2005; Staats, 2007), rDNA의 Internal transcribed spacer (ITS) 영역은 *Botrytis*속의 종내 변이가 적어 계통발생학적 정보를 충분히 제공하지 못한다(Holst-Jensen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2001).

이 연구는 2003년에서 2005년 사이 국내외에서 수집한 백합 잎마름병균인 *B. elliptica*와 *B. cinerea*의 형태적, 배양적 특성을 비교하고 이들의 분류학적 위치를 정립하기 위하여 분자생물학적 기법을 이용한 계통발생학적 유연관계 분석하였으며, 병원성 검정을 통해 두 종의 백합에 대한 병원성 차이를 명확히 하기 위해서 실시하였다.

재료 및 방법

사용 균주

Botrytis 균주를 분리하기 위하여 2003년부터 2005년까지 국내의 백합 재배지인 충남의 서산, 태안, 홍성, 아산, 경기도의 수원, 파주, 강원도의 강릉, 영월, 횡성, 인제, 화천, 전북의 남원, 익산, 정읍, 김제, 전남의 해남, 강진, 부산, 제주도와 또한 일본 및 네덜란드의 백합 재배지에서 잎마름병에 이병된 백합의 잎, 꽃, 줄기를 채집하였다. 채집한 병든 조직을 멸균 증류수로 씻어내고 1% NaOCl 용액으로 2분간 표면 소독한 후 2매의 filter paper(No. 2)가 깔린 Petri dish에 옮기고 20°C 항온기에서 2일간 배양하며 포자형성을 유도하였다. 병든 조직에 형성된 *Botrytis* 포자에서 단포자를 분리한 후 물한천(WA) 배지에 옮겨 20°C에서 3일간 배양하여 총 79균주를 분리하였다. 분리한 *Botrytis* 균주들은 시험관의 PDA 사면배지에 옮겨 5°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

형태적, 배양적 특징 조사

분리 균주들의 형태적 특징을 조사하기 위해 V-8 juice agar 배지에 접종하고, 근자외선(NUV) 광이 1일 12시간씩 조사되는 20°C 항온기에서 2~3주간 배양한 후, 분생자경 및 분생포자의 모양, 색, 크기 등을 광학현미경($\times 400$)으로 조사하였고 문헌상의 기술과 비교하였다.

형태적 특징에 기초하여 동정한 *B. elliptica*와 *B. cinerea*의 배양적 특징을 조사하기 위하여 각 종에서 3균주씩을 택하여 PDA 배지에 접종, 15, 20, 25, 30°C의 온도에서 암상태로 4일간 배양한 후 균총의 직경을 측정하였다.

분자 생물학적 특징 조사

Genomic DNA 분리. 수집 균주들의 분리 지역을 고려하여 *B. elliptica* 20균주, *B. cinerea* 20균주, 총 40개 균주를 선발하여 실험에 사용하였다. 사용 균주들을 PDA 배지에 전접종하여 20°C에서 3일간 배양 후 potato dextrose broth(PDB)에 접종, 20°C에서 3~5일간 정치배양하여 균사체를 얻었다. 균사체는 동결건조 후 소량을 1.5 ml tube에 넣고 마쇄한 뒤 400 μ l의 extraction buffer에 현탁하고, proteinase K 5 μ l을 첨가, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이 혼합액에 동량의 2 \times CTAB 용액을 첨가하여 혼합한 후 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1, v/v)로 추출하고 원심분리하여 얻은 상등액에 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 얻었다. DNA pellet을 TE buffer 50 μ l에 용해하고 RNase(10 mg/ml)를 37°C에 30분간 처리 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

PCR 반응. 공시균주의 *RPB2* 영역을 증폭하기 위해 Liu *et al.*(1999)이 사용한 primer를 변형시킨 *RPB2*-6F (5'-TGG GKG WTG GTY TGY CCT GC-3')와 *fRPB2*-7cR(5'-CCC ATW GCY TGC TTM CCC AT-3') primer를 사용하였고, *HSP60* 유전자의 증폭을 위해 *HSP60* for (5'-CAA CAA TTG AGA TTT GCC CA-3'), *HSP60* rev (5'-GAT GGA TCC AGT GGT ACC GA-3') primer를 사용하였다(Staats *et al.*, 2005).

Polymerase chain reaction(PCR) 반응액은 20 ng의 template DNA, 0.5 pmol의 각 primer, 200 μ M dNTP's, 2.5 units의 Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂에 H₂O를 첨가하여 총량을 50 μ l로 하였다. *RPB2*와 *HSP60* 유전자의 반응조건은 pre-denaturation은 94°C에서 5분간 실시하고, denaturation 30초(94°C), annealing 30초(55°C), extension 90초(72°C)로 35 cycle을 실시하고 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 반응시켰다(Staats *et al.*, 2005). 모든 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하였으며, 증폭 여부와 그 크기는 1 kb DNA Ladder (Promega)와의 비교를 통해 관찰하였다.

염기서열 및 계통 분석. *RPB2*와 *HSP60* 유전자의 PCR 산물은 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega, Madison, WI, USA)으로 정제하고, 염기서열 판독은 Solgent(대전)에 의뢰하였다. 염기서열 정렬 및 계통분석은 CLUSTAL X(Thompson *et al.*, 1997), PHY-DIT program version 3.2(Chun, 1995), PAUP*4.0 10b (Swofford, 2002)를 이용하였고 불명확하게 정렬된 부분은 분석에서 제외하였으며, sequence gap은 missing data로 처리하였다. Kimura's 2-parameter model을 사용한 Neighbor-joining 방법을 사용하였고(Kimura, 1980), Parsimony 분석은 1,000 stepwise random addition replicate에 의한 heuristic search와 tree bisection reconnection(TBR) branch-swapping으로 조사하였다(Fitch, 1971). 각각의 분

Table 1. Disease index used in detached lily leaf/flower assays

Disease index	Symptoms
0	No lesion
1	Lesions < 10 mm in diameter
2	Lesions 10 to 15 mm in diameter
3	Lesions > 15 mm in diameter, lesions are distinguishable
4	Above 80% leaf/flower surface diseased

석은 PAUP*4.0b10을 이용한 1,000 bootstrap replications을 수행하였고, *Sclerotinia sclerotiorum*과 *Monilinia fructigena*가 outgroup으로 사용되었다(Holst-Jensen *et al.*, 1998).

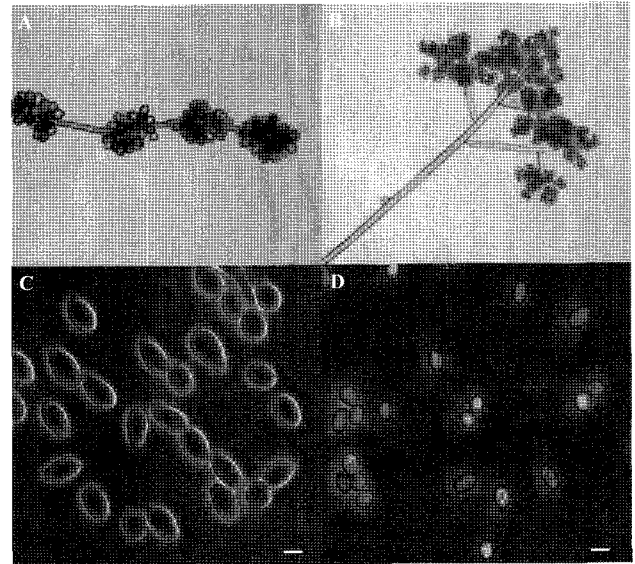
병원성 검정

*B. elliptica*와 *B. cinerea*에서 각각 6균주씩을 선발하여 병원성 검정 시험에 사용하였다. 병원성 검정은 백합의 잎과 꽃잎을 대상으로 실시하였다. 백합 품종은 잎의 접종실험에는 Georgia와 Raizan, 꽃잎의 접종실험에는 Gelria를 사용하였다. 접종실험은 온실에서 생육중인 백합 식물체 중에서 초장이 각각 125 cm, 155 cm인 건전한 Georgia와 Raizan의 잎과, 초장이 120 cm인 Gelria의 꽃잎을 따서 실내에서 실시하였다. 접종원을 준비하기 위하여 선발 균주들을 V-8 juice agar 배지에 접종한 후 근자외선광이 1일 12시간씩 조사되는 20°C 항온기에서 *B. elliptica*는 3주간, *B. cinerea*는 2주간 배양한 후 형성된 분생포자를 붓으로 모아 멸균 증류수로 분생포자 현탁액(5×10^5 spore/ml)을 만들었다. *B. elliptica*는 20 μ l의 분생포자 현탁액을 취하여 표면소독한 백합의 잎과 꽃잎의 뒷면에 점 접종하였다. *B. cinerea*는 분생포자 현탁액 접종과 분생포자 현탁액에 PDB를 1:1 비율로 혼합한 분생포자 PDB 현탁액 접종으로 나누어 실시하였다. 균주당 12개의 잎과 6개의 꽃잎을 사용하였고, 접종 후 포화습도를 유지하기 위하여 흡습여지가 깔린 플라스틱 상자(29×22×12 cm)에 넣어 20°C 항온기에 두고 5일 후 병 발생정도를 Table 1의 발병지수에 따라 조사하였다.

결 과

형태적 특징

백합에서 분리한 79균주의 *Botrytis*를 V-8 juice agar 배지에서 배양한 후 광학현미경을 통하여 분생자경 및 분생포자의 특징을 조사하였던 바 그 특징에 따라 두 그룹으로 나누어졌다. 한 그룹(A)의 균주들은 분생자경이 긴 실모양이고 중간 중간에 작은 가지를 형성하였고 그곳에 분생포자를 다발로 형성하였다. 분생자경은 고생, 직립하고, 길이는 4.0~6.2 mm였으며, 분생포자는 계란형 또는 타원형으로 연갈색이고, 크기는 22~45×15~30(평균, 28.8×18.1) μ m였다(Fig. 1A, 1C, Table 2). 또 한 그룹(B)의 균주들은 분생자경의 상부에 포도송이 모양으로 분생포자

**Fig. 1.** Conidiophores and conidia of *B. elliptica* (A, C) and *B. cinerea* (B, D). Scale bar = 10 μ m.**Table 2.** Conidial size of *Botrytis elliptica* and *B. cinerea* isolated from lily and given by various authors

	Size of conidia (μ m)
A group	22~45 × 15~30 (av. 28.8 × 18.1)
B group	8~18 × 6~12 (av. 12.9 × 8.5)
<i>B. elliptica</i>	25.0~43.8 × 16.3~27.8 ^a 22~48 × 14~28 ^b
<i>B. cinerea</i>	6.5~16.3 × 5.5~10.0 ^a 6~18 × 4~11 (av. 8~14 × 6~9) ^c

^aDescribed by Hong (2002).

^bDescribed by Yu *et al.* (1988).

^cDescribed by Ellis (1971).

를 형성하였으며, 분생자경은 고생, 직립하고 길이는 0.8~2.0 mm였다. B그룹의 분생포자는 계란형 또는 타원형으로 연갈색이며, 크기는 8~18×6~12(평균, 12.9×8.5) μ m였다(Fig. 1B, 1D, Table 2). 이상의 형태적 특징을 문헌과 비교한 결과 A 그룹은 문헌상의 *B. elliptica*(유 등, 1988; 홍, 2002)와 일치하였고 B 그룹은 *B. cinerea*(Ellis, 1971; 홍, 2002)와 일치하였다(Table 2). 실험에 사용된 균주 중 68.4%(54균주)가 A 그룹인 *B. elliptica*에 속하였고 31.6%(25균주)가 B 그룹인 *B. cinerea*에 속하였다.

배양적 특징

*B. elliptica*와 *B. cinerea*의 온도별 균사생장을 조사한 결과 *B. cinerea*가 *B. elliptica*에 비하여 모든 온도에서 빠른 균사 생장을 보였다. 균사생장 최적온도인 20°C에서 *B. cinerea*는 평균 75.6 mm의 균사 생장을 보였으며 *B. elliptica*는 평균 56.2 mm의 균사생장을 보였다. 30°C에서는 두 종 모두 균사 생장이 억제되었으며, 특히 *B. elliptica*의 경우 균사생장이 거의 일어나지 않았다(Fig. 2).

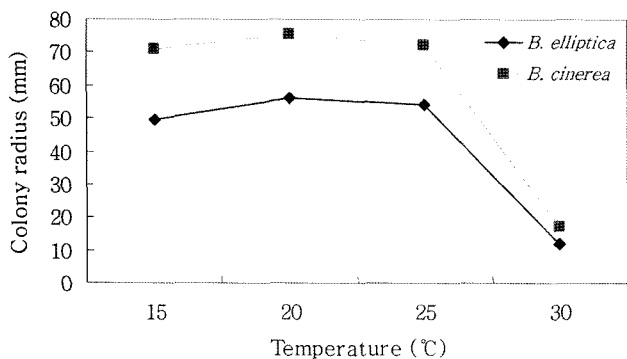


Fig. 2. Mycelial growth of *B. elliptica* and *B. cinerea* on PDA at different temperatures. Colony diameter was measured after 4 days of incubation.

분자생물학적 특징

RPB2 유전자의 염기서열 분석. 유전자 염기서열 분석에 사용한 40개 균주들의 RPB2 영역을 RPB2-6F와 fRPB2-

7cR primer로 증폭하였다. 이들 균주에 대한 RPB2 영역의 PCR 결과 약 740 bp 크기의 증폭산물을 얻었으며 40 균주 모두 거의 동일한 크기를 나타내었다. RPB2 유전자의 염기서열을 정렬한 결과 767 characters 중 72 characters(9.4%)는 parsimony-uninformative였고, 71 characters(9.3%)는 parsimony-informative였다. 이들 염기서열을 바탕으로 parsimony 분석을 수행한 결과 3개의 most parsimonious 계통수(length = 176, CI = 0.9091, RI = 0.9890)를 얻었고 모든 계통수에서 확연히 구분되는 A 그룹(*B. elliptica*)과 B 그룹(*B. cinerea*)을 확인하였으며, 이들 그룹은 형태적 특징에 따라 구분한 그룹과 동일하였다(Fig. 3). A 그룹은 잎마름병에 걸린 백합에서 분리한 20 균주, *B. elliptica* BE9714, BE0022 및 BE9610 reference 균주와 *Botryotinia squamosa* MUCL1107, PRI026이 포함되어 있고, 62% bootstrap 값에 의하여 지지되어진다(Fig. 3). 이들 균주들은 하나의 염기 치환(G/A)에 의하여 두 개의 서로 다른 그룹으로 나누어지며, A 그룹 내의 균주들은

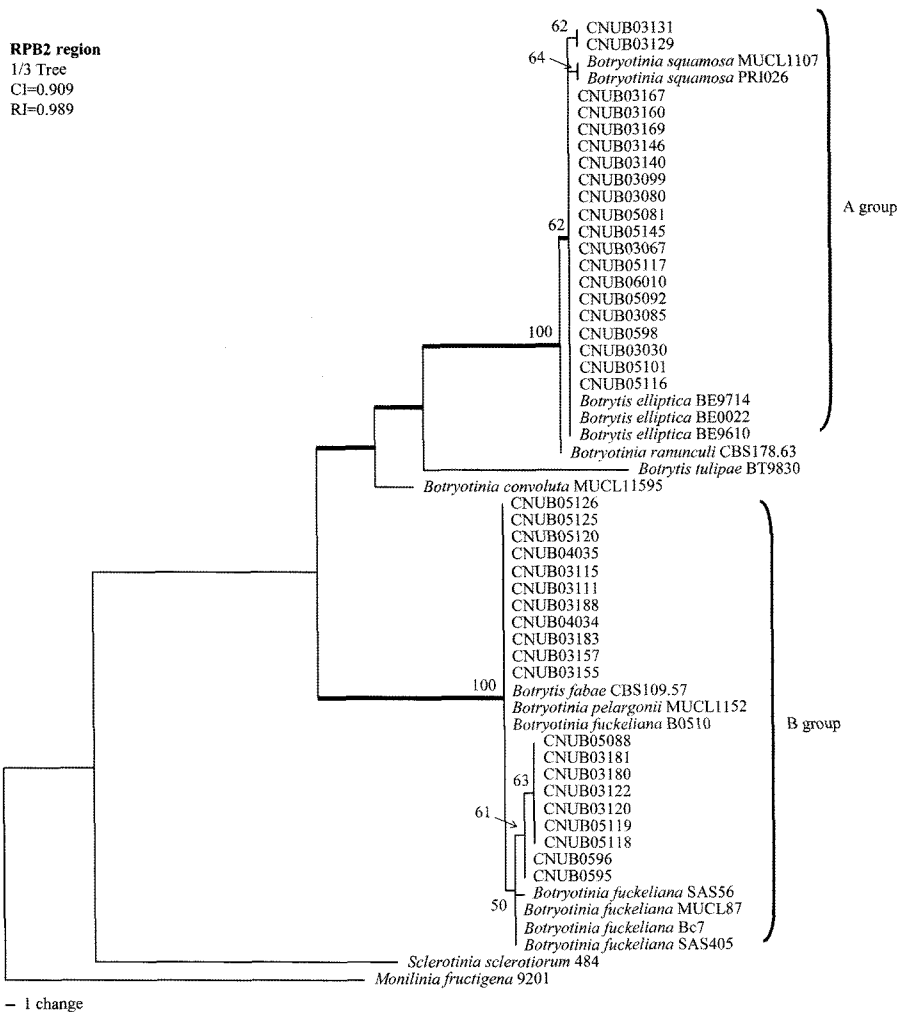


Fig. 3. One of 3 most parsimonious trees obtained by heuristic search in a phylogenetic analysis of RPB2 sequence data among *Botrytis* spp. isolates collected from lily. The percentage numbers below each branch indicate levels of bootstrap support for the branch point based on 1,000 resamplings. CI = consistency index and RI = retention index.

1~2개의 염기의 치환에 의하여 *Botryotinia squamosa*와 구별되어진다. B 그룹은 잎마름병에 걸린 백합에서 분리한 20균주, *Botryotinia fuckeliana* B0510, SAS56, SAS405, MUCL87 및 Bc7 reference 균주와 *B. fabae* CBS109.52, *Botryotinia pelargonii* MUCL1152가 포함되어 있고, 100% bootstrap 값에 의하여 지지되었으며, 이들 그룹은 2~3개의 염기 치환에 의하여 두 개의 그룹으로 나누어졌다(Fig. 3). Neighbor-joining 분석결과도 parsimony 분석을 통한 계통수와 거의 동일한 계통수를 얻었다(성적 미기재).

HSP60 유전자의 염기서열 분석. 사용 균주들의 HSP60 유전자를 PCR한 결과 970 bp의 증폭산물을 얻었으며 40 균주 모두 동일한 크기를 나타내었다. HSP60 유전자의 염기서열을 정렬한 결과 977 characters 중 97 characters(9.9%)는 parsimony-uninformative였고, 84 charac-

ters(8.6%)는 parsimony-informative였다. 이들 염기서열을 바탕으로 parsimony 분석을 수행한 결과 3개의 most parsimonious 계통수(length = 231, CI = 0.8650, RI = 0.9704)를 얻었고, 모든 계통수에서 A 그룹(*B. elliptica*)과 B 그룹(*B. cinerea*)을 확인하였고, 이들은 형태적 특징에 따라 구분한 그룹과 동일하였다. A 그룹은 RPB2와 같이 잎마름병에 걸린 백합에서 분리한 20균주와 *B. elliptica* BE9714, BE0022 및 BE9610 reference 균주와 *Botryotinia squamosa* MUCL1107, PRI026이 포함되어 있고, 91% bootstrap 값에 의하여 지지되었으며 1~3개의 염기 치환에 의하여 두 개의 서로 다른 그룹으로 나누어졌다. B 그룹은 잎마름병에 걸린 백합에서 분리한 20균주와 *Botryotinia fuckeliana* B0510, SAS56, SAS405, MUCL87 및 Bc7균주, *Botryotinia pelargonii* MUCL1152 reference 균주가 포함되어 있고 84% bootstrap 값에 의하여 지지되어진다.

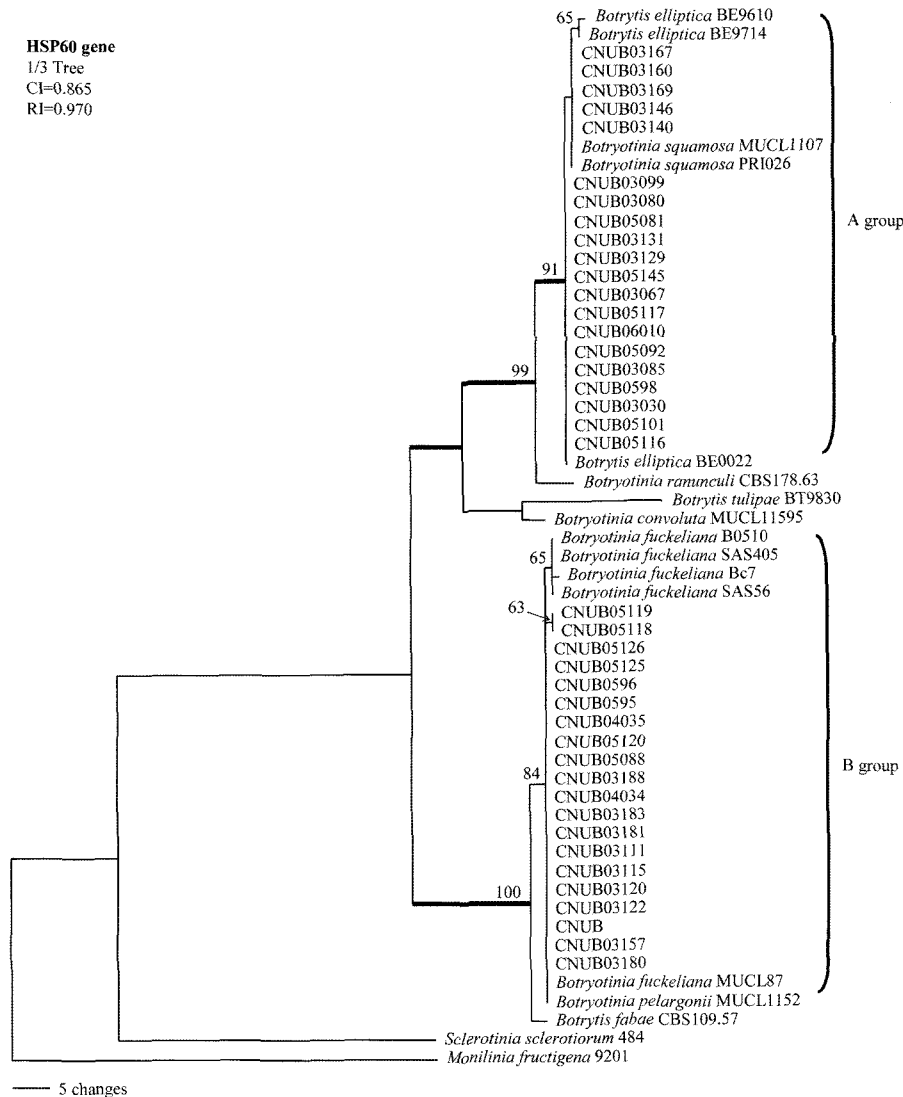


Fig. 4. One of 3 most parsimonious trees obtained by heuristic search in a phylogenetic analysis of HSP60 sequence data among *Botrytis* spp. isolates collected from lily. The percentage numbers below each branch indicate levels of bootstrap support for the branch point based on 1,000 resamplings. CI = consistency index and RI = retention index.

분리 균주들은 하나의 염기 치환(T/C)에 의하여 두 개의 서로 다른 그룹으로 나누어졌다(Fig. 4). Neighbor-joining 분석결과 parsimony 분석을 통한 계통수와 동일한 계통수를 얻었다(성적 미 기재).

병원성

*B. elliptica*와 *B. cinerea*의 백합에 대한 병원성을 비교하기 위해 백합품종 Raizan과 Georgia의 잎과 Gelria 품종의 꽃잎에 접종 실험을 실시한 결과는 Figs. 5~7과 같다. *B. elliptica* 균주들은 분생포자 현탁액을 접종하였을 경우 백합 잎에 직경 15 mm 이상의(발병지수 3) 병반을 형성하였다(Fig. 5). 그러나 *B. cinerea*의 균주들은 분생포자 현탁액을 접종하였을 경우 백합 잎에 전혀 병반을 형성하지 못 하였으며 PDB를 첨가한 분생포자 현탁액을 접종하였을 경우 직경 15 mm(발병지수 3)정도의 병반을 형성하였다(Fig. 6). *B. elliptica*는 균주간에 병원성의 차이를 나타내어 CNUB03067, 03042균주는 발병지수 4의 강한 병원성을 나타낸 반면, CNUB03168 균주는 발병지수 3.2의 병원성을 나타내었다. 그러나 *B. cinerea*는 균주간에 병원성 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5, 6). 백합 잎의

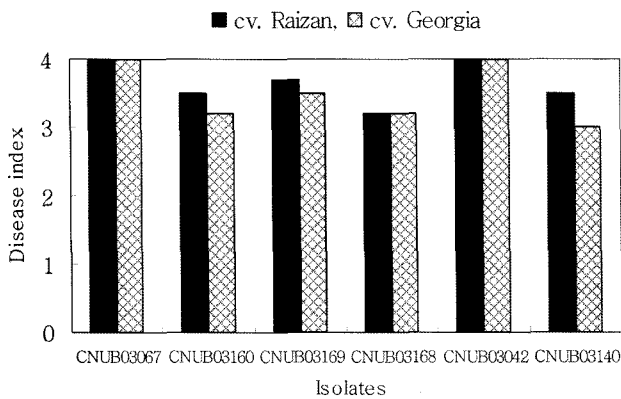


Fig. 5. Pathogenicity of *B. elliptica* on lily leaves when spore suspension was inoculated on detached lily leaves.

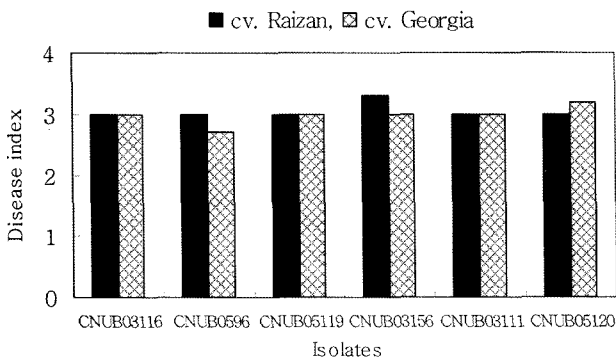


Fig. 6. Pathogenicity of *B. cinerea* on lily leaves when spore suspension amended with PDB was inoculated on detached lily leaves.

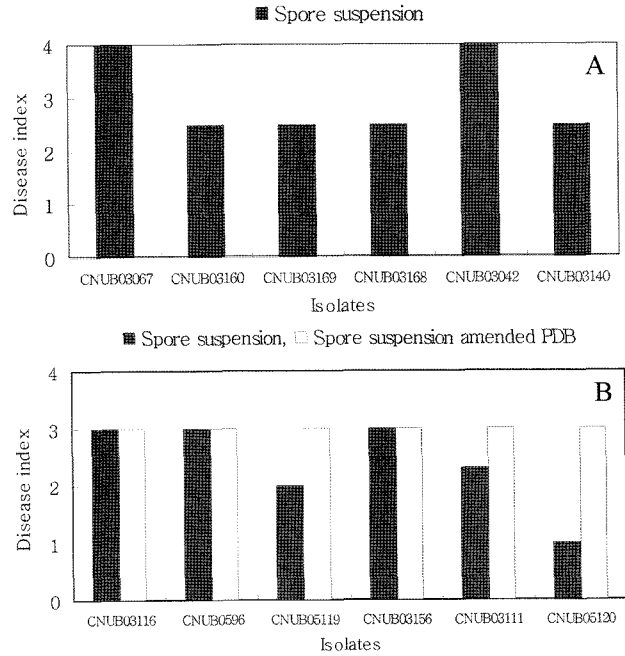


Fig. 7. Pathogenicity of *B. elliptica* (A) and *B. cinerea* (B) on detached lily flowers.

성숙도와 부착부위에 따른 감수성의 차이는 발견되지 않았다(성적 미 기재).

백합 꽃잎에 대한 병원성 검정을 실시한 결과, *B. elliptica*는 균주간에 병원성의 차이를 나타내어 2균주(CNUB03067, 03042)는 발병지수 4의 강한 병원성을 나타내었으나 나머지 4균주들은 발병지수 3 이하의 병원성을 나타내었다. *B. cinerea*의 꽃잎에 대한 병원성은 잎에 대한 병원성과 달리 PDB를 첨가한 현탁액뿐 아니라 PDB를 첨가하지 않은 분생포자 현탁액만으로 접종한 경우에도 병원성을 나타내었다. *B. cinerea*는 PDB를 첨가했을 때는 균주들 간에 병원성에 차이를 보이지 않았지만, PDB를 첨가하지 않았을 때는 균주에 따라 병원성에 차이를 나타내었다(Fig. 7).

고 찰

*B. elliptica*와 *B. cinerea*에 의해 야기되는 백합 잎마름 병은 백합 생산에 매우 큰 피해를 주는 질병 중 하나로서 심하게 발생하였을 경우 생산량의 60%까지 손실을 가져온다(Doss et al., 1988; Lorbeer et al., 2004; Wright, 1928). 본 연구에서는 백합 잎마름병에 관여하는 *B. elliptica*와 *B. cinerea*의 형태적, 배양적 특성과 분자생물학적 특성을 비교하고 병원성 검정을 통하여 이들의 병원학적 중요성을 검토하였다.

백합 병반에서 수집한 79개의 *Botrytis* 균주들은 분생자경과 분생포자의 형태적 특징에 따라 *B. elliptica*와 *B. cinerea*의 두 개의 그룹으로 나뉘었다. *B. elliptica*는 긴

실모양의 분생자경에 작은 가지를 형성하며 그곳에 포자를 다발로 형성하는 특징을 갖고 있으며, 이는 유 등 (1988) 및 Tsukiboish(<http://www.maes.affrc.go.jp/inventry/microorg/eng/zl6e-Botry.html>)의 보고와 잘 일치하는 것이다. 한편 *B. cinerea*는 분생자경이 나뭇가지 모양을 형성하며 끝부분에 포도송이 모양으로 포자를 형성하는 특징을 나타내었는데 이는 권(2006)과 anonymous(2000)의 보고와 일치하였다. 분생포자의 크기도 두 종간에 차이가 있어 *B. elliptica*의 분생포자가 *B. cinerea*에 비하여 월등히 크며 분생자경의 길이와 형태도 2 종간에 확연한 차이를 나타내었다. 이러한 형태적 특징에 따라 79개 사용 균주들을 동정하였던 바 54균주(68%)가 *B. elliptica*로 25균주(32%)가 *B. cinerea*로 밝혀짐으로, 백합 잎마름병에 관여하는 2종의 상대적 중요성이 밝혀졌다. *B. elliptica*와 *B. cinerea*의 균사생장 최적 온도는 20°C로서 Furukawa (2005)의 보고와 일치하였다.

여러 종류의 균류에서 ITS 영역은 많은 변이가 존재하는 것으로 알려졌고, 종의 분류나 특이 primer 개발 연구에 유용한 부위로 평가되어 왔다(Chen *et al.*, 1992; Lee and Taylor, 1992; Gardes *et al.*, 1991). 그러나 *Botrytis* rDNA의 ITS 영역은 중간 변이가 적어 충분한 계통발생학적 정보를 제공하지 못함으로(Holst-Jensen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2001) 본연구에서는 protein-coding 유전자인 *RPB2*와 *HSP60*을 이용하여 계통발생학적 분석을 실시하였다. *B. elliptica*와 *B. cinerea* 40개 균주와 대조균 10종이 분석에 사용되었고 *RPB2*, *HSP60* 유전자의 염기서열 분석에 의해 사용 균주들은 두개의 그룹으로 뚜렷하게 구분이 되었다. 이러한 결과는 형태적 특징을 통해 분리된 그룹과 동일하였으며 이는 분자생물학 기법을 이용한 계통발생학적 분석이 전통적인 균류의 분류 방식을 지지해 주는 것을 의미한다. 그러나 이들 마커 역시 동일 그룹내에 유전적으로 유사한 일부 종들이 100%의 염기서열 상동성을 나타내었다. 따라서 *Botrytis*속 내의 유전적으로 유사한 종간 유연관계분석을 위해서는 여러 개의 유전자를 분석 마커로 사용하여 이를 종합하는 multilocus 분석의 필요가 있다고 생각된다.

병원성 검정의 결과 *B. elliptica*는 백합 잎과 꽃에 모두 강한 병원성을 나타내었고 균주간 병원성에 차이를 보였다. Doss(1988)는 하부에 있는 잎들은 상부에 있는 어린 잎보다 *B. elliptica*에 의한 병 발생이 더 심하다고 하였으나 본 실험에서는 차이점이 발견되지 않았다. *B. cinerea*는 접종원 조제시에 영양원인 PDB를 첨가하지 않았을 때는 건전한 백합 잎에 병을 일으키지 못 하였지만 PDB를 첨가하였을 때는 균주간에 거의 동일하게 강한 병원성을 나타내었다. 그러나 백합 꽃잎에는 접종원에 영양원의 첨가와 관계없이 모두 병원성을 나타내었다. 이상의 결과를 종합할 때 *B. elliptica*가 백합 잎마름병의 주요 병원이지만 *B. cinerea*도 잎마름병에 부분적으로 관여하며 특히

꽃잎에는 *B. elliptica*와 병원성에 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 그러나 본 연구를 통하여 외국에서 보고된(Ellis, 1971; Farr *et al.*, 1989) *B. tulipae*와 *B. squamosa*는 확인되지 않았다.

적 요

본 연구는 백합 잎마름병에 관여하는 *B. elliptica*와 *B. cinerea*의 형태적, 배양적 특성을 조사하고, 유전자 염기서열에 기초한 분자계통분석을 하며 병원성을 비교하기 위하여 실시하였다. 한국, 일본, 네덜란드의 주요 백합 재배지역에서 잎마름병에 걸린 백합으로부터 79개의 *Botrytis*속 균주를 분리하였다. 분생자경과 분생포자의 형태적 특징에 의하여 *Botrytis* 균들은 2개의 그룹으로 분리되었으며 이들은 각각 *B. elliptica*와 *B. cinerea*로 동정되었다. 균사생장 속도는 *B. cinerea*가 *B. elliptica*에 비해 빨랐으며 이러한 형태적, 배양적 특성에 기초하여 79개의 균주 중 54균주(68%)가 *B. elliptica*로, 25균주(32%)가 *B. cinerea*로 동정되었다. *RPB2*와 *HSP60*의 염기서열 분석을 통해, 공시균주는 두 그룹으로 구분되었으며 이들은 형태적으로 동정한 그룹과 일치하였다. 포자 현탁액을 이용한 *B. elliptica*와 *B. cinerea*의 병원성 검정 결과 *B. elliptica* 균주들은 백합 잎과 꽃잎 모두에 병원성을 나타내었다. 그러나 *B. cinerea* 분생포자 현탁액은 꽃잎에만 병원성을 나타내었으며 PDB가 첨가된 포자현탁액을 접종원으로 사용했을 때에만 백합 잎에 병원성을 나타내었다.

감사의 글

이 연구는 농림부 농림기술개발사업 및 농촌진흥청 현장협력 기술개발과제 연구비의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- 권진혁. 2006. *Botrytis cinerea*에 의한 배초향 잿빛곰팡이병. 한국균학회지 34: 59-61.
- 유승현, 김흥기, 박종성. 1988 *Botrytis elliptica*(Berk) Cook에 의한 한국 미기록 백합 잎마름병. 충남대농업기술연구보고 15: 23-27.
- 이은중, 이영희, 조원대, 김완규, 유화영. 1989. 화훼병해원색도감. 농업기술연구소 Pp 74-75.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명명목록.
- 함수상. 2007. 백합 잎마름병균(*Botrytis* spp.)의 병리학적 특성 및 제어. 박사 학위 논문. 충남대학교.
- 홍성기. 2002. 한국산 *Botrytis* 균과 유사속균의 형태 및 분자계통분류학적 연구. 박사 학위 논문. 충남대학교.
- Anonymous. 2000. Gray-mold rot or *Botrytis* blight of vegetables. Report on Plant disease. University of Illinois, USA.
- Berbee, M. L., Pirseyedi, M. and Hubbard, S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91: 964-977.

- Chen, W., Hoy, J. W. and Schneider, R. W. 1992. Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Exp. Mycol.* **16**: 22-34.
- Chun, J. 1995. Computer assisted classification and identification of actinomycetes. Ph. D. Thesis, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.
- Cotton, A. D. 1933. The detection and control of lily diseases. *Lily Year-Book.* **2**: 194-214.
- Doss, R. P., Chastagner, G. A. and Riley, K. I. 1988. Streaking of lily leaves associated with infection by *Botrytis elliptica*. *Plant Disease* **72**: 859-861.
- Ellis, M. B. 1971. *Dematiaceous Hypomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. Pp 178-184.
- Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. and Rossman, A. Y. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. APS Press, St. Paul. Pp 594-595.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Syst Zool* **20**: 406-416.
- Furukawa, T., Ushiyama, K. and Kishi, K. 2005. *Botrytis* Blight of Taiwanese Toad Lily caused by *Botrytis elliptica* (Berkeley) Cooke. *J. Gen. Plant Pathol.* **71**: 95-97.
- Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D. and Taylor, J. W. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* **69**: 180-190.
- Hsieh, T. F. and Huang, J. W. 1998. Factors affecting disease development of *Botrytis* leaf blight of lily caused by *Botrytis elliptica*. *Plant Protection Bulletin* **40**: 227-240.
- Hennebert, G. L. 1973. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* **7**: 183-204.
- Holst-Jensen, A., Vaage, M. and Schumacher, T. 1998. An approximation to the phylogeny of Sclerotinia and related genera. *Nordic Journal of Botany* **18**: 705-719.
- Jarvis, W. R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species; taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph No. 15, Canadian Department of Agriculture, Ottawa
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1992. Phylogeny of five fungus-like protoclitan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 636-653.
- Liu, Y., Whelen, S. and Hall, B. D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1799-1808.
- Lorbeer, J. W., Seyb, A. M., de Boer, M. and van den Ende, J. E. 2004. *Botrytis* species on bulb crops. Pp 273-294. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. Eds. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands.
- MacFarlane, H. H. 1968. Plant host-pathogen index to volumes 1-40. Review of Applied Mycology. Commonwealth Mycological Institute, Kew, VIII+820. Pp 1922-1961.
- Nielsen, K., Justesen, A. F., Jensen, D. F. and Yohalem, D. S. 2001. Universally primed polymerase chain reaction alleles and internal transcribed spacer restriction fragment length polymorphisms distinguish two subgroups in *Botrytis aclada* distinct from *B. byssoidea*. *Phytopathology* **91**: 527-533.
- Staats, M. 2007. *Botrytis* species on flower bulb crops: Phylogeny, genetic variation and host specificity. PhD Thesis. Wageningen University, The Netherlands.
- Staats, M., van Baarlen, P. and van Kan, J. A. L. 2005. Molecular Phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* **22**: 333-346.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTALX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Ward, H. M. 1888. A lily disease. *Ann. Bot.* **2**: 319-382.
- Wright, J. 1928. The causal parasite of the lily disease. *Trans. Bot. Soc. Edinburgh.* **30**: 59-65.
- Yohalem, D. S., Nielsen, K. and Nicolaisen, M. 2003. Taxonomic and nomenclatural clarification of the onion neck rotting *Botrytis* species. *Mycotaxon* **85**: 175-182.