

Rhizopus arrhizus (syn. *R. oryzae*)에 의한 팥 갈색잎마름병 첫 보고

이성균*, 연지은, 연은솔, 전종옥, 신현만, 김주형, 이상범

충청북도농업기술원

First report of red bean brown leaf blight caused by *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*)

Seongkyun Lee*, Jieun Yeon, Eunsol Yeon, Jongok Jeon, Hyunman Shin, Ju-Hyung Kim and Sangbeom Lee

Chungbuk Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Republic of Korea

Contribution to Environmental Biology

- The study results can be used as basic data for establishing a control strategy for red bean brown leaf blight.

*Corresponding author

Seongkyun Lee
Tel. 043-220-5672
E-mail. lepimoth@korea.kr

Received: 10 November 2023

First revised: 18 December 2023

Second revised: 20 December 2023

Revision accepted: 26 December 2023

Abstract: Milky white spots appeared on red bean leaves in a red bean cultivation area located in Jangyeon-myeon, Goesan-gun, Chungbuk Province. After culturing the pathogen in PDA medium, their morphology was observed, and their genes were BLAST-searched in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The pathogen was identified as a fungus called *Rhizopus arrhizus*. As a result of re-inoculating the isolated pathogen on red beans, the same symptoms as those in the isolated leaves occurred. Characteristic colonies of *R. arrhizus* on PDA medium initially showed a bright color and then changed to dark gray over time, with mostly spherical sporangia. The sporangiospores were spherical or elliptical, mostly irregular, and small in size. Therefore, based on these results, this disease has not yet been reported in red beans and was called red bean brown leaf blight caused by *Rhizopus arrhizus* A. Fisch (syn. *R. oryzae*).

Keywords: *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, red bean

1. 서 론

팥(*Vigna angularis*)은 우리나라의 두류 작물 중 콩 다음으로 많이 재배하는 일년생 작물로서 소두(小豆) 또는 적두(赤豆)라고 불리며, 따뜻하고 습한 기후를 좋아하고, 종류에는 줄기가 곧게 서는 보통 팥, 덩굴로 자라는 덩굴팥이 있으며, 열매 색깔은 붉은색, 검정색, 푸른색, 녹색, 갈색으

로 다양하다(KAMIS 2023). 또한 한국, 중국, 일본 등 주로 온대지역에서 재배되며(Thomas and McClary 1994) 우리나라의 팥 재배면적 및 농가수는 2022년 기준 1,690 ha, 16,908호이다(AgriX 2022).

팥에는 현재까지 세균갈색무늬병 등 세균 2종, 흰가루병 등 진균 12종, Alfalfa mosaic virus 등 바이러스 5종의 병해가 보고되어 있다(KSP 2022). 이러한 병해들은 지속적

으로 발생하고 있으며, 특히 새로 발생하는 병해의 경우 농업 현장에서 정보 부족으로 진단 및 방제가 어려워 초기 대응이 원활하게 이루어지기 힘들어 피해가 확산될 수 있다. 본 연구에서는 팔에 기존에 보고되어 있지 않은 *Rhizopus arrhizus*라는 진균이 팔 잎에 병을 유발시킨다는 사실을 발견하였다.

*Rhizopus*는 전 세계적으로 많은 지역에서 분포하고 온대지역에서 주로 발생하며(Domsch *et al.* 1980), 작물에서는 운송과 보관 중인 작물에 부패를 발생시키며 생육 중인 식물에서도 질병을 발생시킨다(Agrios 2005). *R. arrhizus*는 토양, 배설물, 썩은 초목 등에서 흔히 볼 수 있다(Ellis 1985; Liou *et al.* 2001). 우리나라에서는 고구마, 굴나물, 바나나, 백합, 복숭아, 사과, 오이, 참오동나무에서 무름병, 더덕에서 수확후뿌리썩음병을 발생시키는 것으로 보고되어 있어(KSPP 2022), 이미 많은 작물에서 병을 발생시키고 있다. 따라서 팔 재배 현장에서 *R. arrhizus*에 의한 병해가 확산되기 전 초기에 대응을 할 수 있도록 병징의 특징, 병원균 형태 등 균학적 특성을 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 병원균 채집

2021년 8월 충북 괴산군 장연면(36.878543, 127.980979)의 팔 재배지의 팔잎에서 Fig. 1과 같은 이상 증상이 나타나는 것을 발견하여 병원균을 분리하였다.

2.2. 병원균 분리

병원균을 분리하기 위해 이상 증상이 나타나는 조직을 멸균수로 세척한 뒤 차아염소산 1% (NaOCL) 용액으로 약

30초간 표면을 살균하였다. 그리고 감자한천배지(potato dextrose agar)에 건전부와 병든 부위가 포함된 조직을 잘라내어 배지에 올려두고 3일간 배양하여 병원균 동정 및 병원성 검정을 위해 사용하였다.

2.3. 병원균 동정

배양된 병원균은 광학현미경(DM3000 LED; Leica, Germany)을 통해 colony, sporangia, sporangiospore, sporangiophore 등의 형태를 관찰하였다. 또한 유전자를 이용한 진단을 위해 ITS (international transcribed spacer) region의 염기서열을 확보하였으며 PCR 조건은 다음과 같다. Pre-denaturation (95°C, 2분), denaturation (95°C, 30초), annealing (48°C, 50초), extension (72°C, 1분), final extension (72°C, 5분). 이렇게 확보한 염기서열은 NCBI에서 BLAST search하였으며, phylogeny 분석은 MEGA program 11 version을 이용하여 분석하였다.

2.4. 병원성 검정

괴산군 포장에서 자연 발생된 병징에서 분리한 병원균을 28°C에서 PDA 배지에 약 3일간 배양한 후 멸균수를 부어 병원균 표면을 긁어낸 뒤 멸균수를 한곳에 모아 거즈를 통해 걸러낸 뒤 팔 잎에 분무 살포하여 기존의 증상과 동일한 증상이 나타나는지 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 병원균의 동정

PCR을 통해 ITS gene을 증폭 후 sequence를 확보하여 nucleotide BLAST search를 한 결과 *R. arrhizus* (NCBI



Fig. 1. Symptoms of red bean abnormalities caused by *Rhizopus arrhizus*. Initial (A), middle (B), and final (C) symptoms.

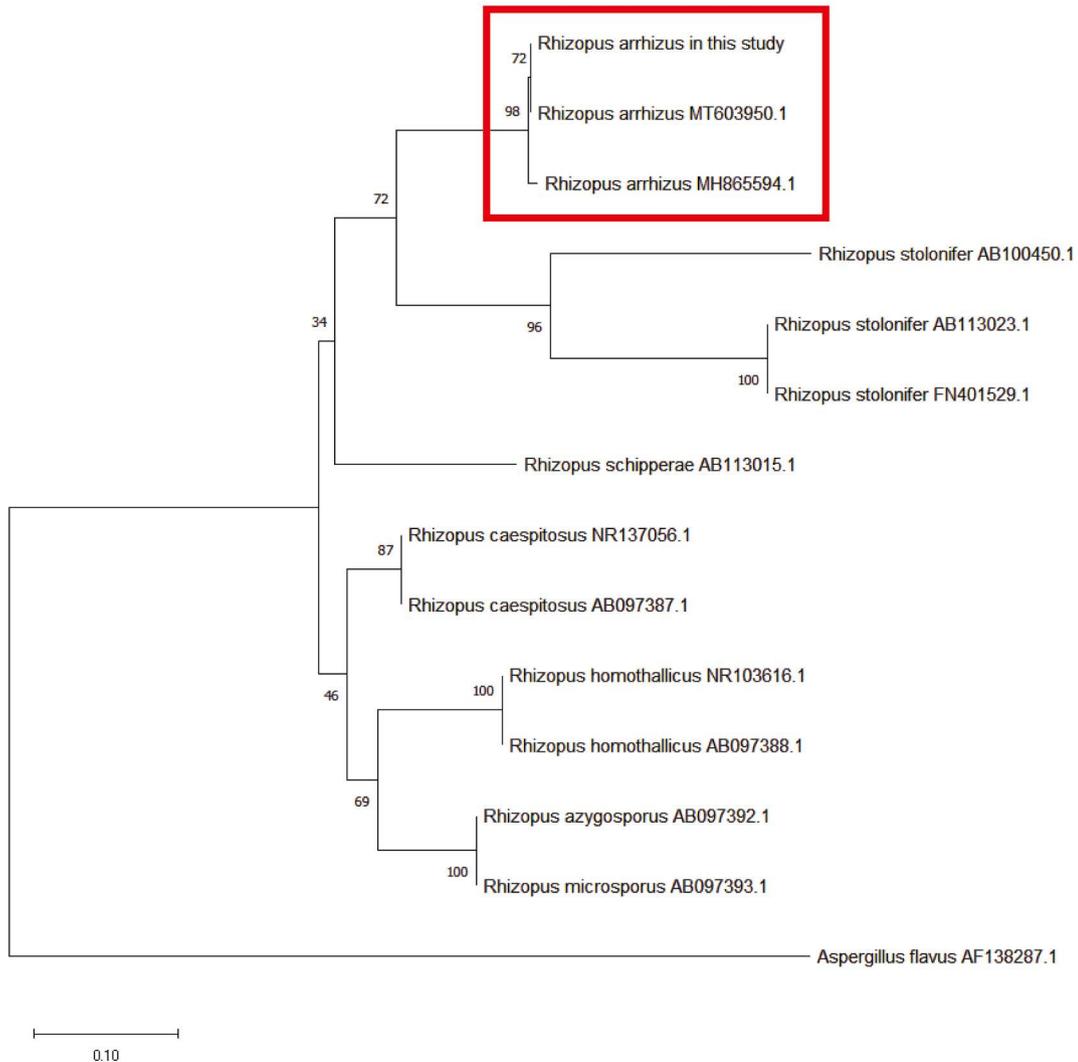


Fig. 2. Phylogenetic analysis using ITS showing the closest known relatives of *Rhizopus arrhizus*. DNA sequences from the NCBI nucleotide database were aligned using Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (MAFFT), and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. Numbers above the branches indicate bootstrap values. Bars indicate the number of nucleotide substitutions per site.

accession number MT603964.1 등)와 염기서열이 100% 일치하였으며, neighbor-joining 방법을 통해 phylogenetic tree를 그려본 결과도 *R. arrhizus*와 grouping이 이루어졌다(Fig. 2). 또한 유전자 검정뿐만 아니라 병원균의 외부 형태를 관찰한 결과, PDA 배지에서 배양된 균총(colony)은 초기에는 밝은 회색을 띠다가 배양 기간이 지속될수록 어두운 회색으로 점차 변화하였으며 포자낭(sporangia)의 모양은 대부분 구형이고, 그 크기는 직경이 약 50~220 μL 정도였다. 포자낭포자(sporangiospore)의 경우 구형 또는 타원형으로 대부분의 모양이 불규칙하였고 그 크기는 약

4~10 μm 로 매우 작았으며, 포자낭경(sporangiophore)은 12~16 μm 의 두께를 가졌다(Fig. 3). 이와 같이 팔의 이상 증상에서 분리된 *R. arrhizus* (syn. *R. oryzae*)는 CABI and Lunn *et al.* (1977)이 보고한 *R. oryzae*와 형태가 매우 유사하였다(Table 1). 또한 최근 국내에서 보고된 복숭아 무름병의 *R. oryzae*의 균총(brownish-grey to black-grey), 포자낭(globose, 35~200 μm), 포자낭포자(sub-globose, 5~10 μm), 포자낭경(6~20 μm), 백합 무름병의 균총(brownish-grey to black-grey), 포자낭(globose, hemispheric, 87~116 μm), 포자낭포자(sub-globose, rhomboidal, 4~8 μm), 포

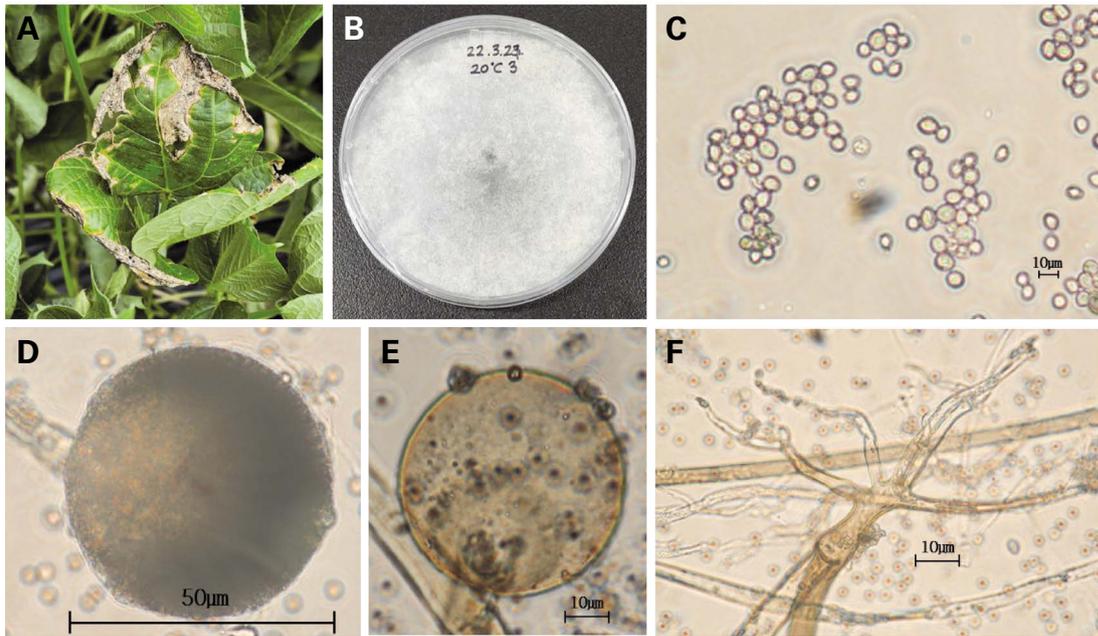


Fig. 3. Symptom and morphological characteristics of *Rhizopus arrhizus*. A: Leaf blight symptoms, B: colony on PDA, C: sporangiospores, D: sporangium, E: columellum, and F: rhizoid.

Table 1. Comparison of the morphological characteristics of *Rhizopus oryzae* fungus isolated from red beans

Characteristics		Present isolate	<i>Rhizopus arrhizus</i> ^a
Colony	Color	Light-grey to blackish-grey	Brownish-grey to blackish-grey
Sporangia	Shape	Globose	Globose
	Size	50–220 µm in diameter	30–210 µm in diameter
Sporangiospore	Shape	Sub-globose, limoniform	Sub-globose, rhomboidal or limoniform
	Length	4–10 µm	4–10 µm
Sporangiophore	Diameter	12–16 µm	7–20 µm

^aDescribed by CABI and Lunn (1977).

자낭경(6~10 µm)과 색, 길이, 두께가 유사하였다(Kwon *et al.* 2012; Hahm *et al.* 2014).

분리한 병원균은 농촌진흥청 국립농업과학원 씨앗은행(KACC 410626)에 기탁하였고, 염기서열은 National Library of Medicine (National Center for Biotechnology Information)에 등록(accession number OR93654)하였다.

3.2. 병원성 검정 및 증상

괴산의 팔 재배지에서 분리한 병원균을 PDA 배지에서 약 3일간 배양한 후 충청북도농업기술원 팔 재배포장에 접종한 결과 병원균이 분리된 최초의 증상과 동일한 증상이

발현되었다.

R. arrhizus 감염 초기에는 잎에 유백색의 반점이 생기며 (Fig. 1A), 감염이 진전됨에 따라 병반의 크기가 커지며 갈색으로 변하였고(Fig. 1B), 병 감염 후기에 이르면 잎이 완전히 말리며 잎 끝에 병원균의 포자낭이 매우 높은 밀도로 발생하였다(Fig. 1C). *R. arrhizus*는 다양한 작물에서 무름병을 일으키는 것으로 보고되어 있는데(KSPP 2022), 백합에서 그 증상으로 발병 초기 지제부 줄기에서 작은 반점이 형성 후 병징이 급격히 진전되면서 10일 이내에 전체적으로 물러지고 줄기는 부러지며(Hahm *et al.* 2014), 복숭아는 접종한 표면이 수침상으로 물러지면서 부패한다

고 보고되어 있다(Kown *et al.* 2012). 감귤은 상처 접종 후 3일 후 감귤 표면에 수침상이 생기며 물러졌으며, 무상처 접종한 경우에는 병이 발생 하지 않는다고 보고되어 있다(Kwon *et al.* 2011).

팔의 경우 *R. arrhizus*를 열매와 잎에 접종한 결과, 열매에서는 증상이 나타나지 않았으나, 잎에서는 초기에 작은 유백색의 반점이 생기며 병징이 잎 전체로 번져가며 감염 부위가 괴사된 반면 기존에 보고된 *R. arrhizus*에 의한 백합, 복숭아, 감귤의 무름병 증상은 줄기나 열매에 생기면서 수침상 후 무름 증상과 부패가 이루어졌다. 팔 열매의 경우 껍질이 두껍고 미세한 털이 많아 병원균이 내부로 침투하기 어려워 위에 보고된 기주와 다른 발생 패턴을 보인 것으로 판단된다.

3.3. 명명(갈색잎마름병)

이와 같이 코흐(koch)의 법칙을 이용해 최초 병징에서 분리한 병원균을 배양 후 동일한 작물에 접종하여 최초 병징과 동일한 증상이 발현되는 것을 확인하였으며, 병원균의 형태와 유전자 진단을 통해 *R. arrhizus*라는 진균이 병을 일으키는 것으로 최종 진단을 하였다. 따라서 지금까지 이 병은 보고되지 않은 팔 병해로서 *Rhizopus arrhizus* A. Fisch (syn. *R. oryzae*)에 의한 팔 갈색잎마름병으로 명명하고자 한다.

적 요

충북 괴산군 장연면에 위치한 팔 재배지에서 팔잎에 유백색 반점이 생기고 점차 시간이 지남에 따라 감염 부위가 갈색으로 변하는 증상을 발견하였다. PDA 배지에서 병원균을 배양 후 형태를 관찰하고 유전자를 NCBI에서 BLAST search한 결과 *R. arrhizus*라는 진균으로 동정되었다. 또한 분리한 병원균을 팔에 다시 접종한 결과 분리한 잎에서 나타난 증상과 동일한 증상이 발생하여 팔에 병원성이 있는 것으로 확인되었다. *R. arrhizus*의 특징으로 PDA 배지에서 균총은 초기에 밝은색을 띠다가 시간이 지남에 따라 어두운 회색으로 변하였으며, 포자낭은 대부분 구형이었다. 포자낭포자의 경우 구형 또는 타원형으로 대부분이 불규칙하고 크기가 작았다. 따라서 이와 같은 결과를 토대로 이 병은 지금까지 팔에 보고되지 않은 병으로서

Rhizopus arrhizus A. Fisch (syn. *R. oryzae*)에 의한 팔 갈색잎마름병으로 명명하고자 한다.

CRedit authorship contribution statement

S Lee: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing - Original draft. **J Yeon:** Data curation, Investigation. **E Yeon:** Data curation, Investigation. **J Jeon:** Supervision. **H Shin:** Supervision. **J Kim:** Supervision, **S Lee:** Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from the Agenda Program (RS-2021-RD009863), funded by the Rural Development Administration of Korea.

REFERENCES

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. Florida, USA.
- AgriX. 2022. <https://www.agrix.go.kr>. Agricultural and Forestry Business Information System. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Sejong, Korea. Accessed November 9, 2023.
- CABI and JA Lunn. 1977. *Rhizopus oryzae*. Descriptions of Fungi and Bacteria. No. 525. Center for Agriculture and Bioscience International. <https://doi.org/10.1079/DFB/20056400525>
- Domsch KH, W Hams and TH Anerson. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press Ltd. London, UK.
- Ellis JJ. 1985. Species and varieties in the *Rhizopus arrhizus*-*Rhizopus oryzae* group as indicated by their DNA complementarity. Mycologia 77:243-247. <https://doi.org/10.2307/3793074>
- Hahm SS, GW Hong, BR Kim, K Han, T Choi, Y Nam and S Yu. 2014. *Rhizopus* soft rot on lily caused by *Rhizopus oryzae* in Korea. Res. Plant Dis. 20:50-53. <https://doi.org/10.5423/RPD.2014.20.1.050>
- KAMIS. 2023. Korea Agricultural Marketing Information Service. Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation. Naju, Korea. <https://www.kamis.or.kr>. Accessed December 19, 2023.

- KSPP. 2022. List of Plant Diseases in Korea. 6th Edition. The Korean Society of Plant Pathology. Seoul, Korea. pp. 448-449.
- Kwon JH, DW Kang, JS Ha, JW Kim and YS Kwak. 2012. Soft rot on peach caused by *Rhizopus oryzae* in Korea. Korean J. Mycol. 40:65-68. <https://doi.org/10.4489/KJM.2012.40.1.065>
- Kwon JH, J Kim, JW Hyun, YH Lee and HS Shim. 2011. Soft rot on *Citrus unshiu* caused by *Rhizopus oryzae* in Korea. Res. Plant. Dis. 17:78-81. <https://doi.org/10.5423/RPD.2011.17.1.078>
- Liou GY, CC Chen, GF Yuan and CY Chien. 2001 A taxonomic study of the genus *Rhizopus* by isosyme patterns. Nova Hedwigia 72:231-239. <https://doi.org/10.1127/nova.hedwigia/72/2001/231>
- Thomas AL and DC McClary. 1994. Adzuki Bean: Botany, Production and Uses. Center for Agriculture and Bioscience International Press. pp. 247.