*Botrytis cinerea*에 의한 오크라 잿빛곰팡이병

Occurrence of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on Okra in Korea

*Co-corresponding authors

I.Y. Choi

Tel: +82-63-290-6182

Fax: +82-63-290-6198

E-mail: choiy21@korea.kr

H.D. Shin

Tel: +82-2-3290-3063

Fax: +82-2-925-1970

E-mail: hdshin@korea.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-7778-2747>최장남¹ · 최인영^{2*} · 이귀재³ · 이정노⁴ · 조성완⁵ · 신현동^{6*} · Victor Galea⁷¹전북대학교 농생물학과, ²전라북도농업기술원, ³전북대학교 환경생명자원대학,⁴한국폴리텍대학 바이오캠퍼스, ⁵건양대학교 제약생명학과, ⁶고려대학교 환경생태공학부,⁷퀸즐랜드대학JangNam Choi¹, InYoung Choi^{2*}, KuiJae Lee³, JungNo Lee⁴, SeongWan Cho⁵,
HyeonDong Shin^{6*}, and Victor Galea⁷¹Department of Agricultural Biology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea²Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 54591, Korea³Division of Biotechnology, College of Environmental and Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea⁴Department of Bionanometerials, Biocampus of Korea Polytechnics, Nonsan 32943, Korea⁵Department of Pharmaceutics & Biotechnology, Konyang University, Daejeon 35365, Korea⁶Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 02841, Korea⁷School of Agriculture and Food Sciences, The University of Queensland, QLD 4343, Australia

From 2014 to 2016, approximately 5% of okra fruit were observed displaying gray mold symptoms at the research field of Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Korea. The symptoms observed were water-soaked, brown or gray spots, and abundant mycelial with conidia appearing on the infected fruit. Initial infection commenced from the base of fruit and gradually moved to the pod, where it finally resulted in collapse. Colonies on potato dextrose agar were gray to grayish brown, felted and cottony expanding 65–80 mm after one week. The fungus formed several black sclerotia ranging 1.0–3.5×0.5–3.0 mm on the Petri dish after two weeks. The conidia were one-celled, ellipsoidal or ovoid, colorless or pale brown, and 6.2–15.4×5.0–10.4 μm. Conidiophores arose solitary or in groups, straight or flexuous, septate, with an inflated basal cell brown to light brown, and measured 85–450×10.0–40.0 μm. On the basis of the morphological characteristics and phylogenetic analyses of internal transcribed spacer rDNA, the fungus was identified as *Botrytis cinerea* Pers. Pathogenicity of a representative isolate was proved by artificial inoculation, fulfilling Koch's postulates. To our knowledge, this is the first report on the occurrence of *B. cinerea* on okra in Korea.

Keywords: *Abelmoschus esculentus*, *Botrytis cinerea*, Gray mold, Okra

Received August 26, 2018

Accepted September 14, 2018

오크라[*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]는 아욱과 (Malvaceae)에 속하는 아열대성 채소로 여자 손가락 모양과

비슷하다 하여 '레이디핑거'라고도 불린다. 아프리카 동북부가 원산지이며, 전 세계의 열대와 아열대지방인 인도, 동남아시아, 아프리카, 중남미에서 널리 재배되고 있다. 오크라에는 단백질과 비타민, 미네랄이 풍부하며, 과일 안의 점질물은 배변에 도움이 되는 것으로 알려져 있어 샐러드 또는 튀김으로 먹거나 스

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.

프 등에 넣어 먹는다(Salameh, 2014). 오크라는 아시아와 아프리카의 개발도상국에서 99% 이상 독점적으로 재배되고 있으며, 전 세계의 연평균 생산량은 5.26 MT ha^{-1} 로 183 만 ha에서 9.62 million metric tons (MMT)을 생산하고 있다. 특히, 인도의 생산성은 12.0 MT ha^{-1} 이며(FAOSTAT, 2014), 50만 ha 이상에서 6.3 MMT(세계 총 생산량 72%)의 생산량으로 세계 1위를 차지하고 있다(Mishra 등, 2017). 우리나라의 경우 지구 온난화에 따라 아열대작물의 재배 가능지역이 남부지역부터 점차 확대됨에 따라 다양한 아열대작물이 국내에 도입되어 재배가 시도되고 있다. 그 중 해외 수입에만 의존하던 오크라의 상업적인 재배가 2000년대부터 시작되어 제주, 전라, 경남 등의 지역으로

확대되었으나 재배면적은 통계에 나타나 있지 않다(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2017).

*Botrytis*에 의한 잿빛곰팡이병은 기주범위가 넓어 초본류와 목본류에서 blight, blossom-end rot, gray mold, bulb rot, blossom blight, damping-off 등을 유발하며 가장 일반적인 종은 *B. cinerea*로 보고되고 있다(Plant Disease Diagnostic Clinic, 2011). 또한 *B. cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병은 목화, 무궁화, 접시꽃 같은 아욱과에 주로 발병하는 중요한 식물병원균으로 235종의 식물에서 다양한 부위와 작기에 감염을 일으키며, 전형적인 사물기생균으로 식물세포를 죽이고 영양원으로 활용한다(Ten Have 등, 2010; Zhao 등, 2016). *B. cinerea*의 발육

Fig. 1. Typical symptoms of gray mold disease on naturally infected okra caused by *Botrytis cinerea*. (A) The fruit was infected, devastating the whole plant. (B) One-week-old colony of *B. cinerea* growing on a PDA (Potato Dextrose Agar). (C) Black sclerotia developed on PDA of two-week-old colony. (D) Conidia and conidiophores. (E) Conidia.

온도는 22–24°C 내외로 저온성균에 속하며, 기주범위가 매우 넓어 관상식물이나 과채류 및 엽채류 등 대부분의 작물에 피해를 일으킨다.

2014년부터 2016년까지 전라북도농업기술원(익산) 시험연구 포장에 식재한 오크라에서 잣빛곰팡이병이 발생하였다. 발병된 오크라에서 병원균을 순수 분리한 후 단일균주를 획득하였으며, 병원균의 형태적 특징 및 DNA 염기서열 분석을 기초로 *Botrytis cinerea*로 동정하였고, 오크라 열매에 인공접종하여 병원성을 검정하였다. 따라서 본 연구는 오크라 잣빛곰팡이병의 발병 및 병징, 병원성 검정, 균학적 특징 및 염기서열 분석 등에 대하여 보고한다.

발병 및 병징. 잣빛곰팡이병은 장마철 과습한 조건에서 발병이 가장 많았으며, 최고 발병률은 5%였다. 오크라 품종간의 차이는 없었으며, 'Green Hope'와 'Red Hope'에서 동일하게 발생되었다. 초기 감염은 열매의 기저부에서 갈색 또는 회색의 점무늬로부터 시작하여 꼬투리와 줄기쪽으로 확대되었다. 이병부는 수침상으로 분생포자와 함께 많은 균사가 형성되었으며, 저온다습한 조건에서 더욱 빠르게 확산되었다(Fig. 1A).

병원균의 분리 및 병원성 검정. 병원균 분리는 오크라 재배 포장에서 병든 식물체를 채집하여 실험실에서 건전 부위와 병원균에 감염된 이병 부위의 경계 조직을 5×5 mm 크기로 잘라 1% NaOCl 용액에서 1분 동안 표면 살균하였다. 그 다음, 멸균수로 2–3회 세척하여 멸균된 여과지에서 물기를 제거한 다음 감자한천배지(PDA) (Difco, MD, USA)에 옮겼으며, 22±1°C 항온기 내에서 2–3일간 배양하였고, 2균주(JARES71과 JBARES72)를 확보하였다.

오크라 잣빛곰팡이병에 대한 병원성 검정은 포트에서 30일간 생육된 5개 유묘 식물체에 형성된 열매를 대상으로 실시하였다. 접종원은 JARES71균주를 감자한천배지에서 2주간 배양한 후 멸균수를 넣고 메스(scalpel)로 포자를 수거한 현탁액

(2.3×10^5 conidia/ml)를 사용하였다. 접종방법은 5개 유묘에 형성된 10개 열매에 포자현탁액을 충분히 분무하였으며, 대조구는 멸균수를 동일한 개체에 분무하였다. 접종된 모든 식물체는 95% 이상의 높은 상대습도를 유지하기 위하여 식물체 주변에 증류수를 충분히 분무한 후 비닐봉지로 밀봉하여 25±1°C에서 유지하였다. 접종 5일 후에 잣빛곰팡이병이 포장에서 관찰된 모습과 동일하게 열매 꼬투리부분부터 발병하기 시작하여 밑부분에서도 나타났으나 대조구는 병징이 나타나지 않았다. 병징이 나타난 열매로부터 포장에서 분리한 동일한 병원균이 분리되었다. 따라서 오크라 잣빛곰팡이 증상에서 분리된 병원균은 병원성을 가지는 것으로 판단된다.

병원균의 균학적 특징 및 rDNA의 ITS 염기서열 분석. 병원균의 형태적 특징은 감자한천배지에서 7일 동안 배양된 병원균(JARES71, JBARES72)과 열매에 감염된 병원균의 분생포자경과 분생포자를 대상으로 확인하였으며, Stereo 현미경(Stereo Discovery V8, Zeiss)과 DIC (differential interference contrast) 모듈이 장착된 광학현미경(AXIO, Zeiss)에서 400–1,000배로 관찰하였다. 분생포자경, 분생포자의 형태와 크기(n=50) 등은 AxioVision LE Module Interactive Measurement (Zeiss) 프로그램 이용하여 측정하였다. 분리된 병원균은 감자한천배지에서 22±1°C, 7일간 배양하였을 때 직경이 65–80 mm 생육을 보였으며, 균층은 중앙부와 가장자리에서 더욱 진한 쥐색으로 양모상이며, 원형으로 배양되었다(Fig. 1B). 같은 조건에서 2주간 배양된 병원균은 배지 위에 작고 검은색의 균핵이 많이 형성되었으며, 크기는 1.0–3.5×0.5–3.0 mm (n=20)이었다(Fig. 1C). 병원균의 분생포자는 무색 또는 회색의 단세포이며, 구형 또는 타원형으로 크기는 6.2–15.4×5.0–10.4 μm이었다(Fig. 1E). 또한 수지상으로 분지한 분생포자경위에 포도 송이와 같이 분생포자가 집단적으로 형성되었다. 분생포자경은 갈색 또는 투명한 색의 수지상으로 크기는 85–450×10.0–40.0 μm이었다(Fig. 1D, Table 1).

Table 1. Comparison of mycological characteristics of the present isolate obtained from okra (*Abelmoschus esculentus*) and *Botrytis cinerea* as previously described

Characteristics		Present isolate	<i>B. cinerea</i> ^a	<i>B. cinerea</i> ^b
Conidia	cell shape	one-celled	one-celled	one-celled
	shape	ellipsoidal or ovoid	ellipsoidal or ovoid	ellipsoidal or ovoid
	size (μm)	6.2–15.4×5.0–10.4	5.1–10.4×5.1–7.8	6.0–18.0×4.0–11.0
	color	colorless or pale brown	dark brown	colorless or pale brown
Conidiophore	size (μm)	85–450×10–40	110–406×10–27	16–30×2
Colony	color	brown to light brown	brown to light brown	grayish brown

^aAktaruzzaman et al. (2018), ^bEllis (1971).

Fig. 2. Phylogenetic tree obtained through the neighbor-joining method using the MEGA 6.06 program based on the internal transcribed spacer ribosomal DNA (rDNA) sequence of our isolates of *Botrytis cinerea*, and that of other *Botrytis* spp. retrieved from GenBank. The numbers above the nodes are the bootstrap values obtained from 1,000 replicates. The isolates obtained in this study are shown in boldface.

또한 형태적 특징을 기초로 한 병원균의 동정을 보완하기 위하여 염기서열 분석을 하였다. 감자한천배지에서 일주일 동안 배양한 병원균주의 균총을 메스로 긁어 마쇄한 후, DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. Ribosomal DNA (rDNA)의 internal transcribed spacer (ITS) 영역을 분석하기 위해 ITS1/ITS4 primer를 사용하여 PCR로 증폭했으며(White 등, 1990), 증폭된 산물은 정제를 위해 1.5% agarose gel에서 분리한 후 PCR purification kit (Core-one™, Core-bio, Korea)를 사용하였다. ABI 3130 auto sequencer를 이용하여 ITS1과 ITS4의 염기서열을 분석하였으며, ITS rDNA sequence data는 GenBank database (National Centre for Biotechnology Information [NCBI], US National Institute of Health Bethesda, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 확인하였다. Phylogenetic analysis는 MEGA

6.06 program을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 작성하였으며, sequence distance는 Tamura-Nei parameter model로 계산하였고, bootstrap analysis는 1,000반복으로 수행하였다(Tamura 등, 2013).

오크라에 잿빛곰팡이병을 일으키는 *B. cinerea* JARES71, JBARES72 균주의 ITS 영역의 길이는 539 bp로 NCBI의 GenBank 등록번호(JBARES71)는 MH763647이다. NCBI에서 Blastn search한 결과 *B. cinerea*로 등록된 GenBank accession number KY817370, MH458888, KX229751, KR055052, KU570456, KP165493, KX443701 등과 >99% 일치하였다. 또한 계통수 작성 결과 JARES71, JBARES72의 ITS 염기서열과 *Botrytis* spp.의 종간 비교에서도 *B. cinerea*와 같은 계통군에 속하였다(Fig. 2).

이상과 같이 오크라 잿빛곰팡이병을 일으키는 병원균을 분리·배양하여 형태적 특징과 염기서열 분석, 병원성 검정을 기

초로 *Botrytis cinerea* Pers.로 동정하였다(Aktaruzzaman 등, 2018; Ellis, 1971). 오크라에 기록된 병해는 전 세계적으로 230여개의 병원균이 기록되어 있지만 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병은 불가리아와 중국에만 기록되어 있다(Farr와 Rossman, 2018). 우리나라에는 *Podosphaera xanthii*에 의한 흰가루병(Choi 등, 2018)과 *Choanephora cucurbitarum*에 의한 Choanephora rot (Park 등, 2015)만 보고되어 있어 기주 미기록 종이다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 따라서 균학적 특징, 병원성 검정, ITS rDNA 염기서열 비교분석 등의 결과를 바탕으로 이 병은 우리나라에서 지금까지 보고되지 않은 *Botrytis cinerea* Pers.에 의한 오크라 잿빛곰팡이병으로 명명하고자 한다. 전 세계적으로 잿빛곰팡이병을 일으키는 *B. cinerea*는 시설재배지의 저온 다습한 환경에서 많이 발생하는데, 분생포자나 균핵의 형태로 이병잔사물이나 토양에서 월동하여 1차 전염원이 되며, 이른 봄부터 분생포자가 형성되면 바람에 의해 다른 곳으로 전파되거나 다른 병든 주에서 형성된 분생포자가 날아와 발병되기도 한다. 잿빛곰팡이병은 95% 이상의 상대습도가 유지될 때 발생이 많으며, 노지보다는 하우스에서 재배되는 작물에 더 큰 피해를 준다(Plant Disease Diagnostic Clinic, 2011). 따라서 잿빛곰팡이병 방제는 무엇보다도 환경관리가 중요한 요인이다.

요 약

2014년부터 2016년까지 전라북도농업기술원(익산) 시험연구 포장에 식재한 오크라에서 잿빛곰팡이병이 5%정도 발생하였다. 초기 감염은 열매의 기저부에서 갈색 또는 회색의 점무늬로부터 시작하여 꼬투리와 줄기 쪽으로 확대되었고, 수침상으로 분생포자와 함께 많은 균사가 형성되었다. 감자한천배지에서 균사 생육은 직경이 65–80 mm/7일이었으며, 중앙부와 가장자리에서 진한 쥐색으로 양모상이었다. 2주간 배양된 병원균은 배지 위에 작고 검은색의 균핵을 형성하였으며, 크기는 1.0–3.5×0.5–3.0 mm이었다. 병원균의 분생포자는 무색 또는 회색의 단세포이며, 구형 또는 타원형으로 크기는 6.2–15.4×5.0–10.4 μm이었다. 또한 수지상으로 분지한 분생포자경위에 포도 송이와 같이 분생포자가 집단적으로 형성되었다. 분생포자경은 갈색 또는 투명한 색의 수지상으로 크기는 85–450×10.0–40.0 μm이었다. 균학적 특징, 병원성 검정, ITS rDNA 염기서열 비교분석 등의 결과를 바탕으로 이 병은 우리나라에서 지금까지 보고되지 않은 *Botrytis cinerea* Pers.에 의한 오크라 잿빛곰팡이병으로 명명하고자 한다.

Conflicts of Interest

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

Acknowledgement

This study was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ0124192018)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Aktaruzzaman, M., Afroz, T., Kim, B. S., Choi, I. Y. and Shin, H. D. 2018. First report of gray mold caused by *Botrytis cinerea* on strawflower in Korea. *Plant Dis.* 102: 452.
- Choi, I. Y., Kim, J. H., Uhm, M. J., Cho, S. E. and Shin, H. D., 2018. First report of powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* on okra in Korea. *Plant Dis.* 102: 1663.
- Ellis, M. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 608 pp.
- FAOSTAT. 2014. FAOSTAT URL <http://faostat.fao.org/> [8 February 2017].
- Farr, D. F. and Rossman, A. Y. 2018. Fungal Databases, Systematic Mycology & Microbiology Laboratory. URL <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> [14 November 2018].
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2017. Statistics of cultivation and production of industrial crops in 2015. Korean Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, Korea.
- Mishra, G. P., Singh, B., Seth, T., Singh, A. K., Halder, J., Krishnan, N. et al. 2017. Biotechnological advancements and begomovirus management in okra (*Abelmoschus esculentus* L.): status and perspectives. *Front. Plant Sci.* 8: 360.
- Park, J. H., Cho, S. E., Choi, I. Y. and Shin, H. D. 2015. First report of Choanephora rot of okra caused by *Choanephora cucurbitarum* in Korea. *J. Phytopathol.* 163: 503–506.
- Plant Disease Diagnostic Clinic. 2011. Botrytis blight: *Botrytis cinerea*; *Botrytis* spp.. Cornell University, Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology Report. URL <http://plantclinic.cornell.edu/factsheets/botrytisblight.pdf> [14 November 2018].
- Salameh, N. 2014. Genetic diversity of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) landraces from different agro-ecological regions revealed by AFLP analysis. *Am-Euras. J. Agric. Environ. Sci.* 14: 155–160.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- ten Have, A., Espino, J. J., Dekkers, E., Van Sluyter, S. C., Brito, N., Kay, J. et al. 2010. The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal*

- Genet. Biol.* 47: 53-65.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant disease in Korea. 5th ed. The Korean Society of Plant Pathology, Suwon, Korea. 853 pp. (In Korean)
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*, eds. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninski and T. J. White, pp. 315-322. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Zhao, Q., Chai, A. L., Shi, Y. X., Xie, X. W. and Li, B. J. 2016. First report of grey mould disease on *Abelmoschus esculentus* caused by *Botrytis cinerea* in China. *J. Phytopathol.* 164: 354-357.