식물병연구
Res. Plant Dis. 17(1) : 78-81 (2011)
DOI: 10.5423/RPD.2011.17.1.078

단보 | Open Access

Research in Plant Disease
©The Korean Society of Plant Pathology

*Rhizopus oryzae*에 의한 감귤 무름병

권진혁* · 김진우[1] · 현재욱[2] · 이용환[3] · 심홍식[4]
경상남도농업기술원, [1]경상대학교, [2]감귤시험장, [3]농촌진흥청, [4]국립농업과학원

Soft Rot on *Citrus unshiu* Caused by *Rhizopus oryzae* in Korea

Jin-Hyeuk Kwon*, Jinwoo Kim[1], Jae-Wook Hyun[2], Yong Hwan Lee[3] and Hong-Sik Shim[4]
Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Servies, Jinju 660-360, Korea
[1]Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
[2]Citrus Research Station, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Jeju 699-946, Korea
[3]Knowledge and Information Officer Division, RDA, Suwon 441-707, Korea
[4]National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea
(Received on February 21, 2011; Accepted on March 17, 2011)

Soft rot caused by *Rhizopus oryzae* occurred on unshiu orange (*Citrus unshiu* Marc.) sampled from commercial markets in Jinju, Korea, 2010. The first symptom of soft rot on orange is a water-soaked appearance of the affected tissue. The infected parts later disintegrated into a mushy mass of disorganized cells followed by rapid softening of the diseased tissue. The lesion on orange was rapidly softened and rotted, then became brown or dark brown. Optimum temperature for mycelial growth of the causal fungus on potato dextrose agar was 30°C and growth was still apparent at 37°C. Sporangiophores were 6~20 μm in diameter. Sporangia were globose and 40~200 μm in size. The color of sporangia was brownish-grey to blackish-grey at maturity. Sporangiospores were sub-globose, brownish- black streaked and 4~10 μm in size. Columella were globose to sub-globose and 85~120 μm in size. On the basis of mycological characteristics, pathogenicity test, and the ITS sequence analysis, the causal fungus was identified as *Rhizopus oryzae*. To our knowledge, this is the first report of soft rot caused by *R. oryzae* on unshiu orange in Korea.

Keywords **: *Citrus unshiu, Rhizopus oryzae,* Soft rot, Unshiu orange**

2010년 12월 진주시 농산물도매시장에서 판매하기 위해 저장 중인 감귤에서 물러지고 부패되는 증상을 발견하였다. 부패가 진행 중인 감귤의 표면에서 솜털 같은 곰팡이가 발생하였고 물러지는 이상증상을 관찰하였다. 이러한 증상을 보이는 감귤을 채집하여 실험실에서 병원균을 분리, 배양한 후 균학적 특징과 병원성을 검정하였다. 병원균의 동정을 명확히 하고자 ITS(internal transcribed spacer) rDNA 염기서열 분석을 하였고 그 결과 *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs로 동정되었다.

지금까지 우리나라에서 감귤에 발생하는 무름병으로 기록된 병원균은 *Rhizopus stolonifer*가 보고되었지만(권과 박, 2002), *R. oryzae*에 의한 감귤 무름병 이외 다른 어떤 작물에도 발생 보고되지 않았다(한국식물병리학회, 2009). 따라서 본 연구에서는 *R. oryzae*에 의한 감귤 무름병 발생 보고하기 위해 병징을 관찰하고 병원균의 균학적 특징과 병원성 검정을 실시하였다.

병징. 과실이 수침상으로 물러지면서 부패되어지고 점차 병징이 진전되어 병반부위에는 백색의 균사가 자라면서 균사 끝부분에 작은 검은색의 포자낭이 많이 형성되었다(Fig. 1A). 과실 내부가 연화되어 상품성이 없게 되었다(Fig. 1B).

발생환경. 농산물도매시장에서 감귤 한 상자를 구입하여 실내에 둔 후 상자 내 감귤의 부패 증상을 관찰하였다. 병해 발생은 실내온도가 올라가고 습도가 적당히 유지되는 상자에 보관중일 때 무름병이 쉽게 발생하며 주로 상처가 난 과실에서 먼저 무름병이 발생하였다. 특히 감귤을 수확하는 동안 생긴 상처나 운반·수송 중 물

*Corresponding author
Phone) +82-55-771-6423, Fax) +82-55-771-6419
Email) kwon825@korea.kr

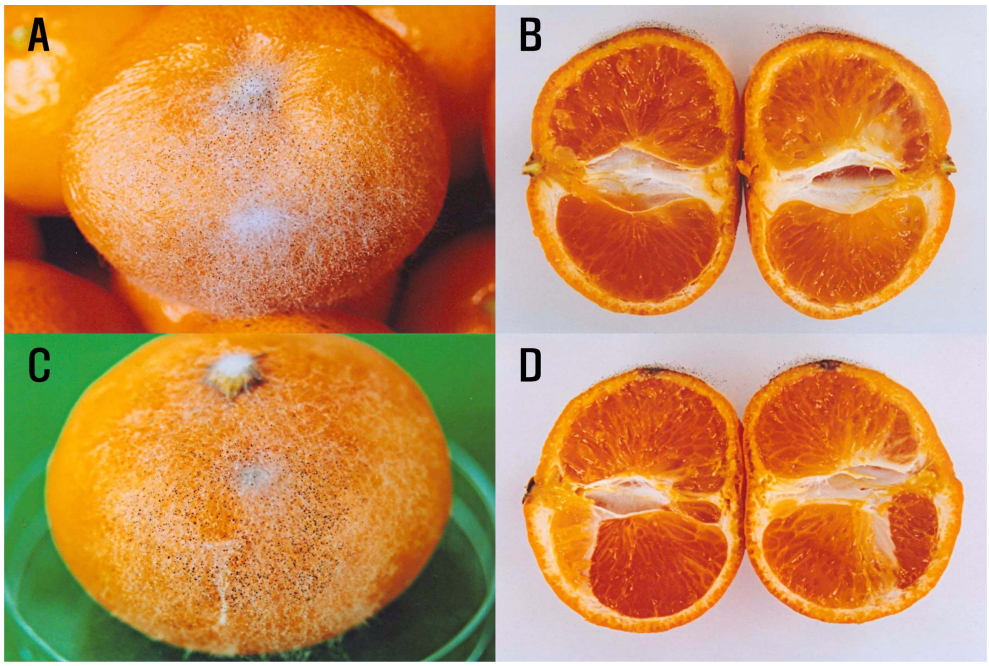

Fig. 1. Symptoms of soft rot on unshiu orange (*Citrus unshiu*) caused by *Rhizopus oryzae*. **A**: Typical symptoms of soft rot on fruit, **B**: Longitudinal section of the infected fruits showing water-soaked lesions, **C**: Symptoms induced by artificially inoculation after 4 days of incubation, **D**: Longitudinal section of fruit. Symptom was induced by artificial inoculation.

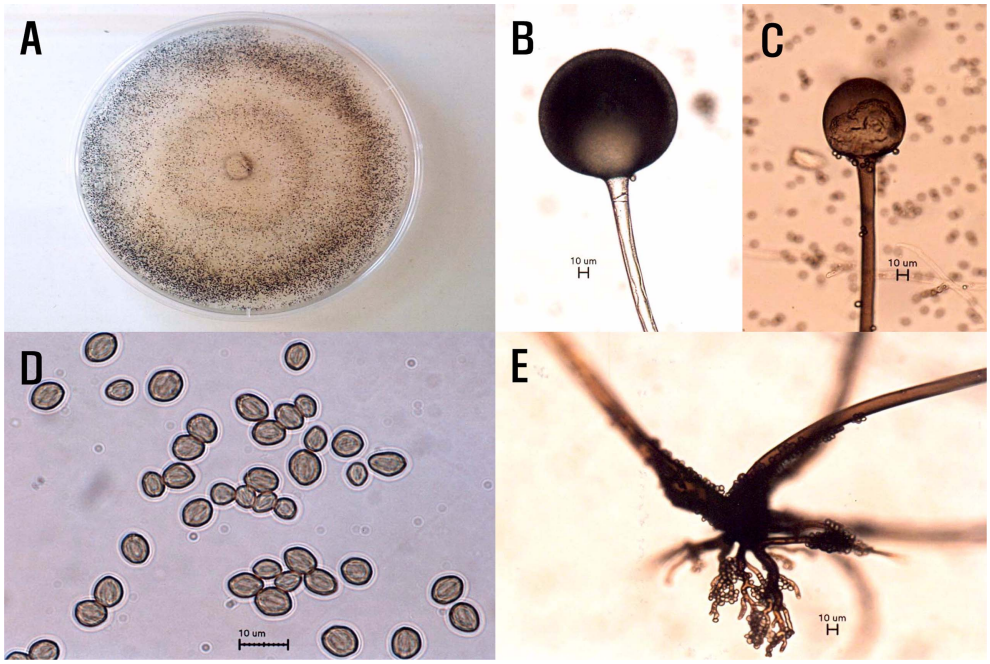

Fig. 2. Morphological characteristics of *Rhizopus oryzae* isolated from unshiu orange. **A**: Colony on PDA after 7 days of inoculation, **B**: Sporangium and sporangiophore, **C**: Columellum, **D**: Sporangiospores, **E**: Rhizoid.

리적인 손상 부위에 병원균이 주로 감염되어 물러지고 부패되어 병이 쉽게 발생하였다. 상자 내 병든 감귤에 접촉된 건전한 과실에서도 조금씩 무름병이 관찰되었다.

균학적 특성. 병징이 뚜렷한 과실을 채집하여 습실 처리한 후 포자낭포자가 형성된 과실로부터 핀셋으로 포자낭 한 개씩 떼어 내어 감자한천배지(Potato dextrose agar:

Table 1. Comparison of morphological characteristics of the fungus isolated from unshiu orange (*Citrus unshiu*) with those of *Rhizopus oryzae* described previously

Characteristics		Present isolate	*Rhizopus oryzae*[a]
Colony	color	brownish-grey to blackish-grey	brownish-grey to blackish-grey
Sporangia	shape	globose	globose
	diameter	40~200 μm	30~210 μm
Sporangiospore	shape	sub-globose	sub-globose, rhomboidal or limoniform
	length	4~10 μm	4~10 μm
Sporangiophore	diameter	6~20 μm	7~20 μm
Columellum	shape	globose to sub-globose	globose to sub-globose
	diameter	85~120 μm	90~120 μm

[a]Described by Lunn, J. A. (1977).

PDA) 위에 30개를 옮긴 다음 30°C 항온기에서 3일간 배양하였다. 배양한 균사 끝부분을 5×5 mm 크기로 잘라내어 PDA배지 위에 다시 옮겨 30°C 항온기에서 7일간 배양한 다음 시험균주로 사용하였다. 감귤 무름병을 일으키는 병원성 곰팡이는 PDA 배지상에서 균사생장이 아주 빠르고 균총이 연한 갈색이며 포자낭을 많이 형성하여 검은색으로 나타난다(Fig. 2A). 균사생장 적온은 PDA 배지 상에서 30°C이지만 37°C에서도 생장은 잘 되었다. 포자낭은 흰색에서 성숙되면서 검은색으로 되며 구형 또는 반구형이고 크기는 40~200 μm였다(Fig. 2B). 주축은 구형 또는 반구형으로 크기는 85~120 μm 였다(Fig. 2C). 포자낭경은 흰색에서 점차 암갈색으로 변하며 끝에 검은색의 둥근 포자낭을 형성하였으며 크기는 6~20 μm이었다. 포자낭포자는 암갈색, 단포이며 구형으로 불규칙한 것이 많고 포자낭에서 잘 떨어지며 크기는 4~10 μm였다(Fig. 2D, Table 1). 균사는 PDA 표면에 자라면서 포복균사를 형성하고 배지에 뿌리모양의 가근을 형성한다. 가근 하나에 3~5개의 포자낭경을 만들고 끝에 검은색의 포자낭을 형성하였다(Fig. 2E). 조사기간 동안 접합포자는 관찰되지 않았다. 이상과 같이 감귤에서 발생한 병원균을 분리 배양하여 균학적 특성을 조사한 결과 Lunn(1977)이 기술한 *R. oryzae*와 잘 일치하였다.

병원성 검정. 병원성을 확인하기 위하여 농산물도매시장에서 구입한 건전한 감귤을 1% 차아염소산나트륨(NaOCl)으로 표면 살균한 다음 멸균수로 3회 세척하여 완전히 말렸다. 접종상으로 준비해 둔 3개의 플라스틱 상자(29×22×15 cm)에 표면 소독한 감귤을 넣고 상처접종 9개, 무상처 접종 3개를 준비하여 총 12개로 3회 인공접종 하였다. PDA에서 7일간 배양한 곰팡이 균에 멸균수 10 m*l* 넣고서 붓으로 긁어모아 가아제로 3회 거른 다음 3×10^5 conidia/m*l* 농도로 분생포자 현탁액을 만들어 접종원으로 사용하였다. 감귤 껍질표면에 3 mm 크기로 상처를 내고서 붓으로 현탁액 1방울(30 μ*l*) 접종하였다. 접종 후 플라스틱 상자 안에 일정한 습도가 유지될 수 있도록 필터 페이프를 5장씩 3곳에 깔고 일회용 페트리디쉬 위에 접종한 과실을 올려놓고 멸균수 300 m*l* 붓고 뚜껑을 닫은 후 30°C 항온기에 넣고서 발병유무를 조사하였다. 접종 3일후 상처 접종한 감귤 표면이 수침상으로 물러지면서 부패하기 시작하였으며 시간이 경과함에 따라 자연발생한 병징과 동일하였다(Fig. 1C와 1D). 병원균을 재분리하여 동정한 결과 *R. oryzae*에 의한 감귤 무름병과 같은 병원균이었다. 무상처 접종한 감귤에서는 조사기간 동안 병이 발생하지 않았다.

ITS 염기서열 분석. 병원균 동정을 확인하기 위해 ITS(internal transcribed spacer) rDNA 부분을 2개의 프라이머 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')로 증폭하였고 pGEM-T Easy vector에 클로닝한 후 염기서열(총 627 bp)을 결정하여(White 등, 1997) GenBank에 등록하였다(Accession No. HQ897686). MEGA4 프로그램을 사용하여 *Mucor miehei*(Accession No. AF198253)의 ITS rDNA 염기서열을 그룹외 표본으로 하여 계통발생을 비교분석하였다(Abe 등, 2006). Fig. 3과 같이, 감귤 무름병의 원인 곰팡이는 *R. oryzae* 표준균주들의 subclade에 함께 포함되었다(Fig. 3).

Rhizopus spp.는 전 세계적으로 널리 분포하고 있으며, 접합균류 중 가장 일반적인 병원균의 하나로서 따뜻한 지역에서 주로 발생한다고 보고되어 있다(Domsch, 1980). *Rhizopus*는 전 세계적으로 수확 후 채소 및 과일, 화훼류의 다육질 식물에 발병하며 저장, 운반, 판매 중에 발생한다(Agrios, 2005). 감귤 무름병에서 분리한 *R. oryzae* 균주는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC 45817)에 기탁·등록하였다. 균학적 특성, 병원성 검정, ITS rDNA 염기서열 비교분석 등을 바탕으로 본 연구에서 보고한 이 병을 우리나라의 감귤에서 지금까지

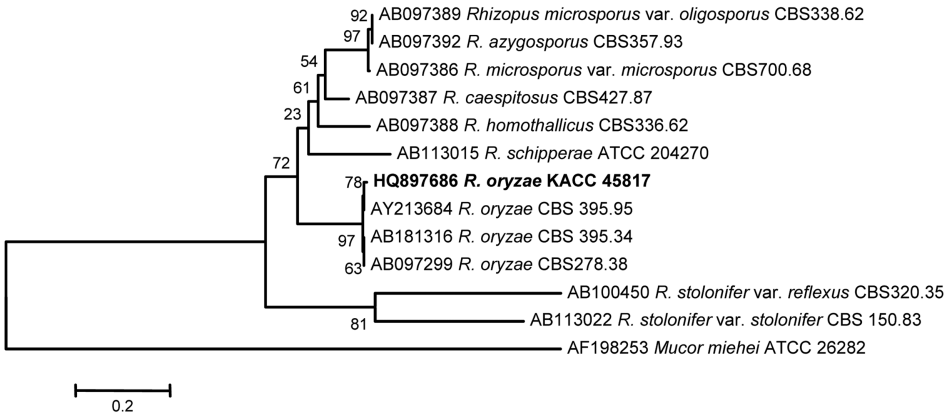

Fig. 3. Phylogenetic tree using ITS sequences showing relationships among *Rhizopus oryzae* isolated from *Citrus unshiu* and closely relative *Rhizopus* species. DNA sequences from the NCBI nucleotide database were aligned using ClustalW and a phylogenetic tree was constructed using MEGA4 with neighbor-joining method and Tajima-Nei distance model. Numbers above the branches indicate the bootstrap values. Bars indicate number of nucleotide substitutions per site. The present isolate infecting *C. unshiu* Mac. was marked in bold font.

보고되지 않은 *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs에 의한 감귤 무름병으로 명명할 것을 제안한다.

요 약

2010년 진주시 농산물도매시장에 구입한 감귤에서 이상증상이 발생하였다. 상처 난 감귤 껍질이 수침상으로 물러지고 부패하기 시작하였다. 병징으로부터 분리한 감자한천 배지에서 곰팡이는 연한 갈색의 균총과 검은색의 포자낭을 형성하였다. 균사생육 적온은 30°C이었으나 37°C에서도 생육이 가능하였다. 포자낭경은 흰색에서 갈색이며 크기는 6~20 μm이었다. 포자낭은 흰색에서 검은색으로 변하며 구형 또는 반구형으로 크기는 40~200 μm이었다. 주축은 구형 또는 반구형으로 크기는 85~120 μm이었다. 포자낭포자는 담갈색, 단포이며 구형으로 크기는 4~10 μm이었다. 이상과 같은 병원균의 균학적 특징, ITS 염기서열 유사도, 병원성 검정 결과, 본 병해를 *Rhizopus oryzae*에 의한 감귤 무름병으로 명명할 것을 제안한다.

Acknowledgements

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ007345)" Rural Development Administration, Korea.

참고문헌

권진혁, 박창석. 2002. *Rhizopus stolonifer*에 의한 감귤 무름병. 한국균학회지 30: 166-169.

한국식물병리학회. 2009. 한국식물병명목록. 제5판 853 pp.

Abe, A., Oda, Y., Asano, K. and Sone, T. 2006. The molecular phylogeny of the genus *Rhizpus* based on rDNA sequences. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 70: 2387-2393.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th ed.. Academic Press. 922 pp.

Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol. 1. Academic Press. 859 pp.

Lunn, J. A. 1977. *Rhizopus oryzae.* CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 525. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, pp. 315-322. Academic Press, Inc., New York, USA.