

*Trichothecium roseum*에 의한 사과 분홍빛열매썩음병 발생권진혁<sup>1</sup> · 김민정<sup>2</sup> · 심창기<sup>2\*</sup> · 지형진<sup>2</sup> · 이상대<sup>1</sup><sup>1</sup>경상남도농업기술원, <sup>2</sup>국립농업과학원 유기농업과**Pink Mold Rot on Apple (*Malus pumila* var. *dulcissima* Koidz.) Caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray in Korea**Jin-Hyeuk Kwon<sup>1</sup>, Min-Jeong Kim<sup>2</sup>, Chang-Ki Shim<sup>2</sup>, Hyeong-Jin Jee<sup>2</sup> and Sang-Dae Lee<sup>1</sup><sup>1</sup>Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services, Jinju 660-360, Korea<sup>2</sup>Organic Agriculture Division, National Academy of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 565-851, Korea

(Received on November 18, 2014. Revised on November 22, 2014. Accepted on December 20, 2014)

**Abstract** In 2012, a pink mold rot was observed on apple (*Malus pumila* var. *dulcissima* Koidz.) at the Wholesale Market for Agricultural Products, Jinju, Korea. The first symptom of pink mold rot on apple fruit is a water-soaked appearance of the affected tissue and surface fruit formed pink mold rot, then became brown and produced a mass of powdery pink conidia spores. Colony was fast growing colonies, pinkish, zonate in diurnal rhythm, powdery from conidia. Optimum temperature for mycelial growth was 25°C. Conidia were hyaline, smooth, two-celled, thick-walled conidia with truncate bases, ellipsoidal to pyriform, and characteristically held together zig-zag chains and 12-26 × 8-12 μm in size. Conidiophore was erect, colorless, unbranched, and 4-5 μm wide. On the basis of mycological characteristics, pathogenicity test, and molecular identification with the ITS region, the causal fungus was identified as *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray.

**Key words** Apple, *Malus pumila* var. *dulcissima*, Pink mold rot, *Trichothecium roseum*

## 서 론

국내에서 *Trichothecium roseum*에 의한 병해로는 사과 붉은썩음병(Nakata와 Takimoto, 1928), 배 붉은빛썩음병(Park, 1961), 멜론 분홍빛열매썩음병(Kwon et al., 1998), 딸기 분홍빛열매썩음병(Kwon et al., 2010), 배 분홍빛곰팡이병(Kwon et al., 2013), 토마토 분홍빛썩음병(Han et al., 2013) 등이 발생하는 것으로 보고된 바 있다.

2012년 진주시 농산물도매시장 과실 도매가게에서 사과를 구입하여 실험실내에 두었는데 상자 안에 있는 과실로부터 분홍빛 곰팡이가 발생한 이상증상을 관찰하였다. 이러한 증상을 보이는 과실에서 병징을 관찰하고 병원균을 순수분

리하여 배양한 후 균학적 특징과 병원성을 검정하였다. 또한 이러한 병과 관련된 병원균의 명확한 동정을 위해 rDNA의 ITS(internal transcribed spacer) 영역의 염기서열을 분석하여 GenBank에 등록되어 있는 *Trichothecium*속 곰팡이 균주와 비교하였다.

*Trichothecium*속 곰팡이는 Ascomycota문(phylum)의 Sordariomycetes 강(class)에 속하는 균으로 *Acremonium* spp.와 매우 유사한 종(species)으로 보고되어 있다(Summerbell et al., 2011). 또한 아르헨티나, 브라질, 미국 등에서는 수확 후 저장 중에 발생하는 저장병원균 중의 하나로 잘 알려져 있다(Bello, 2008; Inácio et al., 2011; Welch et al., 1975).

지금까지 우리나라에서 Nakada와 Dakimoto(1928)의 사과 붉은썩음병(*T. roseum*)을 기술하였지만 학술적인 근거가 없을 뿐만 아니라, 그 이후 국내 연구자에 의해 *T. roseum*에 의한 사과 붉은썩음병 발생에 대한 보고가 전혀 없었다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009).

\*Corresponding author

Tel: +82-63-238-2557, Fax: +82-63-238-3824

E-mail: ckshim@korea.kr

본 연구는 사과에서 분리한 *T. roseum*에 대한 병원균의 균학적 특성과 병원성 검정 결과 *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray에 의한 사과 분홍빛열매썩음병으로 제안하며 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 병원균 채집

2012년 진주시 농산물도매시장 과실 가게에서 사과 한 상자를 구입하여 병리실험실에 두었는데 상자내에 있는 과실로부터 분홍빛 곰팡이가 발생한 이상증상을 관찰하였다. 50개 과실에서 발생한 병든 과실 모두를 조사하였다.

### 병원균 분리 및 균학적 특성

사과에서 발생한 분홍빛열매썩음병의 병원균을 분리하기 위해 병든 과실 채집하여 실험실에서 건전부와 병반부 경계 부위의 조직을 5 × 5 mm 크기로 자른 다음 1% NaOCl 용액으로 1분간 표면소독한 후 멸균수에 3회 세척을 하였다. 알콜램프에 화염 소독한 필터페이퍼 이용하여 물기를 완전히 제거한 후 크린 벤치 안에서 일회용 페트리디쉬 안에 넣고서 24시간 건조하였다. 감자한천배지(PDA) 위에 옮겨 25°C 항온기내에서 4일간 배양한 후 자라 나온 균사를 다시 떼어 내어 PDA 위에 옮긴 후 25°C 항온기 내에서 8일간 배양하여 병원균의 균학적 특성을 조사하였다.

### 병원성 검정

사과에서 분리한 균주의 병원성을 확인하기 위하여 2013년 1월 농산물도매시장에 건전한 사과 20개 구입하였다. 건전한 과실 12개에 1% 차아염소산나트륨(NaOCl)으로 깨끗이 표면 살균한 다음 멸균수로 3회 세척하여 수분을 완전히 제거하였다. 접종상으로 준비해 둔 3개의 플라스틱 상자(29 × 22 × 15 cm)에 상처접종 9개, 무상처 접종 3개를 준비하여 인공접종하였다. 접종원은 PDA에서 12일간 배양한 병원균을 가지고 멸균수 10 ml 넣고서 붓으로 긁어 모아 가아제로 거른 다음 분생포자 현탁액을 3 × 10<sup>4</sup> conidia/ml 농도로 만들어 사용하였다. 표면 소독한 사과를 가로, 세로 1 mm 크기로 상처를 내고서 붓으로 현탁액 1방울(30 µl) 접종하였다. 접종 후 플라스틱 상자 안에 일정한 습도가 유지될 수 있도록 필터 페이퍼를 5장씩 3곳씩 바닥에 깔고 멸균수 100 ml 붓고 일회용 페트리디쉬 위에 접종한 과실을 올려놓고 뚜껑 덮은 후 25°C 항온기에 넣고서 발병유무를 관찰하였다.

### ITS 염기서열 분석

사과에서 분리한 병원균 동정을 확실시키기 위해 ITS rDNA 부분을 White 등(1990)이 사용한 2개의 프라이머

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 PCR로 증폭하였다. PCR 조건은 최종농도 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTPs이고 10 pmol의 프라이머와 0.1 unit의 rTaq DNA polymerase (Takara, Japan)를 사용하였으며, 50 µl로 반응용량을 맞추었다. PCR 반응 조건은 predenaturation (98°C, 2분), denaturation (98°C, 30초), annealing (55°C, 30초), extension (72°C, 30초), total cycle (30 cycles), final extension (72°C, 4분) 수행하였으며, 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 밴드를 확인하였다. 확인된 밴드는 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 사용하여 분리 정제하였고 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝한 후 M13F와 M13R 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems, Foster, CA, USA)를 이용하여 결정하였다.

## 결과 및 고찰

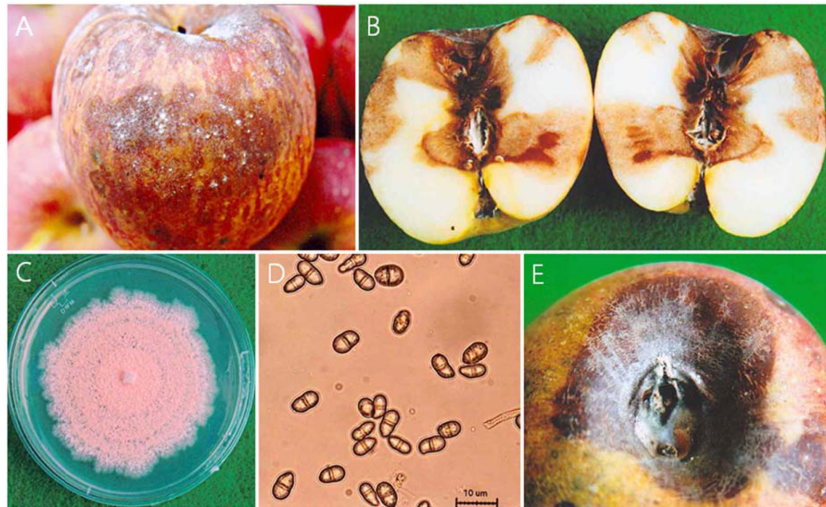
### 병징 및 발생 환경

사과 과실 표면의 상처부위에 발생하였으며 감염된 부분은 수침상으로 물러지고 약간 함몰되어지면서 부패되어졌다. 병든 부위는 연한 갈색으로 변하고 병반부위에 분홍빛 곰팡이가 형성하는 것이 특징이다(Fig. 1A). 감염된 과실의 병반 부위를 절단해 보면 과육 내부가 갈색으로 변하고 상품성이 없다(Fig. 1B).

2012년 경상남도 진주시 농산물도매시장에서 사과를 구입한 후 실험대 위에 20일 정도 두었는데 과실 박스 안에서 분홍빛열매썩음병이 발생하였다. 실험실에서 과실 상자내 온도가 알맞게 유지되어져 병든 과실 표면에 많은 양의 분생포자가 형성된 것으로 관찰되었다. 이것은 포장에서 사과 수확 또는 저장, 수송중 과실 표면에 상처난 부위를 통해 병원균이 감염되어 발병에 알맞은 환경 조건이 되어졌을 때 과실 표면이 갈색으로 변하고 약간 함몰되어지면서 수침상으로 물러지고 부패되어졌다. 병든 과실을 상자내 방치할 경우 병원균이 증식되어 많은 양의 분생포자가 형성하여 상자내에 있는 다른 과실에 2차 전염원이 되어지기 때문에 주의할 필요가 있다. 또한 농산물 도매시장내 과실을 버리는 곳에 간혹 분홍빛열매썩음병에 감염된 과실을 관찰할 수 있다.

### 균학적 특성 및 병원성 검정

*T. roseum*의 균총 색깔은 처음 흰색이고 배양기간이 경과됨에 따라 감자한천배지(PDA) 표면에 분홍빛으로 나타나고 분생포자가 많이 형성되었다(Fig. 1D). 균사생육 적온은 25°C이다. 분생포자의 모양은 서양배형이며 성숙한 분생포



**Fig. 1.** Symptom of pink mold rot on surface fruit of *Trichothecium roseum* on apple (*Malus pumila* var. *dulcissima* Koidz) in the box. A: Typical symptom naturally infected fruits, B: Longitudinal section of infected fruit, C: Colony on PDA after 8 days of inoculation, D: Conidia. E: Artificially inoculated symptoms after 8 days.

**Table 1.** Comparison of morphological characteristics of the fungus isolated from apple (*Malus pumila* var. *dulcissima* Koidz) with those of *Trichothecium roseum* described previously

Characteristics		Present isolate	<i>Trichothecium roseum</i> <sup>a</sup>
Colony	Color	Pinkish	Pinkish
Conidiophores	Shape	Erect, unbranched	Erect, unbranched
	Size	4-5 μm wide	2 mm long, 4-5 μm wide
Conidia	Shape	Ellipsoidal to pyriform, 2-celled, zig-zag chains	Ellipsoidal to pyriform, 2-celled, zig-zag chains
	Size	12-26 × 8-12 μm	12-23(35) × 8-10(13) μm

<sup>a</sup>Described by Domsch et al. (1980).

자는 2세포로 되어있다. 크기가 12-26 × 8-12 μm이고 무색인 분생포자는 좌우 지그자그로 돌출 팽대되어 분생자경 선단에 많이 형성하였다. 분생자경은 균사표면으로부터 직립으로 형성하고 길이는 2 mm 정도이며 폭은 4-8 μm이고 무색이었다(Fig. 1E, Table 1). 이와 같은 특징은 Domsch et al. (1980) 등이 보고한 *T. roseum*의 형태적 특징과 잘 일치하였다.

그러나 Nakada와 Dakimoto (1928)에 기록되어졌지만 사과 붉은썩음병의 병명은 병원균의 생리 및 생태적인 균학적 특징이 전혀 기술되지 않았으며, 지금까지 전혀 국내에서 발생 보고가 없었다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009).

접종 8일후 상처 접종한 사과 표면이 수침상으로 약간 물러지면서 부패하기 시작하였으며 시간이 경과함에 따라 과실표면에 분홍빛 곰팡이가 형성하여 자연 발생한 병징과 일치하였다(Fig. 1C). 또한 병원균을 분리한 결과 똑같은 병원균이었다. 무상처 접종한 사과에서는 조사기간 동안 병이 발생하지 않았다.

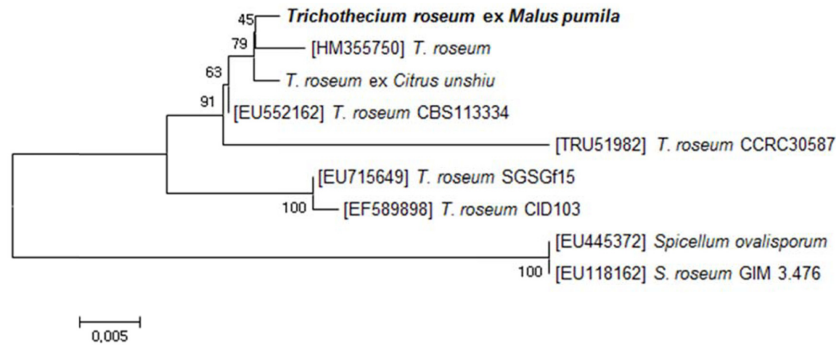
분리한 병원균이 무상처 접종에서는 병이 발생하지 않은

결과는 *Trichothecium*속 곰팡이들이 수확 후 발생하는 저장병(postharvest disease)으로 알려진 보고들과 일치한다(Bello, 2008; Inácio et al., 2011)

따라서 Fig. 1과 같이 사과 과실에 발생한 병징이나 균총의 배양적인 특성을 고려할 때, Nakada와 Dakimoto (1928)에 보고된 사과 붉은썩음병이 아니라 “사과 분홍빛열매썩음병”으로 병명을 제안하고자 한다.

**ITS 염기서열 분석에 의한 동정**

사과에서 분리한 병원균의 분자생물학적인 동정을 위해 병원균의 rDNA의 ITS부분을 White et al. (1990)이 사용한 2개의 프라이머 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 병원 곰팡이의 분자적인 동정을 위해 ITS rDNA 영역의 염기서열(613 bp)을 BLASTN 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 딸기 분홍빛썩음병(GenBank accession no. HM355750)과 망고 분홍빛썩음병을 일으키는 *T. roseum* (GenBank accession no. JQ898156)와 99%의 상동성을 나타내었다(Fig. 2).



**Fig. 2.** Phylogenetic tree based on ITS sequences, showing closest known relatives of *Trichothecium roseum*. DNA sequences from the US National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide database were aligned using ClustalX, and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method and visualized with TreeView. Numbers above the branches indicate bootstrap values. Bars indicate number of nucleotide substitutions per site. The fungal isolate infecting apple fruit is indicated in bold.

분석된 분리균주의 ITS rDNA 영역의 염기서열(627-bp)을 GenBank (Accession No. KP197053)에 등록하였고 BLASTN 프로그램을 이용하여 분석한 결과 *T. roseum* 균주의 rDNA의 ITS 영역(GenBank Accession No. HM355750)과 100% 유사성을 나타내었다. *T. roseum*과 관련된 분류군들과의 관계를 알아보기 위하여 MEGA 4.0 프로그램을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 유연관계를 분석한 결과, *T. roseum*와 같은 군(clade)에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 분자계통학적 특성을 바탕으로 사과 분홍빛열매썩음병의 병원균이 *T. roseum*임을 다시 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ 00843603)의 지원에 의해 이루어진 것임

## Literature Cited

- Bello G. D. (2008) First report of *Trichothecium roseum* causing postharvest fruit rot of tomato in Argentina. Australasian Plant Dis. Notes 3:103-104.
- Domsch, K. H., W. Gams and T. H. Anderson (1980) Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press. 859 pp.
- Han, K. S., S. C. Lee, J. S., Lee and J. W. Soh (2013) First Report of Pink Mold Rot on Tomato Fruit Caused by *Trichothecium roseum* in Korea. Res. Plant Dis. 18:396-398.
- Inacio C. A., R. C. Pereira-Carvalho and F. G. A. Morgado (2011) A tomato fruit rot caused by *Trichothecium roseum* in Brazil. Plant Dis. 95:1318.

- Kwon, J. H., H. S. Lee, S. L. Choi, Y. C. Cho, O. H. Choi, H. S. Cho and C. K. Shim (2013) Pink mold rot on asian pear (*Pyrus serotina* Rehder) caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray in Korea. Korean J. Organic Agri. 21: 373-380. (In Korean).
- Kwon, J. H., S. S. Shen and J. W. Kim (2010) Occurrence of pink mold rot of strawberry caused by *Trichothecium roseum* in Korea. Plant Pathology J. 26:296 (In Korean).
- Kwon, J. H., S. W. Kang, J. T. Lee, H. K. Kim and C. S. Park (1998) Matured fruit *Cucumis melo* caused by *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray in Korea. Plant Pathology J. 14:642645 (In Korean).
- Nakada and Dakimoto. 1928. Korea's Chosun Dynasty Kwonup Mobeomjang Research Report, 15:122 pp. (In Korean).
- Park, J. S. (1961) Fungous Diseases of Plants in Korea (2). Bulletin No. 2, p. 12. College of Agriculture, Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Summerbell, R. C., C. Gueidan, H. J. Schroers, G. S. de Hoog, M. Starink, Y. A. Rosete, J. Guarro and J. A. Scott (2011) Acremonium phylogenetic overview and revision of Gliomastix, Sarocladium, and Trichothecium. Stud. Mycol. 68:139-162.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea, 5th ed., 853 pp. (in Korean).
- White, T. J., T. D. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications, ed. by Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, pp. 315-322. Academic Press, Inc., New York.
- Jr. Welch A. W., S. F. Jr. Jenkins, and C. W. Averre (1975) *Trichothecium* fruit rot on greenhouse tomatoes in North Carolina. Plant Dis. Rep. 59:255-257.

## *Trichothecium roseum*에 의한 사과 분홍빛열매썩음병 발생

권진혁<sup>1</sup> · 김민정<sup>2</sup> · 심창기<sup>2\*</sup> · 지형진<sup>2</sup> · 이상대<sup>1</sup>

<sup>1</sup>경상남도농업기술원, <sup>2</sup>국립농업과학원 유기농업과

**요 약** 2012년 경상남도 진주시 농산물도매시장에서 구입한 사과에서 분홍빛열매썩음병이 발생하였다. 병징은 사과 과실 표면이 갈색으로 변하면서 약간 함몰되어지고 수침상으로 물러지고 썩으면서 그 위에 분홍빛 곰팡이가 형성되었다. 감자한천배지 위에서 균총의 색깔은 처음 흰색이고 배양기간이 경과됨에 따라 분홍빛의 분생포자가 많이 형성되었다. 균사생육 적온은 25°C이었다. 분생포자의 모양은 서양배형이며 좌우 지그자그로 부착하며 성숙한 분생포자는 2개의 세포로 되어있다. 크기는 12-26 × 8-12 μm이었다. 분생자경은 균사표면에 직립으로 형성하고, 폭이 4-5 μm이고 무색이었다. 위와 같은 결과를 통해 사과에서 발생한 병징과 병원균의 균학적 특징을 기초로 하여 이 병을 *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray에 의한 사과 분홍빛열매썩음병으로 명명하고자 제안한다.

**색인어** 사과, *Malus pumila* var. *dulcissima*, 분홍빛썩음병, *Trichothecium roseum*