

Article

https://doi.org/10.7745/KJSSF.2018.51.1.028
pISSN : 0367-6315 eISSN : 2288-2162

Verifications of Resistance to *Phytophthora* spp. in 2-year-old *Citrus junos* Cultivars and Related Species

Yong-Bum Kwack, Hong Lim Kim, Youn-Sig Kwak¹, and Yong Bok Lee¹*

Namhae Branch, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Namhae 52430, Korea

¹Institute of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

*Corresponding author: yblee@gnu.ac.kr

ABSTRACT

Received: January 31, 2018**Revised:** February 22, 2018**Accepted:** February 23, 2018

Yuzu (*Citrus junos*) gummosis disease, caused by *Phytophthora nicotianae*, was first reported in 1997. As known in citrus, *Phytophthora* is the most fastidious soil-borne pathogen to control. In order to minimize its damage to Citrus spp., integrated pest management (IPM) approach, including fungicide chemicals and resistant cultivars, is necessary. Therefore, in this study we tried to evaluate tolerance of yuzu cultivars and its related species against yuzu *Phytophthora*. Trifoliolate orange was evaluated as a susceptible host to yuzu *Phytophthora* by both mycelial growth onto extract media and immature fruit inoculation. However, in zoospores spray-inoculation on 2-year-old cuttings tree, trifoliolate orange appeared to have a resistant property as showing less than 6% diseased leaf rate. Among yuzu cultivars only 'Namhae No. 1' appeared resistant property against both *P. nicotianae* and *P. citrophthora*. The 'Namhae No. 1' showed 5.7% and 10.6% diseased leaf ratio by *P. nicotianae* and *P. citrophthora*, respectively. Clearly, in order to reduce damages caused by two yuzu *Phytophthora*, we suggest that growers may utilize a trifoliolate orange as a rootstock and 'Namhae No. 1' as a scion for fruit production.

Keywords: *Citrus junos*, Cuttings, *Phytophthora*, Resistance, Yuzu

Disease response of 2-year-old cuttings of yuzu cultivars and related species against yuzu *Phytophthora* spp.

Cultivar	<i>P. nicotianae</i>			<i>P. citrophthora</i>		
	Diseased leaf [†] (%)	Infected spot (Number/leaf)	Lesion size [‡] (mm ² /infected spot)	Diseased leaf (%)	Infected spot (Number/leaf)	Lesion size (mm ² /infected spot)
Dajung	48.2 b [§]	1.1 c	169 b	29.2 c	1.4 b	187 bc
Hanayu	39.1 c	1.5 b	285 a	31.8 bc	1.2 bc	318 a
Namchool	74.5 a	3.3 a	165 b	24.6 c	1.8 a	302 a
Namhae No. 1	5.7 d	1.6 b	143 b	10.6 d	1.0 c	177 c
Sangungye	36.4 c	1.8 b	266 a	59.2 a	1.9 a	215 b
Trifoliolate orange	5.7 d	1.0 c	60 c	3.0 e	1.0 c	56 d
Wonhyang	5.3 d	1.5 b	36 c	43.3 b	1.6 ab	192 bc

[†] It represent percentage of infected leaf number out of total leaves a tree 4 days after spray-inoculation of zoospores in concentration of 10³ per ml.

[‡] Lesion size was measured by leaf area meter (LI-3100, LI-COR, USA).

[§] Mean separation within columns by the Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.



Introduction

유자 (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka)는 운향과 (Rutaceae), 감귤속 (Citrus), 후생감귤아속 (Metacitrus)에 속하는 상록교목 과수이다 (Oh et al., 1991; Kwack et al., 2008). 유자나무는 -9°C 이하에서는 동해를 받기에 고흥, 거제 등 남해안 일대와 제주도에서 주로 재배되고 있다 (Kwack et al., 2008).

역병균, *Phytophthora* spp.는 감귤류에 있어 가장 심각한 토양 전염성 병원균으로 세계적으로 널리 분포하며, 특히 관개하거나 강우량이 많은 지역에서 문제되고 있다 (Fawcett, 1936; Frank et al., 1991). 감귤류에 있어 역병균에 의한 피해 양상은 식물체에 양수분을 공급하는 잔뿌리를 가해하는 경우 (Foot rot, Root rot)와 주간부를 가해하여 수지가 흘러나오게 하는 수지병 (Gummosis), 그리고 지면에서 가까운 과실에 주로 발생하는 갈색썩음병 (Brown rot)의 세 가지 형태로 발생하고 있다 (Fawcett, 1936; Frank et al., 1991).

국내에 유자 역병이 처음 보고된 시기는 1997년으로 전라남도과 경상남도의 유자 재배지에서 많이 발생되었다 (Jee et al., 1997). 유자역병은 지제부 가까이의 주간부 수피가 파괴되면서 수지를 많이 흘린다하여 수지병 (Gummosis)이라 불리게 되었다. 발병되면 지상 70 cm 부위까지 진전되며 접목부의 접수에서부터 이병된 나무는 잎이 황화되고 과실 성숙기 이전에 낙엽이 발생한다 (Fig. 1; Jee et al., 1997). 또한 유자역병은 날씨와 같은 주변 환경의 영향을 많이 받기 때문에 그 해의 기상조건에 따라 발생의 변이가 심한 것으로 알려져 있다 (Frank et al., 1991; Jee et al., 1997).

유자역병은 방제가 매우 어려운 병해로서 아인산염을 이용한 방법 등이 시도되고 있으나 근본적으로 저항성 품종을 선발하여 이용하는 것이 이상적이다. 따라서 본 연구에서는 유자에서 분리된 역병균을 이용하여 유자 품종과 근연종의 저항성 정도를 알아보려고 하였다.

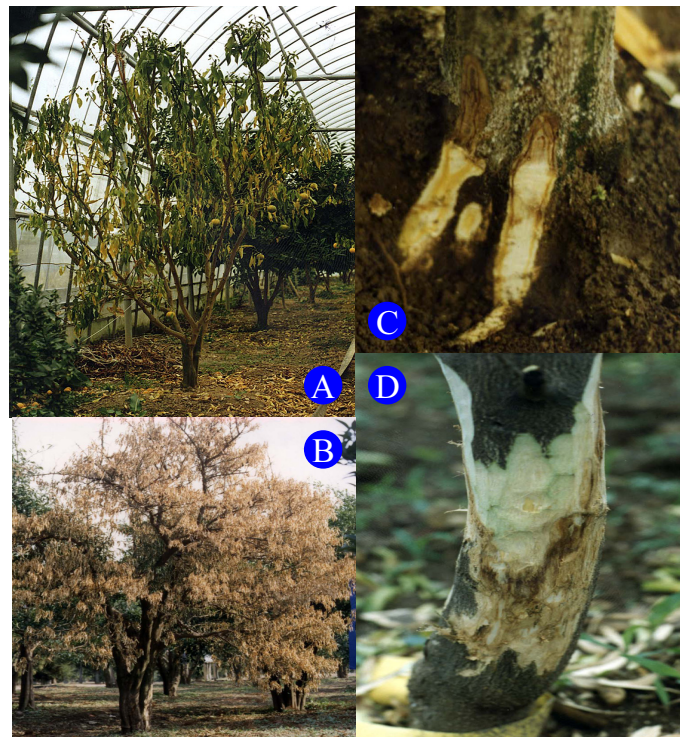


Fig. 1. Symptoms of yuzu gummosis disease caused by *Phytophthora* spp. A, B, wilting and chlorosis of leaves; C, D, necrosed vascular tissues.

Materials and Methods

열매, 잎 추출액 배지에서의 균사생장 조사 유자 품종과 근연종의 역병균에 대한 저항성 정도를 알아보기 위해, 식물체 직접 접종에 앞서 열매와 잎 추출액 배지에서의 균사생장을 조사하고, 이후 식물체 접종 결과와 비교하여 저항성 판별을 위한 간접적 방법으로서의 이용가능성을 판단하고자 하였다.

농촌진흥청 국립원예특작과학원 남해출장소에 보유중인 유자 품종 및 근연종 9종 (Table 2)의 잎과 과실을 9월에 채취하여 마쇄 후 각각 증류수 500 ml당 200 g씩 넣어 121°C에서 5분간 살균, 여과 (Whatman No. 2)하여 추출액을 제조하였다. 이 유자 품종/근연종 추출액을 증류수 대신 용매로 하여 1.5% 한천배지를 만들어 균사생장 비교를 위한 배지로 사용하였다.

시험에 사용된 균주는 유자나무 근권 토양에서 분리된 YP-1 (*P. nicotianae*)과 YP-3 (*P. citrophthora*)이며 (Table 1), 시험균주 배양은 역병균 배양에 많이 이용되는 10% V8 주스 배지 (Jee et al., 1997; Jee et al., 1998)에 치상하여 25°C에서 4-5일 배양 후 8 mm cork borer로 한천원반을 찍어 사용하였다. 각각의 유자추출액 배지에 이 시험균주를 치상하여 25°C에서 5일간 배양 후 균사생장을 조사, 비교하였다.

Table 1. List of *Phytophthora* isolates used in this study.

Isolates	Host	Regions of isolation	Origin
YP-1 (<i>P. nicotianae</i>)	Yuzu	Namhae	Rhizosphere
YP-3 (<i>P. citrophthora</i>)	Yuzu	Namhae	Rhizosphere

Table 2. Mycelial growth of two yuzu *Phytophthora* depending on fruit- and leaf- extract media of yuzu cultivars and related species.

Cultivar	<i>P. nicotianae</i>		<i>P. citrophthora</i>	
	Fruit extract	Leaf extract	Fruit extract	Leaf extract
Dajung	2.9 [†] d [‡]	13.5 cd	9.1 d	19.3 b
Hanayu	5.2 b	16.2 bc	10.8 c	30.9 a
Kabosu	3.1 d	16.5 bc	14.4 b	20.0 b
Namchool	5.1 b	11.2 de	16.4 a	7.0 c
Namhae No. 1	3.4 cd	14.6 c	8.1 e	10.8 c
Sangungye	3.4 cd	10.1 e	10.1 c	7.0 c
Sudachi	4.6 b	19.1 b	10.2 c	30.4 a
Trifoliate orange	12.7 a	23.9 a	17.0 a	31.3 a
Wonhyang	4.5 bc	15.1 c	10.4 c	16.7 b

[†] It represent diameter of mycelial growth which measure mm during 5 days.

[‡] Mean separation within columns by the Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

유과기 과실접종을 통한 저항성 조사 유자에서 분리된 2종의 역병균의 과실에 대한 병원성과 품종별 저항성 정도를 조사코자 하였다. 농촌진흥청 국립원예특작과학원 남해출장소에 보유중인 8종의 유자품종 및 근연종의 과실을 8월에 채취해 접종에 사용하였다. 추출액 배지 접종과 동일한 방법으로 배양한 시험균주를 직경 8-mm cork borer를 이용하여 한천원반을 찍어내, 과실의 꼭지부위에 접종하여 밀폐용기에 담아 25°C에서 병해 발생 경과를 관찰하였

다. 유자품종과 근연종 과실의 역병균에 대한 저항성 정도 판별은 접종 3일 후 과실직경 대비 병반직경의 비율을 산출하여 판정하였다.

유주자 분무접종을 통한 2년생 삼목묘 저항성 조사 유자나무의 역병균 저항성 정도를 알아보기 위해 농촌진흥청 국립원예특작과학원 남해출장소에 보유중인 7종의 유자 품종 및 근연종의 2년생 삼목묘를 대상으로 유주자(zospore) 접종을 실시하였다. 접종원(inoculum) 준비를 위해 유자나무 토양근권에서 분리된 2종의 유자 역병균 *P. nicotianae*와 *P. citrophthora*를 추출액 배지실험과 동일한 방법으로 배양하였다.

유주자낭(zosporangium) 형성을 위해 배양된 균주를 직경 10 mm cork borer를 이용하여 한천원반을 찍어 새로운 Petri dish로 옮겼으며, 각각의 균주원반에 멸균수를 1 ml 첨가하여 20°C에서 24시간 추가 배양하여 유주자낭을 형성시켰다. 유주자낭 형성을 확인 후, 다시 유주자 분화를 위해 5°C에 30-60분간 거치 후 수성거즈를 이용하여 유주자만을 걸러 유주자수를 10^{3-4} cfu ml 정도로 희석하여 분무 접종하였다. 분무접종한 뒤에는 25°C 성장상에 넣어 습도를 90% 이상 유지시켜 주었으며 접종 4일 뒤 병징 발현 정도를 조사하였다.

Results and Discussion

유자 추출액 배지 균사생장에 따른 저항성 판정 유자 품종 및 근연종의 역병균 저항성 정도를 간접적으로 알아보기 위해 국립원예특작과학원 남해출장소에 보존중인 9개의 유자 품종 및 근연종의 과실과 잎을 이용해 추출액 배지를 조제하였다. 이 추출액 배지에서 유자나무 근권 토양에서 분리된 2종의 유자 역병균 YP-1 (*P. nicotianae*), YP-3 (*P. citrophthora*)의 균사생장 정도를 조사한 결과, 유자를 포함한 감귤류 대목으로 많이 사용되고 있는 탕자(Trifoliolate orange) 추출액 배지에서 가장 잘 자랐다(Table 2). 탕자는 일반적으로 역병균에 대해 저항성인 것으로 보고되어 있으나(Raghavendra Rao et al., 1983; Tuzcu et al., 1984; Graham et al., 1990; Hyun et al., 2001), 추출액 배지에서는 감수성으로 나타나 식물체 접종 결과와 비교, 검토가 필요한 것으로 판단된다.

또한 본 실험에서 사용된 2종의 유자 역병균은 과실과 잎 추출액 배지에서 상이한 균사생장 양상을 나타냈다(Table 2). 특히, 과실추출액 배지에서 *P. nicotianae*는 탕자(12.7 mm)를 제외한 다른 유자 품종/근연종의 추출액 배지에서 2-5 mm의 균사생장을 나타낸 반면, *P. citrophthora*의 균사는 ‘다정’, ‘남해1호’를 제외한 나머지 품종에서 10 mm 이상 자라 *P. nicotianae*에 비해 과실에 대한 이병성이 강한 것으로 추정되었다.

유자열매의 역병 피해 가능성 유자 품종별 과실 추출액 배지에서의 *P. nicotianae*와 *P. citrophthora*의 균사생장 차이에 착안하여 실제 품종별 열매의 반응을 보고자 하였다. Hyun et al. (2001)의 보고처럼 유자역병도 주로 감귤처럼 녹색 유과기인 8-9월에 문제되기에 8월에 채취한 어린과실 꼭지부위에 역병균 한천원반을 접종하여 품종별 반응을 조사하였다. 그 결과, 2종의 유자 역병균은 탕자나무 열매에 대해서 열매추출액 배지에서의 균사생장 결과(Table 2)와 마찬가지로 강한 병원성을 나타냈다(Table 3).

그러나 *P. nicotianae*의 경우 탕자나무 열매와 ‘산근계’를 제외한 나머지 유자 품종 및 근연종 과실에서는 전혀 병반이 형성되지 않았다. 반면, *P. citrophthora*는 접종된 모든 품종에서 강한 병원성을 보임으로서 *P. citrophthora*는 과실에 대해 병원성이 분화되어 있음을 알 수 있었다(Table 3). 이것은 Hyun et al. (2001)이 감귤에서 확인한 결과와 동일한 결과로서, 유자의 경우도 과실에 발생하는 역병은 *P. citrophthora*에 의해 야기될 가능성이 높음을 알 수 있었다.

Table 3. Percent lesion of two yuzu *Phytophthora* on immature green fruit of yuzu cultivars and related species.

Cultivar	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. citrophthora</i>
Dajung	0 [†] c [‡]	67.3 bc
Hanayu	0 c	80.0 ab
Kabosu	0 c	84.8 ab
Namchool	0 c	81.3 ab
Namhae No. 1	0 c	90.5 ab
Sangungye	9.1 b	51.9 c
Trifoliolate orange	100 a	100 a
Wonhyang	0 c	87.3 ab

[†] It represents percentage of lesion diameter compared with fruit diameter 3 days after inoculation.

[‡] Mean separation within columns by the Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

2년생 삼목묘의 유자역병 저항성 정도 유자 품종별 추출액 배지에서의 군사생장 차이가 실제 식물체의 반응과 일치하는지 여부를 알아보기 위해, 2년생 삼목묘를 대상으로 2종의 유자 역병균을 여름철 무성번식 감염양상인 유주자 형태로 분무 접종하였다 (Fig. 2).

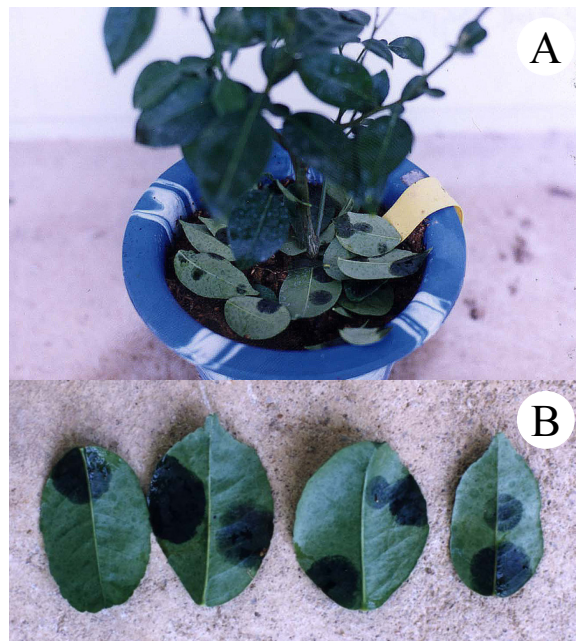


Fig. 2. Symptom development on 2-year-old cuttings yuzu tree by spray-inoculated *Phytophthora* zoospores (A), and lesion formed on the leaves (B).

*P. nicotianae*에 대한 품종별 반응은 이병엽률은 ‘원향’, ‘남해1호’, 탕자나무가 각각 5.3%, 5.7%, 5.7%를 나타내 30% 이상을 나타낸 다른 품종에 비해 상대적으로 저항성인 것으로 판단되었다. 또한 유주자가 침입한 감염점을 기준으로 한 병반면적에서는 ‘원향’과 탕자나무가 각각 36 mm², 60 mm²로 가장 작아 저항성으로 나타났다. 잎당 유주자가 침입한 감염점은 ‘다정’ 품종이 탕자나무와 유사하게 1.1개로 적었지만 이병엽률이 48.2%라는 점과 감염점의 병

반면적이 169 mm²로 넓어 저항성으로 보기 어려웠다 (Table 4).

이에 비해 과실에 대한 병원성이 강했던 *P. citrophthora*에 대한 반응에서는 탕자나무와 ‘남해 1호’가 이병엽률이 각각 3.0%, 10.6%로 20-60%의 이병엽률을 나타낸 타 품종과 비교해 상대적으로 저항성인 것으로 나타났다. 특히, *P. nicotianae*에 대해 저항성으로 나타난 ‘원향’은 *P. citrophthora*에 대해서는 이병엽률과 병반면적이 각각 43.3%, 192 mm²로 감수성을 나타냈다 (Table 4).

따라서 탕자나무의 경우 추출액 배지에서의 균사생장은 유자역병에 대해 감수성으로 나타났지만, 실제 유주자를 이용한 식물체 분무접종에서는 가장 저항성으로 나타나 식물체 추출액배지를 이용해 저항성을 판별하기는 어려울 것으로 판단된다.

Table 4. Disease response of 2-year-old cuttings of yuzu cultivars and related species against yuzu *Phytophthora* spp.

Cultivar	<i>P. nicotianae</i>			<i>P. citrophthora</i>		
	Diseased leaf [†] (%)	Infected spot (Number/leaf)	Lesion size [‡] (mm ² /infected spot)	Diseased leaf (%)	Infected spot (Number/leaf)	Lesion size (mm ² /infected spot)
Dajung	48.2 b [§]	1.1 c	169 b	29.2 c	1.4 b	187 bc
Hanayu	39.1 c	1.5 b	285 a	31.8 bc	1.2 bc	318 a
Namchool	74.5 a	3.3 a	165 b	24.6 c	1.8 a	302 a
Namhae No. 1	5.7 d	1.6 b	143 b	10.6 d	1.0 c	177 c
Sangungye	36.4 c	1.8 b	266 a	59.2 a	1.9 a	215 b
Trifoliolate orange	5.7 d	1.0 c	60 c	3.0 e	1.0 c	56 d
Wonhyang	5.3 d	1.5 b	36 c	43.3 b	1.6 ab	192 bc

[†]It represents percentage of infected leaf number out of total leaves a tree 4 days after spray-inoculation of zoospores in concentration of 10³ per ml.

[‡]Lesion size was measured by leaf area meter (LI-3100, LI-COR, USA).

[§]Mean separation within columns by the Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

또한 비록 유자역병의 주 원인균이 *P. nicotianae*로 보고되어 있지만 (Jee et al., 1997), 감귤류 역병에서 *P. citrophthora*가 과실, 잎, 가지 모두에 문제를 야기하는 것 (Hyun et al., 2001)과 마찬가지로 발병에 알맞은 환경조건만 조성되면 *P. citrophthora*도 언제든지 유자에 심각한 피해를 줄 수 있는 강한 병원력을 지니고 있는 잠재균임을 알 수 있었다.

세계적으로 감귤류 역병에 의한 피해를 줄이기 위해 건전묘목 사용, 저항성 대목, 화학적 방제 등 종합방제가 이뤄지고 있다 (Naqvi, 2004). 특히 메타락실 (Metalaxyl)과 같은 살균제는 방제효과가 높지만 반복된 사용은 약제저항성을 유발한다는 점 (Timmer et al., 1998)과 비용이 많이 소요되고 친환경 재배 추세에 역행한다는 점에서 저항성 품종을 이용하는 방법이 효과적일 것이다.

따라서 본 연구결과에서 유자 역병의 주 원인균인 *P. nicotianae*에 대해 비교적 강한 저항성의 특성을 나타낸 ‘원향’이나 ‘남해1호’를 접수품종으로 사용하고, 유주자 분무접종에서 2종의 유자역병균 (*P. nicotianae*, *P. citrophthora*)에 대해 강한 저항성을 나타낸 탕자나무를 대목으로 이용하면 역병균에 의한 피해를 좀 더 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 Benfradj et al. (2016)이 언급한 것처럼 아직까지 역병균 (*P. nicotianae*)에 대해 완벽한 저항성을 나타내는 감귤류 대목이 없기 때문에 저항성 대목 사용만으로 역병을 완벽하게 방제할 수 없고, 역병의 발병에는 나무의

수령, 수세, 영양상태, 접수품종, 토양환경 등 여러 가지 요인이 복합적으로 작용할 수 있기 때문에 피해를 최소화하기 위해서는 화학적 방제와 함께 종합적 접근이 필요하다.

Conclusions

1997년에 최초 보고된 유자역병은 방제가 까다로운 토양전염성 병해이다. 역병에 의한 피해를 최소화하기 위해서는 화학적 방제와 더불어 종합방제 차원에서 저항성 품종을 이용하는 것이 필요하다. 본 연구는 감귤류 역병에 대해 저항성으로 알려진 탱자대목과 몇몇 유자품종 및 근연종의 저항성 정도를 알아보고자 하였다. 탱자나무의 경우 열매와 잎 추출액 배지에서의 균사생장과 8월 열매 접종에서는 감수성으로 나타났다. 하지만, 2년생 삼목묘에 대한 유주자 분무접종에서는 이병엽률이 6%미만으로 저항성을 나타냈다. 또한 유자품종에서는 ‘남해 1호’가 *P. nicotianae*와 *P. citrophthora* 유주자 분무접종 결과 각각 5.7%, 10.6%의 이병엽률을 나타내 2종의 역병균에 대해 어느 정도 저항성인 것으로 판단되었다. 따라서 유자역병 피해를 줄이기 위해서는 탱자나무를 대목으로 이용하고, 접수품종으로 ‘남해 1호’를 활용하는 것도 하나의 방법일 것이다.

References

- Benfradj N., N. Metoui, and N. Boughalleb-M’Hamdi. 2016. Screening for tolerance of different citrus rootstocks against zoospores of *Phytophthora nicotianae* in infested soil. *J. Phytopathol. Pest Manag.* 3(3):63-75.
- Frank, G.Z., and G.M. Joseph. 1991. Integrated pest management for citrus. University of California, USA.
- Graham, J.H. 1990. Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore-infested soil. *Plant Dis.* 74(10):743-746.
- Hyun, J.W., S.C. Lee, K.S. Kim, and H.J. Jee. 2001. Phytophthora-induced diseases on citrus in Jeju island. *Plant Pathol. J.* 17(3):184-188.
- Jee, H.J., W.D. Cho, K.S. Kim, and Y.S. Kim. 1997. Occurrence of Yuzu (*Citrus junos*) gummosis caused by *Phytophthora nicotianae*. *Korean J. Plant Pathol.* 13:442-445.
- Jee, H.J., Y.B. Kwack, B.C. Lee, and W.D. Cho. 1998. Occurrence of boxthorn blight caused by *Phytophthora nicotianae* and *P. drechsleri*. *Korean J. Plant Pathol.* 14:294-298.
- Kwack, Y.B., J.Y. Lee, E.S. Kim, and H.L. Kim. 2008. GAP manual of Yuzu. Rural Development Administration, Korea.
- Naqvi S.A. 2004. Diagnosis and management of certain important fungal diseases of citrus. p. 247-290. In S.A. Naqvi.(ed). Diseases of fruits and vegetables. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Oh, S.D., W.S. Song, S.J. Kim, and E.H. Park. 1991. In vitro micropropagation of yooza (*Citrus junos* Sieb. et Tanaka) I. Plant regeneration from callus induced from shoot tip. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 32(1):88-97.
- Raghavendra Rao N.N. and M.B. Prasad. 1983. Evaluation of strains of *Poncirus trifoliata* and trifoliolate orange hybrids for resistance to *Phytophthora* root rot. *Sci. Hort.* 20:85-90.
- Timmer L.W., J.H. Graham, and S.E. Zitko. 1998. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*: occurrence, sensitivity and competitive parasitic ability on citrus. *Plant Dis.* 82(2):254-261.
- Tuzcu, Ö., A. Çinar, M.O. Göksedef, M. Özsan, and M. Biçici. 1984. Resistance of citrus rootstocks to *Phytophthora citrophthora* during winter dormancy. *Plant Dis.* 68(6):502-505.