

녹두 갈색무늬병균(*Cercospora canescens* Ellis & Martin)의 分生孢子 形成에 關한 研究

權 臣 漢* · 吳 正 行*

Sporulation of *Cercospora canescens* Ellis & Martin in culture

Shin Han Kwon*, Jeung Haing Oh

Abstract

This study was conducted to obtain a supply of conidia sufficient for screening mungbean mutant lines for a source of resistance to *Cercospora* leaf spot caused by *Cercospora canescens* Ellis and Martin. Abundant sporulation occurred in cultures on mungbean leaf decoction oatmeal agar(MOA) exposed to about 2,500 Lux of fluorescent light, but it did not occur in continuous darkness. The conditions that produced maximum number of conidia was not coincided with those for vegetative growth and pigmentation in culture medium. Removal of aerial mycelium in culture by brushing with sterile water so enhanced the conidial production that oatmeal agar medium(OA) could be useful for production of abundant conidia by the treatment.

緒 論

우리나라에서 중요한 豆科作物의 하나인 綠豆(*Vigna radiata* var. *radiata*)는 近來에 그 需要가 점차 增加하여 상당한 供給不足現象을 보이고 있다. 이와같은 부족현상은 急増하는 需要에 比하여 한정된 栽培面積과 各種 災害要因에 의한 낮은 生産量에 基因한다.

綠豆 갈색무늬병(*Cercospora canescens* Ellis & Martin)은 開化期를 前後하여 급격히 發生하는 극심한 病으로서 綠豆 收量減少의 중요한 要因이 되고 있으며 綠豆 外에도 Common bean, lima bean, Cowpea 大豆等 Phaseolus와 *Vigna*屬 豆科作物에 넓게 發病하여 綠豆의 경우 品種에 따라 約 7~37%의 收量減少를 招來하는 것으로 報告되어 있다¹⁾. 이와같은 갈색무늬병균은 감자한천培地(PDA)에서 人工培養을 하는 경우, 分生孢子 形成이 극히 不良하기 때문에 多量의 分生孢子가 필요한 接種實驗을 하는때는 많은 어려움이 따른다.

따라서 本 實驗에서는 培地의 組成, 光 및 溫度 條件 등이 分生孢子 形成에 미치는 影響을 調查하여 接種實驗에 필요한 多量의 均一한 分生孢子를 形成하는 培養條件을 究明하므로써 綠豆 突然變異集團으로부터 갈색무늬병에 對한 抵抗性 因子源의 選拔에 活用코자 하였다

材料 및 方法

供試菌株는 韓國原子力研究所 試驗農場의 綠豆 罹病葉에서 15菌株를 單孢子分離하여 그들의 病原性, 分生孢子 形成力 및 其他 培地上에서의 特徵을 比較調査한 豫備實驗에서 큰 差異가 없었기 때문에 本實驗에서는 그중 한菌株를 使用하였다. 分生孢子形成을 위한 培地는 오트밀한천培地(OA)와 綠豆葉汁培地(MOA)를 使用하였으며 基本培地로서는 PDA를 使用하였다. OA는 오트밀 50g을 증류수 700ml로 끓인 다음 가-제 로 걸러낸 懸濁액에 寒天 17g을 녹여 1000ml로 하였으며 MOA는 OA에 녹두잎 50g의 汁液을 첨가하였다.

* 韓國原子力研究所, 放射線育種研究室

Korea Atomic Energy Research Institute, Radiation Breeding Lab. Seoul, Korea.

分生胞子の形成은 먼저 PDA에서 2週間 培養한 菌株를 殺菌水로 胞子懸濁液을 만들어 殺菌된 甌으로 胞子形成培地에 크게 묻혀 接種시킨 다음 4日後 부터 形成된 分生胞子數를 調査하는 方法과 接種後 3日間 培養한 葉一례에 증류수를 붓고 殺菌된 甌으로 氣中菌糸를 닦아낸 다음 胞子形成을 시키는 方法을 比較하였으며 이때 照射한 光度는 約 2500Lux로서 光源은 螢光燈을 使用하였다. 이때 形成된 分生胞子の 數는 分生胞子數/cm² = $\frac{a^2}{\pi r^2} \times b \times c$ (a²: cover glass의 넓이, πr²: 현미경 視野의 넓이, b: 한 視野에 나타난 胞子數, c: 稀釋液의 容量)으로 算出하였으며 病原性檢定은 4~5葉期의 綠豆잎에 約 2000 spores/ml의 胞子懸濁液을 噴霧接種하고 接種箱內에서 48時間 霧狀濕度를 維持한 다음 溫室에 옮겨 主莖葉에 나타난 病斑數와 壞死斑點數를 調査하였다.

實驗 結果

綠豆 갈색무늬병균을 溫度, 光 및 培地를 달리하여 培養한 結果 菌糸의 生長은 23°C보다는 比較的 높은 27°C에서 促進되었으나 光照射의 영향은 크지 않은 것으로 보였으며 PDA培地에서는 OA나 MOA에 比하여 다소 빠른 경향은 보였으나 培地에 依한 큰 差異는 나타나지 않았다(Fig. 1). 그러나 菌糸의 生長에 따라 培地에 沈着되는 色素는 培地의 組成에 따라 濃淡의

Table 1. The effects of light and medium on sporulation of *Cercospora canescens*

Media	Light	No. conidia 10 ³ /cm ² after indicated days			
		4	5	6	7
Potato dextrose agar	Light	trace	0.3	0.3	0.9
	Dark	trace	0.3	0.3	0.6
	Alternate*	0.9	0.5	0.5	0.9
Oatmeal agar	Light	3.2	18.2	36.1	48.2
	Dark	0.3	0.8	4.3	4.5
	Alternate	5.5	15.8	37.0	48.4
Mung-bean leaf decoction agar	Light	17.4	67.4	117.7	121.7
	Dark	1.5	2.0	12.3	16.9
	Alternate	14.8	65.1	117.4	120.5

* Fluorescent light of about 2,500Lux for 8 hours and dark for 16 hours.

差異가 현저하여 MOA에서는 色素의 沈着이 거의 없었으나 OA에서는 完연한 분홍빛色素의 沈着을, PDA에서는 紫朱色素의 沈着을 보였다. 培地의 組成은 分生胞子の 形成에 큰 影響을 주어 PDA와 OA에서는 分生胞子の 形成이 極히 不良하였으나 寄主植物의 組織汁液을 첨가한 培地, MOA에서는 현저히 많은 分生胞子が 形成되었다(Table 1).. 分生胞子是 培地接種後 3일째부터 형성되기 시작하여 급속히 增加하였으며 接

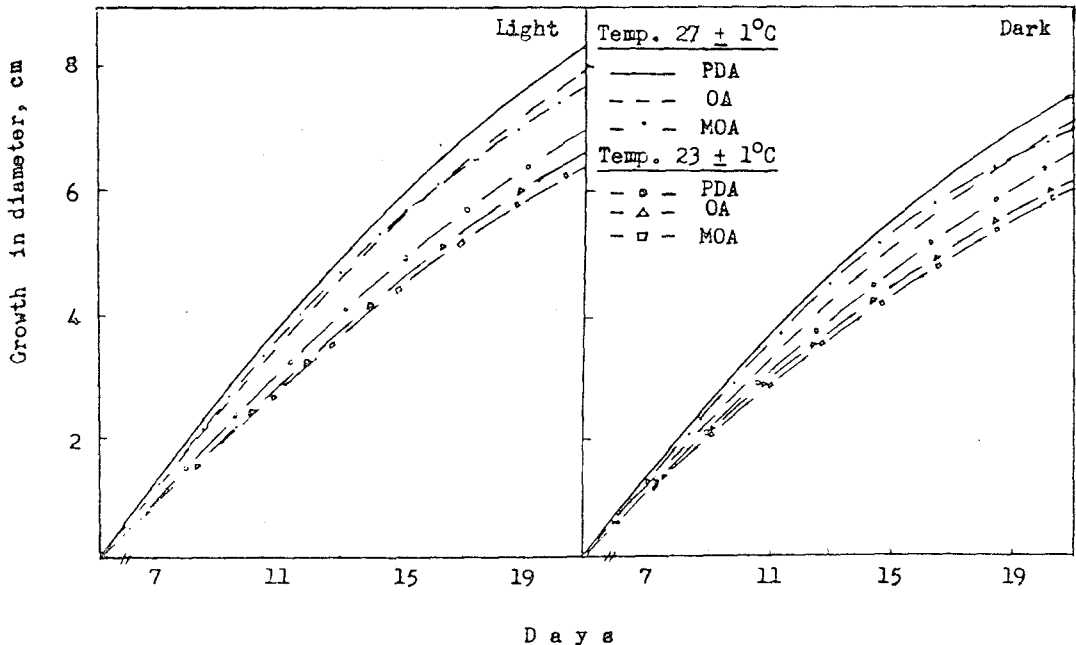


Fig. 1. Growth of *Cercospora canescens* on culture media under different conditions.

種 6일째 부터는 그 增加속도가 줄어 일주일만에 形成된 分生胞子의 數는 MOA에서 120.5×10^3 , OA에서 48.4×10^3 그리고 PDA에서는 0.94×10^3 spores/cm²였다. 分生胞子形成에 미치는 光線의 効果는 현저하여 계속 暗狀態로 維持한 芽-베에서는 培地의 種類에 關係없이 分生胞子形成이 極히 不良하였으나 光을 照射한 芽-베에서는 크게 促進되었다. 그러나 계속 光照射을 한 경우와 8時間 照射後 16時間 暗處理의 交互照射 경우와는 큰 차이가 없었다.

一定期間 MOA에서 菌을 培養한 다음 氣中菌糸를

Table 2. The effect of brushing the culture of *Cercospora canescens* on sporulation

Media	Light	No. conidia $10^3/cm^2$ after indicated days			
		4	5	6	7
Potato dextrose agar	Light	1.5	2.3	5.5	8.4
	Dark	trace	0.3	0.3	0.3
	Alternate*	1.7	2.3	7.3	8.4
Oatmeal agar	Light	2.9	14.8	77.2	121.3
	Dark	trace	0.6	0.9	21.2
	Alternate	3.8	16.0	77.2	122.0
Mungbean leaf decoction agar	Light	2.6	26.8	81.2	179.2
	Dark	trace	2.9	3.9	21.2
	Alternate	3.5	27.7	84.8	173.2

* Fluorescent light of about 2,500Lux for 8 hours and dark for 16hours.

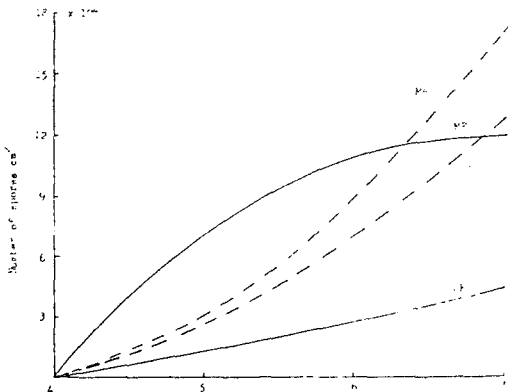


Fig. 1. Sporulation of *Cercospora canescens* on Oatmeal agar (OF) and mungbean leaf decoction agar (MF) inoculated by flooding spore suspension, and on the former (OB) and the latter (MB) brushed with sterile water three days after flooding.

除去하고 胞子形成을 시킨 경우에는 氣中菌糸를 제거하지 않은 경우에 比하여 初期에는 分生胞子形成이 적었으나 漸次 增加하여 일주일 後에는 오히려 훨씬 많은 179.18×10^3 spores/cm²의 分生胞子를 形成하였다. (Table 2). 特히 OA에서는 氣中菌糸를 제거하므로서 제거하지 않은 것에 比해 約 3倍 以上の 增加를 보였으며 (Fig. 2) MOA의 分生胞子數를 상회하는 122.01×10^3 spores/cm²이었다.

그러나 PDA에서는 氣中菌糸의 除去效果가 없었으며 계속 暗狀態에서는 氣中菌糸를 除去하여도 培地의 種類에 關係없이 뚜렷한 增加경향이 없었다. 그리고 分生胞子의 形成에 적합한 溫度는 27°C로서 菌糸의 生長 最適溫度와 同一한 것으로 보였다 (Table 3). 各培地에서 形成된 分生胞子의 懸液을 噴霧接種한 寄主體의 앞에 形成된 病斑의 數는 使用培地의 種類에 따른 차이가 없었으며 接種 3週日後에 조사한 褐點病斑의 數는 큰 變化가 없었으나 壞死病斑의 數는 크게 增加하여 病의 急速한 進展을 보였다.

Table 3. The effect of temperature on sporulation of *Cercospora canescens*

Media	Number of spores ($10^3/cm^2$) at		
	15°C	27°C	32°C
Oatmeal agar	0.429	131.262	53.217
Mungbean leaf decoction agar	0.518	193.874	61.365

* Brushed culture was sporulated for 6 days under fluorescent.

考 察

감색무늬병균의 分生胞子 形成은 寄主植物 組織을 첨가한 MOA培地에서 가장 좋았으며 約 2500Lux의 螢光照射는 分生胞子 形成을 현저히 促進시켰다 (Table 1). 이는 *Cercospora*의 分生胞子形成에 寄主組織培地가 適合하다는 많은 報告와 一致하나^(2,6,7,10) Mew et. al.⁽⁵⁾은 *C. canescens*의 分生胞子 形成이 MOA에 比하여 非寄主植物組織 培地인 Carrot leaf decoction agar에서 현저히 증가하였으며 Kilpatrick and Johnson⁽⁴⁾은 carrot leaf decoction agar에서, Roy and Abney⁽⁹⁾는 V-8 juice agar에서 *C. kikuchii*의 分生胞子 形成이 잘 된다고 하였다. 그러나 Vathakos and Walters⁽¹⁰⁾에 依하면 이들 培地에서는 *C. kikuchii*의 分生胞子가 形成되지 않으며 역시 寄主植物培地인 Senescent soybean plant agar에서 가장 잘 된다고 하였다. 같

식무늬병균의 분생孢子形成에 미치는 光線의 促進效果는 Mew et. al.⁽⁶⁾의 報告와 一致하였으나 *C. beticola*의 포자형성이 光照射에 依하여 오히려 抑制되었다는 Calpouzos and Stallknecht⁽¹⁾의 報告와는 차이를 보였다. 또 MOA培地는 분생孢子 形成에는 적합하나 色素沈着은 거의 없었고 PDA는 菌系生長은 좋았으나 분생孢子 形成은 극히 不良하였으며 光照射는 孢子形成을 促進시켰으나 菌系生長 및 色素生成에는 뚜렷한 影響이 없는 것으로 보아 갈색무늬병균의 분생孢子 形成條件은 色素生成 및 菌系生長 條件과 一致하지 않은 것으로 보였다. 菌體의 氣中菌糸를 除去하므로써 孢子形成이 促進되는 현상은 稻熱病 等에서도 잘 알려져 있으며 이러한 效果는 갈색무늬병에서도 현저하여 一般의 孢子形成이 不良한 OA培地에서도 氣中菌糸를 제거하므로써 MOA와 同一한 孢子形成이 可能하였다. 이때 培地接種은 菌糸를 利用하는 것보다 孢子懸濁液을 塗沫接種하므로써 많은 분생孢子가 형성되었는데 이는 다른 *Cercospora* sp.에서의 報告^(3,7)와 類似하였다. 따라서 이와같은 方法은 綠豆를 栽培하지 않은 겨울철의 抵抗性檢定實驗을 위하여 效果的인 分生孢子 形成方法이 될수 있으며 이렇게 형성된 分生孢子는 比較적 形態와 크기가 一定하여 均一한 孢子를 必로 하는 生理的인 實驗에도 有用할 것으로 보였다.

摘 要

綠豆 突然變異系統의 갈색무늬병에 對한 抵抗性檢定을 위하여 接種實驗에 必要한 多量의 分生孢子를 얻을수 있는 培養條件 實驗結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 갈색무늬병균의 分生孢子 形成에 適合한 培地는 寄主植物組織培地인 綠豆葉汁培地였으며 約 2500Lux의 螢光照射는 分生孢子 形成을 促進시켰다.

2. 培養基上的 氣中菌糸 除去는 分生孢子 形成을 현저히 增加시켜 OA培地에서도 MOA에서와 같은 量의 많은 分生孢子 形成이 可能하였다.

3. 孢子形成의 最適條件은 色素生成 및 菌系生長의 最適條件과 一致하지 않는 것으로 보였다.

Literature Cited

1. Calpouzos, L. and G.F. Stallknecht, 1965. Sporulation of *Cercospora beticola* affected by an interaction between light and temperature. *Phytopathology* 55:1370-1371.
2. Diachun, S. and W.D. Valleau, 1941. Conidial production in culture by *Cercospora nicotianae*. *Phytopathology* 31:97-98.
3. Goode, M.J. and G. R. Brown, 1970. Detection and characterization of *Cercospora citrullina* isolates that sporulate readily in culture. *Phytopathology* 60:1502-1503.
4. Kilpatrick, R.A. and H.W. Johnson, 1956. Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. *Phytopathology* 46:180-181.
5. Mew, I-Pin, C., T. C. Wang and T.W. Mew, 1975. Inoculum production and evaluation of mungbean varieties for resistance to *Cercospora canescens*. *Plant Dis. Repr.* 59:397-401.
6. Murakishi, H.H., S. Honma and R. Knutson, 1960. Inoculum production and seedling evaluation of celery for resistance to *Cercospora apii*. *Phytopathology* 50:605-507.
7. Nagel, C.M. 1934. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. *Phytopathology* 24:1101-1110.
8. Progress report of AVRDC, 1977.
9. Roy, K.W. and T.S. Abney, 1977. Antagonism between *Cercospora kikuchii* and other seed borne fungi of soybean. *Phytopathology* 67:1662-1667.
10. Vathakos, M.G. and H.J. Walters, 1979. Production of Conida by *Cercospora kikuchii* in culture. *Phytopathology* 69:832-833.