

## 감나무 둥근무늬낙엽병균(*Mycosphaerella nawae*)의 배양적 특성

권진혁\* · 강수웅 · 정부근 · 박창석<sup>1</sup>  
경상남도 농촌진흥원, <sup>1</sup>경상대학교 농과대학

### Cultural Characteristics of *Mycosphaerella nawae* causing Spotted Leaf Casting of Persimmon

Jin Hyeuk Kwon\*, Soo Woong Kang, Bu Keun Chung and Chang Seok Park<sup>1</sup>  
Gyeongnam Provincial Rural Development Administration, Chinju 660-370, Korea  
<sup>1</sup>College of Agriculture, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**ABSTRACT :** *Mycosphaerella nawae*, the causal organism, of spotted leaf casting disease of persimmon, was isolated from infected leaves showing typical symptom. The cultural characteristics of the fungus were compared on artificial media. Among 24 different combinations of culture media and supplements, oatmeal agar+persimmon leaf extract (PLE) and PDA+PLE+streptomycin showed the highest rate of isolation as 57.1%. The best medium for mycelial growth of the fungus was PDA+persimmon leaf powder (PLP). The colony diameter was reached 47mm for 30 days at 20°C. PDA+PLE also supported good mycelial growth showing 46mm of diameter in same condition. The optimum growth temperature of this fungus in PDA was recognized fairly low. The mycelial growth was higher at 20°C than 15°C. The variation of pH between pH 4 to pH 8 did not affect to the mycelial growth of the pathogen.

**Key words :** *Mycosphaerella nawae*, cultural characteristics, persimmon leaf extract.

감나무에 있어서 둥근무늬낙엽병은 조기낙엽으로 인한 수세의 약화 뿐만 아니라 심한 낙과를 초래하여 과일의 저장성을 저하시키는 등 큰 피해를 주고 있다. 그러나 병원균(*Mycosphaerella nawae*)의 순수분리와 인공배양이 어려워 이 병의 생리적 특성이나 침입, 감염 등 기주내 활동이 거의 알려지지 않고 있다. 1929년 鑄方(6)과 北島(4)은 전년도 감염된 낙엽에서 형성된 자낭포자가 기공침입을 하고 10~11월 낙엽된 이병엽에서 균사덩어리로 월동하여 이듬해 봄에 자낭각에서 자낭으로 자낭에서 자낭포자가 비산 침입하여 9월, 10월에 발병된다고 보고하였으며, 朴(3, 8)과 姜(5)은 자낭각형성과 자낭포자 비산시기를 보고하였는데, 4월 중순에 자낭각이 형성되며 5월 중순부터 7월 중순까지 포자비산이 되는데 강우에 의해 가장 큰 영향을 받는다고 보고하였다. 그후 이 병에 관한 연구는

대부분 야외포장의 발병생태에 관한 것이고 병원균에 관한 것은 별로 없었다.

1974년 多久田과 廣澤(1, 2)은 자낭포자의 발아와 공기습도 및 pH, 그리고 균총의 발아와 온도에 따른 균사 신장량을 보고하였는데, 자낭포자의 발아는 100%의 공기습도에서 가장 좋고 pH 5.31~6.86에서 최적이며 20°C에서 균총의 발육이 가장 잘 된다고 보고하였다. 1979년에는 배지종류와 균총 발육과의 관계를 보고하였는데, 간장배양기 한천배지가 가장 좋았고 PDA, 당근배지, PSA배지에서도 생육이 좋았다고 보고하였다. *M. nawae*는 인공배지에서 생장이 아주 느려 분리가 까다롭고 자낭포자와 분생포자 형성이 불가능하다.

본 실험에서는 잠복기가 길고 병 발생 기작이 아직 불명확한 병원균의 생리 생태를 파악하는 기초자료로 사용하기 위하여 병원균의 분리와 인공배양을 위한 배양기 개발과 배양조건을 구명하고자 하였다.

\*Corresponding author.

## 재료 및 방법

배지 종류별 분리빈도. 병징이 뚜렷이 나타난 발병 초기의 병반을 가로, 세로 2~3 mm 크기로 자른 다음 sodium hypochlorite 5%에 3~5분간 소독한 후 멸균수로 3회 씻었다. 그 후 화염 소독한 filter paper로 조직의 물기를 제거한 후 공시한 배지에 옮겼다. 사용된 배지에 첨가한 항생제 streptomycin은 50 ppm 농도로 조절하였고 감잎추출액은 물 1 L에 감잎 100 g을 넣어 121°C에서 30분간 고압살균 후 여과하여 사용하였다.

배지종류(7)는 Leonian Agar(Peptone 0.625 g, Maltose(glucose) 6.25 g, Malt extract 6.25 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.25 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.625 g, Agar 20 g, Water 1 L), Oatmeal Agar(Oatmeal 50 g, Agar 30 g, Sugar 20 g, Water 1 L), Potato Dextrose Agar(Potato 200 g, Sugar 20 g, Agar 20 g, Water 1 L), Potato Sucrose Agar(Potato 200 g, Sucrose 20 g, Agar 20 g, Water 1 L), V-8 Juice agar(V-8 Juice 200 ml,  $\text{CaCO}_3$  3 g, Agar 20 g, Water 1 L), Water agar(Agar 20 g, Water 1 L) 등 6종류의 배지에 각각 streptomycin, 감잎추출액, 감잎추출액+streptomycin을 첨가한 배지 등 총 24종류를 공시하였고, 배지당 15개 사례, 한 사례당 병반 7개씩 이식하여 20°C 항온기에 넣고 6~7일 후 병원균의 분리 빈도를 조사하였다.

온도별 균사생장. 사용한 배지는 WA, PDA, LA 및 V-8 Juice 등 4종류의 배지를 사용하였다. 감잎분말 첨가배지는 물 1 L당 낙엽 후 수거 보관한 감잎분말 200 g을 첨가하였으며, 감잎추출액은 물 1 L당 감잎 100 g을 넣고 121°C에서 30분간 고압살균한 후 가아제로 거른 추출액으로 배지를 조제하였다.

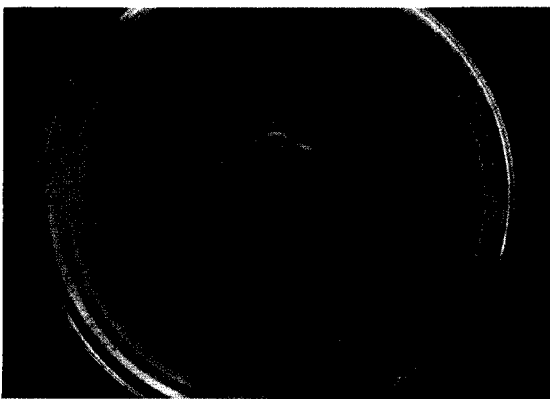


Fig. 1. Colony of *Mycosphaerella nawae* on PDA for thirty days.

사용한 균은 PDA배지에 30일간 미리 배양한 균을 해부용 칼(No.11)로 균사절편을 가로, 세로 1.0 mm 크기로 잘라 공시배지에 이식한 후 15°C, 20°C, 25°C의 항온기에서 배양, 30일 후 그 생장량을 조사하였다. 또 균사생장 적온을 알기 위하여 PDA배지에 이식하여 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C로 조절된 항온기에서 30일간 배양 후 균사생장 정도를 조사하였다.

pH에 따른 균사신장. pH 4, 5, 6은 2% 유산으로 조절하였고 pH 7, 8은 NaOH로 조절하였다. 조절된 PDA 배지가 완전히 굳은 후 미리 배양한 균총을 해부용 칼(No. 11)로 1.0 mm<sup>2</sup> 크기로 자른 균사절편을 사례 중앙에 이식하여 20°C 항온기에 30일간 배양한 후 균사생장량을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

*M. nawae* 균총의 특징. PDA배지에서 미리 배양한 *M. nawae*의 균사절편(1.0 mm)을 PDA배지 중앙에 이식하여 20°C로 조절된 항온기내에 30일간 배양한 결과 균총은 약 37.0 mm로 자랐다. 자란 균총의 모양은 사례 중앙부가 왕성하게 자라 언덕 모양으로 위로 융기하고 그 주변은 크고 작은 주름이 생기고 나머지는 평평하며 테두리 부분은 물결모양을 이루고 원형을 띄었다(Fig. 1). 균총의 중앙부는 밝은 갈색 또는 회갈색이지만 가장자리 부분은 어두운 회갈색을 나타내었고 균사의 신장속도는 아주 느린 편이었다.

多久田과 廣澤(1)의 보고에 의하면 균총은 언덕 모양을 나타내고 중앙부가 왕성하게 자라 올라가고 큰 주름이 생기고 주변은 평활하며 균총의 색은 brown-

Table 1. Isolation rate of *Mycosphaerella nawae* according to various combination of culture media and supplements

Media <sup>a</sup>	Isolation rate with variation of supplements			
	Non treat	SM <sup>b</sup>	PLE <sup>c</sup>	PLE+SM
LA	31.4	35.2	51.2	53.3
OMA	40.0	41.9	57.1	50.5
PDA	20.0	43.8	49.5	57.1
PSA	5.7	30.5	43.8	55.2
V-8	45.0	38.1	41.9	34.3
WA	0	0	49.5	55.2

<sup>a</sup> LA : Leonian Agar, OMA : Oatmeal Agar, PDA : Potato Dextrose Agar, PAS : Potato Sucrose Agar, V-8 : V-8 Juice Agar, WA : 2% Water Agar.

<sup>b</sup> Streptomycin 50 ppm.

<sup>c</sup> Persimmon Leaf Extract : Persimmon Leaf 100 g/L.

ish gray에서 dark oliver gray라고 보고하였는데 본 실험에서도 같은 결과를 얻었다.

배지 종류에 따른 *M. nawae*의 분리. LA, OMA, PDA, PSA, V-8 Juice, WA 등 6개 기본 배지에 streptomycin(SM) 50 ppm, 감잎추출액, 감잎추출액+SM을 넣은 18개의 첨가제 배지에 병반 절편을 이식하여 20°C로 조절된 항온기내에 7일간 배양한 후 분리빈도를 조사한 결과는 Table 1과 같다. WA, WA+SM배지에서는 *M. nawae*가 전혀 분리되지 않았으나, LA, PDA, OMA, V-8 Juice 기본 배지에서는 20~40% 정도가 분리되었다. 분리 빈도는 OMA+감잎추출액배지와 PDA+감잎추출액+SM배지가 57.1%로 공시한 배지중에서는 가장 높았고, PSA+감잎추출액+SM 배지와 WA+감잎추출액+SM배지가 55.2%로 비교적 높았다. 이로 보아 *M. nawae*는 군사생장 속도가 아주 느려 순수 분리가 비교적 까다로운 균으로 생각되며, 순수분리를 위해선 OMA배지나 PDA배지에 감잎추출액 첨가배지를 사용하면 비교적 쉽게 균을 분리할 수 있을 것으로 사료된다.

배지 종류별 군사생장. WA, PDA, LA, V-8 Juice를 기본으로 하고 여기에 감잎분말과 감잎추출액을 첨가하여 만든 각 배지에 미리 PDA에 배양한 1.0 mm 군사 절편을 이식한 후 15°C, 20°C, 25°C로 조절된 항온기에 넣고 30일간 배양한 후에 배지별 군사신

장량을 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서와 같이 군사생장량은 15°C에서는 PDA+감잎추출액 배지가 39.0 mm로 가장 잘 자랐고, 20°C에서는 PDA+감잎분말배지가 47.0 mm, 그 다음이 PDA+감잎추출액배지로 46.0 mm자랐다. 25°C에서는 PDA+감잎추출액배지가 43.0 mm로 다른 배지에 비해 군사신장이 많이 되었다 多久田과 廣澤(1)은 합성배지보다 천연배지에서 군사발육이 좋고 발육이 가장 좋은 것은 간장배양기배지이고 그 다음이 PDA배지, 당근전즙배지, 그리고 PSA배지 순으로 보고하였는데, 본 시험에서는 온도별 약간의 차이는 있었으나 PDA에 감잎분말 첨가배지와 감잎추출액 첨가 배지에서 군사생장이 비교적 잘되는 편이었다.

온도에 따른 군사생장. *M. nawae*의 배양온도에 따른 PDA배지에서 30일간 배양했을 때의 군사생장량을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 온도가 비교적 낮은 5°C에서 30°C까지 높은 온도에서도 생장은 되었으나 전반적으로 성장 속도가 매우 느렸다. 그중 20°C에서 군사생장이 37.0 mm로 가장 많이 자랐고, 15°C에서 27.0 mm였으며 25°C에서는 26.0 mm 성장되었다. 5°C에서 9.0 mm, 30°C에서 3.0 mm로 생장이 극히 저조하였으며 35°C에서는 거의 자라지 못하였다. 北島(4)에 의하면 배지상 군사생장 적온은 20~25°C이며, 35°C에서는 생장이 불가능 하고, 30°C이상에서 군사생장은 극히 저조하고 10°C에서는 다소 성장한다고 한 보고와 거의 일치하였다.

배지의 pH에 따른 군사생장. 배지의 pH에 따른 *M. nawae*의 군사생장 정도를 알기위하여 PDA배지에 pH를 조절한 후 군사절편(1.0 mm<sup>2</sup>)을 이식하여 20°C 항온기 안에서 30일간 배양 후 조사하였다(Table 4).

**Table 2.** Mycelial growth of *Mycosphaerella nawae* on various culture media with different supplements

Culture media	Diameter of mycelial colonies (mm)		
	15°C	20°C	25°C
WA <sup>a</sup>	7.0	13.0	12.0
WA+PLP <sup>b</sup>	27.0	33.0	24.0
WA+PLE <sup>c</sup>	22.0	28.0	27.0
PDA <sup>d</sup>	27.0	37.0	26.0
PDA+PLP	36.0	47.0	35.0
PDA+PLE	39.0	46.0	43.0
LA <sup>e</sup>	24.0	30.0	23.0
LA+PLP	26.0	36.0	31.0
LA+PLE	31.0	33.0	26.0
V-8 <sup>f</sup>	24.2	26.0	21.0
V-8+PLP	26.0	30.0	24.0
V-8+PLE	26.0	31.0	24.0

<sup>a</sup> Water Agar.

<sup>b</sup> Persimmon Leaf Power : 20 g/L.

<sup>c</sup> Persimmon Leaf Extract : 100 g/L.

<sup>d</sup> Potato Dextrose Agar.

<sup>e</sup> Leonian Agar.

<sup>f</sup> V-8 Juice Agar, Incubating for thirty days.

**Table 3.** Mycelial growth of *Mycosphaerella nawae* on PDA at various temperatures

Diameter of mycelial colony (mm) <sup>a</sup>						
5	10	15	20	25	30	35°C
9.0	12.0	27.0	37.0	26.0	3.0	1.0

<sup>a</sup> Mycelial growth was measured 30 days after incubation.

**Table 4.** Mycelial growth of *Mycosphaerella nawae* on PDA at various pH different pH of culture media

Diameter of mycelial colony (mm) <sup>a</sup>				
pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
34.0	34.0	35.0	34.0	32.0

<sup>a</sup> Mycelial growth was measured 30 days after incubation.

균사생장량은 pH 6에서 35.0 mm, pH 4, pH 5, pH 6에서 모두 34.0 mm, pH 8에서는 32.0 mm로 자라 pH 4~8까지는 뚜렷한 차이가 없었는데, 이 결과는 北島(4)가 균사생장 적정범위는 pH 4.5이며 pH 8.3이상에서는 생육되지 않는다고 보고한 것과는 약간의 차이가 있었다.

## 요 약

전형적인 병징을 나타내는 병든 잎으로부터 감나무 등근무늬낙엽병균(*Mycosphaerella nawae*)을 순수분리하여 인공 배지에서 배양적 특성을 조사하였다. 24종류의 배지와 첨가물 조합에 따른 병원균의 분리율은 OMA+감잎추출액배지와 PDA+감잎추출액+SM배지가 57.1%로 가장 높았다. 20°C에서 30일간 배양했을 때 균사생장량은 PDA+감잎분말배지에서 47.0 mm로 가장 잘 자랐으며, PDA+감잎추출액배지에서도 46.0 mm로 생장이 좋았다. PDA배지에서 온도별 균사생장량은 20°C에서 37.0 mm 가장 잘 자랐고, 그 다음이 15°C에서 27.0 mm로 자라 비교적 저온에서 생장이 잘 되었으며, pH에 따른 균사생장량은 pH 4~8 범위에서 뚜렷한 차이가 없었다.

## 참고문헌

1. 多久田達雄 廣澤敬之. 1974. カキ圓星落葉病の生態と防除に關する試験. 2-(2). 生理的性質. 島根縣農業試驗場報告書 : 204.
2. 多久田達雄 廣澤敬之. 1979. カキ圓星落葉病の生態と防除に關する試験. 4. 病原菌の生理的性質. 島根縣農業試驗場報告書 : 240.
3. 하호성, 박창석, 강성모, 추호렬, 최홍림. 1991. 단감 과원의 재배환경과 과수 영양 연구. 경상대 농업연구소보 25(2) : 149-213.
4. 北島博. 1989. 果樹病害各論. pp. 454 486. 日本東京. 養賢堂.
5. 강수웅, 권진혁, 이유식, 박창석. 1993. 단감 등근무늬 낙엽병균(*Mycosphaerella nawae*)의 월동후 자낭각형성과 자낭포자 비산에 미치는 기상요인. 농업논문집 35(1) : 337-343.
6. 鑄方未彦. 1929. 柿圓星性落葉病に關する研究. 農業及園芸 34(8) : 1259-1263.
7. OnKar, D. D. and James, B. S. 1985. Basic Plant Pathology Methods. 285-315. CRC Press. Florida. U. S A.
8. 박창석, 정영민, 하호성. 1992. 단감과원의 주요병 발생실태와 발병환경에 관하여. 경상대 농업연구소보 26 : 91-99.