

## *Bipolaris coicis*의 완전세대인 *Cochliobolus nisikadoi*의 배양기내 형성

김성기\* · 김기우<sup>1</sup> · 박은우<sup>1</sup> · 강위수<sup>1</sup> · 양장석

경기도 농촌진흥원 식물환경과  
<sup>1</sup>서울대학교 농업생명과학대학 응용생물·화학부

### *In vitro* Formation of *Cochliobolus nisikadoi*, the Perfect State of *Bipolaris coicis*

Sung-Kee Kim\*, Ki-Woo Kim<sup>1</sup>, Eun-Woo Park<sup>1</sup>,  
Wee-Soo Kang<sup>1</sup> and Jang-Souck Yang

Department of Plant and Environment, Kyonggi Provincial Rural  
Development Administration, Hwasong 445-970,

<sup>1</sup>Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences,  
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

**ABSTRACT:** The perfect state of *Bipolaris coicis*, causing leaf blight of Job's tears, was induced under *in vitro* conditions. Eighty nine isolates of the fungus were collected from 17 locations in Korea from 1994 to 1996. They were crossed on Sach's nutrient agar, on which a piece of rice straw was placed, and incubated at 25°C. Pseudothecia were produced only by certain combinations of compatible isolates. Although pseudothecia were usually produced on rice straw two weeks after incubation, asci and ascospores were observed only in a few pseudothecia examined. The pseudothecia were black and globose with protruding ostiolar beaks. The locules were filled with a mass of hyaline and filamentous pseudoparaphyses. Asci were cylindrical to clavate and straight or slightly curved. The ascus wall was bitunicate with short stipes. Ascospores were filiform, hyaline, and arranged parallel to slightly coiled in the asci, measuring 143-166.4 × 2.6-3.8 μm. Perfect state of the fungus was identified as *Cochliobolus nisikadoi* (Tsuda, Ueyama & Nishihara Alcorn), based on the morphological characteristics.

**KEYWORDS:** *Cochliobolus nisikadoi*, *Bipolaris coicis*, Perfect state

울무 잎마름병은 잎에 황갈색 방추형 병반을 나타내며 잎 전체를 급속히 고사시킨다. 대체로 7월 하순부터 9월 하순까지 발병하고 잎과 종자를 침해하면서 큰 피해를 주고 있는 병이다. 이 병의 원인으로서는 *Curvularia coicis*, *Helminthosporium coicis*, *Septoria* sp.가 병원균으로 국내에서 알려져 있다(한국식물보호학회, 1986). 그러나 최근에 이 병의 발생 지역을 방문하여 병원균을 채집하고 Alcorn(1988)의 분류 체계에 따라 동정한 결과, *Bipolaris coicis*(Nisikado) Shoemaker가 병원균임이 보고되었다(김 등, 1997). 특히 이 결과는 병원

균의 불완전세대 상태에서 분생포자의 형태, hilum의 존재 유무, 격막수, 발아의 특징에 근거하여 동정되었다. 화본과 식물을 침해하는 *Helminthosporium*속이 세분화되어 설립된 *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum*속은 서로 다른 자낭균류에 속하는 완전세대를 갖는 것으로 알려져 있다(Alcorn, 1988; Smiley 등, 1992). 따라서 울무 잎마름병균의 불완전세대의 형태적 특징을 조사한 동정 자료를 완전세대의 형성을 통하여 확인할 필요가 있다. 또한 현재까지 국내에서는 *Bipolaris coicis*의 유전학적 연구는 보고된 바 없으므로, 이를 위하여 배양기내에서 완전세대를 형성시키는 방법과 그 최적 조건을 구명할 필요성이 있다.

\*Corresponding author

본 연구는 배양기내에서 *Bipolaris coicis*의 완전 세대를 형성시켜 불완전세대의 형태적 특징에 기초한 병원균 동정 결과를 보완하고, 이 병원균의 유전학적 연구의 기초 자료를 제공하기 위하여 수행하였다.

**재료 및 방법**

**병원균 채집 및 분리**

울무 재배단지인 경기도 연천군과 화성군, 전라북도 장수군과 무주군, 충청북도 영동군을 1994년부터 1996년까지 방문하여 황갈색 방추형 병반을 나타낸 병든 잎을 채취하였다. 채취한 병든 잎을 5×5 mm 크기로 절단하여 1% NaOCl 용액에 1분간 침지하여 표면 살균하였다. 살균한 잎을 물한천배지(WA)에 치상하여 25°C에서 7일간 배양하였고, 병

반에 형성된 분생포자를 해부현미경으로 관찰하면서 단포자를 분리하여 89개의 균주를 확보하였다. 분리한 균주는 감자설탕한천배지(PSA) 사면배지에 접종하여 보관하면서 공시균주로 사용하였다.

**완전세대 형성**

완전세대를 형성하기 위하여 Sach's nutrient agar(SNA; CaNO<sub>3</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.125g, CaCO<sub>3</sub> 2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.125g, FeCl<sub>3</sub> 0.07g, agar 10g, 증류수 500 ml)를 직경 90 mm petri dish에 분주하여 제조하였다. 그 위에 길이 8 cm로 절단하여 세척하고 고압 살균한 벧짚을 올려 놓았다. 공시 균주는 모두 89개로서, 1994년에 분리한 10개 균주와 1995년에 분리한 26개 균주, 1996년에 분리한 53개 균주를 사용하였다. 이후 서로 다른 두 균주를 임의로 선발하여 총 326개 조합을 만들었다.

**Table 1.** Compatible isolates of *Bipolaris coicis* producing teleomorphs on rice straws placed on Sach's nutrient agar

Isolates	Formation of teleomorphs in pairing with																
	BC 94-01	BC 94-10	BC 94-13	BC 94-19	BC 95-03	BC 95-09	BC 95-17	BC 95-22	BC 95-32	BC 96-38	BC 96-39	BC 96-49	BC 96-50	BC 96-51	BC 96-57	BC 96-78	BC 96-88
BC94-01	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BC94-10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BC94-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
BC94-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
BC95-03	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BC95-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BC95-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BC95-22	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BC95-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
BC96-38	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
BC96-39	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BC96-49	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BC96-50	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BC96-51	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BC96-57	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BC96-78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BC96-88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

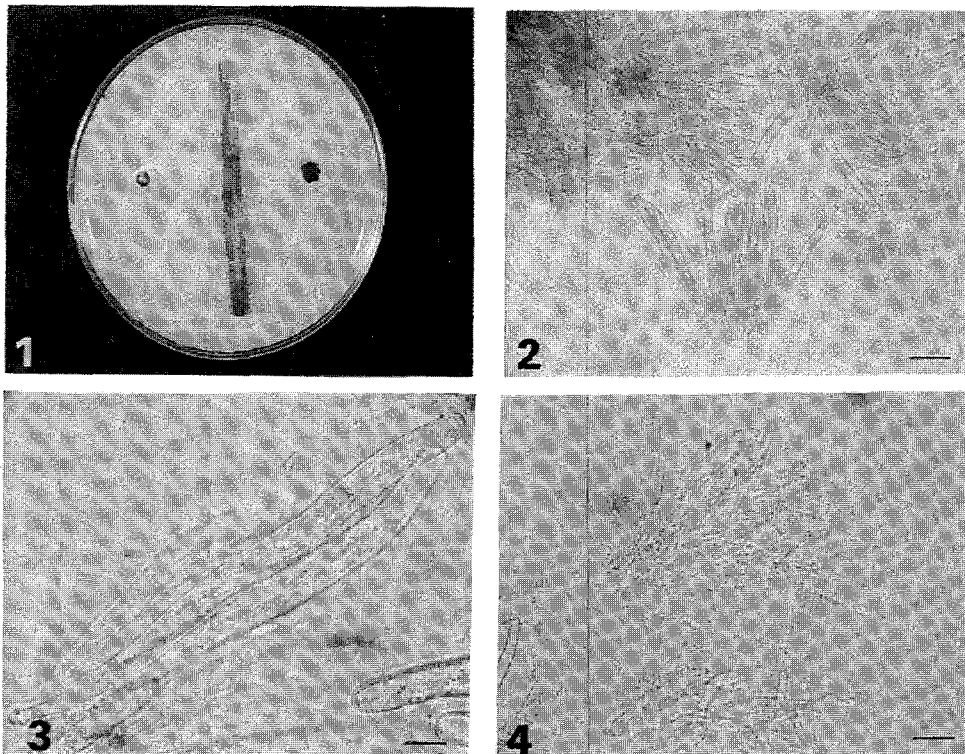
+, Formation of teleomorph.  
 -, No formation of teleomorph.

모든 균주를 PSA에 치상하여 25°C에서 4일 배양한 후 활발하게 생육하는 균사의 말단 부분을 직경 5 mm cork borer로 떼어, 각 조합의 2균주를 SNA 배지 위 벚짚의 양편에 치상한 후 4주간 25°C에서 배양하였다. 벚짚 위에 형성된 자낭각과 자낭 및 자낭포자를 해부현미경과 광학현미경으로 관찰하면서 Hanlin(1990)과 Sivanesan(1987)의 분류 체계에 따라서 형태적 특성을 조사하였다.

### 결 과

SNA 배지에 치상한 326개 조합 중 9개의 조합에서 완전세대의 특징적 구조인 위자낭각(pseudothecia), 자낭, 자낭포자가 형성되었다(Table 1). 완전세대가 형성된 9개 조합을 이루는 균주 중에는, 1994년과 1995년에 분리한 균주가 각각 4개, 5개

이었고, 1996년에 분리한 균주가 8개이었다. 특히 BC96-38은 1996년에 경기도 연천군에서 분리한 균주로서, 1994년과 1996년에 분리한 균주와 완전세대를 형성하였다. 한편 비친화적인 균주들간의 조합에서는 SNA 배지나 벚짚 위에서도 위자낭각과 같은 구조가 형성되지 않았다. 또한 친화적인 두 균주의 균사가 접촉할 때, 특히 SNA 배지에 치상한 벚짚위에서만 완전세대가 형성되었으므로 이 곰팡이는 자웅이주성(heterothallic)인 것으로 판단하였다(Fig. 1). 벚짚을 올려 놓지 않은 SNA 배지에서는 완전세대가 형성되지 않았다. 위자낭각은 2주 후부터 주로 형성되었으나 위자낭각 내부를 조사한 결과 자낭과 자낭포자가 생성되지 않은 것도 있었다. 위자낭각은 흑색이고, 돌출한 ostiolar beak을 가지고 있으며 구형(globose)이었다. 그 내부는 무색의(hyaline) 위측사(pseudoparaphyses)가 형성



**Fig. 1.** A plate of Sach's nutrient agar showing pseudothecia of *C. nisikadoi* produced on a rice straw.

**Fig. 2.** Asci from crushed pseudothecia of *C. nisikadoi*. Scale bar indicates 60  $\mu$ m.

**Fig. 3.** Asci with parallel to slightly coiled ascospores of *C. nisikadoi*. Scale bar indicates 15  $\mu$ m.

**Fig. 4.** Hyaline and filiform ascospores from crushed asci of *C. nisikadoi*. Scale bar indicates 30  $\mu$ m.

되어 있었다. 자낭은 대체로 원통형(cylindrical)이고 곤봉형(clavate)인 것도 있었으며, 전체적으로 직선형이었으나 약간 굽은 것도 존재하였다(Fig. 2). 자낭은 이중경막(bitunicate)으로 둘러싸인 흔적이 있었고 위자낭각과 접촉한 기저 부위에는 짧은 stipe가 있었다(Fig. 3). 자낭 내부에 형성된 자낭포자는 무색의 사상형(filiform)이고 자낭의 장축과 평행하게 배열되거나 나선형으로 약간 휘감기어 있는 특징이 있었다. 자낭포자의 크기는 주로  $146-166.4 \times 2.6-3.8 \mu\text{m}$ 이었다(Fig. 4). 이러한 특징을 기초로 하여 Hanlin(1990)과 Sivanesan (1987)의 분류 체계에 따라서 *Cochliobolus nisikadoi* (Tsuda, Ueyama & Nishihara Alcorn)으로 동정하였다(Table 2).

## 고 찰

울무 잎마름병 병원균의 불완전세대에서의 동정 결과를 보완하기 위하여 수행한 완전세대 형성에서도 동일한 결과를 확인하였다. 본 실험에서 공시한 균주를 대치배양한 결과 위자낭각이 형성되었고, 그 특징은 *Bipolaris*속이 완전세대에서 형성하는 *Cochliobolus*속의 것과 유사하였다. 또한 크기가  $146-166.4 \times 2.6-3.8 \mu\text{m}$ 이며, 사상형의 자낭포자가 형성되었으므로 불완전세대에서의 형태적 특징을

기초로 동정한 결과와 일치하였다(김 등, 1997). 그러나 자낭 내부의 자낭포자가 전형적인 *Cochliobolus*속의 특징인 나선형 배열과 다르게, 자낭포자가 자낭과 평행하거나 약간의 나선형 배열만 가지고 있었다.

Drechsler(1934)는 *Cochliobolus*속을 새롭게 제안하면서 자낭 내부에 있는 자낭 포자는 강하게 나선형으로 휘어 감긴 것을 특징으로 기술하였다. 또한 이 속에 있는 곰팡이의 분생포자가 발아할 때는 포자의 양극단에서 발아관이 출현한다. Tsuda 등(1977)은 Sach's nutrient agar 배지에서 *B. coicis*의 완전세대를 형성하였다. 그러나 *Cochliobolus*속과 유사하지만 자낭포자가 자낭과 평행하게 배열되어 있고, 자좌가 잘 발달된 것을 *Pseudocochliobolus*라고 명명하면서 새로운 속으로 제안하였다. 그 결과 *B. coicis*의 완전세대를 *Pseudocochliobolus nisikadoi* Tsuda, Ueyama & Nishihara라고 기재하였다. 이후에도 *Bipolaris australiensis*가 형성하는 *P. australiensis*와 벼 종자에서 분리한 *Curvularia verruculosa*가 형성하는 *P. verruculosus*에 관한 보고가 있었다(Tsuda와 Ueyama, 1981, 1982). 그 외에도 수종의 *Pseudocochliobolus*가 화분과 식물에서 분리된 *Bipolaris*와 *Curvularia*의 완전세대로 형성되어 새로운 종으로 기재되고, 불완전세대의 동정 결과를

Table 2. Comparison of morphological characteristics of the teleomorph formed in compatible combinations of two isolates of *Bipolaris coicis* examined in this study and *Pseudocochliobolus nisikadoi* described previously

Characteristics	Morphological characteristics	
	the present isolates	<i>Cochliobolus nisikadoi</i> <sup>a</sup>
Pseudothecia		
shape	globose	globose
color	black	black
Asci		
shape	cylindrical to clavate	cylindrical to clavate
curvature	straight or slightly curved	straight or slightly curved
Ascospores		
shape	filiform	filiform
color	hyaline	hyaline
size	$143-166.4 \times 2.6-3.8 \mu\text{m}$	$116-288 \times 3.6-7.2 \mu\text{m}$
arrangement	parallel or slightly coiled in asci	parallel or slightly coiled in asci

a; Description by Sivanesan (1987).

보완하는 사례가 있었다(Tsuda 등, 1985; Tsuda와 Ueyama, 1985). 그러나 Alcorn(1983)은 *Cochliobolus*속의 특성이 변이가 심하므로 *Cochliobolus*속으로 통합하였다. 이후 Sivanesan(1987)은 *B. coicis*은 *Cochliobolus nisikadoi*(Tsuda, Ueyama & Nishihara) Alcorn으로 기재하였다. 본 실험에서 형성된 공시균주의 완전세대도 Sivanesan(1987)의 결과와 대부분 유사하였다.

*Bipolaris*속은 화분과 작물, 잡초류 등에도 기주 범위가 광범위한 병원균으로 잘 알려져 있으므로 서식환경은 매우 다양하다(Alexopoulos 등, 1996). 또한 온도의 강하 및 영양원의 결핍과 같이 생육 환경이 악화될 때는 기주식물의 조직에 위자낭각을 형성하면서 *Cochliobolus nisikadoi*의 자낭포자 상태로 월동하였다가 분생포자가 바람으로 전파되거나 다른 *Bipolaris* spp.와 유사하게 종자 전염하는 것으로 판단된다(이, 1997).

본 연구에서는 *B. coicis*의 완전세대를 배양기내에서 형성시키고자 벧짚을 올려 놓은 SNA 배지를 이용하였다. *Bipolaris* 또는 *Drechslera*속의 완전세대 형성을 위하여 벧짚 이외에도 다른 기질을 이용하였고 다양한 환경조건에서 최적 조건을 설정하는 연구가 보고된 바 있다(Tinline과 Dickson, 1958; Trapero-Casas와 Kaiser, 1992). 수종의 *Bipolaris*, *Curvularia*에서는 균주를 장기간 보관하거나 계대 배양을 반복할 경우, 유성 생식 능력이 감퇴된다는 보고가 있다(Ueyama와 Tsuda, 1976; Tsuda 등, 1985). 본 실험에서 사용한 *B. coicis*도 병든 잎에서 분리하고, 인공 배지에서 배양한 후 1~3년간 보관하는 과정에서 유성 생식 능력이 감퇴된 것으로 추정되며, 이는 완전세대 형성 빈도수가 적었던 하나의 원인으로 생각된다. 이후에는 완전세대가 형성되는 최적 조건을 구명하고 친화적인 균주들간의 mating type을 결정함이 필요하다. Tsuda 등(1977)은 *B. coicis*의 완전세대를 형성하는 친화적인 6개 균주의 mating type을 조사하였고, 그 결과 2개 group으로 구분하여 A와 a로 명명하였다. 그러나 이후에는 mating type의 새로운 명명이 필요하며, 국내 각 지역에 분포하는 병원균 집단의 유전적 구조에 대한 분석, race 분포 연구도 진행되어야 한다. 또한 병원균의 동정과 생활환에 기

초한 발생 생태의 이해 및 합리적인 병방제 체계가 수립되어야 할 것이다.

## 적 요

울무 잎마름병을 일으키는 *Bipolaris coicis*의 완전세대를 배양기내에서 형성하도록 유도하였다. 국내 17개 지역에서 1994년부터 1996년까지 89개의 균주를 수집하였다. 이들을 25°C에서 벧짚을 위에 올려 놓은 Sach's nutrient agar 배지에서 대치배양하였다. 위자낭각은 특정 친화적인 균주의 조합일 때만 형성되었다. 위자낭각은 대체로 배양 2주 후에 벧짚 위에 형성되었으나, 일부 위자낭각에서만 자낭과 자낭포자가 관찰되었다. 위자낭각은 흑색이며 구형이었고, 돌출한 ostiolar beak을 가지고 있었다. 그 내부는 무색이고, 사상형인 위축사로 채워져 있었다. 자낭은 원통형내지 곤봉형이었고, 직선형이거나 약간 굽은 것도 있었다. 자낭벽은 이중격막으로 둘러싸여 있었고 짧은 stipe가 있었다. 자낭포자는 사상형이고 무색이었으며, 자낭의 장축과 평행하거나 약간 나선형으로 굽어 있었다. 자낭포자의 크기는 146-166.4×2.6-3.8 μm이었다. 이러한 형태적 특징에 기초하여 이 곰팡이의 완전세대는 *Cochliobolus nisikadoi*(Tsuda, Ueyama & Nishihara Alcorn)으로 동정되었다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 지역개발연구과제(과제번호: 농축산 1-3)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 김성기, 김기우, 홍순성, 박은우, 양장성, 김윤정. 1997. 울무 잎마름병을 일으키는 병원균 *Bipolaris coicis*의 분리 및 동정. 한국균학회지 25(4): 291-296.
- 이두형. 1997. 기장 점무늬병균(*Bipolaris panici-miliacei*)의 형태적 특징과 종자전염. 한국식물병리학회지 13(1): 18-21.
- 한국식물보호학회. 1986. p. 9. 한국 식물병·해충·잡초 명감. 개정판. 이우인쇄사. 서울.

- Alcorn, J. L. 1988. The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**: 37-56.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. and Blackwell, M. 1996. *Introductory mycology*. 4th Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 868 pp.
- Drechsler, C. 1934. Phytopathological and taxonomic aspects of *Ophiobolus*, *Pyrenophora*, *Helminthosporium*, and a new genus, *Cochliobolus*. *Phytopathology* **24**: 953-983.
- Hanlin, R. T. 1990. *Illustrated genera of ascomycetes*. APS Press. American phytopathological society, St. Paul, Minnesota. 233 pp.
- Smiley, R. W., Dernoeden, P. H. and Clarke, B. B. 1992. *Bipolaris* and *Exserohilum* diseases. Pp 34-36. *In*: *Compendium of turfgrass diseases*. 2nd Ed. APS Press. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 98 pp.
- Tinline, R. D. and Dickson, J. G. 1958. *Cochliobolus sativus*. I. Perithecial development and the inheritance of spore color and mating type. *Mycologia* **50**: 697-706.
- Trapero-Casas, A. and Kaiser, W. J. 1992. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopathology* **82**: 1261-1266.
- Tsuda, M., Ueyama, A. and Nishihara, N. 1977. *Pseudocochliobolus nisikadoi*, the perfect state of *Helminthosporium coicis*. *Mycologia* **69**: 1109-1120.
- Tsuda, M. and Ueyama, A. 1981. *Pseudocochliobolus australiensis*, the ascigerous state of *Bipolaris australiensis*. *Mycologia* **73**: 88-96.
- Tsuda, M. and Ueyama, A. 1982. *Pseudocochliobolus verruculosus* and variability of conidium morphology. *Mycologia* **74**: 563-568.
- Tsuda, M., Nagakubo, T., Taga, M. and Ueyama, A. 1985. Sexuality for the teleomorph formation and conidial variability in *Curvularia lunata*. *Trans. mycol. Soc. Japan* **26**: 27-39.
- Tsuda, M. and Ueyama, A. 1985. Two new *Pseudocochliobolus* and a new species of *Curvularia*. *Trans. mycol. Soc. Japan* **26**: 321-330.
- Ueyama, A. and Tsuda, M. 1976. Mating type and sexuality of *Cochliobolus miyabeanus*, the perfect state of *Helminthosporium oryzae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **42**: 1-6.