韓國林學會誌 87(4) : 557 - 561, 1998
Jour. Korean For. Soc. 87(4) : 557 - 561, 1998

잣나무에서 分離한 피목가지마름병균, *Cenangium ferruginosum*의 培養特性 및 病原性 檢定*[1]

李相龍[2] · 鄭周海[2] · 李鍾奎[2]

Cultural Characteristics and Pathogenicity Test of a Die-back Fungus, *Cenangium ferruginosum* Isolated from *Pinus koraiensis**[1]

Sang Yong Lee[2], Joo Hae Jung[2] and Jong Kyu Lee[2]

요 약

피목가지마름병에 감염된 잣나무로부터 병원균을 분리 동정한 결과, *Cenangium ferruginosum*으로 동정되었다. *C. ferruginosum*의 균사생장은 공시한 5종의 인공배지 중에서 PDA(Potato Dextrose Agar)에서 가장 왕성하였으며, 활엽수 추출물 첨가배지에서보다 침엽수 추출물 첨가배지에서 상대적으로 좋았다. PDA에서의 균사생장 최적온도 및 pH는 각각 10℃ 및 pH5 였다. 한편, 5년생 잣나무에 인공배양한 균사를 접종하여 병원성을 검정한 결과, 80%가 고사하였으며, 자연상태에서 감염된 이병목과 동일한 병징을 나타내었다.

ABSTRACT

A die-back fungus isolated from *Pinus koraiensis* was identified as *Cenangium ferruginosum*. Mycelial growth of the fungus was the best on PDA among five media tested. Mycelial growths on agar media supplemented with extracts from coniferous trees were relatively better than those on media with extracts from non-coniferous trees. Optimum temperature and pH for the mycelial growth of *C. ferruginosum* on PDA were 10℃ and pH 5, respectively. When five-years-old *P. koraiensis* seedlings were artificially inoculated with the fungus for the pathogenicity test of this fungus, 80% of seedlings were infected, and the same symptoms and signs were developed as those of naturally-infected trees.

Key words : die-back, pathogenicity, Pinus koraiensis, Cenangium ferruginosum, *tree extracts*

서 론

잣나무는 강원도 및 경기도 삼림의 주요 조림수종일 뿐만 아니라 산촌주민의 주요 소득원으로 자리 잡고 있다. 그러나, 1989년 가평 및 청평지역의 20 - 30년생 잣나무림에 피목가지마름병이 발생하여 많은 잣나무가 고사된 이래(임업연구원, 1989), 매년 경기도 및 강원도 지역의 잣나무림에서 피해가 상습적으로 발생하고 있어, 이에 관한 전반적인 연구가 시급히 실행되어야 할 필요성이 제기되어 왔다.

피목가지마름병(*Cenangium* die-back)의 병원균으로 알려진 *Cenangium* spp.는 주로 소나무류(*Pinus* spp.)에 피해를 주는 자낭균류의 일종으로 아직 잣나무의 피해를 입힌 보고는 없으며,

[1] 接受 1998年 7月 30日 Received on July 30, 1998.
[2] 강원대학교 삼림자원보호학과 Dept. of Forest Resources Protection, Kangwon Nat'l Univ., Chunchon 200-701, Korea
* 이 연구는 1997년도 특성화대학 강원도비 지원 연구과제임.

외국의 경우에는 오래 전부터 이에 관한 부분적인 연구가 이루어져 왔다. 즉, Cash와 Davidson (1940)은 자낭반의 크기와 excipulum의 색깔에 의하여 *Cenangium*속을 *Cenangium ferruginosum, C. abietis* 및 *C. atropurpureum* 등으로 분류하였으나, Ferchau와 Johnson(1956)은 *C. abietis* 및 *C. atropurpureum*은 *C. ferruginosum*의 변종일 뿐으로, *C. ferruginosum*은 기주식물 및 환경의 영향에 의하여 자낭반의 특성에 많은 변이를 유발시킬 수 있음을 보고하였다.

한편, *C. ferruginosum*의 병원성에 관하여는 연구자 간에 차이를 나타내고 있는데, 즉 Sinclair와 Hudler(1980)는 *C. ferruginosum*이 한해와 같은 환경 스트레스를 받은 나무를 침해하는 기생균일 것으로 간주하였으며, Fink(1911) 및 Weir(1921)는 소나무류의 피목가지마름병이 약한 병원성을 가진 기생균에 의하여 발생된다고 보고하였다. 또한 Boyce(1948)는 피목가지마름병이 약한 병원성의 기생성 병원균에 의해 발생되며, 주로 가지마름 증상을 유발시키므로 가지치기에 의한 병(pruning disease)이라고도 하였다. 한편, Baxter(1937)는 피목가지마름병원균이 상당히 강한 병원성을 갖고 있는 주요 경계대상의 삼림병이라고 하였다. 반면에, Kujala(1950)는 피목가지마름병의 병원균인 *C. ferruginosum*은 기생성이라기 보다는 부생성이 강한 병원체라고 하였으며, Vloten과 Gremmen(1953)도 *Pinus*속의 몇몇 수종(*P. sylvestris, P. nigra* var. *corsicana, P. nigra* var. *austriaca*)을 대상으로 인공접종실험을 실시하여, *C. ferruginosum*이 건조장해에 의해 고사한 가지를 침해하는 절대부생균이라고 단정하였다. Smerlis(1973)도 캐나다 퀘벡주의 삼림을 대상으로 주요 자낭균류에 의한 침엽수의 피해를 조사한 결과, *C. ferruginosum*이 소나무류의 마른가지를 침해하는 부생균의 일종으로 보고하였다.

이와 같이 피목가지마름병에 관한 연구는 국내에서는 물론, 국외에서 조차도 부분적인 연구만이 이루어져 있고 병원성에 관하여도 아직까지 명확하게 증명되어 있지 않은 상황이다. 따라서, 이 연구는 잣나무 피목가지마름병의 관련 연구에 기초적인 자료를 제공할 목적으로, 병원균의 분류 동정, 배양학적 특성, 병원성 검정 등의 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 병원균의 분리

이 연구에 사용한 공시 균주는 강원대학교 연습림에서 피목가지마름병에 걸린 잣무 이병목으로부터 분리하여, 분류 동정 및 분리 배양에 사용하였다. 병원균의 분류 동정은 현미경을 사용하여 병원균의 자낭반, 자낭 및 자낭포자 각 100개씩의 형태적 특성 및 크기를 관찰하였으며, 병원균의 균사는 자낭포자로부터 분리 및 배양하였다. 즉, 고사한 잣나무의 수피상에 형성된 성숙한 자낭반을 70% ethanol에서 5분간 소독하여 1.5% 물한천배지의 페트리접시 안쪽에 부착시킨 상태로 약 2시간 정치시켜 포자를 배지 위에 낙하시켰으며, 이 포자들은 15℃ 항온기에서 2일간 발아 및 균사 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 배양 조건

배양특성의 분석을 위하여 사용된 배지는 MA (2.5% malt extract, 1.5% agar), MPDA(MA, 0.1% peptone, 2% dextrose, 1.5% agar), MYA(MA, 0.2% yeast extract, 1.5% agar), PDA(Difco, Co.) 및 PDYA(0.2% peptone, 2% dextrose, 0.2% yeast extract, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.046% KH_2PO_4, 0.1% K_2HPO_4, 1.5% agar)이었다. 한편, 온도별 균사생장량은 PDA 배지에서 배양한 균사를 직경 5㎜의 접종원으로 하여 페트리접시 PDA배지에 접종하고, 5℃에서 30℃ 항온기에서 30일간 배양한 후의 균사생장량을 조사하였으며, pH별 균사생장량은 PDA 배지를 2N HCl 및 2N NaOH로 pH4에서 pH10까지 조정한 다음, 위와 같은 방법으로 15℃ 항온기에서 30일간 배양한 후의 균사생장량을 조사하였다. 각 실험은 공히 3회 반복 실시하였다.

3. 수목 추출물 첨가배지 제조

추출물 배지는 이와 김(1990)의 방법에 따라서 제조하였다. 각 수종별 2-3년생 가지를 목부와 수피부로 분리하고, 목부는 $1cm^2$, 수피부는 1cm×1cm의 크기로 절단한 다음, 증류수 500ml에 각 수종의 부위별 절편을 50g씩 첨가하여 121℃, $1kg/cm^2$ 조건에서 30분간 가열한 후, 거즈로 여과하여 추출액을 회수하였으며, 여기에 agar를 1.5%로 첨가하고 고압멸균하여 페트리접시에 분주하

였다. 이 배지에 직경 5㎜의 배양 균사가 포함된 agar disc를 접종하여, 15℃ 항온기에서 30일간 배양한 후의 균사생장량을 3회 반복 실시하였다.

4. 병원성 검정

병원성 검정을 위한 인공 접종은 Lee 등(1992)의 방법을 변형시켜 실시하였다. 즉, 대형 화분에서 생장중인 수고 약 1 - 1.5m의 5년생 잣나무의 줄기에 10cm 간격으로 다섯 곳을 직경 0.5cm의 cork borer를 이용하여 수피부 조직을 절취한 다음, 그 자리에 PDA배지에서 배양한 균사가 포함된 같은 크기의 agar disc를 접종하고 parafilm으로 밀봉하였다. 인공 접종한 잣나무는 특별한 처리없이, 야외에서 관리하면서 병징 및 표징의 발현 유무를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 병징, 표징 및 병원균의 동정

피목가지마름병에 걸린 잣나무의 병징은 가지 및 줄기의 마름증상과 함께, 침엽도 적갈색으로 고사하였으며, 표징은 4 - 6월경에는 이병목의 수피하에 흑색의 자좌가 형성되었다가(Fig. 1. A), 그 후 수피상에 다수의 황갈색 자낭반을 형성하였다(Fig. 1. B). 이병목으로부터 자낭반을 분리하여 자낭반, 자낭 및 자낭포자의 형태적 특성을 hand section법 및 현미경으로 관찰한 결과, 미성숙 자낭반은 구형으로 직경이 1 - 2㎜이며 아직 자실층이 발달되지 않았으나(Fig. 2. A,B), 성숙한 자낭반은 원반형으로 직경이 2 - 5㎜이었다(Fig. 3. A). 한편 자낭은 50 - 100×8 - 12μm의 크기로 8개의 자낭포자를 갖고 있었으며, 자낭포자의 색깔은 투명하였고 크기는 6 - 10×4 - 6μm였다(Fig. 3. B). 이상의 특성으로 이 병원균은 *Cenangium ferruginosum* Fr. ex Fr.(Ferchau와 Johnson, 1956 ; Funk, 1981)으로 동정되었다.

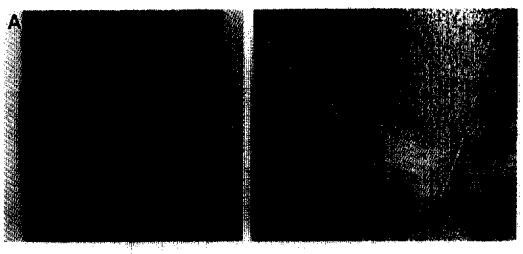

Fig. 1. Signs on the stem of *Pinus koraiensis* naturally infected with *Cenangium ferruginosum* : Stromata formed in the corky outer layer (A), and apothecia formed on the corky outer layer of the stem (B).

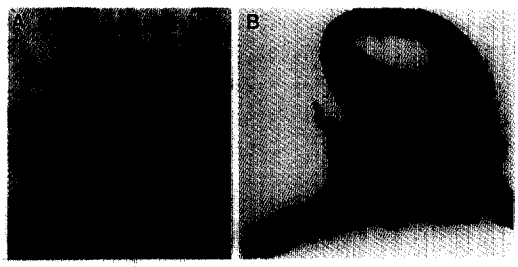

Fig. 2. Young apothecia of *C. ferruginosum* about 1 - 2㎜ in diameter (A), and longitudinal section of the apothecium (B).

2. 배양학적 특성

자낭포자로부터 *C. ferruginosum*의 균사를 분리하여 PDA배지에서 증식시켰을 때, 초기 생장시의 균사 색깔은 백색이었으나, 시간이 경과함에 따라서 황갈색으로 변화하였다. 5종류의 인공합성배지에서 균사의 생장 특성을 조사한 결과, PDA에서 균사생장이 상대적으로 가장 왕성하였고, 그 다음으로 PDYA, MPDA 및 MA였으며, MYA에서는 균사생장이 가장 저조하였다(Table 1). 온도별 균사생장량의 비교 실험에서는 일반적인 병원균들의 생장 적온보다 낮은 10℃에서 *C. ferruginosum*의 균사생장이 가장 양호하였으며, 또한 5℃에서의 균사생장도 20 - 30℃에서의 균사생장보다 높아 *C. ferruginosum*은 저온성균의 특성을 나타내었다(Table 2). 한편, pH별 균사생장량은 pH 5에서 균사생장이 가장 양

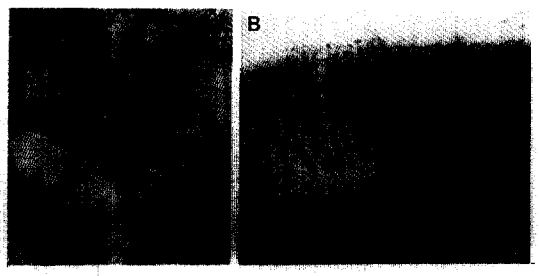

Fig. 3. Matured apothecia of *C. ferruginosum* about 2 - 5㎜ in diameter (A), and longitudinal section of the hymenium containing ascospores in asci (B). Hymenium was stained with 0.3% methylene blue. Bar represents 50μm.

호하였으며, pH 7-9에서의 생장보다 pH 4-6에서의 생장이 상대적으로 높아 *C. ferruginosum*은 약산성의 조건을 선호하는 균으로 조사되었다(Table 3).

3. 수목 추출물 첨가배지에서의 균사생장 특성

수종별로 목부와 수피부를 분리하여 제조한 추출물 첨가배지에서의 *C. ferruginosum* 균사생장은 Table 4에서 보는 바와 같이, 수피부 추출물 첨가배지에서는 주목, 일본잎갈나무, 잣나무, 소나무, 전나무 등의 침엽수 추출물 첨가배지에서 균사생장이 양호하였으며, 목부 추출물 첨가배지에서의 균사생장도 역시 소나무, 잣나무, 일본잎갈나무 등의 침엽수 추출물 첨가배지에서의 균사생장이 양호한 것으로 나타나, *C. ferruginosum*은 활엽수 보다는 침엽수에서 잘 자랄 수 있는 특성이 있음을 나타내 주고 있다. 또한 침엽수의 경우, 전반적으로 목부보다 수피부 추출물 첨가배지에서 *C. ferruginosum*의 균사생장이 양호하였는데, 이러한 특성은 수피부를 가해하는 *C. ferruginosum*의 병원성과 상관관계가 있을 것으로 추정된다. 한편, 은사시나무의 경우는 목부 추출물 첨가배지에서는 균사생장이 다소 인정되었으나, 수피부 추출물 첨가배지에서는 균사생장이 완전히 억제되었는데, 이 결과는 *Rhizina undulata*가 은사시 추출물 첨가배지에서는 균사생장이 억제된다는 이와 김(1990)의 보고와 함께, 은사시나무에는 항균성 물질이 존재할 가능성이 있음을 시사하여 주고 있다.

Table 1. Mycelial growth of *Cenangium ferruginosum* on various culture media.

Diameter of mycelial growth(㎜)				
MA	MPDA	MYA	PDA	PDYA
14	15	11	30	17.5

$LSD_{0.05}$=4.49
MA : 2.5% malt extract, 1.5% agar
MPDA : MA, 0.1% peptone, 2% dextrose, 1.5% agar
MYA : MA, 0.2% yeast extract, 1.5% agar
PDA : Difco, Co.
PDYA : 0.2% peptone, 2% dextrose, 0.2% yeast extract, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.046% KH_2PO_4, 0.1% K_2HPO_4, 1.5% agar

Table 2. Effect of temperature on mycelial growth of *Cenangium ferruginosum*

Mycelial growth on PDA(㎜)					
5℃	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃
24	45	27	18	16	5

$LSD_{0.05}$=7.48

Table 3. Effect of pH on mycelial growth of *Cenangium ferruginosum*

Mycelial growth on PDA at 15℃(㎜)					
pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
35	45	32	24	15	16

$LSD_{0.05}$=6.4

4. 병원성 검정

PDA배지에서 배양한 균사를 3월 중순에 5년생 잣나무 다섯 그루에 인공접종한 결과, 그중 4그루가 3개월 후에 고사하였다. 고사한 이병목의 수피하에는 흑색의 자좌가 형성되었으며(Fig. 4. A), 자좌 형성 약 2개월 후에는 수피상에 자낭반이 형성되어(Fig. 4. B), 자연상태에서 감염된 이병목에서의 병징 및 표징과 동일한 특성을 나타내었다.

Table 4. Mycelial growth of *Cenangium ferruginosum* on agar medium supplemented with extracts from various tree species

Tree species	Radial growth(㎜) on agar medium supplemented with	
	Bark extracts	Wood extracts
Abies holophylla	47	21
Larix leptolepis	75	27
Pinus densiflora	67	40
Pinus koraiensis	70	27
Taxus cuspidata	80	15
Populus euramericana	23	25
Populus tomentiglandulosa	0	12
Quercus aliena	25	24

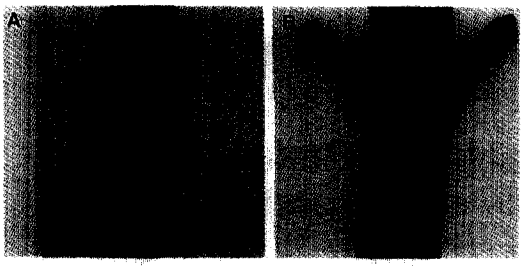

Fig. 4. Pathogenicity test of *C. ferruginosum* by artificial inoculation to *P. koraiensis*: Stromata formed in the corky outer layer (A), and apothecia formed on the corky outer layer of the inoculated stem (B).

결 론

잣나무의 피목가지마름병이 많이 발생하는 임분은, 잣나무의 수령이 약 20 - 30년생이고, 간벌 및 가지치기 작업이 실시되지 않았으며, 지리적으로는 한해를 받기 쉬운 특성이 있었다(자료 생략). 균사의 배양학적 특성을 분석한 결과, *C. ferruginosum*은 생장 적온이 10℃인 저온성균으로 밝혀졌으며, 활엽수 추출물 첨가배지보다 침엽수추출물 첨가배지에서 균사생장이 왕성하였는데, 이러한 성질은 가뭄피해 지역에서 발병율이 높은 잣나무의 피목가지마름병의 발병 특성과 상관 관계가 있을 것으로 추측된다. 한편, *C. ferruginosum*의 병원성에 관하여는 현재까지 명확하게 증명되지 않았으나, 인공접종 실험으로부터 강한 병원성이 입증됨으로써, *C. ferruginosum*은 기생균 또는 조건적 기생균임을 확인할 수 있었다. 따라서, 앞으로도 잣나무의 피목가지마름병에 의한 잣나무 및 기타 침엽수의 피해는 계속적으로 발생될 것으로 예상되는 바, 이 병의 효과적인 방제를 위한 구체적인 연구가 조속히 실시되어야 할 것으로 생각된다.

인 용 문 헌

1. 이상용 · 김완규. 1990. 소나무 리지나뿌리썩음병에 관한 연구 : *Rhizina undulata*의 생리적 특성 및 병원성. 한국임학회지 79 : 322-329.
2. 임업연구원. 1989. 주요조림수종의 병해진단 검색표. 산림방역 22 : 7-8.
3. Baxter, D.V. 1937. Development and succession of forest fungi and disease in forest plantation. Univ. Mich. School For. Cons. Circ. 45pp.
4. Boyce, J.S. 1948. Forest Pathology. McGraw-Hill Book Company, New York.
5. Cash, E.K. and R.W. Davidson. 1940. Some new species of Ascomycetes on coniferous hosts. Mycologia 32 : 728-735.
6. Ferchau, H.A. and T.W. Johnson. 1956. Taxonomy of the *Cenangium* dieback fungus. Forest Science 2 : 281-285.
7. Fink, B. 1911. Injury to *Pinus strobus* caused by *Cenangium abietis*. Phytopathology 1 : 180-183.
8. Funk, A. 1981. Parasitic microfungi of western trees. Canadian Forestry Service, Pacific Forest Research Centre, Victoria, B.C. BC-X-222. 190pp.
9. Kujala, V. 1950. Ueber die Kleinpilze der Koniferen in Finnland. Comm. Institut. Forest. Fenn.
10. Lee, J-K., T.A., Tattar, P.M. Berman and M.S. Mount. 1992. A rapid method for testing the virulence of *Cryphonectria parasitica* using excised bark and wood of American chestnut. Phytopathology 82 : 1454-1456.
11. Sinclair, W.A. and G.W. Hudler. 1980. Tree and shrub pathogens new or noteworthy in New York state. Plant Disease. 64 : 590-592.
12. Smerlis, E. 1973. Pathogenicity test of some Discomycetes occurring on conifers. Can. J. For. Res. 3 : 7-16.
13. Vloten, H.V. and Gremmen, J. 1953. Studies in the Discomycetes genera *Crumenula* De Not. and *Cenangium* FR. Acta Botanica Neerlandica, 2 : 226-241.
14. Weir, J.R. 1921. Note on *Cenangium abietis* (Pers.) Rehm on *Pinus ponderosa* Laws. Phytopathology 11 : 166-169.