

## NUV 광조사에 의한 배나무 흰날개무늬병의 분생자과 형성

이중섭\* · 박종한 · 한경숙 · 최용문 · 松本直行<sup>1</sup>

농촌진흥청 원예연구소 원예환경과, <sup>1</sup>日本 農業環境技術研究所

### Induction of Conidioma Formation of the White Root Rot Fungus in Axenic Culture under Near Ultraviolet Light Radiation

Jung-Sup Lee\*, Jong-Han Park, Kyoung-Suk Han, Young Mun Choi and Matsumoto Naoyuki<sup>1</sup>

Division of Horticultural Environment, National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 441-440, Korea

<sup>1</sup>National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3 Kan-non dai, Tsukuba 305-8604, Japan

(Received on November 4, 2002)

Conidiomata of the *Rosellinia necatrix* were induced in axenic culture under near ultraviolet light radiation. Pieces of sterilized Japanese pear twigs were placed on the 7 days-old oatmeal agar culture in plates. The plates were further incubated for 5 days and then illuminated by under near ultraviolet light radiation. Synnemata were developed on twigs in 19 out of 20 isolates tested within 5 weeks, and conidia were observed in 12 out of the 19 isolates. The synnemata and conidia produced were morphologically identical to those of *Dematophora necatrix*.

**Keywords :** *Dematophora necatrix*, near ultraviolet light, white root rot

흰날개무늬병은 *Rosellinia*에 속하는 곰팡이로 사과를 비롯한 배와 포도, 뽕나무, 삼림 및 고구마, 아스파라거스 등의 초본식물에 발생하여 피해를 주고 있다(Khan, 1959; Watanabe, 1963; Szejnberg and Madar, 1980; Ito and Nakamura, 1984). 이 병원균은 Viara(1891)가 포도나무에서 완전세대인 자낭각을 발견하여 *Rosellinia necatrix* Prill. et. Del.로 명명하였으며, Berlese(1892)는 자낭각 형성법과 구조를 밝혀 분류학적으로 *Rosellinia necatrix*(Hart.) Prillieux로 사용되고 있다(Sivanesan and Holliday, 1972; Kitajima, 1979b; Richard, 1990).

荒木(1963)는 일본에 재식된 전체 과수의 약 10%가 날개무늬병에 이병되었는데 그중 90%가 흰날개무늬병이며, 정도에 따라 10~30%의 수량감소가 나타나는 것으로 보고되어 있다. 본 균은 분생자경속 및 뿌리모양의 균사속을 형성하는데 병든뿌리의 부름켜위에 형성되는 균사막

이 특징적인 백색부채꼴 모양을 하고 있고 균사의 격막부가 서양배 모양으로 팽창되는 것이 이 균을 동정하는 가장 큰 특징이다(Sivanesan and Holliday, 1972; Kitajima, 1979b). 또한, 자낭각, 자낭 및 자낭포자 등의 유성생식에 대한 연구결과도 보고(Sivanesan and Holliday, 1972; Richard, 1990; Jones and Aldwinckle, 1991)되어 있으나, 본 병원균은 인위적인 배양 배지상에서는 완전세대를 형성하지 못한다. 따라서, 영양균사의 형태적인 특성에 기초하여 분류가 이루어 지고 있다(Watanabe, 1963; Francis, 1985; Teixeira de Sousa and Whally, 1991). 그러나, hypovirulence factor를 이용한 생물방제(Matsumoto, 1998)를 수행하기 위해서는 수집된 균주의 불완전세대에 대한 보다 정확한 분류가 요구되고 있다. 한편, 배지상에서 형성된 분생자과에 대한 연구보고는 별로 이루어지지 않았다(Hansen 등, 1937). 따라서, 본 연구에서는 인위적인 배양 배지상에서 near ultraviolet(NUV) light 조사에 의한 배나무 흰날개무늬병원균의 분생자과의 형성이 가능하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

\*Corresponding author

Phone)+82-31-290-6275, FAX)+82-31-295-9548

E-mail)jslee@rda.go.kr

## 재료 및 방법

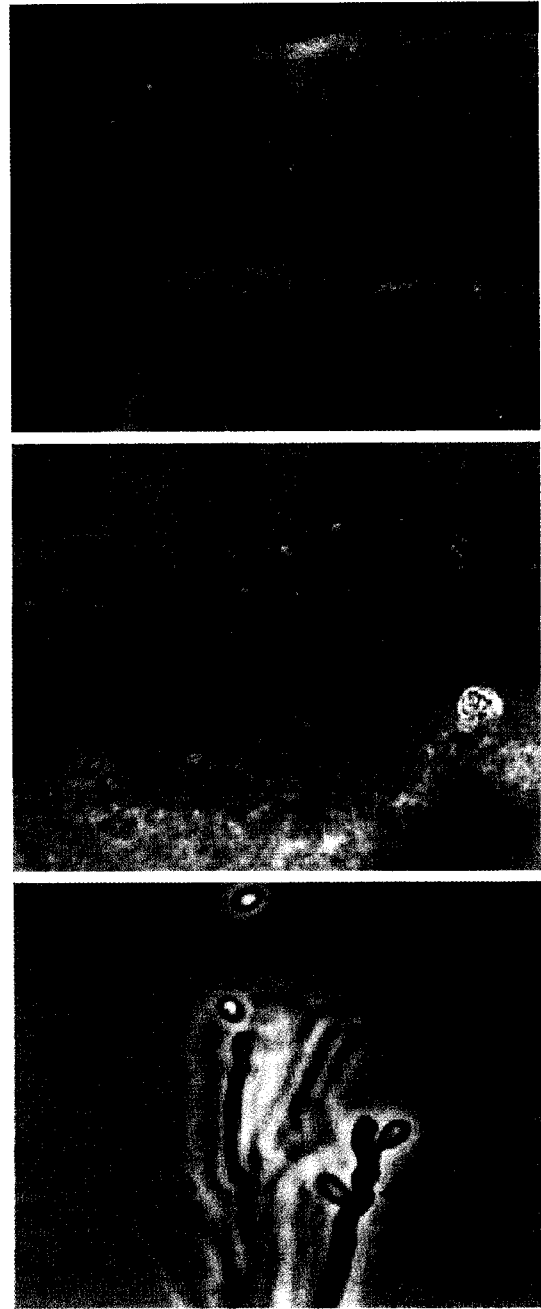
**병원균 수집.** 시험균주는 일본의 여러지역으로부터 1999년과 2000년까지 2년에 걸쳐 이병뿌리 또는 배과원의 발병 토양으로부터 20개의 날개무늬병원균을 분리하여 PDA 배지상에서 성장한 영양균사의 형태적인 특성을 Sivanesan과 Holliday(1972)에 의해 기술된 특성과 비교하여 흰날개무늬병원균으로 동정하였다. 이 실험에 주로 이용된 균주는 w340으로 히로시마의 배과수원 토양속에 존재하는 균을 1년생 배나무 가지를 30 cm 정도로 잘라 5개씩 묶어 토양속 15~20 cm 부위에 묻어 두었다가 약 2개월 후 굴취하여 표면에 부착된 균을 분리하여 사용하였다.

**병원균 조사.** 토양으로부터 분리한 가지의 표면에 형성된 분생자과를 현미경으로 확인한 다음, 실험실내의 실온에 보관하면서 경시적으로 관찰하였다. 각각의 균주는 WA, PDA, OMA 배지에 접종 후 20°C, 암조건에서 일주일 동안 배양하였다. dsRNA가 흰날개무늬병원균의 분생자과 형성에 영향을 미치고 있는가의 여부를 조사하기 위하여 Arakawa 등(2002)이 실시한 방법에 따라 수집된 균주로부터 추출하였다. 또한, 일본배 [*Pyrus pyrifolia* var. *culuta*]와 뽕나무 [*Morus alba*] 가지를 1% 알코올로 표면 살균처리 한후 길이 3~4 cm, 직경 8~12 mm 정도로 자르고 이를 다시 반으로 쪼개어 4개를 만들어 1회용 접시의 배양 배지상에 성장하고 있는 균사의 표면에 올려 놓았다. 가지 조각의 경우, 4개의 조각중 2개는 자른 면이 위로 향하게 놓았으며, 나머지 2개는 껍질의 표면이 위로 향하게 처리하였다. 그리고 기타 가지조각은 자른 표면이 위로 향하게 처리하였다.

**분생자과 형성.** 분생자과 형성유도를 위해 처리된 plates는 5일동안 20°C, 암상태에서 배양한 후, NUV light(peak at 352 nm, FL20S·BLB-A, Toshiba)로부터 20 cm 떨어진 부위에서 계속적으로 조사처리 하였다. 각각의 plates는 NUV 광조사 상태에서 배양 후 2개월 동안 매주 관찰하였다.

## 결 과

**병원균 조사.** 분생자병속과 분생자는 토양속에 묻었던 유인가지에서 형성되었으며, 그 중 하나의 가지 조각으로부터 w340 균주와 상호 비교하였다(Table 3). 두 개 시료의 분생자병은 분생자를 제거한 후 관찰한 결과 상처흔적이 있는 무릎뼈 모양의 형상을 하고 있었다(Fig. 1C). 분생자병속의 길이는 약간의 차이를 나타내었다. 이들 시료의 분생자 상태에서는 분생자병속의 길이를 제외하고는 *D. necatrix*에 관해 보고된 것과 동일하였다(Table 3).



**Fig. 1.** Synnemata of the white root rot fungus isolate w340 produced under near ultraviolet light radiation. A: Synnemata on twig pieces of Japanese pear cultured on oatmeal agar. Arrows show clusters of synnemata, B: Close-up of A, synnemata with conidia, C: Apical part of conidiophore on a synnema. Arrow shows a conidium and arrowhead shows a scar after removal of a conidium. Scale bars: A = 5 mm, B = 3 mm, C = 10  $\mu$ m.

그러나, 분생자병속의 길이는 분류학적인 기준으로서 중요하게 적용되고 있지 않다고 보고하고 있다(Ezuka *et al.*, 1973; Francis, 1985; Petrini, 1992; Watanabe, 1992).

**Table 1.** Isolates of the white root rot fungus used production of synnemata and conidia under near ultraviolet light radiation

Isolate No.	Host plant	Locality	dsRNA	Frequency of synnema production <sup>a</sup>	Conidium production on synnemata	Time required for synnema production (weeks)
W118	Japanese pear	Saga	+	6/12 <sup>b</sup>	+	4
W135	Japanese pear	Fukuoka	+	3/12	-	4
W153	Japanese pear	Chiba	-	12/12	+	3
W233	Japanese pear	Chiba	-	4/12	+	4
W238	Loquat	Chiba	-	2/12	-	5
W281	Japanese pear	Tottori	-	12/12	+	4
W340	Japanese pear	Hiroshima	+	12/12	+	3
W382	Japanese pear	Hiroshima	+	1/12	-	5
W389	Grapevine	Hiroshima	-	11/12	+	3
W442	Japanese pear	Mie	+	12/12	+	2
W430	Japanese pear	Kyoto	-	3/12	-	4
W536	unknown(forest)	Akita	-	3/12	-	3
W588	Prunus mume	Wakayama	-	0/12	-	-
W607	Spiraea thunbergii	Ibaraki	-	12/12	+	2
W645	Aucuba	Miyagi	-	2/12	+	4
W652	unknown(forest)	Kanagawa	-	12/12	+	3
W655	Callicarpa japonica	Tokyo	-	3/12	-	4
W665	Apple	Gunma	+	5/12	+	4
W672	Illicium anisatum	Miyazaki	+	12/12	+	2
W674	unknown(forest)	Aichi	-	3/12	-	5

<sup>a</sup>Twelve twig discs obtained from Japanese pear were placed on each plate culture with cut-surface up.

<sup>b</sup>No. discs of Japanese pear twig with synnemata/No. discs placed on oatmeal agar in a plate.

**Table 2.** Synnema production by the white root rot fungus under near ultraviolet light radiation

Media <sup>a</sup>	NUV light radiation	No. synnemata on <sup>b</sup>			
		horizontal cut-surface(H) <sup>c</sup>	longitudinal cut-surface(L) <sup>d</sup>	bark surface(B) <sup>e</sup>	H+L+B
WA	+	81.9 ± 78.6	1.8 ± 1.4	18.6 ± 27.5	99.6 ± 101.1
WA	- <sup>f</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0
PDA	+	156.4 ± 101.5	82.8 ± 61.2	41.7 ± 65.5	285.6 ± 182.4
PDA	+	0.0	0.0	0.0	0.0
OMA	+	448.5 ± 88.3	635.2 ± 401.7	262.6 ± 58.5	1,296.3 ± 365.6
OMA	+	0.0	0.0	0.0	0.0

<sup>a</sup>Four twig segments of Japanese pear were placed on a plate culture of isolate w340.

<sup>b</sup>Average number of synnemata with standard deviation of three plates.

<sup>c</sup>Observed cut-surface of four twig segments.

<sup>d</sup>Observed cut-surface of two twig segments.

<sup>e</sup>Observed bark surface of two twig segments.

<sup>f</sup>Incubated in the dark.

**분생자과 형성.** 균주 w340은 NUV 광 조사 상태에서 3~4주 후 OMA와 WA 배지상에서 분생자병속이 형성되었다(Fig. 1A, 1B; Table 2). 분생자병속은 멸균처리된 가지조각 표면에서 독립적으로 여러군데 형성된 것을 관찰하였다. 가지의 표면에서 관찰된 분생자병속의 형성은 PDA 또는 WA 배지에서보다 OMA 배지상에서 다량 형성되었다(Table 2). 또한, 분생자병속은 OMA plates 상에

놓은 뽕나무 가지조각에서도 형성되었다. 그러나, 암조건에서 배양처리된 것은 분생자병속이 전혀 형성되지 않았다.

w340 균주를 포함한 20개의 균주는 모두 수평적으로 자른 가지 조각상에 형성된 분생자과(conidioma)와 상호 비교하였다. 그 결과, 세로로 표면을 자른 가지조각 또는 껍질표면위에서 보다 횡으로 표면을 자른 가지상에서 보다 많은 분생자병속이 형성되었다. NUV 광조사 상태에

**Table 3.** Morphology of conidiomata of the white root rot fungus

Partitions	Synnemata		Conidia	
	Length (mm)	Width at base(μm)	Length (μm)	Width (μm)
Produced on bait twigs in the laboratory <sup>a</sup>	1.2~3.8 <sup>d</sup> (2.4 ± 0.7) <sup>e</sup>	12.0~39.0 (20.1 ± 7.0)	2.6~4.4 (3.5 ± 0.5)	1.5~2.6 (2.1 ± 0.3)
Produced in axenic culture <sup>b</sup>	1.4~2.5 (1.8 ± 0.2)	14.6~40.7 (22.9 ± 5.9)	3.1~4.4 (3.7 ± 0.4)	1.9~2.7 (2.4 ± 0.2)
Ezuka <i>et al.</i>	-	-	3.0~5.0	2.0~3.4
Francies	0.5~1.5	-	3.6~4.0	1.8~2.5
Petrini	0.5~1.5	<110	3.0~5.0	2.5~3.0
Watanabe <sup>c</sup>	-	-	3.5~5.5	1.6~2.3

<sup>a</sup>Synnemata and conidia were produced on a bunch of Japanese pear twigs used as a bait, from which isolate w340 was obtained.

<sup>b</sup>Synnemata and conidia of isolate w340 were produced on twig segments of Japanese pear on oatmeal agar.

<sup>c</sup>Description on anamorph with mononematous conidiophores in axenic culture.

<sup>d</sup>Range.

<sup>e</sup>Average with standard deviation(n = 30).

**Table 4.** Effect of incubation period before near ultraviolet light radiation on synnema production in the white root rot fungus

Incubation period (days) <sup>a</sup>	No. synnemata/plate <sup>b</sup>	Time required for synnema production (weeks)
0	257.0 ± 90.4	3~5
5	695.1 ± 480.5	2~3
10	412.3 ± 383.7	3~4
15	255.4 ± 169.4	ND <sup>c</sup>
30	403.2 ± 322.3	ND

<sup>a</sup>Incubation period of twig segments placed on culture before NUV light radiation.

<sup>b</sup>Four twig segments of Japanese pear were placed on a plate culture of isolate w340. Average number of synnemata with standard deviation of three plates.

<sup>c</sup>Not determined because of very thick aerial hyphae above twigs.

서 2~5주 동안 배양한 결과 20균주중 19균주에서 분생자병속이 형성되었으며, 그 중에서도 12균주는 분생자병속위에 분생자가 형성되었다(Table 1). 그러나, 분생자병속 형성 빈도는 다양하게 나타났으며, 분생자병속이 형성된 균주는 각각의 plate상에서 하나 이상의 변이를 나타내었다. 19 균주중에서 7개의 균주 즉, w153, w281, w340, w422, w607, w652 그리고 w672는 plates에 있는 모든 disc상에 분생자병속을 형성하였다. 분생자병속의 형성빈도는 기주 식물체와 분리지역과는 상관관계가 없었다. 한편, dsRNA의 존재는 *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr에 있어서 분생자의 형성을 줄인다고 보고(Nuss and Koltin, 1990) 하고 있으나 이것은 흰날개무늬병의 경우에 있어서는 일

치하지 않은 것으로 판단되었다. NUV 광조사에 의한 예비시험 결과 분생자병속의 형성은 가지조각이 멸균처리되지 않으면 인위적인 배지상에서는 형성되지 않는 것을 확인하였다. 몇 개의 분생자병속은 흰날개무늬병균이 생리적으로 분생자병속으로 진전하는데 필요한 알려지지 않은 성분이 포함된 배나무 가지를 OMA상에 놓은 것중에서도 단지 5균주중 1균주에서만 형성된 것이 관찰되었다. 그러나, 그 들중에서도 분생자로는 전혀 진행되지 못하였다. red light 조사(peak at 660 nm, FL40 · R-F, National) 처리구에서의 분생자병속 형성을 위해 요구된 시간은 WA 배양 plates의 가지조각에서 NUV 광조사 처리구보다 긴 시간이 요구되었다. 또한, NUV를 조사하기 전에 가지조각에서의 배양기간은 분생자병속 생산을 위해 중요하다고 판단되었다. 전체적인 배양기간(0, 5, 10, 15, 30일)중 분생자병속의 형성과 분생자병속 형성을 위해 요구되어진 시간에서 가장 효과적인 배양기간은 5일이었다(Table 4).

## 고 찰

*Rosellinia species*의 불완전세대는 *Dematophora*, *Geniculosporium*과 *Nodulisporium* 등 3개의 속들로 구분되고 있다. *Dematophora*과 *Geniculosporium*은 무릎뼈 모양의 분생자병들을 가지고 있었으며, 전자는 비록 Watanabe(1992)가 무균상에서 배양되고 있는 변이체 *D. necatrix*의 단생 분생자병들에 대하여 보고하였다 하더라도 *Dematophora*은 분생자병속을 형성하는 특징을 가지고 있었다.

*Rosellinia*의 일부 종들에서는 형태적으로 *Dematophora*과 동일한 특징을 가지고 있으며(Francis, 1985; Petrini, 1992), *Rosellinia bothrina*(Berk. & Br.) Sacc.,은 *R. necatrix*와 가장 밀접하게 관련되어 있었으나 이들 종의 분생자는 발견되지 않았다(Francis, 1985). 그리고 *Rosellinia buxi* H. Fabre는 형태적으로 *R. necatrix*와 유사하지만 *R. buxi*는 분생자의 크기가 *D. necatrix*의 분생자의 크기보다 더 크다고 보고하고 있다(Petrini, 1992). 또한, 본 균의 병원성은 아직 증명되지 않았다. 결정적으로 본 연구에서는 일본의 배나무 뿌리고사를 유발하는 *D. necatrix*의 흰날개무늬병원균의 불완전세대를 확인하였다.

NUV광의 조사는 다른 병원균들과 마찬가지로 흰날개무늬병에서도 분생자과의 발현을 위해 필수적이다(Leach, 1962; Calpouzos and Lapis, 1970). 그리고, 이러한 방법은 흰날개무늬병의 불완전세대를 분류 및 동정하는데 유용하다고 판단되었다. Nakamura 등(2000)은 흰날개무늬병원균의 자좌는 분생자병속의 기부에서 형성된다고 보고하였으며, 본 연구에서도 NUV 광조사 처리로 완전세

대가 계속적으로 진행되는 것을 관찰하였다. 그러나, 자좌는 모든 균주에서 동일한 결과를 나타내지는 않았다. 흰날개무늬병의 분생자는 접합기작에 깊이 관여하고 있지만, 분생자 자체가 발아하여 균사로 결코 진행되지 않는다고 보고하였다(Nakamura 등, 2000).

따라서, 흰날개무늬병의 불완전세대 동정을 위해서는 분생자과의 형성이 필수적이며, 이를 위해서는 NUV광 조사에 의해 가능하였다. 본 연구결과, 7일간 OMA 배지상에서 성장된 병원균에 배나무 조각을 처리하여 5일간 NUV광을 조사한 결과 분생자병속을 5주 이내에 95% 발현시킬 수 있었다. 또한, 그로부터 형성된 분생자병속과 분생자는 *Dematophora necatrix*의 것들과 동일하다는 것을 확인하였다. 한편, 흰날개무늬병원균은 무균상태에서 배양할 때에 보다 많은 자좌를 형성시키기 위해서는 다른 병원균들에 의해 보여진 것처럼 추가적인 영양조건이 필요할 가능성도 있다.

## 요 약

흰날개무늬병원균의 분생자과를 형성시키기 위하여 NUV 광을 조사하면서 무균적으로 배양하였다. 흰날개무늬병원균을 Oatmeal Agar 배지상에 7일동안 배양시킨 후 살균 처리된 배나무 가지를 올려놓아 20°C 실온에서 5일 동안 NUV 광을 조사하면서 배양하였다. 그 결과, 배나무 가지 표면에 분생자병속이 처리 5주후에 95% 형성시킬 수 있었다. 또한, 유기된 분생자병속으로부터 63%의 분생자가 형성되는 것을 관찰하였다. 새롭게 형성된 분생자병속과 분생자의 형태적 특성은 *Dematophora necatrix*에 대하여 보고된 것과 동일하였다.

## 참고문헌

Arakawa, M., Nakamura, H., Uetake, Y. and Matsumoto, M. 2002. Diversity of double-stranded in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. Mycoscience 43(In press.)  
 荒木降木, 足立嗣雄. 1963. 紫紋羽病菌 發生土壤における腐植區分の變化と發生消長(講要). 日植病報. 28: 78.  
 Calpouzos, L. and Lapis, D. B. 1970. Effects of light on pycnidium formation, sporulation, and tropism by *Septoria nodorum*. Phytopathology 60: 791-794.  
 Ezuka, A., Kasai, K. and Kibushi, H. 1973. Notes on the perithecial stage of *Rosellinia* parasitic on tea plant. Chagyo

Kenkyu Hokoku 40: 26-30.  
 Francis, S. M. 1985. *Rosellinia necatrix* - fact or fiction Sydowia 38: 75-86.  
 Hansen, H. N., Thomas, H. E. and Thomas, H. E. 1937. The connection between *Dematophora necatrix* and *Rosellinia necatrix*. Hilgardia 10: 561-565.  
 Ito, S. and Nakamura, N. 1984. An outbreak of white root-rot and its environmental conditions in the experimental arboretum. J. Japanese For. Soc. 66: 262-267.  
 Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S. 1991. Compendium of Apple and Pear Diseases. APS press. 100pp.  
 Khan, A. H. 1959. Biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. Biologia 5: 199-245.  
 Kitajima hiroshi. 1979b. Disease of fruits; *Rosellinia necatrix*(Hurt.) Berl. 54: 1405-1409.  
 Leach, C. M. 1962. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. Can. J. Bot. 40: 151-161.  
 Matsumoto, N. 1998. Biological control of root diseases with dsRNA based on population structure of pathogen. JARQ 32: 31-35.  
 Nakamura, H., Uetake, Y., Arakawa, M., Okabe, I. and Matsumoto, N. 2000. Observation on the teleomorph of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, and a related fungus, *Rosellinia aquila*. Mycoscience 41: 503-507.  
 Nuss, D. L. and Koltin, Y. 1990. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 28: 37-58.  
 Petrini, L. E. 1992. *Rosellinia* species of the temperate zones. Sydowia 44: 169-281.  
 Richard, T. H. 1990. Illustrated genera of Ascomycetes. APS press 263pp.  
 Sivanesan A. and Holliday P. 1972. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 351-354.  
 Szejnberg, A. and Madar, Z. 1980. Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white root rot disease in fruit trees. Plant Disease 64: 662-664.  
 Teixeira de Sousa, A. J. and Whalley, A. J. S. 1991. Induction of mature stromata in *Rosellinia necatrix* and its taxonomic implications. Sydowia 43: 281-290.  
 Watanabe, B. 1963. Studies on the ecology and control of white root rot disease caused by *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. Appointed Experiment (Plant disease and Insect pest) Bull. 3, 110 pp. Agric. For. and Fish. Res. Council, Ministry of Agr. and For., and Ibaraki Agric. Exp. Stn.  
 Watanabe, T. 1992. Sporulation of *Dematophora necatrix* in vitro and its pathogenicity. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58: 65-71.