

## 포도나무 갈색무늬병균 (*Pseudocercospora vitis* (Lév.) Speg.)의 병원성과 침입기작

박종한\* · 한경숙 · 이중섭 · 서상태 · 장한익 · 김흥태<sup>1</sup>

원예연구소 원예환경과, <sup>1</sup>충북대학교 식물외과

### Pathogenicity and Infection Mechanism of *Pseudocercospora vitis* Causing Leaf Spot Disease on Grapevine in Korea

Jong-Han Park\*, Kyeong-Suk Han, Jung-Sup Lee, Sang-Tae Seo, Han-Ik Jang and Heung-Tae Kim<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Department of Plant Medicine, Chungbuk Natl. Univ., Cheongju 361-763, Korea

(Received on November 3, 2005)

This study was carried out to know pathogenicity of the pathogen isolated in several location of Korea and penetration mechanism of the *Pseudocercospora vitis* (Lév.) Speg. Inoculation tests at room temperature were performed on both sides of leaves with different isolates of the fungus. The typical symptoms appeared on the abaxial leaf surface, but no symptom was observed

on the adaxial leaf surface with all isolates. The average incubation period was nine days, since all symptoms appeared from 8 to 10 days after inoculation. In order to know the mechanism of invasion of *P. vitis* to grapevine, the behavior of penetration hyphae through stomata were compared in two cultivars having different level of resistance. In order to know the mechanism of resistance of grape vine to *P. vitis*, two cultivars having different level of resistance were compared by counting the numbers and measuring size of the stomata per leaf. In a susceptible cultivar Campbell Early, the number of stomata was more than that of a resistance cultivar 'Kyoho'. In a susceptible cultivar 'Campbell Early', the fungus entered readily into stomata after inoculation. However, in a resistant cultivar 'Kyoho', the fungus seemed to pass over or surrounded only the guard cells. In comparison of height of guard cells of stomata between the two cultivars, significant differences were observed by scanning electron microscopy and light microscopy. The height of guard cells of 'Campbell Early' showed a little higher than those of 'Kyoho' known to be resistant to the fungus.

**Keywords:** Grapevine, Leaf spot, Penetration, *Pseudocercospora vitis*, Stomata

포도나무 갈색무늬병을 일으키는 *Pseudocercospora vitis* (Lév.) Speg.의 분생포자는 내구력이 있고 줄기의 표면 등에 부착하여 월동하고 다음해의 전염원이 되며, 장마기가 길거나 늦여름에 많은 비가 올 경우 발병이 많다고 알려져 있다(Morita 등, 1985; 北島, 1989; 박, 2002).

한편 병원균의 침입과 관련한 기록은 차 등(1999)과 坂神과 工藤(1994)의 저술에 의하면 잎의 기공을 통해 침입한다고 하였으나, 北島(1989)의 저술에 의하면 기공침입을 하지 않는다고 하여 두 기록이 혼재하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 포도 재배국가 중 우리나라에서 특히, 크게 문제가 되고 있는 *P. vitis*에 의한 포도나무 갈색무늬병에 대한 병원균의 접종시험을 통하여 병원성에 대해 알아보고 병원균 접종 후에 감수성 품종과 저항성 품종간 병원균의 식물체 침입과정을 기공구조에 근거한 차이를 고찰하여 침입기작을 구명하고자 수행하였다.

### 재료 및 방법

**분리균의 병원성 검정 및 접종.** 병원성 검정에 이용한 균주는 선행의 연구(박 등, 2006)에서 수집한 87균주 중 총 6개 균주를 선발하여 사용하였다. *Pseudocercospora*

\*Corresponding author

Phone)+82-31-290-6231, Fax)+82-31-290-6259

E-mail) pjhn@rda.go.kr

*vitis*는 균사생장 속도가 매우 느리므로, 우선 PDA 배지에 병원균을 40일 정도 배양한 후 균질기(homogenizer, SMT company PH91)로 균사를 마쇄하여 V8JA 배지에 도말하고, 다시 근자외선(NUV) 등이 설치된  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온기에서 20일 정도 포자 형성을 유도하였다. 형성된 포자는 살균 증류수를 페트리디쉬에 붓고 부드러운 붓으로 긁어 수확한 후, 두 겹의 거즈로 여과하여 포자현탁액을 만들었다. 포자현탁액의 농도는  $1 \times 10^5$  포자/ml로 조절하여 접종원으로 사용하였다. 병원성 검정에는 캠벨얼리 품종의 잎을 사용하였고, 병의 발생을 촉진시키기 위하여 그림빛으로 포자현탁액을 묻혀 잎 뒷면에 접종하였다. 약 2,000 lux의 조명과  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온항습실에 보관하며 발병을 관찰하고, 접종 15일 후에 조사하였다. 식물체의 접종 부위에 형성되는 분생포자의 정도는 잎 뒷면을 육안 관찰하여 조사하였다. 갈색무늬병원균의 포도 잎 침입 과정을 구명하고자, 접종원으로 앞의 시험에서 병원성이 강하고 분생포자 형성이 많은 충주에서 분리한 GCJ-9 균주를 사용하였고, 접종 15일 후에 접종 부위에 형성된 병반을 육안 관찰하여 조사하였다.

**감수성, 저항성 품종간의 병원균 침입과정 비교.** 접종에 이용한 포도 품종은 갈색무늬병에 감수성인 ‘캠벨얼리’와 저항성인 ‘거봉’이며(박, 2002), 고농도의 포자 현탁액을 포도 잎 뒷면에 점접종하였다. 접종 후 포화습도가 유지되는  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온기에 놓아 둔 후, 4시간 간격으로 접종 부위를 약 5 mm×5 mm 절편으로 만들어 고정액에 침지한 후에 전자현미경 검경을 위한 시료를 제작하였다. 이어서 주사전자현미경(Hitachi S2460N)을 이용하여 병원균의 침입 과정을 검경하면서 저항성 품종과 감수성 품종에서의 침입 부위를 중심으로 침입기작의 차이를 구명하였다.

**감수성, 저항성 품종의 기공 수 및 기공구조 비교.** 우리나라에서 가장 많이 재배하는 품종 중, 갈색무늬병에 감수성인 캠벨얼리와 저항성인 거봉 품종의 잎 뒷면에 형성된 기공의 단위면적당 숫자, 크기 및 구조를 비교하기 위해 엽령이 같은 두 품종의 잎을 채취하여 포도 잎의 뒷면에 형성된 기공을 주사전자현미경(Hitachi S2460N)으로 검경하였다. 검경 대상 시료를 5 mm×5 mm 정도로 잘라서 4°C에서 Karnovsky's fixative로 하루 동안 고정한 후, 0.05M(pH 7.2)의 phosphate buffer로 20분씩 3회 세척하고, 1% osmic acid로 4°C에서 2시간 동안 염색하였다. 탈수는 다음과 같은 일련의 ethanol 농도 단계로 탈수를 실시하였다. 50% ethanol에서 30분씩 2회, 75% ethanol에서 30분, 90% ethanol에서 30분, 95% ethanol에서 하루, 100%에서 30분씩 2회, 그리고 100% amyl acetate에서 30분씩

2회 탈수하였다. 건조는 임계점 건조를 실시하였고, 건조가 끝난 시료를 시료대에 접착제로 고정하고 금으로 코팅하여 주사전자현미경으로 검경하였다. 단위면적당 기공의 숫자를 조사하기 위하여, 제작된 시료에서 임의의 지점을 선정하여 150배 현미경 시야 안에 관찰되는 화상에 나타난 기공의 숫자를 조사하였으며, 이 조사는 10반복으로 실시하였다. 또한, 기공의 크기를 측정하기 위하여 주사전자현미경으로 관찰한 임의의 기공을 두 공변세포가 마주치는 장축의 길이를 각각 100개씩 측정하였다. 갈색무늬병에 감수성인 캠벨얼리와 저항성인 거봉 품종의 잎 뒷면에 형성된 기공의 구조를 비교하기 위해 엽령이 같은 두 품종의 잎을 채취 비교하였다. 품종간 기공 구조의 차이는 주사전자현미경으로 확대 검경(1,500배)하면서 각 품종의 특징적인 기공의 구조를 관찰하였다. 또한 품종간 기공 공변세포의 높이의 차이를 관찰하기 위하여 embedding한 시료를 초박절편기(microtome, RMC-MTX)를 사용하여 500 mm 두께로 절단하여 toluidine blue O로 염색한 후에 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

**병원성 검정.** 본 연구를 수행하기 위하여 선발한 6개 균주를 대상으로 병원성 검정을 실시한 결과(Table 1), 6개 균주 모두 병원성을 나타냈으며, 용인에서 채집하여 분리한 GYI-6균주 이외에는 강한 병원성을 나타냈고, 그 중 충주에서 채집하여 분리한 GCJ-9 균주는 병원성도 강하고 접종 후 형성된 병반에 분생포자 수도 현저하게 많이 관찰되어 이 균주를 이용하여 침입에 관한 시험을 수행하였다.

**병원균의 포도 잎 침입.** 갈색무늬병원균의 포도 잎 침입 부위를 구명하기 위한 접종 시험은 캠벨얼리 품종으로 실시하였다. 포도 잎의 앞면에 병원균을 접종한 처리

**Table 1.** Virulence differences of *Pseudocercospora vitis* isolates obtained from grapevine (cv. ‘Chambell Early’) leaves in Korea

Isolates	Locations	Pathogenicity <sup>a</sup>	Degree of sporulation <sup>b</sup>
GSW-2	Suwon	+++	+++
GYI-6	Yongin	++	+
GAS-7	Asan	+++	+++
GCJ-9	Chungju	+++	++++
GYW-10	Youngweol	+++	+++
GSI-11	Sangju	+++	+++

<sup>a</sup>+, weak; ++, moderate; +++, strong.

<sup>b</sup>+, a few; ++, many; +++, more; +++++, most.

**Table 2.** Reaction of adaxial and abaxial surface of grape leaves of 'Champbell Early' *Pseudocercospora vitis* isolates 15 days after inoculation

Isolates	No. of inoculation site	No. of lesion formation	
		Adaxial surface	Abaxial surface
GSW-2	10	0	10
GYI-6	10	0	10
GAS-7	10	0	10
GCJ-9	10	0	10
GYW-10	10	0	10
GSJ-11	10	0	10

구는 전혀 침입이 없으나, 같은 잎의 뒷면에 병원균을 접종한 모든 처리구에서는 접종 15일 후에, 접종 지점 수와 동일한 수의 병반이 형성되었다(Table 2). 이 결과는 *P. vitis*에 의한 포도 갈색무늬병은 포도 잎의 뒷면을 통해서 침입하는 것을 알 수 있었으며, 이는 차 등(1999), 坂神

**Table 3.** Requirement period of lesion formation after inoculation and disease severity of six isolates of *Pseudocercospora vitis*

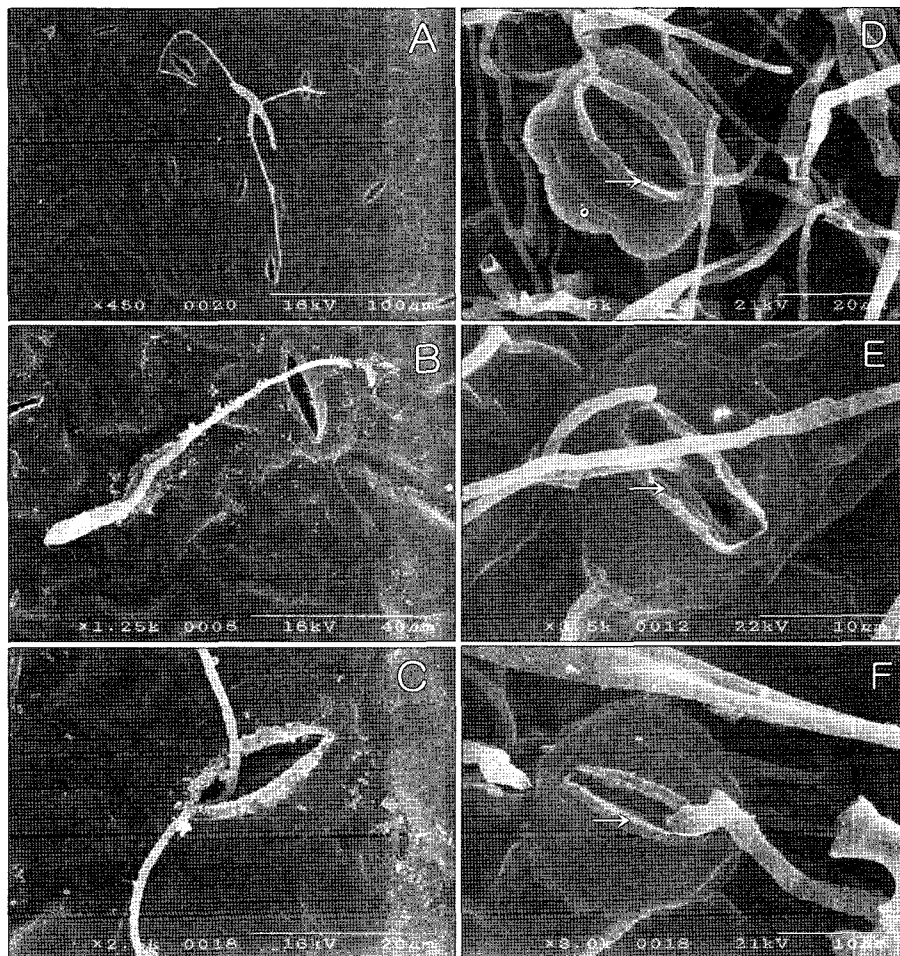
Isolates	No. of inoculation sites	No. of diseased sites		Disease severity <sup>b</sup>
		8 DAI <sup>a</sup>	10 DAI	
GSW-2	10	1	9	++
GYI-6	10	0	7	+
GAS-7	10	0	8	++
GCJ-9	10	3	9	+++
GYW-10	10	0	8	+
GSJ-11	10	7	10	++++

<sup>a</sup>DAI: Days after inoculation.

<sup>b</sup>Disease severity: +, weak; ++, moderate; +++, strong; +++++, severe.

와 工藤(1994)의 기록과 일치하였다.

**저항성, 감수성 품종간의 병원균 침입과정 비교.** 병원균 접종 후에 발병에 소요되는 기간을 조사한 결과(Table

**Fig. 1.** Observation of several penetrating forms of *Pseudocercospora vitis* on grapevine leaf. A, B, C: cv. 'Kyoho', D, E, F: cv. 'Campbell Early'.

3), 접종한 포도 잎의 뒷면에서는 접종 8일 후부터 병반이 나타나기 시작하여, 접종 10일 후에는 거의 모든 병반이 형성되었다. 北島(1989)의 기록에 의한 15~20일의 잠복기간은 포장에서의 잠복기간일 것으로 추측된다. 실제로 우리나라에서 이 병이 많이 발생하는 7월의 장마기에 잦은 강우로 인하여 발병에 좋은 조건이 주어지면 잠복기간은 8~10일 정도로 더 짧아질 것으로 판단되었다. 병원균의 침입과 관련하여 차 등(1999)과 坂神과 工藤(1994)의 기록에 의하면 잎 뒷면의 기공을 통해 침입한다고 하였고, 北島(1989)에 의하면 기공침입을 하지 않는다고 하여 두 기록이 혼재하고 있다. 이 과정을 확인하기 위한 접종시험을 실시함에 있어, 병원균 접종 후 포도 잎을 놓아둔 항온기의 온도와 습도 조건은 다음과 같았다. 온도는  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 가, 상대습도는 100%가 잘 유지되었고, 침입과정을 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope)으로 촬영한 결과는 Fig. 1과 같다. 갈색무늬병에 감수성인 캠벨얼리 품종에서는 잎 뒷면에 부착한 분생포자가 발아하여, 기공을 통하여 직접 식물체 조직 속으로 쉽게 침입하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1D-F). 반면에 갈색무늬병에 저항성인 거봉 품종에서는 분생포자가 기공 근처에서 발아하였어도 기공을 쉽게 인식하여 찾아가지 못하거나, 기공을 찾아도 침입을 하지 못하고 기공을 넘어서 계속 발아하기도 하였다. 또한, 발아관이 기공에 도달하는 도중에 기공 주변을 감싸기도 하고 공변세포에 이

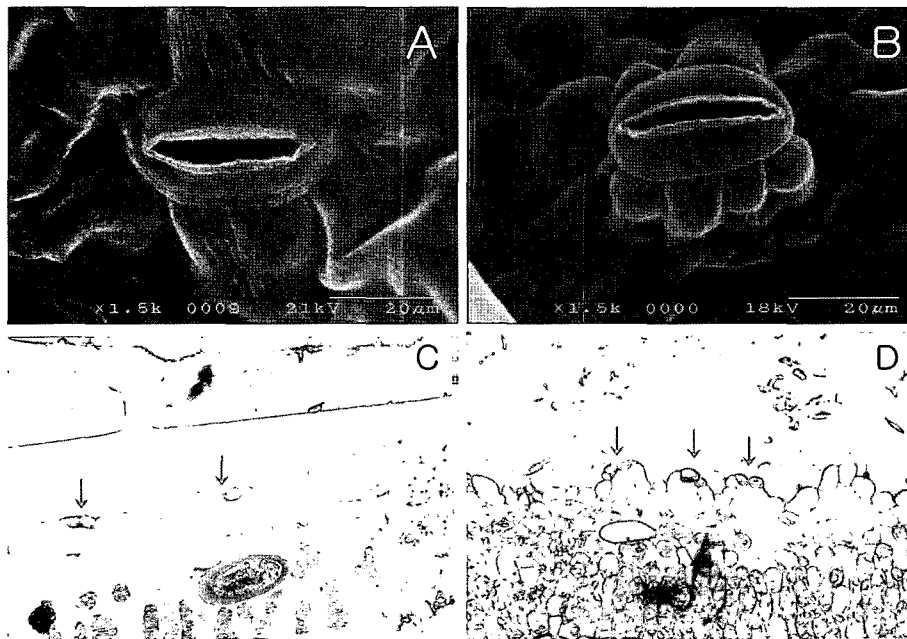
**Table 4.** Comparison of stomata number and size of two cultivars 'Kyoho' and 'Campbell Early'

Cultivars	No. of stomata (/0.53 mm <sup>2</sup> )	Length of stomata (μm)
Kyoho	48.8 ± 4.98 <sup>a</sup>	34.2 ± 4.15
Campbell Early	76.4 ± 10.1	20.63 ± 2.20

<sup>a</sup>Mean ± standard deviation

르러서도 쉽게 기공을 통해 조직 속으로 침입하지 못하였다. 심지어 어렵게 기공을 인식하여 침입을 했어도 계속 발아하면서 감수성 품종과 달리 조직 속으로 침입하지 않고 다시 기공 밖으로 나오는 모습이 관찰되기도 하였다(Fig. 1A-C). 따라서 *P. vitis*에 의한 포도 갈색무늬병의 발생 차이는 병원균의 침입균사가 기공을 인식하여 침입하는 과정의 차이에 기인하는 것으로 판단된다.

**감수성, 저항성 품종의 기공 수 및 기공 구조 비교.** 갈색무늬병에 감수성 품종과 저항성 품종에서의 기공 침입 과정의 차이에 대한 원인을 구명하고자 단위면적당 기공수를 조사한 결과(Table 4), 감수성 품종인 캠벨얼리는  $76.4 \pm 10.1$ 개/0.53 mm<sup>2</sup>인 반면, 저항성인 거봉은  $48.8 \pm 4.98$ 개/0.53 mm<sup>2</sup>로 감수성 품종의 기공 수가 월등히 많았고, 그 크기는 거봉 품종은  $34.2 \pm 4.15$  μm이고 캠벨얼리는  $20.63 \pm 2.20$  μm로 4배체인 거봉 품종이 월등히 컸다. 따라서 *P. vitis*에 의한 포도 갈색무늬병의 침입은 단



**Fig. 2.** Comparison of stomata shape of two cultivars 'Kyoh' (A, C) and 'Campbell Early' (B, D). Arrows in plate C and D represent stomata.

위면적당 기공수가 많고 적은 차이에 따른 침입기회의 다소에 의해 결정되는 것으로 추정된다. 감수성과 저항성 품종의 침입과정의 차이의 원인을 알고자 병원균의 침입구인 기공의 모양을 관찰한 결과(Fig. 2), 저항성인 거봉 품종의 기공은 전체적으로 식물체의 표면과 공변세포와의 높이 차이가 거의 없었던 것이 형태적으로 명확하게 관찰되었다(Fig. 2A와 C). 반면에 감수성인 캠벨얼리 품종의 기공은 전체적으로 식물체의 표면과 공변세포와의 높이 차이가 현저한 것이 형태적으로 명확하게 관찰되었다(Fig. 2B와 D). 이는 녹병균의 발아관은 기주식물의 형태적인 신호를 인식하는 매우 복잡한 능력을 가지고 있으며, 이것이 침입의 가장 중요한 역할을 하게 되고, 기공의 높이 차이에 접촉하는 반응으로 부착기의 형성이 유도되는 특징이 있다는 연구결과(Mendgen 등, 1993; Wolfgang, 1998; Nick 등, 1997)로 해석할 수 있었다. 그러나 시험을 실시한 품종을 비롯하여, 보다 여러 포도 품종의 잎은 물론 기공의 화학적인 물질의 분석을 통한 해석은 추가적인 시험을 수행하여야 가능할 것으로 판단된다.

## 초 록

포도 갈색무늬병균의 침입부위를 알고자 잎의 앞면과 뒷면에 병원균을 접종한 결과 포도 잎의 앞면에 병원균을 접종한 처리구는 전혀 침입이 없었으며, 같은 잎의 뒷면에 병원균을 접종한 모든 처리구에서는 접종 15일 후에, 접종 지점 수와 동일한 수의 병반이 형성되었다. 병원균 접종 후에 발병에 소요되는 기간을 조사한 결과, 포도 잎의 뒷면에 접종한 경우, 접종 8일 후부터 병반이 나타나기 시작하여, 접종 10일 후에는 거의 모든 접종 지점에 병반이 나타났다. 갈색무늬병에 감수성인 캠벨얼리 품종에서는 잎 뒷면에 부착한 분생포자가 발아하여, 기공을 통하여 직접 식물체 조직 속으로 쉽게 침입하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면에 저항성인 거봉 품종에서는 분생포자가 기공 근처에서 발아하였어도 기공을 쉽게 인식하여 찾아가지 못하거나, 기공을 찾아도 침입을 하지 못하고 기공을 넘어서 계속 발아하기도 하였다. 또한 발아관이 기공에 도달하는 도중에 기공 주변을 감싸기도 하고 공변세포에 이르러서도 쉽게 기공을 통해 조직 속으로 침

입하지 못하였다. 심지어 어렵게 기공을 인식하여 침입을 했어도 계속 발아하면서 감수성 품종과 달리 조직 속으로 침입하지 않고 다시 기공 밖으로 나오는 모습이 관찰되기도 하였다. 갈색무늬병에 감수성 품종과 저항성 품종에서의 단위면적당 기공 수를 조사한 결과, 감수성 품종인 캠벨얼리 품종이 저항성 품종인 거봉의 기공 수보다 많았고, 그 크기는 거봉 품종이 컸다. 따라서 갈색무늬병균은 단위면적당 기공 수의 다소가 침입을 좌우하고, 그 크기에 의해 좌우되지는 않는 것으로 추정된다. 저항성인 거봉 품종의 기공은 전체적으로 식물체의 표면과 기공을 구성하는 공변세포와의 높이 차이가 거의 없었던 것이 형태적으로 명확하게 관찰되는 반면, 감수성인 캠벨얼리 품종의 기공은 전체적으로 식물체의 표면과 기공을 구성하는 공변세포와의 높이 차이가 현저한 것을 주사전자현미경과 광학현미경을 이용하여 명확하게 관찰하였다.

## 참고문헌

- 차병진, 차재순, 김정화, 김선규. 1999. 포도 병해충과 생리장애 이렇게 막는다. 도서출판 서원. 서울. pp. 10-77.
- 北島 博. 1989. 果樹病害各論. 養賢堂. pp. 423-424.
- Mendgen, K. and Deising, H. 1993. Infection structure of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*. 124: 192-213.
- Morita, A., Nagano, M., Soda, E. and Takagi, H. 1985. Studies on leaf spot of grape [by *Pseudocercospora vitis*] grown in a plastic green house: Incidence and control. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu* 31: 71-73.
- Nick, D. R., Lesley, J. K., Tony, J. C. and Alan, M. G. 1997. Role of topography sensing for infection-structure differentiation in cereal rust fungi. *Planta* 202: 163-170.
- 박종한. 2002. 포도 노균병과 갈색무늬병 방제기술개발. 농촌진흥청 원예연구소 시험연구보고서 CD-ROM.
- 박종한, 한경숙, 이중섭, 서상태, 장한익, 김홍태. 2006. 포도나무 갈색무늬병균(*Pseudocercospora vitis* (Lév.) Speg.)의 생육에 미치는 온도의 영향과 갈색무늬병 발생 포도나무의 피해해석. *식물병 연구* 12: 10-14.
- 坂神 泰輔, 工藤 晟. 1994. ひと目でわかる果樹の病害蟲. 日本植物防疫協會. pp. 78-109.
- Wolfgang, K. 1998. Fungal Pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 324-328.