

Note Open Access

*Microstroma juglandis*에 의한 호두나무 흰곰팡이병 발생

이상현 · 이승규 · 박지현¹ · 조성은¹ · 신현동^{1*}

국립산림과학원 산림병해충연구과, ¹고려대학교 환경생태공학부

Occurrence of Downy Leaf Spot on *Juglans regia* Caused by *Microstroma juglandis* in Korea

Sang-Hyun Lee, Seung-Kyu Lee, Ji-Hyun Park¹, Sung-Eun Cho¹ and Hyeon-Dong Shin^{1*}

Division of Forest Diseases and Insect Pests, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

¹Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received on September 4, 2011; Revised on September 29, 2011; Accepted on September 29, 2011)

In June 2011, walnuts (*Juglans regia*) from orchards in Kimcheon and Muan, in southern Korea, were found to exhibit downy mildew-like symptoms of a foliar disease. Whitish polygonal efflorescence was produced on the abaxial surface of affected leaves and discolored light green blotches on the corresponding adaxial surfaces. In the later stage of disease development, diseased tissues collapsed and became necrotic. Based on morphological and cultural characteristics, the causal fungus was identified as *Microstroma juglandis*. The sequence of ITS rDNA of the present isolate showed 100% similarity with those of *M. juglandis* obtained from GenBank databases, thus confirming its identity. Pathogenicity tests were conducted on leaves of walnut seedlings, fulfilling Koch's postulates. The disease has been previously reported in North America, Europe, Oceania and some western Asia. This is the first report of downy leaf spot on walnuts in East Asia.

Keywords : Downy leaf spot, *Juglans sinensis*, White mold

호두나무류(*Juglans* spp.)는 가래나무과(Juglandaceae)에 속하는 낙엽활엽교목으로 아시아, 유럽 및 아메리카 대륙에 걸쳐 약 15종이 분포하나, 그 중 8종이 재배되고 있다. 우리나라에서 재배되는 호두나무[*Juglans regia* L. (= *J. sinensis* Dode)]는 4세기 말 중국으로부터 전래된 것으로 추정되고 있다(Kim 등, 2007; Lee 등, 2008). 호두나무는 목재가 단단하고 윤기가 있어 고급가구재나 내장재 등으로 이용되며, 종실은 두뇌 발달에 도움이 되고 강장제나 변비를 없애는데 효험이 있고, 기름은 피부병 치료에 효과가 좋다고 보고되는 등 쓰임새가 많은 나무이다. 호두나무의 상업적 재배는 연평균 12°C 등온선을 중심으로 이루어지고 있는데, 주산지는 천안·영동·김천·무안·무주 등이다. 재배면적은 약 1,200 ha이며 총생산량은 약 1,000톤/년으로 추산된다. 호두나무 재배농가의 조수

익은 11,586천원/ha, 순수익은 4,196천원/ha으로 조사되어 높은 소득액을 나타냈다(Kim과 Lee, 2010).

우리나라에서 호두나무에 발생하는 병해로는 탄저병 등 14가지가 알려져 있는데(Ryu 등, 1993; The Korean Society of Plant Pathology, 2009), 일본에서는 19가지 병해가 보고되었다(The Phytopathological Society of Japan, 2000). 이와 같이 각종 병해가 호두나무 재배에서 발생하고 있지만 아직까지 각 병해의 발생정도 및 피해에 대한 구체적인 조사가 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이에 대한 대책으로 국립산림과학원에서는 실제 호두나무 재배단지에서 발생하는 병해를 조사하고 피해정도를 파악하기 시작하였다. 이 과정에서 지금까지 한국에서 보고된 바 없는 병의 발생이 확인되었다.

2011년 6월 초순에 경상북도 김천시 구성면 마산리의 호두나무 재배지에서 노균병 또는 뒷면흰가루병과 유사한 증상이 처음으로 관찰되었다. 또한 같은 시기에 전라북도 무안군 보안면 상림리의 호두나무 재배지에서도 같은 증상을 나타내는 병든 잎을 다수 채집하였다. 이러한

*Corresponding author

Phone) +82-2-3290-3063, Fax) +82-2-921-1715

Email) hdshin@korea.ac.kr

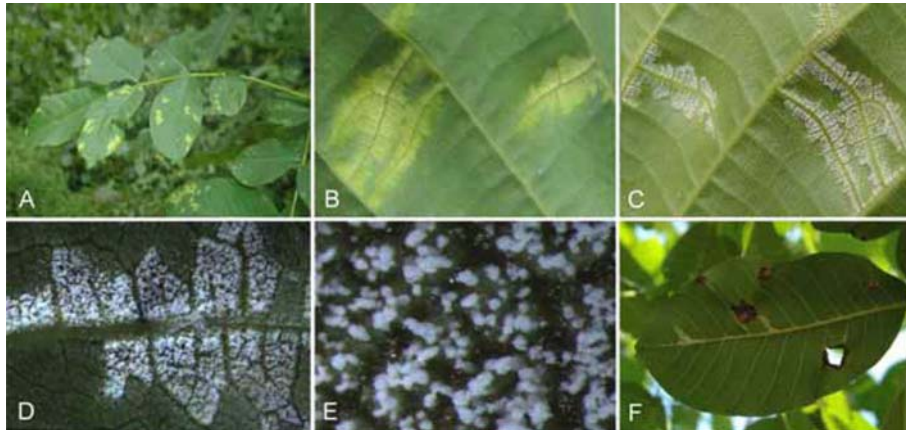


Fig. 1. Symptoms of downy leaf spot on *Juglans regia* caused by *Microstroma juglandis*. **A:** Infected leaves. **B and C:** Comparison of leaf lesions on the adaxial (**B**) and corresponding abaxial (**C**) surface. **D:** Close-up view of angular lesions on the abaxial leaf surface. **E:** Efflorescences of basidial structures on the abaxial leaf surface. **F:** Necrotic lesions in the later stage of disease development.

증상을 나타내는 호두나무 잎으로부터 병원균을 순수분리하여 균학적 특징을 파악하고 병원성을 검정한 결과 *Microstroma juglandis*로 동정되었다. 본 연구에서는 이 병의 병징과 병원균의 균학적 특징 그리고 병원성 검정 결과를 보고한다.

병징 및 발병상황. 잎 뒷면에 엽맥에 의해 제한된 퇴색 부분이 생기므로 전형적인 다각형 병반이 나타났다(Fig. 1A, D). 병세가 심한 경우에는 병든 부분의 조직이 부풀어 오르는데, 흔히 잎 앞면 쪽으로 팽창되므로 뒷면에서는 다소 움푹한 모습을 나타냈다(Fig. 1B, C). 병반이 차츰 확대되면서 오래된 부분에는 흰색의 곰팡이가 서릿발처럼 피어났다(Fig. 1D, E). 이러한 병반에 상응하는 잎 앞면은 퇴색되면서 약간 위로 부풀어 오르며, 차츰 담녹색 내지 황록색으로 변하였다. 병세가 진전됨에 따라 잎이 뒤틀리면서 기형으로 변하였으며, 병든 부분이 괴사되면서 갈색 내지 흑갈색으로 변하며 일부분이 탈락하여 구멍이 뚫리기도 하였다(Fig. 1F).

예비조사(문헌 및 현미경 관찰)를 통하여 이러한 증상은 외국에서 알려진 downy leaf spot[=white mold, 흰곰팡이병(가칭)]이라는 것을 확인하였다. 호두나무에서 이와 유사한 병징을 나타내는 다른 병해가 알려진 바 없으므로, 이와 같은 증상은 흰곰팡이병으로 판단하였고, 발병 상황을 김천과 무안의 6개 재배지에서 개괄적으로 조사하였다. 이들 지역에서 재배되는 호두나무의 품종명은 알 수 없었으나, 수형을 비롯한 여러 특성으로 보아 몇 가지 계통이 존재함을 알 수 있었으며, 이러한 계통에 따라 발병 정도가 다소 다른 것은 인정할 수 있었다(미발표 자료). 이들 재배지에서 흰곰팡이병의 발병률(병징을 나타내는 개체의 백분율)은 10–20%의 범주에 있었으며, 이병

엽울(발병된 개체에서 병징을 가진 잎의 백분율)은 최대 약 40%에 달하였다. 흰곰팡이병에 감염된 잎은 7월 초부터 탄저병도 함께 발생하는 것을 확인하였는데, 이 두 가지 병해의 상호관계에 대해서는 뚜렷한 관련성을 유추하기 어려웠다. 그러나 이러한 복합감염의 경우에는 흰곰팡이병의 단독감염 또는 탄저병의 단독감염에 비하여 피해 면적이 넓고 조기낙엽이 유발되었으며, 7월 초부터 병든 잎은 떨어지기 시작하였다.

병원균의 형태적 특징. 호두나무의 신선한 잎에 생긴 병반으로부터 곰팡이를 절취하여 검경하였다. 이 곰팡이의 분류학적 특성을 파악하거나 크기를 측정하기 위해서는 명시야광학현미경(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 현미경사진은 미분간섭현미경(Axio Imager, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)을 이용하여 촬영하였다. 기공하포(substomatal cavity)에 형성된 위유조직의 자좌(stromata)는 대체로 둥근 편이며, 길이는 30–50 μm 정도였다. 자좌가 다소 돌출되어 있으므로 해부현미경 하에서는 짧은 빨처럼 보였다(Fig. 2A–C). 자좌 위에 형성된 담자기(basidia)는 꽃방석처럼 배열되어 있었다(Fig. 2C, D). 개개의 담자기는 곤봉 모양인데, 길이는 12–22 μm , 폭은 3–5 μm 이었다. 담자포자는 담자기 위에 형성되었는데, 난형 내지 넓은 방추형이며, 무벽의 단세포이며, 무색이며, 대부분 2(–4)개의 기름방울을 가지며, 크기는 5–8.5 \times 2.5–5 μm 이었다(Fig. 2E). 이러한 균학적 특징은 앞선 연구(Garcia-Jimenez, 1995; Kurt 등, 2003; Pires, 1928; Saccardo, 1886; Sinclair와 Lyon, 2005)에서 보고된 호두나무 흰곰팡이병의 병원체인 *Microstroma juglandis*(Berenger) Sacc.와 일치하였다(Table 1).

균주 배양. 병원균의 단포자 균주를 획득하기 위하여

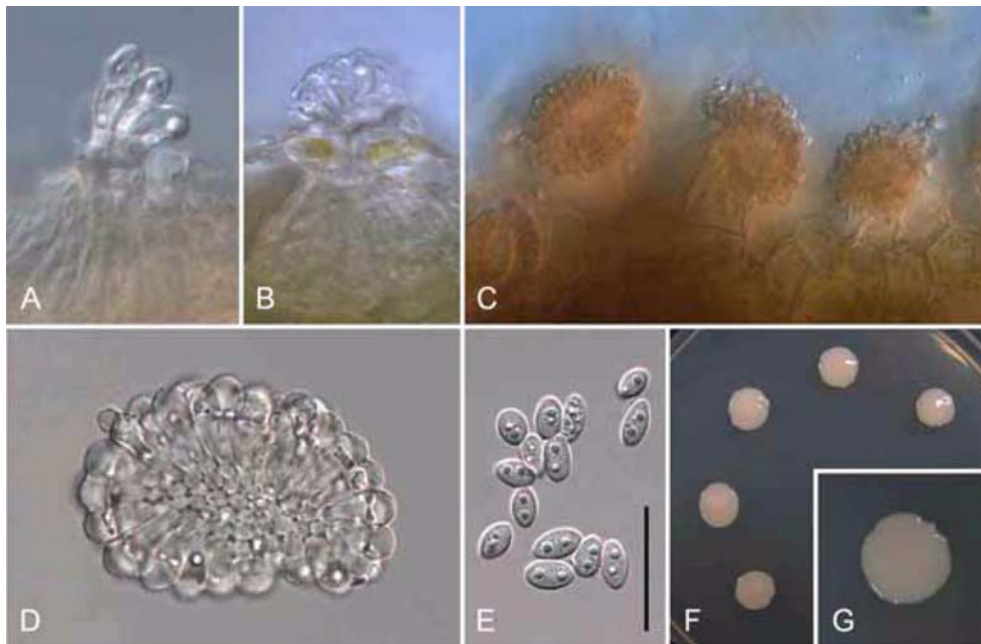


Fig. 2. *Microstroma juglandis* associated with downy leaf spot of *Juglans regia*. **A** and **B**: Young basidia formed on stromata. **C**: Mature basidia. **D**: Upper view of a basidium. **E**: Basidiospores. **F**: Two-week-old colonies on potato dextrose agar. **G**: Close-up view of a colony showing pinkish, mucoid, and yeast-like growth. Scale bar = 20 μ m for **A**, **B**, **D**, **E** and 50 μ m for **C**.

Table 1. Comparison of morphological characteristics of *Microstroma juglandis* examined by different authors

Characteristics	Saccardo (1886)	Pires (1928)	Garcia-Jimenez (1995)	Present isolate
Caespituli	hypogenous	hypogenous	hypogenous	hypogenous
Stroma	— ^a	ca. 35 μ m diam.	—	30–50 μ m diam.
Basidia	obovato-clavate, 18 μ m long	clavate, 17–20 μ m long	—	clavate, 12–22 μ m long
Basidiospores	fusiform to ovoid, hyaline, aseptate, biguttulate, 8 \times 3 μ m	rod-shaped, hyaline, aseptate, —, 5.8–7.3 \times 2–2.9 μ m	—, hyaline, aseptate, —, 3–7 \times 2–3 μ m	fusiform to ovoid, hyaline, aseptate, mostly biguttulate, 5–8 \times 2.5–5 μ m
Host plant	<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans</i> sp.	<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans regia</i>

^aNot described.

희석평판법을 이용하였다. 즉, 병든 조직에 형성된 포자 집단을 떼어낸 후에 슬라이드글라스 위의 멸균수에 희석하여 포자 현탁액을 만들었다. 이 현탁액을 백금루프로 찍어 감자한천평판배지(황산스트렙토마이신 200 μ g/ml 함유)에 도말하였다. 도말 2일 후에 평판배지에 형성된 작은 집락을 새로운 배지에 이식하여 단포자 균주를 획득하였다. 균주는 농촌진흥청 농업미생물유전자원센터에 기탁하여 보존하고 있다(균주번호 KACC46127). 이 균은 배지 상에서 전형적인 효모상 성장을 나타내며, 균층은 점질성이며 분홍색을 나타내었다(Fig. 2F, G). 이러한 성장 특성은 앞선 연구(Garcia-Jimenez, 1995; Kurt 등, 2003)와 일치하였다.

병원성 검정. 병원성 확인을 위하여 직경 25 cm 플라스틱 포트에 2년생 호두나무를 이식하여 이용하였다. 접종원은 감자한천평판배지에 균주를 배양하여 사용하였는데, 농도는 약 10^7 cell/ml로 맞추었다. 대조구로는 멸균수를 이용하였다. 호두나무 잎에 병원균 현탁액을 분무 접종하였으며, 접종 후 2일간 비닐을 씌워 상대습도를 100%로 유지시켰다. 3일째부터는 비닐을 제거하여 유리온실에 두고 발병정도를 관찰하였다. 접종 20일 후부터 자연감염된 호두나무 잎에 나타났던 증상과 동일한 증상이 나타나기 시작하였다. 병징의 발현과 진전은 자연상태에 비하여 더디고 미약하였는데, 이는 인공접종에 의한 감염이 비교적 고온상태에서 이루어졌던 이유 때문인 것으로 판

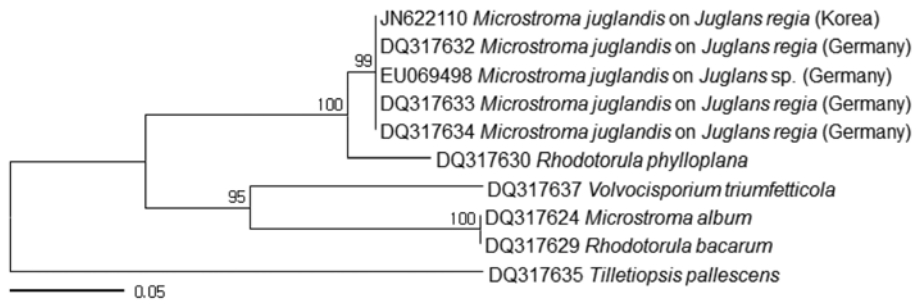


Fig. 3. Phylogenetic relationship between *Microstroma juglandis* and related fungi inferred by neighbor-joining method using sequences of the ITS rDNA region. Numbers above the branches represent the bootstrap values. Bar = Number of nucleotide substitutions per site.

단된다. 한편, 대조구에서는 어떠한 병징도 관찰되지 않았다. 이로써 이 균주의 병원성이 확인되었으며, 코흐의 원칙을 만족시켰다.

균주의 분자적 분석. 분리된 균주(KACC46127)의 동정을 확인하고 기초적인 유전자 정보를 제공하기 위하여 rDNA의 internal transcribed spacer(ITS) 영역을 분석하였다. Lee와 Taylor(1990)의 방법에 따라 균주에서 끊어낸 균사 집단으로부터 rDNA를 추출하였다. ITS 영역은 프라이머 ITS1과 ITS4를 이용하여 증폭하였으며(White 등, 1990), 증폭된 것은 전기영동을 통해 확인한 후에 LaboPass™ PCR kit(Cosmo Genetech, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다. 얻어진 염기서열은 DNASTAR computer package 5.05(Lasergene, Madison, WI, USA)를 이용하여 정리한 뒤, GenBank에 등록하여 Accession number JN622110을 부여받았다. 이 염기서열을 NCBI에서 Blast해 본 결과 앞서 등록되어있는 *Microstroma juglandis*와 100% 일치하는 것으로 나타났다(Beer, 2006). *Microstromataceae*와 관련된 분류군들과 관계를 알아보기 위하여 MEGA 4.0 프로그램을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성한 결과, *M. juglandis*와 같은 clade에 속함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 이러한 분자계통학적 특성을 바탕으로 우리나라에서 발생한 호두나무 흰곰팡이병의 병원균이 *M. juglandis*임을 재확인하였다.

호두나무 흰곰팡이병은 북미(미국, 캐나다), 유럽(불가리아, 영국, 그리스, 독일, 이탈리아, 폴란드, 스페인, 러시아), 오세아니아(호주, 뉴질랜드), 그리고 서아시아 지역(인도, 파키스탄, 터키, 중국의 북서부)에서 보고되었다(Farr and Rossman, 2011; Zhuang, 2005). 한편, 일본에서 호두나무 흰곰팡이병의 발생 기록은 문헌적 오류라고 하며(The Phytopathological Society of Japan, 2000), Sawada(1950)에 의하면 왕가래나무(*Juglans sieboldiana* Max.)에서 1917년과 1919년에 이 곰팡이가 채집되었다고 한다. 따라서 한국에서 호두나무에 이 병이 보고된 것은

적어도 동아시아에서 최초이다.

최근 터키(Kurt 등, 2003)에서 보고된 바에 의하면, 호두 주산지인 Antakya 지역의 12개 및 Altinozu 지역의 5개 재배지를 조사한 결과, 발병률(병징을 나타내는 개체의 백분율)이 무려 69-87%에 이르렀다고 한다. 이러한 감염에 의해 호두 생산량의 감소 및 품질 하락이 초래된다는 구체적인 조사 자료는 없지만, 적어도 조기낙엽 및 수세의 약화 등으로 인하여 상당한 피해를 초래하는 것으로 추정되었다. 따라서 한국에서 이 병의 발생상황 등에 대한 상세한 조사가 이루어지고, 예방 및 방제대책이 강구되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

2011년 6월에 김천과 무안의 호두나무 재배지에서 잎에 노균병 병징과 유사한 증상이 관찰되었다. 병든 잎의 뒷면에는 다각형의 병반에 흰색의 곰팡이가 눈꽃처럼 형성되었고, 상응하는 잎의 앞면에는 퇴록 부분이 생겼다. 병세가 진전되면서 병든 조직은 붕괴되었고 나중에는 괴사되었다. 이 병의 원인균은 형태적 및 배양적 특징으로 보아 *Microstroma juglandis*로 동정되었다. 또한 균주의 ITS rDNA 염기서열을 GenBank에 등록된 *M. juglandis*의 자료와 비교하여 100% 일치함을 확인하였다. 호두나무 묘목에 병원성 검정을 실시하여 코흐의 원칙을 만족시켰다. 이 병은 지금까지 북미, 유럽, 오세아니아 그리고 서아시아(인도, 파키스탄, 터키)에서 보고되었다. 이 연구를 통하여 한국을 포함한 동아시아에서는 이 병을 처음으로 보고하며, 병명은 ‘호두나무 흰곰팡이병’으로 제안한다.

References

Beer, Z. W. de. 2006. Phylogeny of the *Quambalariaceae* fam. nov., including important *Eucalyptus* pathogens in South Africa and Australia. *Stud. Mycol.* 55: 289-298.

- Farr, D. F. and Rossman, A. Y. 2011. Fungal databases. systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA. Retrieved August 27, 2011, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Garcia-Jimenez, J., Armengol, J. and Martinex-Ferrer, G. 1995. First report of downy spot of walnuts caused by *Microstroma juglandis* in Spain. *Plant Dis.* 79: 860.
- Kim, J. S. and Lee, U. 2010. Analysis of production cost of walnut tree cultivation in major cultivating regions. *J. Korean For. Soc.* 99: 611–617.
- Kim, W. J. 2007. 100 Selections of useful trees in Korea. Korea Forest Research Institute, Seoul, Korea. (In Korean)
- Kurt, S., Soylu, E. M. and Soylu, S. 2003. First report of downy leaf spot of walnuts caused by *Microstroma juglandis* in Turkey. *Plant Pathol.* 52: 409.
- Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and applications, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, pp. 282–287. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Lee, U. 2008. Cultivation technique of fruit trees for better Production. Korea Forest Research Institute, Seoul, Korea. (In Korean)
- Pires, V. M. 1928. Concerning the morphology of *Microstroma* and the taxonomic position of the genus. *Am. J. Bot.* 15: 132–140.
- Ryu, H. Y., Lee, Y. H., Cho, W. D., Kim, W. K., Myung, I. S. and Jin, K. S. 1993. Compendium of fruit tree diseases with color plates. Nat. Inst. Agric. Sci. Tech., Rural Development Administration, Suwon, Korea. 286 pp. (In Korean)
- Saccardo, P. A. 1886. Sylloge fungorum IV. pp. 8–9
- Sawada, K. 1950. Fungi of the north-eastern region of Honshu, Japan (2). Basidiomycetes. *Tohoku Biol. Res.* 1: 95–100.
- Sinclair, W. A. and Lyon, H. H. 2005. Disease of trees and shrubs. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca and London.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea. 5th ed., Suwon, Korea. (In Korean)
- The Phytopathological Society of Japan. 2000. Common names of plant diseases in Japan. Japan Plant Protection Association, Tokyo, Japan. 856 pp. (In Japanese)
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A guide to methods and applications, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, pp. 315–322. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Zhuang, W. Y. (ed.) 2005. Fungi of Northwestern China. Mycotaxon, Ltd., Ithaca, NY, 430 pp.