

## 밤나무 종실에 발생하는 탄저병균의 분리 및 친환경적 방제\*

김영재\*\*\* · 강길남\*\*\* · 김종우\*\*\* · 김영명\*\*\* · 이상현\*\*\* · 홍석일\*\*\*\* ·  
이재준\*\*\*\* · 이현수\*\* · 김영권\*\*\*\* · 박인서\*\*\*\*\* · 조용구\*\*\*\*\*

### Biological Control & Isolation of Chestnut Diseases by *Colletotrichum Goeosporioides*

Kim, Young-Jae · Kim, Young-Jae · Kang, Kil-Nam · Kim, Jong-Woo ·  
Kim, Young-Myung · Lee, Sang-Hyeon · Hong, Suk-Il · Lee, Jae-Jun ·  
Lee, Hyun-Su · Kim, Young-Kwon · Park, In-Seo · Cho, Yong-Gu

In order to acquire morphological characteristics and genetic characteristics of pathogen that causes anthrax to chestnut, anthrax was separate and identified in Gongju, chungnam chestnut plantation. Antagonistic microorganisms and plant extracts were selected for control of anthrax. Medium maturing variety treatment of 250 dilution fold in field was control at 71.2% and treatment of 500 dilution fold was control at 64.4% and treatment of 1000 dilution fold was control at 40.7%. Storage control value of Jabong in 25°C after treatment in field is 61.7% at 250 dilution fold, 62.8% at 500 dilution fold, 40.9% at 1000 dilution fold treatment.

Key words : *colletotrichum gloeosporioides*, chestnut, antagonistic microorganism, biological control

---

\* 본 연구는 2012-2013년도 충남 산림자원연구소의 연구비 지원으로 수행된 결과이며 연구비 지원에 감사드립니다.

\*\* Corresponding author, Koreabio Co., Ltd.(E-mail : ihappynow@naver.com)

\*\*\* Chungcheongnam-do Institute of Forest Environment Research Institute

\*\*\*\* Koreabio Co., Ltd.

\*\*\*\*\* Department of Crop Science, Chungbuk National University

## I. 서 론

단기소득임산물인 밤나무는 농산촌 소득증대를 목적으로 1960년대 말부터 정책적으로 식재되기 시작하여, 1990년대 초 약 8만ha까지 도달하였고 단일 품목으로는 매년 7천만 불 내외의 수출을 기록할 정도로 최대 수출품목으로 자리매김 하였다. 2000년대로 접어들면서, 약 6만ha 이하로 감소하였으며, 대외적으로는 중국이 1990년대 후반부터 중국의 밤 재배 진흥정책으로 인해, 수출시장이 치열한 경쟁을 하게 되었다.

밤나무에 발생하는 병해에는 밤나무줄기마름병(*Cryphonectria parasitica* (Murri) Barr), 역병(*Phytophthora* spp.), 종실탄저병(*C. gloeosporioides* Penz) 등이 있다(Korea Forest Service, 2012). 종실탄저병의 특징은 눈 또는 가지에서 균사상태로 월동하고, 다음해 봄에 다량의 포자를 형성하여 밤송이와 과실 등에 피해를 준다. 빗물에 의해 전파되므로, 강수량이 많은 해에 발생이 많다.

우리나라에서는 밤나무에 발생하는 탄저병에 대한 연구가 많이 이루어지지 않았다. 21세기 들어, 일반 국민들 및 농업계, 정부내에서도 친환경농업이 강조되고 있다. 이는 무엇보다도 소비자들의 안전 농산물에 대한 요구 증대 때문인 것으로 판단된다(Ha, 2003).

본 연구에서는 *Colletotrichum gloeosporioides*를 이용한 밤나무 종실에 나타나는 탄저병의 생물적 방제의 기초를 마련하기 위하여, 우리나라 주요 밤나무 재배단지에서 밤나무 및 밤나무 종실에 탄저병을 일으키는 *C. gloeosporioides*의 생육 특징을 규명 및 분리 동정하고자 하였다. 또한, 종실탄저병에 대한 친환경 방제 방법의 방안을 마련하여, 안전한 먹거리 형성에 기여하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 병원균의 분리 및 동정

20012년에서 2013년까지 우리나라 주요 밤나무 재배단지인 충남 공주지역에서 탄저병 증상을 보이는 밤나무 종실에서 재배 단지내 무작위로 8-9월 채취하였다. 표면 소독한 실험용 칼로 밤나무 종실의 주두를 중심으로 반으로 가르고, 병이 진전되는 가장자리를 지름 5mm<sup>2</sup> 균사 조각으로 잘라서, 0.5% sodium hypochloride에 1분간 표면 살균하고 멸균수에 3회 세척한 후, PDA plate에 치상한 후 25℃ 항온기에서 6일간 암배양하였다.

분리된 병원균의 동정은 포자의 형태나 크기를 조사하여 실시하였다. 분리한 균의 동정을 위하여, 균 분석기관 마크로젠에 의뢰하여 ITS 분석법으로 염기서열을 분석하였다. 해독한 염기서열은 NCBI Genebank에서 Blast search하여 분류학적 위치를 비교하였다.

## 2. *C. gloeosporioides*의 배양 특성

*C. gloeosporioides*의 배양 특성을 알아보기 위하여, 배지, pH, 온도 등을 알아보았다. 배지원을 알아보기 위하여 PDA, PDAmb, MEa 배지를 사용하였다. pH 특성을 조사하기 위하여 4.5~7.0 범위에서의 배양 특성을 알아보았다. 10~31°C 범위의 온도에서 8일간 실험하였다. 균총의 지름을 2일 간격으로 총 4회 측정하였으며, 각 배지당 3반복으로 실험하였다. 배지의 pH는 1N NaOH 및 1N HCl을 첨가하여 조절하였으며, plate는 내부지름 87mm인 것을 사용하였고, pH별로 3반복으로 실험하였다.

## 3. 병원성 검정

클린벤치 내에서 밤나무 종실을 0.5% 차아염소산나트륨으로 약 1분간 침지 소독함과 동시에 용액 상층부에 뜨는 밤나무 종실은 제외시켰다. 밤나무 종실을 꺼낸 후, 증류수로 세척한 후, 다시 풍건하여 사용하였다.

밤나무 종실 접종실험은 2가지 방법으로 접종하였다. 첫 번째 방법은 밤나무 종실의 주두 부분에  $1 \times 10^5$  cfu/ml의 밀도인 *C. gloeosporioides* 배양액을 멸균된 일회용 주사기(Greenject-30)로 약 0.1ml 가량 접종하였으며, 두 번째 방법으로는 멸균된 칼로 밤을 2등분한 후, PDA 배지에 배양된 *C. gloeosporioides* 5mm<sup>2</sup> 조각을 2등분된 밤나무 종실 주두 부분 위에 치상하였다. 접종된 밤나무 종실 처리구는 25°C 인큐베이터에 약 7일간 암조건으로 방치 후 관찰하였다.

## 4. 항균물질 검정 및 시제품 조제

### 1) 밤나무 종실에 감염하는 *C. gloeosporioides* 등에 미생물 및 추출물 합제에 따른 시너지 효과검정

80% Eucalyptus oil 10, 100, 500배 및 Eugenol 10, 100, 500배에 *B. amyloliquefaciens* KB-MJK601 대사산물 10배액 및 *B. subtilis* GG95 대사산물 10배로 각각 혼합된 액을 PDA 배지로 제조하였다. 각 혼합액으로 제조된 PDA plate에 *C. gloeosporioides*를 5mm<sup>2</sup> 크기의 균사조각으로 치상한 후, 25°C 인큐베이터에서 6일간 암배양하였다. 6일후, 균총의 크기를 비교 조사하였다.

### 2) 밤나무 종실에 감염하는 *C. gloeosporioides*에 대한 방제제 제조

상기에서 선별된 미생물 및 식물추출물 등을 이용하여 제형화를 시도하였다. 유화제는 polyoxyethylene dodecyl mono ether와 castor oi, ethoxylated 및 ployoxyethylene sorbitan mono-

oleate를 사용하였고, 각 처리구는 1%, 3%, 5%, 10%의 농도로 배합하여, 10배 및 500배로 유화정도를 비교하였다. 생분해성 접착제를 이용한 고착제는 차나무추출물, Gellatin, Xanthan gum, Rosin, Glycerol 등의 점질성을 이용하여 방제제내 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1.0% 농도에서의 고착력 및 배합내 물성안정성 등을 점검하였다. 10~200ppm의 범위의 분산제로 제품내에 혼합 후, 500배로 희석하여, 현미경으로 포자의 묻쳐있는 상태를 확인후, 물성의 이상 유무를 육안관찰하고 유화여부를 육안으로 관찰하여, 최종 배합하였다.

## 5. 밤나무 종실에 감염하는 *C. gloeosporioides*에 대한 방제제 효과 점검

### 1) 포장 방제 효과 점검

#### (1) 이병송이율 조사를 통한 처리 농도별 효과 검증

시험포장은 충남 공주시 보흥리 소재의 서림농원에서 실시하였다. 2012년도에는 시제품을 500배로 하여, 1주일 간격으로 3회 처리 후 밤나무 종실(품종 : 자봉)에 대한 이병과율을 조사하였다. 낙과되거나 달려있는 종실중에 탄저병으로 의심되는 밤나무 종실에 대한 이병과율에 대하여 조사를 실시하였다.

2013년도에는 1차 처리 3일전에 PDB 배지에서 배양된 분리균 *C. gloeosporioides* 배양액을  $1 \times 10^5$ cfu/ml 수준으로 밤나무에 spray 처리하였고, 1주일 간격으로 7/18, 7/23, 8/7, 8/21에 총 4회 처리 후 밤나무 종실에 대한 이병과율을 조사하였다. 중생종인 자봉 품종은 시제품을 250배, 500배, 1,000배로 처리하였고, 조생종인 단택 및 만생종 공주1호는 시제품을 500배로 처리하였으며, 이병과율을 비교하였다.

이병송이율의 조사방법은, 낙과된 밤나무 종실 중에 탄저병으로 의심되는 밤나무 종실 및 착과된 상태의 밤나무 종실중 이병된 송이를 합산하여 이병송이율을 조사하였다. 8월 7일과 8월 21일에 조사한 값을 합하여 최종 방제효과를 산출하였다.

#### (2) 수확후 저장성 확인을 통한 처리 농도별 효과 검증

조생종인 단택은 8월 21일에 수확하였으며, 수확후 2주 및 4주후에 부패과율을 조사하였다. 처리구는 4°C 및 25°C에서 비닐에 넣어 보관하였으며, 각각 약 30일 및 약 14일간 인큐베이터에 방치 후 조사하였다. 중생종인 자봉은 9월 21일과 9월 27일에 수확하였으며, 조사하는 수확후 약 2주후인 10월 10일에 전체 수확과수에 대한 부패과율을 조사하였다. 처리구별로 25°C에서 비닐에 넣어 보관하였으며, 약 14일간 인큐베이터에 방치 후 조사하였다.

### 2) 실내 방제 효과 검증

밤송이를 0.5% 차아염소산나트륨(NaOCl)으로 약 1분간 침지 소독함과 동시에 용액 상층부에 뜨는 썩은 밤나무 종실은 제외시켰다. 밤나무 종실을 꺼낸 후, 증류수로 세척 후, 풍건

하였다. 시제품 250~1,000배액에 3분간 침지된 밤나무 종실을 풍건한 후, 밤나무 종실 전체에 PDB 배지에서 배양된 *C. gloeosporioides* 배양액을  $1 \times 10^5$  cfu/ml 수준으로 spray 처리하였다. 처리된 밤송이를 멸균된 유리병에 넣고, 유리병의 입구를 멸균된 은박지로 감싼 뒤, 절대습도 95% 이상으로 유지하여 25°C 인큐베이터에 암배양하여 발병을 유도후, 약 2주후 처리구별 결과를 관찰하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 병원균의 분리

밤송이에서 병원균인 탄저병균으로 의심되는 *C. gloeosporioides*를 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 25°C 조건에서 암배양하여 분리하였다.



Fig. 1. Separation of *C. gloeosporioides* to chestnut

#### 2. 분리한 균의 동정

##### 1) 형태적 동정

형태적 특징상 *C. gloeosporioides*로 동정되었다. 처음에 약간의 연분홍색을 띤 흰색의 균사체로 자라다가, 가운데 부분부터 진한 회색으로 변하고, 환을 띠는 것으로 관찰되었다. 분생포자는 무격막 상태였고, 투명한 색의 양쪽끝이 둥근 타원형 모양이었으며, 크기는  $13.03\text{-}22.70 \times 3.70\text{-}6.77$  (평균  $15.85 \times 5.34$ )  $\mu\text{m}$ 이었다.

##### 2) 유전자 수준에서의 동정

유연 관계도를 작성한 결과, *C. gloeosporioides*로 동정되었다.

### 3) *C. gloeosporioides*의 배양 특성

MEA 배지에서서의 균사 성장 속도는 빨랐으나, 포자의 형성은 PDA에서 우수했고, pH는 pH 6.5~7.0, 온도는 25~28℃에서 가장 왕성하였다.

### 3. 병원성 검정

*C. gloeosporioides* 배양액 처리구 및 병원균 조각 치상 처리구 모두에서 포장과 동일한 병징이 관찰되었고, 동일한 균이 재분리되었다.



Treatment by syringe



Treatment by hypha

Fig. 2. Inoculation of *C. gloeosporioides*

### 4. 항균물질 검정 및 시제품 조제

#### 1) 미생물 및 식물추출물의 시너지 효과 선별

*B. subtilis* GG95 대사산물 10배액을 혼합한 처리구에서 미혼합 처리구보다 균 성장 저해율이 상대적으로 높은 것으로 조사되었다.

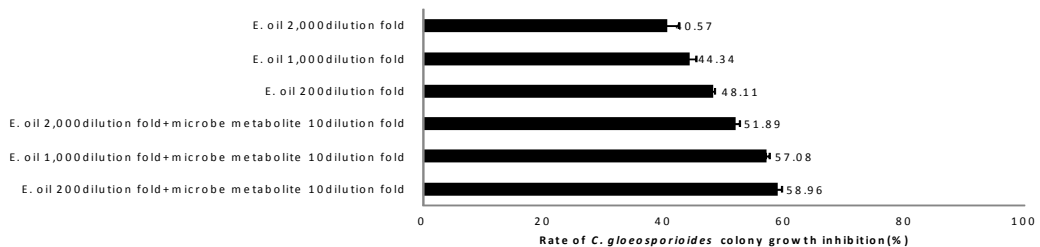
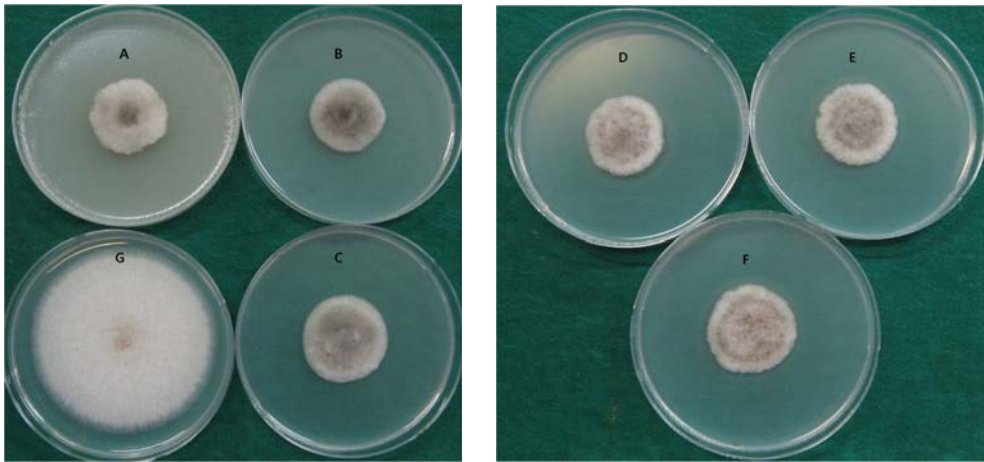


Fig. 3. The synergistic effect of plant extracts & microorganisms



- A Eucalyptus oil 200dilution fold + *B. subtilis* GG95 10dilution fold
- B Eucalyptus oil 1,000dilution fold + *B. subtilis* GG95 10dilution fold
- C Eucalyptus oil 2,000dilution fold + *B. subtilis* GG95 10dilution fold
- D Eucalyptus oil 200dilution fold
- E Eucalyptus oil 1,000dilution fold
- F Eucalyptus oil 2,000dilution fold
- G Nontreatment

Fig. 4. The synergistic effect of plant extracts & microorganisms

## 2) 밤나무 종실에 감염하는 *C. gloeosporioides*에 대한 방제제 제조

유화제는 castor oil, ethoxylated 5% 내외, 고착제는 송진추출물 5% 내외, 확산제는 Pol-yalkyleneoxide Modified Heptamethy ltrisiloxane 5% 내외로 정하였다. 따라서 배합은, 80% Eucalyptus oil 40%, 미생물 배양액(GG95) 40%외에 제제화용 첨가제 20%로 조성하였다.

## 5. 밤나무 종실에 감염하는 *C. gloeosporioides*에 대한 방제제 효과 점검

### 1) 포장 방제 효과 점검

#### (1) 이병송이울 조사를 통한 처리 농도별 효과 검증

2012년도 포장 500배 처리구의 방제가는 60.9%로 조사되고, 2013년 자봉 품종에 대한 방제가는 250배 처리구가 71.2%로 가장 높았다. 유과기부터 처리한 만생종의 방제가는 69.8%로 가장 높은 것으로 보아, 과가 어릴 때부터 방제하면, 방제가를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

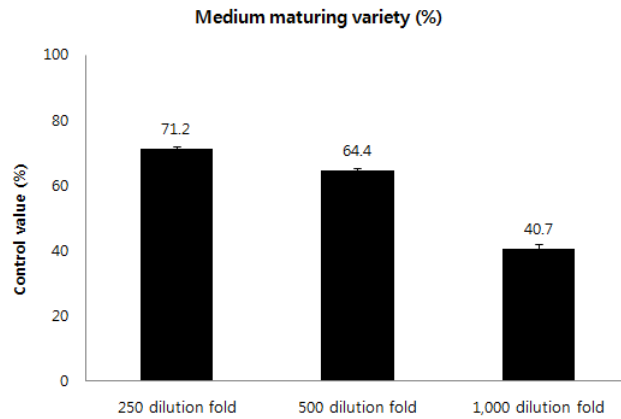


Fig. 5. Control value of spraying to chestnut tree (medium maturing variety) in 2013 year

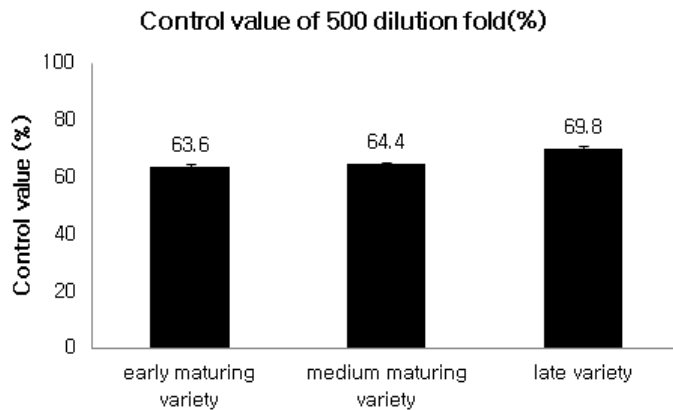


Fig. 6. Control value of spraying to chestnut tree (early maturing variety, medium maturing variety, late variety) in 2013 year

#### (2) 수확후 저장성 확인을 통한 처리 농도별 효과 검증

중생종인 자봉에 대한 250배, 500배 포장 처리구의 방제가는 각각 62.8%와 61.7%의 방제 효과를 나타내었다. 1,000배 처리구에서는 40.9%로 낮은 방제가를 나타내므로, 최소한 500 배 이상으로 약제처리해야 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

중생종 단택의 4℃ 저장에서의 방제효과는 시제품 500배 처리구가 무처리대비 약 61.9%로 조사되었다. 25℃ 저장에서의 방제효과는, 시제품 500배 처리구가 63.2%의 방제가로 조사되었다.



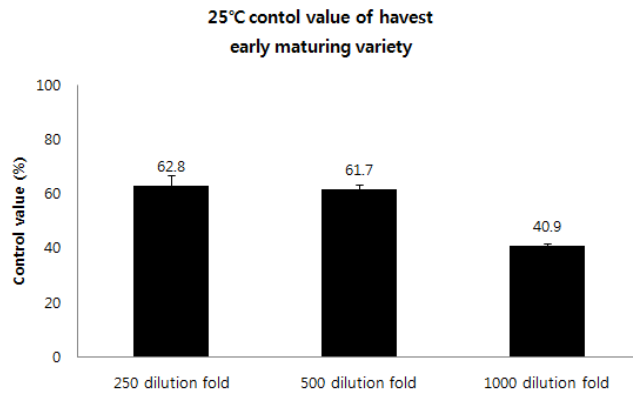


Fig. 7. Damage rate of treatment to chestnut tree (medium maturing variety) in 2013 year



Treatment (250 times dilution)



Treatment (500 times dilution)



Treatment (1,000 times dilution)



Nontreatment

Fig. 8. Treatment to chestnut tree (medium maturing variety) in 2013 year

2) 실내 방제 효과 검정

시제품 250배에서 81.16%이며, 500배의 방제가는 75.36%이고, 1,000배의 방제가는 59.42

%로 측정되었으므로, 약제 처리시 최소 500배 이상의 처리가 필요시 될 것으로 판단되며, 포장에서 500배 처리 4회 이후에 실내 처리 500배까지 겹하여 밤을 보관하면, *C. gloeosporioides*에 대한 방제효과를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

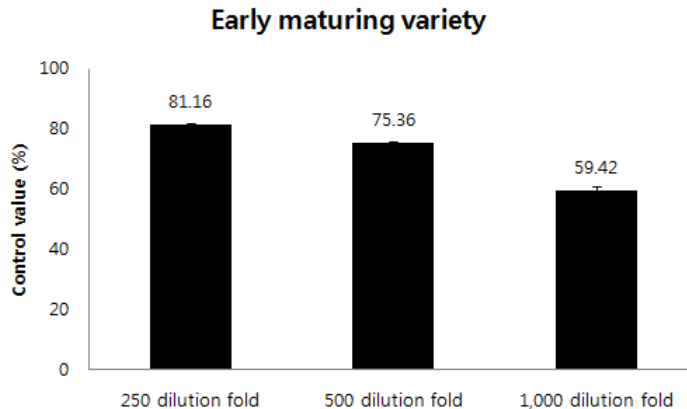


Fig. 9. Control value of treatment to chestnut (early maturing cultivar) in 2013 year

## Ⅵ. 요 약

본 실험에 사용한 *C. gloeosporioides*는 밤나무 재배단지에서 탄저병 증상을 보이는 밤나무 종실로부터 분리하였고, ITS 영역 유전자의 염기서열 및 형태학적 분석을 통하여, *C. gloeosporioides*로 동정하였다.

병원성 검정실험에서, 80% Eucalyptus oil 및 *B. subtilis* GG95 10배액 처리구가 *C. gloeosporioides*에 대한 항균효과가 우수하였고, 최종배합은 Eucalyptus oil 40%, *B. subtilis* GG95 40% 외 제제화용 첨가제 20%로 하였다.

2012년도 포장실험에서, 자봉 품종 시제품 500배 4회 처리구의 방제가 무처리구 대비 60.9%로 조사되었고, 2013년도 포장실험에서, 자봉 품종의 방제는 250배 처리구가 71.2%로 가장 높았다. 조생종 및 중생종보다 만생종에서의 방제가 69.8%로 가장 높은 것으로 보아, 착과이후 종실이 작을 때부터 약제 처리를 하면, 방제가를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

포장 500배 4회 처리후 수확물인 조생종 단택에서는 4℃ 저장에서의 방제효과는 약 61.9%로 조사되었고, 25℃ 저장에서의 방제효과는 63.2%의 방제가로 조사되었고, 실내 단태 품종에 대한 방제가는, 250배에서 81.16%, 500배에서 75.36%로 측정되었으나, 1000배의 효과는 낮은 편이므로, 최소한 500배 이상의 처리가 필요시 된다.

상기의 결과를 바탕으로 밤나무 종실에 발생하는 탄저병을 효율적으로 방제하기 위해서

는 착과 이후 개발제품을 500배 희석농도로 4회 경엽처리하고 수확후 250배로 침지 처리한 후 저장하는 것이 가장 효율적인 방법으로 판단된다.

[논문접수일 : 2013. 11. 4. 논문수정일 : 2013. 11. 18. 최종논문접수일 : 2013. 11. 19.]

## Reference

1. A. IUaciquete, L. Korsten, and J. E. Van der Waals. 2013. Epidemiology of cashew anthracnose (*C. gloeosporioides* Penz) in Mozambique.
2. Ana Maria Queijeiro Lopez, and John Alexander Licas. 2010. Reaction of dwarf cashew clones to *C. gloeosporioides* isolates Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) 67(2): 228-235.
3. Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *C. gloeosporioides* species complex. STUDIES IN MYCOLOGY 73: 115-180.
4. Bo Liu, Frank J. Louws, Turner B. Sutton, and James C. Correll. 2011. A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. European Journal of Plant Pathology. 132(4): 593-607.
5. Chesetnut yield based on standard research. 2012. Korea Forest Service. p. 4.
6. Choi, Y. H. 2010. National Academy of Agricultural Science. Natural crop protection ingredients: plant.
7. Cultivation technology diffusion items of the chestnut specialization. 2012. Korea Forest Service. pp. 224-225, 251-252.
8. Forest crops. 2012. Statistics Korea.
9. Ha, Y. H. 2003. The twenty-first century. Policy direction of sustainable agriculture. p. 3.
10. Hwang, M. S., S. I. Hwang, W. Lee, M. J. Kim, Y. H. Kwon, J. K. Byun, S. W. Lee, S. H. Lee, S. T. Seo, and K. S. Choi. 2010. Chestnut cultivation management technology, eco-friendly. pp. 2-3.
11. Hyde, K. D., L. Cai, P. F. Cannon, J. A. Crouch, P. W. Crous, U. Damm, P. H. Goodwin, H. Chen, P. R. Johnston, E. B. G. Jones, Z. Y. Liu, E. H. C. McKenzie, J. Moriwaki, P. Noireung, S. R. Pennycook, L. H. Pfenning, H. Prihastuti, T. Sato, R. G. Shivas, Y. P. Tan, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, Y. L. Yang, and J. Z. Zhang. 2009. *Colletotrichum* - names in current use. Fungal Diversity 39: 147-182.
12. Industry Trends in China chestnut. 2002. Korea Forest Service. p. 13, pp. 27-29.

13. Kim, M. J., S. C. Kim, and W. Lee. 2006. Chestnut cultivars in Korea. Korea Forest Research Institute. pp. 37-41, 162-166.
14. Korea Agricultural Policy. 2009. Korea Agricultural Policy No. 547. Increasing chestnut farmer friendly certification
15. Lee, S. H. 2012. Anthrax chestnut seed. Forestry Science and Information No. 174. pp. 1-2.
16. Carrington, M. E., P. D. Roberts, R. J. McGovern, and J. J. Mullahey. 2001. Premature Fluit Drop in Saw Palmettos Caused by *C. gloeosporioides*. Plant Disease 85(2): 122.
17. Peres, N. A., L. W. Timmer, J. E. Adaskaveg, and J. C. Correll. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. 2005. Plant Disease 89(8): 784.
18. Oh, S. J. 2012. Korea, and China of the chestnut Industry Trends. p. 5.
19. Stanley freeman, Ezra shabi, and Tama katan, 2000. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*anemone coronaria* L.). Applied and environmental microbiology. 66(12): 5267-5272.
20. Stanley Freeman, Talma katan snd Ezra shabi. 1998. Plant disease. 82(6): 596-605.
21. Sung, I. H. 2009. Fungicidal effect of Eucalyptus oil refinery and Eucalyptol against *Candida albicans*. Korean Journal of Medical Mycology. 14(3): 127-132.
22. Sutton, B. C. 1980. The Coleomycetes. Commonwealth Mycological Institute., England. p. 696.
23. Yang, S. Y., Su, S. C., T. Liu, G. Fan, and J. Wang. 2011. First Report of Anthracnose Caused by *C. gloeosporioides* on Pistachio (*Pistacia vera*) in China. Plant Disease. 95(10): 1,314.1-1,314.1