

배 검은별무늬병균(*Venturia nashicola*)의 균사 생장에 대한 배지 조성의 영향

유정필 · 민광현 · 임순희¹ · 송장훈¹ · 최장전¹ · 이상현 · 김월수 · 조백호 · 양광열*

전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부, ¹농촌진흥청 원예특작과학원 배시협장

Effect of Medium Compositions on the Mycelial Growth of *Venturia nashicola* causing Pear Scab

Jeong-Pil Ryu, Kwang-Hyun Min, Sun Hee Yim¹, Jang Hoon Song¹, Jang Jeon Choi¹,
Sang Hyun Lee, Wol Soo Kim, Baik Ho Cho and Kwang-Yeol Yang*

Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture and Life Science,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea;

¹Pear Research Station, National Institute of Horticultural and Herbal Science, 1034-68
Godong-ri, Geumcheon-myeon, Naju 520-821, Korea

*Corresponding author: kyyang@chonnam.ac.kr

ABSTRACT

Pear scab caused by the fungus *Venturia nashicola* is the most devastating disease on Asian pear (*Pyrus pyrifolia*). However, mycological and biological traits of *V. nashicola* were rarely known because the artificial cultivation of the fungus is difficult using typical fungal growth medium in the laboratory. The main objective of this study, was to determine the best culture medium composition suitable for mycelial growth of *V. nashicola*. A new culture medium using pear extracts, various carbon and nitrogen sources were used to examine the best combination for mycelial growth of *V. nashicola*. The culture medium amended with pear extracts showed higher mycelial growth than non-amended PDA medium. Specifically, the culture medium amended with pear ground young leaf extract showed the highest fungal mycelial growth. The increased mycelial growth of *V. nashicola* was observed in growth medium amended with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ but mycelial growth was negatively influenced by supplement with calcium chelating agent, EGTA. Taken together, we invented a new growth medium amended with pear extract or $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ for growth of *V. nashicola*, and it could be helpful to study on ecological and mycological traits of the pear scab pathogen.

Additional key words: *Venturia nashicola*, Pear scab, Mycelial growth, Pear extracts, PDA medium

서 언

우리나라 배나무의 재배과정에서 발생하는 주요 병해는 검은별무늬병(Scab), 붉은별무늬병(Rust), 검은무늬병(Leaf spot), 과피얼룩병(Skin sooty dapple), 검무늬병(Black rot) 등이 있으며, 이들 주요 병해 중 *Venturia nashicola* Tanaka & Yamamoto에 의해 발병하는 검은별무늬병은 나무가 고사하는 전신적인 피해는 나타나지 않으나, 잎과 과실, 줄기 등 모든 배나무 부위에서 발병한다. 특히 잎과 과실에 감염될 경우 잎의 조기 낙엽이나 과실의 열과, 낙과 등의 직접적인 피해를 주어 수확 시에 상품가치의 하락과 수확량의 감소로 이어져 매년 지속적인 피해를 주는 대표적인 병이다(김 등, 2009). 우리나라의 경우 검은별무늬병에 대해 저항성 품종으로 알려진 “감천배”, “추황배”, “만풍배” 등과 감수성 품종으로 알려진 “신고”와 “황금배” 등 다양한 품종이 재배되고 있지만 그 중에서도 검은별무늬병에 대한 대표적인 감수성 품종인 “신고”의 재배가 전체 재배면적의 약 81.5% 정도를 차지하고 있는 실정이다(신 등, 2009). 또한 또 다른 감수성 품종인 “황금배”의 재배면적이 지속적으로 증가됨에 따라 검은별무늬병 방제를 위해 작물보호제를 이용한 끊임없는 노력을 하고 있지만 2009년부터 2011년까지 나주시역 수출전업농가의 비품과 발생 원인 중 검은별무늬병에 의한 피해가 가장 높은 비율을 차지하고 있다(민 등, 2012). 그러나 이처럼 배 재배농가에 많은 피해를 주는 중요한 병임에도 불구하고 검은별무늬병을 일으키는 병원균에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았는데, 그 이유는 우리나라에서 재배하고 있는 동양배(*Pyrus pyrifolia*)에 검은별무늬병을 일으키는 병원균인 *V. nashicola*의 인공배양이 매우 어렵기 때문이다.

Venturia 속의 검은별무늬병균의 배양적 특성에 관한 연구는 1950년대에 사과나무에서 발생하는 같은 속의 검은별무늬병균인 *V. inaequalis*를 이용해 시작한 후 인공배양 배지의 질소원과 탄소원, 비타민, pH 등과 같은 조건의 탐색과 온도와 습도,

광 등과 같은 배양조건에 대한 연구가 꾸준히 이루어진 결과, 사과 검은별무늬병균을 배양하기 위한 최소요구조건이 확립되었다(Fothergill and Ashcroft, 1955). 또한 새로운 질소원과 탄소원의 첨가에 의한 생육의 변화 및 포자 형성을 위한 연구 등이 꾸준히 이루어 졌다(Ross and Bremner, 1971; Ross, 1974), 그리고 서양배(*Pyrus communis*)에서 발생하는 검은별무늬병의 병원균인 *V. pirina*에 대한 인공배양적 특성에 대한 연구를 통해 질소원, 탄소원, pH 및 배양온도 등과 같은 배양조건이 확립되었으며 각 성분의 변화를 통해 검은별무늬병균의 분생포자 형성에 매우 큰 영향을 끼친다고 알려져 있다(Ben-Yephet, 1977). 또한 동양배의 검은별무늬병균인 *V. nashicola*에 관한 인공배양적 특성 연구는 1990년대 초에 일본에서 집중적으로 많이 이루어져 병원균의 최적생육온도는 15~20℃, pH는 6~7, 탄소원은 soluble starch가 가장 효과적이며, glucose나 D-mannose 등도 비교적 효과적이라고 알려져 있다(梅本清作, 1993). 또한 질소원으로는(NH₄)₂PO₄과 NH₄PO₃가 균사의 생장에 효과적이며 기본배지인 Richard 배지와 비교해 볼 때 기본배지에 Ca(NO₃)₂ 또는 glycine 등을 첨가하였을 때 균사의 생육이 더 효과적이라고 보고하였다(梅本清作, 1993). 그러나 균사의 생육이 좋다고 확인된 Ca(NO₃)₂가 첨가된 Richard 배지에서 검은별무늬병균을 61일간 배양하였으나 균사체의 직경이 불과 20mm 밖에 성장하지 못해서 약제저항성을 포함한 검은별무늬병균의 특성 연구를 위해서는 더 효과적인 배지의 조성을 찾는 연구가 필요하지만 아직까지 연구 결과가 미미한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 현재 곰팡이의 생육에 널리 사용되고 있는 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지를 기본배지로 사용하고 검은별무늬병균이 요구하는 영양원의 조건을 확인하고자 배나무 유래물 질인 유엽, 성엽, 과피, 과육, 과즙 등과 다양한 탄소원 및 질소원 등 화학물질을 추가로 첨가하여 검은별무늬병균의 균사 성장률을 비교 분석함으로써 최적의 배양 배지 조건을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 검은별무늬병균(*Venturia nashicola* Tanaka & Yamamoto)는 Korean Collection for Type Cultures(KCTC)에서 분양 받은 KCTC 6484 균주를 사용하였으며, 균주를 분양 받은 직후 Potato Dextrose Agar(PDA, Potato 200g/L, Dextrose 20g/L, Agar 15g/L, pH 7.0)에 치상하여 20℃에서 45일 동안 배양하여 실험에 사용하였다. 모든 실험은 각 처리당 3반복으로 이루어졌으며, 반복당 3개의 균사체를 이용하였다. 균주의 접종은 기본배지인 PDA에서 배양된 균주의 균사 선단을 지름 4mm의 cork borer로 잘라내어 각각의 배지에 균사체가 배지 윗면에 직접 닿도록 접종하였으며, 20℃ 배양기에서 암흑 하에 20일간 배양 후 개별 균주의 균사체 직경을 측정하여 각각의 균사 생장률을 비교 하였다. 실험결과 값에 대한 유의성은 SPSS 21.0 통계 프로그램을 이용하여 Duncan의 다중범위검정 5% 수준에서 실시하였다.

2. 배나무 유래물질, 탄소원 및 질소원 첨가를 통한 배양 배지 조성

배나무 유래물질들이 첨가된 배양 배지 조성을 위하여 전남대학교 농업생명과학대학의 온실에서 재배중인 신고 품종의 배나무에서 새로 전개되는 3주 뒤의 유엽과 2개월 이상 성장한 성엽을 재료로 하였으며, 과실의 경우 과실의 각각 과피와 과육을 따로 구분하여 사용하거나 또는 과피와 과육을 혼합하여 사용하였다. 배나무 유래물질들이 첨가된 모든 배양배지는 각각의 유래물질 100g을 등량의(v/w) 멸균수로 즙액을 만들어 Miracloth에 여과한 뒤 3,000rpm으로 20분간 원심분리한 후 그 상등액을 기본배지인 PDA배지에 30%의 농도가 되도록 첨가하여 만들었다.

또한 기본배지로써 PDA배지를 이용하여 다양한 탄소원과 질소원 첨가에 따른 검은별무늬병균의 균사 생장률을 비교해 보기 위하여 균사의 생육에 비교적 양호하다고 알려진 glucose, sucrose, mannose, soluble starch 등을 탄소원으로 선발하

여 2% 농도가 되도록 첨가하였으며, 질소원으로는 glycine, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , NH_4NO_3 등을 선발하여 최종적으로 1mM의 농도가 되도록 첨가하여 만들었다.

3. 칼슘 및 칼슘 킬레이트제가 첨가된 배양 배지 조성

칼슘 첨가에 의한 배양 배지상에서 검은별무늬병균의 균사 생장을 변화를 비교하기 위하여 칼슘 첨가 배지를 조성하기 위하여 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , CaCO_3 등을 선발하여 사용하였으며, 칼슘 킬레이트제로 알려진 ethylene-bis(oxy-ethylenenitrolo) tetraacetic acid(EGTA)를 사용하여 칼슘 첨가에 의한 균사 생장을 변화 효과를 확인해 보았다. 칼슘 첨가 배지는 기본배지로 사용된 PDA배지에 각각 1mM의 농도로 처리하였으며, 칼슘 효과 확인을 위한 EGTA 처리 배지는 칼슘처리가 된 각각의 배지 조제 시 추가로 1mM EGTA를 첨가하여 만들었다.

4. 검은별무늬병에 걸린 이병엽 및 이병과로부터 병원균의 단포자 분리

단포자 분리는 전라남도 나주시에 위치한 농가 과수원에서 2012년 5~6월에 유과의 과경이나 과실 혹은 잎자루나 잎맥에서 검은별무늬병의 병징이 나타난 이병엽 및 이병과의 병반에 형성된 검은별무늬병균 분생포자를 채취하여 멸균수에 현탁시킨 뒤 실험 재료로 사용하였다. 외부의 세균이나 부생균의 번식으로 인한 배지의 오염을 막기 위해 penicillin과 streptomycin을 각각 50µg/ml의 농도로 첨가된 한천배지에 준비된 분생포자 현탁액을 Miracloth로 여과하여 도말한 후, 20℃ 배양기에서 48시간 동안 포자의 발아를 유도한 뒤 현미경 하에서 단포자를 선발하였다.

결과 및 고찰

1. 배나무 유래물질 첨가배지에서 검은별무늬병균의 균사 생장률 비교

검은별무늬병균 KCTC 6484 균주를 이용하여

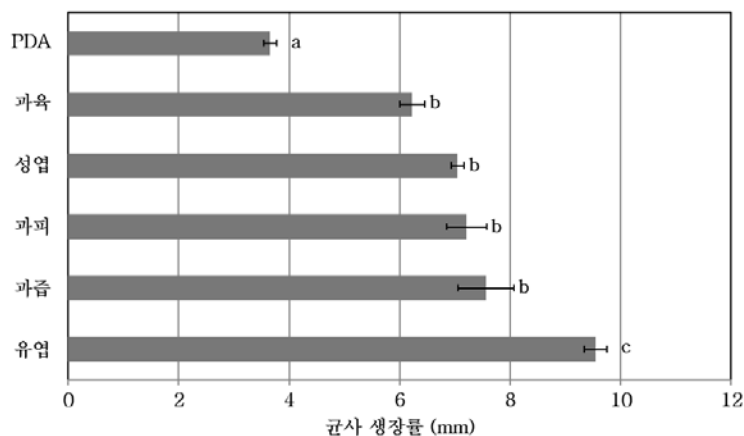
배나무 유래물질 첨가배지에서 검은별무늬병균 균사 생장률을 비교해 본 결과, 첨가된 배나무 유래 물질간에 의미가 있는 차이를 확인할 수 있었다. 기본배지인 PDA배지에서 20일 동안 키운 검은별무늬병균 균사체의 직경은 3.65mm로 확인되었으나, 과육, 성엽, 과피, 과즙, 유엽을 첨가한 배지에서 생장한 검은별무늬병균 균사체의 직경은 각각 6.22, 7.04, 7.21, 7.56, 9.54mm로 나타나 대조구에 비해 비교적 높은 생장률을 보였다(Fig. 1A). 또한 각각의 배지에서 검은별무늬병균의 표현형은 약간씩 차이가 있었는데, 특히 유엽과 성엽을 첨가한 배지에서 다른 배지보다 검은색이 아닌 짙은 회색에 가까운 균사체의 색상이 나타났으며, 이는 유엽 첨가물보다 성엽 첨가물일 경우 더 확연하게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 결과적으로 배나무 유래물질 중 유엽이 첨가된 배지에서 검은별무늬병균 균사체의 직경이 기본배지인 PDA배지

보다 약 3배 정도 증가된 생장률을 보여 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Fig. 1 A and B). 이러한 결과는 PDA배지와 같은 인공배지에는 검은별무늬병균의 생장에 필요한 영양성분이 충분하게 포함되어 있지 않아 균사 생장이 매우 느리게 자랐지만, 배나무 유래물질이 첨가된 배지에서는 그 영양성분이 보완됨으로써 생장이 더 빨라지는 것으로 생각된다. 따라서 유엽과 같은 배나무 유래물질을 첨가하여 배양 배지를 조성한다면 빠른 시간 내에 효과적으로 검은별무늬병균을 확보하여 약제 저항성과 같은 연구에 도움이 될 수 있으리라 생각한다.

2. 다양한 탄소원과 질소원이 첨가된 배양 배지에서 검은별무늬병균의 균사 생장을 비교

유엽과 같은 배나무 유래물질을 첨가한 배지를 만들기 위해서는 유엽 등을 꾸준히 확보해야 하는

A)



B)

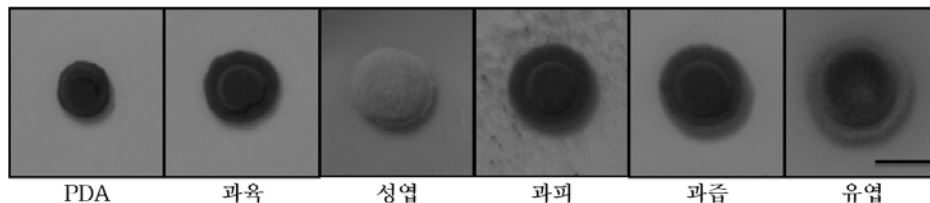


Fig. 1. The mycelial growth rates A) and mycelial phenotypes B) of *V. nashicola* cultured on PDA medium with or without pear extracts. Different letters among treatments indicate the significant differences according to Duncan's multiple range tests, $p < 0.05$. Scale bar is 5mm.

어려움이 있으며 배지를 만드는 과정도 기본배지인 PDA배지와 비교해 볼 때 복잡하다는 단점이 있다. 따라서 PDA배지를 기본배지로 하여 검은별무늬병균의 생장에 효과가 좋다고 알려진 다양한 탄소원과 질소원을 첨가한 뒤 검은별무늬병균의 균사 생장률을 비교하여 최적의 배양 배지를 확인해 보고자 하였다. 탄소원의 첨가에 의한 검은별무늬병균의 균사 생장률은 기본배지인 PDA배지보다 약간 증가하는 것으로 확인되었다. PDA배지에서 자란 검은별무늬병균 균사체의 직경은 Fig. 1A에서와 같이 3.65mm로 나타났으며, 최종적으로 2%의 농도로 탄소원을 첨가한 배지의 경우 sucrose는 4.90mm, soluble starch는 4.80mm, mannose는 4.49mm, 그리고 glucose는 4.78mm로 확인되었다 (Fig. 2A).

또한 질소원 첨가에 의한 검은별무늬병균의 균

사 생장률은 질소원의 종류에 따라 매우 상반되게 나타났다. Fig. 2A에서 확인할 수 있듯이 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 와 glycine을 첨가하였을 경우에는 균사 생장률이 대조구에 비해 증가하였으나, KNO_3 와 NH_4NO_3 를 첨가한 경우는 오히려 대조구에 비해 생장률이 감소하였다. 특히 NH_4NO_3 가 첨가된 배지에서 검은별무늬병균 균사체의 직경은 2.94mm인 반면 KNO_3 가 첨가된 배지에서는 균사체의 직경이 2.54mm로 나타나 KNO_3 가 첨가된 배지에서 균사의 생장이 더 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 반대로 glycine의 경우는 균사체의 직경이 4.78mm로 확인되었으며 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가된 배지에서는 균사체의 직경이 13.51mm로 나타나 대조구에 비해 약 4배 정도 생장이 크게 빨라짐을 확인할 수 있었다(Fig. 2A and 2B).

梅本清作(1993)의 연구에서는 기본배지인 Richard

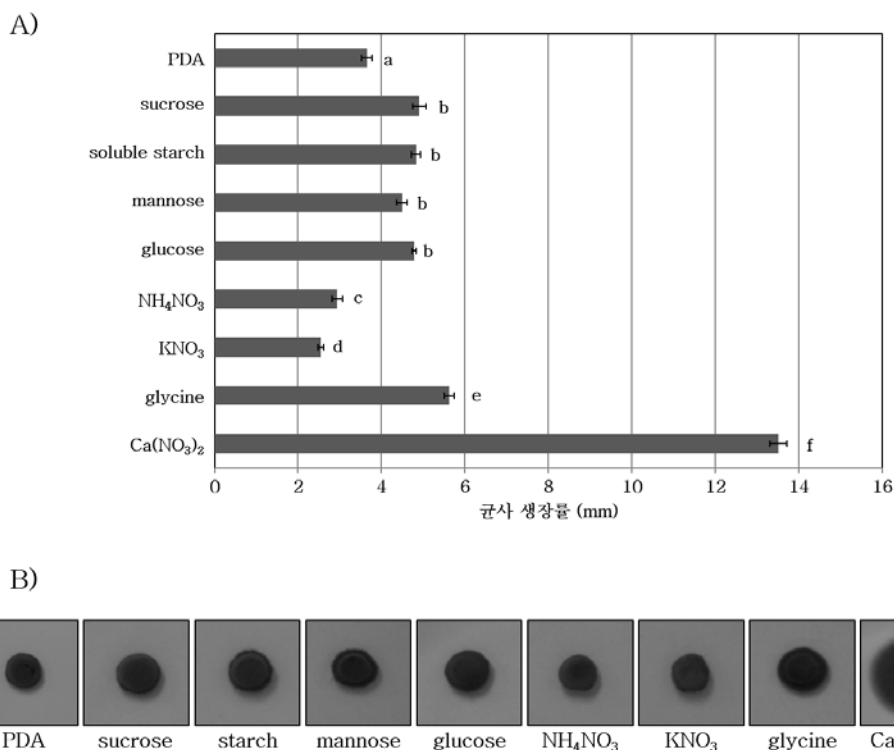


Fig. 2. The mycelial growth rates A) and mycelial phenotypes B) of *V. nashicola* cultured on PDA medium with or without various carbon or nitrogen sources. Different letters among treatments indicate the significant differences according to Duncan's multiple range tests, $p < 0.05$. Scale bar is 5mm.

배지에 첨가된 다양한 탄소원 중에서 soluble starch가 다른 탄소원에 비해 균사의 생장에 월등한 효과를 보였으나 PDA배지를 기본배지로 이용한 본 연구에서는 soluble starch가 다른 탄소원과 비슷한 효과를 보여줌으로써 상이한 결과를 확인할 수 있었다. 그리고 梅本清作(1993)의 연구에서는 질소원으로 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 첨가하였을 때 기본배지인 Richard 배지보다 약 2배에 가까운 균사 생장률의 효과를 나타냄으로써 61일 동안 20mm가 조금 넘는 균사 생장률을 보인 반면 본 연구에서 기본배지를 PDA 배지로 사용하고 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 의 농도 역시 1mM로 낮게 처리하였음에도 불구하고 검은별무늬병균의 균사 생장률이 20일만에 13.51mm로 나타났다(Fig 2A). 이러한 결과는 보다 빠른 검은별무늬병균의 균사 생장을 위해서는 기본배지로 Richard 배지보다는 PDA배지를 사용하는 것이 더 효과적임을 의미한다 하겠다. 또한 본 연구에서 나타난 질소원 첨가배지의 균사 생장률을 비교한 결과에 의하면, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가된 배지에서 NH_4NO_3 , KNO_3 , 그리고 glycine과 같은 다른 질소원이 포함된 배지와 다르게 검은별무늬병균의

균사 생장률이 확연한 차이를 보여 주었다. 따라서 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가된 배지에서 검은별무늬병균 균사 생장률의 효과는 단순히 질소원의 효과가 아닌 다른 첨가 화학물질인 칼슘의 효과에 대한 검증이 필요하리라 생각되었다.

3. 검은별무늬병균의 균사 생장에 영향을 미치는 칼슘의 효과

탄소원과 질소원 첨가배지 실험을 통하여 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 PDA배지에 첨가할 경우 검은별무늬병균의 균사 생장이 극대화 되는 것을 확인하였다. 그러나 이러한 효과가 다른 질소원에서 나타나지 않았으므로 칼슘의 관련성 여부를 확인해 보고자 하였다. 따라서 다양한 칼슘원을 PDA배지에 첨가한 후 검은별무늬병균의 균사 생장률을 비교해 보았다. 본 연구에서는 각각 1mM의 CaCO_3 , CaCl_2 , 그리고 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 칼슘원으로 사용하였으며 그 결과, 모든 처리구에서 검은별무늬병균의 균사 생장률이 기본배지에 비해 크게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 기본배지인 PDA배지에서는 3.65mm가 자라는 반면 CaCO_3 을 첨가한 PDA배

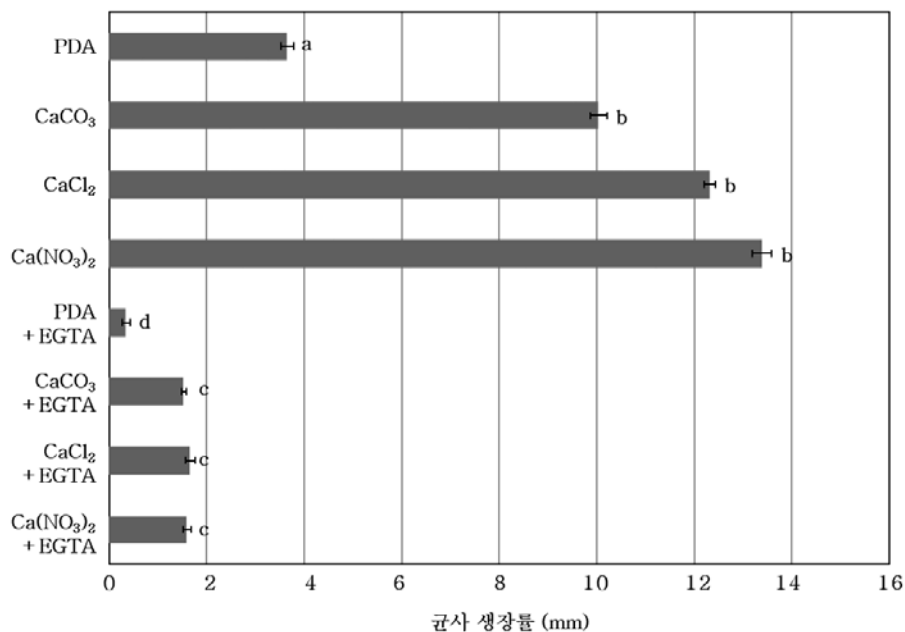


Fig. 3. Effects of calcium with or without EGTA on the mycelial growth. Different letters among treatments indicate significant differences according to Duncan's multiple range tests, $p < 0.05$.

지에서는 10.04mm가 자랐으며, CaCl_2 의 경우는 12.31mm 그리고 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 의 경우는 13.38mm의 생장을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 칼슘이 PDA배지에 첨가되었을 때 검은별무늬병균의 균사 생장에 영향을 미쳤음을 의미한다 하겠다. 여러 보고에 의하면 칼슘 처리가 다양한 곰팡이의 자낭포자 형성이나, 분생포자 발아, 그리고 균사의 생육과 균사 틱의 굴절 등에 관여되어 있다(Jackson and Health, 1993). 특히 잣빛곰팡이를 대상으로 한 칼슘의 효과에 대한 연구에서는 칼슘 처리가 균사의 세포벽의 증량에 관여되어 있다는 보고가 있었고, 균사 생육을 억제 한다고 알려진 식물의 항균단백질인 defensin은 병원균의 칼슘 채널을 막아 균사 생육을 억제한다고 알려졌다(Chardonnet et al., 1999; Spelbrink et al., 2004). 또한 칼슘 채널을 억제할 경우 버 녹병원균에서는 자낭포자의 방출과 균사의 생육이 억제된다고 알려져 있어 칼슘에 의하여 곰팡이의 생육 변화가 나타날 수 있음을 보고하였다(Hallen and Trail, 2008). 그러나 아직까지 검은별무늬병균의 생장에 영향을 미치는 칼슘의 효과에 대한 연구는 전무한 상태이다.

따라서 칼슘의 검은별무늬병균 균사 생장 효과를 보다 명확하게 검증해 보기 위해 칼슘 킬레이트제로 알려진 EGTA를 사용하여 검은별무늬병균의 균사 생장을 변화를 확인해 보았다(Donaldson and Deacon, 1992). 1mM EGTA를 각각의 칼슘 첨가배지에 추가로 처리하여 칼슘의 효과를 억제시킨 후 검은별무늬병균의 균사 생장률을 확인해 본 결과, PDA배지의 경우 0.35mm의 생장을 보여 거의 자라지 못하는 것을 확인하였고, CaCO_3 는 1.54mm, CaCl_2 와 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 는 각각 1.66, 1.6mm의 균사 생장률을 보여 주었다(Fig 3). 이러한 결과들을 종합해 보면 질소원을 보충하고자 사용하였던 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가된 배지에서의 검은별무늬병균 균사 생장률의 효과는 질소 뿐만아니라 칼슘이 크게 영향을 미쳤음을 의미한다 하겠다.

4. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가된 배양 배지를 사용하여 검은별무늬병균의 단포자 분리

최근에 우리나라에서도 *V. nashicola*균의 경우 EBI 계열의 hexaconazole과 flusilazole에 대한 약

제저항성이 보고되었다(Kwon et al., 2010). 따라서 현재 배과수원에서 검은별무늬병을 방제하기 위해 사용 중인 주요 약제에 대한 저항성 여부를 확인하는 노력은 매우 중요하리라 생각된다. 그러기 위해서는 배과수원에서 다양한 검은별무늬병균들을 채집한 후 단포자 분리를 통해 단일 균주를 확보하는 연구가 최우선적으로 수행되어야 하지만 검은별무늬병균은 인공배지에서 균사 생장이 매우 늦기 때문에 단일 균주 확보가 쉽지 않는 상태이다. 그래서 본 연구에서는 검은별무늬병균을 빠르게 배양할 수 있는 최적의 배양 배지를 찾기 위해 먼저 유엽과 같은 배나무 유래물질을 첨가하여 배지를 조성하여 균사 생장률을 확인해 보았다. 그러나 검은별무늬병균이 배나무 유래물질인 유엽을 첨가한 배지에서 20일동안 약 9.54mm정도 자랐으나 기본배지인 PDA배지에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 첨가한 배지에서는 13.51mm정도 생장함으로써 검은별무늬병균의 균사 생장률이 확연하게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1 및 Fig. 2). 따라서 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 첨가한 최적의 배양 배지를 사용하여 우리나라 최고의 배 생산지인 전라남도 나주시의 전남대 봉황농장 배실습장의 과수원에서 검은별무늬병에 걸린 잎과 유과들을 수집하여 검은별무늬병균 단포자를 분리하였다. 분리된 단일 균주들도 본 연구에서 그동안 사용하였던 검은별무늬병균 KCTC 6484 균주처럼 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가된 PDA배지에서 빠른 생장률을 확인할 수 있었다. 배실습장의 과수원에서 수집한 검은별무늬병균의 단포자를 현미경 하에서 분리한 후 균사 배양을 위해 기본배지로 PDA배지를 사용하였을 경우는 직경이 18.31mm인 균사체를 확보하기 위해서 약 180일이 필요하였지만, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 첨가한 PDA배지를 사용하였을 경우는 약 60일간만 배양하여도 직경이 24.35mm인 균사체를 확보할 수 있었다(Fig. 4). 결론적으로 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가한 PDA배지를 검은별무늬병균 균사 생장용 배양 배지로 이용한다면 기본배지인 PDA배지와 비교해 배양시간을 1/3로 절약할 수 있어 한천희석법을 사용하여 간단하게 약제저항성을 확인할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구를 통해 선별된 검은별무늬병균 최적 배양 배지는 그동안 실험실에서 배양이 늦어 어

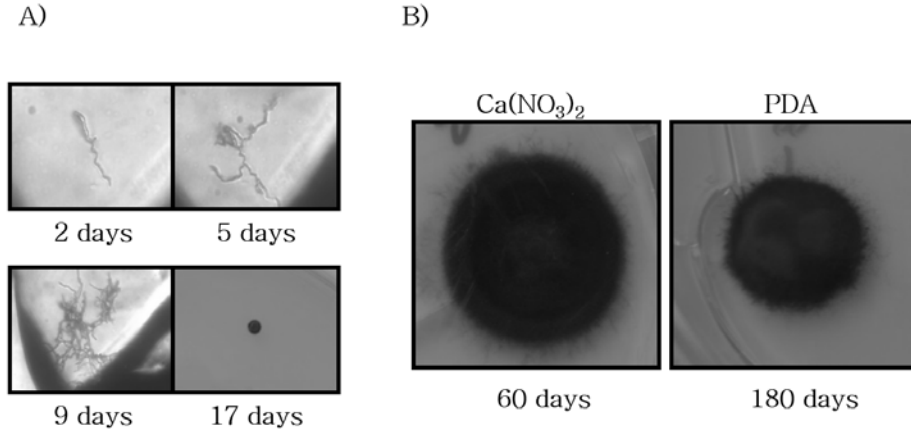


Fig. 4. The procedures of single-spore isolation under microscope A) and mycelial phenotypes B) of *V. nashicola* cultured on PDA medium ammended with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ for 60 days or cultured on PDA medium for 180 days.

럽게 생각되었던 검은별무늬병균에 대한 연구에 도움이 될 것이라 생각한다.

초 록

배 검은별무늬병(Pear Scab)는 배나무의 재배과정에서 발생하는 주요 병해 중에서 가장 큰 피해를 주는 중요한 병입에도 불구하고 검은별무늬병균(*Venturia nashicola*)에 대한 연구는 인공배양의 어려움 때문에 매우 미미한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 검은별무늬병균 인공배양의 어려움을 해결해 보고자 배나무 유래물질들과 다양한 탄소원 및 질소원 등을 이용하여 새로운 배양 배지를 조성해 검은별무늬병균의 군사 생장률을 분석해 보았다. 그 결과 기본배지인 PDA배지 보다 배나무 유래물질을 첨가한 배지에서 군사 생장률이 증가하는 것을 확인하였고, 특히 유엽을 첨가한 배지에서 PDA배지에 비해 약 3배에 가까운 군사 생장률을 확인하였다. 또한 기존의 알려진 다양한 탄소원과 질소원을 PDA배지에 첨가한 후 군사 생장률을 비교한 결과, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 첨가에 의한 효과가 매우 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 칼슘 킬레이트제인 EGTA와 다른 칼슘원 첨가 배지에서 군사 생장률을 확인함으로써 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 에 의한 검은별무

늬병균의 군사 생장률의 증가에 칼슘이 영향을 미치고 있음을 확인하였다. 가장 효과가 좋았던 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가된 PDA배지를 사용할 경우 검은별무늬병균의 단포자 분리 후 배양시 PDA배지를 사용한 것보다 배양 시간을 대폭 줄이면서도 보다 빠른 군사 생장을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 선발된 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 첨가된 PDA배지는 검은별무늬병균의 연구에 크게 도움이 될 것이라 생각한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 사업의 지원에 의해서 수행되었습니다.

참고문헌

1. Ben-Yephet, Y. 1977. Sporulation of *Venturia pirina* on growth media. *Phytoparasitica* 5: 109-113.
2. Chardonnet, C., Sams, C., and Conway, W. 1999. Calcium effect on the mycelial cell walls of *Botrytis cinerea*. *Phytochem.* 52: 967-973.

3. Donaldson, S., and Deacon, J. 1992. Role of calcium in adhesion and germination of zoospore cysts of *Pythium*: a model to explain infection of host plants. J. Gen. Microbiol. 138: 2051-2059.
4. Fothergill, P. G., and Ashcroft, R. 1955. The nutritional requirements of *Venturia inaequalis*. J. Gen. Microbiol. 12: 387-395.
5. Hallen, H.E., and Trail, F. 2008. The L-type calcium ion channel cchl affects ascospore discharge and mycelial growth in the filamentous fungus *Gibberella zeae*(anamorph *Fusarium graminearum*). Eukaryotic cell 7, 415-424.
6. Jackson, S.L. and Health, I.B. 1993. Roles of calcium ions in hyphal tip growth. Microbiol. Rev. 57. 367-382.
7. Kwon, S.M., Yeo, M.I., Choi, S.H., Kim, G.W, Jun, K.J., and Uhm, J.Y. 2010. Reduced sensitivities of the pear scab fungus(*Venturia nashicola*) collected in ulsan and naju to five ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicides. Res. Plant Dis.16: 48-58.
8. Ross, R. G. and Bremner, F. D. 1971. Effect of ammonium nitrogen and amino acids on perithecial formation of *Venturia inaequalis*. Can. J. Plant Sci. 51: 29-33.
9. Ross, R. G. 1974. Conidium production of *Venturia inaequalis* in synthetic culture media. Can. J. Plant Sci. 54: 93-100.
10. Spelbrink, R.G., Dilmac, N., Allen, A., Smith, T.J., Shah, D.M., and Hockerman, G.H. 2004. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. Plant physiology 135, 2055-2067.
11. 梅本清作. 1993. ニホンナシ黒星病の発生生態と防除に関する研究. 千葉農試特報 22: 1-99.
12. 김기청, 조백호, 김영철, 양광열, 황해성, 정상복, 조광식, 방창석, 송장훈, 최장전 등 2009. 배 병해의 진단과 방제이론. 전남대학교 친환경농생명연구사업단. pp.1-103.
13. 민광현, 류정필, 이상현, 김익수, 김월수, 조백호, 양광열. 2012. 수출배에서 발생하는 검은별무늬병 방제를 위한 비품과 원인 분석. 농업과학기술연구. 47: 21-29.
14. 신일섭, 황해성, 신용억, 허성, 김기홍, 강삼석, 김윤경. 2009. 배 검은별무늬병 저항성 “원교나-흑성 2호”. 한국육종학회지. 41: 354-357.