

감귤나무 가지에서 분리한 검은점무늬병균 *Diaporthe citri*의 균학적 특성

권혁모* · 남기웅¹ · 김광식 · 김동환 · 이성찬 · 현재욱

제주농업시험장, ¹농업과학기술원

Characterization of the Causal Fungus of Citrus Melanose, *Diaporthe citri* Isolated from Blighted Twigs of Citrus in Jeju

Hyeog-Mo Kwon*, Ki-Woong Nam¹, Kwang-Sik Kim, Dong-Hwan Kim, Seong-Chan Lee and Jae-Wook Hyun

National Jeju Agricultural Experiment Station, Jeju 690-150, Korea

¹National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

(Received on August 9, 2003)

Mycological characteristics of *Phomopsis citri* isolates obtained from blighted twigs of citrus were investigated in this study. Totally 18 isolates collected from four citrus cultivation areas in Jeju island were all identified as *Phomopsis citri* known as the anamorph stage of *Diaporthe citri*. Pycnidia the isolates sized from 112.2 to 614.4 μm (av. 328.8 μm) and shaped conical to lenticulata in black. Two types of phialospores, α - and β -spores were observed from pycnidia. The α -spores were hyaline, unicellula, fusiform to ellipsoidal and sized 4.7-8.7 $1.9 \times 3.5 \mu\text{m}$ (av. 6.7 \times 2.3 μm). The β -spores were hyaline, unicellula, filiform, curved and often strongly hooked and sized 13.2-27.1 \times 0.8-1.6 μm (av. 22.1 \times 1.0 μm). All isolates grew well and produced abundant pycnidia and spore horns on PDA. In addition, all isolates showed strong pathogenicity to citrus fruit inducing melanose symptoms when artificially inoculated with the pycnidial spores.

Keywords : citrus, *Diaporthe citri*, melanose

제주도 감귤산업은 1968년 이후부터 비약적으로 성장하여 현재 약 25,000 ha의 재배면적에서 60여만톤이 생산되어 우리나라 제2의 과수로 부상되었고, 제주도 농업소득의 40% 이상을 차지하는 기간산업으로 발전되었다. 그러나 최근 국제농업환경의 급격한 변화로 매우 어려운 실정에 처해 있기 때문에 그동안의 양적 생산에서 탈피하여 고품질의 감귤생산으로 전환하지 않으면 안된다. 따라서 고품질 과실생산을 위해서는 고당도계의 품종육성 및 재배기술의 일환으로 병해충의 관리가 중요하다. 감귤원에 발생하는 병해는 많으나 방제상 문제가 되는 병해는 검은점무늬병, 더덩이병, 궤양병이며 이중에서도 검은점무늬병의 방제가 가장 중요하다. 검은점무늬병은 자낭균의 일종으로 잎, 가지, 과실 등에 발생하여 피해를 주

지만 가장 문제가 되는 것은 과실의 피해이다. 특히 과실 생육기인 6월부터 8월에 걸쳐 강우가 많은 시기에 발생량이 많고, 감염이 된 과실은 상품성이 저하된다. 한편 나무의 주간부에 발병되고 있는 수지병이나 과실의 저장후기에 많이 발생되고 있는 축부병도 검은점무늬병균에 의해 발병되는 병해이다(安部, 1938). 이 검은점무늬병이 제주도에서 최초로 확인된 것은 1971년도(백 등, 1974)로 70년대 후반까지만 하더라도 방제의 중요성이 그다지 크지 않았으나 80년대에 들어서면서부터 재배면적의 증가와 나무의 성목화, 밀식화 등으로 현재는 중요도가 가장 큰 병해로 대두되고 있다.

감귤나무의 검은점무늬병 방제는 일반적으로 년 4, 5회 정도의 약제살포로 가능하나 해에 따라 지역별로 강우량 및 기온 등의 기상환경의 차이, 그리고 밀식이나 전정·비배관리 소홀 등 재배방법에 따른 마른가지의 발생량 차이 등으로 병해발생이 달라진다. 지금까지 국내에서는 검은점무늬병에 대하여 발생소장 조사나 방제약제 선별 정

*Corresponding author

Phone)+82-64-741-2570, Fax)+82-64-791-2066

E-mail)hmkwon@rda.go.kr

도의 미미한 연구만 이루어졌을 뿐 체계적인 연구가 이루어지지 않아 농가 지도에 많은 애로가 있다.

따라서 본 연구는 검은점무늬병의 효율적인 방제체계를 수립하고자 각 지역별로 가지마름증상에서 분리한 감귤검은점무늬병균의 균학적 특성과 병원성을 조사하였다.

재료 및 방법

병원균 분리 및 동정. 1995년 제주도 일원에 걸쳐 41개 농가의 감귤원에서 직경 0.3~1.0 cm 정도의 마른 가지를 채취한 후, petri dish에 여과지 3매를 깔고 그 위에 채취한 가지를 올려놓은 다음 살균수를 충분히 공급하고 25±1°C의 항온기에서 3~7일간 습실 처리하였다. 습실처리된 가지에서는 많은 량의 병포자가 누출되어 나왔으며 여기에서 분리된 병원균을 Potato dextros agar(PDA)배지에 이식하여 18개 균주(Table 1)를 확보한 후 실험에 사용하였다. 배양조직에 형성된 분생포자각과 분리한 포자의 형태와 크기를 30개씩 공시하여 현미경을 이용하여 동정하였다.

병원성 검정. 분리한 18균주에 대하여 병원성을 조사하기 위해 배양 균주내 병자각에서 누출되어 나온 병포자를 200배의 현미경에서 포자수가 시야당 200개 정도가 되도록 멸균수로 희석한 후, 직경 5 mm의 여과지를 균

주 현탁액에 담구었다. 이 여과지 절편(4매)을 공시 밀감(10과)의 과정부 3부분에 부착하여 접종한 다음 25±0.5°C의 항온기에서 습실 처리한 후 발병도를 농사시험연구 조사기준(농촌진흥청, 1995)에 따라 조사하였다.

결 과

병원균의 분리동정. 4개 지역에서 수집한 가지를 습실 처리한 결과 가지에서 많은 량의 병포자가 누출(Fig. 1B)되어 나왔으며 여기에서 분리하여 얻어진 18개 균주의 병포자를 PDA배지에서 배양한 결과 많은 분생포자각과 병포자가 형성되었다(Fig. 1A,E). 분생포자각의 크기는 112.2~614.4 µm 범위로 평균 크기는 328.8 µm였으며 균주별로 크기가 다소 상이하였는데 유자에서 분리한 Nj-4 균주의 분생포자각이 398.4 µm로써 가장 큰 편이었고 온주에서 분리한 Su-15 균주의 분생포자각이 평균 281.0 µm로 가장 작았다. 병포자는 α포자와 β포자 2종류가 관찰되었으며 α포자는 무색 단포자로 타원형이었고, β포자는 무색 단포자로 사상형이며 활처럼 약간 구부러졌고 대개의 경우 한쪽 끝이 휘어 있었다(Fig. 1C). 크기는 α포자가 4.7~8.7×1.9~3.5 µm 범위였으며 평균 크기는 6.7~2.3 µm였다. β포자는 13.3~27.1×0.8~1.6 µm 범위로 평균 크기는 22.1×1.0 µm였으며, 분리균주에 따라 다소 크기의 차이가 있었다(Table 2).

병원성 검정. 분리된 병원균을 균주별로 배지에 접종시킨 결과 공시균주 대부분 균사생장이 양호하였는데 그 중에서도 Nk-5, Sg-3 균주가 가장 양호한 편이었다. 병자각 생성은 Pu-2 균주와 Su-15 균주에서 다소 적은 경향이었고, Nk-5, Sg-3, Sc-6 균주에서는 다수의 분생포자각이 형성되어 분리 균주별로 차이가 있었다(Table 3).

또한 균주별로 병원성을 알아보기 위하여 균주의 발아력을 확인(Fig. 1D)한 후 과실에 접종해 본 결과 모든 균주에서 검은점무늬병 증상이 발현되었다(Fig. 1F). 검은점무늬병 발병과율은 모든 균주에서 40~100%로 나타났는데, Nj-4, Nk-5, Sg-3 균주에서 100%의 발병과율을 보였으며, 발병도는 Cu-10, Pu-1, Su-15 균주에서 낮았고 Nk-5, Sg-3, Nj-4, Sn-13 균주가 높은 편으로 균주에 따른 병원성의 차이가 인정되었다(Table 4).

고 찰

감귤나무 검은점무늬병은 마른가지에 형성되어 있는 검은점무늬병균이 강우시 빗방울에 섞여 비산하여 과실에 감염됨으로써 발병되는 병해로(Fawcett and Lea, 1926) 과

Table 1. List of the isolates of *Diaporthe citri* obtained from blighted twigs of citrus tree

Isolate	District of collection		Variety
Cu-8	Jeju city	Odeung	Satsuma mandarin
Cu-16		Noheong	Satsuma mandarin
Cu-10		Hoichon	Satsuma mandarin
Pu-1	Bugjeju-gun	Owaheul	Satsuma mandarin
Pu-18		Hamdug	Satsuma mandarin
Pu-2		Hallim	Satsuma mandarin
Nu-9	Namjeju-gun	Pyosun	Satsuma mandarin
Nu-11		Namwon	Satsuma mandarin
Nj-4		Taiheung	Juzu
Nk-5		Taiheung	Kumquat
Su-14	Seogwipo city	Donghong	Satsuma mandarin
Sg-3		Donghong	Grapefruit
Sc-6		Donghong	Kawano-natsudaidai
Sm-7		Donghong	Marumelo
Sh-12		Donghong	Hwanggeum-hakyul
Sn-13		Donghong	Natsudaidai
Su-15		Donghong	Satsuma mandarin
Sp-17		Donghong	Hassaku

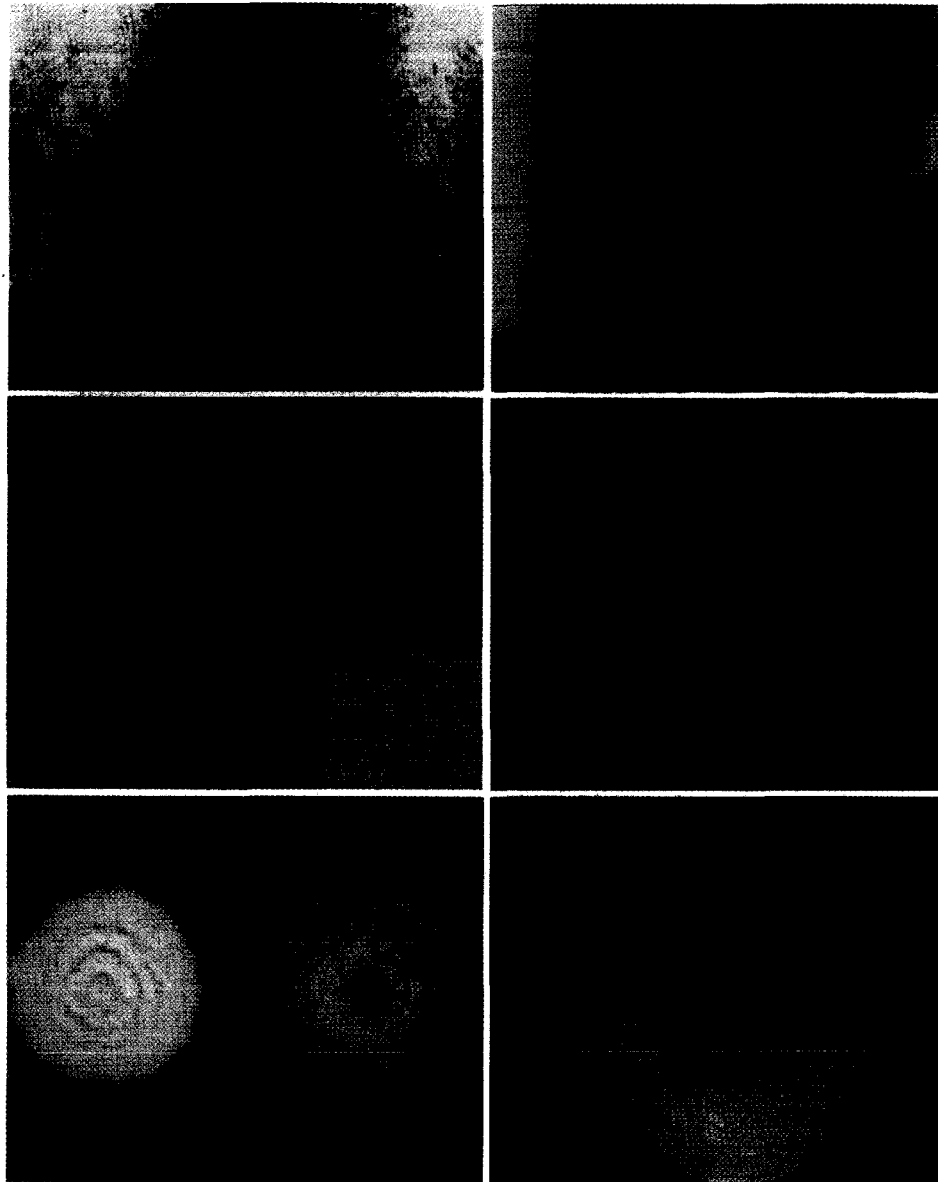


Fig. 1. Features of *Diaporthe citri*, the causal fungus of citrus melanose. **A:** A longitudinal section of a pycnidium, **B:** Spore horns emerged from pycnidia on bark surface of citrus stem, **C:** α -conidia and β -conidia (right below) of the fungus, **D:** Germination of α -conidia in water, **E:** Colony morphology on PDA 10 days after (left) and pycnidial production after 40 days (right), **F:** A symptom of citrus melanose developed on a fruit by artificial inoculation.

실에 흑점형, 니괴형, 누반형 등의 증상을 나타내어 상품성을 떨어뜨림으로써 감귤재배 시 가장 문제가 되고 있는 병해다.

검은점무늬병균은 완전세대인 자낭포자(Bach and Wolf, 1928; Fawcett, 1936; 福岡, 1937; 山本, 1991)와 불완전세대인 병포자로 구분되는데 보통 감귤원에서 흔히 발생하면서 비산하여 발병을 시키는 것은 병포자에 의한 것으로 이에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다. 검은점무늬병

의 영명인 melanose는 Floyd(1911), Stevens(1918a, 1918b) 등이 균을 분리하여 Fawcett가 발견했던 stem-end rot의 병원균과 동일한 *Phomopsis citri*임을 확인함과 동시에, 검은점무늬병균이 기주에 침입 후 세포내에서 원형질의 gum 물질을 분비시키기 때문에 흑점이 생기며 이러한 흑점이 생기는 병을 melanose라 명명하는데서 기인되었다. Fawcett(1911)는 stem-end rot로부터 병원균을 분리하여 *Phomopsis citri* Fawcett로 명명하였으나, Wolf(1926)가 지

Table 2. Comparison of the size of pycnidia and phialospores of 18 isolate of *Diaporthe citri* obtained from twigs of citrus trees

Isolate	Diam. of pycnidium (μm)	Phialospore size (μm)			
		α-conidia		β-conidia	
		Length	Width	Length	Width
<i>D. citri</i> ²	up to 600	6~10	2~3	20~30	0.5~1
Cu-8	328.0 ± 87.8 ^y (193.6-614.4) ^x	7.3 ± 1.0 (4.7-8.7)	2.6 ± 0.4 (1.9-3.5)	18.9 ± 6.1 (13.5-24.1)	1.1 ± 0.2 (0.8-1.6)
Cu-16	306.2 ± 75.7 (148.8-453.6)	6.2 ± 1.9 (4.6-8.8)	2.3 ± 0.3 (2.0-3.1)	17.9 ± 2.1 (14.4-24.4)	1.0 ± 0.1 (0.9-1.3)
Ci-10	349.7 ± 73.2 (173.0-511.5)	6.6 ± 0.7 (4.7-8.1)	2.4 ± 0.2 (2.0-2.8)	22.0 ± 1.9 (19.1-25.4)	1.0 ± 0.1 (0.8-1.3)
Pu-1	316.8 ± 65.4 (183.5-419.6)	7.0 ± 0.8 (5.1-8.4)	2.3 ± 0.2 (2.0-2.6)	21.7 ± 2.1 (18.3-26.1)	1.1 ± 0.1 (0.9-1.4)
Pu-18	351.2 ± 52.7 (231.1-431.1)	6.7 ± 0.6 (5.7-7.6)	2.3 ± 0.1 (2.1-2.5)	20.7 ± 2.9 (14.7-24.1)	1.1 ± 0.1 (0.9-1.2)
Pu-2	300.9 ± 66.5 (198.3-405.2)	6.6 ± 0.3 (5.6-8.1)	2.2 ± 0.2 (2.0-2.6)	19.8 ± 2.9 (15.3-24.1)	1.0 ± 0.1 (1.0-1.2)
Nu-9	296.8 ± 65.4 (145.1-434.5)	6.8 ± 0.4 (6.1-7.8)	2.3 ± 0.1 (2.1-2.5)	19.6 ± 2.7 (16.4-23.5)	1.0 ± 0.2 (0.9-1.2)
Nu-11	313.6 ± 48.4 (201.2-396.5)	6.7 ± 0.8 (5.3-8.0)	2.2 ± 0.2 (1.9-2.6)	20.1 ± 2.0 (16.5-23.0)	1.1 ± 0.1 (1.0-1.2)
Nj-4	398.4 ± 90.7 (201.3-554.6)	6.7 ± 0.8 (5.5-8.3)	2.4 ± 0.3 (5.5-8.3)	21.6 ± 3.1 (14.2-26.3)	1.0 ± 0.2 (0.8-1.4)
Nk-5	376.5 ± 63.5 (316.5-512.0)	7.0 ± 0.7 (5.6-8.0)	2.3 ± 0.2 (2.0-2.6)	21.6 ± 3.6 (17.1-27.1)	1.0 ± 0.1 (0.9-1.1)
Su-14	323.1 ± 82.4 (112.2-459.0)	6.6 ± 1.4 (4.5-9.0)	2.5 ± 0.4 (1.8-3.5)	17.6 ± 3.1 (13.2-23.2)	1.0 ± 0.2 (0.8-1.4)
Sg-3	372.3 ± 66.9 (296.0-516.0)	6.4 ± 0.5 (5.6-7.5)	2.2 ± 0.2 (1.9-2.5)	21.4 ± 2.8 (17.7-26.3)	1.1 ± 0.1 (0.9-1.2)
Sc-6	304.8 ± 59.9 (195.1-411.5)	6.7 ± 0.9 (5.1-8.8)	2.2 ± 0.3 (2.0-2.9)	21.7 ± 3.8 (16.5-26.5)	1.1 ± 0.1 (0.9-1.2)
Sm-7	330.8 ± 73.8 (211.5-451.7)	6.5 ± 0.7 (5.0-7.8)	2.1 ± 0.2 (2.0-2.5)	19.1 ± 3.7 (14.5-24.1)	1.0 ± 0.1 (0.9-1.1)
Sh-12	328.8 ± 63.0 (184.5-411.3)	6.3 ± 0.7 (5.1-7.7)	2.1 ± 0.2 (2.0-2.5)	20.1 ± 2.5 (18.0-23.2)	1.1 ± 0.1 (1.0-1.1)
Sn-13	350.7 ± 36.0 (311.1-441.0)	7.0 ± 0.7 (6.1-8.2)	2.3 ± 0.2 (2.0-3.2)	20.5 ± 2.5 (16.5-24.2)	1.0 ± 0.1 (0.9-1.2)
Su-15	281.0 ± 79.8 (165.4-390.5)	7.3 ± 0.5 (6.4-7.9)	2.5 ± 0.4 (2.1-3.2)	22.3 ± 2.6 (17.5-27.1)	1.1 ± 0.1 (0.9-1.2)
Sp-17	288.3 ± 40.1 (178.4-336.7)	6.6 ± 0.5 (5.9-7.9)	2.2 ± 0.1 (2.1-2.5)	20.4 ± 2.4 (16.4-23.1)	1.0 ± 0.1 (0.8-1.1)
Mean	328.8 ± 66.2	6.7 ± 0.8	2.3 ± 0.3	22.1 ± 2.9	1.0 ± 0.1

²Data from Punithalingam and Holliday (1973).^yNumbers are averages ± standard deviations of 30 pycnidia and conidia.^xRange of size of 30 pycnidia and conidia.

상의 고사지로부터 검은점무늬병균의 완전 세대를 발견하여 *Diaporthe citri*(Faw.)Wolf로 보고하였다. 본 시험에서는 감귤나무 마른 가지로부터 균을 분리한 결과 자낭 포자는 발견되지 않았고 분생포자각과 병포자만을 분리

할 수 있었는데, 이들 병원균의 크기나 형태 그리고 병원성을 조사한 결과 불완전세대인 *Phomopsis citri*로 확인되었다. 검은점무늬병균의 형태와 크기에 대해서는 연구자에 따라 다소 차이를 보였는데(安部, 1938; Fawcett, 1936;

Table 3. Degree of mycelial growth, pycnidial production, and spore horn formation of 18 isolates of *Diaporthe citri* on potato dextrose agar

Isolate	Mycelial growth ^z	Pycnidium production ^y	Spore horn production ^y
Cu-8	++ ^x	++	++
Cu-16	++	++	++
Cu-10	++	++	++
Pu-1	++	++	++
Pu-18	++	++	++
Pu-2	++	+	+
Nu-9	++	++	++
Nu-11	++	++	++
Nj-4	++	++	++
Nk-5	+++	+++	+++
Su-14	++	++	++
Sg-3	+++	+++	+++
Sc-6	++	+++	+++
Sm-7	++	++	++
Sh-12	++	++	++
Sn-13	++	++	++
Su-15	++	+	+
Sp-17	++	++	++

^zDegree of mycelial growth was examined 5 days after incubation at 25°C.

^yPycnidium and spore horn productions were measured from 40-day-old PDA cultures.

^x+: little, ++: intermediate, +++: abundant.

Table 4. Pathogenicity of 18 isolates of *Diaporthe citri* obtained from blighted citrus twigs to fruit by artificially inoculation

Isolate	No. of fruits inoculated	% fruits infected	Degree of disease severity ^z
Cu-8	10	70	12.2
Cu-16	10	60	11.1
Cu-10	10	40	6.7
Pu-1	10	50	7.8
Pu-18	10	80	20.0
Pu-2	10	50	10.0
Nu-9	10	80	20.0
Nu-11	10	90	16.7
Nj-4	10	100	26.7
Nk-5	10	100	34.4
Su-14	10	70	10.0
Sg-3	10	100	33.3
Sc-6	10	80	20.0
Sm-7	10	90	21.1
Sh-12	10	80	22.2
Sn-13	10	90	25.6
Su-15	10	60	8.9
Sp-17	10	90	23.2

^zDegree of disease severity = $\{(A \times 1) + (B \times 3) + (C \times 5) + (D \times 7) + (E \times 9) / (n \times 9)\} \times 100$, where A is the number of fruits with infested area of less than 1%, B with 1~5%, C with 6~25%, D with 26~0%, E with more than 50%.

水澤와 橫木, 1929; 田中와 中村, 1950; 大和, 1968) 본 시험에서 분리한 병원균의 크기는 α 포자인 경우 $4.7\sim 8.7 \times 1.9\sim 3.5 \mu\text{m}$ 정도로 이는 Fawcett(1936)와 田中와 中村(1950) 등이 보고한 것과 비슷했다. 그러나 安部(1938)는 α 포자의 크기를 $5.01\sim 11.44 \times 2.57\sim 2.86 \mu\text{m}$, 水澤와 橫木(1929)은 $6.10\sim 12.20 \times 2.44\sim 4.39 \mu\text{m}$ 로 보고하고 있어 연구자에 따른 포자크기의 차이가 어떤 원인에서 비롯되었는지는 앞으로 검토해야 할 것으로 생각된다.

검은점무늬병균은 균주에 따라 병원성에 차이가 있음이 밝혀졌는데(井上와 芹澤, 1969) 본 시험에서도 18개 균주의 병원성을 검토한 결과 균주에 따라 차이가 있음을 확인할 수가 있어 금후 더 많은 균주를 확보하여 유전적 변이와 병원성 등에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단되었다.

요 약

제주도 감귤원에서 문제가 되고 있는 검은점무늬병의 발병원인을 구명하기 위하여 병원균의 분리동정과 병원성을 조사하였다. 감귤의 마른가지로부터 분리된 병원균은 불완전세대인 *Phomopsis citri*(완전세대 *Diaporthe citri*)로 확인되었다. 각 지역 감귤원에서 수집분리한 18개 균주의 분생포자각의 크기는 $112.2\sim 614.4 \mu\text{m}$ 범위로 평균 크기는 $328.8 \mu\text{m}$ 였으며 균주별로 크기가 다소 상이하였다. 병포자는 α 포자와 β 포자 2종류가 관찰되었으며 α 포자는 무색 단포로 타원형이었고, β 포자는 무색 단포로 사상형이며 활처럼 약간 구부러졌고 대개의 경우 한쪽 끝이 휘어 있었다. 크기는 α 포자가 평균 $6.7 \times 2.3 \mu\text{m}$ 였고, β 포자는 $22.1 \times 1.0 \mu\text{m}$ 였다.

균주별 병원성 검정결과 모든 균주에서 검은점무늬병의 발병이 확인되었으며 균주에 따라 병원성의 차이가 있었다.

참고문헌

- 安部卓爾. 1938. 温州みかんのスターメラノズについて. 日植病報 4: 84-85.
- Bach, W. J. and Wolf, F. A. 1928. The isolation of the fungus that causes citrus melanose and the pathological anatomy of the host. *Jour. Agr. Res.* 37: 243-253.
- 백운하, 허만호, 홍관우. 1974. 감귤 병해충 방제실태. 해성출판사 1-43.
- Fawcett, H. S. 1911. Stem-end rot of citrus fruits (*Phomopsis* sp.). *Florida Agr. Exp. Sta. Bull.* 107: 1-23.
- Fawcett, H. S. and Lea, H. A. 1926. *Citrus Disease and Their Control*. 1st ed. London, 583pp.
- Fawcett, H. S. 1936. *Diaporthe citri* (Faw) Wolf the perfect stage

- of a *Phomopsis citri* and *Phomopsis californica*(Abstr.). *Phytopathology* 22: 928.
- Floyd, B. F. 1911. Melanose and stem-end rot. *Florida Agr. Exp. Sta. Ann. Rept.* 73-81.
- Floyd, B. F. and Stevens, H. E. 1912. Melanose and stem-end rot. *Florida Agr. Exp. Sta. Bull.* 111: 1-16.
- 福岡正信. 1937. 柑橘樹脂病特にその完全時代について. 日植病報 7(1): 32-33.
- 井上一南, 芹澤拙夫. 1969. 칸킥스黑點病 に関する研究(第 6 報) 菌株による病原 性の差異. 静岡縣柑橘試驗場研究報告 (8): 71-79.
- 水澤芳次郎, 横木國臣. 1929. 柑橘樹脂病に関する研究(第 1報). 新奈川農試年報 56: 39.
- 농촌진흥청. 1995. 농사시험연구 조사기준. 374.
- Stevens, H. E. 1918. Melanose II. *Florida Agr. Exp. Sta. Bull.* 145: 105-116.
- Stevens, H. E. 1918. Florida citrus diseases. *Florida Agr. Exp. Sta. Bull.* 150: 1-110.
- 田中彰一, 中村俊一. 1950. 柑橘黑點病菌に関する研究. 園藝學會雜誌 19(3,4): 177-184.
- Wolf, F. A. 1926. The perfect stage of the fungus which causes melanose of citrus. *Jour. Agri. Res.* 33: 621-625.
- 山本省二. 1991. 칸킥스黑點病おそばかすの 生態防除に関する研究. 和歌山縣 果樹園藝試驗場 特別研究報告. 1-95pp.
- 大和浩國. 1968. 温州ミカン枯枝中に形成された칸킥스黑點病菌の完全時代について. 日植病報 34(5): 390.